

## 多功能农药降解基因工程菌株 m-CDS-1 环境释放安全评价

蒋建东, 李荣, 郭新强, 陈凯, 李顺鹏\*

(南京农业大学生命科学院, 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095)

**摘要:**【目的】为了评价多功能农药降解基因工程菌株 m-CDS-1 的环境释放中间试验水平的安全性。

【方法】通过农药检测、平板计数、Most probable number-PCR (MPN-PCR)和 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)等方法在江苏大丰进行了工程菌株 m-CDS-1 田间降解农药效果、定殖动态和对土壤微生物群落结构影响的研究。【结果】投加  $1.01 \times 10^7$  CFU/g 干土的工程菌株 m-CDS-1 在 30 d 时均能完全降解 10.71 mg/kg 的甲基对硫磷和 1.29 mg/kg 的呋喃丹。平板计数表明工程菌株 m-CDS-1 在土壤中快速下降; MPN-PCR 检测结果显示, 在 4 d, 15 d 和 30 d 时, 0~10 cm 混合土壤中该工程菌株的数目分别为  $2.15 \pm 0.98 \times 10^6$  CFU/g 干土,  $3.70 \pm 4.66 \times 10^4$  CFU/g 干土和检测不出。工程菌株 m-CDS-1 的投加不会对土壤可培养三大微生物菌群数量产生显著影响; 基于细菌 16S rDNA V3 区的 DGGE 分析结果表明, 施加农药对细菌菌落结构有显著影响, 4 d, 11 d, 30 d 时农药施用区与空白对照区的图谱相似性分别为 17.16%, 49.81%和 75.01%, 但到 60 d 时的相似性为 98.62%。工程菌株 m-CDS-1 释放在前期对细菌群落结构有一定影响, 4 d, 11 d 和 30 d 工程菌株释放区相对于空白的相似性分别为 49.57%, 38.30%和 83.30%。在 60 d 时, 空白、施药和施菌小区的图谱相似性都在 90% 以上。【结论】工程菌株 m-CDS-1 不仅可同时高效降解甲基对硫磷和呋喃丹, 仍保持了实验室内的原有特性, 而且不会成为优势菌群长期在土壤环境中存在, 也不会对土壤微生物群落结构造成长期影响。

**关键词:** 基因工程菌株 m-CDS-1; 环境释放; 安全评价; 农药降解; Most probable number-PCR (MPN-PCR); Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 11-1479-07

基因工程微生物 (Genetically engineered microorganisms, GEMs) 在污染环境修复中应用潜力巨大<sup>[1, 2]</sup>。由于 GEMs 具有的各种新特性、遗传物质的水平转移性 (Horizontal transfer) 而导致潜在的生态安全问题迫切需要研究, 然而这一领域的研究较少。微生物在环境中的定殖与种群建立直接关系到其功能的发挥, 监测接种到环境中的微生物是工程菌株环境释放安全评价的重要研究内容<sup>[3]</sup>。跟踪环境中的工程菌株有基于常规培养方法的活菌计数法 (CFU 法), 随着分子

生物学技术的发展, 不依赖于纯培养的微生物分析方法已得到广泛的发展和应<sup>[4]</sup>。Most probable number-PCR (MPN-PCR) 是通过极限稀释扩增靶标菌株特异序列来检测微生物的一种方法, 具有很好的灵敏度和可操作性<sup>[5]</sup>。基因工程菌株环境释放安全评价的另一重要内容是监测工程菌株释放对环境的潜在冲击, 主要指环境微生物群体结构的变化<sup>[6]</sup>。分子生物学方法的应用使我们能够在遗传水平上研究微生物的群落结构与多样性, 基于 16S rRNA 基因片段扩增

基金项目: 国家“863 计划” (2007AA10Z405); 国家自然科学基金 (30600016)

\*通讯作者。Tel/Fax: +86-25-84396314; E-mail: lsp@njau.edu.cn

作者简介: 蒋建东 (1978-), 男, 博士, 江苏丹阳人, 主要从环境微生物学研究。E-mail: jiang\_jjd@njau.edu.cn

收稿日期: 2008-05-05; 修回日期: 2008-07-14

的分子指纹图谱技术已经成功用于检测微生物群落结构的变化<sup>[7]</sup>。

本研究按照转基因微生物环境释放中间试验的要求,在江苏大丰韭菜地进行田间试验,研究构建的多功能农药降解基因工程菌株 m-CDS-1 在环境中降解甲基对硫磷和呋喃丹两种农药的效果、田间的生态学行为以及该工程菌株释放对土壤微生物群落的影响,评价其环境释放的安全性,为工程菌株的实际应用提供指导。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 材料:**多功能农药降解菌株 m-CDS-1 (*Sphingomonas* sp. CDS-mpd, Str<sup>R</sup>)<sup>[8]</sup>,能同时降解甲基对硫磷和呋喃丹农药,外源甲基对硫磷水解酶基因 *mpd* 整合在受体菌 *Sphingomonas* sp. CDS-1 的染色体上,该工程菌株已经获准进行环境释放中间实验(农基安办字 2003-T085)。菌剂由实验室摇瓶发酵而成,菌数为  $9.37 \pm 0.23 \times 10^{10}$  CFU/mL。

**1.1.2 培养基:**实验中用到牛肉膏蛋白胨培养基(培养普通细菌用)、改良高氏 1 号培养基(培养放线菌用)和马丁氏培养基(培养霉菌用)配方具体参见文献<sup>[9]</sup>。

**1.1.3 主要试剂和仪器:**50%甲基对硫磷乳油和 3%呋喃丹颗粒剂分别由镇江农药厂和太仓鲍利葛化工有限公司提供,其余试剂均为分析纯,购自创瑞公司。PCR 扩增引物由上海博亚生物技术公司合成。农药检测仪器为 Shimadzu GC-14B,氮磷检测器(FTP)。PCR 仪型号为 Bio-Rad Peltier Thermal Cycler-200。DGGE 仪器型号为 D-Code Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Laboratories, USA)。

### 1.2 试验条件和设计

试验地点在江苏省大丰市南阳镇乡村韭菜地,韭菜刚割过 2~3 d,长势均匀,面积约为 2 亩。试验田土壤质地均一,其基本理化性状为有机碳 10.3 g/kg 干土,全氮 6.4 g/kg 干土,速效磷 11.6 mg/kg 干土,速效钾 8.48 mg/kg 干土,含水量 18.03%。试验地生态环境为滩涂半湿地生态类型。地形环境为滩涂平原,地势平坦。试验共持续 2 个月,平均气温 18.2℃,总降水量 43.2 mm,平均日照时数 8.08 h。试验时实行一般生物隔离。

试验小区设置在试验地中央,设置施药对照区、

施菌处理区和空白区,3 次重复(用 、 和 表示),每小区宽 2 m,长 13.2 m,采用拉丁方排列。农药施用在土壤 0~10 cm 范围内,每小区均匀兑水喷施甲基对硫磷 80 mL;呋喃丹固体颗粒剂采用与细土混匀后垄间撒施,每小区施用 160 g。农药施用后 3 d,在每施菌处理小区均匀兑水喷施 400 mL 工程菌株 m-CDS-1 菌剂,0~10 cm 深度内土壤混匀,该工程菌株理论接种量约为  $1.01 \pm 0.02 \times 10^7$  CFU/g 土。

土壤取样采用 5 点混合取样法,分别取 0~10 cm 深和 10~20 cm 深土样混合后即混合土样;取带根际土壤的韭菜根于无菌水中振荡 30 min,将根捞出后即根际土样。

**1.3 土壤中 3 大菌群和工程菌株 m-CDS-1 的平板计数**  
土壤 3 大菌群采用平板活菌计数法<sup>[9]</sup>。工程菌株 m-CDS-1 的平板活菌计数为取一定土壤样品,梯度稀释后涂布含 100 mg/kg 链霉素和 100 mg/kg 甲基对硫磷的 1/3 LB 平板,培养 3 d 后计数能产生黄色水解圈(对硝基苯酚)的米黄色菌落。

### 1.4 土壤总 DNA 的提取

土壤总 DNA 提取采用间接法,参考 Esther M Gabor 的 Blending 方法<sup>[10]</sup>并作适当修正。均匀取 50 g 土壤样品,加入 50 mL 预冷的无菌水匀浆机匀浆(防止温度过高),然后补加 2×匀浆缓冲液,充分振荡混匀;600 ×g 室温离心 10 min,收集上清液转移至另一离心瓶中。沉淀再用 100 mL 1×匀浆缓冲液洗涤重悬,离心取上清液,与前次合并;所得上清液室温下高速(12000 ×g)离心 30 min 以回收菌体细胞;所得细胞依次用 150 mL 焦磷酸钠(1 g/L)和 100 mL 洗涤缓冲液洗涤,离心取沉淀;用 8 mL 土壤提取缓冲液重悬,加 160 μL 溶菌酶(50 mg/mL)和 20 μL 蛋白酶 K(20 mg/mL),37℃ 水浴 30 min;加 1 mL 200 g/L SDS,65℃ 水浴 2 h,其间每隔 15~20 min 轻轻颠倒混匀,室温 4000 ×g 离心 10 min,收集上清,用氯仿-异戊醇抽提,异丙醇沉淀,回收沉淀洗涤,吹干后溶于 500 μL 灭菌超纯水。

### 1.5 提取 DNA 的定量

以 λDNA (0.569 μg/μL) 作为标准,与提取的 DNA 同时电泳,经溴化乙锭染色后,用 GIS 凝胶分析软件进行分析定量。

### 1.6 土壤 DNA 的提取效率

取大丰韭菜地土样 121 份,湿热灭菌 1 h,至提取不出 DNA。将培养至对数期的工程菌株 m-CDS-1 离

心收集菌体,洗涤后悬浮于同等体积的无菌水中,取 1 mL 接种 50 g 灭菌土壤,摇床振荡吸附 0.5 h 后用间接法提取总 DNA。同时取 1 mL 纯菌提取总 DNA。DNA 提取效率% = 土壤提取量/纯菌提取量 × 100%。

### 1.7 MPN-PCR 法计数土壤中工程菌株 m-CDS-1<sup>[5]</sup>

**1.7.1 MPN-PCR 方法的灵敏度验证:**将 m-CDS-1 培养至对数期,用含有 100 μg/mL 的链霉素和甲基对硫磷的 1/3 LB 平板计数每毫升液体中菌数。10<sup>-2</sup> ~ 10<sup>-8</sup> 系列稀释,各稀释度分别取 1 mL 加入到 5 g 江苏大丰韭菜地土样中,摇床振摇 30 min,间接法提取土壤总 DNA,溶于 50 μL 水中,取 1 μL DNA 作为模板特异性扩增 *mpd* 基因,扩增引物为 F15 -ATGCTAGCTC-CGTCCAATCTCC-3 和 R1 5 -CAGCTAGCTATCAC-TTGGGGTTG-3,反应体系为:10 × Taq 聚合酶反应缓冲液 2.5 μL, dNTP(20 mmol/L) 2.5 μL, 5 和 3 端引物 (25 pmol/μL) 各 1 μL, Mg<sup>2+</sup> (25 mmol/L) 3 μL, Taq DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.5 μL, 体系为 25 μL。反应条件为:首轮循环 95 °C 2 min; 96 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1.5 min, 30 个循环;最后 72 °C 10 min。观察每个稀释度有无特异性条带扩增,验证 MPN-PCR 方法的检测灵敏限。

**1.7.2 小区土壤中靶标菌株的 MPN-PCR 方法检测:**按照上述方法提取施菌处理小区土壤总 DNA,无菌水 10 倍-10 倍稀释,分别作为模板按照上述方法扩增 *mpd* 基因,观察各个稀释梯度中是否有扩增条带,将次最高稀释倍数的模板作为 3 倍-3 倍稀释的起点 (3 个重复,稀释 6 次,共 18 个稀释物) 组成一个矩阵,直至不能扩增出目的条带,根据控制组中的检测灵敏限反推靶标组中的该基因工程菌株数目。

### 1.8 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) 实验

提取各小区土壤总 DNA,提取的 DNA 溶于 1 mL 水中,稀释 100 倍用于 PCR 扩增模板。细菌 16S rDNA V3 区扩增引物为 333F(GC)5 -CGCCCCGCCGCGC-CGGCGGGCGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTAC-GGGAGGCAGCAG-3 和 558R 5 -ATTACCGCGC-TGCTGG-3。所用凝胶的丙烯酰胺浓度为 10%,尿素梯度为 33 ~ 55%。待样品进入分离胶后 85 V 电泳 11.5 h。银染后拍照成像。用 Gelcompar 4.0 program (Applied Maths license version) 的软件包进行系统聚类分析,背景亮度和对比度进行自动调整,条带自动搜索后进行手工调整。通过条带间的 Pearson 相关性系数 (Pearson correlation index) 和 Unweighted

Pair-Group Method Using Arithmetic averages (UPGMA) 聚类分析构建系统聚类树。

## 2 结果和分析

### 2.1 工程菌株 m-CDS-1 对两种农药的降解效率

每小区甲基对硫磷和呋喃丹农药的理论含量分别为 10.71 和 1.29 mg/kg。使用农药后 3 d, 喷施 1.01 ± 0.02 × 10<sup>7</sup> CFU/g 土的工程菌株 m-CDS-1, 相比于对照区, 土壤中甲基对硫磷在 4 d、11 d 和 30 d 的降解率分别为 89.82%、97.79% 和 100%, 呋喃丹降解率分别为 21.92%、39.94% 和 100% (图 1), 表明该工程菌株降解两种农药的效果显著。

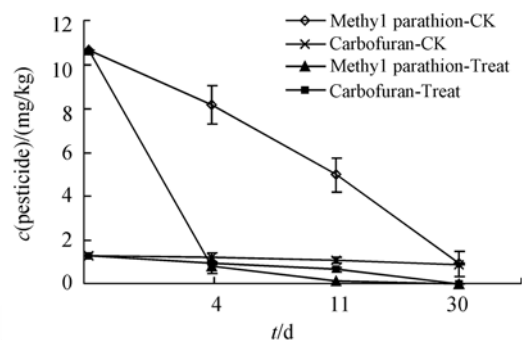


图 1 农药在土壤中的降解

Fig. 1 Dynamic trends of pesticide residues in the soil.

### 2.2 基因工程菌株 m-CDS-1 在田间的动态变化

平板活菌计数法检测表明工程菌株 m-CDS-1 数量快速下降, 4 d 时混合土壤 (0 ~ 10 cm) 中该工程菌株数量下降了 2 个数量级, 为 4.74 ± 0.62 × 10<sup>5</sup> CFU/g 土, 到 11 d 时已经检测不到该工程菌株的存在。韭菜根际的工程菌株 m-CDS-1 数量明显高于混合土壤, 11 d 时为 5.25 ± 2.03 × 10<sup>4</sup> CFU/g 土。混合土壤 (10 cm ~ 20 cm) 中均未检测到该工程菌株。我们构建的工程菌株为 *Sphingomonas*, 平板计数法存在很大的局限, 检测灵敏度小于 10<sup>4</sup> CFU/g 土, 所以, 我们进一步用 MPN-PCR 的方法来检测该工程菌株。

间接法提取土壤总 DNA, 电泳显示片段较大。总 DNA 的提取量为 1.8 ± 0.31 μg/g 干土, 提取效率为 20.8 ± 0.63%。由于间接法首先要将细胞从土壤颗粒中分离出来, 提取效率一般较低, 但由于 DNA 纯度较高, 腐殖酸等干扰物质较少, 有利于后续 PCR 操作, 综合比较后本实验中选用间接法提取土壤总 DNA。

通过人为向土壤中添加一定数量的工程菌株 m-CDS-1, 用 MPN-PCR 法检测发现灵敏度为

$1.09 \pm 0.11 \times 10^3$  CFU 靶标细菌/g 土, 即每 g 土壤中投加 1090 个靶标细菌就可检测到。分别在施菌后 4 d、11 d 和 30 d 取处理区土壤, 提取土壤总 DNA, 通过适当的 10 倍稀释后, 再 3 倍稀释, 用 MPN-PCR 法检测工程菌株数量, 直到正好能扩增出特异性的 1300 bp 的条带。根据 MPN-PCR 的检测灵敏度反推待测土壤中靶标 *mpd* 基因的拷贝数, 由于工程菌株 m-CDS-1 染色体上 *mpd* 基因的拷贝数为 1, 因此, 土壤 DNA 中 *mpd* 基因的拷贝数能反映土壤中工程菌株 m-CDS-1 的数目。

MPN-PCR 法计数工程菌株数目要比平板计数法高出 1~2 个数量级 (见图 2), 结果同样表明释放到环境中的工程菌株 m-CDS-1 呈快速下降趋势。混合土壤 (0~10 cm) 中该工程菌株在 11 d 时下降了 3 个数量级, 为  $3.70 \pm 4.66 \times 10^4$  CFU/g 土。混合土壤 (10~20 cm) 中该工程菌株数量下降最快, 在 4 d 和 11 d 时数量分别为  $3.06 \pm 0.19 \times 10^4$  CFU/g 土和  $7.65 \pm 3.79 \times 10^3$  CFU/g 土。韭菜根际的工程菌株 m-CDS-1 数量高于混合土壤, 表明韭菜根际更适合于该工程菌株的定殖。到 30 d 时所有土样中均未检测到工程菌株 m-CDS-1。

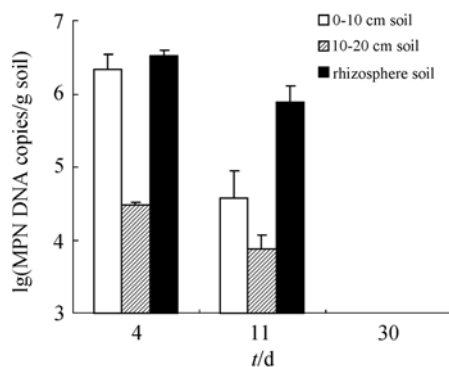


图 2 MPN-PCR 法计数土壤中工程菌株 m-CDS-1 数量  
Fig. 2 Detection of GEM m-CDS-1 cells by MPN-PCR method.

### 2.3 工程菌株 m-CDS-1 释放对土壤微生物群落结构的影响

采用平板计数法分析各小区土壤中可培养三大菌群数量, 结果表明不同时期细菌、真菌和放线菌数量分别处于  $10^8$  CFU/g 干土、 $10^5$  CFU/g 干土和  $10^4$  CFU/g 干土的水平, 都处于同一个数量级, 没有显著差异。

以试验各小区土壤提取的总 DNA 稀释后为模板, 用含 GC 夹子的 V3 区通用引物 333F 和 538R 扩增土壤细菌 16S rDNA 的 230 bp 的片段, 将扩增产物进行 DGGE 电泳。Gelcompar 4.0 program 软件聚类

分析, 构建系统聚类树, 发现重复小区间 ( 、 和 ) DGGE 图谱相似性很高 (见图 3), UPGMA 分析 Pearson 相关性系数后聚为一类, 相似性都在 90% 以上 (除 KB-11d 只有 76% 外), 说明 DGGE 指纹图谱分析方法具有较高的可重复性和可操作性。

DGGE 图谱分析结果表明, 空白区在 2 个月的试验期内图谱的相似性都很高, 4 d 到 60 d 的相似性在 79.7%~88.7% 之间, 说明细菌菌落结构和多样性没有发生太大的变化, 主要是由于在试验期内气象因素变化不大, 也没有进行任何耕作管理。

施药对照区与空白区在 4、11、30 和 60 d 的图谱相似性分别为 17.16%, 49.8%, 75.01% 和 98.62%, 表明施加农药对微生物的群落结构影响很大, 但随着农药浓度的降低, 微生物群落结构逐渐恢复, 到 60 d 时两者的相似性已经达到 98% 以上, 表明施加农药对微生物群落结构的影响具有时效性, 而且依赖于农药浓度。

工程菌株 m-CDS-1 的释放在前期对微生物的群落结构具有一定影响, 在工程菌株释放后 4 d, 相对于空白区图谱相似性为 49.57%, 而且条带减少 (图 3), 表明细菌多样性减少, 并且出现了一条特别浓的条带, 表明某种细菌成了优势菌群, 测序结果显示该条带对应的是 *Sphingomonas*, 表明工程菌株 m-CDS-1 在数量上占一定优势。11 d 和 30 d 相对于同时期的空白区相似性分别为 38.30% 和 83.30%, 对应于 *Sphingomonas* 的条带的浓度也在逐渐降低, 表明工程菌株的数量也在下降。在 60 d 时, 空白区、施药对照区和施菌处理区的图谱相似性都很高, 可聚为一类, 表明工程菌株 m-CDS-1 释放不会长期影响土壤微生物的群落结构。

### 3 讨论

微生物修复是解决农药面源污染的有效方法, 而构建多功能农药降解基因工程菌株则是消除多种农药污染的有力的手段。国内外科研工作者构建了大量具有应用价值的工程菌株, 但大多都限于实验室内研究, 只有少数能实际应用于生产过程, 主要原因便是涉及到工程菌株的环境释放安全性问题, 而国内外对工程菌株环境释放的安全评价体系研究相对较少, 已经成为工程菌株环境释放的一个瓶颈。本研究通过在江苏大丰韭菜地进行工程菌 m-CDS-1 环境释放评价中间试验, 表明该工程菌株不仅可同时高效降解甲

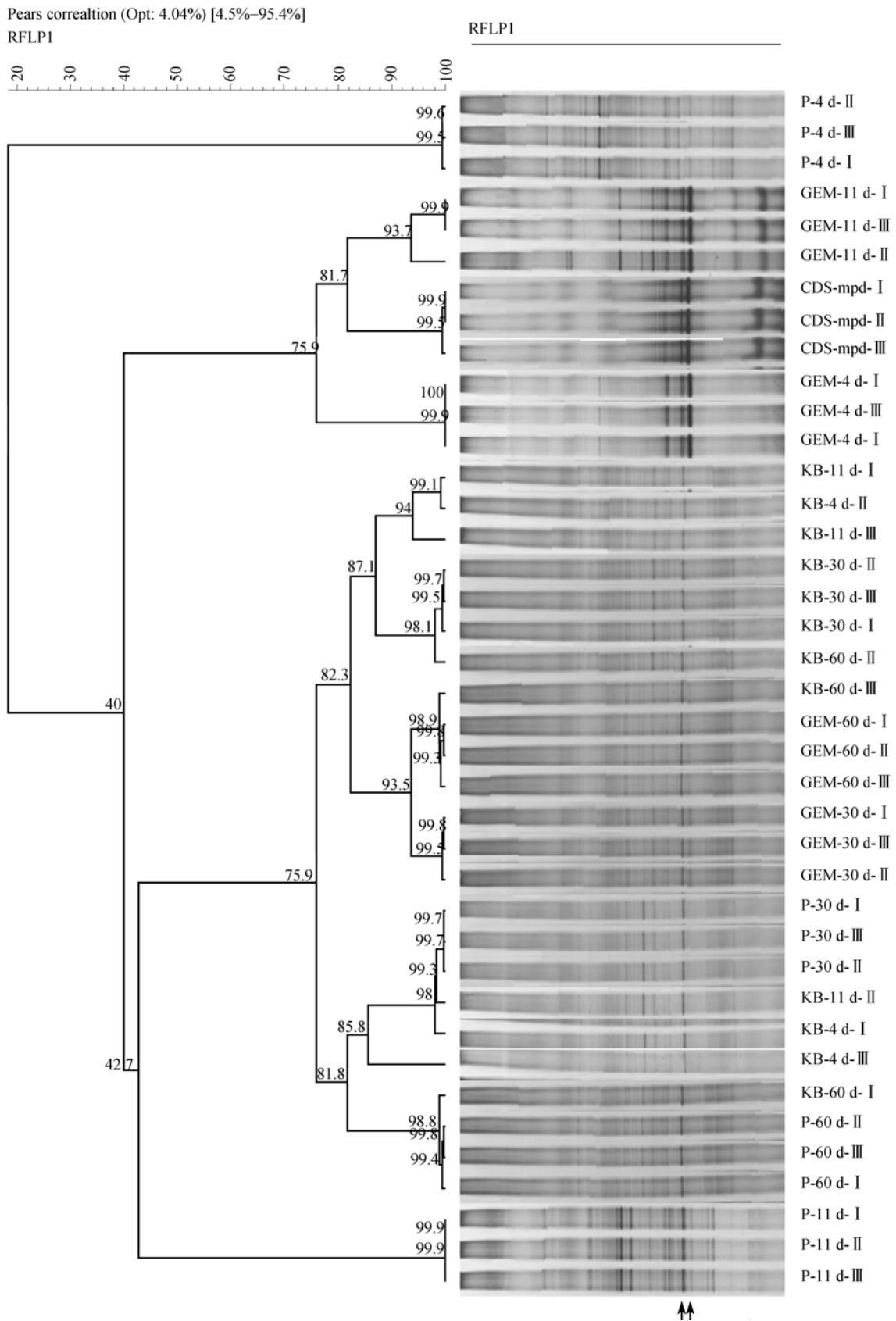


图 3 Pairwise similarity 系统聚类树

Fig. 3 Phylogenetic tree (Values in the Phylogenetic tree indicate the similarity). KB: Blank; P: Pesticides used; GEM: m-CDS-1 inoculated after the pesticides were used; CDS-mpd: Pure culture of m-CDS-1; 4 d, 11 d, 30 d and 60 d: the times soil samples were taken; , , : Replicate , and . m-CDS-1 is indicated by arrows.

基对硫磷和呋喃丹,仍保持了实验室内的原有特性,而且不会成为优势菌群长期在土壤环境中存在,也不会对土壤微生物群落结构造成长期影响,显示了该工程菌株具有良好的安全性和应用前景。

许多研究表明转基因微生物释放到环境后菌数总体呈下降趋势,主要是因为外源发酵性微生物无法和土著微生物进行竞争,但也有接种的工程菌株由于利用降解底物而在初期增殖的研究报道<sup>[11]</sup>。一般情况下,工程菌株初始浓度越高,其数量下降的速度一般越慢,本实验中使用较大剂量的工程菌株 m-CDS-1 (浓度为  $1.01 \pm 0.02 \times 10^7$  CFU/g 土),结果表明该工程菌株在环境中数量是逐渐下降的,对微生物的群落结构的影响也是短暂的,那么低浓度的工程菌株的环境释放肯定也是安全的。我们的工程菌株属于鞘胺醇单胞菌,生存竞争能力弱,在土壤中数量呈直线下降,不会成为优势菌群长期存在于土壤中。两种检测方法都表明韭菜根际的工程菌株 m-CDS-1 数量高于混合土壤,主要是由于韭菜根会分泌一些糖类、氨基酸等物质,这些物质可能会刺激微生物的生长或为微生物提供良好的生存环境,延迟了衰亡时间。试验期间有 43.2 mm 的降水,工程菌株可能会随着雨水的渗透作用向下层转移,但由于工程菌株总体消亡的趋势和深层土壤中生存条件的限制,下层土壤(10~20 cm)中工程菌株数量普遍较低,在 30 d 时均检测不到其存在。

基因工程菌株释放对环境的潜在影响主要包括某些菌种的替代或增殖、微生物群落结构和功能的改变导致的生态系统紊乱等。如果引入的转基因微生物有很高的生存能力,就容易造成土著微生物种群的替代,由此可能产生复杂的生态效应<sup>[12,13]</sup>。从本研究的结果看,由于误差和灵敏度等原因,平板计数法观察不到微生物群落结构的细微变化。通过扩增土壤细菌 16S rDNA V3 区的 DGGE 分析,研究工程菌株释放对微生物群落结构的影响,显示了比平板计数法具有更高的灵敏性和可操作性。工程菌株 m-CDS-1 释放区 60d 的 DGGE 图谱几乎与空白和施药对照小区聚为一类,表明细菌菌落结构已经恢复到自然状态,证明该工程菌株的释放不会长期改变土著细菌的群落结构,工程菌株的环境释放是安全的。微生物群落结构的改变影响因素很多,有接种的微生物、接种微生物降解农药造成农药浓度的变化,甚至植物的生长或是气候的变化等,因此,微生物群落结构的变化异常复杂,有些效应可能是滞后的,但本研究中工程菌株释

放对土壤微生物群落结构的影响总的趋势是逐渐消退的,到目前为止还没有转基因微生物释放对生态系统产生明显的负作用的报道。

## 参 考 文 献

- [1] Akkermans ADL. Application of bacteria in soils: problems and pitfalls. *FEMS Microbiol Rev*, 1994, 15: 185-194.
- [2] Wilson M, Lindow SE. Release of recombinant microorganisms. *Annu Rev Microbiol*, 1993, 47: 913-944.
- [3] Gebhard F, Smalla K. Monitoring field releases of genetically modified sugar beets for persistence of transgenic plant DNA and horizontal gene transfer. *FEMS Microbiol Ecol*, 1999, 28: 261-272.
- [4] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 1995, 59: 225-229.
- [5] Line F, Flemming E, Carsten SJ, *et al.* Development and application of a Most-Probable-Number-PCR assay to quantify flagellate populations in soil samples. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(4): 1613-1618.
- [6] De Leij F, Sutton EJ, Whipps JM, *et al.* Impact of field release of genetically modified *Pseudomonas fluorescens* on indigenous microbial populations of wheat. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61: 3443-3453.
- [7] Juck D, Charles T, Whyte LG, *et al.* Polyphasic microbial community analysis of petroleum hydrocarbon-contaminated soils from two northern Canadian communities. *FEMS Microbiol Ecol*, 2000, 33: 241-249.
- [8] 蒋建东, 顾立锋, 孙纪全, 等. 同源重组法构建多功能农药降解基因工程菌研究. *生物工程学报(Chinese Journal of Biotechnology)*, 2005, 21(6): 884-891.
- [9] 范秀容, 李广武, 沈萍. *微生物学实验*. 第二版. 北京: 高等教育出版社, 1989
- [10] Gabor EM, Vries EJ, Janssen DB. Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction methods. *FEMS Microbiol Ecol*, 2003, 44 (2): 153-163.
- [11] Newton CMG, Irina AK, Wolf-Rainer A, *et al.* Effects of the inoculant strain *Pseudomonas putida* KT2442 (pNF142) and of naphthalene contamination on the soil bacterial community. *FEMS Microbiol Ecol*, 2005, 54: 21-33.
- [12] Muyzer G, Ellen CW, Andre GU. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59: 695-700.
- [13] Lottmann J, Heuer H, Vries J, *et al.* Establishment of introduced antagonistic bacteria in the rhizosphere of transgenic potatoes and their effect on the bacterial community. *FEMS Microbiol Ecol*, 2000, 33: 41-49.

## Risk Assessment for Environmental Release of Genetically Engineered Microorganism m-CDS-1

Jiandong Jiang, Rong Li, Xinqiang Guo, Kai Chen, Shunpeng Li \*

(College of Life Sciences, Key Laboratory for Microbiological Engineering of Agricultural Environment of Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** [Objective] To assess the environmental release risk of genetically engineered microorganism *Sphingomonas* sp. m-CDS-1. [Methods] Pesticides detection, plates counting, most probable number-PCR (MPN-PCR) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) were used to study the pesticides degrading effects, the decline dynamics of m-CDS-1, and the effects of release of m-CDS-1 on community structure of soil microorganisms. [Results] m-CDS-1 ( $1.01 \times 10^7$  CFU/g dry soil) could degrade both 10.71 mg/kg methyl parathion and 1.29 mg/kg carbofuran in 30 days. m-CDS-1 declined quickly with time, and could not be detected anymore in 30 days. Release of m-CDS-1 would not change the number of the cultivable microorganisms notably. The similarities of PCR-DGGE profiles between the pesticides applied treatments and the controls in 4, 11 and 30 days were 17.16 %, 49.81 % and 75.01 %, and the similarities between the m-CDS-1 released treatments and controls were 49.57 %, 38.3 % and 83.3 %, respectively. In 60 days, DGGE profiles of all treatments and controls had high similarities. [Conclusion] m-CDS-1 could degrade both pesticides remarkably in the field, and would not be the predominant population, and would not affect the community structure of soil microorganisms in the long term.

**Keywords:** genetically engineered microorganism m-CDS-1; environmental release; risk assessment; pesticides degradation; most probable number-PCR (MPN-PCR); denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

Supported by the National Science Foundation of China(60578025, 30540420311)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-20-85223569; E-mail: jycai@jnu.edu.cn

Received: 26 April 2008/ Revised: 4 June 2008

### 《微生物学报》答作者问——关于审稿

问：我想知道我的稿件的处理状态，如何查询？

答：您可以登录网上查稿区，输入您的用户名、密码，即可查询到审稿状态；如果不是太明白远程中获取的信息，您可以通过 e-mail 询问，请注意务必要提示稿件编号，编辑部会在收到您的来信的当天或者次日及时给予回复。

问：我想尽早得到审稿结果，或者提前发表，有没有好的办法能使审稿老师快点。比如我们增加审稿费等方法？

答：如上述所言，我们已经告知了本刊处理稿件的程序和大致时间进度。

- (1) 在作者向我刊投稿之前，应详细了解我刊的规定。审稿人评审一篇文章，并给出谨慎的评审意见是需要一定时间的。所以，作者在投稿之前应该留出足够多的时间给编辑部，以便于进行评审。我们的承诺是在 2 个月之内给予答复，5~7 个月之内刊出。
- (2) 如要求提前发表，请在投稿的同时提出书面报告，说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性，经过我刊编委会讨论并通过后，可予提前刊出，无需另加任何费用。

问：我的文章现已审查完毕，并收到了编辑部发来的“审稿意见”。我想咨询，如果文章修改后，再次投递，是否还需要交稿件受理费？是否仍然用原论文编号提交？

答：这要分两种情况，

- (1) 如果你的文章已经被通知“退稿”了，那么修改之后再投来的文章将按“新稿件”处理。从程序上来讲和新投稿件是一样的，仍需要缴纳稿件受理费。但是为便于稿件审理，请作者在投稿时在文题的后面加上“原稿件号+修后再投”字样。
- (2) 如果是编辑部在审稿意见中要求您修改后再经本刊“复审”，则不作为新稿处理，请作者直接将修改稿上传到远程系统中，不再另交稿件受理费。