

# 一株除草剂氰氟草酯降解菌的分离鉴定与降解特性\*

聂志娟<sup>1</sup> 顾谢军<sup>3</sup> 蔡舒<sup>1</sup> 谢香婷<sup>1</sup> 何健<sup>1</sup> 郑金伟<sup>2\*\*</sup> 李顺鹏<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>南京农业大学生命科学学院, 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室 南京 210095)

(<sup>2</sup>南京农业大学资源与环境科学学院 南京 210095)

(<sup>3</sup>金坛市环境监测站 金坛 213200)

**摘要** 氰氟草酯 (Cyhalofop-butyl) 是一种芳氧苯氧羧酸酯类除草剂, 其迁移、转化和分解等行为对环境及人类健康具有潜在危害. 为了解其微生物代谢机制, 从长期使用氰氟草酯的稻田土壤中分离到1株氰氟草酯降解菌株, 命名为QDZ-B. 菌株QDZ-B的16S rDNA基因序列长度为1 400 bp, 在RDP数据库比对结果表明其与寡养单胞菌属菌株的同源性最近, 与模式菌株嗜麦寡养单胞菌 *Stenotrophomonas maltophilia* (AB008509) 的同源性为99.8%. 根据表型特征、生理生化特性和16S rDNA序列同源性分析, 将菌株QDZ-B鉴定为寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas* sp.). 接种量为5%时, 菌株QDZ-B在基础盐液体培养基中5 d对100 mg L<sup>-1</sup>氰氟草酯的降解率约为88.2%. 菌株QDZ-B的降解效果与接种量成正相关, 但接种量大于5%时, 降解效率趋于平稳. 菌株QDZ-B降解氰氟草酯的最适温度为30 ℃, 最适pH为7.0. 通过质谱分析鉴定了3个菌株QDZ-B降解氰氟草酯的代谢产物, 分别为氰氟草酸、氰氟草酰胺和2-氟-3-对-乙氧基苯氧基苯酰胺. 图11 参21

**关键词** 氰氟草酯; 除草剂; 微生物降解; 寡养单胞菌属; 降解产物

CLC X172

## Isolation of a Cyhalofop-butyl-degrading Bacterium and Its Degradation Characteristics\*

NIE Zhijuan<sup>1</sup>, GU Xiejun<sup>3</sup>, CAI Shu<sup>1</sup>, XIE Xiangting<sup>1</sup>, HE Jian<sup>1</sup>, ZHENG Jinwei<sup>2\*\*</sup> & LI Shunpeng<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>College of Life Sciences, Nanjing Agriculture University; Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Nanjing 210095, China)

(<sup>2</sup>College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China)

(<sup>3</sup>Environmental Monitoring Station of Jintan, Jintan 213200, Jiangsu, China)

**Abstract** Cyhalofop-butyl (CyB) is a widely used aryloxyphenoxy propanoate (AOPP) herbicide for weed control in rice fields. Although herbicides are typically applied to the crop and weed canopy, substantial quantities of the active ingredient penetrate to the soil surface. Therefore, great concerns have been raised about the occurrence and fate of the herbicides in the environment. A cyhalofop-butyl-degrading bacterium strain, QDZ-B, was isolated from rice field soil that had been treated with cyhalofop-butyl for many years, and its 16S rRNA gene sequence (1 400 bp) was determined. The result of sequence analysis of the 16S rDNA gene revealed that strain QDZ-B displayed a high sequence similarity with *Stenotrophomonas maltophilia* (99.8%). According to its morphological, physiological and biochemical properties and the homology analysis of 16S rDNA sequence, strain QDZ-B was identified as *Stenotrophomonas* sp. The degradation rate was about 88.2% when the strain with an inoculum size of 5% (V/V) was incubated at the concentration of 100 mg/L cyhalofop-butyl for 5 d. And large initial inoculum size could promote the degradation in the range of 5%. The optimal pH and temperature for cyhalofop-butyl degradation were 7.0 and 30 ℃, respectively. Three metabolites of cyhalofop-butyl degradation by strain QDZ-B were identified as cyhalofop acid, cyhalofop amide and 2-fluoro-(3-p-ethoxy-phenoxy) benzamide by HPLC/MS analysis. Fig 11, Ref 21

**Keywords** cyhalofop-butyl; herbicide; biodegradation; *Stenotrophomonas* sp.; metabolite product

CLC X172

氰氟草酯 (Cyhalofop-butyl) 是一种芳氧苯氧羧酸酯类除草剂, 由美国陶氏公司 (Dow Elanw Co. Ltd) 于1987年首先开发, 化学名称为(R)-2-[4(4-氟基-2-氟苯氧基)苯氧基]-丙酸丁酯, 分子式为C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>FNO<sub>4</sub><sup>[2]</sup>. 氰氟草酯在极低剂量即对杂草

呈现很高活性和选择性, 尤其对稗草、千金子、看麦娘、小糠草等有显著的效果, 具有较好的发展前景, 在我国的应用日益广泛. 随着该类除草剂的长期大量使用, 其在环境中的迁移、转化和分解等环境行为正日益受到关注.

大量研究表明, 进入到土壤、水体和沉积物中的芳氧苯氧羧酸酯类除草剂可以通过光解、化学水解和微生物代谢而快速降解, 而微生物代谢在其中起到主要作用<sup>[4~6]</sup>. 到目前, 已分离筛选到很多能够降解芳氧苯氧羧酸酯类除草剂的微生物菌种, 并研究了其对该类除草剂的降解特性和降解代谢途径<sup>[2~3]</sup>. 如Smith-Greenier和Adkins (1994) 获得6株

收稿日期: 2011-03-04 接受日期: 2011-04-02

\*国家自然科学基金项目 (No. 30970099) 和农业部技术成果转化基金项目 (No. 2009GB23600516) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30970099) and the Technical Achievement Transformation Fund of Ministry of Agriculture of China (No. 2009GB23600516)

\*\*通讯作者 Corresponding author (E-mail: zhengjw@njau.edu.cn)

能降解禾草灵 (Diclofop-methyl) 的微生物菌株, 其中两株细菌 *Chryseomonas luteola* 和 *Sphingomonas paucimobilis* 能够把禾草灵降解为禾草灵酸, 并进而降解为4-(2,4-二氯苯氧基) 苯酚<sup>[2]</sup>. Jackson R和Douglas M (1991) 等人的研究结果表明在土壤和水体中氰氟草酯首先是通过酯键断裂降解为氰氟草酸 (Cyhalofop acid), 氰氟草酸进而连续氧化为氰氟草酰胺 (Cyhalofop amide) 和氰氟草二酸 (Cyhalofop diacid)<sup>[4-6]</sup>, 在土壤中氰氟草酯降解的第一步是化学水解和微生物代谢共同作用的结果, 而产物氰氟草酸随后的降解主要是微生物代谢作用的结果. 在表层土壤中, 光解作用也是氰氟草酯降解的重要因素<sup>[18]</sup>. 但是到目前为止, 国内外还没有获得纯的能降解氰氟草酯的微生物菌株; 因而, 在氰氟草酯微生物降解生态和生理机制方面的研究 (如土壤中到底是哪一类微生物具有氰氟草酯降解功能, 微生物对氰氟草酯的降解代谢中间产物和代谢途径, 等等) 还没有深入开展.

我们从长期使用氰氟草酯的稻田土壤中分离到1株能快速降解氰氟草酯菌株, 命名为QDZ-B, 鉴定为 *Stenotrophomonas* sp. 细菌, 并对该菌对氰氟草酯的降解条件和降解代谢途径进行了初步研究, 以期阐明环境中氰氟草酯微生物降解代谢机制提供材料和理论依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

氰氟草酯原药购自江苏扬州某农药厂 (纯度为99%), 按所需浓度添加到培养基中. 丙酮 (色谱纯) 购自西格玛奥德里奇公司, 分子生物学试剂购于Takara公司. 其它化学试剂为分析纯, 购自上海化学试剂有限公司.

LB培养基的成分和配制参考文献[9]进行. 基础盐培养基 (MM) 的成分和配制参考文献[10]进行. 固体培养基加入1.5%的琼脂粉. 固体培养基加入1.5%的琼脂粉. 富集选择培养基: 在100 mL基础培养基中加入一定量的氰氟草酯原药作为唯一碳源进行选择培养. 富集基质采用江苏南京某村庄长期使用氰氟草酯的稻田土壤.

### 1.2 降解菌株的筛选

取3 g生化污泥于100 mL、50 mg/L 氰氟草酯基础盐培养基中, 震荡摇匀, 30 ℃、180 r/min摇床培养, 每隔7 d以5%接种量转接至新的含氰氟草酯的基础盐培养基中, 按同样的培养富集方式转接5代, 氰氟草酯的浓度逐渐提高到100 mg/L. 富集培养液经紫外检测有降解效果后, 对富集液进行稀释, 并分别在含100 mg/L的氰氟草酯基础盐固体培养基平板上接入0.10 mL稀释富集液涂布, 30 ℃烘箱培养. 待平板上出现菌落后, 挑取有透明圈的菌落划线3次进行纯化, 纯化后取单菌于LB培养基中扩大培养, 转接至含氰氟草酯100 mg/L的基础盐液体中, 30 ℃、180 r/min 摇床培养, 验证纯菌的降解效果.

### 1.3 降解菌株的鉴定

对分离到的菌株进行菌株形态及生理生化特性检测, 菌株形态及生理生化特性测定参照文献[7]进行. 菌株QDZ-B的总DNA的提取方法是采用高盐法<sup>[7]</sup>, 并以总DNA作为模板, 进行16S rDNA基因的扩增. 扩增反应的引物为一对16S通

用引物, 正向引物: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 反向引物: 5'-TACCTGTACGACTT-3'. 50 μL体系为: 10×Taq缓冲液5 μL, dNTP (25 mmol/L) 4 μL, Mg<sup>2+</sup> (25 mmol/L) 4 μL, 模板2 μL, 正反引物 (1 mmol/L) 各1 μL, Taq酶 (5 U/μL) 0.5 μL, 超纯水32.5 μL. 聚合酶链式反应条件: 95 ℃预变性5 min; 94 ℃变性0.5 min, 56 ℃退火0.5 min, 72 ℃延伸1.5 min, 循环30次; 72 ℃延伸20 min. 取2 μLPCR产物进行琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, 条带清晰明亮则采用PCR回收试剂盒 (AXYGEN公司) 回收16S rDNA的基因片段, TA克隆后进行测序 (由南京金斯瑞生物科技有限公司完成). 将测序结果在NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) 和RDP数据库 (https://rdp.cme.msu.edu/) 与相关的16S rDNA序列进行同源性比对分析. 采用Mega3.0等软件对菌株进行系统发育分析.

### 1.4 接种菌液的制备

在LB培养基中接种菌株QDZ-B, 30 ℃、180 r/min振荡培养至对数期 ( $D_{600nm} = 0.8$ ), 6 000 r/min、3 min离心收集菌体, 菌体PBS缓冲液洗涤2次, 再以等体积灭菌基础盐培养基重悬到菌体浓度约  $1.0 \times 10^8$  cfu mL<sup>-1</sup>. 培养液中菌体浓度以平板菌落计数法 (CFU) 测定.

### 1.5 氰氟草酯及其降解产物的提取与检测

全量提取培养液20 mL, 加入10 mL二氯乙烷, 放入摇床 (180 r/min) 震荡15 min, 静置分层, 取下层有机相经无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>脱水. 用移液管准确吸取1 mL放入干净的1.5 mL离心管中, 通风橱中吹干, 再用1 mL甲醇定容. 采用高效液相色谱法 (HPLC) 测定氰氟草酯的含量. HPLC测定条件如下: 高效液相色谱仪 (Waters600); 色谱柱Agilent TC-C18柱, 4.6mm × 250 mm (i.d), 5 μm; 流动相为甲醇 (100%色谱纯), 柱温40 ℃. 检测波长248 nm, 流速1.0 mL/min, 进样量20 μL. 利用质谱检测代谢产物, 质谱型号为安捷伦G64100, 离子化方式ESI (+), 裂解电压135 V, 干燥气温度为350 ℃.

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌株的分离及鉴定

经过富集分离纯化, 从长期施用氰氟草酯的农田土壤中分离获得1株氰氟草酯降解菌, 命名为QDZ-B, 该菌能在含氰氟草酯100 mg/L的基础盐液体培养基中降解氰氟草酯, 降解率约为88% (图1). 同时, 菌株QDZ-B可在含氰氟草酯的LB平板上因将水溶性低的氰氟草酯降解为水溶性高的降解产物而形成透明圈 (图2). 菌株QDZ-B在LB固体培养基上生长1 d后, 菌落表面光滑, 有光泽, 边缘整齐, 隆起, 呈淡黄色, 经过负染, 在透射电子显微镜 (日立H-7650) 下该菌呈杆状, 多根端生鞭毛 (图3) 无荚膜, 不形成芽孢. 革兰氏反应、甲基红试验、产吡嗪试验为阴性, 接触酶、氧化酶和过氧化氢试验为阳性. 菌株QDZ-B的形态和生理生化特征与Bergey's Manual of Systematic Bacteriology上对寡养食单胞菌属的描述<sup>[1]</sup>是一致的.

### 2.2 菌株16S rDNA测定及同源性分析

以菌株QDZ-B的基因组DNA为模板, 用细菌16S rDNA通用引物进行PCR扩增, 得到长度为1 400 bp的16S rDNA基因序列 (GenBank上登录号为HQ890469). 在RDP数据库 (https://

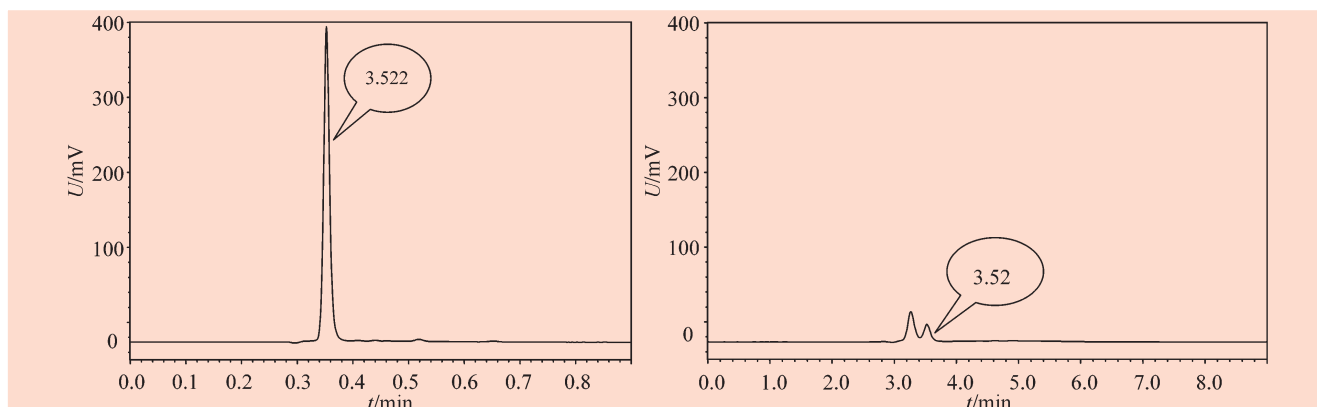


图1 菌株QDZ-B降解氰氟草酯的HPLC分析

Fig. 1 HPLC analysis of biodegradation of cyhalofop-butyl by strain QDZ-B

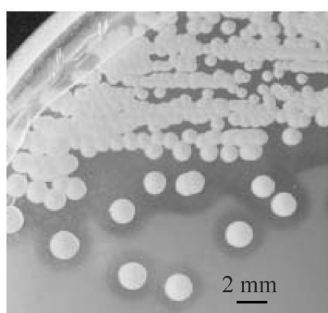


图2 菌株QDZ-B在含氰氟草酯的LB平板上的形态

Fig. 2 Colony morphology of strain QDZ-B on LB agar plate added with cyhalofop-butyl

rdp.cme.msu.edu/) 中进行Blast, 结果表明菌株QDZ-B与寡养单胞菌属菌株的同源性最近, 与模式菌株嗜麦寡养单胞菌 *Stenotrophomonas maltophilia* (AB008509) 的同源性为99.8%。结合形态和生理生化特征, 将菌株QDZ-B初步鉴定为 *Stenotrophomonas* sp. 属。

寡养单胞菌是一种土著微生物, 专性需氧菌, 营养要求不高, 在自然界广泛分布, 在水、土壤、植物根系及食物(冷冻鱼类、牛奶、禽蛋等)等都有该菌的存在。大量的研究表明寡养单胞菌属菌株对很多有毒化合物具有很强的降解作用, 可降解苯、甲苯、乙苯、苯胺, 对农药硫丹、噻吩磺隆、阿维

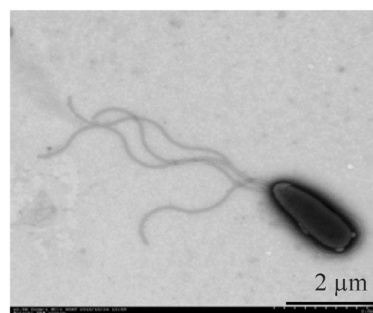


图3 菌株QDZ-B的透射电镜照片

Fig. 3 TEM photograph of strain QDZ-B

菌素、杀螟硫磷、辛硫磷、倍硫磷、三唑磷、乙酰甲胺磷、毒死蜱、苯噻草胺、微囊藻毒素等<sup>[11-21]</sup>。本研究分离筛选的菌株QDZ-B为首次报道的寡养单胞菌属芳氧苯氧羧酸酯类除草剂降解菌。

### 2.3 菌株QDZ-B以氰氟草酯为碳源的生长及降解试验

在基础盐培养基中加入终浓度为100 mg/L的氰氟草酯, 1%的接种量接入QDZ-B菌液, 设接种灭活的QDZ-B为对照。每隔1 d定时取样检测菌株的生长情况和氰氟草酯的降解情况, 结果见图5。菌株QDZ-B在6 d内对氰氟草酯的降解率达到88.2%。同时, 在氰氟草酯的降解过程中, 培养液的菌体量也随着氰氟草酯的降解而增加, 6 d内菌体量从接种时1.1 ×

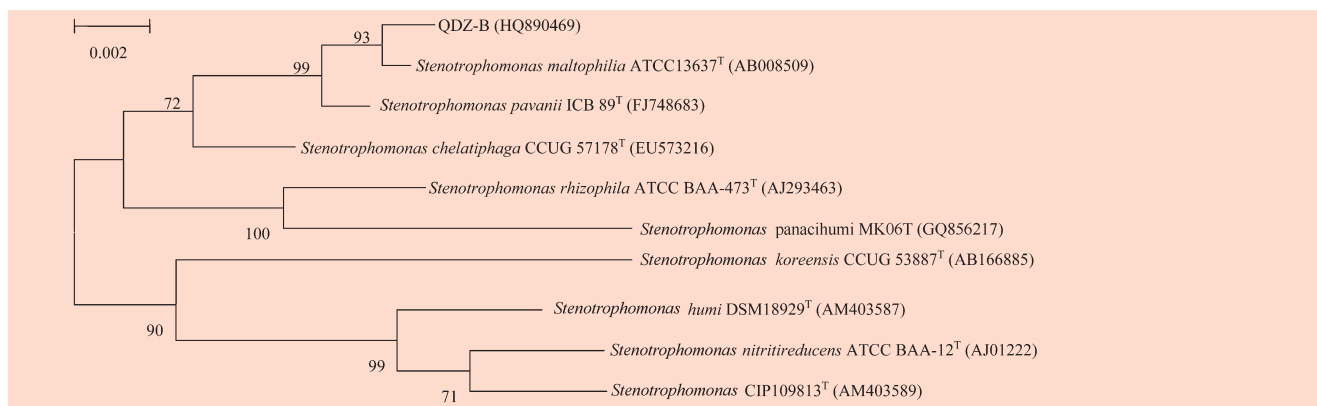


图4 菌株QDZ-B和相关菌株的16S rRNA基因序列构建的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree constructed by the neighbor-joining analysis based on 16S rRNA gene sequences of strain QDZ-B and related species  
分支点的数值为基于1 000个采样数据的百分数。比例尺为每个核苷酸的位置由0.002核苷酸替换  
Numbers at branching points are percentage bootstrap values based on 1 000 resampled datasets. Bar, 0.002 nucleotide substitutions per nucleotide position

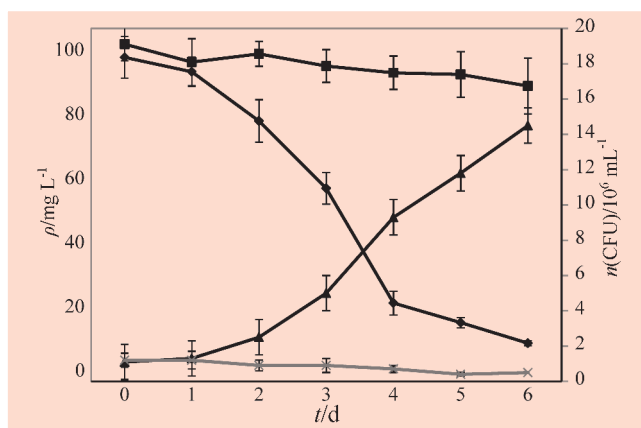


图5 菌株QDZ-B以氰氟草酯为唯一碳源生长及对氰氟草酯的降解情况 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $N = 3$ )

Fig. 5 Growth of QDZ-B with cyhalofop-butyl as sole carbon source and degradation of cyhalofop-butyl by QDZ-B ( $\bar{x} \pm s$ ,  $N = 3$ )

■: 对照; ◆: 添加氰氟草酯; ▲: MSM 培养基中添加氰氟草酯的QDZ-B菌体细胞密度; ×: MSM 培养基中未添加氰氟草酯的QDZ-B菌体细胞密度 (■) and (◆) indicate control and cyhalofop-butyl inoculated, respectively; (▲) and (×) indicate cell density of strain QDZ-B with and without addition of cyhalofop-butyl in MSM medium, respectively

10<sup>6</sup> cfu/mL增加到约1.5 × 10<sup>7</sup> cfu/mL; 表明菌株QDZ-B在降解氰氟草酯的同时, 能够利用氰氟草酯作为碳源生长。

## 2.4 温度对菌株QDZ-B降解氰氟草酯的影响

在基础盐培养基中添加氰氟草酯浓度至100 mg/L, 1%接种量接入QDZ-B菌液, 设接种灭活的QDZ-B为对照, 分别在20、25、30、35、40 °C和150 r/min摇床培养5 d后取样测定氰氟草酯含量。结果(图6)显示, 温度对QDZ-B降解氰氟草酯的影响较大, 菌株QDZ-B在较低和较高的温度下对氰氟草酯的降解率在50%以下; 在25~35 °C时降解效果较好, 降解率能达到80%以上; 降解的最适温度为30°C。

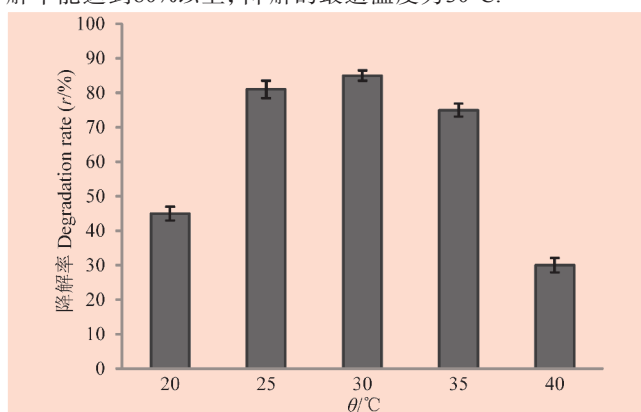


图6 温度对QDZ-B降解氰氟草酯的影响

Fig. 6 Effect of temperature on degradation efficiencies of cyhalofop-butyl by strain QDZ-B

## 2.5 pH对菌株QDZ-B降解氰氟草酯的影响

在不同pH的基础盐培养基中添加氰氟草酯浓度至100 mg/L, 1%接种量接入菌株QDZ-B菌液, 设接种灭活的QDZ-B为对照, 30 °C、150 r/min培养5 d后取样测定培养液中氰氟草酯浓度。结果(图7)显示, 氰氟草酯的降解在pH 4.0时最差; pH 7~7.5之间较好, 降解率都达到80%以上; 降解的最适pH为7.0。

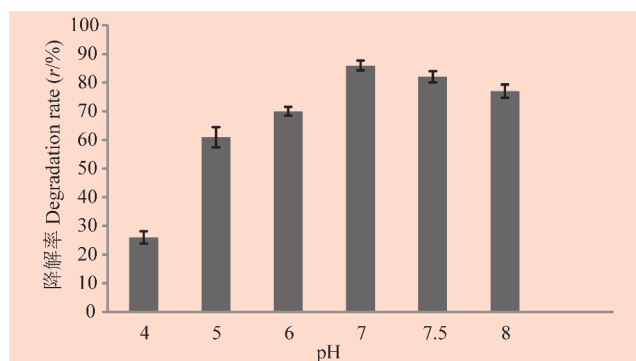


图7 pH对QDZ-B降解氰氟草酯的影响

Fig. 7 Effect of pH on degradation of cyhalofop-butyl by strain QDZ-B

## 2.6 接种量对菌株QDZ-B降解氰氟草酯的影响

在基础盐培养基中添加氰氟草酯浓度至100 mg/L, 以0%、1%、3%、5%、7%的接种量接入QDZ-B菌液, 设相应接种灭活的QDZ-B为对照, 30 °C、150 r/min摇床培养5 d后取样测定氰氟草酯含量。结果(图8)显示, 当接种量小于5%时, 氰氟草酯的降解效率受到QDZ-B接种量的显著影响, 接种量越大降解效果越好; 但接种量大于5%时, 降解效率趋于平稳, 最终降解率不会随接种量的增加而显著增大。

## 2.7 氰氟草酯起始浓度对菌株QDZ-B降解氰氟草酯的影响

在基础盐培养基中添加不等量的氰氟草酯, 使其终浓度为25、50、100、150、200、300 mg/L, 以1%接种量接入菌株

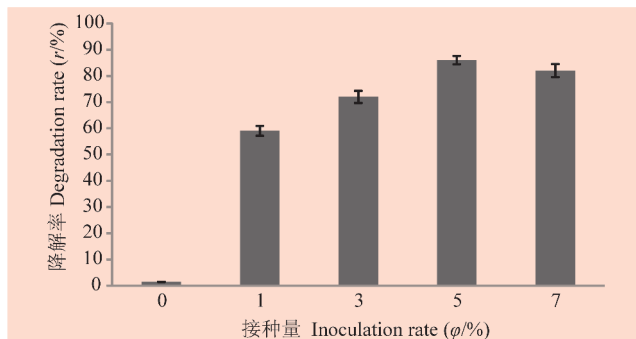


图8 初始接种量对QDZ-B降解氰氟草酯的影响

Fig. 8 Effect of initial inoculum amount on degradation efficiencies of cyhalofop-butyl by strain QDZ-B

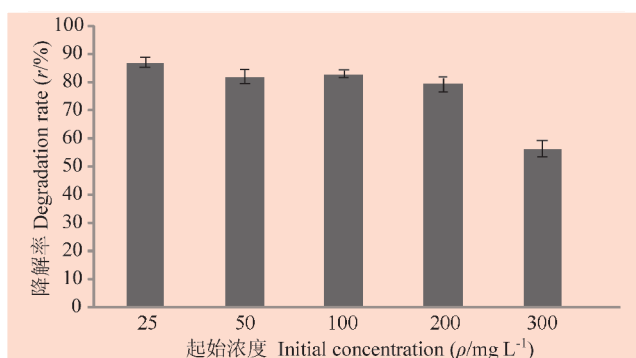


图9 QDZ-B降解不同起始浓度氰氟草酯的效果

Fig. 9 Effect of initial concentration on degradation efficiencies of cyhalofop-butyl by strain QDZ-B

QDZ-B菌液, 设接种灭活的QDZ-B为对照, 30 ℃、150 r/min 摇床培养5 d后取样测定氰氟草酯含量。结果(图9)显示, 当氰氟草酯起始浓度在25~200 mg/L时, QDZ-B在5 d内能降解

约80%的氰氟草酯, 当氰氟草酯浓度达到300 mg/L时, 菌株QDZ-B在5 d内对氰氟草酯的降解率下降到约50%左右, 这说明在培养基中氰氟草酯浓度较高时需要更长的时间菌株

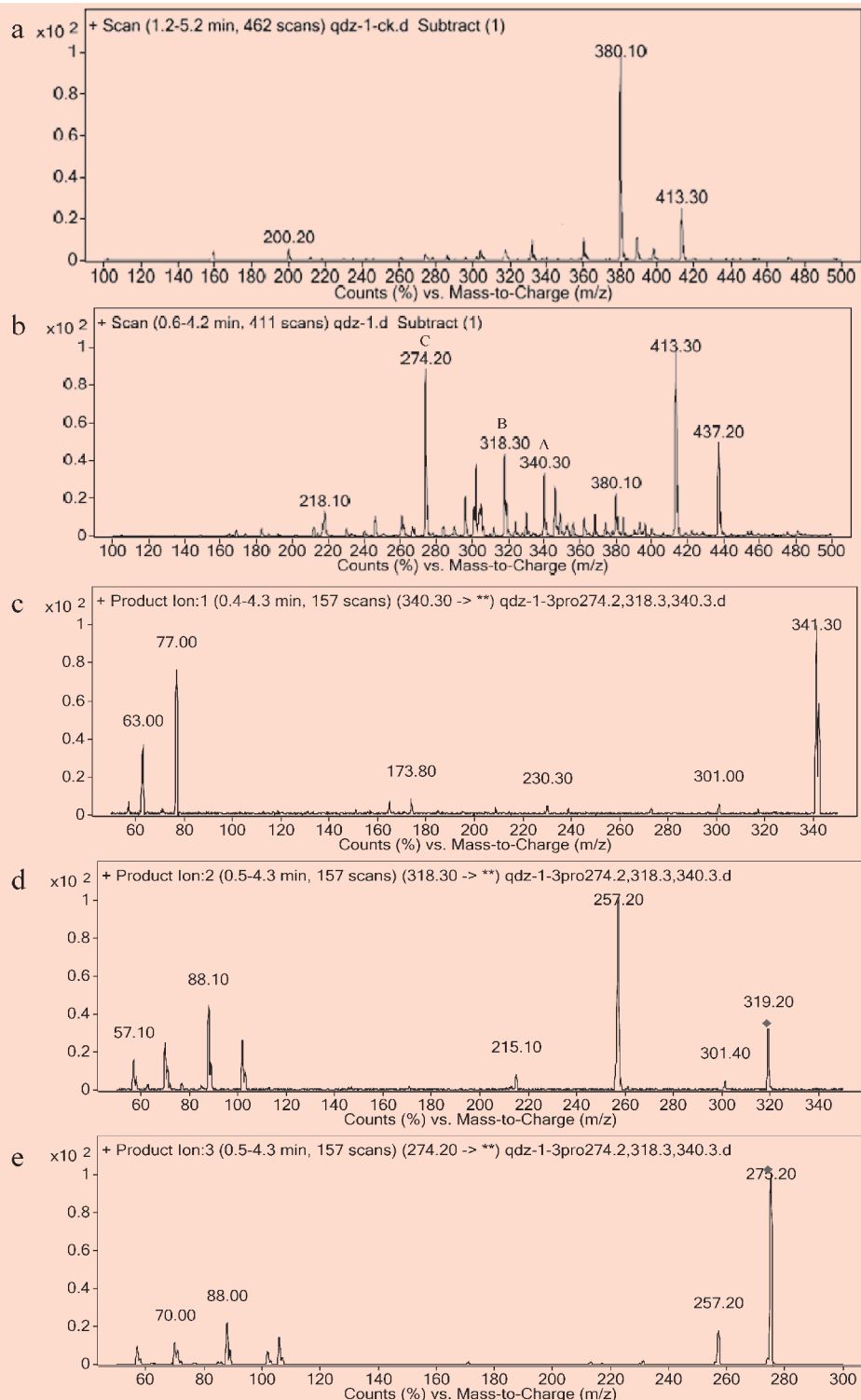


图10 菌株QDZ-B降解氰氟草酯的产物质谱图

Fig. 10 Mass spectrum of degradation products of cyhalofop-butyl by strain QDZ-B

1: 氰氟草酯原药一级质谱图; 2: 氰氟草酯降解产物一级质谱图; 3: 降解产物A的二级质谱图; 4: 降解产物B的二级质谱图; 5: 降解产物C的二级质谱图  
1: First mass spectrum of cyhalofop-butyl; 2: First mass spectrum of metabolite products of cyhalofop-butyl; 3: Second mass spectrum of metabolite product A;  
4: Second mass spectrum of metabolite product B; 5: Second mass spectrum of metabolite product C.

QDZ-B才能把氰氟草酯降解完全。

## 2.8 菌株QDZ-B对氰氟草酯降解的代谢产物及降解途径分析

在含100 mg/L氰氟草酯的基础盐液体培养基中以5%接种量接入菌株QDZ-B分别培养0 h及48 h, 培养液用二氯乙烷全量提取后经质谱分析, 结果见图10。图10-a和图10-b分别是培养0 h及48 h后培养液提取物的总离子流图谱, 对比图10-a和图10-b, 发现菌株QDZ-B降解氰氟草酯后有3个产物明显积累, 在图10-b中标为A、B和C, 其荷质比( $m/z$ )分别为340、318和274; 图10-c、图10-d和图10-e分别为产物A、B和C的二级质谱图。经质谱库检索及分析表明这3个代谢产物分别为2-[4(4-氨基-2-氟苯氧基苯氧基)-丙酸(即氰氟草酸)、2-[4(4-氨基甲酰基-2-氟苯氧基)苯氧基]-丙酸(即氰氟草酰胺)和2-氟-3-对-乙氧基苯氧基苯甲酰胺。

氰氟草酯及其苯环类代谢产物在紫外200~300nm区域有特征吸收峰, 对不同培养时间的培养液二氯乙烷提取液紫外扫描结果表明, 在6 d培养时间内, 提取液的紫外200~300 nm区域的特征吸收峰是不断下降的, 当培养到d 7时提取液的紫外200~300 nm区域的特征吸收峰已下降95%以上, 这个结果说明菌株QDZ-B能将氰氟草酯及其代谢产物的苯环开环并进一步降解。

从对降解产物分子结构分析, 初步推断菌株QDZ-B对氰氟草酯的降解代谢途径。如图11所示, 氰氟草酯降解的第一步是酯键水解断裂为氰氟草酸, 氰氟草酸的氰基水解生成氰氟草酰胺, 氰氟草酰胺进一步脱羧基生成2-氟-3-对-乙氧基苯甲酰胺。

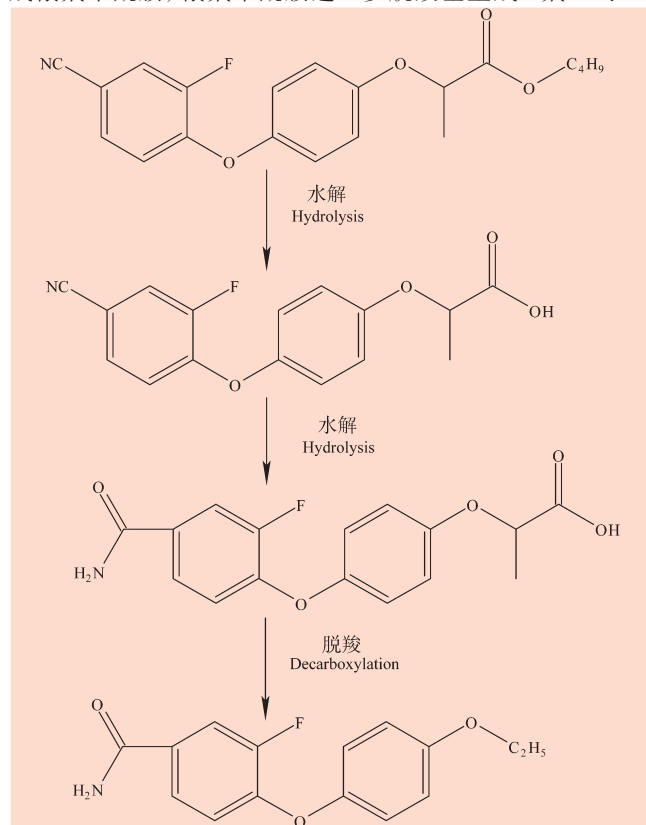


图11 菌株QDZ-B对氰氟草酯降解途径的推测

Fig. 11 Proposed metabolic pathways of cyhalofop-butyl by strain QDZ-B

氧基苯氧基苯甲酰胺。

土壤降解试验研究结果表明微生物代谢在土壤中氰氟草酯残留的降解中起到重要作用, 如Jackson R和Douglas M (1991) 等人的研究结果表明在土壤和水体中氰氟草酯的降解是微生物代谢和化学降解共同作用的结果, 其降解过程首先是通过酯键断裂降解为氰氟草酸, 氰氟草酸进而连续氧化为氰氟草酰胺和氰氟二酸。而利用分离菌株研究氰氟草酯在微生物细胞内降解代谢途径的研究还未见报道。对比本研究分离菌株和上述土壤中氰氟草酯代谢途径, 可以发现菌株QDZ-B对氰氟草酯的降解代谢途径和氰氟草酯在土壤和水体中的降解途径的前两步是相同的, 但第三步并不一样, 菌株QDZ-B对氰氟草酰胺进一步脱羧基生成2-氟-3-对-乙氧基苯氧基苯甲酰胺, 而Jackson R和Douglas M (1991) 等人的结果是在土壤中氰氟草酰胺氧化为氰氟二酸。

## 3 结论

从长期使用芳氧苯氧羧酸酯类除草剂农药的稻田土壤中分离到1株氰氟草酯降解细菌并命名为QDZ-B。根据表型特征、生理生化特性和16S rDNA序列系统发育分析, 将其鉴定为寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas* sp.)。

菌株QDZ-B降解氰氟草酯的最适温度为30℃, 最适pH为7.0。菌株QDZ-B的降解效果与接种量成正相关, 但接种量大于5%时, 降解效率趋于平稳, 最终降解率不会随接种量的增加而显著增大。QDZ-B对较低浓度的氰氟草酯有很好的降解效果, 过高的起始浓度抑制QDZ-B对氰氟草酯的降解。

通过质谱分析鉴定了3个菌株QDZ-B降解氰氟草酯的代谢产物, 分别为氰氟草酸、氰氟草酰胺和2-氟-3-对-乙氧基苯氧基苯甲酰胺。

## References

- Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Second Edition Volume: The Proteobacteria Part A. Baltimore, USA: The Williams & Wilkins Co., 1984. 107~115
- Buendía J, Barotti R, Fullick K, Thompson A, Velilla J. Cyhalofop, a new postemergence herbicide for grass control in rice. The 6th EWRS Mediterranean Symposium, Montpellier, France, 1998
- Smith-Grenier LL, Adkins A. Isolation and characterization of soil microorganisms capable of utilizing the herbicide diclofop-methyl as a sole source of carbon and energy. *Can J Microbiol*, 1996, **42** (3): 221~226
- Jackson R, Douglas M. An aquatic risk assessment for cyhalofop-butyl: A new herbicide for control of barnyard grass in rice. XI Symposium Pesticide Chemistry: Human and Environmental Exposure to Xenobiotics, Cremona, Italy, 1999. 345~354
- Jilisa KM, ZHU GN, Zhao L, Chen YX. Degradation of cyhalofop-butyl in soil. *Acta Agric Zhejiangensis*, 2002, **14** (4): 205~209
- Maria VP, Ilaria B, Sonia B, Carlo EG, Alba P. Hydrolysis and adsorption of cyhalofop-butyl and cyhalofop-acid on soil colloids. *J Agric Food Chem*, 2008, **56** (13): 5273~5277
- Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor, USA: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001
- Dong XZ (东秀珠), Cai MY (蔡妙英). 常见细菌系统鉴定手册.

- Beijing, China: Science Press (北京: 科学出版社), 2001. 370~410
- 9 Fang GH (房桂华), Li LT (李联泰), Li R (李荣), Zhu JC (朱建春), Hong Q (洪青), Li SP (李顺鹏). Isolation and characterization of a malachite green-degrader *Arthrobacter* sp. M6. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2010, **16** (4): 581~584
- 10 He LJ (何丽娟), Li ZH (李正华), Hong Q (洪青), Li SP (李顺鹏). Characterization of a phenanthrene-degrading strain and cloning of degradation-related gene. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2009, **15** (5): 682~685
- 11 Huang X (黄星), He J (何健), Pan JJ (潘继杰), Hong Q (洪青), Li SP (李顺鹏). Separation identification and degradation characteristics of thifensulfuron-methyl degradation bacteria FLX. *China Environ Sci* (中国环境科学), 2006, **26** (2): 214~218
- 12 Li HQ (李红权), Li HM (李红梅), Jiang JZ (蒋继志), Yang XL (杨雪丽), Guo RJ (郭荣君), Ping SZ (平淑珍), Zhang W (张维). Isolation and characterization of a DDT degradation bacterium strain D-1. *Microbiology* (微生物学通报), 2008, **35** (5): 696~699
- 13 Li XY (李现尧), Liu XW (刘晓文), Shi QL (史全良). Isolation and identification of a microcystin-degrading assistant bacterium. *Microbiology* (微生物学通报), 2010, **37** (3): 473~478
- 14 Wang YL (王昀璐), Hua RM (花日茂), Tang XY (唐欣昀). Application of *Stenotrophomonas* in environmental protection. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2010, **38** (28): 15796~15797
- 15 Xu YX (许育新), Feng ZZ (冯昭中), Lu P (陆鹏), Zhang J (张隽), Li SP (李顺鹏), Huang X (黄星). Isolation and characterization of capable of degrading parathion-methyl bacterium *Stenotrophomonas* sp. PF32. *Chin J Pestic Sci* (农药学报), 2009, **11** (3): 329~334
- 16 Ye YF (叶央芳), Du YF (杜宇峰). Degradation of mefenacet by three *Stenotrophomonas* spp. and phylogenetic analysis. *Jiangsu Environ Sci & Technol* (江苏环境科技), 2005, **18** (4): 4~6
- 17 Yu CH (于彩虹), Zhang XT (张显涛), Song YN (宋英男), Lu XB (路兴波), Sun HW (孙红炜), Zhang S (张帅), Qu WD (曲望达), Zhao ZC (赵忠朝). Isolation, identification and degradation characteristics of two acephate-degrading bacteria. *Chin J Environ Engin* (环境工程学报), 2010, **14** (1): 2623~2630
- 18 Zhang W (张卫), Yu YL (虞云龙), Wu JL (吴加伦), Li SN (李少南), Fan DF (樊德方). Screening of highly efficient degradation bacteria of abamectin and its degradation characteristics. *J Shanghai Jiaotong Univ* (上海交通大学学报), 2004, **22** (2): 157~161
- 19 Zhang W (张卫), Yu YL (虞云龙), Wu JL (吴加伦), Li SN (李少南), Fan DF (樊德方). Degradation of abamectin in soils and screening of highly efficient degradation bacterium. *Acta Pedol Sin* (土壤学报), 2007, **41** (4): 590~596
- 20 Zhang W (张卫), Yu YL (虞云龙), Lin KF (林匡飞), Li SN (李少南), Wu JL (吴加伦), Fan DF (樊德方). Microbial degradation of Abamectin in soil. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 2004, **15** (11): 2175~2178
- 21 Zhu GN (朱国念), Wu G (吴刚), Zhao L (赵莉), Wu HM (吴慧明). Photo-degradation of cyhalofop-butyl and its metabolite (ACID) in various aqueous solutions. *Chin J Pestic Sci* (农药学报), 2003, **5** (3): 65~70