

季 丽, 吴 伟. 氟乐灵降解菌株的分离鉴定及降解特性研究[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(3): 390–393, 531.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.03.108

氟乐灵降解菌株的分离鉴定及降解特性研究

季 丽¹, 吴 伟^{1,2}

(1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心/中国水产科学研究院内陆渔业生态环境与资源重点开放实验室, 江苏无锡 214081)

摘要:分离筛选出 1 株能高效降解养殖水体中氟乐灵的微生物菌株 FJ-01, 经生理生化 and 序列同源性分析, 将该菌株鉴定为 *Leucobacter* 菌。结合水产养殖的实际情况, 该菌降解氟乐灵的最适 pH 值为 6.0~8.5, 最适温度为 22~30 ℃, 最佳光照条件为光暗比 12 h: 12 h, 最佳接种量为 0.01%, 氟乐灵的初始浓度 0.05 mg/L。

关键词:氟乐灵; 生物降解; 16S rDNA; *Leucobacter* 菌; 降解特性

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)03-0390-04

氟乐灵(trifluralin), 别称氟乐宁、氟特力、茄科宁等, 化学名称为 2,6-二硝基-N,N-二丙基-4-三氟甲基苯胺, 分子式 $C_{13}H_{16}F_3N_3O_4$ 。实际生产中氟乐灵的常用剂为 48% 的乳油制品, 是一种广泛应用的二硝基苯胺类选择性芽前除草剂。因其在虾蟹育苗及养殖过程中可治疗和预防真菌病(链壶菌病)^[1]且具灭苔不伤草的功效, 也广泛应用于水产养殖中。

然而有研究表明, 氟乐灵可使受试动物发生癌变、染色体突变并对哺乳动物具有基因毒性^[2-4]。氟乐灵对哺乳动物、虾、蟹、鸟类的毒性较低, 但对鱼类的毒性很大^[5]。针对氟乐灵的使用情况和有关毒理学试验数据, 2004 年 11 月底, 美国环保署再次修订氟乐灵最高残留限量^[6], 重新修订后为 0.05 mg/kg。2010 年日本多次检出我国出口的鳗鱼、梭子蟹等水产品中氟乐灵超标, 对我国渔业经济造成一定影响。

利用微生物来降解农药最早报道于 1951 年, 当时 Audus^[7]研究了土壤微生物对 2,4-D 的降解, 引发了世人对微生物降解能力的关注。微生物降解技术相对于物理、化学技术, 具有高效、彻底、无二次污染和成本低等优势, 已成为近年来研究的热点。

目前对于氟乐灵的研究主要着重于其对动植物的影响, 在土壤中的迁移、转化、降解^[8-10]以及检测方法^[11-13]。对于如何去除水环境和生物体内的氟乐灵报道较少, 因此筛选更多类型水体中的氟乐灵高效降解菌对于氟乐灵残留的生物修复研究和应用具有十分重要的意义。本研究从受污染池塘底泥中筛选到 1 株可降解低氟乐灵浓度的菌株, 并研究其降解特性, 以期合理使用渔用药物和保证水产品质量安全提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 氟乐灵降解菌分离源

氟乐灵降解菌分离自江苏宜兴多年使用过氟乐灵的虾蟹养殖池塘的底泥。采用柱状采泥器采集 5 个不同的池塘底泥各 500 g, 装入无菌的玻璃广口瓶中, 4 ℃ 保存下运回实验室备用。

1.2 培养基与试剂

菌株富集所用的培养基(葡萄糖 1 g、蛋白胨 10 g、硝酸铵 0.2 g、酵母膏 0.06 g、磷酸氢二钾 0.1 g、磷酸二氢钾 0.2 g、氯化钠 1 g、水 1 L), pH 值为 7.0~7.5, 121 ℃ 灭菌 20 min。

菌株驯化培养所采用的无碳源培养基(硝酸铵 0.2 g、磷酸氢二钾 0.1 g、磷酸二氢钾 0.2 g、氯化钠 1 g、水 1 L), pH 值为 7.0~7.5, 121 ℃ 灭菌 20 min。

菌株保存培养基采用液体或固体的肉汤培养基[牛肉膏 5.0 g、蛋白胨 10.0 g、氯化钠 5.0 g(固体需加琼脂 20 g)、蒸馏水 1 L], pH 值为 7.0~7.5, 121 ℃ 灭菌 20 min。

1.3 氟乐灵降解菌株的筛选、分离和纯化

无菌条件下取养殖池塘的底泥 1 g, 置于经灭菌冷却的 99 mL 富集培养基中, 30 ℃、150 r/min 振荡 48 h 培养。将经富集培养后的底泥悬浊液静置 0.5 h, 在无菌条件下取 1 mL 上清液于 99 mL 富集培养基中按上述条件继续培养 48 h。取 10 mL 经培养所得的菌液于 250 mL 无碳源培养基(含 0.01 mg/L 氟乐灵)中, 培养(条件均为 30 ℃、150 r/min)48 h 后将菌液转接至下一批次新的无碳源培养基中, 并逐步加大无碳源培养基中氟乐灵的浓度, 从 0.01 mg/L 提高至 2.0 mg/L。每次转接前需测定培养液中氟乐灵的实际含量, 浓度有明显下降则表明培养液中有降解菌株的存在。

将混合培养物经含 2.0 mg/L 氟乐灵无碳源培养基平板涂布, 并将其进行分离化, 取最终的驯化培养液 1 mL 于 9 mL 无菌水中, 得到 10^{-1} 的稀释度, 并依次获得 10^{-2} 和 10^{-3} 的稀释度。从 3 个不同的稀释度中取样, 在含 2.0 mg/L 氟乐灵无碳源培养基平板上进行涂布分离, 每个稀释度做 3 个平行, 放入 30 ℃ 的恒温培养箱中培养 3 d。选择菌落疏密适当的平板, 在显微镜下观察, 挑取生长状况良好、形态不同的

收稿日期: 2015-03-31

基金项目: 国家水产品质量安全风险项目(编号: GJFP2014009)。

作者简介: 季 丽(1989—), 女, 江苏泰兴人, 硕士研究生, 主要从事渔业生态环境保护方面的研究。Tel: (0510) 85559935; Email: 1040486245@qq.com。

通信作者: 吴 伟, 研究员, 硕士生导师, 主要从事污染生态学及环境生物学方面的研究。Tel: (0510) 85559935; Email: wuw@ffrc.cn。

菌落于液体肉汤培养基中培养,再将分离所得的各菌株在平板上连续转接、传代5次,选择其中能在含氟乐灵无碳源培养基上生长的菌株,转接至试管斜面,于4℃冰箱保存。

将纯化得到的菌株用肉汤培养基培养至菌数为 10^9 CFU/mL水平,按5%的比例接种于250 mL装有100 mL 0.5 mg/L 氟乐灵无碳源培养基的三角瓶中,放置振荡培养箱中30℃、150 r/min振荡培养5 d。每隔24 h取样1次,经适当稀释后测定 $D_{600\text{ nm}}$,做3个平行,分别以培养时间、 $D_{600\text{ nm}}$ 吸光值为横、纵坐标绘制菌株的生长曲线。同时测定其中氟乐灵的浓度,选择降解率和生长性能均较好的菌株作为最终的目标菌株,进行鉴定和降解特性的研究。

1.4 氟乐灵降解率的分析测定

菌株分离筛选时,氟乐灵的测定采用气相色谱(GC)法,其中色谱条件的选择参考文献[14]。取培养液50 mL于250 mL分液漏斗中,加入色谱纯二氯甲烷10 mL,振荡萃取5 min,静置分层,取有机溶剂层,经4 000 r/min离心10 min,弃残余水相。有机相在氮气下吹干,再用二氯甲烷定容至1 mL,经0.22 μm 的滤膜过滤后进气相色谱分析。

氟乐灵的降解率 = $(C_i - C_0) / C_0 \times 100\%$ 。

式中: C_i 为培养液中氟乐灵的最终浓度,mg/L; C_0 为培养液中氟乐灵的初始浓度,mg/L。

1.5 氟乐灵降解菌株的16S rDNA的分析

为进一步确定所选菌株的种属,在进行菌落形态观察的同时采用16S rDNA方法鉴定菌株。按SK8255(细菌)试剂盒的操作程度提取菌株的DNA,使用细菌通用引物7f(5'-CAGAGTTTGATCTGGCT-3')和1540 r(5'-AGGAGGT-GATCCAGCCGCA-3')扩增其片段,对扩增产物进行电泳观察(1%琼脂糖电泳,150 V 100 mA,20 min),并由生工(上海)生物工程有限公司进行测序,所得基因序列经Blast程序与GenBank核酸数据库进行比对分析,采用MEGA 5.1软件进行同源性比对分析并建立系统发育树^[15]。

1.6 氟乐灵降解菌株的生长曲线及降解特性

在2500 mL三角瓶中加入1000 mL的养殖水体水样(水质COD为17.75 mg/L,TN为1.6 mg/L,TP为0.30 mg/L, $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 为0.70 mg/L, $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 为0.15 mg/L, $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 为0.10 mg/L,pH值为7.0),经灭菌冷却后根据养殖生产的实际情况和条件加入氟乐灵并接入一定量的培养至对数生长期的菌液(菌液浓度 1×10^9 CFU/mL),研究在不同的温度(15、22、30℃)、pH值(6.0、7.0、8.5)、光暗比(4 h:20 h、12 h:12 h、20 h:4 h)、接种量(1%、0.1%、0.01%)和氟乐灵浓度(0.01、0.05、0.5、1.0、2.0 mg/L)下,菌株经5 d连续作用后对氟乐灵的降解能力;试验设3组平行。

2 结果与讨论

2.1 氟乐灵降解菌株的分离、筛选和纯化

以江苏宜兴多次使用过氟乐灵的5个虾蟹养殖池塘底泥(S1~S5)为分离源,采用富集培养基培养后获得混合菌源。将混合菌源接入含0.01~2.0 mg/L 氟乐灵的无碳培养基中,经30℃、150 r/min振荡培养48 h,分析培养前后培养液中氟乐灵的降解情况,以判别降解菌的存在和选择适宜的分离源。试验结果详见图1。

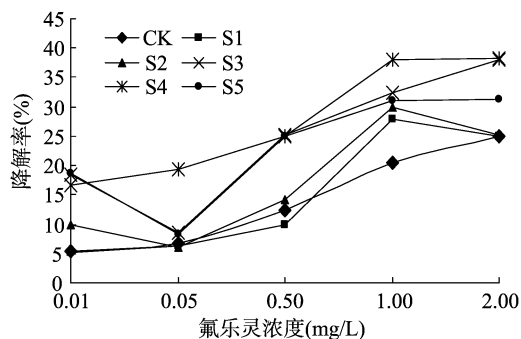


图1 降解菌筛选中氟乐灵的变化

由图1可知,在30℃、150 r/min条件下培养48 h,因挥发等因素的影响,对照组CK的氟乐灵(0.01~2.0 mg/L)有5.31%~25.08%的去除率,且随着浓度的上升而增大。相对于对照组,富集于S1、S2池塘底泥的菌源,其对氟乐灵的降解效果不显著($P>0.05$),而富集于S3~S5池塘底泥的菌源则具有良好的降解效率。其中S4的菌源对于0.05 mg/L以上的氟乐灵降解效果尤其显著($P<0.05$),扣除对照组本底变化值后分别达到11.31%、12.48%、12.56%、17.54%和13.12%。因此降解氟乐灵的菌株重点在S3~S5池塘底泥的菌源中筛选。

将S3~S5这3组的菌株培养物在无菌条件下,经含氟乐灵2.0 mg/L的无碳源培养基平板进行涂布和分离纯化,共获得菌株7株,编号为FJ-01~FJ-07。将这7株菌株对0.5 mg/L的氟乐灵进行5 d的降解,降解结果见图2。由图2可知,在所筛选出的7株菌株中,5 d内对0.5 mg/L 氟乐灵降解效果较好的有4株菌,分别为FJ-01、FJ-02、FJ-06和FJ-07,降解率大于76% (扣除对照组本底后大于55%),其中FJ-01菌株的降解率最高,达84.1% (扣除对照组本底后为64.6%)。

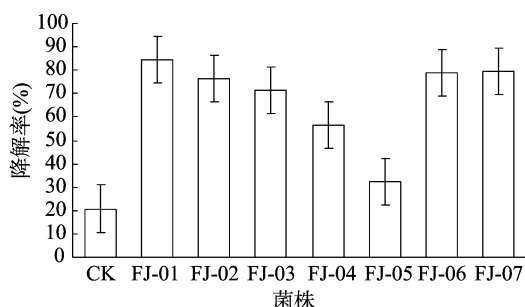


图2 不同菌株对氟乐灵的降解

试验同时测定了4株具有较好降解作用菌株的生长曲线。由图3可知,4株菌在含0.5 mg/L 氟乐灵的无碳培养基中生长良好。相比较而言,FJ-01菌株的生长比较活跃,是唯一D值超过1.0的菌株,因此将其作为降解的首选菌株进行研究和探索。

2.2 氟乐灵降解菌株FJ-01的菌落形态观察和16S rDNA分析

所筛得的氟乐灵降解菌FJ-01在固体肉汤培养基中培养24 h后,菌落圆形且呈乳白色或淡黄色,四周边缘较为光滑,表面湿润,不易挑取,革兰氏染色呈阳性(图4)。

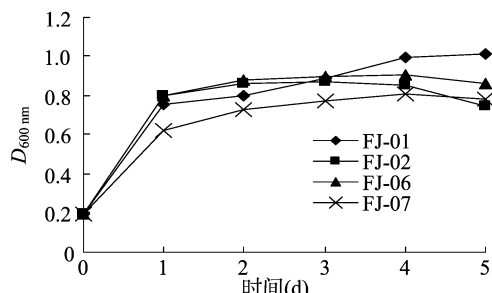


图3 不同菌株的生长曲线

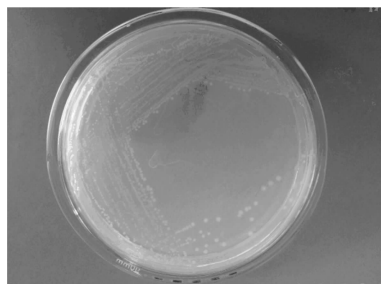


图4 FJ-01菌的菌落照片

以 FJ-01 菌株的基因组 DNA 为模板,利用引物 7f(5' - CAGAGTTTGATCCTGGCT - 3') 和 1540 r(5' - AGGAGGTGATCCAGCCGCA - 3') 对 FJ-01 菌 16S rDNA 片段进行 PCR

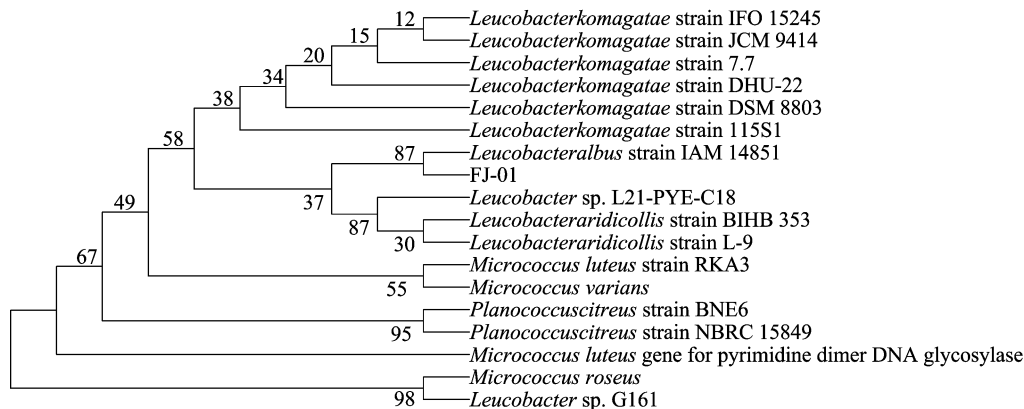


图6 菌株 FJ-01 的 16S rDNA 序列分析发育树

2.3 氟乐灵降解菌株 FJ-01 的降解特性研究

根据养殖生产中氟乐灵使用的实际情况和条件,研究了不同的温度、pH 值、光暗比、接种量和氟乐灵初始浓度对菌株 FJ-01 降解能力的影响,了解菌株 FJ-01 的降解特性。

2.3.1 氟乐灵初始浓度对菌株 FJ-01 降解能力的影响 为考察氟乐灵初始浓度对菌株 FJ-01 降解的影响,试验根据养殖生产中的实际情况,选择了 0.01、0.05、0.5、1.0、2.0 mg/L 5 个浓度。试验条件为:温度 30 ℃、水体 pH 值为 7.0、光暗比为 12 h : 12 h、菌体接种量为 0.1%,试验时间为 5 d。试验结果见图 7。

由图 7 可以看出,当其他条件一致时,经过 5 d 的试验,5 个浓度组的氟乐灵均有不同程度的降解:其中 0.01 mg/L 浓度组的降解率偏低,仅为 17.46%,而其他各浓度组的氟乐灵降解较明显,降解率均大于 38%,其中 0.05 mg/L 组的降解效果最为显著,达 66.26%。5 个浓度组中 0.05、0.5、1.0 mg/L 这

3 个浓度组的降解率较为接近。降解率的不同与浓度有直接的关系,0.01 mg/L 组本身浓度偏低,可利用性差;而 2.0 mg/L 组浓度偏大,对菌株的生长代谢有一定的抑制作用,故降解率又会有一定的下降。0.05 ~ 1.0 mg/L 组的浓度处于菌株代谢的适宜范围,而生产实际中氟乐灵的常用浓度

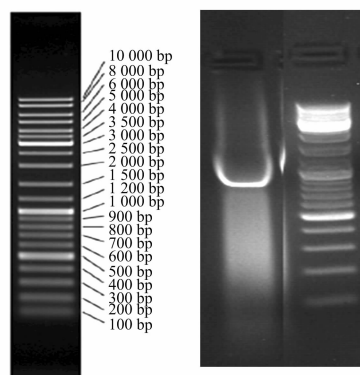


图5 FJ-01菌株 16S rDNA PCR 扩增产物电泳

FJ-01 的 16S rDNA 序列在 NCBI 上比对分析后发现其与多株 *Leucobacter* 菌的 16S rDNA 相似,调出其中相似度较高的 *Leucobacter* 菌 16S rDNA 序列,建立系统发育树。经计算,菌株 FJ-01 与 *Leucobacter albus* strain IAM 14851 距离最近,两者同源率为 91%,可以判断 FJ-01 菌株与 *Leucobacter albus* strain IAM 14851 为不同种,但同属于 *Leucobacter* 属。具体种仍待进一步分析,其系统发育树见图 6。

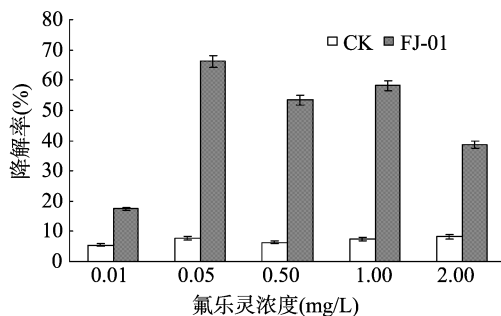


图7 初始浓度对 FJ-01 降解的影响

3 个浓度组的降解率较为接近。降解率的不同与浓度有直接的关系,0.01 mg/L 组本身浓度偏低,可利用性差;而 2.0 mg/L 组浓度偏大,对菌株的生长代谢有一定的抑制作用,故降解率又会有一定的下降。0.05 ~ 1.0 mg/L 组的浓度处于菌株代谢的适宜范围,而生产实际中氟乐灵的常用浓度

是 0.05 mg/L,因此该菌对养殖水体环境中残留氟乐灵的降解是有效和适宜的。

2.3.2 温度对菌株 FJ-01 降解能力的影响 为考察水体温度对菌株 FJ-01 降解的影响,试验根据养殖生产中的实际情况,选择了水温为 15、22、30 ℃ 3 个温度。试验条件为:水体 pH 值 7.0、光暗比 12 h : 12 h、菌体接种量为 0.1%,氟乐灵初始浓度为 0.05 mg/L,试验时间为 5 d,试验结果见图 8。

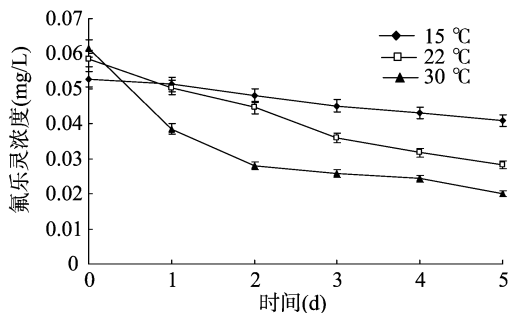


图8 温度对 FJ-01 降解的影响

由图 8 可以看出,相对于 15 ℃ 时 22.58% 的降解率而言,22 ℃ 和 30 ℃ 时 FJ-01 菌株对氟乐灵 5 d 的降解率分别达到 51.62% 和 67.32%,表明温度较高适宜氟乐灵的降解。一方面,水温较高,特别是 30 ℃ 左右时,正是微生物生长代谢的适宜温度,有利于微生物对氟乐灵的代谢转化;另一方面,水温上升有利于氟乐灵的挥发,从而加快其去除。15 ℃ 的水温较低,降解率也偏低,但此时一般不进行养殖生产或虽然养殖但不需要使用氟乐灵,因此对实际应用的影响不大。养殖生产中使用氟乐灵主要在早春水温 22 ℃ 左右,用于杀灭水中的水绵,其次是在水温 30 ℃ 左右时防治虾病。而这 2 个温度条件下 FJ-01 菌株对氟乐灵有 50% 以上的降解率,故适宜在实际生产中应用。

2.3.3 pH 值对菌株 FJ-01 降解能力的影响 为考察水体 pH 值对菌株 FJ-01 降解的影响,试验根据养殖生产中实际情况,选择了水体 pH 值为 6.0、7.0、8.5 的 3 个值。试验条件为:水温 30 ℃、光暗比 12 h : 12 h、菌体接种量为 0.1%,氟乐灵初始浓度为 0.05 mg/L,试验时间为 5 d,试验结果见图 9。

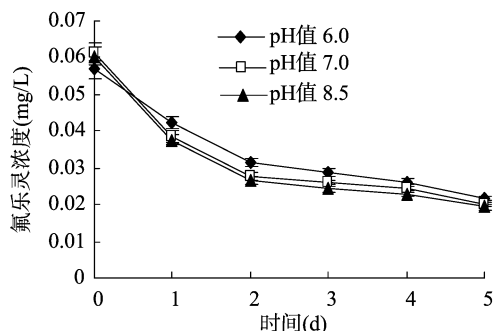


图9 pH 值对 FJ-01 降解的影响

从图 9 可以看出,pH 值为 6.0、7.0、8.5 时,菌株 FJ-01 降解氟乐灵无显著差异,5 d 后降解率分别为 61.97%、66.26% 和 68.05%,表明在 pH 值在 6.0~8.5 范围内,对菌株的降解能力无影响,且养殖水体的 pH 值基本在此范围内波动,故对菌株 FJ-01 而言是适宜降解的条件。

2.3.4 光暗比对菌株 FJ-01 降解能力的影响 为考察光暗

比对菌株 FJ-01 降解的影响,试验根据养殖生产中的实际情况,选择了光暗比为 20 h : 4 h、12 h : 12 h、4 h : 20 h (光照度为 2 500 lx) 3 个水平。试验条件为:水温 30 ℃、pH 值为 7.0、菌体接种量为 0.1%,氟乐灵初始浓度为 0.05 mg/L,试验时间为 5 d,试验结果见图 10。

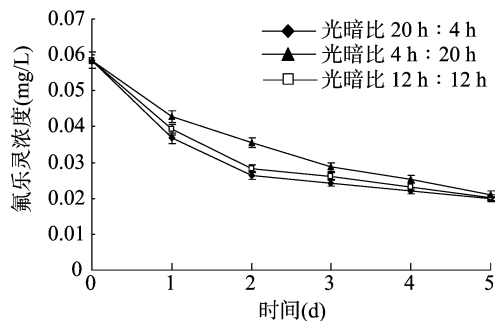


图10 光暗比对 FJ-01 降解的影响

由图 10 可以看出,在 5 d 的试验中,各组最终的降解率在 63.93%~66.15% 之间,并无显著性差异,但 5 d 中的降解速率存在差异。光暗比为 20 h : 4 h、12 h : 12 h 的 2 组,在试验前 2 d 的降解速度明显快于光暗比为 4 h : 20 h 的试验组,且 2 d 的降解率分别为 55.04% 和 51.79%,远大于光暗比为 4 h : 20 h 试验组的 39.32%。表明在试验开始后的 2 d 内,菌株处于适应并增殖状态,氟乐灵的降解中包含了部分的光降解,若此时光照时间长,降解率会明显提高。随着微生物代谢能力的加剧,后 3 d 此种影响减弱,氟乐灵的代谢以菌株的代谢为主,最终的降解率趋于一致。

2.3.5 接种量对菌株 FJ-01 降解能力的影响 为考察菌株 FJ-01 接种量对降解效果的影响,试验根据养殖生产中的实际情况,选择了接种量为 1%、0.1% 和 0.01% 3 个水平进行试验。试验条件为:水温 30 ℃、pH 值为 7.0、光暗比 12 h : 12 h,氟乐灵初始浓度为 0.05 mg/L,试验时间为 5 d,试验结果见图 11。

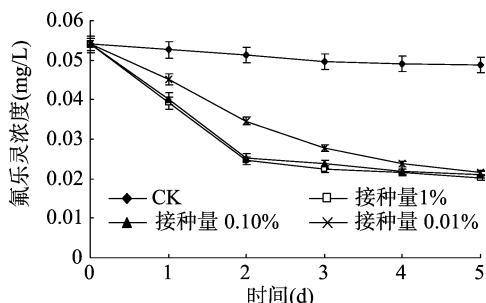


图11 接种量对 FJ-01 降解的影响

由图 11 可以看出,在 5 d 的试验中,各组最终的降解率在 60.19%~62.41% 之间,并无显著性差异,但 5 d 中的降解效果存在差异。接种量为 0.1% 和 1% 的 2 组,试验前 2 d 的降解效率明显要高,2 d 的降解率分别为 54.44% 和 53.15%,远大于另一组的 35.93%。表明在试验开始后的 2 d 内,菌株处于适应和增殖状态,菌株活性菌数高的试验组降解能力明显要强,但随着菌体的代谢,从第 3 天起降解作用效果趋于一致。因此菌株的接种量以 0.1% 为佳,但在实际生产中应用必须考虑经济有效性以及最终的降解结果,故接种量的选

(下转第 531 页)

- [3]王万山. 中国大豆贸易地位与国际定价权为何不对应[J]. 国际贸易, 2007(6): 9-13.
- [4]蓝 昊, 宣亚南. 世界大豆贸易格局的演变及对我国的启示[J]. 国际贸易问题, 2008(6): 39-44.
- [5]沈雪达. 我国大豆国际贸易的历史、现状与前景分析[J]. 现代农业, 2010(11): 48-50.
- [6]林 峰. 勒纳指数存在“悖论”吗——基于中国民航运输业市场势力的测度[J]. 财经科学, 2013(8): 58-66.
- [7]温孝卿, 梁 滨, 闫修建. 关于市场势力测度——生产法的文献综述[J]. 统计与决策, 2013(24): 27-30.
- [8]黄先海, 陈晓华. 浙江企业国际市场势力的测度与分析——以纺织服装业为例[J]. 浙江社会科学, 2007(6): 41-46.
- [9]黄 枫, 吴纯杰. 市场势力测度与影响因素分析——基于我国化学药品制造业研究[J]. 经济学, 2013, 12(1): 511-526.
- [10]Pall Z, Perekhzhuk O, Glauben T, et al. Residual demand measures of market power of Russian wheat exporters[J]. Agricultural Economics, 2013, 45(3): 381-391.
- [11]Darren H, Pan S W. Market structure impacts on market distortions from domestic subsidies: the U. S. cotton case[J]. Electronic Journal of Agricultural and Development Economics, 2010(2): 417-435.
- [12]陈 昕. 中国花生制品国际市场势力分析[J]. 贵州农业科学, 2013, 41(8): 224-227.
- [13]颜海明. 中国家电行业对主要进口国的市场势力测度与分析——以彩电(HS1992;852810)出口为例[J]. 内蒙古财经学院学报, 2010(1): 43-47.
- [14]陈甬军, 胡德宝. 中国电信产业垄断分析——基于剩余需求法的实证研究[J]. 广西社会科学, 2008(8): 78-83.
- [15]罗剑宏, 赵 巧. 中国摩托车产业出口的市场势力测度与分析[J]. 中国商界: 下半月, 2008(7): 4-5.
- [16]Krugman P. Pricing to market when the exchange rate changes[M]. Cambridge: National Bureau of Economic Research, 1986.
- [17]Michael M K. Price discrimination by U. S. and German exporters[J]. The American Economic Review, 1989, 79(1): 198-211.
- [18]Daniel H P, Timothy A P. The competitive structure of U. S agricultural exports[J]. American Journal of Agricultural Economics, 1991, 73(1): 133-141.
- [19]Rakotoarisoa M A, Shapouri S. Market power and the pricing of commodities imported from developing countries: the case of US vanilla bean imports[J]. Agricultural Economics, 2001, 25(2/3): 285-294.
- [20]马述忠, 王 军. 我国粮食进口贸易是否存在“大国效应”——基于大豆进口市场势力的分析[J]. 农业经济问题, 2012(9): 24-32, 110.
- [21]Song B H, Marchant M A, Reed M R, et al. Competitive analysis and market power of China's soybean import market[J]. International Food and Agribusiness Management Review, 2009, 12(1): 21-42.
- [22]陈传兴, 李静逸. 中国大豆与玉米进出口贸易的“大国效应”分析[J]. 国际观察, 2011(2): 73-79.
- [23]夏友富, 汤艳丽, 向清凯. 把握合理规模——我国大豆进口与大豆产业发展研究[J]. 国际贸易, 2003(10): 4-9.

(上接第393页)

择宜小不宜大, 0.01% 及以下的接种量则更加适宜, 这还有待于在实际应用中加以修正和完善。

3 小结

采用富集培养基和含氟乐灵的无碳源培养基从养殖池塘底泥中定向分离得到具有降解功能的4株菌株, 菌株分别标记为 FJ-01、FJ-02、FJ-06 和 FJ-07。将此4菌株加入含有氟乐灵的无碳源培养基中, 经过5 d的培养, 发现 FJ-01 菌株在培养液中生长情况最好, 且对氟乐灵的降解率最高, 故选择 FJ-01 菌株作为重点研究菌株。

对菌株 FJ-01 进行了纯化和培养, 分析了其菌落、菌株形态, 提取了菌体 DNA 并进行了 16S rDNA 片段的 PCR 扩增, 对扩增得到的目标片段进行测序。利用 Blast 对序列结果进行比对, 构建系统发育树进行分析, 初步确定菌株 FJ-01 为 *Leucobacter* sp.。

研究表明, 结合水产养殖的实际情况, 菌株 FJ-01 对氟乐灵降解的适宜条件为: pH 值为 6.0~8.5, 水温为 22~30℃, 光暗比为 12 h: 12 h, 接种量为 0.01%, 氟乐灵初始浓度为 0.05 mg/L。

参考文献:

- [1]梁飞龙, 刘洪军, 傅道军. 斑节对虾幼体链壶菌病的防治试验[J]. 水产科技情报, 2000, 27(3): 102-104, 144.
- [2]Naqvi S M, Leung T S. Trifluralin and oryzalin herbicides toxicities to juvenile crawfish (*Procambarus clarkii*) and mosquitofish (*Gambusia affinis*) [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 1983, 31(3): 304-308.
- [3]杜柳涛, 郭惠琼, 杨杏芬. 氟乐灵对大鼠肝、肾微粒体酶的影响[J]. 中国职业医学, 2000, 27(5): 16.
- [4]Ribas G, Frenzilli G, Barale R, et al. Herbicide-induced DNA damage in human lymphocytes evaluated by the single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay[J]. Mutation Research, 1995, 344(1/2): 41-54.
- [5]吴正铠. 除莠剂氟乐灵(trifluralin)引起的幼鱼脊椎骨畸形[J]. 淡水渔业, 1979, 9(增刊1): 59-60.
- [6]胡 敏, 李二虎, 吴兵兵, 等. 气相色谱法测定大豆中氟乐灵、甲草胺和乙草胺农药残留[J]. 现代农药, 2006, 5(6): 27-28, 47.
- [7]Audus L J. The biological detoxication of hormone herbicides in soil[J]. Plant and Soil, 1951, 3(2): 170-192.
- [8]郑 麟, 王福钧. ^{14}C -氟乐灵在土壤中的迁移和降解[J]. 核农学报, 1993, 7(1): 37-44.
- [9]张大弟, 张晓红, 徐正泰. 除草剂氟乐灵在土壤中的残留降解[J]. 上海环境科学, 1988, 7(6): 11-15.
- [10]安 琼, 陈祖义. 氟乐灵在土壤中的持留及其结合残留研究[J]. 土壤学报, 1993, 30(3): 304-311.
- [11]安 琼, 钱文恒. 测定土壤中氟乐灵残留物的毛细管色谱方法[J]. 土壤, 1992, 24(1): 48-50.
- [12]李孝军, 林仙军, 王亚楠, 等. 超高效液相色谱法测定鳊鱼中氟乐灵残留量[J]. 中国兽药杂志, 2011, 45(5): 17-19.
- [13]黄灵芝, 戴 华, 李拥军, 等. 高效液相色谱法测定芥头中氟乐灵残留量[J]. 食品科学, 2004, 25(7): 151-153.
- [14]季 丽, 张莺月, 晏 涛, 等. 氟乐灵在养殖水体环境中消解动态的模拟研究[J]. 农业环境科学学报, 2015, 34(1): 182-189.
- [15]王 琼, 吴 伟, 季 丽. 侧孢芽孢杆菌对铜绿微囊藻生长胁迫的研究[J]. 农业环境科学学报, 2014, 33(2): 383-391.