

DOI: 10.13758/j.cnki.tr.2022.06.013

滕晓, 徐铭阳, 李锦涛, 等. 除草剂苄嘧磺隆降解菌 *Hansschlegelia zihuaiae* S113 菌剂的研发. 土壤, 2022, 54(6): 1193–1200.

除草剂苄嘧磺隆降解菌 *Hansschlegelia zihuaiae* S113 菌剂的研发^①

滕 晓, 徐铭阳, 李锦涛, 田雁宁, 陈 洋, 黄 星*

(南京农业大学生命科学学院, 南京 210095)

摘 要: 磺酰脲类除草剂苄嘧磺隆残留期较长, 造成农田土壤的残留污染问题。以苄嘧磺隆高效降解菌株 *Hansschlegelia zihuaiae* S113 为材料制备降解菌剂, 优化液体菌剂的保护剂种类与配比, 筛选固体菌剂的最佳载体, 初步应用固体菌剂并评价修复效果。研究结果表明: ①向液体菌剂中添加合适的保护剂(0.30% 柠檬酸钠、0.20% 羧甲基纤维素、0.10% CaCl₂)可使活菌数提高 37.25%, 保存 30 d 的液体菌剂对 50 mg/L 苄嘧磺隆的降解率为 94.25%; ②筛选出猪粪有机肥为固体菌剂的最佳载体, 保存 60 d 时固体菌剂活菌数为 7.45×10^7 cfu/g, 对土壤中 10 mg/kg 苄嘧磺隆的降解率为 91.22%; ③固体菌剂的添加可有效减轻土壤中苄嘧磺隆残留对玉米的药害。

关键词: *Hansschlegelia zihuaiae* S113; 苄嘧磺隆; 菌剂; 微生物修复

中图分类号: X172 文献标志码: A

Study of Bensulfuron-degrading Strain *Hansschlegelia zihuaiae* S113 Microbial Agents

TENG Xiao, XU Mingyang, LI Jintao, TIAN Yanning, CHEN Yang, HUANG Xing*
(College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Sulfonyleurea herbicide bensulfuron-methyl has a long residue period, which causes residual pollution in farmland soil. In this study, *Hansschlegelia Zihuaiae* S113 was used as the material to prepare microbial agents, the preservation conditions of liquid agent were optimized, the best carrier of solid agent was screened and preliminary application of the agent was taken. The results show that : 1) Adding suitable protective agents (0.30% sodium citrate, 0.20% carboxymethyl cellulose, 0.10% CaCl₂) to liquid agent can increase the number of viable bacteria by 37.25%, and the 50 mg/L bensulfuron can be degraded by 94.25% after stored for 30 days. 2) Pig manure fertilizer is screened as the best carrier of solid agent. After 60 days of storage, the viable bacteria number is 7.45×10^7 cfu/g, bensulfuron-methyl can be degraded by 91.22%. 3) The addition of solid bacterial agent can effectively reduce the bensulfuron-methyl toxicity to the maize.

Key words: *Hansschlegelia zihuaiae* S113; Bensulfuron-methyl; Microbial agent; Microbial remediation

通过施用除草剂来提高单位面积粮食产量是现代农业生产的重要举措之一。苄嘧磺隆因其杀草谱广、生物活性高等特点, 被广泛应用于稻田杂草防除^[1-2]。其机制为抑制植物体内乙酰乳酸合成酶活性, 从而阻断支链氨基酸的合成, 最终达到除草的目的^[3]。苄嘧磺隆的土壤半衰期长达数月到一年以上, 田间生产中由于其长期大量施用, 在土壤中沉积, 造成了比较严重的残留问题^[4]。苄嘧磺隆残留物会影响后茬作物的出苗率和产量, 降低土壤菌群群落结构

多样性, 通过渗透等方式进入水体后, 在直接影响大型水生植物和浮游藻类的同时, 给鱼类等非靶标生物带来一定的毒理效应^[5-6]。微生物代谢在苄嘧磺隆除草剂的降解过程中起到关键作用, 通过合理运用农药残留高效降解菌株, 有望改善土壤中苄嘧磺隆的残留污染问题^[7-8]。

目前, 将微生物修复土壤农药残留投入实际应用的主要途径是将农药残留高效降解菌株加工成为液体剂型或固体剂型。液体剂型的特点是生产耗时短、

①基金项目: 国家自然科学基金项目(42277016)、江苏省重点研发计划社会发展项目(BE2020692)和南京农业大学大学生创新创业项目(202110XX06)资助。

* 通讯作者(huangxing@njau.edu.cn)

作者简介: 滕晓(1998—), 女, 山东济宁人, 硕士研究生, 主要从事环境微生物学研究。E-mail: tengxiao98@qq.com

工序少,菌种纯度高,但在运输和保存的过程中菌种易失活^[9-11]。通过添加保护剂以提供营养物质、减小胞内外渗透压、防止杂菌污染等,可延长液体菌剂的货架期,常用的保护剂类型有糖类、氨基酸、表面活性剂、大分子有机物等^[12-13]。研发降解菌剂的固体剂型一方面可以提高菌剂稳定性而有利于保藏和运输,另一方面可以促进廉价农副产品的资源化利用^[14]。目前国内外固体菌剂的制备方法多样,如冻干法、包埋法、交联法、载体吸附法等,综合考虑制备成本和应用场景,本研究选用载体吸附法制备苄嘧磺隆降解菌株的固体剂型^[15]。在应用方面,微生物降解作为一种理想的污染降解技术,近年来已成为水体污染和土壤污染治理领域的研究热点。随着对微生物菌剂作用机理的深入研究和应用经验的总结,其在土壤修复领域中的开发和应用前景广阔^[16]。

Hansschlegelia zhihuaiae S113 是本实验室分离保藏的一株磺酰脲除草剂高效降解菌,其编码的水解酶基因 *sul E*,能通过去酯化反应将噻吩磺隆、甲磺隆、氯嘧磺隆等含有酯结构的磺酰脲除草剂转化为相应的无除草活性的酸,其中对苄嘧磺隆的降解效率为 80.9%^[17]。本研究以 S113 为供试菌株,优化液体菌剂保护剂的配比参数,筛选固体菌剂的最佳载体,并利用玉米苗期试验初探固体菌剂的修复效果,以期为土壤苄嘧磺隆的污染修复提供修复制剂及理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株、材料与培养基

苄嘧磺隆购自上海源叶生物科技有限公司(纯度 98%),供试菌株 *Hansschlegelia zhihuaiae* S113 由本实验室分离并保藏。供试载体包括泥炭、米糠、秸秆肥、花生壳粉、鸡粪有机肥、蚯蚓粪有机肥、猪粪有机肥,均自然风干 3 d 并过 40 目筛,121 °C 高温灭菌 2 次后备用。供试玉米品种为“美玉 4 号”。供试土壤取自南京农业大学牌楼实验基地(32°03'N, 118°86'E),壤质黏土,未施用过苄嘧磺隆等除草剂。取样时去掉表层土,将土样去除杂物后风干待用。

LB 培养基:酵母浸出物 5.0 g,蛋白胨 10.0 g, NaCl 5.0 g, pH 7.0。TY 培养基:酵母浸出物 3.0 g,蛋白胨 5.0 g, CaCl₂ 0.6 mmol/L, pH 7.2。无机盐培养基: NH₄Cl 1.0 g, KH₂PO₄ 0.5 g, K₂HPO₄ 1.5 g, NaCl 1.0 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, pH 7.0。发酵培养基:葡萄糖 9.0 g,蛋白胨 3.0 g, KH₂PO₄ 0.9 g, MgSO₄·7H₂O 0.4 g, NH₄Cl 0.8 g, NaCl 0.6 g, pH 7.0~7.2。以上分别添加去离子水定容至 1 L,固体培养基

加入 1.8% 的琼脂。

1.2 液体菌剂保护剂的筛选

1.2.1 保护剂的单因素试验 S113 菌种活化后挑取单菌落于液体 LB 中,30 °C、160 r/min 培养至对数生长期,按 1% 接种量接入发酵培养基进行发酵培养,作为发酵液。将发酵液分装至 100 ml 锥形瓶中,其他条件保持一致,分别添加柠檬酸钠、乙酸钠、糊精、羧甲基纤维素、KCl、CaCl₂ 等保护剂,使其终浓度分别为 1、2 和 3 g/L,对照将保护剂替换为等体积的无菌水,每组处理设 3 个重复,常温避光保存 30 d 后计算菌株存活提高率。存活提高率(%)=(处理组活菌数-对照组活菌数)/对照组活菌数×100。

1.2.2 保护剂最佳组合的筛选 根据单因素试验的结果,将优化出的保护剂分为 3 类:A,有机物(柠檬酸钠和乙酸钠);B,稳定剂(糊精和羧甲基纤维素);C,无机盐(KCl 和 CaCl₂),作为 3 个因素,每类保护剂选择上述两种物质作为两个水平,进行三因素两水平 L₄(2³)的正交试验。

1.2.3 保护剂组合的最佳浓度筛选 根据三因素两水平试验筛选出的最佳保护剂组合,选择 3 种保护剂(A:柠檬酸钠;B:羧甲基纤维素;C:CaCl₂)作为 3 种因素,每种保护剂设置 3 个终浓度作为 3 种水平,进行三因素三水平 L₉(3³)正交试验筛选最佳使用浓度组合。

1.3 液体菌剂对除草剂的降解效果

将优化出的 4 个最佳保护剂组合分别添加到 S113 发酵液中,常温避光保存 30 d 后,按 2% 接种量加入到终浓度 50 mg/L 苄嘧磺隆的 20 ml 无机盐培养基中,30 °C、160 r/min 培养 3 d 后,使用 HPLC 测定苄嘧磺隆浓度,并计算降解率。高效液相色谱条件:色谱柱为 Thermo scientific Acclaim™ 120 C₁₈(4.6 mm × 250 mm),流动相为乙腈和水(V/V=60/40,水中加入 1% 乙酸),柱温 40 °C,流速 1 ml/min,检测波长 280 nm,进样量 20 μl。降解率(%)=(苄嘧磺隆初试浓度-终浓度)/初始浓度×100。

1.4 液体菌剂的保存效果

将优化出的最优保护剂组合添加至 S113 发酵液中,常温保存 30、60 d 后进行梯度稀释涂布,培养 3 d 后计算活菌数。

1.5 固体菌剂载体的筛选

1.5.1 不同载体对菌株生长的影响 S113 菌液以 2% 接种量接入 100 ml TY 液体发酵培养基中,30 °C、160 r/min 培养至对数生长期。菌液 5 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,用无菌水洗涤 3 次重悬菌体,

作为种子液。各取 2 g 载体加入 20 ml 灭菌水, 30 ℃、160 r/min 摇床振荡 24 h, 得到载体悬浊液。将 100 μl S113 种子液接种至 5 ml 载体悬浊液中, 再次振荡培养, 于第 2、4 天取样测定不同载体处理下的活菌数, 试验设置 3 个平行, 判断载体对菌株生长的影响。

1.5.2 固体菌剂有效菌释放率的测定 称取各固体菌剂 2 g 至含有 18 ml 无菌水的灭菌三角瓶中, 涡旋混匀后进行梯度稀释, 取 100 μl 均匀涂布于固体 LB, 培养并计算有效菌释放率。有效菌释放率(%)=固体菌剂释放的有效菌数量/初始接种菌数量(cfu)×100。

1.6 固体菌剂的保存效果

将各固体菌剂常温保存 30、60 d, 对其分别进行稀释涂布, 30 ℃ 培养 3 d 后测定活菌数。

1.7 固体菌剂对除草剂的降解效果

供试土壤中加入苄嘧磺隆使其含量为 10 mg/kg, 充分混匀后常温静置 5 h, 将固体菌剂以质量比 1 : 9 与上述土壤充分混匀, 装入黑色塑料杯中置于光照培养箱, 培养条件为: 光照 12 h、温度 26 ℃, 黑暗 12 h、温度 20 ℃(24 h 交替进行)。通过补加水分调节土壤含水量为 25%~30%, 在第 1、3、5 和 7 天分别取 5 g 土样检测苄嘧磺隆残留量。同时设置不加固体菌剂的对照组, 对照与处理均设 3 个重复。

1.8 固体菌剂的应用

分别称取 500 g 供试土壤于 0.7 L 盆钵中, 玉米种子消毒萌发后, 挑取长势一致的 3 颗发芽种子移栽至盆钵, 设置正常土壤空白对照、10 mg/kg 苄嘧磺隆、10 mg/kg 苄嘧磺隆+10% 固体菌剂的 3 组处理, 置于培养箱中如步骤 1.7 中所述条件培养, 期间补加水分调节土壤含水量为 25%~30%, 第 14 天随机取样, 测定根长、茎叶长、鲜重等生理指标。

1.9 数据统计与分析

使用 Microsoft Excel™ 软件对数据初步处理, 采用 IBM SPSS statistical Ver. 25.0 进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 液体菌剂保护剂的筛选

2.1.1 保护剂的单因素试验 如表 1 所示, 各保护剂在各浓度梯度均能不同程度地提高菌株存活率。保护剂有效使用浓度与存活提高率呈正相关, 各保护剂均在浓度为 3 g/L 时效果最佳, 1 g/L 的使用浓度时活菌提高率均在 10% 以下。其中, 3 g/L 的 KCl 对 S113 的存活提高率最高, 为 24.71%。

2.1.2 保护剂最佳组合的筛选 如表 2, 通过分析极差 R 值发现各因素对菌株 S113 存活提高率的影响

作用顺序为: C>B>A, 即无机盐的影响较为显著, 稳定剂和有机物影响程度次之。综合分析 3 种因素的 k 值, 其最优水平是 A₁B₂C₂, 即与其他物质组合相比, 柠檬酸钠、羧甲基纤维素、CaCl₂ 组合对菌株生长影响最大。由活菌提高率结果可知, 该组合对菌株保护效果最佳, 为 26.57%。因此, 选择该组合作为最佳保护剂组合开展后续浓度配比的研究。

表 1 液体菌剂保护剂对菌株 S113 的影响
Table 1 Effects of liquid fungicide protectants on strain S113

保护剂	有效使用浓度(g/L)	存活提高率(%)
CaCl ₂	1	4.33 ± 0.99
	2	15.29 ± 1.57
	3	23.53 ± 1.85
KCl	1	3.98 ± 0.84
	2	16.47 ± 1.62
	3	24.71 ± 1.94
乙酸钠	1	2.19 ± 0.53
	2	7.53 ± 1.18
	3	7.56 ± 1.22
柠檬酸钠	1	3.20 ± 0.72
	2	5.88 ± 1.04
	3	10.59 ± 1.35
糊精	1	5.62 ± 1.42
	2	18.82 ± 1.74
	3	22.35 ± 1.99
羧甲基纤维素	1	3.88 ± 0.93
	2	8.82 ± 1.53
	3	14.71 ± 1.62

表 2 菌株 S113 液体菌剂保护剂最佳物质组合正交表
Table 2 Orthogonal test table for substance combination of S113 liquid fungicide agent

组合	因素			存活提高率(%)
	A	B	C	
1	柠檬酸钠	糊精	KCl	14.00
2	柠檬酸钠	羧甲基纤维素	CaCl ₂	26.57
3	乙酸钠	糊精	CaCl ₂	22.29
4	乙酸钠	羧甲基纤维素	KCl	14.86
k ₁	20.29	18.15	14.43	
k ₂	18.58	20.72	24.43	
R	1.71	2.57	10.00	
优水平	A ₁	B ₂	C ₂	
主次顺序	C>B>A			

2.1.3 保护剂组合的最佳浓度筛选 不同的浓度组合对 S113 活菌数的提高效果差异明显。由表 3, 各因素间的主次顺序为: A>B>C, 最优水平为 A₃B₂C₁, 即 3 g/L 的柠檬酸钠、2 g/L 的羧甲基纤维

表 3 菌株 S113 液体保护剂的浓度组合正交表
Table 3 Concentration combination orthogonal test table of strain S113 liquid protective agent

组合	因素			存活提高率(%)
	A	B	C	
1	1 g/L 柠檬酸钠	1 g/L 羧甲基纤维素	1 g/LCaCl ₂	27.65
2	1 g/L 柠檬酸钠	2 g/L 羧甲基纤维素	2 g/LCaCl ₂	26.86
3	1 g/L 柠檬酸钠	3 g/L 羧甲基纤维素	3 g/LCaCl ₂	30.98
4	2 g/L 柠檬酸钠	1 g/L 羧甲基纤维素	2 g/LCaCl ₂	20.39
5	2 g/L 柠檬酸钠	2 g/L 羧甲基纤维素	3 g/LCaCl ₂	26.20
6	2 g/L 柠檬酸钠	3 g/L 羧甲基纤维素	1 g/LCaCl ₂	19.20
7	3 g/L 柠檬酸钠	1 g/L 羧甲基纤维素	3 g/LCaCl ₂	26.27
8	3 g/L 柠檬酸钠	2 g/L 羧甲基纤维素	1 g/LCaCl ₂	37.25
9	3 g/L 柠檬酸钠	3 g/L 羧甲基纤维素	2 g/LCaCl ₂	24.90
<i>k</i> ₁	28.50	24.77	28.03	
<i>k</i> ₂	21.93	30.10	24.05	
<i>k</i> ₃	29.47	25.03	27.82	
<i>R</i>	7.54	5.33	3.98	
优水平	A ₃	B ₂	C ₁	
主次顺序	A>B>C			

素和 1 g/L 的 CaCl₂。且该浓度组合下的菌株存活提高率为 37.25%，保护效果最佳。由此确定该浓度组合为 S113 液体菌剂保护剂的最佳使用浓度组合。

2.2 液体菌剂对除草剂的降解效果

将在上述浓度筛选试验中存活提高率较高的保护剂浓度组合 1、2、3 和 8 进行苄嘧磺隆降解效果验证。如图 1，加入 4 种保护剂保存 30 d 后的 S113 液体菌剂对苄嘧磺隆的降解效果均高于对照组，降解率均达到 80%左右，由此可见，提高活菌数可有效提高降解菌剂的降解效果。其中，组合 2 对苄嘧磺隆降解率最高，达 94.25%，组合 8 对苄嘧磺隆降解率为 79.49%。综合考虑液体菌剂的活菌数与降解率，认为组合 8 为 S113 液体菌剂的最佳保护剂组合。

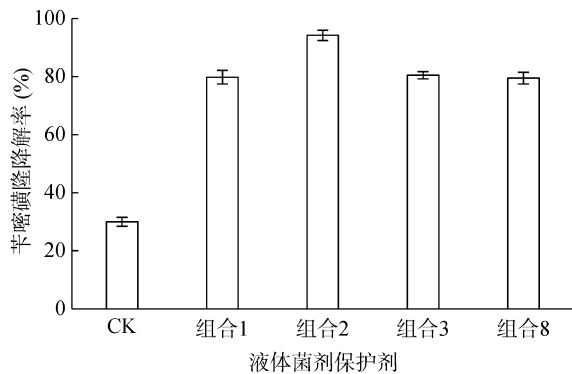


图 1 不同保护剂组合对苄嘧磺隆的降解效果
Fig. 1 Degradation of different protective agent combinations on bensulfuron-methyl

2.3 液体菌剂的保存效果

对已筛选出的最佳保护剂组合 8 进行 S113 液体菌剂的保存试验。如图 2，在没有保护剂的情况下，活菌数在 30 d 内即出现明显下降，由 10⁹ cfu/ml 下降至 10⁴ cfu/ml。而随着保存期的延长，添加了 3 g/L 柠檬酸钠、2 g/L 羧甲基纤维素和 1 g/L CaCl₂ 保护剂的液体菌剂仍保持较高的生物量，60 d 活菌数仍达到 4.53×10⁷ cfu/ml。筛选得到液体菌剂的最佳保护剂组合，可以在储存期内将活菌数维持在较高水平，从而延长液体降解菌剂的货架期，确保其在有效期内施用的降解效果。

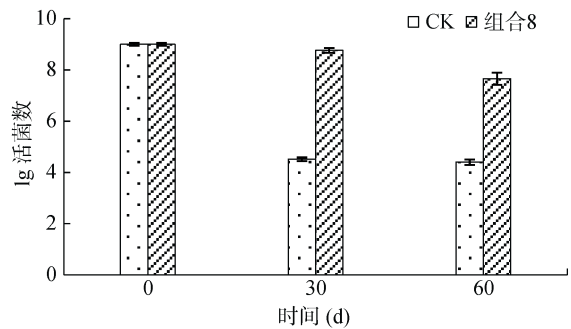


图 2 S113 液体菌剂储存期内活菌数变化
Fig. 2 Numbers of viable liquid bacteria of S113 in storage

2.4 固体菌剂载体的筛选

2.4.1 不同载体对菌株的影响 如图 3，向各载体中接种 S113 后，菌株均可生存及繁殖。储存 4 d 后发现猪粪有机肥载体中所含活菌数最高，达到

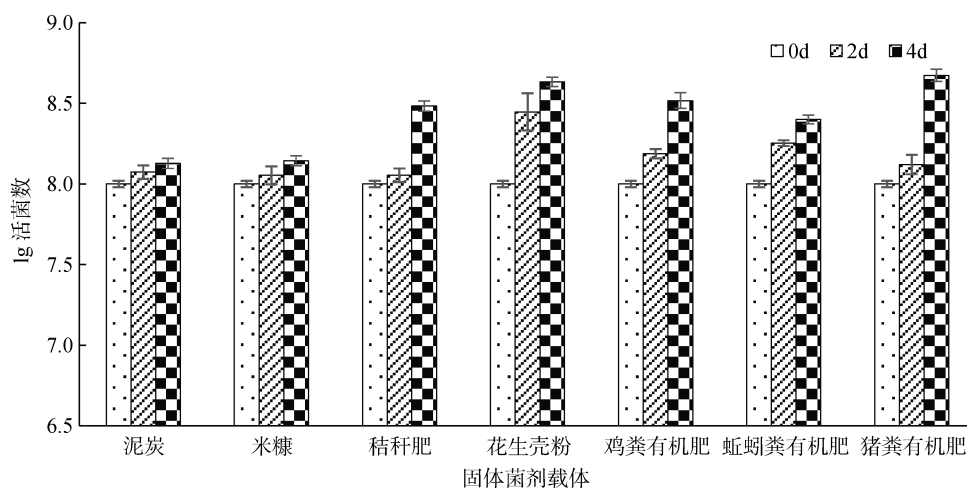


图3 不同载体对菌株 S113 生长的影响

Fig. 3 Effects of different vectors on growth of strain S113

4.73×10^8 cfu/g, 米糠和泥炭所含活菌数较少, 为 1.35×10^8 cfu/g 左右。猪粪有机肥等载体本身含有其他类型载体无法提供的丰富有机质, 可以为菌体生长提供良好的环境和营养, 以便后续试验的开展。研究表明, 有机肥配合微生物菌剂的施用模式不仅能够达到降解效果, 还能部分替代化肥, 减少环境污染^[18]。

2.4.2 固体菌剂有效菌释放率的测定 固体菌剂中微生物的释放率决定了菌剂能否最大化地发挥效

用, 是除活菌数之外衡量固体菌剂质量的重要指标。如图 4, 猪粪有机肥载体的有效菌释放率最高, 为 96.67%, 秸秆肥的有效菌释放率最低, 仅为 33.70%。猪粪有机肥作为载体不仅活菌数最高, 其释放率也最好, 认为可作为固体菌剂载体的最佳候选。可以看出, 同一菌种在不同载体中的释放量存在明显差异, 释放量过低可能是由于载体内部微孔结构中可利用的有效营养物质太少而导致微生物无法生存。

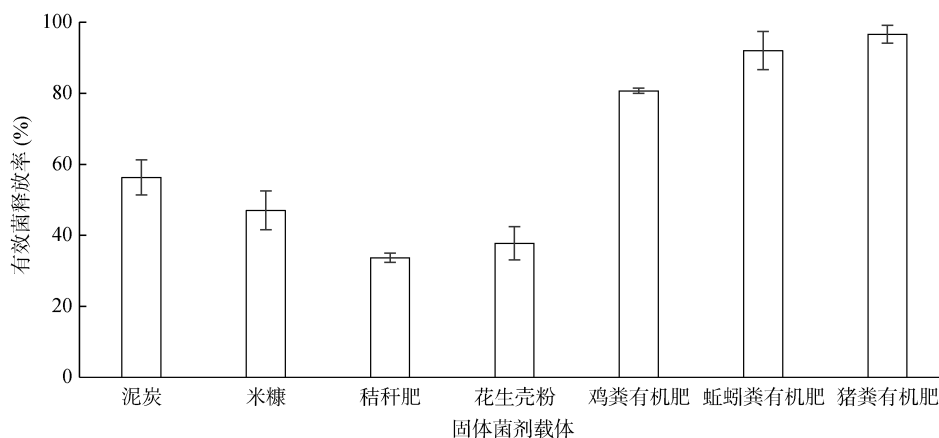


图4 不同载体中菌株 S113 的有效菌释放率

Fig. 4 Effective bacterial release rates of strain S113 in different carriers

2.5 固体菌剂的保存效果

菌剂载体是微生物生存的微环境, 合适的载体通过改变其传质特性以保持微生物活性。如图 5 所示, 随着固体菌剂储存期的延长, 几种载体中的活菌数均呈现不同程度的下降趋势。30 d 和 60 d 时, 活菌保存效果最好的均为猪粪有机肥, 所含 S113 活菌数均保持在 10^7 cfu/g 以上。活菌数作为评估固体菌剂质量的首要指标, 在后续的降解试验和应用中都将优先考虑。

2.6 固体菌剂对除草剂的降解效果

图 6 为保存 30 d 后的各固体菌剂对苄嘧磺隆的 7 d 内降解情况。添加各固体菌剂后, 土壤中苄嘧磺隆降解率均明显上升。在相同条件下 CK 降解率只能达到 13.86%, 而 4 组固体菌剂的 7 d 降解率都高于 80%, 其中以猪粪有机肥为载体的固体菌剂降解效果最优, 为 91.22%。综合考虑保存期活菌数和降解效果, 选择以猪粪有机肥为载体的固体菌剂开展后续初步应用。

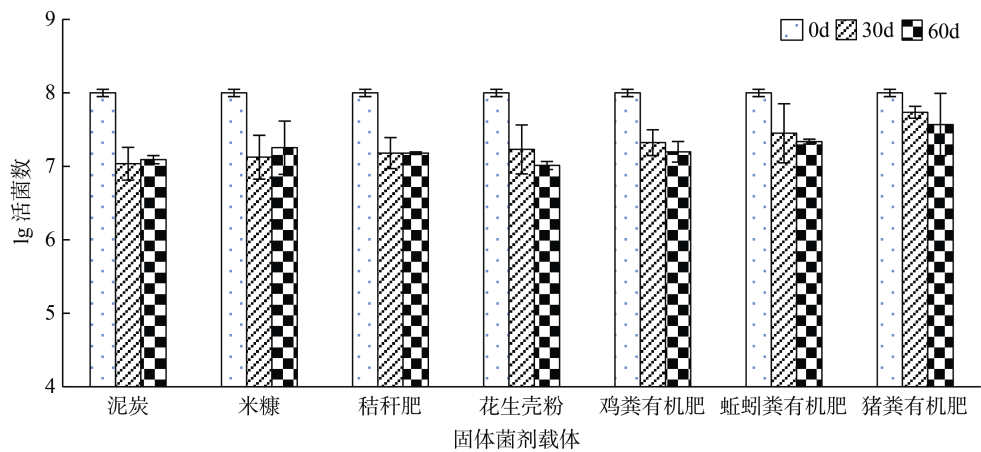


图 5 S113 固体菌剂不同载体的活菌数变化
Fig. 5 Changes in viable counts of strain S113 in different carriers

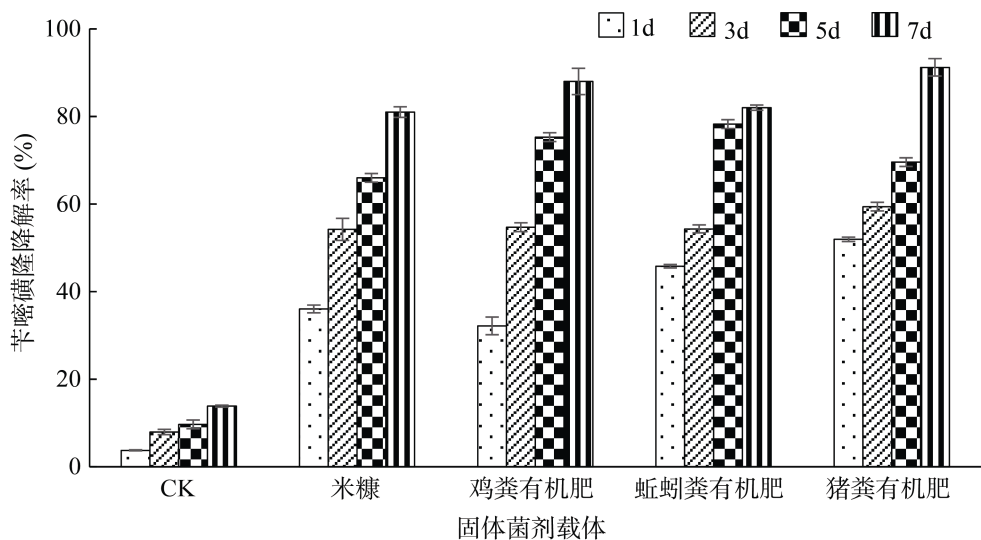


图 6 S113 固体菌剂对卡啉磺隆的降解
Fig. 6 Degradation of bensulfuron methyl by strain S113 solid microbial agents

2.7 固体菌剂的应用

由表 4 可知，除草剂对玉米产生了持续的药害，除草剂处理组在培养期内玉米根系长度、茎叶长度等指标均显著低于其他处理。向含有除草剂残留的盆钵中加入固体菌剂，14 d 后，作物各生理指标与 CK 相近，认为施加固体菌剂可有效降解土壤中除草剂残留，减轻作物所受药害。

表 4 S113 固体菌剂对玉米除草剂药害的解除作用 Table 4 Effect of S113 solid bacterial agent on bensulfuron-methyl toxicity to maize			
处理	根系长度(cm)	茎叶长度(cm)	植株鲜物质量(g)
CK	14.60 ± 2.14 a	19.38 ± 3.37 a	1.07 ± 0.75 a
除草剂	5.41 ± 0.36 b	8.11 ± 2.29 b	0.73 ± 0.33 b
固体菌剂 + 除草剂	13.63 ± 0.61 a	17.48 ± 1.50 a	0.91 ± 0.44 a

注：同列小写字母不同表示处理间差异达 $P<0.05$ 显著水平 (邓肯检验)。

3 讨论

微生物液体菌剂因其制备工艺简单、易于喷施、生产成本低等特点被广泛应用于畜牧业、废水处理、水产养殖中。液体菌剂中的微生物活性主要受温度、紫外线照射和杂菌污染等因素影响，在微生物液体菌剂中添加保护剂有利于菌体的代谢和生存。筛选出的液体菌剂保护剂中，柠檬酸钠属于典型的防腐剂，也称抑菌剂。抑菌剂的作用原理一方面是借助本身的亲油性，阻碍细胞膜对氨基酸的吸收；另一方面可以通过调节环境 pH，抑制微生物的呼吸酶活性，起到防腐作用^[19]。试验表明，将柠檬酸钠控制在合理范围时，对 S113 菌株的生长代谢并未产生抑制作用，可以作为 S113 菌株的菌剂保护剂。研究表明微生物失活的根本原因在于，菌体与外界环境直接接触

后,空气或水中的氧激活酶活性中心,产生羟自由基和超氧阴离子,发生氧化还原反应破坏细菌细胞的代谢增殖^[20-21]。筛选出的羧甲基纤维素充当稳定剂成分,可以在菌体周围形成一层以纤维素多糖为主要成分的抗氧化保护膜,避免菌体直接暴露于环境而迅速失活。 CaCl_2 能够通过调节细胞渗透压维持酶结构及功能,缓解外界环境对菌体产生的胁迫,达到保护目的^[22]。此外,诸多研究表明,添加钙离子可以有效降低细菌细胞壁损伤程度,通过增加细胞膜的不饱和脂肪酸含量以保持膜的流动性和通透性,从而提高细菌存活率、增强贮藏稳定性^[23-24]。本研究中,柠檬酸钠、羧甲基纤维素和 CaCl_2 在 3 个不同的层面保护 S113 菌体,三者协同互补,以延长液体菌剂储存期。

微生物资源的剂型化是高效利用微生物及其代谢产物的重要方式。微生物菌剂的主要成分是活体生物,只有保证高生物量和生物活性的前提下,才能在真正施用达到理想的降解效果^[25]。本研究表明,S113 固体菌剂最佳载体猪粪有机肥在活菌数和有效菌释放率指标方面均最高,菌剂保存试验和苄嘧磺隆降解试验中同样表现良好。此外,猪粪有机肥是无害化处理出料后经高温发酵生产出的安全、优质有机肥料,不仅作为微生物菌剂的良好载体,而且含有丰富的可溶性有机质,能够部分替代化肥,提高作物氮素、磷素、速效钾等利用率^[26]。在微生物菌剂载体的筛选过程中,同一载体对于不同性质的微生物的生物相容性可能相去甚远,因此菌剂最佳载体的选择往往需要具体分析两者的匹配程度^[27]。

目前,微生物固体菌剂已广泛应用于农业生产中,在改善作物生长、提高产量、增加作物抗逆性等方面效果显著。微生物菌剂在田间施用时,需要在一定的浓度范围内有效定殖并建立起优势种群才能发挥其生物作用^[28]。活菌数、制剂类型、性质和贮存条件以及田间环境等诸多因素影响农微生物制剂的应用,科学合理地评价这些影响,并研究其形成原因和内在规律,有益于微生物制剂的深入研究开发,本研究为利用不同类型微生物制剂修复苄嘧磺隆污染土壤提供了理论基础和应用依据。

4 结论

苄嘧磺隆降解菌 S113 液体菌剂添加合适的保护剂(3 g/L 柠檬酸钠、2 g/L 羧甲基纤维素、1 g/L CaCl_2)后,活菌数提高 37.25%,保存 30 d 对 50 mg/L 苄嘧

磺隆的降解率为 94.25%,保存 60 d 活菌数仍达 4.53×10^7 cfu/ml。筛选得到固体菌剂的最佳载体为猪粪有机肥,保存 60 d 活菌数为 7.45×10^7 cfu/g,对土壤中 10 mg/kg 苄嘧磺隆的降解率为 91.22%。玉米苗期试验表明,苄嘧磺隆残留对玉米生长产生严重药害,添加固体菌剂可有效减轻药害作用。

参考文献:

- [1] Kniss A R. Long-term trends in the intensity and relative toxicity of herbicide use[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 14865.
- [2] Medo J, Hricáková N, Maková J, et al. Effects of sulfonylurea herbicides chlorsulfuron and sulfosulfuron on enzymatic activities and microbial communities in two agricultural soils[J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2020, 27(33): 41265–41278.
- [3] Bourdineaud J P. Toxicity of the herbicides used on herbicide-tolerant crops, and societal consequences of their use in France[J]. *Drug and Chemical Toxicology*, 2022, 45(2): 698–721.
- [4] 黄顶成, 尤民生, 侯有明, 李志胜. 化学除草剂对农田生物群落的影响[J]. *生态学报*, 2005, 25(6): 1451–1458.
- [5] Hikosaka M, Iwahashi F, Yamato S. Metabolomic analysis of *Schoenoplectus juncoideus* reveals common markers of acetolactate synthase inhibition among paddy weeds[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2021, 174: 104827.
- [6] 孙兰兰, 徐洪乐, 苏旺苍, 等. 苄嘧磺隆土壤残留对 4 种作物的敏感性及其药害早期诊断[J]. *农药*, 2019, 58(10): 737–740.
- [7] 李顺鹏, 蒋建东. 农药污染土壤的微生物修复研究进展[J]. *土壤*, 2004, 36(6): 577–583.
- [8] 赵玲, 滕应, 骆永明. 中国农田土壤农药污染现状和防控对策[J]. *土壤*, 2017, 49(3): 417–427.
- [9] Zhao W Y, Gu J, Wang X J, et al. Effects of shrimp shell powder on antibiotic resistance genes and the bacterial community during swine manure composting[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 752: 142162.
- [10] 徐铭阳, 卢家森, 孟献雨, 等. 多菌灵降解菌 djl-6 和啮虫脒降解菌 D-2 固体菌剂的研发[J]. *土壤*, 2021, 53(2): 329–335.
- [11] 尹子君, 李秀芬, 任月萍. 多孔淀粉固定化堆肥用微生物菌剂的制备条件优化及其堆肥效果验证[J]. *环境工程学报*, 2021, 15(10): 3334–3344.
- [12] Ramos Yacasi G R, Calpena Campmany A C, Egea Gras M A, et al. Freeze drying optimization of polymeric nanoparticles for ocular flurbiprofen delivery: Effect of protectant agents and critical process parameters on long-term stability[J]. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2017, 43(4): 637–651.
- [13] 毛林强, 郭惠娟, 薛静静, 等. 干粉菌剂保护剂对溶藻菌溶藻效果与稳定性能的影响[J]. *环境化学*, 2019, 38(12): 2819–2825.
- [14] Yin Y N, Gu J, Wang X J, et al. Effects of copper on the

- composition and diversity of microbial communities in laboratory-scale swine manure composting[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2018, 64(6): 409–419.
- [15] 李月月. 液态好氧堆肥复合微生物菌剂的研发及应用[D]. 无锡: 江南大学, 2020.
- [16] Guo Q, Shi M D, Chen L, et al. The biocontrol agent *Streptomyces pactum* increases *Pseudomonas koreensis* populations in the rhizosphere by enhancing chemotaxis and biofilm formation[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2020, 144: 107755.
- [17] Huang X, He J, Sun J Q, et al. Isolation and characterization of a metsulfuron-methyl degrading bacterium *Methylopila* sp. S113[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2007, 60(3): 152–158.
- [18] 李娜, 刘睿, 台培东, 等. 植物-固定化菌剂联合修复多环芳烃污染土壤[J]. *应用生态学报*, 2021, 32(8): 2982–2988.
- [19] Bargaz A, Lyamlouli K, Chtouki M, et al. Soil microbial resources for improving fertilizers efficiency in an integrated plant nutrient management system[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1606.
- [20] Hang B J, Hong Q, Xie X T, et al. SulE, a sulfonylurea herbicide de-esterification esterase from *Hanschlegelia zhihuaiae* S113[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(6): 1962–1968.
- [21] Li Z F, Liu Y, Xie J, et al. Impact of microecological agents on water environment restoration and microbial community structures of trench system in a Baiyangdian wetland ecosystem[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2022, 132(3): 2450–2463.
- [22] 宋福强, 程蛟, 常伟, 等. 黑土农田施加 AM 菌剂对大豆根际菌群结构的影响[J]. *土壤学报*, 2015, 52(2): 390–398.
- [23] Krusong W, Kerdpiroon S, Jindaprasert A, et al. Influence of calcium chloride in the high temperature acetification by strain *Acetobacter aceti* WK for vinegar[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2015, 119(5): 1291–1300.
- [24] 钟磊, 卿晋武, 陈红云, 等. 微生物修复石油烃土壤污染技术研究进展[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(10): 3636–3652.
- [25] 马永强, 朱海霞. 具有除草活性的生防菌株 GD-9 发酵条件优化及菌剂制备[J]. *植物保护*, 2019, 45(3): 88–95.
- [26] 孙杨, 王璐, 赵璐, 等. 复合微生物菌肥对苹果再植病害调控及对根围土壤真菌群落结构的影响[J]. *植物病理学报*, 2022, 52(2): 256–268.
- [27] 王志刚, 爱德华, 张颖, 等. 阿特拉津土壤污染修复菌剂载体材料的筛选与应用[J]. *环境工程学报*, 2014, 8(8): 3487–3494.
- [28] Geng Q Q, Li T, Wang X, et al. The mechanism of bensulfuron-methyl complexation with β -cyclodextrin and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and effect on soil adsorption and bio-activity[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 1882.