

陈锐, 门欣, 瞿佳, 孙晓宇, 赵玲侠. 微生物菌剂 W55 修复多菌灵污染土壤研究 [J]. 广东农业科学, 2021, 48(7): 92–102.

微生物菌剂 W55 修复多菌灵污染土壤研究

陈 锐, 门 欣, 瞿 佳, 孙晓宇, 赵玲侠

(陕西省微生物研究所微生物菌种资源研究中心, 陕西 西安 710043)

摘要:【目的】评估多菌灵降解菌致密链格孢 WJD-55 在棚室土壤中的应用效果及其安全性。【方法】在设施棚室土壤中添加多菌灵并施用由降解菌 WJD-55 制备的菌剂 W55, 栽种番茄作为观测作物, 进行为期 50 d 的土壤修复试验, 同时监测土壤中残留多菌灵、菌剂微生物 WJD-55 定殖及土壤真菌群落的变化, 以及土壤理化性质变化, 观测作物生长等指标, 从而评估菌剂 W55 在棚室土壤施用效果及其安全性。【结果】初始土壤中多菌灵质量浓度约 42 mg/kg, 菌剂使用量 0.1%, 药后第 10 天, 土壤中多菌灵质量浓度为 9.27 mg/kg、下降 78%, 而对照土壤中多菌灵质量浓度为 30.2 mg/kg、下降 29%, 差异极显著 (T -test, $P=0.001$) ; 土壤微生物高通量测序结果显示, 降解菌 WJD-55 可在污染土壤中定殖, 弥补多菌灵对土壤微生物多样性产生的负面影响; 土壤理化指标显示, 菌剂的加入未对土壤物理化学性质带来显著影响; 观测作物番茄生长未受到菌剂的影响, 降解菌 WJD-55 未对番茄叶片等造成病害。【结论】多菌灵降解菌致密链格孢 WJD-55 可在土壤中稳定定殖并有效发挥降解多菌灵的作用, 迅速降低土壤残留多菌灵含量, 可改善污染土壤真菌微生物多样性, 对土壤理化性质及番茄作物生长无不良影响。

关键词:真菌; 多菌灵; 链格孢; 生物降解; 污染修复

中图分类号: S481⁺.8; X53

文献标志码: A

文章编号: 1004-874X (2021) 07-0092-11

Study on Remediation of Carbendazim-contaminated Soil by Microbial Agent W55

CHEN Rui, MEN Xin, QU Jia, SUN Xiaoyu, ZHAO Lingxia

(Microbial Resources Research Center, Shaanxi Province Institute of Microbiology, Xi'an 710043, China)

Abstract:【Objective】The study was carried out to verify the application effect and safety of carbendazim degrading strain *Alternaria compacta* WJD-55 in greenhouse soil.【Method】Carbendazim was added to the greenhouse soil and microbial agent W55 made with WJD-55 were applied at same time, and tomatoes were cultivated for observation. The changes of the remaining carbendazim, colonization of WJD-55 and soil fungal community, soil physical and chemical properties and planting growth of tomatoes were monitored during 50 days of remediation, with a view to evaluate the application effect of microbial agent W55 and its safety.【Result】The carbendazim content in initial soil about 42 mg/kg and the application amount of the agent was 0.1%. After treatment for 10 days, carbendazim residual was 9.27 mg/kg, with a decrease of 78% . While in control soil, carbendazim residual was about 30.2 mg/kg, with a decrease of 29%. There was extremely significant difference (T -test, $P=0.001$) between two groups. High throughput sequencing of soil microorganism showed that WJD-55 could colonize in soil stably, which rescued the negative impacts of carbendazim on microbial diversity. The physical and chemical indexes of soil showed the microbial agent W55 had no significant effect on soil physical and

收稿日期: 2021-04-21

基金项目: 陕西省科学院科技计划项目 (2018K-08, 2018NK-01)

作者简介: 陈锐 (1977—), 女, 博士, 副研究员, 研究方向为微生物资源、污染环境生物修复, E-mail: email4rui@163.com

chemical properties. The growth of tomato plant was not affected by the agent and WJD-55 showed no harm to the tomato leaves.【Conclusion】*Alternaria compacta* strain WJD-55 could colonize stably in soil and degrade carbendazim effectively, decrease the carbendazim content in soil rapidly, improve the fungal microorganism diversity of the contaminated soil, and has no negative effect on soil and plant.

Key words: fungi; carbendazim; *Alternaria*; biodegradation; pollution remediation

【研究意义】多菌灵是广泛使用的氨基甲酸甲酯类杀菌剂，残留农药会进入土壤或水体。已有研究表明，残留于土壤中的多菌灵可改变土壤酶活^[1]，影响土壤微生物菌群结构^[2]，降低土壤有机碳量^[3]，增加铵态氮及硝态氮量，改变土壤线虫、蚯蚓等无脊椎动物数量^[4]，引起脊柱动物氧化应激，引起免疫反应^[5]，产生生殖细胞毒性及神经细胞毒性^[6-7]。针对环境中多菌灵存在的潜在危害，研究学者提出利用微生物的生命代谢活动，在污染区域使用微生物菌剂，使污染物得以被吸收或分解^[8-9]。在污染土壤中使用生物修复法可加速污染物的降解，恢复自然环境，降低生态及农产品安全风险^[10]。【前人研究进展】国内已有报道筛选获得各类降解微生物菌株，包括芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)、木霉(*Trichoderma* sp.)、假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)、红球菌(*Rhodococcus* sp.)、产碱菌属(*Alcaligenes* sp.)、罗尔斯通氏菌(*Ralstonia* sp.)等，摇瓶中降解能力最高可达1 g/L，效率可达99%。朱凤晓等^[11]报道红平红球菌在土壤室内盆栽试验中，降解多菌灵质量浓度为200 mg/L，降解率达95.2%。在已报道的土壤试验中所使用的功能菌株部分属于条件致病菌，部分菌株存在存活时间短、使用条件苛刻等问题，难以规模化应用与开发。【本研究切入点】本研究前期从107株多菌灵耐受菌中筛选获得1株可高效降解多菌灵的菌株WJD-55，经HPLC验证其在沙氏液体培养基中(含多菌灵质量浓度500 mg/L)，120 h后可降解多菌灵67%，对照降解率3%，具有显著差异(T-test, $P=0.02$)。前期试验文献号。经形态观察及ITS测序，鉴定该菌为致密链格孢(*Alternaria compacta*)，回接试验验证该菌不具致病性。该菌株可产生孢子，孢子在室温条件下存活时间久，易储存，便于制剂及规模化应用。【拟解决的关键问题】为验证多菌灵降解菌WJD-55在棚室土壤中的应用效果，进行土壤农药残留、效能菌株定殖、土壤真菌菌群变化、土壤理化指标及作物生长的观测研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株为多菌灵降解菌致密链格孢(*Alternaria compacta*)WJD-55，用无菌生理盐水制备WJD-55菌株孢子液(10⁴个/mL)。麸皮稻壳固体培养基(麸皮300 g，稻壳300 g，水300 mL，豆粕1.12 g，葡萄糖5 g，大米粉2 g，植物油5 mL，115 ℃灭菌2 h)。

1.2 试验方法

1.2.1 菌剂W55制备 麸皮稻壳固体培养基灭菌后平摊于浅盘内，上覆4层无菌纱布，温度降至30 ℃以下进行接种；按照1%的接种量均匀接种，上覆4层无菌纱布，28 ℃静置培养，8 d后孢子充分形成。取出培养物后低温(<40 ℃)烘干约72 h。在粉碎机中以间歇模式进行粉碎至约0.250 mm大小。以粉碎物：麸皮：高岭土=1:5:4混合，搅拌均匀，获得固体粉状菌剂W55，菌剂自封袋分装，在常温条件下保存。

1.2.2 试验设计 田间试验于2020年4月7日至5月27日在陕西省西安植物园设施实验棚室内进行。划出4块长5 m、宽4 m试验地，设W55菌剂对照(菌剂W55用量400 g/m²)、W55-CA修复(菌剂W55用量400 g/m²，多菌灵50%可湿性粉剂0.9 kg，使土壤中多菌灵质量终浓度达到约50 mg/kg)、CA对照(多菌灵50%可湿性粉剂0.9 kg，使土壤中多菌灵质量终浓度达到约50 mg/kg)、空白对照(CK)4个处理。依照设计施入多菌灵及菌剂，翻耕均匀，深度约25 cm。处理后6 d栽种观测作物金鹏1号番茄苗，14株/行，6行/垄，每个地块栽种84株。日常棚室作物田间管理，每隔7~10 d浇水1次，栽后35 d搭设棚架。

1.2.3 土样采集 从施用菌剂开始作为0天，每隔10 d采集土样1次，至处理后50 d共采样6次。5点采样法取土，取土深度5~20 cm合并约1.5 kg

作为1份样，每块地采集土样3份作为平行，取样总数为72份。每次取样后立即分成2份，第1份取10 g左右，置于15 mL无菌离心管，-80 ℃冷冻保存，供土壤微生物多样性测定；余下土壤为第2份，4 ℃保存，供土壤理化指标及土壤中残留农药含量测定。

为观测多菌灵随灌溉水向土壤下层迁移的情况，处理后第10天起取W55-CA修复及CA对照地块20~40、40~60 cm深度土壤样本，每块地取3次合并为1份，每隔10 d取样1次，至处理后40 d结束取样，进行土壤中残留农药含量测定。

1.3 测定指标及方法

1.3.1 土壤残留多菌灵检测 (1) 土壤中多菌灵的提取：取待测土样自然风干，称取50 g于100 mL具塞三角瓶中，加入50 mL乙酸乙酯，振荡萃取30 min，保留上层萃取液。共萃取3次，合并滤液，真空旋转蒸发仪蒸发至干，分次加入稀盐酸(1+11)溶解吸出至20 mL容量瓶，稀盐酸(1+11)定容，待测。

(2) 0.02 mol/L磷酸钠缓冲液(pH=6.8)配制：取磷酸二氢钠1.38 g、磷酸氢二钠1.41 g溶于900 mL水中，用磷酸调pH至6.8，定容至1 L。

(3) HPLC检测：色谱柱依利特C₁₈柱，粒径5 μm，流动相：磷酸钠缓冲液+乙腈(80:20)，流速：1 mL/min，检测波长：286 nm，进样量：10 μL，柱温：25 ℃，测定多菌灵的残留量^[11]。

1.3.2 致密格链孢WJD-55在土壤中的定殖 分别称取W55对照、W55-CA处理、CA对照土壤样本5 g，加入45 mL无菌生理盐水，梯度稀释，涂布于含100 mg/L多菌灵的沙氏固体培养平板上，28 ℃培养48 h，观察平板上菌落的生长。挑取10个形态不同的真菌菌落至沙氏平板进行划线纯化（当平板上的真菌菌落合计不足10个则选取全部菌落）。待单一菌落形成后取菌体进行液氮研磨，提取基因组。使用ITS1、ITS4引物进行序列扩增并测序鉴定，统计致密格链孢被检出的次数。

1.3.3 土壤真菌多样性监测 将保存于-80 ℃的W55-CA处理、CA对照及CK3个地块处理后0、10、20、30、40 d的土壤样本，委托联川生物公司(Omicstudio)通过土壤微生物ITS V3-4区高通量测序分析土壤真菌多样性变化。

1.3.4 土壤理化指标监测 将W55对照、W55-CA修复处理、CA对照、CK处理的土壤样本送

至中国科学院水土保持研究所测定土壤含水量、含盐量、pH、NPOC、全氮、硝态氮、铵态氮、微生物氮、全磷、速效磷、速效钾、土壤团粒等土壤理化指标。

1.3.5 作物生长监测 从番茄种下第2天起开始测定番茄苗株高及叶片大小。随机选取5株番茄苗测定株高，随机选中段分枝5条测量第1叶片大小，观测叶片是否有异常色斑等病变。每隔10 d测定1次，至50 d结束。

2 结果与分析

2.1 致密链格孢WJD-55对土壤多菌灵残留量的影响

通过乙酸乙酯萃取及HPLC测定，结果如图1所示，初始掺入土壤的多菌灵质量浓度约42 mg/kg。处理后10 d，W55-CA修复处理多菌灵残留质量浓度为9.27 mg/kg、残留率22%，CA对照土壤多菌灵残留质量浓度为30.20 mg/kg、残留率71%，二者具有极显著差异(T-test, P=0.001)；处理后20 d，W55-CA修复处理多菌灵残留量为0，CA对照多菌灵残留质量浓度为11.84 mg/kg，残留率28%；处理后30 d，CA对照多菌灵残留质量浓度为2.15 mg/kg；处理后40 d，W55-CA修复处理及CA对照多菌灵残留量均为0。

在田间日常管理中需要定期给作物充分的灌溉，为了解土壤中多菌灵是否随灌溉的水分向下迁移至更深层的土壤中，对20~40、40~60 cm两

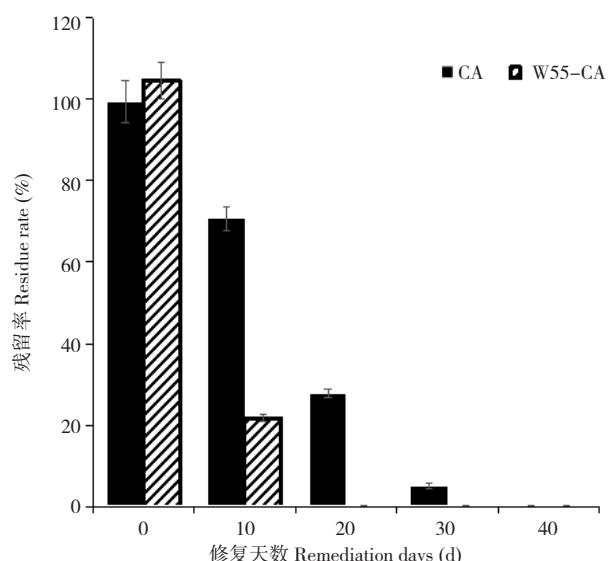


图1 表层5~20 cm土壤多菌灵残留率

Fig. 1 Residue rate of carbendazim in 5~20 cm soil

个深度的土壤进行残留多菌灵的测定。结果(表1)显示,处理后10、20 d,CA对照20~40、40~60 cm的土壤中均检出多菌灵残留,而W55-CA修复处理均为0,表明土壤中的多菌灵会随灌溉水向下迁移,施用修复菌剂W55后,可迅速降解土壤中的多菌灵,有效阻止其向更深层土壤迁移。

2.2 致密链格孢 WJD-55 在土壤中的定殖

表1 深层20~40、40~60 cm土壤中多菌灵的残留量

Table 1 Residue content of carbendazim in 20~40 cm and 40~60 cm soil

土层 Soil layer (cm)	处理 Treatment	多菌灵残留量 Carbendazim residue content (mg/kg)			
		处理后 10 d	处理后 20 d	处理后 30 d	处理后 40 d
20~40	CA	2.32 ± 0.45	1.03 ± 1.72	0	0
	W55-CA	0	0	0	0
40~60	CA	1.68 ± 3.36	0	0	0
	W55-CA	0	0	0	0

降解菌能否在土壤中定殖决定了其在土壤中能否有效发挥作用。为观测WDJ-55菌株在修复过程中在土壤中的定殖情况,尝试重新从土壤中分离培养可耐受多菌灵的真菌微生物,结果如图2所示,W55-CA修复处理的土壤真菌菌落较多,而W55对照真菌菌落形成数量不稳定,CA对照在处理后30、40、50 d有较少菌落形成。

挑取真菌菌落进行测序鉴定,结果如表2所示,W55-CA修复处理的土壤可持续检测出致密链格孢,而W55对照随修复天数有所降低,CA对照则一直未检出。初步确定致密链格孢W55可有效定殖于含多菌灵土壤而难以定殖于不含多菌灵土壤中。

在平板中已检测到一定数量的致密链格孢菌落生长,通过高通量测序分析可以更加准确地了解降解菌WDJ-55在土壤中的定殖情况。由图3可知,W55-CA修复处理的土壤链格孢属优势菌群,CA对照及CK有小比例链格孢属、应属于土壤本源链格孢属,而CA对照链格孢比例随天数降低,可见土壤本源链格孢属不耐受多菌灵,引入的菌剂WJD-55在土壤中可以稳定定殖直至修复后期。

2.3 致密链格孢 WJD-55 对土壤真菌多样性的影响

多菌灵作为一种微生物抑制剂,对土壤微生

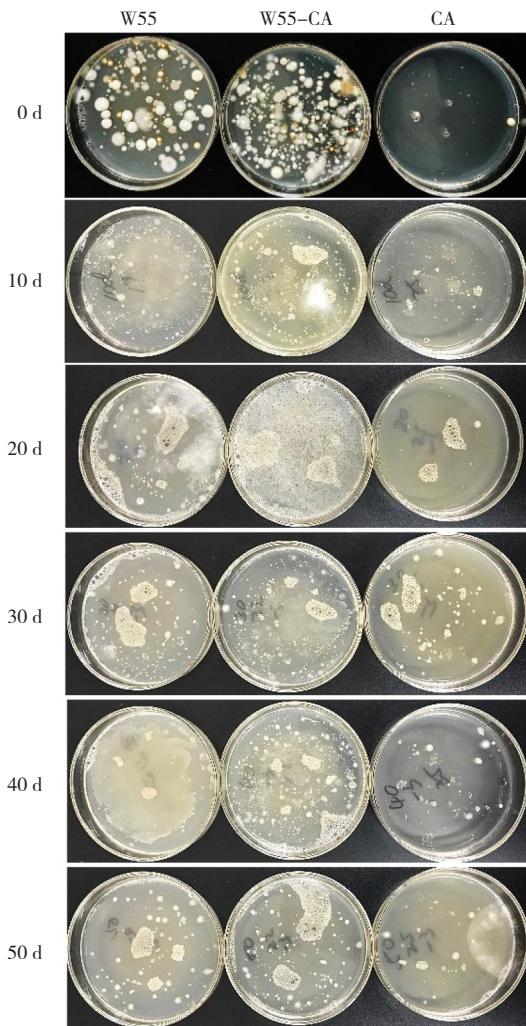


图2 致密链格孢 WDJ-55 在土壤中的定殖
Fig. 2 Colonization of *Alternaria compacta* WDJ-55 in soil

表2 致密链格孢测序检出情况

Table 2 Detection of *Alternaria compacta* in by sequencing

处理 Treatment	Number of detected <i>Alternaria compacta</i> colonies					
	0 d	10 d	20 d	30 d	40 d	50 d
W55	2/10	1/10	1/10	0/10	0/10	0/10
W55-CA	3/10	2/10	2/10	1/10	2/10	1/10
CA	0/3	0/5	0/4	0/10	0/7	0/5

物多样性的影响已有很多文献报道,通过高通量测序对土壤真菌菌群的变化进行观测,土壤真菌微生物 α -多样性如图4所示,施用多菌灵土壤的Chao1、Otus、Shannon、Simpson指数均比CK低,说明土壤真菌微生物丰富度及均匀度都显著降低,随着W55-CA修复天数的增加,W55-CA修复处理的土壤真菌微生物多样性比CA对照恢复快,说明菌剂的加入有利于污染土壤真菌微生物多样性的恢复。

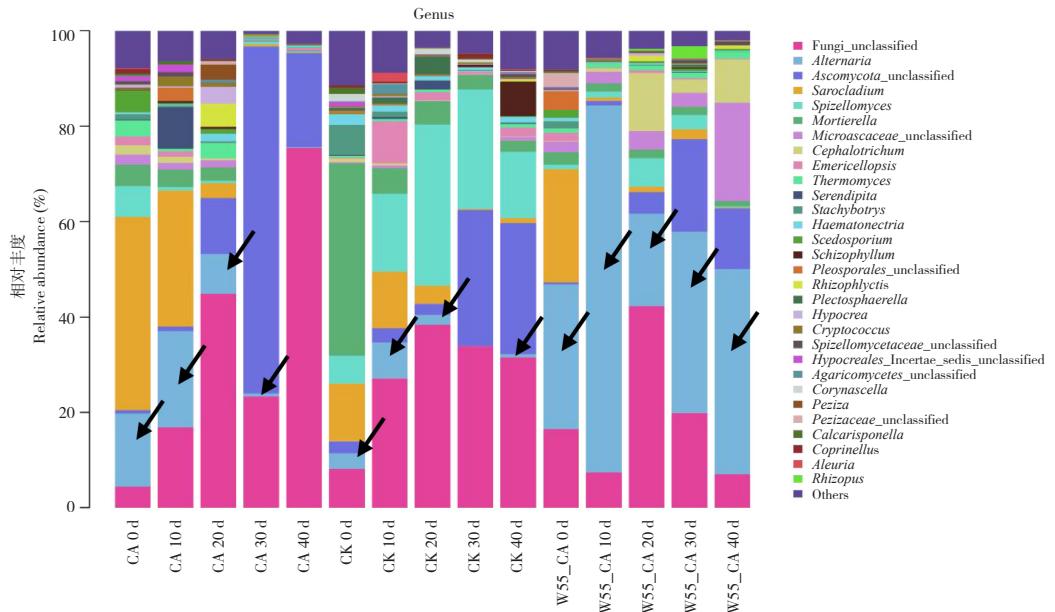


图 3 格链孢属在土壤中的相对丰度
Fig. 3 Relative abundance of *Alternaria* sp. in soil at genus level

物多样性的恢复。

土壤真菌微生物菌群组成差异变化如图 5 所示, CA 对照土壤真菌菌群多样性显著降低, 无法分类的类群比例逐渐增加, 至处理后 40 d, 土壤真菌接近 80% 的菌群成为无法分类类群, 表明多菌灵对土壤微生物群落有显著的影响; 而在加入多菌灵的土壤中施用菌剂, 多菌灵对土壤真菌菌群的影响则显著降低。

2.4 致密链格孢 WJD-55 对土壤理化指标的影响

5~20 cm 土层土壤的基本理化性质如表 3 所示, 由于在菌剂使用过程中引入了麸皮等有机物质, W55 对照、W55-CA 修复处理土壤的有机质、N、P、K 水平比 CA 对照和 CK 高, 分析认为这些指标的提高不是微生物菌株本身发挥的作用, 而可能是菌剂中的辅料提供了部分影响, 微生物 WDJ-55 对土壤性质产生影响的可能性较低。

2.5 致密链格孢 WJD-55 对作物生长的影响

由图 6 可知, W55-CA 修复处理、W55 对照、CA 对照、CK 对番茄植株及叶片的生长均无显著差异, 番茄叶片上未观察到有任何病变, 后期挂果及产果过程中也未观察到显著差异, 表明多菌灵及菌剂对作物生长无不良影响。

3 讨论

农药的广泛使用虽然减少了病害发生, 保证农作物产量, 但过度使用造成土壤残留对环境、

生态安全及人类健康产生负面影响。农药施用后, 未能及时自然降解的残留部分或被动植物吸收, 或残留于土壤、大气、地表、地下水 [12]。近年来在土壤 [13]、农产品 [14] 中广泛检出多菌灵残留, 在我国地表、地下水中检出的地域也极为广泛, 自北京、天津 [15] 直至太湖 [16]、黄浦江流域 [17] 都有报道, 且检出率几乎为 100%。

研究表明, 多菌灵是通过作用于真菌的 β 微管蛋白来发挥其杀菌作用, 敏感性由 β 微管蛋白对多菌灵的差异亲和力决定 [18]。但 β 微管蛋白广泛存在于所有真核生物, 并且进化较为保守, 因此多菌灵亦具有生殖毒性及神经毒性 [19-20], 通过阻滞植物细胞有丝分裂继而影响植物的正常生长 [21], 威胁自然生态中的鱼类、鼠类及昆虫的生存。对人类健康也会产生一定影响, 通过降低 G0/G1 期细胞的百分比诱导细胞凋亡 [22], 对肝细胞产生肝毒性损伤 [23], 慢性多菌灵暴露会引起肠道菌群失调和脂质代谢紊乱 [24]。多菌灵残留对于农业土壤影响最为显著, 它可以显著改变土壤细菌 [25] 及真菌的菌群结构 [26]。本研究中, 高通量测序结果显示微生物真菌的多样性受多菌灵的影响逐步降低, 无法分类的比例显著增加。在修复菌剂的作用下, 前期菌多样性有一定下降趋势, 而后逐步得以恢复, 但在处理后 40 d 尚未达到对照水平, 土壤具有抗性的真菌数量显著增加 [27], 耐药性病害真菌数量也显著增

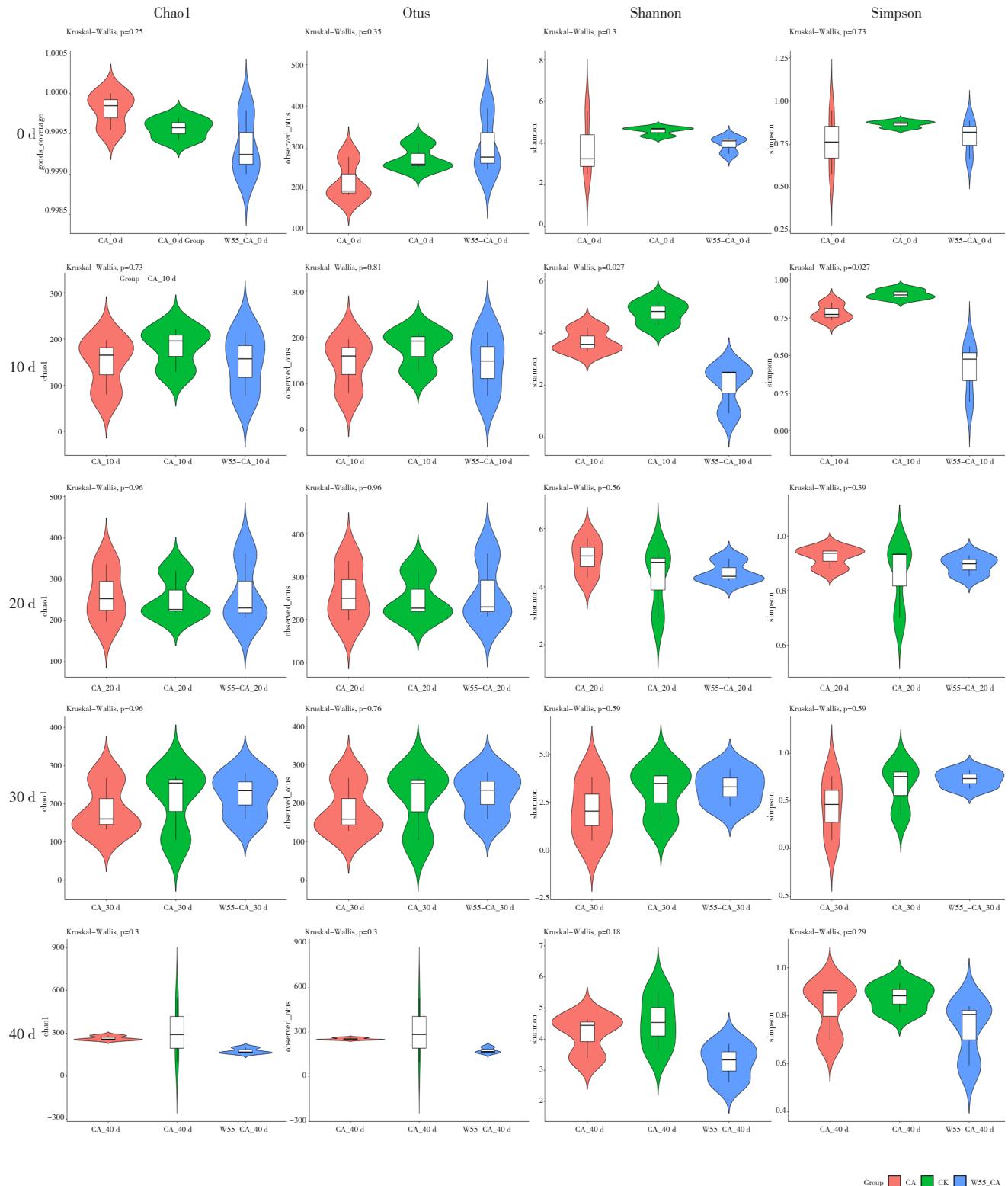


图 4 土壤真菌微生物多样性指数

Fig. 4 Diversity index of fungal microorganism in soil

加^[28-31]，并且由于多菌灵的存在增强了病害真菌的毒性^[32]。研究表明，通过宏基因组测序法对比温室和山区土壤样本，含有杀真菌剂的温室土壤比山区土壤具有更多样和丰富的抗杀菌剂基

因，并且温室土壤中的抗性基因多集中于肠杆菌中^[33]。本研究前期在多年设施棚室中也分离出大量的肠杆菌及其他条件致病菌。条件致病菌在土壤应用中会存在潜在安全问题，因此并不适合

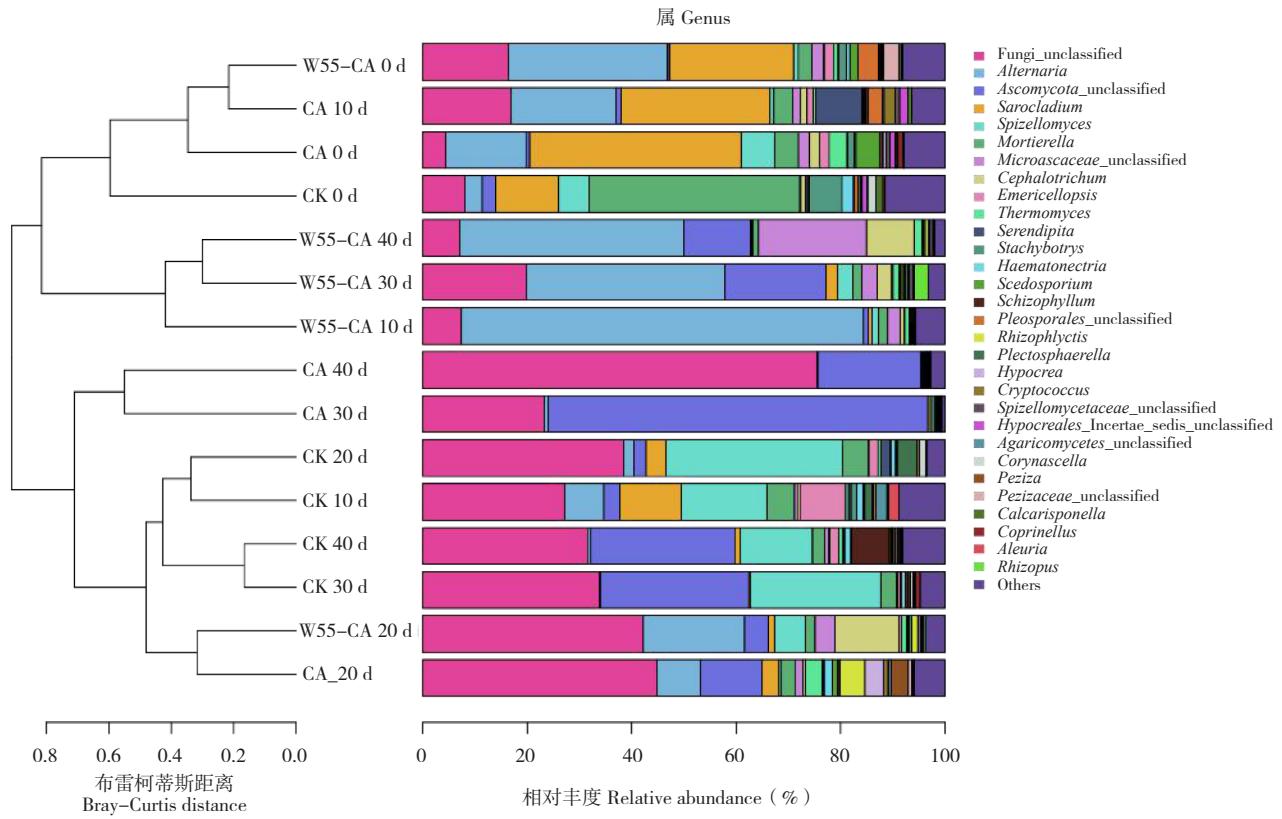


图 5 属水平修复期土壤真菌群落聚类

Fig. 5 Fungi colony cluster of soil at genus level during remediation period

表 3 土壤理化指标
Table 3 Soil physical and chemical indexes

处理 Treatment	pH	含水量 Water content (%)	含盐量 Salt content (g/kg)	土壤有机质 SOM (g/kg)	微生物碳 NPOC (mg/Kg)	全氮 Total-N (g/kg)	硝态氮 NOx-N (mg/Kg)
0 d	W55	8.11 ± 0.03bd	15.9 ± 2.5	0.81 ± 0.02bc	5.77 ± 0.13bcd	25.98 ± 0.48bd	0.6051 ± 0.0457cd
	W55-CA	7.95 ± 0.04ad	12.3 ± 0.8	0.54 ± 0.02ad	5.57 ± 0.12acd	20.74 ± 0.24a	0.5739 ± 0.0187cd
	CA	8.01 ± 0.15d	13.8 ± 1.2	0.48 ± 0.06ad	4.49 ± 0.2ab	11.49 ± 0.69	0.4137 ± 0.0549abd
	CK	8.16 ± 0.08abc	10.9 ± 1.1	0.79 ± 0.02bc	5.11 ± 0.1abc	17.7 ± 1.18a	0.5129 ± 0.0448abc
10 d	W55	8.13 ± 0.05d	16.3 ± 0.2	0.81 ± 0.04cd	5.47 ± 0.21bc	22.34 ± 1.12	0.6395 ± 0.0305bcd
	W55-CA	8.03 ± 0.11	15.9 ± 0.6	0.68 ± 0.08	6.68 ± 0.91acd	19.93 ± 1.31d	0.7537 ± 0.0231acd
	CA	8.07 ± 0.11	16.5 ± 0.2	0.53 ± 0.05a	4.46 ± 0.19abd	13.76 ± 1.96	0.5179 ± 0.0295ab
	CK	8.05 ± 0.06a	17.5 ± 4.0	0.48 ± 0.02a	5.45 ± 0.86bc	16.29 ± 0.44b	0.5298 ± 0.0133ab
20 d	W55	8.11 ± 0.07bcd	13.7 ± 2.1	0.58 ± 0.05bcd	5.47 ± 0.06bed	22.3 ± 0.58d	0.6028 ± 0.0254bcd
	W55-CA	8.00 ± 0.05a	15.5 ± 1.6	0.88 ± 0.05ac	5.09 ± 0.22ac	16.81 ± 1.34d	0.5648 ± 0.0338ac
	CA	7.99 ± 0.07a	12.4 ± 3.5	1.23 ± 0.06ab	4.6 ± 0.07abd	13.38 ± 0.38	0.5093 ± 0.0366abd
	CK	7.95 ± 0.07a	15.1 ± 1.3	1.17 ± 0.1a	5.09 ± 0.26ac	14.8 ± 1ab	0.5422 ± 0.0182ac
30 d	W55	8.18 ± 0.03bcd	12.9 ± 3.9	1.02 ± 0.03d	5.77 ± 0.28cd	22.45 ± 0.8	0.6035 ± 0.0320bcd
	W55-CA	7.98 ± 0.03ac	14.3 ± 1.6	1 ± 0.06	5.67 ± 0.41cd	16.06 ± 1.21	0.6330 ± 0.0483acd
	CA	8.09 ± 0.04ad	21.8 ± 6.5	0.85 ± 0.08	4.92 ± 0.27abd	12.61 ± 1.31	0.4937 ± 0.0242abd
	CK	7.98 ± 0.07ac	12.3 ± 1.2	0.77 ± 0.04a	4.73 ± 0.25abc	10.86 ± 1.11	0.5567 ± 0.0127abc
40 d	W55	8.16 ± 0.13b	7.5 ± 1.4	0.8 ± 0.04bd	7.26 ± 0.61cd	22.09 ± 0.43	0.6794 ± 0.0867cd
	W55-CA	7.96 ± 0.05acd	7.9 ± 2.0	0.96 ± 0.03acd	6.81 ± 0.54cd	15.88 ± 0.75	0.6969 ± 0.0328cd
	CA	8.21 ± 0.09b	8.5 ± 0.7	0.73 ± 0.03bd	5.21 ± 0.30abd	9.05 ± 0.82	0.4646 ± 0.0326ab

(续表3)

处理 Treatment		pH	含水量 Water content (%)	含盐量 Salt content (g/kg)	土壤有机质 SOM (g/kg)	微生物碳 NPOC (mg/Kg)	全氮 Total-N (g/kg)	硝态氮 NOx-N (mg/Kg)
处理 Treatment		铵态氮 NH ₄ -N (mg/kg)	结合氮 Tnb (mg/kg)	全磷 Total-P (g/kg)	速效磷 Olsen-P (mg/kg)	速效钾 Olsen-K (mg/Kg)	土壤团聚 MWD (mm)	土壤团聚体 GMD (mm)
40 d	CK	8.22 ± 0.07b	7.6 ± 0.5	0.37 ± 0.03abc	5.07 ± 0.21abc	10.33 ± 1.37	0.4210 ± 0.0432ab	8.209 ± 0.220ab
50 d	W55	8.00 ± 0.06c	9.7 ± 0.3	0.63 ± 0.02d	5.54 ± 0.51bed	18.1 ± 0.63d	0.6236 ± 0.0710cd	8.909 ± 0.271bcd
	W55-CA	8.08 ± 0.08bd	8.7 ± 1.0	0.51 ± 0.05	4.91 ± 0.53ac	15.17 ± 0.92d	0.6097 ± 0.0483cd	10.760 ± 0.323acd
	CA	8.17 ± 0.15abd	11.1 ± 1.0	0.56 ± 0.03	4.29 ± 0.29abd	10.84 ± 0.52d	0.4689 ± 0.0111abd	7.974 ± 0.290abd
	CK	7.92 ± 0.07bc	7.1 ± 0.9	0.51 ± 0.03a	4.64 ± 0.17ac	8.93 ± 0.55abc	0.5476 ± 0.0308abc	10.244 ± 0.232abc
0 d	W55	19.383 ± 2.589cd	83.266 ± 56.531	0.171 ± 0.001bcd	25.98 ± 0.48bcd	84.70 ± 0.92bcd	1.30 ± 0.13bd	0.41 ± 0.04bcd
	W55-CA	15.871 ± 3.277cd	53.55 ± 27.692	0.175 ± 0.001acd	20.74 ± 0.24acd	57.80 ± 2.03acd	1.44 ± 0.03ac	0.29 ± 0.08ac
	CA	9.588 ± 1.845abd	44.526 ± 16.59	0.148 ± 0.001abd	11.49 ± 0.69abd	44.35 ± 0.00abd	1.23 ± 0.11cd	0.34 ± 0.07abd
	CK	8.048 ± 1.136abc	45.11 ± 21.656	0.163 ± 0.001abc	17.70 ± 1.18abc	52.06 ± 1.18abc	1.48 ± 0.07ac	0.26 ± 0.09ac
10 d	W55	12.793 ± 1.916bcd	101.248 ± 89.096	0.182 ± 0.001cd	22.34 ± 1.12cd	77.49 ± 0.72bcd	1.21 ± 0.05bc	0.29 ± 0.09
	W55-CA	19.654 ± 8.342acd	188.777 ± 40.781	0.191 ± 0.009cd	19.93 ± 1.31cd	52.56 ± 1.97acd	1.42 ± 0.02acd	0.19 ± 0.08cd
	CA	22.928 ± 11.103abd	60.351 ± 45.457	0.157 ± 0.002abd	13.76 ± 1.96ab	38.29 ± 1.38abd	1.30 ± 0.03ab	0.36 ± 0.14b
	CK	55.600 ± 7.401abc	87.328 ± 47.404	0.164 ± 0.002abd	16.29 ± 0.44ab	44.03 ± 0.52abc	1.18 ± 0.12b	0.41 ± 0.11b
20 d	W55	31.515 ± 6.333bcd	105.643 ± 46.057	0.182 ± 0.001cd	22.30 ± 0.58bcd	74.70 ± 2.62bcd	1.11 ± 0.05bd	0.55 ± 0.17bd
	W55-CA	39.700 ± 10.133ac	61.584 ± 36.38	0.174 ± 0.006c	16.81 ± 1.34acd	45.17 ± 0.00acd	1.38 ± 0.09acd	0.26 ± 0.07acd
	CA	47.257 ± 4.836bd	142.69 ± 49.148	0.159 ± 0.001abd	13.38 ± 0.38ab	35.99 ± 0.85abd	1.11 ± 0.09bd	0.56 ± 0.09b
	CK	43.859 ± 4.44ac	678.126 ± 20.635	0.173 ± 0.002ac	14.8 ± 1.00ab	42.88 ± 1.18abc	1.31 ± 0.09abc	0.44 ± 0.15ab
30 d	W55	10.195 ± 4.734bd	124.222 ± 51.6	0.229 ± 0.011c	22.45 ± 0.80bcd	72.24 ± 2.30bcd	1.23 ± 0.05bcd	0.22 ± 0.11c
	W55-CA	44.067 ± 8.135acd	301.507 ± 2.684	0.223 ± 0.004c	16.06 ± 1.21acd	46.49 ± 1.38acd	1.46 ± 0.04ac	0.25 ± 0.06c
	CA	13.689 ± 7.481b	73.641 ± 8.086	0.172 ± 0.009ab	12.61 ± 1.31ab	35.66 ± 0.72abd	1.31 ± 0.08ab	0.40 ± 0.09abd
	CK	22.964 ± 7.074ab	165.199 ± 31.831	0.156 ± 0.041	10.86 ± 1.11ab	42.39 ± 0.92abc	1.36 ± 0.10ab	0.22 ± 0.11c
40 d	W55	7.716 ± 1.753bd	128.68 ± 41.196	0.221 ± 0.006bcd	22.09 ± 0.43bcd	64.86 ± 1.31bcd	1.32 ± 0.15	0.29 ± 0.10d
	W55-CA	31.112 ± 5.794bcd	86.623 ± 54.78	0.204 ± 0.002acd	15.88 ± 0.75acd	53.54 ± 1.18acd	1.38 ± 0.05cd	0.32 ± 0.06cd
	CA	8.965 ± 1.059b	86.708 ± 32.812	0.167 ± 0.004abd	9.05 ± 0.82ab	33.04 ± 0.79abd	1.27 ± 0.02bd	0.25 ± 0.09bd
	CK	11.195 ± 3.604ab	69.227 ± 46.641	0.165 ± 0.004abc	10.33 ± 1.37ab	37.63 ± 0.85abc	1.30 ± 0.02bc	0.14 ± 0.03abc
50 d	W55	12.124 ± 4.66d	95.189 ± 57.612	0.231 ± 0.008bcd	18.10 ± 0.63bcd	63.54 ± 1.38bcd	1.22 ± 0.04bcd	0.23 ± 0.05
	W55-CA	15.613 ± 0.599d	31.792 ± 26.328	0.221 ± 0.009acd	15.17 ± 0.92acd	43.70 ± 0.52acd	1.43 ± 0.09acd	0.26 ± 0.12
	CA	6.66 ± 1.889d	92.005 ± 59.117	0.162 ± 0.001abd	10.84 ± 0.52abd	35.33 ± 0.66abd	1.32 ± 0.04abd	0.41 ± 0.26
	CK	48.21 ± 7.456abc	42.674 ± 30.522	0.182 ± 0.002abc	8.93 ± 0.55abc	40.75 ± 1.25abc	1.28 ± 0.05abc	0.29 ± 0.14

注：同列数据后小写英文字母不同者表示差异显著。

Note: Different lowercase letters after data in the same column represent significant differences.

作为土壤残留农药微生物菌剂的出发菌株。

残留于环境中的多菌灵经过土壤本源微生物的作用亦会逐渐分解^[34]，外源引入可降解化学农药的微生物菌剂可以加速降低土壤中残留农药的水平，使土壤快速恢复健康水平，恢复土壤微生物的多样性，降低土壤微生物病原微生物数量及抗性基因，减少残留农药向水体及其他生物体内的迁移量。

目前报道具有多菌灵降解特性的微生物有芽

孢杆菌^[35]、苍白杆菌^[36-37]、克雷伯氏菌、单胞菌^[38]、金黄色葡萄球菌^[39]、分枝杆菌^[40]等。在土壤中验证其效果的微生物有枯草芽孢杆菌^[35]，该菌可加速土壤中多菌灵的降解；金黄色葡萄球菌^[39]可在液体及土壤中将200 mg/L的多菌灵完全降解；木霉^[41]可将土壤中100 mg/kg多菌灵在6 d内完全降解。但部分已报道的可降解多菌灵的微生物部分属于人条件致病菌，如金黄色葡萄球菌、克雷伯氏菌等，并不适合实际应用。本研究使用的

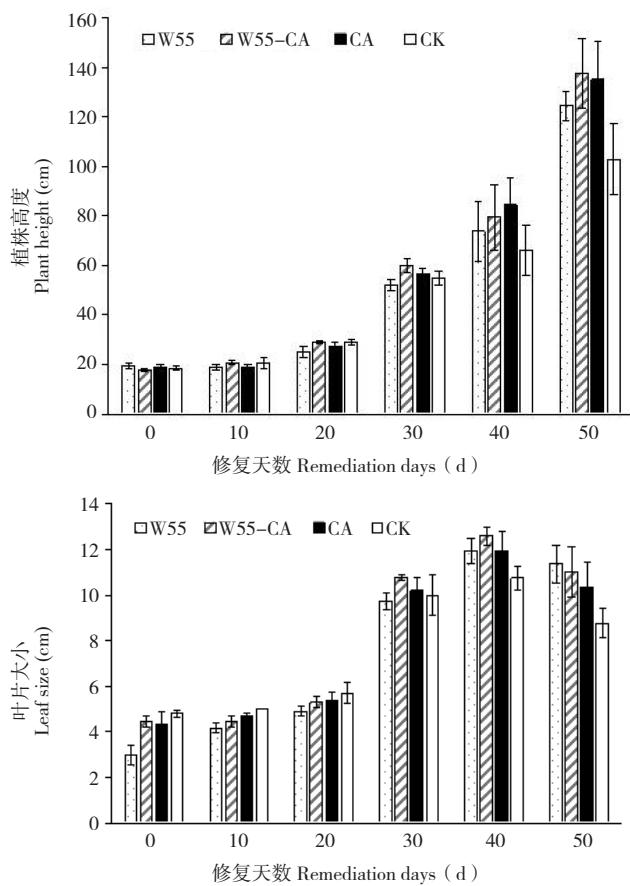


图 6 菌剂 W55 对作物生长的影响

Fig. 6 Effects of microbial agent W55 on crop growth

效能菌株致密格链孢(*A. compacta*)属于丝状真菌，回接试验证实不具有致病性，产生的孢子可在室温条件下保存1年以上，利于制剂及规模化应用，经土壤降解效果及安全性验证后，下一步将开展其降解机制及适用范围研究。

4 结论

本研究通过在多菌灵污染土壤中施用修复菌剂W55，初始多菌灵土壤含量约42 mg/L，使用菌剂0.1%处理后10 d，修复处理土壤多菌灵残留量为9.27 mg/kg、残留率22%，而对照土壤多菌灵残留量为30.20 mg/kg、残留率71%，具有极显著差异(T-test, $P=0.001$)。表明菌剂W55可有效加速多菌灵在土壤中的降解。土壤微生物高通量测序结果显示降解菌WJD-55可在多菌灵污染土壤中定殖，并可弥补多菌灵对土壤微生物多样性产生的负面影响；土壤理化指标显示菌剂的加入未对土壤物理化学性质带来显著影响；观测作物番茄生长未受到菌剂的任何影响。通过土壤残留多菌灵的测定，土壤真菌微生物多样性测序、

土壤理化指标测定以及作物生长观测结果均表明，多菌灵降解菌WJD-55可在土壤中稳定定殖并发挥降解多菌灵的作用，在番茄种植土壤中使用该菌剂安全有效。

参考文献 (References) :

- [1] YAN H, WANG D D, DONG B, TANG F F, WANG B C, FANG H, YU Y L. Dissipation of carbendazim and chloramphenicol alone and in combination and their effects on soil fungal: bacterial ratios and soil enzyme activities [J]. *Chemosphere*, 2011, 84 (5): 634–641. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2011.03.038.
- [2] WANG X G, SONG M, GAO C M, DONG B, ZHANG Q, FANG H, YU Y L. Carbendazim induces a temporary change in soil bacterial community structure [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2009, 21 (12): 1679–83. DOI: 10.1016/s1001-0742(08)62473-0.
- [3] KUMAR A, NAYAK A K, SHUKLA A K, PANDA B B, RAJA R, SHAHID M, TRIPATHI R, MOHANTY S, RATH P C. Microbial biomass and carbon mineralization in agricultural soils as affected by pesticide addition [J]. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology*, 2012, 88 (4): 538–542. DOI: 10.1007/s00128-012-0538-6.
- [4] LISA A B, CLIVE A E. The use of integrated soil microcosms to assess the impact of carbendazim on soil ecosystems [J]. *Ecotoxicology*, 2004, 13 (1–2): 143–161. DOI: 10.1023/b:ecotx.0000012411.14680.21.
- [5] GÖTTE J Y, CARRIZO J C, PANZERI A M, AMÉ M V, MENONE M L. Sublethal effects of carbendazim in *Jenynsia multidentata* detected by a battery of molecular, biochemical and genetic biomarkers [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020, 205:111157. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.111157.
- [6] LI H T, ZHANG P F, ZHAO Y, ZHANG H F. Low doses of carbendazim and chlorothalonil synergized to impair mouse spermatogenesis through epigenetic pathways [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020, 188: 109908. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.109908.
- [7] ULUDAG B, TARLACI S, YUCEYAR N, ARAC N. A transient dysfunction of the neuromuscular junction due to carbendazim intoxication [J]. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 2001, 70 (4): 563. DOI: 10.1136/jnnp.70.4.563.
- [8] LONG Z N, WANG X G, WANG Y J, DAI H W, LI C H, XUE Y F, DENG Y F, ZHANG H P, YU Y L, FANG H. Characterization of a novel carbendazim-degrading strain *Rhodococcus sp.* CX-1 revealed by genome and transcriptome analyses [J]. *The Science of the Total Environment*, 2020, 754:142137. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.142137.
- [9] CHEN Y K, JIANG Z, WU D, WANG H L, LI J J, BI M C, ZHANG Y. Development of a novel bio-organic fertilizer for the removal of atrazine in soil [J]. *Journal of Environmental Management*, 2019, 233:553–560. DOI: 10.1016/j.jenvman.2018.12.086.
- [10] APARICIO J, SOLÁ M Z, BENIMELI C S, AMOROSO M J, POLTI

- M A. Versatility of *Streptomyces sp.* M7 to bioremediate soils co-contaminated with Cr (VI) and lindane [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2015, 116:34–39. DOI:10.1016/j.ecoenv.2015.02.036.
- [11] 朱凤晓. 多菌灵农药高效复合降解菌的研制及其应用 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2011.
- ZHU F X. An effective carbendazim-degrading combined bacterium and its application [D]. YangLing: Northwest A&F University, 2011.
- [12] ALVAREZ A, SAEZ J M, DAVILA COSTA J S, COLIN V L, FUENTES M S, CUOZZO S A, BENIMELI C S, POLTI M A, AMOROSO M J. Actinobacteria: Current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals [J]. *Chemosphere*, 2017, 166: 41–62. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.09.070.
- [13] TAN H D, LI Q F, ZHANG H J, WU C Y, ZHAO S Q, DENG X, LI Y. Pesticide residues in agricultural topsoil from the Hainan tropical riverside basin: Determination, distribution, and relationships with planting patterns and surface water [J]. *The Science of the Total Environment*, 2020, 722:137856. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.137856.
- [14] WU P L, WANG P S, GU M Y, XUE J, WU X L. Human health risk assessment of pesticide residues in honeysuckle samples from different planting bases in China [J]. *The Science of the Total Environment*, 2021, 759:142747. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.142747.
- [15] KONG L X, KADOKAMI K, DUONG H T, CHAU H T C. Screening of 1300 organic micro-pollutants in groundwater from Beijing and Tianjin, North China [J]. *Chemosphere*, 2016, 165:221–230. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.08.084.
- [16] ZHOU Y T, WU J X, WANG B, DUAN L, ZHANG Y Z, ZHAO W X, WANG F, SUI Q, CHEN Z Y, XU D J, LI Q X, YU G. Occurrence, source and ecotoxicological risk assessment of pesticides in surface water of Wujin District (northwest of Taihu Lake), China [J]. *Environmental Pollution*, 2020, 265 (Pt A):114953. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.114953.
- [17] XU L, GRANGER C, DONG H Y, MAO Y X, DUAN S L, LI J, QIANG Z M. Occurrences of 29 pesticides in the Huangpu River, China: Highest ecological risk identified in Shanghai metropolitan area [J]. *Chemosphere*, 2020, 251:126411. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.126411.
- [18] ZHU Y Y, LIANG X Y, LI Y J, DUAN Y B, ZHENG Z T, WANG J X, ZHOU M G. F240 of β -Tubulin explains why *Fusarium graminearum* is less sensitive to carbendazim than *Botrytis cinerea* [J]. *Phytopathology*, 2018, 108 (3):352–361. DOI: 10.1094/PHYTO-09-17-0295-R.
- [19] JIANG J H, WU S G, WU C X, AN X H, CAI L M, ZHAO X P. Embryonic exposure to carbendazim induces the transcription of genes related to apoptosis, immunotoxicity and endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2014, 1 (2):493–500. DOI: 10.1016/j.fsi.2014.09.037.
- [20] LIU J, ZHANG P F, ZHAO Y, ZHANG H F. Low dose carbendazim disrupts mouse spermatogenesis might be through estrogen receptor related histone and DNA methylation [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 176:242–249. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.03.103.
- [21] VERMA S, SRIVASTAVA A. Cyto-genotoxic consequences of carbendazim treatment monitored by cytogenetical analysis using Allium root tip bioassay [J]. *Environment Monitoring and Assessment*, 2018, 190 (4):238. DOI: 10.1007/s10661-018-6616-4.
- [22] ZHOU J H, XIONG K, YANG Y, YE X P, LIU J, LI F X. deleterious effects of benomyl and carbendazim on human placental trophoblast cells [J]. *Reproductive Toxicology*, 2015, 51:64–71. DOI: 10.1016/j.reprotox.2014.12.008.
- [23] DIKIĆ D, LANDEKA I, KNEŽEVIĆ F, MOJSOVIĆ-ČUIĆ A, BENKOVIĆ V, HORVAT-KNEŽEVIĆ A, LONČAR G, TEparić R, ROGIĆ D. Carbendazim impends hepatic necrosis when combined with imazalil or cypermethrin [J]. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2012, 110 (5):433–440. DOI: 10.1111/j.1742-7843.2011.00831.x.
- [24] JIN C Y, ZENG Z Y, WANG C Y, LUO T, WANG S Y, ZHOU J C, NI Y C, FU Z W, JIN Y X. Insights into a possible mechanism underlying the connection of carbendazim-induced lipid metabolism disorder and gut microbiota dysbiosis in mice [J]. *Toxicological Sciences*, 2018, 166 (2):382–393. DOI: 10.1093/toxsci/kfy205.
- [25] WANG X G, SONG M, WANG Y Q, GAO C M, ZHANG Q, CHU X Q, FANG H, YU Y L. Response of soil bacterial community to repeated applications of carbendazim [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2012, 75 (1):33–39. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2011.08.014.
- [26] SHI S H, TIAN L, XU S Q, JI L, NASIR F, LI X J, SONG Z P, TIAN C J. The rhizomicobiomes of wild and cultivated crops react differently to fungicides [J]. *Archives of Microbiology*, 2019, 201 (4):477–486. DOI: 10.1007/s00203-018-1586-z.
- [27] DUAN Y B, XIN W J, LU F, LI T, LI M X, WU J, WANG J X, ZHOU M G. Benzimidazole- and QoI-resistance in *Corynespora cassiicola* populations from greenhouse-cultivated cucumber: An emerging problem in China [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2019, 153:95–105. DOI: 10.1016/j.pestbp.2018.11.006.
- [28] FAN F, HAMADA M S, LI N, LI G Q, LUO C X. Multiple fungicide resistance in *Botrytis cinerea* from greenhouse strawberries in Hubei Province, China [J]. *Plant Disease*, 2017, 101 (4):601–606. DOI: 10.1094/PDIS-09-16-1227-RE.
- [29] LIU S M, FU L Y, WANG S, CHEN J P, JIANG J, CHE Z P, TIAN Y, CHEN G Q. Carbendazim resistance of *Fusarium graminearum* from Henan wheat [J]. *Plant Disease*, 2019, 103 (10):2536–2540. DOI: 10.1094/PDIS-02-19-0391-RE.
- [30] XU S Q, WANG J H, WANG H X, BAO Y X, LI Y S, GOVINDARAJU M, YAO W, CHEN B S, ZHANG M Q. Molecular characterization of carbendazim resistance of *Fusarium* species complex that causes sugarcane pokkah boeng disease [J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1):115. DOI: 10.1186/s12864-019-5479-6.

- [31] YANG Y, ZENG G D, ZHANG Y, XUE R, HU Y J. Molecular and biochemical characterization of carbendazim-resistant *Botryodiplodia theobromae* field isolates [J]. *Plant Disease*, 2019,103 (8) : 2076–2082. DOI: 10.1094/PDIS-01-19-0148-RE.
- [32] CONG M L, HE S, MA H J, LI G Q, ZHU F X. Hormetic effects of carbendazim on the virulence of *Botrytis cinerea* [J]. *Plant Disease*, 2018,102 (5) :886–891. DOI: 10.1094/PDIS-10-17-1602-RE.
- [33] ZHANG H P, CHEN S U, ZHANG Q K, LONG Z N, YU Y L, FANG H. Fungicides enhanced the abundance of antibiotic resistance genes in greenhouse soil [J]. *Environmental Pollution*, 2020,259:113877. DOI: 10.1016/j.envpol.2019.113877.
- [34] 刘倩倩.三种常用杀菌剂在麦田土壤中的消解动态及对土壤微生物的毒性评价 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2016:24–27. DOI:10.7666/d.Y3031875.
LIU Q Q. Degradation dynamics of three kinds of commonly used fungicides in wheat fields and their toxicity to soil microorganisms [D]. Taian: Shandong Agricultural University,2016:24–27. DOI:10.7666/d.Y3031875.
- [35] SALUNKHE V P, SAWANT I S, BANERJEE K, WADKAR P N, SAWANT S D, HINGMIRE S A. Kinetics of degradation of carbendazim by *B. subtilis* strains: possibility of in situ detoxification [J]. *Environmental Monitoring Assessment*, 2014, 186 (12) : 8599–8610. DOI: 10.1007/s10661-014-4027-8.
- [36] HU G, ZHAO Y, LIU B, SONG F Q, YOU M S. Isolation of an indigenous imidacloprid-degrading bacterium and imidacloprid bioremediation under simulated in situ and ex situ conditions [J]. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2013, 23 (11) : 1617–1626. DOI: 10.4014/jmb.1305.05048.
- [37] 陈锐, 孙晓宇, 邓媛, 路鹏鹏, 赵玲侠, 瞿佳, 沈卫荣. 多菌灵降解菌的生物学特性及降解能力研究 [J]. 生物技术通报, 2018,34 (5) :187–194. DOI:10.13560/j. cnki. biotech.bull.1985.2017–0675.
- CHEN R, SUN X Y, DENG Y, LU P P, ZHAO L X, QU J, SHEN W R. Biological characteristic and biodegradation capacity of *Ochrobactrum tritici* WNP-3 for carbendazim [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2018, 34 (5):187–194. DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2017–0675.
- [38] ALVARADO-GUTIÉRREZ M L, RUIZ-ORDAZ N, GALÍNDEZ-MAYER J, CURIEL-QUESADA E, SANTOYO-TEPOLE F. Degradation kinetics of carbendazim by *Klebsiella oxytoca*, *Flavobacterium johnsoniae*, and *Stenotrophomonas maltophilia* strains [J]. *Environment Science and Pollution Research International*, 2020,27 (23) :28518–28526. DOI: 10.1007/s11356-019–07069-8.
- [39] WANG Z C, WANG Y Y, GONG F F, ZHANG J, HONG Q, LI S P. Biodegradation of carbendazim by a novel *actinobacterium Rhodococcus jialingiae* djl-6-2 [J]. *Chemosphere*, 2010, 81 (5):639–44. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2010.08.040.
- [40] 袁巧云, 孙悦, 张迹. 多菌灵降解菌株 djl-10 的分离及降解特性 [J]. 江苏农业科学, 2019,47 (23) :284–288. DOI: 10.15889/j.issn.1002–1302.2019.23.068.
YUAN Q Y, SUN Y, ZHANG J. Isolation and characterization of a carbendazim-degrading strain djl-10 [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2019,47 (23) :284–288. DOI: 10.15889/j.issn.1002–1302.2019.23.068.
- [41] 田连生, 陈菲.T2-2菌株对多菌灵的降解特性及生物修复试验 [J].微生物学报, 2009,49 (7) :925–930. DOI: 10.3321/j.issn:0001–6209.2009.07.013.
TIAN L S, CHEN F. Characterization of a carbendazim-degrading *Trichoderma* sp. T2-2 and its application in bioremediation [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49 (7) :925–930. DOI: 10.3321/j.issn:0001–6209.2009.07.013.

(责任编辑 邹移光)