

丁草胺降解菌的分离鉴定及降解特性的研究

楚小强, 庞国辉, 方 华, 王秀国, 高春明, 虞云龙

(浙江大学农业与生物技术学院植物保护系, 浙江 杭州 310029)

摘 要: 从处理农药生产废水的膜生物反应器中分离到一株能以丁草胺为惟一碳源和能源生长的细菌 BD-1, 经鉴定为施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)。在纯培养的条件下测定了 BD-1 对丁草胺的降解性能。结果表明, 在接种量为菌浓度 $OD_{415}=0.2$, pH 7.0、30 °C 条件下, BD-1 对丁草胺的降解符合一级动力学特征, 1.0、10.0 和 100.0 $mg \cdot L^{-1}$ 的丁草胺的降解半衰期分别为 0.11、0.60 和 0.96 d。BD-1 在不同 pH 及温度下对丁草胺的降解作用为 pH 7.0>pH 6.0>pH 8.0, 30 °C>20 °C>40 °C。GC/MS 初步分析结果表明, 丁草胺的主要微生物降解产物为 2-氯-2',6'-二乙基乙酰苯胺和 2,6-二乙基苯胺。

关键词: 丁草胺; 施氏假单胞菌; 生物降解

中图分类号: X172 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2009)01-0145-06

Isolation, Identification and Characteristics of a Butachlor-degrading Bacterium

CHU Xiao-qiang, PANG Guo-hui, FANG Hua, WANG Xiu-guo, GAO Chun-ming, YU Yun-long

(Department of Plant Protection, College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: A bacterial strain BD-1 capable of utilizing butachlor as sole carbon and energy sources was isolated from the sludge of a membrane bioreactor after successive enrichment cultures. The isolated strain BD-1 was identified as *Pseudomonas stutzeri* based on its morphology, physiological and biochemical characteristics, Biolog GN2 analysis together with the 16S rDNA homologue sequence analysis. The degradation characteristics of butachlor by this strain were investigated in liquid culture. The degradation half-lives of butachlor at concentrations of 1.0, 10.0 and 100.0 $mg \cdot L^{-1}$ by the bacterial strain BD-1 were measured to be 0.11, 0.60 and 0.96 d, under conditions of pH 7.0, 25 °C and biomass of $OD_{415}=0.2$. The degradation rates of butachlor by BD-1 were affected by pH and temperature following an order of pH 7.0 > pH 6.0 > pH 8.0, and of 30 °C > 20 °C > 40 °C, respectively. The results show that addition of the isolated strain BD-1 enhances degradation of butachlor in water. Two metabolites were extracted and identified as 2-chloro-2',6'-diethylacetanilide, 2,6-diethylaniline and a possible pathway involved in the microbial degradation of butachlor was also proposed. Butachlor is converted to 2-chloro-2',6'-diethylacetanilide through debutoxymethylation, and further transferred to 2,6-diethylaniline by dechloroacetylation.

Keywords: butachlor; *pseudomonas stutzeri*; biodegradation

丁草胺因其杀草活性高、选择性强,可用于水田和旱地防除以种子萌发的禾本科杂草、一年生莎草和一些双子叶杂草,多年来一直是我国水稻田中使用面广、时间长、量大的一种除草剂^[1-2]。它在我国农业生产上得到广泛应用的同时,在环境中的残留引起环境污

染问题也日趋严重:一方面,丁草胺随生产废水、排灌水和降水纵向淋溶、横向扩散,会造成地表水和地下水的污染;另一方面丁草胺对生态系统中的藻类、光合细菌、固氮细菌、产甲烷细菌、真菌、放线菌等产生影响,从而影响到生态系统的正常运转;再者,丁草胺作为一个间接致突变剂对人类健康的影响也不容忽视^[3-9]。研究表明丁草胺在自然条件下挥发性小,不易水解,抗光解性能比较好,其在环境中的消失主要是由于微生物的降解所致,因此寻找丁草胺的高效降解菌对于消除丁草胺的环境污染具有重要的现实意义^[10-15]。

收稿日期: 2008-04-15

基金项目: 浙江省科技厅项目 (2005C23054); 浙江省自然科学基金 (Z306260)

作者简介: 楚小强(1982—),男,河南洛阳人,博士研究生,主要从事农药环境毒理及生物修复方面的研究。

E-mail: csc200000@163.com

通讯作者: 虞云龙 E-mail: ylyu@zju.edu.cn

1 材料与方法

1.1 主要仪器及试剂

Agilent-6980 气相色谱仪带 7683 自动进样器 (Agilent, USA); Agilent-6980/5973B 气质连用仪 (Agilent, USA); Allegra 25R Centrifuge (Beckman Coulter, USA); Biometra PCR 仪 (Biometra, German); Eps-300 电泳仪 (上海天能科技有限公司); BIOLOG 微生物鉴定系统 (Biolog Inc., USA); 丁草胺标准品: 纯度 $\geq 94.7\%$ (农业部农药检定所); 所有有机溶剂使用前经全玻璃装置系统重蒸。

1.2 培养基

无机盐培养基: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g; K_2HPO_4 0.2 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2 g; CaSO_4 0.08 g, 1 000 mL 去离子水, pH 7.0, 高压蒸汽灭菌 (121 $^\circ\text{C}$, 20 min);

普通培养基: 牛肉膏 10 g, 蛋白胨 5 g, 氯化钠 5 g, 1 000 mL 水, 调节 pH 值至 7.0 (固体培养基加 20 g 琼脂), 高压蒸汽灭菌 (121 $^\circ\text{C}$, 20 min)。

1.3 实验方法

1.3.1 丁草胺降解菌的分离

从本实验室正在运行的膜生物反应器中取活性污泥 1 g 置于 100 mL 三角瓶中, 加入 20 mL 的无机盐液体培养基, 同时添加丁草胺浓度至 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 置于摇床中 30 $^\circ\text{C}$ 、150 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养 1 周。取上层浊液 1 环接种于含 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 丁草胺的无机盐培养基, 30 $^\circ\text{C}$ 、160 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 1 周, 与上述方法相同再培养两次 (丁草胺的浓度逐渐增加直至 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。用稀释法将培养液涂布于含有 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 丁草胺的固体普通培养基上, 挑取单菌落分离纯化, 选取能在含丁草胺的无机盐培养基中生长良好的菌落进行鉴定。

1.3.2 细菌的鉴定

分离到的丁草胺降解菌经革兰氏染色反应及氧化酶实验确定为革兰氏阴性非肠道菌, 选择 Biolog GN2 微生物鉴定板并参照《伯杰细菌鉴定手册》进行鉴定^[16-17]。

1.3.3 降解菌 16S rDNA 序列测定

按文献方法^[18]进行细菌总 DNA 的提取, 采用细菌 16 S rDNA 通用引物 FD2 (5'-AGAGTTTGAT-CATGGCTCAG-3') 和 RP1 (5'-ACGGTTACCTGT-TACGACTT-3') 通过 PCR 扩增降解菌的 16S rDNA 片段^[19], PCR 产物测序由上海英骏生物技术有限公司完成。

1.3.4 降解菌的培养与收集

丁草胺降解菌接种于 100 mL 含丁草胺 ($10.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的普通培养基, 30 $^\circ\text{C}$ 、150 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下振荡培养过夜, 离心 (6 500 $\times g$) 8 min 收集菌体。用 30 mL pH 7.0 的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲液洗涤菌体 2 次, 并悬浮于同一缓冲液制成菌悬液备用。

1.3.5 丁草胺微生物降解实验

不同浓度丁草胺的降解: 100 mL 灭菌的三角瓶中加入 20 mL pH 7.0 缓冲液配制的无机盐培养基, 添加丁草胺至浓度为 1.0、10.0、100.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 接种降解菌 (菌浓度 $\text{OD}_{415}=0.2$), 30 $^\circ\text{C}$ 黑暗振荡 (150 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$) 培养。

pH 对丁草胺降解的影响: 100 mL 灭菌的三角瓶中加入 20 mL 用 pH 分别为 6.0、7.0、8.0 的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲液配制的无机盐培养基, 添加丁草胺至浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 接种降解菌 (菌浓度 $\text{OD}_{415}=0.2$), 30 $^\circ\text{C}$ 黑暗振荡 (150 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$) 培养。

温度对丁草胺降解的影响: 100 mL 灭菌的三角瓶中加入 20 mL pH 7.0 缓冲液配制的无机盐培养基, 添加丁草胺浓度至 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 接种细菌 (菌浓度 $\text{OD}_{415}=0.2$), 分别在 20、30、40 $^\circ\text{C}$ 的条件下黑暗振荡 (150 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$) 培养。

以上处理同时设不加菌的对照实验, 处理与对照均设 3 个重复, 培养 0、0.5、1、3、5、7 d 后定时取样分析。

1.3.6 丁草胺的提取

将 20 mL 无机盐培养基连同菌体转入 250 mL 分液漏斗中, 用 30、30、20 mL 的乙酸乙酯振荡提取 3 次, 有机相经无水硫酸钠合并于 250 mL 平底烧瓶, 在旋转蒸发器上浓缩至近干, 然后用氮气流吹干, 最后用正己烷定容至 10 mL 供 GC 或 GC/MS 分析。

1.3.7 色谱条件

GC 条件: HP-5 毛细管柱, 30 m \times 0.32 mm \times 0.25 μm , 检测器: μ -ECD。进样口温度: 250 $^\circ\text{C}$; 检测器温度: 300 $^\circ\text{C}$; 柱温: 起始温度 80 $^\circ\text{C}$, 以 15 $^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速率升温到 200 $^\circ\text{C}$, 保持 10 min; 检测器温度: 250 $^\circ\text{C}$; 载气 (N_2) 流速: 1 mL $\cdot \text{min}^{-1}$; 不分流进样, 进样量 2 μL 。

GC/MS 条件: HP-5 MS 毛细管柱, 30 m \times 0.32 mm \times 0.25 μm (Agilent); EI 离子源; GC/MS 接口温度: 200 $^\circ\text{C}$; 离子源温度: 300 $^\circ\text{C}$; 载气 (He): 1 mL $\cdot \text{min}^{-1}$; 电子能量: 70 eV; 扫描范围: 30~450 amu; GC 进样口温度: 250 $^\circ\text{C}$; 柱温: 起始温度 80 $^\circ\text{C}$, 以 15 $^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速率升温到 200 $^\circ\text{C}$, 保持 10 min; 进样量 2 μL 。

1.3.8 丁草胺添加回收率实验

为检测丁草胺提取方法的有效性, 20 mL 培养基中添加 0.1、1.0、10.0 和 100.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的丁草胺, 每个浓度设 3 次重复, 按上述方法提取并测定方法回收率。

2 结果与分析

2.1 丁草胺降解菌的分离与鉴定

通过富集培养, 从膜生物反应器中分离到一株能以丁草胺为惟一碳源和能源生长的细菌, 命名为 BD-1。BD-1 在普通培养基上初期菌落圆形乳白色, 边缘整齐, 表面隆起, 后期菌落表面出现褶皱, 菌落黄色。革兰氏染色阴性, 氧化酶阳性, 接触酶阳性, 电镜显示 BD-1 菌体杆状, 极生单鞭毛, 大小约为 $(0.5 \mu\text{m} \sim 1.0 \mu\text{m}) \times (2.0 \mu\text{m} \sim 3.0 \mu\text{m})$ (图 1)。Biolog 鉴定结果表明 BD-1 是施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)的可能性(PROB 为 100%)最大, 相似性(SIM)为 0.518。BD-1 的 16S rDNA PCR 扩增产物为一个 1 422 bp 的片段, 其 Genbank 的登录号为 EU636 773。将其与 Genbank 上的其他序列进行同源性比对, 结果表明该菌株的 16S rDNA 与 *Pseudomonas stutzeri* A1 501、*Pseudomonas stutzeri* CCUG 11 256 的同源性为 100%, 与 *Pseudomonas stutzeri* ATTC 17 594、*Pseudomonas stutzeri* isolate Fe31、*Pseudomonas stutzeri* isolate SR10、*Pseudomonas stutzeri* strain phen8、*Pseudomonas stutzeri* strain DNSP2、*Pseudomonas stutzeri* strain Choll1a 等的同源性为 99%。综合上述结果, 将 BD-1 鉴定为施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)。

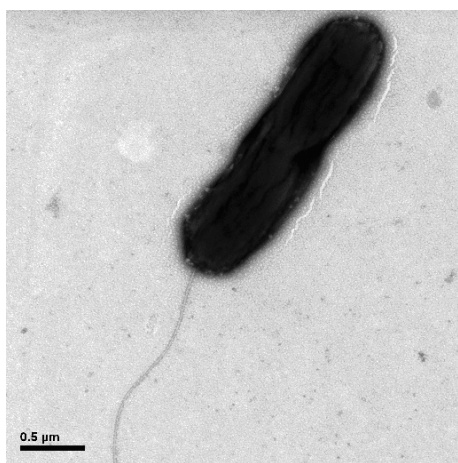


图 1 BD-1 电镜照片

Figure 1 Electron photograph of BD-1

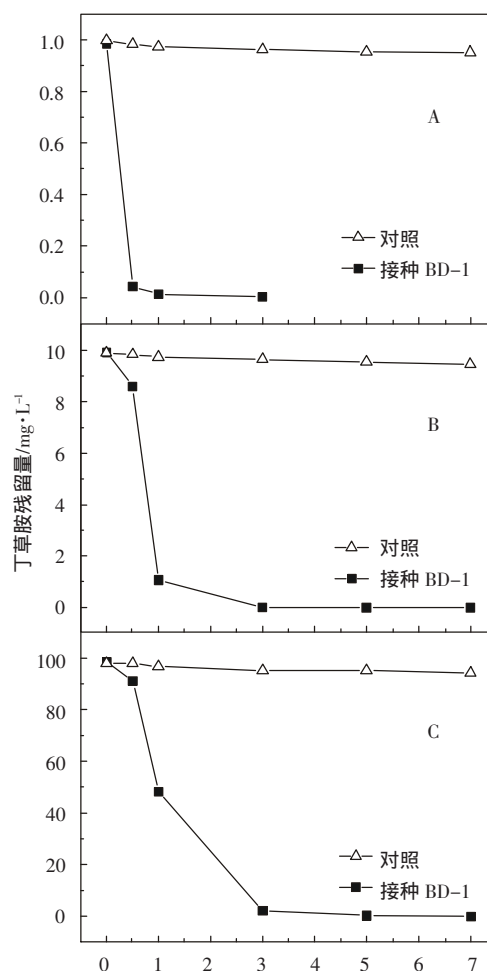
2.2 丁草胺的添加回收率

无机盐培养基中丁草胺的添加回收率在 97.5%~111.5%之间(表 2), 相对标准偏差(RSD) $\leq 4.81\%$, 表明丁草胺在无机盐培养基中的提取方法符合农药残留分析的要求^[20]。

表 2 丁草胺在无机盐培养基中的添加回收率和变异系数

Table 1 Recoveries and coefficient variations of butachlor fortified in mineral salt medium

丁草胺/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	样品体积/mL	添加回收率/%	RSD/%
0.1	20	97.55	1.0
1	20	111.5	1.2
10	20	102.9	4.8
100	20	98.2	1.6



A :1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; B :10.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; C :100.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

图 2 浓度对丁草胺生物降解的影响

Figure 2 Degradation of butachlor at levels of 1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (A), 10.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (B) and 100.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (C) by the strain BD-1

2.3 浓度对丁草胺降解的影响

在 pH 7.0、150 r·min⁻¹ 和 30 ℃条件下,接种一定量的降解菌 BD-1(菌浓度 OD₄₁₅=0.2)对不同浓度的丁草胺的降解特征如图 2。培养 7 d 后,不加菌的对照处理中丁草胺的降解率均小于 5%。降解菌的加入明显加快了丁草胺降解,培养 5 d 后,1 mg·L⁻¹ 丁草胺完全降解,其残留低于方法检测限(本方法丁草胺的最小检测浓度为 2.0 μg·L⁻¹)。BD-1 对丁草胺的降解符合一级动力学特征,相应的降解半衰期分别为 0.11、0.60 和 0.96 d(表 3)。

实验结果表明,降解菌 BD-1 对丁草胺具有很好的降解能力,但其降解作用与丁草胺浓度有关,随着浓度的提高,丁草胺的降解半衰期明显延长,这与吴新杰等人^[10]的研究结果类似:节杆菌属菌 *Arthrobacter* sp. WY306 对丁草胺的降解半衰期在低浓度范围随着浓度的升高而增大(丁草胺添加浓度分别为 0.8、5 和 9 mg·L⁻¹)。但是谭文捷等研究发现在 20~200 mg·L⁻¹ 的浓度范围内,丁草胺的初始浓度越高解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* 对其降解的速率和降解效率也越高^[21],说明本实验获得的降解菌 BD-1 作用特性与 *Bacillus amyloliquefaciens* 存在差异。

2.4 pH 对丁草胺降解的影响

Carlson 等指出碱性条件有利于丁草胺的水解,其机理包括双分子亲核取代反应脱氯生成羟基取代物或者发生氨基化合物的裂解生成 2-氯-2',6'-二乙酰基乙酰苯胺^[22]。在本实验中,不同 pH 对照处理培养 7 d 后,丁草胺降解率均低于 7.1%。温度为 30 ℃、降解菌接种量为 OD₄₁₅=0.2,10 mg·L⁻¹ 丁草胺在 pH 6.0、7.0 和 8.0 培养基中的降解曲线如图 3 所示,降解半衰期分别为 0.60、0.53 和 0.87 d。pH 7.0 条件下丁草胺的

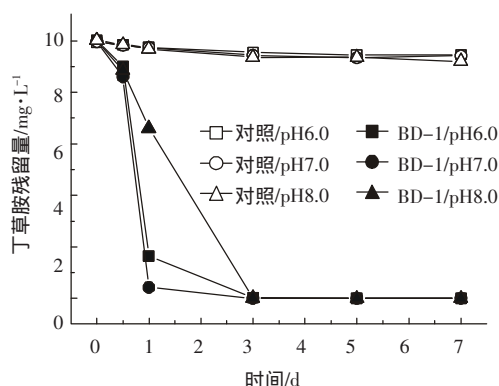


图 3 pH 对丁草胺生物降解的影响

Figure 3 Effect of pH on biodegradation of butachlor

降解效果最好,pH 6.0 时次之,pH 8.0 时最差。说明中性条件是降解菌 BD-1 的适宜生长条件,pH 7.0 时降解菌活性高,丁草胺降解快。

2.5 温度对丁草胺降解的影响

pH 7.0、接种量为 OD₄₁₅=0.2,20℃、30℃和 40℃时 10 mg·L⁻¹ 丁草胺的降解曲线如图 4 所示。在对照中,丁草胺在 20℃、30℃和 40℃时的降解率均小于 8%。加降解菌后,丁草胺在 20℃、30℃和 40℃时的降解半衰期分别为 1.01、0.52 和 5.0 d,丁草胺在 30℃时降解最快,而在 40℃时丁草胺的降解则受到抑制,可能是温度过高抑制了丁草胺降解菌的活性。吴新杰等也发现当培养温度为 20℃、30℃时,发现节杆菌属菌 *Arthrobacter* sp. WY306 对丁草胺的降解速率均随时间的延长而增大,而 40℃时表现为降解前 10 min 丁草胺降解速率较快,随时间的延长降解速率降低,在 $t > 0.5$ h 后,降解速率几乎不再随时间而变^[10]。

2.6 丁草胺降解产物分析

表 2 丁草胺在不同条件下的降解动力学特征

Table 2 Kinetic data of butachlor degradation by the isolated strain BD-1 under various conditions

影响因子			降解动力学方程	半衰期/d	r^2
浓度/mg·L ⁻¹	pH	温度/℃			
1.0	7.0	30	$C=0.984 \cdot 2 \cdot e^{-6.054 \cdot 3t}$	0.11	0.999 6
10.0	7.0	30	$C=10.655 \cdot 3 \cdot e^{-1.162 \cdot 9t}$	0.60	0.883 5
100.0	7.0	30	$C=107.251 \cdot 9 \cdot e^{-0.720 \cdot 1t}$	0.96	0.956 2
10.0	6.0	30	$C=10.917 \cdot 4 \cdot e^{-1.155 \cdot 9t}$	0.60	0.889 9
10.0	7.0	30	$C=10.793 \cdot 1 \cdot e^{-1.318 \cdot 2t}$	0.53	0.864 9
10.0	8.0	30	$C=11.092 \cdot 3 \cdot e^{-0.80 \cdot t}$	0.87	0.909 5
10.0	7.0	20	$C=10.684 \cdot 9 \cdot e^{-0.686 \cdot 0t}$	1.01	0.961 6
10.0	7.0	30	$C=10.521 \cdot 8 \cdot e^{-1.426 \cdot 7t}$	0.52	0.950 5
10.0	7.0	40	$C=9.222 \cdot 4 \cdot e^{-0.138 \cdot 6t}$	5.00	0.856 0

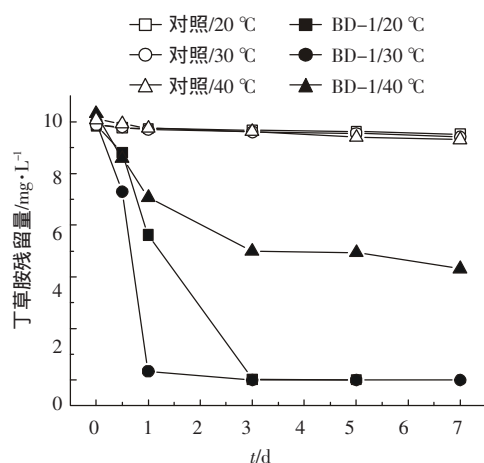


图 4 温度对丁草胺降解的影响

Figure 4 Effect of temperature on biodegradation of butachlor

含丁草胺 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的无机盐培养基接种 BD-1 培养 1 d 后, 丁草胺的降解产物提取后经 Agilent 6890/5973BMSD 分析。图 5(A)是含丁草胺及其降解产物的总离子流图, 其中保留时间为 16.595 min 的是丁草胺, 9.047 min 和 5.753 min 的是其两个主要降解产物, 它们的质荷比分别为 m/z 225.1(B)和 m/z 149.1(C)。经质谱库检索及分析表明这两个主要降解产物分别为 2-氯-2', 6'-二乙基乙酰苯胺和 2, 6-二乙基苯胺。

Chen 发现真菌 *Mucor suifui* NTU-358 能将丁草胺转化为至少 12 种代谢产物, 鉴定出了其中的六种, 分别为 2-氯-2', 6'-二乙基乙酰苯胺、2-羟基-2', 6'-二乙基乙酰苯胺、2, 6-二乙基苯胺、N-氯乙酰基-7-乙基-2, 3-二氢吡啶 2, 6-二乙基乙酰苯胺和 N-甲基-2-氯-2', 6'-二乙基乙酰苯胺^[23]。Chakraborty 等报道了 2 种土壤真菌 *Fusarium solani* 和 *Fusarium oxysporum* 在 pH 值为 5.2 的溶液中能有效降解丁草胺, 检测出至少 30~32 种降解产物, 并鉴定出了其中的 12 种, 丁草胺的主要的降解途径包括: 脱氯作用、羟基化作用、脱氢作用、甲氧基脱丁烷支链、碳端脱烷基作用、氧端脱烷基作用及环化作用等^[24]。

在本实验中 BD-1 对丁草胺的降解可能是通过脱氧甲基丁烷支链生成 2-氯-2', 6'-二乙基乙酰苯胺, 进而脱氯乙酰基生成 2, 6-二乙基苯胺, 最终将其完全矿化来实现的。这与 Chen^[22]和 Chakraborty^[23]等研究的真菌对丁草胺的研究结果类似, 但是降解途径较为简单。

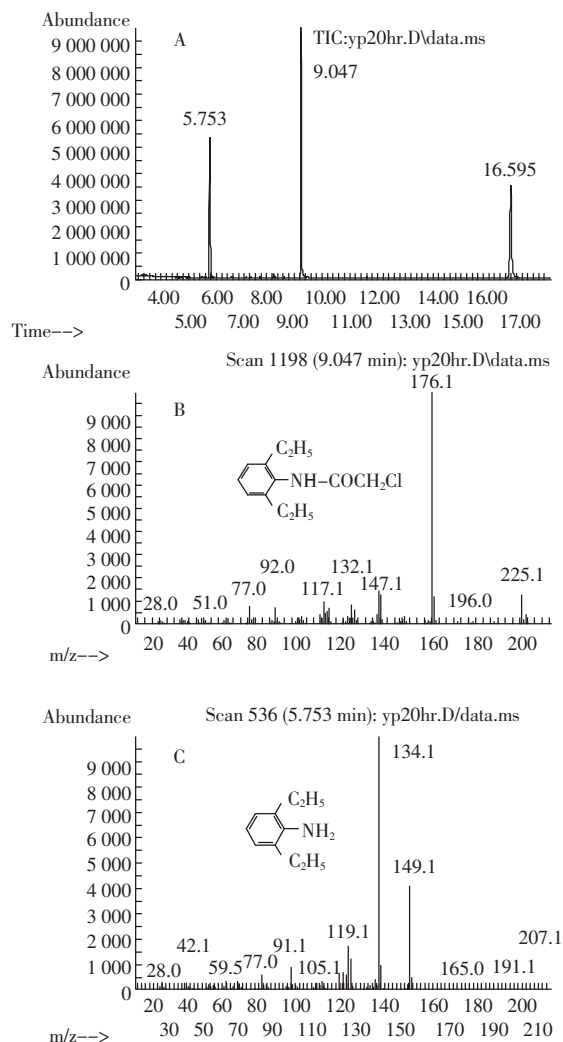


图 5 丁草胺及其降解产物总离子流图(A)和两种降解产物的质谱图(B、C)

Figure 5 TIC chromatograph and mass spectrometry of butachlor and its biodegradation products

3 结论

从处理农药废水的膜生物反应器中分离到一株能以丁草胺为惟一碳源和能源生长的细菌, 命名为 BD-1, 鉴定为施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)。 *Pseudomonas stutzeri* BD-1 对丁草胺的降解主要受农药浓度、pH 值和温度等因素的影响。BD-1 对丁草胺的降解符合一级动力学特征, 对 $1.0 \sim 100.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的丁草胺有较好的降解效果, $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 丁草胺的降解半衰期仅为 0.11 d。BD-1 在不同 pH 及温度下对丁草胺的降解作用为 $\text{pH} 7.0 > \text{pH} 6.0 > \text{pH} 8.0$, $30^\circ\text{C} > 20^\circ\text{C} > 40^\circ\text{C}$ 。GC/MS 分析表明, BD-1 对丁草胺的降解是通过脱氧甲基丁烷支链生成 2-氯-2', 6'-二乙基乙酰苯

胺,进而脱氯乙酰基生成2,6-二乙基苯胺,最终将其完全矿化来实现的。

BD-1在液体培养基中对丁草胺的良好降解效果,为丁草胺污染的生物修复等后续研究提供了的基础。

参考文献:

- [1] 郑和辉,叶常明. 甲草胺和丁草胺等除草剂在多介质环境中环境行为综述[J]. 环境科学进展, 1999, 7(3): 1-10.
ZHENG He-hui, YE Chang-ming. The behavior summary of alachlor and butachlor in the multi-medium environment [J]. *Advances in Environmental Science*, 1999, 7(3): 1-10.
- [2] Yu Y L, Chen Y X, Luo Y M, et al. Rapid degradation of butachlor in wheat rhizosphere soil[J]. *Chemosphere*, 2003, 50(6): 771-774.
- [3] Chen Z, Juneau P, Qiu B. Effects of three pesticides on the growth, photosynthesis and photoinhibition of the edible cyanobacterium *Ge-Xian-Mi* (Nostoc)[J]. *Aquatic Toxicology*, 2007, 81(3): 256-265.
- [4] Mohanty S R, Bharati K, Moorthy B T S, et al. Effect of the herbicide butachlor on methane emission and ebullition flux from a direct-seeded flooded rice field[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2001, 33(3): 175-180.
- [5] 赵宇华,梅其志,陈美慈,等. 丁草胺对水稻土甲烷释放和厌氧细菌的影响[J]. 微生物学报, 1997, 37(6): 477-479.
ZHAO Yu-hua, MEI Qi-zhi, CHEN Mei-ci, et al. Effect of butachlor on CH₄ emission and anaerobes in paddy soil [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 1997, 37(6): 477-479.
- [6] 余柳青,徐福强,俞圣康,等. 丁草胺和杀草丹对稻田土壤放线菌及其白色链霉菌的影响[J]. 中国水稻科学, 1997, 30(6): 81-83.
YU Liu-qing, XU Fu-qiang, YU Sheng-kang, et al. The effect of butachlor and staurin on actinomycetes and streptomyces albus in paddy field [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 1997, 30(6): 81-83.
- [7] Zargar Y, Dar H. Effect of benthocarb and butachlor on growth and nitrogen fixation by cyanobacteria [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1990, 45(2): 232-234.
- [8] Chen Y L, Liu F P, Chen L C, et al. Effects of butachlor on nitrogen transformation of fertilizers and soil microbes in water-logged soil [J]. *Journal of Pesticide Science*, 1981, 6(1-7).
- [9] Hsu K Y, Lin H J, Lin J K, et al. Mutagenicity study of butachlor and its metabolites using salmonella typhimurium [J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2005, 38(6): 409-416.
- [10] 吴新杰,岳永德,花日茂,等. 丁草胺高效降解细菌的分离[J]. 应用与环境生物学报, 2000, 6(6): 593-596.
WU Xin-jie, YUE Yong-de, HUA Ri-mao, et al. Isolation of effectively butachlor degradation bacterium [J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2000, 6(6): 593-596.
- [11] Beestman G B, Deming J M. Dissipation of acetanilide herbicides from soils [J]. *Agronomy Journal*, 1974, 66(2): 308-311.
- [12] Zheng H H, Ye C M. Photodegradation of acetochlor and butachlor in waters containing humic acid and inorganic ion [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2001, 67(4): 601-608.
- [13] Zheng H H, Ye C M. Identification of UV Photoproducts and hydrolysis products of butachlor by mass spectrometry [J]. *Environmental Science & Technology*, 2001, 35(14): 2889-2895.
- [14] 王一茹,刘长武,牛成玉,等. 丁草胺在水体中的光解和稻田中归趋的研究[J]. 环境科学学报, 1996, 16(4): 475-481.
WANG Yi-ru, LIU Chang-wu, NIU Cheng-yu, et al. Photo-transformation of butachlor in aquatic system and its fate in rice field [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 1996, 16(4): 475-481.
- [15] 李川,古国榜,柳松. 丁草胺高效真菌的分离及性能研究[J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(3): 611-614.
LI Chuan, GU Guo-bang, LIU Song. Isolation and its degradability of high efficiency butachlor fungi [J]. *Journal of Agro-Environmental Science*, 2004, 23(3): 611-614.
- [16] 程池,杨梅,李金霞,等. Biolog微生物自动分析系统-细菌鉴定操作规程的研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(5): 50-54.
CHENG Chi, YANG Mei, LI Jin-xia, et al. Biolog microbial identification system - study on the operating regulation of bacteria identification [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2006, 32(5): 50-54.
- [17] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册(第八版)[M]. 1984, 北京: 科学出版社.
Buchanan R E, Gibbons N E. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Eighth Edition)[M]. 1984, Beijing: Science Press.
- [18] Wilson K, Preparation of genomic DNA from bacteria, in *Current Protocols in Molecular Biology*[M]. 2001, John Wiley & Sons, Inc.. Unit 2.4.
- [19] Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study [J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(2): 697-703.
- [20] 樊德方. 农药残留分析与检测[M]. 1982, 上海: 上海科学技术出版社.
FAN De-fang. *Analysis and determination of pesticide residue* [M]. 1982, Shanghai: Shanghai Science and Technology Press.
- [21] 谭文捷,李发生,杜晓明,等. 解淀粉芽孢杆菌对水中丁草胺的降解及影响[J]. 环境科学研究, 2005, 18(3): 71-74.
TAN Wen-jie, LI Fa-sheng, DU Xiao-ming, et al. Biodegradation of herbicide butachlor in water media using *Bacillus amyloliquefaciens* [J]. *Research of Environmental Sciences*, 2005, 18(3): 71-74.
- [22] Carlson D L, Than K D, Roberts A L. Acid- and base-catalyzed hydrolysis of chloroacetamide herbicides [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(13): 4740-4750.
- [23] Chen Y L, Wu T C. Degradation of herbicide butachlor by soil microbes [J]. *Journal of Pesticide Science*, 1978, 3(4): 411-417.
- [24] Chakraborty S K, Bhattacharyya A. Degradation of butachlor by two soil fungi [J]. *Chemosphere*, 1991, 23(1): 99-105.