

张隽, 黄星, 邱吉国, 等. 2009. 氟铃脲降解菌 FLN-1 的分离鉴定及降解特性 [J]. 环境科学学报, 29(6): 1178–1183

Zhang J, Huang X, Qiu JG, *et al.* 2009. Isolation and identification of hexaflumuron-degrading bacterium FLN-1 and its degradation characteristics [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 29(6): 1178–1183

氟铃脲降解菌 FLN-1 的分离鉴定及降解特性

张隽, 黄星, 邱吉国, 李顺鹏, 何健*

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

收稿日期: 2008-09-02 修回日期: 2008-12-15 录用日期: 2009-04-15

摘要: 从农药厂废水处理池的活性污泥中分离到 1 株能降解氟铃脲的菌株, 命名为 FLN-1。根据表型特征、生理生化特性及 16S rDNA 序列同源性分析, 将 FLN-1 初步归类为红球菌属 (*Rhodococcus* sp.)。研究表明, 该菌能在含氟铃脲 (50 mg L^{-1}) 的基础盐液体培养基中降解氟铃脲, 5 d 降解率达 83%, 降解最适 pH 为 6.0~9.0, 最适温度为 25~40℃, 降解速率随初始接种量的增加而增大; 100 mg L^{-1} 的葡萄糖、酵母膏和蛋白胨对菌株降解氟铃脲具有促进作用。酶的定域试验表明, 降解氟铃脲的酶为胞内酶。

关键词: 氟铃脲; 生物降解; 红球菌 FLN-1; 酶的定域

文章编号: 0253-2468(2009)06-1178-06 中图分类号: X172 文献标识码: A

Isolation and identification of hexaflumuron-degrading bacterium FLN-1 and its degradation characteristics

ZHANG Jun, HUANG Xing, QIU Jiguo, LI Shunpeng, HE Jian*

College of Life Sciences, Key Laboratory for Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095

Received 2 September 2008;

received in revised form 15 December 2008;

accepted 15 April 2009

Abstract A hexaflumuron-degrading bacterium, FLN-1, was isolated from activated sludge collected from the wastewater treatment system of a pesticide factory. Based on the analysis of its 16S rDNA, morphology and physiological characteristics, strain FLN-1 was identified as *Rhodococcus* sp. This strain could degrade 85% of 50 mg L^{-1} hexaflumuron within 5 days. The optimum pH and temperature ranges for the degradation were 6.0~9.0 and 25~40℃, respectively. The degradation efficiency was positively correlated to initial inoculum size. Addition of 100 mg L^{-1} yeast extract, glucose or peptone could enhance the hexaflumuron degradation rate. Enzyme distribution experiment results indicated that the hexaflumuron degrading enzyme of strain FLN-1 was an endoenzyme.

Keywords hexaflumuron biodegradation; *Rhodococcus* sp.; FLN-1; enzyme distribution

1 引言 (Introduction)

氟铃脲化学名称为 1-[3,5-二氯-4-(1,1,2,2-四氟乙氧基)苯基]-3-(2,6-二氟苯甲酰基)脲, 是一种新型、高效、低残留的含氟苯甲酰脲类杀虫剂。氟铃脲具有很高的杀虫和杀卵活性, 被广泛应用于蔬菜、瓜果、水稻、棉花等防治鳞翅目害虫, 并对有机磷、氨基甲酸酯类、拟除虫菊酯产生抗性的害虫具有良好的效果 (梁诚, 2003; 张一宾, 2002; Su, 1998)。但是, 随着含氟农药的长期大量使用, 含氟

农药在环境中的迁移、转化和分解等环境行为正受到日益关注。目前国外有关氟铃脲的研究, 主要集中在其药效和农药残留检测方面 (Valenzuela, 1999; Yang *et al.*, 2006; Soler *et al.*, 2007); 国内徐珍 (2008) 采用实验室模拟试验证实了土壤微生物降解是氟铃脲在土壤中分解的主要因素。本实验室从生产氟铃脲的工厂废水处理池污泥中驯化、分离得到 1 株能够降解氟铃脲的红球菌属 (*Rhodococcus* sp.) 细菌, 命名为 FLN-1, 并对该菌的降解特性和降解酶的定域进行初步研究, 旨在为研究氟铃脲微生物降解

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (No. 2006AA10Z402); 国家自然科学基金平台项目 (No. 2005DKA21201-2)

Supported by the High-Tech Research and Development of China (No. 2006AA10Z402) and the Chinese National Technology Platform Programs (No. 2005DKA21201-2)

作者简介: 张隽 (1983—), 男, 博士研究生; * 通讯作者 (责任作者), E-mail: hejian@njau.edu.cn

Biography: ZHANG Jun (1983—), male, Ph.D. candidate; * **Corresponding author:** E-mail: hejian@njau.edu.cn

机制提供材料和理论依据。

2 材料和方法 (Materials and methods)

2.1 材料

仪器设备: Water 600E 高效液相色谱仪, 超声波细胞粉碎机, 冷冻干燥机, 超净工作台, 恒温振荡培养箱, 生化恒温培养箱, 高压灭菌锅, 电子天平及实验室常用玻璃仪器等。

氟铃脲原药由扬州农药厂馈赠 (纯度大于 97.7%)。使用前将氟铃脲原药溶于丙酮并用滤膜 (孔径 0.22 μm) 过滤除菌, 按所需浓度添加到培养基中。

基础盐培养基 (g L^{-1}): NaCl 10.5, K_2HPO_4 1.5, KH_2PO_4 0.5, NH_4NO_3 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 去离子水 1000mL, $\text{pH} = 7.0$

LB 培养基 (g L^{-1}): NaCl 10.0, 酵母膏 5.0, 蛋白胨 10.0 (固体培养基加入 2% 的琼脂), $\text{pH} = 7.0$

富集分离培养基: 在基础盐培养基中视实际情况加一定量的氟铃脲原药作为唯一碳源。

2.2 菌株的富集和分离

取扬州农药厂 (该农药厂生产氟铃脲) 废水处理池中的活性污泥 2g 加入到 100mL 含 50mg L^{-1} 氟铃脲的富集培养基中, 振荡摇匀, 180r min^{-1} 、 30°C 条件下摇床培养。每隔 7d 以 5% 的接种量转接至新鲜的富集培养基中, 传代 3 次。经测定有降解效果后, 在 50mg L^{-1} 的氟铃脲基础盐培养基平板上划线, 置于 30°C 培养箱中培养, 待平板上出现单菌落后, 挑取单菌落转接至含 50mg L^{-1} 氟铃脲的基础盐培养基中, 通过高效液相色谱验证单菌对农药的降解效果。

2.3 菌株的鉴定

2.3.1 形态结构观察及生理生化实验 对分离得到的菌株进行革兰氏染色、拍照, 并进行电镜拍照。生理生化实验参照文献 (东秀珠, 2001) 进行。

2.3.2 16S rDNA 序列和系统发育分析 菌株 16S rDNA 的克隆及序列测定和比较参照文献 (奥斯伯 F, 1999)。提取 FLN-1 的基因组 DNA 作为模板, 进行 16S rDNA 基因的扩增。引物分别为: 5' 端引物 5'-AGAGTTTGA TCCTGGCTCAG-3', 3' 端引物 5'-TACCTTGTTA CCACTT-3'。25 μL 体系为: 模板 1 μL , dNTP (25mmol L^{-1}) 2 μL , 引物 (1mmol L^{-1}) 各 1 μL , $10\times\text{Taq}$ 缓冲液 2.5 μL , Mg^{2+} (25mmol L^{-1})

1.5 μL , Taq 酶 ($5\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 0.3 μL , 超纯水 15.7 μL 。聚合酶链式反应条件: 95°C 下变性 3min, 94°C 下变性 1min, 55°C 下退火 1min, 72°C 下延伸 3min, 循环 30 次; 再在 72°C 下延伸 10min。测序由上海英骏生物技术公司完成。测序结果通过在线分析 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 与 GenBank 中的 16S rDNA 基因序列进行相似性比较。

2.4 菌悬液制备

从平板上挑取一单菌落, 接种于 100mL LB 液体培养基中, 于 30°C 、 180r min^{-1} 摇床培养至 $\text{OD}_{600\text{nm}} \approx 1.00$ 作为种子液; 以 12000r min^{-1} 、 4°C 离心 10min, 收集菌体并用 $100\text{mL } 0.02\text{mol L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ ($\text{pH} = 7.0$) 缓冲液洗涤 2 次后再用等体积的 0.02mol L^{-1} $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ ($\text{pH} = 7.0$) 悬浮, 4°C 下保存备用。

2.5 土壤浸出液的制备

将富含有机质的果园土风干, 捣碎, 过粗筛。然后取土壤 40g 加入 960mL 自来水, 装入 2L 烧瓶中, 在 121°C 下湿热灭菌 1h, 放置过夜。第 2 天取出用滤纸过滤后分装 1L 烧瓶, 每瓶 300mL, 再在 121°C 下湿热灭菌 80min, 在室温下放置 2 周, 慢慢除去沉淀, 取上清液备用。 (刘智等, 2004)

2.6 氟铃脲含量的测定

农药提取参照文献 (韩红新, 2008) 做如下修改: 取 1mL 培养液, 离心, 取上清液于 10mL 刻度试管中, 加 4mL 的乙酸乙酯, 剧烈振荡后静置分层, 取有机相通过装有无水硫酸钠的漏斗过滤, 将滤液置于离心管中用氮气吹干后, 加入 1mL 甲醇溶解 (色谱纯), 用滤膜 (孔径 0.22 μm) 过滤。液相色谱条件参考文献 (王雪娟, 1999) 并适当修改: 流动相为甲醇: 水 (85: 15 V/V), Zorbax C-18 ODS Spherex 反相柱 (5 μm , 4.6mm $\times$ 250mm, Agilent USA), 柱温为室温, 紫外检测器, 测定波长 240nm, 进样量 20 μL , 流速为 0.8mL min^{-1} 。外标法按峰面积定量。

水体中氟铃脲的添加浓度为 1、25、50、100 mg L^{-1} 时添加回收率为 100.12% $\pm$ 0.22%、99.97% $\pm$ 0.12%、100.22% $\pm$ 0.41%、98.98% $\pm$ 0.43%。按照下列公式计算氟铃脲降解率:

$$X = \frac{A-B}{A} \times 100\%$$

式中, X 为降解率, A 为未接菌处理液中氟铃脲浓度 (mg L^{-1}), B 为接菌处理液中氟铃脲浓度 (mg L^{-1}) (周德平等, 2003)。

2.7 粗酶液的制备

将已培养好的菌液 $6000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 10 min 去上清液; 菌体用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 然后在冰浴中超声波粉碎 10 min 破碎细胞时频率为破碎 5 s 间隔 5 s 细胞破碎液于 $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 弃沉淀, 上清液冷冻真空干燥, 制成酶的冻干粉, 临用时重新溶于 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PBS 缓冲液中得到粗酶液。

2.8 酶活力测定方法

取 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液 (PBS) $920 \mu\text{L}$ ($\text{pH} = 7.5$)、 $50 \mu\text{L}$ 氟铃脲 (丙酮溶解, $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)、 $30 \mu\text{L}$ 粗酶液, 30°C 条件下反应 24 h 后, 用 $20 \mu\text{L}$ 浓度为 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 终止反应; 加入 1 mL 乙酸乙酯剧烈振荡 5 min 后, 于 $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min , 取上层有机相进行 HPLC 检测; 通过氟铃脲的标准曲线, 求得氟铃脲的减少量。本实验的 1 个酶活力单位 (U) 定义为在本实验条件下 1 min 内氟铃脲减少的纳摩尔数。

2.9 酶的定域试验

应用渗透休克原理 (Neu *et al.*, 1965; 戴树桂等, 1996), 按下列步骤分步提取。取菌液离心 ($6000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min), 上清 (S_1) 冻存; 沉淀 (P_1) 用 10 mL ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 盐酸三羟甲基氨基甲烷溶液 ($\text{Tris} \cdot \text{HCl}$) ($\text{pH} = 8.0$) 重悬, 离心 ($6000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min), 洗涤 2 次, 上清 (S_2) 冻存; 沉淀 (P_2) 以 10 mL (25%) 的蔗糖溶液重悬, 于 25°C 下振荡 10 min , 离心 ($13000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min), 上清 (S_3) 冻存; 沉淀 (P_3) 加冷超纯水重悬, 在冰浴中振荡 10 min , 离心 ($13000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min), 上清 (S_4) 冻存; 沉淀 (P_4) 重悬于 10 mL ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) $\text{Tris} \cdot \text{HCl}$ ($\text{pH} = 7.5$) 中, 在冰浴中超声波破碎 1 min 间隔 1 min , 重复 5 次, 再离心 ($15000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 20 min) 上清 (S_5) 冻存, 沉淀 (P_5) 弃去。将 S_1 、 S_2 和 S_3 合并, 即为胞外提取液, S_4 为周质提取液, S_5 为膜内提取液。

3 结果 (Results)

3.1 菌株的分离及其生理生化特性

通过富集培养和纯化, 从扬州农药厂废水处理池中的活性污泥中获得了 1 株能降解氟铃脲的菌株, 命名为 FLN-1。图 1 是 FLN-1 对氟铃脲降解 5d 后的液相色谱图。从图上可以看出, 氟铃脲在 7.2 min 有特征吸收峰, 利用 HPLC 测定结果中氟铃脲浓度的减少计算降解率 (周德平等, 2003), 根据

所测样品与对照同一出峰时间出现的峰面积大小, 菌体培养至 5d 时降解率可达 85% 以上。

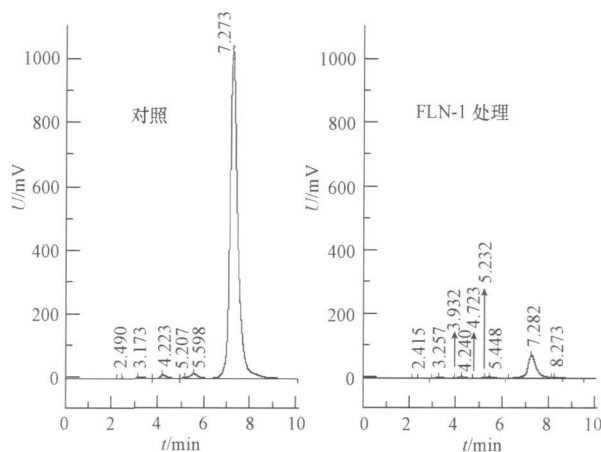


图 1 FLN-1 降解氟铃脲的 HPLC 分析

Fig. 1 HPLC analysis of hexaflumuron before and after five days incubation with the isolate FLN-1

菌株 FLN-1 在 LB 培养基上生长时为圆形, 边缘整齐, 表面隆起、湿润、光滑, 菌落呈橙红色。革兰氏染色阳性, 长杆状, 无鞭毛 (电镜照片见图 2); 无芽孢, 接触酶、V-P 反应为阳性, 氧化酶、甲基红试验 (M. R.)、明胶液化反应为阴性, 不能水解淀粉, 葡萄糖发酵产酸; 在 $25 \sim 40^\circ\text{C}$ 均能生长良好, NaCl 耐受浓度为 $0 \sim 10\%$ 。

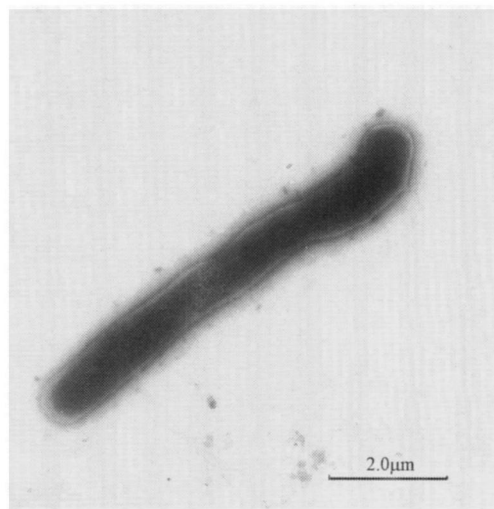


图 2 菌株 FLN-1 的透射电镜照片 ($2000\times$)

Fig. 2 Electron micrograph of strain FLN-1

3.2 菌株的 16S rDNA 的序列分析

扩增并测定了菌株 FLN-1 的 16S rDNA 全长基因 (GenBank accession number EU725800), 在 RDP 数据库中 (<http://rdp.cme.msu.edu/>) 进行 BLAST

并应用 MEGA 软件作系统进化树 (图 3)。结果显示该菌与红球菌属 (*Rhodococcus* sp.) 有较高的同源性, 与 *Rhodococcus ruber* DSM 43338 亲源关系最近, 16S rDNA 基因相似性为 99%, 两者在系统发育树上

聚为一个分支。结合菌株的形态、生理生化特征和 16S rDNA 基因序列的系统发育分析, 将菌株 FLN-1 初步鉴定为放线菌类诺卡氏菌科 (*Nocardiaceae*) 中的红球菌属 (*Rhodococcus* sp.)。

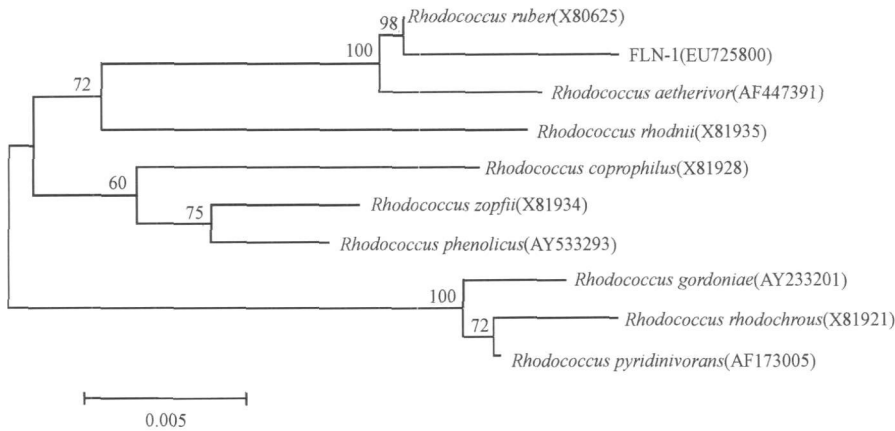


图 3 降解菌株 FLN-1 系统发育分析

Fig 3 Phylogenetic analysis of the isolate FLN-1 with related species by Neighbor-Joining method. Bootstrap values (%) are indicated at the nodes.

3.3 菌株 FLN-1 生长曲线及降解曲线

在 50 mg L⁻¹ 氟铃脲基础盐培养基中, 按 3% 接种量接入 FLN-1 新鲜菌液 (OD_{600nm} ≈ 1.0), pH 值为 7.0 于 180 r min⁻¹、30℃ 条件下摇床培养, 每隔一定时间取样, 测定 OD_{600nm} 及氟铃脲浓度。以未接菌的 50 mg L⁻¹ 氟铃脲基础盐培养基作空白对照, 结果见图 4。

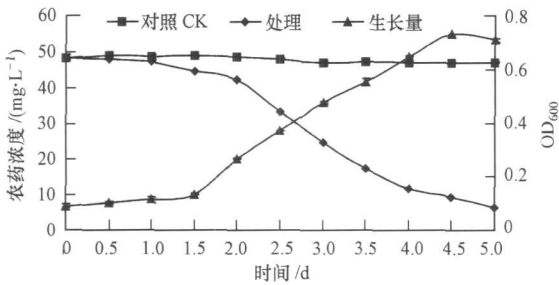


图 4 FLN-1 的生长曲线和氟铃脲降解曲线

Fig 4 Growth curves of bacterial FLN-1 and hexaflumuron degradation

由图 4 可见, 菌株 FLN-1 能以氟铃脲为碳源进行生长, 在初始的 1.5 d 内, 菌株生长处于延迟期, 对氟铃脲的降解非常缓慢, 随着菌株进入对数生长期, 氟铃脲的降解速度也增加, 而到稳定期和衰亡期时, 降解速度又趋于缓慢, 菌体培养至 5 d 时, 降解率可达 85% 以上。

3.4 pH 对 FLN-1 的降解性能的影响

在 50 mg L⁻¹ 氟铃脲基础盐培养基中, 调节初

始 pH 至 4、5、6、7、8、9, 按 3% 接种量接入 FLN-1 新鲜菌液 (OD_{600nm} ≈ 1.0), 于 180 r min⁻¹、30℃ 条件下摇床培养, 5 d 后测定氟铃脲的含量, 结果如图 5 所示。由图 5 可知, 在 pH 值为 4~5 时, 菌株 FLN-1 的降解能力受到抑制, 而在 pH 值为 6~9 范围内, 菌株降解氟铃脲的能力均保持在 80% 左右, 菌株对 pH 耐受范围比较广, 为生物修复特别是碱性环境污染的微生物修复提供了可行性。

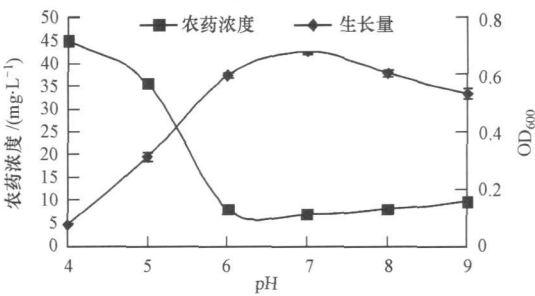


图 5 pH 对 FLN-1 降解氟铃脲的影响

Fig 5 Effect of pH on hexaflumuron degradation by strain FLN-1

3.5 温度对 FLN-1 的降解性能的影响

在 50 mg L⁻¹ 氟铃脲基础盐培养基中, 按 3% 接种量接入 FLN-1 新鲜菌液 (OD_{600nm} ≈ 1.0), 分别在 10、15、20、25、30、35、40℃ 条件下 180 r min⁻¹ 摇床培养, 5 d 后测定氟铃脲的含量, 结果如图 6 所示。

由图 6 可见, 菌株 FLN-1 降解氟铃脲有比较宽的温度耐受范围, 不同的温度下 FLN-1 对农药的降

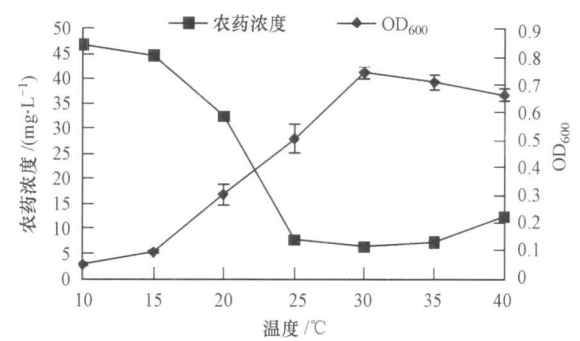


图 6 温度对 FLN-1 降解氟铃脲的影响

Fig 6 Effect of temperature on hexaflumuron degradation by strain FLN-1

解效果相差不大, 最适降解温度范围为 25~40℃, 推断可能是此最适降解温度与菌体的最适生长温度一致。

3.6 接种量对 FLN-1 降解氟铃脲的影响

在 50mg·L⁻¹ 氟铃脲基础盐培养基中, 以 1%、3%、5%、8% 和 10% 的接种量接入 FLN-1 新鲜菌液 (OD_{600nm} ≈ 1.0), pH 值为 7.0, 于 30℃、180r·min⁻¹ 摇床培养, 每天取样 1 次, 测定氟铃脲的含量。

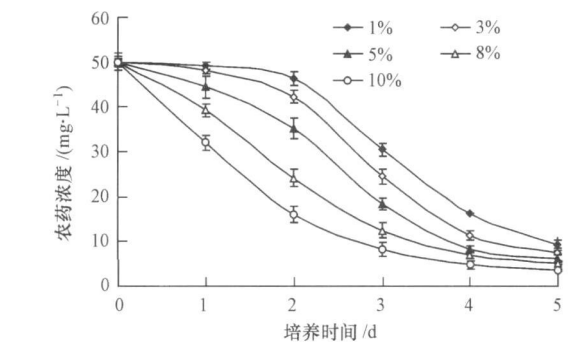


图 7 接种量对 FLN-1 降解氟铃脲的影响

Fig 7 Effect of inoculum on hexaflumuron degradation by strain FLN-1

由图 7 可见, 菌株 FLN-1 降解氟铃脲的速率随初始接种量的增加而增大。当接种量为 1%~8% 时, 氟铃脲的降解随着接种量的加大而加快, 当接种量达到 5% 或以上时, 降解速率迅速上升。

3.7 外源营养物质添加对 FLN-1 降解氟铃脲的影响

在 50mg·L⁻¹ 氟铃脲基础盐培养基中分别添加 100mg·L⁻¹ 的葡萄糖、酵母膏、蛋白胨和土壤浸液 (土壤浸液单位为 mL·L⁻¹) (刘智等, 2004), pH 值为 7.0 按 3% 接种量接入 FLN-1 菌液 (OD₆₀₀ ≈ 1.0), 于 180r·min⁻¹、30℃ 条件下, 每隔 1 天取样测

定氟铃脲的含量。

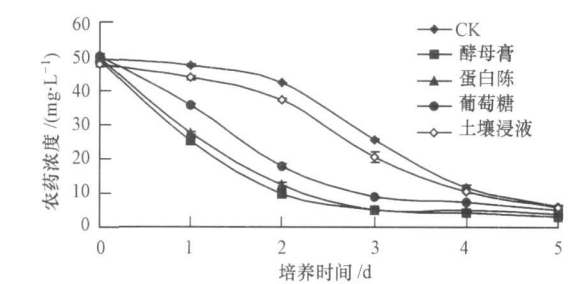


图 8 外源营养物质添加对 FLN-1 降解氟铃脲的影响

Fig 8 Effect of added nutrients on hexaflumuron degradation by FLN-1

从图 8 中可以看出, 外源营养物质的添加对氟铃脲的降解率有一定的影响, 在添加葡萄糖、酵母膏和蛋白胨的情况下, 菌株 FLN-1 降解氟铃脲的速率加快, 但添加土壤浸出液对 FLN-1 降解氟铃脲没有明显促进作用。这可能是外加碳源的添加对 FLN-1 降解氟铃脲具有促进作用, 而土壤中的营养成分含量太低, 不足以影响 FLN-1 对农药的降解。

3.8 降解酶的定域试验

对膜内、周质空间、胞外提取液分别测定其酶活, 结果如图 9 所示。由图可知, 以膜内提取液的酶活最高, 胞外提取液和周质空间提取液的酶活分别只有膜内提取液酶活的 9.5% 和 3.8%。试验结果表明, 菌株 FLN-1 中的氟铃脲降解酶是胞内酶。

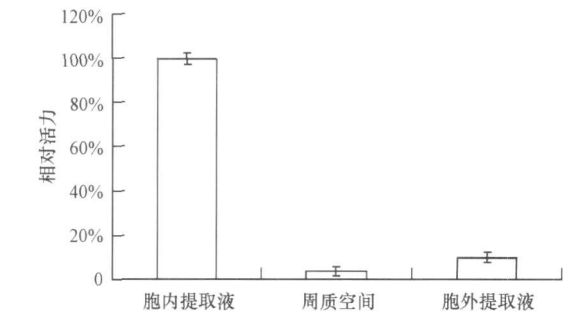


图 9 FLN-1 降解酶的定域

Fig 9 Distribution of crude enzymes in strain FLN-1

4 结论 (Conclusions)

- 1) 从农药厂废水处理池的活性污泥中分离到 1 株能降解氟铃脲的菌株, 经鉴定为 1 株红球菌 (*Rhodococcus* sp.), 命名为 FLN-1。
- 2) 菌株 FLN-1 可以在 5d 内将 50mg·L⁻¹ 氟铃脲降解, 降解率可达到 85% 以上。
- 3) 降解氟铃脲的最适 pH 范围为 6.0~9.0 最

适温度为 25~ 40℃, 降解氟铃脲的速率和起始接种量呈正相关, 另外, 外源营养物质的添加能促进菌株对氟铃脲的降解.

4) 酶的定域试验表明, 降解氟铃脲的酶为胞内酶.

责任作者简介: 何健 (1973—), 男, 副教授. 主要从事环境微生物研究. E-mail: hejian@njau.edu.cn

参考文献 (References):

- 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E, 等. 1999. 精编分子生物学实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 39—40
- Ausubel FM, Brent R, Kingston R E, *et al*. 1999. Short Protocols in Molecular Biology [M]. Beijing: Science Press, 39—40 (in Chinese)
- 戴树桂, 庄源益, 陈勇生, 等. 1996. 两种假单胞菌中二氯酚降解酶活性及其定域研究 [J]. 环境科学学报, 16(2): 173—178
- Dai S G, Zhuang Y Y, Chen Y S, *et al*. 1996. Study on enzyme activity and distribution in two strains of bacteria by dichlorophenol degradation [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 16(2): 173—178 (in Chinese)
- 东秀珠, 蔡妙英. 2001. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 370—377
- Dong X Z, Cai M Y. 2001. Manual of Systematic and Determinative Bacteriology [M]. Beijing: Science Press, 370—377 (in Chinese)
- 韩红新, 吴莉宇, 徐志, 等. 2008. 液质联用 (ESI) 检测蔬菜中 4 种农药残留 [J]. 农药, 47(3): 198—200
- Han H X, Wu L Y, Xu Z, *et al*. 2008. LC-MS method for determination of 4 pesticides residues in vegetables [J]. Pesticides, 47(3): 198—200 (in Chinese)
- 梁诚. 2003. 含氟杀虫剂研究开发与生产现状 [J]. 有机氟工业, 29—34
- Liang C. 2003. Production status study and development of insecticide containing fluorine [J]. Organo-fluorine Industry, 29—34 (in Chinese)
- 刘智, 张晓舟, 何健, 等. 2004. 营养物质及金属离子对 DLL-E4 降解对硝基苯酚的影响 [J]. 土壤学报, 41(2): 292—297
- Liu Z, Zhang X Z, He J, *et al*. 2004. Effects of nutrient substances and metal ions on degradation of p-Nitrophenol by DLL-E4 (*Pseudomonas putida*) [J]. Acta Pedologica Sinica, 41(2): 292—297 (in Chinese)
- Neu H C, Heppel L A. 1965. The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts [J]. J Biol Chem, 240(9): 3685—3692
- Su N Y, Scheffrahn R H. 1998. A review of subterranean termite control practices and prospects for integrated pest management programmes [J]. Integrated Pest Management Reviews, 3: 1—13
- Soler C, James K J, Picot Y, *et al*. 2007. Capabilities of different liquid chromatography-tandem mass spectrometry systems in determining pesticide residues in food. Application to estimate their daily intake [J]. Journal of Chromatography A, 1157(1-2): 73—84
- Valenzuela A J, Lorenzini R, Redondo M J, *et al*. 1999. Matrix solid-phase dispersion microextraction and determination by high-performance liquid chromatography with UV detection of pesticide residues in citrus fruit [J]. Journal of Chromatography A, 839(1-2): 101—107
- 王雪娟, 魏金旺. 1999. 氟铃脲的液相色谱分析研究 [J]. 农药, 38(9): 14
- Wang X J, Wei J W. 1999. Analysis study of hexaflumuron by HPLC [J]. Pesticides, 38(9): 14 (in Chinese)
- 徐珍, 郭正元, 黄帆, 等. 2008. 氟铃脲的土壤降解动力学研究 [J]. 土壤, 40(1): 125—129
- Xu Z, Guo Z Y, Huang F, *et al*. 2008. Dynamics of hexaflumuron degradation [J]. Soils, 40(1): 125—129 (in Chinese)
- Yang X, Xia Y, Liao X, *et al*. 2006. Fragmentation study and analysis of benzoylurea insecticides and their analogs by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry [J]. Talanta, 70(1): 75—87
- 张一宾, 钱跃言. 2002. 含氟农药的结构、特性及研究开发概况 [J]. 江苏化工, 30(2): 13—14
- Zhang Y B, Qian Y Y. 2002. Structure speciality and researching development survey of pesticide containing fluorine [J]. Jiangsu Chemical Industry, 30(2): 13—14 (in Chinese)
- 周德平, 夏颖, 闵航, 等. 2003. 三株菲降解细菌的分离鉴定及降解特性的研究 [J]. 环境科学学报, 23(1): 124—128
- Zhou D P, Xia Y, Min H, *et al*. 2003. Isolation identification and degradation characteristics of three phenanthrene-degrading bacteria [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 23(1): 124—128 (in Chinese)