

乙草胺降解菌 Y-4 的分离鉴定及降解特性研究

倪 俊, 沈维亮, 闫 新*, 李顺鹏

(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)

摘 要: 从长期经乙草胺污染的污泥中分离到一株能以乙草胺为唯一碳源和能源生长的菌株 Y-4, 通过生理生化实验和 16S rDNA 同源性序列分析, 鉴定为申氏杆菌属(*Shinella* sp.)。采用室内培养方法, 研究了 Y-4 对乙草胺的降解特性。结果表明, Y-4 能有效地降解浓度为 5~200 mg·L⁻¹ 的乙草胺, 在 48 h 内对 50 mg·L⁻¹ 乙草胺的降解率达到 83.3%。菌株 Y-4 降解乙草胺的最适 pH 值为 8.0, 最适温度为 30 ℃, 其对丙草胺和丁草胺等农药也有良好的降解效果。

关键词: 乙草胺; 降解; 申氏杆菌

中图分类号: X172 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2043(2011)05-0946-06

Isolation and Characterization of a Acetochlor-degrading Strain Y-4 and Its Degrading Characteristics

NI Jun, SHEN Wei-liang, YAN Xin*, LI Shun-peng

(Key Lab of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Acetochlor were widely used to weeding in agriculture and resulted in severely environmental pollution. Bioremediation is an effective and economic method to treat the environment that has been polluted by acetochlor. So researchers paid much attention in this area. In the present study, a bacterial strain Y-4 capable of utilizing acetochlor as sole carbon and energy sources was isolated from the sludge that have long been subjected to acetochlor pollution by enrichment method. The Y-4 cells were short rod, Gram nesative. The colonies on LB media were light yellow in color, circular, and smooth. Strain Y-4 was identified preliminarily as *Shinella* sp. based on its physiological and biochemical characters and the result of the 16S rDNA homologue sequence analysis. The Y-4 strain could effectively degrade acetochlor ranging of 5~200 mg·L⁻¹. 50 mg·L⁻¹ acetochlor could be degraded at a rate of 83.3% by Y-4 strain in 48 h. The optimal initial pH value and temperature for acetochlor degradation by Y-4 was 8.0 and 30 ℃, respectively. Adding extra glucose or nitrogen source promoted the growth of strain Y-4, but influence the degradation of acetochlor slightly. The ion Mg²⁺ could promote the strain to degrade acetochlor slightly, and Ni²⁺, Co²⁺, Hg²⁺ could inhibit it when it was at low level. However, Zn²⁺, Fe²⁺ had no effect on the degradation of acetochlor. Strain Y-4 could also degrade some other pesticides such as pretilachlor and butachlor.

Keywords: acetochlor; degradation; *Shinella* sp.

随着城市化进程和农村劳动力转移的不断加快, 为提高农业生产效率, 保证农业生产的正常进行, 除草剂被广泛使用, 酰胺类除草剂就是其中的一种。酰胺类除草剂是目前国际上大量使用的除草剂之一, 在国际市场中, 销量最大的酰胺类除草剂品种分别是乙草胺、丁草胺和甲草胺, 并已占酰胺类除草剂总产量的

96%。乙草胺、丁草胺和甲草胺等酰胺类除草剂在农业生产上发挥了重大作用, 但它们的大量使用也带来了一系列环境问题。

例如: 甲草胺具有一定的水溶性(242 mg·L⁻¹), 可以到达地表水和地下水, 可能诱发哺乳动物癌症、干扰内分泌及降低男性精子浓度与活性等^[1-2]; 乙草胺在土壤中持效期可达 8~12 周, 在河水中很难水解, 半衰期在 1 386 d 以上, 乙草胺对鱼类有较强的毒性, 对土壤微生物种群数量及土壤中细菌、放线菌和真菌生长速率均有一定的抑制作用, 被美国环保局定为 B-2 类致癌物^[3-4]; 丁草胺会随水纵、横向淋溶与扩散, 特别

收稿日期 2010-11-11

基金项目 江苏省科技支撑计划(BE2009670)

作者简介: 倪 俊(1987—), 男, 江苏扬州人, 硕士研究生, 主要从事环境微生物方向研究。E-mail 2008116082@njau.edu.cn

* 通讯作者: 闫 新 E-mail yanxin@njau.edu.cn

是随排灌水和降水流失,会造成地下水及江河污染,丁草胺对藻类、光合细菌、固氮细菌等许多微生物的生长有抑制作用,从而破坏了土壤微生态平衡^[5-6]。

此外,乙草胺和丁草胺等酰胺类除草剂的不科学使用还会对农作物产生药害作用,如丁草胺的不科学使用会对水稻产生药害,给农业生产带来巨大损失^[7-8]。针对上述情况,除了加大宣传,指导农户科学用药以外,还要探求消除过量除草剂残留的有效方法,双管齐下才能保证发挥除草剂积极作用的前提下尽量减小其带来的危害,实现可持续发展。

研究表明乙草胺、丁草胺和甲草胺等酰胺类除草剂在环境中的消失主要是由于微生物的降解所致^[9],在地表水和地下水中,由于缺少微生物降解,其持久性可达数月数年不等^[10]。因此,分离相应的高效降解菌,研究其降解机理,对于消除这些除草剂的环境污染具有重要的现实意义,国内外研究者在这方面做了大量的努力,主要在菌株的分离筛选和降解途径的鉴定两个层面。王菁华等研究了丁草胺降解菌 *Pseudomonas putida* ER1 及该菌降解丁草胺时的蛋白质组学^[11]。Durães Sette 研究了 *Streptomyces* sp. LS166, LS177、LS182 对甲草胺的降解并分析了其降解途径^[12]。虞云龙等在丁草胺降解菌株分离、降解途径的鉴定以及土壤修复试验方面做了详细的研究^[13-14]。吴新杰等分离了丁草胺降解菌 *Arthrobacter* sp. WY306^[15]。李艳春等分离筛选了丁草胺降解菌 *Acinetobacter* sp. LYC-1 和 *Ancylobacter* sp. LYC22^[16-17]。

但目前对乙草胺微生物降解的研究报道较少,仅发现食油假单胞菌(*Pseudomonas oleovorans*)能高效降解 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右的乙草胺^[18],而对于更高浓度乙草胺高效降解菌的研究未见报道。此外,能同时降解甲草胺、乙草胺和丁草胺等多种酰胺类除草剂的降解菌也未见报道。本研究分离、鉴定了一株乙草胺高效降解菌株 Y-4,该菌株能在 48 h 内高效降解 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的乙草胺,该菌株还可以降解甲草胺、丙草胺和丁草胺。

1 材料与方法

1.1 供试土壤

土样取自江苏某生产乙草胺的农药厂。

1.2 培养基、试剂及主要仪器

基础盐培养基(MSM $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) NaCl 1.00 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.00 K_2HPO_4 1.50 KH_2PO_4 0.50 MgSO_4 0.20 pH7。

LB 培养基($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 酵母膏 5.00 NaCl 10.00 蛋白

胨 10.00 固体培养基加 2%的琼脂粉。

主要试剂:二氯甲烷(分析纯)、无水硫酸钠、甲醇溶液(色谱纯)。

供试原药:95%乙草胺原药(由山东滨州侨昌化工提供)。

主要仪器:30℃培养箱、可控温摇床、紫外可见分光光度计、高效液相色谱仪(Waters 600)。

1.3 菌株的富集、筛选及纯化

取农药厂的活性污泥样 5.0 g 置于乙草胺浓度为 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 100 mL 基础盐培养基中,于 30℃、160 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养 7 d,以 5%的接种量接入到相同的培养基中,传代 3 次。富集液经紫外可见分光光度计测定,降解乙草胺 90%以上的,即为有效果的富集液,将有效果的富集液进行梯度稀释后,在含 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙草胺的无机盐培养基固体平板上涂布(0.2 mL),于 30℃培养箱培养,待平板上出现单菌落后,挑取单菌落分别转接至含 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙草胺的液体基础盐培养基中,验证菌株对乙草胺的降解效果。

1.4 菌株的生理生化鉴定

菌株形态及生理生化鉴定方法参见文献[19]。

1.5 16S rDNA PCR 扩增及序列的测定

进行菌株 16S rRNA 基因的克隆及序列测定^[20],首先提取 Y-4 基因组 DNA 作为模板,其次是 16S rRNA 基因扩增。一对引物分别为:正向引物 5'-A-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',反向引物 5'-TACG-GCTACCTTGTTA CGACTT-3'。扩增反应体系如下:10×Taq 聚合酶反应缓冲液 5 μL dNTP(20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 4 μL 引物(25 $\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)各 2 μL Mg^{2+} (25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 4 μL 菌体DNA(约 50 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)1 μL Taq DNA 聚合酶(5 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)0.5 μL 加 H_2O 至 50 μL 。反应条件:95℃变性 5 min,94℃30 s,52℃30 s,72℃1 min,30 个循环,最后 72℃延伸 20 min,10℃5 min。采用 PCR 回收试剂盒回收 16S rRNA 的基因片段,琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物的大小(1.5kb 左右),T/A 克隆后进行测序^[21]。测序结果通过在线分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)与 GenBank 中的 16S rRNA 基因序列进行相似性比较,构建系统进化树^[22]。

1.6 降解菌株对乙草胺的降解性能测定

1.6.1 溶液中乙草胺含量的检测方法

1.6.1.1 紫外扫描法

在待测溶液中加入 20 mL 二氯甲烷,剧烈振荡 5 min,室温下静置 10 min,待水相和有机相分层,弃去上层水相,有机相经无水硫酸钠脱水后,于紫外-可见

分光光度计上在波长 200~350 nm 范围内进行扫描。通过乙草胺在 228 nm 处的特征吸收峰的峰值来计算溶液中乙草胺的含量。

1.6.1.2 液相色谱法

取 1.0 mL 上述经无水硫酸钠脱水后的有机相至 1.5 mL 离心管中,吹干,加入 1 mL 甲醇(色谱纯),使用孔径 0.45 μm 的有机相针头过滤器过滤,用液相色谱测定样液中乙草胺的含量。液相色谱条件为:Waters C18 反相柱;流动相为甲醇/水(体积比 80/20),流速 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,紫外检测器波长 215 nm,进样量 20 μL 。

1.6.2 降解特性研究

研究菌株生长量与降解效果的影响。取 100 μL 的乙草胺溶液(甲醇溶解,10 000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)加入三角瓶,待甲醇挥发完,加入 20 mL 无机盐培养基。在液体 LB 中培养 Y-4,取处于对数生长后期的菌液,按 1% 的接种量取 1 mL 菌液,12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心,弃上清液,用 1 mL 无菌水重悬后加入到上述三角瓶中,于 30 $^{\circ}\text{C}$ 、160 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养,每 12 h 定时取样,菌体生长量采用比浊法,即检测 600 nm 的吸光值,并用液相色谱法检测样液中乙草胺的含量。

温度、初始 pH 值、乙草胺起始浓度对 Y-4 降解乙草胺的影响,研究方法同上。

1.7 菌株对不同酰胺类农药的降解情况

在基础盐培养基中分别添加 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲草胺、乙草胺、丙草胺和丁草胺为唯一碳源,按上述研究方

法测定菌株对不同酰胺类农药的降解情况。

2 结果分析

2.1 菌株的分离与鉴定

2.1.1 菌株的生理生化特性

经过分离纯化得到一株以乙草胺为唯一碳源的降解菌 Y-4,该菌株为革兰氏阴性,短杆状,在 LB 固体平板上 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,菌落淡黄色、圆形、不透明、边缘整齐、表面隆起、湿润光滑。能水解淀粉,不能液化明胶。V.P.实验、苯丙氨酸脱氨酶实验呈阴性,硝酸盐还原实验、柠檬酸盐实验呈阳性。菌株对低于 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的卡那霉素具有抗性,而对链霉素、四环素、壮观霉素、氯霉素等敏感。

2.1.2 菌株 16S rRNA 基因序列分析

以菌株 Y-4 的总 DNA 为模板,用细菌 16S rRNA 通用引物进行 PCR 扩增,得到长度约为 1.5kb 的扩增产物。测序后登录 GenBank(序列号为 HQ443288)。与其他菌株 16S rRNA 基因的同源性比较结果显示,与菌株 Y-4 的 16S rRNA 基因同源性最高的是申氏杆菌属,其中与 *Shinella granuli* 相似性为 99%。再结合其生理生化特征将菌株 Y-4 鉴定为申氏杆菌属(*Shinella* sp.)。图 1 为菌株 Y-4 的系统发育树。

2.2 菌株 Y-4 利用乙草胺为唯一碳源的生长和降解

菌株 Y-4 以 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的乙草胺为唯一碳源,每 12 h 取样 1 次,检测该菌株的生长和降解乙草胺的情

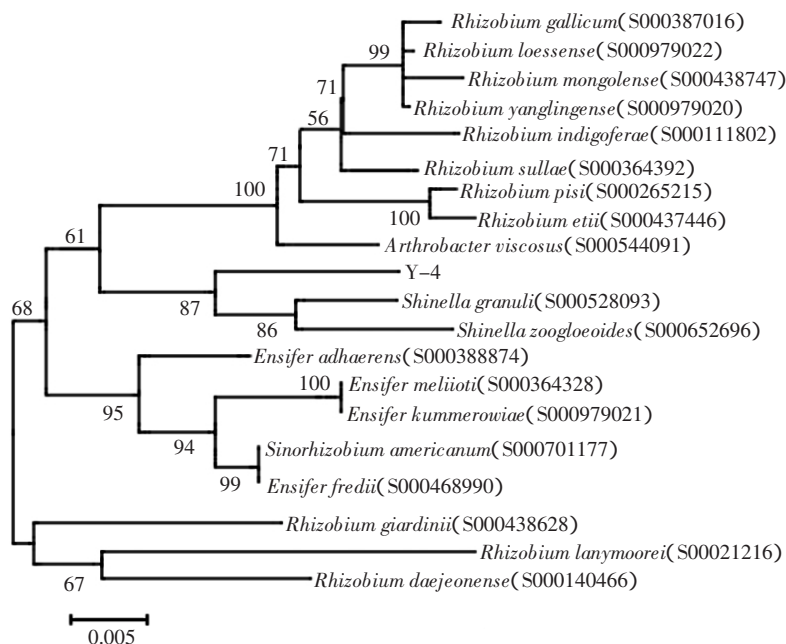


图 1 菌株 Y-4 基于 16S rDNA 序列同源性的系统发育树分析

Figure 1 Phylogenetic analysis of strain Y-4 and related species by the neighbor joining approach

况,设接种灭活的 Y-4 为对照。结果如图 2 所示,菌株 Y-4 能以乙草胺为唯一碳源生长,在 48 h 内对 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙草胺的降解率达到最高,为 83.3%,随后趋于稳定。

2.3 菌株 Y-4 的降解谱

分别以 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的甲草胺、乙草胺、丙草胺和丁草胺为唯一碳源,检测菌株 Y-4 对这些农药的降解情况。结果如图 3 所示,菌株 Y-4 在 3 d 对甲草胺、乙草胺、丙草胺和丁草胺都有一定的降解效果。

2.4 环境条件对菌株 Y-4 降解乙草胺的影响

2.4.1 初始温度对菌株 Y-4 降解乙草胺的影响

在基础盐培养基中添加 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的乙草胺,按 1% 接种量接入 Y-4 菌液,设接种灭活的 Y-4 为对照,分别在 4、10、20、25、30、37、40、50 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d 后取样测定乙草胺残留量。结果如图 4 所示,菌株 Y-4 降解乙草胺的最适温度为 30 $^{\circ}\text{C}$,能达到 80% 以上,在 25~40 $^{\circ}\text{C}$ 之间菌株的降解效果良好,而低温与高温对降解都有一定影响。

2.4.2 初始 pH 对菌株 Y-4 降解乙草胺的影响

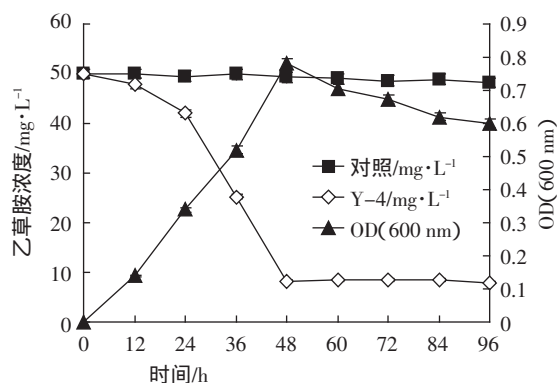


图2 菌株 Y-4 以乙草胺为唯一碳源的生长情况

Figure 2 Utilization of acetochlor as sole source of carbon for growth by Y-4

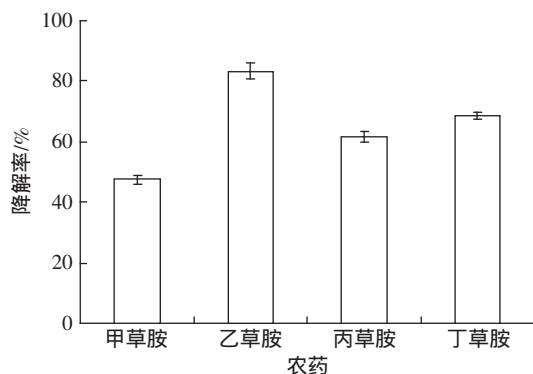


图3 菌株 Y-4 对不同农药的降解

Figure 3 Degradation rate of different pesticides by Y-4

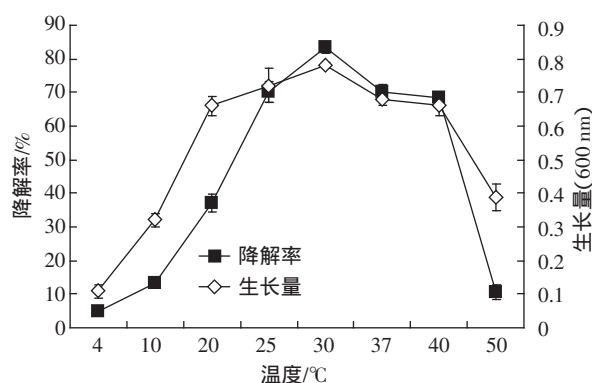


图4 温度对菌株 Y-4 降解乙草胺的影响

Figure 4 Effect of temperature on the degradation of acetochlor by strain Y-4

将菌株 Y-4 以 1% 的接种量接种于含 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙草胺、pH 分别为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 的基础盐培养基中,30 $^{\circ}\text{C}$ 、160 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 3 d 后取样测定乙草胺的降解效果。结果如图 5 所示,乙草胺的降解在 pH 7.0~8.0 之间最好,降解率都达到 80%,其降解的最适 pH 值为 8.0。

2.4.3 农药初始浓度对菌株 Y-4 降解乙草胺的影响

将菌株 Y-4 按 1% 接种量接种到添加乙草胺浓度分别为 5、10、25、50、100、200、400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的基础盐培养基中,30 $^{\circ}\text{C}$ 、160 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 3 d 后取样测定乙草胺的降解效果。结果如图 6 所示,Y-4 对较低浓度的乙草胺有较好的降解效果,当乙草胺的浓度超过 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,Y-4 的降解效果显著下降,400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的乙草胺对降解存在着比较大的抑制作用。

2.4.4 外源营养物质对 Y-4 降解乙草胺的影响

将菌株 Y-4 按 1% 接种量接种到添加乙草胺浓度 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的基础盐培养基中,并分别添加 0.5% 的葡萄糖

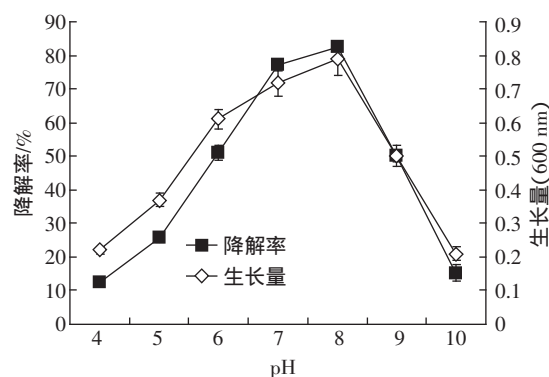


图5 pH 对菌株 Y-4 降解乙草胺的影响

Figure 5 Effect of pH on the degradation of acetochlor by strain Y-4

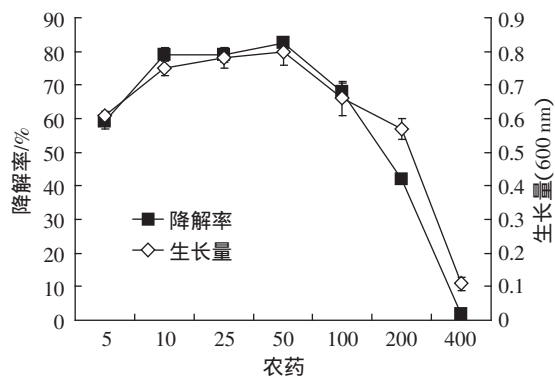


图 6 农药浓度对菌株 Y-4 降解乙草胺的影响

Figure 6 Effect of pesticide concentration on the degradation of acetochlor by strain Y-4

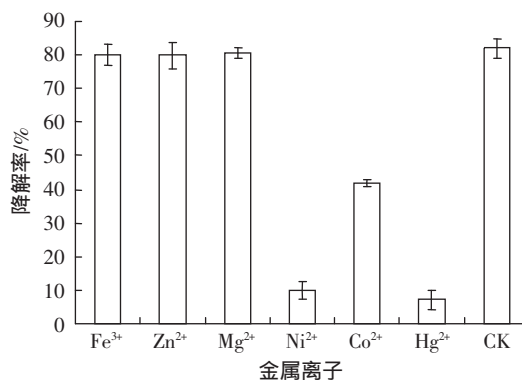


图 8 金属离子对菌株 Y-4 降解乙草胺的影响

Figure 8 Effect of metal ions on the degradation of acetochlor by strain Y-4

糖、蛋白胨、酵母膏, 30 ℃、160 r·min⁻¹ 培养 3 d 后取样测定乙草胺的降解效果。结果如图 7 所示, 葡萄糖、蛋白胨、酵母膏的添加并没有影响菌株对农药的降解。

2.4.5 金属离子对菌株 Y-4 降解乙草胺的影响

将菌株 Y-4 按 1% 接种量接种到添加乙草胺浓度 50 mg·L⁻¹ 的基础盐培养基中, 并分别添加 5% 的 6 种金属离子(Ni²⁺、Co²⁺、Hg²⁺、Zn²⁺、Mg²⁺、Fe³⁺) 30 ℃、160 r·min⁻¹ 培养 3 d 后取样测定乙草胺的降解效果。结果如图 8 所示, Zn²⁺、Mg²⁺和 Fe³⁺ 对菌株 Y-4 降解乙草胺几乎没有影响, Co²⁺对菌株 Y-4 降解乙草胺有一定的抑制作用, 而 Ni²⁺和 Hg²⁺在很大程度上抑制了菌株 Y-4 对乙草胺的降解。

3 结论

本文从江苏某农药厂活性污泥中分离得到一株乙草胺降解菌株 Y-4, 根据表型特征、生理生化特性和 16S rRNA 基因序列相似性分析, 鉴定其为申氏杆菌属(*Shinella* sp.)。有关申氏杆菌属细菌对酰胺类农

药乙草胺降解作用的报道本文尚属首次。

目前国内外关于乙草胺降解菌的报道相对较少, 且没有对 50 mg·L⁻¹ 以上浓度乙草胺降解效果超过 70% 的降解菌。菌株 Y-4 在 48 h 内对 50 mg·L⁻¹ 乙草胺的降解率达 83.3%。

菌株 Y-4 降解乙草胺的最适温度为 30 ℃、最适 pH 为 8.0。过高的起始浓度会抑制菌株 Y-4 对乙草胺的降解。外源营养物质比如葡萄糖、蛋白胨、酵母膏, 对菌株 Y-4 降解乙草胺没有影响, 金属离子 Zn²⁺、Mg²⁺和 Fe³⁺ 对菌株 Y-4 降解乙草胺几乎没有影响, Co²⁺对菌株 Y-4 降解乙草胺有一定的抑制作用, 而 Ni²⁺和 Hg²⁺在很大程度上抑制了菌株 Y-4 对乙草胺的降解。菌株 Y-4 的降解谱实验结果表明, Y-4 还可以降解甲草胺、丙草胺、丁草胺。

参考文献:

- [1] Lee W J, Hoppin J A, Blair A, et al. Cancer incidence among pesticide applicators exposed to alachlor in the Agricultural Health Study[J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 2004, 96(23): 1781-1789.
- [2] Poole C, Cullen M, Irons R, et al. Cancer incidence among pesticide applicators exposed to alachlor in the agricultural health study[J]. *American Journal of Epidemiology*, 2005, 161(1): 101-102.
- [3] 于建垒, 宋国春, 万鲁长, 等. 乙草胺对土壤微生物的影响研究[J]. 环境污染治理技术与设备, 2000, 1(5), 61-65.
YU Jian-lei, SONG Guo-chun, WAN Lu-chang, et al. Study on the effects of acetochlor on soil microbe[J]. *Techniques and Equipment For Environ Poll Cont*, 2000, 1(5): 61-65.
- [4] 郑和辉, 叶常明. 乙草胺和丁草胺的水解及其动力学[J]. 环境化学, 2001, 2(20): 168-171.
ZHENG He-hui, YE Chang-ming. Hydrolysis of chloroacetanilide herbicides acetochlor and butachlor[J]. *Environmental Chemistry*, 2001, 2(20): 168-171.

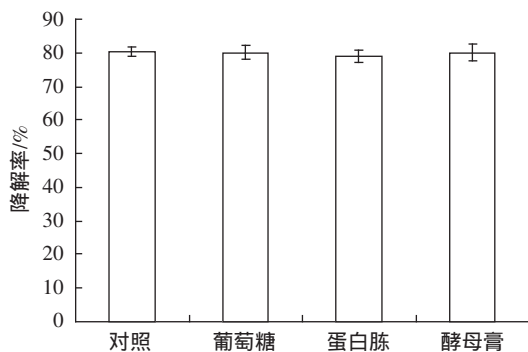


图 7 添加营养物质对菌株 Y-4 降解乙草胺的影响

Figure 7 Effect of adding nutrients on the degradation of acetochlor by strain Y-4

- [5] Min H, Ye Y F, Chen Z Y, et al. Effects of butachlor on microbial populations and enzyme activities in paddy soil[J]. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 2001, 36(5): 581–595.
- [6] Zargar Y, Dar H. Effect of benthocarb and butachlor on growth and nitrogen fixation by cyanobacteria[J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1990, 45(2): 232–234.
- [7] 程湘虹, 沈朵朵. 丁草胺引起药害的原因及对策[J]. 中国植保导刊, 2005, 25(6): 40.
CHEN Xiang-hong, SHEN Duo-duo. The reason and countermeasure of butachlor phytotoxicity[J]. *China Plant Protection*, 2005, 25(6): 40.
- [8] 黄春艳, 陈铁保, 王宇, 等. 土壤湿度对乙草胺药害的影响[J]. 中国农学通报, 2006, 22(8): 393–396.
HUANG Chun-yan, CHEN Tie-bao, WANG Yu, et al. Study on influence of soil humidity to injury of acetochlor[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2006, 22(8): 393–396.
- [9] Chesters G, Simsiman G V, Levy J, et al. Environmental fate of alachlor and metolachlor[J]. *Rev Environ Contam Toxicol*, 1989, 110: 1–74.
- [10] Ye C M, Wang X J, Zheng H H. Biodegradation of acetanilide herbicides acetochlor and butachlor in soil[J]. *J Environ Sci(China)*, 2002, 14(4): 524–529.
- [11] Wang J, Lu Y, Chen Y. Comparative proteome analysis of butachlor-degrading bacteria[J]. *Environmental Geology*, 2008, 53(6): 1339–1344.
- [12] Duraes Sette L, Mendonca Alves Da Costa L A, Marsaioli A J, et al. Biodegradation of alachlor by soil streptomycetes[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 64(5): 712–717.
- [13] 楚小强, 庞国辉, 方华, 等. 丁草胺降解菌的分离鉴定及降解特性的研究[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(1): 145–150.
CHU Xiao-qiang, PANG GUO-hui, FANG Hua, et al. Isolation, identification and characteristics of a butachlor-degrading bacterium[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28(1): 145–150.
- [14] 虞云龙, 潘学冬, 陈英旭. 降解菌HD接种和非接种根围土壤中丁草胺的降解动力学研究[J]. 土壤学报, 2002, 39(4): 575–581.
YU Yun-long, PAN Xue-dong, CHEN Ying-xu. Dynamics of butachlor biodegradation in the root-zone soils and the soil inoculated with a mixture HD of bacterial strains degrading butachlor[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2002, 39(4): 575–581.
- [15] 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.
- [16] 李春艳, 熊明华, 肖晶, 等. 一株丁草胺降解菌的分离鉴定及其降解特性的研究[J]. 微生物学通报, 2009, 36(8): 1178–1182.
LI Yan-chun, XIONG Ming-hua, XIAO Jing, et al. Isolation and characteristics of a butachlor degradation bacterium[J]. *Microbiology*, 2009, 36(8): 1178–1182.
- [17] 李春艳, 李艳春, 成小松, 等. 一株丁草胺降解菌的分离鉴定及培养条件优化[J]. 环境科学学报, 2010, 30(2): 347–353.
LI Chun-yan, LI Yan-chun, CHENG Xiao-song, et al. Isolation and identification of a butachlor degrading bacterium and optimization of its growth conditions[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2010, 30(2): 347–353.
- [18] Xu Jun, Qiu Xinghui, Cao Hong, et al. Isolation and characterization of a *Pseudomonas oleovorans* degrading the chloroacetanilide herbicide acetochlor[J]. *Biodegradation*, 2006, 17(3): 219–225.
- [19] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
DONG Xiu-zhu, CAI Miao-ying. Manual of common system determination bacteriology[M]. Beijing: Science Press, 2001.
- [20] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第二版. 北京: 科学出版社, 1995.
Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning[M]. 2nd edition. Beijing: Science Press, 1995.
- [21] 奥斯伯 F M, 布伦特 R, 金斯顿 R E, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, et al. Current protocols in molecular biology[M]. 1999, Beijing: Science Press.
- [22] William D H, Bathara A M. Bacterial diversity in Adiondack mountain lakes as revealed by 16S rRNA gene sequences[J]. *Appl Envir Microbiol*, 1997, 63(7): 2957–2960.