

咪唑乙烟酸降解菌 S181 的分离鉴定及其降解特性

霍莹, 许景钢, 李淑芹*, 王磊

(东北农业大学资源与环境学院, 哈尔滨 150030)

摘要:为咪唑乙烟酸污染土壤的生物修复提供菌源, 采用瓶富集培养法, 从长期施用咪唑乙烟酸的土壤中筛选出 1 株对咪唑乙烟酸降解能力较强的放线菌, 命名为 S181. 该菌株可利用咪唑乙烟酸为唯一氮源生长. 经形态特征、生理生化特性及 16S rRNA 序列分析, 初步鉴定该菌株为大宫链霉菌(*Streptomyces omiyaensis*). 以 S181 菌体生长量和咪唑乙烟酸降解率为指标, 研究了主要因素(温度、pH、初始浓度和接种量)对 S181 生长和降解能力的影响. 结果表明, 菌株 S181 最佳生长和降解条件为 30℃, pH 为 7.0, 初始咪唑乙烟酸浓度为 200 mg·L⁻¹, 接种量 3%. 在此条件下, 该菌株在去氮源高氏一号培养液中培养 5 d, 咪唑乙烟酸的降解率为 84%.

关键词:咪唑乙烟酸; 降解; 放线菌; 分离鉴定; 特性

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2011)05-1518-06

Isolation and Identification of Imazethapyr Degradable Actinomyces S181 and Its Degradation Characteristics

HUO Ying, XU Jing-gang, LI Shu-qin, WANG Lei

(College of Resources and Environment, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: A selection of actinomyces that could degrade imazethapyr was conducted to provide actinomyces source for bioremediation of soil contaminated by imazethapyr. A strain of actinomyces was isolated from the samples of soil where imazethapyr had been applied for a long-term by use of bottle enriched culture and named S181. The strain had strong ability to degrade imazethapyr and could grow using imazethapyr as the sole nitrogen. The strain was related and shared characteristics to genus *Streptomyces omiyaensis* according to the physiological and biochemical properties as well as 16S rRNA sequence analysis. The influencing factors (temperature, pH, concentration and inoculum) were studied with fungus growth mass and degradation ratio as indexes. The results showed that the optimal degradation ratio occurred at the condition of inoculation ratio of 3%, 200 mg·L⁻¹ imazethapyr, at 30℃ and pH 7.0. Under these conditions, 84% imazethapyr had been degraded by S181 in medium Gao 1 without nitrogen after 5 days.

Key words: imazethapyr; degradation; actinomyces; isolation and identification; characteristics

咪唑乙烟酸(Imazethapyr)是一种长残效咪唑啉酮类除草剂, 我国从 1990 年开始批量进口咪唑乙烟酸并在黑龙江大面积应用, 用量持续增加, 特别是国内产品问世以来, 由于其价格低廉, 除草效果良好, 故使用势头迅猛, 成为黑龙江与内蒙古地区大豆田除草剂的主导品种^[1-3]. 由于大面积长期连年使用, 导致后茬敏感作物受害频繁发生, 文献[4~9]先后证明了施用咪唑乙烟酸 1 a 后, 对玉米、高粱、水稻、棉花、甜菜及马铃薯等作物产生不同程度的药害而造成其减产, 制约了正常的作物轮作, 而且带来农田环境的严重污染.

大量研究证实微生物对土壤的农药降解起着重要的作用, 据报道土壤中咪唑乙烟酸的去除主要依靠微生物降解^[10], 由此筛选咪唑乙烟酸降解菌成为目前消除其对土壤污染领域的研究热点, 科研工作者通过富集培养等技术发现了一些能够降解咪唑乙烟酸的微生物, 如节细菌属、丙酸杆菌属、海球菌属、酸单胞杆菌属、产碱菌属、芽孢杆菌属等细菌, 及黑

曲霉等真菌^[11-14], 但尚鲜见国内外有关放线菌降解咪唑乙烟酸的报道. 基于此, 本实验经过瓶富集培养法, 从长期施用咪唑乙烟酸的土壤中分离、鉴定了 1 株降解咪唑乙烟酸的放线菌, 研究了该菌株的降解能力及其影响因素, 旨在为咪唑乙烟酸污染土壤的生物修复提供菌株资源和理论依据.

1 材料与方 法

1.1 实验材料

菌源样: 取自黑龙江省嫩江某农场长期施用咪唑乙烟酸的土壤.

供试原药: 咪唑乙烟酸(纯度 ≥ 98%), 由沈阳同祥农化有限公司提供.

收稿日期: 2010-06-07; 修订日期: 2010-10-26

基金项目: 东北农业大学创新团队基金项目(CXT003-1-3); 黑龙江省博士后基金项目(LBH-206162)

作者简介: 霍莹(1985~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为环境微生物, E-mail: huoying0932@sina.com

* 通讯联系人, E-mail: shuqinli007@126.com

供试生物测定土壤:从未施用过农药的黑土,取自东北农业大学园艺试验站.风干,过 1 mm 筛,备用.

1.2 实验方法

1.2.1 咪唑乙烟酸降解菌的分离方法

取菌源样 10 g 与 1 g CaCO_3 混合,室温自然风干,空气湿度饱满,28℃ 培养 7 d 后,接入到 100 mL 高氏一号富集培养液,内含咪唑乙烟酸浓度为 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,并含 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的重铬酸钾抑制剂^[15],设置 3 次重复,置于空气浴摇床(30℃,140 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$);培养 7 d 后取出 10 mL 加入到 90 mL 新鲜培养液中继续培养,依此类推,以后每培养 7 d 后取出 10 mL 加入到 90 mL 新鲜培养液中,咪唑乙烟酸的浓度每次增加 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,直至培养液中咪唑乙烟酸浓度达到 1 000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.然后采用平板划线法进行纯化,4℃ 斜面保存备用.

1.2.2 碳源和氮源营养的确定

在咪唑乙烟酸浓度为 1 000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 高氏一号培养液中,分别去除碳源(淀粉)、氮源(KNO_3)及碳氮源(淀粉、 KNO_3),观察菌株生长情况,确定咪唑乙烟酸作为碳、氮源营养情况.

1.2.3 孢子菌悬液的制备和菌体生长量的测定

根据参考文献[16]制备孢子菌悬液并保存.取已烘干恒重的定量滤纸,将菌液进行过滤,收集菌体,用蒸馏水洗涤 2 次,然后连同滤纸置 105℃ 烘干至恒重,差减法得菌体干重,即菌体生长量.

1.2.4 咪唑乙烟酸降解率的测定

本实验采用生物测定法,以水稻根长抑制率作为生测指标.

(1)生测标准曲线的制作 选取颗粒饱满的水稻种子,(32±1)℃ 浸种 36 h,(28±1)℃ 催芽 24 h,待根长约 5 mm 时,挑选长势均匀的种芽播种于分别含咪唑乙烟酸浓度为 0、2、5、10、25、50、100、200、500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的药土小烧杯中,(28±1)℃ 培养,每天称重补水保持土壤含水量为 30%,5 d 后测量水稻根长,计算根长抑制率,建立咪唑乙烟酸浓度与根长抑制率之间的标准曲线方程.

$$\text{根长抑制率} = \frac{\text{空白根长} - \text{处理根长}}{\text{空白根长}} \times 100\% \quad (1)$$

(2)咪唑乙烟酸含量的测定 培养液 121℃ 灭菌 20 min,按需要加入咪唑乙烟酸和孢子菌悬液,对照不接菌,置于空气浴摇床(30℃,140 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$).培养 5 d 后取适量各处理的培养液进行稀释,加入装土的小烧杯中,设置清水空白,按照制作生测标准曲

线的方法培养水稻,5 d 后测量根长,根据式(1)标准曲线方程计算求出根长抑制率,求出咪唑乙烟酸含量,计算咪唑乙烟酸降解率.

1.2.5 菌株鉴定

(1)降解菌的形态及生理生化鉴定 用电子显微镜观察降解菌 S181 的形态,参照文献[17]对其进行生理生化鉴定.

(2)16S rRNA 序列扩增、测序与分析 利用 SK1201-UNIQ-10 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取总 DNA,应用正向引物(5'-AGAGTTTGA TCCTGGCTCAG-3'),反向引物(5'-GGTTACCTT GTTACGACTT -3')进行 16S rRNA 的 PCR 扩增,反应体系为 50 μL :模板 DNA 10 pmol 正反向引物各 1 μL ,dNTP 混合物 1 μL ,10×buffer 5 μL ,Taq DNA 酶(5 U/ μL) 0.25 μL ,加水至 50 μL .

PCR 程序设定:预变性 98℃ 5 min,循环 95℃ 35 s,55℃ 35 s,72℃ 1 min 30 s,35 个循环;延伸 8 min,扩增后 16S rDNA 片段经 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测,观察结果.用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒对 PCR 产物切胶回收 DNA 目的片段进行 TA 克隆.

连接反应体系:10×Ligation Buffer 1 μL ,50% PEG 1 μL ,pUCm-T Vector 50ng,PCR Product 0.2 pmol,T4 DNA Ligase 2.5U,Final Volume 10 μL .16~23℃ 连接 1~2 h 后,将连接产物转化感受态大肠杆菌,涂布在预先用 20 μL 100 mmol/L IPTG 和 100 μL 20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ X-gal 涂布的氨苄青霉素平板上,37℃ 培养过夜,蓝白斑挑选阳性克隆.阳性克隆子委托上海生工生物工程技术有限公司进行序列测定.所得测序结果在通过 BLAST 程序与 GenBank 中核酸数据进行序列搜索比对后,选择亲缘关系较近的菌株作为参比菌株,用 MEGA 4.0 软件构建系统发育树.

1.2.6 降解菌生长和降解特性研究

设定不同初始咪唑乙烟酸浓度、pH、温度、接菌量,对菌株进行生长量及降解率的分析,以确定降解菌的生长和降解的最佳培养条件.

2 结果与分析

2.1 样品的富集培养、菌种分离及营养源确定

参考瓶培养法富集技术^[18,19],土壤样经过多次富集培养后,得到混合微生物的培养物,此混合培养物在高氏一号培养基上进行划线分离,挑取单菌落,经过复筛、纯化后得到 1 株放线菌,命名为 S181.营

养源实验表明, S181 在以咪唑乙烟酸为唯一氮源的高氏一号培养液中生长良好, 在以咪唑乙烟酸为唯一碳源及唯一碳氮源的高氏一号培养液中均不生长. 由此可知 S181 可以咪唑乙烟酸为唯一氮源生长.

2.2 菌株鉴定

2.2.1 菌株 S181 的形态及生理生化鉴定

形态观察和革兰氏染色试验表明: 菌株 S181 为革兰氏阳性菌, 在大部分培养基上都无气生菌丝体, 白色. 基丝薄, 透明至暗乳脂色. 菌落紧密多皱, 边缘整齐, 无可溶性色素. 扫描电镜 (scanning electron micrograph, SEM) 照片 (图 1) 可观察到孢子呈椭圆形至柱形, 表面光滑, 孢子丝直至柔曲, 形成长孢子链. 可利用 D-葡萄糖、D-木糖和鼠李糖; 不利用 L-阿拉伯糖、D-果糖、蔗糖、棉子糖、肌醇和 D-甘露醇. 产生抑制革兰氏阳性和阴性细菌的氯霉素.

对菌株 S181 进行生理生化试验, 结果表明淀粉水解、过氧化氢酶、牛奶酪化、明胶液化、硫化氢、硝酸盐还原试验均呈阳性反应.

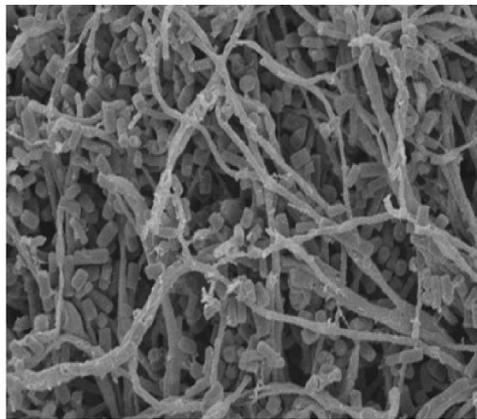


图 1 菌株 S181 的扫描电镜照片 ($\times 4\ 000$)

Fig. 1 SEM of strain S181 ($\times 4\ 000$)

2.2.2 降解菌 16S rRNA 的序列测定及其系统发育分析

PCR 产物经测序得到菌株 S181 16S rRNA 碱基序列, 片段全长为 1 487 bp, 在 GenBank 中登录号为 HM153702. BLAST 对比显示, 菌株 S181 与 *Streptomyces omiyaensis* (GenBank 登录号为 EU741141) 相似性最高, 两者相似性为 99.86%. MEGA 4.0 聚类分析表明, 菌株 S181 与 *Streptomyces omiyaensis* 聚类于同一分支 (图 2). 结合形态特征和生理生化特性, 初步鉴定菌株 S181 为大官链霉菌 (*Streptomyces omiyaensis*).

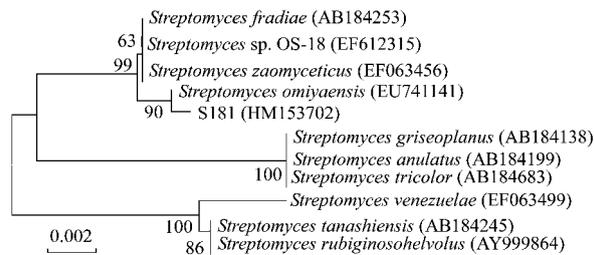


图 2 基于 16S rRNA 序列同源性的 S181 菌株和相关放线菌的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic position of strain S181 and other related actinomycetes based on 16S rRNA sequences analysis

2.3 菌株 S181 的生长和降解咪唑乙烟酸最佳条件

2.3.1 菌株 S181 的生长与咪唑乙烟酸降解

无菌操作下, 将 3% 的 S181 孢子菌悬液加入含 $100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑乙烟酸的去氮源高氏一号培养液 (未添加 KNO_3) 中, 置于空气浴摇床 (30°C , $140\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$) 进行培养, 定时取样测定菌体生长量 (菌体干重)、咪唑乙烟酸降解率变化情况, 结果见图 3.

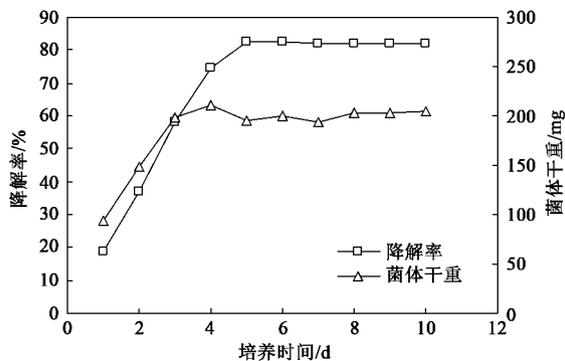


图 3 降解菌 S181 的生长曲线和咪唑乙烟酸降解曲线

Fig. 3 Growth curve of strain S181 and degradation curve of imazethapyr

由图 3 可见, 在培养过程中菌株 S181 生长量与咪唑乙烟酸降解率变化规律一致, 均先迅速升高然后趋于平稳, 第 4 d 菌体干重达到最大为 $211.1\ \text{mg}$, 咪唑乙烟酸降解率在第 5 d 达到最大为 82.27% . 可以看出第 1~4 d 为菌株 S181 对数生长期, 菌体代谢旺盛, 对咪唑乙烟酸的降解率也随之增大; 随后菌株 S181 进入稳定期, 菌体干重和降解率变化不大. 由此选择后续实验的培养时间为 5 d.

2.3.2 初始咪唑乙烟酸浓度对菌株 S181 的生长和降解咪唑乙烟酸的影响

无菌操作下, 在含不同咪唑乙烟酸浓度 ($50\sim 500\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 的去氮源高氏一号培养液中, 接种 3%

的 S181 孢子菌悬液,置空气浴摇床 (30°C , $140\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$) 培养 5 d, 菌体干重和咪唑乙烟酸降解率变化情况见图 4.

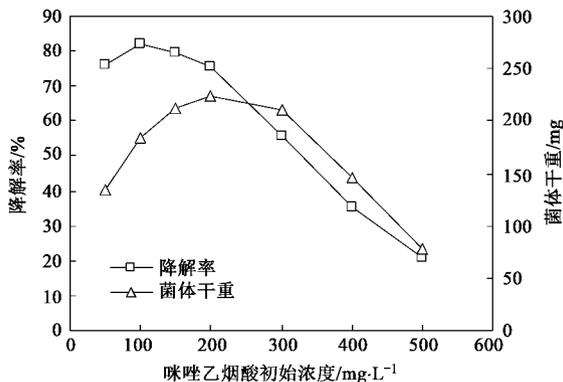


图 4 咪唑乙烟酸浓度对 S181 生长和降解的影响

Fig. 4 Effects of concentration of imazethapyr on S181 growth and imazethapyr degradation

由图 4 可以看出,在 $50 \sim 200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间, S181 菌体生长量随着初始咪唑乙烟酸浓度的增大而增大,在 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时菌体生长量达到最大,而咪唑乙烟酸降解率随初始含量的增加,先升高后降低,总体降解率保持在 75% 以上, $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时达到最大为 81.93%, 降解量为 81.93 mg; $> 200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,菌体生长量和咪唑乙烟酸降解率均随着咪唑乙烟酸初始浓度的增大而迅速减小. 这是因为菌株在降解咪唑乙烟酸的过程中,低浓度时,咪唑乙烟酸主要是作为可利用物质供菌体生长,而高浓度则会对菌体造成毒害作用,抑制菌体生长和降解. 在实际利用微生物消除土壤污染时,要充分考虑到农药浓度与微生物数量的关系,既要得到高的降解率,又要有大的降解量^[20]. 当初始咪唑乙烟酸浓度为 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,其降解率为 75%,降解量为 150 mg,虽然此时降解率不高,但微生物数量和咪唑乙烟酸降解量远高于 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,因此,选择 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑乙烟酸为最佳初始浓度.

2.3.3 温度对菌株 S181 生长和降解咪唑乙烟酸的影响

无菌操作下,按 3% 接菌量将 S181 孢子菌悬液加入到去氮源高氏一号培养液(咪唑乙烟酸浓度为 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 中,置一定温度空气浴摇床 ($140\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$) 培养 5 d, 菌体干重和咪唑乙烟酸降解率变化情况见图 5.

由图 5 可以看出,当温度在 $4 \sim 30^{\circ}\text{C}$ 之间时,随着培养温度的增加,菌株 S181 生长量和咪唑乙烟酸

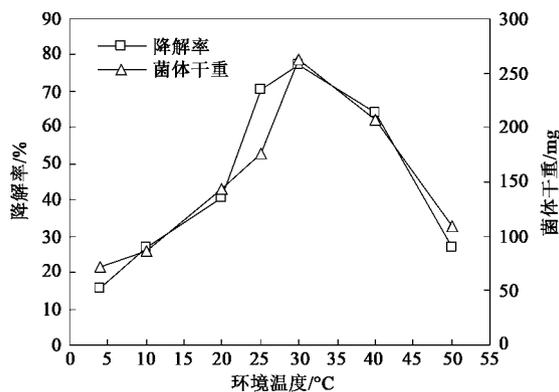


图 5 温度对 S181 生长和降解咪唑乙烟酸的影响

Fig. 5 Effects of temperature on S181 growth and imazethapyr degradation

降解率呈上升趋势;在 30°C 时菌体干重和降解率均达到最大值,分别为 262.5 mg 和 77.23%;温度 $> 30^{\circ}\text{C}$ 时,生长量和降解率则随温度的升高而急剧下降. 还可以看出,当温度范围为 $25 \sim 40^{\circ}\text{C}$ 时,菌株 S181 的生长量和降解率均较高.

2.3.4 初始 pH 对降解菌 S181 生长和降解咪唑乙烟酸的影响

无菌操作下,在不同 pH 的去氮源高氏一号培养液(含 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑乙烟酸)中,接种 3% S181 孢子菌悬液,置于空气浴摇床 (30°C , $140\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$) 培养 5 d, 菌体干重和咪唑乙烟酸降解率变化情况见图 6.

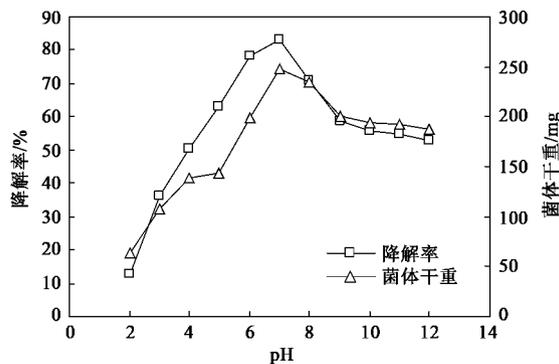


图 6 pH 对 S181 生长和降解咪唑乙烟酸的影响

Fig. 6 Effects of pH on S181 growth and imazethapyr degradation

由图 6 可以看出,菌株 S181 生长量与咪唑乙烟酸降解率随 pH 变化基本一致,均为先迅速增加后降低; pH 为 7.0 时,菌体生长量和咪唑乙烟酸降解率同时达到最大值,分别为 247.6 mg 和 83.8%; pH 由 7.0 \sim 9.0 时,菌体生长量和降解率迅速下降; pH 为 9.0 \sim 12.0 时,菌体生长量和降解率下降缓慢,总体降解率保持在 50% 以上,表明菌株 S181 在 pH 2.0 \sim 9.0 范围内对环境 pH 敏感. 由图 6 还可以看出,菌株

S181 生长和降解在 pH 5.0 ~ 12.0 的范围内都有较高的活性,咪唑乙烟酸的降解率在 50% 以上。

2.3.5 接菌量对降解菌 S181 生长和降解咪唑乙烟酸的影响

无菌操作下,在去氮源高氏一号培养液(含 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 咪唑乙烟酸)中,按照不同比例接入菌株 S181 的孢子菌悬液,置于空气浴摇床(30°C , $140 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)培养 5 d,菌体干重和咪唑乙烟酸降解率变化情况见图 7。

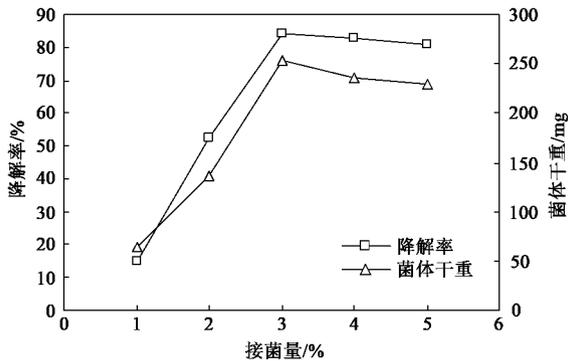


图 7 接菌量对 S181 生长和降解咪唑乙烟酸的影响

Fig. 7 Effects of the inoculum on S181 growth and imazethapyr degradation

由图 7 可以看出,接菌量在 1% ~ 3% 之间,菌体生长量和咪唑乙烟酸降解率随着接菌量增加而升高;接菌量在 3% 时,菌体生长量达到最大为 253.9 mg ,咪唑乙烟酸降解率达到最高为 84%。接菌量在 3% ~ 5% 之间,菌体生长量和咪唑乙烟酸降解率随着接菌量增加而减小,但变化不大。接菌量增加菌体增多,对咪唑乙烟酸降解有明显促进作用,当菌体量达到一定程度,对降解率影响不大,因此适宜接菌量 $\geq 3\%$ 。从经济上考虑,建议采用接菌量为 3%。

3 讨论

到目前为止,人们已分离了许多可降解农药的微生物,这些微生物包括细菌、真菌、放线菌和藻类^[21]。其中,已报道的对咪唑乙烟酸有降解能力的微生物主要为细菌。王学东等^[22]分离得到 2 株咪唑乙烟酸高效降解菌 ZJX-5 和 ZJX-9,当咪唑乙烟酸的原始浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,2 d 内对其降解率均达 70% 以上;臧海莲等^[23]驯化培养得到 1 株细菌,在含 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的咪唑乙烟酸的无机盐基础培养液中培养 5 d 后,降解率在 80% 以上;曹知平等^[13]分离得到 1 株黑曲霉 LZ1,对含 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 咪唑乙烟酸的培养液降解率达到 72.5%;郑玉莲等^[12]获得了

芽孢杆菌属细菌 zx2 和 zx7,它们都能以咪唑乙烟酸为唯一碳源生长,对咪唑乙烟酸的降解率在 80% 以上;本实验所筛选的大宫链霉菌属 (*Streptomyces omiyaensis*) S181,能以咪唑乙烟酸为唯一氮源生长,对 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 咪唑乙烟酸的降解率可达 84%,与其他菌属的菌种降解咪唑乙烟酸的能力相比具有一定的高效性;并且放线菌链霉菌属降解咪唑乙烟酸的研究尚未见报道,具有一定的创新性。

在自然环境中,微生物降解农药的能力与环境 pH 值和温度等有直接的关系^[21]。前人研究表明:影响咪唑乙烟酸在土壤中的可利用性及降解的最主要的因素是 pH 值,土壤 pH 在 6.5 ~ 8 时,除草剂咪唑乙烟酸带负电荷,因而不被带负电荷的有机质吸附,呈游离态,而可被植物吸收与微生物降解^[24],东北地区黑土 pH 呈中性偏碱,菌株 S181 生长和降解在 pH 5.0 ~ 12.0 的范围内有较高的活性,故其自然环境适宜菌株 S181 生长,对咪唑乙烟酸可有较高的降解效果。在降解菌耐受实验中,菌株 S181 能在咪唑乙烟酸最终浓度达到 $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的去氮源高氏一号培养液中生长,表明菌株 S181 具有修复高浓度咪唑乙烟酸污染的能力。

4 结论

(1) 从长期施用咪唑乙烟酸的土壤中筛选出 1 株放线菌,命名为 S181,其可利用咪唑乙烟酸为唯一氮源生长;根据菌株形态、生理生化特性及 16S rRNA 序列分析初步鉴定该菌株为大宫链霉菌属 (*Streptomyces omiyaensis*)。

(2) 在去氮源高氏一号培养液中,菌株 S181 最佳生长和降解条件为:初始咪唑乙烟酸浓度为 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,温度为 30°C ,pH 为 7.0,接菌量为 3%。在此条件下,空气浴摇床(30°C , $140 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)中培养 5 d,咪唑乙烟酸降解率为 84%。

参考文献:

- [1] 赵爽,叶非.咪唑啉酮类除草剂的应用及降解[J].植物保护,2009,35(2):15-19.
- [2] 苏少泉.抗咪唑啉酮类除草剂作物的发展与未来[J].现代农药,2006,5(1):1-4.
- [3] Zhang W Q, Linscombe S, Webster E, et al. Risk assessment of the transfer of imazethapyr herbicide tolerance from leafy rice to red rice (*Oryza sativa*) [J]. Euphytica, 2006, 152: 75-86.
- [4] 陈铁保,杨绍义.普施特在土壤中活性的研究[J].杂草科学,1992,(1):7-10.
- [5] 黄春艳,陈铁保,王宇,等.咪唑啉酮类除草剂对后茬作物安全性研究[J].农药学报,2001,3:29-34.
- [6] 苏少泉.长残留除草剂对后茬作物安全性问题[J].农药,

- 1998, **37**(12):4-7.
- [7] Curran W S. Effects of tillage and application method on clomazone, imazaquin and imazethapyr persistence [J]. Weed Science, 1992, **40**(3):421-428.
- [8] Hart R G. Imazethapyr herbicide [M]. America: CRC Press, 1991. 247-256.
- [9] O'Sullivan J. Effect of imazethapyr and imazamox soil residues on several vegetable crops grown in Ontario [J]. Canadian Journal of Plant Science, 1998, **78**(4):647-651.
- [10] 郑金来,李君文,晁福寰. 常见农药降解微生物研究进展及展望 [J]. 环境科学研究, 2001, **14**(2): 62-64.
- [11] Wang X, Liu X, Wang H, *et al.* Utilization and degradation of imazaquin by a naturally occurring isolate of arthrobacter crystallopoietes [J]. Chemosphere, 2007, **67**(11):2156-2162.
- [12] 郑玉莲,许景钢,李淑芹,等. 普施特优势降解细菌的筛选与鉴定 [J]. 东北农业大学学报, 2009, **40**(6): 40-44.
- [13] 曹知平,许景钢,李淑芹,等. 黑曲霉 LZ1 降解咪唑乙烟酸的特性 [J]. 东北农业大学学报, 2010, **41**(7): 66-69.
- [14] 刘亚光,庞福德. 咪唑乙烟酸高效降解菌降解性能的研究 [J]. 植物保护, 2009, **35**(2): 63-66.
- [15] 刘志恒,姜成林. 放线菌现代生物学与生物技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2004. 248-249.
- [16] 韩慧龙,汤晶,江浩,等. 真菌-细菌修复石油污染土壤的协同作用机制研究 [J]. 环境科学, 2008, **29**(1): 189-195.
- [17] 瓦克斯曼 S A. 放线菌第二卷属和种的分类、鉴定和描述 [M]. 北京: 科学出版社, 1974. 281-282.
- [18] Venkaleswarlu K. Persistence and biodegradation of carbofuran in flooded soil [J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 1997, **25**: 533-538.
- [19] 土壤微生物研究会(日). 土壤微生物实验法 [M]. 北京: 科学出版社, 1983. 267-293.
- [20] 周军英,林玉锁,徐亦刚,等. 巨大芽孢杆菌 LY-4 对土壤中杀虫单农药的降解 [J]. 中国环境科学, 2000, **20**(6): 511-514.
- [21] 李岩,蒋继志,马平,等. 细菌降解农药研究新进展 [J]. 西北农林科技大学学报, 2005, **33**(增刊): 250-252.
- [22] 王学东,欧晓明,王慧利,等. 除草剂咪唑乙烟酸高效降解菌的筛选及其降解性能的研究 [J]. 农业环境科学学报, 2003, **22**(1): 102-105.
- [23] 臧海莲,熊明华,成小松,等. 一株咪唑乙烟酸降解菌的分离鉴定及其降解特性 [J]. 作物杂志, 2010, (3): 40-44.
- [24] 苏少泉. 长残留除草剂在土壤中的分解及其使用中带来的严重问题 [J]. 农化新世纪, 2008, (4): 24-26.