

1 株草除灵高效降解菌的分离鉴定与降解特性研究

钱丽花, 陈立伟, 任倩, 顾海莎, 蔡天明*

(南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095)

摘要: 从农药厂废水处理池的活性污泥中分离得到1株能以草除灵为唯一碳源生长的菌株. 经生理生化鉴定和16S rRNA基因序列同源性分析, 将此菌株初步鉴定为 *Methyloversatilis* sp., 命名为 MBLHC-2. 对菌株 MBLHC-2 的生长特性研究表明, 液体培养时, 菌株呈絮状生长; 在 30℃、pH 8.0 的 R2A 培养基中生长最佳. 菌株在 20~40℃ 之间均能降解草除灵, 在 30℃、pH 8.0 的条件下菌株对草除灵的降解效率最高, 48 h 内降解率达 99.78%. 提高草除灵浓度会对菌株产生毒害作用; 提高接种量有利于加快草除灵的降解, 当接种量由 0.5% 提高到 8% 时, 16 h 时草除灵浓度由 69.83 mg·L⁻¹ 降低为 1.41 mg·L⁻¹; 降解菌利用有机氮源降解草除灵效率最高; 添加蛋白胨、酵母粉和 LB 溶液有利于菌株对草除灵的降解. 草除灵终浓度为 300 mg·L⁻¹ 的工业废水经 48 h 处理后, 草除灵的去除率达 99.34%, 菌株 MBLHC-2 具有很好的应用前景.

关键词: 草除灵; 分离鉴定; 生长特性; 菌体干重; 生物降解

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2011)06-1805-07

Isolation and Identification of a Benazolin-ethyl Degrading Strain and Its Degradation Characteristics

QIAN Li-hua, CHEN Li-wei, REN Qian, GU Hai-sha, CAI Tian-ming

(College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: A highly efficient benazolin-ethyl degrading strain was isolated from pesticide wastewater treatment pool. This strain could use benazolin-ethyl as the sole carbon source for growth. It was identified as *Methyloversatilis* sp. according to its physiological and biochemical properties, and 16S rRNA gene sequence analysis. The strain was designated as MBLHC-2. The results of growth characteristics showed that cells of stain MBLHC-2 tended to clump together in liquid cultures; Stain MBLHC-2 grew best in R2A culture medium at 30℃ and pH 8.0. The strain could degrade benazolin-ethyl when temperature in the range of 20-40℃. The optimal temperature and pH was 30℃ and 8.0, respectively; The efficiency of benazolin-ethyl biodegradation in 48 h was 99.78%. Increasing concentration of benazolin-ethyl produced toxic effects on strain MBLHC-2; When the inoculation rate was 0.5% up to 8%, the residual concentration of benazolin-ethyl was 69.83 mg·L⁻¹ down to 1.41 mg·L⁻¹ in 16 h, which means that improving inoculation rate could speed up the degradation of benazolin-ethyl. Strain MBLHC-2 could degrade benazolin-ethyl more effectively in the use of organic nitrogen. Adding peptone, yeast extract and LB solution in the culture was beneficial to the degradation of benazolin-ethyl. Strain MBLHC-2 was capable of removing 300 mg·L⁻¹ benazolin-ethyl in industrial wastewater by 99.34% in 48 h, and this strain possesses a good application potential for treatment of wastewater containing benazolin-ethyl.

Key words: benazolin-ethyl; isolation and identification; growth characteristics; cell dry weight; biodegradation

草除灵 (benazolin-ethyl), 化学名称为: 4-氯-2-氧代苯并噻唑-3-基乙酸乙酯, 是一种防除油菜田阔叶杂草及其它旱田作物阔叶杂草的芽后处理剂^[1], 属有机杂环类除草剂. 1963年由Brookes等^[2]报告其除草活性, 国内由德国艾格福公司推广, 商品名为高特克, 在我国油菜田大面积推广使用, 除草效果非常显著^[3]. 农药生产废水具有有机物的质量浓度高, 污染物成分十分复杂, 毒性大, 难生物降解等特点^[4,5]. 草除灵的长期施用使其在植株、土壤和水体中有一定量的沉积, 对环境造成了污染; 且草除灵生产过程中产生的大量高浓度的工业废水可生物降解性差^[6].

大量研究表明, 微生物对土壤和水环境中的农药降解起着关键作用^[7,8]. 采用生物方法处理草除

灵工业废水具有高效率、低成本的优势. 目前关于农药的生物降解是国内外的研究热点^[9-15], 且关于草除灵在农作物中的迁移残留及其在土壤中降解的研究较多^[16-19], 但鲜有关于草除灵微生物降解的报道. 因此, 筛选能够降解草除灵的微生物资源必然会对草除灵工业废水及被草除灵污染的环境修复带来促进作用.

本实验室从农药厂废水处理池的活性污泥中分离筛选出1株草除灵高效降解菌, 并对其培养条件

收稿日期: 2010-06-23; 修订日期: 2010-08-23

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30970099); 江苏省省级环保科技项目 (2009001)

作者简介: 钱丽花 (1985 ~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为环境微生物, E-mail: qlh0909@126.com

* 通讯联系人, E-mail: ctm@njau.edu.cn

和降解条件进行研究, 以期为受草除灵污染的环境及草除灵工业废水的生物处理提供菌株资源和理论依据.

1 材料与amp;方法

1.1 供试原药与培养基

草除灵原药(97%)由江苏长青农化有限公司提供.

无机盐培养基: NaCl 1.0 g, (NH₄)₂SO₄ 1.0 g, K₂HPO₄ 1.5 g, KH₂PO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, 去离子水补足至1 000 mL, pH 7.0.

LB 培养基: 胰蛋白胨 10.0 g, NaCl 10.0 g, 酵母粉 5.0 g, 去离子水补足至1 000 mL, pH 7.2.

YG 培养基: 酵母粉 1.0 g, 葡萄糖 1.0 g, K₂HPO₄ 0.3 g, KH₂PO₄ 0.25 g, MgSO₄ 0.25 g, 去离子水补足至1 000 mL, pH 7.0~7.2.

R2A 培养基: 蛋白胨 0.5 g, 可溶性淀粉 0.5 g, 葡萄糖 0.5 g, 酵母粉 0.5 g, 酪蛋白水解物 0.5 g, K₂HPO₄ 0.3 g, 丙酮酸钠 0.3 g, MgSO₄·7H₂O 0.05 g, 去离子水补足至1 000 mL, pH 7.2.

1.2 降解菌的富集与筛选分离

取农药厂废水处理池中的活性污泥 5.00 g, 加入到 100 mL 草除灵浓度为 30 mg·L⁻¹ 的无机盐培养基中, 30℃、160 r·min⁻¹ 条件下培养, 每隔 5 d 以 5% 的接种量接入到新鲜无机盐草除灵培养基中, 连续转接 4 次. 取 0.5 mL 富集液作梯度稀释, 取 10⁻² ~ 10⁻⁸ 稀释度的液体各 0.1 mL 涂布于草除灵浓度为 100 mg·L⁻¹ 的无机盐固体培养基上, 30℃ 培养, 挑取能够产生水解圈的单菌划线分离. 纯化后的菌株转接至草除灵浓度为 25 mg·L⁻¹ 的无机盐液体培养基中, 30℃、160 r·min⁻¹ 条件培养 3 d 后, 通过 HPLC 分析检测其降解效果. 以未接菌的含草除灵的无机盐培养基为对照, 按照降解率 $D\% = (c_{CK} - c_t) / c_{CK} \times 100\%$ 的方式计算降解率, 式中, c_{CK} 为空白处理中草除灵的浓度, c_t 为培养结束时培养基中草除灵的浓度.

1.3 草除灵降解菌株的鉴定

1.3.1 降解菌株的培养特征及生理生化鉴定

将降解菌采用平板涂布法接种于 R2A 固体培养基上, 30℃ 恒温培养 48 h 后观察菌落形态. 并用光学显微镜和电子显微镜观察菌体形态, 参照文献 [20] 进行生理生化鉴定.

1.3.2 降解菌株 16S rRNA 基因序列分析

采用 SDS 高盐沉淀法^[21] 提取菌体总 DNA. 16S

rRNA 基因采用通用引物^[22] 进行 PCR 扩增, 上游引物为 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (*Escherichia coli* bases 8 to 27), 下游引物为 5'-TACCTTGTTACGACTT-3' (*Escherichia coli* bases 1507 to 1492). PCR 产物回收采用试剂盒回收, 与 pMD19-T Vector 连接后, 转化至大肠杆菌 DH5 α 中, 提质粒验证, 将质粒正确的转化子送 Invitrogen 公司测序. 测序结果与 NCBI 数据库中核酸序列比对, 并采用 MEGA 4.0 软件 NJ 方法构建系统发育树.

1.4 降解菌株生长条件的研究

按 1% 的接种量将菌悬液接入 R2A 培养基中, 设置不同的 pH、培养基、温度和 NaCl 浓度, 30℃ 恒温摇床振荡培养 48 h, 测定菌体干重.

1.5 环境条件对菌株降解草除灵的影响

1.5.1 培养温度对草除灵降解的影响

以在 R2A 液体培养基中 30℃、160 r·min⁻¹ 培养至对数生长后期(48 h) 的菌体为种子液, 按 2% 接种量接种至草除灵浓度为 100 mg·L⁻¹ 的无机盐培养基中, 设定培养的温度分别为 20、25、30、35 和 40℃, 于 30℃、160 r·min⁻¹ 摇床条件培养, 48 h 取样, 测定培养液中草除灵残留量, 计算草除灵的降解率.

1.5.2 初始 pH 值对草除灵降解的影响

设定培养液的初始 pH 值分别为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 和 11.0, 每个 pH 值同时设置只加草除灵不加菌的对照, 每一处理重复 3 次, 其它培养参数同 1.5.1 节, 48 h 取样, 测定培养液中草除灵残留量, 计算草除灵的降解率.

1.5.3 草除灵起始浓度对降解的影响

设定无机盐培养基中草除灵浓度分别为 25、50、100、200、400 mg·L⁻¹, 其他培养参数同 1.5.1 节, 每隔 8 h 取样, 测定培养液中草除灵残留量.

1.5.4 接种量对草除灵降解的影响

设定接种量分别为 0.5%、1%、2%、4% 和 8%, 其他培养参数同 1.5.1 节, 每隔 8 h 取样, 测定培养液中草除灵残留量.

1.5.5 氮源对草除灵降解的影响

在无氮无机盐培养基中, 分别加入 0.1% 的蛋白胨、尿素、(NH₄)₂SO₄、KNO₃, 其他培养参数同 1.5.1 节, 24 h 取样, 测定培养液中草除灵残留量, 计算草除灵的降解率.

1.5.6 添加营养物质对菌株降解性能的影响

在无机盐培养基中分别加入 1% 的 LB 溶液、10% 葡萄糖溶液、蛋白胨溶液和酵母膏溶液, 设定不

添加营养物质的处理进行对比,其他培养参数同 1.5.1 节,24 h 取样,测定培养液中草除灵残留量,计算草除灵的降解率。

1.6 含草除灵废水的生物处理

将取自江苏长青农化有限公司的含草除灵废水中加入 40% 的去离子水,再加入 1/10 体积的 5 倍浓度的无机盐培养基,调节 pH 至 8.0,接种 1/10 体积菌株 MBLHC-2 种子液,30℃、160 r·min⁻¹ 摇床条件培养 48 h,测定草除灵残留量。

1.7 草除灵的测定

取待测定的草除灵无机盐液体培养基,加等体积二氯甲烷,振荡萃取 20 min,静置分层后取下层有机相,加入适量无水 Na₂SO₄ 干燥后,加入甲醇溶解待测。测定采用高效液相色谱法,福立 FL2200 高效液相色谱仪,ultimate C18 (2 μm, 250 mm × 4.6 mm) 色谱柱,流速 1.0 mL/min; 流动相 V(甲醇):V(水) = 80:20,经 0.45 μm 过滤膜过滤,并在超声波清洗器中处理 15 min^[23]; 检测波长 254 nm,进样体积 20 μL。

1.8 菌体干重的测定

采用过滤法测定菌体干重。定量滤纸烘干至恒重,将培养 48 h 的菌液全部过滤,过滤后用少量去离子水洗涤,60℃ 烘干至恒重测定结果。

2 结果与讨论

2.1 菌株的分离筛选

通过富集、平板划线分离得到 1 株能以草除灵为唯一碳源生长的菌株,命名为 MBLHC-2。菌株 MBLHC-2 在含有草除灵的无机盐平板上正常生长并能形成水解圈,见图 1。在 30℃ 下培养 48 h 后肉眼可看到清晰的乳白色菌落,菌落圆形,表面光滑干燥,边缘整齐、中央隆起;在液体培养基中呈絮状生长;菌株 MBLHC-2 革兰氏染色呈阴性,能利用多种 C₁ 化合物(如:甲醇、甲醛、甲酸、甲基胺)及多碳化合物(如:葡萄糖、麦芽糖、果糖)生长;其生理生化鉴定结果见表 1。电镜观察该菌呈短杆状,无芽孢,无鞭毛,扫描电镜照片见图 2。

表 1 MBLHC-2 的生理生化特性¹⁾

Table 1 Physiological characteristics of strain MBLHC-2

项目	结果	项目	结果
革兰氏染色	-	过氧化氢酶	+
运动性	-	接触酶	-
氧化酶	+	硝酸盐还原	-
脲酶	-	吲哚试验	-

1) +: 阳性反应; -: 阴性反应

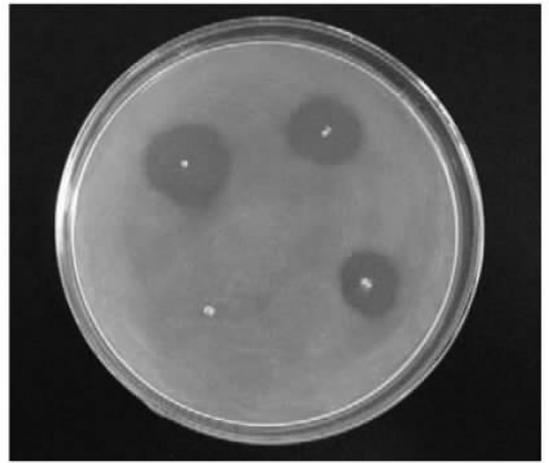


图 1 MBLHC-2 在草除灵无机盐培养基上的水解圈

Fig. 1 Photograph of MBLHC-2 degrading benazolin-ethyl on mineral media



图 2 MBLHC-2 的扫描电镜照片 (×10⁴)

Fig. 2 Electronic micrograph of strain MBLHC-2

2.2 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析

以菌株总 DNA 为模板,采用通用引物进行扩增,获得 1.5 kb 大小的 PCR 产物,用 Blastn 程序将该片段测序结果和 GenBank 中已登录的核苷酸序列进行同源性比较,发现菌株 MBLHC-2 与 *Methyloversatilis universalis* 同源性为 99.133%。根据生理生化结果及序列特征,菌株 MBLHC-2 被鉴定为 *Methyloversatilis* sp., 其系统发育树见图 3。

2.3 菌株生长条件的确定

图 4 为各因素对降解菌株 MBLHC-2 生长的影响情况。由于菌株 MBLHC-2 在液体培养时呈絮状生长,对培养基要求较特殊。从图 4(a) 可以看出,菌株在 LB 培养基中生长最差,在 R2A 培养中生长最好,菌体干重达到 270 mg·L⁻¹,LB 培养基营养丰富

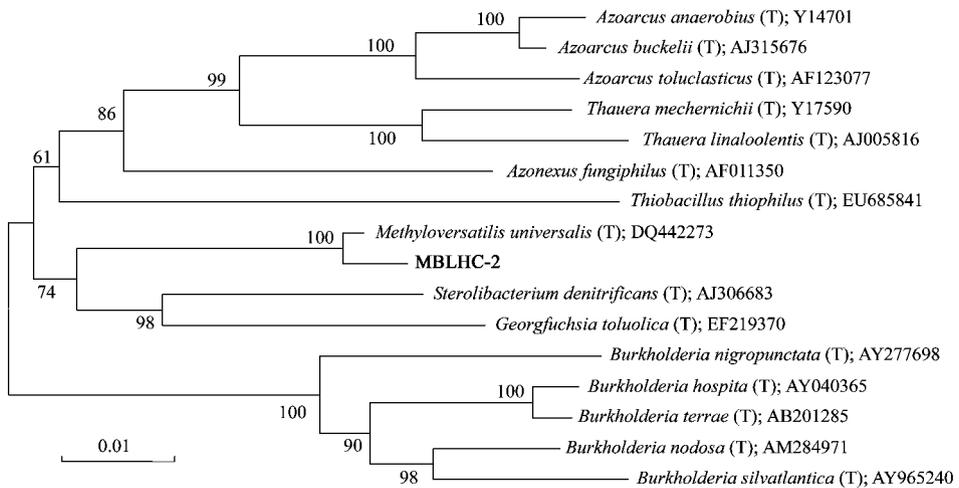


图3 MBLHC-2的系统发育树

Fig. 3 16S rRNA gene based phylogenetic tree of strain MBLHC-2

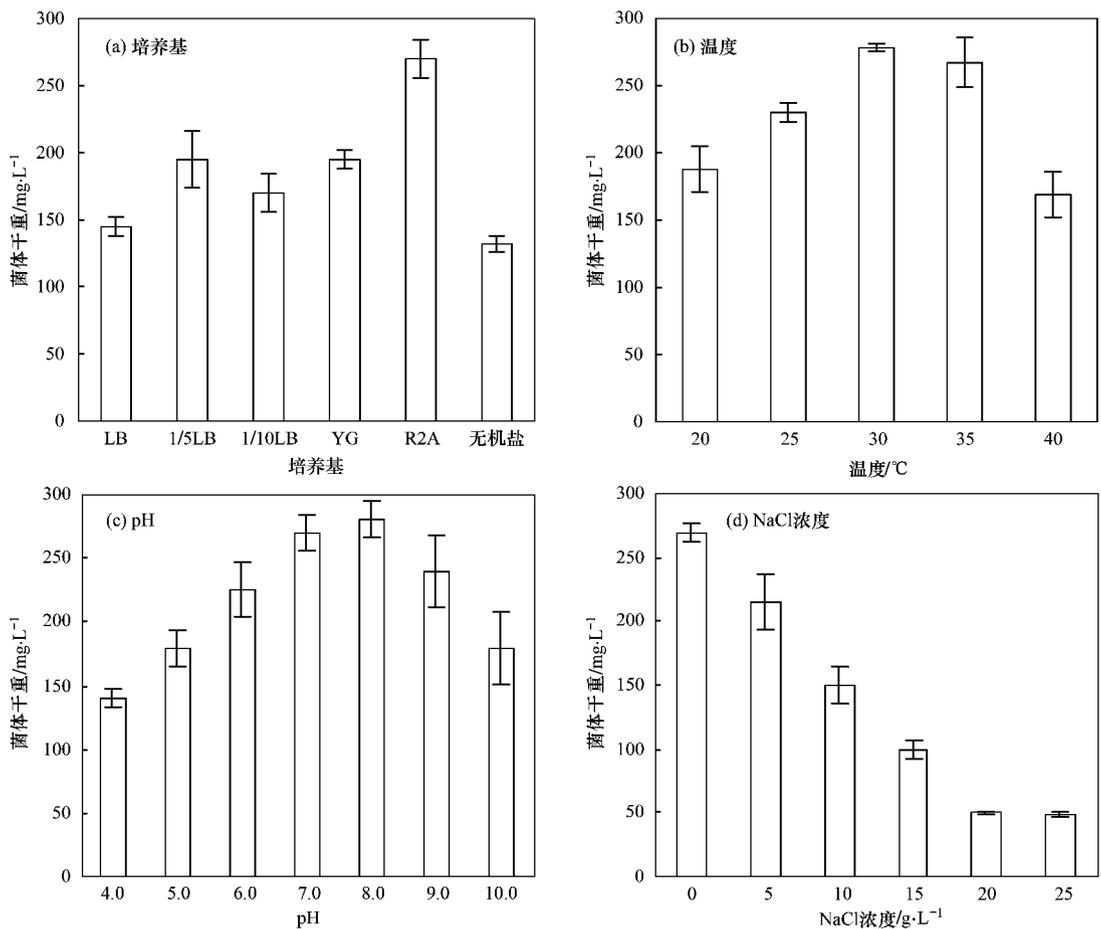


图4 各因素对菌株 MBLHC-2 生长的影响

Fig. 4 Effect of different factors on the growth of strain MBLHC-2

反而抑制了菌株的生长. 由图 4 (b) 可知, 温度对菌株 MBLHC-2 的生长也有一定的影响, 低温下菌株

仍能生长, 高温会抑制菌株的生长, 菌株在 30°C 时生长最好. 图 4 (c) 表明, 菌株 MBLHC-2 的生长对

pH 值没有特殊要求,当 pH 值在 6.0 ~ 9.0 范围内时,菌株 MBLHC-2 均能良好生长,pH 为 8.0 时菌株 MBLHC-2 生长量最大,菌体干重达到 $280 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。由图 4(d)可知,NaCl 浓度对菌株 MBLHC-2 生长的影响很大,当 NaCl 浓度为 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,菌体生长量已经明显下降,当浓度达到 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,菌株基本不生长。

2.4 环境条件对菌株降解草除灵的影响

2.4.1 培养温度对草除灵降解的影响

由图 5 可知,随着温度的升高,草除灵的降解率先升高后降低,在 30°C 时菌株对草除灵的降解率最高,达到 99.65%。在 20°C 时草除灵的降解率为 59.09%,在 40°C 时草除灵的降解率为 48.23%。在 $20 \sim 40^\circ\text{C}$ 之间,菌株对草除灵都有较高的降解率, 30°C 时降解最好,降解菌株对温度有较宽的适应范围。

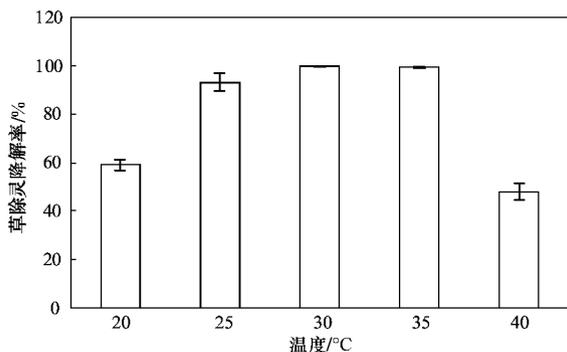


图 5 温度对草除灵降解率的影响

Fig. 5 Effect of temperature on degradation rate of benzazolin-ethyl

2.4.2 初始 pH 值对草除灵降解的影响

由图 6 可知,该菌在 pH 6.0 ~ 9.0 的范围内降解率都达到 90% 以上,在 pH 为 8.0 时降解率最高,达到 99.78%。在 pH 为 4.0 时基本不降解,随着 pH 值的增大,降解率先升高后降低,在 pH 为 10.0 时降解率仅为 30.58%。pH 值过小或过大都不利于菌株对草除灵的降解,即培养液的酸碱度对菌株的生物降解有显著影响。在中性和偏碱性条件下,菌株对草除灵的降解效果较好,在 pH 为 8.0 时,降解效果最好。

2.4.3 草除灵起始浓度对草除灵降解的影响

由图 7 可知,随着草除灵浓度的提高,降解菌对其的降解不断减少。当草除灵浓度为 25 和 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,16 h 时草除灵浓度分别为 1.44 和 $4.55 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,24 h 时草除灵基本被完全降解;当浓度为 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,16 h 时草除灵浓度为 114.08

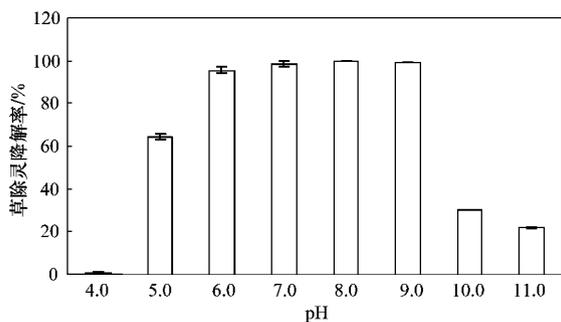


图 6 pH 对草除灵降解率的影响

Fig. 6 Effect of pH on degradation rate of benzazolin-ethyl

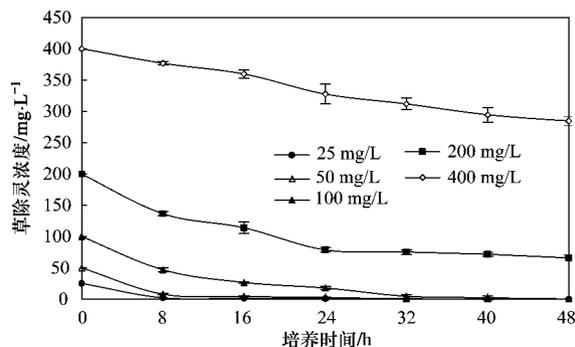


图 7 草除灵起始浓度对降解的影响

Fig. 7 Effect of initial benzazolin-ethyl concentration on degradation

$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,48 h 时为 $65.74 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;当浓度提高到 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,16 h 时草除灵浓度为 $359.84 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,48 h 时仍高达 $284.56 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。这说明,草除灵的初始浓度低时,很容易被菌株利用,降解较快。随着草除灵浓度的提高,菌株将其完全降解的时间也不断增加,而当草除灵浓度增加到一定程度后,它对降解菌株的毒性开始显现,使得降解缓慢。

2.4.4 接种量对草除灵降解的影响

由图 8 可知,草除灵的降解随着接种量的增加而迅速加快。当接种量为 0.5% 时,16 h 时草除灵浓度为 $69.83 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,48 h 时为 $46.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;当接种量为 1% 时,16 h 时草除灵浓度为 $59.18 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,48 h 时为 $19.58 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;而当接种量为 4% 和 8% 时,16 h 时草除灵浓度仅为 6.41 和 $1.41 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,24 h 时草除灵基本已完全降解。当接种量由 0.5% 提高到 8% 时,16 h 时草除灵浓度由 $69.83 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 降为 $1.41 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,结果表明,接种量增加,菌体数量增加,可以加快草除灵的降解。

2.4.5 氮源对草除灵降解的影响

由图 9 可知,氮源对草除灵的降解有很大的影响。氮源为尿素和蛋白胨时草除灵的降解率分别为

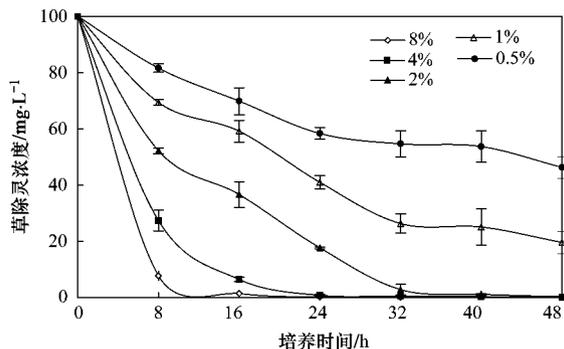


图8 接种量对草除灵降解的影响

Fig. 8 Effect of inoculation amount on degradation of benazolin-ethyl

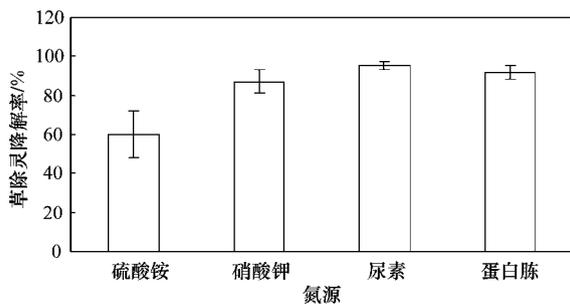


图9 氮源对草除灵降解率的影响

Fig. 9 Effect of nitrogen source on degradation rate of benazolin-ethyl

95.45% 和 91.87%, 氮源为 KNO_3 时降解率为 87.17%, 氮源为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 时降解率为 60.17%。这说明, 降解菌较易利用有机氮源, 其次为硝态氮, 利用铵态氮效率最低、草除灵降解最慢。

2.4.6 外加营养物质对草除灵降解的影响

由图 10 可知, 与未添加营养物质的样品相比, 添加蛋白胨、酵母粉、LB 的样品中草除灵的降解率明显提高, 添加蛋白胨的样品在 24 h 时降解率就达到 97.34%, 而添加葡萄糖的样品降解率基本未发生变化。这可能是因为蛋白胨、酵母粉和 LB 溶液能同时提供细菌生长所需的碳源与氮源, 可以促进降解菌株的生长; 而葡萄糖为碳源, 不能提供氮源, 对菌株生长影响不大。

2.5 菌株 MBLHC-2 处理含草除灵废水

由于高浓度草除灵对菌株具有毒性因而抑制其生长, 所以需对含草除灵废水进行稀释, 再用菌株 MBLHC-2 对其进行处理。实验表明, 用 40% 以上的水稀释上述废水后, 草除灵的去除效果较好。用 40% 的水稀释含草除灵废水中草除灵的终浓度为

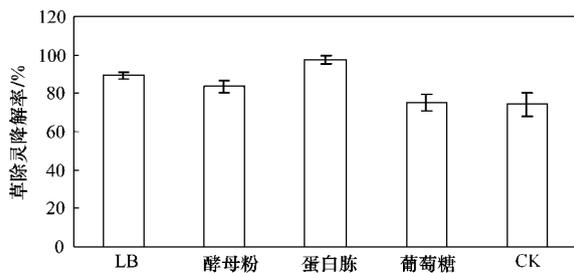


图 10 添加营养物质对草除灵降解率的影响

Fig. 10 Effect of nutrient on degradation rate of benazolin-ethyl

$300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 加入 1/10 体积的 5 倍浓度的无机盐培养基, 接种 1/10 体积的菌株 MBLHC-2 振荡培养 48 h 后, 草除灵的残留量为 $1.98 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 去除率为 99.34%, 故菌株 MBLHC-2 在含草除灵工业废水的生物处理中具有很好的应用潜力。

3 结论

(1) 通过富集培养, 获得了 1 株能以草除灵为唯一碳源的高效降解菌株 MBLHC-2。运用 16S rRNA 基因扩增和 Blastn 软件分析等方法, 初步鉴定降解菌株 MBLHC-2 为 *Methyloversatilis* sp. .

(2) 菌株 MBLHC-2 在液体培养时呈絮状生长, 在 30°C 、pH 8.0 的 R2A 培养基中生长最佳; NaCl 浓度对菌株 MBLHC-2 生长有较大的影响, NaCl 浓度增加, 菌株生长受到抑制。

(3) 菌株 MBLHC-2 在 30°C 、pH 8.0 的条件下对草除灵的降解率最高; 增加草除灵浓度会对菌株产生毒害作用, 降低草除灵降解率; 提高接种量可以加快草除灵的降解; 菌株利用有机氮源降解草除灵效率最高; 添加能同时提供碳与氮的营养物质有利于草除灵的降解。

(4) 废水处理实验表明, 在用 40% 的水稀释后的含草除灵浓度为 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的工业废水中, 加入 1/10 体积的 5 倍浓度的无机盐培养基, 接种 1/10 体积的菌株 MBLHC-2 振荡培养 48 h 后, 草除灵的残留量为 $1.98 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 去除率为 99.34%, 故菌株 MBLHC-2 在含草除灵工业废水的生物处理中具有很好的应用潜力。

参考文献:

- [1] 张百臻. 农药分析[M]. (第四版). 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [2] Brookes B F, Leafe E L. Structure and plant growth-regulating activity of some 2-benzothiazolyloxyacetic acids and 2-

- oxobenzothiazolin-3-ylacetic acids [J]. *Nature*, 1963, **198** (4880):589-590.
- [3] 蔡颢. 草除灵乙酯小试研究报告[J]. *安徽化工*, 1997, **88**(4): 13-14.
- [4] 矫彩山, 彭美媛, 王中伟, 等. 我国农药废水的处理现状及发展趋势[J]. *农药*, 2007, **46**(2):77-80.
- [5] 胡大波, 刘福强, 凌盼盼, 等. 农药废水的处理技术进展与展望[J]. *环境科技*, 2009, **22**(2):63-66.
- [6] 杨赓, 施娟娟, 李明, 等. 草除灵废水可生物降解性及共基质代谢作用快速测定研究[J]. *现代农药*, 2002, **1**(2):30-33.
- [7] Courteix A, Bergel A. Horseradish peroxidase-catalyzed hydroxylation of phenol: I. Thermodynamic analysis [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1995, **17**(12):1087-1093.
- [8] Sogorb M A, Vilanova E. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis[J]. *Toxicology Letters*, 2002, **128** (1-3):215-228.
- [9] 廖敏, 张海军, 谢晓梅. 拟除虫菊酯类农药残留降解菌产气肠杆菌的分离、鉴定及降解特性研究[J]. *环境科学*, 2009, **30** (8):2445-2451.
- [10] 段海明, 王开运, 乔康, 等. 两株毒死蜱降解细菌的分离鉴定及其降解特性[J]. *环境科学学报*, 2009, **29**(4):723-731.
- [11] 张隽, 黄星, 邱吉国, 等. 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*, 2009, **29**(6):1178-1183.
- [12] Pattanasupong A, Nagase H, Inoue M, *et al.* Ability of a microbial consortium to remove pesticide, carbendazim and 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2004, **20**(5):517-522.
- [13] 王彬彬, 熊丽, 郑永良, 等. 甲基对硫磷高效降解菌的分离鉴定及降解酶基因的克隆表达[J]. *环境科学学报*, 2008, **28** (10):1969-1975.
- [14] 丁伟, 白鹤, 程茁, 等. 咪唑乙烟酸降解菌的分离、鉴定及其降解特性研究[J]. *环境科学*, 2008, **29**(5):1359-1362.
- [15] 邓晓, 李勤奋, 侯究文, 等. 乐果降解菌 LGX1 的筛选及其降解特性研究[J]. *生态环境学报*, 2010, **19**(5):1034-1039.
- [16] Kelly I D, Smith S. Chromatographic purification and identification of polar metabolites of benazolin-ethyl from soybean [J]. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 1986, **25**(1-3):135-149.
- [17] 李美玲, 周小刚, 高茵, 等. 草除灵除草效果及对油菜安全性研究[J]. *农药*, 1998, **37**(9):41-42.
- [18] 单正军, 朱忠林, 蔡道基. 高特克在油菜及土壤中的残留降解[J]. *农业环境保护*, 1999, **18**(2):59-61.
- [19] Schnitzler F, Lavorenti A, Berns A E, *et al.* The influence of maize residues on the mobility and binding of benazolin: Investigating physically extracted soil fractions [J]. *Environmental Pollution*, 2007, **147**(1):4-13.
- [20] 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. 267-273.
- [21] Miller S A, Dykes D D, Polesky H F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells[J]. *Nucleic Acids Research*, 1988, **16**(3):1215.
- [22] Stackebrandt E, Goodfellow M. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* [M]. UK: John Wiley & Sons, 1991. 371-375.
- [23] 魏翔. 草除灵的液相色谱分析[J]. *山东化工*, 2003, **32**(1): 30-32.