

百菌清降解菌 BJQ2 的分离、鉴定及影响因素研究

谷晓明, 魏朝俊, 贾临芳, 王春娜, 吴昆明, 赵建庄*

(北京农学院农产品有害微生物及农残安全检测与控制北京市重点实验室, 北京 102206)

摘要:采用未有百菌清用药史的土壤定向培养 49 d, 分离出 50 株百菌清耐受菌株, 经初筛、复筛后得到 1 株降解能力最强的细菌 BJQ2, 经形态学、生理生化试验、16S rDNA 序列同源性比对及系统发育树的分析, 初步确定为阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae* B9), BJQ2 可以以百菌清为唯一碳源于基础培养基中生长。BJQ2 降解百菌清的最适宜条件为: 培养温度 30~35 ℃, 初始 pH 值为 7.0~8.0, 百菌清的初始浓度为 20 mg·L⁻¹, 选用菌体母液(OD₆₀₀=0.35), 以 10% 的接种量接种, 6 d 后提取百菌清, 利用气相色谱进行检测分析, 计算后发现百菌清的降解率可以达到 79.2%。

关键词:百菌清; 阴沟肠杆菌; 生物降解; 影响因素

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2012)02-0306-06

Isolation, Identification and Degradative Characters of Chlorothalonil-degrading Bacteria BJQ2

GU Xiao-ming, WEI Chao-jun, JIA Lin-fang, WANG Chun-na, WU Kun-ming, ZHAO Jian-zhuang*

(Beijing Key Laboratory of Safety Detection and Control on Harmful Microbes and Pesticide Residues in Agricultural Products, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Abstract: Directionally cultivated for 49 days in the soil with no history of chlorothalonil (TPN, 2,4,5,6-tetrachloro-1,3-isophthalonitrile) application, 50 chlorothalonil-tolerant bacteria strains were isolated. The highest concentration of chlorothalonil was up to 600 mg·L⁻¹. BJQ2, one with the best degradability among those strains, was obtained after prescreening and affinity. It was initially identified as *Enterobacter cloacae* B9 on the basis of morphological approach, physiological-biochemical experiment, homology comparison of 16S rDNA and the analysis of phylogenetic tree. BJQ2 could be bred in the basic medium by using chlorothalonil as the unique carbon and energy source. The most appropriate condition for BJQ2 to degrade chlorothalonil was as follows: Breeding temperature was 30~35 ℃, original pH value was 7.0~8.0, original TPN concentration was 20 mg·L⁻¹ and the inoculation amount was 10 percent(primary mother liquor, OD₆₀₀=0.35) in the experiment (V/V). In this condition, chlorothalonil was extracted after 6 days. And its degradation rate was calculated to arrive at 79.2 percent by checking and analyzing with gas chromatography.

Keywords: chlorothalonil; *Enterobacter cloacae* B9; biodegradation; influencing factors

农作物在生长过程中易受许多病虫害的感染,但

农药的不规范使用使得农产品中农药残留量超标问题日益突出。近 10 年来,全球每年至少发生 2 500 万起农药中毒事件^[1],我国平均每年发生农药中毒事故人数约 10 万人^[2]。农药残留量超标还会影响农产品的市场竞争力和国民经济的可持续发展。

百菌清(chlorothalonil)是一种保护性取代苯类农用广谱杀菌剂,有多种剂型,广泛用于蔬菜、果树、豆类、水稻、小麦等多种作物病害的防治,其中对于保护地蔬菜的霜霉病、白粉病、灰霉病及番茄疫病防效较好。但是,已有研究表明百菌清具有很强的“三致”作用,在动物慢性饲喂实验中,对大鼠肾脏有致癌作用,致突变性较强。对啮齿动物的急性毒性低,蓄积作用

收稿日期:2011-05-14

基金项目:2011 第七届北京市教学名师项目;2010 年度北京市属高等学校人才强教深化计划“学术创新人才(PHR201006124)”;北京市属高等学校人才强教深化计划资助项目“蔬菜优质安全生产理论与技术体系创新研究(PHR200907136)”;北京果园常用农药残留检测技术研究与应用(Z09060500600906);农产品加工及贮藏工程北京市重点建设学科(PXM2009-014207-078172);首都农产品安全产业技术研究院成果转化项目(PXM2012-014207-000019)北京市科技计划项目“农产品中有害微生物及农残检测与控制关键技术研究及应用”

作者简介:谷晓明(1986—),女,硕士,从事农药残留研究。

E-mail: guxiaoming88888@yahoo.com.cn

* 通讯作者:赵建庄 E-mail: zhaojianzhuang@263.net

明显,对鱼类有剧毒。百菌清能诱导小鼠骨髓淋巴细胞姊妹染色单体交换和骨髓嗜染红细胞微核率的增加,是一种使细胞的遗传物质发生突变的化学农药。百菌清虽然急性毒性低,但在我国也曾出现过急性中毒事故,加上慢性毒性问题,使用上要严格控制其用量,特别对多次采收的蔬菜等作物的使用更要严格。我国药检部门规定:百菌清在水稻上最终残留量不能超过 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,安全间隔期为 10 d;在苹果、梨、葡萄、草莓上不能超过 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,安全间隔期分别为 21、25、21、21 d^[3-6]。

微生物降解是农药在环境中降解的主要途径之一。由于环境中微生物资源丰富,又可以避免引入其他化学试剂而造成二次污染,许多科学工作者致力于筛选出可以高效降解农药的微生物。已报道可降解农药的微生物有细菌、真菌、放线菌、藻类等,大多数来自土壤微生物类群。细菌由于其生化上的多种适用能力以及容易诱发突变菌株从而占了主要的位置^[7-8]。有报道称土壤中广泛存在着可降解百菌清的微生物。氮单胞菌(*Azomonas*)、黄杆菌(*Flavobacterium*)、莫拉氏菌(*Moraxella*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、微球菌(*Micrococcus*)、苍白杆菌(*Ochrobactrum lupini*)等都作为百菌清的降解菌被分离到^[9]。大多数菌株通过共代谢的方式进行降解,少数菌株可以以百菌清为唯一碳源。尽管百菌清在土壤中降解较快,但是药剂的重复使用大大降低了其降解速率,因而筛选可降解百菌清的微生物资源,丰富百菌清生物降解的数据库,具有十分重要的意义^[10]。本研究以百菌清为唯一碳源,通过定向驯化^[11]、分离,筛选菌种,得到一株可以降解百菌清的兼性厌氧微生物,同时研究不同初始百菌清浓度、pH 值、温度、接种量^[12]对降解效率的影响,以期为该菌株的生物修复应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料及仪器

1.1.1 培养基

基础培养基 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): NH_4NO_3 1.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, KH_2PO_4 0.5 g, NaCl 0.5 g, K_2HPO_4 1.5 g, 去离子水 1 000 mL。用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 或 NaOH 调节 pH 值至 7, 121℃ 湿热灭菌 15 min。

富集培养基 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): 牛肉膏 3.0 g, 蛋白胨 5.0 g, 葡萄糖 10.0 g, 酵母浸膏 1.0 g, NaCl 5.0 g, 去离子水 1 000 mL。用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 或 NaOH 调节 pH 值至 7, 121℃ 湿热灭菌 15 min。

NA 固体培养基 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): 牛肉膏 5.0 g, 蛋白胨 10.0 g, 琼脂 20.0 g, 去离子水 1 000 mL。用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 或 NaOH 调节 pH 值至 7, 121℃ 湿热灭菌 15 min。

1.1.2 药品与试剂

丙酮为色谱纯试剂,购自美国 FISHER 公司。其他试剂(丙酮、间二甲苯)均为分析纯,购自北京化工厂。百菌清(75%可湿性粉剂)购自深圳诺普信农化股份有限公司,98%百菌清原药购自湘潭华源精细化工有限公司,100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 百菌清标样购自农业部环境保护科研监测所。

1.1.3 试验仪器

气相色谱仪 Agilent 6890N, HP-5 石英毛细管柱 (30 m×0.32 mm×0.25 μm), 微池电子捕获检测器 (uECD), 载气为高纯氮(99.999%)。

DHP-9162 型电热恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司), DTC-3G plus PCR 基因扩增仪(上海精密仪器仪表有限公司), DYY-6B 型稳流稳压电泳仪(南京普阳科学仪器研究所南达生物技术开发公司)。细菌基因组 DNA 提取试剂盒(北京三博远志生物技术有限责任公司)。

1.2 菌种的富集与分离

试验以未有百菌清用药史的土壤(取自北京农学院科技园试验田)为供试土壤进行诱导定向培养。土样分 3 组于温度 25℃、湿度 60% 下,分别以 50、100、200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的百菌清可湿性粉剂进行处理,每组设 1 个平行,每次相同处理间隔 7 d,共处理 7 次,共 49 d,最后一次处理后 7 d,将 3 个试验组各取 5.0 g 土壤,分别装入含 100 mL 无菌水的 250 mL 三角瓶(带玻璃珠)中振荡,制成菌悬液,以 10% 的接种量取上清液接至富集液体培养基中^[13]。此时,富集液体培养基中百菌清的浓度为 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,于 30℃、180 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 4 d。然后按 10% 的接种量转接到下一批富集培养基中(含百菌清浓度为 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$),继续培养 4 d,再转接至含百菌清浓度为 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的富集培养基中,如此循环至 500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。最后,各取不同农药浓度的发酵液 0.1 mL 接至对应农药浓度的固体基础培养基中(以百菌清为唯一碳源),涂布平板,置于 30℃ 恒温培养箱中培养 48 h,选取不同形态特征的菌落进行分离、纯化。

经过初筛(观察有无降解圈产生)、复筛(用气相色谱检测所得初筛菌株的实际降解率),最终选出一株降解效果最佳的菌株 BJQ2,于 NA 培养基斜面上,

4℃下保藏。

1.3 农药百菌清的提取与检测

培养结束后,将三角瓶(250 mL)中的 50 mL 培养液置于 100 mL 梨形瓶中,于 85℃、90 r·min⁻¹ 下旋干,静置过夜。分两次以间二甲苯进行振荡提取,每次 2 mL,合并两次提取液,经 0.2 μm 滤头过滤,氮吹近干,以丙酮(色谱纯)定容至 1 mL,再以丙酮(色谱纯)稀释 500 倍,上样进行气相色谱分析。

色谱条件如下:尾气吹扫 60 mL·min⁻¹;进样口温度 250℃;柱温 200℃(3 min)→10℃·min⁻¹→220℃(2 min);检测器温度 250℃。进样量为 1 μL,采用不分流进样,出峰时间为 3.47 min。

经验证,以上提取测定方法所得标准曲线的 $R^2=0.999\ 3$,添加回收率(92.2±1.9)%~(111.4±3.23)%,变异系数 2.1~2.9,均能满足农药残留分析要求。根据农药的残留浓度计算降解率,菌株降解率计算公式^[14]:

$$X = \frac{C_1 - C_2}{C_{CK}} \times 100\%$$

式中: X 为降解率; C_1 为对照培养液中百菌清含量($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), C_2 为试验组培养液中百菌清含量($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), C_{CK} 为试验初始时所测百菌清真实含量($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。

1.4 百菌清降解效果的测定及数据处理

配置不同初筛菌种母液(1 011 cfu·mL⁻¹),以体积比 10%的接种量接种至含有百菌清的基础培养基中,农药终浓度为 20 mg·L⁻¹,装液量为 50 mL。每个处理设 3 个平行,以不接菌为对照。降解培养 6 d 后,以 1.3 方法进行提取,计算。利用 SAS9.1 进行统计分析,选出降解效果最佳的菌株。

1.5 菌种的鉴定

对筛选出的菌株 BJQ2 进行形态学观察、生理生化鉴定、16S rDNA 序列同源性比对,确定其分类地位。

16S rDNA 提取:取 0.5~2.0 mL 培养菌液(最多不超过 2×10^9 个细胞),12 000 r·min⁻¹ 离心 30 s,弃去上清液;向菌体沉淀中加入 200 μL 缓冲液 SL 并立即振荡混匀;加入 20 μL 蛋白酶 K(20 mg·mL⁻¹)溶液,吹打混匀后于 58℃放置 10 min;加入 220 μL 结合液 SB,立刻上下快速颠倒充分混匀,58℃放置 10 min,冷却后加入 220 μL 无水乙醇,充分混匀;将所得溶液和絮状沉淀都加入一个硅基质膜吸附柱中,吸附柱放入收集管中,12 000 r·min⁻¹ 离心 30 s,倒掉收集管中的废液;加入 700 μL 漂洗液 PW,12 000 r·min⁻¹ 离心 30 s,弃掉废液;加入 500 μL 漂洗液 PW,12 000 r·min⁻¹ 离

心 30 s,弃掉废液;将吸附柱再放回收集管中,12 000 r·min⁻¹ 离心 2 min,尽量除去漂洗液,以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应;取出吸附柱,放入一个干净的离心管中,在吸附膜的中间部位加 50~200 μL 洗脱缓冲液 EB,70℃温浴 3~5 min,12 000 r·min⁻¹ 离心 1 min,将所得基因组 DNA 在-20℃保存。

PCR 扩增引物:上游引物 5'-AGAGTTTGATC-CTGGCTCAG-3',下游引物 5'-GGYTACCTTGTTAC-GACTT-3'

扩增后产物的分子量通过电泳确定,切胶回收,测序结果在 NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov)中进行 BLAST 同源性比对分析。运用 ClustalX2.0、MEGA3.1 软件将相关的菌株通过 Neighbor-Joining 法进行系统发育分析,确定菌种分类^[15-16]。

1.6 菌株降解百菌清的影响因素

1.6.1 培养温度对降解率的影响

设定振荡培养温度为 15、20、25、30、35、40℃^[17],装液量为 50 mL,百菌清浓度设为 20 mg·L⁻¹,pH 值 7.0,以 10%(体积比)的接种量分别接种菌种母液(1 011 cfu·mL⁻¹,OD₆₀₀=0.35),于 30℃、180 r·min⁻¹ 下恒温振荡培养。每个处理设 3 个平行,以未接菌的培养基作对照,48 h 后提取百菌清残留量,计算降解率。

1.6.2 初始 pH 值对降解率的影响

设定培养液的初始 pH 值为 5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0。百菌清浓度设为 20 mg·L⁻¹,装液量为 50 mL,培养温度设为 30℃,以 10%(体积比)的接种量分别接种菌种母液,于 30℃、180 r·min⁻¹ 下恒温振荡培养。每个处理设 3 个平行,以未接菌的培养基作对照,48 h 后提取百菌清残留量,计算降解率。

1.6.3 农药初始浓度对降解率的影响

设定农药百菌清初始浓度为 20、30、40、50、80 mg·L⁻¹ 和 100 mg·L⁻¹,初始 pH 值设为 7,培养温度设为 30℃,装液量为 50 mL,以 10%(体积比)的接种量分别接种菌种母液,于 30℃、180 r·min⁻¹ 下恒温振荡培养。每个处理设 3 个平行,以未接菌的培养基作对照,48 h 后提取百菌清残留量,计算降解率。

1.6.4 接种量对降解率的影响

先配置 OD₆₀₀=0.35 的菌体母液,将该母液稀释到原来的 0.01、0.05、0.1、0.5、1 倍,得到 5 个梯度的菌悬液,以 10%(体积比)的接种量接种,装液量为 50 mL,初始 pH 值设为 7,培养温度设为 30℃,百菌清初始浓度 20 mg·L⁻¹,于 30℃、180 r·min⁻¹ 下恒温振荡培养。每个处理设 3 个平行,以未接菌的培养基作对照,

48 h 后提取百菌清残留量,计算降解率^[18]。

2 结果与讨论

2.1 百菌清降解菌的筛选和鉴定

从表 1 可以看出,经过初筛之后得到 4 株可降解百菌清的菌株,BJQ2 降解效果在 4 株中最明显,且与其他菌株存在显著差异($P<0.05$),取 BJQ2 做进一步的鉴定。BJQ2 在固体 NA 培养基上 30 ℃培养 48 h,观察其形态,进行生理生化鉴定。结果显示:BJQ2 为革兰氏阴性菌,最适生长温度为 30 ℃,兼性厌氧菌,单菌落呈圆形、湿润、表面光滑,划线培养后边缘呈树突状,乳白色,接触酶阳性,氧化酶阴性,V-P 实验阳性,甲基红阴性;可以利用葡萄糖产酸产气,可以发酵山梨醇、甘油醇、麦芽糖、木糖等有机碳源,不分解肌醇、卫茅醇,对于乳糖发酵缓慢;菌体大小为 $(0.6\sim1)\mu\text{m}\times(1\sim3)\mu\text{m}$,直杆状,鞭毛周生与阴沟肠杆菌指标一致。

表 1 百菌清降解菌株的分离、筛选

Table 1 Isolated chlorothalonil degrading bacteria

菌株	百菌清降解率(平均值±标准偏差)/%
BJQ1	17.3±2.5c
BJQ2	79.2±1.8a
BJQ3	39.8±2.2b
BJQ4	38.7±1.6b

注:表中数据附相同字母表示经 Duncan 检验,在 $\alpha=0.05$ 水平上差异不显著。

以菌株 BJQ2 的 16S rDNA 为模板,经过凝胶电泳,得到 1.5 kbp 的碱基条带,经过测序、比对,建立系统发育树(图 1)。结合形态学及生理生化鉴定,初步确定 BJQ2 为阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae* B9),其 Genbank 登录号 GQ421477.1。

前人研究中阴沟肠杆菌主要用于有机磷农药及

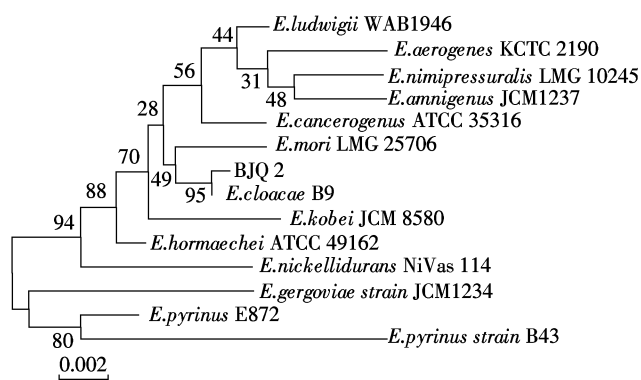


图 1 菌株 BJQ2 的系统发育树

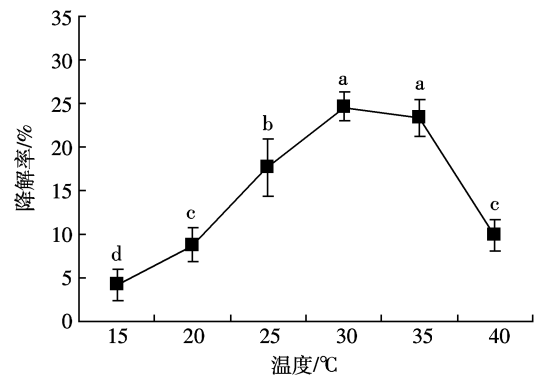
Figure 1 Phylogenetic tree of BJQ2 strain

2-甲基异茨醇的降解^[19-20],尚未见有关于降解百菌清的报道。因此,本试验结果对丰富百菌清生物降解的数据库有十分重要的意义。此外,阴沟肠杆菌生长速度快、能分解利用多种含碳化合物,可以在营养贫瘠的条件下生长,有较强的生存能力,这对于实际应用是一个很有利的条件。

2.2 菌株 BJQ2 降解百菌清的影响因素

2.2.1 培养温度对降解率的影响

从图 2 可以看出,在不同的培养温度下,BJQ2 对于百菌清的降解速度先升后降,48 h 后在 30 ℃时达到最大,为 28.1%,与 35 ℃时无显著差异($P>0.05$),与其他温度存在显著差异($P<0.05$),温度过高或过低造成的降解率下降,可能是因为微生物的生长受到抑制,所以最佳条件选择 30~35 ℃。



图中数据附相同字母表示经 Duncan 检验,

在 $\alpha=0.05$ 水平上差异不显著,下同

图 2 温度对菌株降解百菌清的影响

Figure 2 The effect of temperature on degradation rates of chlorothalonil

2.2.2 初始 pH 值对降解率的影响

从图 3 可以看出,不同的 pH 对百菌清的降解率有较大的影响,呈现先升后降的趋势,在 pH 达到 7 时,最大降解率可以达到 22.6%,当 pH 为 7、8 时,降解率无显著性差异($P>0.05$),pH 为 6、9 时,降解率也无显著性差异($P>0.05$)。其余各组两两比较均存在显著性差异($P<0.05$),当 pH 接近中性时,适合菌株生长,所以最佳 pH 值选取 7~8 较为适宜。

2.2.3 农药初始浓度对降解率的影响

从图 4 可以看出,不同浓度下农药对菌株存在一定抑制作用,在 $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 下达到最大降解率,为 26.5%,随着百菌清浓度的升高,降解率呈缓慢下降,到 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 后,降解率大幅下降,仅为 7.4%。当农药浓度为 20、30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,两组无显著性差异($P>0.05$);浓度为 40、50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,两组也无显著性差异

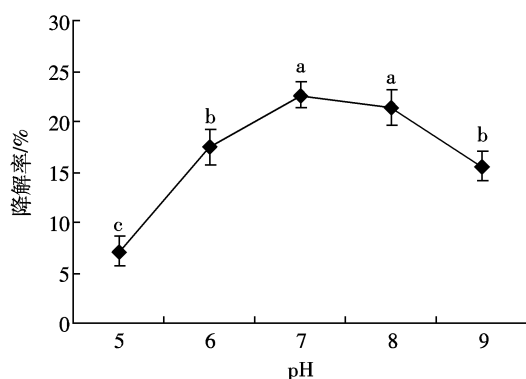


图3 pH 值对菌株降解百菌清的影响

Figure 3 The effect of pH on degradation rates of chlorothalonil

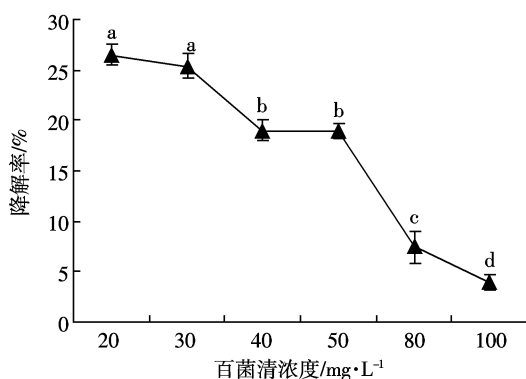


图4 百菌清初始浓度对菌株降解百菌清的影响

Figure 4 The effect of the initial concentration on degradation rates of chlorothalonil

($P>0.05$)。其他各两组间存在显著差异($P<0.05$)。说明 BJQ2 可以降解浓度较低的百菌清,随着浓度升高,农药对菌株毒性增加,影响其正常生长,所以降解率在 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 后出现大幅下降。由于农药含量过低可能导致检测误差增加和影响菌株生长,试验选用 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为最佳降解浓度。

2.2.4 接种量对降解率的影响

从图 5 可以看出,百菌清的降解率随接种量的增加而降低,稀释倍数增加,同一体积的菌液含菌株数量降低,降解率随之降低。当加入 10% 初始菌液时,降解率达到最大,为 24.9%,1 倍与其他处理组差异显著($P<0.05$)。说明初始菌液浓度可以满足 BJQ2 降解百菌清的需要,0.01 倍与 0.05 倍两组处理差异不显著($P>0.05$),说明接种量过小,同百菌清浓度下降解作用变弱。

3 结论

利用未有百菌清用药史的土壤进行定向培养,筛选出一株以百菌清为唯一碳源的菌株 BJQ2, BJQ2 为

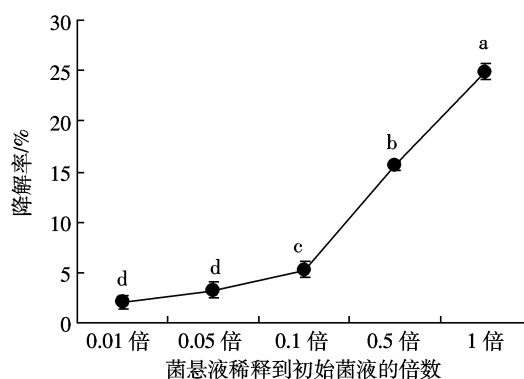


图5 接种量对菌株降解百菌清的影响

Figure 5 The effect of the inoculation amount on degradation rates of chlorothalonil

革兰氏阴性菌,最适生长温度为 30°C ,兼性厌氧菌,单菌落呈圆形、湿润、表面光滑,划线培养后边缘呈树突状,乳白色,菌体大小为 $(0.6\sim 1)\mu\text{m} \times (1\sim 3)\mu\text{m}$,直杆状,鞭毛周生。接触酶阳性,氧化酶阴性,V-P 实验阳性,甲基红阴性。可以利用葡萄糖产酸产气,可以发酵山梨醇、甘油醇、麦芽糖、木糖等有机碳源,不分解肌醇、卫茅醇。对于乳糖发酵缓慢,与阴沟肠杆菌指标一致。经 16S rDNA 序列同源性比对及系统发育树分析,初步鉴定为阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae* B9)。阴沟肠杆菌生长速度快、能分解利用多种含碳化合物,可以在营养贫瘠的条件下生长,有较强的生存能力,这对于实际应用是一个很有利的条件。

BJQ2 降解百菌清的最适宜降解条件:培养温度 $30\sim 35^\circ\text{C}$,初始 pH 值为 7~8,百菌清的初始浓度为 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,直接用菌体母液 ($\text{OD}_{600}=0.35$) 以 10% 的接种量接种,6 d 后提取农药百菌清,气相色谱检测降解率可以达到 79.2%。

参考文献:

- [1] 李饮云,赵玲玲. 有机磷农药对食品的污染及防治[J]. 工业卫生与职业病, 2005(4):260-263.
LI Yin-yun, ZHAO Ling-ling. The prevention pollution on food from organophosphate pesticides[J]. *Industrial Health and Occupational Diseases*, 2005(4):260-263.
- [2] Liu Hong, Zhang Jun-Jie, Jun Su, et al. Plasmid-borne catabolism of methyl parathion and p-nitrophenol in *Pseudomonas* sp. strain WBC-3 [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 334: 1107-1109.
- [3] 李 瑛,李学德,花日茂,等. 百菌清的生态环境效应及降解转化研究进展[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(4):703-704.
LI Ying, LI Xue-de, HUA Ri-mao, et al. Study on eco-environmental effects, degradation and transform of chlorothalonil[J]. *Journal of Anhui Agriculture Science*, 2005, 33(4):703-704.

- [4] 张志恒, 李红叶, 吴珉, 等. 百菌清、腈菌唑和吡唑醚菌酯在草莓中的残留及其风险评估[J]. 农药学报, 2009, 11(4): 449-455.
ZHANG Zhi-heng, LI Hong-ye, WU Min, et al. Residue and risk assessment of chlorothalonil, myclobutanil and pyraclostrobin in green-house strawberry[J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2009, 11(4): 449-455.
- [5] 张玉婷, 郭永泽, 刘磊, 等. 番茄及土壤中百菌清残留量的动态研究[J]. 天津农学院学报, 2008, 15(1): 29-31.
ZHANG Yu-ting, GUO Yong-ze, LIU Lei, et al. Dynamic research on residue of chlorothalonil in tomatoes and soils [J]. *Journal of Tianjin Agricultural University*, 2008, 15(1): 29-31.
- [6] Caroline C. Chlorothalonil[J]. *Journal of Pesticide Reform*, 1997, 17(4): 14-20.
- [7] 杨明伟, 叶非. 微生物降解农药的研究进展[J]. 植物保护, 2010, 36(3): 26-29.
YANG Ming-wei, YE Fei. Research progress in degradation of pesticides by microbes[J]. *Plant Protection*, 2010, 36(3): 26-29.
- [8] 冯波, 单敏, 方华, 等. 百菌清对土壤微生物数量和酶活性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(3): 674-677.
FENG Bo, SHAN Min, FANG Hua, et al. Effects of chlorothalonil on soil microbial populations and enzyme activities[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2006, 25(3): 674-677.
- [9] Sato K, Tanaka H. Degradation and metabolism of fungicide, 2, 4, 5, 6-tetra-chloroisophthalonitrile (TPN) in soil[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1987, 3: 205-209.
- [10] 史秀珍. 百菌清降解菌的筛选及其降解特性研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2007.
SHI Xiu-zhen. Isolation and characterization of a chlorothalonil-degrading bacterium[D]. Beijing: Chinese Academy of Agriculture Sciences, 2007.
- [11] Arata K, Hiroshi I, Shozo K. Population change and characteristics of chlorothalonil-degrading bacteria in soil[J]. *Journal of Pesticide Science*, 1991, 16(2): 239-244.
- [12] 林抗美, 官雪芳, 鲁国东, 等. 阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*) 对乐果降解特性的研究 [J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(2): 398-405.
LIN Kang-mei, GUAN Xue-fang, LU Guo-dong, et al. Degradation characteristics of dimethoate by *Enterobacter cloacae*[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28(2): 398-405.
- [13] 王兆守. 微生物降解茶叶农药残留的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2003.
WANG Zhao-shou. Degradation of pesticide residues on tea by microorganisms[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2003.
- [14] 段海明, 王开运, 王冕, 等. 蜡样芽胞杆菌 HY-1 降解甲基对硫磷和毒死蜱的影响因素研究[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(3): 437-443.
DUAN Hai-ming, WANG Kai-yun, WANG Mian, et al. Degradative characteristics of bacillus cereus HY-1 to methyl-parathion and chlorpyrifos[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(3): 437-443.
- [15] YANG Rui, SUN Bao-lin. Physiological characterization of a microbial consortium that reductively dechlorinates 1, 1-dichloroethane to chloroethane [J]. *Journal of University of Science and Technology of China*, 2009, 39(1): 84-89.
- [16] 许敬亮, 王志春, 王堃, 等. 多菌灵降解菌株 djl-6-2 的分离鉴定及降解特性[J]. 中国环境科学, 2006, 26(3): 307-310.
XU Jing-liang, WANG Zhi-chun, WANG Kun, et al. The isolation identification and degradation characters of an efficient carbendazim-degrading bacterium[J]. *China Environmental Science*, 2006, 26(3): 307-310.
- [17] 马丽娜, 林抗美, 杜文琴, 等. 温度条件对阴沟肠杆菌降解乐果的降解力的影响 [C]//中国环境科学学会. 学术年会优秀论文集. 北京: 中国环境科学出版社, 2006: 3259-3261.
MA Li-na, LIN Kang-mei, DU Wen-qin, et al. The influence for degradation of *Enterobacter cloacae* to dimethoate under different temperature conditions[C]//Chinese Society For Environmental Sciences. Excellent Essays of Annual Conference, Beijing: China Environmental Science Press, 2006: 3259-3261.
- [18] 徐凤, 雷萍. 菌悬液稀释倍数与 OD₆₀₀ 的关系实验 [J]. 环保科技, 2010, 16(3): 43-45.
XU Feng, LEI Ping. The experiment on the relationship between dilution multiples of bacterial suspension and OD₆₀₀[J]. *Environmental Protection and Technology*, 2010, 16(3): 43-45.
- [19] 林抗美, 官雪芳, 马丽娜, 等. 有机磷农药降解菌—阴沟肠杆菌的生物学特性[J]. 中国农学通报, 2008, 24(9): 382-386.
LIN Kang-mei, GUAN Xue-fang, MA Li-na, et al. The biological characteristics of organophosphorus pesticide-degrading bacterium, *Enterobacter cloacae*[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2008, 24(9): 382-386.
- [20] 么敬静, 赵有文, 邹霞, 等. 2-甲基异莰醇降解菌阴沟肠杆菌 Z5 的分离鉴定及 BAC 文库的构建[J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(1): 55-58.
YAO Jing-jing, ZHAO You-wen, ZOU Xia, et al. Isolation, identification and BAC efficient 2-methylisoborneol degradation bacterium *Enterobacter cloacae* Z5 [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2010, 29(1): 55-58.