

Isolation of MCPA-Na Degrading Bacteria and Optimization of Fermentation Conditions

Shuo Jiang*, Shuai Guo, Meiling Song, Xiru Jia, Qiming Wang, Shumin Yao#

College of Life Science, Qufu Normal University, Jining Shandong
Email: #yaoshumin299@163.com

Received: Oct. 16th, 2017; accepted: Oct. 25th, 2017; published: Oct. 30th, 2017

Abstract

The four degrading bacteria strain KE-01(KY274847), KE-02(KY274848), KE-03(KY303833) and KE-04 (KY274849), were isolated and purified from the field soil which have been applied with herbicide MCPA-Na for many years by enrichment culture. Based on the 16S rDNA identification, these 4 bacteria had been identified as *Bacillus sp.*, the similarity between the KE-01 sequence and *Bacillus oceanis edimins gene* sequence reached 100%, and the sequence similarity of KE-02 and *Bacillus pumilius strain 3-2* reached 100%, the similarity between the KE-03 sequence and *Bacillus toyonensis strain J1* sequence reached 100%, the similarity sequence between KE-04 and *Bacillus pumilus strain BS25* sequence reached 100%. By degrading characteristic analysis, KE-04 is the most efficacious in 4 bacteria. The experiment showed that the optimum growth conditions of strain KE-04 was sucrose 5.0%, yeast extract powder 2.0%, NaCl 0.41%, pH 7.8, and the concentration of MCPA-Na is 0.1% after single factor processing and response surface methodology. The degradation rate reached 69.56% after 48 h culturing under these conditions.

Keywords

MCPA-Na, *Bacillus sp.*, 16S rDNA, Degrading Characteristics, Response Surface

MCPA-Na除草剂降解菌的分离及发酵条件优化

姜 硕*, 郭 帅, 宋美玲, 贾晰茹, 王亓明, 姚淑敏#

曲阜师范大学生命科学学院, 山东 济宁
Email: #yaoshumin299@163.com

*第一作者。
#通讯作者。

摘要

从长期受MCPA-Na污染的土壤中经过富集培养分离纯化得到4株MCPA-Na降解菌株KE-01 (KY274847)、KE-02 (KY274848)、KE-03 (KY303833)、KE-04 (KY274849), 并利用紫外分光光度法对其进行降解性能测定。经生理生化实验和16S rDNA序列分析鉴定4株菌株均属芽孢杆菌属(*Bacillus sp.*), KE-01与*Bacillus oceanis ediminis gene*相似度达到100%, KE-02与*Bacillus pumilus strain 3-2*相似度达到100%, KE-03与*Bacillus toyonensis strain J1*相似度达到100%, KE-04与*Bacillus pumilus strain BS25*相似度达到100%。通过对4株菌株进行的降解特性研究表明: 菌株KE-04降解效果最佳, 通过对菌株KE-04进行响应面法进行优化, 在以5.0%蔗糖为碳源, 2.0%的酵母浸粉为氮源, NaCl浓度0.41%, pH为7.8的培养基中培养时降解效果最佳, 可达到69.56%。

关键词

MCPA-Na, 芽孢杆菌属, 16S rDNA, 降解特性, 响应面

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

MCPA-Na, 化学名 2-甲基-4-氯苯氧乙酸钠, 是一种苯氧乙酸类选择性内吸传导激素型有机氯除草剂, 广泛用于小麦田、玉米田、水稻田、城市草坪、麻类作物。MCPA-Na 除草剂本身是中等毒性, 但能在作物植株和果实上残留, 虽然会在农作物及环境中缓慢消解, 但仍然会引起土壤、水体和大气的污染, 也会在人和动物体的脂肪中积累, 因此它们的残留问题也是长期的[1] [2] [3] [4] [5]。研究表明 MCPA-Na 除草剂能够引起大鼠胃肠道、肺部和肾脏功能发生异常, 引起小鼠癌症和白血病, 长期接触可导致雌鼠妊娠后代发育不良, 肌肉骨骼发育受阻[6]-[11]。

长期施用除草剂或使用不当都会引起的植物的抗药性、耐药性等问题的出现[12] [13], 导致除草剂施用的效果也逐渐下降, 若继续加大剂量使用会造成恶性循环, 加大了其进入各种生物体的可能。近年来利用微生物进行生物修复的方法越来越得到了广泛的应用[14] [15] [16], 微生物在繁殖和代谢的过程中, 可以将土壤内残留的污染物进行分解并转化为新的无害或低害化合物, 降低土壤的污染程度。因此, 筛选 MCPA-Na 降解菌并运用其进行生物修复[17] [18]显得尤为重要。

本研究从长期受到污染的 MCPA-Na 生产车间进行土壤取样, 分离出 4 株 MCPA-Na 降解菌, 利用紫外分光光度法[12]进行了菌株生长和降解特性的研究, 筛选降解效果较好的菌株, 以期 MCPA-Na 降解菌株的筛选和微生物在土壤修复中的应用提供理论依据。

2. 材料与方法

2.1. 样品采集及培养基的配制

土样于 2016 年 5 月取自 MCPA-Na 生产车间, 取样时先将表层土刮去 2~3 cm, 每份取土样 10.0 g

左右, 去除小石子、杂草等杂质, 并将土样碾碎, 注明采样地点及日期, 4℃保存备用。

牛肉膏蛋白胨培养基: 牛肉膏 3.0 g, 蛋白胨 10.0 g, NaCl 5.0 g, 葡萄糖 10.0 g, 蒸馏水 1.0 L, pH 7.5。固体培养基加入 2.0% 琼脂, 115℃ 高压蒸汽灭菌 20 min。药品采用 56% MCPA-Na 可湿性粉剂。

2.2. 方法

2.2.1. 降解菌株的富集

将采集的土壤标本用土壤筛过筛后, 取 2.0 g 加入 50 mL MCPA-Na 含量为 0.025% 的牛肉膏蛋白胨培养基中, 37℃, 150 r/min 震荡培养 3 d; 然后取出 1 mL 加入 50 mL 牛肉膏蛋白胨培养基中, 并提高 MCPA-Na 含量到 0.05%, 继续 37℃, 170 r/min 振荡培养 3 d。依此连续驯化 12 d, 至 MCPA-Na 终浓度为 0.1%。

2.2.2. 降解菌的分离与纯化

取富集后的菌液进行浓度稀释 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} , 均匀涂布在含 MCPA-Na 的牛肉膏蛋白胨固体培养基上, 37℃ 恒温培养 3 d, 挑取单菌落划线, 反复分离纯化。

2.2.3. 降解菌株的鉴定

对菌株 KE-01、KE-02、KE-03、KE-04 进行菌落形态观察、革兰氏染色[19]、芽孢染色[19]、电镜拍照[20]。对照《伯杰氏细菌鉴定手册》, 对菌株进行生理生化实验。

分子鉴定: 提取细菌 KE-01~KE-04 总 DNA, 将通用引物

16F: (5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3')

1492R: (3' - TACGGCTACCTTGTTAGGACTT - 5')

作为上下游引物扩增 16S rDNA 片段, 由上海生工生物工程公司完成序列测定。将测序结果上传至 NCBI 进行 Blast 分析, 利用 MEGA5.0 构建系统进化树。

2.2.4. 降解菌株的筛选

采用紫外分光光度法[14]测定菌株降解率。首先, 建立 MCPA-Na 标准曲线, 配制浓度为 0、10、20、40、60、80 mg/L 的 MCPA-Na 标准溶液, 扫描 190~400 nm 波长范围的特征吸收值[21] [22], 在特征吸收波长下测定不同浓度标准溶液的吸光度(Abs), 以 MCPA-Na 标准溶液浓度为横坐标, 吸光度(Abs)为纵坐标, 并绘制标准曲线。其次是对降解率的测定, 取活化菌液($OD_{600} \approx 0.8$)接入 100 mL MCPA-Na 含量为 0.1% 的牛肉膏蛋白胨培养液中, 37℃, 150 r/min 摇床震荡培养。于 0、4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48 h 分别取样, 12,000 r/min 离心 5 min。取上清液, 稀释 10 倍, 测定其吸光度值。根据标准曲线方程计算培养基中 MCPA-Na 的浓度, 通过对降解率进行比较来选取高效降解菌株。降解率的计算方法:

$$\text{降解率} = [(C_0 - C_1)/C_0] \times 100\%$$

其中 C_0 为 MCPA-Na 的初始浓度, C_1 为培养后 MCPA-Na 的浓度。

取活化菌液($OD_{600} \approx 0.8$)接入牛肉膏蛋白胨培养液, 设 3 个重复, 37℃、150 r/min 摇床振荡培养。分别于培养 0、4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48 h 分别取样, 稀释 10 倍后在 600 nm 处测定菌株的吸光度, 表示菌体生物量。结合菌株降解曲线可以确定菌株降解效率与生长的关系。

2.2.5. 最优实验操作条件

将活化菌液($OD_{600} \approx 0.8$)按 2.0% 接入 50 mL 的液体培养基(MCPA-Na 含量为 0.1%)中, 分别加入麦芽糖、葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉、乳糖作为碳源, 实验浓度为 3.5%~5.0%; 加入蛋白胨、胰蛋白胨、酵母浸粉、尿素、 KNO_3 作为氮源, 实验浓度为 0.5%~3.0%; 分别加入 NaCl、 K_2HPO_4 、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 、

MgSO₄·7H₂O、FeSO₄·7H₂O、MnSO₄·H₂O、FeCl₃·6H₂O 为培养基提供无机盐；调节 pH 为 5~12，分别在 25℃~45℃，在 60~180 r/min 转速下，每个处理设 3 个重复，测定 MCPA-Na 降解率。

再运用响应面法对实验操作条件优化，根据单因素实验，选取影响降解效果较大的因素作为自变量，降解率作为响应值，根据 Box-Behnken 的中心组合实验设计原理进行响应面分析实验设计。应用 Design Expert 8.0 软件进行实验设计和结果分析，建立响应面，最后对分析结果进行验证实验。

3. 结果与讨论

3.1. MCPA-Na 降解菌株的分离纯化及鉴定

经过连续富集与逐级驯化培养，从土壤样品中分离得到了 6 株细菌菌株，再通过复筛得到对 0.1% MCPA-Na 具有降解能力的 4 株菌株，分别标记为 KE-01、KE-02、KE-03、KE-04，均能在 MCPA-Na 含量为 0.1% 的培养基中生长。

4 株菌株的形态特征描述如表 1 所示，图 1~4 分别为菌落形态图、革兰氏染色、芽孢染色及电镜扫描的结果(从左到右依次为 KE-01、KE-02、KE-03、KE-04)。从图 2~4 可以看出分离筛选的降解 MCPA-Na 的菌株均为杆菌。

通过形态观察和生理生化实验(见表 2)，可以初步确定菌株属于杆菌属，为了进一步对菌株进行鉴定，利用细菌的 16S rDNA 的通用引物进行 PCR 扩增，得到的扩增产物如图 5 所示。测序成功后将菌株 DNA 序列与 Genbank 细菌基因库中序列进行比对，发现 4 株菌株 KE-01 (Genbank 登录号 KY274847)、KE-02 (Genbank 登录号 KY274848)、KE-03 (Genbank 登录号 KY303833)、KE-04 (Genbank 登录号 KY274849) 与多株芽孢杆菌属(*Bacillus sp.*)的相似程度较高，达到 100%。根据 16SrDNA 序列，结合其生理生化性质可确定 4 株菌株均为芽孢杆菌属(*Bacillus sp.*)。利用 MEGA5.0 构建系统进化树结果见图 6。

Table 1. Morphological characteristics of strain

表 1. 菌株形态特征

特征	KE-01	KE-02	KE-03	KE-04
个体	杆状，有芽孢，革兰氏阳性	杆状，有芽孢，革兰氏阳性	杆状，有芽孢，革兰氏阳性	杆状，有芽孢，革兰氏阳性
菌落	乳白色，不透明，较大，圆形，边缘整齐	乳白色，不透明，小，圆形，边缘不整齐	乳白色，不透明，圆形，边缘规则，表面光滑凸起	乳白色，不透明，较大，表面光滑，边缘规则

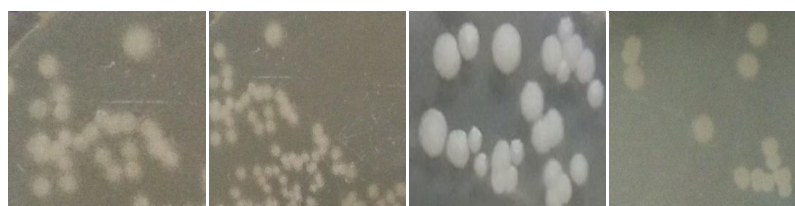


Figure 1. Colonies of the strains

图 1. 菌落形态

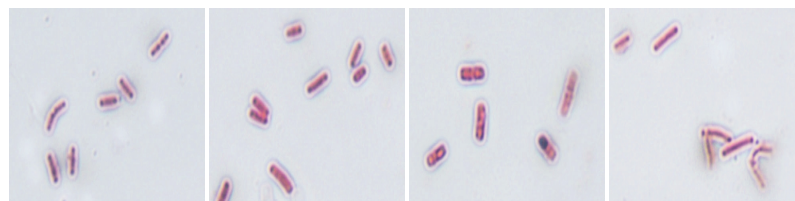


Figure 2. Gram dyeing of the strains

图 2. 革兰氏染色(1600×)

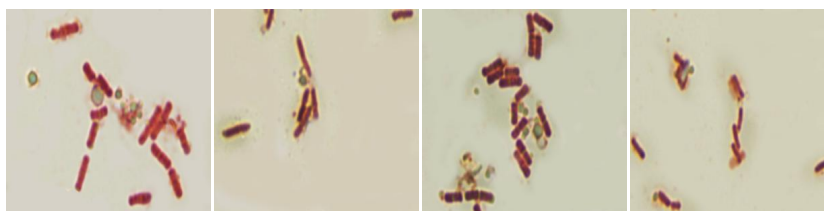


Figure 3. Spore staining of strains
图 3. 菌株芽孢染色(1600×)

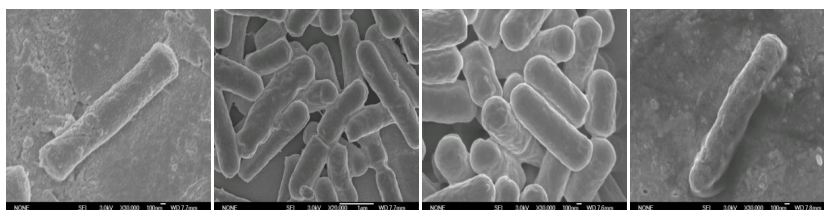


Figure 4. The result of SEM
图 4. 电镜扫描结果(3000×)

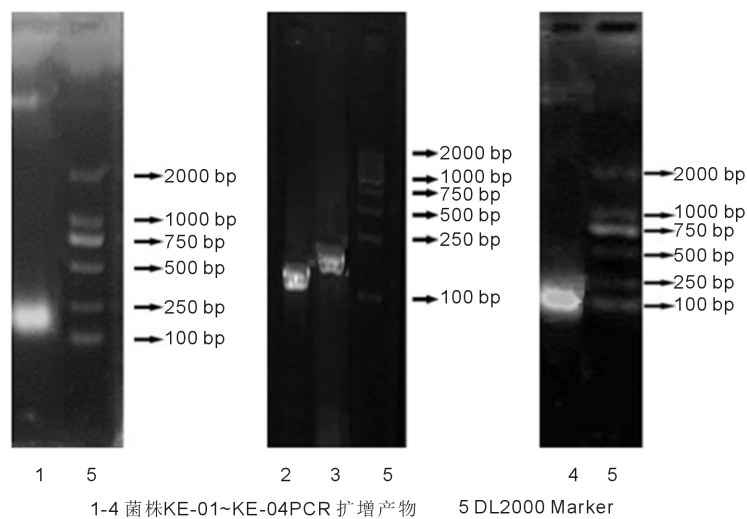


Figure 5. 16S rDNA amplified PCR products
图 5. 16S rDNA PCR 扩增产物

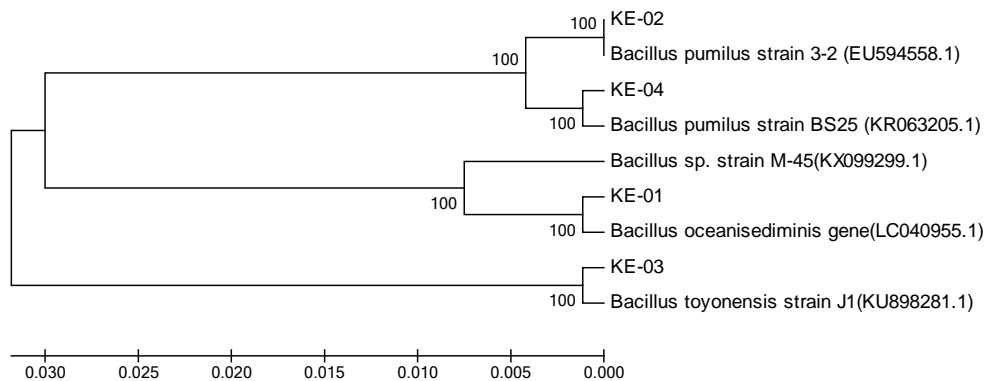


Figure 6. Phylogenetic tree of strains
图 6. 菌株系统进化树

Table 2. Physiological and biochemical identification of strains**表 2.** 菌株生理生化鉴定

	接触酶	V-P 试验	葡萄糖产酸	明胶液化	淀粉水解	硝酸还原	吡啉产生
KE-01	+	-	+	+	-	-	+
KE-02	+	+	+	+	-	-	+
KE-03	+	+	+	+	+	+	-
KE-04	+	-	+	-	-	-	+

“+”表示阳性，“-”表示阴性。

3.2. 降解菌株的筛选

通过配制不同浓度的 MCPA-Na 标准溶液, 利用紫外分光光度计[14]在特征吸收波长 283 nm 测定吸光度值, 进行 3 次测量, 求得平均值, 以 MCPA-Na 标准溶液为横坐标, 吸光度值为纵坐标, 绘制标准曲线(如图 7), 得拟合方程为 $y = 0.0035x + 0.0022$ ($R^2 = 0.9881$)。

将菌株接入到牛肉膏蛋白胨液体培养基中培养 48 h, 通过对培养前后菌液吸光值与标准曲线的比对得到 MCPA-Na 浓度, 计算 4 株菌株降解率, 如表 3 所示。对比得到降解能力最强的菌株为 KE-04, 48 h 降解率达到 51.54%。MCPA-Na 本身呈紫红色, 加入培养基后培养基呈现橘红色, 经过 48 h 的培养后, 4 瓶培养基中橘红色颜色变浅或消失。

通过对菌株 KE-04 生长曲线的测定, 可以确定 KE-04 降解效率与生长的关系(见图 8)。菌株 KE-04 较快进入对数期, 其中在 0 h~24 h 生长较快, 24 h 后 OD 值趋于平缓, 说明菌株生长受到限制。而在 0 h~40 h, MCPA-Na 的降解速率随底物浓度增大而加快, 培养 40 h 后 MCPA-Na 的降解率为 58.54%, 40 h 后, MCPA-Na 降解变化不大, 基本趋稳定, 这一现象说明菌液浓度不再增加。

3.3. 最优操作条件

相同条件下, KE-04 在以 4.0%蔗糖为碳源、2.0%酵母浸粉为氮源、加入 NaCl 提供无机盐的 pH 为 8.0 的培养基中, 在 40℃下 180 r/min 震荡培养 48 小时测定到最大降解率, 可达到 63.84%。再运用响应面法进行进一步优化:

1) Box-Behnken 实验

通过 Plackett-Burman 实验和最陡爬坡实验确定出了影响降解率的主要因素: 碳源(4.0%、4.5%、5%)、氮源(1.0%、1.5%、2.0%)、无机盐(0.04%、0.05%、0.06%)和 pH(7.0、7.5、8.0), 进行四因素三水平的响应面分析实验, 29 个实验点给出的实验结果如表 4。

通过 Design Expert 8.0 软件对表 4 中 Box-Behnken 设计及实验结果进行回归分析, 得到分析结果如表 5 所示。可以得出此模型 $F = 115.36$, $P < 0.0001$, 表明该回归模型的结果是显著的; 失拟项 $P = 0.9098 > 0.05$, 说明该模型的失拟项是不显著的, 因此该模型选择是正确的。此外, 对其进行可信度分析见表 6, 回归系数 $R^2 = 0.9914$, 调整回归系数 $R_{adj}^2 = 0.9828$, 预测回归系数 $R_{pred}^2 = 0.9693$, 说明该模型可以解释 99.14% 实验操作, 表明拟合度比较好。根据回归分析得到该模型的二次回归方程:

$$Y = +68.79 + 0.17A - 0.48B + 1.46C + 0.88D - 1.83AB - 2.44AC + 2.77AD + 1.19BC \\ - 1.07BD + 0.23CD - 9.93A^2 - 11.04B^2 - 9.51C^2 - 9.29D^2$$

响应面实验 3D 图与等高线图如图 9~14 所示, 由图可以看出模型的开口向下, 实验结果存在最大值。并根据等高线图可判断, 最大值落在我们的实验范围以内。

通过以上一系列分析可知, 本实验的最优实验操作条件为: 蔗糖(碳源)浓度为 4.74%, 酵母浸粉(氮源)浓度为 2.34%, NaCl(无机盐)浓度为 0.41%, 初始 pH 为 7.8, 降解率预测值为 69.64%。

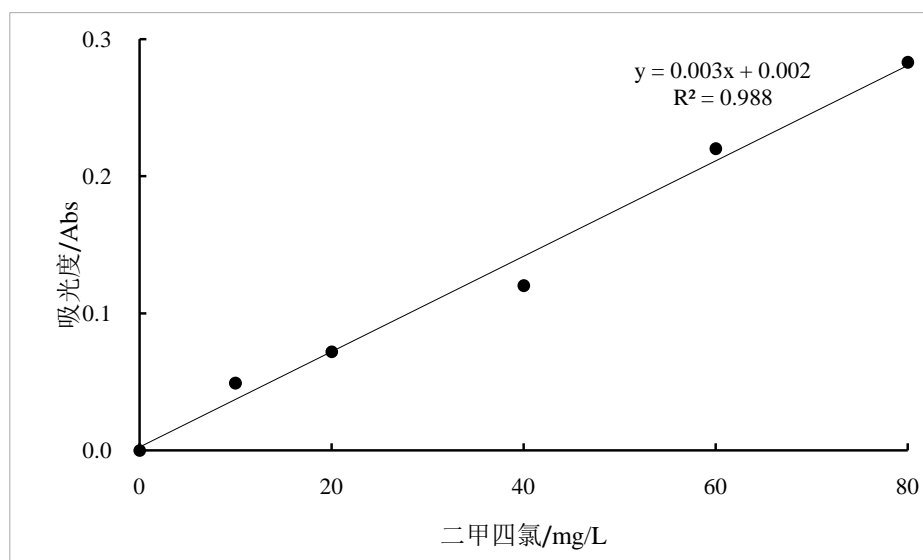


Figure 7. Standard curve of MCPA-Na

图 7. MCPA-Na 的标准曲线图

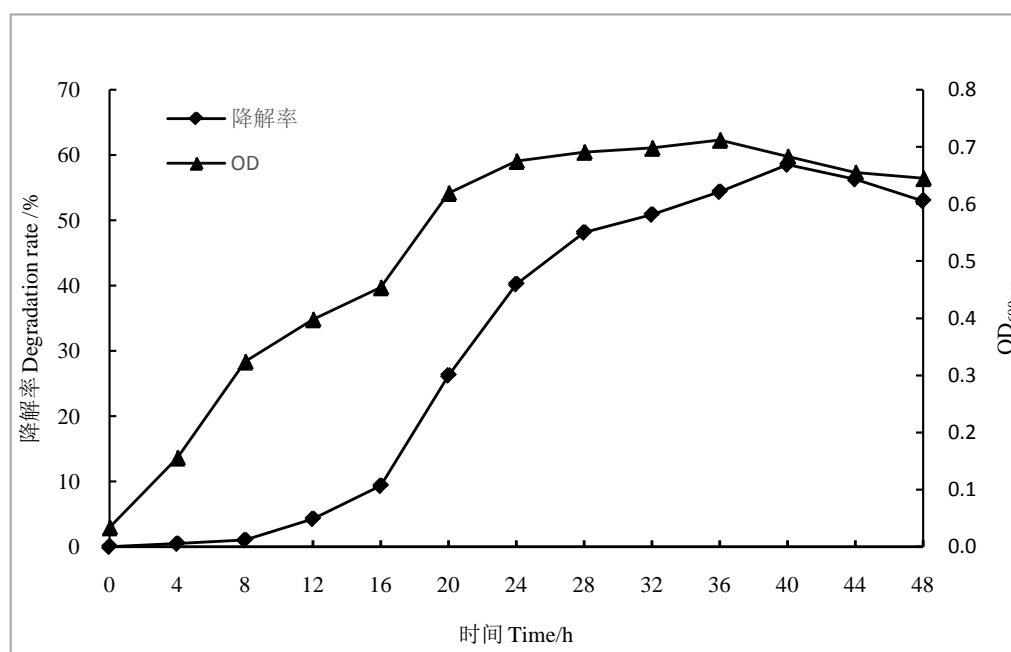


Figure 8. Relationship between growth and degradation rate of KE-04 strain

图 8. KE-04 菌株生长与降解率的关系

Table 3. Comparison of degradation rate in 48 h

表 3. 菌株 48 h 降解率的比较

		KE-01	KE-02	KE-03	KE-04
MCPA-Na 质量浓度/(mg/L)	0 h	78.34	69.39	63.42	75.36
	48 h	46.10	54.76	41.63	29.89
降解率/%		41.15	21.08	34.36	58.54

Table 4. Design and results of Box-Behnken optimization experiments
表 4. Box-Behnken 设计及结果

Std	试验号	因子 1 A: 碳源/%	因子 2 B: 氮源/%	因子 3 C: 无机盐/%	因子 4 D: pH	反应 1 降解率/%
2	1	1	-1	0	0	50.06
23	2	0	-1	0	1	50.55
26	3	0	0	0	0	66.67
13	4	0	-1	-1	0	49.23
24	5	0	1	0	1	47.36
12	6	1	0	0	1	54.45
16	7	0	1	1	0	49.56
5	8	0	0	-1	-1	48.02
17	9	-1	0	-1	0	45.08
19	10	-1	0	1	0	53.96
8	11	0	0	1	1	52.68
6	12	0	0	1	-1	50.79
28	13	0	0	0	0	68.23
14	14	0	1	-1	0	45.64
18	15	1	0	-1	0	49.46
1	16	-1	-1	0	0	46.45
20	17	1	0	1	0	48.58
21	18	0	-1	0	-1	47.26
7	19	0	0	-1	1	48.98
10	20	1	0	0	-1	46.18
11	21	-1	0	0	1	47.35
22	22	0	1	0	-1	48.36
15	23	0	-1	1	0	48.39
25	24	0	0	0	0	68.83
3	25	-1	1	0	0	49.49
4	26	1	1	0	0	45.79
27	27	0	0	0	0	69.89
9	28	-1	0	0	-1	50.16
29	29	0	0	0	0	68.33

Table 5. ANOVA analysis for regression equation
表 5. 回归方程的方差分析

试验号	平方和	自由度	平均方差	F	P	
模型	1766.44	14	126.17	115.36	<0.0001	significant
A-碳源	0.34	1	0.34	0.31	0.5841	
B-氮源	2.75	1	2.75	2.51	0.1354	
C-无机盐	25.67	1	25.67	23.47	0.0003	
D-pH	9.36	1	9.36	8.56	0.0111	
AB	13.36	1	13.36	12.21	0.0036	
AC	23.81	1	23.81	21.77	0.0004	
AD	30.69	1	30.69	28.06	0.0001	
BC	5.66	1	5.66	5.18	0.0391	
BD	4.6	1	4.6	4.21	0.0595	
CD	0.22	1	0.22	0.2	0.6634	
A ²	639.38	1	639.38	584.59	<0.0001	
B ²	790.17	1	790.17	722.45	<0.0001	
C ²	586.43	1	586.43	536.18	<0.0001	
D ²	559.46	1	559.46	511.51	<0.0001	
残差	15.31	14	1.09			
失拟项	7.32	10	0.73	0.37	0.9098	not significant
纯误差	7.99	4	2			
总和	1781.75	28				

Table 6. Analysis of reliability
表 6. 可信度分析

平均值	52.34
回归系数 R ²	0.9914
调整回归系数 R ² _{adj.}	0.9828
预测回归系数 R ² _{pred.}	0.9693
变异系数/%	2.00

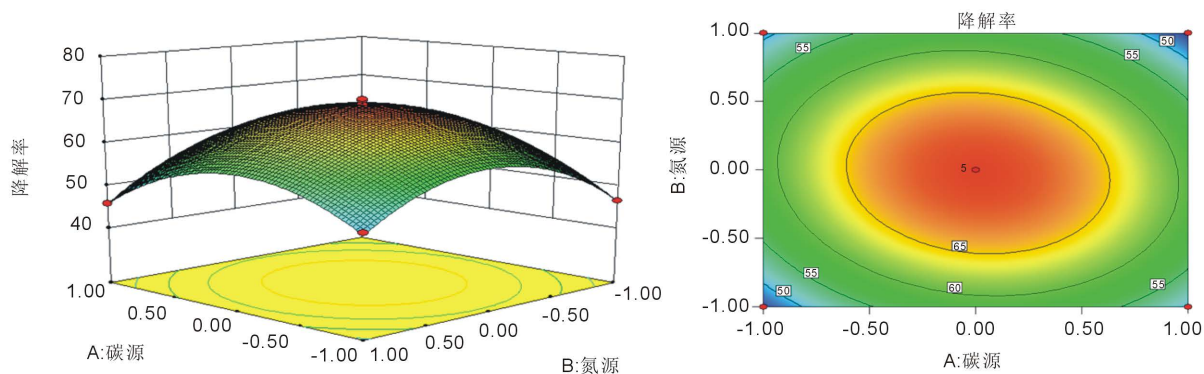


Figure 9. Response surface and contour plots of the effect of carbon source and nitrogen source on degradation rate
图 9. 碳源、氮源对降解率影响的 3D 图和等高线图

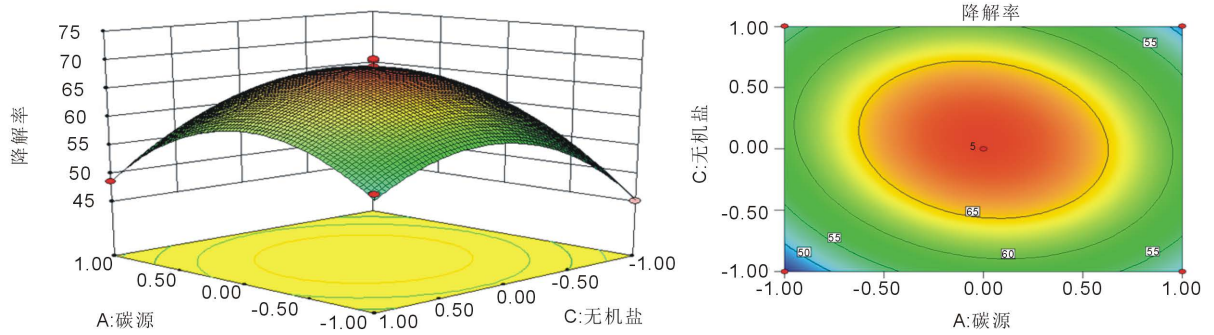


Figure 10. Response surface and contour plots of the effect of carbon source and inorganic salt on degradation rate
图 10. 碳源、无机盐对降解率影响的 3D 图和等高线图

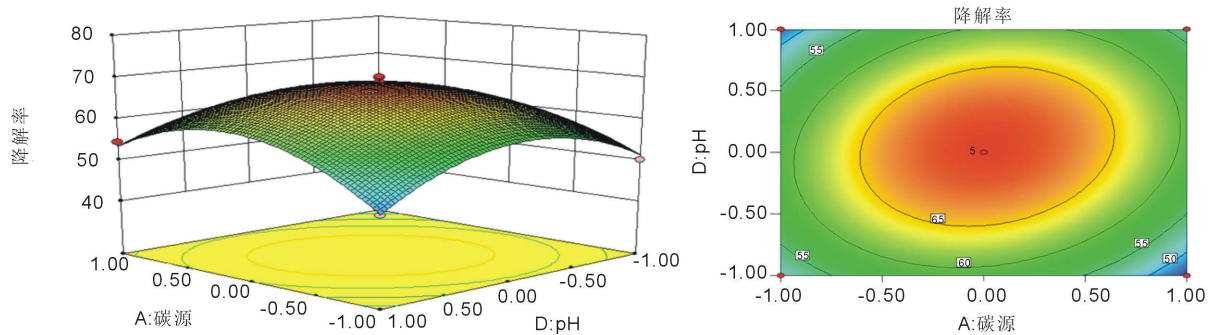


Figure 11. Response surface and contour plots of the effect of carbon source and pH on degradation rate
图 11. 碳源、pH 对降解率影响的 3D 图和等高线图

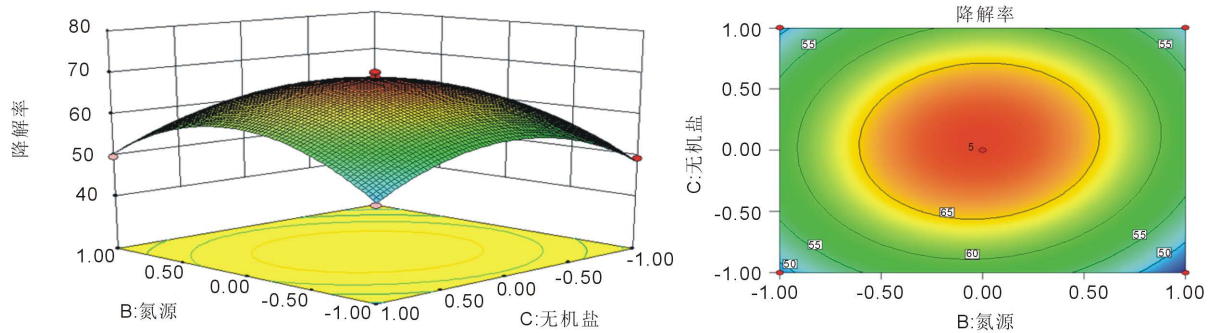


Figure 12. Response surface and contour plots of the effect of nitrogen source and inorganic salt on degradation rate
图 12. 氮源、无机盐对降解率影响的 3D 图和等高线图

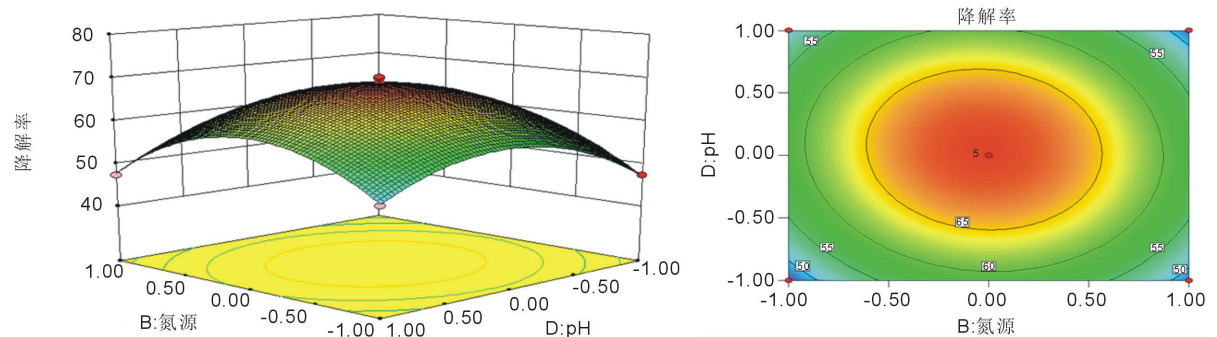


Figure 13. Response surface and contour plots of the effect of nitrogen source and pH on degradation rate
图 13. 氮源、pH 对降解率影响的 3D 图和等高线图

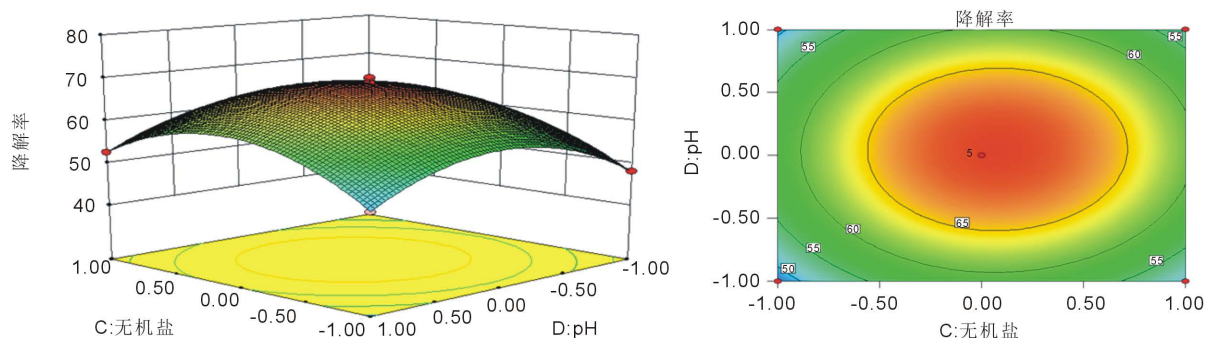


Figure 14. Response surface and contour plots of the effect of inorganic salt and pH on degradation rate

图 14. 无机盐、pH 对降解率影响的 3D 和等高线图

由以上操作确定的条件：蔗糖 5.0%、酵母浸粉 2.0%、NaCl 0.41%，初始 pH 7.8，其他条件不变，重新配置培养基，设置 3 次重复实验，测得降解率分别为 69.32%、69.74%、69.61%，平均值为 69.56%，比优化前的 61.26% 提高了 13.55%，说明此次优化获得的条件对降解率的提高是有效的。

4. 结论

1) 从土壤中筛选得到 4 株 MCPA-Na 降解菌株，经 16S rDNA 序列分析鉴定均为芽孢杆菌属(*Bacillus sp.*)。其中菌株 KE-04 能力较强，37℃ 条件下对含量 0.1% MCPA-Na 的降解效率可达 61.26%。

2) 利用响应面法进行最优操作条件优化，最终菌株 KE-04 在 MCPA-Na 含量为 0.1% 的以 5.0% 蔗糖为碳源，2.0% 的酵母浸粉为氮源，无机盐 0.41%，pH 为 7.8 的培养基中培养时降解效果最佳，可达到 69.56%。

3) 之前有报道[12]称从湖南郴州地区长期受到 MCPA-Na 污染的烟田土壤中分离到 1 株肠杆菌属(*Enterobacter sp.*)细菌 SE08，对 MCPA-Na 溶液的降解效率可达 45.21%。本研究中分离得到的菌株 KE-04 对 MCPA-Na 的降解能力在实验室条件下降解效果更佳，具有潜在的应用前景。

基金项目

国家青年科学基金项目(No.31200400)；山东省青年基金项目(No.ZR2013EEQ009)。

参考文献 (References)

- [1] 单淑芳. 二甲四氯在水稻中的残留分析方法及其消解动态研究[D]: [硕士学位论文]. 合肥: 安徽农业大学, 2014.
- [2] Hajlová, J., Rparová, L., Viden, I., *et al.* (1990) A Comparison of Chromatographic Methods for Determination of Striazines in Milk. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **38**, 105-114. <https://doi.org/10.1080/03067319008026919>
- [3] Wells, M.J. and Yu, L.Z. (2000) Solid-Phase Extraction of Acidic Herbicides. *Chromatogr A*, **885**, 237-250. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00206-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00206-5)
- [4] Rayne, S., Forest, K. and Friesen, K.J. (2009) Mechanistic Aspects Regarding the Direct Aqueous Environmental Photochemistry of Phenol and Its Simple Halogenated Derivatives. A Review. *Environment International*, **35**, 425-437. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.09.004>
- [5] Hiller, E. (2006) Laboratory Study of Retention and Release of Weak Acid Herbicide MCPA by Soils and Sediments and Leaching Potential of MCPA. *Plant Soil and Environment*, **52**, 12.
- [6] 王有森. 苯氧乙酸类除草剂的毒性[J]. 环境卫生学杂志, 1976(2).
- [7] 赵淑华, 李景舜, 隋春生. 除草剂 2-甲-4 氯苯氧乙酸对小鼠的毒作用[J]. 中国公共卫生, 2003, 19(4): 428-429.
- [8] 李景舜, 赵淑华, 杨琼, 等. 除草剂 2-甲基-4 氯苯氧乙酸对雌性小鼠的毒性作用[J]. 吉林大学学报(医学版), 2004, 30(4): 556-558.

- [9] 王怀富, 高鲁红. 除草剂 2-甲-4 氯苯氧乙酸对小鼠的内分泌干扰作用及生殖毒性研究[C]//中华预防医学会学术年会暨全球华人公共卫生协会年会. 2006.
- [10] 徐义方. 二甲四氯急性中毒 5 例报告[J]. 中国实用内科杂志, 2000, 20(6).
- [11] 叶文玲, 邹宝华, 于阳, 等. 除草剂 2 甲 4 氯钠致肾病综合征合并急性肾功能衰竭一例[J]. 中华肾脏病杂志, 2008, 24(3): 216.
- [12] 江紫薇, 谭济才, 谭琳, 等. 1 株二甲四氯降解菌的分离鉴定及其降解特性[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2012, 38(6): 642-647.
- [13] Tranel, P.J. and Wright, T.R. (2002) Resistance of Weeds to ALS-Inhibiting Herbicides: What Have We Learned. *Weed Science*, **50**, 700-712. [https://doi.org/10.1614/0043-1745\(2002\)050\[0700:RROWTA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1614/0043-1745(2002)050[0700:RROWTA]2.0.CO;2)
- [14] 左凤, 夏敏, 谷学新. 高效液相色谱法检测两种苯氧乙酸类除草剂[J]. 现代科学仪器, 2003(4): 63-64.
- [15] 刘春光, 于文全, 王蕊, 等. 利用高效液相色谱法(HPLC)同时测定 37.5% 苯二甲水剂中苯达松和二甲四氯含量[J]. 农业科技通讯, 2012(11): 25.
- [16] 韩丽珍, 刘飞, 赵德刚. 1 株草甘膦降解菌的分离鉴定及特性[J]. 贵州农业科学, 2012, 40(12): 139-142.
- [17] Hayes, J.D. and Wolf, C.R. (1990) Molecular Genetics of Drug Resistance. *Biochem*, **272**, 281-295. <https://doi.org/10.1042/bj2720281>
- [18] 江紫薇, 谭琳, 曾维爱, 等. 降解菌 *Enterobacter sp.*对二甲四氯污染土壤中水稻生长的影响[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(20): 10442-10442.
- [19] 杨革. 微生物学实验教程[M]. 第二版. 北京: 科学出版社, 2009.
- [20] 李培京. 扫描电镜生物样品制备与观察[J]. 现代科学仪器, 2008(3): 124-125.
- [21] 李芳, 王剑, 文娜. 土壤中二甲四氯钠的高效液相色谱分析[J]. 天津农业科学, 2010, 16(6): 55-56.
- [22] 徐巧明, 高清, 董红春, 等. 农药 2 甲 4 氯钠的高效液相色谱分析[J]. 现代农药, 2004, 3(4): 19-20.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2329-7255, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>
期刊邮箱: hjss@hanspub.org