



## 厌氧丁草胺降解菌 BAD-20 的分离鉴定及降解特性研究

刘军委, 张璇, 鲍艺萱, 徐鉴映, 邱吉国, 何健\*

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, 江苏 南京 210095

**摘要:**【目的】分离并鉴定能够降解除草剂丁草胺的厌氧微生物菌株, 研究其厌氧降解丁草胺的特性和代谢途径, 为深入研究丁草胺厌氧降解机制提供依据。【方法】以丁草胺为碳源作为选择压力从水稻田土壤中富集驯化丁草胺降解菌, 利用 16S rRNA 基因系统发育分析结合菌株培养特征对降解菌株进行初步鉴定, 利用液相色谱-时间飞行质谱(LC-TOF-MS)检测菌株降解丁草胺的代谢产物。【结果】筛选到一株降解丁草胺的厌氧细菌, 命名为 BAD-20, 初步鉴定为嗜蛋白质菌属(*Proteiniphilum*), 菌株 BAD-20 降解丁草胺的最适条件为温度 30–35 °C、pH 7.5–8.0 和 0–0.5% NaCl, 在有氧条件下该菌不能降解丁草胺。最适条件下, 菌株 BAD-20 在 10 d 降解 90% 的 20 mg/L 丁草胺。菌株 BAD-20 还能降解甲草胺、乙草胺、丙草胺, 降解效率从高到低依次为甲草胺>乙草胺>丙草胺>丁草胺, 对这些氯乙酰胺除草剂的降解动力学符合一级动力学方程。鉴定到 2 个丁草胺降解代谢产物, 分别是 *N*-(2,6-二乙基苯基)-*N*-(丁氧甲基)乙酰胺(DEPBMA)和 *N*-(2,6-二乙基苯基)乙酰胺(DEPA), 表明菌株 BAD-20 降解丁草胺的起始步骤为脱氯, 随后脱去 *N*-丁氧甲基。【结论】本研究富集分离到一株降解丁草胺的厌氧细菌嗜蛋白质菌属(*Proteiniphilum*) BAD-20, 为深入研究丁草胺厌氧降解机制及研发含丁草胺废水厌氧生物处理技术提供依据。

**关键词:** 丁草胺, 厌氧降解, 富集分离, 嗜蛋白质菌属, 降解特性, 代谢产物

丁草胺[2-氯-*N*-(2,6-二乙基苯基)-*N*-(丁氧甲基)乙酰胺, butachlor]是氯乙酰胺类除草剂中的主要品种, 是我国用量最大的除草剂之一<sup>[1]</sup>。丁草胺作为选择性芽前除草剂, 在直播或移栽水稻田中广泛应用, 防除一年生禾本科杂草及某些阔叶杂

草<sup>[1–3]</sup>。丁草胺具有潜在的致畸变和致突变性, 被美国环保局定为 B-2 类致癌物, 丁草胺会导致心率紊乱、抽搐、昏迷和呼吸停止<sup>[4]</sup>。丁草胺对鱼类有很强的毒性, 比对哺乳动物的毒性大 500–10000 倍, 会严重危害污染水体中的渔业资源<sup>[5]</sup>。丁草胺

基金项目: 国家自然科学基金(31770117)

\*通信作者。Tel/Fax: +86-25-84396314; E-mail: [hejian@njau.edu.cn](mailto:hejian@njau.edu.cn)

收稿日期: 2020-10-16; 修回日期: 2020-12-16; 网络出版日期: 2021-02-23

对土壤微生物有明显的抑制作用, 显著降低土壤微生物多样性<sup>[6-8]</sup>。此外, 丁草胺使用不当会对农作物产生严重药害, 特别是在有机质含量较低的砂质土壤, 或者用药量过大、施药后遇持续低温高湿天气时, 会严重影响作物的生长<sup>[9-12]</sup>。因此研究丁草胺在环境中的转化和降解具有重要的意义。

氯乙酰胺类除草剂在土壤中可以通过微生物降解、光解和化学降解而消失, 其中微生物降解代谢是土壤中该类除草剂消失的主要因素<sup>[13-14]</sup>。目前, 国内外对氯乙酰胺类除草剂好氧微生物降解的研究比较深入透彻, 分离到多株能够好氧降解丁草胺的真菌、放线菌和细菌菌株<sup>[15-25]</sup>。在降解代谢过程和机制方面, 以本课题组对分离到的 *Sphingomonas* sp. DC-6 研究最为深入, 其代谢氯乙酰胺除草剂的过程和参与的酶和基因已经清楚。甲草胺、乙草胺或丁草胺首先在加氧酶 CndABC 催化下发生 *N*-脱烷基, 脱烷基产物接着在酰胺酶 CmeH 催化下脱乙酰基生产苯胺衍生物 2,6-二乙基苯胺 (DEA) 或 2-甲基-6-乙基苯胺 (MEA), 然后 DEA 或 MEA 在单加氧酶 MeaXY 和 MeaAB 催化下接连在苯环上 2 次羟基化, 然后苯环打开进入 TCA 循环直至完全降解<sup>[26-28]</sup>。

此外, 在厌氧条件下氯乙酰胺类除草剂也可以被厌氧微生物降解<sup>[29-32]</sup>, 叶央芳等<sup>[33]</sup>利用农药厂厌氧污泥作为接种物富集驯化到一个高效降解丁草胺的富集菌群。最近, 本课题组通过富集驯化, 利用农药厂污泥作为接种物在厌氧反应器中驯化出能够高效降解乙草胺、丁草胺和甲草胺的厌氧污泥, 并通过代谢产物鉴定推测了乙草胺厌氧降解途径<sup>[34]</sup>。但到目前为止, 国内外还没有分离到能够降解氯乙酰胺类除草剂的厌氧菌株, 这严重制约了对该类除草剂厌氧降解代谢过程及其遗传生化机制的深入研究。

丁草胺主要应用于水稻田杂草防除, 而在水稻种植过程中农田有一段很长的淹水期, 而淹水导致水稻田深层土壤处于厌氧状态。因此研究水稻田土壤中厌氧微生物对丁草胺的降解, 对于阐明丁草胺在水稻田中的转化降解及其生物学机制具有重要意义。本研究利用水稻田土壤作为接种物, 通过富集驯化获得一个高效降解丁草胺的富集液, 并从中筛选到一株高效的丁草胺厌氧降解菌 BAD-20, 研究了该菌的分类地位和对丁草胺的降解特性, 利用液相色谱飞行时间质谱联用技术鉴定了丁草胺厌氧降解代谢产物。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料及培养基

丁草胺(纯度 97%)、甲草胺(纯度 98%)、乙草胺(纯度 96%)和丙草胺(纯度 96%)购买自百灵威公司(中国, 上海)。

厌氧富集驯化培养基 (MSM, g/L)<sup>[34]</sup>:  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  0.35,  $KH_2PO_4$  0.27,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  0.10,  $NH_4Cl$  0.53,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.073, 柠檬酸钠 0.10, 丙酮酸钠 0.10, 刃天青 0.001, 微量元素复合液 1 mL, 维生素复合液 1 mL, 用磷酸盐缓冲液调 pH 为 7.2。

厌氧分离和培养的培养基 (PYT, g/L): 蛋白胨 0.5, 酵母浸粉 1.0, 胰蛋白胨 0.5, 酸水解酪蛋白 1.0, 可溶性淀粉 1.0, 葡萄糖 1.0,  $K_2HPO_4$  0.6,  $MgSO_4$  0.2, 丙酮酸钠 0.6, 微量元素复合液 1 mL, 维生素复合液 1 mL, 过滤除菌, 灭菌后加入, 用磷酸盐缓冲液调 pH 为 7.2。固体培养基加入 1.7% 的琼脂。

培养基除氧: 将配置好的培养基煮沸, 趁热将 30 mL 培养基分装于 50 mL 血清瓶中, 塞住胶

塞并用铝帽固定, 充入  $N_2$  30 min, 115 °C 高压蒸汽灭菌 30 min。灭菌后的培养基应保持无色, 如果颜色变为微红色或红色, 则说明氧气没有除尽。

除草剂母液(10 g/L): 分别称取 0.5155 g 丁草胺、0.5102 g 甲草胺、0.5208 g 乙草胺或 0.5208 g 丙草胺溶于 50 mL 甲醇中, 过滤除菌 4 °C 保存备用。

## 1.2 丁草胺厌氧降解菌的富集分离

用来驯化丁草胺厌氧降解菌群的土壤样品采自江苏省南京市江苏省农业科学院水稻试验地(E32°01'N118°52')。采样时, 挖取 3–10 cm 土壤作为样品, 装于无菌塑料袋带回实验室备用。称取采集的土壤样品 3 g 加入到 30 mL 含有 20 mg/L 丁草胺的无氧 MSM 培养基的血清瓶中, 用丁基胶塞封口, 然后将血清瓶放入 30 °C 恒温摇床 150 r/min 振荡培养, 培养过程中注意观察血清瓶中培养液颜色应保持无色, 如果培养基颜色变红则说明血清瓶中混入了氧气。定时取样测定丁草胺的降解效果, 当血清瓶中的丁草胺大约降解 60%–70% 后, 取 3 mL 富集液转接到另一个新鲜的丁草胺 MSM 培养基的血清瓶中。如此反复转接, 直到富集液能够在 2 周内降解 90% 的 20 mg/L 丁草胺时驯化结束。

富集液中丁草胺降解菌的分离在厌氧操作箱(COY-7000220A, COY Laboratory Products Inc., Michigan, USA)中进行, 将富集液梯度稀释后涂布于 PYT 固体培养基平板上, 然后将平板放入厌氧罐中, 置于培养箱 30 °C 恒温培养 7 d, 培养过程中注意观察培养基颜色变化, 培养基颜色应保持无色状态。挑取平板上的菌落在厌氧培养箱中进一步分离纯化, 将纯化的菌落接种到含有 20 mg/L 丁草胺的 MSM 培养基中, 定时取样测定其降解丁

草胺的能力。

## 1.3 丁草胺厌氧降解菌 BAD-20 的鉴定 16S rRNA 基因序列分析及系统进化树构建

形态鉴定: 将菌株 BAD-20 划线于 PYT 固体平板上, 于厌氧罐中 30 °C 恒温培养 3 d, 观察菌落形态; 将平板上的菌体用磷酸盐缓冲液重悬, 用 1% 钼酸固定后, 2% 的磷钨酸钠负染, 用透射电子显微镜(日立 H-7650, 日本日立)观察。

碳源利用: 分别向去除碳源的 MSM 培养基(去除丙酮酸钠和柠檬酸钠)中加入酵母膏、蛋白胨、甘氨酸、精氨酸、丝氨酸、苏氨酸、甲酸、乙酸、丙酮酸或乳酸作为营养物质, 接种 BAD-20 菌体, 于 30 °C、150 r/min 条件下培养, 定期观察 BAD-20 是否生长。

分子生物学鉴定: 利用高盐法提取分离菌株的总 DNA, 利用细菌 16S rRNA 基因的通用引物对 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3')<sup>[20]</sup> 进行 PCR 扩增。PCR 体系如下(50  $\mu$ L): 2 $\times$ Phanta Master Mix (诺维赞公司) 25  $\mu$ L, 模板(40 ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, 27F (20  $\mu$ mol/L) 2  $\mu$ L, 1492R (20  $\mu$ mol/L) 2  $\mu$ L, 加 ddH<sub>2</sub>O 补至 50  $\mu$ L。扩增条件为: 95 °C 3 min; 95 °C 15 s, 56 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 7 min。PCR 产物纯化后, 收集 1500 bp 左右的片段与 pMD18-T 载体用 DNA 连接酶连接, 然后用热激法转入到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  内, 利用含有氨苄青霉素(100  $\mu$ g/mL)的 LB 平板筛选阳性克隆子, 将阳性克隆子送至南京擎科生物科技有限公司测序。测得的序列在 EzBioCloud database (www.ezbiocloud.net)数据库与已报到模式菌株的 16S rRNA 基因进行同源性分析, 选取与其同源性较高的模式菌株相关序列, 利用 Clustal W 软件对

齐后, 利用 MEGA 6.0 软件, 通过邻接法构建抗性菌株的系统进化树, 采用 Kimura's two-parameter model 计算遗传距离, Bootstrap 值设定为 1000<sup>[20]</sup>。

#### 1.4 影响分离菌株降解丁草胺的各种因素

将菌株 BAD-20 接种于 PYT 液体培养基中, 30 °C 恒温摇床 150 r/min 厌氧培养至对数生长期后期( $OD_{600}$  约为 0.3)作为种子液。将种子液按 5% 的接种量接种于血清瓶中加入 20 mg/L 丁草胺的 MSM 培养基中, 于 30 °C、150 r/min 摇床内培养 10 d。考察不同温度对降解的影响时, 设置 16、20、25、30、35、40 和 45 °C; 考察不同 pH 对降解的影响时, 利用缓冲体系 50 mmol/L  $NaH_2PO_4$ - $Na_2HPO_4$  调节不同的 pH 范围(5.0–9.0)。考察不同盐浓度对降解的影响时, 利用 NaCl 调整培养基盐浓度(0%、0.2%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、3.0%和 5.0%,  $W/V$ )。考察氧气对降解的影响时, 将血清瓶的橡胶塞换成 8 层纱布使培养基通入氧气。考察不同底物浓度影响时, 丁草胺的浓度分别为 10、50、100 mg/L。以上实验分别设置不加菌株 BAD-20 的空白对照组, 处理组和对照组均设置 3 个重复。

#### 1.5 菌株 BAD-20 底物谱的测定

将培养至对数期后( $OD_{600}$  约为 0.3)的菌株 BAD-20 种子液按 5% 的接种量接种于 30 mL MSM 的血清瓶中, 然后分别加入各种氯乙酰胺除草剂至终浓度为 20 mg/L, 于 30 °C、150 r/min 摇床内培养, 定期取样测定培养液中各种氯乙酰胺除草剂的浓度。

#### 1.6 氯乙酰胺除草剂浓度检测方法及代谢产物鉴定

在丁草胺初始浓度为 50 mg/L 的 MSM 液体培养基中, 加入已制备好的 BAD-20 种子液 1.5 mL

( $OD_{600}=0.3$ ), 使其培养体系为 30 mL, 于 30 °C、150 r/min 条件下培养。定时取样测定丁草胺的浓度, 待丁草胺的浓度降解达到 80%时, 将降解液冷冻干燥, 加 2 mL 甲醇, 超声溶解, 过 0.22  $\mu$ m 有机滤膜。丁草胺(或甲草胺、乙草胺和丙草胺)的检测条件: 超高效液相色谱(U3000, Thermo Fisher Scientific, 美国); Thermo Fisher Synchronis C<sub>18</sub> (5  $\mu$ m, 4.6 mm×250 mm); 流动相: 乙腈: 水=90:10 ( $V/V$ ); 检测波长: 215 nm; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 40 °C; 进样量: 20  $\mu$ L。

丁草胺代谢产物液相色谱-时间飞行质谱(LC-TOF-MS)的测定条件: LC-20AD(日本岛津), AB Sciex TripleTOF<sup>®</sup> 5600 (美国 AB SCIEX), Phenomenex Kinetex C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 2.6  $\mu$ m); 柱温: 40 °C; 进样量: 10  $\mu$ L; 流速为 0.3 mL/min; 流动相 A 为水(0.1%甲酸,  $V/V$ ), B 为甲醇; 梯度洗脱程序为: 5%甲醇保持 0.5 min, 甲醇从 5%增加到 95%用时 11 min, 然后 95%甲醇保持 2 min。采用电喷雾离子源(ESI)正离子扫描模式, 离子喷雾电压(ISVF) 5500 V, 离子源温度(TEM) 550 °C, 雾化气(GS1) 65 psi, 辅助气(GS2) 65 psi, 气帘气(CUR) 35 psi; 质谱数据采集模式为高分辨飞行时间质谱全扫描并同时触发采集高分辨二级质谱(TOF MS IDA MS-MS)模式, TOF-MS 扫描范围  $m/z$  50–800, IDA MS-MS 扫描范围  $m/z$  50–800, 去簇电压(DP) 80 V, MS-MS 碰撞能量(CE) 40 eV, 扩展碰撞能量(CES) 20 eV。

#### 1.7 数据处理与统计分析

降解率计算公式如公式 1 所示,  $C_{ck}$  表示空白对照底物的浓度,  $C_t$  表示处理组降解后底物的浓度; 一级动力学方程如公式 2 所示,  $C_0$  表示初始底物浓度,  $k$  表示一级反应速率常数,  $t$  表示培养

时间;降解半衰期( $T_{1/2}$ ):  $T_{1/2}=(\ln 2)/k$ , 其含义为底物降解一半所需要的时间。实验中所有数值为每组 3 个平行的平均值, 对不同处理差异显著性的比较采用 SPSS 19.0 统计学软件进行 Duncan 检验,  $P<0.05$  为具有统计学差异。

$$\text{Degradation (\%)} = \frac{C_{\text{ck}} - C_t}{C_{\text{ck}}} \times 100\% \quad (1)$$

$$C = C_0 e^{-kt} \quad (2)$$

## 2 结果和分析

### 2.1 丁草胺厌氧降解菌 BAD-20 的分离和鉴定

以丁草胺为碳源作为选择压力, 以水稻土壤为接种物, 富集驯化获得一个丁草胺降解富集液。

该富集液能够在 2 周内降解 90% 的丁草胺。利用厌氧分离技术, 从该富集液中分离纯化到 25 株厌氧细菌, 分别编号为 BAD-01 到 BAD-25。降解试验结果表明菌株 BAD-20 对丁草胺有很好的降解效果(图 1), 在接种菌株 BAD-20 的培养液中丁草胺吸收峰显著下降(图 1-A), 而且降解率随着培养时间延长而增加, 在 10 d 内能够降解 90% 以上的丁草胺(20 mg/L)(图 1-B)。而其他分离菌株对丁草胺基本没有降解效果(数据未展示)。

菌株 BAD-20 在 PYT 固体培养基 30 °C 培养 3 d 菌落为白色、不透明、凸起、边缘光滑(图 2-A)。用透射电子显微镜观察, BAD-20 菌体为杆状, 大小为  $(0.5-0.8) \mu\text{m} \times (1.5-1.8) \mu\text{m}$ , 未观察到鞭毛(图 2-B),

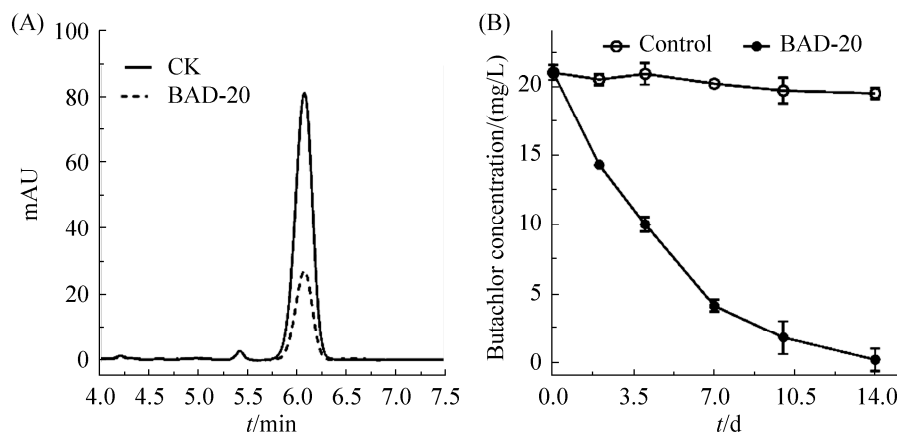


图 1. 菌株 BAD-20 对丁草胺的厌氧降解效果

Figure 1. The anaerobic degradation of butachlor by strain BAD-20. A: HPLC chromatograms of butachlor degradation by strain BAD-20; B: the time-course curve of anaerobic butachlor degradation by strain BAD-20.

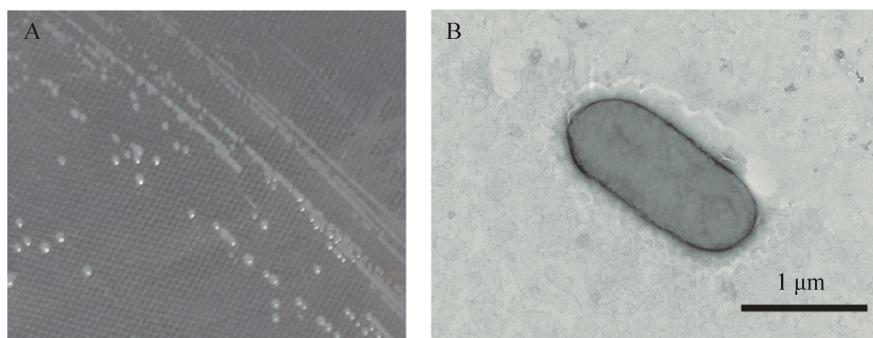


图 2. 菌株 BAD-20 的菌体形态(A)和透射电镜照片(B)

Figure 2. Photograph (A) and transmission electron micrograph (Bar, 1.0 μm) (B) of strain BAD-20.

不能运动, 革兰氏染色阴性。菌株 BAD-20 能利用酵母膏、蛋白胨、甘氨酸、精氨酸、丝氨酸和苏氨酸等蛋白氨基酸类物质生长, 能利用甲酸、乙酸、丙酮酸和乳酸作为碳源。

利用细菌 16S rRNA 基因通用引物扩增该菌 16S rRNA 基因, 测序结果表明 BAD-20 的 16S rRNA 基因长度为 1492 bp (NCBI 的 GenBank 登录号为 MW057853), 和 *Proteiniphilum acetatigenes* TB 107<sup>T</sup> 具有 99% 的一致性, 与其形成一个分支, 置信度为 100% (图 3)。因此, 初步将菌株 BAD-20 鉴定为嗜蛋白属(*Proteiniphilum* sp.)。

## 2.2 菌株 BAD-20 降解丁草胺的影响因素

菌株 BAD-20 降解丁草胺的最适温度为 30–35 °C, 10 d 对丁草胺降解率达到 90% 以上; 当温度高于 35 °C 或低于 20 °C 时, 对丁草胺的降解速率明显在下降(图 4-A)。菌株 BAD-20 降解丁草胺的最适 pH 为 7.5–8.0, 10 d 对丁草胺降解率

达到 80% 以上; 当 pH 高于 8.0 或低于 6.5 时, 菌株 BAD-20 对丁草胺的降解速率明显下降(图 4-B)。菌株 BAD-20 降解丁草胺的最适盐浓度为 0–0.5% NaCl, 当 NaCl 浓度超过 0.5%, 丁草胺的降解效率明显受到抑制(图 4-C)。在有氧条件下, 菌株 BAD-20 完全失去了丁草胺降解能力(图 4-D), 说明菌株 BAD-20 为严格厌氧菌。

图 5 结果表明, 菌株 BAD-20 能高效降解高达 50 mg/L 的丁草胺, 而当培养基中丁草胺的起始浓度超过 100 mg/L 时, 菌株 BAD-20 对丁草胺的降解效率下降, 表明高浓度的丁草胺对菌株 BAD-20 有较强的抑制作用。菌株 BAD-20 对不同浓度丁草胺的降解动态用一级动力学方程拟合, 结果如表 1 所示, BAD-20 对 10 mg/L、50 mg/L 和 100 mg/L 丁草胺的降解半衰期( $T_{1/2}$ )分别为 2.49 d、6.78 d 和 23.17 d, 不同初始浓度之间的降解半衰期存在明显的差异( $P < 0.05$ )。

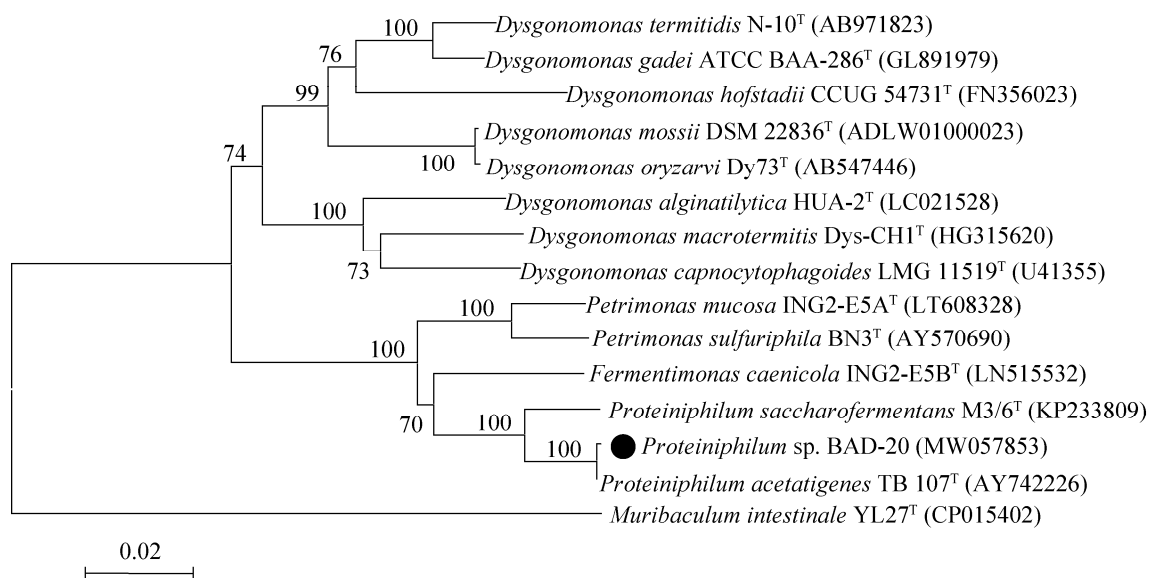


图 3. 菌株 BAD-20 的 16S rRNA 基因序列系统发育树

Figure 3. Phylogenetic tree of strain BAD-20 based on 16S rRNA gene sequences. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank; numbers at the nodes indicate the bootstrap values on Neighbor-Joining analysis of 1000 resampled data sets. Bar 0.02 represent sequence divergence.



表 1. 菌株 BAD-20 对不同初始浓度丁草胺降解的一级动力学参数

Table 1. First-order kinetic parameters of degradation by strain BAD-20 at different initial butachlor concentration

Initial concentration/(mg/L)	Kinetic equation	Correlation coefficient ( $R^2$ <sup>a</sup> )	Rate constant $K$ /[mg/(L·d)]	Half life ( $T_{1/2}$ <sup>b</sup> /d)
10	$C=10.76 e^{-0.2785t}$	0.9880	0.2785	2.49 a
50	$C=51.01 e^{-0.1022t}$	0.9923	0.1022	6.78 b
100	$C=100.03 e^{-0.0299t}$	0.9732	0.0299	23.17 c

<sup>a</sup>: Correlation coefficient, which represents the fitness of the modeling data; <sup>b</sup>: Duncan test was used to test the difference between the data. Different letters after the same column of data indicated the significant difference between the treatments ( $P<0.05$ ).

### 2.3 菌株 BAD-20 对其他主要氯乙酰胺类除草剂的降解

如表 2 所示, 菌株 BAD-20 除能降解丁草胺外, 还能降解甲草胺、乙草胺和丙草胺等主要氯乙酰胺类除草剂。菌株 BAD-20 对甲草胺、乙草胺、丙草胺和丁草胺的降解半衰期( $T_{1/2}$ )分别为 1.34、2.05、2.78 和 3.20 d。差异显著性分析表明, 菌株对氯乙酰胺类除草剂的降解效率从高到低依次为甲草胺>乙草胺>丙草胺>丁草胺。





### 2.4 菌株 BAD-20 降解丁草胺的代谢产物鉴定

利用 LC-TOF-MS 检测了菌株 BAD-20 降解丁草胺的中间代谢产物。结果如图 6 所示, 在培养液高速离心上清中一共检测 3 个物质, 其中

Compound I 的荷质比( $m/z$ )为 312, 和丁草胺分子量相同, 几个碎片峰荷质比也和丁草胺的分子结构相符合(图 6-A), 因此 Compound I 鉴定为底物丁草胺。Compound II 的荷质比为 278, 刚好和丁草胺脱去一个氯的产物 *N*-(2,6-二乙基苯基)-*N*-(丁氧甲基)乙酰胺(DEPBMA)分子量相同, 其几个碎片峰荷质比理论上符合该产物分子结构(图 6-B), 因此 Compound II 鉴定为 *N*-(2,6-二乙基苯基)-*N*-(丁氧甲基)乙酰胺(DEBMA)。Compound III 荷质比为 192, 刚好和 DEBMA 脱去 *N*-丁氧甲基的产物分子量相同, 其几个碎片峰也与脱该脱 *N*-丁氧甲基产物分子结构相同(图 6-C), 因此 Compound III 鉴定为 *N*-(2,6-二乙基苯基)乙酰胺(DEPA)。

表 2. 菌株 BAD-20 对各类氯乙酰胺类除草剂降解效率的测定

Table 2. The degradation of others important chloroacetamide herbicides by strain BAD-20.

Compounds <sup>a</sup>	Structure	Correlation coefficient ( $R^2$ <sup>b</sup> )	Rate constant $K$ /[mg/(L·d)]	Half life ( $T_{1/2}$ <sup>c</sup> /d)
Alachlor		0.9981	0.5172	1.34 a
Acetochlor		0.9889	0.3381	2.05 b
Pretilachlor		0.9724	0.2493	2.78 c
Butachlor		0.9923	0.2167	3.20 d

<sup>a</sup>: the initial concentration of substrate is 20 mg/L; <sup>b</sup>: correlation coefficient, which represents the fitness of the modeling data; <sup>c</sup>: duncan test was used to test the difference between the data. Different letters after the same column of data indicated the significant difference between the treatments ( $P<0.05$ ).



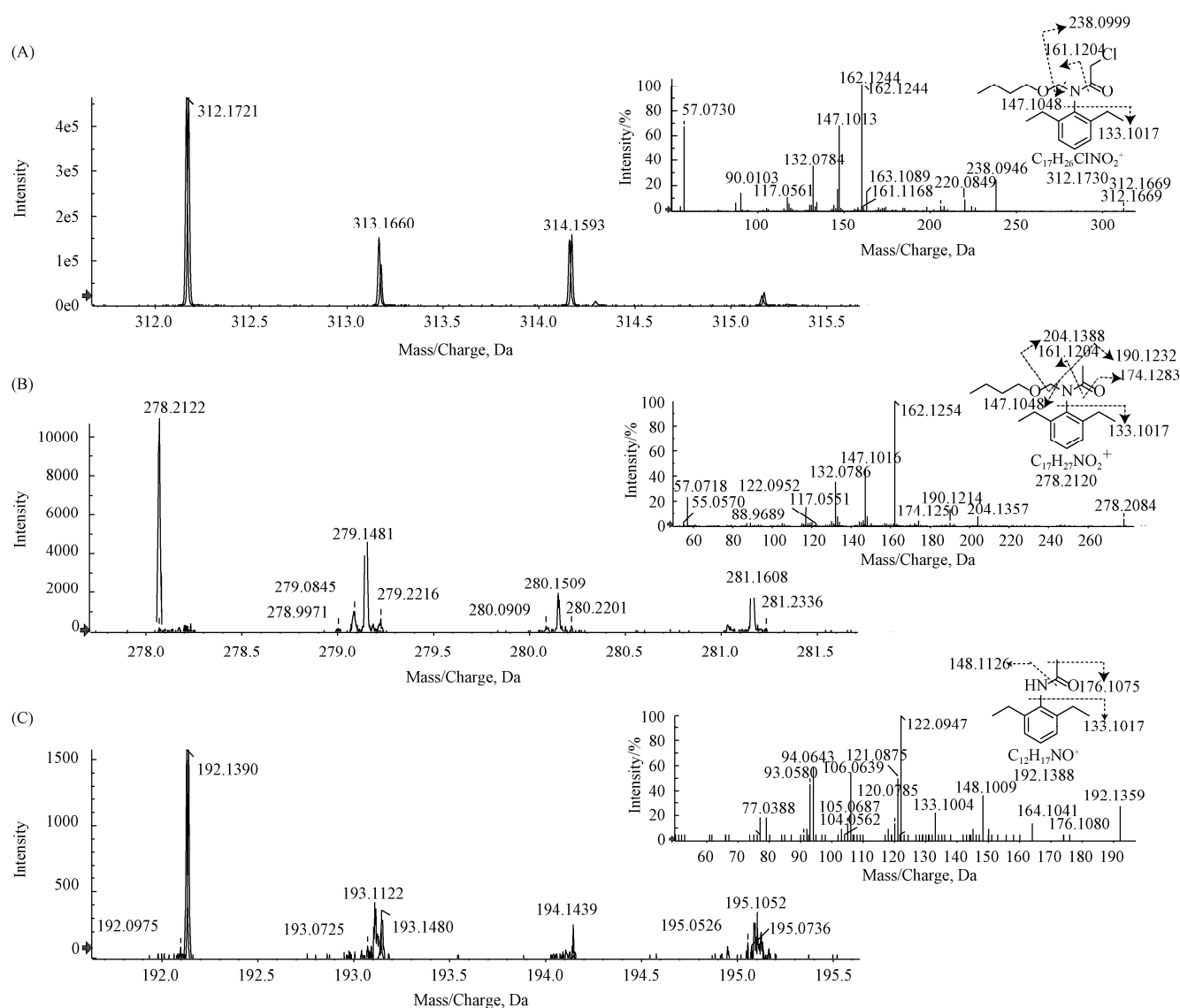


图 6. 利用 LC-TOF-MS 检测菌株 BAD-20 降解丁草胺的代谢产物

Figure 6. LC-TOF-MS Mass spectrograms and proposed structures of butachlor and its metabolites by butachlor-degrading strain BAD-20. A: compound I: butachlor; B: compound II: DEPBM; C: compound II: DEPA.

### 3 讨论

丁草胺作为一种主要氯乙酰类除草剂，在农田除草中得到了广泛使用。但丁草胺有潜在的致癌性，对鱼类有高毒性，破坏土壤微生物多样性，而且土壤高残留还会对农作物产生严重药害，因此研究环境中丁草胺的降解规律和机制、开发丁草胺残留污染降解修复技术具有重要的意义。

目前对丁草胺好氧微生物降解机制的研究比较深入，其降解过程及参与降解的酶和基因得到了阐明<sup>[35]</sup>。但是对于丁草胺厌氧降解的研究很少，仅仅获得了能够厌氧降解丁草胺的富集液，而丁草胺厌氧降解菌株分离鉴定及对丁草胺厌氧降解过程和机制方面的研究还未见报道。水稻田淹水时深层土壤处于厌氧状态，而且经常使用丁草胺除草，因此水稻田土壤存在厌氧丁草胺降解菌的生

态条件。本研究中我们利用富集驯化技术,以丁草胺为碳源作为选择压力,成功从水稻田土壤中富集分离到一株厌氧丁草胺降解菌 BAD-20,鉴定为嗜蛋白质菌属(*Proteiniphilum*)。嗜蛋白质菌属为一个创建于 2005 年的比较新的属,到目前共有两个种 *Proteiniphilum acetatigenes* 和 *Proteiniphilum saccharofermentans*<sup>[36-37]</sup>,嗜蛋白质菌属的模式菌株 *Proteiniphilum acetatigenes* TB107<sup>T</sup> (=JCM 12891<sup>T</sup>=AS 1.5024<sup>T</sup>)分离自处理啤酒废水的 UASB(Up-flow Anaerobic Sludge Bed)厌氧反应器中的颗粒污泥,能够分解利用酵母膏、蛋白胨、甘氨酸、精氨酸、丝氨酸和苏氨酸等蛋白氨基酸类物质生长,但对有机酸利用能力较差,仅能利用丙酮酸生长<sup>[36]</sup>。而菌株 BAD-20 除分解利用酵母膏、蛋白胨、甘氨酸和丙酮酸生长外,还能利用甲酸、乙酸和乳酸等有机酸生长,这可能跟菌株 BAD-20 栖息环境稻田土壤有机酸比较丰富有关;而菌株 BAD-20 能够降解氯乙酰胺类除草剂则为该属细菌首次报道。

从菌株 BAD-20 的降解谱可知,该菌能够降解甲草胺、乙草胺和丁草胺等多种氯乙酰胺类除草剂,其降解效率从高到低依次是甲草胺>乙草胺>丙草胺>丁草胺。而通过比较不同氯乙酰胺类除草剂的分子结构,甲草胺、乙草胺、丙草胺和丁草胺分子结构的主要差异之处在于 *N*-取代烷氧基团的长度不同,以及苯环上侧链基团不同(表 2)。通过比较不同氯乙酰胺类除草剂分子结构的差异及菌株 BAD-20 对不同氯乙酰胺类除草剂降解能力的差异,我们发现氯乙酰胺类除草剂厌氧降解

效率与其分子结构有密切关系,即 *N*-取代烷氧基团越长越复杂,其降解效率越低,而苯环上取代基团对降解效率影响不大。甲草胺、乙草胺、丙草胺和丁草胺支链上烷氧基团分别为 CH<sub>3</sub>O-、CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>O-、CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-和 CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-,其长度和复杂程度逐渐增加,而降解效率逐渐降低。*N*-取代烷氧基团影响降解效率可能的原因是氯乙酰胺除草剂与降解酶作用或结合的关键位置不是苯环,而是 *N*-取代烷氧基团和氯乙酰基,*N*-取代烷氧基团越大越复杂,会影响降解酶-底物的相互结合,从而影响降解效率。

在好氧菌中,丁草胺的降解上游步骤是在加氧酶 CndABC 催化下发生 *N*-脱烷基生成 *N*-(2,6-二 2-氯-*N*-(2,6-二乙基苯基)乙酰胺,该产物接着在酰胺酶 CmeH 催化下脱氯乙酰基生成 2,6-二乙基苯胺<sup>[26-28]</sup>。利用 LC-TOF-MS,我们从厌氧菌株 BDA-20降解丁草胺的培养液中鉴定到 2 个代谢产物 *N*-(2,6-二乙基苯基)-*N*-(丁氧甲基)乙酰胺(DEPBMA)和 *N*-(2,6-二乙基苯基)乙酰胺(DEPA)。根据这个产物鉴定结果我们推测菌株 BDA-20 厌氧降解丁草胺的上游降解步骤为先脱氯再脱 *N*-烷氧烷基(图 7)。这个先脱氯再脱烷基的降解过程完全不同于好氧菌对丁草胺的先脱烷基再脱氯乙酰基降解过程,是一个新的乙草胺降解机制。

卤代化合物广泛存在于自然界,很多重要的合成化学品也是卤代化合物。一般卤代化合物化学性质非常稳定,难以降解,而脱卤可以提高其可生物降解性。研究表明微生物脱卤机制非常多

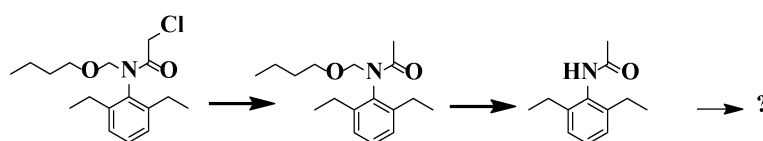


图 7. 菌株 BAD-20 降解丁草胺的代谢途径推测

Figure 7. Proposed anaerobic degradation pathway of butachlor by the strain BAD-20.

样化,有氧化脱卤、水解脱卤、还原脱卤和硫醇取代脱卤<sup>[38-41]</sup>。在厌氧菌中报道比较多的是还原脱卤,有呼吸型还原脱卤和非呼吸型还原脱卤两种类型<sup>[40,42-43]</sup>。呼吸型还原脱卤即卤代芳烃在厌氧条件下作为电子呼吸链最终电子受体,因此呼吸型还原脱卤又叫脱卤呼吸。如 *Dehalobacter restrictus* 和 *Dehalospirillum multivorans* 等能够通过脱卤呼吸将四氯乙烯(Perchloroethylene, PCE)脱去一个氯原子转化为三氯乙烯(Trichloroethylene, TCE)<sup>[40,42]</sup>。非呼吸型还原脱卤不与电子呼吸链耦联,其所需的电子由 NADPH 提供。催化还原型脱卤的关键酶是还原脱卤酶(reductive dehalogenase, RDs),呼吸型位于细胞膜上以方便它们参与膜相关的电子传递—耦合氧化磷酸化,而非呼吸型还原脱卤酶位于细胞质<sup>[40,42-43]</sup>。菌株 BAD-20 到底是通过哪一种脱卤机制脱去丁草胺上的氯原子还不清楚,需要进一步研究。

## 参考文献

- [1] 刘长令. 世界农药大全-除草剂卷. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [2] Jiang ZP, Gu WZ. Research progress of chloroacetamide herbicides. *Shandong Pesticide News*, 2010(3): 27-28. (in Chinese)  
江忠萍, 谷文喆. 酰胺类除草剂研究进展. 山东农药信息, 2010(3): 27-28.
- [3] Lu MR. Market situation and future prospect of amide herbicides at home and abroad. *Pesticide Market News*, 2009(16): 11-13. (in Chinese)  
陆明若. 酰胺类除草剂国内外市场状况及未来前景. 农药市场信息, 2009(16): 11-13.
- [4] EPA US. Report of the Food Quality Protection Act (FQPA) tolerance reassessment progress and risk management decision (TRED) for acetochlor. Report EPA738-R-00-009. US Environmental Protection Agency. Washington, DC. 2006; [http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/REDs/acetochlor\\_tred.pdf](http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/REDs/acetochlor_tred.pdf).
- [5] Xu HJ, He HB, Wu YY, Liu N, Zhang XD. Environmental behavior and ecological effect of chloroacetamide herbicides in terrestrial ecosystem. *Chinese Journal of Soil Science*, 2009, 40(5): 1226-1232. (in Chinese)  
徐会娟, 何红波, 武叶叶, 刘宁, 张旭东. 氯乙酰胺类除草剂的环境行为和生态效应研究. 土壤通报, 2009, 40(5): 1226-1232.
- [6] Zhao YH, Mei QZ, Chen MC, Min H. Effect of butachlor on CH<sub>4</sub> emission and anaerobes in paddy soil. *Acta Microbiologica Sinica*, 1997, 37(6): 477-479. (in Chinese)  
赵宇华, 梅其志, 陈美慈, 闵航. 丁草胺对水稻土甲烷释放和厌氧细菌的影响. 微生物学报, 1997, 37(6): 477-479.
- [7] Deng X, Liao XL, Tang QF. Effects of methamidophos and acetochlor on population and activity of methanogens. *Rural Eco-Environment*, 2004, 20(3): 56-59. (in Chinese)  
邓晓, 廖晓兰, 唐群锋. 甲胺磷和乙草胺对产甲烷菌种群数量及其活性的影响. 农村生态环境, 2004, 20(3): 56-59.
- [8] Seghers D, Verthé K, Reheul D, Bulcke R, Siciliano SD, Verstraete W, Top EM. Effect of long-term herbicide applications on the bacterial community structure and function in an agricultural soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 46(2): 139-146.
- [9] Abu-Qare AW, Duncan HJ. Herbicide safeners: uses, limitations, metabolism, and mechanisms of action. *Chemosphere*, 2002, 48(9): 965-974.
- [10] Han YJ, Yan CX, He FL, Shi N, Zhao CS. Study of butachlor on safety in early stage of rice. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2007, 38(5): 586-589. (in Chinese)  
韩玉军, 闫春秀, 何付丽, 史娜, 赵长山. 丁草胺对水稻安全性影响的研究. 东北农业大学学报, 2007, 38(5): 586-589.
- [11] Liu WX, Chen YQ, Kou YB, Guo HW, Chang L. Effects of individual and combined pollution of cadmium and butachlor on growth of amaranth. *Henan Science*, 2009, 27(3): 305-308. (in Chinese)  
刘文霞, 陈元琦, 寇渊博, 郭华武, 常乐. 镉、丁草胺单一及复合污染对苋菜生长的影响. 河南科学, 2009, 27(3): 305-308.
- [12] Liu B, Guan CH, Wang XF, Xie LH. Analyzing the causes of and solutions for crop injury by herbicides commonly used in northeast China. *Agrochemicals*, 2006, 45(6): 368-373. (in Chinese)  
刘波, 关成宏, 王险峰, 谢丽华. 我国东北地区常见除草剂药害原因分析与解决方法. 农药, 2006, 45(6): 368-373.

- [13] Zheng HH, Ye CM. Hydrolysis of chloroacetanilide herbicides acetochlor and butachlor. *Environmental Chemistry*, 2001, 20(2): 168–171. (in Chinese)  
郑和辉, 叶常明. 乙草胺和丁草胺的水解及其动力学. 环境化学, 2001, 20(2): 168–171.
- [14] Zheng HH, Ye CM. Photodegradation of acetochlor and butachlor in soil. *Environmental Chemistry*, 2002, 21(2): 117–122. (in Chinese)  
郑和辉, 叶常明. 乙草胺和丁草胺在土壤中的紫外光化学降解. 环境化学, 2002, 21(2): 117–122.
- [15] Chu XQ, Pang GH, Fang H, Wang XG, Gao CM, Yu YL. Isolation, identification and characteristics of a butachlor-degrading bacterium. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28(1): 145–150. (in Chinese)  
楚小强, 庞国辉, 方华, 王秀国, 高春明, 虞云龙. 丁草胺降解菌的分离鉴定及降解特性的研究. 农业环境科学学报, 2009, 28(1): 145–150.
- [16] Li C, Gu GB, Liu S. Isolation and its degradability of high efficiency butachlor fungi. *Journal of Agro-Environmental Science*, 2004, 23(3): 611–614. (in Chinese)  
李川, 古国榜, 柳松. 丁草胺高效真菌的分离及性能研究. 农业环境科学学报, 2004, 23(3): 611–614.
- [17] Li YC, Xiong MH, Xiao J, Li CY. Isolation and characteristics of a butachlor degradation bacterium. *Microbiology China*, 2009, 36(8): 1178–1182. (in Chinese)  
李艳春, 熊明华, 肖晶, 李春艳. 一株丁草胺降解菌的分离鉴定及其降解特性的研究. 微生物学通报, 2009, 36(8): 1178–1182.
- [18] Ni YY, Zheng JW, Zhang J, Wang BZ, He J, Li SP. Isolation of chloracetanilide herbicides-degrading bacterium Y3B-1 and its degradability to chloracetanilide herbicides. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2011, 17(5): 711–716. (in Chinese)  
倪盈盈, 郑金伟, 张隽, 王保站, 何健, 李顺鹏. 氯代酰胺类除草剂降解菌的分离及降解性能. 应用与环境生物学报, 2011, 17(5): 711–716.
- [19] Wu XJ, Yue YD, Hua RM, Tang F. Isolation of effectively butachlor degradating bacterium. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2000, 6(6): 593–596. (in Chinese)  
吴新杰, 岳永德, 花日茂, 汤锋. 丁草胺高效降解细菌的分离. 应用与环境生物学报, 2000, 6(6): 593–596.
- [20] Chen Q, Zhang J, Wang CH, Jiang J, Kwon SW, Sun LN, Shen WB, He J. *Novosphingobium chloroacetimidivorans* sp. nov., a chloroacetamide herbicide-degrading bacterium isolated from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(Pt8): 2573–2578.
- [21] Chu CW, Chen Q, Wang CH, Wang HM, Sun ZG, He Q, He J, Gu JG. *Roseomonas chloroacetimidivorans* sp. nov., a chloroacetamide herbicide-degrading bacterium isolated from activated sludge. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2016, 109(5): 611–618.
- [22] Chen Q, Yao L, Wang CH, Deng SK, Chu CW, He J. Isolation and characterization of acetochlor-degrading strain *Sphingomonas* sp. DC-6 and preliminary studies on its metabolic pathway. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2013, 15(5): 67–74. (in Chinese)  
陈青, 姚利, 王成红, 邓诗凯, 褚翠伟, 何健. 乙草胺降解菌 *Sphingomonas* sp. DC-6 的分离鉴定及其代谢途径的初步研究. 中国农业科技导报, 2013, 15(5): 67–74.
- [23] Liu HM, Cao L, Lu P, Ni HY, Li YX, Yan X, Hong Q, Li SP. Biodegradation of butachlor by *Rhodococcus* sp. strain B1 and purification of its hydrolase (ChlH) responsible for N-dealkylation of chloroacetamide herbicides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(50): 12238–12244.
- [24] Zhang J, Zheng JW, Liang B, Wang CH, Cai S, Ni YY, He J, Li SP. Biodegradation of chloroacetamide herbicides by *Paracoccus* sp. FLY-8 *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(9): 4614–4621.
- [25] Wang F, Zhou J, Li ZK, Dong WL, Hou Y, Huang Y, Cui ZL. Involvement of the cytochrome P450 system EthBAD in the N-deethoxymethylation of acetochlor by *Rhodococcus* sp. strain T3-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(6): 2182–2188.
- [26] Cheng MG, Meng Q, Yang YJ, Chu CW, Chen Q, Li Y, Cheng D, Hong Q, Yan X, He J. The two-component monooxygenase MeaXY initiates the downstream pathway of chloroacetanilide herbicide catabolism in sphingomonads. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(7): 1–13. DOI:10.1128/aem.03241-16.
- [27] Chen Q, Wang CH, Deng SK, Wu YD, Li Y, Yao L, Jiang JD, Yan X, He J, Li SP. Novel three-component rieske non-heme iron oxygenase system catalyzing the N-dealkylation of

- chloroacetanilide herbicides in sphingomonads DC-6 and DC-2. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(16): 5078–5085.
- [28] Li Y, Chen Q, Wang CH, Cai S, He J, Huang X, Li SP. Degradation of acetochlor by consortium of two bacterial strains and cloning of a novel amidase gene involved in acetochlor-degrading pathway. *Bioresource Technology*, 2013, 148: 628–631.
- [29] Llor-Vela SX, Crawford Simmons JJ, Simmons FW, Raskin L. Dissipation of [14C]acetochlor herbicide under anaerobic aquatic conditions in flooded soil microcosms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(23): 6767–6773.
- [30] Janniche GS, Mouvet C, Albrechtsen HJ. Acetochlor sorption and degradation in limestone subsurface and aquifers. *Pest Management Science*, 2010, 66(12): 1287–1297.
- [31] Konopka A. Anaerobic degradation of chloroacetanilide herbicides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1994, 42(2/3): 440–445.
- [32] Seybold CA, Mersie W, McNamee C. Anaerobic degradation of atrazine and metolachlor and metabolite formation in wetland soil and water microcosms. *Journal of Environmental Quality*, 2001, 30(4): 1271–1277.
- [33] Ye YF, Min H, Du YF. Anaerobic degradation of butachlor by sulfate reducing bacteria enrichment culture. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2000, 20(3): 376–378. (in Chinese) 叶央芳, 闵航, 杜宇峰. 一个硫酸盐还原细菌富集物对丁草胺的厌氧降解. *环境科学学报*, 2000, 20(3): 376–378.
- [34] Liu JW, Zhang X, Xu JY, Qiu JG, Zhu JC, Cao H, He J. Anaerobic biodegradation of acetochlor by acclimated sludge and its anaerobic catabolic pathway. *Science of the Total Environment*, 2020, 748: 141122.
- [35] Chen Q, Wang HM, Li XH, Wei HF, Su P, He J, Jiang JD. Research progress in microbial degradation of chloroacetanilide herbicides. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2019, 25(5): 1252–1260. (in Chinese) 陈青, 王红妹, 李晓红, 尉鸿飞, 苏朋, 何健, 蒋建东. 氯乙酰胺类除草剂微生物降解研究进展. *应用与环境生物学报*, 2019, 25(5): 1252–1260.
- [36] Chen SY, Dong XZ. *Proteiniphilum acetatigenes* gen. nov., sp. nov., from a UASB reactor treating brewery wastewater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(6): 2257–2261.
- [37] Hahnke S, Langer T, Koeck DE, Klocke M. Description of *Proteiniphilum saccharofermentans* sp. nov., *Petrimonas mucosa* sp. nov. and *Fermentimonas caenicola* gen. nov., sp. nov., isolated from mesophilic laboratory-scale biogas reactors, and emended description of the genus *Proteiniphilum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, 66(3): 1466–1475.
- [38] Xun L. Purification and characterization of chlorophenol 4-monooxygenase from *Burkholderia cepacia* AC1100. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(9): 2645–2649.
- [39] Scholten JD, Chang KH, Babbitt PC, Charest H, Sylvestre M, Dunaway-Mariano D. Novel enzymic hydrolytic dehalogenation of a chlorinated aromatic. *Science*, 1991, 253(5016): 182–185.
- [40] Holliger C, Wohlfarth G, Diekert G. Reductive dechlorination in the energy metabolism of anaerobic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 1998, 22(5): 383–398.
- [41] la Roche SD, Leisinger T. Sequence analysis and expression of the bacterial dichloromethane dehalogenase structural gene, a member of the glutathione S-transferase supergene family. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172(1): 164–171.
- [42] Neumann A, Scholz-Muramatsu H, Diekert G. Tetrachloroethene metabolism of *Dehalospirillum multivorans*. *Archives of Microbiology*, 1994, 162(4): 295–301.
- [43] Chen K, Huang LL, Xu CF, Liu XM, He J, Zinder SH, Li SP, Jiang JD. Molecular characterization of the enzymes involved in the degradation of a brominated aromatic herbicide. *Molecular Microbiology*, 2013, 89(6): 1121–1139.

# Isolation, identification and degradation characteristics of an anaerobic butachlor-degrading bacterium BAD-20

Junwei Liu, Xuan Zhang, Yixuan Bao, Jianyi Xu, Jiguo Qiu, Jian He\*

Key Laboratory of Agricultural Environmental Microbiology, Ministry of Agriculture, College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China

**Abstract:** [Objective] The aim of this study was to isolate anaerobic bacteria capable of degrading butachlor. [Methods] By enrichment and acclimation method using butachlor as carbon source for enrichment, we screened an anaerobic butachlor-degrading bacterium from paddy soil. The isolated strain was preliminarily identified based on morphological and biochemical characteristics as well as 16S rRNA phylogenetic analysis, and the metabolites of butachlor degradation were identified by liquid chromatography-time of flight mass spectrometry. [Results] An anaerobic bacterium designated as BAD-20 was screened and identified as *Proteiniphilum*. The optimum conditions for butachlor degradation by strain BAD-20 were 30–35 °C, pH 7.5–8.0 and 0–0.5% NaCl. Under the optimal conditions, 90% butachlor was degraded within 10 days by *Proteiniphilum* sp. BAD-20. Under aerobic conditions, the strain lost the ability to degrade butachlor. *Proteiniphilum* sp. BAD-20 could also degrade alachlor, acetochlor and propionate with the degradation efficiency following the order: alachlor>acetochlor>propranolol>butachlor. The degradation kinetics to these chloroacetamide herbicides fit to a first-order kinetic equation. Two metabolites, *N*-(2,6-diethylphenyl)-*N*-(butoxymethyl)acetanilide and *N*-(2,6-diethylphenyl)acetamide, were identified, indicating that the initial two steps of butachlor degradation are dechlorination and dealkylation. [Conclusion] An anaerobic butachlor-degrading bacterium BAD-20 was enriched and isolated from paddy soil and identified as *Proteiniphilum*. This study provides a basis for further study on the anaerobic catabolism of butachlor and the development of anaerobic biological treatment technology for butachlor-containing wastewater.

**Keywords:** butachlor, anaerobic degradation, acclimation and isolation, *Proteiniphilum* sp., degradation characteristics, metabolites

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31770117)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-25-84396314; E-mail: hejian@njau.edu.cn

Received: 16 October 2020; Revised: 16 December 2020; Published online: 23 February 2021

刘军委, 出生于 1987 年, 河南固始人, 博士研究生, 目前博士就读于南京农业大学微生物专业。主要研究方向是环境微生物, 污染物在环境中的降解与修复和厌氧污水处理。E-mail: liujunwei@ahau.edu.cn。

