

久效磷降解菌的分离及其酶促降解特性研究

贾开志, 李晓慧, 何健, 顾立锋, 马吉平, 李顺鹏*

(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, 南京 210095)

摘要:从某农药厂废水处理池的污泥中分离到 1 株久效磷高效降解菌株 M-1, 经过对其形态特征、生理生化、以及 16S rDNA 序列分析, 该菌株初步鉴定为 *Paracoccus* sp. M-1 能以久效磷作为唯一碳源生长, 24 h 对 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 久效磷的降解效率为 92.47%。久效磷降解酶定域表达试验表明该酶为胞内酶, 组成表达。久效磷酶促降解的最适反应 pH 为 8.0, 最适反应温度为 25 °C; 其米氏常数 (K_m) 为 $0.29 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$, 最大降解速率 ($V_{\max}$) 为 $682.12 \mu\text{mol} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg})^{-1}$ 。久效磷降解酶热稳定性差, 碱性条件下能够保持较高降解活性。

关键词:久效磷; 生物降解; *Paracoccus* sp.; 酶促降解

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)04-0908-05

Isolation of a Monocrotophos-Degrading Bacterial Strain and Characterization of Enzymatic Degradation

JIA Kai-zhi, LI Xiao-hui, HE Jian, GU Li-feng, MA Ji-ping, LI Shun-peng

(Key Laboratory of Agricultural Environment Microbiological Engineering, Ministry of Agriculture, College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: A monocrotophos [dimethyl (E)-1-2-methylcarbamoylvinylphosphate or MCP] -degrading strain named as M-1 was isolated from sludge collected from the wastewater treatment pool of a pesticide factory and identified as *Paracoccus* sp. according to its morphology and biochemical properties and 16S rDNA sequence analysis. Using MCP as a sole carbon source, M-1 was able to degrade MCP ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) by 92.47% in 24 h. The key enzyme(s) involved in the initial biodegradation of monocrotophos in M-1 was shown to be constitutively expressed cytosolic proteins and showed the greatest activity at pH 8.0 and 25 °C, with its Michaelis-Menten's constant (K_m) and maximum degradation rate ($V_{\max}$) of $0.29 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $682.12 \mu\text{mol} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg})^{-1}$ respectively. This degrading enzyme(s) was sensitive to high temperature, but kept high activity under alkaline conditions.

Key words: monocrotophos; biodegradation; *Paracoccus* sp.; enzymatic degradation

久效磷 [dimethyl (E)-1-2-methylcarbamoylvinylphosphate, MCP] 是 1 种速效、剧毒有机磷杀虫剂, 具有内吸和触杀作用。由于其高效, 价格便宜, 被广泛用于各种作物上防治螨类, 刺吸性害虫, 食叶甲虫, 棉铃虫以及其他鳞翅目幼虫^[1]。环境中, 久效磷的半衰期与土壤 pH 相关, 其在 pH 3 和 9 土壤中的半衰期分别为 131 d 和 26 d^[2]。久效磷在农作物和土壤中的残留可通过食物链对人类健康产生潜在影响。微生物是导致环境中有机磷农药降解的主要方式, 但是降解微生物在环境中的释放要经过严格的环境评估, 且其降解周期较长^[3-6]。有机磷降解酶可降解有机磷农药分子, 破坏有机磷的磷脂键, 从而使其脱毒^[7]。研究表明, 降解酶比产生该酶的微生物菌株更能忍受异常环境条件, 降解效果远胜于微生物本身, 且不为农药及其制剂中的溶剂所抑制。因此有机磷降解酶目前已被公认为是消除农药残留的最有潜力的新方法^[8-11]。

目前, 国内外有关久效磷环境归趋的研究主要

集中于其光解动态、工业废水处理以及土壤降解^[12-17], 而对其微生物降解方面的研究不多^[18, 19]。本实验室从某农药厂污水处理池中分离到 1 株久效磷高效降解菌株 M-1, 建立了久效磷降解酶酶促反应体系, 同时对该菌株的产酶条件以及酶的基本性质进行了初步的研究, 以期对农药污染的酶学控制提供科学的理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株的富集和分离

久效磷污泥采自某农药厂废水处理池中, 其物理化学性质如下: pH 6.5, 黑色, 久效磷含量 $16.67 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 全氮 $32.46 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 全磷 $48.79 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。将采

收稿日期: 2006-05-09; 修订日期: 2006-06-30

基金项目: 农业部成果转化项目(农技函 2004514); 农业部科教司基金项目(200557); 科技部教科司成果转化项目(2004, 24a)

作者简介: 贾开志(1976~), 男, 博士研究生, 主要研究方向为农药降解菌的分离及降解基因的克隆等, E-mail: jiakaizhi@yahoo.com.cn

* 通讯联系人, E-mail: lsp@njau.edu.cn

集到的污泥以 10% 的接种量接到含 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 久效磷的基础培养基中,振荡培养。待菌长出后,取适量菌液接入同样培养基中, 30°C 培养, 30 d 的传代过程中久效磷的浓度从 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 逐步增高至 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 平板稀释法将富集的菌液涂布在含有 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 久效磷的基础培养基的平板上,从农药培养基中选取单菌落转入斜面保存,进行性能测试。培养基的配方如下,基础培养基(MM): NH_4NO_3 $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, KH_2PO_4 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, MgSO_4 $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NaCl $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH7.0. LB 培养基: 蛋白胨 $10.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 酵母膏 $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NaCl $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH7.0. 固体培养基中加入 1% 的琼脂粉。

1.2 供试农药及试剂

久效磷标准品购自上海西宝生物科技有限公司,二氯甲烷(AR)购自上海化学试剂厂。

1.3 生理生化反应

采用常规测定方法^[20]。

1.4 16S rDNA 的 PCR 和测序

用于扩增反应的引物为一对通用引物,上游引物为 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (*Escherichia coli* bases 8 to 27), 下游引物为 5'-TACCTTGTACGACTT-3' (*Escherichia coli* bases 1507 to 1492)。PCR 反应体系为 $50 \mu\text{L}$, 包括 $10 \times \text{PCR}$ 缓冲液 $5 \mu\text{L}$, dNTP ($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) $4 \mu\text{L}$, 引物 ($25 \text{ pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 各 $2 \mu\text{L}$, Mg^{2+} ($25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) $4 \mu\text{L}$, 菌体 DNA (约 $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) $1 \mu\text{L}$, *Taq* DNA 聚合酶 ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) $0.5 \mu\text{L}$, 加 H_2O 至 $50 \mu\text{L}$ 。反应条件: 94°C 变性 2 min; 94°C 1 min, 50°C 1 min, 72°C 1.5 min, 30 个循环; 72°C 延伸 20 min。测序由 TaKaRa 公司完成。

1.5 菌株培养

将 -70°C 冷冻保藏的 M-1 划线接种于含有 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 壮观霉素的 LB 平板上, 30°C 活化培养过夜。挑取单菌落接种于 3 mL 液体 LB 培养基中, 30°C 、 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养过夜。按 3% 接种量接种于 100 mL LB 液体培养基中, 30°C 、 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养 24 h, 此时菌体密度为 $10^8 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.6 粗酶液的制备

应用渗透休克原理,按下列程序分步提取:先取菌液离心 ($6000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min), 上清(S1)冻存;沉淀(P1)用 10 mL (pH8.0) $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 重悬,离心 ($6000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min), 洗涤 2 次, 上清(S2)冻存;沉淀(P2)以 10 mL 25% 蔗糖溶液重悬,于 25°C 振荡 10 min, 离心 ($10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min), 上清(S3)冻存, 沉淀(P3)加冷双蒸水重悬,在冰水浴中振荡

10 min 离心 ($10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min) 上清(S4)冻存;沉淀(P4)用 10 mL (pH8.0) $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 重悬,冰浴中超声破碎细胞(间隔 3 s, 共破碎 4 min), 离心 ($10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min) 后, 上清(S5)冻存, 沉淀(P5)弃去。将 S1, S2 和 S3 合并, 即为胞外提取液, S4 为周质提取液, S5 为膜内提取液^[21,22]。

1.7 久效磷残留量的测定

用可见紫外分光光度计(岛津 UV-2401PC/2450)扫描经二氯甲烷提取的不同浓度的久效磷溶液,确定测定波长;测定不同浓度久效磷样品的吸光度,以浓度为横坐标、吸光度为纵坐标作图制定标准曲线。二氯甲烷提取久效磷的方法为:向培养液中加入 4 mL 二氯甲烷,混合振荡器上振荡提取 30 min, 静置分层后,提取液经紫外分光光度计测定其吸光值。水体中久效磷的添加浓度分别为 5 、 25 、 50 、 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,添加回收率分别为 $(102.78 \pm 0.22)\%$ 、 $(100.33 \pm 0.14)\%$ 、 $(99.98 \pm 0.38)\%$ 、 $(100.19 \pm 0.45)\%$, 测定结果的变异系数均小于 5%, 说明此方法完全符合残留检测标准。同时作了气相色谱与分光光度计测定方法相比较的试验,二者测定结果相近,说明该方法快速、简单、可靠。久效磷降解酶促反应体系 (1 mL) 为: $50 \mu\text{mol}$ Tris-HCl 缓冲液 (pH8.0), $30 \mu\text{L}$ 粗酶液, $22.41 \mu\text{mol}$ 久效磷, 25°C 水浴 5 min, 二氯甲烷提取, 通过上述方法测定溶液中久效磷的残留量, 重复 3 次, 同时设加入失活的酶液处理作为对照。酶活力单位(U)定义为本实验条件下, 1 min 内减少 $1 \mu\text{mol}$ 久效磷所需要的酶量。

1.8 碳、氮源对 M-1 生长和产酶的影响

取菌株培养液以 1% 的接种量分别接种到 100 mL 含不同碳、氮源的基础培养基中,碳、氮源浓度分别为 1% 和 0.2% (久效磷浓度为 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 30°C 培养 24 h, 收集菌体, 胞内酶的提取方法同上, 蛋白质含量的测定采用考马斯亮蓝法, 以牛血清白蛋白(BSA)作为标准蛋白。细菌生长量通过分光光度法测定, 以波长 600 nm 处的光密度表示^[23]。

1.9 pH、温度对久效磷降解酶活性的影响

采用 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 缓冲液设置不同的 pH 环境, 检测反应体系中久效磷降解酶的活性;用水浴加热, 分别控制反应温度为 $15 \sim 85^\circ\text{C}$, 检测反应体系中久效磷降解酶的活性。

1.10 pH、温度对久效磷降解酶稳定性的影响

25°C , 将粗酶置于不同 pH 缓冲液中处理 1 h, 检测处理后酶液活性变化;分别在温度为 4 、 15 、 25 、 37 、 45 、 55 、 65 、 75 、 85°C 下处理酶液 1 h, 检测降解酶

活性.

2 结果与分析

2.1 久效磷降解细菌的筛选与鉴定

菌株 M-1 为短杆状, 革兰氏染色阴性, 在 LB 培养基上生长时, 菌落呈圆形, 隆起, 表面光滑, 湿润, 边缘整齐, 乳黄色. 菌株好氧, 不运动, 不耐盐, 接触酶、氧化酶阳性, 壮观霉素抗性, 不能利用柠檬酸盐, 硝酸盐还原阳性, 反硝化有气体产生. 扩增菌株 M-1 的 16S rRNA 部分基因, 长度为 1 425 bp, GeneBank 中的登录号为 DQ307757, 序列分析表明该菌株与 *Paracoccus* sp. PCLb-30 (Genebank 登录号: AB195172, 1 453 bp) 的相似性最高, 为 99.8%. 结合菌株的形态和生理生化特征, 菌株 M-1 初步鉴定为 *Paracoccus* sp.. 迄今为止, 久效磷降解细菌仅见 *Pseudomonas aeruginosa* sp.、*Clavibacter michiganense* subsp.^[18]、*Arthrobacter atrocyaneus* sp. 以及 *Bacillus megaterium* sp.^[19]. 本研究分离到的久效磷降解菌株 M-1 归属于副球菌属, 在此之前未见有关副球菌降解久效磷农药的报道. 因此, 本研究为久效磷微生物降解提供了新的微生物资源.

2.2 M-1 降解久效磷效果的测定

久效磷是一类含有共轭结构的有机磷化合物, 波长 231 nm 处存在明显的特征吸收峰. 以下试验均在波长 231 nm 下分光测定久效磷的吸光度, 通过与工作标准曲线(图 1)对照吸光值的下降, 求出久效磷被降解的量. M-1 能以久效磷作为唯一碳源生长. 100 mL 基础培养基中加入 100 mg·L⁻¹ 久效磷, 然后按 3% 的接种量接入离心后以无菌水洗涤并悬浮的 M-1, 同时设不接菌的对照, 30 ℃, 150 r·min⁻¹ 摇床培养 24 h 后, 久效磷降解效率为 92.47%(图 2).

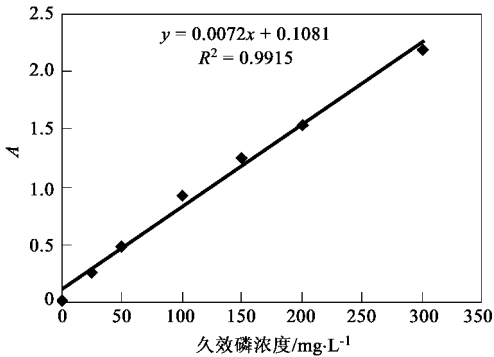


图 1 久效磷浓度与吸光度的相关曲线

Fig.1 Curve of relativity of MCP concentration and absorbcncy

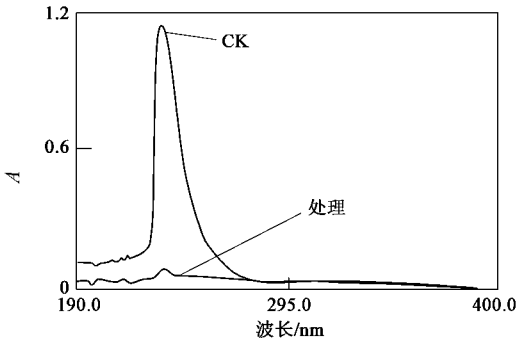


图 2 M-1 降解久效磷的紫外扫描图谱

Fig.2 UV scanning of degradation of MCP by M-1

2.3 久效磷降解酶的定域实验

Subhas 等的研究表明久效磷降解酶定位在膜周质空间^[18]. 本研究(图 3)表明 M-1 胞内酶降解久效磷的活性最高, 分别为周质空间以及胞外酶活性的 14.53 和 21.80 倍, 据此推测该酶为胞内酶. 这一结果为纯化酶的准备工作的提供了依据, 即主要通过超声波破碎细胞的方法直接获得粗酶.

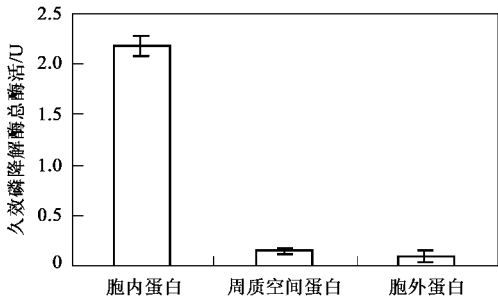


图 3 久效磷降解酶的定域试验

Fig.3 Distribution of the degrading enzyme(s) in the M-1

2.4 碳、氮源对 M-1 生长和产酶的影响

接种 M-1 于含有不同碳源的基础培养基中, 30 ℃ 培养 24 h, 分别测定 M-1 的生长量和久效磷降解酶活力, 结果见表 1. M-1 能够以丁二酸钠、麦芽糖、蔗糖、糊精、葡萄糖、久效磷作为唯一碳源生长, 最适碳源为丁二酸钠, M-1 在葡萄糖作为唯一碳源培养基中降解酶比活力最高. 接种 M-1 于含有不同氮源的基础培养基中(以 1% 葡萄糖作为碳源), 30 ℃ 培养 24 h. 结果表明 M-1 氮源利用谱较广, 其对有机氮源的利用要优于无机氮源, 但久效磷降解酶比活力却显著低于无机氮源; 最适无机氮源为硝酸铵, 产酶效率明显高于其他氮源培养基. M-1 在不同碳、氮源培养基中均能产生久效磷降解酶活性, 由此推测久效磷降解酶在 M-1 胞内组成表达.

表 1 不同碳、氮源对菌株 M-1 生长和产酶的影响

Table 1 Effect of different carbon and nitrogen sources on biomass and enzyme production of strain M-1

碳源	$A_{600\text{ nm}}$	久效磷降解酶比活力/ $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$	氮源	$A_{600\text{ nm}}$	久效磷降解酶比活力/ $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$
丁二酸钠	2.78 ± 0.08	12.65 ± 3.15	牛肉膏	2.05 ± 0.11	22.27 ± 1.64
麦芽糖	1.69 ± 0.03	40.12 ± 5.18	酵母膏	3.04 ± 0.09	32.63 ± 1.34
蔗糖	0.91 ± 0.01	41.70 ± 3.02	蛋白胨	2.09 ± 0.11	23.15 ± 2.16
糊精	0.44 ± 0.01	17.47 ± 5.36	硝酸铵	0.38 ± 0.01	83.54 ± 7.21
葡萄糖	0.32 ± 0.02	87.11 ± 3.38	硫酸铵	0.31 ± 0.02	69.78 ± 8.93
乳糖	0.11 ± 0.01	17.28 ± 1.15	氯化铵	0.30 ± 0.01	64.66 ± 5.88
淀粉	0.12 ± 0.01	21.74 ± 5.26	久效磷	0.29 ± 0.02	79.01 ± 6.75
久效磷	0.17 ± 0.01	52.72 ± 7.21			
乙酸钠	0.08 ± 0.01	19.04 ± 3.08			

2.5 pH 和温度对久效磷降解酶活性的影响

将粗酶液与底物在不同 pH 缓冲液中反应 5 min, 分别测定久效磷降解酶活力(以最大活力的百分率表示). 图 4 表明久效磷降解酶的最适反应 pH

为 8.0, 但随着 pH 的升高, 久效磷降解酶活力显著下降. 久效磷降解酶活性在 25 ℃ 达到顶峰; 随着温度的升高, 降解酶活性显著降低.

2.6 pH 和温度对久效磷降解酶稳定性的影响

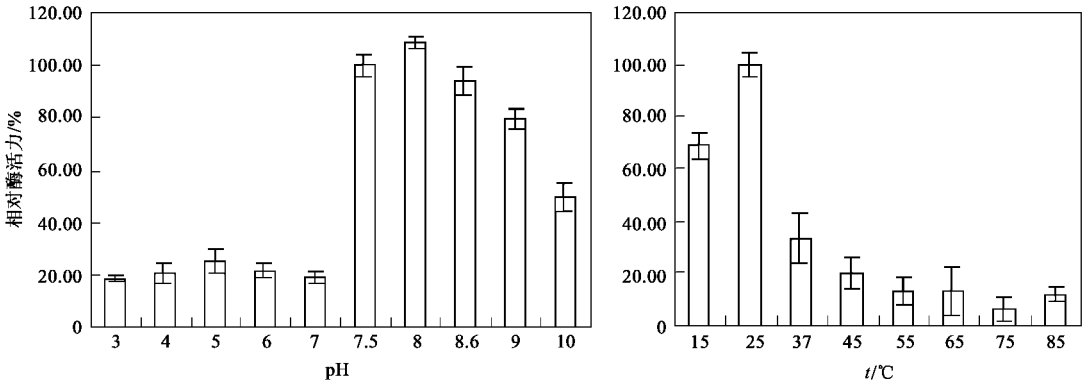


图 4 pH 值和温度对久效磷降解酶活性的影响
Fig.4 Effect of pH and temperature on enzyme activity

分别于不同 pH 缓冲液和不同温度处理粗酶液 1 h, 按 1.10 中方法检测降解酶活性(以最大活力的百分率表示). 图 5 表明久效磷降解酶活性在 pH 介于 7~10 之间保持较高的稳定性, 不同处理之间酶活性没有显著差异; 酸性条件下, 降解酶活性显著降

低, 表明久效磷降解酶在酸性条件下不稳定. 久效磷降解酶在温度介于 4~25 ℃ 内能保持较高的降解活性, 3 个处理之间降解酶活性没有显著差异; 但温度高于 25 ℃, 降解酶活性显著降低, 表明久效磷降解酶对高温敏感.

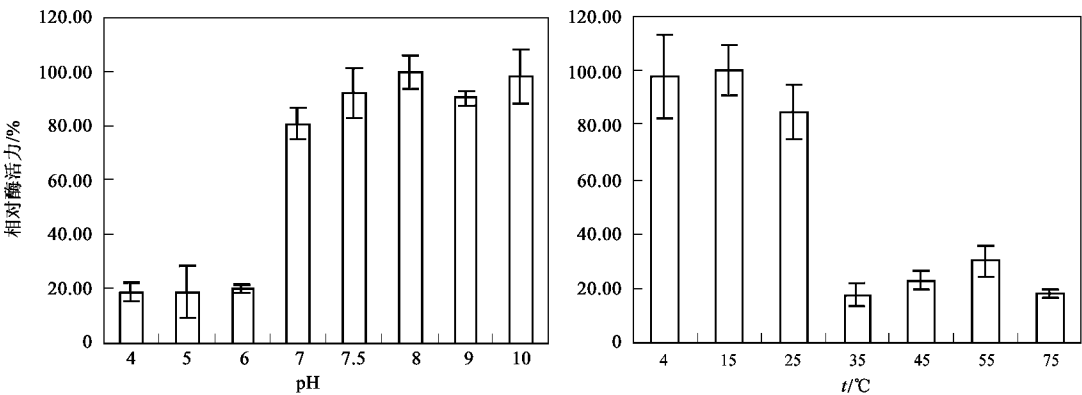


图 5 pH 值, 温度对久效磷降解酶稳定性的影响
Fig.5 Effect of pH and temperature on enzyme stability

2.7 粗酶液的米式常数 (K_m) 和最大反应速率 (V_{max})

将 870 μL 含已知浓度 (0.45、0.90、1.34、1.79、2.24、2.69、3.14 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 久效磷在 pH 8.0 的 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液和 30 μL 粗酶液分别在 25 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 5 min, 二氯甲烷提取, 测定久效磷浓度对酶促反应速率的影响. 根据久效磷浓度和测得的反应速率作 Lineweaver-Burk 图 (图 6), 粗酶液降解久效磷的 K_m 为 0.29 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$, V_{max} 为 131.58 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$. 经测定粗酶液中可溶性蛋白含量是 6.43 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 因此粗酶液降解久效磷的最大速率为 682.12 $\mu\text{mol}\cdot(\text{min}\cdot\text{mg})^{-1}$.

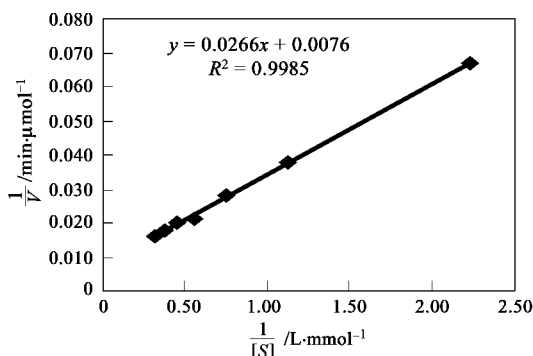


图 6 M-1 粗酶液的 Lineweaver-Burk 图

Fig.6 Lineweaver-Burk plot of the crude enzyme of M1

3 结论

(1) 本研究从农药厂污水处理池的污泥样品中分离到 1 株能够利用久效磷作为唯一碳源生长的细菌 M-1, 初步鉴定为 *Paracoccus* sp.. 其降解久效磷的效率为 92.47%.

(2) 久效磷降解酶存在于 M-1 细胞内, 组成表达. 最适产酶碳、氮源分别为葡萄糖和硝酸铵.

(3) 久效磷降解酶的最适反应温度为 25 $^{\circ}\text{C}$, pH 为 8.0; 久效磷降解酶在温度低于 25 $^{\circ}\text{C}$, pH 高于 7.0 时稳定表达. 粗酶液的 V_{max} 为 131.58 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$, K_m 为 0.29 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$, 最大降解速率为 682.12 $\mu\text{mol}\cdot(\text{min}\cdot\text{mg})^{-1}$.

参考文献:

[1] 沙家骏. 化工产品手册-农用化学品[M]. 北京: 化学工业出版社, 1999. 13~14.
[2] Lee P W, Fukuto J M, Hernandez H, et al. Fate of MCP in the environment[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1990, 38: 567~573.

[3] Cheng T C, Harvey S P. Cloning and expression of a gene encoding a bacterial enzyme for decontamination of organophosphorus nerve agents and nucleotide sequence of the enzyme[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62: 1636~1641.
[4] Cui Z L, Li S P, Fu G P. Isolation of methyl parathion-degrading strain M6 and cloning of the methyl parathion hydrolase gene[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67: 4922~4925.
[5] Kertesz M A, Cook A M, Leisinger T. Microbial metabolism of sulfur- and phosphorus-containing xenobiotics [J]. FEMS Microbiology Review, 1994, 15: 195~215.
[6] 李顺鹏, 蒋建东. 农药污染土壤的微生物修复研究进展[J]. 土壤, 2004, 6: 577~583.
[7] Vilanova E, Sogorb M A. The role of phosphotriesterases in the detoxification of organophosphorus compounds[J]. Critical Reviews in Toxicology, 1999, 29: 21~57.
[8] Munneke D M. Hydrolysis of organophosphate pesticides by an immobilized enzyme system[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1979, 22: 2247~2261.
[9] Nannipieri P, Bollag J M. Use of enzyme to detoxify pesticides contaminated soils and water[J]. Journal of Environmental Quality, 1991, 20: 510~517.
[10] 虞云龙, 陈鹤鑫, 樊德方, 等. 一硫代磷酸酯杀虫剂的酶促降解[J]. 环境科学, 1998, 19(2): 58~61.
[11] 谢慧, 朱鲁生, 王军, 等. 真菌 WZ-I 对有机磷杀虫剂毒死蜱的酶促降解[J]. 环境科学, 2005, 26(6): 164~168.
[12] Ku Y, Wang W, Shen Y S. Reaction behaviors of decomposition of monocrotophos in aqueous solution by UV and UV/O processes[J]. Journal of Hazardous Materials, 2000, 72(1): 25~37.
[13] Ku Y, Jung L L. Decomposition of monocrotophos in aqueous solution by UV irradiation in the presence of titanium dioxide[J]. Chemosphere, 1998, 37(13): 2589~2597.
[14] 陈士夫, 赵梦月, 陶跃武, 等. 光催化降解有机磷农药的研究[J]. 环境科学, 1995, 16(5): 61~63.
[15] 谢冰, 史家梁. 农药废水的“物化+生化”处理技术研究[J]. 环境工程, 1998, 16(6): 21~23.
[16] 王寿祥, 陈子元. 久效磷在环境中的行为与归趋[J]. 浙江农业大学学报, 1993, 19(3): 279~285.
[17] Gundi V A, Reddy B R. Degradation of monocrotophos in soils[J]. Chemosphere, 2006, 62(3): 396~403.
[18] Subhas, Singh D K. Utilization of monocrotophos as phosphorus source by *Pseudomonas aeruginosa* F10B and *Clavibacter michiganense* subsp. Insidiosum SBL 11[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2003, 49(2): 101~109.
[19] Bhadbhade B J, Samaik S S, Kanekar P P. Biomineralization of an organophosphorus pesticide, monocrotophos, by soil bacteria[J]. Journal of Applied Microbiology, 2002, 93: 224~234.
[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.
[21] Harold C N, Leon A H. The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1965, 240(9): 3685~3692.
[22] 戴树桂, 庄源益, 陈勇生. 两种假单胞菌中二氯酚降解酶活性及其定域研究[J]. 环境科学学报, 1996, 16(2): 173~177.
[23] 范秀容, 李广武, 沈萍. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1988. 75~78.