

毒死蜱降解细菌 XZ-3 的分离及降解特性研究

钱博, 朱鲁生*, 谢慧, 王军, 刘伟, 徐琦峰, 宋艳, 徐荣娟

(山东农业大学资源与环境学院, 泰安 271018)

摘要: 从某农药厂排污口的污泥中采样, 经驯化富集后筛选到 1 株能高效降解毒死蜱的细菌 XZ-3, 经过对其形态、生理生化特征及 16S rDNA 的分析, 鉴定该菌株为节杆菌属 (*Arthrobacter* sp.). 测定了不同碳源、pH、温度及毒死蜱浓度对细菌降解能力和生长量的影响, 以培养液在波长 400 nm 下的光密度值表示细菌生长量, 液体介质中毒死蜱的提取采用漩涡振荡提取法, 提取溶剂为石油醚, 毒死蜱的测定采用紫外分光光度法. 结果表明, 该菌株 24 h 内对 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 毒死蜱的降解率高达 86.8%; 在外加碳源浓度为 0.3% 时降解率最大; 细菌的生长量随着外加碳源浓度的升高而增加; pH 在偏酸和偏碱性的条件下降解率较大, pH 9.0 时达到最大, 细菌的生长量在 pH 8.0 ~ 10.0 偏碱性的条件下较大; 在毒死蜱浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时降解率最大, 该菌具有较强的抗药性, 当毒死蜱浓度达到 $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时仍能生长, 细菌的生长量在 $800 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时达到最大, 绝对去除量随毒死蜱浓度的提高而增加; 细菌的生长和降解需要适宜的温度, 30°C 培养时, 降解率和生长量最大. 本研究提出了细菌 XZ-3 生长和降解毒死蜱的最佳培养条件, 可为农药污染治理及生产污水处理提供理论依据.

关键词: 生物降解; 毒死蜱; 节杆菌

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)12-2827-06

Isolation and Degrading Characters of Chlorpyrifos Degrading Bacteria XZ-3

QIAN Bo, ZHU Lu-sheng, XIE Hui, WANG Jun, LIU Wei, XU Qi-feng, SONG Yan, XU Rong-juan

(College of Resources and Environment, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

Abstract: A strain of bacterium XZ-3 capable of highly degrading chlorpyrifos was screened from the soil sample collected from a pesticide plant after taming and enrichment. Based on analysis of phenotype, physiological and biochemical characters and 16S rDNA, XZ-3 was identified as *Arthrobacter* sp.. The effects of carbon source, pH, temperature and chlorpyrifos concentration on degradation were determined. The growth of bacteria in culture media were measured by visible absorption spectrophotometry under 400 nm. The residual chlorpyrifos in culture media was extracted with an equal volume of petroleum ether, and then determined by ultra-violet spectrophotometry. The results showed that the degradation rate of chlorpyrifos by XZ-3 was 86.8% in 24 h. The biodegradation rates were the highest when the additional carbon source was 0.3%, pH value was 9, chlorpyrifos concentration was $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, and cultivated temperature was 30°C . The growth of bacteria increased with carbon source concentration, and was higher with pH from 8.0 to 10.0, and the highest when temperature was 30°C , and chlorpyrifos concentration was $800 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The strain could survive when chlorpyrifos concentration was $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and the removed amount of chlorpyrifos increased with chlorpyrifos concentration. The optimal conditions were proposed, which could provide theoretic basis for prevention and control of pesticides pollution.

Key words: biodegradation; chlorpyrifos; *Arthrobacter* sp.

毒死蜱是一种广谱高效的有机磷杀虫剂, 它虽然属于中等毒性杀虫剂, 但由于其在土壤中的持效期较长^[1,2], 因此在土壤中的降解备受关注, 而土壤中的微生物降解是有机磷农药降解最可靠、最有效的方法^[3~5].

关于毒死蜱的微生物降解研究, 国内外有许多学者报道过. Singh 等^[6,7]从土壤中分离出了可降解毒死蜱的 *Enterobacter* Strain B-14 和 *Pseudomonas*, 其中 *Enterobacter* Strain B-14 可利用毒死蜱作为唯一的碳源和磷源, 通过水解酶将毒死蜱降解为二乙基硫代磷酸酯 (diethylthiophosphshate, DETP) 和 3, 5, 6-三氯-2-吡啶酚 (3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol, TCP), 并能以 DETP 作为能源进行生长. Mallick 等^[8]在富集甲基对硫磷的土壤中筛选出 1 株 *Arthrobacter* sp., 该菌 48 h

内对无机盐培养基中 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 毒死蜱的降解率为 100%. Cho 等^[9]从 5 种突变菌株中筛选到一种能加速毒死蜱水解的菌株 B₃₅₆₁, 其水解酶可使毒死蜱水解速度提高 725 倍, 研究表明该水解酶能水解多种有机磷杀虫剂, 是一种具有广谱性的高活性酶. 其它学者也进行了许多研究^[10~13]. 在国内, 刘新等^[14]分离出降解毒死蜱的高效降解真菌曲霉 (*Aspergillus* sp.) 和木霉, 并对其性质进行了研究. 王金花等^[15]筛选出 3 株高效降解真菌, 并分别研究了其降解特性.

收稿日期: 2007-01-04; 修订日期: 2007-03-05

基金项目: 国家自然科学基金项目 (20477022); 山东省优秀中青年科学家科研奖基金项目 (03BS123)

作者简介: 钱博 (1981 ~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为农药残留与环境毒理, E-mail: eti@sda.u.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: lushzhu@sda.u.edu.cn

但迄今为止国内研究毒死蜱降解细菌的报道较少^[16],这是因为 TCP 作为毒死蜱的代谢产物,一般情况下当含量达到 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时就会阻滞毒死蜱的降解^[17,18],所以不易筛选出降解毒死蜱的高效降解细菌,但是也有研究表明有些菌株对毒死蜱的降解不受 TCP 含量的影响^[19].

本研究从生产毒死蜱的农药厂排污口污泥中筛选出 1 株降解毒死蜱的高效降解细菌,并进一步分析了其降解和生长条件,以期为今后降解菌的应用提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 实验药品

97.8% 毒死蜱原药:山东华阳集团提供;石油醚:分析纯.

1.2 培养基

富集培养基、基础培养基的配制均参考文献[20,21].

1.3 细菌的富集、分离

采用液体富集培养法,称取活性污泥 10.0 g 于 100 mL 富集培养基中,培养基中毒死蜱的浓度为 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,于 30°C 、 $130 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床培养,培养 1 周后,以 10% 的接种量接入新鲜培养液中,以后每周转移 1 次,如此反复多次驯化.最后,用平板稀释法进行分离纯化,接种斜面,编号保存.

1.4 微生物降解试验

细菌预培养于无药平板,用无菌生理盐水配成一定浓度的菌悬液,待用.根据实验需要配制一定蔗糖浓度的培养液,并根据实验需要加入毒死蜱,分装到试管,接种上述细菌溶液,另设置不接菌处理,同时置恒温振荡培养箱一定温度下 $130 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养.

1.5 细菌生长量的测定

以培养液在波长 400 nm 下的光密度值表示细菌生长量^[22,23].

1.6 毒死蜱测定方法

毒死蜱的测定主要采用紫外分光光度法,谢慧等^[24]对紫外分光光度法的可靠性进行了研究.

1.7 降解率的计算

$$\text{计算公式: } R = \frac{c_{\text{CK}} - c}{c_{\text{CK}}} \times 100\%$$

式中, R 为毒死蜱降解酶的降解率; c 为接菌液处理缓冲液中毒死蜱的浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$); c_{CK} 为对照缓冲液中毒死蜱的浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$).

1.8 分离菌株的鉴定

(1)菌株的生理生化鉴定 参照文献[25],同时通过在 MH 平板和血平板上用 0.9% 的 NaCl 配制成 6 个麦氏单位,在 api coryne 鉴定条上用法国梅里埃 APB 半自动细菌鉴定仪进行生化鉴定,24 h 后观察结果,再根据微生物分类鉴定检索表的要求,并结合菌株的形态特征,对菌进行初步的分类鉴定.

(2)菌株 16S rDNA 的 PCR 扩增及测序测定 参照文献[26].采用菌落 PCR 扩增方法,将得到的细胞裂解液作为模板,直接用于 PCR.引物为一对细菌 16S rDNA 扩增通用引物(大连宝生物工程有限公司合成).以 XZ-3 总 DNA 为模板, $50 \mu\text{L}$ 体系为:模板 DNA(菌体破碎液) $1 \mu\text{L}$ 、PCR Premix $25 \mu\text{L}$ 、正向/反向引物各 $0.5 \mu\text{L}$ 、 ddH_2O $23 \mu\text{L}$.同时做阴性和阳性对照,阴性对照使用 $1 \mu\text{L}$ 的 ddH_2O 替代模板 DNA,阳性对照取 $1 \mu\text{L}$ 的 Positive Control DNA 作为模板. PCR 反应条件为: 94°C 5 min; 94°C 1 min; 50°C 1 min; 72°C 1.5 min,循环 30 次; 72°C 5 min. PCR 产物的纯化和测序由大连宝生物工程有限公司完成.

2 结果与分析

2.1 XZ-3 的鉴定

2.1.1 XZ-3 菌落形态及生理生化特性

菌体的形态早期为杆状,单个,成对连成链状,生长过程中杆状断裂成小球状,有明显的杆、球周期变化;菌落大,边缘规则,圆形,中凸,开始培养时为乳白色,随着时间的推移,最终为黄色.革兰氏染色阳性,易退色,明胶水解、接触酶试验呈阳性,柠檬酸盐的利用、M.R 试验、V.P 试验、吲哚试验、半固体试验、脲酶试验、碱性磷酸酶试验、硝酸盐还原、葡萄糖发酵、乳糖发酵、蔗糖发酵、肝糖发酵、核酸发酵、甘露醇发酵、DNA 试验均呈阴性.

2.1.2 16S rDNA 序列测序结果分析

以 XZ-3 的总 DNA 为模板,利用细菌 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增,得到长度约为 1.5 kb 的扩增产物,测序由 TakaRa 公司完成.根据 Gene Bank 序列同源性比较,菌株 XZ-3 与 *Arthrobacter mysorens* 同处于一个最小的分支,同源性达到 99%,与节杆菌属遗传进化距离最近,同源性均达到 98% 以上,结合菌株的生理生化特征,将菌株 XZ-3 初步鉴定为节杆菌属,命名为 *Arthrobacter* sp. XZ-3,系统发育地位如图 1.

2.2 菌株 XZ-3 的生长曲线和毒死蜱降解曲线

分别于降解菌接种培养后的 6、12、18、24、48、72 h 取样,测定培养液中毒死蜱的浓度,计算降解菌

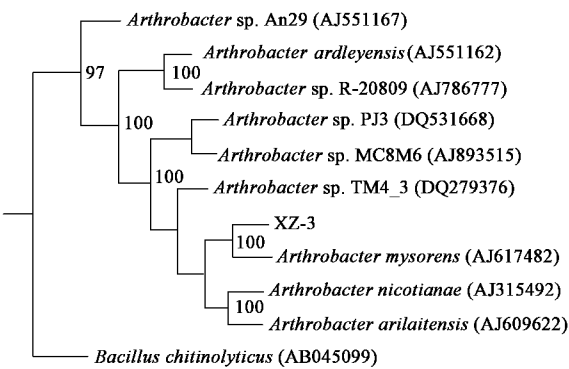


图 1 XZ-3 的系统发育树

Fig.1 Phylogenetic position of strain XZ-3

对毒死蜥的降解率,以培养液中毒死蜥的浓度为纵坐标,取样时间为横坐标,绘制毒死蜥的降解曲线,确定降解菌的最佳降解时间,同时测定在含有 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 毒死蜥的培养液中以及在无药培养液中菌株 XZ-3 的生长量,结果见图 2.

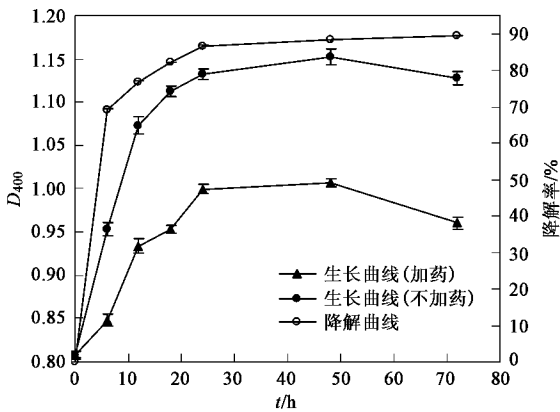


图 2 XZ-3 的生长曲线和毒死蜥降解曲线

Fig.2 Growth curves of bacteria XZ-3 and chlorpyrifos degradation

从图 2 中可以看出,在无药培养液和含药培养液中细菌的生长量总体上保持增大,在 6 ~ 24 h 期间,菌的生长量增长较快,24 h 后增长的趋势相对平缓;在无药培养液中菌株 XZ-3 的适应期短,生长迅速,生长量大,而在含药培养液中适应期较长,最大生长量小于无药培养基上的最大生长量,表明毒死蜥作为一种复杂的化合物,微生物对其利用有一定的适应过程.随着培养时间的延长,降解菌对毒死蜥的降解率总体上保持先增大,到 24 h 达到 86.8%,在 6 ~ 24 h 期间,降解率增长较快,24 h 后增长的趋势相对平缓,通过本实验确定降解菌对毒死蜥的最佳降解时间是 24 h.

2.3 培养条件对菌株 XZ-3 的生长和降解率影响

2.3.1 外加碳源浓度对降解细菌生长和降解率的影响

以蔗糖为外加碳源,配制蔗糖浓度分别为 0、0.1%、0.3%、0.5%、1.0% 和 1.5% 的培养液,控制毒死蜥的含量为 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,接种培养 24 h 后取样,测定细菌的生长量和对毒死蜥的降解率,结果如图 3 所示.

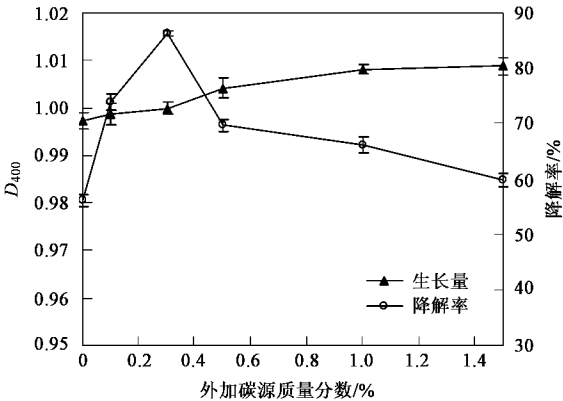


图 3 外加碳源浓度对毒死蜥降解率和细菌生长量的影响

Fig.3 Effects of carbon source concentration on chlorpyrifos degradation and bacteria growth

由图 3 可以看出,随着外加碳源浓度的提高细菌的生长量增大,这是因为蔗糖浓度的提高增加了可利用碳源的数量,微生物生长繁殖加快.

随着外加碳源浓度的增加,毒死蜥的降解率先增加后降低.在没有外加碳源的情况下,该菌的降解率在 60% 左右,随着外加碳源浓度的提高,降解能力提高,在蔗糖浓度为 0.3% 时达到最大,当蔗糖浓度高于 0.3% 时,降解率下降.由此看来,外加碳源促进细菌的生长,没有外加碳源时降解率低的原因是缺乏易于利用的碳源,细菌的生长受到抑制.当蔗糖浓度超过 0.3% 时,虽然细菌的生长量增大,但降解率却下降,下降的原因是易于利用的碳源浓度过高,菌株优先利用了蔗糖,减少了对毒死蜥的分解利用.总之,微生物降解农药,需要合适的外加碳源浓度,过低则抑制了微生物正常的生长代谢,过高则降低了对农药的利用,只有添加适量的外加碳源,才能既保证细胞的正常生理功能,又满足对农药有效降解的要求.

2.3.2 初始 pH 值对降解细菌生长及降解率的影响

控制培养液的初始 pH 值分别为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0,其中毒死蜥的浓度为 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右,定量接种细菌,蔗糖浓度为 0.3%,pH 9.0,30℃ 振荡培养,24 h 后取样,测定细菌的生长量

和对毒死蜱降解率,结果如图 4 所示.

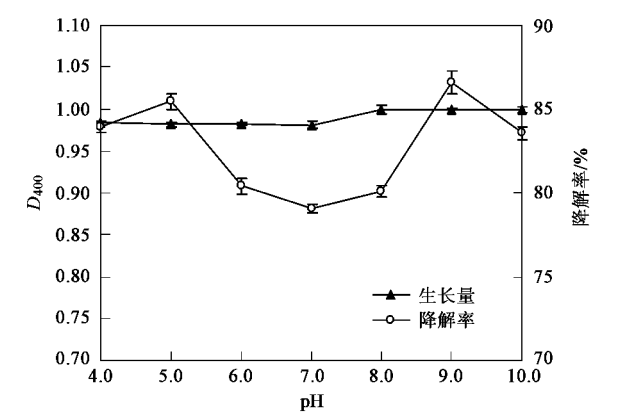


图 4 pH 对毒死蜱降解率和细菌生长量的影响
Fig.4 Effect of pH on chlorpyrifos degradation and bacteria growth

由图 4 可以看出,当 pH 在 4.0~10.0 的范围内,pH 值对细菌的生长量没有显著的影响,偏碱性条件下较偏酸性条件更适宜该菌株的生长.

在 pH 4.0~10.0 的范围内,pH 值对细菌的降解率有一定的影响.在 pH 5.0 和 pH 9.0 时的降解率较高,pH 7.0 时降解率最低.在酸性条件下,从 pH 7.0~4.0,随着 pH 值的降低,降解率增大,在 pH 5.0 时,降解率达到最大,pH 值再降低,降解率下降;在碱性条件下,从 pH 7.0~10.0,随着 pH 值的升高,降解率增大,在 pH 9.0 时降解率达到最大,pH 值再升高,降解率下降.综上所述,该菌在偏酸或偏碱性的条件下有较高的降解能力,并且在偏碱性 pH 9.0 的条件下降解率达到最大值.该菌株在不同 pH 条件下的降解曲线比较特殊,本课题组在做了多次重复后确定该结论的准确可靠性.一般情况下,在研究不同 pH 条件下细菌对农药降解率的影响时,只有 1 个最高点,并且多数在偏中性条件下,而本课题组筛选出的该菌株在偏酸性、偏碱性的条件下都有 1 个较高点,这正是该菌株的特别之处,所以,下一步将重点研究该菌株的降解途径,探明其降解机理.

可以看出,培养液初始 pH 值对细菌生长和降解能力的影响并不完全一致,分析其原因可能是微生物的生长和降解酶的活性同时受到培养液酸碱度的影响,而且两者所受影响不完全一致的原因.

2.3.3 毒死蜱浓度对降解细菌的生长和降解能力的影响

控制培养液中初始毒死蜱浓度分别为 10、20、50、100、200、500、800 和 1 000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,定量接种降解

菌,蔗糖浓度为 0.3%,pH 9.0,30℃ 振荡培养,24 h 后取样测定细菌的生长量和对毒死蜱降解率,如图 5 所示.

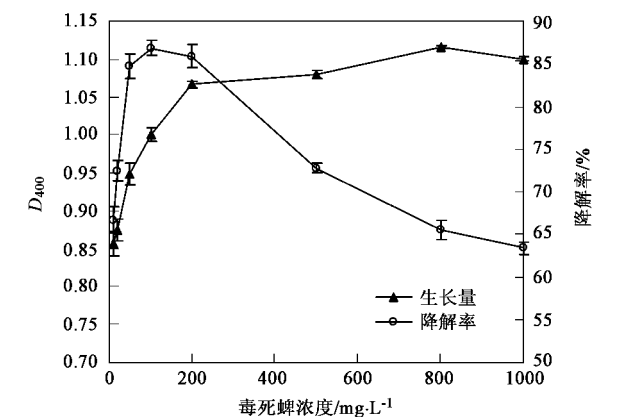


图 5 不同毒死蜱浓度下的毒死蜱降解率和细菌的生长量
Fig.5 Effect of concentration of chopyrifos on chlorpyrifos degradation and bacteria growth

由图 5 可以看出,不同毒死蜱浓度下,细菌的生长量不同.毒死蜱浓度在 0~200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 期间,菌的生长量增长较快;毒死蜱浓度大于 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时增长的趋势相对平缓;当毒死蜱的浓度为 800 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时细菌的生长量达到最大;毒死蜱浓度再增大,菌的生长量下降.

随着培养液中毒死蜱浓度的升高,降解率先升高,后降低.随培养液中毒死蜱浓度的升高,降解率先升高后降低,当毒死蜱浓度为 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,降解率达到最高;当毒死蜱浓度继续增加时,降解率开始降低,当毒死蜱的浓度达到 1 000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时该菌的降解率仍在 60% 以上,说明该菌株对高浓度毒死蜱仍有较高的降解率,所以研究该菌株对高浓度毒死蜱的废水处理具有十分重要的意义.

微生物对农药的降解一方面可以用农药的降解率表示,另一方面也可以用农药的绝对去除量表示,单位为 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,如图 6 所示.

本实验中,随着毒死蜱浓度的增加,降解菌的降解率先增大,到 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时达到最大,浓度继续增加,降解率降低;从图 6 可以看出,随着毒死蜱浓度的增加,降解菌对毒死蜱的绝对去除量逐渐增加.由此可见,在微生物降解农药的过程中对于一定量的菌体来讲,应当充分考虑降解率和绝对去除量.而本课题组筛选出的菌株 XZ-3 不仅对低浓度毒死蜱有较高的降解率,而且对高浓度毒死蜱也具有较高的绝对去除量.

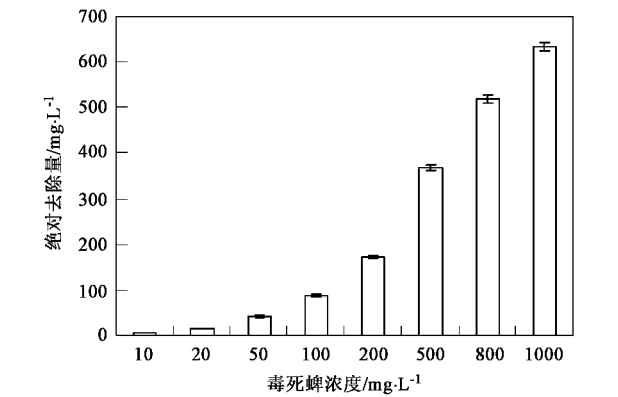


图 6 不同毒死蜱浓度下细菌降解毒死蜱的绝对去除量

Fig.6 Absolute removal amount of chlorpyrifos in different concentration by bacteria

2.3.4 培养温度对降解细菌的生长和降解能力的影响

毒死蜱的浓度为 100 mg·L⁻¹, 定量接种降解菌, 初始 pH 9.0, 蔗糖浓度为 0.3%, 设定振荡培养的温度分别为 10、20、30、35、40 和 50℃, 24 h 后取样, 测定细菌的生长量和对毒死蜱降解率, 如图 7 所示。

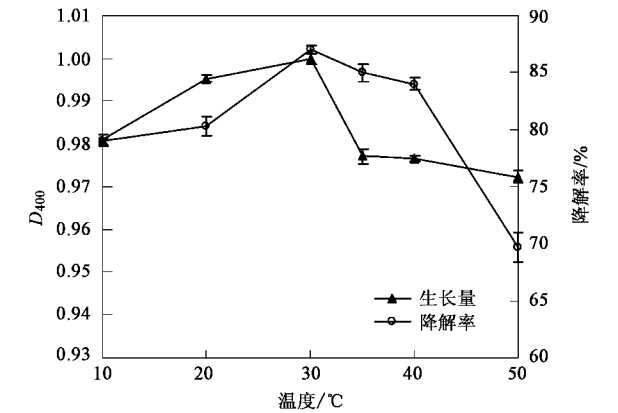


图 7 不同温度下毒死蜱的降解率和细菌生长量

Fig.7 Effects of different temperature on chlorpyrifos degradation and bacteria growth

从图 7 可以看出, 在不同的培养温度下, 细菌的生长量随着温度的升高而增大, 到 30℃ 达到最大, 然后随温度的升高细菌的生长量迅速下降。

培养温度对细菌降解毒死蜱的影响和对生长的影响是相同的, 也是随着温度升高降解率先增加, 在 30℃ 达到最大, 然后降解率下降。这是因为培养温度影响细菌的生长, 并通过影响生长来影响其对毒死蜱的降解。毒死蜱作为农用杀虫剂时主要使用在水果和蔬菜上, 使用时田间温度一般比较高, 而本实验所得的降解菌在 20 ~ 40℃ 均有较高的降解能力, 为

降解细菌的田间应用打下了重要的基础。

3 结论

(1) 从某农药厂排污口的污泥中筛选出 1 株能降解毒死蜱的革兰氏阳性细菌 XZ-3 菌株, 经过对其形态、生理生化特征及 16S rDNA 的分析, 最终鉴定为节杆菌属 (*Arthrobacter* sp.)。

(2) 研究表明, 碳源浓度为 0.3%, pH 5.0 和 pH 9.0, 温度为 20 ~ 40℃, 毒死蜱浓度为 50 ~ 200 mg·L⁻¹ 时, 降解效果较好; 细菌的生长量随着外加碳源的增加而增加, 在 pH 8.0 ~ 10.0, 温度为 30℃, 毒死蜱浓度为 100 ~ 800 mg·L⁻¹ 时生长量较大。上述结果表明, 节杆菌属 XZ-3 对毒死蜱的降解能力强, 在毒死蜱污染环境修复以及污水处理中具有很好的应用前景。

参考文献:

[1] Mohan S V, Sirisha K, Rao N C, *et al.* Degradation of chlorpyrifos contaminated soil by bioslurry reactor operated in sequencing batch mode: bioprocess monitoring[J]. Journal of Hazardous Materials, 2004, **116**: 39 ~ 48.

[2] Getzin L W. Degradation of chlorpyrifos in soil: influence of autoclaving, soil moisture, and temperature[J]. Journal of Econ Entomol, 1981, **74**: 158 ~ 162.

[3] Bhadbhade B J, Sarnaik S S, Kanekar P P. Biomineralization of an organophosphorus pesticide, Monocrotophos, by soil bacteria[J]. Journal of Applied Microbiology, 2002, **93**(2): 224 ~ 234.

[4] Horne I, Harcourt R L, Sutherland T D, *et al.* Isolation of a *Pseudomonas montelli* strain with a novel phosphotriesterase[J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, **206**: 51 ~ 55.

[5] 汪立刚, 蒋新, 颜冬云, 等. 土壤中残留毒死蜱的作物效应[J]. 环境科学, 2006, **27**(2): 366 ~ 370.

[6] Singh B K, Walker A, Morgan J A W, *et al.* Effects of soil pH on the biodegradation of chlorpyrifos and isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, **69**: 5198 ~ 5206.

[7] Singh B K, Walker A, Morgan J A W, *et al.* Biodegradation of chlorpyrifos by *Enterobacter* strain B-14 and its use in bioremediation of contaminated soils[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, **70**: 4855 ~ 4863.

[8] Mallick K, Bharati K, Banerji A, *et al.* Bacterial degradation of chlorpyrifos in pure culture and in soil[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 1999, **62**: 48 ~ 55.

[9] Cho C M H, Mulchandani A, Chen W. Altering the substrate specificity of organophosphorus hydrolase for enhanced hydrolysis of chlorpyrifos[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, **70** (8): 4681 ~ 4685.

[10] Omar S A. Availability of phosphorus and sulfur of insecticide origin by fungi[J]. Biodegradation, 1998, **9**(5): 327 ~ 336.

- [11] Bumpus J A, Kakar S N, Coleman R D. Fungal degradation of organophosphorus insecticides[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 1993, **39**: 715 ~ 726.
- [12] Bending G D, Friloux M, Walker A. Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, **212**: 59 ~ 63.
- [13] Obojska A, Teman N G, Lejczak B, *et al.* Organophosphonate utilization by the thermophile *Geobacillus caldoxylosilyticus* T20[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**(4): 2081 ~ 2084.
- [14] 刘新, 尤民生, 魏英智, 等. 降解毒死蜱曲霉 Y 的分离和降解效能测定[J]. *应用与环境生物学报*, 2003, **9**(1): 78 ~ 80.
- [15] 王金花, 朱鲁生, 王军, 等. 3 株真菌对毒死蜱的降解特性[J]. *应用与环境生物学报*, 2005, **11**(2): 211 ~ 214.
- [16] Yang C, Liu N, Guo X, *et al.* Cloning of *mpd* gene from a chlorpyrifos-degrading bacterium and use of this strain in bioremediation of contaminated soil[J]. *FEMS Microbiology Letters*, **265**(1): 118 ~ 125.
- [17] Racke K D, Coats J R, Titus K R. Degradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in soil[J]. *Journal of Environmental Science and Health Part B: Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*, 1988, **23**: 527 ~ 539.
- [18] Racke K D, Fontaine D D, Yoder R T, *et al.* Chlorpyrifos degradation in soil at termiticidal application rates[J]. *Pesticide Science*, 1994, **42**: 43 ~ 51.
- [19] Yang L, Zhao Y, Zhang B, *et al.* Isolation and characterization of a chlorpyrifos and 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol degrading bacterium[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, **251**(1): 67 ~ 73.
- [20] 朱鲁生, 林爱军, 王军, 等. 二甲戊乐灵降解细菌的分离及降解特性[J]. *环境科学*, 2005, **26**(1): 145 ~ 149.
- [21] 朱鲁生, 林爱军, 王军, 等. 二甲戊乐灵降解细菌 HB-7 的分离及降解特性研究[J]. *环境科学学报*, 2004, **24**(2): 360 ~ 365.
- [22] Mandelbaum R T, Allan D L, Wackett L P. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the striazine herbicide atrazine[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, **61**(4): 1451 ~ 1457.
- [23] Ram M B, Shahamat U K. Degradation of atrazine, propazine and simazine by *Rhodococcus* strain B-30[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994, **42**: 1237 ~ 1241.
- [24] 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.
- [25] 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. 349 ~ 370.
- [26] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆[M]. (第三版). 北京: 科学出版社, 2003. 611 ~ 618.