

氰戊菊酯降解菌 FDB 的分离鉴定及其生长特性

汤鸣强^{1,2} 田盼¹ 尤民生^{1*}

(1. 福建农林大学应用生态研究所 福建 福州 350002)

(2. 福建师范大学福清分校生物与化学工程系 福建 福清 350300)

摘要: 从长期受农药污染的农田土壤中分离筛选到一株降解氰戊菊酯杀虫剂的细菌菌株 FDB。经形态和生理生化特征鉴定以及对 16S rDNA 序列进行同源性比较, 将该菌株鉴定为铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*。FDB 能以氰戊菊酯杀虫剂为唯一碳源生长, 在 30°C 培养 5 d 对 100 mg/L 氰戊菊酯异构体的降解率分别达到 69.06% (SR + RS) 和 64.32% (SS + RR)。FDB 的最适生长条件为: 温度 35°C, 初始 pH 值 7.0, 250 mL 摇瓶装液量 75 mL。采用超声波方法破碎菌体细胞, 得到粗酶液。胞内和胞外粗酶液对氰戊菊酯异构体的降解试验表明, FDB 的氰戊菊酯降解酶属于胞内蛋白组分。

关键词: 氰戊菊酯, 降解菌, 生长特性, 降解酶

Isolation, Identification and Growth Characteristics of a Fenvalerate Degradation Bacterium

TANG Ming-Qiang^{1,2} TIAN Pan¹ YOU Min-Sheng^{1*}

(1. Institute of Applied Ecology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

(2. Department of Biological and Chemical Engineering, Fuqing Branch of Fujian Normal University, Fuqing, Fujian 350300, China)

Abstract: Strain FDB, a fenvalerate-degrading bacterium, was isolated from some long-term pesticide-contaminated agricultural soils. The strain was identified as *Pseudomonas aeruginosa* based on its morphological and physiological properties, and 16S rDNA sequence analysis. Strain FDB grew in the medium supplemented with fenvalerate as its sole carbon source and degraded fenvalerate isomers at the concentration of 100 mg/L at the degradation rate from 69.06% (SR + RS) to 64.32% (SS + RR) in 5 days shaking at 30°C. The optimal growth was obtained under 35°C, pH 7.0 and 75 mL medium content 250 mL flask through shaking. The crude fenvalerate-degrading enzyme solution from cellular disruption was prepared by sonication, the activity of fenvalerate-degradation was associated with the intracellular fractions.

Keywords: Fenvalerate, Degrading bacterium, Growth characteristics, Degrading enzyme

氰戊菊酯(Fenvalerate), 别名杀灭菊酯、速灭杀丁、来福灵, 化学名称为(RS)- α -氰基-3-苯氧基苄基(RS)-2-(4-氯苯基)-3-甲基丁酸酯, 1974 年由日本住友化学工业公司开发, 是我国应用最早最普遍的菊酯类杀虫剂, 适用于棉花、果蔬、茶叶等作物以及林木、家畜、卫生和仓储等害虫防治。随着其广泛的使用, 也带来了一系列环境污染和食品安全等问题。氰戊菊酯是约 20 年来, 国内外茶叶中残留出现频率和残留量最高的两种农药之一^[1]。寻找一种有效方法消除或降低食品和环境中的氰戊菊酯农药残留已成为当前迫切需要解决的问题^[2]。

氰戊菊酯有 4 种光学异构体, 分别为 SS、SR、RS 和 RR。商品制剂中氰戊菊酯的主要成分为 SS 异构体^[3]。氰戊菊酯在土壤中可通过挥发、土壤吸附、缓慢渗透和生物转化等途径而发生转移。灭菌后土壤中氰戊菊酯的半衰期明显延长, 说明土壤微生物对其转化起重要作用^[4]。国内外学者对拟除虫菊酯杀虫剂的微生物降解进行了广泛的研究。廖敏等分离到一株缺陷假单胞菌 M5R14, 在合适条件下培养 5 d, 对联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的降解率分别为 43.78%、43.91%和 43.75%^[5]。徐莲等分离到一株能利用功夫菊酯为唯一碳源生长的芽孢杆菌 GF-3, 在 24 h 内对 100 mg/L 功夫菊酯的降解率达到 98.4%^[6]。Tallur PN 分离到一株微球菌 CPN1 (*Micrococcus*), 能以氯氰菊酯为唯一碳源生长并彻底降解氯氰菊酯^[7]。由于拟除虫菊酯类农药化学结构上都是由多个苯环通过酯键等化学键相连接, 理论上对一种农药有降解效果的菌株对其他拟除虫菊酯类农药有降解效果。但目前多数研究所涉及的微生物只针对某一种或少数几种农药, 而同时能降解多种拟除虫菊酯类农药的微生物报道还相对较少。迄今, 国内外报道的氰戊菊酯降解菌株主要属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)^[8-10]、产碱菌属(*Alcaligenes*)^[11]、微球菌属(*Micrococcus*)^[7]。对降解酶的研究主要停留在实验室水平。

本文以福州周边长期施用农药的农田土壤为采样点, 从中分离筛选到一株降解氰戊菊酯的细菌菌株 FDB (Fenvalerate-degrading bacterium), 对其生物学特性与生长特性进行了研究, 采用超声波破碎方法破碎细胞, 通过测定胞外与胞内提取物对氰戊菊酯的降解效果, 对降解酶进行定位, 为该菌株的开

发利用提供依据。

1 材料和方法

1.1 土样

福州市长乐、连江、罗源、琅岐等市县郊区栽种果树、蔬菜、花卉土样 22 个。

1.2 药品与试剂

氰戊菊酯原药(91.7%), 上海市农药研究所; 20%氰戊菊酯乳油, 浙江威尔达化工有限公司。其余药品均为国产分析纯。

1.3 培养基

基础盐培养基(g/L): NH_4NO_3 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5, KH_2PO_4 0.5, NaCl 0.5, K_2HPO_4 1.5, pH 自然。LB 普通培养基。

1.4 方法

1.4.1 降解菌的富集、驯化与分离: 取农田土样 2.0 g, 添加到 100 mL 氰戊菊酯浓度为 50 mg/L 的富集培养基中。30°C、135 r/min 培养 7 d; 之后以 2% 的接种量将其转接到氰戊菊酯浓度为 100 mg/L 的富集培养基中, 30°C、135 r/min 培养 7 d; 再以 2% 的接种量转接到下一批相同的富集培养基中, 30°C、135 r/min 培养 7 d。富集培养液以 5% 的接种量转接到氰戊菊酯浓度为 100 mg/L 的基础盐培养基中, 30°C、135 r/min 培养。每隔 7 d 按 5% 的接种量将其转接到下一批基础液体培养基中, 其中氰戊菊酯浓度以 200 mg/L 梯度逐步提高, 驯化培养 1 个月。取 0.1 mL 稀释适当倍数的基础培养基发酵液, 转接到普通培养基平板上, 涂布后置于 30°C 恒温培养 48 h, 选取不同形态特征的菌株划线分离纯化。

1.4.2 菌株的鉴定: 对筛选到的菌株进行形态观察和生理生化特征鉴定, 初步鉴定到属^[12]。细菌总 DNA 提取参照文献^[13]。16S rDNA 序列扩增引物采用正向引物 F: 5'-AAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 反向引物 R: 5'-GGTTACCTTGTTGCGACTT-3'。PCR 反应体系为: 10 × PCR buffer 5 μL 、dNTPs 4 μL 、PCR 引物各 1 μL 、*Taq* 酶 1.25 U、DNA 模板 2~5 μL (600~1500 ng), 加灭菌双蒸水至 50 μL 。PCR 反应条件为: 95°C 5 min; 95°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 10 min。PCR 产物用 pMD18-T 载体克隆后, 送上海生工测序。测序结果通过在线分析 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 与

GenBank 中的 16S rDNA 序列进行同源性分析并构建系统发育树。

1.4.3 降解菌致病力的测定与药敏试验: 降解菌致病力的测定参照文献[10]。药敏实验采用纸片扩散法。控制每张滤纸片抗生素含量 50 μg , 以 LB 普通培养基配制菌悬液, 涂种于 LB 普通培养基琼脂平板上, 37°C 培养 24 h, 测量其抑菌圈直径。

1.4.4 菌株对氰戊菊酯的降解效能: 按 5% (V/V) 接种量接种生长旺盛期的菌种于基础盐培养基中(氰戊菊酯浓度为 100 mg/L), 设不接菌为对照, 30°C、135 r/min 培养一定时间。样品处理后, 检测氰戊菊酯残留量并换算成降解率。

1.4.5 氰戊菊酯的提取和测定: 适量培养液经正己烷萃取后用气相色谱仪检测。气相色谱检测条件: 柱温采用程序升温, 起始温度 170°C, 以每 min 上升 30°C 的速度升至 290°C, 保持 10 min。FID 检测器温度 300°C, 进样口温度 270°C, 不分流, 载气为 N_2 , 流量为 25 mL/min, H_2 流量为 40 mL/min, 空气流量为 400 mL/min, 进样量为 1 μL 。降解率的计算方法: 降解率 = $(1 - C_1/C_0) \times 100\%$ 。其中, C_1 为降解菌处理氰戊菊酯残留浓度(mg/L), C_0 为对照处理氰戊菊酯残留浓度(mg/L)。

1.4.6 粗酶液的制备: 采用超声波破碎细胞, 参照文献[11]做法, 分别获得胞外粗酶液与胞内粗酶液。

1.4.7 酶反应体系的建立: 参照文献[14], 取 2.5 mL 0.02 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.2), 其中的氰戊菊酯浓度为 100 mg/L, 30°C 水浴预热 10 min, 加预热酶液 0.5 mL, 30°C 反应 30 min 后, 用 0.2 mL 10 mol/L HCl 终止反应。每一处理重复 3 次, 以不加酶液的氰戊菊酯缓冲溶液为对照, 测定氰戊菊酯含量。

1.4.8 培养条件对菌株 FDB 生长的影响: (1) 氰戊菊酯浓度: 在基础盐培养基中加入氰戊菊酯, 使其浓度分别为 300、500、800、1000、1500 mg/L, 接种后于 30°C、135 r/min 培养 48 h, 取样测定其 OD_{600} 值; (2) 温度: 在氰戊菊酯浓度为 100 mg/L 的基础盐培养基中, 接种处理, 置于不同温度(17°C、22°C、27°C、32°C、37°C、42°C、47°C), 135 r/min 培养 12、24 h 后取样测定菌液 OD_{600} 值; (3) pH: 在 pH 值为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0, 氰戊菊酯浓度为 100 mg/L 的基础盐培养基中做接种处理, 30°C、135 r/min 培养 6、12、24 h 后取样测定菌液

OD_{600} 值; (4) 摇瓶装液量: 设定摇瓶装液量分别为 25、50、75、100、125、150、175、200 mL, 接种后置 30°C、135 r/min 培养 12、24 h, 取样测定菌液 OD_{600} 值。

1.4.9 降解酶的定位: 取培养至稳定期的菌株 FDB 培养液, 按 1.4.7 实验方法, 分别提取胞外和胞内粗酶液, 以浓度为 100 mg/L 的氰戊菊酯为底物分别测定胞外粗酶液和胞内粗酶液的降解率。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选

从长期受农药污染的土壤中分离筛选到一株降解氰戊菊酯农药的细菌菌株 FDB。图 1 的透射电镜结果表明, FDB 呈杆状或短杆状, 端生 1 根鞭毛, 菌体大小为 $(0.4-0.7) \mu\text{m} \times (1.6-2.8) \mu\text{m}$ 。革兰氏染色阴性。在氰戊菊酯浓度为 100 mg/L 的 LB 平板上培养 24 h, 菌落为不透明灰色, 边缘不整齐, 菌落直径 2-4 mm, 扁平或凸起, 表面光滑湿润, 容易被挑取。产生水溶性色素, 使培养基呈青绿色(图 2)。菌株 FDB 的部分生理生化特征见表 1。

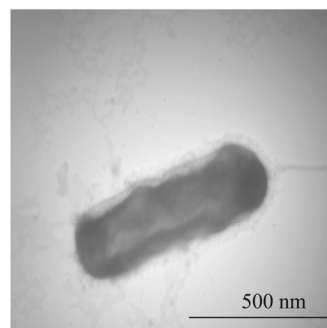


图 1 FDB 透射电镜下的形态($\times 50000$)

Fig. 1 Morphological character of FDB strain under transmission electron microscope ($\times 50000$)

2.2 16S rDNA 序列测定和系统发育分析

目的片段扩增后克隆测序, 得到长为 1496 bp 序列(图 3, GenBank 登录号: GQ433374)。将该序列与数据库中同源性较高的 23 个细菌模式株进行比较。系统进化结果显示, 细菌 FDB 与 *Pseudomonas* (属)的成员聚类, 与 *P. aeruginosa* 同源性高达 100% (图 4)。综合形态学与特征、生理生化指标及 16S rDNA 序列分析, 将分离菌株 FDB 鉴定为铜绿假单胞菌, 命名为 *Pseudomonas aeruginosa* sp. FDB。

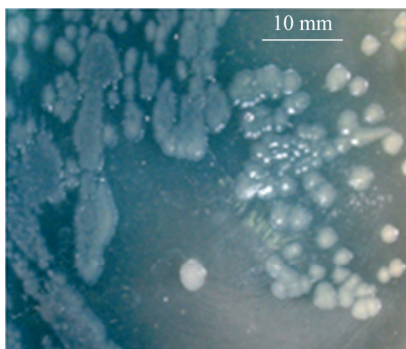


图2 FDB 在 LB 培养基上形成的菌落
Fig. 2 The colonies of the strain FDB forming on LB medium

注: 培养条件: 37℃, 24 h; 氰戊菊酯浓度 100 mg/L.
Note: Cultural conditions: 37℃, 24 h. Concentration of fenvalerate: 100 mg/L.

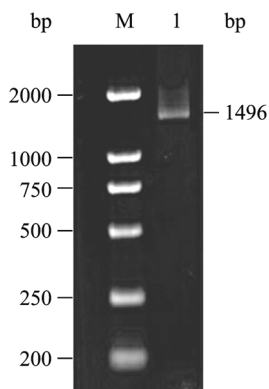


图3 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳
Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA fragment

Note: 1: PCR-amplified 16S rDNA fragment of FDB; M: DNA marker, DL2000.

表1 分离株 FDB 的部分生理生化特征 Table 1 The physio-biochemical characteristics of isolated strain FDB		
Characteristics	Results	
淀粉水解 Starch hydrolysis	—	
甲基红试验 Methyl red test	—	
伏-普试验 Voges-prokauer test	—	
接触酶试验 Catalase activities	+	
氧化酶试验 Oxidase activities	+	
精氨酸水解酶 Arginine hydroxylase	+	
荧光色素 Fluorescence pigment	+	
柠檬酸盐利用试验 Citrate test	+	
明胶水解试验 Gelatin hydrolysis	+	
果聚糖试验 Levan production	—	
葡萄糖发酵试验 Glucose ferment	产酸不产气	
聚 β-羟丁酸 HBP accumulation	—	
41℃ 生长 Growth at 41℃	+	

注: +: 阳性; —: 阴性.
Note: +: Positive; —: Negative.

2.3 菌株 FDB 致病力的测定与药敏试验

注射菌液浓度 $\geq 10^{10}$ 个/mL, 注射剂量 0.1 mL。每种注射剂量选用了两只小鼠, 经连续观察 48 h, 处理组和对照组的小鼠都未表现出异常行为, 说明菌株 FDB 对小白鼠无致病力。药敏试验表明, FDB 对庆大霉素、阿米卡星、左氧氟沙星、氯霉素、罗红霉素和头孢克洛敏感, 而对几种常用的 β-内酰胺类抗生素如阿莫西林、头孢唑啉、头孢曲松、头孢噻肟耐药(表 2)。

表2 菌株 FDB 的抑菌圈直径 Table 2 Zone diameters of strain FDB under the certain concentration of various antibiotics		
抗生素 Antibiotics	抑菌圈直径(mm) Zone diameters (mm)	
庆大霉素 Gentamicin	41	
阿米卡星 Amikacin	34	
左氧氟沙星 Levofloxacin	33	
氯霉素 Chloromycetin	23	
罗红霉素 Roxithromycin	16	
阿莫西林 Amoxicillin	—	
头孢唑啉 Cefazolin	—	
头孢曲松 Ceftriaxone	—	
头孢克洛 Cefaclor	14	
头孢噻肟 Cefotaxime	—	

注: 不同抗生素使用量为 50 μg; —: 没有观察到抑制圈。
Note: Levels of various antibiotics tested were 50 μg; —: No zone diameters observed.

2.4 FDB 菌株对氰戊菊酯的降解效能

FDB 在氰戊菊酯农药为唯一碳源的基础培养基中培养 3 d, 对氰戊菊酯异构体 SR + RS、SS + RR 的降解率分别为 42.25%和 40.67%; 继续培养到第 5 天时降解率分别达到 69.09%和 64.32% (表 3)。说明菌株 FDB 能以氰戊菊酯为唯一碳源进行生长。

2.5 培养条件对菌株 FDB 生长的影响

当氰戊菊酯浓度低于 1000 mg/L 时, FDB 均能较好的生长。氰戊菊酯浓度高于 1000 mg/L 时, 随着氰戊菊酯浓度的增加, FDB 的生长受到抑制, 最高耐受浓度为 1500 mg/L (图 5A)。FDB 在 27℃–37℃ 均能较好地生长, 最适温度范围是 32℃–37℃, 42℃ 时生长受到抑制, 而 47℃ 时, 基本不能生长(图 5B)。FDB 在 pH 值 5.0–9.0 范围内均能较好地生长, pH 7.0 时生长量最高, 且各不同培养条件的最终 pH 值均趋向 pH 7.0。pH 值低于 4.0 或高于 10.0 均不利于生长, 尤其在 pH 4.0 的强酸环境下菌体基本

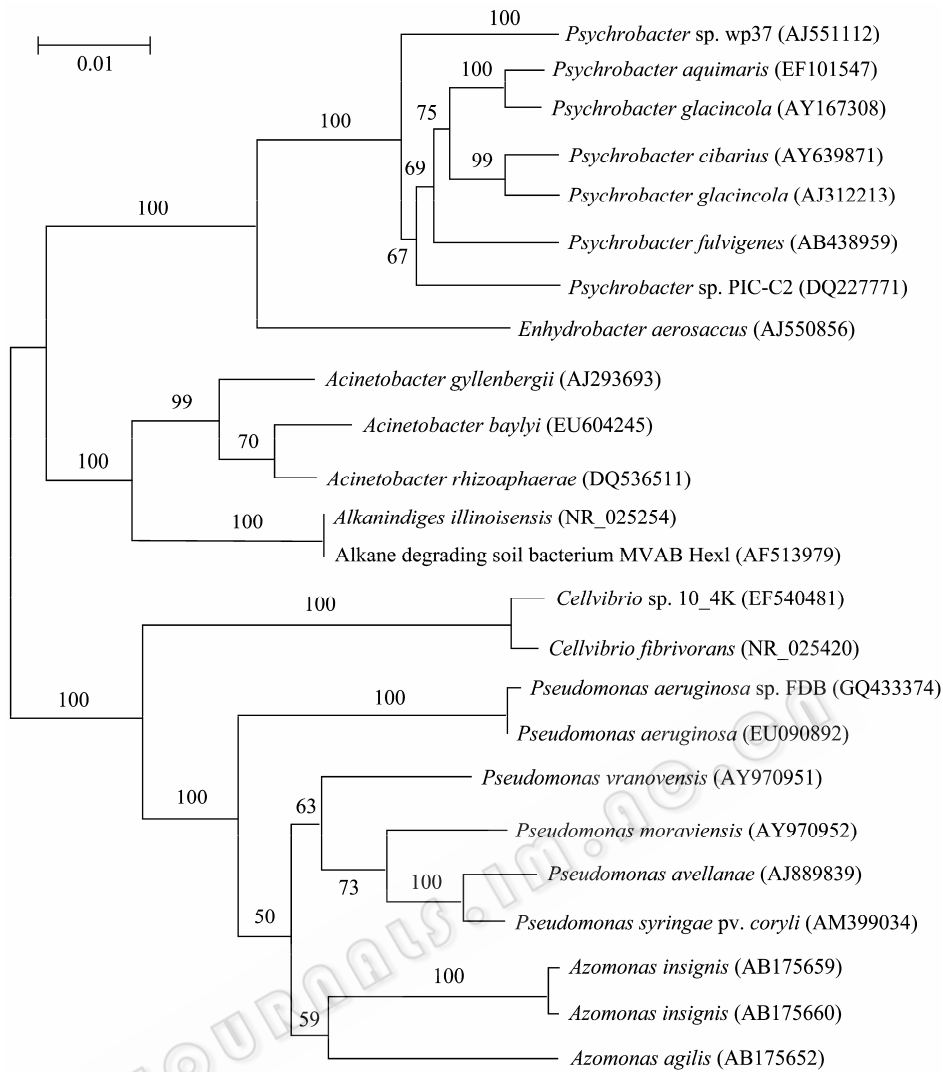


图 4 以菌株 FDB 16S rDNA 序列为基础的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of the strain FDB

Note: Numebers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. Numbers at the nodes indicate the bootstrap values on neighbor-joining anaylsis of 1000 resampled data sets. Bar 0.01 represent sequence divergence.

表 3 菌株 FDB 对氰戊菊酯的降解率

Table 3 The degradation rate of fenvalerate by FDB strain

培养时间(d) Cultivating time (d)	氰戊菊酯异构体 Isomers of fenvalerate	残留农药浓度(mg/L) Residue concentration (mg/L)		降解率(%) Degradation rate (%)
		Treated	Control	
3	SR + RS	69.22	119.36	42.25
	SS + RR	73.68	124.22	40.67
5	SR + RS	36.41	117.67	69.06
	SS + RR	43.64	122.30	64.32

没有生长(图 5C)。装液量为 50–125 mL 时 FDB 生长较好,装液量 75 mL 时 OD_{600} 最高。随着装液量的增加,培养液中的溶解氧减少,菌体密度呈下降趋势,可见菌株 FDB 为需氧菌(图 5D)。

2.6 降解酶的定位

菌株 FDB 胞内粗酶液对氰戊菊酯异构体 SR +

RS、异构体 SS + RR 的降解率分别为 $79.6\% \pm 4.6\%$ 和 $68.7\% \pm 5.8\%$,而胞外粗酶液对氰戊菊酯异构体 SR + RS、异构体 SS + RR 的降解率分别为 $3.8\% \pm 1.2\%$ 和 $3.9\% \pm 1.1\%$,酶活明显低于胞内粗酶液。说明菌株 FDB 氰戊菊酯降解酶属于胞内蛋白组分(图 6)。

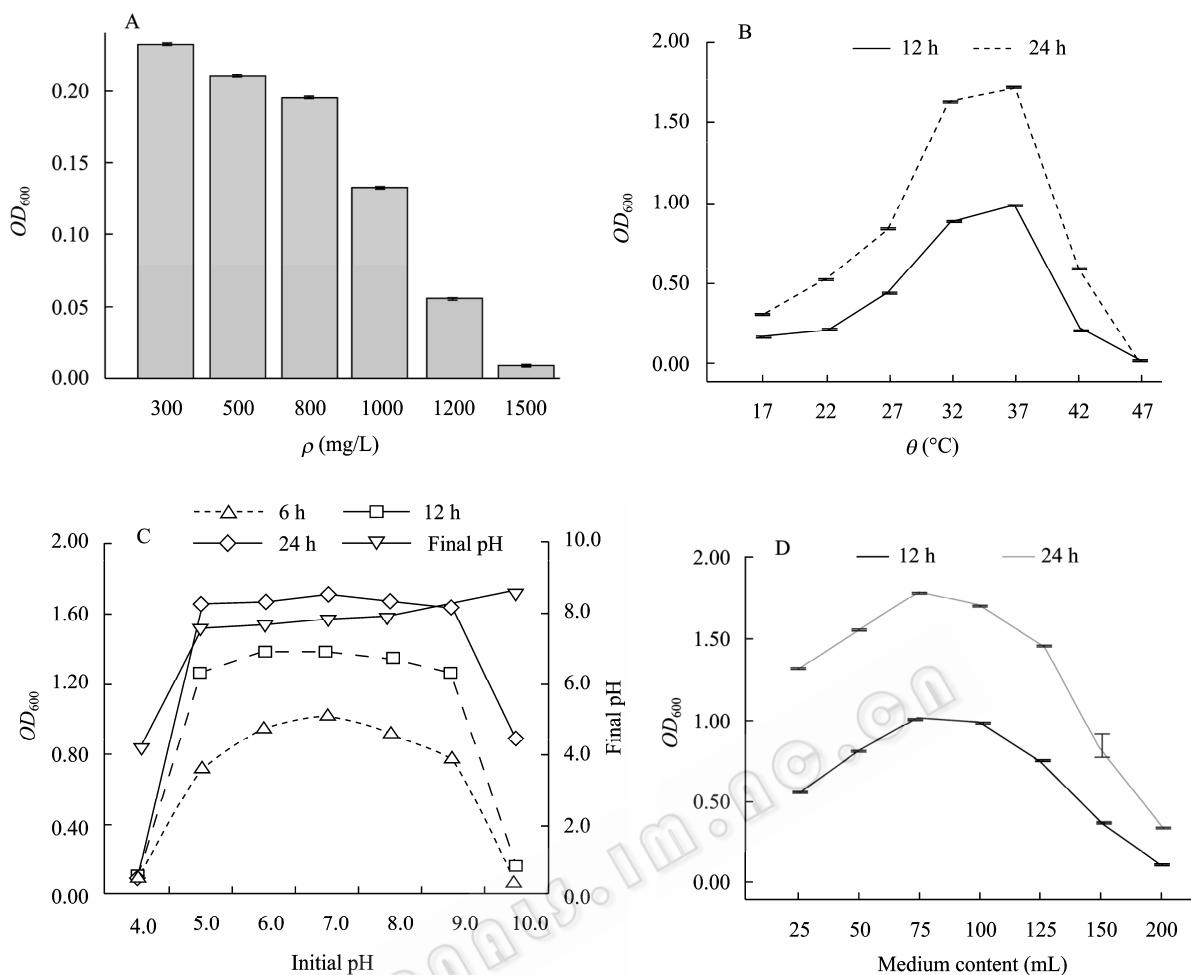


图 5 培养条件对菌株 FDB 生长的影响

Fig. 5 Effect of culture conditions on the growth of strain FDB

Note: A, B, C and D stands for the cultural conditions of fenvalerate concentration, temperature, pH value and medium content in 250 mL flask, respectively.

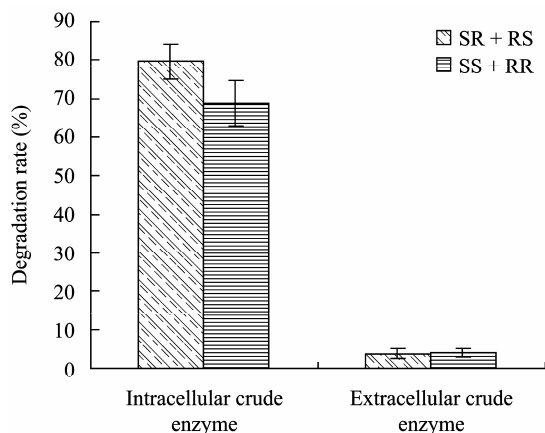


图 6 胞内与胞外粗酶液对氰戊菊酯的降解效果

Fig. 6 Effect of intracellular and extracellular crude enzyme from strain FDB on the degradation rate of fenvalerate

3 讨论

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)在自然界广泛分布, 由于是条件致病菌, 在医学临床研究上颇受重视。近年来也常作为石油等有机污染物的生物修复菌株而得到广泛研究^[15], 但作为农药降解菌特别是拟除虫菊酯杀虫剂降解菌鲜见报道^[16]。

通过多次驯化、富集, 本项目从长期施用农药的农田土壤中分离到一株氰戊菊酯降解菌株 FDB。该菌株的 16S rDNA 序列与 *Pseudomonas aeruginosa* 的同源性为 100%, 结合菌株形态与生理生化指标, 将菌株 FDB 鉴定为铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。降解菌致病力测定与药敏试验结果初步表明, 菌株 FDB 对小白鼠无致病力, 对几种常用的氨基糖苷类、喹诺酮类抗生素及氯霉素敏感, 但

对头孢类抗生素耐药。菌株 FDB 的田间安全性试验有待进一步开展。

菌株 FDB 在氰戊菊酯为唯一碳源的基础培养基上生长, 培养 5 d 对浓度为 100 mg/L 氰戊菊酯异构体的降解率分别达到 69.06% (SR + RS) 和 64.32% (SS + RR)。该降解率高于地衣芽孢杆菌 qw5 对氰戊菊酯等 3 种菊酯类农药的降解率^[10]。另外, 由于迄今分离的降解菌都以共代谢的方式降解或转化菊酯类杀虫剂^[17], 而菌株 FDB 很可能是一株矿化菌, 也显示了该菌进一步开发的價值。

通常情况下, 菌体生长状况与其降解农药的能力有直接的关系。适合 FDB 生长的最适条件为温度 37°C、培养基初始 pH 7.0、250 mL 摇瓶装液量 75 mL。大多数拟除虫菊酯类降解菌对高浓度农药的适应性较差^[18], 而 FDB 对氰戊菊酯的最高耐受浓度高达 1500 mg/L。

不同细菌对拟除虫菊酯杀虫剂的作用方式有所不同, 但降解过程都与降解酶的作用有关^[8]。应用降解酶于农药的生物降解可以避免因在自然环境中直接使用菌体带来的风险。Maloney 等从 *Bacillus cereus* SM3 提取氯菊酯酶(Permethrinase)^[8], 开始了拟除虫菊酯杀虫剂酶促降解的研究。虞云龙等采用超声波破碎方法提取广谱性降解菌 *Alcaligenes* sp. YF11 胞内酶, 提取的酶液对氯菊酯、杀灭菊酯、溴氰菊酯等 12 种拟除虫菊酯类杀虫剂具有较好的降解效果^[11,19]。微球菌 CPN1 (*Micrococcus* CPN1), 能以氯氰菊酯为唯一碳源并同时降解氰戊菊酯和溴氰菊酯, 所产生的降解酶为诱导型表达的胞内降解酶^[7]。徐莲等的试验表明, 芽孢杆菌 GF-3 功夫菊酯降解酶属于胞外酶^[6]。FDB 菌体胞内粗酶液对氰戊菊酯表现明显的降解活性, 说明所产生的氰戊菊酯降解菌酶为组成型表达的胞内酶组分。由于拟除虫菊酯杀虫剂在化学结构上的相似性, 菌株 FDB 对氰戊菊酯以及其他拟除虫菊酯类农药的降解途径与机理有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] 骆爱兰, 余向阳, 张存政, 等. 拟除虫菊酯类农药残留分析研究进展. 江苏农业学报, 2004, **20**(2): 120-125.
- [2] 王卓娅, 刘玉焕, 李荷. 克雷伯氏菌 ZD112 氯氰菊酯降解酶基因的克隆与生物信息学分析. 广东药学院学报, 2008, **24**(3): 277-281.
- [3] 尹喜林, 王玉琴, 杨世宗. H-NMR 测定氰戊菊酯的立体结构与含量. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 1992, **8**(1): 59-64.
- [4] 陈莉, 章钢娅, 胡锋. 氰戊菊酯在土壤中的降解及其影响因素研究. 土壤学报, 2008, **45**(1): 90-97.
- [5] 廖敏, 张海军, 谢晓梅. 降解拟除虫菊酯类农药的缺陷假单胞菌的分离、鉴定及降解特性研究. 环境科学学报, 2009, **29**(7): 1388-1394.
- [6] 徐莲, 张丽萍, 刘怡辰, 等. 功夫菊酯降解菌 GF-3 的筛选鉴定及其降解特性研究. 农业环境科学学报, 2009, **28**(7): 1545-1551.
- [7] Tallur PN, Megadi VB, Ninnekar HZ. Biodegradation of cypermethrin by *Micrococcus* sp. strain CPN1. *Biodegradation*, 2008, **19**(1): 77-82.
- [8] Maloney SE, Maule A, Smith AR. Purification and preliminary characterization of permethrinase from a pyrethroid-transforming strain of *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, **59**(7): 2007-2013.
- [9] Hashem, Hafez FH, El-Mohandes MAO. Isolation and identification of pyrethroid insecticides-degrading bacteria from soil. *Annals of Agricultural Science*, 1999, **44**(1): 123-137.
- [10] 丁海涛, 李顺鹏, 沈标, 等. 拟除虫菊酯类农药残留降解菌的筛选及其生理特性研究. 土壤学报, 2003, **40**(1): 123-129.
- [11] 虞云龙, 陈鹤鑫, 樊德方, 等. 拟除虫菊酯类杀虫剂的酶促降解. 环境科学, 1998, **19**(3): 66-69.
- [12] Buchanan RE, Gibbons NE. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th Edition. Baltimore: The Williams and Wilkins Co. Baltimore Md, 1984: 446-450.
- [13] 侯卫国, 连宾. LiCl 沉淀法提取富含荚膜的细菌基因组 DNA. 土壤, 2006, **38**(6): 774-777.
- [14] 钞亚鹏, 赵永芳, 刘斌斌, 等. 甲基营养菌 WB-1 甲胺磷降解酶的产生、部分纯化及性质. 微生物学报, 2000, **40**(5): 523-527.
- [15] 汤晓, 张国亮, 孟琴. 铜绿假单胞菌分泌鼠李糖脂能力对原油降解影响的研究. 高校化学工程学报, 2008, **22**(1): 88-93.
- [16] 郑永良, 刘德立, 陈舒丽, 等. 一株甲基对硫磷高效降解菌的鉴定及特性研究. 环境科学研究, 2006, **19**(4): 100-104.
- [17] 许育新, 戴青华, 李晓慧, 等. 氯氰菊酯降解菌株 CDT3 的分离鉴定及生理特性研究. 农业环境科学学报, 2004, **23**(5): 958-963.
- [18] 李青云, 顾宝群, 刘幽燕, 等. 氯氰菊酯降解菌 GF31 的分离鉴定及其降解特性. 微生物学通报, 2009, **36**(9): 1334-1339.
- [19] 虞云龙, 盛国英, 傅家谟, 等. 杀灭菊酯的微生物降解及酶促降解. 环境科学, 1997, **18**(2): 5-8.