

CP1 菌株的分离、筛选及其对毒死蜱的降解

史延华 曲杰 李康 王圣惠 闫艳春*

(中国农业科学院研究生院 北京 100081)

摘要: 从生产毒死蜱的农药生产厂曝气池中分离、筛选到降解毒死蜱且能以毒死蜱为唯一碳源生长的微生物菌株, 命名为 CP1。根据该菌株的 Biolog 特性鉴定和 16S rRNA 序列相似性分析, 初步鉴定该菌为苍白杆菌属(*Ochrobactrum* sp.)。利用正交实验和 Box-Behnken 响应面法对影响 CP1 菌株降解毒死蜱的主要因素进行优化分析, 得到菌株 CP1 对毒死蜱的最适降解条件为: 农药浓度 100 mg/L, pH 值 7.0, 温度为 28.5 °C。优化后, CP1 对毒死蜱的降解率由最初的 70.26% 提高到 75.18%。毒死蜱降解优化试验提高了 CP1 菌株对毒死蜱的生物降解性能。

关键词: 毒死蜱, 生物降解, 正交实验, 响应面法, 优化

Isolation, identification and degradative properties of CP1 for chlorpyrifos

SHI Yan-Hua QU Jie LI Kang WANG Sheng-Hui YAN Yan-Chun*

(Graduate School, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: A bacterium, named CP1, capable of effectively degrading chlorpyrifos was isolated from activated sludge from a pesticide plant. Based on the phylogenetic analysis of 16S rRNA gene and Biolog test, the isolate CP1 was preliminarily identified as a strain of Genus *Ochrobactrum*. Both the orthogonal experimental design and Box-Behnken design were employed to optimized the main factors which influences the chlorpyrifos-degrading efficiency by strain CP1. The optimum conditions for chlorpyrifos biodegradation were as follows: the initial concentration of chlorpyrifos was 100 mg/L, the pH was 7.0, and the culturing temperature was 28.5 °C. Under the optimum condition, the biodegradation efficiency of chlorpyrifos increased from 70.26% to 75.18%. Therefore, the optimization of chlorpyrifos-degrading condition could improve the biodegradation efficiency of chlorpyrifos by *Ochrobactrum* sp. strain CP1.

Keywords: Chlorpyrifos, Biodegradation, Orthogonal experimental design, Response surface method, Optimization

毒死蜱(Chlorpyrifos, CP), 化学名称为 O,O-二乙基-O-(3,5,6-三氯-2-吡啶基)硫代磷酸酯, 商品名乐斯本、白蚁清等, 是目前全球使用最广泛的 5 种杀虫剂之一^[1]。杀虫剂的使用大幅度降低了农业病虫害对农业生产造成的损失^[2], 提高了作物产量, 创造了巨大的经济价值。毒死蜱可以抑制乙酰胆碱酯酶的活性, 能够杀灭害虫, 它对昆虫具有触杀、胃毒和熏蒸 3 种作用方式, 其杀虫谱广^[3], 高效低毒, 是防治粮食、果树、蔬菜和其他经济作物的理想杀虫剂。高毒农药在我国禁用之后, 作为高毒农药的替代品种, 毒死蜱在我国产销量逐年增加且使用范围不断扩大, 但其缺点是在自然环境中的半衰期较长, 在 10-120 d 左右, 容易在农作物和蔬菜中残留^[4], 从而对人体造成损害。因此, 如何有效地处理毒死蜱的毒性和残留带来的污染, 成为人们亟待解决的问题。

环境中农药的降解主要有生物降解和非生物降解两种方式, 微生物是进行有机磷农药生物降解的最主要因素^[5], 所以分离筛选能够高效降解毒死蜱的微生物是解决毒死蜱污染^[6], 进行生物修复的有效措施。目前国内外报道的能够降解毒死蜱的微生物主要有黄杆菌属(*Flavobacterium* sp.)^[7]、假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)^[8]、节杆菌属(*Arthrobacter* sp.)^[9]、嗜麦芽窄食单胞菌属(*Stenotrophomonas* sp.)^[10]、沙雷菌属(*Serratia* sp.)^[11]、丝孢酵母(*Trichosporon* spp.)^[11]和副球菌属(*Paracoccus* sp.)^[12]等。但有的菌株对毒死蜱的降解特异性和降解效率不高, 如黄杆菌属(*Flavobacterium* sp.)对毒死蜱的降解率仅为 33%; 节杆菌属(*Arthrobacter* sp.)仅能在浓度为 10 mg/L 的培养基中具有降解能力; 沙雷菌属、丝孢酵母和副球菌属对浓度为 50 mg/L 的毒死蜱有降解作用, 对农药的耐受度不高等。因此, 为了扩大菌种资源, 继续筛选得到能够高效降解毒死蜱的微生物菌株是很有必要的。

本研究从农药厂污水处理池中, 采用富集驯化的方法筛选到 1 株能够高效降解毒死蜱的菌株 CP1, 并对其进行了初步鉴定及降解特性的研究。以期为

毒死蜱污染环境的生物修复提供理论依据, 同时为构建高效降解毒死蜱工程菌和降解菌酶制剂提供菌种资源。降解菌酶制剂有着降解菌无法比拟的优势^[13], 例如, 降解酶通常比产生这些酶的菌体对异常环境具有更强的忍耐力, 酶的降解效果远胜于菌株本身, 而且酶不易被微生物代谢抑制剂所影响, 酶制剂的储存和使用更加方便等。因此分离纯化农药降解酶, 研究酶的固定化及产业化生产, 对修复环境中的农药污染具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 活性污泥样品: 取自长期生产毒死蜱的华阳农药厂污水曝气处理池。

1.1.2 主要仪器和试剂: LRH-250 生化培养箱, 上海一恒科技有限公司; Heto-PowerDry LL3000 Freeze Dryer, Thermo Electron Corporation; 恒温摇床, 华利达实验设备公司; OLYMPUS BH-2 光学显微镜; Automated Bacteria Identification System-Biolog Micro Station System; 岛津 GC-2010 气相色谱仪, ECD 检测器, Rtx-1301 型毛细管柱; 正己烷、乙醇、丙酮、无水硫酸钠等化学试剂均为分析纯, 北京化工厂。

毒死蜱原药: 纯度>98%, 购自山东华阳农药厂。毒死蜱母液: 首先以乙醇/丙酮为溶剂将毒死蜱原药制备成质量浓度为 10⁵ mg/L 的标准母液, 使用时根据比例稀释加入到培养基中。

1.1.3 培养基: 富集培养基(g/L): 蛋白胨 10, NaCl 1.0, KH₂PO₄ 1.0, pH 7。

无机盐培养基(g/L): NH₄NO₃ 1.0, MgSO₄·7H₂O 0.5, (NH₄)₂SO₄ 0.5, KH₂PO₄ 0.5, NaCl 0.5, K₂HPO₄ 1.5, 酵母提取物 0.05, pH 7。

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母提取物 5, NaCl 10, pH 7.0-7.4。

BUG+B 平板培养基参照文献[14]配制。

1.2 毒死蜱降解菌的分离与筛选

称取 1 g 活性污泥, 加入到毒死蜱浓度为 200 mg/L 的富集培养基中, 30 °C、170 r/min 条件下摇床培养, 每 7 d 转接 1 次。每次转接时都

将毒死蜱浓度提高 200 mg/L, 直到农药浓度达到 1 000 mg/L。然后接种到毒死蜱浓度为 1 000 mg/L 的无机盐培养基中, 连续培养 1 个月后, 再用梯度稀释法、平板涂布法等进行菌株的分离纯化。

1.3 降解菌的鉴定

1.3.1 形态特征及 Biolog GN2 分析: 降解菌采用平板涂布法接种, 30 °C 培养 12–16 h 后用光学显微镜观察菌体形态。Biolog GN2 分析参考文献[14]。

1.3.2 降解菌的分子鉴定: 降解菌总 DNA 的提取采用 CTAB 法^[15], 并以提取的总 DNA 为模板, 设计引物 PCR 扩增 16S rDNA 序列。引物序列: F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG; R: GGCTACCTTGTACGACT。扩增反应体系为: 10×PCR Buffer (Mg²⁺) 2.5 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 2.0 μL, 引物(5 μmol/L) 各 2.0 μL, 菌体 DNA (约 50 mg/L) 1.0 μL, *rTaq* DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.125 μL, 加 ddH₂O 至 25 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 54 °C 50 s, 72 °C 90 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。将 PCR 产物进行测序。将所测序列进入 GenBank 数据库进行 BLAST 相似性分析, 并用 MEGA 4.0 软件进行系统发育树的构建。

1.4 毒死蜱降解率的测定

1.4.1 菌体生长曲线的绘制: 菌株 CP1 接种到毒死蜱初始浓度为 100 mg/L 的无机盐培养基中, 定期取样, 以毒死蜱浓度为 100 mg/L 的无机盐培养基为空白对照, 用分光光度计测定 600 nm 下的吸光值, 绘制菌体生长曲线。

1.4.2 毒死蜱降解率的测定: 在上述 1.4.1 条件下设置 3 个独立重复实验, 每个重复实验在相同的培养条件下进行。3 个实验同时、定时取样 2 mL, 加入等体积的正己烷旋涡振荡 1 min, 静置 1 h, 使有机相和水相完全分离, 萃取毒死蜱, 取出上层的有机相溶液, 经无水硫酸钠脱水后真空冷冻抽干, 重溶于等体积正己烷中, 气相色谱检测毒死蜱降解率。

气相色谱条件: 气相色谱仪(GC-2010, 岛津), 色谱柱为 Rtx-1301 毛细管柱, 检测器: ECD。条件: 进样口 300 °C; 柱温(程序升温): 180 °C 保留 2 min, 10 °C/min 升至 280 °C, 保留 10 min; ECD 检测器:

330 °C, 载气 N₂, 流速: 19.9 mL/min, 进样量: 1 μL。

采用外标法测定样品中毒死蜱的含量, 求出其降解率。

毒死蜱降解率(%)=[1-(实测残量/对照样实测残量)]×100%。

1.5 菌株降解条件的优化

1.5.1 正交实验设计: 研究表明, 影响菌株降解农药的重要因素有以下 4 种^[16]: 农药浓度、培养温度、pH 值和菌体接种量。本研究采用正交实验设计方法对 4 个关键影响因素进行研究^[17], 筛选出影响毒死蜱降解效率的主效因子。采用 4 因素 3 水平的正交实验表对因素 A (农药浓度, mg/L)、因素 B (温度, °C)、因素 C (pH)和因素 D (接种量, g/L)进行正交实验设计, 实验结果为毒死蜱的降解率 Y (%), 对结果进行方差分析可以得到对菌株降解性能影响最显著的主效因子。实验设计见表 1。

表 1 正交实验设计
Table 1 Orthogonal experimental design

Factors	Factor A (mg/L)	Factor B (°C)	Factor C	Factor D (g/L)
Level 1	10	20	3.0	0.4
Level 2	100	30	7.0	0.7
Level 3	200	40	9.0	1.0

1.5.2 响应面设计: 响应面法(Response surface method, RSM)能够对影响降解效率的因子水平及其交互作用进行优化与评价^[18], 从而快速有效地确定降解过程的最佳条件。本研究运用 Design-Expert (Version 7.1.6)软件中的 Box-Behnken Design (BBD) 程序进行响应面设计, 对正交实验中筛选得到的关键影响因素及其交互作用进一步研究和探讨, 以确定适合 *Ochrobactrum* sp. 菌株 CP1 降解毒死蜱的最优条件。

根据正交实验中得到的 3 个主要因素浓度、温度和 pH 的最适条件, 对 A、B、C 进行 BBD (Box-Behnken Design) 实验设计, 3 个因素的水平分别选取浓度: 0、100、200 mg/L; 温度: 20.0 °C、27.5 °C、35.0 °C; pH 值: 3、7、11。具体因素及水平设计如表 2 所示:

表2 Box-Behnken 实验设计
Table 2 Box-Behnken Design

Factors	Level 1	Level 2	Level 3
毒死蜱浓度 CP concentration (mg/L)	0	100.0	200
温度 Temperature (°C)	20	28.5	35
pH 值 pH value	3	7.0	11

2 结果与分析

2.1 降解菌的分离鉴定

2.1.1 形态学特征和 Biolog 分析: 从农药厂污水曝气池中采集活性污泥, 经富集驯化后涂布到含有毒死蜱的无机盐平板上, 得到 15 个单菌落, 单菌落接种到毒死蜱浓度为 100 mg/L 的无机盐培养基中, 分别测定各个菌株对毒死蜱的降解能力, 从中分离得

毒死蜱降解能力较强的菌株 CP1。经革兰氏染色可判断该菌株为革兰氏阴性杆菌, 菌落呈圆形, 表面凸起、光滑、湿润、边缘规则, 在光学显微镜下可观察到菌株是具平行边和圆端的杆菌。将菌液加到 Biolog 平板上, 经 Biolog 读数仪分析代谢指纹, 菌株 CP1 可较强利用其中 68 种碳源, 对其它 27 种碳源不能利用或利用能力较弱。Biolog 鉴定结果如表 3 所示。

2.1.2 菌株 CP1 的 16S rRNA 系统发育分析: 经 PCR 扩增, 菌株 CP1 的 16S rRNA 片段长约 1.5 kb, 在 GenBank 中的注册号为 HQ589348, 经 BLAST 比对发现菌株 CP1 的 16S rRNA 与苍白杆菌属菌株的 16S rRNA 相似度高达 99%。构建系统发育树(图 1), 结合形态学特征、Biolog GN2 分析和 16S rRNA 的 BLAST 比对分析, 初步将菌株 CP1 鉴定为苍白杆菌属(*Ochrobactrum* sp.)。

表3 CP1 对 Biolog GN2 板上 95 种碳源的利用能力
Table 3 Utilization of 95 carbon substrates by strain CP1 using Biolog GN2 microplate

Carbon	Results	Carbon	Results	Carbon	Results
Water	-	Turanose	+	D-Alanine	+
α -Cyclodextrin	-	Xylitol	-	L-Alanine	+
Dextrin	+	Pyruvic Acid Methyl Ester	+	L-Alanyl-Glycine	+
Glycogen	+	Succinic Acid Mono-Methyl Ester	+	L-Asparagine	+
Tween 40	-	Acetic Acid	+	L-Aspartic Acid	+
Tween 80	+	Cis-Acomtic Acid	+	L-Glutamic Acid	+
N-Acetyl-D-Galactosami-ne	+	Gtric Acid	+	Glycyl-L-Aspartic Acid	+
N-Acetyl-D-Glucosamine	+	Formic Acid	+	Glycyl-L-Glutamic Acid	+
Adonitol	+	D-Galactonic Acid Lactone	+	L-Histidine	+
L-Arabinose	+	D-Galacturonic Acid	+	Hydroxy-L-Proline	+
D- Arabinose	+	D-Gluconic Acid	+	L-Leucine	+
D-Cellobiose	+	D-Glucosaminic Acid	+	L-Ornithine	+
i-Erythritol	+	D-Glucuronic Acid	+	L-Phenylalanine	-
D-Fructose	+	α -Hydroxy butyric Acid	+	L-Proline	+
L-Fucose	+	β -Hydroxy butyric Acid	+	L-Pyroglutamic Acid	-
D-Galactose	+	γ -Hydroxy butyric Acid	+	D-Serine	+
Gentiobiose	+	p-Hydroxy-phenylacetic Acid	-	L-Serine	+
α -D-Glucose	+	Itaconic Acid	-	L-Threonine	+
m-Inositol	+	α -Ketobutyric Acid	+	D,L-Carnitine	+
α -D-Lactose	-	α -Ketoglutaric Acid	+	g-Aminobtyric Acid	+
Lactulose	-	α -Ketoaleric Acid	+	Urocanic Acid	+

续表 3

Carbon	Results	Carbon	Results	Carbon	Results
Maltose	+	D,L-Lactic Acid	+	Inosine	-
D-Mannitol	+	Malaric Acid	-	Uricline	-
D-Mannose	+	Propionic Acid	+	Thymidine	-
D-Melibiose	-	Quinic Acid	+	Phenylethylamine	-
β -Methyl-D-Glucoside	-	D-Saccharic Acid	-	Putrescine	-
D-Psicose	+	Sebacic Acid	-	2-Aminoethanol	-
D-Raffinose	-	Succinic Acid	+	2,3-Butanediol	-
L-Rhamnose	+	Bromosuccinic Acid	+	Glycerol	-
D-Sorbitol	+	Succinamic Acid	-	D-L- α -Glycerol Phosphate	-
Sucrose	+	Glucuronamide	+	α -D-Glucose-1-Phosphate	-
D-Trehalose	+	L-Alaninamide	+	D-Glucose-6-Phosphate	-

Note: +: Positive; -: Negative.

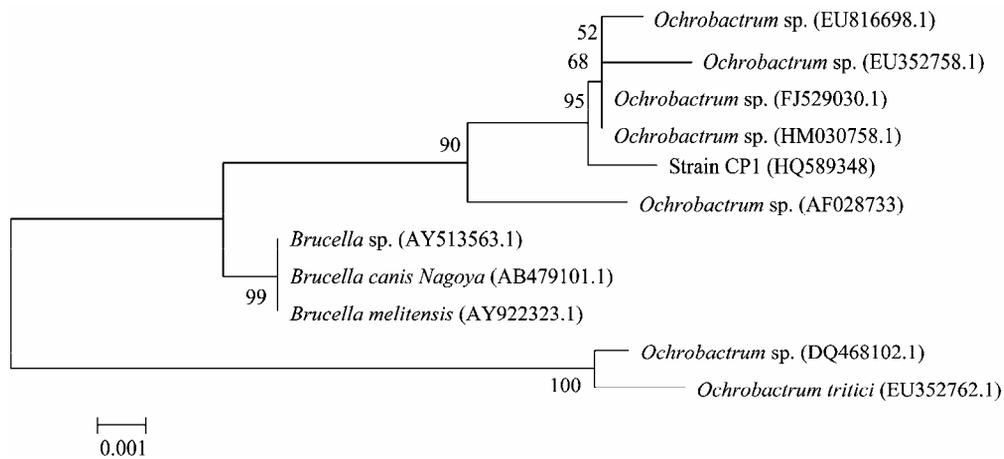


图 1 根据 16S rRNA 基因序列构建的菌株 CP1 与相关种属菌株的系统发育树

Fig. 1 The phylogenetic tree of strain CP1 and other bacteria in the same genera based on 16S rRNA sequence analysis

2.2 正交实验设计及结果

按照正交表的设计和 1.4.2 步骤进行实验, 分别测定正交设计得到的 9 组实验中, 培养 7 d 后的毒死蜱降解率。对实验结果降解率 Y 进行直观分析, 得到了每个因素的 R 值, 结果见表 4, 对结果进行方差分析, 结果见表 5。

从表 4 的 R 值和表 5 中因素的显著性可以看出 pH 值(因素 C)对毒死蜱降解率的影响最大, 其次为农药浓度(因素 A)和温度(因素 B)。对正交实验中的数据进行因素指标分析, 可以得出各个因素的最适条件, 其中农药浓度(因素 A)为 100 mg/L, 温度(因素 B)为 30 °C, pH 值(因素 C)为 7.0。

2.3 响应面分析及结果

根据实验设计表可得到 17 组不同的实验

Code	Factor A	Factor B	Factor C	Factor D	Degradation rate Y
1	1	1	1	1	15.32
2	1	2	2	2	59.89
3	1	3	3	3	30.69
4	2	1	2	3	70.26
5	2	2	3	1	47.41
6	2	3	1	2	27.95
7	3	1	3	2	40.94
8	3	2	1	3	34.02
9	3	3	2	1	50.94
K_1	35.300	42.173	25.763	37.890	
K_2	48.540	47.107	60.363	42.927	
K_3	41.967	36.527	39.680	46.990	
R	13.240	10.580	34.600	7.100	

表5 正交实验结果方差分析
Table 5 ANOVA of orthogonal experimental result

Factor	Squares	Freedom	F	Fe	Significance
A	260.951	2	3.285	19.000	
B	168.159	2	2.101	19.000	
C	1 818.634	2	22.723	19.000	※
D	80.035	2	1.000	19.000	
Error	80.030	2			

组合, 分别对这 17 组实验进行毒死蜱降解效率的测定, 得到每个实验的毒死蜱率(表 6), 并对结果进行方差分析及二次多项回归拟合(表 7)。

从表 7 可知, 模型 $Prob>F$ 值小于 0.01, 说明该模型显著。模型失拟项表示模型预测值与实际值不拟合的概率, 表 7 中模型失拟项的 $Prob>F$ 值小于 0.01, 模型的相关系数 $R^2=0.994 8$, 校正系数 $R_{Adj}^2=0.986 5$, 这说明该模型比较合适。软件分析得到毒死蜱降解率对农药浓度、温度和 pH 值的多元回归方程:

$$Y=69.04-31.29A-5.65B+10.49C+0.13AB+15.04AC+12.74BC-83.07A^2-21.66B^2-17.28C^2$$

表6 Box-Behnken 试验结果
Table 6 Box-Behnken results

Code	CP concentration (mg/L)	Temperature (°C)	pH value	Degradation rate (%)
1	0	1	1	43.90
2	1	1	0	17.40
3	0	0	1	50.20
4	0	-1	-1	51.40
5	-1	0	-1	0
6	1	0	-1	24.60
7	-1	-1	0	0
8	0	-1	1	50.35
9	0	0	0	71.52
10	0	0	-1	44.27
11	1	-1	0	17.05
12	1	0	1	60.00
13	-1	1	0	0
14	0	0	0	73.21
15	-1	0	1	0
16	0	0	0	72.03
17	0	1	-1	0

表7 模型方差分析
Table 7 NOVA for model

Source	Squares	Freedom	Mean square	F value	Prob>F
Model	11 481.37	9	1 275.71	8.49	0.005 0
A	1 167.60	1	1167.60	7.77	0.027 0
B	166.04	1	166.04	1.10	0.328 2
C	473.84	1	473.84	3.15	0.119 1
AB	0.031	1	0.031	2.04	0.989 0
AC	313.29	1	313.29	2.08	0.192 1
BC	505.13	1	505.13	3.36	0.109 4
A ²	5 604.25	1	5 604.25	37.28	0.000 5
B ²	1 928.57	1	1 928.57	12.83	0.009 0
C ²	705.20	1	705.20	4.69	0.067 0
Lack of Fit	1 050.79	5	210.16	283.27	0.003 5

注: $Prob>F$ 值小于 0.05 表示模型或因素有显著影响; $Prob>F$ 值小于 0.01 表示影响高度显著^[19]。

Note: $Prob>F$ value less than 0.05 indicates a significant effect of model or factors, and $Prob>F$ value less than 0.01 indicates an extremely significant effect of model or factors^[19]。

为了进一步研究相关变量之间的交互作用并确定其最优点, 用 Design-Expert 软件绘制 2 个关键影响因素对毒死蜱降解交互影响的曲面图。从图 2 中可知, 得到毒死蜱降解率达到预测最大值时的条件为: 毒死蜱浓度为 100 mg/L, pH 值 7, 培养温度为 28.5 °C, 预测的最高降解率为 73.2%。

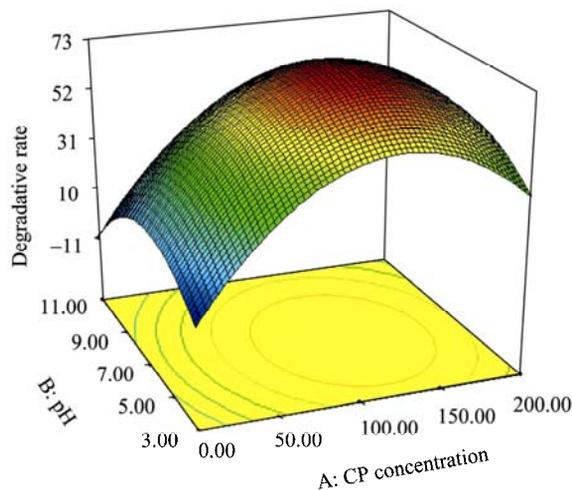


图2 毒死蜱浓度和 pH 交互作用的响应面
Fig. 2 Response surface plots of the interaction between CP concentration and pH value

2.4 最适条件下菌株生长和降解性能的测定

将菌株 CP1 接种在含有 100 mg/L 毒死蜱的 pH 值为 7 的基础培养基中, 在 28.5 °C 下进行培养。测定培养基中毒死蜱的浓度可知, 在最优条件下前 3 天菌株 CP1 的生长和降解率均达到最大值, 3 d 后毒死蜱的浓度降低为 31.13 mg/L, 得到其降解率为 70.0%, 4 d 以后菌株的生长能力有所衰退, 降解能力随之减弱。最终在 7 d 内菌株 CP1 将毒死蜱的浓度降低为 24.82 mg/L, 降解率达到 75.18% (图 3)。

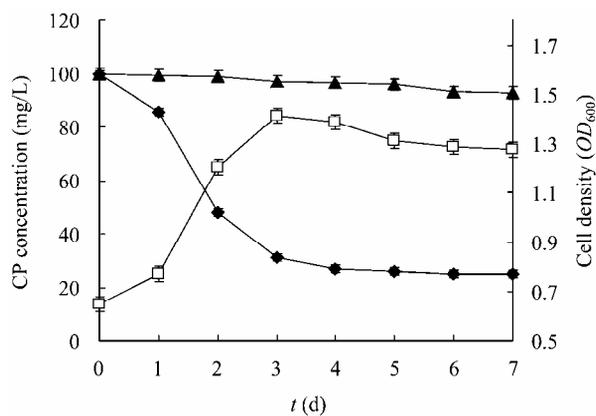


图 3 最优条件下菌株 CP1 的生长曲线和毒死蜱降解曲线

Fig. 3 Bacterial growth curve of strain CP1 during degrading CP under optimum conditions

注: ▲: 100 mg/L 毒死蜱对照; ◆: CP1 对 100 mg/L 毒死蜱的降解曲线; □: 100 mg/L 毒死蜱培养基中菌株的生长曲线。

Note: ▲: 100 mg/L CP control; ◆: 100 mg/L CP degrading curve inoculated CP1; □: Microbial growth curve with 100 mg/L CP.

试验证实该设计方法切实可行, 条件优化后的毒死蜱的降解率为 75.18%, 与模型预测值相当接近, 与优化前正交实验的最高降解率 70.26% (见表 4)相比, 其降解率明显提高。

3 讨论

本研究从毒死蜱生产厂的曝气池中分离筛选毒死蜱降解菌株, 曝气池中毒死蜱浓度较高, 细菌处于极端环境当中, 能形成降解毒死蜱的能力, 从中分离到毒死蜱降解菌株的可能性比较大。本研究首次分离到 1 株能够以毒死蜱为唯一碳源并能够高效的降解毒死蜱的苍白杆菌属 *Ochrobactrum* sp. CP1

菌株, 此类菌株对毒死蜱的降解能力此前尚未见报道。通过正交实验设计和 BBD 响应面法实验设计, 优化了 CP1 菌株对毒死蜱的降解条件, 通过降解特性研究, 可以得知培养 7 d 后, CP1 菌株在 28.5 °C, pH 值为 7.0, 毒死蜱初始浓度为 100 mg/L 的最适条件下, 对毒死蜱的降解率可达 75.18%。结果表明, 毒死蜱降解条件的优化能够促进 CP1 菌株对毒死蜱的生物降解, 可提高农药的降解效率。

在优化条件下, CP1 菌株对毒死蜱的降解能力高于目前分离到的大部分毒死蜱降解菌株, 例如黄杆菌属^[7], 节杆菌属^[9]等, 其对农药的耐受力高于沙雷菌属^[11]、丝孢酵母^[11]和副球菌属^[12]。本研究中测定了菌株在液体培养基中的降解性能, 下一步工作还需要继续探究菌株对污染土壤的修复能力、降解基因的克隆和降解酶制剂的应用。

参考文献

- [1] Kho KM, Math RK, Islam SMA, et al. Biodegradation of chlorpyrifos by lactic acid bacteria during kimchi fermentation[J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(5): 1882-1889.
- [2] Singh BK, Walker A. Microbial degradation of organophosphorus compounds[J]. FEMS Microbiol Rev, 2006, 30(3): 428-471.
- [3] Thengodkar RRM, Sivakami S. Degradation of chlorpyrifos by an alkaline phosphatase from the cyanobacterium *Spirulina platensis*[J]. Biodegradation, 2010, 21(4): 637-644.
- [4] 郑燕飞, 花日茂, 操海群. 毒死蜱微生物降解研究进展[J]. 安徽化工, 2008, 34(5): 8-9.
- [5] 吴祥为, 花日茂, 操海群, 等. 毒死蜱降解菌的分离鉴定与降解效能测定[J]. 环境科学学报, 2006, 26(9): 1433-1439.
- [6] 王晓, 楚小强, 虞云龙, 等. 毒死蜱降解菌株 *Bacillus laterosporus* DSP 的降解特性及其功能定位[J]. 土壤学报, 2006, 43(4): 648-654.
- [7] Mallick K, Bharati K, Banerji A, et al. Bacterial degradation of chlorpyrifos in pure cultures and in soil[J]. Bull Environ Contam Toxicol, 1999, 62(1): 48-54.
- [8] Serdar CM, Gibson DT, Munnecke DM, et al. Plasmid involvement in parathion hydrolysis by *Pseudomonas diminuta*[J]. Applied and Environmental Microbiology,

- 1982, 44(1): 246-249.
- [9] Mallick BK, Bharati K, Banerji A, et al. Bacterial degradation of chlorpyrifos in pure cultures and in soil[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 1999, 62(1): 48-54.
- [10] Yang C, Liu N, Guo XM, 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, 2006, 265(1): 118-125.
- [11] Xu GM, Li YY, Zheng W, et al. Mineralization of chlorpyrifos by co-culture of *Serratia* and *Trichosporon* spp. [J]. Biotechnol Lett, 2007, 29(10): 1469-1473.
- [12] Xu GM, Zheng W, Li YY, et al. Biodegradation of chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by a newly isolated *Paracoccus* sp. strain TRP[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2008, 62(1): 51-56.
- [13] 彭香. 呋喃丹降解菌 YM3 的分离鉴定及降解性能研究 [D]. 泰安: 山东农业大学硕士毕业论文, 2008.
- [14] 程池, 杨梅, 李金霞, 等. Biolog 微生物自动分析系统——细菌鉴定操作规程的研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(5): 221.
- [15] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [16] 刘知远, 牛明芬, 李卓坪, 等. 毒死蜱降解菌的筛选及其特性的研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(33): 16200-16203.
- [17] 罗宇焯, 张甲耀, 黄利萍, 等. 正交实验选择嗜碱细菌降解木质素的最优综合培养条件[J]. 环境科学, 2001, 22(5): 95-98.
- [18] Sen R, Swaminathan T. Response surface modeling and optimization to elucidate and analyze the effects of inoculum age and size on surfactin production[J]. Biochemical Engineering Journal, 2004, 21(2): 141-148.
- [19] 熊小真, 赵南. 基于响应面分析法的甲胺磷降解条件优化[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(27): 15026-15028.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。