

微生物降解 3,5,6-三氯-2-吡啶醇的研究进展

曹礼^{1,2*} 徐琳^{1,2}

(1. 河西学院 农业与生物技术学院 甘肃 张掖 734000)

(2. 河西学院 甘肃省河西走廊特色资源利用重点实验室 甘肃 张掖 734000)

摘要: 随着高毒性有机磷杀虫剂的限制和禁止使用,近年来以毒死蜱为代表的低毒性有机磷杀虫剂的市场份额有所增加。然而,毒死蜱的使用也导致了环境中 3,5,6-三氯-2-吡啶醇(TCP)的产生,因为 TCP 是毒死蜱和甲基毒死蜱在环境中降解的主要中间代谢产物。它具有较高的水溶性和迁移性,容易进入深层土壤及水体环境,从而引起广泛的污染。释放到环境中的 TCP 不仅可以抑制 TCP 及其母体化合物毒死蜱和甲基毒死蜱的生物降解,而且也能抑制其他有机污染物的生物降解,从而进一步加重环境中 TCP 以及其他有机污染物的累积残留,影响环境系统的自我修复功能。本文概述了 TCP 及其母体化合物的结构、TCP 的生态毒性、TCP 降解菌的多样性及其微生物降解的最新研究进展,为毒死蜱和 TCP 污染地区进行经济可行的生物修复提供参考。

关键词: 3,5,6-三氯-2-吡啶醇, 毒死蜱, 生物降解, 生物修复

Research progress in microbial degradation of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol

CAO Li^{1,2*} XU Lin^{1,2}

(1. College of Agriculture and Biotechnology, Hexi University, Zhangye, Gansu 734000, China)

(2. Key Laboratory of Hexi Corridor Resources Utilization of Gansu, Hexi University, Zhangye, Gansu 734000, China)

Abstract: Along with the restriction and prohibition of use of highly toxic organophosphorus pesticides, the market share of the low toxic organophosphorus pesticides represented by chlorpyrifos has increased in the recent years. However, the use of chlorpyrifos has led to generation of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP) in the environment, because TCP is the main intermediate metabolite of chlorpyrifos and chlorpyrifos-methyl. It is more water soluble, more mobile in soil and more leachable into groundwater and surface water, which causes widespread contamination in soils and aquatic environment. TCP released into the environment not only inhibits the biodegradation of TCP and its parent compound chlorpyrifos and chlorpyrifos-methyl, but also inhibits the biodegradation of other organic pollutants and therefore further increases the residual of TCP and other organic pollutants. In this article, we summarize the chemical structure of TCP and its parent compound, the ecological

基金项目: 甘肃省高等学校科研资助项目(No. 2014A-108)

*通讯作者: Tel: 86-936-8280648; 信箱: caolicl@126.com

收稿日期: 2014-11-06; 接受日期: 2015-04-13; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-04-15

toxicity of TCP, the diversity of microorganisms capable of degrading TCP, the latest research progress of the biodegradation of TCP, in order to provide the guidance for the economically feasible bioremediation strategy in chlorpyrifos and TCP contaminated area.

Keywords: 3,5,6-Trichloro-2-pyridinol, Chlorpyrifos, Biodegradation, Bioremediation

3,5,6-三氯-2-吡啶醇 (3,5,6-Trichloro-2-pyridinol, TCP) 是杀虫剂毒死蜱和甲基毒死蜱以及除草剂绿草定和绿草定-2-丁氧基乙酯的主要中间代谢产物, 其分布遍及土壤、水体、空气和生物体内^[1-5]。同时, TCP 也是合成上述农药的中间体化合物, 是它们共同的母体结构(图 1)。在这些农药的生产过程中, TCP 也被排放到生产区域附近而污染土壤和水体环境^[6]。

20 世纪 60 年代以来, 许多国家开始禁止或限制使用有机氯农药, 有机磷农药一度成为品种最多、应用最广泛的农药。自 2007 年 1 月起, 我国全面禁止使用和销售甲基对硫磷、甲胺磷、对硫磷、磷胺、久效磷等 5 种高毒有机磷农药。2008 年, 我国选出了以毒死蜱、吡蚜酮等为代表的 5 种高效低毒低残留有机磷杀虫剂作为今后的主导品种, 替代了甲胺磷、对硫磷和久效磷等为代表的 5 种高毒有

机磷农药。然而, 以毒死蜱为代表的这些农药长期和大规模使用, 使得大量残留农药在土壤以及水体中富集。据统计, 2008 年毒死蜱全球销量达 10 万 t, 国内销量为 1.8 万 t, 每年以 10% 增长, 释放到环境中的毒死蜱代谢物 TCP, 估计将达到 6 万 t^[7]。随着毒死蜱需求的增长, 其释放到环境中的 TCP 也不断增加。

1 TCP 的生态毒性

TCP 在不同 pH 值有不同的存在形态。pH 值小于其 pKa (pKa=4.55) 时, 以两性离子形态存在, 如图 2 所示。而在中性 pH 时, TCP 是带有电荷的分子, 具有较高的水溶性和迁移性, 比母体化合物更易淋溶或渗漏到深层土壤及水体环境中^[8], 在低浓度下就能够对水生生物和陆生生物产生中等毒性^[9], 从而对土壤和水体环境带来较大的污染^[10-12]。

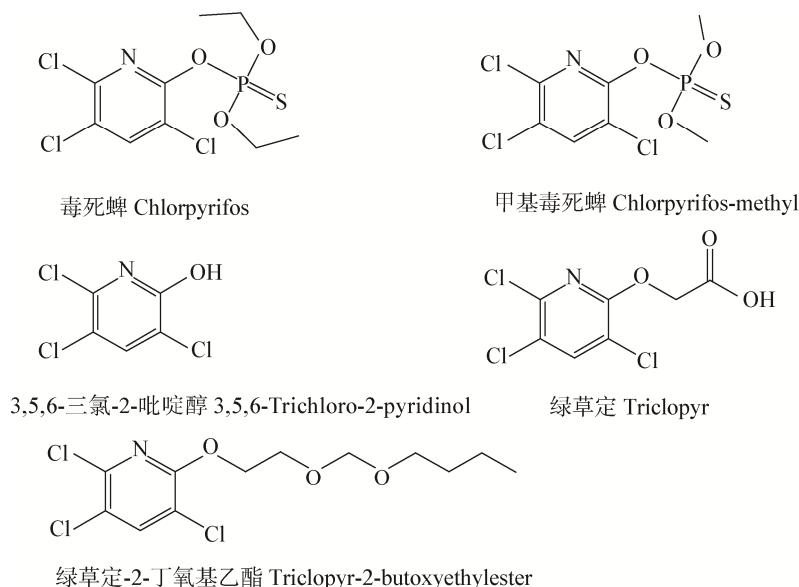


图 1 3,5,6-三氯-2-吡啶醇及其农药母体化合物的结构
Figure 1 Chemical structure of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol and its parent compounds

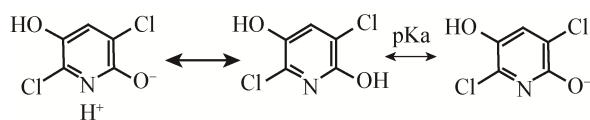


图2 TCP在pH小于pKa时的存在状态

Figure 2 The section of TCP under the condition of pH < pKa

TCP在环境中蓄积后,对环境中的真菌和细菌生长有较强的抑制作用,阻止微生物对TCP和毒死蜱的降解。Baskaran等指出,TCP对环境微生物的毒性比毒死蜱更高,TCP对土壤细菌群落的毒性是毒死蜱的2.5倍^[13]。当TCP的含量超过50 mg/L时会对TCP本身的降解产生抑制作用,同时抑制其他有机化合物的降解,进一步加重环境中TCP以及其他有机污染物的累积残留,影响环境系统自我修复的功能^[14]。

TCP对人体有害,如果被吞咽,能够引起眼部损伤^[9]。Meeker等在研究毒死蜱及其代谢产物对人体的影响时指出,当人体受到毒死蜱的毒害后,它们在人体内代谢产生的TCP会使男性精子的质量下降,同时产生的TCP还会造成体内睾丸激素的下降^[15-16]。Hunter等研究发现,怀孕母鼠肝脏中TCP含量是其胎儿肝脏中TCP的5倍,而胎儿大脑中的TCP含量却是怀孕母鼠肝脏中的2-4倍,说明胎儿的神经系统更容易受到TCP的影响^[17]。

2 降解TCP的微生物

环境中TCP的进一步降解是毒死蜱完全脱毒的关键,因为在毒死蜱的降解过程中,生成的二乙基硫代磷酸酯相对容易发生生物降解,而TCP在环境中较难降解,所以毒死蜱的彻底脱毒取决于TCP的降解。

微生物是TCP降解的主要驱动力。1997年,Feng等首次从环境中筛选到一株有氧条件下能以TCP作为唯一碳源和能源的TCP降解菌株*Pseudomonas* sp. ATCC 700113,70 h可以降解40 mg/L TCP,完全降解100 mg/L的TCP需要3周

时间^[18]。1998年,Robertson等研究毒死蜱在甘蔗田中的降解动态时发现,毒死蜱降解产物TCP的快速降解是土壤微生物作用所致^[19]。目前为止,从不同地域不同环境中分离筛选到TCP降解菌株,部分毒死蜱降解菌能够继续分解TCP为其他产物,如*Bacillus laterosporus* DSP、*Alcaligenes faecalis* DSP3、*Sphingomonas* sp. Dsp-2、*Paracoccus* sp. TRP、*Bacillus pumilus* C2A1、*Synechocystis* sp. PUPCCC 64、*Cupriavidus* sp. DT-1等^[10,20-25]。另外,也有一些仅能降解TCP但是不能降解毒死蜱的菌株被筛选和鉴定。如Racke等对土壤中TCP的降解进行研究,发现微生物能显著提高TCP的降解速率,表明TCP的矿化主要是微生物作用的结果^[26]。Feng等分离出一株有氧条件下能以TCP作为唯一碳源和能源的TCP降解菌株*Pseudomonas* sp. ATCC 700113,后来将该菌株命名为M285,70 h可以降解40 mg/L的TCP^[18]。Li等通过富集培养的方法分离的一株TCP降解菌株*Ralstonia* sp. T6,可以在12 h内降解100 mg/L的TCP^[3]。Cao等分离的菌株*Cupriavidus pauculus* P2对TCP降解速度最快,10 h内可以将100 mg/L的TCP完全降解^[27]。

由于TCP对环境中的真菌和细菌生长有较强的抑制作用^[28],所以目前报道的能矿化TCP的菌株大多降解低浓度的TCP,一般在4-30 d才能完全降解50-100 mg/L的TCP。菌株*Pseudomonas* sp. ATCC 700113能在3周内完全降解100 mg/L的TCP,但是不能降解高于200 mg/L的TCP^[18]。*Burkholderia* sp. KR100在144 h可以完全降解100 mg/L的TCP,但却不能降解高于300 mg/L的TCP^[2]。

也有少量可以耐受或降解高浓度TCP的菌株被报道,如*Alcaligenes faecalis* DSP3在10 d内可以完全降解100 mg/L的TCP,该菌株的生长和降解不受TCP浓度的影响,即使TCP的浓度达到800 mg/L该菌株也能较好生长^[10]。*Ralstonia* sp. T6可以在80 h内完全降解700 mg/L的TCP^[3]。菌株

Cupriavidus pauculus P2 在 70 h 内可以将 800 mg/L 的 TCP 完全降解^[27],这是目前能降解最高起始浓度 TCP 的菌株。

3 TCP 微生物降解途径的研究进展

不同的微生物对 TCP 的降解途径有所差异,归纳起来, TCP 主要有 3 种类型的降解途径。(1) 烷基化反应途径。如图 3A 所示, TCP 经微生物作用生成 3,5,6-三氯-2-甲氧基吡啶(TCMP)或 3,5,6-三氯-2-甲基吡啶(TMP)^[29]。如 Racke 等对土壤中毒死蜱的微生物降解研究表明, 毒死蜱首先水解生成 TCP, 进而降解为 TCMP, 最终矿化为水, 二氧化碳和铵离子^[9]。(2) 还原脱氯途径。如图 3B 所示, 在缺氧或厌氧条件下, TCP 脱掉环结构上的 2 个氯原子生成氯吡啶酚。如菌株 *Bacillus latsprorus* DSP 可将 TCP 还原生成 6-氯-2-吡啶酚, 最后被矿化^[24]。Singh 和 Walke

推测 3-氯-2-吡啶酚是毒死蜱微生物降解的产物之一^[30]。Lu 等在研究菌株 *Cupriavidus* sp. DT-1 降解 TCP 过程中检测到 3 个中间代谢产物, 分别鉴定为 5,6-二氯-2-吡啶醇、6-氯-2-吡啶醇和 2-吡啶醇, 并认为 TCP 降解首先是一个连续还原脱氯的过程, TCP 分子上的 3 个氯原子可以被连续脱去然后生成 2-吡啶醇^[22]。(3) 氧化脱氯途径。如图 3C 所示, Bhuimbar 等研究发现, *Micrococcus* spp.和 *Bacillus* spp.可以将 TCP 转化为二氯二羟基吡啶, 最后产生 3,6-二羟基吡啶-2,5-二酮^[31]。Cao 等将菌株 *Cupriavidus pauculus* P2 在降解 TCP 过程中产生的绿色代谢产物鉴定为 3,6-二羟基吡啶-2,5-二酮^[32]。Li 等发现, 菌株 *Ralstonia* sp. T6 可以将 TCP 降解的绿色中间代谢产物 3,6-二羟基吡啶-2,5-二酮进一步转化为 5-氨基-2,4,5-三羧基戊酸(ATOPA)^[33]。

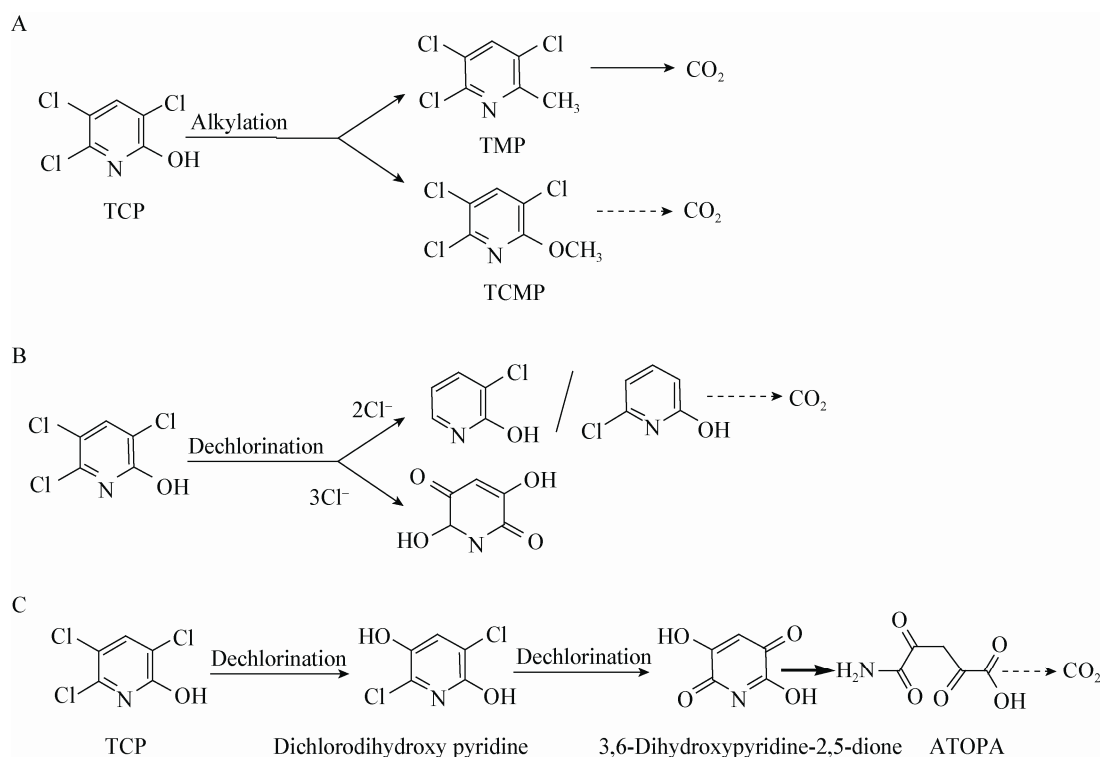


图 3 微生物降解 TCP 的 3 种途径

Figure 3 Three possible pathways for TCP microbial degradation

注: 1: TCP 的烷基化反应; 2: TCP 的还原脱氯途径; 3: TCP 的氧化脱氯途径。

Note: 1: The alkylation pathway of TCP; 2: The reductive dehalogenation of TCP; 3: The oxidative dehalogenation of TCP.

4 TCP 微生物降解基因和酶的研究进展

目前关于毒死蜱降解机制和代谢途径的研究,多数仅集中在毒死蜱到 TCP 这一步转化,而对于 TCP 进一步降解的代谢途径及编码 TCP 降解酶的基因报道不多。2010 年 Math 等从奶牛瘤胃的宏基因组文库中克隆一个长 1 800 bp 的 TCP 降解基因(*tcp3A*),它编码的 TCP 水解酶与 NCBI 数据库中酰胺水解酶的序列相似性最大,为 24%–26%。将该基因连接在表达载体 pET-28a 上,然后转化到 *Escherichia coli*,获得的重组菌株可以降解 TCP^[34],但是在 TCP 降解产物、降解机理及代谢途径方面,并没有进一步的报道。

Cao 等^[32]通过转座子突变的方法建立了菌株 *Cupriavidus pauculus* P2 的突变株文库,从中筛选到 3 株丧失 TCP 降解能力的突变株,通过 SEFA-PCR,分别扩增出突变株中 Tn5 转座子插入位置的上下游序列,将其测序后进行分析和拼接,得到一个包含 5 个基因的基因簇,将基因 *tcpA1* 和 *tcpB1* 异源表达显示,与菌株 *Ralstonia eutropha* JMP134 中 2,4,6-

三氯苯酚的脱氯作用非常相似^[35-36], *TcpA1* 和 *TcpB1* 共同负责 TCP 的脱氯,生成 3,6-二羟基吡啶-2,5-二酮,如图 4 所示。

Li 等从菌株 *Ralstonia* sp. T6 中分别克隆到 2 个与 TCP 降解相关的基因簇 *tcpRXA* 和 *dhpRIJK*,基因簇 *tcpRXA* 编码的产物可以将 TCP 转化为 3,6-二羟基吡啶-2,5-二酮,而基因簇 *dhpRIJK* 编码的产物可以将 3,6-二羟基吡啶-2,5-二酮进一步转化为 5-氨基-2,4,5-三羧基戊酸(ATOPA),并最终被矿化,如图 5 所示^[33]。

5 讨论

随着高效低毒农药在市场中需求量的增加,毒死蜱等的大量使用将导致环境中大量 TCP 的产生。TCP 具有较高的水溶性和迁移性,容易进入深层土壤及水体环境,从而引起广泛的污染。微生物是 TCP 降解的主要驱动力,对 TCP 降解微生物的研究将有助于对 TCP 污染环境的修复。TCP 降解相关的酶及其编码的基因在菌株 *Cupriavidus pauculus* P2^[32]和菌株 *Ralstonia* sp. T6^[33]中被发现,但是,在

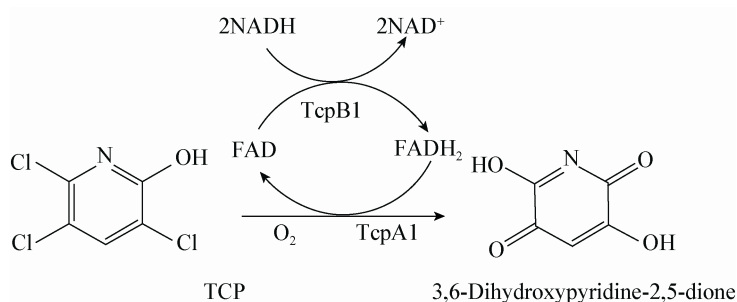


图 4 菌株 P2 中 *TcpA1* 和 *TcpB1* 在 TCP 脱氯反应中的作用

Figure 4 The proposed functions of *TcpA1* and *TcpB1* during TCP dechlorination in *Cupriavidus pauculus* P2

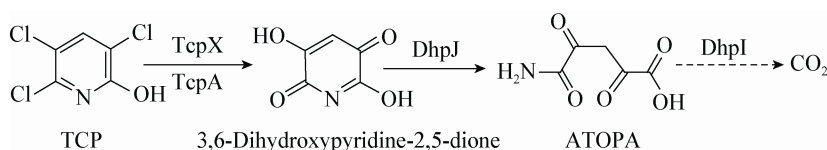


图 5 菌株 T6 中 TCP 的降解途径

Figure 5 Proposed metabolic pathway for TCP in *Ralstonia* sp. T6

这2个菌株将TCP降解为3,6-二羟基吡啶-2,5-二酮的过程中,与Bhuimbar等^[31]的研究不同的是,并没有发现包括1个或2个氯原子的中间代谢产物,其详细的降解机制及降解中所涉及的酶还有待进一步的研究;同时,5-氨基-2,4,5-三羰基戊酸在TCP降解菌株中的进一步代谢有待阐明。

目前,环境中残留农药的微生物降解是环境微生物学领域研究的热点之一,在各种去除污染的措施中,通过微生物对污染环境进行的生物修复因其高效、安全、成本低、无二次污染等优点而具有良好的发展前景。微生物对环境污染物的生物修复作用能否最终实现,不仅依赖于其本身的降解能力,还依赖于农药的性质、环境因子(温度、盐度、pH、氧化还原电位、营养可利用程度)以及降解细菌与土著微生物之间的竞争能力等其他因素。但是,目前对于TCP污染环境的生物修复的研究,大多集中在TCP降解菌株降解特性的研究及其分子降解机制的研究,仍停留在实验室研究阶段。对于将来大规模的污染环境中TCP的生物修复,应通过各种方法和措施优化降解环境,强化降解条件,提高微生物对TCP的降解能力和降解速度,从而更有效地修复污染环境。

目前,菌株*Cupriavidus pauculus* P2的全基因组测序已经完成,随着研究的深入,TCP完整的代谢途径及其降解机制将被阐明,TCP新降解基因的发现、以及降解酶构象和动力学的研究等,将会有新的进展,这将为微生物应用于污染物的实际修复提供理论指导,大大有助于对毒死蜱和TCP的污染产品或地区开展高效而彻底的生物修复工作。

参 考 文 献

- [1] Baglieri A, Nègre M, Trotta F, et al. Organo-clays and nanosponges for aquifer bioremediation: adsorption and degradation of triclopyr[J]. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 2013, 48(9): 784-792
- [2] Kim JR, Ahn YJ. Identification and characterization of chlorpyrifos-methyl and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol degrading *Burkholderia* sp. strain KR100[J]. *Biodegradation*, 2009, 20(4): 487-497
- [3] Li J, Liu J, Shen W, et al. Isolation and characterization of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol-degrading *Ralstonia* sp. strain T6[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(19): 7479-7483
- [4] McMullin RT, Bell FW, Newmaster SG. The effects of triclopyr and glyphosate on lichens[J]. *Forest Ecology and Management*, 2012, 264: 90-97
- [5] Morgan MK, Sheldon LS, Croghan CW, et al. Exposures of preschool children to chlorpyrifos and its degradation product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in their everyday environments[J]. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*, 2005, 15(4): 297-309
- [6] Feng Y, Racke KD, Bollag JM. Use of immobilized bacteria to treat industrial wastewater containing a chlorinated pyridinol[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1997, 47(1): 73-77
- [7] Liang C. The market prospect of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol sodium is worth looking forward to[J]. *Fine Chemical Industrial Raw Materials and Intermediates*, 2009(5): 33-35 (in Chinese)
梁诚. 三氯吡啶醇钠市场前景值得期待[J]. *精细化工原料及中间体*, 2009(5): 33-35
- [8] Manclús JJ, Montoya A. Development of immunoassays for the analysis of chlorpyrifos and its major metabolite 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in the aquatic environment[J]. *Analytica Chimica Acta*, 1995, 311(3): 341-348
- [9] Racke KD. Environmental fate of chlorpyrifos[J]. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 1993, 131: 1-150
- [10] 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
- [11] Ling Y, Wang H, Yong W, et al. The effects of washing and cooking on chlorpyrifos and its toxic metabolites in vegetables[J]. *Food Control*, 2011, 22(1): 54-58
- [12] Zhang Z, Wu ZP. Determination of chlorpyrifos-methyl residues in tomato, hot pepper and eggplant[J]. *Food Science*, 2011, 32(22): 257-259 (in Chinese)
张征, 武中平. 番茄, 辣椒, 茄子中甲基毒死蜱残留量测定[J]. *食品科学*, 2011, 32(22): 257-259
- [13] Baskaran S, Kookana RS, Naidu R. Contrasting behaviour of chlorpyrifos and its primary metabolite, TCP (3,5,6-trichloro-2-pyridinol), with depth in soil profiles[J]. *Soil Research*, 2003, 41(4): 749-760
- [14] Racke KD, Fontaine DD, Yoder RN, et al. Chlorpyrifos degradation in soil at termiticidal application rates[J]. *Pesticide Science*, 1994, 42(1): 43-51
- [15] Meeker JD, Singh NP, Ryan L. Urinary levels of insecticide metabolites and DNA damage in human sperm[J]. *Human Reproduction*, 2004, 19(11): 2573-2580
- [16] Meeker JD, Barr DB, Hauser R. Thyroid hormones in relation to urinary metabolites of non-persistent insecticides in men of reproductive age[J]. *Reproductive Toxicology*, 2006, 22(3): 437-442
- [17] Hunter DL, Lassiter TL, Padilla S. Gestational exposure to chlorpyrifos: comparative distribution of trichloropyridinol in the fetus and dam[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1999, 158(1): 16-23
- [18] Feng Y, Racke KD, Bollag J. Isolation and characterization of a chlorinated-pyridinol-degrading bacterium[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(10): 4096-4098
- [19] Robertson LN, Chandler KJ, Stickley BDA, et al. Enhanced

- microbial degradation implicated in rapid loss of chlorpyrifos from the controlled-release formulation suSCon® Blue in soil[J]. Crop Protection, 1998, 17(1): 29-33
- [20] Anwar S, Liaquat F, Khan QM, et al. Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by *Bacillus pumilus* strain C2A1[J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 168(1): 400-405
- [21] Li X, He J, Li S. Isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium, *Sphingomonas* sp. strain Dsp-2, and cloning of the *mpd* gene[J]. Research in Microbiology, 2007, 158(2): 143-149
- [22] Lu P, Li Q, Liu H, et al. Biodegradation of chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by *Cupriavidus* sp. DT-1[J]. Bioresource Technology, 2013, 127: 337-342
- [23] Singh DP, Khattar JIS, Nadda J, et al. Chlorpyrifos degradation by the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PUPCCC 64[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2011, 18(8): 1351-1359
- [24] Wang X, Chu XQ, Yu YL, et al. Characteristics and function of *Bacillus latesporus* DSP in degrading chlorpyrifos[J]. Acta Pedologica Sinica, 2006, 43(4): 648-654 (in Chinese)
王晓, 楚小强, 虞云龙, 等. 毒死蜱降解菌株 *Bacillus latesporus* DSP 的降解特性及其功能定位[J]. 土壤学报, 2006, 43(4): 648-654
- [25] Xu G, Zheng W, Li Y, 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
- [26] Racke KD, Robbins ST. Factors affecting the degradation of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in soil[A]//Pesticide Transformation Products: Fate and Significance in the Environment[M]. Washington, DC: American Chemical Society, 1991: 92-107
- [27] Cao L, Liu H, Zhang H, et al. Characterization of a newly isolated highly effective 3,5,6-trichloro-2-pyridinol degrading strain *Cupriavidus pauculus* P2[J]. Current Microbiology, 2012, 65(3): 231-236
- [28] Racke KD, Fontaine DD, Yoder RN, et al. Chlorpyrifos degradation in soil at termiticidal application rates[J]. Pesticide Science, 1994, 42(1): 43-51
- [29] Wu CY, Chen N, Li QF, et al. Research progress in chlorpyrifos degrading microorganisms and biodegrading mechanisms[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2011, 32(10): 1989-1994 (in Chinese)
武春媛, 陈楠, 李勤奋, 等. 毒死蜱降解菌及其降解机理研究进展[J]. 热带作物学报, 2011, 32(10): 1989-1994
- [30] Singh BK, Walker A. Microbial degradation of organophosphorus compounds[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2006, 30(3): 428-471
- [31] Bhuimar MV, Kulkarni AN, Ghosh JS. Detoxification of chlorpyrifos by *Micrococcus luteus* NCIM 2103, *Bacillus subtilis* NCIM 2010 and *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 2036[J]. Research Journal of Environmental and Earth Sciences, 2011, 3(5): 614-619
- [32] Cao L, Xu J, Wu G, et al. Identification of two combined genes responsible for dechlorination of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP) in *Cupriavidus pauculus* P2[J]. Journal of Hazardous Materials, 2013, 260: 700-706
- [33] Li J, Huang Y, Hou Y, et al. Novel gene clusters and metabolic pathway involved in 3,5,6-trichloro-2-pyridinol degradation by *Ralstonia* sp. strain T6[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(23): 7445-7453
- [34] Math RK, Islam SMA, Cho KM, et al. Isolation of a novel gene encoding a 3,5,6-trichloro-2-pyridinol degrading enzyme from a cow rumen metagenomic library[J]. Biodegradation, 2010, 21(4): 565-573
- [35] Belchik SM, Xun L. Functions of flavin reductase and quinone reductase in 2,4,6-trichlorophenol degradation by *Cupriavidus necator* JMP134[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(5): 1615-1619
- [36] Xun L, Webster CM. A monooxygenase catalyzes sequential dechlorinations of 2,4,6-trichlorophenol by oxidative and hydrolytic reactions[J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(8): 6696-6700