

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2013.02.006

联苯菊酯降解菌株 BF-3 的分离筛选、鉴定和降解特性

宋凤琴^{1,2}, 胡桂萍^{1,2}, 赵艳^{1,2}, 尤民生^{1,2*}¹福建农林大学应用生态研究所; ²农业部闽台作物有害生物综合治理重点实验室, 福建福州 350002

摘要:【背景】联苯菊酯是人工合成的类似天然除虫菊素的一种仿生杀虫剂, 近年来被广泛应用于农业病虫害的防治。联苯菊酯化学性质较稳定, 在环境中的残留期长, 是我国出口果蔬、茶叶中残留较严重的农药之一。微生物降解具有降解速度快、无二次污染等优点, 被认为是有效去除农药残留的绿色生产技术。【方法】通过富集驯化, 从农药厂排污口的污泥中筛选分离能够降解联苯菊酯的菌株, 经形态学观察、生理生化特性测定及 16S rRNA 序列分析对其进行鉴定, 通过单因素试验对菌株的降解特性进行研究。【结果】分离到 1 株联苯菊酯的降解菌株 BF-3。菌株 BF-3 为革兰氏阳性菌, 被鉴定为蜡状芽孢杆菌; 该菌株在联苯菊酯质量浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的无机盐液体培养基 (MSM) 中呈现 S 型生长, 7 d 后对联苯菊酯的降解率达到 87.9%。单因素试验表明, 菌株最适降解条件为 pH 7.0、30 °C, 初始菌株 $D_{600 \text{ nm}} = 1.0$ 。【结论与意义】蜡状芽孢杆菌 BF-3 能够有效降解联苯菊酯, 在环境中联苯菊酯残留的生物修复方面具有应用潜力。

关键词: 联苯菊酯; 降解菌; 鉴定; 生物修复

Isolation, identification and degradation characteristics of a bifenthrin-degrading bacterial strain BF-3

Feng-qin SONG^{1,2}, Gui-ping HU^{1,2}, Yan ZHAO^{1,2}, Min-sheng YOU^{1,2*}¹Institute of Applied Ecology, Fujian Agriculture and Forestry University; ²Key Laboratory of Integrated Pest Management for Fujian-Taiwan Crops, Ministry of Agriculture, Fuzhou, Fujian 350002, China

Abstract:【Background】Bifenthrin is a synthetic organic compound similar to natural pyrethrins, and has been widely applied against agricultural pest during the last decades. Due to its relative stability and long residual life in the environment, its residues have become a serious problem in export fruits, vegetables and tea microbial degradation, due to its speed and environmental safety could be an effective way to deal with the pesticide residues. 【Method】The bacterial strain capable of degrading bifenthrin was isolated from sludge through the enriched culture. It was identified through its morphological, physiological and 16S rDNA sequence analysis. Its degradation characteristics was studied by using single factor tests. 【Result】A bacterial strain BF-3, capable of degrading bifenthrin, was isolated. We identified and characterised a Gram-positive bacterial strain BF-3, belonging to *Bacillus cereus* genus. The strain showed S growth in minimum salts medium (MSM) containing $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ bifenthrin, and after 7 days, the bifenthrin-degradation reached 87.9%. The single factor tests indicated that the optimal values for pH, temperature and initial inoculum density was pH 7.0, 30 °C and $D_{600 \text{ nm}} = 1.0$, respectively. 【Conclusion and significance】The identified strain BF-3 could efficiently degrade bifenthrin, suggesting its great application potential to eliminate bifenthrin residues in the environment.

Key words: bifenthrin; degrading bacterium; identification; bioremediation

联苯菊酯 (bifenthrin) 是人工合成的一种拟除虫菊酯杀虫剂, 广泛应用于棉花、茶树、果树、蔬菜等农业害虫及白蚁、螨虫等卫生害虫的防治 (Guan et al., 2011)。拟除虫菊酯虽然对作物安全, 但是对

人、畜有中等毒性, 对水生物、蜜蜂、家蚕高毒 (王朝晖等, 2000)。联苯菊酯对光、热稳定, 进入环境中不易被分解 (Laskowski, 2002), 其广泛使用引发了大量的残留, 给人们的健康造成了巨大的威胁

收稿日期 (Received): 2013-04-01 **接受日期 (Accepted):** 2013-05-10**基金项目:** 国际科技合作项目 (2010DFB33030); “973”重点项目 (2011CB100404); 国家自然科学基金 (30570309, 30871649)**作者简介:** 宋凤琴, 女, 硕士研究生。研究方向: 微生物修复。E-mail: songfengqin.2008@163.com*** 通讯作者 (Author for correspondence):** E-mail: msyou@fjau.edu.cn

(Hintzen *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2009)。世界卫生组织(WHO, 2009)已经将联苯菊酯归为第2类农药,即中等毒性/中度危害的类别。在农药的生物降解过程中,具有多样性代谢酶的微生物起关键作用(Singh, 2009)。研究表明,水中或土壤中的联苯菊酯可通过微生物的作用而被分解(Lee *et al.*, 2004)。微生物降解在消除自然环境中联苯菊酯及其他拟除虫菊酯类杀虫剂残留方面具有安全、经济、高效等特点,被认为是治理环境农药污染的一种有效的生物修复途径(王兆守和李顺鹏,2005; Singh & Walker, 2006)。

目前,我国已有大量关于氯氰菊酯、氰戊菊酯、甲氰菊酯等拟除虫菊酯农药降解菌的报道,筛选到的降解菌主要有芽孢杆菌属 *Bacillus*、假单胞菌属 *Pseudomonas*、鞘氨醇单胞菌属 *Sphingomonas*、肠杆菌属 *Enterobacter*、无色杆菌属 *Achromobacter*、克雷伯氏菌属 *Klebsiella*、沙雷菌属 *Serratia*、气单胞菌属 *Aeromonas*、产碱菌属 *Alcaligenes*、曲霉属 *Aspergillus*、木霉菌属 *Trichoderma*、白腐菌 *Phanerochaete*、链霉菌属 *Streptomyces*、红球菌属 *Rhodococcus* 等(冯海燕和崔志峰,2011)。而有关联苯菊酯降解菌分离鉴定的报道较少(Wang *et al.*, 2009),已知的联苯菊酯降解菌主要有假单胞菌(赵宇蕾等,2009)、角膜假丝酵母 *Candida pelliculosa* Salesa (Chen *et al.*, 2012)、醋酸钙不动杆菌 *Acinetobacter calcoaceticus* Salesa(刘婷婷等,2012)、戴尔福特菌 *Delftia acidovorans* den Dooren de Jong(景岳龙等,2010)。本研究拟筛选能有效降解联苯菊酯的菌株,并通过形态学观察、生理生化特性测定和分子序列分析对其进行鉴定,同时采用单因素试验优化其最佳降解条件,为开展环境中联苯菊酯污染的生物修复工作奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品与试剂

污泥取自福建省江阴农药厂排污口。联苯菊酯原药(96%)购自福建省科丰农药有限公司;tween-80购自上海生工生物工程有限公司,丙酮、石油醚30-60、无水硫酸钠、琼脂粉等均购自上海国药试剂公司,均为分析纯。

联苯菊酯储备液:称取联苯菊酯原药2.61 g溶于30 mL丙酮,按农药质量1.5倍的比例加入

tween-80,用丙酮定容至50 mL,经0.45 μm微滤膜过滤,获得50 g·L⁻¹联苯菊酯储备液,使用时按需要量加入灭菌后的培养基中。

富集培养基(Zhang *et al.*, 2010):5 g蛋白胨,5 g酵母提取物,1.0 g K₂HPO₄,1 g葡萄糖,加蒸馏水定容到1 L, pH 7.0。

基础无机盐培养基(Chen *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011):1.5 g Na₂HPO₄·12H₂O, 1.5 g KH₂PO₄, 1 g NH₄NO₃, 0.2 g MgSO₄·7H₂O, 0.01 g CaCl₂·2H₂O, 0.001 g FeSO₄·7H₂O, 0.05 g酵母提取物,加蒸馏水定容至1 L, pH 7.0。

LB培养基(Sambrook & Fritsch, 1989):10 g蛋白胨,5 g酵母提取物,10 g NaCl,加水定容至1 L, pH 7.0。配制相应的固体培养基需加入1.5%琼脂。

1.2 方法

1.2.1 联苯菊酯降解菌的分离、富集与筛选 取5 g污泥于100 mL含50 mg·L⁻¹联苯菊酯的富集培养基中,30 °C、170 r·min⁻¹振荡培养4 d。再取富集培养液的上清液10 mL加入100 mL含100 mg·L⁻¹联苯菊酯的基础培养基中,30 °C、170 r·min⁻¹振荡培养7 d。然后取10 mL培养上清液接入质量浓度为200 mg·L⁻¹的联苯菊酯基础培养基中,培养方法同上,培养7 d。按上述培养方法以100 mg·L⁻¹的梯度依次提高培养基中联苯菊酯的浓度直到800 mg·L⁻¹。将最终驯化得到的培养液经过梯度稀释后涂布于含100 mg·L⁻¹联苯菊酯的基础培养基上。挑取生长旺盛的单菌落进行纯化,将纯化后的菌株保存在含15%甘油的LB培养基中,并置于-80 °C冰箱内。

1.2.2 降解菌的鉴定 (1) 形态特征及生理生化特性。将分离纯化得到的降解菌采用平板涂布法接种于固体LB培养基上,30 °C培养16 h后,用光学显微镜和电子显微镜观察菌体形态(岳东,2008)。根据菌株的革兰氏染色结果、个体形态、菌落特征和生理生化反应特性对菌株进行初步鉴定(东秀珠和蔡妙英,2001)。

(2) 16S rRNA基因序列分析(Sambrook & Russell, 2002)和系统发育树构建。细菌总DNA的提取参照Murmur (1961)。以总DNA为模板,用细菌16S rRNA基因通用引物P0(5'-GAGAGTTGATCCTGGCTCAG-3')和P6(5'-CATCGGCTACCTTGTACGA-3')进行扩

增。PCR 扩增反应体系:引物 P0 ($10 \text{ pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) $1 \mu\text{L}$, 引物 P6 ($10 \text{ pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) $1 \mu\text{L}$, DNA 模版 $1 \mu\text{L}$, *Taq* PCR Mastermix(天根生化科技有限公司) $12.5 \mu\text{L}$ ($2 \times$), ddH₂O 补足总体积至 $25 \mu\text{L}$ 。PCR 反应程序: 94°C 5 min ; 94°C 30 s , 55°C 30 s , 72°C 90 s , 30 个循环; 72°C 10 min 。PCR 产物送往上海生工生物工程有限公司测序。将所得序列提交 GenBank 进行 BLAST 比对, 下载相似性大于 95% 的模式菌株的序列, 通过 MEGA 5 软件, 用 Maximum Composite Likelihood 模型计算遗传距离, Neighbour-Joining 法构建发育树、计算 Bootstrap 值评估置信度, 重复数设为 1000。

1.2.3 种子液的制备 将菌株用 LB 平板活化后, 挑取单克隆接种于含 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 联苯菊酯的 LB 液体摇瓶中, 30°C , $170 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养至对数期, 测定菌液的 $D_{600 \text{ nm}}$, 5000 g 离心 5 min , 收集菌体。用基础培养基洗涤细胞 3 次, 根据实际测得的 $D_{600 \text{ nm}}$ 进行换算, 用不多于 20 mL 的基础培养基重悬菌体, 获得高浓度种子液。下文所示 $D_{600 \text{ nm}}$ 均为换算后所得。

1.2.4 降解菌生长和降解情况的测定 将纯化后的降解菌接种于 100 mL 含 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 联苯菊酯的基础培养基中, 使初始菌液的 $D_{600 \text{ nm}} = 1.0$, 设置 3 个平行, 以含相同浓度无菌液的基础培养基作为对照。于 30°C , $170 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养, 从 0 d 开始每隔 24 h 取样, 连续取 6 d , 用 UV9100 可见 / 紫外分光光度计测定菌悬液的 $D_{600 \text{ nm}}$ 。同时, 取 1 mL 培养液依次用 2 、 2 、 1 mL 石油醚萃取 3 次, 收集的有机相经无水硫酸钠脱水后, 过 $0.45 \mu\text{L}$ 滤膜于 GC 小瓶中。经气相色谱检测, 并绘制降解菌的生长曲线和降解曲线。

气相色谱检测条件(景岳龙等, 2010): Agilent 6890GC 气相色谱仪, 带 ECD 检测器, HP-5 色谱柱 ($30 \text{ mm} \times 0.32 \text{ mm} \times 0.25 \mu\text{m}$), 进样口温度 250°C ; 柱温(程序升温): 160°C 保留 5 min , $10 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升至 200°C , 保留 1 min , $10 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升至 280°C , 保留 8 min 。ECD 检测器温度 320°C , 载气 N₂, 流速 $36 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样量 $1 \mu\text{L}$ 。

联苯菊酯降解率(%) = [1 - (实测残量 / 对照实测残量)] × 100(姜岩等, 2012)。

1.2.5 培养条件对 BF-3 降解效能的影响 将种子液接入含 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 联苯菊酯的基础培养基中, 在不同培养条件(温度、pH、接种量)下 $170 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 7 d , 测定降解率。每个处理设置 3 个平行, 并以不接菌的农药培养基为空白对照。

(1) pH: 调节 pH 分别为 2 、 5 、 6 、 7 、 8 、 10 , 培养基菌液的初始 $D_{600 \text{ nm}} = 1.0$, 30°C 摆床培养。

(2) 接种量: 调节 pH 为 7 , 往 100 mL 的基础培养基摇瓶中分别添加高浓度种子液($D_{600 \text{ nm}} = 20$) $500 \mu\text{L}$ 、 2.5 mL 、 5 mL 、 10 mL 、 15 mL (添加大于 2 mL 的种子液之前需将其离心浓缩), 使培养基内的 $D_{600 \text{ nm}}$ 分别为 0.1 、 0.3 、 0.5 、 1.0 、 2.0 , 30°C 摆床培养。

(3) 温度: 调节 pH 为 7 , 培养基菌液的初始 $D_{600 \text{ nm}} = 1.0$, 分别在 10 、 20 、 25 、 30 、 35 、 40°C 摆床培养。

2 结果与分析

2.1 联苯菊酯降解菌的筛选

从农药厂排污口取样的活性污泥, 经富集驯化, 分离得到多株对联苯菊酯具有降解能力的菌株, 根据在含联苯菊酯的基础培养基平板上的生长情况, 从中选出降解能力较强的菌株 BF-3。

2.2 菌株 BF-3 的形态特征及生理生化特性

BF-3 在固体 LB 培养基平板上 30°C 下培养 24 h 后, 菌落颜色为白色, 圆形, 表面粗糙、稍有光泽, 易挑起(图 1)。

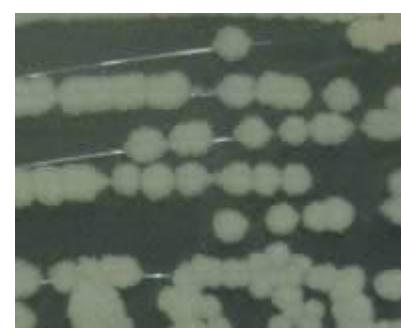


图 1 BF-3 在 LB 培养基上的菌落形态

Fig. 1 Colony morphology of strain BF-3 on LB culture medium

菌体形态如图 2 所示, 细胞短杆状、无鞭毛, 长约 $2 \mu\text{m}$, 宽约 $0.8 \mu\text{m}$ 。该菌株为革兰氏阳性菌, 可利用阿拉伯糖和水解明胶, 能还原硝酸盐, 但尿素酶为阴性。

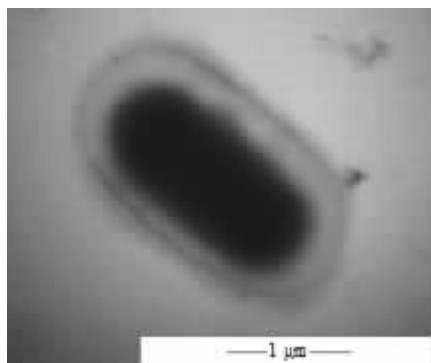


图 2 BF-3 的电镜照片 (25000 ×)

Fig. 2 Electronic microscopy photograph of strain BF-3 (25000 ×)

2.3 菌株 BF-3 的分子鉴定及系统进化树

经 PCR 扩增, 菌株 BF-3 的 16S rRNA 片段长约 1.5 kb(图 3)。构建的系统进化树(图 4)表明, 菌株 BF-3 与蜡状芽孢杆菌 *Bacillus cereus* Frankland 的 16S rRNA 相似性高达 100%。

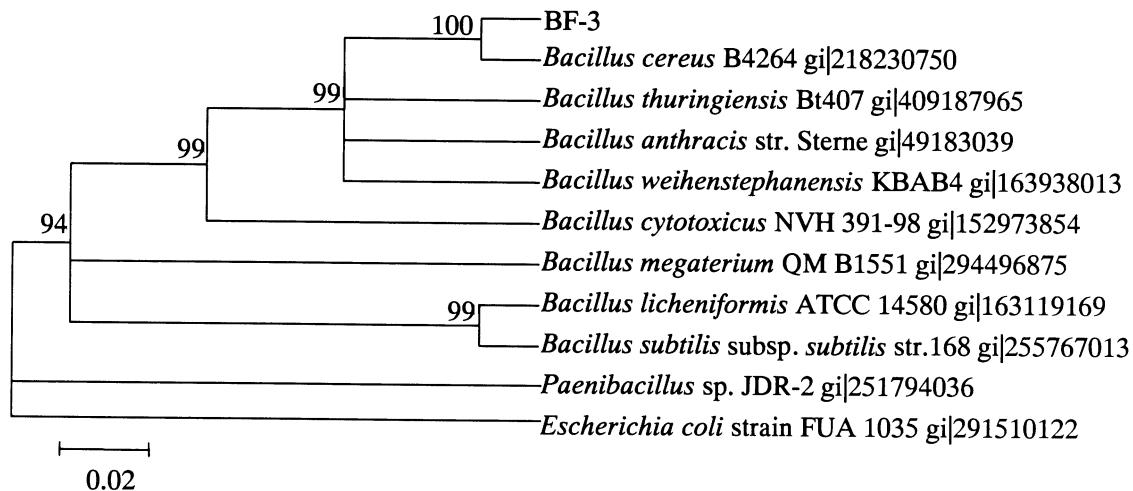


图 4 菌株 BF-3 的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of strain BF-3

2.4 降解菌 BF-3 的生长曲线和降解曲线

降解菌 BF-3 的生长曲线和降解曲线见图 5。菌株在含联苯菊酯的基础培养基中显现 S 型生长曲线。其中, 0 ~ 2 d 菌株生长平缓, 培养基中联苯菊酯的质量浓度从 $98 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 减少到 $55 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 降解率为 66.5%; 2 ~ 5 d 菌株生长迅速, 第 5 天时菌体浓度达到最大($D_{600 \text{ nm}} = 1.14$), 培养基中联苯菊酯的质量浓度从 $55 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 减少到 $29.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 降解率为 46.5%; 5 d 后菌株生长变慢, $D_{600 \text{ nm}}$ 保持在 1.0 左右, 但培养基中联苯菊酯的质量浓度从 $29.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 迅速下降至 $12.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 降解率达到 58.8%。

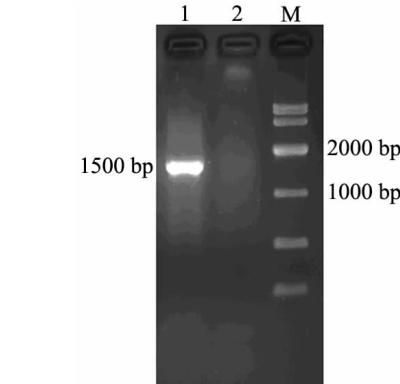


图 3 菌株 BF-3 16S rRNA 基因扩增电泳图

Fig. 3 Electrophoresis profile of 16S rRNA gene

PCR products of the isolate BF-3

1: 菌株 BF-3 16S rRNA 基因扩增产物;

2: 空白对照; M: DL10000 (Takara)。

1: 16S rRNA gene PCR products of the isolate BF-3;

2: Control; M: DL1000 (Takara).

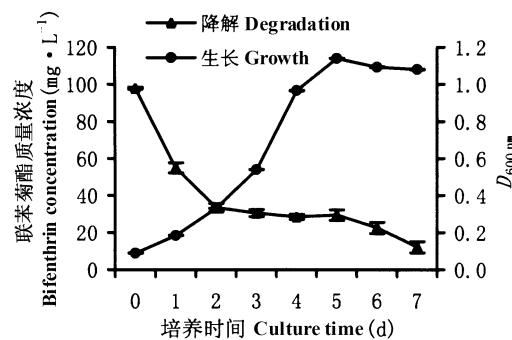


图 5 菌株 BF-3 的生长曲线与联苯菊酯降解曲线

Fig. 5 The curve of growth and bifenthrin degradation of strain BF-3

2.5 降解菌BF-3的降解特性

2.5.1 pH对降解效果的影响 pH为6~8时, BF-3对联苯菊酯的降解活性较高, 当pH=7时, 降解率最高, 达57.9%; 之后随pH的升高, 降解率逐渐降低(图6A)。过酸或过碱基本没有降解效果, 可能是因为其抑制了降解酶的降解活性。

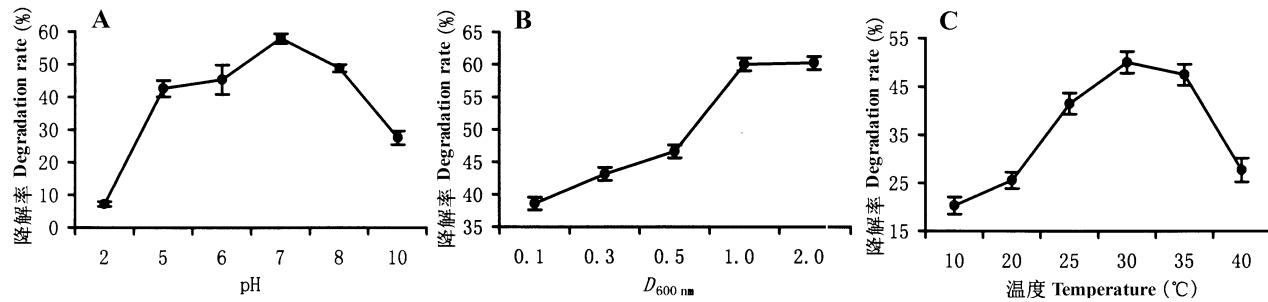


图6 培养条件对BF-3降解联苯菊酯的影响

Fig. 6 Effects of culture conditions on bifenitrin-degradation by strain BF-3

2.5.3 温度对降解效果的影响 由图6C可知, 降解率随培养温度的增大先升高后降低, 当培养温度为30℃时, 降解率最高, 达50.1%, 说明菌株BF-3对联苯菊酯的最佳降解温度为30℃。

3 讨论

本研究利用富集驯化的方法, 从农药厂排污口的污泥中, 以含联苯菊酯的培养基进行摇瓶培养, 筛选得到1株能够高效降解联苯菊酯的细菌。根据其形态特征、生理生化特性和16S rRNA基因序列分析结果, 将该菌株鉴定为蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*), 命名为BF-3。蜡状芽孢杆菌有较强的异生物质耐受性, 能在相对恶劣的环境中存活。已有研究表明, 蜡状芽孢杆菌对氯氰菊酯有降解作用(曲杰等, 2011); 但其对联苯菊酯的降解则为我国首次报道。本研究所筛选的菌株将为解决在相对恶劣环境中联苯菊酯的生物修复问题提供有利资源。

在利用微生物进行农药的生物修复中, 温度和pH是2个非常重要的影响因素(Singh et al., 2006)。从菌株降解特性的研究结果可知, 菌株BF-3在较宽的温度范围(25~35℃)及pH范围(6~8)内对联苯菊酯均有较理想的降解效果。这对菌株在多变的环境中发挥生物修复功能具有重要意义(Singh et al., 2006)。本研究所得到的最佳接种量偏高, 可能是由于菌株对联苯菊酯起降解作用的关键因子是在菌体达到稳定生长时产生的某种或某类水解酶。今后可以进一步通过挖掘菌株降解联苯

2.5.2 接种量对降解效果的影响 在 $D_{600\text{ nm}} = 1.0$ 之前, 降解率随 $D_{600\text{ nm}}$ 的增大而升高, 当 $D_{600\text{ nm}} = 1.0$ 时, 降解率最高, 达60%; 之后, 随着 $D_{600\text{ nm}}$ 的升高, 降解率则趋于平缓(图6B)。这说明该降解菌最适初始菌体的 $D_{600\text{ nm}} = 1.0$ 。

菊酯的关键作用酶来解决联苯菊酯在环境中的残留问题。

参考文献

- 东秀珠, 蔡妙英. 2001. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社.
- 冯海燕, 崔志峰. 2011. 微生物降解拟除虫菊酯类农药残留的研究进展. 环境污染与防治, 33(8): 87~91.
- 姜岩, 刘艳, 王晓萍. 2012. 氯嘧磺隆降解菌的分离鉴定及其降解特性. 中国农学通报, 28(12): 88~92.
- 景岳龙, 朱凤晓, 王军玲, 呼世斌, 秦宝福, 张磊. 2010. 联苯菊酯降解菌的筛选、鉴定及其降解特性. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 38(10): 98~102.
- 刘婷婷, 董昆明, 缪莉, 周晓见, 斯翠丽, 姜薇, 封克. 2012. 联苯菊酯降解菌的筛选、鉴定及降解特性研究. 农业环境科学学报, 31(6): 1147~1152.
- 曲杰, 王海胜, 史延华, 李康, 王圣惠, 闫艳春. 2011. 氯氰菊酯降解菌株L12的分离鉴定及降解特性. 微生物学报, 54(4): 510~517.
- 王朝晖, 尹伟, 林小涛, 骆育敏, 林秋奇, 许忠能. 2000. 拟除虫菊酯农药对水生态系统的生态毒理学研究综述. 暨南大学学报: 自然科学与医学版, 21(3): 123~127.
- 王兆守, 李顺鹏. 2005. 拟除虫菊酯类农药微生物降解研究进展. 土壤, 37(6): 577~580.
- 岳东. 2008. 辛基酚聚氧乙烯醚的微生物降解研究. 上海: 上海交通大学.
- 赵宇蕾, 呼世斌, 秦宝福, 许炳云, 余磊. 2009. 联苯菊酯降解菌的筛选及降解特性研究. 西北农业学报, 18(3): 273

- 276.

Chen S H, Luo J J, Hu M Y, Geng P and Zhang Y B. 2012.

Microbial detoxification of bifenthrin by a novel yeast and its potential for contaminated soils treatment. *PLoS ONE*, 7: 1 - 13.

Guan Y Q, Chen J M, Tang J H, Yang L and Liu J M. 2011.

Immobilizing bifenthrin on wood for termite control. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65: 389 - 395.

Hintzen E P, Lydy M J and Belden J B. 2009. Occurrence and potential toxicity of pyrethroids and other insecticides in bed sediments of urban streams in central Texas. *Environmental Pollution*, 157: 110 - 116.

Laskowski D A. 2002. Physical and chemical properties of pyrethroids // *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. New York: Springer, 49 - 170.

Lee S, Gan J Y, Kim J S, Kabashima J N and Crowley D E. 2004. Microbial transformation of pyrethroid insecticides in aqueous and sediment phases. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23: 1 - 6.

Liu J, Yang Y, Yang Y, Zhang Y and Liu W P. 2011. Disrupting effects of bifenthrin on ovulatory gene expression and prostaglandin synthesis in rat ovarian granulosa cells. *Toxicology*, 282: 47 - 55.

Murmur J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribo-nucleic acid from microorganisms. *Molecular Biology*, 3: 208.

Sambrook J and Fritsch E F. 1989. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sambrook J and Russell D W. 2002. *The Condensed Protocol*

from *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Beijing: Science Press.

Singh B K. 2009. Organophosphorus-degrading bacteria: ecology and industrial applications. *Nature Reviews Microbiology*, 7: 156 - 163.

Singh B K and Walker A. 2006. Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiology Reviews*, 30: 428 - 471.

Singh B K, Walker A, Denis J and Wight D J. 2006. Bioremedial potential of fenamiphos and chlorpyrifos degrading isolates: influence of different environmental conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 2682 - 2693.

Wang B Z, Ma Y, Zhou W Y, Zheng J W, Zhu J C, He J and Li S P. 2011. Biodegradation of synthetic pyrethroids by *Ochrobactrum tritici* strain pyd-1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27: 2315 - 2324.

Wang C, Chen F, Zhang Q and Fang Z. 2009. Chronic toxicity and cytotoxicity of synthetic pyrethroid insecticide cis-bifenthrin. *Environmental Science & Technology*, 21: 1710 - 1715.

World Health Organization (WHO). 2009. *The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2009*. Geneva: WHO.

Zhang C, Jia L, Wang S H, Qu J, Li K, Xu L L, Shi Y H and Yan Y C. 2010. Biodegradation of beta-cypermethrin by two *Serratia* spp. with different cell surface hydrophobicity. *Bioresource Technology*, 101: 3423 - 3429.

(责任编辑:杨郁霞)

