

克百威降解菌株 HQ-C-01 的筛选及培养基优化

乔润香, 钟国华, 罗建军, 刘承兰, 胡美英

(华南农业大学 昆虫毒理研究室, 广东 广州 510642)

摘要:以涂布法和富集培养法筛选得到降解菌株 HQ-C-01, 该菌株在 48 h 时对 50 mg/L 克百威、甲萘威、茚虫威和仲丁威的降解率分别可达 95.2%、99.0%、85.0% 和 67.5%。确定菌株 HQ-C-01 的 C、N、P 源化合物为葡萄糖、蛋白胨和磷酸氢二钾, 采用中心组分设计法确定了菌株 HQ-C-01 的培养基最适 C、N、P 源配比为葡萄糖 32.10 g/L、蛋白胨 3.25 g/L、磷酸氢二钾 1.50 g/L; 在最佳培养基条件下, $D_{590\text{ nm}}$ 实测值为 0.786 5, 与期望值 0.805 4 接近, 48 h 时对 50 mg/L 克百威降解率为 95.9%。

关键词:克百威; 高效降解菌; 筛选; 培养基优化

中图分类号: S154.39; X509

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2009)03-0027-05

Screening of Carbofuran Degrading Fungi Strain HQ-C-01 and Its Medium Optimization

QIAO Run-xiang, ZHONG Guo-hua, LUO Jian-jun, LIU Cheng-lan, HU Mei-ying

(Laboratory of Insect Toxicology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: A high effective strain named HQ-C-01 was screened, which the degrading rates for 50 mg/L carbofuran, carbaryl, indoxacarb and fenobucarb after treatment in 48 h were 95.2%, 99.0%, 85.0% and 67.5% respectively. It was found that the compounds for C, N and P were glucose, peptone and potassium phosphate dibasic. By using the central composite rotary design method, the results indicated that the optimum of C, N and P were 32.10 g/L for glucose, 3.25 g/L for peptone and 1.50 g/L for potassium phosphate dibasic respectively. The measured value of $D_{590\text{ nm}}$ was 0.786 5 similarly to the expected value, and the degrading rate of 50 mg/L carbofuran was 95.9% after 48 h by the strain incubation in medium optimization.

Key words: carbofuran; high degrading ability strain; screening; medium optimization

氨基甲酸酯类农药具有高效、广谱的特点, 是目前应用于粮食、蔬菜、水果及经济作物害虫防治中最重要的农药种类之一。随着此类农药使用范围的不断扩大, 不科学使用的情况时有发生, 对食品、土壤及环境水造成了不同程度的污染^[1-4]。国际上规定单种氨基甲酸酯农药在谷物中的最高残留量(MRL)为 0.02~7.00 mg/kg, 饮用水中的 MRL 是 0.1 $\mu\text{g/L}$ ^[5]。克百威(Carbofuran)作为氨基甲酸酯类的代表性农药, 应用量大, 但其毒性较高, 原药大鼠经口 LD_{50} 为 8~14 mg/kg, 属高毒杀虫剂, 易被淋溶而直接进入

环境, 致使环境污染严重^[6-7], 且其代谢产物具有更强的抗胆碱酯酶能力^[3,4], 还可在体内积累, 造成二次中毒^[5]。因此, 有效控制以克百威为代表的氨基甲酸酯类农药在农产品中的残留, 缓解环境污染压力, 具有重要意义。近年来国内外对克百威微生物降解的研究报道渐多^[8-11], 为克百威残留问题的解决提供了一些解决途径。本文筛选得到克百威降解菌株 HQ-C-01, 优化了其培养基, 旨在为该菌将来的实际应用提供基础资料。

收稿日期: 2008-11-04

作者简介: 乔润香(1982—), 女, 硕士研究生; 通讯作者: 胡美英(1954—), 女, 教授, E-mail: humy@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(30871660)

1 材料与方法

1.1 供试菌种、主要试剂和仪器

分别从广东、安徽、贵州、山东、山西、河北、辽宁等地采集土样,编号,4℃冰箱保存备用.本文筛选确认的高效降解菌株 HQ-C-01 分离自贵州省贵阳市郊贫营养土样中.

供试 98.0% 克百威、90.2% 丁硫克百威、96.5% 仲丁威原药由河北威远生物化工有限公司提供,96.5% 灭多威、98.0% 甲萘威、90.0% 速灭威、99.7% 异丙威原药由广东省农科院提供,86.0% 茚虫威原药由美国杜邦公司提供.其余药品、试剂均为市售分析纯.

主要仪器包括常规立式压力蒸汽灭菌锅(YXQ-LS-30S)、超净工作台、生化培养箱、冷冻恒温振荡器、超声波清洁剂、旋转蒸发仪(LABORTA-4001)、UV mini1240 紫外分光光度计、HP-1100 型高效液相色谱仪等.

1.2 残留克百威提取方法

根据文献[12-13],取 50 mL 经降解菌处理过的加药培养液,加入 7 g 氯化钠,溶解后,全部移入 250 mL 分液漏斗,二氯甲烷萃取,下层液加入 10 g 无水硫酸钠,吸水后转入圆底烧瓶,旋转蒸发仪 50℃ 恒温浓缩蒸干,甲醇溶解,经 0.45 μm 有机过滤器过滤后,采用高效液相色谱(HPLC)测定克百威含量.

供试药剂在降解菌培养基中添加回收率的测定:取预培养 4 d 的降解菌培养液 50 mL,添加克百威母液,使其添加终质量浓度分别为 10、25、50 mg/L,按以上提取方法提取,HPLC 法测定克百威含量,计算回收率:回收率 = 处理后的质量浓度/标准液质量浓度 × 100%.

1.3 克百威降解菌的筛选

涂布法:将所收集土样用无菌水稀释 10^5 倍后,涂布法接种于含 50 mg/L 克百威查氏固体培养基上,待长出单个菌落后,挑取单菌落转接到克百威质量浓度为 200 mg/L 的培养基上,相同方法继续转接驯化直到加药质量浓度为 500 mg/L,纯化 3 次后,保存菌种.

富集培养法:250 mL 三角瓶中装基础培养液 50 mL,加入克百威溶液使其终质量浓度为 200 mg/L,加入 5 g 土样,28℃,150 r/min 摇床培养,每隔 7 d 按照 5% 的接种量转接 1 次,逐步增加克百威终质量浓度至 400、600、800、1 000 mg/L. 1 000 mg/L 培养后,移取 1 mL 菌液接到平板培养基,生长菌落后,分离纯化菌株,保存待测.

菌株对克百威的降解率测定:用无菌水将待测菌株制成菌悬液($D_{590\text{ nm}}$ 为 0.2),吸取 1 mL 菌悬液加入含 50 mL 基础培养液的三角瓶中,以加 1 mL 无菌水到等量培养液为对照,在 28℃、150 r/min 条件下振荡培养.每处理 3 个重复.预培养 4 d 后,培养菌液中加入克百威母液,使其终质量浓度为 50 mg/L,48 h 后,按 1.2 方法提取残留克百威,HPLC 测定含量,计算降解率:降解率 = (对照的克百威含量 - 处理的克百威含量)/对照的克百威含量 × 100%.

将高效降解菌株 HQ-C-01 分别转接到含茚虫威、甲萘威、仲丁威、异丙威、灭多威、速灭威和丁硫克百威质量浓度为 50 mg/L 的固体培养基上,待长出菌落后继续转接直到加药质量浓度为 500 mg/L,测定 HQ-C-01 对各农药的降解率,初步评估菌株对其他氨基甲酸酯类农药的降解效果.

1.4 对高效降解菌株 HQ-C-01 的初步鉴定

以 YPD 培养基培养单菌落,观察菌落颜色、边缘形状、透明度等;用接种环以无菌操作法挑取菌苔少许,制成水浸片,置显微镜下观察细胞的形态;生殖培养基培养菌株,细胞染色后,显微镜观察生殖方式;接菌到葡萄糖蛋白胨培养液,观察菌液特征.

1.5 降解菌株 HQ-C-01 培养基筛选

确定 C、N、P 源化合物:以蔗糖、麦芽糖、葡萄糖和淀粉分别作为唯一 C 源,以蛋白胨、硝酸钾、硝酸钠和硝酸铵分别作为唯一 N 源,以磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、磷酸二氢钠和磷酸氢二钠分别作为唯一 P 源,接入 1 mL $D_{590\text{ nm}}$ 为 0.2 的菌悬液,4 d 后测其 $D_{590\text{ nm}}$,以最高值为 C、N、P 源化合物.

1.6 降解菌株 HQ-C-01 培养基配方的优化和验证

C、N、P 源化合物确定后,采用中心组分设计(Central composite design, CCD)技术进行优化试验,3 个因子分别为 C、N、P 含量(x_1 、 x_2 、 x_3),各 5 个水平,分别编码为:C(-0.50, -0.25, 0, 0.25, 0.50)、N(-0.50, -0.25, 0, 0.25, 0.50)、P(-0.500 000, -0.392 857, -0.214 286, 0.142 857, 0.500 000),取 20 个点,利用 DPS 统计软件进行试验设计和数据分析,采用二次多项式逐步回归分析方法,得出回归模型 $y = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ij} x_i x_j + \sum b_{ii} x_i^2$,其中 y 为函数 $D_{590\text{ nm}}$, x 为培养基 C、N、P 含量, b 为变异系数,并进行寻优,得到培养基优化配方,按此配方培养降解菌,按 1.3 方法测定该菌对 50 mg/L 克百威 48 h 的降解率,理论预测值与实测值比较验证优化配方.

2 结果与分析

2.1 克百威 HPLC-UV 测定条件

经反复探索,确定克百威 HPLC-UV 测定条件

为:HP-1100 型 HPLC, 色谱柱 0 为 C_{18} 反相柱 (ODS Hypersil 5 μm , 125 mm $\times$ 4 mm), 柱温为常温, 流动相为 $V(\text{甲醇}):V(\text{水})=55:45$, 检测波长为 275 nm, 流速为 1 mL/min, 进样量 10 μl . 依此条件, 在 0 ~ 50 mg/L 范围内其浓度 (Y) - 峰面积 (X) 标准曲线方程为: $Y = 16.72X - 9.5789$, $R^2 = 0.9990$. 添加回收率测定结果表明, 当克百威添加质量浓度分别为 10、25、50 mg/L 时, 回收率都能达到 90% 以上, 提取和分析方法可信.

在上述分析测定条件下, 其他几种氨基甲酸酯类农药的浓度 - 峰面积标准曲线方程分别为茚虫威: $Y = 31.9590X + 2.6204$, $R^2 = 0.9999$; 甲萘威: $Y = 6.7925X + 2.3965$, $R^2 = 0.9999$; 仲丁威: $Y = 3.4088X + 1.5593$, $R^2 = 0.9990$; 异丙威: $Y = 1.1490X - 1.0622$, $R^2 = 0.9997$; 速灭威: $Y = 31.3500X + 4.6218$, $R^2 = 0.9998$; 丁硫克百威: $Y = 0.3223X + 0.0008$, $R^2 = 1.0000$; 灭多威: $Y = 1.9422X + 0.6117$, $R^2 = 0.9999$.

2.2 克百威降解菌筛选结果

按照 1.3 的降解菌分离筛选方法和 2.1 确定的分析测定方法, 本文初步筛选得到 5 株真菌、11 株细菌, 各菌株保存于华南农业大学昆虫毒理研究室胡美英教授课题组, 各菌株编号、归类及处理后 48 h 对 50 mg/L 克百威降解率结果见表 1. 结果表明, 真菌菌株 HQ-C-01 和细菌菌株 HQ-C-02 处理后 48 h 对 50 mg/L 克百威的降解率分别为 95.2% 和 93.0%, 显著高于其他菌株降解效果. 本文选取真菌菌株 HQ-C-01 作为高效降解菌株进一步研究.

表 1 克百威降解微生物的筛选结果

Tab. 1 Screening results of carbofuran degrading strain

菌株编号	归类	48 h 降解率 ¹⁾ / %
HQ-C-01	真菌	95.2a
HQ-C-02	细菌	93.0a
HQ-C-03	细菌	87.5b
HQ-C-04	细菌	81.8c
HQ-C-05	真菌	78.6cd
HQ-C-06	细菌	78.0d
HQ-C-07	细菌	72.6e
HQ-C-08	细菌	51.4f
HQ-C-09	真菌	47.6g
HQ-C-10	细菌	38.3h
HQ-C-11	细菌	30.7i
HQ-C-12	真菌	28.7i
HQ-C-13	细菌	23.6j
HQ-C-14	细菌	22.4j
HQ-C-15	细菌	18.7k
HQ-C-16	真菌	14.1l

1) 本列数据后注有相同字母者表示差异不显著 (DMRT 法, $P=0.05$), $n=3$

测定了降解菌株 HQ-C-01 对其他几种氨基甲酸酯类农药的降解效果, 结果表明, 共培养降解处理后 48 h, 菌株 HQ-C-01 对 50 mg/L 甲萘威、茚虫威和仲丁威的降解率分别为 99.0%、85.0% 和 67.5%, 降解效果较好; 对异丙威、灭多威和速灭威降解效果较弱, 降解率分别为 34.6%、39.5% 和 45.0%, 而对丁硫克百威降解率只有 5.1%, 几乎没有降解能力.

2.3 高效降解菌株 HQ-C-01 的初步鉴定结果

菌株 HQ-C-01 在 YPD 培养基上培养 3 d 后, 菌落乳白色, 呈奶油状, 圆形, 边缘规则整齐, 中间突起, 不透明, 表面光滑发亮, 不皱缩 (图 1); 细胞呈圆形或椭圆形 (图 2a); 出芽生殖 (图 2b); 液体培养特征: 混浊, 表面不形成菌, 试管底部有沉淀; 根据文献 [14], 初步确定该菌为酵母菌.

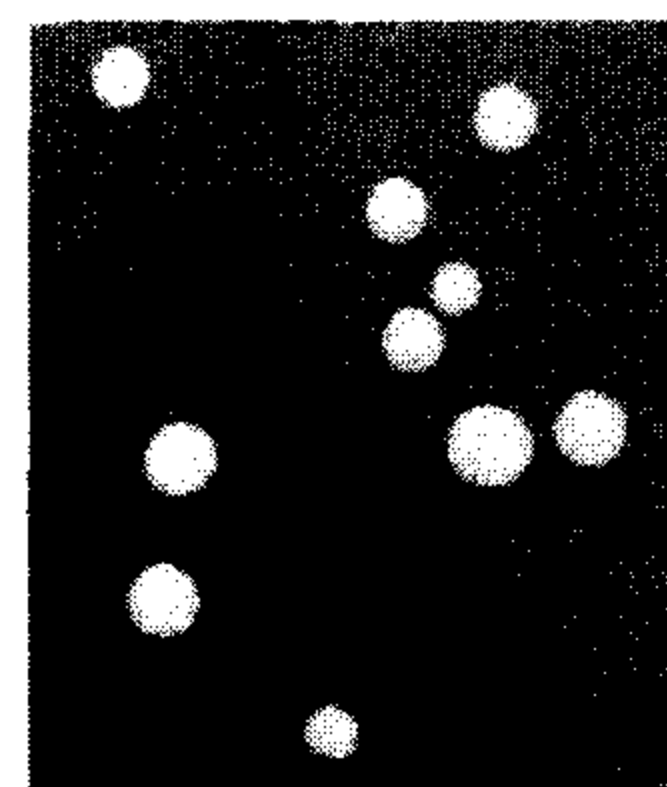


图 1 降解菌株 HQ-C-01 单菌落

Fig. 1 Individual colonies of degrading strain HQ-C-01

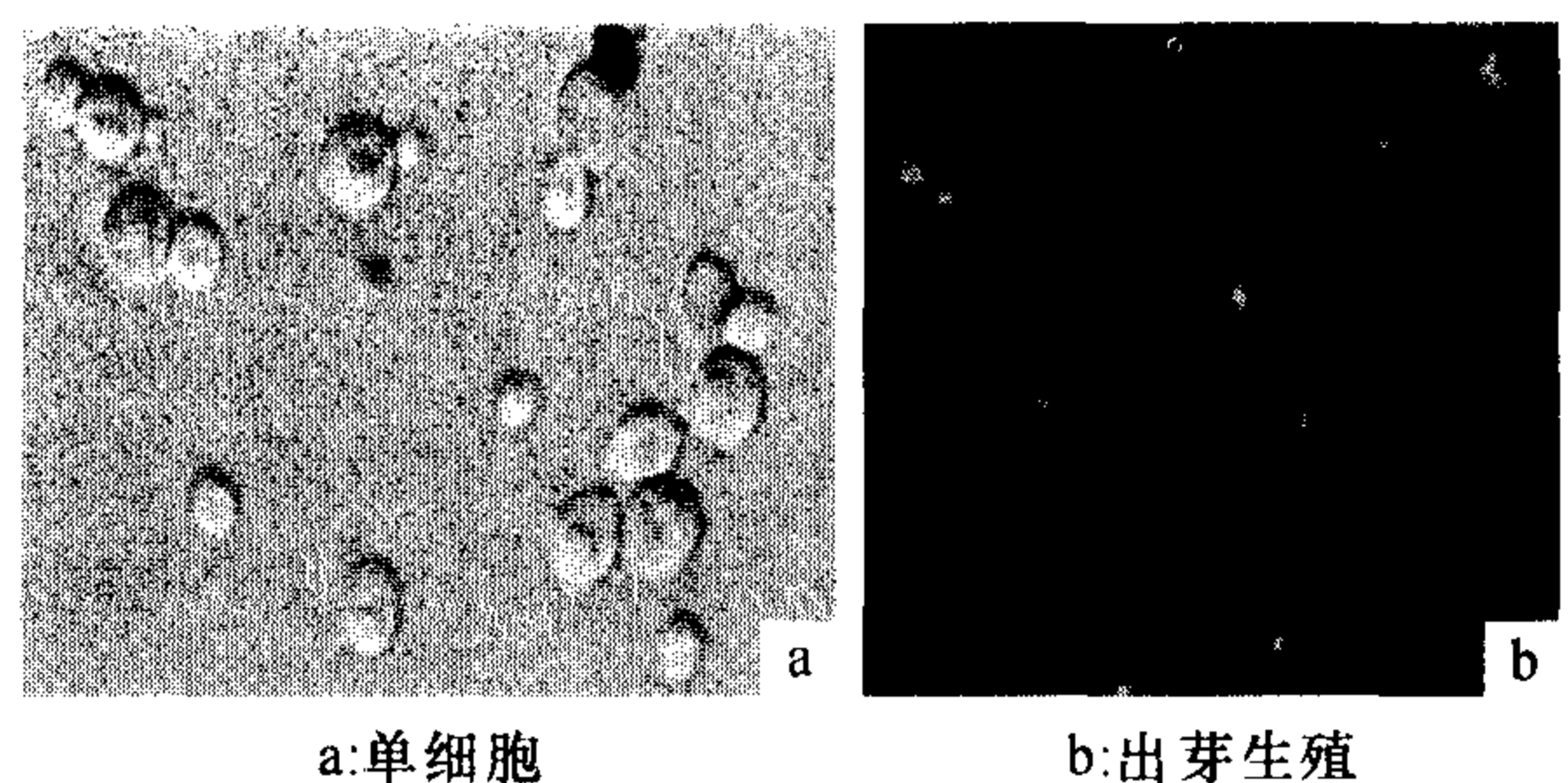


图 2 降解菌株 HQ-C-01 显微形态

Fig. 2 Microscopic morphology of degrading strain HQ-C-01

2.4 高效降解菌株 HQ-C-01 培养基的筛选

以 $D_{590\text{ nm}}$ 反映 HQ-C-01 菌株在不同 C、N、P 源条件下的生长情况, 结果如表 2 所示. 预培养 4 d 后, HQ-C-01 菌株在葡萄糖中的 $D_{590\text{ nm}}$ 显著高于蔗糖、麦芽糖和淀粉培养, 在 N 源方面, HQ-C-01 菌株在蛋白胨的 $D_{590\text{ nm}}$ 显著高于在硝酸钾、硝酸钠和硝酸铵培养, 而在 P 源方面, HQ-C-01 菌株在磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、磷酸二氢钠中的 $D_{590\text{ nm}}$ 差异不大, 以磷酸氢二钾的 $D_{590\text{ nm}}$ 稍高, 但在磷酸氢二钠中培养的 $D_{590\text{ nm}}$ 显著低于上述三者的培养. 最终确定葡萄糖、蛋白胨、磷酸氢二钾作为 HQ-C-01 菌株的培养基 C、N、P 源化合物.

表 2 菌种 HQ-C-01 在不同 C、N、P 源条件下的生长情况¹⁾
Tab. 2 Growth situation of the strain under different conditions of C,N,P

C 源	$D_{590\text{ nm}}$	N 源	$D_{590\text{ nm}}$	P 源	$D_{590\text{ nm}}$
蔗糖	0.938 3b	蛋白胨	1.310 0a	磷酸二氢钾	0.889 9a
麦芽糖	0.833 8b	硝酸钾	0.907 2b	磷酸氢二钾	0.938 3a
葡萄糖	1.147 4a	硝酸钠	0.938 3b	磷酸二氢钠	0.899 3a
淀粉	0.376 3c	硝酸铵	0.636 2c	磷酸氢二钠	0.751 5b

1) 同列数据后注有相同字母者表示差异不显著(DMRT 法, $P=0.05$), $n=3$

2.5 高效降解菌株 HQ-C-01 的配方优化和验证

根据 2.4 试验结果,通过 CCD 技术 C、N、P 源化合物配方优化试验,测定 $D_{590\text{ nm}}$,采用二次多项式逐步回归分析,建立了 $D_{590\text{ nm}}(y)$ 的回归模型:

$$y = -0.508\ 7 + 0.016\ 3x_1 + 0.480\ 9x_2 + 0.361\ 2x_3 - 0.000\ 3x_1^2 - 0.080\ 6x_2^2 - 0.119\ 3x_3^2,$$
经诊断,该模型相关系数 R 为 0.950 4,模型达到极显著水平($F=21.3, P<0.0001$).进而寻优得到各因子的最佳配比值和预期响应值,详见表 3.按照该模型计算得到菌株 HQ-C-01 的培养基最佳 C、N、P 源配方:葡萄糖、蛋白胨和磷酸氢二钾的质量浓度分别为 32.10、3.25 和 1.50 g/L,期望 $D_{590\text{ nm}}$ 为 0.805 4 (表 4).

按照上述理论最佳配方培养降解菌株 HQ-C-01,测定 $D_{590\text{ nm}}$,结果(表 4)表明, $D_{590\text{ nm}}$ 实测值为 0.786 5,接近期望值 0.805 4;1 mL 按此配方培养的菌株 HQ-C-01 菌液($D_{590\text{ nm}}$ 值为 0.2),对 50 mg/L 克百威 48 h 的降解率达 95.9%,表明该配方较适合 HQ-C-01 菌丝生长,并能保持该菌株对克百威的较高降解率.

表 3 回归模型及诊断结果					
Tab. 3 Regression model and diagnosis results					
变异来源	偏回归系数	y 标准差值	t 检验值	显著水平 $P^{1)}$	
偏相关 $r(y, x_1)$	0.016 3	0.003 6	4.60	0.001 0	
$r(y, x_2)$	0.480 9	0.040 0	12.02	<0.000 1	
$r(y, x_3)$	0.361 2	0.066 2	5.45	0.000 3	
$r(y, x_1 \times x_1)$	-0.000 3	0.000 1	-3.87	0.003 6	
$r(y, x_2 \times x_2)$	-0.080 6	0.006 5	-12.40	<0.000 1	
$r(y, x_3 \times x_3)$	-0.119 3	0.014 6	-8.19	<0.000 1	
$r(y, x_1 \times x_2)$	0.000 7	0.000 8	0.91	0.382 1	
$r(y, x_1 \times x_3)$	-0.001 5	0.000 8	-1.78	0.105 7	
$r(y, x_2 \times x_3)$	0.013 8	0.012 4	1.11	0.293 0	
相关系数 R				0.950 4	
F				21.3	
显著水平 $P^{1)}$				<0.000 1	

1) $P\leq0.05$,说明方程拟合是显著的

表 4 培养基的优化配方及其响应¹⁾
Tab. 4 Optimization formula of medium and response value

项目	$\rho/(g \cdot L^{-1})$			$D_{590\text{ nm}}$ (y)	降解率/%
	葡萄糖 (x_1)	蛋白胨 (x_2)	K_2HPO_4 (x_3)		
理论预测	32.10	3.25	1.50	0.805 4a	
验证性实验	32.10	3.25	1.50	0.786 5a	95.9

1) $n=3$;同列数据后注有相同字母者表示差异不显著(DM-RT 法, $P=0.05$)

3 讨论与结论

本文筛选得到克百威高效降解菌株 HQ-C-01,并能有效降解其他几种氨基甲酸酯类农药,已初步鉴定为酵母菌.对于具有降解活性的酵母类真菌已有报道,如降解有机磷类农药及酚类物质等的酵母菌^[15-19],但降解氨基甲酸酯类农药的酵母菌鲜见报道.已报道的克百威降解菌多为细菌,如鞘氨醇单胞菌、假单胞杆菌等^[8-10],且未同时测定对其他氨基甲酸酯类农药的降解效果.菌株 HQ-C-01 作为酵母菌,耐受环境条件较细菌范围更广,并且在存有许多抗生素的条件下也能生长旺盛,对于取得方式和效益来说,酵母菌比细菌更容易、更经济,大规模生产也不会引起人们像对细菌那样产生对公共健康问题的担心^[14],因此,可为克百威的降解研究提供新思路,同时,菌株 HQ-C-01 对甲萘威、茚虫威和仲丁威都有较好的降解效果,可进一步作为广谱降解菌应用于对氨基甲酸酯类农药降解的研究.

酵母菌培养通常使用固定配方的麦氏、酵母膏蛋白胨等培养基^[20-21],本试验采用中心组分旋转设计法筛选优化菌株 HQ-C-01 培养基配方,以最经济的方式和最少的试验次数进行全面研究,对培养基主要成分 C、N、P 源化合物做了广泛筛选,并对其使用量做了更精确的分析,验证结果表明,理论最优配方期望值与实测值结果相吻合,48 h 后对克百威降解率由培养基配方优化前的 95.2% 提高到优化后的 95.9%,刘宪华等^[22]已研究并报道假单胞菌 120 h 后对克百威降解率为 96.2%,本文菌株 HQ-C-01 的降解效果与其相当.

本文筛选到 2 株降解效果较好的菌株,但只选择菌株 HQ-C-01 做了相关研究,没有结合另一菌株 HQ-C-02 进行深入研究,例如这 2 种菌的协同降解作用等.研究表明,假单胞菌和节杆菌协同降解克百威,可以加快降解速度,利用基因工程菌可同时降解甲基对硫磷和克百威^[23-24].本研究结果表明菌株 HQ-C-01 对克百威、甲萘威、茚虫威和仲丁威等氨基

甲酸酯类农药具有降解作用,对有机磷类及拟除虫菊酯类农药的降解作用有待进一步研究.此外,本文在室内条件下优化了菌株 HQ-C-01 培养基并进行纯培养,使其在最优条件下达到最高的降解效果,但降解菌在自然条件下的生长受到微生物多样性的控制,自然环境影响较大.因此,需进一步研究降解菌的生长条件、降解酶特性、工程菌、菌制剂等,为实际应用解决克百威残留问题提供基础和参考.

致谢:降解菌株 HQ-C-01 的初步鉴定是在华南农业大学资源环境学院刘琼光老师的指导下完成,谨此致谢!

参考文献:

- [1] 陈燕,邓天龙.氨基甲酸酯类农药残留分析研究进展[J].安徽农学通报,2007,13(8):176-178.
- [2] 席艳丽,董慧茹.溶剂浮选-气相色谱/质谱法测定蔬菜中氨基甲酸酯类农药残留[J].化学通报,2008(7):553-556.
- [3] 武中平,高巍,杨红.氨基甲酸酯类农药残留测定方法的研究进展[J].江苏化工,2004,32(5):24.
- [4] 李萍.氨基甲酸酯农药残留分析方法[J].国外医学:卫生学分册,1999,26(6):366.
- [5] BEGUM G, VIJAVARAHAYAN S. Carbofuran toxicity on total lipids and free fattyacids in air breathing fish during exposure and cessation of exposure-inviv[J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2001(70):233-239.
- [6] IPCS. Pesticides residues in food: Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group (JMPR) [EB/OL]. (2002-09) [2008-11]. <http://www.who.int/ipcs/publications/jmpr/en/>.
- [7] 张明星,洪青,何健,等. BHC-A 与 CDS-1 降解菌对六六六、呋喃丹污染土壤的原位生物修复[J].土壤学报,2006,43(4):693-696.
- [8] YAN Qiu-xiang, HONG Qing, HAN Peng, et al. Isolation and characterization of a carbofuran-degrading strain *Novosphingobium* sp. FND-3[J]. FEMS Microbiology Letters, 2007, 271(2):207-213.
- [9] OGRAM A V, DUAN Y P, TRABUE S L, et al. Carbofuran degradation mediated by three related plasmid systems[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2000, 32(3):197-203.
- [10] SLAOUi M, OUHSSINE M, BERNY E, et al. Biodegradation of the carbofuran by a fungus isolated from treated soil[J]. Afr J Biotechnol, 2007, 6(4):419-423.
- [11] 王伟东,牛俊玲,崔宗均.农药的微生物降解综述[J].黑龙江八一农垦大学学报,2005,17(2):18-22.
- [12] 文君,孙成,缪红,等.高效液相色谱法同时测定蔬菜中5种氨基甲酸酯类农药[J].中国卫生检验杂志,2007,6(17):964-967.
- [13] 龚炜,刘惠民,石杰,等. LC-MS-MS 分析烟草中氨基甲酸酯农药残留[J].烟草科技,2008(8):44-48.
- [14] 巴尼特,佩恩.酵母菌的特征与鉴定手册[M].青岛:青岛海洋大学出版社,1991.
- [15] SCHOFIELD D A, WESTWATER C, BARTH J L, et al. Development of a yeast biosensor-biocatalyst for the detection and biodegradation of the organophosphate paraoxon[J]. Springer-Verlag, 2007, 76(6):1383-1394.
- [16] IRINA K, SVETLANA G, LUDMILA S, et al. Phenol degradation by immobilized cold-adapted yeast strains of *Cryptococcus terreus* and *Rhodotorula creatinivor* [J]. Extremophiles, 2006(10):441-449.
- [17] 立锋,何健,张瑞福,等.一株耐盐苯酚降解酵母菌的筛选及降解特性研究[J].土壤学报,2004,41(5):756-760.
- [18] 王永义,彭清忠,彭清静,等.一株苯酚降解菌的分离与鉴定[J].生物技术通讯,2007,18(6):952-954.
- [19] 刘斌斌,赵永芳,钞亚鹏,等.鲁氏酵母菌 WY-3 降解甲胺磷的性能[J].环境科学,2001,22(4):37-41.
- [20] 王小红,徐康,赵山,等.孝感凤窝酒曲中酵母菌的分离及特性研究[J].现代食品科技,2008,24(2):134-137.
- [21] 吕文洲,刘英,黄亦真.酵母菌-SBR 法处理油脂碱炼废水研究[J].环境科学,2008,29(4):966-970.
- [22] 刘宪华,宋文华,戴树桂.呋喃丹降解菌 AEEL3 的筛选及特性研究[J].上海环境科学,2003,22(11):743-745.
- [23] JIANG Jian-dong, ZHANG Rui-fu, LI Rong. Simultaneous biodegradation of methyl parathion and carbofuran by a genetically engineered microorganism constructed by mini-Tn5 transposon[J]. Biodegradation, 2007(18):403-412.
- [24] SINGH N, SAHOO A, MISRA D, et al. Synergistic interaction between two bacterial isolates in the degradation of carbofuran[J]. Biodegradation, 1993, 4(2):115-123.

【责任编辑 李晓卉】