

多功能农药降解基因工程菌剂保藏条件研究

蒋建东, 李 荣, 陈 凯, 倪 斌, 李顺鹏

(南京农业大学生命科学学院, 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 江苏 南京 210095)

摘 要:应用多功能农药降解基因工程菌修复农药污染潜力巨大,但由于微生物菌剂的保存一直是个难题,直接影响到微生物菌剂的应用。本实验室构建的基因工程菌属于鞘胺醇单胞菌属,易受到污染而消亡,液态菌剂保藏效果不理想,因此找到一种吸菌量大,并能增加细胞密度和保持菌种存活力的载体显得尤为迫切。通过单一载体吸菌量的测定、不同剂型保藏试验、不同接种量保藏试验、保护剂选择试验等方法研究了不同剂型对微生物菌剂活菌数量及保存期的影响。结果表明草炭是一种优良的固体载体——吸菌量大,可达 10^{11} CFU·g⁻¹,并能促进工程菌的生长, 10^9 CFU·g⁻¹ 接种量接种后 120 d 仍能使工程菌数量维持在 10^8 CFU·g⁻¹ 水平。通过盆钵试验表明长期保藏后的微生物菌剂能在 25 d 内将甲基对硫磷和呋喃丹完全降解,应用效果不受保藏影响。本实验为工程菌剂的保存和应用提供了理论参考。

关键词:鞘胺醇单胞菌属;载体;保藏试验;生物修复

中图分类号:Q93-336 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2008)04-1686-06

Study on the Conservation of Multifunctional Pesticides-Degrading Genetically Engineered Microorganisms

JIANG Jian-dong, LI Rong, CHEN Kai, NI bin, LI Shun-peng

(College of life sciences, Key Laboratory for Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Chemical pesticides are frequently applied in modern agricultural system to ensure good harvests. However, the extensive use of chemical pesticides may easily lead to widespread environmental pollution. The control of pesticides pollutants is of great importance because they are toxic and recalcitrant. The use of microorganisms for bioremediation of pesticides-contaminated sites may prove to be a viable alternative to physical and chemical clean-up methods, because a variety of microorganisms are known to utilize pesticides as their sole carbon or energy source. Because of the various kinds of pesticide-residues present in environment, multifunctional genetically engineered microorganisms (GEMs) play key roles in the bioremediation of pesticides contaminated sites. However, the difficulty of the conservation of Gram negative GEMs would be an obstacle to the application of GEMs. Our previously constructed GEMs capable of simultaneous degrading methyl parathion and carbofuran belong to *Sphingomonas* genus. The genetically engineered bacterium declined quickly in liquid medium because it was easily polluted and the conservation of GEMs in liquid phase was dissatisfaction. So it is necessary to find some solid carriers which can absorb a large quantity of GEMs and keep the livingness of GEMs. Plant ash, vermiculite, mica, kieselguhr and zeolite were used as solid carriers to study the conservation of the GEMs. The maximum adsorptive amount of GEMs of every carrier was studied and it was found that plant ash had the maximum adsorptive amount of about $(19.7 \pm 8.78 \sim 33.1 \pm 5.32) \times 10^{10}$ CFU·g⁻¹. The effect of different carriers, different inoculum amount and protection additive on the conservation were also carried out. It was found that plant ash was the best carrier. The number of GEMs in plant ash was kept above 10^{10} CFU·g⁻¹ in 120 days. The GEMs conserved for 120 days could still degrade methyl parathion and carbofuran completely in 25 days in soil pot experiment, indicating that conservation had not any negative influence on the GEMs' application. It was economic to inoculate 10^9 CFU·g⁻¹ plant ash GEMs for conservation and addition of protection additive to plant ash would not promote the conservation significantly. This work will provide some useful information for the conservation and application of GEMs.

Keywords: *Sphingomonas* sp.; carrier; conservation trial; bioremediation

收稿日期:2007-09-07

基金项目:国家“863”计划(2007AA10Z405);国家自然科学基金(30600016)

作者简介:蒋建东(1978—),男,江苏人,讲师,研究方向为环境微生物与环境微生物工程。E-mail:jiang_jjd@njau.edu.cn

联系人:李顺鹏 E-mail:lsp@njau.edu.cn

农药污染是一种面源污染,物理化学修复方法存在一定的缺陷。微生物由于种类丰富,代谢途径多样,其转化、降解各种化合物的潜力巨大,应用微生物的方法修复农药污染已经被公认为是一种安全、有效、廉价和无二次污染的方法。目前国内外针对各种农药污染物筛选分离了大量降解性微生物,并且开发了各种微生物降解制剂及配套产品应用于生物原位修复,然而,生物菌剂的保存一直是个难题,也直接影响到生物菌剂的应用潜力。国内外对生物菌剂的剂型进行了众多研究,包括不同剂型油剂、乳剂、粉剂、可湿性粉剂及微胶囊的报道^[1-7]。马梅荣^[9]等研究了麦麸、麦壳、锯末、活性炭和砖粉作为固态菌剂载体的研究。吴皓琼^[8]等研究发现糖蜜、裁皮可显著提高菌剂的保存期。吴红慧^[10]等在研究表明费氏中华根瘤菌和大豆慢生根瘤菌的载体中,草炭要优于蛭石,蛭石又优于珍珠岩。供试菌在液体剂型中的存活率和活菌数均较高,供试菌在冻干过程中的死亡率较高,但是关于多功能农药降解生物菌剂的保存条件研究报道较少,并且我们构建的基因工程菌属于鞘氨醇单胞菌属,很容易受到污染而消亡。液态菌剂保存和运输都很不方便,常规的液体发酵剂型在常温条件下只能保存1周左右,严重影响工程菌剂的应用,因此工程菌剂的保存条件研究也显得尤为迫切。如能选择一种吸菌量大,并能增加细胞密度和保持菌种存活力的载体,将液体菌剂吸附其上而制成固体菌剂具有重要价值。本实验中将重点研究不同剂型对微生物菌剂活菌数量及保存期的影响,并通过盆栽试验验证长期保藏后菌剂的应用效果,为工程菌剂的保存和应用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 菌株、试剂及培养基

1.1.1 菌株和载体

菌株:为本实验室保藏的能同时高效降解呋喃丹和甲基对硫磷的工程菌株 *Sphingomonas* sp. CDS-mpd。

载体:草炭,未过60目筛(0.420 mm)的草炭分别为草炭Ⅰ和草炭Ⅱ(来源于南京农业大学芳华园艺中心,有机质含量49%,水分15%,pH 6.5);蛭石(SiO_2 42%, Fe_2O_3 3.5%, Al_2O_3 18%, MgO 21%, CaO 0.8%,pH 6.5~9.0);云母(灵寿县东风矿产加工厂);硅藻土(pH 6.58,嵊州市华力硅藻土制品有限公司);膨润土(pH 8.5~9.0,信阳核工业恒达实业公司)和沸石(pH 7~7.5,信阳核工业恒达实业公司)。将上述材料烘干后,

草炭中加入5% CaCO_3 中和草炭酸度;其余分别过80目筛(0.17 mm)。所有载体分别取100 g分装在三角瓶中,经两次121℃间歇式(每次1 h)高压灭菌后备用。

1.1.2 试剂及培养基

LB培养基($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$):酵母膏 5.00,蛋白胨 10.00,NaCl 10.00,pH 7.2~7.5。

发酵培养基($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$):蛋白胨 0.50,葡萄糖 10.00, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.50, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.10, K_2HPO_4 1.50,pH 7.2~7.5。

1.2 工程菌计数方法

平板法计数每毫升菌数,均匀取5 g保存样品,经过梯度稀释后,取0.1 mL涂布于含100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Str和100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的甲基对硫磷的1/3 LB平板,经过3~4 d培养后,由于导入甲基对硫磷水解酶基因的工程菌水解甲基对硫磷能够产生黄色水解圈^[11],所以计数能产生黄色水解圈的黄色菌落即为工程菌的数量。

1.3 单一载体吸菌量的测定

称取上述载体各2 g于50 mL离心管中,分别与10 mL菌液在25℃下吸附5 h,1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,倾去上清液;沉淀中加入10 mL蒸馏水,振荡5 min,1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,倾出上清液,测定其菌数。重复3次,3次测得的总菌数除以载体质量为单位载体的吸菌量^[9]。

1.4 不同剂型保藏试验

设置液体剂型(用发酵液直接分装)做对照。

液体剂型Ⅰ:pH3.5 香草醛 5/10 000,山梨酸钾 1/1 000。

常规冻干菌剂:将摇到对数期的菌液离心(5 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,15 min)200 mL,去上清液,加无菌水洗涤两次,去上清液,浓缩到1/20体积10 mL,每管加入0.5 mL菌液和0.5 mL 30%无菌甘油,置于-70℃条件下保存,定期取样,稀释平板测数。

固体剂型:将培养至对数期的菌液(35 mL)与各载体(65 g)(草炭Ⅰ、草炭Ⅱ、蛭石、云母、硅藻土、膨润土、沸石)混匀,同时平板计数测定菌液中菌数,计算每克载体的含菌量。载体湿润(水分30%~35%),保持疏松,不结块,在30℃进行发酵2~3 d,最后使水分控制在14%~15%(质量分数);稻壳膨润土剂型为将过40目稻壳与膨润土以3:7(m/m)混合,菌剂接种量与载体比例为4:6(m/m)薄膜封口,将以上剂型在室温(约4~20℃)下放置,分别于0、2、7、15、45、90、120 d取样,采用平皿稀释法测定菌数。

1.5 不同接种量保藏试验

选择某保藏效果最好的载体作为不同接种量试验 ($100\text{ 亿 CFU}\cdot\text{g}^{-1}$, $10\text{ 亿 CFU}\cdot\text{g}^{-1}$, $1\text{ 亿 CFU}\cdot\text{g}^{-1}$, $0.1\text{ 亿 CFU}\cdot\text{g}^{-1}$)接种,分别于 0、2、7、15、45、90、120 取样,采用平皿稀释法测定菌数。

1.6 保护剂选择试验

选择某保藏效果最好的载体添加麸皮(10%)、糖蜜(5%)和无机盐营养液(10%)作为保护剂添加到载体中,按一定比例加入到已培养好的发酵液中混匀,不同时间测定活菌数,以未添加保护剂的处理为对照,每处理 3 次重复。

1.7 农药降解盆钵试验

在工程菌经过保藏后(最适保藏期),按一定接种量将保藏的菌剂接种用于降解盆钵土壤中甲基对硫磷和呋喃丹,验证菌剂效果。土壤样品取自江苏大丰韭菜地土壤,土壤样品性质见表 1。每份样品取土壤 500 g,风干后过 2 mm 筛,灭菌土壤中农药降解试验是在灭菌土壤样品中进行,土壤样品于 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压 30 min 灭菌两次备用。呋喃丹和甲基对硫磷分别添加浓度到 25 和 $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 土;处理土壤 1 d 后接种工程菌,对照接种灭菌菌液,所有处理 3 个重复。每份土壤样品室温下置于盆钵中,用灭菌水调节土壤水分至 40%。为防止农药光解,盆钵用黑布覆盖。在试验过程中,不同时期取 25 g 土壤样品用于农药分析和工程菌计数。

1.8 土壤中农药的提取和测定

土壤中的甲基对硫磷含量提取、检测与计算参照文献^[13]进行。

土壤中的呋喃丹提取方法:将含有呋喃丹的土壤阴干、研碎,再置于 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的烘箱中烘 10~20 min,除尽土壤中的水分。称取土壤 5.0 g,加入 10 g 分析纯的丙酮,密闭容器中剧烈振荡 10 min,静置过夜。移出其中的丙酮, $10\text{ 000 r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,收集上清液,过无水硫酸钠柱,收集流出的丙酮,土壤中呋喃丹的气相色谱分析参照文献^[12]进行。

2 结果分析

2.1 单一载体最大吸菌量试验

单一载体的最大吸菌量试验结果见表 2。吸菌量

的大小主要是由载体的比表面积决定的,多数载体的吸菌量较大,能够满足菌体载体的要求,其中草炭的吸菌量最大,膨润土最小。

表 2 单一载体的最大吸菌量
Table 2 The maximum amount of GEMs adsorbed
by different carriers

材料	菌数 $\times 10^{10}\text{ CFU}\cdot\text{g}^{-1}$
草炭 I	33.1 $\pm$ 5.32
草炭 II	19.7 $\pm$ 8.78
蛭石	2.9 $\pm$ 1.52
云母	6.8 $\pm$ 1.35
硅藻土	8.3 $\pm$ 3.86
膨润土	1.5 $\pm$ 0.52
沸石	2.4 $\pm$ 2.16
稻壳膨润土	12.7 $\pm$ 5.52

2.2 不同剂型保藏试验

本研究分别测定了工程菌在不同剂型和载体中的存活率,试验结果见图 1。由图可见液体菌剂效果很不理想,pH3.5 香草醛和山梨酸钾液体剂型 2 d 后即无法检测到菌数,可能这种保藏条件会导致功能工程菌很快死亡。发酵液直接 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保藏后,菌数呈指数下降,保藏时间不超过 20 d,主要由于工程菌属于鞘胺醇单胞菌属,很容易消亡,因此,液体剂型不适合保藏该类菌剂,需要发展合适的固体剂型来保藏菌剂。

在固体剂型中,草炭的保藏效果最好,在前期工程菌数量还会有一定的增加,从 $10^{10}\text{ CFU}\cdot\text{g}^{-1}$ 载体增加到 $10^{11}\text{ CFU}\cdot\text{g}^{-1}$ 载体,表明草炭能为工程菌提供良好的生存环境,在一定时期内能够促进工程菌生长,当工程菌数量达到饱和、维持较短的时间后开始回落到 $10^{10}\text{ CFU}\cdot\text{g}^{-1}$ 载体水平,维持一段较长的时间后,工程菌数量下降到 $10^9\text{ CFU}\cdot\text{g}^{-1}$ 载体水平,在保藏 120 d 后还能维持在 $10^8\text{ CFU}\cdot\text{g}^{-1}$ 载体水平,表明草炭是一种优良的载体,适合于本工程菌的保藏。草炭是否过 60 目筛对菌剂保藏影响不大,几乎相同,因此,为节省生存成本与工时,可以直接用未过 60 目筛的草炭保藏菌剂。

其他载体如云母、硅藻土、膨润土、沸石和稻壳膨润土的保藏,在前期工程菌增殖不明显,保藏不是很理想,很快下降到 $10^8\text{ CFU}\cdot\text{g}^{-1}$ 载体水平。蛭石的保藏效

表 1 盆钵试验土壤样品性质
Table 1 Selected properties of the soil tested

pH 值	有机碳/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	持水量/%	总氮/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	可溶性氮/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	总磷/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	速效磷/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	总钾/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	速效钾/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$
7	13.6	32.40	0.79	75.62	0.19	4.02	17.54	102.4

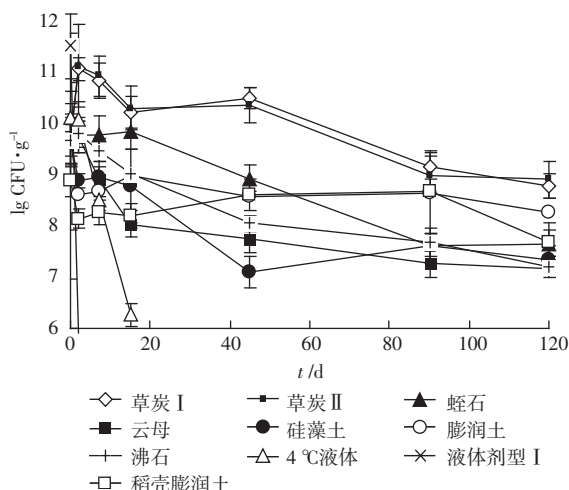


图 1 不同载体和剂型的保藏效果

Figure 1 Number of GEM cells on different carriers in different times

果较好,虽然工程菌增殖不明显,但能维持在 10^9 CFU·g⁻¹ 载体水平,说明蛭石也是一种比较理想的载体。

2.3 接种量对保藏效果的影响

上面结论表明,草炭是一种很好的菌剂保藏材料,而且菌剂接种到草炭中有一个增殖过程。同时本文研究了 0.1 亿、1 亿、10 亿、100 亿 CFU·g⁻¹ 接种量对保藏效果的影响,见图 2。结果表明接种后菌数均有一定程度增长,而 100 亿 CFU·g⁻¹ 接种量接近草炭含菌量上限,增殖较少。在试验中,发现 1 亿、10 亿、100 亿 CFU·g⁻¹ 接种量的保藏效果无显著差异,而 0.1 亿 CFU·g⁻¹ 的保藏效果较差,因此,考虑成本等因素,接种量可以控制在 10^9 CFU·g⁻¹ 草炭左右。

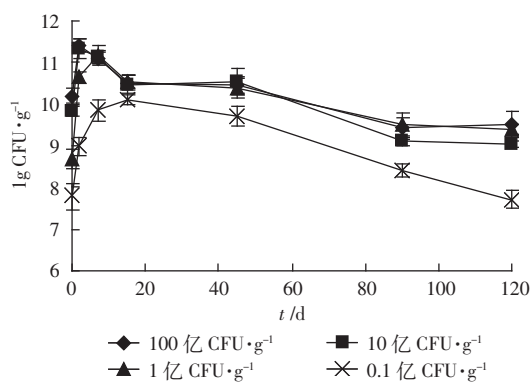


图 2 不同接种量对保藏条件的影响

Figure 2 Effect of the inoculum amount on the conservation of GEM cells

2.4 添加剂对保藏效果的影响

从图 3 可知,添加保护剂,有利于微生物细胞的分散与生存,产品的有效活菌数与 CK(未加保护剂)

相比略有提高,但提高幅度不大,因此,在菌剂的保藏过程中可以考虑不添加保护剂。

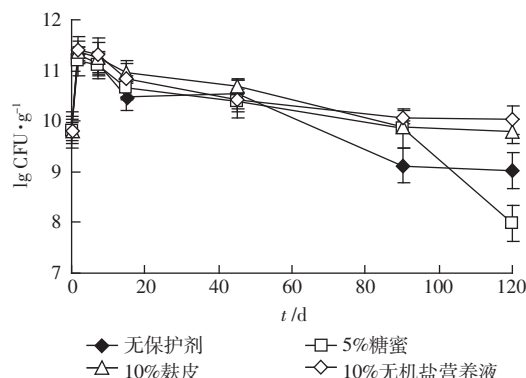


图 3 添加剂对保藏效果的影响

Figure 3 Effect of protection additive on the conservation of GEMs cells

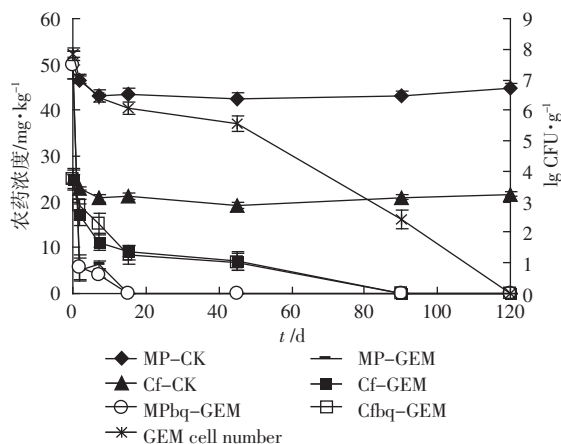
2.5 降解菌剂的土壤盆栽试验

为了验证保存的基因工程菌剂的质量,对保存后的工程菌在土壤中对甲基对硫磷和呋喃丹农药的降解效果,工程菌在灭菌和未灭菌土壤中的降解情况都进行了研究,平板计数表明初始接种到处理土壤样品中的菌浓度为 7.1×10^7 CFU·g⁻¹ 干土。由图 4、图 5 可知对照的两种农药灭菌土壤中都几乎没有降解,而在未灭菌的对照土壤样品中经过 25 d 约有 30% 的甲基对硫磷被降解,这可能是未灭菌土壤中存在的土著微生物降解了部分甲基对硫磷的结果。

研究发现,甲基对硫磷在两种土壤中完全降解不超过 10 d,而呋喃丹的降解则需要 25 d 左右,保存前后工程菌的降解效果相当。灭菌土壤两种农药的降解效率明显高于未灭菌土壤,工程菌数量的下降也较未灭菌土壤慢,表明未灭菌土壤中存在土著微生物和工程菌之间的竞争作用。从图 4 和图 5 中还可以看出这种竞争作用并没给工程菌的保存和降解效果造成多大影响,两种农药在灭菌与未灭菌土壤中完全降解所需的时间差不多。这可能是因为工程菌能将复杂的有机大分子降解为可利用的简单小分子化合物,获得更多的碳源和氮源,从而获得较好的生存环境。生物修复的效果往往依赖于降解性微生物和污染物的生物可利用性^[14],污染物的生物可利用性受到物理、化学和土壤结构特征等多种因素的影响^[15]。说明在田间农药污染生物修复领域,不管是否存在土著微生物的竞争和外在其他营养物质的影响都具有非常重要的应用前景。

通过平板计数法计数土壤中的工程菌数量,在灭菌和未灭菌土壤中 20 d 和 15 d 后均不能检测到工

程菌,这可能是由于平板计数方法的限制导致了工程菌在后期检测不到,但工程菌在两种土壤中下降的趋势非常明显,表明工程菌在土壤中不会成为优势菌,也同样表明工程菌在田间实际应用时不会有环境释放生态安全问题,具有很好的应用潜力。



MP-CK 为甲基对硫磷土未加菌液;MP-GEM 为甲基对硫磷土添加菌液;MPbq-GEM 为甲基对硫磷土添加保存前菌液;Cf-CK 为呋喃丹土未加菌液;Cfbq-GEM 为呋喃丹土添加保存前菌液;Cf-GEM 为呋喃丹土添加菌液;GEM cell number 为细菌数量。下同。

图4 灭菌土壤中甲基对硫磷和呋喃丹的降解

Figure 4 Biodegradation of MP ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) and carbofuran ($25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) in sterile soil by GEM cells.

(The data are means $\pm$ standard deviation for triplicate treatments)

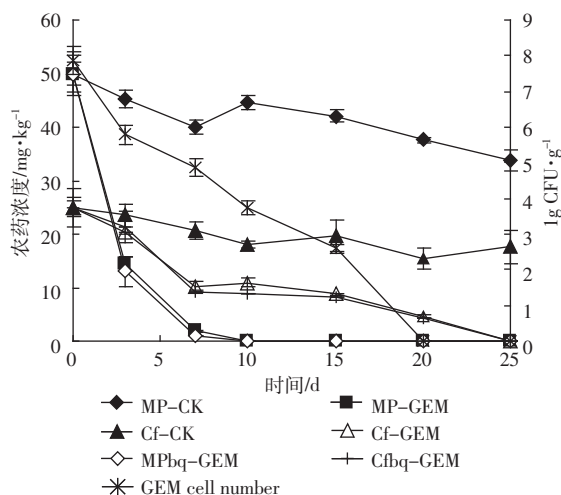


图5 未灭菌土壤中甲基对硫磷和呋喃丹的降解

Figure 5 Biodegradation of MP ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) and carbofuran ($25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) in non-sterile soil by GEM cells.

(The data are means $\pm$ standard deviation for triplicate treatments)

3 讨论

生物菌剂的保存一直是个难题,是制约生物菌剂应用的重要障碍。通过本试验筛选合适的载体,开发固体剂型,将液体剂型工程菌的保藏期从 20 d 延长到固体剂型的 120 d,有效地延长菌剂的货架期,因此通过筛选适宜载体来提高工程菌的贮存期是有一定意义的,本研究筛选的载体种类可以为今后农药降解生物菌制剂的工业化、商品化生产提供一定参考。

在载体的选择中,草炭由于体积大,原料供应不方便等问题,使用仍然会受到一定的限制。虽然蛭石菌剂的存活率比草炭菌剂略低,但由于原料价格低廉、运输方便,可在只需短期保存时用于代替草炭。然而,固体剂型由于载体成本、原料供应、操作较为麻烦、体积大、运输不方便等原因也同样存在一定缺陷,因此,在菌剂剂型研究方面仍然需要进一步加强,开发廉价、可行的,甚至是具有肥料等功能的多功能新型剂型。

参考文献:

- [1] 王成树,李农昌,汤坚,等. 球孢白僵菌混合制剂的加工研究[J]. 植物保护, 1998, 3:5-8.
WANG Cheng-shu, LI Nong-chang, TANG Jian, et al. Studies on the mixed dust formulation of *Beauveria bassiana* [J]. *Plant Protection*, 1998, 3:5-5.
- [2] 隋文志,卢林纲,钟鄂蓉,等. 玉米联合固氮耐铵工程菌 *Enterobacter gergoviae*-7(E7)在不同载体及玉米根际的存活规律[J]. 应用与环境生物学报, 2002, 8(2):200-203.
SUI Wen-zhi, LU Lin-gang, ZHONG E-rong, et al. Survival regularization of *enterobacter gergoviae*-7(E7) in different carriers and maize rhizosphere[J]. *J Appl Environ Biol*, 2002, 8(2):200-203.
- [3] 李永兴,匡柏健,李久蒂. 不同载体对微生物菌剂质量的影响 [J]. 土壤肥料, 1999, 6:30-32.
LI Yong-xing, KUANG Bai-jian, LI Jiu-di. Effect of different carriers on the quality of bacterium[J]. *Soil Fertilizer*, 1999, 6:30-32.
- [4] 中华人民共和国农业行业标准. 微生物肥料 N Y 2272941 [M]. 北京:中国标准出版社, 1994.
PRC agricultural industry standard. Microb fertilizer N Y 2272941[M]. Beijing:Standards Press of China, 1994.
- [5] 孙淑荣,吴海燕,杨天宇,等. 大豆根瘤菌吸附剂的选择及样品检测[J]. 吉林农业科学, 2005, 30(5):51-53.
SUN Shu-rong, WU Hai-yan, YANG Tian-yu, et al. Chouse the adsorbent of the soybean rhizobium and detect the sample[J]. *Jilin Agricultural Science*, 2005, 30(5):51-53.
- [6] 吴观以,李慧荃. 用海绿石作为载体吸附硅酸盐细菌的初步研究[J]. 土壤肥料, 1997, 2:43-45.
WU Guang-yi, LI Hui-quan. Preliminary study of using the glauconite

- as a carrier to adsorb the Portland bacteria[J]. *Soil Fertilizer*, 1997, 2: 43-45.
- [7] 康丽华, 李素翠, 彭耀强, 等. 木麻黄弗兰克氏菌的菌剂类型与保藏方法对接效果的影响[J]. *林业科学研究*, 1999, 12(4): 374-378.
- KANG Li-hua, LI Su-cui, PENG Yao-qing, et al. Effect of *Casuarina frankia* bacterium types and preservation methods on the quality of the inoculation[J]. *Forest Research*, 1999, 12(4): 374-378.
- [8] 吴皓琼, 沙长青, 牛彦波, 等. 保护剂与抑菌剂对生物肥料保存期的影响[J]. *生物技术*, 2004, 14, 16: 55-56.
- WU Hao-qiong, SHA Chang-qing, NIU Yan-bo, et al. Effect of the protective agent and biocide on the quality of the preservation of biological fertilizer[J]. *Journal of Microbiology*, 2004, 14(16): 55-56.
- [9] 马梅荣, 陈雷, 宣世伟, 等. XM 固态菌剂载体选择的初步研究[J]. *哈尔滨工业大学学报*, 2005, 137(12): 259-261.
- MA Mei-rong, CHEN Lei, XUAN Shi-wei, et al. Study on choice of carrier of XM microbial community[J]. *Journal of Harbin Institute of Technology*, 2005, 37(2): 259-261.
- [10] 吴红慧, 周俊初. 根瘤菌培养基的优化和剂型的比较研究[J]. *微生物学通报*, 2004, 31(2): 14-19.
- WU Hong-hui, ZHOU Jun-chu. Medium optimization and inoculant type comparison of rhizobium[J]. *Microbiology*, 2004, 31(2): 14-19.
- [11] 蒋建东, 顾立锋, 孙纪全, 等. 同源重组法构建多功能农药降解基因工程菌研究[J]. *生物工程学报*, 2004, 21(6): 884-891.
- JIANG Jian-dong, GU Li-feng, SUN Ji-quan, et al. Construction of multifunctional genetically engineered pesticides-degrading bacteria by homologous Recombination[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2005, 21(6): 884-891.
- [12] 武俊, 徐剑宏, 洪青, 等. 一株呋喃丹降解菌(CDS-1)的分离和性状研究[J]. *环境科学学报*, 2004, 24(2): 338-342.
- WU Jun, XU Jian-hong, HONG Qing, et al. Isolation of a carbofuran degrading bacterium(CDS-1) and its characterization[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2004, 24(2): 338-342.
- [13] Zang R, Cui Z, Jiang J, et al. Diversity of organophosphorus pesticide-degrading bacteria in a polluted soil and conservation of their organophosphorus hydrolase genes[J]. *Can J Microbiol*, 2005, 51: 337-343.
- [14] Cort and A Bielefeldt. Effects of surfactants and temperature on PCP biodegradation[J]. *J Environ Eng*, 2000, 126: 635-643.
- [15] Loh K-C, Wang S-J. Enhancement of biodegradation of phenol and a nongrowth substrate 4-chlorophenol by medium augmentation with conventional carbon sources[J]. *Biodegradation*, 1998, 8: 329-338.