

毒死蜱降解菌株 *Bacillus laterosporus* DSP 的降解特性及其功能定位*

王 晓 楚小强 虞云龙[†] 方 华 陈 洁 宋凤鸣

(浙江大学农业与生物技术学院植保系, 杭州 310029)

摘 要 从土壤中分离到一株能有效降解毒死蜱的细菌 DSP, 该分离株鉴定为侧芽孢杆菌 (*Bacillus laterosporus*)。在纯培养条件下测定了分离株 DSP 对毒死蜱的降解性能。在接种量为菌浓度 $OD_{415} = 0.2$, pH 7.0、25 条件下, 测得 $1, 10 \text{ mg L}^{-1}$ 毒死蜱的降解符合一级动力学特征, 其降解半衰期分别为 1.48 d、5.00 d, 100 mg L^{-1} 毒死蜱对 DSP 菌有明显的抑制作用; 分离株 DSP 在不同 pH 及温度下对毒死蜱的降解作用为 pH 7.0 > pH 5.0 > pH 9.0, 35 > 25 > 15。该菌株含有一个 20 kb 左右的质粒, 通过吡啶橙与升温法对质粒消除实验证实, 随着质粒的丢失, 菌株利用毒死蜱的能力也丧失, 用热击法和 CaCl_2 法将菌株质粒转入大肠杆菌 JM109 和质粒消除处理的 DSP 菌中, 随着质粒的获得, 这些转化子获得了降解毒死蜱的能力。研究结果表明, *Bacillus laterosporus* DSP 降解毒死蜱的功能和质粒有关。

关键词 毒死蜱; 降解质粒; 侧芽孢杆菌; 土壤
中图分类号 S154.39 **文献标识码** A

大量研究表明, 土壤微生物对环境中的农药降解起着重要的作用, 这些微生物包括细菌、真菌、放线菌和藻类^[1~3]。微生物降解农药的能力一部分是固有的, 一部分是由使用农药后诱发产生的^[4~7]。对于很多降解有机污染物的细菌来说, 降解性能通常是由质粒控制的, 或者与质粒有关^[8,9]。所以, 对于降解菌质粒和有机物特性之间的关系认识, 将有助于我们更深刻的了解微生物对有机污染物降解的内在机制和过程。

毒死蜱是一种应用广泛的有机磷杀虫剂, 国内外对毒死蜱的微生物降解进行较为广泛的研究, 对于其降解途径和机理都有了比较详尽的了解^[10,11], 但是未见关于毒死蜱降解性质粒的研究报道。本研究从土壤中分离到毒死蜱的降解菌 *Bacillus laterosporus* DSP, 测定了其降解性能, 并明确了其降解功能与质粒的关系。

1 材料与方 法

1.1 菌株

大肠杆菌 JM109 由浙江大学生物技术研究所水

稻生物学国家重点实验室提供。

1.2 仪器与药剂

GC-9790 气相色谱仪 (福立分析仪器有限公司); 超净工作台 (上海浦东荣丰科学仪器厂); HZ-9310K 全温振荡器 (太仓市科教器材厂); LRH 250-G 光照培养箱 (广东省医疗器械厂); 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); 数显恒温水浴锅 (常州国华电器有限公司); 循环水式多用真空泵 (上海豫康科教仪器设备有限公司); 高压灭菌锅 (上海医用核子仪器厂); 5417R 高速冷冻台式离心机 (Eppendorf); EC1 000-90 水平电泳仪 (EC); 凝胶成像系统 (UVP); NH 866 涡旋振荡仪; 电子天平; 微量取液器 (20 μl , 200 μl , 1 000 μl) 等。

毒死蜱原药 (99.5%) (农业部农药检定所); 无水硫酸钠 (A. R.); 氢氧化钠 (A. R.); 苯二甲酸氢钾 (A. R.); 磷酸二氢钠 (A. R.); 磷酸氢二钠 (A. R.); 硼酸 (A. R.); 氯化钾 (A. R.); 乙酸乙酯 (A. R.); 二氯甲烷 (A. R.); 正己烷 (A. R.); 石油醚 (60~90) (A. R.); 吡啶橙; DNA/Hind (Fermentas); 琼脂糖 (oxid)。溶液: 50 mmol L^{-1} 葡萄糖, 25 mmol L^{-1} Tris。

* 国家自然科学基金项目 (20377036、30230250)、国家重点基础研究发展规划 973 项目 (2002CB410806) 和杭州市科技专项项目 (2002112A08) 资助

[†] 通讯作者, E-mail: ylyu@zju.edu.cn

作者简介: 王 晓 (1980~), 女, 硕士研究生, 主要从事农药环境毒理及生物修复方面的研究

收稿日期: 2005-04-04; 收到修改稿日期: 2005-08-13

Cl (pH 8.0), 10 mmol L⁻¹ EDTA (pH 8.0), 高压蒸汽灭菌 (121 °C, 20 min), 储存于 4 °C 冰箱内。

溶液 : 0.2 mol L⁻¹ NaOH, 1 % SDS, 储存于 4 °C 冰箱内。

溶液 : 5 mol L⁻¹ 醋酸钾 60 ml, 冰醋酸 11.5 ml, 水 28.5 ml, 高压蒸汽灭菌 (121 °C, 20 min), 储存于 4 °C 冰箱内。

1.3 培养基配方

LB 培养基: 酵母膏 5.0 g; 蛋白胨 10.0 g; 氯化钠 10.0 g; 蒸馏水 1 000 ml; pH 7.0, 高压蒸汽灭菌 (121 °C, 20 min)。

基础培养基: MgSO₄ · 7H₂O 20 mg; EDTA 5 mg; FeSO₄ · 7H₂O 2 mg; ZnSO₄ · 7H₂O 0.1 mg; MnSO₄ · H₂O 0.03 mg; H₃BO₃ 0.3 mg; CoSO₄ · 7H₂O 0.24 mg; CuSO₄ · 5H₂O 0.01 mg; NiSO₄ · 7H₂O 0.02 mg; Na₂MbO₄ · 2 H₂O 0.03 mg; Ca (OH)₂ 0.5 mg; 蒸馏水 1 000 ml; pH 7.0, 高压蒸汽灭菌 (121 °C, 20 min)^[12]。

M 培养基: K₂HPO₄ · 3H₂O 2.96 g; KH₂PO₄ 0.87 g; (NH₄)₂SO₄ 1.1 g; MgSO₄ 0.097 g; MnSO₄ · H₂O 0.025 g; FeSO₄ · 7H₂O 0.005 g; CaSO₄ 0.0015 g; 抗坏血酸 0.005 g; 蒸馏水 1 000 ml; pH 7.0, 高压蒸汽灭菌 (121 °C, 20 min)。

1.4 不同酸度缓冲溶液的配制

pH 5.0 缓冲溶液: 取 0.10 mol L⁻¹ 氢氧化钠 226 ml + 0.2 mol L⁻¹ 苯二甲酸氢钾 250 ml, 加蒸馏水定容至 1 000 ml, 高压蒸汽灭菌 (121 °C, 20 min)。

pH 7.0 缓冲溶液: 取 0.20 mol L⁻¹ 磷酸氢二钠 61 ml + 0.2 mol L⁻¹ 磷酸二氢钠 39 ml, 加蒸馏水定容至 1 000 ml, 高压蒸汽灭菌 (121 °C, 20 min)。

pH 9.0 缓冲溶液: 取 0.10 mol L⁻¹ 氢氧化钠 208 ml + 1.1 mol L⁻¹ 硼酸 氯化钾混合溶液 500 ml (0.03 mol L⁻¹ 硼酸 0.1 mol L⁻¹ 氯化钾), 加蒸馏水定容至 1 000 ml, 高压蒸汽灭菌 (121 °C, 20 min)。

1.5 降解菌的分离、筛选与鉴定

参考 Venkaleswarlu 等^[13]的方法, 取轻粘土 5 ~ 10 cm 的土样 (采自浙江大学华家池校区) 40 g 于含 50 ml 基础培养基 (含毒死蜱 10 mg L⁻¹) 的 250 ml 三角瓶中, 30 °C 间歇振荡培养 15 d (每天振荡 3 次, 每次 30 min)。取上层浊液一杯于内含 50 ml 基础培养基 (含毒死蜱 20 mg L⁻¹) 的 250 ml 三角瓶中, 30 °C 振荡培养 10 d, 与上述方法相同再培养 3 次 (毒死蜱量每次加倍增加)。将菌液在固体基础培养基 (含毒死蜱 50 mg L⁻¹) 上划线分离筛选。30 °C 培养 5 d 后, 挑出单菌落接种于

固体基础培养基 (含毒死蜱 50 mg L⁻¹) 上。5 次纯化后, 挑出单菌落进行鉴定。

降解菌的鉴定依据《伯杰细菌鉴定手册》^[14]、《芽孢杆菌属》^[15]。

1.6 毒死蜱降解试验

不同浓度毒死蜱的降解: 100 mL 灭菌的三角瓶中加入 20 ml pH 7.0 的基础培养基, 添加至毒死蜱浓度 1、10、100 mg L⁻¹, 接种细菌 (菌浓度 OD₄₁₅ = 0.2), 25 °C 黑暗振荡 (150 min⁻¹) 培养;

pH 对毒死蜱降解的影响: 100 mL 灭菌的三角瓶中加入 20 ml pH 5.0、7.0、9.0 的缓冲液, 添加毒死蜱浓度至 1 mg L⁻¹, 接种细菌 (菌浓度 OD₄₁₅ = 0.2), 25 °C 黑暗振荡 (150 min⁻¹) 培养;

温度对毒死蜱降解的影响: 100 mL 灭菌的三角瓶中加入 20 ml pH 7.0 的缓冲液, 添加毒死蜱浓度至 1 mg L⁻¹, 接种细菌 (菌浓度 OD₄₁₅ = 0.2), 分别在 15、25、35 °C 的条件下黑暗振荡 (150 min⁻¹) 培养。

不加菌的对照也在上述条件下振荡培养, 上述试验分别在 0、0.5、1、3、5、7 d 定时取样。处理与对照各为 3 个重复。

1.7 培养液中毒死蜱的提取方法

将培养液转入分液漏斗中, 用 3 × 50 ml 二氯甲烷液-液分配萃取, 下层有机相经过无水硫酸钠合并于 250 ml 平底烧瓶中, 在旋转蒸发器上浓缩至 1 ~ 2 ml, 然后用氮气流吹干, 用重蒸石油醚定容至 5 ml 供 GC 分析。

1.8 GC 测试条件

气相色谱仪: GC-9790; 检测器 FPD; 色谱柱 AT-RPA 农药分析专用柱 (中国科学院兰州化学物理研究所), 30 m × 0.32 mm × 0.25 μm; 进样口温度 250 °C; 柱温 230 °C; 检测器温度 250 °C; 载气 (N₂) 50 ml min⁻¹; 氢气 120 ml min⁻¹; 空气 80 ml min⁻¹。

1.9 质粒消除

挑毒死蜱降解菌的单菌落于 3 ml LB 培养基中, 30 °C 摇床过夜培养, 然后取 200 μl 菌液, 分别接入含吡啶橙浓度为 150、300 mg L⁻¹ 的 5 ml LB 培养基中, 30 °C 摇床培养 24 h, 分别稀释涂布于 LB 平板, 42 °C 培养 24 h, 再于 30 °C 培养 24 h, 然后取若干个单菌落分别稀释并涂布于 LB 平板上, 30 °C 培养过夜, 再挑取单个菌落分别接种于 LB 平板及 M 平板 (含毒死蜱 50 mg L⁻¹) 的对应位置, 培养 2 ~ 3 d 观察平板的生长情况。在 M 平板 (含毒死蜱 50 mg L⁻¹) 上不生长的菌落可以初步视为质粒消除菌。为提高质

粒消除率,重复升温若干次消除质粒^[16]。

1.10 质粒提取

细胞质粒的提取采用碱法^[17]。取 1.5 ml 新鲜 DSP 菌培养液倒入 1.5 ml eppendorf 管中,4 ℃ 下 12 000 g 离心 30 s。弃上清液将菌体沉淀重悬浮于 100 μl 溶液,室温下放置 5 min。加入溶液 200 μl,温和颠倒 eppendorf 管数次,冰浴 5 min。加入 150 μl 溶液,温和颠倒 10 s,冰浴 10 min,4 ℃ 下 12 000 g 离心 10 min。上清液移入干净 eppendorf 管加入等体积的酚/氯仿(1:1),振荡混匀,4 ℃ 下 12 000 g 离心 5 min,将水相移入干净的 eppendorf 管中加入 2 倍体积的无水乙醇,振荡混匀置于 -20 ℃ 冰箱中 20 min,然后在 4 ℃ 下 12 000 g 离心 10 min。弃上清液,加入 1 ml 70% 的乙醇沉淀一次,4 ℃ 下 12 000 g 离心 5 min。吸除上清液,真空干燥 10 min,将沉淀溶于 20 μl TE 缓冲液(pH 8.0,含 20 μg ml⁻¹ RNA 核酸酶 A)中,储于 -20 ℃ 冰箱中。

1.11 质粒转化

分别取 1 μl 的 DSP 菌质粒加入感受态质粒消除菌(采用 CaCl₂ 法制备感受态细胞,方法参见文献^[17])及感受态大肠杆菌 JM109,轻轻摇匀,冰浴放置 30 min,42 ℃ 水浴中热击 90 s 后迅速置于冰浴冷却 5 min,加入 1 ml LB 液体培养基,混匀后在 37 ℃ 振荡培养 1 h,使细菌恢复正常生长状态,分别取 100 μl 涂布 M 平板(含毒死蜱 50 mg L⁻¹),于 30 ℃ 培养 2~3 d 观察细菌生长情况。同时设未转入质粒的质粒消除菌 *Bacillus laterosporus*、DSP⁻ 及大肠杆菌 JM109 的对照。

1.12 琼脂糖电泳分析

琼脂糖浓度为 0.8%,电泳电压为 100 V,marker 为 DNA/Hind III,采用 UVP 凝胶成像仪分析电泳

结果。

1.13 重组菌种降解试验

在 100 ml 灭菌的三角瓶中加入 20 ml 基础培养基,添加毒死蜱浓度 1 mg L⁻¹,分别接种 *Bacillus laterosporus* DSP 菌,质粒消除后的 *Bacillus laterosporus* DSP⁻ 菌,大肠杆菌 JM109,转入质粒的质粒消除菌 *Bacillus laterosporus* DSP⁻ 及大肠杆菌 JM109(菌浓度 OD₄₁₅ = 0.2),在 pH 7.0、25 ℃、150 min⁻¹ 的条件下黑暗振荡培养;3 d 后定时取样。同时设不加菌的对照,处理与对照各为 3 个重复。

2 结果与讨论

2.1 菌株的分离与鉴定

从土壤中分离获得一株能以毒死蜱做唯一碳源和能源生长的细菌,命名为 DSP。分离株 DSP 在营养肉汁琼脂培养基上,菌落圆形,光滑,不透明,湿润,乳白色。菌落直径 1~2 mm 左右。革兰氏染色阴性,24 h 培养细胞杆状,细胞约 0.3 μm × 2 μm,芽孢侧中生,孢囊膨大,鞭毛周生,鉴定为侧芽孢杆菌 (*Bacillus laterosporus*) 如图 1、图 2 所示。

2.2 不同浓度毒死蜱对细菌降解毒死蜱的影响

在 pH 7.0、25 ℃ 条件下,接种一定量降解菌(菌浓度 OD₄₁₅ = 0.2),对不同浓度的毒死蜱的降解进行试验,1、10、100 mg L⁻¹ 的降解曲线如图 3,以一级动力学拟合计算得 1、10 mg L⁻¹ 时,降解半衰期分别为 1.48、5.00 d(表 1),1 mg L⁻¹ 毒死蜱降解效果最好,10 mg L⁻¹ 毒死蜱降解效果次之,100 mg L⁻¹ 毒死蜱对 DSP 菌有明显的抑制作用。不加菌的对照中,毒死蜱在 1 周内的水解率相差不大,均小于 5%。

表 1 毒死蜱在不同条件下的降解动力学特征

Table 1 Degradation kinetics of chlorpyrifos in different conditions

影响因子 Impact factor	处理 Disposal	降解动力学方程 Kinetic equation	半衰期 Half-life (d)	相关系数 <i>r</i> Relative coefficient
毒死蜱浓度 Chlorpyrifos concentration (mg L ⁻¹)	1	$C = 1.2154e^{-0.4705 t}$	1.48	0.9563
	10	$C = 9.9469e^{-0.1386 t}$	5.00	0.9630
	100	$C = 1.0615e^{-0.1913 t}$	3.62	0.9711
pH	5	$C = 1.0236e^{-0.4883 t}$	1.42	0.9938
	7	$C = 1.0850e^{-0.3266 t}$	2.12	0.9580
	9	$C = 0.9713e^{-0.2458 t}$	2.82	0.9792
温度 Temperature ()	15	$C = 1.0340e^{-0.4910 t}$	1.41	0.9950
	25	$C = 0.6761e^{-0.6419 t}$	1.08	0.9095
	35	$C = 0.6761e^{-0.6419 t}$	1.08	0.9095

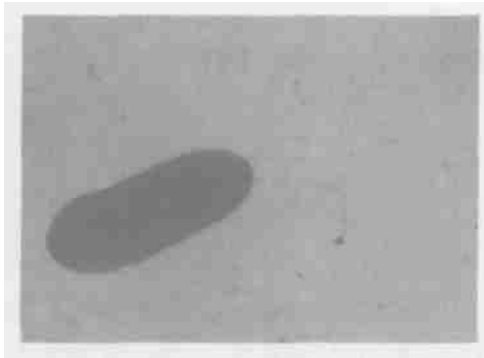


图 1 单细菌图

Fig. 1 Individual bacterium

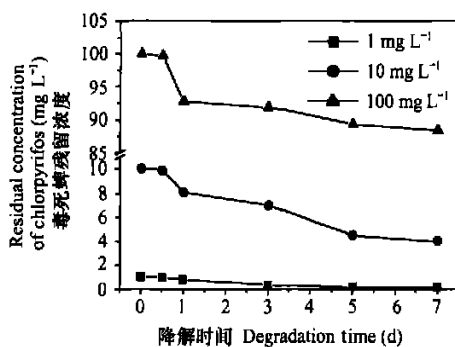
图 2 细菌放大图 ($\times 1\ 000$)Fig. 2 Amplified bacteria ($\times 1\ 000$)

图 3 浓度对毒死蜱降解的影响

Fig. 3 Effect of concentration on biodegradation of chlorpyrifos

2.3 酸度对细菌降解毒死蜱的影响

温度 25^o、接种一定量降解菌(菌浓度 OD₄₁₅ = 0.2), pH 5.0、7.0、9.0 时 1 mg L⁻¹ 毒死蜱的降解曲线如图 4,以一级动力学拟合计算得其降解半衰期分别为 3.62、1.42、2.12 d(表 1),pH 7.0 时降解效果最好,半衰期仅为 1.42 d,pH 5.0 时降解效果较差,pH 9.0 时降解半衰期比 pH 5.0 时降解半衰期要短,

但由于毒死蜱为二烷基磷酸酯类农药,在水介质中的水解反应是亲核加成取代反应(SN₂),随着介质中 OH⁻ 浓度加大,反应速率变快,Racke 等^[18,19] 也曾经报道在碱性环境中(pH 7.5~9.0),毒死蜱会较快水解生成 TCP。在本实验中,在 pH 9.0 时,对照试验毒死蜱在 1 周内的水解率高达 45%,综合考虑水解和微生物降解,pH 9.0 时的微生物降解效果最差。pH 5.0 和 7.0 的对照处理,毒死蜱在 1 周内的水解率相差不大,均小于 5%。

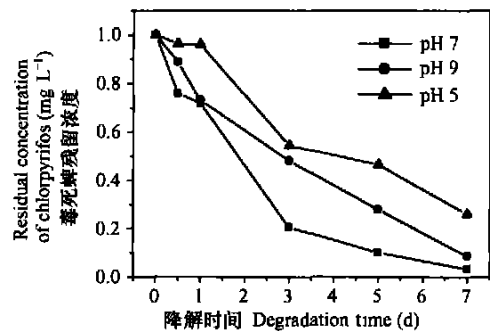


图 4 酸度对毒死蜱降解的影响

Fig. 4 Effect of acidity on biodegradation of chlorpyrifos

2.4 温度对细菌降解毒死蜱的影响

pH 7.0、接种一定量降解菌(菌浓度 OD₄₁₅ = 0.2),15、25、35^o 时 1 mg L⁻¹ 毒死蜱的降解曲线如图 5,以一级动力学拟合计算得其降解半衰期分别为 2.82、1.41、1.08d(表 1),35^o 时降解效果最好,25^o 时降解效果略差,15^o 时降解效果较差。不加菌的对照中,毒死蜱在 1 周内的水解率相差不大,均小于 8%。

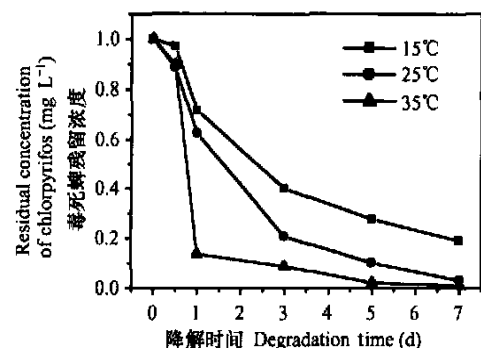


图 5 温度对毒死蜱降解的影响

Fig. 5 Effect of temperature on biodegradation of chlorpyrifos

2.5 质粒消除

对质粒进行遗传学研究时,常希望得到其消除

质粒的衍生菌株,以便两者比较观察质粒的遗传功能。某些质粒可自发的从细胞中丢失,但大多数质粒在细胞内很稳定。要想获得消除质粒的菌株,需要使用合适的物理或化学方法干扰质粒复制、或降低质粒的稳定性,人为地提高质粒丢失的频率^[20],以达到质粒消除的目的。由于结构及生理上的独特性,不同菌株的质粒消除机制各不相同,到目前为止,尚没有普遍适用的质粒消除方法。本研究采用提高生长温度^[16]及嵌合染料吡啶橙两种方法消除降解细菌的质粒。考虑到吡啶橙处理后可能会对细菌基因组有损伤,在本实验中,一组细菌用吡啶橙处理,另一组细菌用相同的不含吡啶橙溶液作对照处理。处理后,分别点种于 LB 培养基,看长出的细菌数量是否相等。我们的试验过程证实两者基本相同,说明吡啶橙处理并不引起细菌的死亡,也即吡啶橙处理不会对细菌基因组造成致死性损伤。再将在 LB 培养基上生长的细菌转移到 M 平板(含毒死蜱 50 mg L⁻¹)上,对照处理的细菌能在 M 平板上生长,而吡啶橙处理过的细菌不能生长,这样,在 M 平板上不能生长的菌就是质粒消除菌。当吡啶橙浓度分别为 150、300 mg L⁻¹时,300 mg L⁻¹质粒消除效果明显优于 150 mg L⁻¹;升温次数增加,质粒消除效果越好。吡啶橙浓度为 300 mg L⁻¹时采用升温法处理 3 次后质粒消除率达 50%以上。细菌经质粒消除后,在 LB 培养基上,菌落表面粗糙,中央凹陷,较干燥,较之于质粒未消除的细菌外表有较明显区别。将质粒消除的细菌提取质粒,并未得到所含目的质粒片段(图 6 C 所示),证明细菌内质粒已被消除。

2.6 质粒提取

如图 6 B 所示, *Bacillus laterisporus* DSP 菌中只含有一个质粒,且质粒大小位于 23 130bp 与 9 416bp 之间,大约 20 kb 左右,命名为 pDOC (plasmid for degradation of chlorpyrifos)。

2.7 质粒转化

将质粒 pDOC 转入质粒消除的 *Bacillus laterisporus* DSP⁻ 菌中,在 M 平板(含毒死蜱 50 mg L⁻¹)培养 2~3 d 后可恢复生长,同时提取质粒后如图 6 D 所示,表明质粒 pDOC 具有可回复性。质粒转入大肠杆菌 JM109 后在 M 平板(含毒死蜱 50 mg L⁻¹)培养 2~3 d 后可生长,同时提取质粒后如图 6 F 所示,表明质粒转化成功,得到可降解毒死蜱的工程菌。未转入质粒的质粒消除 *Bacillus laterisporus* DSP⁻ 菌及大肠杆菌 JM109 在 M 平板(含毒死蜱 50

mg L⁻¹)培养 2~3 d 后未生长。

2.8 重组菌种降解试验

Bacillus laterisporus DSP 降解菌、质粒消除菌、质粒回复 DSP⁻ 菌、大肠杆菌 JM109、转入质粒 pDOC 的大肠杆菌 JM109 及不加菌的对照在毒死蜱浓度 1 mg L⁻¹、pH 7.0、25℃ 条件下黑暗振荡培养 3 d 对于毒死蜱的降解情况如表 2,原始降解菌的降解效率最高,大肠杆菌 JM109(含质粒 pDOC)降解效率次之,质粒回复的 DSP⁻ 菌再次之,而质粒消除菌和原始大肠杆菌几乎没有降解。究其原因,降解菌本身功能较完整,而质粒重新回复后可能影响其降解效能,而大肠杆菌转入质粒后可能短时间存在不适应,具体的应用有待继续深入研究。

表 2 重组菌种对毒死蜱的降解率
Table 2 Chlorpyrifos degradation rate of transformants

菌株 Strains	降解率 Percentage removed (%)
降解菌 DSP Degradative strain DSP	61.8
质粒消除菌 DSP ⁻ Plasmid-removed strain DSP ⁻	5.5
质粒回复入 DSP ⁻ 菌 Plasmid-reverted strain DSP ⁻	49.6
大肠杆菌 JM109 <i>Escherichia coli</i> JM109	4.0
大肠杆菌 JM109(含质粒) <i>Escherichia coli</i> JM109 (containing pDOC)	55.5
对照 Control	3.5

3 结 语

本研究筛选获得了一株能以毒死蜱做唯一碳源和能源生长的细菌,命名为 DSP,鉴定为侧芽孢杆菌 (*Bacillus laterisporus*)。

Bacillus laterisporus. DSP 对毒死蜱的降解特性与毒死蜱浓度、pH 值和温度有关。1、10 mg L⁻¹毒死蜱的降解半衰期分别为 1.48、5.00 d,100 mg L⁻¹毒死蜱对 DSP 菌有明显的抑制作用;分离株 DSP 在不同 pH 及温度下对毒死蜱的降解作用为 pH 7.0 > pH 5.0 > pH 9.0,35℃ > 25℃ > 15℃。

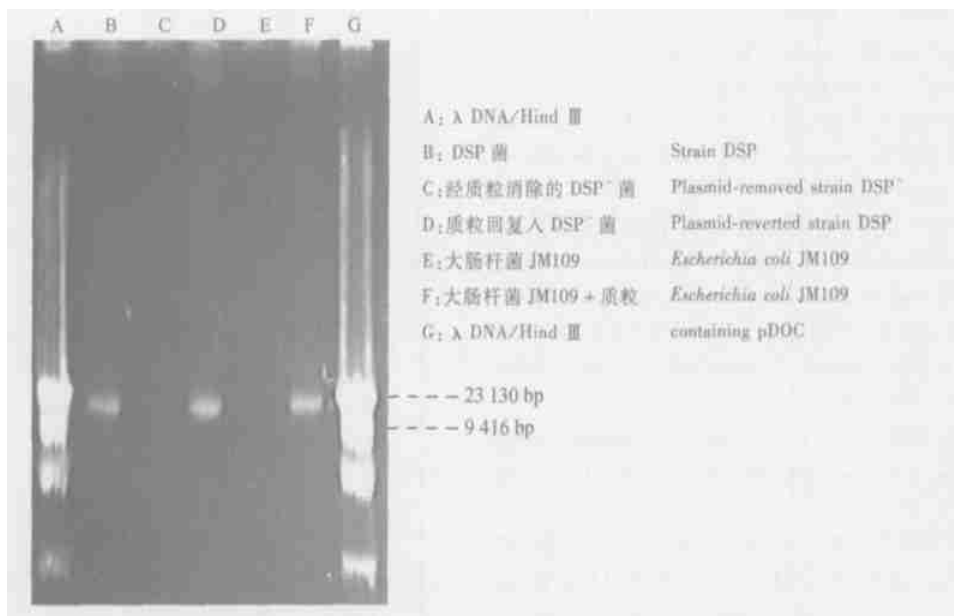


图 6 质粒提取电泳图

Fig. 6 Electrophoresis of plasmid

农药降解酶基因的克隆与表达正成为近期农药生物修复领域的研究热点。对许多降解有机化合物的微生物研究表明,降解基因一般在大质粒上^[8],这些质粒称为降解性质粒(Degradative plasmid or Catabolic plasmid)。菌株的质粒经许多次传代培养都不会丢失,说明它很稳定。通过对降解菌及质粒消除 DSP 菌的降解实验得到与毒死蜱降解有关的基因位于菌株的质粒上,为下一步克隆其相关基因打下了基础。

将降解质粒导入易于繁殖的宿主中获得高表达,提高产酶率,或将不同的降解质粒导入同一菌株中,扩大降解谱,提高降解效率已成为一个重要的研究内容^[21, 22]。Wilfred^[23]构建的带有有机磷水解酶基因的工程大肠杆菌,能够快速降解有机磷农药。此外,有机磷农药水解酶基因、除草剂 2,4-D 降解质粒、阿特拉津降解酶基因已成功的克隆并表达,使构建的工程菌具有更高的降解活性。本研究以大肠杆菌 JM109 为受体菌转入降解质粒 pDOC 构建新的工程菌具有降解毒死蜱的能力,为以后具体的应用提供良好的条件。

参考文献

- [1] 韩熹来. 农业百科全书(农药卷). 北京:农业出版社,1993. 68. Han X L. Agriculture Cyclopaedia (Pesticide Volume) (In Chinese). Beijing: Agriculture Press, 1993. 68
- [2] 薛琦译. 土壤微生物和农药. 农药译丛,1994,16(4):51~54, 30. Xue Q. Edsphon and pesticide (In Chinese). World Pestic.

1994,16(4):51~54,30

- [3] 虞云龙,樊德方,陈鹤鑫. 农药微生物降解的研究现状与发展策略. 环境科学进展,1996,44(3):28~36. Yu Y L, Fan D F, Chen H X. The current situation and research trend of degradation of pesticides by microorganisms (In Chinese). Adv. Environ. Sci. 1996,44(3):28~36
- [4] Walker A, Welch S J, Roberts S J. Induction and transfer of enhanced biodegradation of the herbicide napropamide in soils. Pestic. Sci., 1996, 47:131~135
- [5] Matsumura F, Murti C R K. Biodegradation of Pesticides. New York and London:Plenum Press, 1983. 67~87
- [6] Ronald B C, Jean A M. Enhanced degradation of the fungicide vinclozolin: Isolation and characterization of a responsible organism. Pestic. Sci., 1996, 48: 13~23
- [7] Yucel U, Yilm M, Gøzek K, et al. Chlorpyrifos degradation in Turkish soil. J. Environ. Sci. Health, 1999, 34(1):75~95
- [8] 张素琴,罗如新. 微生物对环境遗传适应和质粒的分子生态效应. 应用生态学报, 1999, 10(4):506~510. Zhang S Q, Luo R X. Microbial genetic adaptability to environment and molecular ecological efficiency of plasmid (In Chinese). Chin. J. Appl. Ecol., 1999, 10(4):506~510
- [9] Pemberton J M. Degradative plasmids. In: Bourne G H, Daniellie J F. eds. International Review of Cytology. New York and London: Academic Press, 1983. 155~181
- [10] Al Mihanna A A, Salama A K, Abdlla M Y. Biodegradation of chlorpyrifos by either single or combined cultures of some soilborne plant pathogenic fungi. J. Environ. Sci. Health, 1998, 33(6):693~704
- [11] Robertson L N, Chandler K J, Stickley B D A, et al. Enhanced microbial degradation implicated in rapid loss of chlorpyrifos from the controlled-release formulation suSCon Blue in soil. Crop Prot., 1998, 17(1):29~33

- [12] Yanze-Kontchou C, Gschwind N. Mineralization of the herbicide atrazine as a carbon source by a *Pseudomonas* strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, 60(12): 4297 ~ 4302
- [13] Venkateswarlu D, Siddarama T K, Sethunathan N. Persistence and biodegradation of carbofuran in flooded soils. *J. Agric. Food Chem.*, 1977, 25: 533 ~ 538
- [14] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册. 第 8 版. 北京: 科学出版社, 1984. Buchanan R E, Gibbs N E. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (In Chinese). 8th Ed. Beijing: Science Press, 1984
- [15] 戈登 R E, 等著. 芽孢杆菌属. 北京: 农业出版社, 1983. Gordon R E, *et al.* *The Genus Bacillus*. USDA (In Chinese). Beijing: Agriculture Press, 1983
- [16] Ghosh S, Mahapatra N R, *et al.* Plasmid curing from an acidophilic bacterium of the genus *Acidobacteria*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2000, 183: 271 ~ 274
- [17] 李德葆, 周雪平, 许建平, 等. 基因工程操作技术. 上海: 上海科学技术出版社, 1996. Li D B, Zhou X P, Xu J P, *et al.* *Genetic Engineering Technology* (In Chinese). Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Press, 1996
- [18] Racke K D, Steele K P, Yoder R N, *et al.* Factors affecting the hydrolytic degradation of chlorpyrifos in soil. *J. Agric. Food Chem.*, 1996, 44(6): 1582 ~ 1592
- [19] Racke K D, Coats J R, Titus K R. Degradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product, 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in soil. *J. Environ. Sci. Health*, 1988, 23(6): 527 ~ 539
- [20] Caro L, Churchward G, Chandler M. *Methods in Microbiology*. London: Academic Press, 1984, 17: 97 ~ 122
- [21] Havens P L, Rase H F. Reusable immobilized enzyme/polyurethane sponge for removal and detoxification of localized organophosphate pesticide spills. *Indus. Engin. Chem. Res.*, 1993, 32(10): 2254 ~ 2258
- [22] Mulbry W, Kearney P C. Degradation of pesticides by microorganisms and the potential for genetic manipulation. *Crop Prot.*, 1991, 10(5): 334 ~ 346
- [23] Wilfred C, Ashok M. The use of live biocatalysts for pesticide detoxification. *Trends in Biotechnology*, 1998, 16(2): 71 ~ 76

CHARACTERISTICS AND FUNCTION OF BACILLUS LATERSPRORUS DSP IN DEGRADING CHLORPYRIFOS

Wang Xiao Chu Xiaoqiang Yu Yunlong[†] Fang Hua Chen Jie Song Fengming

(Department of Plant Protection, College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract A bacterial strain *Bacillus laterosporus* DSP capable of degrading chlorpyrifos was isolated from soil. Degradation characteristics of chlorpyrifos by the strain DSP were investigated in pure culture system under conditions of pH 7.0, 25 and biomass of OD₄₁₅ 0.2. The half-life of chlorpyrifos at concentrations of 1 and 10 mg L⁻¹ was measured to be 1.48 d and 5.00 d, respectively. The chemical showed obvious inhibitive effect on degradation capability of the strain, when its concentration reached as high as 100 mg L⁻¹. The degradation rate of chlorpyrifos by the Strain DSP was affected by pH and temperature showing an order of pH 7.0 > pH 5.0 > pH 9.0, and of 35 > 25 > 15, respectively. A plasmid with a size of approximately 20 kb was found in Strain DSP. The strain lost its ability to degrade chlorpyrifos when the plasmid was removed by acridine orange and heating. When the plasmid was transferred into *Escherichia coli* JM109 and back into plasmid-removed DSP the transformants obtained the ability to degrade chlorpyrifos. These observations indicated that the plasmid of Strain DSP is responsible for the degradation of chlorpyrifos.

Key words Chlorpyrifos; Degradative plasmid; *Bacillus laterosporus*; Soil