

文章编号:1002-4026(2011)05-0014-04

降解毒死蜱多功能菌株的构建 及其对土壤的修复作用

李红梅,张广志,张新建,黄玉杰,李纪顺,杨合同*

(山东省科学院中日友好生物技术研究中心,山东省应用微生物重点实验室,山东 济南 250014)

摘要:将实验室保存的有机磷降解酶基因 *mpd* 连接到自杀性质粒 pUT-Km1 上,构建重组质粒 pUT-M,通过三亲杂交,将 *mpd* 整合到越南伯克氏菌 B418 的染色体上,获得多功能工程菌株。实验证明工程菌株的原有解磷、解钾、固氮活性没有改变;48 h 后对溶液中毒死蜱降解率达到 65%;对室内模拟污染土壤有一定的降解能力,20 d 对土壤中的毒死蜱降解率达 91%。

关键词:降解毒死蜱;多功能菌株;载体构建;越南伯克氏菌;土壤修复

中图分类号:X172 文献标识码:A

Construction of multifunctional bacterium strain of chlorpyrifos degradation and its bioremediation application

LI Hong-mei, ZHANG Guang-zhi, ZHANG Xin-jian, HUANG Yu-jie, LI Ji-shun, YANG He-tong

(Shandong Provincial Key Laboratory of Applied Microbiology, Biotechnology Center,
Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China)

Abstract: We constructed recombinant plasmid pUT-M by ligating *mpd* gene on a suicide plasmid pUT-Km1. We integrated *mpd* gene onto the chromosome of *B. vietnamiensis* B418 by triparental hybridization and obtained a multifunctional engineering stain. Experimental results show that the engineering stain retains its original activity of phosphorus or potassium decomposition and nitrogen fixation. The strain degrades chlorpyrifos in solution at a rate of 65% 48 hours later. Moreover, the strain can also degrade chlorpyrifos in simulated soil and the degradation rate can reach 91% 20 days later.

Key words: chlorpyrifos degradation; multifunctional bacterium strain; construction of recombinant plasmid; *Burkholderia vietnamiensis*; soil bioremediation

毒死蜱作为高毒有机磷农药的替代品,大量频繁使用对生态环境造成了严重污染,尤其在土壤中残留期较长^[1],因此毒死蜱污染土壤的治理备受关注。过去分离到的多数降解微生物在室内纯培养方式下有较好的降解效果,但不能适应复杂的自然土壤环境,且功能单一,难以适应农业生产的需求,因此研制降解农药残留的多功能微生物制剂将成为可持续发展农业和生态农业发展的战略需求。

收稿日期:2011-05-23

基金项目:科技部国际合作项目(2010DFA32330,2009DFA32340);“十二五”农村领域国家科技计划课题(2011AA10A205)

作者简介:李红梅(1977-),女,硕士,助理研究员,研究方向为农业微生物。

* 通讯作者,Email:yanght@keylab.net

本实验室分离的越南伯克氏菌(*Burkholderia vietnamiensis*) B418 具有多功能性,可以固氮、解磷、解钾、防治植物根结线虫、防治植物土传病害、促进植物生长,并已进行了商品化生产^[2]。本文将有机磷降解酶基因 *mpd* 整合到 B418 的染色体上,获得了具有降解毒死蜱活性的多功能工程菌株,为毒死蜱污染土壤的生物治理提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

本研究所用菌株和质粒参见表 1。

表 1 供试菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids to be tested

菌株和质粒	基因型和表型	来源
质粒		
pMD18-T-M	T-Vector harboring <i>mpd</i> gene	实验室保存
pUT-Km1	Suicide plasmid ;R6K Replicon;Amp ^r ;Km ^r ;	实验室保存
pUT-M	pUT-Km1 harboring <i>mpd</i> gene	本文构建
pRK600	Cm ^r ;helper plasmid	实验室保存
菌株		
<i>E. coli</i> DH5 α (λ -pir)	F ⁻ , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>deoR</i> , <i>thi-1</i> , <i>supE44</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, λ ⁺	实验室保存
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> 418(B418)	<i>Burkholderia vietnamiensis</i> type strain	实验室保存
<i>E. coli</i> TOP10-M	<i>E. coli</i> TOP10 harboring plasmid pMD18-T-M	实验室保存
<i>E. coli</i> S17-1-M	<i>E. coli</i> S17-1 harboring plasmid pUT-M	本文构建
B418-M	<i>Burkholderia vietnamiensis</i> 418 harboring <i>mpd</i> gene	本文构建

1.1.2 试剂和仪器

限制性内切酶,T4 DNA 连接酶,DNA 凝胶回收试剂盒为 TaKaRa 公司产品。毒死蜱测定采用岛津 LC-20ATVP 液相色谱仪。

1.2 毒死蜱的检测与分析

毒死蜱的提取及检测参照文献[3]进行。

1.3 表达载体的构建和转化

Not I 酶切质粒 pMD18-T-M(*mpd* 基因两端带有 *Not* I 酶切位点及 SD 序列),小片段回收后连接到经同样酶切的质粒 pUT-Km1 上,构建自杀性重组质粒 pUT-M,转化大肠杆菌 DH5 α (λ -pir),验证后的阳性转化子命名为 *E. coli* DH5 α -M。

1.4 多功能工程菌的构建

采用三亲杂交方法^[4],利用助手质粒 pRK600 将供体菌中的自杀性质粒 pUT-M. 转入受体菌 B418 中;即将过夜培养的供体菌、受体菌、助手菌以 1:1:1(体积比)混合,离心收集菌体,无菌水冲洗 2 次,再次收集菌体悬浮于 100 μ L 的无菌水中,30 $^{\circ}$ C 静止培养 10 h 后涂布于含毒死蜱和 Kan 的基础无机盐平板上,30 $^{\circ}$ C 培养 72 h,挑选有水解圈的菌落进行验证,阳性克隆命名为 B418-M。

1.5 工程菌对毒死蜱的降解

1.5.1 对溶液中毒死蜱的降解

将转化子活化后接种到无机盐培养基(含毒死蜱 100 mg \cdot L⁻¹),30 $^{\circ}$ C ,150 r/min 培养 48 h 后,萃取培养液中残留的毒死蜱,测其残留量,以不接菌的作为对照计算毒死蜱的降解率,每个样品设三个重复。

1.5.2 对室内模拟毒死蜱污染土壤的降解

以工程菌株及原始菌株 B418 为试验菌株,取蔬菜地土壤(山东省科学院中日友好生物技术中心基地),

自然风干,过 20 目筛,进行灭菌处理。然后分成等份,每份 100 g,未灭菌土壤也同样分成等份,分别放入三角瓶中,按每千克干土 100mg 毒死蜱的量加入,搅拌均匀,过夜,作为模拟试验土壤。然后按每克干土 10^8 个细胞的量加入工程菌发酵液及 B418 发酵液,保持土壤的含水量在 40% 左右,放入暗处培养。每隔 5 d 取样,萃取后进行测定。以不接菌的土壤作为对照。每个处理三个重复。

降解率 = (对照毒死蜱残留量 - 样品毒死蜱残留量) / 对照毒死蜱残留量 $\times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 表达载体 pUT-M 的构建

载体 pMD18-T-M 经 *Not* I 酶切后,目的片段克隆到自杀性质粒 pUT-Km1 上,构建了表达质粒 pUT-M,并成功转化 *E. coli* DH5 α (λ -pir),经酶切验证(见图 1)载体构建成功。

2.2 多功能工程菌的构建

通过三亲杂交,将有机磷降解酶基因 *mpd* 整合到 B418 染色体 DNA 上,挑选有水解圈的转化子进行进一步的 PCR 验证(见图 2),转化子都能扩增到目的片段,表明 *mpd* 基因已经进入 B418 中。

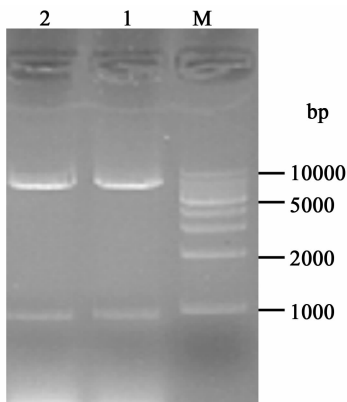


图 1 重组质粒 pUT-M 的酶切鉴定

Fig. 1 Restriction enzyme analysis of recombinant plasmid pUT-M

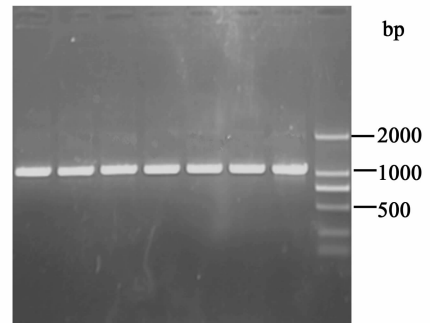


图 2 部分转化子的 PCR 检测

Fig. 2 PCR detection of partial transformants

2.3 工程菌对毒死蜱的降解

2.3.1 工程菌对溶液中毒死蜱的降解

工程菌株接入无机盐液体培养基,48 h 后测定农药残留量,计算降解率,结果见表 2。重组工程菌对 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 毒死蜱的降解率达到 65%,表明 *mpd* 基因已经整合到 B418 的染色体上,表达出有活性的有机磷降解酶。

表 2 工程菌株降解活性检测

Table 2 Detection of degradation activity of pUT-M

菌株	残留量/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	降解率/%
pUT-M	33	65
B418	89	6
CK	95	-

2.3.2 工程菌对室内模拟污染土壤的降解

工程菌株接入土壤后,土壤中的毒死蜱在前 20 d 内降解

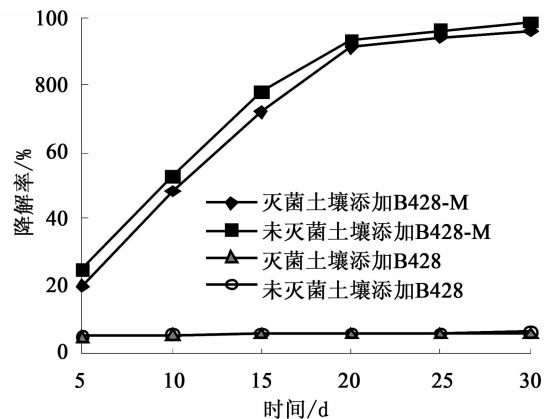


图 3 工程菌及 B418 对室内模拟污染土壤的降解

Fig. 3 The degradation of chlorpyrifos in simulated soil with B418-M and B418

很快(见图3),到第20 d,降解率达到91%,在自然土中降解率稍高于灭菌土,达到93%;第20 d到第30 d,降解速率减慢,到第30 d时毒死蜱基本降解完。整个降解过程中,毒死蜱在自然土中的降解率都稍高于灭菌土中的降解率,因为自然土中存在的微生物起到了加速降解的作用。原始菌株 B418 无论是在自然土中还是灭菌土中,对毒死蜱基本不降解。表明有机磷降解酶基因导入 B418 菌株后,获得的工程菌具有了降解毒死蜱的能力。

2.4 重组工程菌的遗传稳定性研究

在不加抗生素的平板上,连续转接100次后,随机挑取50个单菌落,均能在含抗生素的平板上生长,并且对毒死蜱的降解特性相同,说明 *mpd* 基因是通过同源重组整合到 B418 的染色体上,并且得到了稳定表达。

3 讨论

重组自杀性载体是以 Tn5 转座的方式将目的基因整合到宿主菌的染色体上,与以质粒为载体构建的工程菌相比^[5],在遗传稳定性方面表现出独特的优越性,本文构建的重组工程菌经连续传代,其降解特性没有发生改变,能稳定遗传;且获得的工程菌与出发菌相比,原有的解磷、解钾、促生、防病等功能没有改变(本文数据没有列出),因此自杀性载体用于工程菌构建安全、有效。

在工程菌构建中有多种受体菌可供选择,如恶臭假单胞、鞘胺醇单胞菌等^[6-7],本文选择已商品化的具有解磷、解钾、固氮、促生、防根结线虫等功能的 B418 菌株作为受体菌,将有机磷降解酶基因整合到其染色体中,获得了具有降解毒死蜱功能的多功能工程菌株,实验证明,工程菌株在土壤中可有效降解毒死蜱。本研究为毒死蜱污染土壤的生物降解提供理论支持。

参考文献:

- [1] RACKE K D, COATS J R, TITUS K R. Degradation of chlorpyrifos and its hydrolysis products, 3,5,6-trichloro-2-pyridinol, in soil [J]. *Environ Sci Health B*, 1988, 23(6): 527-539.
- [2] 李纪顺, 杨合同, 陈凯. 两株多功能生防细菌在小麦根际定殖及其对小麦病害的防治效果[J]. *山东农业科学*, 2005(4): 38-39.
- [3] LI X H, HE J, LI S P. 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.
- [4] 刘智, 洪青, 徐剑宏. 耐盐及苯乙酸、甲基对硫磷降解基因工程菌的构建[J]. *微生物学报*, 2003, 43(5): 554-559.
- [5] 彭冉, 曹德菊, 叶碧碧, 等. 抗铅联合苯酚降解多功能菌的构建[J]. *安徽农业大学学报*, 2010, 37(2): 342-345.
- [6] 顾立锋, 何健, 黄星, 等. 多功能降解菌 *Pseudomonas putida* KT2440-DOP 的构建与降解特性研究[J]. *微生物学报*, 2006, 46(5): 763-766.
- [7] 陆鹏, 洪源范, 洪青, 等. 遗传稳定型六六六、甲基对硫磷降解基因工程菌的构建及特性研究[J]. *环境科学*, 2008, 29(7): 1973-1976.