第 40 卷 第 2 期
2003 年 3 月

土 壤 学 报
ACTA PEDOLOGICA SINICA

Vol. 40, No. 2
Mar., 2003

甲基对硫磷降解菌 DLL- 1 的诱变育种*

刘 智 李顺鹏-
(南京农业大学资源与环境学院微生物学系, 南京 210095)

摘 要 采用紫外线和氯化锂诱变, 从甲基对硫磷降解菌假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) DLL- 1 中获取高效突变株 DLL- E1, DLL- E2, DLL- E3, DLL- E4。并对其降解甲基对硫磷性能、降解对硝基苯酚性能、底物广谱性及胞外酶及粗酶液活性等生物学功能进行了研究。与出发菌株相比, 上述性能均有所提高。选择 DLL- E4 作为进一步研究的对象, 详细研究了其对甲基对硫磷及对硝基苯酚的耐受和降解情况。高效菌株的选育为农药残留降解的酶学研究打下了基础。

关键词 甲基对硫磷, 假单胞菌, 突变株, 生物学功能
中图分类号 S154.39

目前世界上已知的化学品已达 1000 万种左右, 常用的化学品也在 8 万种以上, 每年约有 1000 种新化学品投入市场[1]。大量化学合成品的出现及其品种结构的不断更新, 给自然生态系统带来了极大的压力, 同时也给人们提出了如何消除环境污染的问题。微生物是化学物质转化和降解的最重要因素之一, 利用微生物降解化学品, 特别是农药, 国内外均进行了大量的研究。筛选到优良的菌株并对其进行遗传改造, 使其具有生产价值, 从而利用其进行污染物的生物修复, 是人们努力的方向。

据 1994 年资料, 高毒的有机磷杀虫剂占我国整个农药的 50% 左右[2], 甲基对硫磷作为一种广泛使用的有机磷杀虫剂, 多年来的大量施用, 形成了对土壤、水体等自然媒介的严重污染[3]。我们已经分离到一株能完全矿化甲基对硫磷的菌株假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) DLL- 1[4], 现对其进行诱变, 获得了具有优良性状的 4 株突变菌株, 本文研究了它们的一些生物学性状, 旨在为该系列菌株应用于环境修复打下良好的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 菌株 DLL- 1。菌株 DLL- E1, DLL- E2, DLL- E3, DLL- E4, 为 DLL- 1 经紫外线和 LiCl 复合诱变获得的高甲基对硫磷降解性能突变菌株。

1.1.2 培养基 见参考文献[4]。

1.1.3 试剂 农用甲基对硫磷(50%, 镇江市农资公司)、甲基对硫磷(90%, 苏州化工厂)、甲基对硫磷(色谱纯, 99.5%, 上海市农药标准化研究所), 对硝基苯酚及其它试剂均为化学纯。

1.2 方法

1.2.1 降解菌的培养 参见文献[4]。

1.2.2 紫外和氯化锂复合诱变 紫外诱变杀菌曲线参见文献[5], 选择 70% 左右致死率的 UV 剂量和常规氯化锂浓度(0.4%)对 DLL- 1 进行复合诱变, 具体方案如下:

由于 DLL- 1 产生的酶水解甲基对硫磷, 在添加甲基对硫磷的培养基平板上形成透明圈, 故粗筛根据突变菌株在含 500 mg L^{-1} 甲基对硫磷的 LB 培养基表面形成的透明圈直径与菌落大小的比值进行, 复

* 农业部"九五"重点项目(编号: 96 环 02- 02)资助
- 通讯作者
收稿日期: 2001- 02- 15; 收到修改稿日期: 2001- 12- 03

筛则通过测定菌液降解甲基对硫磷的能力来选择高效降解菌株, 复筛具体方法同酶学试验, 将酶液用培养液替代即可。本试验共进行四次, 每次筛选出一株高效菌株。

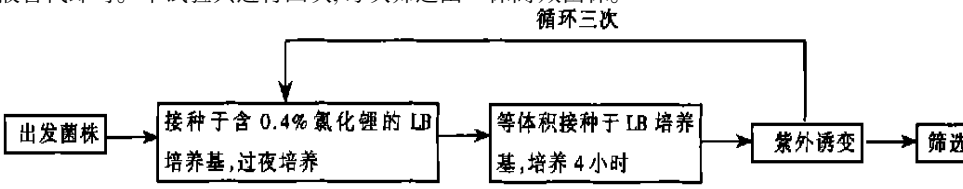

图 1 紫外和氯化锂复合诱变流程图

Fig. 1 The flow scheme of mutation with UV and LiCl

1.2.3 降解谱试验 选择实验室常备农药及芳香族化合物, 共 11 种, 以 200 mg L^{-1}浓度添加于基础培养基, 3% 接种过夜培养的 DLL-1 及其诱变菌株, 24 h 后通过比浊法[5] 测生物量。

1.2.4 降解性试验 3% 接种过夜培养的 DLL-1 及其诱变菌株于含 800 mg L^{-1}甲基对硫磷及 400 mg L^{-1}对硝基苯酚的基础培养基中, 培养 24 h 及 30 h 后检测降解率。其中甲基对硫磷的检测方法参考文献[6], 对硝基苯酚检测方法参考文献[7]。本文所有数据均为三个平行测定的平均值。

1.2.5 胞外酶及粗酶液试验 收集 LB 培养基过夜培养的菌液, 通过调节, 使它们在 550 nm 处吸光值一致, 5 000 r min^{-1}, 10 min 离心取上清, 备用胞外酶试验; 使用 JY92—II型超声波破碎仪, 200V 电压, 3s 处理, 7s 间隙, 冰浴循环进行 25 次破碎细胞, 备用粗酶液试验。酶学试验反应体系为: 0.5 ml 菌液(上清或粗酶液, 调 pH 至 7.0)、12.5 μL 甲基对硫磷(色谱纯, 10 mg ml^{-1}, 无水甲醇溶解), 35℃恒温水浴 5 min, 100℃沸水浴 10 min 中止反应, 12 000 r min^{-1}, 10 min 离心, 取上清检测。

1.2.6 甲基对硫磷及对硝基苯酚的耐受和降解试验 接种 DLL-1 及 DLL-E4 于含不同浓度甲基对硫磷或对硝基苯酚的基础培养基和葡萄糖铵盐培养基中, 检测培养基颜色变化、生物量及甲基对硫磷或对硝基苯酚的降解率。生物量检测采用比浊法或梯度稀释计数法[4]。

1.2.7 DLL-E4 遗传稳定性检测 于 LB 斜面上连续传代 DLL-E4, 分别选取第十次传代及第三十次传代斜面菌种测定其胞外酶和粗酶液活性。

2 结果与讨论

2.1 高降解性能突变株选育

2.1.1 紫外杀菌曲线 按文献[5]方法操作, 得出紫外杀菌曲线如图 2。

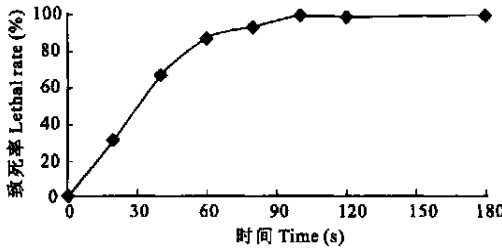

图 2 DLL-1的紫外杀菌曲线

Fig. 2 The UV bacterium-killing curve of DLL-1

在紫外线进行微生物诱变的过程中, 正向突变比较多地出现在偏低剂量中, 而负向突变则较多地出现于偏高剂量[8], 故本试验采用致死率 70% 左右的紫外作用剂量, 即紫外作用时间 40s。

2.1.2 突变株筛选 由于出发菌株 DLL-1 在含甲基对硫磷的平板上生长后可形成黄色的水解圈(培养一段时间后, 黄色褪去, 但水解圈仍存在), 因此采用测量水解圈直径大小与菌落大小的比值作为粗筛手段, 每轮筛选出四株菌。然而, 对于高产菌株而言, 这种筛选方法并不一定可行, 例如: 头孢霉素 C 诱变研究中发现, 抑菌圈的大小和抗菌素的浓度在低浓度时呈线性关系, 但在高浓度时浓度增加很多, 可是抑菌圈却很少增加[8]。因此, 复筛时, 选择在 LB 培养基中过夜培养的诱变菌株培养液, 测定其降解甲基对硫磷的能力, 对照为 100℃, 10 min 灭活的培养液。由于每分子甲基对硫磷生成一分子对硝基苯酚, 本试验通过测定对硝基苯酚的生成来计算甲基对硫磷的降解率。降解率(%) = 100% × (处理中生成的对硝基苯酚含量 - 对照中生成的对硝基苯酚含量) ÷ 理论上甲基对硫磷应转化的对硝基苯酚的含量, 结果如下(见表 1):

表 1　DLL- 1 突变菌株的筛选

Table 1　Selection of DLL- 1's mutants

试验次数 Test times	菌株代号及甲基对硫磷降解率(%) The strains' code and removal rate of MP[1)]				
第一次	DLL- 1	A63	A70	A75	A89
	88.36	93.83	109.3	97.6	100.1
第二次	DLL- 1	B54	B63	B70	B81
	91.28	92.36	95.27	103.8	92.15
第三次	DLL- 1	C3	C9	C20	C21
	89.54	90.24	89.7	88.68	98.56
第四次	DLL- 1	D7	D35	D47	D87
	86.08	81.1	73.41	94.05	80.87

1) MP: Methyl Parathion

其中 DLL- 1 为出发菌株, A、B、C、D 分别代表四次试验。由于出发菌株降解甲基对硫磷的能力较强, 通过比较菌株在添加农药的固体培养基上产生的水解圈大小筛选菌株, 有一定的局限性, 因此在检测突变子降解甲基对硫磷的能力时, 出现水解圈较大而降解能力反而下降的现象。分析原因, 可能因为菌株在农药平板上产生的水解圈大小还与降解酶的分泌性能、农药平板的厚薄(即相同面积中农药的量多少)等有关, 而测量突变子降解能力时, 菌株对甲基对硫磷的降解是在液体培养基中进行, 可以排除上述因素。由于对突变子一一进行降解能力测试, 其工作量太大, 运用上述方法进行初筛, 然后对初筛结果运用测定降解能力的方法进行复筛, 在目前看来, 仍然不失为一种较好的方法。据上表, 选择 A70、B70、C21、D47 作为下一步研究的对象, 为方便起见, 分别重新命名为 DLL- E1, DLL- E2, DLL- E3, DLL- E4。

2.2　突变株生物学活性

2.2.1　突变株降解谱　　DLL- 1 及其诱变株在以下列物质为唯一碳源培养时, 利用 722 分光光度计监测培养液在 550 nm 处的吸光值以比较菌体生长情况, 生长情况如表 2 所示:

表 2　突变株降解谱试验

Table 2　Test of substrates used by DLL- 1 and its mutants

农药名称 Pesticide	菌株生长情况(OD_{550nm}) Growth of the strain (OD_{550nm})				
	DLL- 1	DLL- E1	DLL- E2	DLL- E3	DLL- E4
空白对照	0.150	0.031	0.040	0.078	0.056
甲醇	0.084	0.040	0.043	0.040	0.043
苯甲酸	0.415	0.121	0.339	0.115	0.086
苯乙酸	0.292	0.373	0.523	0.312	0.179
邻氨基酚	0.195	0.057	0.205	0.241	0.057
水杨酸	0.112	0.028	0.032	0.025	0.029
2,4- 二氨基酚	0.076	0.030	0.042	0.028	0.032
间苯二酚	0.073	0.029	0.037	0.032	0.026
邻苯二酚	0.489	0.426	0.426	0.309	0.262
苯胺	0.098	0.037	0.031	0.039	0.025
马拉硫磷	0.153	0.201	0.062	0.111	0.068
辛硫磷	0.100	0.363	0.141	0.029	0.214
甲胺磷	0.149	0.027	0.041	0.033	0.046
乐果	0.083	0.031	0.021	0.032	0.019
敌敌畏	0.106	0.034	0.051	0.040	0.042
杀虫双	0.096	0.025	0.025	0.027	0.034
杀虫单	0.100	0.032	0.025	0.026	0.037
扑虱灵	0.110	0.050	0.050	0.041	0.060

由于 DLL- 1 及其诱变菌株出发菌浓度不一致, 故上表数据只能纵向比较。可以看出, 诱变菌株的降解谱有明显扩大。其中, DLL- E1 增加了马拉硫磷、辛硫磷; DLL- E2 增加了邻氨基酚、辛硫磷; DLL- E3 增加了邻氨基酚; DLL- E4 增加了辛硫磷。由于以上化合物结构与甲基对硫磷或对硝基苯酚相似, 诱变株降解谱的扩大可能是使降解农药的酶系专一性下降所导致的, 具体机理有待于进一步研究。

2.2.2 突变株降解性能 分别接种3% 过夜培养的 DLL- 1 及诱变菌株于含 800 mg L^{-1}甲基对硫磷(化学纯) 的基础培养基中, 35℃, 120 r min^{-1}摇床培养 24 h, 检测甲基对硫磷的降解率(图 3), 同样的菌液接入含 400 mg L^{-1}对硝基苯酚(化学纯) 的基础培养基中, 分别于 24 h 后和 30 h 后检测对硝基苯酚的降解率(图 4)。

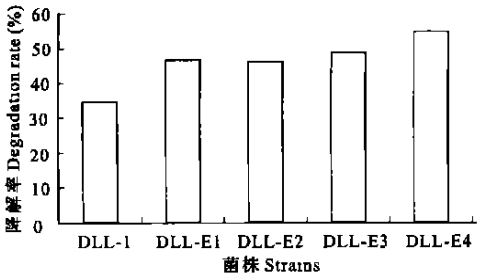

图 3 DLL- 1 及其诱变菌株对甲基对硫磷的降解

Fig. 3 Rate of methyl parathion removal by DLL- 1 and its mutants

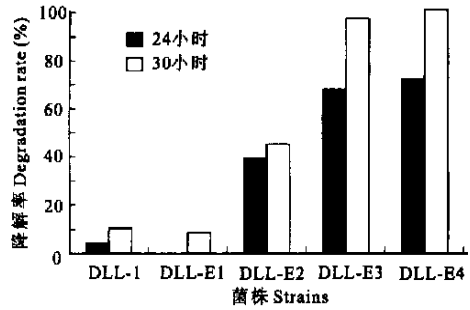

图 4 DLL- 1 及其诱变菌株对对硝基苯酚的降解

Fig. 4 Rate of PNP removal by DLL- 1 and its mutants

从上二图可以看出, 诱变菌株对甲基对硫磷的降解均有一定程度的提高, 以 DLL- E4 效果最好, 而对对硝基苯酚的降解, 除 DLL- E1 外, 其它三株菌有极大的提高, 其中也以 DLL- E4 效果最好, 故选择 DLL- E4 为进一步研究的对象。Douglas 等曾指出, 降解甲基对硫磷的菌株生长可被对硝基苯酚所抑制[6], 但我们的研究发现诱变菌株对对硝基苯酚降解能力的提高可以减轻在降解甲基对硫磷过程中产生的对硝基苯酚对菌株生长的影响。

2.2.3 突变株酶活 取于 LB 培养基中过夜培养的 DLL- 1 及其诱变菌株, 离心收集上清, 测胞外酶活性, 破碎培养液, 取经破碎的培养液测粗酶液活性(图 5)。

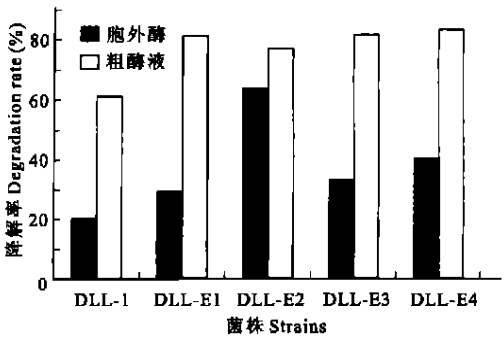

图 5 DLL- 1 及其诱变菌株胞外酶及粗酶液活性

Fig. 5 Activity of ectoenzyme and crude enzyme of DLL- 1 and its mutants

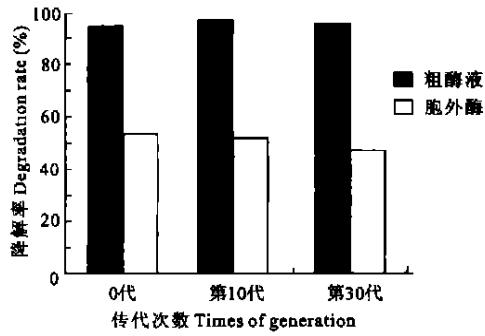

图 6 DLL- E4 的遗传稳定性

Fig. 6 Genetic stability of DLL- E4

从图 5 可以看出, 诱变菌株的胞外酶及粗酶液活性均有大幅度提高, 其中, DLL- E2 胞外酶活性最高, 对甲基对硫磷的降解率从原始菌株的20% 提高到约65%, 酶活提高了 2.2 倍。DLL- E2 降解甲基对硫磷的胞外酶酶活的大幅上升可能是由于诱变改善了该降解酶的分泌性能, 该突变子将可用于提取与

纯化降解甲基对硫磷的酶, 同时也可以作为研究该降解菌分泌降解酶的机制提供了良好的材料。

2.2.4　DLL- 1 和 DLL- E4 对甲基对硫磷的耐受及降解　　农用甲基对硫磷乳油加入培养基后, 培养基变得十分浑浊, 因此采用活菌平板计数法检测降解菌的生长情况。菌体在生长过程中, 先将甲基对硫磷分解, 生成对硝基苯酚(黄色) , 随后, 对硝基苯酚也将被完全矿化[4] 。所以选择黄色褪去作为甲基对硫磷大部分降解的标记, 取刚好褪色的样品进行分析。始终不褪色的样品培养至 48 h 时检测结果。分别采用两种培养基, 基础盐培养基中(表 3) , DLL- 1 空白对照起始菌数为 1.4×10^8 个 ml^{-1}, 48 h 后为 9.2×10^7 个 ml^{-1}。DLL- E4 空白对照起始菌数为 1.5×10^8 个 ml^{-1}, 48 h 后为 3.3×10^7 个 ml^{-1}。葡萄糖铵盐培养基中(表 4) , DLL- 1 空白对照起始菌数为 1.4×10^8 个 ml^{-1}, 48 h 后为 9.2×10^7 个 ml^{-1}。DLL- E4 空白对照起始菌数为 1.5×10^8 个 ml^{-1}, 48 h 后为 3.3×10^7 个 ml^{-1}。

表 3　基础培养基中 **DLL- 1** 和 **DLL- E4** 对甲基对硫磷的耐受及降解

Table 3　Resistance and degradation of Methyl Parathion by DLL- 1 and DLL- E4 in basic medium

		两种菌株对甲基对硫磷的耐受及降解 Resistance and degradation of MP by the two strains individually				
甲基对硫磷	起始添加浓度	100	300	500	700	1 000
($mg\ L^{-1}$)	对照最终浓度	114.04	344.16	392.24	547.82	805.62
DLL- 1	褪色时间(h)	8	20	24	—	—
	菌数(10^6 个 ml^{-1})	150	289	39	< 1	< 1
	残留量($mg\ L^{-1}$)	0	5.73	242.29	397.74	609.93
DLL- E4	褪色时间(h)	7	20	24	—	—
	菌数(10^6 个 ml^{-1})	350	240	18	< 1	< 1
	残留量($mg\ L^{-1}$)	0	5.55	270.16	389.89	579.86

表 4　葡萄糖铵盐培养基中 **DLL- 1** 和 **DLL- E4** 对甲基对硫磷的耐受及降解

Table 4　Resistance and degradation of methyl parathion by DLL- 1 and DIL- E4 in glucose medium

		两种菌株对甲基对硫磷的耐受和降解 Resistance and degradation of MP by the two strains individually				
甲基对硫磷	起始添加浓度	100	500	1 000	2 000	3 000
($mg\ L^{-1}$)	对照最终浓度	116.35	412	996.78	1 845.31	2 456.32
	对硝基酚对照产生量($mg\ L^{-1}$)	8.039	31.37	63.73	161.27	186.74
DLL- 1	褪色时间(h)	8	10	24	—	—
	菌数(10^6 个 ml^{-1})	100	233	86	< 1	< 1
	甲基对硫磷残留($mg\ L^{-1}$)	50.80	68.12	779.59	1 755.77	2 403.36
	对硝基酚产生量($mg\ L^{-1}$)	85.82	75.15	106.63	192.32	186.18
DLL- E4	褪色时间(h)	7	10	24	—	—
	菌数(10^6 个 ml^{-1})	121	250	78	< 1	< 1
	甲基对硫磷残留($mg\ L^{-1}$)	52.85	51.25	326.37	1 776.19	2 374.18
	对硝基酚产生量($mg\ L^{-1}$)	87.06	66.78	121.43	204.04	234.17

从表 3、4 可以看出, DLL- E4 对甲基对硫磷耐受能力在基础培养基中为 500~ 700 $mg\ L^{-1}$, 在葡萄糖铵盐培养基中为 1 000~ 2 000 $mg\ L^{-1}$之间。其与出发菌株 DLL- 1 相比在降解速率上有明显的提高, 尤其在葡萄糖铵盐培养基中时这一点显得极为显著。基础培养基中, 在 100 $mg\ L^{-1}$的甲基对硫磷浓度时突变子完全降解农药的时间由 8 h 缩短到 7 h, 当农药浓度逐步提高时, 两者之间的降解速度趋于相同。在添加了葡萄糖的培养基中, 甲基对硫磷降解的速度都变快, 最终残留量变少, 而且菌株对农药的耐受浓度也相应提高, 这一点值得注意。这里的原因可能是添加的葡萄糖使微生物更好的生长, 从而更好的产生出降解农药酶, 作者在试验中还发现, 当葡萄糖等营养物质添加到一定的浓度时, 会对微生物

的降解作用产生抑制,具体机理尚在研究之中。营养物质对微生物降解能力的影响方面的研究还会对该微生物在田间释放等试验的设计和管理具有指导和借鉴作用。

关于菌数,根据平板计数法,处于相同数量级的菌数可视为相等,但从表 3、4 中我们都可以看出,随着农药浓度的升高,DLL- 1 和 DLL- E4 均出现菌数先上升后下降的趋势。菌数的升高可以解释为营养物质的含量以及培养时间的长短,因为这些菌株均能以甲基对硫磷作为良好的营养物质来生长,又由于本试验的设计是在对硝基苯酚消失时(即,黄色褪去时)取样,在添加高浓度的农药时,培养时间相应较长,随着培养时间的延长,菌株可能会生长得更多。降低则可能是由于高浓度农药对菌体生长的抑制作用。尤其是在农药浓度极高时,例如基础盐培养基中甲基对硫磷浓度 700~ 1 000 mg L^{-1} 及葡萄糖铵盐培养基中浓度 2 000~ 3 000 mg L^{-1} 时,微生物的菌数较之没有添加任何营养物质的空白对照中的菌数还少一个数量级以上($< 1\times 10^6$ 与 9.2×10^7 及 3.3×10^7)。所以在以上条件下微生物菌数的变化很可能是由于营养物质、培养时间、农药浓度等多种因素共同决定的,尤其是农药,不但是微生物的营养物质和能量来源[4],同时也是微生物生长的抑制因素。

从上面的试验结果中,我们还发现,即使在菌株不生长时甲基对硫磷同样有明显的降解。由于在培养过程中,农药的非生物降解情况同时存在(例如,光解),随着农药浓度的上升,培养基中对硝基苯酚的浓度也上升,但接种菌剂的培养基中对硝基苯酚的浓度均显著大于空白对照,即使在菌株不生长时也是如此。这可能是接种时随菌株所带来的酶一直在发挥作用,对甲基对硫磷进行降解。

另外,由于该系列菌株统属假单胞菌,利用葡萄糖发酵产酸,而且降解甲基对硫磷生成的产物 *O*, *O*- 二甲基- 硫代磷酸及对硝基苯酚均为酸性,对硝基苯酚在酸性环境中不显黄色,因此导致了添加高浓度农药或添加葡萄糖时黄色消失,但甲基对硫磷还有一定残留的现象。尤其是在葡萄糖铵盐培养基中,菌株生长产生大量的酸性物质,所以在该条件下菌株生长良好时甲基对硫磷和对硝基苯酚的残留量均较高。另外,降解菌的大量产酸同时也对菌株的生长带来一定的影响,实际生产应用时应采取相应的措施加以消除,例如培养基中添加一定量的碳酸钙,调整碳氮比,以及加入高效的缓冲剂等。

2.2.5 DLL- 1 和 DLL- E4 对对硝基苯酚的耐受及降解 考虑到对硝基苯酚是甲基对硫磷重要的中间代谢产物,又是一种难降解的环境污染物,我们研究了 DLL- 1 和 DLL- E4 对对硝基苯酚的耐受和降解情况,如表 5、6。

表 5 基础培养基中 **DLL- 1** 和 **DLL- E4** 对对硝基苯酚的耐受及降解

Table 5 Resistance and degradation of p-nitrophenol by DLL- 1 and DLL- E4 in basic medium

		两种菌株对对硝基苯酚的耐受和降解 Resistance and degradation of p-nitrophenol by the two strains individually				
	对硝基苯酚(mg L^{-1})	50	100	200	400	700
DLL- 1	褪色时间(h)	18	24	36	96	—
	生长情况(OD_{550nm})	0.139	0.216	0.240	0.255	—
DLL- E4	褪色时间(h)	8	12	24	48	—
	生长情况(OD_{550nm})	0.092	0.127	0.166	0.230	—

表 6 葡萄糖铵盐培养基中 **DLL- 1** 和 **DLL- E4** 对对硝基苯酚的耐受及降解

Table 6 Resistance and degradation of p-nitrophenol by DLL- 1 and DLL- E4 in glucose medium

		两种菌株对对硝基苯酚的耐受和降解 Resistance and degradation of p-nitrophenol by the two strains individually				
	对硝基苯酚(mg L^{-1})	100	300	500	700	1 000
DLL- 1	褪色时间(h)	24	36	72	—	—
	生长情况(OD_{550nm})	1.005	0.786	0.255	—	—
DLL- E4	褪色时间(h)	12	17	40	—	—
	生长情况(OD_{550nm})	0.667	0.366	0.239	—	—

从表5、6中可以看出,突变子 DLL- E4 在降解对硝基苯酚的性状方面较之出发菌株 DLL- 1 有明显的改善。无论是在以对硝基苯酚为唯一碳源,还是在添加易利用碳源葡萄糖的情况下,突变子降解完全对硝基苯酚的时间都几乎提前一半。从菌体的生长情况看,在基础培养基中,突变子在完全降解底物时,菌体的浓度都小于出发菌株,一方面可能与培养时间有关;另一方面,可能与菌体对对硝基苯酚的代谢产物利用有关其原因有待进一步研究。

在葡萄糖铵盐培养基中,菌体的生长则呈现明显的下降趋势,其原因与 2. 2. 2 中提到的一样。同样,我们还从表 6 中发现突变子与出发菌株的生长情况之间的关系,突变子的在降解完对硝基苯酚时的菌体浓度一直低于出发菌株,而且随着对硝基苯酚浓度的升高,两者的差距越来越小。这是高浓度对硝基苯酚对菌体生长的抑制作用和菌体在生长过程中利用其它营养物质(葡萄糖及对硝基苯酚的代谢产物)共同作用的结果。

2. 2. 6　DLL- E4 遗传稳定性　　从图 6 可以看出,DLL- E4 的遗传性相当稳定,传代 10 次和 30 次,其粗酶液降解甲基对硫磷的能力没有任何下降,胞外酶活性也只略为降低。从而说明了 DLL- E4 可望作为生产菌种应用于环境中农药污染的生物修复。

3　结　论

1. 利用 UV 与 LiCl 复合诱变筛选出四株对甲基对硫磷有良好降解作用的高效菌株。在以 800 mg L^{-1}甲基对硫磷及 400 mg L^{-1}对硝基苯酚为唯一碳源时降解率均有提高,DLL- E1, 2, 3, 4 对甲基对硫磷的降解率(24h)分别从出发菌株的 34. 39% 提高到 46. 54%, 46. 54%, 49. 02%, 55. 76%;对对硝基苯酚 24h 和 30h 的降解率分别从 4. 17% 和 10. 83% 改变到 0%, 39. 35%, 67. 02%, 72. 19% 和 8. 89%, 44. 61%, 96. 4%, 100%。

2. 诱变菌株胞外酶和粗酶液活性均有大幅度提高,其中 DLL- E2 胞外酶活性最强,对甲基对硫磷的降解率从原始菌株的 20% 提高到约 65%,酶活提高了 2. 2 倍。DLL- E4 粗酶液活性最强,甲基对硫磷的降解率从原始菌株的 61. 43% 提高到 82. 92%。

3. 诱变菌株降解谱均有不同程度的增宽。其中,DLL- E1 增加了马拉硫磷、辛硫磷;DLL- E2 增加了邻氨基酚、辛硫磷;DLL- E3 增加了邻氨基酚;DLL- E4 增加了辛硫磷。

4. DLL- E4 对甲基对硫磷及对硝基苯酚的降解速率增加,即使在菌株不生长的情况下,残余的酶也能对甲基对硫磷进行降解,而且 DLL- E4 的遗传稳定性好,传代 10 次和 30 次后,胞外酶和粗酶液活性几乎没有下降。

参考文献

1. 国家环境保护局编. 中国环境保护 21 世纪议程. 北京: 中国环境科学出版社, 1995. 101
2. 张一宾, 张怿主编. 农药. 北京: 中国物资出版社, 1997. 47
3. Augustin C, Monteoliva M. Contamination by pesticides in Arable land in the Province of Granada, Spain. Anales de Edafoloegiay Agrobiologia, 1985, 44: 1 785
4. 刘智, 孙建春, 李顺鹏. 甲基对硫磷降解菌 DLL- 1 的分离、鉴定及降解性研究. 应用与环境生物学报, 1999, 5 (增刊): 147~ 150
5. 范秀容, 李广武, 沈萍. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版社, 1988. 75~ 78
6. Douglas, Munnecke M, Dennis P H. Hsieh. Microbial decontamination of parathion and p-nitrophenol in aqueous media. Applied Microbiology, 1974, 28: 212~ 217
7. 郭坤梅, 邓友军. 紫外分光光度法测定对硝基苯酚的适宜条件的探讨. 环境污染与防治, 1998, 20(1): 47~ 48
8. 《微生物诱变育种》编写组. 微生物诱变育种. 北京: 科学出版社, 1979

MUTATION BREEDING OF METHYL PARATHION DEGRADING STRAIN DLL-1(*PSEUDOMONAS* sp.)

Liu Zhi Li Shun-peng
(*Department of Microbiology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China*)

Summary

Four mutants (DLL-E1, DLL-E2, DLL-E3 and DLL-E4) were obtained by UV and LiCl mutation breeding of Methyl Parathion degrading strain *Pseudomonas sp.* DLL-1. Studies on their abilities to degrade Methyl Parathion and p-nitrophenol, substrates, activities of ectoenzyme and crude enzyme showed that all mutants have higher biological activities compared to the original strain. Further studies on resistance and degradation of Methyl Parathion and p-nitrophenol by DLL-E4 was conducted.

Key words Methyl Parathion, *Pseudomonas sp.*, Mutants, Biological functions