

# 马拉硫磷降解菌缺陷短波单胞菌 L19 菌株的 *luxAB* 基因标记及其在土壤中的存活

薛全<sup>1</sup>, 王道胜<sup>1</sup>, 赵静<sup>1</sup>, 花日茂<sup>2\*</sup>, 陈晓琳<sup>1</sup>, 唐欣昀<sup>1\*</sup>

(1. 安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036; 2. 安徽农业大学资源与环境学院, 合肥 230036)

**摘要:** 采用电转化法成功的将带有发光酶基因 *luxAB* 的质粒 pTR102 导入缺陷短波单胞菌 L19 菌株 (*Brevundimonas diminuta* L19) 中, 考察了电击时间、电击场强、细胞生长期等因素对转化效率的影响。测定了转化子 L19-*luxAB* 菌株的遗传稳定性以及标记基因的介入对 L19 菌株降解有机磷农药能力的影响, 研究了 L19 菌株在土壤中的定殖动态和降解马拉硫磷的能力。结果表明, 转化子 L19-*luxAB* 具有发光活性和对卡那霉素的抗性, 遗传稳定性强, 在抗性平板上传代 15 次仍有很强的发光活性, 并且标记菌株与出发菌株对有机磷农药的降解能力无显著差异。证明可以应用 L19-*luxAB* 进行菌株土壤定殖生态学。标记菌株在灭菌土壤和自然土壤中均能很好的存活, 具有明显的降解马拉硫磷的能力。

**关键词:** 马拉硫磷降解; 缺陷短波单胞菌; 电转化; 发光酶基因; 土壤定殖

中图分类号: Q939.99

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2013)05-0838-05

## *luxAB* labelling of malathion-degrading strain L19 of *Brevundimonas diminuta* and its fate in soils

XUE Quan<sup>1</sup>, WANG Dao-sheng<sup>1</sup>, ZHAO Jing<sup>1</sup>, HUA Ri-mao<sup>2</sup>, CHEN Xiao-lin<sup>1</sup>, TANG Xin-yun<sup>1</sup>

(1. School of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. School of Resources and Environment, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

**Abstract:** The plasmid pTR102 with *luxAB* gene was successfully introduced in *Brevundimonas diminuta* L19 strain by electroporation to monitor colonization dynamics of the strain in the natural environment. The influencing factors, such as pulse field strength, pulse time and optical density at  $\lambda_{600\text{ nm}}$  of the culture on transformation efficiency were tested. The *luxAB* gene was expressed in the transformant strain L19-*luxAB*, and after continual transfer for 15 generations, the characteristic of luminescence was still stable. The survival conditions for L19-*luxAB* in soil were studied. The results showed that L19-*luxAB* stably colonized in the soil after 40 d and the L19-*luxAB* strain had high ability in degradation of malathion in soil.

**Key words:** malathion degradation; *Brevundimonas diminuta*; electroporation; *luxAB*; colonization

马拉硫磷是一种低毒的有机磷农药, 触杀效果好, 被广泛用于农业防害以及粮食仓储。广泛的使用带来了土壤及水体污染的负面影响, 已有研究表明许多地区的水体和土壤受到了马拉硫磷污染<sup>[1]</sup>。并且有研究人员对马拉硫磷的毒理进行了研究, Zhang 等系统研究了马拉硫磷及其代谢产物的毒性<sup>[2]</sup>。严峻的环境问题亟待迅速的解决, 利用微生物

的代谢活性进行土壤、水体中有机磷农药残留的生物修复是一种安全、高效、环保的方法。马拉硫磷降解菌的分离和应用也成为了热门的研究话题, Goda 等分离并鉴定了几株具有高效降解马拉硫磷的菌株<sup>[3]</sup>。研究降解菌的实际应用必须解决菌株在土壤及水体中的检测问题, *LuxAB* 基因标记技术的成熟为研究降解菌株在土壤中的存活情况提供了有

收稿日期: 2013-03-19

基金项目: 国家“863”高技术研究发展计划项目 (2007AA102403) 和安徽省科技攻关项目 (08010302166) 共同资助。

作者简介: 薛全, 男, 硕士研究生。E-mail: xq.ok.12345@163.com

\* 通信作者: 花日茂, 男, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: rimaohua@ahan.edu.cn

唐欣昀, 男, 教授, 博士生导师。E-mail: txyah@126.com

效的检测手段。例如, 孙洁梅用 *luxAB* 基因标记了甲基对硫磷降解菌 DLL-1, 并研究了其在土壤和植物根际的生态行为<sup>[4]</sup>; 李瑞雪等使用 *luxAB* 基因标记技术研究了毒死蜱降解菌株 *Sphingopyxis terrae* R17 的土壤定殖和土壤中降解毒死蜱的能力<sup>[5]</sup>。本实验室从土壤中筛选出来的缺陷短波单胞菌 (*Brevundimonas diminuta*) L19 菌株具有很强的降解马拉硫磷的能力, 为了进一步研究该菌株在土壤中的定殖动态和降解马拉硫磷的过程及其机制, 作者采用 *luxAB* 基因标记的检测方法, 研究了标记菌株在土壤中的生态行为和 L19 菌株在土壤中降解马拉硫磷的能力, 为 L19 菌株在土壤修复领域的实际应用提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 菌株与质粒** *E. coli* WA803; 质粒 pTR102::*lux-AB*, *kan<sup>r</sup>*, *tet<sup>r</sup>*; 缺陷短波单胞菌 (*Brevundimonas diminuta*) L19<sup>[6]</sup> 均为本实验室保藏菌种。

**1.1.2 试剂与培养基** 马拉硫磷, 无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 石油醚, 无菌双蒸水, 10% (V/V) 甘油, 20% (V/V) 癸醛。无机盐培养基 (MSM); LB 培养基; SOC 培养基; 选择性培养基: 含 30 μg·mL<sup>-1</sup> 卡那霉素(*kan*) 的 LB 抗性培养基; 质粒提取试剂盒。

**1.1.3 仪器** 比色管, Bio-Rad 电脉冲仪, LG10-2.4A 型高速离心机, GC-2010 型岛津气相色谱仪, NaNo Drop1000, WH-3 微型旋涡混合仪。

### 1.2 方 法

**1.2.1 感受态细胞的制备**<sup>[7]</sup> 将活化的 L19 菌种接种于 100 mL 液体 LB 培养基中, 34℃ 培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.700。将培养液冰浴 15 min 以终止细菌的生长。4℃ 离心, 弃去上清液。用冰浴后的 10%甘油洗涤菌体。重复甘油洗涤步骤 1 次。最后用 1 mL 10%甘油悬浮菌体, 菌体浓缩 100 倍, 以提高转化子的得率, -70℃ 保存待用<sup>[8]</sup>。

**1.2.2 发光酶基因标记 L19 菌株** 按照质粒提取试剂盒的操作说明从 *E. coli* WA803 中提取质粒 pTR102, 进行琼脂糖凝胶电泳检测质粒提取的效果, 并用 Nano Drop1000 测量质粒的浓度。将 2 μL 质粒 DNA 加入到 80 μL 新鲜制备的感受态细胞中, 混合均匀后转入预冷的间隙为 0.2 cm 的电极杯中, 避免产生气泡, 调节脉冲场强强度和脉冲时间, 电击后迅速加入 1 mL 预热至 34℃ 的 SOC 培养基, 34℃、160 r·min<sup>-1</sup> 培养 1 h。将菌悬液进行系列稀释后涂布在含有 *kan* 30 μg·mL<sup>-1</sup> 的 LB 抗性平板上。

34℃ 培养 1~2 d 后, 在培养皿盖上滴加 10 μL 癸醛暗室中观察菌落的发光情况。具有发光能力的菌落即为转化子所形成的菌落, 挑取保存。

**1.2.3 转化效率影响因素的探究**<sup>[7,9]</sup> 设定电击时间为 4 ms, 细胞生长状态 OD<sub>600</sub> 为 0.7, 电击场强范围为 5~15 kV·cm<sup>-1</sup> 以考察电击场强对转化效率的影响。设定电击场强为 2.8 kV, 细胞生长状态 OD<sub>600</sub> 为 0.7, 电击时间范围为 1~4 ms, 以考察电击时间对转化效率的影响。设定电击时间为 3.5 ms, 电击场强为 14 kV·cm<sup>-1</sup>, 细胞生长状态 OD<sub>600</sub> 范围为 0.2~1.2, 以考察细胞生长状态对转化效率的影响。

**1.2.4 测定转化子的遗传稳定性** 将标记的 L19-*luxAB* 菌株在 LB 抗性平板和 LB 平板上连续传代, 检测标记菌株的发光情况。将标记菌株 L19-*luxAB* 接种于 300 mL LB 液体培养基中, 34℃, 160 r·min<sup>-1</sup> 培养 4 d, 分别在抗性平板和 LB 平板做稀释梯度涂板。计算质粒保留率: 质粒保留率=抗性平板菌落数/非抗性平板菌落数×100%<sup>[10-11]</sup>

**1.2.5 *luxAB* 基因导入对菌株降解马拉硫磷能力的影响**<sup>[10]</sup> 将培养至 OD<sub>600</sub> 达到 0.8 左右的 L19 和 L19-*luxAB* 菌株分别用无机盐培养基洗涤菌体 2 次, 最后用无机盐培养基悬浮菌体, OD<sub>600</sub> 调至 1.0。实验组将 1 mL 菌液接种于 4 mL 无机盐培养基中, 空白对照为 5 mL 无机盐培养基, 马拉硫磷初始浓度都为 60 mg·L<sup>-1</sup>, 34℃, 160 r·min<sup>-1</sup> 黑暗培养。定时取样, 用石油醚萃取, 萃取液定容至 10 mL, 稀释一定的倍数后用气相色谱测定马拉硫磷含量。实验结果使用软件 design expert 做显著性分析, 并计算降解率:

降解率=(对照组残留浓度-实验组残留浓度)/对照组残留浓度×100%

**1.2.6 L19-*luxAB* 在不同处理土壤中的定殖**<sup>[12]</sup> 将供试土壤, 自然风干后研磨, 过 2 mm 筛。分别取灭菌土壤(土壤装入塑料袋中, 121℃ 灭菌 1 h, 24 h 以后再次灭菌) 和非灭菌土壤 500 g。加入经无菌水洗涤的 L19-*luxAB* 菌液 30 mL, 调节水分含量为 25%, 轻轻搅拌均匀, 定期加水保持水分含量恒定。定期取土置于小试管中, 蒸馏水悬浮, 涡旋仪上振荡均匀后采用梯度稀释法涂布在含有抗生素的 LB 平板(*kan* 30 μg·mL<sup>-1</sup>, *Nys* 50 μg·mL<sup>-1</sup>) 上, 测定标记菌株存活状况。另外, 灭菌处理的土样同时在非抗性平板上涂布计数以计算标记菌株在土壤当中质粒的保留率: 土壤中标记菌株质粒保留率=非抗性平板发光菌落数/非抗性平板菌落总数×100%

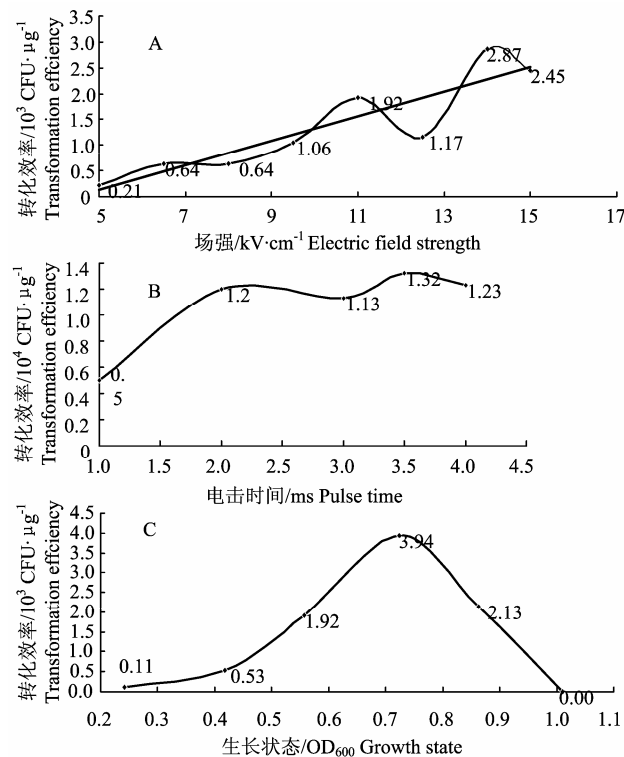
**1.2.7 L19 菌株对土壤中马拉硫磷的降解**<sup>[13-14]</sup> 取

处理好的土壤 2 份, 每份 1 000 g, 每组加入 10 mg·mL<sup>-1</sup> 的马拉硫磷乙酸乙酯溶液 10 mL, 使土壤中马拉硫磷的含量达到 100 mg·kg<sup>-1</sup>, 搅拌均匀。实验组加入 L19 菌液 60 mL, 对照组不加菌液, 2 组均用无菌水调节含水率至 25%。定期取土样 2 g 于 50 mL 离心管中, 加 5 mL 无菌水震荡悬浮, 加 5 mL 石油醚超声波提取 20 min, 3 600 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 上层石油醚转移到 10 mL 容量瓶中, 重复萃取 1 次, 定容萃取液。用气相色谱测定马拉硫磷的含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 luxAB 基因标记

将提取的质粒进行琼脂糖凝胶电泳, 条带明亮清晰, 表明质粒提取成功, 并测得质粒浓度为 23.5 ng·μL<sup>-1</sup>。转化后暗室中观察, 抗性平板上形成的菌落有很强的发光活性, 表明标记成功, 标记菌株命名为 L19-luxAB。



A: 电场场强对转化效率的影响; B: 电击时间对转化效率的影响; C: 感受态细胞的生长状态对转化效率的影响

A, Effect of electric field strength on the transformation efficiency; B, Effect of pulse time on the transformation efficiency; C, Effect of growth state on the transformation efficiency

图 1 影响转化效率的因素

Figure 1 Effects of different factors on the transformation efficiency

### 2.2 电转化转化效率影响因素的探究

如图 1 A 所示, 在 5~14 kV·cm<sup>-1</sup> 的场强范围内, 随着场强的不断增高, 转化效率整体上呈现上升趋势, 在 14 kV·cm<sup>-1</sup> 出现最高转化效率, 转化子的个数达到 2.87×10<sup>3</sup> CFU·μg<sup>-1</sup>。并且上升趋势明显, 表明电击场强的变化对转化效率的影响较大。电击时间是影响电击强度的另一制约因素, 由图 1 B 可知, 电击时间为 3.5 ms 时转化效率最高, 可达到 1.32×10<sup>4</sup> CFU·μg<sup>-1</sup>, 但是平缓的趋势表明了电击时间对转化效率的影响不如电击电压显著。对于 L19 菌株, 电转化最适的细胞生长状态为对数中后期, 即 OD<sub>600</sub> 为 0.724, 转化效率高达到 3.94×10<sup>3</sup> CFU·μg<sup>-1</sup>。如图 1 C 所示。

### 2.3 转化子遗传稳定性的测定

在抗性平板和非抗性平板上进行划线传代培养, 在抗性平板上传代 15 次仍有很强的发光活性, 但在非抗性平板上, 传代至第 7 次不再具有发光活性。计算质粒 pTR102 保留率为 84%。

### 2.4 luxAB 发光酶基因的导入对菌株降解马拉硫磷能力的影响

实验结果显示, 出发菌株和标记后的菌株对马拉硫磷的降解整体趋势相似, 对两者降解率进行显著性分析, 其 *F* 值为 0.775 0, 表明 L19 和 L19-luxAB 菌株对马拉硫磷的降解能力差异不显著。如图 2 所示, L19 和 L19-luxAB 菌株在 24 h 时对马拉硫磷的降解率分别为 25.42% 和 22.03%, 马拉硫磷残留浓度减少量分别为 15.07 mg·L<sup>-1</sup> 和 13.06 mg·L<sup>-1</sup>。48 h 的降解率分别为 36.99% 和 36.38%, 残留浓度减少量分别为 24.06 和 23.66 mg·L<sup>-1</sup>。

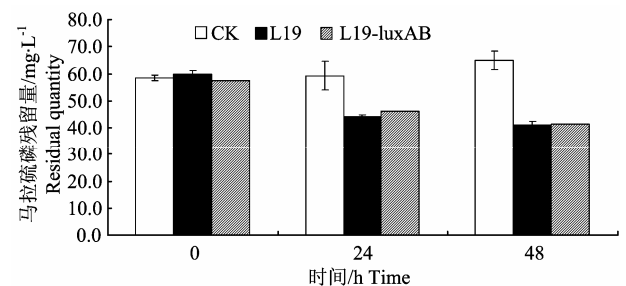


图 2 L19 与 L19-luxAB 菌株对马拉硫磷降解能力的比较  
Figure 2 Biodegradation of malathion by L19 and L19-luxAB strains

### 2.5 L19-luxAB 在不同处理土壤中的定殖

L19-luxAB 菌株中 PTR 102 质粒的保留率如表 1 所示。数据显示, 标记基因遗传稳定, 标记菌株 L19-luxAB 可以用来进行菌株土壤定殖生态学的研

究。图 3 显示了 L19-*luxAB* 在不同处理土壤中的存活情况, L19-*luxAB* 在灭菌土壤和非灭菌土壤中的定殖趋势基本相同。菌株释放到灭菌土壤当中之后有一个短暂的数量上升的趋势, 最高数量达到了  $1.23 \times 10^{10}$  CFU·g<sup>-1</sup>, 随后下降直至平稳, 数量水平为  $10^7$  CFU·g<sup>-1</sup>。而释放到非灭菌土壤中的菌株则表现出数量不断下降直至平衡的趋势, 数量水平为  $10^6$  CFU·g<sup>-1</sup>。

## 2.6 L19 菌株对土壤中马拉硫磷的降解

L19 菌株在土壤中对马拉硫磷的降解如图 4 所

示, 在不加入菌液的土壤当中, 马拉硫磷的降解表现出了比较迅速的自然降解, 但加入 L19 菌液的土壤则表现出了更为迅速的降解速率。土壤中马拉硫磷的降解动力学如表 2 所示, 马拉硫磷在土壤中的自然降解半衰期为 16.7562 h, 而 L19 菌株在土壤中对马拉硫磷降解的半衰期为 6.5867 h。12 h 内, 实验组和对照组的残留浓度分别为 28 mg·kg<sup>-1</sup> 和 56 mg·kg<sup>-1</sup>, 在实验组的土壤中, 马拉硫磷在 84 h 内可以完全降解。

表 1 质粒保留率的测定

Table 1 Retention rate of *luxAB* gene

时间/d Time	平板菌落总数 Total colony number in plate	发光菌落数 Total colony number with luminescence	保留率/% Retention rate
0	70	70	100
4	180	180	100
8	103	103	100
12	111	111	100
16	208	201	97
20	64	62	97
24	110	102	93
28	125	121	97
32	176	170	97
36	161	156	97
40	90	86	96

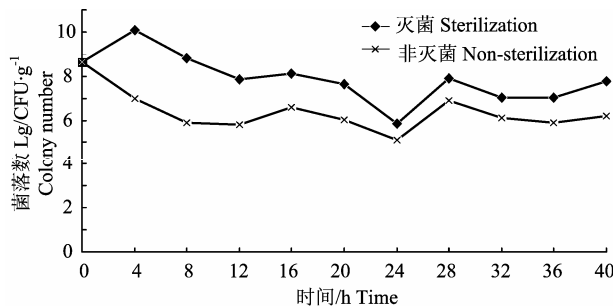


图 3 L19-*luxAB* 在不同处理土壤中的存活情况

Figure 3 Survival of L19-*luxAB* in different soils

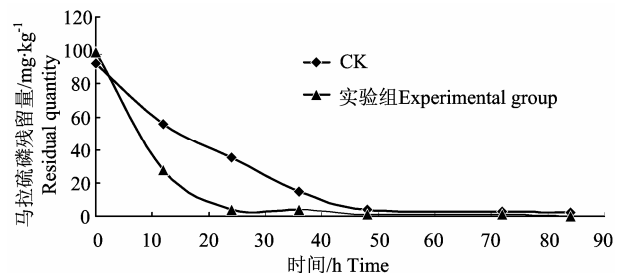


图 4 L19 菌株对土壤中马拉硫磷的降解

Figure 4 Degradation of malathion by L19 in soil

表 2 土壤中马拉硫磷的降解动力学

Table 2 Degradation kinetics of malathion in soil

降解类型 Degradation type	一级动力学方程 The first-order kinetic equation	$k/h^{-1}$	半衰期/h Half-life
自然降解 Nature degradation	$C_t = 92e^{-0.0414t}$	0.0414	16.7562
L19 菌株降解 Degradation with L19 strain	$C_t = 99e^{-0.1052t}$	0.1052	6.5867

## 3 小结与讨论

本研究用发光酶基因 *luxAB* 成功标记了缺陷短波单胞菌 L19 菌株, 旨在为研究 L19 菌株在土壤、

水体及其他介质当中的定殖动态提供一个简便、可靠性高的检测方法。成功的标记方法必须符合不改变出发菌株的原有特性、真实反应出发菌株的定殖行为等基本要求。本研究得到的标记 L19-*luxAB* 菌

株,其质粒的遗传稳定性很高,特别是在土壤中,经过40d的定殖,质粒的保留仍然可以保持在96%以上。对L19与L19-luxAB菌株48h对马拉硫磷的降解率进行显著性分析, $F$ 值为0.7750,说明发光酶基因的导入对菌株降解马拉硫磷的能力影响不显著。因此采用L19-luxAB菌株进行土壤定殖生态学研究是可行的<sup>[15]</sup>。影响转化效率的因素很多,本实验分析了电击场强、电击时间、细胞生长状态对转化效率的影响。从生长状态对转化效率的影响趋势图来看,随 $OD_{600}$ 的不断增长,转化效率的快速增长和快速降低表明了感受态细胞的生长状态对转化效率的影响很大。相对而言,平缓的电击时间影响趋势图反映出了电击时间对转化效率的影响较小,而电击场强对转化效率的影响介于生长状态和电击时间之间<sup>[8-9]</sup>。

L19-luxAB菌株能够在灭菌土壤和非灭菌土壤当中很好的定殖,而且定殖趋势基本相同。处于定殖平衡状态时非灭菌土壤中L19-luxAB的数量水平为 $10^6$  CFU·g<sup>-1</sup>,灭菌土壤中L19-luxAB的数量水平为 $10^7$  CFU·g<sup>-1</sup>。可能由于非灭菌土壤中土著菌群的竞争性影响,使L19-luxAB在非灭菌土壤中的数量低于灭菌土壤中的数量。马拉硫磷是一种较易降解的有机磷农药,在土壤中的半衰期较短<sup>[13]</sup>。土壤的结构、pH、土著菌群等因素都可能影响马拉硫磷的降解,在不接种目标菌株的情况下,马拉硫磷在对照土壤当中也能够被降解,但接种L19菌株加快了马拉硫磷的降解。马拉硫磷在土壤中自然降解的半衰期为16.756h,接种L19菌株的作用使马拉硫磷的降解更为迅速、明显,半衰期为6.5867h,并且在84h内可以完全降解。L19菌株在土壤当中能稳定定殖,具有显著降解马拉硫磷的能力,该菌株在土壤修复等领域将具有很好的应用前景。

## 参考文献:

- [1] 赵静,唐欣昀,花日茂,等. 马拉硫磷的应用及其降解研究进展[J]. 安徽农学通报, 2011, 17(11): 116-118.
- [2] Zhang A, Xie X, Ye J, et al. Stereoselective toxicity of malathion and its metabolites, malaoson and isomalathion[J]. Environmental Chemistry Letters, 2011: 1-5.
- [3] Goda S K, Elsayed I E, Khodair T A, et al. Screening for and isolation and identification of malathion-degrading bacteria: cloning and sequencing a gene that potentially encodes the malathion-degrading enzyme, carboxylesterase in soil bacteria[J]. Biodegradation, 2010, 21 (6): 903-913.
- [4] 孙洁梅, 崔中利, 邱珊莲, 等. luxAB 基因标记甲基对硫磷降解菌 DLL-1 在土壤和植株根部的生态行为研究[J]. 农村生态环境, 2003, 19 (1): 43-46.
- [5] 李瑞雪. 毒死蜱降解菌株 *Sphingopyxis terrae* R17 的分离鉴定及其 luxAB 基因标记研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2010: 27-29.
- [6] Zhao X T, Wang D S, Gan X, et al. Isolation and identification of malathion -degrading strain of *Brevundimonas diminuta*[C]//Proceedings of 2011 international conference on electrical and control engineering (ICECE). 2011: 1600-1602.
- [7] 包其郁, 孙永巧, 王慧峰, 等. 影响电转化效率的几个因素探讨[J]. 温州医学院学报, 2003, 33(1): 9-11.
- [8] 冯建成, 崔贞华, 罗素兰. 大肠杆菌 JM109 菌株高效电转化条件的研究[J]. 湖北大学学报: 自然科学版, 2008, 3 (1): 79-81.
- [9] 张洋, 王志强, 刘斌, 等. DH10B 菌株高效电转化条件探究[J]. 生物工程学报, 2007, 23(2): 347-351.
- [10] 沈标, 洪青, 李顺鹏. 甲基对硫磷降解菌 DLL-1 的发光酶基因标记及在土壤中的变化[J]. 农村生态环境, 2002, 18 (1): 16-21.
- [11] 齐飞飞. 芽胞杆菌 K2116 菌株的 luxAB 基因标记及在土壤和棉花根圈的定殖动态规律[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2007: 19-20.
- [12] 韦兵, 唐欣昀. 假单胞菌 JK45 菌株 lux 基因标记及在土壤中的存活[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25 (6): 1524-1528.
- [13] 傅强, 杨仁斌, 王钟, 等. 马拉硫磷在柑桔和土壤中的残留消解动态[J]. 农药学学报, 2008, 10(4): 487-490.
- [14] 陈宗保. 土壤中有机农药残留分析及有机磷农药降解行为研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2006: 28-33.
- [15] 齐飞飞, 夏觅真, 唐欣昀, 等. 黄单胞菌属 (*Xanthomonas*) P2126 菌株 luxAB 基因标记及其生理活性的研究[J]. 安徽农学通报, 2007, 13 (10): 31-32.