

施氏假单胞菌 YC-YH1 对甲基对硫磷的降解及其代谢产物检测

史延华, 任磊, 贾阳, Ruth Nahurira, 闫艳春*

(中国农业科学院研究生院, 北京 100081)

摘要: 利用实验室已获取的菌株 YC-YH1 对甲基对硫磷进行降解, 以高效液相色谱结合质谱分析(HPLC-MS)测定菌株 YC-YH1 对甲基对硫磷的降解速率并检测其代谢产物, 通过基因克隆研究菌株 YC-YH1 对甲基对硫磷降解的分子机制, 同时分析代谢产物对菌株 YC-YH1 生长的影响。结果表明, 菌株 YC-YH1 为施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*), 能够高效降解甲基对硫磷, 其同时含有甲基对硫磷水解酶基因 *mpd* 和有机磷水解酶基因 *ophC2*。经质谱分析确定, 菌株 YC-YH1 将甲基对硫磷水解为对硝基苯酚和二甲基硫代硫酸酯, 其中对硝基苯酚显著抑制 YC-YH1 的生长。综上, 施氏假单胞菌 YC-YH1 能够高效地降解甲基对硫磷, 但对硝基苯酚作为其代谢产物对 YC-YH1 的生长存在显著抑制作用。

关键词: 甲基对硫磷; 对硝基苯酚; 施氏假单胞菌; 生物降解

中图分类号: X171.5 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2015)11-2097-08 doi:10.11654/jaes.2015.11.009

Biodegradation of Methyl Parathion by *Pseudomonas stutzeri* YC-YH1 and Detection of Its Metabolites

SHI Yan-hua, REN Lei, JIA Yang, RUTH Nahurira, YAN Yan-chun*

(Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: A newly isolated bacterial strain YC-YH1, which could degrade methyl-parathion efficiently, was identified according to 16S rRNA gene analysis in combination with physiological, biochemical and Biolog tests. The present study was focused on its capability of degrading methyl parathion. The metabolites of methyl parathion were identified by HPLC-MS. Changes of methyl parathion and its metabolite concentrations in the inorganic medium were determined by HPLC. The primers of genes involved in the methyl parathion degradation were designed and the target fragments were obtained by gene cloning. The influence of degradation intermediates on the growth of the strain YC-YH1 was examined using filter paper and plate methods. The colonic and microscopic morphologies of the strain YC-YH1 was determined. The 16S rRNA gene sequence showed that YC-YH1 had 98% similarity to *Pseudomonas stutzeri*. *Pseudomonas stutzeri* YC-YH1 showed high degradation efficiency for parathion-methyl. p-nitrophenol and dimethyl phosphorothioate were identified as the intermediates. p-nitrophenol concentrations increased along with decrease of methyl parathion concentrations in the inorganic medium. However, p-nitrophenol significantly inhibited the growth of the strain YC-YH1 in the inorganic medium. Methyl parathion hydrolase gene *mpd* and organophosphorus pesticides hydrolase gene *ophC2* were both cloned from the strain YC-YH1. These results suggest that the strain YC-YH1 could efficiently degrade methyl parathion, but the degradation intermediate p-nitrophenol could significantly inhibit the growth of the strain YC-YH1.

Keywords: methyl parathion; p-nitrophenol; *Pseudomonas stutzeri*; biodegradation

甲基对硫磷, 化学名称为 O,O-二甲基-O-(4-硝基苯基)硫代磷酸酯, 属高毒有机磷农药, 因其半衰期

长、毒性大而广受关注, 在环境和粮食中均有检出^[1-3]。甲基对硫磷对哺乳动物的危害主要为神经性毒剂, 通过抑制乙酰胆碱酯酶活性导致乙酰胆碱积累, 从而引起神经功能紊乱, 严重时可致死, 对生态环境与人体健康具有较大威胁^[4]。

环境中有机污染物的传统处理方法主要包括化学法或焚烧、掩埋等, 这些方法的副作用较大, 容易造

收稿日期: 2015-05-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(31170119); 中国农业科学院基本科研业务基金项目(0042014006, 0042012003, 0042011006)

作者简介: 史延华(1983—), 男, 博士研究生, 主要从事污染物生物降解研究。E-mail: shiyanhua@hotmail.com

* 通信作者: 闫艳春 E-mail: yanyanchun@caas.cn

成第二次污染,因此有机磷农药污染在环境中最有效的清除主要是以生物降解为主^[5]。生物降解具有降解彻底、无二次污染、速效性和广谱性等优点。细菌等原核生物代谢农药通常是同化吸收,将其作为基本的营养物质和能源,因此微生物在环境污染物的降解过程中占据着主导地位^[6]。

对于农药的微生物降解,已经分离获得大量的降解菌株,可降解污染物包括杀虫剂、杀菌剂和除草剂等,微生物类型主要为细菌与真菌^[7-9]。本研究以实验室保藏的有机磷农药降解菌株 YC-YH1 为研究对象,对菌株进行鉴定,测定其对甲基对硫磷的降解效率并克隆降解相关基因。同时,建立基于 HPLC 对甲基对硫磷代谢产物对硝基苯酚的检测方法并检测降解产物对 YC-YH1 生长的影响。

1 材料与方法

1.1 药品、仪器和培养基

本研究所用的甲基对硫磷(纯度 97.2%)与对硝基苯酚(纯度 99.1%)均购自国药集团。甲醇和乙腈为色谱纯级(美国, Fisher 公司),其余药品为分析纯级,均购自国药集团。

所用仪器有 Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国, Agilent 公司), Biolog 微生物鉴定系统(美国, Biolog 公司), Bio-Rad C1000 PCR 仪(美国, Bio-Rad 公司), BX63 显微镜(日本, Olympus 公司), S-3000N 扫描电镜(日本, Hitachi 公司), ScanSpeed 1580R 冷冻高速离心机(丹麦, Labogene 公司), Agilent 1260 HPLC-Agilent 6420 三重四极杆液质联用仪(美国, Agilent 公司), Supcre G6R 全自动菌落分析仪(中国, 迅数)。

普通培养基(LB)^[10]:胰蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, NaCl 10 g, 去离子水 1 L, pH=7.2±0.2。

无机盐离子培养基(MSM)^[11]:NH₄NO₃ 1.0 g, NaCl 0.5 g, (NH₄)₂SO₄ 0.5 g, KH₂PO₄ 0.5 g, K₂HPO₄ 1.5 g, 去离子水 1 L, pH=7.2±0.2。

上述培养基中加入 1.5%的琼脂粉即得到对应的固体培养基,所有培养基均在 121 °C 灭菌 30 min 备用。

1.2 菌株来源

菌株为中国农业科学院研究生院生物学教研室分离保藏的有机磷农药降解菌 YC-YH1, 菌株分离自常年生产有机磷农药的邢台农药厂排污口活性污泥。菌种保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心, 保藏

号为 CGMCC No. 9624。

1.3 菌株的鉴定

将 YC-YH1 菌株在 LB 固体平板上划线, 30 °C 条件下培养过夜, 观察平板上生长的菌落形态。挑取单菌落放到载玻片上, 固定后进行革兰氏染色, 显微镜观察菌株的菌体形态。对菌落进行制片, 进行电镜扫描观察。

YC-YH1 菌株的生理生化特性鉴定使用博检革兰氏阴性细菌鉴定系统进行(青岛海博生物技术有限公司)^[12], 同时使用 Biolog 微生物鉴定系统和 Gen III 微孔板测试菌株 YC-YH1 利用不同化合物的能力^[13]。该微孔板上含有 94 个不同的表型测试, 可将该微生物鉴定到种的水平上。

采用 16S rRNA 基因序列分析对菌株 YC-YH1 进行鉴定, 主要步骤: ①细菌基因组 DNA 提取(Takara, 细菌基因组小提试剂盒)。②以获得的基因组为模板进行 16S rRNA 序列 PCR 扩增(引物序列见表 1)。PCR 反应条件为:a.95 °C 5 min;b.95 °C 0.5 min;c.50 °C 0.5 min;d.72 °C 1.5 min(重复 b~d 循环 34 次);e.72 °C 10 min。③PCR 产物纯化并进行测序(上海生工生物工程股份有限公司)。测序结果进行 BLAST 比对分析(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。

表 1 基因名称及引物序列

Table 1 Gene names and primers

基因	引物序列
16S	16SF:AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 16SR:GGTTACCTTGTACGACTT
<i>mpd</i>	<i>mpd</i> F:ATGCCCTGAAGAACCCT <i>mpd</i> R:TCACCTGGGGTTGACGAC
<i>ophC2</i>	<i>ophC2</i> F:ATCGCTCTTTTCTCGCTGAGC <i>ophC2</i> R:TCACGGTTCGCTACGGAT
<i>opdA</i>	<i>opdA</i> F:ATGCAAACGAGAAGAG <i>opdA</i> R:TCATCGTTCCGGTATCT

1.4 菌株 YC-YH1 对甲基对硫磷的降解效率

将菌株 YC-YH1 在 LB 液体培养基中培养至对数期, 取 1 mL 菌液, 6000 r·min⁻¹ 离心 2 min 收集菌体, 用新鲜的 MSM 培养基冲洗并悬浮至 OD_{600nm}=1.0。按 1%接种量接入 10 mL 含有 100 mg·L⁻¹ 甲基对硫磷的 MSM 无机盐培养基中作为处理组, 以相同条件下不接菌的含甲基对硫磷的 MSM 培养基作为对照组, 在 180 r·min⁻¹、30 °C 的摇床中培养。每 12 h 取样一次, 检测培养液中甲基对硫磷浓度。

以正己烷作为萃取剂提取培养液中的甲基对硫磷,预实验表明该方法的回收率为 98.7%~101.2%,证实该方法可行。向培养液中加入等体积的正己烷,颠倒混匀 5 min,超声波振荡 10 min,4 ℃条件下静置 1 h。取上层有机相,经无水硫酸钠脱水后真空冷冻抽干,重溶于等体积甲醇中,经孔径为 0.22 μm 的滤膜过滤,用 Agilent 1200 高效液相色谱仪进行检测。色谱柱为 Zorbax Eclipse Plus C18(4.6 mm×150 mm×5 μm),流动相为甲醇:乙腈=80:20,流速为 1 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,进样量 2 μL,检测波长 288 nm,同时以甲基对硫磷标准品建立标准曲线($R^2=0.9931$)。利用 SPSS 15.0 软件分析实验数据,并绘制相关标准曲线和降解曲线。

1.5 甲基对硫磷降解相关基因检测

根据已有报道^[14-16],分别对有机磷水解酶基因 *mpd*、*ophC2* 和 *opdA* 设计引物以进行 PCR 扩增,引物序列见表 1。PCR 反应条件为:a.95 ℃ 5 min;b.95 ℃ 0.5 min;c.(*mpd* 为 53 ℃,*ophC2* 为 55 ℃,*opdA* 为 60 ℃)0.5 min;d.72 ℃ 1 min(重复 b~d 循环 34 次);e.72 ℃ 10 min。将获得的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,产物纯化后连接载体转化入大肠杆菌 DH5α,挑选阳性克隆子进行测序,进行 BLAST 比对分析并将序列递交至 GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

1.6 基于 HPLC-MS 的甲基对硫磷及其代谢产物检测

取在含 100 mg·L⁻¹ 甲基对硫磷的 MSM 培养基中培养 48 h 的培养液 20 mL,10 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,收集上清液并用 0.22 μm 滤膜过滤。利用 HPLC 检测样品中的对硝基苯酚,流动相为甲醇:乙腈:水=48:42:10,流速为 1 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,进样量 2 μL,检测波长 320 nm。同时对硝基苯酚标准品建立标准曲线($R^2=0.9872$)。

利用 HPLC-MS 检测菌株 YC-YH1 降解甲基对硫磷的代谢产物,电喷雾电离(ESI 源),负离子模式扫描。流动相 100%甲醇,流速 0.2 mL·min⁻¹,1 μL 样品直接注射至质谱中。质谱检测条件:毛细管电压和碎裂电压分别为 3500 V 和 150 V,源温度和去溶剂化温度分别为 150 ℃和 350 ℃。扫描离子范围 50~200 Da。用 Agilent MassHunter 软件收集并分析数据。

1.7 甲基对硫磷代谢产物对菌株 YC-YH1 生长的影响

通过底物抑菌实验分析甲基对硫磷代谢产物对 YC-YH1 生长的影响。分别制备普通 LB 固体平板、含甲基对硫磷(100 mg·L⁻¹)的 LB 固体平板和含对硝基苯酚(100 mg·L⁻¹)的 LB 固体平板。用无菌的直径

为 0.8 cm 的滤纸片蘸取在 LB 培养基中培养至对数期的 YC-YH1 菌液,将滤纸片置于制备的固体 LB 平板中央。在 30 ℃、避光条件下培养,定时观察并用迅数 Supere G6R 全自动菌落分析仪拍照记录。

2 结果与讨论

2.1 菌株 YC-YH1 的鉴定

经革兰氏染色、显微镜观察和电镜扫描观察,菌株 YC-YH1 的特征如图 1 所示:菌株为革兰氏阴性菌,菌落为淡黄色,干燥,扁平,边缘不整,不透明,表面粗糙,有褶皱;电镜扫描观察发现菌体为杆状,菌体细长,顶部生有单根鞭毛,长度为 3~4 μm。

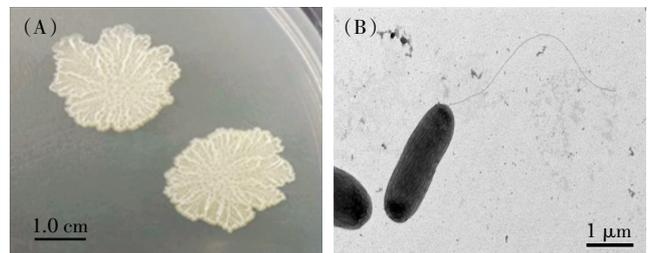


图 1 菌株 YC-YH1 的菌落(A)及电镜扫描(B)观察
Figure 1 Colonic morphology(A) and SEM image(B) of strain YC-YH1

根据博检革兰氏阴性细菌鉴定系统说明书中提供的方法对培养结果进行判读,得到菌株对各种生化反应的结果,如表 2 所示。

Biolog 分析菌株 YC-YH1 的代谢指纹并与数据库进行比对。鉴定结果表明,菌株 YC-YH1 最具可能性为 *Pseudomonas stutzeri*,其 PROB 值为 0.827、SIM 值为 0.540、DIST 值为 5.029,说明鉴定结果较为可信^[13]。

表 2 菌株 YC-YH1 的生理生化特征

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of strain YC-YH1

类型	结果	类型	结果
氧化酶	+	柠檬酸	+
精氨酸	-	脲酶	-
赖氨酸	-	明胶	-
鸟氨酸	-	甘露醇	-
吡啶	-	苦杏仁苷	-
乳糖	-	硫化氢	-
蔗糖	-	VP	+
葡萄糖	+	山梨醇	-
肌醇	-	蜜二糖	-
鼠李糖	-	阿拉伯糖	-

将菌株的 16S rRNA 基因序列提交到 GenBank 数据库,登录号为 KJ786450。经 BLAST 比对,构建系统发育树(图 2),表明该菌株的 16S rRNA 基因序列与菌株 *Pseudomonas stutzeri* ATCC 17588 的相似度高达 98%。结合上述结果,将菌株 YC-YH1 鉴定为施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)^[12]。

2.2 菌株 YC-YH1 对甲基对硫磷的降解效率

菌株 YC-YH1 在 72 h 内对甲基对硫磷的降解情况如图 3 所示。结果表明:100 mg·L⁻¹ 甲基对硫磷在 60 h 内被彻底降解,降解率为 100%,而对照组中甲基对硫磷的浓度为 99.3 mg·L⁻¹。同时,菌株 YC-YH1 接种到含甲基对硫磷的无机盐培养基中后,因与原 LB 生长环境差别较大,菌体内需要产生许多适应新环境的变化,如降解基因的表达和降解酶合成等,故在 0~12 h 之间存在一个短暂的适应期,在 12 h 以后进入快速降解阶段。可见,菌株 YC-YH1 能够高效的降解甲基对硫磷,其对甲基对硫磷的降解效率高于 *Bacillus cereus* HY-1^[17]和 *Candida blankii* JMUPMD-1^[8]。

2.3 甲基对硫磷降解相关基因的检测

以菌株 YC-YH1 的基因组为模板,以设计的引物分别进行 PCR 扩增并经电泳检测产物(图 4),其中 *mpd* 与 *ophC2* 基因检测结果为阳性。对获得的 PCR 产物进行回收、克隆并测序,测序结果进行 BLAST 比对分析。*mpd* 基因与 *Pseudomonas* sp. WBC-3 的 *mpd* 基因相似性为 100%,*ophC2* 基因与 *Stenotrophomonas* sp. SMSP-1 的 *ophC2* 基因相似性为 99%。将获得的 *mpd* 与 *ophC2* 基因序列递交至 GenBank,登录号分别为 KP207597 和 KP207598。这两种基因分别报道自 *Pseudomonas* sp. WBC-3^[18]和 *Pseudomonas pseudoalcaligenes*^[19],在这两种菌中均只含有一种降解酶。本研究首次报道了在一个菌株内同时存在这两种有机磷水解酶的情况。

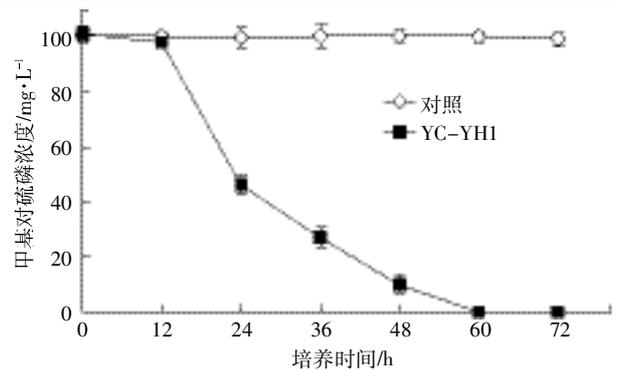
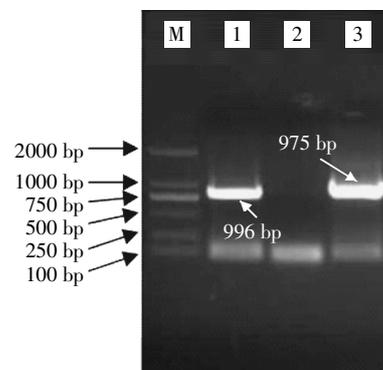


图 3 菌株 YC-YH1 对甲基对硫磷的降解曲线

Figure 3 Degradation curve of methyl parathion by strain YC-YH1



M: DNA Maker, 1: *mpd*, 2: *opdA*, 3: *ophC2*

图 4 甲基对硫磷降解相关基因检测

Figure 4 Detection of methyl parathion degrading genes

根据已有报道^[20-21],*mpd* 和 *ophC2* 分别编码甲基对硫磷水解酶 MPH 和有机磷水解酶 OPHC2,它们都能作用于有机磷农药的 P-O 酯键,进行水解作用。MPH 和 OPHC2 能够将甲基对硫磷水解为二甲基硫代硫酸酯和对硝基苯酚。因此,可以初步判断,菌株 YC-YH1 通过对硝基苯酚途径对甲基对硫磷进行水解。

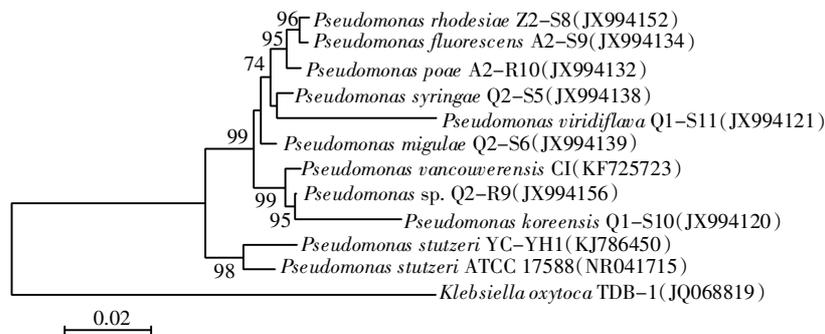


图 2 菌株 YC-YH1 与相关种属菌株的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of strain YC-YH1 and other bacteria within a genera

2.4 基于 HPLC-MS 的甲基对硫磷代谢产物检测

根据甲基对硫磷降解相关基因检测的结果,初步判断菌株 YC-YH1 降解甲基对硫磷生成对硝基苯酚。因此,利用 HPLC-MS 对甲基对硫磷及其代谢产物进行检测,在负离子模式下质谱分析检出质荷比分别为 $m/z=138.1000[M-H]^-$ 、 $m/z=141.3000[M-H]^-$ 的两种不同物质,其中前者与对硝基苯酚的分子量相吻合(图 5A),后者推测为甲基对硫磷降解另一产物二甲基硫代硫酸酯;以对硝基苯酚标准品进行质谱负离子模式扫描分析,在 $m/z=138.1000[M-H]^-$ 处出现目标峰(图 5B),据此可判断 YC-YH1 中的甲基对硫磷水解酶 MPH 和有机磷水解酶 OPH 将溶液中的甲基对硫磷水解为对硝基苯酚和二甲基硫代硫酸酯。通过 HPLC-MS 对代谢中间产物进行了分析,得出菌株 YC-YH1 是通过对硝基苯酚途径降解甲基对硫磷,与已报道的 *Pseudomonas aeruginosa* HS-D38^[22] 和 *Klebsiella* sp. MP-6^[23] 的代谢方式均一致。

本研究使用 HPLC 法对甲基对硫磷及对硝基苯酚浓度进行检测,结果如图 6 所示。图 6A 和图 6B 分别为甲基对硫磷与对硝基苯酚标准品的 HPLC 检测结果,甲基对硫磷的保留时间为 4.21 min,对硝基苯酚的保留时间 1.59 min;图 6C 和图 6D 为接入菌株

YC-YH1 后未进行培养时甲基对硫磷和对硝基苯酚的色谱峰,可以看出此时培养液中无对硝基苯酚的存在;接菌培养 72 h 后,甲基对硫磷色谱峰消失(图 6E),而此时检测到对硝基苯酚的浓度为 $43.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (图 6F)。因此,菌株 YC-YH1 可高效降解甲基对硫磷,在 72 h 内将 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲基对硫磷彻底降解,并生成对硝基苯酚。

2.5 甲基对硫磷的水解产物对菌株 YC-YH1 生长的影响

在污染物的生物降解过程中,代谢中间产物的积累会反馈抑制上游反应酶的活性,甚至抑制菌株的生长^[24]。某些代谢中间产物还可破坏环境微生物的多样性,影响环境微生态,如毒死蜱降解后的产物三氯吡啶酚已被证实能够显著减少环境微生物多样性,同时导致毒死蜱的降解受抑制^[25-26]。本研究检测了甲基对硫磷降解中间代谢产物对菌株 YC-YH1 生长的影响,结果如图 7 所示。图 7A 表明菌株 YC-YH1 在含甲基对硫磷的固体 LB 平板上生长 72 h 后,在滤纸片周围出现了黄色水解圈,但菌株基本没有生长,可以判断 YC-YH1 的代谢中间产物对菌株的生长产生了显著的抑制作用,提取黄色水解圈中的物质并进行 HPLC-MS 分析,结果表明其主要成分为对硝基苯酚;

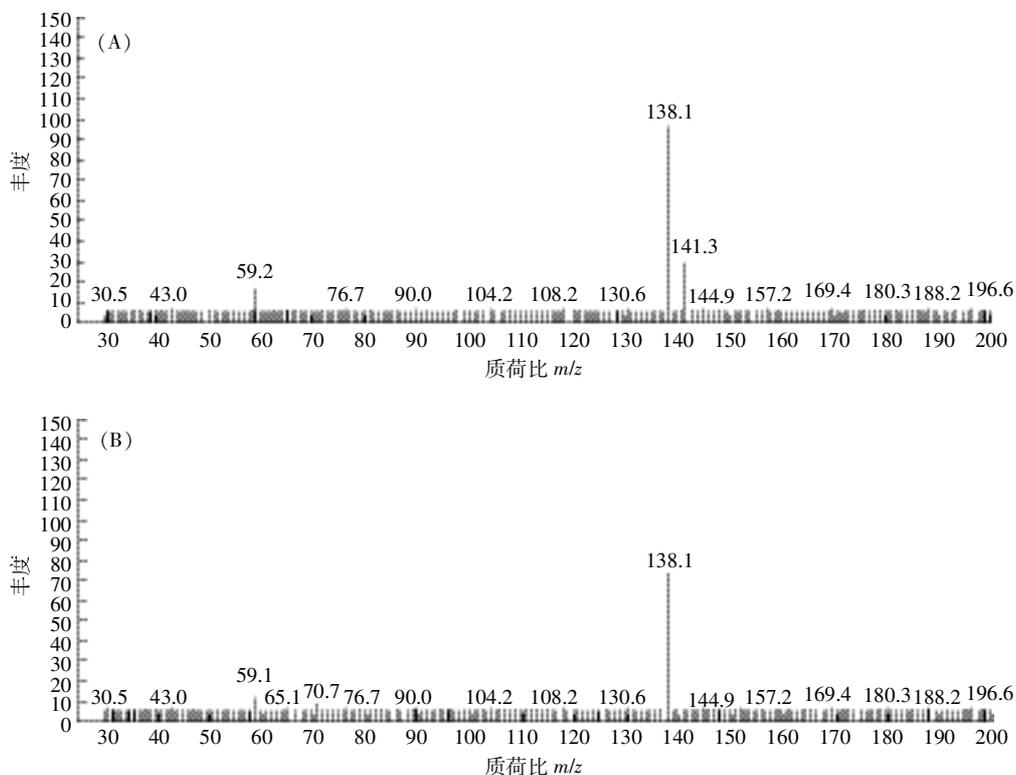
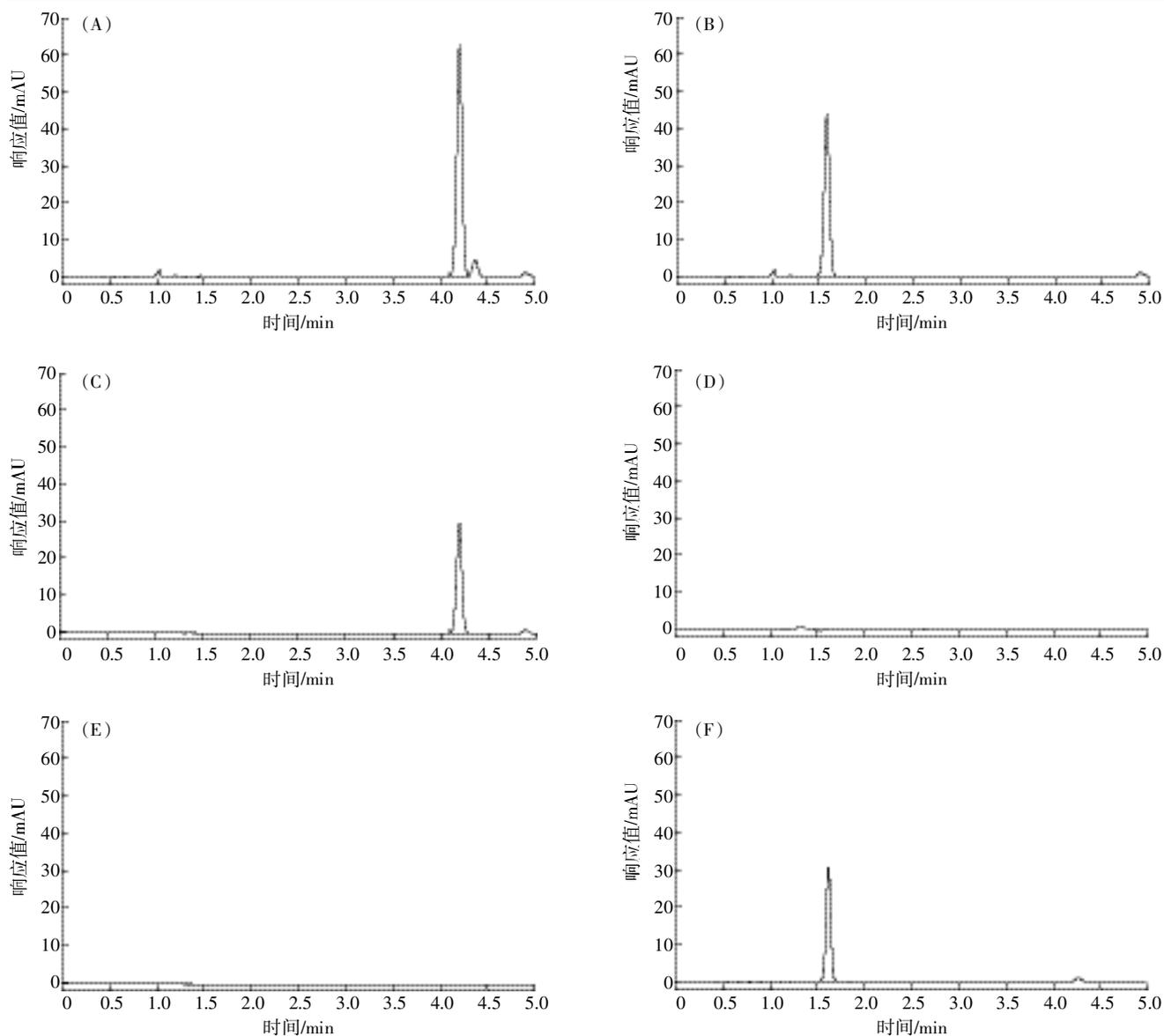


图 5 菌株 YC-YH1 降解甲基对硫磷后代谢产物质谱(A)和对硝基苯酚标准品质谱(B)

Figure 5 Mass spectral analysis of metabolic intermediates of methyl parathion by strain YC-YH1(A) and p-nitrophenol standard(B)



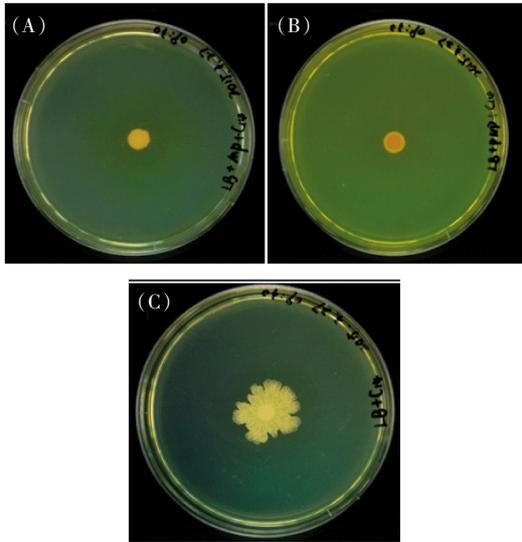
(A)甲基对硫磷标准品;(B)对硝基苯酚标准品;(C)0 h 培养液中甲基对硫磷检测;(D)0 h 培养液中对硝基苯酚检测;
 (E)72 h 培养液中甲基对硫磷检测;(F):72 h 培养液中对硝基苯酚检测
 (A)methyl parathion standard;(B)p-nitrophenol standard;(C)methyl parathion in culture at 0 h;(D)p-nitrophenol in culture at 0 h;
 (E)methyl parathion in culture at 72 h;(F)p-nitrophenol in culture at 72 h

图6 甲基对硫磷与对硝基苯酚 HPLC 检测

Figure 6 HPLC analyses of methyl parathion and p-nitrophenol

图 7B 表明菌株 YC-YH1 在含对硝基苯酚的固体 LB 平板上生长 72 h 后,平板中对硝基苯酚的颜色(黄色)并无任何变化,且菌株的生长同样也受到显著抑制;图 7C 可以看出菌株 YC-YH1 在不含甲基对硫磷和对硝基苯酚的固体 LB 平板上培养 72 h 时,生长良好。综上所述,菌株 YC-YH1 降解甲基对硫磷产生对硝基苯酚,而对硝基苯酚的积累会对菌株 YC-YH1 的生长产生显著的抑制作用。

污染物的降解,在很大程度上减小了污染物对环境及人体健康的危害。但不彻底降解所产生的代谢中间产物,不仅在毒性上与母体分子产生较大差异,同时理化性质及结构等均不同于母体分子。总的来说,大多数代谢中间产物的毒性通常较母体分子毒性低,如三氯吡啶酚作为毒死蜱的代谢中间产物毒性被降低^[27],这也导致了对于代谢中间产物危害的认识不足;同时,许多水溶性差的母体分子经过降解后得到的中间产物往



(A)YC-YH1 在含甲基对硫磷平板生长 72 h;(B)YC-YH1 在含对硝基苯酚平板生长 72 h;(C)YC-YH1 在普通 LB 平板上生长 72 h

(A)Growth of strain YC-YH1 on plate containing methyl parathion at 72 h;(B)Growth of strain YC-YH1 on plate containing p-nitrophenol at 72 h;(C)Growth of strain YC-YH1 on normal LB plate at 72 h

图 7 甲基对硫磷代谢产物对菌株 YC-YH1 的影响

Figure 7 Effect of methyl parathion metabolites on growth of strain YC-YH1

往具有良好的水溶性,如三氯吡啶酚和对硝基苯酚,这使得污染物的代谢中间产物在环境中具有更好的流动性^[28],也更容易进入地下水环境中,因而导致了更大的潜在威胁;而且,部分代谢中间产物的积累可导致母体分子降解受到抑制,一方面是代谢中间产物抑制了菌株的生长从而导致降解过程的减缓,另一方面是代谢中间产物的积累抑制降解途径上游酶的活性。

3 结论

研究获得了甲基对硫磷水解酶基因 *mpd* 与有机磷水解酶基因 *ophC2*,并通过共降解实现了对甲基对硫磷的彻底降解。

首次证实了甲基对硫磷的降解存在代谢中间产物抑制效应,为甲基对硫磷的生物降解研究及实际应用提供了参考依据。

参考文献:

[1] 马晓艳,蒋建荣,潘喻佳. 2012 年苏州市水生蔬菜中有机磷农药残留状况监测及分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(15):3112-3113.
MA Xiao-yan, JIANG Jian-rong, PAN Yu-jia. Analysis of organophosphorus pesticide residues in aquatic vegetables in Suzhou in 2012[J]. *Chinse Journal of Health Laboratory Technology*, 2013, 23(15):3112-

3113.
[2] Liu F Y, Hong M Z, Liu D M, et al. Biodegradation of methyl parathion by *Acinetobacter radioresistens* USTB-04[J]. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 2007, 19(10):1257-1260.
[3] 杨卫萍,陆天友. 贵州省饮用水源地有机磷农药污染研究现状[J]. 西南给排水, 2014, 36(4):51-55.
YANG Wei-ping, LU Tian-you. Status of organophosphorus pesticide contamination of drinking water sources in Guizhou Province[J]. *Shouthwest Water and Wastewater*, 2014, 36(4):51-55.
[4] Lu P, Li Q, Liu H, et al. Biodegradation of chlorpyrifos and 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol by *Cupriavidus* sp. DT-1[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 127:337-342.
[5] Deng S, Chen Y, Wang D, et al. Rapid biodegradation of organophosphorus pesticides by *Stenotrophomonas* sp. G1[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2015, 297:17-24.
[6] Song J, Gu J, Zhai Y, et al. Biodegradation of nicosulfuron by a *Talaromyces flavus* LZM1[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 140:243-248.
[7] 李阳,孙庆元,宗娟,等. 一株降解氟磺胺草醚的黑曲霉菌特性[J]. 农药, 2009, 48(12):878-880.
LI Yang, SUN Qing-yuan, ZONG Juan, et al. Characteristics of fungus degeneration fomesafen[J]. *Agrochemicals*, 2009, 48(12):878-880.
[8] 张霞,张书泰,谢顺昌,等. 一株甲基对硫磷降解菌-布朗克假丝酵母 JMUPMD-1 的分离与鉴定[J]. 激光生物学报, 2014, 23(2):183-188.
ZHANG Xia, ZHANG Shu-tai, XIE Shun-chang, et al. Isolation and identification of a parathion-methyl degrading fungus-*Candida blankii* JMUPMD-1[J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2014, 23(2):183-188.
[9] 杨德玉,李小明,戴速航,等. 一株耐盐性莠去津高效降解菌 *Halomonas* sp. SY-AD-9 的分离、鉴定及其特性[J]. 农药, 2015, 54(1):34-38.
YANG De-yu, LI Xiao-ming, DAI Su-hang, et al. Isolation, identification and characterization of an salt tolerance atrazine-degrading bacteria SY-AD-9(*Halomonas* sp.)[J]. *Agrochemicals*, 2015, 54(1):34-38.
[10] Dejonghe W, Berteloot E, Goris J, et al. Synergistic degradation of linuron by a bacterial consortium and isolation of a single linuron-degrading *Variovorax* strain[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(3):1532-1541.
[11] Wang S, Zhang C, Yan Y. Biodegradation of methyl parathion and p-nitrophenol by a newly isolated *Agrobacterium* sp. strain Yw12 [J]. *Biodegradation*, 2012, 23(1):107-116.
[12] 史延华. 农药降解菌施氏假单胞菌 YC-YH1 的分离鉴定及降解机理研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2015.
SHI Yan-hua. Isolation and identification of pesticides-degrading bacterium *Pseudomonas stutzeri* YC-YH1 and study of degradation mechanism[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2015.
[13] 罗小溪,高建忠,陈再忠,等. 新型脱氮菌 *Rhizobium radiobacter* 的分离鉴定及其硝化特征分析[J]. 生物技术通报, 2015,31(5):167-172.
LUO Xiao-xi, GAO Jian-zhong, CHEN Zai-zhong, et al. Isolation and

- identification of novel denitrifier strain *Rhizobium radiobacter* and its nitrifying characterisation[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2015, 31(5): 167-172.
- [14] Yang C, Liu N, Guo X, et al. Cloning of *mpd* gene from a chlorpyrifos-degrading bacterium and use of this strain in bioremediation of contaminated soil[J]. *FEBS Microbiology Letters*, 2006, 265(1): 118-125.
- [15] Fanyunliu W D S L. Isolation, purification and characterization of a new organophosphorus hydrolase OPHC2[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2004, 49(3): 268-272.
- [16] Horne I, Sutherland T D, Harcourt R L, et al. Identification of an *opd* (organophosphate degradation) gene in an *Agrobacterium* isolate[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(7): 3371-3376.
- [17] 段海明, 王开运, 王冕, 等. 蜡状芽孢杆菌 Hy-1 降解甲基对硫磷和毒死蜱的影响因素研究[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(3): 437-443.
- DUAN Hai-ming, WANG Kai-yun, WANG Mian, et al. Degradative characteristics of *Bacillus cereus* HY-1 to methyl-parathion and chlorpyrifos[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(3): 437-443.
- [18] Dong Y, Bartlam M, Sun L, et al. Crystal structure of methyl parathion hydrolase from *Pseudomonas* sp. WBC-3[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2005, 353(3): 655-663.
- [19] Wu N, Deng M, Shi X, et al. Isolation, purification and characterization of a new organophosphorus hydrolase OPHC2[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2004, 49(3): 268-272.
- [20] Shen Y J, Lu P, Mei H, et al. Isolation of a methyl parathion-degrading strain *Stenotrophomonas* sp. SMS-1 and cloning of the *ophC2* gene[J]. *Biodegradation*, 2010, 21(5): 785-792.
- [21] Li X H, He J A, 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.
- [22] 郑永良, 刘德立, 陈舒丽, 等. 一株甲基对硫磷高效降解菌的鉴定及特性研究[J]. 环境科学研究, 2006, 19(4): 100-104.
- ZHENG Yong-liang, LIU De-li, CHEN Shu-li, et al. Study on isolation and characteristic identification of a novel high-efficiency degrading strain methyl parathion[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2006, 19(4): 100-104.
- [23] 耿芳芳, 王慧, 秦伟, 等. 基于构建微生物传感器的甲基对硫磷降解菌的分离鉴定及其降解特性研究[J]. 农业资源与环境学报, 2014, 31(6): 521-526.
- GENG Fang-fang, WANG Hui, QIN Wei, et al. Isolation and characterization of methyl parathion-degrading bacteria based on microbial sensor construction[J]. *Journal of Agricultural Resources and Environment*, 2014, 31(6): 521-526.
- [24] 黄栩, 骆苑蓉, 胡忠, 等. 持久性有机污染物(POPs)生物修复研究进展[J]. 环境科学学报, 2006, 26(3): 353-361.
- HUANG Xu, LUO Yuan-rong, HU Zhong, et al. Recent advance in the study of persistent organic pollutants bioremediation[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2006, 26(3): 353-361.
- [25] Wang D, Xue Q, Zhou X, et al. Isolation and characterization of a highly efficient chlorpyrifos degrading strain of *Cupriavidus taiwanensis* from sludge[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2015, 55(2): 229-235.
- [26] Li J, Liu J, Shen W, et al. Isolation and characterization of 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol-degrading *Ralstonia* sp. strain T6[J]. *Biore-source Technology*, 2010, 101(19): 7479-7483.
- [27] 张 扬, 王 飞, 黄 彦, 等. 罗尔斯顿菌(*Ralstonia* sp.) T6 对三氯吡啶醇污染土壤的修复及能完全矿化毒死蜱工程菌株的构建[J]. 生态与农村环境学报, 2014, 30(6): 761-767.
- ZHANG Yang, WANG Fei, HUANG Yan, et al. Remediation of 3, 5, 6-Trichloro-2-pyridinol polluted soil with *Ralstonia* sp. T6 and construction of a chlorpyrifos-mineralizing engineered strain[J]. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2014, 30(6): 761-767.
- [28] Cao L, Xu J, Wu G, et al. Identification of two combined genes responsible for dechlorination of 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol (TCP) in *Cupriavidus pauculus* P2[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2013, 260: 700-706.