

甲基对硫磷降解菌假单胞菌 WBC-3 的筛选 及其降解性能的研究*

陈亚丽 张先恩** 刘虹 王银善 夏祥明

(中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

摘 要 从农药污染土样中分离出一株细菌具有彻底降解甲基对硫磷的能力。该菌经生理生化特性分析和 16S rDNA 序列同源性分析, 鉴定为假单胞菌属, 命名为 *Pseudomonas* sp. WBC-3。该菌在 pH7 ~ 8、温度 23℃ ~ 30℃ 范围内均生长良好, 对甲基对硫磷的耐受浓度在单纯无机盐培养基中可达到 800mg/L, 在含有 0.1% 葡萄糖的培养基中可达到 2000mg/L。该菌能够以甲基对硫磷作为唯一碳源、氮源, 将其彻底降解作为生长基质, 对于 300mg/L 甲基对硫磷的降解速度达 15mg/L·h, 于 22h 后达到其稳定生长期。该菌对于多种有机磷农药及部分芳烃类化合物具有生化代谢能力。从该菌的细胞周质组分中纯化出的有机磷水解酶在 SDS-PAGE 胶上显示为分子量约为 33.5×10^3 的条带。

关键词 甲基对硫磷, 降解菌, 筛选, *Pseudomonas* sp. WBC-3, 16S rDNA, 有机磷水解酶

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2002)04-0490-08

我国是高毒农药生产大国, 其中有机磷农药的产量约占整个农药工业的 57%^[1]。对硫磷一类的有机磷农药被大量用于农业生产与害虫防治, 但其残毒会造成环境与食品的严重污染, 并产生大量的杀虫剂废物, 严重影响了人们的身体健康及农产品的质量, 引起社会的广泛关注。针对目前该类农药的大量使用对人类造成的影响, 如何有效地处理残药, 避免对环境及人类的损害, 成为人们亟待解决的问题。传统的方法是采取化学法(40℃ 时以 0.1mol/L 的 NaOH 处理)或焚烧、掩埋的方法, 这些方法的副作用大, 往往造成环境的二次污染, 并且作用很慢^[2]。

曾有文献报道了微生物处理有机磷农药残留的方法。多株微生物可通过共代谢 (co-metabolism) 的方式矿化对硫磷, 即一株菌将对硫磷降解成对硝基苯酚后再由其他菌株进行彻底的分解^[3]。我们从湖北沙市地区农药污染土样中分离出一株有机磷农药降解细菌, 具有彻底降解对硫磷的能力。本文报道该菌的分离筛选及其有关降解性能。

1 材料和方法

1.1 药品与试剂

甲基对硫磷 (MPAR), 纯度 95%, 购自沙市农药厂; MPAR 标准品, 纯度 99.9%, 色谱纯, 购自沙市农药厂药品研究所; 对硝基苯酚 (PNP), 纯度 99%, 购于吴江市桃源试剂厂; 其

* 国家“863”生物技术项目 (SZ-03-01-03) 资助

** 通讯作者, E-mail: x.zhang@pentium.whiov.ac.cn, Tel/Fax: +862787641492

作者简介: 陈亚丽 (1975 -), 女, 山东省青岛市人, 现为中国科学院微生物研究所 2001 级博士研究生。

收稿日期: 2001-08-06, 修回日期: 2001-11-26

他有机磷类农药:二嗪农、杀螟松、辛硫磷、喹硫磷、亚胺硫磷,由武汉市公安厅检验科提供。基因组提取试剂盒 UNIQ-10 Genomic DNA Minipreps Kit 购自 NSBC-Sangon,实验中所用其他化学试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

蛋白电泳仪(minigel, Bio-Rad), Gel Scan 电泳图像分析系统(Bio-Rad), 测定 OD_{405} 用 Titertek Uniskan® I 酶标仪, 测定 OD_{600} 使用 752 型紫外可见分光光度计, 测定 MPAR 浓度使用 Shimadzu 公司的 gas chromatograph GC-9A, 测定 BOD 用微生物快速测定传感器^[4]。

1.3 培养条件

无机盐培养基(Burk mineral solution): K_2HPO_4 0.2g, KH_2PO_4 0.8g, $MgSO_4$ 0.2g, $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ 0.1g, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.0033g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005g, $(NH_4)_2SO_4$ 1.0g 以双蒸水定容至 1000mL, 调节 pH 成 7.2, 0.55×10^5 Pa 灭菌 30min。使用前加入适量农药浓缩储存液成适当浓度。接种适量土样悬液或菌液于上述培养基中, 30℃、200r/min 振荡培养, 平板或斜面在 30℃ 恒温箱中静置培养。

1.4 菌体的富集与分离

将采集的农药污染土样配制成为 20% 的悬浮液, 然后以 5% 的接种量接到含 50mg/L MPAR 的无机盐培养基中, 并加适量玻璃珠, 振荡培养。待菌长出后, 取适量菌液接入同样培养基中 30℃ 培养, 60d 的传代过程中 MPAR 的浓度从 50mg/L 逐步增高至 800mg/L, 平板稀释法将富集的农药降解菌菌液涂布在含有 200mg/L PNP 的无机盐固体培养基上, 当平板颜色从黄色变为白色时, 选取在农药培养基中生长快, 菌落规则, 传代稳定的单菌落转入斜面保存, 进行性能测试。菌种鉴定参照文献^[5]。

1.5 基因组 DNA 的提取与 16S rDNA 的同源性比较

参照文献^[7]以蛋白酶 K/CTAB 法结合试剂盒提取 WBC-3 基因组 DNA。参照文献^[8]采用 WBC-3 的基因组 DNA 16S rDNA 扩增引物如下: 上游引物为 5'AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3', 下游引物为 5'TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'。以新提的 WBC-3 基因组 DNA 为模板, 每 50 μ L PCR 反应体系中含: 1 \times PCR 缓冲液(Mg^{2+} free), 1.5mmol/L Mg^{2+} , 400nmol/L 引物, 200 μ mol/L dNTP, 0.38 μ L Ex Taq(5u/ μ L), DDW。PCR 循环设定为: 94℃ 3.5min, 循环一次; 95℃ 变性 1min, 41℃ 退火 40sec, 72℃ 延伸 1.5min, 共 30 个循环; 72℃, 10min, 循环一次; 4℃ 延伸。1.0% 琼脂糖电泳检测 PCR 产物后, 进行 PCR 产物的克隆。测序由 Bioasia 博亚生物工程公司完成, 用 BLAST 软件与 GenBank 中的 16S rDNA 序列进行同源性比较。

1.6 MPAR 及 PNP 的分析检测方法

培养基经萃取提纯后进行气相色谱分析, 测定底物 MPAR 的含量。萃取方法为: 25mL 细菌培养液, 以 4000r/min 离心 10min, 获取上清液, 转移至 250mL 分液漏斗中, 加入 12mL 二氯甲烷和 10mL Na_2SO_4 (50g/L), 充分振荡 5min, 静置分层, 将下层提取液转移至蒸发皿中, 重复萃取两次(各加入二氯甲烷 8mL), 合并三次的提取液, 令其在蒸发皿中自然挥发。用少量二氯甲烷清洗蒸发皿, 洗液移入具塞刻度离心管中, 定容至 2.5mL。气相色谱的测定条件为: 内径 3mm, 长 2.1m 的色谱柱, 装涂以 2%(m/m)OV-17 和 2.5%(m/m)QF-1

1 混合固定液的 80 ~ 100 目的 Chromosorb W AW DMCS ;气流速度为氮气 50mL/min ,空气 500mL/min ,氩气 50mL/min ;进样口温度为 250℃ ,检测器温度为 250℃ ,柱温为 180℃ 。每次测定将待测样品适当稀释 ,然后上样 1 μ L 。中间产物对硝基苯酚的浓度则以其在 405nm 的特征光吸收值表示。菌体生长量通过测定样品的 OD_{600} 来确定。

1.7 呼吸底物范围实验(微生物传感器法)

将菌株首先接种于含 40mg/L 的 2,3-二氯酚、邻苯二酚或马拉硫磷的富集培养基中,24h 培养至菌体的 OD_{600} 分别达到 1.5、1.5 和 0.5 时,取出 OD 值为 0.75 的菌量做测定用的菌膜,以 10mg/L 标准 GGA 溶液(150mg/L 葡萄糖 + 150mg/L 谷氨酸) + 10mg/L 二氯酚/5mg/L 马拉硫磷活化所做菌膜,用活化好的菌膜进行 BOD 实验^[4]。同时进行了对呼吸代谢有较大毒性的化合物为唯一碳源的培养试验:在 400mg/L 的 PNP 中活化的 WBC-3 以 4% 接种于 5mL 无机盐培养基(含 40mg/L 的底物)中,于 30℃ 振荡培养 48h 后测其 OD_{600} 的变化。

1.8 有机磷水解酶的纯化

用渗透压休克法提取细胞周质区蛋白^[9],利用硫酸铵分级沉淀获取饱和度为 60% ~ 80% 的组分,即目的蛋白的集中区。将盐析下来的蛋白沉淀重悬于 50mmol/L, pH8.0 的 Tris-Cl 缓冲液后,进行 4℃ 透析脱盐,再以 PEG6000 适当浓缩至酶液体积少于 5mL。参照文献^[10]处理 Sephadex G-75 凝胶,装填于清洁的柱子中,以 50mmol/L, pH7.5 的 Tris-Cl 缓冲液平衡柱床。上样 5mL 于 1cm \times 45cm 的柱床,再以同样的缓冲液以 0.2mL/min 的流速进行洗脱,以分部收集器进行收集,测定各收集管中的酶活,集中酶活高的组分,以 PEG600 进行适当浓缩。将 100mL 的 Q Sepharose Fast Flow 离子交换树脂经 1mol/L 的 NaOH 及蒸馏水反复浸泡清洗,静置分层去上清,最后加入 1/2 体积的蒸馏水,搅拌均匀后装柱,以 50mmol/L, pH10.0 的 Tris-Cl 平衡柱床,将样品以流速 1mL/min 上至柱床,然后以缓冲液 A(50mmol/L, pH10.0 Tris-Cl)和缓冲液 B(含 0.3mol/L NaCl 的 50mmol/L, pH10.0 Tris-Cl)梯度混合后进行洗脱,以 6mL/管的速度分部收集,合并酶活最高的几管,进行超滤浓缩,取少量样品进行 SDS-PAGE。

1.9 蛋白浓度测定

Bradford 法测定蛋白浓度^[11],以 BSA 作为标准蛋白。

1.10 有机磷水解酶活力测定

适当体积的周质酶、盐析组分、凝胶过滤组分、纯酶 2 ~ 10 μ L 加入 10 μ L 的 MPA 样品(至终浓度 1mmol/L),以 50mmol/L, pH8.5 Tris-HCl 缓冲液补齐至 200 μ L,30℃ 反应,测定最初反应的 OD_{405} 值变化。 OD_{405} 值的变化反映了产物对硝基苯酚的生成量,酶活单位定义为 30℃ 时每分钟产生 1 μ mol 对硝基苯酚所需要的酶量。

2 结果

2.1 菌种的鉴定及其生理生化特性

该菌种的主要特征为:菌体呈短杆状,极生单鞭毛(图 1),革兰氏染色阴性,氧化葡萄糖产酸、硝酸盐还原及 V.P. 反应阴性,过氧化氢酶和氧化酶测定阳性。丰富培养基上菌落白色,光滑,边缘整齐。能以对硝基苯酚(PNP)或对硫磷做唯一碳氮源生长,在无机盐

培养基(外加 PNP 浓度为 500mg/L)中、30℃ 摇床培养时生长很快。在 pH6~8、温度 20℃~40℃ 范围内均生长良好。该菌的 16S rDNA 序列与 GenBank 中存有的其它 16S rDNA 序列的同源性见表 1,与之序列同源性极高的菌种包括 *Pseudomonas* sp. ML2, *Pseudomonas plecoglossicida*, 及一些 *Pseudomonas putida* 的菌株。鉴定该菌为假单胞菌(*Pseudomonas* sp.), 编号为 WBC-3。

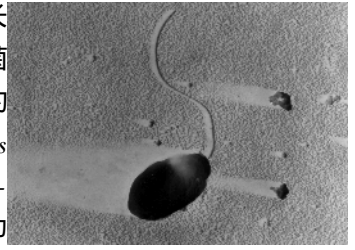


图 1 *Pseudomonas* sp. WBC-3 菌的电镜照片(×8000)

Fig.1 Transmission electron micrograph of strain WBC-3 (×8000)

表 1 WBC-3 菌的 16S rDNA(GenBank Accession No. AY040872) 的 BLAST 分析

Table 1 BLAST analysis of 16S rDNA sequences showing the classification of strain WBC-3

Bacterium for alignment	GenBank Accession No.	Identity
<i>Pseudomonas</i> sp. ML2	AF378011	1494/1497(99.8%)
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	AB009457	1493/1498(99.67%)
<i>Pseudomonas putida</i>	AF291048	1495/1501(99.6%)
<i>Pseudomonas putida</i> strain ATCC 17390	AF074737	1490/1495(99.67%)
<i>Pseudomonas</i> sp. isolate R1	AJ002805.1	1479/1481(99.87%)
<i>Pseudomonas putida</i> strain ATCC 17453	AF094746	1474/1474(100%)
<i>Pseudomonas monteilii</i>	AF064458	1489/1493(99.73%)
<i>Pseudomonas putida</i> strain ATCC 17514	AF094741	1475/1476(99.93%)
<i>Pseudomonas putida</i> strain ATCC 17642	AF094744	1487/1494(99.53%)
<i>Pseudomonas putida</i>	AB029257	1466/1470(99.73%)
<i>Pseudomonas</i> sp. PH1	AF065166	1489/1499(99.33%)
<i>Pseudomonas putida</i> strain MTB6	AF131103	1480/1488(99.46%)
<i>Pseudomonas</i> sp.	AJ007006	1459/1461(99.86%)
<i>Pseudomonas</i> cf. monteilii	AF181576	1487/1500(99.13%)
<i>Pseudomonas mosselii</i>	AF072688	1482/1493(99.26%)

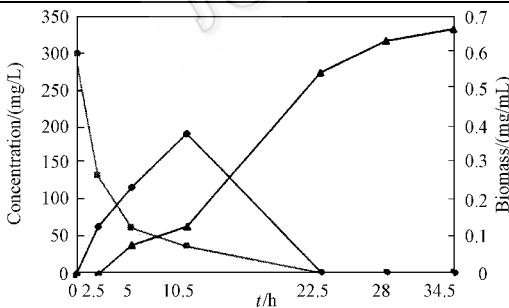


图 2 WBC-3 菌利用 MPAR 及 PNP 的生长曲线

Fig.2 Methylparathion catabolism and p-nitrophenol degradation in batch culture

■—Methylparathion ; ◆—p-nitrophenol ; ▲—Cell density.

2.2 WBC-3 对甲基对硫磷、对硝基苯酚的降解

将 400mg/L PNP 中培养 20h 活化至对数期的菌液,按 5% 计接于含 300mg/L 的 MPAR 的无机盐培养基中,每隔一定时间取样一次,测定底物 MPAR、中间产物 PNP 及菌体生长量。WBC-3 菌能利用甲基对硫磷或对硝基苯酚快速生长(图 2),在生长过程中唯一碳源物质甲基对硫磷的浓度有明显的降低,降解速度大约是 15mg/L·h,培养 20h 后 MPAR 已检测不出。在底物甲基对硫磷减少的同时伴随着其降解产物对硝基苯酚浓度的增加。经过一段时间的诱导及耐受过程,菌株会利用二次底物对硝基苯酚为碳源和能源进行快速生长,且对硝基苯酚的减少与生物量的增多成正比关系。

2.3 WBC-3 对甲基对硫磷的耐受浓度

将在 600mg/L PNP 的无机盐培养基中活化至对数期的菌液,按 4% 计接于含 500mg/L

1000mg/L MPAR 的无机盐培养基中, 30℃培养 28h 左右测其 OD_{600} 值。同样以活化好的菌液接种于含 200 ~ 300mg/L MPAR 的葡萄糖(浓度为 0.1%)无机盐培养基中, 培养至稳定期测其 OD_{600} 值。WBC-3 菌接种于无机盐培养基中培养时, 其耐受底物浓度达 800mg/L, 最适生长浓度为 600mg/L。而将 WBC-3 接种于含不同浓度甲基对硫磷的葡萄糖无机盐培养基中, 则其耐受底物浓度高达 2000mg/L, 最适生长浓度为 1200mg/L(图 3)。

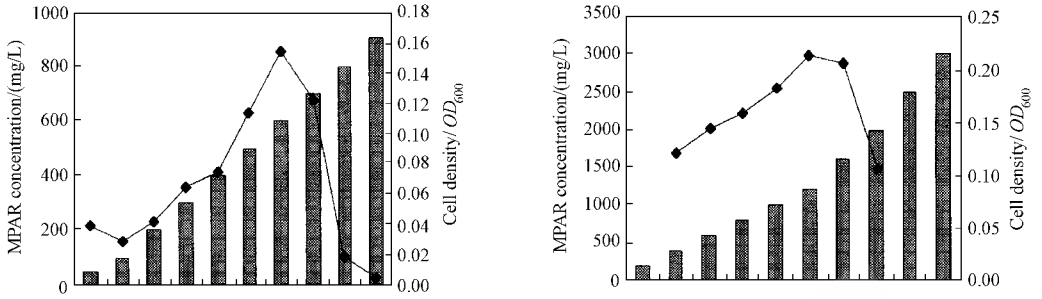


图 3 WBC-3 菌对高浓度 MPAR 的耐受曲线

Fig. 3 Tolerance to high-concentration methylparathion in

(A) basal medium and (B) 0.1% glucose-added basal medium

2.4 WBC-3 对多种化合物的生化代谢能力

用微生物传感器稳态 BOD 快速测定法, 来检验 WBC-3 菌对于某些单一有机底物的可生化能力, 发现其对于一些芳烃类衍生物, 如 2,3-二氯酚、邻苯二酚、邻苯二胺、对苯二酚、马拉硫磷等有较强的代谢活性; 另外, 对于 3,4-二氯酚、PNP、二嗪农、杀螟松、喹硫磷、辛硫磷、乐果等也有一定代谢活性, 但对于五氯酚、2,4,5-T、亚胺硫磷则无代谢活性(表 2)。

表 2 WBC-3 菌的降解底物范围

Table 2 Evaluation of degradability of chemical substrates by the strain WBC-3

Substrates	BODm	Cell growth	Degradability [*]
Methamidophos	0.39	0.3700	+
Phosemet	0	0.0299	-
Fenitrothion	0.26	0.0730	+
Diazinon	0.25	0.0494	+
Quinalphos	0.18	-	+
Phoxim	0.15	-	+
Dimethoate	0.22	0.1500	+
Malathion	0.51	0.4906	+
2,4,5-Trichlorophenol	0	0	-
Pentachlorophenol	0	0	-
3,4-Dichlorophenol	0.21	-	+
2,3-Dichlorophenol	1.52	1.5190	+++
p-Nitrophenol (PNP)	0.22	0.1529	+
Hydroquinone	0.68	-	++
1,2-Dihydroxybenzene	1.59	1.4920	+++
2,3-Diaminophenol	0.70	-	++

* , + , denotes "degradable"; ++ , denotes "higher degradability"; +++ , "a very strong degradability"; - , "no degradability".

用 2,3-二氯酚、邻苯二酚、马拉硫磷、二嗪农、杀螟松、二嗪农、亚胺硫磷等物质为唯一碳源培养 WBC-3 菌时也显示了同样的结果。

2.5 WBC-3 有机磷水解酶的纯化

经过硫酸铵沉淀、凝胶过滤、离子交换层析等步骤,原存在于 WBC-3 菌细胞周质中的含量较少的有机磷降解酶得到了有效的纯化,获得 SDS-PAGE 胶上的单一条带蛋白,凝胶分析软件显示,该蛋白的分子量大约为 33.5kD。(图 4)

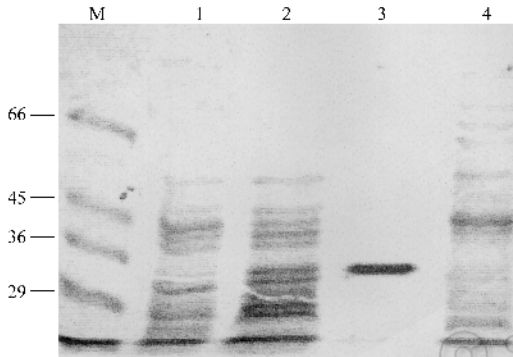


图 4 WBC-3 菌有机磷水解酶的纯化

Fig.4 Purification of the organophosphate hydrolase from *Pseudomonas* sp. WBC-3

M. Low-range protein molecular weight marker ;

1. Fraction of 60% ~ 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation ; 2. Pooled fractions after Sephadex G-75 step ;

3. Pooled fractions after Q Sepharose FF step ; 4. Crude periplastic extract of *Pseudomonas* sp. WBC-3.

纯化过程的效率见表 3,经三个步骤的纯化,得到的酶比活是最初的细胞周质酶液的 48 倍,整个纯化过程的回收率为 36%。

表 3 WBC-C 菌有机磷水解酶的纯化

Table 3 Purification of organophosphate hydrolase from *Pseudomonas* sp. WBC-3

Step	Volume/mL	Total protein/mg	Total activity/U	Specific activity(U/mg)	Purification factor	Yield/%
Periplastic fraction	40	102.00	222	2.2	1.00	100
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation	5	48.10	197	4.1	1.86	88.7
Sephadex G-75	6	8.64	154	17.8	8.09	69.4
Q Sepharose FF	3	0.76	80	105.8	48.10	36.0

3 讨论

对甲基对硫磷、对硝基苯酚的彻底降解,意味着 WBC-3 菌具有苯环类化合物的分解代谢能力,在苯环开裂的过程中,必然存在着加氧酶的作用。本实验中采用了微生物传感器测定生化需氧量(BOD)的方法,初步确定了菌株能够代谢的底物范围。其原理是:将菌株预先在芳香烃类化合物存在的情况下培养驯化,待驯化成熟后,将菌体作成微生物膜,以夹心法构成微生物传感器的生物敏感元件。在测定中,样品液接触固定化微生物膜时,

如果微生物能够氧化利用其中的有机物,则会消耗样品中的溶解氧,使与之接触的氧电极附近的氧浓度降低,经换能器转换后表现为电极电流的减小,这样通过电流响应值的变化可以测定对样品的利用情况。为避免溶剂物质可能造成的干扰,一些难溶于水的苯环类物质先将其转变为钠盐的形式溶解;对于一些抑制细胞呼吸的毒性较大的化合物,用于 BOD 的测定显然不够准确,实验中辅以该种化合物为唯一碳源的培养试验,结果如表 2 显示,两种方法的结果基本一致。实验中发现,凡苯环上有—OH 或—NH₂ 取代基的化合物都比较容易为 WBC-3 菌所降解,这与苯环的降解通常需先羟化再开环的原理一致^[12]。本实验说明,WBC-3 菌具广泛的底物适用性,对于由多种不同苯环类化合物引起的点源污染的治理有着非常重要的意义。另外,在进行邻苯二酚双加氧酶测定时,发现经 PNP 诱导培养的菌体具有明显的邻苯二酚 1,2-双加氧酶活性,而不具有 2,3-双加氧酶活性,说明该菌很可能以邻位开环的途径降解 PNP。

实验中还发现编码有机磷降解酶的基因在 WBC-3 菌中是组成型表达的,菌株经丰富培养基传代或冻存后再次接种使用,其降解有机磷化合物的能力始终不变,无需诱导。而进行对硝基苯酚分解代谢的酶系则不然。当加入适量诱导物(如 PNP、2,3-二氯酚等)的菌株经传代或冻存后,接入较高浓度的苯环类化合物,均不显示降解;分别由丰富培养基和含 PNP 的无机盐培养基培养得来的等量菌体,对于同一浓度的农药的降解速度有明显差异(图 5);在 PNP 存在的情况下,菌体生长有一定时间的延迟,可能在此期间,降解所需的中间酶系(如苯环类化合物羟化开环的单加氧酶、双加氧酶)正被诱导生成,经过这段时间,菌体才能分解并利用 PNP 作为其生长的基质,而且加入的 PNP 浓度越高,延迟现象越明显(表 4),说明降解酶系只有积累到一定量值时,才能抵消苯环类化合物对菌体生长的抑制作用。在该菌用于环境污染治理的时候,需要重视这一点。

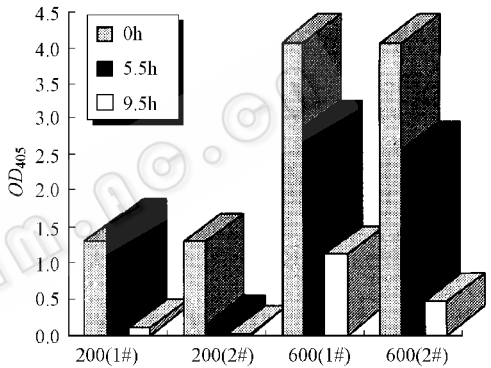


图 5 WBC-3 菌的降解可诱导性

Fig.5 Inductivity of the degradative capability of strain WBC-3

1 # . Cells from LB culture ;

2 # . Cells from PNP-additive basal medium.

表 4 PNP 导致的 WBC-3 生长延迟

Table 4 *p*-Nitrophenol-induced lag period in the growth of strain WBC-3 on methylparathion.

MPAR concentration/(mg/L)	PNP peak time/h	Turn-over time/h
100	3.5	5
200	< 14	17
400	18	24
600	20	27
800	21	30

参 考 文 献

- [1] 华小梅, 单正军. 环境科学进展, 1996 (2) 33 ~ 45.
- [2] Dave K I, Phillips L, Luckow V A, et al. *Biotechnol Appl Biochem*, 1994, **19** 271 ~ 284.
- [3] Munnecke D M, Hsieh D P. *Appl Microbiol*, 1974, **28** (2) 212 ~ 217.
- [4] 张先恩, 王志通, 简浩然. 环境科学学报, 1986 (2) :184 ~ 192.
- [5] 王大耜编著. 细菌分类基础. 北京: 科学出版社, 1977.
- [6] John R H. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.
- [7] Frederick M A, Roger B, Robert E K, et al. Short Protocols in Molecular Biology. 3rd ed. John Wiley & Sons Inc, 1995.
- [8] William G W, Susan M B, Dale A P, et al. *J Bacterial*, 1991, **173** (2) 697 ~ 703.
- [9] Brockman R W, Heppel L A. *Biochemistry*, 1968, **7** 2554 ~ 2562.
- [10] 赵永芳编著. 生物化学技术原理及其应用. 第二版. 武汉: 武汉大学出版社, 1994.
- [11] Bradford M M. *Anal Biochem*, 1976, **72** 248 ~ 252.
- [12] Marvin-Sikkema F D, M deBont J A. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1994, **42** 499 ~ 507.

Study on *Pseudomonas* sp. WBC-3 Capable of Complete Degradation of Methylparathion

Chen Yali Zhang Xianen Liu Hong Wang Yinshan Xia Xiangming

(Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

Abstract : A bacterial strain was isolated from the polluted soil around Shashi Pesticides Factory, which was capable of complete degradation of methylparathion. Through chemotaxonomic characterizations and phylogenetic inference based on 16S rDNA sequence analysis, the strain was identified as a member of the genus and was named as *Pseudomonas* sp. WBC-3. It can tolerate high-concentration methylparathion up to 800mg/L in basic medium and up to 2000mg/L in 0.1% glucose medium. Using 300mg/L methylparathion as its sole carbon and nitrogen sources, the strain was able to degrade 15 mg of parathion per liter per hour and reached its stationary phase in about 22 hours. The strain possessed broad-spectrum degradative capability to kinds of organophosphorus pesticides and aromatic compounds. Its organophosphate hydrolase was purified from the periplasm of WBC-3 to homogeneity, through a whole process consisting of ammonium sulfate precipitation, Sephadex G-75 gel filtration, Q Sepharose FF ionexchange column chromatography. The purified enzyme showed a single band on SDS-PAGE gel with an approximate molecular weight of 33.5 kD.

Key words : Methylparathion, Degradative strain, *Pseudomonas* sp. WBC-3, Isolation, 16S rDNA, Organophosphate hydrolase