

# 趋化信号转导基因 *cheA* 突变对 *Pseudomonas putida* DLL-1 甲基对硫磷的趋化性及原位降解的影响

文 阳, 蒋建东, 邓海华, 蓝 鸿, 李顺鹏\*

(南京农业大学生命科学院 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室 南京 210095)

**摘 要:** *Pseudomonas putida* DLL-1 是一株甲基对硫磷(MP)高效降解菌株,同时对 MP 具有趋化性。*cheA* 基因是菌株趋化信号转导过程中负责编码组氨酸激酶的基因,为了研究菌株趋化性在农药原位降解中的作用,通过基因打靶的方式使 *P. putida* DLL-1 染色体上单拷贝的 *cheA* 基因失活,成功地获得了 MP 的趋化突变株 *P. putida* DAK,突变株与野生菌株生长能力没有显著差异。通过土壤盆栽试验(MP 浓度为 50mg/kg),发现在灭菌与未灭菌土壤中趋化突变株对 MP 的降解能力低于原始出发菌株 DLL-1 约 20% ~ 30%,说明菌株 DLL-1 趋化性的丧失会减慢其对农药的降解,趋化性在农药的原位降解过程中发挥重要作用。

**关键词:** 趋化性; 农药降解; *Pseudomonas putida* DLL-1; *cheA* 基因; 甲基对硫磷

**中图分类号:** X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-6209(2007)03-0471-06

微生物对环境污染物的降解效果不仅仅取决于降解能力本身,而且依赖于污染物的生物可利用性以及降解性细菌与土著微生物之间的竞争能力<sup>[1,2]</sup>。细菌的趋化性(chemotaxis)是细菌响应环境化学物质梯度的移动,是细胞对碳源、能源竞争的一种表现。近几年来,细菌趋化性与降解性之间的关系研究开始受到科研工作者的关注,许多研究表明细菌的趋化性和降解特性之间存在密切关系。趋化性可以使降解菌株有效地感应到污染物,增加污染物周围的细菌密度,提高污染化合物的生物降解性。而且,趋化性可以增加细菌寻找合适碳源和氮源的机会,使细菌在有限碳、氮源环境中与土著微生物的竞争中表现出优势<sup>[3]</sup>。

趋化反应过程中负责信号转导的相关基因相对保守,研究也比较成熟,在大肠杆菌(*Escherichia coli*)、*Salmonella serovar*、*Pseudomonas aeruginosa*、*P. putida*、*Hizobium leguminosarum* 和 *Rhodobacter sphaeroides* 等菌属中都进行了许多研究<sup>[4,5]</sup>,其信号转导的过程主要通过甲基酯酶(CheB)和甲基转移酶(CheR)调节趋化受体蛋白(MCPs)(methyl-accepting chemotaxis proteins)的甲基化来影响组氨酸激酶(CheA)的磷酸化,再来调节反应调节蛋白(CheY)的磷酸化,而 CheY 与鞭毛马达开关结合,直接决定着鞭毛的旋转方向<sup>[6,7]</sup>。

本文以本实验室分离到的一株高效甲基对硫磷(MP)的降解菌株 *P. putida* DLL-1<sup>[8]</sup>为研究对象,通过游动平板法<sup>[4]</sup>,发现该菌株对 MP 同样具有趋化性。通过基因打靶使 DLL-1 菌株中单拷贝的趋化信号转导基因(*cheA*)失活,验证该趋化突变株在土壤原位条件下对 MP 的降解能力的变化,研究趋化性和降解性之间的关系,阐明趋化性在农药原位降解中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒** 本实验中使用的菌株和质粒见表 1。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 限制酶、碱性磷酸酶、T4 DNA 连接酶、LA Taq 酶购自 TaKaRa 公司,抗生素购自江苏创瑞公司,DNA 片段纯化回收试剂盒购自 Genbase 公司,所用引物由 TaKaRa 公司合成,气相色谱专用试剂均为色谱纯,其他试剂均为分析纯。80%的 MP 原药购自浙江嘉化集团股份有限公司。气相色谱型号为 GC-14B。

**1.1.3 培养基和缓冲液:** ① 无机盐、LB 培养基配方见参考文献<sup>[9]</sup>; ② LBM 培养基:LB 中加 100 $\mu$ g/mL 的 MP; ③ SLB 培养基:LB 中添加 5% 的蔗糖。根据实验需要再添加相应的抗生素,如:氨苄青霉素

基金项目:国家自然科学基金(30600016)

\* 通讯作者。Tel/Fax: 86-25-84396314 E-mail: lisp@njau.edu.cn

作者简介:文 阳(1982-)女,江苏人,硕士研究生,研究方向为环境微生物学。E-mail: wy\_vivienne@yahoo.com.cn

收稿日期:2006-10-12;接受日期:2006-11-21;修回日期:2007-03-07

表 1 使用的菌株和质粒的基本特性

Table 1 Basic characteristics of strains and plasmids used in this study		
Strains or plasmids	Relevant property(ies)	Source or reference
Strains		
<i>P. putida</i> DLL-1	High efficient methyl parathion degrading strain	Laboratory stored
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	$\Delta lacU169$ ( $\Phi 80 lacZ \Delta M15$ )	Laboratory stored
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha_{\lambda pir}$	$RP4$ -2- $tet^r$ : $\mu$ - $Km^r$ :: $Tn7$ integrant $leu-63$ :: $IS10$ $recA1$ $creC510$ $hsdR17$ $endA1$ $zbf-5$ $uidA$ ( $\Delta mlul$ ) ; $pir^+$ + $thi$	Laboratory stored
<i>E. coli</i> SM10 $_{\lambda pir}$	$Km^r$ , $thi-1$ , $thr$ , $leu$ , $tonA$ , $acy$ , $supE$ , $recA$ : $RP4$ -2- $Tc^r$ : $\mu$ - $pir$	Laboratory stored
<i>P. putida</i> DAK	$Str^r$ , $Km^r$ $cheA^-$	This study
Plasmids		
pMD 18-T	$Amp^r$	Laboratory stored
pSC123	$Km^r$	Laboratory stored
pWM91	$Amp^r$ , $f1(+)ori$ $lacZa$ of pBluescript II ( $SK^+$ ) ; $oriR_{6K7}$ , $oriT_{RP4}$ , $sacB$ , $Suc^s$	Laboratory stored
pRK600	$tra^+$ , $mob^+$	Laboratory stored
pMDA	$Amp^r$ , $cheA$ fragment inserted into the MCS of pMD 18-T	This study
pMDK	$Amp^r$ , $Km^r$ , $Km$ gene inserted into the MCS of pMD 18-T	This study
pWMA	$Amp^r$ , with $cheA$ fragment inserted into the $Bam$ HI and $Xho$ I site of pWM91	This study
pAK	$Amp^r$ , $Km^r$ , with $Km$ fragment inserted into $Bgl$ II site of pWMA	This study

(Amp)为 100 $\mu$ g/mL,卡那霉素(Km)为 50 $\mu$ g/mL,链霉素(Str)为 50 $\mu$ g/mL。④ 趋化培养基<sup>[10]</sup>:每升含 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0g ,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.7g ,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3g ,MgSO<sub>4</sub> 0.2g ,NaCl 0.5g ,pH 7.0 ,琼脂糖 0.2%。⑤ 趋化缓冲液<sup>[11]</sup>:40mmol/L K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> , 0.05% 甘油 , 10mmol/L EDTA ,pH7.0。

1.2 细菌培养

*E. coli* 和 *P. putida* 分别于 LB 培养基中 37℃

和 30℃培养。

1.3 分子生物学操作

细菌总 DNA 的制备、酶切、酶连、载体脱磷、*E. coli* 普通感受态制备、转化、质粒提取等操作方法见参考文献[9];DNA 的回收纯化按照试剂盒说明书进行 ;DNA 测序委托 TaKaRa 公司完成 ;实验中所用的引物及 PCR 扩增条件列于表 2。

表 2 引物及 PCR 扩增条件

Primers names		Sequences of primers(5'→3')	Denatural T/℃	Annealing T/℃	Remarks
<i>cheA</i>	AF	ATGAGCTTCGCGCCGATGAAGA	94	64	<i>Bgl</i> II
	AR	AGCATGCTCAAGCGTTACGCCGC			
Km	KF	AAAAAGATCTACAATAAACTGTCTGCT	94	52	<i>Bgl</i> II
	KR	CCCCAGATCTCGTCCCGTCAAGTCAGCG			

1.4 同源重组打靶载体的构建

参照模式菌株 *P. putida* KT2440 的全基因组序列 根据保守序列设计扩增编码组氨酸激酶磷酸化的基因(*cheA*)引物(表 2),扩增目的条带 *cheA*。将扩增的 *cheA* 片段与 pMD18-T 载体连接获得 pMDA。以 pSC123 为模板 ,引物 KF 和 KR 扩增出含启动子的 Km 抗性基因片段 ,两端同时引入 *Bgl* II 酶切位点 ,连接到 pMD18-T 载体上 ,命名为 pMDK。 *Xho* I 和 *Bam*HI 双酶切 pMDA ,将 2kb 左右的 *cheA* 大部分片段连到同样酶切的 pWM91 质粒载体上 ,转化 *E. coli* DH5 $\alpha_{\lambda pir}$  获得 pWMA。用 *Bgl* II 分别单酶切 pWMA 和 pMDK ,分别回收 10kb 的 pWMA 线性片段和 1kb 的 Km 片段 ,将 Km 片段连接到 pWMA 的 *Bgl*

II 酶切位点 ,获得 *cheA* 片段中间插入 Km 基因的同源重组打靶载体 pAK ,最终将 pAK 转入 *E. coli* DH5 $\alpha_{\lambda pir}$ 。图 1 为同源重组载体构建的具体路线。

1.5 三亲接合

将供体菌、受体菌、辅助菌在各自培养基中培养至对数中期 ,8000r/min 离心回收菌体 ,用无菌水洗涤 1 次 ,浓缩后按 1:1:1 混合 3 种菌液于微孔滤膜 (0.22 $\mu$ m)上 ,过滤除去滤液 ,置于不含抗生素的 LB 培养基上 30℃培养 24h 后用无菌水洗下菌体 ,直接涂布于含 100 $\mu$ g/mL Amp、50 $\mu$ g/mL Km 和 50 $\mu$ g/mL Str 的 LB 平板上。

1.6 趋化分析方法

游动平板分析法(Swarming plate assay):取处于对

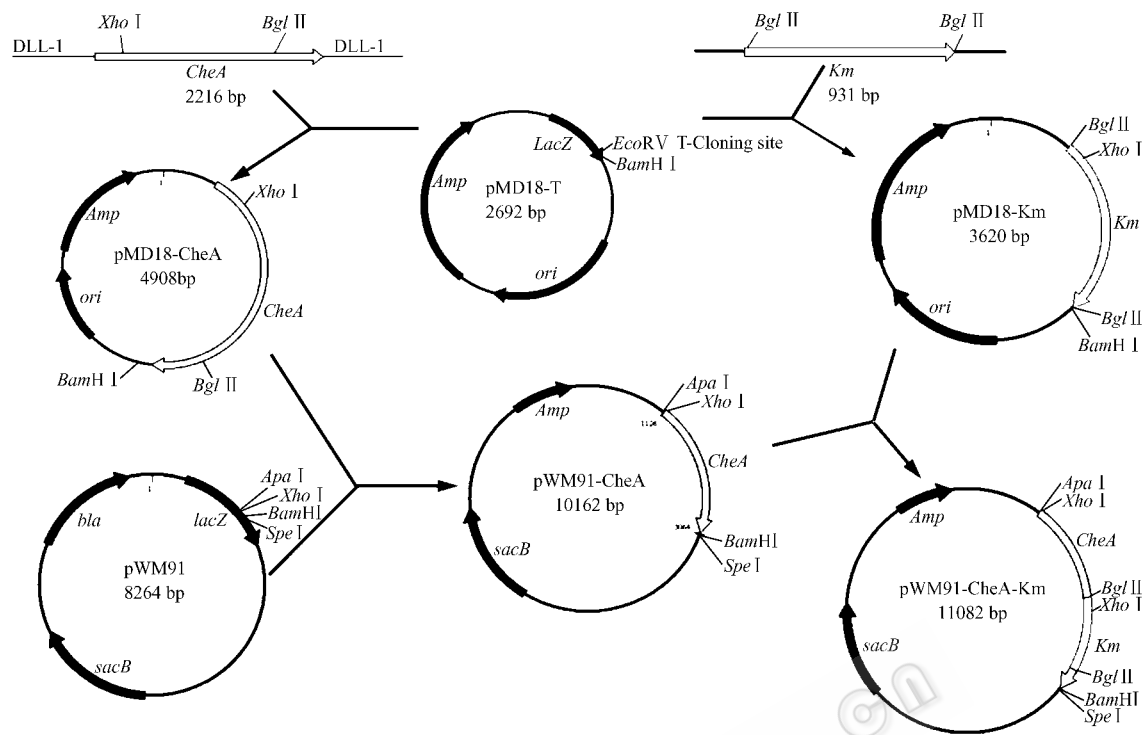


图 1 同源重组打靶载体的构建路线图

Fig.1 Construction of the homologous recombination vector for *cheA* gene targeting

数生长期的细菌培养液 ,收集菌体 ,用趋化缓冲液洗涤 ,悬浮于趋化缓冲液中 ,滴加  $10\mu\text{L}$  (约  $10^6$  个细胞) 于以受试底物(  $100\text{mg/kg}$  的 MP )为唯一碳源的趋化平板中央 ,培养一定时间 ,如果细菌对所测化合物产生趋化反应 ,就会在平板上形成很大的菌落圈。

### 1.7 菌株 DLL-1 和 DAK 生长曲线测定

将两个菌株分别培养至对数期 ,调节使  $OD_{600}$  值一致 ,分别取  $1\text{mL}$  培养液接种于装有等体积 LB 的三角瓶中 ,震荡培养 ,每隔一段时间取  $3\text{mL}$  培养液用分光光度法测定 OD 值。本试验重复 3 次。

### 1.8 菌株 DLL-1 和 DAK 对土壤中农药的降解

取菜园土 ,风干 ,过 20 目筛 , $100\text{g}$  灭菌与  $100\text{g}$  未灭菌土壤中各加入  $50\text{mg/kg}$  的 MP。将菌株 DLL-1 与 DAK 分别培养至对数生长期 ,调节  $OD_{600}$  值一致 ,用无菌水洗涤菌体 1 次。接菌处理中分别接种 DLL-1 与 DAK 菌体 ,接菌量尽量保持一致 (通过平板计数确定) 接种量控制在  $10^5 \sim 10^6$  个/g 土 ,分别于 12h、24h、36h、48h、3d 和 5d 取样测定农药浓度。本试验重复 3 次。

MP 的气相色谱检测 :每个处理取  $10\text{g}$  土 ,加 2 倍体积的丙酮 ,剧烈震荡 3min ,静置过夜 ,取  $2\text{mL}$  挥发定容至  $1\text{mL}$  ,去水相 ,过无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  柱 ,收集流出的丙酮液体 ,气相色谱检测<sup>[12]</sup>。

## 2 结果和分析

### 2.1 菌株 *P. putida* DLL-1 对 MP 的趋化性

菌株 DLL-1 在  $100\mu\text{g/mL}$  的 MP 为唯一碳源的趋化培养基中显示出明显的趋化性 ,4h、36h、3d 的趋化情况如图 2-A 4h 时趋化圈不够明显 ,但肉眼可观察到 (照片显示不出) ,通过图 2-B 中数据显示 ,随着时间的延长 ,趋化圈也随之增大。随着趋化物浓度的升高 ,趋化圈随之明显扩大。当 MP 浓度达到  $500\mu\text{g/mL}$  时 ,趋化圈开始明显减小 ,可能是高浓度的 MP 导致菌株出现负趋化。

### 2.2 *P. putida* DLL-1 中趋化信号转导基因 *cheA* 的突变

成功地在菌株 DLL-1 染色体中扩出  $2.2\text{kb}$  左右目的条带 *cheA* 片断 ,测序结果表明该片段与 KT2440 中 *cheA* 基因同源性在 99% 以上。

通过三亲接合的方法将同源重组打靶载体 pAK 转入到受体菌 DLL-1 中 ,因 pAK 为 R6K 复制位点不能在 DLL-1 中自主复制 ,在 Str、Km 和 Amp 三抗平板上筛选出来的即为同源重组单交换子。将同源重组单交换子在无抗生素的液体培养基中培养过夜 ,稀释涂布于含 5% 蔗糖的 Str 和 Km 平板 (SLB) 上 ,挑取能生长的具有双重抗性的单菌落即为阳性同源重组双交换子 ,即为 *cheA* 基因被 Km 抗性基因插入失活

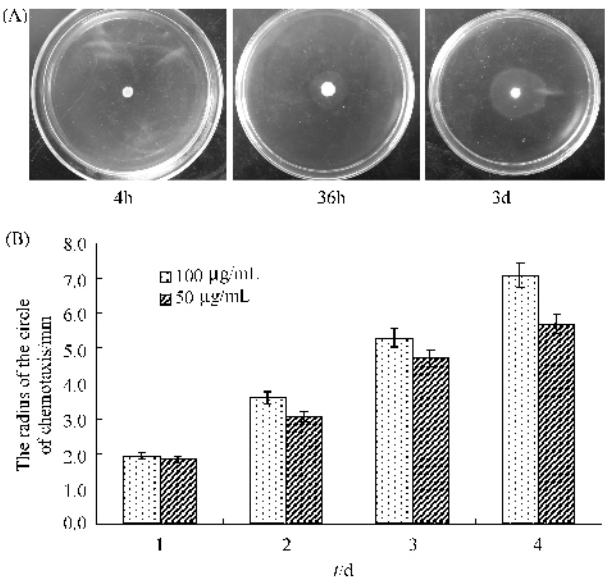


图2 *P. putida* DLL-1 分别对 100 µg/mL 的 MP 不同时间培养后的趋化性 (A) 和对 100 µg/mL 和 50 µg/mL 的 MP 不同时间培养后的趋化圈的半径大小 (B)

Fig.2 Chemotaxis of *P. putida* DLL-1 to MP after incubation for different times (A) and the radius of the circle of Chemotaxis of *P. putida* DLL-1 to MP after incubation for different times (B).

的突变株,命名为 *P. putida* DAK。

2.3 *P. putida* DAK 中 *cheA* 基因突变的验证

提取 *P. putida* DAK 总 DNA,分别用引物 AF 和 KR、AF 和 KF、KF 和 AR 扩增 (图 3-A),扩增结果如图 4-B。由于引物 AF 和 AR、KF 和 KR 分别设计在 *cheA* 和 *Km* 基因片段上,因此,通过 PCR 扩增能够

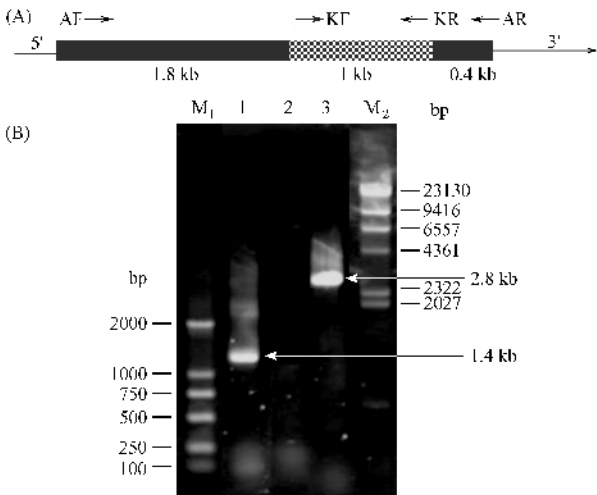


图3 引物在菌株 DAK 中位置示意图 (A) 和突变株 DAK 的 PCR 扩增电泳图谱 (B)

Fig.3 The locations of primers in the chromosome of *P. putida* DAK (A) and PCR amplification results (B). M<sub>1</sub>: DL2000 DNA marker; 1. amplified with primer KF and AR; 2. amplified with primer AF and KF; 3. amplified with primer AF and KR; M<sub>2</sub>: λDNA/ *Hind* III marker.

确定 *Km* 基因是否插入到 *cheA* 位点。用引物 AF 和 KR 扩增出 2.8kb 左右的条带,AF 和 KF 没有扩增出条带,KF 和 AR 扩增出 1.4kb 左右的条带,PCR 结果证明了 *Km* 基因确实插入到 *cheA* 基因位点。

2.4 突变菌株 DAK 和野生菌株 DLL-1 生长情况比较以及 DAK 菌株趋化性分析

图 4 为野生菌株 DLL-1 和突变菌株 DAK 生长曲线。从图中可以看出 DAK 中 *cheA* 基因突变后和 DLL-1 菌株在 LB 培养基中生长情况基本一致,表明 *Km* 基因插入到 *cheA* 位点对受体菌的生长速率没有显著影响。

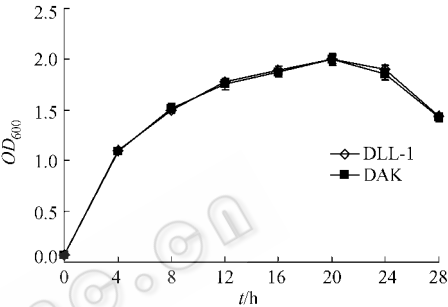


图4 *P. putida* DLL-1 与 DAK 在 LB 中的生长曲线

Fig.4 Growth curves of *P. putida* DLL-1 and DAK in LB medium.

将趋化突变株 DAK 与野生株 DLL-1 按同等条件接种到含 100mg/kg MP 的无机盐培养基中,每隔 1h 取样,过气相色谱检测残留的 MP 的量。结果显示 (图 5) 野生和突变株在液体摇瓶中,对农药的降解效率几乎没有差异,说明在动态环境中,菌体与趋化物充分接触,对其降解能力影响不大。

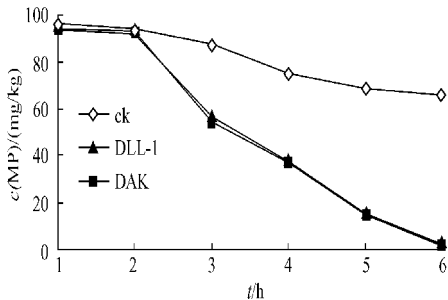


图5 菌株 DLL-1 和突变株 DAK 在无机盐培养基中的降解

Fig.5 Biodegradation of MP (100mg/kg) in inorganic salt medium by *P. putida* DLL-1 and mutant DAK.

采用游动平板法验证突变株 DAK 对 MP 的趋化性。图 6 为 12h、36h 和 3d 对 MP 的趋化性,结果表明突变株 DAK 丧失了对 MP 的趋化性。菌株 DAK 中 *cheA* 基因的失活阻碍了组氨酸激酶的磷酸化,中断了整个信号转导过程,阻断了鞭毛的运动,导致菌体不能游向趋化物,丧失了趋化性。

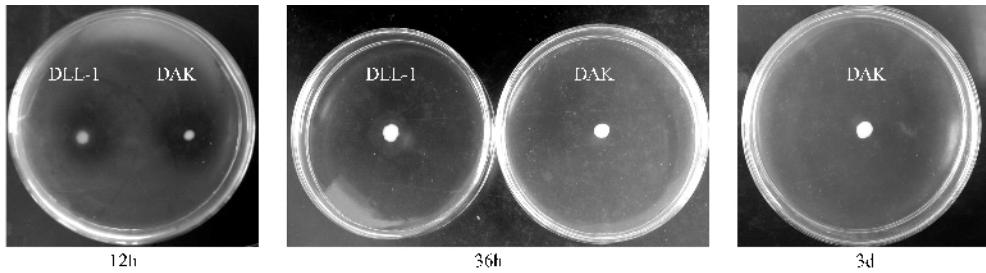


图 6 突变株 DAK 和菌株 DLL-1 在不同培养时间时对 MP 的趋化反应

Fig.6 Chemotaxis of DAK and DLL-1 to MP in different times

2.5 突变菌株 DAK 和野生菌株 DLL-1 在土壤降解 MP 的比较

将趋化突变株 DAK 与野生株 DLL-1 按同等条件接种到含 50mg/kg MP 的未灭菌和灭菌的土壤中 , 每隔一定时间取样 , 过气相色谱柱检测残留的 MP 的量。结果显示 ( 图 7 ) , DLL-1 对 MP 的降解效果明显 , 3d 后几乎全部降解了 , 而同等条件下 , 趋化突变株 DAK 和 DLL-1 相比 , 降解效率不如野生菌株快 , 在未灭菌土壤中 , 36h 内其降解速率比原始菌株低约 20% , 在灭菌土壤中低约 30%。农药在灭菌的土壤中的降解速率低于未灭菌土壤 , 这跟土壤中存在的有机质含量以及其他菌群有关 , 有些土著微生物对农药有一定的降解作用<sup>[13]</sup>。以上表明在土壤中 , 菌株趋化性的丧失对 MP 的降解是有一定影响的。对于野生菌株而言 , 菌株的趋化特性对农药的降解能力有促进作用 , 要想趋化突变株达到同样的降解

效果 , 必须加大施菌量。

3 讨论

细菌的趋化性在化学污染物的原位降解中发挥重要作用。Witt 等<sup>[18]</sup>最早在实验室微宇宙系统中发现趋化性能促进细菌对沉积物中四氯甲烷污染物的生物修复。Marx 等<sup>[15]</sup>通过比较野生菌株 *P. putida* G7、趋化突变株和非游动菌株对萘的降解 , 发现野生菌株的降解速率最快 , 如果要同样达到相同的降解效果 , 趋化突变株的细胞浓度要比高出几倍<sup>[14]</sup>。Pedit 同样证实了非趋化性菌株要达到趋化性菌株对萘相同的降解效果时 , 其数量也须高出几倍。Lanfranchi 等<sup>[16]</sup>从汽油污染的土壤中分离到一株脂肪烃降解菌 *Flavimonas oryzae* , 该菌对分离源土壤中存在的十六烷烃等链烷烃具有趋化性 , 结果表明趋化性在污染物的降解过程中有重要作用 , 有利于降解菌株与底物之间的接触 , 增强生物降解效果。Ortega-Calvo 等<sup>[17]</sup>首次评价了根圈中多环芳烃( 萘、菲、蒽及芘 ) 降解菌的趋化性在污染物植物修复系统中的作用。他们在煤炭和石油污染的土壤中分离了 20 余株多环芳烃趋化性降解菌株 , 研究发现细菌的趋化性使根圈中降解性细菌数量增加 , 提高了污染物的生物可利用性 , 促进了根圈中多环芳烃的降解。

*P. putida* DLL-1 能以 MP 为唯一碳源、氮源生长 , 通过游动平板法发现该菌株对 MP 表现出很强的趋化性 , 随着农药浓度的增加 , 趋化能力也增强 , 但高浓度情况下( 500 mg/kg ) 在平板上显示为很小甚至没有趋化圈 , 从而证明趋化物浓度不断加大则会出现负趋化现象 , 而过高浓度甚至会毒害菌体。

本实验通过基因打靶的方法成功获得趋化突变株 , 在液体摇瓶降解试验中 , 野生和突变株对农药的降解效率几乎没有差异。采用土壤盆栽试验来验证原位条件下 2 种菌株对 MP 的降解效率 , 结果发现在低浓度条件下 , 趋化突变株 DAK 对 MP 的降解比

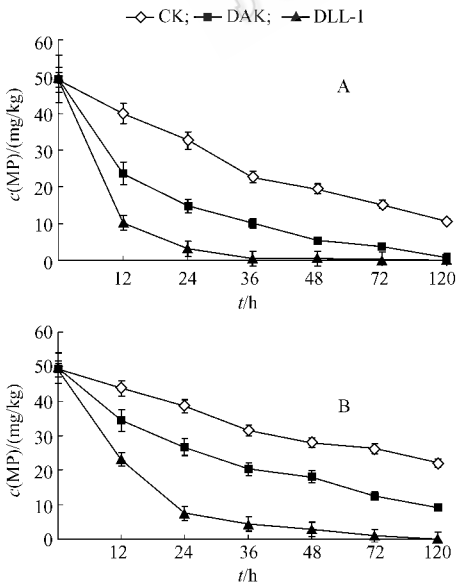


图 7 菌株 DLL-1 和突变株 DAK 在未灭菌土壤和灭菌土壤中对 MP 的降解

Fig.7 Biodegradation of MP( 50mg/kg ) in non-sterile and sterile soil by *P. putida* DLL-1 and mutant DAK. A : Non-sterile soil ; B : Sterile soil.

野生菌株 DLL-1 低约 20% ~ 30% ,更进一步得说明趋化性与降解性密切相关,细菌的趋化性在农药的原位降解中具有重要作用。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Pilgram WK , Williams FD. Survival value of chemotaxis in mixed cultures. *Can J Microbiol* , 1976 , **22** ( 12 ) :1771 – 1773.
- [ 2 ] Yang XQ , Erickson LE , Fan LT. A study of the dissolution rate-limited bioremediation of soils contaminated by residual hydrocarbons. *Journal of Hazardous Materials* , 1995 , **41** ( 2-3 ) :299 – 313.
- [ 3 ] Terracciano JS , Canale-Parola E. Enhancement of chemotaxis in *Spirochaeta aurantia* grown under conditions of nutrient limitation. *J Bacteriol* , 1984 , **159** ( 1 ) :173 – 178.
- [ 4 ] Parales RE , Harwood CS. Bacterial chemotaxis to pollutants and plant-derived aromatic molecules. *Curr Opin Microbiol* , 2002 , **5** ( 3 ) :266 – 273.
- [ 5 ] 蒋建东,张瑞福,李顺鹏. 细菌对环境污染物的趋化性及其在生物修复中的作用. *生态学报* 2005 , **25** ( 7 ) :1764 – 1771.
- [ 6 ] Alexandre G , Zhulin I B. Dierent evolutionary constraints on chemotaxis proteins CheW and CheY revealed by heterologous expression studies and protein sequence analysis. *J Bacteriol* , 2003 , **185** ( 2 ) :544 – 552.
- [ 7 ] Ferrandez A , Hawkins AC , Summerfield DT , *et al.* Cluster II *che* genes from *Pseudomonas aeruginosa* are required for an optimal chemotactic response. *J Bacteriol* , 2002 , **184** ( 16 ) :4374 – 4383.
- [ 8 ] 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** ( suppl ) :147 – 150.
- [ 9 ] Sambrook J , Fritsch EF , Maniatis T. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989.
- [ 10 ] 辛玉峰,刘 虹,周宁一. *Ralstonia* sp. strain U2 菌株对萘的趋化作用. *应用与环境生物学报* 2005 , **11** ( 4 ) :490 – 492.
- [ 11 ] Grimm AC , Harwood CS. Chemotaxis of *Pseudomonas putida* to the polyaromatic hydrocarbon naphthalene. *Appl Environ Microbiol* , 1997 , **63** ( 10 ) :4111 – 4115.
- [ 12 ] ZHOU J , LIN Y , CHEN L. Degradation of parathion-methyl in soil by the *Plesiomonas* sp. DLL-1. *China Environmental Science* , 2002 , **22** ( 3 ) :231 – 234.
- [ 13 ] 张瑞福,吴旭平,李顺鹏. 污染土壤中有机磷农药降解菌的分离及其多样性. *生态学报* 2005 , **25** ( 6 ) :1503 – 1508.
- [ 14 ] Marx RB , Aitken MD. Bacterial chemotaxis enhances naphthalene degradation in a heterogeneous aqueous system. *Environ Sci Technol* , 2000 , **34** ( 16 ) :3379 – 3383.
- [ 15 ] Pedit JA , Marx RB , Miller CT , *et al.* Quantitative analysis of experiments on bacterial chemotaxis to naphthalene. *Biotechnol Bioeng* , 2002 , **78** ( 6 ) :626 – 634.
- [ 16 ] Lanfranconi MP , Alvarez HM , Studdert CA. A strain isolated from gas oil-contaminated soil displays chemotaxis towards gas oil and hexadecane. *Environ Microbiol* , 2003 , **5** ( 10 ) :1002 – 1008.
- [ 17 ] Ortega-Calvo JJ , Marchenko AI , Vorobyov AV , *et al.* Chemotaxis in polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria isolated from coal-tar- and oil-polluted rhizospheres. *FEMS Microbiol Ecol* , 2003 , **44** ( 3 ) :373 – 381.
- [ 18 ] Witt ME , Dybas MJ , Worden RM , *et al.* Motility-enhanced bioremediation of carbon tetrachloride contaminated aquifer sediments. *Environ Sci Technol* , 1999 , **33** ( 17 ) :2958 – 2964.

## Effect of mutation of chemotaxis signal transduction gene *cheA* in *Pseudomonas putida* DLL-1 on its chemotaxis and methyl parathion biodegradation

WEN Yang , JIANG Jian-dong , DENG Hai-hua , LAN Hong , LI Shun-peng\*

( Key Lab of Microbiological Engineering of Agricultural Environment , Ministry of Agriculture , Microbiology Department , College of Life Science , Nanjing Agricultural University , Nanjing 210095 , China )

**Abstract :** *Pseudomonas putida* DLL-1 is a high effective methyl parathion( MP ) degrading strain , which is also of chemotaxis to MP. *cheA* , responsible for coding histidine kinase , plays an important role in bacterial chemotaxis signal transduction. In order to study the effect of bacterial chemotaxis on *in-situ* biodegradation of pesticides , *cheA* in chromosome of *P. putida* DLL-1 was mutated by gene-targeting and successfully obtained a MP-chemotaxis mutant DAK. The mutant DAK shows the same growth ability as wild-type DLL-1 in LB medium. The degrading rate of 50 mg/kg MP in non-sterile and sterile soil of chemotaxis mutant DAK is about 20% ~ 30% lower than that of wild-type bacterial DLL-1. Lose of chemotaxis in DLL-1 would decline its degradation ability of MP. It was demonstrated that chemotaxis plays an important role in the *in-situ* biodegradation of pesticides.

**Keywords :** Chemotaxis ; Pesticide biodegradation ; *Pseudomonas putida* DLL-1 ; *cheA* : Methyl parathion

Foundation item : National Natural Science Foundation of China ( 30600016 )

\* Corresponding author. Tel/Fax : 86-25-84396314 ; E-mail : lsp@njau.edu.cn

Received : 12 October 2006 / Accepted : 21 November 2006 / Revised : 10 February 2007