

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
49(11): 1520 – 1526; 4 November 2009  
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 一株菊酯类农药降解菌的分离鉴定及其降解酶基因的克隆

张松柏<sup>1,2</sup>, 张德咏<sup>1,2</sup>, 刘勇<sup>1,2\*</sup>, 罗香文<sup>2</sup>, 成飞雪<sup>2</sup>, 罗源华<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>中南大学研究生院隆平分院, 长沙 410125)

(<sup>2</sup>湖南省植物保护研究所, 长沙 410125)

**摘要:**【目的】筛选分离高效降解菊酯类农药的光合细菌, 研究其降解特性, 并对该菌株中降解酶基因进行克隆与初步分析。【方法】根据分离菌株的细胞形态结构、活细胞光吸收特征、生理生化特征及其 16S rDNA 序列系统发育分析鉴定降解菌, 气相色谱法测定该菌株降解菊酯类农药的能力, PCR 方法克隆降解酶基因。【结果】菌株 PSB07-21 属红假单胞菌属 (*Rhodospseudomonas* sp.), 其降解最佳条件为 3000 lx、35°C、pH 7, 在此条件下培养 15 d 对 600 mg/L 甲氰菊酯、氯氰菊酯、联苯菊酯降解率分别为 66.63、43.25、50.18%。经序列测定与分析表明, 克隆到 1 个 329bp 的 ORF, 该 ORF 预测的编码蛋白与 2OG-Fe(II) oxygenase 的同源性为 37.0%。添加低浓度 Fe(II) 对该菌株降解菊酯类农药有一定促进作用。【结论】PSB07-21 能有效的降解多种菊酯类农药, 该研究为菊酯类农药生物修复提供理论依据。

**关键词:** 红假单胞菌 PSB07-21; 菊酯类农药; 降解酶基因; 克隆

**中图分类号:** Q814 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2009) 11-1520-07

菊酯类杀虫剂是一类人工合成的、类似天然除虫菊酯的化合物。从 20 世纪 80 年代以后, 在我国被广泛用于粮食、蔬菜和果树等多种作物, 挽回了大量因虫害造成的经济损失。此类农药过去一直被认为在体内易被氧化酶系统降解, 无蓄积性, 是毒性较低, 使用安全的农药<sup>[1]</sup>。最近研究表明, 此类农药有蓄积性<sup>[2]</sup>, 长期接触即使是低剂量的也会引起慢性疾病<sup>[3]</sup>; 对哺乳动物具有中等的神经毒性、免疫系统毒性、心血管毒性和遗传毒性<sup>[4-6]</sup>; 对家蚕、蜜蜂和鱼类等水生生物高毒, 对鱼类的 LC<sub>50</sub> 常在每升几微克的水平<sup>[7-8]</sup>。该类农药残留成为一个日益突出的环境问题。

以生物修复 (Bioremediation) 为理论基础的农药残留降解菌技术为降低农产品和农业生产环境中的农药残留物提供了希望, 该技术具有高效、无毒、无

二次污染的特点, 而且经济实用, 操作简便, 目前已成为去除农药残留污染的一种重要方法<sup>[9-10]</sup>。菊酯类农药残留的微生物降解在降解菌的分离筛选和生理特性方面已有较多报道, 但却鲜见光合细菌降解菊酯类农药以及菊酯类农药降解酶基因克隆的报道<sup>[11]</sup>。本文报道一株降解菊酯类农药的光合细菌, 并从该菌株中克隆降解菊酯类农药的降解酶基因。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 培养基:** ①光合细菌 (PSB) 培养基: MS 培养基添加 0.15% 酵母膏<sup>[12]</sup>; ②选择培养基: 在 PSB 培养基中加入一定浓度的菊酯类农药; ③固体培养基: 在培养基中加入 1.5% 的琼脂。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 甲氰菊酯原粉 (95%)、氯

基金项目: 国家“863 计划” (2006AA10Z401); 国家“十一五”科技支撑计划项目 (2006BAD17B08, 2006BAD08A08)

\* 通信作者。Tel: +86-731-4691736; Fax: +86-731-4691166; E-mail: haoasliu@163.com

作者简介: 张松柏 (1980 - ), 男, 湖北监利人, 助理研究员, 博士研究生, 主要从事农药降解微生物研究。E-mail: zsongh@sohu.com

收稿日期: 2009-04-22; 修回日期: 2009-05-18

氰菊酯原粉(95%)、联苯菊酯原粉(95%),海南正业化工有限公司惠赠;甲氰菊酯、氯氰菊酯、联苯菊酯标准品(纯度均为98%)购自天津东方绿色技术发展有限公司;其它农药残留检测试剂均为色谱纯。农药残留检测在湖南省植物保护研究所农药残留检测室进行。6890N气相色谱仪(Agilent, USA),扫描电子显微镜(JEOL-230,日本电子公司),PCR仪(GeneAmp 9700, USA),光照培养箱(GZP-350,上海精宏实验设备有限公司)。

## 1.2 降解菌的分离、筛选

将来自某农药厂的污泥2.0 g加入120 mL PSB培养基中,光照培养7 d后,取1%接种到含甲氰菊酯100 mg/L选择性液体培养基中,30 ± 2℃、约3000 lx,光照培养7 d后,取300 μL菌液稀释涂布到含甲氰菊酯100 mg/L选择性固体培养基中,光照培养至菌落出现,挑取菌落形态不同的菌,分别接种到含甲氰菊酯100 mg/L选择性液体培养基中,30 ± 2℃、约3000 lx,光照培养7 d后,取1%分别接种到200 mg/L选择培养基中,重复以上步骤,直到1000 mg/L选择培养基。15 d后检测农药浓度,以含相同浓度的甲氰菊酯,相同培养条件不接种细菌的培养基为对照。选择降解率最大的进行后续研究,命名为PSB07-21。将该菌株接种于120 mL PSB培养基中培养,30 ± 2℃、约3000 lx,光照培养,梯度稀释平板培养法测定菌株生物量,后续实验中菌液浓度调整至约10<sup>9</sup> cfu/mL。

## 1.3 菌种的鉴定

**1.3.1 电镜样品制备及观察:**将活的细菌滴到具膜载网上,然后进行磷钨酸染色,TEM(transmission-scanning electron microscope)观察拍照。

**1.3.2 活细胞吸收光谱的测定:**取1.5 mL培养5 d的光合细菌培养液,8000 r/min离心洗涤3次,用0.9%生理盐水重悬浮,在分光光度计上于300~900 nm扫描。

**1.3.3 菌株的生理生化特征的测定:**参照文献[13]。

**1.3.4 菌体16S rDNA序列的测定及系统发育分析:**细菌基因组提取采用UNI-Q-10柱式基因组DNA抽提试剂盒(上海生工生物工程技术有限公司)。以所提的细菌总DNA为模板,采用细菌16S rDNA通用引物扩增<sup>[10]</sup>,PCR反应体系(50 μL):10 × PCR Buffer 2.5 μL; MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 2 μL; dNTP (10 mmol/L) 2 μL; 引物 Bpf/Bpr (25 μmol/L) 各0.5 μL; Taq 酶(5 U/μL) 0.5 μL; 双蒸水 43 μL。PCR

反应条件:94℃ 4 min; 94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 1 min, 循环30次; 72℃ 10 min。反应完成后,经1%琼脂糖电泳,检测扩增片断的大小和特异性。PCR产物纯化后(PCR产物纯化试剂盒,上海生工生物工程技术有限公司),委托上海生工生物工程公司测序。

将PSB07-21测得的16S rDNA序列在GenBank中利用blast进行比对,然后用Clustal W(缺省参数)进行多序列联配,并计算不同细菌间的相似性。采用邻接法(Neighborhood-joining)进行进化关系分析和系统树的构建<sup>[14]</sup>。进化关系分析和系统树的构建使用MEGA(Version 3.1)软件进行,系统树各分支的置信度(Bootstrap)均进行1000次的重复检验,并删去置信度小于70%的分支<sup>[15]</sup>。分析时采用AY628689(*Micrococcus luteus*)作为外群。

## 1.4 不同初始条件下降解试验

120 mL的含菊酯类农药600 mg/L的PSB培养基中,加入0.5%的PSB07-21菌液,培养15 d后取样测定菊酯类农药残留量。试验设定不同初始光照强度、温度及pH值以考察菌株的降解性能及降解最适条件。试验同时分别设未加菌的灭菌培养基在同等条件下作为空白对照。试验均设3次重复。

## 1.5 菌株在最佳降解条件下降解试验

120 mL的含菊酯类农药600 mg/L的PSB培养基中,加入0.5%的PSB07-21菌液,35℃、3000 lx光照培养,每隔一段时间取样,测定菊酯类农药残留量。设未加菌的灭菌培养基在同等条件下作为空白对照。试验均设3次重复。

## 1.6 菊酯类农药含量的测定

120 mL样品,用正己烷萃取3次,每次用量分别为40, 40, 30 mL。旋转蒸发仪上蒸干,然后用正己烷溶解并用容量瓶定容至10 mL,接着加入无水硫酸钠脱水。气相色谱测定其含量<sup>[16]</sup>。以相应的标样定性定量,所有数据均为3次重复平均值。

测试条件如下:气相色谱仪型号Agilent 6890N,色谱柱型号为HP-5 (30 m × 0.32 mm × 0.25 μm),采用程序升温法:毛细管柱起始温度160℃,保持5 min,10℃/min升至200℃,保持1 min,10℃/min升至280℃,保持8 min,检测器(μECD)温度320℃,进样口温度250℃,载气为N<sub>2</sub>(纯度99.99%),流量1 mL/min。进样量均为1 μL,分流(20:1)。

降解率的计算方法:

$$\text{降解率}(\%) = (1 - C_1/C_0) \times 100$$

C<sub>1</sub>:降解菌处理菊酯类农药残留浓度(mg/L),

$C_0$ :对照处理菊酯类农药残留浓度(mg/L)。

### 1.7 降解酶基因的克隆与序列测定

根据肖红利等<sup>[17]</sup>克隆的对高效氯氰菊酯和三氟氯氰菊酯具有降解作用的 DNA 片段,利用生物学软件 Primer 5(Premier, Canada)设计一对 PCR 引物 Df/Dr (Df: 5' > TTGCTGTAGAGGAAGAAGGA < 3', DI: 5' > AGAGCTCTGTGACGATGACC < 3'),PCR 扩增菌株 PSB07-21 的降解菊酯类农药的基因,PCR 反应体系(20  $\mu$ L): 10  $\times$  PCR Buffer 2.5  $\mu$ L; MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 2  $\mu$ L; dNTP(10 mmol/L) 0.5 $\mu$ L; 引物 Df/Dr(25  $\mu$ mol/L) 各 0.5  $\mu$ L; Taq 酶(5 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L; ddH<sub>2</sub>O 13.5  $\mu$ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 循环 30 次; 72 $^{\circ}$ C 10 min。反应完成后,经 1% 琼脂糖电泳,检测扩增片断的大小和特异性。PCR 产物纯化后(PCR 产物纯化试剂盒,上海生工生物工程技术有限公司),委托上海生工生物工程公司测序。

### 1.8 序列分析

测序所得的部分序列,利用 ORF finder 在线分析序列的 ORF (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>),登陆 [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) 网站进行比对分析。

### 1.9 添加微量 Fe(II)降解试验

在 PSB 培养基中添加微量 Fe(II)(终浓度 0.1 mmol/L),加入 0.5% 的 PSB07-21 菌液,35 $^{\circ}$ C、3000 lx 光照培养,15 d 测定菊酯类农药残留量,以不加 Fe(II)处理为对照。试验均设三次重复。

## 2 结果和分析

### 2.1 菌株鉴定

**2.1.1 培养特征和活细胞光吸收特征:**菌株活细胞光吸收结果如图 1,在 883 nm、808 nm、593 nm、382 nm 有特征吸收峰,表明含有细菌叶绿素 a 及类胡萝卜素<sup>[12]</sup>。培养结果表明,PSB07-21 最佳生长温度和 pH 分别为 30~35 $^{\circ}$ C、6.5~7.5,具有红色培养

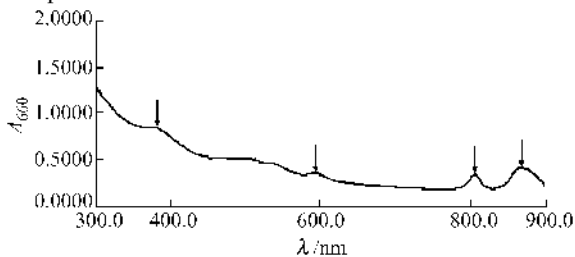


图 1 PSB07-21 吸收光谱

Fig.1 PSB07-21's photometric absorption.

物、黑暗好氧生长慢以及耐盐低于 3% 的特征。

**2.1.2 形态结构和生理生化特征:**PSB07-21 形态结构结果表明(图 2),PSB07-21 为杆状,大小为 0.8~1.0  $\mu$ m  $\times$  2.4~3.1  $\mu$ m,端生鞭毛,以二分裂方式繁殖。生理生化结果:G<sup>-</sup>,V-P 反应阴性,甲基红反应阴性,不能利用淀粉,H<sub>2</sub>S 反应阴性;可以利用多种小分子的有机酸(甲酸钠、乙酸钠、乳酸钠、丙酮酸)生长,也能利用部分糖类和醇类化合物(丙三醇、葡萄糖醇、肌醇、葡萄糖、木糖、蔗糖、甘露糖)进行生长,在蛋白胨和酵母膏中生长最好,不能利用 NaHCO<sub>3</sub>。

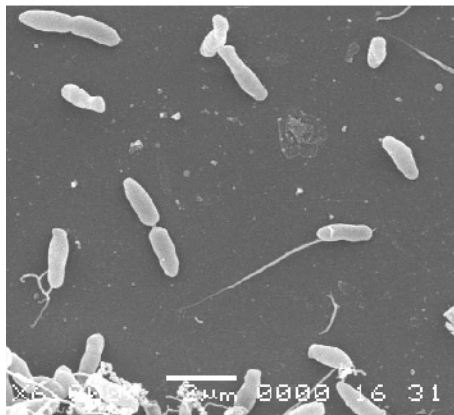


图 2 PSB07-21 的扫描电镜照片(6000  $\times$ )

Fig.2 PSB07-21's SEM photo (6000  $\times$ ).

**2.1.3 16S rDNA 序列比对及系统发育树分析:**PSB07-21 测定的 16S rDNA 序列,在 Genbank 中的登录号为 EU018458,在系统发育树上与序列号为 AB250616 (*Rhodospseudomonas sphaeroides*) 菌株 16S rDNA 序列为一簇(图 3),同源率为 99%。

**2.1.4 鉴定结果:**根据 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology<sup>[13]</sup>,PSB07-21 属红假单胞菌属(*Rhodospseudomonas sp.*)。

### 2.2 降解特性

菌株在不同起始光照条件下降解 3 种菊酯类农药的效率如图 4-A 所示,在光照强度为 3000~4000 lx,菌株具有较好的降解效果。菌株降解 3 种菊酯类农药的最佳光照强度为 3000lx。

菌株在不同起始 pH 条件下降解 3 种菊酯类农药的效率如图 4-B 所示,pH 在 6~8 之间,菌株对 3 种菊酯类农药具有较好的降解效率,降解最适 pH 为 7。

菌株在不同起始温度条件下降解 3 种菊酯类农药的效率图 4-C 所示,菌株在温度为 30 $^{\circ}$ C~35 $^{\circ}$ C 条件下,对 3 种菊酯类农药具有良好的降解能力,最佳降

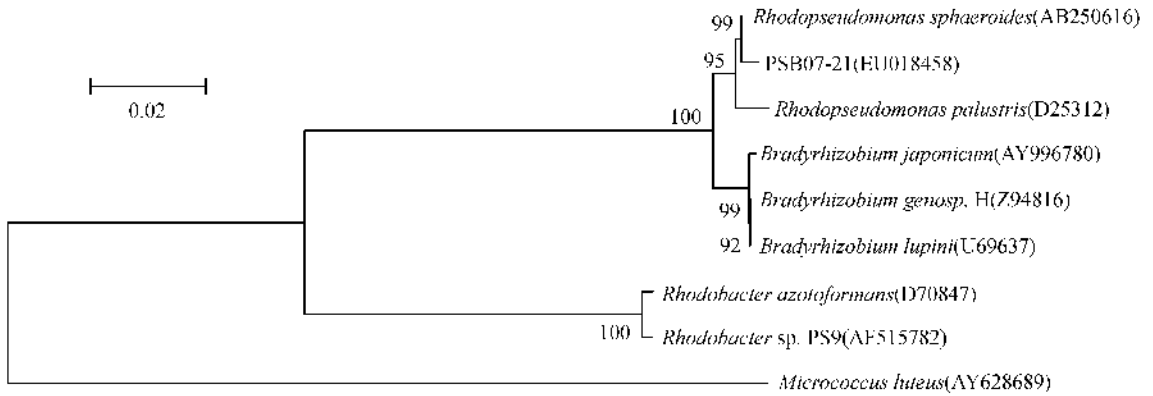


图3 PSB07-21的16S rDNA序列聚类分析

Fig.3 Phylogenetic tree of PSB07-21 16S rDNA sequence, *Micrococcus luteus* was selected as the outgroup to root the tree. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 2% sequence divergence.

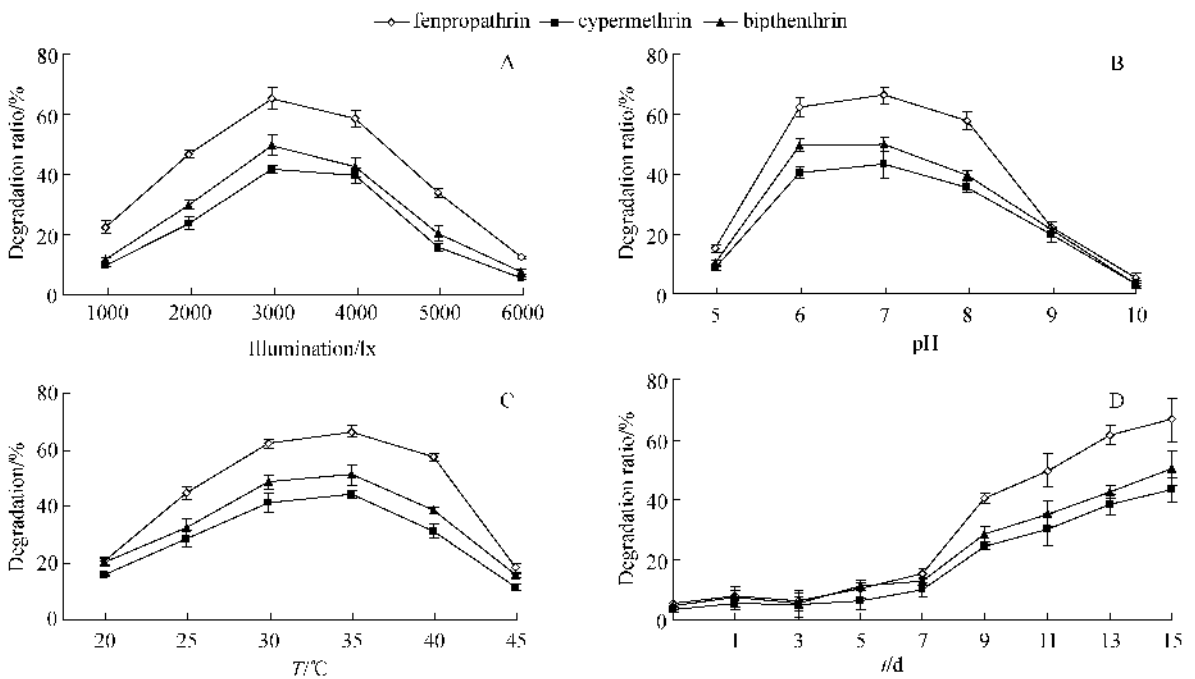


图4 菌株 PSB07-21 降解菊酯类农药的特性(A)、光照(B)、pH(C)和温度(D)降解动态

Fig.4 Degrading characteristics of synthetic pyrethroids by strain PSB07-21. A: illumination; B: pH; C: temperature; D: degrading trend.

解温度为 35℃。

菌株在最佳条件下,对菊酯类农药的降解效率结果如 4-D 所示,菌株 PSB07-21 对 3 种菊酯类农药在前 7 d 降解效果并不明显;7 d 后,降解速率快速上升。15 d 对 600 mg/L 甲氰菊酯、氯氰菊酯、联苯菊酯降解率分别为 66.63%, 43.25%, 50.18%。

## 2.3 降解酶基因的克隆

### 2.3.1 PCR 克隆与测序:以 PSB07-21 菌株为底物,

PCR 扩增获得一条大约 1000 bp 左右的条带,将该目的条带回收,测序。测序结果表明,该目的条带共约 1050 bp(序列未显示)。

**2.3.2 序列分析:**测定所得序列 ORFfinder 分析结果表明,该片段含有一个 329bp 的 ORF (GenBank Accession No. FJ793200)。在 [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) 比对分析结果表明,该 ORF 编码的预测蛋白与 *Burkholderia* sp.383 的 2OG-Fe(II) oxygenase 的同源

性为 37.0% (图 5)。

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)
ref_YP_371352.1 2OG-Fe(II) oxygenase [Burkholderia sp. 383] ...	37.0
ref_YP_002675640.1 hypothetical protein OA307_2394 [Octadeca...	34.3
ref_ZP_01012641.1 indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase [...	33.5
ref_ZP_01751382.1 indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase [...	33.1
ref_ZP_03647393.1 phenylalanyl-tRNA synthetase subunit alpha...	33.1
ref_ZP_03646589.1 phenylalanyl-tRNA synthetase subunit alpha...	33.1
ref_ZP_03618781.1 hypothetical protein BIFBFE_00961 [Bifidob...	33.1
ref_YP_002323336.1 phenylalanyl-tRNA synthetase, alpha subun...	33.1
ref_NP_698239.1 phenylalanyl-tRNA synthetase subunit alpha [...	33.1
ref_ZP_00120531.2 COG0016: Phenylalanyl-tRNA synthetase alph...	33.1
ref_YP_002631486.1 pyruvate ferredoxin/ferredoxin oxidoreduc...	32.7

图 5 预测蛋白比对结果

Fig. 5 Blastp result of ORF putative protein

## 2.4 添加微量 Fe(II) 降解实验

添加微量 Fe(II) 降解实验结果如图 6, 添加微量 Fe(II), 菌株 PSB07-21 对 3 种菊酯类农药的降解能力分别提高 10.22%、9.53%、8.60%。

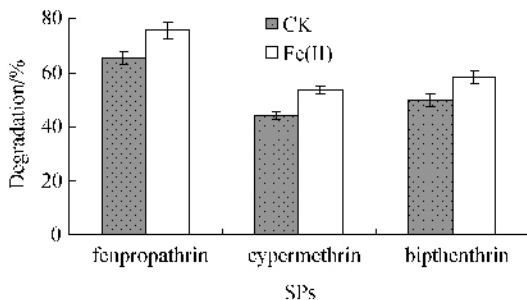


图 6 添加 Fe(II) 对降解菌 PSB07-21 降解效果的影响

Fig. 6 Effect of compensating Fe(II) on SPs degradation by strain PSB07-21

## 3 讨论

光合细菌 (Photosynthetic Bacteria, PSB) 是地球上最早出现的具有原始光能合成体系的原核生物。已有的研究表明, 光合细菌可以有效地降解有机磷农药<sup>[12]</sup> 硫代磷酸酯类农药<sup>[18]</sup>、甲氧菊酯<sup>[16]</sup>, 本文分离的一株光合细菌 PSB07-21 菌株, 初步鉴定为红假单胞菌。该菌株可以去除高浓度菊酯类农药, 对 600 mg/L 甲氧菊酯、氯氰菊酯、联苯菊酯降解率分别为 66.63, 43.25, 50.18%。其降解效果优于丁海涛等<sup>[19]</sup> 分离的降解菌, 以及张松柏等<sup>[16]</sup> 报道的红假单胞菌降解速率; 与洪源范等<sup>[20]</sup>、Grant 等<sup>[9]</sup>、Tallur 等<sup>[10]</sup> 分离的降解菌降解速率相当。由于光合细菌具有促进作物生长, 提高作物抗逆性的作用<sup>[21]</sup>, 因此, 筛选更多类型的菊酯类农药残留高效降解光合细菌, 对菊酯类农药残留的生物修复研究和应用具有十分重要的意义。

菌株 PSB07-21 降解特性表明, 该菌株降解 3 种

菊酯类农药的最佳条件与其生长条件基本一致, 表明该菌具有潜在的应用价值。菌株 PSB07-21 对 3 种菊酯类农药降解效率不一致, 该研究结果与 Liu 等<sup>[22]</sup> 研究的土壤微生物对不同氯氰菊酯和三氟氯氰菊酯能力不同的结果一致, 可能原因是降解酶与不同结构菊酯类农药的亲和力不一致。

PCR 方法从菌株 PSB07-21 中克隆到一个 1050bp 的 DNA 片段, 分析表明该片段包含一个 ORF, 该 ORF 的预测蛋白与 *Burkholderia* sp.383 的 2OG-Fe(II) oxygenase 的同源性为 37.0%。菊酯类降解机理研究<sup>[10, 23-24]</sup> 表明, 菊酯农药的降解过程是菊酯类农药首先由酯酶水解, 其次脱氢酶作用与水解产物, 然后是羟化酶或者加氧酶将脱氢酶产物转化为不同代谢产物。据此推测本文克隆的 ORF 可能编码一种蛋白, 该蛋白与菊酯类代谢产物的加氧反应相关。

因为克隆的 ORF 编码的预测蛋白与 *Burkholderia* sp.383 的 2OG-Fe(II) oxygenase 的同源性最高, 所以, 测定了添加微量 Fe(II) 对菌株降解效率的影响。结果表明: 添加 0.1 mmol/L Fe(II), 可提高菌株 PSB07-21 降解 3 种菊酯类农药的降解能力。Gaw 等<sup>[25]</sup> 研究表明 Cu(II) 抑制土壤中 DDT 的降解。Liu 等<sup>[22]</sup> 研究表明, 10mg/Kg Cu(II) 抑制土壤微生物降解土壤中氯氰菊酯和三氟氯氰菊酯能力, 但却能增加水体中氯氰菊酯和三氟氯氰菊酯光降解率。添加 0.1 mmol/L Fe(II), 可提高菌株 PSB07-21 降解菊酯类农药的降解能力, 可能的原因是添加微量 Fe(II) 可以提高本文克隆的 ORF 编码降解酶的活性, 或是增加菊酯类农药的光降解率; 因此, 微量 Fe(II) 促进菌株 PSB07-21 的降解能力的机理, 以及该 ORF 编码酶的降解效果有待进一步的研究。

## 参考文献

- [1] George N, Kalyanasundaram M. Chemistry of synthetic pyrethroid insecticides-some recent advances. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 1994, 53: 933 - 945.
- [2] Saha S, Kaviraj A. Effect of ambient temperature and daylight on the survival of freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch, 1794) exposed to cypermethrin. *Environmental Engineering Science*, 2009, 26(2): 459 - 462.
- [3] Meeker JD, Barr DB, Hauser R. Pyrethroid insecticide metabolites are associated with serum hormone levels in adult men. *Reproductive Toxicology*, 2009, 27(2): 155 - 160.

- [ 4 ] Pine MD, Hiney JK, Lee B, et al. The Pyrethroid pesticide esfenvalerate suppresses the afternoon rise of luteinizing hormone and delays puberty in female rats. *Environmental Health Perspectives*, 2008, 116(9): 1243 – 1247.
- [ 5 ] Rodriguez H, Tamayo C, Inostroza J, et al. Cypermethrin effects on the adult mice seminal glands. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2009, 72(2): 658 – 662.
- [ 6 ] Ueyama J, Kimata A, Kamijima M, et al. Urinary excretion of 3-phenoxybenzoic acid in middle-aged and elderly general population of Japan. *Environmental Research*, 2009, 109(2): 175 – 180.
- [ 7 ] Almakkawy HK, Madbouly MD. Persistence and accumulation of some organic insecticides in Nile water and fish. *Resource Conservation and Recycling*, 1999, 27(1/2): 105 – 115.
- [ 8 ] Antwi FB, Peterson RK. Toxicity of  $\delta$ -phenothrin and resmethrin to non-target insects. *Pest Management Science*, 2009, 65(3): 300 – 305.
- [ 9 ] Grant RJ, Betts WB. Biodegradation of the synthetic pyrethroid cypermethrin in used sheep dip. *Letters in Applied Microbiology*, 2003, 36: 173 – 176.
- [ 10 ] Tallur PN, Megadi VB, Ninneker HZ. Biodegradation of cypermethrin by *Micrococcus* sp. strain CPN 1. *Biodegradation*, 2008, 19: 77 – 82.
- [ 11 ] 王兆守, 李顺鹏. 拟除虫菊酯类农药微生物降解研究进展. *土壤(Soils)*, 2005, 37(6): 577 – 580.
- [ 12 ] 张德咏, 谭新球, 罗香文, 等. 一株能降解有机磷农药甲胺磷的光合细菌 HP-1 的分离及生物学特性的研究. *生命科学研究(Life Science Research)*, 2005, 9(3): 247 – 253.
- [ 13 ] Holt JG. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9<sup>th</sup> eds. Baltimore: The Williams & Wilkins, 1993.
- [ 14 ] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology Evolution*, 1987, 4: 406 – 425.
- [ 15 ] Kumar S, Tamura K, Nei M. Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, 5: 150 – 163.
- [ 16 ] 张松柏, 张德咏, 罗香文, 等. 降解甲氰菊酯光合细菌的分离鉴定及其降解特性研究. *农业环境科学学报(Journal of Agro-Environment Science)*, 2009, 28(1): 140 – 144.
- [ 17 ] 肖红利. 拟除虫菊酯降解菌株分离及生化分子基础研究. 北京: 中国农业科学院, 2005: 46 – 47.
- [ 18 ] 李乐, 李兰生, 孙涛, 蒋万枫. 固定化光合细菌降解氧化乐果. *农业环境科学学报(Journal of Agro-Environment Science)*, 2006, 25: 721 – 725(supplement).
- [ 19 ] 丁海涛, 李顺鹏, 沈标, 等. 拟除虫菊酯类农药残留降解菌的筛选及其生理特性研究. *土壤学报(Acta Pedologica Sinica)*, 2003, 40(1): 123 – 129.
- [ 20 ] 洪源范, 洪青, 武俊, 等. 甲氰菊酯降解菌 JQL4-5 的分离鉴定及降解特性研究. *环境科学(Environmental Science)*, 2006, 27(10): 2100 – 2104.
- [ 21 ] 揭晶, 赵越. 光合细菌应用的研究进展. *广东药学院学报(Journal of Guangdong Pharmacy College)*, 2006, 22(1): 113 – 115.
- [ 22 ] Liu T, Sun C, Ta N, et al. Effect of copper on the degradation of pesticides cypermethrin and cyhalothrin. *Journal of Environmental Sciences*, 2007, 19: 1235 – 1238.
- [ 23 ] 许育新, 李晓慧, 张明星, 等. 红球菌 CDT3 降解氯氰菊酯的特性及途径. *中国环境科学(China Environmental Science)*, 2005, 25(4): 399 – 402.
- [ 24 ] Halden UR, Peters EG, Halden BG, et al. Transformation of mono- and dichlorinated phenoxybenzoate dioxygenase in *Pseudomonas pseudoalcaligenes* POB310 and a modified diarylether-metabolizing bacterium. *Biotechnology and Bioengineering*, 2000, 69: 107 – 112.
- [ 25 ] Gaw SK, Palmer G, Kim ND. Preliminary evidence that copper inhibits the degradation of DDT to DDE in pip and stonefruit orchard soils in the Auckland region, New Zealand. *Environmental Pollution*, 2003, 122(1): 1 – 5.

## Isolation, identification and degrading gene cloning of a pyrethroids-degrading bacterium

Songbai Zhang<sup>1,2</sup>, Deyong Zhang<sup>1,2</sup>, Yong Liu<sup>1,2\*</sup>, Xiangwen Luo<sup>2</sup>, Feixue Cheng<sup>2</sup>, Yuanhua Luo<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Branch of Longping, Graduate College, Central South University, Changsha 410125, China)

(<sup>2</sup> Hunan Plant Protection Institute, Changsha 410125, China)

**Abstract:** [Objective] This study aimed to isolate, identify and clone degrading gene of a synthetic pyrethroids degrading bacterium. [Methods] A photosynthetic bacterial strain PSB07-21 capable of degrading several synthetic pyrethroids efficiently was isolated by an enrichment culture. PSB07-21 was identified based on its morphology, physiology and phylogenetic analysis of 16S rDNA sequence. The degradation ability of this strain was evaluated with gas chromatography. The degrading gene was cloned with PCR. [Results] PSB07-21 was closely related to *Rhodospseudomonas* sp. The optimum condition of degrading synthetic pyrethroidss was at 35°C, pH 7 and 3000 lx. PSB07-21 could degrade fenpropathrin, cypermethrin and biphenethrin by 66.63%, 43.25% and 50.18% in a concentration of 600 mg/L at day 15, respectively. We cloned a putative gene which was 326bp long with 37.0% identical to 2OG-Fe(II) oxygenase gene. When compensating low concentration Fe(II) in PSB medium with synthetic pyrethroids, the degradation efficiency of PSB07-21 was enhanced. [Conclusion] The strain has the potential application to synthetic pyrethroids bioremediation.

**Keywords:** *Rhodospseudomonas* sp. PSB07-21; synthetic pyrethroids; degrading-enzyme gene; clone

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Program for Hi-tech Research and Development of China (2006AA10Z401) and the National Key Technologies R&D Program of China during the 11<sup>th</sup> Five-year Plan Period (2006BAD17B08, 2006BAD08A08)

\* Corresponding author. Tel: +86-731-4691736; Fax: +86-731-4691166; E-mail: haoasliu@163.com

Received: 22 April 2009/ Revised: 18 May 2009

### 科学出版社新书推介(2009-09)



#### 抗病毒天然免疫

(现代生物技术前沿丛书)

舒红兵 主编

978-7-03-025488-7 ¥ 68.00 2009年9月出版

**内容简介:**天然免疫,又称固有免疫(innate immunity),是宿主抵抗病毒感染的第一道防线,也是激活适应性免疫的基础,在宿主清除病毒的免疫反应中具有关键作用。本书对抗病毒天然免疫这一生物医学的热点领域的最新研究成果做了比较深入的介绍,包括病毒的感染与复制,宿主限制因子介导的内源性免疫,模式识别受体介导的抗病毒天然免疫,补体系统、NK和NKT细胞在抗病毒天然免疫中的作用,抗病毒天然免疫与适应性免疫的关系及病毒逃逸免疫反应的机制等。

本书对病毒学、免疫学及细胞生物学等领域的科学工作者、研究生、本科生、感染性疾病防治领域的医务工作者和相关科技管理人员都具有重要的参考价值。

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址 北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编:100717

联系人 李韶文(010-64000849) 周文宇(010-64031535)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn> 欢迎致电索要书目