

毒死蜱降解菌枝孢霉菌的紫外诱变和筛选

赵 川, 林庆胜, 杨 柳, 胡美英
(华南农业大学 昆虫毒理研究室, 广东 广州 510642)

摘要:通过紫外诱变毒死蜱降解菌枝孢霉菌 *Cladosporium cladosporioides* Hu-01,利用高效液相色谱(HPLC)检测,筛选获得 12 株突变菌株,其中突变株 Hu-01-4 和 Hu-01-6 的降解效果明显高于初始菌株 Hu-01. 突变株 Hu-01-4 和 Hu-01-6 经过加药斜面传种 10 代,Hu-01-6 的降解率比初始菌株提高 11.74%,并且保持良好的稳定性. 突变菌株 Hu-01-6 在 28 ℃、pH6.5 培养条件下的生长量最大,降解率最高,且均明显高于初始菌株 Hu-01.

关键词:毒死蜱;微生物降解;枝孢霉菌;紫外线诱变;突变株
中图分类号:S482.7;Q93 文献标识码:A 文章编号:1001-411X(2010)04-0044-05

Breeding and Screening of Chlorpyrifos-Degrading Strain
Cladosporium cladosporioides by Ultraviolet Ray Mutation

ZHAO Chuan, LIN Qing-sheng, YANG Liu, HU Mei-ying
(Laboratory of Insect Toxicology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Twelve mutants were obtained from chlorpyrifos-degrading strain *Cladosporium cladosporioides* Hu-01 by UV-induced screening and their degradation capacities were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The degradation abilities of mutant strain Hu-01-4 and Hu-01-6 were higher than the original strain Hu-01. Furthermore, the mutant strain Hu-01-6 kept a good stability of degradation rate after 10 serial passages on the test-tube medium containing chlorpyrifos, increasing by 11.74% compared with the original strain. Moreover, both the growth and degradation ability of mutant strain Hu-01-6 were higher than original strain Hu-01 under the conditions of 28 ℃ and pH 6.5.

Key words: chlorpyrifos; microbiol degradation; *Cladosporium cladosporioides*; ultraviolet ray mutation; mutant strain

毒死蜱(Chlorpyrifos)是一种广谱性有机磷酸酯类杀虫剂,具有良好的触杀、胃毒和熏蒸作用,对稻、麦、棉、蔬菜、果树、茶叶等作物害虫,蚊、蝇类及牛羊体外寄生虫有防效. 在土壤中残留期较长,对地下害虫和白蚁的防治效果较好^[1]. 毒死蜱对鱼类及水生生物毒性极高,对蚯蚓不安全,能明显加重蚯蚓的死亡率. 许多国家对农产品,特别是蔬菜上的毒死蜱残留量进行了严格的规定,日本规定甘蓝中的毒死蜱残留限量(MRL)标准为 0.05 mg/kg,美国与欧盟规定蔬菜中毒死蜱的残留限量为 0.05 mg/kg,国际食品法典委员会(CAC)规定毒死蜱在叶菜类农药残留限量为 1 mg/kg,在番茄为 0.5 mg/kg,而毒死蜱在我国果蔬上的 MRL 为 1 mg/kg,以致出口的许多农产品因毒死蜱残留超标而被销毁,造成巨大的经济损失. 因此,毒死蜱的残留问题日益受到重视^[2]. 目前,国内外学者已经对环境土壤和水体中毒死蜱残留生物降解进行了广泛深入的研究,证明了土壤微生物对毒死蜱的降解起重要作用^[3-5],具有毒死蜱降解效果的微生物不断被分离出来^[6-8]. 但是从自然界直接分离的野生菌种,其活性往往比较低,且传代稳定性

收稿日期:2009-12-11
作者简介:赵 川(1984—),男,硕士研究生;通信作者:胡美英(1954—),女,教授,E-mail:humy@scau.edu.cn
基金项目:国家自然科学基金(30871660);广东省科技计划项目(2009B020310005)

较差,在产量和质量上均难以适合工业化生产的要求,因此,分离的野生菌种必须根据其形态、生理上的特点,进行菌种的改良^[9]。

本课题组分离筛选得到的毒死蜱降解菌株 Hu-01,经鉴定为枝孢霉菌 *Cladosporium cladosporioides*,该菌株对 50 mg/L 毒死蜱处理 24 h 后的降解率为 74.20%^[10];并提取其粗酶液,优化了其降解酶液保护剂组成配方,明确了其在不同条件下降解毒死蜱的稳定性,为商品化生产降解酶制剂,处理农产品农药残留提供了基础^[11];但是该菌在传代多次后,其降解能力大幅下降,对其进行菌种改良,使其保持对毒死蜱的高效降解能力成为解决其实际应用的关键问题之一^[12]。本文在上述研究的基础上,以毒死蜱降解菌 Hu-01 菌株为初始菌株,进行了紫外线诱变和毒死蜱梯度平板选育高效降解毒死蜱突变株的研究,以期诱变筛选获得高效、稳定降解毒死蜱的优良菌株。

1 材料与方法

1.1 菌株

枝孢霉菌 *Cladosporium cladosporioides* Hu-01 菌株,从农药厂废水中分离筛选得到,保存于华南农业大学本课题组(2007 年 7 月 20 日寄存于中国微生物菌种保存管理委员会普通微生物中心,菌种保藏号为 CCTCC M 20711)。

1.2 培养基、试剂

降解菌培养采用的培养基是查彼氏培养基(Czapek medium):硝酸钠 2.0 g,氯化钾 0.5 g,硫酸镁 0.5 g,磷酸氢二钾 1.0 g,硫酸铁 0.01 g,蔗糖 30.0 g,蛋白胨 0.5 g,调整 pH 7.0,加双蒸水定容至 1 000 mL,〔固体平板 w (琼脂)为 1.8%〕,121 ℃ 高压蒸汽灭菌 20 min^[13]。

毒死蜱选择培养基:查彼氏培养基灭菌后添加一定浓度的毒死蜱。

95% 毒死蜱原药(西安西诺农化有限公司生产)用甲醇配制成质量浓度为 10 000 mg/L 的溶液供试。

1.3 方法

1.3.1 毒死蜱生物降解残留量高效液相色谱(HPLC)测定方法 以 1702-MP8 型电子天平准确称取 95% 毒死蜱原药 0.010 5 g 于 10 mL 容量瓶中,加入乙酸乙酯,定容得 100 mg/L 毒死蜱标样工作母液,按梯度稀释法,分别配制 50、10、5、1、0.5 和 0.05 mg/L 溶液,在文献方法基础上略做改动,用 HP-1100 型高效液相色谱仪测定各浓度对应的峰面积 Y ,以毒

死蜱残留浓度为 X ,制作标准曲线 $Y = a + bX$ 。HPLC 测定条件:色谱柱为 C_{18} 反向柱(Hypersil ODS2 型 5 mm,4.6 mm × 250 mm),流速为 1 mL/min,柱温 (25 ± 1) ℃,流动相为甲醇和水, V (甲醇): V (水) = 90:10,检测波长 300 nm,进样量 10 μ L^[14]。

1.3.2 毒死蜱降解菌菌株的培养及孢子悬液的制备 按照无菌操作的要求,将沙土管保存的菌种接种到改良的查彼氏培养基试管斜面,置于 28 ℃ 的培养箱中培养 4 d,然后在无菌条件下用 100 mL 无菌水洗下孢子,倾于装有玻璃珠的三角瓶内,放在摇床上振荡(150 r/min)20 min,使孢子均匀分散在溶液中,再用灭菌纱布过滤,滤液即为毒死蜱降解菌的孢子悬液,用血球计数板计数,调整其孢子浓度为 $10^6 \sim 10^7$ 个/mL^[15-16]。

1.3.3 紫外光诱变致死率的测定 取制备好的菌悬液 5 mL 于无菌培养皿中,并放在无菌磁力搅拌器上进行紫外光照射处理,照射菌悬液之前先开启紫外灯预热 30 min,使光波稳定。紫外光灯功率为 15 W,照射距离为 30 cm,波长为 253.7 nm,分别照射 30、60、90、120 和 150 s,分别取不同照射时间的毒死蜱降解菌孢子悬液 0.1 mL 涂布于加药的培养基平板(毒死蜱添加终浓度为 50 mg/L),每处理 3 个重复,设无紫外光处理为对照。处理后包裹黑布于 28 ℃ 倒置培养 2 d,待平板长出菌落后进行菌落计数,并计算致死率,致死率 = (未照射平板菌落数 - 照射平板菌落数)/未照射平板菌落数 × 100%^[17-21]。

1.3.4 定量诱变处理 根据剂量 - 致死率曲线选出致死率达 70% 的剂量^[18]。用该剂量进行诱变处理,方法同 1.3.3。

1.3.5 突变株的分离及高产菌株的筛选 诱变处理后置于 28 ℃ 倒置培养 4 d,依据菌落形态、大小等特征选出与对照相比差异较大、生长较快的菌落,依次编号,接种到发酵培养基中,250 mL 三角瓶装液量为 50 mL/瓶,28 ℃,转速 150 r/min,培养 4 d,然后离心,得到湿菌体,接种湿菌体 0.1 g 至液体培养基摇床培养 4 d,再添加毒死蜱终质量浓度为 50 mg/L,培养 24 h 后用高效液相色谱仪测定每个菌株对毒死蜱的降解效能。同时设不经诱变处理作对照。初筛获得降解力明显高于初始菌株的有效变异菌株,再进行菌株降解效能稳定性试验^[18]。

1.3.6 高产菌株降解效能稳定性试验 将诱变得到的高效菌株在加药斜面培养基上连续培养 10 代后,测其对毒死蜱的降解效能,每个菌株设 4 次重复^[19]。

1.3.7 高产菌株培养 pH 和温度的确定 将预培养 3 d 的降解菌培养液于 4 000 r/min 离心 10 min,取 0.1 g 湿菌体在无菌条件下分别接入装有 50 mL 培养基的 250 mL 三角瓶中,置于气浴恒温振荡器中(28 ℃,150 r/min)震荡培养,分别测定不同 pH 值(4.0、5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、9.0 和 10.0)、温度(23、25、28、30 和 32 ℃)条件下,菌株的生长量及其对 50 mg/L 毒死蜱的降解率^[22-23].

2 结果与分析

2.1 毒死蜱生物降解残留 HPLC 测定条件的确定

按 1.3.1 测定方法,做出标准曲线方程为 $Y = 5.3514X + 7.5866$,相关系数(R^2)为 0.999 2,相关性显著,检测方法可信.同时测定了毒死蜱的添加回收率,试验结果显示,当添加质量浓度为 10、25 和 50 mg/L 时,回收率分别为 $(77.86 \pm 3.64)\%$ 、 $(97.97 \pm 3.14)\%$ 和 $(86.28 \pm 1.24)\%$,说明本试验确定的毒死蜱测定方法稳定可靠,可为以下内容测定提供技术基础.

2.2 毒死蜱降解菌的紫外照射剂量 - 菌体致死曲线

对于理化诱变的诱变效果而言,正突变较多出现在较低的剂量中,负突变则较多出现在偏高的剂量中^[19],而且,近年来人们一直认为致死率在 70%~80% 诱变效果较好^[24].从本文采用紫外光不同时间照射毒死蜱降解菌 Hu-01 菌悬液后的试验结果(图 1)中可以看出,随着紫外光处理时间的增加,菌体的死亡率逐渐升高,当照射时间在 120 和 150 s 时,该菌体的死亡率分别为 76.97% 和 90.39%.进一步分析表明,紫外光照射时间 - 菌体致死率曲线符合以下模型,其实测值与拟合值之间差异很小,拟合性很好, $R^2 = 0.9952$,拟合方程 $y = 91.5730 / (1 + e^{3.4841 - 0.04548x})$.因此,根据紫外光对菌体的致死曲线,笔者选定照射时间 120 s 为最佳诱变剂量(图 1).

2.3 定量诱变处理及突变株的筛选

采用紫外灯最佳诱变剂量,即 15 W 紫外灯,照射距离 30 cm,照射时间 120 s 诱变毒死蜱降解菌 Hu-01 的菌悬液后,初筛获得 12 株生长较快的菌株,然后分别对其进行降解率的测定,得到 2 株降解毒死蜱效果较好的菌株,分别编号为 Hu-01-4 和 Hu-01-6,这 2 株菌株对 50 mg/L 毒死蜱处理 24 h 后的降解效果分别为 92.09% 和 86.55%,分别比初始菌株提高了 16.25% 和 9.27% (表 1).

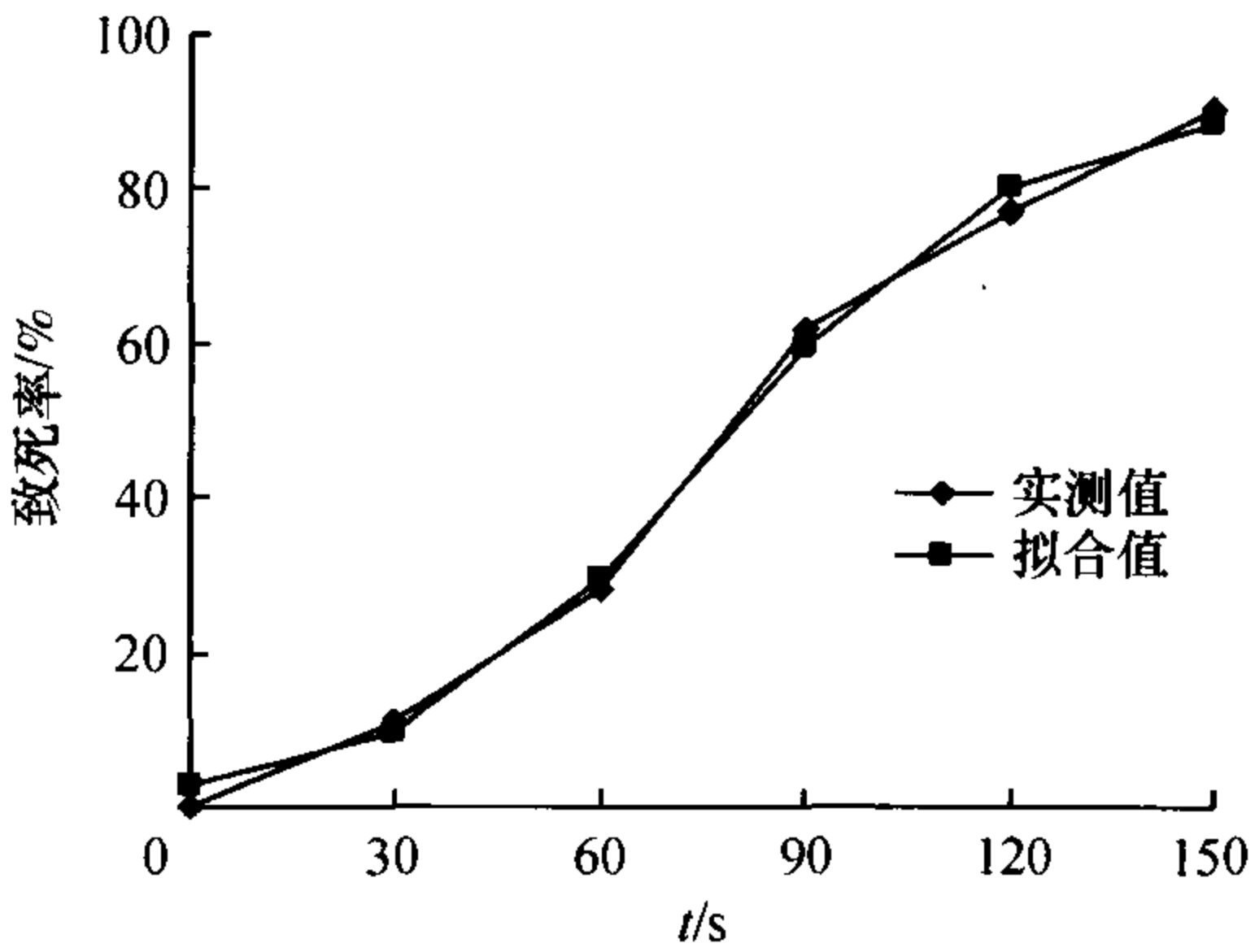


图 1 紫外光照射不同时间的毒死蜱降解菌杀菌曲线
Fig.1 The fungus-killing curve of *C. cladosporioides*

表 1 突变菌株的降解率¹⁾

Tab.1 Degradation capacity of mutants

菌株	降解率/%	菌株	降解率/%
Hu-01(初始菌株)	79.21 ± 1.50b	Hu-01-7	52.43 ± 2.06ef
Hu-01-1	59.63 ± 3.23d	Hu-01-8	41.12 ± 2.17g
Hu-01-2	71.70 ± 2.35c	Hu-01-9	71.89 ± 3.56c
Hu-01-3	54.86 ± 4.32def	Hu-01-10	58.60 ± 1.00de
Hu-01-4	92.09 ± 1.12a	Hu-01-11	32.64 ± 1.27h
Hu-01-5	53.56 ± 2.47ef	Hu-01-12	49.64 ± 2.74f
Hu-01-6	86.55 ± 1.31a		

1)表内数据为 4 次重复的平均值 ± 标准误;供试毒死蜱初始添加质量浓度 50 mg/L,降解 24 h;同列数据后凡标有一个相同英文字母,表示在 5% 水平差异不显著(DMRT 法).

2.4 高产菌株降解效能的稳定性

对初筛获得的菌株 Hu-01-4 和 Hu-01-6 经过斜面传代培养 10 代后,测其降解效果,结果(表 2)表明:菌株 Hu-01-4 和 Hu-01-6 的降解率分别为 84.54% 和 87.14%,分别比初始菌株提高 8.40% 和 11.73%,存在较小的显著性差异,保持了较好的传代降解稳定性.因此本文就菌株 Hu-01-6 做了进一步研究(关于菌株 Hu-01-4 的研究将另文发表).

表 2 突变菌株降解稳定性¹⁾

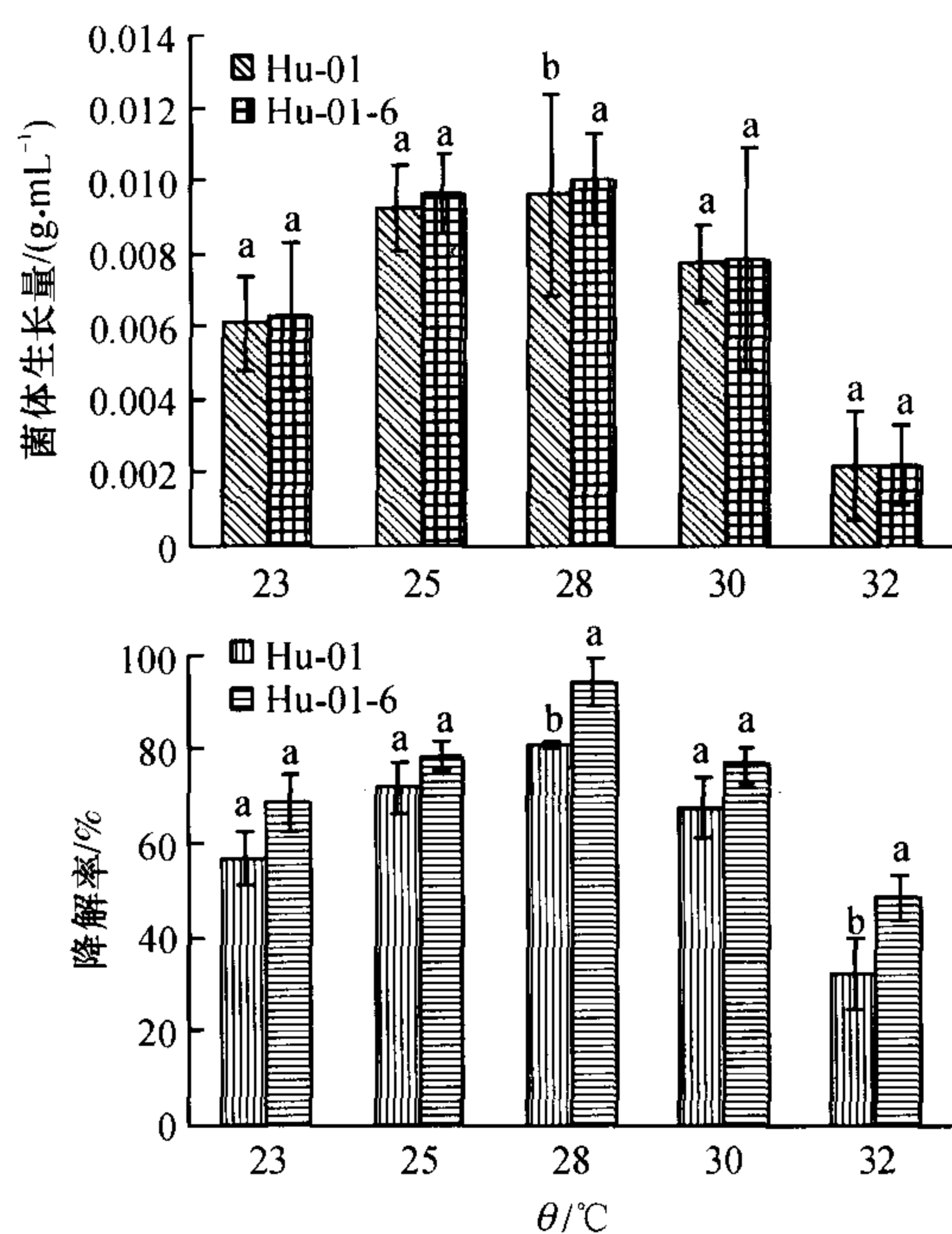
Tab.2 Degradation stability of mutants

菌株	降解率/%	
	5 代	10 代
Hu-01(初始菌株)	81.27 ± 2.38c	77.99 ± 2.40b
Hu-01-4	87.49 ± 1.34b	84.54 ± 2.85ab
Hu-01-6	92.64 ± 4.08a	87.14 ± 4.21a

1)表内数据为 4 次重复的平均值 ± 标准误;供试毒死蜱初始添加质量浓度 50 mg/L,降解 24 h;同列数据后凡标有一个相同英文字母,表示在 5% 水平差异不显著(DMRT 法).

2.5 诱变菌株培养温度和 pH 的确定

2.5.1 温度的确定 从图2可知,温度对降解菌活性影响显著.诱变菌株 Hu-01-6 和初始菌株 Hu-01 在 25~30℃ 温度范围内,均生长旺盛,对毒死蜱的降解活性均较高,于 23 和 32℃ 时,其活力低.诱变菌株 Hu-01-6 和初始菌株 Hu-01 在 28℃ 培养条件下的生长量均达到最高,分别为 0.010 0 和 0.009 6 g/mL,诱变菌株 Hu-01-6 的菌体生长量显著高于初始菌株 Hu-01.诱变菌株 Hu-01-6 和初始菌株 Hu-01 对 50 mg/L 毒死蜱 24 h 后的降解率在 28℃ 培养条件下均达到最高,分别为 93.97% 和 81.08%,诱变菌株 Hu-01-6 的降解率显著高于初始菌株 Hu-01.



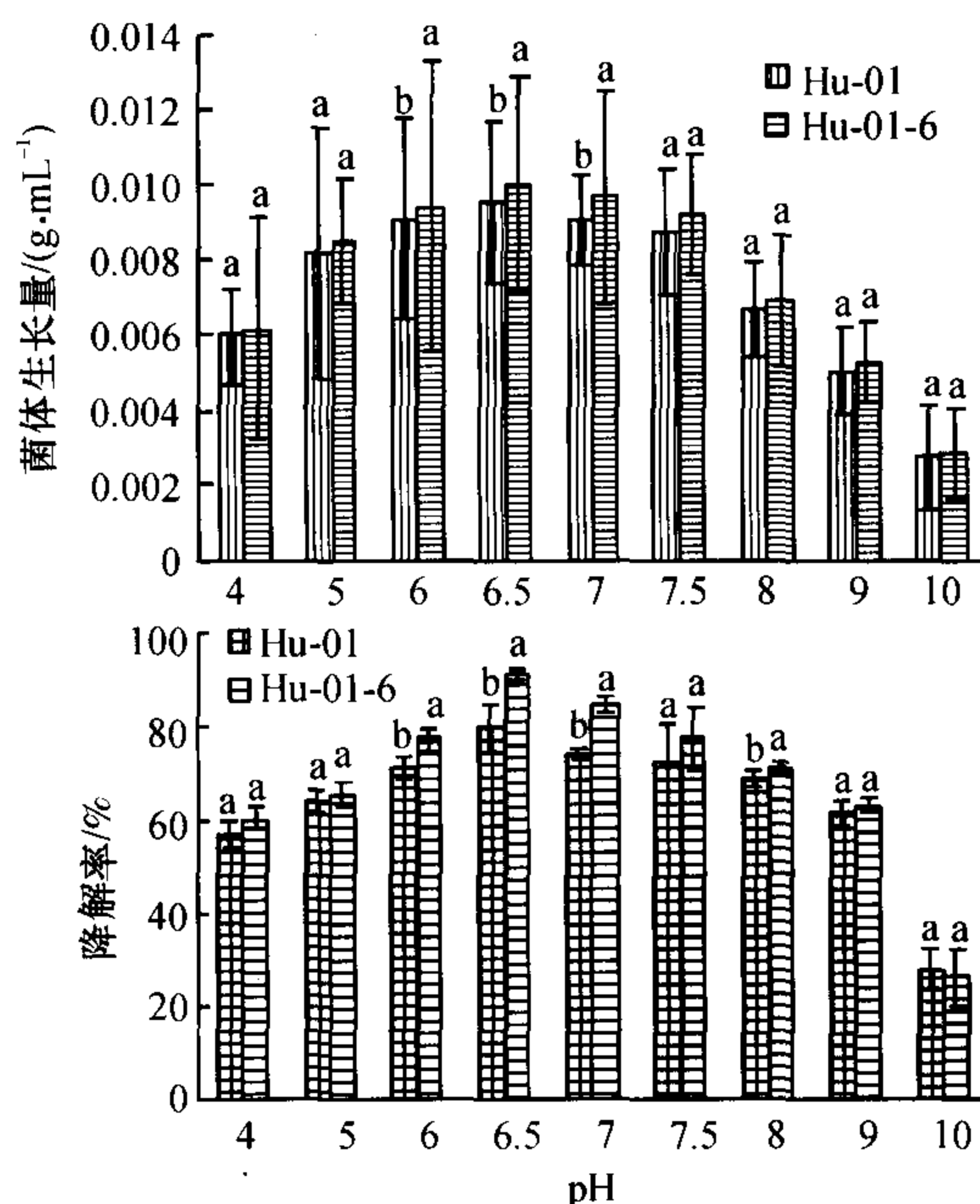
图中显示 4 次重复的平均值 $\pm$ 标准误;供试毒死蜱初始质量浓度为 50 mg/L (终质量浓度),降解 24 h;同一量的相同温度下,柱形图上方凡标有一个相同英文字母,表示在 5% 水平差异不显著 (DMRT 法).

图2 不同温度培养下的菌株生长量和对毒死蜱的降解率

Fig. 2 Fungi growth and chlorpyrifos biodegradation rate at different temperatures

2.5.2 pH 的确定 从 2.5.1 结果可知,诱变菌株 Hu-01-6 和初始菌株 Hu-01 在 28℃ 条件下对毒死蜱降解活性最高.因此,测定降解菌在 28℃ 时,不同 pH 值对降解菌降解活性的影响.结果 (图3) 表明, pH 在 4~10 范围内菌株生长有差异,在 pH 值为 6.5 时,诱变菌株 Hu-01-6 和初始菌株 Hu-01 的生长量均达到最高,分别为 0.010 0 和 0.009 6 g/mL,诱变菌株 Hu-01-6 的菌体生长量显著高于初始菌株 Hu-01.诱变菌株 Hu-01-6 和初始菌株 Hu-01 对 50 mg/L 毒死蜱 24 h 后的降解率也均达到最高,分别为

91.16% 和 79.95%,诱变菌株 Hu-01-6 的降解率显著高于初始菌株 Hu-01.



图中显示 4 次重复的平均值 $\pm$ 标准误;供试毒死蜱初始质量浓度为 50 mg/L (终质量浓度),降解 24 h;同一量的相同温度下,柱形图上方凡标有一个相同英文字母,表示在 5% 水平差异不显著 (DMRT 法).

图3 不同 pH 培养条件下的菌株生长量和对毒死蜱的降解率

Fig. 3 Fungi growth and chlorpyrifos biodegradation rate at different pH

3 讨论与结论

一般而言,从自然环境中直接分离得到的菌株,纯化后如长期培养于实验室条件下,就会容易变异,降低甚至失去对农药的降解能力^[22].本文研究的毒死蜱降解菌株 Hu-01 在查彼氏培养基中连续传代多次之后,发现其降解能力有较大幅度的下降,因此,运用一些手段对其进行改造、提高,使之更符合工业发酵生产的要求是必要的.

目前,菌种的诱变筛选是当前国际上的研究热点,国内外在菌种的育种方面还有用微波、离子注入等物理诱变和亚硝基胍、硫酸二乙酯、亚硝酸钠等化学诱变剂或几种方法结合进行^[25-29],但紫外诱变较安全、简便易行,且诱变效果也很显著,因此被广泛应用于工业育种^[30].紫外线诱变剂量因紫外灯的功率、照射时间及照射距离的不同而不同.功率大,时间长,距离短,剂量就大;功率小,时间短,距离长,剂量就小.不同紫外线剂量照射对微生物的影响是不同的,在一定剂量范围内引起的是诱变作用,超过这一范围则引起致死作用,所以在紫外线诱变育种时,应先测定紫外线照射剂量对菌体的致死曲线,以确

定最佳诱变剂量.在诱变处理中,高剂量一般引起致死或者负突变,正突变一般出现在较低的剂量中,但处理剂量太低则达不到诱变目的,所以一般选用达到70%~80%的致死剂量为宜^[17].本研究确定的紫外线最佳诱变剂量为15 W紫外灯(预热30 min),垂直照射距离30 cm,波长为253.7 nm,照射时间120 s.

菌种的诱变筛选中,突变株的降解率比初始菌株降低10%以下的突变株属于负突变株,提高10%以上的突变株即是正突变株,正突变株具有一定的研究开发价值.本文采用紫外最佳诱变剂量诱变毒死蜱降解菌Hu-01后,筛选到1株突变株Hu-01-6, Hu-01-6培养的适宜温度为28℃,pH为6.5,传代10代后,其对50 mg/L毒死蜱24 h后的降解率达到87.14%,比初始菌株提高了11.73%.因此,突变株Hu-01-6在工业生产中具有一定的研究与开发前景.

参考文献:

- [1] 刘乾开,朱国念.新编农药使用手册[M].2版.上海:上海科学技术出版社,1999:60-61.
- [2] 王金花,朱鲁生,王军,等.3株真菌对毒死蜱的降解特性[J].应用与环境生物学报,2005,11(2):211-214.
- [3] SINGH B K, WALKER A. Microbial degradation of organophosphorus compounds [J]. FEMS Microbiol Rev, 2006 (30):428-471.
- [4] 刘新,尤民生,廖金英,等.土壤中毒死蜱和微生物相互作用的研究[J].应用生态学报,2004,15(7):1174-1176.
- [5] 李顺鹏,蒋建东.农药污染土壤的微生物修复研究进展[J].土壤,2004,36(6):577-583.
- [6] 张瑞福,戴青华,何健,等.七株有机磷农药降解菌的降解特性比较[J].中国环境科学,2004,24(5):584-587.
- [7] SINGH B K, WALKER A, MORGAN J A W, et al. Biodegradation of chlorpyrifos by *Enterobacter* strain B-14 and its use in bioremediation of contaminated soils [J]. Applied Environmental Microbiology, 2004 (70):4855-4863.
- [8] 李晓慧,贾开志,何健,等.一株毒死蜱降解菌株 *Sphingomonas* ssp. Dsp-2 的分离鉴定及降解特性[J].土壤学报,2007,44(4):734-739.
- [9] 岑沛霖,蔡谨.工业微生物学[M].2版.北京:化学工业出版社,2008:227.
- [10] 彭维燕.毒死蜱残留降解菌的研究[D].广州:华南农业大学资源环境学院,2005.
- [11] 钟国华,何玥,刘萱清,等.毒死蜱高效降解酶保护剂配方优化及稳定性[J].中国农业科学,2009,42(1):136-144.
- [12] 高燕.毒死蜱高效降解酶的纯化及其基因的克隆与表达[D].广州:华南农业大学资源环境学院,2008.
- [13] 杨文博.微生物学实验[M].北京:化学工业出版社,2004:217-218.
- [14] 陈夏娇.毒·辛乳油的液相色谱分析[J].农药科学与管理,2002,23(3):14-17.
- [15] 金志华,林建平,梅乐和.工业微生物遗传育种学原理与应用[M].北京:化学工业出版社,2005:83-84.
- [16] 施巧琴,吴松刚.工业微生物育种学[M].2版.北京:科学出版社,2003:137-139.
- [17] 王兆守,梁小虾,林淦,等.拟除虫菊酯类农药降解菌的紫外线诱变[J].华东昆虫学报,2003,12(2):82-86.
- [18] 王永杰,李顺鹏,沈标,等.有机磷农药降解菌的紫外诱变育种[J].应用与环境生物学报,1999,5(6):635-637.
- [19] 武晓炜,吴志国,王艳敏,等.甲胺磷降解菌的紫外诱变及高产菌株的筛选[J].河北省科学院学报,2005,22(3):71-73.
- [20] 王静,朱建华,林纬,等.枯草芽孢杆菌 B47 高产拮抗物质菌株的紫外诱变选育[J].农业科学与技术,2008,9(4):71-72.
- [21] 蒲小明,林壁润,胡美英,等.星形孢菌素产生菌的选育研究[J].核农学报,2008,22(3):276-279.
- [22] 刘玉焕,钟英长.甲胺磷降解真菌的研究[J].中国环境科学,1999,19(2):172-175.
- [23] 仪美琴,王开运,姜兴印,等.降解甲基对硫磷真菌的分离及降解特性[J].农药学学报,2000,2(4):40-43.
- [24] 岑沛霖,蔡谨.工业微生物学[M].2版.北京:化学工业出版社,2008:230.
- [25] 宋丽,刘晓风,刘培旺,等.微波诱变选育耐酸高效厌氧产氢菌[J].应用与环境生物学报,2008,14(3):427~431.
- [26] 孙金凤,吴薇,潘翔.产壳聚糖酶菌株的分离筛选及诱变育种[J].工业微生物,2008,38(2):56-59.
- [27] WAN Hisao-ming, CHEN Chien-chiang, CHANG Te-sheng, et al. Combining induced mutation and protoplasting for strain improvement of *Aspergillus oryzae* for kojic acid production [J]. Biotechnology Letters, 2004, 26 (14): 1163-1166.
- [28] CHEN Zhi, WEN Jia, SONG Yuan, et al. Enhancement and selective production of avermectin B by recombinants of *Streptomyces avermitilis* via intraspecific protoplast fusion [J]. Chinese Science Bulletin, 2007, 52(5):616-622.
- [29] HIDA H, YAMADA T, YAMADA Y. Genome shuffling of *Streptomyces* sp. U121 for improved production of hydroxycitric acid [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 73(6):1387-1393.
- [30] 诸葛健,沈微,方慧英,等.工业微生物实验与研究技术[M].北京:科学出版社,2007:192.

【责任编辑 李晓卉】