

阿特拉津降解菌 SA1 的分离鉴定及其降解特性研究

代先祝^{1,2} 蒋建东¹ 顾立锋¹ 李 荣¹ 李顺鹏^{1*}

(¹ 南京农业大学生命科学学院 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室 南京 210095)

(² 西南大学资源环境学院 微生物学实验中心 重庆 400715)

摘 要: 为进行阿特拉津(AT)污染的生物修复,从 AT 降解混合菌群中,经长期的交替液体摇瓶培养和平板划线分离,筛选到一株能完全降解 AT 的菌株 SA1。经生理生化特征及 16S rDNA 序列分析,将该菌鉴定为假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)。与已报道的 AT 降解菌 *Pseudomonas* sp. ADP 不同,SA1 能以 AT 为唯一碳源、氮源和能源生长,培养基中添加铵盐不抑制 SA1 的降解功能,而添加葡萄糖时,累积的氰尿酸会被快速降解。SA1 生长的最适温度为 37℃,最适 pH 值为 7.0。SA1 的静息细胞在 10℃~40℃或 pH 值 4~11 时均能高效降解 AT,比 ADP 降解具有更广的 pH 和温度范围,表明 SA1 降解菌株具有广阔的应用前景。SA1 中 AT 降解基因为保守的 *atzABCD*,并含有 *IS1071* 的 *tnpA* 基因片段,传代过程中降解基因会以一定频率丢失。

关键词: 阿特拉津;生物降解;分离鉴定;降解特性;基因转移

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-6209(2007)03-0544-04

阿特拉津,又名莠去津(atrazine,AT),化学名 2-氯-4-乙氨基-6-异丙氨基-1,3,5-均三氮苯,是世界范围内使用量最大的除草剂之一。由于长期、广泛的使用,AT 在环境中残留造成的污染问题引起越来越多的关注^[1-4],关于 AT 微生物降解方面的研究也成为热点。在上个世纪 60~80 年代,AT 被认为是一种难生物降解的化学物质^[5]。到 80 年代初,研究者们从土壤中分离到一系列能以氰尿酸、melamine(2,4,6-三氨基-1,3,5-均三氮苯)、脱乙基西玛津等为唯一氮源生长的细菌,但它们都不能降解 AT^[6]。到 90 年代中期,几个不同的实验室都分离到能矿化 AT 并以之为唯一氮源或碳源生长的细菌^[7,8],其中 AT 降解菌株假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)ADP 的降解特性、降解基因 *atzABCDEF* 和降解酶得到了详细的研究^[5,9,10],对分离至不同地区降解菌的研究发现 AT 降解基因 *atzABC* 具有高度的保守性。国内也有降解 AT 微生物的报道,但关于降解特性和降解基因等方面的研究较少^[5]。本研究从混合降解菌群中分离到一株能完全降解 AT 的菌株 SA1,并鉴定为 *Pseudomonas* sp.,并对该菌的生长、降解特性和降解基因等方面进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品来源: 取之浙江嘉兴使用阿特拉津(AT)三年以上的水稻土,pH8.0,有机质含量 10.6g/kg。

1.1.2 培养基: ①基础盐培养基:每升含 KH_2PO_4 0.45g, K_2HPO_4 1.79g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g, NaCl 0.4g, pH7.5。②GAT

培养基:基础盐培养基加入 1g/L 葡萄糖溶液和 500mg/L AT 乙醇悬液。

1.1.3 主要试剂和仪器: AT 原粉(96%)由浙江长兴中山化工有限公司馈赠;Taq DNA 聚合酶购自上海生工生物工程有限公司;pMD 18-T Vector 购自 TaKaRa 公司;苄芐青霉素(Amp)购自南京创瑞公司;PCR 引物委托上海博亚生物有限公司合成。液相色谱仪型号为 Waters 600,PCR 扩增仪为 BIO-RAD 公司的 Peltier Thermal Cycler(PTC-200)。

1.2 AT 降解菌的分离筛选

本实验室采用直接稀释涂平板法从长期受 AT 污染的土壤样品中分离获得一能以 AT 为唯一碳氮源生长的混合菌群,该菌群为多种细菌的结团生长体,并产生大量粘性物质。挑取混合菌群在 GAT 固体培养基平板上划线。因 AT 在水中的溶解度为 33 mg/L(25℃),所以 GAT 培养基呈混浊状,当 AT 被降解后会在菌落周围形成透明圈^[4]。挑取形成透明圈的“单菌落”接种液体 AT 培养基,振荡培养至 AT 粉末消失,再在 GAT 固体平板上划线分离,如此重复,至镜检时菌体形态单一,并在 LB 平板上划线纯化三次确证。

1.3 AT 及其代谢产物的检测

参考文献[5]进行。

1.4 温度和 pH 值对菌株生长和降解 AT 的影响

接种相同量的 SA1 菌液于稀释 10 倍的 LB 培养基(LB/10)中,分别在 10℃、25℃、30℃、37℃和 41℃振荡培养 24h 后测菌的生长量,用 NaOH 和盐酸调整基础盐培养基的 pH 值分别为 4、5、6、7、8、9 和 10,接种相同量的 SA1 菌液振荡培养 24h 后测菌的生长量。

基金项目:国家“863 计划”(2006AA10Z402)、国家自然科学基金(30600016)

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

作者简介:代先祝(1978-),女,四川安岳人,硕士,现为西南大学助教,研究方向为环境微生物。E-mail: daixianzhu@126.com

收稿日期:2006-11-13;接受日期:2006-12-22;修回日期:2007-03-03

挑取 AT 固体平板上形成透明圈的单菌落,接种 AT 液体培养基培养至稳定期,8000 r/min 离心收集菌体,用生理盐水洗涤两次后重悬,调节 OD_{600} 值为 1.0,10℃ 放置 24h 即为用于降解试验的静息细胞。在 10mmol/L 磷酸盐缓冲液中加入过量的 AT 原药,37℃ 剧烈振荡过夜,Φ0.25μm 滤膜过滤去除未溶解 AT,将其 pH 值分别调整为 3、4、5、6、8、9、10 和 11,各取 1mL 加入 0.5mL 降解菌的静息细胞悬液,30℃ 温育 20min 后,立即离心(4℃,12000r/min)10min,取上清,用 Φ0.25μm 滤膜过滤后 HPLC 检测 AT 含量。温度试验为 1mL 的 pH 值为 7 的 AT 饱和溶液,加入 0.5mL 降解菌的静息细胞悬液,然后分别在温度为 10℃、16℃、25℃、30℃、37℃ 和 42℃ 温育 20min 后,立即离心(4℃,12000r/min)10min,过滤后 HPLC 检测 AT 含量。每试验均为 3 个重复,设不加菌为对照。

1.5 降解菌形态观察及生理生化鉴定

参考文献 [11] 进行。

1.6 基因保守片段的扩增和系统进化树的构建

用高盐 SDS 裂解法提取 SA1 的基因组 DNA。tnpA、atzABCD 基因片段的扩增参考文献 [12]。16S rDNA 扩增使用通用引物对 5'-AGAGTTTGATCCT GGCTCAG-3'(E. coli 8 to 27)和 5'-TACCTTGT TACGACTT-3'(E. coli 1507 to 1492),由上海博亚生物有限公司完成测序,测序结果用 BLAST 软件在 GenBank 进行同源性比较,采用 ClustalX 软件进行多序列

比对, NJplot 程序进行系统进化分析。菌株 SA1 的 16S rDNA 序列的 GenBank 索取号为 DQ059546。

2 结果和分析

2.1 AT 降解菌株的分离鉴定

从混合菌群中分离到一株能以 AT 为唯一碳源、氮源和能源生长的单菌 SA1(图 1)。SA1 的生理生化特性为接触酶阳性、氧化酶阳性、不产芽孢、液化明胶、不水解淀粉、硝酸盐还原阳性,严格好氧。SA1 菌株的 1501bp 长度的 16S rDNA 片段系统进化分析发现 SA1 与 Pseudomonas 聚在一个分支上(图 2),结合培养及生理生化特征,我们将 SA1 鉴定为 Pseudomonas sp.。



图 1 SA1 透射电镜照片(20000 ×)

Fig.1 TEM graph of SA1(20000 ×).

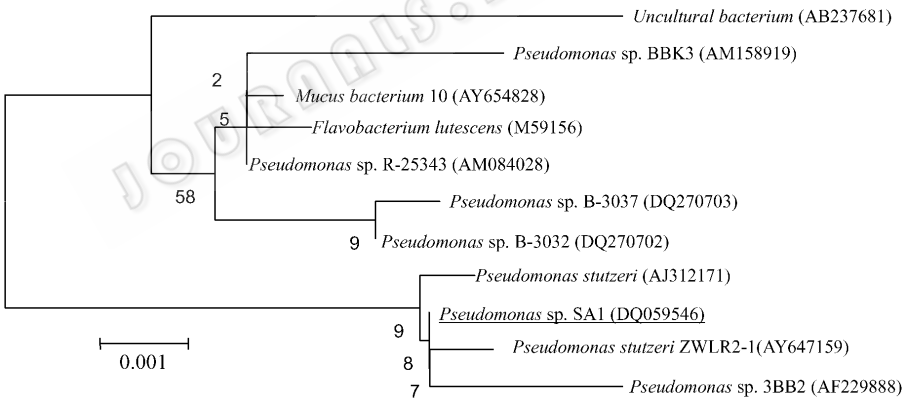


图 2 SA1 16S rDNA 系统进化树

Fig.2 Phylogenic tree of SA1 and related species by the neighbor joining approach. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. Bootstrap values(%) are indicated at the nodes. The scale bars represent 0.001 substitution per site.

2.2 菌株 SA1 的降解特性研究

研究了 SA1 以 AT 为唯一碳氮源和添加葡萄糖/铵盐降解 AT 的情况,发现加铵盐(图 3-A)和以 AT 为唯一碳氮源时,AT 的降解速率及菌体生长均没有显著差异,表明在铵离子对降解没有抑制或促进作用。不加葡萄糖时,SA1 降解 AT 的产物氰尿酸浓度不断增加,最终累积到与 AT 量相当的浓度,而添加葡萄糖能明显促进降解(图 3-B,D),最初的 15h 生成一定量氰尿酸,随后在 22h 时被降解至检测不出的水平(图 3-C),表明降解氰尿酸的酶是诱导酶。最近关于

Pseudomonas sp. ADP 的研究发现氰尿酸的降解基因受氮源条件和氰尿酸的双重激活^[13],我们的研究表明 SA1 中氰尿酸的代谢似乎也存在相似的调控系统。氰尿酸上的碳原子处于完全被氧化的状态,不能作为能源被细菌利用,但其环上的氮原子却可被用作氮源,因此在葡萄糖存在条件下 SA1 能继续利用氮原子生长,使得生长量增加。菌株 ADP 只能以 AT 为唯一氮源生长,而 SA1 能以 AT 为唯一碳、氮源生长,并且降解 AT 到氰尿酸的活性不受铵盐抑制,这在田间应用时非常有利,因为耕作土壤中往往具有丰富氮源的特点。

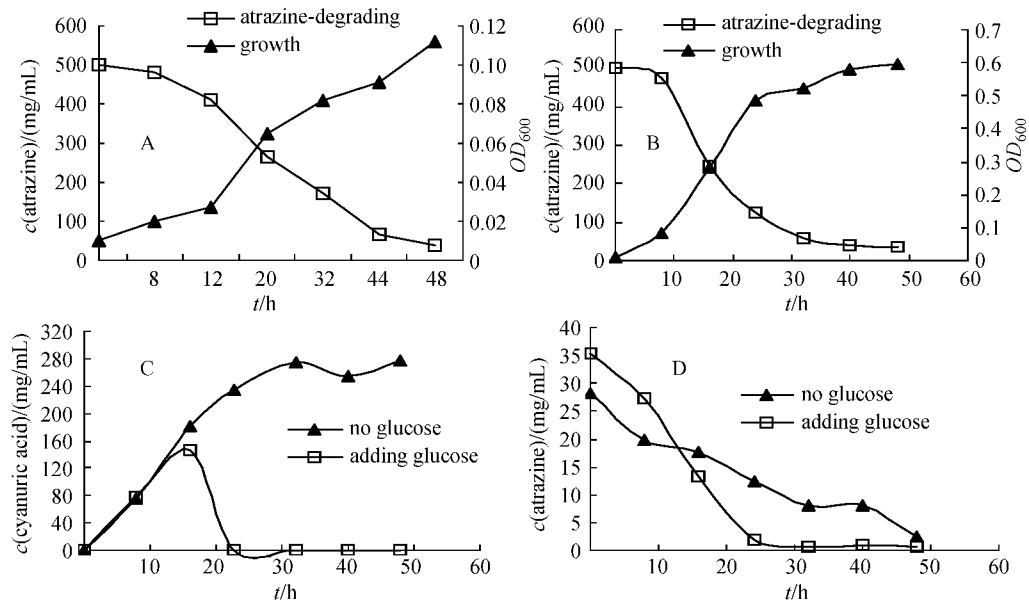


图3 SA1在添加碳源或氮源时降解AT生长及氰尿酸的降解

Fig.3 Growth of SA1 in AT medium with the addition of carbon or nitrogen sources and the degradation of cyanuric acid. A : Growth curve of SA1 with the degradation of AT (addition of NH_4^+); B : Growth curve of SA1 with the degradation of AT (addition of glucose); C : The change curve of cyanuric acid with the degradation of AT; D : The degrading curve of AT by SA1 in solution.

2.3 温度和 pH 值对 SA1 生长和降解的影响

试验表明 SA1 在 pH 值 6~10 的范围内生长良好,低于 5 时生长差,最适生长 pH 值为 7~8。SA1 在 10℃~40℃ 条件下都能生长良好,最适生长温度为 37℃。

Jennifer^[14]等研究发现几株具有 *atzA* 基因菌株的降解底物特异性并不相同,可能是受宿主影响或点突变导致基因编码的酶性质不同。SA1 的降解基因与 *Pseudomonas* sp. ADP (由 Lawrence Wackett 馈赠,能以 AT 为唯一氮源生长)的类似 (见 2.4 结果) 降解试验结果显示两株菌在 37℃~42℃ 时降解效率差不多。然而,当温度低于 30℃ 时,ADP 降解 AT 的效率要远低于 SA1 (图 4-A),表明 SA1 具有更广的温度降解范围,SA1 在 10℃ 降解率也可以达到 60%,这种特性有利于低温环境下 AT 的去除。ADP 在 pH 值 < 6 时降解效率低于 40%,而 SA1 在 pH 值 4~10 范围内降解效率都在 60% 以上,显著高于 ADP (图 4-B),比 ADP 具有更广的 pH 值降解范围,表明菌株 SA1 比 ADP 具有更广阔的应用前景。

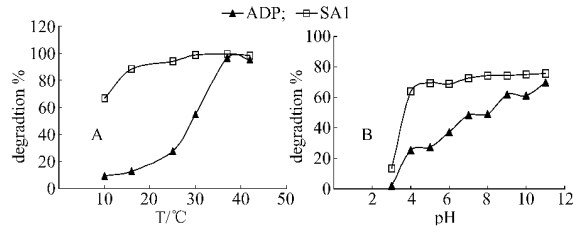


图4 温度(A)和 pH(B)对 ADP 和 SA1 静息细胞降解 AT 的影响

Fig.4 Effect of temperature (A) and pH (B) on degradation of AT by resting cells of ADP and SA1.

2.4 *atzABCD* 降解基因及 *tnpA* 基因的 PCR 扩增

从 SA1 中均扩增到 *atzABCD* 及 IS 1071 的 *tnpA* 基因片段 (图略),说明 SA1 的降解基因与 ADP 的一样非常保守。目前报道的 *atzABCD* 基因几乎都位于质粒上,*atzABC* 各基因两端与 IS 1071 相连,质粒或单个基因经常会丢失^[9,10]。我们从 ADP 中提取到两个大质粒,但未能在 SA1 菌中提取到质粒。将以 AT 为唯一碳氮源培养的 SA1 稀释涂布,发现有少量的菌落在 AT 平板上不能形成透明圈,将其命名为 SA1⁻。PCR 检测发现 *atzABCD* 基因及 *tnpA* 基因均已丢失 (图略),暗示 SA1 的降解基因也在质粒上,并且会以一定频率丢失。

3 结论

从混合降解菌群中分离到一株 AT 降解菌 SA1 (*Pseudomonas*)。SA1 能以 AT 为唯一碳源、氮源和能源生长,降解产物主要是氰尿酸,培养基中添加铵盐不抑制降解,而添加葡萄糖时,氰尿酸会被快速降解。SA1 生长的最适温度为 37℃,最适 pH 值为 7.0。SA1 比 ADP 具有更广的 AT 降解 pH 值和温度范围。SA1 具有保守的 *atzABCD* 降解基因及 IS 1071 转座子相关序列,且这些基因会以一定频率丢失。

参考文献

[1] 熊文兰,陈一兵.农药渗透污染地下水的监测及管理.西南农业学报,2003,16(suppl):43-49.
[2] 谢文明,刘兴泉,范志先,等.莠去津在土壤中的残留动态和淋溶动态.农药学报,2003,15(1):82-87.
[3] Goodrich J A, Lykins B W, Clark R M. Drinking water from agriculturally contaminated ground water. J Environ Qual, 1991, 20:707-714.

- [4] Storrs S I, Kiesecker J M. Survivorship patterns of larval amphibians to low concentration of atrazine. *Environ Health Perspect*, 2004, **112** (10): 1054 – 1057.
- [5] Jennifer L S, Wackett L P. Rapid evolution of bacterial catabolic enzymes: A case study with atrazine chlorohydrolase. *Biochemistry*, 2001, **40** (43): 12747 – 12752.
- [6] Cook A M, Beilstein P, Brossenbacher H. Ring cleavage and degradative pathway of cyanuric acid in bacteria. *Biochem J*, 1985, **231**: 25 – 30.
- [7] Struthers JK, Jayachandran K, Moorman TB. Biodegradation of atrazine by *Agrobacterium radiobacter* J14a and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**: 3368 – 3375.
- [8] 蔡宝立, 黄今勇, 石建党, 等. 阿特拉津降解菌株的分离和鉴定. *微生物学通报*, 2001, **28** (2): 22 – 26.
- [9] de Souza ML, Wackett LP, Sadowsky MJ. The *atzABC* genes encoding atrazine catabolism are located on a self-transmissible plasmid in *Pseudomonas* sp. strain ADP. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**: 2323 – 2326.
- [10] Martinez B, Tomkins J, Wackett LP, et al. Complete nucleotide sequence and organization of the atrazine catabolic plasmid pADP-1 from *pseudomonas* sp. strain ADP. *J Bacteriol*, 2001, **183**: 5684 – 5697.
- [11] 东秀珠, 蔡妙英. 细菌分类鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 267 – 273.
- [12] Rousseaux S, Soulas G, Hartmann A. Plasmid localization of atrazine-degrading genes in newly described *Chelatobacter* and *Arthrobacter* strains. *FEMS Microbiol Ecol*, 2002, **41**: 69 – 75.
- [13] Vicente GFG, Odil P, Eduardo S. Regulation of the *Pseudomonas* sp. strain ADP cyanuric acid degradation operon. *J Bacteriol*, 2005, **187** (1): 155 – 167.
- [14] Jennifer LS, Gilbert J, Michael J S. Substrate specificity of atrazine chlorohydrolase and atrazine catabolizing bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66** (10): 4247 – 4252.

Isolation and characterization of an atrazine-degrading bacterium strain SA1

DAI Xian-zhu^{1,2}, JIANG Jian-dong¹, GU Li-feng¹, LI Rong¹, LI Shun-peng^{1*}

(¹ College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Key Laboratory for Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Nanjing 210095, China)

(² College of Resources and Environmental Sciences, Southwest University, The Experimental Center for Microbiology, Chongqing 400715, China)

Abstract :Atrazine (AT), a kind of herbicide for the pre and post-emergence control of annual and broad leaved weeds and perennial grasses, had been widely used in the world. However, the extensive use of atrazine had led to widespread environmental pollution. A bacterium strain SA1, which could degrade AT completely, was isolated from an atrazine-degrading consortium by long-time repeated alternative cultivation and plate striking. Combining cultural and physiobiochemical characteristics with 16S rDNA sequence analysis, SA1 was identified as *Pseudomonas* sp.. SA1 could use atrazine as the sole carbon, nitrogen and energy sources for growth, and the main product of AT biodegradation was cyanuric acid. AT degrading activity of SA1 was not affected by the addition of nitrogen resources. However, cyanuric acid could be degraded quickly to an undetectable level when glucose was added. The optimal temperature and pH value for SA1 growth was 37°C and pH7, respectively. Atrazine could be degraded efficiently by the resting cells of SA1 under the conditions of 10°C ~ 40°C or pH value 4 ~ 11, and SA1 had a wide range of temperature and pH value for AT degradation when compared with ADP. *atzABCD* and conserved sequence of *tnpA* gene of IS1071 could be amplified from SA1, and these genes could be lost during subculture.

Keywords : atrazine, biodegrading, isolation and identification, degrading characteristics, gene transfer