

阿特拉津降解菌株的分离和鉴定*

蔡宝立 黄今勇 石建党** 张心平 刘 海

(南开大学生命科学学院 天津 300071)

朱昌寿

(南开大学元素有机化学研究所 天津 300071)

摘要:从农药厂废水中分离到6株能以除草剂阿特拉津为唯一氮源生长的细菌,即假单胞菌(*Pseudomonas* spp.)AD1、AD2和AD6,土壤杆菌(*Agrobacterium* sp.)AD4,黄单胞菌(*Xanthomonas* sp.)AD5,欧文氏菌(*Erwinia* sp.)AD7。AD1菌株能使无机盐培养基中的0.3g/L阿特拉津在72h内降解99.9%。当以AD1、AD2、AD4、AD5、AD6和AD7菌株的总DNA为模板进行PCR扩增时,除AD2菌株以外,均得到了与文献报道的假单胞菌ADP菌株的阿特拉津氯水解酶基因(*atzA*)同源的PCR产物。

关键词:阿特拉津,生物降解,菌株分离,阿特拉津氯水解酶基因

中图分类号:Q93 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2001)02-0022-06

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ATRAZINE-DEGRADING STRAINS

CAI Bao-Li HUANG Jin-Yong SHI Jian-Dang ZHANG Xin-Ping LIU Hai

(College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071)

ZHU Chang-Shou

(Institute of Elemento-Organic Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract: Six atrazine-degrading strains, *Pseudomonas* spp. AD1, AD2, AD6, *Agrobacterium* sp. AD4, *Xanthomonas* AD5, and *Erwinia* sp. AD7, were isolated from industrial wastewater. These strains are able to grow on atrazine as sole nitrogen source. Strain AD1 is able to degrade atrazine of 0.3g/L in minimal medium at a percentage of 99.9% in 72 hours. PCR products that are homologous to the atrazine chlorohydrolase gene (*atzA*) from *Pseudomonas* sp. strain ADP were obtained by PCR method using total DNA of the strains AD1, AD4, AD5, AD6, and AD7 as templates.

Key words: Atrazine, Biodegradation, Isolation of strains, Atrazine chlorohydrolase gene

阿特拉津(Atrazine)又称氯乙异丙嘧,学名2-氯-4-乙基胺-6-异丙基胺-1,3,5-三嗪,商品名莠去津,是一种广泛使用的三嗪类除草剂,用于阔叶杂草和禾草的防除,如玉米、高粱和甘蔗杂草等。阿特拉津分子中含有一个氯原子,所以对人和哺乳动物具有毒性。由于这种除草剂在世界范围内广泛使用达40年,所以对土壤、地下水和表面水造成了严重污染。美国环保署规定饮用水中的阿特拉津含量不得超过 $3\mu\text{g/L}$,但是在污染严重的地区,阿特拉津的浓度在土壤中是 1100mg/kg ,表面水中 $16\mu\text{g/L}$,地下水中 $1500\mu\text{g/L}$ [1]。

* 天津市自然科学基金资助项目(No. 993604611)

** 天津医科大学分析中心

收稿日期:2000-01-18,修回日期:2000-05-25

虽然自八十年代以来从多个细菌属中分离到降解阿特拉津的菌株,但直至九十年代中期,对这一生物降解过程所涉及到的基因、酶和中间代谢产物,仍知之甚少。1995 年 Wackett 实验室从施用过阿特拉津的土壤中分离到假单胞菌 ADP 菌株以后,阿特拉津的生物降解研究获得了迅速发展^[2]。研究表明,ADP 菌株阿特拉津生物降解途径的第一个反应由阿特拉津氯水解酶催化,使阿特拉津脱氯生成无毒的羟基阿基拉津,编码这种酶的基因 *atzA* 已被克隆和测序^[3]。此外,编码该途径的第二和第三个反应的酶的基因 *atzB* 和 *atzC*,也被克隆和测序^[4,5]。一般情况下,*atzA*、*atzB*、*atzC* 基因位于一个分子大小为 97kb 的传递性质粒上^[6]。目前,有关阿特拉津生物降解的机理以及利用天然的和遗传工程改造的微生物对污染土壤和水进行生物修复的研究,受到广泛重视。我们从农药厂废水中分离到 6 个高效降解阿特拉津的菌株,并通过 PCR 反应对它们的阿特拉津氯水解酶基因进行了检测。

1 材料与方法

1.1 培养基和培养条件

1.1.1 LB 培养基:见文献[7]。

1.1.2 无机盐(MM)培养基:KH₂PO₄ 0.9g,Na₂HPO₄ 12H₂O 6.5g,MgSO₄·7H₂O 0.2g 蔗糖(或柠檬酸钠)3g,微量元素 1mL^[8],定容 1L。阿特拉津(悬浮于甲醇,100mg/mL)加到摇瓶培养基中,使终浓度为 300μg/mL,高压灭菌 10min。

1.1.3 培养条件:30℃,150r/min 振荡培养。

1.2 阿特拉津降解菌株的分离和最适生长条件的测定

用含阿特拉津(200μg/mL)的 MM 培养基对农药厂的工业废水进行富集培养,然后筛选能以阿特拉津为唯一氮源生长的菌株。菌株分离和最适生长条件的测定见参考文献[8]。

1.3 细菌菌株的鉴定

见参考文献[9]。

1.4 阿特拉津的浓度测定

用二氯甲烷萃取细菌培养液中的阿特拉津,用 HP-5890 气相色谱仪测定萃取液中阿特拉津的含量^[10],然后以零时培养液中的阿特拉津相对含量为 100%,计算不同培养时间的培养液中阿特拉津的相对含量。色谱条件:固定相为 3% QF-1/Chromosorb W_{HP}100~120 目,色谱玻璃柱为 2m×2mm,进样量 1μL,进样口温度 230℃,柱温 180℃,检测器(FID)温度 260℃,载气(N₂)流量 6mL/min,氢气流量 20mL/min,空气流量 200mL/min。

1.5 质粒检测

见参考文献[11]。

1.6 细菌总 DNA 的提取

用 MM 和 LB 混合培养基(9:1)培养阿特拉津降解菌株 24h,离心 1mL 培养物,提取总 DNA^[7]。

1.7 PCR 反应

按 Gibco BRL 公司产品说明书进行,反应体积为 100μL,模板 DNA 浓度为 3~10μg/mL,引物浓度为 1μmol/L。合成 *atzA* 中心区的引物是:5'-TGAAGCGTCCACATTACC-3'和 5'-CCATGTGAACCAGATCCT-3'。反应条件:98℃ 预变性 5min;95℃ 变性 0.5min,58℃ 复性 1min,72℃ 延伸 1min,36 个循环;最后 72℃ 延伸 2min。

1.8 探针 DNA 的制备、标记和杂交

从含有假单胞菌 ADP 菌株 *atzA* 基因的质粒 pMD4^[12] 中分离 0.6kb 的 *ApaI-PstI* 片段, 然后用 Amersham Pharmacia Biotech 公司的随机引物标记系统进行³²P-标记, 与阿特拉津降解菌株 *atzA* 基因 PCR 扩增产物的 Southern 转移膜进行杂交^[7]。

2 结果与讨论

2.1 阿特拉津降解菌株的分离和鉴定

通过富集培养, 从河北省张家口市宣化农药厂的废水中分离到 6 个降解阿特拉津的菌株, 即 AD1、AD2、AD4、AD5、AD6 和 AD7。这些菌株能以阿特拉津为唯一氮源, 以蔗糖或柠檬酸钠为碳源生长。6 个阿特拉津降解菌株的生理和生化特征见表 1。根据表 1 和参考文献[9], AD1、AD2 和 AD6 菌株被鉴定为假单胞菌属 (*Pseudomonas* spp.), AD4 菌株为土壤杆菌属 (*Agrobacterium* sp.), AD5 菌株为黄单胞菌属 (*Xanthomonas* sp.), AD7 菌株为欧文氏菌属 (*Erwinia* sp.)。

2.2 阿特拉津降解菌株的降解性能

新分离的 6 个菌株都能高效降解阿特拉津, 在 0.2~1g/L 阿特拉津的 MM 培养基中都能生长良好。其中假单胞菌 AD1 菌株降解性能最好, 在以蔗糖为碳源时能使 0.3g/L 阿特拉津在 72h 内降解 99.9%, 培养液的 OD₆₀₀ 值可达 1.58(图 1)。而在相同条件下, 假单胞菌 ADP 菌株以柠檬酸钠为碳源(该菌株不能利用蔗糖)时仅能使阿特拉津降解 88.3%, OD₆₀₀ 值为 0.36。所以, AD1 菌株降解阿特拉津的能力大大超过文献报道的假单胞菌 ADP 菌株。

2.3 阿特拉津降解菌株的碳源利用

碳源利用实验表明, 各种阿特拉津降解菌株在 MM 培养基中可利用的碳源种类不尽相同(表 2)。所有菌株都能利用葡萄糖和柠檬酸钠。本文分离的 6 个菌株都能利用蔗糖, 而且在蔗糖培养基中菌体生长和阿特拉津降解都明显好于柠檬酸钠培养基。但是, ADP 菌株不能以蔗糖为碳源, 它可以在含柠檬酸钠、琥珀酸钠和乙酸钠的阿特拉津 MM 培养基中生长。碳源利用情况的研究为这些菌株

表 1 阿特拉津降解菌株的生理和生化特征

菌株	AD1	AD2	AD4	AD5	AD6	AD7
革兰氏染色	—	—	—	—	—	—
细胞形状	圆杆	圆杆	圆杆	圆杆	圆杆	圆杆
鞭毛	周生	极生	周生	极生	极生	周生
类脂粒	+	—	+	—	—	—
葡萄糖氧化	+	+	+	+	+	+
葡萄糖发酵	—	—	—	—	—	+
氧化酶	+	+	—	—	+	—
过氧化氢酶	+	+	+	+	+	+
硝酸盐还原	+	+	—	—	+	+
水解淀粉	—	+	—	—	+	+
水解明胶	+	—	+	+	—	+
石蕊牛奶	脓化	脓化	不变	不变	脓化	脓化

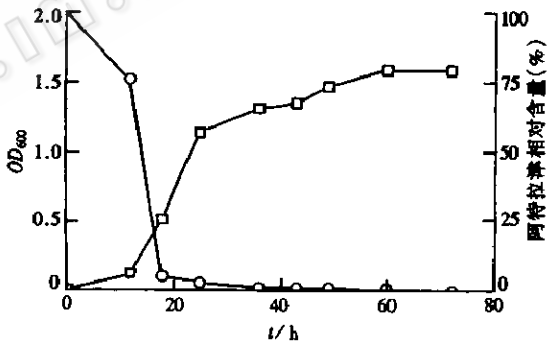


图 1 假单胞菌 AD1 菌株在阿特拉津 MM 培养基中的生长和降解曲线

表 2 阿特拉津降解菌株的可利用碳源

菌株	葡萄糖	柠檬酸钠	蔗糖	琥珀酸钠	乙酸钠
ADP	+	+	—	+	+
AD1	+	+	+	—	—
AD2	+	+	+	—	+
AD4	+	+	+	—	—
AD5	+	+	+	—	—
AD6	+	+	+	—	—
AD7	+	+	+	—	—

在土壤和水的生物修复中的应用提供了有用资料。

2.4 阿特拉津降解菌株的质粒检测

用 NaOH-SDS 裂解法从 7 个阿特拉津降解菌株中提取质粒,经琼脂糖凝胶电泳检查,ADP 菌株含有 2 个较大的质粒,与参考文献[6]的报道一致。AD1 菌株含有一个更大的质粒,估计大于 120kb。AD2 菌株含有一个较大的质粒和一个小质粒。其它 4 个菌株则含有一个或几个较大的质粒(图 2)。从同一个工业废水样品中分离到的 6 个属于 4 个细菌属的菌株,都至少含有一个大质粒,表明这些菌株很可能和 ADP 菌株一样,编码阿特拉津降解途径的基因位于质粒上,但这有待于通过实验加以证明。

2.5 阿特拉津氯水解酶基因的 PCR 扩增和 DNA 杂交

以 6 个阿特拉津降解菌株的总 DNA 为模板,ADP 菌株 *atzA* 基因中间部分的部分序列为引物,进行 PCR 扩增,每个菌株都至少出现一条由 PCR 产物形成的 DNA 带(图 3)。这些产物有的是特异性扩增,有的可能是非特异性扩增。以 ADP 菌株的 *atzA* 基因为探针进行的 DNA 杂交实验表明,AD1、AD4、AD5、AD6 和 AD7 菌株都出现一条 0.5kb 的杂交带,与对照菌株 ADP 相同(图 3),表明上述 5 个菌株都含有与 ADP 菌株的 *atzA* 同源的阿特拉津氯水解酶基因。唯一的例外是 AD2 菌株,它虽然有 2 条由 PCR 产物形成的 DNA 带,但这些带都没有与 *atzA* 探针杂交,表明 AD2 菌株的阿特拉津降解基因很可能与 ADP 菌株的 *atzA* 基因不同,或

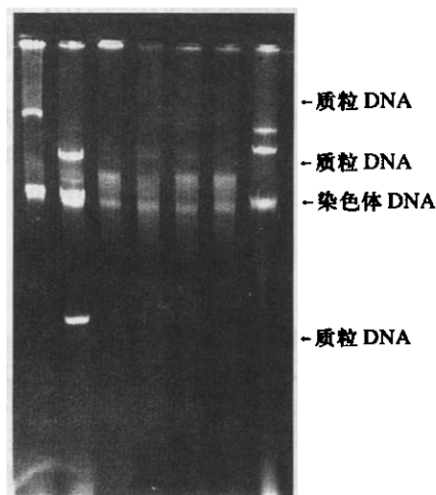
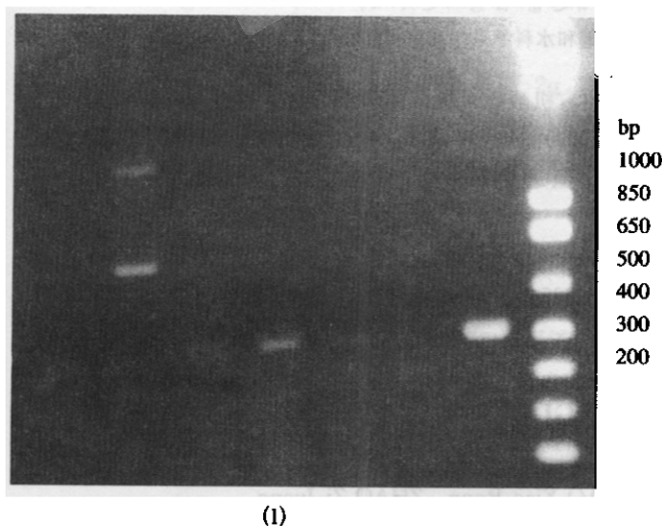
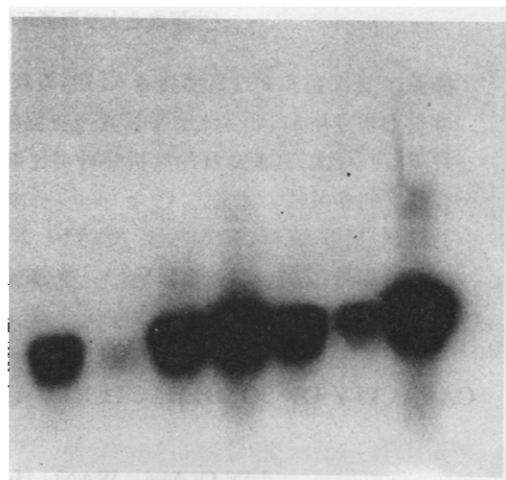


图 2 阿特拉津降解菌株的琼脂糖凝胶电泳质粒检测

从左至右:AD1、AD2、AD4、AD5、AD6、AD7、ADP



(1)



(2)

图 3 阿特拉津降解菌株的 PCR 分析及其 PCR 产物与 ADP 菌株 *atzA* 基因的杂交分析

(1)PCR 分析:AD1、AD2、AD4、AD5、AD6、AD7、ADP,分子量标准(从左至右)

(2)杂交分析:AD1、AD2、AD4、AD5、AD6、AD7、ADP,(从左至右)

者同源性较低,在进行 PCR 反应时被非特异性扩增所代替。AD6 和 AD7 菌株也出现非特异性 PCR 扩增带,但这些带不与 ADP 菌株的 *atzA* 探针杂交。以上结果为研究不同阿特拉津降解菌株的阿特拉津氯水解酶基因的同源性奠定了基础。

致谢 感谢河北省张家口市宣化农药厂魏镇和王秀英高级工程师对菌株分离工作的支持和帮助。

参 考 文 献

- [1] Struthers J K, Jayachandran K, Moorman T B. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **64**:3368~3375.
- [2] 蔡宝立,黄今勇. *生物工程进展*, 1999, **19**:7~11.
- [3] de Souza M L, Sadowsky M J, Wackett L P. *J Bacteriol*, 1996, **178**:4894~4900.
- [4] Boundy-Mills K L, de Souza M L, Mandelbaum R T, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1997, **66**:916~923.
- [5] Sadowsky M J, Tong Z, de Souza M L, *et al.* *J Bacteriol*, 1998, **180**:152~158.
- [6] de Souza M L, Wackett L P, Sadowsky M J. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**:2323~2326.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- [8] 蔡宝立,张富国,张心平,等. *应用与环境生物学报*, 1998, **4**:286~289.
- [9] Holt J G, Krieg N G, Sneath P H A. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (9th Ed), Willims & Wilkings, Baltimore, 1994.
- [10] Shao Z Q, Seffens W, Mulbry W, *et al.* *J Bacteriol*, 1955, **177**:5748~5755.
- [11] 蔡宝立,高才昌,焦瑞身. *环境科学学报*, 1984, **4**:291~295.
- [12] de Souza M L, Wackett L P, Boundy-Mills K L, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**:3373~3378.