

# 极端污染环境下草甘膦抗性菌株 HTG7 的筛选 及其特性研究\*

刘 柱<sup>1,2</sup> 梁爱敏<sup>2</sup> 张 维<sup>2</sup> 平淑珍<sup>2</sup> 陈 明<sup>2</sup>

(四川大学生命科学学院 成都 610064)<sup>1</sup> (中国农业科学院生物技术研究所 北京 100081)<sup>2</sup>

**摘要:** 从被草甘膦极度污染的土壤中分离到一株极端抗草甘膦菌 HTG7, 经初步鉴定其为可变盐单胞菌 (*Halomonas varabilis*), 该菌株最高可以耐受 500mmol/L 左右的草甘膦浓度。电镜观察表明, 550mmol/L 的草甘膦浓度下, 细胞大量坏死。生理生化特性表明该菌最适 pH 为 7.0, 并且在氯化钠浓度 0~10% 生长良好。

**关键词:** 可变盐单胞菌, 草甘膦, 生物抗性

**中图分类号:** Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 01-0035-05

\* 国家高技术研究发展计划项目 (“863” 项目) (No. 2001AA214231)

Project of Chinese National Progress for High Technology Research and Development (No. 2001AA214231)

国家转基因植物研究与产业化专项资助 (No. JOO-A-010)

作者还有: 陆 伟<sup>2</sup> 徐玉泉<sup>2</sup> 杨志荣<sup>1</sup> 林 敏<sup>2,\*</sup>

\* \* 联系人 Email: linmin57@vip.163.com

收稿日期: 2002-11-18, 修回日期: 2002-12-24

## SEPARATION AND CHARACTERIZATION OF GLYPHOSATE-TOLERANT BACTERIAL STRAIN HTG7 FROM EXTREMELY POLLUTED ENVIRONMENT

LIU Zhu<sup>1,2</sup> LIANG Ai-Min<sup>2</sup> ZHANG Wei<sup>2</sup> PING Shu-Zhen<sup>2</sup> CHEN Ming<sup>2</sup> LU Wei<sup>2</sup>  
XU Yu-Quan<sup>2</sup> YANG Zhi-Rong<sup>1</sup> LIN Min<sup>2</sup>

(College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064)<sup>1</sup>

(Institute for Application of Atomic Energy, CAAS, Beijing 100094)<sup>2</sup>

**Abstract:** Bacterial strain HTG7 was isolated from extremely glyphosate-polluted soil. It was identified as *Halomonas varabilis* preliminarily. It could tolerate in 500 mmol/L glyphosate concentration. Micrograph of HTG7 demonstrated that almost no cells lived well in the 550 mmol/L glyphosate concentration. General characterization of strain HTG7 showed that the optimal pH was 7.0. It grew well in the NaCl concentration range from 0 to 10%.

**Key words:** *Halomonas varabilis*, Glyphosate, Bioresistance

草甘膦(N-phosphonomethyl-glycine, 简称 Glyphosate)是一种优秀的内吸传导型, 广谱灭生性除草剂。它具有在目标植物中良好的输导性, 在环境中不破坏土壤结构等特点。自70年代中期商品化以来, 草甘膦广泛用于50多种作物种植前、种植后的处理, 成为全世界除草剂使用量最大的品种之一。但它作为非选择性除草剂, 同样会杀死农作物, 这大大限制了草甘膦在农业生产中的应用范围。转基因抗草甘膦作物的培育成功, 既大大减少了田间杂草使用草甘膦的用量, 降低了除草费用, 也为解决杂草抗性找到了有效的方法, 为草甘膦的应用发展开辟了新的途径。

当前抗草甘膦基因资源比较单一, 如何克隆草甘膦抗性新基因, 转化植物获得抗草甘膦作物新品种显得尤为重要。在自然环境中, 特别在长期受高浓度草甘膦污染的土壤中, 存在种类繁多, 能耐受草甘膦的菌株。从耐受菌株中克隆基因, 转化作物获得抗草甘膦作物新品种是行之有效的重要途径。很多学者在这方面进行了研究<sup>[1-3]</sup>。本文报道一株能在高浓度的草甘膦中生长的细菌, 这将对进一步了解草甘膦的作用机制以及开发培育抗草甘膦作物品种以扩大其使用范围、提高对作物选择性均有意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要实验材料

污泥取自河北某草甘膦生产厂分装点(草甘膦浓度为10%的土壤中), 内切酶、载体 pGEM-Teasy、连接酶、dNTP、IPTG、酚等购于 Promega 公司; pGEM-3zf (-) 及菌株 JM109 由中国农业科学院原子能利用研究所生物技术室提供。

### 1.2 主要溶液配制

富集培养基: 固体 LB 培养基: 蛋白胨 10g, 酵母提取膏 5g, NaCl 10g, 琼脂 15g, pH6.8, 用蒸馏水定容至 1L; 筛选培养基: M9 固体培养基:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  12.8g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3g, NaCl 0.5g,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1g, 琼脂 15g, 用蒸馏水定容至 1L; M9 液体培养基不加琼脂。

### 1.3 菌株的分离与表型鉴定

样品接种在草甘膦终浓度 (100mmol/L, 200 mmol/L, 300 mmol/L, 400 mmol/L, 500 mmol/L, 550 mmol/L) 的 M9 液体培养基中, 30℃, 200r/min 摇瓶振荡培养 2d, 稀释菌

液,然后在草甘膦浓度为 200 mmol/L 的 M9 固体培养基上涂板,挑取单菌落反复划线纯化后接种在 LB 固体培养基上。对筛选出的单一菌株进行细菌形态、生理生化综合特征表型鉴定。包括革兰氏染色、细胞形态、形成芽孢鞭毛及数量、接触酶、VP 试验、吲哚试验, O/F 试验等。

#### 1.4 菌株分子鉴定

提取细菌总 DNA,以 DNA 为模板,用引物 F27: 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3',引物 R1492 5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3',PCR 扩增出 16S rDNA。产物经纯化,用 pGEM-Teasy 连接,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞。16S rDNA 测序由上海基康公司完成。将测序结果用 BLAST 软件与 Genbank 中 16S rDNA 序列进行同源性比较,并用 DNAMAN V4 软件的 Multiple Sequence Alignment 进行同源性分析。菌株 HTG7 的 16S rDNA 在 Genbank 上的序列号为 AY204638。

#### 1.5 生理特性的研究

将菌株 HTG7 接种到草甘膦终浓度 (100 mmol/L, 200 mmol/L, 300 mmol/L, 400 mmol/L, 500 mmol/L, 550 mmol/L) M<sub>9</sub> 液体培养基中,并以不加草甘膦的 M<sub>9</sub> 液体培养基为对照,30℃,200r/min,摇瓶振荡。用不同草甘膦终浓度的 M<sub>9</sub> 液体培养基中生长 48h 的菌制成超薄切片后用 JEM-1200EX 型透射电镜观测和拍摄。将菌株 HTG7 接种于不同 pH (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14) 的 M<sub>9</sub> 液体培养基中,在 30℃ 条件下摇瓶培养 12 h;将菌株 HTG7 接种于不同氯化钠浓度 (0, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%) 的 LB 液体培养基中,在 30℃ 条件下摇瓶培养 12 h。菌体生长量测定以波长为 600nm 的 OD 值表示。

## 2 结果

### 2.1 菌株的筛选与鉴定

通过对菌株的富集培养与划线分离、纯化,再用筛选培养基在不同草甘膦浓度下对这些菌进行筛选,得到 1 株抗草甘膦能力极强的菌株 HTG7,其抗草甘膦的最高浓度可达 500 mmol/L。菌株 HTG7 在固体培养基上为革兰氏染色阴性,细胞为杆状,无芽孢。将 HTG7 菌株的 16S rDNA 序列在 Genbank 中进行同源性检索,发现在最相近的 100 个序列中,前 48 个均为盐单胞菌属细菌,HTG7 与它们的同源性为 95% ~ 98%,未鉴定的细菌占 18%,其余为 *Chromohalobacter* 属和 *Pseudomonas* 属,并且 HTG7 与 *Halomonas varabilis* 核苷酸序列同源性达 98%,初步鉴定为盐单胞菌属 *varabilis*。

### 2.2 草甘膦浓度对 HTG7 生长的影响

为了验证菌株在不同草甘膦终浓度 M<sub>9</sub> 液体培养基中的生长,我们绘制了菌株的生长曲线图 (图 1)。在不加草甘膦

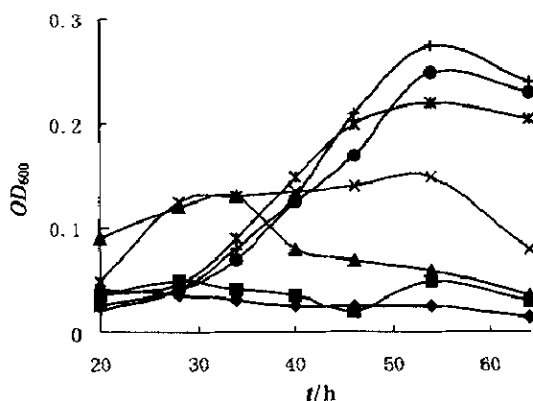


图 1 不同草甘膦浓度的 M9 培养基对抗性菌株 HTG7 生长的影响

◆ 0mmol/L, ■ 100mmol/L, ▲ 200mmol/L,  
× 300mmol/L, \* 400mmol/L, ● 450mmol/L,  
+ 500mmol/L

或在草甘膦浓度 300 mmol/L 以下, 菌株生长极差。当草甘膦浓度高于 500 mmol/L (如 550 mmol/L), 菌株生长完全受到抑制。HTG7 在草甘膦中的最适生长浓度为 400 ~ 500 mmol/L。说明该菌株不仅对草甘膦有极端抗性, 而且具有类似于细菌噬盐特性的噬草甘膦的生长特性。这种噬草甘膦特性至今尚无相关报道。

### 2.3 不同草甘膦浓度下菌株的电镜切片观察

在草甘膦终浓度为 300 mmol/L 的液体培养基中, HTG7 菌的细胞能进行正常的生长分裂、增殖, 原生质体中内含物多, 颜色较深 (图 2a); 草甘膦终浓度为 450 mmol/L 时, 部分细胞出现坏死, 细胞开始萎缩、破碎, 细胞膜开始破裂, 内含物渗出, 处于分裂状态细胞数目明显减少 (图 2b); 当草甘膦终浓度达到 550 mmol/L 时, 大量细胞坏死, 细胞质大量渗出, 只有极少数细胞能正常生长 (图 2c)。由此可以推断, 菌株不能耐受 550 mmol/L 以上草甘膦浓度, 是因为溶液中渗透压太高, 使细胞膜中内含物大量渗出所致, 导致细胞无法正常生长, 而并非草甘膦对菌株具有杀死作用。

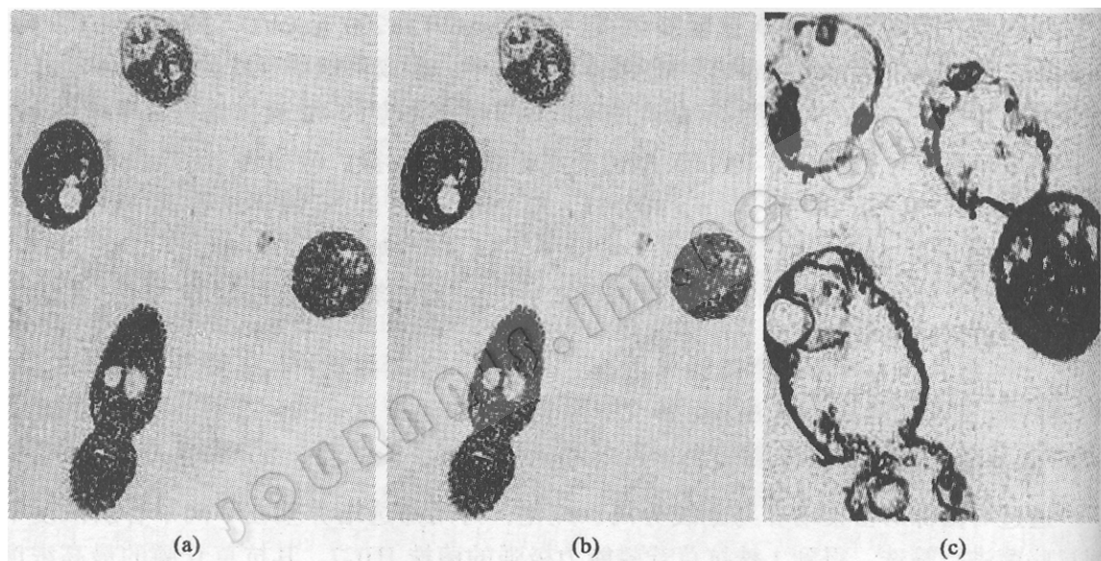


图2 不同草甘膦浓度下菌株的电镜切片观察

(a) 300 mmol/L 的草甘膦浓度下菌株的电镜观察 (1,5000 ×), (b) 450 mmol/L 的草甘膦浓度下菌株的电镜观察 (1,5000 ×), (c) 550 mmol/L 的草甘膦浓度下菌株的电镜观察 (2,5000 ×)

### 2.4 pH 的影响

菌株 HTG7 的生长在 pH6.0 ~ 12 之间比较稳定, 其中在 pH7.0 时效果最佳, 菌体生长  $OD_{600}$  为 1.45。此结果说明菌体 HTG7 是一株中性菌, 但其在碱性环境中能较好的生长 (图 4)。

### 2.5 不同氯化钠浓度对菌株生长的影响

菌株在氯化钠浓度为 0 ~ 10% 的条件下生长良好, 其中在 NaCl 浓度为 5% 时生长最好,  $OD_{600}$  为 1.6 (图 5)。说明了该菌也是中度耐盐菌, 同样具有其他中度耐盐菌的某些特征。

## 3 结论

目前, 有关微生物耐受或降解草甘膦的研究已有报道。国外报道节杆菌 *Arthrobacter* sp.、大肠杆菌 *E. coli* 及耶尔森氏杆菌 *Yersinia enterocolitica* 中, 都有抗草甘膦突变菌

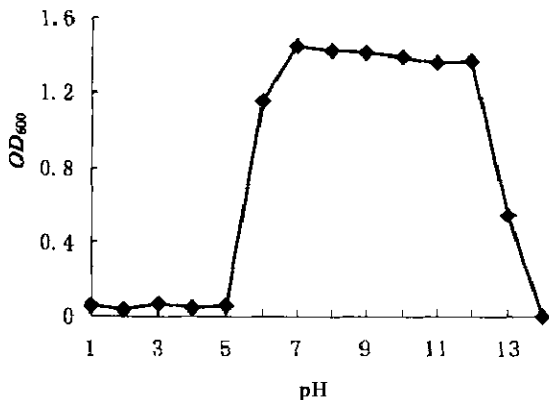


图3 不同 pH 值对菌株 HTG7 生长的影响

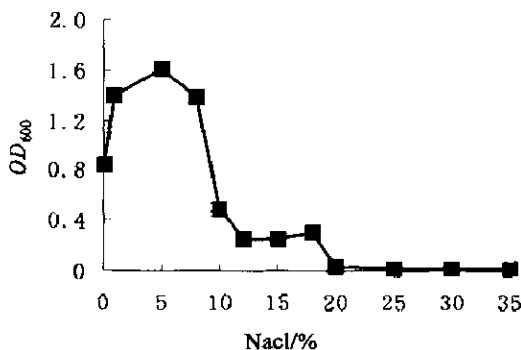


图4 不同 NaCl 浓度对菌株 HTG7 生长的影响

株<sup>[4-6]</sup>。通过克隆其 *aroA* 基因转入 *aroA* 缺陷型大肠杆菌, 获得了抗草甘膦的表达。Joseph 等也能以草甘膦为唯一磷源的假单胞菌 *Pseudomonas* sp. 中克隆到一个可使细菌耐受低浓度草甘膦的基因 *igrA*, 该基因不同于原先所克隆到的 *aroA* 基因<sup>[7]</sup>。不过他们所报道的草甘膦抗性菌株对草甘膦的耐受浓度均在 200 mmol/L 以内, 远不如本文报道的盐单胞菌 HTG7 的最佳抗草甘膦浓度 300 ~ 500 mmol/L, 最高草甘膦负荷量 500 mmol/L 的水平。而且该菌株对于各种环境条件包括温度、酸碱度及对氯化钠耐受浓度的适应性较强, 是一株良好的草甘膦耐受菌。

### 参考文献

- [1] O'Connell C, Pattee P A, Foster T J. J Gen Microbiol, 1993, **139**: 1449 ~ 1460.
- [2] Duncan J M, Pierre M, Gordon D, et al. J Bacteriol, 1998, **170**: 2467 ~ 2461.
- [3] Hugh G G, Annette M G. J Gen Microbiol, 1991, **137**: 113 ~ 121.
- [4] Huynh Q K, Kishore G M, Bild C S. J Biol Chem, 1988, **263**: 735 ~ 739.
- [5] O' Geora P, Maskel D, Coleman D, et al. Gene, 1989, **84**: 23 ~ 30.
- [6] Pipke R, Anurheim N, Jacob G S, et al. Eur J Biochem, 1987, **165**: 267 ~ 273.
- [7] Fitzgibbon, Braymer H D. Appl Environ Microbiol, 1990, **56**: 3382 ~ 3388.

### 重要声明

为适应国家信息发展的需要, 加强信息交流, 本刊已加入“中国学术期刊(光盘版)”、“中国期刊网”、“中文科技期刊数据库”。本刊现在除发行印刷版《微生物学通报》外, 还同时以电子版等形式出刊。如作者不同意将文章版权转让于本刊并编入数据库, 请在来稿时声明, 本刊将作适当处理。