

基因工程菌对阿特拉津的生物转化及其影响因素*

刘 春 黄 霞** 王 慧

(清华大学环境科学与工程系环境模拟与污染控制国家重点实验室 北京 100084)

摘要: 研究考察了基因工程菌转化阿特拉津的共代谢碳源、转化动力学和影响因素。结果表明, 作为共代谢碳源, 葡萄糖优于乙酸盐, 碳源浓度对转化影响不大, 对工程菌生长影响显著。阿特拉津比转化速率与工程菌初始密度无关, 与阿特拉津初始浓度有关, 用 Monod 方程拟合转化动力学, 求得方程参数为 $V_{\max} = 0.168/\text{h}$, $K_s = 30.49\text{mg/L}$ 。降低温度会显著降低阿特拉津比转化速率; 偏碱性的条件下, 阿特拉津转化率较高, 酸性条件严重抑制阿特拉津转化; 盐度在一定范围内不影响转化活性; Co^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Zn^{2+} 促进阿特拉津转化, Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Cu^{2+} 抑制阿特拉津转化。菌株细胞对阿特拉津的吸附和转化作用呈正相关关系。

关键词: 基因工程菌, 阿特拉津, 生物转化

中图分类号: X173 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2007) 01-0010-05

The Biotransformation of Atrazine and Influence Factors by Genetically Engineered Microorganism*

LIU Chun HUANG Xia** WANG Hui

(ESPC State Key Joint Laboratory, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084)

Abstract: The co-metabolic carbon sources, dynamics and influence factors of atrazine biotransformation by genetically engineered microorganism (GEM) were investigated in the paper. The results showed that glucose was superior to acetate as co-metabolic carbon sources. The concentration of carbon sources affected little on atrazine transformation but much on GEM growth. The specific transformation rate (STR) of atrazine was influenced not by cell density of GEM but by atrazine concentration. Monod model was used to simulate atrazine transformation dynamics and the parameters were $v_{\max} = 0.168/\text{h}$ and $K_s = 30.49\text{mg/L}$. When temperature reduced, STR decreased markedly. The transformation was efficient in weak alkaline condition and was inhibited in acidic condition. To some extent, salinity did not affect transformation activity of GEM. Co^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , and Zn^{2+} improved atrazine transformation, but Mn^{2+} , Ni^{2+} and Cu^{2+} inhibited atrazine transformation. The results also showed that there existed a direct correlation between adsorption and transformation of atrazine by GEM.

Key words: Genetically engineered microorganism (GEM), Atrazine, Biotransformation

阿特拉津是使用最广泛的一种除草剂, 在田间施用后, 会在田间残留, 并且从土壤中迁移到地下水层, 造成污染^[1,2]。阿特拉津生产废水的不当排放, 也会危及农作物, 造成严重的污染事故^[3,4]。由于阿特拉津的难生物降解性, 传统的生物处理方式难以达到稳定高效的处理效果^[5-7]。本研究所采用基因工程菌 pMD4 对阿特拉津进行生物转化。工程菌 pMD4 可以将阿特拉津转化为羟基阿特拉津^[8], 大大降低阿特拉津的生物毒性, 提高生物可降解性。该工程菌可以充分表达脱氯水解酶基因, 在土壤生物修复中对阿特拉津具有较高

的转化活性^[9], 但是还缺乏在废水生物强化处理中转化特性的研究。本研究考察了在污水处理应用中, 工程菌 pMD4 转化阿特拉津的共代谢碳源、转化动力学以及环境因素的影响, 为利用该基因工程菌进行阿特拉津废水生物强化处理摸索条件。

1 材料与方法

1.1 菌株

基因工程菌 pMD4 受体细胞为大肠杆菌 DH5 α , 质粒载体为 pACYC184, 含有阿特拉津脱氯水解酶基因, 对氯霉素有抗性。菌株由南开大

* 国家重点基础研究发展计划 (973) 项目 (No. 2004CB418506)

** 通讯作者 Tel: 010-62772324, E-mail: xhuang@tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2006-02-27, 修回日期: 2006-06-15

学蔡宝立教授赠送。

1.2 培养和转化实验

菌株培养：挑单菌落于 LB 培养基中（内含 25 μg/mL 氯霉素），在 37℃，120 ~ 140 r/min 摇床转速下过夜培养，离心，磷酸缓冲液洗涤（pH 7.0），收获细胞，制成菌悬液备用。

菌密度测定：首先在不同菌密度条件下，测得菌密度（mg 细胞干重/mL）与 600 nm 波长下的光密度（OD）值的标准曲线。然后在实验中，通过测定 600 nm 波长下的 OD 值，计算菌细胞的密度。

转化：转化培养基为基础无机盐培养基^[10]加入一定浓度的阿特拉津和共代谢碳源，然后加入一定量的菌悬液，在一定的温度和 120 ~ 140 r/min 摇床转速下培养，测定体系中的阿特拉津浓度和菌密度随时间的变化。

1.3 吸附实验

菌体细胞对阿特拉津的吸附量通过向阿特拉津溶液投加一定量的菌细胞，120 ~ 140 r/min 摇床振荡培养 10 min 后，测定阿特拉津浓度的减少求得。在短时间内，可以认为菌体细胞的生物转化作用还没有发挥，而仅仅存在吸附作用。

1.4 比转化速率的计算

基因工程菌对阿特拉津的转化活性，用比转化速率来反映。在转化实验开始的 6h 内，菌细胞的密度变化不大，因此取这一段时间内阿特拉津的转化速率与平均菌密度的比值，作为比转化速率。

1.5 阿特拉津检测方法

含阿特拉津的水样用 0.45 μm 的滤膜过滤后，采用 HP1050 型 HPLC 进行检测，色谱柱为 RP C18 反相柱，检测器为二极管阵列检测器，检测条件为：流动相比为甲醇：水 = 70:30，检测波长为 223 nm。

2 结果与讨论

2.1 基因工程菌对阿特拉津转化的共代谢碳源

工程菌 pMD4 细胞内仅含有阿特拉津脱氯水解酶基因，不能利用阿特拉津作为唯一碳源和能源，需要提供其它碳源。研究中，选取葡萄糖代表糖类碳源，选取乙酸盐代表小分子挥发性有机酸碳源，作为共代谢碳源。两种碳源都考察了两个浓度：200 和 400 mg/L（以 COD 计）。在 37℃，初始菌密度为 0.018 ~ 0.020 mg 细胞干重/mL（采取

较低的投菌量，以使得工程菌的生长有比较明显的差异），阿特拉津浓度约为 20 mg/L 时，比较了两种共代谢碳源对基因工程菌生长和阿特拉津转化的影响。

如图 1 所示，在浓度同为 200 mg/L 时，葡萄糖条件下，工程菌生长没有明显的停滞期，6h 时的比生长速率为 0.223/h，而且可以达到比较高的稳定细胞密度，阿特拉津的比转化速率为 0.0263/h，24h 的转化率为 60.9%；乙酸盐条件下，基因工程菌的生长有一定的停滞期，初期比生长速率很低，6h 时为 0.0192/h，不及葡萄糖碳源的 10%，12h 时也仅为 0.196/h，而且稳定的细胞密度也相对较低，阿特拉津的比转化速率为 0.0149/h，24h 的转化率为 53.5%。因此，无论是对工程菌的生长，还是阿特拉津转化，葡萄糖都要优于乙酸盐。

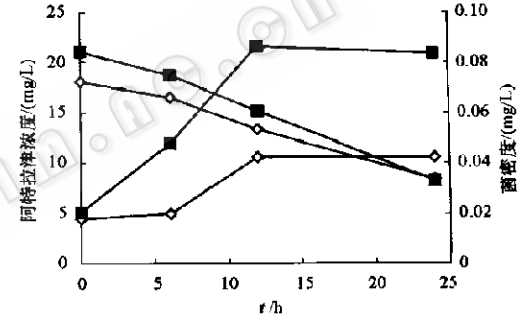


图 1 不同共代谢碳源下基因工程菌的生长和阿特拉津转化

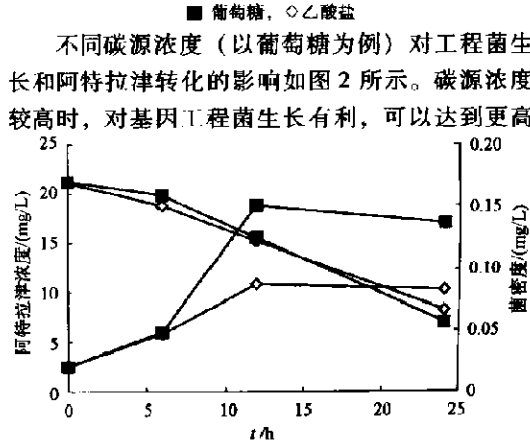


图 2 不同碳源浓度下（葡萄糖）基因工程菌的生长和阿特拉津的转化

的稳定细胞密度, 不过对阿特拉津的转化影响不显著。乙酸盐条件下有相同的结果。

2.2 基因工程菌对阿特拉津的转化动力学

在 37℃ 时, 分别测定了不同的阿特拉津初始

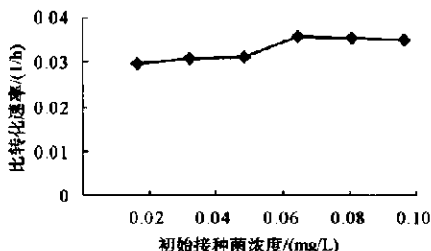
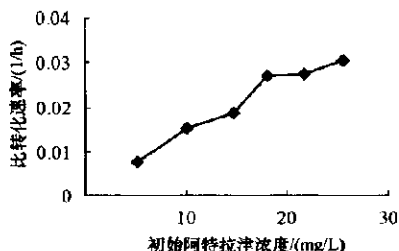


图3 不同阿特拉津初始浓度和不同接种菌细胞密度下的比转化速率

可以看到, 工程菌初始密度不变, 阿特拉津初始浓度升高, 比转化速率也随之升高; 阿特拉津初始浓度不变, 工程菌初始密度增大, 比转化速率却变化不大。在一定条件下, 工程菌对阿特拉津转化动力学基本符合 Monod 方程:

$$V = V_{\max} \frac{S}{K_s + S} \quad (1)$$

式中, V -比转化速率 (1/h), S -阿特拉津浓度 (mg/L), V_{\max} -最大比转化速率 (1/h), K_s -半饱和常数 (mg/L)。

用 Monod 方程拟合不同阿特拉津初始浓度下的比转化速率的数据, 如图 4 所示。

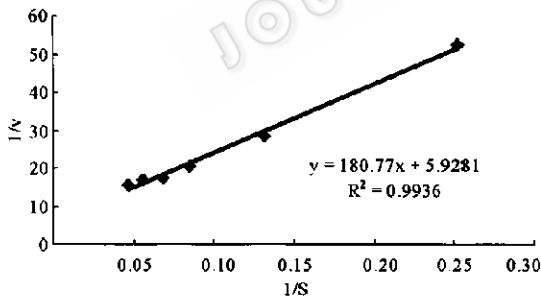


图4 阿特拉津转化动力学的 Monod 方程拟合

可以得到 Monod 转化动力学方程的参数为 $V_{\max} = 0.168/\text{h}$, $K_s = 30.49 \text{ mg/L}$ 。 V_{\max} 越高而 K_s 越低, 表明物质越容易转化。从拟合得到的参数看, 虽然和大多数容易降解的物质相比 (如葡萄糖 $V_{\max} = 0.35 \sim 0.49/\text{h}$, $K_s = 8 \sim 29 \text{ mg/L}$) 还稍难降解, 但是已经超过脱脂乳 ($V_{\max} = 0.12/\text{h}$, $K_s = 100 \text{ mg/L}$) 的降解性水平, 甚至接近了乳糖的降解性水平 ($V_{\max} = 0.20 \sim 0.53/\text{h}$, $K_s = 33 \sim 55 \text{ mg/L}$), 说明阿

特拉津相对于基因工程菌已经不是难降解物质, 基因工程菌具有很好的阿特拉津脱氮转化能力。

浓度 (工程菌初始密度为 0.03 mg 细胞干重/ mL) 和不同的工程菌密度 (阿特拉津浓度为 20 mg/L) 条件下的比转化速率, 以葡萄糖作为共代谢碳源, 如图 3 所示。

2.3 环境因素对阿特拉津转化的影响

2.3.1 温度对阿特拉津转化的影响: 在相同的阿特拉津初始浓度 (20 mg/L) 和工程菌初始密度 (0.03 mg 细胞干重/ mL) 下, 测定了 4 个温度条件下基因工程菌对阿特拉津转化的平均比转化速率, 结果如图 5 所示。可以看到, 温度对工程菌的转化活性具有显著的影响, 随着温度的降低, 比转化速率也有大幅度的下降。在废水生物强化处理中, 实际的温度会低于基因工程菌的适宜生长温度 (37°C), 对于发挥基因工程菌的生物强化作用不利。

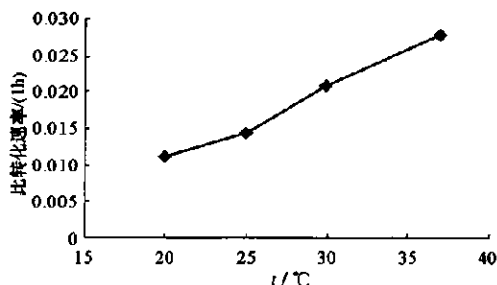


图5 温度对工程菌阿特拉津转化活性的影响

2.3.2 pH 值对阿特拉津转化的影响: 37°C , 阿特拉津初始浓度为 20 mg/L , 工程菌初始密度为 0.03 mg 细胞干重/ mL 时 (以下盐度、金属离子影响的转化实验条件与此相同), 测定了不同 pH 值条件下, 基因工程菌对阿特拉津 24 小时的转化率, 结果如图 6 所示。

在中性和偏碱性条件下, 工程菌对阿特拉津

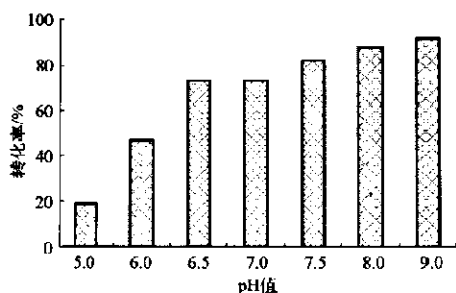


图6 不同pH值下工程菌对阿特拉津的转化率

表现出很好的转化活性,但是在偏酸性条件下,转化活性就会受到严重抑制。而且在转化过程中体系pH值不断下降,初始碱性稍强的体系有利于在整个转化过程中保持中性或偏碱性,因此也有利于工程菌保持转化活性。体系pH值下降的原因可能有两个: NH_4^+ 离子作为氮源被利用后造成pH值下降;基质代谢利用过程中的一些酸性产物造成pH值下降^[11]。

2.3.3 盐度对转化的影响:阿特拉津生产废水中,盐含量往往可以高达4% (w/v),高盐度可能会对工程菌转化活性产生影响。因此,比较了1%、2%、4% (w/v) 3个盐度条件下,工程菌的转化活性,如图7所示。

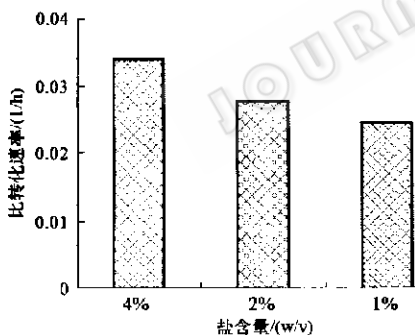


图7 盐度对工程菌转化活性的影响

可以看到,和纯酶相比,相同的影响是 Co^{2+} 和 Fe^{2+} 促进了阿特拉津的转化, Mn^{2+} 对转化略有影响, Ni^{2+} 使转化率减低一半, Cu^{2+} 完全抑制了阿特拉津的转化。不同的影响是 Fe^{3+} 和 Zn^{2+} 没有降低或者抑制阿特拉津的转化率,相反还对转化有促进作用。实验中 Fe^{3+} 和 Zn^{2+} 的离子浓度还略高于纯酶条件下的离子浓度,说明酶存在于完整细胞中会降低或避免金属离子对酶活性的不利

可以看到,3个盐度条件下,工程菌的转化活性略有差异,盐度较高时,比转化速率较大。造成这种情况的原因是:一方面,在高盐度条件下,大肠杆菌可以通过在细胞内产生和累积海藻糖,来适应高盐度的环境条件^[12],因此在本研究的盐度范围内,高盐度不会影响细胞的转化活性;另一方面,高盐度造成溶液的离子强度增加,从而减小了阿特拉津的溶解性^[1],有利于增加细胞对阿特拉津的吸附转化。

2.3.4 金属离子对阿特拉津转化的影响:工程菌所表达的阿特拉津脱氯水解酶属于酰胺水解酶蛋白族,是一种金属酶,纯酶活性受到很多金属离子的影响,比如 Co^{2+} 和 Fe^{2+} 可以使酶活性增加将近一倍,而 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 对酶活性基本没有影响, Fe^{3+} 和 Ni^{2+} 可以使酶活性降低一半, Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 则基本完全抑制了酶的活性^[13]。基因工程菌细胞内的脱氯水解酶活性也会受到金属离子影响,因此考察了不同金属离子对基因工程菌转化阿特拉津的影响。分别选取 Co^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 7种离子,离子浓度均为20 mg/L (以离子计),测定了工程菌对阿特拉津24h的转化率,如图8所示。

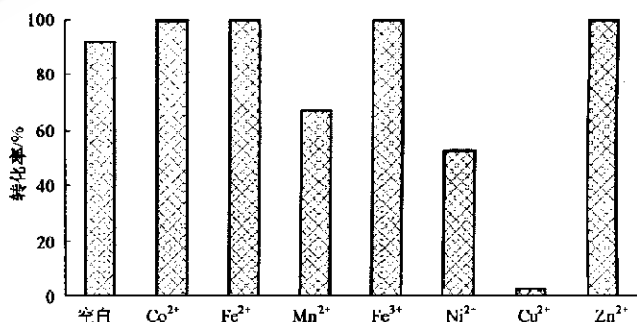


图8 不同金属离子对阿特拉津的转化率的影响

影响。

2.4 阿特拉津的吸附与转化活性的关系

工程菌细胞投加到反应体系中,对阿特拉津有明显的吸附作用,吸附量除了和温度、浓度等因素有关外,还受到作为吸附剂的菌体细胞的影响。将不同培养条件下(温度、生长阶段不同)获得的工程菌细胞在相同的条件下(阿特拉津初始浓度20 mg/L和工程菌投加密度0.03 mg/细胞干

重/mL, 37℃), 对阿特拉津的吸附量和比转化速率进行比较, 可以看到, 在相同的环境条件下, 细胞吸附量和比转化速率是呈正相关的, 如图9所示。同时, 没有转化活性的高温灭活的工程菌细胞和普通大肠杆菌细胞完全没有吸附作用。工程菌细胞的吸附作用和转化过程密切相关, 这种关系的内在机制可能是细胞内的转化酶决定了吸附量和转化活性, 而细胞内表达的转化酶的数量和活性由于培养和收获条件的不同而有所差异。

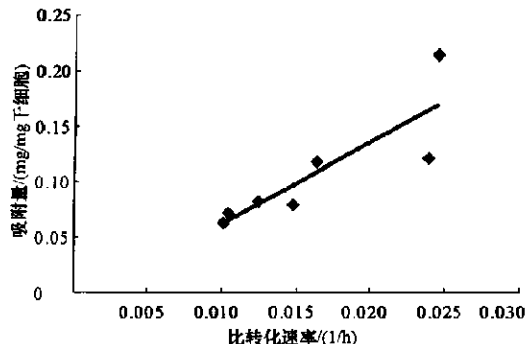


图9 工程菌对阿特拉津的吸附与转化的关系

3 结论

(1) 作为共代谢碳源, 葡萄糖比乙酸盐更有利于基因工程菌生长和阿特拉津转化; 碳源浓度对转化的影响不大, 对工程菌生长的影响显著。(2) 基因工程菌的比转化速率与工程菌初始密度无关, 与阿特拉津初始浓度有关。用 Monod 方程拟合转化动力学过程, 求得方程参数为 $V_{\max} = 0.168/\text{h}$, $K_s = 30.49 \text{ mg/L}$ 。(3) 随着温度的下降, 比转化速率显著降低; pH 值在偏碱性的条件

下, 工程菌的转化活性最高, 酸性条件严重抑制工程菌转化活性; 在本实验范围内, 高盐度没有对工程菌转化活性产生不利影响; Co^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Zn^{2+} 促进了阿特拉津的转化, Mn^{2+} 对转化略有影响, Ni^{2+} 使转化率减低一半, Cu^{2+} 完全抑制了阿特拉津的转化。(4) 菌体细胞对阿特拉津的吸附量和比转化速率呈正相关, 吸附和转化是密切相关的过程。

参考文献

- [1] 弓爱君, 叶常明. 环境科学进展, 1997, 5 (2): 37 ~ 47.
- [2] 蔡宝立, 黄今勇. 生物工程进展, 1999, 19 (3): 7 ~ 11.
- [3] 任晋, 蒋可. 科学通报, 2002, 47 (10): 758 ~ 762.
- [4] Ren J, Jiang K. Bulletin of Environmental Contamination Toxicology, 2002, 68: 893 ~ 900.
- [5] Protzman R S, Lee P H, Ong S K, et al. Water Research, 1999, 33: 1399 ~ 1404.
- [6] Kontchou C Y, Geschwind N. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1999, 43: 47 ~ 56.
- [7] Ghosh P K, Philip L. Water Research, 2004, 34: 2277 ~ 2284.
- [8] De Souza M L, Wackett L P. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61 (9): 3373 ~ 3378.
- [9] Strong L C, McTavish H, Sadowsky M J, et al. Environmental Microbiology, 2000, 2 (1): 91 ~ 98.
- [10] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验. 北京: 科学出版社, 2002. 143.
- [11] 李军, 杨秀山. 微生物与水处理工程. 北京: 化学工业出版社, 2000. 83.
- [12] Shapir N, Mandelbaum R T, Gottlieb H. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 1998, 20: 153 ~ 159.
- [13] Seffernick J L, McTavish H, Osborne J P, et al. Biochemistry, 2002, 41: 14430 ~ 14437.

关于测序类论文的投稿说明

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请作者先通过计算机网络进入国际基因库 EMBL (欧洲) 或 GenBank (美国) 或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库接受号 (Accession No.) 后再投稿, 谢谢!