

阿特拉津降解菌 *Acinetobacter* sp. DNS32 对无机氮源的响应

王志刚^{1,2} 张颖^{2*} 郭火生² 伊欢¹

(1. 齐齐哈尔大学 生命科学与农林学院 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

(2. 东北农业大学 资源与环境学院 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:【目的】研究 *Acinetobacter* sp. DNS32 的生长、阿特拉津降解能力和降解基因转录水平的表达对无机氮素的响应关系,为菌株的工程应用提供指导与理论基础。【方法】以 *Acinetobacter* sp. DNS32 为对象,采用摇瓶法研究菌株在阿特拉津培养基中菌株生长情况及降解能力对外加硝态氮与铵态氮的响应关系,利用荧光定量 PCR 技术检测 DNS32 降解基因表达量对外加无机氮源的响应关系。【结果】外加无机氮源可以促进 DNS32 菌株的生长,提高阿特拉津降解能力,无机氮源对 DNS32 菌株的 *trzN*、*atzB* 和 *atzC* 3 种降解基因表达均有促进作用,加入无机氮源的试验处理中 DNS32 菌株 *trzN* 基因的表达量最高可达对照的 11.252 ± 2.408 倍,推断 DNS32 菌株的这 3 种降解基因所编码的酶是稳定表达的组成酶。【结论】DNS32 降解阿特拉津不受“氮饥饿”诱导机制调控,且无机氮源的存在对菌株的生长与降解有促进作用,因此菌株在土壤修复实践中具有广阔的应用前景。

关键词: 阿特拉津, *Acinetobacter* sp. DNS32, 无机氮源, 降解能力, 基因表达

Response of an atrazine-degrading bacterium strain *Acinetobacter* sp. DNS32 to inorganic nitrogen source

WANG Zhi-Gang^{1,2} ZHANG Ying^{2*} GUO Huo-Sheng² YI Huan¹

(1. College of Life Science and Agriculture & Forestry, Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang 161006, China)

(2. College of Resource & Environment, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

Abstract: [Objective] The objective was to study the response relationship between the growth, degradation ability and gene expression of *Acinetobacter* sp. DNS32 and inorganic nitrogen source, and to provide guidance and theoretical foundation for engineering application of strain DNS32. [Methods] Taked *Acinetobacter* sp. DNS32 for research object, the effect of inorganic nitrogen source were studied on the growth and degradation ability of strain DNS32 by the bottle shaking method, and the influence of inorganic nitrogen on the expression of the degrading genes was studied by RT-qPCR. [Results] The results showed that the inorganic nitrogen in culture medium could promote the growth and the ability to degrade atrazine of DNS32 strain. The inorganic nitrogen could increase the expression of the *trzN*, *atzB* and *atzC*. Compared with the control treatment, the

基金项目: 黑龙江省高校长江学者后备支持计划项目(No. 2012CJHB001, CSCP); 黑龙江省高校创新团队建设计划项目(No. 2013TD003)

*通讯作者: Tel: 86-451-55190993; 信箱: zhangyinghr@hotmail.com

收稿日期: 2013-10-02; 接受日期: 2013-11-18; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-11-26

expression of *trzN* gene in the treatments with inorganic nitrogen could be 11.25±2.40-folds. It was inferred that the atrazine-degrading enzyme coded by the three degrading genes may be constitutively in strain DNS32. **[Conclusion]** The degradation of atrazine in the strain DNS32 is not controlled by the induction mechanism of “nitrogen starvation”. The inorganic nitrogen can promote growth and degradation ability of strain DNS32. Therefore, strain DNS32 has broad application prospects in soil remediation practice.

Keywords: Atrazine, *Acinetobacter* sp. DNS32, Inorganic nitrogen source, Degradation ability, Gene expression

阿特拉津(Atrazine)是目前世界销售额最大的18个除草剂品种之一^[1-2],在土壤中的半衰期长,容易对一些后茬敏感作物产生药害^[3-4],已被列为环境荷尔蒙的可疑物质^[5-7],且对动物细胞具有遗传学毒性^[8]。因此,阿特拉津的生物修复技术已经成为了农药污染控制领域的研究热点。

氮源是微生物生命活动所不可缺少的营养要素,是构成重要生命物质蛋白质和核酸等的主要成分,许多微生物可以利用阿特拉津为氮源进行生长^[9-11],*Acinetobacter* sp. DNS32能够以阿特拉津为唯一氮源生长,且在低温下具有相对较高的降解能力^[12],有大量研究结果证明微生物降解阿特拉津存在“氮饥饿”诱导机制,Garcés等^[13]研究发现外加氮源抑制微生物群落对阿特拉津的降解,Sims G. K.^[14]和 Indesta K. J.等^[15]研究发现土壤中氮元素含量降低时,可以促进土壤中氮杂环物质的生物降解。在农业土壤环境中,氮素是重要成分,含量为0.5–3.0 g/kg^[16],因此当DNS32菌被应用于实际土壤修复的过程中时,阐释其降解效果与其他氮源物质的响应关系对于生物修复的可行性具有重要意义。本研究以*Acinetobacter* sp. DNS32为对象,研究了其生长、降解能力及降解基因转录与无机氮素的响应关系,旨在为该菌株的工程应用提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 菌株和培养基

Acinetobacter sp. DNS32为本实验室在长期使用阿特拉津的北方寒地黑土中分离获得的一株阿特拉津降解菌株,它通过降解基因 *trzN*、*atzB* 和

atzC 所编码的蛋白,能够将阿特拉津降解成氰尿酸^[12],已在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏,保藏编号为CGMCC No. 5365。

基础培养基(g/L): K₂HPO₄ 1.6, KH₂PO₄ 0.4, MgSO₄ 0.2, NaCl 0.1, 葡萄糖 3.0, 阿特拉津 0.1。

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 10, 调节 pH 到 7.0。

1.2 方法

1.2.1 菌株生长和降解能力对外加氮源的响应:用LB培养基培养DNS32菌体过夜,离心收集菌体,清除培养基,以无菌水重悬菌体,调节OD₆₀₀值至0.9作为种子,1%接菌量接入基础培养基培养,在阿特拉津含量为0.1 g/L的基础培养基中,以与阿特拉津等含氮量进行计算,分别加入不同浓度(0.1、1.0和2.0 g/L)的铵态氮[(NH₄)₂SO₄]与硝态氮(KNO₃),同时设置未加无机氮源及未接菌的对照实验,每隔8 h取样,测定OD₆₀₀值以及阿特拉津含量。

1.2.2 阿特拉津的测定:将含有阿特拉津的10 mL培养液倒入分液漏斗中,加入等体积的CHCl₃等体积萃取,浓度低于检出限的置于旋转蒸发仪中浓缩后用CHCl₃定容至1 mL待测。阿特拉津的检测采用岛津公司生产的GC-14C型气相色谱仪,FID检测器和N2000色谱工作站;色谱柱:内涂14%OV-1701大口径毛细管柱(300 mm×0.53 mm);温度条件:进样口250 °C,柱温200 °C,检测器250 °C,非程序升温;气体流量:氮气50 kPa,氢气50 kPa,空气50 kPa,尾吹100 kPa;不分流进样,进样量1 μL。利用峰高计算阿特拉津浓度^[17]。

1.2.3 荧光定量 PCR 测定降解基因的转录量: 按 1.2.1 中方法培养 DNS32 菌株种子,在阿特拉津含量为 100 mg/L 基础培养基中加入不同浓度的铵态氮与硝态氮,同时设置不加阿特拉津,只加外加氮源(NH₄)₂SO₄ 或 KNO₃ 的处理(0.1、1.0 和 2.0 g/L),均培养 12 h,使用 Omega 公司的 Bacterial RNA (R6950-01)试剂盒提取菌株 RNA,反转录反应体系为 20 μL,其中 2×RT buffer 10 μL,随机引物(100 μmol/L) 1 μL,RT-mix 1 μL,模板(RNA) 5 μL,DEPC 水 3 μL,反转录条件的设置为 25 °C 10 min,42 °C 60 min,85 °C 5 min。根据降解基因序列设计荧光定量 PCR 引物,内参引物选用细菌 16S rRNA 基因的 V3 区引物,所用引物见表 1。使用德国耶拿公司的 qTOWER 荧光定量 PCR 仪进行实验,反应体系为 50 μL,其中 2×RT buffer 25.0 μL,Primers (25 μmol/L) 0.6 μL×2,SYBR Green I (20×) 0.3 μL,模板(cDNA) 1.0 μL,DEPC 水 22.5 μL。扩增条件设置为:94 °C 4 min;94 °C 20 s,60 °C 30 s,72 °C 30 s,共 35 个循环;72 °C 检测信号。

2 结果与分析

2.1 氮源对 DNS32 生长及降解能力的影响

硝态氮和铵态氮是自然界中最普遍和最重要的氮源,他们影响着生物的细胞生长、代谢能力和对污染物的降解能力^[18],大量的研究表明无机氮源会抑制含氮有机污染物的生物修复^[19-20],

因此,找到降解能力与无机氮源之间的响应关系好的菌株是生物修复成功的关键。

由图 1 可知,硝态氮和铵态氮存在时均可促进 DNS32 菌株的生长,在整个生长周期内生物量均高于无机培养基对照,说明无机氮源与阿特拉津相比更易于被 DNS32 利用于生长代谢。无机培养基中 KNO₃ 含量为 1.0 g/L 和 2.0 g/L 时菌体 OD₆₀₀ 值均高于 0.1 g/L KNO₃ 的处理,而 KNO₃ 浓度超过 1 g/L 时并没有发现明显的促进生长的作用(图 1A);在无机培养基中(NH₄)₂SO₄ 浓度较高(1.0 g/L 和 2.0 g/L)时,菌体生长相比低浓度(0.1 g/L)有明显的抑制作用(图 1B),造成这种现象可能是由于以 KNO₃ 或(NH₄)₂SO₄ 为氮源时,菌体对 NO₃⁻或 SO₄²⁻的吸收利用,导致培养基 pH 略有上升^[21],从而影响菌体的生长。

由图 2 可知,不同浓度外加氮源处理的阿特拉津残留量均低于对照(AT-CK),KNO₃ 的不同浓度处理在 36 h 时将阿特拉津完全降解,较对照提前了 16 h;而加入(NH₄)₂SO₄ 的处理中,0.1 g/L 浓度处理在 44 h 时将阿特拉津完全降解,而 1.0 g/L 及 2.0 g/L 浓度处理降解速度慢于 0.1 g/L 处理,与 OD₆₀₀ 值的变化趋势一致,说明硝态氮与铵态氮对菌株 DNS32 降解阿特拉津的能力均表现为促进作用,但是高浓度铵态氮对菌株降解能力的促进作用减弱。

表 1 本试验中所用荧光定量 PCR 引物 Table 1 The quantitative real-time PCR primers used in this study			
基因 Genes	引物 Primers	序列 Sequences (5'→3')	片段大小 Fragment sizes (bp)
trzN	TrzNF	GTCTCCTCCAGTCGCTCC	178
	TrzNR	AGAAGCCACCTTCGCTCTTG	
atzB	AtzBF	CCCATCACCATTTTTTTCAGG	149
	AtzBR	CATGGACACCACTGTGCTGTG	
atzC	AtzCF	GGGCAAGACGATTATCGAA	165
	AtzCR	TGGGCTGTGATTAGTTGGG	
16S rRNA	F341	CCTACGGGAGGCAGCAG	250
	R518	ATTACGCGGCTGCTGG	

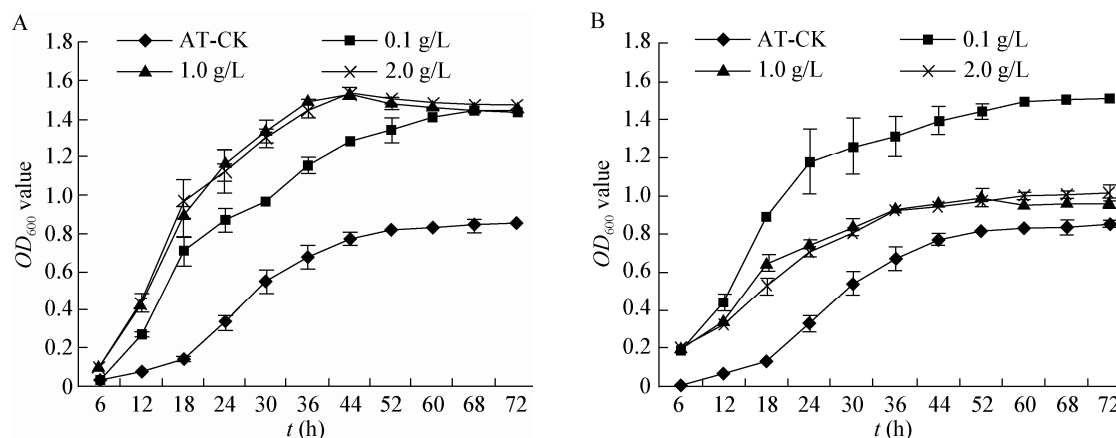


图 1 硝态氮(A)和铵态氮(B)对菌株 DNS32 生长的影响
Figure 1 The effect of nitrate (A) and ammonia (B) on growth of strain DNS32

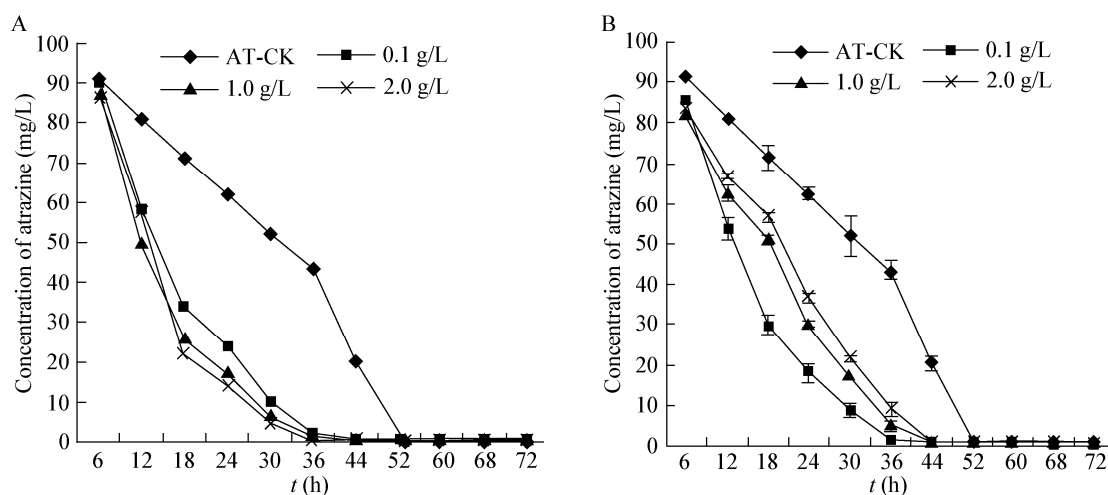


图 2 硝态氮(A)和铵态氮(B)对菌株 DNS32 降解能力的影响
Figure 2 The effect of nitrate (A) and ammonia (B) on degradability of strain DNS32

外加无机氮源对 DNS32 的降解具有促进作用,可能存在以下两种可能,首先可能是由于单个细胞降解能力受到外加氮源的促进,总体上表现为促进降解;其次是单个细胞降解能力受到外加氮源抑制,但由于细胞数量增多,整体上也表现为促进作用。因此,本研究通过荧光定量 PCR 技术检测了 DNS32 降解基因的转录量,阐释其促进作用机制。

2.2 菌株降解基因转录水平表达量对外加氮源的响应

由于外加氮源在 12 h 时与对照在生长和降解

能力上呈现明显差异,因此不同处理的 DNS32 菌株培养至 12 h,取样提取 RNA,通过荧光定量 PCR 技术研究降解基因 *trzN*、*atzB* 和 *atzC* 在 mRNA 水平上各个基因的表达情况,用相对表达量反映各基因的表达情况。

由图 3A 可知,在培养基中加入硝态氮培养 12 h 后, *trzN*、*atzB* 及 *atzC* 基因的表达量与阿特拉津对照相比均显著升高。*trzN* 基因与对照相比,表达量增加最为显著,其中 0.1 g/L 处理的表达量是对照的 6.361 ± 1.355 倍,而 1.0 g/L 与 2.0 g/L 处理的表达量分别为对照的 10.323 ± 2.205 倍与

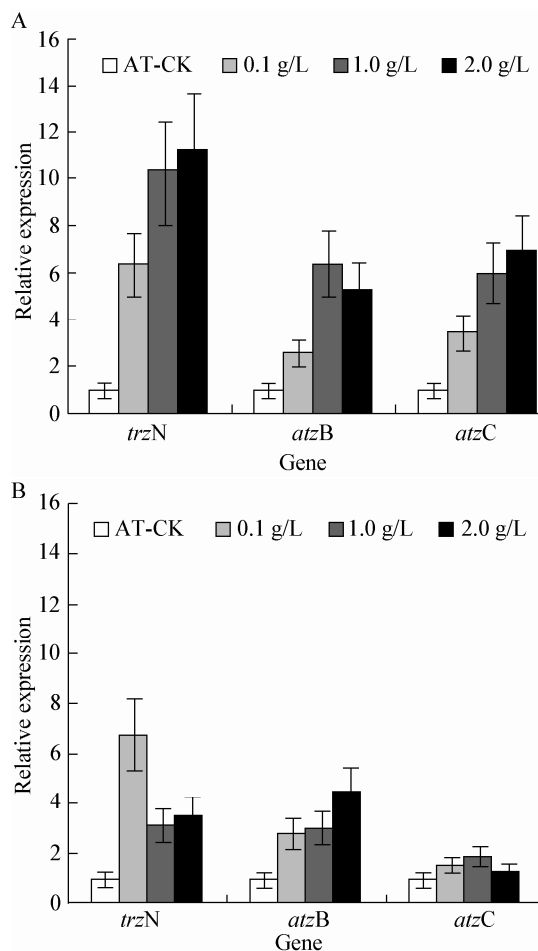


图3 菌株降解基因转录对硝态氮(A)和铵态氮(B)的响应
Figure 3 The response of degradation gene transcription to nitrate (A) and ammonia (B)

11.252±2.408 倍; *atzB* 与 *atzC* 基因的相对表达量随硝态氮浓度的增加而增加,这与菌株阿特拉津降解趋势相一致,说明外加硝态氮对 DNS32 单个细胞的阿特拉津降解在降解基因转录水平的表达上是促进作用。在培养基中加入铵态氮后, *trzN*、*atzB* 及 *atzC* 基因的表达量与阿特拉津对照相比均有所升高(图 3B)。与对照组相比, 0.1 g/L *trzN* 的表达量最高,达到对照的 6.803±1.458 倍,而 1.0 g/L 和 2.0 g/L 处理的相对表达量有所下降,分别为对照的 3.183±0.683 倍与 3.535±0.751 倍; *atzB* 基因表达量随铵态氮浓度的增加而增加;与对照组相比, *atzC* 基因表达量随氮源的加入有所增加,但增幅较小。且加入铵态氮的试验组,同浓度下的 *trzN*、*atzB*

及 *atzC* 基因的相对表达量均分别低于硝态氮组。

以无阿特拉津且分别加入 0.1 g/L 的硝态氮和铵态氮的基础培养基培养 DNS32 菌株,以基础培养基作对照,未加入外加氮源的试验组作为对照组,计算各降解基因的表达量。结果见图 4,与对照组相比,试验组的 3 种降解基因的表达量均升高,其中 *trzN* 基因的表达量显著升高,硝态氮组为对照组的 6.060±1.300 倍,铵态氮组为对照组的 6.659±1.449 倍。说明阿特拉津降解基因的转录不受阿特拉津的诱导,在有其它氮源存在时降解基因转录量提升,且硝态氮的提升作用明显。

通过图 3 和图 4 发现,硝态氮在有无阿特拉津存在的条件下对 *trzN*、*atzB* 和 *atzC* 转录水平上均表现为促进效应;铵态氮对 *trzN* 和 *atzB* 促进效应较明显,说明 DNS32 降解阿特拉津不存在“氮饥饿诱导机制”,适合于实践工程应用中。*trzN* 基因编码的酶具有广谱的水解脱氯活性^[22-24],因此含有 *trzN* 基因的 DNS32 菌株具有较广的降解谱,对三氮苯类除草剂均具有降解效果, Singh P.等^[25]研究发现 *Acinetobacter* A6 可以利用除阿特拉津以外的其他 4 种三氮苯类除草剂进行生长,因此推断 DNS32 可以运用到其他三氮苯类除草剂污染的工程修复中,可能具有更广阔的应用前景,有待于进一步研究。

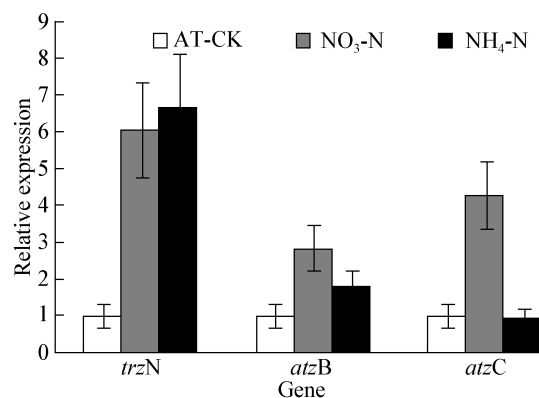


图4 无阿特拉津降解基因转录相对量
Figure 4 The relative amount of gene transcription without atrazine

3 结论

(1) 硝态氮与铵态氮对 DNS32 菌株生长和降解阿特拉津的能力均表现为促进作用。培养 12 h 以后, 外加氮源组的阿特拉津降解量均高于对照, 在 36 h 时硝态氮的 3 个处理基本将阿特拉津完全降解, 较对照提前了 18 h; 在 44 h 时, 铵态氮处理将培养基中的阿特拉津基本完全降解, 较对照提前了约 8 h。较高浓度的硝态氮促进效应未见明显增加, 较高浓度铵态氮促进效应降低。

(2) 外源硝态氮和铵态氮的加入均可促进降解基因 *trzN*、*atzB* 及 *atzC* 转录水平的表达, 其中 *trzN* 基因表达量增加最为显著, 说明菌株 DNS32 降解功能不受“氮饥饿”诱导机制控制, 同时具有降解其他三氮苯类除草剂的潜力, 在工程修复实践中具有较广阔的应用前景。

参考文献

- [1] Siripattanakul S, Wirojanagud W, McEvoy J, et al. Atrazine degradation by stable mixed cultures enriched from agricultural soil and their characterization[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 106(3): 986-992.
- [2] Khan JA, He XX, Khan HM, et al. Oxidative degradation of atrazine in aqueous solution by $UV/H_2O_2/Fe^{2+}$, $UV/S_2O_8^{2-}/Fe^{2+}$ and $UV/HSO_5^-/Fe^{2+}$ processes: A comparative study[J]. Chemical Engineering Journal, 2013: 218: 376-383.
- [3] Anderson PC, Georgeson M. Herbicide-tolerant mutants of corn[J]. Genome, 1989, 31(2): 994-999.
- [4] Mandelbaum RT, Allan DL, Wackett L P. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine[J]. Applied Environmental Microbiology, 1995, 61(4): 1451-1457.
- [5] Cooper RL, Storker TE, Tyrey L. Atrazine disrupts the hypothalamic control of pubertal development[J]. Toxicology Science, 2000, 53(2): 297-307.
- [6] Laws SC, Ferrell JM, Storker TE. The effects of Atrazine on female wistar rats: an evaluation of the protocol for assessing pubertal development and thyroid function[J]. Toxicology Science, 2000, 58(2): 366-376.
- [7] Swain J, Lessey A, Mirczuk S, et al. Effects of the endocrine disrupting herbicide, Atrazine, on pituitary development, gene expression and signalling pathways in Zebrafish (*Danio rerio*) and mouse pituitary cell lines[J]. Endocrine Abstracts, 2013(31): 147.
- [8] Gammon DW, Aldous CN, Carr WCJ, et al. A risk assessment of atrazine use in California: human health and ecological aspects[J]. Pest Management Science, 2005, 61(4): 331-355.
- [9] 郑柳柳, 袁博, 朱希坤, 等. 阿特拉津降解菌株的分离、鉴定和工业废水生物处理试验[J]. 微生物学通报, 2009, 36(7): 1099-1104.
- [10] 郑晓宁. 阿特拉津降解菌 ADX10的分离、鉴定及其降解特性的研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2007.
- [11] Sagarkara S, Mukherjee S, Nousiainenb A, et al. Monitoring bioremediation of atrazine in soil microcosms using molecular tools[J]. Environmental Pollution, 2013, 172: 108-115.
- [12] 郭火生, 王志刚, 孟冬芳, 等. 阿特拉津降解菌株 DNS32 的降解特性及分类鉴定与降解途径研究[J]. 微生物学通报, 2012, 39(9): 1234-1241.
- [13] Garcés RAG, Hansen AM, van Afferden M. Mineralization of atrazine in agricultural soil: inhibition by nitrogen[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2007, 26(5): 844-850.
- [14] Sims GK. Nitrogen starvation promotes biodegradation of N-heterocyclic compounds in soil[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2006(38): 2478-2480.
- [15] Indesta KJ, Hancock DE, Junga CM, et al. Role of nitrogen limitation in transformation of RDX (Hexahydro-1,3,5-Trinitro-1,3,5-Triazine) by *Gordonia* sp. strain KTR9[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(5): 1746-1750.
- [16] 刘克锋, 刘建斌, 贾月慧. 土壤、植物营养与施肥[M]. 北京: 气象出版社, 2006.
- [17] Zhang Y, Jiang Z, Cao B, et al. Metabolic ability and gene characteristics of *Arthrobacter* sp. strain DNS10, the sole atrazine-degrading strain in a consortium isolated from black soil[J]. International Biodeterioration and Biodegradation, 2011, 65(8): 1140-1144.
- [18] Lee ES, Park JY, Yeom SH, et al. Effects of nitrogen sources on toluene degradation by *Pseudomonas putida* BZ918[J]. Korean Journal of Chemical Engineering, 2008, 25(1): 139-143.
- [19] Sauer J, Görl M, Forchhammer K. Nitrogen starvation in *Synechococcus* PCC 7942: involvement of glutamine synthetase and NtcA in phycobiliprotein degradation and survival[J]. Archives of Microbiology, 1999, 172(4): 247-255.
- [20] Gebendinger N, Radosevich M. Inhibition of atrazine degradation by cyanazine and exogenous nitrogen in bacterial isolate M91-3[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 51(3): 375-381.
- [21] 韦金河, 汪廷, 宁运旺, 等. 不同氮、碳源对蛋白核小球藻培养液 pH 值的影响[J]. 江苏农业学报, 2004, 20(1): 63-64.
- [22] Arbeli Z, Fuentes C. Prevalence of the gene *trzN* and biogeographic patterns among atrazine-degrading bacteria isolated from 13 Colombian agricultural soils[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2010, 73(3): 611-623.
- [23] Topp E, Mulbry WM, Zhu H, et al. Characterization of s-triazine herbicide metabolism by a *Nocardioideis* sp. isolated from agricultural soils[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(8): 3134-3141.
- [24] Strong LC, Rosendahl C, Johnson G, et al. *Arthrobacter aurescens* TC1 metabolizes diverse s-triazine ring compounds[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(12): 5973-5980.
- [25] Singh P, Suri CR, Cameotr SS. Isolation of a member of *Acinetobacter* species involved in atrazine degradation[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 317(3): 697-702.