

污染土壤中原位阿特拉津降解菌的分离和鉴定^{*}

代先祝 胡 江 蒋建东 徐 玮 李顺鹏[†]

(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)

摘 要 为克服传统富集培养分离降解菌的局限性,直接将长期受阿特拉津污染的土壤稀释后,涂布于加有土壤浸出液和阿特拉津农药的平板,分别从两个采自不同地区的污染土壤中各分离了一株高效广谱降解菌 AGI 和 ADGI:它们能以阿特拉津为唯一碳源、氮源和能源生长,能分别在 44 h 和 48 h 内降解 $1\ 000\ \text{mg L}^{-1}$ 的阿特拉津,降解率 100%;它们还能以扑草净、西玛津等三嗪类除草剂为唯一氮源生长。16S rDNA 核苷酸序列分析结果表明菌株 AGI 与 ADGI 都与节杆菌属 (*Arthrobacter*) 的细菌有高度同源性,结合两株菌的形态特征及生理生化特征,将它们鉴定为 *Arthrobacter* spp.。PCR 扩增两株菌的降解基因,结果表明它们的降解基因都是 *trzN* 和 *atzBC* 的组合,这是国内首次报道具有该基因类型的阿特拉津降解菌。

关键词 阿特拉津;原位降解菌;分离;鉴定;降解基因类型

中图分类号 X172 文献标识码 A

阿特拉津(2-氯-4-乙胺基-6-异丙胺基-1,3,5-三嗪)是一种广泛使用的三嗪类除草剂,它在土壤中的半衰期长,可移动性较强,可通过地表径流、淋溶、干沉降和湿沉降等途径进入地表水和地下水^[1,2],从而对水生生态环境和人类饮用水源构成威胁^[3]。

阿特拉津在土壤中主要通过微生物的作用被降解。到目前为止,人们已分离了很多阿特拉津降解菌,并对其中的 *Pseudomonas* sp. ADP 菌株的降解基因 *atzABCD* 和酶进行了详细的研究^[4~6],对其他菌的研究发现阿特拉津降解基因 *atzABC* 具有高度的保守性^[7]。然而,这些菌几乎都是采用富集培养方法分离的,由于富集过程中培养条件的选择性,所得的降解菌可能不能反映自然界中降解菌的真实情况^[8]。Sajjaphan 和 Piutti 等报道直接从污染土壤分离的阿特拉津降解菌,就没有 *atzA* 基因,都是 *trzN* 和 *atzBC* 的组合^[9,10]。为获得污染土壤中的原位降解菌,本研究通过向分离培养基中添加土壤浸出液,不经过富集培养,直接从两个不同地区的污染土壤中各分离到一株高效阿特拉津降解菌 AGI 和 ADGI,并对它们进行了鉴定,比较了它们降解基因与已报道的阿特拉津降解基因的同源性。

1 材料与方法

1.1 样品及培养基

土壤样品 1 采自浙江某化工厂存放阿特拉津仓库旁土壤 1~10 cm 表层土,属水稻土,pH 8.5,有机质含量 $11.2\ \text{g kg}^{-1}$;土壤样品 2 采自山东某地长期使用阿特拉津的玉米地 5~10 cm 表层土,属黄潮土,pH 7.4,有机质含量 $20.5\ \text{g kg}^{-1}$ 。土样过 40 目筛后 4℃ 保存备用。

土壤浸出液:取相应土样 50 g,加入装有 100 ml 蒸馏水的三角瓶中,置摇床 $200\ \text{r min}^{-1}$,常温振荡 30 min,然后高速离心 ($10\ 000\ \text{g}$) 取上清,滤膜除菌 ($\phi 0.22\ \mu\text{m}$)。

基础盐 (MM, 1 L): KH_2PO_4 0.45 g、 K_2HPO_4 1.79 g、 Mg_2SO_4 0.1 g、 NaCl 0.4 g,pH 7.5;分离培养基 (SAT) 为 MM 培养基中含 20% (m/m) 的土壤浸出液和 $500\ \text{mg L}^{-1}$ 阿特拉津乙醇悬液,因阿特拉津在水中的溶解度仅 $33\ \text{mg L}^{-1}$,所以培养基呈混浊状,阿特拉津被降解后会在菌落周围形成透明圈^[4]。

^{*} 国家 863 项目 (2004AA46070,2004AA214102,2003AA241150) 和江苏省科技攻关项目 (BE2002345, BE2003343) 资助

[†] 通讯作者, Tel: 025-84396314; Fax: 025-84396314; E-mail: lsp@njau.edu.cn

作者简介:代先祝 (1978~),女,汉族,四川省安岳县人,硕士研究生,主要从事环境微生物研究。E-mail: daixianzhu@126.com

收稿日期:2005-03-16;收到修改稿日期:2005-09-07

1.2 降解菌的分离和纯化

取污染土样 10 g, 加入盛有 90 ml 无菌水和玻璃珠的三角瓶中, 置摇床, 25°C , 150 r min^{-1} 振荡 10 min, 吸取 1 ml 土壤悬液用于梯度稀释, 涂布 SAT 平板, 将平板在 25°C 培养至有菌落周围产生透明圈, 挑取透明圈大的单菌落划线纯化, 再将其转接液体 SAT 培养基验证降解效果。

1.3 阿特拉津检测

用三氯甲烷/培养液 (1:10 (V/V)) 全量提取 SAT 培养液中的阿特拉津, 提取后的上清用于测菌体生长量, 提取液适当稀释后 HPLC 检测, 检测条件: 250 mm \times 4.6 mm C-18 不锈钢色谱柱; 流动相为 80/20 (V/V) 的甲醇/水; 流速为 1.0 ml min^{-1} ; 柱温: 25°C ; Waters 2487 紫外检测器, 检测波长为 226 nm; 进样量 $10\text{ }\mu\text{l}$ 。

1.4 降解菌株降解性能验证及降解谱测定

降解性能验证培养基为液体 MM 培养基加 $1\ 000\text{ mg L}^{-1}$ 阿特拉津为唯一碳源和氮源 (AT), 降解谱测定以 MM 培养基加葡萄糖为碳源 (1 g L^{-1}), 待测除草剂为唯一氮源, 接种量接种用无菌水洗涂重悬的菌种 ($\text{OD}_{600} = 1.0$) 1 ml。未经特别说明液体培养条件为 30°C , 150 r min^{-1} 摇床振荡培养。细菌生长量用 722 型分光光度计测菌液在波长 600 nm 处的吸收值表示。

1.5 降解菌形态观察及生理生化鉴定

用光学显微镜进行形态观察, 生理生化鉴定过程参考文献 [11]。

1.6 细菌总 DNA 提取

用 SDS-溶菌酶联合裂解, 高盐沉淀法去除蛋白质和多糖, 再用异丙醇沉淀提取总 DNA。

1.7 16S rDNA 和降解基因保守片段的 PCR 扩增

细菌 16S rDNA 通用引物, *trzN*、*atzA*、*B*、*C* 基因片段扩增引物按文献 [7, 12, 13] 中的方法合成。使用 PCR 仪 (MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler) 进行 PCR 扩增, $25\text{ }\mu\text{l}$ 扩增体系: $10\times\text{Taq Buffer}$ $2.5\text{ }\mu\text{l}$, $2.5\text{ mmol L}^{-1}\text{ dNTP}$ $2\text{ }\mu\text{l}$, $25\text{ mmol L}^{-1}\text{ MgCl}_2$ $1.5\text{ }\mu\text{l}$, 3' 端和 5' 端引物各 $1\text{ }\mu\text{l}$, Taq 酶 $0.5\text{ }\mu\text{l}$, 超纯水补至 $25\text{ }\mu\text{l}$, 总 DNA $0.5\text{ }\mu\text{g}$ 。16S rDNA 扩增条件: 95°C 预变性 10 min, 94°C 变性 1 min, 50°C 复性 1 min, 72°C 延长 2 min, 30 个循环后 72°C 延伸 20 min。降解基因保守片段扩增条件: 95°C 预变性 10 min, 94°C 变性 1 min, 57°C (*trzN*) 或 45°C (*atzA*) 或 55°C (*atzB*) 或 48°C (*atzC*) 复性 1 min, 72°C 延长 30 s, 30 个循环后 72°C 延伸 5 min。PCR 产物 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,

EB 染色后紫外分析仪检测。V-gene 核酸纯化试剂盒纯化回收 DNA 片段, 连接到 pMD18-T 载体上, 转化大肠杆菌 DH5 α , 挑取阳性转化子酶切验证, 将插入有相应大小片段的转化子测序。

1.8 序列测序和分析

测序委托上海博亚生物有限公司完成, 将测序结果用 BLAST 软件在 GenBank 进行同源性比较。AGI 和 ADGI 的 16S rDNA 的 GenBank 索取号分别为 AY651317 和 AY641318, 采用 ClustalX 软件进行多序列比对, Nplot 程序进行系统进化分析。

2 结果与分析

2.1 阿特拉津降解菌 AGI 和 ADGI 的分离与鉴定

3 周后 2 种土壤稀释涂布的 SAT 平板上都有形成透明圈的单菌落, 选取透明圈大的菌落划线纯化, 最后分别从 2 种土样中各分离到一株阿特拉津降解菌 AGI 和 ADGI。

AGI 革兰氏染色阳性, 无鞭毛, 菌体在培养过程中具有典型的球杆变化 (图 1A, 图 1B), 在 LB 固体平板上形成圆形、光滑、凸起的菌落, 产生柠檬绿色不扩散色素, 接触酶阳性、氧化酶阴性、不产芽孢、液化明胶、不水解淀粉, 严格好氧, 37°C 不生长。ADGI 革兰氏染色阳性, 无鞭毛, 菌体在培养过程中有球杆变化 (图 1a, 图 1b), 在 LB 固体平板上形成圆形、光滑、凸起的菌落, 产生柠檬绿色不扩散色素, 并有刺激性气味, 接触酶阳性、氧化酶阴性、不产芽孢、液化明胶、不水解淀粉, 严格好氧, 37°C 生长。

以菌株总 DNA 为模板, PCR 扩增细菌 16S rDNA 得到长约 1.5 kb 的扩增产物。将 PCR 产物克隆到 T 载体上测序, 测序结果用 BLAST 程序和 GenBank 中已登录的 16S rDNA 序列进行核苷酸同源性比较, 结果发现 AGI 和 ADGI 与多株节杆菌属细菌的 16S rDNA 核苷酸序列相似性均在 98% 以上, 下载与 AGI 和 ADGI 16S rDNA 同源性较高的序列, 进行聚类分析, 结果 (图 2) 表明 AGI 与 *A. crystallopoietes* (X80738) 同源性最高, ADGI 与 *A. polychromogenes* (X80741) 同源性最高, AGI 还与已报道的阿特拉津降解菌 *A. crystallopoietes* cit1 * (AF329834) 分类地位很接近。综合以上鉴定结果, AGI 与 ADGI 都为节杆菌属 (*Anthrobacter*)。

2.2 菌株 AGI 和 ADGI 阿特拉津降解特性及降解谱

从图 3 中可以看出经过约 4 h 的延滞期后, 菌量随阿特拉津浓度降低而增加, 其中 AGI 降解 $1\ 000\text{ mg L}^{-1}$ 阿特拉津约需要 44 h, 菌液 OD_{600} 最后可达

0.714, ADG1 需 48 h, 菌液 OD₆₀₀ 可达 0.783, 这可能与 ADG1 分泌的胞外物质较多有关。该实验表明

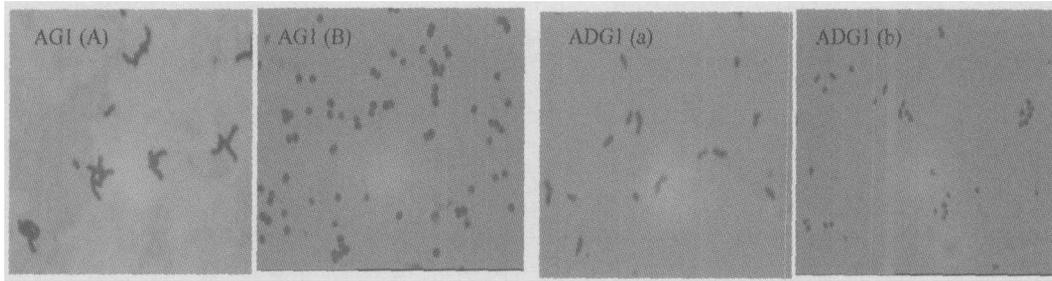


图 1 AGI 与 ADGI 菌体显微照片 (×1 000) (A, a:幼龄培养物;B, b:老龄培养物)

Fig. 1 Micrographs of AGI and ADGI (×1 000) (A, a:New cultures;B, b:Old cultures)

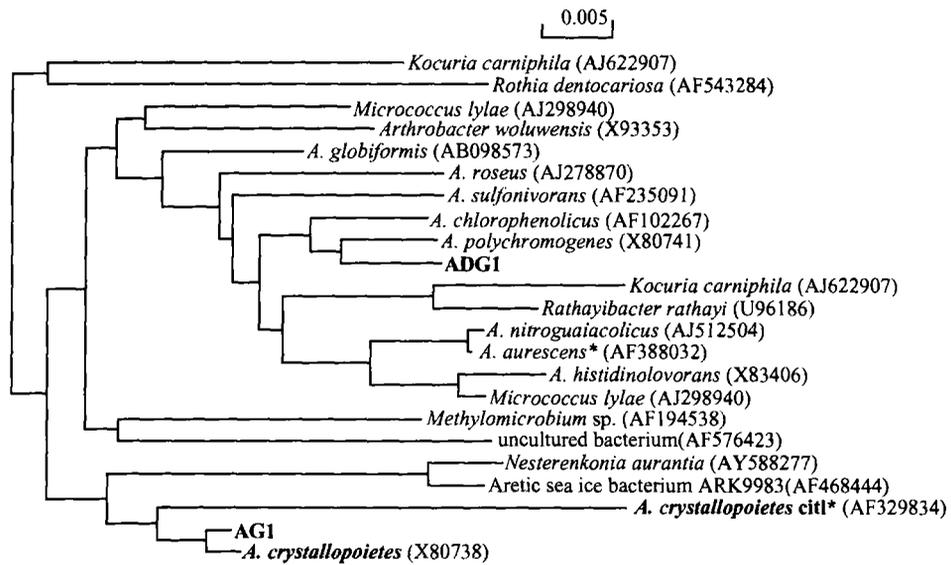


图 2 AGI 和 ADGI 16S rDNA 系统进化分析(带 * 的是阿特拉津降解菌或相关菌)

Fig. 2 16S rDNA phylogenic analysis of AGI and ADGI with related 16S rDNA in GenBank

(16S rDNA series of bacteria with " * " were atrazine-degrading bacteria or related ones)

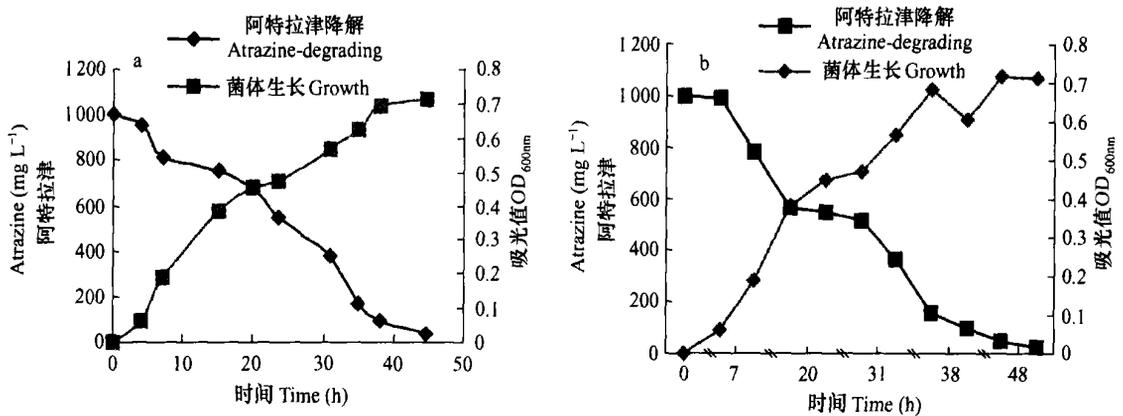


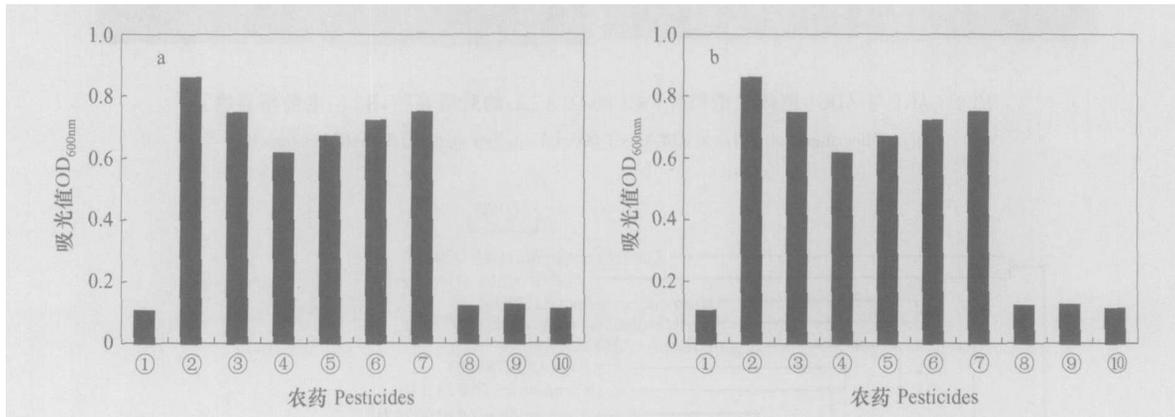
图 3 阿特拉津降解曲线(a. AGI ; b. ADGI)

Fig. 3 Atrazine-degrading curves (a. AGI , b. ADGI)

AGI 和 ADGI 都能以阿特拉津为唯一碳源、氮源和能源生长,能高效快速地降解高浓度的阿特拉津,HPLC 检测时发现它们的降解终产物与氰尿酸的保留时间相同,说明它们是利用阿特拉津的侧链生长的。

AGI 和 ADGI 都能以 500 mg L^{-1} 的扑草净等三嗪类除草剂为唯一氮源生长(图 4),并在约 72 h(莠灭净降解速度较慢,约需 7 d 时间)内将其完全降

解,其中阿特拉津、西玛津、特丁津和莠灭津三氮苯环是氯取代基,西草净和扑草净在相同的位置上是甲氧取代基,说明它们的降解谱较广。它们都不能降解类三嗪类除草剂环嗪酮和嗪草酮,可能是因为 AGI 和 ADGI 降解酶的底物专一性导致的。它们也不能降解氰尿酸,这与 HPLC 检测降解产物的结果一致。



不加药 No pesticide; 阿特拉津 Atrazine; 西玛津 Simazine; 特丁津 Terbutylazine; 莠灭津 Ametryn;
西草净 Simetryne; 扑草净 Prometryne; 环嗪酮 Hexazinone; 嗪草酮 Metribuzin; 氰尿酸 Cyanuri

图 4 AGI 和 ADGI 的降解谱(a. AGI; b. ADGI)

Fig. 4 Degrading spectra of AGI and ADGI (a. AGI; b. ADGI)

2.3 菌株 AGI 和 ADGI 降解基因保守片段的 PCR 扩增及测序

以 *Pseudomonas* sp. ADP 为对照,以总 DNA 为模板,PCR 扩增 *Anthrobacter* spp. AGI 和 ADGI 的 *atzABC* 基因保守片段,结果(图 5)从 AGI 和 ADGI 中均能扩增出与 ADP 同源的 *atzBC* 基因片段,同源性都在 99% 以上,却没有扩增到与 *atzA* 基因同源的片段,但氯离子检测实验结果却显示 AGI 降解阿特拉津的过程中释放氯离子(结果未显示),说明它们可

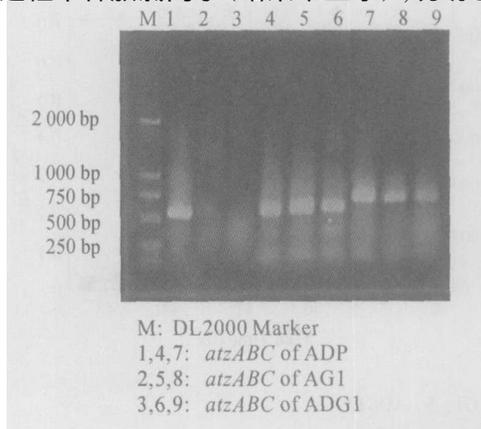


图 5 *atzABC* PCR 产物电泳图

Fig. 5 Electrophoresis profile of *atzABC* PCR products

能以一个不同于 *AtzA* 的酶催化阿特拉津脱氯。

根据 Mulbry 等的报道合成另一个阿特拉津氯水解酶基因 *trzN* 的基因特征引物,从 AGI 和 ADGI 中 PCR 扩增 *trzN* 基因保守片段,结果都扩增到相应大小的片段(图 6)。该序列与 Mulbry 等报道的 *Nocardioides* sp. C190 的 *trzN* 基因相似性为 100%。Topp 等报道 *Nocardioides* sp. C190 的总 DNA 与 *atzA* 探针都没有杂交信号,该菌具有一个全新的阿特拉津降解途径,到目前为止还仅有关于该途径第一个

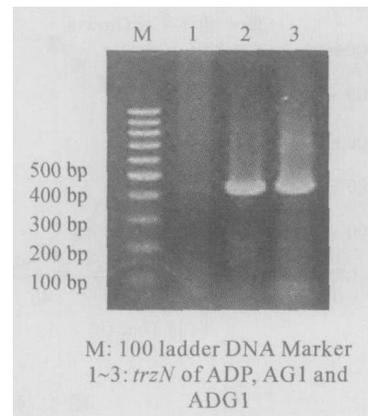


图 6 *trzN* PCR 产物电泳图

Fig. 6 Electrophoresis profile of *trzN* PCR products

基因 *trzN* 的报道^[13]。与之不同的是 AGI 和 ADGI 是 *Nocardioides* sp. C190 和 *Pseudomonas* sp. ADP 降解阿特拉津途径的组合: *trzN* 和 *atzBC*。

3 讨 论

采用在分离培养基中添加污染土壤浸出液可在一定程度上模拟土壤环境,而且分离样品不经过富集培养,避免了富集过程中对生长快菌群的选择,这样所分离到的降解菌比用常规分离方法所分离的降解菌更能代表污染土壤中的优势降解菌群,在用于污染土壤的原位修复时可能具有更强的生存能力和降解活力。

节杆菌属的细菌具有很强的抗旱性、耐饿性和广食性,往往是土壤中的优势菌^[14],本研究分离的菌株 AGI 和 ADGI 都是节杆菌属细菌,它们可能就是该污染土壤中主要的降解菌群,虽然降解阿特拉津的终产物是氰尿酸,但氰尿酸在土壤中很容易被降解,因此它们有很好的应用前景。

Pseudomonas sp. ADP 降解阿特拉津的基因 *atzABCDEF* 都在质粒 pADP1 上,并且 *atzABC* 两侧都有与基因转座有关的 *tnpA* 和 IS1071 序列^[16],该质粒可结合转移到大肠杆菌中^[15]。ADP 菌株是从能矿化阿特拉津的混合菌群中划线分离得到的,最初并不能从该混合菌中纯化出能矿化阿特拉津的纯菌。另外 De Souza 等报道的能矿化阿特拉津的混合菌群中 *Clavibacter michiganes* ATZ1 有与 *atzA* 同源的基因,*Pseudomonas* sp. CN1 中有与 *atzBC* 同源的基因^[17]。综合这些报道可推测 ADP 的阿特拉津矿化途径可能是在划线分离过程中组合形成的,不能代表自然环境中降解基因的主要类型。不经过富集培养避免了不同菌的基因交换组合,因此所分离到的降解菌更能代表土壤中降解菌降解基因的原始类型。本研究从两个采自不同地区的污染土壤样品中分离的菌株都是 *Arthrobacter* spp.,且降解基因都是 *trzN* 和 *atzBC* 的组合,Sajjaphan 和 Piutti 等报道直接分离的阿特拉津降解菌也都是革兰氏阳性菌 *Nocardioides* sp. 和 *Arthrobacter* sp.,基因类型也是 *trzN* 和 *atzBC* 的组合^[9,10],并且 *trzN* 基因片段保守性都是 100%,可见在土壤环境中阿特拉津降解菌可能是以革兰氏阳性菌为主,而这种基因类型也许是自然环境下最优基因组合,这些降解菌为研究自然环境条件下微生物(特别是革兰氏阳性菌)的污染物降解基因进化机制提供了良好的研究材料。

参 考 文 献

- [1] 赵志强,赵慧敏,全雯. 土壤中氯代有机化合物的环境行为. 土壤,2000,32(5):231~235. Zhao Z Q, Zhao H M, Quan Y. Environmental behavior of chloride organic compounds in soil (In Chinese). Soils,2000,32(5):231~235
- [2] 任理,毛萌. 阿特拉津在饱和砂质壤土中非平衡运移的模拟. 土壤学报,2003,40(6):829~837. Ren L, Mao M. Simulation of nonequilibrium transport of atrazine in saturates sandy loam under steady-state water flow condition (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2003, 40(6): 829~837
- [3] Storrs S I, Kiesecker J M. Survivorship patterns of larval amphibians to low concentration of atrazine. Environ Health Perspect, 2004, 112(10):1054~1057
- [4] Mandelbaum R T, Allan D L, Wackett L P. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. Appl. Environ. Microbiol., 1995, 61: 1451~1457
- [5] Cai B, Han Y, Liu B, et al. Isolation and characterization of an atrazine-degrading bacterium from industrial wastewater in China. Applied Microbiology, 2003, 36: 272~276
- [6] Shapir N, Sadowsky M J, Wackett L P. On the origins of cyanuric acid hydrolase: Purification, substrates, and prevalence of AtzD from *Pseudomonas* sp. strain ADP. Appl. Environ. Microbiol., 2003, 69(6): 3653~3657
- [7] De Souza M L, Seffernick J, Martinez B, et al. The atrazine catabolism genes *atzABC* are widespread and highly conserved. J. Bacteriol., 1998, 180: 1951~1954
- [8] Dunbar J, White S, Jerry F. Genetic diversity through the looking glass: Effect of enrichment bias. Appl. Environ. Microbiol., 1997, 63(4): 1326~1331
- [9] Sajjaphan K, Wackett L P, Shapir Nir, et al. *Arthrobacter aurescens* TCl atrazine catabolism genes *trzN*, *atzB* and *atzC* are linked on a 160-kilobase region and are functional in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol., 2004, 70(7): 4402~4407
- [10] Piutti S, Semon E, Landry D. Isolation and characterisation of *Nocardioides* sp. SPI2, an atrazine-degrading bacterial strain possessing the gene *trzN* from bulk- and maize rhizosphere soil. FEMS Microbiology Letters, 2003, 221: 111~117
- [11] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京:科学出版社, 2001. 267~273. Dong X Z, Cai M Y. Systematic Identification Manual of Normal Bacteria (In Chinese). Beijing: Science Press, 2001. 267~273
- [12] Mulbry W W, Zhu H, Nour S M, et al. The triazine hydrolase gene *trzN* from *Nocardioides* sp. strain C190: Cloning and construction of gene-specific primers. FEMS Microbiology Letters, 2002, 206: 75~79
- [13] Weissburg W G, Barns S M, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol., 1991, 173: 697~703
- [14] Topp E, Mulbry W M, Zhu H, et al. Characterization of s-triazine herbicide metabolism by a *Nocardioides* sp. isolated from agricultural soils. Appl. Environ. Microbiol., 2000, 66(8): 3134~3141
- [15] 陈文新. 土壤和环境微生物学. 北京:北京农业大学出版社, 1989. 24~25. Chen W X. Soil and Environmental Microbiology (In

- Chinese). Beijing: Beijing Agricultural University Press, 1989. 24 ~ 25
- [16] De Souza ML, Wackett L P, 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: 2 323 ~ 2 326
- [17] Martinez B, Tomkins J, Wackett L P, *et al.* Complete nucleotide sequence and organization of the atrazine catabolic plasmid pADP-1 from *Pseudomonas* sp. strain ADP. *J. Bacteriol.*, 2001, 183 (19): 5 684 ~ 5 697
- [18] Mervyn L, De Souza ML, Newcombe D, *et al.* Molecular basis of a bacterial consortium: Interspecies catabolism of atrazine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64 (1): 178 ~ 184

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF IN SITU ATRAZINE-DEGRADING BACTERIA FROM CONTAMINATED SOILS

Dai Xianzhu Hu Jiang Jiang Jiandong Xu Wei Li Shunpeng[†]

(College of Life Science, Nanjing Agric Univ, Key Lab of Microbiological Engineering Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Nanjing 210095, China)

Abstract To overcome limitations of the traditional enrichment culturing method for degrading bacteria isolation, two strains of bacteria, AGI and ADGI, capable of degrading atrazine efficiently, were isolated by diluting and plating atrazine-contaminated soils directly onto plates coated with soil extracts and atrazine. They grew in medium with atrazine as the sole sources of nitrogen, carbon and energy, degrading $1\ 000\ \text{mgL}^{-1}$ of atrazine within 44 h and 48 h, respectively, and could also grow with some other s-triazine herbicides as sole nitrogen sources. Based on their 16S rDNA sequences analysis and their physiologic and biochemical characteristics, AGI and ADGI were identified as *Arthrobacter* spp.. Results of amplifying their degrading genes with PCR, showed that atrazine metabolic genotype of AGI and ADGI were both combination of *trzN* and *atzBC*. It is the first report in the country about atrazine-degrading bacteria with such metabolic genotypes.

Key words Atrazine; *In situ* degrading bacteria; Isolation; Identification; Metabolic genotype