

阿特拉津降解菌 *Arthrobacter* sp. AG1 降解基因研究 Study on the Atrazine-degrading Genes in *Arthrobacter* sp. AG1

代先祝^{1,2} 蒋建东¹ 顾立峰¹ 潘荣清¹ 李顺鹏^{1*}

DAI Xian-Zhu^{1,2} JIANG Jian-Dong¹ GU Li-Feng¹ PAN Rong-Qing¹ and LI Shun-Peng^{1*}

1 南京农业大学生命科学学院,农业部环境微生物工程重点开放实验室,南京 210095

2 西南大学资源环境学院微生物学实验中心,重庆 400715

1 College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Key Laboratory for Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Nanjing 210095, China

2 College of Resources and Environmental Sciences, Southwest University, The Experimental Center for Microbiology, Chongqing 400715, China

摘要 菌株 *Arthrobacter* sp. AG1 能以 4000 mg/L 的阿特拉津(AT)为唯一碳源、氮源和能源生长。通过设计特异引物从 AG1 中扩增出阿特拉津氯水解酶基因 *trzN* 的全序列,该基因与已报道的 *trzN* 基因序列相似性为 99%。AG1 菌株中含有两个大于 100kb 的质粒, Southern 杂交结果显示 *trzN* 和 *atzB* 基因均位于其中较大的一个质粒 pAG1 上。将 AG1 菌株在 LB 液体培养基中转接三代后,发现 34% 的细菌细胞丢失了降解活性,但却未发现丢失质粒,PCR 扩增结果表明突变子丢失了 *trzN* 基因,但 *atzB* 和 *atzC* 基因未丢失,说明降解活性的缺失是 *trzN* 基因片段从质粒上丢失的结果,表明 *trzN* 基因在环境中存在水平转移现象,暗示菌株 AG1 中的阿特拉津降解基因是基因的水平转移重组的结果。

关键词 *Arthrobacter* sp. AG1, *trzN*, 基因水平转移,阿特拉津,降解

中图分类号 Q938.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)05-0789-05

Abstract Atrazine could be used as the sole carbon, nitrogen and energy sources for growth by strain *Arthrobacter* sp. AG1, and the atrazine-degrading genes of AG1 were found to be the combination of *trzN*, *atzB* and *atzC*. The atrazine chloride hydrolyase gene *trzN* was cloned by PCR amplification, whose sequence shared 99% identity with that of *Norcardioides* sp. C190. Two large plasmids were found in AG1, and *trzN* and *atzB* were confirmed to be localized on the larger plasmid pAG1 by the method of southern hybridization. Subculture of AG1 in liquid LB for three generations, 34% of the subsequent cells were found to lose degrading activity, however, neither plasmid was lost. PCR amplification results showed that the mutants had only lost the *trzN* gene instead of *atzB* and *atzC*. It was deduced that mutation might be due to the *trzN* gene deletion from the plasmid. This study provided new evidence that atrazine metabolic genotypes were resulted from horizontal gene transfer between different bacteria under environmental selective pressure.

Key words *Arthrobacter* sp. AG1, *trzN*, horizontal gene transfer, atrazine, degradation

阿特拉津(2-氯-4-乙氨基-6-异丙氨基-1,3,5-三嗪)是世界上使用最多的除草剂之一,关于它在环境

Received: November 13, 2006; Accepted: December 18, 2006.

This work was supported by the grant from the National Natural Science Foundation of China (No.30600016).

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-25-84396314; E-mail: lsp@njau.edu.cn

国家自然科学基金 No.30600016 资助。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

中的危害已经引起了广泛关注^[1-4],近十几年来,关于阿特拉津的微生物降解研究成为热点。*Pseudomonas* sp. ADP 菌株的阿特拉津降解基因 *atzA*、*B*、*C*、*D* 和对应的酶研究的比较详细^[5-7],这些基因编码的酶催化阿特拉津水解脱氯、羟基阿特拉津水解脱乙胺基等。世界各地关于阿特拉津降解基因的研究报道显示降解基因 *atzA*、*B*、*C* 具有高度的保守性^[8]。2002年, Mulbry 等^[9]从菌株 *Norcardioides* sp. C190 中克隆到一个新的阿特拉津氯水解酶基因 *trzN*, 但该菌中却不存在 *atzA*、*B*、*C* 基因。Sajjaphan 和 Piutti 等报道的降解菌株中的降解基因却都是 *trzN* 和 *atzB*、*C* 的组合。因为 *trzN* 基因编码的酶比 *atzA* 编码的酶具有更广谱的水解脱氯活性, 因此含有 *trzN* 基因的阿特拉津降解菌株具有较广的降解谱^[10-13], 对均三氮苯类除草剂均具有降解效果。基于 *atzA*、*B*、*C* 基因具有高度的保守性, *trzN* 和 *atzB*、*C* 基因以组合形式出现, 以及降解基因几乎都位于质粒上的事实^[5, 8, 11], 暗示阿特拉津降解基因的进化机制与基因水平转移有关。近年来, 对已经测序的微生物的基因组分析发现基因水平转移是细菌代谢途径进化的主要途径之一, 了解污染物降解基因进化机制对于充分利用微生物进行环境污染治理至关重要, 但国内相关领域研究还很少。本文研究了阿特拉津降解菌 AG1 的水解脱氯酶基因 *trzN*, 并对该基因进行了定位、缺失研究, 揭示了该基因的水平转移现象, 为阿特拉津降解基因进化机制提供了新的证据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: *Arthrobacter* sp. AG1, 为本实验室直接分离自阿特拉津污染土壤, 能以阿特拉津为唯一碳源、氮源和能源生长, 对均三氮苯类除草剂西玛津、特丁津、莠灭津、西草津、扑草津等均具有降解效果, 降解终产物为氰尿酸; 菌株 *Pseudomonas* sp. ADP: Lawrence Wackett 馈赠, 能以阿特拉津为唯一氮源生长, 通过降解基因 *atzABCDEF* 编码的酶矿化阿特拉津, 降解受易利用氮源抑制^[14-16]。

1.1.2 培养基与试剂: 基础盐培养基 (MM): KH_2PO_4 0.5g/L, K_2HPO_4 1.5g/L, MgSO_4 0.1g/L, NaCl 0.4g/L, H_2O 1000mL, pH7.0; 降解培养基 (MA): 在 MM 培养基灭菌前添加 0.5g/L 的阿特拉津原粉; LB 培养基稀释 10 倍即为 LB/10 培养基, 添加 500mg/L 阿特拉津原粉即为 AL 培养基, 固体培养基为添加 20g/L 的

琼脂。氯离子检测培养基 (ML) 为 MM 液体培养基中的 NaCl 用等摩尔的 Na_2SO_4 代替, 灭菌前加入 500mg/L 阿特拉津原粉, 在培养基中添加 1g/L 的蛋白胨、0.5g/L 的酵母粉。阿特拉津原粉 (纯度 96%) 由浙江中山化工股份有限公司馈赠, 分子生物学试剂购自大连宝生物公司。

1.2 方法

1.2.1 细菌总 DNA 及质粒的提取: 在细菌裂解时添加溶菌酶, 采用高盐沉淀法提取细菌总 DNA, 碱裂解法提取细菌质粒^[17]。

1.2.2 *trzN* 及其他保守片段的 PCR 扩增: 扩增 *trzN* 全基因的引物根据 Mulbry 等的报道合成^[9], *atzA*、*atzB*、*atzC* 基因片段扩增引物按文献 [11] 合成。以 AG1 总 DNA 为模板, 使用 PTC-200 Peltier Thermal Cycler, 25 μL 扩增体系: 10 \times Buffer 2.5 μL , dNTP (2.5mmol/L) 2 μL , MgCl_2 (25mmol/L) 1.5 μL , 3'端和 5'端引物各 1 μL , Taq 酶 0.5 μL , 超纯水补至 25 μL , 总 DNA 0.5 μg 。 *trzN* 全基因扩增条件: 95 $^\circ\text{C}$ 预变性 10min, 94 $^\circ\text{C}$ 变性 1min, 55 $^\circ\text{C}$ 复性 1min, 72 $^\circ\text{C}$ 延长 2min, 30 个循环后 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 20min。降解基因保守片段扩增条件: 95 $^\circ\text{C}$ 预变性 10min, 94 $^\circ\text{C}$ 变性 1min, 57 $^\circ\text{C}$ (*trzN* 片段) 或 55 $^\circ\text{C}$ (*atzB*) 或 48 $^\circ\text{C}$ (*atzC*) 复性 1min, 72 $^\circ\text{C}$ 延长 30s, 30 个循环后 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 5min。扩增产物 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后紫外分析仪检测。PCR 扩增产物用 V-gene 核酸纯化试剂盒纯化, 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, 插入片段由 TaKaRa 公司测序。

1.2.3 阿特拉津降解基因的杂交定位: 分别以菌株 AG1 中扩增的 *trzN* 基因片段, 菌株 ADP 中扩增的 *atzB*、*C* 基因片段纯化产物为合成探针的模板 [α -³²P]dCTP 标记使用 Random Primer DNA Labeling Kit 按说明合成探针。杂交使用带正电荷的尼龙膜, 杂交过程参照参考文献 [17]。

1.2.4 降解性状缺失的菌株筛选: 将 AG1 接种到 LB 液体试管, 30 $^\circ\text{C}$, 150r/min 振荡培养 24h 后以 1% 的接种量转接到另一个 LB 液体试管, 同样条件培养, 转接三代后, 取 1mL 菌液稀释涂 LB 固体平板, 30 $^\circ\text{C}$ 培养至单菌落长出, 用牙签随机挑取 100 个单菌落点种在 AL 平板上, 培养 48h 后筛选周围不产生透明圈的菌落。

1.2.5 氯离子的检测实验: 实验分三组, 一组为不接菌空白, 第二组接种经无菌生理盐水洗涤的 AG1 作为阳性对照, 第三组接种经无菌生理盐水洗涤的

突变菌株 AG1-M, 各组均设三个重复。30℃, 150r/min 振荡培养至阳性对照组阿特拉津粉完全消失, 每个处理取 10 mL 培养液用铬酸钾指示剂滴定法^[18]测定氯离子浓度。

2 结果与分析

2.1 阿特拉津氯水解酶基因 *trzN* 的克隆

以 AG1 总 DNA 为模板, 用设计的引物扩增到与报道的 *trzN* 全基因大小相当的序列(图 1)。将扩增产物纯化, 克隆到 T-载体上, 测序。测序结果用 BLAST 软件在 GenBank 进行同源性比较, 该序列与 *Norcardioides* sp. C190 中的 *trzN* 基因核苷酸序列相似性为 99%, 表明 *trzN* 基因具有高度的保守性。使用 Bioedit 软件分析 AG1 16S rDNA 的(G+C)% 为 57.6%, *atzB* 的(G+C)% 为 64.0%, *atzC* 的(G+C)% 为 39.4%, 而 AG1 中 *trzN* 的(G+C)% 为 62.6% 暗示 *atzB*、*atzC*、*trzN* 基因并非 AG1 中的原始基因, 而是通过基因水平转移获得的, 并经过基因重组形成阿特拉津的降解途径。

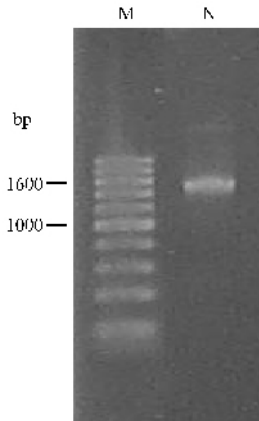


图 1 AG1 中扩增的 *trzN* 全基因图谱

Fig.1 Profile of *trzN* gene amplified from AG1

M: DNA marker; N: *trzN* gene.

2.2 菌株 AG1 质粒提取及降解基因定位

用改进后的碱裂解法从 AG1 提取到两个大于 23kb 的质粒(图 2), 将其中一个较大的质粒命名为 pAG1。为进一步确定菌株 AG1 中降解基因是否位于质粒上, 我们采用 Southern 杂交进行基因定位, 将合成的探针分别与经过 *Bam*H I 完全酶切的 AG1 总 DNA 和质粒杂交, ADP 为对照。基因 *trzN* 和 *atzB* 与菌株 AG1 中的 pAG1 质粒以及酶切总 DNA 片段均有杂交信号(如图 3、4), 说明这两个基因都位于该质粒上。我们也同时进行了 *atzC* 基因与质粒和经 *Bam*H I 完全酶切的 AG1 总 DNA 杂交, 但都没有

杂交信号, 可能是 *atzC* 的拷贝数较低, 未检测到杂交信号, 具体原因有待进一步研究。

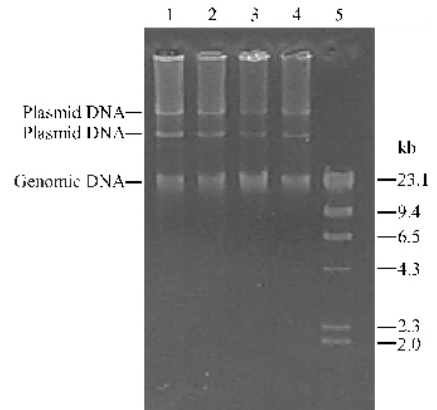


图 2 AG1 和 AG1-M 中质粒电泳图谱

Fig.2 Electrophoresis profiles of plasmids of AG1 and AG1-M

1, 2: plasmids of AG1; 3, 4: plasmids of AG1-M; 5: λ Hind III DNA marker.

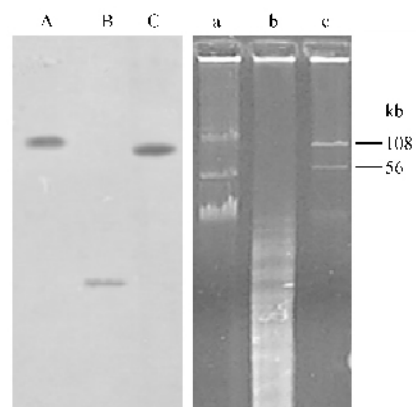


图 3 *atzB* 基因 Southern 杂交图谱

Fig.3 Southern blotting profile of *atzB*

A a: plasmids of AG1; B, b: *Bam*H I digestion of genomic DNA of AG1; C, c: plasmids of ADP.

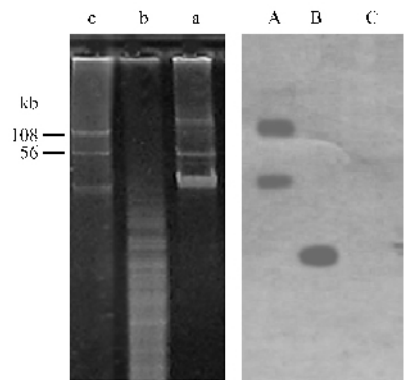


图 4 *trzN* 基因 Southern 杂交图谱

Fig.4 Southern blotting profile of *trzN*

A a: plasmids of AG1; B, b: *Bam*H I digestion of genomic DNA of AG1; C, c: plasmids of ADP.

2.3 降解性状缺失突变株的筛选及其特性的研究

因阿特拉津在水中的溶解度约 $33\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (25°C), 实验中使用浓度高达 $500\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 颗粒状阿特拉津导致培养基呈混浊状。有降解活性的菌株能水解阿特拉津, 在菌落周围形成透明圈, 而降解活性缺失的菌株只能利用培养基, 在菌落周围不形成透明圈(图5, 箭头所指处即为降解活性缺失菌株的菌落)。共挑取了100个转接三代的AG1单菌落点种在AL平板上, 结果有34个菌落周围不形成透明圈。分别在AL平板上划线验证后确实丢失阿特拉津降解活性, 将其中的一株突变株命名为AG1-M。

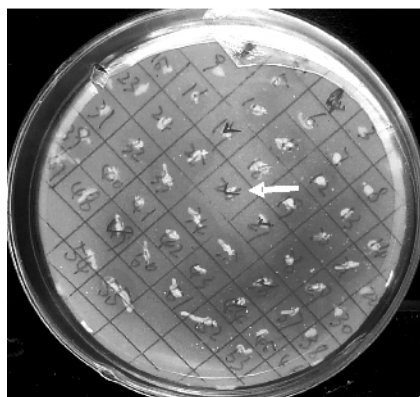


图5 降解活性缺失菌株

Fig.5 Mutants of non-degrading activity

将突变株AG1-M接种到ML液体培养基进一步验证降解活性。因为阿特拉津降解的第一步反应就是水解脱氯, 可以通过检测培养基中氯离子的浓度变化来确定菌株是否具有氯水解酶活性。氯离子检测结果表明接种AG1组培养液中的氯离子浓度为 4.65mmol/L 与理论值 4.63mmol/L 基本一致, 说明AG1已将培养基中的阿特拉津降解完全。而AG1-M虽然能在ML培养基中生长, 但培养液中的 $[\text{Cl}^-]$ 却没有增加, 反而低于未加菌组的浓度(见表1), 这可能是因为菌体吸附了部分氯离子, 该结果证明AG1-M确实无阿特拉津水解脱氯活性。

表1 AG1和AG1-M在ML培养基中培养后培养液中的氯离子浓度

Table 1 $[\text{Cl}^-]$ in medium cultured with AG1 and AG1-M

	I $[\text{Cl}^-]$ (mmol/L)	II $[\text{Cl}^-]$ (mmol/L)	III $[\text{Cl}^-]$ (mmol/L)	Average $[\text{Cl}^-]$ (mmol/L)
CK	0.34	0.25	0.43	0.34
AG1	4.60	4.85	4.52	4.65
AG1-M	0.12	0.15	0.14	0.14

PCR扩增结果表明AG1-M丢失 *trzN* 基因, 却未丢失 *atzB*, *C* 基因(图6), 而AG1-M质粒图谱并没有显著变化(见图2), Southern杂交证明 *trzN* 和 *atzB*

基因都定位于 *pAG1* 质粒上, 因此 *trzN* 基因的丢失应该只是该基因片段从质粒上缺失的结果。Sajjaphan 等^[11] 研究发现菌株 *Arthrobacter aurescens* TC1的降解基因 *trzN* 和 *atzB*, *C* 分散在同一个质粒上, 但并不受同一个调控基因调控。由于AG1-M仅仅丢失了 *trzN* 基因, 我们推测该突变菌株应该可以降解羟基阿特拉津, 但试验结果却表明AG1-M不能以羟基阿特拉津为唯一碳源、氮源或唯一氮源生长, 其菌悬液也不能降解羟基阿特拉津, 具体原因还有待进一步研究。

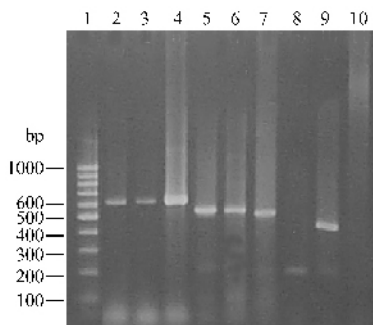


图6 从AG1-M中扩增 *trzN*、*atzBC* 基因

Fig.6 Electrophoresis pattern of partial gene *trzN* and *atzBC* amplified from AG1 and AG1-M

1 100bp DNA ladder marker; 2 to 4: *atzC*; 5 to 7: *atzB*; 8 to 10: amplification of *trzN* using AG1-M, AG1 and ADP as template respectively.

3 讨论

本实验室原先分离的一株阿特拉津降解菌株 *Exiguobacterium* sp. BTAH1^[20], 其降解阿特拉津第一步的基因是 *atzA*, 而AG1的第一步基因 *trzN*, 由于第一步降解基因决定了菌株的降解谱, 因此AG1具有更加广谱的除草剂降解功能。Jennifer 等研究几株具有 *atzA* 基因的降解菌的降解底物特异性, 结果也表明除了菌株 *Clavibacter michiganensis* ATZ1 外, 其它菌的底物特异性都较强^[19], 而具有 *trzN* 基因的降解菌降解谱都较广^[10, 12]。

AG1菌株的降解性能突变和基因丢失现象从反面证明了自然环境中细菌降解阿特拉津的基因是通过水平转移和重组形成的, 揭示了该基因的水平转移现象, 为阿特拉津降解基因进化机制提供了新的证据。同时也提醒我们在培养这一类降解菌株的过程中一定要注意培养方法, 避免降解性状的丢失。

REFERENCES (参考文献)

[1] Xue XB(薛晓博), Zhou YM(周岩梅), Xu ZY(许兆义).

- Research advance of environmental fate and ecological remediation of herbicide atrazine in farmland ecosystem. *Tianjin Agricultural Sciences*(天津农业科学) 2006, **12**(4):28-31.
- [2] Yao H(姚斌), Xu JM(徐建民), Shang H(尚鹤), et al. Study on ecological effect of atrazine on soil microbial activity. *Journal of Soil and Water Conservation*(水土保持学报) 2005, **19**(3):46-49.
- [3] Goodrich JA, Lykins BW, Clark RM. Drinking water from agriculturally contaminated ground water. *J Environ Qual*, 1991, **20**:707-717.
- [4] Storrs SI, Kiesecker JM. Survivorship patterns of larval amphibians to low concentration of atrazine. *Environ Health Perspect* 2004, **112**(10):1054-1057.
- [5] Martinez B, Tomkins J, Wackett LP, et al. Complete nucleotide sequence and organization of the atrazine catabolic plasmid pADP-1 from *Pseudomonas* sp. strain ADP. *J Bacteriol* 2001, **183**:5684-5697.
- [6] de Souza ML, Wackett LP, Sadowsky MJ. The *atzACB* genes encoding atrazine catabolism are located on a self-transmissible plasmid in *Pseudomonas* sp. strain ADP. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**:2323-2326.
- [7] Isaac F. 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.
- [8] de Souza ML, Seffernick J, Martinez B, et al. The atrazine catabolism genes *atzABC* are widespread and highly conserved. *J Bacteriol*, 1998, **180**:1951-1954.
- [9] Mulbry WW, Zhu H, Nour SM, et al. The triazine hydrolase gene *trzN* from *Nocardioideis* sp. strain C190: Cloning and construction of gene-specific primers. *FEMS Microbiol Lett* 2002, **206**:75-79.
- [10] Topp E, Mulbry WM, Zhu H, et al. Characterization of s-triazine herbicide metabolism by a *Nocardioideis* sp. isolated from agricultural soils. *Appl Environ Microbiol* 2000, **66**:3134-3141.
- [11] Sajjaphan K, Shapir N, Wackett LP, et al. *Arthrobacter aureescens* TC1 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**:4402-4407.
- [12] Strong LC, Rosendahl C, Johnson G, et al. *Arthrobacter aureescens* TC1 metabolizes diverse s-triazine ring compounds. *Appl Environ Microbiol* 2002, **68**:5973-5980.
- [13] Piuttial SE, Semonb DL. Isolation and characterization of *Nocardioideis* sp. SP12, an atrazine-degrading bacterial strain possessing the gene *trzN* from bulk-and maize rhizosphere soil. *FEMS Microbiol Lett* 2003, **221**:111-117.
- [14] Mandelbaum RT, Allan DL, Wackett LP. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**:1451-1457.
- [15] Vicente G. Nitrogen control of atrazine utilization in *Pseudomonas* sp. strain. *Appl Environ Microbiol* 2003, **69**(12):6987-6993.
- [16] Vicente G. Regulation of the *Pseudomonas* sp. strain ADP cyanuric acid degradation operon. *J Bacteriol* 2005, **187**(1):155-167.
- [17] Sambrook J, David WR. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd ed.). USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.
- [18] Environmental Protection Agency. Detection and analysis methods for water and waste water. 4th ed. Beijing: China Environmental Science Press, 2002.
- [19] Jennifer LS, Wackett LP. Rapid evolution of bacterial catabolic enzymes: A case study with atrazine chlorohydrolase. *Biochemistry*, 2001, **40**(43):12747-12752.
- [20] Hu J(胡江), Dai XZ(代先祝), Li SP(李顺鹏). The isolation and identification of a Gram positive atrazine-degradation bacterium BTAHI. *China Environmental Science*(中国环境科学), 2004, **24**(6):738-742.