

阿特拉津降解融合子的原生质体制备及其筛选

崔俊涛¹, 张伟², 曹天舒¹

(1.吉林农业大学资源与环境学院, 吉林 长春 130118; 2.长春市农业学校, 吉林 长春 130031)

摘要:以吉林省玉米带黑土中的优势真菌黑曲霉(A-02-10)为受体,阿特拉津降解菌青霉(P-02-07)的灭活原生质体为供体,对利用原生质体融合技术将降解基因导入土壤微生物优势种细胞,进而提高阿特拉津降解菌在土壤中定殖能力的可行性进行了初步研究。结果表明:(1)通过原生质体融合技术可显著提高阿特拉津降解菌在土壤中的定殖能力和降解效果,筛选出的融合子 A1 在自然土壤中的定殖数量可维持在 6.4×10^6 CFU $\cdot$ g⁻¹,使土壤中阿特拉津降解的半衰期由亲本(青霉 P-02-07)的 30 d,缩短为 10 d。(2)供试的 2 个亲本具有相似的原生质体制备条件,即供试菌株的原生质体制备溶壁酶(Lywallzyme)浓度为 2.0%~2.5%,最适酶解温度为 30 ℃,酶解时间为 5 h,酶解液的 pH 值为 6.0~6.5。此外,还讨论了单亲灭活原生质体融合技术在农药降解菌筛选中的独特技术优势——无需对菌株进行抗性标记,完全可以通过用农药配制的选择性培养基,依据菌落特征和农药溶解圈进行融合子的筛选,其中由农药配制而成的选择性培养基不仅可以用于降解融合子的定性筛选,而且还可以用于降解融合子在土壤中定殖数量的动态描述。原生质体融合技术仍是现阶段最为现实可行,最易广泛开展并收到实效的生物工程技术手段,通过原生质体融合进行基因体内重组构建具有降解优势基因工程菌的生物技术手段,应重新得到人们广泛关注。

关键词:阿特拉津;原生质体融合;融合子;青霉;曲霉

中图分类号:X172 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2008)06- 2269-05

Preparation and Selection of Atrazine Degradation Fusants

CUI Jun-tao¹, ZHANG Wei², CAO Tian-shu¹

(1.College of Resource and Environment Science, Jilin Agriculture University, Changchun 130118, China; 2.Jilin Agriculture School, Changchun 130031, China)

Abstract: Duo to its safety, high efficiency and lower cost, bioremediation technology has been regarded as an effective method to remediate the soils which polluted by pesticide and herbicide. But there are still some technological obstacles such as the relationship between the inoculums and indigenous microbes, soil type and other environmental factors etc, which hold-back to put it into practice. It is well known many bioremediation are failure due to the function microbial strains have not grown and multiplied in the polluted soils. The aim of this research is to investigate the possibility of making atrazine degradation genes recombination into soil dominated species, and then enhance the ability of the inoculums multiply and effect of atrazine degradation in soil. Single inactivate protoplasts technology was used, the parent strains for test were dominated species *Aspergillus niger* (A-02-10) in black soil and atrazine mineralization strain *Penicillium* sp (P-02-07), respectively. The proper conditions of protoplasts preparation were researched and a high efficiency fusant was selected. The results showed: (1) the two parents had the similar protoplast preparation conditions; the enzyme concentration, enzymolysis temperature, enzymolysis time and pH value was 2.0%~2.5%, 30 ℃, 5 h, 6.0~6.5, respectively. (2) Making genetic recombination of atrazine degradation genes into soil dominated species by protoplast fusion could increase the ability of the atrazine degradation fusant multiply and effect of atrazine degradation in soil. The amounts of atrazine degradation fusant cells could keep on 6.4×10^6 CFU $\cdot$ g⁻¹ in soil after inoculated 20 d; the half-decay period of atrazine in soil was decreased to 10 d from 30 d of the parent *Penicillium* sp P-02-07.

Keywords: atrazine; protoplast fusion; fusant; *Penicillium*; *Aspergillus*

收稿日期:2008-01-31

基金项目:国家自然科学基金(40471076);吉林省科技厅项目(400118)

作者简介:崔俊涛(1968-),男,博士,副教授,主要从事环境微生物及污染土壤的生物修复技术研究。E-mail:cuijuntao2005@163.com

阿特拉津是世界上许多国家都大面积使用的内吸传导型除草剂。土壤中残留的阿特拉津可通过地表径流、淋溶、干沉降和湿沉降等途径进入地表水和地下水,从而对水生生态环境和人类饮用水源构成威胁,其危害已引起人们的高度重视^[1-2]。由于生物修复是治理土壤农药污染的最有效的方法,自1982年,在常年施用阿特拉津的土壤中分离得到第一株具有降解阿特拉津的细菌以来,到目前为止,已从假单孢菌属(*Pseudomonas*)、链霉菌属(*Streptomyces*)和青霉属(*Penicillium*)等11个属中分离出多个可以降解阿特拉津的菌株^[3]。并对其降解途径、降解酶学、质粒与阿特拉津降解的关系等进行了研究^[4-10]。然而,如何将实验室中获得的高效菌株应用到实际生态环境中去,仍是个有待探讨的复杂问题。其中,如何提高阿特拉津降解菌与土著微生物的竞争能力及促进其在土壤中的定殖,是能否实现污染土壤生物修复的核心问题之一。

由于原生质体融合育种技术具有遗传物质传递更为完全,杂交频率较高,不需要有已知的遗传系统,可在种间、属间,甚至界间实现原生质体融合,可以获得遗传性状优良的重组体等特点,因此,摸清选育阿特拉津高效降解菌的原生质体制备条件,探讨通过该技术将降解基因导入土壤微生物优势种细胞,进而提高阿特拉津降解菌在土壤中定殖能力和降解效果的可行性,对将实验室中获得的高效菌株应用到实际生态环境中去有着重要意义。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

(1)吉林省玉米田土壤优势种:黑曲霉 A-02-10 (*Aspergillus niger*),在吉林省玉米带黑土中的分离出现率 87.7%,占真菌总数 61.5%。

(2)阿特拉津降解菌:青霉 P-02-07 (*Penicilium* sp.),纯培养条件下阿特拉津降解半衰期($d_{1/2}$)46 h, 25℃土壤培养试验阿特拉津降解半衰期($d_{1/2}$)30 d。

以上菌种保存在吉林农业大学资源与环境学院微生物研究室。

1.2 溶壁酶

溶壁酶(Lywallzyme)购于广东微生物所。

1.3 培养基

DPY 培养基:葡萄糖 2 g,蛋白胨 2 g,酵母膏 1 g,蒸馏水 100 mL, pH7.2。

再生培养基:在 DPY 固体培养基中加入 0.8 mol·L⁻¹ 甘露醇。

阿特拉津降解菌(融合子)选择性培养基:阿特拉津(纯品 99.94%)0.5 g, NaNO₃ 0.3 g, K₂HPO₄ 0.1 g, KCl 0.05 g, MgSO₄ 0.05 g, FeSO₄ 0.001 g, 蒸馏水 100 mL, 琼脂粉 2 g, pH 自然。

1.4 缓冲液及原生质体稳定液

缓冲液:0.1 mol·L⁻¹ pH6.0 磷酸缓冲液、0.1% EDTA 和 0.3% SH-OH。

原生质体稳定液:0.6 mol·L⁻¹ 甘露醇, pH6.5。

1.5 主要仪器

离心机(TD5A, 湖南凯达科学仪器有限公司)。

恒温振荡培养箱(华普达 150A, 常州华普达科学仪器有限公司)。

生物显微镜(BA300, 北京麦克迪奥 Motic 仪器仪表有限公司)。

高效液相色谱仪/紫外检测器:Agilent1100, 美国; 色谱柱:Hypersil ODS 5 μm Performed with a 2.1×200 mm。

色谱条件:柱温, 30℃恒温;检测波长, 230 nm;流动相, 甲醇/水=60/40, 流速 0.5 mL·min⁻¹;采用保留值定性, 峰面积外标法定量。校准曲线 $y=125.62x+8.9571$ ($R=0.9989$), 仪器的最小检测量为 5 ng, 加标回收率 82.1%~109.4%。

1.6 原生质体融合及再生方法

首先加热灭活青霉 P-02-07 原生质体:取青霉 P-02-07 原生质体悬液 1 mL(起始效价为 512 mg·L⁻¹)置于小试管中,于 60℃水浴中保温 10 min,使原生质体存活率为 0。然后将青霉 P-02-07 与黑曲霉 A-02-102 亲本原生质体 1:1 等量混合, 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 去掉上清液, 混匀并加入 35%PEG-4000 溶液 1 mL, 于 27℃保温 10~30 min, 再加入缓冲液 1 mL 稀释, 放置 10~15 min, 同样条件下离心去掉上清液, 沉淀用稳定洗涤数次, 最后的沉淀经适当稀释后, 置再生培养基上培养再生。

1.7 目标融合子筛选方法

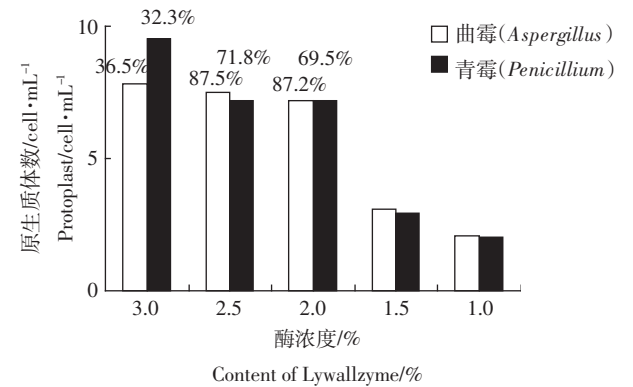
首先依据融合子在阿特拉津降解菌选择性培养基上的阿特拉津溶解圈进行融合子的初筛,然后将筛选出的融合子(A1、A2、A3)分别接种在阿特拉津含量为 3.0 mg·kg⁻¹ 的自然土壤中,进行融合子的复筛选, A1、A2、A3 接种量分别为 5.6×10⁸、5.1×10⁸、5.8×10⁸ CFU·mL⁻¹, 土壤含水量为田间最大持水量的 70%, 在 25℃条件下培养 40 d, 分别于培养 10、20、30、40 d 采样, 利用阿特拉津降解菌选择性培养基, 采用稀释平板法测定土壤中融合子的数量, 高效液相色谱仪测定

土壤阿特拉津残留量,依据融合子在土壤中的定殖数量和土壤阿特拉津降解效果筛选目标融合子。

2 结果与讨论

2.1 酶浓度对原生质体制备的影响

酶的种类、浓度是制备原生质体最关键的因素,由于各菌种细胞壁的成分和结构存在差异,因此不同的菌株所用酶的种类和浓度都有很大差异^[11]。本研究使用的溶壁酶(Lywallzyme)是目前广泛应用于真菌原生质体制备的溶壁酶,研究结果表明,不同的酶浓度对不同的真菌的作用效果各不相同,供试菌株的原生质体形成量都随酶浓度的增加而增加,其中 3.0%酶浓度的形成量最高,但再生率较低,分别为 36.5%、32.3%,因此,供试菌株的原生质体制备溶壁酶浓度在 2.0%~2.5%(图 1)。



注:原生质体的数量= $n \times 10^6$;柱形图上的数值表示原生质体的再生率。

图 1 酶浓度对原生质体数量及再生率的影响
Figure 1 Effect of Lywallzyme on the amounts of protoplast and its regeneration rate

2.2 酶解温度对原生质体制备的影响

不同的酶均有各自的最适酶解温度。酶解时温度选择的原则是既有利于原生质体化,又能防止原生质体被破坏^[12]。酶解温度一方面影响酶的活性,从而影响原生质体的释放量,另一方面还影响原生质体的活性。供试菌株的原生质体释放量都表现为随着温度的增加而增加的趋势,但 30℃原生质体的再生率较高,因此,青霉和黑曲霉的最适酶解温度为 30℃(图 2)。

2.3 酶解时间对原生质体制备的影响

酶解时间的长短直接影响原生质体化的效果,处理时间过短,脱壁不完全;处理时间过长,会导致原生质体脱水皱缩,再生率显著降低。时间从 20 min~10 h 不等。研究结果表明:随着酶解时间的延长,黑曲霉和

青霉的原生质体释放量都表现为随着时间的延长而增加的趋势,但 5 h 后数量增加不显著且再生率较低(图 3),因此,酶解时间为 5 h。

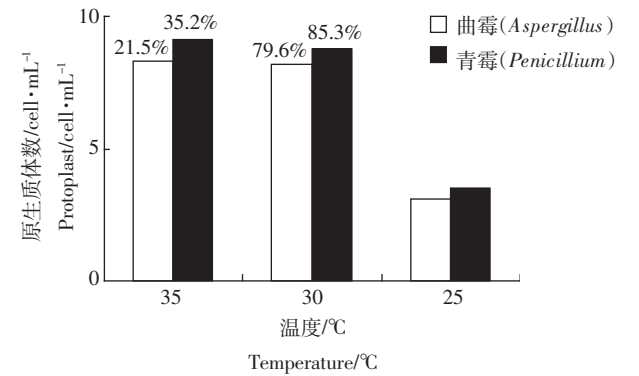


图 2 温度对原生质体数量及再生率的影响
Figure 2 Effect of temperature on the amounts of protoplast and its regeneration rate

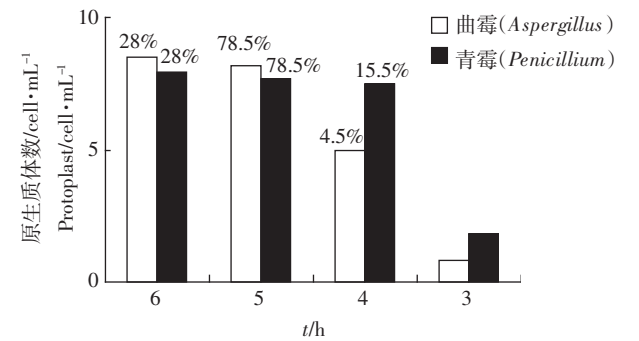


图 3 时间对原生质体数量及再生率的影响
Figure 3 Effect of time on the amounts of protoplast and its regeneration rate

2.4 pH 值对原生质体制备的影响

酶解时的 pH 值随酶和菌种有一定的差异,需根据实际情况对 pH 值进行优化。在以甘露醇为渗稳剂时,当酶解 5 h, pH5.5、pH6.0、pH6.5 时,原生质体制备率随着 pH 的降低而升高,但原生质体再生率下降,说明酶解液的 pH 值不仅影响酶及渗稳剂的活性,而且还影响供试菌株膜的稳定性。通过采用 0.1% 中性红染色的研究结果亦表明, pH5.5 的活原生质体只有 54.5%,因此,结合原生质体再生率的研究结果,供试菌株酶解液的 pH 值为 6.0~6.5(图 4)。

2.5 目标融合子的初筛选

研究结果表明,35%PEG-4000 的融合率 1.22‰,通过将在再生培养基筛选出的 20 株融合子的孢子接种在阿特拉津降解菌的选择性培养基中,连续转接 10 代后,依据菌落和阿特拉津溶解晕圈的大小,进行

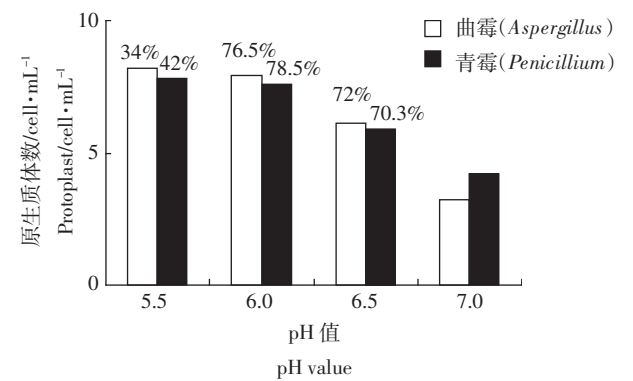


图 4 pH 值对原生质体数量及再生率的影响
Figure 4 Effect of pH value on the amounts of protoplast and its regeneration rate

目标融合子的初筛选,共获得遗传性状稳定的融合子 3 株。该 3 株融合子具有典型的黑曲霉形态特征(图 5),但其阿特拉津溶解晕圈的大小不同(表 1),说明通过原生质体融合技术,将阿特拉津的降解基因在土壤优势真菌黑曲霉体内进行基因重组,可获得遗传性状稳定的阿特拉津降解融合子。

2.6 目标融合子的复筛选

将初筛选的融合子进行土壤定殖能力试验的复筛选是该研究的一个重要环节,尽管初筛选的融合子 A1、A2、A3 都表现出降解阿特拉津的能力,但其在土壤中的定殖数量存在显著差异。在接种后的前 20 d,

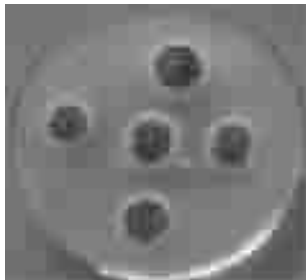


图 5 融合子的菌落形态
Figure 5 Colony of fusant

表 1 阿特拉津降解圈大小
Table 1 Atrazine degradation ring in the culture media

融合子 Recombinant	菌落直径 r/cm Colony diameter	菌落+溶解圈直径 R/cm Degradation ring with Colony	R/r R/r rate
青霉 P-02-07 <i>Penicillium</i> sp.	0.3	0.4	1.33
融合子 A1 Recombinant A1	0.7	1.0	1.43
融合子 A2 Recombinant A2	0.6	0.8	1.33
融合子 A3 Recombinant A3	0.8	1.1	1.38

融合子 A1、A2、A3 与亲本青霉 P-02-07 都表现出数量下降的趋势,但 20 d 后融合子 A1 的数量基本稳定在 6.4×10^6 CFU·g⁻¹(图 6)。结合土壤中阿特拉津降解效果的研究结果:土壤中阿特拉津降解的半衰期由亲本(青霉 P-02-07)的 30 d,缩短为 10 d(图 7),说明提高降解菌在土壤中的定殖数量,可显著提高阿特拉津的降解效果。

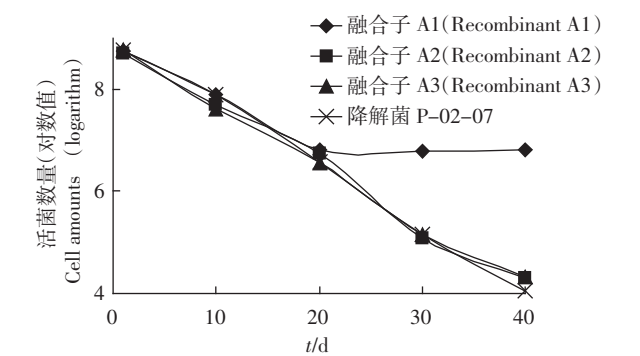


图 6 融合子在自然土壤中的定殖数量
Figure 6 Amounts of recombinants in soil

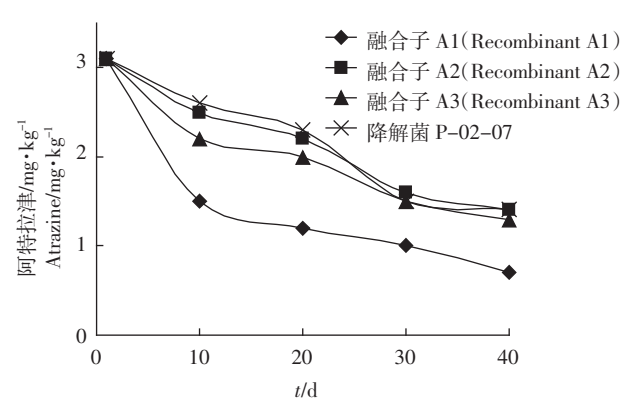


图 7 土壤中阿特拉津的残留量
Figure 7 Amounts of atrazine in soil

综上所述,可以看出:利用原生质体融合技术,将阿特拉津的降解基因在土壤微生物优势种体内进行重组,筛选高效阿特拉津降解菌是一项切实可行的技术手段,而且具有独特的技术优势,主要表现在:(1)无需对菌株进行抗性标记,完全可以通过含 0.5 g 阿特拉津的选择性培养基,依据菌落特征和阿特拉津溶解圈进行融合子的筛选,该方法简便、快捷、选择性强;(2)不需要有已知的遗传系统,它较基因体外重组技术简单易行,安全可靠,是现阶段最为现实可行,最易广泛开展并收到实效的生物工程手段;(3)可以利用已有的降解农药的菌种资源,进行降解基因在不同地区、不同土壤中微生物优势种体内进行重组,

提高降解菌在该地区土壤中的定殖能力。

此外,该方法可能在不同农药高效降解菌的筛选中有着广阔的应用前景,其中由不同农药配置而成的选择性培养基和土壤定殖试验是关键,选择性培养基不仅可以用于降解融合子的定性筛选,而且还可以降解融合子在土壤中定殖数量的动态描述,但应注意用于配制选择性培养基的农药至少应为化学纯,不能使用商品农药,以免造成把微生物降解农药助剂形成的假降解晕圈误认为农药的假降解晕圈。

3 结论

(1)供试的 2 个亲本具有相似的原生质体制备条件,即供试菌株的原生质体制备溶壁酶(Lywallzyme)浓度为 2.0%~2.5%,最适酶解温度为 30℃,酶解时间为 5 h,酶解液的 pH 值为 6.0~6.5。

(2)利用原生质体融合技术,将阿特拉津的降解基因在土壤微生物优势种体内进行重组,筛选高效阿特拉津降解菌是一项切实可行的技术手段,而且具有独特的技术优势。通过原生质体融合技术可显著提高阿特拉津降解菌在土壤中的定殖能力和降解效果。筛选出的融合子 A1 在自然土壤中的定殖数量可维持在 6.4×10^6 CFU $\cdot$ g⁻¹,使土壤中阿特拉津降解的半衰期由亲本(青霉 P-02-07)的 30 d,缩短为 10 d。

参考文献:

- [1] 王 辉,赵春燕,李宝明,等.微生物降解阿特拉津的研究进展[J].土壤通报,2005,36(5):791-794.
WANG Hui, ZHAO Chun-yan, LI Bao-ming, et al. Degradation of atrazine by microorganism—a review [J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2005, 36(5): 791-794.
- [2] 弓爱君,叶常明.除草剂阿特拉津的环境行为综述[J].环境科学进展,1997,5(2):37-47.

- GONG Ai-jun, YE Chang-ming. Review on the environmental behavior of atrazine[J]. *Advances in Environmental Science*, 1997, 5(2):37-47.
- [3] 蔡宝立,黄今勇,朱昌寿.阿特拉津降解菌株的分离和鉴定[J].微生物学通报,2001,28(2):22-26.
CAI Bao-li, HUANG Jin-yong, ZHU Chang-shou. Isolation and identification of atrazine-degrading strains[J]. *Microbiology*, 2001, 28(2): 22-26.
- [4] Brodkorb Giardina M T, Giardi G F. A new metabolite of atrazine by a soil bacterium[J]. *Agric Biol Chem*, 1980(44):2067-2072.
- [5] T S, Legge R L. Enhanced biodegradation of phenanthrene in oil tar-contaminated soils supplemented with *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1992(58):3117-3121.
- [6] Mark R. Degradation and mineralization of atrazine by a soil bacterial isolate[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995:297-302.
- [7] Mougin C C, Laugero M, Asther J, Dubroca P, Frasse, et al. Biotransformation of the herbicide atrazine by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1994(60):705-708.
- [8] Raphi T M. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. That mineralizes the atrazine herbicide atrazine[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(5):1451-1457.
- [9] Raphi T M. Mineralization of the atrazine ring of atrazine by stable bacterial mixed cultures[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(6):1695-1701.
- [10] Yanze Kontchou C, Gschwind N. Mineralization of the herbicide atrazine as a carbon source by a *Pseudomonas* strain[J]. *Applied Environ Microbiol*, 1994, 60(12):4297-4302.
- [11] 郑重谊,谢达平,谭周进.影响微生物原生质体融合技术的因素[J].湖南农业科学,2006(4):35-38.
ZHENG Zhong-yi, XIE Da-ping, TAN Zhou-jin. Influence factors of microbial protoplast fusion technology[J]. *Hunan Agricultural Sciences*, 2006(4):35-38.
- [12] 张彩霞,王金艳,于晓丹.原生质体融合技术在生防菌株筛选中的应用[J].杂粮作物,2004,24(5):301-302.
ZHANG Cai-xia, WANG Jin-yan, YU Xiao-dan. Application of protoplast fusion technology in the biological control strains selection[J]. *Rain Fed Crops*, 2004, 24(5):301-302.