

极端污染环境草甘膦抗性菌株的分离、鉴定及特性

沙纪莹^{1,2}, 金丹³, 陆伟², 张晓喻¹, 张超¹, 李亮², 马瑞强², 肖磊¹,

王一丁^{1*}, 林敏^{2*}

(¹ 四川师范大学生命科学学院, 成都 610068)

(² 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

(³ 西南大学生物技术中心, 重庆 400716)

摘要:【目的】筛选高抗草甘膦菌株并对其进行鉴定和特性研究。【方法】从草甘膦极端污染土壤中分离高抗草甘膦菌株, 并检测其草甘膦耐受能力, 最适生长 pH 和抗生素抗性。通过生理生化特征和分子生物学特征的测定对该菌株进行鉴定。【结果】从草甘膦极端污染土壤中分离到一株高抗草甘膦的菌株 SL06500, 该菌株最高耐受草甘膦浓度为 500 mmol/L, 并且在 200~500 mmol/L 之间, 菌株生长迅速, 最适生长 pH 为 4.0, 具有氨苄青霉素、卡那霉素、四环素和氯霉素抗性。用 16S rDNA 的通用引物, 经 PCR 扩增、测序得到 SL06500 的 16S rDNA 序列, 该序列在 GenBank 的登录号为 EU006066。将此序列经 NCBI Blast 进行核苷酸比对发现 SL06500 与无色杆菌属 (*Achromobacter*) 和产碱杆菌属 (*Alcaligenes*) 的 Identity 值均为 99%。按照 1994 年版伯杰氏鉴定细菌学手册的命名规则, 结合生理生化指标测定的结果, 将菌株命名为木糖氧化产碱杆菌木糖氧化亚种 SL06500 (*Alcaligenes xylosoxidans subsp. xylosoxidans* SL06500)。【结论】该菌株的较高草甘膦抗性和嗜药性的特点值得我们进行进一步的研究。更重要的是, 这是首次关于木糖氧化产碱杆菌木糖氧化亚种草甘膦抗性的报道。

关键词: 草甘膦抗性; 16S rDNA 序列分析; 木糖氧化产碱杆菌木糖氧化亚种

中图分类号: Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 06-0824-05

草甘膦是美国 Monsanto 公司生产的除草剂 Roundup 中的主要活性成分, 具有广谱、高效、低毒、低残留等特点。但它作为一种非选择性除草剂, 对农作物同样有灭生性作用, 这大大限制了草甘膦在农业生产中的应用范围。有关抗草甘膦或降解草甘膦菌株的分离, 国外已有很多报道^[1~3]。但在已报道的菌株中, 草甘膦的耐受浓度一般在 10~200 mmol/L 之间^[4~5]。在自然环境中, 特别是在长期受高浓度草甘膦污染的土壤中, 存在种类繁多, 能耐受草甘膦的菌株, 从耐受菌株中克隆基因, 转化作物获得抗草甘膦

作物新品种是行之有效的重要途径。

莽草酸途径是植物和微生物芳香族氨基酸合成的重要途径。5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸合酶 (EPSPS) 是莽草酸途径的关键酶, 催化 3-磷酸莽草酸 (3P) 和磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 生成 5-烯醇式丙酮酸-3-磷酸莽草酸 (EPSP)。除草剂草甘膦是 PEP 的结构类似物, 能与 PEP 竞争性抑制 EPSPS 的活性, 从而阻断芳香族氨基酸的生物合成, 最终导致植物死亡。我国作为草甘膦生产和出口的大国, 目前尚没有具有自主知识产权的、适用于转基因抗草甘膦作物的 EPSPS

基金项目: 国家自然科学基金 (30470047, 30200007)

*通讯作者。王一丁, Tel: +86-28-84766411, Fax: +86-28-84766126, E-mail: wwwyiding@vip.tom.com; 林敏, Tel: +86-10-62139578, Fax: +86-10-62136981, E-mail: linmin57@vip.163.com

作者简介: 沙纪莹 (1983-), 硕士, 研究方向为环境微生物。E-mail: shajiyang@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-12-12; 修回日期: 2008-02-23

基因,在国际竞争中处于不利地位。

本研究从草甘膦极端污染环境中筛选到一株极端耐受草甘膦的菌株 SL06500,通过生理生化指标的测定和 16S rDNA 的分析对其进行了鉴定。这为进一步克隆抗草甘膦基因和培育具有自主知识产权的抗草甘膦作物提供了理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品: 供试样品采自四川某草甘膦生产厂区内,此厂生产草甘膦已有 5~6 年历史。

1.1.2 培养基: LB 培养基:参照文献[7]进行配制。M9 培养基:参照文献[8]进行配制。

1.1.3 主要试剂和仪器: 草甘膦购自河北某化工有限公司;胶回收试剂盒为 QIAEXII Gel Extraction Kit 购自 QIAGEN 公司;Ex Taq 酶和 PCR 相关试剂购自大连 TaKaRa 公司;卡那霉素、氯霉素、四环素购自上海生工生物技术有限公司;其它普通化学试剂购自北京化学试剂厂。紫外可见分光光度计:日立 U-3010;凝胶成像系统:Bio-Rad Gel Doc XR;离心机:日立 CR-22G, Sigma 3K15;PCR 仪:Thermo Hybaid PX2、Idaho1818 毛细管 PCR 仪。

1.1.4 引物: F27, 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3', R1492, 5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'。由上海生物工程有限公司合成。

1.2 草甘膦抗性菌株的筛选

将采集到的土样接入含有 50 mmol/L 草甘膦的 M9 液体培养基中,37℃ 恒温摇床上进行富集培养。如此连续转接 3 次即得到以耐受草甘膦占优势的菌株富集液。将此富集液用 LB 平板划线法分离单菌落,根据形态、色泽及大小的差异,选择单菌落进行纯化。将纯化后的单菌落在不同浓度梯度草甘膦平板上进行筛选,挑选适应草甘膦浓度高的、生长繁殖快而旺盛的单菌落进行进一步研究。

1.3 菌株的草甘膦耐受性检测

将菌株接入草甘膦浓度分别为 100 mmol/L、200 mmol/L、300 mmol/L、400 mmol/L、500 mmol/L、600 mmol/L 和 700 mmol/L 的 M9 液体培养基中,37℃ 摇床培养 72 h 后,测定培养液的 OD_{600} (同时以不加草甘膦的 M9 液体培养基作为对照)。

1.4 菌株的抗生素抗性检测

本实验所用抗生素及其工作浓度分别为:氨苄青霉素 50 μ g/mL;氯霉素 25 μ g/mL;卡那霉素 50 μ g/mL;

四环素 5 μ g/mL。将菌株接种到分别加入各种抗生素的 LB 平板上,37℃ 恒温培养过夜,观察菌株生长情况。

1.5 pH 对菌株生长的影响

将菌株接种于不同 pH(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14)的 LB 液体培养基中,在 37℃ 条件下摇床培养 12 h。菌体生长量以 OD_{600} 值表示。培养 24 h 后测培养液的 pH 值。

1.6 菌株形态和生理生化鉴定

参照文献[6, 7]进行操作。

1.7 菌株的 16S rDNA 序列分析

按 CTAB 法提取细菌基因组为模板^[9],以 F27 和 R1492 为上下游引物扩增菌株 16S rDNA。利用 Promega 公司的 pGEM-T Vector Systems 对 PCR 产物进行克隆,连接产物转化大肠杆菌 JM109,在含 Ap (50 μ g/mL)/IPTG/X-gal 的 LB 平板上选择白斑,碱解法提取质粒,用 *Nde*I 和 *Hind*III 酶切分析插入片段的大小。16S rDNA 核苷酸序列测定由农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程开放实验室测序部完成。将所得到的核苷酸序列用 Blast 程序与 GenBank 中的 16S rDNA 序列进行同源性比较,用 ClustalW 进行多重序列对比,用软件 Phylip 按 Neighbor-Joining 法构建系统发育树,计算菌株间同源性。

2 结果

2.1 草甘膦抗性菌株的筛选

经富集培养和筛选,得到纯化菌株 35 株,其草甘膦抗性范围均大于 200 mmol/L,其中一株能在草甘膦浓度为 500 mmol/L 的 M9 平板上生长良好,暂将其命名为 SL06500,用于进一步研究。

2.2 菌株的草甘膦耐受性检测

在草甘膦浓度低于 200 mmol/L 或大于 500 mmol/L

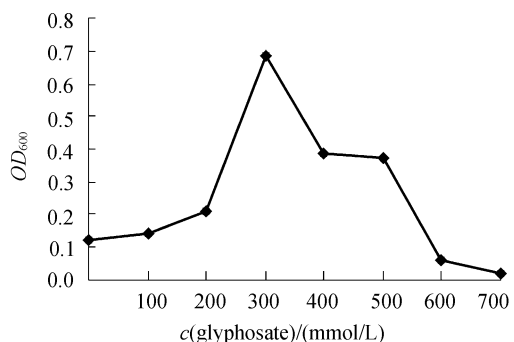


图 1 菌株 SL06500 在不同草甘膦浓度液体 M9 培养基中的生长情况

Fig. 1 Growth of the strain SL06500 in liquid M9 minimal medium supplemented with glyphosate at the concentrations indicated.

时,菌株生长非常缓慢;在 200~500 mmol/L 之间,菌株生长迅速,并且在浓度为 300 mmol/L 时培养液的 OD_{600} 达到最大值(图 1)。可知,一定浓度的草甘膦会促进菌株的生长,这种特点与某些菌株的嗜盐^[6]或嗜酸特性相类似,这一点值得我们进行进一步的研究。

2.3 pH 对菌株生长的影响

菌株 SL06500 的生长在 pH 3.0~9.0 之间比较稳定,其中在 pH 4.0 时生长效果最佳,菌体生长 OD_{600} 为 2.68。此结果说明菌体 SL06500 是一株中性菌,但在酸性环境中能较好的生长(图 2)。培养 24 h 后测量菌体生长旺盛的培养液的 pH 值,结果显示(表 1),培养后菌液均呈碱性,说明菌株 SL06500 在生长的过程中产生碱性物质,从而改变了培养液的 pH。

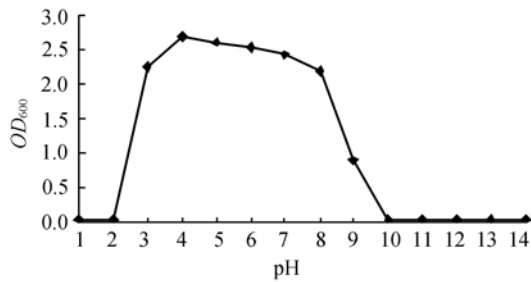


图 2 pH 对菌株生长的影响
Fig. 2 The influence on the growth of the strain from the pH value.

表 1 培养前后培养液的 pH 值变化
Table 1 Comparison of the value of the pH in the medium before and after the cultivation

pH value before the cultivation	pH value after the cultivation
3	7.32
4	8.13
5	8.33
6	8.43
7	8.46
8	8.48
9	8.45

2.4 菌株的抗生素抗性

通常在环境中分离的菌株对一些抗生素具有抗性^[11]。菌株 SL06500 对于常用的抗生素如:氯苄青霉素、卡那霉素、氯霉素和四环素都具有明显的抗性。

2.5 菌株形态和生理生化特征

根据文献[6]和[7],对菌株 SL06500 进行了形态学观察和生理生化特征的测定,结果见表 2,菌株革兰氏染色阴性,短杆状,不产生芽孢。在 LB 培养基上呈黄色、不透明、圆形菌落,边缘不规则。检索文献[6]和[7],初步鉴定为产碱杆菌属。

表 2 菌株形态和生理生化特征
Table 2 The morphology, physiological and biochemical characteristics of the strains

Characters	Results	Characters	Results
Gram staining	—	M. R test	—
Shape of strain body	Short staff	V. P test	—
Spore	—	Indole test	—
Catalase	+	Only one carbon source	
Oxidase	+	utilization	
Gelatin liquefaction	—	Glucose	+
Nitrate reduction	+	Lactose	—
Phenylalanine deamination	—	Cane sugar	—
Citrate utilization	+	Rhamnegin	—
Hydrogen sulphide production	—	Fructose	—
		Arabinose	—

2.6 菌株的 16S rDNA 序列分析

用引物 F27、R1492,以 SL06500 基因组 DNA 为模板,PCR 扩增得到约 1.5 kb 左右的 16S rDNA 片段,经测序,序列长度为 1496 bp (GenBank 登录号为 EU006066)。用 BLAST 程序对 SL06500 菌的 16S rDNA 序列和 GenBank 中已收录的 16S rDNA 序列进行核苷酸同源性比较,调出其中已鉴定菌株的 16S rDNA,用 ClustalW 进行多重序列对比,用软件 Phylip (3.67) 按

Neighbor-Joining^[12]法构建系统发育树(图 3)。结果发现 SL06500 与无色杆菌属 (*Achromobacter*) 和产碱杆菌属 (*Alcaligenes*) 都有同源性,Identity 值均为 99%,并且与 *Achromobacter xylosoxidans* strain AU1011 (AF411020) 的 Identity 值高达 99.47%。根据生理生化实验结果,依据文献[2]的命名规则,将菌株 SL06500 命名为木糖氧化产碱杆菌木糖氧化亚种 SL06500 (*Alcaligenes xylosoxidans subsp. xylosoxidans* SL06500)。

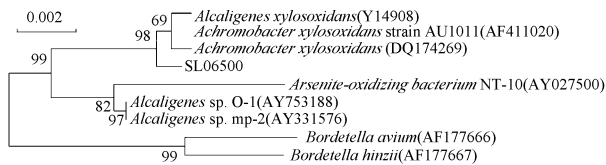


图 3 利用16S rDNA同源序列和邻接法 (Neighbor-Joining) 构建的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on homologous sequences of 16S rDNA and Neighbor-Joining analysis. The numbers at each branch points are the percentage supported by bootstrap, and the numbers after each bacterial name are 16S rDNA accessions in GenBank. Bar, 2% sequence divergence.

3 讨论

目前,有关微生物耐受或降解草甘膦的研究已有报道,并且,草甘膦抗性微生物的筛选、鉴定及草甘膦抗性基因的克隆、转化和表达技术都已相当成熟。但是在已报导的菌株中,草甘膦的耐受浓度一般在10~200 mmol/L之间,远不如本文报道的最佳抗草甘膦浓度100~300 mmol/L,最高草甘膦负荷量500 mmol/L的水平,而且该菌株对于各种环境条件包括温度、酸碱度的适应性较强,是一株良好的草甘膦耐受菌,并且该菌株还具有嗜药性这一特性^[10],这值得我们进行进一步的研究。

但是到目前为止,对于木糖氧化产碱杆菌这一菌种的研究主要集中在该菌种引起的临床感染上^[13~15],尚没有关于其草甘膦抗性的报道。1995年,Barry等^[16]曾将无色杆菌LBAA的草甘膦氧化还原酶基因GOX(glyphosate oxidoreductase enzyme)克隆并转化获得耐受草甘膦的植物。这一结果对于木糖氧化产碱杆菌的草甘膦抗性机制及其草甘膦抗性基因的克隆都具有极大的帮助。基于此菌对草甘膦有如此之高的抗性,如能将该菌株的抗草甘膦基因克隆,进行植物偏爱密码子改造,并且转入植物中,或许能比其它的转基因抗草甘膦作物有更好的草甘膦抗性,并且能成为转基因抗草甘膦作物的一个很好的资源。

参 考 文 献

- [1] Moore JK, Braymer HD, Larson AD. Isolation of a *Pseudomonas* sp. which utilizes the phosphonate herbicide glyphosate. *Appl Environ Microbiol*, 1983, 46: 316-320.
- [2] O'Connell C, Pattee PA, Foster TJ. Sequence and mapping of the

aroA gene of *Staphylococcus aureus* 8325-4. *J Gen Microbiol*, 1993, 139: 1449-1460.

- [3] Duncan K, Lewendon A, Coggins JR. Mutant EPSP synthase genes from *tomato*, *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, glycine max *E.Coli* K-12 confer tolerance to glyphosate. *FEBS lett*, 1984, 170: 59-63.
- [4] Griffin HG, Griffin AM. Cloning and DNA sequence analysis of the *serC-aroA* operon from *Salmonella gallinarum*; evolutionary relationships between the prokaryotic and eukaryotic *aroA*-encoded enzymes. *J Gen Microbiol*, 1991, 137: 113-121.
- [5] Pipke R, Amrhein N. Isolation and characterization of a mutant of *Arthrobacter* sp. strain GLP-1 which utilizes the herbicide glyphosate as its sole source of phosphorus and nitrogen. *Appl Environ Microbiol*, 1988, 54: 2868-2870.
- [6] Breed EG, Murray D, Smith NR. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 9th ed. Baltimore(USA): The Williams and Wilkins co, 1994.
- [7] 张纪忠. 微生物分类学. 上海: 复旦大学出版社, 1990.
- [8] Sambrook J, Frisch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫等译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1996.
- [9] Wilson K. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: J Wiley, 1987.
- [10] 宁卓, 张波. 嗜盐菌的研究进展及应用. *苏盐科技(Jiangsu Salt Science & Technology)*, 2007, 1: 31-32.
- [11] Franklin FCH, Bagdasarian M, Bagdasarian MM, et al. Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWWO from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring meta cleavage pathway. *Natl Acad Sci USA*, 1981, 78(12): 7458-7462.
- [12] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 14: 406-425.
- [13] 尚建中. 木糖氧化产碱杆菌生物学特性研究. 河北医科大学学报(*Journal of Hebei Medical University*), 2002, 23(6): 335-337.
- [14] 尚建中, 孔武明, 江河清. 12例脱硝产碱菌木糖氧化亚种感染临床分析. *中华内科杂志(Chinese Journal of Internal Medicine)*, 1996, 35(3): 197-198.
- [15] 尚建中, 江河清, 张正行. 木糖氧化无色杆菌感染30例临床分析. *中华内科杂志(Chinese Journal of Internal Medicine)*, 2000, 39(6): 411-412.
- [16] Barry GF, Kishore GM. Glyphosate tolerant plants. US: 5776760. 1998.

Isolation and characterization of a new glyphosate-resistant strain from extremely polluted environment

Jiying Sha^{1,2}, Dan Jin³, Wei Lu², Xiaoyu Zhang¹, Chao Zhang¹, Liang Li², Ruiqiang Ma²,
Lei Xiao¹, Yiding Wang^{1*}, Min Lin^{2*}

(¹College of Life Sciences, Sichuan Normal University, Chengdu 610068, China)

(²Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Science, Beijing 100081, China)

(³Biotechnology Research Center, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: [Objective] To isolate and characterize a glyphosate-resistant strain from extremely polluted environment. [Methods] A glyphosate-resistant strain was isolated from extremely polluted soil taking glyphosate as the selection pressure. Its glyphosate resistance, growth optimal pH and antibiotic sensitivity were detected. Its morphology, cultural characteristics, physiological and biochemical properties, chemotaxonomy and 16S rDNA sequences were studied. Based on these results, the strain was identified according to the ninth edition of Bergey's manual of determinative bacteriology. [Results] The isolate was named SL06500. It could grow in M9 minimal medium containing up to 500 mmol/L glyphosate. The cell growth optimal pH of SL06500 was 4.0. It was resistant to ampicillin, kanamycin, tetracycline and chloromycetin. The 16S rDNA of SL06500 was amplified by PCR and sequenced. Compared with the published nucleotide sequence of 16S rDNA in NCBI(National Center for Biotechnology Information), SL06500 showed high identity with *Achromobacter* and *Alcaligenes*. Based on morphological, physiological and biochemical characteristics, the strain was identified as *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* SL06500 according to the ninth edition of Bergey's manual of determinative bacteriology. [Conclusion] Strain SL06500 is worthy to be studied because of its high glyphosate resistance. **Keywords:** glyphosate resistance; 16S rDNA sequence analysis; *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *Xylosoxidans*

Supported by the National Natural Science of Foundation of China (30470047,30200007)

*Corresponding author. Yiding Wang, Tel: +86-28-84766411, Fax: +86-28-84766126, E-mail: wwwyiding@vip.tom.com; Min Lin, Tel: +86-10-62139578, Fax: +86-10-62136981, E-mail: linmin57@vip.163.com

Received: 12 December 2007/ Revised: 23 February 2008

《微生物学报》真诚欢迎刊登广告

《微生物学报》(月刊)创刊于 1953 年,由中国微生物学会和中国科学院微生物研究所主办,是我国微生物领域唯一的综合性学报级期刊和国家自然科学核心期刊,被国内外多家重要的文摘刊物和数据库收录。曾多次被评为优秀科技期刊。

本刊历史悠久,发行量大,内容涵盖面广,主要报道普通微生物学,工业、农业、医学和兽医微生物学,免疫学以及与微生物学有关的生物工程等方面的研究成果和科研进展。一直受到国内外科研工作者、高等院校师生和相关企业界的欢迎。

本刊提供广告服务,分为彩色图版、黑白图版及彩样装订 3 种形式,刊登与微生物学相关的试剂、仪器、设备及生物技术等方面的产品信息,为您开拓在微生物学领域新的发展空间。本刊态度严谨,信守协议,已与众多生物技术公司建立了长期的合作关系。

需刊登广告的客户,可以能过电话、email 与我们联系获取具体版位及报价,双方经协商确定版位后将签署正式的广告刊登合同。欲了解更多信息,欢迎登录本刊网站 <http://journals.im.ac.cn>, 进入《微生物学报》查看广告服务专区。

联系人: 武文、王闵; 电话: 010-64807336, 010-64807521; 传真: 010-64807327; E-mail: gg@im.ac.cn