

# 一株阿特拉津降解菌的分离鉴定及降解特性

闫彩芳<sup>1</sup> 娄旭<sup>1</sup> 洪青<sup>1,2\*</sup> 李顺鹏<sup>1</sup>

(1. 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室 南京农业大学生命科学学院 江苏 南京 210095)

(2. 土壤与农业可持续发展国家重点实验室 中国科学院南京土壤研究所 江苏 南京 210008)

**摘要:** 从农药厂废水处理池的活性污泥中分离到一株阿特拉津降解菌 X-4, 根据其生理生化特性和 16S rRNA 基因序列相似性分析, 将其初步鉴定为节杆菌属(*Arthrobacter* sp.)。该菌能以阿特拉津为唯一碳氮源生长, 42 h 内对 100 mg/L 的阿特拉津降解效果为 95.7%, 降解阿特拉津的最适温度为 30 °C, pH 为 7.0。该菌对多种重金属离子都存在抗性, 显示了其在去除阿特拉津和重金属复合污染方面的应用潜力。对其降解基因的初步研究显示, 该菌含有 *trzN*、*atzB* 和 *atzC* 3 个阿特拉津降解相关基因。

**关键词:** 阿特拉津, 生物降解, 重金属抗性, 降解相关基因

## Isolation, identification and characterization of an atrazine-degrading strain

YAN Cai-Fang<sup>1</sup> LOU Xu<sup>1</sup> HONG Qing<sup>1,2\*</sup> LI Shun-Peng<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

(2. State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Science, Nanjing, Jiangsu 210008, China)

**Abstract:** A bacteria strain X-4 capable of degrading atrazine was isolated from the activated sludge from the wastewater treating system of an atrazine manufacturer. It was preliminarily identified as *Arthrobacter* sp. according to its physiological & biochemical characteristics and the analysis of its 16S rRNA gene sequence. This strain could use atrazine as sole carbon and nitrogen source, and degrade 95.7% of 100 mg/L atrazine within 42 h. The optimal pH and temperature for the degradation were 30 °C and pH 7.0, respectively. Strain X-4 could tolerate many kinds of heavy metals, which showed its potential in treating the co-contamination of atrazine and heavy metals. The atrazine-degrading related genes of strain X-4 were the combination of *trzN*, *atzB* and *atzC*.

**Keywords:** Atrazine, Biodegradation, Heavy metal-resistance, Degradation related genes

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31070099); 土壤与农业可持续发展国家重点实验室开放基金(No. Y052010025)

\* 通讯作者: Tel: 86-25-84396685; 信箱: hongqing@njau.edu.cn

收稿日期: 2010-12-29; 接受日期: 2011-02-16

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

阿特拉津也称莠去津(Atrazine),是在世界范围内广泛使用的一种三嗪类除草剂,在防除杂草方面占有重要地位,但它的残留会对一些后茬敏感作物如小麦、大豆、水稻等产生药害<sup>[1-2]</sup>。由于阿特拉津淋溶性好,易扩散,迁移率高,可以随排灌水和降水流失而造成地下水及江河污染<sup>[3]</sup>,因此阿特拉津污染环境的生物修复问题是农药污染控制领域的研究热点。革兰氏阴性的假单胞菌 ADP 菌株中的阿特拉津降解途径已经得到阐明,它通过降解基因 *atzABCDEF* 编码的 6 个酶将阿特拉津完全矿化<sup>[4-8]</sup>。而革兰氏阳性的节杆菌 SP12 菌株中的降解基因则是 *trzN* 和 *atzBC* 基因的组合<sup>[9]</sup>。本研究从农药厂废水处理池的活性污泥中分离到一株阿特拉津降解菌,初步鉴定为 *Arthrobacter* sp., 并对其降解特性和相关基因进行了研究,以期为其在生物修复中的应用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 培养基与试剂

LB 培养基(g/L): 酵母膏 5.00, 蛋白胨 10.00, NaCl 10.00。

唯一碳氮源培养基(g/L): NaCl 1.00, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.50, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.50, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.10。

以阿特拉津为唯一碳氮源,浓度视需要添加。

阿特拉津,纯度>98%,由江苏省农科院提供。其他化学试剂均为分析纯。

### 1.2 菌株分离

将取自某农药厂废水处理池的活性污泥 5 g 置于 100 mL 的以阿特拉津为唯一碳氮源的培养基(浓度为 100 mg/L)中,于 30 °C、180 r/min 培养 5 d,然后每 5 d 以 3% 的接种量转接到相同的培养基中,连续传 3 代。然后取 0.5 mL 富集液梯度稀释,取 10<sup>-5</sup>-10<sup>-7</sup> 梯度的稀释液各 0.1 mL 涂布于含 100 mg/L 阿特拉津的 1/10 LB 的固体培养基上,30 °C 培养 7 d 后,挑取周围有透明圈的单菌落,对其划线纯化 3 次后验证其降解性能。

### 1.3 菌株鉴定

菌株的形态及生理生化特性测定参照文献[10]

进行,16S rRNA 基因克隆参照文献[11]进行,高盐法提取 X-4 总 DNA 作为模板,进行 16S rRNA 基因扩增,正向引物: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',反向引物: 5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'; 50 μL 体系为: 模板 1 μL, dNTPs (25 mmol/L) 4 μL, 引物(1 mmol/L)各 1 μL, 10×*Taq* 缓冲液 5 μL, Mg<sup>2+</sup>(25 mmol/L) 4 μL, *Taq* 酶(5 U/μL) 0.5 μL, 用超纯水补至 50 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。采用试剂盒回收 PCR 扩增产物,琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物的大小(1.5 kb 左右)后,将其 TA 克隆后进行测序(由上海英骏生物技术有限公司完成)。将测序结果与 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)及其 Ribosomal Database Project II (<http://rdp.cme.msu.edu>)上的相关 16S rRNA 基因序列进行同源性比对分析。

### 1.4 阿特拉津浓度的测定

将培养液和三氯甲烷按 1/3 的比例进行全量提取,剧烈振荡后静置分层,弃去上层水相,有机相经无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 脱水后,用滤膜过滤萃取液,收集滤液,常温挥发干,甲醇溶解,用 HPLC 检测。参考文献[12]进行,检测条件: 250 mm×4.6 mm C<sub>18</sub> 不锈钢色谱柱;流动相为甲醇/水(80:20, V/V);流速为 1.0 mL/min; Waters 2487 紫外检测器,检测波长为 226 nm。

### 1.5 阿特拉津降解相关基因的检测

扩增 *trzN* 全基因的引物根据 Mulbry 等的报道合成<sup>[13]</sup>, *atzABC* 基因片段扩增引物按文献<sup>[14-15]</sup>合成。以 X-4 总 DNA 为模板,使用 PTC-200 Peltier Thermal Cycler, 25 μL 扩增体系: 10×buffer 2.5 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2 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 0.3 μg。 *trzN* 全基因扩增条件: 95 °C 5 min; 94 °C 30s, 57 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。降解基因保守片段扩增条件: 95 °C 3 min; 94 °C 30 s, 50 °C(*atzA*)或 57 °C(*atzB*)或 49 °C(*atzC*) 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物大小,将其 TA 克隆后进行测序(由上海英骏生物技术有限公司

完成), 测序结果通过在线分析 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 与 GenBank 中的基因序列进行相似性比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株分离及其生理生化特性

经过富集培养和纯化, 获得一株能降解阿特拉津的细菌, 命名为 X-4。该菌株革兰氏阳性, 杆状, 有鞭毛, 菌体大小为  $(0.8-1.2) \mu\text{m} \times (1.8-3.0) \mu\text{m}$ ; 在 LB 平板上生长 1 d 形成 1.0 mm–1.5 mm 的菌落, 菌落为圆形, 表面凸起、呈金黄色, 粘稠, 不透明, 有光泽, 光滑, 菌落边缘不整齐, 生长过程中有球杆变化。该菌接触酶和氧化酶阳性, VP 试验阳性, 不产吡啶, 不产芽孢, 不水解淀粉, 不水解明胶, 能使石蕊牛乳酪化。以菌株 X-4 的基因组总 DNA 为模板, 用 16S rRNA 基因通用引物进行 PCR 扩增, 得到长度约为 1.5 kb 的产物, 测序后在 GenBank 上登录, 序列号为 HQ834307, 和其他模式菌株 16S rRNA 基因序列的同源性比较结果显示, 菌株 X4 与模式菌株产脉节杆菌 (*Arthrobacter ureafaciens* DSM 20216<sup>T</sup>) 的相似性 100%, 结合其生理生化特征将该菌初步鉴定为 *Arthrobacter* sp.。

### 2.2 菌株 X-4 生长与阿特拉津降解的关系

在浓度为 100 mg/L 的以阿特拉津唯一碳氮源的液体培养基中, 以 3% 的接种量接入用唯一碳氮源培养基洗涤 2 次的在 LB 培养基中培养的 X-4 种子液 ( $A_{600} \approx 1.00$ ), 于 30 °C、180 r/min 摇床培养, 定时取样, 测定阿特拉津浓度和菌体的生长量。从图 1 可以看出, X-4 可以以阿特拉津为唯一碳氮源生长, 在 42 h 内对阿特拉津的降解率为 95.7%。

### 2.3 温度对 X-4 降解阿特拉津的影响

在浓度为 100 mg/L 的以阿特拉津唯一碳氮源的液体培养基中, 以 3% 的接种量分别接入用唯一碳氮源培养基洗过的 X-4 种子液 ( $A_{600} \approx 1.00$ ), 在不同温度下以 180 r/min 摇床培养, 48 h 后取样测定阿特拉津浓度, 结果如图 2 所示, 菌株 X-4 在 30 °C 时降解阿特拉津效果最好, 过高过低温度都不利于 X-4 对阿特拉津的降解。

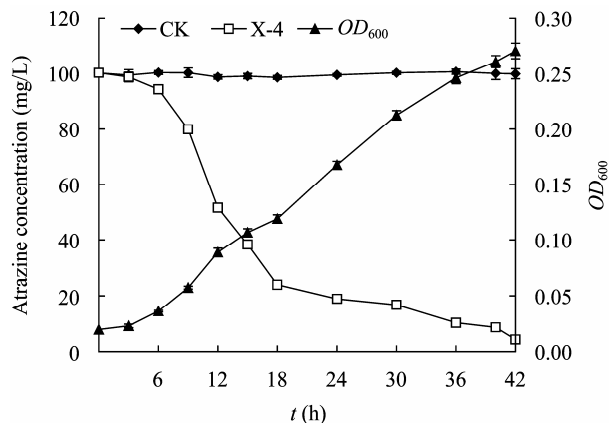


图 1 菌株 X-4 生长与阿特拉津降解的关系

Fig. 1 Relationship between the growth of X-4 and degradation of atrazine

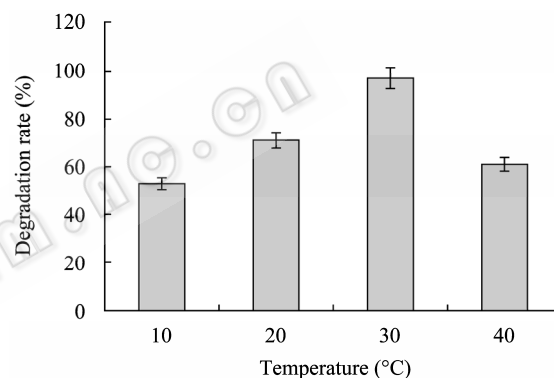


图 2 不同温度对 X-4 对降解阿特拉津的影响

Fig. 2 Effects of different temperature on atrazine degradation by X-4

### 2.4 初始 pH 值对 X-4 降解阿特拉津的影响

调整浓度为 100 mg/L 的阿特拉津唯一碳氮源液体培养基的 pH 值分别为 5、6、7、8、9、10, 以 3% 的接种量分别接入用唯一碳氮源培养基洗过的 X-4 种子液 ( $A_{600} \approx 1.00$ ), 30 °C、180 r/min 摇床培养, 48 h 后取样测定阿特拉津浓度, 结果见图 3, 从图中可以看出, 菌株 X-4 在 pH 6–9 范围内都能表现出良好的降解能力, 最适 pH 为 7。

### 2.5 阿特拉津起始浓度对 X-4 降解阿特拉津的影响

在唯一碳氮源培养基中加入阿特拉津, 使起始浓度分别为 5、10、20、30、50 mg/L, 以 3% 的接种量接入用唯一碳氮源培养基洗过的 X-4 种子液 ( $A_{600} \approx 1.00$ ), 于 30 °C、180 r/min 的摇床培养, 每

隔一段时间取样,测定阿特拉津的浓度。从图 4 可以看出, X-4 对较低浓度的阿特拉津有较好的降解效率,对 5 mg/L 的降解率达 99.9%,当阿特拉津浓度大于 10 mg/L 时,阿特拉津终浓度维持在 1-2 mg/L,不再有明显变化,可能是由于代谢产物的积累引起了抑制作用。

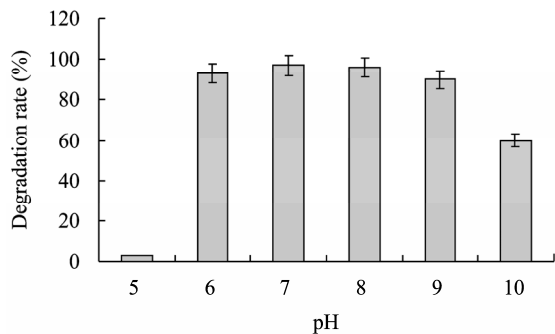


图 3 不同初始 pH 对 X-4 阿特拉津的影响  
Fig. 3 Effects of different initial pH on atrazine degradation by strain X-4

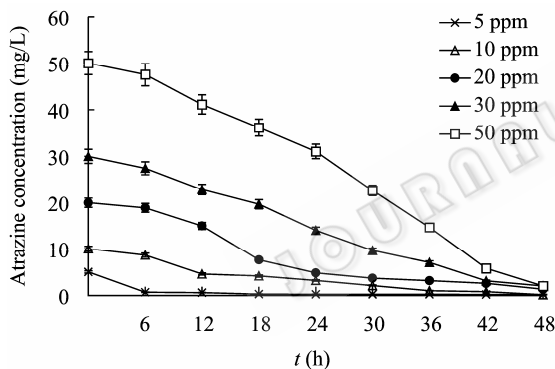


图 4 X-4 对不同起始浓度阿特拉津的降解  
Fig. 4 Effects of different initial atrazine concentration on atrazine degradation by strain X-4

## 2.6 不同金属离子对 X-4 降解阿特拉津的影响

在浓度为 100 mg/L 的阿特拉津唯一碳氮源的液体培养基中分别加入终浓度为 1 mmol/L 的金属离子,以 3% 的接种量分别接入用唯一碳氮源培养基洗过的 X-4 种子液( $A_{600} \approx 1.00$ ),在 30 °C 条件下以 180 r/min 摇床培养 48 h 后,取样测定阿特拉津浓度,结果如图 5 所示,菌株 X-4 的降解能力受  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$  的抑制显著, $\text{Cd}^{2+}$  和  $\text{Ni}^{2+}$  有一定的抑制作用,其他的金属离子没有明显的抑制,显示该菌株有较强的重金属抗性。

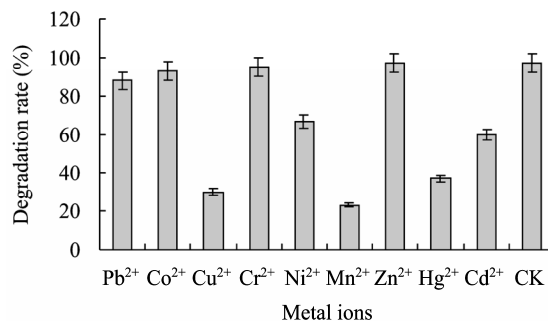


图 5 不同金属离子对 X-4 降解阿特拉津的影响  
Fig. 5 Effects of different metal ions on atrazine degradation by strain X-4

## 2.7 X-4 中阿特拉津降解相关基因的检测

以 X-4 总 DNA 为模板扩增相关阿特拉津降解相关基因,分别扩出 1 392 bp 大小的 *trzN* 基因、491 bp 大小的 *atzB* 核心片段和 579 bp 的 *atzC* 核心片段,未扩出 *atzA* 核心片段(图 6),说明菌株 X-4 中降解相关基因是是 *trzN* 与 *atzBC* 基因的组合,序列测定和比较结果显示,它们与已报道的其它菌中的相应序列的相似性分别为 100%、100%、99%,说明 3 个基因都具有保守性。

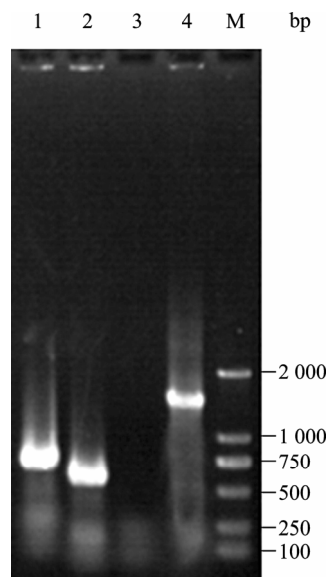


图 6 阿特拉津降解相关基因的检测  
Fig. 6 PCR detection of atrazine-degradation related genes fragment of X-4

Note: 1: PCR product of *atzC* fragment; 2: PCR product of *atzB* fragment; 3: PCR product of *atzA* fragment; 4: PCR product of total *trzN*; M: DL2000 DNA marker.

### 3 结论

阿特拉津是一种三嗪类除草剂, 其生物降解一直受到环境保护领域的关注。本研究分离到一株以阿特拉津为唯一碳氮源生长的降解菌 X-4, 根据生理生化及 16S rRNA 基因序列比对分析, 将其初步鉴定为节杆菌属(*Arthrobacter* sp.)。该菌在 42 h 内对 100 mg/L 阿特拉津降解率达 95.7%, 与以往报导的阿特拉津降解菌<sup>[13-15]</sup>相比, 该菌能抗多种重金属离子, 显示该菌在处理阿特拉津和重金属复合污染方面有一定的应用潜力。

### 参考文献

- [1] Best JA, Weber JB. Disappearance of *s*-triazines as affected by soil pH using a balance sheet approach[J]. *Weed Sci*, 1974, 22(4): 364-373.
- [2] Cohen SZ, Greeger SM, Carse RF, et al. Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses, in Krueger RF, Seiber JN. Treatment, disposal of pesticide waste[M]. American Chemical Society, Washington DC, 1984: 297-325.
- [3] U S Environmental Protection Agency. Rules and regulations[M]. *Fed Regist*, 1991: 3552.
- [4] de Souza ML, Wackett LP, Boundy-Mills KL, et al. Cloning, Characterization, and expressing of a gene region from *Pseudomonas* sp. strain ADP involved in the dechlorination of atrazine[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61(9): 3373-3378.
- [5] Boundy-Mills KL, de Souza ML, Mandelbaum RT, et al. The *atzB* gene of *Pseudomonas* sp. strain ADP encodes the second enzyme of a novel atrazine degradation pathway[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(3): 916-923.
- [6] de Souza M, Sadowsky MJ, Wackett LP. Atrazine chlorohydrolase from *Pseudomonas* sp. strain ADP: gene sequence, enzyme purification, and protein characterization[J]. *J Bacteriol*, 1996, 178(16): 4894-4900.
- [7] Sadowsky MJ, Tong Z, de Souza M, et al. AtzC is a new member of the amidohydrolase protein superfamily and is homologous to other atrazine-metabolizing enzymes[J]. *J Bacteriol*, 1998, 180(1): 152-158.
- [8] 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]. *J Bacteriol*, 2001, 183(19): 5684-5697.
- [9] Piutti S, Semon E, Landry D, et al. Isolation and characterization of *Nocardioide*s sp. SP12, an atrazine-degrading bacterial strain possessing the gene *trzN* from bulk- and maize rhizosphere soil[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 221(1): 111-117.
- [10] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 370-410.
- [11] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE. Short Protocols in Molecular Biology[M]. 颜子颖, 等译. 北京: 科学出版社, 1999: 39-40.
- [12] Mandelbaum RT, Allan DL, Wackett LP. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the *s*-triazine herbicide atrazine[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61(4): 1451-1457.
- [13] Mulbry WW, Zhu H, Nour SM, et al. The triazine hydrolase gene *trzN* from *Nocardioide*s sp. strain C190: cloning and construction of gene-specific primers[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, 206(1): 75-79.
- [14] Fruchey I, Shapir N, Sadowsky MJ, et al. On the origins of cyanuric acid hydrolase: purification, substrates, and prevalence of AtzD from *Pseudomonas* sp. strain ADP[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(6): 3653-3657.
- [15] Topp E, Mulbry WM, Zhu H, et al. Characterization of *s*-triazine herbicide metabolism by a *Nocardioide*s sp. isolated from agricultural soils[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(8): 3134-3141.