

阿特拉津降解菌株 DNS32 的降解特性及分类鉴定与降解途径研究

郭火生 王志刚 孟冬芳 王洋 张庆媛 张颖*

(东北农业大学 资源与环境学院 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:【目的】研究阿特拉津降解菌株 DNS32 的菌种分类、降解特性及降解途径,丰富阿特拉津降解菌菌种资源。【方法】在长期施用阿特拉津的东北地区寒地黑土中筛选出一株以阿特拉津为唯一氮源生长的降解菌株 DNS32,测定其基本降解特性,通过 16S rRNA 序列分析进行分类鉴定,并利用阿特拉津降解基因 PCR 扩增技术及降解产物生成量的测定,进一步揭示其降解途径。【结果】实验结果发现 DNS32 菌株具有较好的降解能力,且在相对较低温度下也具有一定的降解能力。16S rRNA 序列分析结果表明 DNS32 与鲁氏不动杆菌 (*Acinetobacter lwoffii*) 16S rRNA 序列同源性高达 99%。成功地扩增降解基因 *trzN*、*atzB* 及 *atzC*,实验结果表明 DNS32 遵循 *Arthrobacter aureescens* TC1 的降解模式,可将阿特拉津降解为氰尿酸,降解产物的生成量测定也证明了这一点。【结论】实验结果丰富了阿特拉津降解菌菌种资源,为不动杆菌属的阿特拉津降解菌研究提供了参考。

关键词: 阿特拉津, 不动杆菌属, 阿特拉津降解基因, 降解途径

Degradation characteristics and identification and the degradation pathway of the atrazine-degrading strain DNS32

GUO Huo-Sheng WANG Zhi-Gang MENG Dong-Fang WANG Yang
ZHANG Qing-Yuan ZHANG Ying*

(College of Resource & Environment, Northeast Agricultural University, Harbin,
Heilongjiang 150030, China)

基金项目: “十二五” 国家科技计划(No. 2011BAD04B02-1); 国家科技重大专项项目(No. 2012ZX07201003); 黑龙江省杰出青年科学基金项目(No. JC201006); 国家自然科学基金项目(No. 30970525); 黑龙江省教育厅新世纪优秀人才项目(No. 1155-NCET-006); 教育部新世纪人才支持计划项目(No. NCET-10-0145); 黑龙江省高校长江学者后备支持计划(CSCP)

*通讯作者: Tel: 86-451-55190993; 信箱: zhangyinghrb@neau.edu.cn

收稿日期: 2011-12-30; 接受日期: 2012-03-15

Abstract: [Objective] The objective was to study the identification, degradation characteristics and the degradation pathway of the atrazine-degrading strain DNS32, and enrich the resources of atrazine-degrading bacteria. **[Methods]** Strain DNS32, which was isolated from black soil in this study, could utilize atrazine as the sole nitrogen source for growth, and its basic degradation characteristics were studied. The 16S rRNA gene phylogenetic analysis was used to identify of the strain DNS32. The degradation pathway was studied by degrading genes amplification and the measurement of the content of the final catabolite. **[Results]** The results showed that strain DNS32 had greater degradation capacity and could utilize certain amount of atrazine even under a relative low temperature. The 16S rRNA gene phylogenetic analysis showed that the 16S rRNA gene sequence of the strain DNS32 had a 99% similarity with that of *Acinetobacter lwoffii*. Atrazine-degrading genes *trzN*, *atzB* and *atzC* were amplified by PCR, and these genes enabled strain DNS32 decompose atrazine to cyanuric acid, in accordance with the degradation pathway of *Arthrobacter aurescens* TC1 proved by the measurement of the atrazine degradation rate and the content of the final catabolite. **[Conclusion]** This study enriched the resources of atrazine-degrading bacteria and provided useful informations to the study of the atrazine-degrading strains belonging to *Acinetobacter*.

Keywords: Atrazine, *Acinetobacter*, Atrazine-degrading genes, Degradation pathway

阿特拉津是一种长残留除草剂, 具有生物毒性, 且矿化过程缓慢, 在土壤中的半存留期长达 30–400 d^[1], 容易对某些后茬作物产生毒害。阿特拉津对土壤、地下水和表面水的污染及其对生态环境的危害已引起广泛重视^[2]。近年来, 生物修复方法以其低成本、效果好、不产生二次污染等特点, 已成为阿特拉津污染土壤修复的首选方法, 得到了人们的广泛关注^[3]。

为了获得高效稳定的生物修复效果, 就必须获得更多新的阿特拉津降解菌种。20 世纪 80 年代以来, 至少在 19 个属的细菌中发现具有阿特拉津降解能力的菌株^[4–11]。其中, *Pseudomonas* sp. ADP 菌株和 *Arthrobacter aurescens* TC1 菌株的降解途径研究得最为清楚, 是目前阿特拉津生物降解研究的模式菌株^[4–6]。*Pseudomonas* sp. ADP 菌株含有 6 个降解基因 *atzA*、*atzB*、*atzC* 和 *atzD*、*atzE*、*atzF*, 通过编码催化阿特拉津降解所需要的酶, 可将阿特拉津完全降解成 CO₂ 和 NH₃^[12–13]。

另外一种降解途径的代表是某些 *Arthrobacter* 细菌, 它们通过降解基因 *atzA*、*atzB* 和 *atzC*^[14], 或者是 *trzN*、*atzB* 和 *atzC*^[6], 能够将阿特拉津降解成氰尿酸。

在北方高寒黑土区, 阿特拉津施用量大, 而该地区生物修复效果受到低温因素的限制, 目前针对低温阿特拉津降解菌菌种资源相对较少, 因此筛选出适用于北方高寒黑土区的阿特拉津降解菌株, 并对其降解机理进行深入研究是十分必要的。本研究在长期施用阿特拉津的北方寒地黑土中分离获得一株阿特拉津降解菌株 DNS32, 研究其基本降解特性, 利用分子生物学手段对其进行分类鉴定, 并研究其降解基因组成及终产物的生成情况, 阐明其降解途径。

1 材料与方法

1.1 培养基及试剂

无机盐培养基(g/L): K₂HPO₄ 1.6, KH₂PO₄ 0.4,

MgSO₄ 0.2, NaCl 0.1, 葡萄糖 3, 阿特拉津含量 0.1; LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 10, 调节 pH 到 7.0。

dNTPs (北京庄盟生物公司), 10×PCR Buffer (北京庄盟生物公司), *Taq* 酶(北京庄盟生物公司), 丙酮(中国人民解放军第九零六六工厂), 三氯甲烷(天津市耀华化学试剂有限责任公司), 甲醇(TEDIA 公司), 0.01 mol/L 磷酸缓冲液(磷酸氢二钠-磷酸二氢钠 pH 7.5, 均为天津市耀华化学试剂有限责任公司)。

1.2 方法

1.2.1 16S rRNA 序列分析: LB 培养菌体过夜, 离心收集菌体, 去培养基, 采用 CTAB/NaCl 方法提取菌体总 DNA。

50 μL PCR 反应体系: DNA 模板 1 μL, Primer1 1 μL, Primer2 1 μL, dNTPs (10 mmol/L) 1 μL, 10×*Taq* Buffer 5 μL, DNA *Taq* 聚合酶 1 μL, 加 ddH₂O 至 50 μL。

PCR 扩增条件: 95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 25 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存 30 min。用 1%的琼脂糖电泳检测扩增反应产物。

本实验使用的全部引物参见 Zhang Ying 等的实验内容^[15]。

1.2.2 阿特拉津降解基因克隆: PCR 反应体系 (50 μL): DNA 模板 1 μL, Primer1 1 μL, Primer2 1 μL, dNTPs (10 mmol/L) 1 μL, 10×*Taq* Buffer 5 μL, DNA *Taq* 聚合酶 1 μL, 加 ddH₂O 至 50 μL。

PCR 扩增条件: 95 °C 5 min; 95 °C 1 min, 根据引物要求^[15]退火 30 s, 72 °C 下基因 *atzA*、*atzB*、*atzC*、*atzD*、*atzE*、*atzF* 及 *trzN* 依次分别延伸 60、40、40、60、60 和 60 s, 共 35 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存 30 min。用 1%的琼脂糖电泳检测扩增反应产物。

1.2.3 基本降解特性及降解终产物的研究: 用

LB 培养 DNS32 菌体过夜, 离心收集菌体, 清除培养基, 以无菌水重悬菌体, 调节 OD₆₀₀ 至 0.9, 1%接菌量接入无机盐培养基培养。

设定不同底物浓度、pH 值及培养温度, 在 48 h 取样测定 DNS32 生长情况及降解情况, 以此考察不同因素对 DNS32 菌株生长情况及降解能力的影响; 接菌后 30 °C 培养, 阿特拉津浓度为 100 mg/L, 每隔 8 h 取样, 测定 OD₆₀₀ 值及阿特拉津降解率, 以此研究 DNS32 菌株利用阿特拉津的生长情况及降解能力; 接菌后 30 °C 培养, 阿特拉津浓度为 100 mg/L, 每隔 12 h 取样, 测定阿特拉津含量及氰尿酸含量, 以此研究 DNS32 菌株的降解途径。每组实验设计均设置不接菌的含有同浓度阿特拉津的无机盐培养基的空白对照。

1.2.4 阿特拉津残留量及氰尿酸含量测定: 将含有阿特拉津的 10 mL 培养液倒入分液漏斗中, 加入等体积的 CHCl₃ 等体积萃取, 浓度低于检出限的置于旋转蒸发仪中浓缩后用 CHCl₃ 定容至 1 mL 待测。阿特拉津的检测采用岛津公司生产的 GC-14C 型气相色谱仪, FID 检测器和 N2000 色谱工作站; 色谱柱: 内涂 14% OV-1701 大口径毛细管柱 (300 mm×0.53 mm); 温度条件: 进样口 250 °C, 柱温 200 °C, 检测器 250 °C, 非程序升温; 气体流量: 氮气 50 kPa, 氢气 50 kPa, 空气 50 kPa, 尾气 100 kPa; 不分流进样, 进样量 1 μL。利用峰高计算阿特拉津浓度^[15]。

氰尿酸的测定根据侯升杰等^[16]的方法进行调整。将所取培养液离心, 吸取上清液, 用无机相无菌滤膜过滤到液相色谱专用瓶中。测定时采用 C18 液相色谱柱 (5 μm, 150 mm×4.6 mm), 控制器为 Waters 600 controller, 检测器为 Waters 2489 ultraviolet 紫外可见检测器, 检测波长为 213 nm。流动相为 0.01 mol/L 磷酸缓冲液(磷酸氢二钠-磷酸二氢钠 pH 7.5); 流速为 1.0 mL/min; 柱温 35 °C。利用标准曲线计算氰尿酸浓度。

2 结果与分析

2.1 DNS32 菌株降解阿特拉津的基本特性

由图 1 可知, 阿特拉津浓度低于 100 mg/L 时, 48 h 时 DNS32 菌株对培养基中的阿特拉津的降解率可达到 98% 以上, 当阿特拉津浓度高于 200 mg/L 时, 生长和降解率均受到一定抑制, 当高于 500 mg/L 时降解率低于 50%, 生长也受到抑制, 当达到 1 000 mg/L 时, 降解率仅为 2.13%。当高于 1 200 mg/L 时, 菌株几乎不降解阿特拉津。这是由于阿特拉津对微生物具有毒害作用, 若培养液中阿特拉津的浓度过高, 其毒性就会对微生物的代谢活动产生抑制作用, 导致降解活性大幅下降^[17]。DNS32 菌株对阿特拉津耐受能力可达到 1 000 mg/L, 而在 100 mg/L 时, 其降解能力及生长情况最佳。由图 2 可知, DNS32 菌株最佳生长的 pH 为 7~8, 在酸性条件和 pH 高于 8 的碱性条件下, DNS32 菌株的降解能力及生长情况均受到抑制, 该菌株在偏碱性条件下的降解与生长能力要优于酸性条件。

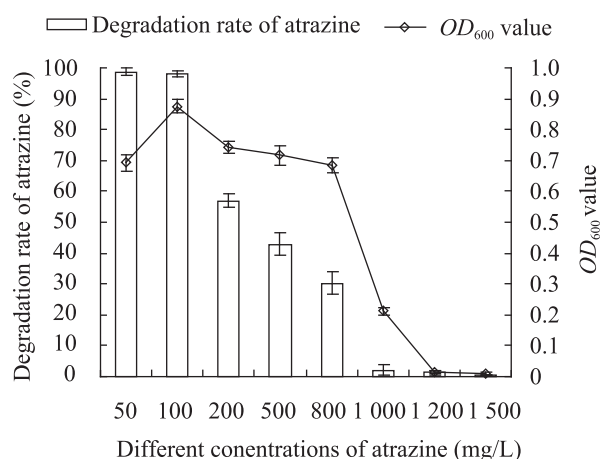


图 1 底物浓度对菌株 DNS32 生长情况及降解能力的影响

Fig. 1 Effects of different atrazine concentration on the growth and the strain DNS32

不同温度对 DNS32 生长情况及降解能力影响的研究结果见图 3。由图 3 可知, 菌株在 25 °C~30 °C 条件下有较好的生长和降解能力, 30 °C 为其最适温度。高于 35 °C 或低于 20 °C 时, 其生长和降解均受到抑制。由结果可见菌株 DNS32 在低温下仍具有一定的降解能力, 10 °C~20 °C 条件下对阿特拉津的降解率仍有近 30% 左右, 在 5 °C 时, 对阿特拉津的降解率仍为 18.12%。代先祝等研究了温度因素对 *Pseudomonas* sp. ADP 菌株(Lawrence Wackett 赠予)的降解能力

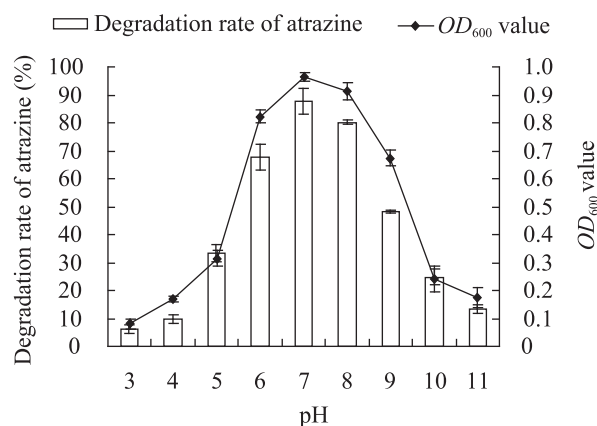


图 2 pH 值对 DNS32 菌株生长情况及降解能力影响
Fig. 2 Effects of pH on the growth and the degradation capacity of strain DNS32

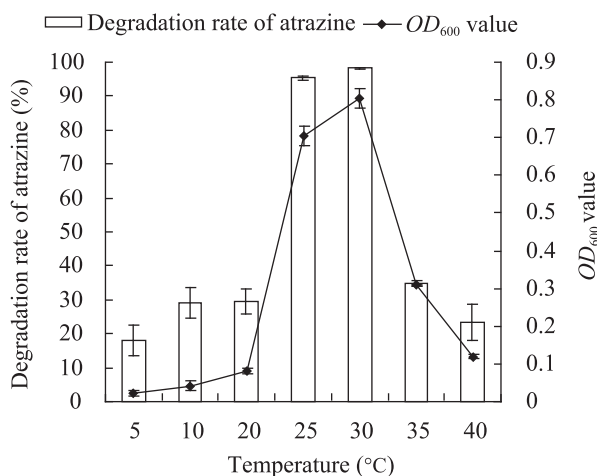


图 3 温度对 DNS32 菌株生长情况及降解能力的影响
Fig. 3 Effects of temperature on the growth and the degradation capacity of strain DNS32

的影响, 结果发现, 当温度在 20 °C 以下时, *Pseudomonas* sp. ADP 对阿特拉津降解率便下降到 10% 左右^[18]。因此, DNS32 菌株较为适合应用于北方寒地黑土区较低温度下的阿特拉津污染修复。由图 4 可知, DNS32 菌株在 16 h 以后进入指数生长期, 在 48 h 以后进入生长延滞期, OD_{600} 值可达 0.876, 其利用阿特拉津为唯一氮源时生

长情况较好。阿特拉津在 16 h 以后开始快速降解, 48 h 降解率达到 97.63%, 可将浓度为 100 mg/L 的阿特拉津基本降解完全, 具有较好的降解能力, 降解情况与生长情况基本同步。

模式菌株 *Pseudomonas* sp. ADP 在液体培养基中将浓度为 100 mg/L 的阿特拉津完全降解需要 24 h^[19], DNS32 菌株降解同等浓度的阿特拉津需要 48 h 左右, 但 *Pseudomonas* sp. ADP 的最适生长温度为 42 °C, 与之相比, DNS32 菌株可在较低温度条件下降解阿特拉津, 且降解速率较快, 因此综合最适降解温度等因素来看 DNS32 是一株阿特拉津高效降解菌株。

2.2 16S rRNA 序列分析及系统发育进化树的构建

16S rRNA 的 PCR 产物送至赛拓生物技术有限公司进行测序, DNS32 菌株的 GenBank 注册号在进化树中标注, 所得序列采用 MEGA 3.1 的 Neighbor-Joining 法构建系统发育树, 进行 1 000 次的相似度重复计算, 结果见图 5。

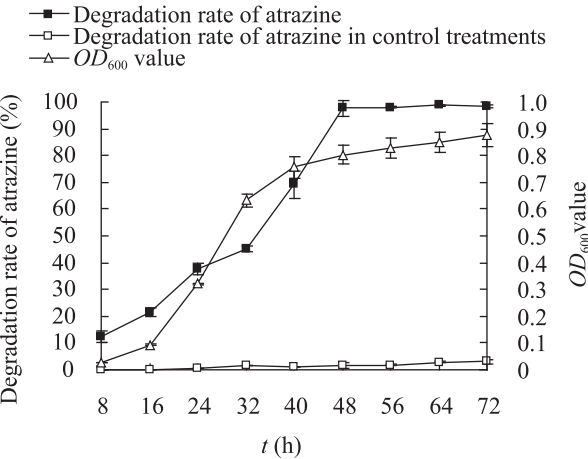


图 4 DNS32 菌株的生长情况及阿特拉津降解曲线
Fig. 4 The growth and degradation curve of strain DNS32 on atrazine

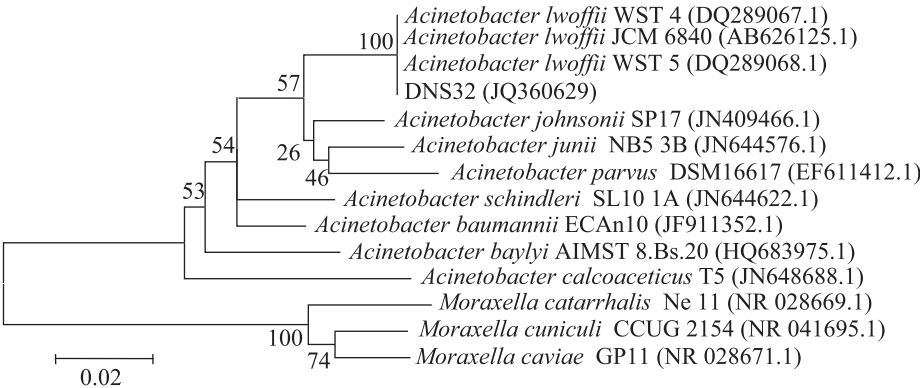


图 5 菌株 DNS32 与相关种的 16S rRNA 序列系统发育树
Fig. 5 Phylogenetic tree derived from 16S rRNA sequence data for strain DNS32 and other species of the genus Bifidobacterium

注: 括号中的序号代表菌株的 GenBank 登录号; 分支点上的数字代表计算 1 000 次聚类到一起的几率; 标尺刻度代表 2% 的序列差异。

Note: The sequence number in the bracket means the GenBank accession number of the strain. The number at the node means the percentage of occurrence in 1 000 boot-strapped trees. The scale bar means 2% sequence difference.

以莫拉克斯氏菌属(*Moraxella*)为外群, 构建菌株 DNS32 16S rRNA 序列系统发育树。菌株 DNS32 聚类在与鲁氏不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*)分类距离最近的一个分支上, Bootstrap 支持率为 100%, 菌株 DNS32 与 *Acinetobacter lwoffii* WST 4 (DQ289067.1)、*Acinetobacter lwoffii* JCM 6840 (AB626125.1)、*Acinetobacter lwoffii* WST 5 (DQ289068.1)序列同源性均在 99%以上, 与不动杆菌属内其他种同源性均低于 97%, 鉴定结论为鲁氏不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*)。

2.3 阿特拉津降解途径的研究

2.3.1 DNS32 菌株阿特拉津降解基因的克隆及测序: 如图 6 所示, 经 PCR 扩增后, 得到了 *trzN*、*atzB* 和 *atzC* 的扩增片段, 但未得到 *atzA*、*atzD*、*atzE* 和 *atzF* 的扩增片段。将所得到的扩增片段进行切胶纯化回收, 回收后的 PCR 产物送至赛拓生物技术有限公司进行测序, 测序结果经 NCBI 网站进行 BLAST 比对。

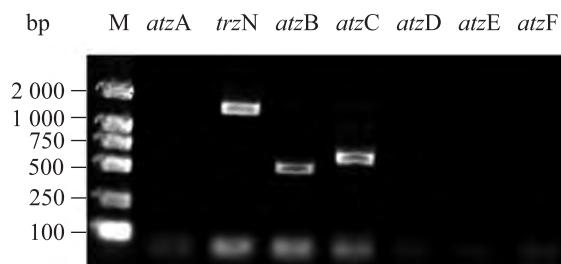


图 6 菌株 DNS32 阿特拉津降解基因 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 6 Agarose gel electrophoresis of PCR reactions from strain DNS32 for amplifying the atrazine-degrading genes

比对结果说明 DNS32 菌株与阿特拉津降解模式菌株 *Arthrobacter aureescens* TC1 的降解基因 *trzN*、*atzB* 及 *atzC* 具有极高同源性, 均达到了 99%。因此可判断 DNS32 菌株降解阿特拉津的降解途径遵循 *Arthrobacter aureescens* TC1 的降解模式, 即先通过 *TrzN* 水解阿特拉津生成羟基阿特拉津, 再通过 *AtzB* 使羟基阿特拉津脱酰胺基, 生

成 N-异丙基氰尿酸, 最后通过 *AtzC* 将 N-异丙基氰尿酸转化为终产物氰尿酸。AtzB、AtzC 及 *TrzN* 的 GenBank 注册号分别为 JQ360630、JQ360631、JQ360632。

2.3.2 阿特拉津残留量及终产物氰尿酸的测定: 由图 7 可知, 随着阿特拉津的降解, 到 24 h, 氰尿酸含量开始明显增加, 到 48 h 以后不再增加, 而此时阿特拉津也降解殆尽, 说明阿特拉津已经完全被降解为氰尿酸。这与降解基因的测定结果相一致, 进一步说明 DNS32 可以将阿特拉津降解到氰尿酸, 但不能将氰尿酸进一步降解, 其降解途径与模式菌株 *Arthrobacter aureescens* TC1 相一致。

目前关于不动杆菌属降解阿特拉津的报道极少, 国内外文献中, 仅有 Pooja Singh 等(2004)^[10]报道过一株以阿特拉津作为碳源生长的不动杆菌属 A6, 但并未进行深入研究, 只研究了 A6 菌株在不同条件下以阿特拉津作为碳源的生长情况。Singh 发现的 *Acinetobacter* A6 在含有阿特拉

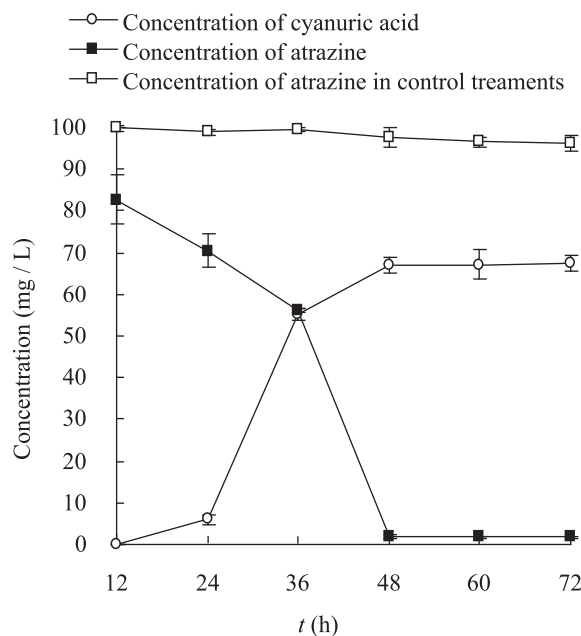


图 7 阿特拉津的降解及氰尿酸的生成情况

Fig. 7 The atrazine degradation and the cyanuric acid formation

津的培养基中的最适生长温度为 37 °C, 而 DNS32 菌株在 30 °C 时为最适生长温度。当温度为 25 °C 时, A6 菌株的生长就受到了明显抑制, 而 DNS32 在 25 °C 时与其最适温度下相比, 其生长及降解情况并未受到很大抑制, 与 Singh 所发现的不动杆菌属相比, DNS32 更适合于在较低温度下生长和降解阿特拉津。

研究中发现 *Acinetobacter* DNS32 的降解基因组为 *trzN* 及 *atzB*、*atzC*, 可将阿特拉津降解为无毒的氰尿酸。这一基因组合最早只在 *Nocardioides*^[20] 及 *Arthrobacter* 等属中发现, 但 Devers 等在之后的研究中发现一些革兰氏阴性菌如 *Sinorhizobium* 和 *Polaromonas* 也存在这种基因组合^[21], Arbely 等在哥伦比亚展开的一项生物地理学研究发现 *trzN* 基因的存在比 *atzA* 更为普遍, 在 *Ancylobacter* 菌属中也可检测到^[22]。这说明这种基因组合在阿特拉津降解菌中的存在具有普遍性, 本研究所得结论为这一基因组合的研究提供了新的菌种佐证。有研究表明 *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更广的降解谱^[23-24], 对三氮苯类除草剂均具有降解效果, Singh 研究中也发现 *Acinetobacter* A6 可以利用除阿特拉津以外的其他 4 种三嗪类除草剂进行生长, 因此推断 DNS32 可能还具有降解其他三氮苯类除草剂的能力, 可能具有更广阔的应用前景, 有待于进一步研究。

本文首次深入研究了能够降解阿特拉津的 *Acinetobacter* 菌属的基本降解特性及降解途径, 这将有利于了解阿特拉津生物降解途径和机制的多样性研究, 为阿特拉津污染环境的生物修复研究提供了新的菌种选择。研究发现 DNS32 菌株能够在较低温度下降解阿特拉津, 因此本实验所得结果对于高寒黑土区阿特拉津污染土壤环境的修复具有重要意义, 且对不动杆菌属对阿特拉津的降解作用的研究具有重要的参考价值。

3 结论

(1) DNS32 菌株具有较好的降解效果, 可耐受 1 000 mg/L 浓度的阿特拉津, 在阿特拉津浓度为 100 mg/L 的培养液中, 48 h 的降解率可达 97.63%, 其最适 pH 为 7-8, 最适生长温度为 30 °C, 且在低温下也有一定的降解能力, 适用于温度较低的北方高寒黑土区的阿特拉津污染土壤环境的生物修复治理。

(2) 通过 16S rRNA 序列分析, 确定了 DNS32 菌株属于不动杆菌属, DNS32 的阿特拉津降解基因组成为 *trzN*、*atzB* 及 *atzC*, 说明其降解途径遵循 *Arthrobacter aurescens* TC1 的降解模式, 可将阿特拉津最终降解为无毒的氰尿酸, 阿特拉津降解率及终降解产物的测定也证明了这一点。实验结果为不动杆菌属的阿特拉津降解菌研究提供了参考。

参 考 文 献

- [1] 李清波, 黄国宏, 王颜红, 等. 阿特拉津生态风险及其检测和修复技术研究进展[J]. 应用生态学报, 2002, 13(5): 625-628.
- [2] Wackett LP, Sadowsky MJ, Martinez B, et al. Biodegradation of atrazine and related s-triazine compounds: from enzymes to field studies[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 58 (1): 39-45.
- [3] 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.
- [4] de Souza ML, Wackett LP, Sadowsky MJ. The *atzABC* genes encoding atrazine catabolism are located on a self-transmissible plasmid in *Pseudomonas* sp. strain ADP[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(6): 2323-2326.
- [5] de Souza ML, Seffernick J, Martinez B, et al. The atrazine catabolism genes *atzABC* are widespread and highly conserved[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(7): 1951-1954.

- [6] Sajjaphan K, Shapir N, Wackett LP, et al. *Arthrobacter aurescens* TC1 atrazine catabolism genes *trzN*, *atzB*, and *atzC* are linked on a 160-kilobase region and are functional in *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(7): 4402–4407.
- [7] Behlci RM, Khan SU. Degradation of atrazine, propazine, and simazine by *Rhodococcus* strain B-30[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1994, 42(5): 1237–1241.
- [8] Bouquard C, Ouazzani J, Prome JC, et al. Dechlorination of atrazine by a *Rhizobium* sp. isolate[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(3): 862–866.
- [9] Struthers JK, Jayachandran K, Moorman TB. Biodegradation of atrazine by *Agrobacterium radiobacter* J14a and use of this strain in bioremediation of contaminated soil[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(9): 3368–3375.
- [10] Singh P, Suri CR, Cameotr SS. Isolation of a member of *Acinetobacter* species involved in atrazine degradation[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 317(3): 697–702.
- [11] Cai B, Han Y, Liu B, et al. Isolation and characterization of an atrazine-degrading bacterium from industrial wastewater in China[J]. Letters in Applied Microbiology, 2003, 36(5): 272–276.
- [12] Martine B, Tomkin J, Wackett LP, et al. Complete nucleotide sequence and organization of the atrazine catabolic plasmid pADP-1 from *Pseudomonas* sp. strain ADP[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(19): 5684–5697.
- [13] De Souza ML, Wackett LP, Boundy-Mills KL, et al. Cloning, characterization, and expression of a gene region from *Pseudomonas* sp. strain ADP involved in the dechlorination of atrazine[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(9): 3373–3378.
- [14] Aislabie J, Bej AK, Ryburn J, et al. Characterization of *Arthrobacter nicotinovorans* HIM, an atrazine-degrading bacterium, from agricultural soil New Zealand[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2005, 52(2): 279–286.
- [15] Zhang Y, Jiang Z, Cao B, et al. Metabolic ability and gene characteristics of *Arthrobacter* sp. strain DNS10, the sole atrazine-degrading strain in a consortium isolated from black soil[J]. International Biodeterioration and Biodegradation, 2011, 65(8): 1140–1144.
- [16] 侯升杰, 王辉, 丁明玉. 反相高效液相色谱法同时分析三聚氰酸和三聚氰胺[J]. 中国科学 B 辑: 化学, 2009, 39(8): 845–849.
- [17] 朱希坤. 三个降解除草剂阿特拉津的菌株的分离鉴定和应用研究[D]. 天津: 南开大学硕士学位论文, 2009.
- [18] 代先祝, 蒋建东, 顾立锋, 等. 阿特拉津降解菌 SA1 的分离鉴定及其降解特性研究[J]. 微生物学报, 2007, 47(3): 544–547.
- [19] Mandelbaum RT, Allan DL, Wackett LP. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(4): 1451–1457.
- [20] Piutti S, Semon E, Landry D, et al. Isolation and characterisation of *Nocardioides* 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.
- [21] Devers M, Elazhari N, Kolic NU, et al. Detection and organization of atrazine-degrading genetic potential of seventeen bacterial isolates belonging to divergent taxa indicate a recent common origin of their catabolic functions[J]. FEMS Microbiology Letters, 2007, 273(1): 78–86.
- [22] Arbeli Z, Fuentes C. Prevalence of the gene *trzN* and biogeographic patterns among atrazine-degrading bacteria isolated from 13 Colombian agricultural soils[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2010, 73(3): 611–623.
- [23] Topp E, Mulbry WM, Zhu H, et al. Characterization of s-triazine herbicide metabolism by a *Nocardioides* sp. isolated from agricultural soils[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(8): 3134–3141.
- [24] Strong LC, Rosendahl C, Johnson G, et al. *Arthrobacter aurescens* TC1 metabolizes diverse s-triazine ring compounds[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(12): 5973–5980.