

工业废水中阿特拉津降解细菌的遗传和生理多样性

郭巧云¹ 牛淑敏¹ 赵化冰^{2*} 赵雅芳³ 蔡宝立^{1*}

(1. 南开大学 微生物学系 天津 300071)

(2. 武警后勤学院 天津市职业与环境危害防控重点实验室 天津 300162)

(3. 河北医科大学 公共卫生学院 河北 石家庄 050017)

摘要:【目的】通过遗传学和生理学实验,揭示分离自工业废水的阿特拉津降解细菌具有遗传和生理多样性,为阐明阿特拉津生物降解的分子机理和阿特拉津降解细菌在污染环境生物修复中的应用提供新见解。【方法】用普通 PCR 方法检测菌株的阿特拉津降解基因,分析其降解基因组成;用基因组重复序列 PCR 技术(rep-PCR)分析降解菌株的基因组类型;用 Western blot 方法检测菌株阿特拉津降解途径的第一个酶三嗪水解酶(TrzN);用不同氮源(阿特拉津、莠灭净、扑草净、西玛津、氰草净、阿特拉通和氰尿酸)和碳源(蔗糖、葡萄糖、麦芽糖、乳糖、柠檬酸钠、乙酸钠和琥珀酸钠)培养降解菌株,通过检测培养液的 OD_{600} 值,证明菌株能够利用的氮源和碳源种类。【结果】对分离自工业废水的 27 个阿特拉津降解菌株所进行的阿特拉津降解基因 PCR 检测表明,其降解基因组成分别为 *trzN-atzBC*、*trzN-atzABC* 和 *atzADEF*;通过 rep-PCR 实验将 27 个阿特拉津降解菌株分为 7 个群;Western blot 结果表明,27 个菌株中有 24 个含有三嗪水解酶 TrzN;氮源利用实验表明,2 个菌株能够利用所有 7 种氮源生长,其余 25 个菌株只能利用其中的 2-6 种;碳源利用实验表明,10 个菌株能够利用所有 7 种碳源生长,其余 17 个菌株只能利用其中的 3-6 种。【结论】分离自某工业废水的 27 株阿特拉津降解功能菌存在相当广泛的遗传和生理学上的多样性,*trzN-atzABC* 降解基因组成为首次发现。

关键词: 阿特拉津, 生物降解, 细菌, 多样性

Genetic and physiological diversity among atrazine-degrading bacteria isolated from industrial wastewater

GUO Qiao-Yun¹ NIU Shu-Min¹ ZHAO Hua-Bing^{2*} ZHAO Ya-Fang³ CAI Bao-Li^{1*}

(1. Department of Microbiology, Nankai University, Tianjin 300071, China)

(2. Tianjin Key Laboratory for Prevention and Control of Occupational and Environmental Hazard, Logistics University of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China)

(3. School of Public Health, Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050017, China)

Abstract: [Objective] The purpose of this paper is to reveal the genetic and physiological diversity

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 40971183)

*通讯作者: 赵化冰: Tel: 86-22-60578418; 信箱: huabingzhao@aliyun.com

蔡宝立: Tel: 86-22-23503272; 信箱: caibaoli@nankai.edu.cn

收稿日期: 2013-06-03; 接受日期: 2013-07-18; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-12

of atrazine-degrading bacteria isolated from industrial wastewater, to provide new insights for molecular mechanism of atrazine biodegradation. **[Methods]** Atrazine-degrading genes of 27 atrazine-degrading strains were detected by the conventional PCR and their composition of atrazine-degrading genes was analyzed. The genome composition of these bacteria was analyzed by repetitive extragenic palindromic PCR (rep-PCR) genomic fingerprinting. Triazine hydrolase TrzN in bacteria, the first enzyme for atrazine-degrading pathway, was detected by Western blot analysis. Nitrogen source (atrazine, ametryn, atratone, cyanazine, prometryn, simazine and cyanuric acid) and carbon source (glucose, sucrose, maltose, lactose, sodium citrate, sodium succinate and sodium acetate) used by these bacteria were analyzed by measuring absorbance of the culture at 600 nm. **[Results]** The conventional PCR experiments indicated that three main atrazine-degrading gene combinations (i) *trzN-atzBC*, (ii) *trzN-atzABC*, and (iii) *atzADEF* were observed respectively from either strain of 27 atrazine-degrading strains. rep-PCR analysis indicated that these bacteria could be differentiated into 7 clusters. Western blot analysis proved that 24 strains contained TrzN protein. Nitrogen source experiments showed that two strains could use all of the 7 compounds as nitrogen source and other 25 strains only could use 2–6 compounds as nitrogen source. Carbon source experiments showed that 10 strains could use all of the 7 compounds as carbon source and other 17 strains only could use 3–6 compounds as nitrogen source. **[Conclusion]** These 27 atrazine-degrading strains isolated from industrial wastewater have their genetic and physiological diversity.

Keywords: Atrazine, Biodegradation, Bacteria, Diversity

阿特拉津(Atrazine), 商品名莠去津, 是一种三嗪类除草剂, 广泛应用于玉米、高粱和甘蔗等杂草的防除。它的长期和大量使用, 已造成对土壤、地下水 and 地表水的污染^[1]。因为阿特拉津已经被确认是一种内分泌干扰剂, 所以对这种除草剂污染的环境进行生物修复引起广泛重视^[2]。为了更好地进行生物修复, 自 1985 年以来, 来自 20 多个不同属的阿特拉津降解细菌被分离和鉴定, 它们包括 *Nocardia*^[3]、*Rhodococcus*^[4]、*Pseudomonas*^[5]、*Rhizobium*^[6]、*Agrobacterium*^[7]、*Pseudaminobacter*^[8]、*Chelatobacter*、*Aminobacter*、*Stenotrophomonas*^[11]、*Ralstonia*^[9]、*Arthrobacter*^[10]、*Acinetobacter*^[2]、*Delftia*^[11]、*Exiguobacterium*^[12]、*Nocardioides*^[13]、*Sinorhizobium*、*Polaromonas*^[14]、*Ancylobacter*^[15]、*Alcaligenes*^[16]、*Enterobacter*、*Burkholderia*^[17]。在这些细菌中, 研究最深入并成为模式菌株的是 *Pseudomonas* sp. ADP 和 *Arthrobacter aurescens* TC1。ADP 菌株含有降解基因 *atzABCDEF*, 前 3 个基因编码的酶将阿特拉津降解成氰尿酸, 后 3 个基因编码的酶将氰尿酸降解成 CO₂ 和 NH₃^[18]。TC1 菌株含有降解基因 *trzN-atzBC*, 能将有毒的阿特拉津

降解成无毒的氰尿酸。这两个菌株催化阿特拉津降解第一步反应的酶分别是阿特拉津氯水解酶 AtzA 和三嗪水解酶 TrzN, 后者的底物范围更广泛^[19]。

近年来, 一些学者对阿特拉津降解细菌的遗传多样性和生物地理学进行了很好的研究。Devers 等^[14]根据降解基因的组成, 将来自土壤的 17 个阿特拉津降解菌株分成 3 种类型, 它们分别含有降解基因 *atzABCDEF*、*trzN-atzBC* 和 *atzABC-trzD*。Arbeli 和 Fuentes^[15]根据 rep-PCR 结果将分离自土壤的 83 个阿特拉津降解菌株分成 11 个群, 其中 3 个群(54 个菌株)属于 *Arthrobacter*, 7 个群(28 个菌株)属于 *Nocardioides*, 1 个群(1 个菌株)属于 *Ancylobacter*。他们对 83 个菌株所进行的 PCR 分析表明, 74 个菌株的降解基因组成是 *trzN-atzBC*, 82 个菌株含有 *trzN* 基因, 只有 1 个菌株含有 *atzA* 基因。到目前为止, 尚未见到系统而全面的阿特拉津降解细菌生理多样性的报道。

本研究的目的是通过测定 27 个来自工业废水的阿特拉津降解菌株的降解基因组成、基因组重复序列和三嗪水解酶 TrzN, 揭示它们的遗传多样性; 通过测定这些菌株的氮源和碳源利用谱, 证明它们

的生理多样性。研究结果将为阐明阿特拉津生物降解的分子机制和阿特拉津降解细菌在污染环境生物修复中的应用提供新见解。

1 材料与方 法

1.1 细菌菌株和生长条件

本实验室先后从河北省张家口市和吉林省吉林市的农药厂工业废水中分离和鉴定 27 个阿特拉津降解菌株, 其中 *Arthrobacter* 属 22 株, *Pseudomonas* 属 5 株, 详情见表 1。其中 *Arthrobacter* sp. AD3, 以前曾称 *Micrococcus luteus* AD3^[21]。用作对照实验的 *Pseudomonas* sp. ADP^[5] 和 *Arthrobacter aureescens* TC1^[10] 分别由美国明尼苏达大学 Wackett L. P. 教授和 Sadowsky M. J. 教授惠赠。阿特拉津降解菌株的分离方法、16S rRNA 基因鉴定以及培养基和生长条件参照文献[20]。

1.2 阿特拉津降解基因的 PCR 检测

PCR 检测方法和所用引物参照文献[24]。

1.3 Western blot 分析

用 *Arthrobacter aureescens* TC1 菌株 *trzN* 基因的表达蛋白(TrzN)制备多克隆抗体(北京华大蛋白质研发中心制备)。降解菌株在阿特拉津液体培养基中 30 °C 振荡培养 48 h, 4 °C、4 800 r/min 离心收集细胞, 用 0.85% (质量体积比)的 NaCl 溶液洗 3 次, 然后将细胞悬浮于磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.2), 用超声破碎仪在冰浴中破碎细胞, 于 4 °C 离心 30 min (13 400×g), 收集上清液即为粗蛋白, 进行 SDS-PAGE。按照 Bio Basic Inc 的产品说明书进行 Western blot 实验: SDS-PAGE 电泳之后, 将凝胶中的蛋白质转移到聚偏氟乙烯(Polyvinylidene difluoride)膜上, 用 TBS 封闭液(含 5%脱脂奶粉的 Tris 缓冲液)于 4 °C 对膜进行过夜封闭, 然后在 1:5 000 稀释的 TrzN 多克隆抗体中孵育 4 h, 取出膜, 用 TBST 溶液(含 0.01%吐温 20 的 TBS)漂洗 5 次, 将膜与 1:5 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (北京博奥森生物技术有限公司)孵育, 然后按照上述方法洗膜, 用鲁米诺(Luminal)试剂显色。将膜用保鲜膜包好抚平, 在暗室中使胶片曝

光 1–5 min, 然后用显影液和定影液冲洗胶片。*Arthrobacter aureescens* TC1 和 *Pseudomonas* sp. ADP 菌株分别用作阳性和阴性对照。

1.4 rep-PCR 分析

用 BOXA1R 引物(5'-CTACGGCAAGGCGAC G-3')^[26]对 27 个阿特拉津降解菌株进行 rep-PCR 检测。反应液体体系为: 10×反应缓冲液 2.5 μL, 1 mmol/L dNTPs, 8 mmol/L 引物, 0.5 U *Taq* DNA 聚合酶, 10% DMSO, 0.2 g/L BSA, 50 ng 模板 DNA, 用超纯水补足反应总体积至 25 μL。反应条件: 95 °C 2 min; 94 °C 1 min, 52 °C 1 min, 65 °C 8 min, 共 30 个循环; 65 °C 18 min。取 5 μL PCR 产物用 1.5% (质量体积比)琼脂糖凝胶进行电泳, 缓冲液为 1×TAE, 50 V 恒压电泳 2 h。凝胶用 EB 染色, 最后用 Gel Doc 2000 gel system (Bio-Rad)进行成像观察并保存。

1.5 氮源测定

将 7 种化合物(阿特拉津、莠灭净、扑草净、西玛津、氰草净、阿特拉通和氰尿酸)分别加入到无机盐液体培养基中, 用作唯一氮源, 加入量为 500 mg/L, 蔗糖或柠檬酸钠(0.3%, 质量体积比)用作碳源, 然后分别接种阿特拉津降解菌株, 于 30 °C 振荡培养 48 h, 测定培养液的 OD_{600} , OD_{600} 值大于 0.5 被判断为可用氮源。

1.6 碳源测定

将 7 种化合物(蔗糖、葡萄糖、麦芽糖、乳糖、柠檬酸钠、乙酸钠和琥珀酸钠)分别加入到无机盐液体培养基中, 用作唯一碳源, 加入量为 1 000 mg/L, 阿特拉津作为氮源(500 mg/L), 然后分别接种阿特拉津降解菌株, 于 30 °C 振荡培养 48 h, 测定培养液的 OD_{600} , OD_{600} 值大于 0.5 被判断为可用碳源。

2 结果与分析

2.1 阿特拉津降解菌株的分离和鉴定

从河北省和吉林省的 2 个农药厂的工业废水中先后分离到 27 个降解阿特拉津的细菌菌株, 并进行了基于 16S rRNA 基因序列的分类鉴定, 其中 *Arthrobacter* 属 22 株, *Pseudomonas* 属 5 株, 详情

见表 1。在这些菌株中, AD1 和 AD1-2、AD3 和 AD3-2 以及 AD25 和 AD25-2, 分别是以聚生体单菌落的形式被分离, 这些单菌落经过进一步划线纯化, 可以分离到两种形态不同的单菌落, 一种是黄色的 *Arthrobacter* 菌株(AD1、AD3 和 AD25), 另一种是白色的 *Pseudomonas* 菌株(AD1-2、AD3-2 和 AD25-2)。AD1、AD3 和 AD25 能以阿特拉津为唯

一氮源生长, 但不能降解氰尿酸。AD1-2、AD3-2 和 AD25-2 不能以阿特拉津为唯一氮源生长, 但能降解氰尿酸。聚生体能够将阿特拉津降解成 CO_2 和 NH_3 , 这是由于聚生体中 *Arthrobacter* 和 *Pseudomonas* 两种菌株的降解途径发生了偶联, 前者将阿特拉津降解成氰尿酸, 后者将氰尿酸降解成 CO_2 和 NH_3 。

表 1 阿特拉津降解菌株的分离地点、16S rRNA 基因 GenBank 注册号和降解基因组成
Table 1 GenBank numbers of 16S rRNA gene, location of isolation, and degrading gene composition of atrazine-degrading strains

菌株 Strains	分离地点 Location of isolation	16S rRNA gene GenBank No.	降解基因 Degrading genes	参考文献 References
<i>Arthrobacter</i> sp. AD1	河北	AF543695	<i>trzN-atzABC</i>	[20]
<i>Pseudomonas</i> sp. AD1-2	河北	JX081252	<i>atzADEF</i>	本研究
<i>Arthrobacter</i> sp. AD2	河北	JQ219844	<i>trzN-atzBC</i>	本研究
<i>Arthrobacter</i> sp. AD3	河北	AY628689	<i>trzN-atzABC</i>	[21]
<i>Pseudomonas</i> sp. AD3-2	河北	JX081253	<i>atzADEF</i>	本研究
<i>Arthrobacter</i> sp. AD4	河北	JF751037	<i>trzN-atzBC</i>	[22]
<i>Arthrobacter</i> sp. AD5	河北	JF751038	<i>trzN-atzBC</i>	[22]
<i>Arthrobacter</i> sp. AD6	河北	JF751039	<i>trzN-atzBC</i>	[22]
<i>Arthrobacter</i> sp. AD7	河北	JF775581	<i>trzN-atzBC</i>	[22]
<i>Arthrobacter</i> sp. AD12	河北	AY628690	<i>trzN-atzBC</i>	[23]
<i>Arthrobacter</i> sp. AD13	河北	JF950287	<i>trzN-atzBC</i>	本研究
<i>Arthrobacter</i> sp. AD25	河北	AY628691	<i>trzN-atzABC</i>	[23]
<i>Pseudomonas</i> sp. AD25-2	河北	JX081254	<i>atzADEF</i>	本研究
<i>Arthrobacter</i> sp. AD26	吉林	EF623831	<i>trzN-atzBC</i>	[24]
<i>Arthrobacter</i> sp. AD27	吉林	EU710551	<i>trzN-atzBC</i>	[25]
<i>Arthrobacter</i> sp. AD28	吉林	EU661379	<i>trzN-atzBC</i>	[25]
<i>Arthrobacter</i> sp. AD29	吉林	EU672427	<i>trzN-atzBC</i>	[25]
<i>Arthrobacter</i> sp. AD30	吉林	FJ161693	<i>trzN-atzBC</i>	[25]
<i>Arthrobacter</i> sp. AD31	吉林	EU672426	<i>trzN-atzBC</i>	[25]
<i>Arthrobacter</i> sp. AD32	吉林	EU672428	<i>trzN-atzBC</i>	[25]
<i>Arthrobacter</i> sp. AD33	吉林	EU636656	<i>trzN-atzBC</i>	[25]
<i>Arthrobacter</i> sp. AD34	吉林	EU636658	<i>trzN-atzBC</i>	[25]
<i>Pseudomonas</i> sp. AD35	吉林	EU636657	<i>trzN-atzBC</i>	[25]
<i>Arthrobacter</i> sp. AD36	吉林	EU710553	<i>trzN-atzBC</i>	[25]
<i>Arthrobacter</i> sp. AD37	吉林	EU672425	<i>trzN-atzBC</i>	[25]
<i>Arthrobacter</i> sp. AD38	吉林	EU710554	<i>trzN-atzBC</i>	[25]
<i>Pseudomonas</i> sp. AD39	吉林	EU636659	<i>trzN-atzBC</i>	[25]

2.2 阿特拉津降解菌株的遗传多样性

2.2.1 降解基因组成分析: 降解基因的 PCR 分析表明, 来自工业废水的 27 个菌株的降解基因组成可以分为 3 种类型: *trzN-atzBC* (21 株)、*trzN-atzABC* (3 株) 和 *atzADEF* (3 株)。Devers 等^[14]分析了来自法国、美国和克罗地亚土壤的 17 个阿特拉津降解菌株的降解基因成分, 它们主要包括 3 种类型, 其降解基因组成分别是 *atzABCDEF*、*trzN-atzBC* 和 *atzABC-trzD*。与他们的结果相比, 我们分离的 27 个阿特拉津降解菌株只有一种类型与其相同, 即 *trzN-atzBC* 基因型。这些结果表明, 不同地理来源的阿特拉津降解菌株的降解基因组成具有多样性, 它将赋予细菌不同的降解功能, 这是阿特拉津降解细菌为适应环境而进化的结果。大量研究表明, 含有 *trzN-atzBC* 基因的阿特拉津降解菌较为常见, 在 Arbeli 和 Fuentes^[15]从哥伦比亚土壤中分离的 83 个阿特拉津降解菌株中, 74 个菌株的基因型为 *trzN-atzBC*, 比例为 89%。我们的结果与其类似, 含有 *trzN-atzBC* 基因的菌株所占比例为 78% (21:27)。阿特拉津降解菌株含有 *trzN-atzABC* 基因为本研究首次发现。目前所报道的阿特拉津降解菌株, 一般只含有阿特拉津氯水解酶基因 *atzA* 或三嗪水解酶基因 *trzN*, 它们编码的酶具有相同的功能, 都能催化阿特拉津的水解脱氯反应, 但与 *AtzA* 相比, *TrzN* 的催化底物相对较多^[10,19]。一个菌株同时含有这两种阿特拉津水解酶, 有利于细菌对不利环境的适应, 具有进化意义。具有 *atzADEF* 基因型的菌株, 可能是含有 *atzABCDEF* 的菌株丢失 *B* 和 *C* 基因所致, 在这两个基因的旁侧含有 IS 序列, 所以容易丢失^[27]。

2.2.2 rep-PCR 分析: 27 个阿特拉津降解菌株的 rep-PCR 分析表明, 供试菌株能扩增出 4–9 条大小在 250–4 500 bp 之间的片段, 根据这些片段在琼脂糖凝胶电泳中的特异性迁移率, 用 NTSYS-pc 软件和非加权组平均法 (Unweighted pair group

method with arithmetic mean, UPGMA)^[28]得到聚类树状图分析指纹图谱(图 1)。聚类图结果显示在相似指数为 0.71 处 27 个菌株被分成 7 个群(Cluster)。群 由 10 个 *Arthrobacter* 菌株组成 (AD1-1、AD3-1、AD25-1、AD4、AD5、AD6、AD7、AD12、AD13 和 AD26); 3 个 *Pseudomonas* 菌株 (AD1-2、AD3-2 和 AD25-2) 组成群 ; 群 、 群 、 群 和 群 分别由 1 个菌株组成 (分别是 AD2、AD29、AD35 和 AD27), 群 包括 9 个 *Arthrobacter* 菌株 (AD28、AD30、AD31、AD32、AD33、AD34、AD36、AD37 和 AD38) 和 1 个 *Pseudomonas* 菌株 (AD39)。这些结果表明, 27 个阿特拉津降解菌株染色体的遗传背景不尽相同, 具有遗传多样性。

2.2.3 TrzN 蛋白的 Western blot 分析: 表 1 表明, 在 27 个阿特拉津降解菌株中, 24 个菌株含有 *trzN* 基因, 另外 3 个菌株不含 *trzN* 基因, 而含有 *atzA* 基因。为了验证 24 个菌株中的 *trzN* 基因是否表达, 进行了 *TrzN* 蛋白的 Western blot 分析(图 2)。结果表明, 24 个含有 *trzN* 基因的阿特拉津降解菌株和对照菌株 *Arthrobacter aurescens* TC1 都出现阳性条带, 而不含 *trzN* 基因的对照菌株 *Pseudomonas* sp. ADP 没有出现阳性条带。这表明, 所有含有 *trzN* 基因的菌株, 都能表达出 *TrzN* 蛋白。以前认为 *trzN* 基因只存在于革兰氏阳性细菌中, 自 2007 年 Devers 等^[14]在革兰氏阴性细菌 *Sinorhizobium* sp. 和 *Polaromonas* sp. 中发现 *trzN* 基因以后, 陆续在其它革兰氏阴性细菌中也发现了这种基因, 例如表 1 中的 2 个 *Pseudomonas* 菌株 (AD35 和 AD39)。Arbeli 和 Fuentes^[15]从土壤中分离的 83 个阿特拉津降解菌株中, 82 个含有 *trzN* 基因, 只有 1 个菌株含有 *atzA* 基因, 这表明 *trzN* 基因广泛存在于革兰氏阳性和革兰氏阴性的阿特拉津降解细菌中。由于该基因存在的普遍性, 以及它所编码的酶具有更广的底物范围, 所以该基因及其编码酶的分子生物学和在环境生物技术中应用的研究具有重要意义。

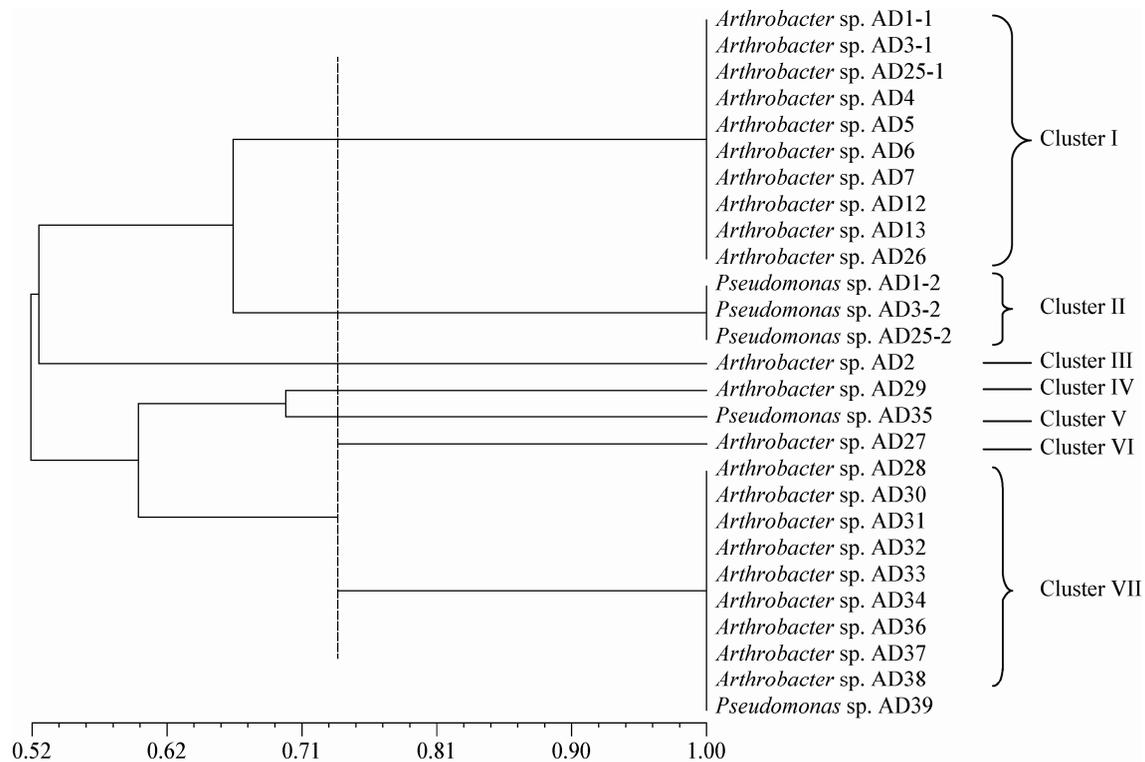


图 1 用 UPGMA 分群方法绘制的 27 个阿特拉津降解菌株的系统进化树

Figure 1 Dendrograms illustrating the relationship between 27 atrazine-degrading bacteria by UPGMA clustering
注：标尺指明各群之间的相似指数。

Note: The scale indicates similarity index between each cluster.

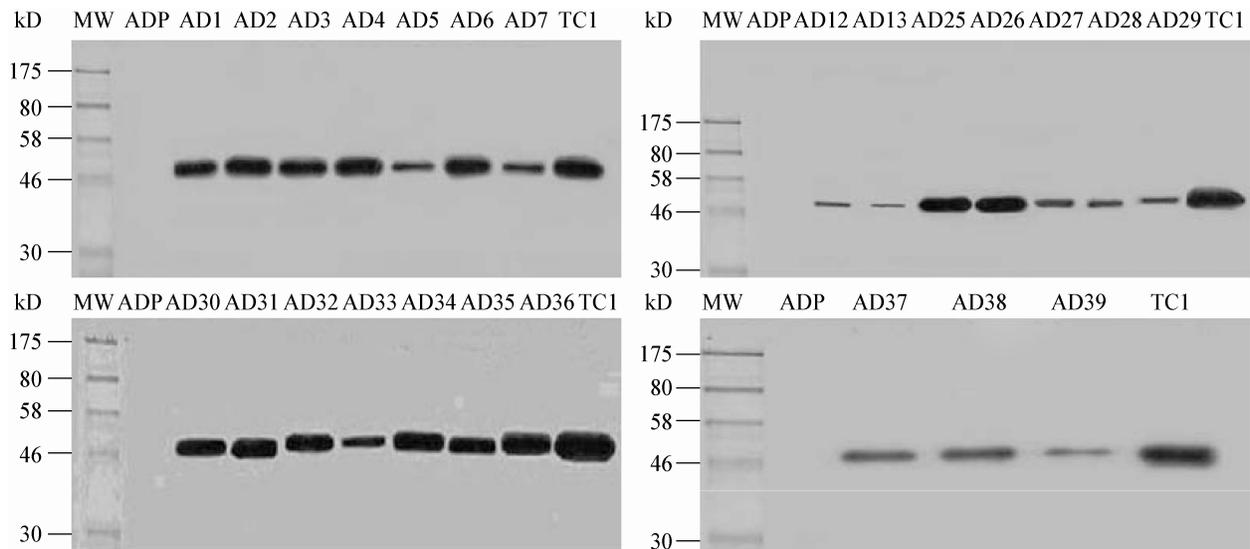


图 2 阿特拉津降解菌株 TrzN 蛋白的 Western blot 分析

Figure 2 Western blot analysis of TrzN protein in atrazine-degrading strains

注：MW 为蛋白分子量标准。

Note: MW is the protein molecular weight standards.

2.3 阿特拉津降解菌株的生理多样性

2.3.1 氮源利用: 6 种三嗪类除草剂(阿特拉津、莠灭净、扑草净、西玛津、氰草净和阿特拉通)和阿特拉津生物降解的中间产物氰尿酸,分别作为唯一氮源加到无机盐培养基中,试验它们是否可被 27 个菌株利用。*Pseudomonas* sp. ADP 和 *Arthrobacter aurescens* TC1 用作对照菌株。结果见表 2。*Arthrobacter* sp. AD32 和 *Pseudomonas* sp. AD39 能利用所有 6 种除草剂和氰尿酸作为氮源生长,表明这 2 个菌株可能是三嗪类除草剂污染环境生物修复的优良候选者。*Pseudomonas* sp. AD25-2 菌株不能利用任何一种除草剂作为氮源生长,但它

可以利用氰尿酸作氮源,因为它含有 *atzDEF* 基因。*Pseudomonas* sp. ADP 仅能用阿特拉津、扑草净和氰尿酸作氮源。其它 25 个菌株可以利用 7 种氮源中的 2-6 种作氮源。从表 2 可见,包括 TC1 在内的 11 个基因型为 *trzN-atzBC* 的菌株(TC1、AD27、AD30、AD31、AD32、AD33、AD34、AD35、AD36、AD38 和 AD39)可以用氰尿酸作氮源生长,但 PCR 分析表明它们不含有编码氰尿酸水解酶的 *atzD* 或 *trzD* 基因^[14],这表明它们可能有新的基因负责氰尿酸的降解,也可能是它们的 *atzD* 或 *trzD* 基因序列与已经报道的这 2 个基因的序列有较低的一致性。

表 2 可被 27 个阿特拉津降解菌株利用的氮源
Table 2 Range of nitrogen sources used by 27 atrazine-degrading strains

菌株 Strain	阿特拉津 Atrazine	莠灭净 Ametryn	扑草净 Prometryn	西玛津 Simazine	氰草净 Cyanazine	阿特拉通 Atraton	氰尿酸 Cyanuric acid
AD1	+	-	-	+	-	+	-
AD1-2	-	-	-	+	-	-	+
AD2	+	+	+	+	+	+	-
AD3	+	+	-	+	-	+	-
AD3-2	-	-	-	+	-	-	+
AD4	+	+	+	+	-	+	-
AD5	+	+	+	+	+	+	-
AD6	+	+	+	+	+	+	-
AD7	+	+	+	+	-	+	-
AD12	+	+	+	-	+	+	-
AD13	+	+	+	+	-	+	-
AD25	+	-	-	+	-	-	-
AD25-2	-	-	-	-	-	-	+
AD26	+	+	+	+	+	+	-
AD27	+	+	+	-	+	+	+
AD28	+	-	+	-	-	-	-
AD29	+	-	+	-	-	-	-
AD30	+	+	+	-	+	+	+
AD31	+	+	+	-	+	-	+
AD32	+	+	+	+	+	+	+
AD33	+	+	+	-	-	+	+
AD34	+	+	+	-	+	-	+
AD35	+	-	+	-	+	-	+
AD36	+	+	+	+	-	+	+
AD37	+	+	+	+	-	+	-
AD38	+	+	+	+	-	+	+
AD39	+	+	+	+	+	+	+
TC1	+	+	+	+	+	+	+
ADP	+	-	+	-	-	-	+

2.3.2 碳源利用: 将蔗糖、葡萄糖、麦芽糖、乳糖、柠檬酸钠、乙酸钠和琥珀酸钠等 7 种化合物作为唯一碳源, 分别加到无机盐培养基中, 试验它们是否可被 27 个菌株利用。 *Pseudomonas* sp. ADP 和 *Arthrobacter aureescens* TC1 用作对照菌株。结果见表 3。9 个 *Arthrobacter* 菌株(AD2、AD7、AD12、AD27、AD30、AD33、AD34、AD36 和 AD38)和 1 个 *Pseudomonas* 菌株(AD39)可以利用上述所有 7 种化

合物作为唯一碳源生长, 表明这些菌株可能是阿特拉津污染环境生物修复的优良候选者。 *Pseudomonas* sp. ADP 不能利用蔗糖和麦芽糖作为碳源生长。另外 18 个菌株只能利用 7 种化合物中的 3-6 种作为碳源。

综合氮源和碳源试验的结果, 对前述 7 种氮源和 7 种碳源都能利用的菌株, 只有 *Pseudomonas* sp. AD39, 所以该菌株在三嗪类除草剂污染环境的生物修复中具有更大的应用潜力。

表 3 可被 27 个阿特拉津降解菌株利用的碳源
Table 3 Range of carbon sources used by 27 atrazine-degrading strains

菌株 Strain	蔗糖 Surcrose	葡萄糖 Glucose	麦芽糖 Maltose	乳糖 Lactose	柠檬酸钠 Sodium citrate	乙酸钠 Sodium acetate	琥珀酸钠 Sodium succinate
AD1	+	+	+	+	-	+	+
AD1-2	-	+	-	-	+	+	+
AD2	+	+	+	+	+	+	+
AD3	+	+	+	+	-	+	+
AD3-2	-	+	-	-	+	+	+
AD4	+	+	+	-	-	-	+
AD5	+	+	+	+	-	-	+
AD6	+	+	+	+	-	+	+
AD7	+	+	+	+	+	+	+
AD12	+	+	+	+	+	+	+
AD13	+	+	+	-	-	+	-
AD25	+	+	+	+	-	+	+
AD25-2	-	+	-	-	+	+	+
AD26	+	+	+	+	-	-	-
AD27	+	+	+	+	+	+	+
AD28	+	+	+	+	-	-	+
AD29	+	+	+	-	-	-	+
AD30	+	+	+	+	+	+	+
AD31	+	+	+	+	-	+	+
AD32	-	+	+	+	+	+	+
AD33	+	+	+	+	+	+	+
AD34	+	+	+	+	+	+	+
AD35	+	+	+	-	-	-	-
AD36	+	+	+	+	+	+	+
AD37	+	+	+	+	-	-	+
AD38	+	+	+	+	+	+	+
AD39	+	+	+	+	+	+	+
TC1	+	+	+	+	+	+	+
ADP	-	+	-	+	+	+	+

3 结论

分离自工业废水的 27 株阿特拉津降解功能菌存在遗传和生理学上的多样性。它们的降解基因组成具有 3 种类型: *trzN-atzBC*、*trzN-atzABC* 和 *atzADEF*, 其中 *trzN-atzABC* 组成为首次发现。根据 rep-PCR 实验结果, 27 个菌株被分成 7 个群。27 个菌株具有不尽相同的氮源和碳源利用谱, 其中 *Pseudomonas* sp. AD39 可以利用全部 7 种氮源(阿特拉津、莠灭净、扑草净、西玛津、氰草净、阿特拉通和氰尿酸)和 7 种碳源(蔗糖、葡萄糖、麦芽糖、乳糖、柠檬酸钠、乙酸钠和琥珀酸钠), 在三嗪类除草剂污染环境的生物修复中具有更大的应用潜力。

参考文献

- [1] Rousseaux S, Hartmann A, Soulas G. Isolation and characterisation of new Gram-negative and Gram-positive atrazine degrading bacteria from different French soils[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2001, 36(2/3): 211-222.
- [2] Singh P, Suri CR, Cameotra SS. Isolation of a member of *Acinetobacter* species involved in atrazine degradation[J]. Biochemical Biophysical Research Communication, 2004, 317(3): 697-702.
- [3] Giardi MT, Giardina MC, Filacchioni G. Chemical and biological degradation of primary metabolism of atrazine by a *Nocardia* strain[J]. Agricultural Biology and Chemistry, 1985, 49: 1551-1558.
- [4] Behki R, Topp E, Dick W, et al. Metabolism of the herbicide atrazine by *Rhodococcus* strains[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(6): 1955-1959.
- [5] 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.
- [6] Bouquard C, Ouazzani J, Prome J, et al. Dechlorination of atrazine by a *Rhizobium* sp. isolate[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(3): 862-866.
- [7] 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.
- [8] Topp E, Zhu H, Nour SM, et al. Characterization of an atrazine-degrading *Pseudaminobacter* sp. isolated from Canadian and French agricultural soils[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(7): 2773-2782.
- [9] Stamper DM, Radosevich M, Hallberg KB, et al. *Ralstonia basilensis* M91-3, a denitrifying soil bacterium capable of using *s*-triazines as nitrogen sources[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2002, 48(12): 1089-1098.
- [10] 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.
- [11] Vargha M, Takáts Z, Márialigeti K. Degradation of atrazine in a laboratory scale model system with Danube river sediment[J]. Water Research, 2005, 39(8): 1560-1568.
- [12] 胡江, 代先祝, 李顺鹏. 两株降解菌对阿特拉津污染土壤的修复效果研究[J]. 土壤学报, 2005, 42(2): 323-327.
- [13] Satsuma K. Characterisation of new strains of atrazine degrading *Nocardioides* sp. isolated from Japanese riverbed sediment using naturally derived river ecosystem[J]. Pest Management Science, 2006, 62(4): 340-349.
- [14] Devers M, Azhari NE, 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.
- [15] 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.
- [16] 李清艳, Boundy-Mills KL, Sadowsky MJ, 等. 阿特拉津降解菌株 *Alcaligenes* sp. SG1 的分离鉴定和降解特性研究[J]. 南开大学学报: 自然科学版, 2010, 43(3): 94-100.
- [17] Ngigi AN, Getenga ZM, Boga HI, et al. Biodegradation of *s*-triazine herbicide atrazine by *Enterobacter cloacae* and *Burkholderia cepacia* sp. from long-term treated sugarcane- cultivated soils in Kenya[J]. Journal of Environmental Science and Health, Part B, 2012, 47(8): 769-778.
- [18] 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]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(19): 5684-5697.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 温雪松, 李颖, 李婧, 等. 降解除草剂阿特拉津的藤黄微球菌 AD3 菌株的分离、鉴定和降解特性研究[J]. 环境科学学报, 2005, 25(8): 1066-1070.
- [22] 姚金成. 三组阿特拉津降解细菌的降解特性及其在阿特拉津污染土壤生物修复中的应用[D]. 天津: 南开大学硕士学位论文, 2011.
- [23] 温雪松. 阿特拉津降解菌株的分离和鉴定[D]. 天津: 南开大学硕士学位论文, 2004.
- [24] Li Q, Li Y, Zhu X, et al. Isolation and characterization of atrazine-degrading *Arthrobacter* sp. AD26 and use of this strain in bioremediation of contaminated soil[J]. Journal of Environmental Sciences, 2008, 20(10): 1226-1230.
- [25] 郑柳柳, 袁博, 朱希坤, 等. 阿特拉津降解菌株的分离、

- 鉴定和工业废水生物处理试验[J]. 微生物学通报, 2009, 36(7): 1099-1104.
- [26] Versalovic J, Schneider M, de Bruijn FJ, et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction[J]. Methods in Molecular and Cellular Biology, 1994, 5(1): 25-40.
- [27] Changey F, Devers-Lamrani M, Rouard N, et al. *In vitro* evolution of an atrazine-degrading population under cyanuric acid selection pressure: evidence for the selective loss of a 47 kb region on the plasmid ADP1 containing the *atzA*, *B* and *C* genes[J]. Gene, 2011, 490(1/2): 18-25.
- [28] Charkhabi NF, Shams-bakhsh M, Rahimian H. Genetic diversity among *Brenneria nigrifluens* strains in Iran[J]. European Journal of Plant Pathology, 2010, 128(3): 303-310.

2014年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表

序号	会议名称	主办单位	时间	人数	地点	联系人
1	第五届全国微生物基因组及组合生物学学术研讨会	中国微生物学会	5月	180	湖北武汉	周萍 027-87287254
2	中国微生物学会兽医微生物学专业委员会暨中国畜牧兽医学会生物制品学分会学术大会	中国微生物学会兽医微生物学专业委员会	5月	300	辽宁沈阳	丁家波
3	第四届全国人畜共患病学术研讨会	中国微生物学会等	5月	300	吉林长春	王旭 010-64807200
4	第五届传染病防控基础研究与应用技术论坛	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	6月	300	山东济南	吕向征 010-85158365
5	昆虫与微生物联合转化废弃物机制及资源化利用	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	6月	120	湖北武汉	张吉斌 027-87287702-8206
6	第五届全国农业微生物研究及产业化研讨会暨第十四届全国杀虫微生物学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	7月	200	云南昆明	邹成钢 0871-5031092
7	2014年中国微生物学会学术年会	中国微生物学会	8月	700	黑龙江哈尔滨	杨海花 王旭 010-64807200
8	第五届中国临床微生物学大会暨微生物学与免疫学论坛	中国微生物学会临床微生物学专业委员会	9月	400	四川成都	刘辉
9	病原真菌与宿主相互作用研讨会	中国微生物学会真菌学专业委员会	9月	100	江苏常州	卫风莲
10	第十二届全国土壤微生物学术讨论会暨第五届全国微生物肥料生产技术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	9月	260	广东广州	沈德龙 马鸣超 010-82108702, 82106208
11	第四届北京中关村生物应急与临床POCT技术创新论坛	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	10月	300	北京	肖瑞峰 010-61271105
12	中国微生物学会微生物生物安全专业委员会第三届学术研讨会	中国微生物学会微生物生物安全专业委员会	待定	100	待定	贾晓娟
13	2014年全国微生物毒素与脓毒症学术会议	中国微生物学会微生物毒素专业委员会	10月	300	浙江杭州	季会
14	第二届微生物与白酒酿造技术研讨会	中国微生物学会工业微生物学专业委员会	待定	200	山东	翟磊
15	中日韩国际酶工程学术研讨会	中国微生物学会酶工程专业委员会	11月	200	韩国济州	欧阳浩森 010-64807420
16	第十七次全国环境微生物学学术研讨会	中国微生物学会环境微生物学专业委员会	11月	500	四川成都	蒋建东 025-84396314
17	第二届中国放线菌生物学与产业化大会	中国微生物学会分子微生物学及生物工程专业委员会	11月	150	广东广州	张长生 020-89023105
18	第六届微生物资源学术暨微生物资源平台运行服务研讨会	中国微生物学会微生物资源专业委员会	11月	300	福建厦门	姜瑞波 010-82108636