

研究报告

阿特拉津降解菌株 AD111 的分离鉴定及其降解特性

高梓峰^{#1,2}, 刘明^{#1,3}, 王昕¹, 高涵¹, 闫岩², 郭永霞^{*1,3}

1 黑龙江八一农垦大学农学院, 黑龙江 大庆 163319

2 国家杂粮工程技术研究中心, 黑龙江 大庆 163319

3 农业农村部东北平原农业绿色低碳重点实验室, 黑龙江 大庆 163319

高梓峰, 刘明, 王昕, 高涵, 闫岩, 郭永霞. 阿特拉津降解菌株 AD111 的分离鉴定及其降解特性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(7): 2826-2836.

GAO Zifeng, LIU Ming, WANG Xin, GAO Han, YAN Yan, GUO Yongxia. Isolation, identification, and characterization of atrazine-degrading bacterial strain AD111[J]. Microbiology China, 2023, 50(7): 2826-2836.

摘要:【背景】玉豆轮作过程中, 玉米田中长残留除草剂阿特拉津易对下茬大豆作物产生不良影响。【目的】从黑龙江省安达市的农田土筛选一株能适应该土壤环境生长的阿特拉津降解菌并研究其降解特性。【方法】利用富集培养法, 分离、筛选一株阿特拉津高效降解菌并结合外观形态、生理生化及 16S rRNA 基因序列测定对其进行鉴定, 通过单一变量法设置不同的碳源、pH、温度和阿特拉津浓度, 研究降解菌株最佳发酵及降解条件。【结果】得到一株在 BSM-G 中能够以阿特拉津为唯一氮源生长的高效阿特拉津降解菌 AD111, 鉴定为马德普拉塔无色小杆菌(*Achromobacter marplatensis*)。菌株 AD111 降解阿特拉津的最适温度为 35 °C, 最适 pH 为 8.0, 最佳碳源为蔗糖, 24 h 内对浓度为 50 mg/L 的阿特拉津降解率达到 99.7%, 对 300 mg/L 的阿特拉津降解率达到 81.9%。【结论】降解菌 AD111 具有较好的环境适应及阿特拉津降解能力, 为解决黑龙江偏碱土壤中阿特拉津残留提供了良好的候选菌株。

关键词: 阿特拉津; 生物降解; 轮作; 马德普拉塔无色小杆菌

资助项目: 黑龙江八一农垦大学三横三纵支持计划(ZRCPY201820); 黑龙江八一农垦大学科研启动计划(XDB201817)

[#]对本文贡献相同。

This work was supported by the Heilongjiang Bayi Agricultural University Support Program for Three-vertical and Three-horizontal (ZRCPY201820) and the Heilongjiang Bayi Agricultural University Support Program for Scientific Research (XDB201817).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: gyxia@163.com

Received: 2022-09-25; Accepted: 2022-11-19

Isolation, identification, and characterization of atrazine-degrading bacterial strain AD111

GAO Zifeng^{#1,2}, LIU Ming^{#1,3}, WANG Xin¹, GAO Han¹, YAN Yan², GUO Yongxia^{*1,3}

1 College of Agriculture, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, Heilongjiang, China

2 National Coarse Cereals Engineering Research Center, Daqing 163319, Heilongjiang, China

3 Key Laboratory of Green and Low-carbon Agriculture in Northeast Plains, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Daqing 163319, Heilongjiang, China

Abstract: [Background] In maize-soybean rotation system, the residual atrazine in maize field may influence the next crop soybean. **[Objective]** To screen an atrazine-degrading strain from the field soil in Anda City, Heilongjiang Province and explore the degradation characteristics. **[Methods]** A highly efficient strain was isolated and screened by enrichment culture method, and identified based on morphological observation, physiological and biochemical determination, and 16S rRNA sequencing. Different carbon sources, pH, temperatures, and atrazine concentration were set to explore the optimal fermentation and degradation conditions with the simple variable method. **[Results]** A highly efficient atrazine-degrading strain AD111 was screened out, which used atrazine as the sole nitrogen source in basic salt medium-glucose (BSM-G). It was identified as *Achromobacter marplatensis*. The optimal temperature, pH, and carbon source for atrazine degradation by AD111 were 35 °C, pH 8.0, and sucrose. Within 24 h, it degraded 99.7% and 81.9% of atrazine at 50 mg/L and 300 mg/L, respectively. **[Conclusion]** AD111 has exceptional environmental adaptability and atrazine-degrading ability, which can remove the atrazine residue in alkaline land in Heilongjiang Province.

Keywords: atrazine; biodegradation; crop rotation; *Achromobacter marplatensis*

在农业现代化进程不断加速的背景下, 农药成为农业生产中的必需品^[1]。然而密集和不合理地使用农药会损害生态系统, 并对人类健康产生负面影响^[2]。阿特拉津(Atrazine)又名莠去津, 是一种三嗪类除草剂, 化学名称为 2-氯-4-乙氨基-6-异丙氨基-1,3,5-三嗪, 分子式为 C₈H₁₄ClN₅。阿特拉津自 1957 年被发现后, 仅用 1 年时间便得到开发生产, 在全球得到广泛应用, 主要施用于甘蔗、玉米和高粱地中防除阔叶和禾本科杂草^[3-4]。由于氯离子及正烷基存在, 使得阿特拉津在土壤中被吸收率低、半衰期长, 在地表水、地下水和土壤中残留浓度高, 被归类为中等持久性除草剂^[4-6]。2006 年, 美国环境保护局将阿特

拉津列为可能的致癌物^[7]。此外已经发现阿特拉津在生产过程中会对后茬作物造成损害。例如玉米轮作时, 施用过阿特拉津的玉米田残留易引起下茬大豆、绿豆药害, 造成出苗不齐、产量降低等现象^[8]。

微生物降解是一种被认为既经济、环保又高效的阿特拉津降解方法^[9-10]。从 20 世纪 80 年代开始, 研究发现很多细菌和真菌具有降解阿特拉津的能力, 其中细菌所占比例最大且种类繁多。主要包括不动杆菌属(*Acinetobacter*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)

等^[11-14], 均为采用好氧富集分离而得到的好氧菌。因此, 本研究利用富集培养法从黑龙江省碱性农田土壤分离、筛选能适应当地环境的阿特拉津降解菌并研究其降解性能, 以期为解决本土偏碱土壤玉米-豆轮作过程中阿特拉津残留的生物修复提供候选菌株资源。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 供试土壤

筛选降解菌的土壤采集于黑龙江省安达市长期施用阿特拉津的农田, 经自然风干后过2 mm筛, 用于后续研究。

1.1.2 主要试剂和仪器

97%纯度的阿特拉津购自上海源叶科技有限公司, 使用前制成10 g/L的阿特拉津-甲醇母液; 甲醇中阿特拉津溶液标准品(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)购自上海阿拉丁(aladdin)生化科技股份有限公司。除了用于色谱分析的试剂为色谱纯外, 其他试剂均为分析纯。

紫外分光光度计, 北京普析通用仪器公司; 氮吹仪, 睿科集团股份有限公司; 高效液相色谱仪, Waters公司。

1.1.3 培养基

基础盐培养基-葡萄糖(basic salt medium-glucose, BSM-G) (g/L): 葡萄糖 3.0, KH_2PO_4 0.9, Na_2HPO_4 6.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, NaCl 0.4, 微量元素(参照文献[15]配比) 1.0 mL/L, 115 $^\circ\text{C}$ 灭菌 20 min。

基础盐培养基(basic salt medium, BSM) (g/L): KH_2PO_4 0.9, Na_2HPO_4 6.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, NaCl 0.4, 微量元素 1.0 mL/L, 121 $^\circ\text{C}$ 灭菌 20 min。

LB培养基(g/L): 酵母粉 5.0, 胰蛋白胨 10.0, NaCl 10.0, 121 $^\circ\text{C}$ 灭菌 20 min。

配制固体培养基时, 每100 mL加入1.5 g琼脂粉。

1.2 方法

1.2.1 阿特拉津降解菌的富集与分离

利用富集培养法将5 g已过筛处理的土壤样品加入含有100 mL BSM-G的250 mL三角瓶中, 设置阿特拉津的初始浓度为50 mg/L, 30 $^\circ\text{C}$ 、180 r/min避光振荡培养7 d, 吸取5 mL培养液加入新的阿特拉津浓度为100 mg/L的100 mL BSM-G中, 30 $^\circ\text{C}$ 、180 r/min避光振荡培养7 d。按照同样方法, 阿特拉津浓度每7天增加50 mg/L, 直至达到500 mg/L后培养结束。将最终的培养液分别稀释到 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 这3个浓度梯度, 涂布在阿特拉津浓度为200 mg/L的固体BSM-G上, 5 d后挑取在培养基上形成阿特拉津水解圈的菌株并进一步纯化。

1.2.2 阿特拉津降解菌株的鉴定

将纯化后的菌株转接到LB平板上30 $^\circ\text{C}$ 培养12 h, 根据《伯杰细菌鉴定手册》第8版^[16]对菌株进行外观形态和生理生化鉴定。

参考文献[17]进行分子鉴定。以AD111菌株的基因组DNA为模板, 以27F和1492R(表1)为引物, PCR反应体系(50 μL): Taq DNA Mix 25 μL , ddH₂O 22 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)各1 μL , DNA模板1 μL 。PCR反应条件: 95 $^\circ\text{C}$ 2 min; 95 $^\circ\text{C}$ 30 s, 54 $^\circ\text{C}$ 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 1.5 min, 共30个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 10 min。以1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物, 将符合目标条带大小的PCR产物送至吉林库美生物科技有限公司进行测序。通过NCBI中的BLAST功能将菌株的16S rRNA基因序列与NCBI数据库中的已知序列进行比对。使用MEGA 11软件构建菌株AD111的系统发育树, 并将AD111的序列上传至GenBank, 获得登录号。

表 1 16S rRNA 基因的 PCR 引物序列

Table 1 PCR primer for the 16S rRNA gene

引物名称	引物序列
Primers name	Primers sequences (5'→3')
27F	AGAGTTTGATCCTCCTGGCTCAG
1492R	TACGGCTACCTTGTTACGACTT

1.2.3 阿特拉津降解菌接种液的制备

将分离纯化得到的菌株 AD111 接种到 LB 液体培养基中, 30 °C、180 r/min 振荡培养 12 h 进行活化。在 100 mL 的 LB 培养基中加入 1 mL 活化后的 AD111 菌液, 30 °C、180 r/min 振荡培养 12 h 后 6 000 r/min 离心 5 min, 倒掉上清液, 用无菌水悬浮菌体后 6 000 r/min 离心 5 min, 重复 3 次, 测量菌体在可见分光光度计 600 nm 处的吸光度, OD_{600} 为 0.5 时为接种液浓度。

1.2.4 阿特拉津降解菌的生长曲线和降解曲线测定

将接种液按 1% 接种量接种到 100 mL BSM-G 中, 阿特拉津浓度设定为 200 mg/L, 30 °C、180 r/min 振荡培养, 每隔 3 h 测其 OD_{600} 值, 并测定 BSM-G 中阿特拉津含量, 绘制菌株的生长曲线及降解曲线。

阿特拉津提取方法^[3]: 1 mL 培养液中加入 2 mL 三氯甲烷, 室温振荡 30 min 后 8 000 r/min 离心 5 min, 取下层三氯甲烷, 通过氮吹仪吹干, 加 1 mL 甲醇定容后过 0.22 μ m 滤膜将滤液置于棕色进样瓶中用于高效液相检测。

高效液相色谱(HPLC)检测阿特拉津含量的条件为: 流动相为甲醇:水=80:20 (体积比), 进样 10 μ L, 柱温 30 °C, 流速 0.8 mL/min, 检测波长 216 nm。

1.2.5 阿特拉津降解菌对外加碳源和氮源的利用

设置 4 组处理: 在 BSM 中分别添加 1 g/L 葡萄糖作为外加碳源(AT+C)、1 g/L 硝酸铵为外加氮源(AT+N)、1 g/L 葡萄糖+1 g/L 硝酸铵为外

加碳氮源(AT+CN)及不添加任何碳氮源(AT)。设置阿特拉津浓度为 50 mg/L, 接入 1 mL 接种液, 30 °C、180 r/min 振荡培养, 设置 3 次重复, 以不加菌液为空白对照。分别在 0、12、24、36、48 h 测其 OD_{600} 值。根据各处理组得到的生长曲线分析外加碳、氮源对降解菌 AD111 生长的影响。

1.2.6 外加不同碳源对阿特拉津降解菌生长及降解的影响

设置 6 组处理: 在 BSM 中分别添加 1 g/L 的葡萄糖(G)、蔗糖(C)、乳糖(I)、果糖(F)、可溶性淀粉(S)和柠檬酸三钠(T)作为碳源处理组。设置阿特拉津浓度为 50 mg/L, 加入 1 mL 接种液, 30 °C、180 r/min 振荡培养, 设置 3 次重复, 以不加碳源的 BSM 为对照组。分别在 12、24 h 测其 OD_{600} 值和阿特拉津降解率。

1.2.7 环境因素对阿特拉津降解菌生长及降解的影响

为研究不同温度、pH、阿特拉津浓度对菌株生长及降解阿特拉津的影响。配制含有 1 g/L 葡萄糖的 BSM 中, 设置阿特拉津浓度为 50 mg/L, 加入 1 mL 接种液, 设置 8 组不同温度(10、15、20、25、30、35、40、45 °C)处理, pH 7.0; 设置 7 组不同 pH(5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0)处理, 30 °C、180 r/min 振荡培养。设置在含有 1 g/L 葡萄糖的 BSM 中不同阿特拉津浓度(50、100、150、200、250、300 mg/L), 180 r/min、30 °C、pH 7.0 培养。设置 3 组重复, 以不加菌液为空白对照。分别在 12、24 h 测其 OD_{600} 值和阿特拉津降解率。

2 结果与分析

2.1 阿特拉津降解菌的筛选结果

经过富集、分离纯化, 从供试土壤中分离得到 20 株具有水解圈的菌株, 利用高效液相色谱

进行降解效果验证,发现编号为 AD111 的菌株降解效果最佳,其在 BSM-G、180 r/min、30 °C、pH 7.0 条件下,18 h 对 200 mg/L 的阿特拉津降解率为 98.1%。

2.2 阿特拉津降解菌 AD111 的鉴定结果

菌株 AD111 的外观形态如图 1A 所示,菌落圆形,轻微隆起,淡黄色,湿润,边缘整齐,光滑;在含有 200 mg/L 阿特拉津的 BSM-G 上可以产生水解圈(图 1B)。进一步通过生理生化鉴定,发现菌株 AD111 革兰氏染色为阴性(图 1C),可以利用果糖、 β -半乳糖苷酶(ortho-nitrophenyl- β -galactoside, ONPG)和乳糖,对其他物质不能单独利用(表 2)。根据《伯杰细菌鉴定手册》第 8 版^[16]对比发现菌株 AD111 形态特征和生理生化符合无色小杆菌属(*Achromobacter*)。

将 PCR 产物送至吉林库美生物科技有限公司进行测序,获得菌株 AD111 的 16S rRNA 基因序列长度为 1 425 bp。NCBI BLAST 分析发现,其与 *Achromobacter marplatensis* SY6 相似性为 99.93%。构建基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树发现,菌株 AD111 与 *Achromobacter marplatensis* SY6 在同一个分支上,初步表明菌株 AD111 为马德普拉塔无色小杆菌(*Achromobacter marplatensis*) (图 2)。将菌株 AD111 测序所得的 16S rRNA 基因序列上传至 GenBank,获得序列

表 2 菌株 AD111 生理生化鉴定结果

Table 2 Physiological biochemical characteristics of strain AD111

试验名称	菌株 AD111 结果
Experiment name	Result of strain AD111
蔗糖 Sucrose	-
甘露醇 Mannitol	-
葡萄糖 Glucose	-
麦芽糖 Maltose	-
果糖 Fructose	+
ONPG	+
阿拉伯糖 Arabinose	-
蕈糖 Mushroom sugar	-
乳糖 Lactose	+
半固体琼脂 Motility test medium	-
鼠李糖 Rhamnose	-
蛋白胨水 Gelatin medium	-

+: 阳性; -: 阴性

+: Positive; -: Negative.

登录号为 ON054297。

综合形态、生理生化特性及 16S rRNA 基因测序分析结果,将菌株 AD111 鉴定为马德普拉塔无色小杆菌(*Achromobacter marplatensis*),命名为 *Achromobacter marplatensis* AD111。

2.3 菌株 AD111 的生长和阿特拉津降解特性

2.3.1 菌株 AD111 的生长和阿特拉津降解曲线

如图 3 所示,在 0-12 h 时,菌株 AD111 生长速度逐渐加快,但是对阿特拉津的降解速度较

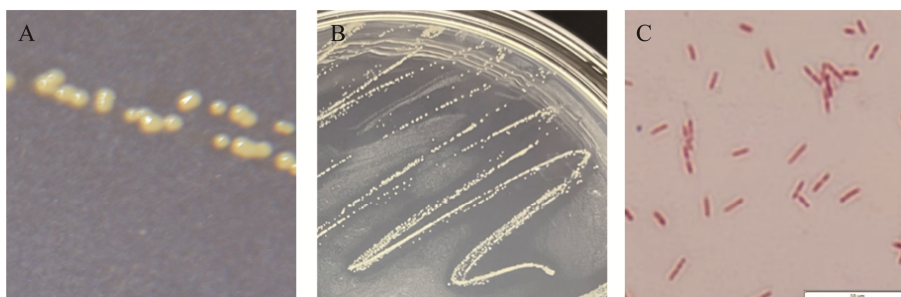


图 1 菌株 AD111 在 LB 培养基(A)、BSM-G (B)的形态及革兰氏染色(C)照片

Figure 1 The morphology of AD111 on LB medium (A), BSM-G (B) and Gram stain (C) photographs.

小, 在此阶段, 菌株 AD111 主要是利用 BSM-G 中除阿特拉津以外的养分生长。在 15–27 h 时, 菌株 AD111 生长速度增加, OD_{600} 值达到 1.674, 随后开始衰减。菌株 AD111 在 12 h 开始逐渐降解阿特拉津, 在 18 h 时降解率达到 98.1%, 表明菌株能够实现对阿特拉津的降解。

2.3.2 阿特拉津降解菌 AD111 对外加碳源和氮源的利用

如图 4 所示, 在 BSM 中外加碳源、碳氮源对于菌株 AD111 的生长量都有明显的提高。在同时外加碳氮源的无机盐基础培养基中生长速度最大, 12 h 就可以达到最大生长量; 而在缺少外加碳源的培养基中菌株 AD111 生长情况明显低于其他处理, 表明碳源对 AD111 的生长至关重要。

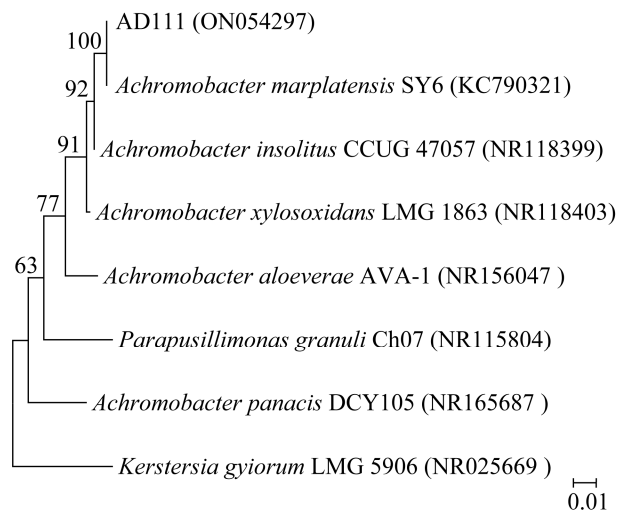


图 2 菌株 AD111 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 利用邻接法计算(进行 1 000 次重复验证); 标尺刻度表示 1% 的序列差异; 括号中文字表示菌株基因的 GenBank 登录号

Figure 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of strain AD111. The calculations were performed according to a neighbour-joining analysis (number=1 000), and the scale bar meant 1% sequence difference. The letters and numbers in bracket represent the GenBank accession number of the strain gene.

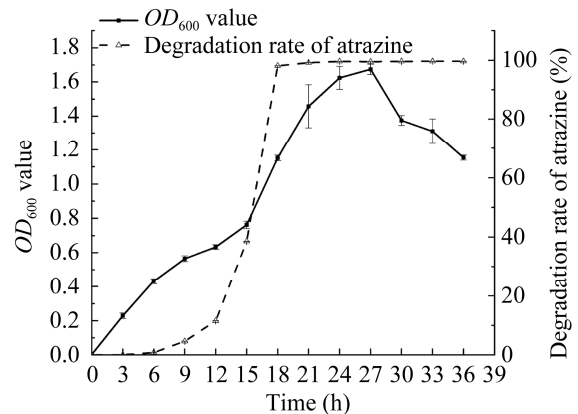


图 3 菌株 AD111 的生长曲线和阿特拉津降解曲线

Figure 3 Growth curve and atrazine degradation curve of strain AD111.

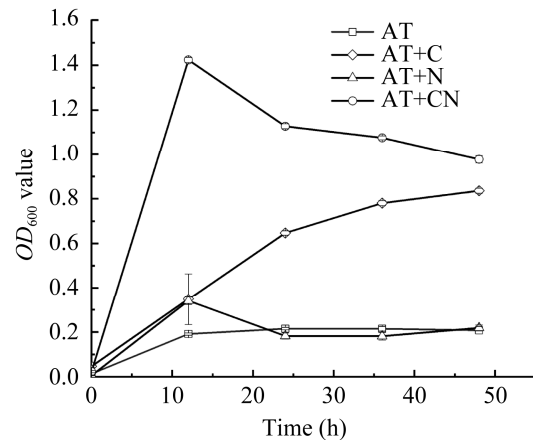


图 4 外加碳、氮源对阿特拉津降解菌株 AD111 生长的影响

Figure 4 Effects of additional different carbon source and nitrogen source on AD111 growth.

2.3.3 外加不同碳源对菌株 AD111 生长及阿特拉津降解的影响

外加不同碳源对菌株 AD111 生长情况和降解效果如图 5 所示, BSM 中外加任何一种碳源对于菌株 AD111 的生长均有明显促进作用。12 h 和 24 h 时, 菌株 AD111 的生长量大小关系均为: 蔗糖>葡萄糖>乳糖>果糖>柠檬酸三钠>可溶性

淀粉,最佳的外加碳源为蔗糖。在阿特拉津降解方面,12 h时,外加可溶性淀粉、果糖和乳糖的菌株 AD111 对阿特拉津的降解率达到了 90%以上,外加葡萄糖、柠檬酸三钠、蔗糖的降解率分别为 75%、85%、53%;而在 24 h时,6 种外加碳源处理组中阿特拉津的降解率都达到了 99%以上。

2.3.4 不同 pH 对菌株 AD111 生长及阿特拉津降解率的影响

菌株 AD111 在不同 pH 条件下表现了不同的生长情况和降解能力。如图 6 所示,菌株 AD111 能适应生长的 pH 范围非常宽泛,在 pH 6.0–10.0 之间都能生长较好,具有较高的菌浓度,且在 24 h 时降解率都超过了 99%;其中 pH 8.0 时,菌的生长情况最好,是 AD111 的最适 pH。pH 11.0 时,24 h 降解率也能达到 99%以上。pH 5.0 时,菌株基本停止了生长,降解能

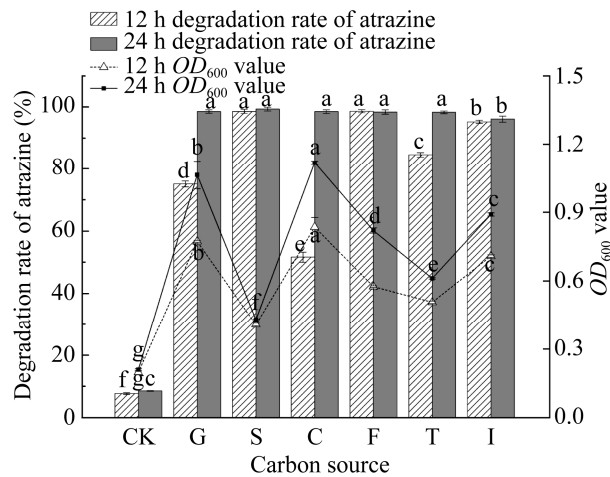


图 5 外加不同碳源对菌株 AD111 生长及阿特拉津降解的影响 G: 外加葡萄糖处理组; S: 外加可溶性淀粉处理组; C: 外加蔗糖处理组; F: 外加果糖处理组; T: 外加柠檬酸三钠处理组; I: 外加乳糖处理组

Figure 5 Effects of additional different carbon source on growth and atrazine degradation by strain AD111. G: Added glucose; S: Added soluble starch; C: Added cane sugar; F: Added fructose; T: Added trisodium citrate; I: Added lactose.

力也随之丧失,这可能是因为筛选菌株 AD111 的土壤样品取自偏碱性土壤(pH 8.08),在酸性环境下菌株 AD111 适应能力较差。

2.3.5 不同温度对菌株 AD111 生长及阿特拉津降解率的影响

不同温度对菌株 AD111 生长及阿特拉津降解率的影响结果如图 7 所示。在 25–35 °C 条件下,菌株 AD111 都有良好的生长量,在 24 h 时对阿特拉津的降解率达到了 99%以上。其中,温度为 35 °C 时,菌株 AD111 的生长量最大,降解率达到了 99.7%;而在 15 °C 以下和 40 °C 以上时,菌株 AD111 的生长受到一定的抑制,生长缓慢,菌株基本停止生长,对阿特拉津的降解能力也随之消失。表明过高的温度和过低的温度都会对菌株 AD111 的生长和降解率产生明显的抑制。

2.3.6 不同底物浓度对菌株 AD111 生长及阿特拉津降解率的影响

为了探究在不同程度阿特拉津污染中菌株 AD111 是否有足够的降解能力,设置了阿特拉津浓度为 50–300 mg/L 的不同处理。从图 8 可

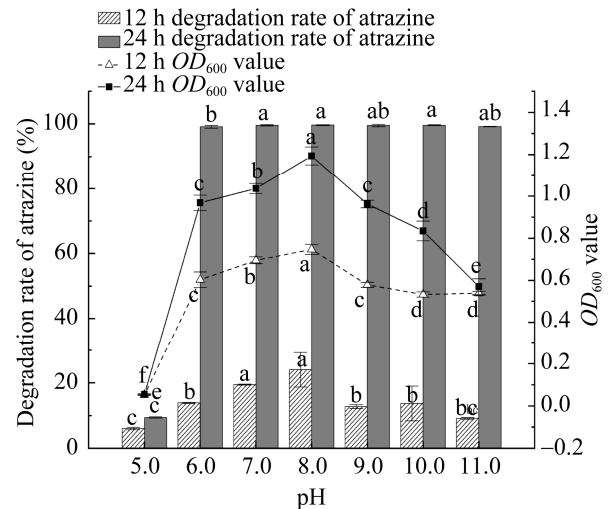


图 6 pH 对菌株 AD111 生长及阿特拉津降解的影响 Figure 6 Effects of pH on growth and atrazine degradation by strain AD111.

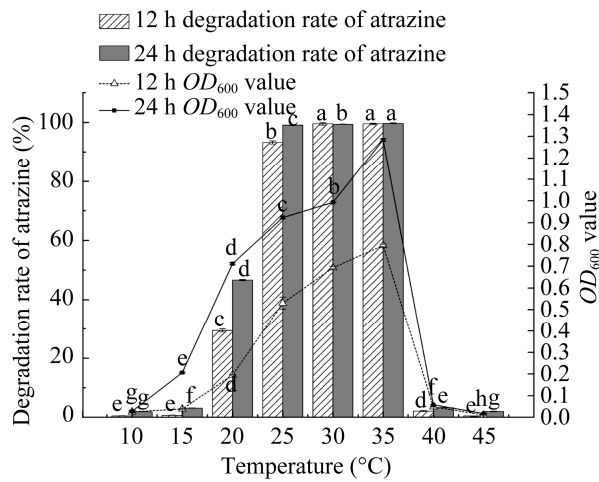


图 7 温度对菌株 AD111 生长及阿特拉津降解的影响

Figure 7 Effects of temperature on growth and atrazine degradation by strain AD111.

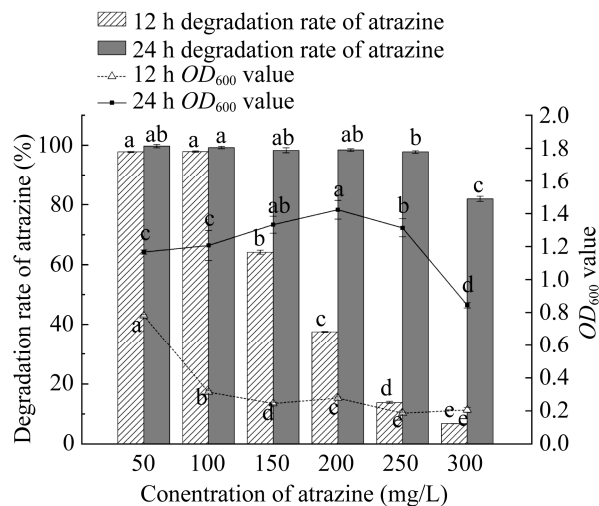


图 8 阿特拉津浓度对菌株 AD111 生长及阿特拉津降解的影响

Figure 8 Effects of initial atrazine concentrations on growth and atrazine degradation by strain AD111.

可以看出,阿特拉津含量在 100–300 mg/L 时,菌株 AD111 均在 0–12 h 时生长缓慢,12 h 之后菌株开始快速生长;而浓度为 50 mg/L 时表现出不同的生长趋势,这可能是培养基中阿特拉津浓度较低时菌株对无机盐培养基中的营养优先选择不同。阿特拉津浓度在 100 mg/L 以下时,菌株

可以在 12 h 内将其基本完全降解;浓度在 100–250 mg/L 时,24 h 内菌株可以将其降解 97% 以上;当阿特拉津浓度达到 300 mg/L 时,菌株 AD111 在 24 h 时降解率也可以达到 81.9%。

3 讨论

现在许多国家仍致力于寻找高效降解阿特拉津的微生物,截至目前,已经从不同环境筛选、分离了许多可以降解阿特拉津的微生物,其中杨晓燕等^[18]从农药厂排污河水中的废水分离的产脲节杆菌(*Arthrobacter ureafaciens*) CS3、Zhao 等^[19]从工业废水中分离的节杆菌(*Arthrobacter* sp.) ZXY-2 和朱希坤等^[20]分离的 AD26 都是从水环境得到的菌种,其能否适应农田土壤生存环境并降解阿特拉津不得而知。然而利用土壤中的微生物对农药进行分解,减少农药对生态系统的破坏起着重要作用,本研究中的降解菌 AD111 从农田土壤中分离得到,后续可研究将其应用于降解农田阿特拉津残留的实际应用中。目前报道的从土壤中分离的阿特拉津降解菌多数为节杆菌(*Arthrobacter* sp.),是革兰氏阳性菌,如 Getenga 等^[21]从肯尼亚污染土壤中筛选的菌株 GZK-1、Vaishampayan 等^[22]从印度根际土壤中筛选的 MCM B-436。本试验筛选出的阿特拉津降解菌株 AD111 为马德普拉塔无色小杆菌(*Achromobacter marplatensis*),是革兰氏阴性菌,目前国内未见其能降解阿特拉津的相关报道。在国外, Fernandes 等^[23]从农田土壤中分离得到的以假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)和无色小杆菌(*Achromobacter* sp.)为混合菌,在 24 h 内对阿特拉津的降解率达到了 99%,并发现无色小杆菌有 *atzA*、*atzB*、*atzC* 这 3 种能够降解阿特拉津的基因,而在阿特拉津降解过程中,混合菌中的假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)起主要作用。本研究单独利用马德普拉塔无色小杆菌(*Achromobacter*

marplatensis)降解阿特拉津,同样在 24 h 内降解率达到 99%,可能为无色杆小菌属的不同种,后续将研究其降解基因及降解途径。另有报道指出,无色小杆菌属还能降解几丁质、二氯喹啉酸、环己酮等其他物质,该菌属可以广泛应用于修复多种污染问题^[24-26]。

有研究表明,微生物会优先利用结构更为简单的碳、氮源,外加不同碳、氮源对菌株降解阿特拉津的能力会产生影响^[27]。外加碳源对菌株 AD111 的生长具有较大影响,本试验选用的 6 种外加碳源均能显著提升菌株 AD111 的生长量和阿特拉津降解能力,在以后的应用中有宽泛的碳源选择。

菌株的降解能力强弱和所处环境息息相关,影响的因素有 pH、培养温度、底物浓度等。本试验筛选的阿特拉津降解菌 AD111 最适 pH 范围是 6.0–11.0,相较于张庆媛等^[28]报道的节杆菌(*Arthrobacter* sp.) DNS10 最适 pH 范围(5.0–8.0)有更广的适应范围和耐碱能力。有文献指出利沃夫氏不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*) DNS32 在温度为 25–30 °C 范围内有较好的生长和阿特拉津降解能力,在温度高于 35 °C 时,菌株的生长和阿特拉津降解均受到抑制^[29],而菌株 AD111 具有更好的温度适应范围(25–35 °C)。Radwan 等^[30]报道 *Stenotrophomonas maltophilia* 和 *Agrobacterium tumefaciens* 混合菌对浓度为 50 mg/L 阿特拉津在 7 h 内达到 80% 降解率, Zhang 等^[31]报道栖异地克雷伯氏菌(*Klebsiella variicola*) FH-1 最适条件(25 °C, pH 9.0)下对浓度为 50 mg/L 的阿特拉津在 11 d 时的降解率为 81.7%, Khatoun 等^[32]报道栗褐芽孢杆菌(*Bacillus badius*) ABP6 在 30.4 °C、pH 7.05、转速 145.7 r/min、阿特拉津浓度为 200.9 mg/L 的情况下,480 h 时降解率为 89.7%,李晓微^[27]报道根瘤菌属(*Rhizobium*) AT2 在 30 °C、pH 7.0、

阿特拉津浓度为 100 mg/L 时降解率为 99%,李阳阳等^[3]报道节杆菌属(*Paenarthrobacter*) W11 在 30 °C、pH 7.0 阿特拉津浓度为 100 mg/L 时降解率为 97.1%。相较于以上菌株,菌株 AD111 在 35 °C、pH 8.0 的条件下,24 h 时对浓度为 50 mg/L 的阿特拉津降解率可达到 99.7%,表现出更强的降解效果。*Achromobacter marplatensis* AD111 表现出对阿特拉津高效降解率及充分适应碱性环境能力,为修复黑龙江偏碱性土壤中玉米-大豆轮作田阿特拉津残留对后茬作物产生药害问题提供了新的菌株资源。

4 结论

本研究从黑龙江省安达市农田土壤分离出一株可以利用阿特拉津为氮源生长的高效阿特拉津降解菌 AD111。经外观形态、生理生化鉴定和 16S rRNA 基因序列分析,将其鉴定为马德普塔拉无色小杆菌(*Achromobacter marplatensis*)。该菌在 35 °C、pH 8.0 条件下,24 h 内将浓度为 50 mg/L 的阿特拉津降解 99.7%、将 300 mg/L 的阿特拉津降解 81.9%。菌株 AD111 生长和降解阿特拉津的温度范围较宽且具有较好的耐碱性,为未来修复北方偏碱性土壤中阿特拉津残留问题提供了新的候选菌株。

REFERENCES

- [1] VILLAVERDE J, RUBIO-BELLIDO M, LARA-MORENO A, MERCHAN F, MORILLO E. Combined use of microbial consortia isolated from different agricultural soils and cyclodextrin as a bioremediation technique for herbicide contaminated soils[J]. Chemosphere, 2018, 193: 118-125.
- [2] 刘丹丹,孙宛玉,王鹤. 3 株降解阿特拉津菌株的特性与固定载体分析[J]. 浙江农业学报, 2021, 33(6): 1078-1087.
LIU DD, SUN WY, WANG H. Characterization and fixation analysis of three atrazine-degrading strains[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2021, 33(6): 1078-1087 (in Chinese).

- [3] 李阳阳, 范作伟, 张立明, 王彦国, 赵阳, 刘晓颖, 李晓秋, 吴海燕. 阿特拉津降解菌 W11 的分离鉴定及降解特性研究[J]. 玉米科学, 2020, 28(4): 165-171.
LI YY, FAN ZW, ZHANG LM, WANG YG, ZHAO Y, LIU XY, LI XQ, WU HY. Isolation, identification and degradation characteristics of atrazine-degrading strain W11[J]. Journal of Maize Sciences, 2020, 28(4): 165-171 (in Chinese).
- [4] BARCHANSKA H, SAJDAK M, SZCZYPKA K, SWIENIEK A, TWOREK M, KUREK M. Atrazine, triketone herbicides, and their degradation products in sediment, soil and surface water samples in Poland[J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2017, 24(1): 644-658.
- [5] 李绍峰, 朱静, 李铁晶. 阿特拉津降解菌株的分离、鉴定及降解特性研究[J]. 环境科学, 2012, 33(9): 3214-3219.
LI SF, ZHU J, LI TJ. Isolation, identification and characterization of an atrazine degrading bacterium[J]. Chinese Journal of Environmental Science, 2012, 33(9): 3214-3219 (in Chinese).
- [6] DUTTA A, SINGH N. Degradation of atrazine in mineral salts medium and soil using enrichment culture[J]. Journal of Environmental Science and Health, Part B, 2013, 48(10): 860-868.
- [7] Decision Documents for Atrazine. Washington D.C.: United States Environmental Protection Agency, April, 2006.
- [8] YANG C, LIM W, SONG G. Reproductive toxicity due to herbicide exposure in freshwater organisms[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Toxicology & Pharmacology: CBP, 2021, 248: 109103.
- [9] GAO JP, SONG PP, WANG GY, WANG JH, ZHU LS, WANG J. Responses of atrazine degradation and native bacterial community in soil to *Arthrobacter* sp. strain HB-5[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 159: 317-323.
- [10] ZHAO XY, WANG L, MA F, YANG JX. Characterisation of an efficient atrazine-degrading bacterium, *Arthrobacter* sp. ZXY-2: an attempt to lay the foundation for potential bioaugmentation applications[J]. Biotechnology for Biofuels, 2018, 11: 113.
- [11] YANG XY, WEI HY, ZHU CX, GENG B. Biodegradation of atrazine by the novel *Citricoccus* sp. strain TT3[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 147: 144-150.
- [12] 刘春光, 杨峰山, 卢星忠, 黄飞, 刘丽萍, 杨传平. 阿特拉津降解菌 T3AB1 的分离鉴定及土壤修复[J]. 微生物学报, 2010, 50(12): 1642-1650.
LIU CG, YANG FS, LU XZ, HUANG F, LIU LP, YANG CP. Isolation, identification and soil remediation of atrazine-degrading strain T3 AB1[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(12): 1642-1650 (in Chinese).
- [13] WANG JH, ZHU LS, WANG Q, WANG J, XIE H. Isolation and characterization of atrazine mineralizing *Bacillus subtilis* strain HB-6[J]. PLoS One, 2014, 9(9): e107270.
- [14] 刘丹丹, 刘畅. 阿特拉津降解菌 *Enterobacter* sp. 的基因差异分析[J]. 科学技术与工程, 2017, 17(27): 110-115.
LIU DD, LIU C. Genetic difference analysis of atrazine biodegradation bacteria (*Enterobacter* sp.)[J]. Science Technology and Engineering, 2017, 17(27): 110-115 (in Chinese).
- [15] 杨立杰, 施德志, 彭湃, 吴迪, 杨君子, 李彦成, 王恩彪, 孟垚, 魏小娜, 李婷婷. 阿特拉津降解菌 ATR3 的分离鉴定与土壤修复[J]. 微生物学杂志, 2021, 41(5): 37-42.
YANG LJ, SHI DZ, PENG P, WU D, YANG JZ, LI YC, WANG EB, MENG Y, WEI XN, LI TT. Isolation identification of atrazine-degradable strain ATR3 and soil remediation[J]. Journal of Microbiology, 2021, 41(5): 37-42 (in Chinese).
- [16] BUCHANAN RE, GIBBONS NE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所, 译. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984.
BUCHANAN RE, GIBBONS NE. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, trans. 8th ed. Beijing: Science Press, 1984 (in Chinese).
- [17] 李戈. 阿特拉津厌氧降解菌的筛选鉴定及其降解特性研究[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2018.
LI G. Isolation of anaerobic degrading bacteria of atrazine in soil and studies on the degrading characteristics[D]. Taian: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [18] 杨晓燕, 李艳苓, 魏环宇, 朱昌雄, 李峰, 耿兵. 阿特拉津降解菌 CS3 的分离鉴定及其降解特性的研究[J]. 农业环境科学学报, 2018, 37(6): 1149-1158.
YANG XY, LI YL, WEI HY, ZHU CX, LI F, GENG B. Isolation, identification, and characterization of atrazine-degrading bacterial strain CS3[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2018, 37(6): 1149-1158 (in Chinese).
- [19] ZHAO XY, WANG L, DU LN, YANG JX, DONG J,

- MA F. Optimization of culturing conditions for isolated *Arthrobacter* sp. ZXY-2, an effective atrazine-degrading and salt-adaptive bacterium[J]. RSC Advances, 2017, 7(53): 33177-33184.
- [20] 朱希坤, 李清艳, 蔡宝立. 节杆菌 AD26 的分离鉴定及其与假单胞菌 ADP 对阿特拉津的联合降解[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(3): 627-632.
- ZHU XK, LI QY, CAI BL. Isolation and identification of *Arthrobacter* sp. AD26 and joint degradation of atrazine by *Arthrobacter* sp. AD26 and *Pseudomonas* sp. ADP[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2009, 28(3): 627-632 (in Chinese).
- [21] GETENGA Z, DÖRFLER U, IWObI A, SCHMID M, SCHROLL R. Atrazine and terbutylazine mineralization by an *Arthrobacter* sp. isolated from a sugarcane-cultivated soil in Kenya[J]. Chemosphere, 2009, 77(4): 534-539.
- [22] VAISHAMPAYAN PA, KANEKAR PP, DHAKEPHALKAR PK. Isolation and characterization of *Arthrobacter* sp. strain MCM B-436, an atrazine-degrading bacterium, from rhizospheric soil[J]. International Biodeterioration and Biodegradation, 2007, 60(4): 273-278.
- [23] FERNANDES AFT, BRAZ VS, BAUERMEISTER A, PASCHOAL JAR, LOPES NP, STEHLING EG. Degradation of atrazine by *Pseudomonas* sp. and *Achromobacter* sp. isolated from Brazilian agricultural soil[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2018, 130: 17-22.
- [24] 黄思琦, 屠王满措, 潘九月, 李洪艳, 马晨怡, 陈铭学, 林晓燕. 稻田除草剂二氯喹啉酸降解菌 15[#]的分离、鉴定及降解特性[J]. 微生物学通报, 2021, 48(11): 4111-4122.
- HUANG SQ, TU W, PAN JY, LI HY, MA CY, CHEN MX, LIN XY. Isolation, identification and degradation characteristics of paddy field herbicide quinclorac degrading bacteria 15[#][J]. Microbiology China, 2021, 48(11): 4111-4122 (in Chinese).
- [25] 何倩, 彭清忠, 彭晓春, 恩特马克·布拉提白, 陈义光, 刘祝祥, 彭清静. 高效降解环己酮的无色杆菌 JDM-3-03 株的分离和鉴定[J]. 生物技术通讯, 2008, 19(4): 558-561.
- HE Q, PENG QZ, PENG XC, BORRATHYBAY E, CHEN YG, LIU ZX, PENG QJ. Isolation and identification of a high cyclohexanone degradation *Achromobacter* in-solitus JDM-3-03 strain[J]. Letters in Biotechnology, 2008, 19(4): 558-561 (in Chinese).
- [26] 张瑶心, 王亮节, 郑文, 徐汉琴, 郑恋, 钟静. 产几丁质酶的无色杆菌 ZWW8 的发酵产酶及酶学性质研究[J]. 生物技术通报, 2021, 37(4): 96-106.
- ZHANG YX, WANG LJ, ZHENG W, XU HQ, ZHENG L, ZHONG J. Study on enzyme production of a chitinase-producing strain *Achromobacter* sp. ZWW8 by fermentation and its enzymatic characterization[J]. Biotechnology Bulletin, 2021, 37(4): 96-106 (in Chinese).
- [27] 李晓微. 阿特拉津降解菌 AT2 的分离鉴定及其模拟土壤修复研究[J]. 黑龙江环境通报, 2017, 41(4): 88-94.
- LI XW. Isolation and identification of atrazine-degrading strain AT2 and bioremediation of contaminated soil[J]. Heilongjiang Environmental Journal, 2017, 41(4): 88-94 (in Chinese).
- [28] 张庆媛, 葛世杰, 姜昭, 王志刚, 张颖. 高效阿特拉津降解菌株 DNS10 降解条件优化[J]. 环境工程学报, 2013, 7(3): 1169-1174.
- ZHANG QY, GE SJ, JIANG Z, WANG ZG, ZHANG Y. Optimization for degradation conditions of atrazine-degrading strain DNS10[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2013, 7(3): 1169-1174 (in Chinese).
- [29] 郭火生, 王志刚, 孟冬芳, 王洋, 张庆媛, 张颖. 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[J]. 微生物学通报, 2012, 39(9): 1234-1241.
- GUO HS, WANG ZG, MENG DF, WANG Y, ZHANG QY, ZHANG Y. Degradation characteristics and identification and the degradation pathway of the atrazine-degrading strain DNS32[J]. Microbiology China, 2012, 39(9): 1234-1241 (in Chinese).
- [30] RADWAN EK, EL SEBAI TNM, ABDEL GHAFAR HH, KHATTAB AEA. Atrazine mineralization by *Stenotrophomonas maltophilia* and *Agrobacterium tumefaciens* Egyptian soil isolates[J]. Desalin Water Treat, 2019, 171: 325-330.
- [31] ZHANG JP, LIANG S, WANG XH, LU ZB, SUN P, ZHANG H, SUN FJ. Biodegradation of atrazine by the novel *Klebsiella variicola* strain FH-1[J]. BioMed Research International, 2019, 2019: 4756579.
- [32] KHATOON H, RAI JPN. Optimization studies on biodegradation of atrazine by *Bacillusadius* ABP6 strain using response surface methodology[J]. Biotechnology Reports, 2020, 26: e00459-10.