

# 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

朱希坤, 李清艳, 蔡宝立

(南开大学微生物学系和生物活性材料教育部重点实验室, 天津 300071)

**摘要:**用富集培养法,从农药厂的工业废水中分离到高效降解除草剂阿特拉津的 AD26 菌株,通过 16S rRNA 基因序列分析,该菌株被鉴定为节杆菌(*Arthrobacter* sp.)。降解基因的 PCR 分析表明,AD26 含有阿特拉津降解基因 *trzN* 和 *atzBC*,它能以阿特拉津为唯一氮源、蔗糖或柠檬酸钠为碳源生长,将阿特拉津降解成氰尿酸,降解速度快但降解不完全。假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)ADP 是 Wackett 实验室分离的阿特拉津降解菌株,含有阿特拉津降解基因 *atzABCDEF*,能以阿特拉津为唯一氮源、柠檬酸钠为碳源(不能以蔗糖为碳源)生长,将阿特拉津降解成  $\text{NH}_3$  和  $\text{CO}_2$ ,降解完全但降解速度慢。在阿特拉津浓度为  $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的无机盐培养基中进行的 AD26 和 ADP 混合培养表明,它们对阿特拉津的降解发生了互补和增强作用,两个菌株能在以阿特拉津为唯一氮源、蔗糖为碳源的培养基中生长,而且生长和降解速率都好于单个菌株,培养 72 h 后阿特拉津去除率达到 99.9%,其中 76.7% 的阿特拉津被降解成  $\text{NH}_3$  和  $\text{CO}_2$ 。这表明由节杆菌 AD26 和假单胞菌 ADP 组成的混合菌株在阿特拉津废水处理和污染土壤的生物修复中有很好的应用潜力。

**关键词:**节杆菌 AD26;假单胞菌 ADP;阿特拉津;联合降解

**中图分类号:**X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2009)03-0627-06

## Isolation and Identification of *Arthrobacter* sp. AD26 and Joint Degradation of Atrazine by *Arthrobacter* sp. AD26 and *Pseudomonas* sp. ADP

ZHU Xi-kun, LI Qing-yan, CAI Bao-li

(Department of Microbiology, and Key Laboratory of Bioactive Materials, Ministry of Education, Nankai University, Tianjin 300071, China)

**Abstract:** A highly efficient atrazine-degrading bacterium, strain AD26, was isolated from an industrial wastewater sample using enrichment culture. 16S rRNA gene sequencing identified AD26 as an *Arthrobacter* sp. strain. PCR assays for degradation genes indicated that AD26 contains atrazine-degrading genes *trzN* and *atzBC*. This strain uses atrazine as sole source of nitrogen and sucrose or sodium citrate as the carbon source for growth and degrades atrazine to cyanuric acid. Although AD26 exhibited a higher degradation rate, the degradation of atrazine was not complete. *Pseudomonas* sp. strain ADP is an atrazine-degrading strain isolated by Wackett and his cooperators. This strain contains atrazine-degrading genes *atzABCDEF*, uses atrazine as sole source of nitrogen and sodium citrate (not sucrose) as the carbon source for growth and degrades atrazine to  $\text{NH}_3$  and  $\text{CO}_2$ . Although atrazine degradation of ADP was complete, the degradation rate of atrazine was slower. Co-cultivation of AD26 and ADP in minimal medium containing  $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  of atrazine showed that they exhibited joint degradation of atrazine and higher degradative rate. The two strains could grow quickly in the minimal medium that atrazine as sole source of nitrogen and sucrose as carbon source. They were capable of removing atrazine in the medium at 99.9% in 72 h, and 76.7% of atrazine was degraded to  $\text{NH}_3$  and  $\text{CO}_2$ . These results indicated that co-cultivation of *Arthrobacter* sp. strain AD26 and *Pseudomonas* sp. strain ADP has great application potentialities in bioremediation of atrazine-contaminated soils and waters.

**Keywords:** *Arthrobacter* sp. AD26; *Pseudomonas* sp. ADP; atrazine; joint degradation

收稿日期:2008-05-07

作者简介:朱希坤(1983—),男,硕士研究生,辽宁葫芦岛人,主要从事生物降解研究。E-mail:zhuxikun\_1983@yahoo.com.cn

通讯作者:蔡宝立 E-mail:caibaoli@nankai.edu.cn

阿特拉津是一种价廉、高效的三嗪类除草剂,商品名莠去津,广泛应用于玉米、高粱和甘蔗地的杂草防除。由于阿特拉津在农业上的大量使用和阿特拉津工厂的废水排放,造成对土壤、地下水和表面水的污染<sup>[1-3]</sup>。研究表明,阿特拉津是一种内分泌干扰剂,它能干扰激素的调节功能,引起人和两栖动物的生殖缺陷并能诱发肿瘤,其生态毒理风险不容忽视<sup>[4-6]</sup>。为了修复阿特拉津造成的环境污染,人们从污染位点和工业废水中分离出许多阿特拉津降解细菌,并对其生物降解的分子机理进行了大量研究<sup>[7-11]</sup>。根据降解基因的组成可以将阿特拉津降解细菌分成 3 种类型,它们含有的基因分别是 *atzABCDEF*、*trzN-atzBC* 和 *atzABC-trzD*<sup>[12]</sup>。其中前两种类型较为常见。第一种类型以模式菌株假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)ADP 为代表,该菌株能以阿特拉津为唯一氮源生长,6 个降解基因位于 108 845 bp 的阿特拉津降解质粒 pADP-1 中,*atzABC* 基因编码的酶将阿特拉津降解成氰尿酸,*atzDEF* 基因编码的酶将氰尿酸降解成 NH<sub>3</sub> 和 CO<sub>2</sub><sup>[8]</sup>,其特点是能将阿特拉津完全降解,但降解速度较慢。第二种类型以金黄节杆菌(*Arthrobacter aureescens*)TC1 菌株为代表,位于质粒 pTC1 中的降解基因 *trzN-atzBC* 编码的酶将阿特拉津降解成氰尿酸<sup>[9]</sup>,其特点是阿特拉津降解速度快,但降解不完全。

本文报道一个新的阿特拉津降解菌株节杆菌(*Arthrobacter* sp.)AD26 的分离和鉴定,以及该菌株与假单胞菌 ADP 菌株对阿特拉津的联合降解作用。

1 材料与方法

1.1 培养基

培养基 I (g·L<sup>-1</sup>):KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.9, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O

6.5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2, 1 mL 微量元素溶液<sup>[13]</sup>,蔗糖 3 (碳源),阿特拉津 0.2(氮源,配成 10 g·L<sup>-1</sup> 甲醇储液,高压灭菌之前加入);培养基 II :用 3 g 柠檬酸钠代替蔗糖作碳源,其他成分与培养基 I 相同;培养基 III :用 0.5 g 氰尿酸代替阿特拉津作氮源,其他成分与培养基 I 相同;培养基 IV :用 3 g 柠檬酸钠代替蔗糖作碳源,其他成分与培养基 III 相同;培养基 V :用 3 g 葡萄糖代替蔗糖作碳源,其他成分与培养基 I 相同;培养基 VI :用 3 g 果糖代替蔗糖作碳源,其他成分与培养基 I 相同。

1.2 菌株和培养条件

阿特拉津降解菌株 *Arthrobacter* sp. AD26: 本研究从吉林化工有限公司农药厂的工业废水中分离得到。阿特拉津降解菌株 *Pseudomonas* sp. ADP: 美国明尼苏达大学生物化学系 L.P. Wackett 教授惠赠。AD26 菌株和 ADP 菌株分别用培养基 I 和培养基 II 培养 48 h,离心收获细胞,用 pH7.0 的磷酸缓冲液悬浮制成 OD<sub>600</sub> = 2.0 的菌悬液,然后分别接种新的培养基进行降解实验。在进行混合菌株的联合降解实验时,将两菌株的菌悬液按 1:1 比例混合,然后接入新的培养基中。单个菌株和混合菌株的接种量均为 1%(体积比),100 mL 三角瓶中含有 20 mL 培养基,在 150 r·min<sup>-1</sup> 摇床中 30 ℃振荡培养 72 h。

1.3 阿特拉津降解菌株的 16S rRNA 基因鉴定

以 AD26 菌株的总 DNA 为模板,用 PCR 方法扩增其 16S rRNA 基因。扩增产物用 DNA 纯化试剂盒(北京鼎国公司)纯化,然后连接到 pMD18-T 载体上(TakaRa 公司),转化到大肠杆菌 DH5α 中,送到北京钧尧伟业生物技术公司测序,得到的序列与 GenBank 数据库中的类似序列进行 Blast 比对,从而确定其分

表 1 扩增阿特拉津降解基因所用的 PCR 引物  
Table 1 PCR primers used in amplification of atrazine-degrading genes

| 基因          | 引物             | 序列(5'→3')                         | 退火温度/℃ | 大小/kb |
|-------------|----------------|-----------------------------------|--------|-------|
| <i>trzN</i> | <i>trzN</i> -F | ATGATCCTGATCCGCGGACTGA            | 54     | 1.37  |
|             | <i>trzN</i> -R | CTACAAGTCTCTGGGAATGAGTG           |        |       |
| <i>atzB</i> | <i>atzB</i> -F | GGGCACGGTGCCTTAATGG               | 53     | 1.15  |
|             | <i>atzB</i> -R | TCAGATCGACGCAAAGAAAT              |        |       |
| <i>atzC</i> | <i>atzC</i> -F | TATTGCCCATTTGTGGTGACAAC           | 52     | 1.08  |
|             | <i>atzC</i> -R | TTGGGATTGTTGGTGACAGAAT            |        |       |
| <i>atzA</i> | <i>atzA</i> -F | TTGCCGTGCGAGTTTTCGATG             | 65     | 1.50  |
|             | <i>atzA</i> -R | TGCAGCAACGGCGTCATTTTC             |        |       |
| <i>atzD</i> | <i>atzD</i> -1 | GGAGACATCATATGTATCAGATCGACGTTTTTC | 60     | 1.10  |
|             | <i>atzD</i> -2 | CCAATAAGCTTAGCGCGGCAATGACTGCA     |        |       |
| <i>atzE</i> | <i>atzE</i> -1 | TACGCGGTAAAGAATCTGTT              | 50     | 1.00  |
|             | <i>atzE</i> -2 | GGAGACCGGCTGAGTGAGA               |        |       |
| <i>atzF</i> | <i>atzF</i> -1 | CGATCGGAAAAACGAACCTC              | 55     | 0.95  |
|             | <i>atzF</i> -2 | CGATCGCCCCATCTTCGAAC              |        |       |

类地位(鉴定到属)。所用 PCR 引物和实验方法见文献[10]。AD26 菌株 16S rRNA 基因序列的注册号是: EF623831。

#### 1.4 阿特拉津降解基因的 PCR 检测

用 PCR 方法,以 AD26 菌株的总 DNA 为模板,扩增 AD26 菌株的阿特拉津降解基因,所用引物见表 1。表 1 中 *trzN*、*atzB*、*atzC*、*atzA* 和 *atzD* 引物的扩增产物是全基因,*atzE* 和 *atzF* 引物的扩增产物是基因中心区。扩增基因的纯化、克隆和测序与 16S rRNA 基因相同。得到的序列提交到 GenBank 数据库,并与同源基因进行 Blast 比对。基因序列的注册号分别是: *trzN*(EU091479)、*atzB*(EU621846)、*atzC*(EU621847)。

#### 1.5 测定方法

菌液浊度测定:用分光光度计在 600 nm 波长下测定菌液的吸光值。

阿特拉津测定:用二氯甲烷萃取含有阿特拉津的培养液,用 0.22  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤,然后用气相色谱仪检测。色谱柱为 HP-5, 30 m $\times$ 0.2 mm $\times$ 0.25  $\mu\text{m}$ 。检测条件:程序升温 90  $^{\circ}\text{C}$  1 min(30  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ), 240  $^{\circ}\text{C}$  3 min(5  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ), 250  $^{\circ}\text{C}$  2 min;进样口温度 250  $^{\circ}\text{C}$ ,检测器温度 290  $^{\circ}\text{C}$ ,氮气流速 10 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ ,氢气流速 2 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ ,空气流速 60 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ 。

氰尿酸测定:菌液 10 000 r $\cdot\text{min}^{-1}$  离心 15 min 去除菌体和杂质,取上清,用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤,进行液相色谱检测。色谱柱为 150 mm $\times$ 3.9 mm Symmetry RP18(5  $\mu\text{m}$ );流动相甲醇:水(5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + $\text{H}_3\text{PO}_4$  缓冲液, pH3)为 10:90;柱温为室温;检测波长 200 nm;流速 0.7 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ 。

还原糖测定:采用 DNS 光度法测定培养液中还原性单糖(葡萄糖和果糖)的浓度[14]。

氨氮含量测定:采用纳氏试剂光度法测定培养液中氨氮的浓度[15]。

#### 1.6 碳源和氮源利用实验

将 0.2 mL 的 AD26、ADP 或混合菌株的菌悬液接种到 20 mL 阿特拉津浓度为 200 mg $\cdot\text{L}^{-1}$  的无机盐培养基中,振荡培养 72 h 以后培养液明显混浊的视为生长。

#### 1.7 阿特拉津降解实验

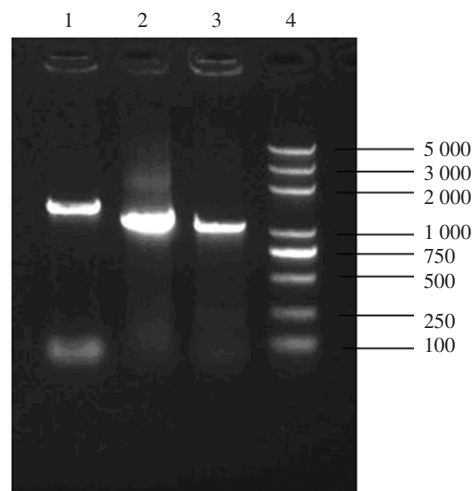
向 20 mL 阿特拉津浓度为 200 mg $\cdot\text{L}^{-1}$  的无机盐培养基(装于 100 mL 三角瓶)中接种 0.2 mL 的 AD26、ADP 或混合菌株的菌悬液,振荡培养,定时取样。测定样品的 OD<sub>600</sub>,了解细菌的生长情况;测定残留的阿特拉津浓度,了解阿特拉津的降解情况;测定

中间代谢产物氰尿酸的浓度和终产物  $\text{NH}_3$  的浓度,证明阿特拉津是否能被完全降解;测定还原性单糖的浓度,证明 AD26 菌株通过降解蔗糖产生葡萄糖和果糖,为 ADP 菌株的生长提供碳源。每个样品做 3 个平行实验。AD26 和混合菌株用培养基 I,ADP 用培养基 II。

## 2 结果与分析

### 2.1 阿特拉津降解菌株 AD26 的分离和鉴定

用富集培养法,从吉林化学工业公司农药厂的工业废水中分离到能以阿特拉津为唯一氮源、蔗糖或柠檬酸钠为碳源生长的 AD26 菌株。16S rRNA 基因鉴定结果表明,AD26 菌株的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 中 15 个 *Arthrobacter* 菌株的 16S rRNA 基因有 99% 以上的类似性,所以 AD26 菌株被鉴定为 *Arthrobacter* sp.。用表 1 所列的引物对 AD26 的阿特拉津降解基因进行 PCR 检测,得到 1 371 bp 的 *trzN* 基因、1 154 bp 的 *atzB* 基因和 1 082 bp 的 *atzC* 基因的扩增产物(图 1)。用 *atzA*、*atzD*、*atzE* 和 *atzF* 引物所进行的 PCR 反应没有得到相应的产物,表明 AD26 的降解基因组成与金黄节杆菌 TC1 类似,它只能将阿特拉津降解成氰尿酸。Blast 结果表明,AD26 和 TC1 两个菌株的 *trzN* 基因只有 1 个碱基不同,它们的第 907 位碱基,AD26 为 A,TC1 为 T。它们编码的三嗪水解酶(*TrzN*)的第 303 位氨基酸,AD26 为亮氨酸,TC1 为甲硫氨酸。AD26 和 TC1 的 *atzB* 基因和它们编码的羟基阿特拉津乙氨基水解酶(*AtzB*)的序列完全相同,这与 de Souza 报道的结果一致,即所有阿特拉



lane 1: *trzN*, lane 2: *atzB*, lane 3: *atzC*, lane 4: DNA marker(bp)

图 1 AD26 菌株 *trzN*、*atzB* 和 *atzC* 基因的 PCR 检测

Figure 1 PCR detection of *trzN*、*atzB* and *atzC* genes of strain AD26

津降解菌株中的 *atzB* 基因具有很高的保守性<sup>[6]</sup>。AD26 和 TC1 的 *atzC* 基因的同源性为 99%, 序列中有一个碱基不同, 即第 950 位的碱基由 TC1 的 C 变为 T, 导致该基因编码的 N-异丙基氰尿酸胺异丙基氨基水解酶 (AtzC) 第 317 位氨基酸由甘氨酸变为天冬氨酸。*trzN* 和 *atzC* 基因编码的酶出现 1 个氨基酸改变是否对酶的活力和性质有影响, 有待通过酶的表达和酶学性质测定加以确定。

## 2.2 阿特拉津降解菌株的碳源和氮源利用

用培养基 I~VI 分别培养 AD26、ADP 和混合菌株, 检查它们对氮源和碳源的利用情况, 所得结果见表 2。从表 2 可知, AD26 能以蔗糖、柠檬酸钠、葡萄糖、果糖为碳源, 阿特拉津为氮源生长, 但不能以氰尿酸为氮源生长, 这与基因的 PCR 检测中该菌株不含有降解基因 *atzDEF* 的结果一致。ADP 能以柠檬酸钠、葡萄糖、果糖为碳源, 阿特拉津、氰尿酸为氮源生长, 但不能以蔗糖为碳源降解阿特拉津和氰尿酸。混合菌株在所有 6 种培养基中都能生长。其中, 在以蔗糖为碳源和氰尿酸为氮源的培养基 III 中, ADP 和 AD26 都不能生长, 而它们的混合菌却能生长, 说明两个菌株在混合培养时发生了互补作用。据此推测, 在培养基 I 中混合菌株对阿特拉津的降解也可能会发生互补作用 (见 2.3)。

表 2 可被阿特拉津降解菌株利用的碳源和氮源

Table 2 The carbon and nitrogen sources used by atrazine-degrading bacteria

| 菌株   | 蔗糖+阿<br>特拉津<br>(I) | 柠檬酸<br>钠+阿特<br>拉津(II) | 蔗糖+氰<br>尿酸(III) | 柠檬酸<br>钠+氰尿<br>酸(IV) | 葡萄糖+<br>阿特拉津<br>(V) | 果糖+阿<br>特拉津<br>(VI) |
|------|--------------------|-----------------------|-----------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| AD26 | +                  | +                     | -               | -                    | +                   | +                   |
| ADP  | -                  | +                     | -               | +                    | +                   | +                   |
| 混合菌  | +                  | +                     | +               | +                    | +                   | +                   |

注: +表示能生长; -表示不能生长。

## 2.3 混合菌株在以蔗糖为碳源的基本培养基中对阿特拉津的联合降解

### 2.3.1 混合菌株对阿特拉津降解的互补作用

当 AD26 在以蔗糖为碳源、阿特拉津为氮源的培养基 I 中生长时, 将阿特拉津降解成氰尿酸以后就不再进一步降解, 所以培养基中会有大量的氰尿酸积累。因为 ADP 不能以蔗糖为碳源降解阿特拉津和氰尿酸, 所以它在培养基 I 中根本不能生长。如果在培养基 I 中一起培养由 AD26 和 ADP 组成的混合菌株时, 阿特拉津能被降解, 但是不产生或产生少量的氰

尿酸积累, 则说明 ADP 和 AD26 发生了互补和联合降解作用, AD26 在降解阿特拉津的过程中为 ADP 提供了可以利用的碳源, ADP 能将 AD26 降解阿特拉津产生的氰尿酸进一步降解。为了证明上述假设, 我们分别用培养基 I 培养 AD26 和混合菌株, 用培养基 II 培养 ADP, 在不同时间测定培养液中的氰尿酸含量。测定结果表明, 在接种 ADP 的培养液中, 自始至终没有氰尿酸积累, 这是由于 ADP 含有降解基因 *atz-ABCDEF*, 这 6 个基因编码的酶能将阿特拉津完全降解成  $\text{NH}_3$  和  $\text{CO}_2$ 。在接种 AD26 的培养液中, 氰尿酸的积累不断增加, 72 h 后达到  $83.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 这是由于它含有的 *trzN-atzBC* 基因编码的酶将阿特拉津降解成氰尿酸以后, 氰尿酸不能被进一步降解。混合菌株在 0~24 h 内没有氰尿酸积累, 之后, 随着细菌的生长和阿特拉津的降解, 氰尿酸含量不断升高, 72 h 达到  $19.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 是 AD26 培养液中氰尿酸含量的 23.3% (质量比), 这表明有 76.7% 的氰尿酸被降解 (图 2)。混合菌株培养 48 h 以后培养液中的氨氮含量为  $80.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 这表明大部分氰尿酸已经被降解成  $\text{NH}_3$  和  $\text{CO}_2$ 。混合菌株培养过程中降解氰尿酸的反应肯定是由 ADP 所携带的 *atzDEF* 基因编码的酶催化的, 但是 ADP 不能以蔗糖为碳源降解阿特拉津和氰尿酸, 这又如何解释呢? 是不是 AD26 在以蔗糖为碳源降解阿特拉津的过程中也将蔗糖降解成葡萄糖和果糖, 从而为 ADP 提供可以用作碳源的单糖呢? 对混合菌培养液中还原性单糖的测定结果表明, 这种推测是正确的, 在培养到 24 h 时还原性单糖的浓度是  $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 48 h 后达到  $2500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。混合菌株在培养过程中出现少量氰尿酸积累, 是由于 AD26 和 ADP 将阿特拉津降

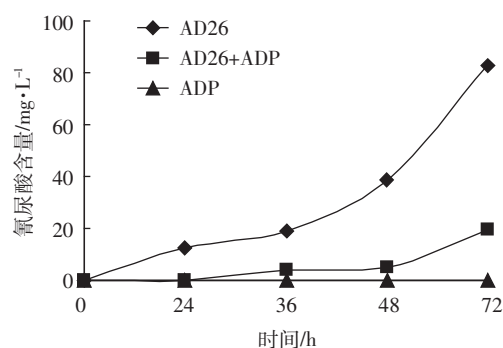


图 2 ADP、AD26 和混合菌株在以  $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  阿特拉津为唯一氮源的基本培养基中的氰尿酸积累

Figure 2 Cyanuric acid accumulation of *Pseudomonas* sp. ADP, *Arthrobacter* sp. AD26 and mixed bacteria in minimal media with  $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  atrazine as the sole nitrogen source

解成氰尿酸的速度比 ADP 将氰尿酸降解成  $\text{NH}_3$  和  $\text{CO}_2$  的速度快。

### 2.3.2 混合菌株对阿特拉津降解的增强作用

为了证明混合菌株在以蔗糖为碳源、阿特拉津为氮源的培养基 I 中对阿特拉津降解的增强作用,我们分别用培养基 I 培养 AD26 和混合菌株,用培养基 II 培养 ADP,用不接种任何细菌的培养基 I 作负对照。细菌生长情况见图 3,阿特拉津降解情况见图 4。从图 3 可见,培养 48 h 后混合菌株的生长量最高,菌液的  $\text{OD}_{600}$  值达到 1.75。AD26 次之,菌液的  $\text{OD}_{600}$  值为 1.23。ADP 的生长量最低,菌液的  $\text{OD}_{600}$  值仅为 0.79。阿特拉津的测定结果表明,混合菌株的降解速度和降解率最好,培养 12 h 后阿特拉津降解率为 93.2%,明显好于 AD26 的 53.5% 和 ADP 的 22.3%。混合菌株、AD26 和 ADP 在培养 72 h 后的阿特拉津残留量分别是 0.2、0.6 和 21  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。上述结果表明,在接种量和培养条件相同的情况下,混合菌株的生长量和阿特拉津降解能力明显好于 AD26 和 ADP 单菌。由 AD26 和

ADP 组成的混合菌株不仅扩大了碳源的利用范围(蔗糖),使阿特拉津降解的速度快、残留低,而且能将大部分(76.7%)阿特拉津完全降解,因此,混合菌株在阿特拉津污染土壤和水的生物修复中有很好的应用潜力。到目前为止,尚未见到用节杆菌和假单胞菌对阿特拉津进行联合降解的报道。

## 3 结论

(1)从农药厂的工业废水中分离到高效降解除草剂阿特拉津的节杆菌(*Arthrobacter* sp.)AD26 菌株,该菌株含有阿特拉津降解基因 *trzN* 和 *atzBC*,能以阿特拉津为唯一氮源、蔗糖为碳源生长,将阿特拉津降解成氰尿酸,降解速度快但降解不完全。

(2)由节杆菌 AD26 和阿特拉津降解完全但降解速度慢的假单胞菌 ADP 组成的混合菌株,在以阿特拉津为唯一氮源、蔗糖为碳源的基本培养基中培养时,对阿特拉津的降解发生互补作用。AD26 在降解阿特拉津的过程中将蔗糖降解成葡萄糖和果糖,为 ADP 提供可利用的碳源;ADP 将大部分的 AD26 降解阿特拉津的产物氰尿酸进一步降解成  $\text{NH}_3$  和  $\text{CO}_2$ 。

(3)由节杆菌 AD26 和假单胞菌 ADP 组成的混合菌株在以阿特拉津为唯一氮源、蔗糖为碳源的基本培养基中培养时,对细菌生长和阿特拉津降解发生了增强作用,在接种量和培养条件相同的情况下,混合菌株的生长量和阿特拉津降解能力明显好于 AD26 和 ADP 单菌。因此,混合菌株在阿特拉津污染土壤和水的生物修复中有很好的应用潜力。

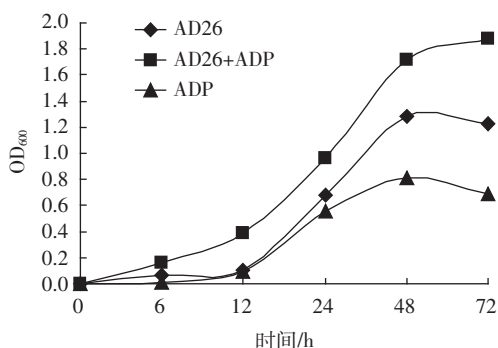


图3 节杆菌 AD26、假单胞菌 ADP 和混合菌株的生长曲线

Figure 3 The growth curves of *Arthrobacter* sp. AD26, *Pseudomonas* sp. ADP and mixed bacteria

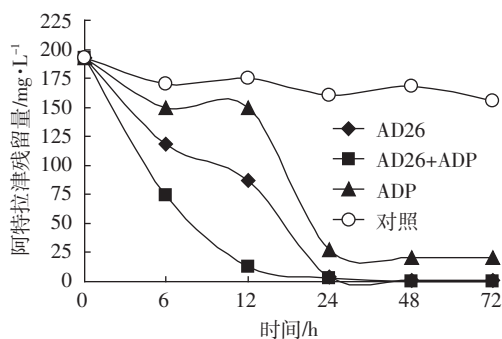


图4 节杆菌 AD26、假单胞菌 ADP 和混合菌株的阿特拉津降解曲线

Figure 4 Degradation curves of atrazine of *Arthrobacter* sp. AD26, *Pseudomonas* sp. ADP and mixed bacteria

## 参考文献:

- [1] 叶常明, 雷志芳, 王杏君, 等. 除草剂阿特拉津的多介质环境行为[J]. 环境科学, 2001, 22(2): 69-73.  
YE Chang-ming, LEI Zhi-fang, WANG Xing-jun, et al. Multimedia environmental behavior of herbicide atrazine[J]. *Environmental Science*, 2001, 22(2): 69-73.
- [2] 邓建才, 蒋新, 王代长, 等. 农田生态系统中除草剂阿特拉津的环境行为及其模型研究进展[J]. 生态学报, 2005, 25(12): 3359-3367.  
DENG Jian-cai, JIANG Xin, WANG Dai-chang, et al. Research advance of environmental fate of herbicide atrazine and model fitting in farm land ecosystem[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(12): 3359-3367.
- [3] Struthers J K, Jayachandran K, Moorman T B. Biodegradation of atrazine by *Agrobacterium radiobacter* J14a and use of this strain in bioremediation of contaminated soil[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(9): 3368-3375.
- [4] Singh P, Suri C R, Cameotra S S. Isolation of a member of *Acinetobacter* species involved in atrazine degradation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 317(3): 697-702.

- [5] Gammon D W, Aldous C N, Carr Jr W C, et al. A risk assessment of a-triazine use in California: human health and ecological aspects[J]. *Pest Management Science*, 2005, 61(4):331-355.
- [6] 万年升, 顾继东, 段舜山. 阿特拉津生态毒性与生物降解的研究[J]. 环境科学学报, 2006, 26(4):552-560.
- WAN Nian-sheng, GU Ji-dong, DUAN Shun-shan. Eco-toxicity and biodegradation of a triazine in the environment[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2006, 26(4):552-560.
- [7] Shapir N, Mongodin E F, Sadowsky M J, et al. Evolution of catabolic pathways: genomic insights into microbial s-triazine metabolism[J]. *J Bacteriol*, 2007, 189(3):674-682.
- [8] Martinez B, Tomkins J, Wackett L P, 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] Sajjaphan K, Shapir N, Wackett L P, et al. *Arthrobacter aureus* TC1 atrazine catabolism genes *trzN*, *atzB*, and *atzC* are linked on a 160-kilobase region and are functional in *Escherichia coli*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(7):4402-4407.
- [10] Cai B, Han Y, Liu B, et al. Isolation and characterization of an a-triazine-degrading bacterium from industrial wastewater in China[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2003, 36(6):272-276.
- [11] Marecik R, Kroliczak P, Czaczky K, et al. Atrazine degradation by aerobic microorganisms isolated from the rhizosphere of sweet flag (*Acorus calamus* L.)[J]. *Biodegradation*, 2008, 19(2):293-301.
- [12] Deversl M, Azharil N E, Kolic N-U, 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 Microbiol Lett*, 2007, 273(1):78-86.
- [13] 蔡宝立, 王淑芳, 黄今勇, 等. 黄杆菌 ND3 菌株的分离和降解率的研究[J]. 环境化学, 1998, 17(5):434-438.
- CAI Bao-li, WANG Shu-fang, HUANG Jin-yong, et al. Isolation and study of naphthalene biodegradation of *Flavobacterium* sp. strain ND3[J]. *Environmental Chemistry*, 1998, 17(5):434-438.
- [14] 杨贵明, 蒋爱华, 薛秋生. 用 DNS 光度法测定还原糖的条件研究[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(14):3258, 3264.
- YANG Gui-ming, JIANG Ai-hua, XUE Qiu-sheng. Study on the determination factor of reduced sugar with DNS spectrophotometry[J]. *Journal of Anhui Agri Sci*, 2006, 34(14):3258, 3264.
- [15] 国家环保总局水和废水监测分析方法编委会. 水和废水监测分析方法[M]. 第四版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002:279-281.
- Monitoring and Analytical Methods for Water and Wastewater, Edited by the Committee of Monitoring and Analytical Methods for Water and Wastewater, Environmental Protection General Bureau, PRC[M]. 4th edition. China Environmental Science Press, Beijing, 2002:279-281.
- [16] de Souza M L, Seffernick J, Martinez B, et al. The atrazine catabolism genes *atzABC* are widespread and highly conserved[J]. *J Bacteriol*, 1998, 180(7):1951-1954.