

杨晓燕, 李艳苓, 魏环宇, 等. 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 Xiao-yan, LI Yan-ling, WEI Huan-yu, et al. Isolation, identification, and characterization of atrazine-degrading bacterial strain CS3[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2018, 37(6): 1149–1158.

阿特拉津降解菌 CS3 的分离鉴定及其降解特性的研究

杨晓燕, 李艳苓, 魏环宇, 朱昌雄, 李 峰, 耿 兵*

(中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所, 北京 100081)

摘要:为了适应不同环境污染修复需要,分离更多有效的阿特拉津降解菌是十分必要的。鉴于此,本研究从河北省某农药厂排污河中的废水中分离出一株以阿特拉津为唯一氮源生长的高效降解阿特拉津降解菌 CS3。经生理生化鉴定和 16S rRNA 基因序列分析,最终鉴定其为产脲节杆菌(*Arthrobacter ureafaciens*)。在 30 ℃ 和 pH 7 的最适条件下,菌株 CS3 能在 48 h 内完全降解 50 mg·L⁻¹ 的阿特拉津,甚至能够在 6 d 内将 500 mg·L⁻¹ 的阿特拉津完全降解,表明该菌株对阿特拉津具有较好的降解性。菌株 CS3 含有 *trzN*, *atzB*, *atzC* 3 个阿特拉津降解基因。菌株 CS3 具有较宽的温度(10~37 ℃)和 pH(5~11)范围,且具有很好的耐碱性,为未来偏碱环境中阿特拉津污染修复提供了良好的候选菌株。

关键词:阿特拉津;节杆菌属;生物降解

中图分类号:X171.5 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2018)06-1149-10 doi:10.11654/jaes.2017-1453

Isolation, identification, and characterization of atrazine-degrading bacterial strain CS3

YANG Xiao-yan, LI Yan-ling, WEI Huan-yu, ZHU Chang-xiong, LI Feng, GENG Bing*

(Institute of Environment and Sustainable Development in Agriculture, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100081, China)

Abstract: Isolation of microbial resources from polluted environments used for soil remediation will be increasingly necessary in future agriculture. In view of this, atrazine-degrading bacterial strain CS3, which grows using atrazine as its sole nitrogen source, was isolated from the effluent of a pesticide factory in Hebei Province. Based on its biochemical characterization and 16S rRNA gene sequence, strain CS3 was identified as *Arthrobacter ureafaciens*. Its optimum growth temperature and pH were 30 ℃ and 7.0, respectively. Under these conditions, *A. ureafaciens* CS3 completely degraded 50 mg·L⁻¹ atrazine within 48 h and 500 mg·L⁻¹ within 6 days. *A. ureafaciens* CS3 contains the atrazine-degrading genes *trzN*, *atzB*, and *atzC* and has good growth and atrazine degradation in the pH range 5~11.

Keywords: atrazine; *Arthrobacter* sp.; biodegradation

阿特拉津(Atrazine)是一种被世界各地广泛应用的三嗪类除草剂,可防除农业和森林中的阔叶杂草及一些禾本科杂草^[1-2]。虽然阿特拉津的杂草防除效果很好,但是由于其具有淋溶性好、易扩散、迁移率高等特点,导致其可以随排灌水和降水流失,进而对土壤^[3-5]、

地表水和地下水^[3,6-9]造成严重污染。此外,还有研究表明阿特拉津是一种内分泌干扰物和致癌物,能够干扰生物体内分泌系统,阻断正常的激素功能,导致先天缺陷、生殖肿瘤、两栖类和人类体重减轻等,进而影响生态平衡^[10-11]。因此用生物法修复阿特拉津污染的环

收稿日期:2017-10-25 录用日期:2018-01-26

作者简介:杨晓燕(1989-),女,河南荥阳人,博士研究生,从事农业生态学和微生物学研究。E-mail:lxldream12@163.com

*通信作者:耿 兵 E-mail:gengbing2000@126.com

基金项目:国家水体污染控制与治理科技重大专项课题(2015ZX07103-007,2017ZX07603-002);国家自然科学基金项目(41471399,41101474)

Project supported: The National Water Pollution Control and Treatment Science and Technology Major Project in China(2015ZX07103-007,2017ZX07603-002); The National Natural Science Foundation of China(41471399,41101474)

境受到广大研究工作者的密切关注并逐渐成为一个研究热点。

目前,已经报道的能够降解阿特拉津的细菌包括 *Pseudomonas* sp.^[12-13]、*Arthrobacter* sp.^[14-15]、*Acinetobacter* sp.^[16]、*Rhodococcus* sp.^[17-18]、*Pseudaminobacter* sp.^[19]、*Nocardioide* sp.^[6]、*Bacillus* sp.^[20]、*Agrobacterium* sp.^[21-22] 等许多属。其中革兰氏阴性菌 *Pseudomonas* sp. ADP 和革兰氏阳性菌 *Arthrobacter* sp. TC1 是目前研究的比较透彻的代表性菌株,前者对阿特拉津的降解是通过降解基因 *atzA*、*atzB*、*atzC*、*atzD*、*atzE* 和 *atzF* 编码的 6 个酶来完成,最终可以将阿特拉津完全矿化^[23-24];后者则是由 *trzN*、*atzB*、*atzC* 这 3 个基因编码的酶催化完成,最终只能将阿特拉津降解为氰尿酸^[15]。

尽管目前对阿特拉津生物降解的研究已经取得了显著的进步,但鉴于阿特拉津的应用范围及其毒性,仍需要分离更多有效的降解菌以适应不同环境需要。如 Ye 等^[25]在 2016 年从中国东北的寒黑土壤中分离到 *Shewanella* sp. 菌株 YJY4,为寒冷地区的阿特拉津污染修复提供新的候选菌株。本研究从河北省某农药厂排污废水中分离出一株阿特拉津降解菌 *Arthrobacter ureafaciens* CS3,并对其生长降解特性和相关基因等进行了分析。本研究分离的菌株 CS3 具有较好的耐碱性,丰富了阿特拉津降解的菌种资源并为未来偏碱环境中阿特拉津污染修复提供了优良候选菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 水样来源

阿特拉津污染水样采集自河北省某农药厂排污河中的废水。

1.1.2 试剂与培养基

阿特拉津标准样品和纯度 97% 的阿特拉津原药,购自北京百灵威科技有限公司。将阿特拉津原药溶解在甲醇中配制成 $10\,000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的母液备用。氰尿酸(纯度 98%)购自北京百灵威科技有限公司;用于高效液相色谱分析的试剂均为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

无机盐基础培养基(MM):NaCl 1.0 g、 K_2HPO_4 1.5 g、 KH_2PO_4 0.5 g、 MgSO_4 0.2 g,蒸馏水定容至 1 L,调节 pH 至 7.0,121 °C 条件下灭菌 30 min。

LB 培养基:胰蛋白胨 10 g、酵母粉 5 g、NaCl 10 g,蒸馏水定容至 1 L,调节 pH 至 7.0,121 °C 条件下灭菌 30 min。

1.2 方法

1.2.1 菌株的富集与分离

在无菌条件下取 10 mL 阿特拉津污染废水水样加入到含有 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 阿特拉津的 100 mL MM 中驯化培养,每个样品 6 次重复,30 °C、 $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养 7 d。然后取 10 mL 培养液接种到 100 mL 新鲜的培养基中,并逐渐增加培养基中阿特拉津浓度。按相同的富集培养方式培养,直至阿特拉津浓度增加到 $1000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,驯化结束。同时将所有浓度的富集培养物分别稀释 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 倍,各取 0.1 mL 稀释液分别涂布于含有相应阿特拉津浓度的 LB 固体平板上,置于 30 °C 恒温培养箱中培养。培养结束后,挑取 LB 固体平板上不同形态特征的单菌落,在 LB 平板上连续划线纯化培养,得到纯化菌株。

1.2.2 高效降解菌株的筛选

将得到的纯化菌株分别接种到 LB 液体培养基中 30 °C 过夜培养。将培养液以 $5000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 3 min 收集菌体,并用无菌水洗涤两次。接种 1 mL 菌悬液到含有 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 阿特拉津的 50 mL MM 中,30 °C、 $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 7 d。用高效液相色谱法定量测定各样品中阿特拉津的残留浓度,并计算降解率,从中筛选出高效阿特拉津降解菌。

1.2.3 高效降解菌株的鉴定

根据常见细菌系统鉴定手册对菌株的形态和生理生化特征进行鉴定^[26]。菌株 16S rRNA 基因的克隆及序列分析参照如下步骤进行:(1)基因组 DNA 的提取按照北京全式金生物技术有限公司的细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行;(2)采用 16S rRNA 基因通用引物 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R(5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'),以基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增。扩增条件为:95 °C 预变性 2 min,然后 95 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 90 s,共 35 个循环,最终 72 °C 延伸 10 min。使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物大小并用北京全式金生物技术有限公司的 EasyPure Quick Gel Extraction Kit 试剂盒纯化 PCR 产物。纯化后的 PCR 产物由生工生物(上海)工程股份有限公司进行测序。通过 NCBI 网站上的 BLAST 程序(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)将菌株 16S rRNA 基因序列与 GeneBank 数据库中的已知序列进行比对,得出相似性。使用 MEGA 6.0 软件中的 Neighbor-Joining 法对菌株的 16S rRNA 基因序列进行聚类分析^[27],并构

建系统进化树,用 Bootstrap 值进行检验,并重复 1000 次。

1.2.4 外加碳氮源对菌株生长及降解阿特拉津效果的影响

为了探究外加碳氮源对菌株 CS3 生长和降解阿特拉津的影响,本研究设立了四个不同处理,即在 MM 中分别加入 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 阿特拉津作为唯一氮源, $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖作为外加碳源(AT+C); $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 阿特拉津作为唯一碳源, $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NH_4NO_3 作为外加氮源(AT+N); $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 阿特拉津和 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NH_4NO_3 作为氮源, $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖作为外加碳源(AT+CN); 只加入 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 阿特拉津作为唯一碳氮源(AT)。然后将 1 mL 浓度为 $1\times 10^8\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的菌悬液接种到 100 mL 上述四种培养基中,同时设立不接种菌液的样品为空白对照。每个处理组设三个重复。将所有样品在 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下振荡培养 48 h ,每隔 12 h 取样测定样品中的菌浓度和阿特拉津的残留浓度,并计算阿特拉津的降解率。

另外,为了研究不同碳源对菌株生长及降解阿特拉津效果的影响,本研究分别在 MM 中添加 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖、蔗糖、乳糖、柠檬酸钠作为外加碳源,然后将 pH 调节至 7.0 , $121\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下灭菌 30 min 。将 1 mL 浓度为 $1\times 10^8\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的菌悬液接种到上述 100 mL 含有不同外加碳源的培养基中,并加入 0.5 mL 浓度为 $10\text{ }000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的阿特拉津甲醇母液,使阿特拉津的终浓度为 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。同时设立没有添加外加碳源的样品为空白对照。每个处理组设三个重复。将所有样品在 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下振荡培养。分别在培养 24 h 和 48 h 时取样测定样品中的菌浓度和阿特拉津的残留浓度,并计算阿特拉津的降解率。

菌浓度测定方法:通过紫外分光光度计测定样品在 600 nm 处的吸光值(OD_{600})来表示,阿特拉津降解率的计算参照方法 1.2.8 进行。

1.2.5 环境因素对菌株生长及降解阿特拉津效果的影响

为了研究不同的环境因素如 pH、温度、阿特拉津浓度等对菌株生长及降解阿特拉津的影响,本研究分别设置不同温度(4 、 10 、 20 、 30 、 37 、 $45\text{ }^\circ\text{C}$)、不同 pH 值(4.0 、 5.0 、 6.0 、 7.0 、 8.0 、 9.0 、 10.0 、 11.0 、 12.0) 和不同阿特拉津浓度(5 、 25 、 50 、 75 、 100 、 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)处理组。分别将 1 mL 浓度为 $1\times 10^8\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的菌悬液接种到 100 mL 含 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖的 MM 中,并加入 0.5 mL 浓度为 $10\text{ }000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的阿特拉津甲醇母液,使阿特拉津

的终浓度为 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。同时设立不接种菌液的样品为空白对照,每个处理组设三个重复。将所有样品在 $30\text{ }^\circ\text{C}$ (不同温度实验除外)、 $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下振荡培养。分别在培养 24 h 和 48 h 时取样测定样品中的菌浓度和阿特拉津的残留浓度,并计算阿特拉津的降解率。

1.2.6 阿特拉津降解基因的检测

参考前人报道的 *atzA*、*atzB*、*atzC*、*atzD*、*atzE*、*atzF*、*trzD* 和 *trzN* 基因引物序列^[23,28-30],以菌株 CS3 的基因组 DNA 为模板对上述 8 种降解基因进行 PCR 扩增。扩增条件为: $95\text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min ,然后 $94\text{ }^\circ\text{C}$ 变性 1 min ,最佳退火温度退火 60 s , $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 2 min ,共 35 个循环,最终 $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 10 min 。使用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,并由生工生物(上海)工程股份有限公司进行测序。将测序结果通过 NCBI 网站上的 BLAST 程序(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)与 GeneBank 数据库中已知序列进行同源性比对。

1.2.7 菌株的生长及降解曲线

将 1 mL 浓度为 $1\times 10^8\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的菌悬液接种到 100 mL 含 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖的 MM 中,然后加入 0.5 mL 浓度为 $10\text{ }000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的阿特拉津甲醇母液,使阿特拉津的终浓度为 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。将样品分别在 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下振荡培养。每隔 6 h 取样并测定样品中的菌浓度、阿特拉津的残留浓度和氰尿酸浓度。每个处理设三个重复。

1.2.8 阿特拉津和氰尿酸的测定

将培养液与二氯甲烷以 $1:2$ 的比例混合萃取 3 次,合并有机相。将合并的有机萃取液放入圆底烧瓶中,用旋转蒸发仪将液体浓缩并蒸发至干,最后用色谱纯的甲醇溶液调节体积。之后将样品通过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 尼龙膜过滤,并装进样瓶中备用。

采用 HP1050 型高效液相色谱(HPLC)仪检测阿特拉津和氰尿酸的浓度。阿特拉津检测的液相条件为:反相 C18 色谱柱($4.6\text{ mm}\times 250\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$),流动相配比为甲醇:水= $70:30(V/V)$,流速为 $0.8\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,可变波长紫外检测器,检测波长为 225 nm ,柱温: $40\text{ }^\circ\text{C}$,进样量: $10\text{ }\mu\text{L}$ 。氰尿酸检测的液相条件为:Thermo 氨基色谱柱($4.6\text{ mm}\times 250\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$),流动相配比为甲醇: $0.1\%\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ = $70:30(V/V)$,流速: $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,可变波长紫外检测器,检测波长为 215 nm ,柱温: $30\text{ }^\circ\text{C}$,进样量: $10\text{ }\mu\text{L}$ 。

根据 HPLC 测定的结果,计算阿特拉津的降解率,计算公式如下:

$$X = (C_{CK} - C_X) / C_{CK} \times 100\%$$

式中: X 为阿特拉津的降解率, %; C_X 为阿特拉津的终浓度, $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; C_{CK} 为阿特拉津的初始浓度, $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.3 数据分析统计方法

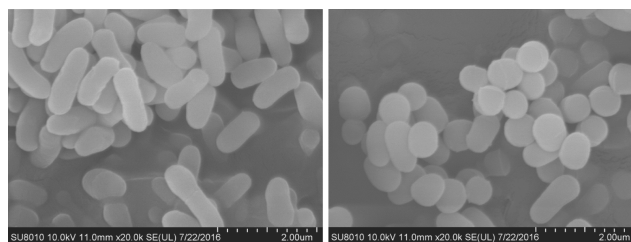
实验结果用平均值和标准差来表示。采用软件 SPSS 21.0 对数据进行单因素方差分析(ANOVA)和相关性分析以确定所有处理组之间的差异。设定 $P < 0.05$ 为显著性差异。利用 Origin 9.0 软件进行作图。

2 结果与分析

2.1 高效阿特拉津降解菌的分离及鉴定

经分离纯化,最终筛选出 1 株高效阿特拉津降解菌,命名为菌株 CS3。菌株 CS3 为革兰氏阳性菌,在 LB 平板上的菌落形态特征为菌落边缘整齐,表面凸起,呈金黄色,不透明,粘稠,光滑的圆形菌落。菌株 CS3 的菌体形态特征如图 1 所示,在培养过程中有明显的杆、球变化特征,培养 2 d 的幼龄菌体呈长杆状,培养 6 d 后的老龄菌体则呈球状或短杆状。菌株 CS3 不水解淀粉,不产 H_2S 和吲哚,氧化酶阴性,甲基红试验、V-P 试验、硝酸盐还原试验均为阴性;接触酶阳性,能够产氨。

通过 PCR 扩增得到菌株 CS3 的 16S rRNA 基因序列长度为 1394 bp(GenBank 登录号为 MF612193)。通过 NCBI 的 BLAST 程序与已知序列比对可知,菌株 CS3 与产脲节杆菌(*Arthrobacter ureafaciens*)的 16S rRNA 基因序列同源,相似性在 99%以上;与其余多株节杆菌属细菌的 16S rRNA 基因序列亦同源,相



左图为培养 2 d 的幼龄菌体;右图为培养 6 d 的老龄菌体

The left image represents young cells cultivated for 2 d; The right image represents aged cells cultivated for 6 d

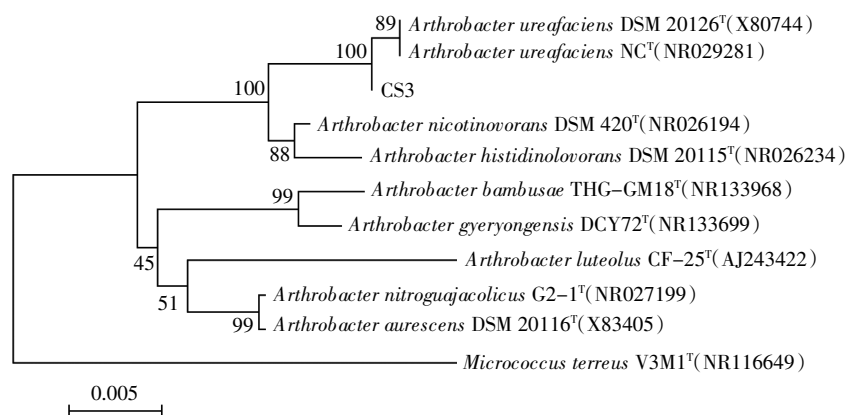
图 1 菌株 CS3 的扫描电镜图($\times 20\,000$ 倍)

Figure 1 Scanning electron micrograph of strain CS3($\times 20\,000$ times)

似性都在 97%以上。菌株 CS3 的系统发育树(图 2)遗传距离显示菌株 CS3 与 *Arthrobacter ureafaciens* 的亲缘关系最近,并与其聚集在同一个分支上。结合其形态特征及生理生化特征,将菌株 CS3 初步鉴定为产脲节杆菌(*Arthrobacter ureafaciens*)。

2.2 外加碳氮源对菌株生长及降解阿特拉津效果的影响

图 3 显示了外加碳氮源对菌株 CS3 生长的影响和菌株 CS3 降解阿特拉津的影响。在整个培养过程中,处理组(AT+CN)和(AT+C)中菌株 CS3 的菌浓度都显著高于(AT+N)和(AT)处理组($P < 0.05$)。处理组(AT+N)和(AT)中的菌株 CS3 的菌浓度增长微弱,且这两个处理组之间无显著性差异($P < 0.05$)。以上结果表明外加碳源能够明显促进菌株 CS3 的生长,外加



采用邻近法进行计算(bootstrap number = 1000),误差棒代表每个核苷酸的碱基置换率为 0.005
The calculations were performed according to a neighbour-joining analysis(bootstrap number = 1000),
and the bar indicates 0.005 substitution per nucleotide position

图 2 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 CS3 的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences of strain CS3

氮源对其生长影响不大,并且菌株 CS3 能够利用阿特拉津作为唯一氮源生长,不能利用其作为唯一碳源生长。培养 36 h 之前,处理组(AT+CN)和(AT+C)中的阿特拉津降解率均显著高于处理组(AT+N)和(AT)。36 h 之后所有处理组中的阿特拉津基本都被完全降解,各处理组之间无显著性差异,表明外加碳源或氮源对阿特拉津降解率的影响并不大。

外加不同碳源对菌株 CS3 生长的影响如图 4 所示。在整个培养过程中,在含有外加蔗糖的处理组中菌株 CS3 的菌浓度都明显高于其他处理组;其次为乳糖。葡萄糖处理组中的菌株生长最慢,与对照组之间无显著性差异。以上结果表明外加蔗糖、乳糖和柠檬酸钠均会明显促进菌株 CS3 的生长,其中最佳外加碳源为蔗糖。葡萄糖对菌株 CS3 的生长无显著影响。图 4 还显示了外加不同碳源对菌株 CS3 降解阿特拉津的影响。在培养 24 h 时,在含有外加蔗糖的处理组中菌株 CS3 对阿特拉津的降解效果最好且显著

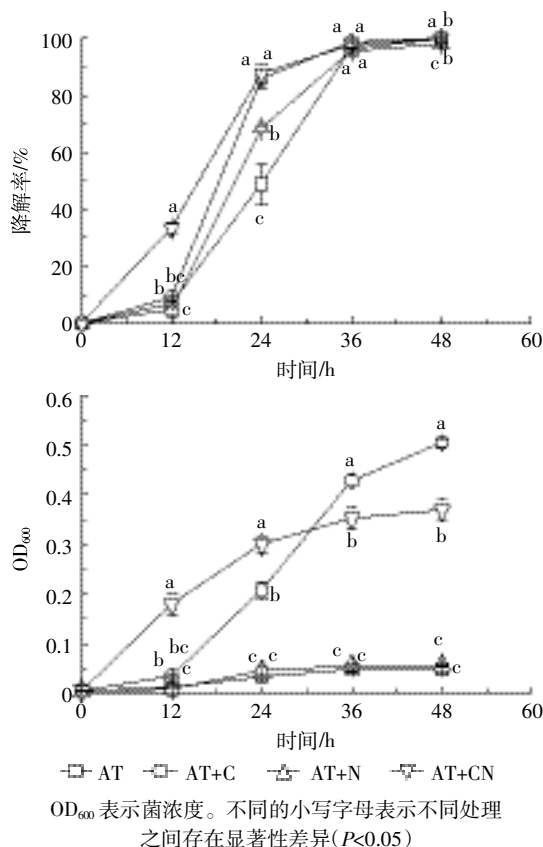


图 3 外加碳氮源对菌株 CS3 生长及阿特拉津降解的影响
Figure 3 Growth and atrazine degradation of strain CS3 with exogenous carbon or nitrogen sources

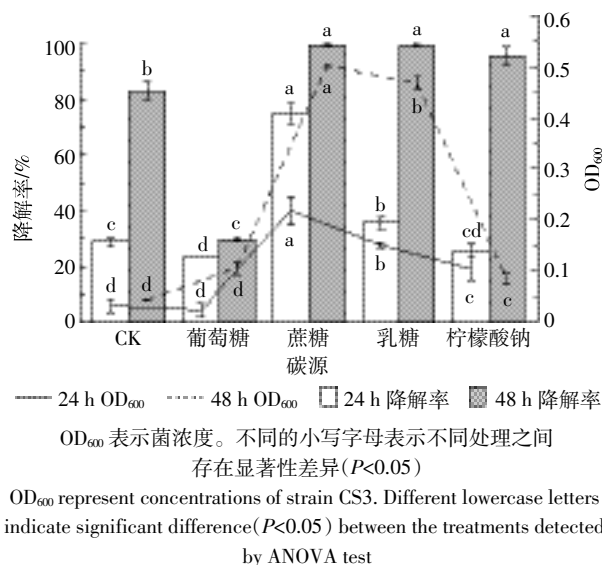


图 4 外加不同碳源对菌株 CS3 生长及阿特拉津降解的影响
Figure 4 Growth and atrazine degradation of strain CS3 with different carbon sources

高于其他处理组,其次为乳糖。培养 48 h 之后,外加蔗糖、乳糖和柠檬酸钠的 3 个处理组中阿特拉津降解率均达到 95%以上,无显著性差异。此时葡萄糖处理组中菌株 CS3 对阿特拉津的降解率最低,仅为 29.53%,甚至远低于对照组的 83.04%。综上可知,外加葡萄糖会抑制菌株 CS3 对阿特拉津的降解,外加蔗糖、乳糖和柠檬酸钠则均会促进菌株 CS3 对阿特拉津的降解。

2.3 环境因素对菌株生长及降解阿特拉津效果的影响

图 5 显示了不同 pH 值、不同温度和不同阿特拉津浓度对菌株 CS3 生长及降解阿特拉津效果的影响。当 pH 值为 7 时菌株 CS3 的生长最好,对阿特拉津的降解率也最高。当 pH 为 6 时,菌株生长及对阿特拉津的降解都受到较大影响,48 h 后的阿特拉津降解率下降为 58.90%。当 pH 低于 4 时,菌株几乎不能生长,48 h 后对阿特拉津的降解率低于 20%,表明该菌株不适宜在酸性环境降解阿特拉津。当 pH 为 11 时,菌株仍能较好地生长,48 h 后对阿特拉津的降解率依然保持在 90%以上。当 pH 为 12 时,菌株生长及对阿特拉津的降解则会受到较大影响,48 h 后对阿特拉津的降解率为 31.40%。由此可知菌株 CS3 能够生长和降解阿特拉津的 pH 范围在 5~11 之间,范围很宽且具有较好的耐碱性,偏碱性环境对阿特拉津的降解效果影响不大。因此该菌株可以作为未来偏碱环境中修复阿特拉津污染的优良候选菌株。

温度过高或过低会抑制阿特拉津降解菌的生长,

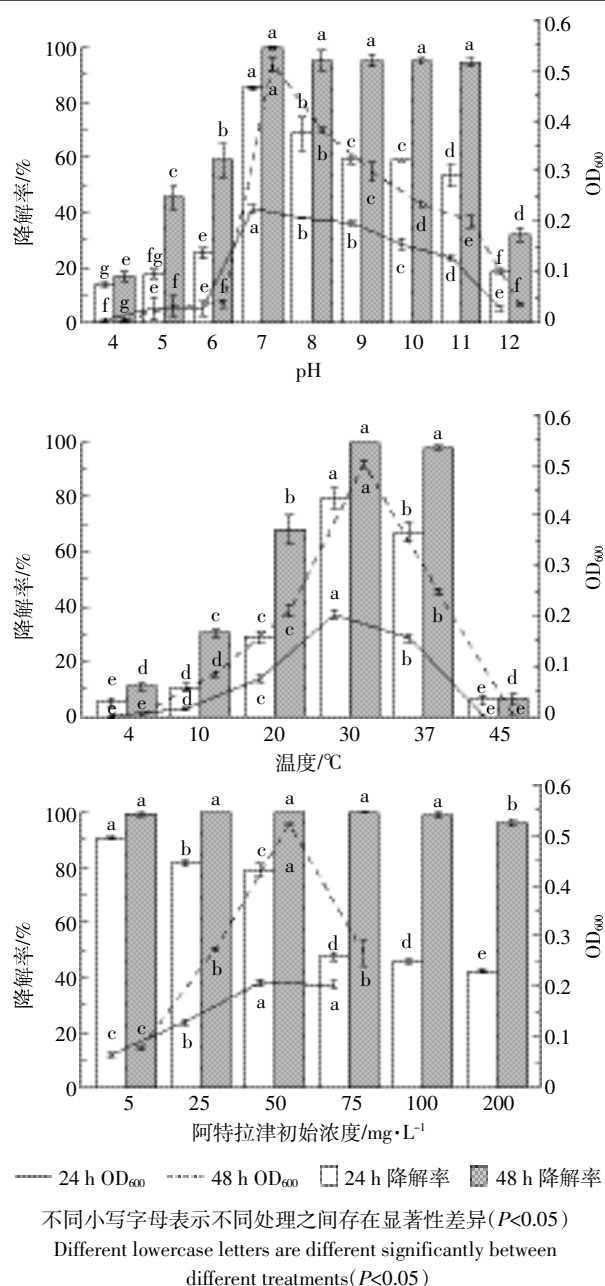


图5 不同环境条件对菌株CS3生长及阿特拉津降解的影响

Figure 5 Growth and atrazine degradation by strain CS3 under different culture conditions

同时影响阿特拉津降解菌代谢和降解酶活性^[31]。由图5可知,菌株CS3生长和降解阿特拉津的最佳温度为30℃,在温度范围为10~37℃之间,具有一定的生长和降解能力。当温度低于4℃或高于45℃时,菌株CS3几乎不能生长。显著性分析表明在实验温度条件下菌株CS3的生长与对阿特拉津的降解率之间存在极显著相关性($R=0.959^{**}$)。

由图5可知,当阿特拉津浓度为5 mg·L⁻¹时,菌

株CS3的浓度基本保持不变,OD₆₀₀的值没有明显增加,原因可能是低浓度阿特拉津不能够为菌株生长提供足够的营养。阿特拉津浓度在5~50 mg·L⁻¹之间时,OD₆₀₀的值随着阿特拉津浓度的增高而逐渐增加。当阿特拉津浓度超过50 mg·L⁻¹后,OD₆₀₀值开始下降,推测可能是因为高浓度的阿特拉津会对菌株CS3的生长产生抑制作用。当阿特拉津浓度高于75 mg·L⁻¹时,由于其低水溶性(33 mg·L⁻¹)而不能完全溶解在培养基中,因此之后未测定OD₆₀₀的值。培养24 h时,随着阿特拉津浓度的升高,降解率逐渐降低。培养48 h后,只有阿特拉津浓度为200 mg·L⁻¹处理组的阿特拉津降解率为96.15%,其余处理组阿特拉津降解率都达到98.81%以上,且与其余处理组之间都存在显著性差异。但在试验最高浓度(200 mg·L⁻¹)以内,阿特拉津的降解率最终不会受到太大影响。另经实验证明,菌株CS3能在6 d内将500 mg·L⁻¹的阿特拉津降解完全(数据未显示)。综上可知,菌株CS3对低浓度和高浓度的阿特拉津都具有较好的降解能力。

2.4 阿特拉津降解基因的检测

通过PCR扩增,分别获得444 bp的Arthrobacter sp.SD41(KP994319)^[32]和*Arthrobacter* sp.C3(KR263873)^[33]的Arthro-

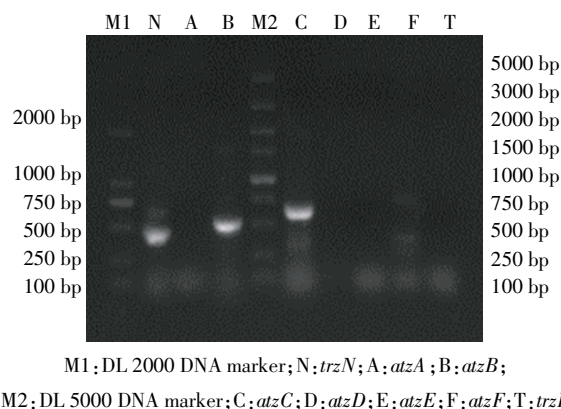


图6 1%琼脂糖凝胶电泳检测菌株CS3的阿特拉津降解基因

Figure 6 Agarose gel electrophoresis (1%) detection of atrazine-degrading genes of strain CS3

bacter aurescens TC1 (AY456696)^[34]的 *atzB* 和 *atzC* 基因的同源性分别为 98% 和 99%。

2.5 菌株的生长及降解曲线

从图 7 可以看出,12 h 内 OD₆₀₀ 的值增加缓慢,对阿特拉津的降解效果也不明显,可能因为前 12 h 菌株 CS3 处于延滞期,对于环境需要一个适应的过程。从 12 h 开始菌株进入对数生长期,OD₆₀₀ 的值增长迅速,其对阿特拉津的降解速度也相应加快。到 48 h 时菌株 CS3 进入生长稳定期,OD₆₀₀ 的值基本保持不变,此时阿特拉津也被降解完全。在整个降解过程中,氰尿酸的浓度变化与阿特拉津浓度变化趋势完全相反,从 12 h 至 36 h 之间浓度急剧增加,到 48 h 后保持在 30 mg·L⁻¹ 左右不再增加。相关性分析也表明,菌株的生长与阿特拉津的降解之间具有极显著正相关性 ($R=0.991^{**}$),而氰尿酸浓度与阿特拉津浓度之间具有极显著负相关性 ($R=-0.989^{**}$)。此外,阿特拉津的初始平均摩尔浓度等于累积的氰尿酸的平均摩尔浓度。以上结果表明,阿特拉津的降解和菌株的生长基本同步。结合菌株 CS3 降解基因的检测结果,推测菌株 CS3 可能只能降解阿特拉津为无毒的氰尿酸,而不能进一步代谢氰尿酸为 CO₂ 和 NH₃。

3 讨论

目前已经报道了许多从不同地方分离到的属于节杆菌属的阿特拉津降解菌,如菌株 HIM^[35]、GZK-1^[1]、KU001^[36]、TC1^[34]、ADH-2^[37]、AD26^[38]、MCM B-436^[39]、AG1^[40]、FM326^[41]等。另有许多报道指出,该属细菌能够降解许多其他有机污染物,如苯胺、苯酚、石油、有机磷农药等^[15,39]。这些工作显示出节杆菌属菌株在污

染位点生物修复方面具有巨大潜力。

研究报道多数阿特拉津降解菌能够以阿特拉津为氮源进行生长并将它降解^[14,38,42-44],因此外加氮源会抑制多数菌株对阿特拉津的利用和降解^[45],对外源氮源不敏感阿特拉津降解菌的报道很少。本研究中菌株 CS3 也能够利用阿特拉津为唯一氮源,但是外加氮源对其生长和降解阿特拉津没有太大影响,具体原因还在进一步研究中。

本研究中,外加蔗糖、乳糖和柠檬酸钠能够促进菌株 CS3 的生长及对阿特拉津的降解,外加葡萄糖则会抑制其对阿特拉津的降解。不同外加碳源对不同阿特拉津降解菌的影响不同。在某些情况下,外加碳源甚至可以抑制阿特拉津的降解。前人研究报道,外加蔗糖和葡萄糖能显著促进菌株 ADH-2 的生长,但对阿特拉津的降解表现出显著的抑制,而淀粉对其生长和阿特拉津降解均表现出促进效应^[37]。Wang 等^[43]研究表明加入蔗糖、柠檬酸钠或半乳糖可显著促进菌株 DAT1 的生长,蔗糖是其生长最适合的碳源。然而, Wang 等^[46]2011 年发现加入蔗糖并没有加速菌株 HB-5 对阿特拉津的降解。李绍峰等^[47]研究发现降解菌株 L-6 可以利用葡萄糖、果糖和柠檬酸钠生长,不能利用蔗糖、乳糖和淀粉。因此,不同阿特拉津降解菌的生长及对阿特拉津的降解依赖于有机物质的类型^[42]。

与许多菌株,如菌株 HB-5^[46]、DNS10^[42]、T3AB1^[48]、X-4^[49]、FM326^[41]等相比,菌株 CS3 能够生长并降解阿特拉津的 pH 范围更宽。菌株 CS3 降解阿特拉津的 pH 范围不仅很宽,且具有一定的嗜碱性,在 pH 值为 11 的条件下,也具有很高的降解特性,这对于未来偏碱环境中修复阿特拉津提供了更好的选择。

已经分离到的节杆菌属阿特拉津降解菌株中,除 AD1^[14]、MCMB436^[39]、C3^[33]外,许多其他 *Arthrobacter* sp. 菌株都含有 *trzN*、*atzB*、*atzC* 基因。菌株 CS3 中包含的阿特拉津降解基因组合与许多已经报道的节杆菌菌株如 SD41^[32]、TC1^[34]、ADH-2^[37]、AD26^[38]、X-4^[49]、KU001^[36]、DNS10^[42]、DAT1^[43]等含有相同的基因组合 (*trzN*-*atzBC*)。结合前人报道的阿特拉津降解基因及降解途径的研究报道^[23-24],初步推测其只能将阿特拉津降解为无毒的氰尿酸,而不能完全将阿特拉津矿化。菌株 CS3 降解阿特拉津的实验结果也显示,当阿特拉津被降解时会积累氰尿酸,且阿特拉津的初始平均摩尔浓度等于累积的氰尿酸的平均摩尔浓度。因此可以推测菌株 CS3 通过 *trzN*-*atzB*-*atzC* 代谢途径,经水解脱氯和脱烷基化,将阿特拉津转化为氰尿酸,但

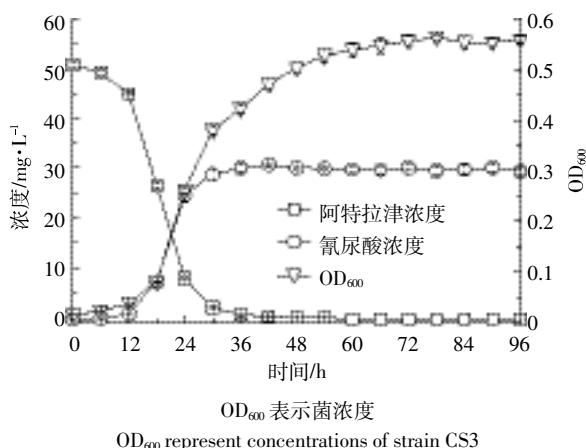


图 7 菌株 CS3 的生长曲线及阿特拉津降解曲线

Figure 7 Growth curve of strain CS3 and atrazine degradation curve by strain CS3

不能进一步催化三嗪环的裂解,使氰尿酸进一步降解为 CO_2 和 NH_3 ^[1,50-51]。

菌株 CS3 具有较好的降解性,对低浓度和高浓度阿特拉津都具有较好的降解能力。其降解速率远高于 Zhang 等^[31]筛选的菌株 N1 以及 Vaishampayan 等^[39]报道的菌株 MCM B-436,前者 96 h 将 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 阿特拉津降解 66.4%,后者 30 h 将 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 阿特拉津完全降解。

目前本研究只是在实验室条件下进行,下一步将重点研究其在生态环境中的实际应用效果及特性,为进一步提高其实际应用效果提供基础。此外,关于菌株 CS3 与其他降解菌之间是否存在共存互作以及相互之间的互作机制也在进一步研究当中。

4 结论

(1)从河北某农药厂排污河中的废水中分离出一株以阿特拉津为唯一氮源生长的高效降解阿特拉津降解菌 CS3。经生理生化鉴定和 16S rRNA 基因序列分析,将其鉴定为产脲节杆菌(*Arthrobacter ureafaciens*)。

(2)菌株 CS3 含有降解基因 *trzN*、*atzB*、*atzC*,能够将阿特拉津降解为无毒的氰尿酸。

(3)在最适条件(30°C , pH 为 7)下,菌株 CS3 能在 48 h 内完全降解 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的阿特拉津。甚至能够在 6 d 内将 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的阿特拉津完全降解,表明该菌株具有很好的降解能力。

(4)菌株 CS3 生长和降解阿特拉津的温度和 pH 范围较宽,分别为 $10\sim 37^\circ\text{C}$ 和 $5\sim 11$,显示出较好的环境生存能力及较好的生物修复潜力。此外,菌株 CS3 生长和降解阿特拉津的 pH 范围表明该菌株具有较好的耐碱性,为未来偏碱环境中阿特拉津污染修复提供了良好的候选菌株。

参考文献:

- [1] Getenga Z, Dörfler U, Iwobi A, et al. Atrazine and terbuthylazine mineralization by an *Arthrobacter* sp. isolated from a sugarcane-cultivated soil in Kenya[J]. *Chemosphere*, 2009, 77(4):534-539.
- [2] Lima D, Viana P, André S, et al. Evaluating a bioremediation tool for atrazine contaminated soils in open soil microcosms: The effectiveness of bioaugmentation and biostimulation approaches[J]. *Chemosphere*, 2009, 74(2):187-192.
- [3] Houot S, Topp E, Yassir A, et al. Dependence of accelerated degradation of atrazine on soil pH in French and Canadian soils[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2000, 32(5):615-625.
- [4] Bastos A C, Magan N. *Trametes versicolor*: Potential for atrazine bioremediation in calcareous clay soil, under low water availability conditions [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2009, 63(4):389-394.
- [5] 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.
- [6] Omotayo A E, Ilori M O, Radosevich M, et al. Metabolism of atrazine in liquid cultures and soil microcosms by *Nocardioides* strains isolated from a contaminated nigerian agricultural soil[J]. *Soil & Sediment Contamination An International Journal*, 2013, 22(4):365-375.
- [7] Singh S N, Jauhari N. Degradation of atrazine by plants and microbes[M]//Microbe-Induced Degradation of Pesticides. Springer International Publishing, 2017.
- [8] Fan X, Song F. Bioremediation of atrazine: recent advances and promises [J]. *Journal of Soils & Sediments*, 2014, 14(10):1727-1737.
- [9] Solomon K, Carr J P L, Giesy J, et al. Effects of atrazine on fish, amphibians, and aquatic reptiles: A critical review[J]. *Critical Reviews in Toxicology*, 2008, 38(9):721-772.
- [10] Shenoy K. Environmentally realistic exposure to the herbicide atrazine alters some sexually selected traits in male guppies[J]. *PloS One*, 2012, 7(2):e30611.
- [11] Hayes T B, Case P, Chui S, et al. Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: Are we underestimating the impact? [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2006, 114(Suppl 1):40-50.
- [12] Fernandes A F, Da S M, Martins V V, et al. Isolation and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* from a virgin Brazilian Amazon region with potential to degrade atrazine[J]. *Environmental Science & Pollution Research International*, 2014, 21(24):13974-13978.
- [13] Mandelbaum R T, Allan D L, Wackett L P. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1995, 61(4):1451-1457.
- [14] 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.
- [15] Strong L C, Rosendahl C, Johnson G, et al. *Arthrobacter aureus* TC1 metabolizes diverse s-triazine ring compounds[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2002, 68(12):5973-5980.
- [16] Singh P, Suri C R, Cameotra S S. Isolation of a member of *Acinetobacter* species involved in atrazine degradation[J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2004, 317(3):697-702.
- [17] Kolekar P D, Phugare S S, Jadhav J P. Biodegradation of atrazine by *Rhodococcus* sp. BCH2 to N-isopropylammelide with subsequent assessment of toxicity of biodegraded metabolites[J]. *Environmental Science & Pollution Research International*, 2014, 21(3):2334-2345.
- [18] Fazlurrahman, Batra M, Pandey J, et al. Isolation and characterization of an atrazine-degrading *Rhodococcus* sp. strain MB-P1 from contaminated soil[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2009, 49(6):721-729.
- [19] Topp E, Zhu H, Nour S M, et al. Characterization of an atrazine-degrading *Pseudomonas* sp. isolated from Canadian and French agri-

- cultural soils[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2000a, 66(7):2773-2782.
- [20] Wang J, Zhu L, Wang Q, et al. Isolation and characterization of atrazine mineralizing *Bacillus subtilis* strain HB-6[J]. *PloS One*, 2014, 9(9): e107270.
- [21] 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]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1998, 64(9):3368-3375.
- [22] Siripattanukul S, Wirojanagud W, Meevov J M, et al. Atrazine removal in agricultural infiltrate by bioaugmented polyvinyl alcohol immobilized and free *Agrobacterium radiobacter*, J14a: A sand column study[J]. *Chemosphere*, 2009, 74(2):308-313.
- [23] 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]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(19):5684-5697.
- [24] Wackett L P, Sadowsky M J, Martinez B, et al. Biodegradation of atrazine and related s-triazine compounds: from enzymes to field studies[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2002, 58(1):39-45.
- [25] Ye J, Zhang J, Gao J, et al. Isolation and characterization of atrazine-degrading strain *Shewanella* sp. YJY4 from cornfield soil[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2016, 63(1):45-52.
- [26] 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.
- DONG Xiu-zhu, CAI Miao-ying. Manual of systematic determinative familiar bacteriology[M]. Beijing: Science Press, 2001.
- [27] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12):2725-2729.
- [28] De Souza M L, 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.
- [29] Mulbry W W, Zhu H, Nour S M, et al. The triazine hydrolase gene *trzN* from *Nocardioides* sp. strain C190: Cloning and construction of gene-specific primers[J]. *Fems Microbiology Letters*, 2002, 206(1):75-79.
- [30] Devers M, El A N, 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 Microbiology Letters*, 2007, 273(1):78-86.
- [31] Zhang H, Zhang Y, Hou Z, et al. Biodegradation of triazine herbicide metribuzin by the strain *Bacillus* sp. N1[J]. *Journal of Environmental Science & Health Part B*, 2014, 49(2):79-86.
- [32] 李红梅, 张新建, 李纪顺, 等. 阿特拉津降解菌 SD41 的分离鉴定及土壤修复[J]. 环境科学与技术, 2014, 37(4):38-41.
- LI Hong-mei, ZHANG Xin-jian, LI Ji-shun, et al. Experimental study on atrazine-degrading strain SD41: Isolation, identification and soil remediation[J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 37(4):38-41.
- [33] Wang H, Liu Y, Li J, et al. Biodegradation of atrazine by *Arthrobacter* sp. C3, isolated from the herbicide-contaminated corn field[J]. *International Journal of Environmental Science & Technology*, 2016, 13(1):257-262.
- [34] 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]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2004, 70(7):4402-4407.
- [35] Aislabie J, Bej A J, Lloyd N, 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.
- [36] Sajjaphan K, Heepngoen P, Sadowsky M J, et al. *Arthrobacter* sp. strain KU001 isolated from a Thai soil degrades atrazine in the presence of inorganic nitrogen sources[J]. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2010, 20(3):602-608.
- [37] 韩鹏, 洪青, 何丽娟, 等. 阿特拉津降解菌 ADH-2 的分离、鉴定及其特性研究[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(2):406-410.
- HAN Peng, HONG Qing, HE Li-juan, et al. Isolation, identification and characterization of an atrazine-degrading bacteria ADH-2[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28(2):406-410.
- [38] 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 Xi-kun, LI Qing-yan, CAI Bao-li. 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.
- [39] Vaishampayan P A, Kanekar P P, Dhakephalkar P K. Isolation and characterization of *Arthrobacter* sp. strain MCM B-436, an atrazine-degrading bacterium, from rhizospheric soil[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2007, 60(4):273-278.
- [40] 代先祝, 胡江, 蒋建东, 等. 污染土壤中原位阿特拉津降解菌的分离和鉴定[J]. 土壤学报, 2006, 43(3):467-472.
- DAI Xian-zhu, HU Jiang, JIANG Jian-dong, et al. Isolation and identification of *in situ* atrazine-degrading bacteria from contaminated soils[J]. *Aeta Pedologica Sinica*, 2006, 43(3):467-472.
- [41] 李明锐, 祖艳群, 陈建军, 等. 阿特拉津降解菌 FM326(*Arthrobacter* sp.) 的分离筛选、鉴定和生物学特性[J]. 农业环境科学学报, 2011, 30(11):2242-2248.
- LI Ming-rui, ZU Yan-qun, CHEN Jian-jun. Isolation, screening and identification of atrazine-degrading bacterium FM326 (*Arthrobacter* sp.)[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 30(11):2242-2248.
- [42] 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 & Biodegradation*, 2011, 65(8):1140-1144.
- [43] Wang Q, Xie S. Isolation and characterization of a high-efficiency soil atrazine-degrading *Arthrobacter* sp. strain[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2012, 71(4):61-66.
- [44] 周宁, 王荣娟, 孟庆娟, 等. 寒地黑土中阿特拉津降解菌的筛选及

- 降解特性[J]. 环境工程学报, 2008, 2(11): 1560–1563.
- ZHOU Ning, WANG Rong-juan, MENG Qing-juan, et al. Screening and identification of atrazine degrading bacteria and their degradation characteristics from black soil in cold area[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2008, 2(11): 1560–1563.
- [45] Yang C, Li Y, Zhang K, et al. Atrazine degradation by a simple consortium of *Klebsiella* sp. A1 and *Comamonas* sp. A2 in nitrogen enriched medium[J]. *Biodegradation*, 2010, 21(1): 97–105.
- [46] Wang J, Zhu L, Liu A, et al. Isolation and characterization of an *Arthrobacter* sp. strain HB-5 that transforms atrazine[J]. *Environmental Geochemistry & Health*, 2011, 33(3): 259–266.
- [47] 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 Shao-feng, ZHU Jing, LI Tie-jing. Isolation, identification and characterization of an atrazine degrading bacterium[J]. *Environmental Science*, 2012, 33(9): 3214–3219.
- [48] 闫彩芳, 娄 旭, 洪 青, 等. 一株阿特拉津降解菌的分离鉴定及降解特性[J]. 微生物学通报, 2011, 38(4): 493–497.
- YAN Cai-fang, LOU Xu, HONG Qing, et al. Isolation, identification and characterization of an atrazine-degrading strain[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 38(4): 493–497.
- [49] 刘春光, 杨峰山, 卢星忠, 等. 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 Chun-guang, YANG Feng-shan, LU Xing-zhong, et al. Isolation, identification and soil remediation of atrazine-degrading strain T3AB1 [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(12): 1642–1650.
- [50] Vibber L L, Pressler M J, Colores G M. Isolation and characterization of novel atrazine-degrading microorganisms from an agricultural soil[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2007, 75(4): 921–928.
- [51] 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.