

阿特拉津降解菌 T₃AB₁ 的分离鉴定及土壤修复

刘春光¹, 杨峰山^{1,2*}, 卢星忠¹, 黄飞¹, 刘丽萍¹, 杨传平²

(¹ 黑龙江大学生命科学学院, 微生物黑龙江省高校重点实验室, 哈尔滨 150080)

(² 东北林业大学, 林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 哈尔滨 150040)

摘要:【目的】从阿特拉津污染土壤分离高效降解菌株, 进行分类学鉴定、降解特性及黑土修复能力初步研究, 为阿特拉津污染土壤微生物修复提供新的菌株。【方法】通过形态特征、生理生化特征和 16S rDNA 序列分析方法进行菌株鉴定; 通过培养时间、温度、pH 值等环境因素的研究得出菌株的最佳降解条件; 通过降解菌株接种于不同种类除草剂为唯一碳氮源培养基获得该菌株的降解谱; 通过土壤接种和敏感作物盆栽生测试验验证菌株对阿特拉津污染土壤修复能力。【结果】本试验从黑龙江省讷河市长期施用阿特拉津的玉米田地中分离出一株能以阿特拉津为唯一碳氮源生长的细菌 T₃AB₁, 初步鉴定为节杆菌属 (*Arthrobacter* sp.), 该菌株在 72 h 内对 500 mg/L 阿特拉津 (pH 8.0) 的降解率高达 99%, 其降解能力较高的条件为 pH7.0-8.0、25-30℃、摇培 72-108 h, 该菌株能够利用甲氧咪草烟、咪唑乙烟酸、氟磺胺草醚、氟乐灵、异噁草松为唯一碳氮源进行生长, 处理 168 h 的降解率能够达到 12.66%-40.54%, 该菌株处理 21 d 能够显著恢复敏感作物水稻的各项生物量指标, 且随着处理时间的延长, 其对土壤的修复作用也会逐渐增强。【结论】从黑龙江省污染土壤中筛选得到的高效降解阿特拉津的节杆菌属近缘种 T₃AB₁, 土壤接种实验表明该菌株具有很好的土壤修复作用, 可为阿特拉津生物修复的研究提供适宜菌种资源。

关键词: 阿特拉津; 生物降解; 节杆菌属 (*Arthrobacter* sp.); 土壤修复

中图分类号: Q814 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 10-1642-09

阿特拉津 (atrazine, 简称 AT) 是农田中广泛使用的一种三嗪类长残效除草剂, 对玉米田的杂草防除具有重要作用, 黑龙江省阿特拉津使用面积约占玉米田化学除草面积的 32%^[1]。由于其在土壤后半衰期较长, 容易对一些后茬敏感作物产生药害作用^[2], 近年来在我国北方地区, 施用过阿特拉津的土壤毒死水稻幼苗的事件屡屡发生^[3-5]。因此, 如何有效地应对阿特拉津的污染成为亟待解决的问题。目前, 关于黑龙江省阿特拉津高效降解微生物的筛选及污染土壤的修复研究少有报道, 且菌株的降解能力较低而未能进行土壤修复。由于不同地区的土质、环境气候及降解菌本身的情况不同, 常常出

现从某地筛选出的高效降解菌株应用于土壤特征相差较大的异地土壤时降解效果较差的现象^[6], 针对黑龙江省现有的研究状况, 本研究从长期施用阿特拉津的农田土壤中驯化分离高效降解菌株, 并对菌株的鉴定、环境因素的影响、菌株的降解谱及土壤修复方面进行了研究, 以为阿特拉津污染土壤微生物修复提供优质的菌种资源和理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试土样: 菌株筛选的土样采自黑龙江省讷河市兴旺乡长期施用阿特拉津的玉米田表层土, 土

基金项目: 黑龙江大学博士启动基金; 黑龙江大学青年基金项目 (QL200816); 黑龙江大学高层次人才创新团队支持计划

* 通信作者。Tel: +86-451-86609306; E-mail: yangfshan@126.com

作者简介: 刘春光 (1982-), 女, 黑龙江人, 助理实验师, 硕士, 主要从事农药污染土壤的生物修复研究。E-mail: liu_chun_guang@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-04-14; **修回日期:** 2010-08-16

壤接种实验的土样采自同一地区从未施用过阿特拉津的大田土,土样过 40 目筛后备用。

1.1.2 培养基:基础无机盐培养基(MM)参照文献[7]配制;向 MM 培养基中加入 90% 莠去津水分散剂(AT)即为 MM + AT 培养基;生理生化反应的培养基均参照《常见细菌系统鉴定手册》^[8]进行配制。

1.1.3 主要试剂和仪器:90% 莠去津水分散剂(吉林金秋农药有限公司);二氯甲烷(分析纯,天津市光复科技发展有限公司);甲醇(色谱纯,山东禹王实业有限公司);其它常规试剂主要购自上海生物工程(大连)有限公司;PCR 引物合成及序列测定由 Invitrogen 生命技术公司完成。高速冷冻离心机(CF16RXII,日本日立电气公司);高效液相色谱仪(CBM-102,日本岛津仪器有限公司);紫外可见分光光度计(TU-1810,北京普析通用仪器有限责任公司);扫描电子显微镜(S-3400N,日本日立电气公司);透射电子显微镜(H7650,日本日立电气公司);PCR 仪(TPSG,德国 Biometra 公司);凝胶成像系统(Imager HP,Alpha Innotech 公司);三恒电泳仪(DYY-11B,北京六一仪器厂)。

1.2 降解菌的驯化与分离

土样过筛后,参考摇瓶富集培养法^[9],不断升高阿特拉津的浓度,连续驯化培养 1 个月,稀释涂布于添加相应阿特拉津浓度的无机盐(MM + AT)平板上培养。培养 1-2 周左右挑取有透明圈的单菌落进行纯化,透明圈可作为初步判定菌株对阿特拉津有降解能力的标志。

1.3 菌株降解能力的定量分析

土样经驯化得到的菌株分别进行 MM + AT 和 LB 传代,然后制成 OD₆₀₀ 为 1.0 的均匀菌悬液,等量接种于含有 500 mg/L 阿特拉津的 MM + AT 培养基中,30℃,200 r/min 摇培。设置不接菌为对照,但 CK₁ 静置于 4℃ 冰箱中,CK₂ 跟接菌的摇瓶同样摇培。108 h 后取样,培养液和二氯甲烷以 1:7 的比例对阿特拉津进行全量萃取^[10],用甲醇适当稀释后用 HPLC 分析,色谱条件如下:流动相:甲醇:水 = 4:1;流速:0.8 mL/min;检测波长:220 nm;进样量:10 μL;柱温:室温;色谱柱:Inertsil ODS-3 C₁₈(4.6 × 250 mm,5 μm)。根据阿特拉津的标准曲线计算出残留浓度和降解率,将降解率较高的菌株确定为高效降解菌株。

1.4 高效降解菌株的鉴定

1.4.1 形态与生理生化鉴定:本实验将待测菌株涂

布于 LB、孟加拉红与 MM + AT 培养基上,初步确定其为细菌。菌株经多次纯化后,参照《常见细菌系统鉴定手册》^[8]和《Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (second edition)》^[11],选取必要的鉴定指标对该降解菌株进行形态与生理生化鉴定。

1.4.2 分子鉴定:本实验以待测菌株的基因组 DNA 为模板,对其 16S rDNA 基因进行克隆及序列分析。16S rDNA 的 PCR 引物^[12]为:27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1492R: 5'-TACCTGTACCGACTT-3'。PCR 反应采用 25 μL 反应体系,反应程序为:94℃ 5 min;94℃ 1 min,52℃ 1 min,72℃ 1 min,30 个循环;72℃ 10 min。PCR 的产物经试剂盒回收后与 pMD18-T Vector 连接,转化入大肠杆菌 DH5α 中,用载体通用引物进行阳性克隆子验证后,送往 invitrogen 公司进行测序。测序结果通过在线分析与 GenBank 中的 16S rDNA 基因序列进行同源性比对,然后用软件 DNAMAN 的 Observed Divergency 进行系统发育树的构建,以确定菌株的种属关系。

1.5 环境因素对菌株生长及降解阿特拉津的影响

环境因素如培养时间、温度及 pH 值等对菌株生长及阿特拉津的降解有一定的影响^[13]。本实验吸取等量的菌悬液(OD₆₀₀ = 1.0)接入到含有 500 mg/L 阿特拉津的 MM + AT 液体培养基(pH7.0)中,置于 30℃、200 r/min 摇瓶培养,每 12 h 取样一次测定培养时间的影响;选取不同温度(10℃、16℃、25℃、30℃、37℃和 42℃)分别培养 72 h、108 h 取样测定温度的影响;另外选取不同 pH 值(5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0)分别培养 72 h、108 h 取样测定 pH 的影响,以上各实验取样后测 OD₆₀₀并用 HPLC 测定阿特拉津的残留量,每个处理设置 3 个重复,设不接菌为对照。

1.6 菌株 T₃AB₁ 降解谱的测定

本试验选择三嗪类除草剂以外的其它种类除草剂进行菌株降解范围测定,分别为甲氧咪草烟、咪唑乙烟酸、氟磺胺草醚、氟乐灵、异噁草松、烟嘧磺隆。向基础无机盐培养基中分别加入上述六种除草剂使其终浓度为 500 mg/L,吸取等量的菌悬液(OD₆₀₀ = 1.0)以 1% 接入到上述液体培养基中,置于 30℃,200 r/min 摇培,84 h、168 h 各取样一次,测 OD₆₀₀并计算降解率。每个处理设置 3 个重复,设不接菌为对照。

1.7 菌株 T₃AB₁ 的土壤修复试验

为了验证菌株 T₃AB₁ 对阿特拉津污染土壤的

修复能力,本试验选择其后茬敏感作物水稻进行土壤接种盆栽试验,其步骤如下:土样经检测、过筛、灭菌后分装于花盆中,设置不添加阿特拉津且不接菌的为空白组,设置添加阿特拉津且不接菌的为对照组,设置添加阿特拉津且接菌的为处理组,阿特拉津添加浓度为 140 mg/kg 土壤,水稻种子事先经表面消毒、催芽处理,待菌株分别处理 7 d、14 d、21 d 后播种,置于光照温室培养 25 d 左右观察,记录出苗个数、株高、株鲜重、根鲜重,50℃ 烘干至恒重,称取株干重、根干重,将所得数据进行生物统计学分析。

2 结果和分析

2.1 降解菌的驯化与分离

供试土样经过驯化后,观察到 600 mg/L 摇瓶中白色粉末大部分已经消失,且培养液呈现澄清的现象。经多次转接发现供试土样对较低浓度(600 mg/L 以下)的阿特拉津降解澄清现象重现性很好,但对高浓度(700 - 1000 mg/L)的阿特拉津降解的澄清现象不明显,有可能是菌株在高浓度的阿特拉津条件下耐受能力较差。将阿特拉津驯化浓度为 600 mg/L 的富集培养物稀释涂布于添加相应阿特拉津浓度的 MM + AT 平板上,培养一周后产生了明显的透明圈,如图 1 所示。挑取透明圈较明显的菌落进行纯化,结合常规镜检进行区分,得到 5 株菌株,分别命名为 T_3AB_1 、 T_3AB_2 、 T_3AB_3 、 T_3AB_4 和 T_3AB_5 。

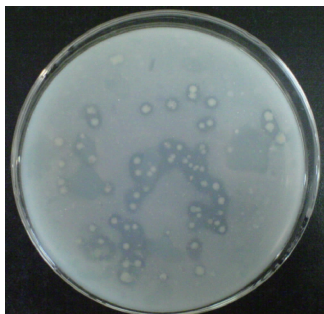


图 1 土样驯化后涂布于阿特拉津培养基产生透明圈的现象

Fig. 1 Transparent circles on the culture after the soil enriched.

2.2 菌株降解能力的定量分析试验

经过 HPLC 定量分析后,对照 CK_1 (不接菌,不摇培) 的添加回收率为 $96.91 \pm 2.1\%$,对照 CK_2 (不接菌,同时摇培) 的添加回收率为 $97.61 \pm 2.8\%$,二者之间差异不显著。如图 2 所示,菌株 T_3AB_2 和 T_3AB_3 用 MM + AT 传代后的降解率很高,分别为

87.4% 和 89.2%,但经 LB 传代后丧失了降解能力,降解率很低,达到 10% 以下; T_3AB_4 和 T_3AB_5 无论是 MM + AT 还是 LB 培养基传代其降解率均不是很高;而编号为 T_3AB_1 的菌株,无论是 MM + AT 还是 LB 培养基传代,降解效果都很好,其降解率均达到 98% 以上。通过反复验证,菌株 T_3AB_1 对阿特拉津高效降解的重现性很好。

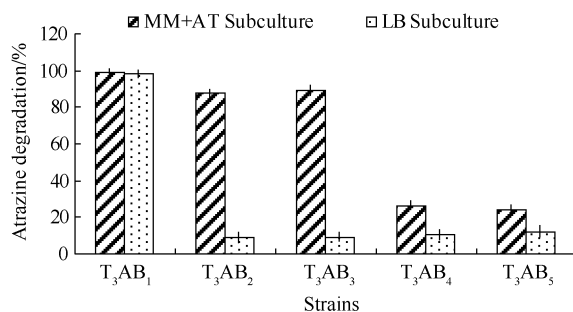


图 2 供试土样分离出的降解菌对 500 mg/L 阿特拉津处理 108 h 的降解活性

Fig. 2 Degrading activity of the stains isolated from the tested soil to 500 mg/L atrazine at 108 h.

2.3 高效降解菌株的鉴定

本试验将待测菌株 T_3AB_1 确定为细菌,接种于 LB 固体培养基、30℃ 培养,该菌株的细胞形态如图

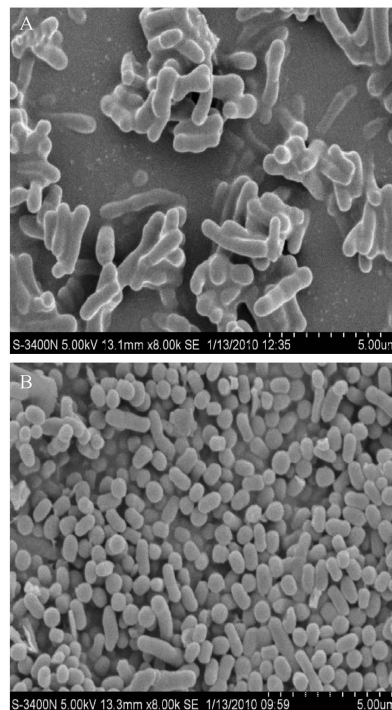


图 3 阿特拉津降解菌株 T_3AB_1 扫描电镜下照片 (30℃, LB 培养基)

Fig. 3 Scanning electron micrographs of atrazine-degrading strain T_3AB_1 under 30℃ in LB. A: 48h of Inoculation (8000 ×); B: 144h of Inoculation (8000 ×).

3、图4和表1所示。扫描电子显微镜下观察到,放大倍数为8000倍时菌体细胞形态清晰可见,如图3,A图为T₃AB₁培养48h的幼龄菌形态,细胞呈不规则杆状,有节;B图为T₃AB₁培养144h的老龄菌形态,大部分细胞由杆状断裂为小球状或棒状,此特征正是节杆菌属(*Arthrobacter*)的典型特征。

透射电子显微镜下观察到,如图4A所示,菌株T₃AB₁的幼龄菌呈棒状,两端钝圆,具有周生菌毛而无鞭毛;如图4B所示,菌株T₃AB₁老龄菌的细胞内容物已有少量释放,细胞明显膨胀并即将分裂。

表1为菌株的菌落特征,表2为生理生化特征。用16S rDNA序列引物对菌株T₃AB₁进行扩增得到1482 bp的目的DNA片段,其与多株节杆菌属细菌的16S rDNA序列同源性均在99%以上,其序列提交至GenBank获得的登录号为GU459313。图5为所构建的系统发育树,遗传距离显示菌株T₃AB₁与多株节杆菌属细菌的亲缘关系都很近,该菌株有若干项生理生化指标与所报道的节杆菌属中阿特拉津降解菌有所不同,结合形态及生理生化鉴定结果,将T₃AB₁初步鉴定为节杆菌属的成员(*Arthrobacter* sp. T₃AB₁)。

表1 菌株 T₃AB₁ 的细胞形态与菌落特征

Table 1 Cellular and colonial morphologic characteristics of strain T₃AB₁

Cellular Characteristics	Strain T ₃ AB ₁	Colonial Characteristics (30°C, LB, 144h)	Strain T ₃ AB ₁
Shape	Rod	Shape	Round
Size	0.5 - 0.7 × 0.9 - 1.6 μm	Size	Diameter 1 - 2mm
Gram dyeing	G +	Surface	Smooth
Flagella	-	Uplift	+
Spore	-	Transparency	-
Capsule	-	Edge	Regular
PHB	-	Color	Yellowish

表2 菌株 T₃AB₁ 的生理生化反应结果

Table 2 Physiological and biochemical features of the strain T₃AB₁

Identification Index	Strain T ₃ AB ₁	Identification Index	Strain T ₃ AB ₁
Fermentation or oxidization of glucose	Oxidization	Esculin soluble	-
Oxidase	-	Nitrate reduction	-
Catalase	+	Urease	-
Denitrification	-	Indole production	-
Fluorochrome	-	Gelatin liquefaction	-
Aerobism	Aerobic	Decomposition of milk	-
H ₂ S production	-	Lipase (Tween80)	+
Methyl red	-	Oxidation of ethanol	-
Arginine dihydrolase	-	Amylohydrolysis	+
Levan production	-	Lecithase	+
Glucan production	+	Nitrite reductase	+
Growth temperature 4°C	-	V. P. test	-
12°C	+	Citrate utilization	+
20°C	+	Sole carbon Glucose	+
30°C	++	Salicin	-
37°C	+	Sorbitol	-
41°C	+	Mannitol	-
54°C	-	Mannitose	+
65°C	-	Arabinose	+
Salt tolerance NaCl 0	+	Fructose	+
NaCl 2%	+	Sucrose	+
NaCl 5%	-	Lactose	-
NaCl 7%	-	Glycerine	+
NaCl 10%	-	Maltose	-

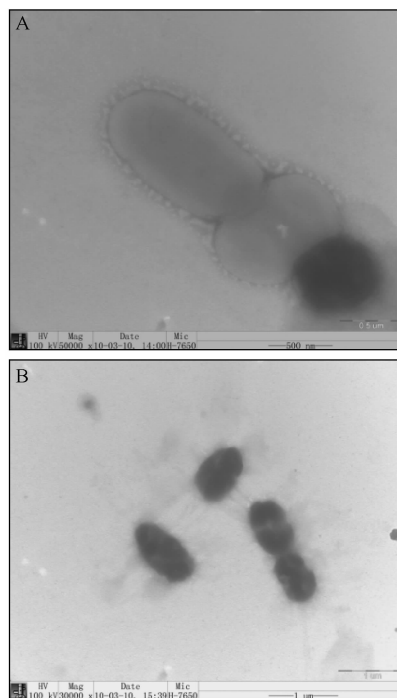


图4 阿特拉津降解菌株 T₃AB₁ 透射电镜下照片

Fig. 4 Electron transmitted micrographs of atrazine-degrading strain T₃AB₁. A: Juvenile strain of T₃AB₁ (50000 ×); B: Mature strain of T₃AB₁ (30000 ×).

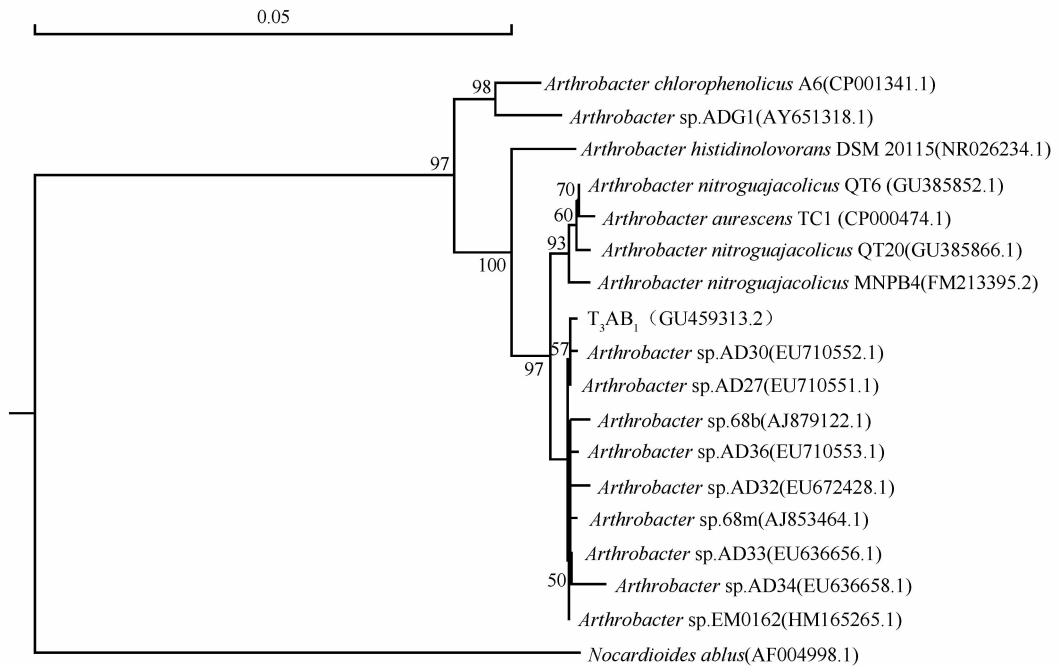


图 5 菌株 T_3AB_1 16S rDNA 系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of strain T_3AB_1 . Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each node is the percentage supported by bootstrap and bootstrapping value lower than 50% is not shown. Bar, 5% sequence divergence.

2.4 环境因素对菌株生长及降解阿特拉津的影响

培养时间实验结果如图 6 所示,与不含阿特拉津的 LB 培养基相比,MM + AT 培养基使得菌株生长的各个时期均向后延长,且菌体浓度远不如 LB 培养基,该菌株于 72 h 后对阿特拉津的降解率明显升高,降解率达到 60.3%,108 h 时阿特拉津浓度由 500 mg/L 降至 3.5 mg/L,降解率达到 99.3%, OD_{600} 值也达到最大,之后的两次取样发现降解率几乎不变,但 OD_{600} 值有小幅下降,却仍保持较高数值。这说明该菌株稳定期较长,在环境营养条件改变时自身调节和适应环境的能力较强,比较适合修复应用。

温度实验结果如图 7 所示,菌株 T_3AB_1 在 10–42℃ 条件下摇培 108 h 对阿特拉津均有降解效果,在 10℃ 低温和在 42℃ 高温条件下经过 108 h 培养也具有一定的耐受性,可以利用阿特拉津进行生长 OD_{600} 分别为 0.025 和 0.109,阿特拉津降解率分别为 21.3% 和 32.5%,在 30℃ 时阿特拉津的降解率达到最高为 99.1%, OD_{600} 达到最大为 0.332;25℃ 降解率和 OD_{600} 均次于 30℃ 所测数值。可见,培养基 pH7.0 时,以 200 r/min 摇培,25–30℃ 为该菌株降解阿特拉津的最适温度范围。由于菌株在 10℃ 和 16℃ 对阿特拉津有一定降解率且能够生长,推断该菌株在我国北方低温环境的应用会有很好的适

应性。

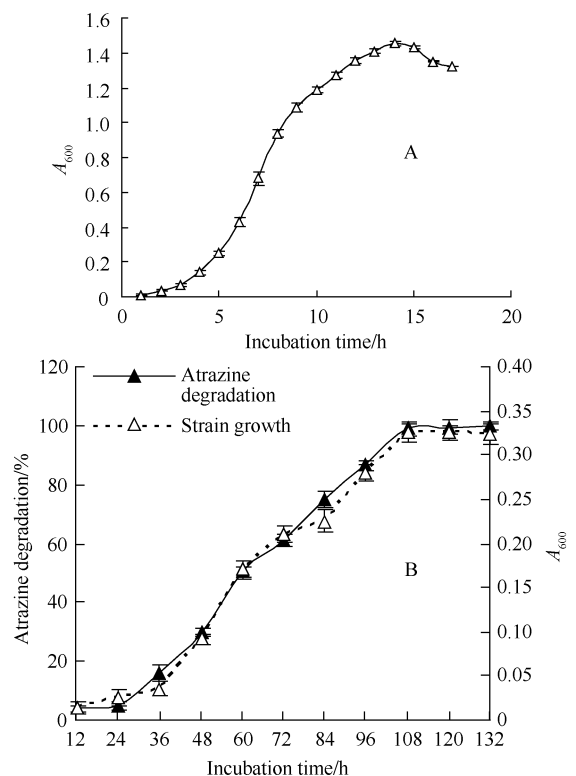


图 6 培养时间对菌株 T_3AB_1 生长及降解阿特拉津的影响

Fig. 6 Effect of different incubation time on the growth and atrazine degradation of T_3AB_1 . A: LB culture; B: MM + AT culture.

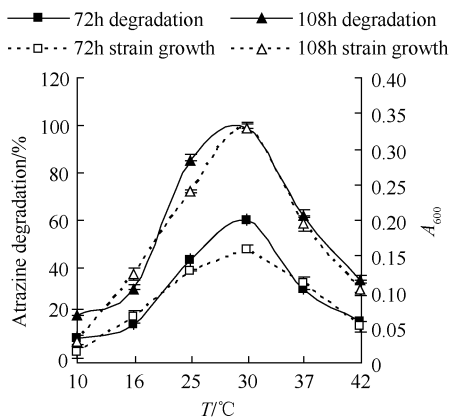


图7 温度对菌株 T_3AB_1 生长及降解阿特拉津的影响

Fig. 7 Effect of different temperatures on the growth and atrazine degradation of T_3AB_1 .

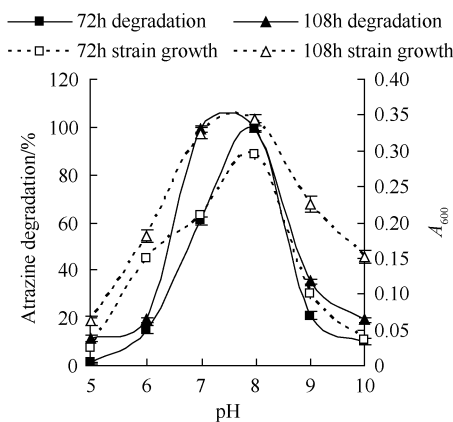


图8 pH值对菌株 T_3AB_1 生长及降解阿特拉津的影响

Fig. 8 Effect of different pH on the growth and atrazine degradation of T_3AB_1 .

pH 实验结果如图 8 所示,72 h 取样发现 pH 为 8.0 时阿特拉津的降解率达到最高 99.3%,菌体的 OD_{600} 达到最大为 0.306;108 h 取样发现 pH 为 8.0 时所测得降解率均保持原来水平几乎未变,而 OD_{600}

有所升高,达到 0.336。但 pH 为 7.0 时所测得降解率由 72 h 的 62.5% 升至 99.6%, OD_{600} 由 72 h 的 0.217 升至 0.334。可见,在 30°C 以 200 r/min 摇培下,pH7.0 - 8.0 是该菌株降解阿特拉津的最适 pH 范围。

2.5 菌株 T_3AB_1 的降解谱

菌株 T_3AB_1 的降解谱如图 9 所示,该菌株能够利用甲氧咪草烟、咪唑乙烟酸、氟乐灵、异噁草松和氟磺胺草醚为唯一碳氮源进行生长,其对各种除草剂处理 168 h 的降解率分别达到 40.54%、27.91%、28.32%、13.13% 和 12.66%,但是却几乎不能利用烟嘧磺隆进行生长。从结构上来看,氟磺胺草醚、氟乐灵、异噁草松虽属不同类别除草剂,但其分子结构上均含有卤族元素(F、Cl),这与阿特拉津的脱氯作用可能类似;甲氧咪草烟、咪唑乙烟酸同属于咪唑啉酮类除草剂,其分子结构上均不含有卤族元素,但二者侧链均含有烷基,这可能与阿特拉津的脱烷基作用相似;而烟嘧磺隆的降解率不高可能是由于结构中不含卤族元素且分子结构较复杂造成的。

2.6 菌株 T_3AB_1 土壤修复试验结果

从土壤修复试验结果来看,无菌水处理的空白组水稻幼苗植株长势良好,对照组的出苗率较低且植株矮小枯黄,处理组随着处理时间的延长呈现了较好的修复效果。如表 3 所示,菌株 T_3AB_1 施用后,处理 7 - 21 d 可显著增加株干重,达到空白组水平,而且根干重有所增加,但幅度均不显著,仍低于空白组数值,但已达到不显著水平;处理 14 - 21 d 可极显著增加株高和株鲜重,并达到空白组水平;处理 21 d 可显著提高出苗率,但与空白组水平相差极显著,但可显著增加根鲜重,达到空白组水平。这说明

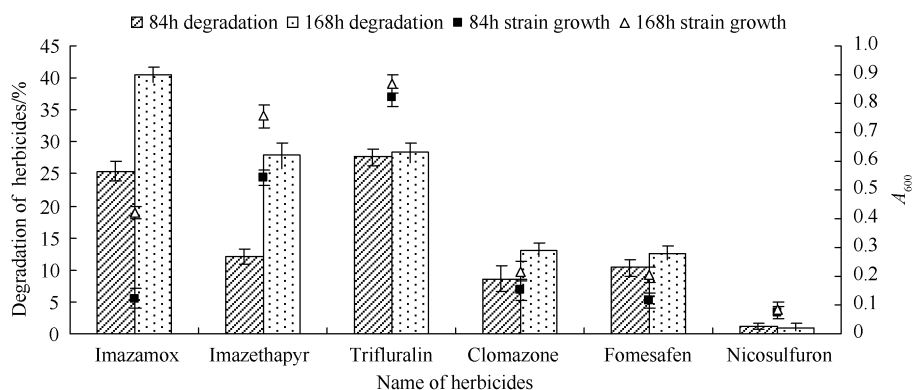


图9 菌株 T_3AB_1 的降解谱

Fig. 9 The degrading range of strain T_3AB_1 .

水稻根系吸收土壤中的阿特拉津后,会影响根部的生长并抑制其吸收水分,进而影响出苗率、株高、株鲜重和株干重等,而该菌株施用后随着处理时间的

延长,其对土壤的修复作用也会逐渐增加,这表明该菌株在阿特拉津污染土壤的修复方面可能具有很好的应用潜力。

表3 Duncan 法分析菌株 T₃AB₁ 施用后对水稻生长指标的影响

Table 3 Effect of strain T₃AB₁ on rice growth indexes by Duncan

No.	Emergence rate (%)	Plant height (mm)	Plant fresh weight (mg/5plants)	Plant dry weight (mg/5plants)	Root fresh weight (mg/5plants)	Root dry weight (mg/5plants)
Blank	75.83 ^{aA}	97.01 ^{aA}	158.2 ^{aA}	64.9 ^{aA}	46.8 ^{aA}	43.2 ^{aA}
CK	9.18 ^{cC}	55.00 ^{cC}	77.3 ^{cC}	26.5 ^{bA}	28.1 ^{bA}	24.7 ^{bA}
7d treatment	15.02 ^{cC}	62.39 ^{bC}	116.7 ^{bC}	65.5 ^{aA}	40.1 ^{abA}	33.1 ^{abA}
14d treatment	16.18 ^{cC}	78.63 ^{bAB}	153.2 ^{aAB}	69.3 ^{aA}	39.5 ^{abA}	36.6 ^{abA}
21d treatment	28.32 ^{bB}	86.89 ^{abA}	153.8 ^{aAB}	64.8 ^{aA}	42.9 ^{aA}	37.1 ^{abA}

Multiple comparisons by Duncan. Capital and small letters in the same column stand for 0.01 and 0.05 significant levels.

3 讨论

目前已报道的国内外研究人员从不同土壤中筛选到同为节杆菌属的阿特拉津降解菌株共9株,编号如下: TC1^[14]、HIM^[15]、MCM B-436^[16]、ADX10^[17]、AG1^[18]、Z₄₂^[19]、AD26^[6]、GZK-1^[20]、ADH-2^[21],其中多数菌株(HIM、MCM B-436、Z₄₂、AD₂₆、GZK-1)利用阿特拉津为唯一氮源生长,然而另外几株菌株(TC1、ADX10、AG1、ADH-2)能够以阿特拉津为唯一碳氮源生长,本试验所筛选出的菌株 *Arthrobacter* sp. T₃AB₁ 是首次报道在黑龙江省分离得到以阿特拉津为唯一碳氮源的高效降解菌株,该菌株在72 h内对于500 mg/L阿特拉津的降解率能够达到99%以上,与上述以阿特拉津为唯一氮源生长的菌株(尤其是同样从寒地黑土中筛选的菌株Z₄₂)相比,其具有显著的降解优势。在以阿特拉津为唯一碳氮源的培养基中,菌株T₃AB₁的生长量不大却能够高效降解阿特拉津,这与先前报道过的 *Agrobacterium radiobacter* J14a^[22]和 *Pseudomonas* sp. ADP^[23]的静息悬浮细胞能够高效降解阿特拉津是一致的,这也说明该菌属(*Arthrobacter* sp.)对阿特拉津的降解能力不亚于其它菌属。

土壤环境中阿特拉津降解菌可能是以革兰氏阳性菌为主^[24],其适应复杂环境的能力较强,本试验筛选的降解菌株 *Arthrobacter* sp. T₃AB₁ 也正是革兰氏阳性菌,然而有若干项生理生化指标与所报道的文献有所不同:与东北农业大学周宁等^[19]从寒地黑土中筛选出的阿特拉津降解菌株 *Arthrobacter* sp. Z₄₂相比,菌株T₃AB₁蔗糖、甘油利用为阳性,而Z₄₂均为阴性,菌株T₃AB₁不产生硫化氢,而菌株Z₄₂则为阳性;与南京农业大学郑晓宁等^[17]筛选的阿特拉

津降解菌 *Arthrobacter* sp. ADX10相比,菌株T₃AB₁不能液化明胶,但水解淀粉,而ADX10能够液化明胶,但不水解淀粉;与南京农业大学代先祝等^[18]筛选出的阿特拉津降解菌株 *Arthrobacter* sp. AG1,菌株T₃AB₁不能液化明胶,但水解淀粉,37℃能够生长,而菌株AG1以上各项结果都相反,这说明菌株T₃AB₁有可能是节杆菌属的近源种。

在已知的阿特拉津降解菌株当中, *Arthrobacter aureus* TC1被认为是代谢底物最具多样性的菌株,其能够利用许多三嗪类底物作为唯一氮源生长^[14],本实验获得的菌株T₃AB₁具有较宽的降解谱,其对三嗪类以外的其它种类除草剂也有一定的降解能力,这或许能够应用于多种除草剂污染土壤的生物修复。

对于土壤的生物修复,研究人员大多研究了降解菌株(*Pseudomonas* sp. ADP、节杆菌属菌株AD26、TC1、GZK-1等)对土壤中阿特拉津的降解效果,而对其后茬敏感作物的修复效果进行验证的报道较少,仅见南京农大的胡江等人^[25]研究了两株降解菌(*Exiguobacterium* sp. BTAH1和 *Arthrobacter* sp. AG1)对阿特拉津的修复效果,发现菌株的使用能够高效解除阿特拉津对敏感作物小麦的药害作用。由于盆栽实验更能反映出菌株对土壤修复能力的真实情况,本试验通过土壤接种,验证了菌株T₃AB₁对后茬敏感作物水稻的各项生长指标(出苗率、株高、株鲜重、株干重、根鲜重和根干重)不但能够达到很好的修复效果,且未表现出对后茬作物的药害作用,在黑土的田间应用上可能会表现出很好的修复效果,有待进一步研究。这在黑龙江省未见类似的报道,会为阿特拉津生物修复的后续研究工作提供理论参考和实践依据。

参考文献

- [1] 李志范, 王雁南, 李玉涛. 黑龙江统计年鉴-2009. 北京: 中国统计出版社, 2009.
- [2] 赵长山, 何付丽. 长残留性除草剂与黑龙江省农业的未来发展. 东北农业大学学报 (*Journal of Northeast Agricultural University*), 2007, 38(1): 136-139.
- [3] 李萃义, 焦晓娟. 洋河下游农灌区农作物受灾与水质污染的关系. 中国环境监测 (*Environmental Monitoring in China*), 1996, 12(4): 49-51.
- [4] 王立仁, 赵明宇. 阿特拉津在农田灌溉水及土壤中的残留分析方法及影响研究. 农业环境保护 (*Agricultural Environmental Protection*), 2000, 19(2): 111-113.
- [5] 任晋, 蒋可, 周怀东. 官厅水库水中阿特拉津残留的分析及污染来源. 环境科学 (*Environmental Sciences*), 2002, 23(1): 126-128.
- [6] Li QY, Li Y, Zhu XK, Cai BL. Isolation and characterization of atrazine-degrading *Arthrobacter* sp. AD26 and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. *Journal of Environmental Sciences*, 2008, 20(10): 1226-1230.
- [7] 应飞. 阿特拉津高效降解菌及其降解酶粗酶液特性的研究. 中国农业科学院的硕士学位论文, 2007.
- [8] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 第一版. 北京: 科学出版社, 2001: 353-398.
- [9] 吴慧明, 张晶, 朱国念. 新型杀螨剂 F1050 优势降解菌(芽孢杆菌)的筛选及其鉴定. 农药学报 (*Chinese Journal of Pesticide Science*), 2004, 6(2): 43-47.
- [10] 国家环境保护总局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法. 第四版. 北京: 中国环境出版社, 2002: 598-600.
- [11] George MG, Julia AB, Timothy GL. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed. New York: Springer Publishing Company. 2004: 209-211.
- [12] 王浩竹, 王正祥. 细菌分子鉴定技术的研究进展. 安徽农业科学 (*Journal of Anhui Agricultural Sciences*), 2008, 36(20): 9880-9881.
- [13] Xiao CB, Ning J, Yan H, Sun XD, Hu JY. Biodegradation of aniline by a newly isolated *Delftia* sp. XYJ6. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2009, 17(3): 500-505.
- [14] Sajjaphan K, Shapir N, Wackett LP, Palmer M, Blackmon B, Tomkins J, Sadowsky MJ. *Arthrobacter aurescens* TC1 atrazine catabolism genes *trzN*, *atzB*, and *atzC* are linked on a 160-kilobase region and are functional in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(7): 4402-4407.
- [15] Aislabie J, Bej AK, Ryburn J, Lloyd N, Wilkins A. Characterization of *Arthrobacter nicotinovorans* HIM, an atrazine-degrading bacterium, from agricultural soil New Zealand. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, 52(2): 279-286.
- [16] Parag AV, Pradnya PK, Prashant KD. Isolation and characterization of *Arthrobacter* sp. strain MCM B-436, an atrazine-degrading bacterium, from rhizospheric soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2007, 60(4): 273-278.
- [17] 郑晓宁. 阿特拉津降解菌 ADX10 的分离、鉴定及其降解特性的研究. 南京农业大学的硕士学位论文, 2007.
- [18] 代先祝, 蒋建东, 顾立峰. 阿特拉津降解菌 *Arthrobacter* sp. AG1 降解基因研究. 生物工程学报 (*Chinese journal of biotechnology*), 2007, 23(5): 789-793.
- [19] 周宁, 王荣娟, 孟庆娟, 张颖. 寒地黑土中阿特拉津降解菌的筛选及降解特性. 环境工程学报 (*Chinese Journal of Environmental Engineering*), 2008, 2(11): 1651-1651.
- [20] Zachary G, Ulrike D, Azuka I. Atrazine and terbutylazine mineralization by an *Arthrobacter* sp. isolated from a sugarcane-cultivated soil in Kenya. *Chemosphere*, 2009, (77): 534-539.
- [21] 韩鹏, 洪青, 何丽娟. 阿特拉津降解菌 ADH-2 的分离、鉴定及其特性研究. 农业环境科学学报 (*Journal of agro-environment science*), 2009, 28(2): 406-410.
- [22] Struthers JK, Jayachandran K, Moorman TB. Biodegradation of atrazine by *Agrobacterium radiobacter* J14a and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, (64): 3368-3375.
- [23] Mandelbam RT, Allan DL, Wackett LP. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(4): 1451-1457.
- [24] Topp E, Mulbry WM, Zhu H. Characterization of s-triazine herbicide metabolism by a *Nocardioides* sp. isolated from agricultural soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(8): 3134-3141.
- [25] 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. 土壤学报 (*Acta Pedologica Sinica*), 2005, 42(2): 323-327.

Isolation, identification and soil remediation of atrazine-degrading strain T₃ AB₁

Chunguang Liu¹, Fengshan Yang^{1,2*}, Xingzhong Lu¹, Fei Huang¹, Liping Liu¹, Chuanping Yang²

(¹Key Laboratory of Microbiology, College of Life Science, Heilongjiang University, Harbin 150080, China)

(²Key Laboratory of Forest Tree Genetic Improvement and Biotechnology of Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: [**Objective**] To provide new atrazine-degrading strains for atrazine-polluted soil, we isolated the high-efficiency degradation bacterium from contaminated soil, identified with taxonomy, and studied the degrading characteristics and remediation capability of the strain in black soil. [**Methods**] We used morphological, physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA sequences analysis to identify the strain. We studied the effect of environmental factors such as incubation time, temperature and pH on the strain growth and atrazine degradation to confirm the optimum degradation conditions. The strain's degradation range was studied by using different herbicides as sole carbon and nitrogen source. The strain's remediation capability to atrazine - polluted soil was tested by sensitive crop bioassay after inoculating in pot soil. [**Results**] We isolated a high - efficiency degradation strain T₃AB₁ that used atrazine as sole carbon and nitrogen source from maize field suffering atrazine in Nehe, Heilongjiang province. It was initially identified as a member of the genus *Arthrobacter* sp. . The strain could degrade more than 99% of 500 mg/L atrazine (pH8.0) within 72 h. We determined the best degradation conditions as follows: pH7.0 - 8.0, 25 - 30°C, 72 - 108 h. In addition, the strain used other herbicides as sole carbon and nitrogen source such as imazamox, imazethapyr, trifluralinm, clomazone and fomesafen, and the degradation rate reached 12.66% - 40.54% after 168 h. The strain could significantly remedy the sensitive rice crop biomass indexes after treating 21 days, and as time extending, its role in the remediation gradually increased. [**Conclusion**] The screened atrazine-degrading strain T3AB1 could be a suitable candidate for bioremediation of atrazine-polluted soil.

Keywords: atrazine; biodegradation; *Arthrobacter* sp. ; soil remediation

(本文责编:王晋芳)