

一株阿特拉津降解菌株 L-1 的鉴定和降解特性研究

冉治霖¹, 朱静² (1. 深圳信息职业技术学院交通与环境学院, 广东深圳 518172; 2. 东北农业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨 150080)

摘要 [目的] 鉴定 1 株阿特拉津(ATZ)降解菌株, 并对其降解特性进行研究。[方法] 通过对取自城市污水处理厂的污泥进行驯化培养, 分离能够降解除草剂 ATZ 的菌株; 通过 16S rDNA 基因序列分析及生理生化试验对菌株进行鉴定, 并对其室内降解效果进行优化。[结果] 试验分离到 1 株能降解 ATZ 的菌株 L-1, 该菌株与 *Arthrobacter* 菌株基因相似, 同源性达 99% 以上, 结合生理生化方法, 确定该菌株为节杆菌(*Arthrobacter* sp.); L-1 降解 ATZ 时培养基的最佳碳源为葡萄糖, 最佳加入量为 3 g/L。在此条件下, 将 L-1 接种于阿特拉津无机盐培养基(ATZ 浓度为 500 mg/L) 96 h 后降解率达 94.8%。[结论] 该研究为进一步研究 ATZ 降解菌株及其在 ATZ 微污染水体生物修复中的应用奠定了基础。

关键词 降解菌株; 阿特拉津; 鉴定; 降解特性

中图分类号 S273.5 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)14-06137-03

Study on Identification and Degradation Characteristics of An Atrazine-degrading Strain L-1

RAN Zhi-lin et al (Transportation and Environment Institution, Shenzhen Institute of Information Technology, Shenzhen, Guangdong 518172)

Abstract [Objective] The paper was to identify an atrazine-degrading strain and study its degradation characteristics. [Method] Atrazine-degrading strains were isolated by sludge culture of Municipal sewage treatment plant. The strains were identified by the analysis of physiological and biochemical tests and 16S rDNA gene sequence, and the indoor degradation effects were optimized. [Result] An atrazine-degrading strain L-1 was isolated. The gene of L-1 and *Arthrobacter* strain were similar with homology more than 99%, and combining with physiological and biochemical methods, the strain was identified as *Arthrobacter* sp. The best carbon source of the atrazine degradation medium was glucose, and the best adding amount was 3 g/L. Under these conditions, the degradation rate was up to 94.8% 96 h after the L-1 inoculated in atrazine inorganic salts medium (atrazine concentration for 500 mg/L). [Conclusion] The study laid a foundation for the further study of atrazine-degrading strains and the application in the bioremediation of ATZ polluted water.

Key words Degrading strains; Atrazine; Identification; Degradation characteristics

阿特拉津, 英文名 Atrazine (ATZ), 化学名称: 2-氯-4-乙胺基-6-异丙胺基-1,3,5-三嗪(图 1), 是代表性 s-三嗪类除草剂的一种, 属持久性有机污染物(persistent organic pollutants, POPs), 近几十年来广泛应用于世界各国^[1-2]。由于其在水中的低生物降解率和长半衰期(30~100 d)^[3], 且土壤对其吸附能力也很差, 因此其在环境水体中检出率较高^[4-5], 且极易迁移至地下水中, 最终对人类健康造成危害, 而且其本身及其氯代降解产物都是内分泌干扰物质(endocrine disrupting chemicals, EDCs)^[6-7]。

针对阿特拉津对环境污染日趋严重的问题, 化学法和高级氧化技术等去除方法均被提出^[8-11], 但效果都不尽理想, 且生成的副产物去乙基阿特拉津 DEA(deethylatrazine)、去异丙基阿特拉津 DIA(deisopropylatrazine)和 4-氯苯基苯乙酸 DDA(Didealkylatrazine)等不仅毒性大^[12]且易扩散和渗透, 造成水体的污染。而生物处理方法具有成本低、效率高、无二次污染、易操作等优点。目前国内外对土壤中 ATZ 降解菌株的报道大多以细菌为主, 及少量真菌、放线菌等^[13]。

笔者利用富集培养法, 从污水处理场的污泥中分离得到 1 株阿特拉津高效降解菌株。通过生理生化检测和 16S rDNA 基因序列分析确定其系统分类, 并对该菌株的生长和降解特性进行了系统考察, 摸索出其最佳降解条件, 以期为今后对该降解菌株做进一步的研究及 ATZ 微污染水体的生物修复应用奠定基础。



1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器。 Waterse2695 高效液相色谱仪(Waters); MIR-254 低温恒温培养箱(Sanyo); S-4700 TP 020-801PCR 仪(Biometra); Explorer D55-20-M 凝胶成像系统(UVI); HZQ-FX 恒温震荡培养箱(东联); HVE-50 高压灭菌锅(HIRAYAMA)及实验室常规玻璃仪器等。

1.1.2 培养基。 LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 10, 蒸馏水定容至 1 L, pH 7.2。标准阿特拉津液体培养基(g/L): KH₂PO₄ 0.9, Na₂HPO₄ · 12H₂O 6.5, MgSO₄ · 7H₂O 0.2, 1 ml 微量元素溶液, 葡萄糖 3.0, 阿特拉津 0.5 (氮源, 配成 10 g/L 甲醇储液, 高压灭菌之前加入)。配置固体培养基时加入 1.5%~2.0% 的琼脂粉。灭菌条件采用 115 °C 高压灭菌 30 min。

1.2 阿特拉津浓度测定 阿特拉津浓度采用高效液相色谱法测定。

1.3 阿特拉津降解菌株的驯化 采用梯度驯化方式^[14]。

1.4 16S rDNA 基因 PCR 扩增和测序 提取菌株的总 DNA 为模板, 用 16S rDNA 的一对通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGG CTCAG-3') 和 1492R (5'-CGGTTAC-CCTTGTGA CGACTTC-3') 进行 PCR 扩增反应。反应体系为 50 μl, 含 10 × PCR buffer 5 μl, Pfu 1 μl, dNTPs (10 mmol/L)

基金项目 广东省自然科学基金项目(No. 2010K3080009)。

作者简介 冉治霖(1980-), 男, 河南郑州人, 讲师, 从事水污染控制及污水资源化技术研究, E-mail: zhilinran@126.com。

收稿日期 2013-04-24

2 μ l, 27F 2 μ l, 1492R 2 μ l, DNA 模板 1 μ l, ddH₂O 37 μ l。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 35 个循环 (94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min), 最终 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物检测后回收纯化, 与 pMD19-T 载体连接, 转化 *E. coli* DH5 α , 用 X-gal 平板筛选含插入 DNA 的白色转化子菌落。用 GenBank 的数据库进行菌株的 16S rRNA 基因序列 Blast 比对, 确定菌株分类^[15]。

1.5 降解菌株的生理生化鉴定 相关生理生化试验包括: 革兰氏染色、明胶液化、葡萄糖发酵、淀粉水解等, 参照《微生物学实验》^[16] 和《伯杰细菌鉴定手册(第八版)》^[17] 进行。

2 结果与分析

2.1 阿特拉津降解菌株 L-1 的分离 从污泥混合液中分离到 1 株能在阿特拉津固体平板上产生明显透明降解条带的革兰氏阳性降解菌株, 命名为 L-1。常规的细菌鉴定结果如表 1 所示。

表 1 降解菌株 L-1 的生理生化鉴定

试验名称	结果
V-P	-
葡萄糖发酵试验	+
革兰氏染色	+
甲基红(M.R)	-
接触酶反应	+
淀粉水解试验	+
明胶液化试验	-
氧化酶反应	-

注: “+”表示阳性, “-”表示阴性。

2.2 DNA 的提取 利用琼脂糖凝胶电泳法检测所提取的基因组 DNA, 结果见图 1。由图 1 可知, 降解菌 L-1 的 DNA 大小约为 21 kb。

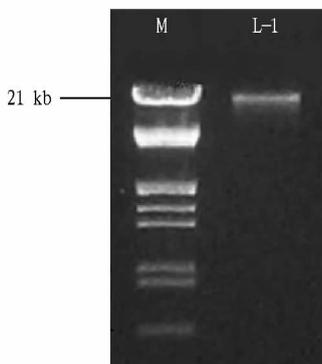


图 1 菌株 L-1 基因组 DNA 电泳结果

2.3 16S rRNA 基因序列与进化树分析 经 PCR 扩增后, 试验得到长约 1 500 bp 的 16S rRNA 片段 (图 2)。经 PCR 产物回收、纯化, 与 pMD19-T 载体连接, 转化 *E. coli* DH5 α , 筛选后进行测序分析, 最后测得实际长度为 1 415 bp。

由于同一个种、属细菌的 16S rRNA 基因变异性较小或具有高度的保守性, 因此, 常用 16S rRNA 基因序列的同源性分析鉴别微生物种类。提交 L-1 的序列至 GenBank 数据库, 进行 Blast 比对, 结果显示该菌株与 GenBank 数据库中 *Arthrobacter* 菌株基因相似, 同源性达 99% 以上。结合生理

生化方法, 判断该菌株为节杆菌 (*Arthrobacter* sp.)。

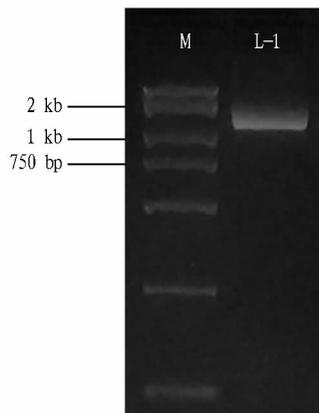


图 2 16S rRNA 片段的扩增

2.4 菌株 L-1 生长曲线的测定 对降解菌株 L-1 在含药 (阿特拉津为唯一氮源) 和无药 (NH_4NO_3 为唯一氮源) 培养基中的生长曲线进行考察, 结果见图 3, 发现降解菌在不含阿特拉津的培养液中生长迅速, 而在含药培养液中降解菌生长相对缓慢, 尤其是在含药培养基的培养初期需要一个适应阶段, 约有 7 h 的延迟期, 菌体数目增加迟缓。在 2 种培养液中, 菌株 L-1 培养 48 h 后, 其生长量达最大值。

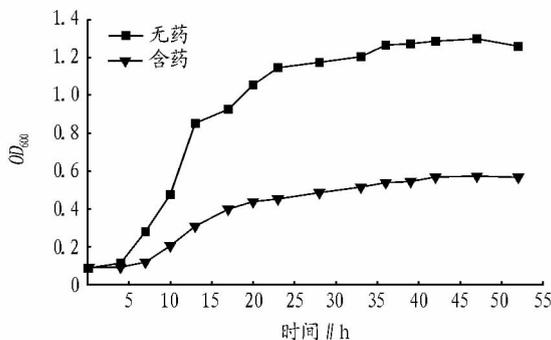


图 3 菌株 L-1 生长曲线

2.5 碳源对阿特拉津降解的影响 分别以唯一碳源 (葡萄糖、乳糖、蔗糖、D-果糖、柠檬酸钠等) 和不加碳源作为对照组进行阿特拉津利用碳源考察, 阿特拉津初始浓度为 500 mg/L, 降解时间为 96 h, 结果图 4 所示。

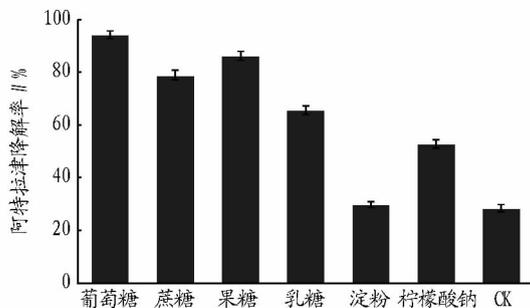


图 4 不同碳源对降解效率的影响

当所加碳源为葡萄糖和果糖时, 降解效果最好。降解率分别为 94.2% 和 86.2%; 其次为蔗糖、乳糖和柠檬酸钠, 降解率分别为 78.9%、65.6% 和 52.8%; 当所加碳源为淀粉时降解效果较差, 降解率为 29.8%; 不加碳源时降解效果

最差,降解率仅为 28.4%。因此,确定菌株 L-1 降解阿特拉津的最佳碳源为葡萄糖。

2.6 碳源浓度对降解效果的影响 在阿特拉津浓度为 500 mg/L 的无机盐培养基中分别选取 0、1、2、3、4 和 5 g/L 5 个不同葡萄糖添加量进行降解效果试验,结果如图 5 所示。由图可知:在碳源浓度在 1~3 g/L 范围内降解效果理想,当碳源添加量为 3 g/L 时,降解效果最好,96 h 后达 94.8%。

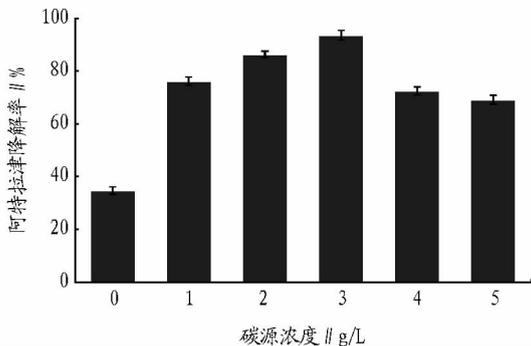


图 5 碳源浓度对 L-1 降解阿特拉津的影响

2.7 最适条件下阿特拉津降解动态考察 配置含 500 mg/L 阿特拉津的无机盐培养基,调节 pH 为 7.5,添加 3 g/L 葡萄糖作为碳源,30 ℃、150 r/min 振荡培养,培养液中阿特拉津的残留动态见图 6。由图可见,在前 12 h 内阿特拉津的利用率很低,仅降解了 45.6 mg,12 h 后降解速度开始迅速加快,84 h 后培养液里仅余了 4.3 mg,继续培养,阿特拉津的降解速度基本保持平稳,96 h 后,培养液中残余 26.9 mg 阿特拉津,降解率为 94.8%,降解效果理想。

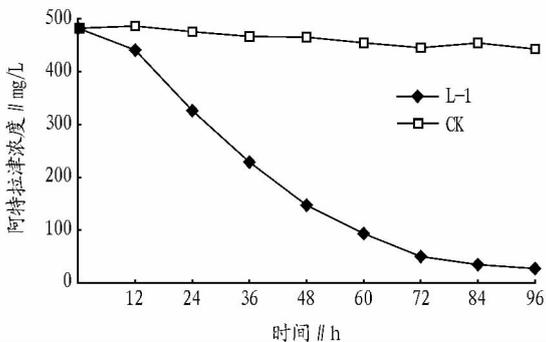


图 6 阿特拉津的降解曲线

3 讨论

3.1 降解菌的分离与鉴定 目前,国内外关于阿特拉津降解菌的研究中有较多节杆菌属 (*Arthrobacter* sp.) 细菌的报道。菌种的筛选多数为采自阿特拉津污染土壤^[18-20] 样品经富集培养后分离获得。该试验样品采自城市污水处理厂的污泥,通过富集培养后分离得到 1 株降解菌 L-1,经鉴定为节杆菌属,说明该菌属的环境适应能力较好。同时许多研究表明,该菌属降解底物比较广泛,对多种复杂化合物都具有良好的降解功能^[21-23]。

节杆菌属菌体细胞最大特点为幼龄期和老龄期的形态会发生变化,因此试验过程中分别对这 2 个时期的菌体取

样处理后,在扫描电镜下清楚观察到这一特征。结合生理生化检测和 16S rRNA 基因序列分析,也证明分离得到的菌株为节杆菌,与扫描电镜的观察结果相吻合。

3.2 降解菌株的生长和降解特性考察 在对 L-1 生长曲线的考察中发现,在含有阿特拉津的无机盐培养液中该菌株生长相对迟缓并有明显的延迟期,各生长阶段不是十分明显且生长量远低于不含阿特拉津的培养液。由此推测,虽然阿特拉津可作为氮源被降解菌利用,但对降解菌株的生长有明显的抑制作用。

许多研究发现,添加一定的碳源有利于降解菌株的生长和降解^[24-25]。但也有试验表明,碳源的添加仅有利于菌体的生长而对降解效率不产生影响^[26]。该试验对分离出的菌株考察发现在以葡萄糖作为碳源,添加浓度为 3 g/L 时降解效果最好,当添加浓度再增加,降解率反而降低。在 pH 值和温度对降解效率的影响研究中发现,该菌株不能耐受较高的温度,且在中偏碱性条件下降解效果较好,这与多数已发现的节杆菌属的降解性状相类似,说明该菌属降解菌的降解性状比较稳定。

4 结论

该研究从污水处理厂的污泥中分离、筛选出 1 株对阿特拉津具有较高降解能力的菌株,命名为 L-1,通过生理生化反应及 16S rRNA 鉴定,判断降解菌 L-1 为节杆菌 (*Arthrobacter* sp.)。降解特性考察确定最佳碳源为葡萄糖,最佳碳源加入量为 3 g/L。在此条件下,接种于阿特拉津(初始浓度 500 mg/L)为氮源的无机盐培养基中,培养 4 d 后降解率 94.8%。

参考文献

- [1] LUCIANE S, ATTILIO C. New aspects on atrazine biodegradation [J]. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2010, 53(2): 487-496.
- [2] ZHANG K, LI Y, ZU Y Q, et al. Effects of Atrazine Stress on the Growth of *Pennisetum hybridum* [J]. Agricultural Science & Technology, 2011, 12(11): 1653-1656.
- [3] KOMANG R, ERIC S, HENK W, et al. Microbial aspects of atrazine degradation in natural environments [J]. Biodegradation, 2002, 13: 11-19.
- [4] FREITAS L G, SINGER H, MÜLLER S R, et al. Source area effects on herbicide losses to surface waters - A case study in the Swiss Plateau [J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2008, 128(11): 177-184.
- [5] 吴卫东, 周驰. 高压液相色谱测定地表水和饮用水中的阿特拉津 [J]. 干旱环境监测, 2011, 25(1): 1-8.
- [6] STEPHEN S. Clinical correlates of environmental endocrine disruptors [J]. Trend in Endocrinology and Metabolism, 2005, 16(4): 139-144.
- [7] GUÉRIT I, BOCQUENÉ G, JAMES A, et al. Environmental risk assessment: A critical approach of the European TGD in an in situ application [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2008, 71(9): 291-300.
- [8] LIONEL H, CHARLOTTE G. Assessing granular media filtration for the removal of chemical contaminants from wastewater [J]. Water Research, 2011, 11: 3461-3472.
- [9] HIROSHI A, TOSHIHIKO M. Experimental study of behavior of endocrine-disrupting chemicals in leachate treatment process and evaluation of removal efficiency [J]. Waste Management, 2009, 29: 1852-1859.
- [10] SANTIAGO E, DANIELE M, BILA L, et al. Ozonation and advanced oxidation technologies to remove endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water effluents [J]. Journal of Hazardous Materials, 2007, 149: 631-642.
- [11] 李绍峰, 梁媛, 张荣全, 等. O₃/H₂O₂ 降解 Atrazine 效能研究 [J]. 环境科学, 2009, 30(5): 1425-1429.

2.4 酶解物对 DPPH 的清除率 检测浓度为 10 mg/ml 时胰蛋白酶水解物对 DPPH 自由基的清除率,结果如图 6 所示,水解物对 DPPH 自由基的清除率以 3~5 kD 分子量多肽为最佳,清除率达 46.9%。

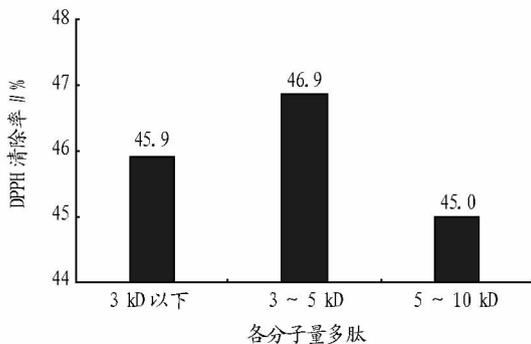


图 6 不同分子量多肽对 DPPH 的清除率

2.5 酶解物的还原力检测 当酶解物浓度为 10 mg/ml 时,其在波长 700 nm 处的吸光度见图 7,吸光度越大,水解物的还原能力越强。从图中可知,3 kD 以下的多肽酶解物还原力最强。

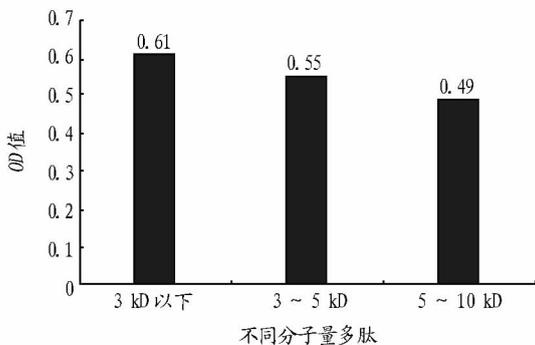


图 7 不同分子量多肽还原力值

3 结论

在机体的新陈代谢过程中,可产生 O_2^- 、 H_2O_2 、ROO 和

-OH 等自由基,而体内自由基的积聚可导致脂质的过氧化,进而破坏细胞膜引起细胞的损伤,导致人体疾病发生。因此,清除体内过剩的自由基是防治疾病发生的重要途径。由于人工合成的抗氧化剂 BHA、BHT、PC 等具有毒副作用,人们将目光转身天然产物,从海洋生物中提取抗氧化肽成为学者的研究热点。酶法水解蛋白是制备抗氧化肽的常用方法,该法反应条件温和、反应时间短、效率高,在一定条件下可定位水解,且反应过程易控制^[5]。而对于酶解乌贼内脏蛋白得到抗氧化多肽的研究尚未见报道。该研究选用胰蛋白酶对乌贼内脏进行水解,通过单因素试验和正交试验确定最佳的试验条件,结果显示温度 40 °C、酶解时间 7 h,加酶量 4 500 U/g、pH 值 8.0 时酶解产物对羟自由基的清除率最强。试验经超滤得到 3 个不同分子量的多肽,对冷冻干燥后获得的产物进行羟自由基、DPPH 自由基清除率和还原力测定,结果表明:3~5 kD 的多肽对于羟自由基的清除率和 DPPH 清除率最大,3 kD 以下的多肽还原力最强。因此认为 3 种不同分子量多肽对羟自由基、DPPH 自由基均有一定的清除活性,并具有还原力。乌贼内脏作为乌贼加工过程中的低值品一直未被很好利用,如能对该试验中的乌贼内脏酶解液进一步分离纯化并进行结构鉴定,相信其是一种良好的抗氧化剂来源,这将为乌贼内脏的药用价值开发提供科学的试验依据。

参考文献

- [1] 常抗美,吴常文.曼氏无针乌贼的增值开发与利用的研究进展[J].中国水产,2008,30(2):55-58.
- [2] 刘智禹,江琴.乌贼内脏粉的营养价值及其安全性研究[J].福建农业学报,2005,20(4):271-274.
- [3] 董亚辉,李和生,何燕飞,等.双酶协同水解乌贼内脏的工艺条件研究[J].中国酿造,2011(1):136-140.
- [4] 郁迪,许新建,杨最素,等.菲律宾蛤仔木瓜蛋白酶水解物抗氧化活性研究[J].浙江海洋学院学报:自然科学版,2011,30(6):515-519.
- [5] 姜威,李智博,赵前程,等.象拔蚌酶解制备抗氧化肽的工艺研究[J].安徽农业科学,2012,40(7):3976-3979.
- [6] 中国土壤与肥料,2008(5):66-69.
- [7] WIDEHEM P, AIT-AISSA S, TIXIER C, et al. Isolation, characterization and diuron transformation capacities of a bacterial strain *Arthrobacter* sp. N2 [J]. Chemosphere, 2002, 46(4): 527-534.
- [8] TIXIER C, SANCELME M, AIT-AISSA S, et al. Biotransformation of phenylurea herbicides by a soil bacterial strain, *Arthrobacter* sp. N2; structure, ecotoxicity and fate of diuron metabolite with soil fungi [J]. Chemosphere, 2002, 46(4): 519-526.
- [9] WESTERBERG K, ELVANG A M, STACKEBRANDT E, et al. *Arthrobacter chlorophenolicus* sp. nov, a new species capable of degrading high concentrations of 4-chlorophenol [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2000, 50(6): 2083-2092.
- [10] PRANAB K G, LIGY P. Atrazine degradation in anaerobic environment by a mixed microbial consortium [J]. Water Research, 2004, 38: 2277-2284.
- [11] 刘娜,毕海涛,任何军,等.阿特拉津低温降解菌的筛选及降解机理研究[J].吉林大学学报:地球科学版,2009,29(5):894-898.
- [12] 刘爱菊.阿特拉津高效降解细菌的筛选及降解特性研究[D].泰安:山东农业大学,2003.
- [13] SAGLIO P, RIJASSE T. Behavioral Responses to Atrazine and Diuron in Goldfish [J]. Arch Environ Contam and Toxicol, 1998, 35(3): 484-491.
- [14] 万年升,顾继东,段舜山.莠去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.
- [15] 朱静,李铁晶.阿特拉津高效降解菌株的筛选和降解特性研究[J].化学工程师,2012(5):26-28.
- [16] 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,2012,3(9):3214-3219.
- [17] 赵斌,何绍江.微生物学实验[M].北京:科学出版社,2002:121-159.
- [18] BUCHANAN R E, GIBBONS N E. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology [M]//The Translate and Edit Group of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology of Microbiological Institute of Chinese Academy of Science. Beijing: Science Press, 1984.
- [19] 周宁,王荣娟,张颖,等.寒地黑土中阿特拉津降解菌的筛选与降解特性[J].环境工程学报,2008,2(11):1560-1563.
- [20] 代先祝,蒋建东,顾立峰,等.阿特拉津降解菌 *Arthrobacter* sp. AG1 降解基因研究[J].生物工程学报,2007,23(5):789-793.
- [21] 郑晓宁,顾金刚,李世贵,等.一株阿特拉津高效降解菌的分离与鉴定

(上接第 6139 页)