

Arthrobacter sp. AG1 菌株降解土壤中阿特拉津研究^①

代先祝^{1,2}, 蒋建东¹, 李 荣¹, 李顺鹏^{1*}

(1 南京农业大学生命科学学院, 农业部环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095;

2 西南大学资源环境学院, 微生物学实验中心, 重庆 400715)

摘 要: 在阿特拉津浓度为 50 mg/kg 干土的黄棕壤、潮土和红壤接种 1.5×10^6 CFU/g 干土的降解菌 *Arthrobacter* sp. AG1, 10 天后土壤中的阿特拉津分别降解至 1.5、6.6 和 10 mg/kg 干土。阿特拉津的降解速率受到土壤性质的影响, 但 AG1 仍能在不满足其生长繁殖要求的 pH 值的土壤中有降解酸性土壤中阿特拉津; 土壤中水分含量对降解效果影响较大, >20% 时降解效果较好; 土壤低含水量和低 pH 值会导致 AG1 降解阿特拉津的活力下降。不同的接种量对降解效果有一定影响, 但 $10^5 \sim 10^7$ CFU/g 干土接种量的 AG1 都能有效发挥降解作用。AG1 降解完土壤中的阿特拉津后, 在土壤含水量分别为 5% 和 15% 的情况下能长期保持降解活性, 对 60 天后第 2 次施入黄棕壤和潮土中的 50 mg/kg 阿特拉津 4 天时降解效率在 65% 以上。

关键词: 阿特拉津; 土壤生物修复; 降解效果; 土壤性质

中图分类号: Q938.1

阿特拉津 (2-氯-4-乙胺基-6-异丙胺基-1,3,5-三嗪, AT) 是一种广泛使用的三嗪类除草剂, 在土壤中的残留期长, 严重危害下茬农作物^[1-2], 而且阿特拉津在土壤中的可移动性较强, 通过地表径流、淋溶等途径污染地表水和地下水, 危害人类健康^[3-4]。

采用微生物方法对农药污染土壤进行修复具有处理效果好、费用低、操作简单、无二次污染等优点, 因而受到广泛关注, 目前已经有许多成功修复的报道。关于阿特拉津的微生物降解研究目前主要集中于降解菌株的分离筛选以及降解特性上^[5-9]。阿特拉津降解的第一步反应为水解脱氯, 其编码基因有氯水解酶基因 *atzA* 和 *trzN*, 关于含 *atzA* 基因的降解菌株对污染土壤修复及其影响因素有一些研究报道^[10-13]。由于 *trzN* 基因编码的酶比 *atzA* 基因编码的酶具有降解效率高、更广谱的水解脱氯活性 (对均三氮苯类除草剂均具有降解效果), 而且其降解效果不受 N 源影响等优点^[9], 因此

含 *trzN* 基因的降解菌株具有更加广阔的应用前景, 然而, 应用此类菌株修复土壤阿特拉津污染的研究目前并不多见。本研究采用土壤盆栽试验, 对含 *trzN* 基因的菌株 *Arthrobacter* sp. AG1 在 3 种不同土壤中降解阿特拉津的性能进行了研究, 为 AG1 菌株的田间修复研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株: *Arthrobacter* sp. AG1 由南京农业大学农业部环境微生物工程重点开放实验室分离筛选, 其阿特拉津降解的第一步氯水解酶基因为 *trzN*。

供试土壤: 黄棕壤、潮土和红壤, 土壤性质见表 1。供试土壤均为未接触过阿特拉津 (AT) 的表层土 (0 ~ 30 cm), 经风干过筛 (2 mm) 后备用。

表 1 供试土壤有机质和 pH 值
Table 1 Characteristics of tested soils

土壤类型	采集地点	有机质含量 (g/kg)	pH 值	阿特拉津吸附系数*	植被
铁质湿润淋溶土 (黄棕壤)	南京孝陵卫	22.9	6.94	1.3	蔬菜
淡色潮湿锥形土 (潮土)	南京板桥	12.74	6.32	1.2	水稻
富铝湿润富铁土 (红壤)	江西鹰潭	11.20	4.70	0.6	花生

* 阿特拉津吸附系数: 用 5 mg/L 的阿特拉津溶液与土壤按质量比 1:2 的比例混合, 振荡过夜后静置 24 h, 然后取上清, 用 $\Phi 0.25 \mu\text{m}$ 滤膜过滤后 HPLC 检测阿特拉津浓度, 阿特拉津吸附系数为土壤中阿特拉津浓度和平衡时液相中阿特拉津浓度的比值。

①基金项目: 国家“863”项目 (2007AA10Z405) 和国家自然科学基金项目 (30600016) 资助。

* 通讯作者 (lsp@njau.edu.cn)

作者简介: 代先祝 (1978—), 女, 四川安岳人, 硕士, 讲师, 主要从事环境微生物研究。E-mail: daixianzhu@126.com

基础盐培养基(MM): 葡萄糖 1 g/L, KH_2PO_4 0.5 g/L, K_2HPO_4 1.5 g/L, MgSO_4 0.1 g/L, NaCl 0.4 g/L, NH_4NO_3 0.5 g/L, H_2O 1000 ml; 阿特拉津培养基(MA): MM培养基中的 NH_4NO_3 用等质量的阿特拉津原粉(纯度 96%)代替; 阿特拉津降解菌分离培养基(SA): MM培养基中不加葡萄糖和 NH_4NO_3 , 加 10 ml 土壤浸出液, 倒平板时加入阿特拉津的乙醇悬液, 使阿特拉津浓度为 300 mg/L。固体培养基加琼脂 20 g/L, 培养基经 115℃、25 min 高压蒸气灭菌备用。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种制备 在 MA 培养基中接种 AG1 菌振荡培养至阿特拉津降解完全, 离心收集菌体, 用生理盐水重悬, 调整菌液 OD_{600} 为 1.5 (1.7×10^8 CFU/ml)后作为试验菌种。将菌体再洗涤 2 次, 用生理盐水重悬 (OD_{600} 为 1.5), 放置 2 h 后即静息细胞。

1.2.2 AG1 菌生长及其静息细胞降解阿特拉津的 pH 值范围的测定 将 AG1 菌按 1.5×10^4 CFU/ml 分别接种至初始 pH 值为 4、5、6、7、8、9 和 10 的 MM 液体培养基中, 30℃ 振荡培养 16 h 后用 722 型分光光度计测定菌体 OD_{600} 。

在 10 mmol/L pH 值为 7.0 的磷酸盐缓冲液中加入过量的阿特拉津原粉, 置 37℃ 振荡溶解过夜, 然后用滤纸过滤除去未溶解的粉末, 将阿特拉津的饱和溶液 pH 值分别调整为 3、4、5、6、8、9、10、11, 分别取 1 ml 溶液, 加入 0.5 ml AG1 菌的静息细胞悬液, 各设 3 个重复, 30℃ 温育 30 min, 立即离心 (4℃, 12000 r/min) 10 min, 取上清, 用 Φ 0.25 μm 滤膜过滤后, HPLC 检测阿特拉津含量。

1.2.3 土壤农药降解试验 称取阿特拉津原药, 溶于少量甲醇中, 再将其倒入纯水中, 使阿特拉津均匀地分散在水中, 得到浓度为 500 mg/L 的悬浊液。按 50 g/杯的量将土壤分装到一次性塑料杯中, 均匀施入阿特拉津悬液使最终浓度为 50 mg/kg 干土, 吸附 24 h 后备用。试验设空白、对照和处理 3 组, 每组 3 个重复。处理组接入浓度为 1.5×10^6 CFU/g 干土的菌液, 调整各组土壤含水量为 20%, 置于 20℃ 培养箱中保温保湿培养, 定期取样测定阿特拉津浓度。

1.2.4 菌株 AG1 在土壤中降解阿特拉津的活力保持 3 种土壤降解试验进行 20 天后 (土壤中阿特拉津已经检测不出), 分别调整土壤含水量为 5% 和 15%, 降低土壤含水量, 使降解菌株处于休眠状态, 继续放入培养箱中培养 60 天, 然后第 2 次向土壤中施入约 50 mg/kg 干土的阿特拉津, 调节土壤含水量为 20% (使降解菌株处于适宜的降解状态), 培养 4 天后取样检测阿特拉津浓度。

1.2.5 施菌土壤中阿特拉津降解菌的分离 取第 2 次施入阿特拉津培养 10 天后的土样各 5 g, 稀释涂布 SA 平板, 20℃ 培养 3 天以上, 培养过程中观察在平板上是否有形成透明圈的单菌落^[7]。

1.2.6 土壤中阿特拉津的提取及检测 称取土样 10 g 于锥形三角瓶中, 加入 30 ml 甲醇或纯水, 置 37℃ 摇床 220 r/min 振荡 2 h, 取 5 ml 土壤悬液, 12000 r/min 离心 5 min, 取上清, 用 Φ 0.25 μm 滤膜过滤后, HPLC 检测。检测条件: 250 mm $\times$ 4.6 mm C18 不锈钢色谱柱; 流动相为 80/20 (V/V) 甲醇/水; 流速为 1.0 ml/min; 柱温: 25℃; Waters 2487 紫外检测器, 检测波长为 226 nm; 进样量 10 μl 。

2 结果与讨论

2.1 AG1 菌生长及其静息细胞降解阿特拉津的 pH 值范围

从图 1 可以看出 AG1 菌在初始 pH 值 <5 的条件下生长不良, 在 pH 值为 7~10 范围内生长良好。经 HPLC 检测发现对照管中各 pH 值条件下阿特拉津浓度基本都保持在 33.1~34.5 mg/L (数据未显示), 说明阿特拉津在不同酸碱条件下稳定。从图 2 可以看

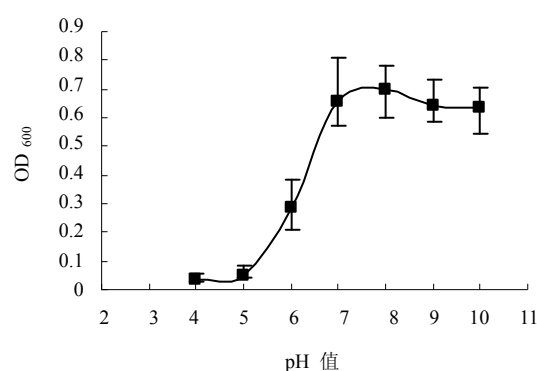


图 1 AG1 生长 pH 值范围

Fig. 1 pH range for AG1 growth

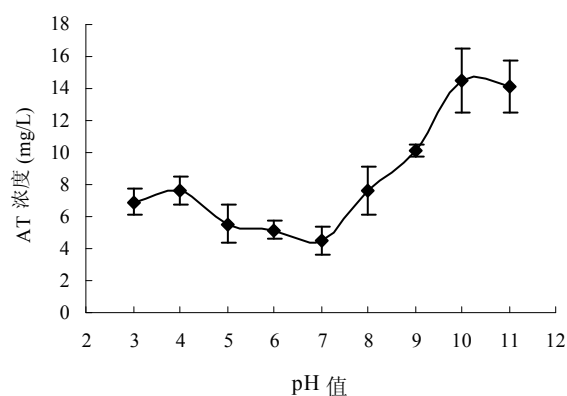


图 2 AG1 静息细胞降解阿特拉津的 pH 值范围

Fig. 2 pH range for AT-degradation by AG1 rest cells

出静息细胞降解阿特拉津的 pH 值范围较广, 在 pH 值 3~11 范围内都能良好地降解阿特拉津, 以上结果表明 AG1 降解阿特拉津的酶系比菌体具有更广的 pH 值适应范围, 这将有利于菌株 AG1 应用于田间阿特拉津的降解。

2.2 菌株 AG1 在不同土壤中降解阿特拉津的效果

土壤中的阿特拉津分别用水和甲醇提取, 用水提取的目的是为了了解土壤中阿特拉津进入水相的浓度情况, 甲醇提取则视为土壤中阿特拉津的全量提取。从图

3 的降解曲线可以看出, AG1 菌在 3 种土壤中降解阿特拉津速率有一定的差异, 接菌10天后黄棕壤、潮土和红壤中阿特拉津浓度分别降低到1.5、6.6 和 10 mg/kg 干土, 而对照中阿特拉津浓度分别为 45、44 和 48 mg/kg 干土。表明土壤性质对菌株的降解活力有一定影响。到 18 天后各土壤中阿特拉津浓度进一步被降解, 其中黄棕壤的水相提取物中已经检测不到阿特拉津, 表明接种降解菌 AG1 可以使土壤中阿特拉津浓度低到不随水迁移。

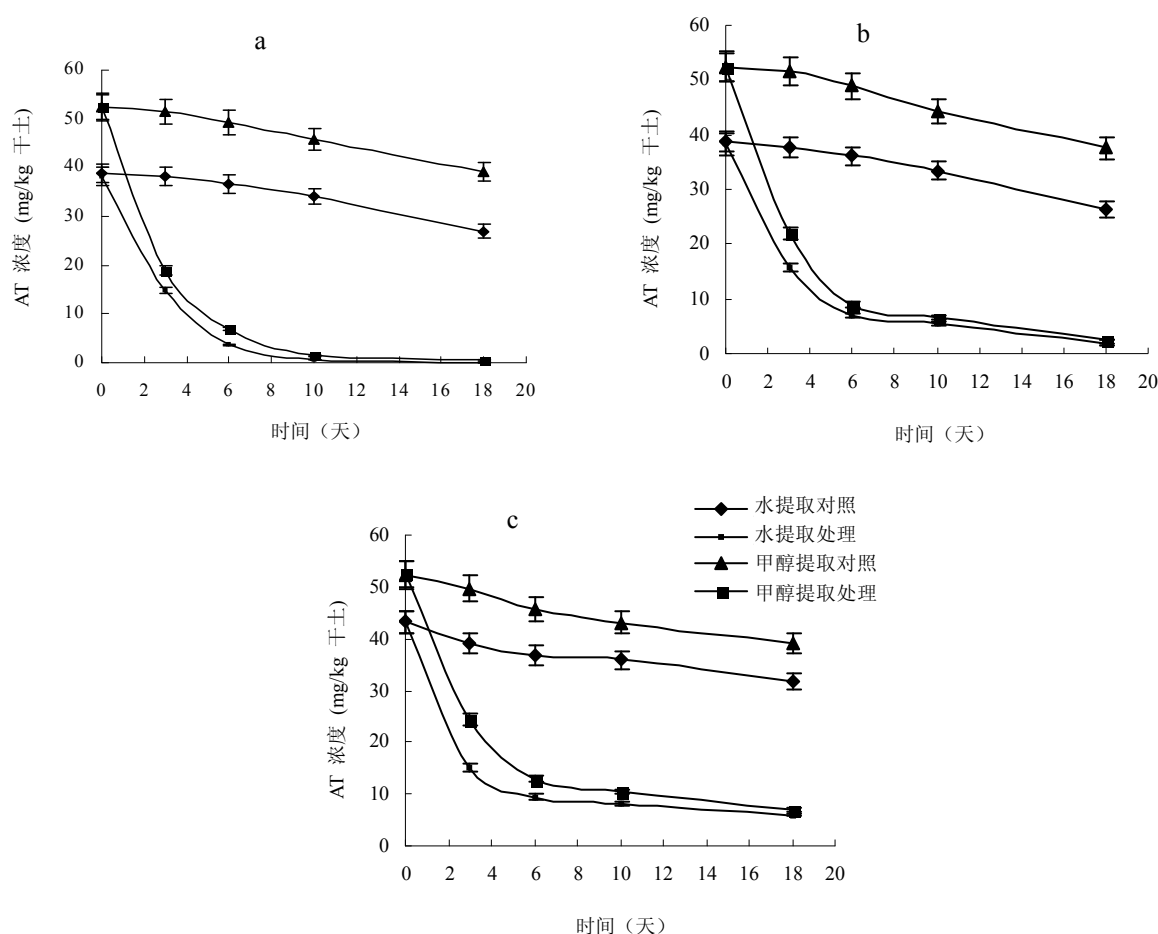


图 3 AG1 在黄棕壤 (a)、潮土 (b)、红壤 (c) 中降解阿特拉津的曲线

Fig. 3 Degradation of AT in yellow-brown soil (a), fluvo-aquic soil (b) and red soil (c)

3 种土壤中红壤的阿特拉津吸附系数最小, 有研究表明小的吸附系数有利于阿特拉津的降解^[15], 但 AG1 菌在红壤中的降解效率最低, 这可能是由其低 pH 值 (4.7) 不利于 AG1 的生长所致, 但还是处于静息细胞降解阿特拉津的 pH 值范围内, 表明 AG1 在红壤中可能会以类似于静息细胞状态发挥降解作用, 而在黄棕壤和潮土中 AG1 菌能利用土壤中的营养生长并发挥降解作用, 从而导致降解效率的差异。

从图 3 中 a、b 可见, AG1 菌在黄棕壤中降解阿特拉津的速率大于潮土, 这两种土壤除了有机质含量差异大外 (黄棕壤为 22.9 g/kg, 潮土为 12.74 g/kg), 其他性质相差不大, 而且它们各自对照土壤中阿特拉津的自然降解速率也没有显著差异, 因此接种 AG1 菌降解能力的差异可能是由有机质含量的不同引起的。虽然有研究表明土壤有机质含量过高会导致阿特拉津的生物可利用性降低, 从而阻碍降解^[10], 然而本

研究结果却与此不一致,主要原因可能是报道的土壤有机质含量(36%)要远高于我们实验所用土壤的有机质含量,黄棕壤中有机质含量还没有高到会阻碍阿特拉津降解的程度,这一点也可从黄棕壤和潮土两种土壤对阿特拉津的吸附系数没有显著差异看出。另外,黄棕壤是菜园土,生物可利用的水溶性有机质含量可能较高,因而比潮土更有利于 AG1 菌的生长繁殖,还有阿特拉津在土壤中的吸附时间较短,可能还没有形成结合态残留,但具体原因还有待于进一步研究。

2.3 土壤含水量对阿特拉津降解效果的影响

由于在黄棕壤中阿特拉津降解效果最好,我们首先选择了利用黄棕壤来研究土壤水分含量对阿特拉津降解的影响。调整黄棕壤处理组土壤含水量分别为 10%、15%、20%、25%、30% 和 40%,培养 4 天后取样检测阿特拉津含量。结果(图 4)发现 AG1 菌在土壤中降解阿特拉津的效率随土壤含水量增加而提高,水分含量为 15% 时 AG1 菌就能有效降解阿特拉津,4 天可去除土壤中 70% 的阿特拉津;土壤含水量在 20% 以上时,降解率>89%。潮土和红壤两种土壤中含水量对阿特拉津的降解试验结果类似于黄棕壤,降解效率在 10%~40% 的范围内随着含水量的增加而增加。Clotaire 等^[10]用假单胞菌株 YAY6 进行土壤试验时也发现土壤含水量<10% 时降解效率开始明显降低。

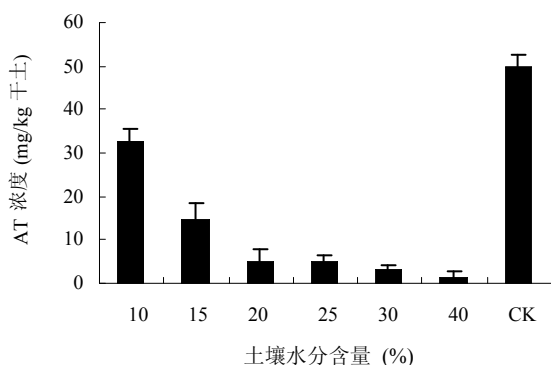


图 4 土壤水分含量对阿特拉津降解效果的影响

Fig. 4 Effect of soil water content on AT degradation

2.4 土壤中 AG1 菌接种量对阿特拉津降解效果的影响

在黄棕壤处理组中接种不同体积的菌液,使土壤中菌浓度分别为 3.4×10^7 、 1.7×10^7 、 8.5×10^6 、 3.4×10^6 、 1.7×10^6 、 3.4×10^5 CFU/g 干土,土壤含水量保持在 20%,培养 4 天后取样检测阿特拉津含量。结

果(图 5)表明不同接种量的 AG1 都能有效降解阿特拉津,即使接种量低至 3.4×10^5 CFU/g 干土,4 天后降解率也能达到 77%;接种量 3.4×10^7 CFU/g 干土时 4 天后降解率可达 96%。潮土和红壤两种土壤中的接种量试验同样也显示接种量越大降解效率越高。以上结果表明在实际应用中可以根据不同的修复目的施用不同浓度的降解菌,有利于降低使用成本。

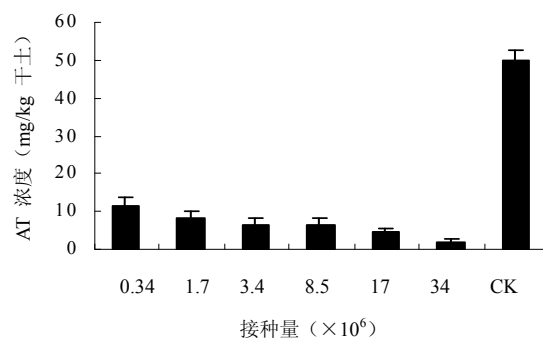


图 5 AG1 菌接种量对阿特拉津降解效果的影响

Fig. 5 Effect of AG1 inoculation volume on AT degradation

2.5 菌株 AG1 在土壤中降解阿特拉津的活力保持

3 种土壤中降解试验均表明第一次施入的阿特拉津在 20 天后都被完全降解,为了研究菌株 AG1 在无阿特拉津土壤中降解活力的保持情况,我们进行了 60 天时间的放置后不投加降解菌对再次投加的阿特拉津的降解试验。从表 2 的结果可见,在不同含水量情况下,AG1 在黄棕壤和潮土土壤中对第 2 次施入的阿特拉津的降解率都在 65% 以上,但红壤中降解率较低,尤其是低土壤含水量(5%)情况下仅为 14.5%。土壤的降解活力依次为黄棕壤>潮土>红壤,这可能是因为红壤的 pH 值不适于 AG1 菌生长,容易导致细菌死亡,降解活力丧失较快。黄棕壤与潮土之间的降解活力差别表明较高的有机质含量有利于菌体的存活,这与上面的降解实验结果以及有关的研究报道^[10]相一致。

表 2 AG1 在土壤中降解阿特拉津活力的保持

Table 2 Survival of AG1 in soil

土壤含水量 (%)	4 天时 AT 降解率 (%)		
	黄棕壤	潮土	红壤
5	78.4	65.7	14.5
15	85.2	76.1	40.6

水分含量固然对降解活力影响很大,但当土壤的理化条件适合菌体生长时,即使水分含量很低,AG1

菌仍然能保持较高的降解活力。实际上,我们在放置一年后的处于风干状态的处理组中施入 50 mg/kg 干土的阿特拉津,然后调整土壤含水量到 20%,4 天后仍有 67% 的阿特拉津被降解。由于菌株 AG1 是未经富集培养,直接将污染土壤稀释涂布加有土壤浸出液的 SA 平板分离筛选的,该细菌属节杆菌属,具有抗旱、耐饿和广食性的特点,常常是土壤中的优势菌群^[16],因此该降解菌在环境中具有较大的竞争优势,存活时间长。以上试验结果也验证了节杆菌在土壤中的耐旱性,自然环境中的土壤经常会处于这种干燥状态,AG1 的这一特性非常利于土壤污染的生物修复。

AG1 虽然能在土壤中长期保持降解活力,然而我们不能从相应的土样中分离到 AG1 或阿特拉津降解菌,这可能是因为 AG1 的数量在土壤中已经少到不能分离,处于存活但不可培养状态,具体原因有待进一步研究。

3 结论

(1) 在不向土壤中添加任何营养物质的情况下,接种 1.5×10^6 CFU/g 干土的降解菌 AG1,即使在低于菌体生长的 pH 值条件下仍然可以降解黄棕壤、潮土和红壤中的阿特拉津,分别从 50 mg/kg 干土降解至 1.5、6.6 和 10 mg/kg 干土。

(2) 土壤中水分含量对降解效果影响较大, > 20% 时降解效果较好。土壤低含水量和低 pH 值会导致 AG1 降解阿特拉津的活力下降。不同的接种量对降解效果有一定影响,但 $10^5 \sim 10^7$ CFU/g 干土接种量的 AG1 都能有效发挥降解作用。

(3) AG1 菌在土壤中能长期保持降解活力,AG1 降解完土壤中的阿特拉津后,在土壤含水量分别为 5% 和 15% 的情况下能长期保持降解活性,对 60 天后第 2 次施入黄棕壤和潮土中 50 mg/kg 干土的阿特拉津 4 天时降解效率在 65% 以上。

参考文献:

- [1] 范小振,吕柏,弓爱君.阿特拉津在土表的紫外光降解行为研究.土壤,2005,37(2):197-201
- [2] 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,1996,12(4):49-53
- [3] 任晋,蒋可.阿特拉津及其降解产物对张家口地区饮用水资源的影响.科学通报,2002,47(10):758-762
- [4] Storrs SI, Kiesecker JM. Survivorship patterns of larval amphibians to low concentration of atrazine. Environ. Health Perspect, 2004, 112(10): 1054-1057
- [5] 蔡宝立,黄今勇,石建党,张心平,刘海.阿特拉津降解菌株的分离和鉴定.微生物学通报,2001,28(2):22-26
- [6] 代先祝,胡江,蒋建东,徐玮,李顺鹏.污染土壤中阿特拉津降解菌的分离和鉴定.土壤学报,2006,43(3):467-472
- [7] Mandelbaum RT, Allan DL, Wackett LP. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. Appl. Environ. Microbiol., 1995, 61: 1451-1457
- [8] Topp E, Mulbry WM, Zhu H. Characterization of s-triazine herbicide metabolism by a *Nocardioide* sp. isolated from agricultural soils. Appl. Environ. Microbiol., 2000, 66(8): 3134-3141
- [9] Sajiaphan K, Wackett LP, Shapir N. Arthrobacter aureus TC1 atrazine catabolism genes *trzN*, *atzB* and *atzC* are linked on a 160-kilobase region and are functional in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol., 2004, 70(7): 4402-4407
- [10] Clotaire YK, Nikolaus G. Mineralization of the herbicide atrazine in soil inoculated with a *Pseudomonas* strain. J. Agric. Food Chem., 1995, 43(8): 2291-2294
- [11] Park JH, Feng YC, Ji PS. Assessment of bioavailability of soil-sorbed atrazine. Appl. Environ. Microbiol., 2003, 69(6): 3288-3298
- [12] Zhao S, Arthur EL, Coats JR. Influence of microbial inoculation (*Pseudomonas* sp. strain ADP), the enzyme atrazine chlorohydrolase, and vegetation on the degradation of atrazine and metolachlor in soil. J. Agric. Food Chem., 2003, 51(10): 3043-3048
- [13] Struthers JK, Jayachandran K, Moorman TB. Biodegradation of atrazine by *Agrobacterium radiobacter* J14a and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. Appl. Environ. Microbiol., 1998, 64: 3368-3375
- [14] 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,2005,42(2):323-327
- [15] Clay SA, Koskinen WC. Adsorption and desorption of atrazine, hydroxyatrazine, and S-glutathione atrazine on two soils. Weed Sci., 1990, 38: 262-266
- [16] 陈文新.土壤和环境微生物学.北京:北京农业大学出版社,1989:24-25

Biodegradation of Atrazine in Soils by *Arthrobacter* sp. AG1

DAI Xian-zhu^{1,2}, JIANG Jian-dong¹, LI Rong¹, LI Shun-peng¹

(1 College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Key Laboratory for Microbiological Engineering
of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Nanjing 210095, China;

2 College of Resources and Environmental Sciences, Southwest University, the Experimental Center for Microbiology, Chongqing 400715, China)

Abstract: 1.5×10^6 CFU/dry soil atrazine-degrading strain *Arthrobacter* sp. AG1 was inoculated into three different types of soils (yellow-brown soil, fluvo-aquic soil and red soil) with atrazine (AT) at the concentration of 50 mg/kg. AT decreased to 1.5, 6.6 and 10 mg/kg. respectively in the three kinds of soils by AG1 after 10 days. AG1 degraded AT efficiently in these soils and the degrading efficiency was affected by soil characteristics. AG1 could still degrade AT in acid soil, even when soil pH was lower than the lowest pH for its growth. After removing AT in soils, AG1 could remain its degrading ability for long term even if soil water content was adjusted to 5% and 15%. After 60 days, AG1 inoculated before could still degrade over 65% of the 50 mg/kg AT which was added to yellow-brown soil and fluvo-aquic soil secondary. Low soil water content and pH value were not suitable for AG1 survival and pesticide-biodegradation in soil. Degradation was affected by soil water content, the feasible water content for AG1 to degrade AT efficiently should be above 20%. Degradation was also affected by inoculation volume, however, 10^5 to 10^7 CFU/g dry soil inoculation volume could degrade AT efficiency.

Key words: Atrazine, Bioremediation of soil, Degradation, Soil characteristics