

DOI: 10.11918/j.issn.0367-6234.201612088

阿特拉津降解菌 *Pseudomonas* sp. ZXY-1 的 分离鉴定及降解动力学

赵昕悦^{1,2}, 马放^{1,2}, 杨基先^{1,2}, 王立^{1,2}

(1.哈尔滨工业大学 环境学院, 哈尔滨 150090; 2.城市水资源与水环境国家重点实验室(哈尔滨工业大学), 哈尔滨 150090)

摘要: 为深化微生物修复技术在阿特拉津降解中的应用, 从受农药污染的土壤中分离出一株高效阿特拉津降解菌株 ZXY-1. 经鉴定(形态特征、生理生化特征、16s rRNA 序列分析) ZXY-1 为假单胞菌属(*Pseudomonas*). 研究表明, ZXY-1 在 11 h 内可完全降解初始质量浓度为 100 mg/L 的阿特拉津, 降解效率为 9.09 mg/(L·h). 同时, 实验得到 ZXY-1 的最适生长条件分别为温度 30 ℃、pH 8.0、摇床转速 150 r/min、接种量 3%. 在最适生长条件下, 阿特拉津初始质量浓度 20~80 mg/L 内, 菌株 ZXY-1 的降解符合一级动力学方程; 在 100~250 mg/L 内, 菌株 ZXY-1 的降解符合零级动力学方程. 随着初始阿特拉津质量浓度的升高, 菌株 ZXY-1 的生长受到抑制作用, 在降解过程中菌株细胞的生长符合 Haldane 生长抑制模型, 其相关动力学参数为 $\mu_{\max} = 0.696 \text{ h}^{-1}$, $K_s = 98.55 \text{ mg/L}$, $K_i = 142.6 \text{ mg/L}$. 本研究菌株可为含有阿特拉津工农业废水的生物修复提供可行性选择.

关键词: 阿特拉津; 细菌; 分离鉴定; 降解特性; 动力学

中图分类号: X592

文献标志码: A

文章编号: 0367-6234(2018)02-0082-07

Isolation of an atrazine-degrading bacterium (*Pseudomonas* sp. ZXY-1) and its biodegradation and kinetic studies

ZHAO Xinyue^{1,2}, MA Fang^{1,2}, YANG Jixian^{1,2}, WANG Li^{1,2}

(1.School of Environment, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China;

2.State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment(Harbin Institute of Technology), Harbin 150090, China)

Abstract: A new atrazine-degrading strain named ZXY-1 was isolated in the present study. ZXY-1 was identified as *Pseudomonas* based on the physio-biochemical characteristics and 16s rRNA gene sequence analysis. The newly isolated strain had a strong ability to biodegrade atrazine of 100 mg/L completely within 11 h, with a degrading rate up to 9.09 mg/(L·h). The optimal conditions for atrazine degradation were captured: temperature 30 ℃, pH 8.0, velocity of shaker 150 r/min and inoculums 3%. Atrazine biodegradation, under the optimum conditions, fitted the first-order kinetic equation when the initial atrazine concentration ranged from 20 mg/L to 80 mg/L, and the zero-order kinetic equation when the initial atrazine concentration ranged from 100 mg/L to 250 mg/L. The kinetic analysis indicated that the strain ZXY-1 cell growth perfectly suited Haldane model with $\mu_{\max}$, K_s and K_i of 0.696 h⁻¹, 98.55 and 142.6 mg/L, respectively. Overall, this study provided an efficient bacterium and approach that might serve as a viable bioremediation solution to treat the atrazine wastewater.

Keywords: atrazine; bacterium; isolation and identification; biodegradation characteristic; kinetic

中国作为农业大国, 农药的施用量逐年增加. 近年来, 因不合理使用及其难生化降解特性, 农药常伴随着地表径流、干沉降和湿沉降等途径进入地表水和地下水, 造成严重污染. 阿特拉津(2-氯-4-乙胺基-6-异丙胺基-1,3,5-三嗪)是一种人工合成的

化学除草剂, 广泛应用于世界范围内, 并严重危害自然界动植物的安全^[1-4]. 在污水处理领域, 如何高效降解阿特拉津是当前的热点问题. 微生物修复技术因其成本低、不产生二次污染等特点已成为降解阿特拉津的重要技术之一. 自 20 世纪 80 年代以来, 至少存在 19 个属的微生物被证明具有降解阿特拉津的能力, 包括节杆菌属、红球菌属、不动杆菌属、假单胞菌属、根瘤菌属、诺卡氏菌属等^[5-9]. 然而, 截至目前, 能够高效降解阿特拉津的菌种资源非常有限. 例如, Pooja Bhardwaja 等^[10]分离出的假单胞菌属 EGD-AKN5 能够将阿特拉津完全降解为二氧化碳, 但其降解速率较低, 难以进一步推广至实际应用. 因

收稿日期: 2016-12-20

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFC0401105);
水体污染控制与治理科技重大专项(2012ZX07201003)

作者简介: 赵昕悦(1990—), 女, 博士研究生;
马放(1963—), 男, 教授, 博士生导师;
杨基先(1964—), 男, 教授, 博士生导师

通信作者: 杨基先, yangxj@hit.edu.cn;
王立, wli@hit.edu.cn

此,为了将微生物修复技术应用于含有阿特拉津的废水处理中,有必要分离出具有高效降解能力的阿特拉津降解菌株,并对其降解特性加以研究.

本研究从长期受污染的吉林化工厂的土壤中分离得到一株高效的阿特拉津降解菌株,并对其进行鉴定.同时,研究了菌株在不同环境条件下的生长特性以及对阿特拉津的降解情况,并建立动力学模型用以表征菌株的生长和降解阿特拉津的能力,以期为微生物强化修复含有阿特拉津工农业废水的实际应用提供理论依据.

1 实 验

1.1 细菌的分离与培养

取吉林化工厂受污染土壤样品 10 g 加入至 100 mL 含有 100 mg/L 阿特拉津的无机盐培养基三角瓶中,在培养温度为 30 ℃、pH 7.0、摇床转速为 150 r/min 条件下摇床培养 7 d,获得富集菌液.再取 10 mL 富集菌液加入至 100 mL 含有 100 mg/L 阿特拉津的无机盐培养基三角瓶中,重复此步骤 3 次.将富集后的菌液进行平板涂布,恒温培养箱培养 3 d 后获得单菌落.挑取如上单菌落进行平板三区划线,重复此步骤 3 次直至平板上出现形态大小相同的单菌落,其后将纯菌接入斜面培养基培养 3 d,4 ℃ 保存.

其中,无机盐培养基为:0.9 g KH_2PO_4 , 6.5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 3 g 蔗糖, 0.2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 阿特拉津(固体阿特拉津溶解于甲醇溶液中制成阿特拉津甲醇储备液)以及 1 mL 微量元素液溶于 1 000 mL 蒸馏水中.无机盐固体培养基/斜面培养基是在无机盐的成分中另加入琼脂 18 g/L.

微量元素液为:0.1 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.425 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g ZnCl_2 , 0.01 g $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.015 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g $\text{Na}_2\text{SeO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶于 1 000 mL 蒸馏水中.

1.2 菌株的鉴定

将菌体于 50 μL TaKaRa Lysis Buffer 中离心后取上清作为模板,使用 TaKaRa 16S rDNA 试剂盒进行 PCR 扩增目的片段. PCR 反应条件为:94 ℃ 预变性 5 min,再经 30 个循环的 94 ℃ 变性 1 min,55 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1.5 min,而后再经过 72 ℃ 延伸 5 min.使用 TaKaRa MiniBEST 试剂盒切胶回收目的片段进行 DNA 测序.将测序结果采用 Blast 程序提交至 GenBank 与已知细菌序列进行比对,使用 ClustalX 及 Mega 软件进行系统发育树的绘制.最后将筛选菌株序列提交至 NCBI 数据库并保藏菌株.

对分离到的 ZXY-1 降解菌进行革兰氏染色,并根据伯杰氏细菌鉴定手册(第八版)进行常规生理生化实验^[11].

1.3 菌株降解特性研究

将菌体细胞接种至新鲜的液体培养基中(所用培养基为 1.1 所述培养基,培养至菌体浓度为 10^8 CFU/mL),分别考察菌株在不同的温度(5、10、15、20、25、30、35、40 ℃)、pH(4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0)、摇床转速(0、50、100、150、200 r/min)以及接种量(1%、3%、5%、7%)(体积分数)环境下的生长特性以及降解特性,并确定最佳的生长及降解条件.单一变量改变的同时,固定温度 25 ℃、pH 8.0、摇床转速 150 r/min、接种量 5%,初始阿特拉津质量浓度 100 mg/L 保持不变.9 h 后取样,以不同温度、pH、摇床转速以及接种量为横坐标,以阿特拉津降解率及细菌 OD₆₀₀为纵坐标绘图分析.

1.4 动力学研究

改变初始阿特拉津质量浓度(20、50、80、100、120、150、200、250、300、350、400、450、500 mg/L),在温度 30 ℃、pH 8.0、摇床转速 150 r/min、接种量 3%条件下培养菌株 ZXY-1.每隔 1 h 取样待测菌液的 OD₆₀₀值及阿特拉津质量浓度,研究菌株 ZXY-1 在不同初始质量浓度范围内的生长特性及降解阿特拉津特性.

在研究菌株 ZXY-1 降解时,常利用一级动力学方程进行数据拟合.即

$$\rho = \rho_0 e^{kt}. \quad (1)$$

对式两边同时取自然对数得

$$\ln \rho = \ln \rho_0 + kt. \quad (2)$$

式中: k 为一级动力学速率常数(h^{-1}), ρ 为 $t(\text{h})$ 时刻的质量浓度(mg/L), ρ_0 为初始质量浓度(mg/L),一级动力学半衰期为 $t_{1/2} = \ln 2/k$.

同时,利用零级动力学方程进行数据拟合,即

$$\rho = -kt + \rho_0. \quad (3)$$

式中: k 为零级动力学速率常数(h^{-1}), ρ 为 $t(\text{h})$ 时刻的质量浓度(mg/L), ρ_0 为初始质量浓度(mg/L).

在好氧条件下,微生物生长动力学涉及底物的分解及微生物生物量的增长,采用式(4)计算菌株 ZXY-1 对数生长期的比生长速率(μ),并通过 Haldane 生长抑制模型(5)进行拟合,即

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}. \quad (4)$$

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S + S^2/K_i}. \quad (5)$$

式中: μ 为比生长速率(h^{-1}), X 为细胞质量浓度(mg/L), $\mu_{\max}$ 为最大比生长速率(h^{-1}), S 为底物质量浓度(mg/L), K_s 为底物半饱和系数(mg/L), K_i 为

底物抑制系数(mg/L).

对式(5)求导,并令该方程的一阶导数为零,可得

$$V=\frac{V_{\max }}{1+2 \sqrt{K_s / K_i}} .$$

(6)

此外,得到菌株达到最大比降解速率时对应的阿特拉津质量浓度,即

$$S_{\max }=\sqrt{K_s K_i} .$$

(7)

1.5 测试及分析方法

阿特拉津的测定:以二氯甲烷作为萃取剂,通过液液萃取的方法萃取出样品中的阿特拉津,随后将样品进行 10 000g 离心 10 min,再经 0.22 μm 滤膜过滤.利用高效液相色谱法测定阿特拉津的质量浓度,色谱条件为:C18 柱,流动相为 V(乙腈):V(水)=6:4,检测波长为 220 nm,柱温 30 ℃,流速1 mL/min,进样量 20 μL.

菌体 OD₆₀₀值的测定:菌液 OD₆₀₀值为测定值与空白对照值的差值(以未接种菌液的选择性培养基 OD₆₀₀值作为空白对照值).同时,本实验将菌液离心后收集菌体,再与等量的无菌水混合后重悬菌体测定 OD₆₀₀值.

菌体细胞质量浓度的测定:将不同时期生长的

菌液离心(10 000g, 5 min),弃上清液获得菌体并干燥称重,建立细胞质量浓度 X 与 OD₆₀₀的线性关系: X=178.25×OD₆₀₀(mg/L).

2 结果与讨论

2.1 菌株 ZXY-1 的分离及鉴定

从吉林化工厂受污染土壤样品中分离出多株阿特拉津降解菌,其中,菌株 ZXY-1 能够在 11 h 内完全降解初始质量浓度 100 mg/L 的阿特拉津,因此,将具有高效降解能力的菌株 ZXY-1 作为实验菌株.

菌株 ZXY-1 生理生化特性如表 1 所示,其为好氧革兰氏阴性杆菌,结合氧化酶等生化实验,初步判定该菌株属于假单胞菌属.如图 1 所示,基于 16s rRNA序列及系统发育树可知,菌株 ZXY-1 与 *Pseudomonas* sp.具有相似亲缘关系.因此,结合生理生化分析结果,菌株 ZXY-1 归为 *Pseudomonas*.菌株 *Pseudomonas* sp. ZXY-1 已在 GenBank 中获得登录序列号为 KT778823,且菌株已在“中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心”保藏,保藏编号为 CGMCC No.10936.

表 1 菌株 ZXY-1 生理生化特性

Tab.1 Physio-biochemical characteristics of strain ZXY-1

测定项目	结果	测定项目	结果
菌株形状	杆状	亚硝酸盐还原	+
菌落形态	边缘整齐,表面光滑	反硝化	+
运动性	-	甲基红	+
有无鞭毛	-	纤维素分解	-
革兰氏染色	-	淀粉水解	-
接触酶	+	明胶液化	+
V.P 反应	-	氧化酶反应	+
葡萄糖氧化发酵	-	产芽孢	-
硝酸盐还原	+	吡啉反应	-

注: + 阳性; - 阴性

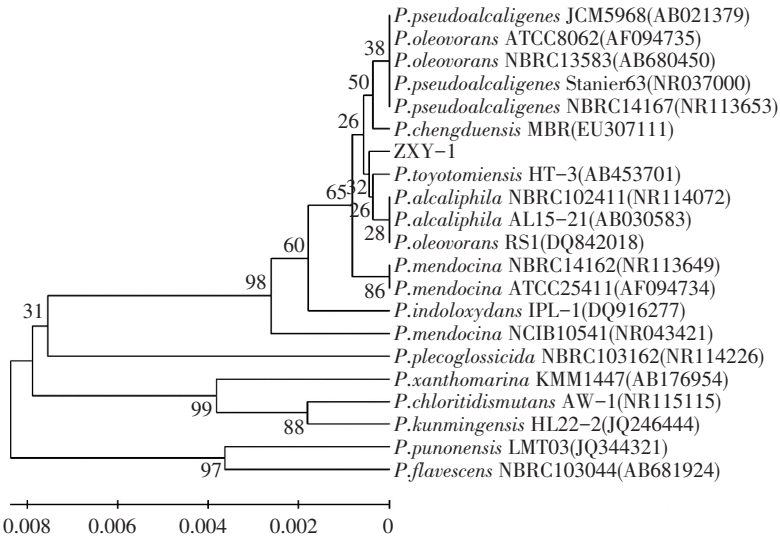


图 1 ZXY-1 系统发育树

Fig.1 Pylogenetic tree of strain ZXY-1

如表2所示,菌株ZXY-1在30℃、pH 7.0、摇床转速150 r/min、接种量5%的生长环境下降解效率为9.09 mg/(L·h).在相同的生长环境下,菌株ADP需要24 h才能完全降解初始质量浓度100 mg/L的阿特拉津,降解效率为4.17 mg/(L·h)^[5].而菌株DAT1只能在48 h后实现初始质量浓度100 mg/L的阿特拉津的完全降解,降解效率仅为2.08 mg/(L·h)^[12].由此可见,菌株ZXY-1具有高效降解阿特拉津的能力.

表2 阿特拉津降解菌株降解效率比较
Tab.2 Comparison of degradation efficiency of atrazine-degrading microorganisms

菌株	$\rho_{\text{初始}}/$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	时间/ h	降解率/ %	降解效率/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	文献
ADP	100	24	100.0	4.17	[5]
N186/21	55	48	100.0	1.15	[13]
J14a	50	72	94.0	0.65	[14]
AD1	300	48	100.0	6.25	[2]
AD26	300	72	95.0	3.96	[15]
HB-5	100	18	100.0	5.56	[16]
AG1	1 000	44	100.0	22.73	[17]
DNS10	100	24	100.0	4.17	[18]
DAT1	100	48	100.0	2.08	[12]
HB-6	200	24	90.0	7.50	[9]
EGD-AKN5	100	87	98.3	1.88	[10]
ZXY-1	100	11	100.0	9.09	本研究

2.2 不同条件下菌株ZXY-1的生长与底物的降解
将10⁸ CFU/mL的菌液作为接种初始质量浓

度,优化菌株ZXY-1的生长及降解条件,同时,研究菌株ZXY-1在不同温度、pH、摇床转速、接种量条件下的生长特性以及菌株对阿特拉津的降解特性.

温度是影响微生物新陈代谢最重要的因素,每种微生物都有其各自的最适生长温度范围,超过最适生长温度范围会使微生物的生长受到抑制作用^[19].如图2(a)所示,随着生长温度由5℃增加至30℃,菌株ZXY-1对阿特拉津的降解率由19.2%增加至100%,菌株的生长OD₆₀₀值由0.11增加至0.72.再随着温度由30℃升高至40℃,阿特拉津降解率及生长OD₆₀₀值均逐渐降低.因此,菌株ZXY-1最适生长温度为30℃.

pH是影响微生物生长及物质降解的一个重要参数,过高或过低的pH都可能严重影响微生物对营养物质的运输和吸收^[20].如图2(b)所示,阿特拉津降解率及菌株生长OD₆₀₀值随着pH的增加呈现先升高再降低的趋势.在初始pH为5~9内,菌株ZXY-1均能够在12 h内降解70%以上的阿特拉津,说明在偏酸性及偏碱性的环境条件下,菌株有较强的耐酸及耐碱能力.当初始pH为8.0时,阿特拉津的降解率为95.8%,OD₆₀₀值为0.71,为最佳生长pH.即在pH 8.0的环境下既有利于菌株ZXY-1降解阿特拉津,又有利于菌株ZXY-1自身生长.

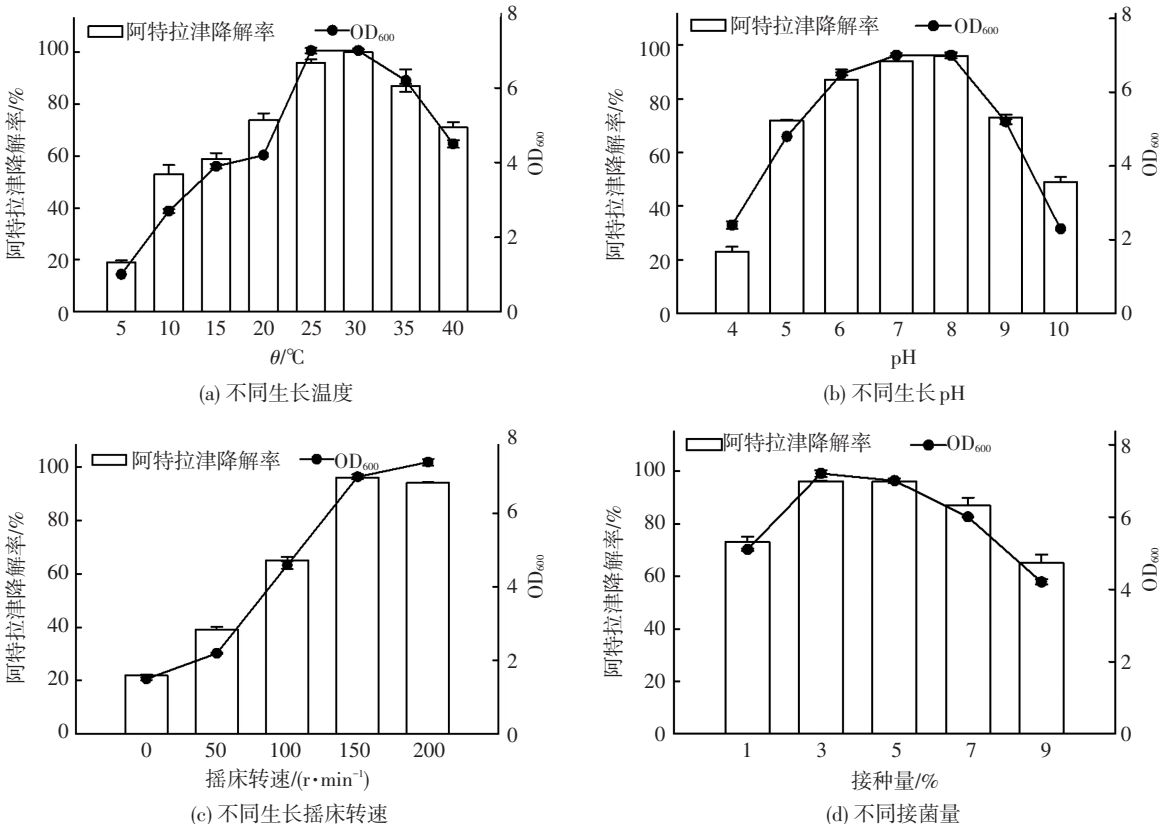


图2 不同生长条件对ZXY-1生长及ZXY-1降解阿特拉津的影响

Fig.2 Different effects on the growth of strain ZXY-1 and atrazine degradation

如图 2(c) 所示,阿特拉津降解率及菌株生长 OD_{600} 值随着摇床转速的增加而增加.当摇床转速达 150 r/min 时,阿特拉津降解率最高,可达 96.4%. 其原因是 ZXY-1 为好氧细菌,不同的摇床转速会导致培养基内不同的溶解氧含量,摇床转速过低会导致培养基内溶解氧含量较低,摇床转速越高,培养基内溶解氧含量越高,但转速过高会减弱酶与阿特拉津接触的机会,从而影响菌株的生长代谢.当摇床转速达 150 r/min 时,培养基内的溶解氧质量浓度基本达到饱和状态,此时为最佳的菌株生长溶解氧质量浓度,再进一步加快转速也难以提高溶解氧质量浓度.因此,150 r/min 为最佳摇床转速.

如图 2(d) 所示,阿特拉津降解率及菌株生长 OD_{600} 值随着接种量的增加呈现先增大后降低的趋势.当接种量由 1% 增加至 3% 时,阿特拉津的降解及菌株的生长较为显著,其降解率及 OD_{600} 值分别由 73.2% 增加至 96.4%, 0.51 增加至 0.72. 然而,随着接种量增加至 5% 后,再继续增加接种量会导致阿特拉津降解率及细胞生长能力的降低.其原因是过量的菌体加入培养基后,菌体之间相互竞争有限的阿特拉津,从而导致菌体生长缓慢,生物量降低,菌体降解阿特拉津能力也随之减弱.因此,在接种量 1%~9% 范围内,3% 为最适比例接种量.

综上,通过研究不同条件下菌株的生长以及底物的降解,得到最优的单因素条件为温度 30 ℃、pH 8.0、摇床转速 150 r/min、接种量 3%. 在此条件下,菌株 ZXY-1 能够在 9 h 内降解 96.4% 的阿特拉津,其降解效率为 11.1 mg/(L·h).

2.3 不同初始质量浓度对菌株 ZXY-1 生长以及降解的影响

不同的初始质量浓度会影响微生物的活性,高质量浓度的污染物可能会抑制微生物的生长,也有可能刺激微生物自身的繁殖^[21]. 因此,在最优的单因素生长条件下,即温度 30 ℃、pH 8.0、摇床转速 150 r/min、接种量 3%,考察菌株 ZXY-1 在不同阿特拉津初始质量浓度下对底物的降解能力以及菌株生长能力.

如图 3 所示,在阿特拉津初始质量浓度为 0~450 mg/L 时,菌株能够在不同的时间内完全降解阿特拉津,但降解速率却各不相同.在阿特拉津质量浓度为 20 mg/L 时,5 h 内阿特拉津能够完全被降解,并且没有延滞期的出现.当阿特拉津初始质量浓度为 300 mg/L 时,底物的降解受到明显的抑制,出现了 5 h 的延滞期,要达到完全降解需要延长降解时间至 15 h.当阿特拉津初始质量浓度为 500 mg/L 时,降解延滞期约为 10 h,且在 25 h 内不能将阿特

拉津完全降解.因此,高质量浓度的阿特拉津会导致菌株降解阿特拉津延滞期的延长.

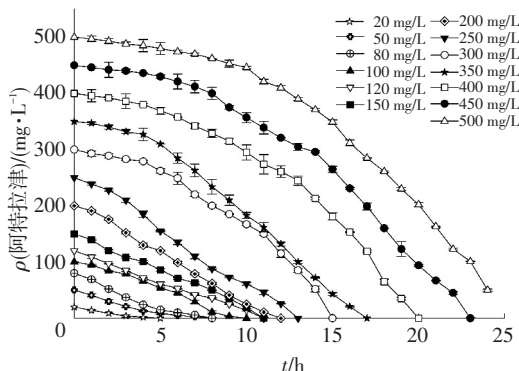


图 3 菌株在不同质量浓度下降解图

Fig.3 Time courses of the degradation of ZXY-1 at different initial atrazine concentrations

如图 4 所示,随着阿特拉津初始质量浓度的不断提高,菌体浓度也不断增加,由初始质量浓度 20 mg/L 时 OD_{600} 值 0.06 增加至初始质量浓度 500 mg/L 时 OD_{600} 值 1.12. 其原因是菌株随着时间通过利用阿特拉津自身繁殖,从而使生物量增加,并保持较高的生长代谢活性.菌株经过不同时间的延滞期后,能够较快地进入对数生长期.然而,细胞生长的延滞期随着初始阿特拉津质量浓度的增加而相应地延长.当初始阿特拉津为 50 mg/L 时,延滞期小于 1 h,随着阿特拉津的质量浓度增加到 400 mg/L,延滞期延长为 5 h,这表明高质量浓度的阿特拉津会抑制菌体细胞的生长,导致菌株生长缓慢.

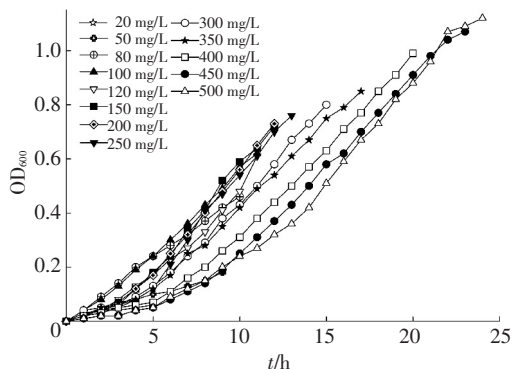


图 4 菌株在不同质量浓度下生长图

Fig.4 Time courses of the growth of ZXY-1 at different initial atrazine concentrations

2.4 菌株 ZXY-1 降解阿特拉津的动力学研究

建立动力学模型对表征菌株的降解能力、理论研究和实际应用都有重要的指导意义.根据不同初始质量浓度下菌株 ZXY-1 的生长以及降解情况研究菌株降解阿特拉津的动力学性能.

如表 3 所示,当阿特拉津初始质量浓度低于 80 mg/L 时,阿特拉津的生物降解过程符合一级动力学方程.此时,阿特拉津比降解速率与阿特拉津质量浓度呈正相关,阿特拉津的质量浓度成为影响菌

株比降解速率的限制因子.在初始阿特拉津质量浓度为 20、50、80 mg/L 时,半衰期分别为 1.12、1.54、1.58 h,降解速率常数分别为 0.617、0.451、0.438 h⁻¹.然而, Siripattanakul 等^[22]研究阿特拉津降解菌株 MC1、MC2、MC3 及 J14a 在初始质量浓度 0.1 mg/L 下的一级降解动力学,4 株细菌的降解速率常数为 0.11、0.10、0.06 及 0.08 h⁻¹,其降解速率常数值远小于 ZXY-1 在低质量浓度下降解阿特拉津的速率常数.Marion Devers 等^[23]研究菌株 *Pseudomonas* sp. ADP 及菌株 *Chelatobacter heintzii* 在初始质量浓度 15 mg/L 下的一级动力学降解速率常数分别为 0.052 7 和 0.021 9 h⁻¹,而在初始质量浓度 60 mg/L 下的一级动力学降解速率常数分别为 0.012 8 和 0.007 9 h⁻¹,其数值也远小于 ZXY-1.

另如表 3 所示,当阿特拉津初始质量浓度在 100~250 mg/L 时,菌株的生物降解过程可用零级动力学模型进行拟合,此时的降解速率与底物质量浓度无关,阿特拉津的质量浓度已不是菌株降解的限制因子.在初始阿特拉津质量浓度为 100、120、150、200、250 mg/L 时,菌株降解半衰期分别为 6.15、6.24、6.37、6.30、6.99 h.然而,刘娜等^[24]研究了阿特拉津降解菌株 W4 在初始阿特拉津质量浓度为 33、22 和 10 mg/L 时,阿特拉津的降解符合零级降解动力学方程,其半衰期延长至 2.2、2.0 和 2.3 d.当初始阿特拉津质量浓度高于 250 mg/L 时,*R*²也明显下降,菌株 ZXY-1 的降解基本不再符合零级动力学方程.

表 3 菌株在阿特拉津初始质量浓度小于 250 mg/L 内的降解动力学方程

Tab.3 Degradation kinetics equation of ZXY - 1 at different initial atrazine concentrations (<250 mg/L)

$\rho/$ (mg · L ⁻¹)	拟合方程	降解速率 常数/h ⁻¹	$t_{1/2}/$ h	R^2
20	$\ln \rho = -0.617t + 3.814$	0.617	1.12	0.983
50	$\ln \rho = -0.451t + 4.679$	0.451	1.54	0.983
80	$\ln \rho = -0.438t + 5.200$	0.438	1.58	0.979
100	$\rho = -9.19t + 113$	9.190	6.15	0.993
120	$\rho = -10.09t + 126$	10.090	6.24	0.994
150	$\rho = -12.72t + 162$	12.720	6.37	0.996
200	$\rho = -17.65t + 222.5$	17.650	6.30	0.996
250	$\rho = -19.91t + 278.3$	19.910	6.99	0.992

采用 Haldane 生长抑制模型模拟菌株在不同初始阿特拉津质量浓度下的生长动力学过程,通过 Matlab 2015b 软件利用非线性最小二乘法对实验数据进行拟合,拟合结果如图 5 所示.菌株降解阿特拉津过程中的细胞生长动力学参数为: $\mu_{\max} = 0.696 \text{ h}^{-1}$, $K_s = 98.55 \text{ mg/L}$, $K_i = 142.6 \text{ mg/L}$.因此,菌株生长动力学方程为

$$\mu = \frac{0.696S}{98.55 + S + S^2/142.6}$$

式中 $\mu_{\max}$ 为 0.696 h⁻¹, $\mu_{\max}$ 值越高,菌株降解阿特拉津能力越强.Marion Devers 等^[25]研究了 *Pseudomonas* sp. ADP 在 28 ℃、pH 为 6.6 的生长环境下最大比生长速率为 0.035 h⁻¹,因此,可以进一步证明菌株 ZXY-1 的高效降解阿特拉津能力.

另根据式(7)可求得 $S_m = 118.5 \text{ mg/L}$,即达到最大比降解速率时,最大底物质量浓度为 118.5 mg/L,此质量浓度为菌株 ZXY-1 降解阿特拉津的最佳质量浓度.当阿特拉津质量浓度小于 118 mg/L 时,菌株对阿特拉津的比降解速率随着阿特拉津质量浓度的增加而升高;当阿特拉津质量浓度大于 118 mg/L 时,菌株对阿特拉津的比降解速率随着阿特拉津质量浓度的增加而降低,呈现底物抑制生长模式.若考虑实际应用,因实际工农业污水中的阿特拉津质量浓度为 $\mu\text{g/L}$ 数量级,在水体环境中,阿特拉津的生物降解会按照一级反应动力学模式进行,较高质量浓度阿特拉津对菌株的生长和降解的影响可以忽略.因此,菌株 ZXY-1 能够为含有阿特拉津工农业废水的生物修复提供可行性选择.

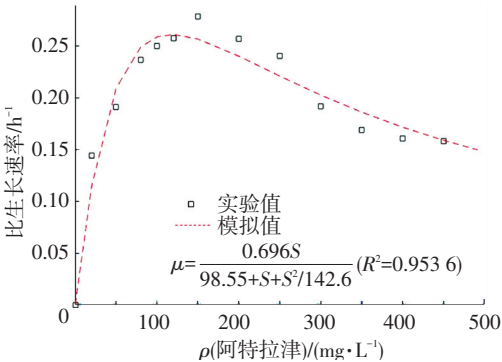


图 5 菌株在不同质量浓度下比生长速率

Fig.5 Specific growth rate of ZXY - 1 at different atrazine concentrations

3 结 论

1)从吉林化工厂土壤样品中分离出一株高效阿特拉津降解菌 ZXY-1,综合菌体形态特征、生理生化分析及 16s rDNA 分子鉴定结果,确定菌株属于 *Pseudomonas* sp.

2)菌株 ZXY-1 生长以及菌株 ZXY-1 降解阿特拉津的最优条件为温度 30 ℃、pH 8.0、摇床转速 150 r/min、接种量 3%.在最佳条件下,菌株 ZXY-1 能够高效降解阿特拉津,其降解效率可达 11.1 mg/(L · h).

3)降解动力学分析表明在低质量浓度阿特拉津范围内(<80 mg/L),降解过程符合一级降解动力学模型;在阿特拉津质量浓度为 100~250 mg/L 内,降解过程符合零级降解动力学模型.过高的阿特拉津质量浓度能够抑制菌株 ZXY-1 的细胞生长,

Haldane 生长抑制模型能够较好地拟合菌株以阿特拉津为单一底物的生长动力学性能,其相关动力学参数为 $\mu_{\max} = 0.696 \text{ h}^{-1}$, $K_s = 98.55 \text{ mg/L}$, $K_i = 142.6 \text{ mg/L}$ ($R^2 = 0.9536$).

参考文献

- [1] SU Junfeng, ZHENG Shengchen, HUANG Tinglin, et al. Characterization of the anaerobic denitrification bacterium *Acinetobacter* sp. SZ28 and its application for groundwater treatment [J]. *Bioresour Technol*, 2015, 192: 654–659.
- [2] CAI B, HAN Y, LIU B, et al. Isolation and characterization of an atrazine-degrading bacterium from industrial wastewater in China [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2003, 36 (5): 272–276.
- [3] VANRAES P, WILLEMS G, NIKIFOROV A, et al. Removal of atrazine in water by combination of activated carbon and dielectric barrier discharge [J]. *J Hazard Mater*, 2015, 299: 647–655.
- [4] 郭火生, 王志刚, 孟冬芳, 等. 阿特拉津降解菌株 DNS32 的降解特性及分类鉴定与降解途径研究 [J]. *微生物学通报*, 2012, 39 (9): 1234–1241.
GUO Huosheng, WANG Zhigang, MENG Dongfang, et al. Degradation characteristics and identification and the degradation pathway of the atrazine-degrading strain DNS32 [J]. *Microbiology China*, 2012, 39(9): 1234–1241.
- [5] MANDELBAUM R T, ALLAN D L, WACKETT L P. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61 (4): 1451–1457.
- [6] 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.
- [7] FAZLURRAHMA N, BATRA M, PANDEY J, et al. Isolation and characterization of an atrazine-degrading *Rhodococcus* sp. strain MB-P1 from contaminated soil [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2009, 49 (6): 721–729.
- [8] EL S T, MARION D L, FREDERIQUE C, et al. Evidence of atrazine mineralization in a soil from the Nile Delta: Isolation of *Arthrobacter* sp. TES6, an atrazine-degrading strain [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2011, 65 (8): 1249–1255.
- [9] WANG Jinhua, ZHU Lusheng, WANG Qi, et al. Isolation and characterization of atrazine mineralizing *Bacillus subtilis* strain HB-6 [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (9): e107270.
- [10] BHARDWAJ P, SHARMA A, SAGARKAR S, et al. Mapping atrazine and phenol degradation genes in *Pseudomonas* sp. EGD-AKN5 [J]. *Biochem Eng J*, 2015, 102: 125–134.
- [11] DONG X, CAI M. Identification manual of common bacteria system [M]. Beijing: Science Press, 2001.
- [12] WANG Qingfeng, XIE Shuguang. Isolation and characterization of a high-efficiency soil atrazine-degrading *Arthrobacter* sp. strain [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2012, 71: 61–65.
- [13] NAGY I, COMPERNOLLE F, GHYS K, et al. A single cytochrome P-450 system is involved in degradation of the herbicides EPTC (S-ethyl dipropylthiocarbamate) and atrazine by *Rhodococcus* sp. strain N186/21 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61 (5): 2056–2060.
- [14] 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.
- [15] LI Qingyan, LI Ying, ZHU Xikun, et al. Isolation and characterization of atrazine-degrading *Arthrobacter* sp. AD26 and use of this strain in bioremediation of contaminated soil [J]. *J Environ Sci (China)*, 2008, 20 (10): 1226–1230.
- [16] WANG Jinhua, ZHU Lusheng, LIU Aiju, et al. Isolation and characterization of an *Arthrobacter* sp. strain HB-5 that transforms atrazine [J]. *Environ Geochem Health*, 2011, 33 (3): 259–266.
- [17] 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 Xianzhu, HU Jiang, JIANG Jiandong, et al. Isolation and identification of in situ atrazine-degrading bacteria from contaminated soils [J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2006, 43(3): 467–472.
- [18] ZHANG Ying, JIANG Zhao, CAO Bo, 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.
- [19] 陈佳亮, 刘晓文, 张雅静, 等. 耐性细菌的分离鉴定及重金属污染修复初步研究 [J]. *生态环境学报*, 2014, 23(7): 1199–1204.
CHEN Jialiang, LIU Xiaowen, ZHANG Yajing, et al. Isolation and identification of four tolerance bacteria and the preliminary study for pollution remediation of heavy metals [J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2014, 23(7): 1199–1204.
- [20] 郑菲菲, 胡江, 辛华东, 等. N-乙烯吡咯烷酮降解菌的筛选降解及其竹炭固定化 [J]. *化境工程学报*, 2016, 10(10): 5593–5599.
ZHENG Feifei, HU Jiang, XIN Huadong, et al. Isolation and degradation characteristics of a N-vinylpyrrolidone degrading strain ZF1 and its immobilization on bamboo-based carbon [J]. *Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control*, 2016, 10(10): 5593–5599.
- [21] 辛蕴甜. 石油降解菌的降解性能, 固定化及降解动力学研究 [D]. 上海: 东华大学, 2013.
XIN Yuntian. Study on degradation property, immobilization and degradation kinetics of oil degrading bacteria [D]. Shanghai: Donghua University, 2013.
- [22] SIRIPATTANAKUL S, WIROJANAGUD W, MCEVOY J, et al. Atrazine degradation by stable mixed cultures enriched from agricultural soil and their characterization [J]. *J Appl Microbiol*, 2009, 106 (3): 986–992.
- [23] DEVERS M, SOULAS G, FABRICE M L. Real-time reverse transcription PCR analysis of expression of atrazine catabolism genes in two bacterial strains isolated from soil [J]. *J Microbiol Methods*, 2004, 56 (1): 3–15.
- [24] 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, 39(5): 893–898.
LIU Na, BI Haitao, REN Hejun, et al. Isolation of atrazine degrading low temperature bacteria and researching of atrazine biodegradation [J]. *Journal of Jilin University*, 2009, 39(5): 893–898.
- [25] DEVERS M, ROUARD N, FABRICE M L. Fitness drift of an atrazine-degrading population under atrazine selection pressure [J]. *Environ Microbiol*, 2008, 10 (3): 676–684.