

阿特拉津降解菌节杆菌菌株 TW-1 的分离及其在大豆中的初步应用分析

吴占文¹, 王帅¹, 魏莹¹, 赵健淞¹, 孙冬梅^{1,2*}

(1. 黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院 / 黑龙江省寒区环境微生物与农业废弃物资源化利用重点实验室, 黑龙江 大庆, 163000; 2. 农业农村部东北平原农业绿色低碳重点实验室, 黑龙江 大庆, 163000)

摘要:为缓解药害,通过选择培养基富集培养,从黑龙江省安达市农田中分离出一株以阿特拉津为唯一氮源生长的降解菌 TW-1,经鉴定该菌株为节杆菌属(*Arthrobacter* sp.)。菌株 TW-1 对培养基中 100 mg/L 的阿特拉津降解率在 48 h 内可达到 99.5%。盆栽实验结果表明,菌株 TW-1 可使大豆植株的叶绿素含量提高,并且可增加过氧化氢酶与过氧化物酶含量,有效缓解大豆植株的阿特拉津药害,具有良好的应用潜力。

关键词:大豆;阿特拉津;降解菌;节杆菌

中图分类号:S482.4;S565.1

文献标识码:A

文章编号:1007-9084(2023)01-0183-08

Isolation of atrazine degrading *Arthrobacter* TW-1 and its preliminary application in soybean

WU Zhan-wen¹, WANG Shuai¹, WEI Ying¹, ZHAO Jian-song¹, SUN Dong-mei^{1,2*}

(1. College of Life Science and Technology of Heilongjiang Bayi Agricultural University / Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Environmental Microbiology and Recycling of Agro-Waste in Cold Region, Daqing 163000, China; 2. Key Laboratory of Low-Carbon Green Agriculture in Northeast China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Daqing 163000, China)

Abstract: To alleviate phytotoxicity, a degrading strain TW-1 (with atrazine as the sole nitrogen source) was isolated from farmland in Anda City, Heilongjiang Province by selective medium enrichment culture. It was identified as *Arthrobacter* sp. The degradation rate of 100 mg / L atrazine in the medium by strain TW-1 could reach 99.5% within 48 h. The results of pot experiment showed that strain TW-1 could increase the chlorophyll content of soybean plants, increase the contents of catalase and peroxidase, effectively alleviate the atrazine damage of soybean plants. It was considered to have a good application potential.

Key words: soybean; atrazine; degrading bacteria; *Arthrobacter*

阿特拉津(Atrazine)是一种内吸选择性苗前、苗后封闭除草剂,一般由植物根部吸收并向上传导,通过抑制杂草的光合作用使其枯死,可防除一年生禾本科杂草和阔叶杂草^[1,2],但也是目前生产上最易产生药害的除草剂种类之一^[3]。在我国,阿特拉津主要被应用于玉米田中的杂草防治,但由于其性质比较稳定,在土壤中残留期长达一年左右,且对下茬的豆科作物有明显的毒害作用,长期受到阿特拉津污染,土壤可持续性也会相应减弱^[4],且阿特拉津

在施用到土壤中后,很容易被雨水淋洗到土壤深层,对某些深根植物同样具有药害作用。该农药虽然成本低廉、除草高效,但同时也具有降解困难的问题,对人类具有潜在的“三致”危害^[5],即长期接触有机污染物存在导致人体致癌、致畸、致突变等方面的隐患,随着“三致”引起畸形和癌症患者增多,有机污染物的“三致”效应越来越受到人们的重视。另外,有研究人员指出,阿特拉津同样是一种能够干扰内分泌和致癌的物质,长期受到食物链富集产

收稿日期:2022-02-07

基金项目:中国科学院战略性先导科技专项项目(XDA28030203)

作者简介:吴占文(1998-),男,硕士研究生,研究方向为微生物学,E-mail: 706357199@qq.com

* 通讯作者:孙冬梅(1970-),女,教授,博士,硕士生导师,从事应用微生物研究,E-mail: sdmLzw@126.com

生的药害影响会危害人体正常的激素功能,导致先天缺陷、生殖肿瘤等一系列疾病,进而影响生态平衡^[6,7]。阿特拉津的缓慢积累会导致植株发育不良,甚至表型的改变。有研究表明,农药也可以通过干扰植物细胞膜类脂的形成,造成膜系统的损伤从而破坏细胞膜的完整性,植物体内过剩自由基的毒害会引发膜脂过氧化作用,致使植物死亡^[8]。为了防止这种情况的发生,植物体内进化出了抗氧化物系统清除自由基,减轻和阻断脂质过氧化作用,保护植物细胞膜质膜免受损伤^[9],达到减轻作物药害的作用。

大豆是我国主要的油料作物之一,是世界上最重要的豆类作物^[10],全国各地均有种植,但以东北地区,尤其黑龙江省大豆种植面积最广,产量最高。而大豆玉米轮作是东北地区重要的耕作措施。轮作可以提高作物产量、维持土壤养分、降低水土流失^[11],但轮作期间的农药不合理施用会影响下茬作物的生长,例如,玉米地在施用阿特拉津后,就会对下茬豆科作物产生严重的药害作用。陈乐^[12]等人的研究表明,当土壤中的阿特拉津含量为 500 g/hm²时,30 d 内大豆幼苗的生长就会产生抑制现象,直至枯死。所以,在我国东北地区,如何有效降低或者去除玉米地中阿特拉津的残留是一个重要的科学问题。

国内外研究表明^[13],阿特拉津可以通过物理法、化学法和生物法等进行降解,而生物法是目前对环境最为友好的去除阿特拉津的方法^[14]。目前的研究发现细菌、真菌、放线菌和藻类中均有能降解阿特拉津的菌株^[15],已发现或构建的阿特拉津降解细菌至少有 19 个属^[16-21]。尽管在降解阿特拉津及修复土壤环境方面的研究已经有了成熟的体系,但不同地区土壤中阿特拉津降解的特质并不完全相同^[22],所以,需要发现和研究不同的菌株来满足不同地区的需要。孙瑞莲^[23]探究阿特拉津与化肥的复合污染及阿特拉津在不同肥力土壤中的降解情况,研究成果为作物合理施肥施药、减少环境污染提供了理论依据。Newcombe^[24]对阿特拉津降解菌反复施用于不同类型土壤做了相关研究,研究成果有助于解决菌株活性下降问题。

本试验从黑龙江省安达市常年施用阿特拉津的农田采集土样,分离出一株对阿特拉津具有高效降解作用的优势菌株,并利用大豆植株来检测降解菌株在阿特拉津污染土壤中的实际应用效果。本

研究结果将为丰富阿特拉津降解菌的菌种资源,修复受阿特拉津影响的土壤环境提供候补菌株及理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

含有阿特拉津的土壤取自黑龙江省安达市农田(东经 124°53'~125°55',北纬 46°01'~47°01')。试验所需土壤采用五点取样法,将农田 5~10 cm 土层处取得的土样混匀,作为试验土壤。阿特拉津原药购于内蒙古灵圣作物科技有限公司。

改良 SMS 培养基: K₂HPO₄ 0.5 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.2 g/L, NaCl 0.1 g/L, D-葡萄糖 2 g/L, 阿特拉津母液 10 mL(100 mL 蒸馏水, 5 g 阿特拉津, 1 mL 吐温 80), 锌铁母液 5 mL(100 mL 蒸馏水, 10 g 柠檬酸钠, 0.4 g CaCl₂, 0.4 g FeSO₄, 0.04 g ZnSO₄·7H₂O), 蒸馏水定容至 1 L, 121℃灭菌 25 min。

NB 培养基: 蒸馏水 1000 mL, 营养肉汤 18 g/L, 121℃灭菌 25 min。

1.2 方法

1.2.1 阿特拉津降解菌株的分离与纯化 准备锥形瓶一只,在无菌条件下,将 5 g 土样加入含 100 mg/L 阿特拉津的 NB 培养基中,于 25℃, 150 r/min 恒温振荡培养 5 d。

从第 5 d 开始,每天从富集试验的锥形瓶中取 10 mL 的培养液加入含 100 mL 新鲜 NB 培养基的锥形瓶中,于 25℃, 150 r/min 恒温振荡培养。另准备改良 SMS 阿特拉津培养基 100 mL,加入 1.5 g 琼脂,制作平板,取二级富集的菌液 10 μL 进行平板涂布操作,放置在 30℃ 恒温培养箱中进行培养。以相同的富集方式进行培养,每天将培养基中的阿特拉津浓度上升 50 mg/L,以 500 mg/mL 为上限,连续操作直到分离出降解菌株。

1.2.2 菌株降解能力的测定 将美国 1995 年发布的使用正己烷测定阿特拉津残留方法(Method 505)与分光光度法^[25]结合使用,选取正己烷作为溶剂萃取溶液中的阿特拉津,绘制阿特拉津在 218 nm 处吸光的标准曲线。取分离出的阿特拉津降解菌单菌落进行液体培养,待培养菌株至对数期后按 1% 的接菌量接入改良 SMS 液体培养基中,在接菌后 12 h、24 h、36 h、48 h 后分别用正己烷按 1:10 的比例进行萃取,测定吸光度,并带入标准曲线,判断菌株是否可以降解阿特拉津,以及对菌株的降解能力进行初步检验。

1.2.3 菌株的鉴定 根据菌株的形态和生理生化特征使用细菌常见系统鉴定手册进行鉴定^[26]。使用细菌基因组提取试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)提取基因组 DNA,操作流程以试剂盒说明书为准。提得基因组 DNA 后,用所得细菌基因进行 16S rRNA PCR,使用凝胶回收试剂盒(康宁生命科学有限公司)对扩增片段进行凝胶回收以纯化目的 DNA,按试剂盒说明书进行操作。最后,对收集得到的产物进行测序,将获得的阿特拉津降解菌的 16S rRNA 序列与 GenBank 数据库中的已知序列进行比对,得出相似性。进行葡萄糖氧化发酵检验、淀粉水解检验、甲基红检验、刚果红检测等,进一步确定菌株的生物分类地位。

1.2.4 阿特拉津浓度对菌株生长的影响 保持上述改良 SMS 培养基其他成分不变,使阿特拉津浓度分别为 100 mg/L、200 mg/L、300 mg/L、400 mg/L、500 mg/L、600 mg/L、800 mg/L、1000 mg/L。接种后培养 40 h,测定菌株生长量。

1.2.5 盆栽实验 该实验共设 6 个处理,分别记作 A(阿特拉津浓度 2.5 mg/kg)、B(阿特拉津浓度 5.0 mg/kg)、C(阿特拉津浓度 7.5 mg/kg)、AT(阿特拉津浓度 2.5 mg/kg + 菌液 TW-1)、BT(阿特拉津浓度 5.0 mg/kg + 菌液 TW-1)、CT(阿特拉津浓度 7.5 mg/kg + 菌液 TW-1)。盆栽土壤用上述处理孵育过夜后,将饱满度较好的大豆种子种植进土壤中,待大豆幼苗长至三叶期后,进行以下指标的测定,其中叶绿素含量采用丙酮萃取法,过氧化氢酶(CAT)活性采用紫外吸收法测定^[27],过氧化物酶(POD)活性采用愈创木酚法测定^[28]。每隔 4 d 测定一次,观察大豆幼苗生长趋势。

2 结果与分析

2.1 阿特拉津降解菌 TW-1 的分离与鉴定

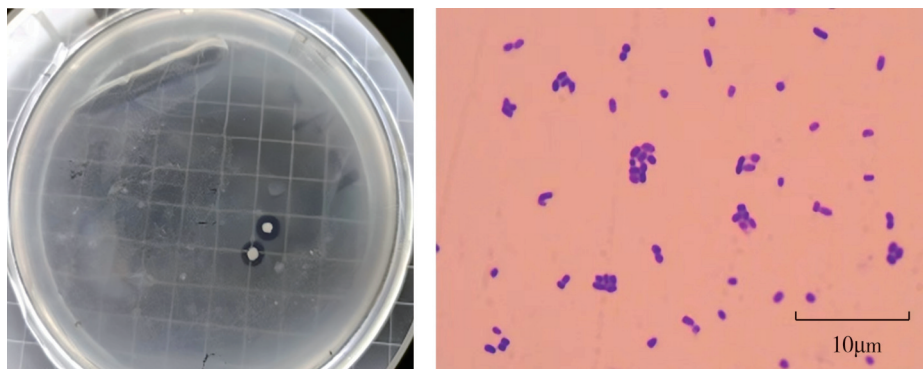
经过分离纯化,获得一株对阿特拉津具有高效降解能力的菌株,命名为 TW-1。菌株 TW-1 的菌落形态特征为表面光滑、半透明、菌落较小且边缘整齐。菌体呈杆形,直径约在 0.8~1.5 μm 之间,革兰氏染色结果为阳性(图 1)。通过 PCR 扩增得到菌株 TW-1 的 16S rRNA 基因序列长度为 1509 bp,菌株序列已上传至国家微生物科学数据中心(National Microbiology Data Center, NMDC),编号为 NMDCN0000RLI,通过 NCBI 的 BLAST 程序与已知序列比对,最终通过 MEGA 7.0 软件绘制系统发育树,该菌株与节杆菌属(*Arthrobacter* sp.)相似性最高(图 2)。TW-1 的生理生化鉴定结果如表 1 所示,结合生理生化结果与 16S rRNA 鉴定结果,可初步判断菌株 TW-1 属于节杆菌属(*Arthrobacter* sp.)。

2.2 菌株 TW-1 的生长曲线

阿特拉津降解菌 TW-1 的生长曲线如图 3 所示,在培养初期(0~8 h),菌体数目增加缓慢,此时为菌株 TW-1 的延滞期,这主要是由于 TW-1 对培养基有短暂的适应过程,生长代谢较缓慢。在 12~32 h 菌株快速生长,此为菌株的指数期(又叫生长期)。在 32~48 h,菌株菌量保持稳定,这时菌株到达平台期,可持续 16 h,在 40~48 h 时菌株到达最大生长量。

2.3 TW-1 降解能力检测

阿特拉津降解菌 TW-1 的降解能力曲线如图 4 所示,可以看出在培养初期(0~8 h),菌株 TW-1 对阿特拉津降解效率较慢,这是因为培养基中菌体含量较低。在 12~36 h 时,降解速度开始加快,在经



注:左图为 TW-1 在正常光源下拍摄的形态图,右图为 TW-1 的革兰氏染色显微镜观察图

Note: The figure on the left shows the morphology of TW-1 taken under normal light source, and the figure on the right shows the Gram staining microscope observation of TW-1

图 1 TW-1 菌落与菌株形态图

Fig. 1 Morphology of TW-1 colony and strain

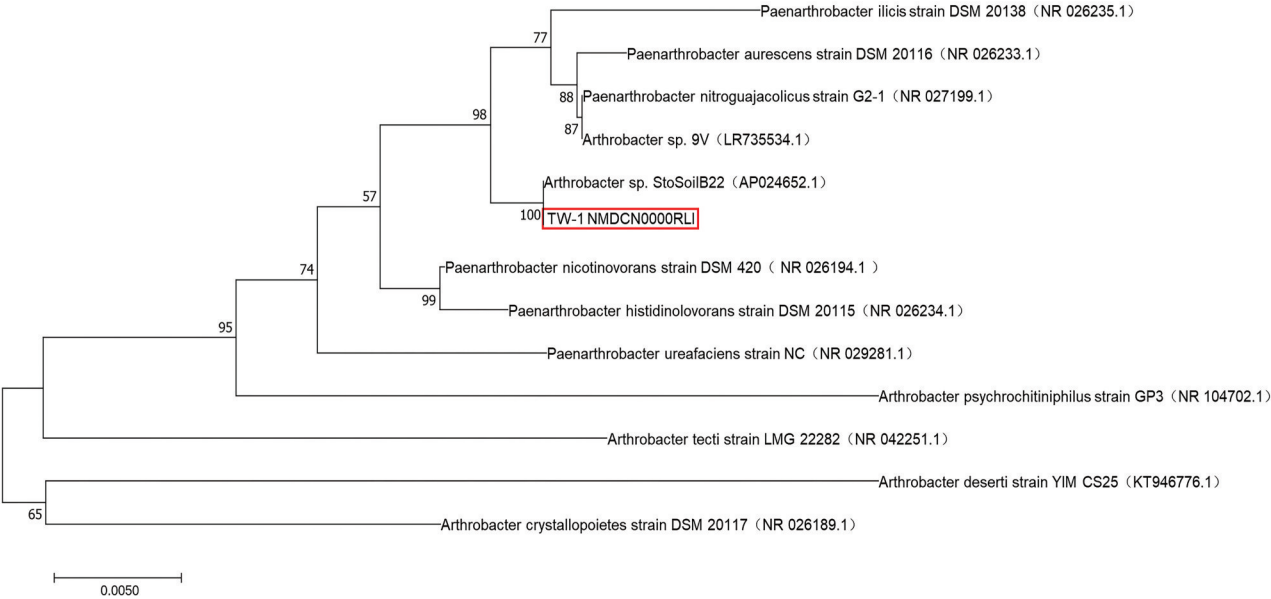


图2 基于16S rRNA基因序列构建的菌株TW-1的系统发育树
Fig. 2 Phylogenetic tree of strain TW-1 constructed based on 16S rRNA gene sequence

表1 TW-1的生理生化鉴定结果

Table 1 Physiological and biochemical identification results of TW-1

实验名称	菌株TW-1
Experiment name	StrainTW-1
革兰氏染色	-
Gram staining	-
葡萄糖氧化发酵检验	+
Glucose oxidative fermentation test	+
淀粉水解检验	+
Starch hydrolysis test	+
甲基红检验	+
Methyl red test	+
0.0025% 刚果红检验	+
0.0025% Congo red test	+

注: +表示阳性; -表示阴性
Note: +: positive; -: negative

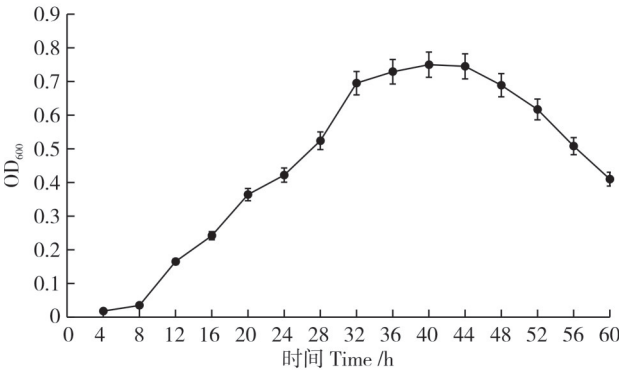


图3 菌株TW-1的生长曲线
Fig. 3 Growth curve of strain TW-1

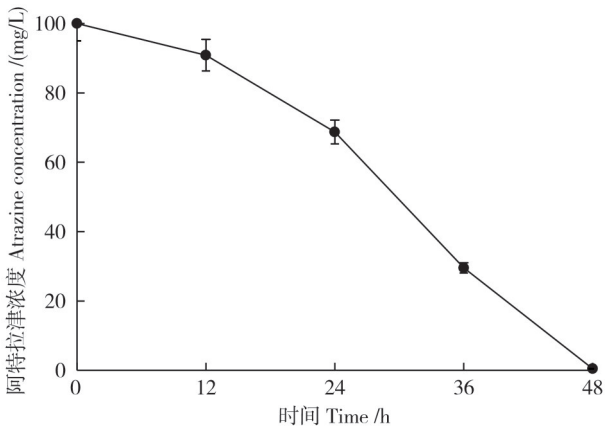


图4 菌株TW-1降解能力曲线
Fig. 4 Degradation capacity curve of strain TW-1

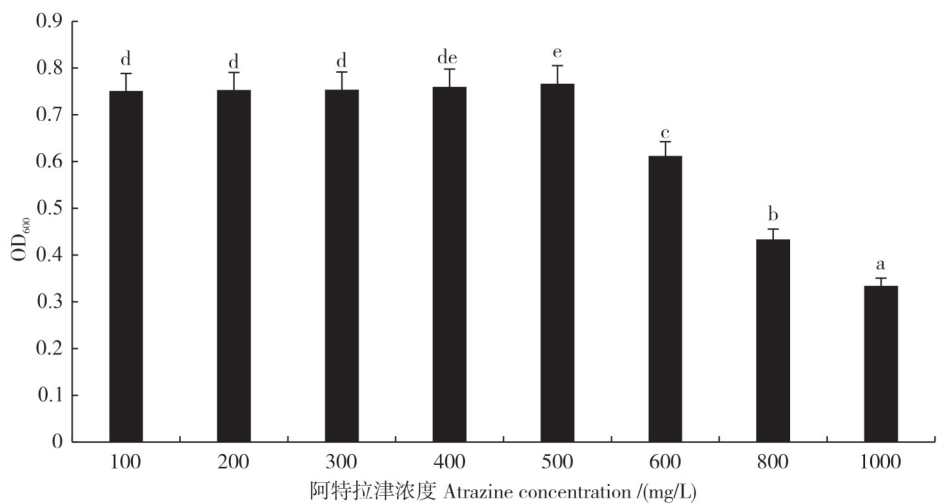
过48 h的培养后,菌株TW-1对无机盐培养基中100 mg/L阿特拉津的降解效率达到99.5%。

2.4 阿特拉津浓度对菌株TW-1生长的影响

不同阿特拉津浓度对菌株生长情况的影响如图5所示,可以看出培养基中的阿特拉津浓度为100~500 mg/L时,菌株TW-1的生长量差异不大,但当阿特拉津浓度超过500 mg/L时,其生长量明显下降。结果表明,菌株TW-1的阿特拉津最大耐受浓度为500 mg/L,当超过这一浓度时,就会对菌株的生长情况造成影响。

2.5 不同处理大豆叶绿素含量的变化

不同处理大豆植株变化如图6所示,叶绿素含量的变化如表2所示,可以看出随着大豆幼苗的生长,各处理的大豆叶片叶绿素含量都呈现了明显的



注:不同字母表示差异显著性($P<0.05$)
Note: Different letters indicate significant difference ($P<0.05$)

图5 不同阿特拉津浓度下的菌株 TW-1 生长量
Fig. 5 Growth of strain TW-1 under different concentrations of atrazine

表2 不同处理大豆叶绿素含量
Table 2 Chlorophyll content of soybean in different treatments $\text{U}/(\text{g}\cdot\text{min})$

取样时期 Sampling period (yy.mm.dd)	A	B	C	AT	BT	CT
三出复叶 Triple compound leaf (2021.07.04)	26.71±0.91 Ba	25.60±0.78 Ba	26.51±0.75 Ba	31.49±0.89 Bb	30.75±0.92 Bb	27.35±0.98 Ba
三出复叶 Triple compound leaf (2021.07.08)	23.61±1.11 Aab	22.44±1.16 Aa	20.97±1.02 Aa	25.64±1.22 Ab	25.64±0.99 Ab	23.49±1.16 Aab
三出复叶 Triple compound leaf (2021.07.12)	22.64±1.12 Aab	22.44±1.04 Aab	20.66±0.86 Aa	29.47±1.00 Bd	26.43±1.07 Ac	23.34±1.00 Ab

注:处理 A:阿特拉津(2.5 mg/kg);B:阿特拉津(5.0 mg/kg);C:阿特拉津(7.5 mg/kg);AT:阿特拉津(2.5 mg/kg)+菌液 TW-1;BT:阿特拉津(5.0 mg/kg)+菌液 TW-1;CT:阿特拉津(7.5 mg/kg)+菌液 TW-1。数据后不同大写字母表示各取样时期之间的差异达到 0.05 的显著水平;不同小写字母表示各处理间的差异达到 0.05 的显著水平
Note: Treatment A: atrazine (2.5 mg/kg); B: atrazine (5.0 mg/kg); C: atrazine (7.5 mg/kg); AT: atrazine (2.5 mg/kg) + TW-1; BT: atrazine (5.0 mg/kg) + TW-1; CT: atrazine (7.5 mg/kg) + TW-1. Different capital letters after data refer to significances at 0.05 among sampling periods; Different low-ercase letters refer to significances at 0.05 among the 6 treatments

下降趋势。通过对比 A 与 AT、B 与 BT 及 C 与 CT 几个处理不同取样期大豆叶片中叶绿素含量发现:添加菌剂处理的显著高于不添加菌剂的处理,且在第三次取样时,AT 处理的叶绿素含量较 A 处理提高幅度最大,而 CT 处理与 C 处理的差异不显著;此结果表明菌株 TW-1 对土壤中的阿特拉津有一定的降解作用,且对低浓度阿特拉津药害的缓解作用尤为明显。

2.6 不同处理大豆抗氧化酶含量的变化

不同处理大豆过氧化氢酶(CAT)含量的变化如表 3 所示,不同处理大豆过氧化物酶(POD)含量的变化如表 4 所示,可以看出第一次取样时两种抗氧化酶各处理之间差异不大,而到了第三次取样时,施用菌液的处理叶片中 CAT 含量与对照组差异达显著水平,其中 C 组处理最为明显,CAT 含量提高了 25 $\text{U}/(\text{g}\cdot\text{min})$ (表 4)。同时,施用菌液的处理叶片中 POD 含量与对照组差异显著,其中 A 组处理对最为

明显,POD 含量提高了约 583 $\text{U}/(\text{g}\cdot\text{min})$ 。结果表明,在土壤中施用菌株 TW-1 可以明显提高大豆幼苗的 CAT 与 POD 活性,增强大豆幼苗的抗逆能力。

3 讨论

微生物在环境清洁和除草剂降解等方面的研究均具有重要意义。目前,使用微生物菌剂降解环境中的阿特拉津是该领域一个研究热点。在微生物活性土壤中,阿特拉津的平均半衰期比无菌土壤低 2.4 倍。目前所报道的菌株 W24 在适宜温度下(25~30℃)对 100 mg/L 的阿特拉津降解率在 40% 以上^[29],菌株 W11 在无机盐培养基中 60 h 内对 100 mg/L 的阿特拉津降解率为 97.1%^[30]。分离高效降解阿特拉津的菌株及开发微生物制剂从污染环境中去除阿特拉津仍然是研究热点,但许多目前已分离的阿特拉津降解菌在不同类型土壤中所表现的降解能力并不完全相同,所以需要进一步探究不同环境



注:图中左侧为清水土壤盆栽,中间为阿特拉津加菌液土壤盆栽,右侧为阿特拉津土壤盆栽(阿特拉津浓度为2.5 mg/kg,菌液 TW-1 浓度为0.2 mL/L)

Note: The left is clear water soil pot, the middle is atrazine soil pot with bacterial solution, and the right is atrazine soil pot (the concentration of atrazine is 7.5 mg/kg and the concentration of bacterial solution TW-1 is 0.2 mL/L)

图6 不同处理大豆植株叶片变化情况

Fig. 6 Changes of soybean leaves under different treatments

条件对菌株的影响。本研究所分离出的菌株可以

在48 h内将100 mg/L的阿特拉津接近完全降解,在降解能力方面优于目前所报道的大部分菌株。

在生物体受到环境胁迫时,其细胞内的活性氧含量会迅速增加,造成细胞的氧化损伤以及细胞死亡。过氧化氢酶与过氧化物酶是广泛存在于生物体内的抗氧化酶,它们可以调节生物体内的自由基平衡,起到抗逆的作用^[31]。在适量的胁迫条件下,植物体内抗氧化酶的合成会对植物本身起到促进作用,但如果超过了一定限度,就会不利于植物体生长,甚至产生失调的现象。

本研究中,盆栽土壤中施用阿特拉津对大豆植株产生了药害作用,施用降解菌株可缓解阿特拉津的药害作用,抗氧化酶含量有显著提升,表明菌株 TW-1 可以缓解大豆植株的药害作用,提高大豆植株的抗逆性,促进其生长。

本研究分离出的菌株 TW-1 降解能力强,可以缓解大豆盆栽的阿特拉津药害,提高抗氧化酶含量,但其降解机制尚不明确,目前已知对阿特拉津具有降解作用的基因有两种类型,分别为编码水解

表3 不同处理大豆过氧化氢酶(CAT)含量

Table 3 Catalase (CAT) content of soybean in different treatments /U/(g·min)

取样时期 Sampling period (yy.mm.dd)	A	B	C	AT	BT	CT
三出复叶 Triple compound leaf (2021.07.04)	106.25±5.31 Bab	112.50±5.63 Bb	106.25±5.31 Cab	106.25±5.33 Aab	100.00±5.00 Bab	93.75±4.69 Ba
三出复叶 Triple compound leaf(2021.07.08)	87.50±4.38 Abc	68.75±3.44 Aa	81.25±4.06 Bb	105.25±5.00 Ade	106.25±5.31 Be	93.75±4.69 Bed
三出复叶 Triple compound leaf(2021.07.12)	81.25±4.06 Abc	75.00±3.61 Ab	50.00±2.50 Aa	100.00±5.00 Ad	87.50±4.38 Ac	75.00±3.75 Ab

注:处理 A:阿特拉津(2.5 mg/kg);B:阿特拉津(5.0 mg/kg);C:阿特拉津(7.5 mg/kg);AT:阿特拉津(2.5 mg/kg)+菌液 TW-1;BT:阿特拉津(5.0 mg/kg)+菌液 TW-1;CT:阿特拉津(7.5 mg/kg)+菌液 TW-1。数据后不同大写字母表示各取样时期之间的差异达到0.05的显著水平;不同小写字母表示各处理间的差异达到0.05的显著水平

Note: Treatment A: atrazine (2.5 mg/kg); B: atrazine (5.0 mg/kg); C: atrazine (7.5 mg/kg); AT: atrazine (2.5 mg/kg) + TW-1; BT: atrazine (5.0 mg/kg) + TW-1; CT: atrazine (7.5 mg/kg) + TW-1. Different capital letters after data refer to significances at 0.05 among sampling periods; Different low-ercase letters refer to significances at 0.05 among the 6 treatments

表4 不同处理大豆过氧化物酶(POD)含量

Table 4 soybean peroxidase (POD) content in different treatments /U/(g·min)

取样时期 Sampling period (yy.mm.dd)	A	B	C	AT	BT	CT
三出复叶 Triple compound leaf (2021.07.04)	2100.00±105.00 Aa	2616.67±130.83 Ab	2091.67±104.58 Aa	2550.00±127.50 Ab	2650.00±132.50 Ab	2025.00±101.25 Aa
三出复叶 Triple compound leaf(2021.07.08)	3291.67±164.58 Bab	3758.33±187.92 Bb	3125.00±156.25 Ba	3700.00±185.00 Bb	4600.00±230.00 Bc	4333.33±216.67 Bc
三出复叶 Triple compound leaf(2021.07.12)	4250.00±212.50 Ca	4516.67±225.83 Cab	4616.67±230.83 Cab	4833.33±241.67 Cab	4900.00±245.00 Bb	5083.33±254.17 Cb

注:处理 A:阿特拉津(2.5 mg/kg);B:阿特拉津(5.0 mg/kg);C:阿特拉津(7.5 mg/kg);AT:阿特拉津(2.5 mg/kg)+菌液 TW-1;BT:阿特拉津(5.0 mg/kg)+菌液 TW-1;CT:阿特拉津(7.5 mg/kg)+菌液 TW-1。数据后不同大写字母表示各取样时期之间的差异达到0.05的显著水平;不同小写字母表示各处理间的差异达到0.05的显著水平

Note: Treatment A: atrazine (2.5 mg/kg); B: atrazine (5.0 mg/kg); C: atrazine (7.5 mg/kg); AT: atrazine (2.5 mg/kg) + TW-1; BT: atrazine (5.0 mg/kg) + TW-1; CT: atrazine (7.5 mg/kg) + TW-1. Different capital letters after data refer to significances at 0.05 among sampling periods; Different low-ercase letters refer to significances at 0.05 among the 6 treatments

酶的 *atzA*、*atzB*、*atzC*、*trzN* 等基因与编码环裂解酶的 *atzD*、*atzE*、*atzF*、*trzD* 等基因。但不同菌属间差异较大,探究菌株 TW-1 的阿特拉津降解基因是接下来的研究方向。且未来仍有一些问题需要进一步探究,例如,实验室中的阿特拉津降解菌株在有外加氮源的条件下是否会优先利用容易吸收的含氮物质,此外,根据 Sims 的研究^[32],当土壤中氮元素含量降低即“氮饥饿”时,就会对土壤中的阿特拉津等氮杂环物质的生物降解产生促进作用,该结论能否适用于降解菌株。最后,因为目前分离到的大多数降解菌最适降解温度都在 25℃~30℃ 之间,显然不适用北方地区的气候条件,解决这些从实验室纯培养条件筛选出的菌株接种到自然界土壤所面临的问题,是我们下一阶段的研究方向。

4 结论

从黑龙江省安达市长期施用阿特拉津的农田中分离出一株对阿特拉津具有高效降解作用的节杆菌(*Arthrobacter* sp.)菌株 TW-1,该菌株 48 h 对 100 mg/L 的阿特拉津降解率达到 99.5%,且在盆栽实验中可增强大豆植株的抗逆能力,能有效缓解阿特拉津的药害作用。本研究结果为将来阿特拉津污染修复提供具有良好应用潜力的候选菌株。

参考文献:

- [1] 吴奇,宋福强.土壤中阿特拉津生物降解的研究进展[J].土壤与作物,2017,6(2):153-160. DOI: 10.11689/j.issn.2095-2961.2017.02.011.
- [2] Gao J P, Song P P, Wang G Y, et al. Responses of atrazine degradation and native bacterial community in soil to *Arthrobacter* sp. strain HB-5 [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2018, 159: 317-323. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.05.017.
- [3] 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[J].东北农业大学学报,2007,38(1):136-139. DOI:10.19720/j.cnki.issn.1005-9369.2007.01.028.
- [4] Buser H R. Atrazine and other s-triazine herbicides in lakes and in rain in Switzerland [J]. Environ Sci Technol, 1990, 24 (7): 1049-1058. DOI: 10.1021/es00077a016.
- [5] Singh S N, Jauhari N. Degradation of atrazine by plants and microbes [M]//Microbe-Induced Degradation of Pesticides. Cham: Springer International Publishing, 2016: 213-225. DOI:10.1007/978-3-319-45156-5_10.
- [6] 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. DOI: 10.11654/jaes.2017-1453.
- [7] Hayes T B, Case P L, Chui S, et al. Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: are we underestimating the impact? [J]. Environ Health Perspect, 2006, 114 (Suppl 1): 40-50. DOI: 10.1289/ehp.8051.
- [8] 曹楠,赵义良,宋瑞,等.常见除草剂的药害原因及防治策略[J].食品安全导刊,2021(S1):51-53. DOI: 10.16043/j.cnki.cfs.2021.z1.019.
- [9] 张宝,李越,刘双智,等.干旱胁迫对3种木本植物酶活性的影响[J].防护林科技,2016(5):61-63. DOI: 10.13601/j.issn.1005-5215.2016.05.023.
- [10] 王荣繁,杨存义.大豆种子耐储藏的生物学机制研究进展[J].中国油料作物学报,2020,42(5):911-919. DOI:10.19802/j.issn.1007-9084.2019164.
- [11] 丁俊男,王慧,于少鹏,等.玉米-大豆轮作对土壤酶和根系微生物群落多样性的影响[J].黑龙江农业科学,2021(4):11-16. DOI: 10.11942/j.issn1002-2767.2021.04.0011.
- [12] 陈乐,赵莹莹,王媛媛,等.细菌SnebYK诱导大豆抗阿特拉津的效果评价[J].中国油料作物学报,2014,36(5):641-647. DOI:10.7505/j.issn.1007-9084.2014.05.013.
- [13] Li X W, Ma J, Gao Y F, et al. Enhanced atrazine degradation in the Fe(III)/peroxymonosulfate system via accelerating Fe(II) regeneration by benzoquinone [J]. Chem Eng J, 2022, 427: 131995. DOI: 10.1016/j.cej.2021.131995.
- [14] Wang Q F, Xie S G, Hu R. Bioaugmentation with *Arthrobacter* sp. strain DAT1 for remediation of heavily atrazine-contaminated soil [J]. Int Biodeterior Biodegrad, 2013, 77: 63-67. DOI:10.1016/j.ibiod.2012.11.003.
- [15] Lin Z, Zhen Z, Ren L, et al. Effects of two ecological earthworm species on atrazine degradation performance and bacterial community structure in red soil [J]. Chemosphere, 2018, 196: 467-475. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.12.177.
- [16] Omotayo A E, Ilori M O, Radosevich M, et al. Metabolism of atrazine in liquid cultures and soil microcosms by *Nocardioide*s strains isolated from a contaminated Nigerian agricultural soil [J]. Soil Sediment Contam Int J, 2013, 22(4): 365-375. DOI:10.1080/15320383.2013.733444.
- [17] Fernandes A F T, da Silva M B P, Martins V V, et al. Isolation and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* from a virgin Brazilian Amazon region with potential to degrade atrazine [J]. Environ Sci Pollut Res, 2014, 21(24): 13974-13978. DOI: 10.1007/s11356-014-3316-7.
- [18] 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. DOI: 10.1128/aem.61.4.1451-1457.1995.
- [19] 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. DOI: 10.1046/j. 1472-765x. 2003.01307.x.
- [20] Strong L C, Rosendahl C, Johnson G, et al. *Arthrobacter aureus* TC1 metabolizes diverse s-triazine ring compounds[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68 (12): 5973-5980. DOI: 10.1128/AEM.68.12.5973-5980.2002.
- [21] Zhou Q X, Chen L L, Wang Z B, et al. Fast atrazine degradation by the mixed cultures enriched from activated sludge and analysis of their microbial community succession[J]. Environ Sci Pollut Res, 2017, 24 (28): 22152-22157. DOI: 10.1007/s11356-017-9052-z.
- [22] 陈世宇. 不同土壤中阿特拉津降解特征、降解基因分布及细菌群落演替规律[D]. 杭州: 浙江大学, 2021.
- [23] 孙瑞莲. 阿特拉津在不同肥力土壤中的生态效应[D]. 泰安: 山东农业大学, 2003.
- [24] Newcombe D A, Crowley D E. Bioremediation of atrazine-contaminated soil by repeated applications of atrazine-degrading bacteria[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1999, 51(6): 877-882. DOI: 10.1007/s002530051477.
- [25] 蒋婷, 张国文, 王安萍, 等. 多元校正-分光光度法同时测定六种除草剂[J]. 南昌大学学报(工科版), 2007, 29 (2): 123-125, 130. DOI: 10.3969/j. issn.1006-0456.2007.02.006.
- [26] 布坎南(R.E.Buchanan)等编. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组译. 伯杰细菌鉴定手册第八版[M]. 北京: 科学出版社, 1984.
- [27] 王学奎, 黄见良. 植物生理生化实验原理与技术[M]. 3版. 北京: 高等教育出版社, 2015.
- [28] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 134-260.
- [29] 范作伟, 李阳阳, 陈帅民, 等. 阿特拉津降解菌 W24 的分离鉴定和土壤修复效果研究[J]. 玉米科学, 2021, 29(5): 172-177. DOI: 10.13597/j.cnki.maize.science.20210523.
- [30] 李阳阳, 范作伟, 张立明, 等. 阿特拉津降解菌 W11 的分离鉴定及降解特性研究[J]. 玉米科学, 2020, 28 (4): 165-171. DOI: 10.13597/j. cnki. maize. science.20200424.
- [31] 于德玲, 王昌留. 过氧化氢酶的研究进展[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2016, 25 (2): 189-194. DOI: 10.16705/j.cnki.1004-1850.2016.02.017.
- [32] Sims G K. Nitrogen starvation promotes biodegradation of N-heterocyclic compounds in soil[J]. Soil Biol Biochem, 2006, 38 (8): 2478-2480. DOI: 10.1016/j. soil-bio.2006.01.006.

(责任编辑:郭学兰)