

莠去津高效降解菌 ADBD-13 的降解机理及生物修复研究

李蒙蒙^{1,2}, 郭金春^{2,3}, 刘珂良¹, 何碧珀⁴, 刘红彦⁴, 吴仁海⁴, 刘颖¹, 刘清浩¹

(1. 中北大学 化学与化工学院, 山西 太原 030051; 2. 中北大学德州产业技术研究院, 山东 德州 253034;
3. 中北大学 环境与安全工程学院, 山西 太原 030051; 4. 河南省农业科学院 植物保护研究所, 河南 郑州 450002)

摘要: 莠去津广泛用于玉米田间杂草去除, 但其残留会对人体健康及生态环境造成一定的危害。本文从长期施加莠去津农药的玉米田表层土壤中通过富集和驯化, 筛选分离出5株能生长在较高浓度莠去津的培养基中并且能降解莠去津的细菌, 对其中降解效果最好的菌株进行形态特征、16S rRNA序列及ANI指数分析, 鉴定菌株种属。通过高效液相色谱法测定其降解效果, 使用HPLC-MS研究其降解机理。利用土壤接种、盆栽试验及水培试验探究其对土壤、小麦及玉米的生物修复作用。结果显示: 筛选出的5株菌, 其中降解效果最好的菌株 ADBD-13 为产脲节杆菌 *Paenarthrobacter ureafaciens*, 培养70 h可将100 mg/L 莠去津降解99.90%; 其在30 °C, pH 8.0, 莠去津初始质量浓度为10 mg/L时降解效果最好, 具有一定的耐酸碱及耐高温和低温性; 菌株 ADBD-13 对莠去津经脱氯、去异丙基、羟基化、加氢脱烷基、消除和水解后的生物降解产物为氰尿酸; 对于含50 mg/kg 莠去津的污染土壤, 施加菌株 ADBD-13 发酵液可在7 d时将土壤中的莠去津降解70.54%; 在莠去津胁迫下, 施加菌株 ADBD-13 发酵液后土壤中小麦幼苗及玉米幼苗的株高、根长、鲜重和干重比对照分别增加至少21%和30%, 在水体中生长的小麦幼苗及玉米幼苗的四个生长指标比对照分别增加至少24%和27%。研究表明, 产脲节杆菌 ADBD-13 在土壤修复及生物修复方面具有广阔应用前景。

关键词: 产脲节杆菌; 莠去津; 生物降解; 生物修复; 小麦; 玉米

中图分类号: X53

文献标识码: A

doi: 10.62756/jnuc.issn.1673-3193.2024.08.0007

引用格式: 李蒙蒙, 郭金春, 刘珂良, 等. 莠去津高效降解菌 ADBD-13 的降解机理及生物修复研究[J]. 中北大学学报(自然科学版), 2025, 46(3): 369-378.

LI Mengmeng, GUO Jinchun, LIU Keliang, et al. Degradation mechanism and bioremediation of atrazine efficient degrading strain ADBD-13[J]. Journal of North University of China (Natural Science Edition), 2025, 46(3): 369-378.

Degradation Mechanism and Bioremediation of Atrazine Efficient Degrading Strain ADBD-13

LI Mengmeng^{1,2}, GUO Jinchun^{2,3}, LIU Keliang¹, HE Bibo⁴, LIU Hongyan⁴, WU Renhai⁴,
LIU Ying¹, LIU Qinghao¹

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, North University of China, Taiyuan 030051, China;

2. Dezhou Industrial Technology Research Institute of North University of China, Dezhou 253034, China;

收稿日期: 2024-08-09

基金项目: 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系项目(CARS-14); 河南省农科院优秀青年科技基金资助项目(2022YQ04); 河南省重点研发专项(221111112300)

作者简介: 李蒙蒙(2000—), 女, 硕士生, 主要从事复合微生物菌剂的研究。

通信作者: 刘清浩(1979—), 女, 副教授, 博士, 主要从事生物源农药的研究。E-mail: liuqinghao@nuc.edu.cn.

3. School of Environment and Safety Engineering, North University of China, Taiyuan 030051, China;

4. Institute of Plant Protection Research, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Atrazine is widely used to remove weeds in corn fields, but its residues have caused certain harm to human health and ecological environment. In this paper, 5 strains of bacteria that could grow in medium with higher concentrations of atrazine and degrade atrazine were screened and isolated from the surface soil of corn fields where atrazine pesticide had been applied for a long time through enrichment and domestication. Morphological characteristics, 16S rRNA sequence and ANI index were analyzed for the strains with the best degradation effect, and the species were identified. The degradation effect was determined by high-performance liquid chromatography and the degradation mechanism was studied by HPLC-MS. The bioremediation effects on soil, wheat and maize were investigated by soil inoculation, pot experiment and hydroponic experiment. The results show that among the 5 strains, the one with the best degradation effect is ADBD-13. ADBD-13 is *Paenarthrobacter ureafaciens*, which can degrade 99.90% of atrazine at 100 mg/L after 70 hours of incubation. It has the best degradation effect at 30 °C, pH 8.0, and the initial mass concentration of atrazine is 10 mg/L. It has certain acid and alkali resistance, high and low temperature resistance. The biodegradation product of ADBD-13 to atrazine is cyanuric acid after dechlorination, deisopropyl, hydroxylation, hydrodealkylation, elimination and hydrolysis. The application of strain ADBD-13 in the fermentation solution can degrade 70.54% of atrazine in the contaminated soil containing 50 mg/kg atrazine at 7 days. Under atrazine stress, the plant height, root length, fresh weight and dry weight of wheat seedlings and corn seedlings in the soil increases by at least 21% and 30%, respectively, compared with the control. And the four growth indexes of wheat seedlings and corn seedlings growing in water increases by at least 24% and 27%, respectively. These results indicate that *Paenarthrobacter ureafaciens* ADBD-13 has broad prospects in soil remediation and bioremediation.

Key words: *Paenarthrobacter ureafaciens*; atrazine; biodegradation; bioremediation; wheat; corn

0 引言

莠去津(atrazine, ATZ)是一种三嗪类农药,广泛用于玉米、水稻、小麦、大豆等作物种植中阔叶杂草及禾本科杂草的去除^[1]。作为一种在世界范围内长期使用的除草剂,莠去津具有价格低廉、除草效率高、除草种类多等优点,但同时莠去津在土壤后半衰期长,难降解且迁移性强,对环境污染性强^[2-3]。莠去津对后茬敏感作物如小麦、大豆、甘薯等有着明显药害,如:致使小麦叶片干枯,籽粒偏小^[4];抑制大豆生长,降低大豆产量^[5];致使甘薯叶片黄化,植株矮小^[6]。当植物吸收莠去津后,会经由食物链转移至水生动物、陆生动物及人类体内,造成神经系统、内分泌系统、免疫与遗传系统等损害甚至造成癌症^[7]。因此,对莠去津残留土壤进行物理化学修复及生物修复,对人体健康、生态环境恢复及作物生产具有重大意义。

莠去津的生物修复相比物理化学修复成本更

低,操作更易上手,修复效果更好,对环境更友好,其中微生物降解是生物修复中最主要的方式^[8-9]。可有效降解莠去津的微生物种类很多,包含节杆菌属(*Arthrobacter sp.*)^[10]、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas sp.*)^[11]、柠檬球菌属(*Citricoccus sp.*)^[12]、假单胞菌属(*Pseudomonas sp.*)^[13]、不动杆菌属(*Acinetobacter sp.*)^[14]、红球菌属(*Rhodococcus sp.*)^[15]、芽孢杆菌属(*Bacillus sp.*)^[16]、农杆菌属(*Agrobacterium sp.*)^[17]等。不同降解菌对莠去津的降解途径稍有不同,其本质与降解基因有关。其中, *trzN/atzA*、*atzB*、*atzC*基因逐步控制莠去津降解为氰尿酸;*atzD*基因控制氰尿酸降解为缩二脲;*atzE*基因控制缩二脲降解为脲基甲酸盐;*atzF*基因则将脲基甲酸盐转化为二氧化碳和氨^[18]。近年来,各国学者筛选出多种能高效降解莠去津的菌株,但是能适用于各种环境并实际应用于土壤中的种类较少,故仍需要不断丰富菌株库以期生产出能够施加于大田中的微生物菌剂。

本文从长期施加莠去津农药的玉米田表层土

壤中通过富集和驯化,筛选分离出 5 株能生长在较高浓度莠去津的培养基中并且能降解莠去津的细菌,并对其中降解效果最好的菌株 ADBD-13 进行鉴定,同时研究其降解特性、降解机理及对土壤的修复作用,通过盆栽试验和水培试验探究 ADBD-13 对莠去津胁迫下的小麦及玉米幼苗的生物修复及修复后残留对小麦及玉米幼苗生长的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试土壤及种子

供试土壤采自于山东省德州市平原县长期施加莠去津农药的玉米田表层。供试小麦种子为烟农 19、供试玉米种子为郑单 958。

1.1.2 供试培养基

LB(Luria-Bertani)培养基:胰蛋白胨 10 g,酵母提取物 5 g, NaCl 10 g,蒸馏水 1 L,调整 pH 至 7.0;无机盐(Minimal Medium, MM)液体培养基: KH_2PO_4 0.45 g, K_2HPO_4 1.79 g, NaCl 0.4 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g,蒸馏水 1 L,调整 pH 至 7.0; LB 及 MM 固体培养基在其液体培养基的基础上加入体积分数为 2% 的琼脂。

1.2 试验方法

1.2.1 土壤中莠去津降解菌富集、驯化和筛选

取 10 g 风干、过筛处理后的土壤加至 100 mL 含 10 mg/L 莠去津的 MM 液体培养基中,将混合物摇匀后在 30 °C、180 r/min 的暗培养中摇培,每隔 7 d 以 10% 的接种量将 10 mL 摇培后的菌液移至莠去津质量浓度递增的 100 mL MM 液体培养基中,MM 液体培养基中莠去津的质量浓度依次为 10, 20, 30, 50, 100 mg/L。从含 100 mg/L 莠去津的 MM 液体培养基中吸取摇培后的菌液,用无菌生理盐水将菌液按照体积比梯度稀释至 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} 和 10^{-7} ,并涂布在含 100 mg/L 莠去津的 MM 固体培养基上。在 30 °C 恒温培养箱中培养 3~5 d 后,通过是否在含莠去津的 MM 固体培养基上产生透明圈定性判定菌株的降解能力,分离具有降解能力的菌落并进行形态学纯化^[19-20]。选取降解效果较好的菌株 ADBD-13 进行后续研究。

1.2.2 降解菌 ADBD-13 的鉴定

将分离纯化后的菌株 ADBD-13 划线于 LB 固体培养基中,挑取单菌落并在显微镜下观察菌落的形态^[21]。委托生工生物工程(上海)股份有限公司利用二代测序技术对菌株 ADBD-13 的基因组测序。对基因组测序结果使用 RNAmmer 进行菌种 16S rRNA 序列预测,预测结果在 NCBI 核苷酸数据库中通过 BLAST 程序进行比对,并使用 MEGA 11.0 进行系统发育树的构建。使用 FastANI 计算所测菌株与 20 株参考菌株的平均核苷酸相似度(Average Nucleotide Identity, ANI)指数并作出热图,结合预测的 16S rRNA 序列及 ANI 指数确定菌株种属。

1.2.3 降解菌 ADBD-13 的生长曲线及降解能力测定

将菌株 ADBD-13 单菌落接种至 LB 液体培养基中摇培 16~24 h 后,4 °C、4 500 r/min 离心 10 min,收集离心后的菌泥并用 PBS 缓冲液(pH 7.0)反复冲洗 3 次,加入 PBS 缓冲液(pH 7.0)调整菌落浓度至 1×10^9 CFU/mL(CFU/mL 表示每毫升溶液含有的细菌群落总数)。将体积分数 2% 的 ADBD-13 菌液加入至 50 mL MM 液体培养基(含 100 mg/L 莠去津)中,以不接菌的含药培养基为阴性对照,分别在第 1.5, 3, 6, 9, 12, 15, 17.5, 20, 30, 50, 70, 90, 110, 130, 150 h 时取样,测量菌液的 OD_{600} 值及培养基中莠去津的质量浓度,试验重复 3 次。 OD_{600} 值使用微量分光光度计测定。使用二氯甲烷对菌液中的莠去津进行萃取,蒸干后用色谱级甲醇定容,最后过 0.22 μm 滤膜,使用高效液相色谱仪外标法测定莠去津含量。高效液相检测色谱条件:色谱柱 Hypersil ODS2(直径×粒长为 4.6 mm×250 mm,粒径为 5 μm),柱温 30 °C;流动相甲醇与水(0.1% 甲酸)的体积比为 70:30;波长为 225 nm;流速为 1 mL/min;进样量为 20 μL 。

1.2.4 降解菌 ADBD-13 的降解特性测定

从初始 pH 值、摇培温度、莠去津初始质量浓度三方面分析菌株 ADBD-13 的降解特性^[22]。其中,初始 pH 值分别为 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 和 9.0,摇培温度分别为 10, 20, 30, 40 和 50 °C,莠去津的初始质量浓度分别为 10, 25, 50, 100 和 200 mg/L。将体积分数为 2% 的 ADBD-13 菌液(1×10^9 CFU/mL)加入至调节过初始条件的含莠去津培养基中,150 r/min 摇培 20 h 后检测莠去津

的含量,按照式(1)计算菌株 ADBD-13 的降解率 X ^[23]。

$$X = \frac{(C_0 + C_x)}{C_0} \times 100\%, \quad (1)$$

式中: X 为降解率; C_0 为对照样品中莠去津的终浓度; C_x 为菌株样品中莠去津的终浓度。

1.2.5 降解菌 ADBD-13 对莠去津的降解途径分析

将 ADBD-13 菌液加至含 100 mg/L 莠去津的 MM 液体培养基中, 30 °C、150 r/min 摇培 3 d, 二氯甲烷萃取, 蒸干后用色谱级甲醇定容, 最后过 0.22 μm 滤膜。使用 Ultimate 3000 UHPLC - Q Exactive 液质联用仪对样品进行总离子流图、一级质谱、二级质谱检测。HPLC-MS 检测由杭州研趣信息技术有限公司完成。

1.2.6 降解菌 ADBD-13 对含莠去津土壤的修复作用

取 100 g 土壤过筛后灭菌, 将莠去津加入至土壤中, 莠去津与土壤的质量比为 50 mg/kg。将处理后的土壤均分为两组, 一组土壤加入 ADBD-13 菌液至 1×10^6 CFU/g, 另一组加入无菌蒸馏水。分别将两组土壤置于灭菌锥形瓶中, 每日喷水保持土壤湿度。分别在培养第 1, 2, 3, 4, 5 天时间点取样, 检测土壤中的莠去津残留量。将样品加入至 50 mL 甲醇中超声 40 min 后, 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液在 35 °C 蒸干后用色谱级甲醇定容, 过 0.22 μm 滤膜后检测, 每组试验重复 3 次。

1.2.7 降解菌 ADBD-13 在不同培养条件下对莠去津胁迫下小麦幼苗及玉米幼苗的修复作用

1) 降解菌 ADBD-13 在土壤中对莠去津胁迫下小麦幼苗及玉米幼苗的修复作用试验: 将降解菌 ADBD-13 单菌落接种至 250 mL LB 液体培养基中, 30 °C、150 r/min 摇培发酵 48 h, 用 PBS 缓冲液调整发酵液中菌落浓度为 1×10^9 CFU/mL。称取 250 g 土壤并置于花盆中, 分别加入处理液 A~D, 再加入蒸馏水浸润土壤并充分搅拌均匀^[20]。处理液如下: A: 无菌蒸馏水对照; B: 2.5 μL 莠去津(10 g/L); C: 2.5 mL 发酵液; D: 2.5 μL 莠去津(10 g/L)+2.5 mL 发酵液。挑取颗粒饱满, 大小相似的发芽小麦及玉米种子, 每盆 15 粒种于处理后的土壤中, 在 27 °C, 光照与黑暗周期分别为 16 h 和 8 h, 相对湿度 70%, 光强 5 500 lx 情况下生长 14 d, 每组处理重复 5 次, 每次重复随机挑选 5 株, 记录小麦及玉米的株高、根

长、鲜重和干重^[24]。

2 降解菌 ADBD-13 在 MM 液体培养基中对莠去津胁迫下小麦幼苗及玉米幼苗的修复作用试验: 挑选颗粒饱满, 大小相似的发芽小麦及玉米种子, 分别种在太空杯的泡沫板上, 将根部浸泡在 A~D 组处理液中^[25], 在 1) 中的条件下生长 14 d 后, 记录小麦和玉米的株高、根长、鲜重以及干重等生长指标。处理液如下: A: MM 液体培养基; B: 加入体积分数为 2% ADBD-13 菌液的 MM 液体培养基; C: 含 100 mg/L 莠去津的 MM 液体培养基; D: 含 100 mg/L 莠去津及体积分数为 2% ADBD-13 菌液的 MM 液体培养基。所有处理液均经过 30 °C、150 r/min 摇培 5 d, 并稀释 10 倍。试验中添加灭菌蒸馏水保持水分, 每组分别处理 15 颗小麦及玉米种子并重复 5 次, 每次重复随机挑选 5 株记录数据。

1.2.8 数据分析

使用 SPSS 19.0 软件对数据进行统计分析, 应用 Duncan 氏新复极差法作差异性检验, 当差异显著时($P < 0.05$)使用不同小写字母表示, 当不存在显著差异时($P > 0.05$)使用相同小写字母表示。使用 Origin 2021 对数据作图。

2 结果与讨论

2.1 莠去津降解菌的分离与鉴定

经过 35 d 驯化培养, 从玉米田中筛选出 5 株降解菌 ADBG-2、ADBG-3、ADBG-5、ADBD-13、ADBD-14, 它们在含 100 mg/L 莠去津的 MM 固体培养基上均可长出透明水解圈。5 株降解菌的透明水解圈直径分别为 5.0, 4.0, 3.0, 6.0 和 5.5 mm, 其中 ADBD-13 的水解圈直径最大, 降解效果最好, 故对此菌做进一步研究。

菌株 ADBD-13 菌落较粘稠湿润, 整体呈圆形不透明的淡黄色, 菌落边缘光滑完整, 显微镜下观察菌体呈杆状, 无芽孢。NCBI 核苷酸数据库中的对比显示, 菌株 ADBD-13 与 *Paenarthrobacter ureafaciens* strain NC 处于统一分支, 相似性达 99.53%。根据菌株 ADBD-13 与 20 株参考菌株的热图结果, 菌株 ADBD-13 与 *Paenarthrobacter ureafaciens* AAC22 (GCA-011393315.2) 的 ANI 指数达 98.09%, 超过了 95%。结合菌株 ADBD-13 的 16S rRNA 系统发育树及与参考菌株的 ANI 结果, 鉴定菌株 ADBD-13 为产脲节杆菌(*Paenar-*

throbacter ureafaciens)。邻接法构建的菌株 ADBD-13 的 16S rRNA 系统发育树如图 1 所示, 菌株 ADBD-13 与 20 株参考菌株的距离热图如图 2 所示。图 1 中, 线段 0.01 表示序列差异的分支长度。

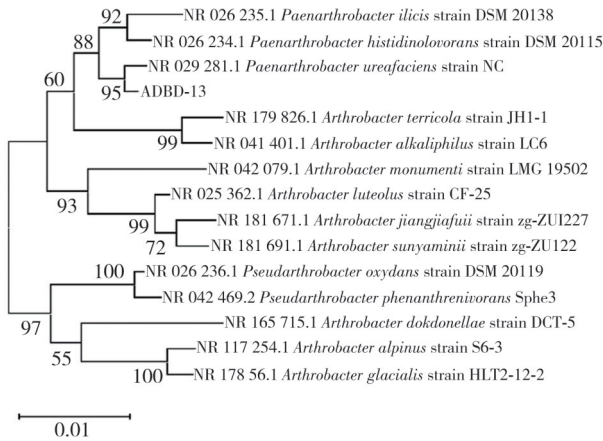


图 1 邻接法构建的菌株 ADBD-13 的 16S rRNA 系统发育树
Fig. 1 16S rRNA phylogenetic tree for the strain ADBD-13 constructed by using neighbor-joining methods

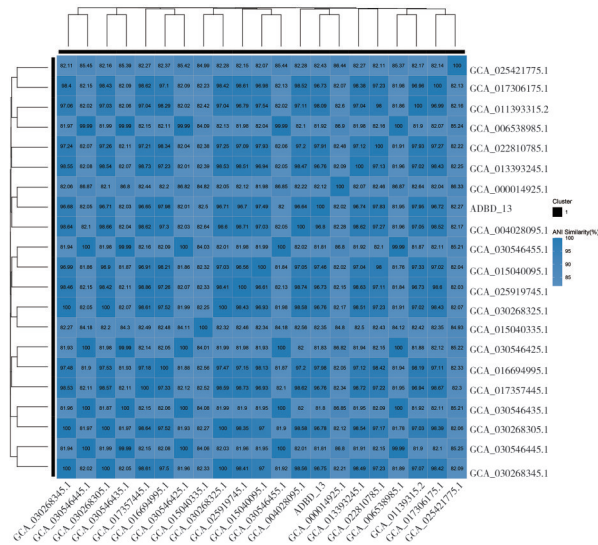


图 2 菌株 ADBD-13 与 20 株参考菌株的距离热图
Fig. 2 Distance heat map of strain ADBD-13 and 20 reference strains

2.2 降解菌 ADBD-13 的生长曲线及降解能力

降解菌 ADBD-13 在以莠去津为唯一能量源的培养基中生长良好, 如图 3 所示。

由图 3 可以看出: 降解菌 ADBD-13 在含 100 mg/L 莠去津的 MM 液体培养基中首先经历了大约 10 h 的迟缓期, 在此期间菌液浊度几乎没有变化, 莠去津质量浓度下降缓慢; 在 10~30 h 降解菌 ADBD-13 菌液浊度增长迅速, 这表明降解菌

ADBD-13 在对数生长期; 在 30~130 h 降解菌 ADBD-13 处于稳定期; 130 h 后降解菌 ADBD-13 进入衰退期^[26]。根据莠去津的质量浓度曲线, 降解菌 ADBD-13 处于对数生长期时, 莠去津的质量浓度快速下降, 这表明降解菌 ADBD-13 在此时对受影响最敏感, 故而选择 20 h 作为降解特性的研究时间。此外, 70 h 时降解菌 ADBD-13 莠去津降解率达 99.90%。已报道的假单胞菌 SFAD3 的莠去津降解率为 88.90%, 土壤杆菌 AT-2 的降解率为 90%, 降解菌 ADBD-13 与这两种菌株均能高效降解莠去津^[20,27]。

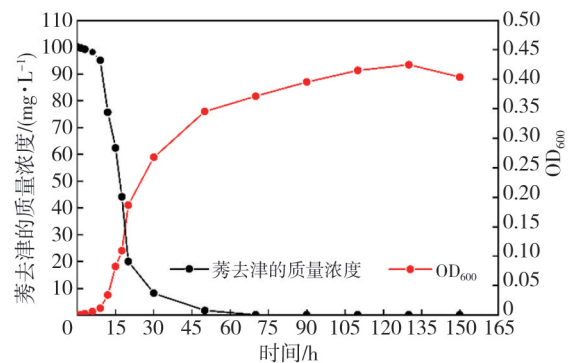


图 3 菌株 ADBD-13 在 MM 液体培养基中的生长曲线及降解能力
Fig. 3 Growth curve and degradation ability of strain ADBD-13 in MM liquid medium

2.3 降解菌 ADBD-13 的降解特性

初始 pH 值、摇培温度、莠去津初始质量浓度对降解菌 ADBD-13 降解效果的影响如图 4 所示。

由图 4 可以看出: 当初始 pH 值在 5~9 之间时, 降解菌 ADBD-13 对莠去津的降解率均高于 75%, 当初始 pH 值为 8.0 时, 降解菌 ADBD-13 对莠去津的降解率最高, 达到了 (89±0.4)%。这与 pH 为 7~8 时降解率最高的节杆菌 T₃AB₁ 有着相似的最适 pH, 但是降解菌 ADBD-13 在 pH 为 5~9 时均能有效降解莠去津, 这表明降解菌 ADBD-13 对酸碱环境的耐受性较强^[28]。摇培温度是对降解菌 ADBD-13 降解特性影响最大的一个因素, 30℃ 是降解菌 ADBD-13 的最佳摇培温度, 此时莠去津降解率达到了 (80±0.5)%。同为产脲节杆菌的 ZF1 降解莠去津的最佳温度范围为 30~40℃, 并且在 10~50℃ 时也能够有效降解莠去津, 具有较强的耐冷耐热性^[29]。图 4(c) 表明, 随着莠去津初始质量浓度的增大, 降解菌 ADBD-13 对莠去津的降解率逐渐减小, 与何碧珀等^[20]报道的门多萨假单胞菌 SFAD3 的降解特性相似, 这

可能是由于莠去津质量浓度的升高会增大对降解菌的细胞毒性,导致降解菌的降解能力下降。

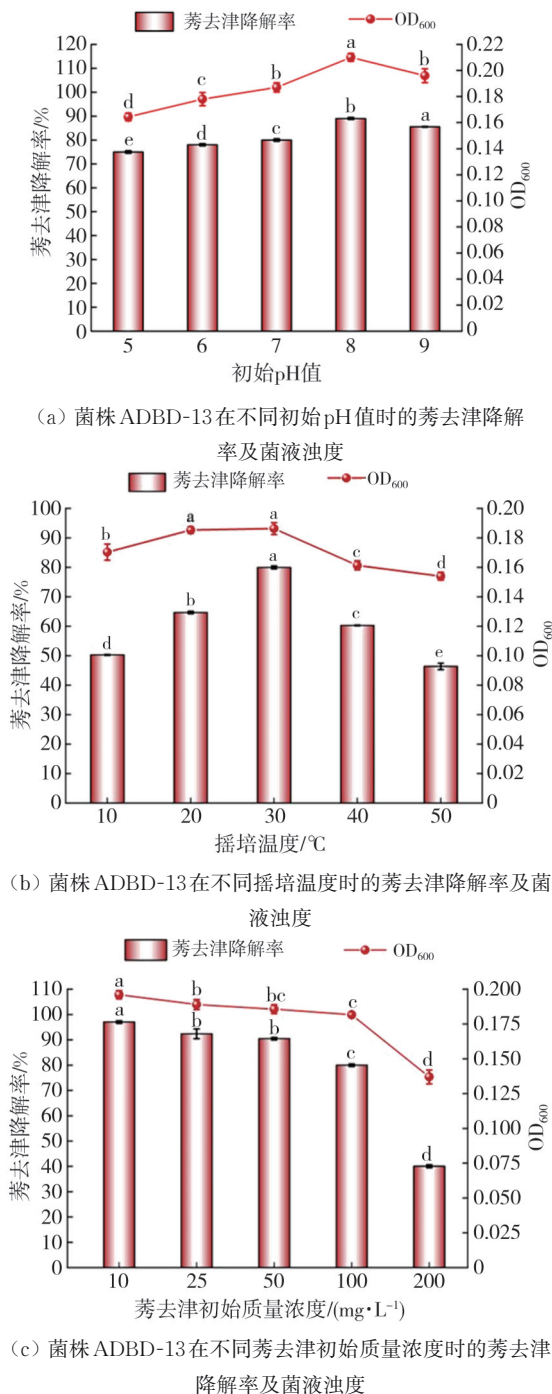


图 4 菌株 ADBD-13 在不同环境条件下的降解特性
Fig. 4 Degradation characteristics of strain ADBD-13 under different environmental conditions

2.4 降解菌 ADBD-13 对莠去津的降解途径

菌株 ADBD-13 降解莠去津产物的总离子流如图 5 所示。图 5 是将不同峰所在时间 t 对应的一级质谱中相对丰度最大的质荷比 m/z (以下简称

m/z) 标注在相应时间后做出的。图 5 中正离子流图中的 m/z 按照时间排序依次为 198.3, 212.2, 130.0, 216.1 和 230.1, 结合二级质谱检测结果预估对应的物质分别为 HA (羟基莠去津, Hydroxyatrazine), HMEA (2-羟基丙嗪, 2-hydroxypromazine), 氰尿酸 (Cyanuric acid), ATZ, MEA (甲基化莠去津, 6-chloro-N, N'-diisopropyl-1, 3, 5-triazine-2, 4-diamine); 负离子流图中的 m/z 按照时间排序依次为 128.0, 197.8, 223.9, 195.1 和 214.1, 结合二级质谱检测结果预估对应的物质分别为氰尿酸, HA, EAA (2-乙氨基莠去津, 2-ethylaminoatrazine), AA (2-氨基莠去津, 2-aminoatrazine), ATZ。

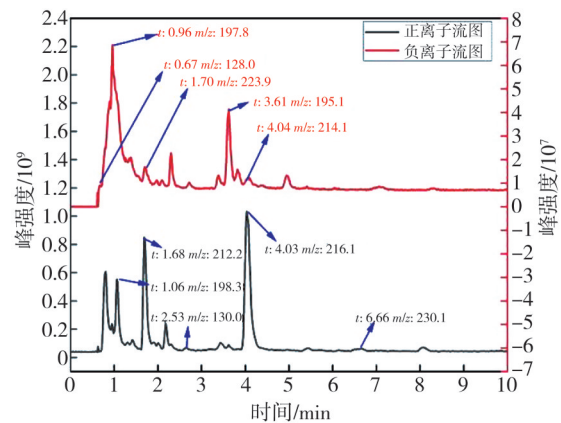


图 5 菌株 ADBD-13 降解莠去津产物的总离子流图
Fig. 5 Total ion current map of atrazine products degraded by strain ADBD-13

根据目标分子式检索,在正离子流图中 t 为 1.04 min 时, $C_6H_{10}N_4O_2$ 即 IPA (N-异丙酰胺, N-Isopropylammelide) 的相对丰度达到最大; t 为 1.08 min 时, $C_5H_9N_5O_1$ 即 DIHA (脱异丙基羟基莠去津, Deisopropylhydroxyatrazine) 的相对丰度达到最大。在负离子流图中 t 为 1.09 min 时, $C_8H_{15}N_5O_1$ 即 IPA 的相对丰度达到最大; t 为 9.61 min 时, $C_5H_9N_5O_1$ 即 DIHA 的相对丰度达到最大。故而推测菌株 ADBD-13 降解莠去津的产物中除去由图 5 预估出的物质外还包含 IPA 和 DIHA。

由预估出的物质推测降解菌 ADBD-13 对莠去津可能的降解路径有 4 种,如图 6 所示。图中虚线代表本试验中未确定的反应。

1) 莠去津去异丙基,生成脱异丙基莠去津 (Deisopropylatrazine, DEA), 然后发生取代反应,羟基取代氯生成 DIHA, 之后羟基取代氨基生成 DHA (2, 4-Dihydroxy-6- (N'-ethyl) -amino-1,

3, 5-tfiazine), 最后羟基化生成氰尿酸。

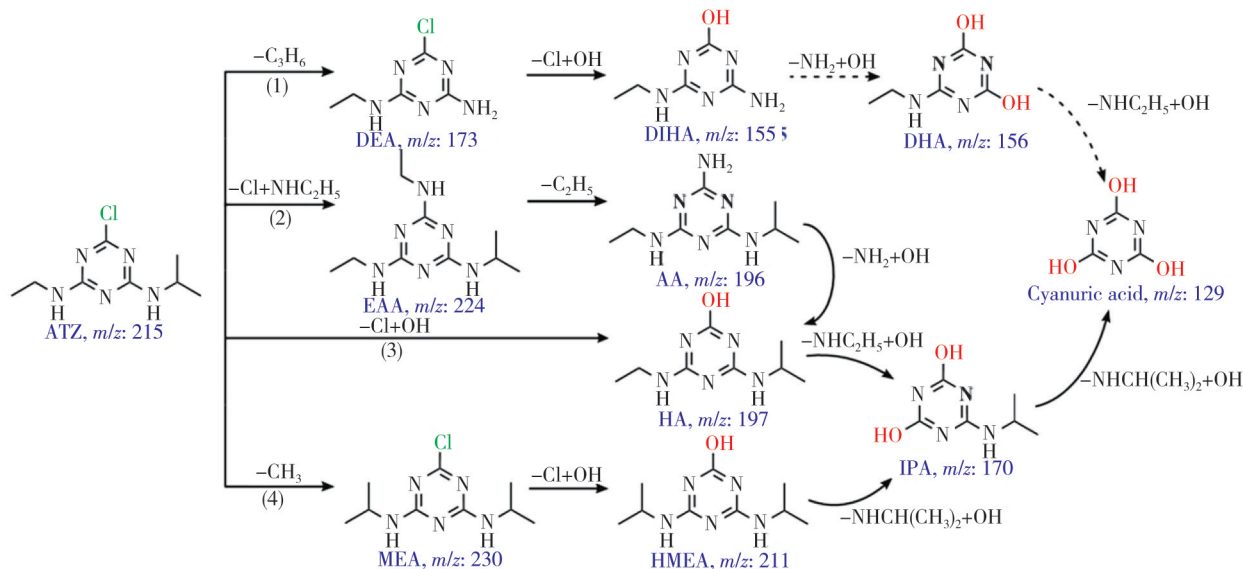


图 6 降解菌 ADBD-13 对莠去津可能的降解路径

Fig. 6 The probably degradation pathway of atrazine by degrading bacteria ADBD-13

2) 莠去津脱氯和乙氨基结合生成 EAA, 后去乙基生成 AA, 之后羟基取代氨基生成 HA, 后羟基取代乙氨基生成 IPA, 最后羟基化生成氰尿酸。

3) 莠去津中的氯被羟基取代生成 HA, 之后的降解路径同 2)。

4) 莠去津先引入一个甲基生成 MEA, 之后脱氯生成 HMEA, 后羟基取代异丙氨基生成 IPA, 最后羟基化生成氰尿酸。综上可知, 菌株 ADBD-13 可能含有降解基因 *trzN/atzA*、*atzB*、*atzC* 使得莠去津可以降解为氰尿酸, 但是一定不含有降解基因 *atzD*、*atzE*、*atzF*, 不能将氰尿酸进一步降解, 而同为产脉节杆菌的 ZF1 基因鉴定结果为含有降解基因 *trzN*、*atzB*、*atzC*, 同时也无法进一步降解氰尿酸, 这表明该降解机理具有一定的可靠性^[29]。

2.5 降解菌 ADBD-13 对含莠去津土壤的修复作用

由图 7 可知, 无菌蒸馏水在 7 d 后只能将土壤中的莠去津的质量比由 50 mg/kg 降低至 49.12 mg/kg, 降解率仅为 1.76%, 但是降解菌 ADBD-13 在 7 d 后可将土壤中莠去津的质量比降低至 14.73 mg/kg, 降解率可达 70.54%, 门多萨单胞菌 SFAD3 在 30 d 后对土壤中莠去津的降解率为 72.6%, 产脉节杆菌 ZF1 对土壤中莠去津的降解率在 6 d 内可达 99.2%, 可见降解菌 ADBD-13 具有显著的生物降解莠去津作用且能够对莠去

津污染的土壤进行有效修复^[20,29]。

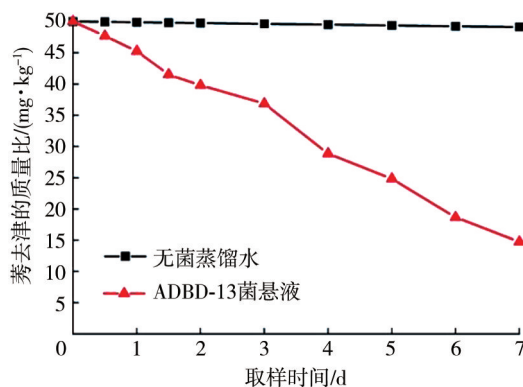


图 7 降解菌 ADBD-13 处理后土壤中的莠去津残留量
Fig. 7 The residue of atrazine in soil treated with degrading bacterium ADBD-13

2.6 降解菌 ADBD-13 在不同培养条件下对莠去津胁迫下小麦幼苗及玉米幼苗的修复作用

2.6.1 降解菌 ADBD-13 在土壤中对莠去津胁迫下小麦幼苗及玉米幼苗的修复作用

莠去津胁迫的盆栽试验的结果如表 1 和表 2 所示。可以看出, 在莠去津胁迫下小麦和玉米的株高、根长、鲜重和干重均降低了至少 32%, 而单独施加降解菌 ADBD-13 发酵液对小麦和玉米幼苗的 4 个生长指标的影响均很小, 菌液和药液混施时小麦幼苗及玉米幼苗的 4 个生长指标与受胁迫时相比分别有至少 21% 及 30% 的提升^[30-31]。这个结果与节杆菌 C2 在土壤中对莠去津胁迫下的小麦幼苗的修复效果几乎完全相同^[30]。这表明,

使用降解菌 ADBD-13 发酵液可以有效修复土壤 中莠去津对小麦及玉米幼苗的胁迫。

表 1 ADBD-13 在盆栽试验中对莠去津胁迫下对小麦幼苗的修复作用

Tab. 1 Repair effect of ADBD-13 on wheat seedlings under atrazine stress in pot experiment

处理方式	株高/cm	根长/cm	鲜重/g	干重/g
无菌蒸馏水(CK)	22.34±0.22 c	13.34±0.09 c	0.317±0.011 d	0.042±0.003 a
莠去津	15.18±0.12 a	8.74±0.17 a	0.125±0.002 a	0.018±0.002 b
ADBD-13	22.70±0.16 d	13.38±0.26 c	0.274±0.004 c	0.041±0.002 a
ADBD-13+莠去津	18.46±0.23 b	10.57±0.28 b	0.174±0.003 b	0.023±0.002 b

注:表中同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$);表中同列相同小写字母表示不存在显著差异($P>0.05$)。

表 2 ADBD-13 在盆栽试验中对莠去津胁迫下对玉米幼苗的修复作用

Tab. 2 Repair effect of ADBD-13 on maize seedlings under atrazine stress in pot experiment

处理方式	株高/cm	根长/cm	鲜重/g	干重/g
无菌蒸馏水(CK)	45.03±0.56a	38.46±0.19 a	3.449±0.127 d	0.438±0.006 d
莠去津	21.53±0.22 d	19.64±0.16 c	1.948±0.103 a	0.249±0.008 a
ADBD-13	42.77±0.18 b	38.60±0.23 a	2.932±0.153 c	0.364±0.020 c
ADBD-13+莠去津	38.22±0.18 c	34.35±0.18 b	2.531±0.150 b	0.343±0.070 b

注:表中同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$);表中同列相同小写字母表示不存在显著差异($P>0.05$)。

2.6.2 降解菌 ADBD-13 在 MM 液体培养基中对莠去津胁迫下小麦幼苗及玉米幼苗的修复作用

表 3 和表 4 表明,在不同处理液中生长 14 d 的小麦和玉米幼苗的生长指标均有明显变化。降解菌 ADBD-13 和莠去津处理后的小麦和玉米幼苗的 4 个生长指标均有一定程度的降低。将同时加入降解菌 ADBD-13 及莠去津的处理组与单独加入莠去津的处理组的数据进行比较,前者小麦

幼苗的 4 个生长指标分别增加了 24%, 57%, 70% 和 91%, 玉米幼苗的四个生长指标分别增加了 27%, 105%, 32% 和 34%。对比菌株 ADBD-13 对莠去津胁迫下的小麦幼苗及玉米幼苗的两种修复方式的修复作用,菌株 ADBD-13 在水培时对莠去津胁迫下小麦玉米幼苗修复效果比土壤中的修复效果更好,这是因为水培修复时多数莠去津已经转化为对小麦和幼苗威胁更小的氰尿酸。

表 3 ADBD-13 修复后水培时的小麦幼苗生长指标

Tab. 3 Growth indexes of wheat seedlings under hydroponics after ADBD-13 restoration

处理方式	株高/cm	根长/cm	鲜重/g	干重/g
MM 液体培养基(CK)	14.23±0.04 c	25.80±0.09 d	0.236±0.004 d	0.054±0.002 d
ADBD-13	13.54±0.04 b	24.64±0.02 c	0.207±0.006 b	0.048±0.003 c
莠去津	11.35±0.06 a	14.04±0.05 a	0.134±0.001 a	0.022±0.003 a
ADBD-13+莠去津	14.43±0.11 d	22.08±0.06 b	0.228±0.006 c	0.042±0.001 b

注:表中同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$);表中同列相同小写字母表示不存在显著差异($P>0.05$)。

表 4 ADBD-13 修复后水培时的玉米幼苗生长指标

Tab. 4 Growth indexes of maize seedlings under hydroponics after ADBD-13 restoration

处理方式	株高/cm	根长/cm	鲜重/g	干重/g
MM 液体培养基(CK)	21.27±0.26 a	25.59±0.15 b	3.143±0.007 a	0.338±0.011 a
ADBD-13	19.87±0.21 b	27.03±0.19 a	3.088±0.047 a	0.334±0.013 a
莠去津	12.00±0.09 d	9.98±0.09 d	1.390±0.066 c	0.183±0.007 c
ADBD-13+莠去津	15.29±0.11 c	20.45±0.11 c	1.831±0.022 b	0.245±0.010 b

注:表中同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$);表中同列相同小写字母表示不存在显著差异($P>0.05$)。

3 结论

本文从喷施过莠去津农药的农田土壤中筛选出一株可高效降解莠去津的菌株 ADBD-13,通过形态特征、16S rRNA 序列及 ANI 指数分析鉴定确定其菌株种属为产脉节杆菌,该菌株对 100 mg/L 莠去津的降解率为 99.90%,且能有效降解

200 mg/L 的莠去津,在偏酸偏碱条件下均能有效降解莠去津并具有一定耐热耐冷性。菌株 ADBD-13 对莠去津的降解方法包含去异丙基、脱氯加乙胺基、脱氯加羟基、直接加甲基四种,之后通过取代反应逐步降解为氰尿酸。菌株 ADBD-13 也可以有效降解土壤中的莠去津,修复莠去津在土壤及水体中对小麦及玉米幼苗的胁迫。本研究为修复污染土壤提供了菌株资源,具有良好的

应用前景。

参考文献:

- [1] 马丽雅, 王亚, 葛静, 等. 降解菌 *Pseudomonas sp.* AT2 对莠去津胁迫下水稻生长的影响机制[J]. 农药学报, 2024, 26(1): 140-148.
MA Liya, WANG Ya, GE Jing, et al. Mechanism of the effect of *Pseudomonas sp.* AT2 on the growth of rice under atrazine stress[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2024, 26(1): 140-148. (in Chinese)
- [2] SAWANGJIT S. Isolation, identification of novel atrazine-degrading *Burkholderia sp.* and its atrazine biodegradation efficiency[J]. Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Science, 2018, 20(4): 1147-1152.
- [3] 李阳阳, 张金波, 沙君雪, 等. 阿特拉津降解菌 LY-2 的分离鉴定及其对污染土壤的修复[J]. 农业生物技术学报, 2018, 26(6): 987-994.
LI Yangyang, ZHANG Jinbo, SHA Junxue, et al. Isolation and identification of atrazine-degrading bacterial strain LY-2 and its bioremediation to contaminated soil[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2018, 26(6): 987-994. (in Chinese)
- [4] 王太泉, 宋梁栋, 冯文涛. 除草剂烟嘧磺隆和莠去津对不同时期小麦生长及产量的影响[J]. 陕西农业科学, 2018, 64(11): 9-12.
WANG Taiquan, SONG Liangdong, FENG Wentao. Effects of herbicide nicosulfuron and atrazine on wheat growth and yield at different growth stages[J]. Shaanxi Journal of Agricultural Sciences, 2018, 64(11): 9-12. (in Chinese)
- [5] JIANG D, JIANG Z, LIU S Q, et al. Inhibition mechanism of atrazine on soybean growth insight from the plant nitrogen fixation and rhizobia diversity inhabiting in nodules and rhizosphere soil[J]. Applied Soil Ecology, 2024, 195: 105236.
- [6] 王容燕, 马娟, 高波, 等. 土壤中烟嘧磺隆和莠去津残留对甘薯的药害评价[J]. 农药学报, 2021, 23(5): 915-921.
WANG Rongyan, MA Juan, GAO Bo, et al. Phytotoxicities of nicosulfuron and atrazine residues in soil on sweetpotato[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2021, 23(5): 915-921. (in Chinese)
- [7] 白亚男, 周蓉, 邢巍巍, 等. 除草剂莠去津暴露对人类和其他哺乳动物健康影响的研究进展[J]. 职业与健康, 2024, 40(4): 547-553.
BAI Yanan, ZHOU Rong, XING Weiwei, et al. Research progress on healthy effects of herbicide atrazine exposure on human and other mammal[J]. Occupation and Health, 2024, 40(4): 547-553. (in Chinese)
- [8] KOLEKAR P D, PATIL S M, SURYAVANSHI M V, et al. Microcosm study of atrazine bioremediation by indigenous microorganisms and cytotoxicity of biodegraded metabolites[J]. Journal of Hazardous Materials, 2019, 374: 66-73.
- [9] MILI C, KALITA S, ROY S. Microbes as a potential bioremediation tool for atrazine-contaminated soil: a review[J]. Journal of Applied Biology & Biotechnology, 2023, 11: 8-15.
- [10] 吴占文, 王帅, 魏莹, 等. 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[J]. 中国油料作物学报, 2023, 45(1): 183-190.
WU Zhanwen, WANG Shuai, WEI Yin, et al. Isolation of atrazine degrading *Arthrobacter* TW-1 and its preliminary application in soybean[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2023, 45(1): 183-190. (in Chinese)
- [11] 高天聪. 阿特拉津在黑土中的微生态效应及其降解功能菌群的构建[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2023.
- [12] YANG X Y, WEI H Y, Zhu C X, et al. Biodegradation of atrazine by the novel *Citricoccus sp.* strain TT3 [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 147: 144-150.
- [13] TONELLI FERNANDES A F, SANTOS BRAZ V, BAUERMEISTER A, et al. Degradation of atrazine by *Pseudomonas sp.* and *Achromobacter sp.* isolated from Brazilian agricultural soil[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2018, 130: 17-22.
- [14] 王志刚, 张颖, 郭火生, 等. 阿特拉津降解菌 *Acinetobacter sp.* DNS32 对无机氮源的响应[J]. 微生物学通报, 2014, 41(8): 1541-1546.
WANG Zhigang, ZHANG Ying, GUO Huosheng, et al. Response of an atrazine-degrading bacterium strain *Acinetobacter sp.* DNS32 to inorganic nitrogen source[J]. Microbiology China, 2014, 41(8): 1541-1546. (in Chinese)
- [15] FAZLURRAHMAN, BATRA M, PANDEY J, et al. Isolation and characterization of an atrazine-degrading *Rhodococcus sp.* strain MB-P1 from contaminated soil[J]. Letters in Applied Microbiology, 2009, 49(6): 721-729.
- [16] 朱晓明, 时焦, 张保全, 等. 除草剂不同耐性水平烟草品种叶面微生物研究[J]. 中国烟草科学, 2019, 40(6): 60-65.

- ZHU Xiaoming, SHI Jiao, ZHANG Baoquan, et al. Study on foliar microbes of tobacco varieties with different tolerant levels to herbicides [J]. Chinese Tobacco Science, 2019, 40(6): 60-65. (in Chinese)
- [17] AGUIAR L M, DE FREITAS SOUZA, DE LAIA M L, et al. Metagenomic analysis reveals mechanisms of atrazine biodegradation promoted by tree species [J]. Environmental Pollution, 2020, 267: 115636.
- [18] LIANG Y, DING L N, SONG Q, et al. Biodegradation of atrazine by three strains: identification, enzymes activities, and biodegradation mechanism [J]. Environmental Pollutants and Bioavailability, 2022, 34(1): 549-563.
- [19] 赵秋, 丁海娥, 党苗苗, 等. 蒲公英内生真菌分离纯化及其形态学鉴定 [J]. 农产品加工, 2019(14): 55-57.
ZHAO Qiu, DING Haie, DANG Miaomiao, et al. Isolation, purification and morphological identification of endophytic fungi from dandelion [J]. Farm Products Processing, 2019(14): 55-57. (in Chinese)
- [20] 何碧珀, 赵辉, 倪云霞, 等. 除草剂莠去津降解菌 SFAD3 的分离鉴定及其土壤修复潜力 [J]. 植物保护学报, 2023, 50(4): 1096-1104.
HE Bibuo, ZHAO Hui, NI Yunxia, et al. Isolation, identification and soil remediation potential of the herbicide atrazine-degrading bacterium *Pseudomonas mendocina* strain SFAD3 [J]. Acta Phytologica Sinica, 2023, 50(4): 1096-1104. (in Chinese)
- [21] 孙楠, 朱广雷, 杨安培, 等. 寒区降解多环芳烃耐冷菌株的分离鉴定及特性 [J]. 农业工程学报, 2022, 38(17): 224-231.
SUN Nan, ZHU Guanglei, YANG Anpei, et al. Isolation, identification and characterization of cold resistance and PAHs-degrading bacteria [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2022, 38(17): 224-231. (in Chinese)
- [22] MA Y F, ZHU H, LIU H W, et al. Degrading characteristics of oil-degrading bacteria and its study of petroleum hydrocarbon metabolites [J]. Clean-Soil, Air, Water: A Journal of Sustainability and Environmental Safety, 2024, 52(2): 300163. 1-300163. 12.
- [23] MOFEED J, MOSLEH Y Y. Toxic responses and antioxidative enzymes activity of *Scenedesmus obliquus* exposed to fenhexamid and atrazine, alone and in mixture [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2013, 95(1): 234-240.
- [24] 王彦钦, 李武阳, 孟宪刚, 等. 衣藻对盐胁迫下小麦幼苗生长和生理指标的影响研究 [J]. 浙江农业科学, 2024, 65(3): 497-504.
- WANG Yanqin, LI Wuyang, MENG Xiangang, et al. Effects of *Chlamydomonas debaryana* powder on growth and physiological indices of wheat seedlings under salt stress [J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2024, 65(3): 497-504. (in Chinese)
- [25] 胡星磊, 白鸽, 邱巍, 等. 生物菌剂对青枯病防控效果及其影响因素的优化 [J]. 植物营养与肥料学报, 2024, 30(4): 655-665.
HU Xinglei, BAI Ge, QIU Wei, et al. Control effect of biological agents on soil-born bacterial wilt and the optimization of the influencing factors [J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizers, 2024, 30(4): 655-665. (in Chinese)
- [26] 亢涵, 藏春月, 李玲, 等. 1株高效除磷菌的筛选及其除磷性能研究 [J]. 环境科学与技术, 2017, 40(S1): 56-60.
KANG Han, ZANG Chunyue, LI Ling, et al. Screening of a high-efficiency phosphorus removal bacterium and its phosphorus removal performance [J]. Environmental Science & Technology, 2017, 40(S1): 56-60. (in Chinese)
- [27] 吕惠萍. 莠去津高效降解菌的分离与鉴定 [J]. 化工技术与开发, 2017, 46(2): 22-24.
LYU Huiping. Isolation and identification of atrazine high efficient degradation bacteria [J]. Technology & Development of Chemical Industry, 2017, 46(2): 22-24. (in Chinese)
- [28] 刘春光, 杨峰山, 卢星忠, 等. 阿特拉津降解菌 T₃AB₁ 的分离鉴定及土壤修复 [J]. 微生物学报, 2010, 50(12): 1642-1650.
LIU Chunguang, YANG Fengshan, LU Xingzhong, et al. Isolation, identification and soil remediation of atrazine degrading strain T₃AB₁ [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(12): 1642-1650. (in Chinese)
- [29] 张志菲. 阿特拉津降解菌株 ZF1 的降解特性及其土壤修复能力的研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2022.
- [30] 徐昊昱. 阿特拉津降解菌 *Arthrobacter sp.* C2 的分离鉴定、降解特性和机理 [D]. 杭州: 浙江大学, 2018.
- [31] 郝永丽, 乌仁图雅, 高博, 等. 莠去津降解菌 Y204 的分离鉴定及其对甜菜莠去津药害缓解作用研究 [J]. 中国糖料, 2024, 46(2): 57-63.
HAO Yongli, WUREN Tuya, GAO Bo, et al. Isolation and identification of atrazine-degrading strain Y204 and its toxicity alleviation to atrazine in sugar beet [J]. Sugar Crops of China, 2024, 46(2): 57-63. (in Chinese)