

降解菌对大豆生长前期莠去津毒害作用的缓解

刘丹丹,刘 畅,王 琳,赵 晋,丁永昌

(沈阳化工大学 环境与安全工程学院,辽宁 沈阳 110142)

**摘 要:**为明确降解菌(*Enterobacter* sp.)对大豆莠去津毒害作用的缓解能力,以辽豆 15 为试验材料,通过室内种子萌发和幼苗盆栽试验方法,对大豆生长前期的生长和生理指标进行测定。结果表明:与莠去津处理比较,降解菌能显著提高大豆种子的发芽率、发芽指数、种子活力指数和  $\alpha$ -淀粉酶活性,减少电解质外渗和脯氨酸积累。同时,降解菌对大豆幼苗生长有一定的促进作用,大豆经菌液处理后,其根系相关发育指标、胚芽和子叶重量均显著高于莠去津处理。可见,试验菌株能有效缓解生长前期莠去津对大豆的毒害作用。

**关键词:**莠去津;大豆;生物修复

**中图分类号:**S565.1;X53      **文献标识码:**A      **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2017.06.0938

Alleviation Effects of Degrading Bacteria on Atrazine Toxicity in Early Stage of Soybean Growth

LIU Dan-dan, LIU Chang, WANG Lin, ZHAO Jin, DING Yong-chang

(Department of Environmental and Safety Engineering, Shenyang University of Chemical Technology, Shenyang 110142, China)

**Abstract:** Atrazine toxicity alleviation of degrading bacteria (*Enterobacter* sp.) was investigated by determination of growth and physiological indexes of soybean, utilizing seed germination and pot experiments in the early stage of soybean growth. The results showed that the degrading bacteria could significantly increase the germination rate, germination index, seed vigor index and  $\alpha$ -amylase activity of soybean seeds, reduce the electrolyte extravasation and the accumulation of proline. Degradation bacteria could promote the growth of soybean seeding. After treated with bacterial solution, root development index, embryo and cotyledon weight were significantly increased compared with atrazine treatment. Test strains could effectively relieve the toxicity of atrazine.

**Keywords:** Atrazine; Soybean; Bioremediation

中国是农业大国,农化产品的用量巨大,随之而来的环境污染、生态破坏和农产品安全问题不容忽视。莠去津是世界范围内广泛使用的除草剂,具有价格低廉,除草效果好等优点,常用于玉米、菠萝、高粱、棉花田等防除一年生禾本科杂草和阔叶杂草<sup>[1-3]</sup>。莠去津曾一度被认为具有较高的环境安全性,但随着毒理学研究的不断深入,其生物毒性逐渐被人们所认识。农业生产中莠去津残留易使敏感植物如大豆、菜豆、小麦、谷子、甜菜和花生等受害<sup>[4-6]</sup>,产生严重经济损失的同时,也带来了恶劣的社会影响。目前,环境中莠去津污染的去除主要有光解、水解和生物降解方法,而生物技术以其安全、经济、高效和操作简便等优点逐渐成为众多治理方法中的首选。从 20 世纪 90 年代至今,已有大量莠去津降解微生物被鉴定出来<sup>[7]</sup>。本试验中的供试细菌(*Enterobacter* sp.),由沈阳化工大学环境科学实验室筛选并保存,前期工作中,其高效的莠去津降解能力已得到证实<sup>[8]</sup>。

大豆是我国常见的经济作物,种植面积大,大豆-玉米轮作是常见的生产模式。这种轮作方式在解决大豆连作障碍、促进土壤氮素循环、增加大豆增产、改善大豆品质、维持土壤健康和防虫抗病等方面都具有重要意义<sup>[9]</sup>。但玉米田施用莠去津后,极易对后茬大豆产生毒害,当土壤中莠去津含量超过  $0.1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  时,就会抑制大豆的萌发和生长<sup>[10]</sup>。有研究表明,功能细菌能有效去除土壤中莠去津残留<sup>[11]</sup>,提高大豆抗莠去津的能力<sup>[12]</sup>。本试验研究了在大豆种子萌发和幼苗生长过程中,降解菌对莠去津毒害作用的缓解能力,旨在为缓解莠去津药害,明确降解菌的环境安全性奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

- 1.1.1 药剂 莠去津,由沈阳化工研究院提供,纯度 97%。
- 1.1.2 大豆 辽豆 15,购自辽宁省农业科学院。

选籽粒饱满的大豆种子,蒸馏水洗净表面,用质量分数 0.1% HgCl<sub>2</sub>溶液进行消毒,无菌水冲洗,滤纸吸干后备用<sup>[13]</sup>。

1.1.3 降解菌 莠去津降解菌 *Enterobacter* sp. 由沈阳化工大学环境科学实验室筛选并保存。降解菌在 LB 液体培养基中培养至对数生长期,制成生物量为 1 × 10<sup>8</sup> CFU · mL<sup>-1</sup> 菌液,备用。

1.2 方法

将大豆置于 20 mL 不同浓度莠去津处理液中浸泡 6 h,莠去津处理液浓度分别为 0.05、0.1、0.2、0.4 和 0.8 mg · L<sup>-1</sup>,每个处理放入大豆 50 粒,作为药剂处理。种子充分吸水膨胀后,置于放有纱布的培养皿中,避光,保湿,并保持 25℃。采用相同方法,用 20 mL 含有等量莠去津的降解菌液进行种子处理,检验细菌解除莠去津毒害的能力。试验同时以清水作对照,设置 5 次重复。

在 4 d 后记录并统计大豆种子萌发率、种子发芽指数、种子活力指数、电解质渗透、α - 淀粉酶活性和脯氨酸含量等指标。其中,种子萌发以胚根突出种皮 1 mm 为萌发标准开始数据记录;萌发率(%) = 发芽种子数/处理种子总数 × 100;发芽指数 = 第 t 天时的全部发芽种子数/发芽天数;种子活力指数 = 发芽指数 × 第 4 天发芽大豆的单株平均鲜重;电解质渗透采用 DDS-IIA 型电导率仪直接

测定浸出液的电导率<sup>[14]</sup>;α - 淀粉酶活性测定参照张志良<sup>[15]</sup>的方法;脯氨酸含量测定采用薛应龙<sup>[16]</sup>的方法。

待种子萌发结束后,每个处理随机取种子 15 粒进行幼苗生长测定。取底部 φ 6 cm,顶部 φ 9 cm,高 9 cm 的盆钵装满土,播种大豆,3 粒每盆。室温下放置,试验期间保持土壤湿润。7 d 后,测量幼苗主根长度、侧根总长、侧根数量、根部鲜重、胚芽和子叶重量。

1.3 数据分析

试验数据使用 SPSS 22.0 和 Excel 2007 进行统计和差异性分析。

2 结果与分析

2.1 降解菌对莠去津作用下大豆种子萌发的影响

如表 1 所示,在药剂处理中,随着莠去津浓度的增大,大豆种子的萌发率显著降低,种子发芽指数和活力指数也逐渐下降,各处理间差异显著。加入降解细菌,莠去津的毒性明显减弱,加菌液处理后,种子萌发率显著高于单独莠去津处理、种子活力指数除 0.05 mg · L<sup>-1</sup> + 菌液处理外其它处理均较对应药剂处理显著提高,种子发芽指数在莠去津浓度为 0.4 和 0.8 mg · L<sup>-1</sup> 时,加菌液处理显著缓解了莠去津的毒害作用。

表 1 降解菌对莠去津作用下大豆种子萌发的影响

Table 1 Effect of degradation bacteria on germination of sybean seeds under atrazine stress

莠去津浓度 Atrazine concentration/(mg · L <sup>-1</sup> )	菌液 Bacteria	种子萌发率 Germination rate/%	种子发芽指数 Germination rate index	种子活力指数 Active index
0.05	-	92 ± 1.22 c	34 ± 1.30 ab	153 ± 1.22 b
	+	98 ± 1.14 a	35 ± 2.28 a	154 ± 1.14 b
0.1	-	86 ± 0.83 d	30 ± 1.81cd	129 ± 1.30 d
	+	95 ± 1.30 b	32 ± 1.30 bc	140 ± 2.04 c
0.2	-	78 ± 0.83 e	26 ± 1.22 ef	104 ± 1.48 f
	+	91 ± 0.89 c	28 ± 1.64 de	120 ± 1.64 e
0.4	-	69 ± 1.14 f	20 ± 2.04 g	72 ± 2.17 h
	+	85 ± 2.30 d	24 ± 1.48 f	94 ± 0.83 g
0.8	-	59 ± 1.14 g	15 ± 2.50 h	46 ± 1.30 j
	+	78 ± 0.83 e	19 ± 1.64 g	68 ± 0.83 i
对照 Control		97 ± 0.83 a	35 ± 1.30 a	160 ± 1.58 a

表中数据均为 5 次重复“平均值 ± 标准差”,不同小写字母差异显著(P < 0.05),“-”代表未添加降解菌,“+”代表添加降解菌。下同。  
Date are(  $\bar{x} \pm SD$  ), different lowercase indicate significant different ( P < 0.05 ), ‘ - ’ represent no atrazine addition, ‘ + ’ represent bacteria addition. The same as below.

2.2 大豆种子淀粉酶活性、脯氨酸含量及电解质渗透率的变化

如图 1 所示,莠去津 + 降解菌处理中,α - 淀粉酶活性高于单独药剂处理(图 1a),而脯氨酸含量也

在添加降解菌后,出现不同程度的下降(图 1b)。脯氨酸是常见的植物抗逆性指标,含量降低说明莠去津的毒害作用减弱。

莠去津胁迫让大豆内含物质外渗,使渗透率上

升,营养物质流失不仅会影响种子萌发,对大豆的后期生长也是极为不利。用低浓度莠去津处理大豆种子时,渗透率数值变化不大,但随着莠去津浓度的提高,电解质渗透量继续增加,加入降解菌后

渗透率与清水对照基本相同,此时莠去津对大豆的胁迫作用不明显,降解细菌可以减缓大豆种子电解质外渗(图1c)。

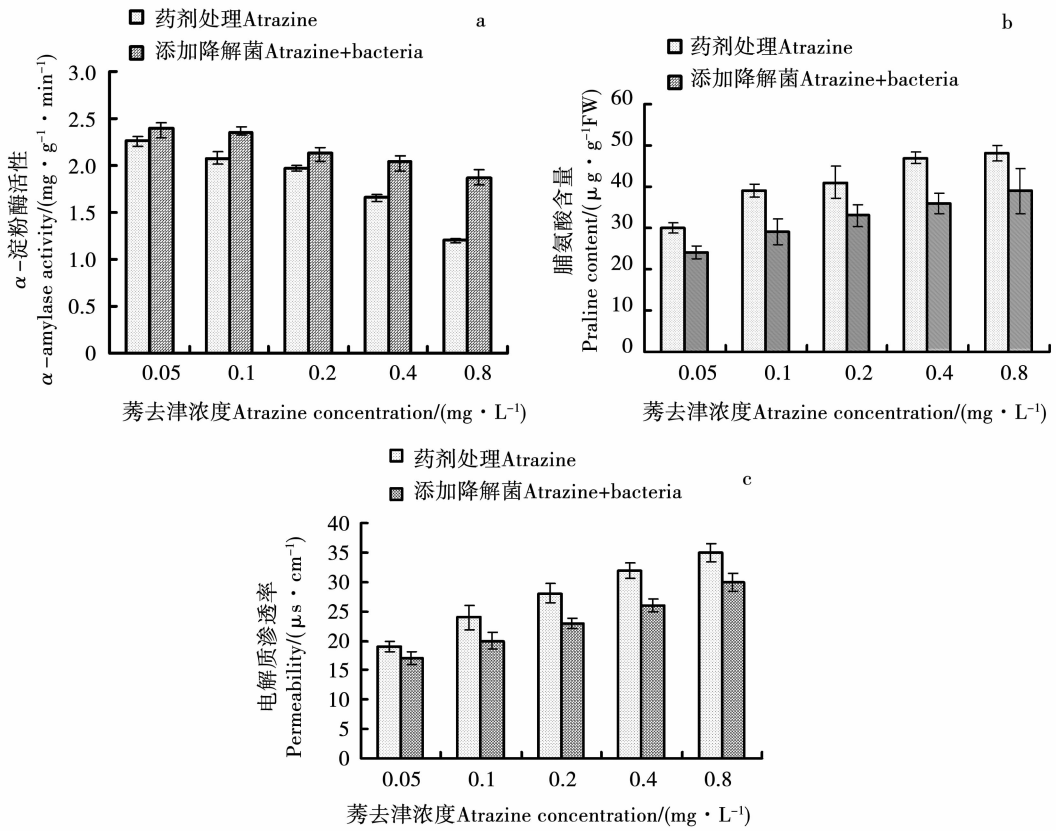


图1 不同处理的 $\alpha$ -淀粉酶活性(a)、脯氨酸含量(b)及电解质含量(c)变化

Fig. 1 Changes of  $\alpha$ -amylase activity (a), proline content (b) and permeability (c) in different treatments

2.3 降解菌对莠去津作用下大豆幼苗根系生长的影响

如表2所示,莠去津 $0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,对大豆幼苗根系生长的影响相对较小,随着莠去津浓度升高,幼根生长受到较明显抑制,加入降解菌可以起到不

同程度的抑制减缓作用,莠去津浓度 $0.1, 0.2, 0.4$ 和 $0.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,加降解菌处理的主根长、侧根数量、侧根总长及根重均显著高于单独莠去津处理。

表2 降解菌对莠去津作用下大豆幼苗根系生长的影响

Table 2 Effects of degradation bacteria on root growth of soybean seedling under atrazine stress					
莠去津浓度 Atrazine concentration /( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	菌液 Bacteria	主根长 Taproot length /cm	侧根数量 Number of lateral roots	侧根总长 Total length of lateral roots / cm	根重 Root weight /g
0.05	-	13.20 $\pm$ 0.4 a	25.94 $\pm$ 1.6 a	38.56 $\pm$ 0.77 bc	0.14 $\pm$ 0.02 ab
	+	13.45 $\pm$ 0.77 a	26.09 $\pm$ 1.6 a	40.50 $\pm$ 1.3 a	0.16 $\pm$ 0.01 a
0.1	-	11.74 $\pm$ 0.84 bc	20.12 $\pm$ 1.94 c	32.10 $\pm$ 1.16 d	0.11 $\pm$ 0.02 cd
	+	13.08 $\pm$ 0.95 a	25.45 $\pm$ 1.2 a	39.26 $\pm$ 0.94 ab	0.15 $\pm$ 0.01 ab
0.2	-	9.20 $\pm$ 0.28 de	16.47 $\pm$ 1.2 d	26.62 $\pm$ 1.72 e	0.08 $\pm$ 0.01 e
	+	12.64 $\pm$ 0.73 ab	23.16 $\pm$ 1.17 b	37.20 $\pm$ 1.13 c	0.13 $\pm$ 0.01 bc
0.4	-	8.65 $\pm$ 0.54 e	10.32 $\pm$ 1.2 e	20.87 $\pm$ 1.66 f	0.05 $\pm$ 0.01 f
	+	11.33 $\pm$ 0.99 c	20.28 $\pm$ 1.47 c	33.64 $\pm$ 0.97 d	0.11 $\pm$ 0.01 cd
0.8	-	5.82 $\pm$ 0.18 f	6.40 $\pm$ 1.02 f	13.66 $\pm$ 0.87 g	0.02 $\pm$ 0.01 g
	+	10.23 $\pm$ 0.81 d	16.60 $\pm$ 1.02 d	26.58 $\pm$ 1.31 e	0.09 $\pm$ 0.01 de
对照 Control		13.22 $\pm$ 0.91 a	26.17 $\pm$ 0.75 a	40.25 $\pm$ 1.18 ab	0.15 $\pm$ 0.02 ab

2.4 降解菌对莠去津作用下大豆胚芽和子叶生长的影响

图2所示,在0.05 mg·L<sup>-1</sup>时,莠去津对大豆胚芽和子叶重量的影响不大,降解细菌对胚芽和子叶的生长表现出一定的促进作用。莠去津浓度大于

0.1 mg·L<sup>-1</sup>,胚芽和子叶生长受阻,当莠去津浓度越大,这种生长阻碍表现的越明显,在降解菌+莠去津处理中,胚芽和子叶重量均有增加,但仍低于对照。

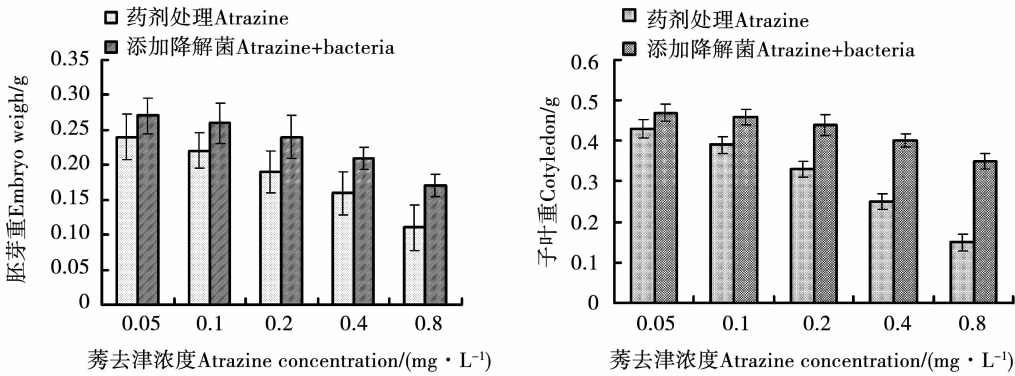


图2 不同处理中大豆胚芽(a)及子叶(b)生长情况  
Fig. 2 Soybean embryo (a) and cotyledon (b) growth in different treatments

3 结论与讨论

许多植物在生长发育过程中受到莠去津胁迫会表现出不同程度的生长受阻和抗性下降,易出现死亡。植物的抗逆性改变可以通过相关的生理生化指标反映出来。在逆境胁迫下,植物体内受体蛋白传递胁迫信号,产生大量活性氧,引起膜脂过氧化并破坏细胞器,使细胞内含物外渗,电解质流失,电导率上升。试验中,大豆萌发过程中电导率随着莠去津浓度的增加有所升高,与相关研究结果一致<sup>[17]</sup>。 $\alpha$ -淀粉酶是水解淀粉的关键酶,其活性直接关系淀粉水解程度,对大豆萌发和幼苗生长有重要影响。莠去津处理的大豆,其种子活力下降,种子萌发率和发芽指数也显著降低,与淀粉酶的活性变化趋势一致。脯氨酸在水中的溶解度大,显著高于其它氨基酸,植物在不利环境条件下,可以通过调节脯氨酸含量,来降低环境胁迫带来的自由基损伤,维持细胞的还原状态。大豆用莠去津处理后,脯氨酸含量升高,添加降解菌后,脯氨酸含量显著降低,表明莠去津对大豆的毒害作用得到了缓解。莠去津作用下,大豆生长和生理指标的变化,与前人研究结果基本一致<sup>[18-19]</sup>。但在添加降解菌后,这些不利的情况得到显著改善,说明降解菌能够有效缓解莠去津对大豆的伤害作用。

从试验结果还能看出,降解菌在降低莠去津毒性的同时,具有促进植物生长的生物活性。试验菌株主要通过哪种作用方式来发挥其生物活性,需要我们进一步的探讨。如果降解菌主要是通过分解莠去津来使种子处理液中莠去津浓度降低,最终减

弱莠去津对大豆的毒害作用,那么在后续的研究中,应侧重进行菌株分解莠去津机制方面的研究,同时探索降解菌分解莠去津的最佳环境条件,并加快微生物菌剂的研发工作,从而最大程度发挥细菌的分解能力。若降解菌通过促进植物生长来提高对莠去津的抗性,则可以将后续研究的重点放在不同环境胁迫的植物促生效果的对比上,例如可以选择其它对大豆生长影响较大的药剂,检测降解菌是否能够同样减轻其毒害作用,相关的后续研究能够进一步扩展降解菌的使用范围,即针对多种药剂的促生作用来发挥解毒作用。

试验结果显示,莠去津对大豆有明显毒害作用,施用降解菌能够有效减缓毒害。在大豆种子萌发过程,应用降解菌处理的大豆种子,其发芽率、发芽指数、活力指数、电解质渗透率、淀粉酶和脯氨酸含量都与药剂处理有显著差异,这些指标的变化使植物活力和抗逆性增强。试验中,降解菌不能完全解除高浓度莠去津对大豆的伤害作用,这很可能与降解菌的有效浓度有关,可以通过制备性能稳定的细菌菌剂来解决这一问题。淀粉水解酶与淀粉水解强度直接相关,能直接影响种子萌发力和幼苗前期生长。大豆受到伤害后,可使细胞脂膜和细胞器过氧化,导致电解质外渗。脯氨酸则与植物的抗逆性有关,在不良环境条件下,植物通过增加体内脯氨酸含量来提高抗逆性。研究这些生化指标的变化,对我们了解降解细菌的作用机理有一定的帮助。

幼苗期的大豆,其植株抗性弱,对不良环境条件尤为敏感。幼苗长势直接关系到植株后期的养分吸收和抗病性能,对产量也有很大影响。试验通

过测定大豆幼苗根系生长指标以及胚芽和子叶重量变化,来检验莠去津降解菌的作用强弱。结果显示,降解菌对大豆幼苗生长具有明显的保护作用,能够显著减轻莠去津带来的伤害。

参考文献

[1] Johnson T A, Ellsworth T R, Hudson R J M, et al. Diffusion limitation for atrazine biodegradation in soil [J]. *Advances in Microbiology*, 2013, 5: 412-420.

[2] Solomon R D J, Kumar A, Satheer S V. Atrazine biodegradation efficiency, metabolite detection, and *trzD* gene expression by enrichment bacterial cultures from agricultural soil [J]. *Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine & Biotechnology)*, 2013, 14(12):1162-1172.

[3] Udiković-Kolić N, Hršak D, Devers M, et al. Taxonomic and functional diversity of atrazine-degrading bacterial communities enriched from agrochemical factory soil [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 109:355-367.

[4] 周游. 阿特拉津对小麦幼苗的生物毒性[D]. 南京:南京农业大学, 2012;6-11. (Zhou Y. The bio-toxicity of atrazine on the stand wheat seedlings [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012;6-11.)

[5] 王锦, 陈雅琳, 刘丹竹, 等. 玉米田残留除草剂对后茬大豆苗期药害的研究 [J]. *大豆科技*, 2016(5):23-26. (Wang J, Chen Y L, Liu D Z, et al. Phytotoxicity of herbicide resided in corn field on succeeding soybean seedlings [J]. *Soybean Science & Technology*, 2016(5):23-26.)

[6] 宋日, 刘利, 马丽艳, 等. 阿特拉津对不同种子大小品种大豆的危害 [J]. *中国油料作物学报*, 2013, 35(2):207-210. (Song R, Liu L, Ma L Y, et al. Effect of atrazine on soybeans with various seed size varieties [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2013, 35(2):207-210.)

[7] Fan X, Song F. Bioremediation of atrazine: Recent advances and promises [J]. *Journal of Soils Sediments*, 2014, 14:1727-1737.

[8] 刘丹丹, 梁彦秋, 刘长风, 等. 莠去津高效降解菌的鉴定和降解特性分析[J]. *农药*, 2016(5):340-342,355. (Liu D D, Liang Y Q, Liu C F, et al. Identification and characterization of an atrazine degrading bacterium [J]. *Agrochemicals*, 2016, 5:340-342,355.)

[9] 周岚, 杨永, 王占海, 等. 玉米-大豆轮作及氮肥施用对土壤细菌群落结构的影响[J]. *作物学报*, 2013, 39(11):2016-

2022. (Zhou L, Yang Y, Wang Z H, et al. Influence of maize-soybean rotation and N fertilizer on bacterial community composition [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2013,39(11):2016-2022.)

[10] 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, 34(5):641-647. (Chen L, Zhao Y Y, Wang Y Y, et al. Evaluation of bacterial strain *SnebYK* induced soybean against atrazine [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2014, 34(5):641-647.)

[11] Wang H, Liu Y, Li J, et al. Biodegradation of atrazine by *Arthrobacter* sp. C3, isolated from the herbicide-contaminated corn field [J]. *International Journal Environmental Science and Technology*, 2016, 13:257-262.

[12] 罗在全, 段玉玺, 王媛媛, 等. 细菌 *SnebYK* 发酵液诱导大豆抗阿特拉津的研究 [J]. *大豆科学*, 2010, 29(2):284-287. (Luo Z Q, Duan Y X, Wang Y Y, et al. Fermentation broth of bacteria *SnebYK* induced anti-atrazine effect in soybean [J]. *Soybean Science*, 2010, 29(2):284-287.)

[13] 莫金钢, 马建, 张丽辉, 等. 干旱胁迫对大豆种子萌发的影响 [J]. *大豆科学*, 2014, 33(5):701-704. (Mo J G, Ma J, Zhang L H, et al. Effect of drought stress on germination of soybean [J]. *Soybean Science*, 33(5):701-704.)

[14] 陈玉生. 外源谷胱甘肽对大豆种子萌发过程中铜毒害的缓解效应[J]. *大豆科学*, 2012, 30(2):245-251. (Chen Y S. Alleviation effects of exogenous glutathione on copper toxicity during soybean seeds germination [J]. *Soybean Science*, 2012, 30(2):245-251.)

[15] 张志良. 植物生理学实验指导(第二版) [M]. 北京:高等教育出版社, 1993. (Zhang Z L. *Plant physiology experiments guidance (second edition)* [M]. Beijing: Higer Education Press, 1993.)

[16] 薛应龙. 植物生理学实验 [M]. 北京:高等教育出版社, 1990. (Xue Y L. *Plant physiology experiments* [M]. Beijing: Higer Education Press, 1990.)

[17] Giannopo L C N, Ries S K. Superoxide dismutases: I. occurrence in higer plants [J]. *Plant Physiology*, 1977, 59(2):309-314.

[18] 马兵兵, 姜昭, Kehinde O E, 等. 狼尾草根系对阿特拉津长期胁迫的氧化应激响应 [J]. *生态毒理学报*, 2016, 11(6):214-222. (Ma B B, Jiang Z, Kehinde O E, et al. Oxidative stress response in root of *Pennisetum americanum* L., (cv. K. Schum) to long term atrazine exposure [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2016, 11(6):214-222.)