

降解莠去津木霉筛选鉴定及其降解条件优化

姜浩楠^{1,2#}, 吕雨蝶², 邬伊萍^{1,2}, 邬国良^{1,2}, 王睿^{1,2}, 张漫漫^{1,2}, 刘铜^{1,2*}

(1. 海南大学 海南省农用生物制剂创制工程研究中心, 海南 儋州 571737 中国; 2. 海南大学 热带农林生物灾害教育部重点实验室, 海南 海口 570228 中国)

摘要: 使用莠去津为唯一碳氮源的无机盐培养基, 从 10 株木霉中筛选出一株莠去津降解能力最强的木霉菌株 HN154; 根据菌株 HN154 的菌落形态、分生孢子等形态学特征以及 ITS 与 RPB2 基因序列分析结果, 将 HN154 鉴定为 *Trichoderma lentiforme*。通过对降解条件优化发现, 以无机盐培养基为基础培养基, 当葡萄糖浓度为 10 g·L⁻¹、pH7、培养温度 25 °C 和 HN154 接种量为 1% 时 HN154 降解莠去津效率最佳, 降解率可达 87.79%。通过响应面法优化后的最佳培养条件为葡萄糖质量浓度 5.24 g·L⁻¹、pH7.78、接种量 0.77%、温度 25.5 °C, 木霉菌株 HN154 的降解率可达到 89.02%。本研究结果为高效降解莠去津提供了菌株资源和技术支撑, 也为探究微生物降解农药残留提供重要参考。

关键词: 莠去津; 木霉; 响应面法; 农药残留降解; 除草剂

中图分类号: X171.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-7054(2026)03-0451-12

姜浩楠, 吕雨蝶, 邬伊萍, 等. 降解莠去津木霉筛选鉴定及其降解条件优化[J]. 热带生物学报(中英文), 2026, 17(3): 451–462. DOI: 10.15886/j.cnki.rds wxb.20240204 CSTR: 32425.14.j.cnki.rds wxb.20240204



莠去津(Atrazine)又名阿特拉津, 分子式为 C₈H₁₄ClN₅, 属于三氮苯类化合物^[1-2]。莠去津通过干扰光合系统 II 上的电子流动, 破坏细胞膜完整性, 最终导致杂草植株死亡^[3], 主要用于防除 1 年生禾本科杂草和阔叶杂草, 对某些多年生杂草也有一定的抑制作用^[4]。莠去津自 1959 年投入商业生产以来在全世界范围内广泛施用^[5], 占美国全年除草剂使用量的 60%^[6]。在中国华北和东北地区, 莠去津及其混剂也是应用最广泛的除草剂^[7]。莠去津属于低毒类除草剂, 长期接触可对生物机体产生亚急性损伤^[8-9]。莠去津使用后残留时间较长, 水中的半衰期为 15~20 d, 在土壤中的半衰期可达 330~385 d^[10]。近年来, 莠去津因其使用量大、土壤残留期长、环境中检出率高及潜在的内分泌干扰效应等受到广泛关注^[11-12]。

在土壤和水体生态系统中, 莠去津的代谢途径主要分为化学降解和生物降解。化学降解包括光解、水解、氧化-还原降解等。而生物降

解途径则依赖于细菌、真菌和藻类等多种微生物类群的作用^[13]。目前已知的莠去津降解细菌主要属于假单胞菌属(*Pseudomonas*)^[14]、红球菌属(*Rhodococcus*)^[15]、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)^[16]、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)^[17]、诺卡氏菌属(*Nocardia*)^[18]等。真菌属主要有曲霉属(*Aspergillus*)、青霉属(*Penicillium*)、木霉属(*Trichoderma*)、镰刀菌属(*Fusarium*)^[19-20]; 藻类有衣绿藻属(*Chlamydomonas*)等^[20]。

木霉(*Trichoderma* spp.)是农业生产中应用广泛的一种重要生防菌, 同时还具有降解多种环境污染物的能力, 可用于修复农化物质对环境的污染^[21-22]。王素娜等^[23]利用莠去津降解木霉菌株 Ttrm11 和 Ttrm12 对莠去津残留土壤进行修复研究。祁金玉等^[24]探究了绿木霉(*T. virens*)和哈茨木霉(*T. harzianum*)在不同浓度阿特拉津处理下的生长速率、生物量和酶活特性。关于如何提升木霉降解莠去津的能力却鲜有报道, 因此, 本



收稿日期: 2024-12-31

修回日期: 2025-02-22

基金项目: 南繁与热带高效农业协同创新中心基金(XTCX2022NYB12); 海南省科技人才创新基金(KJRC2023C42)

*第一作者: 姜浩楠(1999—), 男, 海南大学热带农林学院 2022 级硕士研究生。E-mail: 182469672@163.com

*通信作者: 刘铜(1978—), 男, 教授, 博士生导师。研究方向: 生物防治等研究。E-mail: liutongamy@sina.com

研究通过含药培养基筛选出一株降解莠去津木霉菌株 HN154, 并通过单因素试验和响应面法优化培养条件, 确定菌株 HN154 降解莠去津的最佳培养基配方, 为后续莠去津的微生物降解提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及培养基 从常年施莠去津的土壤里分离出木霉菌株 HN154、AH003、AH009、FJ002、HL008、HL201、FJ059、LS029-3、SC106 和 WL043-2, 均为海南大学热带农林学院植物病害微生物生态学研究与防控团队分离并保存。PDA 培养基配方^[25]: 马铃薯 0.2 kg·L⁻¹, 无水葡萄糖 0.02 kg·L⁻¹, 另加琼脂粉 20.0 g·L⁻¹。

Burk 培养基配方^[25]: KH₂PO₄ 800.0 mg·L⁻¹, K₂HPO₄ 200.0 mg·L⁻¹, CaSO₄·2H₂O 100.0 mg·L⁻¹, MgSO₄·7H₂O 200.0 mg·L⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 1000.0 mg·L⁻¹, MnSO₄ 10.0 mg·L⁻¹, FeSO₄·7H₂O 5.0 mg·L⁻¹, Na₂MoO₄·2H₂O 3.3 mg·L⁻¹, 无水葡萄糖 100.0 g·L⁻¹。以莠去津为唯一碳氮源时, 不添加(NH₄)₂SO₄ 和无水葡萄糖; 配制固体培养基时, 添加琼脂粉 20.0 g·L⁻¹。

1.2 供试材料与试剂 供试大豆品种为‘中黄 37’。莠去津原药(98%)购于阿拉丁公司。色谱级的甲醇和二氯甲烷购自阿拉丁公司。其他常见分析纯试剂和药品购自白鲨易(biosharp)。

1.3 木霉菌株活化与菌丝培养物制备 参考孙佳楠等^[26]的试验方法, 将木霉菌株分别接种于 PDA 平板, 随后放置在 28 °C 的恒温环境中活化, 每隔 3 d 实施 1 次传代, 待完成 3 次传代培养后, 菌株供后续实验。

使用无菌水洗脱孢子, 吸取 1 mL 孢子悬液(2×10⁹ CFU·mL⁻¹), 接种至 200 mL PD 培养基中, 28 °C、180 r·min⁻¹, 振荡培养 48 h 后, 利用真空抽滤装置对培养液进行抽滤处理, 无菌水冲洗菌丝, 再将其压干备用。

1.4 降解莠去津木霉的筛选 将木霉菌株分别接种至 PDA 培养基平板上, 28 °C 培养 96 h 后, 用打孔器打取 6 mm 菌饼接种到以 5000 mg·L⁻¹ 莠去津为唯一碳氮源的无机盐培养基平板中, 28 °C 倒置培养, 96 h 内观察记录木霉生长速率。通过比较菌丝生长速率筛选出对莠去津耐受效果最优菌

株进行后续实验。

将莠去津添加到 Burk 培养基平板中, 使莠去津最终浓度分别为 0、100、250、500、750、1000、1500 mg·L⁻¹, 取培养 96 h 的木霉平板, 用打孔器打取 6 mm 菌饼, 分别接种到含不同浓度莠去津的培养基中央, 持续观察并记录各平板上木霉的菌丝生长直径, 用交叉法测量菌落直径, 制作菌落直径生长曲线, 每个处理重复 5 次^[27]。

1.5 木霉降解莠去津的能力检测 将菌丝用滤纸过滤, 称取 0.5 g 菌丝, 121 °C、30 min 灭菌。将灭菌的木霉菌丝体(HN154-heatkilled)与未灭菌的木霉菌丝体(HN154-Live)分别加入到 50 mL 以 500 mg·L⁻¹ 莠去津为唯一碳氮源的 Burk 培养基中, 28 °C、180 r·min⁻¹ 摇培 72 h, 在获得的培养液中分别加入等体积二氯甲烷振荡萃取 30 min, 静置分层后收集上层二氯甲烷相, 重复 3 次。合并萃取液, 加入 1 g 无水硫酸镁除水, 旋蒸干燥(水温 ≤ 30 °C), 用色谱级甲醇溶解, 经 0.22 μm 滤膜过滤。样品经高效液相色谱仪进行检测, 检测条件为流动相为水-甲醇(V:V = 50:50), 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 220 nm, 进样量 20 μL, 柱温 30 °C, 液相色谱样品制备及检测条件参考朱云鹏等^[28]。

莠去津样品标准曲线的制作: 用色谱甲醇把莠去津标准溶液逐步精准稀释成 500、400、300、200、100、80、60、40、20 mg·L⁻¹ 质量浓度系列, 依次用高效液相色谱仪检测。以峰面积为纵坐标, 农药含量为横坐标绘制标准曲线, 重复实验 5 次。

1.6 木霉菌株鉴定

1.6.1 形态学鉴定 将 HN154 接种在 PDA 培养基上, 26 °C 黑暗培养, 每隔 24 h 观察菌株形态、大小、颜色、表面、边缘及生长速率等特征。3 d 后, 挑取菌丝于光学显微镜下观察并拍照记录^[29]。

1.6.2 分子生物学鉴定 提取 HN154 脱氧核糖核酸(DNA), 使用引物 ITS1(5'-GCACAATAAGC GGAGGAAAAG-3')和 ITS4(5'-GGTCCGTGT-TT CAAGACGG-3')^[30] 扩增内转录间隔区(ITS)的基因序列; 利用对应的通用引物 PR2-F(序列为 5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACATGGCCT ACATGAAGCGAT-3')与 PR2-R(序列为 5'-AGCG GATAACAATTTCACACAGGAATCTCACAATG

CGTGTACATGT-3') 扩增编码 RNA 聚合酶 II 第 2 大亚基 (*RPB2*) 的基因序列。进一步测序和 Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 分析鉴定, 利用 MEGA v11 软件构建系统树。通过亲缘关系分析确定分离株的种属分类^[31]。

1.7 莠去津降解条件优化

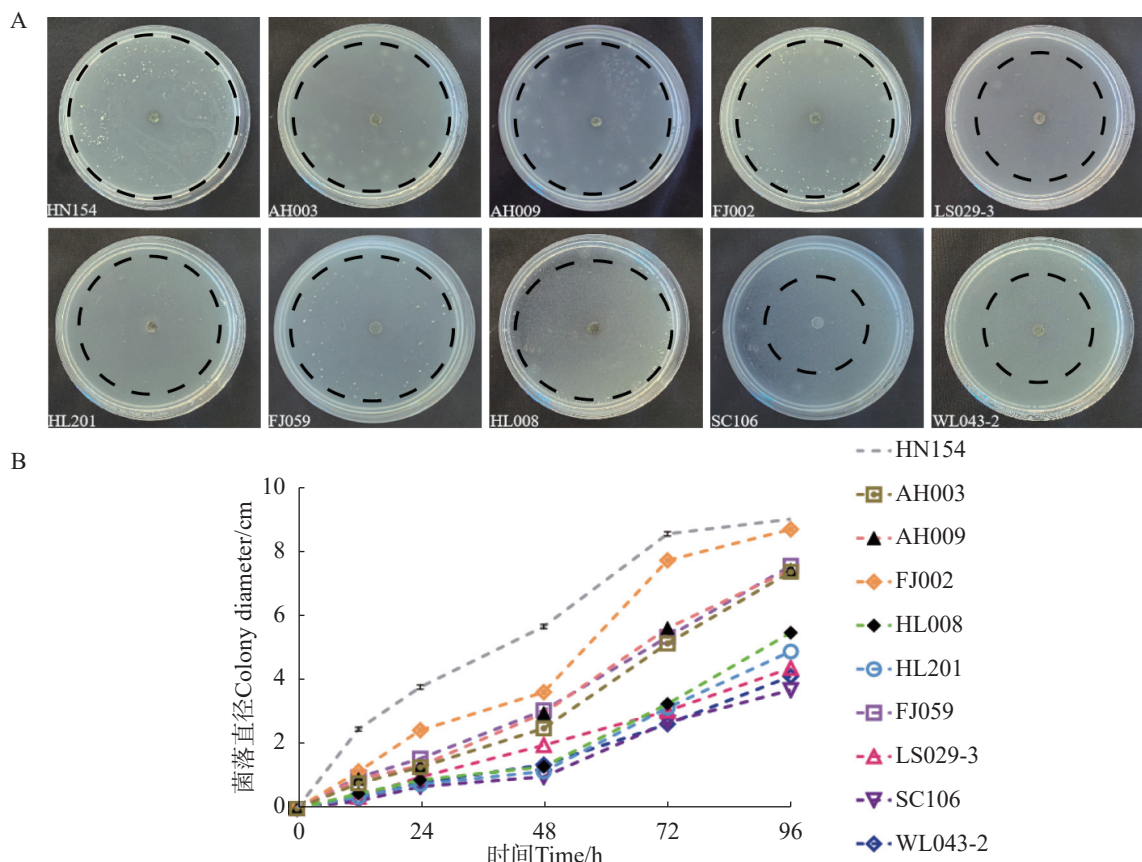
1.7.1 单因素试验 将 HN154 接种至 PDA 培养基平板中, 28 °C 培养 96 h, 用 20 mL ddH₂O 将平板中木霉孢子洗脱, 稀释孢子浓度至 1×10^7 CFU·mL⁻¹ 备用。以莠去津降解率为评价指标, 依次探究葡萄糖质量浓度 (0、10、15、20、25 g·L⁻¹)、初始 pH (5、6、7、8、9)、接种量 (0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%) 和培养温度 (20、25、30、35 °C) 4 个因素对 HN154 降解莠去津的影响。实验重复 5 次。

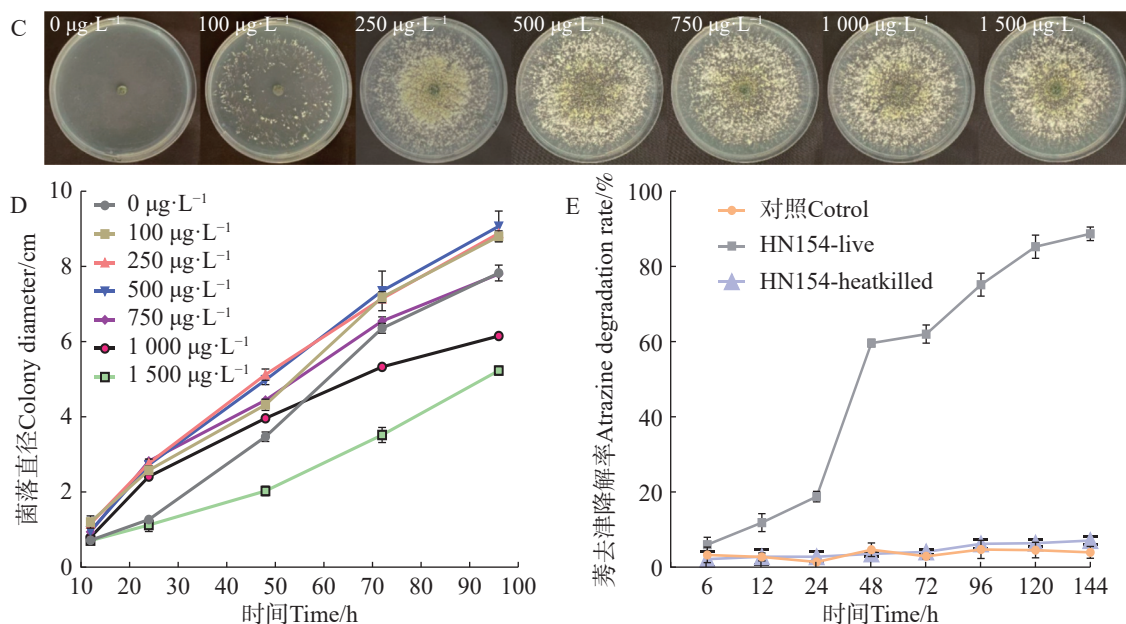
1.7.2 响应面优化试验 利用 Design-Expert 软件设计 4 因素 3 水平响应面优化试验。根据单因素实验数据进行回归分析, 得到以莠去津降解率为参考值的回归模型。利用该模型对 HN154 的发酵条件进行实验和分析。重复预测试验, 取平均值, 以验证模型是否可靠, 进而得出最终优化结果。实验方法参考耿凯伟等^[32]。分析方法参考王珊珊等^[33]。

1.8 统计分析 采用单因素方差分析 (ANOVA) 与 Tukey 检验评估组间统计差异, 每处理设 5 次重复, 结果用“平均值±标准差”表示。数据利用 Design-Expert v10、SPSS v26.0 和 OriginPro v9.5 软件处理分析。

2 结果与分析

2.1 降解莠去津木霉筛选结果 通过以高质量浓度莠去津为唯一碳源的 Burk 培养基, 对 10 株木霉菌株进行耐药性测定, 结果 (图 1-A—B) 显示, 在平板筛选结果中菌株 HN154 在 5000 mg·L⁻¹ 莠去津为唯一碳氮源的 Burk 培养基中生长状况最佳, 72 h 菌丝即可覆满平板, 且后续产孢能力显著优于其他菌株。菌株 FJ002 需培养 96 h 可覆满平板; 其余菌株菌丝生长缓慢, 培养 96 h 仍未能覆满平板。使用不同质量浓度梯度的莠去津平板, 测定莠去津对菌株 HN154 生长的影响, 结果 (图 1-C—D) 显示, 莠去津浓度为 500 mg·L⁻¹ 时 HN154 生长最快, 96 h 菌丝布满平板且产孢浓密。为了进一步鉴定 HN154 降解莠去津的能力, 将未灭活和灭活的 HN154 菌丝体放在以 500 mg·L⁻¹ 莠去津为唯一碳氮源的 Burk 培养基中培养, 结果显示灭活





A. 不同木霉菌株在以 5 000 mg·L⁻¹ 莠去津为唯一碳氮源的 Burk 培养基生长情况; B. 不同木霉菌株在以 5 000 mg·L⁻¹ 莠去津为唯一碳氮源的 Burk 培养基菌落直径生长曲线; C. 96 h 平板观察不同质量浓度莠去津对 HN154 生长的影响; D. HN154 在含莠去津 Burk 培养基的菌落直径变化; E. 木霉 HN154 灭活与非灭活菌体对莠去津降解率的影响。
A. Growth of different *Trichoderma* strains in Burk's medium with 5 000 mg·L⁻¹ atrazine as the sole carbon and nitrogen source; B. Growth curves of the colony diameters of different *Trichoderma* strains in Burk's medium with 5 000 mg·L⁻¹ atrazine as the sole carbon and nitrogen source; C. Observation of the effects of different concentrations of atrazine on the growth of HN154 on plates at 96 h; D. Changes in the colony diameter of HN154 in Burk's medium containing atrazine; E. Effect of inactivated and non-inactivated mycelia of *Trichoderma* HN154 on the degradation rate of atrazine.

图 1 降解莠去津木霉菌株筛选

Fig. 1 Screening of atrazine-degrading *Trichoderma* strain

注: 对照. Burk 培养基中仅添加莠去津; HN154-heatkilled. 灭菌的木霉菌丝体; HN154-Live. 未灭菌的木霉菌丝体。莠去津初始浓度为 500 mg·L⁻¹。实验组设 5 次重复, 结果按 Means±SEM 表示。

Note: Control. Only atrazine was added to the Burk medium; HN154-heatkilled. Sterilized *Trichoderma* mycelium; HN154-Live. Non-sterilized *Trichoderma* hyphae. The initial concentration of atrazine was 500 mg·L⁻¹. experiments included five replicates, with results expressed as means ± SEM.

的莠去津降解速率与对照无显著性差异, 不能降解莠去津, 非灭活的莠去津降解速率在 24~48 h 从 20.3% 上升至 60.5%, 呈现指数上升趋势, 整体降解率随时间延长而显著提高, 144 h 降解率达到 90.1%, 表明 HN154 具有降解莠去津能力(图 1-E)。

2.2 降解莠去津 HN154 菌株鉴定

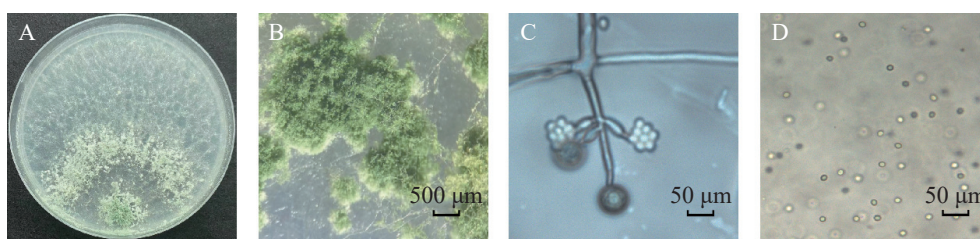
2.2.1 形态学观察

HN154 菌落呈同心圆形, 初期气生菌丝呈白色, 羊毛状, 菌丝交错, 在菌丝生长后期产生分生孢子, 分生孢子深绿色, 孢子簇棉

絮状, 分布在菌丝密集处; 分生孢子梗常呈现 2~3 个孢子梗分支, 顶端具有多个瓶梗, 瓶梗与主轴夹角约 75°距顶端较远处产生至多三级分枝; 瓶梗产生于分枝顶端, 3~5 个呈漩涡状排列, 瓶梗直、中间稍有加粗, 顶部、基部缢缩; 分生孢子球形、近圆形(图 2)。

2.2.2 分子生物学鉴定

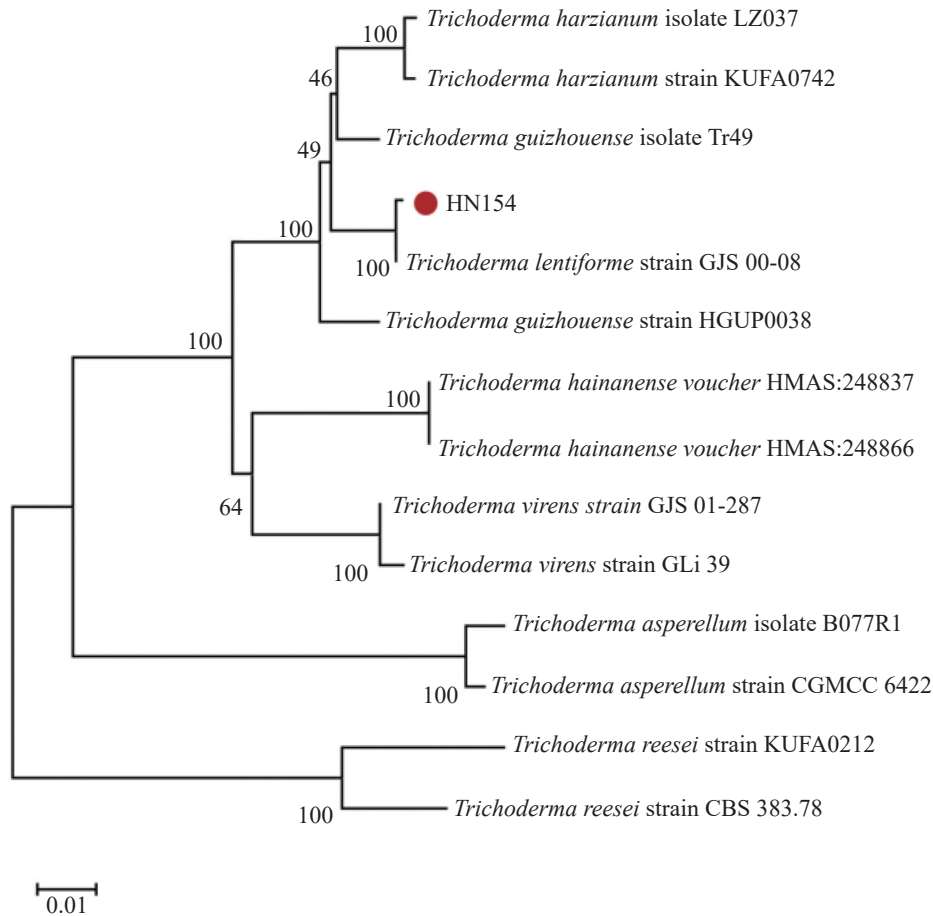
基于 *ITS* 与 *RPB2* 基因序列构建的系统树(图 3)发现, 菌株 HN154 和模式菌株 *Trichoderma lentiforme* strain GJS00-08



A. HN154 菌株在 PDA 培养基上的形态; B. 菌落形态; C. 分生孢子梗; D. 分生孢子。
A. The morphology of strain HN154 on PDA medium; B. Colony morphology; C. Conidiophores; D. Conidia.

图 2 菌株 HN154 形态特征

Fig. 2 Morphological characteristics of strain HN154

图3 HN154 基于 *ITS* 和 *RPB2* 序列构建的系统树Fig. 3 Phylogenetic tree of HN154 constructed based on *ITS* and *RPB2* sequences

的亲缘关系最近,二者在系统树上分支距离极短,亲缘关系最近。结合形态学特征的观测结果,菌株 HN154 最终被鉴定为 *Trichoderma lentiforme*。

2.3 HN154 莠去津降解条件的优化

2.3.1 单因素优化 不同质量浓度葡萄糖的培养基对菌株 HN154 生长及降解莠去津能力的测定结果(图 4-A)显示,菌株 HN154 对莠去津降解率随葡萄糖质量浓度呈先升后降的趋势。当葡萄糖质量浓度为 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,菌丝生物量最高,为 $3.85 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;其对莠去津的降解率也最高,为 59.51%。

不同初始 pH 的培养基对菌株 HN154 生长及其降解莠去津能力的测定结果(图 4-B)显示,菌株 HN154 对莠去津降解率随初始 pH 呈先升后降的趋势。当初始 pH7 时,菌丝生物量最高,为 $3.89 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;其对莠去津的降解率也最高,为 86.75%。

不同接种量的培养基对菌株 HN154 生长及其降解莠去津能力的测定结果(图 4-C)显示,菌株 HN154 对莠去津的降解率随木霉接种量呈先升后降的趋势。当接种量为 1% 时,菌丝生物量最高,

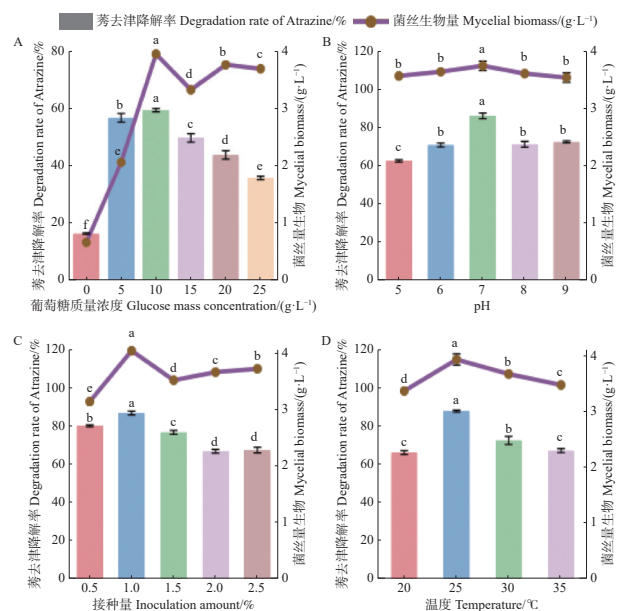


图4 不同条件对 HN154 菌丝体生长和莠去津降解的影响

Fig. 4 Effects of different conditions on the mycelial growth of HN154 and atrazine degradation

注:不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Note: different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

为 $3.93 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; 其对莠去津的降解率也最高, 为 87.62%。

不同发酵温度的培养基对菌株 HN154 生长及其降解莠去津能力的测定结果(图 4-D)显示, 菌株 HN154 对莠去津的降解率随发酵温度呈先升后降的趋势。当发酵温度为 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, 菌丝生物量最高, 为 $3.96 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; 其对莠去津的降解率也最高, 为 87.79%。

2.3.2 响应面优化试验 依据单因素试验设计所获结论, 针对 4 个自变量开展不同组合, 总计进行 29 次试验, 具体的试验设计与结果详见表 1。借助预测并经过回归拟合处理, 得出了以莠去津降解率(Y)作为响应值的回归方程:

$$Y=83.00+2.00a+0.33b+0.58c+1.75d+0.000ab-0.25ac-1.75ad+2.00bc-6.50bd-5.50a^2-5.00b^2-4.36c^2-3.88d^2$$

表 1 响应面试验设计与结果

Tab. 1 Response surface experimental design and results

实验号 Experimental No.	a 温度/ $^{\circ}\text{C}$ Temperature	b pH	c 接种量/% Inoculum amount	d 葡萄糖质量浓度/ $(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ Glucose mass concentration	Y 莠去津降解率/% Atrazine degradation rate
1	40	7	1.5	25.0	75
2	30	7	2.5	0	77
3	30	9	1.5	0	79
4	20	7	2.5	12.5	71
5	30	7	1.5	12.5	83
6	30	7	0.5	0	69
7	20	7	0.5	12.5	70
8	30	5	2.5	12.5	71
9	30	5	1.5	25.0	82
10	20	5	1.5	12.5	70
11	40	5	1.5	12.5	75
12	40	9	1.5	12.5	75
13	30	9	0.5	12.5	72
14	30	7	1.5	12.5	83
15	40	7	0.5	12.5	75
16	30	7	1.5	12.5	83
17	30	7	1.5	12.5	82
18	30	9	2.5	12.5	76
19	30	7	2.5	25.0	75
20	30	9	1.5	25.0	70
21	30	5	0.5	12.5	75
22	30	7	1.5	12.5	84
23	40	7	2.5	12.5	75

续表 1 Tab. 1 Continued

实验号 Experimental No.	<i>a</i> 温度/℃ Temperature	<i>b</i> pH	<i>c</i> 接种量/% Inoculum amount	<i>d</i> 葡萄糖质量浓度/(g·L ⁻¹) Glucose mass concentration	<i>Y</i> 莠去津降解率/% Atrazine degradation rate
24	20	7	1.5	0	69
25	30	7	0.5	25.0	77
26	20	7	1.5	25.0	76
27	30	5	1.5	0	65
28	20	9	1.5	12.5	70
29	40	7	1.5	0	75

由表 2 可知, 该模型的 P 值小于 0.000 1, 达到了极显著水平; 失拟项的 P 值为 0.260 5, 大于 0.05, 未呈现出显著差异, 这意味着模型具备较高的可靠性。变异系数(CV)仅为 1.24%, 处于较低水平, 进一步佐证了模型的可信度。决定系数 R^2 的数值是 0.983 0, 这表明模型与测试结果数据的符合程

度高达 98.30%。调整决定系数 R^2_{adj} 为 0.965 9, 说明此方程对试验的拟合效果良好。此外, 由表 2 还可知, 一次项中的 a 、 c 、 d , 交互项里的 ad 、 bc 、 bd 、 cd , 以及二次项的 a^2 、 b^2 、 c^2 、 d^2 , 它们对结果的影响极为显著; 其余各项对结果的影响并不显著 ($P < 0.01$)。

表 2 回归模型方差分析表

Tab. 2 ANOVA table of the regression model

来源 Source	平方和 Squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F Value	P 值 Prob > F Prob > F	显著性 Significance
模型Model	697.36	14	49.81	57.71	< 0.000 1	**
a -温度Temperature	48.00	1	48.00	55.61	< 0.000 1	**
b -pH	1.33	1	1.33	1.54	0.2343	
c -接种量 Inoculation amount	4.08	1	4.08	4.73	0.0473	**
d -葡萄糖浓度 Glucose concentration	36.75	1	36.75	42.58	< 0.000 1	**
Ab	0.000	1	0.000	0.000	1.0000	
Ac	0.25	1	0.25	0.29	0.5989	
Ad	12.25	1	12.25	14.19	0.002 1	**
Bc	16.00	1	16.00	18.54	0.000 7	**
Bd	169.00	1	169.00	195.81	< 0.000 1	**
Cd	25.00	1	25.00	28.97	< 0.000 1	**
a^2	196.22	1	196.22	227.34	< 0.000 1	**
b^2	162.16	1	162.16	187.88	< 0.000 1	**
c^2	138.75	1	138.75	160.76	< 0.000 1	**
d^2	97.40	1	97.40	112.85	< 0.000 1	**
残差Residual	12.08	14	0.86			
失拟项Lack of Fit	10.08	10	1.01	2.02	0.260 5	
变异系数 CV	1.24					**
净误差Net error	2.00	4	0.50			

续表 2 Tab. 2 Continued

来源 Source	平方和 Squares	自由度 df	均方 Mean square	F值 F Value	P值 Prob > F	显著性 Significance
合计 Total	709.45	28				
决定系数 R^2	0.9830					
adj决定系数 R_{adj}^2	0.9659					

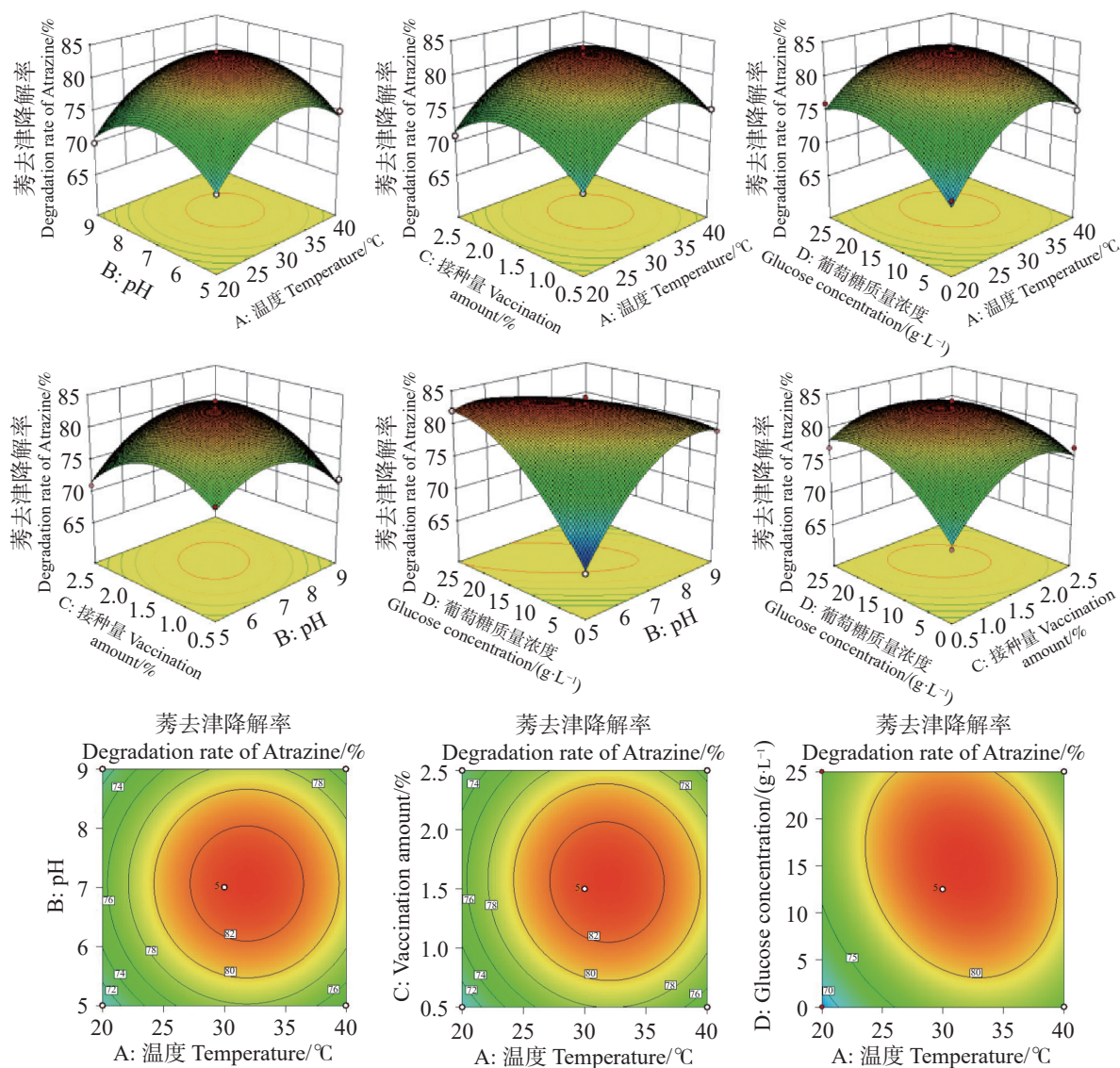
注: **, $P < 0.0001$ 。

Note: **, $P < 0.0001$.

图 5 所示的响应面模型, 直观且清晰地呈现出各因素之间的交互作用给 HN154 降解莠去津的影响。其中, 3D 响应面呈现出凸面形态, 意味着在当前因素组合下, 均存在对应的降解率最大值。在交互项中, ad 、 bc 、 bd 、 cd 的等高线呈现为椭圆形, 依据响应面分析的原理, 表明这些交互项对莠去津降解率有着较大的影响力; 与之相反, ab 、 ac

的等高线形态则显示出它们对莠去津降解率的影响相对较小, 与表 2 的方差分析结果相互印证。

通过回归模型预测莠去津降解率的最佳参数为葡萄糖质量浓度 $5.24 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.78, 接种量 0.77% , 温度 $25.5 \text{ }^\circ\text{C}$; 莠去津的理论最大预测降解率为 88.57% 。应用回归模型预测莠去津降解率的最佳参数进行验证。HN154 (*T. lentiforme*) 在以



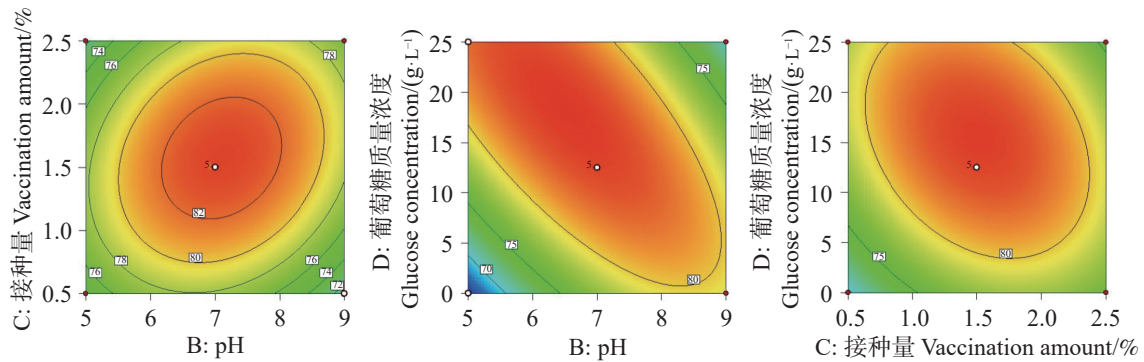


图5 四因素三水平3D响应面模型及等高线模型

Fig. 5 Three-dimensional response surface model and contour line model of the four-factor three-level design

500 mg·L⁻¹ 莠去津为唯一碳氮源的无机盐培养基中培养3 d时莠去津降解率最高达到89.02%，与理论最大预测降解率符合。

3 讨论

本试验从不同土壤中分离的10株木霉,以莠去津为唯一碳氮源筛选出生长较好的菌株HN154。该菌株在高浓度5000 mg·L⁻¹ 莠去津浓度下72 h菌丝即可覆满平板,且后续产孢能力显著优于其他菌株。灭活菌丝体降解能力与空白组相近,无降解能力;未灭活菌丝体降解效果显著,12~48 h内降解速率快速提升,降解曲线符合酶促反应规律。500 mg·L⁻¹ 莠去津浓度可能接近HN154降解酶的最适底物浓度,此时酶活性最高,菌株生长最活跃。与前人研究一致,木霉对三氯苯类除草剂有强耐受性和氧化还原酶活性^[34-35]。

微生物降解农药的效率受多种因素影响,主要包括温度、pH、微生物特性、碳源和氮源的存在及其浓度等^[36-37]。有研究表明,通过调节培养基中的葡萄糖质量浓度、pH、发酵温度和光照时间等条件,可显著影响木霉的生长及其对病原菌的抑制作用^[38-39]。如葡萄糖的质量浓度可直接影响木霉的生长和代谢^[40]。环境pH是调控木霉生理活动的关键因素,通过影响细胞膜通透性和酶活性,进而影响营养物质的吸收和利用效率^[41]。木霉对pH变化具有代谢应激能力,初始pH接近中性或弱碱性有利于其生长和代谢^[42]。接种量是木霉发酵过程中的重要参数,过高或过低的接种量均会影响木霉生长和发酵效率^[43-44]。此外,发酵温度也是调控微生物生长的重要因素,25℃被证实为木霉营养生长的最适温度^[45]。本研究通过优化葡萄糖浓度、初始pH、接种量和发酵温度,确定了HN154

菌株的最佳培养条件:初始pH7、葡萄糖质量浓度10 g·L⁻¹、接种量1%、温度25℃,在此条件下对莠去津的降解效率达到最优。这一结果与已有文献报道的研究数据具有相似性,进一步验证了培养条件对木霉降解莠去津效率的显著影响。

响应面分析法(RSM)因其高效性和精准性,已广泛应用于培养基和发酵条件的优化研究。该方法通过局部试验构建连续变量的曲面模型,能够以最少的实验次数快速确定多因子系统中的最优条件,并识别关键影响因素^[46]。例如,李洋^[47]利用RSM优化草酸青霉菌(*Penicillium oxalicum*) JG的发酵培养基,以滤纸酶活(FPA)为响应值,最终使FPA活性提升至0.366 IU·mL⁻¹。类似地,Lotfy等^[48]采用RSM优化黑曲霉产柠檬酸的培养基,显著提高了发酵效率。本研究采用RSM优化HN154的降解条件,通过调节葡萄糖浓度、pH、接种量和发酵温度,寻求最佳降解效率。结果表明,葡萄糖浓度不宜过高,与袁辉林等^[49]、陈晨等^[50]研究结果一致,而pH、接种量和发酵温度的优化结果与木霉的常规培养条件相符^[51]。最终优化条件为葡萄糖质量浓度5.24 g·L⁻¹、pH7.78、接种量0.77%、温度25.5℃,在此条件下,HN154对500 mg·L⁻¹ 莠去津的降解率提升至89.02%。目前,真菌降解莠去津的机制尚未完全明确。尽管如此,利用微生物降解莠去津以减轻莠去津污染的做法,因其成本低廉,处理效果显著,对环境影响小,且不会破坏植物生长所需的土壤环境等优点,仍得到了广泛的应用^[52]。未来,运用微生物技术来降解莠去津并修复受污染的土壤和水体,将继续成为研究热点。

4 结论

本研究成功筛选出高效降解莠去津的木霉菌

株 HN154, 并通过优化培养条件显著提升了其降解效率, 为农药残留的生物治理提供了具有应用潜力的真菌资源。实验结果为中国农业污染治理及生态安全维护提供了新的技术支撑与理论依据。未来可进一步探究 HN154 的降解代谢机制及田间应用潜力, 以推动绿色农业与可持续发展目标的实现。

参考文献:

- [1] 司友斌, 孟雪梅. 除草剂阿特拉津的环境行为及其生态修复研究进展 [J]. *安徽农业大学学报*, 2007, 34(3): 451–455. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1672-352X.2007.03.028>
- [2] 李清波, 黄国宏, 刘孝义, 等. 阿特拉津薄层层析检测方法 [J]. *沈阳农业大学学报*, 2002, 33(2): 112–114. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1000-1700.2002.02.010>
- [3] 李红梅, 张新建, 李纪顺. 阿特拉津降解菌 SD41 的分离鉴定及土壤修复 [J]. *环境科学与技术*, 2014(4): 38–41.
- [4] Si youbin, Meng Xuemei. Advance in environmental fate and ecological remediation of the herbicide atrazine [J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2007, 34(3): 451–455.
- [5] Jablonowski N D, Schsffer A, Burauel P. Still present after all these years: persistence plus potential toxicity raise questions about the of atrazine [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2011, 18(2): 328–331. <https://doi.org/10.1007/s11356-010-0431-y>
- [6] 孟顺龙, 胡庚东, 瞿建宏, 等. 阿特拉津在水环境中的残留及其毒理效应研究进展 [J]. *环境污染与防治*, 2009, 31(6): 64–83. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-3865.2009.06.018>
- [7] 吕德滋, 李洪杰, 李香菊, 等. 冬小麦对除草剂莠去津反应敏感性及其遗传控制 [J]. *华北农学报*, 2000, 15(3): 55–60. <https://doi.org/10.3321/j.issn:1000-7091.2000.03.012>
- [8] 陈家长, 孟顺龙, 胡庚东, 等. 阿特拉津对雄性鲫鱼血清雌二醇含量的影响 [J]. *生态学杂志*, 2007, 26(7): 1068–1073. <https://doi.org/10.3321/j.issn:1000-4890.2007.07.019>
- [9] 张晓君, 马晓国, 彭俊标, 等. 环境样品中阿特拉津的检测方法研究进展 [J]. *理化检验 (化学分册)*, 2017, 53(1): 119–124.
- [10] Jones T, Kemp W, Stevenson J, et al. Degradation of atrazine in estuarine water/sediment system sand soils [J]. *Journal of Environmental Quality*, 1982, 11(4): 632–638.
- [11] Graymore M, Stagnitti F, Allinson G. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems [J]. *Environment International*, 2001, 26(7/8): 483–495.
- [12] Hopenhayn RC, Stump ML, Browning S R. Regional assessment of atrazine exposure and incidence of breast and ovarian cancers in Kentucky [J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2002, 42(1): 127–136. <https://doi.org/10.1007/s002440010300>
- [13] 万年升, 顾继东, 段舜山. 阿特拉津生态毒性与生物降解的研究 [J]. *环境科学学报*, 2006, 26(4): 552–560. <https://doi.org/10.3321/j.issn:0253-2468.2006.04.003>
- [14] Ram behki, Edward topp, Warren dick, et al. Metabolism of the herbicide atrazine by *Rhodococcus* strains [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59: 1955–1959. <https://doi.org/10.1128/aem.59.6.1955-1959.1993>
- [15] Behki R M, Khan S. Degradation of atrazine, propazine, and simazine by *Rhodococcus* strain B-30 [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994, 42: 1237–1241. <https://doi.org/10.1021/jf00041a036>
- [16] Mark radosevich, Samuel traina, Yueli hao, et al. Degradation and mineralization of atrazine by a soil bacterial isolate [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61: 297–302. <https://doi.org/10.1128/aem.61.1.297-302.1995>
- [17] 叶常明, 王杏君, 弓爱君, 等. 阿特拉津在土壤中的生物降解研究 [J]. *环境化学*, 2000, 19(4): 300–305. <https://doi.org/10.3321/j.issn:0254-6108.2000.04.002>
- [18] Giardina M C, M T Giardi, R Buffone. Soil enrichment studies with atrazine: Long term atrazine effects on degradation and microbiological composition [J]. *Chemosphere*, 1979, 11: 831–834.
- [19] 虞云龙, 樊德方, 陈鹤鑫. 农药微生物降解的研究现状与发展策略 [J]. *环境科学进展*, 1996, 4(3): 28–36.
- [20] 李清波, 黄国宏, 王颜红, 等. 阿特拉津生态风险及其检测和修复技术研究进展 [J]. *应用生态学报*, 2002, 13(5): 625–628. <https://doi.org/10.3321/j.issn:1001-9332.2002.05.026>
- [21] 田连生, 陈菲. 木霉对多菌灵的生物降解特性研究 [J]. *土壤学报*, 2009, 46(6): 1127–1131. <https://doi.org/10.3321/j.issn:0564-3929.2009.06.022>
- [22] 孙佳楠, 张泰龙, 陈硕闻, 等. 深绿木霉 (*Trichoderma atroviride*) T23 降解有机磷农药敌敌畏转运蛋白 Ta Pdr2 基因的克隆与功能预测分析 [J]. *上海交通大学学报 (农业科学版)*, 2016, 34(6): 46–62.
- [23] 王素娜, 梁兵兵, 杨瑞秀, 等. 莠去津及烟嘧磺隆残留土壤修复技术初探 [C]//中国植物保护学会. 植保科技创新与农业精准扶贫: 中国植物保护学会 2016 年学术年会论文集. 2016: 16–15.
- [24] 祁金玉, 宋瑞清, 尹大川, 等. 木霉对阿特拉津的耐受性及酶活响应 [J]. *土壤通报*, 2019, 50(3): 649–654.
- [25] Zhang T, Tang J, Sun J, et al. Hex1-related transcriptome of *Trichoderma atroviride* reveals expression patterns of ABC transporters associated with tolerance to dichlorvos. [J]. *Biotechnology letters*, 2015, 37(7): 1421–1429. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1806-4>
- [26] 孙佳楠. 深绿木霉 T23 对敌敌畏的降解特性及机制 [D]. 上海: 上海交通大学, 2020.

- [27] 陈宸, 沙鹏飞, 江学, 等. 金森女贞叶斑病原物的鉴定、生物学特性及防治药剂筛选[J]. 植物病理学报, 2024, 54(1): 36-48.
- [28] 朱云鹏. 毒死蜱、莠去津降解菌的筛选与鉴定[D]. 泰安: 山东农业大学, 2021.
- [29] 李琳, 张雅梅, 张祥辉, 等. 生防棘孢木霉 T31 菌株的分离筛选及其生物学特性[J]. 植物保护学报, 2014, 41(1): 54-60.
- [30] 邓霞婵, 黄朵, 陶勇, 等. 高产乙酸乙酯酵母菌的筛选鉴定及发酵条件优化[J]. 中国酿造, 2024, 43(10): 134-141. <https://doi.org/10.11882/j.issn.0254-5071.2024.10.019>
- [31] 周清丽, 周绍琴, 周艳. 自然发酵猕猴桃果酒中降苹果酸酵母的筛选与鉴定[J]. 中国酿造, 2023, 42(12): 76-80. <https://doi.org/10.11882/j.issn.0254-5071.2023.12.012>
- [32] 耿凯伟, 李克克, 王俊峰, 等. 响应面法优化玉米赤霉烯酮降解菌及其硫酸酯酶的发酵工艺[J]. 饲料工业, 2023, 44(13): 21-30.
- [33] 王珊珊, 吴昊, 司月阳, 等. 响应面法优化甘蔗菠萝复合果酒的酿造工艺[J]. 中国酿造, 2019, 38(9): 80-85. <https://doi.org/10.11882/j.issn.0254-5071.2019.09.016>
- [34] 王辉, 赵春燕, 李宝明, 等. 微生物降解阿特拉津的研究进展[J]. 土壤通报, 2005, 36(5): 153-156.
- [35] 毛应明, 蒋新, 王正萍, 等. 阿特拉津在土壤中的环境行为研究进展[J]. 环境污染治理技术与设备, 2004(12): 11-15.
- [36] 蔡宝立, 黄今勇. 除草剂阿特拉津生物降解研究进展[J]. 生物工程进展, 1999, 19(3): 7-11.
- [37] 刘宏生, 姜薇, 宋雅娜, 等. 莠去津高效降解菌的筛选及鉴定[J]. 辽宁工程技术大学学报, 2009, 28(1): 145-148.
- [38] 牛东东, 冯振群, 翟清云, 等. 哈茨木霉菌对灰葡萄孢菌生长的抑制及培养基优化研究[J]. 现代农业科技, 2017(14): 98-102. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1007-5739.2017.14.065>
- [39] 李梅云, 谭丽华, 方敦煌, 等. 哈茨木霉的培养及其对烟草疫霉生长的抑制研究[J]. 微生物学通报, 2006(6): 79-83. <https://doi.org/10.3969/j.issn.0254-2654.2006.06.016>
- [40] 台莲梅, 高俊峰, 张亚玲, 等. 拮抗长枝木霉 T115D 菌株发酵条件[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(10): 333-334. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1002-1302.2013.10.123>
- [41] 高雪丽, 吴坚平, 徐刚, 等. 侧钩木霉的分离、鉴定及产孢条件优化[J]. 中国生物工程杂志, 2014, 34(2): 84-92.
- [42] 袁辉林. 植物促生菌培养优化及作用机理研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2011.
- [43] 葛青, 章亭洲, 王腾浩, 等. 高产纤维素酶里氏木霉菌株诱变选育及其发酵条件优化[J]. 饲料博览, 2019, 326(6): 1-5. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-0084.2019.06.001>
- [44] 李珊, 詹晓北, 郑志永, 等. 哈茨木霉产 β -1, 3-葡聚糖内切酶的发酵工艺条件研究[J]. 工业微生物, 2015, 45(2): 39-46. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-6678.2015.02.007>
- [45] 闫峰, 徐凤花, 顾金刚, 等. 木霉属真菌的生物降解及生物转化作用研究进展[J]. 微生物学杂志, 2009, 29(3): 77-80. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1005-7021.2009.03.016>
- [46] 张家麟, 柯涛, 王曦, 等. 哈茨木霉产纤维素酶菌株筛选及培养基优化[J]. 生物技术, 2019, 29(6): 566-572.
- [47] 李洋. 纤维素酶产生菌的筛选及产酶条件优化[D]. 大连: 大连理工大学, 2015.
- [48] Lotfy W A, Ghanem K M, El-helow ER. Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: II. Optimization of process parameters through statistical experimental designs [J]. *Bioresource technology*, 2007, 98: 3470-3477. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.11.032>
- [49] 袁辉林, 康丽华, 马海滨. 响应曲面法及其在微生物发酵工艺优化中的应用[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(16): 9498-9500. <https://doi.org/10.3969/j.issn.0517-6611.2011.16.012>
- [50] 陈晨, 钱林, 于稳欠, 等. 利用响应面分析法优化深绿木霉 Tr16 液体发酵产孢培养基研究[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(10): 117-120. <https://doi.org/10.3969/j.issn.0517-6611.2020.10.031>
- [51] 周金雨, 庞雪辉, 吴桐, 等. 响应面法优化植物乳杆菌高密度发酵参数[J]. 食品工业科技, 2016, 37(14): 206-209.
- [52] 黄艺, 赵曦, 敖晓兰. 4种外生菌根真菌对滴滴涕的耐受性及生理响应[J]. 环境科学研究, 2006, 19(4): 36-41. <https://doi.org/10.3321/j.issn.1001-6929.2006.04.007>

Screening and identification of atrazine-degrading *trichoderma* strains and optimization of degradation conditions

Jiang Haonan^{1,2#}, Lyu Yudie², Wu Yiping^{1,2}, Wu Guoliang^{1,2},
Wang Rui^{1,2}, Zhang Manman^{1,2}, Liu Tong^{1,2*}

(1. Hainan Engineering Research Center for Agricultural Biopharmaceutical Creation, Hainan University, Danzhou, Hainan 571737, China; 2. Ministry of Education Key Laboratory of Tropical Agriculture, Forestry and Biological Hazards, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: The inorganic salt medium with atrazine as the sole carbon and nitrogen source was used to screen a *Trichoderma* strain with the best growth performance among 10 *Trichoderma* strains, and the *Trichoderma* strain HN154 was selected. The degradation test of atrazine demonstrated that this strain had a high ability to degrade atrazine. Strain HN154 was identified as *Trichoderma lentiforme* based on morphological characteristics and *ITS/RPB2* gene sequence analysis. Optimization of atrazine degradation conditions showed that the atrazine degradation rate was as high as 87.79% when cultured in inorganic salt medium with 10 g·L⁻¹ glucose, pH7, 25 °C, and 1% inoculum. Response surface optimization further improved degradation to 89.02% under the conditions of 5.24 g·L⁻¹ glucose, pH7.78, 0.77% inoculum, and 25.5 °C. This study provides microbial resources and technical support for efficient atrazine degradation, offering insights into degradation of microbial pesticide residues.

Keywords: atrazine; *Trichoderma*; response surface method; degradation of pesticide residues; weedicide

(责任编辑:叶 静)