

一株草甘膦高效降解菌的筛选和表征研究

王天廓, 温玉娟, 杨悦锁, 路莹, 张茜, 曹楠, 孙东

引用本文:

王天廓, 温玉娟, 杨悦锁, 等. 一株草甘膦高效降解菌的筛选和表征研究[J]. 农业环境科学学报, 2021, 40(3): 591-599.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-1404>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

磷与草甘膦在酸性土壤中吸附解吸交互作用机制

周垂帆, 林静雯, 李莹, 刘爱琴

农业环境科学学报. 2016, 35(12): 2367-2376 <https://doi.org/10.11654/jaes.2016-0862>

毒死蜱降解菌降解特性及其降解条件优化

杜晓敏, 王金花, 朱鲁生, 王军, 杨莉莉, 林琳

农业环境科学学报. 2020, 39(10): 2437-2445 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0212>

草甘膦对大型的急性和慢性毒性效应研究

蔡小宇, 姜锦林, 单正军, 卜元卿, 续卫利, 周洁莲

农业环境科学学报. 2016, 35(10): 1903-1908 <https://doi.org/10.11654/jaes.2016-0375>

水环境中草甘膦和三价砷对大型的联合毒性评价

许杨贵, 李晶, 秦俊豪, 李琦, 黎华寿

农业环境科学学报. 2015, 34(11): 2076-2082 <https://doi.org/10.11654/jaes.2015.11.006>

土著B[a]P降解菌群的富集及最佳降解条件研究

郭光, 田芳, 丁克强, 杨凤, 徐进, 李晓华, 刘翀

农业环境科学学报. 2021, 40(1): 123-128 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0711>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

王天廓, 温玉娟, 杨悦锁, 等. 一株草甘膦高效降解菌的筛选和表征研究[J]. 农业环境科学学报, 2021, 40(3): 591–599.

WANG Tian-kuo, WEN Yu-juan, YANG Yue-suo, et al. Isolation and characterization of high-efficiency glyphosate-degrading bacteria [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2021, 40(3): 591–599.



开放科学 OSID

一株草甘膦高效降解菌的筛选和表征研究

王天廓¹, 温玉娟², 杨悦锁^{1,2*}, 路莹¹, 张茜³, 曹楠⁴, 孙东⁴

(1. 吉林大学地下水资源与环境教育部重点实验室, 长春 130021; 2. 沈阳大学区域污染环境生态修复教育部重点实验室, 沈阳 110044; 3. 东北农业大学水利与土木工程学院, 哈尔滨 150030; 4. 四川省地质矿产勘查开发局成都水文地质工程地质中心, 成都 610081)

摘要: 为研究利用细菌微生物降解草甘膦农药污染, 从沈阳某地区农田土壤中分离得到一株草甘膦高效降解菌 *Ensifer* sp. BRY。基于 16S rDNA 检测, BRY 被鉴定为剑菌属 (*Ensifer* sp.)。BRY 能在以草甘膦 (最高浓度 400 mg·L⁻¹) 为唯一碳源的无机盐培养基中生长, 在 50 h 对 300 mg·L⁻¹ 草甘膦的降解率可达到 69.60%。在 30 °C、pH 6.0、10% 初始接种量时, 菌株 BRY 在 50 h 内的草甘膦 (100 mg·L⁻¹) 降解率达到 91.93%, 当相同条件下调节初始接种量为 20% 时, 菌株 BRY 的草甘膦降解率升高。当培养体系加入其他碳源 (葡萄糖、蔗糖) 时, 草甘膦降解率降低。菌株 BRY 对不同浓度草甘膦的降解过程符合 Haldane 方程, 其最大比生长速率 $\mu_{\max}$ 为 1.68 h⁻¹, 半饱和常数 K_s 为 167.80 mg·L⁻¹, 抑制常数 K_{si} 为 50.55 mg·L⁻¹, K_{si}/K_s 为 0.30。研究表明, 菌株 BRY 对草甘膦具有较高的耐受能力和降解能力, 通过优化培养条件可以提高降解效率, 在用于草甘膦污染环境的生物修复过程中, 菌株 BRY 具有独特潜力。

关键词: 草甘膦; 生物降解; 剑菌属 (*Ensifer* sp.); 降解菌; Haldane 模型

中图分类号: X172; X592 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2021)03-0591-09 doi:10.11654/jaes.2020-1404

Isolation and characterization of high-efficiency glyphosate-degrading bacteria

WANG Tian-kuo¹, WEN Yu-juan², YANG Yue-suo^{1,2*}, LU Ying¹, ZHANG Xi³, CAO Nan⁴, SUN Dong⁴

(1. Key Lab of Groundwater Resources and Environment, Ministry of Education, Jilin University, Changchun 130021, China; 2. Key Lab of Eco-restoration of Regional Environment Pollution, Shenyang University, Shenyang 110044, China; 3. College of Water Conservancy and Civil Engineering, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 4. Chengdu Center of Hydrogeology and Engineering Geology, SBGEEMR, Chengdu 610081, China)

Abstract: Pollution from pesticides is a primary eco-health concern, in which glyphosate eco-treatment is a particularly controversial topic. In this study, an efficient glyphosate-degradation bacteria *Ensifer* sp. BRY was isolated and screened from farmland soil in Shenyang, China, where various pesticides have been applied for extended periods. Strains were identified by 16s rDNA sequence homology analysis. The optimal growth and glyphosate removal characteristics of strain BRY were explored by an environmental single-factor experiment. Kinetic curve fitting was performed on the removal processes of different initial glyphosate mass concentrations using the Haldane equation. Results show that the strain BRY identified as *Ensifer* sp. BRY can grow in an inorganic salt medium with glyphosate (maximum concentration of 400 mg·L⁻¹) as the sole carbon and energy source. The glyphosate degradation rate (300 mg·L⁻¹) can reach 69.60% within 50 h. The glyphosate degradation rate (100 mg·L⁻¹) of strain BRY reached 91.93% within 50 h at 30 °C, pH 6.0, and a 10% initial inoculation. The glyphosate degradation rate of strain BRY increased when the initial inoculum was adjusted to 20% under the same

收稿日期: 2020-12-06 录用日期: 2021-02-09

作者简介: 王天廓 (1996—), 男, 内蒙古赤峰人, 硕士研究生, 从事污染场地微生物修复研究。E-mail: wangtiankuo1996@163.com

*通信作者: 杨悦锁 E-mail: yangyuesuo@jlu.edu.cn

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFC1800904); 辽宁省重点研发新项目 (2020JH2-10300083); 国家自然科学基金项目 (41703125); 辽宁兴辽英才计划项目 (XLYC1807259); 高等学校学科创新引智计划资助项目 (B16020)

Project supported: National Key R&D Program of China (2018YFC1800904); Key R&D Program of Liaoning Province (2020JH2-10300083); The National Natural Science Foundation of China (41703125); Liaoning Revitalization Talents Program (XLYC1807259); 111 Project (B16020) of Jilin University

conditions and did not change significantly when the initial inoculum was increased to 30%, indicating that the optimal initial inoculation amount for BRY to degrade glyphosate was 20%. When other carbon sources (glucose, sucrose) were added to the culture system, the glyphosate degradation rate decreased. The glyphosate degradation process of strain BRY agrees with the Haldane equation. According to Haldane's model, the kinetic parameters for the glyphosate-grown strain BRY were $\mu_{\max}=1.68 \text{ h}^{-1}$, $K_s=167.80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $K_{si}=50.55 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, and $K_{si}/K_s=0.30$. Based on these results, the strain BRY shows particular potential in the bioremediation of a glyphosate-contaminated environment.

Keywords: glyphosate; bioremediation; *Ensifer* sp.; degrading bacteria; Haldane's model

草甘膦[N-(膦酸甲基)甘氨酸]是一种广谱的系统性除草剂,主要作用于杂草的韧皮部,对杂草中合成蛋白质所必需的5-烯醇丙酮酸莽草酸-3-磷酸合酶(简称为EPSP合酶)具有显著的抑制作用,并会在整个植物中转移,还会通过其磷酸基团吸附在土壤矿物上^[1]。作为除草剂农达(Roundup)的主要成分,草甘膦因具有低成本、高效率除杂草的优点而在全世界农业领域得到广泛使用。美国地质勘探局(USGS)在2007年对采集于全国范围内的1 262个地表水样本和193个土壤样本进行了草甘膦残留量的检测,结果表明其中489个地表水样本中有草甘膦的检出,浓度范围为0.02~427.00 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,119个土壤样本中有草甘膦的检出,其浓度范围为1.0~476.0 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,同时在地下水样本和雨水样本中也分别有不同程度的草甘膦检出^[2]。草甘膦在土壤和水环境中的积累,对人类健康以及水土环境产生诸多负面影响^[3-6]。草甘膦会在作物的组织中积累,当其通过污染作物被人类食用并在体内积累到一定含量后即会危害健康,导致癌症、慢性肾病、先天性缺陷等^[7-9]。2009年 Poulsen 等^[10]最先提出草甘膦能够穿透人类胎盘障碍进入胎儿室,危害胎儿正常发育。2009年 Senapati 等^[11]首次提出草甘膦会使人食道、胃和肠道中蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶的活性降低,从而引发消化系统紊乱,出现腹泻、过敏等症状。2017年,国际癌症研究机构(IARC)首次将草甘膦列为人类“可能致癌”物质,随后世界卫生组织根据其结论,把草甘膦列为“2A级”致癌物质^[12]。同时,草甘膦的积累给土壤和水环境带来各种危害^[13-15]。2009年 Valeska 等^[16]首次对比了分别暴露于草甘膦与其合成制剂农达中的夹杂带丝蚓,同时段内两种物质都使蠕虫体内抗氧化酶活性显著提高,结果表明草甘膦对于土壤生物存在氧化应激效应。去除草甘膦在水土环境中的残留污染已成为当下急需解决的问题。

土壤中的草甘膦降解方式主要有水解、光化学降解、生物降解等^[17],其中生物降解是草甘膦降解的主

要途径。自然界中微生物广泛存在,尤其在长期施用草甘膦的土壤中会存在耐受或利用草甘膦的微生物菌群^[18]。因此,利用具有草甘膦降解能力的本土微生物进行生物修复是最适合的策略,且生物降解技术具有低成本、高效、无环境负面影响的优点^[19-21]。近年来利用微生物降解草甘膦的研究得到了越来越多的关注。Moore 等^[22]于1983年首次筛选出利用草甘膦作为唯一磷源的假单胞菌 *Pseudomonas* sp. PG2982,这为筛选草甘膦降解菌的研究奠定了基础。Fan 等^[23]首次分离出具有草甘膦降解能力的蜡样芽孢杆菌,该菌能利用草甘膦为唯一碳源生长。Hadi 等^[24]分离筛选出草甘膦降解菌 *Ochrobactrum* sp. GDOS,这是首次报道的能在60 h内将507 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 草甘膦完全降解的细菌,其对于污染水土修复具有重要意义。Zhao 等^[25]在中国某除草剂生产厂附近污染土壤中分离得到3株具有草甘膦降解能力的假单胞菌属细菌,接种菌的污染土壤相较于未接种土壤的草甘膦去除率提高了2~3倍,同时利用一级反应动力学方程对草甘膦降解过程进行拟合,但一级反应动力学方程并不能反映微生物在生长代谢中受到抑制的过程。利用微生物降解草甘膦(细菌、真菌、放线菌等)时,细菌最有效,并起到最关键的作用,诸多已知的具备降解草甘膦能力的菌种都属于细菌,例如 *Pseudomonas* sp.、*Burkholderia* sp.、*Arthrobacter* sp.、*Ochrobactrum* sp. 等^[26-30]。

在对降解菌的生物降解动力学研究中,草甘膦可以被认为是一种生长抑制化合物,Haldane方程是表征底物对微生物生长抑制的方程,适用于拟合草甘膦菌株的生长动力学^[31]。Nourouzi 等^[32]利用Haldane方程拟合不同初始浓度、pH、初始接种量下草甘膦在溶液中的生物降解,结果显示当草甘膦浓度大于500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,Haldane方程拟合的 R^2 值较高(0.942),表明在较高草甘膦初始浓度下,Haldane模型能够表征底物的抑制作用。Yan 等^[33]在活性污泥中筛选得到草甘膦降解菌 *Agrobacterium tumefaciens* BZ8,并对其降解过程进行了Haldane动力学方程拟合,得到菌株

BZ8的动力学参数 $\mu_{\max}$ 为 1.28 h^{-1} 、 K_s 为 $84.82\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 K_{si} 为 $227.59\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($R^2=0.99$), 确定其菌株相应的降解动力学参数, 同时证明 Haldane 方程与实验数据具有很强的相关性。

在以往对草甘膦微生物修复的研究报道中, 利用剑菌降解草甘膦同时优化其最佳培养条件的研究尚未出现, 并且目前还没有报道使用 Haldane 方程拟合剑菌菌株降解草甘膦的动力学参数。本研究通过分离筛选实验获取了一株具有草甘膦降解能力的剑菌菌株 *Ensifer* sp. BRY, 并利用 16S rDNA 序列分析手段对其进行了菌种鉴定。通过探究该细菌最佳降解条件(pH、草甘膦初始浓度、接种量、外加碳源)以获得最大的生物降解性能, 并利用 Haldane 降解动力学模型首次拟合剑菌菌株对草甘膦的降解过程, 确定其降解动力学参数, 优化降解菌的培养条件, 为剑菌菌株用于含草甘膦农药的生物降解提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

98.2% 草甘膦原药购买于百灵威科技有限公司, 琼脂购于索莱宝生化试剂公司, 其他化学试剂为国产分析纯。

以草甘膦为唯一碳源的基础盐培养基, 每 1 L 蒸馏水中组分构成: $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.500 g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1.310 g、 $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.018 g、 NaNO_3 3.000 g。外加 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 草甘膦用于培养和分离草甘膦降解菌株。

主要仪器包括高压蒸汽灭菌锅(日本 TOMY/SX-500), 离子色谱仪(瑞士万通/930 Compact), 紫外分光光度计(Hitachi/U-2910), 恒温培养振荡器(上海智城/ZWYR-2102C), 生化培养箱(上海智城/ZXSD-B1090), 超净工作台(安泰/SW-CJ-2FD), Milli-Q 超纯水系统(默克)。

1.2 草甘膦降解菌的富集与分离

供试土壤取自辽宁省沈阳市沈北新区前进农场土壤($123^\circ 31' 29'' \sim 123^\circ 31' 55''\text{E}$, $41^\circ 04' 50'' \sim 42^\circ 05' 10''\text{N}$), 该区长期施用多种复合农药。土样 200 g 取自 0~15 cm 土层, 自然阴干后储存备用。

取 10 g 土样和 100 mL 基础盐培养基于 250 mL 锥形瓶中, 外加 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 草甘膦, 在 30°C 、 $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的条件下振荡培养 3 d, 取 10 mL 上层悬浮液加入到 100 mL 新鲜基础盐培养基中, 外加 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 草甘膦, 在同样条件下继续培养, 第 3 个周期以后固定外加 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 草甘膦, 并在相同条件下培养。自第 4

个周期起, 在液体培养基中蘸取适量培养液涂布于基础盐固体培养基和牛肉膏蛋白胨固体培养基平板上, 其中基础盐培养基以草甘膦为唯一碳源, 在 30°C 恒温培养箱中培养 3 d, 待菌落长出后, 用接种环在分离较好的单一菌落上沾取少量菌体涂抹于以草甘膦为唯一碳源的基础盐培养基平板上, 倒置于 30°C 恒温培养箱中培养, 如此反复, 经过 13 个周期, 直到平板上长出的所有菌落形状和大小相近。

1.3 细菌的鉴定和系统发育分析

利用高通量测序对筛选得到的菌株进行菌种分类学鉴定, 通过 PCR 通用引物对菌株的 16S rDNA 进行基因序列扩增, 正向引物为 27F: $5'-\text{AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG}-3'$, 反向引物为 1492R: $5'-\text{AAGGAGGTGATCCAGCCGCA}-3'$, 扩增反应体积 $50\text{ }\mu\text{L}$, 反应条件为 94°C 预变性 3 min, 94°C 变性 1 min, 55°C 退火 1 min, 72°C 延伸 2 min, 共进行 35 个循环。产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 经染色剂染色后凝胶成像, 将产物于 -80°C 保存。在 The EzBioCloud database (www.ezbiocloud.net) 对 BRY 进行序列比对分析, 将所得结果利用 MEGA10.0 软件中的 Neighbor-Joining (NJ) 方法构建系统发育树。

1.4 菌株 BRY 的降解特性

挑取适量 BRY 菌落接种于 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 草甘膦基础盐培养基中, 在 30°C 、 $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下培养至对数生长期后离心 ($10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10 min), 去上清, 使用磷酸盐缓冲溶液对沉淀菌体进行反复冲洗两次后重悬, 调节菌悬液 OD_{600} 值为 0.2, 采用稀释涂布平板法测得此时菌液细胞浓度约为 $1.4\times 10^7\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。通过每次改变一种培养条件, 来探究菌株 BRY 的生长特性。

以 10% 的接种量接种 BRY 至不同 pH (5.0、6.0、7.0、8.0、9.0, pH 调节使用 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 溶液和 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 溶液) 的基础盐培养基中, 并设置草甘膦浓度为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 放置于 30°C 、 $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的摇床中, 自 0 h 起, 每隔 4 h 取 8 mL 样品, 经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤后, 使用离子色谱法^[34]测定草甘膦浓度, 仪器参数设置: 淋洗液为 $8\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Na_2CO_3 ; 抑制系统为 $0.5\%\text{H}_2\text{SO}_4$ +超纯水; 流速为 $0.7\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 进样体积为 $20\text{ }\mu\text{L}$; 柱温 308 K ; 泵压 9.9 MPa ; 色谱运行时间 31.0 min; 保留时间 25.0~26.0 min, 该方法检测范围为 $0.1\sim 100.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。同时利用紫外分光光度计测定菌液 OD_{600} 值, 以考察菌株在不同 pH 条件下的生长情况。草甘膦降解率计算公式:

$$Q = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \times 100\%$$

式中: Q 为草甘膦降解率, %; C_0 为草甘膦的初始浓度, $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; C_t 为培养结束后培养基中残留的草甘膦浓度, $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

为研究 BRY 对污染物草甘膦的耐受能力, 以 10% 的接种量接种 BRY 至不同浓度 (50、100、200、300、400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 草甘膦基础盐培养基中, 放置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 、150 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的摇床中, 自 0 h 起, 每隔 4 h 取 8 mL 样品, 经 0.22 μm 滤膜过滤后, 利用离子色谱测定草甘膦浓度, 同时利用紫外分光光度计测定菌液 OD₆₀₀ 值。

为研究接种量对降解速率的影响, 以 1%、5%、10%、20%、30% 的接种量接种 BRY 至 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 草甘膦基础盐培养基中, 放置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 、150 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的摇床中, 自 0 h 起, 每隔 4 h 取 8 mL 样品, 经 0.22 μm 滤膜过滤后, 利用离子色谱测定草甘膦浓度, 同时利用紫外分光光度计测定菌液 OD₆₀₀ 值。

为研究 BRY 在有其他碳源的影响下对草甘膦的利用能力, 选取单糖 (葡萄糖 0.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 和双糖 (蔗糖 0.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 加入到 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 草甘膦基础盐培养基中, 另设不外加碳源的草甘膦基础盐培养基作为对照。其中 BRY 接种量为 10%, 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、150 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的摇床中培养, 自 0 h 起, 每隔 4 h 取 8 mL 样品, 经 0.22 μm 滤膜过滤后, 测定溶液 pH 值, 利用离子色谱测定草甘膦浓度, 同时利用紫外分光光度计测定菌液 OD₆₀₀ 值。

1.5 菌株对草甘膦的降解动力学实验

Monod 动力学模型是最常用来描述微生物生长的动力学模型, 但当体系含有抑制性底物时 Monod 模型并不适用。Haldane 模型在 Monod 模型基础上开发, 目前已经被广泛用于表征底物对微生物的生长抑制^[35]。因此本研究采用 Haldane 方程来描述菌株 BRY 的生长动力学。对于不同初始浓度草甘膦的反应体系, 菌株比生长速率用如下公式计算:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \rho_s}{K_s + \rho_s + \rho_s^2 / K_{si}}$$

式中: μ 为菌体的比生长速率, h^{-1} ; $\mu_{\max}$ 为最大比细胞生长速率, h^{-1} ; ρ_s 为草甘膦初始浓度, $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; K_s 为半饱和常数, $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; K_{si} 为抑制常数, $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2 结果与讨论

2.1 菌株 BRY 的分子生物学鉴定

以 BRY 的总 DNA 为模板, PCR 扩增 16s rDNA 序列, 16S rDNA 长度为 1 363 bp。将 BRY 的 16S rDNA

扩增序列在 The EzBioCloud database 上做序列比对分析, 结果表明其与 *Ensifer morelensis* 模式菌株 Lc04 (GenBank 登录号 AY024335) 的 16S rDNA 基因序列相似性达到 99.48%。根据 BRY 的 16S rDNA 序列与其相关种属 16S rDNA 序列构建系统进化发育树 (图 1) 可知, 菌株 BRY 与 *Ensifer morelensis* 进化关系最近, 并与多株 *Ensifer sp.* 型菌株聚在一个支持良好的分支上, 因此确定菌株 BRY 归属于剑菌属 (*Ensifer sp.*)。模式菌株 *Ensifer morelensis* Lc04 最早由 Wang 等^[36] 在 2002 年提出, 该菌株为革兰氏阴性菌, 无芽孢, 杆状, 好氧, 能以广泛的碳水化合物和氨基酸作为唯一碳源生长, 并且除 dl-丙氨酸和尿素外, 大多数氨基酸可以作为其生长的唯一氮源, 同时对羧苄青霉素、卡那霉素、红霉素等抗生素具有多重耐药性。

2.2 菌株 BRY 的最佳降解条件

2.2.1 pH 对菌株 BRY 降解草甘膦的影响

微生物生长体系中 pH 的变化会通过影响细胞膜所带电荷而改变细胞对外界物质的吸收, 偏酸性或偏碱性的环境条件均会影响生物酶的活性, 主要表现在细胞膜电荷的变化以及蛋白质、核酸等生物大分子所带电荷的变化^[37]。细菌的生长状况会直接影响对污染物的降解率^[38]。pH 对菌株 BRY 降解草甘膦能力的影响如图 2 所示, 可以看出 pH 对菌株 BRY 的降解率影响较大, 在 50 h 培养时间内, 菌株 BRY 在 pH 5.0 时的草甘膦降解率为 79.36%, 在 pH 6.0 时达到最高降解率 91.93%, 在 pH 为 7.0、8.0、9.0 时的降解率逐渐下降, 分别为 60.02%、57.18%、54.32%。草甘膦属于酸性除草剂, 长期过量使用会导致土壤酸化, 影响土壤中的生物转化^[39]。一些草甘膦降解菌从长期施用草甘膦的农田土壤中分离筛选出来后, 都在偏酸性的条件下展现出更强的降解能力。Fan 等^[23] 对降解菌 *Bacillus cereus* CB4 降解草甘膦的 pH 条件的研究结果表明, 在 pH 6.0 时草甘膦降解率最高, 并且随着 pH 的增大降解率逐渐下降。张慧芳等^[40] 分离筛选得到的菌株 *Burkholderia vietnamiensis* B-1 和假单胞菌属 *Pseudomonas sp.* Y-1 均在 pH 6.0 条件下达到最佳降解能力, 认为弱酸性条件下降解酶活性较高。Sun 等^[41] 对固氮细菌 *Ensifer meliloti* 及其脲水合酶 (NHase) 降解新烟碱类杀虫剂的特性研究中表明, NHase 在 pH 6.0~9.0 条件下保存 12 h 后, 活性仍保留在 93% 以上, 其中在 pH 6.0 条件下, NHase 活性保持最高。因此推测 pH 6.0 更有助于提高菌株 BRY 的草甘膦降解酶的活性。总体而言, *Ensifer sp.* BRY 在 pH 6.0 时的降解效果最佳。

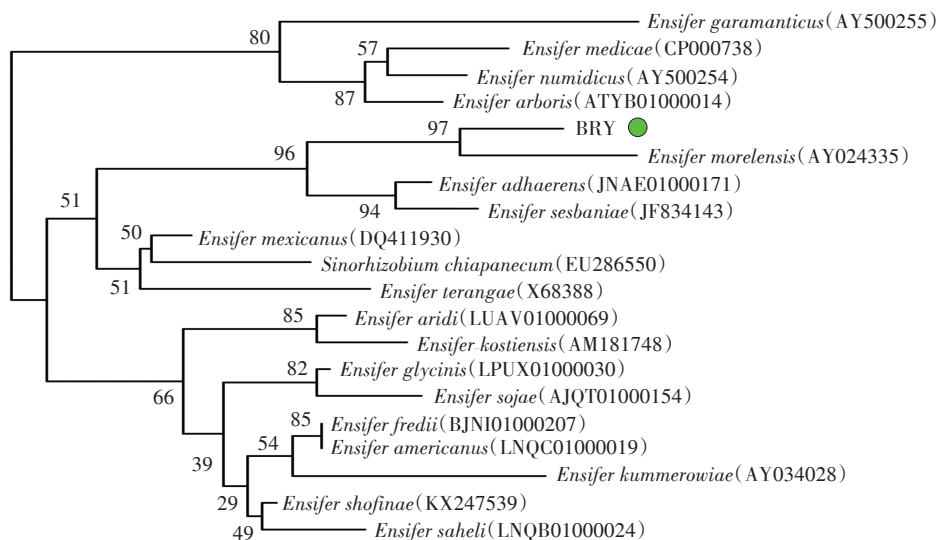


图1 草甘膦降解菌株BRY基于16S rDNA的系统发育树

Figure 1 Neighbour-joining tree based on 16S rRNA sequences for isolat strain BRY

2.2.2 菌株BRY对不同浓度草甘膦的降解能力

当微生物培养体系中草甘膦浓度发生变化时,细菌的生长状况也会受到影响,草甘膦的生物毒性随着其浓度的增大而增大,研究细菌对不同浓度草甘膦的降解程度是评价其降解能力的主要标准之一^[42]。菌株BRY对不同浓度草甘膦的降解能力见图3。总体上,同时间内菌株的生长量随着草甘膦浓度的增大而有所减少,当草甘膦初始浓度为100、200、300 mg·L⁻¹时,同时间内菌株OD₆₀₀值相差较小,说明在这一浓度范围内草甘膦对菌株BRY的生长影响较小。50 h内,在草甘膦浓度为50、100、200、300、400 mg·L⁻¹时的降解率分别为53.39%、60.64%、62.52%、69.60%、40.01%,表明 *Ensifer* sp. BRY能够在以草甘膦为唯一

碳源的培养基中生长,可以耐受最高400 mg·L⁻¹的草甘膦,并在此浓度下具有一定降解能力。在不同初始浓度草甘膦溶液中,同时间内菌株BRY在300 mg·L⁻¹草甘膦培养基中降解率最高。降解过程在50 h左右趋于平稳,因此在实际场地修复过程中,菌株BRY应至少在土壤中停留50 h以上才能达到较佳修复效果。

2.2.3 不同初始接种量对菌株BRY降解草甘膦能力的影响

初始接种量是直接影响草甘膦降解菌降解的影响因素,一定程度上增加细菌初始接种量可以提高降解速率、减少生长延迟时间^[43]。研究不同初始接种量对菌株BRY降解草甘膦速率的影响,以此确定菌株BRY对草甘膦的最佳降解条件。不同初始接种量对菌株BRY降解草甘膦能力的影响见图4。24 h内,在初始接种量为1%、5%、10%、20%和30%时的草甘膦降解率分别为7.52%、15.57%、14.89%、40.06%和26.80%。总体上,从经济成本以及修复效率考虑,20%接种量是草甘膦降解的最佳接种量,在8 h内草甘膦降解菌的降解率可达到40.06%,并在72 h达到完全降解。

2.3 外加碳源对菌株BRY降解草甘膦能力的影响

蔗糖和葡萄糖均属于容易被微生物利用的外加碳源,葡萄糖属单糖,蔗糖是由果糖和葡萄糖构成的双糖。在微生物降解过程中,如培养体系中含有多种碳源时,会优先消耗葡萄糖和蔗糖这类速效碳源,因此参与利用的其他碳源的酶系合成会受到抑制,这一

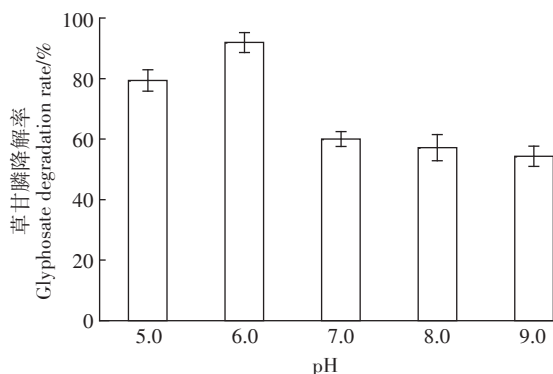


图2 不同pH条件下菌株BRY的草甘膦降解率

Figure 2 Degradation rate of glyphosate by strain BRY with different pH

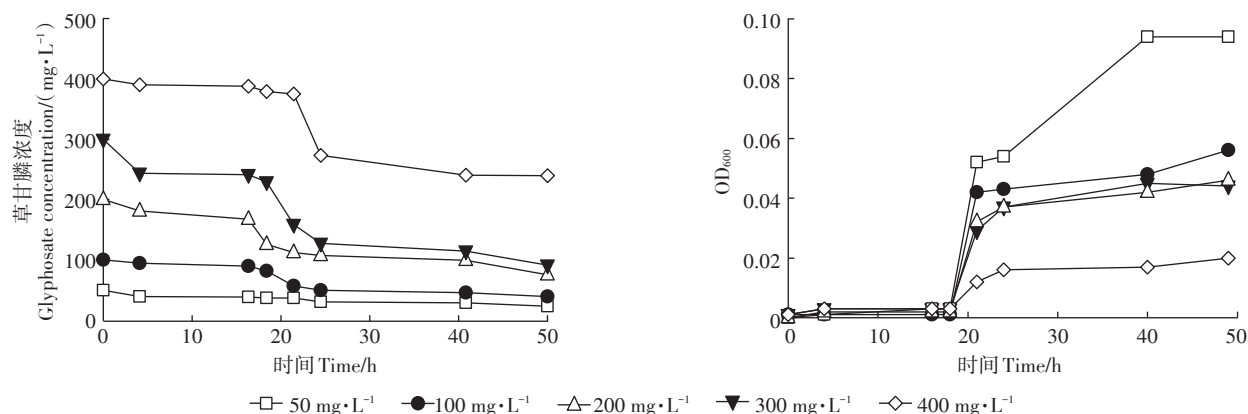


图3 不同初始草甘膦浓度下菌株BRY的草甘膦降解情况

Figure 3 Degradation of glyphosate by strain BRY under different initial glyphosate concentrations

现象称为碳源阻遏效应^[44]。因此分别用葡萄糖和果糖作为外加碳源加入培养体系中,以探究外加碳源对菌株BRY降解草甘膦能力的影响,其结果如图5所示。由结果可知,外加葡萄糖和蔗糖都明显促进了菌株BRY的生长,在30℃、起始pH 7.96、150 r·min⁻¹时,对照中草甘膦降解率较高,加入葡萄糖和果糖都会使草甘膦降解率下降,因为在碳源阻遏效应的影响下,菌株BRY会优先代谢消耗葡萄糖和蔗糖。在培养过程中实时监测溶液pH变化,结果如图6,显示外加碳源的两种体系pH均升高,由于降解过程中pH的升高间接导致了草甘膦降解率的降低。

2.4 菌株BRY的降解动力学

微生物在不同浓度污染物质中的比生长速率(μ)由指数生长期决定,是根据指数生长期的菌体细胞干质量和时间的半对数图绘制线性最小二乘拟合得到,在指数生长期可以认为比生长速率为一个常数^[45]。菌体比生长速率的实验数据与Haldane模型拟合结果如图7所示。结果表明,初始浓度由0 mg·L⁻¹增加

到100 mg·L⁻¹时,菌体的比生长速率随着初始草甘膦浓度的增加而增大;初始浓度由100 mg·L⁻¹增加到400 mg·L⁻¹时,比生长速率随草甘膦浓度的增加而显著下降,呈现出由于底物浓度增加导致的菌体生长受到抑制现象。通过实验数据确定Haldane方程参数,并且利用Origin 2018软件进行非线性曲线拟合,得到以草甘膦为唯一碳源的培养基培养的菌株BRY的Haldane参数, $\mu_{\max}$ 为1.68 h⁻¹, K_s 为167.80 mg·L⁻¹, K_{si} 为50.55 mg·L⁻¹, $K_{si}/K_s=0.30$,相关系数 $R^2=0.99$,拟合情况良好。 K_{si} 为50.55 mg·L⁻¹,说明该菌株的草甘膦抑制浓度为50.55 mg·L⁻¹,并且用Haldane方程描述菌株BRY降解过程是合理的。通过表1中生长动力学拟合结果对比可以看出BRY具有较高的降解率和 $\mu_{\max}$ 值,说明将*Ensifer* sp. BRY应用于实际修复草甘膦污染具有较高的可行性和使用前景。

3 结论

(1)通过富集培养法在辽宁省沈阳市沈北新区某

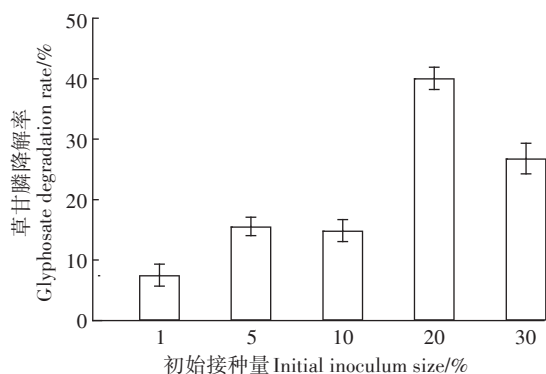


图4 不同初始接种量时菌株BRY的草甘膦降解率

Figure 4 Degradation rate of glyphosate by strain BRY at different initial inoculum

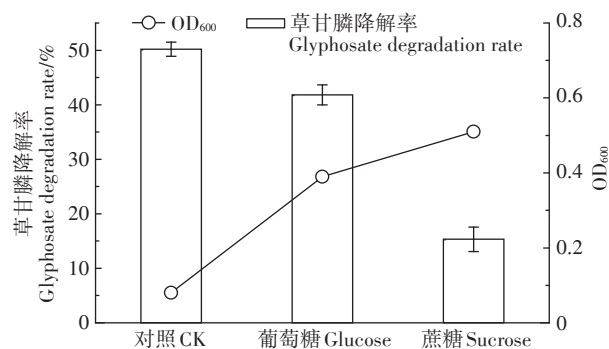


图5 外加碳源(葡萄糖和蔗糖)对BRY草甘膦降解率的影响

Figure 5 The effect of adding carbon sources (glucose and sucrose) on the degradation of BRY glyphosate

农田土壤中分离得到一株草甘膦高效降解菌株 *Ensifer* sp. BRY, 其能够在以草甘膦为唯一碳源的培养基中生长。

(2)微生物修复的研究结果表明,草甘膦降解菌 *Ensifer* sp. BRY 对草甘膦的耐受能力最高达 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 其对草甘膦的去除率与初始草甘膦浓度有较大关系。30 ℃、pH 6.0、 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、初始接种量为 20%

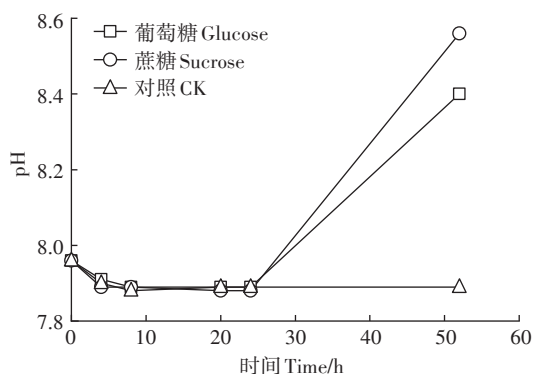


图6 外加葡萄糖、蔗糖以及对照体系中pH的变化

Figure 6 pH changes in systems with added glucose, sucrose and no treatment

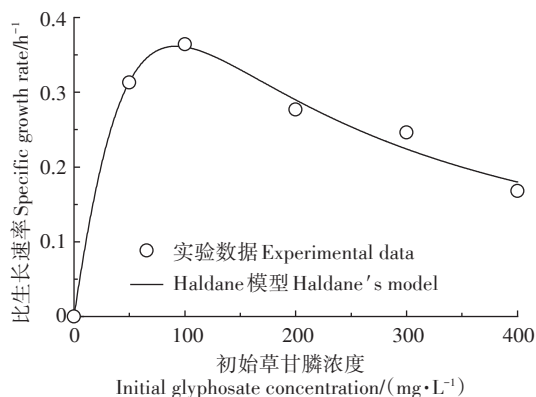


图7 菌株比生长速率的实验数据与Haldane模型拟合结果

Figure 7 Experimental and predicted specific growth rates of the culture due to Haldane's model

为最佳降解条件,在体系中外加碳源(葡萄糖、蔗糖, $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)会促进 *Ensifer* sp. BRY 的生长,但会降低其对草甘膦的利用率。*Ensifer* sp. BRY在含 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 草甘膦的基础盐培养基中 50 h内降解率为 91.93%,降解过程较短,在一定程度上提高了修复效率。

(3)*Ensifer* sp. BRY降解过程符合 Haldane 方程, $\mu_{\max}$ 为 1.68 h^{-1} , K_s 为 $167.80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, K_{si} 为 $50.55 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 由拟合结果可知当浓度高于 $50.55 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时降解速率开始下降,出现抑制模式。

参考文献:

- [1] Franz J E. Glyphosate: A Unique Global Herbicide[M]. Sikorski J A, Mao M K. Washington: American Chemical Society, 1997:28.
- [2] Scribner E A, Battaglin W A, Gilliom R J, et al. Concentrations of glyphosate, its degradation product, aminomethylphosphonic acid, and glufosinate in ground- and surface-Water, rainfall, and soil samples collected in the United States, 2001-06[R]. U. S. Geological Survey Scientific Investigations Report, 2007.
- [3] Battaglin W A, Meyer M T, Kuivila K M, et al. Glyphosate and its degradation product AMPA occur frequently and widely in U. S. soils, surface water, groundwater, and precipitation[J]. *Journal of the American Water Resources Association*, 2014, 50(2):275-290.
- [4] Borggaard O K, Gimsing A L. Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: A review[J]. *Pest Management Science*, 2010, 64(4):441-456.
- [5] Muskus A M, Krauss M, Miltner A, et al. Degradation of glyphosate in a colombian soil is influenced by temperature, total organic carbon content and pH[J]. *Environmental Pollution*, 2020, 259:113767.
- [6] Okada E, Allinson M, Barral M P, et al. Glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) are commonly found in urban streams and wetlands of Melbourne, Australia[J]. *Water Research*, 2020, 168:115-139.
- [7] Romano R, Souza P, Nunes M, et al. Perinatal exposure to a commercial formulation of glyphosate reduces the mRNA expression and increases the protein content of Beta TSH in the pituitary of male offspring[J]. *Endocrine Abstracts*, 2012, 29:753.
- [8] Marc J, Mulner-lorillon O, Bellé R. Glyphosate-based pesticides affect

表1 不同草甘膦降解菌生长动力学参数对比

Table 1 Comparative list of glyphosate-degrading bacteria growth due to Haldane's model

细菌种类 Bacteria	草甘膦浓度 Glyphosate concentration/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	草甘膦降解率 Glyphosate degradation rate/%	拟合方程 Equations	$\mu_{\max}/$ h^{-1}	$K_s/$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	$K_{si}/$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	K_{si}/K_s	R^2	参考文献 References
<i>Ensifer</i> sp. BRY	400	100	Haldane	1.68	167.80	50.55	0.30	0.99	本研究
<i>Providencia alcalifaciens</i>	300	99	Haldane	0.63	—	—	3.10	0.94	[30]
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> BZ8	2 800	100	Haldane	1.28	84.82	227.59	2.68	0.99	[31]
活性污泥中混菌	1 000	60	Monod	0.34	1 600	—	—	—	[46]
活性污泥中混菌	1 000	100	Andrews	0.22	340	412	1.21	0.99	[47]

- cell cycle regulation[J]. *Biology of the Cell*, 2004, 96(3):245-249.
- [9] Jayasumana C, Gunatilake S, Senanayake P. Glyphosate, hard water and nephrotoxic metals: Are they the culprits behind the epidemic of chronic kidney disease of unknown etiology in Sri Lanka?[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2014, 11(2):2125-2147.
- [10] Poulsen M S, Rytting E, Mose T, et al. Modeling placental transport: Correlation of *in vitro* BeWo cell permeability and *ex vivo* human placental perfusion[J]. *Toxicology in Vitro*, 2009, 23(7):1380-1386.
- [11] Senapati T, Mukerjee A, Ghosh A. Observations on the effect of glyphosate based herbicide on ultra structure (SEM) and enzymatic activity in different regions of alimentary canal and gill of *Channa punctatus*(Bloch)[J]. *Journal of Crop and Weed*, 2009, 5:236-245.
- [12] Peillex C, Pelletier M. The impact and toxicity of glyphosate and glyphosate-based herbicides on health and immunity[J]. *Journal of Immunotoxicology*, 2020, 17(1):163-174.
- [13] Eberbach P. Applying non-steady-state compartmental analysis to investigate the simultaneous degradation of soluble and sorbed glyphosate(N-(phosphonomethyl)glycine) in four soils[J]. *Pesticide Science*, 1998, 52(3):229-240.
- [14] Kogevinas M. Probable carcinogenicity of glyphosate[J]. *BMJ*, 2019, 365:13-16.
- [15] Jensen P K, Wujcik C E, McGuire M K, et al. Validation of reliable and selective methods for direct determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in milk and urine using LC-MS/MS[J]. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 2016, 51(4):254-259.
- [16] Valeska C, Eva K, Claudia W. Bioaccumulation of glyphosate and its formulation roundup Ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes[J]. *Environmental Pollution*, 2009, 157(1):57-63.
- [17] Lafi W K, Al-qodah Z. Combined advanced oxidation and biological treatment processes for the removal of pesticides from aqueous solutions[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2006, 137(1):489-497.
- [18] Mohsen N M, Chuah T G, Choong T S Y, et al. Glyphosate utilization as the source of carbon: Isolation and identification of new bacteria[J]. *Journal of Chemistry*, 2011, 8(4):1582-1587.
- [19] Khayat M E, Rahman M F A, Shukor M S, et al. Characterization of a molybdenum-reducing *Bacillus* sp. strain shayat with the ability to grow on SDS and diesel[J]. *Rendiconti Linc*, 2016, 27(3):1-10.
- [20] Yaacob N S, Mohamad R, Ahmad S A, et al. The influence of different modes of bioreactor operation on the efficiency of phenol degradation by *Rhodococcus* UKMP-5M[J]. *Rendiconti Lincei*, 2016, 27(4):749-760.
- [21] Stefano F, Stefano A, Barbara C, et al. Arsenic removal from naturally contaminated waters: A review of methods combining chemical and biological treatments[J]. *Rendiconti Lincei*, 2016, 27(1):51-58.
- [22] Moore J K, Braymer H D, Larson A D. Isolation of a *Pseudomonas* sp. which utilizes the phosphonate herbicide glyphosate[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1983, 46(2):316-320.
- [23] Fan J Y, Yang G X, Zhao H Y, et al. Isolation, identification and characterization of a glyphosate-degrading bacterium, *Bacillus cereus* CB4, from soil[J]. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2012, 58(4):263-271.
- [24] Hadi F, Mousavi A, Noghabi K A, et al. New bacterial strain of the genus *Ochrobactrum* with glyphosate-degrading activity[J]. *Journal of Environmental Science and Health*, 2013, 48(3):208-213.
- [25] Zhao H Y, Tao K, Zhu J Y. Bioremediation potential of glyphosate-degrading *Pseudomonas* spp. strains isolated from contaminated soil[J]. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2015, 61(5):165-170.
- [26] Zboinska E, Barbara L, Pawel K. Organophosphonate utilization by the wild-type strain of *Pseudomonas fluorescens*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(9):2993-2999.
- [27] Jacob G S, Garbow J R, Hallas L E, et al. Metabolism of glyphosate in *Pseudomonas* sp. strain LBr[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54(12):2953-2958.
- [28] 李冠喜, 吴小芹, 叶建仁. 多噬伯克霍尔德氏菌 WS-FJ9 对草甘膦的降解特性[J]. *生态学报*, 2013, 33(21):6885-6894. LI Guan-xi, WU Xiao-qin, YE Jian-ren. The characterization of glyphosate degradation by *Burkholderia multivorans* WS-FJ9[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(21):6885-6894.
- [29] Ermakova I T, Kiseleva N I, Shushkova T, et al. Bioremediation of glyphosate-contaminated soils[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 88(2):585-594.
- [30] Firdous S, Iqbal S, Anwar S, et al. Identification and analysis of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) gene from glyphosate-resistant *Ochrobactrum intermedium* Sq20[J]. *Pest management science*, 2018, 74(5):1184-1196.
- [31] Salihu I, Khalilah A K, Khadijah N M Z, et al. Biosurfactant production and growth kinetics studies of the waste canola oil-degrading bacterium *Rhodococcus erythropolis* AQ5-07 from Antarctica[J]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2020, 25(17):38-78.
- [32] Nourouzi M M, Chuah T G, Choong T S Y, et al. Modeling biodegradation and kinetics of glyphosate by artificial neural network[J]. *Journal of Environmental Science & Health*, 2012, 47(5):455-465.
- [33] Yan S B, Zhao W, Shi C E, et al. Isolation and characterization of a high salt-tolerant and glyphosate-degrading strain of *Agrobacterium tumefaciens* BZ8[J]. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2017, 34(3):739-746.
- [34] 李亚娟. 铁基石墨烯修复草甘膦污染水体的性能机理[D]. 沈阳: 沈阳大学, 2018:20-21. LI Ya-juan. Performance and mechanism of iron-based graphene for remediation of glyphosate contaminated water[D]. Shenyang: Shenyang University, 2018:20-21.
- [35] Li Y, Li J, Wang C, et al. Growth kinetics and phenol biodegradation of psychrotrophic *Pseudomonas putida* LY1[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(17):6740-6744.
- [36] Wang E T, Tan Z Y, Willems A, et al. *Sinorhizobium morelense* sp. nov., a *Leucaena leucocephala*-associated bacterium that is highly resistant to multiple antibiotics[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52:1687-1693.
- [37] Singh B K, Walker A. Microbial degradation of organophosphorus compounds[J]. *Fems Microbiology Reviews*, 2010, 30(3):428-471.

- [38] Chodak M, Gołębiewski M, Morawska-płoskonka J, et al. Diversity of microorganisms from forest soils differently polluted with heavy metals [J]. *Applied Soil Ecology*, 2013, 64:7-14.
- [39] 李婷, 寇向龙, 李金娟, 等. 草甘膦污染现状及检测技术研究进展 [J]. *江西农业*, 2019, 22:27-29. LI Ting, KOU Xiang-long, LI Jin-juan, et al. Current status of glyphosate pollution and research progress in detection technology [J]. *Jiangxi Agriculture*, 2019, 22:27-29.
- [40] 张慧芳, 冉梦兰, 汪倩, 等. 草甘膦微生物降解菌株的筛选及其生物学特性 [J]. *贵州农业科学*, 2015, 10:111-115, 118. ZHANG Hui-fang, RAN Meng-lan, WANG-Qian, et al. Screening and biological characteristics of strains with degrading glyphosate capacity [J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2015, 10:111-115, 118.
- [41] Sun S L, Lu T Q, Yang W L, et al. Characterization of a versatile nitrile hydratase of the neonicotinoid thiacloprid-degrading bacterium *Ensifer meliloti* CGMCC 7333 [J]. *RSC Advances*, 2016, 6(19):15501-15508.
- [42] Xu B, Sun Q J, Lan J C, et al. Exploring the glyphosate-degrading characteristics of a newly isolated, highly adapted indigenous bacterial strain, *Providencia rettgeri* GDB 1 [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2019, 128(1):80-87.
- [43] Ishii S, Suzuki S, Yamanaka Y, et al. Population dynamics of electrogenic microbial communities in microbial fuel cells started with three different inoculum sources [J]. *Bioelectrochemistry*, 2017, 117:74-82.
- [44] 冷一非. 微生物降解四环素特性及降解机理研究 [D]. 武汉: 中国地质大学, 2017:31-33. LENG Yi-fei. Characteristics and mechanism of tetracycline degradation by microorganism [D]. Wuhan: China University of Geosciences, 2017:31-33.
- [45] 温玉娟. 再生水中硝基芳香族有机物污染的 SAT 及其生物强化修复机理研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2016:62-64. WEN Yu-juan. Removal mechanisms of para-nitrophenol in reclaimed water using SAT and its bio-enhancement [D]. Changchun: Jilin University, 2016:62-64.
- [46] Dan F, Laure M, Guillaume C, et al. Biodegradation capabilities of acclimated activated sludge towards glyphosate: Experimental study and kinetic modeling [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2020, 161:107643.
- [47] Tazdait D, Salah R, Grib H, et al. Kinetic study on biodegradation of glyphosate with unacclimated activated sludge [J]. *International Journal of Environmental Health Research*, 2018, 28(4):448-459.