

草甘膦曲霉生物降解的动力学研究

石成春¹, 郭养浩^{1*}, 王大奈², 肖美添^{1,2} (1.福州大学化学化工学院, 福建 福州 350003; 2.华侨大学, 福建 泉州 362000)

摘要: 曲霉 B21 可利用草甘膦为唯一碳源或磷源生长. 在 pH 6.0、300mg/L 草甘膦和 7g/L 葡萄糖组成的共基质底物系统中, 草甘膦降解率可达 97%. 曲霉生长优先利用葡萄糖作为碳源和能源物质, 生长进入减速期后开始快速降解草甘膦. 应用分批补料培养方式, 在底物浓度恒定条件下研究草甘膦底物抑制降解动力学模型, 假设草甘膦和降解酶络合形成五元底物-酶复合物, 得到的动力学模型和参数可以很好地模拟其生物降解过程.

关键词: 草甘膦; 曲霉; 生物降解; 降解动力学

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2005)03-0361-05

Studies on the kinetics of the biodegradation of glyphosate by *Aspegillus*. SHI Cheng-chun¹, GUO Yang-hao^{1*}, WANG Da-nai², XIAO Mei-tian^{1,2} (1. Institute of Chemistry and Chemical Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350003, China; 2. Huaqiao University, Quanzhou 362000, China). *China Environmental Science*, 2005, 25(3): 361~365

Abstract: *Aspegillus* B21 could grow utilizing glyphosate as the sole source of C or P. The degradation rate could reach 97% in pH=6 substrate and the system of common base matter composed of glyphosate 300mg/L and glucose 7g/L. *Aspegillus* gave priority to utilize glucose as carbon and energy sources for its growth, and glyphosate was degraded rapidly in the growth decelerated period. The kinetics model of degradation inhibited by glyphosate base matter was studied the condition of constant base matter concentration, applying the cultivation type of fed-batch, that could stimulate suppose glyphosate and degradation enzyme complex to form five unit base matter-enzyme complex, the kinetics mode and parameter could stimulate the biodegradation process of glyphosate very well.

Key words: glyphosate; *Aspegillus*; biodegradation; kinetics

草甘膦是一种常用的灭生性有机磷除草剂, 其作用机理是抑制 5-烯醇式丙酮酸草酰-3-磷酸合成酶(EPSP 合成酶)的活性, 阻断芳香族氨基酸的生物合成^[1], 对水体、土壤中的细菌和真菌等具有毒性^[2]. 已报道的草甘膦微生物降解, 是关于高效降解菌株的筛选和降解的机理. 降解微生物的种类主要有假单胞菌属、无色菌属、青霉菌属、嗜热菌属等, 这些微生物能以草甘膦为唯一磷源生长^[3,4]. 土壤中快速矿化草甘膦的菌株还未分离确定^[5]. 研究表明, 草甘膦在环境中可能的降解途径有 3 条, 在转氨酶的作用下降解为氨甲基磷酸(AMPA), 然后在磷酸酯酶的作用下矿化; 在磷酸酯乙酰水解酶作用下直接矿化为无机磷; 在 C—P 键断裂酶作用下转化为磷酸盐. Bozena 等^[6]认为仅有一定数量的真菌可以利用草甘膦生长,

并筛选出 1 株青霉在唯一磷源下将其降解为在环境中可被真菌缓慢利用的中间产物 AMPA. 因此, 研究真菌降解草甘膦特性及其动力学对于环境中草甘膦的归宿具有重要的意义.

本课题组曾报道曲霉 G21 降解氧化乐果过程特性和中间产物^[7], 经对该曲霉进行诱导驯化, 得到 1 株能以草甘膦为唯一碳源或磷源生长的黑曲霉 B21. 本文研究了其降解草甘膦的特性及其动力学模型.

1 实验方法

1.1 菌种的筛选

收稿日期: 2004-09-10

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(D0210007)

* 责任作者, 教授, stonerainman@126.com

从福建省三农集团股份有限公司废水处理装置的活性污泥中筛选到 1 株以草甘膦为唯一碳源或磷源的曲霉 B21,初步鉴定为黑曲霉 (*Aspergillus niger*).

1.2 间歇培养

使用种子培养基对曲霉 B21 预培养 3d,按照 10%接种量接入 100mL 基本培养基中,根据实验设计添加不同量的草甘膦和葡萄糖,于 30℃,转速 180r/min 条件下摇瓶培养.

1.3 补料分批培养

曲霉孢子经种子培养基预培养 3d 后,按 0.5%接种量接入分批补料反应器中,反应器体积 250mL,培养液初始体积为 100mL.于 180r/min 磁力搅拌,30℃下培养,培养过程中维持反应器内料液 pH 值在 5.5~6.0.根据实验要求,通过分批补料操作,维持生物反应器内草甘膦(或葡萄糖)保持在设定的浓度,定期采样,测定菌体干重和草甘膦、葡萄糖浓度.

1.4 培养基

基本培养基组成(g/L):MgSO₄ 0.5, KCl 0.5, CaCl₂ 0.04, MnSO₄ 0.02, FeSO₄ 0.01,蒸馏水 1000. pH 6.50.葡萄糖和草甘膦浓度按要求添加.

种子培养基组成(g/L):葡萄糖 10,蛋白胨 2,硫酸铵 1,硫酸镁 0.5,氯化钾 0.5,硫酸亚铁 0.01.蒸馏水 1000. pH 5.50.草甘膦含量按实验要求添加.

草甘膦原药纯度为 95.0%,由福建省三农集团股份有限公司提供.

1.5 分析方法

草甘膦样品衍生化处理和测定参考文献[8].高效液相色谱仪(日本岛津),UV 检测器,检测波长 240nm, C₁₈ 色谱柱:4.6mm×250mm,流动相为体积比 4/1 的 0.05mol/L 磷酸二氢钠缓冲液(pH5.50)/甲醇,柱温 35℃,流速 1mL/min,进样量 20μL.

葡萄糖浓度测定采用葡萄糖氧化酶试剂法,微生物菌体干重测定参考文献[7].

1.6 草甘膦比降解速率计算

比降解速率定义为单位时间内质量细胞的底物消耗量,计算公式:

$$\gamma = \frac{1}{X_{\text{细胞}}} \frac{dS_{\text{底物}}}{dt}$$

式中: γ 为比降解速率; $S_{\text{底物}}$ 为底物浓度; $X_{\text{细胞}}$ 为细胞质量, t 为时间.

2 结果与讨论

2.1 菌株的初步鉴定

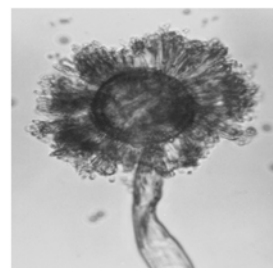
将菌株点植于察氏培养基平板上,30℃培养观察.第 1d 为白色绒状;第 2d 开始转为灰色;第 3d 孢子逐渐成熟,菌落颜色变黑,菌落直径可达 3~4cm.菌落中央部分凸起,边缘呈纤毛状,反面中央部分略带黄褐色,且产生皱褶,菌落散发出泥土气味,在其表面有透明的液态物质产生.菌株有足细胞(图 1a),分生孢子头幼时呈球形,渐变为放射形或裂变成几个放射的柱状物(图 1b).顶囊为球形,小梗双层(图 1c).初步鉴定菌株为黑曲霉 (*Aspergillus niger*)^[7].



a (40×16)



b (10×16)



c (40×16)

图 1 菌株形态

Fig.1 Shape of fungi

2.2 唯一碳源条件下曲霉的生长

由图 2 可见,当草甘膦浓度为 300mg/L 时,经过预培养的曲霉在接种后初期可以利用草甘膦作为唯一碳源进行生长,但生长量较小,48h 后曲霉即停止生长并开始死亡,曲霉对草甘膦的降解率仅为 30%左右.当草甘膦浓度为 1000mg/L 时,曲霉生长受到抑制,仅在接种初期表现出轻微的生长趋势.在草甘膦浓度高达 2000mg/L 时,曲霉已无法生长.这与 Bozena 等^[6]报道的高浓度草甘膦对真菌的生长具有抑制作用的结果相符.

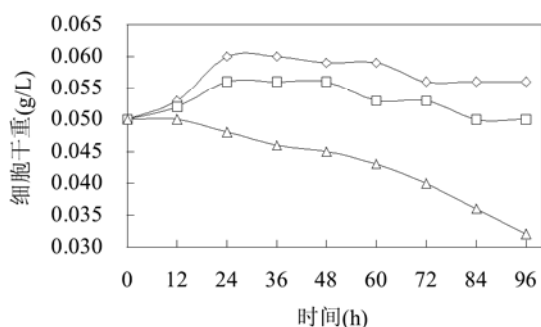


图 2 草甘膦为唯一碳源条件下曲霉浓度变化曲线

Fig.2 Growth of *Aspegillus* under glyphosate as the sole carbon source

—◇— 300mg/L —□— 1000mg/L —△— 2000mg/L

2.3 外加碳源葡萄糖对草甘膦降解的影响

在葡萄糖和草甘膦组成的共基质体系中,采用间歇培养方式,以草甘膦为唯一磷源,初始浓度 300mg/L pH6.0,培养时间为 5d,初始葡萄糖浓度对曲霉生长和草甘膦降解的影响如图 3 所示.由图 3 可见,当葡萄糖浓度由 0 增加到 7g/L 时,曲霉细胞量明显上升,草甘膦降解率也逐步提高,并在 7g/L 时达到最大值,降解率为 97%.葡萄糖浓度超过 7g/L 后,细胞生长量仍有所增大,但草甘膦的降解率却下降.可见,葡萄糖是曲霉生长和草甘膦的降解或转化程度的关键性控制因素,这与文献[9]的报道相符.其原因可能是在低浓度区,外加易利用的碳源有利于激发微生物的生长代谢作用,促进了降解作用的关键酶的诱导产生.由于共基质代谢过程中不同底物之间存在竞争抑制作用,高浓度的葡萄糖反而会抑制草甘膦的共

代谢降解速率^[10].

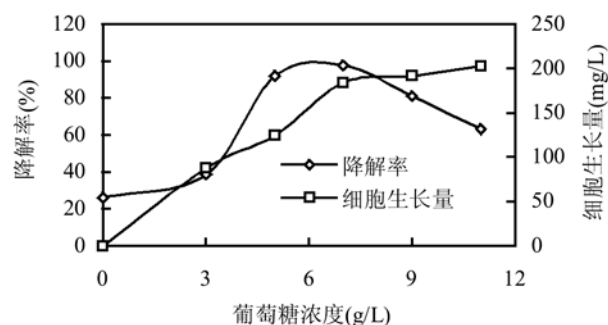


图 3 葡萄糖对曲霉生长和草甘膦降解的影响

Fig.3 Effect of glucose on the growth of cell and the degradation of glyphosate

2.4 pH 值对草甘膦降解的影响

在 7g/L 葡萄糖和 300mg/L 草甘膦组成的底物系统中,5d 后分别测定草甘膦的降解率.pH 值在 4~7 范围内,草甘膦降解率先是上升,然后下降,pH 6 时生物降解效果最好.在 pH 8 的弱碱性条件下,草甘膦的降解率上升,其主要原因是草甘膦为中等强度的三元酸,弱碱性的介质导致草甘膦的化学降解速率加快.

2.5 葡萄糖和草甘膦共基质体系中底物消耗和曲霉生长

采用间歇培养方式研究曲霉生长和底物利用随时间的变化趋势,结果见图 4.在接种后 2~3d,葡萄糖作为曲霉细胞生长的碳源和能源物质被迅速代谢消耗,细胞生长处于对数生长期;该阶段草甘膦浓度变化范围很小,仅作为体系中唯一磷源被降解.3~5d 内曲霉生长进入减速期,当葡萄糖浓度降到 1g/L 以下时,草甘膦进入快速降解期.曲霉生长进入稳定期后,体系中葡萄糖已全部被消耗,曲霉对草甘膦利用也达到极限.实验表明,曲霉生长的减速期是草甘膦快速降解利用的关键阶段,其原因可能是此阶段细胞仍保持很高的代谢活性,在可发酵碳源葡萄糖严重不足的情况下,曲霉通过基质共代谢机制降解草甘膦.因此,在葡萄糖和草甘膦组成的共基质体系中,曲霉对草甘膦的降解存在诱导过渡作用.

2.6 底物抑制酶反应动力学模型

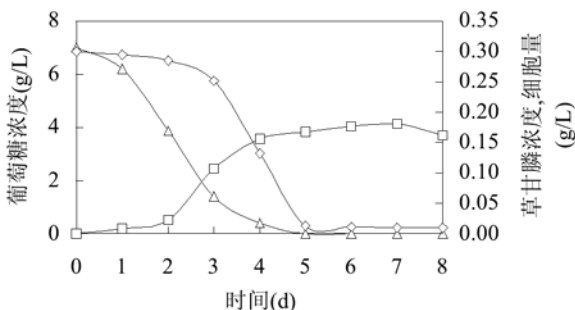


图 4 曲霉生长和底物消耗

Fig.4 Growth of cell and consumption of substrate

—△— 葡萄糖 —□— 细胞量 —◇— 草甘膦

反应条件:间歇培养,葡萄糖 7g/L,草甘膦 300mg/L,基本培养基

采用分批补料培养,在恒定底物浓度条件下研究草甘膦曲霉生物降解动力学规律.反应器中葡萄糖浓度维持在 6~7g/L,各批草甘膦浓度不同的分批补料培养过程的实测数据如图 5 所示.当草甘膦浓度较低时,草甘膦比降解速率随其浓度提高而增大,并达到最大值;草甘膦浓度继续提高,比降解速率反而下降,表现为底物抑制酶催化反应动力学过程,其机理可能是低浓度的草甘膦可以激发降解酶催化活性,而当底物的浓度超过临界值后,草甘膦与降解酶形成多元络合物,抑制了酶的降解活性^[11].

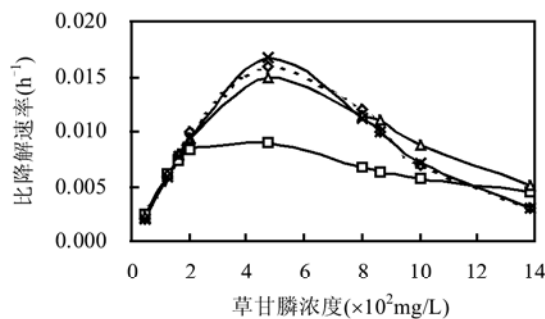


图 5 实测降解和模型模拟曲线

Fig.5 Curve of models and experiment

----- 实测值 —□— S₁ —△— S₂ —×— S₃

底物抑制酶催化反应动力学的机制为在高浓度时,底物与酶形成二元复合物后,继续和过量的底物分子结合形成多元底物-酶复合物,而多元底物-酶复合物不能进一步分解形成产物,影

响了酶的总活性.假设降解酶与过量底物草甘膦形成三元、四元、五元底物-酶复合物,可分别推导出模型函数如下:

模型 1(M₁):
$$\gamma = \frac{\gamma_m}{1 + K_m/S + S/K_1}$$

模型 2(M₂):
$$\gamma = \frac{\gamma_m}{1 + K_m/S + S/K_1 + S^2/K_2}$$

模型 3(M₃):
$$\gamma = \frac{\gamma_m}{1 + K_m/S + S/K_1 + S^2/K_2 + S^3/K_3}$$

式中:γ 为草甘膦比降解速率;γ_m 为最大比降解速率;S 为草甘膦浓度,mg/L;K_m 为 Michaelis 常数,表示酶-底物复合物的真实解离常数,mg/L;K₁、K₂、K₃ 为抑制常数.

采用最小二乘法和拟牛顿法,应用 Mathcad 数学软件对上述 3 个数学模型进行数据拟合,模型动力学参数的拟合计算结果见表 1.模型 M₂、M₃ 的偏差平方和 R² 值比 M₁ 要小一个数量级,且 M₂、M₃ 模型中 γ_m、K_m 值比较接近,M₃ 的 R² 值则更小.各降解数学模型模拟曲线和实测降解曲线如图 5 所示.模型 M₁ 和实测值偏离较大,M₂ 比 M₁ 有很大的改进,在相当一段浓度区域(S≤800mg/L)内与实验数值相吻合,但在高浓度的抑制区,则与实测值出现偏离;模型 M₃ 在实验选定的浓度范围内均能与实测值很好的吻合.因此,选择模型 M₃ 描述草甘膦曲霉生物降解动力学过程.

表 1 底物抑制模型中动力学参数拟合结果						
Table 1 Value of parameter in the kinetics model						
模型	γ _m	K _m	K ₁	K ₂	K ₃	R ²
M ₁	34.17	5976	19	—	—	0.868
M ₂	25.397	5016	1404	44570	—	0.022
M ₃	23.636	4786	3233	67840	37740000	0.015

注:—为模型中无此参数

3 结论

3.1 曲霉 B21 可以草甘膦为唯一碳源或磷源生长,但作为唯一碳源利用仅限于低浓度.在葡萄糖和草甘膦组成的底物系统中,曲霉 B21 通过共基质代谢降解草甘膦.在 pH 6.0, 300mg/L 草甘膦和

7g/L 葡萄糖组成的共基质底物系统中,草甘膦降解率可达 97%.

3.2 曲霉生长优先利用葡萄糖作为碳源和能源物质,生长进入减速期后开始快速降解草甘膦,草甘膦的曲霉生物降解存在诱导过渡过程.

3.3 曲霉降解草甘膦是一个底物抑制生物反应动力学过程.

参考文献:

- [1] Alejandro P V, Gildal M, Luis H E, *et al.* Cloning and sequencing of the genes involved in glyphosate utilization by *pseudomonas pseudomallei* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995,61(2):538-543.
- [2] Busse Matt D, Ratcliff Alice W, Shestak Carol J, *et al.* Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2001,33:1777-1789.
- [3] Dick R, John P Q. Control of glyphosate uptake and metabolism in *Pseudomonas* sp. 4ASW [J]. FEMS Microbiology Letters, 1995,134:177-182.
- [4] Agnieszka Obojska, Nigel G Ternan, Barbara Lejczak, *et al.* Organophosphonate utilization by the thermophile *Geobacillus caldoxylosilyticus* T20 [J]. Applied and Environmental

Microbiology, 2002,68(4):2081-2084.

- [5] Forlani G, Mangiagalli A, Nielsen E, *et al.* Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate in soil: evidence for a possible involvement of unculturable microorganisms [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1999,13:991-997.
- [6] Bozena B, Piotr W, Teresa K L, *et al.* Organophosphonate utilization by the wild-type strain of *Penicillium notatum* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995,61(8):2905-2910.
- [7] 石成春,徐 升,郭氧浩,等.氧化乐果曲霉降解特性和中间产物的研究 [J]. 中国环境科学,2004,24(2):180-183.
- [8] 董文庚,邓晓丽,刘长春,等.草甘膦与共存有机磷酸的对甲基苯磺酰氯衍生物反相高效液相色谱分离 [J]. 理化检验(化学分册),2001,37(11):481-483.
- [9] Bali U, Sengul F. Performance of a fed-batch reactor treating a wastewater containing 4-chlorophenol [J]. Process Biochemistry, 2002,37:1317-1323.
- [10] 李 萍,刘俊新.废水中难降解有机污染物的共代谢降解 [J]. 环境污染治理技术与设备, 2002,3(11):43-46.
- [11] 臧荣春,夏凤毅.微生物动力学模型 [M]. 北京:化学工业出版社,2004.164-172.

作者简介: 石成春(1973-),男,福建省长乐市人,博士,主要从事有机污染物微生物降解方面的研究.发表论文 5 篇.