

抗草甘膦酵母菌 ZM-1 的分离鉴定及其生长降解特性

汤鸣强^{1,2} 尤民生^{1*}

(1. 福建农林大学应用生态研究所 福建 福州 350002)

(2. 福建师范大学福清分校生物与化学工程系 福建 福清 350300)

摘要: 以福州市郊区的耕作土壤为研究材料, 利用草甘膦为选择压力, 通过富集、驯化培养, 分离出一株对草甘膦具有高耐受和降解作用的酵母菌菌株 ZM-1, 结合生理生化特征及 26S rDNA D1/D2 区序列分析将其初步鉴定为胶红酵母菌(*Rhodotorula mucilaginosa*)。菌株 ZM-1 能以草甘膦为唯一碳、氮源生长, 对草甘膦的最高耐受浓度为 50 g/L。在草甘膦初始浓度为 1 g/L 的无机盐培养基中, 30°C、150 r/min 摇床振荡培养 7 d, 草甘膦降解率为 85.38%。适合菌株 ZM-1 生长及降解草甘膦的最佳条件为: 草甘膦初始浓度 1 g/L, 接种量 4%, 温度 30°C, pH 值 5.5–6.0, 装料量 50 mL/250 mL。菌株 ZM-1 是一株良好的草甘膦耐受菌, 可用于草甘膦污染环境的生物修复, 也可能成为转基因抗草甘膦作物的一个很好资源。

关键词: 草甘膦降解菌, 26S rDNA D1/D2, 系统发育分析, 降解特性

Isolation and Identification of a Glyphosate-resistant Yeasty Strain (ZM-1) and Its Optimal Growth and Degradation Traits

TANG Ming-Qiang^{1,2} YOU Min-Sheng^{1*}

(1. Institute of Applied Ecology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

(2. Department of Biological and Chemical Engineering, Fuqing Branch of Fujian Normal University, Fuqing, Fujian 350300, China)

Abstract: Using glyphosate as the sole selective pressure, a yeast strain ZM-1 was isolated by enrichment-domestication culture technique from cultivated soils in the suburb around Fuzhou, PR China. The strain was identified as *Rhodotorula mucilaginosa* based on its physiological, biochemical and 26S rDNA D1/D2 domain sequences analysis. Strain ZM-1 grew with glyphosate as sole carbon and nitrogen source. The maximum glyphosate tolerant concentration for ZM-1 was 50 g/L. Strain ZM-1 was cultivated for 7 d under the conditions that glyphosate concentration 1 g/L, temperature 30°C, and rotation speed 150 r/min with 85.38% glyphosate-degraded rate. With the basal salts medium, the optimal conditions for growth and glyphosate-degraded rate for the strain were as follow: initial glyphosate concentration 1 g/L, inocu-

基金项目: 福建省重大科技专项项目(No. 399393939)

* 通讯作者: Tel: 86-591-83789396; ✉ msyou@fjau.edu.cn

收稿日期: 2010-03-21; 接受日期: 2010-05-04

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

lating dose 4% (V/V), temperature 30°C, pH value 5.5–6.0 and medium contents 50 mL/250 mL, respectively. Strain ZM-1 could play an important role in bioremediation of glyphosate-contaminated environment, and may be a potential resource in the study of glyphosate-resistant GMO plant.

Keywords: Glyphosate-degraded strain, 26S rDNA D1/D2, Phylogenetic analysis, Biodegradation traits

草甘膦(Glyphosate, 简称 GPA)是内吸传导型广谱灭生性除草剂, 化学名为 N-膦酸甲基-甘氨酸, 商品名“农达”。自 1974 年在美国注册登记以来, 至今已在世界 100 多个国家注册, 成为世界上使用面积最大的除草剂品种。我国自 20 世纪 80 年代开始生产草甘膦, 主要应用于农业生产上“三园”(果、桑、茶园)杂草的去除, 近年来也被应用于防治南方水域空心莲子草、水葫芦等恶性杂草, 目前已成为继美国之后世界第 2 大生产和出口国。随着转基因抗草甘膦作物的发展, 全球草甘膦的使用面积正以每年 20% 的速度递增, 成为具有典型代表性的农药产品^[1]。

尽管草甘膦除草剂具有经济、高效、广谱、无残留、易降解等优点, 但长期施用对非靶标生物和环境的影响不可低估, 尤其是对水生生物和土壤微生物等具有较强毒害作用^[2-3]。有文献报道, 草甘膦一旦施用于土壤中, 便很快借助于其极性基团与土壤颗粒紧密结合在一起, 稳定而不容易被滤去, 其半衰期也平均延长到两个月甚至更多的时间^[4]。因此, 有关草甘膦除草剂的环境效应及其修复技术是近年来学者们关注的热点问题^[5]。草甘膦在土壤中主要是通过生物途径实现降解, Moore 等分离到 *Pseudomonas aeruginosa* PG2982, 开始了单株细菌降解草甘膦的研究^[6]。20 世纪 80 年代以来, 国内外学者对草甘膦的微生物降解进行了比较深入的研究^[7-8], 所分离到的微生物种类主要有假单胞菌属^[6]、产黄菌属^[8]、节杆菌属^[9]、产碱杆菌属^[10]等, 这些细菌多数能以草甘膦为唯一磷源生长, 但不能以草甘膦为唯一碳源快速生长。因此, 土壤中快速矿化草甘膦的菌株还未分离确定^[11]。

本课题采用多次驯化筛选方法, 从耕作土壤中分离到多株能耐草甘膦浓度达 40 g/L 的微生物菌株, 其中酵母菌 ZM-1 对草甘膦的最高耐受浓度为 50 g/L。该菌株在草甘膦初始浓度为 1 g/L 的无机盐培养基中, 培养 7 d 对草甘膦的降解率高达 85.38%。本课题在实验室条件下测定并分析了 ZM-1 的生物学特性和降解特性, 为该菌株应用于草甘膦污染的

生物修复提供菌种资源和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品: 2007 年 9 月, 在福州市郊区的罗源、连江、长乐、马尾的果园、蔬菜田和花圃采集土壤样品。

1.1.2 主要药品与仪器: 草甘膦: 纯度 98%, 上海农药研究所; 甲醇: 色谱纯, 德国 Merck 公司; 98% 草甘膦异丙胺盐: 迪林飞达 98% 可湿性粉剂, 南通飞天化学实业有限公司。其他试剂均为 AR 或生物试剂。日立高效液相色谱仪(日立): 配有 L-2400 紫外检测器, L-2130 蠕动泵; 色谱柱: Apollo-C18 (250 × 4.6 mm, i.d., 5 μm)。

1.1.3 培养基: 富集培养基(g/L): 葡萄糖 10, 牛肉膏 5, 蛋白胨 10, NaCl 5, pH 7.0;

选择培养基(g/L): $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, CaCl_2 0.04, NaCl 0.5, pH 7.0;

基础盐培养基(g/L): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, KCl 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, pH 7.0;

唯一碳源培养基(g/L): 基础盐培养基中添加草甘膦 0.05、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1.31、 NaNO_3 3.0;

唯一碳、氮源培养基(g/L): 基础盐培养基中添加草甘膦 0.05、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1.31;

唯一碳、磷源培养基(g/L): 基础盐培养基中添加草甘膦 0.05、 NaNO_3 3.0;

唯一碳、氮、磷源培养基(g/L): 基础盐培养基中添加草甘膦 0.05。

上述培养基常规灭菌后, 根据需要添加适量经 0.45 μm 微孔滤膜过滤的草甘膦溶液备用。固体培养基琼脂添加 1.8%。

1.2 菌株驯化筛选

称取土壤样品 10.0 g 于草甘膦浓度为 10 g/L 的富集培养基中, 28°C、180 r/min 振荡培养 7 d; 之后按 5% 的接种量接种到草甘膦浓度为 20 g/L 的富集培养基中, 同样条件培养; 依此类推并控制选择培养基中草甘膦浓度分别达到 30、40、50 g/L 进行驯

化培养。取最后一次培养的菌液适当稀释后涂布于富集培养基平板, 30℃ 恒温培养, 选取单菌落转接到富集培养基上, 做进一步试验。

1.3 菌株鉴定

1.3.1 形态及理化特征: 形态及理化特征鉴定参考文献[12]。

1.3.2 26S rDNA D1/D2 区域基因的扩增: 按照文献[13]的方法提取酵母菌基因组 DNA。根据 26S rDNA D1/D2 区序列基因同源序列, 设计一对保守引物(引物由上海生工合成), 其中正向引物 26s-F: 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3', 反向引物 26s-R: 5'-GGTCCTTGTTTCAAGACGG-3'。PCR 反应体系为: 10 × PCR buffer 5 μL、dNTP 4 μL、PCR 引物各 1 μL、*Taq* 酶 1.25 U、DNA 模板 2–5 μL (600–1500 ng), 加灭菌双蒸水至 50 μL。PCR 反应条件为: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 循环 30 次; 72℃ 10 min。PCR 扩增产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳进行检测。26S rDNA D1/D2 区域测序委托上海生工公司完成。测序结果与 GenBank 中的已知序列进行比对。采用 MAGE 4.0 软件包以 Neighbor-joining 法构建进化树, 自举支持率(Boots-trap)取值为 1000 个重复, 进行系统发育分析。

1.4 菌株的生长和降解特性研究

菌种的制备: 在富集培养基中接种 ZM-1, 振荡培养 15 h ($OD_{600} \approx 1.0$), 离心收集菌体并用生理盐水洗涤后作为降解实验的菌液。除非特别说明, 降解实验中草甘膦浓度为 1 g/L, 接种量为 5%。培养条件均为 30℃、150 r/min 摇床振荡培养 7 d, HPLC 检测。实验设 3 个重复。对照组接种相同量的经沸水浴灭活的菌体, 在相同条件下培养。菌体生长量采用离心收集沉淀、105℃ 烘干至恒重, 测定菌体干重法。在葡萄糖对菌体生长和草甘膦降解的影响实验中, 设置葡萄糖浓度 0%、2%、4%、6%、8%、10%共 6 个水平, 以考察快速利用碳源对菌体生长和草甘膦降解的影响; 在草甘膦浓度对菌体生长和草甘膦降解的影响实验中, 设置基础盐培养基中草甘膦浓度 0.5、1、2、3、4、5 g/L 共 6 个水平, 以考察菌体对高浓度草甘膦的降解与耐受情况; pH、温度、培养基装量、接种量等条件对菌体生长和草甘膦降解的影响实验参考文献[14]进行。

1.5 草甘膦提取与测定

取草甘膦降解菌液 10 mL, 4000 r/min 离心

10 min, 上清液适当稀释后, 用 HPLC 测定。测定方法采用亚硝化柱前衍生的高效液相色谱法^[15]。色谱工作条件 柱温: 室温; 流动相: 水(含 0.1%磷酸): 甲醇 = 98:2; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 10 μL; 检测波长: 240 nm; 时间 10 min, 保留时间 $t = 4.39$ min 左右。

降解率的计算方法: 降解率(%) = $(1 - C_1/C_0) \times 100$ 。 C_1 : 降解菌处理草甘膦残留浓度, C_0 : 对照处理草甘膦残留浓度。

1.6 数据处理

实验所得数据, 由 Excel 2003 和 DPS (V6.85)统计软件进行处理, 采用 Duncan 法进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离及降解率测定

通过富集与驯化培养从采集的土壤样品中分离到真菌(编号为 MJ-3、YS-2、ZM-1)与细菌(编号为 JH-3、EW-1)5 株, 耐受的草甘膦浓度为 40 g/L。继续提高草甘膦浓度到 50 g/L, 28℃、150 r/min 培养 5 d 后观察, 发现培养液中仍有少量 ZM-1 菌存活, 说明 ZM-1 菌对草甘膦的最高耐受浓度为 50 g/L。表 1 所示, 在草甘膦为唯一碳、氮、磷源且草甘膦浓度为 1 g/L 的基础培养基中, 28℃、180 r/min 振荡培养 5 d, 5 株分离株对草甘膦的降解率各不相同, 降解率最高的菌株是 ZM-1 菌株(表 1)。选取该菌株做进一步的试验。

表 1 不同分离菌株对草甘膦的降解率 Table 1 Glyphosate-degraded rate ($\bar{x} \pm s$) by various isolated strains	
菌株 Strains	降解率 Degradation rate (%)
JH-3	5.6 ± 0.4
YS-2	17.8 ± 2.1
EW-1	22.7 ± 1.4
MJ-3	12.1 ± 2.3
ZM-1	35.5 ± 3.3

2.2 菌株 ZM-1 的鉴定

2.2.1 菌株的形态与生理生化特征: 如图 1 所示, 菌株 ZM-1 在葡萄糖肉胨平板培养基上, 28℃ 培养 7 d, 菌落形态为圆形, 油脂状, 菌落呈红褐色, 表面光滑, 明显突起, 边缘圆整。电子显微镜下, 细胞为椭圆形或卵形, 大小为(2.6–4.0) μm × (3.4–6.0) μm。单一、成对、短链排列或形成小丛集。营单边出芽

生殖。能利用葡萄糖、蔗糖、麦芽糖为唯一碳源生长,但不能以乳糖、淀粉、D-甘露醇、纤维二糖、D-半乳糖醛酸、棉子糖为唯一碳源生长。不能同化硝酸盐、尿素为唯一氮源生长。在含 5% NaCl 选择培养基中生长良好。最适生长 pH 7.0, 最适生长温度 30℃。

2.2.2 26S rDNA D1/D2 区域序列测定: PCR 扩增产物电泳图谱如图 2 所示。经测序、扩增得到的目的片段为 613 bp 序列, 该序列在 GenBank 中的登录号为 GU247752。

2.2.3 基于 26S rDNA D1/D2 区序列的系统发育树: 将得到的 26S rDNA D1/D2 区域序列通过 BLAST 程

序与核酸序列库中的序列进行同源性比对。采用 MEGA 4.1b 软件包中的 Kimura two-parameter 矩阵模型和 Neighbor-joining 法构建系统发育树(图 3)。系统进化结果显示, 分离菌株 ZM-1 位于 *Rhodotorula*(属)分支上, 经同源性比较发现菌株与 *Rhodotorula mucilaginosa* 同源性最高, 达 100%。Kurtzman 等^[16]的研究表明, 酵母菌种内不同菌株间 D1/D2 区域序列差异一般在 1%以内, 同源性在 99%以上就可以认为是同一个种。因此, 可以确定菌株 ZM-1 为胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)的一个菌株。结合菌体形态和生理生化特征, 鉴定菌株 ZM-1 为胶红酵母菌(*Rhodotorula mucilaginosa*)。

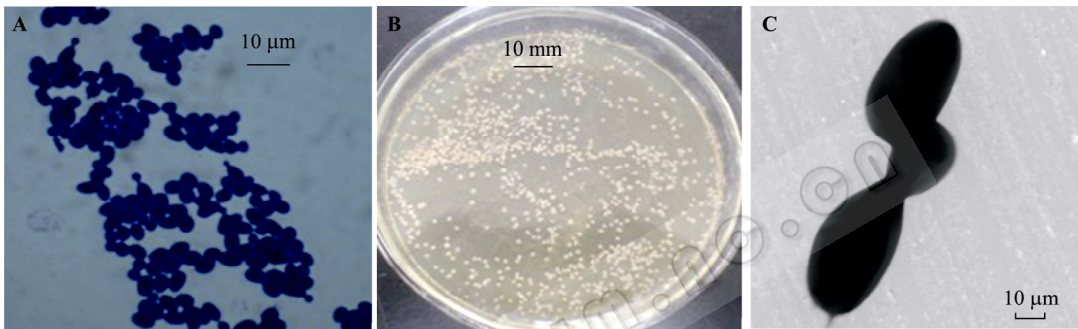


图1 酵母菌ZM-1的形态特征
Fig. 1 Morphological characters of ZM-1 strain

注: A: ZM-1 美兰染色(×1000); B: ZM-1 菌落形态; C: ZM-1 透射电镜下的形态(× 10000).
Note: A: Methylene blue trihydrate dyeing of ZM-1 strain (× 1000); B: Colonies of ZM-1 strain; C: Morphological character of strain ZM-1 under transmission electron microscope (× 10000).

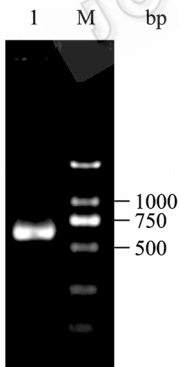


图2 26S rDNA D1/D2 区域的 PCR 扩增产物电泳图
Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified 26S rDNA D1/D2 domain sequences

Note: 1: PCR-amplified D1/D2 domain of ZM-1; M: DNA marker, DL2000.

2.3 菌株 ZM-1 的生长特性

在以草甘膦(0.5 g/L)为主要营养的基质中, 控制草甘膦为唯一碳、氮、磷源, 28℃、180 r/min 培养 3 d, 以平板菌落数(CFU/mL)为考察指标, 考察

菌株对草甘膦的利用情况及其生长特性(表 2)。ZM-1 能以草甘膦为唯一碳、氮源生长, 但以草甘膦为唯一磷源时生长较差。在缺乏外加氮、磷源情况下, 该菌对草甘膦的利用较差。

表 2 ZM-1 在以草甘膦为主要营养基质中的生长情况 Table 2 Growth exhibition for strain ZM-1 based on glyphosate as the main nutrient substrate				
培养基种类 Kinds of media	菌落数/mL CFU/mL (× 10 ³)		均值 ± 标准差 $\bar{x} \pm s$	
A	6.1	3.1	4.8	4.7 ± 1.2c
B	783	652	588	674.3 ± 88.9a
C	454	543	561	519.3 ± 51.2b
D	5.1	3.3	2.3	3.6 ± 1.3c

注: A、B、C、D 分别指在基础培养基上添加草甘膦(0.5 g/L), 使之成为唯一碳、氮、磷源; 碳源; 碳、氮源和碳、磷源。最后一个空格中的不同字母表示 $P < 0.05$ 水平上有极显著差异。

Note: Based on the basal salt medium, A, B, C, D refer to use glyphosate (0.5 g/L) as the sole source of: carbon, nitrogen, phosphorus; carbon; carbon, nitrogen and carbon, phosphorus; respectively. Values within the the last column with different letters.

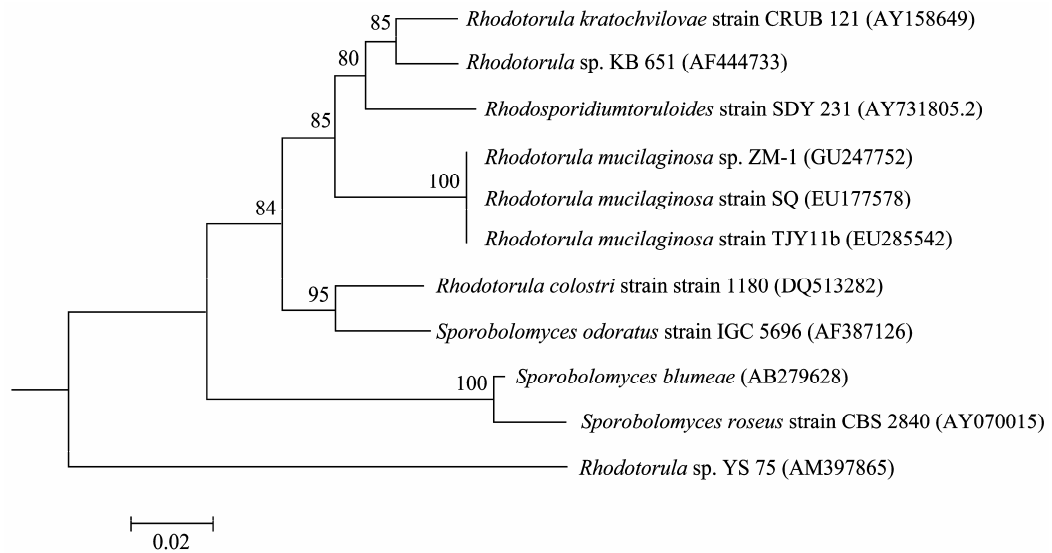


图 3 以菌株 ZM-1 26S rDNA D1/D2 序列为基础的系统发育树

Fig. 3 hylogenetic tree based on 613 bp fragment of 26S rDNA D1/D2 sequences of strain ZM-1

Note: Numbers at each branch points indicate the percentage supported by bootstrap based on 1000 resampled data sets. After each yeasty name, the GenBank accession numbers are showed in parentheses. Bar 0.02 represents sequence divergence.

2.4 菌株 ZM-1 的生长和降解特性

2.4.1 葡萄糖对菌株生长和降解率的影响：在葡萄糖和草甘膦组成的共基质体系中，以草甘膦为唯一氮、磷源，设定草甘膦的起始浓度为 1 g/L，观察并分析葡萄糖对菌株生长和草甘膦降解的影响。结果表明，当葡萄糖浓度由 0 提高到 4%时，菌株 ZM-1 的生物量明显上升，草甘膦的降解率也逐步提高，并在 4%时达到最大值，降解率为 88.67%。葡萄糖浓度超过 4%后，菌株 ZM-1 的生物量继续明显上升，但草甘膦的降解率却呈现先缓慢下降而后急剧下降的变化趋势(图 4)。可见，葡萄糖是菌株 ZM-1 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[17]的报道相符。

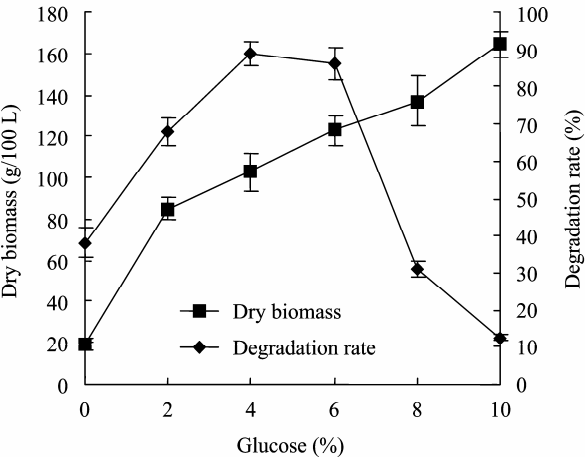


图 4 葡萄糖对菌体生长和降解率的影响
Fig. 4 Effects of glucose on the growth and degradation rate

2.4.2 草甘膦浓度对菌株生长和降解率的影响：在不同起始浓度草甘膦情况下，菌株生物量与降解率基本呈相同的变化趋势(图 5)。当草甘膦浓度为 1 g/L 时，菌体干重和降解率分别为 290 mg/L 与 84.73%，均达到最大值。在以草甘膦为主要营养的基础盐培养基中，草甘膦浓度过低，容易造成菌株生长所需要的碳、氮、磷源的缺乏，从而影响生长与降解。草甘膦浓度过高，则可能由于物理化学损伤或生理性破坏，如草甘膦与降解酶形成多元络合物，抑制了酶的降解活性，直接导致菌体生长迟缓，从而影响降解。

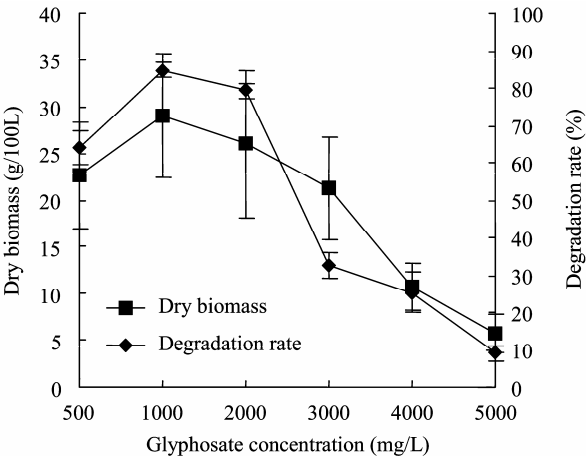


图 5 草甘膦浓度对菌体生长和降解率的影响
Fig. 5 Effects of glyphosate concentration on the growth and degradation rate

2.4.3 pH 对菌株生长和降解率的影响: 适宜菌株 ZM-1 生长的 pH 范围为 5.0–7.5(图 6)。ZM-1 适合在酸性条件下生长, 这与多数酵母菌生长的要求是一致的。pH = 5.5 时, 菌株的生物量达最大值 340 mg/L, 草甘膦的降解率为 82.9%; pH = 6.0 时, 菌株的生物量为 240 mg/L, 而草甘膦的降解率达最大值 85.1%。在碱性条件下(pH > 7.0), 随着培养基 pH 的升高, 菌株的生物量和草甘膦的降解率呈现快速下降的趋势。因此, 适合 ZM-1 生长和获得草甘膦最佳降解率的 pH 范围为 5.5–6.0。

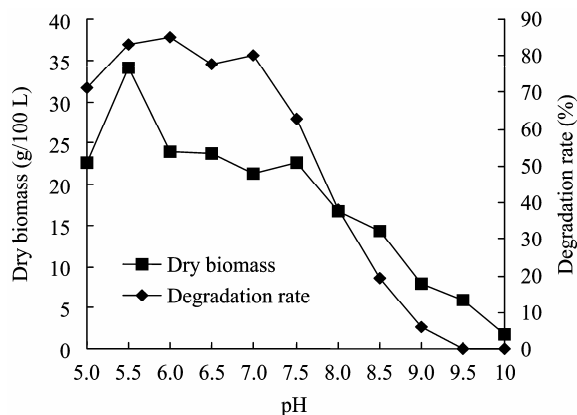


图 6 pH 对菌体生长和降解率的影响

Fig. 6 Effects of pH on the growth and degradation rate

2.4.4 温度对菌株生长和降解率的影响: 温度对菌株 ZM-1 的生长与降解率有明显影响。适宜菌株生长的温度范围 20°C–40°C, 说明菌株 ZM-1 是中温型微生物。温度 > 30°C 时, 随着温度提高, 菌体生物量与降解率都有明显下降的趋势。温度 30°C 情况下, 菌株的生物量与降解率达到最大值, 分别为 283 mg/L、85.63%。在 40°C 条件下, 菌株的生物量与降解率分别是 30°C 条件下的 58.81% 和 29.7% (图 7)。因此, ZM-1 生长与降解的最适温度为 30°C。

2.4.5 培养基装量对菌株生长和降解率的影响: 控制 250 mL 三角瓶中培养基装量于不同体积, 考察氧气对菌株生长和降解率的影响。结果表明, 不同装量情况下培养基中供给菌体生长代谢的氧气量也相应减少, 与多数酵母菌相似。装量 50 mL 条件下, 菌株生物量与降解率分别为 306.7 mg/L 和 87.6%, 分别是装量 175 mL 时的 1.87 和 4.06 倍(图 8)。

2.4.6 接种量对菌株生长和降解率的影响: 图 9 表明, 接种量对菌体生物量与降解率的影响不是很显

著。但不同接种量情况下, 菌体生物量与降解率还是有差异的。当接种量为 4% 时, 菌体生物量与降解率均达到最大值, 分别为 320 mg/L 和 85.63% (图 9)。

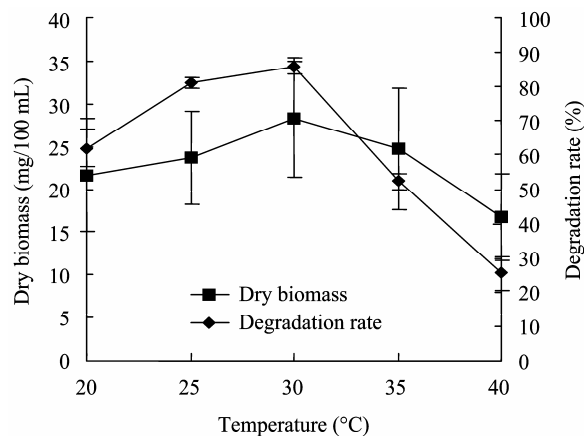


图 7 温度对菌体生长和降解率的影响

Fig. 7 Effects of temperature on the growth and degradation rate

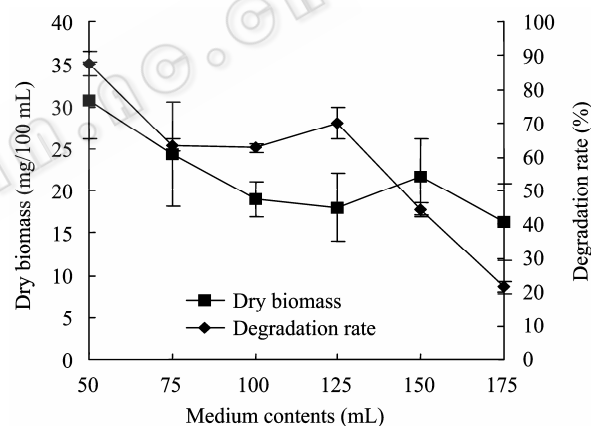


图 8 培养基装量对菌体生长和降解率的影响

Fig. 8 Effects of medium contents on the growth and degradation rate

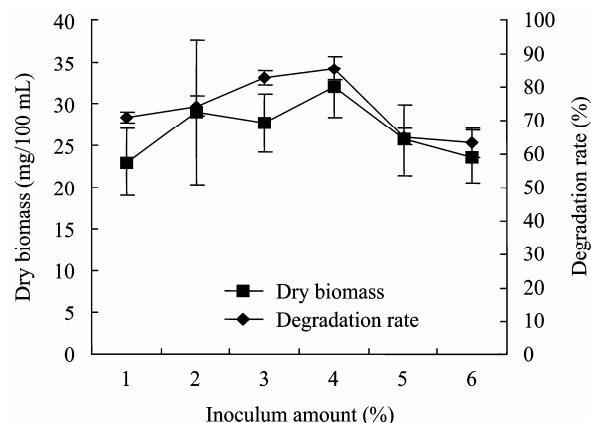


图 9 接种量对菌体生长和降解率的影响

Fig. 9 Effects of inoculum amounts on the growth and degradation rate

2.4.7 菌株在最适条件下的生物量与降解率:以无机盐选择培养基为基质,草甘膦初始浓度 1 g/L,培养条件为温度 30°C、pH 值 5.5–6.0、装料量 50 mL/250 mL, 150 r/min 摇床振荡培养 7 d, HPLC 检测。对照组接种相同量的灭活菌体,在相同条件下培养。进行了 5 批次发酵培养,取其平均值。结果表明,在最佳条件下培养,菌体生物量、草甘膦降解率分别为(314.1 ± 2.2) mg 干重/L、85.4% ± 2.6% (表 3)。

表 3 ZM-1 菌株在最佳培养条件下的生物量与降解率
Table 3 Optimal growth and glyphosate-degrading rate of strain ZM-1

批次 Batches	生物量 Dry biomass (mg/L)	降解率 Degradation rate (%)
1	289	85.7
2	311	81.9
3	324	82.7
4	294	87.5
5	351	89.1
$\bar{x} \pm s$	314 ± 2.2	85.4 ± 2.6

3 讨论

在自然环境中,特别是在长期受高浓度草甘膦污染的土壤中,存在种类繁多、能耐受草甘膦的微生物菌株^[17]。本项目采用传统的驯化选择方法,从耕作土壤中分离筛选到耐受草甘膦浓度高达 40 g/L 的 3 株真菌与 2 株细菌。其中酵母菌 ZM-1 对草甘膦的最高耐受浓度为 50 g/L。说明耕作土壤中草甘膦耐受菌株的多样性。

近年来,许多分子分类学方法特别是 26S rDNA D1/D2 区序列分析法被广泛应用于酵母菌的分类。酵母核糖体大亚基基因(26S rDNA)中的 D1/D2 区域能将绝大部分酵母种类区分开来,而种内不同菌株间 D1/D2 区域序列差异一般在 1%以内,因此同源率在 99%以上就可以认为是同一个种^[16]。菌株 ZM-1 的 26S rDNA D1/D2 区序列与酵母菌属的胶红酵母菌(*Rhodotorula mucilaginosa*)同属一个类群,序列同源性 100%。结合菌体形态和生理生化特征,鉴定菌株 ZM-1 为胶红酵母菌(*Rhodotorula mucilaginosa*)。胶红酵母在自然界广泛分布,国内外有报道将其开发应用于硝基苯等污染物的降解,但目前尚无将其用于农药污染治理的报道。

迄今所分离的草甘膦降解菌株主要是一些细菌^[7,9],但在同等数量情况下,耕作土壤中的真菌菌

有比细菌更高的生物量,应用真菌于草甘膦等除草剂的生物修复已成为一个新的研究方向。石成春等^[11]分离到一株可利用草甘膦为唯一碳源或磷源生长的黑曲霉 B21,在共基质底物系统中,B21 生长优先利用葡萄糖作为碳源和能源物质,草甘膦的降解率可达 97%。郑永良等^[3]分离到两株能以草甘膦为唯一碳、氮源生长的真菌 HS-04 和 HS-05。在基础培养基中,30°C、150 r/min 条件下培养 6 d,两株真菌对浓度为 0.2 g/L 的草甘膦的降解率分别为 85%和 91%,两株真菌在草甘膦浓度为 0.4–0.6 g/L 时生长较好。Cristina 等^[18]从土壤中分离到多株酵母菌,其优势菌株都是假丝酵母属(*Candida krusei*)和解脂亚罗酵母属(*Yarrowia lipolytica*)酵母菌。其中,假丝酵母 3 d 内对草甘膦的降解率达到 42.5%–66%。菌株 ZM-1 在草甘膦初始浓度为 1 g/L 的无机盐培养基中,30°C、150 r/min 振荡培养 7 d,草甘膦降解率为 85.38%。说明菌株 ZM-1 具有较强的草甘膦适应力与降解效能。

微生物主要通过两条途径降解草甘膦:C–N 键断裂生成氨甲基磷酸(Aminomethylphosphonate, AMPA)和 C–P 键断裂生成肌氨酸(Sarcosine)^[19]。由于 C–P 共价键的稳定性,多数细菌通过前一种方式也就是拥有 C–N 键降解酶,以共代谢的形式降解草甘膦^[17,20–21],而对 C–P 键裂解酶的研究也有较多的报道^[6,9,19,22]。菌株 ZM-1 能以草甘膦为唯一碳、氮源生长,在草甘膦为唯一磷源或缺乏外加氮、磷源情况下,该菌的生长量较低(表 2)。说明不能以草甘膦为唯一磷源进行生长。由此可以推断,菌株 ZM-1 可能走 C–N 键断裂生成氨甲基磷酸的途径降解草甘膦。

葡萄糖是 ZM-1 菌株生长和草甘膦降解或转化程度的关键性控制因素^[21]。其原因可能是在低浓度区,外加快速利用的碳源有利于促进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。草甘膦在化学性质上属于弱酸性三元复合物,碱性特别是强碱性条件下发生降解的趋势增强。实验中由于空白设定为接种灭活的菌液,培养基的其他条件一致,所以随着碱性条件增强,草甘膦的降解率没有出现升高的趋势(图 6)。

已经有多种方法使农作物获得对草甘膦的抗性。其中,从耐受菌株中克隆抗性基因,并转化作物

是行之有效的的重要途径^[23]。已经报道的菌株中, 草甘膦的耐受浓度一般在 10–200 mmol/L(相当于 1.69–33.8 g/L)之间^[9], 而菌株 ZM-1 在基础盐培养基中能耐受的草甘膦浓度高达 50 g/L。该菌株适宜的生长温度范围为 20°C–40°C, pH 范围为 5.0–7.5, 对于各种环境条件的适应性较强, 是一株良好的草甘膦耐受菌, 后续工作必须对其抗性机理进行研究。

4 结论

(1) 通过多次驯化培养, 从耕作土壤中分离到一株能以草甘膦为唯一碳、氮源生长的酵母菌菌株 ZM-1, 该菌株对草甘膦的最高耐受浓度达 50 g/L。

(2) 采用 26S rDNA D1/D2 区序列分析, 结合菌株的生理生化特征, 将菌株 ZM-1 初步鉴定为胶红酵母菌(*Rhodotorula mucilaginosa*)。

(3) 在草甘膦初始浓度 1 g/L 的无机盐培养基中, 30°C、150 r/min 摇床振荡培养 7 d, 菌株 ZM-1 对草甘膦的降解率为 85.38%。适合菌株 ZM-1 生长及降解草甘膦的最佳条件为: 草甘膦初始浓度 1 g/L、接种量 4%、温度 30°C, pH 值 5.5–6.0、装料量 50 mL/250 mL。

(4) 菌株 ZM-1 是一株良好的草甘膦耐受菌, 可用于草甘膦污染环境的生物修复, 也可能成为转基因抗草甘膦作物的一个良好资源。

参考文献

- [1] 朱玉, 于中连, 林敏. 草甘膦生物抗性和生物降解及其转基因研究. 分子植物育种, 2003, 1(4): 435–441.
- [2] Suna YC, Yan L, Hai ZG, *et al.* Reconstitution of the enzyme AroA and its glyphosate tolerance by fragment complementation. *FEBS Letters*, 2006(580): 1521–1527.
- [3] 郑永良, 刘德立, 刘世旺. 两株草甘膦降解真菌的分离及其降解效能研究. 黄冈师范学院学报, 2006, 26(3): 28–30.
- [4] Mara MA, Terezinha BP, Luiz CL, *et al.* Influence of repeated applications of glyphosate on its persistence and soil bioactivity. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 2003, 38(11): 1329–1335.
- [5] Stephan B, Dominique W, Marguerite L, *et al.* Chlorination kinetics of glyphosate and its by-products modeling approach. *Water Research*, 2006(40): 2113–2124.
- [6] Moore JK, Braymer HD, Larson AD. Isolation of a *Pseudomonas* sp. which utilizes the phosphonate herbicide glyphosate. *Applied and Environmental Microbiology*, 1983, 46(2): 316–320.
- [7] 沙纪莹, 金丹, 陆伟, 等. 极端污染环境草甘膦抗性菌株的分离、鉴定及特性. 微生物学报, 2008, 48(6): 824–828.
- [8] Terry M, Balthazor E, Hallas E. Glyphosate-degrading microorganisms from industrial activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 1986, 51(2): 432–434.
- [9] Pipke R, Amrhein N. Isolation and characterization of a mutant of *Arthrobacter* sp. strain GLP-1 which utilizes the herbicide glyphosate as its sole source of phosphorus and nitrogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988(54): 2868–2870.
- [10] Werner L, Manfred S, Benno P. Physiological aspects of glyphosate degradation in *Alcaligenes spec.* strain GL. *Archives of Microbiology*, 1990(153): 146–150.
- [11] 石成春, 郭养浩, 王大奈, 等. 草甘膦生物降解的动力学研究. 中国环境科学, 2005, 25(3): 361–365.
- [12] 巴尼特 JA, 胡瑞卿. 酵母菌的特征与鉴定手册. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991: 265–291.
- [13] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南: 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 343–351.
- [14] 汤鸣强, 田盼, 尤民生. 羧戊菊酯降解菌 FDB 的分离鉴定及其生长特性. 微生物学通报, 2010, 37(5): 682–688.
- [15] 吴晓红, 杨文远. 用反相高效液相色谱法测定农药草甘膦含量的研究. 宁夏大学学报: 自然科学版, 2006, 27(4): 351–353.
- [16] Kurtzman C, Robnett C. Identification and phylogeny of basidiomycetous yeasts for analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Leeuwenhoek*, 1998, 73(4): 331–371.
- [17] Hallas LE, Hahn MH, Korndorfer C. Characterization of microbial traits associated with glyphosate degradation in industrial activated sludge. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 1988, 3(6): 377–385.
- [18] Cristina RM, Enso H, Reinoso A, *et al.* Biodegradation of glyphosate by wild yeasts. *Revista Mexicana De Micologia*, 2004(19): 45–50.
- [19] Gary SJ, Joel RG, Laurence EH, *et al.* Metabolism of glyphosate in *Pseudomonas* sp. strain LBr. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54(12): 2953–2958.
- [20] Pipke R, Schulz A, Amrhein N. Uptake of glyphosate by an *Arthrobacter* sp.. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987(53): 974–978.
- [21] McAuliffe KS, Hallas LE, Kulpa CF. Glyphosate degradation by *Agrobacterium radiobacter* isolated from activated sludge. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 1990, 6(3): 219–221.
- [22] Liu CM, Mclean PA, Sookdeo CC, *et al.* Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family rhizobiaceae. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(6): 1799–1804.
- [23] 刘柱, 梁爱敏, 张维, 等. 极端污染环境下草甘膦抗性菌株 HTG7 的筛选及其特性研究. 微生物学通报, 2004, 31(1): 35–39.