

文章编号: 0529-6579 (2000) 03-0111-05

两个分离菌株对 2,4-D 降解效率的 微生态系统模拟^{*}

夏北成¹, 李婉华², David S. Treves³, James M. Tiedje³

(1. 中山大学环境科学研究所, 广东 广州 510275; 2. 广州污水处理总厂;
3. Center for Microbial Ecology, Michigan State University, East Lansing, MI USA)

摘 要: 在微生态系统模拟条件下, 2 个分离菌株 *Sphingomonas paucimobilis* 9256, *Ralstonia eutrophus* JMP 表现出对除草剂 2,4-D 的高效降解性能. 但 *R. eutrophus* JMP 能在更多的模拟条件下成为优势种群. 对 2 个菌株的种群消长影响最大的生态因子是湿度和 2,4-D 的浓度. 种群增长与 2,4-D 降解有约 24 h 的时滞; 种群的增长量不完全受底物 2,4-D 消耗的多少制约. 多个生态因子的综合作用说明模拟的微生态系统离自然系统还有较大的差别.

关键词: 生物降解; 2,4-二氯苯氧基乙酸 (2,4-D); 微生态系统模拟

中图分类号: X172; X5 **文献标识码:** A

2,4-二氯苯氧基乙酸 (2,4-D, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid) 是一种全球性普遍使用的含氯有机化合物. 其化学性质稳定, 不容易自然降解^[1]. 许多地方都已经测试到地下水含有 2,4-D. 因此 2,4-D 已成为生物恢复 (bioremediation) 的重要研究对象之一. 大量的研究已经分离获得了许多有效的降解菌株, 虽然对这些菌株有一定的研究和报导, 但是生态学模拟方面却较少见. 本文选用降解 2,4-D 的 2 个菌株 (*Sphingomonas paucimobilis* 9256, *Ralstonia eutrophus* JMP) 进行微生态系统 (microcosm) 模拟研究.

1 材料与方法

1.1 菌株

本文采用 Tiedje 等从长期使用 2,4-D 的农田分离出来的 2 个分离菌株 *S. paucimobilis* 9256 和 *R. eutrophus* JMP. 这 2 个菌株的生理生化特性有一定的差异.

1.2 菌株标记

使用 β -Galactosidase 对 *S. paucimobilis* 进行标记. 被标记的菌株菌落呈乳黄色, 很容易与未标记 *R. eutrophus* JMP 的乳白色菌落分开, 以方便对 2 个菌株进行数量统计.

1.3 微生态系统设置

以 20 mL 的实验小玻璃瓶为容器, 以 Sigma 的 Quartz 细沙 (50~70 目) 为载体. 各处理的重量相同, 即沙和所加入的液体的总量控制为 5.00 g. 液体的构成为 2,4-D 溶液、

^{*} 收稿日期: 1999-10-08; 作者简介: 夏北成 (1957~), 男, 副教授.

菌株培养液和一种矿物质培养液（MMO）^[1]。2，4-D 溶液的量是根据各处理的要求确定，菌株的初始数量控制在每个处理 1 000~5 000 个细胞。按照实验处理的要求将 3 种液体混合均匀，密封置于 25℃室温，设 3 个重复。

1.4 取 样

为了保证微系统条件的稳定，采取破坏性取样，即将整个微系统一次性取样。取样时在总量为 5.00 g 的微系统内加入 5 mL MMO，混匀后从中取约 1 mL 液体放入微型离心管，并于微型离心机上离心 5 min（14 000 r/min）。离心后取上清液，经 0.45 μm 过滤器过滤后注入液相色谱样品瓶，用封口器封口后置于-20℃待测。每个样品取 100 μL 后进行梯度稀释，取 3 个合适的梯度作平板测数，设 3 个重复。置于 30℃恒温下培养、计数。

2 结果与分析

2.1 种群动态与 2，4-D 降解

图 1a、b 和 c 是湿度为 20% 时的情形，显示了 *S. paucimobilis* 和 *R. eutrophus* JMP 的种群增长和 2，4-D 的降解动态。图 1a 中 2 个菌株的种群呈同步增长趋势，2 个菌株的种群在微生态系统设置后的 24 h 内就已有明显的增长。其中 *S. paucimobilis* 增长 3 675 倍。与此同时作为基质的 2，4-D 已被大幅度地降解，降解幅度达 76%，并在随后的 24 h 内被完全降解。在该微生态系统中，基质被利用完后种群仍有继续增长的趋势。

图 1b 表明 2 个菌株的种群在微生态系统内的竞争结局与图 1a 有不相同之处。*S. paucimobilis* 在微生态系统设置后种群就开始微弱下降，并一致维持在比初始种群略低的低水平上。而 *R. eutrophus* JMP 在开始的 24 h 内增长速率不太大，但随后其增长速率显著提高，成为微生态系统中竞争的胜利者。与图 1a 相同，在这期间里 2，4-D 也几乎被完全降解。所不同的是图 1a 在第 1 个 24 h 内

2，4-D 的降解幅度较大，而图 1b 在第 1 个 24 h 内的降解幅度相对较小，但在第 2 个 24 h 中降解幅度较大。图 1c 与图 1a 和 b 的明显差别在于第 1 个 24 h 内种群没有明显增长，2，4-D 也没有被明显降解，随后 *R. eutrophus* 开始增长，2，4-D 的浓度急剧下降，48 h 内有约 90% 的 2，4-D 被降解。

由图 1 可以发现，种群增长的启动过程有差异。微生态系统中 2，4-D 的初始浓度较高时，对 2 个菌株的种群增长的启动产生抑制作用。同时，随着 2，4-D 浓度的增加，2，4-D 对菌株 *S. paucimobilis* 增长的抑制逐步增强，到图 1c 时，*S. paucimobilis* 完全被抑制，最后种群消亡。分析对 *S. paucimobilis* 的作用，可分为 2 个阶段。第 1 个阶段是因为 2，4-D 浓度对

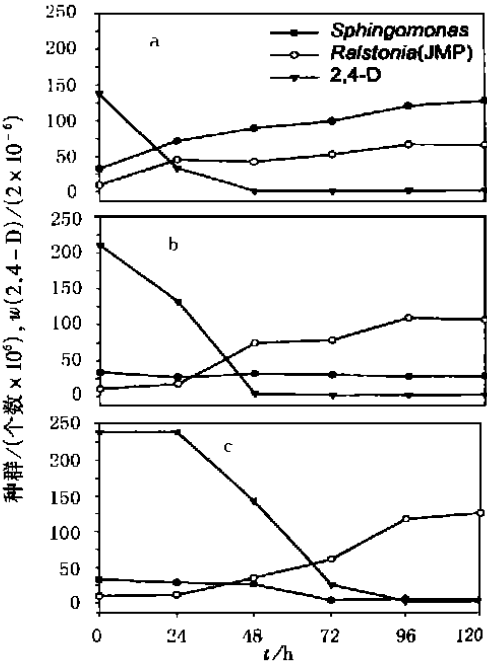


图 1 不同底物浓度下的种群动态和 2，4-D 降解动态
Fig. 1 Population dynamics and 2，4-D decline under different substrate concentrations

种群的抑制作用，随着 2, 4-D 浓度的降低，抑制作用逐步减弱，但是在 2, 4-D 降低的过程中，*R. eutrophus* 已经增长到了一定的水平，这时 *R. eutrophus* 将对 *S. paucimobilis* 产生抑制作用。

2.2 2, 4-D 浓度与降解动态

图 2a 和 a' 是湿度为 16% 的微生物生态系统中的种群增长和 2, 4-D 降解动态，相应地，图 2b 和 b'、c 和 c' 分别为 13% 和 10% 湿度条件下的微生物生态系统种群增长和 2, 4-D 降解动态。图 2a、b 和 c 为 2, 4-D 初始浓度更高的微生物生态系统，而 a'、b' 和 c' 则较低。

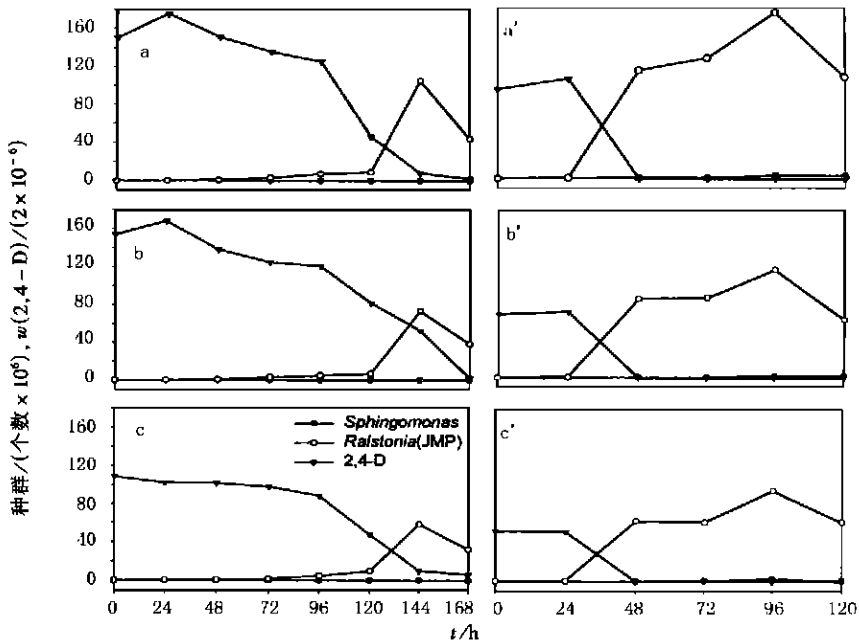


图 2 不同土壤温度和底物浓度下的种群动态和 2, 4-D 降解动态

Fig. 2 Population dynamics and 2, 4-D decline under soil different moistures and substrate concentrations

图 2a'、b' 和 c' 的 2, 4-D 降解曲线均为同一形态，即在起初的 24 h 内 2, 4-D 的浓度基本保持不变，2 个菌株的种群在这段时间里也没有明显的增长，而在随后的 24 h 内，3 个不同湿度条件下的 2, 4-D 都被全部降解。图 2a、b 和 c 中 2, 4-D 的降解曲线也有相同的，从微生物生态系统的设置开始到第 96 h，2, 4-D 的降解幅度都较小，分别为 17%、22% 和 19%，而菌株种群也只有微弱的增长。96 h 后，2, 4-D 降解速度急剧加速，在随后的 48 h 内分别降解 79%、45% 和 73%，至 168 h 时，3 个处理的 2, 4-D 都几乎被全部降解。

图 2 中各相对应的 a-a'、b-b' 和 c-c' 是具有相同湿度条件的微生物生态系统，但 2, 4-D 的初始浓度不相同，对比之下，2, 4-D 的降解动态也具有明显不同，这一差异表明，由于 2, 4-D 对菌株种群的增长过程有一定的抑制作用，因而影响到 2, 4-D 的降解过程，当湿度条件相同，2, 4-D 浓度较高时，其降解过程将延长约 100 h。

比较图 2c 和 a'，2, 4-D 初始浓度基本相同，但 c 的湿度较低，相应地液相中的 2, 4-D 的浓度相对较高，因此图 2c 和 a' 之间的 2, 4-D 降解动态之差异是与液相中的 2, 4-D 浓度有关，当湿度条件相同时，2, 4-D 在微生物生态系统中的差异也相应地反映在液相中。

2.3 2, 4-D 浓度对种群增长的抑制作用

在图 1 和图 2 所显示的各处理中，*S. paucimobilis* 的增长受到明显的抑制，除了在图 1a

中 *S. paucimobilis* 有较明显的种群增长和在图 1b 中基本维持在初始种群水平外, 在其他各处理中 *S. paucimobilis* 种群很明显地处于被抑制状态, 2 个种群出现很大的差异. 这种抑制作用主要来自 2, 4-D 的浓度变化. 同时也有其他因素的作用, 如湿度和竞争.

图 1 显示, 随着基质 2, 4-D 浓度的增加, 种群增长的初始阶段会出现一个明显的延迟. 图 1a 中 2 个种群在第 1 个 24 h 内出现明显的增长, 而图 1b 和 c 中则没有出现明显的增长. 在第 2 个 24 h 内, *R. eutrophus* JMP 图 1b 中的增长速率明显地高于图 1c.

在图 2a、b 和 c 中, 种群在开始的几天内没有增长的迹象, 而随后的增长过程较短, 增幅较小. 与图 2a、b 和 c 相对应的图 2a'、b' 和 c' 中, 种群在第 2 d 就开始迅速增长, 且图 2a'、b' 和 c' 中种群的增长幅度也明显大于相对应的图 2a、b 和 c 中种群的增长幅度.

2.4 湿度对种群增长的影响

种群增长在受 2, 4-D 浓度影响的同时, 也受到湿度条件的影响, 图 2a 和 a' 的种群明显大于图 1b 和 b', 而图 1b 和 b' 的种群又明显大于图 1c 和 c'. a 和 a'、b 和 b' 及 c 和 c' 的相对湿度分别为 16%、13% 和 10%. 比较图 2c 和 2a', 初始 2, 4-D 浓度相近, 但种群大小相差甚远. 且增长过程及 2, 4-D 降解过程都有显著的差异. 类似差异也出现在图 1a 和图 2a 之间.

2.5 2, 4-D 降解与种群增长的时滞

微生态系统中的 Sigma 沙粒中不含 2, 4-D 降解菌株可以利用的有机物质, 也不提供任何其他的可利用的碳源物质, 仅有 2, 4-D. 微生物细胞利用碳源代谢产生能量, 当基质被消耗完后, 细胞进行内源代谢继续生长. 从本项研究的几个处理来看, 2, 4-D 降解与种群增长的时滞为 24 h 左右, 当 2, 4-D 浓度较低时, 时滞将小于 24 h, 当以 24 h 为取样时间间距时, 时滞被掩盖, 如图 1a 和图 2a'、b' 和 c' 中 2, 4-D 降解与种群增长同步开始. 但是, 2, 4-D 被全部降解后, 种群继续增长, 然后再下降. 这一时滞过程在不同处理间变化较大.

2.6 2, 4-D 降解量与种群的增长

从一般概念来讲, 基质消耗的多少会与种群增长有一定的关系, 种群在消耗基质的同时获得能量, 为种群增长之用. 在本项研究中, 有些资料可以支持上述结论, 如图 2a、b 和 c, 随着所消耗的 2, 4-D 的减少种群也随之变小. 同样也可以从图 2a'、b' 和 c' 中得到相关信息. 然而, 综合全部图 2a、b、c 和 a'、b'、c' 以及图 1a、b 和 c, 不是全部的资料都支持这一结论, 这表明其他因子也在发挥很重要的作用, 比较图 2a 和 a', a' 中 *R. eutrophus* 种群明显超过图 2a, 而前者所消耗的基质 2, 4-D 明显偏少. 在图 1 中考虑 2 个种群的总和时, 图 1a 中所消耗的基质少, 则种群数量大于图 1b 和 c 中的数量. 图 2a 中 *R. eutrophus* 的种群量最大时达 105×10^6 , 而图 2a' 中 *R. eutrophus* 的种群则达到 174×10^6 个细胞. 而两者所消耗的基质 2, 4-D 的总量分别为 0.75 mg 和 0.50 mg. 在所有的处理中, 虽然设置的条件不同, 但所有的处理中 2, 4-D 都基本被降解, 尽管降解者的种群数量有较大的差异.

这一结果表明, 这 2 个分离菌株对 2, 4-D 降解的能力很强, 不管条件如何, 都能彻底降解环境中的 2, 4-D, 但是在克服不利环境(如低湿度、高浓度基质的抑制作用等)时会消耗部分能量, 从而使种群的增长与所消耗的基质不呈显著的线性关系. 但是总的结果是微生态系统中所有 2, 4-D 都能被降解.

3 讨论

综观全部的研究资料, 就会发现在研究某一单因子的作用时所获得的单因子的作用规

律不一定会表现在研究其他因子的各处理中. 这一现象说明多因子的综合作用的重要性. 研究单因子的作用规律可以揭示某些现象, 但不能据此而作出更多的推论.

据本文的研究结果, 在较多的情况下是 *R. eutrophus* JMP 成为竞争的胜利者, 而使得 *S. paucimobilis* 9256 不能建立优势种群. 但是, *S. paucimobilis* 9256 将在环境条件变的有利时建立自己的优势种群, 如图 1a. 这时是 2, 4-D 浓度较低, 同时还有另一项研究表明, 微生物系统的湿度从高往低变化时, 可以使 *S. paucimobilis* 9256 从弱势竞争地位转变为强势竞争地位, 因此不能简单判断 *S. paucimobilis* 9256 和 *R. eutrophus* JMP 那一个更适合于挑选作为 2, 4-D 降解菌释放于被污染环境. 当环境中 2, 4-D 浓度较低, 土壤偏干时, 可能的竞争胜利者将 *S. paucimobilis* 9256, 而在其他情况时, *R. eutrophus* JMP 将成为竞争的胜利者. 另有研究指出, 时滞和 2, 4-D 降解基因是竞争的决定因素^[4].

在微生物系统设置时因为考虑到对单因子的作用规律的探讨, 而尽可能地使微生物系统简化. 但是真正要客观地反映某一菌株在自然条件下的真实表现, 应该将微生物系统的设置条件更接近自然, 使微生物系统中包含有一些并不知晓的作用因子 (但使各处理间相似), 再观察研究对象在其中的表现规律. 例如用某种自然的介质作为微生物系统的介质, 当然这里会给微生物系统模拟研究带来许多新的困难.

参考文献:

- [1] BIEDERBECK V O, CAMPBELL C A, SMITH A E. Effects of long-term 2, 4-D field application on soil biochemical processes[J]. J Environ Qual, 1987, 16: 257~262.
- [2] KA J O, HOLBEN W E, TIEDJE J M. Genetic and phenotypic diversity of 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D)-degrading bacteria isolated from 2, 4-D treated field soils[J]. App and Environ Microbiol, 1994, 60: 1106~1115.
- [3] DON R H, PEMBERTON J M. Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus* [J]. J Bacteriol, 1981, 145: 681~686.
- [4] KA J. O, HOLBEN W E, TIEDJE J M. Analysis of competition in soil among 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading bacteria[J]. App and Environ Microbiol, 1994, 60(4): 1121~1128.

Simulation of Microcosms of Two Strains Isolated from Contaminated Soil by 2, 4-D for Population Dynamics and Substrate Degradation

XIA Bei-cheng^{*}, LI Wan-hua, David S. TREVES, James M. TIEDJE

Abstract: Two strains, *Sphingomonas paucimobilis* 9256 and *Ralstonia eutrophus* JMP, isolated from contaminated soil, can effectively degrade 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) in simulative microcosm system. In most situations strain *Ralstonia eutrophus* JMP was dominant population. The most important ecological factors affecting two strain population dynamics were microcosm moisture and substrate (2, 4-D) concentration. There was a 24-hour time lag between population growth and 2, 4-D degradation. Total population growth was not directly relative to quantity of substrate degraded by the strains. Multiple factors affect microcosm situation together. Some combined results revealed that the simulative microcosms are not very closed to the natural environment system.

Keywords: biodegradation; 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid; microcosm simulation

^{*} Institute of Environmental Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China.