

· 研究简报 ·

## 解酚假单胞菌的分离及毒物降解的特点\*

周世宁

(生物学系)

**关键词** 假单胞菌, 酚降解菌, 汞抗性菌

在假单胞菌中有些株可以降解芳香类有机物<sup>[1,2]</sup>, 另一些株可以抗重金属<sup>[3,4]</sup>。某些芳环化合物如苯酚等, 及含汞的化合物都是可以造成环境污染的有毒物质。对假单胞菌降解水杨酸等芳香化合物的途径已有一些了解<sup>[5,6]</sup>, 但少有涉及代谢的调控问题。本文报道一株从化学工业污染区域新分离到的假单胞菌。这株菌不但可以降解水杨酸、苯甲酸及邻苯二酚, 而且还能降解毒性较强的苯酚, 并具有耐受一定浓度  $Hg^{2+}$  的能力, 是一株有前途的去污染工程菌。对该菌降解混合芳香化合物的研究发现, 邻苯二酚在这些芳香化合物降解代谢中是一个具有调节作用的物质。

**1. 材料和方法**

(1) 培养基 ①最低合成培养基参照文献<sup>[7]</sup>配方。其中微量盐溶液作以下改变: 重蒸水 1 升含  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  12克;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  1克;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0.025克;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.144克;  $CoSO_4 \cdot 7H_2O$  0.028克;  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  1.12克;  $CaCl_2$  0.2克。

②肉汤: 每升含蛋白胨10克,  $NaCl$  5克, 酵母膏5克, 葡萄糖1克,  $pH7.2$ 。

③胨水: 每升无离子水含蛋白胨8克,  $NaCl$  5克,  $pH7.3$ 。

(2) 细菌分离和鉴定 来自化工污水沟的样品接种于增加了0.02%酵母膏及10mM水杨酸盐的最低合成培养基中,  $30^\circ C$ , 振荡培养1—2天。适当稀释后涂布同种培养基平板,  $30^\circ C$ 培养, 从中选取菌落。细菌的鉴定按照文献<sup>[8]</sup>介绍的方法进行。

(3) 芳香化合物浓度测定 ①氧化显色法测定苯酚<sup>[1]</sup>: 0.05毫升样品加入含1%  $K_3Fe(CN)_6$  的0.1M甘氨酸缓冲液( $pH9.7$ )0.5毫升, 再加入含1% 4-氨基安替比林的0.1M甘氨酸缓冲液( $pH9.7$ )2.5毫升, 待显色稳定后, 于分光光度计测吸光率, 选用505nm波长。

②高效液相色谱条件: TRACOR900系列高效液相色谱仪, 多孔微粒硅胶 pastisil 10, 流动相为二氯甲烷: 甲醇: 冰乙酸 = 100:0.5:0.025(v/v/v), 测量波长280nm; 流

本文1987年3月收到

\* 本文在陈俊民副教授指导下完成

速1.5ml/min。样品经酸化，二氯甲烷抽提，从有机相取样分析。

(4) 总汞量用汞分析仪[CH7601]测定<sup>[9]</sup>。

### 2. 结果与讨论

分离到的菌株S7具有以下分类学特征：杆状，无芽孢，革兰氏染色阴性，氧化葡萄糖产酸，极生鞭毛，可运动，好气生长，不利用乙醇产酸，pH4.5以下不生长，氧化酶反应阳性，过氧化氢酶反应阳性等。据此，此菌归类于假单胞菌属<sup>[7,8]</sup>。

菌株S7对芳香化合物的降解利用试验表明，水杨酸、苯甲酸、苯酚及邻苯二酚均可作为它的唯一碳源。这一试验在液体最低合成培养基中进行。各化合物以下述浓度加入培养基中作碳源：水杨酸10mM，苯甲酸8 mM，苯酚及邻苯二酚为2 mM。细菌不能利用间苯二酚及对苯二酚。

苯酚对S7的最低抑制浓度约为700微克/毫升。试验结果见图1。

由图2可见，当接种量为 $10^8$ 个细胞/毫升时，经12小时培养，液体培养基中的苯酚浓度从262微克/毫升下降至零，细胞数达到最大值 ( $>10^8$ 个/毫升)；而在不接菌的对照样品中，苯酚浓度只有轻微下降，如培养基中没加入苯酚，细胞数也不增加，这说明细菌能利用苯酚而生长。当在较高苯酚浓度中 (532 $\mu$ g/ml) 用相同接种量培养时，消耗全部苯酚所需的时间大大延长，这不仅是因为苯酚量的增加，也由于苯酚的抑制作用所致。

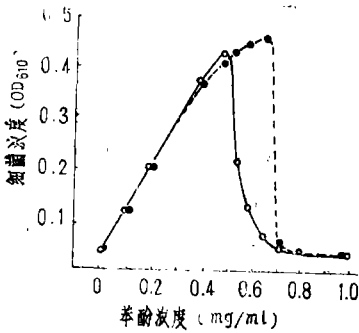


图1 苯酚对S7生长的最低抑制浓度

Fig. 1 The minimal inhibitory concentration of phenol for the S7

培养条件：最低合成培养基加苯酚，30℃，摇床。菌种为肉汤过夜培养物。

○—○ 培养12小时      ○—○ 培养24小时

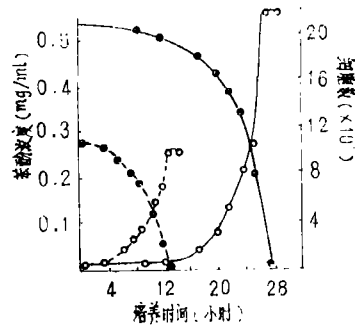


图2 菌株S7对苯酚的降解和利用

Fig. 2 Degradation and utilization of phenol by the S7

..... 苯酚开始浓度为262 $\mu$ g/ml,  
—— 苯酚开始浓度为532 $\mu$ g/ml,  
● 苯酚浓度, ○ 细胞数。

应用高效液相色谱测定，得到了这些化合物在混合碳源培养系统中的细菌降解历程曲线(图3)。由图3可见，当环境中同时存在几种可作碳源的芳香化合物，菌S7对它们的降解在先后方面有着差异。在所有的实验系统中，细菌对邻苯二酚的降解速率较均匀，且最先被完全消耗；水杨酸、苯甲酸及苯酚的降解有前期慢后期突然增快的现象，

这一现象不能简单地用细菌生长变快来解释, 因为降解速率的转折不仅与培养时间有关, 而且取决于邻苯二酚是否耗尽。这表明细菌对邻苯二酚及其他几种化合物的降解调控是有不同的。

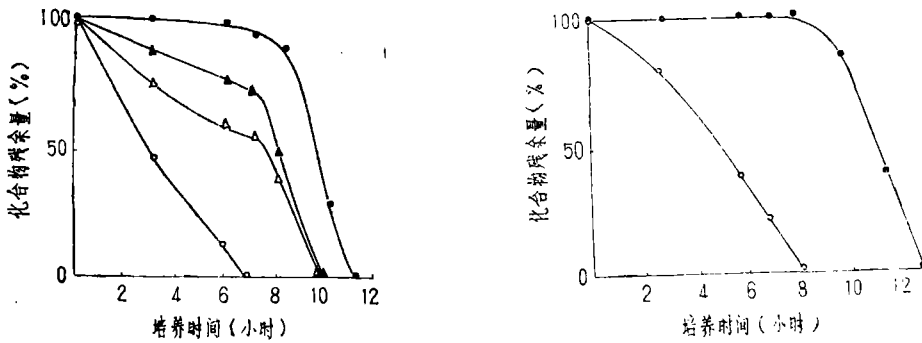


图 3 菌株S7对混合碳源降解

Fig. 3 Degradation of mixed carbon sources by the S7

苯酚(●), 邻苯二酚(○), 苯甲酸(▲), 水杨酸(△)

种子为在水杨酸培养基中培养过夜细胞, 接种量:  $8 \times 10^6$  细胞/ml

为了进一步了解邻苯二酚在混合碳源降解中所起的作用, 用苯酚或者水杨酸与邻苯二酚作双碳源培养细菌并增加检测次数, 发现细菌出现二度生长现象, 即在二次生长高峰之间有一个明显的生长停滞期(图 4)。在这种情况下, 因为有邻苯二酚存在, 细菌可以很快地开始利用它而生长繁殖, 而当邻苯二酚耗完后, 需经过一段时间的诱导, 细菌方可利用第二个碳源而继续生长。降低邻苯二酚用量, 第一度生长的持续时间也会相应地缩短。如果不加邻苯二酚, 这时无无论单一碳源是苯酚或者是水杨酸, 细胞的生长都需要较长时间后才能测到。这一现象表明了苯酚和水杨酸降解的诱导性, 邻苯二酚的存在可以阻碍这种降解能力的表达。邻苯二酚的这种作用与葡萄糖效应产生的分解产物阻遏

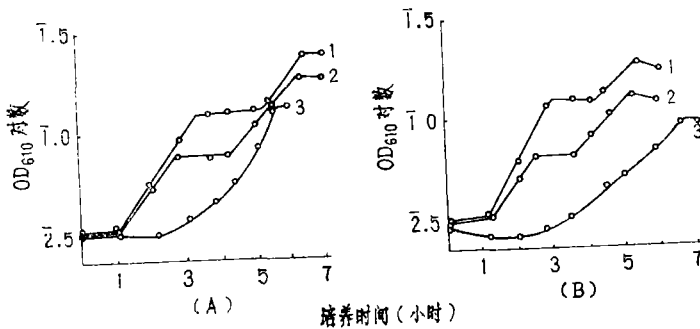


图 4 S7的二度生长实验

Fig. 4 Diauxic growth of the S7 in the medium containing catechol and phenol or salicylic acid

(A) 1.邻苯二酚100 $\mu$ g/ml, 苯酚100 $\mu$ g/ml; 2.邻苯二酚50 $\mu$ g/ml, 苯酚100 $\mu$ g/ml; 3.苯酚100 $\mu$ g/ml.

(B) 1.邻苯二酚100 $\mu$ g/ml, 水杨酸100 $\mu$ g/ml; 2.邻苯二酚50 $\mu$ g/ml, 水杨酸 100 $\mu$ g/ml; 3.水杨酸100 $\mu$ g/ml; 所用菌种来自经肉汤培养过夜培养物。

相类似。这种调节方式是在基因水平上发生的。这一了解可以帮助我们更好地深入研究该菌的生物降解作用及其基因表达的调控。

菌株S7也能在含 $\text{HgCl}_2$  6微克/毫升以下的肉汤或脓水培养基中生长。用冷原子吸收法分析了培养前后肉汤中汞含量的变化,接种细菌于含 $\text{HgCl}_2$ 培养基培养12小时,与不接菌空白对照,总汞量呈降低趋势。这提示细菌抗汞性可能是通过对 $\text{Hg}^{2+}$ 离子的还原蒸发机理<sup>[6,9]</sup>起作用的。

研究表明,该菌不但具有较强的同化利用酚类化合物作为唯一碳源的能力,并且耐受一定浓度的 $\text{Hg}^{2+}$ 。对该菌遗传学方面的初步分析,没有证据证明芳香化合物降解和汞抗性这两种特征是由染色体以外基因控制的。这些特征可能是由染色体本身决定的,因此是比较稳定的。更多的遗传分析工作有待进一步进行。

### 参 考 文 献

- [1] Yang, R. D. and Humphrey, A. E., *Biotechnol. Bioeng.*, 17(1975), 1211-1235.
- [2] Williams, P. A., *Development in Biodegradation of Hydrocarbons-1* ed. R. J. Watkinson, p.135-164.
- [3] Summers, A. O. and Lewis, E., *J. Bacteriol.*, 113(1973), 1070-1072.
- [4] Chakrabarty, A. M., *Ann. Rev. Genet.*, 10 (1976), 7-30.
- [5] Dagley, S. and Gibson, D. T., *Biochem. J.*, 95(1965), 466-474.
- [6] Dagley S. et al., *Nature*, 202(1964), 775-778.
- [7] Yano, K. and Nishi, T., *J. Bacteriol.*, 143(1980), 552-560.
- [8] 中国科学院微生物研究所细菌分类组,一般细菌常用鉴定方法,科学出版社,1978.
- [9] Clark, D. L. et al., *J. Bacteriol.*, 132(1977), 186-196.

## The Isolation and Characteristics of Phenol-degrading and Hg-resistant Bacteria

Zhou Shining

### Abstract

A *Pseudomonas* species designated as S7, was isolated from polluted environment by using a minimal medium containing salicylate as the sole carbon source and a rich medium containing  $\text{HgCl}_2$ . The organism could degrade and utilize phenol, salicylate, benzoic acid or catechol as the sole carbon source and was resistant to  $\text{HgCl}_2$  when it was grown in a rich medium. The minimal inhibitory concentration of phenol for the bacterium was 7.4 mM. The degradation of phenol and salicylate by S7 was inducible and regulated by catechol or its catabolites as a repressor.

**Keywords** *Pseudomonas*, Phenol degrading bacteria, Mercury-resistant bacteria