

研究报告

微生物降解邻苯二甲酸(O-PA)的动力学*

万 登 榜

(中国科学院水生生物研究所)

苯二甲酸及其脂类在石油化工,特别是作为合成工业的增塑剂和初化剂和染料制造业中的重要性以及他们对江河湖海的广泛污染而越来越引起人们的关注。Kluwe^[3]研究了邻苯二甲酸脂的致癌影响。Kozumbo^[9]发现了这种脂类的致突变作用。Kanesima^[7]发现,苯二甲酸浓度在 500—1000ppm 时毒性甚大;Wilson^[13]指出,苯二甲酸钠在 500ppm 以上时有很大毒性。所以,关于苯二甲酸在天然环境里归趋的研究便相继进行。Ribbons 等^[12]用测压技术研究了土壤假单胞菌类对苯二甲酸的氧化代谢,证明 4,5-二羟基苯二甲酸为其代谢的中间产物。Engelhardt^[6]从土壤分离的 *Nocardia* sp. 可经由二羟基苯二甲酸代谢邻苯二甲酸。Aftring^[4]自沉积物分离的混合细菌培养物可厌气地利用这种化合物。然而,却缺乏关于苯二甲酸降解的微生物动力学资料。国内邹惠仙等^[1]研究了对苯二甲酸降解的微生物动力学,但没有确定基质与微生物的消长关系。更未见到关于比基质降解速率与微生物比生长率同基质浓度的关系的报道。所以,作者以邻苯二甲酸(O-PA)为降解基质,以混合微生物和纯菌株为接种物,用分批培养方式研究了这些关系。

一、材料与方 法

1. 微生物的富集培养

把自武汉石油化工厂取回的长期为含 O-PA 的污水浸润的土壤样品制成 20% 的土

壤悬浮液,以 20% 的接种量接入含如下成分的无机盐培养基中: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.0g; KH_2PO_4 , 0.4g; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.02g; ZnSO_4 , 0.002g; MgSO_4 , 0.002g; CuSO_4 , 0.002g; 蒸馏水, 1l. 调 pH 至 7.0. O-PA 的富集浓度在一个月由 0.1% 增加到 10%, 于室温(约 26℃)通气培养。

2. 混合微生物的降解试验

(1) 于盛有 200ml 无机盐培养基中,加入 0.4% 的 O-PA 作为唯一碳源,加 0.05% 酵母膏作为辅助生长因素,接种 10% 的富集液,于 30℃ 摇床培养 24 小时,以此新鲜培养液作为降解试验用的种子培养液。

(2) 在培养基中接入 10% 的种子液和 0.3% 的 O-PA, 间隔一定时间测定 O-PA 浓度与菌液的光密度。另以未接种的培养基作为空白,以确定 O-PA 的挥发量。

(3) 将 O-PA 以不同的浓度加入,以研究不同浓度的 O-PA 对微生物降解作用的影响。

3. 纯菌株的分离与鉴定: 方法见文献 [2]、[3]、[5]。

4. 纯菌对 O-PA 降解能力的比较试验

在含相同浓度的 O-PA 的培养基中,以 5% 的量接种不同菌株进行摇床培养。然后以细菌的比生长率(μ),比基质降解率(ν)及基质降解百分率(%)为指标确定各目的降解能力。

* 本文承蒙王德铭教授审阅,特此致谢。

5. O-PA 的测定

用标准 O-PA 溶液在紫外分光光度计上扫描,以确定 O-PA 的最大吸收所需要的波长. 然后按 Engelhardt 描述的方法,在 280nm 测定 O-PA 的光密度,据此绘制标准曲线. 残留于培养液中的残留物,通过 9,000 R. P. M 离心,取上清液,经适当稀释后进行测定. 用该法测定 O-PA,求得的相对标准误差为 1.48% (变异系数, 3.6%). 可见此法有较高的精密性.

6. 微生物干重的测定 方法见文献 [11].

二、结 果

1. O-PA 降解与混合微生物生长的关系

结果显示,混合微生物能以 O-PA 为生长的唯一碳源和能源. 微生物生物量随着基质浓度的下降而上升. 在培养的最初 4 小时内,微生物比生长速率和比基质降解率最高,分别达到 0.95/h 和 $2.46 \times 10^{-3} \text{mol/h}$. 其后,随着培养时间的延长,这两个参数逐渐降低,以至到第 36 小时后,二者均处于稳定状态. 从图 1 可明显地看出微生物生物量增加和基质浓度减少呈高度负相关,其关系系数等于 -0.98. 此系数和零比较,差别显著 (<0.01) (见表 1). 另外,从不接菌的对照试验里, O-PA 浓度由零时的 $1.26 \times 10^{-2} \text{M/L}$ 变为 72 小时时的 $1.25 \times 10^{-2} \text{mol/L}$, 可见变化甚微. 因此,于 30°C 摇床培养中由挥发作用引起的基质浓度的变化可忽略不计.

2. O-PA 浓度对微生物降解作用的影响

在 10^{-4}mol/L 到 10^3mol/L 基质浓度范围里研究了 O-PA 浓度对微生物基质降解作用的影响. 在此范围内,微生物对 O-PA 的降解速度随基质浓度的升高而升高,其关系符合 Michaelis-Menten 氏酶的动力学方程:

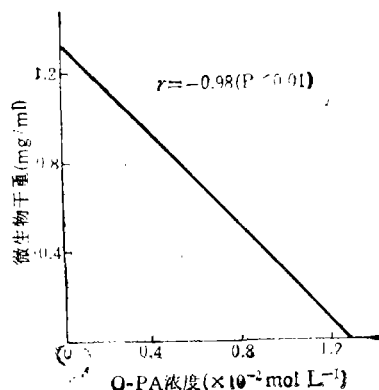


图 1 O-PA 降解与微生物增长的线性关系

$$V = \frac{V_{\max}[c]}{K_m + [c]}$$

用 Lineweaver-Burk 作图法,求得的米氏常

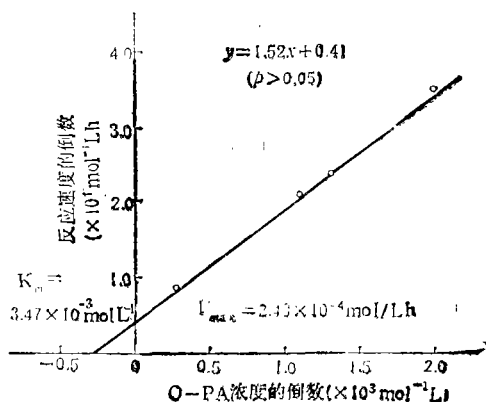


图 2 反应速度的倒数 ($1/v$)

表 1 O-PA 降解与混合微生物生长的关系

培 养 时 间 (h)	0	4	8	12	16	24	36	48
O-PA 浓度 ($\times 10^{-2} \text{mol/L}$)	1.26	1.00	0.88	0.77	0.42	0.19	0.08	0.06
微生物干重 (mg/ml)	0.006	0.27	0.52	0.67	0.88	1.15	1.32	1.32
微生物比生长率 $\mu(\text{h}^{-1})$	0	0.95	0.56	0.39	0.31	0.22	0.15	0.11
比基质降解率, $v(\times 10^{-3} \text{mol/L} \cdot \text{g} \cdot \text{h})$	0	2.46	0.93	0.61	0.60	0.39	0.25	0.19

表 2 O-PA 浓度对混合微生物比基质降解率和比生长率的影响

O-PA 浓度, sc ($\times 10^{-4} \text{mol/L}$)	8.13	10.54	15.06	20.18	25.60	30.12
比基质降解速率, v ($10^{-4} \text{mol/g} \cdot \text{h}$)	1.67	1.94	2.49	2.63	2.74	2.85
$v_{\max} = 4.10 \times 10^{-4} \text{mol/g} \cdot \text{h}; K_c = 1.22 \times 10^{-3} \text{mol/L}$						
比生长速率, μ (h^{-1})	0.13	0.14	0.16	0.17	0.18	0.19
$\mu_{\max} = 0.23/\text{h}; K_c = 0.33 \times 10^{-4} \text{mol/L}$						

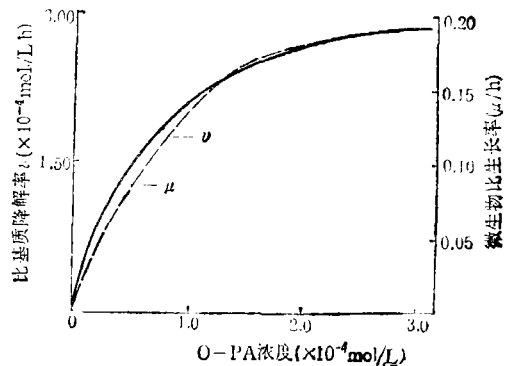
数, K_m 值等于 $3.47 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ 基质最大降解速度, $V_{\max}$ 等于 $2.43 \times 10^{-4} \text{mol/L} \cdot \text{h}$ (见图 2). 当基质浓度低于 K_m 值时, 其基质降解速度远低于 $V_{\max}$; 当基质浓度接近 K_m 值时, 基质的降解速度几乎为 $V_{\max}/2$ ($1.15 \times 10^{-4} \text{mol/L} \cdot \text{h}$).

3. 微生物比生长率, 比基质降解率与 O-PA 浓度的关系

当 O-PA 浓度处于 $10^{-4} \sim 10^{-3} \text{mol/h}$ 范围内, 于 30°C 摇床培养 16 小时后, 分别测定了微生物的比生长速率 (μ) 与比基质降解速率 (v). 从表 2 可以看到, 这两个参数均随基质浓度的升高而升高. 二者之间呈高度正相关, 其关系系数, r 等于 0.99. 此系数与零比较, 差别显著 ($P < 0.01$) 在低基质浓度下, 二参数同 O-PA 浓度呈线性关系, 其关系曲线如图 3 所示.

4. 纯菌株对 O-PA 的降解作用

以 $1.26 \times 10^{-2} \text{mol/L}$ 为 O-PA 的起始

图 3 比基质降解率(v)、微生物比生长率(μ)与 O-PA 浓度的关系

浓度, 在实验菌株于规定条件下培养 24 小时后, 分别测定了各个菌株对 O-PA 的比降解速率与细菌的比生长速率; 同时用这两个参数及对基质的百分降解率把实验菌株同混合微生物进行了比较. 由表 2 可见, 各实验菌株均具有相当高的比基质降解速率和细菌比生长速率. 其中 3 号菌株为 O-PA 高效降

表 3 纯菌株和混合微生物的一些动力学参数和降解百分率的比较

试验微生物	菌 株 代 号						混合微生物
	1	2	3	4	6	7	
零时, O-PA 浓度 ($\times 10^{-2} \text{mol/L}$)	1.27	1.33	1.45	1.27	1.27	1.27	1.27
第 24 时, O-PA 浓度 ($\times 10^{-2} \text{mol/L}$)	0.96	0.95	0.96	1.00	0.93	0.93	0.19
v ($\times 10^{-4} \text{mol/L} \cdot \text{g} \cdot \text{h}$)	2.11	2.47	2.88	1.30	2.18	1.96	3.89
μ (h^{-1})	0.16	0.14	0.15	0.17	0.20	0.16	0.22
O-PA 降解率 (%)	24.4	28.6	33.8	21.3	26.8	26.8	85

解菌,无论是它的比基质降解速率还是基质的百分降解率均高于其它菌株。然而,该菌株的这两个动力学参数及对基质的百分降解率却比混合微生物的低得多。

6. O-PA 降解菌的鉴定

用常规技术自富集培养液分离了 8 株细菌,对其中的 2, 3, 6, 7, 8 号菌株进行了分类学鉴定。根据各自的形态学特征和生理生化特性确定了如下的鉴定结果: 2 号为 *Aeromonas*; 3 号为 *Achromobacter*; 6, 7 号为 *Xanthomonas*; 8 号为 *Alcaligenes*。

四、讨 论

当新鲜微生物培养物接种到含 $1.26 \times 10^{-2} \text{mol/L}$ O-PA 的培养基中时,该培养物利用这种基质而生长并且无延滞期,以至在培养的第 4 小时,微生物的比生长率和比基质降解率均处于高峰期。这显示了经富集培养的混合微生物对基质的高度适应性。然而,随着培养时间的延长而暂时积累的中间产物会逐渐增加,以致影响到对前提物的降解作用,使其降解速度趋于减缓;但它的百分降解率却一直在增加,到第 24 小时时, O-PA 被降解到 15%。由此表明这种混合微生物对基质利用的高效率。

微生物对 O-PA 的降解作用遵循 Michaelis 酶的动力学方程。在本实验条件下,求得的 K_m 值同邹惠仙的报道接近,但求得的 $V_{\max}$ 却远远高于他的报道。尽管本研究使用的材料不是酶而是活体细胞,但其实验结果完全可用 Michaelis 酶的动力学理论予以解释。

由图 3 所示,在低基质浓度下,微生物比生长率和比基质降解率同基质浓度呈线性关系,二者之互为正相关说明了这两个参数的一致性。在高基质浓度下,比基质降解率接近于 $V_{\max}$ 而与基质浓度无关。Monod^[10] 方程式正反映了这些关系。

本研究还表明,混合微生物较之纯菌株

对 O-PA 有更高的降解速率。这可能是由于混合微生物存在着提供生长因素或除去有毒的(或有抑制作用的)中间产物的共生关系^[4]。正是由于微生物的这种协同作用而使得广泛分布于天然环境里的这种化合物完全降解。

五、结 语

土壤样品中富集的混合微生物及分离的不同细菌菌株能以 O-PA 为唯一碳源和能源而生长。这种混合微生物在 24 小时内可高效地将浓度为 $1.26 \times 10^{-2} \text{mol/L}$ 的基质降解 85%。微生物降解基质的动力学研究显示,在低基质浓度下,比基质降解速率和微生物比生长率同基质浓度成正比。这种关系和 Monod 方程式相符合。自富集物分离的菌株经鉴定为 *Aeromonas* sp., *Achromobacter* sp., *Xanthomonas* sp. 和 *Alcaligenes* sp.。其中 *Achromobacter* sp. 有相对高的降解能力。纯菌株的降解能力低于混合微生物。

参 考 文 献

- [1] 邹惠仙等,科学通报,22, 1374—1377(1983).
- [2] 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,1—4 页,科学出版社,1978 年.
- [3] 徐浩译(冈查洛夫著),异养细菌的检索与方法,82—100 页,科学出版社,1973 年.
- [4] Afring, R. P. and B. E. Chalker, *Appl. Environ. Microb.*, 4(5), 1177—1183(1981).
- [5] Breed, R. S. et al., *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 6th. pp. 68, 412, 1953.
- [6] Engelhardt, G., *Arch. Microb.*, 109, 109—114 (1976).
- [7] Kanechima, H., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 20, 725—728(1978).
- [8] Kluwe, W. M. et al., *Environ. Health Perspect.*, 45, 129—133(1982).
- [9] Kozumbo, W. J. et al., *Environ. Health Perspect.*, 45, 103—110(1982).
- [10] Monod, J., *Annals Institute Pasteur Paris*, 79, 394 (1956).
- [11] Pelczar, M. J. et al., *Quantitative Bacterial Physiology*, pp. 16—17, 1956.
- [12] Ribbons, D. W. and W. C. Evans, *Biochem. J.*, 76, 311(1960).
- [13] Wilson, W. B., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 20, 149—154(1978).