

3. 对场地行车试验测定的各采样点的结果, 经过模式计算后, 推广到公路行车可以做出污染预报。如果与本试验条件相近、在市区常速行驶下使用 M_{15} 燃料, 离公路 50m 以外的下风处甲醇浓度接近本底值。即使仅离公路 5m 处甲醇、甲醛的浓度也只有 0.05ppm 和 0.005ppm 仍低于居民区的卫生标准。若不考虑其它污染物的影响, 车流量可达 10,000 辆次/小时。

参 考 文 献

- [1] Allsup, J. R., BERC/RI, 76/15, 1977—81.
- [2] Bechtold, R. and Pullman, J. B., SAE-800260, 1980.
- [3] Dutkiewicz, R. K. and Nates, R. J., *Proc. of 6 th. Int. sym. on Alcohol Fuels Tech.*, B-4, pp.2—23, 1984.
- [4] Lawrence, R. S. and Charles, M. U., EPA 460/3-82-004.
- [5] Timourian, H., UCRL-52697, 1979.

在农药长期培养下的细菌群体中 选育降解菌株的初步试验*

吴 云 马 国 华

(中国科学院武汉病毒研究所)

一、前 言

有人推测, 释放到环境中的大量人工化合物, 如农药等, 可以引起微生物群落以新的降解功能进化的方式反应^[1]。现在, 已有许多人从农药污染区中分离到各种降解菌株。但是, 由于自然环境的作用因素比较复杂, 在微生物降解农药功能的进化问题上, 各种条件难于确定, 因此, 通过实验室手段, 了解原先无降解农药能力的细菌群体, 利用农药在各种特定的条件下, 促使降解功能的获得, 这将为降解菌株的选育和进化的研究提供重要的依据。

我们自 1983 年以来, 先后利用 6 株假单胞菌, 11 株根瘤菌, 19 株苏芸金杆菌和 1 株大肠杆菌以及在农药污染区分离的 13 株革兰氏阴性菌, 共 49 株供试菌株, 分别用 666、2, 4-D、2, 4, 5-T (2, 4, 5-三氯苯氧乙酸) 等农药长期培育, 并按分类进行混合培养, 加入低

浓度诱变剂混合培养等处理, 定期测定这些菌株的生长繁殖情况和降解能力。目前发现, 某些菌株已初步获得对 2, 4-D 和 666 具有一定的降解能力, 现将试验的初步结果报告于后。

二、材料和方法

1. 培养基

(1) 生长培养基: 牛肉膏 5g、蛋白质 10g、NaCl 5g、琼脂 20g、自来水 1000ml、pH 7.4—7.6, 15 磅灭菌 30min。

(2) 选择培养基的种类、成份和制备。

① K_2HPO_4 20mg、 KH_2PO_4 5mg、溴甲酚紫 16mg、农药及其含量根据试验而定, 蒸馏水 1000ml、pH 7.0, 8 磅灭菌 0.5h。

② NH_4Cl 4g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.13g、

* 本工作由陈涛、罗绍彬、岑英华等同志提供试验菌株, 为慈祺、余运华同志在技术上进行热情的指导和帮助在此一并表示感谢。

$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6g、溴麝酚兰 16mg、农药与 I 同、蒸馏水 1000ml, pH7.0, 8 磅灭菌 0.5h。

③ 在①和②的基础上增减无机盐的含量或某些成份。加入 2,4-D 时,先用 NH_4OH 中和,培养液用 0.1 NaOH 调 pH 至 7.0, 辅代谢试验加入酵母膏

2. 农药浓度 666 先用无水酒精溶解后加到培养液中,使其至试验需要的浓度,一般为 10ppm。2,4-D 和 2,4,5-T 试验浓度在 250ppm 以下时,可直接用蒸馏水溶解作培养基母液;高于此浓度时,用无水酒精溶解后加到培养液中,使其至试验需要的浓度,一般为 200ppm 菌数测定用平皿法计数。

3. 培养物中农药含量的测定 666 用 SP-501 气相色谱(电子捕获)测定; 2,4-D、2,4,5-T 用 751 型紫外分光光度计测定吸收高峰(2,4-D 按 P. R. Fisher 的方法^[2] O. D284 μ ; 2,4,5-T 按 Chatterjee 等人的方法^[4]测定 O. D216 μ 和 288 μ) 的消光值。

4. 混合培养 根据同属或同类型菌等量混合。

5. 试验程序 供试菌先在生长培养基斜面活化后,转接于生长培养液中,30℃ 摇床培养 16 至 18h, 用无菌操作手续以 4000rpm 离心 5min, 菌体用无菌蒸馏水反复洗涤数次,再悬浮于选择培养液中,使菌数为 10^7 — 10^8 个/ml, 置 30℃ 摇床培养。以后每隔一定时间测定培养物的降解值,每次测定前镜检菌体的形态特征,计算活菌数。每批在选择培养液生长较好的培养物,转入生长培养液培养 16h 后再按上述方法,继续进行下一次的试验。

三、结果与讨论

1. 在不同农药浓度中供试菌的生长情况

农药长期培养后,大部分菌株在含农药 100—300ppm 的选择培养基中不能生长或生长较差。只有 10 株生长较好。这些菌株接种量 10^8 /ml 培养一 week 后,农药含量在 500ppm 内,有一半以上的菌株菌数保持或大

表 1 各种细菌对某些农药的适应能力

农药浓度(ppm)		666			2, 4-D			2, 4, 5-T		
菌株	菌落数 (个/ml)	500	1000	>1000	500	1000	>1000	500	1000	>1000
假单胞菌										
1926	>10 ⁸	10 ⁶ -10 ⁸	10 ⁶ -10 ⁸	>10 ⁸	10 ⁶ -10 ⁸	10 ⁴ -10 ⁵	10 ⁶ -10 ⁸	10 ⁴ -10 ⁵	<10 ⁴	
1593	>10 ⁸	>10 ⁸	>10 ⁸	>10 ⁸	>10 ⁸	>10 ⁸	>10 ⁸	>10 ⁸	10 ⁶ -10 ⁸	10 ⁴ -10 ⁵
1238	>10 ⁸	10 ⁴ -10 ⁵	10 ⁴ -10 ⁵	10 ⁶ -10 ⁸	10 ⁴ -10 ⁵	10 ⁴ -10 ⁵	10 ⁴ -10 ⁵	<10 ⁴		0
根瘤菌										
97-1	10 ⁴ -10 ⁶	0	0	10 ⁴ -10 ⁵	<10 ⁴	0	10 ⁶ -10 ⁸	10 ⁴ -10 ⁵		0
113-2	<10 ⁴	0	0	0	0	0	10 ⁴ -10 ⁵	0		0
苏芸金杆菌										
006	<10 ⁴	0	0	10 ⁴ -10 ⁵	0	0	10 ⁴ -10 ⁵	10 ⁴ -10 ⁵		0
D ₁	>10 ⁸	10 ⁶ -10 ⁸	10 ⁶ -10 ⁸	>10 ⁸	>10 ⁸	>10 ⁸	10 ⁶ -10 ⁸	10 ⁶ -10 ⁸		0
大肠杆菌										
C ₆₀₀	10 ⁶ -10 ⁸	10 ⁴ -10 ⁵	10 ⁴ -10 ⁵	10 ⁴ -10 ⁵	0	0	10 ⁶ -10 ⁸	10 ⁶ -10 ⁸		0
污染区自选菌										
6-2*	>10 ⁸	>10 ⁸	>10 ⁸	>10 ⁸	>10 ⁸	>10 ⁸	>10 ⁸	10 ⁶ -10 ⁸	10 ⁴ -10 ⁵	10 ⁴ -10 ⁵
6-4	>10 ⁸	>10 ⁸	>10 ⁸	10 ⁶ -10 ⁸	10 ⁶ -10 ⁸	10 ⁶ -10 ⁸	>10 ⁸	10 ⁴ -10 ⁵	<10 ⁴	
混合菌										
	>10 ⁸	>10 ⁸	>10 ⁸	10 ⁶ -10 ⁸	10 ⁶ -10 ⁸	10 ⁶ -10 ⁸	>10 ⁸	10 ⁶ -10 ⁸	10 ⁴ -10 ⁵	10 ⁴ -10 ⁵

* *Pseudomonas* sp. 6-2.

于 $10^8/\text{ml}$; 在 1000ppm 内, 根瘤菌生长较差, 甚至大部分死亡; 在 1000ppm 以上, 含 2, 4, 5-T 培养液除假单胞菌和农药污染区分离的菌之外, 都不能生长 (见表 1)。

有人认为, 适应是降解的第一步, “即使是较小的适应, 也能使顽固的化合物发生降解”^[3]。我们挑选这些菌株, 基本上能适应于低浓度的农药环境, 某些菌株初步出现降解

功能。但如何加速这种功能的发展, 还涉及到与选择有关条件的试验。

2. 农药降解值的测定

在供试的 49 株菌株中, 初步具有降解 2, 4-D 能力的有 2 株 (D_2 、6-2), 这两株菌在纯培养中能以 2, 4-D 作唯一碳源, 在一个月内存活菌数仍在 10^7 – 10^{10} 个/ ml 。(见表 2)。

为了检查消耗值是否由菌体吸附造成的

表 2 菌株 D_2 和 6-2 对 2, 4-D 的降解

菌 株	培养时间 (d)*	选择培养基及 2, 4-D 含量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	测定前菌数 (个/ ml)	$\text{OD}_{284\text{m}\mu}$	消耗值	降解率%
对照	5	① $150\mu\text{g}/\text{ml}$ 加酵母膏	0	0.695	—	—
D_2			106×10^7	0.587	0.108	15.5
6-2			84×10^7	0.655	0.04	5.6
对照	14	① $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 不加酵母膏	0	0.431	—	—
D_2			99×10^8	0.316	0.115	26.6
6-2			73×10^8	0.354	0.077	17.9
对照	32	② $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 不加酵母膏	0	0.292	—	—
D_2			27×10^{10}	0.160	0.132	45.2
6-2			40×10^{10}	0.190	0.102	34.9

* 每天以 24h 计算。

表 3 菌体吸附 2, 4-D 作用的测定

菌 株	菌体显重(g)	菌体外萃取液 $\text{OI}_{284\text{m}\mu}$	菌体内萃取液 $\text{OD}_{284\text{m}\mu}$
D_2	0.25	0	0
6-2	0.37	0	0
对照	0	0.297	0

误差, 我们测定了菌体内外萃取液 2, 4-D 的含量, 结果表明, 这些菌无吸附作用 (见表 3)。

666 试验表明, 假单胞菌 1926 等对某些

异构体初步出现有降解功能的现象 (见表 4)。

666 难溶于水, 对微生物的营养不利, 作唯一碳源的高浓度培养液容易沉淀析出。在

表 4 666 降解试验的测定结果

菌株	666 异构体 含量 (ppm)	α		β		γ		δ		测定前 菌落数 (个/ ml)
		测定值	消耗值	测定值	消耗值	测定值	消耗值	测定值	消耗值	
对照		0.686	—	1.46	—	0.613	—	2.28	—	0
1926		0.504	0.182	1.12	0.34	0.567	0.046	1.54	0.74	32×10^8
C_{600}		0.636	0.050	1.44	0.02	0.637	—	1.54	0.74	27×10^8
97-1		0.530	0.156	1.40	0.06	0.490	0.123	2.10	0.18	19×10^8

低浓度试验中,消耗值有反复确定。

供试菌株在 2, 4, 5-T 试验中,到现在为止,还未测得任何降解的迹象。这种化合物是一种“顽固性”化合物,对微生物有毒性,不利于微生物的生长繁殖^[4]。迄今尚未见到自然分离的菌株获得以 2, 4, 5-T 作唯一碳源降解的报道。

3. 菌株混合培养试验

编号为 TW 的 14 株农药污染区分离的阴性菌,在含 2, 4-D 选择培养基中纯培养,大部分不能生长。但混合培养后生长较好,并逐步发展为初步具有降解能力的培养物(见表 5)。

混合培养可能是微生物之间发生接合,

表 5 纯培养和混合培养降解值的测定

处 理	测定前菌落数 (个/ml)	培养时间(d) 每天以 24h 计	培养基 2, 4-D 含量	测定值 OD _{284nm}	降解率
对 照	0	54	①含 2, 4-D 150ppm	0.900	—
TW 单株培养*	<5	54	同 上	0.900	0
TW 混合培养	>10 ⁷	54	同 上	0.162	82%

* 单株培养的测定值,是 14 株菌的平均值,测定误差为 ± 0.002 。

使微生物基因发生重组,从而获得降解功能^[5]。

4. 不同选择培养基对生长与降解的关系

本试验设计的三种选择培养基的作用表明: ①和②对选择 2, 4-D 降解菌具有一定

的效果。②的选择性较好。①次之, III 无选择作用,而且对测定的干扰较大(见表 6)。

选择培养基的成份应该使特定的微生物适合于利用的营养特点,使特定的微生物旺盛生长。因此,在降解菌的选育过程中,培养

表 6 不同选择培养基对生长与降解的影响

选择培养基	菌 株	培养时间 (d)*	菌落数(个/ml)	测定值 OD _{284nm}	降解率%
① 2, 4-D 100ppm, 不加酵母膏	D ₂	33	173 × 10 ¹⁰	0.205	37
	6-2		77 × 10 ¹⁰	0.240	26
	对照		0	0.324	—
② 2, 4-D 100ppm 不 加酵母膏	D ₂	33	27 × 10 ¹⁰	0.160	45.2
	6-2		40 × 10 ⁸	0.190	34.9
	对照		0	0.292	—
③ 2, 4-D 100ppm 不 加酵母膏	D ₂	37	38.5 × 10 ²	0.192	—
	6-2		11.6 × 10 ²	0.208	—
	对照		0	0.181	—

* 每天以 24h 计。

基有无选择性是很重要的^[5]。

5. 降解菌株质粒的检测

我们对上述三种农药培养基可以生长,长期培养的菌株进行质粒检测,结果发现,一般生长较好,并且出现一定降解能力的菌株均有质粒存在(见表 7)。其中,初步具有降解, 2, 4-D 能力的 D₂ 和 6-2 菌株的质粒(见

图 1),经不同浓度农药培养和 SDS 及吡啶橙进行消除说明,质粒在寄主细胞中的存在比较稳定,长期培养和保存不易丧失。

据报道,降解 2, 4-D 是由质粒携带的基因所控制的,降解酶的编码在质粒上^[1]。Kellogg 等利用含有各种特定质粒的菌株混合培养进行育种,得到一种利用 2, 4, 5-T 作为

表 7 农药长期培养的菌株的质粒检测

菌 株	D ₂	6-2	1926	1953	1238	97-1	113-2	006	C ₆₀₀	6-4
质 粒	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

注: +、- 分别表示质粒的有、无。

图 1 D₂ 和 6-2 菌株的质粒测定

图中从左至右分别是: 大肠杆菌 P⁻ 菌株(对照, 1-2)、6-2 菌株(3-4)、D₂ 菌株(5-6)的质粒带

唯一碳源的培养物^[6]。D₂ 和 6-2 菌株的质粒是否与降解有关, 尚在试验之中。

四、小 结

在农药长期培养下的细菌群体中选育降解菌, 首先是获得在农药一定浓度下生长较好的单一菌株或混合菌株, 然后通过选择培养基对这种菌株进行长期选择培养。结果使其中一些菌株初步具有降解能力。试验的初步结果表明, 在实验室中, 利用农药作为选择手段, 促使某些细菌对农药的降解功能的获得和提高, 以及对这种功能进化反应的了解是可能的。

参 考 文 献

- [1] Chakrabarty, A. M., *ASM News*, 44(12), 687—690(1978).
- [2] Fisher, P. R., et al., *J. Bacteriol.*, 135(3), 798—804(1978).
- [3] Cook, A. M., et al., *Experientia*, 39, 1191—1198 (1983).
- [4] [日]微生物研究法讨论会编(程光胜等译), 微生物学实验法, 58—61, 科学出版社, 1983.
- [6] Kellogg, S. T., et al., *Science*, 214, 1133—1135 (1981).

• 环境信息 • 美国饮用水标准中铅含量拟改订为 20ppb

美国环保局测算在饮用水中实行更严格的含铅标准所得到的效益将超过付出的费用。该局的一项初步研究发现, 把标准降低到 20ppb (现标准为 50 ppb, 我国该项卫生标准为 100ppb——译注) 每年要多付出费用 1.15—1.45 亿美元, 而在医疗卫生效益方面却将取得 8.78 亿至 10 亿美元以上。这项研究可望促使环保局降低在公共饮用水系统中铅的最大允许水平, 拟定把它降到 20ppb。通常强制性标准考虑到可行性和费用-效益而订得略宽些。最近研究表

明, 摄入很少量的铅都可损害人体健康。根据环保局测算, 降低饮用水中铅水平将减少成年人的高血压、心脏病突发, 中风等发病率, 将减少铅对儿童的脑损害。铅污染主要来自自来水管和铅焊料的溶出。公用供水系统可以用降低供水酸度和投加碳酸钙使“软”水硬化的办法来解决这问题。

孙伯英摘译自 *WSJ (NJ)*, 1986,

11, 6.