

凤眼莲及其根际微生物共同代谢和协同降酚机理的研究*

郑师章 乐毅全 吴 辉 汪 敏 赵大君
(复旦大学环境与资源生物系, 上海 200433)

【摘要】 研究表明凤眼莲在苯酚浓度不超过 $150\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的水体中, 不但可以在体内富集酚, 而且可以通过多酚氧化酶、过氧化物酶、酚糖苷等途径降解水体中的酚类化合物; 其根际微生物可以通过 meta 或 orth 途径降酚, 起到共同降酚的作用. 当两者结合构成生物系统, 便会产生协同效应, 其降酚效果可达 97.5%, 大大超过两者分别降酚效果之和(含酚 $50\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的培养液中, 10h 内, 无菌凤眼莲降酚仅为 1.9%, 假单胞菌 No. 5 降酚 37.9%).

关键词 凤眼莲 根际微生物 协同降酚 共同代谢

Co-metabolic and synergic phenol-degradation mechanisms of *Eichhornia crassipes* and its rhizospheric microorganisms. Zheng Shizhang, Le Yiquan, Wu Hui, Wang Ming and Zhao Dajun (Fudan University, Shanghai 200433). -Chin. J. Appl. Ecol., 1994, 5(4): 403 - 408.

The study shows that *Eichhornia crassipes* can not only concentrate exotic phenol compounds, but also transfer them to other non-toxic ones when grown in an environment containing $< 150\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ of phenol. Its rhizospheric microorganisms can degrade the exotic phenolic compounds through meta- and orth-pathway. The co-metabolism of phenols by *Eichhornia crassipes* and its rhizospheric microorganisms could construct a high efficient synergic phenol-degradation biosystem: in media containing $50\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ of phenol, *Eichhornia crassipes* and its rhizospheric microorganisms can degrade phenol only about 1.9% and 37.9%, respectively in 10 hours, but the biosystem can degrade it up to 97.5% under the same condition.

Key words *Eichhornia crassipes*, Rhizospheric microorganisms, Synergic phenol-degradation, Co-metabolism.

1 引言

在有机污染生物降解的研究中, 国内外学者对高等植物、微生物的作用分别都做过大量工作. Martin Alexander^[10]指出: “水体和土壤中微生物群落是环境化学物质降解的主体, 尽管植物和动物能代谢种种化学物质, 但是与同一场所的异养细菌和真菌完成的转化相比, 高等生物的降解能力要逊色得多”. 有必要强调指出以往的工作, 大多是孤立的, 而没有从生态系统的角度或种间协同作用方面来认识.

虽然有些著作中有过这样论述: “有些

物质被混合生物群落的降解可能要比单一的种来得快. 原因可能是由于种间协同作用, 或生物种间对该物质 ‘共同代谢’ 引起的”^[1]. 不难看出以上结论还是一种推测, 这方面的研究尚不多见.

在生物降酚研究中发现凤眼莲与其根际微生物的协同作用, 可以大大提高降酚的效果. 根据系统的功能大于部分相加的原理, 于 1990 年提出了 ‘凤眼莲-根际微生物松散、非特异性的协同降酚系统’ 的概念^[2]. 不过, 当时对该系统的认识还只是个

* 国家自然科学基金和国家教委博士点基金资助项目.

1993 年 12 月 10 日收到, 1994 年 2 月 18 日改回.

‘黑箱’；对其协同效应的机理尚未作深入研究。

几年来, 分别对凤眼莲耐酚和降酚的性能、降酚的途径、根分泌物的组分, 根际微生物的降酚途径、降酚的关键酶, 以及根分泌物的不同组分对细菌生长、降酚酶活性的影响, 以及细菌对凤眼莲降酚的影响都作了一定的研究, 为本文深入讨论两者的协同降酚机理创造了条件。

2 材料与方法

2.1 无菌凤眼莲培养

利用组织培养的方法, 获得无菌凤眼莲, 将它接入 MS 无机培养液中, 温度控制在 28—30 , 光强 2000lx, 每天光照 12h 培养; 收集其培养液, 视其为根分泌物, 进一步采用柱层析方法, 分离其糖、氨基酸、有机酸等不同组分^[5]。

为保证凤眼莲是在严格无菌的条件下作试验, 每一步骤均要消毒, 并在无菌室内操作。

2.2 高效降酚细菌分离筛选

用以 500μg · ml⁻¹浓度的酚为唯一碳源的合成培养基, 分别从凤眼莲根际分离得到高效降酚菌株假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) No. 5^[2], 肠杆菌(*Enterobacter* sp.) No. 2^[6] 以及从含酚废水中分离得肠杆菌(*Enterobacter* sp. nov.)^[4]备用。

2.3 酚的测定

以 4-氨基氮替比林氯仿萃取法^[8]测定酚的含量, 分析研究对象的降酚效果。

2.4 细菌降酚酶活性测定

高效降酚菌降酚酶活性测定方法参照[5]。

2.5 凤眼莲体内多酚氧化酶、过氧化物酶的测定

将凤眼莲培养在 30μg · ml⁻¹酚浓度的 MS 培养液中, 12h 光照培养后, 作为待测材料。多酚氧化酶测定采用在 3. 9ml pH6. 8PBS 中加入 1ml 0. 1M 邻苯二酚与 100μl 酶液, 在 SHIDMADUZ UV-240 上 420nm 扫描测定。过氧化物酶测定见[3]。酚富集测定法见文献[8]。

在含酚培养液中, 加入不同数量或不同浓度的凤眼莲培养液来验证凤眼莲分泌物对细菌降酚的影响。

3 实验结果

3.1 凤眼莲降酚效率

由表 1—3 可见, 无菌凤眼莲对酚的耐受是有一定限度的, 即有一耐酚阈值^[9], 当酚浓度低于 150μg · ml⁻¹时, 凤眼莲能健康地生长而且具有一定的降酚能力。关于降酚途径, 凤眼莲可以通过多酚氧化酶、过氧化物酶、酚糖苷等途径降酚, 并且在体内富集(另文发表)。

3.2 细菌的降酚效率

从生长于含酚很低的自然水体中的凤眼莲根部分离到 15 株菌, 它们混合的降酚性能见表 4。

表 1 初始酚浓度约为 150μg · ml⁻¹时凤眼莲降酚率(凤眼莲的干重为 0. 2-0. 3g)
Table 1 Rate of phenol degradation in original concentration 150μg · ml⁻¹

时 间 Time (d)	对照浓度 Control (μg · ml ⁻¹)	样品浓度变化 Concentration variation(μg · ml ⁻¹)				剩余量 Rem ainder (%)	降酚率 Phenol- degrading rate(%)
		A	B	C	平均 Average		
0	149. 32	148. 20	149. 98	147. 08	148. 42	100	0
1	141. 49	123. 37	127. 62	126. 72	125. 90	84. 8	15. 2
2	147. 31	117. 77	120. 23	117. 55	118. 52	79. 9	20. 1
3	142. 83	111. 51	109. 84	113. 07	111. 81	75. 3	24. 7
4	140. 82	100. 32	107. 48	113. 07	106. 96	72. 1	27. 9
5	143. 06	98. 08	105. 47	117. 73	105. 59	70. 8	29. 2

实验用溶液体积 50ml, 下同。

表 2 初始酚浓度约为 200 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时凤眼莲降酚率
Table 2 Rate of phenol degradation in original concentration 200 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$

时 间 Time (d)	对照浓度 Control ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	样品浓度变化 Concentration variation($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)				剩余量 Remainder (%)	降酚率 Phenol- degrading rate(%)
		A	B	C	平均 Average		
0	194.74	190.53	192.95	194.96	194.81	100	0
1	191.83	156.26	168.12	150.89	158.42	81.3	18.7
2	187.36	133.88	144.84	148.20	142.31	73.1	26.9
3	186.02	129.18	131.20	143.73	134.30	69.1	30.9
4	181.32	122.92	127.39	134.10	128.14	65.8	34.2
5	187.80	118.44	121.80	131.42	123.89	63.6	36.4

表 3 初始酚浓度约为 800 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时凤眼莲降酚率
Table 3 Rate of phenol degradation in original concentration 800 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$

时 间 Time (d)	对照浓度 Control ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	样品浓度变化 Concentration variation($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)				剩余量 Remainder (%)	降酚率 Phenol- degrading rate(%)
		A	B	C	平均 Average		
0	795.81	800.29	800.29	788.65	796.41	100	0
1	796.71	691.54	659.77	684.39	678.57	85.2	14.8
2	797.22	626.21	640.53	612.79	626.51	78.6	21.4
3*	788.65	613.26	616.81	603.39	612.49	76.9	23.1
4	766.73	604.73	612.79	597.51	602.94	76.0	24.0
5	788.65	586.38	609.65	603.39	599.81	75.3	24.7
14	800.29	534.03	612.34	586.03	577.73	72.5	27.5

* 3 天凤眼莲几乎全死, 但培养液中的酚浓度仍有下降, 并没有上升, 详见[8].

表 4 15 株混合菌对初始浓度为 50 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的降酚率*
Table 4 Rate of phenol degradation of 15 mixed bacteria
in 50 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$

时 间 Time(d)	对照浓度 Control($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	酚浓度变化($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) Concentration variation
40	50	48.43
80	43.25	40.63
112	41.75	40.00

* 15 株细菌从生长在黄天荡鱼场的凤眼莲根际分离.

实验表明, 这些细菌虽有一定耐酚能力, 但降酚能力并不强, 因为生长凤眼莲的水体中酚的浓度并不高.

表 5 假单胞菌 No. 5 降酚率
Table 5 Rate of phenol degradation of rhizosphere *Pseudomonas* No. 5

起始浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) Original con- centration	接种 10h 后溶液中 酚浓度($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) Concentration after 10h	降酚率(%) Phenol-degrading rate
A	37.4	21.8
B	37.9	25.1
C	39.3	23.7
平均 Average	38.2	23.7

从表 5 可见, 从生长于煤气厂高酚污

水中的凤眼莲根际分离到的菌株(假单胞菌 No. 5) 具有很强的降酚能力. 这种情况符合 Shelford 耐受性定律, 在高酚环境里生长的微生物, 能够耐受较高的酚浓度, 而且还具备了较强的降解利用酚的能力; 而在低酚环境条件下, 虽然微生物也有一定的耐酚性能, 但它们对酚的转化利用能力有限.

另从含酚废水中筛选、分离出能降解浓度为 500 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 苯酚的肠杆菌属细菌 (*Enterobacter* sp. nov.), 该菌不仅能以 meta 途径降解苯酚, 还能以 orth 途径为主代谢邻苯二酚等, 实验表明该菌在 10h 内能降解 500 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的苯酚达 96.1%^[5].

3.3 凤眼莲-根际微生物系统的降酚效率

无菌凤眼莲可以降解酚, 但其本身的作用十分有限, 在 50ml、50 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 含酚溶液中, 10h 降酚 1.9%^[2]; 从表 5 可见, 假单

表 6 凤眼莲-根际假单胞菌 No. 5 的降酚效率
Table 6 Rate of phenol degradation of *Eichhonia crassipas* and *Pseudomonas* No. 5

起始浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	10h 后溶液中 酚浓度($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	降酚率(%)
Original con- centration	Concentration after 10h	Phenol-degrading rate
A	37.5	0.0
B	38.8	2.8
C	41.6	0.1
平 均	39.3	1.0
Average		97.5

表 7 凤眼莲培养液对细菌降酚的影响*

Table 7 Influence of exudates from *Eichhonia crassipes* on phenol degradation by *Enterobacter* sp. nov.

	时 间 Time (d)								对 照 Control
	5	10	15	20	25	30	35	40	
细菌浊度(OD ₅₄₆)	0.42	0.66	0.69	0.70	0.72	0.69	0.74	0.77	0.67
Bacteria turbidity									
降酚酶比活(unit)	2.94	3.0	3.1	4.05	3.23	2.74	0	0	-
Activity of bacteria									
降酚效果(%)	79.0	80.4	89.3	85.3	99.3	90.0	67.0	10.0	-
Rate of phenol-degradation									

* 实验菌株为肠杆菌(*Enterobacter* sp. nov.) meta 降酚途径的关键酶是 2, 3 加氧酶^[4, 5].

表 8 还原糖对 *Enterobacter* sp. nov. 的影响

Table 8 Effect of reducing sugars on *Enterobacter* sp. nov.

	还原糖浓度 Reducing sugar con- centration ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	细菌浊度 OD ₅₄₆ Bacteria turbidity	酶活性 Enzyme activity (unit)	降酚率(%) Phenol-de grading rate
对 照	0	0.75	30.6	88.0
Control				
葡萄糖	20	0.76	31.2	90.2
Glucose	100	0.77	32.8	88.3
	200	0.55	27.2	29.8
	1000	0.64	16.0	5.4
	2000	0.77	2.0	0.1
果 糖	20	0.73	36.8	90.2
Fructose	100	0.77	27.2	89.0
	200	0.56	21.2	64.4
	1000	0.84	2.0	1.6
	2000	1.05	0.0	0.02

注: 表 7、8 中加入的溶液量均是 10ml.

视作分泌物)对细菌的降酚能力是有影响的. 首先, 分泌物对细菌生长速率有影响, 随着培养时间的增加, 即凤眼莲分泌物浓度的增加, 细菌生长的浊度(OD₅₄₆)也随着增加. 其次, 分泌物对细菌的降酚酶活性也有影响, 低浓度培养液(小于 20 天), 对细菌降酚酶活性有促进作用, 而高浓度的培养液(大于 30 天), 对细菌的降酚酶活性则

胞菌 No. 5, 10h 降酚可达 37.9%, 两者相比较而言, 细菌起主要作用; 由凤眼莲和细菌组成的生物系统, 其整体降酚效率大于两者各自效率的总和, 10h 降酚率可达 97.5%(表 6), 可见, 这里存在协同效应.

3.4 凤眼莲培养液对细菌降酚的影响

从表 7 可以看到凤眼莲培养液(将它

有抑制作用.

细菌的降酚, 不仅取决于细菌的数量, 而且还取决于细菌的降酚酶活性, 只有两者最佳组合时才能得到降酚的最高效率, 这时候凤眼莲及其根际微生物降酚协同效应最大. 培养 40 天的凤眼莲培养液可以使细菌降酚能力完全丧失, 细菌降酚酶电泳谱带中, 关键酶区带消失, 也正说明这一点, 这时候细菌呼吸所利用的基质是凤眼莲的分泌物, 而不再是酚.

表 9 不同浓度的根分泌物对 *Enterobacter* sp. nov. 的影响

Table 9 Effect of different concentrations of root exudates from *E. crassipes* on *Enterobacter* sp. nov.

	根分泌物浓度 Concentra- tion ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	细胞光 密度值 OD ₅₄₆	酶活性 Enzyme activity (unit)	降酚率(%) Phenol-de grading rate
对 照	0	0.75	30	88.0
Control				
处 理	0.1	0.75	34.4	91.1
Treat-	1	0.77	47	90.2
ment	2	0.65	27	84.6
	10	0.83	18	10.0
	20	0.86	2	2.2

从表 8 可以看到还原糖(包括葡萄糖和果糖)是凤眼莲分泌物中影响细菌生长、

降酚酶活性和降酚效果的最主要成分^[7]。当溶液中还原糖浓度小于 $100\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时, 促进细菌生长, 降酚酶保持较高水平, 降酚效果甚佳, 浓度一旦超过 $100\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, 细菌数量虽然增加, 但降酚酶活性受到抑制, 当浓度增加到 $2000\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, 细菌数量很多, 但降酚酶活性严重受抑, 降酚效果接近于零。当凤眼莲培养液浓度过高也就是还原糖浓度过高, 凤眼莲及其根际微生物降酚协同效应也就不存在了。

3.5 细菌对凤眼莲降酚的影响(表 10)

表 10 细菌(Enterobacter sp.)No. 2 对凤眼莲降酚的影响

Table 10 Effect of Enterobacter sp. No. 2 on phenol degradation by Eichhorhia crassipes

	PPO 活性 (unit)	PO 活性 (unit)	凤眼莲体内酚富集量 ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) Phenol concentration in plant
无菌凤眼莲 Abacterial <i>E. crassipes</i>	245	200	11.50
接菌凤眼莲 Inoculant <i>E. crassipes</i>	310	240	13.14

注: 起始酚浓度为 $30\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, 接菌 12h 后测定。

可见, 细菌能增加凤眼莲体内苯酚的富集量, 激活凤眼莲体内的多酚氧化酶(PPO)与过氧化物酶(PO)的活性。

4 讨 论

4.1 凤眼莲及其根际微生物对环境酚的共同代谢

实验证明凤眼莲和其根际微生物可以共同代谢环境中的酚类化合物(图 1), 其中微生物起主导作用。由此可以看到在利用凤眼莲或其它高等植物净化受污水体时, 应该重视其根际微生物的作用。

干重为 0.2–0.3g 的无菌凤眼莲 5 日降酚率为 20–40%, 而 David H. O keeffee et al. (1987) 认为干重为 1–3g 的凤眼莲 3 日降酚率为 60–80%^[9], 可见, 凤眼莲降酚速率与其本身重量有关。同时不同种类的细菌降酚途径和速率也不相同。

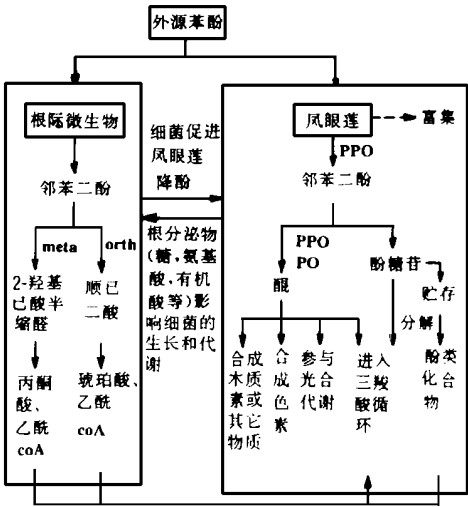


图 1 凤眼莲及其根际微生物共同代谢途径
Fig 1 Co-metabolic pathway of Eichhornia crassipes and its rhizospheric microorganisms.

4.2 凤眼莲-根际微生物降酚系统的建立

凤眼莲和根际微生物在一定条件下(如水体中含酚不超过 $150\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)可以建立起高效降酚的生物系统。在这个系统中, 细菌降酚起主导作用。要筛选出这样的细菌, 首先, 周围水环境中必须有一定的含酚浓度, 浓度太低, 虽然可以筛选到耐高浓度酚($500\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)的细菌, 而得不到高效降酚的细菌^[2], 不难理解, 因为细菌降酚途径中的关键酶是一种诱导酶^[11, 12], 其活性和酚的存在密切相关。另一方面, 凤眼莲有一个耐酚阈值, 当水体中酚浓度达到 $200\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时, 凤眼莲在 7 天内全部死亡, 也就是该系统的崩溃。

4.3 凤眼莲-根际微生物降酚生物系统的化学信息

降酚生物系统的建立, 是通过物种间的化学信息来实现的。E. P. Odum 在讨论生态系统分解过程时, 已经注意到这种物质, “分解释放到环境中的有机物质, 除了为其它生物作食物外, 还可能对生态系统中其它生物的生长有重大影响。”他称这种物质为“环境激素”(environmental hor-

none). 研究表明凤眼莲根分泌物对根际降酚细菌的作用, 主要是还原糖^[7]的作用.

4.4 凤眼莲-根际微生物的协同降酚

凤眼莲-根际微生物生物系统的协同降酚作用的实现, 不仅依靠构成系统生物数量的增加, 而且还有降酚酶活性的提高. 不论加入不同生长天数的凤眼莲培养液都得到了类似的结论, 低浓度培养液不仅可以促进细菌生长, 而且提高降酚酶的比活力. 培养液浓度增加到一定程度(25 天培养液达最高峰, 相当于葡萄糖 $900 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ^[5-7]), 浓度继续增加, 但降酚酶活性下降, 电泳结果证明, 加入 40 天凤眼莲培养液时, 细菌的无细胞抽提液的电泳谱带中降酚途径关键酶的区带消失. 所以, 协同效应的产生是有条件的, 换言之, 物种间是否建立协同关系同样是有条件的.

4.5 细菌对凤眼莲降酚的影响

通过实验证明凤眼莲本身具有多种降酚途径(另文报道): 酚糖苷降酚途径、多酚氧化酶途径、过氧化物酶途径以及酚的富集等. 分别测定接菌和无菌凤眼莲的 PPO、PO 和酚的富集(酚糖苷途径的定量问题尚未解决), 均证明接菌的凤眼莲几个降酚酶活性和降酚效果普遍得到提高. 但对细菌是以什么物质, 通过什么方式影响凤眼莲的降解迄今尚不清楚, 有待于进一

步深入研究.

参考文献

- [1] 辽宁省林业土壤研究所编译. 1976. 环境污染与生物净化(水-土壤-植物). 科学出版社, 北京, 158—166.
- [2] 乐毅全、郑师章、周纪纶. 1990. 凤眼莲-根际微生物系统的降酚效应. 植物生态学与地植物学学报, **14**(2): 151—159.
- [3] 华东师范大学生物系植物生理教研组编. 1987. 植物生理实验指导. 人民教育出版社, 北京, 143—144.
- [4] 吴 辉、郑师章. 1992 可. 肠杆菌属——降酚菌株的降酚效果及其机理. 复旦学报(自然科学版), **31**(4): 361—368.
- [5] 吴 辉、郑师章. 1993. 凤眼莲分泌物对 *Enterobacter* sp. nov. 苯酚代谢的影响. 应用生态学报, **4**(1): 78—84.
- [6] 吴 辉、郑师章. 1991. 凤眼莲根分泌物对降酚细菌影响的研究. 见: 生态学研究进展. 中国科学技术出版社, 北京, 72—73.
- [7] 郑师章、吴 辉、何 敏. 1991. 凤眼莲根分泌物中还原糖分析及其化学信息作用的研究. 见: 生态学研究进展. 中国科学技术出版社, 北京, 70—72.
- [8] 《环境污染分析方法》科研协作组编. 1987. 环境分析方法(第 2 分册)有机物分析, 科学出版社, 北京, 190—200.
- [9] 赵大君、郑师章. 1993. 无菌凤眼莲降酚和耐酚性能的研究. 上海环境科学, **12**(4): 13—16.
- [10] Alexander, M. 1981. Biodegradation of chemicals of environmental concerns. *Science*, **211**: 123—138.
- [11] Murray, D., Williams, P. A. 1974. Role of catechol and methylcatechol as inducers of aromatic metabolism in *Pseudomonas putida*. *J. Bacter.*, **117**(3): 1153—1157.
- [12] Nakazawa, T., Yokota, T. 1973. Benzoate metabolism in *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: Demonstration of two benzoate pathways. *J. Bacter.*, **115**(11): 262—267.