

凤眼莲-根际微生物系统的降酚效应¹⁾

乐毅全 郑师章 周纪伦

(复旦大学生物系)

摘 要

在自然水体中,由于凤眼莲的存在,其根际的异养细菌的数量和种类均大量增加,从而提高降解水体中的有机物的能力;在实验室条件下,人工组建成凤眼莲-根际细菌系统,系统的降酚效应要大于单独的细菌和凤眼莲,证实这是一个具高效降酚能力的共生生物系统。本文从野外原位调查和实验室模拟试验两方面,讨论了凤眼莲-根际细菌共生系统的降酚效应,以及其中的机制和应用。

关键词 凤眼莲; 根际细菌; 共生生物系统; 酚的降解

凤眼莲(*Eichhornia crassipes*)是属于雨久花科的漂浮水生植物,它具有分布广、生长快的特点,在环境科学的研究,尤其是水体污染治理中,受到人们的重视^[1,5-7,9]。我们的工作对生活在污染水体中的凤眼莲的根际微生物进行原位调查,并且实验模拟了凤眼莲-根际微生物系统,由此来确定和研究由凤眼莲与根际微生物构成的降酚的生物系统。测定其降酚效应,揭示其中可能的机制,为应用这一系统治理污水提供依据。

一、实验方法

(一) 原位调查方法

野外调查对生长在水体中的凤眼莲根际和自由水体中的异养细菌的数量和大类进行比较,并且测定了根际细菌的降酚性能。

1. 取样: 在苏州黄天荡葑门塘的两个采样点,分别取表层污水和凤眼莲的样品,置冰箱备用。

2. 培养: 采用普通肉汤培养基。

3. 计数: 稀释污水样品至1 000倍、10 000倍和100 000倍;取鲜根一克,剪碎,用玻璃珠振荡后稀释至1 000倍、10 000倍和100 000倍。分别取水样和根样的稀释液各0.2 ml,在培养基平板上涂布计数。

4. 大类鉴定: 对不同类型菌落的菌株,选取形态、革兰氏染色、氧化酶反应、糖代谢类型等指标,进行大类的鉴定。

5. 根际细菌降酚性能的测定: 选取从凤眼莲根际分离得到的菌种15株,混合接种于合成液体培养基中,酚的起始浓度为10 μ g/ml,振荡培养(32 $^{\circ}$ C, 120—150rpm),在18小

本文于1988年11月收到, 1989年1月收到修改稿。

1) 国家自然科学基金资助项目之一。

时时,补加酚至50 $\mu\text{g}/\text{ml}$,继续培养。于不同时间测定酚的浓度,并以同样加酚的无菌培养液作对照。测酚方法采用4-氨基安替比林氯仿萃取比色法。

(二) 模拟试验方法

从生活在高酚水体中的凤眼莲根际分离得到高效降酚菌种,与无菌凤眼莲组建成凤眼莲-根际微生物系统,研究这个系统的降酚功能。

1. 无菌凤眼莲系通过组织培养的方法得到。

2. 实验菌种是从生活在煤气厂污水中的凤眼莲根际分离,它能在以酚为唯一碳源的培养基上良好生长,经鉴定,为假单胞菌(*Pseudomonas sp.*) No. 5。

3. 降酚效应的测定:选取大小相似、生长良好的无菌凤眼莲,培养于250ml三角瓶中(内有100ml合成培养液),接入菌液0.4毫升(OD_{580} 为0.09),振荡培养(30 $^{\circ}\text{C}$ 、50rpm、光照),18小时后加酚至30—40 $\mu\text{g}/\text{ml}$,并测定起始浓度,继续培养10小时后,测定酚的最终浓度。同时以单纯细菌和无菌凤眼莲作为对照。

$$\text{降酚百分率} = \frac{\text{起始浓度} - \text{最终浓度}}{\text{起始浓度}} \times 100\%$$

4. 人工假根试验:在盛有100ml合成培养液的三角瓶中放入人工模拟假根(在环保上称为软性填料,由聚丙烯材料制成,丝状,长12cm)¹⁾,接菌,其它条件同上,测定酚的降

表1 试验因子及水平

Table 1 The experimental factors and their level

因子 Factor	水平 Level	1	2	3
(A)pH		5.8	7.0	8.0
(B)温度 Temperature($^{\circ}\text{C}$)		35	25	15
(C)酚浓度 Concentration of phenol($\mu\text{g}/\text{ml}$)		50	30	10

表2 正交设计试验方案

Table 2 The plan of orthogonal design experiment

试验号 No.	因子 Factor	(A) pH	(B) 温度 Temperature($^{\circ}\text{C}$)	(C) 酚浓度 Concentration of phenol ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
1		5.8	35	50
2		5.8	25	30
3		5.8	15	10
4		7.0	35	30
5		7.0	25	10
6		7.0	15	50
7		8.0	35	10
8		8.0	25	50
9		8.0	15	30

1) 由浙江玉环县环境保护设备厂生产。

解情况。

5. 影响因子试验(正交试验法)

考察三个因子(pH值、温度和酚浓度)对假单胞菌No. 5降酚性能的影响, 分别取三个不同的水平(表1)。根据正交试验表 $L_9(3)^4$, 制定了试验方案(表2), 每组试验三次重复, 其它条件同上。

二、实验结果

(一) 野外原位调查的结果

1. 凤眼莲根际异养细菌和水体表层异养细菌在数量和大类上的比较, 调查结果见表3、表4。

表3 水体和凤眼莲根际异养菌总数
Table 3 Total number of heterotrophic bacteria in water and waterhyacinth rhizosphere

次数 No.	样品 Sample	水样 I Water sample I(No./ml)	根样 I Root sample I(No./g)	水样 II Water sample II(No./ml)	根样 II Root sample II(No./g)
1		3.6×10^5	3.2×10^9	3×10^4	3.1×10^9
2		1×10^4	4.8×10^8	1×10^4	1.6×10^8
3		1×10^5	1.8×10^8	3.7×10^5	6.7×10^8

表4 细菌大类鉴定(共73株)
Table 4 Identification of bacteria (total: 73 strains)

来源 Strain source	大类 Big type	假单胞菌属 Pseudomonas	肠道菌科 Enterobac- teriaceae	芽孢杆菌属 Bacillus	弧菌属 Vibrio	其它 Others
水样 I Water sample I		1	1	0	2	2
根样 I Root sample I		13	6	4	1	8
水样 II Water sample II		0	2	2	1	0
根样 II Root sample II		13	4	3	0	10

从两个表中可以看到, 与自由水体相比较, 存在于凤眼莲根际的异养菌, 其数量要多。

得多,各大类菌的种数,也比水体多,其中尤以假单胞菌的差异最为明显(弧菌例外)。

2. 来自野外凤眼莲根际的异养菌降酚性能的测定,实验结果列于表5。

表5 15株混合菌对酚的降解
Table 5 Phenol degradation of 15 mixed bacteria

样品 Sample		时间 Time(h)	40	88	112
		对 照 Control	酚 浓 度 Phenol concentration ($\mu\text{g/ml}$)	50.0	41.25
消 耗 量 Consumption (μg)	0		437.5	312.5	
混 合 菌 Mixed bacteria	酚 浓 度 Phenol concentration ($\mu\text{g/ml}$)	48.43	40.63	40.0	
	消 耗 量 Consumption (μg)	78.5	468.5	500.0	

酚的起始浓度为50微克/毫升,培养液50毫升。The original concentration of phenol is 50 $\mu\text{g/ml}$ and the volume of culture solution is 50 ml.

表中的酚消耗量包括自然挥发和细菌的利用。实验结果表明:这些根际细菌的降酚能力并不强,这是因为它们来自酚浓度不高的水体。

(二) 模拟试验的研究结果

1. 凤眼莲和根际假单胞菌No.5的降酚效应 实验测得酚的起始浓度和10小时后最终浓度,求出降酚百分率,结果列于表6。

凤眼莲与根际细菌结合成为一个人工的共生系统,其降酚能力大大增加,超过单纯细菌和无菌凤眼莲的降酚效应之和。这表明:由凤眼莲和根际细菌共同组成的生物系统,产生了更有效的系统效应。

2. 人工假根试验 把模拟的人工假根与假单胞菌No.5结合,测定系统的降酚效应,结果列于表7。

与前面的实验结果相比较,说明应用非生物性的人工模拟假根也可以部分达到提高降酚效果的目的。

3. pH值等因子对假单胞菌No.5降酚能力的影响 对每次试验结果,求出10小时降酚百分率并进行统计处理(表8,表9)。

分析统计结果,培养液的pH值和温度这两个因子对假单胞菌No.5的降酚效应有十分显著的影响,较高的温度和偏酸性的pH值有利于细菌的降酚效率的提高,而酚浓度因子在所取范围(10—50 $\mu\text{g/ml}$)内的影响不显著,这也反映了该菌对酚的适应能力。

表 6 凤眼莲和根际假单胞菌 No.5 的降酚能力
Table 6 Phenol degradation of waterhyacinth and rhizosphere *Pseudomonas* No.5

		1	2	8	平 均 Average
菌 Bacteria	起始浓度 Original concentration	37.4	37.9	39.3	37.9
	10小时后浓度 Concentration after 10 hours	21.8	25.7	23.7	
	降解率 Degradative rate (%)	41.7	32.2	39.7	
无菌凤眼莲 Abacterial waterhyacinth	起始浓度 Original concentration	37.8	35.8	36.8	1.9
	10小时后浓度 Concentration after 10 hours	37.2	35.1	36.0	
	降解率 Degradative rate (%)	1.6	2.0	2.2	
菌 + 凤眼莲 Bacteria and abacterial waterhyacinth	起始浓度 Original concentration	37.5	38.8	41.6	97.5
	10小时后浓度 Concentration after 10 hours	0	2.8	0.1	
	降解率 Degradative rate (%)	100	92.8	99.8	

浓度单位 Concentration unit: $\mu\text{g/ml}$.

表 7 人工假根试验结果
Table 7 The result of artificial root experiment

结果 Result 样品 Sample	起始浓度 Original concentration ($\mu\text{g/ml}$)	10小时后浓度 Concentration after 10 hours ($\mu\text{g/ml}$)	酚降解百分率 Phenol degradative rate (%)
1	36.1	2.5	94.5
2	36.0	0.5	98.5
3	40.6	11.6	71.4
平 均 Average			88.2

表 8 正交设计试验结果和统计计算
Table 8 The result of orthogonal design experiment and statistics calculation

	(A)	(B)	(C)	4	试验结果(减20)			合计 Total
	1	2	8		Experimental result(%) (subtract 20)			
1	1	1	1	1	34.7	45.0	56.1	135.8
2	1	2	2	2	9.4	6.2	-9.1	6.5
8	1	8	8	8	-12.8	-4.7	-9.8	-27.3
4	2	1	2	8	-4.5	3.1	-10.3	-11.7
5	2	2	8	1	-13.1	-2.7	4.6	-11.2
6	2	8	1	2	-16.9	-19.3	-18.5	-54.2
7	8	1	8	2	-6.4	17.3	0.7	11.6
8	8	2	1	8	-12.7	-14.1	-13.2	-40.0
9	8	8	2	1	-14.5	-14.5	-14.7	-43.7
K_1	115.0	135.7	41.1	80.9	$A = \sum X^2 = 9715.91$			$\sum X = -34.7$
K_2	-77.0	-44.7	-48.9	-36.6	$B = \frac{1}{8} [(135.8)^2 + (6.5)^2 + \dots +$			
K_3	-72.1	-125.7	-26.9	-79.0	$(-43.7)^2] = 8709.28$			
K_1^2	13225.00	18414.49	1689.21	6544.81	$C = \frac{1}{27} (-34.7)^2 = 44.60$			
K_2^2	6021.76	1998.09	2391.21	1339.56	$A - C = 9671.31$			$df = 26$
K_3^2	5198.41	15800.49	723.61	6241.00	$B - C = 8664.68$			$df = 8$
$K_1^2 + K_2^2 + K_3^2$	24445.17	36213.07	4864.42	14125.36	$A - B = 1006.63$			$df = 18$
$(K_1^2 + K_2^2 + K_3^2) / 3 \times 3$	2716.13	4023.67	540.49	1569.48				
ssq	2671.53	3979.07	495.89	1524.88				

表 9 统计分析结果
Table 9 The result of statistics analysis

项 目 Item	自 由 度 Degree of freedom	平 方 和 Sum of squares	均 方 和 Sum of mean squares	F
(A)	2	2671.53	1335.77	10.55**
(B)	2	3979.07	1989.54	15.72**
(C)	2	495.89	247.95	1.96
误差 e ₁ Error e ₂	2 18	1524.88 1006.63	126.58	—
总计 Total	26	—	—	—

$F(2,20)_{0.05} = 3.5$
 $F(2,20)_{0.01} = 5.9$

三、讨 论

植物与微生物的相互作用,表现在很多方面,如:微生物与植物的致病关系,根瘤菌与豆科植物的共生关系以及植物菌根等,国内外的研究报道均很多。但是,有关植物与微生物的相互作用应用于环境污染治理方面,尚不多见^[8,10]。Wolverton(1982)^[11]的工作是一个较成功的例子,他利用芦苇和厌气微生物各自的特点,组成一个系统,能有效地提

高处理污水的能力,但是,对于系统的内部机理缺乏深入的研究。

由于凤眼莲已经被广泛应用于监测和净化水体污染,有人推测:凤眼莲根际的共生微生物可能对污染物质的降解转化起着重要作用^[2],但还缺乏进一步的试验证实。

我们的研究对凤眼莲根际微域和水体表层的异养细菌进行了原位调查,发现两者在数量和大类上均存在明显差异,反映了它们对污染物降解功能的差异;在实验室条件下,组建成功高效降酚的人工凤眼莲-根际细菌系统,证明两者的相互作用的系统效应提高了净化有机污水的能力。

(一)生态系统中的不同生物类群,在长期进化过程中,互相适应,形成独特的生态系统的结构。生态系统的结构与其功能有着密切的联系,良好的结构是系统发挥最佳功能的必要条件。从野外原位调查的结果来看:在生长的凤眼莲根际聚集了大量的异养细菌,其种类和数量均要多于自由水体(除弧菌外),其中尤以假单胞菌的差异最为明显,这些细菌生活所需的营养(主要是碳素和氮素)绝大部分来自于水体,这样就大量去除了水体中的有机物。因此,在大面积范围内种植的凤眼莲,可以起到净化各种有机污水的作用。

(二)由于野外调查的取样地黄天荡养殖场水体中所含酚浓度不高,所以,从生长在该水体中的凤眼莲根际,虽然筛选到一些耐酚菌株,但实验结果表明:它们的降酚能力并不很强;而从生长在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),则具有很强的降酚能力。这种情况符合谢尔福德(Shelford)氏耐性定律^[3],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;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要有限得多。

正是由于在正常自然条件下的凤眼莲-微生物系统,并不具备高效降解酚的能力,所以,就有必要通过人工组建的方法,建立高效的凤眼莲-微生物系统,使之能够应用于环境治理。

(三)在实验室人工控制的条件下,我们把无菌凤眼莲与从凤眼莲根际分离的具高效降酚能力的假单胞菌No. 5重新组合,把它们看作是一个有机的系统,系统功能是对水体中的酚的降解,探讨系统降酚功能的变化,以及凤眼莲和微生物在系统中的作用。

从凤眼莲根际分离的假单胞菌No. 5,其10小时降酚率平均可达37.9%,而无菌凤眼莲仅1.9%。当把两者结合以后,降酚效率大大提高,在10小时内平均可达97.5%。实验结果表明:在对酚的降解中,凤眼莲的直接作用是十分有限的,而细菌起着主导作用;由凤眼莲和细菌组成的系统,其整体降酚效应要大于细菌和凤眼莲各自的效应之和。

凤眼莲对于提高凤眼莲-根际细菌系统降酚能力的作用可能是二方面的:(1)物理性的因素,Ehrhardt等人曾利用活性炭吸附微生物来提高降解苯酚的能力^[4],在我们的实验中,提供人工假根也可以提高菌的降酚能力,10小时降酚率平均可达88.2%,凤眼莲发达的根系为根际细菌提供吸附生长的场所,从而提高降酚效果;(2)生物性的因素,凤眼莲与细菌相互结合组成一个系统以后,两者均会受到影响,尤其在它们的生理活性方面,这种变化有助于提高系统的降酚功能。

(四)为了有效地发挥系统的功能,并且应用于生产实际,还必须考虑系统运行的条件

和控制,考虑在自然条件下的各种条件及其影响。虽然本工作是在实验室条件下进行的,各种条件与自然状态有所区别,但通过实验,仍能得到有意义的结果。

在凤眼莲-细菌系统中,起降酚的主导作用的是细菌,因此,任何影响细菌的生长和降酚的因子,都将对系统的功效产生影响。在实验中,我们应用正交设计的方法,考察几个可控因子(pH值,温度和酚浓度)的不同水平对假单胞菌No. 5的降酚效率的影响,结果得出,pH值和温度对菌的降酚能力产生显著的影响,而酚浓度在所取的三个水平(50, 30和10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)没有显著的影响。所以,在凤眼莲-细菌系统中,pH值和温度是两个主要的影响因子,必须适当控制,不过营养条件在其中的作用也不可忽视。我们可以利用各种可控条件使凤眼莲-微生物系统处于良好状态,保持其高效净化污水的能力。

当然,要彻底弄清楚凤眼莲与根际微生物的相互关系,完善凤眼莲-微生物净化系统,并且在生产实践中得以应用。例如,系统中凤眼莲与微生物相互作用的具体过程和工艺设计,以及系统运行的条件和控制等。这些将有待于进一步的深入工作,一定会在理论上和实践上有新的突破。

参 考 文 献

- [1] 孙连芬, 1982: 利用水生植物监测和净化鞍钢污水的研究, 环境科学丛刊, 3: 10—12.
- [2] 吴玉树, 鲍奕佳, 1984: 酚、氰在凤眼莲-水体系统中的迁移、积累和转化, 植物生态学与地植物学丛刊, 8: 336—345.
- [3] 奥德姆, E. P. 著, 孙儒泳等译, 1981: 生态学基础, 人民教育出版社.
- [4] Ehrhardt, H. M. 等, 1986: 利用吸附于活性碳上的微生物降解苯酚, 应用微生物, 5: 58—61.
- [5] Cooley, T. N. (ed), 1978: Radio-manganese, -iron, and -phosphorus uptake by water hyacinth and economic implication. *Eco. Bot.*, 32: 371—378.
- [6] Cornwell, D. A. (ed), 1977: Nutrient removal by water hyacinths. *J. Water Pollut. Control Fed.* 49: 57—65.
- [7] Duffer, W. R. & J. E. Moyer, 1978: Municipal wastewater aquaculture. U. S. EPA 600/2-78—110.
- [8] Hsu, T. S. & R. Bartha, 1979: Accelerated mineralization of two organophosphate insecticides in the rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37: 36—41.
- [9] McDonald, R. C. & B. C. Wolverton, 1980: Comparative study of wastewater lagoon with and without water hyacinth. *Eco. Bot.*, 34: 101—110.
- [10] Reddy, B. R. & N. Sethunathan, 1983: Mineralization of parathion in the rice rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.*, 35: 85—112.
- [11] Wolverton, B. C., 1982: Hybrid wastewater treatment systems using anaerobic microorganisms and reed (*Phragmites communis*). *Eco. Bot.*, 36: 373—380.

PHENOL DEGRADATION EFFECT OF WATERHYACINTH-RHIZOSPHERE MICROORGANISH SYSTEM

Le Yi-quan Zheng Shi-zhang Zhou Ji-lun

(Department of Biology, Fudan University)

Abstract

The result of investigation in situ shows that the abundance and species number of heterotrophic bacteria of waterhyacinth rhizosphere are greatly increased because of the existence of waterhyacinth, which improves the degradation of organic substance. The artificial waterhyacinth-rhizosphere bacteria system established in the laboratory is more powerful for phenol degradation than either the bacteria or the waterhyacinth alone. It has been proved that the system is a symbiotic biological one. The artificial root used in this experiment shows the importance of physical factor in phenol degradation in this system. The mechanism and application of this system is discussed in this paper.

Key words Waterhyacinth; Rhizosphere bacteria; Symbiotic biological system; Phenol degradation