

污染环境 中细菌质粒的研究*

张素琴 赵姬勇 马国华
宋冬林 罗卫星 王志通**

(中国科学院武汉病毒研究所)

摘 要

本研究主要调查了受石油、农药和汞等污染的环境中好氧异养菌的种类及其所携带的质粒,并在恒化器中半连续培养和观察细菌质粒的变化。结果表明在恒化器小生境中76株初始菌检出29株带质粒,6个月后检测出6株菌全带质粒。

从不同地区分离出470株好氧异养菌,用噬裂解和琼脂糖电泳技术测出带质粒菌的百分数,它们分别为:石油污染土49%,五氯酚污染土41%,对照土11.3%。

抗汞菌质粒检出数为62%。在102株带质粒菌中有78%对石油烃有不同程度的降解作用,这些带质粒菌74.6%是革兰氏阴性菌,其中假单胞菌类占31.6%。

关键词: 质粒, 质粒生态, 降解性质粒, 小生境。

质粒是存在于寄主细胞并能自我复制的染色体外的环状DNA分子。据 JOHN 等人的报道^[1],在许多细菌属的细胞中均可检测到质粒。但是在一般条件下质粒对寄主细胞并非都是必要的,在特殊环境下(营养贫乏,有毒污染物存在及高温等),质粒却起着重要作用。一些研究表明,细菌对于环境中特异性限制因子的应答能力一般由质粒控制。本文试图从污染环境中细菌质粒的分布及其某些特性来研究探索质粒存在的生态学意义。

一、材料和方法

1. 样品来源和菌种分离

1980年至1987年多次从湖北、广州、河北等地石油化工厂和炼油厂收集油污土样。两次从天津大沽化工厂取五氯酚污染土样,一次取武汉温度计厂汞污染土样。用常规的牛肉膏蛋白胨培养基平板稀释计数,用牛肉膏蛋白胨和 TGY^[2] 培养基分离纯化好氧异养菌,牛肉膏斜面保存。

2. 实验菌株

- Paw₁, *P. putida*带分子量为76md的TOL质粒。
- 9501, 假单胞菌含有Tn转座子分子量为38md的质粒。
- S_{1s}, T₃, P₁₂, H₂₋₃为本组分离的假单胞菌带有降解性质粒。
- B₂, 本组分离保存的*E. coli*。

3. 假单胞菌的鉴定

* 国家自然科学基金资助项目。 ** 现在广州能源所工作。
本文于1988年12月21日收到。

按Burton等人所描述的方法进行^[3]。

4. 质粒的检测

按照本实验室对Kodo方法修改后的方法进行^[4]。

5. 质粒的消除和转移

按Chakrabarty的方法^[5]进行。

6. 石油烃降解实验

用Stanlake^[6]的无机盐培养基分别加入0.2%碳、一碳、4的饱和正烷烃、0.05%苯酚、0.15%甲基苯甲酸或水杨酸, 200ppm的五氯酚。对于萘、樟脑、菲、二氯苯易挥发性底物以挥发气体被吸收为碳源, 接种培养。即在250—500ml三角瓶内放入3—5个青霉素小瓶, 其中一瓶加入固体挥发性底物, 其余小瓶各加入3ml无机盐培养液并接入待测菌。用分光光度计和气相色谱技术测定底物的代谢产物和降解作用。

7. 双加氧酶的测定

根据Brut, D. Ensley^[7] 1983年的描述, 降解苯环的双加氧酶可以将大肠杆菌产生的吡啶氧化成吡啶酚, 进而在空气中氯化生成兰色沉淀。我们用待测菌与本组分离的*E. coli*、*B.*在1%的胰胨水中混合培养观察定性。

8. 恒化器小生境中驯化细菌

用含有200ppm的五氯酚无机盐培养基750ml装在美国New Brunswick科仪公司生产的BIOFLO C₃₀型1升的恒化器中, 接种76株对石油烃或对五氯酚有降解能力的混合菌, 其中29株菌携带质粒, 温度控制在30℃, 搅拌为200rpm, 通气量0.6l/min半连续培养。每两周放出1/3的培养液, 加入等量新鲜培养液, 每两个月取样挑取不同形态的菌落, 进行质粒检测。

二、结 果

1. 不同环境中细菌质粒的分布

按上述方法对从不同环境中分离纯化的细菌进行质粒检测。由表1可以看出不同环境中分离的细菌质粒检出率有一定的差别, 从污染环境中分离的细菌质粒检出率远远高于未受污染土壤细菌质粒的检出率(11.3%); 石油污染程度不同的环境中细菌质粒的检出率亦不同。在人工曝气池中比一般油污土样中细菌质粒检出率高(各为58%和40.7%)。在200ppm的五氯酚恒化培养的小生境中, 初始接种76株混合菌, 其中29株带质粒。经过两个月的运转培养, 检测26株菌中有21株带质粒, 运转到6个月和9个月两次分离6株菌检测都含有质粒。此结果表明: 在特殊的恒化器小生境中有利于细菌质粒的结合、转移和重组, 带质粒的菌有更强大的生命力。污染环境中细菌质粒出现频率高于清洁区, 可以说是环境对微生物的选择压力和微生物对环境适应相互作用的结果。根据Glassman^[8]等人对油污海湾好氧异养菌质粒的调查, 除带质粒菌多于清洁区外, 且带多质粒。本实验检测的菌大多数都是带分子量大于38md的质粒。例如把曝气池的活性污泥中分离的69株带质粒的菌与9501所含质粒(38md)作泳动度比较, 由表2所示, 所带质粒分子量大于38md的占95%; 带两条以上质粒带的占45%。这种大质粒足以能够携带结合转移的基因, 使寄主在特殊环境中发展代谢功能适其生存。

表 1 不同地区细菌质粒的检出数
Table 1 Incidence of plasmids in bacteria isolated from various sites

菌株来源	待测菌株 (个)	含质粒菌数 (个)	质粒检出率 (%)
五氯酚污染土	194	43	41
油污染土	194	78	40.7
活性污泥	119	69	58
对照土	53	6	11.3

表 2 活性污泥中分离的菌所带质粒的特征
Table 2 Characteristics of carrying plasmids bacteria isolated from active sludge

类别	菌株数	百分数 (%)
测试菌总数	69	
分子量大于38md质粒菌	66	95
带多质粒菌	31	45

表 3 不同地点分离的细菌数和抗汞菌的质粒调查
Table 3 Counts of bacteria from various sites and survey of plasmids in the mercury resistant bacteria

样品来源	汞重污染土	汞轻污染土	对 照
细菌总数(个/g)	A 18×10^5	A 35×10^5	A 46×10^6
	B 22×10^5	B 32×10^5	B 51×10^6
	C 19×10^5	C 39×10^5	C 44×10^6
	\bar{X} 19.7×10^5	\bar{X} 35.3×10^5	\bar{X} 47×10^6
抗汞菌数(个/g)	A 14×10^5	A 12×10^5	A 9×10^6
	B 17×10^5	B 14×10^5	B 10×10^6
	C 16×10^5	C 10×10^5	C 11×10^6
	\bar{X} 15.7×10^5	\bar{X} 12×10^5	\bar{X} 10×10^6
抗汞菌所占的比例(%)	80	34	21.3
质粒菌的百分数	$\frac{55}{80} \times 100 = 68.8\%$		$\frac{16}{29} \times 100 = 55\%$

采样时间: 1983年4月。

表 4 带质粒菌的某些特性
Table 4 Some characteristics of bacteria carrying plasmids

菌类	项目	菌株数	占总数的百分比 (%)
测试菌总数	革兰氏阴性菌	78	74.6
	假单胞菌	32	31.6
	能降解石油烃的菌	80	78

2. 细菌的抗汞性与质粒的关系

为了研究重金属污染环境 中细菌质粒分布的情况, 我们分别取武汉温度计厂受汞污染严重的土样、一般污染的土样以及未受污染的土样分析。用LB培养基^[9]和汞选择性培养基(LB培养基加20ppm氯化汞), 通过平板稀释计算, 挑出单个菌落, 以在汞选择性培养基生长的菌为抗汞菌, 对其进行质粒调查列于表3。从表3可见, 不同来源的土壤样品所含细菌数目不同。受汞长期严重污染的土样含细菌数为 19.7×10^5 个/克, 而未受污染的土样含细菌则数为 47×10^6 个/克。汞污染区细菌总数较低, 而抗汞菌所占总菌数的比例远远大于非污染区(分别为80%, 21.3%)。对汞污染区80株抗菌检测的结果, 带质粒的抗汞菌占68.8%; 对非污染区29株抗汞菌检测, 其中带质粒的抗汞菌占55%。测试结果推测, 虽然抗汞菌来源不同, 但含质粒菌的百分比相差不如两者细菌个数的差别大。其原因可能是细菌的抗汞性能与质粒有关。

3. 带质粒菌的某些特征的研究

按方法3和方法6对所分离到的102株带质粒的细菌进行分类学和对石油烃代谢的实验。由表4看出带质粒的细菌中革兰氏阴性菌和假单胞菌占的比例较高。初步分析其原因可能是这类菌在污染环境中生存与质粒有密切关系, 尤其是假单胞菌属占31.6%, 说明它们所含的质粒DNA携带着重要的分解代谢的基因, 获得了不良环境更强的适应力。

为进一步查明质粒与降解难分解物质的性能关系, 我们又对102株带质粒的菌进行石油烃的降解实验。通过加氧酶和双加氧化酶的检测及底物浓度的测定, 证明78%的菌具有不同程度的降解烃的能力。它们当中有的对2000ppm的 $C_{10}-C_{24}$ 长链混合烃于4天中完全降解^[10], 有的解酚菌对500ppm的

酚7天完全降解^[10]，在有0.005%酵母膏存在的无机盐培养基中（1000ppm的酚或200ppm的五氯酚）有的细菌能生长良好。为了获得降解性质粒我们选择了一些氧化酶阳性或双氧化酶阳性菌进行质粒消除或结合转移。表5表明S₁₃具有降解萘的质粒^[21]，P₁₂含有降解菲的质粒^[11]，T₃和H₂₋₃分别含有降解甲基苯甲酸和水杨酸的质粒。S₁₃菌的质粒不容易消除，故采用了结合转移的方法。选用*E. coli* B₂为受体菌获得几株结合子以I₆为代表进行电泳和其它特性的检测^[12]。

表5 带降解性质粒菌的比较

Table 5 Comparison of the bacteria carrying degrading plasmid

菌株分类	带质粒数	降解底物	质粒转移或消除
假单胞菌S ₁₃ <i>Pseudomonas</i> sp. S ₁₃	molwt > 38md 2 < 38md 1	萘	结合子能降解萘
<i>Pseudomonas</i> sp. T ₃	> 38md 1	甲基苯甲酸盐	消除子失去降解性
<i>Pseudomonas</i> sp. P ₁₂	> 38md 1	菲	
<i>P. putida</i> H ₂₋₃	> 38md 2	水杨酸	

表6 S₁₃、B₂、I₆等菌某些特征的比较

Table 6 Comparison of some characteristics of strains S₁₃, B₂, I₆

特征	菌株	吲哚反应	双加氧酶	降解底物
供体菌 S ₁₃	-	+	+	
受体菌 B ₂	+	-	-	
结合子 I ₆	+	+	+	

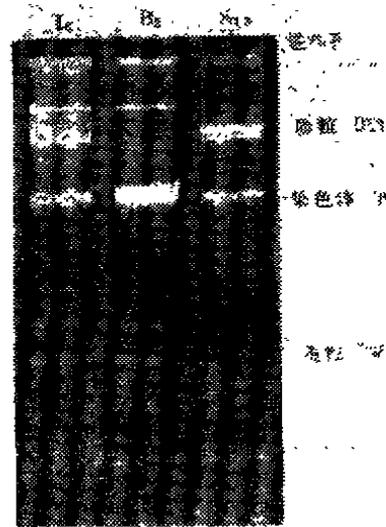


图1 S₁₃、B₂和I₆质粒DNA琼脂糖凝胶电泳图谱
Fig.1 Agrase gel electrophoresis of plasmids DNA of strains S₁₃, B₂, I₆

从表6以及电泳图谱可以看S₁₃菌中具有一条转移性的萘质粒。关于降解性质粒的研究已经有了许多报道，自从1972年Chakrabarty发现水杨酸降解性质粒以来到目前为止国际上已经发现三十多种天然降解性质粒，这对于环境污染的治理有着重要的意义。

综合上述结果可以说明在污染环境中的细菌质粒的存在对于寄主细胞在不良环境中生存有着重要的生态学意义。由于质粒本身是个复制子，可以保持信息传代的稳定性；又因为它可以携带转座子和插入序列尤有发展代谢的灵活性，使寄主在选择性压力下优先增殖获得对不利环境的适应性。假单胞菌具有代谢功能多样化的功能，使之在自然界广泛存在，除了染色体携带的基因功能以外，质粒上的基因也编码着重要功能。

参 考 文 献

[1] Beriger J. E. et al., 1984, The Role of Plasmids in Microbiol Ecology, in *Curent Perspective in Microbiol Ecology*, Edited by M.J.Klug and C.A.Reddy American Society for Microbiology Washington, D.C., p63-70.

[2] 赵短勇等, 1988, 萘降解性质粒的筛选及其在炼油污水处理场中的转移, 环境科学学报 8(1):83-82.

[3] Barton N. F. et al, 1982, Distribution of Bacterial Plasmids in Clean and Polluted Sites in a South Weles River. *Appl. Environ. Microbiol.* 44(3):1026.

[4] 张素琴等, 1988, 京津地区气挟优势细菌及其某些特征的研究, 环境科学与技术 (1):p16-18.

- [5] Chakrabarty, A.M., 1972, Genetic Basis of The Biodegradation of Salicylate in *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.* 112, 815.
- [6] Stanlake G. J. et al, 1982, Isolation and Characterization of a Pentachlorophenol-degrading bacterium. *Appl. Environ. Micro.* 44(6):1421.
- [7] Burt, D. Ensley et al, 1983, Expression of Naphthalene Oxidation Genes in *Escherichia Coli* Results in The Biosynthesis of indigo, *Science* 222, 4620.
- [8] Glassman, D.L, et al., Plasmid Frequency in Natural Populatoin of Estuarine Microorganisms. *Plasmid* 5, 231.
- [9] 北京大学生物系遗传学教研室编, 1983, 遗传学实验方法和技术, 第243页. 高等教育出版社.
- [10] 张素琴等, 1980, 长江中上游部分江段水细菌质粒的研究, *环境科学与技术* (1): 9—12.
- [11] 张素琴等, 1989, 假单胞菌P12对菲的降解, *环境科学学报* 9(1): 80—85.
- [12] 吴云、张素琴等, 1989, 质粒转移到大肠杆菌中合成靛兰的研究, *遗传学报* 16(4): 318—323.

STUDY ON BACTERIAL PLASMIDS IN POLLUTED ENVIRONMENT

Zhang Suqin Zhao Jiyong Ma Gohua Song Donglin
Luo Weixing Wang Zhitong
(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica)

Investigation was made on species of aerobic heterotrophic bacteria, along with the presence of their plasmid DNA, from various sites where are clean or polluted by petroleum alkane, pesticide or mercury. Semicontinuous mixed culture in chemostat was carried out for the study on variation in percentage of bacteria containing plasmids. The results showed that in the chemostat niche 29 of 76 initial strains were found with plasmids, and all of 6 strains detected after 6 months running contained plasmids. The percentage of those with plasmids of the 470 strains isolated from various sites was different, 49% for those from artificial oil polluted sites, 41% for those from pesticide (e.g., pentachlorophenol) polluted sites, and 11.3% for the control. The incidence of plasmid in mercury resistant bacteria was 62%. Of 102 strains carrying plasmid, 78% could degrade petroleum alkane to different extents; 74.6% were Gram-negative, and 31.6% were *Pseudomonas*-likes.

Key words: plasmid, degradation plasmid, plasmid ecology, niche.