

芽孢杆菌与假单胞菌的疏水性及其应用

吴伟^{1*},余晓丽²,黎小正²,李咏梅²,瞿建宏¹ (1.中国水产科学研究院淡水渔业研究中心,江苏 无锡 214081; 2.广西壮族自治区水产研究所,广西 南宁 530021)

摘要: 根据细菌在烃-水两相体系中的细胞数量研究了芽孢杆菌和假单胞菌的表面疏水性及其在不同环境条件下的变化.试验结果显示,正辛醇-水两相体系适用于芽孢杆菌和假单胞菌这类细菌的表面疏水性的研究,细菌表面的疏水性随培养时间、温度和 pH 值的变化而发生改变.芽孢杆菌和假单胞菌的疏水性与其在水环境中对有机污染物的降解呈一定的相关性.疏水性大的细菌对疏水性有机物的降解速度较疏水性小的细菌快,在其表面的生长速度也更快.探讨了细菌表面的疏水性在养殖生态系统中的生态学意义,为养殖水体有机污染的生物修复提供新的理论基础.

关键词: 芽孢杆菌; 假单胞菌; 疏水性; 有机污染; 生物修复

中图分类号: Q949.217.08; S192 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6923(2003)02-0152-05

Hydrophobicity of *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. and its application. WU Wei¹, YU Xiao-li², LI Xiao-zheng², LI Yong-mei², QU Jian-hong¹ (1.Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China; 2.Fisheries Research Institute of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China). *China Environmental Science*, 2003,23(2): 152~156

Abstract: The surface hydrophobicity of *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. and its changes under different environmental conditions were studied based on the cell amount of bacteria in hydrocarbon-water two-phase system. The experiment results showed that the *n*-octanol-water two-phase system was suitable for studying the surface hydrophobicity of bacteria such as *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp.; and the hydrophobicity changed with the change of cultivation time temperature and pH value. The hydrophobicities of *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. were related definitely with the degradation of the organic pollutant in the water environment. The degradation rate of hydrophobic organic by the bacteria of high hydrophobicity was quicker than that by the bacteria of low hydrophobicity; and the growth rate on its surface was more quicker. The ecological significance of the surface hydrophobicity of the bacteria was explored to supply new theoretical basis for the bioremediation of organic pollution in the cultivation waters.

Key words: *Bacillus* sp.; *Pseudomonas* sp.; hydrophobicity; organic pollution; bioremediation

近年来,在我国的水产养殖业中普遍采用高密度和集约化的养殖模式,为了提高单位水体的养殖产量,往往过分地增加水体营养.养殖过程中的饲料利用率并不高,仅有小部分的饵料成分转化为水产品,未被利用的有机饲料或经降解转化为水溶性的养分或成疏水物质沉积于水底,使得水质和底质中的有机污染物大量积聚.因养殖水体的环境承载能力有限,其自身污染日趋严重,养殖水域的环境质量日益下降,并可通过清塘或排水使有机污染物进入周围水体环境而影响水质.因此对养殖池塘中水质和底质有机污染的修复显得十分重要.

疏水性是决定细菌非特异性黏附到各种生物和非生物表面及界面的最重要动力之一^[1-3],也是影响细菌吸收和降解疏水性有机物质的主要因素之一^[4].因此研究细菌表面疏水性及其随环境条件的变化具有十分重要的生态学意义.自 Mudd 1924 年首次报道细菌表面的疏水现象以来,人们从细菌表面电荷、表面蛋白等方面研究了细菌的疏水性^[5].但是在水产养殖生态系统中,应用细菌表面疏水性的差异来提高对水体有机污

收稿日期: 2002-07-15

基金项目: 广西科学基金资助项目(0144007)

* 通讯联系人

染物的降解转化还未见报道.

1 材料与方法

1.1 材料

实验菌株为芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)和假单胞菌(*Pseudomonas* sp.),由南京大学环境科学系提供,可适用于淡水或海水水体.

芽孢杆菌和假单胞菌的培养基均为肉汤培养基.主要成份为牛肉膏 0.5g,蛋白胨 1.0g,氯化钠 0.5g,水 100mL,pH 值 7.2. 121℃灭菌 20min 备用.试验中所用的正辛醇,二甲苯等均为国产分析纯化学试剂.

1.2 方法

1.2.1 芽孢杆菌和假单胞菌的培养与收集 选用肉汤培养基,将芽孢杆菌和假单胞菌从斜面菌种转入液体培养基中,在 $30\pm 1^\circ\text{C}$ 的恒温培养箱中培养 18h,使两种细菌的生长进入对数生长期.取菌液在 4000r/min 条件下离心 10min,去除上清液,并用 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{--NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液(0.2mol/L, pH 值 7.0)洗涤 2 次,使细胞浓度达到 10^9CFU/mL 后试验.

1.2.2 细菌表面疏水性的测定 根据文献[6],选用体积为 10mL 的带有盖子的圆形刻度离心管,加入 4mL 受试菌液后按 0,0.2,0.5,1.0,1.5,2.0mL 的梯度加入正辛醇和二甲苯,用盖子盖紧,室温($20\pm 1^\circ\text{C}$)下剧烈振摇 2min 后静置 15min,使两相分离完全.

细菌在烃-水两相分离过程中发生了疏水分配,可根据水相中细菌细胞数量的变化来了解细胞表面的疏水性.以光密度值 $\text{OD}_{500\text{nm}}$ 表示细菌细胞的数量,采用无菌注射针头吸取下相水溶液(动作要轻和快,以免破坏两相的分离状态),在 721 分光光度计上测定,试验重复 3 次,由下式计算出疏水分配值.疏水分配值 $H = [\text{OD}_0(500\text{nm}) - \text{OD}_i(500\text{nm})] / \text{OD}_0(500\text{nm}) \times 100\%$,式中 OD_0 , OD_i 分别表示水相初始的光密度和振荡静置后的光密度.

1.2.3 细菌表面疏水性随环境条件的变化 将

受试菌种培养到对数生长期(18h 菌龄)和衰退期(96h 菌龄)后分别测定表面疏水性,以了解细菌生长状态与其表面性质的关系;将处于对数生长期的芽孢杆菌和假单胞菌分别在 5°C 和 20°C 的条件下培养 2h 后测定其表面疏水性,研究环境温度对细菌表面疏水性的影响;在处于对数生长期的受试菌液中用酸或碱调 pH 值为 5.5,7.0 和 8.5,以了解水质酸碱度对细菌表面疏水性的影响.

1.2.4 不同疏水性的细菌对残剩饵料的利用能力 将芽孢杆菌和假单胞菌分别接入由饵料配制成的培养基中,了解细菌在以饵料为唯一碳源和氮源情况下的生长.选用市售对虾饵料,含粗蛋白 42%,粗脂肪 5%,碳水化合物 22%.取对虾饵料 2g(不研碎,保持颗粒状),加入 1000mL 水中,121℃灭菌 20min 备用.将细菌按 1%的比例(为防止细菌培养基的带入,先将菌液在 4000r/min 条件下离心 10min,去除上清液,并用 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{--NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液洗涤)接入饵料培养基后在 $30\pm 1^\circ\text{C}$ 的恒温培养箱中培养,分别在 0,24,48,72,96h 测定培养液的 $\text{OD}_{500\text{nm}}$ 值,以了解细菌以饵料为底物的生长情况.同时在试验初始时测定培养液的 COD_{Mn} (酸性高锰酸钾法)^[7],并在试验 48h 和 96h 测定培养液 BOD 值^[7].以 BOD/COD 的比例来表示细菌对养殖生态环境中残剩饵料的利用能力^[8].

1.2.5 细菌对有机污染的修复 有机污染的修复试验在广东湛江的一对虾池中进行,水体有效面积为 6670m²,水深 0.8m.试验周期为 1 个月,试验期间水温大于 25°C ,溶解氧大于 4.0mg/L.设置相同规模和水质条件的对照组(不加菌).采用培养到对数生长期的芽孢杆菌和假单胞菌的菌液(菌液浓度 $\geq 10^9\text{CFU/mL}$),使用方法和浓度按养殖常规,第一次使用 15mg/L,15d 后再使用 10mg/L,菌液采用全池泼洒.菌液每次使用后的 2d 和 5d (因细菌在 0~5d 内生长最快)进行水质的测定,以了解细菌对水体有机污染的净化功能.试验重复 3 次.

2 结果与讨论

2.1 二甲苯-水和正辛醇-水两相体系的选择

在剧烈振摇之后,疏水性强的细菌细胞趋近于烃相的表面,静止后随烃相上移,最后分布在烃相中及烃-水和烃-气的界面上.采用正辛醇和二甲苯作为有机相进行对比试验,通过直接观察发现,对于含芽孢杆菌和假单胞菌的水相而言,正辛醇-水两相体系的相分离速度要明显快于二甲苯-水的两相体系,正辛醇吸附细菌细胞的能力较二甲苯强.在正辛醇-水两相体系中,疏水性细菌细胞主要集中在正辛醇-水和正辛醇-气的界面上并能维持较长的时间,而二甲苯-水两相体系中,疏水性的细菌细胞则大多集中于二甲苯-水的界面上,且很不稳定,细胞易解除吸附而进入水相,水相和烃相间有较大的一层中间乳化层,使得两相分离不稳定.由此可见,对于芽孢杆菌和假单胞菌而言,正辛醇是研究其表面疏水性的理想的有机物.以下实验中均采用正辛醇-水两相体系.

2.2 芽孢杆菌和假单胞菌在不同生长期的表面疏水性

在不同生长期芽孢杆菌和假单胞菌的表面疏水性见图 1,图 2.

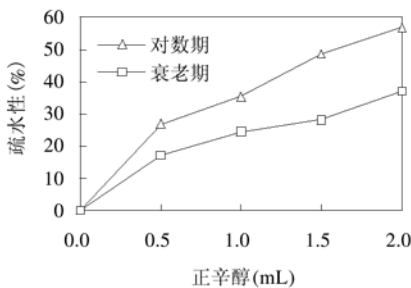


图 1 芽孢杆菌在不同生长期的表面疏水性差异
Fig.1 Difference of the surface hydrophobicity of *Bacillus* sp. in different growth phases

由图 1,图 2 可见,随着培养时间的推移,芽孢杆菌和假单胞菌的表面疏水性呈下降趋势.在对数生长期,当正辛醇(2mL)-水(4mL)相之比为 1:2 时,芽孢杆菌和假单胞菌的疏水性分别为 56.8%

和 69.3%,假单胞菌的疏水性稍大于芽孢杆菌.进入衰退期后,芽孢杆菌和假单胞菌的表面疏水性不断降低,分别为 37%和 47.7%.在相分配时仅有少量菌体聚集到界面,大量菌体和烃相与水相混溶,不易分离.这种现象表明衰老的菌体细胞的表面疏水作用较弱,无法吸附到非水有机物的表面,从而影响其在水环境中的生存和功能.

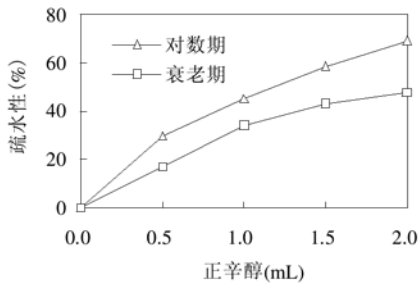


图 2 假单胞菌在不同生长期的表面疏水性差异
Fig.2 Difference of the surface hydrophobicity of *Pseudomonas* sp. in different growth phases

2.3 环境条件对芽孢杆菌和假单胞菌表面疏水性的影响

温度和 pH 值对芽孢杆菌和假单胞菌表面疏水性的影响见表 1.

表 1 温度和 pH 值对芽孢杆菌和假单胞菌疏水性的影响

Table 1 Effect of temperature and pH on the hydrophobicity of <i>Bacillus</i> sp. and <i>Pseudomonas</i> sp.			
试验条件		疏水性(%)	
pH 值	温度(℃)	芽孢杆菌	假单胞菌
7.0	5	58.9	72.1
7.0	20	56.8	69.3
5.5	5	62.3	74.3
5.5	20	59.2	70.8
8.5	5	61.4	75.6
8.5	20	58.9	71.2

注: 正辛醇用量为 2.0mL

由表 1 可见,降低培养温度和改变培养液的 pH 值可改变芽孢杆菌和假单胞菌的表面疏水性.

疏水性是细菌的表现特征,与细菌细胞表面的物质组成有关.据研究,细菌细胞外壁中脂多糖的含量、表面蛋白等与细胞表面的疏水性密切相关^[9,10].温度和pH值也许是通过改变细胞表面的蛋白含量或细胞的表面电荷来改变表面疏水性,具体的作用机理还有待进一步的研究.

2.4 不同疏水性的细菌对残剩饵料的利用能力
以对虾饵料为唯一碳源和氮源,芽孢杆菌和假单胞菌的生长情况见图 3.

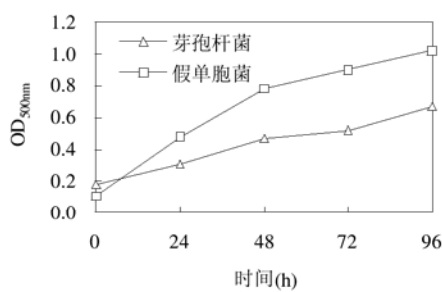


图 3 芽孢杆菌和假单胞菌的生长比较
Fig.3 Comparison on the growth of *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp.

从图 3 可以看出,在 96h 内,假单胞菌的生长速率较芽孢杆菌大,且在生长初期对培养基的适应期短、适应能力更强.而上述两菌在培养基纯培养中的生长情况差异不大.因假单胞菌的表面疏水性要强于芽孢杆菌,因此能更快更强地粘附于饵料颗粒的表面,不仅可利用水中可溶的营养成分,而且还可充分利用固-液界面上难溶性的有机养分而迅速生长.细菌的生长从一个角度反映了水体中不同种属的细菌对有机物质的利用情况,而一定时间内对虾饵料培养液的 BOD/COD 则更能反映出细菌对饵料有机物的利用能力.试验起始测得样品的 COD_{Mn} 为(395.6±4.4)mg/L,其中包括了可生物降解和不能降解的部分.在接种后的 48h 和 96h 测定培养液的 BOD 值,并以 BOD/COD 的比值来反映菌体对有机物的利用情况.凡比值大于 45% 的表示菌体降解能力强^[8].芽孢杆菌和假单胞菌对对虾饵料的利用能力测定结果见表 2.从表 2 可看出,在 48h 内,芽孢杆菌和假单

胞菌能消化 58.3%和 67.5%的饵料;到 96h 芽孢杆菌和假单胞菌对饵料的利用达 62.4%和 75.1%,表明假单胞菌对饵料的利用能力较芽孢杆菌要强.

表 2 菌株降解对虾饵料的能力
Table 2 Degradation activities of shrimp feed by bacteria

菌株	48h		96h	
	BOD (mg/L)	BOD/ COD _{Mn} (%)	BOD (mg/L)	BOD/ COD _{Mn} (%)
芽孢杆菌	230.3±2.62	58.3	246.5±3.52	62.4
假单胞菌	266.6±4.23	67.5	296.6±2.69	75.1
CK	82.9±5.63	21.0	101.7±6.52	25.7

注:表中结果经统计 t 检验,与对照组差异显著(P<0.01);CK 为
无菌对照

2.5 细菌对养殖生态环境中有机污染的修复
采用培养到对数生长期的芽孢杆菌和假单胞菌的菌液(菌液浓度≥10⁹CFU/mL)全池泼洒,第一次使用 15mg/L 后的 2d 和 5d 测定 COD_{Mn}(因是海水养殖,COD_{Mn} 采用碱性高锰酸钾法).与对照组相比,芽孢杆菌处理组的 COD_{Mn} 下降了 10% 和 18%,假单胞菌的处理组下降了 15%和 22%;15d 后再使用 10mg/L 菌液,使用后的 2d 和 5d 进行水质测定,发现芽孢杆菌处理组的 COD_{Mn} 下降了 30%和 38%,假单胞菌的处理组下降了 36%和 45%.试验结果表明芽孢杆菌和假单胞菌对养殖水体中的有机物均有良好的降解作用,假单胞菌的作用能力要强于芽孢杆菌,除了菌种本身的生理生化性能外,菌体的疏水性也是一个重要的原因.因疏水性菌体能更好更快地粘附于并利用养殖水体中一些不溶性的有机质(如残饵,动物排泄物),切断了难溶性有机大分子向水体缓释小分子有机物的途径,从而使水体的 COD 下降,达到在养殖水环境中修复有机污染的目的.

3 结语

采用正辛醇-水两相体系能较准确地测量芽孢杆菌和假单胞菌表面的疏水性及在不同环境条件下发生的改变.这种因表面疏水作用而导致

菌体在不同溶剂相之间的分配现象适用于其他种属的微生物,可利用这种方法来研究其他微生物的表面疏水性.采用这种方法进行细菌表面疏水性的测定时,有机烃类化合物的选择、有机相与水相的体积和比例、微生物细胞的浓度等均影响试验结果,同时环境条件(如温度,pH值等)对试验结果有一定的影响,因此必须根据不同的菌体细胞来确定试验条件.

利用不同表面疏水性的微生物来降解养殖水体中的可溶性和难溶性的有机物质,对因养殖过程(如过量投饵等)造成的有机污染进行原位生物修复具有重要的生态学意义.疏水性较强的细菌对水体残饵的降解能力要大于疏水性弱的菌体,且其在大水体的实际使用中有较好的降解净化有机污染的效果.

参考文献:

- [1] Hermansson M, Jlang Q, Gotschalk BW. Hydrophobic and electr-ostatic characterization of bacteria and its relationship to adhesion to an air-water interfaces [J]. Arch. Microbiol., 1983, 131:308-312.
- [2] van Loosdrecht MCM, Lyklema J, Norde W, *et al.* The role of bacteria cell wall hydrophobicity in adhesion[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1987,53(8):1893-1897.
- [3] Devasia P. Surface chemistry of *Thiobacillus ferrooxidans* rellevant to adhesion on mineral surfaces [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1993,59(12):4051-4055.
- [4] 张育红,于红霞,韩朔睽,等.芳基取代化合物对藻类的毒性及其定量构效的相关性研究 [J]. 环境化学,1995,14(2):140-144.
- [5] Rosenberg M, Kjelleberg S. Hydrophobic interactions: role in bacterial adhesion [A]. Advances in Microbial ecology [C]. New York: Plenum Press, 1986.353-393.
- [6] 罗岳平,马剑敏,李益健,等.小球藻表面疏水性的研究 [J]. 应用与环境生物学报,1999,5(5):491-495.
- [7] 国家环境保护局.水和废水监测分析方法 [M]. 第 3 版. 北京:中国环境科学出版社,1989.240-380.
- [8] 莫照兰,王祥红,于 勇,等.虾池有机污染物降解细菌的筛选 [J]. 水产学报,2000,24(4):334-338.
- [9] Gruber K, Sleytr UB. Influence of an S-layer on surface properties of *Bacillus stearothermophilus* [J]. Arch. Microbiol., 1991, 180:101-105.
- [10] Parker ND, Munn CB. Increased cell surface hydrophobicity associated with possession of an additional surface protein by *Aeromonas salmonicida* [J]. FEMS Microbiol. Lett., 1984,(21): 233-237.

作者简介: 吴 伟(1967-),男,江苏无锡人,中国水产科学研究院淡水渔业研究中心副研究员,主要从事生态毒理学与环境生物学的研究工作.发表论文 25 篇.

致谢: 南京农业大学无锡渔业学院 2002 届本科毕业生贾代汉、邹金照参加了部分研究工作,谨表谢意.