

菌株 SD-2 对正十六烷摄取及中间代谢产物的初步研究

Preliminary study of strain SD-2 on its hexadecane uptake and intermediate metabolite

刘岚铮¹, 潘学芳²

LIU Lan-zheng¹, PAN Xue-fang²

(1. 济南市疾病预防控制中心, 山东 济南 250013; 2. 长春师范学院, 吉林 长春 130032)

摘要: 从济南某炼油厂附近的污染土壤中, 分离出能高效降解烃类的菌株 SD-2, 初步鉴定为假单胞菌属。菌株 SD-2 对正十六烷中间代谢产物的初步分析表明: 以正十六烷为惟一碳源培养的菌体细胞中, 不仅有正十六烷的存在, 还含有少量的十六酸。证明菌体可以不加修饰地将正十六烷摄取到细胞内, 而十六酸则是其中间代谢产物, 说明此菌株对正十六烷的降解是通过单末端氧化途径进行的, 这与文献报道的直链烷烃降解的单末端氧化途径相符合。

关键词: SD-2; 正十六烷; 摄取; 中间代谢产物

中图分类号: R124 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2003)04-0251-02

随着石油工业的发展, 难降解的石油烃类物质引起的环境污染越来越引起人们的关注。微生物可以通过遗传改变和非遗传适应来获得对环境污染物的降解能力, 从而在净化环境中起重要作用^[1]。从济南某炼油厂附近的石油污染土壤中, 分离出能高效降解烃类的菌株 SD-2, 初步鉴定为假单胞菌属。有关菌株 SD-2 对正十六烷的运输及降解中间代谢产物的初步研究, 为微生物处理石油烃类污染物奠定了基础。现将实验结果总结如下。

1 材料与方法

1.1 样品的采集 于济南某炼油厂附近采集石油污染的土壤样品。

1.2 供试培养基^[2]

1.2.1 基础无机盐溶液: NaCl 质量分数 0.5%, (NH₄)₂SO₄ 质量分数 0.1%, MgSO₄·7H₂O 质量分数 0.025%, NaNO₃ 质量分数 0.2%, KH₂PO₄ 质量分数 0.4%, K₂HPO₄·3H₂O 质量分数 1.0%。

1.2.2 以葡萄糖为碳源的培养基: 10倍无机盐溶液加酵母膏 0.1%, 葡萄糖 2%, 自然 pH 值, 0.0552 MPa 灭菌 15~20 min。固体培养基加琼脂 2%。

1.2.3 LB 固体培养基: 蛋白胨 1%, 牛肉膏 0.5%, NaCl 1%, 蒸馏水 100 ml, 琼脂 1.5%, pH 7.0, 0.104 MPa 灭菌 20 min。

1.2.4 原油培养基: 10倍无机盐溶液 10%, 水 90%, 原油(新疆油 8293) 2%, 自然 pH 值, 0.104 MPa 灭菌 20 min。

1.2.5 以原油为碳源的固体选择培养基(油平板): 10 倍无

机盐溶液 10%, 水 90%, 酵母膏 0.1%, 琼脂 1.5%, 原油 2%, 自然 pH 值, 0.104 MPa 灭菌 20 min, 倾注平板, 称为油平板。

1.2.6 以正十六烷为惟一碳源的液体培养基: 无机盐溶液 10%, 水 90%, 正十六烷 2%, 自然 pH 值, 0.104 MPa 灭菌 20 min。

1.3 烃类降解菌株的分离筛选及纯化 参照参考文献 [3]。

1.4 分析方法 色谱-质谱分析正十六烷中间代谢产物。

1.4.1 发酵液样品处理: 由斜面挑取一环菌种接种到正十六烷液体培养基中, 35℃ 摇床培养 7 d。将正十六烷发酵液进行离心, 收集菌体细胞, 用蒸馏水洗涤至少 3 次, 最后一遍洗液经检测, 无正十六烷的存在。将菌体细胞制成菌悬液, 用超声波细胞破碎仪破碎, 并涂片观察细胞破碎前后情况。将细胞破碎液进行离心, 取上清液, 用无水乙醚萃取 (1:1 体积比), 反复多次, 收集萃取液, 并进行浓缩处理, 最后加入 1 ml 无水乙醚溶解样品, 进行色谱-质谱分析。

1.4.2 测定条件: 气相色谱装备硅胶毛细管柱 (长 30 m, 内径 0.25 mm), 氢气作为载气, 初始柱温为 80℃, 终温 260℃, 离子源温度 140℃, 电离方式 ET。检索标准谱库 NBS (美国国家标准局)。

2 结果与讨论

2.1 菌株 SD-2 的鉴定结果 分离得到菌株 SD-2, 革兰染色为阴性; 细胞短杆状, 大小为 (0.2~0.5) μm × (0.3~0.9) μm, 端生单鞭毛, 能运动; 菌落圆形乳白色, 边缘整齐。氧化酶(+), 过氧化氢酶(+), 葡萄糖氧化发酵为氧化型产酸、硝酸盐还原实验(+)。通过上述菌体形态特征及生化反应结果, 初步鉴定 SD-2 菌株为假单胞菌属 (*Pseudomonas*, sp)^[4]。

2.2 正十六烷摄取的初步机制及其中间代谢产物分析 用菌株 SD-2 接种以正十六烷为惟一碳源的培养基进行发酵, 样品处理后做色谱-质谱分析。结果见色谱图。

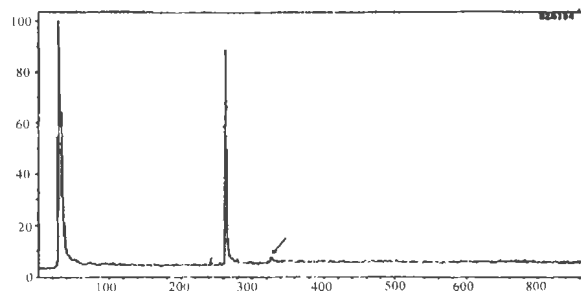


图 1 正十六烷样品离子流色谱图

收稿日期: 2002-11-11; 修回日期: 2003-02-18

作者简介: 刘岚铮 (1965-), 女, 山东济南人, 主管技师, 研究方向: 微生物检验。

从色谱图中看到: 第一个较大的峰为有机溶剂, 第二个较大的峰为正十六烷。另外还有一较小的峰(小箭头所示)是十六酸。除十六酸外, 并没有发现有其他代谢产物存在。正十六烷的存在表明, 细胞能将未加修饰的十六烷摄取到胞内并大量贮存。在细胞内分离出十六酸, 这说明菌株 SD-2 耗氧代谢烷烃时将沿单末端氧化(monoterminal oxidation)途径进行, 这与文献报道的直链烷烃氧化途径相符合, 即正十六烷单端氧化成相应的醇、醛和十六酸。源于正十六烷的十六醇在醇脱氢酶的作用下被氧化成正十六醛, 醛则通过醛脱氢酶氧化成十六酸。源于正十六烷的十六酸经过可诱导的 β -氧化系统, 被氧化成乙酰辅酶 A, 随后进入三羧酸循环^[5]。

3 结论

菌株 SD-2 对正十六烷的摄取及降解中间代谢产物的初步研究表明: 此菌株对正十六烷有较好的降解能力。以正十六烷为惟一碳源的发酵液样品经色谱-质谱联用技术分析, 证明菌株 SD-2 可以将正十六烷不加修饰地摄取到细胞内。另外,

还发现少量十六酸的存在, 说明十六酸是正十六烷的中间代谢产物。证明此菌对正十六烷的代谢是通过单末端氧化进行的, 这与文献报道的直链烷烃氧化途径相符合。

本文所做工作只是对外环境中分离到的 SD-2 菌株的一个初步研究, 其他系列工作有待于进一步探讨。目的是分离到代谢能力更强的菌株来处理石油烃类污染物, 减少环境污染。

参考文献:

- [1] 张素琴, 陈廷, 赵姬勇, 等. 假单胞菌 P₁₂对菲的降解[J]. 环境科学学报, 1989, 3 (1): 80-84.
- [2] 潘学芳, 沈红, 荆麟, 等. 炼油厂有机浮渣的微生物处理方法初探[J]. 山东轻工业学院学报, 2001, 15 (2): 57-60.
- [3] 潘学芳, 倪秀珍, 王浩, 等. 烃类降解微生物的筛选与鉴定[J]. 长春师范学院报, 2001, 11 (2): 56-58.
- [4] 张纪忠. 微生物学分类学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1990. 95-97.
- [5] 刘春德. 假单胞杆菌 64D 在厌氧条件下降解石油烃的研究[D]. 山东大学, 1994.

一起油漆工急性中毒事故调查

A survey on an acute accidental poisoning in painting workers

黄玉玲¹, 金 杰¹, 孙丽艳²

(1. 大连市卫生监督所, 辽宁 大连 116012 2. 大连市疾病预防控制中心, 辽宁 大连 116001)

1998 年 4 月 10 日上午 8 时 30 分, 大连某建筑工地 2 名油漆女工发生急性混苯及汽油混合性中毒, 现报告如下。

1 事故经过

1998 年 4 月 10 日上午 8 时, 2 名油漆女工蹬梯爬入工地顶楼消防水箱内油漆水箱内壁。10 min 后, 2 人向箱外有关人员反映自觉胸闷、气短、刺激性气味难以忍受。20 min 左右, 外面的作业工人听到水箱内有呻吟声, 爬入水箱内将已昏迷的 2 名女工抬出, 10 min 后送往医院。在送往医院途中 5~6 min, 2 名女工意识逐渐恢复, 后被送往大连市职业病院救治。诊断为急性混苯及汽油混合性中毒, 采用葡萄糖、维生素 C 对症治疗 20 余日, 症状好转相继出院。

2 现场劳动卫生学调查

消防水箱是一个 10 m×10 m×2 m 的铁箱, 位于顶楼一 40 m² 的房间内。水箱最高处距室顶 34~40 cm, 整个房间仅有一个 1 m×0.5 m 的小窗。防锈漆的稀释剂为松香水。作业现场无任何通风排毒设备, 也未使用任何个人防护用具。

当日下午 2 时许, 对该作业现场可能存在的职业病危害因素的浓度进行了模拟油漆作业 2 min 的检测(见表 1)。

表 1 作业现场环境中职业病危害因素浓度测定结果

地点	mg/m ³			
	苯	甲苯	二甲苯	汽油
水箱内	1 210	528	182	8 435
水箱内(模拟)	1 473	906	431	8 810
室内	9	5	未检出	48
室内(模拟)	57	44	26	282
国家卫生标准	40	100	100	350

3 中毒病例

于某, 女, 40 岁, 油漆工龄 19 年。事故发生当日, 作业 10 min 后即感头部不适、眼花, 随即晕倒, 失去知觉, 被工友发现后抬出置于室外空气新鲜处。十几分钟后意识逐渐恢复, 自觉头痛、头昏、恶心、呕吐, 呕吐物为少许胃内容物, 被送往大连市职业病院救治。入院后体检, 除头发、皮肤均可闻及较浓刺鼻的油漆味外未见其他阳性体征。实验室检查: 血常规中白细胞总数为 $9.9 \times 10^9/L$, 白细胞分类中中性粒细胞占 0.85、淋巴细胞占 0.14、嗜碱细胞占 0.04, 白细胞中查到中毒颗粒, 其他检查未见异常。根据现场检测及临床检查确诊为急性混合性毒物中毒, 另一油漆女工葛某情况与此基本相同。

4 讨论

从作业现场环境检测的结果可以看出, 苯、甲苯、二甲苯、汽油分别超过国家卫生标准 29~35.5、3~8、0.8~3、23~24 倍。这仅是在事故发生 6 h 后和模拟作业 2 min 的测定结果, 而实际作业现场有害物质浓度会更高, 因此本次事故主要是由混苯和汽油联合作用所引起的混合性中毒。水箱内和室内有害物质浓度相差悬殊, 作业现场无通风排毒设施, 自然通风极度不良, 加速了中毒事故的发生。另外, 作业人员未采用任何有效的防毒措施和使用有效的防毒用具, 缺乏应有的安全卫生常识和自我保护意识, 野蛮作业, 终酿苦果。因此, 加强有毒有害作业场所职业卫生工作的法治化管理, 增强企业负责人和作业人员的职业卫生和安全生产意识, 提高自我保护意识至关重要。