

低能离子束二次注入诱变石油微生物菌株的研究

陈争超^{1,2} 张祥胜³ 向廷生^{1,2} 王慧敏^{1,2}

¹ (长江大学油气资源与勘探技术教育部重点实验室 荆州 434023)

² (长江大学地球环境与水资源学院 荆州 434023)

³ (江苏省滩涂生物资源与环境保护重点实验室 盐城师范学院 盐城 224051)

摘要 研究二次低能离子束诱变对石油污染土壤中微生物原油降解能力及产表面活性剂能力的影响。选取经一次低能粒子束诱变筛选出的高效产表面活性剂降解菌 23A 作为出发菌株,对其进行第二次低能离子束注入诱变。二次诱变后可以产生降解原油效果更好的菌株,并且能降低表面张力,所筛选出的菌 23A-3,对原油的降解率比出发菌高 17.3%,产生的表面活性物质使表面张力低于出发菌 25%。结果表明:利用低能离子束对降解微生物进行二次诱变改良是可行的,对降解菌降解水平的进一步提高具有现实意义,同时也丰富了离子束生物工程学的技术路线。

关键词 石油微生物, 低能离子束, 生物表面活性剂, 石油污染土壤, 生物修复, 离子注入

中图分类号 TL99

随着石油工业的发展,石油在开采、运输和使用过程中的泄漏以及含油废弃物的排放引起的土壤污染问题日益严重。环境中的石油污染危害表现在土壤中对植物根系的损害,造成植物的死亡,石油的某些有害成分在粮食中形成积累,并进入食物链;同时污染地下水体,危害人类健康^[1-3]。因此,石油污染土壤的修复研究越来越受到人们的重视。在诸多石油污染土壤的治理方法中,微生物修复技术被公认为是治理石油污染的较好方法,特定的微生物在生长过程中会以石油作为营养物质,对其进行分解利用,产生无害的代谢产物。另外,微生物在生长代谢过程中也会产生表面活性物质,这种物质能进一步促进微生物对石油的分解,因此微生物修复技术以其工艺简单、成本低、效果好以及不引起二次污染等优点日益受到广泛关注^[4-7]。获得高效、广谱、稳定、适应性强的石油降解菌株是进行生物修复石油污染土壤的关键。因此,诱变改良选育出高效产表面活性剂降解菌的研究至关重要^[8]。低能离子束作为一种诱变源,具有损伤轻、突变率高、不易回复突变等优点^[9],已经广泛的应用于育种领域^[10-11]。本研究以低能离子束为诱变源,以表面张力和降解率为筛选指标对诱变菌种进行了诱变和筛选。

1 实验材料和方法

1.1 出发菌

降解菌 23A,由大庆油田污染土壤中分离出降解菌株 23,经低能离子束诱变(一次诱变)筛选出诱变菌 23A,该菌有较高的产表面活性剂和降解原油的能力。经生理生化以及 16SrDNA 分子鉴定,出发菌 23A 为革兰氏阴性杆状铜绿假单胞菌。

1.2 培养基

1.2.1 种子培养基 KH_2PO_4 1 g, Na_2HPO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g, NaNO_3 1 g, NH_4Cl 1.25 g, 牛肉膏 0.5 g, 蛋白胨 1.0 g, 酵母膏 1.0 g, 微量元素 5 mL, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.0—7.2。

1.2.2 肉胨培养基 牛肉膏 1.5 g, 蛋白胨 5 g, 酵母膏 0.05 g, NaCl 2.5 g, 琼脂粉 9 g, 蒸馏水 500 mL, pH 7.0。

1.2.3 无机盐培养基 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, K_2HPO_4 1.0 g, KH_2PO_4 1.0 g, NH_4NO_3 1.0 g, FeSO_4 0.05 g, CaCl_2 0.02 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.0—7.2。

1.2.4 降解摇瓶培养基 无机盐培养基+2 g 原油。

1.2.5 产表面活性剂培养基 无机盐培养基+13 g 葡萄糖。

国家自然科学基金(10905035)资助

第一作者:陈争超,男,1987年1月出生,2011年毕业于长江大学生命科学学院,现为长江大学地球环境与水资源学院在读硕士研究生,主要从事石油地质微生物及环境微生物学方面的研究

通讯作者:张祥胜, E-mail: yongshengzh@163.com

收稿日期:初稿 2013-04-07, 修回 2013-05-21

1.2.6 实验用油 大庆油田南 6-40-丙 619 井。

产表活培养基在 115℃,其他培养基在 121℃下灭菌 20 min。

1.3 样品处理及离子注入

1.3.1 样品制备 使用活化培养基将菌株 23A 活化培养 24 h,菌液用生理盐水稀释至相应倍数后,取 0.1 mL 涂布于 90 mm 平皿上,置超净工作台吹干。

1.3.2 离子束注入处理 离子注入在南京工业大学离子束生物工程实验室采用离子束生物工程装置进行。注入参数(从一次诱变时的注入参数中,根据致死率以及正突变率等数据选取的最佳注入参数):20 keV N^+ ,脉冲式注入,间隔 10 s,每个脉冲 30 个单位,每个单位注入剂量为 $2.5 \times 10^{13} / \text{cm}^2$,注入速度约为每秒 2 个单位,靶室真空度约为 10^{-2} Pa,束流 $400 \mu\text{A}^{[12]}$ 。注入剂量分别为 0(真空对照)、30、60、90、120、150 个单位,并做 3 个平行样。

1.3.3 存活率统计 注入完成后,立即用 1 mL 无菌水清洗平皿,稀释 100 倍后,取 0.1 mL 菌液涂于肉脔平板上,35℃培养 24 h,使用稀释平板计数法统计菌落数,各剂量处理均与空白对照组对比,求得相对存活率。存活率(%)=各处理剂量的总单菌落数/真空对照的总单菌落数 $\times 100$ 。

1.3.4 发酵液表面张力的测定 挑取真空对照和各剂量处理的单菌落,接于肉脔培养基斜面上,35℃培养 24 h 后保存于 4℃冰箱中备用;同时接于 10 mL 种子培养基中,135 r/min 转速于 35℃摇床培养 2 d;以 2%的接种量将发酵液接种于 25 mL 产表面活性剂液体培养基中,每个菌做 3 个平行,以相同条件培养 3 d,取各处理的产表活培养基发酵液,用表面张力计测定表面张力大小,取平均值。本实验所采用的是上海衡平仪器仪表厂生产的 BZY-1 型全自动表面张力仪。

1.3.5 突变率统计 把各剂量处理的发酵液表面张力值分别于真空对照组比较,统计出正突变效率(表面张力值比出发菌降低 $\geq 5.0\%$)。

1.3.6 石油降解率的测定 用石油醚对培养液中的残余油进行萃取(其中有 3 瓶培养液未接菌株,作为空白对照,用于数据的矫正,排除非生物降

解的原油烃消耗),再用活化后的颗粒状无水硫酸钠脱水,过滤后用旋转蒸发仪蒸干,转至预先衡重的小瓶中,采用重量法测定培养液中残余油含量,与对照培养液比较计算原油降解率。降解率的计算公式:

$$\text{降解率 } r = (m_1 - m_i) / m_1 \times 100\%$$

式中, m_1 为初始加入到培养基中的石油量, m_i 为培养 i 天后剩余的石油量^[13,14]。

1.3.7 最佳注入剂量 根据菌株的存活率和突变率确定最佳注入剂量。

2 结果和分析

2.1 最佳注入剂量的确定

在之前一次诱变中发现,随着辐射剂量的增加,生物体的存活率呈现“马鞍型”波动曲线^[15],如图 1 所示。二次诱变后,存活率没有明显表现出“马鞍型”波动曲线,但在整体上,随着注入剂量的增加,微生物的存活率呈下降趋势,并且二次诱变后的存活率明显高于一次诱变。这说明存活率曲线出现“马鞍型”需要满足一定的条件。经过一次注入后,菌体细胞对离子束注入产生了一定的抵抗能力,造成存活率明显高于一次诱变,并且呈现出不明显的“马鞍型”。

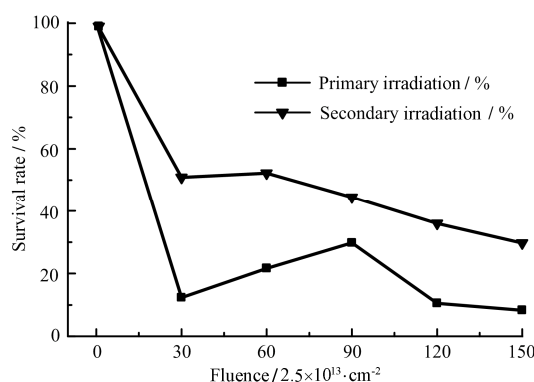


图 1 一次诱变和二次诱变后的存活率
Fig.1 Survival rate of primary and secondary mutation

二次诱变后,各注入剂量下的正突变率略高于一次诱变(见表 1)。正突变率在注入剂量为 90 个单位时达到最高值,而存活率为 44.5%,相对较高,所以,最佳照射剂量确定为 90 个单位,这与一次诱变时所选取的最佳照射剂量相同。

表 1 两次诱变后不同注量下的正突变率
Table 1 Positive mutation rate in different dose after inducing mutations twice

注量 / $2.5 \times 10^{13} \cdot \text{cm}^{-2}$ Fluence	一次诱变正突变率 / % Positive mutation rate of primary mutation	二次诱变正突变率 / % Positive mutation rate of secondary mutation
30	14.4	18.8
60	23.7	25.0
90	32.4	36.4
120	21.5	22.2
150	10.8	20.3

2.2 表面张力的比较

二次诱变后,将注入剂量为 90 的平板用无菌水冲洗,菌液稀释后涂于肉胨平板上,35℃培养 24 h 后,根据菌落的形态和是否产色素共挑去了 11 株不同的菌种 (23A-1—23A-11),培养并测定其各自发酵液的表面张力 (见图 2)。

二次诱变后挑取的菌种 23A-1 的表面张力最低,为 27.2 mN/m,而出发菌的表面张力为 37.6 mN/m,降低 27.7%,并且在挑取的 11 株中,有 8 株的表面张力低于出发菌,这说明对菌种进行二次诱变仍能获得使表面张力再次降低的菌种。

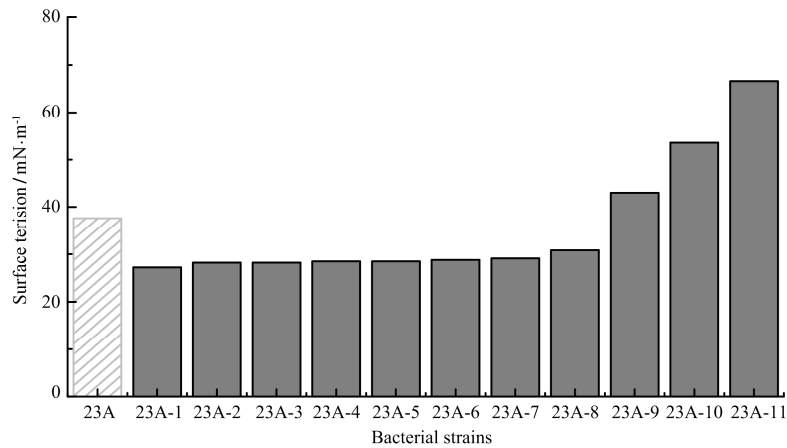


图 2 诱变菌株和出发菌株的表面张力
Fig.2 The surface tension of original strain and mutant strain

2.3 石油总烃降解率

将挑取的 11 个菌株进行原油降解实验,有 3 个菌株基本没有降解原油,其余 8 个菌株的原油降解率如图 3 所示。在所挑取的菌株中,菌 23A-3 的原油降解率高于出发菌,高出 17.3%,有两个菌株

的原油降解率远远低于出发菌。离子束诱变是不定向的,正突变和副突变均有,此次挑去的诱变菌具有一定的随机性,菌 23A-3 的出现有一定的偶然性,但符合离子束诱变的规律,它的出现也有一定的必然性。图 4 为微生物培养 7 d 后对原油的降解效果。

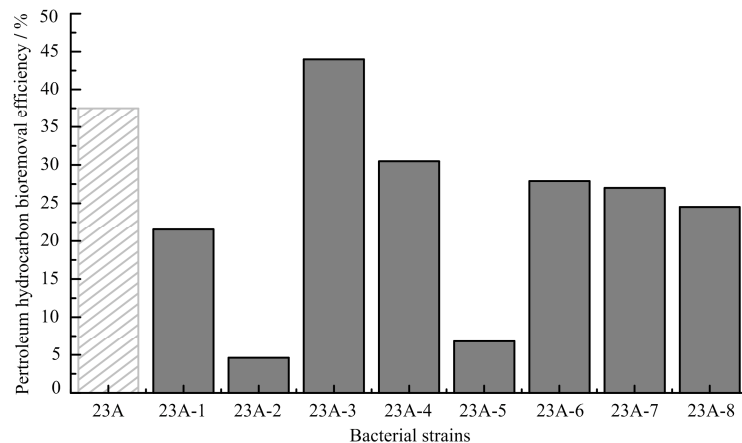


图 3 出发菌株和诱变菌株的石油总烃降解率
Fig.3 Bio-removal efficiency rate of total petroleum hydrocarbon of original strain and mutant strain

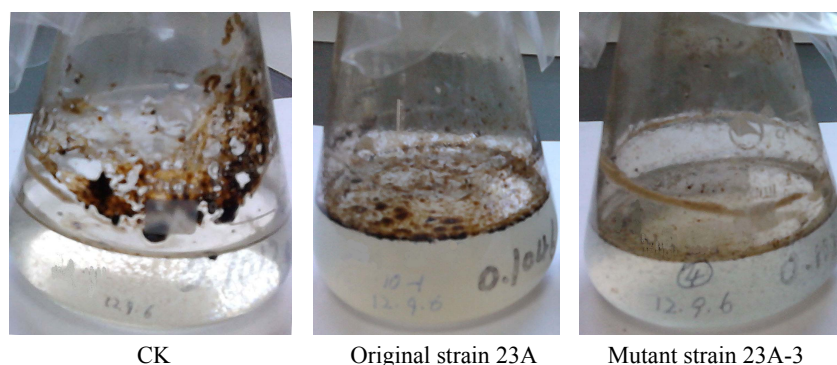


图4 摇瓶培养7天后的原油降解效果
Fig.4 Degradation of crude oil after 7 d incubation

3 结论

由于一次诱变的效果不够理想,本实验对离子束注入诱变选育得到产生物表面活性剂的高效石油降解菌进行第二次诱变,确定了二次注入的参数和最佳注入剂量。注入能量为 20 keV,在注入剂量为 90 个单位时,正突变率最高,存活率为 44.5%。二次诱变后微生物的存活率远远高于一次诱变。结果表明,二次诱变后能得到数量较多的高效产生物表面活性剂的菌种,其中筛选出的菌 23A-1 的表面张力最低,较出发菌降低达 27.7%,但是对原油的降解率低于出发菌。在原油降解试验中,菌 23A-3 表现出较高的原油降解效果,其高出出发菌 17.3%,且产生的表面活性物质使表面张力低于出发菌 25%,接近菌 23A-1。可以发现,在本研究中,诱变菌在产表面活性剂和烃降解能力方面表现并不一致,这也说明表面活性物质只能在一定程度上提高微生物对原油的降解率,而对降解率不起决定性作用。可见,利用低能离子束对烃降解微生物进行二次诱变改良是可行的,对烃降解菌降解水平的进一步提高具有现实意义,也为石油污染土壤的现场修复提供了优良的菌种和治理石油污染的新思路。

参考文献

- 1 谢丹平,尹华,彭辉. 石油降解菌株的分离及其降解特性研究[J]. 上海环境科学, 2003, 22(12): 951-954
XIE Danping, YI Hua, PENG Hui. Isolation and degrading characteristics of crude Oil-degrading microorganism [J]. Shanghai Environ Sci, 2003, 22(12): 951-954
- 2 刘文霞,孟祥元,冯建灿,等. 中原油田耕地污染分析[J]. 农业环境保护, 2002, 21(1): 56-59
LIU Wenxia, MENG Xiangyuan, FENG Jiancan, *et al.* Pollution of farmland soil by petroleum industry in the central plains oil field [J]. Agro Environ Prot, 2002, 21(1): 56-59
- 3 李嘉,魏涛,陆续武. 中原油田洒落原油对地下水污染研究[J]. 西安科技大学学报, 2006, 26(2): 196-200
LI Jia, WEI Tao, LU Xuwu. Pollution of groundwater by scattered oil in Zhongyuan oil field [J]. J Xian Univ Sci Technol, 2006, 26(2): 196-200
- 4 梁生康,王修林,汪卫东,等. 高效石油降解菌的筛选及其在油田废水深度处理中的应用[J]. 化工环保, 2004, 24(1): 41-46
LIANG Shengkang, WANG Xiulin, WANG Weidong, *et al.* Screening highly efficient petroleum-degrading bacteria and their application in advanced treatment of oil field wastewater [J]. Environ Protect Chem Ind, 2004, 24(1): 41-46
- 5 Carraway J W, Doyle J R. Innovative remedial action at a wood-treating superfund site [J]. Tappi J, 1991, 74(7): 113-118
- 6 孙清,陆秀君,梁成华. 土壤的石油污染研究进展[J]. 沈阳农业大学学报, 2002, 33(5): 390-393
SUN Qing, LU Xiujun, LIANG Chenghua. Progress on contamination of soils by petroleum [J]. J Shenyang Agric Univ, 2002, 33(5): 390-393
- 7 ZHANG Xiangsheng, XU Dejun, ZHU Chunyan, *et al.* Isolation and Identification of Biosurfactant Producing and Crude Oil Degrading Pseudomonas Aeruginosa Strains [J]. Chem Eng J, 2012, 209: 138-146
- 8 张祥胜,熊涛. 烃降解菌研究进展及低能离子束应用于诱变育种的设想 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(23): 10229-10231
ZHANG Xingsheng, XIONG Tao. Assumption of petroleum degrading microorganisms presumption in application of low energy ion beam on breeding [J]. J Anhui Agri Sci, 2007, 35(23): 10229-10231

- 9 余增亮. 离子束生物技术导论 [M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1998: 23
YU Zengliang. Introduction to ion beam biotechnology [M]. Hefei: Anhui Science and Technology Publishing House, 1998: 23
- 10 袁成凌, 姚建铭, 王纪, 等. 低能离子注入在花生四烯酸(AA)高产菌株选育中的研究[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2003, **21**(4): 237-242
YUAN Chengling, YAO Jianming, WANG Ji, *et al.* Breeding of arachidonic acid-producing strain by low-energy ion implantation [J]. J Radiat Res Radiat Process, 2003, **21**(4): 237-242
- 11 虞龙, 潘涛, 周剑. 氮离子注入柠檬酸生产菌的诱变选育[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2005, **23**(4): 233-236
YU Long, PAN Tao, ZHOU Jian. Breeding of citric acid-producing bacteria by 15 KeV N⁺ ion implantation [J]. J Radiat Res Radiat Process, 2005, **23**(4): 233-236
- 12 向廷生, 马飞, 张祥生. 低能离子诱变产表面活性剂的烃降解菌研究 [J]. 环境科学与技术, 2012, **35**(11): 41-45
XIANG Tingsheng, MA Fei, ZHANG Xiangsheng. Mutagenesis of a hydrocarbon degrading and biosurfactants-producing bacteria with low energy ions [J]. Env Sci Technol, 2012, **35**(11): 41-45
- 13 Mishra S, Tyot J, Kuhad R C, *et al.* Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, **67**(4): 1675-1681.
- 14 崔丽虹, 郭萍, 李宝明, 等. 石油烃降解菌的筛选与鉴定[J]. 生物技术通报, 2009(9): 143-147
CUI Lihong, GUO Ping, LI Baoming, *et al.* The screening and identification of toyal petroleum hydrocarbon degrading bacteria [J]. Biotechnol Bull, 2009(9): 143-147
- 15 余增亮, 邱励俭, 霍裕平. 离子注入生物效应及育种研究进展 [J]. 安徽农学院学报, 1991, **18**(4): 251-257
YU Zengliang, QIU Lijian, HUO Yuping. Progress in studies of biological effect and crop breeding induced by ion implantation [J]. J Anhui Agri Coll, 1991, **18**(4): 251-257

Secondary mutation of petroleum microbe with low-energy ion implantation

CHEN Zhengchao^{1,2} ZHANG Xiangsheng³ XIANG Tingsheng^{1,2} WANG Huimin^{1,2}

¹ (Key Laboratory of Petroleum Resource and Exploration Technology, Jingzho, 434023, China)

² (Department of Earth Environment and Water Resources, Yangtze University, Jingzhou 434023, China)

³ (Jiangsu Provincial Key Laboratory of Coastal Wetland Bioresources and Environmental Protection, College of Life Science and Technology, Yancheng Teachers University, Yancheng 224051, China)

ABSTRACT To study the effects of secondary mutation on the ability for degradation of petroleum hydrocarbon and producing biosurfactant, microorganism from the oil contaminated soil was implanted again with low-energy N⁺ ions. Mutant strain 23A, obtained after the primary mutation with the low-energy N⁺ which could efficiently degrade oil and produce biosurfactant, was implanted again with low-energy N⁺. Secondary mutant strain degrades oil better and reduces the surface tension of culture medium significantly. Compared with the original strain 23A, mutant strain 23A-3 increases the degradation rate of total petroleum hydrocarbon by 17.3% and decreases the surface tension of culture medium by 25%. The results indicate that the secondary mutation has great potential to gain more effective microorganism. It has practical significance to improve the level of petroleum degradation further, and can enrich the technical route of ion beam bioengineering.

KEYWORDS Petroleum microorganism, Low-energy ion beam, Biosurfactant, Petroleum-contaminated soil, Bioremediation, Ion implantation

CLC TL99