

$^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐射下海迪茨氏菌及其表面活性物质研究

周翔¹, 梁剑平¹, 李雪虎¹, 陆锡宏¹, 郭志廷², 郝宝成²

1. 中国科学院近代物理研究所, 兰州 730000

2. 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所, 兰州 730050

摘要 生物表面活性剂具备无毒、生物降解等优点, 这些特性尤其适合于石油的生物降黏、提高原油采收率、重油污染土壤的生物修复等。本文以一株在唯一碳源培养基中能产生胞外生物表面活性剂的海地茨开菌 (*Dietzia maris*) 为对象, 利用不同剂量 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐射该菌, 从大量突变株中筛选出一株正突变菌株 YR9。研究表明, 经 25Gy 剂量辐照至该菌突变率最佳, 生物表面活性剂产量达到 6336.45U/mL, 比未经诱变处理菌株提高了 2.25 倍, 能够完全降解 $n\text{-C}_5$ 、 $n\text{-C}_6$ 、 $n\text{-C}_{16}$ 、甲苯、喹啉、呋唑、邻二甲苯、对二甲苯、汽油、萘、邻苯二酚, 但对 $n\text{-C}_5$ 、萘降解力降低。分析了该菌产生物表面活性剂的理化性质, 对其产物进行了鉴定, 对产生生物表面活性剂的条件进行了优化研究。

关键词 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子; 辐射; *Dietzia maris* 菌; 生物降解能力

中图分类号 Q937

文献标识码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2012.12.001

Dietzia maris Induced by Carbon-ion Beams and Its Biodegradation Ability

ZHOU Xiang¹, LIANG Jianping¹, LI Xuehu¹, LU Xihong¹, GUO Zhiting², HAO Baocheng²

1. Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China

2. Institute of Animal Husbandry and Veterinary (Lanzhou), Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730050, China

Abstract Biosurfactants have the advantages of non-toxic, biodegradable, and these properties are particularly suitable for the biological viscosity reduction of oil, oil recovery enhancement, and the bioremediation of heavy oil polluted soil. By using *Dietzia maris* bacteria that are the only one could produce extracellular biosurfactants in the sole carbon source medium radiated by the different doses of $^{12}\text{C}^{6+}$ ion beam, a positive mutant strain YR9 is screened from the large number of mutants. The studies show that the best mutation rate of the bacteria is obtained with the 25Gy dose irradiation, resulting in surface active dose of 6336.45U/mL. Comparing with the strain without mutagenic treatment, the improvement of 2.65-fold is achieved; it almost able to completely degrade $n\text{-C}_5$, $n\text{-C}_6$, $n\text{-C}_{16}$, toluene, quinoline, carbazole, *o*-xylene, *p*-xylene, gasoline, naphthalene, catechol, however for $n\text{-C}_5$, naphthalene degradation is lower. The physical and chemical properties of the surface active agent produced by the bacteria are analyzed, its products are identified, and the condition produced surface active agent is optimized.

Keywords $^{12}\text{C}^{6+}$ ion; radiation; *Dietzia maris*; biodegradability

0 引言

石油污染土壤的生物强化修复能否成功, 首先取决于能否筛选和获得具有高降解能力的外源微生物。高降解能力的微生物可以通过辐射诱变获得^[1-2]。辐射诱变具有速度快的优

点, 可在短期内使微生物某些特性得到大幅度改良, 并可满足生产发展提出的新要求, 是目前应用广泛的一种主要育种技术^[3-4]。近年来, $^{12}\text{C}^{6+}$ 重离子作为新型诱变源, 通过对生物体系做不同方式处理, 可获得多种不同需求的突变体, 有利于

收稿日期: 2012-02-23; 修回日期: 2012-03-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (211105193); 中国博士后第 50 批面上项目 (2011M501484); 中国科学院近代物理研究所博士后基金项目 (Y161060ZY0)

作者简介: 周翔, 博士后, 研究方向为辐射生物诱变技术、环境修复技术, 电子邮箱: syannovich@gmail.com

拓宽突变谱,提高突变率,为辐射诱变研究注入了新的活力。

1998年,Bhagwat等^[9]利用 γ 射线外辐射诱变获得抗枯萎病的突变体。但如果将放射性物质(如 $\text{Co}60$ 等)注入生物体内进行内辐射诱变,容易造成污染,需要防护条件,而且被吸收的剂量也难以精确测定。2002年,Zinjarde等^[6]利用紫外线诱变微生物育种,由于化学反应的干扰,不能在蛋白胨肉汤等成分复杂的液体中进行;同时要有电磁搅拌设备,以求照射均匀,尤其在菌液浓度较大或菌体、孢子等较大而重时很容易在处理期间发生沉降。2011年,蔡兴旺等^[7]利用低能 N^+ 离子注入诱变选育 α -淀粉酶高产菌株。哺乳动物细胞在1Gy以下的辐照处理存在细胞超敏感性,使其辐射生物学效应不同于高于1Gy的辐照处理效应。但是被筛选出的BF7658菌株是否存在超敏感性、多少剂量的辐射处理才出现该效应、能否获得稳定高效突变菌株,还无从得知。

1997年,Hino等^[8]发现胞外多糖对石油烃降解起强化作用,用*Pseudomonas* sp. SLI和SLK降解石油烃过程中发现其分泌胞外多糖,并发现其强化作用。但胞外多糖对菌体细胞在环境中抵抗有毒物质侵害所起的作用尚不清楚。2002年,Streger等^[9]针对在微生物修复过程中,土壤多相复杂结构限制微生物迁移性的问题,使用*Hydrogenophaga flava* ENV735的黏附能力缺失的突变株*H. flava* ENV735:24,突变株由于细胞表面亲水性较强而具有较好的迁移能力。但遗憾的是,突变后的低黏性细菌在迁移性方面虽有所改善,但其对污染物的降解能力却有些减弱。2007年,刘春等^[10]对基因工程菌强化膜生物反应器工艺采用阿特拉津处理,取得了很好的效果。Charkrabarty^[11]发现降解芳烃、萜烯、多环芳烃和酯烃的细菌降解基因位于质粒上,利用基因工程的手段将多种质粒表达达到一种菌体内,构成所谓“超级细菌”,能同时降解4种石油组分,可消耗原油中约2/3的烃类。但对基因工程菌的使用,除考虑安全性、高效性等因素外,潜在的“生物风险”是必需考虑的问题。

分析可见,多年来该研究利用的诱变手段主要是基于传统的紫外线、X射线、 γ 射线、 N^+ 离子等常用的物理诱变源,由于这些诱变技术存在不可控制性、诱变谱狭窄、诱变能力低等缺点,因此传统诱变源展现出一定局限性。目前高降解能力菌的研究策略方面,大多研究着眼于培养方式的选择和选育生物技术的变化,对新型诱变源 $^{12}\text{C}^{6+}$ 重离子诱变技术与微生物分子生态学技术结合利用方面的关注尚较少。本文以1株由黄河沉积物中分离出的具有高降解能力的海地茨开菌(*Dietzia maris*)为出发菌株,对其进行 $^{12}\text{C}^{6+}$ 重离子不同低剂量辐射诱变处理,研究该菌产生的生物表面活性剂的理化性质,鉴定其产物,对其在石油烃降解过程中的作用进行初步探讨。

1 *Dietzia maris* 菌

Dietzia 属是1995年由Rainey等^[12]命名的新属,目前已

发现*Dietzia maris*等10个菌株种。*Dietzia maris*多分布在海洋沉积物、碱湖上覆水、盐矿沉积中,具有降解烷烃、降低水的表面张力、产生表面活性剂及排油等能力^[13]。在显微镜下观察为杆状、排列紧密、无鞭毛;菌落呈奶白色、菌落光滑并且均一、不透明;革兰氏染色阳性;能在TSA固体培养基和LB固体培养基中生长;最适生长温度为24—29℃^[14]。

2 材料与方法

2.1 材料与处理

(1) 所用实验菌株为实验室分离纯化得到、降解原油效果较好的海地茨氏菌属菌株(*Dietzia* sp., YR9)。

(2) 将该实验菌株置于盛有50mL无菌种子培养基的250mL三角瓶中,恒温振荡培养,于25℃培养60h得到种子液。以 10^{-2} — 10^{-3} 的稀释度,将菌体浓度稀释为 10^{-8} — 10^{-9} /mL,制成靶子悬液。

(3) 重离子辐照实验在重离子研究装置(HIRFL)TL2终端上进行。重离子束流为 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束,能量为80MeV,LET为35.5keV/ μm ,吸收剂量率1Gy/min,用空气电离室监测剂量。取制备的靶子悬液2mL,分别加入到无菌30mm皿中,用封口膜密封,于5,10,15,20,25,30Gy辐照剂量下处理,以未照射菌种作为对照^[15-16]。

(4) 初筛:将不同辐照剂量处理后的菌液,稀释后涂布于平板筛选培养基上,于27℃培养后,测定排油圈直径与菌落直径之比(*H/C*),根据比值大小初步衡量该菌种产生物表面活性剂能力的高低。

(5) 复筛:接1环初筛菌种于种子培养基中,于恒温振荡培养箱200r/min,27℃培养60h得到种子液,按6%接种量接入发酵培养基,27℃恒温振荡培养96h,培养液抽滤后,进行生物表面活性剂的提取和纯化。

(6) 将抽滤后的培养液再接种至发酵培养液中,培养约4d,发酵液离心(1500r/min,30min)去除菌体后,用6mol/L的HCl调pH值至2.0以下,4℃过夜,离心收集沉淀,冷冻干燥,沉淀用 NaHCO_3 溶解,离心去除非溶物,再用2倍体积预冷的氯仿:甲醇(2:1)分多次进行萃取,收集萃取液,蒸发干燥,得到表面活性物质的纯化提取物^[17]。

2.2 表面活性物质分析

采用气相色谱-质谱联用(GC-MS)法,结合固相萃取(SPE)前处理技术,依据保留时间和特征离子丰度比,对表面活性物质的纯化提取物分子质量和结构信息进行确证,分析时间在13.50min之内显示了分子质量为 $m/z [\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2]^+=284.27$ (图1、图2)。

3 结果与分析

3.1 $^{12}\text{C}^{6+}$ 重离子辐照处理后菌株的致死率

出发菌株的重离子处理剂量为5,10,15,20,25,30Gy,不同剂量重离子处理后,测定其致死率。结果显示,重离子辐照

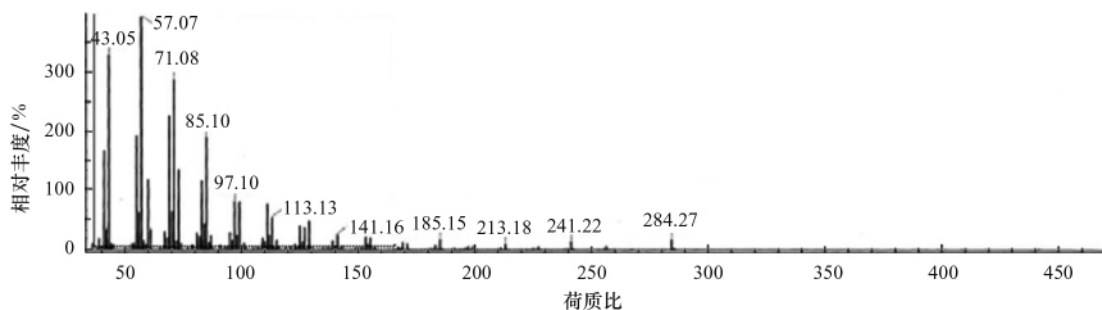


图 1 表面活性物质的纯化提取物分子质量

Fig. 1 Molecular mass of biosurfactants purified extract

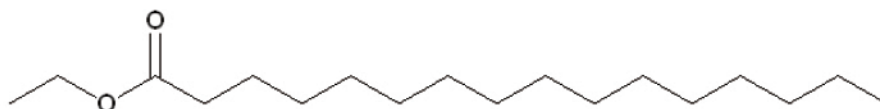


图 2 表面活性物质的纯化提取物分子化学结构

Fig. 2 Molecular chemical structure of biosurfactants purified extract

处理对菌株的作用效果非常明显。随着辐照剂量的增加,其致死率逐渐增大,但不存在线性关系。将产生的生物表面活性剂性能在出发菌株 90% 及以下、99% 及以上为负突变株,90%—99% 之间为正突变株。结果表明,不同剂量 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束处理菌株后,以 25Gy 辐射剂量的突变效果最佳。

3.2 突变菌株的选育

初筛使用以原油为碳源的平板,采用稀释涂布法进行,复筛采用摇瓶发酵法进行,发酵后测定发酵液表面活性物质活力。将原菌株进行重离子辐照处理,共筛选出 18 株相对产生生物表面活性剂较高的菌株。其中 *Dietzia* sp., YR9 菌株产生生物表面活性剂的能力最高且稳定,排油圈 H/C 为 0.36,生物表面活性剂的活力达到 6336.45U/mL,较原菌株提高了 2.25 倍。采用原油平板稀释涂布法筛选菌株,培养 9,90d 后得到的菌落形态及排油圈分别如图 3(a)、3(b)所示。菌落直径在 0.3—1.5cm,颜色为红色略黄,湿润、隆起、多为圆形、边缘不规则,菌落周围为排油圈。

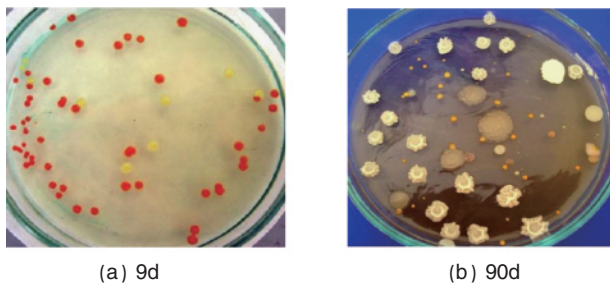


图 3 培养 9,90d 后得到的菌落形态

Fig. 3 Colony morphology cultured for nine days and 90 days later

3.3 YR9 菌株的表面活性剂对石油中烷烃的降解

以体积分数 2% 接种量,将经 25Gy 剂量辐射处理后,筛

选得到的 YR9 菌株接入石油培养基中,于 30℃、180r/min 下培养 48h,以未经辐照菌作为对照,测定 YR9 菌株的表面活性剂对石油中烷烃的降解。培养结束后,在 25mL 石油培养基中,加入 5mL 正己烷及用正己烷溶解的 10000mg/L 菲 25μL 内标,充分振荡溶解石油。然后倒入 50mL 离心管中,于 4℃、1200r/min 离心 5min,取上清液用正己烷重复萃取 2 次,合并萃取液定容至 25mL,然后取 1μL 上清液进行 GC 测定。气相色谱仪为 HP 5890,色谱柱为 HP-5。色谱条件:80℃ 保持 5min,3℃/min 升至 165℃,保持 2min,再以 5℃/min 升至 270℃,保持 10min。进样口温度 250℃,检测器温度 280℃。

从图 4 可看出,YR9 菌株所产生的表面活性剂能降解石油中 C_{13} — C_{32} 正构烷烃,除了对 C_{17} 、 C_{18} 正构烷烃降解率较低外,对其余烷烃,甚至超长链烷烃均有较高的降解效率。

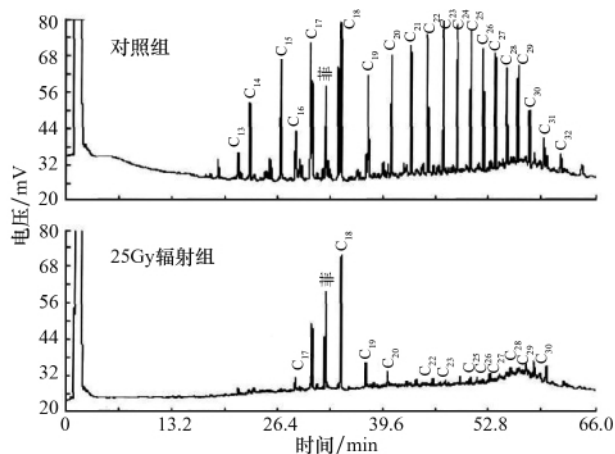


图 4 GC 测定 YR9 菌株的表面活性剂对石油中烷烃的降解

Fig. 4 GC determination of YR9 strains surfactants degrading petroleum alkenes

表 2 诱变菌株 YR9 遗传稳定性实验结果
Table 2 Experimental results of genetic stability for
the mutagenic the strains YR9

菌株代数	表面活性剂 最高产量 /(U·mL ⁻¹)	表面活性剂 累积达最大值 时间/h	表面活性剂 活力累积 保持率/%
1	6336.45	120	100
2	6231.26	120	98.34
3	6112.14	120	96.46
4	5892.89	120	93.56
5	5744.63	120	90.66
6	5470.26	120	86.33
7	5360.64	120	84.60

4 结论

(1) 从黄河沉积物中,分离出 1 株产生物表面活性剂的石油高降解 *Dietzia maris* 菌株,利用气相色谱/质谱(GC/MS)法分析确定了其分子量为: m/z [C₁₈H₃₆O₂]⁺=284.27,*Dietzia maris* 菌株所产生物表面活性剂为蜡酯类。¹²C⁶⁺离子束辐照处理后选育到诱变菌株 YR9,实验结果表明,经 25Gy 为辐照剂量诱变后菌株产生物表面活性剂量最佳。

(2) 诱变菌株 YR9 几乎完全能够降解 *n*-C₅、*n*-C₆、*n*-C₁₆、甲苯、喹啉、呋唑、邻二甲苯、对二甲苯、汽油、萘、邻苯二酚,但对 *n*-C₅、萘降解力降低。

(3) 诱变菌株 YR9 产生物表面活性剂能力较强,使培养液的表面张力值由最初的 68.3mN/m 下降至 28.6mN/m,实验结果表明 24h 为菌株培养优化条件的培养时间。

(4) 诱变菌株 YR9 种龄 60h 的种子培养基,接入已优化的培养基,其生物表面活性剂量最佳为:6336.45U/mL;而接种量 6% 的诱变菌株 YR9 产生物表面活性剂量最佳,为 5744.63U/mL。通过遗传稳定性传代 7 代实验,其生物表面活性剂活力保持在 85%。

(5) 对生物表面活性剂产生菌株 *Dietzia maris* 进行重离子辐照诱变,发现菌株的致死率随着辐照剂量的增加而增大,但不存在线性关系。出发菌株产生物表面活性剂量为 3227.346U/mL,经 ¹²C⁶⁺离子束 25Gy 辐照诱变处理,筛选出生物表面活性剂高产突变菌株 YR9,其产生物表面活性剂量达到 6336.45U/mL,比出发菌株提高了 2.25 倍。本研究结果证实,¹²C⁶⁺离子束辐射 *Dietzia maris* 菌对其产生的生物表面活性剂性能产生一定影响这一生物诱变效应。

参考文献 (References)

[1] Power H R, Schmidt R A, Snow G A. Current status and management of fusiform rust on Southern pine [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 1981, 19: 353–371.
[2] 姚德明, 许华夏, 张海荣. 石油污染土壤生物修复过程中微生物生态

研究[J]. *生态学杂志*, 2002, 21(1): 26–28.
Yao Deming, Xu Huaxia, Zhang Hairong. *Chinese Journal of Ecology*, 2002, 21(1): 26–28.
[3] Mana C S, Busalmen J P, Sanchez S R. Hydrocarbon bioremediation of a mineral–base contaminated waste from crude oil extraction by indigenous bacteria [J]. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2001, 47 (4): 233–238.
[4] 周双飞, 蒲万芬, 吴凯, 等. 石油降解微生物的物理化学诱变育种研究 [J]. *油田化学*, 2009, 26(3): 328–331.
Zhou Shuangfei, Pu Wanfe, Wu Kai, et al. *Oilfield Chemistry*, 2009, 26 (3): 328–331.
[5] Bhagwat B, Duncan E J. Mutation breeding of banana cv. Highgate (*Musa* spp., AAA group) for tolerance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* using chemical mutagens[J]. *Scientia Horticulturae*, 1998, 73(1): 11–22.
[6] Zinjarde S S, Pant A A. Hydrocarbon degraders from tropical marine environments[J]. *Division of Biochemical Sciences*, 2002, 44(3): 118–121.
[7] 蔡兴旺, 杜连祥, 路福平. N⁺离子注入诱变选育耐酸性 α-淀粉酶高产菌株[J]. *原子能科学技术*, 2011, 45(4): 469–473.
Cai Xinwang, Du Lianxiang, Lu Fuping. *Atomic Energy Science and Technology*, 2011, 45(4): 469–473.
[8] Hino S, Watanabe K, Tatkahashi N. Isolation and characterization of slime –producing bacteria capable of utilizing petroleum hydrocarbons as a sole carbon source [J]. *Journal of fermentation and Bioengineering*, 1997, 84: 528–531.
[9] Streger S H, Vainberg S, Dong H, et al. Enhancing transport of *Hydrogenophaga flava* ENV735 for bioaugmentation of aquifers contaminated with methyl tert–butyl ether[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68: 5571–5579.
[10] 刘春, 黄霞, 孙炜, 等. 基因工程菌生物强化 MBR 工艺处理阿特拉津试验研究[J]. *环境科学*, 2007, 28(2): 417–421.
Liu Chun, Huang Xia, Sun Wei, et al. *Chinese Journal of Environmental Science*, 2007, 28(2): 417–421.
[11] Chakrabarty A M. Crossing species boundaries and making human–nonhuman hybrids [J]. *Moral American Journal of Bioethics*, 2003, 3(3): 20–21.
[12] Rainey F A, Klatte S. *Dietzia*, a new genus including *Dietzia maris* comb. nov[J]. *Syst Bacteriol*, 1995, 45: 32–36.
[13] 陈义光, 李汇明, 李沁元, 等. 一平浪盐矿古老岩沉积中可培养细菌的系统发育多样性研究[J]. *微生物学报*, 2007, 47(4): 571–577.
Chen Yiguang, Li Huiming, Li Qinyuan, et al. *Acta Microbiological Sinica*, 2007, 47(4): 571–577.
[14] Erin A G, William F, Paul R J. Phylogenetic diversity of gram–positive bacteria cultured form marine sediment [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(10): 3272–3282.
[15] 曲颖, 李文建, 周利斌, 等. 重离子辐射植物的诱变效应研究[J]. *原子核物理评论*, 2007, 24(4): 294–298.
Qu Ying, Li Wenjian, Zhou Libing, et al. *Nuclear Physics Review*, 2007, 24(4): 294–298.
[16] Zheng C. Hadron physics programs at HIRFL–CSRm: Plan and status[J]. *High Energy Physics and Nuclear Physics*, 2007, 31(12): 1177–1180.
[17] Thaniyavarn J, Chongchin A, Wanitsuksombut N, et al. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* A41 using palm oil as carbon source[J]. *Journal of General and Applied Microbiology*, 2006, 52: 215–222.

(责任编辑 陈广仁)