

油田采出水石油烃降解菌分离、鉴定及高通量 选育复合诱变菌株

杜茂林¹ 付瑞敏^{1,2} 谷亚楠¹ 薛婷婷¹ 吕睿³ 陈五岭^{1*}

(1. 西北大学 生命科学学院 陕西 西安 710069)

(2. 河南教育学院 人口与生命科学系 河南 郑州 450046)

(3. 陕西省微生物研究所 陕西 西安 710069)

摘要:【目的】为解决石油烃类物质(Total petroleum hydrocarbons, TPHs)引起的环境污染问题,提高野生型菌株对 TPHs 的降解率。【方法】基于微生物修复技术,通过富集培养、初筛和复筛从油田采出水中分离 TPHs 优势降解菌株,经形态学、生理生化以及 16S rRNA 基因序列分析确定其种属。采用紫外线与等离子体复合诱变技术,以 96 孔板发酵法替代摇瓶培养发酵,采用以多功能酶标仪双波长紫外光谱法测定为基础的高通量筛选方法选育 TPHs 高效降解菌株,并通过方差分析检验突变株的遗传稳定性。【结果】经鉴定,分离自采出水的野生型菌株 PW04 为多食鞘氨醇杆菌(*Sphingobacterium multivorum*)。通过复合诱变获得了 3 株能够高效降解 TPHs 的突变菌株: *S. multivorum* PW04-H10、*S. multivorum* PW04-G9、*S. multivorum* PW04-A6,降解率分别为 85.1%、82.7%、82.9%。遗传稳定性分析结果表明这 3 株菌遗传性能均稳定。【结论】经分离、诱变选育出的 TPHs 高效降解菌株其降解率最高达 85.1%,与野生型菌株相比提高了 48%,可显著降低环境中 TPHs 含量,有效修复原油污染环境。

关键词: 石油烃降解菌, 分离鉴定, 紫外线, 等离子体, 复合诱变, 高通量筛选

Isolation, identification and breeding of petroleum-degrading bacteria in oilfield produced water by UV-plasma complex mutagenesis

DU Mao-Lin¹ FU Rui-Min^{1,2} GU Ya-Nan¹ XUE Ting-Ting¹ LÜ Rui³
CHEN Wu-Ling^{1*}

(1. The College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an, Shaanxi 710069, China)

(2. Population and Life Department, Henan Institute of Education, Zhengzhou, Henan 450046, China)

(3. Microbiology Institute of Shaanxi, Xi'an, Shaanxi 710069, China)

Abstract: [Objective] In order to solve the environmental pollution problem caused by total petroleum hydrocarbons (TPHs), the wild type strains' degradation rate of TPHs was enhanced in this

基金项目: 陕西省重大科技创新项目(No. 2009ZKC04-16); 河南省科技攻关重点项目(No. 122102310171)

*通讯作者: Tel: 86-29-88303700; ✉: wuling.chen@263.net

收稿日期: 2015-01-09; 接受日期: 2015-03-16; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-03-19

study. **[Methods]** Based on bioremediation technique, the strains, which can degrade TPHs effectively, were isolated from the oilfield produced water and selected out by enrichment culture, prescreening and rescreening. Then, the strains were identified through morphological, physiological, biochemical, and phylogenetic (16S rRNA gene) characterization. In order to obtain highly efficient TPHs-degrading strains, after being mutated by UV-plasma and 96-pore plate fermentation, the isolated strains were screened by high-throughput screening method, with the use of multi-functional microplate reader based on the dual wavelength ultraviolet spectrum. At last, the mutants' hereditary stability was tested by analysis of variance. **[Results]** The wild strain PW04, which was isolated from produced water, was identified as *Sphingobacterium multivorum*. After the compound mutation, three highly efficient TPHs-degrading strains (*S. multivorum* PW04-H10, *S. multivorum* PW04-G9 and *S. multivorum* PW04-A6) were obtained, which the degradation rate of TPHs can reach to 85.1%, 82.7% and 82.9% respectively. As was shown in the result of hereditary stability analysis, the three mutants all had stable genetic stability. **[Conclusion]** Through the isolation and mutation breeding, the TPHs degradation rate of the highly efficient TPHs-degrading strain reached to 85.1%, increased by 48% compared with wild type strains. The highly efficient TPHs-degrading strain can reduce the TPHs contents in the environment significantly and restore the oil-contaminated environment effectively.

Keywords: Oil-degrading bacterium, Isolation and identification, UV radiation, Plasma, Complex mutagenesis, High-throughput screening

由于石油开采、运输和使用过程中的污染、泄漏以及含油污水、钻井废弃液的肆意排放,石油烃类物质(Total petroleum hydrocarbons, TPHs)引起的污染已对人体健康和生态环境造成了巨大危害,并已成为一项世界性环境污染难题^[1]。石油污染环境的修复研究越来越受到人们的重视,目前针对 TPHs 污染环境的修复主要包括物理方法(如吸附法、超声波分离法、气浮法)、化学方法(如氧化法和破乳法等)以及生物修复法。其中微生物修复技术由于具有处理费用低、操作简单、无二次污染等优点而被公认为具有广阔的应用前景^[2]。如何获得高效、广谱、稳定、适应性强的 TPHs 降解菌是微生物技术修复石油污染环境的关键。据报道,自然界中已知的能够降解石油污染物的微生物菌群达二百多种,TPHs 降解率最高达 47%^[3-6]。野生型菌株对 TPHs 降解普遍存在作用周期较长、降解效率低等问题,故采用高新技术选育出具有高代谢能力的 TPHs 降解菌具有重要的现实意义。

目前针对 TPHs 高效降解菌株的选育主要采用传统的物理诱变(X 射线、He-Ne 激光、紫外线)、化学诱变(LiCl、亚硝基胍、碱基类似物)或者两者

相结合的方式,这些诱变方法通常存在毒性强、效率低、工作量大等不足。等离子体诱变是近年来新兴的一种高效率诱变技术,具有操作简便、条件温和、安全性高、诱变快速、突变率高等特点,可以大大提高菌种突变的强度和突变库容量^[7-9]。将等离子体与紫外线复合使用,既可克服紫外线单独诱变时负突变率高、子代生长缓慢的缺点,又可避免单一诱变所产生的诱变饱和和效应,再结合多功能酶标仪高通量筛选技术,能够有效弥补常规诱变育种的不足^[10-11]。

为获得遗传性状稳定的 TPHs 高效降解菌株,本研究从国内主要油田采出水分离野生型 TPHs 优势降解菌,并对其进行紫外线与等离子体复合诱变,然后通过 96 孔板发酵法替代摇瓶培养法,结合酶标仪紫外双波长光谱法快速测定 TPHs 含量,建立一种高通量筛选 TPHs 降解菌株的新方法。本研究结果将为今后石油烃污染环境修复菌种的大规模选育及进一步应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 样品及试剂

采出水样品取自国内各主要油田(大庆油田、长

庆油田、新疆油田、辽河油田、中原油田)的不同采出水处理站,样品取回后 4 °C 保存;原油样品由长庆油田采油三厂提供。

配置微生物分离纯化常用培养基所需试剂及提取、检测用试剂皆为国产分析纯。

1.2 培养基

无机盐培养基(g/L): CuCl₂ 0.000 5, FeSO₄ 0.005, ZnCl₂ 0.005, MnCl₂·4H₂O 0.05, CaCl₂ 0.02, K₂HPO₄ 4.0, KH₂PO₄ 0.5, MgSO₄·7H₂O 1.0, NaCl 1.0, 无菌水 1 L, 用 4 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.5。

石油烃降解培养基: 在无机盐培养基中加入灭菌(1×10^5 Pa, 20 min)的原油至终浓度为 100 mg/L。固体培养基加入 1.5%琼脂。

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 氯化钠 10, 酵母提取物 5, 加水至 1 L, NaOH 调整 pH 为 7.4–7.6, 高压蒸汽灭菌(1×10^5 Pa, 20 min)后使用。固体培养基需加入 1.5%琼脂。

1.3 检测方法

1.3.1 菌数检测及致死率计算: 菌数检测采用活菌平板菌落计数法以及血球计数板计数法: 致死率(%)=(诱变前总菌数-诱变后总菌数)×100/诱变前总菌数。

1.3.2 TPHs 含量测定: (1) 酶标仪双波长紫外光谱法。孔板发酵中 TPHs 含量的测定利用 BioTek 公司 Synergy 2 型多功能酶标仪简化的双波长紫外光谱法完成, TPHs 中带有 C=C 共轭双键的有机化合物在紫外区 215–230 nm 处有特征吸收, 而含有简单非共轭双键和具有 n 电子的生色基团有机化合物在 250–300 nm 范围内有较强吸收带, 吸收强度与特殊键化合物含量成正比例。TPHs 紫外光谱的特征峰值一般位于 225 nm 及 254 nm 处。以石油醚为萃取剂(石油醚:发酵液=1:2, 体积比), 根据 225 nm 和 254 nm 双波长下吸光度差值确定 TPHs 含量^[12]。

(2) 红外光谱法。TPHs 含量的红外光谱法测定参照 HJ/T 637-2012^[13]。利用四氯化碳萃取样品中的 TPHs (四氯化碳:发酵液=2:3, 体积比), 并使

其通过含硅胶填料(40 μm, 60 Å pores) 0.5 g 的固相提取小柱, 四氯化碳冲洗。将经硅胶吸附后的萃取液转移至 4 cm 比色皿中, 以四氯化碳作为参比溶液, 于 2 930、2 960、3 030 cm⁻¹ 处测量其吸光度 A_{2 930}、A_{2 960}、A_{3 030}, 与标准样品对比计算 TPHs 的浓度。

1.4 菌株分离

取油田采出水样品各 1 mL 分别加入到装有 49 mL LB 培养基的摇瓶中, 35 °C、180 r/min 富集培养 48 h, 检测菌体数量的变化。当菌体浓度达到 10⁷ CFU/mL 左右时, 将 0.1 mL 菌悬液稀释涂布于石油烃降解平板培养基初筛, 35 °C 恒温培养 48 h, 选择在石油烃平板培养基上透明圈明显、生长茁壮的单菌落接入装有 50 mL 石油烃降解液体培养基摇瓶中复筛(每株菌接 3 摇瓶), 35 °C、180 r/min 培养 72 h, 红外光谱法检测发酵液中 TPHs 含量, 计算 TPHs 降解率, 将降解率最高的菌株分离保存备用。

1.5 菌株鉴定

菌株的形态学鉴定参照《常见细菌系统鉴定手册》^[14], 培养 24 h 后观察菌落形态。生理生化鉴定利用 BioMerieux 公司全自动微生物分析仪(Vitek 2 Compact)及其配套的革兰氏阴性菌鉴定卡 GN 分析完成。分子生物学鉴定利用通用引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 1492R: 5'-TACGCTACCTTACGACTT-3'对菌株 PW04 的 16S rRNA 基因序列进行 PCR 扩增, 100 μL PCR 反应体系分装两管: 10×缓冲液 10 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 6 μL, dNTPs (10 mmol/L) 2.5 μL, DNA 模板 (20–50 ng/L) 2 μL, 引物(10 μmol/L)各 1.5 μL, 双蒸水 70 μL。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 50 s, 52 °C 50 s, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。引物合成以及 PCR 产物的纯化和测序由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。利用 BLAST 将菌株的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 数据库中已知的序列进行比较, 并采用 MEGA 5.05 软件构建系统发育树^[15]。

1.6 紫外线-等离子体复合诱变

1.6.1 菌悬液制备: 将菌株 PW04 接种于 LB 液体培养基中, 35 °C 培养至对数生长期, 1 000×g 离心 15 min 收集菌体, 用无菌生理盐水洗涤 2 次后制成菌悬液。血球计数板计数并调节菌体浓度为 1.0×10^7 /mL 左右备用。

1.6.2 紫外线诱变: 取对数生长期菌悬液 5 mL, 转入直径 9 cm 的培养皿中, 磁力搅拌。紫外灯(功率 15 W, 照射距 35 cm)分别照射 1、2、3、4、5、6、7 min。取诱变后菌悬液 0.1 mL 稀释涂平板, 以不经诱变的菌悬液为对照, 培养 48 h 计算致死率。

1.6.3 紫外线-等离子体复合诱变: 取对数生长期菌悬液 5 mL 于紫外灯下照射 2 min 红光下取 0.2 mL 均匀涂布于无菌平皿中, 无菌风吹干形成菌膜, 镜检无细胞重叠, 以氦气为工作气体, 气流量设定为 10 L/min, 作用距离 3.0 mm, 作用功率 120 W 的等离子体射线辐照处理^[16-17], 处理时间分别设定为 10、20、30、40、50、60、70 s。将经过不同辐照时间处理的菌株以 2 mL 无菌生理盐水洗脱制成菌悬液。以未经诱变的菌株为对照, 稀释涂平板, 培养 48 h, 计算致死率。

1.7 孔板培养

取经复合诱变的菌悬液 0.1 mL, 涂布于 LB 平板上, 根据生长菌落的圆整和丰满度挑取一定数量的菌株转接到 96 孔种子孔板 种子孔板装有 100 μ L 的 LB 液体培养基。对照孔接入未经诱变菌株, 于

35 °C、180 r/min 的恒温摇床培养 48 h 后转入发酵孔板培养。发酵孔板装有 700 μ L 石油降解培养基, 接种量为 10% 于 35 °C、180 r/min 振荡培养 72 h^[18]。

1.8 高通量检测

将发酵孔板置于孔板离心机中 1 000×g 离心 30 min; 取上清液 200 μ L 加入空白孔板中, 另加入 100 μ L 石油醚, 35 °C 恒温摇床中 180 r/min 振荡 10 min 后, 每孔移取 200 μ L 加入酶标板中, 利用多功能酶标仪检测 225 nm 和 254 nm 下的吸光值差, 计算发酵孔板中 TPHs 含量。

1.9 摇瓶培养及遗传稳定性测定

由高通量筛选得到 TPHs 高效降解菌, 为了保证其遗传稳定性, 将其连续传代 5 次, 每次传代后经种子摇瓶和发酵摇瓶培养, 并测定发酵液中 TPHs 含量。种子摇瓶装液量 50 mL, 于 35 °C、180 r/min 的恒温摇床中培养 48 h; 发酵摇瓶装液量 100 mL, 接种量 10%, 35 °C、180 r/min 培养 72 h。红外光谱法测定 TPHs 含量。

2 结果与分析

2.1 菌株分离

从石油降解平板上挑取透明圈大、生长茁壮的单菌落, 将其分别接入石油降解摇瓶中, 计算其 TPHs 降解率结果如表 1 所示。所分离的菌株对 TPHs 降解率平均为 46.6% 降解率最高可达 57.5%, 选取 TPHs 降解率最高的菌株 PW04 保存备用。

表 1 分离菌株石油烃降解率结果
Table 1 The results of TPHs-degrading rate on isolated strain

菌株编号 Strain number	菌株来源 Isolate source	石油烃含量 TPHs content (mg/L)	石油烃降解率 TPHs-degrading rate (%)
PW01	长庆油田	49.1±1.6	50.1
PW02	长庆油田	60.2±1.1	39.8
PW03	辽河油田	54.7±1.8	45.3
PW04	新疆油田	42.5±0.7	57.5
PW05	中原油田	49.8±1.5	50.2
PW06	大庆油田	56.4±0.7	43.6
PW07	新疆油田	59.1±0.6	40.6

2.2 菌株鉴定结果

菌株PW04在LB培养基中生长时菌落呈乳白色，圆形，凸起，边缘整齐，大小约为(0.8–1.0) μm×(2.0–3.0) μm，革兰氏染色阴性，菌体呈梭棒形。利用全自动微生物分析仪检测菌株PW04生化实验详情如表2所示，菌株PW04与多食鞘氨醇杆菌(*Sphingobacterium multivorum*)典型生化谱相似度达95%。以16S rRNA基因序列一致性为基础构建相关种属细菌在内的系统发育树，结果如图1所示，菌株PW04与*Sphingobacterium multivorum* NBRC14947相似性高达100%。综上所述，由油田采出水中筛选的石油烃优势降解菌PW04可以确定为多食鞘氨醇杆菌(*Sphingobacterium multivorum*)。

2.3 紫外线-等离子体复合诱变选育

2.3.1 紫外线诱变选育：*S. multivorum* PW04菌悬液经不同时间紫外线照射致死率如图2所示。随着照射时间的延长，致死率增加，7 min时全部致死。由于紫外线有较强的杀菌能力，诱变时间短，致死率低时正突变率不高，但是如果诱变时间过长，部分高活性菌株也可能致死，工业诱变育种过程中一般将紫外线致死率控制在60%–80%之间，可保证

菌体发生最大程度的突变。菌株*S. multivorum* PW04辐照2 min时致死率在80%左右，因此选取2 min为紫外诱变处理时间。

表2 生化实验结果					
Table 2 The results of biochemical experiment					
反应型	结果	反应型	结果	反应型	结果
Reaction type	Results	Reaction type	Results	Reaction type	Results
APPA	+	PyrA	+	dCEL	+
H2S	–	AGLTp	+	GGT	–
BGLU	+	dMAN	–	BXYL	+
ProA	–	PLE	+	URE	–
SAC	+	dTRE	+	MNT	–
ILATk	–	SUCT	–	AGAL	+
GlyA	–	LDC	–	CMT	–
O129R	+	IMLTa	–	ILATa	–
ADO	–	IARL	–	BGAL	+
BNAG	+	dGLU	+	OFF	–
dMAL	+	dMNE	+	BAlap	–
LIP	–	TyrA	+	dSOR	–
dTAG	–	CIT	–	5KG	–
AGLU	+	NAGA	+	PHOS	+
ODC	–	IHISa	–	BGUR	+
GGAA	+	ELLM	–		

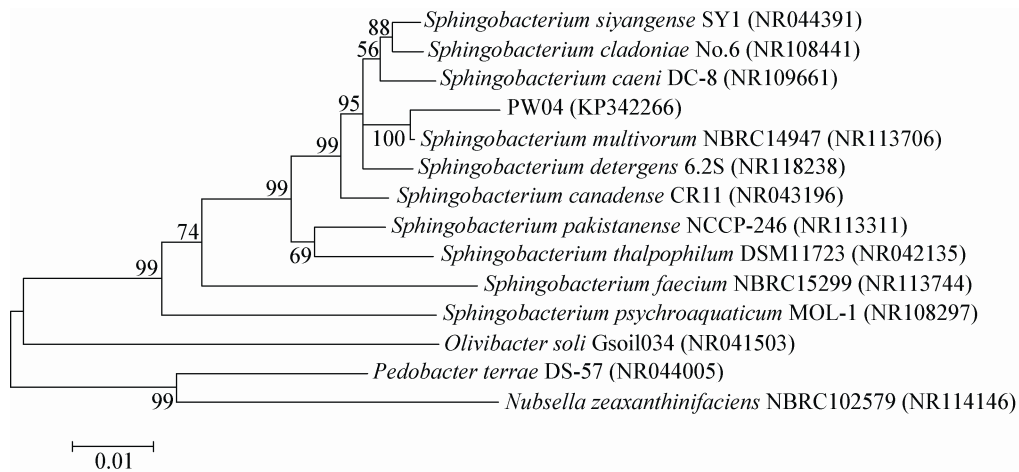


图1 基于16S rRNA基因序列同源性的菌株PW04系统发育树状图

Figure 1 Phylogenetic tree showing the relationship of strains PW04 on 16S rRNA gene sequence

注：括号中的序号代表菌株的GenBank登录号；分支点上的数字代表计算1 000次聚类到一起的几率；标尺刻度代表1%的序列差异。

Note: The sequence number in the bracket means the GenBank accession number of the strain. The number at the node means the percentage of occurrence in 1 000 boot-straped trees. The scale bar means 1% sequence difference.

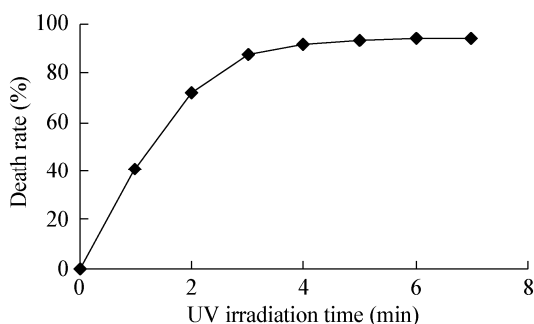


图2 紫外线诱变菌体致死率曲线

Figure 2 UV irradiated celled rate curve

2.3.2 紫外线-等离子体复合诱变选育: 等离子体处理不同时间致死率如图3所示。随辐照时间增加致死率整体不断上升, 0–20 s 致死率增加较快, 至20 s 时致死率约80%, 30 s 时致死率略有下降后继续上升, 当等离子体射线辐照时间为60 s 时, 致死率近100%, 这可能是由于离子注入到一定程度激活了菌体的修复机制, 但当注入时间继续增加细胞损伤无法修复。因此, 将等离子体诱变辐照时间设定为30 s。

2.4 TPHs 高效降解菌的高通量筛选

2.4.1 孔板与摇瓶发酵性能对比: 将复合诱变后的菌液稀释涂平板, 挑取一定数量的单菌落分别接入种子孔板和摇瓶中, 在35 °C、180 r/min 培养48 h 之后, 以10%的接种量将孔板和摇瓶的种子液转接入发酵孔板和摇瓶中, 相同条件下培养72 h, 96 孔板与摇瓶发酵 TPHs 降解率随培养时间变化如图4所示。

发酵初期, 摇瓶发酵培养菌株的 TPHs 降解率较高, 但在培养约36 h 后, 孔板发酵的 TPHs 降解率超过摇瓶发酵并持续到约48 h 后, 孔板发酵菌株 TPHs 降解率不再增加为止。造成这一现象的原因可能是 *S. multivorum* PW04 降解 TPHs 为需氧过程^[19], 初期摇瓶含氧量相对较高, 培养36 h 后孔板的溶氧状况较摇瓶好。同时 TPHs 检测方法的不同也是出现这一现象的重要原因。孔板发酵与摇瓶发酵整体上有较好的相关性, 可利用其替代摇瓶发酵

验证菌株 TPHs 降解效率。

2.4.2 TPHs 高效降解菌株筛选: 复合诱变所得突变株对 TPHs 降解率结果如表3所示(同一菌株接3个发酵孔, TPHs 含量取平均值, 发酵孔编号为相邻3个平行实验中 TPHs 降解率最高孔编号)。从2个96孔板中共筛选出 TPHs 降解率在80%以上的突变型菌株4株, 其中菌株 *S. multivorum* PW04-H10 的 TPHs 降解率最高, 达85.1%, 与野生型菌株 *S. multivorum* PW04 相比, 降解率提高了48%。

2.5 菌株遗传稳定性分析

选取 TPHs 降解率在80%以上的4株突变型菌株: *S. multivorum* PW04-H10、*S. multivorum* PW04-F3、*S. multivorum* PW04-G9 和 *S. multivorum* PW04-A6 进行传代培养, 并通过摇瓶发酵确定每一代菌株的 TPHs 降解率, 结果如表4所示。

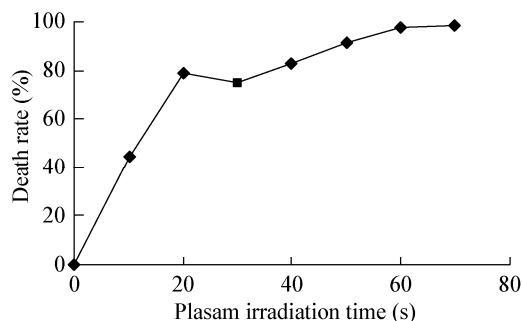


图3 等离子体诱变菌体致死率曲线

Figure 3 Plasam irradiated celled rate curve

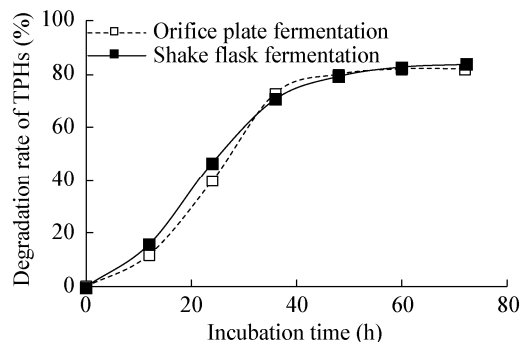


图4 孔板发酵与摇瓶发酵 TPHs 降解率曲线

Figure 4 Degradation rate of TPHs by shake flask and orifice plate fermentation

表 3 复合诱变菌株 TPHs 降解率
Table 3 The results of TPHs-degrading rate by complex mutagenesis

孔板编号 Orifice plate number	发酵孔编号 Fermentation hole number	石油烃含量 TPHs content (mg/L)	石油烃降解率 TPHs-degrading rate (%)
1	B5	24.2±0.4	75.8
	D7	26.6±0.3	73.4
	F1	20.2±1.0	79.8
	H10	14.9±0.3	85.1
	A6 (CK)	42.9±0.7	57.1
2	A6	17.3±0.7	82.7
	C11	20.7±0.7	79.3
	E8	22.5±0.5	77.5
	F3	15.4±0.5	84.6
	G9	17.1±0.4	82.9
	H6 (CK)	42.3±0.9	57.7

表 4 菌株 TPHs 降解率遗传稳定性分析结果
Table 4 The results of TPHs-degrading rate by analysis of strain genetic stability

菌株编号 Strain number	石油烃降解率 TPHs-degrading rate (%)				
	I	II	III	IV	V
PW04-H10	84.9±0.3	84.1±0.9	84.3±0.4	84.6±0.4	84.6±0.4
PW04-F3	82.7±0.9	82.0±0.3	81.3±0.9	79.8±0.6	79.4±1.1
PW04-G9	82.5±0.5	82.8±0.4	82.4±0.3	83.1±0.6	83.3±0.5
PW04-A6	82.6±0.3	82.7±0.4	82.5±0.6	81.7±0.5	82.3±0.6
CK	57.2±0.4	58.1±0.7	57.6±0.6	57.7±1.0	57.4±0.7

经单因素方差分析，突变株 *S. multivorum* PW04-H10、*S. multivorum* PW04-G9 和 *S. multivorum* PW04-A6 不同世代对 TPHs 降解率的差异不显著，说明这 3 株菌的 TPHs 降解遗传稳定性较好。而菌株 *S. multivorum* PW04-F3 的 TPHs 降解率在不同世代差异极显著且呈逐渐下降的趋势，说明该突变株遗传稳定性差，菌株退化严重。综上，选取菌株 *S. multivorum* PW04-H10、*S. multivorum* PW04-G9 和 *S. multivorum* PW04-A6 进行后续研究。

3 讨论

紫外线诱变是微生物育种中最为常用的方法，但是单纯的紫外线诱变效果并不理想，段盛文等^[20]

利用紫外诱变选育的 TPHs 降解菌降解率仅为 42.85%。因此，有学者采用紫外线-激光复合诱变、紫外线-微波复合诱变等方法对野生型 TPHs 降解菌进行诱变，以提高其 TPHs 降解率，通过上述诱变方式获得的突变株其 TPHs 降解率最高可达 75%^[21-25]。等离子体作为一种新型诱变手段，通过适当剂量的中性活性粒子作用于微生物致其细胞结构和 DNA 损伤修复能力发生改变最终引起突变^[26]。本研究首次对筛选的野生型 TPHs 降解菌进行紫外线与等离子复合诱变处理，所选育出的突变株 TPHs 降解率最高可达 85.1%，较野生型菌株提高了 48%，较其他方式获得的突变株提高约 13.5%，实验结果显示所得突变株遗传性能稳定，展现了良

好的诱变效果,推测其原因是由于紫外线诱变作用于 DNA,使其产生嘧啶二聚体,但微生物本身具有自我修复机制,而等离子体诱变通过其活性粒子作用于微生物细胞,改变其 DNA 损伤修复机制,突破了紫外单独诱变的局限,故可以筛选出 TPHs 降解率较高的优秀突变株。

复合诱变过程中产生大量的突变体,常规手段(如摇瓶发酵和红外光谱检测)选育 TPHs 高效降解突变株操作复杂、成本高,难以实现高通量筛选。以 96 孔板替代摇瓶发酵,采用酶标仪紫外双波长光谱法快速测定突变株的 TPHs 含量,该技术微型、高效、低成本,96 孔板一次即可培养检测 96 个样品,实现了突变株的快速筛选。

本文主要集中于 TPHs 高效降解菌株的诱变及选育工作,还缺乏对紫外与等离子体复合诱变的机理以及 TPHs 降解机理等方面的研究。此外,遗传稳定性分析只进行到了第五代,这些都需要在今后的实际生产应用过程中做进一步探讨和研究。

4 结论

将紫外线和等离子体两种诱变技术复合使用,通过 96 孔板发酵处理,结合多功能酶标仪建立的高通量筛选方法,最终选育出 3 株 TPHs 高效降解菌株 *S. multivorum* PW04-H10、*S. multivorum* PW04-G9 和 *S. multivorum* PW04-A6,TPHs 降解率分别达到了 85.1%、82.7%和 82.9%。降解率最高的突变型菌株 *S. multivorum* PW04-H10 与野生型菌株相比,提高了 48%。经单因素方差分析,这 3 株突变菌对 TPHs 降解遗传性状稳定,基本实现了选育的目的,可直接应用于石油烃污染环境的修复中。

参考文献

- [1] Cao YZ, Shi LY, Li LH. Petroleum hydrocarbons contaminated sites and related risk based management strategy[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2007, 2(3): 265-272 (in Chinese)
曹云者,施烈焰,李丽和,等. 石油烃污染场地环境风险评估与风险管理[J]. 生态毒理学报, 2007, 2(3): 265-272
- [2] Song H. Microbial bioremediation technology of petroleum hydrocarbon pollutants[J]. Environment Science and Management, 2013, 38(2): 83-88 (in Chinese)
宋华. 石油烃类污染物的微生物修复技术[J]. 环境科学与管理, 2013, 38(2): 83-88

- [3] Akio U, Yukiya I. Isolation and characterization of bacteria from oil contaminated with diesel oil and the possible use of these in autochthonous bioaugmentation[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2007, 23(12): 1739-1745
- [4] Su GC, Zhou CY, Cai HN, et al. Effectiveness of the cleaning performance of the bacterial strain *Acinetobacter* sp. SG06-02 in the petroleum hydrocarbon-polluted intestine of clams[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2008, 3(24): 383-386
- [5] Huang XD, El-Alawi Y, Gurska J, et al. A multi-process phytoremediation system for decontamination of persistent total petroleum hydrocarbons (TPHs) from soils[J]. Microchemical Journal, 2005, 81(1): 139-147
- [6] Yanto DHY, Tachibana S. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by a newly isolated *Pestalotiopsis* sp. NG007[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2013, 85(11): 438-450
- [7] Zhang XR, Huang JX, Luo S. The mutagenic effect on a strain producing PHB by cooperation of UV and He-Ne Laser[J]. Acta Photonica Sinica, 2005, 34(5): 682-685 (in Chinese)
张晓瑞,黄建新,罗莎. He-Ne 激光和紫外线对 PHB 产生菌的复合诱变效应[J]. 光子学报, 2005, 34(5): 682-685
- [8] Zhang X, Zhang XF, Wang LY, et al. Recent progress on atmospheric and room temperature plasma mutation breeding technology and its applications[J]. CIESC Journal, 2014, 65(7): 2676-2684 (in Chinese)
张雪,张晓菲,王立言,等. 常压室温等离子体生物诱变育种及其应用研究进展[J]. 化工学报, 2014, 65(7): 2676-2684
- [9] Pang DQ, Zhou PP, Lu MB, et al. Breeding of high glutathione producing strain by plasma-UV complex mutagenesis[J]. Life Science Research, 2014, 11(3): 238-241 (in Chinese)
庞德钦,周蓬蓬,鲁明波,等. 等离子体-紫外线复合诱变选育高产谷胱甘肽酵母菌[J]. 生命科学研究, 2014, 11(3): 238-241
- [10] Ji YZ, Tan TW, Du LX. Study on mutation breeding of the lipase producing strain *Rhizopus arrhizus* with low energy N^+ ion beam implantation[J]. Journal of Biotechnology, 2008, 136(Suppl): S337
- [11] Feng F, Zhao W, Sun SS. Studies on high throughput screening for calcium gluconate high producing strains[J]. Food and Fermentation Industries, 2012, 38(2): 74-77 (in Chinese)
冯芳,赵伟,孙姗姗. 高通量筛选葡萄糖酸钙高产菌株[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(2): 74-77
- [12] Fu SH, Liu YA. Detecting oil content in power plant oily wastewater using double wavelength ultraviolet spectrophotometric method[J]. Industrial Water & Wastewater, 2012, 43(6): 88-90 (in Chinese)
傅仕海,刘玉安. 双波长紫外法测定电厂废水含油量[J]. 工业用水与废水, 2012, 43(6): 88-90
- [13] HJ/T 637-2012. Water quality-determination of petroleum oils and animal and vegetable oils-infrared spectrophotometry[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2012 (in Chinese)
HJ/T 637-2012. 水质石油类和动植物油类的测定红外分光光度法[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2012
- [14] Dong XZ, Cai MY. Common Aerial System Identification Manual[M]. Beijing: Science Press, 2001: 353-419 (in Chinese)
东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 353-419
- [15] Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, et al. Gapped blast and psi blast: a new generation of protein database search programs[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(17): 3389-3402

- [16] Zhang LP, Cheng HC, Tian LS, et al. Breeding of high yield phytase bacterium by UV-plasma complex mutagenesis[J]. China Feed, 2006(9): 13-15 (in Chinese)
张丽萍, 程辉彩, 田连生, 等. 植酸酶高产菌株的紫外线-空气等离子体复合诱变选育[J]. 中国饲料, 2006(9): 13-15
- [17] Dong XY, Teng H, Xiu ZL. Selection of strain exposed under plasma discharge with enhanced 1,3-propanediol production and kinetic analysis of batch fermentation[J]. The Chinese Journal of Process Engineering, 2011, 11(2): 304-311 (in Chinese)
董晓宇, 滕虎, 修志龙. 高产1,3-丙二醇的等离子体诱变菌株选育及发酵动力学分析[J]. 过程工程学报, 2011, 11(2): 304-311
- [18] Zhang H, Guo CL, Lu GN, et al. Screening and fermentation optimization of a biosurfactant-producing oil-degrading bacteriums[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2013, 32(11): 2185-2192 (in Chinese)
章慧, 郭楚玲, 卢桂宁, 等. 具有产表面活性剂功能石油降解菌的筛选及其发酵条件优化[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(11): 2185-2192
- [19] Tang JC, Wang RG, Niu XW, et al. Enhancement of soil petroleum remediation by using a combination of ryegrass (*Lolium perenne*) and different microorganisms[J]. Soil and Tillage Research, 2010, 110(1): 87-93
- [20] Duan SW, Liu ZC, Zheng K. Petroleum degradation capacity of *Sphingobacterium bambusaue* and its UV-mutants[J]. Microbiology China, 2013, 40(12): 2336-2341 (in Chinese)
段盛文, 刘正初, 郑科, 等. *Sphingobacterium bambusaue* 及其紫外诱变菌株的石油降解功能[J]. 微生物学通报, 2013, 40(12): 2336-2341
- [21] Zhang YB, Liu HT, Zhao YK. UV-mutagenesis improvement on an efficient petroleum degradation strain[J]. Chemistry & Bioengineering, 2013, 30(7): 71-73
张云波, 刘海涛, 赵雅坤. 一株高效石油降解菌的紫外微波复合诱变改良[J]. 化学与生物工程. 2013, 30(7): 71-73 (in Chinese)
- [22] Dellagnezze BM, Sousa GV, Martins LL, et al. Bioremediation potential of microorganisms derived from petroleum reservoirs[J]. Marine Pollution Bulletin, 2014, 89(12): 191-200
- [23] Mancera-López ME, Esparza-García F, Chávez-Gómez B, et al. Bioremediation of an aged hydrocarbon contaminated soil by a combined system of biostimulation bioaugmentation with filamentous fungi[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2008, 61(2): 151-160
- [24] Sathishkumar M, Binupfiya AR, Ho BS, et al. Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortia isolated from hydrocarbon contaminated areas[J]. Clean, 2008, 36(9): 92-96
- [25] Li MY. Breeding of oil-degrading bacterium and study on petroleum hydrocarbons degradation[D]. Xi'an: Master's Thesis of Northwest University, 2011 (in Chinese)
李茂毅. 石油烃降解菌株的选育以及对石油中烃类物质降解的研究[D]. 西安: 西北大学硕士学位论文, 2011
- [26] Liu RM, Liang LY, Ma JF, et al. An engineering *Escherichia coli* mutant with high succinic acid production in the defined medium obtained by the atmospheric and room temperature plasma[J]. Process Biochemistry, 2013, 48(11): 1603-1609

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、病毒学、酶工程、发酵工程、代谢工程等领域的最新研究成果, 产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究和改革等。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、名课讲堂、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wwxwtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿, 凡不符合(投稿须知)要求的文稿, 本部恕不受理。

(下转 p.1051)