

付瑞敏,康治华,彭瑞强,等. 高效石油烃降解菌 CQ6 的分离鉴定及 He-Ne 激光诱变[J]. 江苏农业科学,2015,43(7):404-407.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.07.135

# 高效石油烃降解菌 CQ6 的分离鉴定及 He-Ne 激光诱变

付瑞敏<sup>1,4</sup>, 康治华<sup>2</sup>, 彭瑞强<sup>3</sup>, 陈五岭<sup>1</sup>

(1. 西北大学生命科学学院,陕西西安 710069; 2. 中国石油长庆油田分公司第三采油厂,陕西西安 710069;  
3. 中国石油长庆油田分公司第五采油厂,陕西西安 710069; 4. 河南教育学院生命科学系,河南郑州 450046)

**摘要:**从长庆油田石油污染土壤中分离得到一株产生生物表面活性剂的高效石油烃降解菌。通过形态学、生理生化及分子生物学研究,筛选出的菌株 CQ6 被鉴定为短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)。为了增强该菌降解石油烃的能力,对其进行 He-Ne 激光诱变,获得 6 株突变株,通过检测其表面张力、排油圈直径和烃降解率,降解石油烃能力最强且遗传性状稳定的突变株 CQ66 被挑选出来。研究表明,He-Ne 激光诱变育种技术可有效改良石油烃降解菌,该手段对修复石油污染土壤具有现实意义。

**关键词:**石油烃降解菌;表面活性剂;He-Ne 激光诱变;遗传稳定性

**中图分类号:** S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)07-0404-03

随着石油工业的快速发展,在石油勘探、开采、运输及炼制等过程都会出现原油的泄漏,从而对土地和邻近水体造成严重污染<sup>[1]</sup>。这些原油可通过生物学或非生物学途径而逐步降解。研究表明,消除石油烃污染的各个因素中,微生物降解具有重要作用,当前已报道有多种微生物具有降解石油烃并产生表面活性剂的能力<sup>[2-4]</sup>。李倩等制备石油烃降解菌剂并将其应用于溢油岸滩的生物修复,结果发现经过 28 d 的生物修复,其石油烃降解率最高达 45.07%<sup>[5]</sup>。可见采用现代育种技术选育石油烃降解菌对于石油污染区域的生物修复具有极为重要的应用价值。激光可通过光、电、热和电磁等综合作用引起菌体细胞基因发生改变,从而使所产生的酶发生激活或钝化<sup>[6]</sup>。低能量的 He-Ne 激光作用于菌体细胞,可促进菌体细胞生长进而提高代谢物产量,当前引起了微生物育种者的广泛关注<sup>[7]</sup>。本研究针对长庆油田石油污染土壤,进行了石油烃高效降解菌的分离、鉴定,并通过 He-Ne 激光辐射诱变育种,选育出一株遗传性能稳定的高效石油烃降解菌,以为石油污染土壤的生物修复提供数据参考。

## 1 试验材料

### 1.1 菌种来源

从长庆油田石油污染土壤中提取。

### 1.2 培养基

1.2.1 无机盐培养基  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.0 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0 g,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1.0 g,  $\text{FeCl}_3$  0.05 g, 蒸馏水 1 000 mL,

pH 值 7.0。

1.2.2 选择培养基 将 2 g 原油抽滤灭菌后加到上述无机盐培养基中,即为液体选择培养基,也叫原油发酵培养基。在培养基中加入 15 g 琼脂制成相应的固体选择培养基,即为油平板。试验所用原油采自长庆油田 G010-18 井。

1.2.3 LB 培养基 蛋白胨 8 g,氯化钠 7 g,酵母浸膏 5 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 值 7.0,即为液体培养基;固体培养基的琼脂添加量控制在 15%~18%。

1.2.4 复壮培养基 蛋白胨 8 g,氯化钠 7 g,酵母浸膏 5 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 值 7.0,葡萄糖 50 mmol/L

### 1.3 试验仪器

He-Ne 激光发生器(波长 632 nm,功率 10 mW),由西北大学光电厂生产;WZY-1 自动液体表面张力仪,由上海衡平制造厂生产。

## 2 试验方法

### 2.1 菌株培养

菌株分离自长庆油田 G010-18 井周边污染土壤。将 100 mL 选择液体培养基加入到 250 mL 锥形瓶中,121 ℃ 灭菌 20 min,而后称取 5 g 污染土壤置于其中,透气封口膜封住瓶口,280 r/min,30 ℃ 摇床振荡培养 7 d。

### 2.2 菌株筛选与分离

2.2.1 初筛 采用梯度稀释法,将培养后的菌液用无菌水连续稀释  $10^1 \sim 10^7$  倍,取  $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  的梯度稀释液分别涂布于以石油烃为唯一碳源的油平板上,每个稀释度均做 3 个平行试验,将其置于 37 ℃ 培养 3 d,能在油平板上生长的就是石油烃降解菌。将石油烃降解菌通过平板划线获得单菌落,将其转至斜面,4 ℃ 保存。

2.2.2 复筛 为了进一步检测石油烃降解菌对石油烃的降解能力,采用表面张力检测、排油圈<sup>[8]</sup>和烃降解率<sup>[9]</sup>等 3 种方法进行复筛。(1)表面张力检测<sup>[8]</sup>。将筛选出的石油烃降解菌菌株活化,以 2% 的比例接入葡萄糖发酵培养基,280 r/min,30 ℃ 摇床振荡培养 7 d 后,使用张力仪检测发酵

收稿日期:2014-09-07

基金项目:河南省科技计划(编号:122102310331);河南省教育厅自然科学基金项目(编号:2011B180015);河南教育学院青年科研课题(编号:20100103)。

作者简介:付瑞敏(1981—),女,河南郑州人,博士研究生,讲师,从事农业及食品微生物研究。E-mail:angelamimin@163.com。

通信作者:陈五岭,教授,博士生导师,从事农业、环境及食品微生物研究。E-mail:wuling.chen@263.net。

液的表面张力。(2)排油圈<sup>[8]</sup>。取 90 mm 培养皿,加入 50 mL 去离子水,滴加 0.1 mL 液体石蜡于水面,石蜡中心加入 10 μL 发酵液,发酵液会将石蜡挤向四周形成圆圈,菌株所产生表面活性剂的量及活性同该圆圈的直径成正比。通过对比各菌株所形成的排油圈,选取排油圈直径最大的菌株作深入研究。上述试验均重复 3 次。(3)烃降解率<sup>[9]</sup>。将石油烃降解菌菌液以 10% 的比例接入 50 mL 的原油发酵培养基中,280 r/min、30 ℃ 摇床振荡培养 7 d 后,按照文献[9]中方法测定培养液中原油降解率,计算石油烃降解率。

降解率(D) = (m<sub>1</sub> - m<sub>7</sub>)/m<sub>1</sub> × 100%。

式中:m<sub>1</sub> 为初始发酵培养基中原油含量;m<sub>7</sub> 为培养 7 d 残留油含量。

经过上述试验,即可选出降解石油烃能力最强的菌株。

2.3 形态学和生理生化鉴定

参照文献[10 - 11]对所选的降解石油烃能力最强的菌株进行形态学鉴定(包括革兰氏染色、芽孢染色和大小测定等),并参照微生物试验标准对该菌进行生理生化测定(包括过氧化氢酶反应、糖发酵试验、IMViC 试验、淀粉水解试验、柠檬酸盐利用试验、酪素水解试验和耐盐性试验等),上述试验均重复 3 次。

2.4 16S rDNA 序列分析

参照 Fani 等的方法<sup>[12]</sup>,采用上海生工生物工程技术服务有限公司提供的试剂盒提取所选菌株的 DNA 和回收其 16S rDNA 片段。16S rDNA 的 PCR 扩增引物采用通用引物(27F:5' - AGAGTTGTCATGGCTC - 3' 和 1492R:5' - TACG-GYTACCTTGTACGACTT - 3'),该引物合成自上海生工。PCR 反应参数:94 ℃ 5 min;94 ℃ 50 s,50 ℃ 50 s,72 ℃ 90 s,共计 30 个循环;72 ℃ 10 min。将所得 PCR 产物回收纯化并提交目的片段至上海生工进行基因测序,所得序列采用 MEGA 3.0 同 NCBI 上的相近物种的 16S rDNA 序列构建系统发育树,树的聚类稳定性进行 1 000 次自导检验<sup>[13]</sup>。

2.5 He - Ne 激光诱变和突变株的选育

2.5.1 诱变前的活化 将所选菌株于 37 ℃ 培养 24 h 后,用 5 mL 无菌生理盐水冲洗斜面后将其置于三角瓶中(内含玻璃珠),充分振荡混匀,采用光电比浊计数法将菌悬液的 D 值调节至 0.986,使其浓度为 10<sup>8</sup> CFU/mL。

2.5.2 He - Ne 激光诱变<sup>[14]</sup> 取 2 mL 菌悬液分别置于无菌试管中,将 He - Ne 激光的输出功率调节为 10 mW,照射距离调节为 25 cm,照射时间为 5、10、15、20、25 min,以原菌液为对照,试验均重复 3 次。

2.5.3 诱变菌培养 无菌条件下取 1 mL 激光照射后的菌液,将其置于装有 9 mL 无菌水的试管中,作为 10<sup>-1</sup>,振荡混匀后再以同样方法将其稀释至 10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup>,从 3 个梯度的稀释液中各取 0.2 mL 涂平板,每个稀释度设 3 个平行,37 ℃ 培养 20 h 后,以原菌悬液作为对照,进行菌落形态观察和菌落计数。

2.5.4 存活率和正突变率的计算 将激光诱变后的菌悬液用复壮培养基培养,条件为 280 r/min、37 ℃ 下培养 6 h,而后使用梯度稀释法将其稀释至 10<sup>-6</sup>,分别取 0.1 mL 10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup> 和 10<sup>-6</sup> 的稀释液涂布在油平板上,以未照射的菌液为对照,37 ℃、96 h 后观察生长状况,并计算存活率和正突变率:

存活率 = 诱变后活菌数/诱变前活菌数 × 100%;

正突变率 = 正突变菌株数/诱变后活菌数 × 100%。

2.5.5 挑取优良突变株 通过菌落形态观察和计数,从诱变后的菌株中挑选出菌落形态变化较大、长得又快又好且透明圈明显的突变株,通过表面张力检测、排油圈和烃降解率等方法检测正突变株降解石油烃和产生表面活性剂的能力,并挑选优良突变株。

2.5.6 突变株遗传稳定性试验 将挑选出的降解石油烃能力最强的突变株转接至 LB 平板上,作为第 1 代,然后以相同方法连续继代 20 代,每隔 4 代分别将其按照 10% 的比例接入原油发酵培养基中,280 r/min、30 ℃ 摇床振荡培养 7 d,测其降解率和表面张力,并将其与第 1 代菌株比较,确定突变株的遗传稳定性。

3 结果与分析

3.1 石油烃降解菌的筛选与分离

从长庆油田石油污染土壤中分离得到可在油平板上生长且产生透明圈的石油烃降解菌 6 株,分别为 CQ1、CQ2、CQ3、CQ4、CQ5 和 CQ6,经过表面张力、排油圈和烃降解率等方法检测,结果如表 1 所示:6 株菌对石油烃的降解能力和产生表面活性剂的能力有较为显著的差异,菌株 CQ6 的排油圈直径和石油烃降解率均高于其他菌株,且表面张力低于其他菌株。基于此,说明菌株 CQ6 的降解石油烃能力和产生表面活性剂能力最强,因此选取菌株 CQ6 进行后续研究。

表 1 菌株筛选参数

菌株编号	排油圈直径 (cm)	表面张力 (mN/m)	石油烃降解率 (%)
CQ1	2.5	46.8	34
CQ2	3.8	37.8	44
CQ3	4.5	35.6	50
CQ4	3.0	42.3	38
CQ5	2.6	45.6	35
CQ6	5.8	32.5	64

3.2 石油烃降解菌 CQ6 的表型特征和生理生化特性

将上述所选的石油烃高效降解菌株 CQ6 挑选出来并进行显微镜镜检和菌落形态观察。结果显示:该菌个体形态为杆状,G<sup>-</sup>,产椭圆形芽孢,芽孢囊膨大,菌落干燥、不透明且有褶皱,菌落边缘有不规则扩散。

对 CQ6 进行生理生化检测,结果显示:CQ6 为严格好氧菌,抗氯化钠 2%、5%、7%、10%,可发酵葡萄糖产酸,IMViC 试验结果为 -+++ ,淀粉水解和酪素水解试验结果为阳性。

通过分析 CQ6 的表型特征和生理生化特征,发现其形态和生理生化特点均和枯草芽孢杆菌标准株相同,据此,可初步判定菌株 CQ6 为芽孢杆菌属。

3.3 CQ6 的 16S rDNA 的系统发育研究

菌株 CQ6 的 16S rDNA 片段(约 1 500 bp)的 PCR 扩增结果如图 1 所示,将所得 PCR 产物测序,得到 1 492 bp 的序列,将该序列和 NCBI 数据库中的各近缘菌株的 16S rDNA 序列进行比对,应用 Bioedit7.0 软件进行多重比较,分析其同源性,并构建系统发育树(图 2),经分析,所得序列和 *Bacillus pumilus*(登录号:X60637)显示了 99% 的同源性,根据其系

统进化特征,可确定菌株 CQ6 为短小芽孢杆菌。

3.4 突变株筛选

用激光照射诱变育种的生物学效应主要是引起基因突变从而使酶激活或钝化,激光照射时间会导致突变率发生变化,照射时间越长,突变率越高,但是致死率也随之升高,因此要挑选合适的照射时间以保证一定的突变率和控制致死率。用激光对石油烃降解菌 CQ6 照射不同时间,结果如表 2 所示。

由表 2 可以看出,随着照射时间的延长,菌株的存活率不断下降,正突变率的变化趋势是先升高后降低,推断造成这种情况的原因是由于照射时间过长,不仅会导致活菌数剧烈下

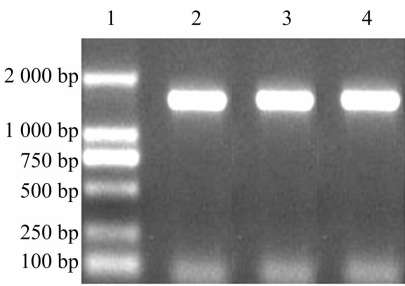


图1 菌株 CQ6 的 16S rDNA PCR 扩增结果

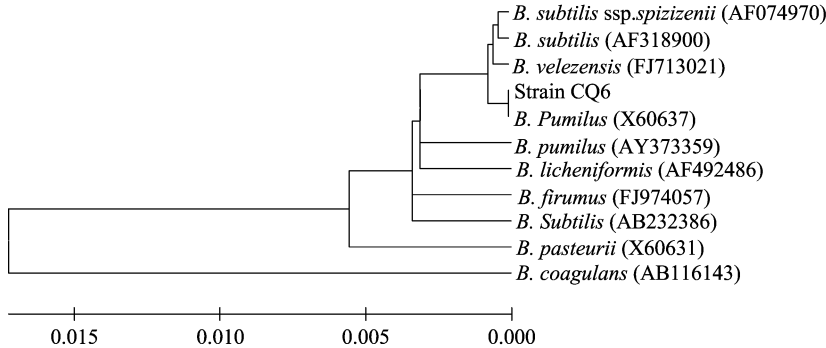


图2 菌株 CQ6 系统进化树

表 2 不同激光处理时间对菌株 CQ6 的影响

照射时间 (min)	存活率 (%)	正突变率 (%)
5	60.3	10.5
10	45.1	18.4
15	33.2	24.1
20	15.0	17.5
25	10.0	15.6

降,也会使更多的菌株出现负突变,因此,综合考虑,CQ6 的最佳照射时间选为 15 min。

采用排油圈检测、表面张力检测和烃降解率等方法,5 株降解石油烃和产生表面活性剂的能力均强于亲本 CQ6 的菌株被挑选出来,分别编号为 CQ61、CQ63、CQ65、CQ66 和 CQ67,其降解石油烃和产生表面活性剂的结果如表 3 所示。

表 3 各突变株降解石油烃能力

菌株编号	排油圈直径 (cm)	表面张力 (mN/m)	石油烃降解率 (%)
CQ61	5.9	31.3	66
CQ63	6.1	29.7	68
CQ65	6.5	28.9	71
CQ66	7.1	27.5	73
CQ67	6.3	29.3	69

如表 3 所示,突变株 CQ66 的排油圈直径和石油烃降解率均高于其他突变株,且表面张力低于其他突变株,说明该突变株的降解石油烃能力和产生表面活性剂能力是突变株中最强的,故将其挑选出来,用于后续研究。

3.5 突变株遗传稳定性研究

把石油烃降解能力和产生表面活性剂能力均有所提高的

突变株 CQ66 继代培养 20 代,每隔 4 代的菌株分别做石油烃降解率和表面张力试验,结果(表 4)表明各代降解石油烃和产生表面活性剂的能力基本一致,说明突变株 CQ66 的降解石油烃能力的遗传稳定性良好。

表 4 突变株 CQ66 的遗传稳定性

代数	石油烃降解率 (%)	表面张力 (mN/m)
1	73.0	27.5
4	72.8	27.7
8	72.9	27.6
12	72.7	27.8
16	72.4	28.1
20	72.0	28.5

4 讨论

本研究从长庆油田石油污染的土壤中分离筛选得到一株高效降解石油烃和产生表面活性剂的菌株 CQ6,经形态学、生理生化 and 分子鉴定确定该菌株为短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)。

为了增强该菌株降解石油烃的能力和产生表面活性剂的能力,对所选菌株进行 He-Ne 激光诱变育种,并确定最佳照射时间为 15 min。

He-Ne 激光诱变后,采用排油圈检测、表面张力检测和烃降解率等方法挑选出降解石油烃和产生表面活性剂能力最强的突变株 CQ66,并对其进行遗传稳定性检测,试验结果表明,该突变株降解石油烃和产生表面活性剂的遗传性状稳定,可用于制备固体菌剂或液体菌剂应用于长庆油田石油污染土壤的生物修复。

陈超,王建立,杨丰,等. 贵州人工草地-农田界面土壤水分的影响域[J]. 江苏农业科学,2015,43(7):407-410.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.07.136

# 贵州人工草地-农田界面土壤水分的影响域

陈超,王建立,杨丰,刘洪来

(贵州大学动物科学学院/贵州大学草业科学研究所,贵州贵阳 550025)

**摘要:**以贵州人工草地-农田景观界面为研究对象,采用野外调查、室内统计分析等方法研究表层土壤(0~20 cm)水分变化特征及界面影响域。结果表明:研究区人工草地-农田界面土壤水分在空间上是变化的,草地表层土壤的平均水分含量约为 23.6%,农田表层土壤平均水分含量约为 11.8%;农田-草地界面的土壤水分含量平均约为 17.7%;通过移动窗口法对研究区界面影响域进行判定,结果发现,土壤水分在人工草地、农田的影响域分别为 12、14 m,总界面宽度为 26 m,属渐变型

**关键词:**南方农牧交错区;喀斯特山区;界面宽度;土壤水分;影响域;移动窗口法

**中图分类号:** S152.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)07-0407-04

生态交错带是指 2 个或 2 个以上生态系统之间的过渡地带,是生态系统功能密集区和压力敏感区,在生态系统结构、过程和功能上扮演重要角色,已引起国内外的高度重视并开展大量的研究工作<sup>[1]</sup>。中国复杂的地理环境和多样的植被类型叠加人为干扰因素形成了多种类型的生态交错带,如森林草地交

错带、森林农田交错带、农牧交错带等,其中农牧交错带在我国分布最广,面积达到 81 万 km<sup>2</sup>,按照地理位置和成因可分为华北农牧交错带、新疆农牧交错带和南方农牧交错带<sup>[2]</sup>。受亚热带季风性气候的影响,南方的水热条件优越于北方,加之人口的持续增长,导致南方大量草地被开垦为农田,形成南方农牧交错带。南方农牧交错带别称滇黔农牧交错带,主要分布在云南、贵州、四川等地,面积达 24 万 km<sup>2</sup><sup>[3]</sup>。然而,南方是我国喀斯特地貌的核心分布区,其生境的严酷性和生态的脆弱性使得该区域的植被不适于进行大规模开垦种植农作物。目前,关于农牧交错带的研究主要集中在土壤侵蚀、土地退化、土地生产力等方面,而关于生态交错带形成的生态界面方面的研究尚不深入。生态界面是指两侧分别是生物面和非生物面的物质薄层,相邻生态系统通过界面区域相互渗透、连接和区分<sup>[4]</sup>。生态界面宽度指某种变化穿透到栖息地内的距离,是

收稿日期:2014-06-15

基金项目:国家自然科学基金(编号:31101751);贵州省优秀科技教育人才省长专项(编号:黔省专合字[2011]39号);贵州省科技项目(编号:黔科合 NY 字[2012]3011号、黔科合 J 字[2012]2162号、黔科合 J 字[2011]2325号)。

作者简介:陈超(1974—),男,贵州惠水人,博士,副教授,从事草学、畜牧学研究。Tel:(0851)8298001;E-mail:gzgyxgc3855218@163.com。  
通信作者:刘洪来,博士,副教授,主要从事草学、生态学研究。  
E-mail:lhonglai@126.com。

## 参考文献:

- [1] Ueno A, Ito Y, Yumoto I, et al. Isolation and characterization of bacteria from soil contaminated with diesel oil and the possible use of these in autochthonous bioaugmentation[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 23(12): 1739-1745.
- [2] Sathishkumar M, Binupfiya A R, Ho B S, et al. Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium isolated from hydrocarbon contaminated areas[J]. Clean, 2008, 36(1): 92-96.
- [3] 姜 肸, 高 伟, 李 倩, 等. 南海高效石油降解菌的筛选及降解特性研究[J]. 环境科学学报, 2012, 32(7): 1572-1578.
- [4] 王彦杰, 毕思宁, 左豫虎, 等. 一株表面活性剂产生菌的分离及抑菌活性[J]. 微生物学通报, 2012, 39(3): 353-360.
- [5] 李 倩, 高 伟, 崔志松, 等. 不同剂型石油降解菌剂在模拟溢油岸滩修复中的中试应用[J]. 海洋环境科学, 2013, 32(5): 772-775.
- [6] 陈义光, 李铭刚, 徐丽华, 等. 新型物理诱变方法及其在微生物诱变育种中的应用展[J]. 长江大学学报: 自然版, 2005, 2(5): 46-50.
- [7] 马昕源. 微生物激光诱变育种应用研究进展[J]. 河北农业科学,

2008, 12(1): 75-77.

- [8] 刘 佳, 黄翔峰, 陆丽君, 等. 生物破乳剂产生菌的筛选及其方法研究[J]. 微生物学通报, 2008, 35(5): 690-695.
- [9] 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.
- [10] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984: 729-795.
- [11] 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: 43-66.
- [12] Fani R, Bandi C, Bazzicalupo M, et al. Phylogeny of the genus *Azospirillum* based on 16S rDNA sequence[J]. FEMS Microbiology Letters, 1995, 129(2/3): 195-200.
- [13] Han J, Sun L, Dong X, et al. Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain Delftia tsuruhatensis HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2005, 28(1): 66-76.
- [14] 付瑞敏, 韩鸿鹏, 张丽琴, 等. 葡萄霜霉病和白粉病拮抗菌的分离、鉴定和 He-Ne 激光诱变[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(8): 122-125.