

产表面活性剂菌株的筛选及其功能基因的初步定位

张林达¹, 刘红玉¹, 鲁双庆², 张利¹, 张慧¹, 刘臻²

(1.湖南大学环境科学与工程学院, 湖南 长沙 410082; 2.长沙大学, 湖南 长沙 410003)

摘要:通过以液体石蜡为惟一碳源和能源的选择性富集培养,从某具有有机磷生产史的农药厂内的污染泥土中分离到1株产表面活性剂的细菌,采用形态学、生理生化和16S rDNA基因序列比对分析,对其进行了研究。结果表明,该菌株属于不动杆菌属,暂定名为*Acinetobacter* sp.W2。通过细菌质粒消除法和细菌质粒的快速检测法实验,初步认定,该菌质粒上含有影响其产表面活性剂的功能基因。

关键词:生物表面活性剂;细菌;筛选;功能基因;有机磷农药

中图分类号:X172 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2008)06-2265-04

Screening for Biosurfactant-producing Bacterium and Preliminary Location of Its Functional Gene

ZHANG Lin-da¹, LIU Hong-yu¹, LU Shuang-qing², ZHANG Li¹, ZHANG Hui¹, LIU Zhen²

(1.College of Environmental Science and Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China; 2.Changsha University, Changsha 410083, China)

Abstract: A biosurfactant-producing bacterium strain was isolated from organophosphorus pesticides contaminated soil by using selective enriched culture medium method which used liquid paraffin as the sole carbon and energy sources. Based on the results from morphological, physiological and biochemical analysis, as well as the results from 16S rDNA sequence analysis, the strain was identified to be *Acinetobacter* sp. W2. And plasmid eliminating experiment was carried out to locate the biosurfactant producing gene in the strain. The results showed that the functional gene of control biosurfactant producing was located at the plasmid.

Keywords: biosurfactant; bacterium strain; screening; functional gene; organophosphorus pesticide

生物表面活性剂(biosurfactant)是微生物通过代谢合成的具有双亲性(亲水性和亲油性)的一类次级代谢产物^[1-3]。与化学合成表面活性剂相比,生物表面活性剂还具有低毒性、易生物降解和极端环境的高选择性等优良特性^[4-5],生物表面活性剂在医药、食品、农业、化工、环境保护等众多行业得到了重视与应用。生物表面活性剂还可增加憎水性有机化合物与水相之间的接触面,从而提高憎水性有机化合物的水溶性,促进微生物对它的吸收和降解。从而促进有机农药的环境修复与治理。国内外学者多数是从油类污染^[6-8]、重金属污染^[9]等污染环境或从堆肥环境^[10]中进行生物

表面活性生产菌的筛选和研究,但从有机磷农药污染土壤中筛选出产表面活性剂的微生物并把筛选得到的细菌及其产物运用到有机磷农药污染治理,国内外都还未曾有过报道。

有机磷农药(Organophosphate, OPs)由于其有提高农作物产量的作用而长时间为农业所用,是所有有毒农药中最普通的一类。虽然国家明确规定从2007年1月1日起全面禁止甲胺磷等5种高毒有机磷农药的销售和使用,并积极研发和推广替代品种,但替代品种相对高价、较窄的杀虫谱和较差的速效性等问题,加之农民多年的使用习惯,使得因使用有机磷农药而导致的土壤污染问题必将在较长时间内存在。

本实验从有机磷农药污染土壤中筛选出并鉴定了一株产生物表面活性剂的细菌,并对其功能基因进行了初步研究,以期深化生物表面活性剂的研究并对有机磷农药污染的土壤治理与修复提供一些参考。

收稿日期:2008-02-01

基金项目:国家高新技术研究发展(863)项目(2004AA 649370);湖南省自然科学基金(05JJ30021)

作者简介:张林达(1978—),男,硕士研究生,研究方向为生物表面活性剂的研究与应用。E-mail:wolinda@163.com

责任作者:刘红玉 E-mail:hylu@hnu.cn

1 材料与方法

1.1 菌种的筛选

1.1.1 菌种来源

采自某有机农药磷生产历史的农药厂的污染土壤。

1.1.2 土样前处理

将土样 10 g 与 90 mL 无菌水振荡混匀,静置 30 min 后,吸取 1 mL 的上清液于 9 mL 的无菌水中,振荡混匀,即成 10^{-2} 的土壤菌悬液。

1.1.3 富集培养

液体富集培养基($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)^[11]: NaNO_3 7.0, K_2HPO_4 1.0, KH_2PO_4 0.5, KCl 0.1, MgSO_4 0.5, CaCl_2 0.01, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, 酵母提取物 0.1, 微量元素溶液 0.05 mL, 自然 pH 值。其中微量元素溶液含 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$): H_3BO_3 0.25, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{MoNa}_2\text{O} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.06, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.7。依次以 1% 和 2% 的液体石蜡为惟一碳源和能源进行两轮富集培养,每轮 5~7 d; 培养条件: $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 30°C 。

1.1.4 产生物表面活性剂细菌的筛选及纯化

筛选平板培养基: 固体富集培养基表面涂沫 2 滴液体石蜡制得。平板划线后, 30°C 恒温培养 1~2 d。

纯化平板培养基($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): 胰蛋白胨 10, 葡萄糖 20, 酵母浸出粉 0.1, 琼脂粉 20, 自然 pH 值。挑取筛选平板培养基上的单菌落进行划线, 并 30°C 恒温培养 1~2 d。

液体复筛培养基: 液体富集培养基+2% 葡萄糖。挑取单菌落摇瓶发酵培养: $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 30°C , 2~5 d。按参考文献[12、13], 分别检测发酵液的排油圈和表面张力。

斜面培养基: 同纯化平板培养基。 30°C , 恒温培养 1~2 d, 4°C 冰箱保藏, 待用。

1.2 细菌鉴定

1.2.1 形态学及生理生化鉴定

通过系列的细菌分离纯化后, 参考文献[14、15]对筛得的一株产表面活性剂的细菌进行生理生化试验。

1.2.2 基于 16S rDNA 的鉴定

以 CTAB/蛋白酶 K 法提取筛得细菌的总 DNA^[11], 并以细菌 16S rDNA 通用引物(F8: $5' - \text{AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG} - 3'$; R1541: $5' - \text{AAG} - \text{GAGGTGATCCAGCCGCA} - 3'$)^[16-17] 进行 PCR 扩增(94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 1 min, 55°C 退火 1 min, 72°C 延伸 1 min, 30 个循环, 最后 72°C 延伸 5 min), 产物进行琼脂糖电泳检测, 纯化测序由上海生工技术

有限公司完成。最后, 将 16S rDNA 的测序结果上传到 GenBank 中进行序列比对。

1.3 细菌产表面活性剂功能基因的定位

1.3.1 细菌质粒快速检测

参考文献[18], 并做适当修改。取过夜培养的菌液 200 μL 于 EP 管中, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 s, 弃上清; 沉淀重悬于 100 μL TE 电泳缓冲液中, 制成菌悬液, 加 2 μL 的 NaCl ($5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 4 μL 的 EDTA ($0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 8.0), 然后加 $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶菌酶 3.5 μL , 在冰上保温 20 min 后, 加 2 μL 的 10% SDS; 取 50~100 μL 在 1 $\times$ TBE 电泳缓冲液进行电泳, 电压为 50 V。

1.3.2 SDS 法进行质粒消除

参考文献[17, 19], 并做适当修改。在装有 50 mL 的三角瓶中分别加入适量 10% 的 SDS, 使其终浓度分别为 0.02%、0.04% 等, 至 0.20%, 30°C 培养 36 h, 取菌体能生长的 SDS 浓度最大的三角瓶, 将其进行梯度稀释, 接种于 LB 平板, 30°C 培养 36 h。通过影印接种于表面涂有 2 滴液体石蜡的固体筛选培养基, 30°C 培养 36 h。观察是否能产生噬油斑的现象, 不产生噬油斑的可能为质粒消除的突变株。

2 实验结果

2.1 筛选结果

本实验首先采用液体石蜡作为选择性培养基的惟一碳源和能源, 对有机磷农药污染土壤中的细菌进行了富集筛选和平板分离纯化, 筛得一株细菌 W2。并通过进一步的发酵培养, 测定发酵液的表面张力, 发现该细菌能使液体复筛发酵培养基的表面张力从 $72.4 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ 降低到 $32.8 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$, 排油圈直接达到 9 cm 左右。

2.2 菌种鉴定

2.2.1 W2 菌落形态及生理生化特征

形态观察和生理生化特征为菌落半透明, 革兰氏染色为阴性, 不形成芽孢, 无鞭毛; 氧化酶阴性, 接触酶阳性, 不产生乙酰甲基甲醇、吡啶和 H_2S 。

2.2.2 16S rDNA 的序列测序结果分析

筛得的细菌 W2 提取总的 DNA 后进行细菌通用引物 PCR, 电泳显示, 得到了约 1 500 bp 的目的条带(如图 1)。将测序结果上传到 GeneBank (登录号为 EF570077) 进行序列比对, 发现与 *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 (登录号为 NC_009085) 和 *Acinetobacter* sp. ADP1 (登录号为 NC_005966) 的得亲缘关系较为相近(如图 2)。并结合先前所做的形态及生理

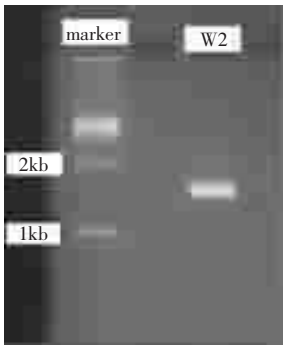


图 1 W2 菌 16S rDNA 通用引物 PCR 产物
Figure 1 Result of 16S rDNA PCR amplification

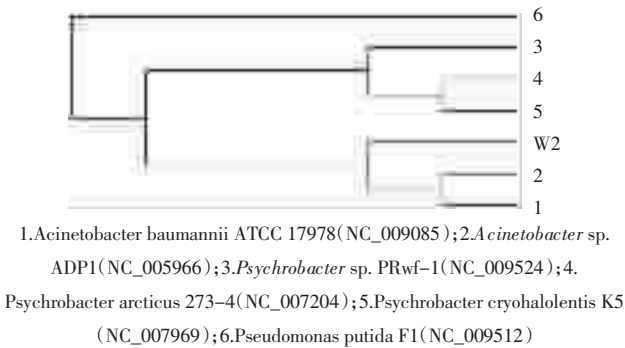


图 2 基于 16S rDNA 序列的亲缘关系
Figure 2 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence of W2 and the sequences of relating species

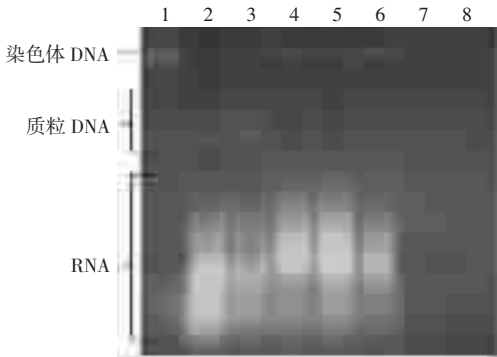
生化实验结果描述，可以初步鉴定该菌为不动杆菌属，暂时命名为 *Acinetobacter* sp. W2。

2.3 功能基因的初步定位

一般自然界中编码或辅助编码细菌降解复杂有机物等特殊功能大多分布在质粒上^[20]，进行质粒检测，结果发现 W2 菌至少存在一个质粒。经过对质粒的消除实验和电泳检测，结果发现，未消除质粒的细菌(图 3，泳道 2、3)能产生噬油斑(即产表面活性剂)，消除了质粒的细菌(图 3，泳道 4、5、6)不能产生噬油斑(即不产表面活性剂)。从而可以初步确定了该菌产表面活性剂的功能基因位于这个质粒上。

3 讨论

世界上使用的有机磷农药至少有 150 多种以上，他们的环境效应及其修复技术越来越受到关注，生物修复尤其是微生物对有机磷农药的降解具有广泛的应用前景而越来越受到青睐^[21]。不少学者利用选择性培养基分离到了各种不同来源的有机磷农药降解菌株^[22-25]。但有机磷农药多数属于酯类，一般难溶于



1.W2 菌基因组 DNA;2 和 3.影印接种前后均产生噬油斑;
4-6.只有影印接种前产生噬油斑;7 和 8.空白对照样

图 3 对 W2 几种不同处理后的质粒电泳图谱
Figure 3 Electrophoresis of W2's plasmid by different curing

水^[26]，从而在一定程度上阻碍了微生物对其的直接降解利用。而生物表面活性剂的分子结构由亲水基团和亲脂基团构成，所以可增加憎水性有机化合物与水相之间的接触面，从而提高憎水性有机化合物的水溶率，促进微生物对它的吸收和降解。因此，可以提高微生物对此类物质的降解。实验从有机农药活性污泥中筛选产表面活性剂的细菌，如做进一步的实验和分析，必将对有机磷农药的环境治理与修复产生积极的影响。

参考文献:

[1] Banat I M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review[J]. *Bioresource Technology*, 1995, 51(1): 1-12.

[2] Healy M G, Devine C M, Murphy R. Microbial production of biosurfactants[J]. *Resources, Conservation and Recycling*, 1996, 18: 41-57.

[3] Jitendra D, Desai. Microbial production of surfactants and their commercial potential[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1997, 61(1): 47-64.

[4] Kretschmer A, Bock H, Wagner F. Chemical and physical characterization of interfacial-active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkenes[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1982, 44(4): 864-870.

[5] Georgiou G S, Lin C, Sharma M M. Surface active compounds from microorganisms[J]. *Bio/Technology*, 1990, 10: 60-65.

[6] Deziel E, Paquette G, Villemur R, et al. Biosurfactant production by soil pseudomonas strain growing on polycyclicaromatic hydrocarbons[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62: 1908-1912.

[7] Batista S B, Mounteer A H, Amorim F R, et al. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites[J]. *Bioresource Technology*, 2006, 97: 868-875.

[8] 卢国满, 刘红玉, 曾光明, 等. 生物表面活性剂产生菌犁头霉菌

(*Absidia orchidis*) 的筛选及发酵条件优化[J]. 环境科学学报, 2006, 26(9):1426–1432.

LU Guo–man, LIU Hong–yu, ZENG Guang–ming, et al. Screening and optimization of cultural medium of bio–surfactant strain *Absidia orchidis*[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2006, 26(9):1426–1432.

[9] 叶和松, 盛下放, 江春玉, 等. 生物表面活性剂产生菌的筛选及其对土壤重金属铅的活化作用[J]. 环境科学学报, 2006, 26(10):1631–1636.

YE He–song, SHENG Xia–fang, JIANG Chun–yu, et al. The isolation of biosurfactant–producing bacteria and their effect on the availability of lead in soil[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2006, 26(10):1631–1636.

[10] 傅海燕, 曾光明, 黄国和, 等. 堆肥过程中产生物表面活性剂的细菌的筛选[J]. 环境科学学报, 2004, 24(5):936–938.

FU Hai–yan, ZENG Guang–ming, HUANG Guo–he, et al. Isolating biosurfactant–producing bacteria from composting[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2004, 24(5):936–938.

[11] Fátima M B, Flávio A O, Benedict C O, et al, Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil[J]. *Microbiological Research*, 2005, 160:249–255.

[12] 宁长发, 沈 薇, 孟广荣, 等. 产生物表面活性剂菌种的一种快速筛选模型[J]. 微生物学通报, 2004, 31(3):55–58.

NING Chang–fa, SHEN Wei, MENG Guang–rong, et al. A rapid screening model for biosurfactant producing strains[J]. *Microbiology*, 2004, 31(3):55–58.

[13] 潘冰峰, 徐国梁, 施邑屏, 等. 生物表面活性剂产生菌的筛选 [J]. 微生物学报, 1999, 39(3):264–267.

PAN Bing–feng, XU Guo–liang, SHI Yi–ping, et al. The isolation of microbe producing biosurfactants[J]. *Acta Micorbiologyica Sinca*, 1999, 39(3):264–267.

[14] 沈 萍, 范秀容, 李广武. 微生物学试验 (第三版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999.

SHEN Ping, FAN Xiu–rong, LI Guang–wu. Microbiology test manual (version III)[M]. Beijing: Higher Education Press. 1999.

[15] Lu ZZ. Bacterial taxonomy[M]. Wuhan; Wuhan University Press, 1994.

[16] Devereux R, Willis S G. Amplification of ribosomal RNA sequences. molecular microbial ecology manual[M]. Netherland: Kluwer Academic Publishers, 1995.

[17] 仇 磊, 袁红莉. 一株菲降解细菌的分离及其特性 [J]. 环境科学, 2005, 26(1):159–163.

ZHANG Lei, YUAN Hong–li. Screening for phenanthrene–degrading bacteria and its characteristics[J]. *Environmental Science*, 2005, 26(1):159–163.

[18] 马士金, 孙国萍. 一种便捷快速检测质粒 DNA 的方法[J]. 遗传, 1983, 5(2):15–16.

MA Shi–jin, SUN Guo–ping. A rapid method for detecting plasmid DNA[J]. *Heteditas (Beijing)*, 1983, 5(2):15–16.

[19] Lou K, Ban R, Zhao X M. Curing of the bacillus subtilis plasmid using sodium dodecyl sulfate[J]. *Transactions of Tianjin University*, 2002, 8(3):149–152.

[20] 娄 恺, 班 睿, 赵学明. 细菌质粒的消除[J]. 微生物学通报, 2002, 29(5):99–103.

LOU Kai, BAN Rui, ZHAO Xue–ming. Plasmid curing in bacteria[J]. *Microbiology*, 2002, 29(5):99–103.

[21] 高仙灵, 卢慧星, 李国婧. 有机磷生物修复研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(3):127–131.

GAO Xian–ling, LU Hui–xing, LI Guo–jing, et al. Progress of bioremediation of organophosphate[J]. *China Biotechnology*, 2007, 27(3):127–131.

[22] Fulthorpe R R, Rhodes A N, Tiedje J M. High levels of endemic city of 3–chlorobenzoate–degrading soil bacteria[J]. *Appl Environ Microbial*, 1998, 64(5):1620–1627.

[23] Topp E, Zhu H, Nour S M, et al. Characterization of an atrazine –degrading *Pseudaminobacter* sp. isolated from Canadian and French agricultural soils[J]. *Appl Environ Microbial*, 2000, 66(7):2773–2782.

[24] 江玉姬, 邓优锦, 刘新锐, 等. 一株能高效降解几种有机磷农药的菌株 JS018 的鉴定[J]. 微生物学报, 2006, 46(3):463–466.

JIANG Yu–ji, DENG You–jin, LIU Xin–rui, et al. Isolation and identification of a bacterial strain JS018 capable of degrading several kinds of organophosphate pesticides[J]. *Acta Micorbiologyica Sinca*, 2006, 46(3):463–466.

[25] 张瑞福, 吴旭平, 樊 奔, 等. 污染土壤中有有机磷农药降解菌的分离及其多样性[J]. 生态学报, 2005, 25(6):1502–1508.

ZHANG Rui–fu, WU Xu–ping, FAN Ben, et al. Diversity of the organophosphate pesticide–degrading bacteria isolated from organo–phosphate pesticide polluted soil[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(6):1502–1508.

[26] 方晓航, 仇荣亮. 有机磷农药在土壤环境中的降解转化 [J]. 环境科学与技术, 2003, 26(2):57–59.

FANG Xiao–hang, QIU Rong–liang. On deegradation and transfor–mation of organophosphorous pesticide in soil[J]. *Environmental Science and Technology*, 2003, 26(2):57–59.