

多环芳烃降解菌的细胞融合及降解性能研究

卢 静¹, 侯 彬^{1*}, 郭楚玲²

(1.中北大学化工与环境学院, 太原 030051; 2.华南理工大学环境与能源学院, 广州 510006)

摘要:以菲降解菌——鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas* sp.)GY2B 和芘降解菌——假单胞菌(*Sphingomonas* sp.)GP3A 为研究对象, 对两株菌进行融合前的抗药性标记筛选, 融合后的菌株通过形态学及分子生物学进行分析鉴定, 并测定其对菲和芘的降解效果。结果表明, 筛选出 GY2B 的遗传标记为哌拉西林抗性($80\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), GP3A 的遗传标记为头孢他啶抗性($80\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)或红霉素抗性($100\sim 150\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。通过菲和芘的初步降解实验筛选出一株融合菌株 F14, 通过平板菌落形态、扫描电镜(SEM)及 PCR-RFLP 分析鉴定 F14 是不同于亲本的菌株, 是 GY2B 和 GP3A 的融合子。融合菌株 F14 既可以降解菲又可以降解芘, 对初始浓度为 $100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的菲和芘的降解率分别为 99%(24 h)和 18%(10 d), 降解能力和降解效果明显高于其亲本。

关键词:菲; 芘; 融合菌; 遗传标记; 多环芳烃

中图分类号:X53 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2015)06-1134-08 doi:10.11654/jaes.2015.06.017

Cell Fusion of PAHs-degrading Bacteria and Its Degradation Ability

LU Jing¹, HOU Bin^{1*}, GUO Chu-ling²

(1.School of Chemical Engineering and Environment, North University of China, Taiyuan 030051, China; 2.School of Environment and Energy, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: In the present study, a phenanthrene-degradation strain(*Sphingomonas* sp.) GY2B and a pyrene-degradation strain(*Pseudomonas* sp.) GP3A were used to obtain a fusant capable of degrading PAHs. The antibiotic resistance test was used to screen the genetic markers. Morphology and molecular biology were employed to identify fusants. Results showed that the genetic markers of *Sphingomonas* sp. GY2B was piperacillin($80\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)-resistant and *Pseudomonas* sp. GP3A was ceftazidime($80\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) or erythromycin($100\sim 150\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)-resistant, respectively. A fusant strain with the highest degradation of both phenanthrene and pyrene was selected and named F14. Tests by colony morphology, electron microscope, scanning electron microscope(SEM) and molecular technology(PCR-RFLP) indicated that the strain F14 was a fusant of GP3A and GY2B, and was different from its parents. F14 could degrade both phenanthrene and pyrene. It almost completely degraded phenanthrene($100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) within 24 hours, much quicker than GY2B and other strains. F14 degraded 18% of pyrene($100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) within 10 days, still higher than GP3A.

Keywords: phenanthrene; pyrene; fusant strain; genetic marker; PAHs

多环芳烃是一类广泛分布于环境中并具有显著的致癌、致畸、致突变效应的持久性有机污染物, 在持久性有机污染物(POPs)中居于重要地位^[1-2]。鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas* sp.)GY2B 和假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)GP3A 是环境中重要的多环芳烃(PAHs)降解菌, 两者都是革兰氏阴性菌。GY2B 是一株菲降解菌, 对芘不能降解, GP3A 是一株芘降解菌, 对菲基

本上没有降解效果。在实际 PAHs 污染的土壤中, PAHs 不会只以单一的物质存在, 一般会有多种底物同时以混合物的形式存在^[3-5], 所以获得能够同时降解不同 PAHs 的菌株是当前研究的一个热点。原生质体融合技术具有不需要详细了解研究对象的遗传背景, 不需要构建载体系统, 可在种内、种间、属间、甚至目间实现原生质体融合, 可以获得遗传性能优良的重组体等特点, 在环境领域的应用越来越广^[6-8]。以 GY2B 和 GP3A 为亲本进行原生质体融合, 构建一株能够同时并且高效降解菲和芘的菌株是本研究的目的。此研究的关键是必须从大量的非目标融合子中筛选出具有上述性状的融合子, 因为两株菌的原生质体融合

收稿日期:2015-01-22

基金项目:国家自然科学基金青年基金(41401355, 41101291); 山西省青年科技研究基金(2014021034-2, 2015021053)

作者简介:卢 静(1982—), 女, 山西襄汾人, 博士, 讲师, 主要研究方向为污染土壤与水体的生物修复。E-mail: lujing19822@163.com

* 通信作者:侯 彬 E-mail: houbin566@163.com

后,不仅有 GY2B 和 GP3A 的融合,还有 GY2B 和 GY2B、GP3A 和 GP3A 自身的融合以及大量未融合的细胞,我们期望得到的是既能降解菲又能降解芘的 GY2B 和 GP3A 的融合子,所以原生质体融合前必须对亲本菌株进行遗传标记以便于顺利地筛选到融合菌株,融合后的菌株也必须经分析鉴定来确定其是真正的融合子。抗药性筛选方法具有一定的针对性,并且比较灵敏、快速,是一种较好的筛选方法^[9-10]。

1 材料与方法

1.1 菌株及培养基制备

芘降解菌 GP3A(Genbank 登录号:EU233280)和菲降解菌 GY2B(Genbank 登录号:DQ139343)是本实验室先前在石油污染的土壤中筛选得到的,其培养方法及无机盐基础培养基(MSM)见参考文献[11]和[12]。

混合抗生素溶液的牛肉膏蛋白胨固体培养基(NR):牛肉膏 5.0 g,蛋白胨 10.0 g,NaCl 5.0 g,蒸馏水 1 L,琼脂 1.0%,调 pH 值为 7.2~7.4。高压蒸汽灭菌 20 min 后,冷却到 60℃左右倒平板。

1.2 试剂及培养基

菲购于 Fluka 公司,芘、甲醇、*Taq* 酶、DNA Marker 购于 Sigma 公司,6×Loading Buffer 和 UNIQ-10 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒购于上海生工。*Afa* I 核酸内切酶和 *Msp* I 核酸内切酶购于加拿大 BBI。

PCR 反应引物 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCT-CAG-3')和 1522R(5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

正己烷重蒸后使用,菲和芘用正己烷分别配成浓度 10 g·L⁻¹ 和 5 g·L⁻¹ 的贮备液,置于 4℃冰箱中保存备用。无水硫酸钠于马弗炉中 400℃灼烧 4 h 后使用。医用脱脂棉用二氯甲烷抽提 72 h,通风橱风干后放入防潮箱。所有萃取过程用到的玻璃器皿先用重铬酸钾洗液清洗,静置过夜后依次用自来水、蒸馏水冲洗,放入烘箱中于 120℃烘干后用锡纸封口,放置备用。

抗生素储备液制备:取一定质量抗生素,其中氯霉素用乙醇溶解,其他抗生素用去离子水溶解,配成浓度为 2.5 mg·mL⁻¹ 的母液。用一次性注射器使抗生素溶液通过孔径为 0.22 μm 的滤膜,过滤后的抗生素除氨苄青霉素和氯霉素置于常温下外,其余全部置于-20℃的环境下保存备用。

菲、芘无机盐培养液:取一定量的菲(芘)储备液,置于灭菌的三角瓶中,待正己烷挥发完毕加入经高压

蒸汽灭菌的无机盐基础培养基。

1.3 GP3A 和 GY2B 菌种抗药性的检测

(1)在 100 mL 锥形瓶中配制 50 mL 牛肉膏蛋白胨固体培养基溶液。灭菌后,将固体培养基置于 55℃水浴锅中待用。

(2)在冷却至 45~55℃的固体培养基溶液中分别加入不同体积的抗生素储备液,摇匀并排除气泡,倒平板冷却制成一系列浓度的固体培养基。每种浓度三个平行样,以一个不加抗生素的平板做空白对照。

(3)取 1 mL 活化后的 GP3A 和 GY2B 菌液,用去离子水稀释 1000 倍,涂布于含有抗生素的固体培养基上,30℃恒温培养 48 h 后观察细菌生长情况。

1.4 原生质体制备及融合

1.4.1 原生质体的制备

将两种菌的菌液(OD₆₀₀=1.0)在 4℃下以 8000 r·min⁻¹ 的转速离心 10 min,收集的菌体用磷酸缓冲液(PBS)冲洗两遍并重新悬浮在含有 0.5 mol·L⁻¹ 蔗糖的 PBS 中;然后菌体用 0.1%的 EDTA(pH=8.0)在水浴振荡器中以 37℃、110 r·min⁻¹ 预处理 20 min;收集菌体并用高渗液(SMM:0.5 mol·L⁻¹ 蔗糖、20 mmol·L⁻¹ MgCl₂、20 mmol·L⁻¹ 马来酸钠,pH=6.5)冲洗两遍,将 GP3A 和 GY2B 菌体重新悬浮在 20 mL 含有 5 mg·mL⁻¹ 溶菌酶的 SMM 缓冲液中,在水浴摇床中以 37℃、110 r·min⁻¹ 分别处理 100 min 和 80 min,然后菌液用 8000 r·min⁻¹ 的转速离心 10 min,弃去上清液,再用 SMM 洗涤除酶后将原生质体悬浮于 SMM 中。

1.4.2 原生质体融合

将两种菌的原生质体在含有 1 mL 40% 聚乙二醇、10 mmol CaCl₂、15% 二甲基亚砷的 PEG6000 溶液中诱导融合 5 min,收集融合子。

1.5 菲和芘的测定

菲和芘的测定方法见参考文献[11]和[12],具体步骤如下:

(1)将培养液经梨形分液漏斗用重蒸过的正己烷萃取两次,将有机相合并于鸡心瓶。有机相通过旋转蒸发在 35℃下减压浓缩到 3 mL 左右,然后经无水硫酸钠脱水后(在一个小漏斗底部放一点棉花,上面放约 2 g 无水硫酸钠)转入另一个干净的鸡心瓶,再在旋转蒸发仪上减压蒸发、浓缩到一定体积后用 5 mL 或 25 mL 容量瓶定容。最后所有样品转移至 2 mL 细胞瓶中,用压盖器压好盖子,放置-20℃冰箱中保存,待分析。

(2)菲和芘的浓度采用高效液相色谱仪(安捷伦

1200)分析,采用 HP-Extender-C18 柱,流动相为甲醇:水=80:20,流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。菲和芘的检测波长分别为 254、240 nm。该方法对菲和芘的检测限分别为 $10、50 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, 菲的回收率在 83.86%~122.86%之间,标准偏差 2.61%~25.28%,芘的回收率在 91.14%~106.34%之间,标准偏差 4.71%~16.55%。

1.6 形态学分析与扫描电镜观察

将菌株 GP3A、GY2B 与融合菌株用涂布法接种到 NR 固体培养基,置恒温培养箱($30 \text{ }^{\circ}\text{C}$)培养 2~3 d,观察融合菌株在 NR 固体培养基上的菌落特征。

通过扫描电镜的观察分析融合菌株 F14 和亲本的形态差异,具体步骤如下:

(1)细菌固定:NR 培养基培养过夜的细胞用 $0.1 \text{ mol PBS}(\text{pH}=7.0)$ 清洗三遍,每次 10 min,加入 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷的 2.5% 体积分数戊二醛,在 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 固定 12 h,吸出固定剂,用 $\text{PBS}(\text{pH}=7.0)$ 洗 3 次,每次 30 min,再用 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷的 1% 四氧化锇固定 3 h,然后用 $0.1 \text{ mol PBS}(\text{pH}=7.0)$ 洗 3 次,每次 5 min。

(2)脱水:用系列梯度(体积分数)乙醇逐级脱水 $30\% \rightarrow 50\% \rightarrow 70\% \rightarrow 80\% \rightarrow 90\%$ 每个浓度 15 min,100% 时脱水三次,每次 10 min。 $30\%、50\%、70\%$ 在 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内脱水,其他浓度乙醇在室温脱水。

(3)替换:将乙醇倒掉,换成叔丁醇重复进行脱水步骤(2)。

(4)干燥:用 JFD-310 冷冻干燥仪进行干燥。

(5)喷镀金属:将干燥的样品用导电性好的粘合剂或其他粘合剂粘在金属样品台上,然后用 JFC-1600 离子溅射镀金膜约 10 nm。

(6)观察:利用 JSM-6360LV 扫描电子显微镜进行观察并拍照(条件:EHT=25.00 kV)。

1.7 PCR-RFLP 鉴定

(1)菌种总 DNA 的提取:采用 UNIQ-10 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒。

(2)50 μL PCR 反应体系:DNA 模板 ($100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 1 μL ; MgCl_2 ($25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 3 μL ;PCR 缓冲液 ($10 \times$) 5 μL ; dNTP ($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1 μL ; 引物 27F ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.5 μL ; 引物 1522R ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.5 μL ; *Taq* 酶 ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 1 μL ; 去离子水 38 μL 。PCR 扩增条件为: $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 30 个循环; $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 最终延伸 7 min。

(3)PCR 产物酶切:用 *Afa* I 和 *Msp* I 限制性内切酶对扩增得到的 PCR 产物进行酶切。30 μL 酶切反应体系:15 μL PCR 产物,3 μL $10 \times$ 缓冲液,1 μL 内切

酶(10 U),11 μL ddH₂O, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 4 h。反应中止后,取 5 μL 酶切后反应产物用 2.5% 琼脂糖凝胶电泳,然后用美国 BIO-RAD 凝胶成像系统观察拍照。

1.8 菲和芘的降解及比生长率的测定

取适量的菲和芘的正己烷溶液,加入灭菌的锥形瓶中,待正己烷挥发完,加 20 mL MSM 培养基,使菲和芘的终浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,调节 pH 在 7.0 左右,加入 1 mL 融合菌液,将锥形瓶放入摇床中在 $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下以 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的转速培养。菲在 0、8、12、24、36、48、60 h 取样,芘在 0、24、48、72、120、168、216、240 h 取样,每个时间点设置 3 个平行样,3 瓶培养液整瓶萃取,测定菲和芘的残留量。空白对照只加菲和芘于无机培养液中。

细菌的比生长速率以 μ 表示,单位为 h^{-1} 。计算公式如下:

$$\mu = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t}$$

式中: t 为时间, h; N_t 为培养 t 时间的生物量, $\text{个} \cdot \text{mL}^{-1}$; N_0 为开始时生物量, $\text{个} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2 结果与讨论

2.1 利用抗生素筛选融合子

微生物耐药性以及耐药机制的启动通常是由抗生素抗性基因调控的^[13-15],不同种的微生物对同一种药物的抗性不同,利用这种差异可对融合子进行选择^[16-17]。假单孢菌株 GP3A 的耐药性试验结果见表 1。本实验选用 16 种抗生素,浓度范围 $40 \sim 300 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。在此浓度范围内可以看出,任何浓度的新霉素和氨基糖苷类对 GP3A 完全没有抑制作用,说明 GP3A 对新霉素和氨基糖苷类具有抗性。从表 1 也可以看出,任何浓度的新霉素和氨基糖苷类对 GY2B 完全没有抑制作用, GY2B 和 GP3A 一样,对新霉素和氨基糖苷类也具有抗性。

进行菌株 GY2B 和 GP3A 的抗生素敏感试验时,为避免筛选出来的融合子是一种细胞融合或未融合的单细胞,选取只对 GY2B 有抗性的抗生素和只对 GP3A 有抗性的抗生素,用于对融合细胞的筛选。从表 1 可看出,在哌拉西林浓度为 $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, GY2B 不能生长而 GP3A 可以生长;在红霉素浓度为 $100 \sim 150 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 或头孢他啶浓度为 $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, GP3A 不能生长而 GY2B 可以生长。因此, $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的哌拉西林和头孢他啶或者 $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的哌拉西林和 $100 \sim 150 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的红霉素可以初步被选为筛选融合子的抗生素。然而由于抗生素之间可能存在的拮抗作

表 1 菌株 GP3A 和 GY2B 对抗生素的抗性测定
Table 1 Resistance to antibiotics of GP3A and GY2B

抗生素 Antibiotic/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	40	50	60	75	80	100	150	200	300
链霉素	++	++	\	\	\	--	--	--	--
庆大霉素	\	-	-	-	-	-	-	-	-
新霉素	++	++	++	++	++	++	++	++	++
妥布霉素	--	--	--	--	--	--	--	--	--
卡那霉素	++	++	++	++	++	++	\	\	\
青霉素	++	++	++	++	++	++	\	\	\
氨苄青霉素	-	-	\	-	-	-	-	-	-
哌拉西林	-	-	-	-	+	-	-	-	-
四环素	++	++	++	++	++	++	--	--	--
红霉素	++	++	+	+	+	+	+	--	--
头孢哌酮	++	++	++	++	++	\	\	\	\
头孢他啶	++	++	++	++	+	--	--	--	--
氨基南	++	++	++	++	++	++	++	++	++
环丙沙星	-	-	--	--	--	--	--	--	--
美罗培南	-	-	-	-	-	-	-	--	--
氯霉素	++	++	++	++	++	++	\	\	\

注：“+”表示在此浓度的抗生素平板中相应菌种可以生长；“-”表示在此浓度的抗生素平板中相应菌种不可以生长；“\”表示没有做过该实验。每个单元格中,左边的符号属于 GP3A,右边的符号属于 GY2B。
Note: "+" and "-" indicate growth and no growth of the strain in the plate containing antibiotic at the concentrations, respectively; "\" indicates that no test was done in this experiment. The left symbol is for GP3A and the right symbol for GY2B.

用^[18],使得 GP3A 和 GY2B 可以在含有上述浓度抗生素的再生培养基中生长,导致筛选不出融合子。我们将 GP3A 和 GY2B 分别涂布于含有上述浓度的抗生素的培养基上,经过 48 h 的 30 ℃恒温培养,发现 GP3A 和 GY2B 在两个平板中都不能生长。因此可以认为,能够在同时存在哌拉西林(80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)和头孢他啶(80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)或哌拉西林(80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)和红霉素(100~150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的再生平板上生长出来的菌体,就是 GP3A 和 GY2B 的融合子。

利用此法筛选融合子应注意,药物使用浓度不宜过高,否则会降低融合频率,同样也不可过低,浓度过低不足以抑制亲本的生长,从而降低筛选效率。除了药物质量、药物浓度及细菌耐药性遗传外,药物加入培养基时的温度也会对其产生重要影响^[17]。培养基中加入药物时的适宜温度为 45~55 ℃,如果温度过高药物会降低药效甚至完全失效,温度低于 45 ℃时琼脂会凝固以致倒不成平板,因此在具体应用时应严格控制加入药物时的培养基温度。

2.2 利用降解菲、芘效果初步筛选融合子

从含有上述两种抗生素的选择培养基中随机挑选一批菌株,经活化培养后分别涂布于含有菲或者芘的无机盐固体培养基,30 ℃培养 72 h。传代培养 8 代并挑取同时能在含有菲和芘的无机盐固体培养基上

生长并产生透明圈的菌株,将这些菌分别接种于含有 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 菲或 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 芘的无机盐液体培养基,降解菲 2 d,降解芘 10 d,最后测出剩余的菲和芘的含量,实验结果见表 2。可以看出降解菲效果最好的是 14 号菌株,降解芘效果最好的是 8 号菌株,但是 8 号菌株降解菲的效果不高,而 14 号菌株的芘降解率可以达到 37%,所以选择 14 号菌株做为后续研究对象,并命名这株菌为 F14。

2.3 F14 的形态学和扫描电镜分析

图 1 为三种菌的菌落对比图片,GY2B 菌落(图 1 A)为乳黄色,圆形,边缘整齐,不透明,光滑,湿润。

表 2 融合子对菲和芘的降解率

Table 2 Degradation efficiencies of phenanthrene and pyrene by fusant strains

融合子编号 Fusant number	菲降解率 Phenanthrene degradation efficiency/%	芘降解率 Pyrene degradation efficiency/%
7	40.95	19.7
8	41.50	50.6
10	42.95	8.2
11	39.6	10
14	80.45	37
18	46.45	32.1
23	27.38	28.59
37	41.3	13.6
38	48.6	29.4



图1 菌株GY2B(A)、GP3A(B)和融合菌株F14(C)的菌落形态
Figure 1 Colonies of GY2B(A), GP3A(B) and fusant strain F14(C) grown on NR plate

GP3A 菌落(图1B)颜色淡黄,表面光滑不透明,边缘整齐,有光泽。图1C为F14的菌落图片,F14在平板上菌落为规则的圆形、隆起,边缘整齐,表面光滑,有粘稠感,菌落颜色为白色,不透明。肉眼观察F14和GP3A要比GY2B的菌落大。融合子菌落的形态特征介于亲本菌落之间,兼而有之且不完全同于任一亲本菌落。

用电子显微镜测微尺,分别测定两亲株的融合子的细胞长轴(a)和短轴(b),按下式计算细胞的平均体积(V):

$$V = \frac{4}{3} \pi \left(\frac{a}{2} \right) \left(\frac{b}{2} \right)^2$$

每种菌取20个平行样,结果见表3。

从图2和表3数据可以看出,GY2B为短杆状,GP3A为长杆状,融合菌株F14为椭球状,比双亲都短,而直径却大于双亲。融合子体积为 $0.184 \mu\text{m}^3$,约为GP3A体积($0.096 \mu\text{m}^3$)和GY2B体积($0.078 \mu\text{m}^3$)之和。这与其他细菌或真菌原生质体融合的结论相似^[20-21]。

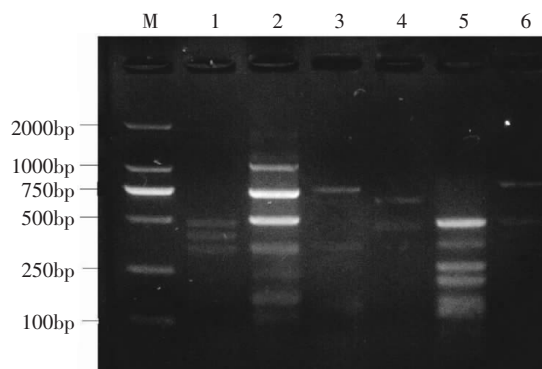
2.4 融合菌株F14的PCR-RFLP分析

为进一步鉴定融合菌株F14是不同于亲本的菌株,采用分子生物学技术——限制性片段长度多态性(PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism, PCR-RFLP)对其进行分析。图3是GP3A、GY2B和F14 rDNA用限制性内切酶进行酶切的结果图。可以

表3 融合子和亲本菌株细胞尺度和体积比较

Table 3 Sizes and volumes of fusant and its parental cells

指标	GY2B	GP3A	F14
长/ μm	1.107 ± 0.124	1.590 ± 0.202	0.948 ± 0.087
直径/ μm	0.367 ± 0.033	0.340 ± 0.039	0.609 ± 0.077
体积/ μm^3	0.078 ± 0.024	0.096 ± 0.047	0.184 ± 0.056



M: Marker; 1: GP3A/ *Afa* I; 2: GY2B/ *Afa* I; 3: F14/ *Afa* I; 4: GP3A/ *Msp* I; 5: GY2B/ *Msp* I; 6: F14/ *Msp* I

图3 GP3A、GY2B和F14 rDNA PCR-RFLP用限制性内切酶 *Afa* I 和 *Msp* I 酶切的结果

Figure 3 rDNA restriction patterns exhibited by three strains (GP3A, GY2B, fusant strain F14) after digestion with restriction enzymes *Afa* I and *Msp* I

看出,用 *Afa* I 和 *Msp* I 限制性内切酶对 PCR 产物进行酶切,酶切产物通过2.5%琼脂糖凝胶电泳显示酶

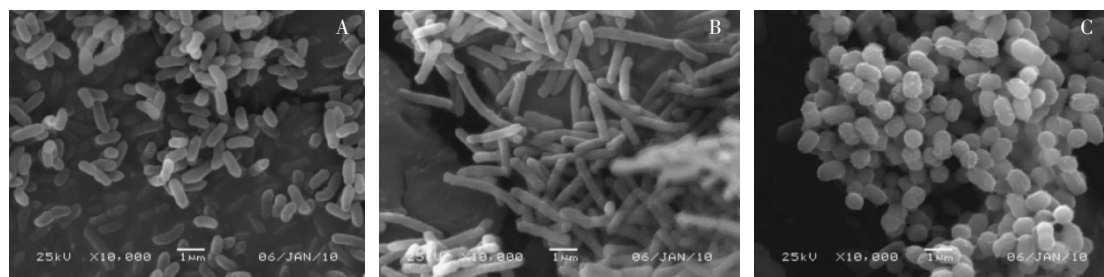


图2 菌株GY2B(A)、GP3A(B)和融合菌株F14(C)的扫描电镜照片^[19]
Figure 2 Scanning electron microscope (SEM) images of GY2B(A), GP3A(B) and fusant F14(C)

切位点有显著差异,三种菌产生的酶切片段数目和大小都不一样。PCR-RFLP 是发展最早的分子标记技术之一,其原理是检测 DNA 在限制性内切酶酶切后形成的特定 DNA 片段的大小。凡是可引起酶切位点变异的突变位点(新产生和去除酶切位点)和一段 DNA 的重组(如插入和缺失造成酶切位点间的长度发生变化)均可导致 RFLP 的产生^[22]。不同菌种之间在不同的限制性内切酶的酶切片段大小和数目上有一定的差异。由此可见,F14 是不同于亲本 GP3A 和 GY2B 的菌株。

2.5 降解菲、芘效果实验

图 4 是融合菌株 F14 和其亲本对菲和芘的降解图。从图 4a 可以看出,在起初的 12 h,F14 就将菲降解了 65%左右。降解 99%以上的菲(初始浓度为100 mg·L⁻¹) F14 需要 24 h,而亲本 GY2B 需要 48 h,和亲本 GY2B 比较,F14 降解菲的能力有很大提高。表 4 是 F14 和其他菌株对菲的降解结果,在这些菲降解菌中,相同菲初始浓度下融合菌株 F14 的降解时间快,降解百分比高,且细胞的比生长率μ 值大。这些都说明融

合菌株 F14 是一个具有高效降解菲能力的菌株。

F14 和 GP3A 降解芘的效果如图 4b 所示。对于初始浓度为 100 mg·L⁻¹ 的芘,F14 在 72 h 之前对芘的降解都比较快,降解率达到11.6%,在之后的 7 d 里降解比较缓慢,在最终的 10 d 时降解率为 18.3%,而 GP3A 在此时只可以降解 11.3%。表 5 列举了 F14 和文献报道的其他降解菌对芘的降解率,在这些芘降解菌中,F14 的降解效果要优于一些菌。实验选取了初始浓度为15、50 mg·L⁻¹ 的芘为研究对象,F14 在 10 d 时对这两种初始浓度的芘的降解率分别为 46%和 37.1%。这说明 F14 对芘是有一定降解效果的。

菲降解菌 GY2B 对芘没有降解效果,而芘降解菌 GP3A 不能降解菲,两者融合后的菌株 F14 则既可以降解菲又可以降解芘,且比亲本降解菲、芘的效果都高。这可能是因为 GY2B 和 GP3A 是相近的两个菌属^[29],在遗传背景上存在着一定程度的相似性。融合子是由于亲本的原生质体发生了基因重组,导致在融合细胞中具有双亲的细胞质和细胞核,因而融合子细胞合成并分泌有关的加氧酶类、降解有机物的能力,优于任

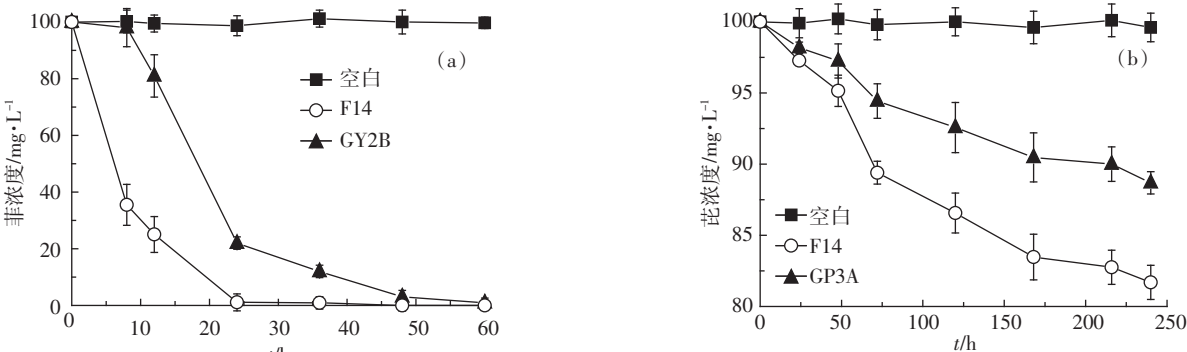


图 4 F14 和其亲本对菲(a)和芘(b)的降解效果比较

Figure 4 Phenanthrene(a) and pyrene(b) degradation by strain F14 and its parental strains

表 4 F14 和文献报道的其他降解菌在菲降解时间、菲降解百分比和细胞比生长率方面的比较^[19]

Table 4 Comparisons of time and percentages of phenanthrene degradation by and microbial specific growth rate(μ) of strain F14 with those in literature

菲初始浓度/mg·L ⁻¹ Initial concentration	降解时间 Time/d	菲降解/% Degradation percentage	比生长率/μ·h ⁻¹ Specific growth rate	菌株 Strain	参考文献 Reference
100	1	99	0.146	Fusant F14	本研究
100	2	99.1	0.135	<i>Sphingomonas</i> sp. GY2B	[23]
100	30	99.5	0.028	<i>Rhodotorula glutini</i>	[24]
100	30	99.8	0.041	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	[24]
100	2	95.0	0.033	<i>Pseudomonas mendocina</i>	[25]
100	14	58.0	ND	Mixed culture	[26]
100	14	100	ND	Mixed culture	[27]
100	6	50	ND	<i>Ganoderma lucidum</i>	[28]

注:ND 表示没有检测。

表5 本研究得到的融合菌和文献报道的其他降解菌对芘降解率的比较

Table 5 Comparisons of pyrene degradation by a fusant strain obtained in this study with that reported in literature

芘初始浓度/mg·L ⁻¹ Initial concentration	降解时间 Time	芘降解率/% Degradation percentage	分离到的微生物 Strains	参考文献 References
10	12 d	19	Mixed culture F2 (<i>P. putida</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Flavobacterium</i> sp.)	[30]
0.5	14 d	25	Marine bacterium	[31]
0.4	32 d	40	<i>Mycobacterium</i> sp. Strain RGJ II-135	[32]
100	44 h	11.3	<i>Actinomyces</i> sp. DP4	[33]
100	44 h	13.6	<i>Actinomyces</i> sp. DP6	[33]
50	5 d	25.9	<i>Aminobacter ciceronei</i> B05	[34]
15	10 d	46	F14	本研究
50	10 d	37.1	F14	本研究
100	10 d	18	F14	本研究

一亲本菌株。同时,融合菌株 F14 可以同时降解菲和芘的能力预示了其在处理多环芳烃污染土壤的实际应用中,可以提高处理效率,具有开发应用的前景。融合菌株 F14 对其他多环芳烃的降解能力将在后续的文章中报道,并对 F14 的降解酶、降解基因等做进一步的研究。

3 结论

(1)通过 16 种抗生素不同浓度的耐药性实验,选出了哌拉西林($80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)+头孢他啶($80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)或哌拉西林($80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)+红霉素($100\sim 150 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的组合可以作为筛选 GY2B 和 GP3A 融合子的抗生素药物。

(2)通过形态学、扫描电镜观察,F14 与亲本菌株 GY2B 和 GP3A 在形态上有明显不同,通过分子生物学技术 PCR-RFLP 分析,鉴定融合菌株 F14 与 GY2B 和 GP3A 为不同的菌种,是 GY2B 和 GP3A 的融合子。

(3)F14 在 24 h 可以将初始浓度为 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的菲降解 99% 以上,与亲本 GY2B 及文献报道的其他降解菌相比,F14 具有较高的降解菲的能力。F14 对于初始浓度为 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的芘也具有降解作用,在 10 d 时的降解率为 18%,比其亲本 GP3A 的降解率高。融合后的菌株既可以降解菲又可以降解芘。

参考文献:

- [1] Wang Y F, Wu Y, Pi N, et al. Investigation of microbial community structure in constructed mangrove microcosms receiving waste water-borne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs)[J]. *Environmental Pollution*, 2014, 187: 136-144.
- [2] Lang C, Tao S, Liu W X, et al. Atmospheric transport and outflow of polycyclic aromatic hydrocarbons from China[J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(14): 5196-5201.
- [3] Nesta B S, Yoshinori I, Shouta M M, et al. Occurrence, distribution, sources and toxic potential of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface soils from the Kumasi Metropolis, Ghana[J]. *Science of the Total Environment*, 2014, 496: 471-478.
- [4] Chen H Y, Teng Y G, Wang J S, et al. Source apportionment of sediment PAHs in the Pearl River Delta region (China) using nonnegative matrix factorization analysis with effective weighted variance solution[J]. *Science of the Total Environment*, 2013, 444: 401-408.
- [5] Patricia M, Romain A, Ismahen S, et al. Selective extraction of PAHs from a sediment with structural preservation of natural organic matter[J]. *Chemosphere*, 2014, 107: 476-479.
- [6] Deng Z J, Cao L X, Zhang R D, et al. Enhanced phytoremediation of multi-metal contaminated soils by interspecific fusion between the protoplasts of endophytic *Mucor* sp. CBRF59 and *Fusarium* sp. CBRF14[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2014, 77: 31-40.
- [7] Li M, Yi P, Liu Q, et al. Biodegradation of benzoate by protoplast fusant via intergeneric protoplast fusion between *Pseudomonas putida* and *Bacillus subtilis*[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2013, 85: 577-582.
- [8] Deng Z J, Zhang R D, Shi Y, et al. Enhancement of phytoremediation of Cd- and Pb-contaminated soils by self-fusion of protoplasts from endophytic fungus *Mucor* sp. CBRF59[J]. *Chemosphere*, 2013, 91(1): 41-47.
- [9] 谭悠久, 谭红, 周金燕, 等. 以抗生素抗性为选择标记的毛壳菌种间原生质体融合[J]. 华东理工大学学报: 自然科学版, 2010, 36(1): 36-41.
TAN You-jiu, TAN Hong, ZHOU Jin-yan, et al. Interspecies protoplast fusion between *Chaetomium cupreum* and *C. globosum* with antibiotic resistance markers[J]. *Journal of East China University of Science and Technology (Natural Science Edition)*, 2010, 36(1): 36-41.
- [10] 刘玲, 叶博, 刘长江. 原生质体融合亲本菌株抗药性标记的筛选[J]. 江苏农业科学, 2007(3): 225-227.
LIU Ling, YE Bo, LIU Chang-jiang. Screening of resistance tag of the parental fungus strains by protoplast fusion technique[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2007(3): 225-227.
- [11] Tao X Q, Lu G N, Dang Z, et al. Isolation of phenanthrene-degrading

- bacteria and characterization of phenanthrene metabolites[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2007, 23(5):647-654.
- [12] 陈晓鹏, 易筱筠, 陶雪琴, 等. 石油污染土壤中芘高效降解菌群的筛选及降解特性研究[J]. 环境工程学报, 2008, 2(3):413-417.
- CHEN Xiao-peng, YI Xiao-yun, TAO Xue-qin, et al. Screening and characterization of pyrene-degrading microbial[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2008, 2(3):413-417.
- [13] 张博. 城市污水中肠杆菌的抗生素耐药性和多种耐药基因的检测[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2013.
- ZHANG Bo. Detection of antibiotic resistance and various resistance genes in *Enterobacteriaceae* isolated from the urban sewage[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2013.
- [14] 刘春磊, 刘艳, 谢丽萍, 等. 利用基因组改组技术改良 7-ACA 产生菌[J]. 中国医药工业杂志, 2013, 44(5):440-445.
- LIU Chun-lei, LIU Yan, XIE Li-ping, et al. Improvement of 7-ACA production by genome shuffling[J]. *Chinese Journal of Pharmaceuticals*, 2013, 44(5):440-445.
- [15] 尹良芬. 利用原生质体融合技术构建梨孢属融合子的研究方法初探[J]. 西南农业学报, 2011, 24(1):233-239.
- YIN Liang-fen. Constructing fusants by protoplast fusion between *Oryza* and *Eleusine* pathotypes of *Magnaporthe oryzae*[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2011, 24(1):233-239.
- [16] 高鹤. 脂肪酶产生菌的细胞融合选育及其产酶条件优化[D]. 南昌:南昌大学, 2010.
- GAO He. Selection of lipase produce strains by protoplast fusion and the conditions optimization[D]. Nanchang: Nanchang University, 2010.
- [17] 陈光荣, 肖克宇, 翁波, 等. 细胞融合技术及其在生物医药中的应用[J]. 动物医学进展, 2004, 25(1):19-21.
- CHEN Guang-rong, XIAO Ke-yu, WENG Bo, et al. Application of cell fusion technique in biological medicine[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2004, 25(1):19-21.
- [18] Muir III W W. Drug interactions, analgesic protocols and their consequences, and analgesic drug antagonism[M]. 3rd ed. USA: Elsevier-Health Sciences Division, 2015:335-355.
- [19] Lu J, Guo C L, Li J, et al. A fusant of *Sphingomonas* sp. GY2B and *Pseudomonas* sp. GP3A with high capacity of degrading phenanthrene[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2013, 29(9):1685-1694.
- [20] Bottcher F, Becher D, Klinner U, et al. Genetic structure of yeast hybrids constructed by protoplast fusion[J]. *Advances in Protoplast Research*, 1980:99-104.
- [21] 程树培, 耿小六, 汪蓉, 等. 光合细菌种间原生质体融合及融合子鉴定[J]. 南京大学学报, 1993, 29(3):407-413.
- CHENG Shu-pei, GENG Xiao-liu, WANG rong, et al. Protoplast fusion between photosynthetic bacteria inter-species and the fusants identification[J]. *Journal of Nanjing University(Nature Sciences Edition)*, 1993, 29(3):407-413.
- [22] 魏晓棠, 肖海军, 白桦, 等. 大猿叶虫四地理种群的 PCR-RFLP 方法鉴别及遗传多样性分析[J]. 昆虫学报, 2010, 53(2):209-215.
- WEI Xiao-tang, XIAO Hai-jun, BAI Hua, et al. Identification and genetic diversity of four geographic populations of *Colaphellus bowringi* Baly (Coleoptera: Chrysomelidae) in China by PCR-RFLP[J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2010, 53(2):209-215.
- [23] Tao X Q, Lu G N, Yi X Y, et al. Isolation of phenanthrene-degrading microorganisms and analysis of metabolites of phenanthrene[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2006, 25(1):190-195.
- [24] Romero M, Cazau M, Giorgieri S, et al. Phenanthrene degradation by microorganisms isolated from a contaminated stream[J]. *Environmental Pollution*, 1998, 101(3):355-359.
- [25] Tian L, Ma P, Zhong J J. Kinetics and key enzyme activities of phenanthrene degradation by *Pseudomonas mendocina*[J]. *Process Biochemistry*, 2002, 37(12):1431-1437.
- [26] Tam N F Y, Guo C L, Yau W Y, et al. Preliminary study on biodegradation of phenanthrene by bacteria isolated from mangrove sediments in Hongkong[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2002, 45:316-324.
- [27] Janbandhu A, Fulekar M H. Biodegradation of phenanthrene using adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 187(1-3):333-340.
- [28] Ting W, Yuan S, Wu S, et al. Biodegradation of phenanthrene and pyrene by *Ganoderma lucidum*[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2011, 65(1):238-242.
- [29] 黄海东, 刘云, 刘如林. 合成生物聚合物的重要微生物资源——鞘氨醇单胞菌[J]. 微生物学报, 2009, 49(5):560-566.
- HUANG Hai-dong, LIU Yun, LIU Ru-lin. *Sphingomonas* sp.: An important microbial resources for biopolymer synthesis[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(5):560-566.
- [30] Trzesicka M D, Ward O. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a mixed culture and its component pure cultures, obtained from PAH-contaminated soil[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1995, 41(6):470-476.
- [31] Heitkamp M A, Cerniglia C E. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterium isolated from sediment below an oil field[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54(6):1612-1614.
- [32] Schneider J, Grosser R, Jayasimhulu K, et al. Degradation of pyrene, benz[a]anthracene, and benzo[a]pyrene by *Mycobacterium* sp. strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(1):13-19.
- [33] 刘艳锋, 周作明, 李小林, 等. 芘降解菌的分离纯化及其降解性能测定[J]. 华侨大学学报:自然科学版, 2008, 29(002):267-269.
- LIU Yan-feng, ZHOU Zuo-ming, LI Xiao-lin, et al. Isolation and purification of pyrene degrading strains and measurement of their degradation capability[J]. *Journal of Huaqiao University(natural science)*, 2008, 29(002):267-269.
- [34] 王元芬, 张颖, 任瑞霞, 等. 芘高效降解菌的分离鉴定及其降解特性的研究[J]. 生物技术, 2009, 19(1):58-61.
- WANG Yuan-fen, ZHANG Ying, REN Rui-xia, et al. Identification and characterization of highly efficient pyrene-degrading bacteria[J]. *Biotechnology*, 2009, 19(1):58-61.