

絮凝基因的克隆及其絮凝机理分析

常玉广, 马放, 郭静波, 任南琪

(哈尔滨工业大学市政环境工程学院, 哈尔滨 150090)

摘要:分离到 1 株具有强絮凝特性的芽孢杆菌 *Bacillus* sp. F2, 絮凝率达 84 %, 并构建絮凝基因组文库. 以絮凝菌 F2 为实验材料, 提取基因组总 DNA, 经限制性内切酶 *Sau*3AI 部分酶切后, 与用限制性内切酶 *Bam*HI 完全酶切的载体 PUC19DNA 连接, 并转化到感受态细胞 JM109 中. 然后将其涂布于含氨苄青霉素的 LB 培养基上, 过夜培养后, 经蓝白斑筛选, 构建了絮凝基因组文库, 该文库包含 3.5×10^4 个重组子, 经测定文库滴度为 3.5×10^5 pfu/mL. 从文库中筛选而获得 1 株表达絮凝活性的大肠杆菌阳性克隆子 FC2. 序列分析得出该克隆序列为新的絮凝基因. 絮凝试验测定 FC2 的絮凝率为 90 %, 稍高于原絮凝菌 F2, 高于受体菌 JM109 (6.9 %). 红外光谱分析证明 FC2 的絮凝有效成分与 F2 一致, 说明 FC2 絮凝性状遗传于原絮凝菌 F2. 采用轻敲模式下的原子力显微镜成像技术、Zeta (ξ) 电位测定对加入絮凝剂 FC2 与加入絮凝剂 F2、不加入絮凝剂的絮凝微观形貌进行了测定. 原子力显微镜成像显示, 加入克隆菌 FC2 发酵液的高岭土悬浮液 (5 % 的高岭土水溶液) 形成的絮凝体出现较大而且紧密的球形颗粒结构, 且表面积粗糙, 凹凸程度大, 具有大的比表面积和吸附液体悬浮颗粒的能力. 向高岭土悬浮液中加入克隆菌 FC2 发酵液后, 絮凝颗粒由不定形且松散的结构转变为密集分布、水平尺寸均匀的球形结构, 表明克隆菌 FC2 发酵液中的凝集素容易以高岭土悬浮颗粒为中心, 吸附在其表面, 而且絮凝试验中絮凝率达 90 %, 从更直观上进一步证实了克隆菌 FC2 发酵液的除污染效能. Zeta (ξ) 电位测定结果表明, 离子键作用强度不同, 致使絮凝形态存在着差异, 为研究生物絮凝剂的絮凝机理提供了有力的依据.

关键词:絮凝基因; 原子力显微镜; Zeta (ξ) 电位; 微观形貌

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301 (2007) 12-2849-07

Flocculent Genomic Clone and Flocculating Mechanism Analysis

CHANG Yu-guang, MA Fang, GUO Jing-bo, REN Nan-qi

(School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

Abstract: One strain, named as *Bacillus* sp. F2, of which flocculent ability can reach 84 %, was separated. Flocculent genomic library was constructed. The total genomic DNA of F2 was extracted. It was partly digested by restriction enzyme *Sau*3AI and then was connected with carrier PUC19DNA which was totally digested by restriction enzyme *Bam*HI and further was converted to competent cells JM109. These cells were smeared on the ampicillin substrate. After one night culture, we selected them by white-blue spot screening and constructed the flocculent genomic library. The library included 3.5×10^4 recons and the titre was 3.5×10^5 dpfu/mL. strain of *Escherichia coli*. positive clone FC2, which could express flocculent activity, was acquired after selection. Flocculent tests showed that the flocculent efficiency of FC2 was 90 %, which was slightly higher than the original flocculent bacterium F2 and greatly higher than the competent cell JM109 (6.9 %). It demonstrated that FC2's flocculent characteristic inherited from the original flocculent bacterium F2. By adopting the tapping mode AFM and Zeta-potential test, the flocculent microtopography of FC2, F2 and pure kaolin suspending solution was identified. The AFM study revealed that, compared to the kaolin suspending solution with and without F2's fermented liquid, the kaolin suspending solution which has cloning bacterium FC2's fermented liquid had larger flocculent gel and more compact spherical structure, and the surface was rough with high degree concave and convex, and had large specific surface area and strong adsorption ability to the suspending particles in the solution. After adding the fermented solution of cloning bacterium FC2 into kaolin suspending solution, the amorphous and incompact flocculent particles transformed into spherical structure which was compact and had even horizontal dimension, which indicated that the agglutinin in FC2's fermented liquid could easily take kaolin suspending particles as its adsorption core and adsorbed on its surface and the flocculent efficiency was about 90 %, which gave further confirmation to the great pollution removal capability of FC2's fermented liquid. The results of Zeta-potential test illustrated that the intensity of electrovalent bond was different, resulting in various flocculent morphology, which provided significant evidences for studying flocculent mechanisms of bioflocculant.

Key words: flocculent gene; AFM; Zeta-potential; microtopography

生物絮凝剂的絮凝效果在受到其自身发酵条件控制的同时, 还与其絮凝基因^[1~4]、絮凝剂对水体颗粒物的吸附作用^[5,6]有关. 由于微生物絮凝剂是由微生物产生的有絮凝活性的代谢产物, 其有效成分为多糖类物质^[7,8], 因此它受到多种因素的影响, 其中

遗传因素是内在的依据. 国内学者多年的研究表明,

收稿日期: 2007-01-22; 修订日期: 2007-03-06

基金项目: 国家重点基础研究发展规划 (973) 项目 (2004CB418505); 哈尔滨市科委科技攻关项目 (2004AA4CS048)

作者简介: 常玉广 (1973~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为环境生物技术与污水处理, E-mail: changyuguang@yahoo.com.cn

酵母菌中絮凝基因^[10~13]的表达机理复杂,由多个基因控制絮凝基因的表达功能。经过修饰基因和校正基因等调控基因的作用之后,絮凝基因方可有效地表达出絮凝素^[9],*FlO1*是迄今为止研究最为详尽的1个。1994年,Junji等^[10]报道了完整的*FlO1*全序列。它包含1个4611的ORF,编码1个包含1537个氨基酸的蛋白质产物。尽管目前酵母菌的絮凝基因^[11]的研究受到一定关注,然而有关细菌的絮凝基因的研究尚鲜见报道,而且有关生物絮凝剂微观形貌的报道也为数不多,仍缺乏更加直观的检测手段证明生物絮凝剂具有很强的吸附、沉降能力。

本试验在从含油废水处理单元曝气池中分离到1株具有强絮凝特性的芽孢杆菌*Bacillus* sp. F2^[12]。为研究细菌的絮凝基因,构建了絮凝基因组文库,得到有絮凝特性的大肠杆菌阳性克隆子,并证明絮凝絮凝效果确与絮凝基因相关。由于絮凝基因克隆子产生的生物絮凝剂更加具有絮凝效果,因此对絮凝胶体的形态及稳定性进行表征,以期为进一步考证絮凝基因的遗传因素与代谢产物的关系及微观界面现象的观测研究奠定良好的基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种来源

分离自含油废水处理单元曝气池中的水样,是黑龙江省环境生物技术重点实验室开发的高效絮凝菌F2,芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)。絮凝测定结果显示其为高效的絮凝菌株,絮凝率为84%^[13]。

1.1.2 培养基和培养条件

LB培养基(每L含酵母膏5g,蛋白胨10g,NaCl10g,调pH值至7.0)用于培养大肠杆菌,37℃,液体培养时160r/min。普通培养基(每L含蛋白胨10g,酵母膏3g,NaCl5g,调pH值至7.2)用于培养絮凝菌,30℃,液体培养时160r/min。絮凝培养基(每L含葡萄糖10g,K₂HPO₄5g,MgSO₄·7H₂O0.2g,KH₂PO₄2g,NaCl0.1g,尿素0.5g,酵母膏0.5g,调pH值至7.2)用于絮凝菌的发酵培养,30℃,液体培养时160r/min。

1.1.3 试验试剂与仪器

所有限制性内切酶、碱性磷酸酶CIP、T4DNA连接酶、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)等分子生物学试剂均购自TaKaRa(大连宝生物)公司;生化药品为进口或国产分析纯试剂;细菌DNA提取试剂盒、胶回收试剂盒均购自上海华舜生物工程公司,并

按其说明书操作。

主要试验仪器:程控混凝试验搅拌机(TAG-4,武汉恒岭科技有限公司);全自动压力蒸汽灭菌器(8037-SCS超型,长春百奥);恒温空气浴振荡器(ZHWY-2112B,上海智城分析仪器制造有限公司);傅立叶FT-IR红外分光光度计(Avatar360型,美国尼高力公司出品);Zeta电位仪(ZETASIZEVNAOZ,英国马尔文公司);基因扩增仪(Mastecycler gradient,德国eppeendorf公司);原子力显微镜(Bioscope,美国维易科公司);可见光分光光度计(PC22,上海棱光技术有限公司);生化培养箱(LRH-250,上海一恒科学有限公司);离心机(Allegra™64R Centrifuge,美国BECKMAN COULTER公司);液体颗粒计数器(9703,美国HIAC公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 酶制剂的酶解条件

酶解条件根据说明书进行。质粒DNA转化的条件、大肠杆菌的培养,参照文献[14]。

1.2.2 絮凝菌的培养

絮凝菌F2通常用普通培养基在30℃培养,而絮凝诱导为絮凝培养基。2种培养基均分别调节pH到7.2。絮凝菌在30℃培养过夜到达静止期,普通培养基培养的菌液用于提取基因组总DNA,絮凝诱导培养基培养的发酵菌液用于测定絮凝率。

1.2.3 基因组文库的构建

首先提取絮凝菌F2的基因组总DNA,制备方法按照试剂盒说明操作;然后用限制性内切酶*Sau3AI*部分酶切基因组总DNA,基因组DNA的*Sau3AI*部分酶切按以下方法进行:先进行预实验,取基因组DNA10μg,在50μL中加0.5μL的*Sau3AI*,37℃酶切,每隔1min取一次样电泳检测,至大部分DNA片段分布在7.5~15kb左右。在72℃水浴,10min终止限制性内切酶的酶切反应。根据预实验确定的条件,用适量的*Sau3AI*,适当的时间消化100μg的基因组DNA。然后进行0.8%琼脂糖凝胶电泳(电压2V/cm)检测其部分酶切效果,对照DNA Marker在紫外灯下切下含7.5~15kb DNA片段的凝胶,用试剂盒回收DNA;质粒DNA的制备按照试剂盒说明操作,用限制性内切酶*Bam*HI完全酶切载体PUC19DNA,反应体系为:反应总体积为20μL,*Bam*HI2μL,10×Buffer2μL,载体PUC19DNA5μL,dH₂O11μL。混匀于30℃恒温箱中保温过夜后终止反应。用0.8%的琼脂糖凝胶电泳(电压2V/cm)检测其酶切效果,回收酶切片段,并用碱性磷酸酶去除载体片段的5'末端磷酸

基,防止线性 DNA 自身环化.最后将絮凝基因组 DNA 酶切片段与载体 PUC19DNA 酶切片段连接、转化到受体菌 JM109 中.然后受体菌 JM109 于 LB 培养基上做蓝白斑筛选培养,此培养基的制备方法如下:在 100 mL 的 LB 固体培养基中,加入浓度 100 mg/mL 的氨苄青霉素 100 μ L、浓度 24 mg/mL 的 IPTG 100 μ L 及浓度 20 mg/mL 的 X-Gal 200 μ L,制成的 IPTG、X-Gal、Amp 平板培养基.当 DNA 片段插入到 PUC 载体(带有 *lacZ*、Amp 基因载体),然后转化至 *lacZ* 缺失细胞中后,涂布上述的 IPTG、X-Gal、Amp 平板培养基,可根据长出菌体的蓝白色,从而方便地挑选出基因重组体(白色为具有 DNA 插入片段的基因重组体),得到的白色菌落为克隆子,构建了絮凝基因组文库^[14].铺平板培养进行文库滴度测定^[15].DNA 序列测定由大连宝生物公司测序部完成.

1.2.4 絮凝基因组文库的筛选

目测法:将每个克隆菌接种于装有 10 mL LB 液体培养基的试管中,37 $^{\circ}$ C 静置培养 48 h 后,剧烈振荡 1 min,室温静置,观察絮状沉淀的产生^[16].将上述产生絮凝沉淀的克隆菌在絮凝液体培养基中重复发酵培养,待菌种稳定保持絮凝特性,进行如下试验.

1.2.5 阳性克隆子的鉴定

取筛选并保存的克隆菌株,抽提阳性克隆子的质粒,以 DNA Marker 15 000 作为参照,进行琼脂糖凝胶电泳分析,确定重组质粒的大小.对插入的絮凝基因片段进行 PCR 检测反应.

1.2.6 絮凝菌絮凝试验

絮凝试验效果采用絮凝率进行表征.取 5 g 高岭土(化学纯,平均粒度为 4.5 μ m)加至 1 000 mL 的烧杯中,然后依次加入自来水 1 000 mL,10% 的 CaCl_2 溶液 1.0 mL 和 10 mL 发酵液,并且调节溶液 pH 至 7.2,之后将烧杯溶液放在搅拌仪上搅拌(快搅,慢搅)使之充分混合,静置 20 min 后于波长 550 nm 处测定吸光度(B).以蒸馏水代替培养液作对照空白,于波长 550 nm 处测定吸光度(A).通过絮凝率 F 来表示絮凝活性,公式如下^[17]: $F = (B - A) / B \times 100\%$.

分别将原菌株与筛选出来的克隆菌株发酵培养,条件一致的情况下,利用絮凝试验做絮凝菌发酵液的絮凝率测定,来验证絮凝效果.

1.2.7 絮凝形态的表征

在絮凝试验的基础上,静置 20 min 后形成絮凝胶体,进行以下试验.测定 Zeta (ξ) 电位以及利用原

子力显微镜对絮凝形态进行表征.

(1)絮凝过程 Zeta (ξ) 电位 采用高岭土悬浊液絮凝试验(试验用人工配水为高岭土悬浊液).静置 20 min,之后用 Zeta 电位仪测定混合液的 ξ 电位.为了考证复合型生物絮凝剂的作用,同时对未加生物絮凝剂而经过混凝处理的高岭土溶液原样及絮凝剂进行 ξ 电位测定.根据 Smoluchowski 公式电泳速度与电动电位 (ξ 电位) 有如下关系: $\xi = 4\pi\eta u / DE \times 300^2$, 式中, ξ 为电动电位 (mV), η 为液体粘度 (Pa $\cdot$ s), u 为电泳速度 (μ m/s), D 为液体的介电常数, E 为电位梯度(电极两端电位差除其长度, V/cm).

(2)光学显微镜下的絮凝形态表征 将絮凝胶体平铺于云母片上,待样品干燥后,在光学显微镜下观察絮凝胶体形态.

(3)原子力显微镜表征絮凝形态(轻敲模式的 AFM) 轻敲模式的 AFM 采用原子力显微镜 (NanoScope™, Veeco Metrology Group, USA) 的轻敲模式进行样品的观测.与接触模式相比,轻敲模式几乎不会对样品产生破坏,并且具有较高水平方向的分辨率(1~5 nm),轻敲模式所采用的探针为 TESP 探针(针尖曲率半径为 5~10 nm).成像扫描过程中同时生成图像的高度、相模像,扫描范围在 0~90 μ m 之间,扫描速率为 2 Hz,通过设定力参数调节样品和针尖之间的垂直距离,以确保针尖准确地探测样品表面的特性.增加积分增益和比例增益直到扫描曲线产生噪声为止,扫描过程中获得的反馈信号用以生成表面微观形貌图像,每一个样品进行 3 次不同位置的 AFM 观测,将捕捉到最具代表性的图像采用 Nanoscope V6111 软件进行相应的处理和分析.采用高岭土悬浊液絮凝试验,形成絮凝胶体,平铺于云母片上,待样品干燥后,通过光学显微镜对絮凝胶体进行二维形态表征,通过原子力显微镜观察胶体的表面微观形貌.

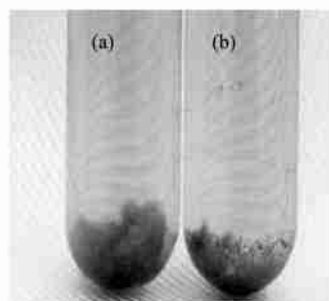
2 结果与讨论

2.1 文库的构建和阳性克隆的筛选

絮凝菌总基因组 DNA 经 *Sau3A*I 部分酶切,回收 7.5~15 kb 左右的 DNA 片段,连接到经 *Bam*HI 完全酶切的克隆载体 PUC19 上,构建了质粒 FP,将质粒 FP 转化感受态细胞 *E. coli* JM109,以 Amp^r-IPTG/X-Gal LB 平板筛选,构建基因组文库.作 10^3 、 10^4 、 10^5 梯度稀释后铺平板测定滴度,得其平均滴度为 3.5×10^5 pfu/mL,重组子数目共为 3.5×10^4 .

用目测法检测并筛选基因组文库中的重组子,将具有絮凝特性的质粒 FP 转入不具絮凝特性的受体菌 *E. coli* JM109 中后,在 LB 培养基中加入 Ca^{2+} 至终浓度 0.2 mol/L,37 °C 恒温培养 48 h 后取出,剧烈振荡 1 min,静置观察结果.目测即可见克隆子产生明显絮凝现象,由此筛选得到 1 个阳性克隆,命名为 FC2,所含的质粒命名为 FP.

图1(a)为克隆菌 FC2 产生的絮凝胶体,图1(b)为空白试验无絮凝体产生.图1(a)的絮凝胶体颗粒大,易沉降,且易于聚集.因此,该絮凝菌具有良好的絮凝特性,同时也表明,供体菌的确含有絮凝基因,但根据絮凝效果的表达多少,不能简单地认为有此性状仅仅是由一个絮凝基因引起的,供体菌中还可能存在其他与絮凝能力有关的基因.



(a) 克隆菌产生的絮凝胶体; (b) 无生物絮凝剂的空白试验

图 1 絮凝性状的比较

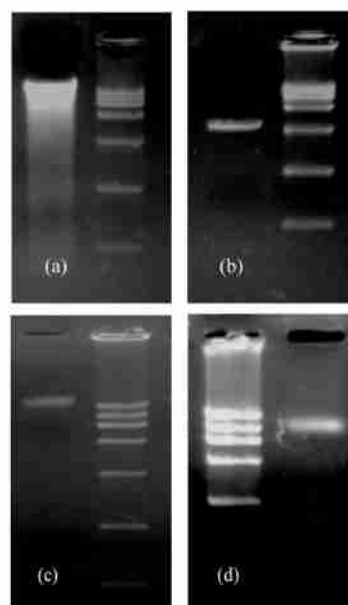
Fig. 1 Comparison of flocculent properties

2.2 阳性克隆的鉴定

絮凝基因组 DNA 经 *Sau*3AI 酶切后,经 0.8 % 琼脂糖凝胶电泳,结果见图 2(a).从图 2(a) 可看出, DNA 片段长度范围主要在 7.5 ~ 15 kb,符合实验要求. *PUC*19 经 *Bam*HI 酶切后,经碱性磷酸酶去除载体片段的 5' 末端磷酸基,防止线性 DNA 自身环化,经 0.8 % 琼脂糖凝胶电泳,结果见图 2(b),在 2 686 bp 处有单一条带,与 *PUC*19 长度相符合.

抽提 FC2 的质粒 DNA,采用通用引物对插入的絮凝基因片段进行 PCR 检测反应,在试验中通用引物为: BcaBEST Primers RV-M: GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG; BcaBEST Primers M13-47: CGCCAGGGTTTCCCAATCAGAC,由上海生物工程公司合成.电泳检测的结果表明,重组质粒的大小为 15 kb 左右,载体中插入了约 10 kb 左右的外源 DNA 片段,与预期大小相符[图 2(c)、2(d)],图 2 中均使用了 DL15000 的 DNA Marker.用该质粒再转化大肠杆菌,在含氨苄青霉素的 LB 平板上生长,重

复做继代培养,均具有稳定的絮凝特性.



(a) DNA 酶切图谱; (b) *PUC*19 酶切图谱;
(c) 构建质粒图谱; (d) PCR 扩增目的基因片段

图 2 电泳图谱

Fig. 2 Electrophoresis image

2.3 絮凝基因的序列及同源性分析

克隆基因的序列由大连宝生物公司测序.将测序结果在 BLAST 的 GENE BANK 进行序列比对,与假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 相似性仅为 35.8 %,原菌株 F2 芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.) 与假单胞菌同源性很低,但同时又具备了絮凝菌的絮凝功能,所以推测它很可能属于 1 个新的絮凝基因,暂定该段基因为新基因,即絮凝基因.

2.4 FC2 表达的有效絮凝成分分析

根据文献[18]中提出,絮凝剂的有效成分为多糖类物质.图 3 为阳性克隆菌 FC2 絮凝成分表达的红外光谱扫描图谱,其特征峰与原始絮凝菌 F2 絮凝成分一致,在红外光谱扫描图 2 926 cm^{-1} 左右处均出现了峰值,此处为 C—H 不对称伸缩振动的结果,此区域的吸收峰是糖类的特征峰.1 647 cm^{-1} 是由于多糖中的乙酰氨基 ($-\text{NHCOCH}_3$) 的 C=O 键伸缩振动造成的.1 385 cm^{-1} 左右处出现峰值,此处为羧基 $-\text{COO}^-$ 中的 C=O 对称伸缩振动,此峰较微弱,但也证明了含有该成分.在图 3 中出现的 1 个明显的向上峰值,推测可能是制样中加入溴化钾所引起的,它不影响絮凝成分的分析.所以,可以判克隆菌 FC2 发酵液中含有糖类物质,而且含有絮凝剂 F2 所具有的羧基基团,以 $-\text{COO}^-$ 形式存在.根据含有的羧基

基团是以 —COO^- 的链型形式存在,因此该絮凝剂的链型为线性,从而易于形成分子架桥,形成絮凝体.所以,阳性克隆菌 FC2 中表达了 F2 菌株的有效絮凝成分.

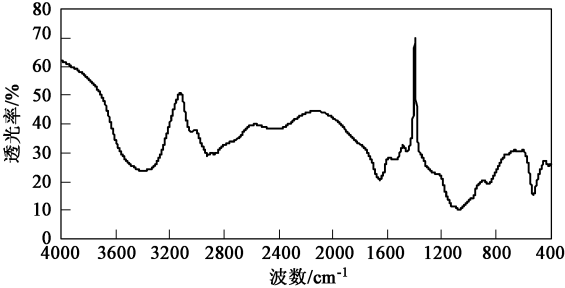


图3 FC2 的红外光谱图
Fig. 3 Infrared spectra of FC2

2.5 FC2 表达的絮凝特性

将克隆菌 FC2 在无选择压力的培养基连续培养 5 次,每次 16 h,仍具有明显絮凝现象,表明质粒 FP 在细胞中是比较稳定的.所以,做絮凝试验验证其絮凝率.在絮凝测定中(如图 4),1 号为 JM109,2 号为 FC2,3 号为 F2.其中絮凝菌 F2 的絮凝率为 84%,FC2 的絮凝率为 90%.结果表明,克隆菌的絮凝效果明显强于原絮凝菌 F2,但受体菌 JM109 的絮凝率仅为 6.9%,从这一点上可以证明 FC2 具有的絮凝特性不是来自于受体菌 JM109,而是来源于絮凝菌 F2.由于 FC2 比絮凝菌 F2 的絮凝率稍高,说明了克隆菌所携带的来自于 F2 的基因片段是受絮凝基因的主要部分,或者说该段基因具有絮凝特性.

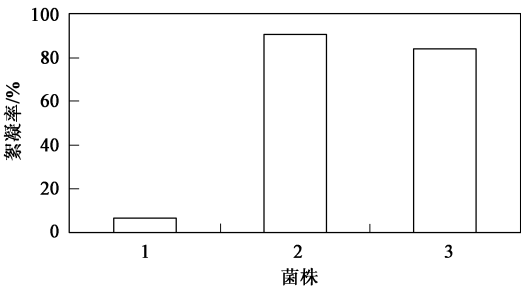


图4 絮凝率的比较
Fig. 4 Comparison of flocculation rate

2.6 絮凝形成过程与 Zeta (ξ) 电位的关系

微生物絮凝特性受到多种因素的影响,其中遗传因素是内在的依据,絮凝基因的表达机理复杂,由多个基因控制絮凝基因的表达功能.经过修饰基因和校正基因等调控基因的作用之后,絮凝基因方可有效地表达出絮凝素.絮凝性微生物产生絮凝素后,

能使离散颗粒之间相互粘附,并能使胶体脱稳,形成絮体沉淀而从反应体系中分离出去.因此,研究形成絮凝胶体后的悬浊液的电位是研究胶体脱稳现象的一个重要标志.所以,当生物絮凝剂与高岭土悬浊液形成絮凝胶体颗粒后,在溶液中的稳定状态,用 Zeta (ξ) 电位来表征.

对高岭土原液、微生物絮凝剂及其絮凝后的高岭土溶液进行 Zeta (ξ) 电位分析,结果见表 1.由 Zeta (ξ) 电位的测定可知,高岭土颗粒与生物絮凝剂在水中都带高负电,因此存在较大的静电斥力,这就需要某些特殊的作用来克服生物絮凝剂与高岭土颗粒之间的静电排斥力.一般 ξ 电位绝对值小于 14 mV 絮凝颗粒发生脱稳就会发生凝聚.如表 1 所示,高岭土悬浊液的电位值很高,是一种较稳定的悬浊液.而絮凝剂 F2 和 FC2 的 ξ 电位值比高岭土悬浊液低了 23.9 mV 和 31.5 mV,但仍然是一种较稳定的胶体悬浮液.投加絮凝剂 F2 后的高岭土悬浊液电位为 $-13.3 \text{ mV}^{[19]}$,投加絮凝剂 FC2 后的高岭土悬浊液电位为 -9.57 mV ,由数据显示,当颗粒表面电位降低到某个程度,此颗粒的聚集稳定性降到一定得低点,颗粒将很快聚沉.因此,在絮凝过程中,每个絮凝剂分子可以和多个高岭土颗粒结合,使絮凝剂表面的电荷降低,产生极易聚沉的现象.由此可知,此时的絮凝颗粒悬浮液已经处于不稳定状态,有利于形成絮凝体,并且产生的絮凝素促使絮凝体与高岭土颗粒相互粘附.所以,絮凝剂 FC2 比絮凝剂 F2 更不稳定,更容易形成絮体沉淀,因此,前者的絮凝能力要强于絮凝剂 F2,即 FC2 的絮凝基因表达能力强.

表 1 CBF、高岭土原液及其絮凝后的高岭土溶液的 Zeta (ξ) 电位

Table 1 Zeta-potential of CBF and kaolin suspending solution and kaolin suspending solution after flocculation

样品名称	Zeta/mV
高岭土悬浊液	- 49.6
微生物絮凝剂 F2	- 25.7
微生物絮凝剂 FC2	- 18.1
投加絮凝剂 F2 后的高岭土悬浊液	- 13.3
投加絮凝剂 FC2 后的高岭土悬浊液	- 9.57

2.7 FC2 絮凝形态结构的表征

2.7.1 FC2 絮凝体的表面微观形态

图 5 所示絮凝体的原子力显微三维模式图像中,高低落差很大,絮凝体表面具有光泽,可能是絮凝菌在发酵过程中分泌大量的多糖类黏液性物质^[18].絮凝素是存在于细胞表面的多糖类物质,有

明显的乳化作用,使胶体脱稳^[9],正是由于具备这种特点,决定了 FC2 絮凝体对水中悬浮颗粒具有一定的吸附作用,与高岭土颗粒结合的数量多、结构紧密.以上结果则直观地证实了克隆菌 FC2 絮凝体具有很强的吸附能力,很大程度上能够影响絮凝效能的发挥.根据吸附架桥理论,发酵液中的多糖类物质为一种具有线性结构的高分子化合物, Ca^{2+} 对微生物絮凝剂起促进作用,这是由于发酵液中暴露的羧基等官能团^[18]与 Ca^{2+} 的“架桥”,而羧基等官能团暴露的数量,又受到絮凝基因表达的相关酶的水平影响,克隆菌 FC2 具有很高的絮凝特性.因此,酶的水平研究将是今后研究的一个重要方向.

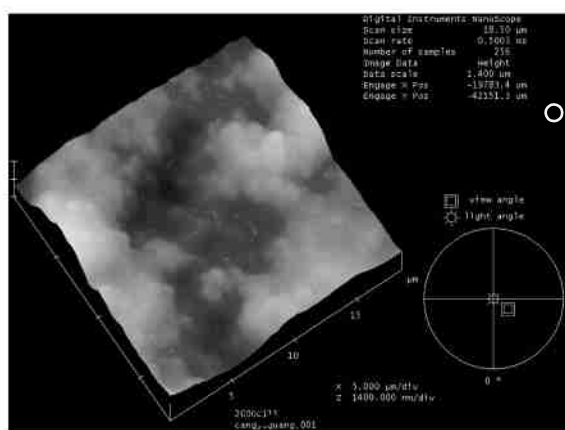


图5 FC2 絮凝体表面微观形态

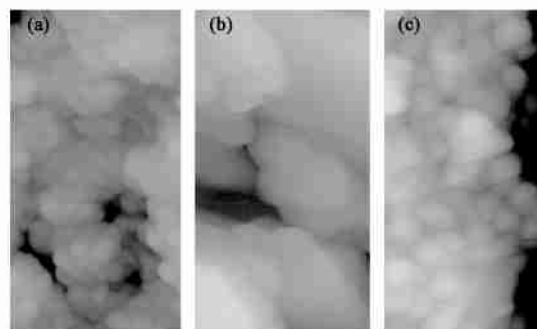
Fig. 5 Surface microtopography of FC2's flocculating constituent

2.7.2 FC2 与高岭土絮凝的图像分析

原子力显微成像技术 (atomic force microscope, AFM) 的出现,使人们不仅能够观测环境中颗粒物质的表面结构和微观形貌,同时能够观察溶解、生长、吸附、异相成核和氧化还原等众多过程中的微观形貌变化^[19].本研究采用轻敲模式的原子力显微成像技术,对克隆菌 FC2 发酵液絮凝形态的微观形貌进行了观测,并进一步研究了生物絮凝剂絮凝颗粒微观吸附形貌的改变情况.

在经典的水处理理论中,天然水中的胶体颗粒被简化成均匀对称的球形.但实验表明,水中的胶体颗粒有着各种不同的形状、大小及厚薄,而且其表面电荷分布不均匀.这些特征势必会影响到胶体颗粒的絮凝特性,从而使得絮凝机理更加复杂.为了更加清晰地反映出图像的边界轮廓,图6显示了原子力成像的图像,其中图6(b)所示为高岭土悬浮颗粒.与高岭土悬浮颗粒松散分布、扁平的团状分子构型不同,絮凝体 FC2 吸附高岭土为密集分布、水平尺寸大而均匀的扁平球状结构,见图6(c).这说明了 FC2

絮凝剂具有容易以其自身颗粒为核心进行吸附高岭土颗粒的可能,由于 FC2 絮凝剂比表面积大,具有很强的吸附性能和大量表面羧基官能团,因而能够与高岭土悬浮颗粒相互作用生成氢键,促进吸附现象的发生. FC2 絮凝剂这一新相的引入,将使得高岭土颗粒以 FC2 絮凝剂颗粒为吸附中心,包裹在其表面,图6(a)为絮凝体 F2 与高岭土悬浮颗粒絮凝的细小的颗粒^[19],高岭土的颗粒能够以悬浮颗粒的形态稳定的分布于水体中,干扰其絮凝剂颗粒的自然沉降过程,絮体粒径较大、沉降快^[20].所以,两者在结构上的差异,决定了两者的絮凝效果的不同,FC2 絮凝剂的絮凝效果要强于 F2 絮凝剂.由于高岭土的分散相颗粒小,有强烈的布朗运动,能阻止其因重力作用而引起的下沉,因此,在动力学上是稳定的,是高岭土同无机盐的结合松散且不规则的主要原因.



(a) F2 菌絮凝原子力图像; (b) 高岭土原样;
(c) FC2 菌絮凝原子力图像

图6 原子力显微镜下的图像

Fig. 6 AFM images

3 结论

(1) 通过构建絮凝基因组文库,筛选出具有絮凝活性的大肠杆菌阳性克隆子 FC2,且具有稳定的絮凝特性.絮凝试验测定出克隆子 FC2 的絮凝率为 90%,絮凝效果要远远高于受体菌 JM109,证明 FC2 具有的絮凝特性来源于絮凝菌 F2,由于 FC2 比絮凝菌 F2 的絮凝率稍高,说明了克隆菌所携带的絮凝基因片段来自于 F2 的絮凝基因的主要部分,或者说该段基因具有絮凝特性.序列测定结果表明,初步认为克隆菌 FC2 携带的目的基因为 1 段新的絮凝基因.该絮凝基因控制絮凝剂产生菌的表达功能,经过修饰基因和校正基因等调控基因的作用之后,絮凝基因有效地表达出凝集素,能使离散颗粒之间相互粘附,并能使胶体脱稳,形成絮体沉淀.因此,遗传因素是絮凝现象的内在依据.

(2) 分析其絮凝机理及絮凝形态,克隆子 FC2 的絮凝体大而表面粗糙,因此具有大的比表面积和吸附能力,其原因在于强絮凝菌能表达大量的凝集素,吸附悬浮颗粒能力强,胶体溶液更加容易脱稳产生絮凝,直接影响了菌种自身的 Zeta (ξ) 电位,而且克隆子 FC2 的 Zeta (ξ) 电位比其他絮凝剂的电位相对低,与高岭土吸附过程中的排斥力相对小得多,且容易脱稳沉降,使得 FC2 比 F2 吸附高岭土颗粒的能力更强,结构更紧密,絮凝颗粒体积更大,沉降速度更快.因此,从更直观上进一步证实了克隆菌 FC2 发酵液的除污染效能.

致谢:感谢实验中心施雪华老师的热情帮助以及实验中给予笔者帮助的人.

参考文献:

- [1] Yamashita I, Fukui S. Isolation of Gucoamylase non producing Mutants in the Yeast *Saccharomyces diastaticus* [J]. *Agric Biol chem*, 1983, **47** (1): 131 ~ 135.
- [2] Yamashita I, Fukui S. Mating signals Control Expression of both Starch Fermentation Genes and a Nove Flocculation Gene *FLO8* in the Yeast *Saccharomyces* [J]. *Agric Biol chem*, 1983, **47** (12): 2889 ~ 2896.
- [3] Endo T, Takahasi H. Genetic Evidence for the Evolvment of Aggregation Factor and other Components in Flocculation of *Flavobacterium* Strain B [J]. *Agric Biol Chem*, 1981, **45** (2): 379 ~ 383.
- [4] Endo T, Takahasi H. Partial Purification and Some Properties of Aggregation Factor from Pronase susceptible Flocc Forming *Flavobacterium* Strain B [J]. *Agric Biol Chem*, 1981, **45** (2): 513 ~ 516.
- [5] Kurane R, Matsuyama H. Production of a bioflocculant by mixed culture [J]. *Biosic Biotechnol Biochem*, 1994, **58**: 235 ~ 238.
- [6] Nakata K, Kurane R. Production of an extracellular polysaccharide bioflocculant by *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Bioscience Biotechnol Biochem* (JAPAN), 1999, **63** (12): 2064 ~ 2068.
- [7] 邓述波,余刚,蒋展鹏,等. 微生物絮凝剂 MBFA9 的絮凝机理研究 [J]. *水处理技术*, 2001, **27** (1): 22 ~ 25.
- [8] 秦培勇,张通,陈翠仙. 微生物絮凝剂 MBFTRJ21 的絮凝机理 [J]. *环境科学*, 2004, **25** (3): 69 ~ 72.
- [9] 程树培,崔益斌,杨柳燕. 高絮凝性微生物育种生物技术研究与应用进展 [J]. *环境科学进展*, 1995, **3** (1): 65 ~ 69.
- [10] Junji W, Yoshihiro T, Mahiro O, *et al.* Molecular cloning and analysis of the yeast flocculation gene *FLO1* [J]. *Yeast*, 1994, **10**: 211 ~ 225.
- [11] 何秀萍,郭文洁,张博润. 絮凝基因 (*FLO1G*) 的序列测定及分析 [J]. *微生物学报*, 2002, **42** (2): 242 ~ 245.
- [12] 朱艳彬,马放,任南琪,等. 2 株芽孢杆菌利用不同碳源生产絮凝剂的研究 [J]. *环境科学*, 2005, **26** (5): 152 ~ 155.
- [13] 马放,刘俊良,李淑更,等. 复合型微生物絮凝剂的开发 [J]. *中国给水排水*, 2003, **19** (4): 1 ~ 4.
- [14] Sambrook J, Fritsh E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M]. (2nd ed). Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- [15] Goodenough U W. Green yeast [J]. *Cell*, 1992, **70** (4): 533 ~ 538.
- [16] 刘小琳,贺鹏,卢大军,等. 絮凝选择载体的构建及 β -葡萄糖苷酶基因在酿酒酵母中的表达 [J]. *生物工程学报*, 2005, **21** (1): 167 ~ 170.
- [17] Nakamura J, Miyashiro S, Hirose Y. Screening, isolation and some properties of microbial cell flocculants [J]. *Agric Biol Chem*, 1976, **46** (2): 377 ~ 383.
- [18] 马放,张金凤,远立江,等. 复合型生物絮凝剂成分分析及其絮凝机理的研究 [J]. *环境科学学报*, 2005, **25** (11): 1491 ~ 1496.
- [19] Maurice P A. Applications of atomic force microscopy in environmental colloid and surface chemistry [J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 1996, **107**: 57 ~ 75.
- [20] 李冬梅,施周,梅胜,等. 絮凝条件对絮体分形结构的影响 [J]. *环境科学*, 2006, **27** (3): 488 ~ 492.