

## 一株高效烷烃降解菌 *Acinetobacter* sp. LAM1007 的分离 鉴定及降解特性

朱杰<sup>1</sup> 阮志勇<sup>2,3\*</sup> 董卫卫<sup>4</sup> 郭翔<sup>2</sup> 孔德龙<sup>2</sup> 张琪<sup>2</sup> 赵述森<sup>4</sup> 张伟<sup>1\*</sup>

(1. 新疆师范大学生命科学学院 新疆特殊环境物种保护与调控生物学实验室 新疆 乌鲁木齐 830046)

(2. 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所 农业部农业微生物资源收集与保藏重点实验室  
北京 100081)

(3. 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室 新疆 阿拉尔 843300)

(4. 华中农业大学生命科学技术学院 农业微生物学国家重点实验室 湖北 武汉 430070)

**摘要:**【目的】挖掘高效烷烃降解菌,为后续石油烃污染修复工程提供优良菌种资源。【方法】以正十六烷为唯一碳源,将大庆石油污染土样中分离筛选到的高效烷烃降解菌经形态观察、生理生化试验、细胞化学组分及 16S rRNA 基因序列分析等方法进行初步鉴定与系统分类;同时通过单因素试验研究环境因素(温度、pH、接种量和转速)以及不同初始浓度的正十六烷(0.1%、0.3%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%, 体积比)对菌株降解效率的影响。【结果】筛选到一株高效烷烃降解菌 LAM1007,经初步鉴定该菌株为不动杆菌属(*Acinetobacter*)。该菌株在添加正十六烷的无机盐培养基中的最适降解条件为: 30 °C, pH 7.0, 接种量 1% (体积比), 转速 180 r/min, 在该条件下浓度为 0.3% (体积比)的正十六烷 60 h 内降解率高达 90%。【结论】菌株 LAM1007 是一株在石油烃污染修复方面极具应用潜力的高效烷烃降解菌。

**关键词:** 正十六烷, *Acinetobacter* sp., 柴油, 液体石蜡

**Foundation item:** Xinjiang Production & Construction Corps Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resources in Tarim Basin (No. BRZD1603)

**\*Corresponding authors:** RUAN Zhi-Yong: Tel: 86-10-82108636; E-mail: ruanzhiyong@caas.cn  
ZHANG Wei: Tel: 86-991-4333294; E-mail: zw0991@sohu.com

**Received:** January 05, 2017; **Accepted:** April 12, 2017; **Published online** (www.cnki.net): May 09, 2017  
**基金项目:** 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室开放课题(No. BRZD1603)

**\*通讯作者:** 阮志勇: Tel: 86-10-82108636; E-mail: ruanzhiyong@caas.cn

张伟: Tel: 86-991-4333294; E-mail: zw0991@sohu.com

**收稿日期:** 2017-01-05; **接受日期:** 2017-04-12; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2017-05-09

## Isolation, identification and degradation characterization of an alkane-degrading *Acinetobacter* sp. LAM1007

ZHU Jie<sup>1</sup> RUAN Zhi-Yong<sup>2,3\*</sup> DONG Wei-Wei<sup>4</sup> GUO Xiang<sup>2</sup> KONG De-Long<sup>2</sup>  
ZHANG Qi<sup>2</sup> ZHAO Shu-Miao<sup>4</sup> ZHANG Wei<sup>1\*</sup>

(1. College of Life Science, Xinjiang Normal University, Key Laboratory of Special Environment Biodiversity Application and Regulation, Urumqi, Xinjiang 830046, China)

(2. Key Laboratory of Microbial Resources Collection and Preservation, Ministry of Agriculture, Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, CAAS, Beijing 100081, China)

(3. Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resources, Production & Construction Corps, Alaer, Xinjiang 843300, China)

(4. State Key Laboratory of Agricultural Microbiology and College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

**Abstract:** [Objective] We isolated and identified alkane-degrading bacteria to provide microbial resources to remediate petroleum hydrocarbon pollution. [Methods] With n-hexadecane as sole carbon source, we identified strain LAM1007 isolated from Daqing oil-contaminated field by analysis of morphological, physiological and biochemical characteristics, cellular chemical composition, and 16S rRNA gene sequence. Furthermore, single factor experiment was used to evaluate various parameters including temperature, pH, biomass, shaking speed, concentration of n-hexadecane (0.1%, 0.3%, 0.5%, 1.0%, 1.5% and 2.0%, V/V). [Results] Strain LAM1007 was isolated and identified as a member of the genus *Acinetobacter*. Optimum condition of the strain was in an inorganic salt medium supplemented with n-hexadecane at 30 °C, pH 7.0, 1% (V/V) biomass and 180 r/min. The degradation of n-hexadecane (0.3% V/V) was 90% after 60 h under the optimum conditions. [Conclusion] *Acinetobacter* sp. LAM1007 has the potential to remediate petroleum hydrocarbon pollution.

**Keywords:** n-Hexadecane, *Acinetobacter* sp., Diesel, Paraffin liquid

随着经济的快速发展,石油已成为日趋需求的主要能源物质。然而石油在勘探、开采、提炼、运输过程中漏油事件频发,造成的环境污染已经威胁到人类健康和其它生物的生存和发展,对海洋、陆地生态系统的平衡也造成了严重迫害<sup>[1-2]</sup>。烷烃是石油中的主要成分,含量可达 50%–95%<sup>[3]</sup>,是主要的石油污染物<sup>[4]</sup>,其中链烷烃(C<sub>10</sub>–C<sub>20</sub>)毒性更大<sup>[3]</sup>。自然界中能够利用饱和烷烃的微生物广泛存在<sup>[5]</sup>,较传统石油污染的物理、化学治理方法,生物修复法具有环保、低成本、高效等特点。利用微生物修复石油污染的方法已经广受关注,并取得一定成效<sup>[6-11]</sup>。目前已经分离到的石油烃降解菌主要有假单胞菌属(*Pseudomonas*)<sup>[12-13]</sup>、不动杆菌属(*Acinetobacter*)<sup>[14-16]</sup>、戈登氏菌属(*Gordonia*)<sup>[17-18]</sup>、芽孢杆菌属(*Bacillus*)<sup>[19-20]</sup>、迪茨氏菌属(*Dietzia*)<sup>[21]</sup>和红球菌属(*Rhodococcus*)<sup>[22]</sup>等。然而,石油烃类

物质属于难降解性物质,一般需要较长时间才能被降解,且大多数已公开报道的石油烃降解菌可降解的烷烃浓度较低,在实际应用中容易受限,所以高效烷烃降解菌株的筛选仍然是微生物修复技术的关键。作为最常见的烷烃降解菌,不动杆菌是陆地环境两大主要降解菌之一<sup>[23]</sup>,且众多研究表明不动杆菌在石油降解过程中起着重要的作用<sup>[24-26]</sup>,其产生的表面活性剂促进石油烃乳化,进而有助于石油烃的降解<sup>[27-28]</sup>,因此筛选出该属的高效烷烃降解菌应用于石油烃修复工程仍具有重要意义<sup>[29]</sup>。

在原油中,中链饱和烷烃正十六烷(C<sub>16</sub>H<sub>34</sub>)是其脂肪烃类物质中具有代表性的模式化合物,它也是柴油、矿物油等的主要组成部分,已在许多研究中被选择作为模式污染物<sup>[30-31]</sup>。目前在正十六烷降解相关的众多研究中尚未见各类菌株耐受浓度高达

2.0% (体积比) 的报道, 多数高效降解菌的实验浓度仅到 1.0%<sup>[19,31]</sup>, 而本实验中筛选到的这株高效烷烃降解菌 LAM1007 可良好生长于 2.0% (体积比) 的正十六烷无机盐培养基中。因此, 本研究以菌株 LAM1007 为研究对象, 通过形态特征、生理生化试验、细胞化学组分及 16S rRNA 基因序列分析, 初步鉴定其为不动杆菌属(*Acinetobacter*), 并进一步展开了其对正十六烷降解特性的研究以及对柴油、液体石蜡降解能力的初步评估。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器及培养基

正十六烷(99.55%)购于德国 Haltermann 公司; 色谱级正己烷(95%)购于 Duksan 公司; 柴油(0#)购于中国石油化工集团公司; 液体石蜡(比重范围 0.835–0.855)购于北京益利精细化学品有限公司; 细菌基因组提取试剂盒购于北京天根生化科技有限公司; 2×*Taq* PCR Master Mix 购于北京博迈德基因技术有限公司。光学显微镜(80i), 日本 Nikon 公司; 透射电子显微镜(7500), 日本 Hitachi 公司。

培养基 TSB (Tryptic soy broth) 和 TSA (Tryptic soy agar) 购自美国 BD 公司。无机盐培养基(g/L):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  1.0,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1.1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2, 微量元素液 2 mL, pH 7.3,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min 后使用。微量元素液(g/L): EDTA 0.500,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.220,  $\text{CaCl}_2$  0.005,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.051,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.019 9,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.011,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.015 7,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.016 1, pH 6.0,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min 后使用。

### 1.2 烷烃降解菌的分离筛选

土样为长期受石油污染的大庆油田土壤, 在以正十六烷为唯一碳源的无机盐液体培养基中进行富集培养。具体操作如下: 将 1 g 污染土样加入至 100 mL 的正十六烷无机盐培养基中, 30 °C、180 r/min 振荡培养 3 d 后, 取 1 mL 进行转接, 连续转接 4 次后取 1 mL 富集液, 经稀释为不同浓度梯度( $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  和  $10^{-6}$ )后, 取 100  $\mu\text{L}$  稀释液涂布于浓度为 0.3% (体积比) 的正十

六烷无机盐固体平板上, 每个梯度 3 个平行。经恒温 30 °C 倒置培养 3 d, 将平板上生长的菌落根据其不同的形态进行分离纯化, 最终将获得的 13 株纯培养物进行编号并接种于浓度为 0.3% (体积比) 的正十六烷无机盐液体培养基中, 同时设置空白对照(不接菌), 30 °C、180 r/min 培养 3 d, 在此期间观察菌体生长量及浮在培养基表层正十六烷变化情况。最终筛选到一株长势及降解能力均明显优于其他的菌株并编号为 LAM1007, 保藏于中国农业微生物菌种保藏管理中心(保藏编号 ACCC 19899)和日本理化研究所生物资源中心(保藏编号 JCM 31429)。

### 1.3 菌株多相分类的鉴定

**1.3.1 菌株的形态观察、生理生化试验及细胞化学组分分析:** 通过光学显微镜和透射电子显微镜对菌株形态进行观察。革兰氏染色、淀粉水解、吐温-20、吐温-40、甲基红、接触酶、氧化酶等的试验主要参照《常见的细菌鉴定手册》, 其他生理生化试验及细胞化学组分中脂肪酸与极性脂的分析主要参照 Ruan 等<sup>[32]</sup>描述的方法。

**1.3.2 16S rRNA 基因的扩增及系统发育进化树的构建:** 通过细菌基因组提取试剂盒(Bacterial DNA Kit)提取菌株 LAM1007 的基因组 DNA, 以细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 与 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 扩增其 16S rRNA 基因。PCR 反应体系(25  $\mu\text{L}$ ): 基因组模板 2.0  $\mu\text{L}$ , 上下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 0.5  $\mu\text{L}$ , 2×*Taq* PCR Master Mix 12.5  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu\text{L}$ 。PCR 扩增条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 40 s, 30 个循环; 72 °C 5 min。将 PCR 产物送北京美吉桑格生物医药科技有限公司进行测序。将获得的 16S rRNA 基因序列于 EzTaxon-e 数据库中进行相似度比对, 最终通过软件 MEGA 6.0 与 ClustalW 1.8 进行多重序列比对分析并利用 Neighbor-Joining 法进行系统发育树的构建。

### 1.4 正十六烷的降解特性以及柴油、液体石蜡降解能力的初步评估

将菌株 LAM1007 在 TSB 培养基中培养 48 h

至对数期后期, 8 000 r/min 离心菌体, 无菌水漂洗两遍并稀释  $OD_{600}$  至 0.8。以 1% 的接种量研究了不同温度(25、30、35、40 和 45 °C)、pH (5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0)、转速(120、150、180 和 210 r/min)、60 h 内对浓度为 0.3% (体积比) 的正十六烷降解效率的影响。同时分析了不同接种量(0.5%、1%、2%、4%、6% 和 8%, 体积比)与不同初始浓度的正十六烷(0.1%、0.3%、0.5%、1.0%、1.5% 和 2.0%)对菌株降解能力的影响; 研究了在 0.3% (体积比) 的条件下, 菌体生长量与正十六烷残量随时间变化的情况, 以未加菌的正十六烷培养基作为空白对照样品。实验中也进一步研究了菌株对 2.0% (体积比) 柴油及 0.3% (体积比) 液体石蜡降解能力的初步评估, 并分别以未加菌的柴油与液体石蜡培养基作为空白对照样品。

### 1.5 正十六烷、柴油及液体石蜡的萃取与测定方法

烷烃的萃取主要参考 Wang 等<sup>[21]</sup>描述的方法, 详细步骤为: 将 30 mL 正己烷萃取液加入到 100 mL 正十六烷液体无机盐培养基中, 轻轻振荡混匀以充分溶解上层表面的烷烃相, 静置 3 min, 吸取上层有机相, 重复萃取两次, 合并萃取液, 经无水硫酸钠干燥后定容于 100 mL 容量瓶。取 1 mL 萃取液经过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜除杂, 进行 GC-MS 的测定。气相色谱质谱联用仪为岛津 GCMS-QP2010 Plus, 色谱柱为 HP-1ms (30 m $\times$ 0.32 mm, 0.25  $\mu\text{m}$ ), 载气: He。色谱条件: 80 °C 保持 5 min, 3 °C/min 升至 165 °C 保持 2 min, 5 °C/min 升至 270 °C 保持 10 min。进样口、检测器 250 °C 和 280 °C, 进样 0.5  $\mu\text{L}$ 。正十六烷降解率的测定及计算方法主要参照陈小蓉等<sup>[18]</sup>。柴油与液体石蜡的萃取方法同上, 将合并液定容于 50 mL 容量瓶, 经氮气吹干浓缩至 4 mL, 取 1 mL 过滤除杂后进行 GC-MS 测定。气相色谱质谱仪为 Agilent 6890GC-5975iMS, 色谱柱 HP-5ms (60 m $\times$ 250  $\mu\text{m}$  $\times$ 0.25  $\mu\text{m}$ ), 载气: He。色谱条件: 50 °C 保持 1 min, 20 °C/min 升至 120 °C, 3 °C/min 升至 310 °C 保持 25 min, 进样 1  $\mu\text{L}$ 。柴油与石蜡样品中各

烃相对百分含量的计算方法以及样品处理前后各烃含量变化的显著情况主要参照何华等<sup>[33]</sup>描述的方法。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株 LAM1007 的鉴定

菌株 LAM1007 在 TSA 平板于 30 °C 培养 48 h 后的菌落形态为: 淡黄色, 圆形, 中间凸起, 表面湿润光滑, 边缘整齐, 直径 0.5 mm–4.0 mm (图 1)。革兰氏染色为阴性, 严格好氧, 菌体形态为球杆状 (0.7–2.0)  $\mu\text{m}$  $\times$ (0.5–0.8)  $\mu\text{m}$  (图 2)。生长条件: 温度为 6–45 °C, pH 为 5.0–11.0 以及 NaCl 为 0–3% (质量体积比)。溶血反应呈阳性(5%羊血琼脂平板), 菌落周围见明显透明圈(图 3)。该菌能够利用柠檬酸、精氨酸、2,3-丁二醇、吐温-20、吐温-40、吐温-80 等底物, 其他部分生理生化试验结果见表 1。



图 1 菌株 LAM1007 菌落形态

Figure 1 Colony morphology of strain LAM1007

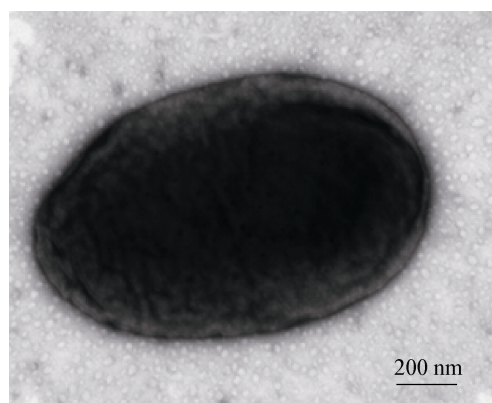


图 2 菌株 LAM1007 电镜扫描照

Figure 2 Electron micrograph of strain LAM1007

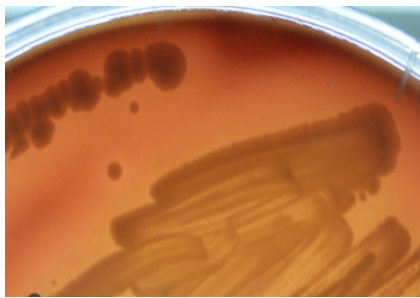


图 3 菌株 LAM1007 的溶血反应  
Figure 3 Hemolytic reaction of strain LAM1007

表 1 菌株 LAM1007 的部分生理生化试验 Table 1 Partial physiological and biochemical experiment of strain LAM1007			
生理生化特征 Characteristics	结果 Result	生理生化特征 Characteristics	结果 Result
D-棉籽糖 D-Raffinose	+	D-葡萄糖酸 D-Gluconic acid	-
D-海藻糖 D-Trehalose	+	D-半乳糖醛酸 D-Galacturonic acid	-
乙酸 Acetic acid	+	D-氨基葡萄糖酸 D-Glucosaminic acid	-
D-半乳糖酸内脂 D-Galactonic acid lactone	+	硝酸盐还原反应 Nitrate reduction	-
琥珀酸 Succinic acid	+	明胶水解 Gelatin hydrolyase	-
乙酰甲基甲醇试验 Voges-Proskauer test	+	吡啉反应 Indole production	-
$\beta$ -半乳糖苷酶 $\beta$ -Galactosidase	+	甲基红 Methyl red	-
淀粉水解 Starch hydrolysis	-	衣康酸 Itaconic acid	+
D-葡萄糖 D-Glucose	-	苹果酸 Malic acid	+

注: +: 阳性; -: 阴性.  
Note: +: Positive; -: Negative.

关于细胞化学组分中极性脂的结果如图 4 所示。菌株 LAM1007 中主要的极性脂为: 双磷脂酰甘油(Diphosphatidylglycerol, DPG)、磷脂酰乙醇胺(Phosphatidylethanolamine, PE)、磷脂酰胆碱(Phosphatidylcholine, PC)、磷脂酰甘油(Phosphatidylglycerol, PG)、一种未命名的脂质(Unidentified lipids, UL)和两种未命名的磷脂(Unidentified phospholipids, UPL1-2)。菌株 LAM1007 中主要的细胞脂肪酸(>10%)包括  $C_{18:1}$

$\omega 9c$ 、Summed feature 3 ( $C_{16:1} \omega 7c/C_{16:1} \omega 6c$ )和  $C_{16:0}$ , 与不动杆菌属内相近的两株菌 *Acinetobacter junii* LMG998<sup>T</sup> 和 *Acinetobacter venetianus* LMG 19082<sup>T</sup> 相比, 主要脂肪酸类型一致, 只是含量有所不同(表 2)。

同时分析了菌株 LAM1007 的 16S rRNA 基因序列, 其片段长度为 1 443 bp (GenBank 登录号: KT957431), 经基因序列比对分析, 发现其与 *Acinetobacter junii* LMG 998<sup>T</sup> 相似度最高为 98.8%, 与 *Acinetobacter venetianus* LMG 19082<sup>T</sup> 相似度为 97.0%, 并且基于它们的 16S rRNA 基因序列所构建的系统发育进化树也呈现出稳定的亲缘关系(图 5)。

以上多项分类结果初步表明该菌株属于假单胞菌目(Pseudomonadales)莫拉菌科(Moraxellaceae)不动杆菌属(*Acinetobacter*)。

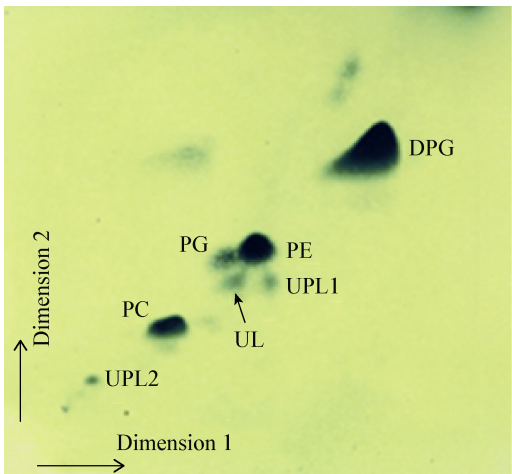


图 4 菌株 LAM1007 的主要极性脂  
Figure 4 The major polar lipids of strain LAM1007

表 2 LAM1007 与属内相近菌脂肪酸含量的比较 Table 2 Cellular fatty acid comparasion between strain LAM1007 and relative strains (%)			
脂肪酸 Fatty acid	LAM1007	<i>A. junii</i>	<i>A. venetianus</i>
$C_{10:0}$	1.1	1.3	1.0
$C_{12:0}$	3.5	3.4	4.0
$C_{12:0} 2OH$	2.7	2.8	2.7
$C_{12:0} 3OH$	5.6	5.5	5.9
$C_{16:0}$	12.2	20.4	15.0
$C_{18:1} \omega 9c$	37.0	34.1	38.0
Summed feature 3	22.5	23.7	22.3

Note: Summed feature 3:  $C_{16:1} \omega 7c$  and/or  $C_{16:1} \omega 6c$ .



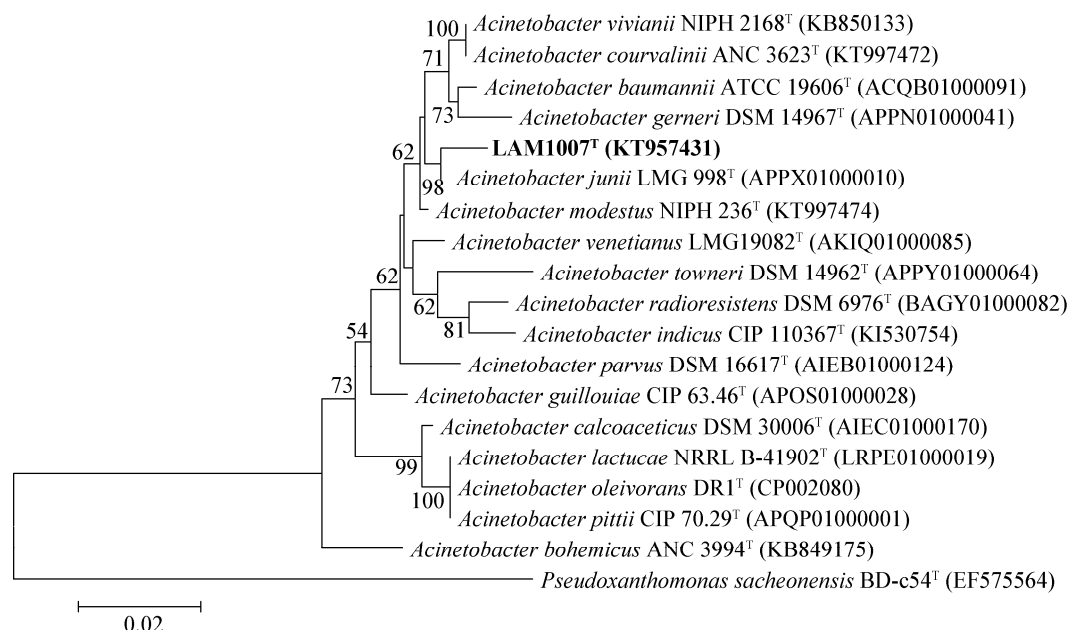


图 5 基于菌株 LAM1007 与属内其他相近菌株的 16S rRNA 基因序列构建的系统发育进化树

Figure 5 Neighbor-joining phylogenetic tree based on a comparison of the 16S rRNA gene sequences of strain LAM1007 and its closest relatives

## 2.2 菌株 LAM1007 对正十六烷降解特性的研究

**2.2.1 温度对正十六烷降解的影响：**由图 6 可知，当  $OD_{600}$  为 0.8，接种量 1%，pH 7.0，180 r/min，培养 60 h 后，菌株可生长并产生降解作用的温度范围宽泛，30 °C 时菌株对正十六烷的降解率已高达 90%，同时在 30–40 °C 之间都能保持稳定且高效的降解能力。当温度在 15–25 °C 时，菌株 LAM1007 的降解能力明显减弱；当温度为 45 °C 时，菌体生长量很少，降解率也仅为 5%。因此最适的温度为

30–40 °C。

**2.2.2 初始 pH 对正十六烷降解的影响：**当  $OD_{600}$  为 0.8，接种量 1%，30 °C，180 r/min 时，由图 7 可知，初始 pH 对于菌株降解正十六烷具有明显影响，同时菌株在初始 pH 5.0–9.0 内均可生长，且降解率在 20%–88% 之间。初始 pH 偏酸性时的降解效率与偏碱性时相比明显有所降低，这与姚嫄等<sup>[34]</sup>的研究结果相一致。当初始 pH 为 7.0 时，菌体生长量最多，降解效率最高，为 88%。

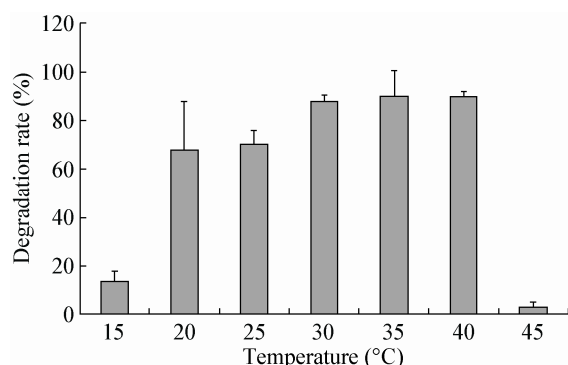


图 6 不同温度对降解正十六烷的影响

Figure 6 Effects of different temperature on the degradation of n-hexadecane

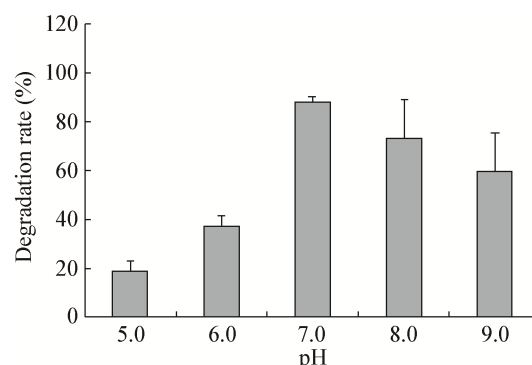


图 7 不同 pH 对降解正十六烷的影响

Figure 7 Effects of different pH on the degradation of n-hexadecane

**2.2.3 接种量对正十六烷降解的影响:** 当  $OD_{600}$  为 0.8 时, 在 30 °C、180 r/min 条件下, 不同接种量 (0.5%–8.0%) 培养 60 h 后, 发现接种量对菌株 LAM1007 降解正十六烷的影响差异较不明显。由图 8 可知, 当接种量在 0.5%–8.0% 时, 降解率均在 70% 以上。当接种量为 0.5% 时降解率为 85.0%; 当接种量为 1%–4% 时, 降解率最高为 90%。因此选取 1% 的接种量作为最适接种条件。

**2.2.4 转速对正十六烷降解的影响:** 转速对于菌株 LAM1007 降解正十六烷具有明显的影响, 随着转速(通氧量)的增加, 菌株降解正十六烷的能力显著增强。由图 9 可知, 当转速达到 180 r/min 时, 菌株降解正十六烷的能力显著增强; 而当转速大于 180 r/min 后, 降解率并无明显增加。因此最佳转速为 180 r/min。

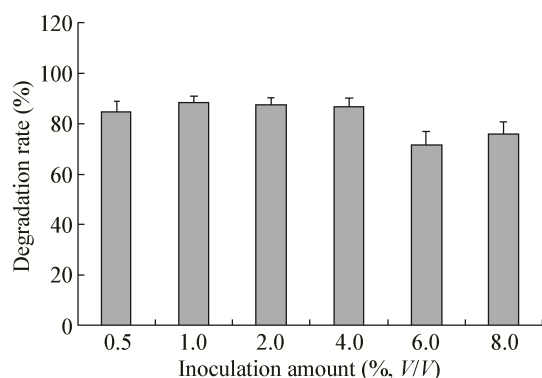


图 8 不同接种量对菌株 LAM1007 降解正十六烷的影响  
Figure 8 Effects of different inoculation amount on the degradation of n-hexadecane

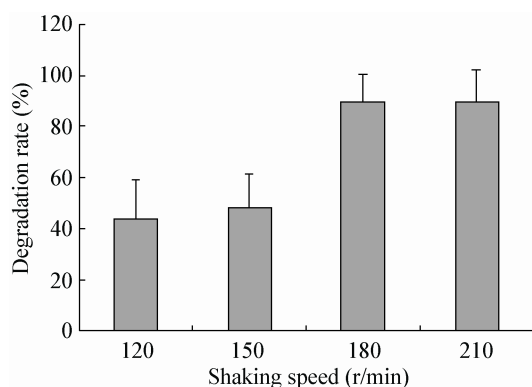


图 9 不同转速对降解正十六烷的影响  
Figure 9 Effects of different shaking speed on the degradation of n-hexadecane

**2.2.5 不同初始浓度的正十六烷对菌株 LAM1007 降解效率的影响:** 在 30 °C、180 r/min、1% 接种量条件下, 不同初始浓度的正十六烷 (0.1%、0.3%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%) 60 h 内的降解效率如图 10 所示, 当正十六烷的浓度为 0.3% 时, 降解率最高达 90%。然而当正十六烷( $C_{16}$ )的浓度为 0.1% 时, 降解率并没有因为  $C_{16}$  含量的减少而提高, 说明过少的  $C_{16}$  不能促进菌体的大量生长, 也无法满足菌体大量繁殖所需要的碳源, 该现象与刘莎莎<sup>[35]</sup>的研究结果一致。随着  $C_{16}$  浓度的增加, 降解率逐渐降低, 但即使正十六烷的浓度高达 2.0%, 降解率也能达 53%, 因此该菌是一株具有潜在应用价值的高效烷烃降解菌株。

**2.2.6 菌株 LAM1007 生长量与降解率随时间变化的关系:** 当菌株 LAM1007 在最适降解条件下 (30 °C, pH 7.0, 180 r/min, 1% 接种量) 降解浓度为 0.3% (2 310.4 mg/L) 的正十六烷时, 如图 11 所示, 菌体生物量在 48 h 后已经趋于稳定, 此时  $OD_{600}$  为 1.2, 降解效率已经高达 85%; 当培养 72 h 后, 培养物的  $OD_{600}$  为 1.3, 基本将培养基中浓度为 2 310.4 mg/L 的正十六烷完全降解。这说明菌株对正十六烷的降解能力与其生物量成正相关, 降解菌的生长量与正十六烷残量的关系对于后续深入研究有着重要的指导意义。

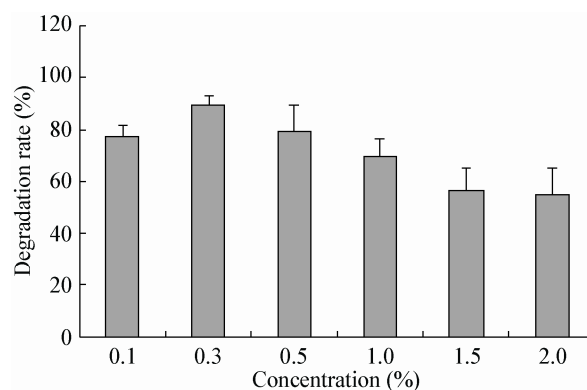


图 10 菌株 LAM1007 对不同初始浓度的正十六烷的降解  
Figure 10 Degradation of n-hexadecane with different initial concentration by strain LAM1007

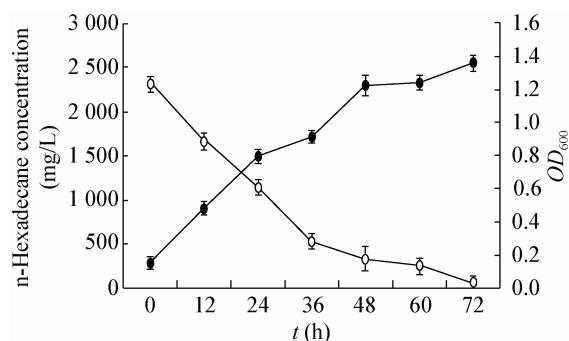


图 11 菌株 LAM1007 的生长量和正十六烷残量随时间变化的关系

Figure 11 The relationship between the biomass of the strain LAM1007 and the residual of n-hexadecane

### 2.3 菌株 LAM1007 对于柴油及液体石蜡降解能力的初步评估

菌株 LAM1007 在 1% 的接种量、30 °C、180 r/min 的条件下培养 6 d 后, 对于浓度为 2.0% (体积比) 的柴油降解前后各烷烃组分的相对含量进行了比较, 如图 12 所示。同时对各烷烃组分峰面积计算出的相对百分含量数据进行了进一步分析, 见表 3。结果表明, 菌株对于柴油中烷烃组分(C<sub>13</sub>–C<sub>19</sub>)具有显著降解作用, 尤其是 C<sub>16</sub> 降解效果更显著, 而对于姥鲛烷(Pr, 异构 C<sub>19</sub>)的降解效果不显著。表明正构烷烃与异构烷烃相比更易被降解, 且相较于短链

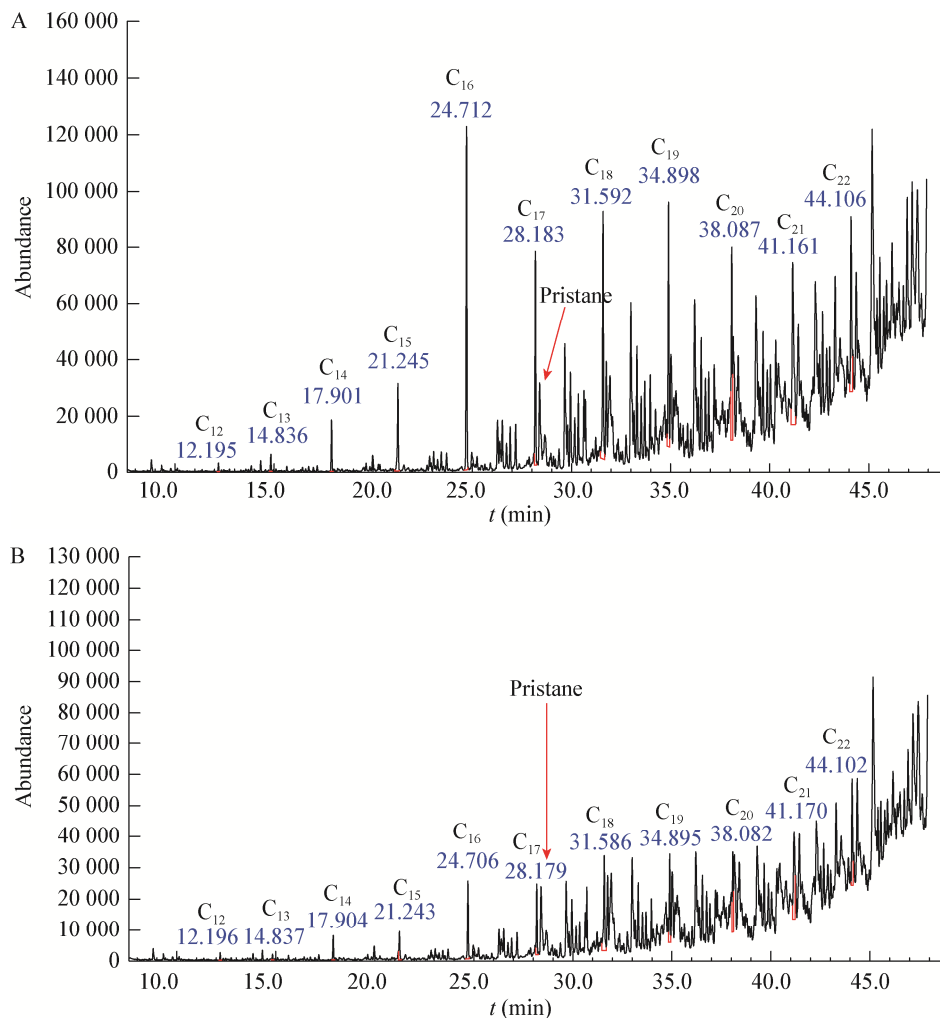


图 12 菌株 LAM1007 降解前后柴油中烷烃组分的变化

Figure 12 Change of alkane component in the diesel before and after degradation

注: A: 空白对照组样品; B 实验组样品。

Note: A: Control group; B: Experimental group.



表 3 柴油样品中各烷烃组分的相对百分含量  
Table 3 Relative percentage content of each alkane component in the diesel

烷烃 Alkane	空白对照组 Control group	实验组 Experimental group	实验组/对照组 Experimental/ Control
Pr	5.46	10.59	1.94
C <sub>12</sub>	0.30	0.64	2.16
C <sub>13</sub>	0.65	0.51	0.78
C <sub>14</sub>	2.46	2.16	0.88
C <sub>15</sub>	4.35	3.30	0.76
C <sub>16</sub>	16.28	8.81	0.54
C <sub>17</sub>	10.13	7.97	0.79
C <sub>18</sub>	14.09	13.35	0.95
C <sub>19</sub>	11.70	10.70	0.91
C <sub>20</sub>	9.70	9.96	1.03
C <sub>21</sub>	15.26	16.79	1.10
C <sub>22</sub>	10.67	14.18	1.33

烷烃, 菌株 LAM1007 更偏向选取 C<sub>16</sub> 为降解底物, 这与 Acer 等<sup>[14]</sup>的研究结果一致。不仅如此, 该菌株在降解液体石蜡时也表现出相同的规律。图 13 为菌株 3 d 内对 0.3% (体积比) 液体石蜡降解前后各烷烃组分相对含量的结果比较。同时对各烷烃组分峰面积计算出的相对百分含量数据进行了进一步分析, 见表 4。结果表明菌株对于 C<sub>13</sub>–C<sub>18</sub> 降解效果显著, 尤其对于 C<sub>16</sub> 的降解效果最为显著, 这更进一步说明该菌株偏向选取 C<sub>16</sub> 为降解底物。菌株 LAM1007 是一株非常有望应用于石油烃修复工程的广谱高效烷烃降解菌。

### 3 结论与讨论

本研究从长期受石油污染的土壤样品中分离筛选出一株高效烷烃降解菌 LAM1007, 通过形态观察、生理生化试验、细胞化学组分及 16S rRNA 基因序列分析等鉴定该菌属于不动杆菌属 (*Acinetobacter*)。

以正十六烷为唯一碳源, 该菌株可在较宽的温度范围(15–40 °C)内降解正十六烷。72 h 内对浓度

为 0.3% (体积比) 的 C<sub>16</sub> 基本完全降解, 同时 60 h 内对于高浓度 2.0% (体积比) 即 15 402.6 mg/L 的正十六烷降解率仍能高达 53%, 是目前有关报道中耐受正十六烷浓度最高和降解正十六烷能力最强的一株菌。然而其他报道的降解菌均在较低浓度的正十六烷条件下降解效果才比较明显, 如姚嫚等<sup>[34]</sup>分离筛选的菌株 C18 在 47 h 内对 900 mg/L 的 C<sub>16</sub> 可完全降解; 鲁雅梅等<sup>[36]</sup>筛选的菌 SY16 对于 150 mg/L 以内的正十六烷降解效果较明显; 焦春燕等<sup>[37]</sup>筛选的菌株 S5 对于低浓度的正十六烷(15 mg/L)具有明显降解趋势。虽然对于菌株利用烃类化合物已有很多报道, 但是大多数菌株只能利用范围较窄的底物, 而 LAM1007 菌株可良好地生长于以 2.0% (体积比) 的柴油及 0.3% (体积比) 的液体石蜡为唯一碳源的液体培养基中, 并分别对高浓度的柴油样品中的烷烃组分(C<sub>13</sub>–C<sub>19</sub>)以及液体石蜡样品中的烷烃组分(C<sub>13</sub>–C<sub>18</sub>)均具有较明显降解能力。

目前微生物修复中存在的主要问题是微生物降解能力不够理想, 主要通过接种高效降解菌和施加安全可靠的生物表面活性剂等方法增强石油烃类的降解<sup>[38]</sup>。因此, 本研究筛选到的菌株 LAM1007 是一株具有生物修复应用潜力的高效烷烃降解菌。

表 4 液体石蜡样品中各烷烃组分的相对百分含量  
Table 4 Relative percentage content of each alkane component in paraffin liquid

烷烃 Alkane	空白对照组 Control group	实验组 Experimental group	实验组/对照组 Experimental/ Control
Pr	24.91	49.15	1.97
C <sub>12</sub>	0.86	3.49	4.05
C <sub>13</sub>	2.61	1.81	0.69
C <sub>14</sub>	8.88	6.10	0.69
C <sub>15</sub>	13.73	6.28	0.45
C <sub>16</sub>	20.19	8.51	0.42
C <sub>17</sub>	14.49	12.67	0.87
C <sub>18</sub>	9.60	4.81	0.50
C <sub>19</sub>	4.75	10.02	2.11

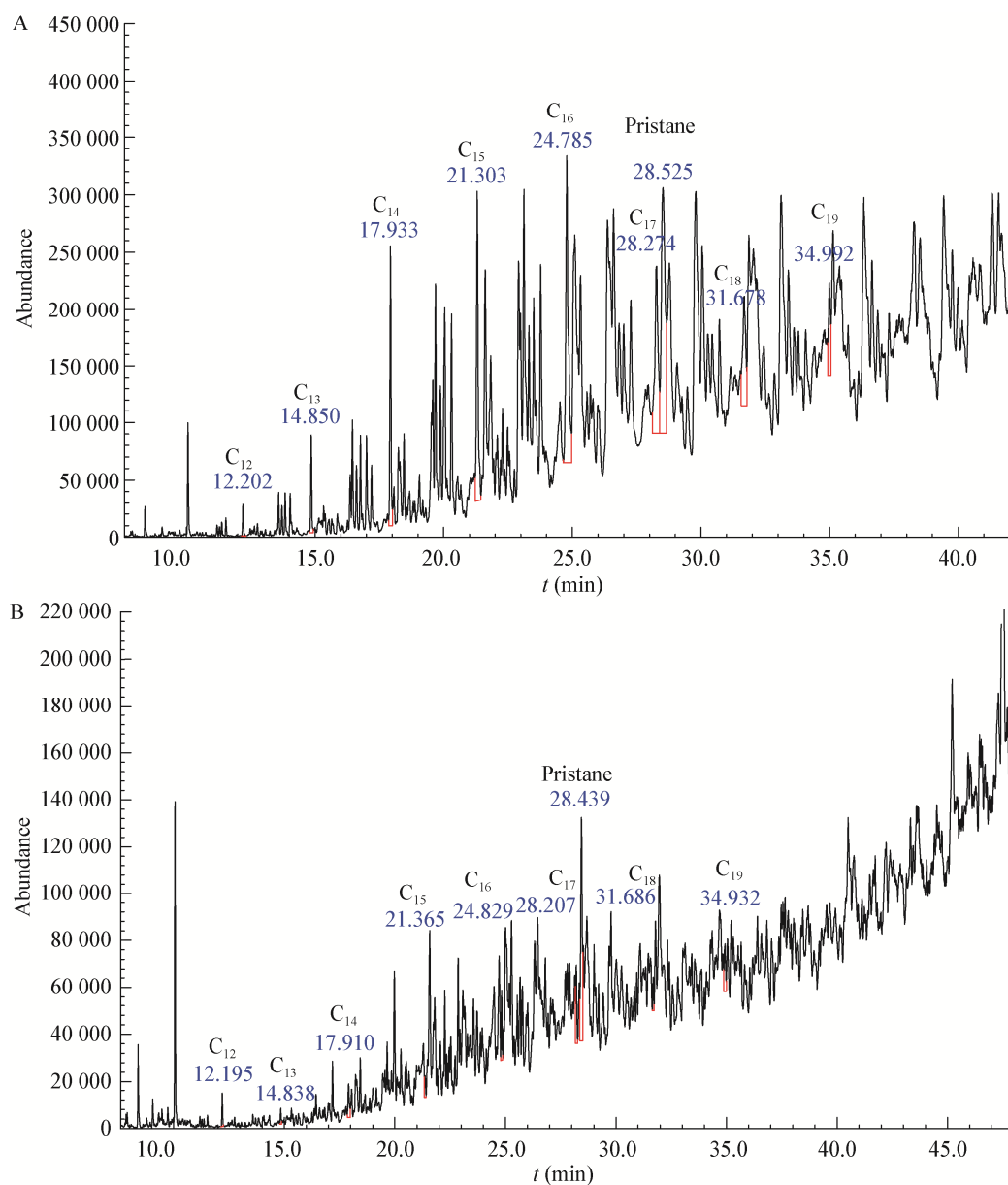


图 13 菌株 LAM1007 降解前后液体石蜡中烷烃组分的变化

Figure 13 Change of alkane component in the paraffin liquid before and after degradation

注：A：空白对照组样品；B：实验组样品。

Note: A: Control group; B: Experimental group.

## 参考文献

- [1] Bao MT, Wang LN, Sun PY, et al. Biodegradation of crude oil using an efficient microbial consortium in a simulated marine environment[J]. Marine Pollution Bulletin, 2012, 64(6): 1177-1185
- [2] Oren A. Estimation of the contribution of halobacterial to the bacterial biomass and activity in solar salterns by the use of bile salts[J]. FEMS Microbiology Letters, 1990, 73(1): 41-47
- [3] Xia WJ, Du ZF, Cui QF, et al. Biosurfactant produced by novel *Pseudomonas* sp. WJ6 with biodegradation of *n*-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. Journal of Hazardous Materials, 2014, 276: 489-498
- [4] Qian P, Sun GQ, Zhang CZ. A novel fuzzy neural network method for diesel quantitative analysis with near infrared spectroscopy[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2008, 28(12): 2851-2854 (in Chinese)

钱平, 孙国琴, 张存洲. 基于近红外光谱技术的石油组分定量

- 分析新方法[J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(12): 2851-2854
- [5] Atlas RM, Atlas MC. Biodegradation of oil and bioremediation of oil spills[J]. Current Opinion in Biotechnology, 1991, 2(3): 440-443
- [6] Zheng L, Cui ZS, Gao W, et al. Field study of the bioremediation of oil-contaminated Dalian beach by marine oil-degrading bacterial agent[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2012, 34(3): 163-172 (in Chinese)
- 郑立, 崔志松, 高伟, 等. 海洋石油降解菌剂在大连溢油污染岸滩修复中的应用研究[J]. 海洋学报, 2012, 34(3): 163-172
- [7] Kostka JE, Prakash O, Overholt WA, et al. Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in gulf of Mexico beach sands impacted by the deepwater horizon oil spill[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(22): 7962-7974
- [8] Thavasi R, Jayalakshmi S, Banat IM. Effect of biosurfactant and fertilizer on biodegradation of crude oil by marine isolates of *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium kutscheri* and *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(2): 772-778
- [9] Gandolfi I, Siculo M, Franzetti A, et al. Influence of compost amendment on microbial community and ecotoxicity of hydrocarbon-contaminated soils[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(2): 568-575
- [10] Simon MA, Bonner JS, Page CA, et al. Evaluation of two commercial bioaugmentation products for enhanced removal of petroleum from a wetland[J]. Ecological Engineering, 2004, 22(4/5): 263-277
- [11] Pritchard PH, Mueller JG, Rogers JC, et al. Oil spill bioremediation: experiences, lessons and results from the Exxon valdez oil spill in Alaska[J]. Biodegradation, 1992, 3(2): 315-335
- [12] Liu H, Xu J, Liang RB, et al. Characterization of the medium-and long-chain n-alkanes degrading *Pseudomonas aeruginosa* strain SJTD-1 and its alkane hydroxylase genes[J]. PLoS One, 2014, 9(8): e105506
- [13] Zhang ZZ, Hou ZW, Yang CY, et al. Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(5): 4111-4116
- [14] Acer Ö, Güven K, Bekler FM, et al. Isolation and characterization of long-chain alkane-degrading *Acinetobacter* sp. BT1A from oil-contaminated soil in Diyarbakır, in the Southeast of Turkey[J]. Bioremediation Journal, 2016, 20(1): 80-87
- [15] Liu HJ, Yao J, Yuan ZM, et al. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from oil-water mixture in Dagang oil field, China[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2014, 87: 52-59
- [16] Hassanshahian M, Emtiazi G, Cappello S. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea[J]. Marine Pollution Bulletin, 2012, 64(1): 7-12
- [17] Wang LP, Liu YH, Shao ZZ. Isolation and identification of a hydrocarbon-degrading bacterium *Gordonia* sp. S14-10 from the surface water of Atlantic Ocean and analysis on its related characteristics[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2009, 49(12): 1634-1642 (in Chinese)
- 王丽萍, 刘昱惠, 邵宗泽. 一株来自大西洋表层海水的烷烃降解菌 *Gordonia* sp. S14-10 的分离鉴定及其降解相关特性的分析[J]. 微生物学报, 2009, 49(12): 1634-1642
- [18] Chen XR, Ruan ZY, Wang YW, et al. Research on the isolation, identification on n-hexadecane biodegrading characteristics of *Gordonia* sp. LAM0048[J]. Current Biotechnology, 2015, 5(2): 137-141 (in Chinese)
- 陈小蓉, 阮志勇, 王彦伟, 等. *Gordonia* sp. LAM0048 的分离鉴定及其降解正十六烷的研究[J]. 生物技术进展, 2015, 5(2): 137-141
- [19] Das K, Mukherjee AK. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India[J]. Bioresource Technology, 2007, 98(7): 1339-1345
- [20] Liu BQ, Ju MT, Liu JP, et al. Isolation, identification, and crude oil degradation characteristics of a high-temperature, hydrocarbon-degrading strain[J]. Marine Pollution Bulletin, 2016, 106(1/2): 301-307
- [21] Wang XB, Chi CQ, Nie Y, et al. Degradation of petroleum hydrocarbons (C6-C40) and crude oil by a novel *Dietzia* strain[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(17): 7755-7761
- [22] Zuo K. Carbon metabolism of *Rhodococcus* sp. and production of 2-phenylpropionic acid[D]. Shanghai: Master's Thesis of East China University of Science and Technology, 2012 (in Chinese)
- 左可. 烷烃降解菌的代谢和 2-苯基丙酸的生物催化[D]. 上海: 华东理工大学硕士学位论文, 2012
- [23] Geißdörfer W, Kok RG, Ratajczak A, et al. The Genes *rubA* and *rubB* for alkane degradation in *Acinetobacter* sp. strain ADP1 are in an operon with *estB*, encoding an esterase, and *oxyR*[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(14): 4292-4298
- [24] Li B, Shen L, Zhang DM. Dynamics of Petroleum-degrading bacterial community with biodegradation of petroleum contamination in seawater[J]. Journal of Ningbo University (Natural Science & Engineering Edition), 2009, 22(4): 477-483 (in Chinese)
- 李博, 沈璐, 张德民. 石油污染海水中细菌群落的动态变化[J]. 宁波大学学报: 理工版, 2009, 22(4): 477-483
- [25] Labbé D, Margesin R, Schinner F, et al. Comparative phylogenetic analysis of microbial communities in pristine and hydrocarbon-contaminated Alpine soils[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2007, 59(2): 466-475
- [26] Cui QF, Qi YB, Yi LN, et al. Study on indigenous microorganism activator in a oil reservoir of calcium Chloride water[J]. Science Technology and Engineering, 2015, 15(4): 78-83 (in Chinese)
- 崔庆峰, 齐义彬, 伊丽娜, 等. 氯化钙水型油藏内源微生物激活剂研究[J]. 科学技术与工程, 2015, 15(4): 78-83
- [27] Cao J, Xu ZH, Li LZ, et al. Biosurfactant-producing petroleum-degrader *Acinetobacter* BHSN[J]. Journal of Ecology and Rural Environment, 2009, 25(1): 73-78 (in Chinese)
- 曹娟, 徐志辉, 李凌之, 等. 产生物表面活性剂的石油降解菌 *Acinetobacter* BHSN 的研究[J]. 生态与农村环境学报, 2009, 25(1): 73-78

- [28] Tan TF, Shao ZZ. Construction of marine oil biodegradation bacterial consortium and its dynamic change in the process of oil consumption[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2006, 45(S1): 262-266 (in Chinese)  
谭田丰, 邵宗泽. 海洋石油烃降解菌群构建及其在降解过程中的动态分析[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2006, 45(S1): 262-266
- [29] Liu YH, Wang H, Hu XK. Recent advances in the biodegradation of hydrocarbons by *Acinetobacter* species[J]. Microbiology China, 2016, 43(7): 1579-1589 (in Chinese)  
刘玉华, 王慧, 胡晓珂. 不动杆菌属(*Acinetobacter*)细菌降解石油烃的研究进展[J]. 微生物学通报, 2016, 43(7): 1579-1589
- [30] Yuan Y, Guo SH, Li FM, et al. Effect of an electric field on *n*-hexadecane microbial degradation in contaminated soil[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2013, 77: 78-84
- [31] Mishra S, Singh SN. Microbial degradation of *n*-hexadecane in mineral salt medium as mediated by degradative enzymes[J]. Bioresource Technology, 2012, 111: 148-154
- [32] Ruan ZY, Wang YW, Song JL, et al. *Kurthia huakuii* sp. nov., isolated from biogas slurry, and emended description of the genus *Kurthia*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64: 518-521
- [33] He H, Qiao FD, An ML, et al. Isolation, identification and characterization of a crude-oil-degradating thermophiles in petroleum reservoirs[J]. Biotechnology Bulletin, 2012, 12(14): 156-162 (in Chinese)  
何华, 乔发东, 安明理, 等. 一株油藏耐热原油降解菌的分离鉴定与特性分析[J]. 生物技术通报, 2012, 12(14): 156-162
- [34] Yao M, Tuo BH, Wang QF, et al. Isolation of an alkane-degradation bacterium and study on its degradation performance and kinetics[J]. Petroleum Processing and Petrochemicals, 2012, 43(2): 29-32 (in Chinese)  
姚嫄, 唐保华, 王巧凤, 等. 一株烷烃降解菌的筛选、降解特性及动力学研究[J]. 石油炼制与化工, 2012, 43(2): 29-32
- [35] Liu SS. A study on remediating diesel fuel contaminated soil by bioventing and degradation capability of diesel degrading bacteria[D]. Tai'an: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2013 (in Chinese)  
刘莎莎. 柴油污染土壤生物通风修复效果及柴油降解菌的降解能力研究[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2013
- [36] Lu YM, Zou DL, Zhao YS, et al. Isolation, characterization, and alkane degradation potential of hydrocarbon-degrading bacteria SY16[J]. Ecology and Environment, 2007, 16(5): 1394-1398 (in Chinese)  
鲁雅梅, 邹东雷, 赵勇胜, 等. 烷烃降解菌 SY16 的筛选、鉴定及降解能力测定[J]. 生态环境, 2007, 16(5): 1394-1398
- [37] Jiao CY, Nie MQ. The screening of long n-alkane bacteria and its degradation ability[J]. Environmental Protection and Technology, 2011, 17(1): 6-9 (in Chinese)  
焦春燕, 聂麦茜. 长链烷烃生长菌的筛选及其降解能力的测定[J]. 环保科技, 2011, 17(1): 6-9
- [38] Li GZ, Lai QL, Yan PS, et al. Advance on marine petroleum pollution and microbial remediation[J]. Current Biotechnology, 2015, 5(3): 164-169 (in Chinese)  
李贵珍, 赖其良, 闫培生, 等. 海洋石油污染及其微生物修复研究进展[J]. 生物技术进展, 2015, 5(3): 164-169