

研究报告



高效石油降解菌群的构建及对芳香烃化合物萘的协同降解性能

张惠^{1,2} 杨英^{*1,2} 杨晨^{1,2} 储明^{1,2} 施海珊^{1,2} 李卫华^{1,2}

1 安徽建筑大学环境与能源工程学院 安徽 合肥 230601

2 安徽建筑大学水污染控制与废水资源化安徽省重点实验室 安徽 合肥 230601

摘要:【背景】石油作为一类混杂有机化合物,一旦产生污染就会对人类和环境造成严重的危害。

【目的】从新疆石油污染土壤中分离筛选石油降解菌,为石油污染土壤的生物修复提供数据支持及技术参考。【方法】以石油为唯一碳源,通过富集培养、筛选分离得到 123 株单菌,根据菌落形态挑选出 30 个不同形态菌株,通过 16S rRNA 基因序列确定其种属,构建系统发育树;通过原油降解实验筛选出高效石油降解菌,以芳香烃的标志化合物萘为唯一碳源筛选出高效降解菌株,并分别筛选可降解水杨酸、邻苯二酚的菌株。【结果】分离筛选出 5 株高效石油降解菌,降解率高于 85%;萘、水杨酸和邻苯二酚降解菌株各获得一株,将 3 种菌株按照 1:1:1 的接种比例对萘进行降解,萘的降解率从单菌 60.74%提升到 89.40%,菌株间的分工协作可以提高有机物的降解效率。

【结论】筛选得到的菌株丰富了石油降解微生物菌种库,不同微生物菌株之间的分工协作为石油污染物的降解提供了新思路,为进一步研究石油污染治理提供参考。

关键词: 石油降解菌, 分离鉴定, 16S rRNA, 生物降解, 分工协作

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (21677001); Key Research and Development Projects of Anhui Province (1704a0902006); Major Science and Technology Projects of Anhui Province (17030801028); Major Teaching and Research Projects in Anhui Provincial Department of Education (2018jyxm1444)

***Corresponding author:** E-mail: yangying5918@163.com

Received: 21-07-2019; **Accepted:** 30-12-2019; **Published online:** 06-01-2020

基金项目: 国家自然科学基金(21677001); 安徽省重点研发项目(1704a0902006); 安徽省科技重大专项(17030801028); 安徽省教育厅重大教研项目(2018jyxm1444)

***通信作者:** E-mail: yangying5918@163.com

收稿日期: 2019-07-21; **接受日期:** 2019-12-30; **网络首发日期:** 2020-01-06

Construction of highly efficient crude oil degrading bacteria and synergistic degradation performance on aromatic hydrocarbon compound naphthalene

ZHANG Hui^{1,2} YANG Ying^{*1,2} YANG Chen^{1,2} CHU Ming^{1,2} SHI Hai-Shan^{1,2}
LI Wei-Hua^{1,2}

1 College of Environmental and Energy Engineering, Anhui Jianzhu University, Hefei, Anhui 230601, China

2 Key Laboratory of Anhui Province of Water Pollution Control and Wastewater Reuse, Anhui Jianzhu University, Hefei, Anhui 230601, China

Abstract: **[Background]** As a type of mixed organic compound, crude oil can cause serious harm to humans and the environment once oil pollution occurs. **[Objective]** Crude oil degrading bacteria from contaminated soil in Xinjiang were isolated and screened to provide data support and technical reference for the bioremediation of crude oil contaminated soil. **[Methods]** Using crude oil as the sole carbon source, a total of 123 individual strains were isolated from crude oil through enrichment culture and screening. Thirty different strains were selected according to the morphology of the colonies, and their species were determined by 16S rRNA gene sequencing to construct a phylogenetic tree. Highly efficient crude oil degrading bacteria were screened out through crude oil degradation experiments, and the naphthalene, a representative compound of aromatic hydrocarbons, as the sole carbon source to screen high efficient degradation strains. **[Results]** Five strains of highly efficient crude oil degrading bacteria were isolated; these strains showed degradation rates higher than 85%. The strains capable of degrading naphthalene, salicylic acid, and catechol were obtained and applied for naphthalene degradation at a 1:1:1 inoculation ratio. The degradation rate of naphthalene increased from 60.74% to 89.40%, thus proving that division of labor cooperation between strains could improve their degradation efficiency for organic matter. **[Conclusion]** The strains obtained from screening enrich the crude oil degrading microbial species bank, and the observed division of labor cooperation among different microbial strains provides new ideas for the degradation of crude oil pollutants. The results also offer a reference for further research on crude oil pollution control.

Keywords: Crude oil degrading bacteria, Isolation and identification, 16S rRNA, Biodegradation, Co-metabolism

石油是由古代海洋、湖泊的生物历经悠久的演变形成的一类复杂混合物^[1],其成分包含各种芳香烃、烷烃、胶质和沥青质^[2]。石油可能会在动植物和人体内富集,进而导致癌变、畸形、突变等。目前由于石油的全球性广泛开采,在加工和使用过程中泄漏和排放石油引发的环境污染问题日益严重^[3-4]。石油污染的治理方法主要分为物理修复、化学修复和生物修复^[5]。物理法和化学法操作成本高、易造成二次污染,而微生物修复法操作简便、费用低、无二次污染,被公认为最经济、有效且环保的修复技术,生物修复是人为挑选出对可降解有毒、有害物质的微生物或植物,从而达到治理污染物的目的^[6-8]。由于生物修复消耗少、效果彻底和

无二次污染,目前已被广泛应用于土壤清洁领域^[9]。其中,石油污染土壤微生物修复技术可分为原位生物修复技术和异位生物修复技术,原位修复技术是直接在污染场地就地修复污染土壤,无需将石油污染土壤移位的修复技术,包括:(1) 生物培养法,即生物刺激法;(2) 生物强化法,即投菌法;(3) 生物通气法^[10]。生物强化法是直接向油污土壤引入外源污染物降解菌,同时添加降解菌生长所需营养物质,以促进其对污染物的降解^[11],可显著提高石油类物质的降解效率。

据统计,自然界中能够降解石油污染物的微生物类群有 100 多个属,超过 200 个种,分属于细菌、霉菌、酵母菌、放线菌等,主要包括不动杆菌属

(*Acinetobacter*)、苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、产碱菌属(*Alcaligenes*)等^[12-14]。分离、筛选出具有降解石油能力的菌株,是研究微生物降解石油机理及对污染环境进行生物修复的基础^[15]。然而石油组分复杂,靠单一的微生物菌种不易将其完全降解,其中芳香烃类由于毒性强且结构稳定,较难被降解除去^[16]。研究发现石油和柴油组分中,适量的饱和烃可促进菌株对原油的降解作用,但是高浓度的芳香烃会对菌株产生毒性作用,从而降低菌株的降解能力^[17]。郭娜等发现 *Rhodococcus* sp. G2 具有广谱的烷烃降解能力,并且具有一定的芳香族有毒物质降解能力^[18]。进一步丰富石油降解微生物菌种库,研究芳香烃化合物降解机制,提高降解效率,筛选更加高效、适应性更强的降解菌株至关重要^[9,19]。

本研究通过对石油污染土壤样品进行富集分离筛选,得到 30 株高效石油降解菌株,根据形态学观察和 16S rRNA 基因序列分析进行初步鉴定,并通过原油降解实验筛选出高效石油降解菌株;针对芳香烃化合物萘及其代谢产物——水杨酸、邻苯二酚,分别分离出可降解这三种物质的菌株各一株,并将 3 株菌混合后对萘进行降解,通过紫外分光光度法、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)分析其降解能力,发现微生物间的分工协作可以进一步提高其降解效率,达到高效降解石油污染物的目的^[16,20]。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品

土壤样品采自新疆油田的表层、中层和深层石油污染土壤,4 °C 保藏。

1.1.2 主要试剂和仪器

胰蛋白胨、酵母浸粉、琼脂粉、萘、水杨酸、邻苯二酚,上海麦克林生化科技有限公司;土壤 DNA 提取试剂盒,安诺伦生物科技有限公司。

恒温培养箱,上海三发科学仪器有限公司;紫

外分光光度计,岛津公司;PCR 仪,Bio-Rad 公司;气相色谱-质谱联用仪,安捷伦科技有限公司。

1.1.3 培养基

(1) 富集筛选用无机盐液体培养基(g/L): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 17.90, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 7.80, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5.00, KCl 5.00, 1% (体积比)微量元素溶液 SL-4。

SL-4 配制方法: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002 g/L, 10% (体积比)微量元素溶液 SL-6。

SL-6 配制方法(g/L): $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.10, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.03, H_3BO_3 0.30, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.20, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.02, $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.03, pH 为 7.8 ± 0.2 。

单独配制 5% (质量体积比) CaCl_2 和 20% (质量体积比) MgSO_4 , 分别加入 0.1% (体积比)至上述培养基中, pH 为 7.8 ± 0.2 , 1×10^5 Pa 高压蒸汽灭菌 30 min。

(2) 原油培养基:在无机盐液体培养基中添加 1% (体积比)原油, pH 为 7.8 ± 0.2 , 1×10^5 Pa 高压蒸汽灭菌 30 min。

(3) 萘碳源的添加:准确称量 2.0 g 固体萘溶于 20 mL 丙酮中,制成浓度为 1×10^5 mg/L 的萘储备液,然后加入到无机盐培养基,使萘的浓度为 0.2% (质量体积比)。

(4) 水杨酸碳源的添加:在无机盐液体培养基中添加 0.2% (体积比)用 0.2 μm 滤膜过滤除菌的水杨酸。

(5) 邻苯二酚碳源的添加:在无机盐液体培养基中添加 0.2% (体积比)用 0.2 μm 滤膜过滤除菌的邻苯二酚。

(6) 分离用液体 LB 培养基(g/L):胰蛋白胨 10.0, 氯化钠 10.0, 酵母浸粉 5.0, pH 为 7.0 ± 0.2 , 1×10^5 Pa 高压蒸汽灭菌 20 min。

(7) 分离用固体 LB 培养基:在液体 LB 培养基中添加 15 g/L 琼脂, pH 为 7.0 ± 0.2 , 1×10^5 Pa 高压蒸汽灭菌 20 min。

1.2 土壤含油率的测定

土壤含油率的测定采用环境国家环境保护标

准 HJ 783-2016 土壤和沉积物有机物的提取加压流体萃取法^[21]。

1.3 原油四组分的测定

原油四组分的测定采用薄层棒状色谱,按照中国石油天然气行业标准 SY/T 5119-2016 岩石中可溶有机物及原油族组分分析^[22]。

1.4 原油降解菌的富集分离

称取 1 g 土壤加入含有 100 mL 灭菌的原油培养基中,空白对照选择不接种土壤的原油培养基,30 °C、150 r/min 振荡培养 7 d 后,取 3 mL 上清液加入新的 100 mL 原油培养基中继续培养,依次培养 4 个周期,即 28 d。取上清液 1 mL 依次稀释至 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 涂布于 LB 固体培养基平板上,倒置于 30 °C 恒温培养箱中培养,挑取单菌落接种到 LB 液体培养基中培养,用灭菌的 30% (体积比)甘油溶液保存菌液,放置于-30 °C 冰箱冻存。利用原油为唯一碳源的无机盐液体培养基筛选高效降解石油菌株。

1.5 原油降解菌的鉴定

采用革兰氏染色、形态观察对分离得到的菌株进行形态鉴定,同时采用土壤 DNA 提取试剂盒按照使用说明提取分离菌株的基因组 DNA,用细菌 16S rRNA 基因的通用引物 8F (5'-GAGAGTTTG ATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGCTACC TTGTTCTCAG-3')进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: 10×缓冲液 5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μ L, *Taq* 酶(5 U/ μ L) 0.3 μ L, 引物 8F 和 1492R (10 μ mol/ μ L) 各 1 μ L, DNA 模板 1 μ L, ddH₂O 37.7 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 45 s, 72 °C 1.5 min, 共 29 个循环; 72 °C 10 min, 10 °C 保温。

将 PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后,送至北京诺赛基因组研究中心有限公司测序,测序结果提交至 GenBank 数据库,采用 BLAST 程序进行相似性分析,选取相似度最高的序列,利用 ClustalX、MEGA 等软件,采用邻接法(neighbor-joining method)绘制系统发育树。

1.6 原油降解率的测定

将分离得到的大量纯菌从甘油管接入 LB 固体培养基平板 30 °C 活化,再转接 LB 液体培养基试管进行培养,获得种子液,取生长在对数期的种子液于 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min,用无机盐培养基洗涤 3 次,利用紫外分光光度计检测 600 nm 波长下的菌体浓度。菌株接种到含有 2%石油为唯一碳源的无机盐培养基中,使最终浓度达到 OD_{600} 约为 0.10,设置不接菌的培养基为对照组。

14 d 后取培养液加入 30%体积的正己烷进行萃取,GC-MS 分析测定原油的降解率。色谱条件: Agilent HP-5AS (30 m×0.25 mm)色谱柱;温度程序为 40 °C 恒温 10 min, 5 °C/min 升温至 295 °C,恒温 29 min; 氦气载体流速为 2.5 mL/min; 进样量为 1 μ L, 进样温度为 295 °C,分流比为 29:1; 检测器为四级杆质谱,质谱条件为: EI 源,离子源温度 230 °C,四级杆温度 150 °C, EI 源电子能量 69.9 eV,质量范围为 40-550 m/z 。

1.7 萘、水杨酸、邻苯二酚降解菌株的筛选

芳香烃的标志化合物萘结构稳定,由于大多数微生物在降解萘的过程中会产生有害的代谢产物,抑制细胞生长,降低其降解率,因此可高效降解萘的微生物菌株较少。萘的主要有害代谢产物是水杨酸和邻苯二酚,“分工协作”降解是将可利用有害代谢产物的微生物菌株加入到萘降解菌株中,共同完成萘的降解。

针对这 30 株石油降解菌株,利用萘、水杨酸、邻苯二酚为唯一碳源分离出具有降解能力的菌株,并调节筛选菌株的菌液浓度,使 OD_{600} 值比例为 1:1:1 对萘进行降解。

1.8 萘、水杨酸、邻苯二酚降解率的测定

(1) 萘降解率的测定: 将 30 株菌利用萘-无机盐培养基培养 7 d 后,取培养液加入 30%体积的正己烷进行萃取,GC-MS 分析测定原油的降解率。色谱条件: Agilent HP-5AS (30 m×0.25 mm)色谱柱;温度程序为 60 °C 恒温 1 min, 10 °C/min 升温至 220 °C,恒温 15 min; 氦气载体流速为 2.5 mL/min; 进样量为 1 μ L,进样温度为 240 °C,分流比为 29:1;

检测器为四级杆质谱, 质谱条件为 EI 源, 离子源温度 230 °C, 四级杆温度 150 °C, EI 源电子能量 69.9 eV, 质量范围为 40–550 *m/z*。

(2) 水杨酸降解率的测定: 将 30 株菌利用水杨酸-无机盐培养基培养 7 d 后, 取培养液用分光光度计测定其在 304 nm 的吸光值, 以不加微生物的培养液为对照组。

水杨酸降解率=(对照组水杨酸浓度-实验组水杨酸浓度)/对照组水杨酸浓度。

(3) 邻苯二酚降解率的测定: 将 30 株菌利用邻苯二酚-无机盐培养基培养 7 d 后, 取培养液用分光光度计测定其在 288 nm 的吸光值, 以不加微生物的培养液为对照组。

邻苯二酚降解率=(对照组邻苯二酚浓度-实验组邻苯二酚浓度)/对照组邻苯二酚浓度。

2 结果与分析

2.1 石油污染土壤的含油率

经测定得到不同样品的含水率、油重、鲜土重和含油率 4 项参数(表 1), 表层、中层和下层的含油率分别是 4.57%、12.43%和 22.96%, 含油率逐层递增。

2.2 原油四组分

经测定, 该原油四组分为: 饱和烃 35.20%, 芳香烃 44.64%, 非烃 4.63%, 沥青质 15.54%。

2.3 原油降解菌的分离鉴定

石油污染土样通过原油培养基的 4 次富集培养后, 挑选生长良好的优势菌株, 分离纯化得到 123 个微生物菌株, 根据菌落形态学观察挑选出

30 个菌落形态不同的微生物菌株(图 1)。对这些菌株编号并进行形态特征观察和革兰氏染色, 利用 PCR 引物进行 16S rRNA 基因的序列分析和菌属鉴定(表 2)。

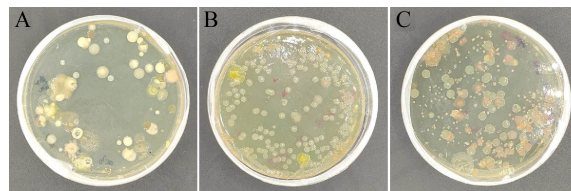


图 1 用 LB 平板分离得到的部分菌株菌落形态

Figure 1 Colony morphology of partial strains isolated from LB plates

表 2 菌种鉴定及革兰氏镜检结果

Table 2 Strain identification and Gram microscopy results

菌株编号 Strain No.	相似菌属 Similar genus	相似性 Similarity (%)	革兰氏染色 Gram's stain
A1	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	99.6	G ⁺
A3	<i>Achromobacter spanius</i>	99.9	G ⁻
A4	<i>Pannonibacter phragmitetus</i>	99.6	G ⁻
A6	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	100	G ⁻
A7	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99.9	G ⁻
A8	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	99.5	G ⁻
A9	<i>Dietzia cercidiphylli</i>	99.6	G ⁺
A11	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99.9	G ⁻
A12	<i>Pseudomonas songnenensis</i>	99.8	G ⁻
A13	<i>Ochrobactrum cytisi</i>	90.6	G ⁻
A15	<i>Achromobacter denitrificans</i>	96.4	G ⁻
A18	<i>Delftia lacustris</i>	95.5	G ⁻
A22	<i>Microbacterium schleiferi</i>	99.7	G ⁺
A23	<i>Rhodococcus ruber</i>	100	G ⁺
A24	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	99.8	G ⁻
A25	<i>Bacillus cereus</i>	100	G ⁺
A28	<i>Kocuria rhizophila</i>	99.8	G ⁺
A30	<i>Halomonas alkalicola</i>	96.1	G ⁻
A31	<i>Mycoplana ramosa</i>	91.0	G ⁻
A32	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	95.6	G ⁺
A33	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	100	G ⁻
A34	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	90.3	G ⁺
A44	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	95.5	G ⁺
A46	<i>Pseudomonas nitritireducens</i>	95.8	G ⁻
A50	<i>Pseudomonas guguanensis</i>	96.5	G ⁻
A52	<i>Pseudomonas guguanensis</i>	99.8	G ⁺
A56	<i>Bacillus proteolyticus</i>	100	G ⁻
A58	<i>Pantoea dispersa</i>	99.4	G ⁻
A62	<i>Exiguobacterium profundum</i>	99.9	G ⁺
A68	<i>Pseudomonas balearica</i>	94.5	G ⁻

表 1 不同样品参数

Table 1 Different sample parameters

参数 Parameters	表层 Surface layer	中层 Middle layer	下层 Lower layer
含水率 Moisture content (%)	3.99	24.35	8.55
油重 Crude oil weight (g)	0.179 1	0.378 0	0.841 0
鲜土重 Fresh soil weight (g)	3.915 3	3.040 1	3.663 6
含油率 Crude oil content (%)	4.57	12.43	22.96

如表 2 所示, 这 30 株菌的 16S rRNA 基因鉴定序列相似性都在 90%以上。菌株 A1 为短小芽孢杆菌属(*Lysinibacillus*); 菌株 A3、A15 为无色杆菌属(*Achromobacter*); 菌株 A4 为 *Pannonibacter*; 菌株 A6、A8 和 A13 为苍白杆菌属(*Ochrobactrum*); 菌株 A7、A11、A12、A46、A50、A52 和 A68 为假单胞菌属(*Pseudomonas*); 菌株 A9 为迪茨氏菌属(*Dietzia*); 菌株 A18 为戴尔福特菌属(*Delftia*); 菌株 A22、A44 为微杆菌属(*Microbacterium*); 菌株 A23 和 A32 为红球菌属(*Rhodococcus*); 菌株 A24 为不动杆菌属(*Acinetobacter*); 菌株 A25、A56 为芽孢杆菌属(*Bacillus*); 菌株 A28 为考克氏菌属(*Kocuria*); 菌株 A30 为盐单胞菌属(*Halomonas*); 菌株 A31 为枝动菌属(*Mycoplana*); 菌株 A34 为葡萄球菌属(*Staphylococcus*); 菌株 A58 为泛菌属(*Pantoea*); 菌株 A62 为微小杆菌属(*Exiguobacterium*)。

假单胞菌属(*Pseudomonas*)的菌株数量最多, 占所筛选出的原油降解菌总数的 23.33%, 和油藏中的核心微生物的属种一样, 可能有着重要的功能和生态意义。对这 30 株菌构建系统发育树, 以进一步确定筛选菌株之间的亲缘关系。通过图 2 的系统发育树可以发现分离的菌株都能与标准菌株很好地聚类, 分离的菌株在门水平上主要聚类在厚壁菌门(*Firmicutes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*); 在纲水平的主要聚类在芽孢杆菌纲(*Bacilli*)、 γ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)、 α -变形菌纲(*Alphaproteobacteria*)、 β -变形菌纲(*Betaproteobacteria*)、放线菌亚纲(*Actinobacteridae*)。

2.4 原油降解菌的筛选和降解结果

2.4.1 原油降解菌的筛选

以原油为唯一碳源筛选, 将 30 株菌处理后分别接种于原油培养基中培养, 与未接菌的空白对照组进行对比, 观察培养液的颜色、混浊程度及分层现象等变化。由图 3 可见: 培养前, 培养液上下层呈黑褐色和透明色; 培养 14 d 后, 石油部分或全部乳化分散到水中, 培养液部分上层有油膜或褐色

絮状物, 下层呈现红褐色或黑褐色。

2.4.2 原油降解菌的降解率

利用正己烷萃取培养液, 采用 GC-MS 分析测定原油的降解率。降解实验结果表明, 这 30 个单菌株降解石油的能力有很大差异。经 14 d 降解后, 不同菌对原油的降解率明显不同, 其中降解率最高可达 90.2%, 最低只有 7.1%, 降解率在 50%以上的菌株有 12 株, 降解率如表 3 所示, 形态特征如表 4 所示。同等条件下培养 14 d, 菌株 *M. esteraromaticum* 降解率最高; 80%以上的菌株有 9 株: *A. denitrificans*、*R. ruber*、*A. lwoffii*、*B. cereus*、*M. esteraromaticum*、*P. nitritireducens*、*P. guguanensis*、*P. guguanensis*、*B. proteolyticus*, 占所选菌株的 30%; 降解效果优异的菌株中, *Pseudomonas* 的菌株数量最多, 占假单胞菌属总数的 57%。

2.4.3 原油全烃色谱图

原油降解效果可用原油全烃色谱图直观观察(图 4), 降解前原油各组分丰度较高, 各组分含量不一, 峰高不同; 降解后, 不同菌株呈现不同程度、不同组分的减少。选取 4 株降解能力不同、亲缘关系不近的菌株, 分别是: 菌株 *P. stutzeri* sp. A11, 降解率 28.9%; 菌株 *L. fusiformis* sp. A1, 降解率 7.1%; 菌株 *M. esteraromaticum* sp. A44, 降解率 90.2%; 菌株 *P. dispersa* sp. A58, 降解率 62.5%。结果表明不同菌株代谢不同, 因此在同一条件下降解效果不同。

2.5 萘、水杨酸、邻苯二酚降解菌株的筛选

分别以 0.2%的萘、水杨酸、邻苯二酚为唯一碳源, 将 30 株菌处理后分别接种并培养 7 d, 未接菌作为空白对照组, 测定其降解率, 挑选具有降解作用的菌株。筛选到具有萘降解能力的菌株: *P. nitritireducens* sp. A46, 降解率 60.74%; 水杨酸降解菌株 *R. pyridinivorans* sp. A32, 降解率 58.15%; 邻苯二酚降解菌株 *P. stutzeri* sp. A11, 降解率 72.22%。

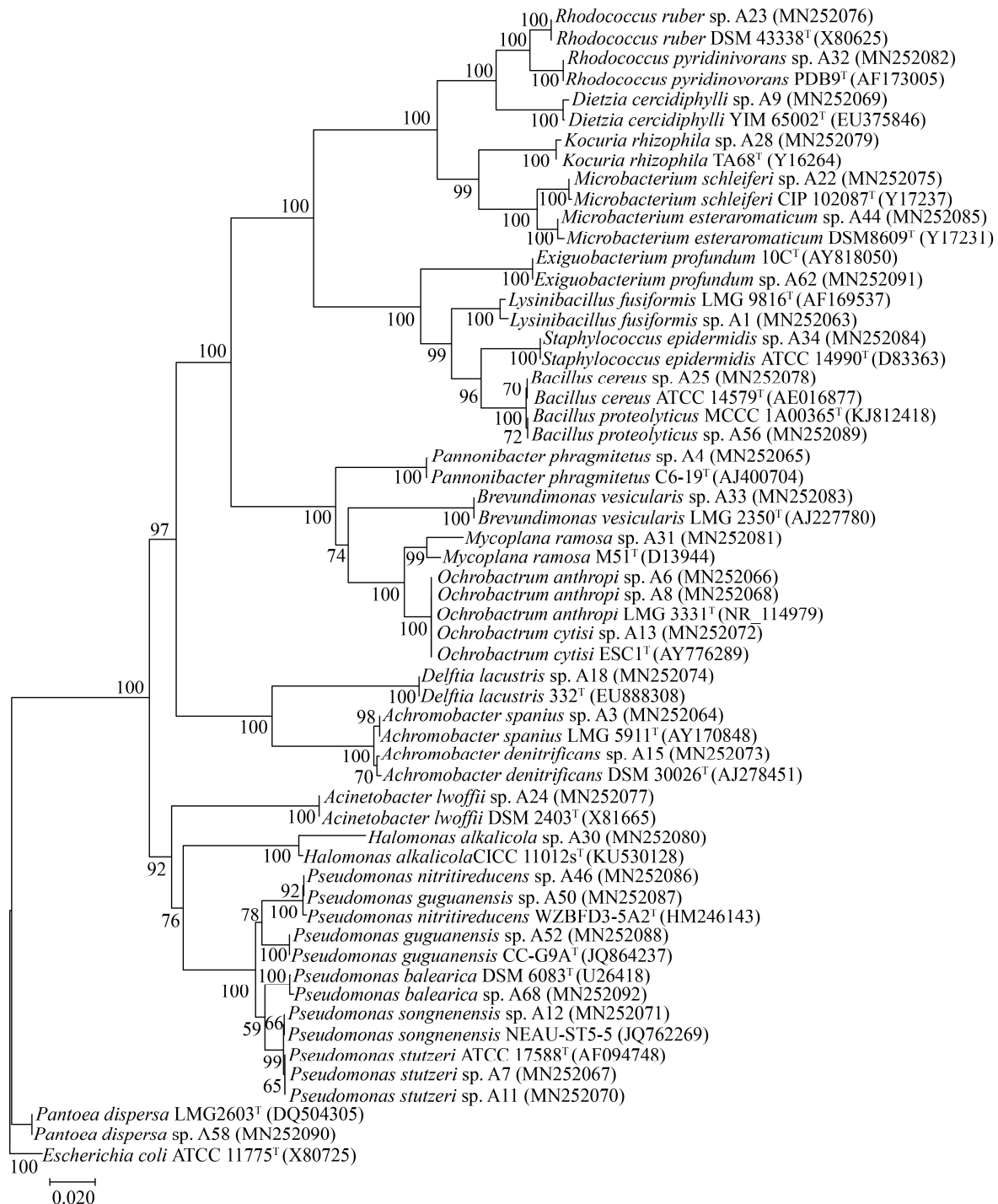


图 2 30 株菌基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

Figure 2 Neighbour-Joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequencing for thirty strains

注：分支点上的数字代表可信度，数值越接近 100，可信度越高；标尺代表遗传距离，标尺越短代表亲缘关系越近；括号中的序号为 GenBank 序列号。

Note: The number at each branch point represents the credibility, the closer the number is to 100, the higher the credibility; Ruler represents genetic distance, shorter ruler indicates closer genetic relationship; Numbers in parentheses represent the accession number of the sequence in GenBank.

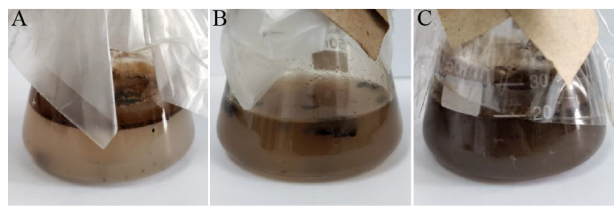


图 3 培养 14 d 后的不同降解效果菌株
Figure 3 Degradation effect of different strains after 14 d of culture

2.6 微生物“分工协作”对萘的降解

将菌株 A46、A32 和 A11 按照 OD_{600} 值为 1:1:1 的比例接种到含有 0.2% 萘为唯一碳源的无机盐培养基中, 30 °C、150 r/min 条件下培养 7 d, 未接菌作为空白对照组, 7 d 后测定降解率。绘制菌株 A46 的细胞生物量曲线图, 如图 5 所示: A46 单一降解萘组, 由于产生有毒代谢产物, 细胞生物量随时间逐渐下降; 3 株菌混合降解萘组, 菌株 A32、A11 降低了有毒的代谢产物量, 相对提高了 A46 的生物量, 进而促进了对萘的降解。萘

的 GC-MS 峰图如图 6 所示, A46 单一降解萘的降解率为 60.74%, 3 株菌“分工协作”降解萘的降解率为 89.40%, 同样验证了“分工协作”降解比单一降解更具有优势。

表 3 原油降解率超过 50% 的菌株
Table 3 Statistical table of strains with crude oil degradation rates greater than 50%

样品编号	菌株编号	相似菌属	降解率
Sample No.	Strain No.	Similar genus	Degradation rate (%)
1	A15	<i>Achromobacter denitrificans</i>	89.2
6	A23	<i>Rhodococcus ruber</i>	87.5
7	A24	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	89.6
8	A25	<i>Bacillus cereus</i>	88.3
27	A44	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	90.2
37	A46	<i>Pseudomonas nitritireducens</i>	83.4
38	A50	<i>Pseudomonas guguanensis</i>	82.5
39	A52	<i>Pseudomonas guguanensis</i>	80.4
40	A56	<i>Bacillus proteolyticus</i>	81.4
59	A58	<i>Pantoea dispersa</i>	62.5
60	A62	<i>Exiguobacterium profundum</i>	68.7
72	A68	<i>Pseudomonas balearica</i>	52.7

表 4 高效降解石油菌株的形态特征
Table 4 Morphological characteristics of highly effective crude oil degrading strains

菌株编号	颜色	隆起度	透明度	菌边缘	形状
Strain No.	Colour	Eminence	Transparency	Strain margin	Shape
A15	乳黄色	隆	不透明	整齐	圆形
	Milky yellow	Uplift	Opaque	Regular	Round
A23	橘红色	隆	不透明	不整齐	不规则圆形
	Orange red	Uplift	Opaque	Irregular	Irregular round
A24	白色	隆	不透明	不整齐	不规则圆形
	White	Uplift	Opaque	Irregular	Irregular round
A25	黄色	隆	不透明	整齐	圆形
	Yellow	Uplift	Opaque	Regular	Round
A44	浅黄色	隆	不透明	整齐	圆形
	Light yellow	Uplift	Opaque	Regular	Round
A46	白色	平	不透明	整齐	圆形
	White	Smooth	Opaque	Regular	Round
A50	乳白色	平	不透明	不整齐	圆形
	Milky white	Smooth	Opaque	Irregular	Round
A52	黄色	隆	不透明	不整齐	圆形
	Yellow	Uplift	Opaque	Irregular	Round
A56	浅黄色	平	不透明	整齐	圆形
	Light yellow	Smooth	Opaque	Regular	Round
A58	橙黄色	隆	半透明	整齐	圆形
	Orange yellow	Uplift	Opaque	Regular	Round
A62	浅黄色	隆	不透明	整齐	圆形
	Light yellow	Uplift	Opaque	Regular	Round
A68	乳白色	平	不透明	不整齐	圆形
	Milky white	Smooth	Opaque	Irregular	Round

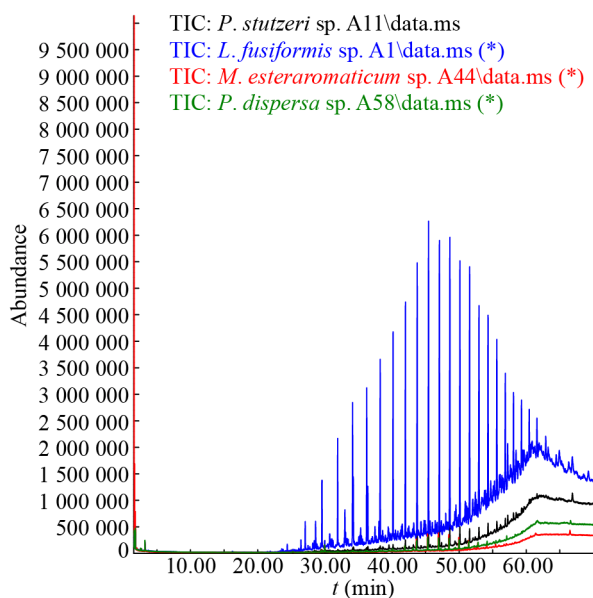


图4 四种不同菌株降解原油气相色谱图

Figure 4 Gas chromatograms of crude oil degraded by four different bacterial strains

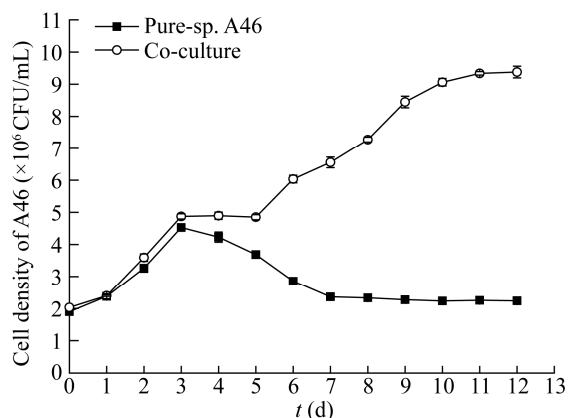


图5 菌株 A46 降解萘细胞密度

Figure 5 Cell density of naphthalene degraded by strain A46

3 讨论与结论

本实验从新疆油田采集到的石油污染土壤中分离出 123 个微生物菌株,根据菌落形态学观察挑选出 30 个菌落形态不同的微生物菌株。

(1) 测定表、中、下层土壤含油率分别为 4.57%、12.43%、22.96%,土壤含油率逐层递增。原油组分为饱和烃 35.20%、芳香烃 44.64%、非烃

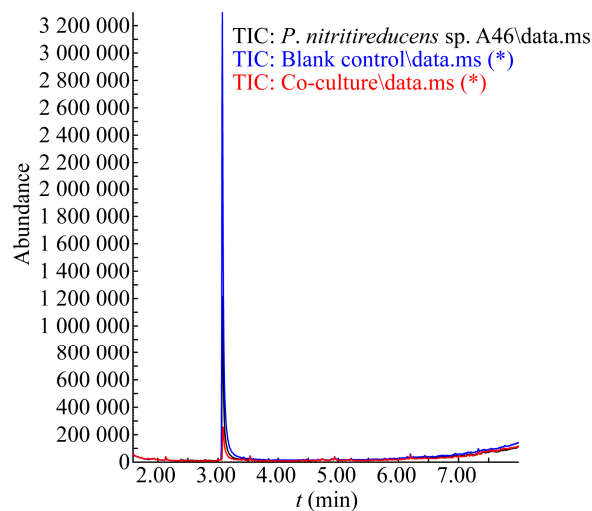


图6 菌株分工协作降解萘的色谱图

Figure 6 Chromatograms of naphthalene degradation by strains

4.63%及沥青质 15.54%,饱和烃含量较低,芳香烃含量较高,高浓度的芳香烃会对菌株产生毒性作用,从而降低菌株的降解能力。

(2) 通过形态特征观察、革兰氏染色、16S rRNA 基因序列分析鉴定这 30 株石油降解菌的菌属,相似性都在 90%以上。其中,假单胞菌属 (*Pseudomonas*)的菌株数量最多,占所筛选出的石油降解菌总数的 23.33%,和油藏中的核心微生物属种一样,可能有着重要的功能和生态意义。

(3) 以原油为唯一碳源进行筛选,观察培养液的颜色、混浊程度及分层现象等前后变化。由于不同菌种的代谢差异,在生物降解过程中所起的作用不同,从而导致不同菌种的降解效果差异明显。其中降解率高于 85%的石油降解菌有 5 株: A15、A23、A24、A25 和 A44,经过 16S rRNA 基因序列鉴定,其分别属于无色杆菌属(*Achromobacter*)、红球菌属 (*Rhodococcus*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和微杆菌属 (*Microbacterium*)。

(4) 微生物的降解过程中会产生一些有毒的、抑制降解菌株细胞生长的代谢产物,从而进一步影响其降解效果。通过对筛选出的降解萘、

水杨酸、邻苯二酚的菌株进行组合, 菌体“分工协作”增加了萘降解菌的生长量, 提高了对芳香烃化合物萘的降解效率。

(5) 传统微生物修复方法的处理周期较长, 存在优势菌浓度较低且容易流失、外接菌株适应能力不一、竞争力相对于土著微生物较弱等问题^[23-24], 因此, 研究如何优化生物强化修复体系, 使微生物更容易适应不同的自然环境至关重要^[25]。例如微生物固定化技术可解决部分缺陷和不足。

基于目前的研究结果, 今后将对 3 个“分工协作”的菌株做进一步的研究, 以期提高微生物对石油烃类的降解效率; 研究培养温度、pH、盐度、时间等对菌株降解能力的影响; 研究微生物固定化技术等其他微生物强化修复体系。从而为当地石油污染土壤的微生物修复提供优良的菌种资源, 为微生物降解石油等技术和应用提供理论依据^[26]。

REFERENCES

- [1] Du JL. Oil: a modern history[J]. Corporate Observer, 2017(10): 110-111 (in Chinese)
杜君立. 石油: 一部现代史[J]. 企业观察家, 2017(10): 110-111
- [2] Gu H, Lu Y, Shang XZ, et al. Recent advances on researches of methods for componental analysis of crude oil[J]. Physical Testing and Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis, 2011, 47(4): 150-154 (in Chinese)
顾欢, 路遥, 尚绪柱, 等. 原油成分分析方法的研究进展[J]. 理化检验(化学分册), 2011, 47(4): 150-154
- [3] Zhou F. Problems and countermeasures in oil production safety production management[J]. Petrochemical Industry Technology, 2019, 26(5): 303-304 (in Chinese)
周峰. 石油开采安全生产管理中存在的问题及对策[J]. 石化技术, 2019, 26(5): 303-304
- [4] Xu BL, Zhang WQ. Research and development of microbial remediation technology for crude oil contaminated soil[J]. Jiangxi Chem Ind, 2016(6): 8-10 (in Chinese)
许邦露, 张维清. 石油污染土壤微生物修复技术的研究发展[J]. 江西化工, 2016(6): 8-10
- [5] Alrumman SA, Hesham AL, Alamri SA. Isolation, fingerprinting and genetic identification of indigenous pahs degrading bacteria from oil-polluted soils[J]. Journal of Environmental Biology, 2016, 37(1): 75-81
- [6] 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
- [7] Zhan YB, Zhang Q, Chen KL, et al. Isolation and construction of petroleum-degrading flora and their degrading characteristics[J]. Environmental Pollution & Control, 2017, 39(8): 860-864,868 (in Chinese)
詹亚斌, 张桥, 陈凯伦, 等. 石油降解菌群的筛选、构建及其降解特性研究[J]. 环境污染与防治, 2017, 39(8): 860-864,868
- [8] Gao YC, Chi JG, Qiu WZ, et al. Application of molecular biology technology in rehabilitation of contaminated soil[A]//Proceedings of the 2011 Annual Conference of the Chinese Society of Environmental Sciences. Urumqi: Chinese society of Environmental Sciences, 2011: 1664-1671 (in Chinese)
高永超, 迟建国, 邱维忠, 等. 分子生物学技术在污染土壤修复中的应用[A]//中国环境科学学会 2011 年学术年论文集. 乌鲁木齐: 中国环境科学学会, 2011: 1664-1671
- [9] Al-Hawash AB, Dragh MAK, Li SE, et al. Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment[J]. The Egyptian Journal of Aquatic Research, 2018, 44(2): 71-76
- [10] Huang MM, Deng BW, Wu XX, et al. Research progress on microbial remediation of petroleum contaminated soil[J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2017(4): 149-153 (in Chinese)
黄曼曼, 邓百万, 武晓雨, 等. 石油污染土壤的微生物修复技术研究进展[J]. 黑龙江农业科学, 2017(4): 149-153
- [11] Xu LP. Research progress on microbial remediation of crude oil contaminated soil[J]. Biology Teaching, 2016, 41(6): 6-9 (in Chinese)
徐丽萍. 石油污染土壤的微生物修复技术研究进展[J]. 生物学教学, 2016, 41(6): 6-9
- [12] Zhang Y, Li BZ, Yang JS, et al. Diversity of culturable butane-oxidizing bacteria in oil and gas field soil[J]. Environmental Science, 2012, 33(1): 299-304 (in Chinese)
张莹, 李宝珍, 杨金水, 等. 油气田土壤样品中可培养丁烷氧化菌多样性研究[J]. 环境科学, 2012, 33(1): 299-304
- [13] Xu ZX, Zhang Y, Jin XM, et al. Efficient oil degrading bacteria screening and degradation systems construction[J]. Journal of Hainan Normal University (Natural Science), 2015, 28(4): 421-424 (in Chinese)
徐志霞, 张颖, 金显敏, 等. 高效石油降解菌株的筛选及菌群的构建[J]. 海南师范大学学报: 自然科学版, 2015, 28(4): 421-424
- [14] Zhu J, Ruan ZY, Dong WW, et al. Isolation, identification and degradation characterization of an alkane-degrading *Acinetobacter* sp. LAM1007[J]. Microbiology China, 2017, 44(7): 1535-1546 (in Chinese)
朱杰, 阮志勇, 董卫卫, 等. 一株高效烷烃降解菌

- Acinetobacter* sp. LAM1007 的分离鉴定及降解特性[J]. 微生物学通报, 2017, 44(7): 1535-1546
- [15] Zhou CY. Construction of oil degradation bacterial consortium from coastal waters and its technique of immobilization[D]. Guangzhou: Master's Thesis of Guangdong University of Technology, 2015 (in Chinese)
周楚莹. 石油降解菌群的构建及其固定化技术研究[D]. 广州: 广东工业大学硕士学位论文, 2015
- [16] Fan RJ, Guo SH, Li FM. Construction of petroleum degrading bacteria consortium and its degradation properties of mixed hydrocarbons[J]. Journal of Agro-environment Science, 2017, 36(3): 522-530 (in Chinese)
范瑞娟, 郭书海, 李凤梅. 石油降解菌群的构建及其对混合烃的降解特性[J]. 农业环境科学学报, 2017, 36(3): 522-530
- [17] Ren SZ, Guo J, Deng SE, et al. Isolation and identification of petroleum degrading strains and the diversity of microbes in petroleum-contaminated soils[J]. Acta Ecologica Sinica, 2005, 25(12): 3314-3322 (in Chinese)
任随周, 郭俊, 邓穗儿, 等. 石油降解菌的分离鉴定及石油污染土壤的细菌多样性[J]. 生态学报, 2005, 25(12): 3314-3322
- [18] Guo N, Li ZM, Ye Q. Screen and identification of alkane degrading bacteria and characteristics of a predominant strain[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2011, 17(4): 572-576 (in Chinese)
郭娜, 李志敏, 叶勤. 烷烃降解菌的筛选、鉴定及优势菌株的降解特性[J]. 应用与环境生物学报, 2011, 17(4): 572-576
- [19] Yang Z, Chen JX, Qin B, et al. Characterization and catabolic genes detection of three oil-degrading *Rhodococcus* spp.[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2015, 21(5): 805-812 (in Chinese)
杨智, 陈吉祥, 秦波, 等. 3 株石油降解红球菌 (*Rhodococcus* spp.) 特性及相关基因分析[J]. 应用与环境生物学报, 2015, 21(5): 805-812
- [20] Hu CH, Yu H, Zhao YG, et al. Isolation and identification of a high-efficient diesel degrading bacterial strain *Acinetobacter* sp. L7[J]. China Environmental Science, 2017, 37(11): 4251-4258 (in Chinese)
胡春辉, 于浩, 赵阳国, 等. 高效耐盐柴油降解菌的筛选、鉴定及降解基因[J]. 中国环境科学, 2017, 37(11): 4251-4258
- [21] HJ 783-2016 Soil and sediment—Extraction of organic compounds—Pressurized fluid extraction (PFE)[S]. Beijing: Ministry of environmental protection of the People's Republic of China, 2016 (in Chinese)
HJ 783-2016 土壤和沉积物有机物的提取 加压流体萃取法[S]. 北京: 中华人民共和国环境保护部, 2016
- [22] SY/T 5119-2016 Analytical method of soluble organic matters in rocks and crude oil group composition column chromatography[S]. Beijing: National Energy Administration of the People's Republic of China, 2017 (in Chinese)
SY/T 5119-2016 岩石中可溶有机物及原油族组分分析[S]. 北京: 中华人民共和国国家能源局, 2017
- [23] Westmeier F, Rehm HJ. Degradation of 4-chlorophenol in municipal wastewater by adsorptiv immobilized *Alcaligenes* sp. A 7-2[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1987, 26(1): 78-83
- [24] Yu W. Isolation of petroleum-degrading strains and study of their degrading characteristics[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2013 (in Chinese)
余薇. 石油降解微生物的筛选及其降解特性的研究[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2013
- [25] Wang YM, Wang JF, Li X, et al. Research progress on microbial remediation of petroleum contaminated soil[J]. Environmental Engineering, 2014, 32(8): 157-161, 130 (in Chinese)
王悦明, 王继富, 李鑫, 等. 石油污染土壤微生物修复技术研究进展[J]. 环境工程, 2014, 32(8): 157-161, 130
- [26] Wu ML, Li W, Dick WA, et al. Bioremediation of hydrocarbon degradation in a petroleum-contaminated soil and microbial population and activity determination[J]. Chemosphere, 2017, 169: 124-130