

研究报告

一株耐碱高效长链烷烃降解菌 C24MT1 的筛选及其降解特性

侯丽君, 赵雷真, 庄严, 贾舒宇, 陈立伟, 蔡天明*

南京农业大学资源与环境科学学院, 江苏 南京 210018

侯丽君, 赵雷真, 庄严, 贾舒宇, 陈立伟, 蔡天明. 一株耐碱高效长链烷烃降解菌 C24MT1 的筛选及其降解特性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(6): 2320-2334.

HOU Lijun, ZHAO Leizhen, ZHUANG Yan, JIA Shuyu, CHEN Liwei, CAI Tianming. Isolation and degradation characterization of C24MT1, a highly effective long-chain alkane-degrading bacterium[J]. Microbiology China, 2023, 50(6): 2320-2334.

摘要:【背景】石油被称为“液体黄金”, 人类的工业生产活动在利用其创造巨大社会价值的同时, 也对自然环境造成了严重的污染。微生物修复技术是现阶段治理石油类污染有效的手段之一, 具有经济、高效、无二次污染等优点。【目的】从受石油污染的土壤中分离高效降解长链烷烃正二十四烷的菌株, 探究其降解特性及在微生物修复中的应用前景。【方法】通过形态学及 16S rRNA 基因测序进行菌株鉴定, 采用气相色谱法检测菌株对正二十四烷的降解效果, 并结合气相色谱-质谱 (gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS) 分析降解中间产物以推测其潜在代谢途径。【结果】筛选到一株可高效降解正二十四烷的菌株 C24MT1, 经鉴定为不动杆菌属 (*Acinetobacter*)。该菌株最适降解条件为 30 °C、pH 9.0、盐度 2 g/L, 该条件下生长 7 d 对 9 g/L 正二十四烷的降解率高达 86.63%; 与此同时, 菌株在强碱性环境 (pH 11.0) 中生长良好 (OD_{600} 为 0.39) 并保持较高烷烃降解率 (75.38%), 对极端环境具备较强的耐受能力; 对降解中间产物进行分析, 推断菌株代谢长链烷烃正二十四烷的途径可能包括末端氧化及次末端氧化。【结论】不动杆菌 C24MT1 具有良好的环境适应能力及烷烃降解能力, 在后续微生物菌剂开发和石油类污染土壤的环境修复领域具有巨大的应用前景。本研究可为盐碱地区高浓度石油类污染土壤的修复提供优良菌种, 并进一步丰富石油烃类生物降解的菌种资源库。

关键词: 石油烃; 生物降解; 不动杆菌属; 降解特性; 代谢途径

资助项目: 国家重点研发计划(2019YFC1804002); 南京农业大学高层次人才引进启动基金

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFC1804002) and the Nanjing Agricultural University High-level Talent Introduction Start-up Fund.

*Corresponding author. E-mail: ctm@njau.edu.cn

Received: 2022-09-20; Accepted: 2022-11-05; Published online: 2023-01-03

Isolation and degradation characterization of C24MT1, a highly effective long-chain alkane-degrading bacterium

HOU Lijun, ZHAO Leizhen, ZHUANG Yan, JIA Shuyu, CHEN Liwei, CAI Tianming*

College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210018, Jiangsu, China

Abstract: [Background] Petroleum is known as liquid gold. While creating a great social value, the utilization of petroleum for industrial production causes serious pollution to the environment. Microbial remediation is one of the effective approaches to control oil pollution, which has the advantages of low cost, high efficiency, and no secondary pollution. [Objective] To isolate and study the degradation characteristics and microbial remediation potential of highly efficient *n*-tetracosane-degrading strain from the oil-contaminated soil. [Methods] The strain was identified by morphological observation and 16S rRNA gene sequencing. Gas chromatography was employed to examine the *n*-tetracosane degradation effect of the strain. Further, we employed gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) to identify the degradation intermediates for predicting the potential metabolic pathway. [Results] Strain C24MT1 was identified as *Acinetobacter* sp., which was highly capable of degrading *n*-tetracosane. The optimum degradation conditions of the strain were 30 °C, pH 9.0, and salinity of 2 g/L, under which the degradation rate of 9 g/L *n*-tetracosane was 86.63%. The strain grew well ($OD_{600}=0.39$) in strong alkaline environment (pH 11) and maintained high alkane degradation rate (75.38%), demonstrating strong tolerance to extreme environment. According to the degradation intermediates, we predicted that the metabolic pathways of *n*-tetracosane in the strain might include terminal oxidation and subterminal oxidation. [Conclusion] *Acinetobacter* sp. C24MT1 had excellent environmental adaptability and alkane-degrading ability, demonstrating great application prospects in the development of microbial inoculants and the remediation of petroleum-contaminated soil. This study provides excellent bacterial resources for the remediation of soil contaminated by high-concentration petroleum in saline-alkali areas and enriches the bacterial resource for the biodegradation of petroleum hydrocarbons.

Keywords: petroleum hydrocarbons; biodegradation; *Acinetobacter*; degradation characteristics; metabolic pathways

石油作为国民工业发展的命脉,其引发的环境问题不容小觑^[1],仅在生产、使用及储存过程中的意外泄露便会对周边环境造成不可逆转的负面影响^[2]。外泄的石油会减少环境中的微生物多样性,严重时甚至会使生态失衡^[3-4]。根据石油污染组分的结构及复杂程度,可将石

油污染分为烷烃、芳烃、树脂、沥青质和其他有机物类型的污染^[5],其中,前两者由于在环境中分布广泛且与人类健康密切相关,一直是研究的热点^[6-8],中长链烷烃($n-C_{16}$ - $n-C_{40}$)更是作为油污土壤的主要组分而存在^[9]。环境中的中长链烷烃通常较为稳定且具有较大脂溶性,

进入食物链后极易在生物体中蓄积,人类长期接触该类物质会导致肝受损与肾毒性^[10-11]。因此,中长链烷烃污染修复技术研究是目前石油污染场地修复领域的一大热点。

修复中长链烷烃污染的技术主要分为物理、化学及生物修复^[12-14],其中微生物修复技术备受关注^[15-16]。目前已分离到的可降解中长链烷烃微生物大多为细菌,如假单胞菌属(*Pseudomonas*)^[17]、不动杆菌属(*Acinetobacter*)^[18-19]、芽孢杆菌属(*Bacillus*)^[14,20]、诺卡氏菌属(*Nocardia*)^[21]及红球菌属(*Rhodococcus*)^[22]等。其中,不动杆菌属常作为主要降解菌参与环境中石油烃的降解^[18,23],相关的微生物组学分析同样表明,在受石油污染的土壤中不动杆菌属具有较高的丰度占比^[23-24]。值得关注的是,链长达到一定长度的烷烃(>n-C₁₈)会以固态的形式存在于环境中,相较液态短中链烷烃(<n-C₁₆)而言具有更强的疏水性和稳定性,被认为是一种常见的难去除持久性有机污染物^[25],因此在链式烷烃污染的修复过程中,长链烷烃(n-C₂₀-n-C₄₀)更难被微生物降解。Liu 等^[18]通过实验探究了不动杆菌 RAG-1 降解混合烷烃(n-C₁₂-n-C₂₉)的效率,发现其对中链烷烃(<n-C₁₆)组分的降解率高达 73.4%,但长链烷烃(>n-C₂₂)组分几乎不被降解;陈丽华等^[26]发现烷烃降解菌 D4 对较低碳链数(n-C₁₄-n-C₂₀)烷烃有着良好的降解效率(67.5%),但对长碳链数(n-C₂₁-n-C₃₀)烷烃组分几乎无降解作用;Kong 等^[27]筛选到的菌株虽然对长链烷烃(n-C₂₄)有着良好的降解效率(80.29%),但在强碱环境中(pH 10.0)菌株生长会受到明显抑制,以至其难以应用于类似条件下的实际修复。据报道,石油污染场地土壤大多偏碱性甚至呈强碱性(8.0<pH<11.0),且不乏高浓度污染(>3 g/kg)^[28-29],因此耐受该类极端环境的高效石油降解菌的筛选工作仍具有较大的

现实意义,是当前微生物修复石油烃类环境污染技术中的一个重要难题。

本文选用长链烷烃正二十四烷(C₂₄H₅₀)为唯一碳源,采用微生物学手段从受石油污染的土壤中筛选可耐受强碱环境的高效烷烃降解菌,通过形态学及分子生物学手段确定所得菌株的分类地位,并研究其对正二十四烷的降解特性及降解途径,以期为极端石油污染环境的修复提供更进一步的理论基础和技术支持。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 供试土样

使用无菌铲从南京某退役化工园区长期受石油污染的土壤(采样深度 10-20 cm,以总石油烃 n-C₁₀-n-C₄₀ 表征其受石油的污染程度,浓度范围为 263-2 240 mg/kg)中取 10 g 新鲜土壤置于灭菌袋中,低温运输至实验室后立即接种到 100 mL 灭菌生理盐水中,在摇床中以 30 °C、200 r/min 的条件充分振荡 12 h,制备成微生物初始储备液,密封储存于 4 °C 冰箱待用。

1.1.2 培养基

无机盐液体培养基(g/L): NaCl 1.0, (NH₄)₂SO₄ 1.0, KH₂PO₄ 0.5, K₂HPO₄ 1.5, MgSO₄·7H₂O 0.2,超纯水定容至 1 L,调 pH 值为 7.0 左右,121 °C 蒸汽灭菌 20 min。

LB 液体培养基(g/L): NaCl 5.0, 蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, 超纯水定容至 1 L,调 pH 值为 7.0 左右,121 °C 蒸汽灭菌 20 min。

LB 固体培养基:每 100 mL LB 液体培养基加入 1.5 g 琼脂粉,121 °C 蒸汽灭菌 20 min。

烷烃选择培养基:无机盐液体培养基中加入正二十四烷,使正二十四烷浓度为 100 mg/L。

灭菌生理盐水:9.0 g NaCl 溶于 1 L 超纯水

中, 121 °C 蒸汽灭菌 20 min。

1.1.3 主要试剂和仪器

二十四烷($\geq 99\%$, AR)、正己烷($\geq 99\%$, GC), Aladdin 公司; 正己烷中 31 种正构烷烃类混标(C₁₀-C₄₀, 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 北京百灵威科技有限公司; FastDNA Spin Kit for Soil, MP 生物医疗公司; 2×*Taq* Plus Master Mix II 反应液, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

气相色谱仪, 福立公司; 三重四极杆气相串联质谱仪, Bruker 公司; 紫外分光光度计, 上海光谱仪器有限公司; 精密 pH 计, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; 生化培养箱, Yamato 公司; 超声波清洗机, 江苏齐宣实验设备有限公司; 多管旋涡混合器, 上海力辰邦西仪器科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离和纯化

取 10 mL 微生物初始储备液, 接种于 100 mL 烷烃选择培养基中, 于 30 °C、200 r/min 振荡培养 7 d 进行菌种富集, 7 d 后以 10% 接种量转接到新的培养基中, 连续传代 3 次, 培养条件不变。对最后一次培养所得的发酵液进行稀释并在 LB 固体平板上涂布、划线。挑取长势良好的单个菌落, 加入烷烃选择培养基中于 30 °C、200 r/min 培养一段时间后, 出现浑浊即表明菌种可在以正二十四烷为唯一碳源的环境下生长。通过测定烷烃残留量筛选出降解效率最高的菌株, 即为正二十四烷高效降解菌, 所得菌株保存于 -80 °C 冰箱。

1.2.2 菌株的鉴定

1) 生理生化鉴定

对菌种进行形态学观察, 并借助光学显微镜进行镜检。革兰氏染色、芽孢染色、甲基红实验、吡啶实验、接触酶等生理生化实验主要参照《常见细菌系统鉴定手册》^[30]进行分析。

2) 扫描电镜观察

将菌株培养至对数生长期(24–48 h), 吸取培养物, 室温 10 000 r/min 离心 5 min 后弃 LB 液体培养基, 收集菌体沉淀于 1.5 mL 离心管管底(黄豆大小), 用灭菌生理盐水清洗 2 次, 弃去上清液, 沿管壁缓慢加入 4 °C 预冷的电镜固定液, 立即送检。

3) 分子鉴定

利用裂解法提取菌株基因组 DNA。选用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGG CTCAG-3')与 1492R (5'-TACGACTTAACCCC AATCGC-3')对菌株 C24MT1 的 16S rRNA 基因进行扩增。PCR 反应体系(30 μL): DNA 模板(DNA 浓度约为 100 ng/ μL) 1 μL , 上、下游引物(1×10^{-7} mol/L)各 0.6 μL , 2×*Taq* Plus Master Mix II 反应液 15 μL , ddH₂O 12.8 μL 。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 90 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。将 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。将获得的菌株序列输入 EzBioCloud 数据库中进行 BLAST 比对, 利用 MEGA 7 软件对相似性前 10 的菌株序列进行多重序列比对及分析, 并利用邻近法(neighbor-joining method)构建系统发育树。

1.2.3 生长曲线的测定

无菌条件下, 将一接种环的菌种储备液接种入以正二十四烷(200 mg/L)为唯一碳源的无机盐液体培养基中, 37 °C、200 r/min 摇床培养 84 h, 每隔 12 h 取培养菌液并使用紫外分光光度计测定其 OD_{600} , 并测定对应的正二十四烷浓度以绘制底物降解曲线, 实验组设置 3 个平行。

1.2.4 烷烃组分的萃取及分析方法

将摇瓶中待分析的 10 mL 发酵液转入棕色玻璃瓶中, 加入 5 mL 色谱纯正己烷清洗摇瓶, 清洗液并入棕色玻璃瓶, 先使用旋涡混合器

2 000 r/min 涡旋 10 min, 再超声(温度 30 °C, 超声频率 40 kHz)萃取 30 min, 最后在 3 000 r/min 条件下离心 5 min 使有机相与水相分层, 吸取上层有机相并使用 0.22 μm 滤膜过滤, 随后进行气相色谱分析。

气相色谱条件参照 Liu 等^[18]的研究方法, 具体设置如下: RB-5 石英毛细管色谱柱(30 m \times 0.32 mm \times 0.25 μm , 5%苯基, 95%甲基聚硅氧烷), FID 检测器, 载气为高纯氮气, 控制流速为 30 mL/min, 氢气流速为 30 mL/min, 空气流速为 300 mL/min, 前进样口、检测器温度均为 300 °C, 进样体积 1.0 μL ; 柱箱升温程序如下: 在 120 °C 下保持 1 min, 以 15 °C/min 增加到 290 °C, 保持 1 min。

质谱条件参照前人的方法^[31-32]并稍作改进, 具体设置如下: 离子源和四极杆的温度分别为 230 °C 和 150 °C; 柱炉 150 °C 保持 2 min, 然后以 5 °C/min 的速度升高到 200 °C, 再以 10 °C/min 的速度升高到 290 °C, 保持 20 min; 电离模式为 EI+, 溶剂延迟 6 min, 70 eV, 全扫描方式, 扫描范围 20–500 amu。

1.2.5 菌株降解性能研究

以正二十四烷为唯一碳源, 以 5%接菌量^[33]、200 r/min 转速^[18]、200 mg/L 的正二十四烷浓度为固定条件, 考察在不同温度(20、25、30、35 和 40 °C)、不同 pH(3.0、5.0、7.0、9.0 和 11.0) 及不同外加盐度(0、2、5、10 和 50 g/L)对菌株 C24MT1 的烷烃降解效率的影响, 每组设置 3 个平行; 考察菌株 C24MT1 对不同初始浓度正二十四烷(50、100、200、500 和 1 000 mg/L) 的耐受性及降解效果, 每组设置 3 个平行。测定不同实验组中菌株的生长量(OD_{600})以评估明该实验组条件下菌株的实际生长状况。

1.2.6 烷烃的降解动力学及降解机理研究

在正二十四烷最佳降解条件下进行实验,

每隔 12 h 整瓶提取摇瓶中残余的烷烃组分进行气相色谱分析, 并测定对应时刻的 OD_{600} , 以绘制菌株降解动力学曲线; 取降解前后的提取样品进行 GC-MS 分析, 以确定正二十四烷降解产生的中间产物。每个取样点设置 3 个平行。

1.3 数据处理方法

实验数据使用 Microsoft Excel 2019 软件进行处理分析, SPSS 23.0 软件进行统计学分析并进行最小显著差异(least-significant difference, LSD)法检验。

2 结果与讨论

2.1 菌株 C24MT1 的分离与鉴定

经过 3 次分离纯化, 从受石油污染的土壤中筛选得一株高效稳定的正二十四烷降解菌株, 命名为 C24MT1, 其在 LB 平板于 30 °C 培养 24 h 后的菌落形态如图 1A 所示, 淡黄色, 圆形, 菌落边缘整齐, 表面湿润且光滑, 中间隆起, 菌体不透明; 菌株 C24MT1 的电子显微镜扫描结果见图 1B, 菌体呈球杆状, 平均菌体直径约为 1.2–2.0 μm ; 部分生理生化实验结果见表 1。

对菌株 C24MT1 的 16S rRNA 基因序列进行分析, 其片段长度为 1 436 bp (GenBank 登录号为 ON459715), 在 EzBioCloud 数据库中进行同源性比对, 发现与该菌株相似性在 98%以上的均为不动杆菌属(*Acinetobacter*), 其中菌株与皮氏不动杆菌(*Acinetobacter pittii*)的相似性高达 99.30%, 基于 MEGA 7 软件邻近法所构建的系统发育树也可证明菌株与不动杆菌属间具有稳定的亲缘关系(图 2)。

2.2 菌株生长曲线

如图 3 所示, 菌株 C24MT1 在以正二十四烷为唯一碳源的无机盐培养基中生长良好, 且能较好地代谢正二十四烷: 24–48 h 属于菌株的对数生长期, 对应的烷烃降解速率也最

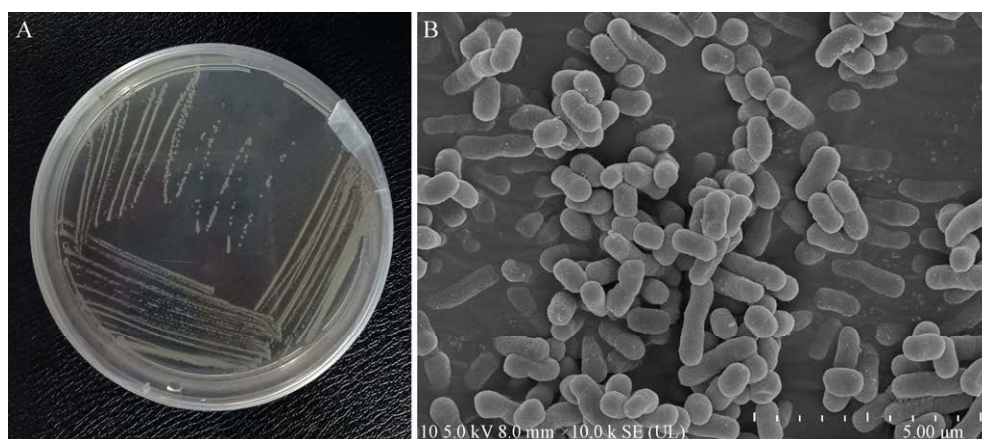


图 1 菌株 C24MT1 的形态 A: LB 平板上的菌落形态. B: 扫描电镜下的菌体形态

Figure 1 The morphology of strain C24MT1. A: Colony morphology on LB plate. B: Bacteria morphology under scanning electron microscope.

表 1 菌株 C24MT1 的部分生理生化特性

Table 1 Some physiological and biochemical characteristics of strain C24MT1

特性 Characteristics	结果 Results
革兰氏染色 Gram stain	-
芽孢染色 Spore stain	-
运动性 Motility	-
甲基红实验 Methyl red experiment	+
V-P 反应 Voges-Proskauer reaction	-
吲哚生成 Indole production	-
过氧化氢酶反应 Catalase reaction	+
氧化酶测试 Oxidase test	-
硝酸盐还原 Nitrate reduction	-

+: 阳性; -: 阴性

+: Positive; -: Negative.

快, 取该时间段内 OD_{600} 为 0.30 的菌液在 LB 固体培养基上稀释涂布, 得出对应菌落数为 $(85 \pm 7) \times 10^8$ CFU/mL; 60 h 时菌株 C24MT1 生长量达到最大并进入稳定期, 对应的 OD_{600} 为 0.50 [菌落数为 $(146 \pm 11) \times 10^8$ CFU/mL], 此时间段内对烷烃的降解效率也趋于平缓; 培养 72 h 后, OD_{600} 呈下降趋势, 表明菌株开始进入细胞衰亡期, 最终 84 h 内对 200 mg/L 正二十四烷的降解率为 92.51%。

2.3 菌株 C24MT1 对正二十四烷的降解特性

在接种量为 5%、摇床转速为 200 r/min 的条件下, 分别改变温度、pH、外加盐度及初始正二十四烷浓度进行菌株 C24MT1 的降解实验, 培养 72 h 后测定的烷烃降解率及菌体生长量如图 4 所示。由图 4 可知, 温度、pH、盐度和污染物初始浓度的变化会不同程度地影响微生物的生长, 进而影响微生物对石油烃的降解率^[34]。

菌株 C24MT1 在 20–40 °C 温度范围内均可正常成长, 对应的烷烃降解率保持在 45% 以上, 表明菌株对该温度范围适应良好。如图 4A 所示, 菌株在 30 °C 时对正二十四烷的降解率最高, 为 72.81%, 此时对应的菌体生长量也最大, OD_{600} 达 0.58; 在 40 °C 条件下, 菌株 C24MT1 仍保持良好的正二十四烷降解率(51%)。综上可知菌株 C24MT1 对正二十四烷的最适降解温度为 30 °C, 与报道过的原油降解菌 *Acinetobacter* sp. YQJ-1^[35]、烷烃降解菌 *Acinetobacter* sp. KJ-1^[36] 的最适温度范围(30–35 °C)一致。

外界环境的 pH 会改变细胞膜上的氧化还原电位, 从而影响微生物汲取外界营养物

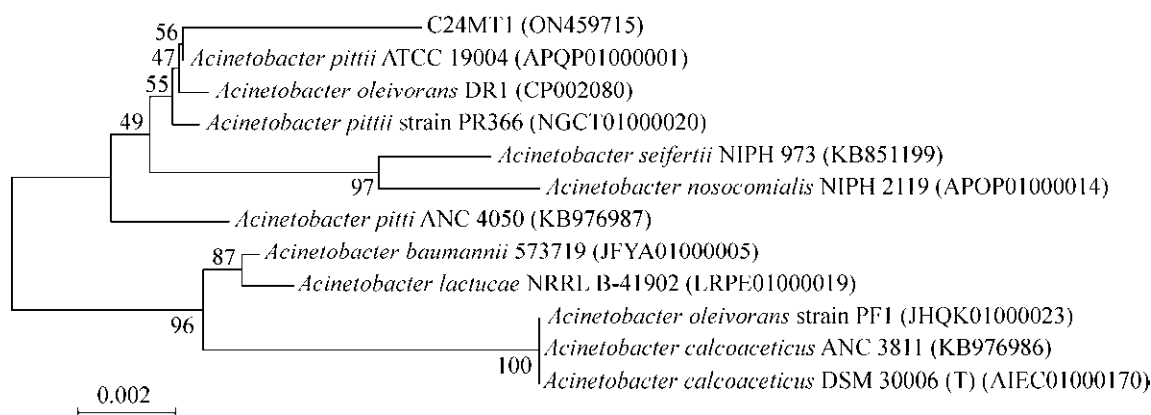


图2 菌株 C24MT1 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 分支点上的数字表示构建系统树时 1 000 次计算时形成该节点的百分比; 分支的长度代表进化距离, 系数为 0.002

Figure 2 Phylogenetic tree constructed from the 16S rRNA gene sequence of strain C24MT1. Numbers at the branch nodes are bootstrap values, expressed as percentages of 1 000 replicates; The length of branch represents the evolutionary distance and the coefficient is 0.002.

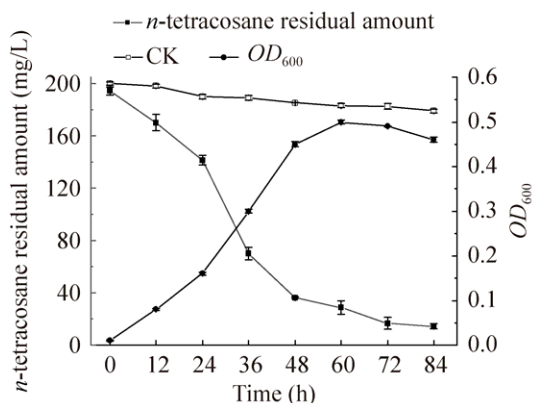


图3 菌株 C24MT1 的生长曲线及底物降解曲线
Figure 3 Growth curve and substrate degradation curve of strain C24MT1.

质的方式, 最终影响其对外界环境中污染物质的降解效率^[37]。由图 4B 可知, 不同初始 pH 对菌株 C24MT1 的烷烃降解率具有明显的影响: 酸性环境(pH≤5.0)下, 菌株降解正二十四烷的能力明显偏低, 对应降解率为 22.34% (OD_{600} 值 0.03)、32.17% (OD_{600} 为 0.03); 碱性条件下(pH 值>7.0)对正二十四烷的去除率均大于 70%, 且菌体数量也逐渐增长; 当 pH 9.0 时, 菌株对正二十四烷的降解效率最高, 达 94.17% (OD_{600}

为 0.34)。据文献报道, 现有的长链烷烃(>n-C₂₀)降解菌对 pH 的耐受范围较小, 一般而言为 7.0–8.0^[34], 虽然个别菌株具备高 pH 耐受性(达 10.0–11.0), 但此时其生长量及对应的长链烷烃降解效率均会大幅下降, 比如某些筛自高盐碱环境的菌株可耐受 pH 高达 11.0, 但此时菌体几乎停止生长($OD_{600} \approx 0$)^[38-39], 对长链烷烃的降解效率也大为下降(<50%)^[40]。本研究中菌株 C24MT1 可适应 pH 值高达 11.0 的强碱环境, 同时具备良好的正二十四烷降解效率(75.38%, 略高于 pH 7.0 时对应的 73.06%)。此外, 菌体数量(OD_{600})一直随碱度(7.0<pH<11.0)的增大而增加, 进一步表明菌株 C24MT1 对极端环境具备良好的适应能力。

外环境中的盐分对调节细胞渗透压的平衡有着极其重要的作用, 当培养液中外加盐的质量浓度上升时, 会使细胞内的水分流向细胞外, 严重时甚至会使细胞脱水死亡^[41]。由图 4C 可知在不同外加盐度(以 NaCl 计)时, 菌株 C24MT1 对正二十四烷的降解率具有较为明显的差异。在低盐度(2 g/L)时, 菌株表现出较高

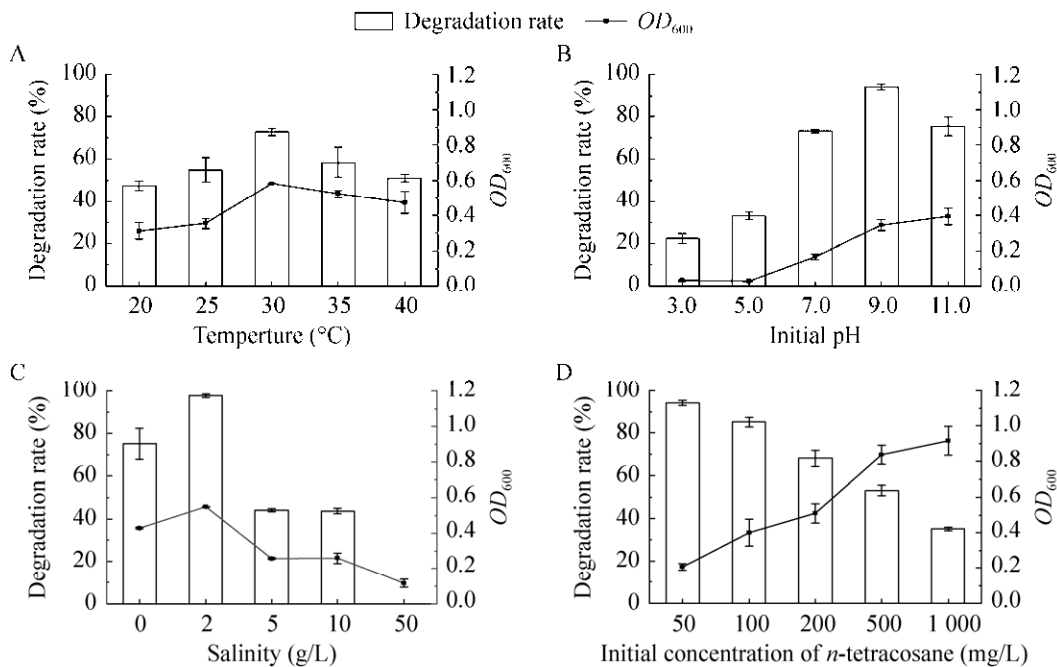


图 4 环境因子对菌株 C24MT1 降解正二十四烷的影响

Figure 4 Effects of environmental factors on degradation of *n*-tetracosane by strain C24MT1.

的烷烃降解率,降解率可达 97.78%,明显高于无外加盐度时的降解率(75.18%);在盐度较高(5 g/L)的环境条件下,菌株 C24MT1 的降解率会受到明显抑制,降至 44.07%;当盐度上升至 50 g/L 时,对应的烷烃降解率几乎为 0。另外,由 C24MT1 的菌体数量变化也可得出,菌株在外加盐度为 2 g/L 时生长量最佳, OD_{600} 达 0.55。以上均表明菌株为一株非嗜盐菌^[42],与张浩等^[43]对苯胺降解菌 Z1 的耐盐性研究结果一致。

在 72 h 内,正二十四烷降解率随初始浓度上升而下降。如图 4D 所示,正二十四烷初始浓度为 50 mg/L 时对应的菌株降解率最高,在 72 h 可达 94.08%;随着正二十四烷的浓度增加,菌株对烷烃的降解率逐渐下降。当正二十四烷的浓度升至 1 000 mg/L 时,菌株对应的降解率为 35.09%,但体系中菌体数量(OD_{600})一直保持增长,表明在该时间段内高浓度的烷烃并未对菌株造成毒害作用^[44],反而会促进其生长,进而推断菌株 C24MT1 对长链烷烃的降解能力

可能更高。为进一步探索其对高浓度烷烃的降解效能,考察了其在 7 d 内对初始浓度为 1–9 g/L 正二十四烷的降解率(图 5)。由图 5 可知,在最适条件下(30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min、pH 9.0、盐度 2 g/L),菌株对初始浓度为 1、3、5、7 和 9 g/L 的正二

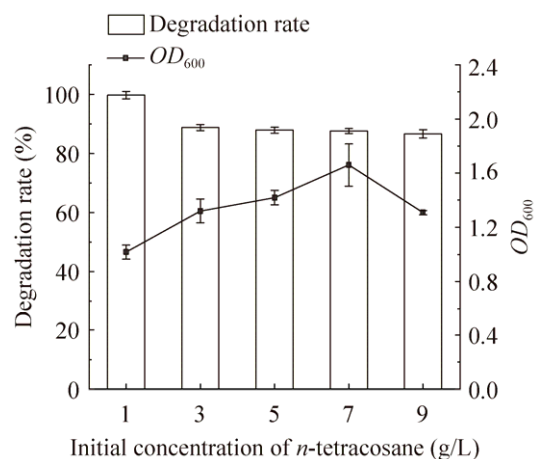


图 5 菌株 C24MT1 对高浓度正二十四烷的 7 d 降解率

Figure 5 Degradation rate in 7 days of strain C24MT1 to high concentration of *n*-tetracosane.

十四烷的降解率分别为 99.77%、88.80%、87.89%、87.64%和 86.63%。目前已报道的部分高效长链烷烃(> n -C₂₀)降解菌中,菌株 *Shewanella* sp. LZ02^[45]对初始浓度为 5 g/L 的正二十四烷(n -C₂₄)的 7 d 降解率为 72%,菌株 *Acinetobacter* sp. L12^[33]对初始浓度为 3 g/L 正二十一烷(n -C₂₁)的 7 d 降解率为 69.47%,相较而言,在相同的降解时间内(7 d),本文中的菌株 C24MT1 对长链烷烃(正二十四烷, n -C₂₄)具有更好的降解效果(86.63%–99.77%)。与此同时,降解过程对应的 OD_{600} (1.02–1.66)也表明高浓度的烷烃并未对菌株 C24MT1 造成毒害作用,侧面证明菌株对高浓度环境的良好适应性。本文筛选到的菌株 C24MT1 不仅对碱性环境(pH 11.0)具有较强的耐受能力,且可在高烷烃浓度下保持优良的降解率(7 d 内对初始浓度为 9 g/L 的正二十四烷降解率为 86.63%),初步表明菌株 C24MT1 在极端环境下具有良好的土壤原位修复潜力。

2.4 菌株 C24MT1 降解正二十四烷的动力学

如图 6A 所示,菌株 C24MT1 在最适条件(接种量为 5%、摇床转速 200 r/min、30 °C、pH 9.0、

外加盐度 2 g/L)下降解初始浓度为 200 mg/L 的正二十四烷时,烷烃降解率和 OD_{600} 均随降解过程进行而增加,且在 48 h 后趋于稳定。该条件下菌株 72 h 的 OD_{600} 从 0.21 上升至 0.64,可降解体系中 90.35% 的正二十四烷,说明菌株 C24MT1 生长量与其降解正二十四烷的能力呈正相关,初步表明菌体生长状况可作为衡量烷烃降解状况的生物学指标^[46]。

据文献报道,微生物对化学物质的降解符合一级动力学^[47-48],可用方程 $\ln(C_t)=-kt+a$ 表示。对正二十四烷的浓度取 \ln 值,使用 Origin 软件拟合其与时间 t 的关系,得到菌株 C24MT1 的动力学曲线如图 6B 所示,动力学方程为 $\ln(C_t)=-0.029t+5.30$, $R^2=0.991$,表明拟合效果良好,即菌株 C24MT1 对正二十四烷的降解过程遵循一级降解动力学,与田秀梅等^[35]关于不动杆菌 YQJ-1 降解动力学的报道一致。由方程可得该条件下正二十四烷降解半衰期仅为 23.96 h,对应最大降解速率为 5.63 mg/h,初步表明该菌株可较好地利用长链烷烃作为唯一碳源进行生长代谢。

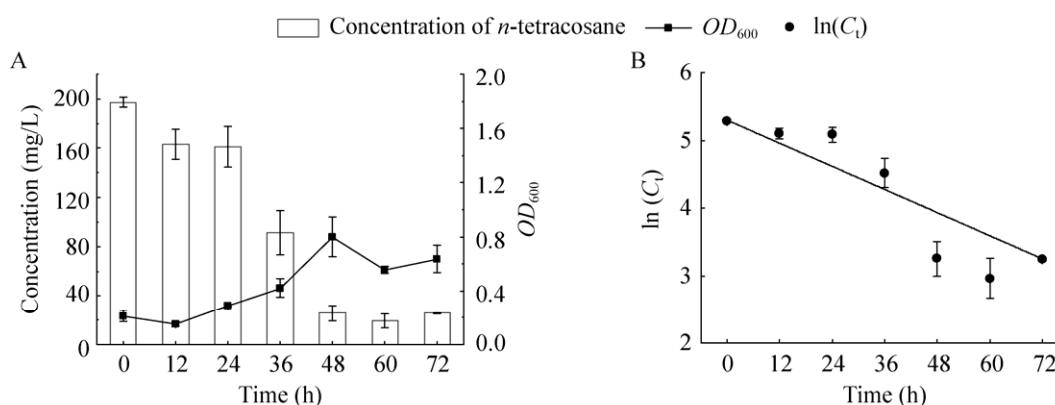


图 6 菌株 C24MT1 对正二十四烷的降解情况和动力学曲线 A: 菌株 C24MT1 的生长量和正二十四烷浓度随时间变化关系. B: 菌株 C24MT1 的降解动力学拟合曲线

Figure 6 Degradation and kinetic curves of strain C24MT1 against *n*-tetracosane. A: The relationship between the biomass of the strain C24MT1 and the concentration of *n*-tetracosane. B: Degradation kinetics fitting curve of strain C24MT1.

2.5 正二十四烷的降解途径分析

目前普遍认为烷基的氧化反应是链式烷烃降解过程的关键起始步骤, 依照初始被加氧碳原子位置的不同, 一般将其划分为末端氧化和次末端氧化两大类^[49-50]。在碳氢化合物代谢途径的研究中, 基于气相质谱(GC-MS)检测关键中间产物并结合相关理论性报道来确定目标物质降解途径的分析手段是一种重要的化学分析

方法, 常被用于推断物质降解途径的过程中^[51-52]。采用 GC-MS 对菌株 C24MT1 降解正二十四烷过程中产生的中间产物进行气相质谱分析, 检测到的中间产物如表 2 所示, 各物质对应的 GC-MS 谱图见图 7。

结合当前报道中涉及的烷烃降解途径^[49]和检测到的物质, 预测正二十四烷的潜在降解途径如图 8 所示。由中间产物 A (1-二十二醇)、

表 2 菌株 C24MT1 降解正二十四烷产生的主要代谢产物质谱数据

Table 2 Spectral data of main metabolites from the degradation of *n*-tetracosane by strain C24MT1

序号 No.	代谢产物 Metabolite	质荷比 <i>m/z</i> (%)
A	1-二十二醇 1-docosanol (C ₂₂ H ₄₆ O)	43(100), 57(43), 83(48), 41(33), 69(71)
B	1-十八烷醛 1-octadecanal (C ₁₈ H ₃₆ O)	43(100), 57(95), 85(43), 109(20), 137(8)
C	1-十六烷酸 1-hexadecanoic acid (C ₁₆ H ₃₂ O ₂)	43(100), 73(72), 51(62), 60(61), 256(9)
D	(14Z)-14-十八碳烯乙酸酯 Z-14-octadecen-1-ol acetate (C ₂₀ H ₃₈ O ₂)	43(100), 85(44), 41(18), 69(31), 123(27)

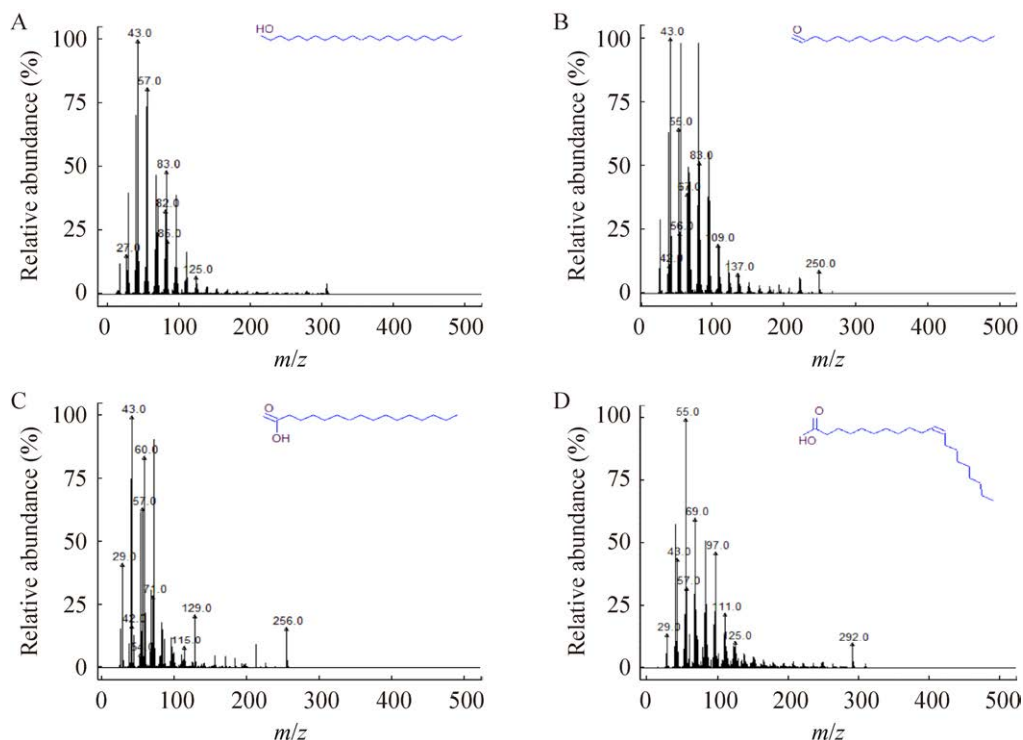


图 7 主要中间代谢产物 GC-MS 谱图 A: 1-二十二醇. B: 1-十八烷醛. C: 1-十六烷酸. D: (14Z)-14-十八碳烯乙酸酯

Figure 7 GC-MS spectra of major intermediate metabolites. A: 1-docosanol. B: 1-octadecanal. C: 1-hexadecanoic acid. D: Z-14-octadecen-1-ol acetate.

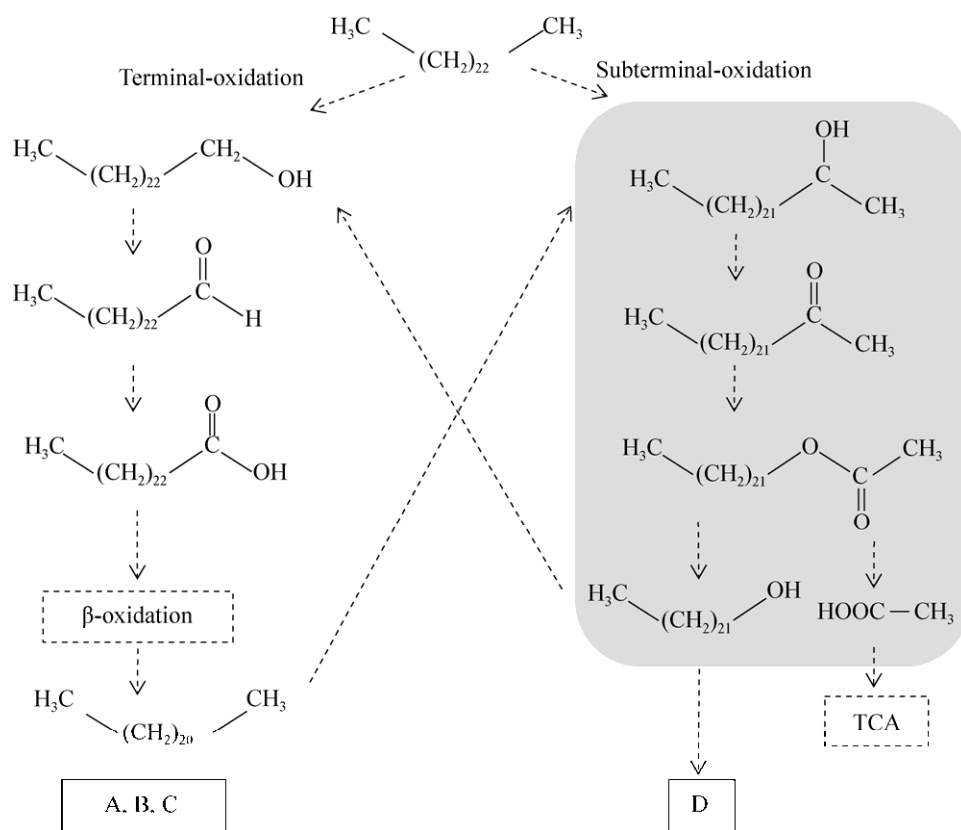


图8 推测 *Acinetobacter* sp. C24MT1 降解正二十四烷的潜在途径 A: 1-二十二醇. B: 1-十八烷醛. C: 1-十六烷酸. D: (14Z)-14-十八碳烯乙酸酯

Figure 8 Proposed degradation pathway of *n*-tetracosane by *Acinetobacter* sp. C24MT1. A: 1-docosanol. B: 1-octadecanal. C: 1-hexadecanoic acid. D: *Z*-14-octadecen-1-ol acetate.

B (1-十八烷醛)、C (1-十六烷酸)可推断菌株 C24MT1 降解正二十四烷的途径为末端氧化^[45]；由检测到的中间产物 D [(14Z)-14-十八碳烯乙酸酯]可推断，正二十四烷也可通过次末端氧化的途径被菌株 C24MT1 降解^[53]。以上结果说明菌株 C24MT1 可能通过末端氧化及次末端氧化途径降解长链烷烃，初步表明菌株可能含有多种不同烷烃代谢相关基因。据报道，微生物通过末端氧化或次末端氧化途径代谢长链烷烃的过程分别由不同基因所控制。前者多由烷烃羟化酶基因^[54](如基因 *alkB*^[55])和细胞色素 P450 基因^[56](如基因 *CYP153*^[21])催化，而后者大多受 BVMO 家族基因^[57](如基因 *almA*^[27])和某些特异性基因簇^[58](如基因簇 *scmAB*、*sadABCD*^[59-60])

的共同调控，这些功能基因的差异性表达使得多种酶不同程度地参与到长链烷烃的氧化进程中^[61]，最终完成对烃类的降解过程。

3 结论

本研究从受石油污染的土壤中分离、纯化得到一株能利用长链烷烃正二十四烷作为唯一碳源的高效降解菌 C24MT1，经形态学观察、生理生化实验及 16S rRNA 基因序列比对分析等手段，初步鉴定为不动杆菌(*Acinetobacter* sp.)。在最适条件(30 °C、pH 9.0、外加盐度 2 g/L)下，7 d 时菌株 C24MT1 对 9 g/L 的正二十四烷的降解率可达到 86.63%。与此同时，该菌株对于极端碱性环境(pH 11.0)具有很强的耐受性，

且可保持良好的降解能力(75.38%)。此外, 通过 GC-MS 检测菌株 C24MT1 代谢正二十四烷产生的中间产物, 初步推断不动杆菌 C24MT1 降解长链烷烃途径包括末端氧化与次末端氧化。菌株 C24MT1 在强碱(pH 11.0)及高浓度烷烃浓度(9 g/L)环境下均表现出良好的耐受能力及降解效率, 为盐碱地区石油污染环境的原位修复提供了优良的候选菌种, 并为后续微生物菌剂开发和优良菌群复配等复合型污染土壤修复技术提供进一步的理论参考和技术支持。

REFERENCES

- [1] ORISAKWE OE. Crude oil and public health issues in Niger Delta, Nigeria: much ado about the inevitable[J]. *Environmental Research*, 2021, 194: 110725.
- [2] SHAW OM, SAWYER GM, HURST RD, DINNAN H, MARTELL S. Different immune and functional effects of urban dust and diesel particulate matter inhalation in a mouse model of acute air pollution exposure[J]. *Immunology & Cell Biology*, 2021, 99(4): 419-427.
- [3] BRANDT EB, BOLCAS PE, RUFF BP, KHURANA HERSHEY GK. IL33 contributes to diesel pollution-mediated increase in experimental asthma severity[J]. *Allergy*, 2020, 75(9): 2254-2266.
- [4] LEWIS AC, CARSLAW DC, KELLY FJ. Diesel pollution long under-reported[J]. *Nature*, 2015, 526(7572): 195.
- [5] ZHANG T, LIU YY, ZHONG S, ZHANG LS. AOPs-based remediation of petroleum hydrocarbons-contaminated soils: efficiency, influencing factors and environmental impacts[J]. *Chemosphere*, 2020, 246: 125726.
- [6] THOMAS CL, JANSEN B, van LOON EE, WIESENBERG GLB. Transformation of *n*-alkanes from plant to soil: a review[J]. *SOIL*, 2021, 7(2): 785-809.
- [7] LI L, XU JL, WANG YH, ZHANG ZN, YE Y. Efficient cyclic oxidation of macro long-chain alkanes in soil using Fenton oxidation with recyclable Fe[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 417: 126026.
- [8] SHUKLA S, KHAN R, BHATTACHARYA P, DEVANESAN S, AISALHI MS. Concentration, source apportionment and potential carcinogenic risks of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in roadside soils[J]. *Chemosphere*, 2022, 292: 133413.
- [9] LI J, XU Y, SONG QW, YANG J, XIE L, YU SH, ZHENG L. Polycyclic aromatic hydrocarbon and *n*-alkane pollution characteristics and structural and functional perturbations to the microbial community: a case-study of historically petroleum-contaminated soil[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021, 28(9): 10589-10602.
- [10] HALSE K, SOLHEIM E, NORDSTOGA K. Pathological hepatic accumulation of long-chain *n*-alkanes (“paraffin liver”) in cows (Harbitz and Fölling, 1940). An overlooked discovery. Description of lesions and identification of alkanes[J]. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 1993, 101(6): 430-436.
- [11] AGHADADASHI V, MEHDINIA A, MOLAEI S. Origin, toxicological and narcotic potential of sedimentary PAHs and remarkable even/odd *n*-alkane predominance in Bushehr Peninsula, the Persian Gulf[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2017, 114(1): 494-504.
- [12] CHOI B, LEE S, JHO EH. Removal of TPH, UCM, PAHs, and *Alk*-PAHs in oil-contaminated soil by thermal desorption[J]. *Applied Biological Chemistry*, 2020, 63(1): 1-6.
- [13] ZUZOLO D, GUARINO C, TARTAGLIA M, SCIARRILLO R. Plant-soil-microbiota combination for the removal of total petroleum hydrocarbons (TPH): an in-field experiment[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 11: 621581.
- [14] RONG LG, ZHENG XH, OBA BT, SHEN CB, WANG XX, WANG H, LUO Q, SUN LN. Activating soil microbial community using *Bacillus* and *rhamnolipid* to remediate TPH contaminated soil[J]. *Chemosphere*, 2021, 275: 130062.
- [15] MICLE V, SUR IM. Experimental investigation of a pilot-scale concerning *ex-situ* bioremediation of petroleum hydrocarbons contaminated soils[J]. *Sustainability*, 2021, 13(15): 8165.
- [16] AGARRY SE, OWABOR CN, YUSUF RO. Bioremediation of soil artificially contaminated with petroleum hydrocarbon oil mixtures: evaluation of the use of animal manure and chemical fertilizer[J]. *Bioremediation Journal*, 2010, 14(4): 189-195.
- [17] PANASIA G, PHILIPP B. LaoABCR, a novel system for oxidation of long-chain alcohols derived from SDS and alkane degradation in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(13): e00626-e00618.
- [18] LIU J, ZHAO B, LAN Y, MA T. Enhanced degradation

- of different crude oils by defined engineered consortia of *Acinetobacter venetianus* RAG-1 mutants based on their alkane metabolism[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 327: 124787.
- [19] CHAUDHARY DK, BAJAGAIN R, JEONG SW, KIM J. Biodegradation of diesel oil and *n*-alkanes (C18, C20, and C22) by a novel strain *Acinetobacter* sp. K-6 in unsaturated soil[J]. *Environmental Engineering Research*, 2020, 25(3): 290-298.
- [20] WANG XT, LIU B, LI XZ, LIN W, LI DA, DONG H, WANG L. Biosurfactants produced by novel facultative-halophilic *Bacillus* sp. XT-2 with biodegradation of long chain *n*-alkane and the application for enhancing waxy oil recovery[J]. *Energy*, 2022, 240: 122802.
- [21] PARK HA, CHOI KY. α , ω -Oxyfunctionalization of C12 alkanes via whole-cell biocatalysis of CYP153A from *Marinobacter aquaeolei* and a new CYP from *Nocardia farcinica* IFM10152[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2020, 156: 107524.
- [22] XIANG W, LIANG Y, HONG S, WANG G, YOU J, XUE YF, MA YH. Degradation of long-chain *n*-alkanes by a novel thermal-tolerant *Rhodococcus* strain[J]. *Archives of Microbiology*, 2022, 204(5): 259.
- [23] LIU H, GAO H, WU ML, MA C, WU JL, YE XQ. Distribution characteristics of bacterial communities and hydrocarbon degradation dynamics during the remediation of petroleum-contaminated soil by enhancing moisture content[J]. *Microbial Ecology*, 2020, 80(1): 202-211.
- [24] SARKAR J, KAZY SK, GUPTA A, DUTTA A, MOHAPATRA B, ROY A, BERA P, MITRA A, SAR P. Biostimulation of indigenous microbial community for bioremediation of petroleum refinery sludge[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1407.
- [25] 李恒昌, 丁明珠. 石油烃生物降解过程的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(8): 2765-2778.
- LI HC, DING MZ. Advances in biodegradation of petroleum hydrocarbons[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(8): 2765-2778 (in Chinese).
- [26] 陈丽华, 孙万虹, 李海玲, 杨琴, 张璇. 石油降解菌对石油烃中不同组分的降解及演化特征研究[J]. *环境科学学报*, 2016, 36(1): 124-133.
- CHEN LH, SUN WH, LI HL, YANG Q, ZHANG X. Biological degradation and transformation characteristics of different components in petroleum hydrocarbon by oil-degradation bacteria[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2016, 36(1): 124-133 (in Chinese).
- [27] KONG WN, ZHAO C, GAO XW, WANG LP, TIAN QQ, LIU Y, XUE SW, HAN Z, CHEN FL, WANG SW. Characterization and transcriptome analysis of a long-chain *n*-alkane-degrading strain *Acinetobacter pittii* SW-1[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2021, 18(12): 6365.
- [28] WU ML. Effect of bioaugmentation and biostimulation on hydrocarbon degradation and microbial community composition in petroleum-contaminated loessal soil[J]. *Chemosphere*, 2019, 237: 124456.
- [29] GENG PX, MA AZ, WEI XX, CHEN XK, YIN J, HU FT, ZHUANG XL, SONG MY, ZHUANG GQ. Interaction and spatio-taxonomic patterns of the soil microbiome around oil production wells impacted by petroleum hydrocarbons[J]. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 2022, 307: 119531.
- [30] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001
- DONG XZ, CAI MY. *Common Bacterial System Identification Manual*[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese).
- [31] LIU H, XU J, LIANG RB, LIU JH. 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.
- [32] 李志琳, 解宇峰, 吴杰, 徐佳迎, 王珏, 蒋静艳. 一株高效柴油降解菌 *Serratia* sp. J-3 的筛选、鉴定和降解特性[J]. *南京农业大学学报*, 2019, 42(6): 1098-1107.
- LI ZL, XIE YF, WU J, XU JY, WANG J, JIANG JY. Isolation and identification of a high efficiency diesel oil degrading strain *Serratia* sp. J-3 and its degradation characteristics[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2019, 42(6): 1098-1107 (in Chinese).
- [33] 王兴龙, 颜家保, 胡杰, 鲍彦舟. 柴油污染土壤烷烃降解菌的筛选及降解特性研究[J]. *现代化工*, 2022, 42(2): 163-166.
- WANG XL, YAN JB, HU J, BAO YZ. Screening and degradation characteristics of bacteria for degrading alkane in diesel contaminated soil[J]. *Modern Chemical Industry*, 2022, 42(2): 163-166 (in Chinese).
- [34] 钟磊, 卿晋武, 陈红云, 栗高源, 陈冠益, 孙于茹, 李金磊, 宋英今, 颜蓓蓓. 微生物修复石油烃土壤污染技术研究进展[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(10): 3636-3652.
- ZHONG L, QING JW, CHEN HY, LI GY, CHEN GY, SUN YR, LI JL, SONG YJ, YAN BB. Advances in bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(10): 3636-3652 (in Chinese).
- [35] 田秀梅, 王晓丽, 彭士涛, 赵淑伟, 邱滨滨. 一株高效

- 原油降解不动杆菌的筛选及降解特性分析[J]. 环境工程, 2019, 37(6): 165-169, 95.
- TIAN XM, WANG XL, PENG ST, ZHAO SW, QIU BB. Screening and degradation characteristics of *Acinetobacter* degrading crude oil efficiently[J]. Environmental Engineering, 2019, 37(6): 165-169, 95 (in Chinese).
- [36] 张腾飞, 黄玉杰, 王磊磊, 张闻, 季蕾, 王加宁. 正十二烷降解菌株的筛选及降解特性研究[J]. 环境科学与技术, 2021, 44(S2): 238-244.
- ZHANG TF, HUANG YJ, WANG LL, ZHANG W, JI L, WANG JN. Screening of *n*-dodecane degrading strain and research on characteristics[J]. Environmental Science & Technology, 2021, 44(S2): 238-244 (in Chinese).
- [37] 李西燕, 张旭, 朱明龙, 吴炜进, 邱永秋, 刘浩, 谭文松. 柴油降解菌的筛选、菌群构建及其对柴油和十五烷的降解机理[J]. 环境工程学报, 2019, 13(12): 2945-2953.
- LI XY, ZHANG X, ZHU ML, WU WJ, QIU YQ, LIU H, TAN WS. Screening and community construction of diesel oil degrading bacteria and their degradation mechanism of diesel oil and pentadecane[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2019, 13(12): 2945-2953 (in Chinese).
- [38] 王之语, 原陇苗, 刘艳红, 马荣, 吴应琴. 高效耐盐碱石油烃降解菌筛选及降解特性研究[J]. 沉积学报, 2022, 40(3): 849-860.
- WANG ZY, YUAN LM, LIU YH, MA R, WU YQ. Screening and degradation characteristics of high efficiency saline alkali-resistant petroleum hydrocarbon degrading bacteria[J]. Acta Sedimentologica Sinica, 2022, 40(3): 849-860 (in Chinese).
- [39] 张海荣, 唐景春, 孙克静, 张清敏. 耐盐碱石油烃降解菌的筛选、鉴定及其耐盐碱性研究[J]. 生物技术通报, 2015, 31(1): 151-159.
- ZHANG HR, TANG JC, SUN KJ, ZHANG QM. Isolation and identification of saline-alkaline tolerant hydrocarbondegrading strains and study on their saline-alkaline tolerant characteristics[J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(1): 151-159 (in Chinese).
- [40] 樊黎黎, 徐兴健, 韩雪容, 李海彦, 王娜, 冀伟, 于洪文. 莫莫格湿地石油污染土壤中耐盐碱石油烃降解细菌的降解特性研究[J]. 土壤与作物, 2019, 8(2): 195-204.
- FAN LL, XU XJ, HAN XR, LI HY, WANG N, JI W, YU HW. Characteristics of saline-alkali-tolerant and petroleum hydrocarbon-degrading bacteria isolated from petroleum oil-polluted soil in Momoge wetland[J]. Soils and Crops, 2019, 8(2): 195-204 (in Chinese).
- [41] 周旭华, 刘鹏程, 王伟, 丁静, 苏悦. 一株耐盐吡啶降解菌的分离及降解特性研究[J]. 环境污染与防治, 2021, 43(10): 1269-1273.
- ZHOU XH, LIU PC, WANG W, DING J, SU Y. Isolation and degradation characteristics of a halotolerant pyridine degrading bacterial strain[J]. Environmental Pollution & Control, 2021, 43(10): 1269-1273 (in Chinese).
- [42] 李凤娟, 徐菲, 李小龙, 李琦, 曹保久. 高盐度废水处理技术研究进展[J]. 环境科学与管理, 2014, 39(2): 72-75.
- LI FJ, XU F, LI XL, LI Q, CAO BJ. Research on treatment of high salinity wastewater[J]. Environmental Science and Management, 2014, 39(2): 72-75 (in Chinese).
- [43] 张浩, 刘玉香, 呼婷婷, 赵晶. 一株苯胺降解菌的分离及其降解特性[J]. 环境工程学报, 2015, 9(12): 6154-6160.
- ZHANG H, LIU YX, HU TT, ZHAO J. Isolation and characterization of an aniline-degrading bacterium[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2015, 9(12): 6154-6160 (in Chinese).
- [44] 陆长鸣, 李想, 徐明恺, 李新宇, 李旭, 谷舞, 郭秋翠, 张惠文. 一株高效广谱莠去津降解菌 SB5 的生长和降解特性[J]. 应用生态学报, 2022, 33(1): 229-238.
- LU CM, LI X, XU MK, LI XY, LI X, GU W, GUO QC, ZHANG HW. Growth and degradation characteristics of an efficient and broad-spectrum atrazine-degrading strain SB5[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2022, 33(1): 229-238 (in Chinese).
- [45] 李兵, 张博. 一株长链烷烃降解菌 LZ02 的筛选及其降解特性[J]. 江西农业大学学报, 2017, 39(4): 780-784, 825.
- LI B, ZHANG B. Screening of a long-chain alkane-degrading bacterium LZ02 and its degradation characteristics[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2017, 39(4): 780-784, 825 (in Chinese).
- [46] 朱杰, 阮志勇, 董卫卫, 郭翔, 孔德龙, 张琪, 赵述森, 张伟. 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.
- ZHU J, RUAN ZY, DONG WW, GUO X, KONG DL, ZHANG Q, ZHAO SM, ZHANG W. Isolation, identification and degradation characterization of an alkane-degrading *Acinetobacter* sp. LAM1007[J]. Microbiology China, 2017, 44(7): 1535-1546 (in Chinese).
- [47] 甄丽莎, 谷洁, 胡婷, 刘晨, 贾凤安, 吕睿. 石油烃类污染物降解动力学和微生物群落多样性分析[J]. 农业工程学报, 2015, 31(15): 231-238.
- ZHEN LS, GU J, HU T, LIU C, JIA FA, LÜ R. Kinetics of petroleum hydrocarbon degradation in soil and diversity of microbial community during composting[J].

- Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2015, 31(15): 231-238 (in Chinese).
- [48] ABIOYE PO, AZIZ AA, AGAMUTHU P. Enhanced biodegradation of used engine oil in soil amended with organic wastes[J]. Water, Air, & Soil Pollution, 2010, 209(1): 173-179.
- [49] ROJO F. Degradation of alkanes by bacteria[J]. Environmental Microbiology, 2009, 11(10): 2477-2490.
- [50] SUN JQ, XU L, LIU XY, ZHAO GF, CAI H, NIE Y, WU XL. Functional genetic diversity and culturability of petroleum-degrading bacteria isolated from oil-contaminated soils[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1332.
- [51] 史可, 郭晨蕾, 马晓丹, 梁斌, 王爱杰. 一株氯霉素降解细菌的分离鉴定与代谢特性研究[J]. 生物工程学报, 2021, 37(10): 3653-3662.
- SHI K, GUO CL, MA XD, LIANG B, WANG AJ. Isolation, identification and characterization of a chloramphenicol-degrading bacterium[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(10): 3653-3662 (in Chinese).
- [52] 牛鸿宇, 舒倩, 杨海君, 颜智勇, 谭菊. 一株十二烷基硫酸钠高效降解菌的分离鉴定、降解特性及代谢途径研究[J]. 生物技术通报, 2022, 38(12):1-13.
- NIU HY, SHU Q, YANG HJ, YAN ZY, TAN J. Isolation, degradation characteristics and metabolic pathway of an efficient sodium dodecyl sulfate-degrading bacterium[J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(12):1-13 (in Chinese).
- [53] 杨海燕. 一株红球菌(*Rhodococcus* sp. strain p52)对石油污染物的降解研究[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2014.
- YANG HY. Degradation of petroleum pollutants by *Rhodococcus* sp. strain p52[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong University, 2014 (in Chinese).
- [54] 吴慧君, 宋权威, 郑瑾, 于文赫, 张坤峰, 林双君, 梁如冰. 微生物降解石油烃的功能基因研究进展[J]. 微生物学通报, 2020, 47(10): 3355-3368.
- WU HJ, SONG QW, ZHENG J, YU WH, ZHANG KF, LIN SJ, LIANG RB. Function genes in microorganisms capable of degrading petroleum hydrocarbon[J]. Microbiology China, 2020, 47(10): 3355-3368 (in Chinese).
- [55] TANI A, ISHIGE T, SAKAI Y, KATO N. Gene structures and regulation of the alkane hydroxylase complex in *Acinetobacter* sp. strain M-1[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(5): 1819-1823.
- [56] SCHNEIKER S, dos SANTOS VAM, BARTELS D, BEKEL T, BRECHT M, BUHRMESTER J, CHERNIKOVA TN, DENARO R, FERRER M, GERTLER C, GOESMANN A, GOLYSHINA OV, KAMINSKI F, KHACHANE AN, LANG S, LINKE B, McHARDY AC, MEYER F, NECHITAYLO T, PÜHLER A, et al. Genome sequence of the ubiquitous hydrocarbon-degrading marine bacterium *Alcanivorax borkumensis*[J]. Nature Biotechnology, 2006, 24(8): 997-1004.
- [57] MINERDI D, ZGRABLIC I, SADEGHI SJ, GILARDI G. Identification of a novel Baeyer-Villiger monooxygenase from *Acinetobacter radioresistens*: close relationship to the *Mycobacterium tuberculosis* prodrug activator EtaA[J]. Microbial Biotechnology, 2012, 5(6): 700-716.
- [58] KOTANI T, KAWASHIMA Y, YURIMOTO H, KATO N, SAKAI Y. Gene structure and regulation of alkane monooxygenases in propane-utilizing *Mycobacterium* sp. TY-6 and *Pseudonocardia* sp. TY-7[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2006, 102(3): 184-192.
- [59] KOTANI T, YURIMOTO H, KATO N, SAKAI Y. Novel acetone metabolism in a propane-utilizing bacterium, *Gordonia* sp. strain TY-5[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(3): 886-893.
- [60] YIN CF, XU Y, LI T, ZHOU NY. Wide distribution of the sad gene cluster for sub-terminal oxidation in alkane utilizers[J]. Environmental Microbiology, 2012, 24(12): 6307-6319.
- [61] 范裕昭, 秦晓宇, 聂勇, 吴晓磊, 许子牧. *Dietzia* 菌中铁氧还蛋白及其还原酶在正十六烷降解中的关键作用[J]. 应用与环境生物学报, 2023, 29(1): 1-6.
- FAN YZ, QIN XY, NIE Y, WU XL, XU ZM. The key role of ferredoxin and ferredoxin reductase in *n*-hexadecane degradation from *Dietzia* bacteria[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2023, 29(1): 1-6 (in Chinese).