生态环境 2007, 16(5): 1394-1398
Ecology and Environment
http://www.jeesci.com
E-mail: editor@jeesci.com

烷烃降解菌 SY16 的筛选、鉴定及降解能力测定

鲁雅梅，邹东雷，赵勇胜，王显胜*

吉林大学环境与资源学院，吉林 长春 130026

摘要：油田生产和运输中经常发生原油落地以及漏油现象，造成大量的石油进入地表土壤，从而产生环境污染。针对原油对土壤产生的环境污染问题，对微生物降解烷烃的能力进行了研究。在以正十六烷为唯一碳源的 HDM 培养基中，从扶余油田东区采油三厂经常被含油废水浸泡的土壤中，分离、筛选出一株高效降解正烷烃的菌株 SY16。经形态学观察和生理生化特征研究，鉴定为施氏假单胞杆菌(Pseudomonas stutzeri)。通过摇瓶试验得出两菌株的最适生长条件为 30 ℃，培养基初始 pH 8.0，摇床转速为 180 r/min，接种量为 1.0%。在最适生长条件下，分别对不同初始质量浓度烷烃进行降解率试验。结果表明，两菌株降解正烷烃的能力显著，当培养基中初始正烷烃含量为 50 mg/L 时，24 h 能全部降解。当混合烷烃中各烷烃的初始质量浓度为 50 mg/L 时，在 24 h 对正十烷、正十二烷、正十六烷和正十八烷的降解率分别达到 47.0%、42.6%、38.8%、36.2%。

关键词：石油污染；生物修复；烷烃降解菌；施氏假单胞杆菌

中图分类号：X592　　文献标识码：A　　文章编号：1672-2175（2007）05-1394-05

随着石油的工业迅速发展，在勘探、开发、运输、储存和加工等过程中，由于井喷事故，泄漏及沉降排放等会对土壤和地下水造成污染，带来了许多环境问题[1]。石油烃的主要化学成分是烷烃和芳香烃等，有些成分有致癌变、致突变、致畸变作用，并能通过食物链在动植物及人体内富集，被列为重点污染物[2]。进入环境中的石油，由于生物学的和某些非生物学的机制(主要是光化学氧化) 而逐步降解[2]。大量研究表明，在自然界净化石油烃类污染的综合因素中，天然微生物的生物降解作用已成为消除环境中石油烃类污染的主要机制[3]。

石油烃降解菌(Hydrocarbon Degradation Bacteria，HDB)是能将石油烃作为唯一碳源进行生物降解，并产生气体、脂肪酸及生物表面活性剂等代谢产物的一类微生物的总称[4]。石油烃降解菌对石油污染环境的生物修复有重要作用[5]。

生物修复是指在污染环境中加入一些物质(如营养、O2、微生物) 或提高这些物质的能力，导致天然生物降解过程加速的活动[3]。生物修复去除石油烃类污染物的方法与化学物理方法相比，具有成本低、修复时间短、对污染物的去除率高、操作简便、对周围环境干扰少及不产生二次污染等优点[6]。

石油烃类化合物组成成分的差异影响其生物降解率，降解石油烃类化合物的能力依赖于微生物群落的种属组成[3]。目前在处理石油污染土壤时，所选用的微生物对污染土壤中烃类的降解针对性较差，降解率较低[7]。高效降解烃类微生物的筛选是是微生物技术处理石油污染的关键。

本文从抚余油田石油污染的土壤中筛选出一株高效降解烃类化合物的微生物，并通过个体形态、菌落形态对其进行了初步鉴定。

1 材料与方法

1.1 实验材料

从扶余油田东区采油三厂经常被含油废水浸泡的土地上选取了 8 处采样点，去除表层 5 cm 的浮土，在 5～10 cm 之间，使用经过高温灭菌的铲子取土，装到灭菌的塑料袋中，封口，－20 ℃冷冻保存，第二天进行分离纯化。

1.2 主要仪器及设备

INNOVA 4000 恒温摇床、Incucell 111R 恒温培养箱、nikon－200 型显微镜、AUTBESTER-E-75 高压灭菌锅、BP221S 电子天平、Waters 515 高压液相色谱、HP4890 气相色谱仪。

1.3 材料与试剂

1.3.1 供试烷烃

正十烷、正十二烷、正十四烷、正十六烷和正十八烷均购自 Sigma。

1.3.2 其它试剂

草酸铵、结晶紫、碘、碘化钾、95%乙醇、番红花红、香柏油、硫酸、无水硫酸钠、石油醚

基金项目：科技部科技成果转化项目（05EFN214400207）；广东省自然科学基金项目（05006634）

作者简介：鲁雅梅（1975－），女，讲师，博士研究生，从事于环境污染综合防治的研究。
*通讯作者

收稿日期：2007-01-26

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

等均为国产分析纯。

1.4 培养基

1.4.1 无机盐储存液

4 g $NaNO_3$，1.5 g KH_2PO_4，0.5 g Na_2HPO_4，0.001 1 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$，0.2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$，0.01 g $CaCl_2$，加水至 1 000 mL，121 ℃灭菌 20 min。

1.4.2 TY 培养基

葡萄糖 10.0 g，蛋白胨 5.0g，酵母浸粉 5.0 g，NaCl 5.0 g，无机盐储存液 2.0 mL，加水至 1 000 mL 调 pH 7.8，121 ℃灭菌 20 min。固体培养基在此基础上加 20 g 琼脂粉[8]。

1.4.3 HDM 培养基

以正十六烷 5.0 g，NH_4NO_3 2.0 g，KH_2PO_4 1.0 g，K_2HPO_4 1.0 g，无机盐储存液 2.0 mL，加水至 1 000 mL 调 pH 8.5，121 ℃灭菌 20 min。固体培养基在此基础上加 20 g 琼脂粉[8]。

1.5 菌体生物量的测定

培养液在 5 000 r/min 离心 15 min，用 100 mL 去离子水洗涤菌体两次，再用与培养液同体积的去离子水重悬菌体，以去离子水为空白测定 A600，以菌体密度表示菌体生物量的大小。

1.6 烷烃的定量测定

在萃取前先向各摇瓶(包括空白对照样)中加入等量正十四烷作为内标，再加入 5 mL 正己烷作萃取剂，振荡 2 min 后迅速倒入离心管中，在 4 ℃、10 000 r/min 条件下离心 5 min，抽取上清液。再分别加入 5 mL 正己烷萃取两次。合并三次萃取液，并作适当稀释，以备分析。

采用 HP4890 气相色谱仪(GC-FID)分析样品，运行条件：柱温先在 150 ℃维持 1 min，然后以 15 ℃/min 速率升至 250 ℃；检测器温度为 280 ℃；注射室温度 250 ℃；进样量 1 mL。通过测定与正十四烷的峰面积比值，定量分析各种烷烃的质量浓度。

1.7 烷烃高效降解菌株的纯化筛选

1.7.1 菌株的分离与纯化

土壤经玻璃珠打碎后静置，取上清液加入到 HDM 培养基中，于 30 ℃培养、富集 7 d；发酵液经梯度稀释后涂布在倒置的固体烷烃平板上，于 30 ℃培养 挑取平板上长出的单菌落进行重复的分离纯化，直到得到单菌株的纯培养。

1.7.2 烷烃高效降解菌株的筛选

将纯化的菌株接种到 HDM 液体培养基中，测试各菌株在 30 ℃、150 r/min 培养 12 h 时对正十六烷的利用情况，初步筛选出对烷烃降解良好的菌株。

对初筛到的数株烷烃降解菌进行培养，测定在 30 ℃、150 r/min 的恒温摇床中培养的生长曲线、烷烃降解率曲线，筛选出生长速率快、生长量大、高效降解混合烷烃的菌株。

1.8 烷烃降解菌最适作用条件的探索

1.8.1 种子液的制备 由于烷烃降解率的测定都在液体培养基中进行，为了减少批次间及批次内实验误差，所以选用液体培养物作为种子用于烷烃降解率的测定。

将经过两次连续活化的菌种接种到装有 50 mL TY 培养基的 250 mL 三角瓶中，在 30 ℃、150 r/min 的恒温摇床中培养 12 h，测定培养液在 600 nm 处的吸光度，用 TY 灭菌的培养基调整其质量浓度，使其 A600＝0.4，以此液作为种子液。

1.8.2 SY16 最适生长条件 在装有 50 mL HDB(以正十六烷为唯一碳源)培养基的 250 mL 三角瓶中，分别对温度(20, 25, 30, 35, 40 ℃)、初始 pH 值(3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11)、摇床转速(100, 125, 150, 175, 200, 225, 250 r/min)和接种量(分别为 0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0%, 3.0%, 4.0%, 5.0%)进行单因素条件试验，测定培养 20 h 时发酵液中的生物量，确定菌株最适生长条件。

1.8.3 SY16 对不同质量浓度单一烷烃的降解效率

在装有 50 mL HDB 培养基的 250 mL 三角瓶中，分别以不同质量浓度的单一烷烃(正十烷、正十二烷、正十六烷和正十八烷)为唯一碳源，接种量为 1.0%，调整初始 pH 为 8.0，在 30 ℃、180 r/min 培养，分别测定 4, 8, 12, 14, 16, 20, 24 h 时对不同正烷烃的降解效率。

1.8.4 SY16 对混合烷烃的降解效率

在装有 50 mL HDB 培养基的 250 mL 三角瓶中，以 1.0%的混合烷烃(正十烷、正十二烷、正十六烷和正十八烷等量混合)为唯一碳源，接种量为 1.0%，调整初始 pH 为 8.0，在 30 ℃、180 r/min 培养，测定 4, 8, 12, 14, 16, 20, 24 h 时对混合烷烃的总降解效率。

1.9 烷烃降解菌 SY16 的初步鉴定

烷烃降解菌 SY16 的细胞个体形态与菌落形态的观察使用 TY 培养基，具体方法参照文献[4]的方法进行；生长特征以及生理生化特征根据文献报道[4]的培养基以及方法进行试验，记录结果。

2 结果与结论

2.1 烷烃降解菌株的分离与筛选

从扶余油田东区采油三厂经常被含油废水浸泡的土地上采取的土壤，经过富集、分离纯化，共获得了 89 株单菌，分别取代号为 SY01-89。将

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

分离的单菌接种到 HDM 培养基中，根据其对正十六烷的降解情况，初筛得到 5 株单菌，分别为 SY07、SY16、SY21、SY53 和 SY64。测定这 5 株菌在 30 ℃的生长曲线和烷烃降解率曲线，最后选择在 HDM 培养基中生长速度快，对正十六烷降解率大的 SY16 用于进一步的实验。

2.2 SY16 在 HDM 培养基中最适生长条件的确定

2.2.1 SY16 最适生长温度的确定

在 pH7.5 的 HDM 液体培养基中接入 1%的种子液，在不同温度下培养，每隔两个小时测一次生物量，以培养时间为横坐标，生物量为纵坐标作图得生长曲线(Fig.1)。结果显示，20 ℃时，菌株生长的潜伏期长，生长缓慢，生物量较小；40 ℃时，菌株生长迅速，生物量较小且平台期短，15 h 后菌体开始出现自溶；30 ℃时，接种后经过短暂的潜伏期(2 h)，菌株就迅速生长，经过短暂的对数生长期(10 h)，菌体浓度达到最大. 菌株 SY16 的最适生长温度为 30 ℃。

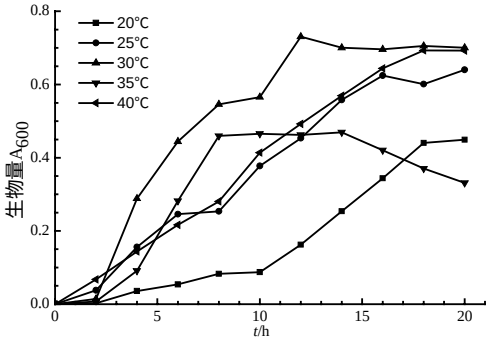

Fig. 1 Effect of temperature on growth curves of SY16

2.2.2 最适生长 pH 值的确定

将菌株SY16在不同初始pH值的培养基中接种，接种量为 1%，30 ℃培养 12 h，测定其生物量，以培养时间为横坐标，生物量为纵坐标作图得 SY16 在不同初始 pH 中的生长曲线(Fig.2)。结果显示，在初始 pH 值为 4～11 的 HDM 培养基中可以生长，在 pH = 8.0 的培养基中的生长情况最好，此时它的对数生长期最短，最后得到菌的浓度最大。

2.2.3 培养时最佳转速的确定

将菌株 SY16 接种在装有 50 mL pH8.0 的 HDM 培养基的 250 mL 锥形瓶中，接种量为 1%，30 ℃以不同转速培养 12 h，测定其生物量，以摇床转速为横坐标，生物量为纵坐标作图得 SY16 在不同转速条件下的生长曲线(Fig.3)。结果显示，

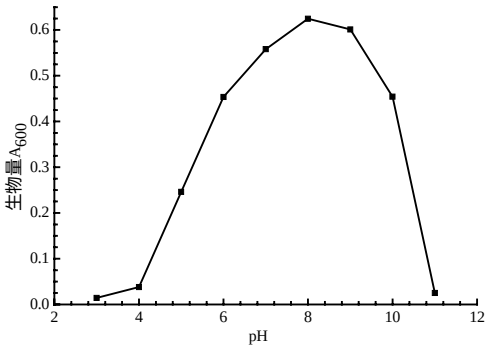

Fig. 2 Effect of pH on growth curves of SY16

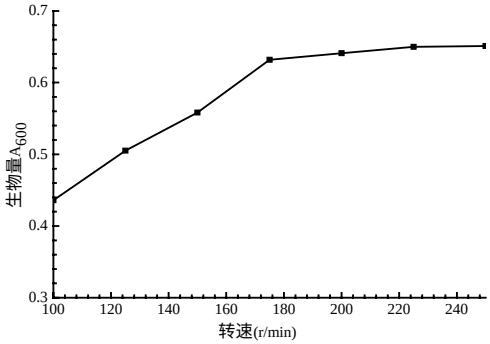

Fig. 3 Effect of rotate speed on growth curves of SY16

在转速由 100 r/min 增加到 180 r/min 时，随着培养时转速（通氧量）的增加，生物量明显增加；转速大于 180 r/min 后，生物量增加不明显，所以培养时最佳转速为 180 r/min。

2.2.3 培养时最佳接种量的确定

将菌株 SY16 接种在装有 50 mL pH8.0 的 HDM 培养基的 250 mL 锥形瓶中，以不同接种量接种，30 ℃、180 r/min 培养 12 h，测定其生物量，以接种量为横坐标，生物量为纵坐标作图得 SY16 不同接种量的生长曲线(Fig.4)。结果显示，在接种量由 0.1%增加到 1.0%时，随着接种量的增加，生物量明显增加；接种量大于 1.0%后，生物量不再增加，所以 SY16 的最佳接种量为 1.0%。

2.3 SY16 对不同正烷烃的降解效率

分别以正十烷、正十二烷、正十六烷和正十八烷作为 HDM 培养基中的唯一碳源，初始 pH 为 8.0，接种量为 1%，在 30 ℃、180 r/min 培养，间隔 4 h 取样测定培养基中残留的正烷烃的量。以培养时间为横坐标，以培养基中残留的正烷烃的量为纵坐标，作图得正烷烃的降解率曲线（Fig.5—8）。结果表明，SY16 对正烷烃的降解效

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

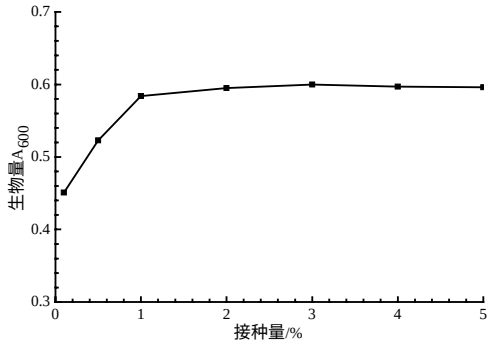

Fig. 4 Effect of inoculum cancentation on growth curves of SY16

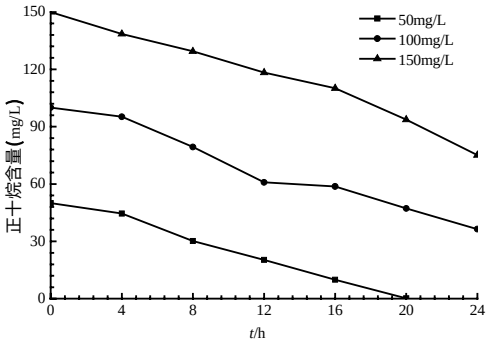

Fig. 5 Degradation rat of n-decane by SY16

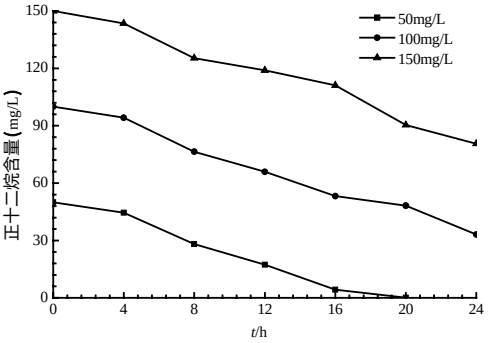

Fig. 6 Degradation rat of n-dodecane by SY16

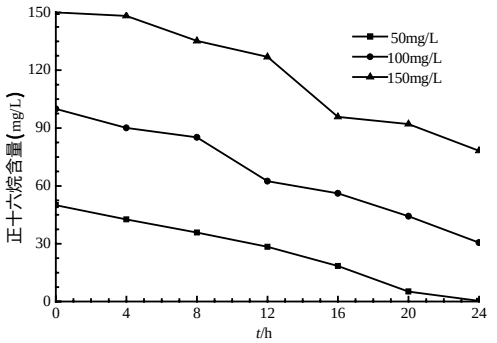

Fig. 7 Degradation rat of n-pentadecane by SY16

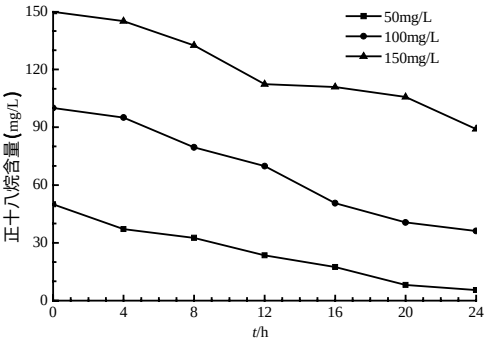

Fig. 8 Degradation rat of n-hexadecane by SY16

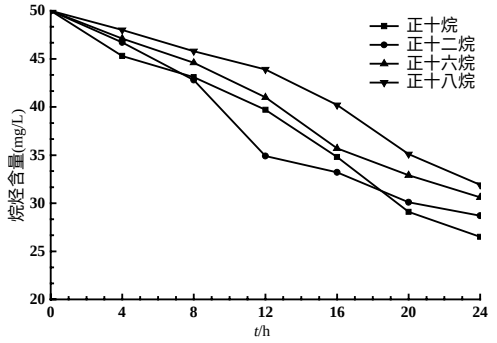

Fig. 9 Degradation rat of mixed saturated hydrocarbon by SY16

果非常显著。

2.4 SY16 对混合正烷烃的降解效率

以正十烷、正十二烷、正十六烷和正十八烷作为 HDM 培养基中的混合碳源，质量浓度均为 50 mg/L，培养基初始 pH 为 8.0，接种量为 1%，在 30 ℃、180 r/min 培养，间隔 4 h 取样测定培养基中残留的正烷烃的量。以培养时间为横坐标，以培养基中残留的正烷烃的量为纵坐标，作图得各正烷烃的降解率曲线（Fig.9）。结果表明，SY16 对混合烷烃的降解效果良好，且对所降解的烷烃没有选择性。这进一步说明 SY16 可广阔的应用与各种烷烃所引起的污染的治理工作中。

2.5 SY16 的初步鉴定

菌株 SY16 为杆状菌，G-，需氧，极生单鞭毛，乳白色圆形菌落，表面有褶皱，具有硝酸盐的反硝化作用，氧化酶阳性，可利用淀粉、不能

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

利用明胶，可利用葡萄糖不能利用海藻糖，根据《伯杰细菌分类手册》这些均符合施氏假单胞杆菌的特征，施氏假单胞杆菌(Pseudomonas stutzeri)。菌株 SY16 的 16S rDNA 的系统进化分析正在进行中。

3 讨论

（1）通过筛选，获得一株在好氧条件下对烷烃有较强降解能力的菌株 SY16.经鉴定为施氏假单胞杆菌(*Pseudomonas stutzeri*)。*Pseudomonas stutzeri* 是土壤中一类具有重要意义的环境修复微生物。根据文献报道，它还是多种具有矿化芳香烃化合物(有机磷农药甲基对硫磷、菊酯等)能力的质粒的天然宿主，并且具有适应多种环境压力的机制，抗逆性强。

（2）通过生长条件优化得出 SY16 的最适生长条件为 30 ℃，培养基初始 pH=8.0，摇床转速(间接反映好氧量)180 r/min，接种量为 1.0%。

（3）在最适生长条件下，SY16 降解单一正烷烃的能力显著，当培养基中初始正烷烃含量为 50 mg/L 时，24 h 能全部降解。当混合烷烃中各烷烃的初始质量浓度为 50 mg/L 时，在 24 h 对正十烷、正十二烷、正十六烷和正十八烷的降解率分别达到 47.0%、42.6%、38.8%、36.2%。

参考文献：

[1] 曹微寰, 徐德强, 张亚雷等, 烷烃降解菌的筛选及其降解能力[J]. 中国环境科学, 2003,23(1)：25-29.
CAO Weihuan, XU Deqiang, ZHANG Yalei, et al, Screening of alkane degrading bacterium strains and their degradation capability[J]. China Environmental Science, 2003,23(1)：25-29.

[2] 罗湘南, 罗人明, 陈天培等, 石油烃类降解菌分离筛选及其特性的实验[J]. 环境科学与技术, 2003,26(04):15-17.
LUO Xiangnan, LUO Renming, CHEN Tianpei, et al, Screening of Lubricating Oil-degrading Strains and Studies on Their Degradation Ability[J], Environmental Science and Technology, 2003, 26(04): 15-17.

[3] 李丽, 张利平, 张元亮, 石油烃类化合物降解菌的研究概况[J]. 微生物学通报, 2001, 28(05):81-92.
LI Li, ZHANG Yuanping, ZHANG Yuanliang, Research Progress of hydrocarbon-degrading bacteria[J], Microbiology, 2001, 28(05): 81-92.

[4] 易绍金, 刁浪滔, 石油烃降解菌菌数测定方法评述[J]. 石油与天然气化工, 2004, 33(03):206-216.
YI Shaojin, DIAO Langtao, The comment on the measuring ways of the becterial cell population of the hydrocarbon bacteria[J], Chemical engineering of oil & gas, 2004, 33(03):206-216.

[5] 易绍金, 细菌瓶法用于石油烃降解菌菌数测定[J]. 油田化学, 2001, 18(04):372-374.
YI Shaojin, Determination of bacterial cell population for hydrocarbon-degrading bacteria by using culture flask test[J], Oilfield chemistry, 2001, 18(04):372-374.

[6] 陈勇, 郑向群, 张从等, 降解菌对堆肥中多环芳烃降解作用的初步研究[J]. 农业环境保护, 2000, 19(1):53-55.
CHEN Yong, ZHENG Xiangqun, ZHANG Cong, et al, Primary study on degradation of the polycyclic aromatic hydrocarbon in compost by bacteria[J], Agroenvironmental Protection, 2000, 19(1):53-55.

[7] 潘学芳, 倪秀珍, 王浩, 烃类降解菌株的分离筛选及鉴定[J]. 长春师范学院学报, 2001, 20(2):56-58.
PAN Xuefang, NI Xiu-zhen, WANG Hao, Isolation and identification of a hydrocarbons-degrading strain[J], Journal of chang chun teachers college, 2001, 20(2):56-58.

[8] YIN Shen, LESTER G. Stehmeier, Gerrit Voordouw, Identification of hydrocarbon-degrading bacteria in soil by reverse sample genome probing[J]. Applied and environmental microbiology, 1998. 64(2): 637-645.

Isolation, characterization, and alkane degradation potential of hydrocarbon-degrading bacteria SY16

LU Yamei，JIANG Huizhong，WANG Xiansheng

School of Resources and Environment, Jilin University, Changchun 130026, China

Abstract：In the process of production and transportation of crude oil, soil around oil wells is easy to be contaminated by crude oil, and environment may be damaged. For solving the problem of soil contamination at oilfield, microbiological degradation for hydrocarbon is studied experimentally. Using Hydrocarbon degradation medium (HDM) which contains n-hexadecane as the sole carbon source, one hydrocarbon-degrading Bacteria, which have high degrading capacity for n-alkanes, are isolated and screened out from soil from Fuyu oilfield. Through morphological observation and character studies of physiology and biochemistry, the strains SY16 are identified as *Pseudomonas stutzeri*. By tests in shaking flasks, it is determined that the conditions of growth for the strain is 30 ℃, with shaker rotary speed 180r/min, and inoculum amount 1.0%, and the initial pH of HDB is 8.0. Under these conditions for optimum growth, the degradation rate experiments on different initial concentrations of alkanes are carried out. The results indicate that the ability of SY16 for degrading n-alkanes is marked. The n-alkanes can be degraded almost 100% if the initial concentration at about 50mg/L in HDB. With the initial concentration of individual compound in the alkanes mixture at about 50mg/L, the degrading rates of n-decane, n-dodecane, n-pentadecane and n-hexadecane are 47.0%, 42.6%, 38.8% and 36.2%, respectively.

Key words：petroleum pollution; biological renovation; hydrocarbon-degrading bacteria; *Pseudomonas stutzeri*

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net