

石油烃降解菌 *Rhodococcus* sp.15-3 的分离鉴定及特性研究

张璐¹, 赵硕伟², 李凤玲¹, 张 建¹, 沈 标¹

(1. 南京农业大学生命科学学院, 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 江苏 南京 210095; 2. 镇江市环保局, 江苏 镇江 212000)

摘 要:从原油污染土壤中分离筛选到一株石油烃降解菌 15-3, 根据其形态特征、生理生化特性及 16S rDNA 序列同源性分析, 将其初步鉴定为红球菌(*Rhodococcus* sp.)。采用室内培养的方法, 研究了 15-3 菌株对原油、原油中的烃类及正十八烷的降解作用。结果表明, 15-3 菌株能以正十八烷为惟一碳源生长, 在 48 h 内对 500 mg·L⁻¹ 的正十八烷降解率达 96.9%。15-3 菌株降解正十八烷的最适温度、pH 值和盐浓度(NaCl)分别为 30 ℃、7.0、2%, 在低温(10 ℃) 及高盐(4%~5% NaCl) 环境下也有良好的降解能力。15-3 菌株可以降解原油中 C₁₃~C₃₂ 的正构烷烃、芳香烃及姥鲛烷。在含 5 g·L⁻¹ 原油的培养基中, 30 ℃培养 5 d 后, 菌株 15-3 对原油的降解率为 60.3%, 对原油中 C₁₃~C₃₁ 烷烃的降解率均大于 90%, 对原油中芳香烃的降解率为 63.6%。该菌株以石蜡为惟一碳源生长时能产生表面活性剂, 将发酵液表面张力由 58.11 mN·m⁻¹ 降到 36.6 mN·m⁻¹, 表明菌株 15-3 具有较强的乳化和分散石油的能力。

关键词:红球菌; 分离鉴定; 石油生物降解

中图分类号:X172 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2008)05-1737-05

The Isolation and Characterizations of a Alkanes-Degrading Bacterium *Rhodococcus* sp 15-3.

ZHANG Lu¹, ZHAO Shuo-wei², LI Feng-ling¹, ZHANG Jian¹, SHEN Biao¹

(1. Open Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Zhenjiang Environmental Protection Bureau, Zhenjiang 212000, China)

Abstract: A bacterial strain 15-3 degrading aromatic and aliphatic hydrocarbons of oil was isolated from crude oil-polluted soils and identified as *Rhodococcus* sp. based on the 16S rDNA sequences and morphological, biochemical and physiological characteristics. Strain 15-3 could use n-octadecane as sole carbon resource and degrade 96.9% n-octadecane(500 mg·L⁻¹) after 48 h of incubation. The optimal temperature, pH and NaCl concentration for degrading n-octadecane by strain 15-3 were 30 ℃, pH7.0 and 2%NaCl respectively. It still had high ability to degrade n-octadecane even at low-temperature(10 ℃) and high-salinity(4%~5% NaCl). Strain 15-3 could degrade C₁₃~C₃₂ n-alkanes, pristine and aromatic hydrocarbon in the crude oil. In the media containing 5 g·L⁻¹ crude oil strain 15-3 degraded 60.33% crude oil, more than 90% C₁₃~C₃₁ n-alkanes and 63.61% aromatic hydrocarbons at 30 ℃ and 5 d incubation. The biosurfactants were produced by strain 15-3 in the degradation of paraffin with the decrease of surface tension from 58.11 mN·m⁻¹ to 36.6 mN·m⁻¹, which implying that strain 15-3 had the abilities for emulsification and dispersancy to crude oil.

Keywords: *Rhodococcus* sp.; isolation and identification; oil biodegradation

石油污染目前已成为世界公害之一, 每年全世界都有大量的石油作为污染物进入环境, 污染水体、土

壤和大气。石油是由不同碳氢化合物组成的混合物, 其组成成分的差异直接影响其生物降解率。其中饱和烃的降解率最高, 其次是低分子量的芳香族烃类化合物, 高分子量的芳香族烃类化合物、树脂和沥青质则难降解^[1]。生物修复是新近发展起来的一项净化环境的低投资、高效益、便于应用、发展潜力较大的新型技术^[2]。目前, 石油污染物生物降解的研究主要集中在高效石油降解菌株的筛选及高效降解工艺的研究上, 其

收稿日期: 2007-11-20

基金项目: 科技部农业微生物菌种资源整理整合及共享试点 (2005DKA21201-11)

作者简介: 张璐(1983—), 女, 硕士研究生, 主要从事环境微生物学研究。E-mail: 2005116050@njau.edu.cn

通讯联系人: 沈 标 E-mail: shenbiao@njau.edu.cn

主要目的是提高石油中难降解组分的清除效率,加快石油污染环境的修复进程。

目前已有大量的石油降解菌被报道^[3-5],在国外利用表面活性剂增溶原理去除污染土壤中的石油烃类物质,也有报道^[6],且应用性更广。但是具有石油降解性能高、降解谱广、兼有乳化性能,产生生物表面活性剂,又能适应低温、高盐、贫营养等极端环境的微生物还很少,实际可以应用到生物修复中的高效菌株更少,如何筛选到降解谱宽而且效率高的菌株仍是亟需解决的问题。

本实验从原油污染土壤中分离筛选到一株广谱降解石油烃的菌株,能降解长、短链烷烃,支链烷烃和芳香烃,并可产生表面活性剂,具有较强的去污、乳化和分散石油的能力。通过对其生长特点及降解性能的研究,以期为该菌株的生物修复应用提供理论依据和技术措施。

1 材料与方法

1.1 取样、试剂和培养基

土壤样品:从胜利油田油井附近长期含有高浓度石油烃的污染现场采样,土壤样品为 5 点混合样品,采样深度为 0~20 cm,每个土壤样品重 1 kg。样品带回室内,除去根系、石块等杂物,再过 4 mm 筛,保存在 4℃冰箱。供试土壤理化性质见表 1。

表 1 供试土壤的理化性质及含油组分

Table 1 Physico-chemical properties of soils、the oil concentration and fraction percents

土壤类型	pH	含水量 / g·kg ⁻¹	全 N / g·kg ⁻¹	全 P / g·kg ⁻¹	含油量 / g·kg ⁻¹	饱和烃 / %	芳香烃 / %
潮土	6.4	3.82	0.69	0.53	23	51	31

高蜡原油来自山东胜利油田,正十八烷购自德国 fluka 公司,其余试剂均为分析纯。

无机盐培养基^[7](MM):NH₄NO₃ 1 g, K₂HPO₄·3H₂O 1 g, KH₂PO₄·H₂O 1 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, NaCl 1 g, CaCl₂ 0.02 g, FeCl₃ 0.03 g, 去离子水 1 L, pH7.2。

富集分离培养基(FJ):在 MM 培养基中添加 5 g·L⁻¹ 的高蜡原油做为惟一碳源。

烷烃培养基:在 MM 培养基中添加 0.5 g·L⁻¹ 的正十八烷做为惟一碳源。

发酵石蜡培养基:在 MM 培养基中添加 20 mL·L⁻¹ 石蜡做为惟一碳源。

LB 培养基:胰蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, NaCl 10 g, 去离子水 1 L。

1.2 菌株的富集和分离

取 3 g 土样置于 50 mL 富集培养基中,于 170 r·min⁻¹, 30℃培养 5 d,以 1%的接种量接到相同的培养基中,转接 3 次,取富集液进行梯度稀释并涂布于 LB 平板,30℃培养 36 h 后,挑取单菌落接种到单一烷烃培养基中,培养 3 d,检测其降解效果。

1.3 菌株的鉴定

对分离纯化得到的菌株进行菌体形态观察、生理生化试验(方法参见文献[8])及 16S rDNA 序列同源性比对分析等,确定其分类地位。菌株的 16S rDNA 克隆参照文献[9]。采用 PCR 回收试剂盒回收扩增到的 1.5 kb 左右的片段,酶连到 pMD19-T 载体上,转化至 *E. coli* DH5α,通过蓝白斑挑选阳性转化子,培养后提取质粒,酶切验证插入片段的大小。测序由 Invitrogen 公司完成。将测序结果在 NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov) 中与 Genbank 的 16S rDNA 序列进行同源性比对分析,采用邻接法构建系统发育树。

1.4 测定方法

1.4.1 原油降解率测定

用紫外分光光度法^[10]和重量法^[11,12],测定菌株对原油中芳香烃的降解率和对原油总量的降解率。

1.4.2 烷烃降解谱的测定

在 FJ 培养液中加入 5 mL 正己烷及用正己烷溶解的 10 000 mg·L⁻¹ 的非(内标)25 μL,充分振荡溶解后离心。用正己烷对萃取液重复萃取两次,合并萃取液后定容至 25 mL,用干燥的无水硫酸钠脱水,取 1 μL 上清液进行 GC-MS 测定。气相色谱仪为 Thermo trace GC ULTRA,色谱柱为 TRB-5, FID 检测器。色谱条件:80℃保持 5 min,以 3℃·min⁻¹ 升至 165℃,保持 2 min,然后以 5℃·min⁻¹ 升至 270℃,保持 10 min。进样口温度 250℃,检测器温度 280℃,无分流比。

1.4.3 正十八烷的测定

在烷烃培养液中加入 5 mL 色谱纯正己烷及 15 μL 正十五烷(内标),充分振荡萃取后,于 4℃10 000 r·min⁻¹ 离心 5 min。吸取上清液至 20 mL 刻度试管中,残液用 5 mL 正己烷重复萃取两次,合并后定容至 15 mL。稀释 10 倍后用干燥的无水硫酸钠脱水,取 1 μL 进行气相色谱测定。气相色谱仪为 OV101,色谱柱为 SPB-5, FID 检测器。色谱条件:130℃保持 5 min,以 10℃·min⁻¹ 升至 220℃,保持 5 min。进样口、检测器温度均为 250℃。

1.4.4 表面张力的测定

每间隔 8 h 取培养后的 30 mL 石蜡培养液,采用

分光光度计于 600 nm 处测细菌生长量,12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 去除菌体,用 JYW-200A 自动界面张力仪(承德实验机有限责任公司)测上清液的表面张力。

2 结果与讨论

2.1 降解菌株的分离与鉴定

从石油污染土壤富集液中筛选到一株能同时降解石油中烷烃和芳香烃的细菌,命名为 15-3。在 LB 平板上菌落为杏黄色、圆形、不透明、边缘整齐、表面隆起、湿润光滑。菌体呈短杆状,无鞭毛,革兰氏染色阳性,甲基红和 V.P.反应阴性,过氧化氢酶和接触酶测定阳性,氧化酶测定阴性,不能利用硝酸盐,能利用含硫氨基酸产生 H₂S,不能水解明胶和淀粉,能利用柠檬酸盐,吡啶实验呈阴性,乳糖发酵不产酸、不产气。

根据 15-3 菌株及相关菌株的 16S rDNA 序列(Genebank 登录号:EU103623)构建的系统发育树见图 1。菌株 15-3 与 *Rhodococcus baikonurensis* AB071951^T 的相似性在 98%。根据 16S rDNA 序列,结合生理生化特性将 15-3 鉴定为红球菌属。

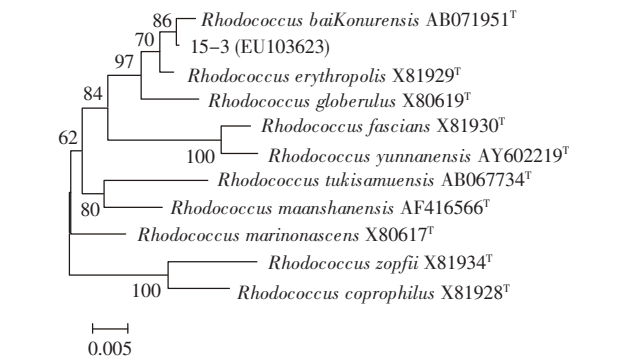


图 1 根据 15-3 及其 *Rhodococcus* 中的模式菌株的 16S rDNA 序列采用邻接法构建的的系统发育树

Figure 1 The neighbor-joining phylogenetic tree based on the 16S rDNAs of 15-3 and type strains of *Rhodococcus* sp. (Numbers at nodes are percentage bootstrap values based on 1 000 repeats (only values greater than 50% are shown). Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.)

2.2 15-3 对原油的降解及对石油烃降解谱的测定

在 FJ 培养基中以 1%接种量($A_{600\text{nm}} \approx 2.00$)接入 15-3,30 ℃、170 r·min⁻¹ 下培养 5 d 后测定 15-3 对原油的降解。表 2 显示石油中芳香烃的降解率为 63.61%。另外用重量法测定的原油的降解率为 60.33%,原油的大部分已得到分解代谢。

15-3 以 1%接种量($A_{600\text{nm}} \approx 2.00$)接到 FJ 培养基

于 30 ℃培养 5 d 后通过 GC 对石油烃降解谱进行测定。从图 2 可以看出,15-3 有着很宽的烷烃降解谱,能降解 C₁₃~C₃₂ 的正构烷烃。结果表明除 C₃₂ 降解率略低,C₁₃~C₃₁ 的降解率都大于 90%。同时对支链烷烃姥鲛烷的降解率也接近 50%,但不能降解植烷。

目前已报道的降解烷烃的菌株有许多,如曹微寰等^[5,13] 分离到的一株诺卡氏菌 C-14-1 对低浓度(2 mg·L⁻¹)的正构烷烃系列降解效果好,但对高浓度的降解效率却较低;Whyte LG 等分离到的 *Rhodococcus* sp. Q15^[14]降解柴油中的 C₁₀~C₂₁ 烷烃周期长,对 C₂₈、C₃₂ 降解不完全,也不能降解萘及其衍生物和包括姥鲛烷在内的支链烷烃。而 15-3 对原油中的饱和脂肪烃、芳香烃及原油总体的降解效率都较高。

表 2 15-3 对原油的降解率
Table 2 Ratio of degradation of oil by 15-3

15-3	紫外分光光度法	重量法
降解率/%	63.61	60.33

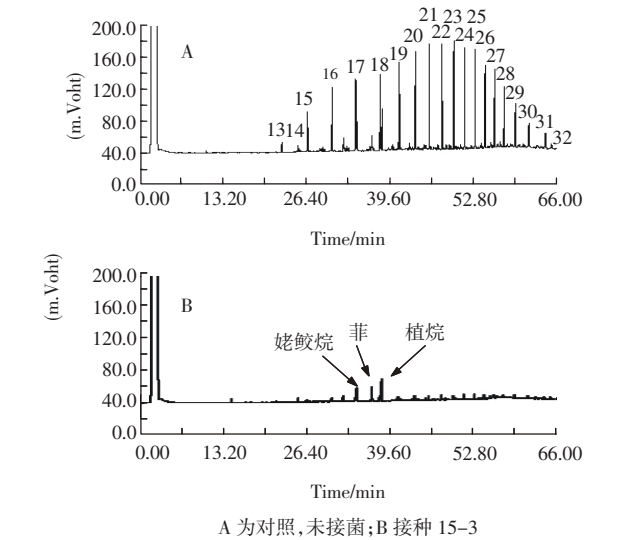


图 2 菌株 15-3 对原油中不同烷烃组分的降解
Figure 2 GC degradation profiles of alkanes in crude oil by strain 15-3

2.3 15-3 以十八烷为惟一碳源的生长及降解试验

在烷烃培养基中以 1%接种量($A_{600\text{nm}} \approx 2.00$)接入 15-3,置于 30 ℃、pH 7 及盐浓度 2%下培养,间隔 8 h 取样,测定培养液的 $A_{600\text{nm}}$ 及残留的正十八烷浓度,以确定 15-3 的生长与正十八烷降解之间的关系,结果见图 3。15-3 在正十八烷的培养基中,延迟期约为 8 h,随后生长迅速,至 56 h,生长量达到最大。生长量和正十八烷的降解是相平行的。在培养至 40 h,正十八烷的降解已达到约 90%,OD 值为 0.9。其后,

菌株出现了再一次明显的生长现象,OD_{600 nm} 在 48 h 达到 1.182,而降解率略升高到 96.94%。也许是长链烷烃分解成的短链烷烃为菌株的进一步生长提供了碳源。

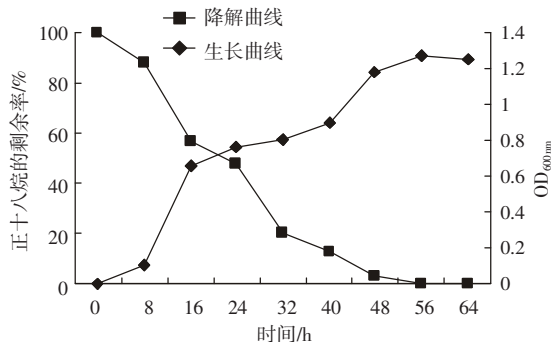


图 3 以正十八烷为惟一碳源时 15-3 的生长和降解曲线
Figure 3 Growth and degrading curve of 15-3 in the medium with n-octadecane as sole carbon resource

2.4 温度、pH 及盐浓度对 15-3 降解正十八烷的影响

将菌株接种于 30 mL 烷烃培养基中,分别在不同温度(10、20、30、37、42 ℃)、pH(4、5、6、7、8、9、10)及盐浓度(0、1%、2%、3%、4%、5%、10% NaCl)下 170 r·min⁻¹ 培养 48 h,测定正十八烷的降解率。结果见图 4~图 6。结果表明 15-3 菌株降解正十八烷的最适温度为 30 ℃,最适 pH 为 pH 6.0~7.0,但其在 10~30 ℃及 pH 5.0~9.0 范围内都具有较好的降解能力。在 10 ℃时,十八烷的降解率仍然达到 90%。15-3 菌株在盐浓度 0~3% NaCl 范围内降解正十八烷的能力较强,在 4%~5% 的高盐条件下,正十八烷的降解率仍在 50% 以上。与其他许多报道的降解石油或烷烃的菌株相比,其环境适应能力强,能在低温及高盐条件下也具有较好的降解能力,显示其在石油污染生物修复中的良好潜力。

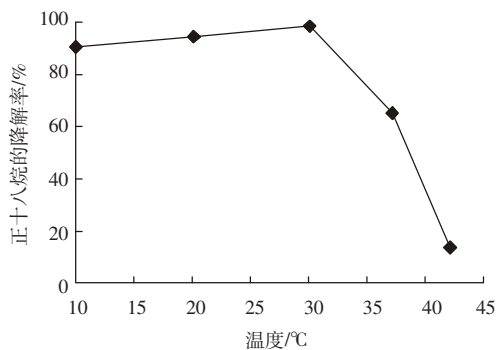


图 4 温度对 15-3 菌株降解正十八烷的影响
Figure 4 The effect of temperature on the alkane degradation by strain 15-3

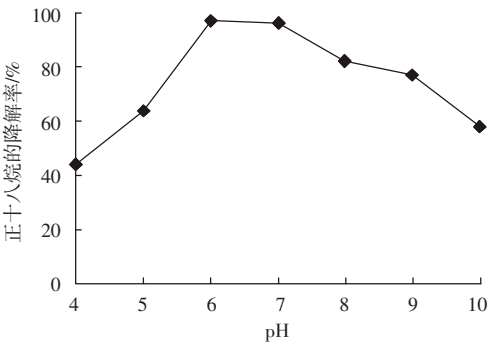


图 5 pH 对 15-3 菌株降解正十八烷的影响
Figure 5 The effect of pH on the alkane degradation by strain 15-3

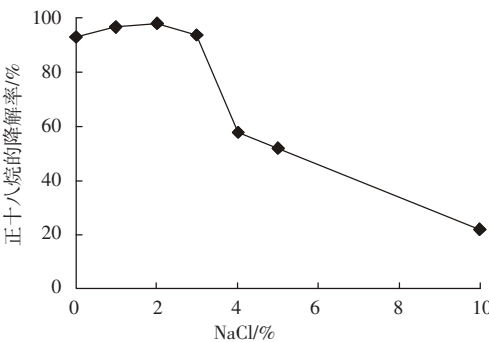


图 6 盐浓度对 15-3 菌株降解正十八烷的影响
Figure 6 The effect of NaCl on the alkane degradation by strain 15-3

2.5 15-3 的生长与培养基表面张力降低之间的关系

在石蜡发酵培养基中以 1%接种量($A_{600\text{ nm}} \approx 2.00$)接入 15-3,置于 30 ℃培养,间隔 8 h 取样测定 $A_{600\text{ nm}}$ 及表面张力,结果见图 7。发酵液的表面张力开始时随细菌生长量的增加而降低,在前 16 h 表面张力降低得很快,在表面张力下降的同时,菌株进入对数生长期。随着细菌生长进入稳定期后,发酵液表面张力趋于稳定,在 16 h 和 56 h 表面张力分别降到 40.13 和 36.6 mN·m⁻¹,OD_{600 nm} 分别为 0.56 和 1.33。可见菌株的生长和表面活性剂的产生密切相关的。

有文献表明^[15],生物表面活性剂的存在,可提高石油类物质在培养基中的乳化度和分散程度,提供石油液滴与培养液中细菌更多的接触机会,对降解有一定的促进作用。本菌株对石油的高降解率及短周期可能与其产生的生物表面活性剂提高石油的密切相关。如果将这种多功能菌株应用于石油污染土壤的生物修复中,将会提高土壤和菌株间污染物的传质速率,从而缩短其修复周期,提高修复效率^[16]。而且这种降解速度快,降解种类多,抗逆性强,并产生生物表面活性剂的环境安全菌株的应用价值更高。

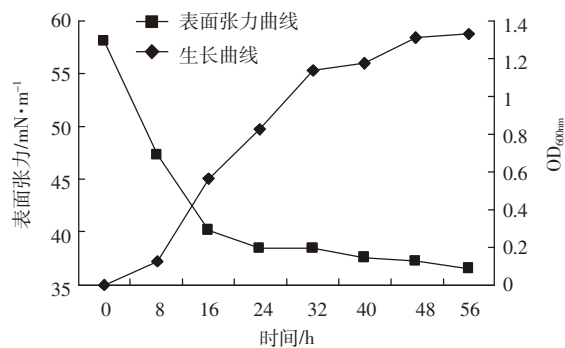


图 7 发酵培养基中 15-3 的生长和表面张力变化曲线

Figure 7 Growth and decreasing curve of 15-3 in fermentation media

3 结论

(1)本研究从原油污染土壤中分离到 1 株广谱石油烃降解菌 15-3,初步鉴定为 *Rhodococcus* sp.,最适条件下培养 48 h 内对 500 mg·L⁻¹ 的正十八烷降解率达 96.9%。

(2)15-3 菌株对石油中 C₁₃~C₃₁ 的降解率均在 90%以上,对姥鲛烷的降解率达到 50%;对原油的降解率为 60.33%;对原油中芳香烃的降解率为 63.61%。

(3)降解正十八烷的最适温度为 30℃、pH 值为 7.0 和盐浓度(NaCl)为 2%,在低温和高盐碱条件下仍具有良好的降解能力。

(4)15-3 降解烷烃的同时能迅速产生生物表面活性剂,使表面张力由 58.11 mN·m⁻¹ 下降到 36.6 mN·m⁻¹。

参考文献:

- [1] 李 丽,张利平,张元亮. 石油烃类化合物降解菌的研究概况[J]. 微生物通报,2001, 28(5):89-92.
LI Li, ZHANG Li-ping, ZHANG Yuan-liang. Proceeding of degrading microganisms of oil hydrocarbons[J]. *Microbiloogy*, 2001, 28(5):89-92.
- [2] Duval M N, et al. Bioremediation of polluted soils from former coal industries and gas sites[J]. *Feul and Energy Abstracts*, 1997, 38(3):184.
- [3] Norman R S, Frontera-Suau R, Morris P J. Variability in *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide expression during crude oil degradation [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(10):5096-5103.
- [4] Sakai Y, Maeng J H, Tani Y, et al. Use of long-chain n-alkanes(C₁₃-C₄₄) by an isolate, *Acinetobacter* sp. M-1[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*,

1994, 58:2128-2130.

- [5] 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 Wei-huan, XU De-qiang, ZHANG Ya-lei, et al. Screening of alkane degrading bacterium strains and their degradation capability[J]. *China Environmental Science*, 2003, 23(1):25-29.
- [6] Osterreicher-Ravid D, Ron E Z, Rosenberg E. Horizontal transfer of an exopolymer complex from one bacterial species to another [J]. *Environ Microbiol*, 2000, 2:366-372.
- [7] Bushnell L D, Haas H F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms [J]. *Journal of Bacteriology*, 1941, 41(5):653-673.
- [8] 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. 370-410.
DONG Xiu-zhu, CAI Miao-ying. Systematic identification manual of familiar bacteriums[M]. Beijing: Sience Press, 2001. 370-410.
- [9] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆[M]. (第 3 版). 北京:科学出版社, 2003.
Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: A laboratory manual (In Chinese)[M](3rd ed). Beijing: Science Press, 2003.
- [10] 奚旦立,孙裕生,刘秀英. 环境监测[M]. (修订版).北京: 高等教育出版社, 1995. 389-407.
XI Dan-li, SUN Yu-sheng, LIU Xiu-ying. Environmental Monitoring [M]. (revision), Beijing: Higher Education Press, 1995. 389-407.
- [11] 詹秀美,吴丽卿. 重量法测定海水中的石油烃. 海洋污染物分析方法[M]. 北京:海洋出版社, 1992.55-58.
ZHANG Xiu-mei, WU Li-qing. Mensurating oil hydrocarbons of seawater by weight. Analysis of oceanic contamination [M]. Beijing: Ocean Press, 1992.55-58.
- [12] Ijah U J J, Ukpe L I. Biodegradation of crude oil by *Bacillus* strains 28A and 61B isolated from oil spilled soil[J]. *Waste Management*, 1992, 12(1):55-60.
- [13] 张亚雷,徐德强,曹微寰,等. 烷烃高效降解菌的广谱降解性能研究[J]. 环境科学, 2006, 27(3):578-581.
ZHANG Ya-lei, XU De-qiang, CAO Wei-huan. Broad-spectrum degradation capability of a high-efficiency alkanes degrading bacterium strain[J]. *China Environmental Science*, 2006, 27(3):578-581.
- [14] Whyte L G, Hawari J, Zhou E. Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low temperatures by a psychrotrophic *Rhodococcus* sp. [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64:2578-2584.
- [15] Stefan J G. Quantifying the biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas Stutzeri* P60 in the presence of a nonionic surfactant[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(7):2387-2397.
- [16] Kingsley U, Steve G, Turgay P, et al. A comparison of the wfficiency of sifferent aurfactants for removal of crude oil from contaminated soils[J]. *Chemosphere*, 2006, 62: 1403-1410.