

柴油降解菌的筛选及其降解特性研究

武金装, 刘红玉, 曾光明, 刘伟, 张利, 贾彩云

(湖南大学环境科学与工程学院, 长沙 410082)

摘要:采用生物驯化法,从石油污染土壤中以 0# 柴油为惟一碳源通过富集培养分离筛选出 9 株菌。利用紫外分光光度法对菌株降解能力进行测定,发现一株菌在柴油初始浓度为 500 mg·L⁻¹ 的培养液中,振荡培养 3 d 降解率达到了 71.7%,具有开发潜力,可以提高石油污染土壤生物修复效率。通过对其形态特征和生理生化特性的分析,初步鉴定该菌株为假单胞菌属。并分析了培养时间、pH 值、接种量、温度、柴油浓度、N 源 6 个因素对菌株生长量和柴油降解率的影响。结果表明,该菌株在培养时间为 6 d、pH 值为 5.0、接种量为 5%、温度为 35 ℃、柴油浓度为 1 000 mg·L⁻¹、N 源为(NH₄)₂SO₄ 的条件下生长旺盛,降解率达到了 80%。

关键词:柴油降解菌;筛选;生物修复;生长量;降解率

中图分类号:X172 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2008)05-1742-05

Isolation of Oil Degradation Bacteria and Its Characteristics in Bio-degradation to Diesel Oil

WU Jin-zhuang, LIU Hong-yu, ZENG Guang-ming, LIU Wei, ZHANG Li, JIA Cai-yun

(College of Environmental Science and Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China)

Abstract: In order to enhance the bioremediation of oil-contaminated soil, nine diesel oil degradable strains were obtained from oil-contaminated soil by using screening cultural medium method which using 0# diesel oil as the sole carbon source. The degradation ratio of diesel oil by the strains was tested by using ultraviolet spectrometry method. One of the strains showed potential for further utilization with a degradation ratio of diesel oil by 71.7% incubating for 3 days in an culture medium with initial diesel oil concentration by 500 mg·L⁻¹. Based on the morphological, physiological and biochemical test results, the strain was identified as *Pseudomonas* sp.. And six factors that affect the strain growth and the degradation ratio to diesel oil, such as pH value of the culture medium, temperature, inoculation amount, N source, initial diesel oil concentration and incubation time, were also studied in the proposed paper. The result showed that the optimum culture condition for *Pseudomonas* sp. strain was pH5.0, inoculation by 5%, (NH₄)₂SO₄ as the N source in the culture medium and incubation under 30 ℃. When the proposed strain grows under this condition, 80% of the diesel oil could be degraded with an initial concentration of 1 000 mg·L⁻¹ and incubating for 6 d.

Keywords: diesel oil degradable bacteria; screening; bioremediation; growth; degradation ratio;

土壤中存在大量依靠有机物生活的微生物,如细菌、真菌、放线菌等,它们具有氧化分解有机物的巨大能力^[1]。在受到石油污染后,一些微生物在污染物的诱导下产生分解污染物的酶系,可将污染物降解转化。由于微生物治理技术费用低、对环境影响小、适用范围广等优点^[2],因此微生物修复技术被认为比物理和化学处理方法更具发展前途的高新技术^[3,4]。现在已

经成为土壤污染治理的热点。本研究从受石油污染土壤中筛选分离出 9 株菌,并对一株降解能力强的菌株进行了初步的鉴定,分析了影响其降解能力的几种因素,以应用于石油污染土壤的生物修复。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

土样采自长沙市某炼油厂排污口。

1.1.2 培养基的配制

富集培养基:葡萄糖 10 g,蛋白胨 5 g,NaCl 5 g,

收稿日期:2007-09-17

作者简介:武金装(1983—),女,湖南浏阳人,硕士研究生,主要从事环境微生物方面的研究。E-mail:wujinzhuang 2006@126.com

通讯作者:刘红玉

H₂O 1 000 mL,pH 7.2~7.4。

无机盐培养基:(NH₄)₂SO₄ 1 g,KH₂PO₄ 1 g,Na₂HPO₄ 1 g,CaCl₂ 0.1 g,NaCl 2 g,MgSO₄ 0.2 g,FeSO₄·7H₂O 0.01 g,H₂O 1 000 mL,pH 7.0。

平板培养基: 在无机盐培养基的基础上添加 20 g·L⁻¹ 的琼脂。

斜面培养基: 葡萄糖 10 g,蛋白胨 5 g,NaCl 5 g,琼脂 20 g,H₂O 1 000 mL。

1.2 方法

1.2.1 土样的前处理

称取土样 10 g 加入到装有 100 mL 无菌水的 250 mL 锥形瓶中,置于培养箱中振荡 3~4 h(30 ℃,150 r·min⁻¹),使土样中的细菌分散于水中,静置 30 min。

1.2.2 降解菌株的筛选

吸取 1 mL 土壤悬浮液接种于柴油浓度为 500 mg·L⁻¹ 的富集培养液中,30 ℃,150 r·min⁻¹ 摇床培养 5 d,再以 5% 的接种量如此连续富集培养 3 次,柴油浓度逐级增加为 1 000、1 500、2 000 mg·L⁻¹。将最终富集液稀释到 10⁻¹、10⁻²、10⁻³ 倍用涂抹玻璃棒分别涂布在无机盐平板进行分离纯化,筛选出 9 株菌。将这 9 株菌株进行平板划线分离纯化直到长出单一菌落,纯化后的菌株保存在斜面培养基中。并于 4 ℃ 冰箱中保藏。

1.2.3 柴油标准曲线的绘制

将柴油配成 100 mg·L⁻¹ 的标准溶液,分别移取 0、1、2、3、4、5 mL 溶液于 10 mL 容量瓶中,用石油醚稀释定容。采用紫外分光光度法^[5]于 254 nm 处测标准油的吸光度。绘制标准曲线得到回归方程:y=0.009 5x+0.015 2,r²=0.997 8。

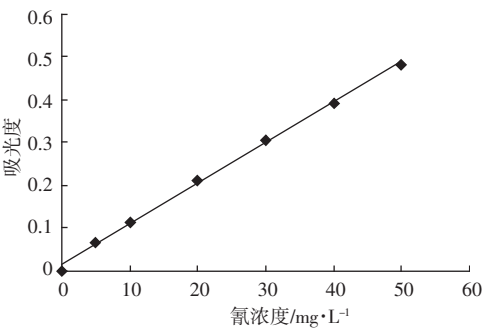


图 1 柴油标准曲线

Figure 1 The standard curve of the absorbency changing with the concentration of diesel oil

1.2.4 生长量和降解率的测定

细菌生长量采用菌悬液 OD₆₀₀ 间接反应,取 10 mL 培养液,5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,倾去上清液,

收集菌体并用无菌水洗涤两次,最后将收集到的湿菌体转入无菌水中形成均匀稳定的菌悬液,定容到 10 mL,以无菌水为参比,在紫外分光光度计 600 nm 处测定吸光度。

柴油含量采用紫外分光光度法测定。挑取斜面上菌株接入含有 500 mg·L⁻¹ 柴油的无机盐培养基内,30 ℃,150 r·min⁻¹ 摇床培养 3 d 后,加入石油醚(60~90 ℃沸程)萃取,并将培养液 5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 转入分液漏斗,静置分层,收集上清液。分别测定其含油量,通过标准曲线计算柴油的浓度。同时设置未接菌的液体柴油无机盐培养基作为对照。降解率计算公式:

$$\frac{\text{空白柴油浓度}-\text{培养液柴油浓度}}{\text{空白柴油浓度}}\times 100\%$$

1.2.5 菌株降解柴油的影响因素研究

将菌株在富集培养液中培养 24 h 后,按 5% 的量接种无机盐培养基中,初始 pH 值 7.0,初始含油量为 500 mg·L⁻¹,发酵温度 30 ℃,摇床转速 150 r·min⁻¹,分别进行以下几组处理测定生长量和降解率的变化:(1)每隔 24 h 取样测定培养时间对生长量和降解率的变化。(2)将初始 pH 值分别设为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0,3 d 后测定生长量和降解率的变化;(3)分别接种 5%、10%、15%、18%、20% 的富集液,3 d 后测定生长量和降解率的变化;(4)将温度分别设置为 25、30、35、37、40 ℃,3 d 后测定生长量和降解率的变化;(5)将柴油浓度分别设置为 500、1 000、1 500、2 000 mg·L⁻¹,3 d 后测定生长量和降解率的变化;(6)以无机盐培养基为基础,分别加入(NH₄)₂SO₄、NH₄NO₃、NaNO₃、CO(NH₂)₂、NH₄Cl 5 种氮源,3 d 后测定生长量和降解率的变化。(7)将菌株的培养时间、pH、接种量、温度、柴油浓度、N 源都设置为优化后的最佳条件,测定柴油的降解率。

1.2.6 降解菌株的鉴定

对菌株进行形态学观察和生理生化试验。试验参照文献[6]的方法进行。

2 结果与讨论

2.1 降解菌株的筛选

初筛得到有明显分解柴油能力的单菌株 9 株,当初始柴油浓度为 500 mg·L⁻¹,其中有一株对柴油的降解能力最强,3 d 内达到了 71.7%,故作为入选菌株,作进一步的鉴定和降解特性研究。

2.2 降解影响因素的研究

2.2.1 培养时间对生长量和降解率的影响

从图2中容易看出,培养时间对菌株的降解效果影响显著。随着培养时间的延长,柴油降解率逐渐提高,特别是在第3d,降解率迅速增加到52.78%,比第1d的21.52%提高了一倍多。这时产表面活性物质达到一定浓度,使油大量乳化,形成水包油乳化状,菌体充分与油滴接触,并吸收利用柴油。此后,降解率没什么变化,但在第6d时又有所提高,达到了73.09%。有资料表明,石油烃中的中长链饱和烃易于被微生物利用,而短链烷烃和芳烃等难于降解^[7]。所以这可能是菌株开始时利用了易于降解的烷烃类物质,而经过一段时间后才利用难于降解的芳香烃类物质。

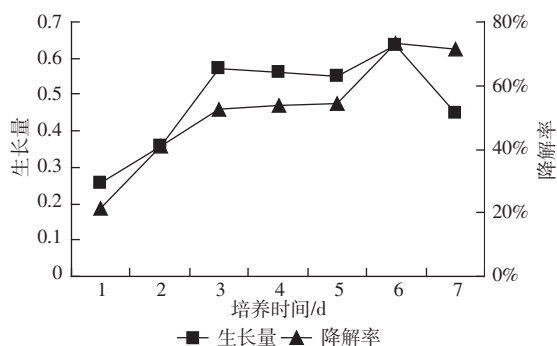


图2 培养时间对生长量和降解率的影响

Figure 2 Effects of incubating time on the strain growth and the degradation ratio of diesel oil

2.2.2 初始 pH 对生长量和降解率的影响

每种微生物都有生长繁殖的适宜 pH,当生存环境的 pH 不适合时,微生物生长代谢会受到抑制。这是因为随着 pH 值的变化,酶分子上的酸性及碱性氨基酸侧链基团处于不同的解离状态。具有催化活性的基团在总酶量中的比例不同使得酶分子的催化能力也不一样。由图3可知,菌株对 pH 值具有较广泛的适应范围,pH 从4~9均具有良好的适应性,降解率可达到60%以上,在 pH=5 的偏酸性条件下菌株生长情况最佳,对原油的降解能力也达到了68.5%。

2.2.3 接种量对生长量和降解率的影响

由图4可知,菌株最适宜的接种量是5%。以后接种量增加,降解率下降,最后趋于平缓。随着接种量的增加,其降解率越来越低主要原因可能是由于接种量过高时,微生物大量生长,菌密度大大增加,从而不利于单个菌的生长和产生表面活性剂,影响微生物对柴油的吸收降解。所以在降解实验中要根据菌种的不同而采用适宜的接种量,并非接种量越大越好。

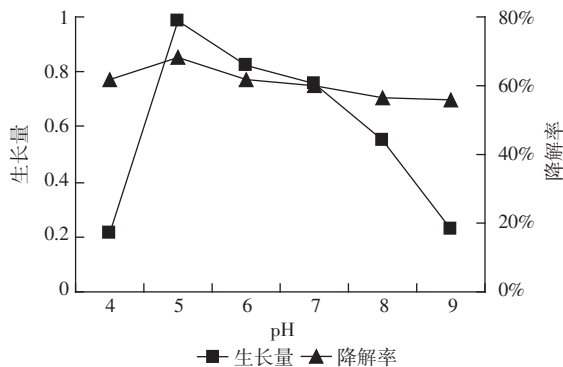


图3 初始 pH 对生长量和降解率的影响

Figure 3 Effect of initial pH on the strain growth and the degradation ratio of diesel oil

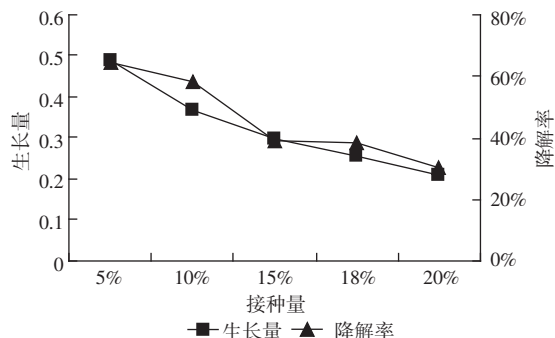


图4 接种量对生长量和降解率的影响

Figure 4 Effects of inoculation on the strain growth and the degradation ratio of diesel oil

2.2.4 温度对生长量和降解率的影响

有研究表明^[8~10],温度不仅会影响石油烃类的物理性质和化学组成,还影响微生物的代谢速度、酶活性以及种群组成,最终会影响石油烃的降解。由图5可知,菌株对温度的适应范围较广泛,在30~37℃时,降解率可达到50%以上,在这个范围内,随着温度的升高,生长情况的波动比较大,降解率也有所增加。

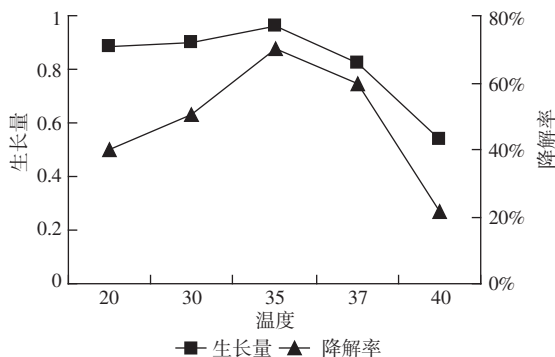


图5 温度对生长量和降解率的影响

Figure 5 Effects of temperature on the strain growth and the degradation ratio of diesel oil

35 ℃的时候生长量最大,此时的降解率也是最高的,达到了 70.01%。之后再升高温度,除油率反而明显降低(40 ℃时测得除油率仅为 21.5%)。另外,低温对原油降解也不利,当温度为 25 ℃除油效果明显下降,这是因为低温时部分细菌进入内源呼吸期,开始代谢自身细胞内的营养物质,菌株的生长、繁殖速率放缓,导致除油率下降。

2.2.5 柴油浓度对生长量和降解率的影响

油的浓度影响微生物的活性和毒性,油浓度过高会抑制微生物的活性^[11]。由图 6 可知,当柴油浓度为 1 000 mg·L⁻¹ 时,降解率最高,达到了 59.4%。以后随着浓度增加降解率下降,2 000 mg·L⁻¹ 时降解率仅为 35.9%。这是因为细菌接触原油后,首先进行强烈地乳化,降解过程中细菌集中在油水界面上,由于原油为细菌的生长提供了较好的碳源,因而随着原油浓度的增加,细菌大量生长繁殖,促进了对原油的生物降解,但当原油浓度过大时,有可能阻隔了菌体与氧气的接触,导致菌体不能良好地生长,从而使降解率下降。

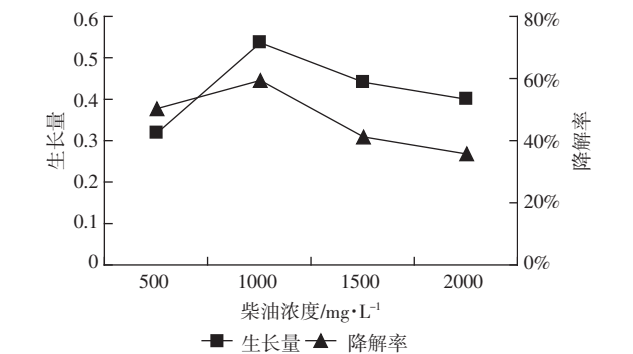


图 6 柴油浓度对生长量和降解率的影响
Figure 6 Effects of diesel oil concentration on the strain growth and the degradation ratio of diesel oil

2.2.6 不同 N 源对生长量和降解率的影响

添加营养盐有利于促进土壤中石油污染物的生物降解,在诸多因素中起着主要作用,而微生物对氮源的作用较敏感^[12,13]。且石油降解菌对氮源的形态有很强的选择性。从实验结果来看,几种氮源对菌株生长的促进作用大小依次为:(NH₄)₂SO₄ > NH₄Cl > NH₄NO₃ > NaNO₃ > CO(NH₂)₂。其中以(NH₄)₂SO₄为首选,作用机理有待进一步探讨。相对而言,无机氮源比有机氮源好,从理论上讲,有机氮源同时作为碳源,将优先于柴油被利用,从而妨碍了柴油的降解。所以选择(NH₄)₂SO₄为最佳氮源进行下一步研究。

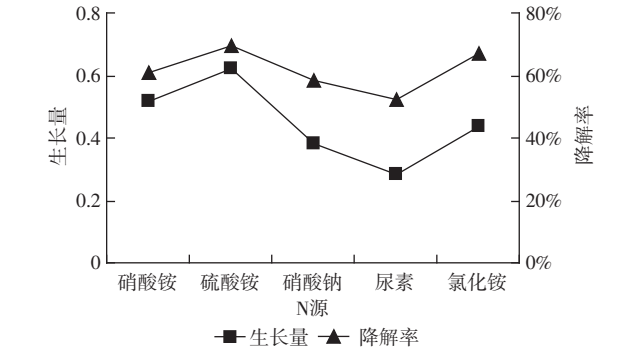


图 7 不同 N 源对生长量和降解率的影响
Figure 7 Effects of different N source on the strain growth and the degradation ratio of diesel oil

2.3 最佳条件下的降解率

前面实验得出菌株的最佳生长条件为培养时间 6 d、pH 值 5.0、接种量 5%、温度 35 ℃、柴油浓度 1 000 mg·L⁻¹、N 源(NH₄)₂SO₄。在此条件下菌株生长旺盛。降解率达到了 80%。

2.4 降解菌株的鉴定

个体形态:菌株为革兰氏阴性短杆菌,大小(0.5~1.0 μm)×(1.5~5.0 μm),极生鞭毛,不产芽孢。菌落特征:表面凸起、白色半透明、湿润,菌落直径 0.16~0.2 mm。液体培养特征:菌膜,底部有沉淀,从上到下混浊,形成乳浊液。斜面培养特征:无色,光滑状,无刺。

菌株的生理生化试验结果见表 1,利用文献^[14]进行检索,表明菌株为假单胞菌属。

表 1 菌株的生理生化特征			
Table 1 Physiological and biochemical characteristics of the strain			
鉴定特征	结果	鉴定特征	结果
革兰氏染色	-	NH ₃	+
M·R 试验	-	吡啶试验	-
接触酶	+	芽孢染色	-
淀粉水解	+	鞭毛染色	+
V·P 试验	-	明胶液化	+
柠檬酸盐	+	H ₂ S	-
氧化酶	+	硝酸盐还原	+
需氧性	好氧	葡萄糖发酵	-

注:+ 为阳性反应,- 为阴性反应。

3 结论

(1)在以柴油为惟一碳源的选择性培养基中筛选出 9 株菌,经过 3 d 的培养,其中一菌株对柴油的降解率为 71.7%。它对柴油的耐受浓度可达 2 000 mg·L⁻¹。

(2)通过对这一菌株的培养条件进行优化,得出菌株在培养时间为 6 d、pH 值为 5.0、接种量为 5%、温度为 35 ℃、柴油浓度为 1 000 mg·L⁻¹、N 源为(NH₄)₂SO₄条件下生长旺盛,降解率达到了 80%。且菌株对温度和 pH 适应范围广泛。同时培养时间的长短、接种量、柴油浓度和 N 源对降解率的影响也很大。

(3)经鉴定这一菌株为假单胞菌属。

参考文献:

- [1] Solano-Serena, F Marchal R, Casare gola S, et al. A new microbacterium strain with extended degradation capacities for gasoline hydrocarbons[J]. *Applied Environmental Biotechnology*, 2000, 66:2392-2399.
- [2] Aries E, Doumenq P, Artaud J, et al. Effects of petroleum hydrocarbons on the phospholipid fatty acid composition of a consortium composed of marine hydrocarbon-degrading bacteria[J]. *Organic Geochem*, 2001, 32: 891-903.
- [3] Lazar I, Dobrota S, Voicu A, et al. Microbial degradation of waste hydrocarbons in oily sludge from some Romanian oil fields [J]. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 1999, 22:151-160.
- [4] 徐金兰, 黄廷林, 唐智新, 等. 高效石油降解菌的筛选及石油污染土壤生物修复特性的研究[J]. *环境科学学报*, 2007, 27(4):622-628.
XU Jin-lan, HUANG Ting-lin, TANG Zhi-xin, et al. Isolation of petroleum degradation bacteria and its application to bioremediation of petroleum-contaminated soil[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2007, 27(4):622-628.
- [5] 周林红, 吴 燕. 紫外分光光度法测定炼油废水中的石油类含量[J]. *石化技术与应用*, 2004, 22(6): 456-458.
ZHOU Lin-hong, WU Yan. Determination of oil content in refinery waste water by ultraviolet spectrometry[J]. *Petrochemical Technology and Application*, 2004, 22(6): 456-458.
- [6] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物学实验教程 [M]. 北京: 北京大学出版社, 2000.4.
QIAN Cun-rou, HUANG Yi-xiu. Microbiological experiment courses[M]. Beijing: Peking University Press, 2000, 4.
- [7] 袁红莉, 杨金水, 王占生, 等. 降解石油微生物菌种的筛选及降解特性[J]. *中国环境科学*, 2003, 23(2): 157-161.
YUAN Hong-li, YANG Jin-shui, WANG Zhan-sheng, et al. Microorganism screening for petroleum degradation and its degrading characteristics[J]. *China Environmental Science*, 2003, 23(2):157-161.
- [8] Atlas R M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons : an environmental perspective[J]. *Microbiol Rev*, 1981, 45(1):180-209.
- [9] Salminen J M, Tuomi P M, Suortti A M, et al. Potential for aerobic and anaerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons in boreal subsurface[J]. *Biodegradation*, 2004, 15(1):29-39.
- [10] Joseph G Leathy, Rita R Colwell. Microbial degradation of hydrocarbons in environment[J]. *Microbiol Rev*, 1990, 54(3):305-315.
- [11] 陆泗进, 王红旗. 汽油降解菌的分离及降解研究[J]. *环境科学研究*, 2006, 19(4):95-99.
LU Si-jin, WANG Hong-qi. Studies on isolation of gasoline degrading bacteria and its degrading properties [J]. *Research of Environmental Sciences*, 2006, 19(4): 95-99.
- [12] 何良菊, 李培杰, 魏德洲, 等. 石油烃微生物降解的营养平衡及降解机理[J]. *环境科学*, 2004, 25(1):91-94.
HE Liang-ju, LI Pei-jie, WEI De-zhou, et al. Nutrient balance and mechanism of biological degradation of oil [J]. *Environmental Science*, 2004, 25(1):91-94.
- [13] Carriere P E P. Enhanced biodegradation of creosote-contaminated soil[J]. *Waste Management*, 1995, 579-583.
- [14] 东秀珠, 蔡妙英, 等. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.2.
DONG Xiu-zhu, CAI Miao-ying, et al. Manual of Systematic Determinative common Bacteriology[M]. Beijing: Science Press, 2001. 2.