

彭怀丽, 李红娜, 张 丽, 等. 石油污染土壤中正十六烷降解菌的效果研究[J]. 农业资源与环境学报, 2017, 34(3): 257-265.

PENG Huai-li, LI Hong-na, ZHANG Li, et al. Degradation Capability of n-hexadecane Degrading Bacteria from Petroleum Contaminated Soils[J]. *Journal of Agricultural Resources and Environment*, 2017, 34(3): 257-265.

## 石油污染土壤中正十六烷降解菌的效果研究

彭怀丽, 李红娜\*, 张 丽, 马金奉, 阿旺次仁, 唐哲仁, 朱昌雄

(中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所农业清洁流域团队/农业部农业环境重点实验室, 北京 100081)

**摘要:**从山东东营石油污染土壤中驯化筛选出一株正十六烷降解菌 TZSX2, 经生理生化和 16S rDNA 基因测序, 通过构建细菌系统发育树确定其为红球菌属(*Rhodococcus*)。通过不同环境因子对 TZSX2 的生长情况和其对正十六烷的降解率的影响研究, 确定菌株 TZSX2 的最适生长和降解温度为 28~36 °C, 对正十六烷的降解率超过 30%; TZSX2 能够耐受较高浓度的正十六烷, 在正十六烷浓度为 2 mL·L<sup>-1</sup> 时, 降解率为 79%, 正十六烷浓度为 20 mL·L<sup>-1</sup> 时, 降解率仍可达到 12%; 在碱性条件(pH=9)下对初始浓度为 10 mL·L<sup>-1</sup> 的正十六烷的降解率高达 91%。综上, 所筛选的 TZSX2 菌株可以耐碱性, 适用于极端环境中石油污染的修复, 对高浓度的正十六烷具有优异的降解效果。

**关键词:**石油污染土壤; 正十六烷; 降解菌; 环境因子; 降解率

中图分类号: X172

文献标志码: A

文章编号: 2095-6819(2017)03-0257-09

doi: 10.13254/j.jare.2017.0014

### Degradation Capability of n-hexadecane Degrading Bacteria from Petroleum Contaminated Soils

PENG Huai-li, LI Hong-na\*, ZHANG Li, MA Jin-feng, Awangciren, TANG Zhe-ren, ZHU Chang-xiong

(Agricultural Clear Watershed Group, Institute of Environment and Sustainable Development in Agriculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences/ Key Laboratory of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Beijing 100081, China)

**Abstract:** Samplings were performed in the petroleum contaminated soils of Dongying, Shandong Province of China. Degrading bacteria was isolated through enrichment in a Bushnel-Hass medium, with n-hexadecane as the sole source of carbon and energy. Then the isolated strains were identified by amplification of 16S rDNA gene and sequencing. The strain TZSX2 was selected as the powerful bacteria with stronger degradation ability, which was then identified as *Rhodococcus hoagii* genera based on the constructing results of the phylogenetic tree. The optimum temperature that allowed both high growth and efficient degradation ratio was in the scope of 28~36 °C, and gas chromatography results showed that approximately more than 30% of n-hexadecane could be degraded in one week of incubation within the temperature range. Moreover, the strain TZSX2 was able to grow in high concentrations of n-hexadecane. The degradation rate reached 79% when the initial n-hexadecane concentration was 2 mL·L<sup>-1</sup>, while it still achieved 12% with n-hexadecane concentration of 20 mL·L<sup>-1</sup>. The optimal pH was 9 that allowed the highest growth and the greatest degradation rate of 91%. Above all, the screened strain TZSX2 showed high capabilities of alkali tolerance with excellent degradation efficiency for even high concentration of n-hexadecane, and thus it would be quite suitable for the remediation of petroleum contaminated soils especially in the extreme environment.

**Keywords:** petroleum contaminated soil; n-hexadecane; degrading bacteria; environmental factors; degradation rate

收稿日期: 2017-01-11

基金项目: “韩国量子能公司农业用颗粒(丸)粉末及使用方法在中国农业生产中实用效果测试计划”[开(2015)1]; 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2014ZX07101-012-001)

作者简介: 彭怀丽(1990—), 女, 河南信阳人, 硕士研究生, 主要研究方向为农业环境污染修复的技术与机理。E-mail: penghli829@126.com

\* 通信作者: 李红娜 E-mail: lihongna828@163.com

土壤是人类赖以生存的自然环境,也是生态环境的重要组成部分,土壤的质量状况直接影响动物、植物和微生物的生长。工业革命的爆发使得石油产业得到迅猛发展,据报道,目前世界上每年石油总产量约为  $3 \times 10^9$  t,约有  $8 \times 10^6$  t 的石油污染物进入环境,其中的大部分进入到了土壤中<sup>[1-2]</sup>。一个多世纪以来石油在生产、加工、运输和使用过程中由于各种原因进入土壤后,破坏了土壤性质,降低了土壤的透水性<sup>[3]</sup>。石油中富含的反应基能与无机氮、磷结合并限制硝化作用和脱磷酸作用,从而使土壤有效磷、氮的含量减少。石油中的多环芳烃具有致癌、致畸、致突变等活性,并且能通过食物链进行生物富集作用<sup>[4-6]</sup>,对动植物产生较大危害。土壤石油污染问题已经严重制约了我国的生态文明建设和农业的可持续发展<sup>[7]</sup>,研究和探索快速、经济、有效、环境友好的土壤修复措施是亟待解决的关键问题。

传统的处理石油泄漏的方法主要局限于物理和化学控制<sup>[8]</sup>。与物理化学方法相比,微生物能够对含油成分进行生物降解使得其具有明显优势<sup>[9-10]</sup>。同时,用微生物去除石油衍生物污染替代物理化学方法净化污染环境更有效、经济和实用<sup>[11]</sup>。生物降解的速率取决于油浓度、烷烃长度、生物表面活性剂和微生物的类型<sup>[12]</sup>。烷烃作为石油的重要成分,占石油中含量的 50%~95%<sup>[13]</sup>,已有的研究报道表明,原油中的饱和烃,特别是中间长度的烷烃( $C_{10}$ ~ $C_{20}$ )更容易被生物降解<sup>[14]</sup>。正十六烷是原油中长链烷烃的重要成分,其在柴油中的含量常作为柴油的自然性指标<sup>[15]</sup>。其蒸气对人体上呼吸道、眼睛及皮肤有刺激性,液体直接吸入肺部可引起化学性肺炎。正十六烷具有低水溶性,在环境中很难被消除,因此会对环境造成持久性污染。已报道能降解石油污染物的微生物超过 200 种,包括细菌、真菌、放线菌及藻类等<sup>[16-17]</sup>,主要有假单胞菌属(*Pseudomonas*)<sup>[18-19]</sup>、不动杆菌属(*Acinetobacter*)<sup>[18,20]</sup>、红球菌属(*Rhodococcus*)<sup>[21]</sup>、放线菌属(*Actinomycetes*)<sup>[22]</sup>、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、无色杆菌属(*Achromobacter*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)<sup>[23]</sup>。Deng 等<sup>[24]</sup>从石油污染的海水中筛选出一株无色杆菌属(*Achromobacter* sp. HZ01)在 pH7、28 °C、石油烃浓度为  $5 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$  时,能降解 90% 以上的烷烃,Hassanshahian 等<sup>[25]</sup>用原油浓度为  $10 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$  的无机盐培养基从波斯湾海岸土壤和海水中筛选出一株棒状杆菌属(*Corynebacterium* *variable* PG-Z)对烷烃具有较好的降解作用,Liu 等<sup>[20]</sup>从石油污染水体中筛选出的不动杆菌属(*Aci-*

*tobacter* sp. LS-1)在 pH 呈中性条件下能够很好地利用烷烃从而降解石油,Hassanshahian 等<sup>[23]</sup>用正十六烷浓度为  $10 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$  的无机盐培养基从油库废水和土壤中筛选出的红球菌属(*Rhodococcus*)、寡养单胞菌(*Stenotrophomonas*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)等在中性条件下降解烃类物质能力最强。刘猛等<sup>[26]</sup>从石油废水中筛选出一株赤红球菌 JC-106(*Rhodococcus*) 在 pH6~8 时对  $1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$  的正构烷烃具有较好的降解作用。陆健等<sup>[27]</sup>从原油中筛选出一株烷烃降解菌的最优降解条件是烷烃浓度为  $2 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ ,最适 pH 为 7。任丽君等<sup>[28]</sup>从渤海油田含油污泥中分离出的 3 株石油烃降解菌,最适降解 pH 为 6~8。

已公开报道的多数烷烃降解菌株对可降解的烷烃浓度均较低,且最适降解 pH 多在 6~8 之间,在实际应用中容易受到限制,因此能耐受较高烷烃浓度污染、并能在较宽 pH 范围下发挥降解作用的微生物修复技术亟待开展。本研究从山东东营的石油污染土壤中筛选分离出能够有效降解高浓度正十六烷的菌株,并研究其在不同条件下的降解效果,为石油污染修复工作提供科学依据和参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品的采集与菌种的筛选分离

在山东东营用无菌刀采集被石油污染的土壤 1~12 cm 土层土样,放置于冰上运输到实验室进行筛选分离。无机盐培养基中添加  $10 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$  的正十六烷作为唯一的碳源和能源<sup>[29]</sup>。将 5 g 土壤样品加入含有正十六烷的 100 mL 无机盐培养基的 250 mL 锥形瓶中,然后放在  $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、30 °C 的恒温振荡培养器(Innova4340,美国 New Brunswick Scientific)上培养 10 d。然后取 5 mL 混合液装进新鲜的含有正十六烷的 100 mL 无机盐培养基中。经过 4 次连续培养后,取出混合液涂布于含有正十六烷的无机盐琼脂培养基上并分离出表面形态不同的菌落;之后将其转移到不含有正十六烷的无机盐琼脂培养基上,去除可以在不含有正十六烷的无机盐琼脂培养基上生长的菌株,以去除自养生物和利用琼脂的细菌。经反复重复和分离,最后筛选出能在正十六烷无机盐培养基上明显生长的菌落进行储存并鉴定。

### 1.2 试剂与培养基

所有试剂除特殊说明外均为市售分析纯或色谱纯。

无机盐培养基:  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$   $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

$1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$   $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{CaCl}_2$   $0.02\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$   $0.02\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 蒸馏水, pH 7.0~7.2, 121 °C 灭菌 20 min。

含有正十六烷的无机盐培养基: 正十六烷浓度为  $10\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$  的无机盐培养基。

含有正十六烷的无机盐琼脂培养基: 每 100 mL 含有正十六烷的无机盐培养基添加 1.2~2.0 g 的琼脂。

不含正十六烷的无机盐琼脂培养基: 每 100 mL 无机盐培养基添加 1.2~2.0 g 的琼脂。

活化培养基: 牛肉膏  $5.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 蛋白胨  $10.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{NaCl}$   $5.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 蒸馏水, pH 7.2~7.4, 121 °C 灭菌 20 min。

### 1.3 菌株的鉴定

经反复重复和分离, 将最后筛选得到的能在正十六烷无机盐培养基上明显生长的菌落进行菌体形态观察、生理生化试验、16S rDNA 序列同源性比对分析等<sup>[30]</sup>, 确定其分类地位。参照细菌系统鉴定手册<sup>[31]</sup>进行菌株的生理生化分析及形态特性测定, 菌株的 16S rDNA 克隆正向引物为 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3', 反向引物为 1492R: 5'-GGTTACC-TTGTTACGACTT-3'。PCR 反应体系 (50  $\mu\text{L}$ ) 为: PCR Mix 25  $\mu\text{L}$ , 引物各 2  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 4  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 17  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 以上程序共进行 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min, 最后 4 °C 保存。PCR 扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测后, 交由生工生物工程(上海)股份有限公司(Sangon Biotech)进行测序。将测序的结果在 NCBI 中与相关的 16S rDNA 序列进行同源性比对分析, 将比对结果用 MEGA6 软件<sup>[32]</sup>进行分析, 采用邻近法(Neighbor-joining)构建菌株的系统发育树。

### 1.4 正十六烷的萃取及气相色谱分析

正十六烷的萃取使用液-液萃取技术, 用正己烷作萃取剂<sup>[27]</sup>。用气相色谱火焰电离检测器(GC-FID)分析正十六烷的含量<sup>[23]</sup>。具体操作方法如下: 首先, 在培养液中加入 10 mL 色谱纯正己烷, 剧烈搅拌 2 min, 将此混合液倒入分液漏斗中反复震荡, 静置分层, 吸取上层有机相至 25 mL 容量瓶中, 按以上步骤重复萃取 2 次。合并萃取液在  $5000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  下离心 10 min, 收集上层清液, 用正己烷定容至 25 mL, 之后液体通过 0.22  $\mu\text{m}$  聚四氟乙烯(PFTE)过滤器。GC-FID 的测定条件为: AHP-5MS 柱(Agilent, USA)(5% 苯基柱, 95% 甲基硅; 长 30 m×直径 0.025 mm×膜厚度 0.25  $\mu\text{m}$ ) 在 120 °C 下保持 1 min, 以 20 °C·min<sup>-1</sup> 增加到

180 °C, 在 180 °C 下保持 5 min。氮气作为载流气体, 控制流速恒定为  $1.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。注射器和检测器的温度分别为 250 °C 和 270 °C。注射体积为 2  $\mu\text{L}$ 。

### 1.5 菌株的生长、降解特性

在斜面培养基中挑取少量菌体放入 100 mL 活化培养基中, 盖上封口膜, 以上操作均为无菌操作, 将装有上述培养基的三角瓶放入摇床中, 30 °C  $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  振荡培养。将菌液分装于 50 mL 的已灭菌的离心管中,  $6000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  下离心 90 s, 弃去上层培养液, 用已灭菌的蒸馏水离心冲洗 3 次, 用已灭菌的无机盐培养液调 OD<sub>600</sub> 为 0.6, 吸取 6 mL 菌液至加有 1 mL 过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜正十六烷的 100 mL 无机盐培养基中, 盖上封口膜, 共 3 个重复。将装有上述培养基的三角瓶放入摇床中, 30 °C  $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  振荡。每隔 6 h 用分光光度计测各培养液在 600 nm 处吸光值。其中不添加菌液的无机盐培养基作为对照。

以正十六烷作为唯一碳源, 分别测定不同初始温度、NaCl 浓度、接种量、正十六烷浓度及 pH 值对分离出的菌株降解正十六烷的效果影响。温度设置为: 5、15、28、36、45 °C; NaCl 浓度设置为: 2、5、10、15、20  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 接种量(V/V)设置为: 2%、4%、6%、8%、10%; 正十六烷浓度设置为: 2、5、10、15、20  $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 初始 pH 值设置为: 4、5、6、7、8、9。每个处理设 3 个重复。将筛选后的菌株接种于 50 mL 含有正十六烷的无机盐培养基中, 放入恒温振荡培养箱中  $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 30 °C 振荡培养, 每日测各菌液的 OD<sub>600</sub> 值, 一周后测定正十六烷的降解率。

### 1.6 乳化性能测定及菌株表面疏水性测定

将带盖的 10 mL 试管灭菌后, 加入 5 mL 菌悬液, 再加入 5 mL 正十六烷, 充分震荡, 使正十六烷与菌悬液混合均匀, 用试管帽密封后放入 30 °C 恒温培养箱中培养, 24 h 后观察正十六烷与水的分界面和乳化效果<sup>[33]</sup>, 每组设置 3 个重复。乳化率( $E_{24\%}$ ) = 乳化层高(mm)/液体总高度(mm)。

菌株表面疏水性测定用 Bacterial Adhesion To Hydrocarbons(BATH)法<sup>[34]</sup>: 将菌株在以正十六烷为唯一碳源的培养基中培养 5 d,  $6000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 90 s, 收集菌体并用已灭菌的无机盐培养基重悬, 调 OD<sub>600</sub> 值为 1.0。取 6 mL 菌悬液, 加入 0.5 mL 正十六烷, 盖上试管塞, 在 25 °C 下培养 10 min, 震荡混合物 2 min, 在室温下静置 60 min, 使有机层分离, 测定前后的液体的吸光值 OD<sub>600</sub>, 每组设置 3 个重复。菌株表面疏水性用 BATH% 表示,  $\text{BATH}\% = (\text{OD}_{600\text{前}} - \text{OD}_{600\text{后}}) / \text{OD}_{600\text{前}} \times$

100%。BATH%的范围是 0~100%,值越大表示菌体表面疏水性越好<sup>[35]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌株的分离、鉴定与生长曲线

经过 4 次连续培养后,分离出共 9 株能在正十六烷无机盐培养基(10 mL·L<sup>-1</sup>)上生长的菌株。经综合比较生长速率及降解效果等,从中挑选 1 株生长速率较快的菌株 TZSX2 进行重点研究。通过 PCR 扩增,得到长度为 1 368 bp 的 16S rDNA 基因序列片段。将测得的 16S rDNA 序列在 NCBI 上进行比对进行同源性分析,将比对结果用 MEGA6 软件进行分析,采用邻近法(Neighbor-joining)构建菌株 TZSX2 的系统发育树如图 1。

通过对菌株 TZSX2 的 16S rDNA 基因序列的对比结果,表明菌株 TZSX2 属于红球菌属(*Rhodococcus*)。

TZSX2 细菌在接种进正十六烷无机盐培养液中后,会先有大约 18 h 的延滞期后再进入对数期的生长,经过约 30 h 对数期的生长后,进入稳定期,经过约 80 h 的生长后,逐渐进入衰亡期(图 2)。延滞期期间内可能会诱导一些与烷烃降解相关的酶类,这些酶类的积累能够加速菌株对烷烃的利用,从而促进菌株的生长。陆键等<sup>[27]</sup>从原油中分离出的一株假单胞菌 *xcz*(*Pseudomonas*)的延滞期长达 26 h,随后才进入对数期。张洁等<sup>[15]</sup>筛选出的两株高效石油烃氧化菌红球菌属 PDA2(*Rhodococcus*)和假单胞菌属 PDB3(*Pseudomonas*)的延滞期则是 24 h。而 TZSX2 的延滞期较短,在 20 h 以内,有利于在石油污染环境中的定植。

### 2.2 反应条件对菌株降解正十六烷的影响

温度能够直接影响油的物理状态、酶的活性和菌

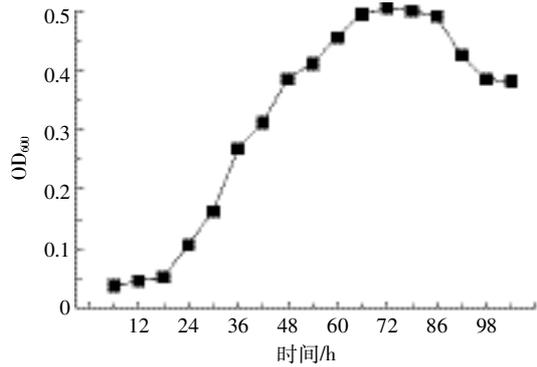


图 2 菌株 TZSX2 的生长曲线

Figure 2 The growth curve of strain TZSX2

株的生长<sup>[28]</sup>,微生物在不同温度下的生长和代谢差异较大。从图 3 和图 4 中可以看出,实验设置的 5 组温度中,菌株 TZSX2 对正十六烷的降解率均超过了 10%,其最适温度范围在 28~36 °C 之间,最大 OD<sub>600</sub> 值均超过 0.5,降解率达到 30%,低于最适温度时随着温度的降低,降解率逐渐减小。目前,多数研究温度对石油烷烃降解菌的生长和降解率的影响中,石油烷烃降解菌的有效降解温度在 20~40 °C 之间<sup>[23,29,36]</sup>,低于 20 °C 或者高于 40 °C 降解率一般都低于 10%<sup>[28]</sup>,这是因为菌株的最适生长浓度在 20~40 °C 之间,温度过高或者过低都会影响菌株的生长和代谢,从而影响菌株对石油的利用效率。本研究驯化分离出的菌株 TZSX2 对低温和高温都有一定的耐受能力,对温度的适应能力强。

在 NaCl 浓度为 5 g·L<sup>-1</sup> 时,菌株 TZSX2 在 7 d 的生长过程中最大 OD<sub>600</sub> 值能达到 0.636,对正十六烷的降解率达到 47%,与不含 NaCl 的组别相比,实验组添加的 NaCl 浓度均能够促进菌株的生长,提高降解率。

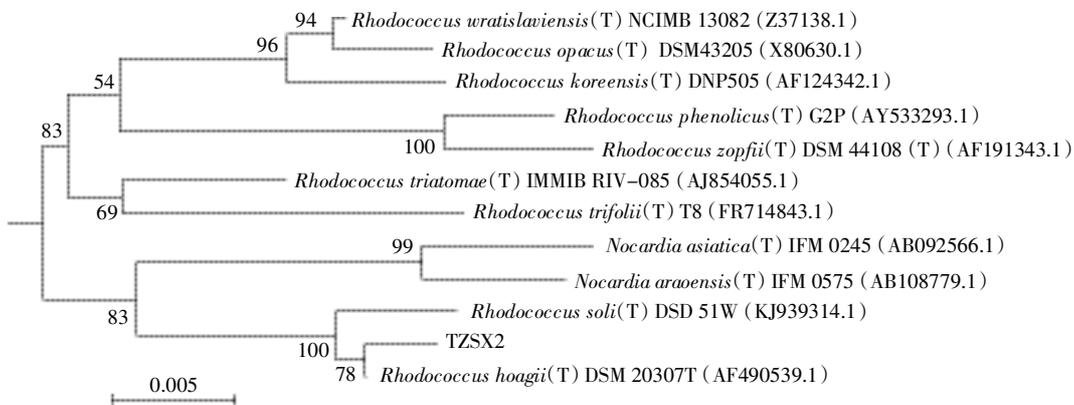


图 1 利用邻近法构建的基于 16S rDNA 的菌株系统发育树

Figure 1 Neighbor-joining phylogenetic tree based on the 16S rDNA gene sequences of strain

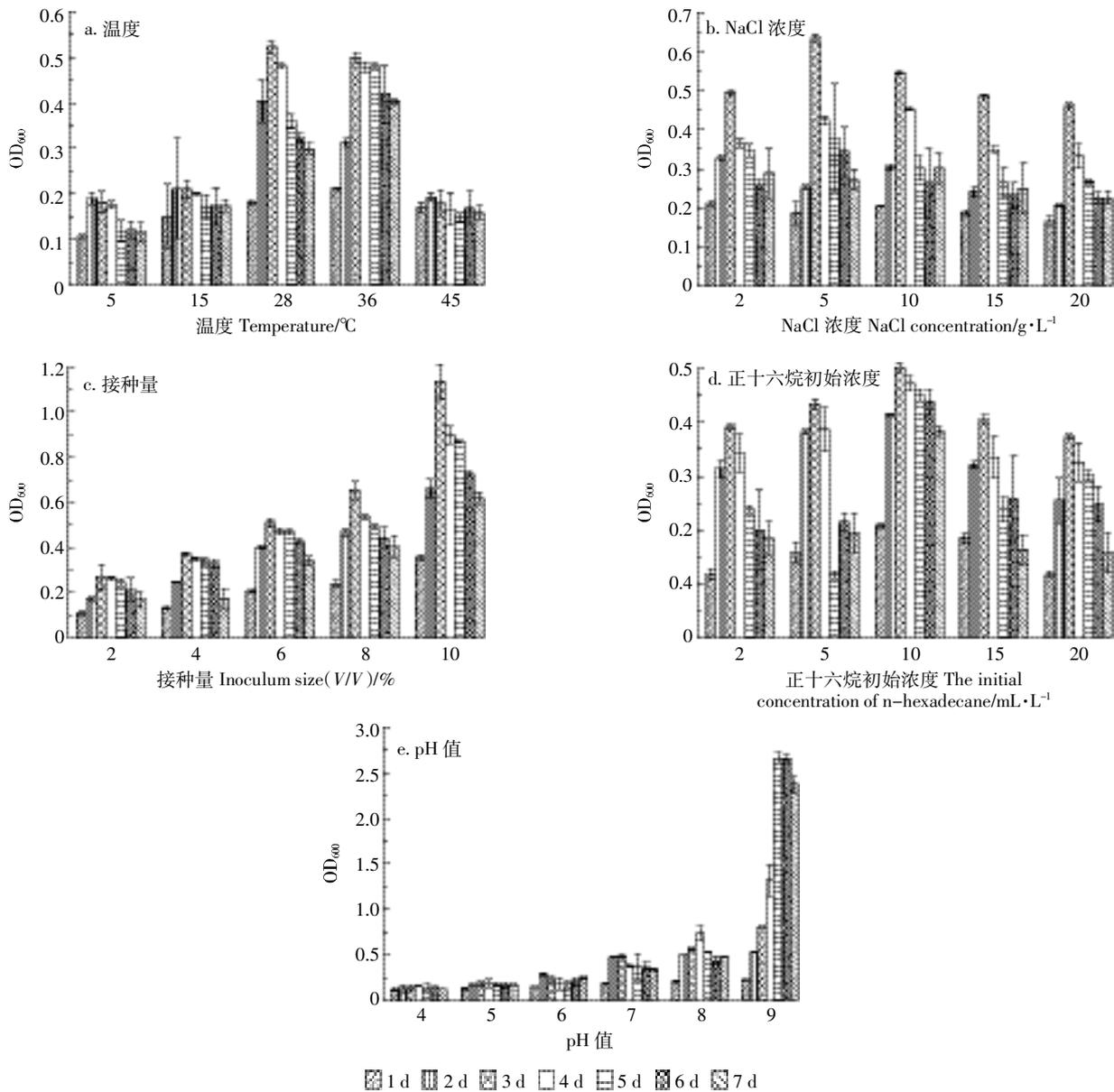


图3 不同影响因子对菌株TZSX2的生长特性的影响

Figure 3 The effect of different environmental factors on strain TZSX2

适量的 NaCl 浓度能够促进菌株 TZSX2 的生长,但是过高的 NaCl 浓度会影响 TZSX2 菌株的生长,这与刘猛等<sup>[26]</sup>的研究结果一致。据报道,在石油烃类降解菌的影响实验中,适宜菌株生长的 NaCl 浓度一般为 0~20 g·L<sup>-1</sup> 之间。盐度过高菌株对石油的降解率会受到相应影响。可能是盐度过高时,微生物会因为细胞外的渗透压过高导致细胞原生质膜中的离子发生种类和数量上的变化,从而抑制微生物的生长繁殖,同时,Na<sup>+</sup>的增多会抑制微生物脱氢酶和氧化酶等酶物质的产生,影响微生物对石油的利用<sup>[37-38]</sup>。

随着 TZSX2 接种量的增加,菌株的 OD<sub>600</sub> 值增长

的越来越快,但是对正十六烷的降解率影响不大,均在 20%~30%之间,可能是菌株 TZSX2 对正十六烷的降解能力是固定的,达到一定程度后就不能继续降解正十六烷,综合考虑,最优接种量可以设置为 2%。

从图 3、图 4 可以看出,最适合 TZSX2 生长的正十六烷浓度是 10 mL·L<sup>-1</sup>,OD<sub>600</sub> 为 0.502,降解率为 30%,随着正十六烷浓度的升高,降解率逐渐降低,正十六烷浓度为 2 mL·L<sup>-1</sup> 时,降解率为 79%。在一定浓度范围内,适量的增加正十六烷浓度,能够促进 TZSX2 菌株的生长,并且 TZSX2 菌株的耐正十六烷浓度较高,目前多数研究的正十六烷浓度设置在 5

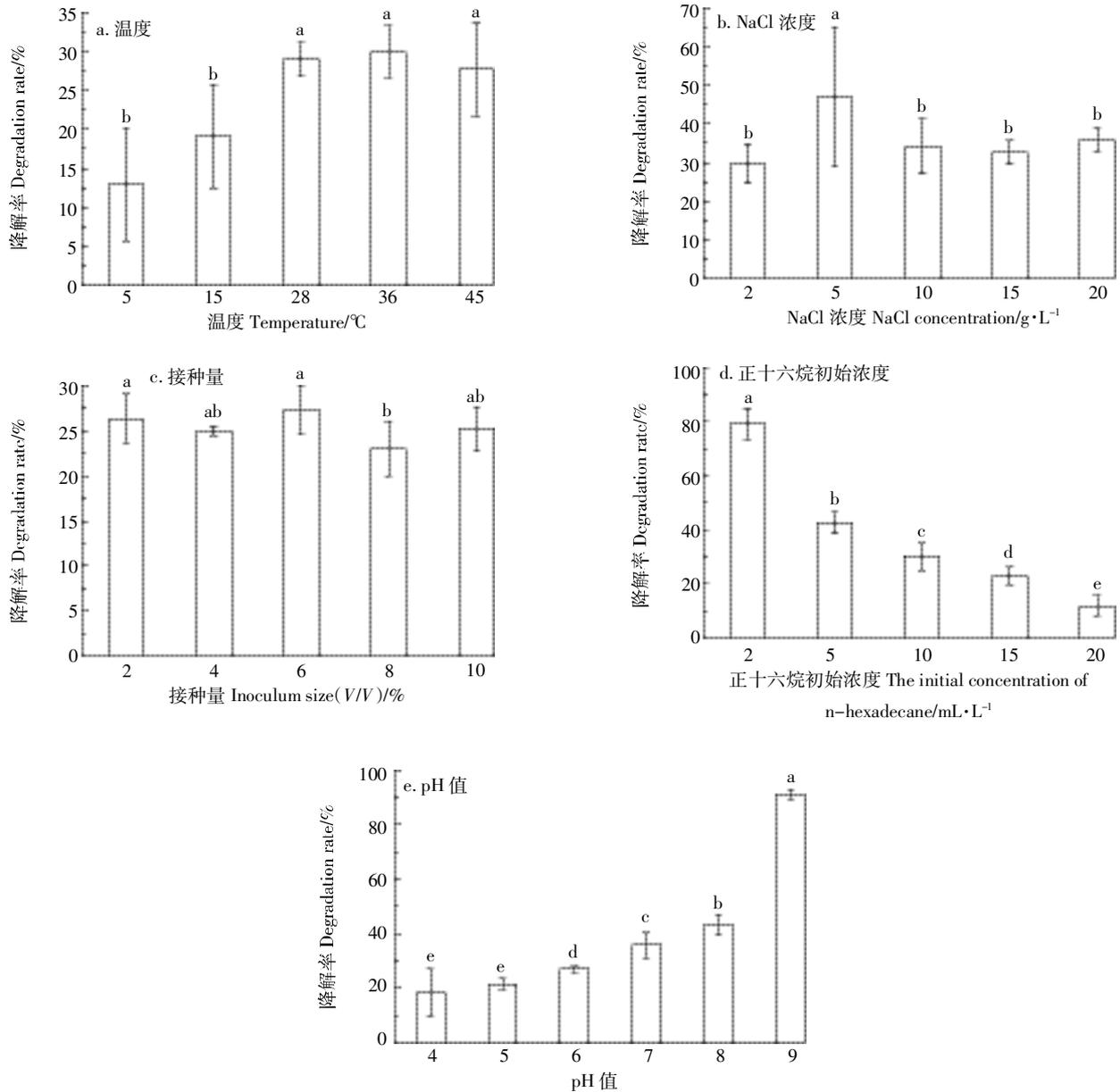


图 4 不同影响因子对正十六烷降解率的影响

Figure 4 The influence of different environmental factors on the degradation rate of n-hexadecane by strain TZSX2

mL·L<sup>-1</sup> 以内<sup>[39-41]</sup>, 超过 5 mL·L<sup>-1</sup> 的研究中正十六烷的降解率都低于 10%, 甚至有些菌株则在高浓度的正十六烷浓度下不能生长, 本研究的正十六烷浓度则最高达到了 20 mL·L<sup>-1</sup>, 并且 TZSX2 仍能够生长, 降解率能达到 12%, 对于高浓度石油污染环境, 菌株 TZSX2 具有优良的生长和降解优势。

初始 pH 值对 TZSX2 菌株的影响比较大, 酸性条件下不利于 TZSX2 菌株的生长, 从图 3 可以看出, TZSX2 菌株表现出较强的嗜碱性, 在碱性条件下菌株生长较快, 尤其是在 pH 为 9 的条件下, 更是表现出

了极强的生长速率, OD<sub>600</sub> 高达 2.663, 并且降解率能达到 91%。在石油降解菌的 pH 值影响研究中, 多数降解菌的最适 pH 在 6~8 之间。张楠等<sup>[42]</sup>以正十六烷为唯一碳源从石油污染土壤中筛选出一株铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)在 pH=7 时对 2 g·L<sup>-1</sup> 的正十六烷降解率最高, 达到 80% 以上。曹微寰等<sup>[43]</sup>从腈纶废水中分离筛选出两株高效降解正十六烷的诺卡氏菌(*Nocardias* pp.) 的最适生长 pH 为 6, 当正十六烷初始浓度为 150 mg·L<sup>-1</sup> 时, 降解率可以达到 85%。任丽君等<sup>[28]</sup>从渤海油田含油污泥中分离出的 3

株石油烃降解菌的最适降解 pH 分别为 6 和 8。也就是说,与常规的已报道的降解菌相比,本实验所筛选出的正十六烷降解菌表现出极优的耐碱性,在石油污染土壤的修复中将发挥更强的耐受性和更优异的效果。

在正十六烷浓度为  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  经灭菌的  $500 \text{ g}$  土壤中添加  $\text{OD}_{600}$  为 0.6 的 TZSX2 菌悬液  $20 \text{ mL}$ ,并加入灭菌纯水,使土壤含水量达 30%,未添加 TZSX2 菌悬液的处理作为空白对照。每日根据蒸发量补充灭菌纯水,每日翻动 1 次。10 d 后测土壤中正十六烷含量。结果显示加有 TZSX2 降解菌的处理组比空白对照组的正十六烷残余量少 12%。说明 TZSX2 菌在土壤中能够有效降解正十六烷,但具体降解效果还需要长期的降解数据支持。

### 2.3 乳化性能测定及菌株表面疏水性测定

TZSX2 的乳化率  $E_{24\%}$  为 52%,细胞表面疏水性 BATH% 为 28%。多数研究筛选的石油降解菌的乳化率在 5%~55% 之间,细胞表面疏水性范围一般为 5%~40%<sup>[15,23]</sup>。菌株 TZSX2 的乳化率较高,细菌表面疏水性则属于中等强度。乳化剂能够将不与水互溶的油层乳化成分散的油滴,将油带入水相中,增大油与水中的微生物接触面积,增大油水接触面积,从而使菌株能够很好地利用污染物而进行生长代谢,从而去除油类污染。细菌表面疏水性是影响细菌吸收和降解疏水性物质的主要因素之一,细菌细胞通过疏水性与正十六烷接触降解正十六烷。

## 3 结论

(1)本研究从石油污染的土壤中以  $10 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$  正十六烷作为唯一碳源经过 5 个循环共计 50 d 的驯化培养,筛选出一株能够很好地降解正十六烷的菌株 TZSX2,经鉴定为红球菌属 *Rhodococcus* sp. TZSX2,丰富了石油降解菌群,为高浓度石油污染的修复提供了理论基础,对石油污染的环境修复具有十分重要的意义。

(2)菌株 TZSX2 的最适生长和降解温度在 28~36 °C 之间,对  $10 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$  正十六烷的降解率能达到 30%,并且在低温 15 °C 以下和高温 45 °C 时对正十六烷的降解率仍在 10% 以上。适量的 NaCl 浓度能够促进菌株 TZSX2 的生长和对正十六烷的降解。

(3)能够有效降解  $10 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$  正十六烷的最适接种量是 2%,在正十六烷浓度为  $2 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$  时,菌株 TZSX2 能降解 79% 的正十六烷,并且菌株 TZSX2 对

正十六烷浓度的耐受性高,可以用于高浓度正十六烷的降解。

(4)菌株 TZSX2 表现出优秀的嗜碱性,在 pH=9 时培养 4 d 的  $\text{OD}_{600}$  值达到 1.324,第 5 d 的  $\text{OD}_{600}$  值为 2.663,培养 7 d 后能够降解 91% 的正十六烷,可以用于极端环境中石油污染的修复。

(5)菌株 TZSX2 的乳化率  $E_{24\%}$  为 52%,细胞表面疏水性 BATH% 为 28%,TZSX2 能有效地把在水面上的正十六烷乳化成分散的油滴,使正十六烷进入水相中,增大正十六烷与水相中的 TZSX2 菌的接触面积,从而更好地降解正十六烷。

(6)在正十六烷浓度为  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  的土壤中,添加  $20 \text{ mL}$   $\text{OD}_{600}$  为 0.6 的 TZSX2 菌悬液,与空白对照组相比,经过 10 d 处理可以降解土壤中 12% 的正十六烷,说明 TZSX2 菌株能够有效降解土壤中的正十六烷,但最终降解效果还需要长期的降解率测定数据。

### 参考文献:

- [1] Delille D, Pelletier E, Coulon F. The influence of temperature on bacterial assemblages during bioremediation of a diesel fuel contaminated sub Antarctic soil[J]. *Cold Regions Science & Technology*, 2007, 48(2): 74-83.
- [2] 蔺 昕,李培军,台培东,等.石油污染土壤植物-微生物修复研究进展[J]. *生态学杂志*, 2006, 25(1):93-100.  
LIN Xin, LI Pei-jun, TAI Pei-dong, et al. Research progress in phyto-microbial remediation of petroleum-contaminated soil[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2006, 25(1):93-100. (in Chinese)
- [3] 丁克强,孙铁珩,李培军.石油污染土壤的生物修复技术[J]. *生态学杂志*, 2000, 19(2):50-55.  
DING Ke-qiang, SUN Tei-heng, LI Pei-jun. Bioremediation of the soil contaminated by petroleum hydrocarbons[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2000, 19(2):50-55. (in Chinese)
- [4] Bossert I, Bartha R. Plant growth in soils with a history of oily sludge disposal[J]. *Soil Science*, 1985, 140(1):75-77.
- [5] Liu D. Fate of petroleum hydrocarbons in sewage sludge after land disposal[J]. *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology*, 1980, 25(1):612-622.
- [6] 杨 茜,吴蔓莉,聂麦茜,等.石油污染土壤的生物修复技术及微生物生态效应[J]. *环境科学*, 2015(5):1856-1863.  
YANG Qian, WU Man-li, NIE Mai-qian, et al. Effects and biological response on bioremediation of petroleum contaminated soil[J]. *Environmental Science*, 2015(5):1856-1863. (in Chinese)
- [7] 王文富,席承藩.中国土壤[M].北京:中国农业出版社,1998.  
Wang W F, Xi C F. Chinese soil[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1998. (in Chinese)
- [8] 苏增建,谷慧宇,李 敏.海洋石油污染修复研究进展[J]. *安全与环境学报*, 2009, 9(2):56-65.  
SU Zeng-jian, GU Hui-yu, LI Min. Research advancements on the ways

- to restore marine oil contamination [J]. *Journal of Safety and Environment*, 2009, 9(2):56–65. (in Chinese)
- [9] Chaillan F, Flèche Le A, Bury E, et al. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms[J]. *Research in Microbiology*, 2004, 155(7):587–595.
- [10] Hanson K G, Nigam A, Kapadia M, et al. Bioremediation of crude oil contamination with *Acinetobacter* sp. A3. [J]. *Current Microbiology*, 1997, 35(3):191–193.
- [11] Emtiazi G, Saleh T, Hassanshahian M. The effect of bacterial glutathione S-transferase on morpholine degradation[J]. *Biotechnology Journal*, 2009, 4(2):202–205.
- [12] Cappello S, Crisari A, Hassanshahian M, et al. Effect of a bioemulsificant exopolysaccharide(EPS2003) on abundance and vitality of marine bacteria[J]. *Water Air & Soil Pollution*, 2012, 223(7):3903–3909.
- [13] Xia W, Du Z, Cui Q, et al. Biosurfactant produced by novel *Pseudomonas* sp. WJ6 with biodegradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons. [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2014, 276C(5):489–498.
- [14] Roy S, Hens D, Biswas D, et al. Survey of petroleum-degrading bacteria in coastal waters of Sunderban Biosphere Reserve[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2002, 18(6):575–581.
- [15] 张洁, 王卫卫, 郭欣, 等. 两株高效石油烃氧化菌的正十六烷降解特性[J]. 西北大学学报(自然科学版), 2013, 43(3):403–410.  
ZHANG Jie, WANG Wei-wei, GUO Xin, et al. Identification of two high-efficiency hexadecane-degrading bacteria and their degradation characteristics [J]. *Journal of Northwest University (Natural Science Edition)*, 2013, 43(3):403–410. (in Chinese)
- [16] Chandra S, Sharma R, Singh K, et al. Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon[J]. *Annals of Microbiology*, 2013, 63(2):417–431.
- [17] Tang X, He L Y, Tao X Q, et al. Construction of an artificial microalgal-bacterial consortium that efficiently degrades crude oil[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 181(1–3):1158–1162.
- [18] Mahjoubi M, Jaouani A, Guesmi A, et al. Hydrocarbonoclastic bacteria isolated from petroleum contaminated sites in Tunisia; Isolation, identification and characterization of the biotechnological potential. [J]. *New Biotechnology*, 2013, 30(6):723–733.
- [19] He Y, Duan X, Liu Y. Enhanced bioremediation of oily sludge using co-culture of specific bacterial and yeast strains[J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2014, 89(11):1785–1792.
- [20] Liu H, Yao J, Yuan Z, et al. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from oil-water mixture in Dagang oilfield, China [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2014, 87(1):52–59.
- [21] Wang W, Zhang R, Shan D, et al. Erratum to: Indigenous oil-degrading bacteria in crude oil-contaminated seawater of the Yellow Sea, China [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(16):7253–7269.
- [22] Wang Y N. *Amycolicococcus subflavus* gen. nov. sp. nov. anactinomycete isolated from a saline soil contaminated by crude oil. [J]. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(3):638–643.
- [23] Hassanshahian M, Ahmadinejad M, Tebyanian H, et al. Isolation and characterization of alkane degrading bacteria from petroleum reservoir waste water in Iran(Kerman and Tehran provenances)[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2013, 73(1):300–305.
- [24] Deng M C, Li J, Hong Y H, et al. Characterization of a novel biosurfactant produced by marine hydrocarbon-degrading bacterium *Achromobacter* sp. HZ01[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2016, 120(4):889–899.
- [25] Hassanshahian M, Zeynalipour M S, Musa F H. Isolation and characterization of crude oil degrading bacteria from the Persian Gulf (Khorramshahr provenance)[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2014, 82(1–2):39–44.
- [26] 刘猛, 陈吉祥, 周永涛, 等. 一株石油降解赤红球菌(*Rhodococcus ruber*)特性及处理含油废水研究 [J]. 环境科学学报, 2016, 36(10):3651–3657.  
LIU Meng, CHEN Ji-xiang, ZHOU Yong-tao, et al. Characterization and application of an oil-degrading *Rhodococcus ruber* for oily wastewater treatment[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2016, 36(10):3651–3657. (in Chinese)
- [27] 陆健, 黄潇, 武贤明, 等. 高效烷烃降解菌 xcz 的分离鉴定及降解特性[J]. 土壤, 2008, 40(3):460–464.  
LU Jian, HUANG Xiao, WU Xian-ming, et al. Isolation, identification and characterization of a high-efficiency alkane-degrading bacterium xcz[J]. *Soils*, 2008, 40(3):460–464. (in Chinese)
- [28] 任丽君, 刘宪斌, 田胜艳. 含油污泥中石油降解菌的分离及其降解特性[J]. 环境工程学报, 2015, 9(7):3538–3544.  
REN Li-jun, LIU Xian-bin, TIAN Sheng-yan. Isolation of petroleum hydrocarbon degrading bacteria from oily sludge and its degrading characteristics [J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2015, 9(7):3538–3544. (in Chinese)
- [29] Hassanshahian M, Emtiazi G, Cappello S. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2012, 64(1):7–12.
- [30] 陈小蓉, 阮志勇, 王彦伟, 等. Gordonia sp. LAM0048 的分离鉴定及其降解正十六烷的研究[J]. 生物技术进展, 2015, 5(2):137–141.  
CHEN Xiao-rong, RUAN Zhi-rong, WANG Yan-wei, et al. Research on the isolation, identification and n-hexadecane biodegrading characteristics of Gordonia sp. LAM0048[J]. *Current Biotechnology*, 2015, 5(2):137–141. (in Chinese)
- [31] Bergy D. *Bergey's manual of determinative bacteriology*[M]. New York: Williams and Wilkins, 1998.
- [32] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis Version 6. 0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12):2725–2729.
- [33] Hassanshahian M, Tebyanian H, Cappello S. Isolation and characterization of two crude oil-degrading yeast strains, *Yarrowialipolytica* PG-20 and PG-32, from the Persian Gulf[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2012, 64(7):1386–1391.
- [34] Pruthi V, Cameotra S S. Rapid identification of biosurfactant-producing bacterial strains using a cell surface hydrophobicity technique[J].

- Biotechnology Techniques*, 1997, 11(9):671-674.
- [35] 陈延君, 王红旗, 王 然, 等. 鼠李糖脂对微生物降解正十六烷以及细胞表面性质的影响[J]. 环境科学, 2007, 28(9):2117-2122.  
CHEN Yan-jun, WANG Hong-qi, WANG Ran, et al. Effects of rhamnolipid on the biodegradation of n-hexadecane by microorganism and the cell surface hydrophobicity[J]. *Environmental Science*, 2007, 28(9):2117-2122. (in Chinese)
- [36] 鲁雅梅, 邹东雷, 赵勇胜, 等. 烷烃降解菌 SY16 的筛选、鉴定及降解能力测定[J]. 生态环境学报, 2007, 16(5):1394-1398.  
LU Ya-mei, ZOU Dong-lei, ZHAO Yong-sheng, et al. Isolation, characterization, and alkane degradation potential of hydrocarbon-degrading bacteria SY16[J]. *Ecology and Environment*, 2007, 16(5):1394-1398. (in Chinese)
- [37] 李习武, 刘志培. 石油烃类的微生物降解 [J]. 微生物学报, 2002, 42(6):764-767.  
LI Xi-wu, LIU Zhi-pei. Microbial biodegradation of petroleum hydrocarbons[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2002, 42(6):764-767. (in Chinese)
- [38] Pospíšil M, Voldřich M, Marek M, et al. Bioremediation of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 1996, 37(3):259-259.
- [39] 吴仁人, 党 志, 易筱筠, 等. 氨基酸对烷烃降解菌 GS3C 降解性能的影响[J]. 环境科学研究, 2009, 22(6):702-706.  
WU Ren-ren, DANG Zhi, YI Xiao-yun, et al. Effect of amino acids on degrading capability of a n-alkanes degrading strain GS3C [J]. *Research of Environmental Sciences*, 2009, 22(6):702-706. (in Chinese)
- [40] 陈延君, 王红旗. 芽孢杆菌 DQ02 吸附摄取、运输和降解正十六烷的机理研究[J]. 环境工程学报, 2011, 5(3):714-720.  
CHEN Yan-jun, WANG Hong-qi. Study on mechanism of uptake, transport and biodegradation of n-hexadecane by *Bacillus* sp. DQ02[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2011, 5(3):714-720. (in Chinese)
- [41] 李 玫, 廖宝文. 红树林湿地烷烃降解菌的分离筛选[J]. 生态科学, 2013, 32(1):40-43.  
LI Mei, LIAO Bao-wen. Isolation and screening of hydrocarbon-degrading bacterial strains from mangrove wetland soils[J]. *Ecological Science*, 2013, 32(1):40-43. (in Chinese)
- [42] 张 楠, 陈波水, 方建华, 等. 正十六烷降解菌的分离、鉴定及降解特性[J]. 化学与生物工程, 2012, 29(8):26-28.  
ZHANG Nan, CHEN Bo-shui, FANG Jian-hua, et al. Isolation, identification and characteristics of a bacterial strain for biodegradation of n-hexadecane[J]. *Chemistry & Bioengineering*, 2012, 29(8):26-28. (in Chinese)
- [43] 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. (in Chinese)