

1 株低温石油烃降解菌的分类鉴定及降解特性研究

黄磊¹, 李丹¹, 孙丹², 谢玉娟¹, 马挺¹, 梁凤来¹, 刘如林^{1*}

(1. 南开大学生命科学学院 天津市微生物功能基因组学重点实验室, 天津 300071; 2. 南开大学学报编辑部, 天津 300071)

摘要:从渤海油船泄漏区域的海底泥中筛选到 1 株能降解柴油的低温石油烃降解菌 T7-2, 初步鉴定为红平红球菌(*Rhodococcus erythropolis*)。研究表明, 利用工业乙醇无机盐培养基培养液体种子是适宜的, 其最适温度和 pH 分别为 15℃ 和 7.8, 工业乙醇最适加入量为 0.5%, 菌体浓度为 10⁸ CFU/mL。接种人工海水烃降解培养基后, 通过补加氮源 (NH₄)₂SO₄ 2.64 g/L、磷源 Na₂HPO₄ 2.5 g/L 和酵母粉 0.015 g/L 后, 15℃ 振荡培养 7 d, 降解率可以达到 73.2%。该菌降解烷烃的范围很广泛, C12 ~ C36 均有不同程度的降解。

关键词: 低温; 烃降解; 红球菌; 生物修复

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)09-2101-05

Isolation and Identification of a Low Temperature Hydrocarbon-degrading Strain and Its Degradation Characteristics

HUANG Lei¹, LI Dan¹, SUN Dan², XIE Yu-juan¹, MA Ting¹, LIANG Feng-lai¹, LIU Ru-lin¹

(1. Tianjin Key Laboratory of Microbial Functional Genomics, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China;

2. Editorial Board of Journal of Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: A low-temperature hydrocarbon-degrading strain T7-2 was isolated from sea-mud of Bohai polluted area and identified as *Rhodococcus erythropolis*, which could use diesel oil as carbon source. The optimal temperature and pH for the strain utilizing ethanol was 15℃ and 7.8, and the optimal concentration of ethanol and the seed culture was 0.5% and 10⁸ CFU/mL, respectively. Inoculated to artificial seawater which was added (NH₄)₂SO₄ 2.64 g/L, Na₂HPO₄ 2.5 g/L and yeast extract 0.015 g/L after 7 days of culture at the temperature of 15℃, the rate of degradation was 73.2%. The strain could degrade a large range of *n*-alkane from C12 to C36.

Key words: low temperature; hydrocarbons-degrading; *Rhodococcus* sp.; bioremediation

海洋环境中最广泛存在的污染可以归为石油污染。随着海上油田开发和运输的不断发展, 石油泄漏造成的污染日益严重, 在国内外已引起关注。生物技术是彻底治理海洋油烃污染的根本途径。由于细菌的结构相对简单, 能更适应极端环境。所以, 大多数有关烃降解微生物的研究是围绕着细菌进行的^[1]。海洋中有多种烃降解菌, 可以降解烷烃及甲苯、萘、菲等芳香烃。最新报道的一些烃降解菌有: 属于 γ -变形细菌 (γ -*Proteobacteria*) 的食碱菌属 (*Alcanivorax*)、解环菌属 (*Cycloclasticus*)、海杆菌属 (*Marinobacter*)、海螺菌属 (*Neptunomonas*)、嗜油菌属 (*Oleiphilus*) 和 油螺旋菌属 (*Oleispira*) 以及属于革兰氏阳性菌的动性球菌属 (*Planococcus*)^[2~8]。这些细菌能以石油烃为碳源生长, 属于“专性烃型”细菌。也有一些“非专性”烃型细菌, 例如分离到降解菲或者的弧菌属 (*Vibrio*)、假交替单胞菌属 (*Pseudoalteromonas*)、海洋单胞菌属 (*Marinomonas*) 和盐单胞菌属 (*Halomonas*) 等^[9]。虽然目前已经有大量的烃降解菌被报道, 但寻求具有特定生理功能, 如适应海洋低温、高盐、贫营养等极端环境^[10~13], 以及具

有特定降解途径, 如支链烃降解、芳香烃降解、卤代烃和硝基烃降解以及厌氧氧化烃的烃降解菌^[14~17], 仍然是非常重要的工作。

国内对海洋石油污染生物修复的报道较少, 本研究从渤海油船泄漏区域的海底泥中, 筛选到 1 株能在低温下高效降解柴油的菌株, 对海洋石油污染的生物修复研究具有实际意义。

1 材料与方法

1.1 化学试剂

不同碳数的烷烃均为国产分析纯, 购自天津化学试剂研究所。其中正二十二烷、正三十六烷、角鲨烷, 均购自 Sigma 公司。

1.2 培养基

种子培养基及烃降解培养基 (g/L): Na₂HPO₄ 1.5, KH₂PO₄ 3.48, (NH₄)₂SO₄ 4, MgSO₄ 0.7, 酵母粉 0.01, pH 7.2。接种时加入 0.5% 的工业乙醇即种

收稿日期: 2006-11-15; 修订日期: 2007-01-09

作者简介: 黄磊 (1980 ~), 男, 博士研究生, 主要研究方向为石油微生物。

* 通讯联系人, E-mail: meor@nankai.edu.cn

子培养基;加入 0.5% 的 0 号柴油即烃降解培养基.

人工海水烃降解培养基(g/L): NaCl 24.53, KCl 0.695, CaCl₂ 1.16, MgCl₂ 5.2, Na₂SO₄ 4.09, NaHCO₃ 0.201, KBr 0.101, H₃BO₃ 0.027, SrCl₂ 0.025, NaF 0.003, pH 7.8, 用无离子水配制,人工海水配方根据文献[18]改良而成,接种时加入 0.5% 的 0 号柴油.

1.3 解烃菌株的筛选与鉴定

1.3.1 菌株的筛选

取 1 g 海底泥于 100 mL 烃降解培养基中,15℃,振荡培养 72 h.取 2 mL 富集菌液移至新的 50 mL 烃降解培养基中振荡培养,培养条件同上.在 LB 固体平板上划线,15℃培养 48 h.挑取单菌落接入装有 30 mL 种子培养基的 100 mL 三角瓶内,15℃振荡培养 72 h,作为种子液.按 2%接种量接入装有 30 mL 烃降解培养基的 100 mL 三角瓶中,15℃振荡培养 72 h,用正己烷萃取,气相色谱(GC)检测对柴油的降解情况.

1.3.2 解烃菌株的鉴定

生理生化特征分析参见文献[19].

16S rDNA 序列分析:以菌株基因组 DNA 为模板,用 16S rDNA 通用引物扩增得到近全长的 16S rDNA.PCR 产物测序后采用 ClustalX1.8 对所获得的核苷酸序列进行比对分析,得到序列之间的相似值;用 MEGA2.0 计算出序列的系统进化距离.采用邻位相连法构建系统进化树.

G + C 含量及 DNA-DNA 同源性分析:G + C 含量采用溶解温度(T_m)法^[19],用 *E. coli* K12 做对照. DNA-DNA 杂交采用复性率方法^[19].

1.4 种子液的培养温度、pH 及碳源的选择

实验不同温度、pH 及碳源对菌株生长的影响,生物量测定采用稀释涂平板法和 D₆₀₀ 检测法.

1.5 烷烃降解实验

1.5.1 对单烃的降解能力考查

将 C12 ~ C36 不同碳链长度的单组分烷烃分别以 0.5% 的浓度代替柴油加入到烃降解培养基中,接种量 2%,15℃振荡培养 7 d 后,每瓶加含有 0.006%角鲨烷的 30 mL 正己烷萃取,用 GC(6820, Agilent)分析残余烷烃量,并计算降解率.

1.5.2 对 0 号柴油的降解

将种子液以 2%接种量接种烃降解培养基中,培养 3 d 后,用 GC 分析并计算降解率.

1.5.3 人工海水降解培养基补加营养实验

将种子液以 2%接种量接种人工海水培养基

(补加氮磷营养)中,培养 7 d 后,用 M-22A 红外测油仪测定柴油降解率.

2 结果与讨论

2.1 解烃菌株的分类鉴定

由渤海石油污染的底泥中筛选得到 1 株烃降解菌株 T7-2,参照文献[20]中的步骤对菌株作了初步鉴定.该菌株为革兰氏阳性菌,短杆状,无芽孢,大小为(0.8 ~ 1.0)μm × (2 ~ 3)μm,不运动,具有典型的八字型排列特征.在 LB 固体培养基上为橙色,菌落圆形,较粘稠,不透明,凸起,有光泽.其生理生化特征如表 1 所示.将 16S rDNA 序列测序后与 GenBank 数据库中的序列进行 BLAST(basic local alignment search tool)比对.构建的 T7-2 菌株和 GenBank 中亲缘关系较近菌属的系统发育树,如图 1 所示.

表 1 T7-2 与红平红球菌 ATCC53968 生理生化性质比较¹⁾

Table 1 Morphological and physiological characteristics of T7-2 and type strain

鉴定项目	T7-2	<i>R. erythropolis</i> ATCC 53968
产芽孢	-	-
接触酶	+	+
氧化酶	-	-
M.R. 实验	-	-
V-P 实验	-	-
吡啶产生	-	-
硝酸盐还原	+	+
淀粉水解	-	-
产氨实验	-	-
脲酶	+	+
分解七叶苷	+	+
乳糖	-	-
甘露醇	+	+
2,3-丁二醇	+	-
天冬氨酸	+	+
肌醇	+	-
水解腺嘌呤	-	+

1)“+”表示反应为阳性,“-”表示反应为阴性

图 1 表明,菌株 T7-2 与 *Rhodococcus erythropolis* DCL14 16S rDNA (GenBank 的序列登录号为 AJ131637)的进化距离最小,相似值最高,分别为 0.00071 和 99.93%.

菌株 T7-2 的 G + C 含量摩尔分数为 62.6%,属于红球菌的 G + C 含量范围(59% ~ 69%).DNA 杂交显示与由中国微生物菌种保藏中心购买的菌株 *Rhodococcus erythropolis* ATCC53968 的相似度为 90.48%.

由以上鉴定结果,断定 T7-2 菌株属于红平红球菌,命名为 *Rhodococcus erythropolis* T7-2.但在生理生化特性与红平红球菌 ATCC53968 比较有个别指标有差异,可能为 1 个新的亚种.

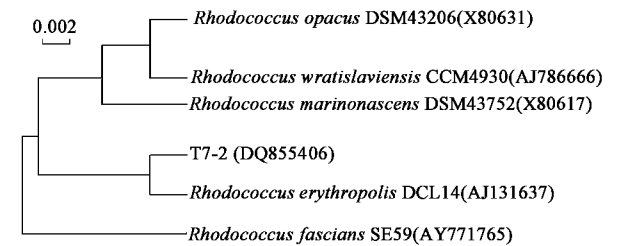


图 1 基于 16S rDNA 序列同源性的菌株间的系统发育树
Fig.1 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence of T7-2 and the sequences of relating species

2.2 种子液培养条件的选择

对种子液培养的温度、pH 及培养基碳源浓度选择进行了实验.如图 2~4 所示,T7-2 在 15~30℃ 范围内均生长良好;在 pH 值为 7.8 时生物量达到最高;在海洋及其滩涂石油污染的生物修复中,种子液将制成一定剂型使用,这就要求其成分不能有烃类物质,避免加重污染.其碳源选择只有糖类和醇类,考虑到工业乙醇廉价易得,制备的种子液不易变质,便于保存,故选用工业乙醇为碳源,当加入量为 0.5% 时菌浓最高.根据种子液生长曲线(图 5)显示,选择对数生长后期的 72 h 接种烃降解培养基,此时种子液菌体浓度可以达到 10^8 CFU/mL.

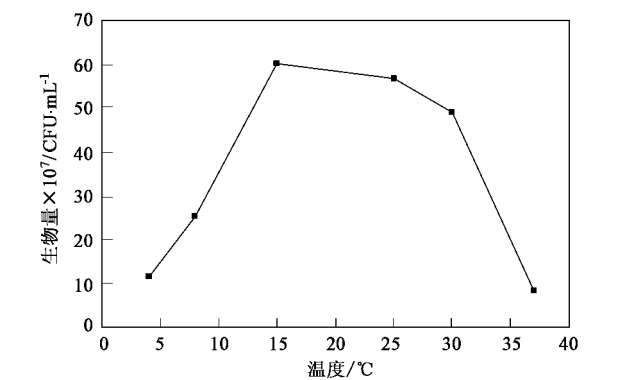


图 2 温度对菌体浓度的影响
Fig.2 Effect of biomass by temperature

2.3 对单组分直链烷烃的降解

将 T7-2 种子液以 2% 接种量接入 30 mL 单组分直链烷烃降解培养基,以未接菌的相同培养基做对照,于 15℃ 振荡培养 7 d 后测定降解率.结果表明,T7-2 菌株在 C12~C36 的烷烃培养基中都能生长,

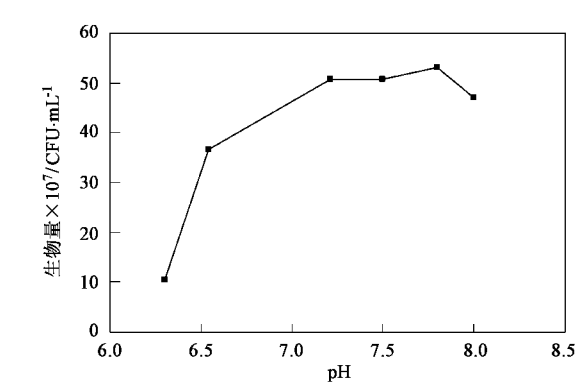


图 3 pH 对菌体浓度的影响
Fig.3 Effect of biomass by pH

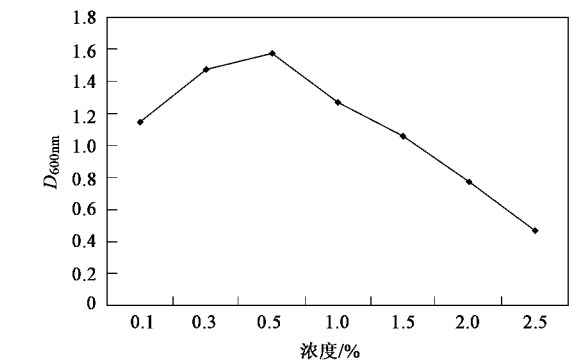


图 4 工业乙醇浓度对菌体浓度的影响
Fig.4 Effect of biomass by industrial ethanol

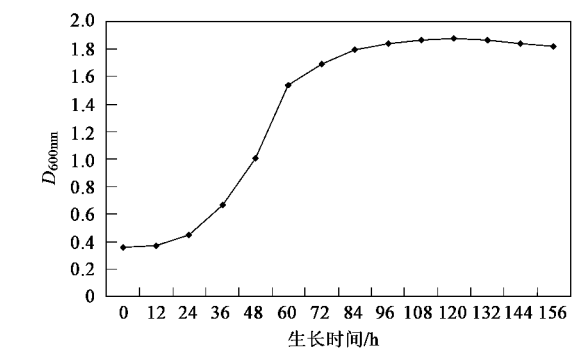


图 5 种子液生长曲线
Fig.5 Growth curve of seed culture

并对其均有较好的降解作用,其中对 C12~C15 的降解率达到 80% 以上,对 C36 也能降解 12% 左右(图 6).T7-2 对长链烷烃降解率低可能是因为由 C16 以上的烷烃在 15℃ 下呈固体状态,与菌体细胞接触减少的结果.T7-2 对饱和中链烷烃具有很好的降解性能,并且对长链烷烃直到 C36 均有一定的降解,有很好的应用价值.目前关于海洋生物修复方面鲜见降

解范围这样广泛菌株的报道.

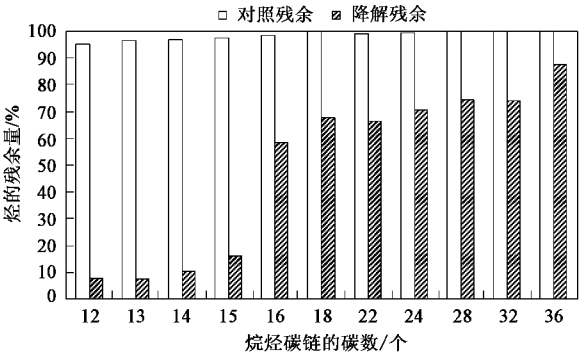


图 6 T7-2 对单烷烃的降解

Fig.6 Degradation of individual *n*-alkanes by T7-2

2.4 降解柴油实验

以 2% 的接种量将 T7-2 种子液接入烃降解培养基,15℃振荡培养 72 h 后,将经微生物作用前后的柴油用正己烷萃取,以角鲨烷做为内标,用 GC 分析柴油降解情况(图 7、8).柴油各组分在 T7-2 作用前后均有了明显的减少,由于柴油组分以饱和中等链长烷烃为主,说明 T7-2 对饱和中链长烷烃具有良好的降解能力.

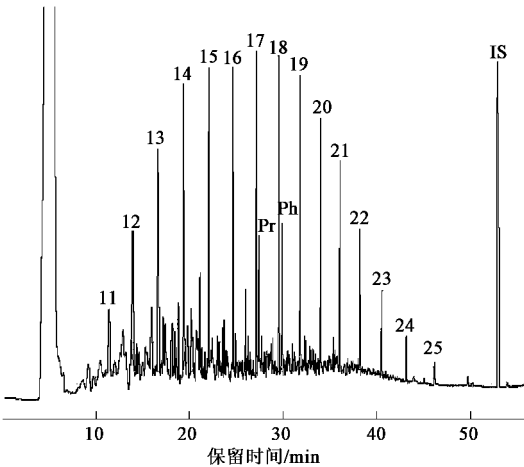


图 7 柴油对照的气相色谱

Fig.7 Gas chromatographic analysis of diesel oil

2.5 人工海水降解培养基补加营养实验

将种子液以 2% 接种量接入人工海水培养基中培养 7 d,对补加氮、磷盐和酵母粉的量进行了选择.确定氮源 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 补加量为 2.64 g/L(图 9)、磷源 Na_2HPO_4 补加量为 2.5 g/L(图 10)和酵母粉补加量为 0.015 g/L(图 11)时降解率最高,利用 M-22A 红外测油仪检测柴油降解率达到 73.2%,相对于未补加营养人工海水降解率的 12.6%,其降解率增加了 5

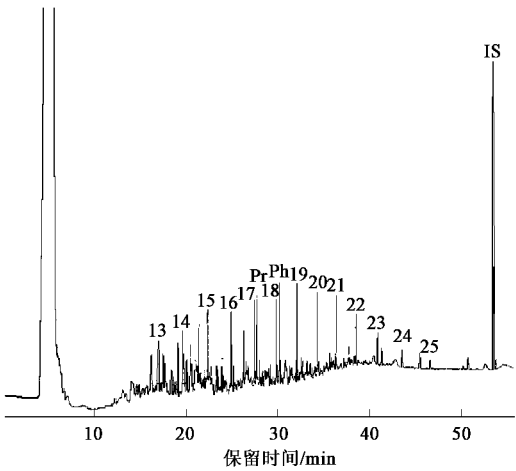


图 8 柴油降解后的气相色谱

Fig.8 Gas chromatographic analysis of diesel oil degraded

倍左右(图 12),具有良好的海洋生物修复应用前景.

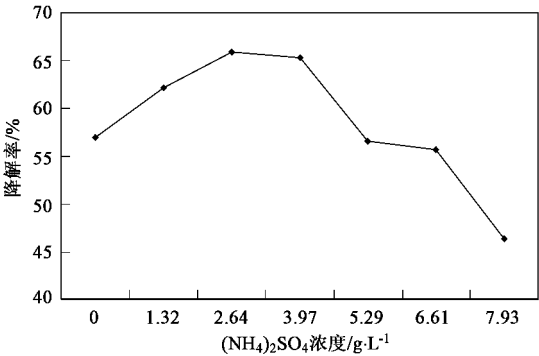


图 9 氮源浓度对降解率的影响

Fig.9 Effect of degradation by concentration of nitrogen

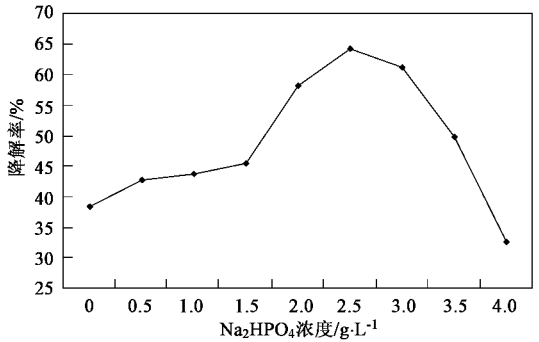


图 10 磷源浓度对降解率的影响

Fig.10 Effect of degradation by concentration of phosphate

3 结论

(1)由海底泥中筛选到 1 株能降解柴油的低温

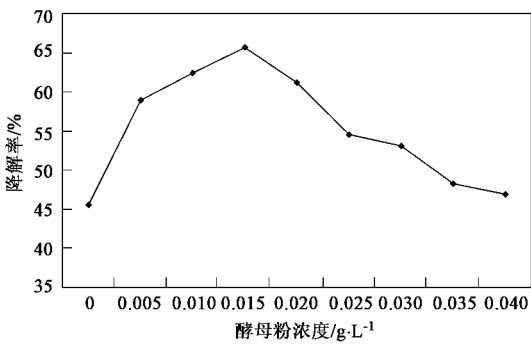


图 11 酵母粉浓度对降解率的影响

Fig.11 Effect of degradation by concentration of yeast extract

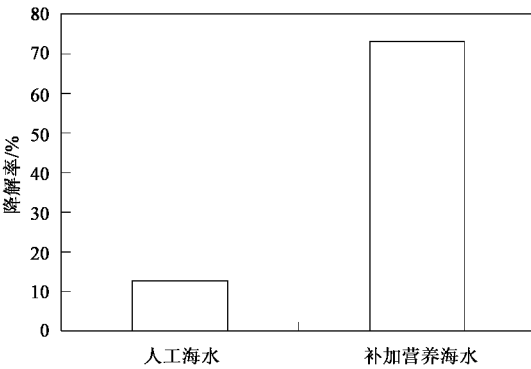


图 12 人工海水中补加营养对降解率的影响

Fig.12 Effect of degradation by concentration of nutrition in artificial seawater

解烃菌株,经初步鉴定为 *Rhodococcus erythropolis* T7-2.

(2)对于种子液培养中碳源、温度、pH 及生长时间进行了研究,确定了最优种子液培养条件为:碳源选择为工业乙醇、温度 15℃、pH 7.8、培养时间 72 h.

(3)对于 T7-2 菌株降解烷烃的底物范围进行了研究:T7-2 菌株对 C12 ~ C36 的烷烃均有较好的降解作用;通过气相色谱检测,柴油各组分均有明显的降解.

(4)对于人工海水中补加营养进行了分析,确定了氮、磷源及酵母粉的加入量分别为:(NH₄)₂SO₄ 2.64 g/L、Na₂HPO₄ 2.5 g/L和酵母粉 0.015 g/L,经过验证表明在补加了营养成分后降解率明显提高.

参考文献:

[1] Mishra V, Lal R, Srinivasan. Enzymes and operons mediating xenobiotic degradation in bacteria [J]. Crit Rev Microbio, 2001, 27 (2): 133 ~ 166.

[2] Yakimov M M, Golyshin P N, Lang S, et al. Alcanivorax borkumensis gen. nov., sp. nov., a new hydrocarbon-degrading and surfactantproducing marine bacterium [J]. Int J Syst Bacteriol, 1998, 48: 339 ~ 348.

[3] Dyksterhouse S E, Gray J P, Herwig R P, et al. Cycloclasticus pugetii gen. nov., sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from marine sediments [J]. Int J Syst Bacteriol, 1995, 45: 116 ~ 123.

[4] Gauthier M J, Lafay B, Christen R, et al. Marinobacter hydrocarbonoclasticus gen. nov., sp. nov., a new extremely halotolerant, hydrocarbondegrading marine bacterium [J]. Int J Syst Bacteriol, 1992, 42: 568 ~ 576.

[5] Hedlund B P, Geisellbrecht A D, Bair T J, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a new marine bacterium, Neptunomonas naphthovorans gen. nov., sp. nov. [J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65: 251 ~ 259.

[6] Golyshin P N, Chernikova T N, Abraham W R, et al. Oleiphilaceae fam. nov., to include Oleiphilus messinensis gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligatory utilizes hydrocarbons [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2002, 52: 901 ~ 911.

[7] Yakimov M M, Giuliano L, Gentile G, et al. Oleispira antarctica gen. nov., sp. nov., a novel hydrocarbonoclastic marine bacterium isolated from Antarctic coastal sea water [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2003, 53: 779 ~ 785.

[8] Engelhardt M A, Daly K, Swannell R P, et al. Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading, Grampositive bacterium, isolated from intertidal beach sediment, and description of Planococcus alkanoclasticus sp. nov. [J]. J Appl Microbiol, 2001, 90: 237 ~ 247.

[9] Melcher R J, Apitz S E, Hemmingsen B B. Impact of irradiation and polycyclic aromatic hydrocarbon spiking on microbial populations in marine sediment for future aging and biodegradability studies [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68: 2858 ~ 2868.

[10] Leahy J G, Colwell R R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment [J]. Microbiology Review, 1990, 54: 305 ~ 315.

[11] Raed M M, Abed, Nimer M D, et al. Microbial diversity of a heavily polluted microbial mat and its community changes following degradation of petroleum compounds [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68: 1674 ~ 1683.

[12] Brakstad O G, Lødeng A G G. Microbial diversity during biodegradation of crude oil in seawater from the North Sea [J]. Microbial Ecology, 2005, 49: 94 ~ 103.

[13] Jan B, van Beilen, Mercedes M, et al. Characterization of two alkane hydroxylase genes from the marine hydrocarbonoclastic bacterium Alcanivorax borkumensis [J]. Environmental Microbiology, 2004, 6(3): 264 ~ 273.

[14] Berekaa M M, Steinbuechel A. Microbial degradation of the multiply branched alkane 2, 6, 10, 15, 19, 23-hexamethyltetracosane (squalane) by Mycobacterium fortuitum and Mycobacterium ratisbonense [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(10): 4462 ~ 4467.

[15] 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.

[16] 邵宗泽,许晔,马迎飞,等. 2 株海洋石油降解细菌的降解能力[J].环境科学,2004,25(5):133 ~ 137.

[17] Akihiro Hara, Kazuaki Syutsubo, Shigeaki Harayama. Alcanivorax which prevails in oil-contaminated seawater exhibits broad substrate specificity for alkane degradation[J]. Environmental Microbiology, 2003, 5(9): 746 ~ 753.

[18] Austin B. Microbiological Methods: Marine Microbiology [M]. Cambridge, U.K.: Cambridge University Press, 1993.24.

[19] 东秀珠,蔡妙英. 常用细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社,2001.

[20] Holt J G. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology [M]. (9th Edition). USA: Williams and Wilkins, Baltimore, 1993.