论文

中国知名大学及科研院所专栏 中国科学院烟台海岸带研究所专辑

高效石油烃降解菌不动杆菌(*Acinetobacter* sp. BZ-15)的筛选、鉴定及其降解性能研究

刘玉华^{①②}, 胡晓珂^{①*}

① 中国科学院烟台海岸带研究所, 海岸带生物学与生物资源利用重点实验室, 烟台 264003;

② 中国科学院大学, 北京 100049

* 联系人, E-mail: xkhu@yic.ac.cn

收稿日期: 2016-02-20; 接受日期: 2016-03-11; 网络版发表日期: 2016-08-26

国家自然科学基金(批准号: 41376138, 41576165)和烟台市重大科技发展专项(批准号: 2012017)资助

摘要 本研究旨在从土壤中筛选高效石油烃降解菌株, 并对其系统分类和降解特性进行研究, 为石油污染的原位修复奠定基础. 该研究从滨州油井溢油污染土壤样品中分离得到一株高效石油烃降解菌株 BZ-15, 对菌株 BZ-15 进行形态观察、16S rRNA 基因序列分析及系统发育树分析; 对该菌株的生长特性进行研究; 通过 GC-MS 分析其对原油组分中不同碳原子饱和烃的降解特性; 同时研究吐温-20 对其生长及降解特性的影响; 对该菌株中的烷烃羟化酶基因 *alkM* 进行了克隆. 结果表明, 菌株 BZ-15 为不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.)细菌, 在 LB 培养基中其代时为 3.25 h, 添加吐温-20 代时为 2.67 h, 吐温-20 可促进菌株 BZ-15 生长; 该菌株可降解 C₁₃~C₂₈ 碳链长度饱和烃, 饱和烃降解率为 61.0%, 添加吐温-20 饱和烃降解效率为 52.2%, 吐温-20 可抑制菌株 BZ-15 降解饱和烃; 菌株 BZ-15 存在烷烃羟化酶基因 *alkM*, 通过末端氧化途径对饱和烃进行降解.

关键词 不动杆菌, 石油烃, 烷烃羟化酶, 吐温-20

随着石油开采和运输的发展, 石油污染已成为世界性的问题, 严重威胁着人类的生存和社会的可持续发展. 石油污染不仅破坏了人类赖以生存的生态环境, 而且石油有害组分通过食物链的积累严重影响人类的食品安全. 因此, 石油污染修复逐渐引起人们的重视. 消除石油污染的方法主要分为物理修复、化学修复和生物修复. 生物修复是利用生物(特别是微生物)催化降解环境污染物, 减少或最终消除环

境污染的受控或自发过程^[1]. 由于生物修复的彻底性和无二次污染, 其已被广泛应用于治理原油泄漏^[2]. 微生物可以代谢降解石油中的绝大部分烃类^[3], 在修复过程中起着关键作用^[4]. 微生物的石油烃降解能力是进行生物修复的基础, 是彻底解决石油污染问题的根本, 直接决定生物修复的效率. 同时, 生存环境中的营养条件以及理化参数能够影响微生物的活性, 从而影响微生物对石油烃的降解^[5].

引用格式: 刘玉华, 胡晓珂. 高效石油烃降解菌不动杆菌(*Acinetobacter* sp. BZ-15)的筛选、鉴定及其降解性能研究. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 1091-1100
Liu Y H, Hu X K. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons by *Acinetobacter* sp. BZ-15, isolated from contaminated soil. Sci Sin Vitae, 2016, 46: 1091-1100, doi: 10.1360/N052016-00060

不动杆菌属(*Acinetobacter*)细菌可以高效降解石油烃^[6]。石油烃主要可以分为饱和烃、芳香烃、胶质和沥青质^[7], 其中沥青质含量愈高, 石油烃(重油)愈难降解。不动杆菌属细菌可以降解直链和支链烷烃、芳香烃等多种石油烃组分, 对其他细菌难以降解的重油亦具有较好的降解效果^[6], 能有效修复石油烃对环境的污染。在有氧条件下, 不动杆菌属细菌对饱和烃的降解主要有两种途径: 末端氧化和芬纳蒂途径^[8]。其中研究最详尽的是末端氧化途径。烷烃首先由单加氧酶氧化成伯醇, 然后经由伯醛转化成脂肪酸, 通过脂肪酸的 β 氧化进入三羧酸循环完成降解。目前, 不动杆菌中已经发现两种类型的烷烃单加氧酶: 一种是 *alk* 基因编码的依赖红素氧还蛋白的氧化酶^[9,10], 第二种是细胞色素 P450 家族的 CYP153 单加氧酶^[11]。不同的单加氧酶可以氧化不同碳链长度的饱和烃。

石油烃溶解度低, 易吸附在土壤和其他物质上。这降低了与微生物的有效接触, 从而增加了石油烃污染的生物修复难度, 延长了生物修复所需时间。因此, 改善环境因素可以促进微生物对石油烃的降解。表面活性剂可以促进石油烃的乳化和分散, 增加石油烃的溶解度^[12]。研究人员发现, 加入表面活性剂后部分种属的微生物对石油烃的降解明显增强^[13-15], 且随着表面活性剂浓度的增加, 石油烃的降解率也随之提高^[16]。但是, 张丽芳等人^[17]研究发现, 在添加表面活性剂后, 细菌细胞因受到毒害作用而导致石油烃降解作用受到抑制。因此, 不同的表面活性剂对微生物降解石油烃的影响存在不同效果。表面活性剂可以被土壤吸附, 吸附性会降低表面活性剂的分散能力, 并且有些表面活性剂的去除非常困难, 容易造成二次污染^[15,18]。非离子表面活性剂具有毒性低、不易产生强吸附、易降解等优点, 被广泛应用于生物修复^[19]。对于不同非离子表面活性剂的研究发现, 吐温系列的非离子表面活性剂具有增溶作用, 在 0.05~1.0 g/L 时能促进有机污染物的降解^[20], 也可以促进沥青质的回收和降解^[21]。本研究从石油污染土壤中筛选得到一株高效石油烃降解菌, 研究其生长特性及对饱和烃的降解特性, 探讨了吐温-20(聚氧乙烯失水山梨醇单月桂酸酯)是对该菌生长及饱和烃降解效率的影响, 进一步克隆该菌株的烷烃单加氧酶, 为该菌株降解石油烃的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂和培养基

原油由山东东营胜利油田提供。正己烷、二氯甲烷、甲醇等为国产分析纯, 气相色谱-质谱联用(gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS)分析用试剂为高效液相纯。

(1) 无机盐液体培养基。BHB(Bushnell-Haas Broth)培养基: MgSO_4 0.2 g/L, CaCl_2 0.02 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, NH_4NO_3 1 g/L, FeCl_2 0.05 g/L, NaCl 25 g/L, 调节 pH 为 7.0 ± 0.2 。

(2) 降解石油烃无机盐液体培养基。在 BHB 培养基基础上添加 0.5% 石油, pH 为 7.0 ± 0.2 。

(3) 降解石油烃固体培养基。在降解石油烃无机盐液体培养基中添加 1.5% 琼脂, pH 为 7.0 ± 0.2 。

(4) 富集液体培养基(LB 培养基)。蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, 氯化钠 10 g/L, pH 为 7.0 ± 0.2 。

(5) 富集固体培养基。在富集液体培养基中添加 1.5% 琼脂, pH 为 7.0 ± 0.2 。

1.2 石油烃降解菌的筛选

土壤样品取自山东滨州油井附近石油污染土壤。称取 10 g 土壤加入含有 100 mL 富集液体培养基的锥形瓶中, 置于摇床上 180 r/min, 30℃ 培养 7 天。富集后的培养液经梯度稀释后涂布, 30℃ 培养 18 h。挑取单菌落, 在降解石油烃固体培养基上连续纯化 3 次, 纯化后的菌株在 LB 液体培养基中培养, 进行后续实验。

1.3 石油烃降解菌 DNA 提取

菌株 BZ-15 在 LB 液体培养基中纯培养(30℃, 150 r/min)16 h 后, 收集 1.8 mL 菌悬液, 使用 DNA 提取试剂盒 UltraCleanTM Microbial DNA Isolation Kit (MO-BIO, 美国)进行基因组 DNA 提取。将 DNA 置于 -20℃ 保存, DNA 可直接用于下游实验。

1.4 石油烃降解菌的鉴定

采用革兰氏染色、形态观察对分离得到的菌株进行形态鉴定。采用 16S rRNA 基因同源性分析进行菌种鉴定。16S rRNA 基因 PCR 扩增以提取的 DNA 为模板, 采用的引物是 27F 和 1492R^[22](表 1)。PCR 反应体系为 50 μL , 包含: 1 $\times$ PCR Buffer, 0.2 mmol/L dNTPs, 0.2 mmol/L 27F, 0.2 mmol/L 1492R 和 1 U Taq 酶。

PCR 反应程序为: 94℃ 预变性 5 min, 30 个循环的 94℃ 变性 1 min, 55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 最后 72℃ 延伸 10 min. PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 由 Invitrogen 公司(美国)完成测序. 测序结果在 NCBI(National Center for Biotechnology Information) 网站通过 BLAST 进行同源性分析, 通过 Mega 软件构建系统发育树.

1.5 菌株生长曲线测定

将菌株 BZ-15 过夜培养活化, 活化后的菌液 1 mL 分别接入 100 mL 富集培养基中和 100 mL 添加 0.5% 吐温-20 的富集培养基, 置于 180 r/min 的摇床中, 30℃ 培养. 使用 UV-7100 紫外分光光度计(上海精密科学仪器有限公司), 调节波长为 600 nm, 每隔一定时间取样测定其吸光值. 以培养时间为横坐标, 吸光值为纵坐标, 绘制该菌株的生长曲线.

代时计算公式如下:

$$G = \frac{t_2 - t_1}{(\lg W_2 - \lg W_1) / \lg 2},$$

t_1, t_2 为所取对数期两点的时间, W_1, W_2 为对应时间的 A_{600} 值.

1.6 菌株降解石油烃效果测定

在石油烃降解液体培养基中接入 10%(v/v) 的菌种, 30℃, 180 r/min 培养 5 天, 以不接菌为对照, 测定菌株对石油烃降解效果并分析代谢产物. 培养结束后, 用正己烷萃取残余石油烃组分, 无水硫酸钠干燥后定容至 25 mL. 利用硅胶柱层析法(硅胶 3 g、氧化铝 2 g、无水硫酸钠 1 g)分离石油烃组分, 加入 1 mL 石油烃样品, 分别用 20 mL 正己烷、15 mL 二氯甲烷与正己烷混合液(2:1)、15 mL 甲醇洗脱, 待溶解饱和烃、芳香烃和胶质组分的溶剂挥发后, 分别用正己烷(色谱纯)、正己烷(色谱纯)和甲醇(分析纯)溶解 3 种组分^[23]. 溶解后的饱和烃组分进行 GC-MS 测定. 色谱条件: HP-5MS 弹性石英毛细管气相色谱柱(30 m×320 μm×0.25 μm). 载气为 99.999% 氮气. 燃烧气为氢气, 流速为 30 mL/min, 空气流速 350 mL/min. FID 检测温度 300℃. 进样口温度 280℃. 柱温 80℃ 到 280℃. 柱流量 2 mL/min, 分流比 5:1, 进样量 1 μL^[24].

1.7 石油烃降解功能基因的克隆

以提取的 DNA 作为模板, 采用引物 *alkB*-1f 和

表 1 本研究中所使用的 PCR 引物序列

引物	序列
27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
1492R	5'-TGACTGACTGAGGYTACCTTGTTACGACTT-3'
<i>alkB</i> -1f	5'-AAYACNGCNCAYGARCTNGGNCAYAA-3'
<i>alkB</i> -1r	5'-GCRTGRTGRTTCNGARTGNCGYTG-3'

alkB-1r^[25](表 1)进行 *alkB* 基因片段 PCR 扩增. PCR 反应体系为 50 μL, 包含: 1×PCR Buffer, 0.2 mmol/L dNTPs, 0.2 mmol/L *alkB*-1f, 0.2 mmol/L *alkB*-1r 和 1 U Taq 酶. PCR 反应程序为: 95℃ 预变性 15 min; 94℃ 变性 1 min, 55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 进行 40 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min. PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 由 Invitrogen 公司进行测序. 测序结果在 NCBI(National Center for Biotechnology Information)网站通过 BLAST 进行分析, 根据与已知序列菌株的同源性高低, 确定菌株 BZ-15 的种属, 并利用 Mega 软件构建系统发育树.

2 结果

2.1 菌株的筛选与鉴定

以石油烃为唯一碳源, 经过筛选与纯化得到一株能够降解石油烃的的菌株, 命名为 BZ-15. 该菌菌落形态为乳白色圆形凸起, 边缘光滑, 直径为 0.5~1.0 mm. LEICA DM500 显微镜(德国)下观察该菌为短粗杆状, 无芽孢和鞭毛, 革兰氏染色结果显示其为革兰氏阴性菌. 16S rRNA 基因 PCR 扩增后, 测序结果通过 BLAST 比对, 结果表明, 该菌株与多株不动杆菌属细菌具有较高的同源性, 与 *Acinetobacter psychrotolerans* strain Ths 相似性最高为 97%. 通过形态和 16S rRNA 基因同源性分析, 鉴定该菌株为不动杆菌属细菌. 利用 MEGA5.0 软件构建 BZ-15 的系统发育树如图 1 所示.

2.2 菌株生长特性

菌株 BZ-15 培养 120 h, 其生长曲线见图 2. BZ-15 的生长曲线包含延滞期、指数期、稳定期和衰退期等. 在富集培养基和添加吐温-20 的富集培养基中, 菌株都经历了延滞期, 约为 4 h, 由延滞期进入指数期的时间差异并不明显. 30 h 后菌株生长开始进入稳定期. 从生长曲线分析, 吐温-20 未对 BZ-15 菌

图1 *Acinetobacter* sp. BZ-15 基于 16S rRNA 基因的系统发育树 图2 *Acinetobacter* sp. BZ-15 生长曲线 图3 *Acinetobacter* sp. BZ-15 在石油烃培养基中的生长状况

A: *Acinetobacter* sp. BZ-15 在石油烃固体培养基上的生长状况; B: 在石油烃液体培养基中, 经 DAPI 染色的 *Acinetobacter* sp. BZ-15 聚集在油滴周围

株的生长产生明显的影响。但是计算代时后发现, 富集培养基中菌株代时为 3.25 h, 添加吐温-20 的培养基中菌株的代时为 2.67 h。添加吐温-20 可以明显缩短菌株的代时(比未添加的对照组代时快 17.8%), 但是未对 BZ-15 菌株的生物量产生显著影响。

2.3 菌株对石油烃的降解效果

在石油烃固体培养基上, 菌株 BZ-15 的菌落较小, 菌落周围颜色变浅甚至无色, 形成噬油斑(图 3A)。经 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色, 在荧光显微镜下观察发现, 菌株 BZ-15(蓝色荧光)聚集在褐色油滴周围, 利用油滴(图 3B)。

以 10%(v/v)接种量, 将菌株 BZ-15 接种于石油烃液体培养基中培养 5 天, 随着培养时间的延长, 培养液的颜色逐渐加深, 油滴分散程度变高。5 天后残余石油烃用正己烷萃取、层析分离后进行 GC-MS 分析, 结果如图 4 所示。与对照组相比, 5 天后饱和烃被降

解了 61.0%。分析不同碳链长度的饱和烃降解效果, 发现 BZ-15 可以降解 C_{13} ~ C_{28} (图 5A), 偶数碳原子烷烃的降解率高于奇数碳原子烷烃(图 5B)。除 C_{17} , C_{19} 外, 菌株 BZ-15 对饱和烃的降解率均达到 65%以上, 对 C_{13} , C_{14} 的降解率可达到 100%, C_{24} ~ C_{28} 的降解率可达到 80%以上(表 2)。

2.4 吐温-20 对石油烃降解效果的影响

通过添加非离子表面活性剂吐温-20, 研究其对菌株 BZ-15 降解效果的影响。以 10%接种量, 将 BZ-15 接种于添加 0.3%吐温-20 的石油烃降解培养基, 观察该菌对石油烃的降解效果(图 6)。在添加 0.3%吐温-20 的石油烃降解培养基中菌株 BZ-15 生长状态优于对照组, 培养液更为浑浊, 随着培养时间的延长, 培养基中石油烃分散程度提高。5 天后饱和烃降解率为 52.2%。在添加吐温-20 的条件下, BZ-15 对 C_{13} , C_{14} 的降解率为 100%, 该菌对其他碳链长度饱和烃降解率下降, C_{24} ~ C_{28} 的降解率可达到 80%以上(表 2)。

图 4 *Acinetobacter* sp. BZ-15 对饱和烃降解的 GC-MS 分析
A: 未接种菌株的对照组; B: 5 天后, 接种量为 10% 的残余石油烃分析

表 2 *Acinetobacter* sp. BZ-15 对不同碳原子的饱和烃的降解率(%)

	C ₁₃	C ₁₄	C ₁₅	C ₁₆	C ₁₇	C ₁₈	C ₁₉	C ₂₀
未添加吐温-20	100	100	77.6	65.8	24.7	74.8	12.8	78.3
添加吐温-20	100	100	71.1	63.6	7.6	70	0	70.9

	C ₂₁	C ₂₂	C ₂₃	C ₂₄	C ₂₅	C ₂₆	C ₂₇	C ₂₈
未添加吐温-20	74.6	77.2	79.2	82.3	81.8	84.8	83.6	83.8
添加吐温-20	66.9	71.7	68.4	71.7	68.1	67.8	61.1	50.7

2.5 石油烃降解功能基因的克隆

对菌株 BZ-15 石油烃降解功能基因(烷烃羟化酶基因 *alk*)进行克隆. 利用已知的 *alkB* 引物, 进行 PCR 扩增, 得到约 500 bp 的片段. PCR 产物测序后, 进行 BLAST 同源性分析, 结果表明该片段与 *Acinetobacter* sp. M-1 烷烃羟化酶基因 *alkane hydroxylase A* 具有较高的同源性(82%). 然后利用 MEGA5.0 软件构建系统发育树(图 7).

3 讨论

微生物具有利用烃类作为能量来源的潜力, 10 个属细菌、11 个属真菌和 10 个属藻类等已被确认具有烃类降解能力^[2]. 微生物的石油烃降解能力受到各种因素的影响, 如微生物的种类、石油烃的组分和环境因素(包括 pH, 温度, 盐度和营养物质等). 生物修复过程中, 土著微生物和外源微生物都应用于石油污染的降解^[26]. 与外源微生物相比, 土著微生物更能

图5 *Acinetobacter* sp. BZ-15 对不同碳原子饱和烃的降解率

适应原位的复杂环境. 本研究从山东滨州石油污染土壤中分离出降解石油烃的菌株 BZ-15, 分析了该菌株的形态和生理生化等表征, 并 16S rRNA 基因系统发育分析, 将该菌株 BZ-15 鉴定为不动杆菌属细菌. 对菌株的石油烃降解特性进行研究, 结果表明, 菌株 BZ-15 可以降解 C₁₃~C₂₈ 碳链长度的正构烷烃, 降解率可达 61%. 王虎等人^[27]从陕北地区分离的 *Acinetobacter* sp. 1 对石油烃的降解率为 60%, *Acinetobacter* sp. 2 在最优条件下降解率最高为 67%. 与之相比, 菌株 BZ-15 的石油烃降解效率较高, 可应用于生物修复, 治理石油污染的土壤.

非离子表面活性剂由于其具有增溶能力、毒性低及能够促进有机污染物降解等能力, 被广泛应于污染土壤的修复研究^[28]. 但是有研究表明, 非离子活性剂对大肠杆菌具有抑制作用^[29]. 吐温-20 是一种常用的非离子表面活性剂, 对各种有机物具有良好的乳化和分散作用. 欧阳科等人^[30]以吐温-20 为表面活性剂使葱的降解率提高了约 30%. 本研究添加吐温-20 对 BZ-15 降解石油烃有不利影响, 饱和烃降解率下降了 15%. 生长曲线分析表明, 吐温-20 可以促进 BZ-15 菌株的生长, BZ-15 的生长速度快于对照组(无吐温-20). 据此推测 0.3%吐温-20 对 BZ-15 没有抑制或毒

图6 添加吐温-20后 *Acinetobacter* sp. BZ-15 对饱和烃降解的 GC-MS 分析

A: 未接种菌株的对照组; B: 5 天后, 接种量为 10% 的残余石油烃分析

图7 *Acinetobacter* sp. BZ-15 *alkM* 基因系统发育树

害作用, BZ-15 可以利用吐温-20 生长, 从而影响了对石油烃的利用, 降低了石油烃的降解效率. 因此, BZ-15 可以与表面活性剂或产生物表面活性剂的菌株联用, 对石油烃污染土壤的生物修复具有实际应用价值.

在大多数情况下, 不动杆菌属细菌在有氧条件下中通过末端氧化途径降解饱和烃, 由末端甲基氧化起始生成伯醇, 进一步氧化成相应的伯醛, 最终转

化成相应的脂肪酸进入 β -氧化循环产生乙酰辅酶 A 而降解^[31]. 另一方面, 在某些不动杆菌属细菌的芬纳蒂途径中双加氧酶将饱和烃转化成正烷烃过氧化物, 不生成醇而形成过氧醛和脂肪酸^[32,33]. 正是由于不动杆菌中饱和烃氧化酶的多样性和复杂性, 进一步研究以确定菌株 BZ-15 中饱和烃的代谢途径是必要的. 研究表明, 在 *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1 中, 烷烃羟化酶 *alkM* 是唯一一个饱和烃降解所必需

的酶,并由饱和烃调控^[34,35]。本研究从菌株 BZ-15 中扩增得到烷烃羟化酶 *alkM* 基因片段,证实了其存在饱和烃降解所必需的烷烃羟化酶 *alkM*。由此,推测菌株 BZ-15 通过末端氧化途径降解饱和烃,首先将饱和烃氧化成醇后,通过醇脱氢酶和醛脱氢酶,生成脂肪酸,生成的脂肪酸进一步通过 β 氧化被降解,一次氧化脱去两个碳原子。所以,本研究中 BZ-15 对偶数碳原子的烷烃表现出更高的降解效率。Throne-Holst 等人^[36]研究发现, *Acinetobacter venetianus* 6A2 可降解 $C_{10}\sim C_{18}$ 的饱和烃。本研究中,菌株 BZ-15 可降解 $C_{13}\sim C_{28}$ 的饱和烃,能够氧化更长碳链长度的饱和烃,推测在菌株中存在其他的氧化酶催化饱和烃降解。

本研究表明,菌株 BZ-15 表现出高效的石油烃降解能力和潜在的非离子表面活性剂代谢利用能力,使其能够加强土壤中石油烃污染物的降解,降低石油烃和表面活性剂在土壤中的毒性,成为石油烃污染土壤生物修复应用的潜在降解者。

4 结论

(1) 从石油烃污染土壤中分离出 1 株可以利用石油的菌株 BZ-15,经生理生化表征形态观察和 16S rRNA 基因同源性分析将其鉴定为不动杆菌属细菌,命名为 *Acinetobacter* sp. BZ-15。

(2) 除 C_{17} , C_{19} 外,菌株 BZ-15 对饱和烃的降解率均达到 65% 以上,对 C_{13} , C_{14} 的降解率可达到 100%,偶数碳原子烷烃的降解率高于奇数碳原子烷烃的降解效率。

(3) 在富集培养基中添加吐温-20,菌株 BZ-15 的代时缩短 17.8%。在石油烃降解过程中添加吐温-20,饱和烃降解率降低为 52%。

(4) 菌株 BZ-15 中克隆得到烷烃单加氧酶基因 *alkM*,推测该菌株可以通过末端氧化途径代谢利用饱和烃。

参考文献

- Madsen E L. Determining *in situ* biodegradation: facts and challenges. *Environ Sci Technol*, 1991, 25: 1663–1672
- Head I M, Jones D M, Roling W F. Marine microorganisms make a meal of oil. *Nat Rev Microbiol*, 2006, 4: 173–182
- 黄艺, 礼晓, 蔡佳亮. 石油污染生物修复研究进展. *生态环境学报*, 2009, 18: 361–367
- Gentili A R, Cubitto M A, Ferrero M, et al. Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbon-degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes. *Int Biodeter Biodegr*, 2006, 57: 222–228
- Sugimori D, Utsue T. A study of the efficiency of edible oils degraded in alkaline conditions by *Pseudomonas aeruginosa* SS-219 and *Acinetobacter* sp. SS-192 bacteria isolated from Japanese soil. *World J Microbiol Biotechnol*, 2012, 28: 841–848
- 贾群超, 郭楚玲, 卢桂宁, 等. 两株稠油高效降解菌的筛选鉴定及其降解性能研究. *环境工程学报*, 2011, 5: 1181–1186
- Colwell R R. Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environment. *Crit Rev Microbiol*, 1977, 5: 423–445
- Ji Y, Mao G, Wang Y, et al. Structural insights into diversity and n-alkane biodegradation mechanisms of alkane hydroxylases. *Front Microbiol*, 2013, 4: 58
- Ratajczak A, Geißdörfer W, Hillen W. Alkane hydroxylase from *Acinetobacter* sp. strain ADP1 is encoded by *alkM* and belongs to a new family of bacterial integral-membrane hydrocarbon hydroxylases. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64: 1175–1179
- Ratajczak A, Geißdörfer W, Hillen W. Expression of alkane hydroxylase from *Acinetobacter* sp. Strain ADP1 is induced by a broad range of n-alkanes and requires the transcriptional activator AlkR. *J Bacteriol*, 1998, 180: 5822–5827
- Maier T, Forster H H, Asperger O, et al. Molecular characterization of the 56-kDa CYP153 from *Acinetobacter* sp. EB104. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 286: 652–658
- 余海粟, 朱利中. 混合表面活性剂对菲和芘的增溶作用. *环境化学*, 2004, 23: 485–489
- Lanzon J B, Brown D G. Partitioning of phenanthrene into surfactant hemi-micelles on the bacterial cell surface and implications for surfactant-enhanced biodegradation. *Water Res*, 2013, 47: 4612–4620
- Li F, Zhu L, Zhang D. Effect of surfactant on phenanthrene metabolic kinetics by *Citrobacter* sp. SA01. *J Environ Sci*, 2014, 26: 2298–2306
- Santanu P. Surfactant-enhanced remediation of organic contaminated soil and water. *Adv Colloid Interface Sci*, 2008, 138: 24–58
- 黄敏, 谭丽泉, 余梅, 等. 表面活性剂对白腐真菌降解石油的影响. *石油炼制与化工*, 2012, 43: 77–81
- 张丽芳, 姜承志, 李东辉. 表面活性剂对不同石油降解菌除油影响的研究. *沈阳工业学院学报*, 2001, 20: 79–83
- Kang S, Jeong H Y. Sorption of a nonionic surfactant Tween 80 by minerals and soils. *J Hazard Mater*, 2015, 284: 143–150

- 19 朱婷婷, 倪晋仁. 表面活性剂对 *Bacillus pumilus* strain Bap9 降解苯并[a]芘的影响. 环境工程学报, 2012, 6: 3344–3348
- 20 肖鹏飞, 孙丽军, 李玉文. Tween 系列表面活性剂对白腐菌降解氯丹的影响. 环境工程学报, 2014, 8: 4468–4473
- 21 Yanto D H, Tachibana S. Enhanced biodegradation of asphalt in the presence of Tween surfactants, Mn^{2+} and H_2O_2 by *Pestalotiopsis* sp. in liquid medium and soil. Chemosphere, 2014, 103: 105–113
- 22 Enticknap J J, Kelly M, Peraud O, et al. Characterization of a culturable alphaproteobacterial symbiont common to many marine sponges and evidence for vertical transmission via sponge larvae. Appl Environ Microbiol, 2006, 72: 3724–3732
- 23 Bastow T P, Aarssen B G K V, Alexander R, et al. Biodegradation of aromatic land-plant biomarkers in some Australian crude oils. Organic Geochem, 1999, 30: 1229–1239
- 24 Bost F D, Frontera-Suau R, McDonald T J, et al. Aerobic biodegradation of hopanes and norhopanes in Venezuelan crude oils. Organic Geochem, 2001, 32: 105–114
- 25 Wasmund K, Burns K A, Kurtbo D I, et al. Novel alkane hydroxylase gene (alkB) diversity in sediments associated with hydrocarbon seeps in the timor sea, Australia. Appl Environ Microbiol, 2009, 75: 7391–7398
- 26 Townsend G T, Prince R C, Suflita M. Anaerobic biodegradation of alicyclic constituents of gasoline and natural gas condensate by bacteria from an anoxic aquifer. FEMS Microbiol Ecol, 2004, 49: 129–135
- 27 王虎, 吴玲玲, 周立辉, 等. 陕北地区石油污染土壤中不动杆菌属的筛选、鉴定及降解性能. 生态学报, 2014, 34: 2907–2915
- 28 Zheng G, Selvam A, Wong J W C. Enhanced solubilization and desorption of organochlorine pesticides (OCPs) from soil by oil-swollen micelles formed with a nonionic surfactant. Environ Sci Technol, 2012, 46: 12062–12068
- 29 Tobe S, Majima T, Tadenuma H, et al. Nonionic surfactants enhancing bactericidal activity at their critical micelle concentrations. J Oleo Sci, 2015, 64: 61–68
- 30 欧阳科, 张甲耀, 戚琪, 等. 生物表面活性剂和化学表面活性剂对多环芳烃的生物降解作用研究. 农业环境科学学报, 2004, 23: 806–809
- 31 Van Hamme J D, Singh A, Ward O P. Recent advances in petroleum microbiology. Microbiol Mol Biol Rev, 2003, 67: 503–549
- 32 Maeng J H, Sakai Y, Tani Y, et al. Isolation and characterization of a novel oxygenase that catalyzes the first step of n-alkane oxidation in *Acinetobacter* sp. strain M-1. J Bacteriol, 1996, 178: 3695–3700
- 33 Sakai Y J, Maeng J H, Kubota S, et al. A nonconventional dissimilation pathway for long chain n-alkanes in *Acinetobacter* sp. M-1 that starts with a dioxygenase reaction. J Ferment Bioeng, 1996, 81: 286–291
- 34 Geissdörfer W, Frosch S C, Haspel G, et al. Two genes encoding proteins with similarities to rubredoxin and rubredoxin reductase are required for conversion of dodecane to lauric acid in *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1. Microbiology, 1995, 141: 1425–1432
- 35 Parche S, Geissdörfer W, Hillen W. Identification and characterization of xcpR encoding a subunit of the general secretory pathway necessary for dodecane degradation in *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1. J Bacteriol, 1997, 179: 4631–4634
- 36 Throne-Holst M, Markussen S, Winnberg, A, et al. Utilization of n-alkanes by a newly isolated strain of *Acinetobacter venetianus*: the role of two AlkB-type alkane hydroxylases. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 72: 353–360

Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons by *Acinetobacter* sp. BZ-15, Isolated from Contaminated Soil

LIU YuHua^{1,2} & HU XiaoKe¹

¹ Key Laboratory of Coastal Biology and Bioresource Utilization, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China;

² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

One of the major environmental problems is the contamination of petroleum hydrocarbons as a result of activities related to the petrochemical industry. This study aimed to isolate petroleum hydrocarbon-degrading bacteria from soil, and to study their systemic classification and degradation characteristics. A bacterial strain BZ-15 capable of degrading petroleum hydrocarbons was isolated from the oil-spilled soils in Binzhou, China. The bacterium was identified as belonging to the genus *Acinetobacter* through morphological and 16S rRNA gene homological analysis. Its growth rate and biodegradation ability were investigated by cell culture on media supplemented with crude oil with or without the surfactant Tween-20. Non-ionic surfactant Tween-20 can promote the growth of BZ-15, reducing the generation time from 3.25 to 2.67 h. After 5 days of growth, GC-MS analysis showed that the degradation efficiency of this bacterial strain for saturated hydrocarbons could reach 61%. However, the degradation efficiency for saturated hydrocarbons decreased and was only 52% Tween-20. The strain BZ-15 could biodegrade saturated hydrocarbons in which carbon chains were of the length C₁₃–C₂₈. Alkane hydroxylase (*alkM*) was successfully cloned, which indicates that the bacterial strain could degrade alkane via the terminal oxidative pathway.

***Acinetobacter* sp., petroleum hydrocarbons, alkane hydroxylase, Tween-20**

doi: 10.1360/N052016-00060