

高效耐盐柴油降解菌的筛选、鉴定及降解基因

胡春辉^{1,2}, 于浩², 赵阳国¹, 田伟君¹, 白洁^{1*} (1.中国海洋大学环境科学与工程学院海洋环境与生态教育部重点实验室, 山东 青岛 266100; 2.青岛农业大学生命学院, 山东 青岛 266109)

摘要: 在辽河口湿地石油污染土壤中分离到一株耐盐柴油高效降解菌株 L7, 经过形态学观察、16S rRNA 基因序列分析鉴定菌株 L7 属于不动杆菌属(*Acinetobacter*)。该菌株能够以柴油、十五烷、十六烷、十七烷、十八烷、十九烷、二十烷和二十二烷为唯一碳源和能源生长。在柴油无机盐培养基中, 菌株的最适生长温度为 30°C, 最适 pH 值为 7.0, 菌株 L7 在 pH 6.0~9.0, 盐度范围为 3% 以内都可以生长。与其他的菌株相比较, 菌株 L7 在柴油中生长更加迅速, 在最适培养条件下培养 4d 后菌株的 OD_{600nm} 就可以达到 4.0, 通过紫外分光光度法测定培养 5d 后, 柴油的降解效率为 61.5%。通过对菌株 L7 的全基因组测序和分析, 在基因组上找到一个烷烃羟化酶基因 *alkB*, 将基因克隆到 pME6032 质粒上, 并电转至不依赖柴油生长的恶臭假单胞菌 KT2440 中, 含有该质粒的 KT2440 菌株能够在柴油无机盐培养基中生长。GC-MS 检测确定了菌株 L7 及其 *alkB* 基因对饱和烷烃的降解能力。推测菌株 L7 中烷烃降解途径为末端氧化途径, 是由烷烃羟化酶催化反应生成相应的醇, 最终通过 β -氧化反应实现完全矿化。

关键词: 不动杆菌; 柴油; 烷烃羟化酶; 生物降解

中图分类号: X703.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2017)11-4251-08

Isolation and identification of a high-efficient diesel degrading bacterial strain *Acinetobacter* sp. L7. HU Chun-hui^{1,2}, YU Hao², ZHAO Yang-guo¹, TIAN Wei-jun¹, BAI Jie^{1*} (1.Key laboratory of Marine Environmental Science and Ecology, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266100, China; 2.College of Life Science, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China). *China Environmental Science*, 2017,37(11): 4251~4258

Abstract: A high-efficient diesel degrading bacterial strain isolated from oil-contaminated soil in Liaohe oil field was identified as *Acinetobacter* sp. and named as L7. The strain could efficiently grow with diesel, n-tridecane, n-hexadecane, n-heptadecane, n-octadecane and n-nonadecane as its sole carbon and energy source. The cultivation conditions of the strain L7 in diesel basic salt medium were investigated. The suitable pH value for the growth of the strain ranged from 6.0~9.0 with the optimum value of 7.0. The optimum temperature and salinity for the cultivation of the strain was 30°C and 1%, respectively. The degradation efficiency of diesel oil was 61.5% under the optimum conditions. Based on the whole-genome DNA sequence analysis of the bacterial strain, an alkane hydroxylase gene, *alkB*, was identified. To study the function of the *alkB* gene in n-alkane utilization by the bacterial strain, the *pME6032-alkB* plasmid was constructed and electroporated into another bacterial strain *Pseudomonas* KT2440, which could not grow in diesel. The electroporated bacteria *Pseudomonas* KT2440 could grow in diesel basic salt medium. Through gas chromatography-mass spectrometric analysis, the degradation capacity of the bacterial strain L7 for n-alkanes and the roles of the *alkB* gene were determined. The results indicated that the n-alkanes were degraded by the strain L7 via the terminal oxidation and β -oxidation pathway.

Key words: *Acinetobacter*; diesel; alkane hydroxylase; biodegradation

柴油的组分以中长链的烷烃为主, 是石油中的重要组分, 每年有大量的柴油通过石油勘探、生产和运输过程被泄漏到海洋环境中, 对海洋生物和海洋环境造成了巨大破坏^[1]。目前处理柴油污染物的方法有物理法、化学法和生物法, 物理法只是将污染物转移, 化学法可能会引入新的污染物, 生物修复是彻底清除环境中柴油污染物的

有效方法。微生物降解菌在柴油污染的生物修复中扮演重要角色^[2]。环境中存在大量的柴油降解菌株, 当环境中柴油含量突然升高时这些菌株会

收稿日期: 2017-04-05

基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2013ZX07202-007)

* 责任作者, 教授, baijie@ouc.edu.cn

迅速变成该区域的优势菌株^[3-5].已报道的柴油降解菌株分布于不动杆菌属(*Acinetobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、分支杆菌属(*Mycobacterium*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、无色杆菌属(*Achromobacter*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、微球菌属(*Micrococcus*)、弧菌属(*Vibrio*)等.不同微生物降解的柴油成分也不尽相同,降解机理差异较大^[6].低温高盐条件下石油类有机污染物的降解过程会发生较大的变化.因此研究低温高盐石油降解菌对于生物修复过程有重要的指导意义^[7].

不同的柴油降解菌株中烷烃代谢途径差异较大,代谢的烷烃种类也不尽相同^[8].微生物中烷烃代谢途径通常是先将烷烃进行羟化变成相应的醇,进一步氧化成酸,最终进入脂肪酸途径或三羧酸(TCA)循环中彻底分解.其中烷烃羟化酶是烷烃代谢途径中的关键酶,决定烷烃代谢的效率和途径^[9],同时这些烷烃羟化酶基因可用于探索 and 寻找环境中的烷烃降解菌株^[10].

本文从辽河口湿地石油污染土壤中筛选出一株耐盐高效柴油降解菌株,对菌株进行鉴定和降解性能研究,确定其最适降解条件,同时对其全基因组进行测序,在其基因组上找到一个烷烃羟化酶基因 *alkB*,通过分子生物学技术确定该基因的功能,以期为高盐环境中柴油污染修复技术提供菌株资源和理论研究基础.

1 材料与方法

1.1 样品采集和培养基配制

样品来源:样品采自辽河口湿地油田石油污染土壤.

无机盐(BSN)液体培养基:KH₂PO₄ 0.5g/L, K₂HPO₄·3H₂O 5.24g/L, KNO₃ 1g/L, NaSO₄ 0.2g/L, 10%MgCl₂·6H₂O 2mL, 1%CaCl₂ 2mL, 1%FeSO₄ 0.2mL, 维生素混合液 0.2mL, 金属离子混合液(1L的 0.1mmol/L 盐酸中溶解 0.05g CaCl₂·2H₂O, 0.05g CuCl₂·2H₂O, 0.008g MnSO₄·H₂O, 0.04g FeSO₄·7H₂O, 0.05g ZnSO₄, 0.1g Na₂MoO₄·2H₂O, 0.05g Na₂WO₄·2H₂O, 0.038g CoCl₂·6H₂O, 0.02g MnCl₂·4H₂O, 0.0124g H₃BO₃)5mL, 调节 pH 值为

7.0, 121 高压蒸汽灭菌 20min.

柴油培养基:无机盐培养基中加入 1%的柴油,柴油采用 0.22μm 滤膜过滤除菌.

饱和烷烃培养基:无机盐培养基中加入 0.2% (V:V)饱和烷烃.

LB 液体培养基:蛋白胨 10g/L, 酵母粉 5g/L, 氯化钠 10g/L, pH7.0, 121 高压蒸汽灭菌 20min.

LB 固体培养基即为 LB 液体培养基中添加 1.5%的琼脂.

1.2 柴油降解菌株的分离纯化

称取 5g 土壤样品放入到已灭菌的无机盐培养基中,加入 1%的柴油置于 170r/min、30 恒温振荡摇床中培养 5d 后,取上清液 5mL 加入到新的柴油培养基中继续培养,重复该过程 4~5 次后,取上清液 1mL 依次稀释至 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ 涂布于 LB 固体培养基平板上.置于 30 恒温培养箱中培养,挑取单菌落接种到新的柴油培养基中,挑选生长较好的菌株进行后续实验.

1.3 菌株的鉴定

选取一株生长最好的菌株命名为 L7, 利用基因组提取试剂盒提取菌株的总 DNA, 以其为模板, 用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F 和 1492R (引物序列见表 1) 扩增其 16S rRNA 基因. PCR 反应体系: 基因组 DNA 0.5μL, 2×Pfu Mix 12.5μL, 引物 27F 1μL, 引物 1492R 1μL, 用 ddH₂O 补足至 25μL. PCR 反应条件为: 94 预变性 5min, 94 变性 1min, 55 退火 1min, 72 延伸 2min, 共 30 个循环; 最后 72 延伸 5min, 4 保温. 将 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测条带单一、大小正确后, 送至上海生工生物工程股份有限公司测序, 测序结果递交至 NCBI 数据库进行比对, 选取同源性较高的序列利用 MEGA6.0 软件, 采用 Neighbor Joining 法构建系统发育进化树^[11].

1.4 菌株的最适生长条件优化和降解效率测定

微生物对柴油的降解效率受温度、pH 值、盐浓度等的影响. 将菌株 L7 以 1%的接种量接种到柴油无机盐培养基中, 分别置于 25, 30, 37 摇床中培养, 摇床转速为 170r/min, 每隔 12h 取样 1mL, 12000r/min 离心 1min, 用蒸馏水重悬后, 利用分光光度计测定波长在 600nm 处的吸光度值

(OD_{600nm})确定微生物的生长量.将菌株 L7 以 1% 的接种量接种到不同初始 pH 值的柴油无机盐培养基(5.0、6.0、7.0、8.0、9.0)中,置于 170r/min,30 摇床中培养,每隔 12h 取样测 OD_{600nm} 处的吸收值绘制生长曲线.将菌株 L7 以 1% 的接种量接种到不同盐浓度的柴油培养基中(氯化钠浓度依次为 0%、1%、2%、3%、5%),置于 170r/min,30 摇床中培养,每隔 12h 取样测定生长情况并绘制生长曲线.

确定菌株的最适生长温度、pH 值和盐浓度后,在最适生长条件下培养菌株 L7,培养至稳定期后,每个实验做 3 组平行.以不接菌的培养基作为空白对照,取样并测定柴油降解效率.

通过测定不同柴油浓度的紫外吸收值,绘制标准曲线,根据标准曲线拟合得到方程:

$$y=0.01414x-0.0446, R^2=0.99318 \quad (1)$$

式一中: x 为柴油浓度, y 为 OD_{225nm} 处的吸收值.

柴油降解率的计算公式为:

$$\eta=(C_0-C_1)/C_0 \times 100\% \quad (2)$$

式二中: C_0 为对照组柴油浓度, $\mu\text{L/L}$; C_1 为实验组柴油浓度, $\mu\text{L/L}$.

1.5 菌株 L7 的底物谱测定

柴油是一种成分复杂的混合物,主要组成成分为 C₁₀~C₂₂ 的饱和烷烃.而每个菌株降解的柴油成分差异较大,因此将菌株 L7 分别接种到正己烷、正癸烷、十一烷、十二烷、十三烷、十四烷、十五烷、十六烷、十七烷、十八烷、十九烷、二十烷、二十一烷、二十二烷的烷烃培养基中,观察其生长情况,对于能够生长的培养基每隔 12h 取样测定 OD_{600nm},绘制生长曲线.

1.6 基因组测序和烷烃羟化酶基因分析

利用上海生工生物基因组提取试剂盒提取菌株 L7 的全基因组 DNA,送至上海锐翌生物科技有限公司,采用 Illumina Hi-Seq4000 测序技术对菌株进行全基因组测序,将获得的基因组序列提交到 Rapid Annotation using Subsystem Technology(RAST)网站上进行自动注释,获得 L7 全基因组的注释信息.将注释得到的烷烃羟化酶基因跟已有的烷烃羟化酶进行 Blast 同源性分析,利用 ClustalX 软件对蛋白序列进行比对.

1.7 烷烃羟化酶基因的功能验证

根据基因组中烷烃羟化酶的基因序列,利用 Primer 软件设计引物 alkB-F 和 alkB-R(表 1),引物由上海生工生物工程股份有限公司合成.以 L7 基因组 DNA 作为模板,PCR 扩增体系为:基因组 DNA 0.5 μL ,2 \times Pfu Mix 12.5 μL ,引物 alkB-F 1 μL ,引物 alkB-R 1 μL ,用 ddH₂O 补足至 25 μL .PCR 反应条件为:94 预变性 5min,94 变性 1min,55 退火 1min,72 延伸 2min,共 30 个循环,最后 72 延伸 5min,4 保温.PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测条带单一后,切胶回收,将回收产物连接到 pEASY-Blunt 载体上转至 *E.coli* DH5 α 中,在抗生素平板上挑取阳性克隆并提取质粒,将质粒 pME6032 和连接有 alkB 基因的 pEASY-Blunt 质粒,分别用 *Eco*RI 和 *Xho*I 进行双酶切,用 T4DNA 连接酶连接后转化到 *E.coli* DH5 α 中,在四环素抗性平板上挑取阳性克隆并提取重组质粒进行酶切和测序验证,将验证正确的质粒命名为 pME6032-alkB.按照单志英等^[12]的方法,制备 KT2440 电转感受态细胞,将质粒 pME6032-alkB 利用电转的方法转化至 KT2440 感受态细胞中,电转条件为:2500V(~5.8ms).将电转后的菌液涂布到四环素和氨苄抗性的双抗 LB 平板上进行筛选,并用 PCR 方法对重组质粒进行验证.将含有 pME6032-alkB 质粒的 KT2440 按照 1% 的接种量接种到柴油培养基中.170r/min、30 培养至 OD_{600nm}0.9 左右加入终浓度为 1mmol/L 的 IPTG 诱导 5d 后用 GC-MS 法检测柴油的降解情况.

表 1 本研究中所使用的 PCR 引物序列

Table 1 Primers used in this study

引物	序列
27F	5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3'
1492R	5'-TGACTGACTGAGGYTACCTTGTACGACTT-3'
alkB-F	5'-CCGGAATTCATGAACGCACCACTGAAAG-3'
alkB-R	5'-CCGCTCGAGTTATTCAGATGATTGCGTT-3'

1.8 直链烷烃含量的测定方法

样品处理方法:准确量取培养液的体积,加入等体积的正己烷,超声 10min 后 8000r/min 离心 10min,静置 10min 待其分层后,去掉水分,重复该

过程.正己烷萃取两次后,向分液漏斗中加入 2g 无水硫酸钠,去除多余水分.

紫外分光光度法测定柴油含量^[13].柴油的最大吸收波长为 225nm,分别配置不同浓度梯度的柴油溶液测定其吸光度,每个实验做 3 组平行,绘制柴油标准曲线.

GC-MS 检测柴油的方法^[14]:气相色谱质谱联用仪为美国安捷伦公司生产(5975B/6890N),色谱柱为 DB-5MS Capillary column(0.32mm×30m×0.25μm),FID 检测器,载气为 He,气体流速为 1.5mL/min,进样器温度为 270 ,连接线温度为 280 ,离子源温度为 230 ,四级杆温度为 150 ,升温程序为:150 保持 2min,然后以 5 /min 的速度升温至 200 ,再以 5 /min 的速度升温至 290 ,进样量为 1μL^[14].

2 结果与分析

2.1 菌株 L7 的筛选与鉴定

从辽河口湿地石油污染的土壤中筛选到一株高效柴油降解菌通过革兰氏染色和扫描电镜观察(图 1),确定其为革兰氏阴性菌,在 LB 固体平板上的菌落形态为白色、半透明、边缘整体、表面湿润,菌体为球杆状,直径约为 0.4~0.5μm,长度约为 0.6~0.8μm.将该菌株命名为 L7.将菌株 L7

的 16S rRNA 基因序列(GenBank accession number:KY817316)与标准菌株的 16S rRNA 基因序列(从 LPSN 数据库下载)进行序列比对和进化树分析,结果表明菌株 L7 的 16S rRNA 基因的序列与 *Acinetobacter baylyi* B2 的序列相似性最高为~97%.选取了部分菌株的 16S rRNA 基因序列与菌株 L7 进行了系统发育树分析(图 2).通过生理生化、形态学性状和 16S rRNA 基因序列分析可以确定菌株 L7 属于 *Acinetobacter* 属,并名为 *Acinetobacter* sp. L7.

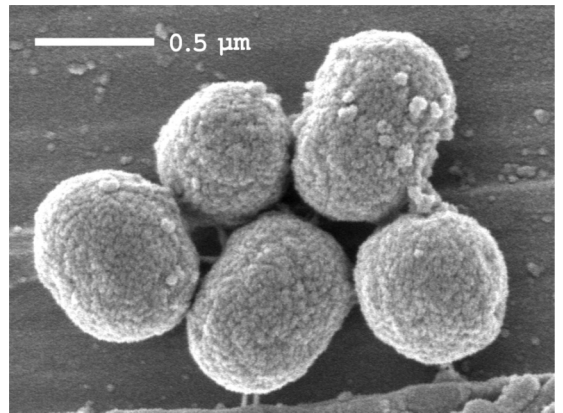


图 1 菌株 *Acinetobacter* sp. L7 扫描电镜细胞形态观察
Fig.1 The scanning electron microscope image of the bacterial strain *Acinetobacter* sp. L7

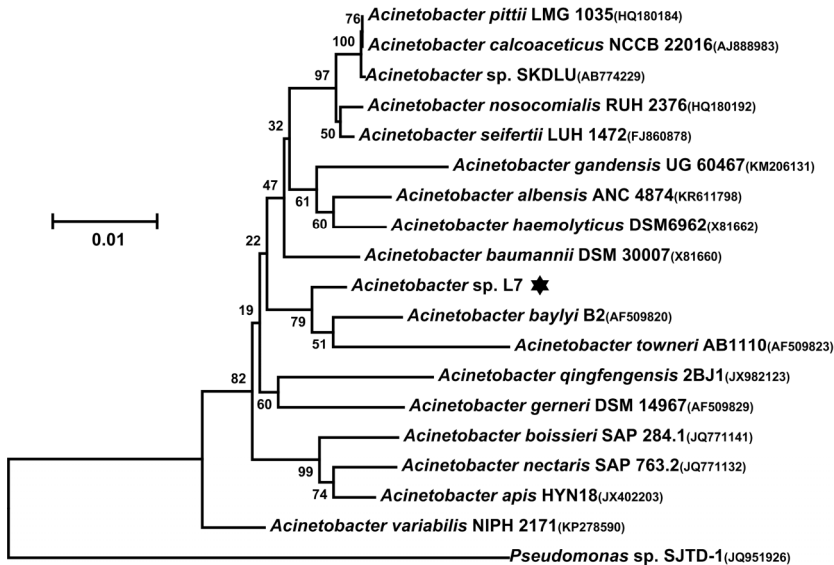


图 2 菌株 L7 的系统发育进化树

Fig.2 The phylogenetic tree for *Acinetobacter* sp. L7

2.2 菌株的最适生长条件

如图 3a 所示,菌株在 30℃ 生长最好,其次为 25℃,在 37℃ 以上生长缓慢,且稳定期的生物量(最大 OD_{600nm} 吸收值)也依次减少.菌株 L7 是从

辽河口石油污染土壤中筛选得到的,辽河口位于高纬度地区当地年最高气温常年等于或者低于 30℃,因此菌株在该温度下具有较强的柴油分解能力.

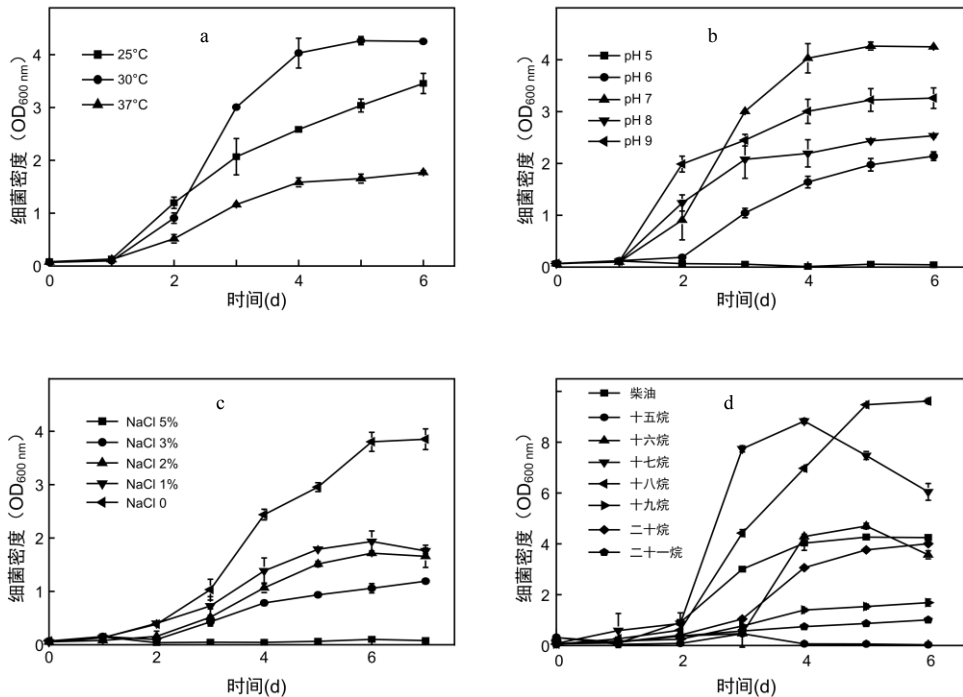


图 3 菌株 L7 在不同生长条件下的生长曲线

Fig.3 The effect of temperature , pH , salinity and carbon sources on the growth of *Acinetobacter* sp. L7

(a)不同温度的生长曲线;(b)不同初始 pH 值的生长曲线;(c)不同盐浓度的生长曲线;(d)不同碳源的生长曲线

如图 3b 所示,菌株 L7 的最适 pH 值为 7.可以良好的适应弱碱性环境,在 pH 值为 9 的情况下仍能够保持较好的生长,但酸性条件下菌株 L7 生长受到明显抑制,培养基中 pH 值为 5 时不能够生长.

如图 3c 所示,在无机盐培养基中,不添加 NaCl 时,菌株生长最好,随着培养基中氯化钠浓度的升高,生长受到抑制,但在 1%氯化钠条件下终 OD_{600nm} 值仍能达到 2.0 左右,在 3%氯化钠条件下终 OD_{600nm} 值仍能达到 1.0 以上.说明菌株 L7 具备一定的耐盐能力.

如图 3d 所示,菌株 L7 能够利用十五烷、十六烷、十七烷、十八烷、十九烷、二十烷和二十二烷为唯一碳源进行生长,在正癸烷、十一烷、

十二烷、十三烷、十四烷和二十一烷为唯一碳源的无机盐培养基中不能生长,其中在柴油培养基中 L7 的适应能力最强,能够在 2d 时间达到最大生物量,另外在十七烷和十八烷无机盐培养基中 L7 菌体稳定期细胞密度(OD_{600nm} 值)明显高于柴油培养基中的最大值.说明菌株 L7 对中长链烷烃有较好的利用和降解效果.

2.3 烷烃羟化酶基因的分析

对菌株 L7 的全基因组进行测序,基因组已经递交到 DDBJ/ENA/GenBank 数据库,序列号为 NBNP00000000.基因组(草图)全长 3388376bp, GC 含量为 42.89%,通过基因功能注释(RAST)预测到 3144 个蛋白编码基因(CDSs).在基因组上发现一个烷烃羟化酶基因(*alkB*),该 AlkB 蛋白的氨

氨基酸序列跟已报道的该家族蛋白氨基酸序列比
对如图 4 所示,跟不动杆菌 ADP1 菌株中 AlkB 蛋
白的氨基酸相似性最高,为 89%.进一步分析基因

组信息在该 *alkB* 基因上游发现一个反向 AraC 家
族的转录调控蛋白基因,跟已有的不动杆菌
ADP1 中基因簇的排列顺序一致^[15].

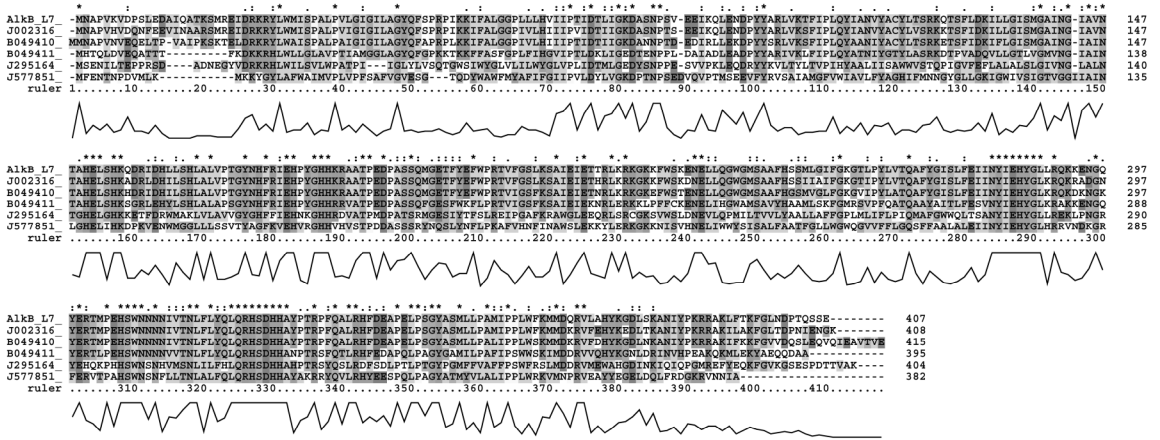


图 4 L7 中烷烃羟化酶的氨基酸序列比对

Fig.4 The sequence alignment of alkane hydroxylases (AlkB) from *Acinetobacter* sp. L7

2.4 烷烃羟化酶基因的功能验证

利用正己烷萃取样品,紫外分光光度法检测
在最适生长条件下(温度 30 ℃,pH 值为 7.0,盐度
0%,170r/min)OD_{225nm} 处的吸收值,菌株 L7 对柴
油的降解效率为 61.5%.

利用 GC-MS 法对碳链长度 C16~C25 的饱
和烷烃的降解情况进行检测.与未接种 L7 菌株
的对照组相比,5d 后 L7 菌株对柴油中的十六烷
到二十五烷均有较好的降解效果.发现菌株 L7
对十九烷到二十五烷的降解效率接近 100%(图
5).

2.5 烷烃羟化酶基因的功能验证

为了验证从 L7 基因组中比对获得的 *alkB* 基
因的功能,将长度为 1224bp 的 *alkB* 基因通过
EcoRI 和 *XhoI* 酶切位点连接到 pME6032 质粒上.
将重组质粒 pME6032-*alkB* 通过电击转化的方
法转化到恶臭假单胞菌 KT2440 中.将含有
pME6032-*alkB* 的 KT2440 菌株接种到四环素抗
性柴油培养基中,观察其生长情况并检测对柴油
的降解,以进一步验证 *alkB* 基因的功能.

菌株 KT2440 在以柴油作为唯一碳源的无
机盐培养基中不能生长,而含有 pME6032-*alkB*
质粒的 KT2440 菌株能够在柴油无机盐培养基

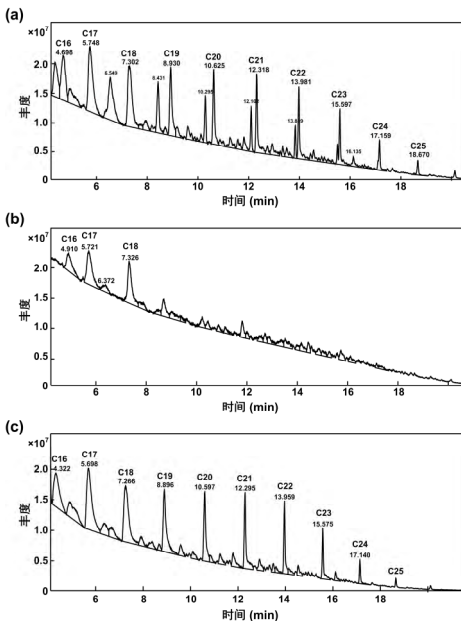


图 5 *Acinetobacter* sp. L7 对饱和烷烃降解的 GC-MS 分析

Fig.5 The diesel degradation analyzed by GC-MS diesel control; diesel degradation by strain L7; diesel degradation by KT2440 with plasmid pME6032-*alkB*

(a)柴油样品;(b)菌株 *Acinetobacter* sp. L7 对柴油的降解;(c)含有 pME6032-*alkB* 质粒的 KT2440 对柴油的降解

中生长.对培养 5d 后的样品用正己烷萃取后,用 GC-MS 检测,结果如图 5c 所示,含有 *alkB* 基因的 KT2440 培养液中十八烷~二十三烷的含量均出现了下降,说明菌株 L7 中的 AlkB 蛋白参与催化十八烷到二十三烷的降解过程.这说明了该 *alkB* 基因的确参与了柴油的降解.

3 讨论

根据底物谱实验和 GC-MS 图谱分析,菌株 L7 对 C19~C25 的饱和烷烃的降解效率几乎达到 100%.对菌株 L7 基因组中的 *alkB* 基因进行体外功能验证,通过基因克隆表达技术和 GC-MS 确定 AlkB 蛋白参与催化十八烷、十九烷、二十烷、二十一烷、二十二烷和二十三烷的降解反应过程,但是跟 L7 菌株相比降解效果较差,原因可能是烷烃代谢过程还需要其他蛋白的参与,菌株 KT2440 中没有相关蛋白,导致降解效率不高.菌株 L7 对碳链长度 C14~C25 的饱和烷烃均有一定的降解作用,说明菌株 L7 中还有存在有其他催化中长链烷烃的羟化酶基因.基因比对并没有发现其他功能基因,说明该基因的序列可能跟已有的烷烃羟化酶基因相比相似性较低,这些有待于进一步研究.

不动杆菌属在有氧条件下代谢饱和烷烃的途径主要有 2 条:一是在末端氧化酶的催化下生成相应的醇,进一步氧化成醛,然后转化成相应的脂肪酸通过 β -氧化反应被完全降解^[16];二是在双加氧酶的催化下将饱和烷氧化为相应的过氧化物,然后生成醛和脂肪酸进入 β -氧化反应^[17].同时有大量的烷烃羟化酶被发现,如 *Acinetobacter* sp. DSM17874 中降解长链烷烃的 *almA* 基因^[18]、*Pseudomonas aeruginosa*^[19]和 *Rhodococcus* sp. BCP1^[20]中的 *alkB* 基因;这些基因的表达都受到烷烃的诱导.在 L7 基因组发现的烷烃羟化酶基因,跟已有的 *alkB* 基因的序列相似性较高,并在该基因上游发现一个 AraC 家族的调控蛋白基因,基因结构跟已经报道的基因排列顺序类似,说明菌株 L7 中的烷烃羟化酶基因也是受到调控蛋白的调控是诱导表达的.推测 L7 跟其他菌株一样也是通过末端氧化途径生成伯醇,伯醇经过氧化

最终通过脂肪酸 β -氧化途径被完全分解.

与已经报道的柴油降解菌株相比较,当以柴油作为唯一碳源进行生长的时候 L7 可以获得更高的细胞密度.菌株 *Pseudomonas aeruginosa* SJTD-1 在柴油培养基中培养时终 OD_{600nm} 在 0.8 左右^[21],菌株 *Acinetobacter calcoaceticus* SY-1 在柴油培养基中培养时终 OD_{600nm} 在 0.4 左右^[22],而菌株 L7 在柴油培养基中培养时终 OD_{600nm} 可达到 4.0 以上,这说明了 L7 对于柴油的高效利用能力和高效的烷烃降解能力.即使是在盐浓度为 3.0%的情况下,菌株 L7 的菌体密度仍然可以达到 1.0 以上,可以达到其他的柴油降解菌株在最适条件下的菌体密度^[21,22].这说明了菌株 L7 不仅仅适合在淡水环境中用于柴油污染的去除,也可以适应海洋环境中柴油的去除工作,是一株优秀的耐盐柴油污染物生物修复菌株.

4 结论

4.1 从石油污染土壤中筛选到一株以柴油为唯一碳源,氮源和能源生长的高效降解菌株 L7,经过形态学观察和 16S rRNA 基因序列比对鉴定为不动杆菌(*Acinetobacter* sp.).菌株 L7 降解柴油的最适温度为 30 ,最适 pH 值为 7.0,能够耐受 3% 盐度的生长条件,在最适条件下培养 5d 后,对柴油的降解效率为 61.5%.

4.2 菌株 L7 具有高效降解中长链烷烃的能力,对碳链长度在 19~25 的饱和烷烃降解效率接近 100%.

4.3 对菌株 L7 的全基因组测序分析,通过序列比对找到一个烷烃羟化酶基因 *alkB*,通过对 *alkB* 基因进行体外功能验证确定基因的功能,为烷烃代谢相关基因的研究提供理论参考,并推测出菌株 L7 降解烷烃的途径为末端氧化途径.本研究可为柴油污染的生物修复提供降解效率高、耐盐、耐碱的优质菌株.

参考文献：

- [1] Hassanshabian 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.
- [2] 黄 艺, 礼 晓, 蔡佳良. 石油污染生物修复研究进展 [J]. 生态环境学报, 2009, 18: 361-367.
- [3] Rojo F. Degradation of alkanes by bacteria [J]. Environmental Microbiology, 2009, 11(10): 2477-2490.
- [4] 林莹莹, 聂麦茜, 王 琰, 等. 生物膜处理高含油废水及膜表面微生物群落特性研究 [J]. 中国环境科学, 2016, 36(9): 2800-2806.
- [5] 张 楠, 初里冰, 丁鹏元, 等. A/O 生物膜法强化处理石化废水及生物膜种群结构研究 [J]. 中国环境科学, 2015, 35(1): 80-86.
- [6] Huan L, Jing X, Rubing L, et al. Characterization of the medium- and long-chain n-alkanes degrading *Pseudomonas aeruginosa* strain SJTD-1 and its alkane hydroxylase genes [J]. PLOS ONE, 2014, 9(8): e105506.
- [7] 刁 硕, 王红旗, 许 洁, 等. 低温耐盐菌降解菌的筛选鉴定及降解特性研究 [J]. 中国环境科学, 2017, 37(2): 677-685.
- [8] Shigeaki H, Yuki K, Akihiro H. Microbial communities in oil-contaminated seawater [J]. Current Opinion Biotechnology, 2004, 15(3): 205-214.
- [9] Van Beilen J B, Funhoff E G. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 74(1): 13-21.
- [10] Diogo J, Vanessa M A, Raquel P, et al. The use of a combination of *alkB* primers to better characterize the distribution of alkane-degrading bacteria [J]. PLOS ONE, 2013, 8(6): e66565.
- [11] Pearson W R, Lipman D J. Improved tools for biological sequence comparison [J]. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 1988, 85(8): 2444-2448.
- [12] Shan Z Y, Xu H J, Shi X Q, et al. The study of optimal conditions of electroporation in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Acta Genetica Sinica, 2004, 31(3): 311-316.
- [13] 黄延林, 宁亚平, 柴蓓蓓. 石油高效降解菌的筛选及其降解特性 [J]. 西安建筑科技大学学报(自然科学版), 2006, 38(6): 795-803.
- [14] Wang X B, Chi C Q, Nie Y, et al. Degradation of petroleum hydrocarbons (C6-C40) and crude oil by a novel *Dietzia* strain [J]. Bioresource Technology, 2011, 102(17): 7755-7761.
- [15] Andreas R, Walter G, Wolfgang H. Alkane hydroxylase from *Acinetobacter* sp. ADP1 is encoded by *alkM* and belongs to a new family of bacterial integral-membrane hydrocarbon hydroxylases [J]. Applied and Environment Microbiology, 1998, 64(4): 1175-1179.
- [16] Van Hamme J D, Singh A, Ward O P. Recent advances in petroleum microbiology [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2003, 67(4): 503-549.
- [17] Maeng J H, Sakai Y, Tani Y. Isolation and characterization of a novel oxygenase that catalyzes the first step of n-alkane oxidation in *Acinetobacter* sp. strain M-1 [J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(13): 3695-3700.
- [18] Mimmi T H, Alexander W, Trond E, et al. Identification of novel genes involved in long-chain n-alkane degradation by *Acinetobacter* sp. strain DSN 17874 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(10): 3327-3332.
- [19] Mercedes M M, Luis Y, Fernando R. Differential expression of the components of the two alkane hydroxylases from *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(10): 3232-3237.
- [20] Cappelltti M, Fedi S, Frascari D, et al. Analyses of both the *alkB* gene transcriptional start site and *alkB* promoter-inducing properties of *Rhodococcus* sp. strain BCP1 grown on n-alkanes [J]. Applied and Environment Microbiology, 2011, 77(5): 1619-1627.
- [21] Liu H, Xu J, Liang R B, et al. Characterization of the medium- and long-chain n-alkanes degrading *Pseudomonas aeruginosa* strain SJTD-1 and its alkane hydroxylase genes [J]. PLOS ONE, 2014, 9(8): e105506.
- [22] 陆洪省, 魏文超, 王厚伟, 等. 高效石油烃降解菌 SKD-1 的分离、筛选及其降解性能 [J]. 环境工程学报, 2013, 7(10): 4116-4120.

作者简介: 胡春辉(1987-), 女, 山东青岛人, 实验师, 中国海洋大学博士研究生, 主要从事环境中石油污染物降解. 发表论文 10 篇.