

# 柴油污染土壤烷烃降解菌的筛选及降解特性研究

王兴龙, 颜家保\*, 胡杰, 鲍彦舟

(武汉科技大学化学与化工学院, 煤转化与新型炭材料湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430081)

**摘要:**从某炼油厂柴油罐区污染土壤中分离筛选出优势柴油降解菌 L12, 并经过形态学观察、生理生化试验以及 16S rDNA 序列分析, 鉴定为不动杆菌属(*Acinetobacter. sp.*)。采用摇瓶实验研究了菌株 L12 对正十六烷的适宜降解条件, 并考察了该菌对柴油的降解能力。结果表明, 菌株 L12 最佳的培养初始 pH 为 7、接种量为 5%、摇床转速为 150 r/min、培养温度为 30℃, 菌株可耐受正十六烷质量浓度高达 5 000 mg/L。最优条件下培养 7 d, 该菌株对正十六烷的降解率高达 90.33%, 能将质量浓度为 3 000 mg/L 的柴油几乎完全降解, 表明该菌具有良好的用于生物修复柴油污染土壤的潜力。

**关键词:**正十六烷; 优势菌; 降解特性; 柴油

**中图分类号:**TH3

**文献标志码:**A

**文章编号:**0253-4320(2022)02-0163-04

**DOI:**10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2022.02.033

## Screening and degradation characteristics of bacteria for degrading alkane in diesel contaminated soil

WANG Xing-long, YAN Jia-bao\*, HU Jie, BAO Yan-zhou

(Hubei Province Key Laboratory of Coal Conversion and New Carbon Materials, School of Chemistry and Chemical Engineering, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430081, China)

**Abstract:** L12, a dominant diesel-degrading bacterium, is isolated and screened out from the contaminated soil in the diesel tank area of a refinery. After morphological observation, physiological tests, biochemical tests and 16S rDNA sequence analysis, it is identified as *Acinetobacter. sp.* The shake flask experiment is utilized to study the suitable degradation conditions of L12 strain to *n*-hexadecane, and the degradation ability of L12 strain to diesel is investigated. The optimal cultural conditions for L12 strain are obtained as follows: the initial pH is 7, the inoculum amount is 5%, the shaking speed is 150 r·min<sup>-1</sup>, and the culture temperature is at 30℃. The strain can tolerate the concentration of *n*-hexadecane up to 5 000 mg·L<sup>-1</sup>. If L12 strain has been cultivated for 7 days under the optimal conditions, the strain's degradation rate to *n*-hexadecane is as high as 90.33%, it can almost completely degrade diesel fuel with a concentration of 3 000 mg·L<sup>-1</sup> within 7 days, indicating that the bacteria has a good potential for bioremediation of diesel polluted soil.

**Key words:** *n*-hexadecane; dominant bacteria; degradation characteristics; diesel

石油开采、炼制、贮存及运输过程中, 难免会发生一些意外性的或操作性的失误导致石油泄漏, 从而造成土壤的石油污染<sup>[1]</sup>。炼化企业的柴油罐区也存在同样的情况, 泄漏的柴油进入到土壤后, 会破坏土壤的性质, 降低土壤的透气、透水性。柴油为轻质石油产品, 主要包括烷烃、环烷烃、烯烃、芳香烃、多环芳烃, 柴油馏分中的碳原子数一般为 10~22, 其中柴油中烷烃占 50%~70%, 是柴油污染土壤的主要污染物<sup>[2]</sup>。土壤修复一般包括物理法、化学法和生物法, 生物修复法是通过土著微生物或生物强化菌剂的代谢作用降解土壤中的污染物, 因而具有操作简便、经济高效的特点, 近年来越来越受到重视<sup>[3]</sup>。笔者以柴油中的正十六烷为目标污染物, 通

过环境微生物手段从柴油罐区筛选出 1 株柴油优势降解菌, 并对其进行了菌种鉴定和降解特性研究, 为柴油罐区污染土壤的生物修复提供菌源和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种来源

菌源采自某炼油厂柴油罐区污染土壤。

### 1.2 培养基

LB 培养基: 蛋白胨 10 g、酵母膏 5 g、NaCl 10 g、去离子水 1 000 mL。

无机盐培养基 (MSM 培养基): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 1 g、NH<sub>4</sub>Cl 1.1 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O

收稿日期: 2021-03-01; 修回日期: 2021-12-06

基金项目: 湖北省科技创新专项重大项目 (2017ACA179)

作者简介: 王兴龙 (1996-), 男, 硕士研究生, 研究方向为生物修复, 724216490@qq.com; 颜家保 (1964-), 男, 硕士, 教授, 研究方向为废水生物强化及深度处理, 通讯联系人, 972787445@qq.com。

0.2 g、微量元素液 2 mL、去离子水 1 000 mL。

### 1.3 菌种的富集和筛选

称取 5 g 受柴油污染土壤样品为菌源,将其加入到灭菌后的 100 mL LB 培养基中,置于恒温摇床培养,摇床转速为 150 r/min,温度为 30℃。培养 24 h 后以 5% 的接种量转入新鲜的培养基中,继续培养 24 h,重复操作 2 次。将富集后的菌液以 5% 的接种量接种至正十六烷无机盐培养基中进行驯化,培养基中正十六烷的质量浓度分别为 500、1 000、2 000、3 000、5 000 mg/L。取驯化后的菌液进行梯度稀释,然后于正十六烷质量浓度为 1 000 mg/L 的无机盐平板上进行涂布,培养 3 d 后,挑取生长明显、菌落较大的菌株进行编号,并将这些菌株分别接种至 1 000 mg/L 的正十六烷无机盐培养基中培养 7 d 后,利用气相色谱法测定剩余正十六烷浓度,计算出各菌株对正十六烷的降解率,然后挑选出降解效果最好的菌株<sup>[4]</sup>。

### 1.4 菌种的鉴定

#### 1.4.1 形态学观察

将菌株培养液以 10 的倍数进行稀释,经番红染色后,在光学显微镜下对细菌进行观察。

#### 1.4.2 生理生化试验

生理生化试验参照《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[5]</sup>。

#### 1.4.3 分子生物学鉴定

##### (1) 16S rDNA 测序

将筛选出的正十六烷优势降解菌株以 5% 的接种量接种至培养基中培养 7 d,然后取出 2 mL 培养液于离心管中贮藏,送至中国科学院水生生物研究所进行 16S rDNA 测序分析。

##### (2) 构建系统发育树

将测序结果输入到 NCBI 网站进行 Blast 比对,挑选出同源性最高的菌株,运用 MEGA7.0 软件构建系统发育树。

### 1.5 降解性能研究

#### 1.5.1 降解正十六烷的影响因素

微生物降解正十六烷受到多种因素的影响,以正十六烷作为唯一的碳源和能源物质,通过单因素实验分别考察不同温度、NaCl 质量分数、初始 pH、初始正十六烷质量浓度、溶解氧以及接种量对正十六烷去除效率的影响<sup>[5]</sup>。

#### 1.5.2 对柴油降解能力的评价

在培养基初始 pH 为 7.0、接种量为 5%、30℃ 下进行培养,将筛选出的优势菌的悬菌液接入柴油培养基中,振荡培养 7 d 后,对于质量浓度为 3 000 mg/L

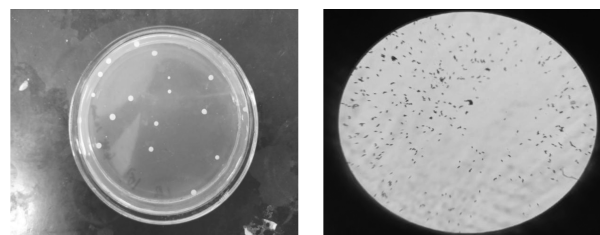
的柴油降解前后各组分的 GC-MS 分析结果进行比较。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌种鉴定

#### 2.1.1 菌落形态和生理生化试验

从柴油污染土壤样品中筛选出 12 株可以明显降解正十六烷的菌株,将其分别编号为 L1~L12,其中 L12 降解能力最好,对初始质量浓度为 1 000 mg/L 的正十六烷培养 7 d,降解率高达 90.33%,选作为优势菌株,其菌落形态与革兰氏染色后的照片如图 1 所示。该菌菌落为圆形,个体较大,呈不透明的乳白色;表面光滑湿润,有光泽;菌落略有凸起,边缘平整,呈长杆状。革兰氏染色呈阳性,葡萄糖、乙醇发酵、淀粉水解、硝酸盐还原、反硝化试验呈阳性,接触酶、甲基红、V-P 测定以及亚硝酸还原试验均呈阴性。



(a) L12 菌落形态

(b) 革兰氏染色

图 1 L12 菌落形态与革兰氏染色后的照片

#### 2.1.2 16S rDNA 测序与系统发育树的构建

通过对菌株 L12 进行 16S rDNA 测序得到长为 1 439 bp 的基因片段,将其输入 NCBI 中进行 Blast 比对,与 L12 菌株同源性达到 98% 以上的均为不动杆菌属,从中挑选出部分同源性较高的序列进行系统发育树分析,利用 MEGA7.0 软件依据 Blast 比对结构构建系统发育树,由发育树可知,L12 菌株与 *Acinetobacter baumannii* strain DSM30007 处于同一分支中,并且这 2 株菌的 16S rDNA 的同源性高达 99.93%,因此可以初步将菌株 L12 归类为不动杆菌属 (*Acinetobacter*.sp)。

### 2.2 降解条件的优化

#### 2.2.1 培养温度的影响

培养温度与微生物的生长繁殖、代谢活动密切相关,结果如表 1 所示。由表 1 中可以看出,当温度由 15℃ 上升至 30℃ 时,菌株对正十六烷的降解率逐步提高,这是由于微生物反应和一般化学反应规律类似,其反应速率都会随着温度的升高而升高,并且在一定温度范围内温度越高,微生物活性也随之增

强;当温度为 30℃ 时,降解率高达 90.33%,这时微生物的活性最高,正十六烷降解效果最好;温度继续升高至 40℃ 时,对正十六烷降解能力显著下降,降解率由 90.33% 下降至 49.96%,其原因是微生物降解正十六烷反应依赖体内有关酶系的催化完成,温度过高导致相关酶活性降低,所以目标菌株 L12 降解正十六烷的最佳温度为 30℃。

表 1 温度对菌株 L12 降解效果的影响

温度/℃	15	20	25	30	35	40
降解率/%	30.41	71.53	85.42	90.33	88.76	50.34

### 2.2.2 培养基初始 pH 的影响

初始 pH 对菌株 L12 降解效果的影响如表 2 所示。由表 2 中可以看出,pH 过高或过低对微生物的生长代谢都不利。目标菌株对 pH 的适应范围较大,在中性、弱碱性条件下正十六烷去除率均较高。当培养液的初始 pH 由 5 上升至 7 时,菌株的正十六烷去除率也随之升高,pH = 7 时菌株的正十六烷降解率达到最大 90.33%,这是因为 pH 在一定范围内升高可以增加细菌细胞质膜的透性,使正十六烷更容易进入细胞内部被利用,同时 pH 的适量提高可以增强相关酶的活性,使正十六烷降解速率加快,从而提高细菌对正十六烷的降解率;pH > 7 之后,随着 pH 升高,降解率明显下降。说明筛选出的目标降解菌在 pH 为 7 条件下降解效果最好。

表 2 初始 pH 对菌株 L12 降解效果的影响

pH	5	6	7	8	9	10
降解率/%	62.48	71.42	90.33	86.55	80.31	50.73

### 2.2.3 正十六烷初始质量浓度的影响

正十六烷质量浓度对菌株 L12 降解效果的影响如表 3 所示。由表 3 中可以看出,筛选所得优势菌对初始正十六烷质量浓度在 1 000~5 000 mg/L 范围内的底物降解能力均较强,其中底物质量浓度为 1 000 mg/L 时的降解率最高。在设定的 5 个正十六烷浓度梯度间,初始正十六烷质量浓度为 500 mg/L 时菌株降解正十六烷的效率相对较低,这是因为在培养液中正十六烷的浓度不足,细菌生长缓慢,菌株降解率相对较低;而当培养液中正十六烷的质量浓度达到 1 000 mg/L 时,培养基中正十六烷质量浓度提高,底物充足,菌株生长代谢能力旺盛,其降解率也随之提高;然而当继续提高培养基中正十六烷质量浓度时,菌株对正十六烷的降解率变化不大,所以优势菌株能耐受过高质量浓度的正十六烷,耐受质量浓度至少可以达到 5 000 mg/L。

表 3 正十六烷浓度对菌株 L12 降解效果的影响

初始 C16 质量浓度/(mg·L <sup>-1</sup> )	500	1000	2000	3000	5000
降解率/%	80.78	90.33	89.56	90.78	9.82

### 2.2.4 盐质量分数的影响

盐质量分数对菌株 L12 降解性能的影响如表 4 所示。由表 4 中可以看出,随着培养液中盐(NaCl)质量分数的升高,菌株对正十六烷降解能力逐渐降低,且 NaCl 质量分数越高,降解效果越不好,原因是盐会影响细胞渗透压,当培养液中盐质量分数升高时,细菌细胞内部渗透压小于外部渗透压,细胞内水分向外流出而出现脱水现象,因而细菌对正十六烷的降解反应减慢,降解率下降。当培养液中 NaCl 质量分数为 3% 时,正十六烷降解率下降至 50% 左右,盐质量分数越高,降解效果越差。当盐质量分数达到 9% 时,菌生长困难、菌浓度低,此时去除率仅为 8.02%,所以该菌的适宜 NaCl 质量分数为 0%~1%,耐受盐质量分数不超过 3%。

表 4 盐浓度对菌株 L12 降解性能的影响

NaCl 质量分数/%	0	1	3	5	7	9
降解率/%	90.33	89.58	50.44	25.21	10.35	8.02

### 2.2.5 溶解氧的影响

控制其他条件不变,改变锥形瓶中培养基的体积相当于改变培养基中的溶氧量,溶解氧对菌株 L12 降解性能的影响如表 5 所示。由表 5 中可以看出,锥形瓶中培养液体积越大溶解氧浓度越低,相反则越高。随着培养基体积逐渐增大,菌株对正十六烷的降解率逐步降低,这是因为在相同的摇床转速下,随着锥形瓶中培养液体积增加,培养基中的溶氧量会随之降低,菌株无法获得充足的氧气,其生命活动会减慢,因此对正十六烷的利用速率也逐渐减慢。由于培养基体积分别为 60、80、100 mL 时本菌株对正十六烷降解率均大于 90%,所以可选择 100 mL 为最佳培养基体积。

表 5 溶解氧对菌株 L12 降解性能的影响

培养基体积/mL	60	80	100	120	150
降解率/%	90.45	90.25	90.33	73.42	70.67

### 2.2.6 接种量的影响

接种量对菌株 L12 降解性能的影响如表 6 所示。由表 6 中可以看出,接种量为 5% 时菌株对正十六烷的降解率为 90.33%,此时再增加接种量对提高正十六烷的去除率并不明显。一般来说,接种量对细菌最为直接的影响反映在细菌延滞期的时长,

接种量越大,细菌生长延滞期越短。在相同培养条件下,接种量越大,越早开始进入对数生长期,也就越早开始快速利用正十六烷,但是在达到 5% 以后再提高接种量,菌株的正十六烷降解率提高不明显,所以选用 5% 作为最佳接种量。

表 6 接种量对菌株 L12 降解性能的影响

接种量/%	1	3	5	7	9
降解率/%	85.56	87.24	90.33	90.87	91.23

### 2.3 菌株对柴油的降解性能

在培养基初始 pH 为 7.0、接种量为 5%、30℃ 条件下,将优势菌 L12 的悬菌液接入柴油培养基中,振荡培养 7 d 后,对于质量浓度 3 000 mg/L 的柴油降解前后各组分进行 GC-MS 分析,结果分别如图 2 和图 3 所示。同时通过各烷烃组分峰面积对比计算出柴油中各组分的降解率,结果如表 7 所示。结果表明菌株对柴油中各组分有显著降解作用,尤其对于烷烃组分降解效果更为明显。

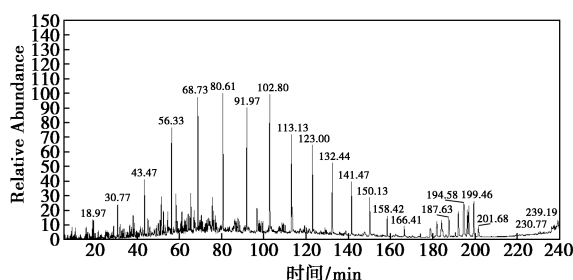


图 2 柴油空白样品 GC-MS 谱图

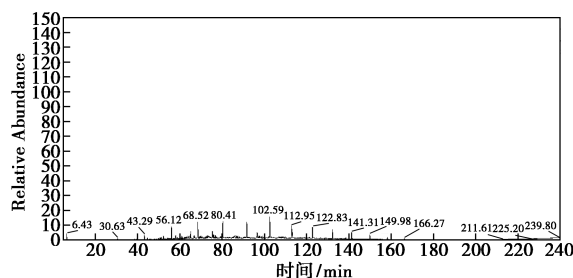


图 3 柴油降解后样品 GC-MS 谱图

表 7 柴油样品中各烷烃组分的降解率

组分	降解率/%	组分	降解率/%	组分	降解率/%
C10	99.96	C14	64.94	C18	65.86
C11	87.36	C15	70.06	C19	64.96
C12	77.19	C16	83.93	C20	67.17
C13	67.91	C17	61.21	C21	69.47

### 3 结论

(1) 从柴油污染土壤中筛选得到 1 株高效柴油降解菌 L12,经形态观察、生理生化特性和 16S rDNA

序列分析,鉴定该菌为不动杆菌(*Acinetobacter. sp.*)。

(2) 菌株 L12 降解正十六烷的最适宜条件为培养温度为 30℃、接种量为 5%、培养基体积为 100 mL、初始 pH 为 7。该菌能耐受质量浓度高达 5 000 mg/L 的正十六烷。

(3) 优势菌 L12 不仅能够高效降解饱和中长链烷烃,而且在 7 d 内能将质量浓度为 3 000 mg/L 的柴油几乎完全降解,表明该菌具有良好的用于生物修复柴油污染土壤的潜力。

### 参考文献

- [1] 王智,王晓丽.原油降解菌群对石油烃的生物演化过程研究[D].天津:天津理工大学,2018.
- [2] 卞晓辉,马明亮,王新华,等.原油组分分离与结构鉴定[J].广州化工,2014,42(21):134-137.
- [3] 周楚莹.石油降解菌群的构建及其固定化技术研究[D].广州:广东工业大学,2015.
- [4] 陈瀑,褚小立.原油及重油的快速分析技术进展[J].分析测试学报,2012,31(9):1191-1198.
- [5] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001.
- [6] 周延西.石油污染物降解菌种鉴定及其协同作用强化研究[D].天津:天津大学,2013.
- [7] 高晓攀,杜显元,李兴春,等.石油降解菌处理污染土壤的研究进展[J].当代化工,2015,44(12):2814-2817.
- [8] 石琛,霍瑜妹,刘佳.天津大港地区石油化工企业大气污染物监测及治理方法研究[J].山东化工,2017,46(3):130-133.
- [9] 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.
- [10] 马朝阳,齐树亭,李斯,等.两株海洋原油降解菌的筛选鉴定及降解特性的初步研究[J].河北工业大学学报,2016,45(6):82-90.
- [11] Hu Y,Zhou J,Du B, et al. Health risks to local residents from the exposure of heavy metals around the largest copper smelter in China [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 171: 329.
- [12] Shao B,Liu Z,Zhong H, et al. Effects of rhamnolipids on microorganism characteristics and applications in composting: A review [J]. Microbiological Research, 2017, 200: 33-44.
- [13] Qian C J,Wei L,Hui L, et al. Responses of genes for the uptake of glycine betaine in *Virgibacillus halodenitrificans* PDB-F2 under NaCl stress [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2018, 132: 192-199.
- [14] 何丽媛,党志,唐霞,等.混合菌对原油的降解及其降解性能的研究[J].环境科学学报,2018,30(6):1220-1227.
- [15] 张晓娟.石油污染土壤中微生物对温度变化的响应研究[D].北京:中国地质大学,2016.
- [16] 李科静.石油污染对土壤的影响与对策[J].技术与市场,2016,23(11):214.
- [17] 余薇.石油降解微生物的筛选及其降解特性的研究[D].武汉:华中农业大学,2013.
- [18] 徐冯楠,冯贵颖,马雯,等.高效石油降解菌的筛选及其降解性能研究[J].生物技术通报,2010,7:221-226.
- [19] 刘鹏,李大平,王晓梅,等.石油污染土壤的生物修复技术研究[J].化工环保,2006,26(2):91-94.
- [20] 郭静波,陈微,马放,等.环境污染治理中难降解有机污染物的生物共代谢[J].安全与环境学报,2014,06:223-227. ■