

石油烃降解菌 *Acinetobacter* sp. 5-5 对正十六烷的降解特性研究

原陇苗¹, 王之语^{2,3}, 邵媛媛^{1,2}, 陈建珍^{1,2}, 吴应琴¹

1.中国科学院西北生态环境资源研究院/甘肃省油气资源研究重点实验室, 兰州 730000

2.中国科学院大学, 北京 100049

3.中新天津生态城生态环境局, 天津 300000

摘要 【目的】石油污染的微生物修复因绿色、无二次污染而备受关注。为了强化石油污染生物修复技术, 筛选高效石油烃降解菌并探究其降解机制。【方法】以长庆油田石油污染场地土壤为菌源, 筛选出对正十六烷具有高效降解功能的菌株。基于菌株形态特征、革兰氏染色、生化理化、16s rDNA 序列分析以及抗逆性实验结果, 优化了菌株 5-5 对正十六烷的最佳降解条件; 进而通过零级、准一级、准二级动力学模型对正十六烷降解过程进行探究, 同时结合培养液酸碱度和降解产物谱图对正十六烷的降解途径进行初步确定。【结果】该菌株 5-5 为不动杆菌(*Acinetobacter* sp.), 在正十六烷初始浓度为 0.5% (V/V)、盐度为 0.5%, pH 为 7.0 的条件下, 石油烃降解菌对正十六烷的总降解率高达 99.24%, 且两天内完成快速降解 (82.13%)。动力学降解过程显示准一级模型对正十六烷的基质降解过程拟合效果最佳, 并初步判定正十六烷在该微生物降解体系中的降解途径为断链和产酸过程。【结论】石油烃降解菌 *Acinetobacter* sp.5-5 在盐度高达 0.5% 时仍对正十六烷具有很强的降解效果, 降解率在 99% 以上, 显示了该菌株具有很高的烷烃降解潜力及较好的耐盐碱特性, 有望在石油污染盐碱化土壤修复中得到广泛应用。

关键词 石油降解菌; 正十六烷; 耐盐碱; 降解机制

第一作者简介 原陇苗, 女, 1994 年出生, 博士研究生, 环境地球化学, E-mail: ylm7321@163.com

通信作者 吴应琴, 女, 正高级工程师, E-mail: yingqinwu@lzb.ac.cn

中图分类号 X53 X172 **文献标志码** A

0 引言

土壤石油污染是一个世界各国普遍关注的环境问题。随着石油工业的迅猛发展, 石油泄漏问题已成为 21 世纪重要的环境污染挑战^[1-2]。石油烃包括烷烃和芳烃组分等, 进入到土壤不仅改变土壤环境、影响作物生长, 并通过食物链威胁人类健康。同时, 长庆油田石油污染土壤呈现盐碱化和板结化特征, 导致污染物去除难度增大^[3-4]。针对长庆油田土壤同时存在的两类问题, 如何在尽快消除石油污染物的同时, 改良和修复土壤的盐碱环境, 实现石油污染盐碱土壤环境质量的明显改善, 已成为普遍关注的问题。

微生物降解被认为是一种既环保又经济有效的去除土壤石油污染物手段。国内外对于微生物修复石油污染土壤的成功案例已有报道, 研究发现自然界中存在 100 余属、200 多种能够烷烃降解能力的微生物^[5-6]。然而, 石油污染土壤通常伴随着盐碱问题, 这会抑制传

收稿日期: 2023-09-15; 收修稿日期: 2023-10-05

基金项目: 国家自然科学基金项目 (42072180, 41772147, 41272147); 中国科学院仪器设备功能开发技术创新项目 (E028010101) [Foundation: National Natural Science Foundation of China, No. 42072180, 41772147, 41272147; Chinese Academy of Sciences Instrumentation and Equipment Functional Development Technology Innovation Project, No. E028010101]

统非耐盐碱微生物的生长和代谢,从而降低微生物降解效果^[7-8]。因此筛选高效耐盐碱石油烃降解菌成为修复石油污染盐碱化土壤的首要前提^[9-10]。石油的主要成分是水溶性较低的烷烃类物质,这些物质不易被微生物利用^[11-12]。然而,微生物在石油污染土壤中通过选择性富集和遗传变异来适应环境,因此,筛选和分离具有烷烃降解能力的菌株对于微生物降解石油污染物至关重要^[13-14]。

研究以长庆原油为碳源,通过富集、分离、筛选、及驯化等程序,筛选出具有高效石油烃降解能力的菌株。对所得菌株进行形态学观察、生理生化鉴定以及 16S rDNA 基因测序,明确其种属,并详细观察该菌株的生长趋势。随后,选用长链烷烃—正十六烷作为石油污染物代表性物质,进行降解实验并构建最优条件参数试验。通过 GC-MS 分析结果,深入研究菌株对正十六烷的降解动力学过程,揭示其降解途径,为长庆油田石油污染土壤的微生物修复提供重要参考依据。

1 材料与方法

1.1 土壤样品采集及处理

土壤样品取自长庆油田受石油污染较严重的油井周围,深度约为 15 cm,被收集并密封于无菌袋中,存放在 4 °C 低温条件下。随后,将样品带回实验室,进行石油烃降解菌的分离纯化。土壤样品总有机碳含量 (TOC) 为 3.12~4.12 g/kg,铵态氮含量为 36.30~48.02 g/kg,有效磷含量为 3.32~13.08 g/kg,速效钾含量为 125.60~232.90 g/kg,盐度为 1.43%~2.03%,pH 为 7.1~8.6,呈中性或弱碱性。土壤理化性质测定:土壤 pH 和盐度(水土比为 1:2.5)由电极仪测定,具体步骤为:称取 10.00 g 土样加入 25 mL 纯水于 50 mL 离心管中,震荡 5 min,静置 1.0 h 后测定。土壤有机质 (SOM) 用重铬酸钾氧化法测定 (HJ615—2011):称取 5.00 g 土壤样品,加入 0.10 g 硫酸汞和 5.00 mL 重铬酸钾溶液,摇匀。再缓慢加入 7.50 mL 硫酸,轻轻摇匀,在 135 °C 下加热 30 min,定容,在波长 585 nm 处测定吸光度。SOM 与土壤总有机碳 (TOC) 的换算公式为: $SOM=1.724 \times TOC$ 。土壤肥力指标均用土壤养分检测仪测定:铵态氮 (AN) 为纳氏试剂比色法;硝态氮 (XN) 为硝酸试粉法;有效磷 (AP) 为钼蓝比色法测定;有效钾 (AK) 为四苯硼钠比浊法。

1.2 石油烃降解菌的筛选、富集、纯化及复筛

取 5.0 g 污染土样(采自长庆油田),无菌操作将其接种于盛有 200 mL 无菌水的锥形瓶中,30 °C,130 r/min 条件下恒温震荡培养 24 h,静置 1 h 后,取上清液 5 mL 接种于 100 mL 无机盐培养基中,加入 1.0% 的原油作为碳源,30 °C,180 r/min 条件下(促进微生物生长和分散)培养 7 d。待培养结束后,取富集液 5 mL 接种于原油无机盐培养基中,相同条件下连续培养 5 个周期。采用平板划线法进行分离,取培养液原液均匀涂布于固体富集培养平板中,30 °C 倒置培养 48 h,根据菌落出现的时间、形态、大小和颜色等挑选不同菌株。取分离后的单一菌落,平板划线培养三个周期,直至得到纯化菌落,将其接种于牛肉膏蛋

白肱斜面上培养 48 h 后，保存在 4 °C 冰箱备用。并将纯化后菌液与甘油 1:1 混合后冻存于 -80 °C 冰箱。图 1 为本研究中优势菌株的筛选、富集和纯化流程图。

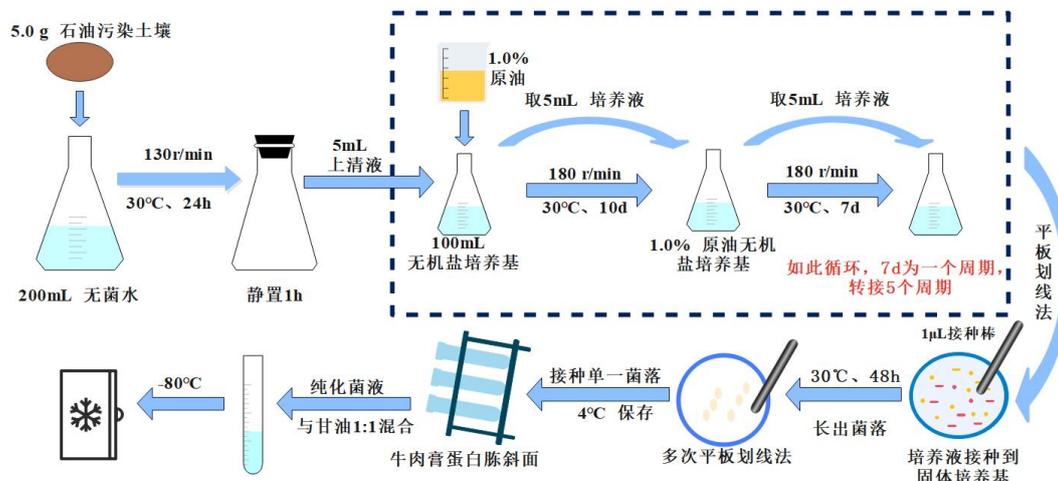


图 1 石油降解菌的筛选、富集、纯化

Fig.1 Screening, enrichment, and purification of petroleum degrading bacteria

以 5.0% (V/V) 的接种率将纯化后的菌株接种到无机盐培养基中进行降解实验（此培养基以 1.0% (V/V) 原油为唯一碳源），以未接种石油烃降解菌的空白培养基作为对照组，每组设置 3 个平行样，在 30 °C、180 r/min 的条件下培养 14 d 后，取 20 mL 石油醚与样品混合，经摇床震荡 10 min、180 W 超声提取 10 min 后，用分液漏斗进行萃取。将萃取过程重复三次，合并萃取液，离心，用 Na_2SO_4 去除水分转移至容量瓶定容待用。利用 GC-MS 测定降解后石油烃含量以筛选出高效石油烃降解菌。

1.3 石油烃降解菌生化理化检验及鉴定

对筛选出的菌株进行显微影像形态学观察及革兰氏染色进行初步鉴定。根据已有方法对分离后的菌株进行接触酶、吲哚、淀粉水解、甲基红和硝酸盐还原等生化理化检验^[15]。

菌株在 LB 液体培养基中 30 °C 振荡培养至对数生长期，以菌液为 DNA 模板，使用通用引物模板 27F 与 1492R 对 16S rDNA 进行聚合酶链式反应（PCR）扩增。通用引物模板为：27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R(5'-TACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 反应体系为：灭菌蒸馏水 22 μL ，10×Buffer 2 μL ，dNTP 1 μL ，27F 和 1492R 引物各 1 μL ，DNA 模板 1 μL (30-100 ng)，Taq 酶 25 μL 。PCR 升温程序设定为：94 °C 预变性 5 min，94 °C 变性 30 s，53 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 30 s，循环 30 次，72 °C 延伸 8 s。扩增产物由广东美格基因科技有限公司使用 ABI3730 测序平台进行测序。将测序结果在 NCBI 上进行对比，根据 BLAS 结果用邻接法构建系统发育树。

1.4 石油烃降解菌降解正十六烷最优条件参数构建

正十六烷浓度：将菌株接种于 100 mL 富集培养基中于 30 °C、150 r/min 培养 24 h 进行活化，以无机盐培养基为基础，将正十六烷浓度分别设置为 0.2%、0.5% 和 1.0% (V/V)，接种量为 5%，每个梯度设置三个平行组。为了验证降解菌对正十六烷降解的影响，实验设置对照组，即在相同条件下，未添加降解菌的实验组。在 30 °C，180 r/min 条件下恒温震

荡培养 48 h, 利用液-液萃取法从培养液中分离出残余的正十六烷, 进行 GC-MS 测定, 并计算降解率。

盐度、pH: 以无机盐培养基为基础, 用 NaOH 和盐酸将 pH 值分别设置为 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 和 10.0, NaCl 浓度分别设置为 0.5%、1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0% 和 6.0%, 正十六烷浓度为 0.5%, 接种量为 5%, 每个梯度设置三个平行组, 30 °C, 180 r/min 条件下恒温震荡培养 48 h, 每 6 h 取样, 于 600 nm 波长处测定吸光度 OD₆₀₀ 值, 绘制菌株生长曲线图, 并对检测培养液中正十六烷的浓度, 计算降解率。

1.5 菌株对正十六烷的降解动力学试验

将空白的无机盐培养基调节菌株的 OD₆₀₀ 为 0.5 左右, 制成菌悬液备用, 加入 0.5% 正十六烷, pH 为 7.0, 盐度为 0.5%, 以 5.0% 的接种量将菌株接种于无机盐培养基中进行 14 d 降解实验, 设置 3 组平行。为了验证降解菌对正十六烷降解的影响, 实验设置了对照组, 即在相同条件下, 未添加降解菌的实验组。在 30 °C、180 r/min 条件下恒温震荡培养, 前 2 d 每 6 h 取样一次, 后 12 d 每 2 d 取样一次, 采用紫外分光光度计测定培养基的 OD₆₀₀ 和 pH 计测定培养基的 pH, 绘制菌株的生长曲线和 pH 变化趋势。

将培养后的无机盐培养基与 20 mL 正己烷混合, 震荡 10 min、180 W 超声提取 10 min 后, 用分液漏斗进行液液萃取。将萃取过程重复三次, 合并萃取液。接着将萃取液于 4 000 r/min 转速下离心 10 min, 取上清液。底层沉淀加入 20 mL 正己烷震荡后继续离心, 重复两次, 合并离心后的上清液, 加入 Na₂SO₄, 过夜干燥, 移至容量瓶定容至 30 mL, 采用 GC-MS 对降解后的残余正十六烷和其降解产物进行测定。

安捷伦 6890/5973 气相色谱质谱联用仪检测条件为: KD-5MS 柱 (30 m×0.32 mm×0.25 μm), 载气为氦气, 进样口温度 280 °C, 色谱柱程序升温条件: 80 °C (恒温 1 min), 以 12 °C/min 升至 140 °C, 再以 4 °C/min 升至 160 °C, 恒温 1 min, 再以 14 °C/min 升至 280 °C, 恒温 5 min。进样量 1.0 μL, 无分流。质谱增强型 EI 源, 电离能量 70 eV, 四极杆温度: 150 °C; 离子源温度: 230 °C; 扫描方式: 全扫描; 质量范围: 50~550 amu; 谱库: NIST12。

1.6 数据处理及分析

菌株对正十六烷的降解率计算公式如下:

$$\eta = \frac{C_d - C_c}{C_d} \quad (1)$$

式中: C_d 为对照组正十六烷浓度; C_c 为残余正十六烷浓度。

为进一步了解降解效果, 采用动力学方程对降解过程进行模拟。本文选择以下三种动力学模型对菌株降解正十六烷的过程进行模拟, 计算通式如下:

$$\text{零级动力学方程: } C_0 - C = K_d t \quad (2)$$

$$\text{一级动力学方程: } \ln\left(\frac{C_0}{C}\right) = K_d t \quad (3)$$

$$\text{二级动力学方程: } \frac{x}{(C_0-x) C_0} = K_d t \quad (4)$$

式中： C 为 t 时刻污染物的浓度，mg/g； C_0 为初始浓度，mg/g； K_d 为一级反应速率常数； t 为时间，h。

2 结果与讨论

2.1 石油降解菌的筛选、生化理化分析及鉴定

由于受石油污染的地区存在大量的石油烃降解菌，而且受石油污染的地区石油烃降解菌数量往往比未受污染的地区高 1-2 个数量级^[6]。因此，选择长期受石油污染的长庆油田油井周边土壤进行石油烃降解菌的筛选。首先对菌株进行分离纯化，并利用石油烃为唯一碳源进行了高效降解菌株的初筛和复筛。研究发现，菌株 5-5 能够利用石油烃为唯一碳源并对正十六烷具有较好降解效果。以原油为碳源的富集培养体系中起初原油全漂浮在水面上，水相澄清，原油和水完全分离。培养一段时间后，原油逐渐被乳化，呈液滴的形式分散在富集培养基中，培养液逐渐变浑浊。最后原油液滴变小，均匀分散在液体培养基中，出现絮状沉淀，这表明体系中的原油被石油烃降解菌 5-5 降解。对培养基中的原油进行提取和测定分析，结果如图 2 所示，发现菌株 5-5 对石油烃及石油烃中的代表性物质正十六烷均有较好的降解效果。因此，基于正十六烷的代表性、简化模型及可控性，选择石油烃代表性物质正十六烷进行后续的最优条件构建及降解实验。

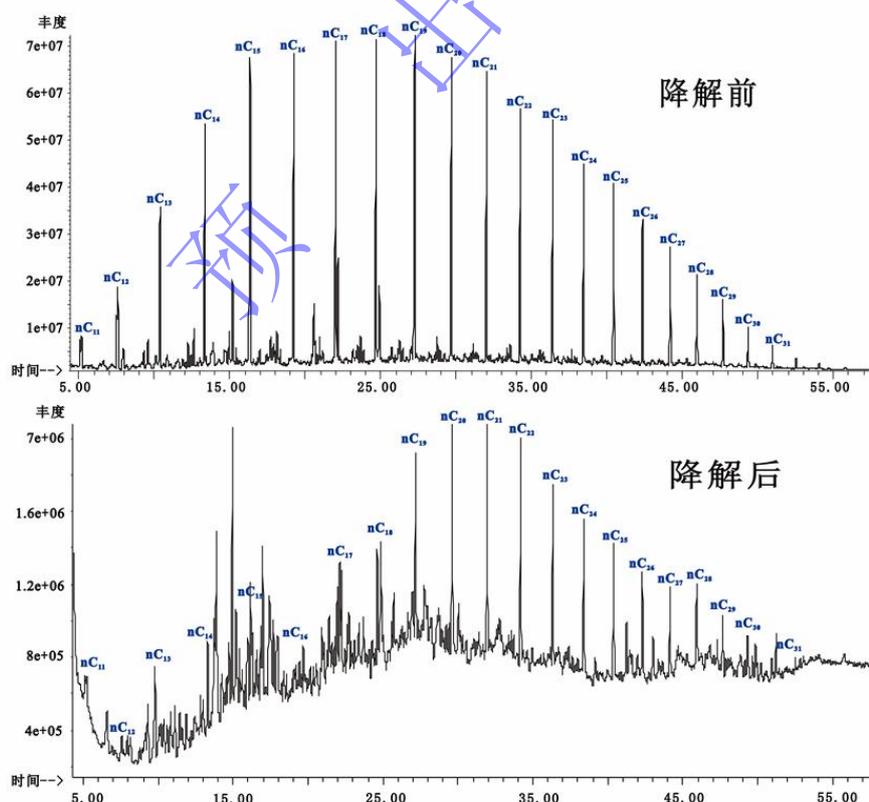


图 2 菌株降解原油前后气相色谱对比图

Fig.2 Gas chromatography comparison before and after the strain degrades crude oil

对 5-5 降解菌进行了生化理化测试，利用该结果对菌株 5-5 的菌种特性进行初步判定。菌株 5-5 在 LB-琼脂平板上的菌落形态如图 3a 所示，由革兰氏染色结果可知降解菌为革兰氏阴性菌，菌落呈乳白色，镜下菌落边缘整齐，菌落形状呈短杆状（图 3b）；吡啶试验、淀粉水解试验、M.R 及 V.P 试验均为阴性，接触酶试验均为阳性，即菌株为需氧菌或兼性厌氧菌，不能分解色氨酸产生吡啶，代谢葡萄糖过程中不产酸，且不能直接利用淀粉^[15]。

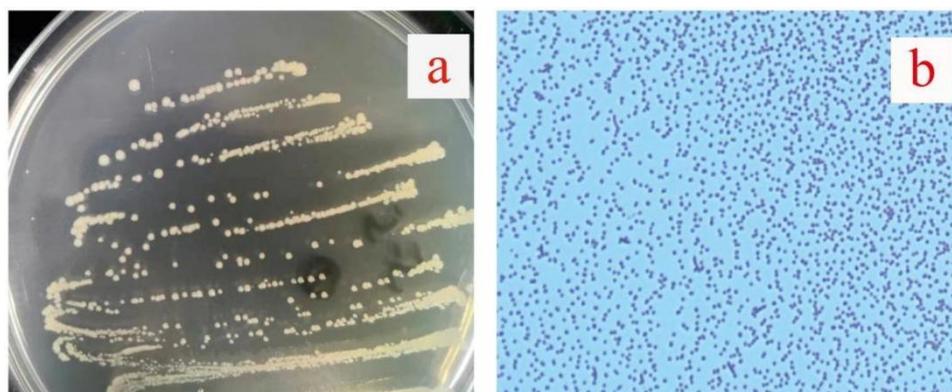


图 3 菌株的菌落形态和革兰氏染色后的显微观察

(a) 菌落形态; (b) 显微观察

Fig.3 Colony morphology and microscopic observation after Gram staining of the strain

(a) colony morphology; (b) microscopic observation

结合生化理化鉴定结果，初步判断菌株 5-5 为不动杆菌属，为了对石油烃降解菌的种属进行进一步鉴定，提取 DNA，PCR 扩增和测序，并与 NCBI 数据库进行了 BLAST 比对。根据测序结果，用 MEGA 软件对降解菌用邻接法构建系统发育树（图 4）显示，菌株 5-5 为醋酸钙不动杆菌 *Acinetobacter calcoaceticus*，与已发表菌株（MN250321.1）相似度为 100%。

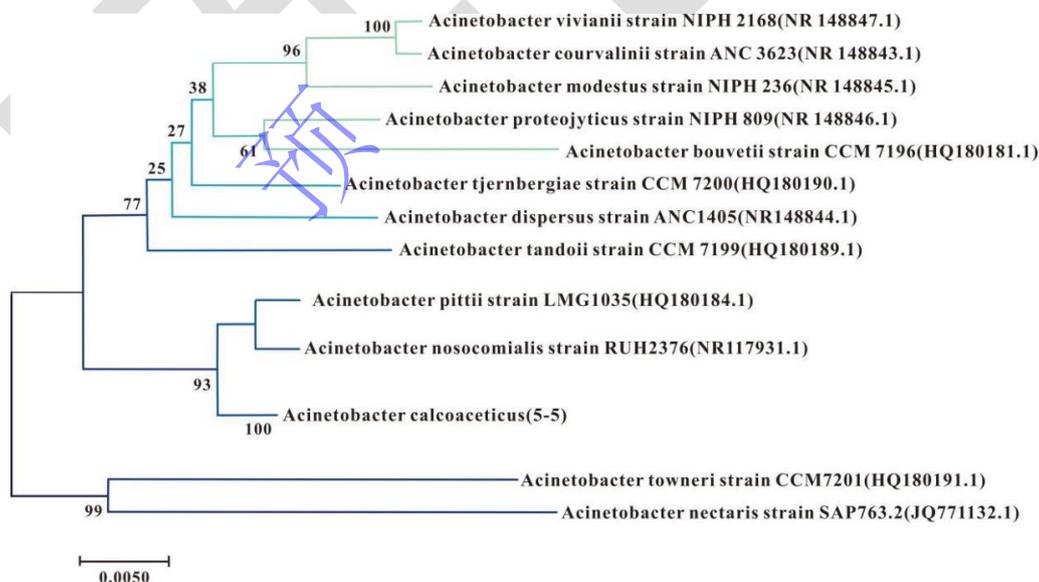


图 4 石油降解菌 5-5 的系统发育进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of petroleum hydrocarbon degrading bacteria 5-5

2.2 *Acinetobacter* sp.5-5 对正十六烷降解的最优条件构建

2.2.1 正十六烷初始浓度对降解率的影响

接种 0.5% 的菌悬液至无机盐培养基中，正十六烷浓度分别为 0.2% (V/V)、0.5% (V/V) 和 1.0% (V/V)，降解 48 h 后不同正十六烷初始浓度对降解率的影响结果如图 5 所示。由图所知，当正十六烷浓度为 0.2% (V/V) 和 0.5% (V/V) 时，菌株 *Acinetobacter* sp.5-5 在 48 h 内几乎降解全部的正十六烷（降解率为 100% 和 99.24%）；随着正十六烷浓度升高为 1.0% (V/V) 时，降解率达到 88.20%，说明正十六烷作为唯一碳源，在适宜浓度范围内能够促进菌株 *Acinetobacter* sp.5-5 的生长，并有较高的降解率，随着底物浓度的逐渐增加，菌株对正十六烷的降解率不断降低（图 5）。陈小蓉等^[16]也发现了相似的规律，经富集筛选后的菌株 *Gordonia* sp.LAM 0048 在 36 h 内能使 0.05% (V/V) 和 1.0% (V/V) 正十六烷降解率分别达到了 100% 和 46.6%。初始浓度对菌株 *Acinetobacter* sp.5-5 降解正十六烷的影响原因如下：首先正十六烷作为唯一的碳源为菌株新陈代谢、生长繁殖提供营养物质，适量浓度的正十六烷有助于增强菌株酶活性，促进降解；其次正十六烷作为疏水性底物，会形成一层油膜覆盖在液体培养基的表面，当正十六烷浓度过高，油膜过厚，会影响好氧细菌对氧气的利用；最后高浓度的正十六烷具有生物毒性，影响菌株利用氧气和无机盐，当浓度达到 1.0% (V/V) 时，降解率仍能达到 88.20%。说明该菌株在较高浓度污染物的环境下仍有较高的降解效率。总体而言，菌株 *Acinetobacter* sp.5-5 在正十六烷浓度（0.5%）相对较高的情况下，降解率仍然接近 100%。因此，在后续试验中，选择正十六烷初始浓度为 0.5% 作为底物浓度。

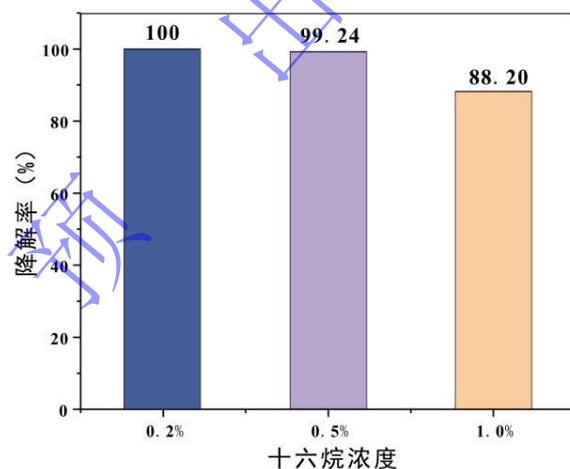


图 5 不同底物浓度下菌株 *Acinetobacter* sp.5-5 对正十六烷的降解率变化

Fig.5 Degradation rate of *n*-hexadecane by strain *Acinetobacter* sp.5-5 under different substrate concentrations

2.2.2 pH 对菌株的影响

酸碱度是影响菌株生长的关键因素。pH 值可以通过影响微生物酶的反应以及对营养物质的吸收来调节微生物的代谢活性^[17]。此外，不同 pH 条件下营养物质和无机盐的电离反应也会干扰微生物的新陈代谢，从而影响其对正十六烷的降解效率^[18]。在 48 h 的降解试验中，菌株 *Acinetobacter* sp.5-5 在 pH 为 6.0~8.0 时，降解率为 95.73%~80.07%（图 6a）。由菌株 *Acinetobacter* sp.5-5 的生长曲线可知（图 6b），当 pH 为 6.0~9.0 时，菌株前 6 h 进入

对数生长期，之后 30 h 稳定生长且 36 h 光密度达到最大值；当 pH 为 5.0 和 10.0 时，菌株存在 6 h 左右的生长延滞期，随后进入对数生长期，48 h 时达到最大菌浓度。与适中的 pH 范围相比，在过酸或过碱的环境下，菌株需更长的时间适应生长，且不利于菌株的生长和代谢。从生长曲线的观察结果可以看出，菌株 *Acinetobacter* sp.5-5 更适应 pH 6.0~8.0 的弱碱性环境。然而，值得注意的是，在 pH 9.0 的高碱性环境下，该菌株对正十六烷的降解率却比在 pH=5.0 的酸性环境下更高。这可能是因为在碱性环境下，水相培养基与疏水性的正十六烷更容易形成水包油乳液，从而提高了菌株对碳源的利用，进而提高了正十六烷的降解效率。此外，已有研究报道表明，O/W（水包油）体系的乳化程度会随着碱性的增强而增强^[9]。根据上述结果，可以得出结论，菌株 *Acinetobacter* sp.5-5 在弱碱性条件下降解效果较好。考虑到长庆油田土壤的 pH 介于 7.1~8.6，由图 6 可以看出，菌株 *Acinetobacter* sp.5-5 在弱碱性环境下（pH 为 9）对正十六烷的降解仍然可达 67%。这说明在弱碱性土壤条件下，*Acinetobacter* sp.5-5 降解菌能够有效适应，并发挥降解作用。

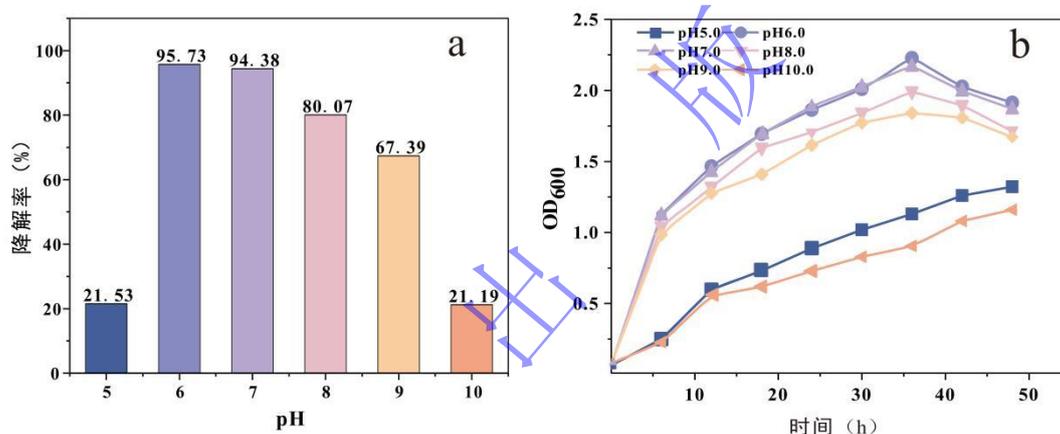


图 6 不同 pH 条件下菌株 *Acinetobacter* sp.5-5 对正十六烷的降解率 (a) 及其生长曲线 (b) 变化
(a) 降解率; (b) 生长曲线

Fig.6 Degradation rate of *n*-hexadecane and growth curve variations of strain *Acinetobacter* sp. 5-5 under different pH conditions
(a) degradation rate; (b) growth curve

2.2.3 盐度参数优化

不同 NaCl 质量浓度对正十六烷降解率的影响如图 7 所示。从图中可以看出，菌株 *Acinetobacter* sp.5-5 在 NaCl 浓度介于 0.5%~6.0% 时，降解率与盐度呈现负相关关系（图 7a）。这说明当培养基体系盐度过高时，介质中的盐浓度升高，导致细胞处于低渗状态，引发细胞膨胀，从而抑制微生物大分子的合成，进而影响菌株降解酶的活性^[20-21]。然而，当盐浓度达到 6.0% 时，降解率仍然能够保持在 3.97%，表明微生物可以通过调节自身新陈代谢来平衡细胞内外的压力，以适应不同盐度环境。通过观察生长曲线，发现盐度与菌株的生长速率也呈负相关关系（图 5b），而且当 NaCl 浓度为 0.5% 时在 36 h 出现了拐点，说明在最优盐度条件下，*Acinetobacter* sp.5-5 通常在 36 h 左右达到最大菌落浓度，并随后进入稳定期和衰亡期。通过观察降解菌 *Acinetobacter* sp.5-5 在不同盐度下的生长曲线和降解率，发现在 0.5%~2% 盐度条件下生长最佳。值得注意的是，研究区土壤的盐度浓度介于

1.43%~2.03%，而在这个范围内，菌株 *Acinetobacter* sp.5-5 的降解率可以达到 70%。这表明在高盐度土壤中，该菌株可作为高效降解菌以进行生物修复。

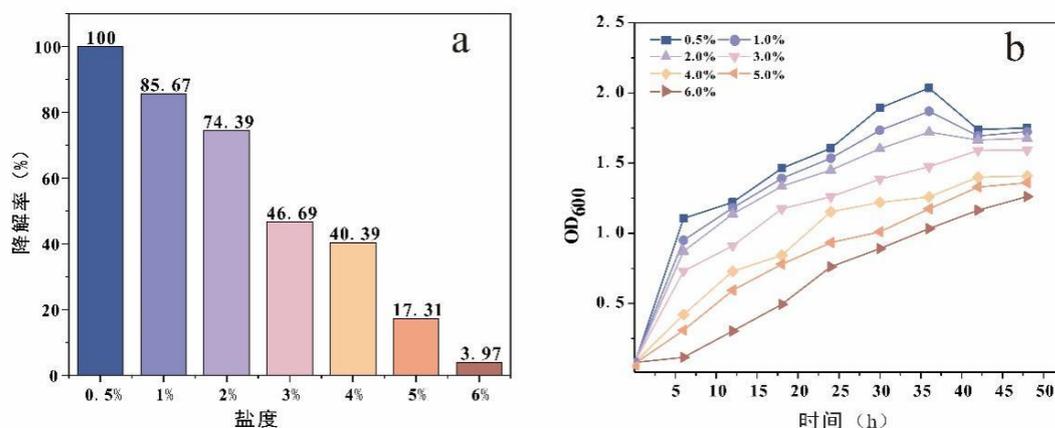


图 7 不同盐度下菌株 *Acinetobacter* sp.5-5 对正十六烷的降解率及其生长曲线变化

(a) 降解率; (b) 生长曲线

Fig.7 Degradation rate of *n*-hexadecane and growth curve variations of strain *Acinetobacter* sp.5-5 under different salinities

(a) degradation rate; (b) growth curve

2.3 *Acinetobacter* sp.5-5 菌株降解正十六烷的动力学及机理研究

根据 2.2 中构建的最优条件以及长庆油田土壤状况选择盐度 0.5%，pH 7.0 和正十六烷初始浓度 0.5% (V/V) 的条件来探讨菌株 *Acinetobacter* sp.5-5 的降解动力学过程。菌株 *Acinetobacter* sp.5-5 在 14 d 内对正十六烷的降解率变化如图 8 所示。经过 14 d 的降解后，菌株 *Acinetobacter* sp. 5-5 成功降解了 99.24% 的正十六烷，尤其值得注意的是，在前 2 d 内，降解率达到 82.13%。这与已有研究结果一致，通常正十六烷降解菌在 5~10 d 内可达到最大的降解率。与之前的研究相比，刘虹等^[22]筛选得到的克雷氏白菌 *Klebsiella* sp. A5、假单胞菌 *Pseudomonas* sp. A6 以及无色杆菌 *Achromobacter* sp. A10 在第 5 d 时对正十六烷的降解率已达到 80% 以上。另外，李迎鹤等^[23]从大庆油田土壤中分离出的溶血不动杆菌在 10 d 内对 5% (V/V) 的正十六烷降解率可达 10% 以上，而在 12 d 时降解率达到 62.0%。相对而言，菌株 *Acinetobacter* sp.5-5 对正十六烷底物适应较快，降解效率较高。

以时间为横轴， C_0-C 、 $\ln(C_0/C)$ 、 $\frac{x}{(C_0-x)C_0}$ 为纵轴作图，利用零级、准一级和准二级对 *Acinetobacter* sp.5-5 降解正十六烷的动力学过程进行拟合，拟合结果如图 9 及表 1 所示。可以看出零级、准一级和准二级的 R^2 分别为 0.6052、0.9276 和 0.6766，说明利用准一级动力学方程能够很好的模拟 *Acinetobacter* sp.5-5 在 pH 7.0、盐度 0.5%、正十六烷浓度 0.5% (V/V) 的条件下对正十六烷的降解过程。

菌株对底物的降解动力学过程、反应级数以及底物浓度之间存在一定的相互关系。例如，刘虹等^[22]研究发现正十六烷降解菌 A6 在初始浓度低于 1 000 mg/L 时，其动力学方程式呈现较好的一级反应拟合，而反之则呈现零级反应特征。本研究如 2.2.1 中所述，*Acinetobacter* sp.5-5 在正十六烷浓度为 0.2% (V/V) 和 0.5% (V/V) 的条件下，能够降解几乎

100%的底物，但在 1.0% (V/V)浓度条件下，降解率下降至 88.20%，通过该现象初步推测当降解体系中碳源（正十六烷）浓度达到一定临界值时，正十六烷降解的反应级数可能会发生变化。

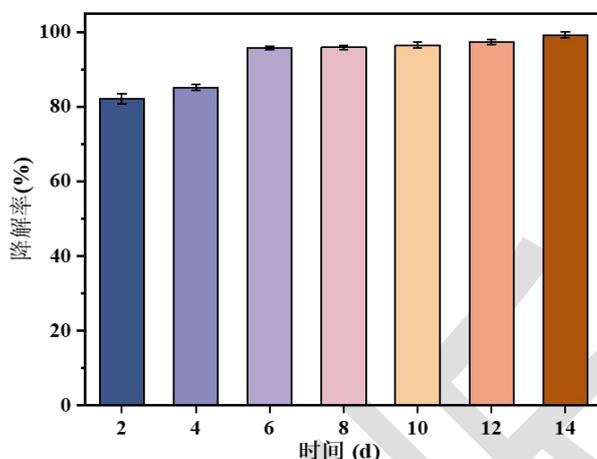


图 8 菌株 *Acinetobacter* sp.5-5 对正十六烷的降解率
Fig.8 Degradation rate of *n*-hexadecane by strain *Acinetobacter* sp.5-5

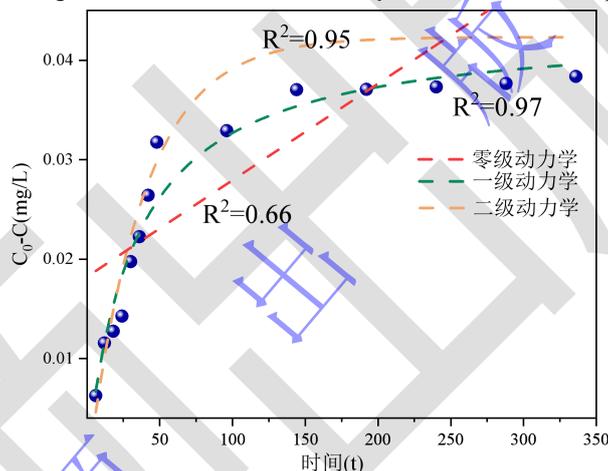


图 9 菌株 *Acinetobacter* sp.5-5 降解正十六烷的零级、准一级和准二级动力学拟合曲线
Fig.9 Zero-order, pseudo-first-order, and pseudo-second-order kinetic fitting curves for the degradation of *n*-hexadecane by strain *Acinetobacter* sp.5-5

表 1 菌株 *Acinetobacter* sp.5-5 降解正十六烷的动力学拟合参数
Table 1 Kinetic fitting parameters of *n*-hexadecane degradation by strain *Acinetobacter* sp.5-5

N 级反应	拟合方程	反应常数/K _d /h	R ²	动力学方程
零级	$C_0 - C = 8.934 \times 10^{-4}t + 0.016$	8.934×10^{-4}	0.605	$C = C_0 - 8.934 \times 10^{-4}t - 0.015$
准一级	$\ln\left(\frac{C_0}{C}\right) = 0.013t + 0.462$	0.013	0.928	$C = C_0 e^{-0.013t - 0.462}$
准二级	$\frac{x}{(C_0 - x)C_0} = 6.630t - 245.052$	6.630	0.677	$C = \frac{C_0^2}{(6.630t - 245.052) + C_0}$

为了更进一步探讨菌株 *Acinetobacter* sp.5-5 对正十六烷的降解特性，我们深入研究了其对正十六烷的降解机理。该降解过程的 pH 值、OD₆₀₀ 和降解率变化如图 10 所示。由生长曲线可以看出，正十六烷为唯一碳源的培养基中，*Acinetobacter* sp.5-5 菌株先经历 18 h 左右的生长延滞期，18 h 后菌株进入对数生长期，36 h 进入稳定期且在 42 h 重新快速生长。

然而在牛肉膏培养基中，菌株在 2 h 内便进入了对数生长期，说明相对于富集培养基，菌株需要更多的时间来适应新的生长环境，包括调整新陈代谢、合成加氧酶、脱氢酶等烷烃降解酶，以及生成一些必要的中间产物。此外菌株延滞期的长短通常受菌株遗传特性的影响，菌株在 36 h 进入稳定期主要是因为生成的有毒物质（如有机酸）致使菌株重新适应环境造成的生长延滞。

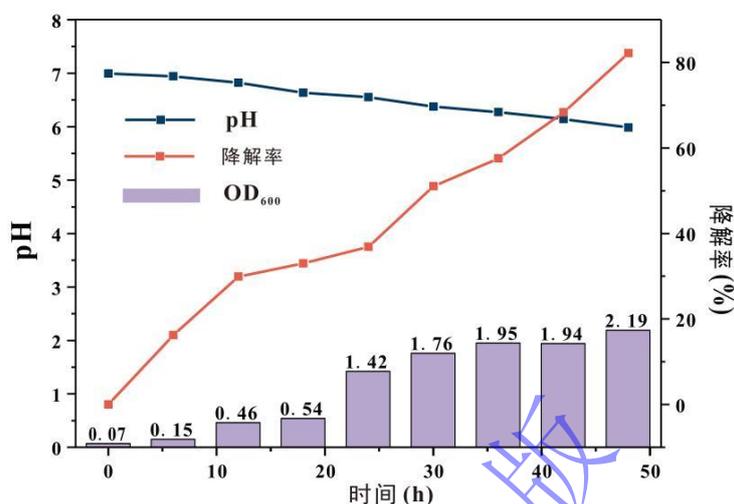
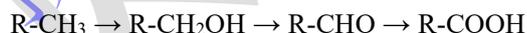


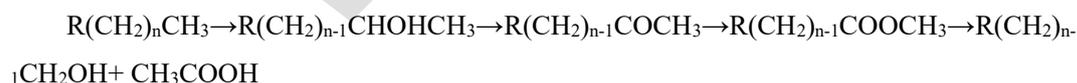
图 10 菌株 *Acinetobacter* sp.5-5 降解正十六烷的生长曲线与 pH 变化

Fig.10 Growth curve and pH change of *n*-hexadecane degradation by strain *Acinetobacter* sp.5-5

生化试验表明菌株 *Acinetobacter* sp.5-5 的甲基红结果为阴性，即菌株 *Acinetobacter* sp.5-5 利用葡萄糖为碳源的降解过程中不产酸。但是在降解试验过程中培养基 pH 由 6.99 下降至 5.98（图 10），说明菌株 *Acinetobacter* sp.5-5 降解正十六烷过程中产酸或者生成了酸性的中间产物。此外，不动杆菌 *Acinetobacter* sp.5-5 为好氧细菌，加氧酶是长链烷烃好氧降解的重要部分，在有氧条件下，长链烷的微生物降解主要由单末端氧化、次末端氧化和双末端氧化三种方式进行^[24]。Thijsee *et al.*^[25]对烷烃氧化产物的色谱分析建立了好氧细菌利用烷烃作为唯一碳源的氧化反应途径：



有文献报道，不动杆菌通过在正十六烷的 10 号碳位进行裂解，生成羟基酸。这个产酸过程包括以下步骤：首先，烷烃末端被氧化成醇，醇氧化形成相应的酮，酮氧化形成相应的脂，酯分解为伯醇和乙酸，醇继续氧化形成脂肪酸，然后进入三羧酸循环^[26]。



此外，对菌株 *Acinetobacter* sp.5-5 在降解正十六烷过程中产生的降解产物进行色谱分析，如图 11 所示，发现正十六烷发生了碳链缩短以及 10 号位碳链的裂解现象。这一发现证实了此过程符合好氧细菌降解饱和烃的典型路径，即首先生成伯醇，然后伯醇被进一步转化为醛，最终在烷烃羟化酶的催化下转化为有机酸，这是一种典型的有氧降解途径。

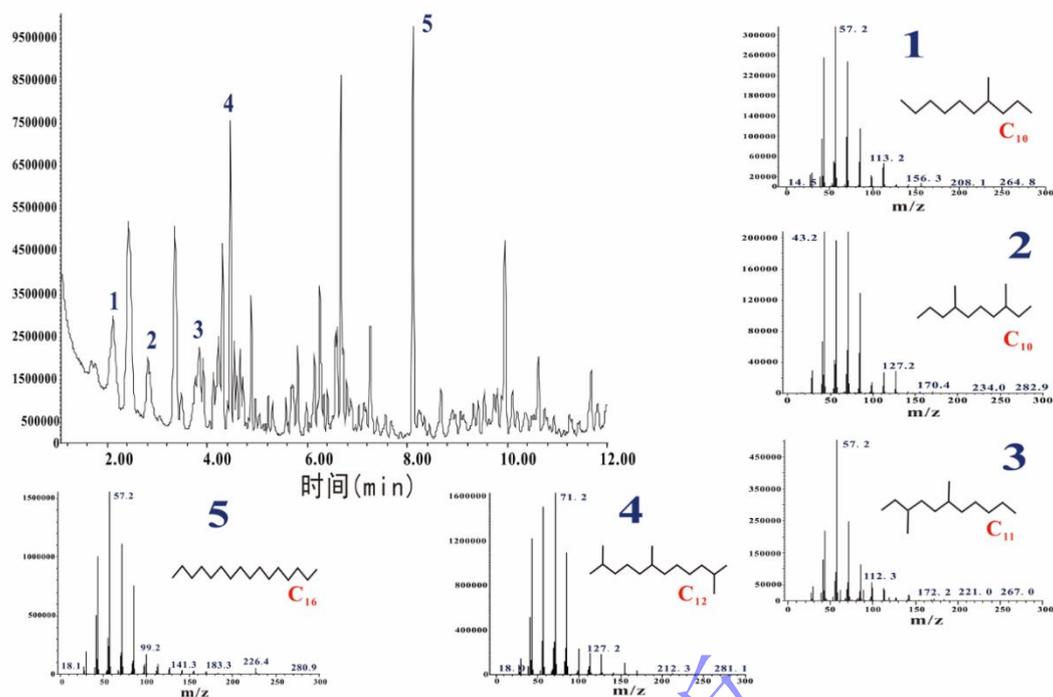


图 11 菌株 *Acinetobacter* sp.5-5 降解正十六烷的产物分析
Fig.11 Analysis of *n*-hexadecane degradation products by *Acinetobacter* sp.5-5

3 结论

(1) 以原油为碳源富集筛选到石油烃降解菌 5-5, 经过形态特征观察和 16S rDNA 序列比对, 鉴定 5-5 菌株为醋酸钙不动杆菌 (*Acinetobacter calcoaceticus*)。

(2) *Acinetobacter* sp.5-5 菌株降解正十六烷的最适条件为正十六烷初始浓度 0.5%、pH=7.0, 以及盐度 0.5%。值得注意的是, 当底物浓度升至 1.0% (*V/V*)时, 降解率仍能维持在 88.20%。长庆油田土壤的 pH 介于 7.1~8.6, 盐度为 1.43%~2.03%时, *Acinetobacter* sp.5-5 对正十六烷的降解率分别达 67%和 70%。表明 *Acinetobacter* sp.5-5 降解菌株能够有效适应高盐碱性环境, 并对石油烃代表性物质 (正十六烷) 具有较好的降解作用。

(3) 在 0.5% (*V/V*)正十六烷浓度、0.5%盐浓度和 pH=7.0 的条件下, *Acinetobacter* sp.5-5 可在 14 d 降解 99.24%的正十六烷, 其动力学过程符合准一级动力学方程。另外, 降解试验中溶液 pH 下降及产物分析可初步推测菌株 *Acinetobacter* sp.5-5 降解正十六烷的途径为断链、脱氢、产酸, 最后进入三羧酸循环。

致谢 感谢审稿专家对文章提出的宝贵意见。

参考文献 (References)

- [1] 朱立强. 石油化工对环境的污染及应对措施[J]. 化工管理, 2020 (10): 44-45. [Zhu Liqiang. Environmental pollution of petrochemical industry and its countermeasures[J]. Chemical Enterprise Management, 2020(10): 44-45.]
- [2] 许华夏, 张春桂. 微生物降解石油污染的土壤[J]. 辽宁城乡环境科技, 1998, 18 (6): 22-24. [Xu Huaxia, Zhang Chungui. Microbial degradation of crude oil contaminated soil[J]. Liaoning Urban and Rural Environmental Science & Technology, 1998, 18(6): 22-24.]
- [3] Mohseni-Bandpei A, Majlesi M, Rafiee M, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) Formation during the fast pyrolysis of hazardous health-care waste[J]. Chemosphere, 2019, 227: 277-288.

- [4] 李宝明, 阮志勇, 姜瑞波. 石油降解菌的筛选、鉴定及菌群构建[J]. 中国土壤与肥料, 2007 (3): 68-72. [Li Baoming, Ruan Zhiyong, Jiang Ruibo. Screen and identification of oil degrading bacteria and community construction[J]. Soils and Fertilizers Sciences in China, 2007(3): 68-72.]
- [5] Abbasian F, Lockington R, Mallavarapu M, et al. A comprehensive review of aliphatic hydrocarbon biodegradation by bacteria[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 176(3): 670-699.
- [6] Farag S, Soliman N A, Abdel-Fattah Y R. Statistical optimization of crude oil bio-degradation by a local marine bacterium isolate *Pseudomonas* sp. sp48[J]. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 2018, 16(2): 409-420.
- [7] Wang Z D, Fingas M. Developments in the analysis of petroleum hydrocarbons in oils, petroleum products and oil-spill-related environmental samples by gas chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 1997, 774(1/2): 51-78.
- [8] 康跃惠, 盛国英, 傅家谟, 等. 珠江澳门河口沉积物柱样品正构烷烃研究[J]. 地球化学, 2000, 29 (3): 302-310. [Kang Yuehui, Sheng Guoying, Fu Jiamo, et al. The study of n-alkanes in a sedimentary core from Macao Estuary, Pearl River[J]. Geochimica, 2000, 29(3): 302-310.]
- [9] 郭娜, 李志敏, 叶勤. 烷烃降解菌的筛选、鉴定及优势菌株的降解特性[J]. 应用与环境生物学报, 2011, 17 (4): 572-576. [Guo Na, Li Zhimin, Ye Qin. Screen and identification of alkane degrading bacteria and characteristics of a predominant strain[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2011, 17(4): 572-576.]
- [10] Sorkhoh N A, Ghannoum M A, Ibrahim A S, et al. Crude oil and hydrocarbon-degrading strains of *Rhodococcus rhodochrous* isolated from soil and marine environments in Kuwait[J]. Environmental Pollution, 1990, 65(1): 1-17.
- [11] M'rassi A G, Bensalah F, Gury J, et al. Isolation and characterization of different bacterial strains for bioremediation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2015, 22(20): 15332-15346.
- [12] Bovio E, Gnani G, Prigione V, et al. The culturable mycobiota of a Mediterranean marine site after an oil spill: Isolation, identification and potential application in bioremediation[J]. Science of the Total Environment, 2017, 576: 310-318.
- [13] 冒学宇, 李勇, 吴从杨慧, 等. 石油烃降解菌的筛选及其降解特性研究[J]. 环境工程技术学报, 2022, 12 (3): 886-892. [Mao Xueyu, Li Yong, Wu Congyanghui, et al. Research on the screening of petroleum hydrocarbon degrading bacteria and their degradation characteristics[J]. Journal of Environmental Engineering Technology, 2022, 12(3): 886-892.]
- [14] 安玉姿. 土壤石油污染的危害与修复[J]. 中国资源综合利用, 2017, 35 (5): 72-73. [An Yuzi. Harm and remediation of soil oil pollution[J]. China Resources Comprehensive Utilization, 2017, 35(5): 72-73.]
- [15] 周德庆, 徐德强. 微生物学实验教程[M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2013: 33-35. [Zhou Deqin, Xu Deqiang. Microbiology lab course[M]. 3rd ed. Beijing: Higher Education Press, 2013: 33-35.]
- [16] 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 Xiaorong, Ruan Zhiyong, Wang Yanwei, et al. Research on the isolation, identification and N-hexadecane biodegrading characteristics of *Gordonia* sp. LAM0048[J]. Current Biotechnology, 2015, 5(2): 137-141.]
- [17] Ibrahim H M M. Biodegradation of used engine oil by novel strains of *Ochrobactrum anthropi* HM-1 and *Citrobacter freundii* HM-2 isolated from oil-contaminated soil[J]. 3 Biotech, 2016, 6(2): 226.
- [18] Kumar B L, Gopal D V R S. Effective role of indigenous microorganisms for sustainable environment[J]. 3 Biotech, 2015, 5(6): 867-876.
- [19] 赵凤兰, 岳湘安, 侯吉瑞, 等. 碱对复合驱油体系与原油乳化作用的影响[J]. 石油钻探技术, 2010, 38 (2): 62-66. [Zhao Fenglan, Yue Xiang'an, Hou Jirui, et al. Impact of alkali on emulsification of compound flooding system and crude oil[J]. Petroleum Drilling Techniques, 2010, 38(2): 62-66.]
- [20] Obuekwe C O, Badrudeen A M, Al-Saleh E, et al. Growth and hydrocarbon degradation by three desert fungi under conditions of simultaneous temperature and salt stress[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2005, 56(4): 197-205.
- [21] Riis V, Kleinstueber S, Babel W. Influence of high salinities on the degradation of diesel fuel by bacterial consortia[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2003, 49(11): 713-721.
- [22] 刘虹, 张朋朋, 刘娜, 等. 三种细菌降解直链烷烃的效果及降解动力学研究[J]. 安全与环境工程, 2017, 24 (3): 66-70. [Liu Hong, Zhang Pengpeng, Liu Na, et al. Degradation efficiency and dynamics of straight-chain alkane degraded by three kinds of bacteria[J]. Safety and Environmental Engineering, 2017, 24(3): 66-70.]
- [23] 李迎鹤, 刘东, 于杰, 等. 正十六烷降解菌的分离、鉴定及降解特性研究[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2022, 38 (2): 131-136. [Li Yinghe, Liu Dong, Yu Jie, et al. Isolation, identification and degradation characteristics of n-hexadecane degrading bacteria[J]. Journal of Harbin University of Commerce (Natural Sciences Edition), 2022, 38(2): 131-136.]
- [24] Heringa J W, Huybregtse R, van der Linden A C. n-alkane oxidation by *apseudomonas* Formation and β -oxidation of intermediate fatty acids[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1961, 27(1): 51-58.
- [25] Thijsse G J E, van der Linden A C. Pathways of hydrocarbon dissimilation by a *Pseudomonas* as revealed by chloramphenicol[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1963, 29(1): 89-100.

[26] Singh B, Bhattacharya A, Channashettar V A, et al. Biodegradation of oil spill by petroleum refineries using consortia of novel bacterial strains[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2012, 89(2): 257-262.

Degradation Characteristics of n-Hexadecane by Petroleum Hydrocarbon-Degrading Bacteria *Acinetobacter* sp.5-5

YUAN LongMiao¹, WANG ZhiYu^{2,3}, SHAO YuanYuan^{1,2}, CHEN JianZhen^{1,2}, WU YingQin¹

1. Northwest Institute of Eco-Environment and Resources, Chinese Academy of Sciences/Key Laboratory of Petroleum Resources Research, Gansu Province, Lanzhou 730000, China

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

3. Ecological Environment Bureau of Sino-Singapore Tianjin Eco-City, Tianjin 300000, China

Abstract: **[Objective]** Microbial remediation of oil pollution has gained significant attention owing to its environmentally friendly nature and the absence of secondary pollution. To enhance the biological remediation technology for oil pollution, this study screened efficient petroleum hydrocarbon-degrading bacteria to understand and assess their degradation mechanisms. Using soils from the oil-polluted site in the Changqing Oilfield as the microbial source, strains with efficient degradation capabilities towards n-hexadecane were identified. **[Methods]** Through morphological characteristics, Gram staining, biochemical and physicochemical tests, 16s rDNA sequence analysis, and resistance experiments, strain *Acinetobacter* sp.5-5 and its optimal degradation conditions for n-hexadecane were investigated. Based on zero-order, quasi-first-order, and quasi-second-order kinetic models, the degradation process of n-hexadecane was studied. Additionally, the acidity-alkalinity of the culture medium and the degradation product spectrum were analyzed to identify the degradation pathway of n-hexadecane. **[Results]** The results indicated that the strain belonged to *Acinetobacter* sp., and at 0.5% (V/V) initial concentration, 0.5% salinity, and pH 7.0, the total degradation rate of n-hexadecane by the petroleum hydrocarbon-degrading bacteria reached 99.24%, with a rapid degradation rate of 82.13% within two days. The kinetics of the degradation process revealed that the quasi-first-order model had the best fitting effect for the substrate degradation of n-hexadecane. The preliminary analysis suggested that the degradation pathway of n-hexadecane in this system involved chain breaking and acid production processes. **[Conclusion]** This research demonstrated that petroleum hydrocarbon degrading bacterium *Acinetobacter* sp.5-5 had a strong degradation effect on n-hexadecane when the salinity was as high as 0.5%, and the degradation rate reached more than 99%, indicating that this strain had a high potential for alkane degradation and good salinity tolerance and was expected to be widely used in the remediation of petroleum-contaminated salinized soils.

Key words: petroleum degrading bacteria; n-hexadecane; salinity tolerance; degradation mechanism