

Sphingobacterium bambusaue 及其紫外诱变菌株的 石油降解功能

段盛文^{1,2} 刘正初^{1,2*} 郑科^{1,2} 冯湘沅^{1,2} 成莉凤^{1,2} 郑霞^{1,2}

(1. 中国农业科学院 麻类研究所 湖南 长沙 410205)

(2. 农业部麻类生物学与加工重点实验室 湖南 长沙 410205)

摘要: 【目的】研究 *Sphingobacterium bambusaue* 及其紫外诱变菌株的石油降解功能。

【方法】紫外诱变后筛选石油降解高效菌株;以不同石油浓度、pH 值及盐浓度优化培养条件,用重量法检测高效菌株石油降解率。【结果】发现菌株 *S. bambusaue* 在石油降解培养基中培养 5 d 的石油降解率为 25.86%,UV 诱变高效菌株 IBFC2009-S3 培养 5 d 的石油降解为 42.85%,比始发菌株提高 65.7%;UV 诱变菌株 IBFC2009-S3 的优化培养条件为石油浓度 0.5 g/L、pH 值 7.0 以及 NaCl 质量浓度为 10 g/L,其石油降解率可达 50.51%。【结论】首次报道 *S. bambusaue* 具有石油降解功能;紫外诱变获得的菌株 S3 的石油降解能力较强。

关键词: *Sphingobacterium bambusaue*, 紫外诱变菌株, 石油降解

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2012AA022209D); 国家麻类产业技术体系建设专项项目(No. CARS-19-E24); 湖南省自然科学基金项目(No. 11JJ4021); 国家微生物资源平台专项经费项目(No. NIMR2012-01-03)

*通讯作者: Tel: 86-731-88998535; Fax: 86-731-88998528; 信箱: ibfclzc@189.cn

收稿日期: 2012-12-14; 接受日期: 2013-02-06

Petroleum degradation capacity of *Sphingobacterium bambusaue* and its UV-mutants

DUAN Sheng-Wen^{1,2} LIU Zheng-Chu^{1,2*} ZHENG Ke^{1,2} FENG Xiang-Yuan^{1,2}
CHENG Li-Feng^{1,2} ZHENG Xia^{1,2}

(1. *Institute of Bast Fiber Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changsha, Hunan 410205, China*)

(2. *Key Laboratory of the Biology and Process of Bsat Fiber Crops, Ministry of Agriculture China, Changsha, Hunan 410205, China*)

Abstract: [Objective] Crude oil degradation by *Sphingobacterium bambusaue* and its UV mutants were studied. [Methods] The efficient crude oil degrading strains were obtained by UV mutagenesis, and the crude oil degradation rate was tested by gravimetric method in the culture conditions of different crude oil concentration, pH and salt concentration. [Results] The crude oil degradation rate of the strain *Sphingobacterium bambusaue* and UV mutant IBFC2009-S3 cultured in crude oil medium for 5 d was 25.86% and 42.85% respectively, and the crude oil degradation rate of UV mutant IBFC2009-S3 increased 65.7% than that of the originating strains; the crude oil degradation rate of the strain IBFC2009-S3 was 50.51% in the optimum condition which was 0.5 g/L crude oil, pH 7.0, and 10 g/L NaCl. [Conclusion] Crude oil degradation by *Sphingobacterium bambusaue* and its UV mutants IBFC2009-S3 have the higher ability of crude oil degradation.

Keywords: *Sphingobacterium bambusaue*, UV-mutagenesis strains, Petroleum degradation

油田开采过程中, 残余废弃物直接外排导致海洋、地表水和农田等环境严重污染, 平均每年几十万吨的海洋溢油已经严重威胁着海洋生态环境^[1]。目前主要采用物理、化学和生物方法对油田采出废水进行深度处理, 其中生物方法因具有处理成本低、操作简便、石油类污染物降解效果好、不易引起二次污染等特点而得到广泛应用^[2-3]。据统计已经发现能够降解石油的微生物超过了 200 多种, 细菌主要有: 无色杆菌属 (*Achromobacter* sp.)、不动杆菌属 (*Acinetobacter* sp.)、产碱杆菌属 (*Alcaligenes* sp.)、芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.)、假单胞菌属

(*Pseudomonas* sp.)和微球菌属 (*Micrococcus* sp.)等, 真菌有地霉属 (*Geotrichum* sp.)、曲霉属 (*Aspergillus* sp.)、假丝酵母属 (*Candida* sp.)、镰刀霉属 (*Fusarium* sp.)和酵母属 (*Saccharomyces* sp.)等^[4]。近年来还发现了蓝细菌和绿藻也具有降解芳香烃的作用^[5]。

微生物 *Sphingobacterium* sp. 自 1983 年才由 Yabuuchi 等建议单独分类成属^[6], 目前已报道 19 个种, 其中有 14 个种是近 5 年才被发现的, 其功能也在逐步发掘。多食鞘氨醇杆菌 (*Sphingobacterium multivorum*)和嗜温鞘氨醇杆菌 (*Sphingobacterium thalophilum*)具有石油降

解能力,其中多食鞘氨醇杆菌 SWH-2 石油降解能力较强^[7-9]。

Sphingobacterium bambusaue 是 2009 年首次从自然界分离获得并报道的微生物新种^[10-11]。本文试图发掘 *S. bambusaue* 在石油降解方面的能力。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 始发菌株: *S. bambusaue* IBFC2009 是中国农业科学院麻类研究所首次分离获得并已报道的新种。

1.1.2 培养基: 生长培养基及石油降解培养基如[9-10]文献所述。

1.2 方法

1.2.1 紫外诱变: 活化态 *S. bambusaue* IBFC2009 菌株在生长培养基中培养 8 h 后,取 5 mL 菌悬液加到直径 9 cm 培养皿内,置于磁力搅拌器上,18 W 紫外灯下于垂直距离 25 cm 处照射 0、30、60、90、120、150、180 s。取不同照射时间的菌悬液适当稀释后,取 0.1 mL 涂布于固态生长培养基上进行培养,平板菌落计数法计算致死率。

1.2.2 诱变菌株筛选: 从致死率在 60%–80% 的处理中挑取出现较早、生长速率较快的单菌落^[12],纯化后保存。将单菌落制备成菌悬液涂布在固态石油降解培养基上生长,根据生长状况重复筛选石油降解高效菌株。

1.2.3 石油降解能力检测: (1) 石油含量测定采用重量法测定培养液中残余石油的含量^[13],以不接菌的培养液为对照。(2) 吸取 10 mL 菌液接种于 50 mL 含油量 1 000 mg/L 的石油降解培养液中,在 30 °C、180 r/min 下摇床培养,分别在第 1、3、5、7、9 天时测定石油降解率。

1.2.4 培养条件对石油降解的影响: (1) 吸取

10 mL 菌液接种于 pH 值为 7.0, NaCl 含量为 10 g/L 的 50 mL 含油量分别为 100、500、1 000、1 500、3 000 mg/L 的石油降解培养液中,在 30 °C、180 r/min 下摇床培养 5 d,测定石油浓度对石油降解率的影响。(2) 将菌株接种于含油量为 1 000 mg/L, NaCl 含量为 10 g/L 的 50 mL pH 值分别为 5、6、7、8、9、10 的石油降解培养液中,在 30 °C、180 r/min 下摇床培养 5 d,测定 pH 值对石油降解率的影响。(3) 将菌株接种于 pH 值为 7.0, 含油量为 1 000 mg/L, NaCl 含量为 0、10、30、50、70 g/L 的石油降解培养液中,在 30 °C、180 r/min 下摇床培养 5 d,测定盐浓度对石油降解率的影响。(4) 通过 Excel 软件的数据分析功能对不同培养条件下的菌株降解能力结果进行组间方差分析。显著性水平 $\alpha=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 紫外线对 *S. bambusaue* 致死率的影响

紫外线照射时间对菌株致死率的影响见图 1。当紫外线照射时间小于 60 s 时,致死率随紫外线照射时间增加而迅速增加;当紫外线照射时间大于 90 s 后,致死率的增加趋势变缓。在曲线的拐点处,即照射时间为 90 s 时,致死率为 87%。90 s 后,致死率接近 90%,180 s 后致死率达到

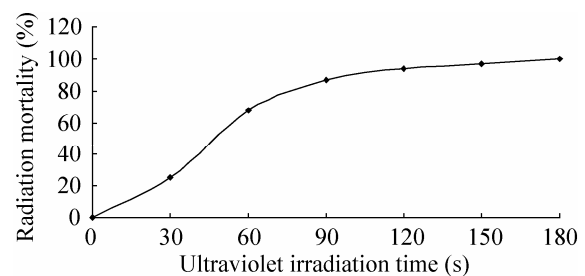


图 1 UV 处理对菌株 IBFC2009 的致死曲线
Fig. 1 Effects of ultraviolet irradiation time on radiation mortality of the stain IBFC2009

100%。由此可见, 诱变 *S. bambusaue* IBFC2009 菌株选择紫外照射时间 60 s 比较合适。

2.2 石油降解功能菌株筛选

从 30、60、90 s 紫外照射后的平板中分别挑出 10、20、10 个长势较快的菌落, 经过 3 次生长培养基转接、活化后, 转接到固态石油降解培养基上, 培养 5 d 后, 检测到 12 个菌株能在固态石油降解培养基上生长。经过复筛, 获得 4 株长势良好菌株, 分别编号为 IBFC2009-S1、IBFC2009-S2、IBFC2009-S3、IBFC2009-S4 (以下分别简称 S1、S2、S3、S4)。

2.3 不同菌株石油降解能力比较

不同菌株在培养过程中的石油降解率如图 2 所示。由图 2 可知, 培养至第 5 天, 所有菌株的石油降解率接近最大值, 并进入稳定状态: 始发菌株 IBFC2009 的石油降解率为 25.86%; 菌株 S3 的石油降解能力最强, 达到 42.85%, 比始发菌株提高了 65.7%; S4 次之, 达到 35.56%; S2 为 28.42%, 略强于始发菌株; S1 降解能力不及始发菌株。此外, 菌株 S3 培养至第 3 天, 其石油降解能力为 35.45%, 说明该菌株石油降解能力较强; 阴性对照的石油含量随时间推移缓慢降低, 9 d 后石油含量减少 12.65%, 可能是因为石油中含有挥发性物质。

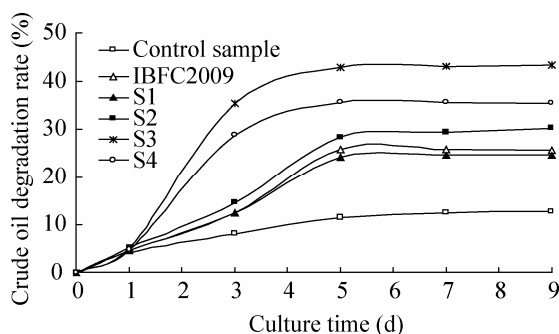


图 2 不同菌株在培养过程中的石油降解率
Fig. 2 Effects of culture time on crude oil degradation rate

2.4 培养条件对诱变菌株 S3 石油降解能力的影响

2.4.1 石油浓度的影响: 石油浓度对诱变菌株 S3 的石油降解率的影响见图 3。由图 3 看出, 石油降解率随石油初始浓度增加而降低。当起始浓度为 0.1 g/L 时, 其降解率为 53.84%; 起始浓度在 0.5–1.5 g/L 时, 降解率快速下降; 浓度达到 1.5 g/L 时, 降解率只有 36.52%, 随后继续降低。石油成分复杂, 其中可能存在部分芳香烃等有机物对微生物具有毒害作用, 随着石油浓度增加, 抑制菌株生长因子增大, 导致菌体不能正常生长或死亡, 石油降解率相应下降。

2.4.2 pH 的影响: 从图 4 可以看出, 菌株 S3 降解石油比较适合的 pH 是 6.0–9.0, 当 pH 过高或过低都直接影响到石油降解率。菌株 S3 始发

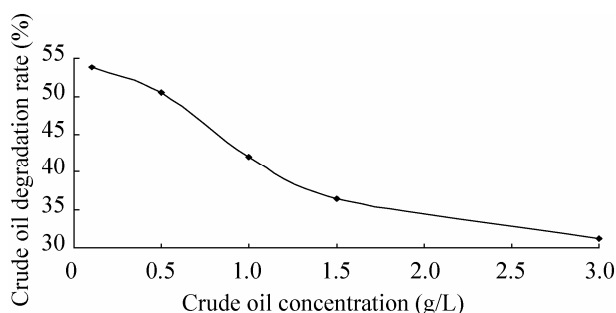


图 3 石油浓度对菌株 S3 的石油降解能力的影响
Fig. 3 Effects of crude oil concentration on its degradation rate

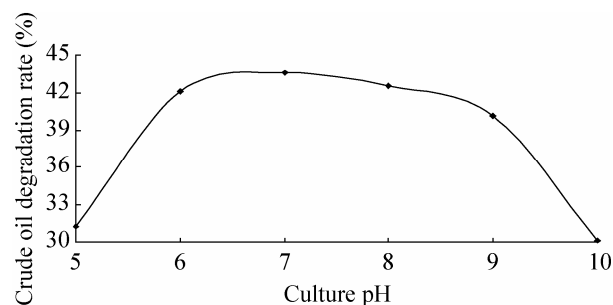


图 4 pH 对菌株 S3 的石油降解能力的影响
Fig. 4 Effects of culture pH on crude oil degradation rate

菌株的 pH 耐受范围为 pH 6.0–9.0^[10], pH 过高或过低都会影响微生物正常生长以及酶的分泌和活性, 从而影响菌株 S3 对石油的降解。

2.4.3 盐浓度的影响: 从图 5 可以看出, 菌株 S3 可以在 NaCl 质量浓度较广的范围内进行生长, 具有较好的耐盐特性。在 NaCl 质量浓度为 0 时, 能使石油降解率达到 42.7%, 随后随着 NaCl 的质量浓度升高而表现出先升后降的石油降解能力, NaCl 的质量浓度为 10 g/L 时, 石油降解率为 43.13%, NaCl 的质量浓度为 30 g/L 时, 石油降解率为 42.89%, 再随着 NaCl 的质量浓度升高, 菌株的石油降解能力急速下降, 盐浓度过高不再适合于菌株正常生长, NaCl 质量浓度为 70 g/L 时, 石油降解率只有 31.26%。

2.4.4 方差分析: 不同培养条件对菌株 S3 石油降解能力的组间方差分析如表 1 所示。石油浓度、pH 及盐浓度的 F 统计量分别是 136.322 10、41.145 96 以及 180.739 40, 均大于相应的临界值 F_{crit} , 也就是说不同条件下菌株 S3 的石油降解能力显著性差异明显。石油浓度、pH 及盐浓度的 P -value 均小于 0.05, 与 F 统计量分析结果一致。

3 讨论

S. bambusaue 具有石油降解功能, 为石油降解微生物菌群添加了新成员。梁生康等报道了 12 株高效石油降解菌, 各单菌株的降解石油率为 40.13%–57.16%^[15]。彭鸽威等^[16]报道菌株

X3 对石油的去除率可达到 72.6%。在 *Sphingobacterium* sp. 中, 李超敏等报道了在石油浓度为 0.5 g/L 下, 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) SWH-1、多食鞘氨醇杆菌(*S. multivorum*) SWH-2 和嗜温鞘氨醇杆菌(*S. thalophilum*) SWH-3 的石油降解率分别为 33.89%、46.31%及 12.88%, SWH-1 和 SWH-2 混合培养降解石油, 降解率高达 51.73%^[9]; Erdoğan E. E. 及 Jürgensen K. S. 也报道 *S. multivorum* 具有石油降解能力^[7,14]。通过本研究证实, *S. bambusaue* IBFC2009 菌株具有石油降解能力, 在石油降解培养基中培养 5 d, 其石油降解率为 25.86%。

紫外诱变菌株 IBFC2009-S3 潜在的开发应用优势明显。李超敏报道的 SWH-1、SWH-2 和 SWH-3 培养 1 周以后具有较大石油降解率^[9], 彭鸽威等报道的一株石油降解菌株 X3 在培养

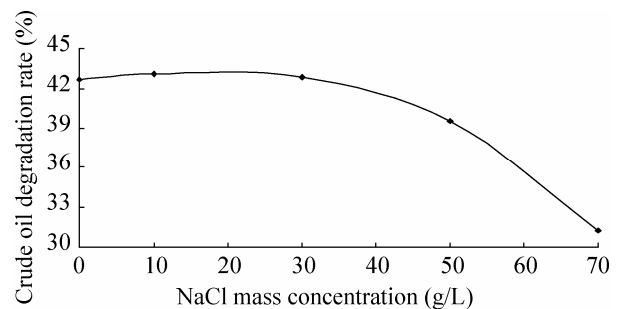


图 5 NaCl 的质量浓度对菌株 S3 的石油降解能力的影响

Fig. 5 Effects of NaCl mass concentration on crude oil degradation rate

表 1 培养条件对菌株 S3 石油降解能力的方差分析

Table 1 Variance analysis on different culture conditions to oil degradation ability of strain S3

组间方差 Interclass variance	平方和 Quadratic sum	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	统计量 Statistical magnitude	P 值 P -value	临界值 Critical value
石油浓度 Crude oil concentration	1 064.217 0	4	266.054 30	136.322 10	1.12E-08	3.478 050
pH 值 Culture pH	543.802 2	5	108.760 40	41.145 96	3.82E-07	3.105 875
盐浓度 NaCl concentration	305.933 6	4	76.483 41	180.734 90	2.80E-09	3.478 050

8 d 后, 达到最大石油降解率^[16]。王中华等对石油降解中微生物群落进行了 16S rDNA-PCR-DGGE 分析, 在降解初期, 微生物种类丰富度较大, 当培养至第 5 天石油开始发生乳化降解, 降解发生至第 15 天, 石油各组分的色谱丰度特征峰几乎消失^[17]。试验证明, 该诱变菌株 S3 培养 5 d, 达到 42.85%, 说明该菌株的石油降解能力较强。

不同培养条件对诱变菌株 S3 的石油降解能力产生较大的影响。经过优化, 诱变菌株 S3 在 pH 7.0 及 NaCl 质量浓度为 10 g/L 的培养条件下, 具有最大石油降解率; 石油浓度越低, 菌株降解能力越强。pH 值及 NaCl 质量浓度过高或过低都会直接影响微生物正常生长以及酶的分泌和活性, 从而影响菌株 S3 对石油的降解。本研究中, 培养条件对诱变菌株 S3 的石油降解率影响的变化趋势与已报道的相关研究基本一致^[16,18]。王福强等认为无论是低浓度还是高浓度的石油, 菌株的降解率都较低^[4], 这种差异可能与菌株本身的性状和培养条件有关。

参 考 文 献

- [1] 吴常亮, 王鑫, 邵宗泽. 印度洋表层海水石油降解菌的多样性分析[J]. 微生物学报, 2010, 9: 1218-1225.
- [2] 宋志文, 夏文香, 曹军. 海洋石油污染物的微生物降解与生物修复[J]. 生态学杂志, 2004, 3: 99-102.
- [3] 谢鲲鹏, 周集体, 曲媛媛, 等. 一株耐盐原油降解菌的分离鉴定及其降解特性研究[J]. 海洋环境科学, 2009, 6: 680-683.
- [4] 王福强, 李凤超, 李彦芹, 等. 原油降解菌的筛选鉴定及降解特性的研究[J]. 环境科学与技术, 2010, 12: 39-42,98.
- [5] 周东凯, 马学良, 刘志刚, 等. PD-1菌株的原油降解能力研究[J]. 石化技术与应用, 2008, 4: 357-360.
- [6] Yabuuchi E, Kaneko T, Yano I, et al. *Sphingobacterium* gen. nov., *Sphingobacterium spiritivorum* comb. nov., *Sphingobacterium multivorum* comb. nov., *Sphingobacterium mizutae* sp. nov., and *Flavobacterium indologenes* sp. nov.: Glucose-nonfermenting Gram-negative rods in CDC groups IIk-2 and IIb[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1983, 33: 580-598.
- [7] Erdoğan EE, Şahin F, Karaca A. Determination of petroleum-degrading bacteria isolated from crude oil-contaminated soil in Turkey[J]. African Journal of Biotechnology, 2012, 11: 4853-4859.
- [8] 高永超, 王加宁, 孔学, 等. 石油降解菌多食鞘氨醇杆菌的发酵条件优化[J]. 生物技术, 2009, 19: 74-77.
- [9] 李超敏, 王加宁, 邱维忠, 等. 高效降解石油细菌的分离鉴定及降解能力的研究[J]. 生物技术, 2007, 4: 80-82.
- [10] Duan SW, Liu ZC, Feng XY, et al. *Sphingobacterium bambusae* sp. nov., isolated from soil of bamboo plantation[J]. The Journal of Microbiology, 2009, 47: 693-698.
- [11] Euzéby J. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60, 1477-1479.
- [12] Pfeifer GP, You YH, Besaratinia A. Mutations induced by ultraviolet light[J]. Mutation Research, 2005, 571: 19-31.
- [13] 魏复盛. 水和废水监测分析方法[M]. 第4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 490.
- [14] Jürgensen KS, Puustinen JA, Suortti M. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles[J]. Environmental Pollution, 2000, 107: 245-254.
- [15] 梁生康, 王修林, 汪卫东, 等. 高效石油降解菌的筛选及其在油田废水深度处理中的应用[J]. 化工环保, 2004, 1: 41-46.
- [16] 彭鸽威, 阎光绪, 刘晓春, 等. 原油降解菌的分离及其降解性能[J]. 化工进展, 2008, 4: 531-534,557.
- [17] 王中华, 李佳霖, 李太武, 等. 一株海洋细菌对原油降解的分析[J]. 海洋湖沼通报, 2011, 3: 89-96.
- [18] 韩寒冰. 原油降解菌的筛选及其降解性能研究[J]. 茂名学院学报, 2009, 19: 21-23.