



## 研究报告

## 一株不动杆菌降解石油烃的特性及关键烷烃降解基因分析

杨劫<sup>1</sup> 宋东辉<sup>\*1,2</sup>

1 天津科技大学海洋与环境学院 天津 300457

2 天津市海洋资源与化学重点实验室 天津 300457

**摘要:**【背景】*Acinetobacter* sp. Tust-DM21 (GenBank 登录号 KX390866)是本实验室前期从渤海湾海洋石油勘探船废油收集区采集的水油混合样中分离出的一株高效石油降解菌,其对短、中、长链烷烃均表现出很强的降解能力,有较好的应用前景。【目的】从应用层面探究其最佳降解条件,同时从生物信息层面探究其降解基因的作用。【方法】将其在不同温度、pH下培养144 h,通过GC-MS内标法测定石油烃各组分的变化情况,计算出其最佳降解条件;同时,通过生物信息学手段确定基因组中的降解基因,每个基因分别选择7个同源基因,对它们的蛋白序列进行比较;最后对2个降解基因在0–144 h的表达情况进行了Real-time PCR分析。【结果】*Acinetobacter* sp. Tust-DM21最佳降解条件为35 °C、pH 8.5,该条件下对石油降解率可达97.5%,其中,对长链烷烃降解率达98.5%,对环烃为81%,对芳香烃为87%;同时,研究发现基因组中含有常见烷烃降解基因*alkB* (GenBank 登录号 MH368539)和长链烷烃降解基因*almA* (GenBank 登录号 MH357335),2个降解基因的蛋白经比较均与其同源蛋白表现出一定的相似性,同属菌的相似性最高;通过Real-time PCR发现这2个基因在0–144 h的相对表达量随时间逐步提高。【结论】*Acinetobacter* sp. Tust-DM21在最佳降解条件下对石油各组分都显示出了优良的降解能力,特别对长链烷烃的降解能力尤为突出;将2个降解基因的相对表达量结合该时间段的生长趋势,证明了菌株*Acinetobacter* sp. Tust-DM21的生长和降解与*alkB*和*almA*基因的上调表达存在关联。

关键词: 石油降解菌, *alkB*, *almA*, 降解率, Real-time PCR

## Characterization of key alkane degradation genes from a petroleum hydrocarbon degradation *Acinetobacter* sp. Tust-DM21

YANG Jie<sup>1</sup> SONG Dong-Hui<sup>\*1,2</sup>

1 College of Marine and Environmental Sciences, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

2 Tianjin Key Laboratory of Marine Resources and Chemistry, Tianjin 300457, China

**Abstract:** [Background] *Acinetobacter* sp. Tust-DM21 (GenBank: KX390866) is a highly efficient petroleum degrading bacteria isolated early from the water-oil mixed sample collected from the waste oil area of the Bohai Bay offshore oil exploration vessel in this laboratory. It exhibits strong

Foundation item: Key Project of Tianjin Natural Science Foundation (18JCZDJC10060)

\*Corresponding author: E-mail: dhsong@tust.edu.cn

Received: 20-01-2020; Accepted: 10-06-2020; Published online: 27-08-2020

基金项目: 天津市自然科学基金重点项目(18JCZDJC10060)

\*通信作者: E-mail: dhsong@tust.edu.cn

收稿日期: 2020-01-20; 接受日期: 2020-06-10; 网络首发日期: 2020-08-27

degradability to short, medium and long chain alkanes. **[Objective]** To investigate the optimal conditions of the strain for degradation at the application level and to investigate the role of degradation genes at the bioinformatics level. **[Methods]** The strain was incubated at different temperatures and pH for 144 h. Changes in petroleum hydrocarbon components were determined by GC-MS internal standard methods, and the best degradation condition was calculated. Meanwhile, the degrading genes were identified in its genome by bioinformatics analysis, and seven homologous genes were selected for each gene and their protein sequences were compared. Real-time PCR analysis of these two genes at 0–144 h were performed for their transcription expression research. **[Results]** The optimal degradation conditions were 35 °C and pH 8.5. The relative degradation level of petroleum hydrocarbon under this optimal condition can reach up to 97.5%. The degradation rate was 98.5% for long-chain alkanes, 81% for cycloalkanes and 87% for aromatics. Meanwhile, the common alkane degradation gene *alkB* (GenBank: MH368539) and the long-chain alkane degradation gene *almA* (GenBank: MH357335) were found in its genome, the proteins of the two degradation genes are similar to their homologous proteins, and the similarity of the same genus is the highest. Real-time PCR showed that gene relative expression increased gradually over time. **[Conclusion]** It exhibits strong degradability to short, medium and long chain alkanes under the optimal degradation conditions, especially for long-chain alkanes. Combining with the growth trend in this time period, it was demonstrated that the strain growth and degradation were associated with up-regulated expression of the *alkB* and *almA* genes.

**Keywords:** Petroleum degrading bacteria, *alkB*, *almA*, Degradation rate, Real-time PCR

海洋石油污染对海洋生态环境造成恶劣影响<sup>[1-3]</sup>,严重影响海洋生物和沿岸渔业的正常活动,对自然环境造成巨大破坏。传统的物理、化学处理方法存在不彻底或副作用大的隐患<sup>[4-5]</sup>,而生物方法主要通过石油烃降解微生物分解海面浮油<sup>[6]</sup>,其优势在于快速降解石油烃的同时不产生二次污染,是处理该类问题的理想途径<sup>[7-11]</sup>,因此,对石油烃降解菌的研究正受到越来越多的重视。

自然界中许多微生物均可降解石油烃类,已报道的可以进行石油烃降解的微生物有 90 余属 200 余种,包括细菌、蓝藻、真菌以及海洋藻类<sup>[12]</sup>。不动杆菌属(*Acinetobacter*)是石油降解菌中重要的一个属,广泛存在于自然水体和土壤中,是海洋环境中的优势细菌,也是一种重要的石油烃降解微生物,可通过乳化作用对石油烃进行降解<sup>[13]</sup>。不动杆菌对石油烃的降解和生态修复具有很大的应用前景。因此,研究不动杆菌对石油降解具有重要意义。

*Acinetobacter* sp. Tust-DM21 (GenBank 登录号

为 KX390866,以下简称 Tust-DM21)是本实验室前期从渤海湾海洋石油污染区分离出的一株不动杆菌属高效石油降解菌,该菌对烷烃、环烃、芳香烃均有很好的降解效果<sup>[14]</sup>。本研究进一步分析了在不同处理时间周期内,不同温度和 pH 值条件下 Tust-DM21 降解石油烃的能力,并根据该菌基因组测序结果,针对 2 个重要的中、长链烷烃降解基因 *alkB* 和 *almA* 进行不同降解时间的实时荧光定量 PCR 研究,以期为今后该菌的实际使用提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株来源

从渤海湾海洋石油勘探船废油收集区提取的菌株经本实验室前期分离得到 Tust-DM21 菌株样本,在-80 °C 的条件下冷藏于 50%甘油当中。中国海洋微生物菌种保藏管理中心对该菌株进行了收藏,菌株编号 MCCC 1K03249,在 GenBank 数据库中其 16S rRNA 基因序列登录号

为 KX390866。

**1.1.2 降解基因信息**

Tust-DM21 全基因组数据来源于本实验室前期 Pacbio 单分子实时全基因组测序所得(数据未公布)。Tust-DM21 由 1 个环状染色体基因组及 3 个环状质粒组成。基因组包含基因 3 595 个, (G+C)mol% 含量为 39.18%, 平均基因长度为 866.3 bp, 基因密度为 1.011 genes/kb<sup>[15]</sup>。

根据 Tust-DM21 基因组注释和已有石油烃降解基因报道, 通过基因库比对, 发现 Tust-DM21 基因组中存在重要的烷烃降解基因  $\alpha$ -酮戊二酸依赖性双加氧酶基因(*alkB*)和长链烷烃降解基因黄素结合单加氧酶基因(flavin-binding monooxygenase, *almA*) (表 1)。*alkB* 基因全长 1 245 bp, 位于 Tust-DM21 基因组的 1 585 077-1 586 321 bp 处。*almA* 基因全长 2 275 bp, 位于 Tust-DM21 基因组

419 407-421 681 bp 处。*alkB* 和 *almA* 的全长基因编码序列已提交 NCBI 数据库, 登录号分别为 MH368539 和 MH357335。

**1.1.3 同源蛋白信息**

由于同时含有 *alkB* 与 *almA* 的降解菌较少, 因此对 2 个基因分别进行比较研究, 每个基因选择 8 个同源基因, 对它们编码的蛋白序列进行比对。

(1) *alkB* 同源蛋白信息

于 NCBI 蛋白数据库选择 8 个不同菌株 *alkB* 基因所编码的烷烃羟化酶(alkane hydroxylase)蛋白序列, 详见表 2。

(2) *almA* 同源蛋白信息

于 NCBI 蛋白数据库选择 8 个不同菌株 *almA* 基因所编码的黄素结合单加氧酶(flavin-binding monooxygenase)蛋白序列, 详见表 3。

表 1 本实验所研究的降解基因

Table 1 Degrading genes in this experiment

基因名称 Gene names	基因序列登录号 GenBank accession No. of nucleotide sequence	基因长度 Gene length (bp)	蛋白序列登录号 GenBank accession No. of protein sequence	氨基酸长度 Amino acid length (aa)
链烷 1-单加氧酶基因 (简称 <i>alkB</i> ) Alkane 1-monooxygenase ( <i>alkB</i> )	MH368539	1 245	AWR93195.1	414
黄素结合单加氧酶基因 (简称 <i>almA</i> ) Flavin-binding monooxygenase ( <i>almA</i> )	MH357335	2 275	AWR93194.1	497

表 2 8 菌株所含 *alkB* 蛋白信息

Table 2 *alkB* protein information of 8 strains

菌株 Strains	GenBank 登录号 GenBank accession No.	氨基酸长度 Amino acid length (aa)
<i>Acinetobacter</i> sp. Tust-DM21	AWR93195.1	414
<i>Acinetobacter beijerinckii</i> TY22	AMO65651.1	411
<i>Acinetobacter</i> sp. LAM1007	ART29879.1	412
<i>Acinetobacter</i> sp. strain HC8-3S	AXA98735.1	415
<i>Acinetobacter</i> sp. M-1	BAB33284.1	415
<i>Alcanivorax dieselolei</i>	AAT91722.2	394
<i>Legionella jordanis</i>	VEH14023.1	360
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	QIF36367.1	382

表 3 8 株菌所含 *almA* 蛋白信息Table 3 *almA* protein information of 8 strains

菌株 Strains	GenBank 登录号 GenBank accession No.	氨基酸长度 Amino acid length (aa)
<i>Acinetobacter</i> sp. Tust-DM21	AWR93194.1	497
<i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1	CAG69876.1	498
<i>Acinetobacter</i> sp. DSM 17874	ABQ18224.1	497
<i>Acinetobacter</i> sp. M-1	ABQ18228.1	496
<i>Acinetobacter venetianus</i> RAG-1	ABQ18226.1	497
<i>Oceanobacter</i> sp. RED65	EAT10988.1	499
<i>Cupriavidus pinatubonensis</i> JMP134	AAZ64503.1	506
<i>Limnobacter</i> sp. MED105	EDM84915.1	507

#### 1.1.4 主要试剂和仪器及培养基

Trizol, 北京索莱宝科技有限公司; DNase I 处理试剂, Fermentas 公司; 总 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、miRNA 反转录试剂盒、PCR Mix 和 Real-time PCR 试剂, 北京希诺谷生物科技有限公司; RNeasy Micro Kit, Qiagen 公司; First Strand cDNA Synthesis Kit 和 Fast SYBR Green Master Mix, Thermo Fisher 科技公司。

电泳仪和凝胶成像系统, 北京君意东方电泳设备有限公司; 冷冻离心机, Sigma 公司; 分光光度计, Eppendorf 公司; 定量 PCR 仪, Thermo Fisher 科技公司。

LB 培养基(g/L): 牛肉膏 5.0, 蛋白胨 5.0, 无水葡萄糖 2.5, NaCl 3.0<sup>[15]</sup>, 分别调 pH 值为 7.5、8.0 和 8.5 共 3 组, 1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 30 min。平板固体培养基加琼脂 15 g/L。石油海水培养基: 天然海水(经 0.22 μm 滤膜抽滤除菌), 1%原油<sup>[16]</sup>(1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 30 min)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 Tust-DM21 降解能力的研究

为研究 Tust-DM21 在不同温度及 pH 条件下的最佳降解情况, 将 Tust-DM21 按 5%接菌量加入石油海水培养基, 根据刘玉华等(2016)的研究, 不动杆菌属细菌可耐受 pH 范围为 3.0–9.0, 可生长温度范围为 20–40 °C<sup>[13]</sup>, 据此通过盐酸或氢氧化钠调节 pH, 分别设定不同温度和 pH 值的 A–E 处理组(表 4), 130 r/min 条件下振荡培养, 在 0、12、24、48、

表 4 不同温度及 pH 培养条件设定

Table 4 Germiculture conditions of 5 groups

分组 Groups	温度 Temperature (°C)	pH 值 pH value
A 组 Group A	35	8.0
B 组 Group B	35	7.5
C 组 Group C	35	8.5
D 组 Group D	40	8.0
E 组 Group E	30	8.0

72、96、120、144 h 时, 各以 5 mL 正己烷萃取原油组分, 将萃取液于 4 °C 保存。

石油烃的降解测定采用气质联用(GC-MS)法<sup>[17-18]</sup>来分析残油组的含量, 内标物是异三十烷<sup>[15]</sup>。GC-MS 在以下条件下完成运行: 色谱柱 HP-5MS (30 m×0.25 mm×0.25 μm); 以氦气作为载气; 保持 1 mL/min 的柱流量。通过定性的方式检测质谱: 进样量为 1 μL。通过程序升温来保持柱温: 10 min 的时间内保持 30 °C 恒温, 当温度达到 100 °C 时, 按照 5 °C/min 的速率继续升温; 当温度处于 100–200 °C 之间时, 按照 20 °C/min 的速率继续升温; 在达到 280 °C 之前时, 按照 30 °C/min 的速率继续升温; 最后尾吹 10 min<sup>[14]</sup>。对各组进行分浓度测量, 降解率的计算利用以下公式<sup>[19-20]</sup>完成:

$$D_{\text{烷烃}} = (C_{\text{ck}} - C_t) / C_{\text{ck}} \quad (1)$$

$$D_{\text{环烃}} = 1 - \left( \frac{A_t}{A_{\text{内标}}} \right) / \left( \frac{A_{\text{ck}}}{A_{\text{ck内标}}} \right) \quad (2)$$

$$D_{\text{芳香烃}} = 1 - \left( \frac{A_t}{A_{\text{内标}}} \right) / \left( \frac{A_{\text{ck}}}{A_{\text{ck内标}}} \right) \quad (3)$$

式中各项分别表示:  $C_i$ =实验组烷烃的浓度(mg/L);  $C_{ck}$ =对照组烷烃的浓度(mg/L);  $A_i$ =实验组分析物峰面积;  $A_{内标}$ =实验组内标物峰面积;  $A_{ck}$ =对照组分析物峰面积;  $A_{ck内标}$ =对照组内标物峰面积;  $D$ =菌株对不同石油烃的降解率(%)[14]。

### 1.2.2 *alkB* 和 *almA* 同源蛋白的比较

#### (1) 系统发育树的构建

将 8 个蛋白序列编为 Database, 使用 MEGA 7.0 软件, 应用邻接法构建系统发育树。

#### (2) 同源蛋白保守结构域与保守基序

通过 NCBI 网站 Conserved Domain Database 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) 预测同源蛋白保守结构域, 再利用 MEME (<http://meme-suite.org/tools/meme>)[21] 对氨基酸序列保守基序进行分析。

#### (3) 同源蛋白序列比对

通过 ClustalW 在线比对工具 (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) 进行蛋白序列比对, 通过 ESPript 3.0 工具绘图[22]。

### 1.2.3 *alkB* 和 *almA* 基因转录表达的研究

#### (1) 样品制备

将 Tust-DM21 在 LB 培养基中活化后接种于 7 瓶石油海水培养基(pH 8.5)中, 置于恒温 35 °C、130 r/min 培养, 在 0、12、24、48、72、96、120、144 h 时测  $OD_{600}$  值, 并取 30 mL 培养液 6 000 r/min 离心 2 min, 将菌体用超纯水清洗 2 次后用 Trizol 试剂裂解, 于 -80 °C 冰箱保存。

#### (2) 实时荧光定量 Real-time PCR 实验

根据 Tust-DM21 测序完成的全基因组序列(数据未公布), 发现存在烷烃降解基因 *alkB* 和 *almA* 的相应序列, 据此设计相应引物序列(表 5)。用 SG 高纯总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 添加 DNase I 处理后, 使用 Thermo First cDNA Synthesis Kit 进行反转录实验, 实验所用引物信息见表 5。使用 2×SG Green qPCR Mix (with ROX) 进行 Real-time PCR 反应。内参基因的设定以 Tust-DM21 菌株 16S rRNA 基因为标准, 对数据进行分析时采用了比较  $C_t$  的方法。数据统计分析工作使用 Prism 5 统计分析软件完成。

## 2 结果与分析

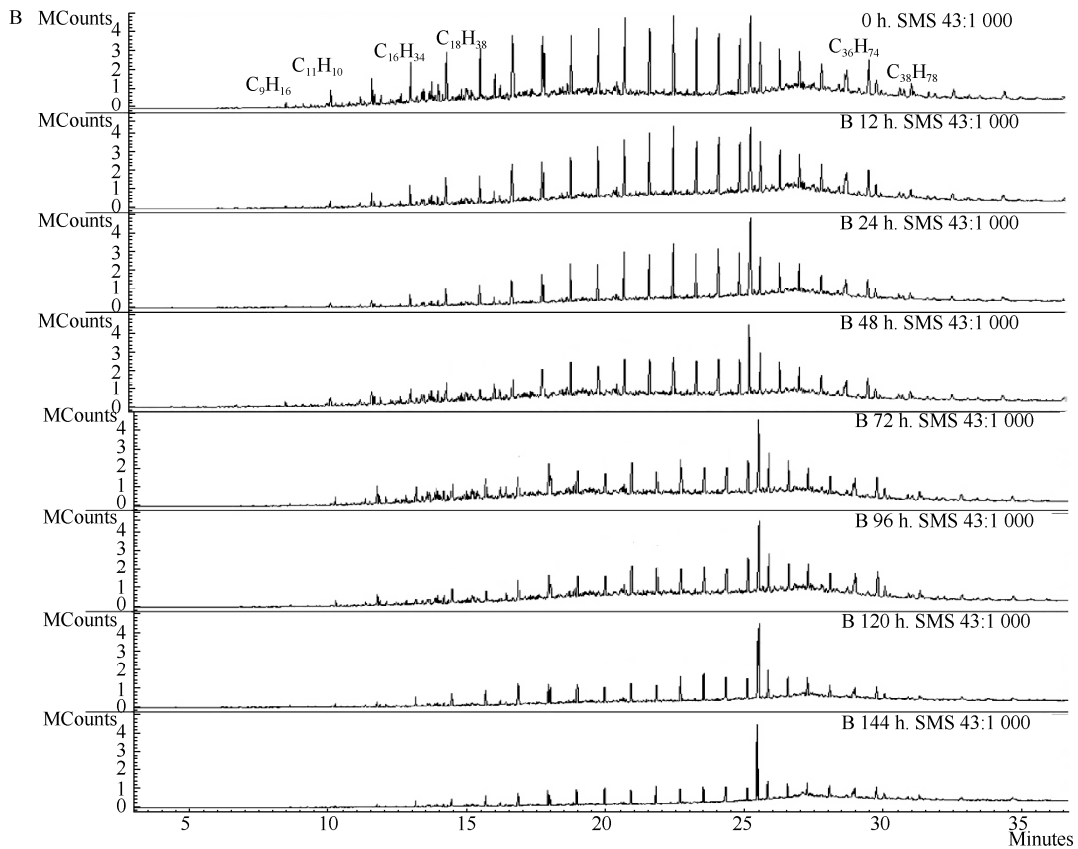
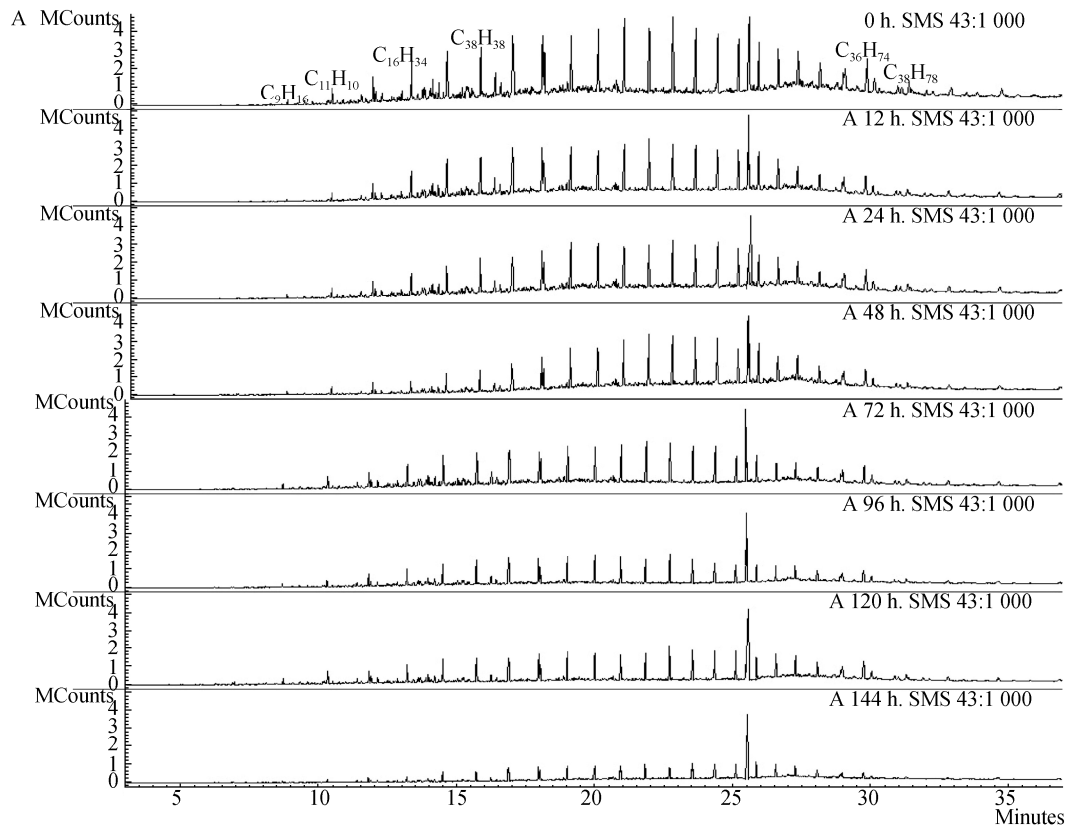
### 2.1 Tust-DM21 最佳降解条件的研究

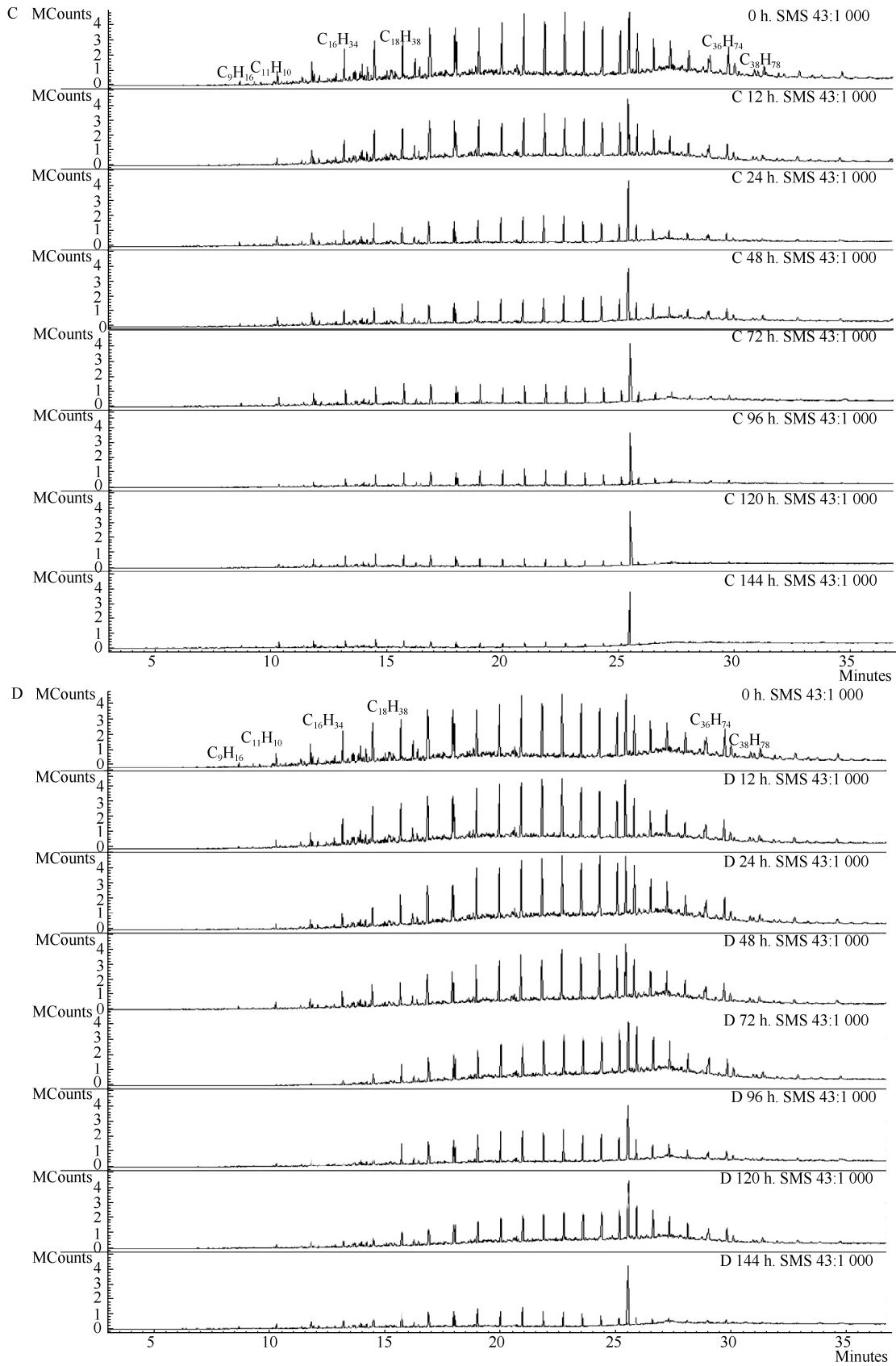
Tust-DM21 菌株的 A-E 处理组降解原油的 GC-MS 图谱见图 1, 其中每个处理组的图谱由 0 (对照)、12、24、48、72、96、120、144 h (由上往下顺序排列) 的降解 GC-MS 图谱组合而成。图 1 中已将中链烷烃代表物如正十六烷( $C_{16}H_{34}$ ) 和石蜡( $C_{18}H_{38}$ )、长链烷烃代表物如正三十六烷( $C_{36}H_{74}$ ) 和正三十八烷( $C_{38}H_{78}$ )、环烃代表物 3-丙基环己烯( $C_9H_{16}$ ) 以及多环芳烃代表物 2-甲基萘( $C_{11}H_{10}$ ) 等在 GC-MS 图谱上做了标注。由图 1 可见, 随着处理时间的增加, 不同处理组对不同石油烃的降解均有效果。各处理组 GC-MS 降解峰图面积逐渐减小, 表示对原油的降解效果逐渐增强。所有处理组在 144 h 时的 GC-MS 峰图面积都最小, 表明此条件下原油降解效果最好。

表 5 实验所用引物信息

Table 5 Primer information

基因名 Gene names	引物序列 Sequence (5'→3')	产物长度 Length (bp)
16S rRNA	Forward primer: GGACAACATTTTCGAAAGGAATG Reverse primer: ATTAATAAAGTAGCCTCCTCC	322
<i>alkB</i>	Forward primer: CAATCGCATCAAGTGGTGA Reverse primer: AGCGGGTTATCAATTTGGGC	137
<i>almA</i>	Forward primer: GTGGTGCTGAGATCAAAGGC Reverse primer: GCAGAAAGTACACGATGGCC	91





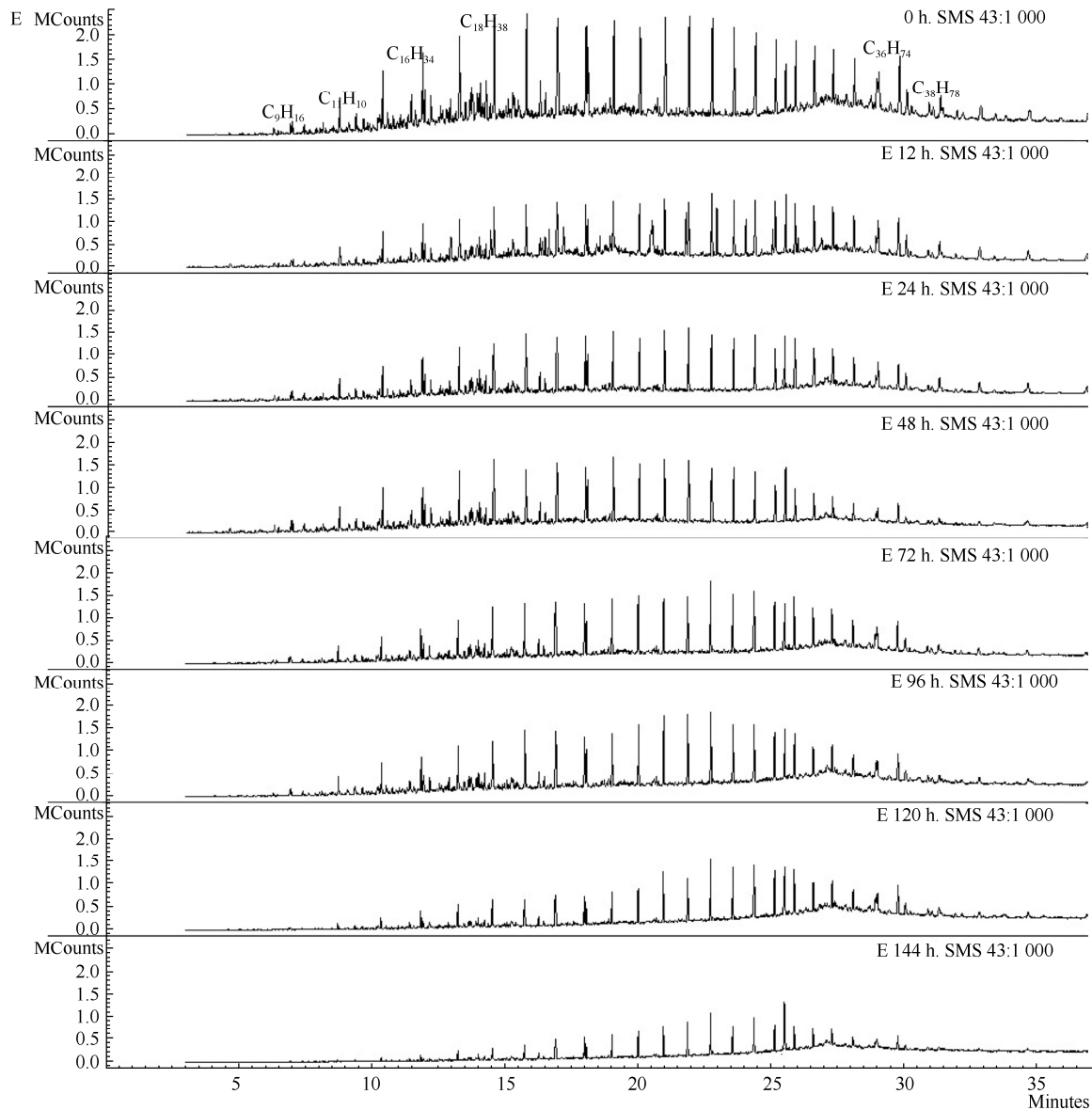


图 1 不同处理时间内 Tust-DM21 菌株各处理组对原油降解的 GC-MS 图谱

Figure 1 GC-MS map of crude petroleum degradation by Tust-DM21 strain in different treatment time

注: A: A 处理组在不同时间内的降解图; B: B 处理组在不同时间内的降解图; C: C 处理组在不同时间内的降解图; D: D 处理组在不同时间内的降解图; E: E 处理组在不同时间内的降解图。

Note: A: The degradation charts of A treatment group in different time; B: The degradation charts of B treatment group in different time; C: The degradation charts of C treatment group in different time; D: The degradation charts of D treatment group in different time; E: The degradation charts of E treatment group in different time.

通过 GC-MS 图谱峰面积及降解率公式计算 Tust-DM21 不同 A-E 处理组对原油的降解能力, 结果如图 2 所示。处理组中 E 组在 96 h 前降解率最高, 从 96 h 开始至 144 h, C 组降解率升为最高, 达

97.34%。在实验周期内, Tust-DM21 对原油降解率的总体表现为: C 组(97.34%)>A 组(88.21%)>E 组(82.60%)>D 组(80.32%)>B 组(77.63%)。由此可知, 当培养温度为 35 °C、pH 8.5 时, Tust-DM21 在



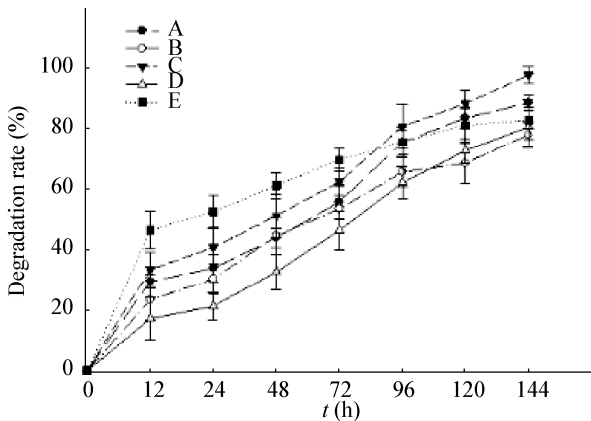


图2 Tust-DM21 在不同处理条件下对原油的降解趋势  
Figure 2 Biodegradation trends of five groups under different culture conditions

注: A-E 分别代表处理组 A-E.

Note: A, B, C, D, and E represent treatment groups A, B, C, D, and E, respectively.

144 h 时内可将原油几乎完全降解。

## 2.2 Tust-DM21 对不同石油烃组分的降解能力研究

### 2.2.1 对烷烃降解能力的分析

因为 Tust-DM21 菌株中可能存在降解长链烷

烃 C<sub>16</sub> 和 C<sub>38</sub> 的降解基因, 通过原油中不同烷烃的降解效果分析可初步判断这些基因所起的作用。菌株 Tust-DM21 在 144 h 时 A-E 组均可降解长链烷烃 C<sub>16</sub> 和 C<sub>38</sub> (图 3), 对长链烷烃中正十六烷(C<sub>16</sub>) 及正三十八烷(C<sub>38</sub>) 的降解率均在 87% 以上(图 4)。对 C<sub>16</sub> 烷烃降解能力较好的为 C 处理组, 正十六烷(C<sub>16</sub>) 降解率高达 98%。烷烃组分在石油污染物当中所占的比例很高, 菌株 Tust-DW21 对长链烷烃 C<sub>38</sub> 的降解效率更高, A-E 组 144 h 时的降解率在 95%–99%, 几乎可完全降解 C<sub>38</sub> 长链烷烃。这为后续检测相关降解基因的转录表达奠定了实验基础。

### 2.2.2 对环烃及多环芳烃降解能力的分析

根据 GC-MS 图谱所显示的效果可以看出, A-E 处理组对原油当中的环烃同样表现出较好的降解效果(图 5A), A-E 处理组在 144 h 时对环烃代表物如 3-丙基环己烯的降解率在 67%–81% 之间, 其中 B 组条件下降解率最高, 达 81% (图 6)。

石油的组成成分比较复杂, 除了烷烃、环烃、烯烃之外, 还包含了芳香烃等最难降解的组分, 其

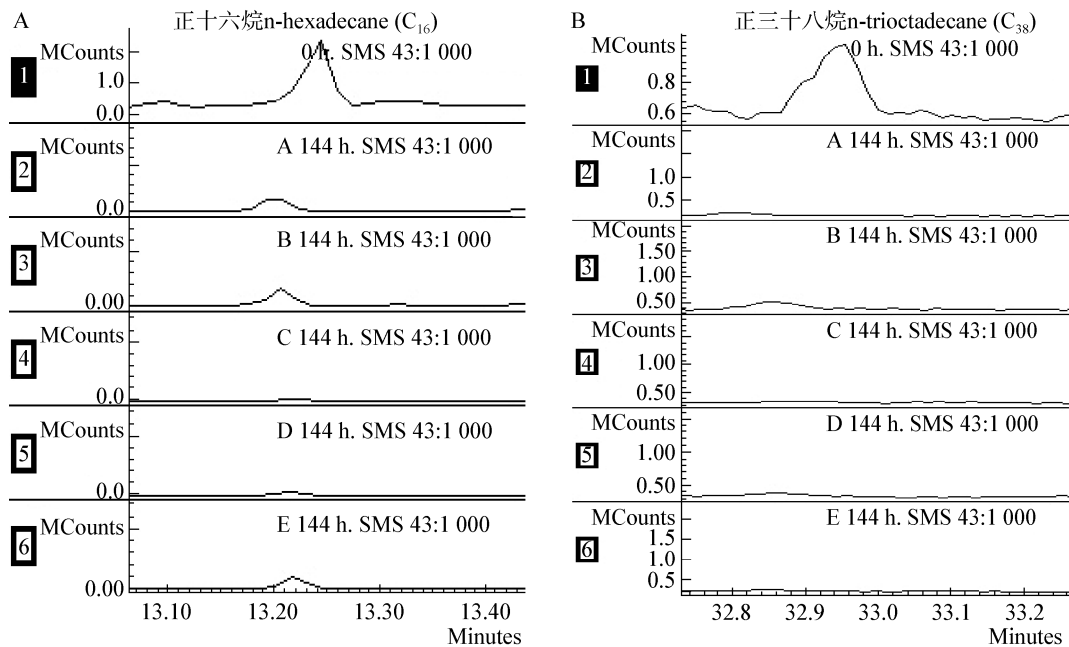


图3 A-E 处理组 144 h 时降解原油中烷烃的 GC-MS 图谱

Figure 3 GC-MS spectra of degradation of alkanes in crude petroleum at 144 h in A-E treatment groups

注: 0 h 对照及 A-E 处理组降解图谱, 由上至下顺序排列, 图 A 为 C<sub>16</sub>, 图 B 为 C<sub>38</sub>。

Note: The spectra of 0 h control and A-E treatment groups were arranged from top to bottom in order. Figure A is C<sub>16</sub>; Figure B is C<sub>38</sub>.

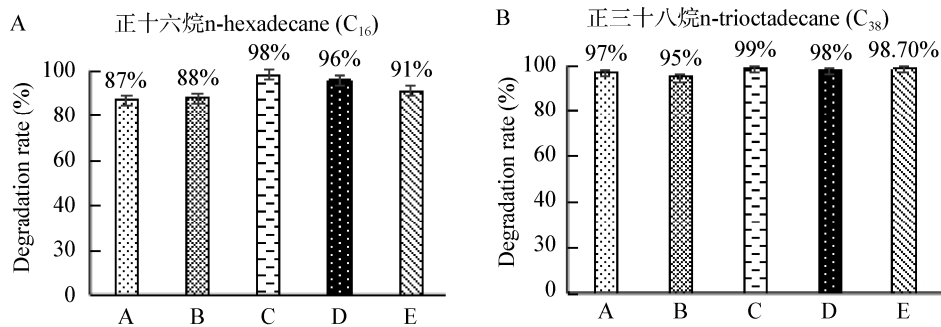


图 4 A-E 处理组 144 h 时对烷烃的降解率

Figure 4 Degradation rates of alkane at 144 h in A-E treatment groups

注: 图 A 为 C<sub>16</sub>; 图 B 为 C<sub>38</sub>. A-E 分别代表处理组 A-E.

Note: Figure A is C<sub>16</sub>; Figure B is C<sub>38</sub>. A, B, C, D, and E represent treatment groups A, B, C, D, and E, respectively.

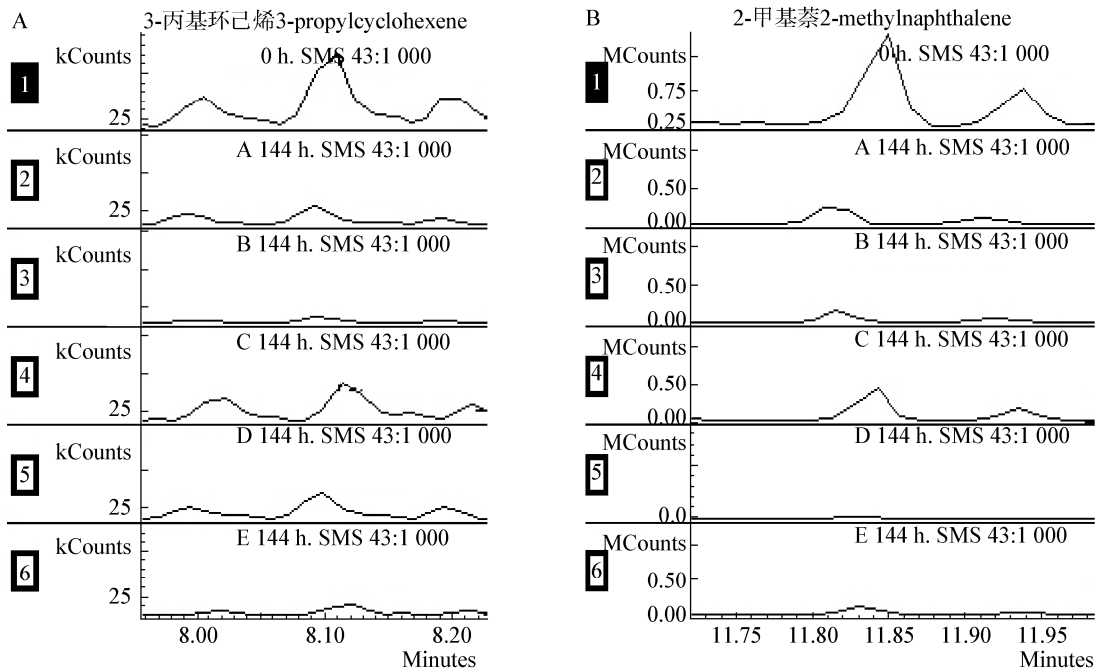


图 5 A-E 处理组 144 h 时降解原油中环烃的 GC-MS 图谱

Figure 5 GC-MS spectra of cyclic hydrocarbons in crude oil degraded by A-E treatment group at 144 h

注: 图 A 为 3-丙基环己烯, 图 B 为 2-甲基萘, 最上为 0 h 对照, 往下依次是 A 至 E 组 144 h 时该物质降解图谱。

Note: Figure A is 3-propylcyclohexene, Figure B is 2-methylnaphthalene, the highest was 0 h control, and the next is 144 h degradation spectra of group A to E.

降解率在 64%–87% 之间(图 6), 要高于对环烃的降解。其中 D 组对多环芳烃 2-甲基萘降解率最高, 为 87% (图 6)。表明 A-E 不同处理组合条件下, 菌株 Tust-DM21 在 144 h 内不仅对长链烷烃有很好的降解效果, 而且还能够降解环烃及多环芳烃, 其中多环芳烃的降解对生态修复有重大意义, 因此可对多环芳烃降解基因的作用进行深入的

研究。

### 2.3 *alkB* 同源蛋白的比较

#### 2.3.1 系统发育树构建

将 8 个 *alkB* 蛋白序列绘制系统发育树, 所得如图 7 所示。可以看出, 5 株不动杆菌属亲缘关系相近, 与 Tust-DM21 亲缘最近的为 *Acinetobacter* sp. strain HC8-3S, 与其他 3 株菌亲缘关系较远。

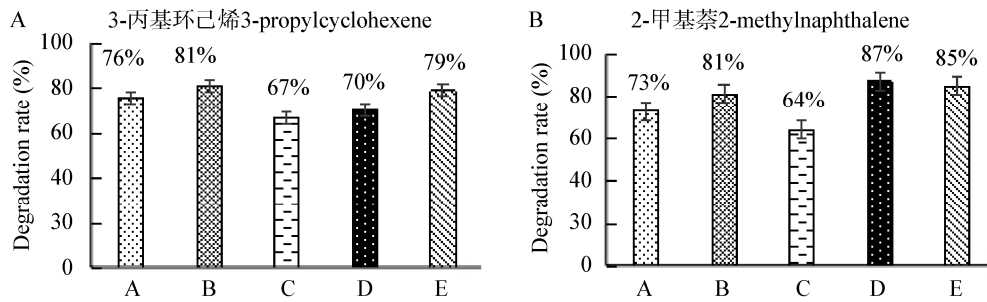


图 6 A-E 处理组 144 h 时对环烃的降解率

Figure 6 Degradation rates of cyclic hydrocarbon in A-E treatment for 144 hours

注: 图 A 为 3-丙基环己烯, 图 B 为 2-甲基萘. A-E 分别代表处理组 A-E.

Note: Figure A is 3-propylcyclohexene, Figure B is 2-methylnaphthalene. A, B, C, D, and E represent treatment groups A, B, C, D, and E, respectively.

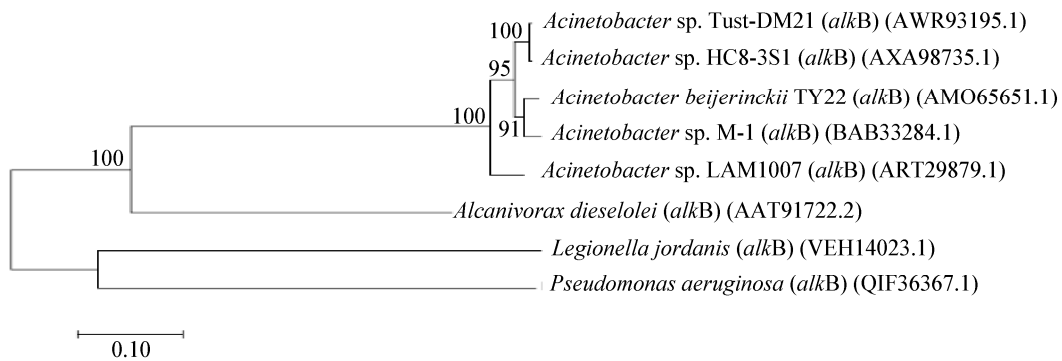


图 7 *alkB* 基因同源氨基酸序列系统发育树

Figure 7 Phylogenetic tree of homologous amino acid sequence of *alkB* gene

注: 图中数值表示置信度, 分支长度代表亲缘关系远近, 菌株名称后括号内为该蛋白 GenBank 登录号.

Note: The values in the figure indicate the confidence level, the branch length represents the genetic relationship, and the GenBank accession number of the protein is shown in brackets after the strain name.

### 2.3.2 同源蛋白保守结构域与保守基序

8 个 *alkB* 基因的同源蛋白保守结构域预测结果见图 8。由图 8 可知, 8 个 *alkB* 蛋白均含有 cl00615 (PSSMID 294412) 超级家族结构域, 菌株 Tust-DM21 的 *alkB* 蛋白结构域位于序列 57–371 aa 位置, 该区域编码一种烷烃羟化酶, 负责失活烷烃的初始氧化, 利用氧的反弹机制来羟基化烷烃。这一机制涉及亲电金属氧中间物对 C–H 键的均裂裂解, 以生成底物基自由基。这个结构域家族具有广泛的疏水区域, 能够跨越膜双层至少 2 次, 该能力可使细菌高效利用石油烃。

再利用 MEME 对 8 个 *alkB* 氨基酸序列保守基序进行分析, 见图 9。由图 9 可见, 5 株不动杆菌的 *alkB* 蛋白均含有 5 个保守基序, 而且大小位置都

基本一致; *Alcanivorax dieselolei* 含有 4 个, *Legionella jordanis* 和 *Pseudomonas aeruginosa* 仅含有 3 个。可见同属的菌株中 *alkB* 氨基酸序列更加保守, 在不同种类菌株中的 *alkB* 氨基酸序列会有所不同。

### 2.3.3 蛋白序列比对

将 8 个 *alkB* 蛋白序列进行比对, 结果见图 10 (完全保守的氨基酸以红色标注, 基本保守的氨基酸以黄色标注; 保守结构域以下横线标注)。比对结果显示: 8 个 *alkB* 蛋白的整体一致性为 72.61%, 由图 10 可知, *alkB* 蛋白序列的 cl00615 保守结构域部分具有相对较高的一致性, 说明该功能在进化上相对保守; 亲缘关系更近的不动杆菌属较其他细菌来说氨基酸一致性更高, 可见亲缘关系越近蛋白其功能也更保守。

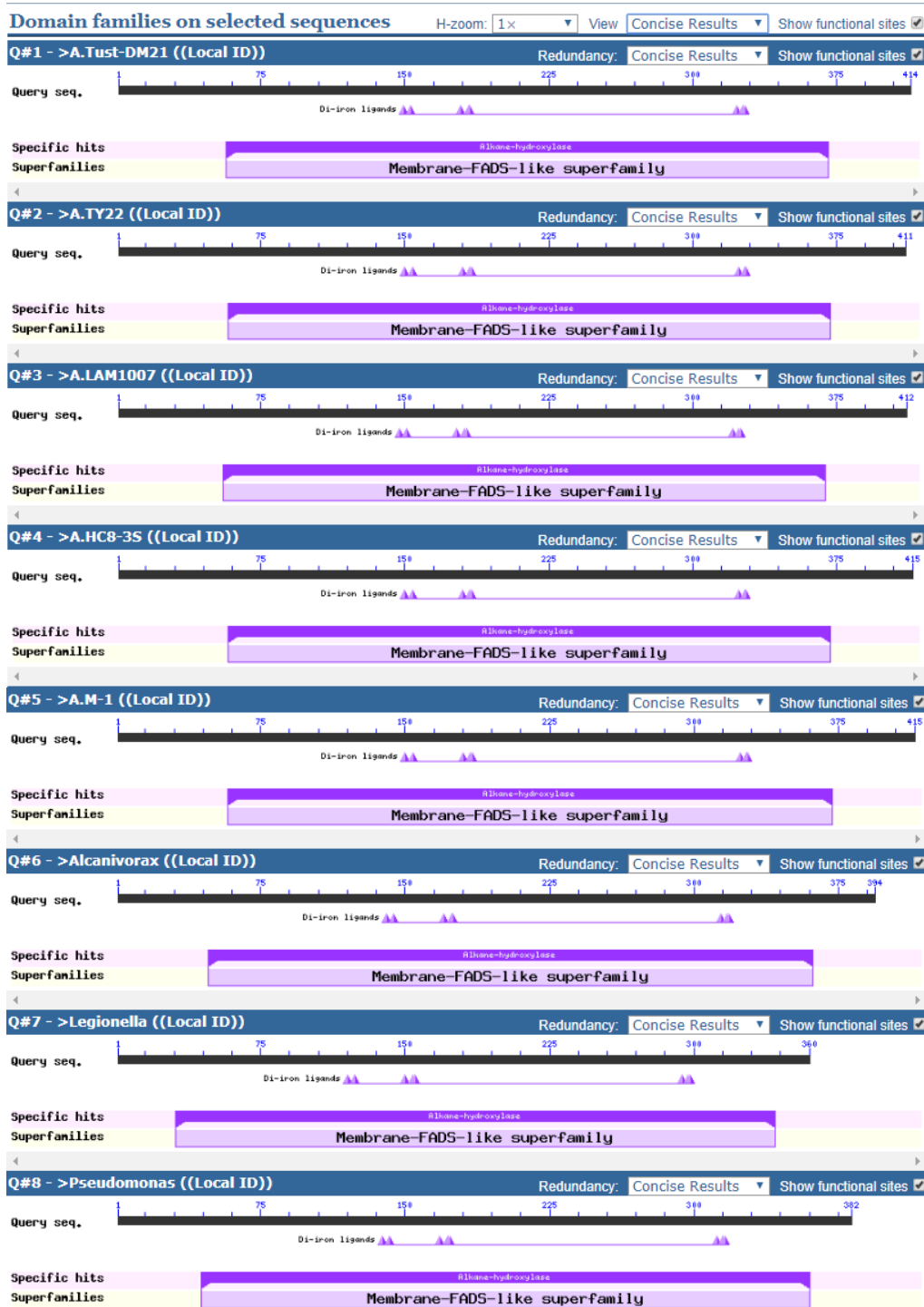


图 8 *alkB* 基因同源蛋白保守结构域

Figure 8 Conserved domain of *alkB* homologous protein

注: 从左至右、从上至下依次为: *Acinetobacter* sp. strain Tust-DM21、*Acinetobacter* beijerinckii strain TY22、*Acinetobacter* sp. LAM1007、*Acinetobacter* sp. strain HC8-3S、*Acinetobacter* sp. M-1、*Alcanivorax dieselolei*、*Legionella jordanis* 和 *Pseudomonas aeruginosa*。

Note: From left to right, top to bottom, they are: *Acinetobacter* sp. strain Tust-DM21, *Acinetobacter* beijerinckii strain TY22, *Acinetobacter* sp. LAM1007, *Acinetobacter* sp. strain HC8-3S, *Acinetobacter* sp. M-1, *Alcanivorax dieselolei*, *Legionella jordanis*, *Pseudomonas aeruginosa*.

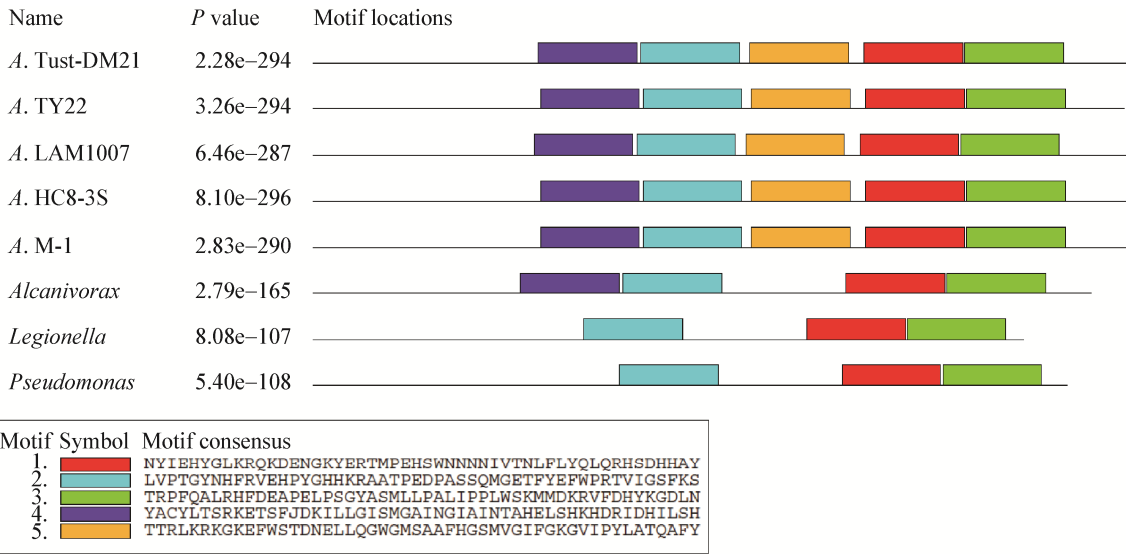


图 9 *alkB* 蛋白保守基序  
Figure 9 *alkB* protein conserved motif

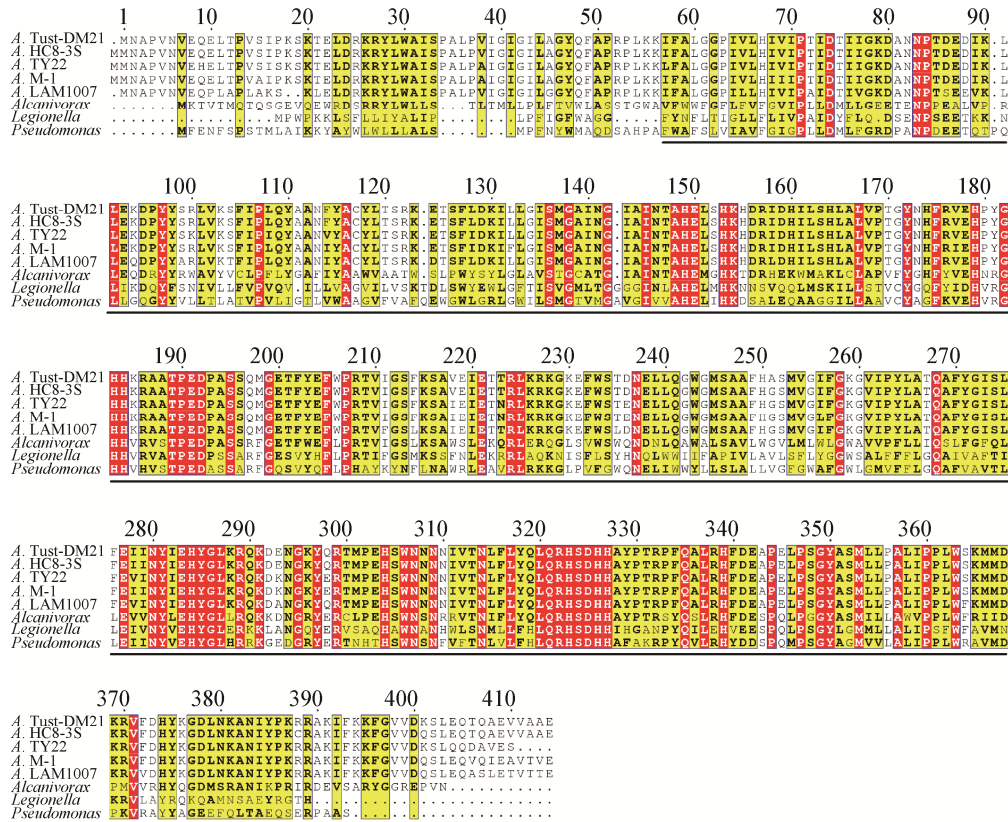


图 10 *alkB* 同源蛋白序列比对  
Figure 10 Sequence alignment of homologous protein of *alkB*

注: 从上至下依次为: *Acinetobacter* sp. strain Tust-DM21, *Acinetobacter beijerinckii* strain TY22, *Acinetobacter* sp. LAM1007, *Acinetobacter* sp. strain HC8-3S, *Acinetobacter* sp. M-1, *Alcanivorax dieselolei*, *Legionella jordanis* 和 *Pseudomonas aeruginosa*.  
Note: From top to bottom, they are: *Acinetobacter* sp. strain Tust-DM21, *Acinetobacter beijerinckii* strain TY22, *Acinetobacter* sp. LAM1007, *Acinetobacter* sp. strain HC8-3S, *Acinetobacter* sp. M-1, *Alcanivorax dieselolei*, *Legionella jordanis*, *Pseudomonas aeruginosa*.

## 2.4 *almA* 同源基因的比较

### 2.4.1 系统发育树的构建

基于8个 *alkB* 蛋白序列绘制的系统发育树如图 11 所示。由图 11 可见, 5 株不动杆菌属的 *almA* 关系相近, Tust-DM21 自为一支, 相对关系最近的为 *Acinetobacter* sp. DSM17874 和 *Acinetobacter venetianus* RAG-1, 与非不动杆菌的其他 3 株菌亲缘关系较远。

### 2.4.2 同源蛋白保守结构域与保守基序

*almA* 的同源蛋白保守结构域见图 12。由图 12 可见, 8 株菌的 *almA* 蛋白都含有 COG2072 (PSSMID 224983) 超级家族结构域, 在 Tust-DM21 菌 *almA* 蛋白序列中的位置为 19–448 aa, 该区域功能推测为黄素蛋白 CzcO 与阳离子扩散促进剂 CzcD, 参与  $K^+$  转运与代谢过程, 与菌株的石油烃代谢能力关系密切。8 个蛋白的保守结构域都相对固定, 可见该功能在进化中相对保守。

再对 8 个蛋白的保守基序进行分析, 结果如图 13 所示, 8 个不同菌株的 *almA* 蛋白均含有 7 个保

守基序, 而且位置基本一致, 可见相对 *alkB*, *almA* 的蛋白序列更加保守, 其序列在不同菌株中未产生太多变化。

### 2.4.3 蛋白序列的比对

将 8 个 *almA* 蛋白序列进行比对, 结果见图 14 (完全保守的氨基酸以红色标注, 基本保守的氨基酸以黄色标注; 保守结构域以下横线标注)。比对结果发现: 8 个 *almA* 蛋白的整体一致性为 76.52%, 与保守基序的结果一致, *almA* 蛋白在不同菌株中未产生较大变异; 不动杆菌属的 *almA* 蛋白相似度更高, 可见 *almA* 的蛋白序列是相对保守的。

## 2.5 *alkB* 和 *almA* 基因转录表达的研究

根据对 Tust-DM21 降解能力的研究, 发现其几乎能够全部降解中链和长链烷烃, 表明链烷烃降解基因 *alkB* 和长链烷烃降解基因 *almA* 在该菌基因组中可能起重要作用, 其中有关长链烷烃降解基因 *almA* 的研究较少。为了研究菌株降解烷烃能力是否与 2 个基因的表达相关, 开展了 *alkB* 基因和 *almA* 基因的转录表达研究。

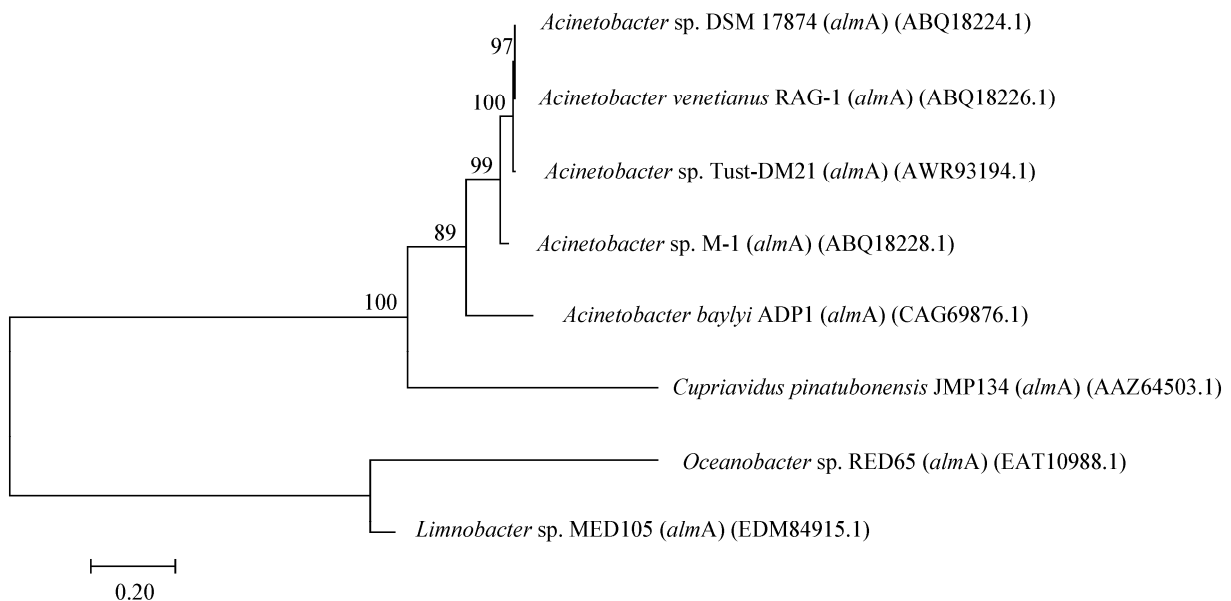


图 11 *almA* 基因同源蛋白系统发育树

Figure 11 Phylogenetic tree of homologous amino acid sequence of *almA* gene

注: 图中数值表示置信度, 分支长度代表亲缘关系远近, 菌株名称后括号内为该蛋白 GenBank 登录号。

Note: The values in the figure indicate the confidence level, the branch length represents the genetic relationship, and the GenBank accession number of the protein is shown in brackets after the strain name.

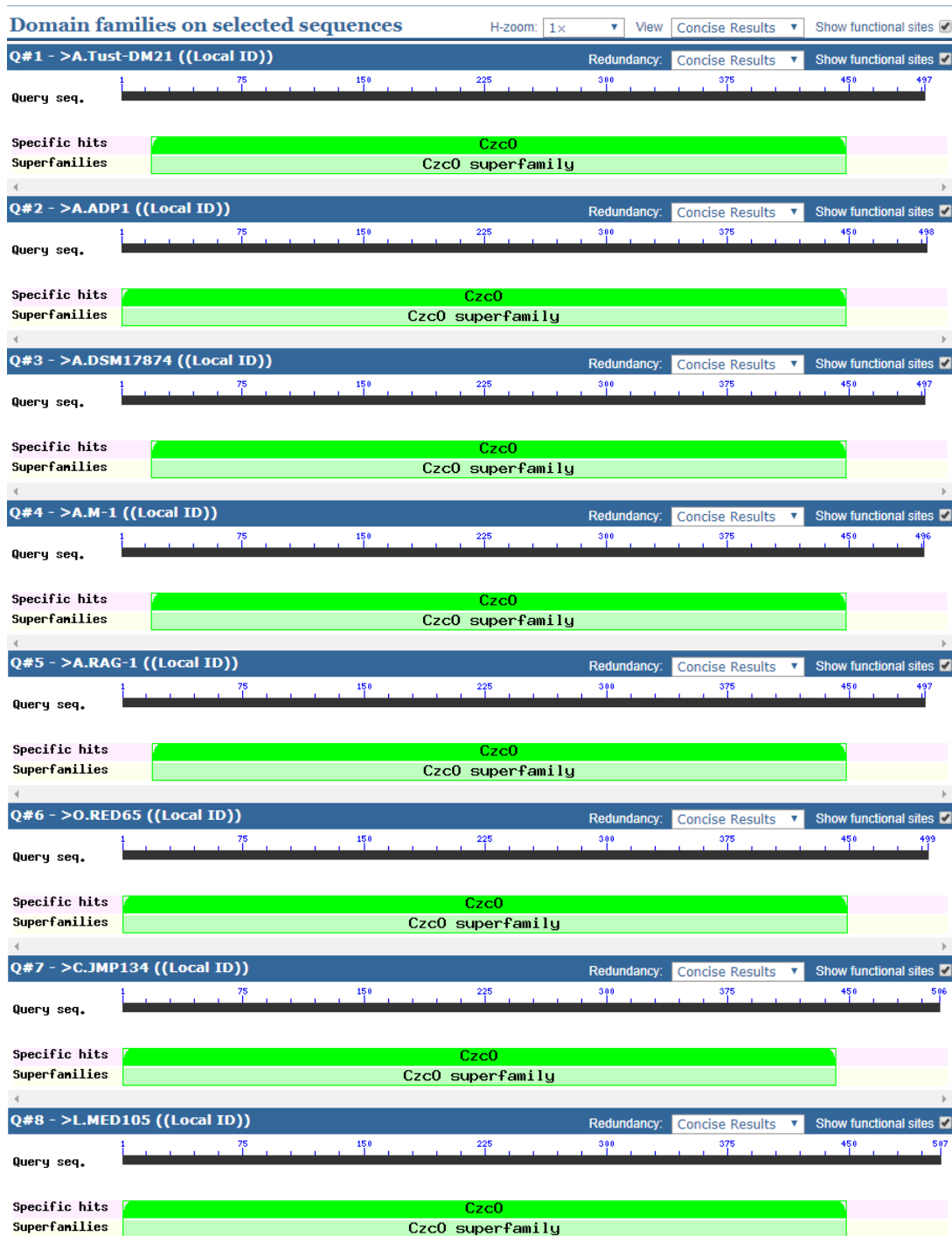


图 12 *alkB* 基因同源蛋白保守结构域

Figure 12 Conserved domain of *alkB* homologous protein

注: 从左至右、从上至下依次为: *Acinetobacter* sp. strain Tust-DM21、*Acinetobacter baylyi* ADP1、*Acinetobacter* sp. DSM17874、*Acinetobacter* sp. M-1、*Acinetobacter venetianus* RAG-1、*Oceanobacter* sp. RED65、*Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 和 *Limnobacter* sp. MED105.

Note: From left to right, top to bottom, they are: *Acinetobacter* sp. strain Tust-DM21, *Acinetobacter baylyi* ADP1, *Acinetobacter* sp. DSM17874, *Acinetobacter* sp. M-1, *Acinetobacter venetianus* RAG-1, *Oceanobacter* sp. RED65, *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134, *Limnobacter* sp. MED105.



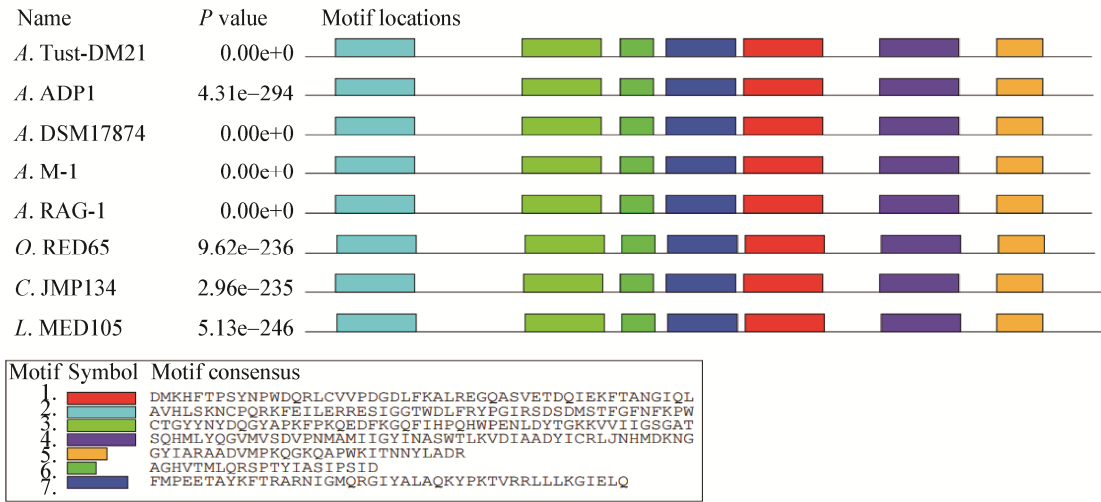


图 13 *almA* 蛋白保守基序  
Figure 13 *almA* protein conserved motif

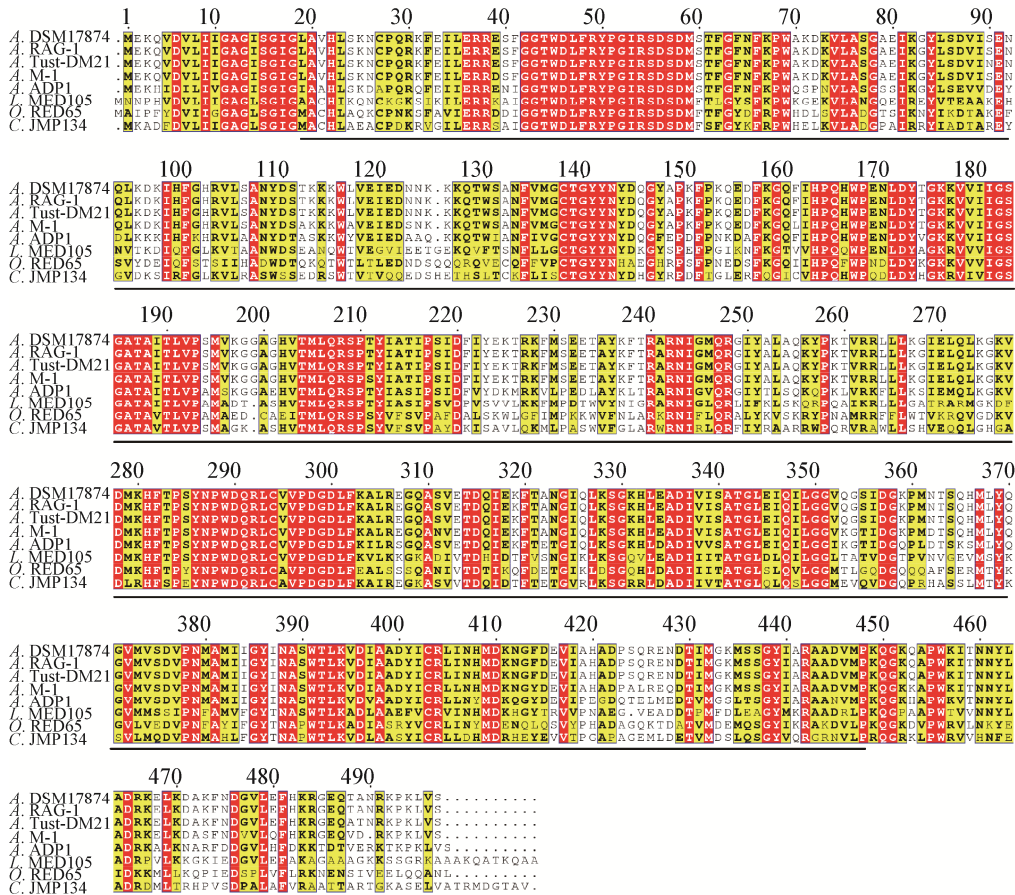


图 14 *almA* 同源蛋白序列比对  
Figure 14 Sequence alignment of homologous protein of *almA*

注：从上至下依次为：*Acinetobacter* sp. DSM 17874、*Acinetobacter venetianus* RAG-1、*Acinetobacter* sp. strain Tust-DM21、*Acinetobacter* sp. M-1、*Acinetobacter baylii* ADP1、*Limnobacter* sp. MED105、*Oceanobacter* sp. RED65 和 *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134。

Note: From top to bottom, they are: *Acinetobacter* sp. DSM 17874, *Acinetobacter venetianus* RAG-1, *Acinetobacter* sp. strain Tust-DM21, *Acinetobacter* sp. M-1, *Acinetobacter baylii* ADP1, *Limnobacter* sp. MED105, *Oceanobacter* sp. RED65, *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134.



### 2.5.1 *alkB* 和 *almA* 基因的 Real-time PCR 转录表达

总 RNA 电泳图如图 15 所示, 总 RNA 条带较为清晰, 无粘滞, 符合实验要求。

将 *alkB* 和 *almA* 在各个降解时间段的相对表达率绘制柱状图, 横坐标数字代表降解时长, 纵坐标代表相对表达量, 如图 16 所示。相对表达率数值见表 6。由图 16 和表 6 可看出, 在 Tust-DM21 中 *alkB* 和 *almA* 基因均有表达, 其相对表达量随着处理时间的增加而增加。*almA* 在 72 h 时表达量有显著上调。

### 2.5.2 *alkB* 基因和 *almA* 基因表达与菌株生长降解的关系

将每个生长时间段的菌液测量的  $OD_{600}$  绘制生长曲线图, 如图 17 所示。根据图 17, 结合前期本实验室的研究<sup>[14]</sup>可知, Tust-DM21 菌群在 0-72 h 时由于刚接种于石油培养基中, 暂时缺乏丰富的营养盐和生长因子, 因此处于延滞期, 繁殖速度较慢; 72-144 h 处于对数期, 菌群开始大量降解石油获得



图 15 *alkB* 和 *almA* 总 RNA 电泳图  
Figure 15 Total RNA electrophoretic diagram

注: 从左至右为 *alkB* 在 24、48、72、96、120、144 h 和 *almA* 在 24、48、72、96、120、144 h 的总 RNA。

Note: From left to right are the total RNA of *alkB* at 24, 48, 72, 96, 120, 144 h and *almA* at 24, 48, 72, 96, 120, 144 h.

营养, 迅猛繁殖; 144 h 后随着菌群数目趋于饱和, 该菌的生长进入稳定期。结合相对表达率趋势图(图 16)可知, 菌的生长与 *alkB* 基因和 *almA* 基因的表达趋势基本一致, 两者呈正相关。

将相对表达率(图 16)结合 2.1 中该菌对原油的降解趋势图(图 2C), 可见菌株对原油的降解率随时

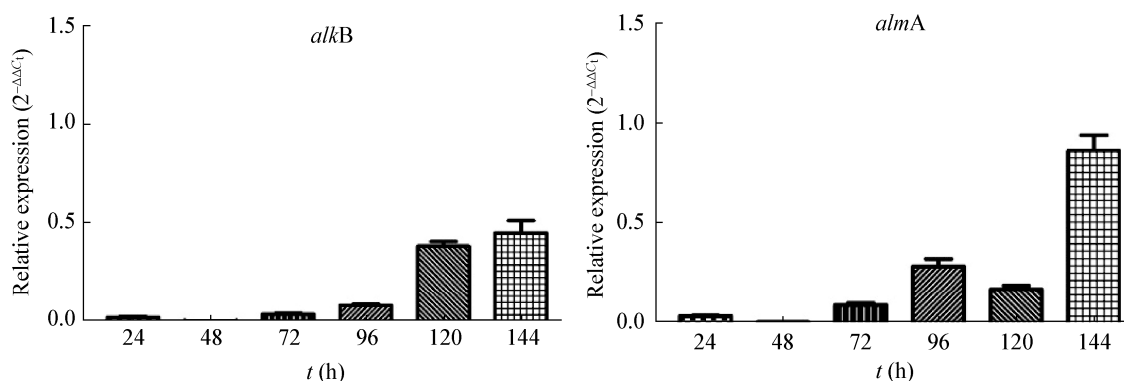


图 16 *alkB* 和 *almA* 的 Real-time PCR 相对表达量  
Figure 16 Relative expression of *alkB* and *almA* by Real-time PCR

表 6 *alkB* 和 *almA* 的相对表达率  
Table 6 Relative expression rate of *alkB* and *almA*

时间 Time (h)	<i>alkB</i> 的相对表达率 Relative expression rate of <i>alkB</i>	<i>almA</i> 的相对表达率 Relative expression rate of <i>almA</i>
24	0.010	0.03
48	0.001	0.01
72	0.030	0.08
96	0.070	0.26
120	0.400	0.15
144	0.460	0.80

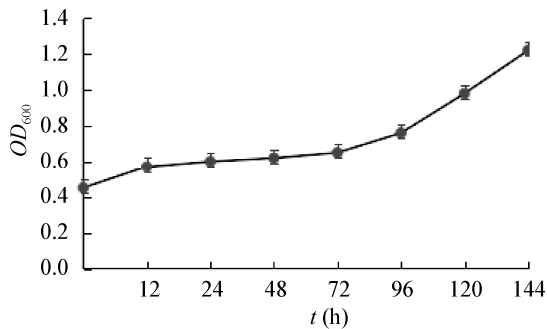


图 17 Tust-DM21 生长趋势图

Figure 17 Growth trend of Tust-DM21

间增加而升高, 在 72 h 时有跃升, 与 2 个基因表达趋势基本一致, 证明了 *alkB* 和 *almA* 基因调控着相应降解酶的表达, 并且参与到了原油的降解过程中, Tust-DM21 根据降解基因的相对表达量呈现降解力随时间逐步提高的降解模式。

### 3 讨论

本研究的主要工作是探明了 *A. sp.* Tust-DM21 对石油不同组分的降解能力及最佳降解条件, 同时, 在对全基因组数据分析后发现了 *alkB* 和 *almA* 两个关键降解基因, 分别对 2 个基因编码的功能蛋白与其同源蛋白做了比较, 并通过 Real-time PCR 方法测算了这 2 个基因在 144 h 内的相对表达量, 探究了其与其菌株生长、降解石油烃之间的关系。

目前, 世界各地均开展了大量对于石油降解菌的研究, 但同时对短、中、长链烷烃及芳香烃都具有良好降解能力的菌株仍比较缺乏, 大部分烷烃降解菌对烷烃的降解率为 70%–90%, 本实验室的 Tust-DM21 菌群在 35 °C、pH 8.5 的最适条件下, 可使中链烷烃降解率达 97.5%, 对长链烷烃降解率达 98.5%, 对环烃为 81%, 对芳香烃为 87%。

目前国内对石油降解菌的研究中, 叶新荣等(2007)研究了一株柴油降解菌, 7 d 时对烷烃降解率为 73.33%, 21 d 达到 94%<sup>[17]</sup>; 江翠翠(2011)对一株放线菌 ZB II-12 做降解条件优化发现其在最优条件下降解率为 77%<sup>[23]</sup>; 而本实验室的 Tust-DM21 可以在最优条件下于 144 h (6 d) 内达到 97.34% 的降解

率, 具有明显优势。对 Tust-DM21 条件优化后, 与本实验室前期结果相比<sup>[13]</sup>, 在 6 d 时达到了之前 9 d 时对烷烃的降解率(98%), 可见优化条件对其降解效果有所提升。

在基因表达水平的研究方面, 除本文所用方法外, 普遍使用的还有用正构烷烃作诱导物观察特定基因是否上调表达的方法。如王万鹏等(2010)对菌株 *A. hongdengensis* A-11-3 的 2 个 *almA* 基因使用正构烷烃进行诱导, 发现 *almA* 只在长链烷烃 C<sub>24</sub>–C<sub>34</sub> 的诱导下上调表达<sup>[24]</sup>; 付媛媛(2011)对 *Salinisphaera sp.* C84B14 的 5 个降解基因进行了 Real time-PCR, 其中包括 *alkB* 和 *almA* 基因, 实验使用中长链正构烷烃诱导, 根据该实验的结果, 该菌的 *alkB* 在中链烷烃诱导下上调表达显著, 长链烷烃诱导只有微量上调, *almA* 基因几乎不表达<sup>[25]</sup>; 董纯明等(2011)对一株深海热液环境来源的多环芳烃(PAHs)降解菌利用 Real-time PCR 研究关键降解酶基因在不同 PAHs 诱导下的表达情况<sup>[26]</sup>; 乔璟等(2012)通过 Real-time PCR 分析, 红球菌 P14 的 *alkB* 基因在烷烃 C16、C24、C28 诱导下表达量均上调, 证明了该基因与该菌烷烃降解有关<sup>[27]</sup>; 而本研究首次使用原油对 *alkB* 和 *almA* 基因同时进行诱导, 发现 2 个基因均有表达且呈现相似的规律, 证明了 Tust-DM21 对中链和长链烷烃的良好降解力与 *alkB* 和 *almA* 的上调表达存在关联。对于 Tust-DM21 的 *almA* 基因相对表达量从 96–120 h 出现了略微下调, 推测原因为: (1) *almA* 为长链烷烃降解酶, 其基因编码区包含有 *almA1* 和 *almA2* 两个基因, 因此, 诱导表达时会有差异基因表达现象<sup>[24]</sup>; (2) 在不同生长节点, 基因 RNA 也会有上升后开始下降的现象, *almA* 基因 96 h 后开始大量转录翻译, 后期 120 h 开始下降也符合这种规律, 可能是石油降解菌的反馈机制。

总之, 有关 *almA* 基因功能目前还没有明确的文献报道, 本文仅做初步表达分析, 具体降解机制有待后续进一步研究。

## 4 结论

Tust-DM21 对石油烃的最佳降解条件为 35 °C、pH 8.5。在该条件下, 经过 144 h, 其中链烷烃降解率达 97.5%, 对长链烷烃降解率达 98.5%, 对环烃为 81%, 对芳香烃为 87%, 对石油的各组分都显示出了优良的降解能力。

Tust-DM21 含有 2 个降解基因 *alkB* 和 *almA*, 分别对 2 个基因的功能蛋白做了比较研究, 发现该菌与 *Acinetobacter* sp. strain HC8-3S 亲缘关系较近, 与同属降解菌所含的降解功能蛋白相似度较高, 功能方面的进化相对保守; 对 2 个降解基因进行 Real-time PCR 实验, 发现 2 个降解基因的表达量均呈由低到高的趋势, 同时生长趋势与降解趋势也呈现出同样的趋势, 由此可知 Tust-DM21 对中长链烷烃的降解力与 *alkB* 和 *almA* 基因的上调表达存在关联。

## REFERENCES

- [1] Delille D, Bassères A, Dessommes A. Effectiveness of bioremediation for oil-polluted Antarctic seawater[J]. *Polar Biology*, 1998, 19(4): 237-241
- [2] Lu B, Wang ZP, Zhu C, et al. Residue levels of PCBs and OCPs in eggs of Antarctic seabirds and their global significance[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(9): 2440-2445 (in Chinese)  
卢冰, 王自磐, 朱纯, 等. 南极食物链顶端海鸟卵中 PCBs 和 OCPs 积累水平及其全球意义[J]. *生态学报*, 2005, 25(9): 2440-2445
- [3] Zhang HS, Wang ZP, Lu B, et al. Occurrence of organochlorine pollutants in the eggs and dropping-amended soil of Antarctic large animals and its ecological significance[J]. *Science in China Series D: Earth Sciences*, 2007, 50(7): 1086-1096 (in Chinese)  
张海生, 王自磐, 卢冰, 等. 南极大型动物粪土层和蛋卵中有机氯污染物分布特征及生态学意义[J]. *中国科学 D 辑 地球科学*, 2006, 36(12): 1111-1121
- [4] Yang C. Discussion on bioremediation of marine oil pollution[J]. *Journal of Northwest University for Nationalities (Natural Science)*, 2008, 29(3): 62-67 (in Chinese)  
杨超. 海洋石油污染生物修复的探讨[J]. *西北民族大学学报: 自然科学版*, 2008, 29(3): 62-67
- [5] Wang J. Discusses shallowly overflows the oil medicinal powder in oil pollution preventing and controlling application[J]. *China Water Transport (Theory Edition)*, 2006, 4(6): 35-36,248 (in Chinese)  
王锦. 浅议溢油分散剂在油污防治中的应用[J]. *中国水运: 理论版*, 2006, 4(6): 35-36,248
- [6] Madsen EL. Determining *in situ* biodegradation[J]. *Environmental Science & Technology*, 1991, 25(10): 1662-1673
- [7] Ventikos NP. Development of an evaluation model for the importance, the causes and the consequences of oil marine pollution: the case of maritime transport in the Greek seas and in the Gulf of Saronikos[R]. Greece: National Technical University of Athens, 2002
- [8] Braddock JF, Lindstrom JE, Brown EJ. Distribution of hydrocarbon-degrading microorganisms in sediments from Prince William Sound, Alaska, following the *Exxon Valdez* oil spill[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 1995, 30(2): 125-132
- [9] Hicks BN, Caplan JA. Bioremediation: a natural solution[J]. *Pollution Engineering*, 1993, 25(2): 30-33
- [10] Pritchard PH, Mueller JG, Rogers JC, et al. Oil spill bioremediation: experiences, lessons and results from the *Exxon Valdez* oil spill in Alaska[J]. *Biodegradation*, 1992, 3(2): 315-335
- [11] Zhao HP, Wang L, Ren JR, et al. Isolation and characterization of phenanthrene-degrading strains *Sphingomonas* sp. ZP1 and *Tistrella* sp. ZP5[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 152(3): 1293-1300
- [12] Zhou NY. Petroleum-degrading microorganisms[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(12): 2335 (in Chinese)  
周宁一. 石油降解微生物[J]. *微生物学通报*, 2013, 40(12): 2335
- [13] Liu YH, Wang H, Hu XK. Recent advances in the biodegradation of hydrocarbons by *Acinetobacter* species[J]. *Microbiology China*, 2016, 43(7): 1579-1589 (in Chinese)  
刘玉华, 王慧, 胡晓珂. 不动杆菌属(*Acinetobacter*)细菌降解石油烃的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(7): 1579-1589
- [14] Di FR, Song DH, Liu FL, et al. Isolation of marine *Acinetobacter* and its characteristics of petroleum hydrocarbon degradation[J]. *Marine Environmental Science*, 2017, 36(6): 898-904 (in Chinese)  
邸富荣, 宋东辉, 刘凤路, 等. 分离海洋不动杆菌及其对石油烃降解性能研究[J]. *海洋环境科学*, 2017, 36(6): 898-904
- [15] Di FR. Isolation and identification of petroleum hydrocarbon-degrading bacteria at Bohai bay and its genomics analysis[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University of Science and Technology, 2017 (in Chinese)  
邸富荣. 渤海石油烃降解菌的分离鉴定及基因组学分析[D]. 天津: 天津科技大学硕士学位论文, 2017
- [16] Jiang X, Gao W, Li Q, et al. Screen and analysis of degradation ability for crude oil degradation strains from

- South China Sea[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2012, 32(7): 1572-1578 (in Chinese)  
姜肸, 高伟, 李倩, 等. 南海高效石油降解菌的筛选及降解特性研究[J]. *环境科学学报*, 2012, 32(7): 1572-1578
- [17] Ye XR, Shi JX, Chen ZY. Gas chromatography analysis for the marine bacteria degrading effect of petroleum hydrocarbon[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2007, 26(6): 847-850 (in Chinese)  
叶新荣, 史君贤, 陈忠元. 海洋石油降解细菌对石油烃降解效果的气相色谱法分析[J]. *分析测试学报*, 2007, 26(6): 847-850
- [18] Bayat Z, Hassanshahian M, Hesni MA. Enrichment and isolation of crude oil degrading bacteria from some mussels collected from the Persian Gulf[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2015, 101(1): 85-91
- [19] Li BM, Ruan ZY, Jiang RB. Screen and identification of oil degrading bacteria and community construction[J]. *Soil and Fertilizer Sciences China*, 2007(3): 68-72 (in Chinese)  
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
- [20] Chen Y, Li C, Zhou ZX, et al. Enhanced biodegradation of alkane hydrocarbons and crude oil by mixed strains and bacterial community analysis[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014, 172(7): 3433-3447
- [21] Bailey TL, Elkan C. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers[A]// *Proceedings of the 2nd International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*[C]. Menlo Park, CA: AAAI Press, 1994: 28-36
- [22] Robert X, Gouet P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(W1): W320-W324
- [23] Jiang CC. Isolation and screening of *Actinomycetes* with high degradation efficiency and study on their degradation characteristics[D]. Ji'ning: Master's Thesis of Qufu Normal University, 2011 (in Chinese)
- 江翠翠. 高效降解石油放线菌的分离筛选及其降解特性研究[D]. 济宁: 曲阜师范大学硕士学位论文, 2011
- [24] Wang WP, Shao ZZ. Identification of *AlmA* genes involved in long-chain alkane degradation by *Alcanivorax hongdengensis* A-11-3[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(8): 1051-1057 (in Chinese)  
王万鹏, 邵宗泽. 红灯食烷菌(*Alcanivorax hongdengensis*) 黄素结合单加氧酶(*AlmA*)的基因克隆及其烷烃诱导表达[J]. *微生物学报*, 2010, 50(8): 1051-1057
- [25] Fu YY. Diversity of oil-degrading bacteria in Beibu gulf and systematic analysis of *Salinisphaera* and research on alkane-degradation genes[D]. Xiamen: Master's Thesis of Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, 2011 (in Chinese)  
付媛媛. 北部湾石油降解菌的多样性分析与咸水球形菌(*Salinisphaera*)的系统进化及烷烃降解基因研究[D]. 厦门: 国家海洋局第三海洋研究所硕士学位论文, 2011
- [26] Dong CM, Chen L, Liao YT, et al. Phylogenetic and degrading genes analysis of a PAH degrading bacterium TVG9-VII from deep-sea hydrothermal environment[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(11): 1548-1554 (in Chinese)  
董纯明, 陈亮, 廖悦婷, 等. 一株深海热液环境来源的PAHs降解菌TVG9-VII的系统发育与降解基因[J]. *微生物学报*, 2011, 51(11): 1548-1554
- [27] Qiao J, Li GM, Zhang Y, et al. Study on *alkB* gene related to alkane degradation of *Rhodococcus* P14[C]// *Annual Conference of Microbiology of Hubei Province and Wuhan Society of Microbiology*. Wuhan: Hubei Society of Microbiology, Guangdong society of Microbiology, 2012 (in Chinese)  
乔璟, 李慧敏, 张莹, 等. 红球菌 P14 烷烃降解相关基因 *alkB* 的研究[A]//2012 年鄂粤微生物学学术年会——湖北省暨武汉微生物学会成立六十年庆祝大会论文集[C]. 武汉: 湖北省微生物学会, 广东省微生物学会, 2012