

# 一株石油降解菌的筛选、分离纯化及降解性能分析

辛玉峰, 曲晓华

(曲阜师范大学生命科学学院, 曲阜 273165)

**摘要:** 从胜利油田污染土壤中分离纯化得到石油降解菌, 并对其部分性状及生理生化特性进行了实验研究。经鉴定该菌株属于假单胞菌属, 能够以石油作为唯一碳源生长。通过光谱扫描 200~600 nm 范围内石油的吸光度确定在 211 nm 处石油有较高吸收峰。通过测量不同时间段菌的悬浮液在 600 nm 和 211 nm 处的吸光度, 结果表明随着菌的生长 211 nm 处的吸收峰显著下降。这表明该菌能以石油为碳源且降解能力较强。

**关键词:** 石油降解菌; 分离; 纯化

中图分类号: Q93-331

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2008)01-0017-02

## Screen, Isolation and Analysis of Degradation Capability for a Crude Oil Degrading Strains

XIN Yu-feng, QU Xiao-hua

(Life Science College, Qufu Normal University, Qufu 273165)

**Abstract:** A strain of oil degrading was separated and purified from the polluted soil of Shengli Oil Field. Its some traits and physiological biochemistry characteristic were studied. The strain was pseudomonas sp. It could grown by the only petroleum. With SP—756P spectrophotometer scanned in 200~600 nm scope, through the spectrum determination of the petroleum extinction. The petroleum absorption peak was at 211 nm place. Through measured the extinction of suspending liquid of fungus in 600 nm and 211 nm at the different time, the result showed that the absorption peak of 211 nm remarkable dropped along with the growth of the strain. This indicated that this strain could take petroleum as carbon source and the degradation capability was strong.

**Key words:** crude oil degrading strain; isolation; purification

已知可降解各类石油烃的微生物共计 100 余属, 200 多种, 分别属于细菌、放线菌、霉菌以及酵母菌等。自然界中就存在着多种石油降解微生物。目前, 有关石油及其产品的微生物降解方面的研究常有报道, 已经分离筛选出能够降解原油的菌种有: *rhodococcus rhodochrous*, *pseudomonas*, *alcaligenes*, *rhodococcus erythropolis*, *acinetobacter*, *devourol* 等<sup>[1]</sup>, Vecchioli G I 报道了通过添加土著微生物增强石油降解的能力<sup>[2]</sup>。在石油污染区域, 实际上就存在着一个对微生物的驯化选择过程。研究发现, 用污染土壤中的污染物接触并驯化土壤微生物, 可大大提高他们的降解速率。在污染土壤中, 多环芳香烃的绝对转化率比在未污染的土壤中要大几

千倍到几十万倍<sup>[3]</sup>。因此在污染区域, 通过人工富集培养, 就能得到降解性能较好的菌株。虽然可利用土著微生物菌群处理石油污染物, 但在许多情况下, 由于土著微生物菌群驯化时间长, 生长速度慢, 代谢活性不高, 难以达到快速除污的效果。因此, 对石油污染进行生物修复, 必须先获得具有高效降解石油能力的菌株, 再通过各种方法加强菌的石油降解效率, 如表面活性剂的使用, 投加亲油的营养盐, 加大菌的密度等。筛选石油降解微生物的研究工作在国内外都受到极大重视。

### 1 方法

#### 1.1 降解菌株的分离与筛选

土样采自胜利油田污染土壤, 利用石油原油作为唯一碳源的基本培养基进行菌株的分离与筛选, 并对筛选的菌株利用划线分离的方法进行菌株的纯化, 在纯化过程中, 始终保持以石油原油作为唯一碳源。

收稿日期: 2007-10-10

基金项目: 曲阜师范大学科研启动基金资金

第一作者简介: 辛玉峰(1981-), 男, 山东省潍坊市人, 硕士, 讲师, 从事环境微生物学研究。E-mail: xinyufeng520@163.com。

1.2 降解菌株的鉴定

对筛选的菌株进行显微镜形态学观察、培养皿观察以及生理生化实验进行鉴定<sup>[4]</sup>。

1.3 石油吸收波峰测定

利用紫外分光光度计，在 200 ~ 600 nm 处，进行光谱扫描，确定石油的最高吸收峰。

1.4 菌株对石油降解能力的测定

在基本培养基中加入足量的石油，稍微加热使其充分溶解，取中层溶液做成石油饱和液。取适量加入比色皿中，扫描测出石油饱和液的吸收峰，然后，挑取菌落加入石油饱和液中，在 37℃振荡箱中振荡培养。分别测量 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 h 的由 1.3 中确定的石油吸收波长下的吸收峰值。以未接种石油降解菌的为阴性对照<sup>[5]</sup>。

2 结果与分析

2.1 通过以石油为唯一碳源的基本培养基进行分离，并纯化后，得到一株石油降解菌，生长良好，编号为 X1。

2.2 对 X1 形态观察及部分生理生化性状鉴定结果(见表 1)表明：该菌株 X1 属于假单胞菌属 (*Pseudomonas sp.*)

2.3 通过对石油的光谱扫描，发现在 211 nm 处的

石油吸收峰最大。

表 1 分离菌株的形态及生理生化特性

鉴定项目	特 性	鉴定项目	特性
菌落颜色	乳白色	蔗糖发酵	—
菌落形态	圆形边缘完整不透明	乳糖发酵	—
菌体形态	短杆无芽孢	甲基红	—
菌体大小	(0.5~0.7)×(1.0~1.5)	吲哚	—
革兰氏染色	—	H <sub>2</sub> S	+
芽孢染色	—	V. P	—
葡萄糖发酵	—	柠檬酸盐	—

注：表 1 中“+”表示为阳性，“—”表示为阴性。

2.4 通过分光光度计在不同时段进行 211 nm 和 600 nm 处吸光度值的测定结果(见表 2, 图 1)表明：随着菌悬液的加入，其溶液在 211 nm 处吸光度值逐渐减小，在 2 h 降至阴性对照的 80%，在 6 h 降至阴性对照值的 58%，在 10 h 降至阴性对照值的 31%，这说明石油混合液中 211 nm 处具有吸收峰的物质正在逐渐降解，而 600 nm 处的吸光度值代表菌悬液中 X1 的生长情况，从中我们可以看出，随着时间的推移，其值符合基本的细菌生长曲线，而且与 211 nm 处吸光值的降低成对应关系。这说明石油混合液中物质的降解是由 X1 的作用引起的。菌 X1 具有一定的石油降解能力。

表 2 不同时间段的吸光度

波长	未接种	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h	8 h	9 h	10 h
211 nm	3.452	2.778	2.761	2.301	2.255	2.097	2.000	2.000	1.903	1.222	1.097
600 nm	2.003	1.985	1.981	1.982	1.959	1.957	1.959	1.978	1.946	1.949	1.956

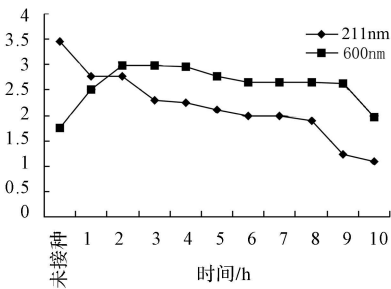


图 1 不同时间段 211nm 和 600nm 吸光度值变化

3 结论与讨论

本实验通过富集培养基进行富集，筛选分离并纯化得到一株石油降解菌，对其基本的生理生化指示进行鉴定，并确定为假单胞菌属。经过紫外分光光度计进行分析其降解能力，发现其具有一定的降解石油的能力。

下一步应对菌株 X1 采用诱变等实验手段进行降解性能的提高，对其降解的底物范围进行分析，弄清其对石油烃类进行降解的途径，并对其进行室内的模拟驱油和降解试验，为具体的应用打下基础。

参考文献:

[ 1 ] 王晓娟, 金樑, 顾宗谦. 机油降解菌的筛选及其降解能力的研究[ J ]. 复旦学报(自然科学版), 2001, 40(5): 562-567.

[ 2 ] Vecchioli G I, Del Panno M T, Panceira M T. Use of selected autochthonous soil bacteria to enhance degradation of hydrocarbons in soil[ J ]. Environmental Pollution, 1990, 67 (3): 24-258.

[ 3 ] 叶小梅, 常志州, 朱万宝 等. 调理剂对污泥中石油降解速率的影响[ J ]. 环境导报, 1999(2): 21-22.

[ 4 ] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法[ M ]. 北京: 科学出版社, 1978: 1-57.

[ 5 ] 马文漪, 杨柳燕. 环境微生物工程[ M ]. 南京: 南京大学出版社, 1998: 128-131.

