

# 石油污染土壤的生态风险评价和生物修复<sup>\*</sup> ——一株具有乳化石油能力的细菌分离鉴定

刘五星<sup>1,2</sup> 骆永明<sup>1,2†</sup> 滕 应<sup>1</sup> 李振高<sup>1</sup> 吴龙华<sup>1</sup>

(1 中国科学院南京土壤研究所土壤与环境生物修复研究中心,土壤与农业可持续发展国家重点实验室,南京 210008)

(2 中国科学院研究生院,北京 100039)

**摘 要** 以江汉原油为唯一碳源,经过 BH 培养基富集培养,以血平板从不同石油污染土壤中分离纯化获得多株细菌。通过测定这些细菌对柴油的乳化程度,发现菌株 X13-1 具有较强乳化能力,其 1 h、24 h 的乳化率分别为 80%和 75%,明显高于文献报道。此外,该菌在以石蜡为唯一碳源的 BH 培养基中生长较好,说明其具有较强的分解石油的能力。经 Biolog 细菌自动鉴定仪鉴定,同时进一步通过 PCR 扩增获得该菌的 16S rDNA,并测序。对其 16S rDNA 分析表明,该菌株与 GenBank 中的醋酸钙不动杆菌同源率为 97%,确定该菌可能为醋酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*)。

**关键词** 石油降解菌;乳化;分离与鉴定

**中图分类号** Q93.331 **文献标识码** A

石油是由数百种化合物组成的复合体。根据性质一般将其分为四类:饱和烃(包括正链烷烃、支链烷烃和环烷烃)、芳香烃(包括单环、双环和多环芳烃以及带有烷基侧链和融合的环烷烃)、树脂(由嘧啶、喹啉、吡啶、噻吩、亚砷、氨基化合物组成的复合体)以及沥青质(环烷酸、硫化物、多元酚、脂肪酸、金属卟啉的复合物)。其中有些成分有致突变、致畸变作用,并能通过食物链在动植物及人体内富集,被列为重点污染物<sup>[1]</sup>。

石油污染对自然环境的破坏以及对人类健康造成的威胁,使人们不得不寻找治理的方法。生物修复由于具有不造成二次污染、费用低、原位降解污染物等优点<sup>[2]</sup>,因而是一种极有前途的技术。但是采用生物修复石油污染的土壤面临石油难溶于水生物可利用性低,单纯的石油降解菌难以与之接触而造成修复率低等问题。有研究表明,表面活性剂可以乳化污染土壤中不溶性有机物,使它们的解吸附增强,水溶性增加<sup>[3,4]</sup>。然而,使用表面活性剂并不总是增强不溶性有机污染物的降解性。Bruheim 等<sup>[5]</sup>的研究表明,化学表面活性剂的加入有时甚至会这些物质的降解性减弱。这可能是由于化学表面活性剂的自身毒性,或是其使溶液中污染物浓度

的增加,从而对土壤中的微生物产生毒害作用,限制了其在生物修复中的应用。生物表面活性剂是由微生物产生的具有表面活性的两性化合物,与化学表面活性剂相比其具有特异性强、高效、低毒、不污染环境以及生产低成本等优点<sup>[2]</sup>。利用其能够乳化原油增强油的水溶性的特性,在清理储油罐以及二次采油上已有成功的应用<sup>[6,7]</sup>。

但是,目前对于石油污染土壤的生物修复研究主要集中在高效石油降解菌的筛选与构建以及添加营养物质、以及增加土壤中空气流通等方面<sup>[8~13]</sup>。筛选和应用具有产生生物表面活性剂能力的石油降解菌并通过对其乳化条件的研究来增强污染土壤中油的生物可利用性,进而对石油污染土壤修复实为鲜见。因此,本文从油田土壤中分离出一株具有高效乳化能力的石油降解菌并对其乳化条件进行了研究,最后还通过 Biolog 和 16S rDNA 序列分析对其进行了鉴定。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

分离菌种的土壤采自不同石油污染区(南京花园路汽车修理厂、山东寿关胜利油田清和采油厂、湖

<sup>\*</sup> 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2002CB4108-9)、国家科技攻关计划课题(2003BA808A18-1-2)资助

<sup>†</sup> 通讯作者, E-mail: ymluo@issas.ac.cn

作者简介:刘五星(1975~),男,湖北监利人,博士研究生,主要从事环境微生物方面的研究

收稿日期:2005-05-10;收到修改稿日期:2005-10-20

北荆门石化焦化装置);原油采自江汉油田钟市采油厂,其基本理化性质见表 1。

表 1 江汉原油基本性质

Table 1 Basic properties of Jiangnan crude oil

密度(20 ) Dentist (g cm <sup>-3</sup> )	API <sup>1)</sup> 重力 API gravity	凝点 Solidifying point ( )	胶质 Colloid (%)	沥青质 Asphaltum (%)	采样日期 Sampling date (yyyy-mm-dd)
0.871	30.20	+28.00	13.55	0.59	2004-02-08

1) American Petroleum Institute

## 1.2 培养基

1.2.1 BH 培养基(L) MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g, FeCl<sub>3</sub> 或 FeSO<sub>4</sub> 0.05 g, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1.0 g, CaCl<sub>2</sub> 0.02 g, 碳源为江汉原油或文中指出碳源,蒸馏水 1 000 ml, pH 7.0~7.2。

1.2.2 血平板培养基(L) 牛肉膏 3 g, 蛋白胨 10 g, 酵母膏 0.1 g, NaCl 5 g, 蒸馏水 1 000 ml, 琼脂 18 g, pH 7.4~7.6, 倒平板时另加入 5 ml/100 ml 的脱纤维羊血。

1.2.3 斜面培养基(L) 蛋白胨 10 g, 葡萄糖 20 g, 酵母膏 0.1 g, 琼脂 18 g, 蒸馏水 1 000 ml, pH 7.0~7.2。

## 1.3 方法

1.3.1 具乳化能力的石油降解菌分离 取 1 g 石油污染土壤接入以 1% 江汉原油为唯一碳源的 BH 培养基中, 恒温 30 ℃, 180 r min<sup>-1</sup> 好氧振荡富集培养 7 d, 取不同稀释度的菌液涂血平板, 挑取溶血圈大的菌落进一步分离纯化。

1.3.2 降解石油性能的测定 在 BH 培养基中以石蜡或萘为唯一碳源, 接入一环分离得到的菌种, 装液量 50 ml/250 ml 三角瓶, 30 ℃, 180 r min<sup>-1</sup> 培养 3 d, 600 nm 处测 OD 值<sup>[14]</sup>。

1.3.3 乳化性能测定 取一平底试管, 加 5 ml 柴油和 5 ml 培养 5 d 的发酵液, 漩涡振荡均匀, 分别静置 1 h、24 h 测量乳化液占整个溶液的比例<sup>[15]</sup>。

1.3.4 表面张力的测定 采用环法测定表面张力, 仪器为 ZL-2 界面张力仪(博山同业分析仪器厂)。

1.3.5 菌体形态的观察及生理鉴定 通过革兰氏染色, 显微镜观察菌体形态; 在 Biolog 96 孔革兰氏阴性平板上培养 24 h 后, 采用 Biolog 细菌自动鉴定仪检测供试菌株的代谢指数。

1.3.6 菌体 DNA 的分离纯化及 16S rDNA 的扩增与序列分析 菌种自斜面接种到 LB 培养基中, 28 ℃, 180 r min<sup>-1</sup>, 摇床培养 24 h。镜检确定无杂菌

后 5 000 r min<sup>-1</sup> 离心 15 min 收集菌体。菌体 DNA 的分离纯化使用 FastDNA 试剂盒。与传统的手工提取相比, 使用该试剂盒避免了匀浆、超声波等方法的费力、耗时、低效的缺点, 可以快速、稳定地裂解并纯化样品<sup>[16]</sup>。根据文献设计引物如下: Primer 1, 27f: 5'-AGAGTTTGA TCCTGGCTCA G-3'; Primer 2, 1522r: 5'-AAGGAGGTGATCCA GCCGCA-3 (上海博亚生物技术有限公司) (f 代表正向引物, r 代表反向引物)。Primer 1 和 Primer 2 用于 DNA 的 PCR 扩增和 DNA 测序。16S rDNA 的扩增参照文献描述的方法。序列测定由上海博亚生物技术有限公司完成。

## 2 结果与讨论

### 2.1 具乳化能力的石油降解菌分离

以往在分离生物表面活性剂产生菌时, 常采用传统方法测定菌株的排油活性、表面张力、乳化活性等, 该方法工作量大、效率低。最近有人根据生物表面活性剂能够溶血的原理, 将加入羊血的培养基作为平板, 将菌株逐个点种, 适温培养 1~2 d, 挑选溶血的单菌落<sup>[17]</sup>。本研究通过采用以原油为唯一碳源的培养基富集以及含去纤维羊血的培养基分离。根据溶血圈的大小初步得到 9 株具有较大溶血圈的细菌菌株, 分别命名为: X2-1, X3-2, X5-6, X13-1, X14-1, X15-1, X16-2, X17-1, X17-2。

### 2.2 各分离菌株乳化能力的测定

选用含有柠檬酸、乙酸、乙醇、柴油、原油、液体石蜡为唯一碳源的 BH 培养基<sup>[13]</sup>, 接入一环菌种, 30 ℃, 180 r min<sup>-1</sup> 培养 5 d, 测定各菌在不同碳源中的乳化能力。由表 2 可以看出, 在以柠檬酸为碳源时 X13-1 菌株在 1 h 和 24 h 后的乳化能力最高, 1 h 可达 80%, 24 h 为 75%, 显著高于文献报道的 1 h 和 24 h 均为 64% 的乳化能力<sup>[13]</sup>。从实验结果还可看出, 不同碳源对同一菌株的乳化性能影响很大, 因此在做石油污染土壤修复实验时可考虑添加不同的碳源来增强油污的水溶性。

### 2.3 各菌株分解石油能力

多环芳烃、长链烷烃和饱和环烷烃是土壤石油污染的主要成分。液体石蜡(C<sub>16</sub>-C<sub>38</sub>)是一种饱和链烷烃和环烷烃的混合物, 其结构组成类似于石油污染土壤中烃的复合物<sup>[14]</sup>, 因此将分离得到的 9 个菌株接入以石蜡和萘为唯一碳源的培养基中用来研究细菌对烃的降解作用。发现 9 株细菌都能在以石蜡为唯一碳源的 BH 培养基中生长, 但均不能在萘

表 2 碳源对几种细菌乳化能力的影响

Table 2 Effect of source of carbon on emulsifying activity of bacteria

菌株 Strain	碳源 Carbon sources											
	柠檬酸 Citric acid (%)		乙酸 Acetic acid (%)		乙醇 Ethanol (%)		柴油 Diesel oil (%)		原油 Crude oil (%)		液体石蜡 Paraffin (%)	
	1 h	24 h	1 h	24 h	1 h	24 h	1 h	24 h	1 h	24 h	1 h	24 h
X2-1	9	9	1	0	3	3	1	1	1	0	8	4
X3-2	4	0	4	0	1	0	1	0	1	0	1	0
X5-6	2	0	7	3	6	3	6	5	5	2	0	0
X13-1	80	75	8	1	3	1	4	3	7	0	5	0
X14-1	0	0	17	3	3	0	1	0	1	0	3	1
X15-1	56	47	50	50	1	0	52	42	2	0	24	19
X16-2	1	0	10	4	4	4	41	24	5	1	6	1
X17-1	26	13	0	0	6	4	39	22	0	0	6	3
X17-2	14	6	5	1	64	60	7	0	8	2	3	0

中生长。由于细菌培养液的浊度反映了细菌的生物量的多少,也间接反映了该菌对石蜡的分解能力。因此采用比浊法筛选具有较强降解原油能力的菌株。摇瓶 71 h 后,测定培养液的 OD<sub>600 nm</sub> 值。实验表明在 9 个菌株中,培养液 OD 值均大于 0.2,说明这 9 株细菌均有一定的分解石油的能力。其中菌株 X5-6、X13-1、X16-2、X17-1、X17-2 等 5 株细菌生长较好,又由表 1 可以看出 X13-1 菌具有较强的乳化能力,而图 1 表明菌株 X13-1 在以石蜡为碳源的 BH 培养基中生长较好,可以初步确定 X13-1 菌株具有较强的乳化和分解石油的能力。因此选择菌株 X13-1 作进一步研究。

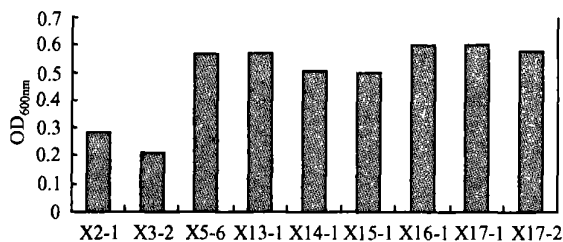


图 1 不同烃降解菌株在 BH 培养基上的生长情况

Fig. 1 The absorption of hydrocarbon-degrading bacteria on BH medium

#### 2.4 不同碳源对菌株 X13-1 发酵液表面张力的影响

采用环法测定菌株 X13-1 在柠檬酸等 6 种不同碳源的 BH 培养基中培养后的发酵液及水的表面张力。经测定水的表面张力为 72.1 mN m<sup>-1</sup>。由表 3

可见,菌株 X13-1 在柠檬酸等 6 种碳源中生长均能降低水的表面张力,而在以柠檬酸为碳源的 BH 培养基中表面张力最低。低的表面张力可增加石油的水溶性,便于石油降解菌与之作用,起到加快石油降解的效果。

表 3 菌株 X13-1 发酵液的表面张力

Table 3 Surface tension of culture fluid of strain X13-1 (mN m<sup>-1</sup>)

菌株 Strain	碳源 Carbon sources					
	柠檬酸 Citric acid	乙酸 Acetic acid	乙醇 Ethanol	柴油 Diesel oil	原油 Crude oil	液体石蜡 Paraffin
	acid	acid		oil	oil	Paraffin
X13-1	49.2	61.1	59.1	54.1	56.8	54.8

#### 2.5 菌株 X13-1 的分类鉴定

经过革兰氏染色,显微镜观察表明其为革兰氏阴性(G<sup>-</sup>),杆状,0.9~1.6-1.5~2.5 μm,无芽孢。在此基础上将菌株 X13-1 细胞悬液接种到 95 种碳源的 Biolog 阴性板微孔中,培养 24 h 后,测定其“代谢指数”。表 4 为菌株 X13-1 对 95 种底物的利用情况。经 Biolog 细菌鉴定系统分析,菌株 X13-1 为醋酸钙不动杆菌 (*Acinetobacter calcoaceticus*),相似率 (SIM INDEX) 为 0.826。

#### 2.6 16S rDNA 序列分析

利用 FastDNA kit 提取,并采用 PCR 扩增得到该菌株的 16S rDNA。经测序,菌株的 16S rDNA 扩增片段长度为 1 441 bp。在 GenBank 中的登记注册号为 AY800383。用 BLAST 程序对菌株 X13-1 的 16S

rDNA 序列与 GenBank、EMBL (Europe Molecular Biology Laboratory)、DDBJ (DNA Data Bank of Japan) 的核苷酸序列进行相似性分析,结果发现在 GenBank 中 X13-1 菌株与接受号为 X81657.1 的醋酸钙不动杆菌 16S rDNA 基因的相似性为 97%。Biolog 细菌自动鉴定仪主要根据被测菌的“代谢指数”,将其与 GenBank 数据库中的 1 500 多种细菌鉴定信息进行比

较,即可鉴定到种。结合 Biolog 和 16S rRNA 基因序列分析的结果,可以初步判断 X13-1 菌株为醋酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*)。由于该菌是在羊血平板上分离得到,因此其具有溶血性,这点与标准菌株的不溶血性存在差异<sup>[18]</sup>。1998 年 Gbluszko 等<sup>[19]</sup>也发现了类似的问题,这说明醋酸钙不动杆菌的某些菌株也存在溶血性能。

表 4 X13-1 菌株对 Biolog 板上 95 种碳底物的利用能力<sup>1)</sup>

Table 4 Strain X13-1 s capabilities of using 95 types of carbon substrates on Biolog

底物 Substrate	利用状况 Utilization	底物 Substrate	利用状况 Utilization	底物 Substrate	利用状况 Utilization	底物 Substrate	利用状况 Utilization
水	-	D-蜜二糖	-	p-羟基苯乙酸	-	L-组氨酸	+
环糊精	v	-甲基-D-葡萄糖苷	-	衣康酸	-	羟基-L-脯氨酸	-
糊精	-	阿洛酮糖	-	-酮丁酸	v	L-亮氨酸	v
淀粉	v	D-棉子糖	+	-酮戊二酸	+	L-鸟氨酸	-
吐温 40	+	L-棉子糖	-	-酮戊酸	-	L-苯丙氨酸	-
吐温 80	+	D-山梨醇	-	D,L-乳酸	-	L-脯氨酸	-
N-乙酰基-D-半乳糖胺	-	蔗糖	-	丙二酸	-	L-焦谷氨酸	+
N-乙酰基-D-葡萄糖胺	-	D-海藻糖	-	丙酸	-	D-丝氨酸	v
侧金盏花醇	-	松二糖	-	奎尼酸	-	L-丝氨酸	+
L-阿拉伯糖	v	木糖醇	-	D-葡糖二酸	-	L-苏氨酸	-
D-阿拉伯糖	-	甲基丙酮酸	+	癸二酸	+	D,L-肉碱	-
D-纤维二糖	-	单甲基琥珀酸	+	琥珀酸	-	-氨基丁酸	+
赤藻糖醇	-	乙酸	+	溴丁二酸	+	尿苷酸	-
D-果糖	-	顺-乌头酸	+	琥珀酰胺酸	-	肌苷	-
L-果糖	-	柠檬酸	+	葡糖醛酰胺	-	尿苷	-
D-半乳糖	-	甲酸	-	L-丙氨酸胺	v	胸腺嘧啶核苷	-
龙胆二糖	-	D-乳糖酸内酯	-	D-丙氨酸	+	苯乙胺	-
-D-葡萄糖	-	D-半乳糖醛酸	-	L-丙氨酸	+	丁二胺	-
肌醇	-	D-葡萄糖酸	-	L-丙氨酰甘氨酸	+	2-氨基乙醇	-
-D-乳糖	-	D-葡萄糖胺酸	-	L-天冬酰胺酸	+	2,3-丁二醇	-
乳果糖	-	D-葡萄糖酸	-	L-天门冬氨酸	+	丙三醇	-
麦芽糖	-	-羟基丁酸	-	L-谷氨酸	+	D,L-磷酸甘油	-
D-甘露醇	-	-羟基丁酸	+	甘氨酸-L-天门冬氨酸	-	1-磷酸葡萄糖	-
D-甘露糖	-	-羟基丁酸	v	甘氨酸-L-谷氨酸	-	6-磷酸葡萄糖	-

1) + :可利用 Available ; - :不能利用 Not available ;v :有微弱利用能力 Partly available

### 3 结 语

从石油污染的土壤样品中经过富集培养,分离得到一株具有乳化和分解石油能力的细菌 X13-1 菌株,经过 Biolog 鉴定和 16S rDNA 同源性比较鉴定为

醋酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*)。醋酸钙不动杆菌 X13-1 具有较强的石油降解能力,其在以石蜡为唯一碳源的 BH 培养基中 30 ℃、180 r min<sup>-1</sup> 培养 3 d,OD<sub>600 nm</sub> 值可达 0.566,同时该菌在以柠檬酸为碳源的 BH 发酵液也具有很强的乳化柴油的能力,与柴油漩涡振荡均匀静置 1 h 和 24 h 后,乳化层

的比例分别为 80 % 和 75 %。同时在以柠檬酸为碳源的 BH 培养基中培养后其表面张力为  $49.2 \text{ mN m}^{-1}$ , 显著低于纯水的表面张力, 具有良好的表面活性, 可以增强石油的水溶性。该菌具有较强的乳化和分解石油以及降低表面张力的能力, 表明其在生物修复石油污染土壤中具有较大的应用前景。有关该菌的生态条件等有待进一步研究。

### 参考文献

- [ 1 ] Zappi M E, Rogers B A, Teeter C L, *et al.* Bajpai, Bioslurry treatment of a soil contaminated with low concentrations of total petroleum hydrocarbons. *Journal of Hazardous Materials*, 1996, 46(1): 1 ~ 12
- [ 2 ] Kósaric N. Biosurfactants for soil bioremediation, food technol. *Biotechnol.*, 2001, 39 (4): 295 ~ 304
- [ 3 ] Volkerling F, Breure A M, Andel J G, *et al.* Influence of nonionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61: 1 699 ~ 1 705
- [ 4 ] Rahman K S M, Banat I M, Thahira J, *et al.* Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. *Bioresource Technology*, 2002, 81: 25 ~ 32
- [ 5 ] Bruheim P, Bredholt H, Einhjellen K. Effects of surfactant mixtures, including corexit 9527, on bacterial oxidation of acetate and alkanes in crude oil. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65: 1 658 ~ 1 661
- [ 6 ] Banat I M, Samarah N, Murad M, *et al.* Biosurfactant production and use in oil tank clean-up. *World J. Microbiol. & Biotech.*, 1991, 7: 80 ~ 88
- [ 7 ] Adkins J P, Tanne R S, Udegbunam E O, *et al.* Microbially enhanced oil recovery from unconsolidated limestone cores. *Geomicrobiol J.*, 1992, 10: 77 ~ 86
- [ 8 ] Gógi B K, Dutta N N, Góswami P, *et al.* A case study of bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site. *Advances in Environmental Research*, 2003, 7: 767 ~ 782
- [ 9 ] Raghavan P U M, Vivekanandan M. Bioremediation of oil-spilled sites through seeding of naturally adapted *Pseudomonas putida*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 1999, 44: 29 ~ 32
- [ 10 ] Lacotte D J, Mille G, Acquaviva M, *et al.* *In vitro* biodegradation of Arabian Light 250 by a marine mixed culture using fertilizers as nitrogen and phosphorous sources. *Chemosphere*, 1995, 31: 4 351 ~ 4 358
- [ 11 ] Pierre E R, Mario W C. Isolation of *Brachymonas petroleovorans* CHX, a novel cyclohexane-degrading L-proteobacterium. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 227: 101 ~ 106
- [ 12 ] Ding K Q, Luo Y M, Sun T H, *et al.* Bioremediation of soil contaminated with petroleum using forced-aeration composting. *Pedosphere*, 2002, 12(2): 145 ~ 150
- [ 13 ] 何翊, 吴海, 魏薇. 石油污染土壤菌剂修复技术研究. *土壤*, 2005, 37(3): 338 ~ 340. He Y, Wu H, Wei W. Bacteria-based bioremediation technique for oil-polluted soil (In Chinese). *Soils*, 2005, 37(3): 338 ~ 340
- [ 14 ] Li G, Huang W, Lerner D N, *et al.* Enrichment of degrading microbes and bioremediation of petrochemical contaminants in polluted soil. *Water Research*, 2000, 34 (15): 3 845 ~ 3 853
- [ 15 ] Marin M, Pedregosa A, Laborda F. Emulsifier production and microscopical study of emulsions and biofilms formed by the hydrocarbon-utilizing bacteria *Acinetobacter calcoaceticus* MM5. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1996, 44: 660 ~ 667
- [ 16 ] 腾应, 骆永明, 赵祥伟, 等. 重金属复合污染农田土壤 DNA 的快速提取及其 PCR-DGGE 分析. *土壤学报*, 2004, 41 (3): 343 ~ 347. Teng Y, Luo Y M, Zhao X W, *et al.* Rapid extraction and purification of DNA in farmland soils contaminated with mixed heavy metals for PCR-DGGE analysis (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2004, 41 (3): 343 ~ 347
- [ 17 ] 施巧琴, 关松刚. 工业微生物育种学(第二版). 北京: 科学出版社, 2003. 123. Shi Q Q, Guan S G. *Breeding Science of Industrial Microbiology* (In Chinese). 2nd Ed. Beijing: Science Press, 2003. 123
- [ 18 ] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001. 188. Dong X Z, Cai M Y. *The Manual of Systematic Determinative Bacteriology* (In Chinese). Beijing: Science Press, 2001. 188
- [ 19 ] Gólszko P, Góspodarek E. Hemolytic properties of *Acinetobacter calcoaceticus* strains. *Med. Dosw. Mikrobiol.*, 1988, 40(4): 219 ~ 225

## ECO-RISK & BIOREMEDIATION OF PETROLEUM CONTAMINATED SOIL . ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PETROLEUM-EMULSIFYING BACTERIA

Liu Wuxing<sup>1,2</sup> Luo Yongming<sup>1,2†</sup> Teng Ying<sup>1</sup> Li Zhengao<sup>1</sup> Wu Longhua<sup>1</sup>

(1 Soil and Environmental Bioremediation Research Center, State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture,  
Institute of Soil Sciences, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

(2 Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

**Abstract** Crude oil is a kind of organic matter, relatively insoluble in water, which seriously affects its bioavailability. Some bacteria are found to be able to produce biosurfactant, which can emulsify the crude oil and enable the bacteria to adhere to the hydrophobic surface of the oil very strongly, thus enhancing bioavailability of the crude oil in the environment. It is reported that bacteria with hemolytic circle in the blood plate show emulsifying activity. Therefore strains of the bacteria were isolated from the petroleum contaminated soil through enrichment culture in BH medium with crude oil from Jiangnan as the sole carbon source and hemolytic activity assay on blood agar plates. Nine strains with high degrading and emulsifying ability were isolated. Strain X13-1 was found at the top of the list of the bacteria with emulsifying ability reaching 80% and 75% at 1h and 24 h respectively.  $OD_{600\text{ nm}}$  of the culture fluid with paraffin as the sole carbon source was used to indirectly measure petroleum-degrading abilities of bacteria. The  $OD_{600\text{ nm}}$  of strain X13-1 was up to 0.566. Besides its emulsifying ability and petroleum-degrading ability, strain X13-1 was chosen for ulterior research. Cell wall composition, morphology, metabolism Biolog Micro-station Identification System and the sequence analysis of 16S rDNA fragment amplified from total DNA of bacterium X13-1 were used to identify the strain of bacterium. The results show that the bacterium is G<sup>-</sup> and bacilliform. SIM (Similarity) in Biolog to typical *Acinetobacter calcoaceticus* is 0.826 and 16S rDNA sequence homology with typical *A. calcoaceticus* in the GenBank is 97%. To sum up the above-described characters, it can be concluded that strain X13-1 is likely to be an *A. calcoaceticus*.

**Key words** Petroleum-degrading bacteria; Emulsification; Isolation and identification