

Isolation and Characterization of a Novel Medium-Long Alkane-Degrading Strain*

Yun Tang[#], Hong Tan

College of Life Sciences, China West Normal University, Nanchong
Email: [#]tangyun_502@yahoo.com.cn

Received: Dec. 3rd, 2012; revised: Dec. 8th, 2012; accepted: Feb. 1st, 2013

Abstract: A strain of medium-long chain *n*-alkanes degrading strain TY12 was screened from petroleum-contaminated soils of Nanchong oil refinery. We adopted several phenotypic and genotypical methods, such as morphological, physical and biochemical characteristics, antibiotic susceptivities, 16S rRNA gene sequences based phylogenetic analysis, to outline the basic biological characteristics and determinate the phylogenetic position. The Gram-negative isolate TY12 was a member of the genus *Acinetobacter*, short rods, no capsules, no endospores, catalase-positive, oxidase-negative, 0.9 - 1.6 μm in diameter and 1.5 - 2.5 μm in length; TY12 was susceptible to 14 kinds of tested antibiotics but resistant to Tetracycline, Amoxicillin, Ampicillin; The similarity between its 16S rRNA gene and that of its most closely related type strain in GenBank *Acinetobacter beijerinckii* CCM7266 (AJ626712), *Acinetobacter beijerinckii* LMH6214 (AJ303013) were 100%. The optimal temperature and pH for the strain utilizing industrial ethanol were 30°C and 7.0, and the optimal concentration of ethanol and concentration of yeast extract were 0.7% and 0.025 g/L, respectively. The *n*-dodecane degradation was 92% after the strain was growing on in hydrocarbon degradation medium with 1% (W/V) of *n*-dodecane at 30°C and 180 r/min for 36 h. The strain could degrade a large range of *n*-alkanes with chain length C₁₂ - C₃₂. It has potential in bioremediation of oil contaminated environment.

Keywords: Petroleum Pollution; Hydrocarbon-Degrading Bacteria; Isolation and Identification; *Acinetobacter*

一株高效降解中长链烷烃菌株的分离鉴定及其降解特性研究*

唐 贇[#], 谭 洪

西华师范大学生命科学学院, 南充
Email: [#]tangyun_502@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012年12月3日; 修回日期: 2012年12月8日; 录用日期: 2013年2月1日

摘 要: 从南充市炼油厂被石油污染土壤中分离到一株中长链烷烃降解菌 TY12。采用形态学观察、生理生化指标测定、抗生素抗性实验、16S rRNA 基因序列同源性分析等多种方法对该菌株进行鉴定。菌株为 *Acinetobacter beijerinckii*, 革兰氏阴性, 短杆状, 无荚膜, 无芽孢, 接触酶阳性, 氧化酶阴性, 菌体大小为 0.9~1.6 μm × 1.5~2.5 μm ; 对新霉素、氯霉素、卡拉霉素等 14 种抗生素敏感, 而对四环素、阿莫西林、氨苄西林耐药; 在 GenBank 中与其 16S rRNA 基因序列相似度最高的模式株分别为 *Acinetobacter beijerinckii* CCM7266 (AJ626712)、*Acinetobacter beijerinckii* LMH6214 (AJ303013), 相似性为 100%。研究表明, 以工业乙醇为唯一碳源的无机盐培养基培养种子最适宜; 其最适温度和 pH 分别为 30°C 和 7.0, 无水乙醇最适加入量为 0.7%, 最适酵母粉浓度为 0.025 g/L。在初始正十二烷浓度为 1%(W/V)培养基中接入 1%种子液, 于 30°C、180 r/min 震荡培养 36 h, 正十二烷降解率可达 92%; 菌株对正构烷烃的降解范围较宽, 能以 C₁₂~C₃₂ 的正构烷烃为唯一碳源和能源生长。该菌是一株能够降解中长链烷烃的不动杆菌新种, 具有应用到石油污染修复的潜力。

*基金项目: 四川省教育厅自然科学重点项目(09ZA123)和南充市科技局重点项目([2009]1067)资助。

[#]通讯作者。

关键词: 石油污染; 烷烃降解; 分离鉴定; 不动杆菌

1. 引言

石油是人类最重要的能源之一,随着科技进步和日益加快的工业化步伐,世界各国都加快了对石油资源的开发和利用。在石油开采、加工和运输过程中,石油及其产品进入环境引起环境的污染和破坏。因此,对石油污染的治理成为近年来世界各国环境保护的焦点,人们不断研究发展了多种修复方法如:物理修复法、化学修复法和生物修复法等。其中,生物修复技术由于具有成本费用低、效果好、对环境污染小、无二次污染等优点,受到越来越多国家的欢迎^[1]。

石油中含量最高的成分各种链长的烷烃,占总质量的 20%~50%,因此在众多的石油污染中,烷烃是最常见的污染源,其生物降解一直以来都是研究的热点。目前已分离到多种烷烃和芳香烃降解菌^[2-4]。其中,不动杆菌属是主要的种属之一,该属目前已报道有五个种具有降解烷烃的能力,第一个种是由 Kleber HP 等^[5]人分离到的 *Acinetobacter calcoaceticus* EB104; 而最具代表性的是由 Sakai Y 等^[6]人分离到的 *Acinetobacter sp.* M-1, 它能利用 C₁₃~C₄₄ 为唯一的碳源和能源,在石油污染的修复过程中起到非常重要的作用。

我们研究小组从南充市炼油厂被石油污染土壤中分离筛选到一株中长链烷烃降解菌 *Acinetobacter beijerinckii* TY12。采用形态学观察、生理生化指标测定、抗生素抗性实验、16S rRNA 基因序列同源性分析等多种方法对其进行了分类学鉴定,并对其正构烷烃利用情况进行了初步分析,表明菌株 *Acinetobacter beijerinckii* TY12 一株能够降解中长链烷烃的不动杆菌新种。

2. 实验材料与方法

2.1. 样品来源

样品取自南充市炼油厂被石油污染的土壤,南充炼油厂位于南充市主城区北半部的中心位置,处于城区上风向。占地面积 50.88 万平方米,年加工原油能力 100 万吨。采集的样品立即放入无菌塑料袋中送至实验室富集培养。

2.2. 材料与试剂

正己烷,正辛烷,正十烷,正十二烷,正十四烷,正十六烷,正十八烷,正二十二烷,正二十四烷,正二十八烷,正三十二烷,所有烷烃的纯度>98%,均购自天津化学试剂研究所。蛋白胨,酵母粉,琼脂粉,NaNH₄HPO₄·4H₂O, K₂HPO₄, MgSO₄·7H₂O, KH₂PO₄, NaCl 均为国产分析纯,均购自 Sigma 公司。TIANGEN 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, TIANGEN 纯化回收试剂盒, TIANGEN 普通质粒小提试剂盒均购自成都博瑞克生物技术有限公司。生化鉴定管购自青岛海博生物技术有限公司;药敏试剂盒购自杭州天和微生物试剂有限公司。

2.3. 培养基

2.3.1. E2 无机盐培养基^[7]

NaNH₄HPO₄·4H₂O 3.5 g, K₂HPO₄ 7.5 g, KH₂PO₄ 3.6 g 加水至 1000 mL,调节 pH 值 7.0,于 121℃ 灭菌 20 min。固体培养基在此基础上加 15 g 琼脂粉,于 121℃ 灭菌 20 min 后加入 1 mol/L MgSO₄ 1.0 mL 和微量元素溶液 II 1.0 mL。

微量元素溶液 II(250 mL): FeSO₄·7H₂O 0.695 g, MnCl₂·4H₂O 0.5 g, CoSO₄·7H₂O 0.7 g, CaCl₂·2H₂O 0.278 g, CuCl₂·2H₂O 0.043 g, ZnSO₄·7H₂O 0.073 g, 溶于 125 mL 1mol/L 的 HCl 中,再用 250 mL 的容量瓶定容,过滤除菌。

2.3.2. 乙醇过渡培养基^[8]

无机盐培养基,加 0.7%的工业乙醇。固体培养基在此基础上加 1.5%的琼脂粉。

2.3.3. 正构烷烃培养基

无机盐培养基,加 1%(W/V)的正构烷烃。固体培养基在此基础上加 1.5%的琼脂粉。

2.3.4. LB 培养基^[9]

2.4. 分析测定方法

2.4.1. 细菌生长量的测定

以未接种的培养基为对照,用 722 型分光光度计

在 600 nm 波长下测定菌悬液的 OD_{600nm} 。

2.4.2. 烷烃的定量测定

在 50 mL 烷烃培养液中加入 5 mL 色谱纯正己烷及等量正十四烷 (内标), 振荡 2 min 后迅速倒入离心管中, 在 4℃、10,000 r/min 条件下离心 5 min, 抽取上清液, 再分别加入 5 mL 正己烷萃取两次, 合并三次萃取液, 并作适当稀释后按以下方法进行气相色谱分析。

用 HP4890 气相色谱仪(GC-FID)进行分析, 色谱柱为美国 KB-1(0.32 mm × 30 m × 0.25 μm)。运行条件: 柱温先在 150℃维持 1 min, 然后以 15℃/min 速率升至 250℃; 检测器温度为 280℃; 注射室温度 250℃; 进样量 1 mL。通过测定与正十四烷的峰面积比值, 定量分析各种烷烃的质量浓度。

2.5. 烷烃高效降解菌株的富集和分离

将采集的土壤样品用玻璃珠打碎后静置, 取上清液加入到十二烷培养基中, 于 30℃、180r/min 振荡恒温培养箱中培养 7 d, 将培养后的菌液经梯度稀释后涂布在倒置的 LB 固体烷烃平板上, 于 30℃生化培养箱中培养 2 d; 挑取平板上长出的单菌落进行重复的分离纯化, 直到得到单菌株。挑取单菌落接种到烷烃培养基中, 测试各菌种在 30℃、180 r/min 培养 72 h 时对正十二烷的利用情况, 筛选出对烷烃降解高效菌株。

2.6. 菌株的鉴定

2.6.1. 菌株形态鉴定

采用扫描电子显微镜观察菌体形态, 电镜照片样品制备参照文献[10]所述方法。

2.6.2. 菌株生理实验

最适温度、最适 pH、最适 NaCl 浓度等生长实验采用 LB 培养基。药敏实验采用 K-B 法, 所用的药敏纸片由杭州微生物试剂有限公司提供。

2.6.3. 菌株生化实验

革兰氏染色镜检形态、氧化酶、接触酶实验及微量生化反应管生化鉴定等, 参照相关细菌鉴定手册进行^[11,12]。

2.6.4. 菌株 16S rRNA 序列测定

1) 菌体总 DNA 的提取和纯化取过夜培养菌液,

离心收集菌体, 用细菌基因组提取试剂盒提取并纯化基因组 DNA。

2) 16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增及克隆^[13]以 TY12 总 DNA 为模板, 采用通用 fD1.rD1 引物(fD1: 5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3, rD1: 5-AAGCAGGTGATCCAGCC-3)进行 16S rRNA 的 PCR 扩增^[14]。100 μL 的 PCR 反应体系组成如下: 100 倍稀释 DNA 模板 4 μL, 10 μmol/L 引物 fD1 10 μL, 10 μmol/L 引物 rD1 10 μL, 2 × MasterMix 50 μL, 加 dd H₂O 至总体积为 100 μL。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 55℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 1 min, 总计 25 个循环; 最后延伸 10 min。扩增得到的 DNA 片段并与 pMD19-T 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5α。对正确的重组子^[15], 送北京泰和生物技术有限公司进行 DNA 测序。将测序结果与 GenBank 上的相关 16S rRNA 序列在 Clustal X2 程序包中进行多重序列匹配排列分析, 用 MEGA(5.0)软件建系统进化树^[16]。

2.7. 烷烃降解菌降解特性的研究

2.7.1. 种子液的制备

在滩涂石油污染的生物修复中, 种子液将制成一定剂型使用, 这就要求其成分不能有烃类物质, 避免加重污染。其碳源选择只有糖类和醇类, 考虑到菌株能够很好的利用工业乙醇, 且制备的种子液不易变质, 便于保存, 故选用工业乙醇为碳源。

实验不同温度、pH 值、碳源浓度及生长因子浓度对菌株生长的影响, 并在最佳的培养条件下测定菌株的生长曲线。

2.7.2. 菌株 TY12 在正十二烷中生长情况

取过渡培养基中生长 12 h 的菌液培养物 0.5 mL 接入 50 mL 的以十二烷为唯一碳源和能源的十二烷液体培养基中(十二烷含量为 1%W/V), 30℃, 180 r/min 振荡培养。观察观察菌体生长情况并测定正烷烃的总降解率。

2.7.3. 纯烃底物降解实验

将 TY12 菌液按 1%接入装有 50 mL 液体培养基的 250 mL 三角瓶中培养 36 h, 摇瓶转速 180 r/min, 温度为 30℃, 每种底物做 3 个重复。以不加任何碳源的接菌培养液做空白对照, 测定培养液 OD_{600nm} , 观

察菌体生长情况。

3. 结果和讨论

3.1. 烷烃降解菌的分离与筛选

从南充炼油厂经常被含油废水浸泡的土壤上采集的土壤, 经过富集、分离纯化, 共获得 13 株单菌, 分别取代号为 TY6-TY18。将分离的单菌接种到十二烷培养基中, 根据菌株在 30℃ 的生长曲线和烷烃降解曲线, 最后选择生长速度快, 对正十二烷降解率最大的 TY12 用于进一步的实验。

3.2. 菌株鉴定

3.2.1. 菌株的培养特征

菌株 TY12 在 LB 固体培养基上培养 12 h, 生长良好, 菌落直径大约 1.0~2.0 mm, 呈淡黄色, 不透明, 圆形, 边缘平整, 中间略隆起, 表面略湿, 有微弱光泽, 不粘稠, 无臭味。在半固体培养基中, 在琼脂表面生长旺盛, 穿刺线不明显。在液体 LB 培养基中呈均匀浑浊, 静止时液体呈及微薄的菌膜, 轻摇则散。菌体革兰氏染色阴性, 抗酸性染色阴性, 短杆状, 两端略钝, 直或略弯, 成双排列、也少量不同程度的链状, 无荚膜, 无芽孢, 大小为 0.9~1.6 μm × 1.5~2.5 μm, 如图 1。

3.2.2. 生理特征

菌株生长温度为 25℃~37℃, 最适温度为 30℃; NaCl 浓度小于 4% 能生长, 最适浓度为 0.5%~1.5%; 由 pH 实验得出, 菌株 TY12 生长 pH 为 5.0~10.0, 最适 pH 为 6.0~8.0。

抗生素实验结果表明, 菌株 TY12 对链霉素、卡拉霉素、大观霉素、氯霉素、氧氟沙星、庆大霉素、恩诺沙星、新霉素、复方新诺明、环丙沙星高度敏感;

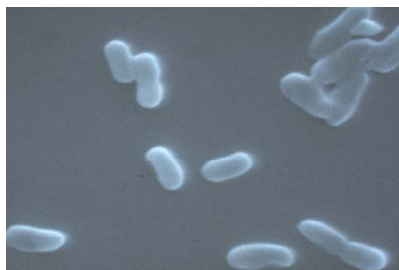


Figure 1. Microphotograph of the strain TY12 (1000×)
图 1. 菌株 TY12 的显微照片(1000×)

对青霉素 G、克林霉素、阿米卡星、乙酰螺旋霉素等中度敏感; 对阿莫西林、氨苄西林、四环素不敏感。

3.2.3. 生化特征

接触性酶阳性, 氧化酶阴性, 不能水解明胶、淀粉和酪蛋白; 不能利用葡萄糖、鼠李糖、蔗糖、蜜二糖、苦杏仁苷、阿拉伯糖、水杨苷、木糖、海藻糖、纤维二糖、苯甲酸、己二酸、酒石酸盐、壬二酸盐、腐胺、精氨酸、赖氨酸、鸟氨酸、苯丙氨酸作为碳源, 微弱利用乳糖、肌醇、山梨醇、麦芽糖、乳糖、棉籽糖、七叶苷。能利用乙醇、苹果酸盐、醋酸盐、硝酸盐、柠檬酸盐、丙二酸盐作为碳源。由表 1 生理生化特征对比可以看出, 菌株 TY12 具有与 *A. beijerinckii* 特别相近生理生化特征, 但 TY12 发酵 DL-乳糖产酸微弱; 而与 *A. venetianus* 和 *A. junii* 的生化特性相差较大, 其中后三者的生理生化特征参照文献[17]所描述。因此, 可以初步推断 TY12 属于 *A. beijerinckii*。

3.2.4. 16S rRNA 基因序列的系统进化分析

通过对菌株 TY12 的 16S rRNA 进行 PCR 扩增、测序, 获得 1541 bp 大小的基因序列, 此序列在 GenBank 上的登录号为: JF742664。将 16S rRNA 序列与 GenBank + EMBL + DDBJ + PDB 数据库中的近缘种进行 BLAST(basic local alignment search tool)比对分析。图 2 是采用邻位相连法(Neighbor-joining method)

Table 1. Comparison of selected phenotypic characteristics of TY12 and reference strains

表 1. TY12 菌株与相近菌株的主要特征比较

特征	TY12	<i>A. beijerinckii</i>	<i>A. venetianus</i>	<i>A. junii</i>
葡萄糖产酸	-	-	-	-
DL-乳糖	V	-	-	+
壬二酸盐	-	-	-	-
β-丙酸盐	-	-	-	-
苹果酸盐	+	+	+	-
L-精氨酸	-	-	+	+
乙醇	+	+	+	V
苯甲酸	-	-	+	-
己二酸	-	-	-	-
腐胺	-	-	-	-

Note: +: All strains positive within 4 days incubation; -: All strains negative within 10 days incubation; V: Strain-dependent results or weak, delayed or non-reproducible reactions.

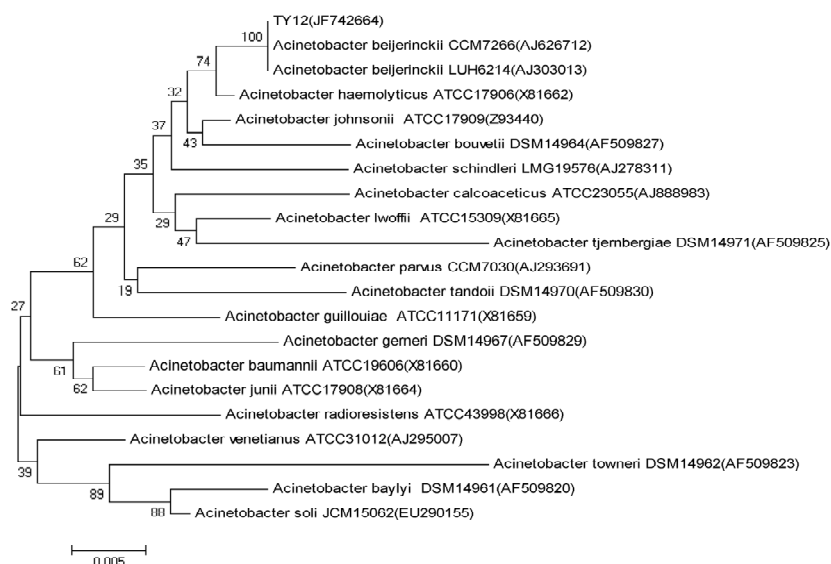


Figure 2. Phylogenetic tree demonstrating the relationship of the 16 S rRNA of the strain TY12 closest related *Acinetobacter*. Scale bar indicates evolutionary distance

图 2. 基于菌株 TY12 的 16S rRNA 序列同源性菌株系统发育树

构建的菌株 TY12 与 *Acinetobacter* 属的 20 株模式种的 16S rRNA 系统进化树。由图 2 所示，菌株 TY12 和模式菌株 *Acinetobacter beijerinckii* CCM7266 (AJ626712)、*Acinetobacter beijerinckii* LMH6214 (AJ303013) 的进化距离最小，相似性为 100%。结合传统的生理生化特性分析，确定菌株 TY12 为 *A. beijerinckii*。

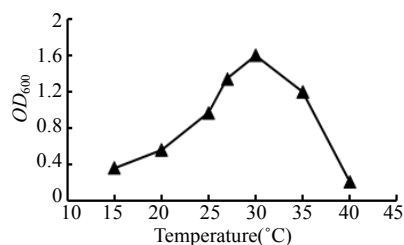


Figure 3. Effect on the growth of the strain TY12 by temperature

图 3. 温度对菌株 TY12 生长的影响

3.3. 烷烃降解菌降解特性的研究

3.3.1. 种子液的制备

对种子液培养的温度、pH、培养基碳源浓度、生长因子浓度进行了选择性实验。如图 3~6 所示，TY12 在 30°C 时生长良好；在 pH 值为 7.0 时生物量达到最高；当加入工业乙醇浓度 0.7%、生长因子浓度 0.025 g/L 时，菌体浓度最高。

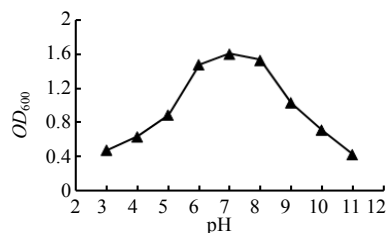


Figure 4. Effect on the growth of the strain TY12 by pH

图 4. pH 对菌株 TY12 生长的影响

在最佳的条件下，震荡培养 20 h，每隔 1 h 取样，以培养时间为横坐标，OD_{600nm} 为纵坐标，测菌株的生长曲线。如图 7 所示，菌株培养 2 h 开始进入对数生长期，到 14 h 左右进入生长稳定期，确定菌株处于对数生长后期的培养时间。选择培养 12 h 菌液接种烷烃降解培养基，此时种子液菌体浓度可以达到 10⁸ cells/ml。

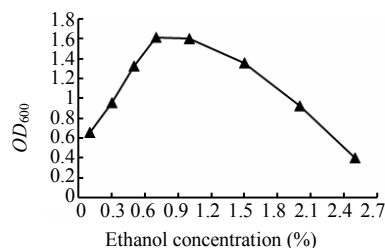


Figure 5. Effect on the growth of the strain TY12 by Industrial ethanol

图 5. 工业乙醇对菌株 TY12 生长的影响

3.3.2. 菌株 TY12 在正十二烷中生长情况

取新鲜的种子液按 1%接种量接入 50 mL 正十二烷浓度为 1%(W/V)无机盐培养基中，于 30°C、180

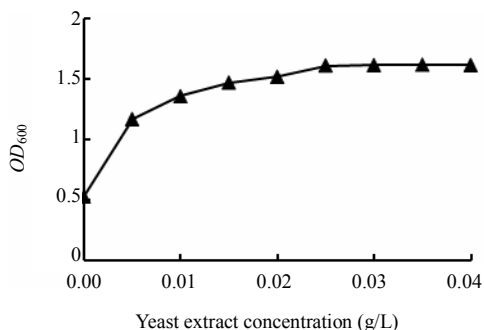


Figure 6. Effect on the growth of the strain TY12 by yeast extract

图 6. 酵母粉对菌株 TY12 生长的影响

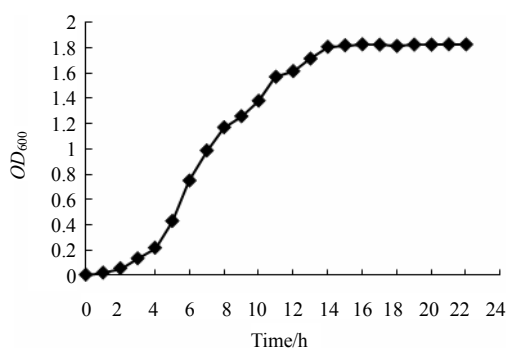


Figure 7. Growth curve of the stain TY12

图 7. 菌株 TY12 种子液生长曲线

r/min 振荡恒温培养箱中培养，每隔 4 h 取样，测定培养液 $OD_{600\text{ nm}}$ 及残留正十二烷量，以确定菌株 TY12 生长量与正十二烷降解量之间的关系，结果见图 8。由图 8 所示，TY12 在正十二烷培养基中，延迟期约为 3 h，随后生长迅速，到 32 h 左右生长量最大。细菌生长量和正十二烷的降解率是相平行的。培养到 14 h 时，正十二烷的降解率达到约 45%， $OD_{600\text{ nm}}$ 为 0.938；其后，菌株出现了一次比较明显的生长现象， $OD_{600\text{ nm}}$ 在 26 h 达到 1.753，而降解率升高到 74%，可能是中链烷烃分解成的短链烷烃为菌株的进一步生长提供了碳源；培养到 36 h 时，正十二烷的降解率达到约 92%， $OD_{600\text{ nm}}$ 为 1.909。

3.3.3. 烷烃降解范围

按方法[1.7.3]，以不同的烷烃作为唯一碳源，接入 1% 的 TY12 种子液，培养 36 h 观察，结果如图 9 所示。菌株 TY12 在 C_6 中生长十分的缓慢， C_8 、 C_{10} 中几乎不生长，推测可能是因为该菌对这些短链烷烃的毒性作用比较敏感或缺乏利用机制。该菌在 C_{12} ~ C_{28} 中生长良好，在 C_{32} 中生长稍微缓慢些，这可能是长

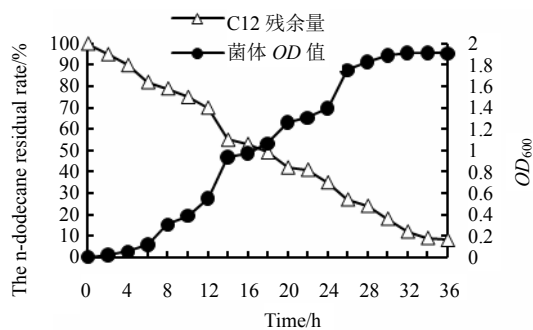


Figure 8. Growth and degrading curve of the strain TY12 with n-dodecane as sole carbon resource

图 8. 菌株 TY12 以正十二烷为唯一碳源生长和降解曲线

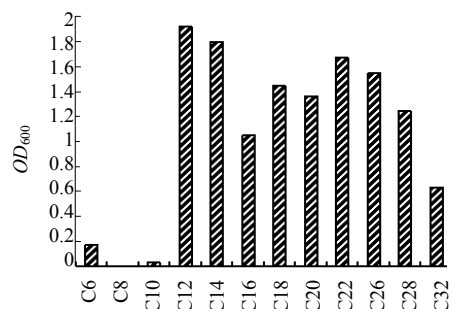


Figure 9. Growth of the strain TY12 with different length of n-alkanes as sole carbon resource

图 9. 菌株 TY12 以不同长度碳链烷烃为唯一碳源的生长情况

链烷烃在水中的溶解度非常小，从而菌株对其可利用性降低。不动杆菌是目前发现的革兰氏阴性烷烃降解菌中降解范围较广的降解菌，之所以在石油污染的治理中能起着重要的作用，与它们宽域的降解谱是密切相关的。

4. 结论

由于细菌的 16S rRNA 具有很高的保守性，因而近十年来细菌分类学家们广泛采用 16S rRNA 序列分析法进行发育分类学研究。通过将某一未知细菌的 16S rRNA 编码基因(16S rRNA)的序列与基因库的 16S rRNA 序列进行同源性比较，可以初步确定该细菌的种属地位，有些细菌甚至可以鉴定到种的水平。通过 16S rRNA 序列分析，结合形态学观察、生理生化指标测定、抗生素抗性实验等多种方法进行鉴定，将 TY12 归属为 *Acinetobacter beijerinckii*。不动杆菌属细菌是条件致病菌，可引起呼吸道感染、败血症、脑膜炎、心内膜炎、伤口及皮肤感染、泌尿生殖道感染等。抗生素实验也表明该菌对多种抗生素不敏感，这将严重影响其实际应用。随着分子生物学的发展，

可以使用基因敲除方法对菌株进行基因改造, 获得去除毒力因子的目的菌株。

目前人们已经研究了 *Alcanivorax sp.* A-11-3A^[18]、*Gordonia sp.* S14-10^[19]、*Geobacillus thermodenitrificans* NG80^[20]等菌株的烷烃降解酶系和相关基因。已报道的 AlkB_s 和 CYP153_s 都是负责中等链长烷烃 (C₅~C₁₂) 的降解, 对于长链烷烃羟化酶 AlmA 和 LadA 的报道却不多见。Maier T 等人^[21]从 *Acinetobacter calcoaceticus* EB104 克隆到了参与烷烃羟化的 P450 基因。Mimmi Throne-Holst 等人^[22,23]从 *Acinetobacter venetianus* 6A2 中克隆到了参与烷烃羟化的 alkMa、alkMb、almA 基因。菌株 *Acinetobacter beijerinckii* TY12 具有降解中长链烷烃能力、也是未曾报道的新种, 烷烃降解酶基因的研究可以作为继续研究的方向。

参考文献 (References)

- [1] 陆健, 黄潇, 伍贤明等. 高效烷烃降解菌 xcz 的分离鉴定及降解特性[J]. 土壤, 2008, 40(3): 460-464.
- [2] V. Mishra, R. Lal and Srinivasan. Enzymes and operons mediating xenobiotic degradation in bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 2001, 27(2): 133-166.
- [3] N. Das, P. Chandran. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. *Biotechnology Research International*, 2011, 2011: Article ID 941810.
- [4] S. Harayama, Y. Kasai and A. Hara. Microbial communities in oil contaminated seawater. *Environmental Biotechnology*, 2004, 15(3): 205-214.
- [5] H. P. Kleber, R. Claus and O. Asperger. Enzymologie der n-alkanoxidation bei acinetobacter. *Acta Biotechnologica*, 1983, 3(3): 251-260.
- [6] Y. Sakai, J. H. Maeng, Y. Tani and N. Kato. Use of long-chain n-alkanes (C₁₃-C₄₄) by an isolate, *Acinetobacter sp.* M-1. *Bio-science, Biotechnology, and Biochemistry*, 1994, 58(11): 2128-2130.
- [7] R. G. Lageveen, G. W. Huisman, H. Preusting, et al. Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: Effect of substrates on formation and Composition of Poly-(R)-3-Hydroxyalkanoates. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54(12): 2924-2932.
- [8] 黄磊, 李丹, 孙丹, 谢玉娟等. 一株低温石油降解菌的分类鉴定及降解特性研究[J]. 环境科学, 2007, 28(9): 2101-2102.
- [9] F. C. Neidhardt, P. L. Bloch and D. F. Smith. Culture medium for enterobacteria. *J. Bacterial*, 1974, 119(3): 736-747.
- [10] 仇天雷, 承磊, 邓宇等. 一株近海沉积物中产甲烷菌的分离及鉴定[J]. 中国沼气, 2007, 25(2): 3-6.
- [11] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 353-398.
- [12] R. E. 布坎南, N. E. 吉本斯, 著, 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组, 译. 伯杰鉴定手册(第八版)[M]. 北京: 科学出版社, 1995: 591-611.
- [13] J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔, 著, 黄培堂等, 译. 分子克隆实验指南(第三版). 北京: 科学出版社, 2002.
- [14] W. G. Weisburg, S. M. Barna, D. A. Pelletier, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(2): 697-703.
- [15] 陈书霞, 王晓武, 房玉林. 单菌落 PCR 法直接快速鉴定重组克隆[J]. 微生物学通报, 2006, 33(3): 52-56.
- [16] N. Saitou, M. Nei. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406-425.
- [17] A. Nemeč, M. Musilek, M. Maixnerova, et al. *Acinetobacter beijerinckii sp. nov.* and *Acinetobacter gyllenbergii sp. nov.*, haemolytic organisms isolated from humans. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59(1): 118-124.
- [18] 吴业辉, 邵宗泽. 海洋烷烃降解菌 *Alcanivorax sp.* A-11-3 的分离鉴定及其降解酶基因研究[J]. 台湾海峡, 2008, 27(4): 427-434.
- [19] 王丽萍, 刘昱慧, 邵宗泽. 一株来自大西洋表层海水的烷烃降解菌 *Gordonia sp.* S14-10 的分离鉴定及其降解相关特性的分析[J]. 微生物学报, 2009, 49(12): 1634-1642.
- [20] L. Li, X. Liu, W. Yang, et al. Crystal structure of long-chain alkane monooxygenase (LadA) in complex with coenzyme FMN: Unveiling the long-chain alkane hydroxylase. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 376(2): 453-465.
- [21] T. Maier, H. H. Foerster, O. Asperger, et al. Molecular characterization of the 56-kDa CYP153 from *Acinetobacter sp.* EB104. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 286(3): 652-658.
- [22] M. Throne-Holst, A. Wentzel, T. E. Ellingsen, et al. Identification of novel genes involved in long-chain n-alkane degradation by *Acinetobacter sp.* strain DSM 17874. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(10): 3327-3332.
- [23] M. Throne-Holst, S. Markussen, A. Winnberg, et al. Utilization of n-alkanes by a newly isolated strain of *Acinetobacter venetianus*: The role of two AlkB-type alkane hydroxylases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 72(2): 353-360.