

# 大连湾原油降解菌的分离和多样性分析

信艳娟 吴佩春 曹旭鹏 薛松\*

(中国科学院大连化学物理研究所 海洋生物产品工程组 辽宁 大连 116023)

**摘要:** 【目的】研究大连湾原油污染海域可培养原油降解菌的多样性, 并获得新的原油降解菌。【方法】通过大连湾海水、海泥和海绵样品采集, 以原油作为唯一碳源, 培养、富集、分离筛选原油降解菌, 根据 16S rRNA 基因序列确定其系统进化地位。【结果】通过形态观察和 16S rRNA 基因分析, 共获得 22 个属的 50 株菌。其中, 有 6 株菌的 16S rRNA 序列与最相近的菌株序列一致性仅为 95%–97%, 可能是潜在的新菌。单菌实验表明, 45 株菌具有石油降解能力。【结论】揭示了大连湾可培养原油降解菌的多样性, 并获得了新的原油降解菌, 为海洋石油污染的生物治理提供新资源。

**关键词:** 生物降解, 原油, 海洋细菌, 多样性

## Isolation and diversity of crude oil-degrading bacteria from Dalian Bay

XIN Yan-Juan WU Pei-Chun CAO Xu-Peng XUE Song\*

(Marine Bioproducts Engineering Group, Dalian Institute of Chemical Physics,  
Chinese Academy of Sciences, Dalian, Liaoning 116023, China)

**Abstract:** [Objective] In order to investigate the diversity of crude oil-degrading bacteria in the seawater, mud and sponge samples from Dalian Bay, and obtain new oil-degrading bacteria. [Methods] Crude oil was used as sole carbon source to enrich and isolate the potential oil-degrading bacteria from samples of seawater, mud or sponge. Phylogenetic analysis was conducted by 16S rRNA gene sequences of the bacteria. [Results] After screening via mor-

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31100092)

\*通讯作者: Tel/Fax: 86-411-84379069; ✉: xuesong@dicp.ac.cn

收稿日期: 2012-08-23; 接受日期: 2012-11-12

phological and 16S rRNA gene sequences analysis 50 strains belonging to 22 genera were obtained. Among them, 6 strains shared 16S rRNA gene sequence identities of 95%–97% with the most similar strains, were speculated new species. Further experiments revealed oil-degrading capability of 45 strains. **[Conclusion]** This study demonstrated a high diversity of the cultivable oil-degrading bacteria in Dalian Bay, and obtained new resources in bioremediation of marine oil pollution.

**Keywords:** Biodegradation, Crude oil, Marine bacteria, Diversity

随着石油工业的迅速发展,人们越来越多地涉及海上石油开发,因此,井喷、运输船舶的石油泄漏、撞船、沉船以及输油管道的泄漏等事故,造成的海上溢油事故也时有发生,严重污染了海洋环境,给海洋的生态平衡带来了极大危害。因此,需要采取及时有效的措施对石油污染进行迅速处理。而目前公认的处理海洋石油污染最环保的方法就是利用微生物降解石油<sup>[1-4]</sup>。石油降解菌的研究目前已经从近海环境扩展到大洋、极地等环境<sup>[5-7]</sup>,这些降解菌主要是从海水、海泥样品中分离获得,而从石油污染后引发一系列变化的生物体内筛选降解菌的研究鲜见报道。海绵属于动物界多孔动物门(Porifera),是最低等的多细胞海洋动物。由于海绵的底栖过滤性摄食和消化选择性等生理特性,其体内蕴藏了丰富的微生物种群。

2010年大连新港输油管道泄漏引起大片海域原油污染,海绵生活在海水中,当海水受到污染时,必然会影响到海绵的生存,但在漏油事故发生一个月后,对分布在污染海域的生物进行实地考察时发现,海绵等海洋生物生长状况良好,表面光洁,体现其具有很强的抗污染和生物修复能力,这可能与海绵中存在能降解污染物的微生物有关<sup>[8-9]</sup>。基于此本文采集大连湾原油污染海域的海水、海泥和海绵样品,富集分离原油降解菌,分析可培养原油降解菌的多样性,并希望获得新资源,同时为原油污染的环境修复提供有价值的信息。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 样品采集

在大连湾潮间带海域采集原油污染的海水、海泥和海绵样品,分别装于无菌样品瓶中,立即带回实验室进行富集分离培养。

### 1.2 培养基和试剂

(1) 人工海水培养基(ASM, g/L): 参照文献[10], 修饰后培养基中 NaCl 含量为 30.0, 原油含量为 1.0, pH 7.2; (2) 固体平板分离培养基 M1 (g/L): 上述人工海水培养基(ASM)加琼脂 18.0; M2 (g/L): 参照文献[11]; (3) 固体平板纯化培养基: 2216E (Difco)。

TaKaRa LA *Taq*, *Hha* I (10 U/ $\mu$ L), DNA 凝胶纯化试剂盒, DNA marker 均购自大连宝生物公司。16S rDNA 扩增引物 F8 (5'-GAGAGTTTG ATCCTGGCTCAG-3'), R1492 (5'-CGGCTACCT TGTTACGAC-3')由大连宝生物公司合成。

### 1.3 菌株的富集分离

取新鲜采集的海水样品 5 mL, 海泥样品称量大约 5 g 左右, 海绵样品用无菌手术刀切成小块, 在烧杯中用无菌海水洗涤 3 次, 以除去海绵样品表面附着的微生物和其它杂质, 在无菌研钵中研磨 5 min, 使之成匀浆状, 取 5 mL。将上述准备好的 3 种样品(5 mL 海水、5 g 海泥和 5 mL 海绵均浆)分别加入到无菌的含 100 mL 人工海水培养基(ASM)的 500 mL 三角瓶中, 以原油为唯一碳源进行富集培养, 置于 30 °C、200 r/min 摇床中培

养, 3 d 后观察培养液的浑浊程度, 7 d 为一个周期, 取 5 mL 的富集培养液转接入新鲜的人工海水培养基(ASM)中, 共转接 3 次。将最终的富集物梯度稀释, 涂布平板固体分离培养基 M1 和 M2, 28 °C 培养 7-10 d, 挑取单菌落于 2216E 纯化平板, 多次划线分离单菌, 得到纯培养。

#### 1.4 16S rRNA 基因的 PCR 扩增

将分离菌株在 2216E 培养基上进行试管规模培养 3 d 左右后, 采用改良细菌基因组 DNA 提取方法对纯化后的菌株进行基因组 DNA 提取<sup>[12]</sup>。根据细菌 16S rRNA 保守序列, 合成引物: F8 (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), R1492 (5'-CGGCTACCTTGTTACGAC-3')。反应体系 (50  $\mu$ L): 25  $\mu$ L 2 $\times$ G+C 缓冲液(Mg<sup>2+</sup> plus), 8  $\mu$ L dNTPs 混合物(2.5  $\mu$ mol/L), 1  $\mu$ L 引物 F8 和 R1492 (20  $\mu$ mol/L), 2  $\mu$ L 模板 DNA, 0.5  $\mu$ L LA *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ $\mu$ L)和 13.5  $\mu$ L 的纯水。反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min, 共 30 个循环; 72 °C 5 min<sup>[13-14]</sup>。

#### 1.5 16S rRNA 基因测序分析

16S rRNA 基因扩增产物经 PCR 产物纯化试剂盒纯化后进行测序分析。测序结果与 NCBI 的

GenBank 进行 BLAST 分析, 采用序列分析软件 Phytidit 用 N-J 法进行系统发育树的构建。

## 2 结果

### 2.1 菌株分离结果

从大连湾原油污染海域的海水、海泥和海绵样品中共富集分离到 50 株菌。其中, 有 16 株菌分离自海水样品富集培养液, 20 株菌分离自海泥样品富集培养液, 14 株菌分离自海绵样品富集培养液(表 1, 图 1)。

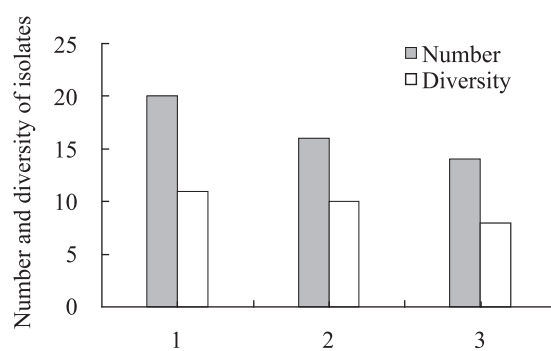


图 1 不同样品来源的菌株数量和多样性

Fig. 1 The number and diversity of strains isolated from marine samples

注: 1: 海泥; 2: 海水; 3: 海绵。

Note: 1: Mud; 2: Water; 3: Sponge.

表 1 大连海域潜在石油降解菌与其最接近的典型菌株间的比对结果及其在石油中的生长情况  
Table 1 Sequence analysis and growth characteristics of 50 bacterial isolates on crude oil

Isolates	16S rRNA Acc. No.	Closest type strains and identity	Source of samples	Crude oil <sup>a</sup>
SN-3-2	JX119039	<i>Idiomarina fontislapidosi</i> (NR_029115) 99%	Mud	++
SN-3-4	JX119040	<i>Marinobacter aquaeolei</i> (AY669169) 99%	Mud	++++
SN-3-9-2	JX119046	<i>Bizionia paragorgiae</i> (NR_025827) 99%	Mud	+
SN-3-9-1	JX119047	<i>Labrenzia aggregate</i> (EU440961) 99%	Mud	+
SN-3-11	JX119041	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> (JQ799097) 99%	Mud	++++
SN-3-1	JX119050	<i>Pseudoalteromonas mariniglutinosa</i> (NR_028992) 97%	Mud	+
OB44-3	JN942144	<i>Luteimonas marina</i> (NR_044458) 95%	Mud	+++
OB38-2	JN942147	<i>Erythrobacter ishigakiensis</i> (AB363004) 97%	Mud	+++
OB56	JN942149	<i>Erythrobacter flavus</i> (NR_025245) 99%	Mud	+
OB53	JN942153	<i>Nitratireductor aquibiodomus</i> (NR_025262) 99%	Mud	++
OB52	JN942154	<i>Halomonas campisalis</i> (GU228480) 98%	Mud	++

(待续)

(续表)				
OB57	JN942151	<i>Microbacterium paraoxydam</i> (EU714377) 99%	Mud	++
OB44-1	JN942146	<i>Microbacterium aquimaris</i> (NR_042656) 99%	Mud	++
OB44-2	JN942145	<i>Microbacterium esteraromaticum</i> (NR_026468) 99%	Mud	++
OA22	JN942130	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i> (NR_029314) 99%	Mud	-
OA16	JN942121	<i>Nocardiopsis alba</i> (NR_026340) 99%	Mud	NT
OA15	JN942122	<i>Nocardiopsis alba</i> (NR_026340) 99%	Mud	NT
OA32	JN942115	<i>Streptomyces griseorubens</i> (EU841555) 99%	Mud	++
OA31	JN942116	<i>Streptomyces litmocidini</i> (HQ909754) 99%	Mud	+
OA30	JN942117	<i>Streptomyces sampsonii</i> (HQ439905) 99%	Mud	+
OA6	JN942112	<i>Streptomyces sampsonii</i> (HQ439905) 99%	Mud	+
SW-2-8	JX119043	<i>Marinobacter aquaeolei</i> (AY669169) 99%	Water	++++
SW-2-6	JX119042	<i>Microbulbifer okinawensis</i> (AB500893) 99%	Water	++
SW-3-3	JX119044	<i>Thalassospira permensis</i> (FJ860275) 99%	Water	+++
SW-3-2	JX119045	<i>Sphingomonas hankookensis</i> (JQ660181) 98%	Water	+++
OB38-1	JN942148	<i>Halomonas nitritophilus</i> (DQ289070) 99%	Water	+
OB51	JN942152	<i>Gordonia bronchialis</i> (HQ316182) 98%	Water	++
OB55	JN942134	<i>Gordonia alkanivorans</i> (AY995556) 99%	Water	++
SW-2-7	JX119048	<i>Altererythrobacter marensis</i> (FM177586) 98%	Water	+
SW-2-4	JX119049	<i>Altererythrobacter epoxidivorans</i> (NR_043706) 97%	Water	+
OA10	JN942125	<i>Nocardiopsis lucentensis</i> (NR_026342) 99%	Water	-
OA21	JN942131	<i>Streptomyces limosus</i> (HQ268538) 99%	Water	+
OA20	JN942132	<i>Streptomyces alboqriseolus</i> (AB184780) 99%	Water	++
OA25	JN942127	<i>Streptomyces griseorubens</i> (EU841555) 99%	Water	++
OA24	JN942128	<i>Streptomyces alboqriseolus</i> (AB184780) 99%	Water	++
OA23	JN942129	<i>Streptomyces anulatus</i> (EU647478) 99%	Water	++
1-1	JN942108	<i>Bacillus sphaericus</i> (DQ350815) 95%	Sponge	+++
2-8	JN942136	<i>Bacillus cereus</i> (HQ833026) 99%	Sponge	++
2-6	JN942138	<i>Bacillus barbaricus</i> (GQ200827) 99%	Sponge	++
2-4	JN942140	<i>Uitellibacter rladivostokensis</i> (NR_028631) 98%	Sponge	++
2-3	JN942141	<i>Paracoccus homiensis</i> (DQ342239) 99%	Sponge	+
2-2	JN942142	<i>Sphingopyxis witflariensis</i> (NR_028010) 98%	Sponge	+
2-5	JN942139	<i>Lysobacter concretionis</i> (AB161359) 96%	Sponge	+++
2-9	JN942135	<i>Nitratireductor aquibiodomus</i> (NR_025262) 98%	Sponge	+++
2-7	JN942137	<i>Nocardiopsis alba</i> (NR_026340) 98%	Sponge	-
OA58	JN942150	<i>Streptomyces albus</i> (AB249915) 99%	Sponge	++++
OA18	JN942133	<i>Streptomyces sampsonii</i> (HQ439905) 99%	Sponge	+
OA1	JN942126	<i>Streptomyces alboqriseolus</i> (AB184780) 99%	Sponge	++
OA2	JN942119	<i>Streptomyces albus</i> (AB249915) 100%	Sponge	+++
OA17	JN942120	<i>Streptomyces limosus</i> (HQ268638) 99%	Sponge	+

Note: <sup>a</sup>: Growth capability with crude oil in ASM medium; NT: Not tested; ++++ ( $OD_{600}>1$ ), +++ ( $OD_{600}>0.6$ ), ++ ( $0.6>OD_{600}>0.2$ ), + ( $OD_{600}<0.2$ ), and - (no growth after a 7-day incubation at 30 °C) indicating the growth capability from strong to weak with crude oil as sole carbon and energy source, measured by optical density at 600 nm.

## 2.2 16S rRNA 序列多样性分析

将测得的 50 株菌的序列信息分别输入 GenBank 中进行比较, 对它们进行属一级的归类,

并构建系统发育树(图 2、3)。结果表明, 50 株菌分别属于 22 个细菌属, 包括 *Marinobacter*, *Idiomarina*, *Microbulbifer*, *Thalassospira*, *Sphingomonas*,

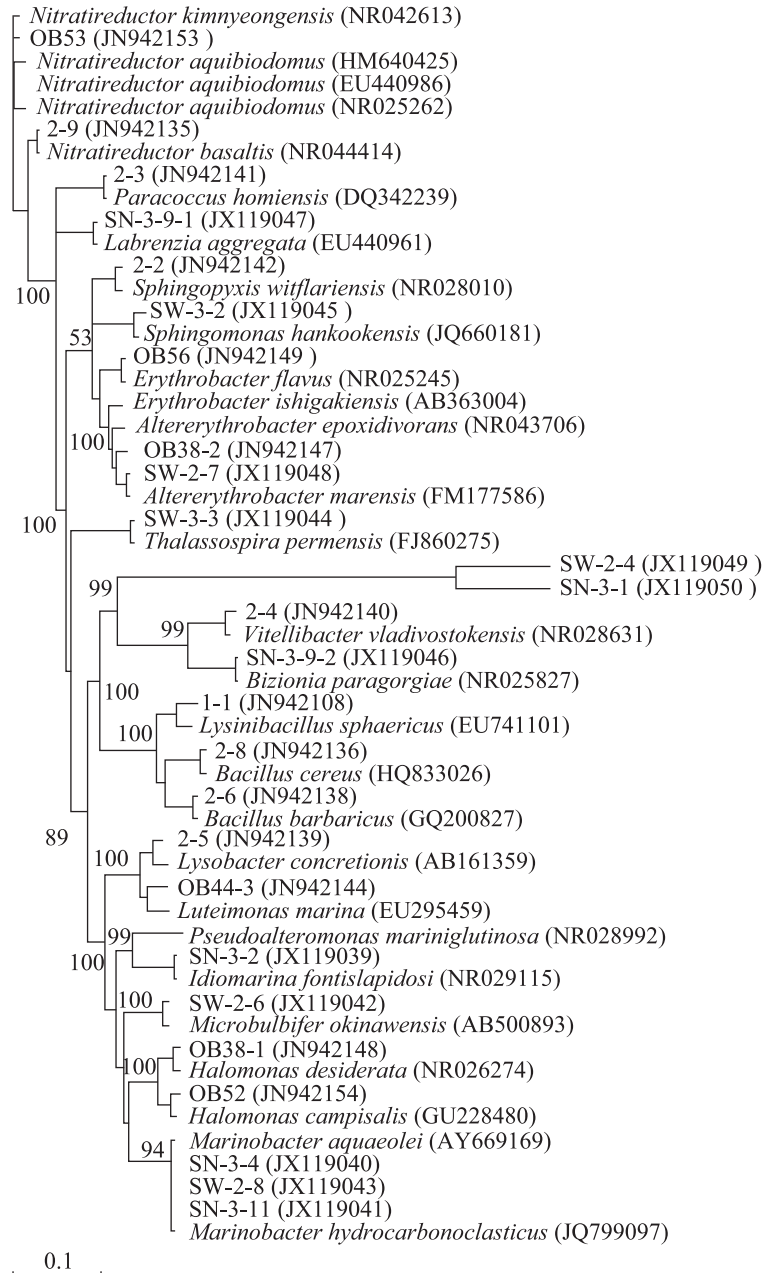


图 2 原油降解菌 16S rRNA 序列 N-J 系统发育树分析

Fig. 2 Neighbor-Joining phylogenetic tree of isolated strains and their closest NCBI (BLASTn) relatives based on 16S rRNA gene sequences

注: 自展值计算用 N-J 法经过 1 000 次重排, 计算值在 50% 以上的标记在相应的分支点上。

Note: Bootstrap values calculated from 1 000 resamplings using Neighbor-Joining are shown at the respective nodes when the calculated values were 50% or greater.

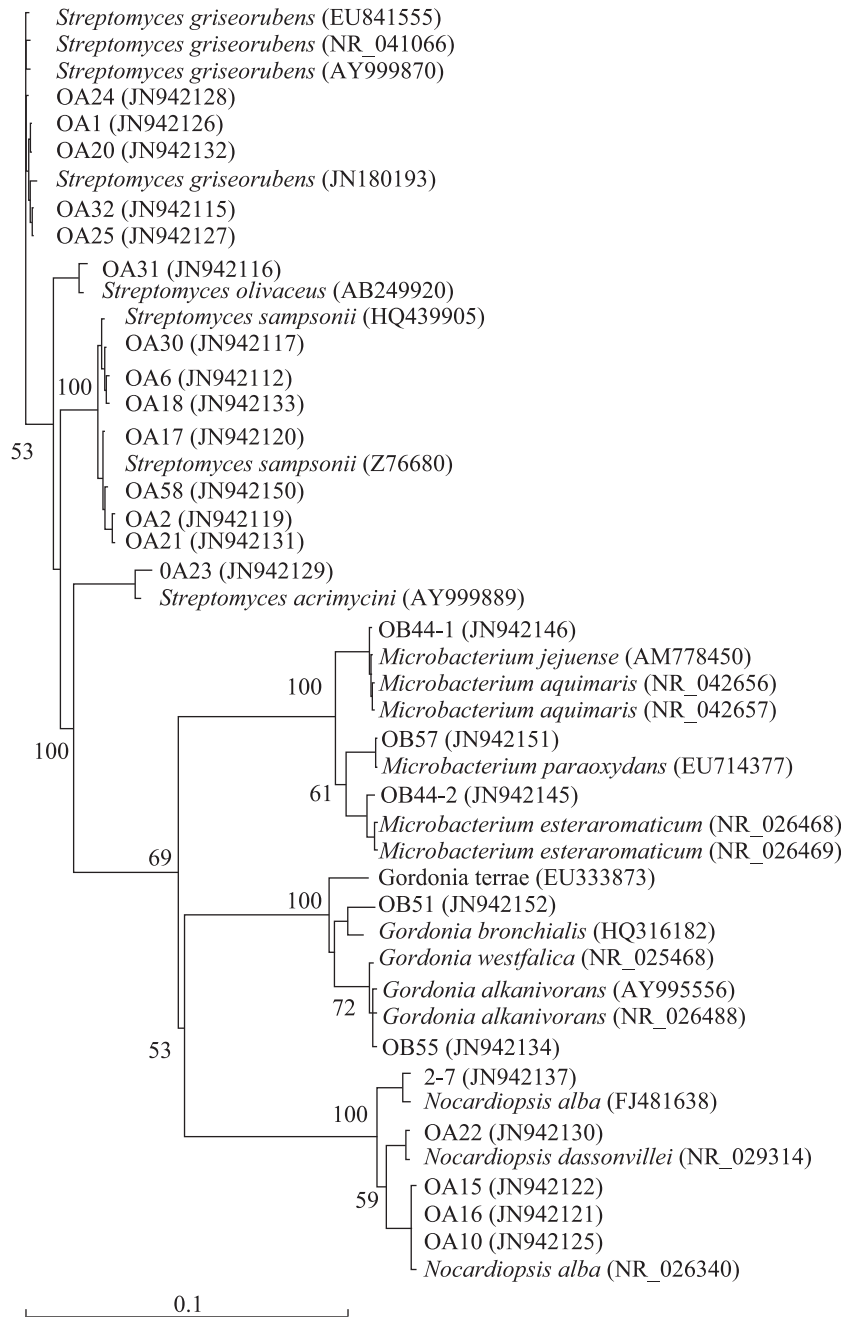


图3 原油降解菌(放线菌) 16S rRNA 序列 N-J 系统发育树分析

Fig. 3 Neighbor-Joining phylogenetic tree of oil-degrading actinobacteria and their closest NCBI (BLASTn) relatives based on 16S rRNA gene sequences

注: 自展值计算用 N-J 法经过 1 000 次重排, 计算值在 50% 以上的标记在相应的分支点上。

Note: Bootstrap values calculated from 1 000 resamplings using Neighbor-Joining are shown at the respective nodes when the calculated values were 50% or greater.

*Bizionia*, *Labrenzia*, *Alterierythrobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Bacillus*, *Uitellibacter*, *Paracoccus*,

*Sphingopyxis*, *Lysobacter*, *Luteimonas*, *Erythrobacter*, *Nitratireductor*, *Halomonas*, *Gordonia*, *Micro-*

*bacterium*, *Nocardiopsis* 及 *Streptomyces*。

分离自海水样品富集培养液的 16 株菌(数量)包括了 9 个属(多样性)的细菌; 分离自海泥样品富集培养液的 20 株菌包括了 11 个属的细菌; 分离自海绵样品富集培养液的 14 株菌包括 8 个属的细菌(表 1)。其中, 有 6 株菌 OB44-3、1-1、SW-2-4、SN-3-1、2-5、OB38-2 的 16S rRNA 序列与最相近的菌株序列一致性仅为 95%–97%, 可能是潜在的新菌。

将这 50 株单菌接种于人工海水培养基(ASM)中, 7 d 后观察其生长情况, 以  $OD_{600}$  表示其生长浓度(表 1)。结果显示绝大部分菌都具有一定的石油降解能力, 菌株 SN-2-4、SN-3-11、SW-3-3 和 SW-3-8 为海洋专性解烃菌, 显示很高的原油降解活性, 其降解特性有待进一步研究。

### 3 讨论

近些年来, 海洋石油降解菌成为研究的热点。研究者们已对大西洋<sup>[15]</sup>、太平洋<sup>[16]</sup>、北冰洋<sup>[17]</sup>和印度洋公海<sup>[11]</sup>等环境中石油降解菌多样性进行了分析。例如, 王丽平等<sup>[18]</sup>从 18 份大西洋表层海水样品富集物中分离到 177 株原油降解菌, 包括 43 个细菌属。王万朋等<sup>[19]</sup>从 10 份厦门岛周围表层海水样品富集物中分离到 44 株原油降解菌, 包括 26 个细菌属。吴常亮等<sup>[11]</sup>从印度洋表层 13 站点海水富集物中分离到 51 株石油降解菌, 包括 29 个细菌属。本研究对大连湾原油污染海域海水、海泥和海绵样品石油降解菌进行分离和多样性分析, 共获得 50 株菌, 包括细菌的 22 个属, 显示出该海域的原油降解菌具有很高的丰富性和多样性。3 个样品来源的降油菌株多样性与文献上的结果进行比较(表 2), 发现从不同海域共同分离到的种属包括 *Marinobacter*、*Idiomarina*、*Microbacterium*、*Pseudoalteromonas*、*Bacillus*、*Erythrobacter*、*Thalassospora*、*Nitratireductor* 和

*Halomonas* 等属, 其中 *Marinobacter* 和 *Thalassospora* 属是专性解烃菌。根据 16S rRNA 基因序列一致性小于 97% 的菌株可能是新种的分类原则<sup>[20]</sup>, 有 6 株菌可能是潜在的新种。

从海水、海泥和海绵 3 份不同富集培养物中分离到的菌株数量没有明显差异, 但是菌株的多样性却明显不同; 从 3 份富集培养物中共同分离到的菌属为链霉菌属和拟诺卡氏菌属, 这可能是由于分离培养过程有利于该种属的菌株生长。其中, 从海泥中分离到的原油降解菌数量和多样性高于从海水和海绵样品中分离到的原油降解菌。一方面, 这一结果说明海泥比海水中富含的微生物更为丰富多样; 另一方面, 可以推测原油污染对海水的影响比海底小(因为在原油污染后一个月的实地考察时发现, 原油污染的海水已变得澄清, 而在泥沙下面约 20 cm 处可见到沉积的黑色油污, 说明污染的原油已在海泥中沉降)。从海绵中分离到的降油菌数量和多样性虽然没有海水和海泥中分离到的多, 但由于海绵底栖滤食性特点, 其体内存在共附生菌群, 当生存环境受到污染时, 推测海绵本身和体内微生物共同产生化学防御功能, 因此能够在原油污染的环境中生存良好。由于仅用平板培养的方法, 同时, 分析的样品数量有限, 不同样品来源的菌株数量和多样性并不能代表其真实情况, 需进一步结合非培养的手段, 例如 PCR-DGGE 或 16S rRNA 克隆文库等方法, 互相补充来揭示其多样性信息。同时, 应该在原油污染 1–5 年(或更长时间)期间内继续采集样品, 跟踪考察原油污染后海洋微生物多样性的变化。

专性解烃菌(The obligate hydrocarbonoclastic bacteria, OHCB)是一类溢油发生前在海洋环境中丰度很低甚至低于检测限, 溢油发生后可以迅速增殖并以石油组分为唯一碳源和能源的微生物<sup>[21–22]</sup>。主要包括 *Alcanivorax*、*Cycloclasticus*,

表2 大连海域原油降解菌多样性与其它海域中的降解菌比对结果

Table 2 The diversity of crude oil-degrading bacteria from Dalian Bay compared with that from other Ocean

Atlantic Ocean seawater <sup>[18]</sup>	Pacific Ocean seawater <sup>[19]</sup>	Indian Ocean seawater <sup>[11]</sup>	Dalian Bay seawater	Dalian Bay mud	Dalian Bay sponge
<i>Alcanivorax</i>	<i>Alcanivorax</i>	<i>Alcanivorax</i>	<i>Alierierythrobacter</i>	<i>Bizionia</i>	<i>Bacillus</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Achromobacter</i>	<i>Achromobacter</i>	<i>Gordonia</i>	<i>Erythrobacter</i>	<i>Lysobacter</i>
<i>Brachybacterium</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Halomonas</i>	<i>Halomonas</i>	<i>Nitratireductor</i>
<i>Erythrobacter</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Arthrobacter</i>	<i>Microbulbifer</i>	<i>Idiomarina</i>	<i>Nocardioopsis</i>
<i>Gordonia</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Cellulomonas</i>	<i>Marinobacter</i>	<i>Labrenzia</i>	<i>Paracoccus</i>
<i>Halomonas</i>	<i>Castellaniella</i>	<i>Dyella</i>	<i>Nocardioopsis</i>	<i>Luteimonas</i>	<i>Sphingopyxis</i>
<i>Idiomarina</i>	<i>Donghicola</i>	<i>Erythrobacter</i>	<i>Sphingomona</i>	<i>Microbacterium</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Kordiimonas</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Gallaecimonas</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Nocardioopsis</i>	<i>Uitellibacter</i>
<i>Leifsonia</i>	<i>Gallaecimonas</i>	<i>Halomonas</i>	<i>Thalassospira</i>	<i>Nitratireductor</i>	
<i>Marinobacter</i>	<i>Idiomarina</i>	<i>Idiomarina</i>		<i>Streptomyces</i>	
<i>Martelevella</i>	<i>Joostella</i>	<i>Knoellia</i>		<i>Pseudoalteromonas</i>	
<i>Mesorhizobium</i>	<i>Leucobacter</i>	<i>Marinobacter</i>			
<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacterium</i>	<i>Modicisalibacter</i>			
<i>Novosphingobium</i>	<i>Nitratireductor</i>	<i>Micrococcus</i>			
<i>Ochrobactrum</i>	<i>Oceanicola</i>	<i>Martelevella</i>			
<i>Parvibaculum</i>	<i>Ochrobactrum</i>	<i>Mycoplana</i>			
<i>Salinisphaera</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Mesoflavibacter</i>			
<i>Solimonas</i>	<i>Paracoccus</i>	<i>Novosphingobium</i>			
<i>Sphingobium</i>	<i>Phyllobacterium</i>	<i>Ochrobactrum</i>			
<i>Spingopyxis</i>	<i>Pusillimonas</i>	<i>Parvibacterium</i>			
<i>Tetrathiobacter</i>	<i>Stappia</i>	<i>Phyllobacterium</i>			
	<i>Tistrella</i>	<i>Pelagibaca</i>			
	<i>Zunongwangia</i>	<i>Sinomonas</i>			
		<i>Sphingobium</i>			
		<i>Salinicola</i>			
		<i>Salinisphaera</i>			

*Marinobacter*, *Marinobacterium*, *Neptunomonas*, *Oleispira*, *Thalassolituus* 等属的细菌。本研究分离到3株专性解烃菌 SW-2-8、SN-3-4 和 SN-3-11, 它们属于 *Marinobacter* 菌属, 与它们的 16S rRNA 基因序列一致性最近的菌株分别是 *Marinobacter aquaolei* (AY669169)<sup>[23]</sup> 和 *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (JQ799097)。 *Marinobacter* 菌属是一类非常重要的海洋烃降解菌, 主要以烷烃降解为主, 单菌降解实验表明它们具有较高的原油降解活性。 *Thalassospira* 菌属是另一个重要的石油降解菌, 主要以芳香烃降解为主。本研究分离

到的菌株 SW-3-3 属于 *Thalassospira* 菌属, 与其 16S rRNA 基因序列一致性最近的菌株为 *Thalassospira permensis* (FJ860275)<sup>[24]</sup>。

## 4 结论

本文通过富集培养的方法, 从大连湾原油污染海域分离到 50 株降解菌, 多样性分析表明包括了 22 个细菌属, 其中有 6 株菌的 16S rRNA 基因序列一致性与最相近的菌株小于 97%, 可能是潜在的新菌。同时, 获得了 4 株海洋专性解烃菌, 并进一步研究它们的降解特性, 为海洋石油污染



的生物治理提供新资源。

## 参考文献

- [1] Swannell RP, Lee K, McDonagh M. Field evaluation of marine oil spill bioremediation[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1996, 60(2): 342–365.
- [2] Head IM, Swannell RP. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 1999, 10(3): 234–239.
- [3] Leahy JG, Colwell RR. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1990, 54(3): 305–315.
- [4] Juhasz AL, Naidu R. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene[J]. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2000, 45(1/2): 57–88.
- [5] Gentile G, Giuliano L, D'Auria G, et al. Study of bacterial communities in Antarctic coastal waters by a combination of 16S rRNA and 16S rDNA sequencing[J]. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(12): 2150–2161.
- [6] Judson RS, Martin MT, Reif DM, et al. Analysis of eight oil spill dispersants using rapid, *in vitro* tests for endocrine and other biological activity[J]. *Environmental Science and Technology*, 2010, 44(15): 5979–5985.
- [7] Camilli R, Reddy CM, Yoerger DR, et al. Tracking hydrocarbon plume transport and biodegradation at deepwater horizon[J]. *Science*, 2010, 330(6001): 201–204.
- [8] Wilkinson CR, Fay P. Nitrogen fixation in coral reef sponges with symbiotic cyanobacteria[J]. *Nature*, 1979, 279(5713): 527–529.
- [9] Unson MD, Holland ND, Faulkner DJ. A brominated secondary metabolite synthesized by the cyanobacterial symbiont of a marine sponge and accumulation of the crystalline metabolite in the sponge tissue[J]. *Marine Biology*, 1994, 199(1): 1–11.
- [10] Liu CL, Shao ZZ. *Alcanivorax dieselolei* sp. nov., a novel alkane-degrading bacterium isolated from sea water and deep-sea sediment[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(3): 1181–1186.
- [11] 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, 50(9): 1218–1225.
- [12] Lee YK, Kim HW, Liu CL, et al. A simple method for DNA extraction from marine bacteria that produce extracellular materials[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 52(2): 245–250.
- [13] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(2): 697–703.
- [14] Reysenbach AL, Giver LJ, Wickham GS, et al. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(10): 3417–3418.
- [15] Brakstad OG, Lødeng AGG. Microbial diversity during biodegradation of crude oil in seawater from the North Sea[J]. *Microbial Ecology*, 2005, 49(1): 94–103.
- [16] Brown MV, Philip GK, Bunge JA, et al. Microbial community structure in the North Pacific Ocean[J]. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 2009, 3(12): 1374–1386.
- [17] Groudieva T, Kambourava M, Yusef H, et al. Diversity and cold-active hydrolytic enzymes of culturable bacteria associated with Arctic sea ice, Spitzbergen[J]. *Extremophiles*, 2004, 8(6): 475–488.
- [18] Wang LP, Wang WP, Lai QL, et al. Gene diversity of CYP153A and *AlkB* alkane hydroxylases in oil-degrading bacteria isolated from the Atlantic Ocean[J]. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(5): 1230–1242.
- [19] Wang WP, Wang LP, Shao ZZ. Diversity and abundance of Oil-Degrading bacteria and alkane Hydroxylase (*alkB*) genes in the subtropical seawater of Xiamen Island[J]. *Microbial Ecology*, 2010, 60(2): 429–439.
- [20] Stackebrandt E, Goebel BM. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1994, 44(4): 846–849.
- [21] Head IM, Jones DM, Röling WFM. Marine microorganisms make a meal of oil[J]. *Nature Review Microbiology*, 2006, 4(3): 173–182.
- [22] Swannell RP, Lee K, McDonagh M. Field evaluations of marine oil spill bioremediation[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1996, 60(2): 342–365.
- [23] Huu NB, Denner EB, Ha DT, et al. *Marinobacter aquaeolei* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a Vietnamese oil-producing well[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1999, 49(2): 367–375.
- [24] Plotnikova EG, Anan'ina LN, Krausova VI, et al. *Thalassospira permensis* sp. nov., a new terrestrial halotolerant bacterium isolated from a naphthalene-utilizing microbial consortium[J]. *Microbiology*, 2011, 80(5): 691–699.