

## 一株石油烃降解菌新种 *Marinobacter* sp. PY97S 的鉴定

李倩<sup>1</sup>, 崔志松<sup>2</sup>, 赵爱芬<sup>1</sup>, 高伟<sup>2</sup>, 郑立<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>鲁东大学生命科学学院, 烟台 264025

<sup>2</sup>国家海洋局第一海洋研究所海洋生态研究中心, 青岛 266061

**摘要:**【目的】为了对 1 株从黄海沉积物中分离到的石油烃降解菌新种 PY97S 进行分类学鉴定。【方法】采用 16S rRNA 基因序列同源性分析、生理生化指标测定、抗生素抗性实验、DNA G + C 含量测定、全细胞脂肪酸组成测定、碳源利用实验、呼吸醌测定以及 DNA 杂交实验等多种方法对该菌株进行鉴定, 并通过降解实验测定其对烷烃的利用情况。【结果】菌株 PY97S 为海杆菌 (*Marinobacter*), 革兰氏阴性, 接触酶阳性, 氧化酶阳性, 主要呼吸醌为 Q-9。在 GenBank 中与其 16S rRNA 基因序列相似度最高的模式株为 *Marinobacter koreensis* DD-M3<sup>T</sup> (96.93%), 两者 DNA-DNA 同源性仅为 46.7%。菌株 PY97S 的温度生长范围为 15°C - 35°C (最适为 30°C), NaCl 浓度生长范围是 0% - 10% (最适为 0%), 初始 pH 生长范围为 pH 6.0 - 9.0 (最适为初始 pH7.0)。该菌株可以利用多种糖类和有机酸类的碳源, 并对氨基青霉素、氧哌嗪青霉素等多种抗生素敏感。其 DNA G + C 含量为 48.2 mol%。其主要脂肪酸组成为 2-methyl C15:0 (29.97%)、C16:1 $\omega$ 7c (27.22%)、C12:0 (22.22%) 和 C16:1 $\omega$ 9c (5.73%)。【结论】菌株 PY97S 是 1 株能够降解多种多环芳烃和烷烃的海洋石油烃降解菌新种, 具有应用到溢油污染海洋环境生物修复的潜力。

**关键词:** 石油烃, 多环芳烃, 烷烃, 生物降解, 菌种鉴定

**中图分类号:**      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2011) 05-0648-08

近年来, 世界石油资源分布的不均匀性和各个国家对石油需求的不同使海上石油运输业快速发展, 增加了溢油事故发生的频率。石油烃的主要化学成分包括烷烃、苯、甲苯、二甲苯和复杂芳香烃等; 有些成分有致癌、致突变、致畸作用, 并能通过食物链在动植物及人体内富集, 已被列为优先控制污染物<sup>[1]</sup>。石油进入海洋后, 一些轻组分可直接挥发进入大气; 一小部分海洋表面石油在紫外线作用下可发生光化学降解, 但速度极慢; 绝大部分石油需要通

过微生物降解得到净化<sup>[2]</sup>。生物修复技术为这一问题的解决提供了一个很有前景的方案。从海洋环境中筛选高效土著降解菌有利于直接应用到石油污染生物修复中, 并获得较好效果<sup>[3]</sup>。

在海洋土著降解菌中有 1 类“专性解烃菌”(the obligate hydrocarbonoclastic bacteria, OHCB), 它们是溢油发生前在海洋环境中丰度很低甚至在检测限以下, 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>[4-5]</sup>。迄今为止报道过的海洋

**基金项目:** 国家自然科学基金 (40906062; 41076108); 公益性行业科研专项经费项目 (200705011); 国家海洋局青年海洋科学基金 (2009114); 海洋一所基本科研业务费专项资金 (2010G23)

\* 通信作者。Tel: +86-532-88961802; Fax: +86-532-88963259; E-mail: zhengli@fio.org.cn

**作者简介:** 李倩 (1985 -), 女, 山东济宁人, 硕士研究生, 主要从事溢油生物修复方面的研究工作。E-mail: liqian\_850730@163.com

**收稿日期:** 2010-11-09; **修回日期:** 2011-01-31

专性解烃菌有 *Alcanivorax* (食烷菌属)、*Cycloclasticus* (解环菌属)、*Marinobacter* (海杆菌属)、*Marinobacterium* (海细菌属)、*Neptunomonas*、*Oleispira* (油螺旋菌属)、*Thalassolituus* 等属的细菌<sup>[6-10]</sup>。目前对这类降解菌的生理生化、降解特性及分子生物学研究逐渐成为研究热点。

我们研究小组从黄海沉积物中分离到 1 株海洋专性解烃菌 *Marinobacter* sp. PY97S, 前期研究发现它能够以菲、蒽等多种 PAHs 为唯一碳源和能源生长<sup>[11]</sup>。本文采用基于 16S rRNA 基因的系统发育学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, 结果表明菌株 *Marinobacter* sp. PY97S 是海杆菌属的一个石油烃降解菌新种。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株来源:** 实验菌株 PY97S 是从黄海沉积物中分离到的 1 株 PAHs 降解菌<sup>[11]</sup>。杂交实验所用菌株 *Marinobacter koreensis* DD-M3<sup>T</sup> 由韩国农业菌种保藏中心 (KACC) 提供。

**1.1.2 培养基:** ONR7a 培养基是一种模拟海水天然组成的培养基<sup>[12]</sup>。ONR7a + M8 培养基用于生理实验<sup>[13]</sup>; ONR7a + 正构烷烃用于降解实验; 2216E 培养基: 蛋白胨 5 g, 酵母膏 1 g, 磷酸高铁 0.01 g, 陈海水 1 L, pH 7.6 - 7.8, 用于 Biolog 微生物碳源利用测定实验。

**1.1.3 脂肪酸提取所用溶液:** 溶液 I: 45 g 氢氧化钠溶于 150 mL 甲醇和 150 mL 蒸馏水; 溶液 II: 190 mL 浓盐酸、溶于 275 mL 甲醇和 135 mL 蒸馏水; 溶液 III: 200 mL 正己烷与 200 mL 乙醚均匀混合; 溶液 IV: 10.8 g 氢氧化钠溶于 900 mL 蒸馏水; 溶液 V: 饱和氯化钠溶液。

**1.1.4 正构烷烃:** 十一烷和十九烷购于 Fluka 公司, 十四烷、十六烷、十七烷、十八烷、二十烷、二十二烷、二十四烷均购于 Alfa Aesar 公司。上述正构烷烃除十六烷的纯度为 98.50% 外, 其余均为 99%。

### 1.2 16S rRNA 基因系统发育分析

对菌株 PY97S 的系统发育学分析参考我们以前的报道, 详见文献<sup>[14]</sup>。

### 1.3 生化指标测定

革兰氏染色、接触酶、氧化酶等生化指标的测定参照相关细菌鉴定手册进行<sup>[15-16]</sup>。

### 1.4 菌株培养特征分析

通过 3 组实验分析菌株 PY97S 在不同温度 (4℃、15℃、20℃、25℃、30℃、35℃、45℃)、不同 NaCl 浓度 (0%、0.5%、1%、5%、7%、10%、15%、20%) 和培养基不同初始 pH (pH5、pH5.5、pH6、pH6.5、pH7、pH7.5、pH8、pH8.5、pH9、pH9.5、pH10、pH10.5) 条件下的培养特征。其中温度和 NaCl 浓度实验的初始 pH 均为 pH 7.6 - 7.8, 而 NaCl 浓度和初始 pH 影响实验的温度均为 25℃。将活化后的菌株按 0.2% 的接种量接入 ONR + M8 培养基中, 在 150 r/min 的条件下培养, 每隔 24 h 取样, 用酶标仪 (Rayto RT-2100C) 测定培养物的吸光度 ( $OD_{600}$ ), 以追踪菌株的生长状况。上述每种处理设 3 个平行。

### 1.5 菌株抗性实验

先将菌株 PY97S 均匀涂布于 ONR7a + M8 平板, 再将药敏纸片 (杭州微生物试剂有限公司, 直径 6 mm) 贴于平板培养基表面, 于 25℃ 培养 48 h, 然后观察纸片周围有无抑菌圈, 测定该菌株对 20 种抗生素的敏感性。实验设 2 个重复。

### 1.6 基因组 DNA 的提取和 DNA G + C 含量测定

用化学裂解法<sup>[17]</sup>提取菌株 PY97S 的基因组 DNA, 采用 Mesbah 报道的 HPLC 法测定脱氧核糖核苷酸的浓度<sup>[18]</sup>, 根据以下公式计算基因组 DNA 的 G + C 含量:

$$(G + C) \text{ mol\%} = 1 / [1 + Y \times (VT/VG)];$$

$$Y = Vg \times Mt / (Vt \times Mg).$$

V 代表峰面积, M 代表 mol; t 和 g 代表标准品的 T 和 G。

### 1.7 全细胞脂肪酸含量的测定

先将菌株 PY97S 接种于 10 mL ONR7a + M8 培养基, 培养获取细菌细胞, 对细菌细胞的前处理方法根据相关参考文献进行<sup>[19]</sup>。采用气相色谱-质谱联用 (美国 Agilent Technologies 公司 7890aGC-5975cMS) 对样品中的脂肪酸组成进行分析。色谱条件: 色谱柱为 HP-5MS 柱, 长 30 m, 内径 0.25 mm, 液膜厚度 0.25 μm。采用二阶程序升温: 起始温度 50℃, 以 30℃/min 升至 200℃, 随后以 5℃/min 升至 215℃, 再以 1℃/min 升至 220℃, 维持 2 min, 最后以 10℃/min 升至 280℃, 维持 2 min。进样口温度 260℃, 离子源温度为 200℃, 四极杆温度为 150℃。

进样量1  $\mu\text{L}$ ,分流进样模式(分流比 100:1),载气为氦气(99.999%)。

### 1.8 Biolog 碳源利用测试

利用 Biolog 微生物自动鉴定系统测试菌株 PY97S 对 95 种碳源的利用情况。先将待测菌株的纯培养菌落制成细胞悬液,然后接种于 GN2 鉴定板上培养,再用 Biolog Microstation 软件读取数据,确定碳源利用情况。

### 1.9 菌株呼吸醌的测定

细菌呼吸醌的抽提和后期 HPLC 分析方法按照参考文献进行<sup>[20]</sup>。

### 1.10 DNA 杂交实验

采用罗氏应用科学诊断股份有限公司的 DNA 杂交试剂盒(DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I)进行探针标记及 DNA 杂交实验,并参考相关文献将目的菌株 PY97S 和模式株 DD-M3<sup>T</sup> 进行杂交<sup>[21]</sup>。

### 1.11 烷烃降解能力测定

在 ONR7a 培养基中分别添加 9 种正构烷烃

(nC11、nC14、nC16、nC17、nC18、nC19、nC20、nC22、nC24)作为唯一碳源和能源,其初始浓度均为 4%,室温下 150 r/min 摇床培养,隔天观察培养基浑浊度,测定菌株 PY97S 对烷烃的降解能力。

## 2 结果

### 2.1 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析

经 NCBI BLASTN 网上软件比对,与菌株 PY97S 亲缘关系最近的模式株依次是 *Marinobacter koreensis* DD-M3<sup>T</sup> (96.93%), *Marinobacter bryozoorum* 50-11<sup>T</sup> (96.58%) 和 *Marinobacter lacisalsi* FP2.5<sup>T</sup> (96.51%)。基于菌株 PY97S 及 GenBank 中与其亲缘关系最近的模式株及参考菌株的 16S rRNA 基因序列(约 1360 bp)进行了系统发育学分析。利用 MEGA4 和 DNAMAN 等辅助软件构建系统发育树(图 1),由于菌株 PY97S 与系统发育树上亲缘关系最近模式株的相似度均小于 97%,所以它很有可能是一个新种。

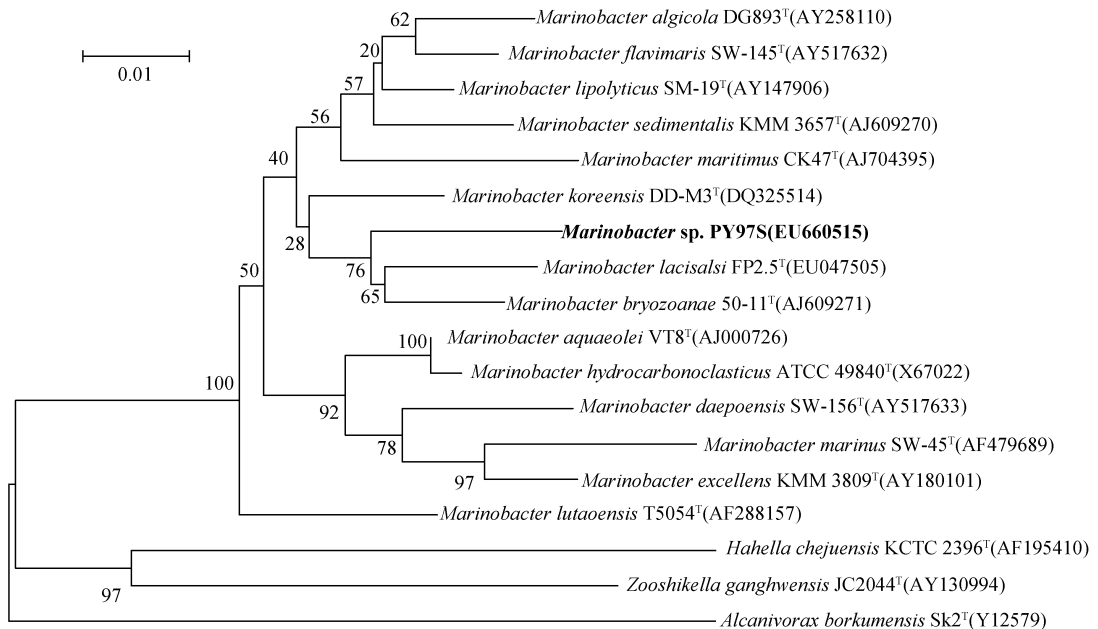


图 1 基于 16S rRNA 基因序列相似度构建菌株 *Marinobacter sp. PY97S* 的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic analysis of *Marinobacter sp. PY97S* (EU660515). The phylogenetic tree was constructed based on 16S rRNA gene sequences fragments (about 1360 bp). Reference used in the phylogenetic analysis was retrieved from database with accession numbers showed in parentheses. The numbers at the branch nodes are bootstrap values based on 1000 repetitions. Bootstrap values are shown. Scale bar equals approximately 1% nucleotide divergence.

## 2.2 菌株 PY97S 的生化特征

菌株 PY97S 为革兰氏阴性细菌,接触酶阳性,氧化酶阳性。

## 2.3 菌株 PY97S 的培养特征

**2.3.1 生长温度范围:**在不同温度条件下,菌株 PY97S 在 4℃ 和 45℃ 下基本不生长;在 15℃ - 25℃ 下生长较为缓慢,到达稳定期的生物量较小;在 30℃ - 35℃ 下生长适宜,到达稳定期的生物量较大。其中以 30℃ 为最适生长温度。

**2.3.2 NaCl 生长浓度范围:**在不同 NaCl 浓度条件下,菌株 PY97S 在 NaCl 浓度较高时(15% - 20%)基本不生长;在 NaCl 浓度为 5% - 10% 时生长缓慢,到达稳定期的生物量较小;在 NaCl 浓度为 0% - 1% 时生长较快,到达稳定期的生物量较大。其最适 NaCl 生长浓度为 0%。

**2.3.3 培养基初始 pH 对菌株生长的影响:**在不同初始 pH 条件下,菌株 PY97S 在初始 pH 较低(pH 5.0 - pH 5.5)和较高时(pH 10.5)基本不生长;在初始 pH 9.0 - pH 10.0 时生长缓慢,到达稳定期的生物量较小;在初始 pH 6.0 - pH 8.5 时生长较好,到达稳定期的生物量较大。其最适初始 pH 为 pH 7.0。

## 2.4 菌株敏感性实验结果

测定了菌株 PY97S 对 20 种药物的敏感性。结果显示,该菌株对氧哌嗪青霉素(Piperacillin)、复达欣(Fortum)、红霉素(Erythromycin)、羧苄青霉素(Carbenicillin)、氨苄青霉素(Ampicillin)、先锋霉素 IV(Vanguard ADM IV)、先锋霉素 VI(Vanguard ADM VI)、四环素(Tetracycline)、先锋必素(Cefoperazone)、苯唑青霉素(Oxacillin)、菌必治(Ceftriaxone)、新霉素(Neomycin)敏感;而对头孢呋肟(Cefuroxime)、美满霉素(Minocycline)、庆大霉素(Gentamicin)、卡那霉素(Kanamycin)、丁胺卡那霉素(Amikacin)、强力霉素(Doxycycline)、先锋霉素 V(Vanguard ADM V)、青霉素(Penicillin)不敏感。

## 2.5 DNA G + C 含量和 DNA 杂交实验结果

采用 HPLC 外标法并根据公式计算得到该菌的基因组 DNA G + C 含量为 48.2 mol%。

菌株 PY97S 与模式株 DD-M3<sup>T</sup> 的 DNA-DNA 杂交实验结果显示,两者的同源率为 46.7%。

## 2.6 呼吸醌的测定和细胞脂肪酸组成测定结果

该菌株的主要呼吸醌为 Q-9。

菌株 PY97S 的主要脂肪酸成分(>5%)为 2-methylC15:0(29.97%)、C16:1 $\omega$ 7c(27.22%)、C12:0(22.22%)、3-methylC16:0(7.29%)和 C18:1 $\omega$ 9c(5.73%),它们占脂肪酸总量的 92.43%。

## 2.7 Biolog 板碳源利用情况

通过 Biolog 微生物自动鉴定系统得到其对 95 种碳源的利用结果。结果显示,该菌可以利用阿拉伯糖、D-果糖、乙酸、柠檬酸等多种糖类和有机酸类的碳源,还可以利用鸟氨酸、脯氨酸等少数几种氨基酸(表 1)。

## 2.8 菌株 PY97S 对烷烃的降解实验结果

菌株 PY97S 能够分别以 9 种正构烷烃(nC11、nC14、nC16、nC17、nC18、nC19、nC20、nC22、nC24)为唯一碳源和能源生长。

## 3 讨论

Biolog 微生物自动鉴定系统(美国 Hwyyword Biolog 公司)数据库中的标准菌种信息主要来自于陆源微生物,而本研究中的海洋细菌在生理生化特征上与之有明显差异,较难获得匹配度较高的鉴定结果。通过 Biolog 碳源利用实验,一方面可以快速得到某些重要海洋菌种资源的生长碳源结果,另一方面可以扩充该鉴定系统的数据库。

菌株 PY97S 是我们研究小组从黄海沉积物中分离到的 1 株 PAHs 降解菌,16S rRNA 基因(EU660515)BLAST 比对结果表明它属于海杆菌属(*Marinobacter*)。其细胞形态为短杆状,其菌体平均大小为 1.13  $\mu$ m  $\times$  0.53  $\mu$ m,能够降解从萘到苯并[ $\alpha$ ]芘在内的 11 种 PAHs,对典型 PAHs 菲的降解率可达到 99%(菲初始浓度为 0.2 g/L,10 d)<sup>[11]</sup>。

菌株 PY97S 与系统发育树上亲缘关系较近的海杆菌属模式株的多数生理特征都是相似的(表 2),说明它具有海杆菌属细菌的一般特征。在 GenBank 中,与菌株 PY97S 亲缘关系最近的是菌株 *Marinobacter* sp. GPM2512(AJ871937, 98.60%),然而该菌株未作分类学鉴定,但它能够以 4 种正构烷烃(nC6、nC14、nC20、nC21)和姥鲛烷作为唯一碳源

表 1 菌株 PY97S 对 95 种碳源的利用结果

Table 1 Utilization of different carbon sources on GN2 plates by strain PY97S

Carbon sources	Results	Carbon sources	Results	Carbon sources	Results	Carbon sources	Results
Water	-	$\beta$ -Methyl-D-Glucoside	-	p-Hydroxy Phenylacetic Acid	-	L-Histidine	-
Dextrin	-	D-Psicose	-	Itaconic Acid	-	Hydroxy-L-Proline	-
Glycogen	-	D-Raffinose	-	$\alpha$ -Keto Butyric Acid	-	L-Leucine	-
Tween 40	+	L-Rhamnose	+	$\alpha$ -Keto Glutaric Acid	-	L-Ornithine	+
Tween 80	+	D-Sorbitol	-	$\alpha$ -Keto Valeric Acid	+	L-Phenylalanine	-
N-Acetyl-D-Galactosamine	+	Sucrose	-	D, L-Lactic Acid	+	L-proline	+
N-Acetyl-D-Glucosamine	+	D-Trehalose	-	Malonic Acid	-	L-Pyrogutamic Acid	+
Adonitol	-	Turanose	+	Propionic Acid	-	D-Serine	-
L-Arabinose	-	Xylitol	+	Quinic Acid	-	L-Serine	-
D-Arabitol	-	Methyl Pyruvate	+	D-Saccharic Acid	-	L-Threonine	-
D-cellobiose	-	Mono-Methyl-Succinate	-	Sebacic Acid	+	D, L-Carnitine	-
i-Erythritol	-	Acetic Acid	+	Succinic Acid	+	$\gamma$ -Amino Butyric Acid	-
D-Fructose	-	Cis-Aconitic Acid	-	Bromo Succinic Acid	-	Urocanic Acid	-
L-Fucose	-	Citric Acid	+	Succinamic Acid	+	Inosine	-
D-Galactose	+	Formic Acid	+	Glucuronamide	+	Uridine	-
Gentiobiose	-	D-Galactonic Acid Lactone	+	L-Alaninamide	-	Thymidine	-
$\alpha$ -D-Glucose	-	D-Galacturonic Acid	-	D-Alanine	-	Phenyethylamine	-
m-Inositol	-	D-Gluconic Acid	-	L-Alanine	+	Putrescine	-
$\alpha$ -D-Lactose	+	D-Glucosaminic Acid	-	L-Alanyl-glycine	-	2-Aminoethanol	-
Lactulose	-	D-Glucuronic Acid	+	L-Asparagine	-	2,3-Butanediol	-
Maltose	-	$\alpha$ -Hydroxy Butyric Acid	-	L-Aspartic Acid	-	Glycerol	-
D-Mannitol	-	$\beta$ -Hydroxy Butyric Acid	+	L-Glutamic Acid	+	D, L- $\alpha$ -glycerol Phosphate	-
D-Mannose	+	$\gamma$ -Hydroxy Butyric Acid	-	Glycyl-L-Aspartic Acid	-	Glucose-1-Phosphate	-
D-Melibiose	-	$\alpha$ -Cyclodextrin	+	Glycyl-L-Glutamic Acid	-	Glucose-6-Phosphate	-

+ : Growth; - : No growth.

表 2 菌株 PY97S 和海杆菌属近缘模式株的鉴别特征

Table 2 Differential characteristics of strain PY97S and type strains of phylogenetically related *Marinobacter* species

Characteristics	1	2	3	4	5
Cell size ( $\mu\text{m}$ )	1.13 $\times$ 0.53	0.3-0.5 $\times$ 1.5-3	1.0-1.3 $\times$ 0.4-0.5	0.6-0.9 $\times$ 1.9-2.4	1-1.5 (d)
Growth temperature:					
Minimum ( $^{\circ}\text{C}$ )	15	10	7	20	4
Maximum ( $^{\circ}\text{C}$ )	35	45	42	40	35
NaCl growth range (%)	0 ~ 10	0.5 ~ 20	1.0 ~ 18	3 ~ 15	1 ~ 15
pH growth range	6 ~ 9	5 ~ 9	ND	5 ~ 9	6 ~ 10
Catalase test	+	ND	+	+	+
oxidase test	+	+	+	+	+
Utilization of:					
Glycerol	ND	-	+	-	-
D-Fructose	+	-	ND	-	-
D-Glucose	+	-	-	-	+
Cellobiose	-	ND	+	-	-
Maltose	+	-	ND	ND	-
D-Mannitol	+	-	+	-	-
Sucrose	-	-	+	-	+
Citric acid	-	-	-	+	-
DL-Lactic acid	+	+	-	+	ND
cis-Aconitic acid	+	-	ND	ND	ND
D-Gluconic acid	+	-	ND	+	-
L-Alanine	+	-	ND	-	-
L-Proline	+	+	-	ND	-
DNA G + C content (mol%)	48.2	54.1	59.6	58.6	60.6

Species/strains: 1. PY97S; 2. DD-M3<sup>T</sup>; 3. 50-11<sup>T</sup>; 4. FP2. 5<sup>T</sup>; 5. JSM078120<sup>T</sup> Data were obtained from this study and the following references: Byung-Yong Kim et al. (2006)<sup>[20]</sup>, Lyudmila A. Romanenko et al. (2005)<sup>[21]</sup>, M. J. Gauthier et al. (1992)<sup>[22]</sup>, Zhuang DC et al. (2009)<sup>[23]</sup>. +, Positive; -, negative; ND, not determined.

和能源生长;而菌株 PY97S 可以利用 9 种正构烷烃 (nC11、nC14、nC16、nC17、nC18、nC19、nC20、nC22、nC24) 为唯一碳源和能源生长,此外它还能利用 11 种 PAHs<sup>[11]</sup>。由此可见,两者的石油烃利用范围存在一定差异。在 GenBank 中,与菌株 PY97S 亲缘关系最近的模式株依次是 Kim 等人报道的 *Marinobacter koreensis* DD-M3<sup>T</sup> (DQ325514, 96.93%)、*Marinobacter bryozorum* 50-11<sup>T</sup> (96.58%) 和 *Marinobacter lacisalsi* FP2.5<sup>T</sup> (96.51%),但它们均不降解石油烃;虽然上述菌株都属于海杆菌属,但

菌株 PY97S 与 3 个模式株之间的 16S rRNA 基因相似度较低 (<97%),初步推测为该属新种。

进一步的研究结果显示,菌株 PY97S 与 3 个模式株之间的 DNA G + C 含量(表 2)、细胞主要脂肪酸组成均存在较大差异(表 3);此外,菌株 PY97S 与其 GenBank 中亲缘关系最近的模式株 DD-M3<sup>T</sup> 的同源性仅为 46.7%。最后,它们在生长条件、底物利用等方面也有一定差异。上述差异充分显示出菌株 PY97S 在该属细菌中的独立性,即它是海杆菌属中一个石油烃降解菌新种。

表 3 菌株 PY97S 和 DD-M3<sup>T</sup> 的主要脂肪酸组成比较

Table 3 Comparison of the predominant fatty acid of strain PY97S and DD-M3<sup>T</sup>

PY97S		DD-M3 <sup>T</sup>	
Fatty acid	Proportion	Fatty acid	Proportion
2-methylC15:0	29.97%	C16:0	28.8%
C16:1 $\omega$ 7c	27.22%	Iso-15:0 2-OH/C16:1 $\omega$ 7c	15.2%
C12:0	22.22%	C18:1 $\omega$ 9c	12.2%
3-methylC16:0	7.29%		
C18:1 $\omega$ 9c	5.73%		

**致谢** 感谢韩国农业菌种保藏中心(KACC)的 Dr. Byung-Yong Kim 无偿提供模式株 *Marinobacter koreensis* DD-M3<sup>T</sup>;感谢中国海洋大学海洋生命学院杨官品教授对本文的细致修改。

## 参考文献

- [1] 王景华,魏从如,刘凤奎. 油田开发环境影响评价文集. 北京:中国环境科学出版社,1989:45-60.
- [2] 谭田丰,邵宗泽. 海洋石油烃降解菌群构建及其在降解过程中的动态分析. 厦门大学学报(*Journal of Xiamen University*),2006,45:262-266.
- [3] 崔志松,邵宗泽. 一株海洋新鞘氨醇杆菌 phe-8 (*Novosphingobium* sp.) 的 PAHs 降解基因和降解特性. 厦门大学学报(*Journal of Xiamen University*), 2006,45:257-261.
- [4] Head IM, Jones DM, Röling WFM. Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Reviews Microbiology*,2006,4:173-182.
- [5] Yakimov MM, Timmis KN, Golysheva PN. Obligate oil-degrading marine bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*,2007,18:257-266.
- [6] Kasai Y, Kishira H, Harayama S. Bacteria belonging to the genus *Cycloclasticus* play a primary role in the degradation of aromatic hydrocarbons released in a marine environment. *Applied and Environmental Microbiology*,2002,68:5625-5633.
- [7] McKew BA, Coulon FA, Osborn M, Timmis KN, McGenity TJ. Determining the identity and roles of oil-metabolizing marine bacteria from the Thames estuary, UK. *Environmental Microbiology*,2007,9:165-176.
- [8] Teira E, Lekunberri I, Gasol J, Nieto-Cid M, Alvarez-Salgado XA, Figueiras FG. Dynamics of the hydrocarbon-degrading *Cycloclasticus* bacteria during mesocosm-simulated oil spills. *Environmental Microbiology*,2007,9:2551-2562.
- [9] Coulon F, McKew BA, Osborn AM, McGenity TJ, Timmis KN. Effects of temperature and biostimulation on oil-degrading microbial communities in temperate estuarine waters. *Environmental Microbiology*, 2007, 9 (1):177-186.
- [10] 郭楚玲,郑天凌,洪华生. 多环芳烃的微生物降解与生物修复. 海洋环境科学(*Marine Environmental Science*),2000,19(3):24-29.

- [11] 崔志松, 郑立, 杨佰娟, 刘倩, 高伟, 韩平, 王绍良, 周文俊, 郑明刚, 田黎. 两种海洋专性解烃菌降解石油的协同效应. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2010, 50(3):350-359.
- [12] Dyksterhouse SE, Gray JP, Herwig RP, Cano Lara J, Staley JT. *Cycloclasticus pugetii* gen. nov., sp. nov., an Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacterium from Marine Sediments. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1995, 45(1):116-123.
- [13] Cui Z, Lai Q, Dong C, Shao Z. Biodiversity of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from deep sea sediments of the Middle Atlantic Ridge. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(8):2138-2149.
- [14] 崔志松, 邵宗泽. 大西洋洋中脊深海多环芳烃降解菌群的优势菌分析. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2009, 49(7):902-909.
- [15] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001:43-66.
- [16] Buchanan RE, Gibbons NE. 伯杰细菌鉴定手册. 中科院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组译. 第八版, 北京: 科学出版社, 1984:729-795.
- [17] Ausubel FM, Kingston RE. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林译. 第四版, 北京: 科学技术出版社, 2001:36-39.
- [18] Mesbah M, Whitman WB. Measurement of deoxyguanosine/ thymidine ratios in complex mixtures by high-performance liquid chromatography for determination of the mole percentage guanine + cytosine of DNA. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 1989, 479:297-306.
- [19] Mrozik A, Seget ZP, Labuzek S. Changes in whole cell derived fatty acids induced by naphthalene in bacteria from genus *Pseudomonas*. *Research in Microbiology*, 2004, 159:87-95.
- [20] Kim BY, Weon HY, Yoo SH, Kim JS, Kwon SW, Stackebrandt E, Go SJ. *Marinobacter koreensis* sp. nov., isolated from sea sand in Korea. *International Journal Systematic Bacteriol*, 2006, 56: 2653-2656.
- [21] Kwon SW, Kim JS, Park IC, Yoon SH, Park DH, Lim CK, Go SJ. *Pseudomonas koreensis* sp. nov., *Pseudomonas songensis* sp. nov. and *Pseudomonas jinjuensis* sp. nov., novel species from farm soils in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53:21-27.
- [22] Kim BY, Weon HY, Yoo SH, Kim JS, Kwon SW, Erko S, Go SJ. *Marinobacter koreensis* sp. nov., isolated from sea sand in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56:2653-2656.
- [23] Romanenko LA, Schumann P, Rohde M, Zhukova NV, Mikhailov VV, Stackebrandt E. *Marinobacter bryozoorum* sp. nov. and *Marinobacter sediminum* sp. nov., novel bacteria from the marine environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55:143-148.

# Identification and characterization of a novel hydrocarbon-degrading *Marinobacter* sp. PY97S

Qian Li<sup>1</sup>, Zhisong Cui<sup>2</sup>, Aifen Zhao<sup>1</sup>, Wei Gao<sup>2</sup>, Li Zheng<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Life Science, Ludong University, Yantai 264025, China

<sup>2</sup>Marine Ecology Research Center, The First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao 266061, China

**Abstract:** [ **Objective** ] To identify and characterize a hydrocarbon-degrading bacterium isolated from the sediment of the Yellow Sea. [ **Methods** ] We used 16S rRNA gene sequences based phylogenetic analysis, physiological and biochemical characterization, DNA G + C content assaying, determination of cellular fatty acids, testing of carbon sources and respiratory lipoquinone and experiment of DNA-DNA relatedness. Its capability of degrading aliphatic hydrocarbons in ONR7a media supplemented with nine n-alkanes, separately, as sole source of carbon and energy was further determined. [ **Results** ] The Gram-negative isolate PY97S was a member of the genus *Marinobacter*, catalase-and oxidase-positive, and with Q-9 as its predominant respiratory lipoquinone. The similarity between its 16S rRNA gene and that of its most closely related type strain in GenBank *Marinobacter koreensis* DD-M3<sup>T</sup> was 96.93%, and their level of DNA relatedness was 46.7%. The appropriate temperature for its growth ranged from 15°C to 35°C with the optimum of 30°C, the appropriate initial acidity from pH 6.0 to 9.5 with the optimum of pH 7.0, and the appropriate salinity (NaCl) from 0% to 10% with the optimum of 0%. It metabolized many carbohydrates and organic acids and was sensitive to diverse antibiotics including ampicillin and piperacillin. The G + C content of its genomic DNA was 48.2 mol%. The major fatty acids were 2-methyl C15:0 (29.97%), C16:1 $\omega$ 7c (27.22%), C12:0 (22.22%) and C16:1 $\omega$ 9c (5.73%). [ **Conclusion** ] The isolate PY97S was identified as a petroleum hydrocarbon-degrading novel species of genus *Marinobacter*, holding the potential of being applied in the bioremediation of oil spill.

**Keywords:** petroleum hydrocarbons, PAHs, alkane, biodegradation, taxonomic identification

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (40906062;41076108), by the Public Welfare Project of Marine Science Research (200705011), by the Marine Science Foundation for the Youth (2009114) and by the Project of Fundamental Science Research, First Institute of Oceanography (2010G23)

\* Corresponding author. Tel: +86-532-88961802; Fax: +86-532-88963259; E-mail: zhengli@fio.org.cn

Received: 19 November 2010/ Revised: 31 January 2011