

南海深海沉积物烷烃降解菌的富集分离与多样性初步分析

刘 真^{1,2}, 邵宗泽^{2,*}

(¹ 厦门大学生命科学学院 厦门 361005)

(² 国家海洋局第三海洋研究所 海洋生物遗传资源重点实验室 厦门 361005)

摘 要 通过培养和非培养 2 种手段研究了南海沉积物中石油降解菌的多样性。通过烷烃富集培养,从 2 个站点不同深度的南海沉积物样品中富集筛选出 48 株深海细菌,其中 27 株对十六烷有降解能力。表面张力测定结果表明,4 株降解菌同时具有较强的表面活性剂产生能力,2 株 *Dieteria maris* 菌能使水的表面张力降至 33mN/m 左右,这是该种微生物产表面活性剂的首次报道。通过变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析显示,南海沉积物富集物中的烷烃降解菌优势菌是芽孢杆菌,而且有多种。其中, *Bacillus aquimaris* 在两个站点的 7 个样品的富集物中都是优势菌。此外, *Sporosarcina*, *Halomona* 以及 *Brevibacterium* 属的细菌在不同样品中也表现为除 *Bacillus* 之外的优势菌。

关键词: 南海; 深海沉积物; 石油降解菌; 生物多样性; 生物表面活性剂

中图分类号: Q938 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)05-0869-05

石油是海洋环境中的重要污染物,烷烃是石油的重要组成成分。但是其疏水性往往不利于微生物对其快速降解。化学表面活性剂虽然可以驱散油或加大其水溶性^[1],但是由于其生物毒性,往往会阻碍微生物对油的利用。生物表面活性剂(biosurfactant)是由微生物、植物或动物产生的天然表面活性剂,相对于化学表面活性剂,它无毒害、易降解、活性高^[2]。研究发现,烃类降解菌往往产生表面活性剂,以促进烃类的降解。

深海是一个低温、高压的独特环境,深海沉积物中蕴藏着丰富的微生物资源^[3]。但是目前人们只是对近海环境中的石油降解菌了解较多^[4,5],而对深海环境知之甚少。了解深海环境中石油降解菌的多样性,不仅有助于了解环境污染物在海洋环境中的归宿,也能有助于获得特殊的降解微生物资源,用于环境污染的治理。目前,DGGE 在分子生态学上的应用极大地丰富了人们对微生物生态的认识,它为更准确、全面地反映混合培养物中微生物的种群组成情况提供了极大帮助^[6-9]。本研究利用培养和 DGGE 两种手段对南海沉积物样品中石油降解菌进行了多样性分析,并获得多种烷烃降解菌和表面活性剂产生菌。

1 材料和方法

1.1 实验材料

南海泥样沉积物:站点 N1:18.667°(E), 116.540°(N),深度为 3649m;站点 N3:17.161°(E), 110.136°(N),深度为 1166m。均为 2005 年“海洋一号”南海试航所采。采样设备为沉积物多管采样器,采集的沉积物高度分别为 22cm 和 31cm,并分别有上覆水 39cm 和 30cm。沉积物样品每 5cm 一层分装于采样杯中,于 4℃ 保存。本实验选用的沉积物样品层次为:站点 N1 的 0~5cm、10~15cm、15~20cm 和站点 N3 的 0~5cm、5~10cm、10~15cm 和 15~20cm,共 7 个样品。

1.2 烷烃降解菌的富集

在含有 50mL 无机盐培养基的 250mL 三角瓶中富集培养烷烃降解菌,十六烷的含量为 2%(V/V),培养条件为 28℃,200r/min。在培养过程中每 4~5d 从培养液中取出 0.5mL 转入 50mL 新鲜的同种培养基中,共转移了 6 次。之后,将最终的富集物梯度稀释、涂平板,分离单菌。

无机盐培养基(MSM 培养基):参见文献[10]。平板固体培养基:1000mL 天然海水中含 NH₄NO₃ 2g, NaAc 2g,酵母提取物 0.5g,胰蛋白胨 0.5g,葡萄糖

基金项目:国家 973 项目“子课题(2004CB719601)”,国家自然科学基金项目(36100501)

* 通讯作者。Tel: 86-592-2195321; Fax: 86-592-2085376; E-mail: shaozz@163.com

作者简介:刘真(1981-),女,河南人,硕士研究生,主要从事环境微生物研究。E-mail: xiaofeizaixian@sina.com

收稿日期:2007-02-12;接受日期:2007-05-22;修回日期:2007-07-02

0.2g 琼脂 1.6% ,pH7.8。

1.3 单菌降解实验与表面张力测定

分离到的单菌分别以 1% 体积的接种量接种到 30mL MSM 培养基中,培养条件为 28℃,200r/min,7 天以后,观察烷烃降解与乳化情况。对乳化效果好的取菌液 20mL,在室温条件下,用 JZ-200A 自动界面张力仪(河北承德精密仪器厂)测其张力值。

1.4 生物表面活性剂排油能力测定

取一干净培养皿,加入少量水,水面上加入 10 μ L 正十六烷形成油膜。在油膜中心加入单菌的发酵液,中心油膜被挤向四周形成一圆圈,其直径与表面活性剂含量和活性成正比^[11]。

1.5 细菌 DNA 提取及系统进化分析

单菌的 DNA 提取方法参照文献[12],16S rDNA PCR 扩增、克隆^[13],由上海生工完成测序。测序结果在 NCBI 进行 BLAST 分析。

菌群的总 DNA 的提取:充分摇充第 6 次转接的富集菌群培养物,在无菌超净台取出 1mL 于 2mL 离心管中,方法同单菌的 DNA 的提取。

1.6 16S rDNA PCR-DGGE

PCR 扩增:16S rDNA V3 区。引物序列如下: DGGE_r:5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3', DGGE_f:5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3'。以 1 μ L 每个样品的混合菌样总 DNA 为模板,50 μ L 体系,反应条件为 95℃ 6min,95℃ 1min,65℃ 45s,72℃ 1min,每个循环降低 0.5℃,循环 20 次,然后在 95℃ 1min,55℃ 45s,72℃ 1min,循环 16 次,72℃ 延伸 10min。

PCR 产物 200 μ L 经 2.5 倍体积冰乙醇和 10% 体积(pH 5.2)的乙酸钠沉淀浓缩后,溶解于 20 μ L 无菌水,用 Bio-Rad 公司 Decode System 电泳仪进行 DGGE 电泳分离。PAGE 胶浓度为 8%,变性梯度 30%~70%(7mol/L 尿素和 40% 甲酰胺为 100% 变性),电泳缓冲液为 1 \times TAE,20 μ L PCR 产物在 60℃,30V 20min,130V 4.5h 条件下电泳,取出于溴乙锭染液中染色 15min。进行拍照。

每个富集样品中筛选出所有单菌的 PCR 产物和混合菌群的 PCR 产物同时在一块胶上样,作 DGGE 分析,比对菌群中的已培养菌和未培养菌。并对未对应上的未培养菌进行条带回收测序。

1.7 DGGE 条带的分析

从凝胶上小心切下未与单菌对上的 DGGE 条带,放入离心管中,加入 20 μ L 无菌水,-20℃ 过夜。次日,12000g 离心 1min,收集上清,以此作为模板进

行 16S rDNA V3 区 PCR 扩增,以获得足够量的 DNA 用来克隆测序。PCR 产物经 pMD19-T 载体连接,转化 *E. coli* 感受态细胞,获得的阳性克隆子,由上海博亚生物公司测序。测序获得的 16S rDNA 序列上网进行 BLAST 比对(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

2 结果

2.1 烷烃降解菌的分离

经过液体富集、平板筛选,从正十六烷富集物中共获得 48 株单菌,经过单菌验证,其中 27 株对十六烷有降解能力。提取降解菌的 DNA,进行 16S rDNA PCR 扩增、克隆及测序,在 NCBI 进行 BLAST 分析,其比对结果及菌落特征见表 1。在这 27 株烷烃降解菌中,以 *Bacillus* 属,*Brevibacterium* 属和 *Halomonas* 属为主要的优势菌,几乎存在于所有的样品中。

2.2 沉积物中烷烃降解菌的多样性分析

为了进一步了解富集物中的未培养菌及种群结构情况,以第 6 次转接培养物的 DNA 为模板,采用 16SrRNA 基因 V3 区的通用引物进行 PCR 扩增、DGGE 分析(图 1)。结果显示 7 个不同沉积物样品富集物中的菌群结构明显不同,在 DGGE 凝胶上呈现的条带在数目与亮度上均存在差异。但是,也能看出有的菌在不同的菌群中反复出现。

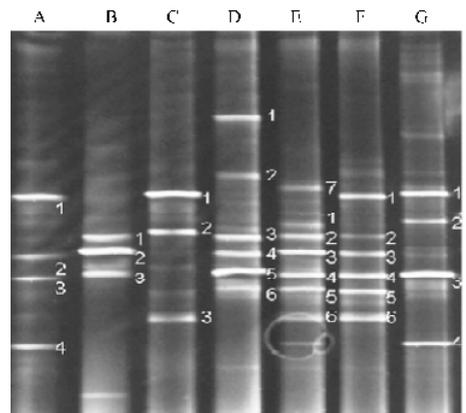


图 1 两个站点 7 个样品的南海沉积物中细菌 16SrDNA V3 区片段的 DGGE 图谱

Fig. 1 DGGE profiles of the 16S rDNA v3 fragment of the bacteria from 7 samples of the sediments at two sampling sites of the South China Sea. Lane A: N35-10 (N3, 5~10cm), Lane B: N1TR (N1, 10~15cm), Lane C: N115-20 (N1, 15~20cm), Lane D: N3ZH (N3, 0~5cm), Lane E: N3TR (N3, 10~15cm), Lane F: N1ZF (N1, 0~5cm), Lane G: N3FT (N3, 15~20cm)

为了确定每条带代表的细菌,将每个样品所有分离株和与菌群的 DGGE 的 PCR 产物一起上样,进

行 DGGE 比对,然后将对未对应上的未培养菌进行条带回收测序。在样品 N3ZF(3 号站位, 0~5cm)中共筛选出 15 株单菌,其 DGGE 的 PCR 产物与该菌群的 DGGE 的 PCR 产物一起电泳。结果显示,混合菌样中有 6 条亮带,分别编号 1~6 号带,其中亮带 2

到 6 号分别与单菌 *Erythrobacter citreus* (100%), *Bacillus aquamarinus* (98%), *Bacillus aquimaris* (99%), *B. aquimaris* (99%), *Bacillus halodenitrificans* (100%) 对应,而亮带 1 没有单菌与之对应。将 1 号带回收测序,序列分析有杂峰,未获得确切结果。

表 1 烷烃降解菌的分离鉴定结果

Table 1 Isolation and identification of alkane degrading bacteria

MCCC accession number #	Original number	Closest relatives in GenBank database	Similarity/%	GenBank accession number
1A02161	N1ZF-2	<i>Bacillus cereus</i> strain L7	770/770 (100)	EF619391
1A02137	N1ZF-3	<i>Halomonas meridiana</i> strain Slthf1	891/891 (100)	/
1A01404	N115-20-1	<i>Bacillus cereus</i>	1029/1041 (98)	EF619393
1A02142	N115-20-2	<i>Halomonas meridiana</i>	975/980 (99)	EF619394
1A01411	N115-20-3	<i>Bacillus litoralis</i>	924/930 (99)	EF619392
1A02167	N1TF-2	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	778/780 (99)	EF619395
1A02166	N35-10-1	<i>Cellulomonas parohominis</i> strain W7385	759/760 (99)	EF619397
1A01406	N35-10-11	<i>Bacillus cereus</i>	921/924 (99)	EF619396
1A02146	N35-10-2	<i>Bacillus cereus</i>	984/987 (99)	EF619398
1A01405	N35-10-3	<i>Brevibacterium aureum</i>	1015/1021 (99)	EF619399
1A02143	N35-10-4	<i>Bacillus cereus</i>	723/729 (99)	EF619400
1A02164	N35-10-5	<i>Microbacterium resistens</i> strain AGP4-3	818/818 (100)	EF619401
1A02129	N35-10-9	<i>Bacillus hackensackii</i>	716/737 (97)	EF619411
1A01407	N3FT-1	<i>Tetrathlobacter kashmirensis</i>	686/690 (99)	EF619402
1A02131	N3FT-3	<i>Bacillus aquimaris</i>	1025/1039 (98)	EF619403
/	N3FT-4	<i>Microbacterium resistens</i>	580/580 (100)	/
1A02138	N3FT-6	<i>Microbacterium resistens</i> strain AGP4-3	721/721 (100)	EF619412
1A01409	N3TF-2	<i>Brevibacterium sanguinis</i>	981/999 (98)	EF619404
1A02165	N3ZF-1	<i>Dietzia maris</i> strain SAFR-020	760/760 (100)	EF619406
1A02136	N3ZF-10	<i>Bacillus halodenitrificans</i>	978/984 (99)	EF619409
1A01403	N3ZF-14	<i>Bacillus aquamarinus</i>	717/728 (98)	EF619410
1A02128	N3ZF-15	<i>Dietzia maris</i> strain SAFR-020	660/660 (100)	EF619415
1A02162	N3ZF-2	<i>Erythrobacter citreus</i>	760/760 (100)	EF619407
1A02132	N3ZF-3	<i>Rhodococcus equi</i>	720/720 (100)	EF619413
1A02183	N3ZF-4	<i>Bacillus aquimaris</i>	729/730 (99)	EF619414
1A01401	N3ZF-5	<i>Bacillus aquimaris</i>	808/812 (99)	EF619405
1A01402	N3ZF-9	<i>Bacillus halodenitrificans</i>	750/750 (100)	EF619408

MCCC: Marine Culture Collection of China.

其它 6 个样品用同样的方法进行菌群结构分析。结果表明,在 N35-10(3 号站位, 5~10cm)样品中,有 4 条主要亮带,其中亮带 1、3、4 分别与单菌 *Bacillus cereus* (99%), *B. aquimaris* (100%) 和 *Brevibacterium aureum* (99%) 对应(图 1 lane A),而亮带 2 没有单菌与之对应。将 2 号带回收测序,序列分析有杂峰,未获得确切结果。在样品 N3TF(3 号站位, 10~15cm)中,有 7 条亮带,其中第 3、4、5 号带最亮,亮带 3 和 5 分别与单菌 *B. aquimaris* (99%) 和 *B. halodenitrificans* (98%) 对应(图 1 lane E),亮带 1、2、4、6、7 没有单菌与之对应。将这 5 条亮带回收测序,其中亮带 2 与 *Halomonas meridiana* (100%) 相似度最高,亮带 6 与 *B. aquimaris* (100%) 相似度最高,而亮带 1、4、7 序列分析有杂峰,未获得确切结果。在样品 N3FT(3 号站位, 15~20cm)中,有 4 条主要亮带,其中亮带 1 和 4 分别与单菌 *B. aquimaris*

(98%) *B. aureum* (99%) 对应(图 1 lane G),亮带 2、3 没有单菌与之对应。将 2、3 号带回收测序,序列分析有杂峰,未获得确切结果。在样品 N1ZF(1 号站位, 0~5cm)中,有 6 条亮带,其中 1、4、6 号带分别与单菌 *B. aquimaris* (100%), *B. cereus* (99%), *H. meridiana* (100%) 对应(图 1 lane F),而亮带 2、3、5 没有单菌与之对应。将这 3 条亮带回收测序,其中亮带 2 与 *Sporosarcina ginsengisoi* 相似度最高(100%),亮带 3 与 *B. aquimaris* 相似度最高(99%),而亮带 5 序列分析有杂峰,未获得确切结果,有待进一步分析。在 N1TF 样品(1 号站位, 10cm~15cm)中,有 3 条主要亮带,其中亮带 2 与单菌 *B. aquimaris* (99%) 对应(图 1 lane B),而亮带 1、3 没有单菌与之对应,将这 2 条亮带回收测序,结果都与 *B. aquimaris* 相似度最高(99%)。在 N115-20 样品(1 号站位, 15~20cm)中,有 3 条亮带,1 和 3 分别与

单菌 *B. cereus* (98%) 和 *H. meridiana* (99%) 对应, 亮带 2 没有单菌与之对应。将 2 号带回收测序, 测序未成功(图 1, lane C)。综上, *Bacillus* 属存在于南海沉积物两个站点的 7 个样品中, 而且是降解菌群中的优势菌, 其次是 *Brevibacterium* 属和 *Halomonas* 属的细菌。说明在南海沉积物烷烃富集菌群中以 *Bacillus* 属, *Brevibacterium* 属和 *Halomonas* 属的细菌为主要菌。两个站点的 7 个样品的主带的测序结果汇总于表 2。

2.3 南海沉积物中表面活性剂产生菌

在 38 株烷烃降解菌中, 有 4 株有较好的表面活

性剂产生能力, 分别是 N3ZF-3 (*R. equi*), N35-10-5 (*M. resistens*), N3ZF-1 (*D. maris*) 和 N3ZF-15 (*D. maris*)。这 4 株单菌在以正十六烷作为唯一碳源生长时产生表面活性剂, 分别能将水的表面张力降至 39.4 mN/m、36.5 mN/m、33.6 mN/m 和 32.7 mN/m。N3ZF-1 和 N3ZF-15 的 16SrDNA 序列分别与 *D. maris* 和 *D. maris* strain SAFR-020 同源性最高, 都达到 100%, 两菌之间同源性为 100%。但菌落颜色不同, 而且通过重复 PCR 检测, 2 个菌带型不同。因此可以确定这是 2 株不同的菌。有关 *D. maris* 菌产生表面活性剂的报道, 本文是第一次。

表 2 降解菌群的 16S rDNA DGGE 亮带的序列分析

Table 2 Sequence similarities to closest relatives and phylogenetic affiliations of DNA recovered from DGGE gel

Sampling sites	Sediment depth (cm)	DGGE band No.	Closest relatives in GenBank database	Similarity/%	MCCC No. of corresponding isolates		
N1	0~5	N1ZK 1)	<i>Bacillus cereus</i>	770/770 (100)	1A02161		
		N1ZK 2)*	<i>Sporosarcina ginsengisoli</i>	195/195 (100)	/		
		N1ZK 3)*	<i>Bacillus aquimaris</i>	189/190 (99)	/		
	10~15	10~15	N1ZK 4)	<i>Bacillus aquimaris</i>	981/989 (99)	1A02133	
			N1ZK 6)	<i>Halomonas meridiana</i>	891/891 (100)	1A02137	
			N1TK 1)*	<i>Bacillus aquimaris</i>	191/192 (99)	/	
15~20		15~20	N1TK 2)	<i>Bacillus aquimaris</i>	578/582 (99)	1A02125	
			N1TK 3)*	<i>Bacillus aquimaris</i>	195/196 (99)	/	
			N115-20(1)	<i>Bacillus cereus</i>	1029/1041 (98)	1A01404	
N3	0~5	N115-20(3)	<i>Halomonas meridiana</i>	975/980 (99)	1A02142		
		N3ZK 2)	<i>Erythrobacter citreus</i>	760/760 (100)	1A02162		
		N3ZK 3)	<i>Bacillus aquamarinus</i>	717/728 (98)	1A02125		
		N3ZK 4)	<i>Bacillus aquimaris</i>	729/730 (99)	1A01401		
		N3ZK 5)	<i>Bacillus aquimaris</i>	1046/1052 (99)	1A02133		
		N3ZK 6)	<i>Bacillus halodenitrificans</i>	750/750 (100)	1A01402		
	5~10	5~10	N35-10(1)	<i>Bacillus cereus</i>	921/924 (99)	1A02143	
			N35-10(3)	<i>Bacillus aquimaris</i>	751/751 (100)	1A02131	
			N35-10(4)	<i>Brevibacterium aureum</i>	1015/1021 (99)	1A02129	
		10~15	10~15	N3TK 2)*	<i>Halomonas meridiana</i>	189/189 (100)	/
				N3TK 3)	<i>Bacillus aquimaris</i>	769/770 (99)	1A01401
				N3TK 5)	<i>Bacillus halodenitrificans</i>	955/969 (98)	1A01402
15~20	15~20	N3TK 6)*	<i>Bacillus aquimaris</i>	192/192 (100)	/		
		N3FK 1)	<i>Bacillus aquimaris</i>	1025/1039 (98)	1A02131		
		N3FK 4)	<i>Brevibacterium aureum</i>	1018/1024 (99)	1A02129		

* the sequence result of 16S rDNA V3 region.

3 讨论

本研究通过富集培养、平板筛选及 DGGE 菌群分析, 初步研究了南海深海沉积物中烷烃降解菌的多样性。通过平板筛选, 分离得到 48 株细菌, 其中 27 株有烷烃降解能力。它们属于 9 个属, 其中芽孢杆菌属最多, 共 13 株。通过 DGGE 与 DNA 序列分析, 也证实了南海沉积物烷烃富集物中 *Bacillus* 是绝对的优势菌, 其他优势菌还有 *Sporosarcina*, *Halomona*, *Brevibacterium* 等。总之, 南海沉积物烷烃富集菌群中以革蓝氏阳性菌居多。DGGE 检测到未能与单菌对应的条带共有 13 条, 其中有 6 个 DGGE

条带已获得序列信息(表 2), *S. ginsengisoli* (100%) 和 *H. meridiana* (100%) 各 1 株, *B. aquimaris* (99%~100%) 4 株。另外 7 个 DGGE 条带序列分析有杂峰, 未获得确切结果, 但是在 DGGE 图谱中, 样品 N35-10 样品 (Lane A) 中的亮带 2 与样品 N3ZK (Lane D) 中的亮带 4, N3TK (Lane E) 中的亮带 3 以及 N1ZK (Lane F) 中的亮带 3 处于同一水平位置, 由此推测 N35-10 样品中的亮带 2 对应的单菌为 *B. aquimaris*。样品 N310-15 (Lane E) 中的亮带 4 与样品 N1ZK (Lane F) 中的亮带 4 处于同一水平位置, 由此推测 N35-10 样品中的亮带 4 对应的单菌为 *B. aquimaris*。其余的条带有待于进一步分析。*B. aquimaris* 是 2003 年从黄

海分离鉴定的新种,至今没有关于它烷烃降解的报道,而在本研究中它是最重要的烷烃降解优势菌(表2)。与大洋环球考察结果不同的是,南海沉积物中没有发现食烷菌属的细菌,而这类细菌是大洋环境中的重要烷烃降解菌(未发表)。

有报道,*D. maris* 是烷烃重要的降解菌,但从海洋环境中分离获得这种菌还未见报道。本研究获得的这2株放线菌科的深海细菌还具有较好表面活性剂产生能力,之前未见与其有关的生物表面活性剂报道。常见的微生物表面活性剂有脂肽、脂肪酸和糖脂等^[15]。该菌所产生的表面活性剂成分尚未确定,具有进一步研究的价值。

致谢 感谢中国科学院广州地球化学研究所彭晓彤研究员协助采集样品。

参 考 文 献

- [1] 徐燕莉. 表面活性剂的功能. 第一版. 北京: 化学工业出版社, 2000.
- [2] Sarney DB, Vulfson EN. Application of enzymes to the synthesis of surfactants. *Trends Biotechnol*, 1995, **13**: 164 - 172
- [3] 谢华, 薛燕芬, 赵爱民等. 太平洋帕里西维拉海盆细菌多样性的非培养初步分析. *微生物学报*, 2005, **45**(1): 1 - 5.
- [4] 刘陈立, 邵宗泽. 海洋石油降解微生物的分类鉴定. *海洋学报* 2005 **27**(4): 114 - 120.
- [5] Liu C, Shao Z. *Alcanivorax dieselolei* sp. nov., a novel alkane-degrading bacterium isolated from sea water and deep-sea sediment. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005 **55**: 1181 - 1186.
- [6] Sarah JM, John RS, Albert DV, et al. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, **65**(8): 3566 - 3574.
- [7] Chen PY, Brian KK. Mycobacterium Diversity and Pyrene Mineralization in Petroleum-Contaminated Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67**(5): 2222 - 2229.
- [8] Raeid MM, Nimer MD, Jurgen K, et al. microbial diversity of a heavily polluted microbial mat and its community changes following degradation of petroleum compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**(4): 1674 - 1683.
- [9] Julietten NR, Robert TA, Jocelyn LF, et al. Microbial communities associated with anaerobic benzene degradation in a petroleum-contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, **65**(7): 305 - 306.
- [10] 牛明芬, 李凤, 韩晓日, 等. 生物表面活性剂产生菌的筛选及表面活性剂稳定性研究. *生态学杂志*, 2005, **24**(6): 631 - 634.
- [11] Jain DK, Thompson DLC, Lee H, et al. drop-collapsing test for screening surfactant producing microorganisms. *J Microbiol Methods*, 1991, **13**: 271 - 279.
- [12] Ausubel F, Brent R, Kingston RE, 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林译, 第三版. 北京: 科学出版社, 1998, 13 - 50.
- [13] Murray AE, Hollibaugh JT. Phylogenetic composition of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gelelectrophoresis of 16SrDNA fragments. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**(7): 2676 - 2680.
- [14] Yoon JH, Kim IG, Kang KH. *Bacillus marisflavi* sp. nov. and *Bacillus aquimaris* sp. nov., isolated from sea water of a tidal flat of the Yellow Sea in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003, **53**: 1297 - 303.
- [15] Peng F, Liu Zh, Wang L et al. An oil-degrading bacterium: *Rhodococcus erythropolis* strain 3C-9 and its biosurfactants. *J Appl Microbiol* (in press), 2007.

The diversity of alkane degrading bacteria in the enrichments with deep sea sediment of the South China Sea

LIU Zhen^{1,2}, SHAO Zong-ze²

(¹Life Science College, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

(²Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, the Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China)

Abstract Deep sea sediment samples of the South Sea of China were used for isolation and biodiversity examination of hydrocarbon degrading bacterium. 48 isolates were obtained from the enrichments with hexadecane as the sole carbon sources. Among them 27 isolates were capable of degrading alkane; and 4 could produce biosurfactant significantly as determined by the surface tension measurement. 2 isolates belonging to *Dietzia maris* lowered water surface tension to 33 mN/m. This is the first report about *D. maris* in biosurfactant production. The results of polymerase chain reaction (PCR) followed by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and DNA sequencing suggested that *Bacillus* was the dominant member in the hexadecane enriched communities. Isolates of *Bacillus aquimaris* were demonstrated to be the most predominant degraders in all 7 samples at 2 sampling sites. In addition, *Sporosarcina*, *Halomonas* and *Brevibacterium* were also found as one of the dominant members in some samples. Therefore, species of *Bacillus* might play an important role in alkane degradation in the sediments of the sampling sites.

Keywords: South China Sea; deep-sea sediment; alkane-degrading bacteria; biodiversity; biosurfactant

Foundation item: Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2004CB719601); National Natural Science Foundation of China (36100501)

* Corresponding author: Tel: 86-592-2195321; Fax: 86-592-2085376; Email: shaozz@163.com

Received: 12 February 2007/Accepted 22 March 2007/Revised: 4 July 2007 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>