

印度洋表层海水石油降解菌的多样性分析

吴常亮, 王鑫, 邵宗泽*

(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:【目的】为了研究印度洋石油降解菌多样性, 并获得新的石油降解菌。【方法】本研究通过印度洋表层海水样品采集、以柴油与原油 1:1 混合物作为碳源, 从中富集、分离筛选石油降解菌, 并通过 PCR-DGGE 对 13 个站点富集菌群的菌群结构进行分析。【结果】通过形态观察、生理生化反应和 16S rRNA 分析, 共得到共 29 个属的 51 株不同的细菌, 它们主要是属于 α 亚群和 γ 亚群。其中, *Alcanivorax* 属(占 18%), *Novosphingobium* 属(占 10%) 和 *Marinobacter*(占 6%) *Thalassospira*(占 6%) 为主要的优势菌。通过生态多样性分析表明, Shannon-Winner 指数(H)为 4.57968, 说明其具有较高的多样性; 均匀度指数(E)为 0.8664771, 表示其分布比较均匀。单菌实验表明, 49 株具有石油降解能力其中, *Sinomonas*, *Knoellia*, *Mesoflavibacter* 等属的细菌为首次发现有降解能力。DGGE 分析表明 *Alcanivorax* 属的细菌是印度洋表层海水中的重要石油降解菌。【结论】本研究首次揭示了印度洋表层海水中石油降解菌的多样性, 并获取了若干在海洋石油污染生物修复中具有应用前景的降解菌。

关键词: 印度洋; 生物降解; 石油; 海洋细菌; 多样性; DGGE

中图分类号: Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 09-1218-08

由于世界石油资源分布的不平衡催生了石油的航运业, 但由于频繁的海洋溢油事故导致了现在的海洋环境面临着严峻的挑战。每年由于自然油溢以及油轮泄漏而进入海洋环境的原油高达几十万吨^[1]。而目前公认的处理海洋溢油污染最环保的方法就是利用微生物降解石油^[2-5]。石油降解菌的研究目前已经从近海环境拓展到大洋、极地环境。不仅对大西洋^[6], 太平洋^[7], 北冰洋^[8]石油降解微生物的多样性进行了分析, 而且还对大西洋中石油降解微生物的降解基因多样性进行了研究^[9], 但是有关印度洋公海环境中的石油降解菌却鲜有报道。

在 2007 年大洋一号第 19 次科考期间, 我们从德班到珀斯对印度洋表层海水进行采样, 进行了降解菌及降解基因多样性分析、以及新种的分类鉴定。

本研究即是降解菌多样性部分的报道。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 表层海水采样与降解菌富集: 印度洋表层海水样品为在 2007 年 3-4 月, 大洋一号科考船从德班出发, 横跨印度洋, 至澳大利亚珀斯, 进行表层海水样品采集。各采样点如图 1 所示。部分样品进行 4℃ 冷藏、部分样品进行船上富集。

富集处理: 按照无菌操作要求, 于样品瓶中加入少量原油和柴油的混合物(质量比 1:1) 和氮、磷源, 静置培养, 待大洋一号科考船青岛靠岸后进行实验室微生物分离培养。

基金项目: 国家自然科技资源平台项目(2005DKA21209); 国家自然科学基金项目(30670051)

* 通信作者。Tel: +86-592-2195321; Fax: +86-592-2085376; E-mail: shaozz@163.com

作者简介: 吴常亮(1984-), 男, 贵州人, 硕士研究生, 研究方向为环境微生物与发酵工程。E-mail: raymond_258@126.com

收稿日期: 2010-04-06; **修回日期:** 2010-05-18

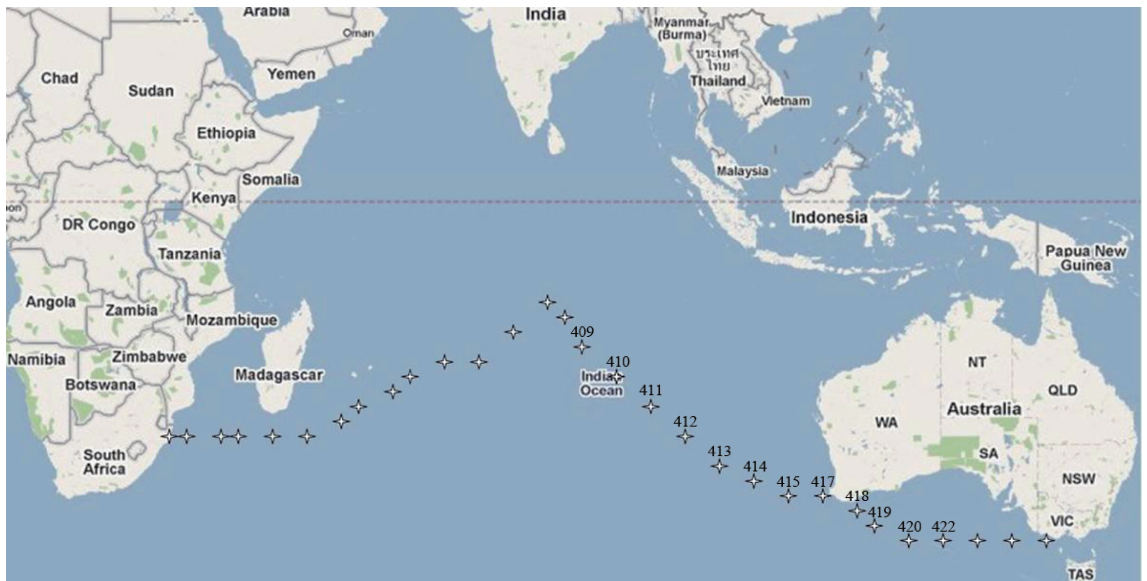


图1 印度洋采样站点

Fig. 1 Sampling sites across the India Ocean. * Sites marked in numbers indicate the sites analyzed by DGGE.

1.1.2 培养基: (1) 液体 NH 培养基: 于天然海水中加入: 原油和柴油的混合物 (质量比 1:1) 10 mL/L, 硝酸铵 1 g/L, 磷酸二氢钾 0.1 g/L, 硫酸亚铁 5.6 mg/L (预先用 0.22 μm 滤膜过滤除菌); (2) 平板固体培养基 M2: 于天然海水中加入: 硝酸铵 2 g/L, 乙酸钠 2 g/L, 酵母粉 0.5 g/L, 蛋白胨 0.5 g/L, 葡萄糖 0.2 g/L, 蔗糖 0.2 g/L, 马铃薯浸出粉 0.5 g/L, 柠檬酸钠 0.05 g/L, 苹果酸钠 0.005 g/L, 酒石酸钠 0.05 g/L, 琼脂粉 1.6%, pH 7.5。

1.2 菌株的富集和分离培养

取 50 mL 新鲜表层海水样品于 250 mL 的灭菌三角瓶中, 补加预先灭菌的 NH_4NO_3 和 KH_2PO_4 , 添加 0.22 μm 滤膜过滤除菌的 FeSO_4 溶液至终浓度为 5.6 mg/L, 最后再加 1% (V/V) 原油和柴油混合物 (质量比 1:1) 为碳源和能源进行富集培养。置于 28°C, 200 r/min 摇床中培养 15 天, 待黑色油污消失, 取 2 mL 富集培养液转接入新鲜的 NH 培养基中, 共转接 3 次。将最终的富集物梯度稀释、涂布 M_2 平板, 同时滴少量原油和柴油混合物于培养皿盖中熏蒸, 28°C 培养 7-10 天后多次划线分离单菌, 得到纯培养。

1.3 16S rRNA 序列的扩增:

将分离的菌株培养后提取 DNA (参照上海赛百盛生物工程公司细菌 DNA 提取试剂盒说明书)。16S rRNA PCR 扩增采用细菌 16S rRNA 通用引物 16SF: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 16SR:

5'-ACGGCTACCTTGTACGACT-3'。PCR 反应体系为 50 μL , 包括 DNA 模版 1 μL , 16SF (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , 16SR (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , dNTP (2.5 mmol/L) 1 μL , 10 \times Buffer 5 μL , MgCl_2 (15 mmol/L) 3 μL 和 TaqDNA 聚合酶 (1U) 2 μL , 加无菌水补至 50 μL 。PCR 扩增条件: 94°C 预变性 5 min, 94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1.5 min, 30 个循环, 72°C 延伸 15 min, 16°C 保持。

1.4 16S rRNA 的 V3 区 PCR 扩增:

利用 DNA 抽提试剂盒提取菌群 DNA, 通过用 16S rRNA V3 区引物 DGGER: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3' 和 DGGEF: 5'-CGCCCGCCGCGCGCGCGGGCGGGCGGGGACGGGGGGCCTACGGGAGG CAGCAG-3' 进行 PCR 扩增获得 16S rRNA V3 区。以 1 μL 每个样品的混合菌样总 DNA 为模板, 50 μL 体系 PCR 反应条件如下: 95°C 变性 6 min, 然后在 95°C 1 min, 65°C 45 s, 72°C 1 min, 每个循环降低 0.5°C, 循环 20 次, 然后在 95°C 1 min, 55°C 45 s, 72°C 1 min, 循环 16 次, 72°C 延伸 10 min。PCR 产物 100 μL 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 μL 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% - 60% (7 mol/L 尿素和 40% 甲酰胺为 100% 变性), 电泳缓冲液为 1 \times TAE, 20 μL PCR 产物在 60°C, 30 V 20 min, 130 V 5 h 条件下电泳, 取出于溴乙锭染液中染色 15 min, 拍照。

2 结果

2.1 基于可培养菌株 16S rRNA 序列测定的多样性分析

通过菌落形态、细胞显微形态及部分生理生化实验结果去冗余,最终从 100 个分离菌株中选取 51 个代表性菌株,进行基于 16S rRNA 基因序列的系统发育多样性分析(见表 1)。结果表明,51 个分离菌株属于细菌域的 5 个亚纲(或纲)(Actinobacteridae, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Flavobacteria, Gammaproteobacteria), 20 个科, 29 个属。多数菌株属于 γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria 25 株, 49.02%), 其次是 α -变形菌纲(Alphaproteobacteria 17 株, 33.33%) 和 Actinobacteridae 纲(7 株, 13.73%)。

由于有 6 株菌其 16S rRNA 相似度小于 97% 可能是潜在的新种(如图 2), 所以 51 个菌株可以分为 39 个物种。根据参考文献^[10], 采用 Shannon-Winner 指数(H)和均匀度指数(E)分析印度洋表层海水石

油降解菌多样性, 计算公式为:

$$H = - \sum_{i=1}^i (P_i) (\log_2 P_i)$$

式中: $P_i = n_i/N$, 表示第 i 个种的相对多度, n_i 表示第 i 个种的个体数目, N 表示群落中所有种的个体总数。

$$E = H/\log_2 S$$

式中: S 为群落中的总物种数。

印度洋石油降解微生物的多样性得到指数 H 为 4.57968, 说明印度洋石油降解菌的物种具有较高的丰富性, 均匀度指数 E 为 0.8664771 说明石油降解菌在印度洋的分布比较均匀。

将这 51 株单菌接种于液体 NH 培养基中, 4 天后观察其生长情况, 以 OD_{600} 表示其生长的浓度(见表 1)。结果显示绝大部分菌都具有一定的石油降解能力, 不仅有 *Alcanivorax*, *Novosphingobium*, *Marinobacter* 和 *Thalassospira* 等已有报道的菌属^[11-14], 而且还发现 *Sinomonas*, *Knoellia*, *Mesoflavibacter* 等菌属也是首次发现其有石油降解能力。

表 1 印度洋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 The blast results of the Indian Ocean potential oil-degrading bacteria between closest type strains and their concentration growing in oil

Phylogenetic groups\Family	Strain ^a	Closest type strain	Accession	Similarity	Growth in oil ^b
Actinobacteridae (7/51)					
Cellulomonadaceae(1)	wcc32213	<i>Cellulomonas hominis</i> DMMZ CE40(T)	X82598	100	++
Intrasporangiaceae(1)	wcc32209	<i>Knoellia sinensis</i> DSM 12331(T)	AJ294412	98.769	++
Microbacteriaceae(2)	wcc32210	<i>Microbacterium insulae</i> DS-66(T)	EU239498	99.318	++
	wcc31602	<i>Microbacterium oxydans</i> DSM 20578(T)	Y17227	99.863	++
Micrococcaceae(3)	wcc32211	<i>Arthrobacter crystallopoietes</i> DSM 20117(T)	X80738	98.497	+++
	wcc32212	<i>Sinomonas flava</i> CW 108(T)	EU370704	98.361	+
	wcc33007	<i>Micrococcus yunnanensis</i> YIM 65004(T)	FJ214355	100	+++
Alphaproteobacteria (17/51)					
Aurantimonadaceae(1)	wcc32007	<i>Marteella mediterranea</i> MACL11(T)	AY649762	99.584	++
Brucellaceae(2)	wcc42904	<i>Mycoplana ramosa</i> DSM 7292(T)	EU022308	93.696	++
	wcc31609	<i>Ochrobactrum tritici</i> SCH24(T)	AJ242584	99.725	++
Erythrobacteraceae(1)	wcc40404	<i>Erythrobacter citreus</i> RE35F/1(T)	AF118020	99.45	++
Phyllobacteriaceae(2)	wcc31905	<i>Parvibaculum lavamentivorans</i> DS-1(T)	AY387398	95.604	++
	wcc32812	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i> IAM 13584(T)	D12789	90.659	ND
Rhodobacteraceae(1)	wcc40805	<i>Pelagibaca bermudensis</i> HTCC2601(T)	DQ178660	99.31	+
Rhodospirillaceae(3)	wcc33004	<i>Thalassospira tepidiphila</i> 1-1B(T)	AB265822	99.036	++
	wcc42901	<i>Thalassospira xianhensis</i> P-4(T)	EU017546	99.725	++
	wcc40504	<i>Thalassospira xianhensis</i> P-4(T)	EU017546	99.311	++
Sphingomonadaceae(7)	wcc41104	<i>Novosphingobium indicum</i> H25(T)	EF549586	97.805	++
	wcc32102	<i>Novosphingobium indicum</i> H25(T)	EF549586	99.451	++
	wcc32001	<i>Novosphingobium indicum</i> H25(T)	EF549586	100	++
	wcc31806	<i>Novosphingobium indicum</i> H25(T)	EF549586	99.863	++
	wcc32607A	<i>Novosphingobium pentaromativorans</i> US6-1(T)	AF502400	100	++

续表 1

Phylogenetic groups\Family	Strain ^a	Closest type strain	Accession	Similarity	Growth in oil ^b
	wcc33102	<i>Sphingobium scionense</i> WP01 (T)	EU009209	95.461	++
	wcc32609	<i>Sphingobium scionense</i> WP01 (T)	EU009209	95.598	++
Betaproteobacteria (1/51)					
Alcaligenaceae (1)	wcc031505	<i>Achromobacter spanius</i> LMG 5911 (T)	AY170848	99.866	++
Flavobacteria (1/51)					
Flavobacteriaceae (1)	wcc40709	<i>Mesoflavibacter zeaxanthinifaciens</i> TD-ZX30 (T)	AB265181	99.055	++
Gammaproteobacteria (25/51)					
Alcanivoraceae (9)	wcc31607	<i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2 (T)	AM286690	100	++++
	wcc40802	<i>Alcanivorax dieselolei</i> B-5 (T)	AY683537	99.734	+++
	wcc33012	<i>Alcanivorax hongdengensis</i> A-11-3 (T)	EU438901	100	+++
	wcc40701	<i>Alcanivorax jadensis</i> T9 (T)	AJ001150	98.136	+++
	wcc40501	<i>Alcanivorax jadensis</i> T9 (T)	AJ001150	99.069	+++
	wcc51008	<i>Alcanivorax venustensis</i> ISO4 (T)	AF328762	100	+++
	wcc42911	<i>Alcanivorax venustensis</i> ISO4 (T)	AF328762	98.668	+++
	wcc42801	<i>Alcanivorax venustensis</i> ISO4 (T)	AF328762	97.875	+++
	wcc40601	<i>Alcanivorax venustensis</i> ISO4 (T)	AF328762	98.138	+++
Alteromonadaceae (3)	wcc42903	<i>Marinobacter lipolyticus</i> SM19 (T)	AY147906	98	+++
	wcc32604	<i>Marinobacter lipolyticus</i> SM19 (T)	AY147906	97.2	+++
	wcc40703	<i>Marinobacter santoriniensis</i> NKSG1 (T)	EU496088	100	++
Halomonadaceae (6)	wcc40705	<i>Halomonas meridiana</i> DSM 5425 (T)	AJ306891	100	++
	wcc51005	<i>Halomonas neptunia</i> Eplume1 (T)	AF212202	99.601	++
	wcc40602	<i>Modicisalibacter tunisiensis</i> LIT2 (T)	DQ641495	99.867	++
	wcc32009	<i>Modicisalibacter tunisiensis</i> LIT2 (T)	DQ641495	99.601	++
	wcc40702	<i>Salinicola salarius</i> M27 (T)	AM229316	99.601	++
	wcc31801	<i>Salinicola salarius</i> M27 (T)	AM229316	99.468	++
Idiomarinaceae (1)	wcc51006	<i>Idiomarina baltica</i> OS145 (T)	AJ440214	97.87	++
Moraxellaceae (1)	wcc32201	<i>Acinetobacter junii</i> LMG 998 (T)	AM410704	98.269	++++
Pseudomonadaceae (2)	wcc41102	<i>Pseudomonas pachastrellae</i> KMM 330 (T)	AB125366	99.334	+++
	wcc51002	<i>Pseudomonas stutzeri</i> CCUG 11256 (T)	U26262	99.335	+++
Unclassified (2)	wcc31703	<i>Gallaecimonas pentaromativorans</i> CEE_131 (T)	FM955223	99.468	ND
	wcc51001w	<i>Salinisphaera dokdonensis</i> ES53 (T)	EF988634	97.6	++
Xanthomonadaceae (1)	wcc31506	<i>Dyella ginsengisoli</i> Gsoil 3046 (T)	AB245367	95.358	++

a Strains marked in bolds indicate potential new taxa; b Growth capability with oil in NH medium. + + + +, + + +, + +, + and -, indicating the growth capability from strong to weak with oil as sole carbon and energy source, measured by optical density at 600 nm. + + + +, growth ($OD_{600} > 1$) after a 4-day incubation at 25°C; + + +, growth ($0.6 < OD_{600} < 1$) after a 4-day incubation at 25°C; + +, growth ($0.2 < OD_{600} < 0.6$) after a 4-day incubation at 25°C; +, growth ($OD_{600} < 0.2$) after a 4-day incubation at 25°C; ND, not detected.

将分属于 29 个属的 51 株菌进行统计后发现: 占富集菌株中数量最多的是 *Alcanivorax* 属 (占 18%), 其次是 *Novosphingobium* 属 (占 10%) 和 *Marinobacter* (占 6%) *Thalassospira* (占 6%) (图 3)。这 4 个属的菌都已经报道证实对于石油主要成分 (烷烃及多环芳烃) 具有直接或间接的降解作用^[11-14]。这 4 个属的菌在经富集后的降解菌种大量存在, 说明在四种菌在印度洋的海洋环境中也是普遍存在的, 并且在石油降解中具有显著的作用。

2.2 降解菌群 DGGE 分析

由于普通的分离纯化培养所用手段可能造成的分析上的误差。所以从中选取 13 个降解效果较好的站点的富集菌群进行 DGGE 菌群结构分析 (站点

位置见图 1), 菌群结构分析表明平均每个站点有 3-7 条亮带, 而这其中又有 1-3 条特别明显的优势亮带。经分析, 这 13 个站点主要有 10 条优势菌的亮带 (图 4)。其中 6 号条带在多个站点中均为优势条带, 切胶回收后, DNA 测序结果经 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 比对分析表明该菌与 *Alcanivorax venustensis* ISO4^(T) 的相似度为 98%。其余条带 1, 3, 5 经切胶回收后 DNA 测序结果经 BLAST 比对分析表明与其最相似的菌株分别为 *Alcanivorax dieselolei* B-5^(T) (相似度 99%), *Novosphingobium indicum* H25^(T) (相似度 99%), *Alcanivorax balearicus* MACLO4^(T) (相似度为 98%)。其余优势条带经切胶回收后比对结果如表 2 所示。

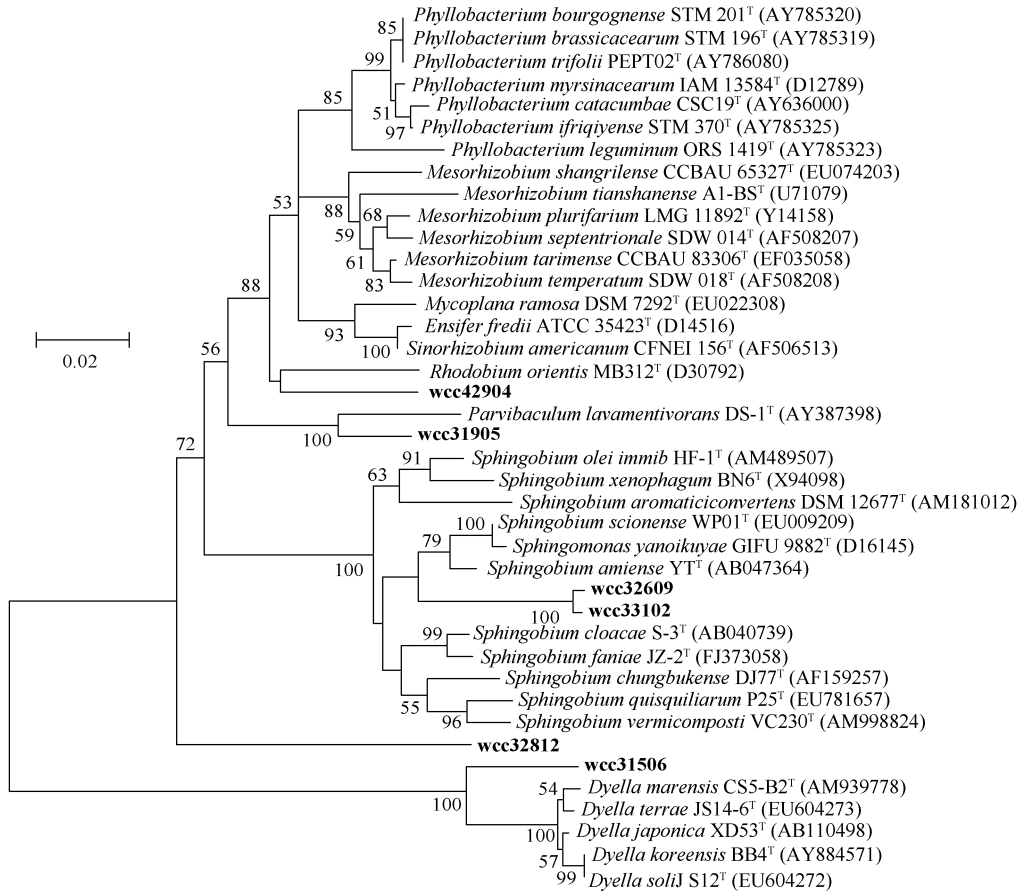


图 2 6 个可能的新种基于与其相关模式菌株 16S rRNA 构建的系统发育树

Fig. 2 Six potential new specieses related to the type strain based on the phylogenetic tree. * Strains marked in bolds indicate potential new taxa.

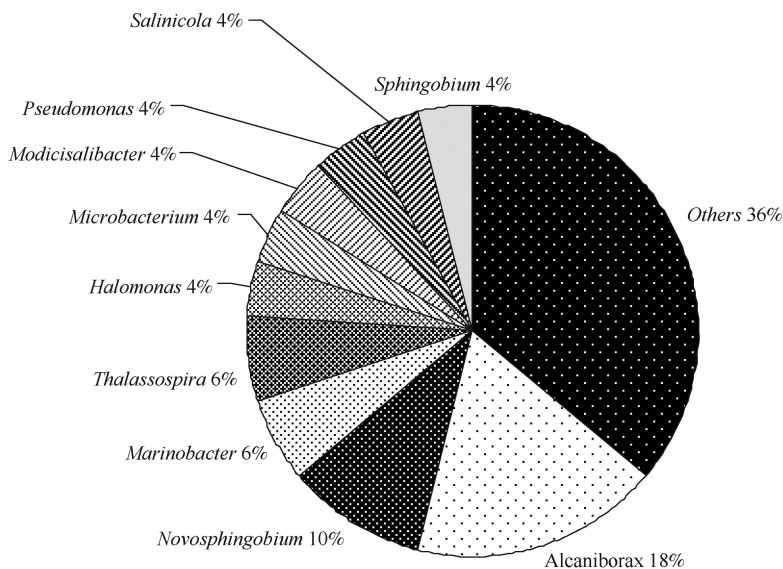


图 3 经富集后的各种潜在石油降解菌在总菌株中所占的比例

Fig. 3 The potential oil-degrading strains belong to the diversified genera percentage of total strains.

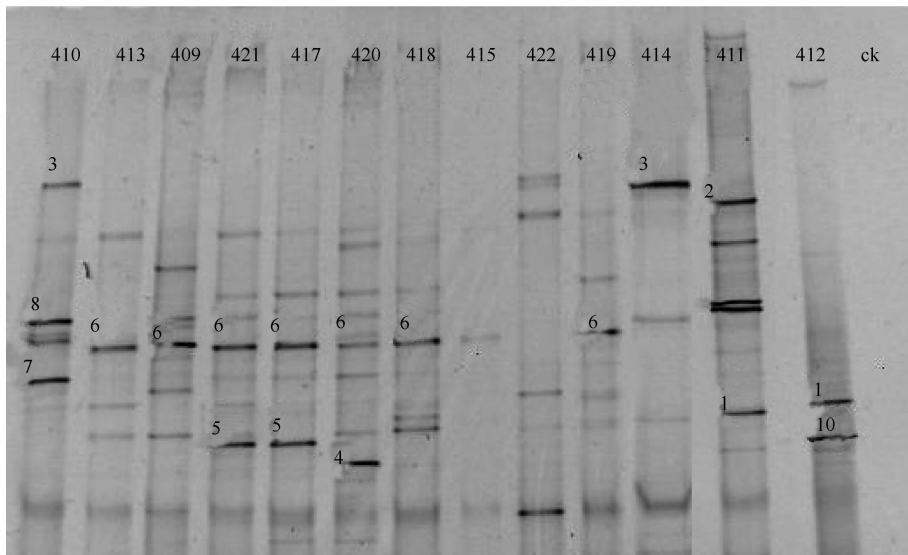


图 4 站点样品 DGGE 电泳分析图*

Fig. 4 Electrophoresis of oil-degrading bacteria DGGE. * 410, 413, 409, 421, 417, 420, 418, 415, 422, 419, 414, 411, 412 were the number of sampling sites, CK indicate the blank control.

表 2 经原油富集的降解菌群 DGGE 电泳中优势亮带分析

Table 2 The analysis of DGGE preponderant band of enriched by crude oil

Band number	Closest type strain	Accession	Similarity
1	<i>Alcanivorax dieselolei</i> B-5	AY683537	99%
2	<i>Pseudomonas stutzeri</i> CCUG 11256	PSU26262	99%
3	<i>Novosphingobium indicum</i> H25	EF549586	99%
4	<i>Acinetobacter venetianus</i> ZX-PKU-001	DQ912805	99%
5	<i>Alcanivorax balearicus</i> MACL04	AY686709	99%
6	<i>Alcanivorax venustensis</i> ISO4	AF328762	98%
7	<i>Marinobacter koreensis</i> DD-M3	DQ325514	99%
8	<i>Marinobacter lipolyticus</i> SM-19	NR_025671	99%
10	<i>Microbacterium insulae</i> DS-66	EU239498	99%

3 讨论

本实验首先对印度洋表层海水中石油降解菌进行富集,共分离后得到 51 株菌,可归属与 5 个亚纲(或纲)、20 个科、29 个属,可以分为 39 个物种。大部分菌株与模式菌株的 16S rRNA 较接近。根据 16S rRNA 基因序列相似性小于 97% 的菌株是新种的分类原则^[15],有 6 株菌可以认为是潜在的新种。其中, wcc32609 和 wcc33102 可能为 *Sphingobium* 属的新种,其他 4 株菌的分类地位还有待进一步确定。

通过 Shannon-Wiener 指数分析表明印度洋海水中石油降解菌多样性较高。进一步 DGGE 分析发现,降解菌群中的主要优势菌是 *Alcanivorax*, *Novosphingobium*, *Marinobacter* 和 *Thalassospira* 等,它们都是重要石油降解菌^[11-14]。*Alcanivorax*, *Marinobacter* 主要以烷烃降解为主,而 *Novosphingobium* 和 *Thalassospira* 主要以芳香烃降解

为主。其中, *Alcanivorax* 属的细菌能够利用多种烷烃,是已经报道的最为重要的海洋烷烃降解菌^[16-18]。该属的细菌不仅可以作为海洋油污染环境修复的重要功能菌,而且可以根据其丰度来指示海洋油污染情况。*Microbacterium* 属细菌在 412 号样品中是主要亮带之一(10 号条带),已报道该属的细菌在低温环境下对多环芳烃(PAHs)具有较强的降解能力^[19],并应用于油污染环境的治理当中^[20]。此外, DGGE 分析中还存在一些弱带,表明可能还有未分离到的降解菌。

根据文献报导,近海海水中的石油降解菌一般是以 α 和 γ 亚群为主,而这其中又以 γ 亚群为最主要^[18],本研究表明在印度洋表层海水中降解菌也是以 α 和 γ 亚群为主(表 1)。说明了这些菌无论在近海环境还是大洋环境都是重要的石油降解菌。单菌石油降解能力验证还首次发现了 *Sinomonas*, *Knoellia* 和 *Mesoflavibacter* 等菌属细菌也有石油降解能力。综上所述,印度洋表层海水中石油降解菌较

为丰富多样,它们在原位石油的自然消除中发挥着作用并在海洋石油污染生物修复中具有应用潜力。

参考文献

- [1] Head IM, Jones DM, R? ling WFM. Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Review Microbiology*, 2006, 4 (3): 173-182.
- [2] Swannell RP, Lee K, McDonagh M. Field evaluation of marine oil spill bioremediation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1996, 60 (2): 342-365.
- [3] Head IM. , Swannell RP. Bioremediation of potroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats. *Current opinion in Biotechnology*, 1999, 10 (3): 234-239.
- [4] Leahy JG, Colwell RR. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1990 54 (3): 305-315
- [5] Juhasz AL, Naidu R. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2000, 45 (1): 57-88.
- [6] Brakstad OG, Lødeng AG. Microbial diversity during biodegradation of crude oil in seawater from the North Sea. *Microbial Ecology*, 2005 ,49 (1): 94-103.
- [7] Brown MV, Philip GK, Bunge JA, Smith MC, Bissett A, Lauro FM, Fuhrman JA, Donachie SP. Microbial community structure in the North Pacific Ocean. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 2009, 3 (12): 1374-1386.
- [8] Groudieva T, Kambourova M, Yusef H, Royter M, Grote R, Trinks H, Antranikian G. Diversity and cold-active hydrolytic enzymes of culturable bacteria associated with Arctic sea ice, Spitzbergen *Extremophiles*, 2004,8 (6):475-488.
- [9] Wang L, Wang W, Lai Q, Shao Z. Gene diversity of CYP153A and AlkB alkane hydroxylases in oil-degrading bacteria isolated from the Atlantic Ocean. *Environmental Microbiology*, [Epub ahead of print]
- [10] 陈梦. 对生态系统及生物多样性等理论问题的探讨. 南京林业大学学报 (*Journal of Nanjing Forestry University*), 2003, 27 (5): 30-34.
- [11] Harayama S. Polycyclic hydrocarbon bioremediation design. *Current Opinion in Biotechnology*, 1997, 8 (3): 268-273.
- [12] Johnson GR, Olsen RH. Multiple pathways for toluene degradation in *Burkholderia* sp. strain JS150. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63 (10): 4047-4052.
- [13] Nakajima K, Sato A, Takahara Y, Iida T. Microbial oxidation of isoprenoid alkanes, phytane, norpristane and farnesane. *Agricultural Biology and Chemistry*. 1985, 49 (7): 1993 - 2002.
- [14] Van Beilen JB, Wubbolts MG, Witholt B. Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans*. *Biodegradation*. 1994 5 (3-4): 161-174.
- [15] Stackebrandt E, Goebel BM. Tax onomic note : a place for DNA-DNA reass ociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 1994 , 44 (4): 846 - 849.
- [16] Harayama S, Kishira H, Kasai Y, Shutsubo K. Petroleum biodegradation in marine environments. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 1999 1 (1): 63-70.
- [17] Kasai Y, Kishira H, Sasaki T, Syutsubo K, Watanabe K, Harayama S. Predominant growth of *Alcanivorax* strains in oil-contaminated and nutrient-supplemented sea water. *Environmental Microbiology*, 2002, 4 (3): 141-147.
- [18] Yakimov MM, Timmis KN, Golyshin PN. Obligate oil-degrading marine bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 2007, 18 (3): 257-266.
- [19] Sheng XF, He LY, Zhou L, Shen YY. Characterization of *Microbacterium* sp. F10a and its role in polycyclic aromatic hydrocarbon removal in low-temperature soil. *Canadian Journal of Microbiology*, 2009, 55 (5): 529-535.
- [20] Supaphol S, Panichsakpatana S, Trakulnaleamsai S, Tungkananuruk N, Roughjanajirapa P, O' Donnell AG. The selection of mixed microbial inocula in environmental biotechnology: example using petroleum contaminated tropical soils. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, 65 (3): 432-441.

Diversity of oil-degrading bacteria isolated from the Indian Ocean sea surface

Changliang Wu, Xin Wang, Zongze Shao*

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

Abstract: [**Objective**] In order to investigate the diversity of oil-degrading bacteria in the surface seawater across the India Ocean, and to obtain new oil-degrading bacteria. [**Methods**] Potential oil-degrading bacteria were selected out via 1:1 mixture of diesel and crude oil as sole carbon source. Meanwhile, the community structure of 13 enrichments was analyzed by polymerase chain reaction with denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE). [**Results**] We obtained 51 unique strains of 29 genera after screening via morphological, physiological, biochemical and 16S rRNA analyses. They mainly belonged to α and γ - Proteobacteria. The four genera *Alcanivorax* (accounting for 18%), *Novosphingobium* (10%), *Marinobacter* (6%) and *Thalassospira* (6%) were the most predominant bacteria. Ecological analyses showed that the bacteria had high diversity with Shannon-Winner index (H) of 4.57968, and distributed even with Evenness index (E) as 0.8664771. Then Further experiments revealed oil-degrading capability of 49 strains. In addition, our investigation revealed oil-degrading ability of genera *Sinomonas*, *Knoellia* and *Mesoflavibacter* for the first time. DGGE fingerprint patterns indicated that the genus *Alcanivorax* was an important oil-degrading bacteria in the surface seawater across the India Ocean. [**Conclusion**] This study demonstrated a high diversity of the oil-degradation bacteria in the surface seawater of Indian Ocean, these bacteria are of potential in bioremediation of marine oil pollution.

Keywords: Indian Ocean; biodegradation; petroleum; marine bacteria; diversity; DGGE

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Infrastructure of Natural Resources for Science and Technology Program of China (2005DKA21209) and the National Natural Science Foundation of China (30670051)

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

Received: 6 April 2010/Revised: 18 May 2010

《微生物学报》审稿程序

问: 贵刊的审稿程序是怎样的? 一般多长时间可以知道稿件是否被录用?

答: 本刊严格遵守“三审制”, 即: 编辑部内审, 专家外审, 主编总审。从投稿日期开始, 争取在 2 个月之内给出审稿结果, 5-7 个月之内发表。

- (1) 收到来稿后, 首先将请 2 位专家进行初审, 再送主编进行最后的总审, 这个过程一般不会超过 2 个月。如果初审 2 位专家的意见分歧较大, 编辑部将再请第 3 位专家进行初审, 之后再送主编总审, 那么此稿的审理时间可能会超过 2 个月。
- (2) 完成审稿后(即主编给出总审意见), 编辑会给作者发出 E-mail 告知修改意见(包括学术上的和写作格式上的)。作者在返回修改稿后, 经本刊审核合格后方可被录用。

在此提醒作者, 在没有完成全部审稿之前, 不要在远程系统中看到初审意见时就急于返回修改稿件。