

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
49 (7): 902–909; 4 July 2009  
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 大西洋洋中脊深海多环芳烃降解菌群的优势菌分析

崔志松<sup>1</sup>, 邵宗泽<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>国家海洋局第一海洋研究所海洋生态研究中心, 青岛 266061)

<sup>2</sup>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】为了分析大西洋洋中脊深海海水及表层沉积物中多环芳烃 (PAHs) 降解菌群中的优势菌。【方法】采用富集培养法和平板涂布法从深海样品中分离可培养细菌及 PAHs 降解菌。通过 16S rRNA 基因测序完成系统发育分析。采用变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 及 DNA 测序分析降解菌群中的优势菌。【结果】总共分离到 16 株细菌, 包括一株 PAHs 降解菌 *Novosphingobium* sp. 4D。系统发育分析发现, 可培养细菌中两个最大的类群分别与 *Alcanivorax dieselolei* NO1A (5/16) 和 *Tistrella mobilis* TISTR 1108<sup>T</sup> (5/16) 亲缘关系最近。DGGE 结果表明, 在菌群 MC2D 中菌株 4L (以及 4M、4N, *Alcanivorax dieselolei* NO1A, 99.21%)、4D (*Novosphingobium pentaromativorans* US6-1<sup>T</sup>, 97.07%) 和 4B (以及 4E、4H、4K, *Tistrella mobilis* TISTR 1108<sup>T</sup>, > 99%) 是降解菌群中的优势菌。而降解菌群 MC3CO 中的优势菌是菌株 5C (以及 5H, *Alcanivorax dieselolei* NO1A, > 99%)、条带 5-8 代表的未培养菌株 (*Novosphingobium aromaticivorans* DSM 12444<sup>T</sup>, 99.41%)、5J (*Tistrella mobilis* TISTR 1108<sup>T</sup>, 99.52%) 和 5F (以及 5G, *Thalassospira lucentensis* DSM 14000<sup>T</sup>, < 97%)。【结论】本研究发现在大西洋洋中脊深海海水及表层沉积物中 *Alcanivorax*、*Novosphingobium*、*Thalassospira*、*Tistrella* 属的细菌是 PAHs 降解菌群中的优势菌, 其中的主要降解菌是 *Novosphingobium* 属的细菌。

**关键词:** 多环芳烃; 生物降解; 大西洋洋中脊; 深海; 新鞘氨醇杆菌

中图分类号: Q938.1 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2009) 07-0902-08

海洋占地球面积的 70%, 而 2000 米以上的深海占 60%<sup>[1]</sup>。深海环境高静水压、低温、缺乏光照, 是极其特殊的生境, 以前一度被认为是不毛之地, 后来发现其中蕴藏着非常高的生物多样性。深海是目前生命科学研究领域的前沿之一, 深海资源 (包括微生物资源) 也是人类亟需开发的自然资源。随着工业社会发展, 人类活动范围的扩大, 原本受人类活动影响较小的深海也逐渐受到污染。深海环境中存在哪些类型的有机污染物降解菌, 以及它们在污染物碳循环过程中起到的作用引人关心。

我们研究小组在以前的文章中连续报道了深海环境中的解环菌属细菌, 并且对其在 PAHs 去除过程中的重要性进行了详细的阐述<sup>[2-3]</sup>。然而, 海洋环境中的微生物资源丰富多变, 同样是深海环境, 在不同的地理位置却蕴藏着不同的微生物种资源。

鞘氨醇单胞菌科是土壤环境和海洋环境中常见的一类降解菌, 其中包括多个跟 PAHs 降解密切相关的属, 比如鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*)、鞘氨醇杆菌属 (*Sphingobium*)、新鞘氨醇杆菌属 (*Novosphingobium*) 以及 *Sphingopyxis* 属。它们在

**基金项目:** 大洋协会项目 (DY115-02-2-05); 国家自然科学基金 (40376041; 30670051); 国家自然资源科技基础设施项目 (2005DKA21209); 公益性行业科研专项经费 (200705011); 海洋一所基本科研业务费专项资金 (2008G15); 国家海洋局海洋溢油鉴别与损害评估技术重点实验室开放基金 (200707)

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

**作者简介:** 崔志松 (1981–), 男, 山东青岛人, 助研, 硕士, 主要从事溢油生物修复方面的研究工作。E-mail: czs@fio.org.cn

收稿日期: 2008-12-23; 修回日期: 2009-03-09

PAHs 的降解过程中扮演非常重要的角色。研究发现: 这类降解菌的降解基因无论从基因核苷酸序列的相似度来看, 还是从基因间的排布顺序来看都跟研究最多的假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 以及其它菌属有很大差异。比如, 在 *Novosphingobium aromaticivorans* F199 中降解萘的基因和降解甲苯的基因是相互交叉分布的<sup>[4]</sup>; 而在假单胞菌中, 降解萘的基因仅仅分为上、下游两个基因簇, 其中不掺杂负责降解其它芳香烃的基因<sup>[5-6]</sup>。

这类降解菌不但具有较强的降解能力, 还具有广泛的碳源利用能力, 例如菌株 *Novosphingobium aromaticivorans* F199<sup>[4]</sup>、*Sphingomonas* sp. CHY-1<sup>[7-8]</sup>、*Novosphingobium pentaromativorans* US6-1<sup>[9]</sup>、*Sphingomonas* sp. A4<sup>[10]</sup>, 可以降解从单环芳烃到高分子量多环芳烃在内的多种海洋污染物, 由此可见这类降解菌在海洋环境中的生物多样性及其重要性。本文报道了从大西洋洋中脊深海表层沉积物、海水样品中分离、检测到的这类重要的降解菌, 并通过 DGGE 技术对多环芳烃降解菌群中的优势菌进行了分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂和仪器:** 萘 (上海国药集团, 纯度 99.8%); 菲 (Fluka, > 97%); 芘 (Sigma, 98%); 蛋白胨、酵母浸出膏 (OXOID); 琼脂粉 (Bio Basic Inc.); CTAB、SDS、Tris、TEMED、丙烯酰胺、N, N'-甲叉双丙烯酰胺、过硫酸铵 (Sigma); Taq 酶、dNTP、Agarose (电泳级)、DNA 分子量标准 (TaKaRa)。Dcode Universal Mutation Detection System (Bio-rad); PCR 仪 (Eppendorf); 凝胶成像仪 (AlphaInnotech); 电子分析天平 (Sartorius); pH 计 (奥立龙); 磁力加热搅拌器 (IKA); 恒温培养箱 (Memmert); 恒温培养摇床 (上海智诚)。

**1.1.2 培养基:** ①富集 PAHs 降解菌群培养基: 在 1 L 陈海水中分别添加 1 g 硝酸铵, 0.8 g 磷酸二氢钾, 0.2 g 磷酸氢二钾,  $2.8 \times 10^{-3}$  g 硫酸亚铁, 然后加入零号柴油 (2%, 体积比)、石油 (1%, 质量体积比) 或者 PAHs 混合物 (萘 0.4 g/L, 菲 0.4 g/L, 芘 0.2 g/L) 作为细菌生长碳源。②M8 培养基<sup>[1]</sup>。

### 1.2 沉积物采样、描述及降解菌群的富集、转接

样品 MAR-MC2 (W 24°23.24'; N 0°9.96') 是由“大洋一号”科学考察船在 2005 年 DY105-17A 环球航次中从大西洋洋中脊 3511m 深海用多管采样器采集到的上覆水样品。样品 MAR-MC3 (W 11°68.35'; S 21°18.90') 是从大西洋洋中脊 4046 m 深海用多管采

样器采集到的 0~18 cm 黄色沉积物。

样品采集后立即在船上实验室进行富集培养: 在 100 mL 含有 2 mL 柴油的陈海水培养基中加入 5 mL 上覆水样品 MAR-MC2, 在 28°C、180 r/min、避光的条件下摇床培养 2 个月; 然后将该培养物在 100 mL 含有 PAHs 混合物的陈海水培养基中连续转接 2 次, 得到 PAHs 降解菌群 MC2D。另外, 在 100 mL 含有 1 g 原油的陈海水培养基中加入 2g 沉积物样品 MAR-MC3, 在同样条件下摇床培养 2 个月; 然后将培养物在 100 mL 含有 PAHs 混合物的陈海水培养基中连续转接 2 次, 得到 PAHs 降解菌群 MC3CO。

### 1.3 单菌分离及降解菌的验证

将上述第 2 次转接的对数生长后期培养物按照 10 倍系列用无菌陈海水进行梯度稀释, 并且将合适的连续 3 个梯度涂布于 M8 培养基平板, 于 28°C 倒置培养。将所有不同形态特征的单菌落用无菌牙签挑取并划线到新鲜的 M8 平板。重复划线 1~2 次以获得细菌纯培养。

用牙签挑取纯培养单菌落接种到 M8 液体培养基于 28°C 过夜培养, 取 1.5 mL 对数生长后期培养物, 经离心、去上清、陈海水重悬处理后接种到含有 PAHs 混合物的陈海水培养基以验证其降解能力。经过 2~4 周培养后, 培养物变混浊或产生红色、褐色的初步判定为降解菌。不接种任何微生物的处理作为阴性对照。

### 1.4 16S rRNA 的扩增、测序、比对及系统发育分析

采用细菌通用引物 16SF (5'-AGAGTTTGATCC TGGCTCAG-3'), 16SR (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACT-3') PCR 扩增 16S rRNA 序列。

扩增到的 PCR 产物经 E.Z.N.A Cycle-Pure 试剂盒纯化后, 直接送至上海博亚公司进行测序, 测序引物为 P300 (5'-CCAGACTCCTACGGGAGGCAGC-3')。

测序得到的结果提交到 NCBI 网站进行 BLASTN 在线序列分析, 得到 GenBank 中与检索菌株亲缘关系最近的参考菌株的 16S rRNA 基因序列。将检索菌株及参考菌株的 16S rRNA 序列导入序列分析软件 DNAMAN 进行分析, 构建系统发育树。

### 1.5 变性梯度凝胶电泳 (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, 简称 DGGE)

采用 SDS 法提取富集降解菌群样品中的 DNA 作为 DGGE-PCR 反应的模板。采用引物 V3F (5'-CGCCCGCCGCGCGGGCGGGCGGGCGGGGCACGGG GGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3')、V3R (5'-ATTAC CGCGGCTGCTGG-3') 对细菌 16S rRNA 序列的 V3 区

进行 PCR 扩增。采用的 PCR 程序如下: 95°C 4 min; 94°C 1min, 65°C 退火温度每个循环降低 0.5°C) 1 min, 72°C 1 min, 循环 20 次; 94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min, 循环 18 次; 72°C 10 min。

DGGE 胶中聚丙烯酰胺的浓度为 8%, 变性剂使用范围为 20% ~ 65%。将电泳缓冲液预热至 60°C, 然后加样。降解菌群 DNA 作为模板的, 每个样品平行做 3 管共 150  $\mu$ L; 上样前需要将 PCR 产物用无水乙醇沉淀并浓缩到 15  $\mu$ L, 然后与 Loading Buffer 混匀后上样。单菌每个样品做 1 管 50  $\mu$ L 即可, 每次取 15  $\mu$ L 与 Loading Buffer 混匀后上样。电泳程序如下: 30 V, 15 min; 130 V, 4.5 h。

### 1.6 DGGE 胶中目标片段的回收、测序及比对分析

DGGE 电泳结束后将胶从玻璃板上小心剥离, 浸入 EB 溶液染色 20 min, 然后拍照。将没有和单菌条带对应的菌群条带按照编号依次切除, 置于 1.5 mL 离心管。切下的胶条用 DDW 冲洗 2 ~ 3 次, 然后用钝吸头将胶条捣成碎屑。加入 15  $\mu$ L DDW, 冻融处理 2 次, 以充分释放胶中的 DNA。以含有目标 DNA 片段的溶液为模板, 以引物 V3F, V3R 重新 PCR 扩增。PCR 产物经纯化、连接后, 转化 *E. coli*, 挑取阳性重组子测序并对测序结果进行比对分析。

## 2 结果

### 2.1 降解菌群的获得、单菌分离及其系统发育分析

以柴油为唯一碳源和能源对上覆水样品 MAR-

MC2 进行烃类降解菌的富集, 待柴油消耗殆尽时, 可以观察到培养物的浊度明显提高; 转接到以 PAHs 混合物为唯一碳源和能源的培养基之后, 大约 2 ~ 3 d 即可观察到典型的因 PAHs 降解中间物积累而引起的颜色变化, 并且在随后的培养过程中细菌的生物量不断提高; 2 周后再转接到 PAHs 混合物中, 最后得到的 PAHs 降解菌群命名为 MC2D。

以原油为唯一碳源和能源对沉积物样品 MAR-MC3 进行烃类降解菌的富集, 在静置后的培养物中可以观察到由于细菌的乳化、降解作用石油逐渐溶到水相, 并且石油降解菌的生长使水相的浊度进一步提高; 转接到以 PAHs 混合物为唯一碳源和能源的培养基之后, 大约 2 ~ 3 d 即可观察到因 PAHs 降解而引起的颜色变化以及浊度提高; 2 周后再转接到 PAHs 混合物中, 得到的 PAHs 降解菌群命名为 MC3CO。

在 M8 平板培养基上, 总共从菌群 MC2D 中筛选到 10 株细菌, 而从菌群 MC3CO 中筛选到 6 株细菌。以细菌纯培养的基因组 DNA 为模板 PCR 克隆到的 16S rRNA 基因约 1.5 Kb, 经纯化后直接测序, 将测序结果 (> 800 bp) 提交到 NCBI 以 BLASTN 程序进行比对分析, 得到 GenBank 中与其亲缘关系最近的参考菌株 (表 1)。然后以近邻法将所有的检索菌株及参考菌株的序列导入生物软件 DNAMAN 构建系统发育树 (图 1)。

表 1 PAHs 降解菌群中可培养细菌的 16S rRNA 分析\*

Table 1 Bacterial isolates and their 16S rRNA sequences analysis from two PAHs-degrading consortia\*

Strains (Accession No.)	Closest type strains in GenBank database (Accession No.)	Length of fragment for alignment analysis/bp	Similarity/%
4B DQ768677)	<i>Tistrella mobilis</i> TISTR 1108 <sup>T</sup> (AB071665)	849	99.53
4D DQ768678)	<i>Novosphingobium pentaromativorans</i> US6-1 <sup>T</sup> (AF502400)	854	97.07
4E DQ768679)	<i>Tistrella mobilis</i> TISTR 1108 <sup>T</sup> (AB071665)	851	99.41
4H DQ768680)	<i>Tistrella mobilis</i> TISTR 1108 <sup>T</sup> (AB071665)	853	99.88
4J DQ768681)	<i>Alcanivorax venusti</i> ISO4 <sup>T</sup> (AF328762)	875	98.63
4K DQ768682)	<i>Tistrella mobilis</i> TISTR 1108 <sup>T</sup> (AB071665)	850	99.41
4L DQ768683)	<i>Alcanivorax dieselolei</i> NO1A (AY683531)	880	99.21
4M DQ768684)	<i>Alcanivorax dieselolei</i> NO1A (AY683531)	877	99.77
4N DQ768685)	<i>Alcanivorax dieselolei</i> NO1A (AY683531)	877	99.66
4P DQ768676)	<i>Stella humosa</i> DSM5900 (SHU535710)	856	91.24
5A DQ768687)	<i>Halomonas meridiana</i> DSM5425 (HME306891)	866	99.89
5C DQ768688)	<i>Alcanivorax dieselolei</i> NO1A (AY683531)	867	99.54
5F DQ768689)	<i>Thalassospira lucentensis</i> DSM 14000 <sup>T</sup> (AF358664)	814	95.58
5G DQ768690)	<i>Thalassospira lucentensis</i> DSM 14000 <sup>T</sup> (AF358664)	844	96.68
5H DQ768691)	<i>Alcanivorax dieselolei</i> NO1A (AY683531)	867	99.42
5J DQ768686)	<i>Tistrella mobilis</i> TISTR 1108 <sup>T</sup> (AB071665)	828	99.52

\* Isolates numbered with 4' before a letter were obtained from consortium MC2D, and numbered with 5' from consortium MC3CO.

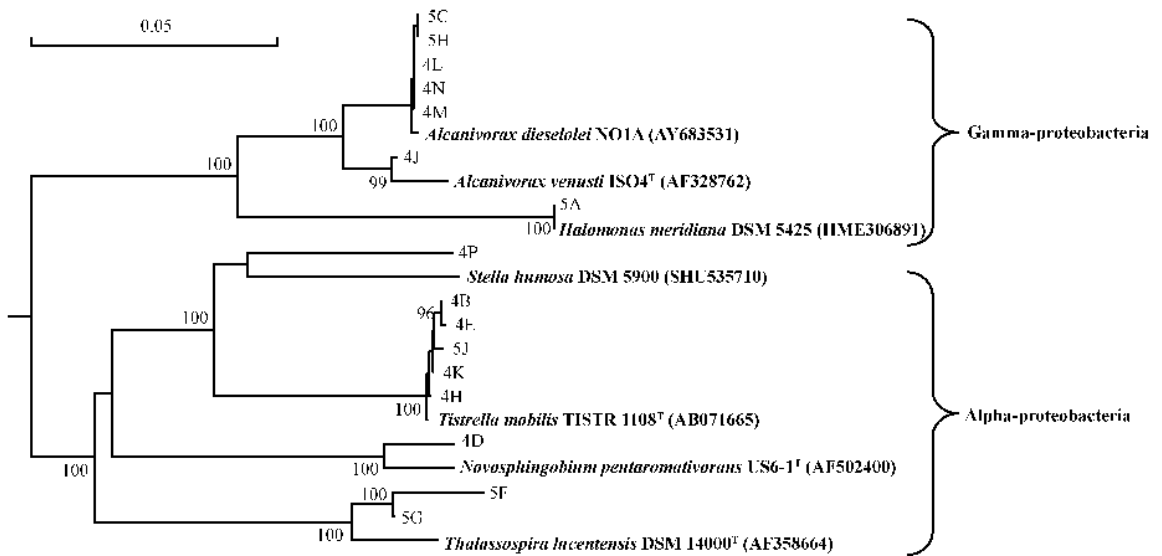


图1 PAHs降解菌群中可培养细菌系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic analysis of the isolates from PAHs-degrading consortia MC2D and MC3CO. The phylogenetic tree was constructed based on 16S rRNA gene sequences fragments (about 860 bp). 4' and 5' in isolate numbers stand for consortia MC2D and MC3CO respectively. Reference strains used in the phylogenetic tree can be retrieved by the database accession number in parentheses. The numbers at the branch nodes are bootstrap values based on 1000 resamplings for maximum likelihood. Only bootstrap values greater than 90% are shown. Scale bar equals approximately 5% nucleotide divergence.

## 2.2 可培养细菌 16S rRNA 鉴定、降解能力验证

在所有分离到的可培养菌株中,两个最大的类群分别是与 *Alcanivorax dieselolei* NO1A (5/16) 和 *Tistrella mobilis* TISTR 1108<sup>T</sup> (5/16) 亲缘关系最近的菌株。*A. dieselolei* NO1A 是从东太平洋深海沉积物中分离到的,能够降解多种烷烃<sup>[1]</sup>。*T. mobilis* TISTR 1108<sup>T</sup> 不能利用烃类作为生长碳源,但是可以在细胞内累积 PHAs (聚羟基脂肪酸酯)<sup>[2]</sup>。

同菌株 4D 相似度最高的是 *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1<sup>T</sup> (97.07%), 菌株 US6-1 能够利用多种 2~5 环的 PAHs 作为生长碳源<sup>[3]</sup>。菌株 4J 跟 *Alcanivorax venusti* ISO4<sup>T</sup> 的相似度达到 98.63%, 菌株 ISO4 耐盐并且可以利用烷烃作为生长碳源<sup>[3]</sup>。菌株 4P 跟 *Stella humosa* 的最高相似度仅为 91.24%, 它有可能代表一个新属。

菌株 5A 跟 *Halomonas meridiana* DSM5425 的相似度达到 99.89%, 但是它不能降解包括 PAHs 在内的任何烃类。在 GenBank 中同菌株 5F、5G 相似度最高的是 *Thalassospira lucentensis* DSM 14000<sup>T</sup> (< 97%), 该菌株也不能降解烃类。

对纯培养菌株的 PAHs 降解能力进行了测定, 发现除了菌株 4D 能够降解含有萘、菲、芘的 PAHs 混合物以外, 其它菌株都不是 PAHs 降解菌。说明通过常规的平板筛选方法, 并不能获得降解菌群中的所有降解菌。而通过不依赖培养的分子生态学方

法变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 可以在一定程度上定量反映降解菌群中的主要类群及相对丰度。

## 2.3 PAHs 降解菌群中可培养优势菌的确定

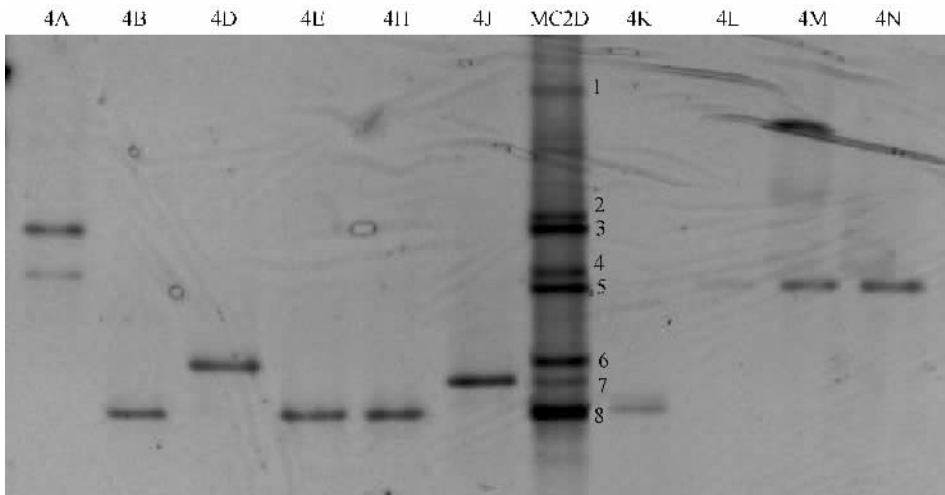
### 2.3.1 PAHs 降解菌群 MC2D 中的可培养优势菌:

分别以降解菌群总 DNA 和纯培养细菌基因组 DNA 为模板 PCR 扩增其 16S rRNA 基因 V3 区约 200 bp 的片段。通过 DGGE 分析发现: 菌群 MC2D 中含有 8 个主要的条带, 其中条带 4-3 和 4-8 的亮度最强, 4-5、4-6 次之, 4-2、4-4 较弱, 4-1、4-7 最弱。菌群中条带亮度的强弱反映细菌的相对丰度, 条带 4-3、4-5、4-6 和 4-8 所代表的菌株为在该菌群中的优势菌。

如图 2 所示, 跟条带 4-3 对应的菌株是 4A, 而跟条带 4-8 对应的菌株是 4B、4E、4H、4K (*T. mobilis* TISTR 1108<sup>T</sup>, >99%)。它们虽然是降解菌群中的优势菌, 但 PAHs 降解实验表明它们并不是 PAHs 降解菌。

菌株 4L、4M 及 4N (*A. dieselolei* NO1A, 99.21%) 和条带 4-5 对应、菌株 4D (*N. pentaromativorans* US6-1<sup>T</sup>, 97.07%) 和条带 4-6 对应。上述 2 种细菌分别是海洋专属烷烃、PAHs 降解菌, 也是这个降解菌群中的优势菌。

菌株 4J (*A. venusti* ISO4<sup>T</sup>, 98.63%) 和弱条带 4-7 对应。弱条带 4-1、4-2 和 4-4 不能和分离到的细菌相互对应, 它们属于菌群中的未培养菌株。对这 3 个条带进行回收、测序, 并通过序列分析确定其种属地位。

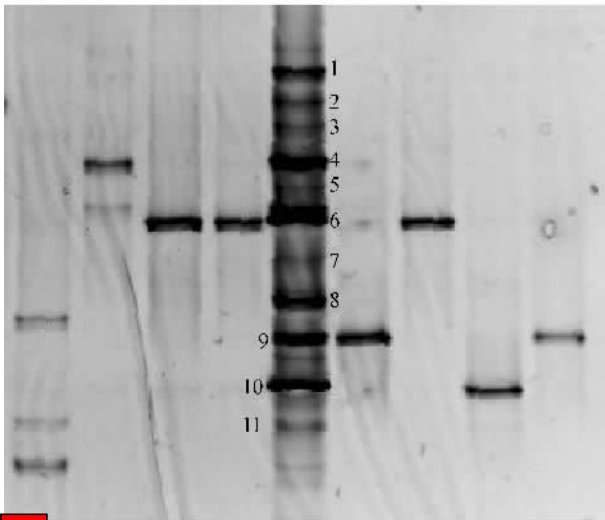


### 2.2 DGGE 分析 PAHs 降解菌群 MC2D 中的优势菌

Fig.2 DGGE profile (20 to 65% denaturant) of PCR-amplified V3 region fragments of 16S rRNA gene from consortium MC2D and its isolates. PCR products of all single isolates from this consortium were loaded. Lane 4A, 4B, 4D, 4E, 4H and 4J stand for isolate 4A, 4B, 4D, 4E, 4H and 4J, respectively; lane MC2D, consortium MC2D; lane 4K, 4L, 4M and 4N stand for isolate 4K, 4L, 4M and 4N, respectively. Predominant DGGE bands 1 ~ 8 correspond to bands 4-1 ~ 4-8 respectively.

**2.3.2 PAHs 降解菌群 MC3CO 中的可培养优势菌:** 如前所述进行 DGGE 分析发现: PAHs 降解菌群 MC3CO 中共含有 11 个条带, 其中条带 5-4、5-6、5-8、5-9、5-10 的亮度最强, 5-1 次之, 5-2、5-3、5-5、5-7、5-11 较弱。

5A 5B 5C 5E, MC3CO 5G 5H 5J 5F



### 2.3 DGGE 分析 PAHs 降解菌群 MC3CO 中的优势菌

Fig.3 DGGE profile (20 to 65% denaturant) of PCR-amplified V3 region fragments of 16S rRNA gene from consortium MC3CO and its isolates. PCR products of all single isolates from this consortium were loaded. Lanes 5A, 5B, 5C and 5E stand for isolate 5A, 5B, 5C and 5E, respectively; lane MC3CO, consortium MC3CO; lanes 5G, 5H, 5J and 5F stand for isolate 5G, 5H, 5J and 5F, respectively. Predominant DGGE bands 1 ~ 11 correspond to bands 5-1 ~ 5-11 respectively.

如图 3 所示, 在最亮的 5 个条带中, 除了条带 5-8 没有对应的可培养菌株外, 其余 4 个条带都有各自对应的菌株。其中条带 5-4 和菌株 5B 对应; 条带 5-6 和菌株 5C、5H (*A. dieselolei* NO1A, >99%) 对应; 条带 5-9 与菌株 5G、5F (*T. lucentensis* DSM 14000<sup>T</sup>, <97%) 对应; 条带 5-10 与菌株 5J (*T. mobilis* TISTR 1108<sup>T</sup>, 99.52%) 对应。以上 5 个条带所代表的菌株为该菌群中的优势菌, 它们当中仅有菌株 5C、5H 是烷烃降解菌, 而没有跟 PAHs 降解有关的; 但是, 能够降解 PAHs 的细菌可能存在于未培养优势菌中。

菌株 5A (*H. meridiana* DSM5425, 99.89%) 和弱条带 5-11 相对应。其余 5 个弱条带都没有对应的菌株, 对这些降解菌群条带也进行回收、测序。

### 2.4 PAHs 降解菌群中未培养优势菌的确定

**2.4.1 PAHs 降解菌群 MC2D 中的未培养优势菌:** 目标条带经切胶回收后, 进行测序、比对 (表 2)。条带 4-1 没有扩增到目的序列。条带 4-2 与 *Alcanivorax borkumensis* Sk2<sup>T</sup> 的 16S rRNA 相似度仅为 96.91%, 它可能代表一个新种。 *A. borkumensis* Sk2<sup>T</sup> 既能降解烷烃, 又可以产生表面活性剂提高烷烃的生物利用度及降解效率 [4]。条带 4-4 与 *Alteromonas litorea* TF-22<sup>T</sup> 的相似度为 100%, 但没有报道显示它能够降解烃类。

**2.4.2 PAHs 降解菌群 MC3CO 中的未培养优势菌:** 在切下的 6 个条带中, 有 3 个条带 (5-2、5-5、5-7) 没有得到目的序列。条带 5-1 与 *Pseudomonas aeruginosa* PD100 相似度为 99.48%。条带 5-3 跟

*Alcaligenes* sp. IS-67 的相似度为 100%, 菌株 IS-67 可以降解酚类化合物<sup>[5]</sup>。条带 5-8 跟 *Novosphingobium aromaticivorans* DSM 12444<sup>T</sup> 的相似度为 99.41%。菌株 DSM 12444 能利用的芳香烃 (或芳

香烃降解中间物)包括: 甲苯、二甲苯、对-甲酚、萘、联苯、二苯并噻吩、茈、水杨酸和苯甲酸;但是它不能利用菲、芘等分子量较大的 PAHs 作为唯一碳源和能源<sup>[6]</sup>。

表 2 从 DGGE 胶中切下的菌群条带及测序比对结果

Table 2 Sequence analyses of bands retrieved from the 16S rRNA DGGE profiles

Bands	GenBank Accession No. ) <sup>a</sup>	Similarity <sup>b</sup>	Most closely related strains in GenBank (Accession No.)
4-2	DQ768710)	188/194 96.91%)	<i>Alcanivorax borkumensis</i> Sk2 <sup>T</sup> (ABY12579)
4-4	DQ768711)	194/194 100%)	<i>Alteromonas litorea</i> TF-22 <sup>T</sup> (AY428573.1)
5-1	DQ768706)	193/194 99.48%)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PD100 (AY825034.1)
5-3	DQ768713)	194/194 100%)	<i>Alcaligenes</i> sp. IS-67 (AY346140)
5-8	DQ768707)	168/169 99.41%)	<i>Novosphingobium aromaticivorans</i> DSM 12444 <sup>T</sup> (CP000248.1)

a. Numbers before ‘)’ stand for codes of the consortia. Number 4 stands for consortium MC2D, 5 stands for consortium MC3CO. Numbers after ‘)’ stand for numbering of the bands in the DGGE profiles. b. Identical nucleotide (bp)/length for alignment (bp).

### 3 讨论

两个降解菌群有类似的群落结构, 与 *Alcanivorax dieselolei* NO1A 和 *Tistrella mobilis* TISTR 1108<sup>T</sup> 亲缘关系最近的菌株, 以及 *Novosphingobium* 属的两株细菌, 构成了这两个降解菌群的绝对优势菌。然而, 它们各自的降解特性有可能存在差异<sup>[5,16]</sup>。另外, 在菌群 MC3CO 中与 *Thalassospira lucentensis* DSM 14000<sup>T</sup> 亲缘关系最近的菌株 (5G、5F) 也是其中的绝对优势菌。

食烷菌属细菌 (*Alcanivorax* spp.) 是海洋环境中非常重要的一类烃类降解菌, 它主要负责石油中烷烃组分的降解<sup>[7]</sup>。在本实验中, 由于采用了石油、柴油作为初始碳源对样品进行富集, 因此即使在 PAHs 作为唯一碳源的培养基中进行了两次转接后, 在降解菌群中仍然可以分离到大量该属的细菌, 包括可培养细菌 *Alcanivorax dieselolei* NO1A 和 *Alcanivorax venusti* ISO4<sup>T</sup> (表 1, 图 2, 图 3) 以及条带 4-2 所代表的一株与 *Alcanivorax borkumensis* Sk2<sup>T</sup> 相似度仅为 96.91% 的未培养细菌<sup>[4]</sup>。这些食烷菌属菌株有的是各自降解菌群中的优势菌, 它们在降解菌群中的主要贡献可能是: 分泌生物表面活性剂、胞外多糖等以提高 PAHs 的生物利用度、加快 PAHs 的降解过程<sup>[4,18]</sup>。Yakimov 等的研究发现菌株 *Alcanivorax borkumensis* SK2 分泌到胞外或结合于细胞表面的一种葡萄糖脂表面活性剂可以使水的表面张力从 72 mN m<sup>-1</sup> 下降到 29 mN m<sup>-1</sup>, 这样的表面活性可以充分提高烃类物质的传质速率, 加快烃类物质的降解过程。Iwabuchi 等人的研究也发现: 菌株

*Rhodococcus rhodochrous* S-2 分泌的一种胞外多糖不但可以提高细菌细胞本身对阿拉伯轻质原油中芳香烃组分的耐受度, 而且在海水中添加该胞外多糖可以促进芳香烃组分的乳化, 刺激土著降解菌解环菌属细菌 (*Cycloclasticus* spp.) 的生长, 改变菌群结构, 显著提高对芳香烃组分的降解效果。

在这两个不同的降解菌群中, 与 *Tistrella mobilis* TISTR 1108<sup>T</sup> 相似度最高的菌株都是优势菌, 但是 PAHs 降解能力测定实验的结果表明它并不能够利用任何 PAHs 作为生长碳源。然而, 该菌株极有可能在降解过程中起到其它作用, 比如利用 PAHs 代谢中间物作为生长碳源, 和主要降解菌的代谢系统形成互补将 PAHs 彻底降解为二氧化碳和水。菌株之间的协同降解实验将是我们下一步工作的重点之一。另外, 与 *Thalassospira lucentensis* DSM 14000<sup>T</sup> 相似度最高的优势菌在降解菌群 MC3CO 中的作用也值得探讨。

在菌群 MC2D 中菌株 4D (*N. pentaromativorans* US6-1<sup>T</sup>, 97.07%) 是降解菌群中的优势降解菌, 它可能在 PAHs 降解过程中发挥主导作用。同样, 在菌群 MC3CO 中, 条带 5~8 所代表的优势菌是与 *Novosphingobium aromaticivorans* DSM 12444<sup>T</sup> [5,16] 的相似度为 99.41% 的菌株, 该菌株也极可能是降解菌群中起主导作用的降解菌 (图 3)。然而, 通过平板分离技术并没有得到该菌株的纯培养, 这需要进一步改进培养条件以获得更多的降解菌。在深海环境中分离到此类降解菌表明该属细菌在海洋中的广泛地理分布及其在有机污染物去除过程中可能发挥的重要作用。

## 参考文献

- [1] Bull AT, Ward AC, Goodfellow M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, 64: 573 – 606.
- [2] Wang B, Lai Q, Cui Z. A pyrene-degrading consortium from deep-sea sediment of the West Pacific and its key member *Cycloclasticus* sp. P1. *Environmental Microbiology*, 2008, 10 (8): 1948 – 1963.
- [3] Cui Z, Lai Q, Dong C. Biodiversity of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from deep sea sediments of the Middle Atlantic Ridge. *Environmental Microbiology*, 2008, 10 (8): 2138 – 2149.
- [4] Romine MF, Stillwell LC, Saffer JD, et al. Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181: 1585 – 1602.
- [5] Bosch R, Moore ERB. Complete nucleotide sequence and evolutionary significance of a chromosomally encoded naphthalene-degradation lower pathway. *Gene*, 2000, 245: 65 – 74.
- [6] Bosch R, Moore ERB. Genetic characterization and evolutionary implications of a chromosomally encoded naphthalene-degradation upper pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN10. *Gene*, 1999a, 236: 149 – 157.
- [7] Willison JC. Isolation and characterization of a novel sphingomonad capable of growth with chrysene as sole carbon and energy source. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 241: 143 – 150.
- [8] Demanèche S, Meyer C, Jouanneau Y, et al. Identification and functional analysis of two aromatic-ring-hydroxylating dioxygenases from a *Sphingomonas* strain that degrades various polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70: 6714 – 6725.
- [9] Sohn JH, Kwon KK, Kim S-J. *Novosphingobium pentaromativorans* sp. nov., a high-molecular-mass polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from estuarine sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54: 1483 – 1487.
- [10] Pinyakong O, Habe H, Omori T, et al. Isolation and characterization of genes encoding polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase from acenaphthene and acenaphthylene degrading *Sphingomonas* sp. strain A4. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 238: 297 – 305.
- [11] Liu C, Shao Z. *Alcanivorax dieselolei* sp. nov., a novel alkane-degrading bacterium isolated from sea water and deep-sea sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55: 1181 – 1186.
- [12] Shi BH, Arunpairojana V, Palakawong S. *Tistrella mobilis* gen. nov., sp. nov., a novel polyhydroxyalkanoate-producing bacterium belonging to  $\alpha$ -Proteobacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2002, 48 (6): 335 – 343.
- [13] Fernández-Martínez J, Pujalte MJ, García-Martínez J. Description of *Alcanivorax venustensis* sp. nov. and reclassification of *Fundibacter jadensis* DSM 12178<sup>T</sup> (Bruns and Berthe-Corti 1999) as *Alcanivorax jadensis* comb. nov., members of the emended genus *Alcanivorax*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53: 331 – 338.
- [14] Yakimov MM, Golyshin PN, Lang S. *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1998, 48: 339 – 348.
- [15] Zhang X, Gao P, Chao Q. Microdiversity of phenol hydroxylase genes among phenol-degrading isolates of *Alcaligenes* sp. from an activated sludge system. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 237 (2): 369 – 375.
- [16] Stillwell LC, Thurston SJ, Saffer JD. Physical mapping and characterization of a catabolic plasmid from the deep-subsurface bacterium *Sphingomonas* sp. strain F199. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177: 4537 – 4539.
- [17] Harayama S, Kasai Y, Hara A. Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Current Opinion in Biotechnology*, 2004, 15: 205 – 214.
- [18] Iwabuchi N, Sunairi M, Urai M. Extracellular polysaccharides of *Rhodococcus rhodochrous* S-2 stimulate the degradation of aromatic components in crude oil by indigenous marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68: 2337 – 2343.

## Predominant strains of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading consortia from deep sea of the Middle Atlantic Ridge

Zhisong Cui<sup>1</sup>, Zongze Shao<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Marine Ecology Research Center, The First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao 266061, China)

<sup>2</sup> Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, The Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** [Objective] In order to identify the predominant strains of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading consortia harboring in sea water and surface sediment collected from deep sea of the Middle Atlantic Ridge. [Methods] We employed enrichment method and spread-plate method to isolate cultivable bacteria and PAHs degraders from deep sea samples. Phylogenetic analysis was conducted by 16S rRNA gene sequencing of the bacteria. Then we analyzed the dominant bacteria in the PAHs-degrading consortia by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) combined with DNA sequencing. [Results] Altogether 16 cultivable bacteria were obtained, including one PAHs degrader *Novosphingobium* sp. 4D. Phylogenetic analysis showed that strains closely related to *Alcanivorax dieselolei* NO1A (5/16) and *Tistrella mobilis* TISTR 1108<sup>T</sup> (5/16) constituted two biggest groups among the cultivable bacteria. DGGE analysis showed that strain 4L (also 4M and 4N, *Alcanivorax dieselolei* NO1A, 99.21%), 4D (*Novosphingobium pentaromativorans* US6-1<sup>T</sup>, 97.07%) and 4B (also 4E, 4H and 4K, *Tistrella mobilis* TISTR 1108<sup>T</sup>, >99%) dominated the consortium MC2D. While in consortium MC3CO, the predominant strains were strain 5C (also 5H, *Alcanivorax dieselolei* NO1A, >99%), uncultivable strain represented by band 5-8 (*Novosphingobium aromaticivorans* DSM 12444<sup>T</sup>, 99.41%), 5J (*Tistrella mobilis* TISTR 1108<sup>T</sup>, 99.52%) and 5F (also 5G, *Thalassospira lucentensis* DSM 14000<sup>T</sup>, <97%). [Conclusion] We found that strains of genus *Alcanivorax*, *Novosphingobium*, *Tistrella* and *Thalassospira* were predominant bacteria of PAHs-degrading consortia in sea water and surface sediment of Middle Atlantic Ridge deep sea, with *Novosphingobium* spp. as their main PAHs degraders.

**Keywords:** Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs); biodegradation; Middle Atlantic Ridge; deep sea; *Novosphingobium*

(本文责编:王晋芳)

Supported by the COMRA programme (Y115-02-2-05), the National Natural Science Foundation of China (40376041; 30670051) and National Infrastructure of Natural Resources for Science and Technology programme (2005DKA21209), Public Welfare Project of Marine Science Research (200705011), the Project of Fundamental Science Research (2008G15) and Open Fund of Key Lab of Marine Oil Spill Identification and Damage Evaluation Technology (200707)

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

Received: 23 December 2008/ Revised: 9 March 2009