

海洋石油烃降解细菌 T₁ 和 T₂ 的分子鉴定分类

田胜艳^{1,2}, 王娟¹, 聂利红¹

(1.天津科技大学 海洋科学与工程学院, 天津 300457; 2.天津市海洋资源与化学重点实验室, 天津 300457)

摘要: 从天津滨海潮间带被石油烃严重污染的沉积物(干样含油量 0.2 g/g)中, 筛选分离出能够以柴油为唯一碳源生长的细菌, 对其中生物量大、单株菌降解效率较高的两株细菌 T₁ 和 T₂ 进行 16S rDNA 克隆, 通过测定和比较 16S rDNA 的部分序列对这两株细菌进行分子鉴定, 以期用于石油污染的微生物修复中。结果表明, T₁ 与深红红螺菌 (*Rhodospirillum rubrum*) 的同源性为 89%, T₂ 与施氏甲单胞杆菌 (*Pseudomonas stutzeri*) 的同源性为 99%。

关键词: 石油烃降解细菌; 16S rDNA; 分子鉴定; 甲单胞杆菌 (*Pseudomonas stutzeri*); 深红红螺菌 (*Rhodospirillum rubrum*)

中图分类号: Q939.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)09-0025-04

随着海上运输、海上油田开发和沿海地区炼油工业的发展, 石油泄漏事故也逐年增多, 受污染的海域范围不断扩展, 石油污染已经成为海洋环境中的重要问题。利用微生物技术治理海洋石油污染, 因其费用低、无二次污染等优点备受各国关注。在海洋出现溢油后, 土著石油烃降解菌会大量繁殖成为优势菌群^[1,2]。目前, 已经从石油污染环境中分离到多种石油烃降解菌^[3-5], 以期用于石油污染的生物修复中。

传统的生理生化法细菌鉴定分类工作复杂而繁琐。近年来, 随着分子生物学技术的发展以及各种微生物的遗传特征和分子差异的研究, 大量已知微生物的 DNA 都被测定并输入国际基因数据库, 成为对微生物鉴定分类非常有用的参照系统, 可以通过对未知微生物 DNA 序列的测定和对比分析, 对其进行快速、有效的鉴定分类。

作者从筛选分离到的 17 株海洋石油烃降解菌中, 选取生物量大、降解效率较高的两株细菌 T₁ 和 T₂, 以 16S rRNA 作为分子指标, 直接对细菌进行分子鉴定分类。

1 材料与方 法

1.1 菌种的筛选与分离

取被石油烃严重污染的潮间带沉积物(干样含油量 0.2 g/g)样品, 以市售 0[#]柴油为唯一碳源并补

加无机氮磷源, 对沉积物内的菌群进行逐级驯化, 当菌群的整体降解能力达到比较高的水平时用 ZoBell 2216E 培养基平板进行分离, 共得到 17 株细菌, 选择其中生物量大、降解能力较高的两株 T₁ 和 T₂, 进行分子鉴定分类。

1.2 细菌总 DNA 的提取^[6]

将细菌接种在 ZoBell 2216E 液体培养基中, 37 °C 培养过夜; 移取 1.5 mL 细菌培养液, 10 000 r/min 离心 1 min, 弃去上清液, 沉淀用 TE 缓冲液再悬浮, 加入 10% SDS 和 20 g/L 蛋白酶 K, 混匀, 37 °C 温育 1 h; 再加入 5 mol/L 的 NaCl 溶液和 CTAB/NaCl 溶液, 混匀后 65 °C 温育 10 min; 然后加入等体积的氯仿/异戊醇 (24:1), 混匀, 10 000 r/min 离心 5 min, 将上清液转入另一支离心管中; 加入等体积的酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1), 混匀, 10 000 r/min 离心 5 min, 将上清液转入另一支离心管中; 最后, 加入 0.6 倍体积异丙醇, 轻轻混合直到 DNA 沉淀下来, 12 000 r/min 离心 5 min, 倒去上清液后, 用 70% 乙醇洗涤; DNA 沉淀晾干后用 TE 缓冲液重新溶解, -20 °C 保

收稿日期: 2008-05-09; 修回日期: 2008-07-14

基金项目: 天津科技大学科学研究基金资助项目 (20060208); 天津市科技支撑计划重点项目 (07ZCKFSF02000)

作者简介: 田胜艳 (1974-), 山东寿光人, 工程师, 硕士, 主要从事海洋生态学研究工作。电话: 022-60601044。E-mail: tiansy@tust.edu.cn

存备用。

1.3 16S rDNA 的 PCR 扩增及纯化^[6]

应用标准的双链 PCR 反应扩增菌株的 16S rDNA 全基因片断。采用的引物为 16 (+): 5'-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3' 和 16 (-) 5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA -3', 两引物间的距离约 1 500 碱基对。50 μ L 反应液中含有: 10 \times PCR 缓冲液 10%, dNTP 200 μ mol/L, 引物各 0.1 μ mol/L, Taq 聚合酶 3 单位。

PCR 扩增条件:

94 $^{\circ}$ C, 5 min	} 30 个循环	预变性
94 $^{\circ}$ C, 1 min		
55 $^{\circ}$ C, 1 min		
72 $^{\circ}$ C, 1.5 min		
72 $^{\circ}$ C, 10 min		保温

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 用 DNA PCR 产物快速回收试剂盒回收纯化 PCR 产物。

1.4 PCR 产物的克隆^[6]

PCR 产物经末端补平磷酸化并与 PMD18-T 载体连接后转化到 *Escherichia coli* DH5 α 中, 转化子在含 X-gal, IPTG 和 Amp (氨苄青霉素) 的 ZoBell 2216E 平板上进行筛选, 提取并纯化质粒 DNA 作为测序模板。

1.5 测序与分析

DNA 测序由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.6 序列的数据处理

将序列数据与 Genbank 中已存在的细菌 16S rRNA 基因序列应用 BLAST 程序进行相似性比较。

2 结果与讨论

2.1 PCR 扩增结果

以细菌 16S rRNA 通用引物对菌株 T₁ 和 T₂ 的总 DNA 提取物进行 PCR 扩增, 得到一约 1500 碱基对长的片段 (图 1)。PCR 的结果表明, 扩增特异性很高, 可用于 16S rDNA 的克隆。

2.2 序列分析结果

16S rRNA 基因的 PCR 扩增产物纯化后, 经末端补平磷酸化并与 PMD18-T 载体连接后转化到 *E. coli* DH5 α 中, 通过蓝白斑筛选得到重组质粒, 并对重组质粒用限制性内切酶 HindIII 和 Kpn I 进行

双切酶验证和 Kpn I 单酶切验证及 PCR 验证, 检验插入片段的正确性。以验证正确的质粒 DNA 作为测序模板, 由上海生工生物工程技术有限公司进行序列测定, 菌株 T₁ 和 T₂ 的 16S rRNA 基因部分序列如图 2 和图 3 所示。

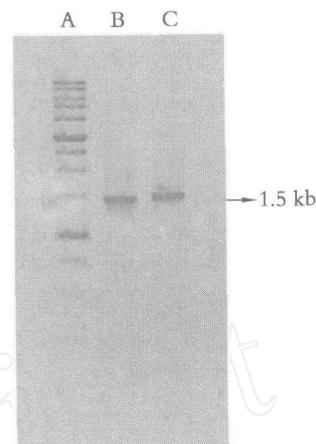


图 1 菌株 T₁ 和 T₂ 的 16S rDNA 琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis analysis of 16S rDNA of strain T₁ and T₂

A. 10 kb DNA 标记; B. 菌株 T₁ 的 16S rDNA; C. 菌株 T₂ 的 16S rDNA
A. 10 kb DNA Marker; B. 16S rDNA of strain T₁; C. 16S rDNA of strain T₂

将所测得序列输入 Genbank 数据库, 用 BLAST 程序进行比对分析, 发现 T₁ 与深红红螺菌 (*Rhodospirillum rubrum*) 的 16S rRNA 基因序列的相似性为 89%; T₂ 与甲单孢菌属 (*Pseudomonas* sp.) 很自然地组成一群, 尤其与施氏甲单孢杆菌 (*Pseudomonas stutzeri*) 的 16S rRNA 基因序列的相似性最大 (99%), 可以确定 T₂ 为甲单孢菌属施氏甲单孢杆菌种。

rDNA 结果既具有保守性, 又具有高变性。保守性能反映生物物种的亲缘关系, 为系统发育重建提供线索; 高变性则能揭示出生物物种的特征核苷酸序列, 是属种鉴定的分子基础; 目前 rRNA 已成为细菌系统分类研究中最有用也是最常用的分子指标^[7]。

深红红螺菌广泛分布在海洋、湖泊、江河等水域环境中, 或是可利用光进行光合作用的一些泥和土壤中, 尤其在有机物污染的积水处数量较多。该菌既可以厌氧生活又可以好氧生活, 厌氧培养中菌落初始为亮粉红色, 之后则变为深紫红色; 好氧培

养中菌落为无色或亮粉红色。菌株 T₁ 适应海洋高盐度（3%）的环境，在 2216E 培养基平板上，菌落初始为无色，2 周之后逐渐变为粉红色，而且该菌株的细胞形态也与深红红螺菌（图 2）的细胞形态

```
TCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCACCTATCCAGCCGAACTGAT
GAAATCCATCTCTGGAAATCGCGATAGGGATGTCAAGGGTTGGTAAGGTTCTGCGCGT
TGCTTCGAATTA AACACATGCTCCACCGCTTGTCGGGGCCCCGTC AATTCCTTTGAG
TTTTAATCTTGCGACCGTACTCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCGTCACCG
AAACCGAAGTCCCGACA ACTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCT
AATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGATCTAGTCCAGGTGGCCGC
CTTCGCCTCTGGTGTTCCTCCCAATATCTACGAATTCACCTCTACACTGGGAATTCAC
CACCTCTCCTAGTCTCTAGTCTTGCAGTATCAGAGGCAGTTCGGGGTTGAGCCCCGG
GCTTTCACCCCTGACTGGCAAGACCGCTGCGTGCCCTTACGCCAGTAAATCCGAA
CAACGCTTGCCCTTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAATTAGCCGGGGCTTCTT
CTGATGTTACCGTCATCATCTTCGCATCTGAAAGAGCTTACAACCCGAAGGCCTTCTT
CACTCACGCGGCATGGCTGGATCAGGGTTGCCCCATTGTCCAATATCCCCACTGCTG
CCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGCTCAGTCCCAGTGTGGCTGATCATCCTCTCAAAC
CAGCTATGGATCGAAGACTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTATCTAATCCAACGCGG
GTCCATCTCTTAGCGATAAATCTTCCCCCGAAGGGCGTATGCGGTATTAGCGGTGCTTT
CCAACCGTTATCCCCACTAAGAGGTAGGTCCCCACGCGTACTCACCCGTGCGCCAC
TCTCCAGTTCCCGAAGGAACCTTCTCGTACGACTTGCATGTGTTAGGCCTGCCGCCAG
CGTTCGTTCTGAGCCAGGATCAAACCTCTCAATCTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGC
TCGAATTCGTAATCATGTCAAAGCTCGCC
```

图2 菌株T₁的16S rDNA部分序列

Fig.2 Partial sequence of 16S rDNA of strain T₁

```
CGTGTGTGAAGAAGGTC TTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTA
AGTTAATACCTTGC TGT TTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCC
AGCAGCCCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCG
CGCGTAGGTGGTTGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCAT
TCCAAAACCTGGCGAGCTAGAGTATGGCAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTG
AAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGGCGACCACCTGGGCTAATACT
GACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCCGTAAACGATGTGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAAC
GCATTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGAC
GGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCT
TACCAGGCCTTGACATGCAGAGAAC TTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTC
TGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC
CGTAACGAGCGCAACCC TTGTCC TAGTTACCAGCACGTTAAGGTGGGCACTCTAAGG
AGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCT
TACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGA
GGTGGAGCTAATCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTG
CGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCTGGGTGAATACGTTCCCGG
GCCTTGACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTC
TAACCTTCGGGGGGACGTTACCACGGAGTGATTCATGACTGGTGAGAAGTTGAGCAA
TTAACGCTGTGCC
```

图3 菌株T₂的16S rDNA部分序列

Fig.3 Partial sequence of 16S rDNA of strain T₂

相似。目前关于深红螺菌的报道多是关于其固氮作用或产氢作用^[9], 还没有关于该菌解烃作用的报道, 因此还不能确定菌株 T₁ 就是深红螺菌。

甲单孢菌属广泛分布于陆地和海洋生态系统中, 是石油烃降解菌群中的主要成员, 目前已经发现了多种甲单孢杆菌^[10], 如: 铜绿甲单孢杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、荧光甲单孢杆菌 (*Pseudomonas fluorescens*)、施氏甲单孢杆菌 (*Pseudomonas stutzeri*)^[10]等对烷烃及芳香烃具有降解作用。菌株 T₂ 也适应海洋高盐度的生活环境, 在 2216E 培养基平板上, 其菌落形态与施氏甲单孢杆菌菌落形态相同, 单细胞为杆状。而且该菌 16S rRNA 序列与施氏甲单孢杆菌的 16S rRNA 序列的相似性高达 99%, 因此, 可以初步断定该菌为甲单孢菌属施氏甲单孢杆菌种。

3 结论

通过对天津滨海潮间带油污沉积物中筛选分离到的石油烃降解细菌 T₁ 和 T₂ 进行 16S rDNA 克隆, 测定 16S rDNA 序列, 与 Genbank 数据库中已有细菌的 16S rDNA 序列进行比对, 发现菌株 T₁ 与深红螺菌的 16S rRNA 序列的相似性为 89%, 并且二者单细胞形态、平板培养菌落形态都很相似; 菌株 T₂ 与甲单孢菌属很自然地组成一群, 其与施氏甲单孢杆菌 16S rRNA 序列的相似性最大 (99%), 可以确定 T₂ 为甲单孢菌属施氏甲单孢杆菌种。

参考文献:

- [1] Rahman K S M, Rahman T J, Kourkoutas Y, *et al.* Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients [J]. *Bioresource Technology*, 2003, 90: 159-168.
- [2] Xu R, Yong L Ch, Lim Y G, *et al.* Use of slow-release fertilizer and biopolymers for stimulating hydrocarbon biodegradation in oil-contaminated beach sediments [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2005, 51: 1101-1110.
- [3] Townsend G T, Prince R C, Suffita J M. Anaerobic biodegradation of alicyclic constituents of gasoline and natural gas condensate by bacteria from an anoxic aquifer [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2004, 49: 129-135.
- [4] Ayotamuno M J, Kogbara R B, Ogaji S O T, *et al.* Bioremediation of crude-oil polluted agricultural-soil at Port Harcourt, Nigeria [J]. *Applied Energy*, 2006, 83: 1249-1257.
- [5] Tam N F Y, Guo C L, Yan W Y, *et al.* Preliminary study on biodegradation of phenanthrene by bacteria isolated from mangrove sediments in Hong Kong [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2002, 45: 316-324.
- [6] 萨姆布鲁克. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [7] Delong E F, Wickham G S, Pace N R. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells [J]. *Science*, 1989, 243(10): 1360-1363.
- [8] 朱建良, 冯有智. 固氮类微生物产氮机理研究进展[J]. 南京工业大学学报: 自然科学版, 2003, 25(1): 102-106.
- [9] 谭田丰, 邵宗洋. 海洋石油烃降解菌群构建及其在降解过程中的动态分析[J]. 厦门大学学报, 2006, 45(5): 262-266.
- [10] 任随周, 郭俊, 邓穗儿, 等. 石油降解菌的分离鉴定及石油污染土壤的细菌多样性[J]. 生态学报, 2005, 25(12): 3314-3322.

(下转第 41 页)

Molecular identification and classification of marine hydrocarbon degrading bacteria T₁ and T₂

TIAN Sheng-yan^{1, 2}, WANG Juan¹, NIE Li-hong¹

(1.College of Marine Science and Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China; 2.Tianjin Key Laboratory of Marine Resources & Chemistry, Tianjin 300457, China)

Received: May,9,2008

Key words: hydrocarbon degrading bacteria;16S rDNA; molecular identification; *Pseudomonas stutzeri*; *Rhodospirillum rubrum*

Abstract: Hydrocarbon degrading bacteria were obtained from oil-polluted sediments in the intertidal zone of Tianjin seashore by a soil enrichment procedure using diesel fuel as carbon source. The 16S rDNA amplified from 2 strains of these isolations, T₁ and T₂, which have a high biomass and a hydrocarbon degrading capability, was cloned. According to molecular criteria, nucleotides sequence of 16S rDNA was determined and analyzed. The results indicate that strain T₁ is similar to *Rhodospirillum rubrum* (89%) and strain T₂ is similar to *Pseudomonas stutzeri* (99%).

(本文编辑: 刘珊珊)