

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
50(3):350-359; 4 March 2010  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 两种海洋专性解烃菌降解石油的协同效应

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  
(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】为研究在石油降解过程中海洋专性解烃菌的协同效应。【方法】以食烷菌 22CO-6、JZ9B 和海杆菌 PY97S 为实验材料构建石油降解菌群, 采用重量法、气相色谱氢火焰离子化检测器、气相色谱质谱联用及棒薄层色谱等多种手段分析、比较降解菌纯培养和降解菌群对原油的降解率及石油降解后产物的多元色谱图。【结果】构建的降解菌群 22CO-6 + PY97S 和 JZ9B + PY97S 中 2 种专性解烃菌具有明显的协同效应。与石油降解菌 22CO-6、JZ9B 单菌降解相比, PAHs 降解菌 PY97S 的加入, 可以使原油降解率从 27.81%、83.52% 分别提高到 64.03% 和 86.89%, 同时促进石油中烷烃、芳香烃组分包括高分子量多环芳烃 chrysene 及其生物物的降解。【结论】在石油降解过程中海洋专性解烃菌之间存在明显的协同效应, 不仅可以加快石油降解, 还可以彻底降解石油中生态毒性较大的高分子量化合物。

**关键词:** 专性解烃菌; 协同效应; 溢油; 生物降解; 多环芳烃

**中图分类号:** X172      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2010) 03-0350-10

伴随着海上交通运输业的发展以及海洋油气资源的勘探开发, 海洋溢油的发生越来越频繁。溢油发生后, 不仅直接导致海鸟、鱼类等大型海洋动物的死亡, 给海洋养殖业、旅游业等造成巨大的经济损失, 而且还会对海洋生态环境及人类健康造成长远的负面影响。所以, 如何控制、消除海洋溢油污染成为海洋环境保护的重要内容之一。生物修复技术由于具有成本低、较彻底、无二次污染等优点, 逐渐成为处理溢油的一种有效途径。

近年来, 各国科研人员对海洋“专性解烃菌”(the obligate hydrocarbonoclastic bacteria, OHCB) 进行了越来越多的研究。它们是一类溢油发生前在海洋环境中丰度很低甚至低于检测限, 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>[1-2]</sup>。它们当中包括 *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>[3-6]</sup>。其中又以食烷菌和解环菌最为重要, 依靠基于 rRNA 分析技术的非培养分析手段发现, 在溢油污染海洋环境中它们的生物量最高并且分别负责石油中主要组分烷烃及芳香烃的降解<sup>[1,7-8]</sup>。

20 世纪 90 年代兴起的溢油原位生物修复技术, 正是通过添加海水中缺乏的氮、磷元素刺激专性解烃菌的生长、加快石油移除速率来实现的<sup>[9]</sup>。由于这类细菌在溢油去除过程中作用显著, 并且具有迥异于陆源耐盐降解菌的生长特性、难以获得纯培养, 所以它们是一种重要的、相对稀缺的海洋菌种资源。我们的研究小组也对这类细菌的代谢特性、降解基因等进行了一些初步研究<sup>[10-11]</sup>。然而, 在溢油这种成分极其复杂的有机污染物降解过程中, 显然在不同降解菌之间也存在着各种复杂的关系<sup>[12]</sup>, 对

**基金项目:** 公益性行业科研专项经费项目 (200705011); 国家自然科学基金 (40906062, 40776098); 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 (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); 青岛市科技计划项目 (08-1-3-10-JCH)

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

**作者简介:** 崔志松 (1981-), 男, 山东青岛人, 助理, 理学硕士, 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:** 2009-09-01; **修回日期:** 2009-12-07

于这一问题的研究可以加深我们对溢油生物降解本质的认识,并且为溢油生物修复技术的推广应用奠定基础。

本文报道了两种专性解烃菌,食烷菌属细菌和海杆菌属细菌在石油各种组分生物降解过程中的协同效应。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂和仪器:**本研究中用到的13种PAHs:苊(97%)购自Avocado,2,6-二甲基萘(98%)购自Fluka,2-甲基萘(97%)购自Lancaster,萘(99.6%)、联苯(99%)、菲(98%)、蒽(99%)、芴(98%)、二苯并呋喃(98%)、二苯并噻吩(98%)、芘(99%)、荧蒽(98%)、苯并[ $\alpha$ ]芘(96%)均购自Alfa Aesar。轻质原油(产自科威特,密度 $0.87\text{ g/cm}^3$ )。正己烷(农残级),二氯甲烷(农残级)均购自Dikma;无水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ (分析纯)、甲苯(分析纯)、正庚烷(分析纯)、甲醇(分析纯)均购自上海国药集团。氘代正二十四烷为正构烷烃的内标,氘代三联苯为多环芳烃的内标,藿烷为生物标志物的内标。气相色谱(Agilent HP7890 Plus);质谱检测器(Agilent HP5975);棒薄层色谱仪(IATROSCAN MK-6S);表面张力仪(上海方瑞QBZY-1);透射电镜(JEOL model JEM-1200)。

**1.1.2 培养基:**①原油降解菌群富集、表面张力测定、协同降解实验培养基:100 mL ONR7a培养基中加入科威特轻质原油的浓度为10 g/L。②PAHs利用范围及降解率测定培养基:先将PAHs用二氯甲烷溶解,再用 $0.22\ \mu\text{m}$ 孔径的耐有机溶剂滤膜过滤除菌,然后添加到100 mL ONR7a培养基中并在摇床上过夜振荡使有机溶剂充分挥发,萘、2-甲基萘、2,6-二甲基萘、联苯的终浓度分别为0.4 g/L,菲、蒽、苊、芴、二苯并呋喃、二苯并噻吩的终浓度分别为0.2 g/L,芘、荧蒽、苯并[ $\alpha$ ]芘的终浓度分别为0.1 g/L。③菌种活化培养基:M8培养基<sup>[11]</sup>。

### 1.2 降解菌群的富集和降解菌的分离、鉴定及系统发育分析

3个沉积物样品HH097、D22-1、JZ9-3-03分别采集自黄海(N $36^{\circ}39.97'$ ; E $121^{\circ}59.66'$ )、南海(N $18^{\circ}8.52'$ ; E $109^{\circ}36'$ )及锦州油田(N $40^{\circ}40.58'$ ; E $121^{\circ}28.33'$ )。石油降解菌群的富集、石油降解菌的分离、鉴定及系统发育分析参考我们以前的报道<sup>[13]</sup>。

### 1.3 菌株的负染及透射电镜观察

用移液器吸取少量对数生长后期的细菌细胞置

于200目铜网静置10 min,用0.5%的磷钨酸染色,采用透射电镜在80.0 kV的条件下观察细胞形态及有无鞭毛。选取视野中5个典型的细胞,测定其细胞大小,并计算平均值。

### 1.4 PAHs降解范围测定

分别以13种PAHs为唯一碳源和能源测定降解菌PY97S的芳香烃利用范围。不添加任何碳源的ONR7a培养基作为阴性对照。将PY97S的培养物按照1%的比例转接到上述13种PAHs培养基中,并在150 r/min、25℃、避光的条件下培养14 d。每种碳源的处理设2个重复。

### 1.5 PAHs降解率测定

将对数生长后期的PY97S培养物按照1%的比例转接到100 mL含有0.2 g/L菲的ONR7a培养基中,并在150 r/min、25℃、避光的条件下培养10 d,设3个重复。不接种微生物的处理作为空白对照。用等体积的正己烷萃取降解后培养基中残留的PAHs,得到的萃取物经脱水、过滤等处理后以外标法采用GC-MS测定菲的浓度。实验中采用的色谱柱为HP-5MS毛细管柱(30 m $\times$ 0.25 mm i. d.,  $df$ : 0.25  $\mu\text{m}$ )。载气为氦气(99.999%),流速为1 mL/min。升温程序如下:起始温度为70℃,以5℃/min的速率升至120℃,然后以10℃/min的速率升至300℃,并保持7 min。进样口和离子源的温度分别为280℃和230℃。采用HP3365化学工作站软件对菲的峰进行鉴别和积分。

### 1.6 细菌培养物表面张力测定

将活化后的细菌培养物按照1%的比例接种到100 mL石油培养基中,不接种微生物的石油培养基作为空白对照,在150 r/min、25℃、避光的条件下培养5 d,设3个重复。采用铂金环式表面张力仪测定细菌培养物的表面张力。

### 1.7 石油降解菌群的构建

将2种专性解烃菌食烷菌和海杆菌按照1:1的比例(细胞总数)构建石油降解菌群。在降解菌纯培养的处理中,将PY97S、22CO-6、JZ9B的培养物按照2%的比例分别转接到100 mL石油培养基中;在降解菌群的处理中,将PY97S的培养物分别与22CO-6、JZ9B的培养物混合,然后按照2%的比例转接到石油培养基中;不接种微生物的处理作为阴性对照;上述每种处理设2个重复。在150 r/min、20℃、避光的条件下培养5周。采用重量法、GC-FID、GC-MS及棒薄层色谱等多种手段分析、比较降解菌纯培养和降解菌群对原油的降解率及石油降解后产物的多元色谱图。

## 1.8 样品前处理、重量法测定石油降解率及石油中各组分的仪器分析

**1.8.1 样品前处理:**将降解后的石油样品及阴性对照在 10000 r/min, 10 min 的条件下离心去除细菌细胞, 准确量取 50 mL 二氯甲烷萃取其中的残余油污。从二氯甲烷相准确量取 4 mL 溶液, 先用无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  脱水, 再用 0.22  $\mu\text{m}$  耐有机溶剂滤膜过滤。其中 2 mL 用于棒薄层分析; 另外 2 mL 用氮气吹干, 然后以 1 mL 正己烷重新溶解, 移入 GC 样品瓶中, 用 GC-FID、GC-MS 对石油降解后残留的烷烃、芳香烃组分进行分析测定。另外从二氯甲烷相吸取 20 mL 溶液, 用于重量法计算降解率。

**1.8.2 重量法:**将萃取液转移到尖底烧瓶中, 在 40°C 的条件下旋转蒸发, 称量带有残留油污的烧瓶总重, 减去烧瓶本身重量, 得到残留油污的重量  $m$ , 按照以下公式计算求得降解率。[  $(m_0 - 2.5m) / m_0$  ]  $\times 100\%$  ( $m_0$  为最初加入培养基中的石油重量)

**1.8.3 石油组分的 GC-FID、GC-MS 分析:**色谱柱为 HP-5MS(30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu\text{m}$ ) 毛细管柱; 进样口温度: 280°C; 离子源温度: 250°C。载气为氦气(99.999%), 流速 1 mL/min。程序升温: 50°C 保持 2 min, 以 6°C/min 升至 300°C, 300°C 保持 10 min。

扫描模式: SCAN、SIM 模式; 扫描质量范围: 50 - 500。进样: HP7683 自动进样器, 不分流进样 1  $\mu\text{L}$ 。数据采集和处理: HP3365 化学工作站。

**1.8.4 棒薄层色谱分析石油族组分百分含量变化:**用微量点样器吸取油样, 在色谱棒的原点处点样; 在展开槽中加入 70 mL 正庚烷作为一级展开剂, 将点样后的色谱棒置于展开槽中展开, 取出晾干; 在另外一只展开槽中加入 72 mL 甲苯与甲醇混合溶液( $v/v = 70:2$ )作为二级展开剂, 将晾干后的色谱棒置于此槽中展开, 取出在棒干燥箱中 75°C 干燥 5 min。TLC/FID 工作条件: 空气流量为 2.0 L/min, 氢气流量为 160 mL/min, 扫描速度为 30 s/根。

## 1.9 GenBank 序列号

菌株 PY97S、22CO-6、JZ9B 的 16S rRNA 基因在 GenBank 中的登录号分别为: EU660515、GQ505286、GQ505281。

## 2 结果

### 2.1 PAHs、石油降解菌株分离、鉴定及系统发育

以黄海沉积物样品 HH097 为接种物进行 PAHs 降解菌群的富集, 从富集培养物 HH097 中分离到 1 株 PAHs 降解菌 PY97S。分别以南海及锦州油田的

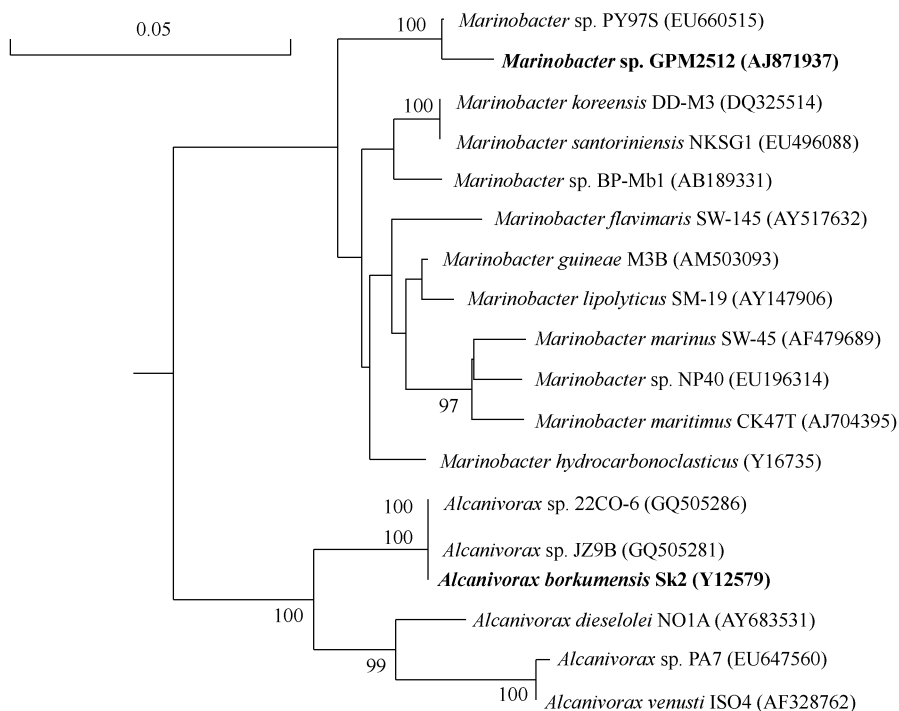


图 1 两种专性解烃菌的系统发育树

Fig.1 Phylogenetic analysis of two species of the obligate hydrocarbonoclastic bacteria. The phylogenetic tree was constructed based on 16S rRNA gene sequences fragments (about 650 bp). 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 re-samplings for maximum likelihood. Only bootstrap values greater than 90% are shown. Scale bar equals approximately 5% nucleotide divergence.

沉积物样品为接种物进行石油降解菌群的富集,从富集培养物 D22-1 及 JZ9-3-03 中分离到 2 株石油降解菌 22CO-6 及 JZ9B。以其 16S rRNA 基因序列比对为基础进行了系统发育分析,发现 PY97S 属于海杆菌属(*Marinobacter*),在 GenBank 中与其亲缘关系最近的菌株是一株十八烷降解菌 *Marinobacter* sp. GPM2512 (AJ871937)<sup>[14]</sup>,两者的 16S rRNA 基因相似度为 98.60%; 而 22CO-6 及 JZ9B 均属于食烷菌属(*Alcanivorax*),在 GenBank 中与其亲缘关系最近的菌株是一株能够产生高效生物表面活性剂的石油

降解菌 *Alcanivorax borkumensis* Sk2 (Y12579)<sup>[15]</sup>,两者的 16S rRNA 基因相似度为 100% (图 1)。

## 2.2 菌株 PY97S、22CO-6、JZ9B 的细胞形态

采用透射电镜观察了菌株 PY97S、JZ9B、22CO-6 的细胞形态(图 2)。发现它们均为短杆状细菌,菌株 PY97S 有一条极生鞭毛,其平均大小为  $1.13 \mu\text{m} \times 0.53 \mu\text{m}$ ; 菌株 JZ9B、22CO-6 没有鞭毛,其平均大小分别为  $1.25 \mu\text{m} \times 0.37 \mu\text{m}$ 、 $0.57 \mu\text{m} \times 0.39 \mu\text{m}$ 。

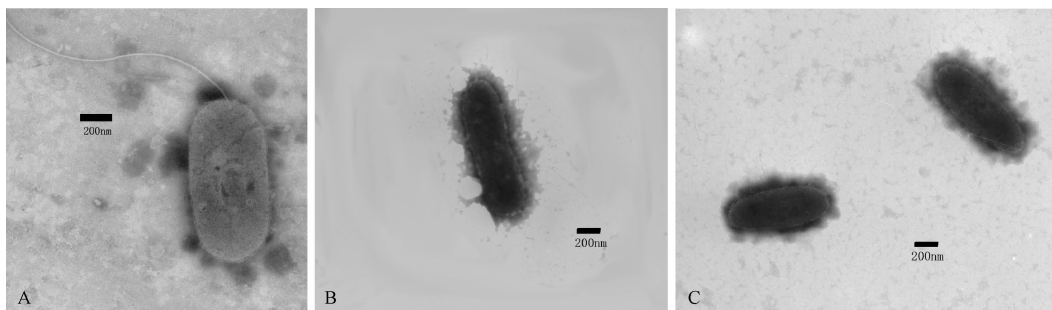


图 2 菌株 PY97S、JZ9B、22CO-6 的透射电镜结果

Fig. 2 Electron micrograph of negatively stained PY97S, JZ9B and 22CO-6. Bar = 200 nm. A: PY97S (30000 ×); B: JZ9B (20000 ×); C: 22CO-6 (20000 ×).

## 2.3 PAHs 降解菌 PY97S 的降解特性

对菌株 PY97S 的 PAHs 降解范围(包括 13 种从两环到五环的 PAHs)进行了测定,发现它们能够降解包括萘、2-甲基萘、2,6-二甲基萘、联苯、苊、芴、菲、蒽、二苯并呋喃、二苯并噻吩、苯并[ $\alpha$ ]芘在内的 11 种 PAHs,而不能降解芘和荧蒽。采用 GC-MS 测定了菌株 PY97S 对典型 PAHs 菲的降解率,发现它对初始浓度为 0.2 g/L 的菲在 10 d 后的降解率可达到 99%。

## 2.4 石油烃降解菌 22CO-6 及 JZ9B 的降解特性

对 22CO-6 及 JZ9B 的柴油、石油降解能力进行了测定,发现它们能够以柴油、石油为唯一碳源和能源生长。另外,以原油为唯一碳源测定了细菌培养物的表面张力,发现 22CO-6 能够将含有原油的培养基的表面张力从 58.3 mN/m 降低至 34.1 mN/m 左右,而 JZ9B 可以降低至 28.3 mN/m。所以,这些菌株不仅能够降解石油烃,而且可以产生高效生物表面活性剂以提高传质速率,加快石油降解过程。

## 2.5 生物降解后石油残留量的重量法分析

采用重量法测定了生物降解后培养基中残留石油的重量,并计算降解率(图 3)。阴性对照在 5 周摇床培养后,损失率达到 20.06%,这主要是由石油中轻组分的挥发造成的。加入海杆菌 PY97S 的处

理对石油降解率的提高不明显,这是由其本身的降解特性决定的;食烷菌 JZ9B 比 22CO-6 的降解率高两倍,这可能是由菌株本身的降解能力差异造成的;降解菌群的处理相对于降解菌纯培养具有更高的降解率,说明海杆菌和食烷菌之间存在明显的协同效应,海杆菌的加入可以使 22CO-6 和 JZ9B 对石油的降解率从 27.81%、83.52% 分别提高到 64.03%、86.89%。

## 2.6 生物降解后石油中烷烃组分变化分析

经过 5 周的摇床培养,与阴性对照相比,在加入降解菌的处理中石油中的烷烃组分在生物降解的作用下都有不同程度的减少(图 4)。海杆菌 PY97S 对烷烃组分的降解作用不显著,食烷菌 JZ9B 对烷烃组分具有良好的降解效果,而加入降解菌群 PY97S + JZ9B 的处理对石油烷烃的降解效果最好,表现出明显的协同降解效应。从烷烃色谱峰的半定量结果来看,降解菌群对石油中 C11 - C35 的烷烃组分的降解是最彻底的(图 4)。

在另一组实验中,经过 5 周的摇床培养,与阴性对照相比,在加入降解菌的处理中石油中的烷烃组分在生物降解的作用下都有不同程度的减少。海杆菌 PY97S、食烷菌 22CO-6 对烷烃组分的降解作用均不显著,而加入降解菌群 PY97S + 22CO-6 的处理对

石油烷烃的降解效果最好,表现出特别明显的协同降解效应。从烷烃色谱峰的半定量结果来看,降解

菌群 PY97S + 22CO-6 对石油中 C11 - C35 的烷烃组分的降解不是很彻底(图 5)。

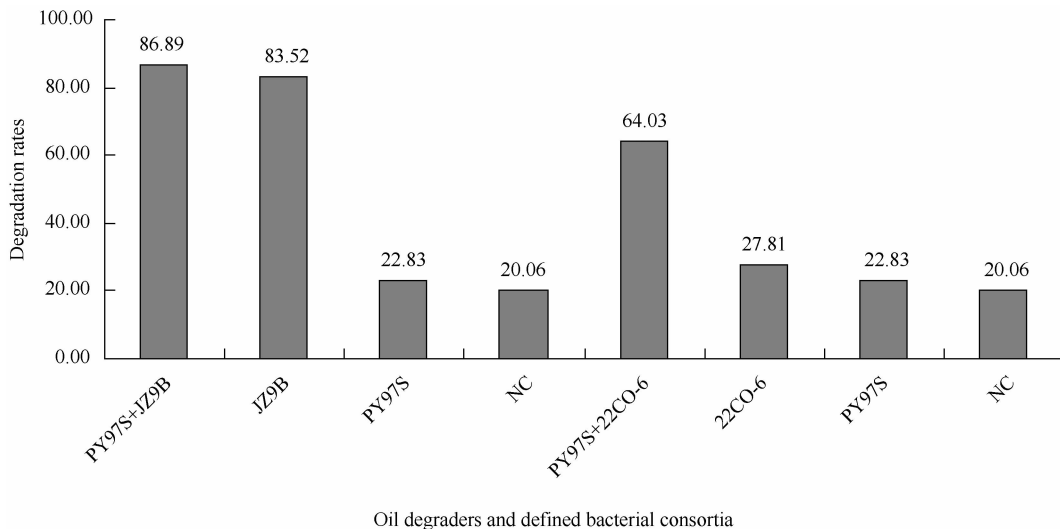


图 3 重量法测定生物降解后石油的降解率

Fig. 3 The degradation rates of oil by weighting method after biodegradation. NC, treatment without any inoculum; PY97S, JZ9B and 22CO-6, treatments with pure culture of each bacterium as inoculum; PY97S + JZ9B and PY97S + 22CO-6, treatments with co-culture of two species of the obligate hydrocarbonoclastic bacteria as inoculum.

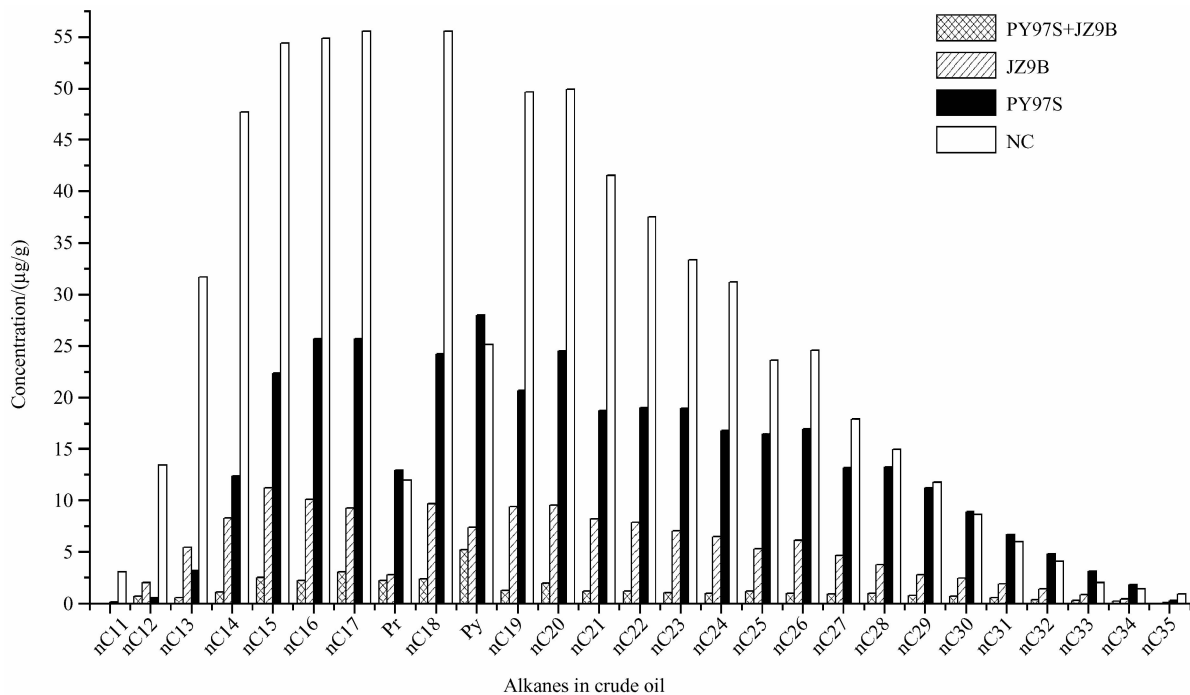


图 4 菌群 PY97S + JZ9B 生物降解后石油中的烷烃组分半定量结果

Fig. 4 The relative concentration of alkanes determined by GC-FID after biodegradation by consortium PY97S + JZ9B. Tetracosane-d50 was used as internal standard to calculate the relative concentration of each alkane in oil. nC11 - nC35, n-alkanes with different carbon atom number; Pr, pristane; Py, phytane.

## 2.7 生物降解后石油中芳香烃组分的变化

经过 5 周的摇床培养,与阴性对照相比,在加入降解菌的处理中石油中的芳香烃组分在生物降解的作用下都有不同程度的减少。海杆菌 PY97S 对出

峰时间较早的低分子量芳香烃组分的降解效果比较显著,但是对出峰时间较晚的高分子量芳香烃组分的降解作用不太显著;食烷菌 JZ9B 对高、低分子量的烷基化芳香烃组分均具有良好的降解效果;而加

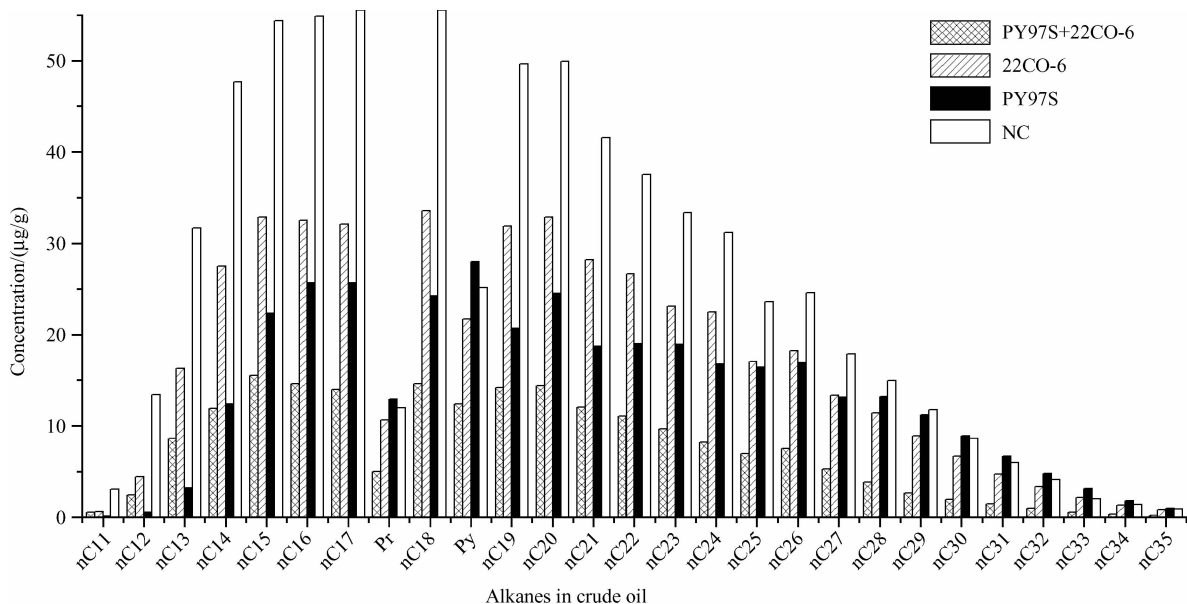


图5 菌群 PY97S + 22CO-6 生物降解后石油中的烷烃组分半定量结果

Fig. 5 The relative concentration of alkanes determined by GC-FID after biodegradation by consortium PY97S + 22CO-6. Tetracosane-d50 was used as internal standard to calculate the relative concentration of each alkane in oil. nC11 - nC35, n-alkanes with different carbon atom number; Pr, pristane; Py, phytane.

入降解菌群 PY97S + JZ9B 的处理对石油芳香烃的降解效果最好,表现出特别明显的协同降解效应。从石油中芳香烃组分的相对丰度变化来看,降解菌群 PY97S + JZ9B 对石油中芳香烃的降解是很彻底的(图6)。

芳香烃组分中的烷基萘系列物几乎全部被降解,烷基萘的降解速率从大到小依次为 C0-N > C1-N > C2-N > C3-N > C4-N(图6)。而石油中其它组分如菲、芴、二苯并噻吩和 chrysene 的烷基化系列物也有不同程度的减少,其降解速率与烷基萘系列物的情况类似。

在另外一组实验中,经过5周的摇床培养,与阴性对照相比,在加入降解菌的处理中石油中的芳香烃组分在生物降解的作用下都有不同程度的减少。海杆菌 PY97S 对出峰时间较早的低分子量芳香烃组分的降解效果比较显著,但是对出峰时间较晚的高分子量芳香烃组分的降解作用不太显著;食烷菌 22CO-6 对高、低分子量的烷基化芳香烃组分的降解效果均不明显;而加入降解菌群 PY97S + 22CO-6 的处理对芳香烃组分的降解效果最好,表现出特别明显的协同降解效应。但是从芳香烃组分的相对丰度变化来看,该降解菌群对石油中芳香烃的降解不如降解菌群 PY97S + JZ9B 彻底(图7)。

## 2.8 生物降解后石油中生物标志物的变化

经过5周的摇床培养,与阴性对照相比,石油中

三萜甾烷、甾烷、三芳甾类烃等生物标志物的色谱图变化不大(数据及图谱未列出)。说明在生物降解程度较高的情况下,上述生物标志物也相对稳定,这在海洋溢油的鉴别工作中有一定的应用价值<sup>[16-18]</sup>。

## 2.9 生物降解后石油中的族组分(SARA)百分含量的变化

采用棒薄层色谱测定了石油中的族组分百分含量,发现生物降解后石油中的沥青、胶质的百分含量与阴性对照相比有不同程度增加,芳香烃有不同程度的减少(表1)。降解菌群 PY97S + JZ9B 及食烷菌 JZ9B 的变化比较明显,降解后油样中胶质的含量增加了1倍多,沥青的含量增加了2倍多,芳香烃减少了1/2多,而饱和烃相对变化不大。降解菌群 97S + 22CO-6,食烷菌 22CO-6 及海杆菌 PY97S 除了沥青组分的含量增加了1倍多之外,其它族组分的百分含量变化不是很大。

表1 生物降解后石油中的族组分百分含量的变化

	Table 1 Percentage change in group components of oil after biodegradation			
	saturates	aromatics	resins	asphaltenes
NC	23.02	58.90	15.63	2.46
PY97S	20.47	59.86	14.09	5.58
JZ9B	24.74	24.68	42.05	8.53
PY97S + JZ9B	24.37	28.34	39.45	7.84
22CO-6	20.96	59.31	13.92	5.80
PY97S + 22CO-6	19.94	57.18	16.28	6.60

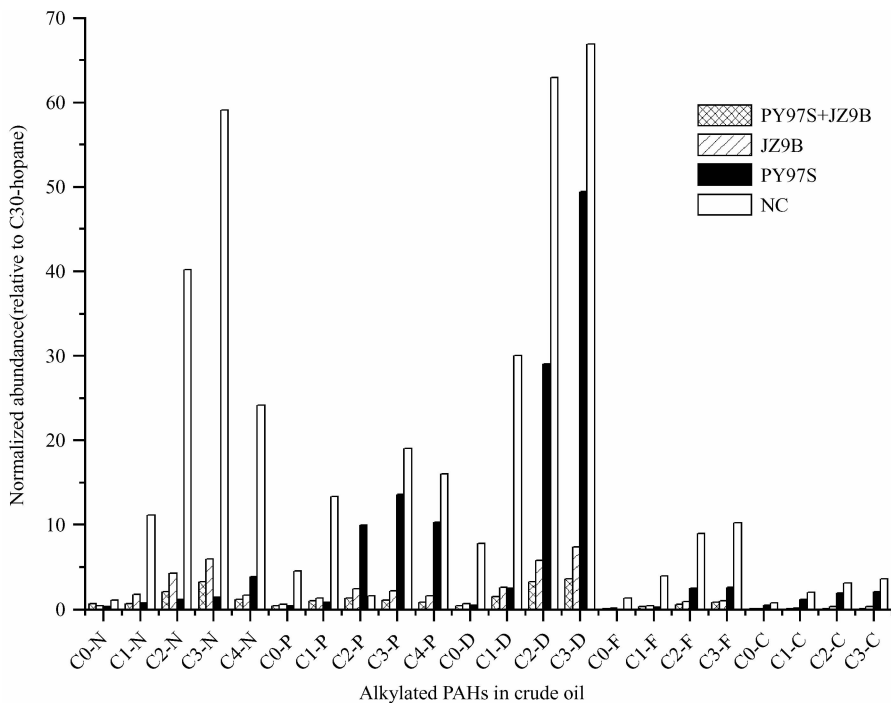


图6 菌群 PY97S + JZ9B 生物降解后石油中芳香烃组分的相对含量(相对于 C30 - 藿烷)

Fig. 6 The relative concentration of aromatics determined by GC-MS after biodegradation by consortium PY97S + JZ9B (normalized to C30-hopane). P-Terphenyl-d14 was used as internal standard to calculate the relative concentration of each alkylated PAH in oil. C0-N, C0-P, C0-D, C0-F and C0-C represent for naphthalene, phenanthrene, dibenzothiophene, fluorene and chrysene, respectively. C1-N - C4-N, alkylated naphthalene with straight-chain of 1 - 4 carbon atoms; C1-P - C4-P, alkylated phenanthrene with straight-chain of 1 - 4 carbon atoms; C1-D - C3-D, alkylated dibenzothiophene with straight-chain of 1 - 3 carbon atoms; C1-F - C3-F, alkylated fluorene with straight-chain of 1 - 3 carbon atoms; C1-C - C3-C, alkylated chrysene with straight-chain of 1 - 3 carbon atoms.

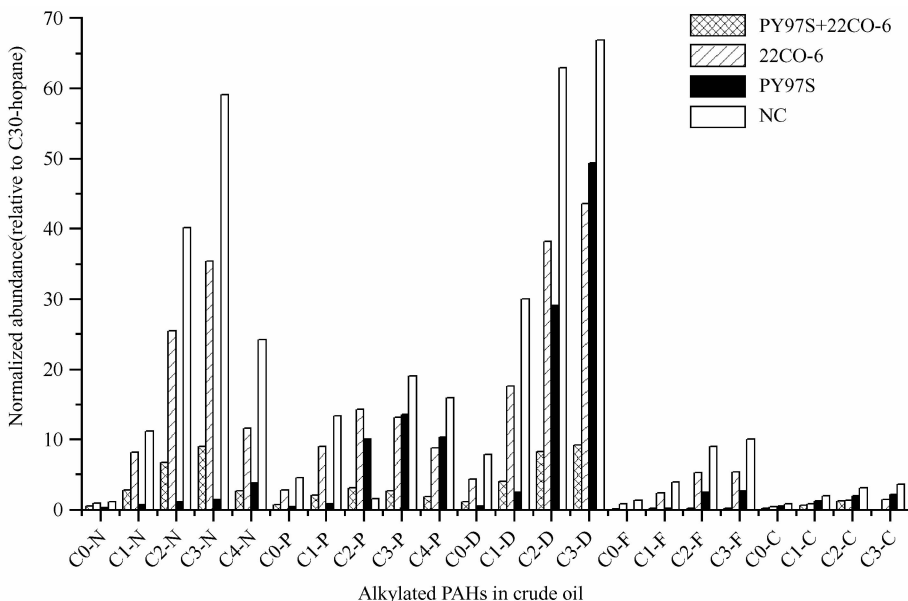


图7 菌群 PY97S + 22CO-6 生物降解后石油中芳香烃组分的相对含量(相对于 C30-藿烷)

Fig. 7 The relative concentration of aromatics determined by GC-MS after biodegradation by consortium PY97S + 22CO-6 (normalized to C30-hopane). P-Terphenyl-d14 was used as internal standard to calculate the relative concentration of each alkylated PAH in oil. C0-N, C0-P, C0-D, C0-F and C0-C represent for naphthalene, phenanthrene, dibenzothiophene, fluorene and chrysene, respectively. C1-N - C4-N, alkylated naphthalene with straight-chain of 1 - 4 carbon atoms; C1-P - C4-P, alkylated phenanthrene with straight-chain of 1 - 4 carbon atoms; C1-D - C3-D, alkylated dibenzothiophene with straight-chain of 1 - 3 carbon atoms; C1-F - C3-F, alkylated fluorene with straight-chain of 1 - 3 carbon atoms; C1-C - C3-C, alkylated chrysene with straight-chain of 1 - 3 carbon atoms.

### 3 讨论

虽然菌株 JZ9B 和 22CO-6 在 GenBank 中亲缘关系最近的模式种都是 *Alcanivorax borkumensis* SK2,但是两者在细胞形态及生长特性上均存在明显差别。菌株 JZ9B 的细胞个体的长度约为菌株 22CO-6 的 2 倍,两者的宽度相差无几;菌株 JZ9B 的生长速度比菌株 22CO-6 快,具体表现为在 M8 平板上形成的菌落较大,在 M8 液体培养基中到达对数生长后期的时间较短(数据未列出)。

此外,两者在降解特性上也存在较明显的差异,具体表现为:菌株 JZ9B 是从锦州油田降解菌群 JZ9-3-03 中分离到的,该菌群能够快速乳化原油,可以在 12 h 内将浓度为 10 g/L 的原油全部乳化溶解到海水培养基中。而其它石油降解菌群,包括南海降解菌群 D22-1,完全乳化原油的时间至少为 48 h,并且乳化效果明显不如菌群 JZ9-3-03(数据未列出)。对菌株 JZ9B、22CO-6 在石油培养基中的培养物的表面张力进行测定发现,它们可以使培养基的表面张力下降到 30 mN/m 左右,这说明它们可能通过产生高效生物表面活性剂加快石油的传质速率,促进石油的彻底降解。而菌株 JZ9B 产生的生物表面活性剂的效果要明显优于菌株 22CO-6。

从石油降解后的色谱图(图谱未列出)及半定量结果(图 4-7)来看,食烷菌 JZ9B、22CO-6 不仅能够降解石油中的烷烃组分,还能够降解石油中的烷基化芳香烃组分。在以前类似的研究中,Brito 也发现某些食烷菌、海杆菌以及鞘氨醇单胞菌具有同时降解上述两种石油中主要组分的能力<sup>[14]</sup>。但是,菌株 JZ9B 对这两种组分的降解能力都要明显优于菌株 22CO-6。上述两株食烷菌的降解特性的差异,是造成 2 个构建降解菌群石油降解效果差异的主要原因。说明在构建降解菌群时,不仅要考虑降解菌的种类,还要考虑具体选用菌株的降解特性。

无论是菌群 JZ9B + PY97S,还是菌群 22CO-6 + PY97S,在石油降解过程中,其中的 2 种专性解烃菌之间都表现出明显的协同效应。这从石油降解率的提高,石油中各种组分的变化分析结果都可以判断(图 3-7)。这种协同效应的机制大致有以下 2 种可能:第一,菌株产生的生物表面活性剂加快了降解菌对石油中各种碳源的利用;第二,菌群中的 2 种

降解菌存在代谢途径上的互补性<sup>[19]</sup>。

尽管 PY97S 具有广泛的 PAHs 利用范围及较高的降解率,然而它对石油中分子量较高的烷基化芳香烃的降解效果并不显著,仅仅对低分子量的烷基化芳香烃有较好的降解效果(图 6、图 7)。这可能是由该菌株中 PAHs 双加氧酶本身的催化活力决定的<sup>[20-21]</sup>。

在降解菌群的处理中,菌株 PY97S 不仅可以显著提高菌株 22CO-6、JZ9B 的石油降解率,刺激其对所有烷烃组分的利用(图 4、图 5),同时还可以加快其对大多数芳香烃组分的降解(图 6、图 7)。对于石油中分子量最小的萘系列物(C0-N - C3-N)及无取代基或取代基为甲基的芳香烃组分的降解(C0-P、C1-P、C0-D、C1-D 等),菌株 PY97S 的降解效果是最好的,其次是降解菌群的处理,但是两者相差并不显著。而对于石油中取代基碳链较长(C2-P - C4-P、C2-D、C3-D、C2-F、C3-F)及分子量较高的芳香烃组分(C0-C - C3-C),降解菌群的处理具有最好的降解效果。

产生上述现象的原因包括:第一,菌株 PY97S 不具有产生生物表面活性剂的能力,在其纯培养的处理中,其生长代谢主要消耗生物利用度较高的 C0-N、C0-P 等芳香烃组分,因此对这部分碳源的利用程度较高;第二,在降解菌群的处理中,由于菌株 JZ9B、22CO-6 的乳化作用,提高了石油中 C2-P、C0-C 等芳香烃组分的生物利用度,这一方面使菌株 PY97S 可利用的碳源增多,另一方面使其对 C0-N、C0-P 等芳香烃组分的利用相对减少。综上所述,本研究中的两种专性解烃菌在石油降解过程中存在显著的协同效应,这种协同作用机制可以对复杂有机污染物在环境中的降解产生重要影响。

### 参考文献

- [1] Head IM, Jones DM, Røling WFM. Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4: 173-182.
- [2] Yakimov MM, Timmis KN, Golyshin PN. Obligate oil-degrading marine bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 2007, 18: 257-266.
- [3] 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.



- [ 4 ] McKew BA, Coulon FA, Osborn M, et al. Determining the identity and roles of oil-metabolizing marine bacteria from the Thames estuary, UK. *Environmental Microbiology*, 2007, 9: 165 - 176.
- [ 5 ] Teira E, Lekunberri I, Gasol J, et al. Dynamics of the hydrocarbon-degrading *Cycloclasticus* bacteria during mesocosm-simulated oil spills. *Environmental Microbiology*, 2007, 9: 2551 - 2562.
- [ 6 ] Coulon F, McKew BA, Osborn AM, et al. Effects of temperature and biostimulation on oil-degrading microbial communities in temperate estuarine waters. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(1): 177-186.
- [ 7 ] Harayama S, Kasai Y, Hara A. Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Current Opinion in Biotechnology*, 2004, 15: 205 - 214.
- [ 8 ] Simone C, Renata D, Maria G, et al. Predominant growth of *Alcanivorax* during experiments on "oil spill bioremediation" in mesocosms. *Microbiological Research*, 2007, 162(2): 185-190.
- [ 9 ] Venosa AD, Zhu X. Biodegradation of crude oil contaminating marine shorelines and freshwater wetlands. *Spill Science & Technology Bulletin*, 2003, 8: 163-178.
- [ 10 ] Wang B, Lai Q, Cui Z, et al. 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.
- [ 11 ] Cui Z, Lai Q, Dong C, et al. Biodiversity of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from deep sea sediments of the Middle Atlantic Ridge. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(8): 2138 - 2149.
- [ 12 ] Nakamura S, Sakamoto Y, Ishiyama M, et al. Characterization of two oil-degrading bacterial groups in the Nakhodka oil spill. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 60(3): 202-207, 2007.
- [ 13 ] 崔志松, 邵宗泽. 大西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.
- [ 14 ] Brito EMS, Guyoneaud R, Goñi-Urriza M, et al. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. *Research in Microbiology*, 157(8): 752-762, 2006.
- [ 15 ] Yakimov MM, Golysheyn 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.
- [ 16 ] Wang Z, Fingas M, Page DS. Oil spill identification. *Journal of Chromatography A*, 1999, 843: 369-411.
- [ 17 ] Wang Z, Fingas MF. Development of oil hydrocarbon fingerprinting and identification techniques. *Marine Pollution Bulletin*, 2003, 47: 423-452.
- [ 18 ] Wang Z, Stout S and Fingas M. Forensic fingerprinting of biomarkers for oil spill characterization and source identification. *Environmental Forensics*, 2006, 7: 105-146.
- [ 19 ] Bouchez M, Blanchet D, Vandecasteele J-P. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1995, 43: 156-164.
- [ 20 ] Parales RE, Lee K, Resnick SM, et al. Substrate specificity of naphthalene dioxygenase: effect of specific amino acids at the active site of the enzyme. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182: 1641-1649.
- [ 21 ] Gibson DT, Parales RE. Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 2000, 11(3): 236-243.

# Synergic effect of marine obligate hydrocarbonoclastic bacteria in oil biodegradation

Zhisong Cui<sup>1</sup>, Li Zheng<sup>\*</sup>, Baijuan Yang, Qian Liu, Wei Gao, Ping Han, Shaoliang Wang, Wenjun Zhou, Minggang Zheng, Li Tian

(Marine Ecology Research Center, The First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao 266061, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] In order to study the synergic effect of two marine obligate hydrocarbonoclastic bacteria in the oil biodegradation process. [ **Methods** ] We combined the PAHs degrader *Marinobacter* sp. PY97S with the oil degrader *Alcanivorax* sp. 22CO-6 and *Alcanivorax* sp. JZ9B respectively to construct oil-degrading consortia. Multiple methods including weighting method, gas chromatography-flame ionization detection, gas chromatography-mass spectrometry and thin layer chromatography-flame ionization detection were used to analyze and compare the oil degradation rates as well as the chromatographic figures of degraded oil between the pure cultures of obligate hydrocarbonoclastic bacteria and defined consortia. [ **Results** ] The two consortia, 22CO-6 + PY97S and JZ9B + PY97S, exhibited synergic effects in the oil biodegradation process. The degradation rates of oil by the consortia were increased from 27.81% and 83.52% to 64.03% and 86.89% compared to the pure culture of oil degrader 22CO-6 and JZ9B, respectively. The consortia could degrade aliphatic and aromatic fraction at the same time, including high molecular weight PAHs chrysene and its alkyl derivatives. [ **Conclusion** ] There are obvious synergic effect of *Alcanivorax* and *Marinobacter* strains in the oil biodegradation process, which accelerated the oil biodegradation and decomposed thoroughly the more ecotoxic high molecular weight compounds in crude oil.

**Keywords:** obligate hydrocarbonoclastic bacteria; synergic effect; oil spill; biodegradation; polycyclic aromatic hydrocarbons

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Public Welfare Project of Marine Science Research (200705011), the National Natural Science Foundation of China (40906062, 40776098), the Marine Science Foundation for the Youth (2009114), the Project of Fundamental Science Research (2008G15), the Open Fund of Key Lab of Marine Oil Spill Identification and Damage Evaluation Technology (200707) and the Project of Science and Technology of Qingdao Government (08-1-3-10-JCH)

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

Received : 1 September 2009/ Revised: 7 December 2009

## 《微生物学报》关于署名

经过本刊审查通过后即将发表的稿件,作者在修改时,如果对“作者或单位的署名”进行变更,与最初的投稿不同,本刊要求:作者必须再提供有关证明,否则不能生效! 此项规定早已公布在本刊的网页上、并且在本刊的纸质出版物中也多次公布。请作者登陆本刊网页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>),在首页内、“常见问题”中有显示,点开左侧的“署名”,其中有详细的说明和办理方法。

- (1) 如变单位署名顺序,需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信,证明内容:原署名顺序→现署名顺序→盖章。
- (2) 如变更作者署名顺序,需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容:原作者姓名及顺序→修改之后的作者姓名及顺序。
- (3) 将此证明信返回编辑部(邮寄原件或扫描后 E-mail 发来),新的变更即可生效。