

一株深海嗜低温萘降解细菌 Nah-1 的分离及降解基因研究

王新新^{1,2}, 党宏月², 王春艳², 唐学玺¹

(1. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003; 2. 中国科学院 海洋研究所 海洋地质与环境重点实验室, 山东 青岛 266071)

摘要:以萘为唯一碳源和能源从南冲绳海槽深海沉积物中分离得到一株能降解萘的海洋嗜低温细菌 Nah-1, 测定了该菌的最适生长条件及生长曲线。16S rRNA 基因(16S rDNA)序列同源性分析表明该菌属于解环菌属(*Cycloclasticus*)。PCR 扩增萘降解基因得到目标片段, 比对结果表明, 相似度最高的基因 *phnA1* 来自 *Cycloclasticus* sp. A5, 为 99%, 该基因编码的蛋白是萘双加氧酶大亚基。

关键词: 萘; 多环芳烃; 生物降解; 双加氧酶; 深海嗜低温细菌

中图分类号: Q 939

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)10-0030-05

多环芳烃(Polycyclic aromatic hydrocarbons, 简称 PAHs)是指分子中含有两个或两个以上苯环的烃类, 呈线状、角状或簇状结构, 它是石油的重要组成部分, 同时也是海洋环境中广泛分布的一类污染物, 主要来源于人类活动和能源利用过程。炼油厂、石化厂的废弃物等通过地表径流、污水排放以及机动车不完全燃烧后的废气随大气颗粒的沉降进入海洋是造成 PAHs 污染的重要途径^[1,2]。PAHs 在环境中积累对人类健康和生态环境都具有巨大的潜在危害, 因此越来越受到各国环境科学家的重视^[1,3]。

多环芳烃在环境中可通过多种途径得以降解, 包括挥发、光氧化、化学氧化、生物富集、颗粒吸附、浸滤作用及微生物的降解等^[1]。研究表明微生物降解是将多环芳烃从环境中去除的最主要途径之一, 具有二次污染少等优点^[1]。影响多环芳烃微生物降解的有生物和非生物因素, 如温度、盐度、pH 值等^[4]。

人们对于多环芳烃的微生物降解机制、降解酶及其有关基因已进行了多年研究^[5~9], 已成功分离出多种具有降解多环芳烃能力的细菌、真菌和藻类。目前, 从海洋环境中分离出来的可用于降解多环芳烃的微生物, 有假单胞菌属(*Pseudomonas*), 黄杆菌属(*Flavobacterium*), 莫拉氏菌属(*Moraxella*), 弧菌属(*Vibrio*), 海杆菌属(*Marinobacter*), 解环菌属(*Cycloclasticus*), 其中属于海洋细菌的, 目前有报道的只有海杆菌属、解环菌属、*Neptunomonas naphthovorans*^[4], 对来自深海微生物及其降解机制的研究还很少。

作者以萘为唯一碳源和能源从南冲绳海槽沉积

物中分离到了一株能降解萘的深海嗜低温细菌, 初步研究了该菌的分类、最适生长条件及萘降解的分子遗传机理, 为多环芳烃深海微生物降解的深入研究和开发利用提供了菌种资源。

1 材料和方法

1.1 样品的采集和处理

样品于 2005 年 5 月采自南冲绳海槽 MD05-2907 站位(24°47.19'N, 122°29.30'E, 水深 1 245 m), 深海沉积物由法国极地研究所海洋调查船 R/V Marion Dufresne 号上的 CASQ 箱式采泥器获得。

1.2 培养基和培养条件

ONR7a^[10]培养基: NaCl 22.79 g, MgCl₂ · 6H₂O 11.18 g, Na₂SO₄ 3.98g, CaCl₂ · 2H₂O 1.46 g, TAPSO 1.3 g, KCl 0.72 g, NH₄Cl 0.27 g, Na₂HPO₄ · 7H₂O 89 mg, NaBr 83 mg, NaHCO₃ 31 mg, H₃BO₃ 27 mg, SrCl₂ · 6H₂O 24 mg, NaF 2.6 mg, FeCl₂ · 4H₂O 2.0 mg。pH 调至 7.4。

碳源萘的添加: 配制 20% 萘-丙酮溶液, 并于 4℃ 保存。

平板培养基: 将整个平板倒置于饱和萘氛围的密闭容器中。

收稿日期: 2007-11-05, 修回日期: 2008-01-10

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KZCX2-YW-211-03)

作者简介: 王新新(1982-), 女, 硕士研究生, 山东青岛人, E-mail: iam-wx108@163.com; 党宏月, 通讯作者, 电话: 0532-82898527, E-mail: danghy20042000@yahoo.com.cn

液体培养条件:16℃摇床震荡培养,转速 160 r/min。

1.3 萘降解细菌的分离及形态观察

向 50 mL ONR7a 无机盐液体培养基中加入 1 g 沉积物样品,萘初始质量浓度为 500 mg/L,16℃振荡(160 r/min)培养 2 周,取 1 mL 接种到新的含萘的无机盐液体培养基中再培养,如此重复 5 次,稀释涂布到萘无机盐平板培养基上,挑取单菌落,反复划线纯化 3 次。挑取单菌落在萘初始质量浓度为 500 mg/L 的液体无机盐培养基中培养 3 d 后,革兰氏染色,用扫描电镜观察细菌形态。

1.4 生长条件及生长曲线测定

以前述无机培养基和培养条件为基础,每次确定一个因素为变量,其他因素不变,定时取样测定菌体培养液在 600 nm 处的吸光度($A_{600\text{nm}}$),每组设定 3 个平行样,确定生长条件。

按 2% 的接种量接种到萘初始质量浓度 500 mg/L 的 ONR7a 无机盐液体培养基中,16℃ 160 r/min 条件下振荡培养,定时取样测定培养液在 600 nm 下的吸光度,测定生长曲线。

1.5 16S rDNA 片断的扩增

用细菌通用引物 27F 和 926R 进行 16S rDNA PCR 扩增^[11]。PCR 反应体系(终体积 25 μL)为 100 $\mu\text{mol/L}$ dNTP、1.5 $\mu\text{mol/L}$ MgCl_2 、1 $\times$ Taq buffer,每个引物浓度为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 和 1.5 U Taq DNA 聚合酶(MBI, USA)。PCR 程序为 94℃预变性 3 min;94℃变性 45 s,55℃退火 1 min,72℃延伸 1 min 30 s,运行 30 个循环;最后 72℃延伸 10 min。PCR 产物测序结果与 NCBI GenBank 数据库进行比对,用 Phylip(version 3.65)软件包中的 DNADIST 和 NEIGHBOR 程序构建系统进化树^[12]。

1.6 萘降解基因的 PCR 检测

水煮法提取细菌基因组 DNA,用 pA1A2F(5'-ATGGTAGATATTAATAAAGTGGTTG-3') 和 pA1A2R(5'-TCAGAAGAATATATATAAATTT TTA-3')扩增菌的双氧酶基因(国家海洋局第三海洋研究所邵宗泽教授提供引物序列)。PCR 程序为 95℃预变性 4 min,94℃变性 1 min,53℃退火 1 min,72℃延伸 2 min,32 个循环,72℃延伸 20 min。PCR 产物通过 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳检验,片断大小大约 1.9 kb,PCR 产物测序结果与 GenBank 数据库进行比对和系统进化树分析。

2 结果

2.1 萘降解菌株的分离及形态观察

以萘为唯一碳源和能源从南冲绳海槽深海沉积

物中分离得到一株降解萘的海洋细菌 Nah-1,其菌落特征:菌落乳白色,表面光滑,湿润,菌落圆形,边缘整齐。革兰氏阴性,扫描电镜观察细菌形态菌体呈杆状,大小约为(4.0~5.0) $\mu\text{m} \times$ (2.0~3.0) μm (图 1)。

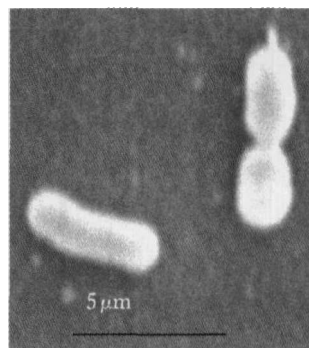


图 1 Nah-1 的扫描电子显微镜照片(15 000 $\times$)

Fig. 1 Scanning electron microscope observation of strains Nah-1 (15 000 $\times$)

2.2 底物浓度对菌株生长的影响

以不同质量浓度的萘(0.25~4 g/L)对菌株进行培养,其生长曲线见图 2。萘质量浓度在 0.25~4 g/L 范围内菌株均生长良好,当萘质量浓度等于和大于 3 g/L 时,虽然在后期 A_{600} 值较高,但延迟期较长,而且培养 72 h 后仍有较多的萘没有被利用,说明底物已经过量。0.5 g/L 是最合适的起始浓度,在这种质量浓度下培养的菌株延迟期较短, A_{600} 值较高,而且 72 h 后萘基本降解完全。

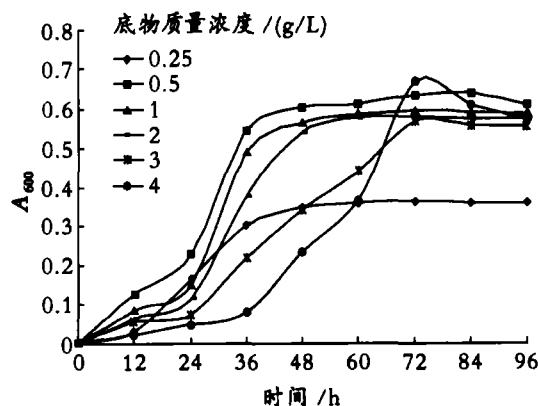


图 2 不同底物质量浓度对 Nah-1 生长的影响

Fig. 2 Effect of naphthalene concentration on the growth of Nah-1

2.3 盐度对菌株生长的影响

在不同盐度的萘无机盐培养基中对菌株进行培养,其生长曲线见图 3。在 10~30 的盐度范围内菌株均生长良好。在盐度为 40 时生长缓慢,且有较多萘剩余,盐度为 5 和 80 时菌株几乎不生长。选择 30 作为最适盐度培养菌株,这种盐浓度下培养的菌株 A_{600} 值较高,而且 72 h 后萘基本降解完全。

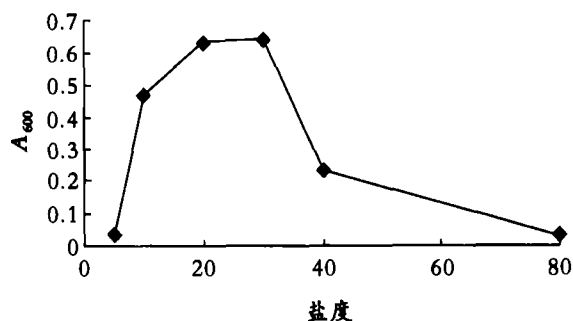


图3 盐度对 Nah-1 生长的影响

Fig. 3 Effect of salinity on the growth of Nah-1

2.4 温度对菌株生长的影响

温度实验表明(图4),8℃培养时菌液的 A_{600} 值几乎没有变化,菌株几乎不生长;26℃时菌液起始 A_{600} 增加较早,但平台期 A_{600} 值较16℃培养偏低;菌株在16℃培养时 A_{600} 值达最高,表明菌株在该温度下处于最佳生长状态,16℃是该菌株的最适生长温度。

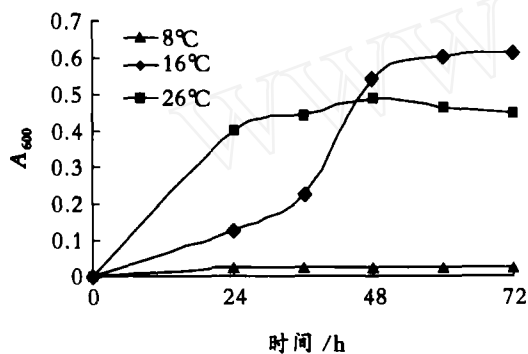


图4 温度对 Nah-1 生长的影响

Fig. 4 Effect of temperature on the growth of Nah-1

2.5 生长曲线

在最适条件下测定菌的生长曲线见图5,表明 Nah-1 在培养24 h后进入对数生长期,生长速度加快,60 h进入平台期。

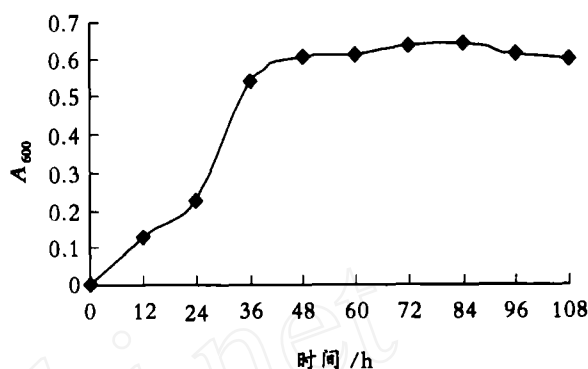


图5 Nah-1 生长曲线

Fig. 5 Growth curve of Nah-1

2.6 16S rDNA 系统发育分析

16S rDNA 序列系统进化分析结果显示该菌属于 γ 变形菌纲,最相似菌株是 *Cycloclasticus spirillensis* P1 (GenBank 注册号: DQ659429),相似度99%。其他与 Nah-1 相似度比较高的菌株都属于 *Cycloclasticus* 属(图6)。

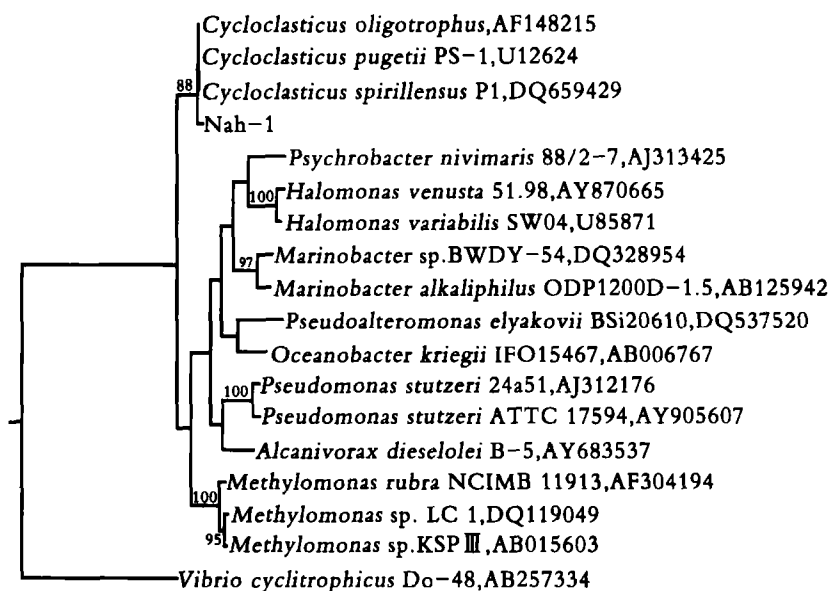


图6 Nah-1 的16S rDNA 系统发育分析

Fig. 6 Phylogenetic analysis of Nah-1 based on 16S rDNA sequences

2.7 萘降解基因的检测

对 Nah-1 的双加氧酶大亚基基因序列比对表明,相似度最高的基因 *phnA1* (GenBanK 注册号: AB102786) 来自 *Cycloclasticus* sp. A5^[13], 相似度为

99%。其他相似的基因是 *Cycloclasticus* sp. P-1P32 (*nahAc*) (GenBanK 注册号: AF053737) 等 (图 7)。

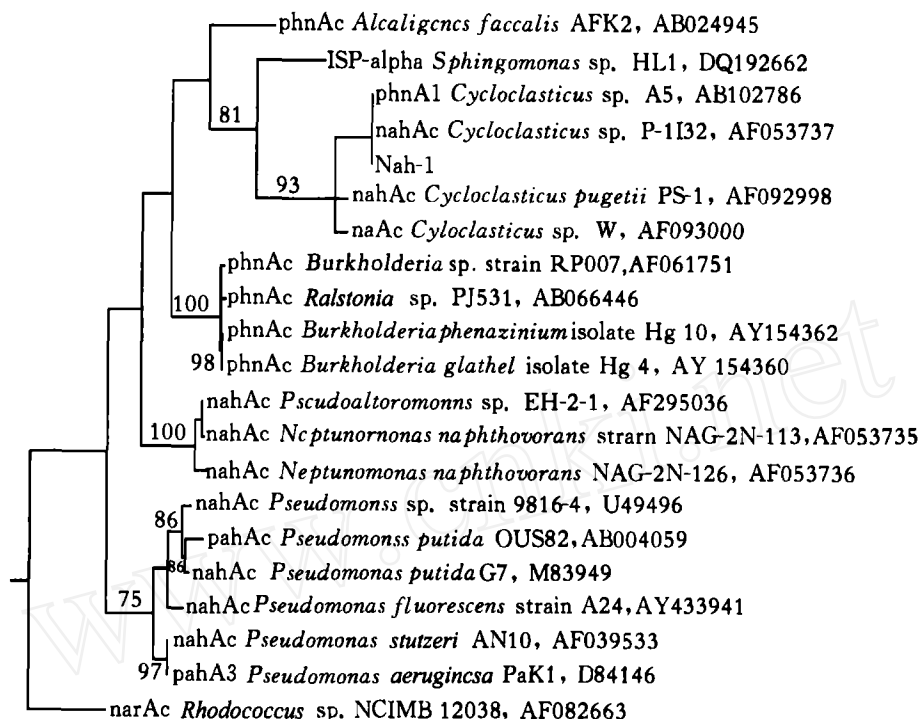


图 7 Nah-1 的双加氧酶大亚基基因序列系统发育分析

Fig. 7 Phylogenetic analysis of the Nah-1 dioxxygenase large subunit gene sequences

3 讨论和结论

冲绳海槽是东海的一个特殊地理单元,来自中国长江和台湾岛的淡水径流陆源颗粒有机碳在南冲绳海槽具有极高的沉积速率,南冲绳海槽成为东海大陆架和台湾岛颗粒有机物的主要沉积区^[14,15]。由于难降解等特点,南冲绳海槽深海沉积物中可能会有一定的陆源积累,为深海嗜低温 PAHs 降解微生物提供了物源和进化基础。作者从南冲绳海槽表层沉积物分离得到一株能以萘为唯一碳源和能源的嗜低温深海细菌,扫描电镜观察细菌形态为杆状。16S rDNA 序列分析鉴定为解环菌属 (*Cycloclasticus* sp.)。生长条件实验表明 Nah-1 生长的最适条件是萘初始质量浓度为 500 mg/L, 16℃、盐度为 30, 培养 72 h 后萘降解完全。与 PCR 得到的双加氧酶基因序列相似度最高的来自 *Cycloclasticus* sp. A5 的 *phnA1* 基因,相似度为 99%。其他相似的基因是 *Cycloclasticus* sp. P-1P32 (*nahAc*) 等。对 PAHs 降解菌分类、最适生长条件及萘降解的分子遗传机理进行研究,可以选择出最优化的方案来治理环境污

染,并为深海极端环境微生物多环芳烃降解及调控机制的深入研究和开发利用提供了基础。

参考文献:

- [1] 陈双雅,郑天凌,胡忠. 若干新技术研究海洋多环芳烃生物降解的进展 [J]. 台湾海峡, 2002, 21(4): 504-515.
- [2] 崔志松,邵宗泽. 一株海洋新鞘氨醇杆菌 *phe-8* (*Novosphigobium* sp.) 的 PAHs 降解基因和降解特性 [J]. 厦门大学学报, 2006, 45(增刊): 257-261.
- [3] 郑天凌,庄铁城,蔡立哲,等. 微生物在海洋污染环境中的微生物修复作用 [J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2001, 40(2): 524-534.
- [4] 郭楚玲,郑天凌,洪华生. 多环芳烃的微生物降解与生物修复 [J]. 海洋环境科学, 2000, 19(3): 24-29.
- [5] Derek R B, Narain D S, Christopher C R. Aromatic dioxxygenases: molecular biocatalysis and applications [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2001, 12: 564-573.
- [6] Gibson D T, Parales R E. Aromatic hydrocarbon dioxxygenases in environmental biotechnoogy [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2000, 11: 236-243.
- [7] Barriault D, Sylvestre M. Catalytic activity of *Pseudo-*

- monas putida* strain G7 naphthalene 1,2-dioxygenase on biphenyl [J]. *Int Biodeter Biodegr*, 1999, 44: 33-37.
- [8] Nigam P, Banat I M, Marchant R. Degradation of naphthalene by bacterial cultures [J]. *Environ Int*, 1998, 4: 671-677.
- [9] Timothy D H. Dioxygenase enzymes; catalytic mechanisms and chemical models [J]. *Tetrahedron*, 2003, 59: 7 075-7 101.
- [10] Sheryl E, James P. *Cycloclasticus pugetii* an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from marine sediments [J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1995, 45: 116-123.
- [11] Dang H Y, Song L S, Chen M N, *et al.* Concurrence of *cat* and *tet* genes in multiple antibiotic-resistant bacteria isolated from a sea cucumber and sea urchin mariculture farm in China [J]. *Microbial Ecology*, 2006, 52: 634-643.
- [12] Felsenstein J. PHYLIP phylogeny inference package (Version 3.2) [J]. *Cladistics*, 1989, 5: 164-166.
- [13] 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 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68: 5 625-5 633.
- [14] Kao S J, Lin F J, Liu K K. Organic carbon and nitrogen contents and their isotopic compositions in surficial sediments from the East China Sea shelf and the southern Okinawa Trough [J]. *Deep Sea Research II*, 2003, 50: 1 203-1 217.
- [15] Huh C A, Su C C, Wang C H, *et al.* Sedimentation in the Southern Okinawa Trough-Rates, turbidites and a sediment budget [J]. *Marine Geology*, 2006, 231: 129-139.

Isolation of a PAHs degrading marine bacterium Nah-1 and its degradative gene

WANG Xin-xin^{1,2}, DANG Hong-yue², WANG Chun-yan², TANG Xue-xi¹

(1. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Key Laboratory of Marine Geology and Environment, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Received: Nov. , 5, 2007

Key words: naphthalene; polycyclic aromatic hydrocarbon; biodegradation; dioxygenase; psychrophilic deep-sea bacterium

Abstract: A PAHs-degrading psychrophilic bacterium, with naphthalene as sole carbon and energy source, was isolated from deep-sea sediment of Southern Okinawa Trough. The growth curve of this bacterium was determined and the optimum growth conditions of this bacterium were studied. 16S rDNA sequences analysis indicated that it belongs to the genus *Cycloclasticus*. A fragment of the degrading dioxygenase gene was obtained through PCR from Nah-1. And sequence alignment revealed that it was similar to the *phnA1* gene of *Cycloclasticus* sp. A5, which encoded a putative naphthalene dioxygenase large subunit.

(本文编辑:张培新)