

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49 (12) :1634 - 1642 ; 4 December 2009
ISSN 0001 - 6209 ; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

一株来自大西洋表层海水的烷烃降解菌 *Gordonia* sp. S14-10 的分离鉴定及其降解相关特性的分析

王丽萍¹, 刘昱慧^{1,2}, 邵宗泽^{1*}

(国家海洋局第三海洋研究所海洋生物遗传重点实验室 厦门 361005)

(厦门大学生命科学学院 厦门 361005)

摘要: 【目的】本研究的目的是从大西洋表层海水分离筛选新的烷烃降解菌,了解其降解基因及降解特性,为海洋石油污染的生物治理提供材料。【方法】以柴油与原油作为混合碳源从大西洋表层海水样品中富集、并分离筛选出降解能力较强的烷烃降解菌。根据 16S rRNA 基因和其看家基因 *secA1* 序列确定其系统进化地位。分析了烷烃降解范围、表面活性剂产生能力及其他生理生化特性;利用已报道的兼并引物进行了烷烃羟化酶基因的 PCR 扩增及系统进化分析。【结果】分离筛选得到 1 株能够降解 C₁₀ (C₃₆ 直链烷烃)的菌株 S14-10。经 16S rRNA 基因序列系统发育分析表明它属于戈登氏菌属 (*Gordonia*),与 *Gordonia terrae*^T 同源性为 99.86%,但 *secA1* 序列相似度仅为 93.69%,可能为戈登氏属的一个新种。从该菌株中扩增得到了烷烃单加氧酶 *alkB* 和 P450 基因片段,它们与菌株 *Gordonia* sp. TF6 相应的基因序列具有最高相似度,分别为 88.76% 和 99.61%。该菌能够产生糖脂类生物表面活性剂,将发酵液的表面张力降低到 31.6 mN/m。【结论】首次从大洋环境中发现了 *Gordonia* 属的烷烃降解菌,可能为该属的一个新种。菌株 S14-10 至少编码两套与烷烃降解相关的单加氧酶系统,对各种直链烷烃降解范围宽,能产表面活性剂,在海洋油溢污染的生物修复中有较好的应用前景。

关键词: 烷烃; 烷烃羟化酶; 表面活性剂; 大西洋; 戈登氏菌

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2009) 12-1634-09

石油中含量最高的成分各种链长的烷烃。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]。仅自然溢油部分就足以在世界各大洋表面形成一层厚达 20 个油分子的膜,对海洋生态环境造成了严重危害,已引起了全球环境科学家的极大重视。近年来,利用微生物的降解作用进行烃类污染的环境的生物修复已成为国际环境科学研究的热点之一。迄今为止,已报道至少有 79 个属的细菌、9 个属的蓝细菌、103 个属的真菌以及 19 个

属的海藻能够降解或者转化烃类物质^[1],而关于其降解机制的分子生物学研究也正在进行当中。膜结合非亚铁血红素羟化酶 *AlkB* 以及细胞色素 P450 CYP153 家族作为两大加单氧酶系统,与烷烃降解密切相关,近年来得到了广泛而深入的研究。海洋占地球表面积的 70%,蕴藏着数量丰富的未知的微生物资源,从中分离、筛选、鉴定高效的烃类降解菌成了环境微生物学的研究重点之一。本研究开展了大西洋石油降解微生物的富集工作,分离筛选到了一

基金项目: 国家自然科学基金 (30670051); 国家自然科技资源共享平台建设项目 (2005DKA21209); 中国大洋协会项目 (DYXM-115-02-2-05); 福建省科技项目 (2009H0029)

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

作者简介: 王丽萍 (1984-) 女,福建泉州人,硕士研究生,主要从事环境微生物的研究工作。E-mail: angelmouse.wlp@163.com

收稿日期: 2009-05-19; 修回日期: 2009-06-22

株中长链烷烃降解菌 S14-10,经鉴定为戈登氏菌 (*Gordonia* sp.) ,并对其相关烷烃降解基因进行了初步研究。

戈登氏菌属 (*Gordonia*) 是 Stackebrandt 等^[1]在 1997 年确立的一个新属,属于放线菌门 (*Actinobacteria*) ,棒杆菌亚目 (*Corynebacterineae*) 。迄今为止,已报道了该属的 23 个新种,它们分离自不同生境如活性污泥^[1],工业废水^[1],红树林根围^[5],摩托车轮胎^[6],柏油和苯酚污染的土壤^[7],油井^[8],临床标本^[9],以及肺结核病人唾液^[10]等,并且能参与各种环境污染物的降解,包括聚异戊二烯、苯并噻吩、二苯并噻吩、3-甲基嘧啶、烷烃、多环芳烃等等。它们在环境的生物修复方面发挥着重要的作用,其中有些已经应用于污染土壤及水体的净化^[11]。戈登氏菌不仅在陆地上广泛分布着,它们在石油污染的地中海海岸线以及深海沉积物中也有发现^[12-13],但研究较少。本论文首次从大洋表层海水环境分离到了该属细菌。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品 :菌株来源 :大西洋表层海水 站点 S14 : 17.5549° (W) ;8.0610° (S) ,为“大洋一号”2005 年环球科考 DY105-17A 航次采集所得。样品采集后立即进行富集,方法如下所述。降解底物为零号柴油和原油。

1.1.2 培养基 :人工海水培养基 (MMC) :见参考文献 [14] ,NH 培养基及 216 L 培养基 :见参考文献 [15] 。

1.1.3 主要试剂和仪器 :烷烃 :十烷、十二烷、十三烷、十五烷、二十六烷、三十六烷购自 Alfa Aesar 公司 ;十一烷、十六烷、二十二烷购自天津市化学试剂研究所 ;十四烷、十七烷、十九烷、二十四烷、三十烷、三十二烷、三十四烷、三十八烷购自 Sigma 公司 ;

八烷、二十烷购自 Eastgate 公司 ;二十八烷购自中国医药 (集团) 上海化学试剂公司。PCR 相关试剂由 TaKaRa 提供 ;恒温摇床 (上海智诚分析仪器制造有限公司) ;Alpha Innotech 凝胶成像仪 (San Leandro, California) ;PCR 扩增仪 (Eppendorf) ;自动界面张力仪 (JYW-200,承德精密试验机有限公司) 。

1.2 菌株的富集和分离培养

取 100 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 浓缩液至终浓度为 0.1% (W/V) ,添加 0.22 μm 滤膜过滤除菌的 FeSO_4 溶液至终浓度为 2.8 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℃ ,160 r/min 摇床中培养 7 d,待黑色油污状消失,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 216L 平板、28℃ 温箱培养、多次划线分离单菌。

1.3 菌株 S14-10 的鉴定

1.3.1 生理生化特性的测定 :革兰氏染色、氧化酶、接触酶检测等参照常川细菌系统鉴定手册^[15]。其它的生化实验采用 API 20NE、API ZYM (BioMérieux) 试剂条及 Biolog GP2 板来测定,依照说明书进行操作。

1.3.2 16S rRNA 和 *secA1* 序列的分析 :菌株 S14-10 的 DNA 提取参照文献 [14] 进行。用通用引物 16S F 和 16S R 扩增 16S rRNA 全长序列。引物序列参见表 1。

SecA1 蛋白 (具 ATPase 活性) 作为前体蛋白转位酶 (preprotein translocase ATPase) ,为蛋白的跨质膜输送提供驱动力。多项研究表明,*secA1* 基因序列具有保守性以及足够的可变性,在以核苷酸序列为基础的放线菌分类及鉴别研究中,同样可作为看家基因,区分属内不同种。因此我们参照文献 [17] 进行了 *secA1* 基因序列的扩增及测序。引物序列参见表 1。

16S rRNA 和 *secA1* 扩增的目的片段长度分别为

表 1 本研究中所使用的各引物序列

Table 1 The sequences of primers used in this paper

Primer name	Sequences (5'→3')	Target gene
16S F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	16S rRNA
16S R	ACGGCTACCTTGTACGACT	
SecA1-f	GTA AACGACGCGCCAGGACAGY GAGTGGATGGGYCGSGTGCACCG	<i>secA1</i>
SecA1-r	CAGGAAACAGCTATGACCGGACGATGCTAGTCCTTGTC	
P450F	ATGTTYATHGCNATGGAYCCNC	P450
P450R	NARNCKRTTNCCCATRCANCKRTG	
alkBf	AAYACNGCNCAYGARCTNGGNCAYAA	<i>alkB</i>
alkBr	GCRTGRTGRTGNGARTGNGCYTC	

1.5 kb 和 500 bp 左右。所有序列均由上海英骏公司完成测序。测序结果在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 进行 blastn 分析, 并通过软件 DNAMAN (Version 5.1) 对扩增序列和 GenBank 中近缘种的序列进行比对, 然后用软件 MEGA 3.1 构建系统发育树。

1.4 烷烃降解范围及降解能力的测定

1.4.1 测定方法: 将菌株 S14-10 在 216L 液体培养基中活化至对数生长期 (OD_{600} 约为 0.6), 以 1% 的接种量 (菌体经离心, 洗涤, 去除培养基) 转接到 50 mL 无碳源的 MMC 液体培养基中 (添加微量元素及 Fe^{2+}), 置于 28°C, 160 r/min 摇床培养 2~7 d。

1.4.2 测定的烷烃: 十烷、十一烷、十二烷、十三烷、十四烷、十五烷、十六烷、十七烷、十八烷、十九烷、二十烷、二十二烷、二十四烷、二十六烷、二十八烷、三十烷、三十二烷、三十四烷、三十六烷、三十八烷。同时设不加菌及不加碳源两组阴性对照。设 3 次重复实验。测定 OD_{600} 值以及肉眼观察判断其生长情况。

1.5 表面活性剂测定的定性实验

以正十六烷作为唯一碳源, 在 MMC 中摇瓶培养, 方法同上, 取 4 d 后的摇瓶发酵液, 测定其液体表面张力及排油活性, 测定方法参照文献 [18]。设 3 次平行实验, 同时以超纯水做阴性对照。

生物表面活性剂的分离、提纯、薄层层析 (TLC) 制备等参照文献 [19] 进行。

1.6 烷烃羟化酶基因 P450 和 *alkB* 的 PCR 扩增与测序

以菌株 S14-10 的基因组 DNA 为模板, 用文献已报道的烷烃羟化酶引物 *alkBf/alkBr* [20] 和 P450F/P450R [21] 分别扩增 *alkB* 以及 P450 基因片段。引物序列如表 1 所示。PCR 产物经纯化、连接、转化后, 挑取阳性克隆子进行酶切分析, 选取多个有代表性的阳性克隆子测序。测序结果的分析方法同上所述。

2 结果和讨论

以柴油和石油 (1:1) 为唯一碳源, 经 4 次富集培养, 从大西洋表层海水 S14 站位样品中, 共分离筛选得到 16 株单菌。经单菌功能验证发现其中菌株 S14-10 具有较强的柴油降解能力, 故对其作了进一步的研究。目前该菌已收藏于海洋微生物菌种保藏中心 (MCCC), 保藏编号为 MCCC 1A02417。

2.1 菌株鉴定

2.1.1 形态特征: 菌株 S14-10 在 216L 固体培养基

上呈朱红色, 不透明, 蜡状质地, 表面较粗糙, 微湿润, 边缘规则, 凸起, 无晕环。菌体呈短杆状, 大小为 $0.5 \mu\text{m} \times 1.0 \mu\text{m}$ 。

2.1.2 生理生化特征: 菌株 S14-10 为革兰氏阳性菌, 氧化酶呈阴性, 接触酶阳性, 经过 API 20NE、API ZYM 以及 Biolog GP2 检测, 菌株 S14-10 氧化酶呈阴性, 接触酶阳性, 能还原硝酸盐, 不能还原亚硝酸盐, 能利用纤维二糖、葡萄糖酸盐、琥珀酸盐、奎尼酸, 不能利用半乳糖、鼠李糖、蔗糖、阿拉伯糖等, 与近缘菌株 *G. terrae* DSM 43249^T、*G. bronchialis* DSM 43247^T、*G. rubripertincta* DSM 43197^T 等存在较明显差异。其中, 后三者的生理生化特征参照文献 [24-25] 所描述。具体如表 2 所示。

表 2 菌株 S14-10 的生化特征

Table 2 Biochemical characteristics that differentiate strain S14-10 from the three representatives of closely related *Gordonia* species

Characteristics	1	2	3	4
API ZYM tests :				
Alkaline phosphatase	+	-	+	-
Butyrate esterase	-	+	+	+
Caprylate esterase	+	+	-	+
Cystine arylamidase	-	-	-	-
β -glucuronidase	-	+	-	-
Leucine arylamidase	+	+	+	+
Myristate lipase	-	-	-	-
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	-	+	+	+
Valine arylamidase	-	+	-	+
Biochemical tests :				
Aesculin	+	+	-	-
Nitrate reductase	+	+	+	-
Oxidase	-	-	-	-
接触酶 (catalase)	+	+	+	+
Utilization of :				
D-Galactose	-	+	+	+
L-Rhamnose	-	+	+	+
D-Sucrose	-	+	+	+
D-Arabitol	-	+	-	+
I-Inositol	-	-	+	-
D-Cellobiose	+	-	-	-
Glycerol	-	+	+	+
N-acetyl-d-glucosamine	+	-	-	+
Gluconate	+	-	+	+
Citrate	+	+	-	-
Succinate	+	-	+	-
Quinate	+	-	-	-
L-Aspartate	+	-	-	-
L-Valine	-	-	+	-

Taxa : 1, S14-10; 2, *G. terrae* DSM 43249^T; 3, *G. bronchialis* DSM 43247^T; 4, *G. rubripertincta* DSM 43197^T

2.1.3 基于 16S rRNA 基因序列的系统进化分析: 将所获得 1462 bp 的 16S rRNA 全长序列与 GenBank

中的近缘种进行 Blast 比对分析。图 1 是采用邻位加入法构建的菌株 S14-10 与 *Gordonia* 属的 23 株模式种的 16S rRNA 系统进化树。如图 1 所示,菌株 S14-10 和 *G. terrae* DSM 43249^T、*G. ambiens* DSM 44568^T、*G. bronchialis* DSM 43247^T 和 *G. rubripertinctus* DSM 43197^T 的进化距离较小,相似性较高,分别为 99.86%、98.22%、98.29% 和 98.15%,其中与 *G. terrae* DSM 43249^T 处于同一分枝,100% 的自展值说

明了这一亚枝的稳定性。基于 16S rRNA 序列判断,菌株 S14-10 属于 *Gordonia* 属。一般情况下,16S rRNA 序列同源性在 99% 以上即可初步认定为同一种,但因菌株 *G. sputi* DSM 43896^T 与 *G. jacobaea* MV-1^T、*G. namibiensis* DSM 44568^T 与 *G. rubripertinctus* DSM 43197^T 的 16S rRNA 同源性也都在 99% 以上,分别为 99.66% 和 99.39%,因此,难以根据 16S rRNA 序列同源性来判断菌株 S14-10 属于哪一个种。

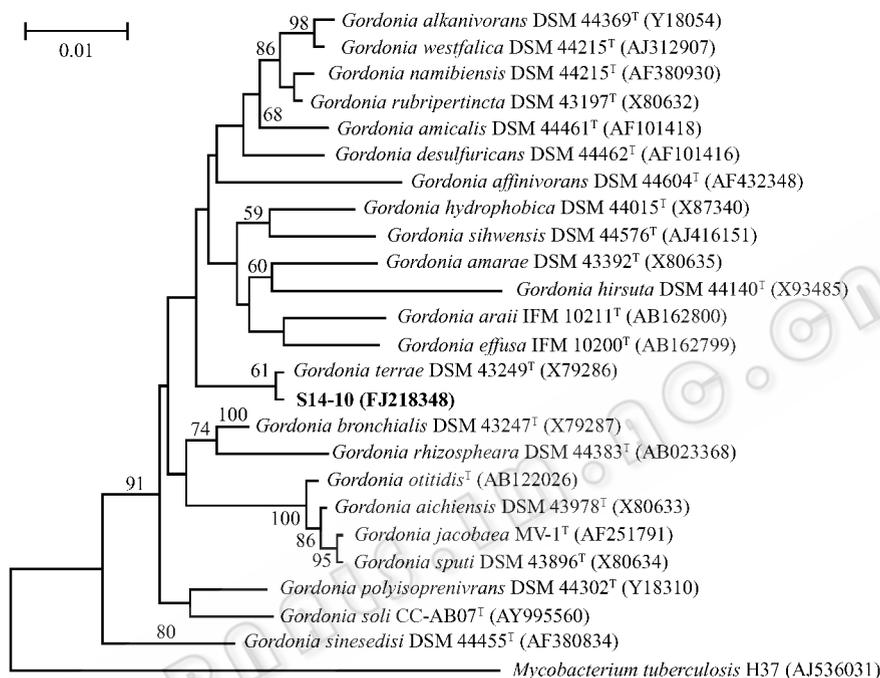


图 1 基于 16S rRNA 全长序列的菌株 *Gordonia* sp. S14-10 的系统进化树

Fig. 1 Neighbour-joining tree of strain S14-10 based on nearly full length 16S rRNA sequences of *Gordonia* species and representative strains. Bootstrap values (from 1000 replication) are shown at branch points, only values above 50% are given. The 16S rRNA sequences of the type strains of members of the genus *Gordonia* were retrieved from the GenBank database. Bar 0.01 substitutions per nucleotide position. ^T, Type strain. The numbers in parenthesis mean sequences accession number in GenBank.

2.1.4 基于 *SecA1* 基因序列的系统进化分析: Sec 系统是相当保守的分泌机制,在古菌、细菌及真核生物中都存在。Sec 分泌途径在细菌中,尤其是大肠杆菌已得到了广泛的研究。SecA1 蛋白(具 ATPase 活性)作为前体蛋白转位酶的重要成分,为蛋白的跨膜输送提供驱动力。最近有多项研究表明,在以核苷酸序列为基础的放线菌分类及鉴别研究中,16S rRNA 序列难以区分某些种,而看家基因 *secA1* 的序列具有足够的保守性以及可变性,可作为区分不同种的靶分子。Fischer 等^[21]扩增了分枝杆菌属 29 个种的 47 株 ATCC 标准菌和 59 株临床分离菌的 *secA1* 基因序列,首次发现分泌相关基因可以用于区分分枝杆菌属内的不同菌种。Conville 等^[23]分析比较了诺卡氏菌属的 29 个种的 16S rRNA 以及 *secA1* 基因

序列,发现 *secA1* 基因能更好更准确地区分和鉴别诺卡氏菌属内的菌种。同样地,Mikami 等^[27]对 *Gordonia* 属的 23 个模式种分别进行了 *secA1* 基因和 16S rRNA 系统进化关系的比较分析,而后得出结论,*secA1* 作为看家基因用来进行种水平的鉴定以及系统进化的研究,是非常理想的靶标。

本文扩增了菌株 S14-10 的 *secA1* 基因序列,用以确定该菌株在戈登氏属内的进化地位。图 2 是用邻位加入法构建的 S14-10 与该属所有模式种的 *secA1* 序列系统进化树。我们发现,尽管 S14-10 与 *G. terrae* DSM 43249^T 仍在一个独立的小分枝,但二者的 *SecA1* 核酸序列同源性较低,仅为 93.69%,翻译的氨基酸序列同源性为 98.77%。需要说明的是,菌株 S14-10 的分离生境与已报道的该属模式种

迥异,其他菌株大多分离自土壤或者临床。

比较 16S rRNA 与 *secA1* 基因序列的系统发育树我们发现,两者的进化关系基本一致。但在区分某些种上,*secA1* 表现出更高的可变性。如菌株 *G.*

sputi DSM 43896^T 与 *G. jacobaea* MV-1^T, 二者的 16S rRNA 同源性高达 99.66%, 但 *secA1* 相似度仅为 95.56%。

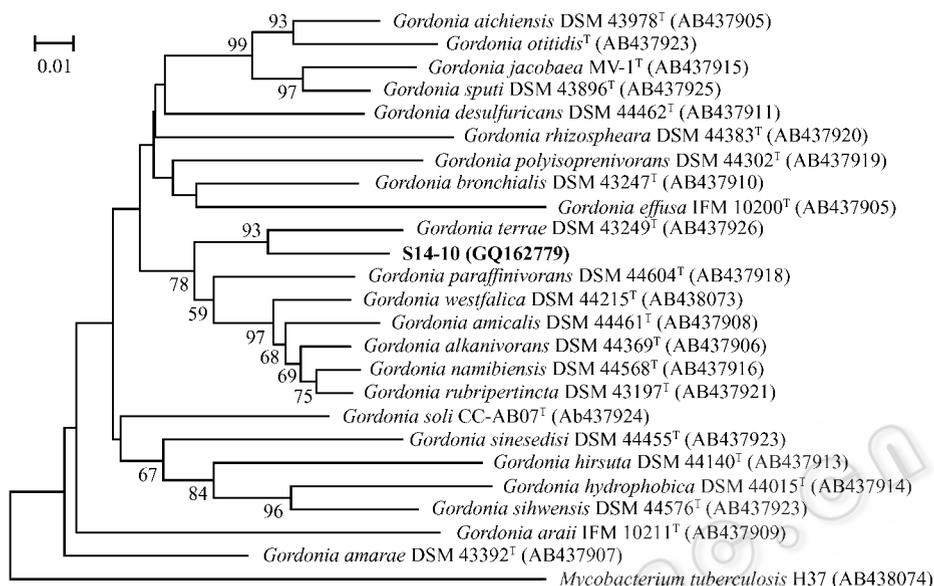


图 2 基于 *SecA1* 序列的菌株 *Gordonia* sp. S14-10 的系统进化树

Fig.2 Neighbour-joining tree of strain S14-10 based on *SecA1* sequences of *Gordonia* species and representative strains. Bootstrap values (from 1000 replication) are shown at branch points (only values above 50% are given). The *secA1* gene sequences of the type strains of members of the genus *Gordonia* were retrieved from the GenBank database. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position. ^T, Type strain. The numbers in parenthesis mean sequences accession number in GenBank.

2.2 烷烃降解范围

经过 2~7 d 的观察培养,发现菌株 S14-10 能够快速很好地利用 C₁₀~C₂₆ 链长的直链烷烃作为唯一碳源生长,培养液呈混浊乳化状,肉眼观测未见油滴残留,其中在 C₁₆ 中经过 3 d 培养,OD₆₀₀ 即可达到 1 左右。对于链长大于 C₂₆ 的烷烃,菌株 S14-10 也表现出了较明显的降解特性。即使在 C₃₈ 中,通过显微镜观察以及 OD₆₀₀ 测定,表明也有一定的生长。但尚未发现有降解支链烷烃或者多环芳烃 (PAH) 的能力。Quatrini^[2] 等曾经从烃污染的地中海海岸线分离到两株 *Gordonia* sp. 菌,碳源生长实验以及 GC-MS 分析表明,这两株菌也能够降解中长链的直链烷烃。而另一株从石油污染土壤中分离到的 *Gordonia* sp. He4 菌,则能够以正十六烷、苯、萘、蒎、菲和芘作为唯一的碳源生长^[6]。

2.3 生物表面活性剂的初步鉴定

许多专性烃类降解微生物在生长过程中往往伴随着生物表面活性剂的生成,如本实验室筛选到的一株专性深海烷烃降解菌红球菌 *Alcanivorax dieselolei* B-5^T TW53 等能产脂肽类的表面活性剂^[4],

还有 Yakimov 等人^[7] 分离鉴定的另一株 *Alcanivorax borkumensis* SK2^T 能产糖脂类表面活性剂。它们的作用主要是使烃类在水溶液中有效扩散,并渗入细胞内部被分解同化分解。另一方面,生物表面活性剂可以通过调节细胞表面的疏水性能来影响微生物细胞与烃类之间的亲和力。作为次级代谢产物的生物表面活性剂,对微生物的生长具有重要作用。在某些放线菌属的细菌,其中包括分枝杆菌 (*Mycobacterium*)、诺卡氏菌 (*Nocardia*)、棒状杆菌 (*Corynebacterium*)、红球菌 (*Rhodococcus*),都发现了产海藻糖脂的能力的存在。

为了了解降解菌 S14-10 产表面活性剂的情况,我们将其菌株 S14-10 接种于以正十六烷为唯一碳源的 MMC 培养基中,培养 4 d 后,取发酵液测定表面张力,能将水的表面张力降低到 31.6 mN/m。排油能力测定显示,排油圈直径大于 3 cm,表现出较强的表面活性。经初步的分离、TLC 展层,苯酚-浓硫酸检测显示棕色,表明该菌株所产的表面活性剂包含糖脂成分。但由于所产的表面活性剂吸附在细胞壁上,对提纯和制备造成了较大的影响,还有待

进一步的研究。

2.4 烷烃羟化酶基因的克隆、测序与分析

烷烃羟化酶是烷烃降解过程中第一步酶,也是整个降解过程的关键酶。目前从微生物中发现了几种不同类型的单加氧酶系统,其中报道得较多的是与恶臭假单胞菌 GPo1 烷烃羟化酶相关的 AlkB 酶系统 AlkB 以及细胞色素 P450 CYP153 家族。

利用兼并引物 alkBf/alkBr 通过条件优化的 PCR 反应程序,从菌株 S14-10 中扩增获得了大小约为 550 bp 的目的基因片段。NCBI Blastn 分析发现, S14-10 *alkB* 与 *Gordonia* sp. TF6 的 *alkB2* 有最高同源性,为 88.76%。其中, Fujii 等^[8]曾将 *Gordonia* sp. TF6 *alkB2* 成功地表达在大肠杆菌中,能转化 C₅ (C₁₃ 链长的烷烃)。

将所得到的 *alkB* 基因翻译成多肽序列后发现,该基因片段编码的多肽中含有 His1 (HE [L/M] XHK) His2 (EHXXGHH) HYG (NYXEHYG [L/M]) 和 His (LQRHXDHHA) 所有膜结合烷烃羟化酶都具有的 4 个保守结构域,并且在 His1 和 His2 中,组氨酸周围的氨基酸残基与其它的 AlkB 一样,都是保守的。图 3 是根据推导的 183 个氨基酸序列与 NCBI GenBank 中同源的序列所构建的系统发育树。

用兼并引物 P450F/P450R,扩增到大小约 800 bp 的 P450 目的片段。NCBI Blastn 分析发现, S14-10 P450 与 *Gordonia* sp. TF6 的 P450 同源性高达

99.61%。其中,两株菌的 16S rRNA 序列相似度为 98.75% (471/478),二者亲缘关系较近。将 P450 翻译成氨基酸序列后发现,其多肽片段也存在 3 个 CYP153 蛋白家族高度保守的结构域,包括 N 端 (MFIAMDPP) I-螺旋的氧结合臂 (LLIVGGNDTTRN) 以及 C 端即亚铁血红素结合的丝氨酸区域 (HLSFGFGIHRIC),表明扩增到的该序列属于 CYP153 家族。图 4 是根据推导的 267 个氨基酸序列与 NCBI GenBank 中同源的序列所构建的系统发育树。

作为高 G + C 含量的革兰氏阳性菌, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Gordonia* 等都是已报道的烷降解菌,并且存在至少一种烷烃羟化酶,即 AlkB 或 P450,而且亲缘关系相对较近,尽管一般认为烷烃羟化酶基因与菌株的系统发育地位之间并没有直接联系^[9]。

已报道的 AlKBs 和 CYP153s 都是负责中等链长烷烃 (C₅ ~ C₁₂) 的降解,其中,不同的 AlKBs 可能还有不同的底物范围^[10]。菌株 S14-10 同时包含了这两套烷烃单加氧酶系统,它们的底物范围有待通过实时定量 PCR 来进一步确定。同时,我们推测 S14-10 可能还包含了其它的羟化酶系统,如长链烷烃羟化酶 Alma^[11]以及 LadA^[12],尽管通过兼并引物 PCR 尚没有扩增到相关基因片段。这种多基因策略为其降解油污环境提供了有效的途径。

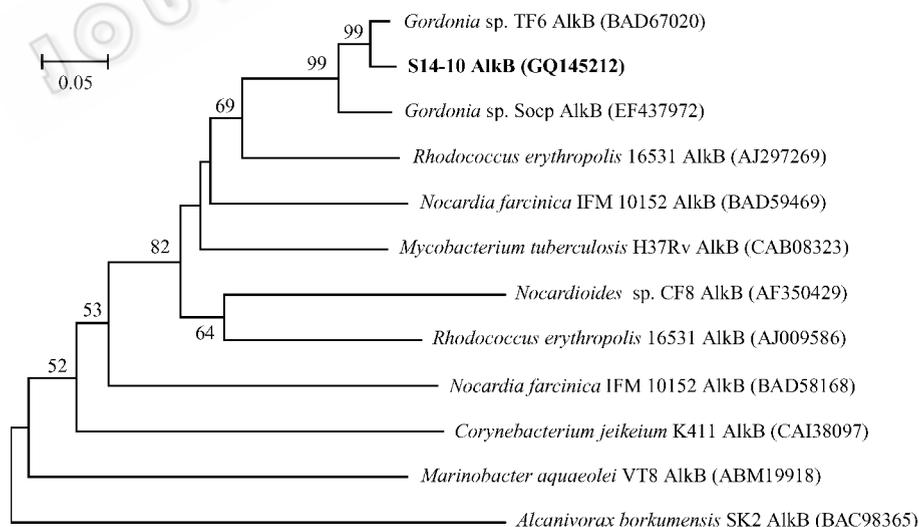


图 3 菌株 *Gordonia* sp. S14-10 烷烃羟化酶 AlkB 部分氨基酸序列的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on partial amino acid sequences of AlkB from strain S14-10 and closely related representatives. Bootstrap values (from 1000 replication) are shown at branch points (only values above 50% are given). The scale bar corresponds to 0.05 substitutions per nucleotide position. The numbers in parenthesis mean sequences accession number in GenBank.

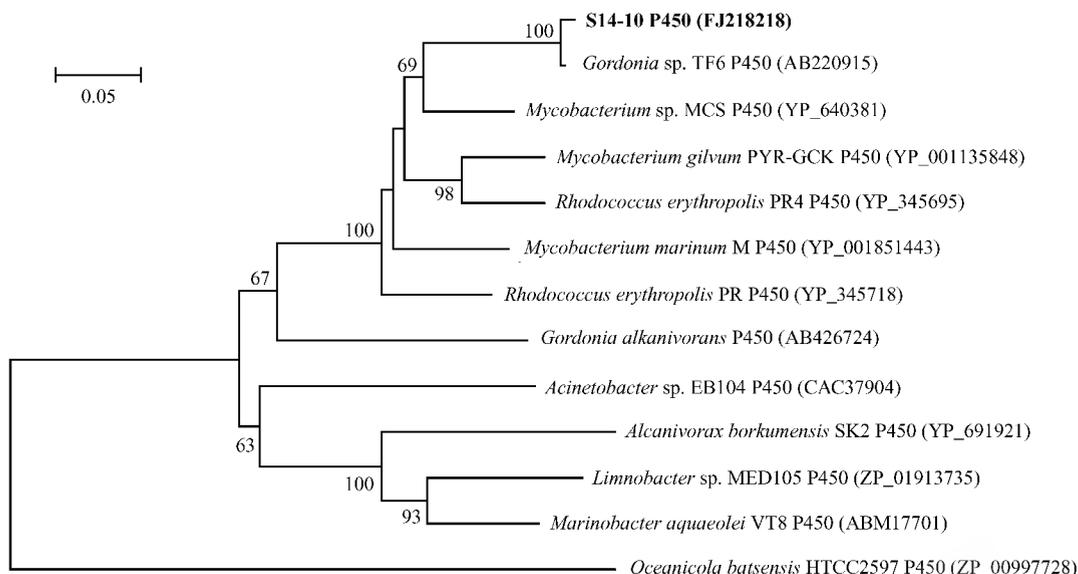


图4 菌株 *Gordonia* sp. S14-10 烷烃羟化酶 P450 部分氨基酸序列的系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree based on partial amino acid sequences of cytochromes P450 from strain S14-10 and closely related representatives. Bootstrap values (from 1000 replication) are shown at branch points, only values above 50% are given. The scale bar corresponds to 0.05 substitutions per nucleotide position. The numbers in parenthesis mean sequences accession number in GenBank.

3 结论

本研究首次从大洋环境中发现并分离了 *Gordonia* 属的烷烃降解菌。结合前人结果表明该属作为烷烃降解菌在陆地、近海及大洋环境中都有分布。根据其 16S rRNA 序列与模式菌的高度同源性, 将其归为戈登氏属 (*Gordonia*)。但是通过比较看家基因 *secA1* (与 *G. terrae* DSM 43249^T 仅为 93.69% 同源性) 以及生理生化特征, 发现该菌株与已报道的 *Gordonia* 属模式种存在较大的差异, 是一个可能的新种。该菌具有良好的烷烃降解能力, 能快速降解 C₁₀ ~ C₂₆, 对 C₂₈ ~ C₃₆ 烷烃也表现出较好的降解能力。进一步分析表明, 菌株 S14-10 至少编码两套与烷烃降解相关的单加氧酶系统 (AlkB 和 CYP153 羟化酶), 同时还能产生糖脂类的表面活性剂。因此, 该菌在海洋油溢污染的生物修复中有较好的应用前景。

参考文献

[1] Head IM, Jones DM, Röling WFM. Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Review Microbiology*, 2006, 4 (3): 173 - 183.

[2] Tsukamura M. Proposal of a New Genus, *Goudona*, for slightly acid-fast organisms occurring in sputa of patients with pulmonary disease and in soil. *Journal of General Microbiology*, 1971, 68: 15 - 26.

[3] Soddell JA, Stainsby FM, Eales KL, et al. *Gordonia defluvi* sp. nov., an actinomycete isolated from activated sludge foam. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2006, 56: 2265 - 2269.

[4] Kim KK, Lee CS, Kroppenstedt RM, et al. *Gordonia sihwensis* sp. nov., a novel nitrate-reducing bacterium isolated from a wastewater-treatment bioreactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2003, 53: 1427 - 1433.

[5] Takeuchi M, Hatano K. *Gordonia rhizosphaera* sp. nov. isolated from the mangrove rhizosphere. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1998, 48: 907 - 912.

[6] Linos A, Steinbuechel A, Sproer C, et al. *Gordonia polyisoprenivorans* sp. nov. a rubber-degrading actinomycete isolated from an automobile tyre. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1999, 49: 1785 - 1791.

[7] Kummer C, Schumann P, Stackebrandt E. *Gordonia alkanivorans* sp. nov., isolated from tar-contaminated soil. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1999, 49: 1513 - 1522.

[8] Xue Y, Sun X, Zhou P, et al. *Gordonia paraffinivorans* sp. nov., a hydrocarbon-degrading actinomycete isolated from an oil-producing well. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2003, 53: 1643 - 1646.

[9] Iida S, Taniguchi H, Kageyama A, et al. *Gordonia otitidis* sp. nov., isolated from a patient with external otitis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2005, 55: 1871 - 1876.

- [10] Klatte S, Kroppenstedt RM, Schumann P, et al. *Gordonia hirsuta* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1996 46 :876 – 880.
- [11] Bell KS, Philp JC, Aw DWJ, et al. The genus *Rhodococcus*. *Journal of Applied Microbiology* 1998 85 :195 – 210.
- [12] Quatrini P, Scaglione G, Pasquale CD, et al. Isolation of Gram-positive n-alkane degraders from a hydrocarbon-contaminated Mediterranean shoreline. *Journal of Applied Microbiology* 2008 104 :251 – 259.
- [13] Goodfellow M, Maldonado LA. The families *Dietziaceae*, *Gordoniaceae*, *Nocardiaceae* and *Tsukamurellaceae* in the Prokaryotes, vol. 3, New York: Springer 2006.
- [14] Peng F, Wang YQ, Liu Z, Sun FQ, et al. A novel lipopeptide produced by a Pacific Ocean deep-sea bacterium, *Rhodococcus* sp. TW53. *Journal of Applied Microbiology* 2008. 105 :698 – 705.
- [15] 袁军, 赖其良, 邵宗泽. 深海多环芳烃降解菌新鞘氨醇杆菌 H25 的降解特性及降解基因. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)* 2008 48 (9) :1208 – 1213.
- [16] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社 2001.
- [17] Kang YQ, Takeda K, Yazawa K, et al. Phylogenetic studies of *Gordonia* species based on *gyrB* and *secA1* gene analyses. *Mycopathologia* 2009 167 :95 – 105.
- [18] Youssef HN, Duncan KE, Nagle DP, et al. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* 2004, 56 :339 – 347.
- [19] Peng F, Liu Z, Shao ZZ. An oil-degrading bacterium: *Rhodococcus erythropolis* strain 3C-9 and its biosurfactants. *Journal of Applied Microbiology* 2007, 102 (6) :1603 – 1611.
- [20] Kloos K, Munch JC, Schloter M. A new method for the detection of alkane-monoxygenase homologous genes (*alkB*) in soils based on PCR-hybridization. *Journal of Microbiological Methods* 2006 66 (3) :486 – 496.
- [21] Kubota M, Nodate M, Yasumoto-Hirose M, et al. Isolation and functional analysis of cytochrome P450 CYP153A genes from various environments. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 2005 69 :2421 – 2430.
- [22] Zelazny AM, Calhoun LB, Li L, et al. Identification of *Mycobacterium* species by *secA1* sequences. *Journal of Clinical Microbiology* 2005 43 :1051 – 1058.
- [23] Conville PS, Zelazny AM, Witebsky FG. Analysis of *secA1* gene sequences for identification of *Nocardia* species. *Journal of Clinical Microbiology* 2006 44 :2760 – 2766.
- [24] Alexandros L, Mahmoud MB, Alexander S, et al. *Gordonia westfalica* sp. nov., a novel rubberdegrading actinomycete. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2002 52 :1133 – 1139.
- [25] Shen F T, Goodfellow M, Jones AL, et al. *Gordonia soli* sp. nov. a novel actinomycete isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2006, 56 :2597 – 2601.
- [26] 刘磊, 李习武, 刘双江, 等. 降解多环芳烃的菌株 *Gordonia* sp. He4 的分离鉴定及其在菲污染土壤修复过程中的动态变化. *环境科学 (Environmental Science)*, 2007 28 (3) :617 – 623.
- [27] 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.
- [28] Fujii T, Narikawa T, Takeda K, et al. Biotransformation of various alkanes using the *Escherichia coli* expressing an alkane hydroxylase system from *Gordonia* sp. TF6. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 2004, 68 (10) :2171 – 2177.
- [29] van Beilen JB, Li Z, Duetz WA, et al. Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil Gas Science and Technology* 2003 58 :427 – 440.
- [30] van Beilen, JB, and Funhoff, EG. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2007 74 :13 – 21.
- [31] Throne HM, Wentzel A, Ellingsen TE, et al. Identification of novel genes involved in long-chain n-alkane degradation by *Acinetobacter* sp. strain DSM 17874. *Applied and Environmental Microbiology* 2007 73 (10) :3327 – 3332.
- [32] Li L, Liu X, Yang W, et al. Crystal structure of long-chain alkane monoxygenase (LadA) in complex with coenzyme FMN unveiling the long-chain alkane hydroxylase. *Journal of Molecular Biology* 2008 376 :453 – 465.

Isolation and identification of a hydrocarbon-degrading bacterium *Gordonia* sp. S14-10 from the surface water of Atlantic Ocean and analysis on its related characteristics

Liping Wang¹, Yihui Liu^{1,2}, Zongze Shao^{1*}

¹(Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, The Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China)

²(School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: [Objective] The aim of this study is to isolate novel and efficient hydrocarbon-degrading bacteria (HDBs) from pelagic ocean. [Methods] The surface water sample from Atlantic Ocean was enriched in NH medium with crude oil (diesel oil (in a ratio of 1:1)) as the sole carbon source. HDBs were isolated and their degradation ability was tested in MMC medium and further subjected to genotypic and phenotypic analysis. Polymerase chain reaction with degenerate primers was performed to detect the genes encoding integral-membrane non-heme iron monooxygenase (*AlkB*) and cytochrome P450 CYP153 family. Meanwhile, the production of biosurfactant was examined by surface tension measurement, then extracted and purified for component characterization. [Results] A hydrocarbon-degrading bacterium named S14-10 was obtained, which can utilize C₁₀ ~ C₃₆ as the sole carbon source. Analysis of 16S rRNA sequence showed that it belonged to *Gordonia* genus showing the highest similarity (99.86%) with type strain of *Gordonia terrae*^T, while *secA1* sequence showed a low identity only 93.69%. Furthermore two genes *alkB* and CYP153 P450 were obtained with PCR, which had highest similarities 88.76% and 99.61% to that of *Gordonia* sp. TF6, respectively. In addition, strain S14-10 was found to produce glycolipid biosurfactant, which lowered the surface tension of water to 31.6 mN/m. [Conclusion] Strain S14-10 is possibly a novel species of *Gordonia*, and the first hydrocarbon-degrading bacterium isolated from open sea. It has potential in bioremediation of oil contaminated environment.

Keywords: hydrocarbon; alkane hydroxylase; biosurfactant; Atlantic Ocean; *Gordonia*

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30670051), the National Infrastructure of Natural Resources for Science and Technology Program of China (2005DKA21209), the COMRA Program (DYXM-115-02-2-05) and the Fujian Province Science foundation (2009H0029)

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

Received: 19 May 2009/Revised: 22 June 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“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。