

北极表层海水中氯代十六烷降解菌的多样性

王建宁¹, 董纯明¹, 赖其良¹, 林龙山², 邵宗泽^{1*}

国家海洋局第三海洋研究所,¹ 海洋生物遗传资源重点实验室,² 海洋生物与生态实验室, 厦门 361005

摘要: 【目的】为了研究北极地区表层海水中氯代十六烷($C_{16}H_{33}Cl$)降解菌的多样性,并获得新的卤代烃降解菌资源。【方法】以 $C_{16}H_{33}Cl$ 为唯一碳源和能源在4℃和25℃下对表层海水样品进行富集,通过平板分离鉴定可培养菌株,并验证其降解能力;同时利用变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析降解菌群结构。【结果】从12个北极表层海水样品中富集分离得到112株可培养菌株。经过降解实验验证,发现19株菌株能够降解氯代十六烷,其中食烷菌(*Alcanivorax*)、红球菌(*Rhodococcus*)表现出很好的乳化和降解现象,海杆菌(*Marinobacter*)也有较好的降解效果。DGGE分析显示,富集驯化的降解菌群中主要优势菌为*Alcanivorax*, *Parvibaculum*和*Thioclava*属的菌株。【结论】北极海水中卤代烃降解菌主要是 α -proteobacteria, γ -proteobacteria, Actinobacteria和Bacteroidetes。文章首次报道了北极海水卤代烃降解菌多样性,研究结果对于认识北极环境中的降解菌资源与生物多样性有参考价值。

关键词: 北极, 表层海水, 氯代十六烷, 生物降解, 多样性

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 08-1011-10

卤代烷烃(halogenated hydrocarbon)是烷烃分子中的氢原子被卤素取代后生成的一类化合物。它们是重要的有机合成中间体,被大量应用于有机溶剂、杀虫剂、去油剂、灭火剂以及多聚化合物的生产中。大量卤代烃及其衍生物的使用,导致这些化合物大量地释放到环境中,严重污染了土壤、地下水与河流,并对人类健康构成威胁^[1-2]。

近年来,分离并利用脱卤微生物来治理卤代烷烃污染的研究越来越受到关注^[3-4]。常见的降解菌有*Xanthobacter autotrophicus*^[5]、*Corynebacterium* sp.^[6]、*Rhodococcus rhodochrous*^[7]、*Sphingomonas*

paucimobilis^[8]、*Mycobacterium avium*^[9]、*Bradyrhizobium japonicum*^[10]、*Mycobacterium tuberculosis*^[11]、*Agrobacterium tumefaciens*^[12]、*Plesiocystis pacifica*^[13],但它们多分离自陆地或近海环境。

卤代烃作为重要的持久性环境污染物经常在北极环境中被检出^[14],但有关极地海洋环境中卤代烃降解菌种类和种群组成的研究还未见报道。本研究以氯代十六烷($C_{16}H_{33}Cl$)作为唯一碳源和能源,对采自白令海至楚科奇海的12个表层海水样品进行了低温(4℃)和常温(25℃)富集,随后分析了表层海水富集菌群中氯代烷烃降解菌的多样性,并对获

基金项目: 国家海洋局青年海洋科学基金(2012142);海洋公益性行业科研专项(201005032);IPY中国行动计划、海洋公益性行业科研专项经费项目(201105022-2)

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

作者简介: 王建宁(1986-),男,福建南安人,硕士研究生,主要从事海洋石油污染降解微生物和海洋微生物资源多样性方面的研究。E-mail: k012101179@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-03-16; **修回日期:** 2012-05-02

得菌株对 $C_{16}H_{33}Cl$ 的降解能力进行了初步的分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集: 12 个表层海水样品由“雪龙号”考察船于 2010 年 7-9 月在执行中国第 4 次北极科学考察时通过 CTD 采水器采集, 采样站位信息见图 1 和表 1。

表 1 表层海水样品采样站位信息

Table 1 Sampling site information of the surface seawater

Sites	Date	Longitude	Latitude	T/°C	Salinity/‰	Sampling depth/m	Depth of water/m
B02	20100710	169°57.49'E	53°19.87'N	7.65	32.97	4.59	1937
B03	20100711	170°43.25'E	53°59.18'N	7.29	32.87	4.12	3667
B05	20100711	173°7.68'E	55°56.57'N	7.69	33.00	2.79	3820
B07	20100712	176°12.24'E	58°0.00'N	7.26	33.14	3.06	3743
B10	20100714	179°20.52'E	59°41.30'N	8.18	32.65	5.81	3080
B14	20100715	177°41.53'W	60°55.27'N	7.53	30.86	4.58	130
BS01	20100719	171°30.10'W	64°20.27'N	2.22	32.93	3.54	48
BS10	20100719	167°00.35'W	64°20.16'N	6.44	31.39	3.93	31
BS11	20100720	168°58.29'W	65°30.23'N	4.58	32.32	3.45	55
R02	20100720	169°00.46'W	67°30.08'N	5.01	31.99	3.30	50
R06	20100721	168°59.00'W	69°30.00'N	5.15	31.14	2.84	52
R08	20100722	168°58.81'W	71°00.19'N	0.85	30.35	5.59	44

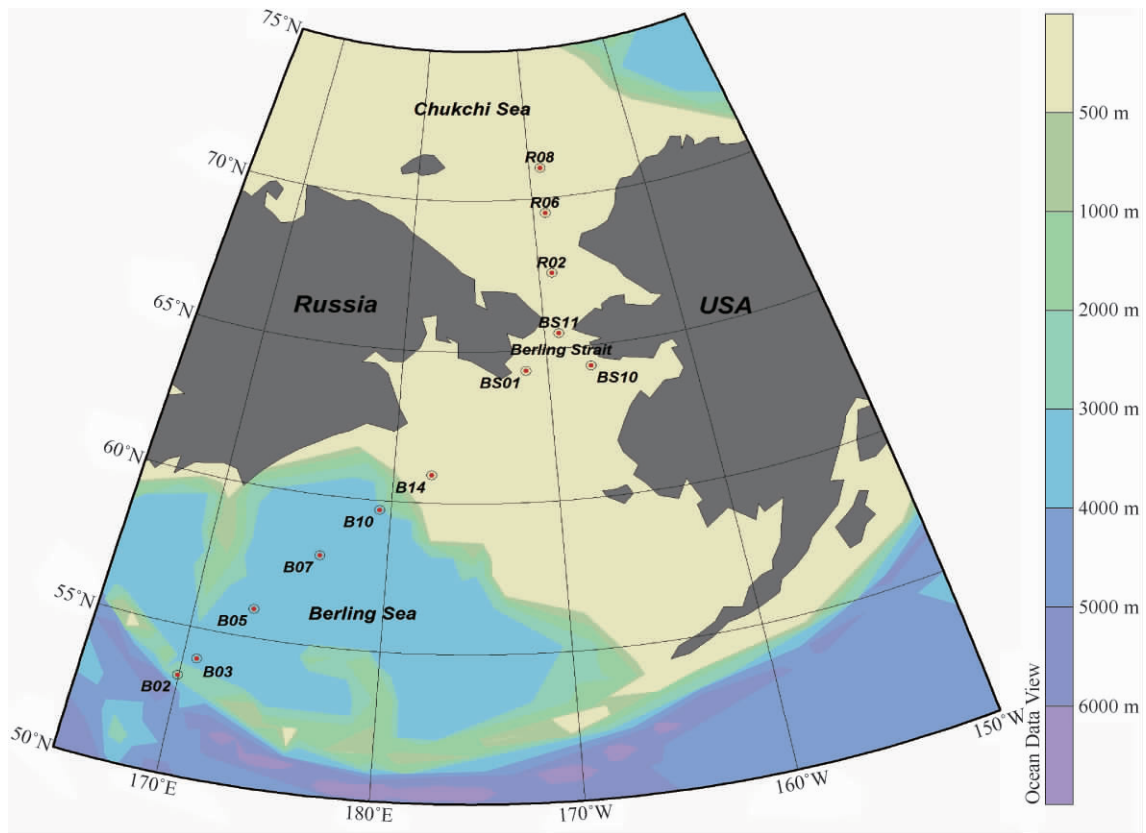


图 1 采样站位图

Fig. 1 The map of the sampling sites.

1.1.2 培养基: ①富集 NH_4 培养基: 取天然海水用 121°C 高压蒸汽灭菌 20 min 后加入 1% 体积高压蒸

汽灭菌的 NH_4NO_3 溶液 (100 g/L) 和 KH_2PO_4 溶液 (10 g/L, pH6.7) 及 0.1% 体积 0.22 μm 滤膜除菌

的 FeSO_4 (2.8 g/L), 再加 0.5% (v/v) 的 $\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{Cl}$ 作为碳源, 最后所得培养基 pH 值约为 7.5。②M2 固体平板培养基: 乙酸钠 5 g/L, 柠檬酸钠 0.05 g/L, 普通肉汤培养基 0.5 g/L, 蛋白胨 0.5 g/L, 酵母粉 0.5 g/L, 苹果酸 0.05 g/L, 葡萄糖 0.5 g/L, 蔗糖 0.5 g/L, NH_4NO_3 1 g/L, NH_4Cl 0.2 g/L, 酒石酸钠 0.05 g/L, 可溶性淀粉 0.5 g/L, 琼脂粉 15 g/L, 调 pH7.5, 115℃ 高压蒸汽灭菌 30 min 后补加 1% 体积已灭菌的 KH_2PO_4 溶液 (10 g/L, pH6.7) 及 0.1% 体积 0.22 μm 滤膜除菌的 FeSO_4 (0.4 g/L)。

1.1.3 主要试剂及仪器: 氯代十六烷 ($\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{Cl}$), 化学纯, 购自 Solarbio; PCR 相关试剂由 Fermentas 提供; 恒温摇床 (上海智诚分析仪器制造有限公司); 生化培养箱 (上海精宏实验设备有限公司); 超净工作台 (上海智诚分析仪器制造有限公司); AlphaInnotech 凝胶成像仪 (San Leandro, California); PCR 扩增仪 (Eppendorf); Decode System 电泳仪 (Bio-Rad 公司); pGEM[®]-T Easy Vector Systems (Promega)。

1.2 $\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{Cl}$ 降解菌的富集和筛选

样品采集以后, 取 250 mL 置于 500 mL 的无菌采水瓶中, 补加 1% (v/v) 的氮源 (NH_4NO_3 溶液 9 g/L) 和磷源 (KH_2PO_4 溶液 10 g/L) 以及 0.1% (v/v) 的 FeSO_4 (0.28 g/L), 再加 0.5% (v/v) 的 $\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{Cl}$ 为唯一碳源在 4℃ 条件下静置培养, 直到样品送回实验室后 (船上培养约 2 个月), 再进行降解菌株的分离。取 4℃ 富集物梯度稀释后涂布 M2 培养基平板, 4℃ 培养 2 周后, 挑取不同形态单菌落, 并在 M2 平板上至少划线纯化 2 次, 提取菌株 DNA 备用, 并保藏菌种。

此外取 4℃ 培养富集物 10 mL 转接到 100 mL 新鲜 NH 培养基中, 于 25℃、150 r/min 振荡培养 2 周后, 取富集液进行可培养菌株的分离, 分离方法同 4℃ 富集菌群。同时提取 2 mL 富集物的总 DNA, 进行 DGGE 菌群结构分析。

1.3 细菌 DNA 提取和系统进化分析

菌株及菌群 DNA 的提取按照赛百盛细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行。同一站位分离的菌株利用 BOX-PCR 方法剔除重复, PCR 引物: 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG, 扩增条件: 94℃, 4 min; 94℃, 15 s; 53℃, 30 s; 65℃, 8 min, 共 35 个循环; 65℃, 25 min; 扩增产物使用 2% 的琼脂糖凝胶电

泳检测。在剔除同一站位具有相同 BOX-PCR 指纹图谱的菌株后, 扩增剩余菌株的 16S rRNA 基因, 送公司利用 P300 测序引物进行测序。随后利用 DNAMAN 软件 (version 6.0) 对测序结果进行编辑、分析和多序列比对, 同时将序列提交 NCBI 和 EzTaxon 网站 (<http://147.47.212.35:8080/>) 进行 Blastn 和系统发育分析; 最后利用 MAGA 软件 (version 4.0) 构建系统发育树 (算法: Neighbor-Joining, 自展 1000 次)。

1.4 16S rRNA 基因 V3 区 PCR-DGGE

16S rRNA 基因 V3 区扩增、产物纯化和 DGGE 电泳, 亮带切胶回收, 克隆建库, 测序过程参照文献 [15]。

1.5 可培养菌株 $\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{Cl}$ 降解能力验证

刮取平板上纯培养菌株重悬于无菌海水中, 以 1% 体积转接到 50 mL 新鲜的 NH 培养基中, 在恒温摇床中 25℃、150 r/min 培养 14 d 后, 参考文献 [23] 通过测定培养物的 OD_{600} 值来判断菌株对 $\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{Cl}$ 的降解情况。

2 结果

2.1 富集菌群中可培养菌株的分离鉴定与系统进化分析

表层海水样品在船上 4℃ 静置富集约 2 个月, 培养物出现浑浊, 说明微生物在利用 $\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{Cl}$ 进行生长, 经过菌株分离, 12 个样品共分离到 50 株可培养菌株, 经 16S rRNA 基因测序和系统进化分析表明, 分离获得的 50 株可培养菌株归属于 γ -proteobacteria, α -proteobacteria, Actinobacteria, ϵ -proteobacteria 和 Bacteroidetes 这 5 个纲中的 16 个属 (图 2)。 γ 变形菌纲的细菌为优势种群 (39 株, 78%), 其中主要是假交替单胞菌属 (*Pseudoalteromonas*, 12 株) 和海单胞菌属 (*Marinomonas*, 11 株), 已有研究表明假交替单胞菌是北极地区常见的石油降解菌^[16], 其次是希瓦氏菌属 (*Shewanella*, 4 株) 和弧菌属 (*Vibrio*, 4 株); 其他几个类群菌株较少, α 变形菌纲分离到 3 株 (6%), 分别属于 *Celeribacter* 和 *Thalassospira*; Actinobacteria 纲分离到 *Rhodococcus* 属的 2 株 (4%); Bacteroidetes 纲分离到 Flavobacteriaceae 科的 5 个菌株 (10%), 此外 ϵ 变形菌纲只分离到归属于 *Arcobacter* 属的 1 株菌株。

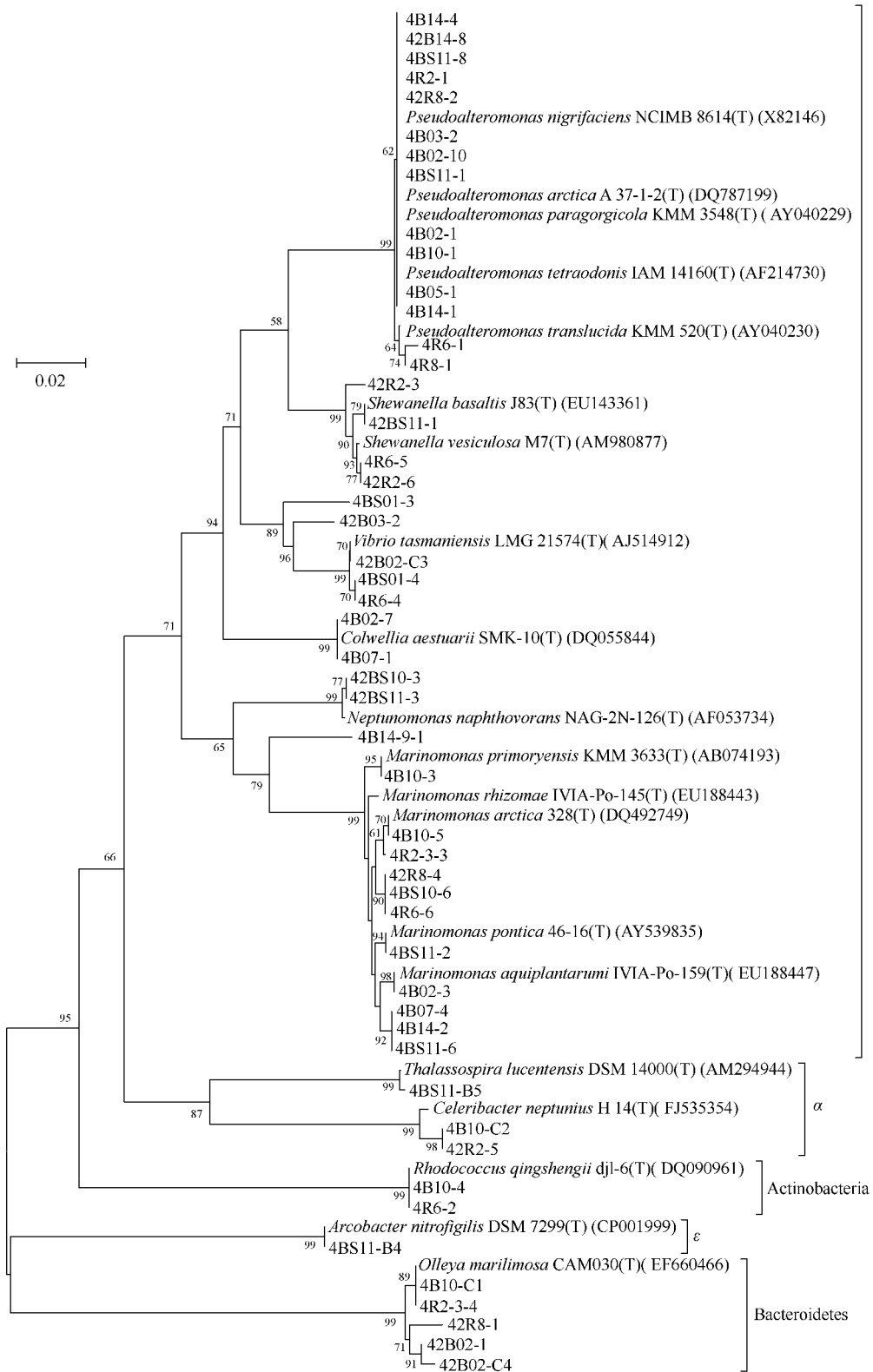


图 2 4°C 富集菌群中可培养菌株的 16S rRNA 基因系统发育树

Fig. 2 The phylogenetic tree based on 16S rRNA genes of bacterial isolates from $C_{16}H_{33}Cl$ -degrading consortia enriched at 4°C. Only bootstrap values $\geq 50\%$ (1000 replicates) are shown at the nodes. The scale bar represents 0.02 nucleotide changes per position.

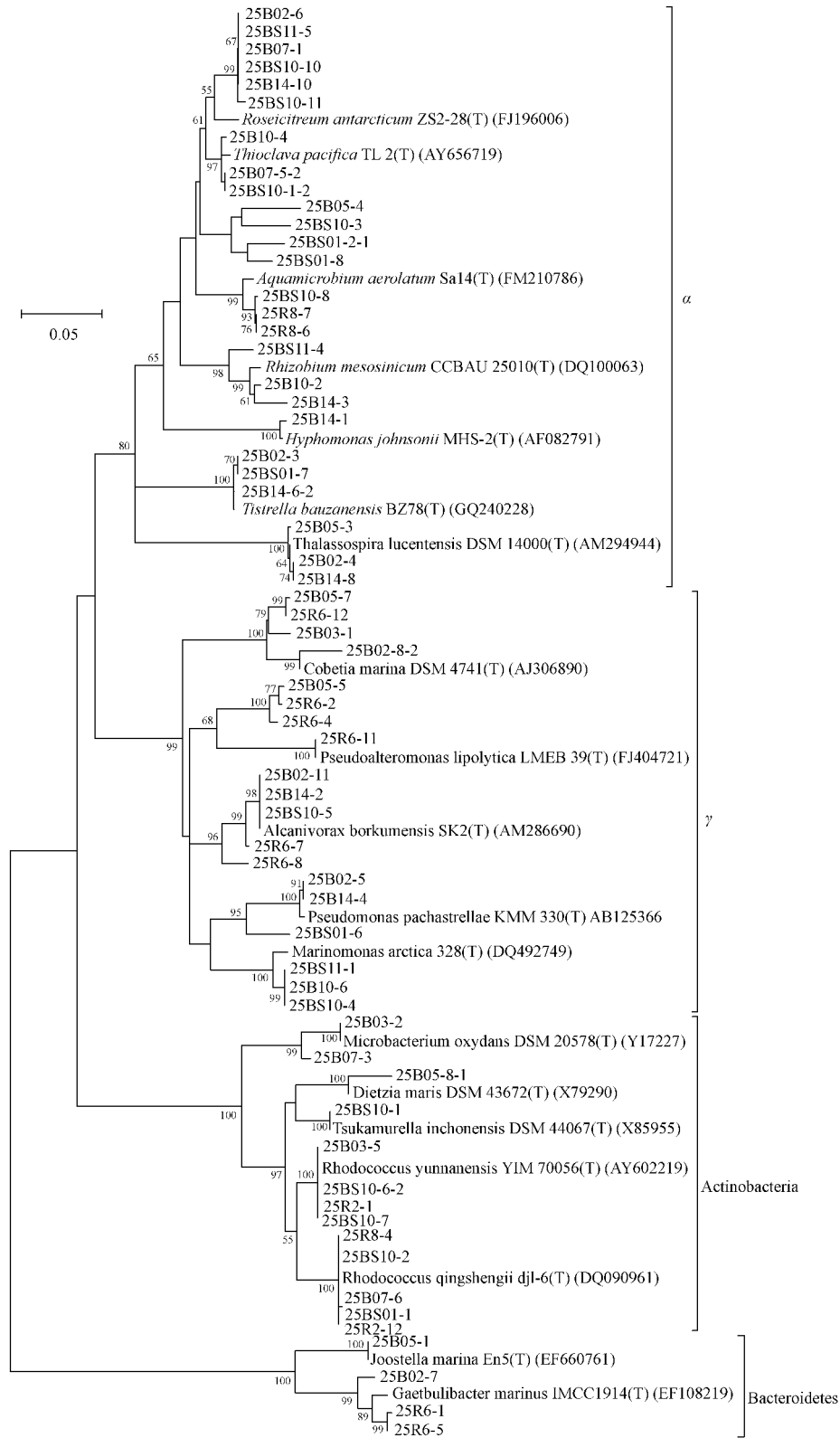


图 3 25°C富集菌群中可培养菌株的 16S rRNA 基因系统发育树

Fig. 3 The phylogenetic tree based on 16S rRNA genes of bacterial isolates from $C_{16}H_{33}$ Cl-degrading consortia enriched at 25°C. Only bootstrap values $\geq 50\%$ (1000 replicates) are shown at the nodes. The scale bar represents 0.05 nucleotide changes per position.

将 4℃ 富集液转接到 25℃ 培养 2 周后, 又从 12 个富集菌群中分离得到 62 株可培养菌株。系统进化分析表明它们分属于 α -proteobacteria, γ -proteobacteria, Actinobacteria 和 Bacteroidetes 中的 31 个属(图 3)。 α 变形菌纲的菌株较多, 占 42%, 多归属于 *Roseicitreum*、*Thalassospira*、*Thioclava*、*Tistrella* 属; γ 变形菌纲占 31%, 主要是 *Alcanivorax*、*Pseudomonas*、*Marinomonas* 属; Actinobacteria 占 21% 主要以 *Rhodococcus* 为主; Bacteroidetes 纲较少 (6%), 仅有 4 个菌株。在 25℃ 富集菌群中, 红球菌属 (*Rhodococcus*) 和食烷菌属 (*Alcanivorax*) 为优势种属, 分别占可培养菌株总数的 15% 和 8%, 这两个属的菌株也是极地环境中常见的石油烃降解菌。已有

研究表明, 红球菌具有烷基脱卤酶基因, 是常见的耐冷菌^[17]。

2.2 菌株 C₁₆H₃₃Cl 降解能力验证

将 25℃ 富集菌群中可培养菌株接种于液体 NH 培养基中, 14 d 后观察其生长情况并测定 OD₆₀₀ 值(表 2)。结果表明, 共有 19 株菌株可单独利用 C₁₆H₃₃Cl 生长, 占总数的 31%, 其中食烷菌 (*Alcanivorax*) 均具有很好的乳化和降解效果; 红球菌 (*Rhodococcus*) 也具有很好的乳化效果, 培养基中残余 C₁₆H₃₃Cl 呈絮状。此外, 海杆菌 (*Marinobacter*) 对 C₁₆H₃₃Cl 也有一定的降解效果。这 3 个属也是 25℃ 富集菌群可培养菌株中的优势种属。

表 2 25℃ 富集菌群中可培养菌株对 C₁₆H₃₃Cl 降解能力的验证

Table 2 Identification of the degrading ability of the strains isolated from enriched consortia against C₁₆H₃₃Cl at 25℃

Isolates	Closest strains in GenBank	Biodegradability ^a	OD ₆₀₀
25B02-11	<i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2 (T)	+++ +	1.064
25B14-2	<i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2 (T)	+++	0.682
25BS10-5	<i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2 (T)	+++	0.611
25R6-7	<i>Alcanivorax jadensis</i> T9 (T)	+++	0.761
25R6-8	<i>Alcanivorax venustensis</i> ISO4 (T)	+++	0.626
25R8-7	<i>Aquamicrobium aerolatum</i> Sa14 (T)	++	0.346
25B05-8-1	<i>Dietzia maris</i> DSM 43672 (T)	+++	0.763
25B05-5	<i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 (T)	++	0.317
25R6-2	<i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 (T)	++	0.350
25R6-4	<i>Marinobacter vinifirmus</i> FB1 (T)	++	0.243
25B07-6	<i>Rhodococcus qingshengii</i> dj1-6 (T)	++	0.314
25BS01-1	<i>Rhodococcus qingshengii</i> dj1-6 (T)	++	0.297
25BS10-2	<i>Rhodococcus qingshengii</i> dj1-6 (T)	++	0.376
25R2-12	<i>Rhodococcus qingshengii</i> dj1-6 (T)	++	0.425
25R8-4	<i>Rhodococcus qingshengii</i> dj1-6 (T)	++	0.327
25B03-5	<i>Rhodococcus yunnanensis</i> YIM 70056 (T)	++	0.341
25BS10-6-2	<i>Rhodococcus yunnanensis</i> YIM 70056 (T)	++	0.344
25BS10-7	<i>Rhodococcus yunnanensis</i> YIM 70056 (T)	++	0.358
25R2-1	<i>Rhodococcus yunnanensis</i> YIM 70056 (T)	++	0.305

a, Growth capability with C₁₆H₃₃Cl in NH medium. + + + +, + + +, + +, indicating the growth capability from strong to weak with C₁₆H₃₃Cl as sole carbon and energy source after 14-day incubation at 25℃, measured by optical density at 600 nm. + + + +, OD₆₀₀ > 1; + + +, 0.6 < OD₆₀₀ < 1; + +, 0.2 < OD₆₀₀ < 0.6.

2.3 降解菌群 DGGE 分析

为了分析 C₁₆H₃₃Cl 降解菌群的组成情况, 我们以 25℃ 富集菌群的总 DNA 为模板, 利用细菌 16S rRNA 基因 V3 区的通用引物进行扩增, 获得长约 200 bp 的扩增产物, 随后进行变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 分析(图 4)。通过对菌群中亮带的切胶回收、克隆测序和比对分析(表 3), 鉴定亮带序列所对应的菌株, 从而解析菌群中的优势菌株。

DGGE 结果表明, 12 个菌群中除 B02、B14 和

R06 等 3 个菌群结构较为简单外, 其余 9 个菌群中亮带均较多, 这说明 C₁₆H₃₃Cl 降解菌群中细菌种群多样性较高(图 4)。12 个菌群中所有切胶测序的 39 个亮带对应序列比对的最近缘菌株共来自 19 个细菌属, 包括 α 变形菌门的 *Parvibaculum*、*Thioclava*、*Mesorhizobium*、*Thalassospira*、*Aurantimonas*、*Sphingosinella*、*Tistrella*; γ 变形菌门的 *Alcanivorax*、*Salinicola*、*Marinomonas*、*Methylophaga*、*Pseudomonas*、*Saccharosporillum* 和 *Salinisphaera*; CFB 类群的

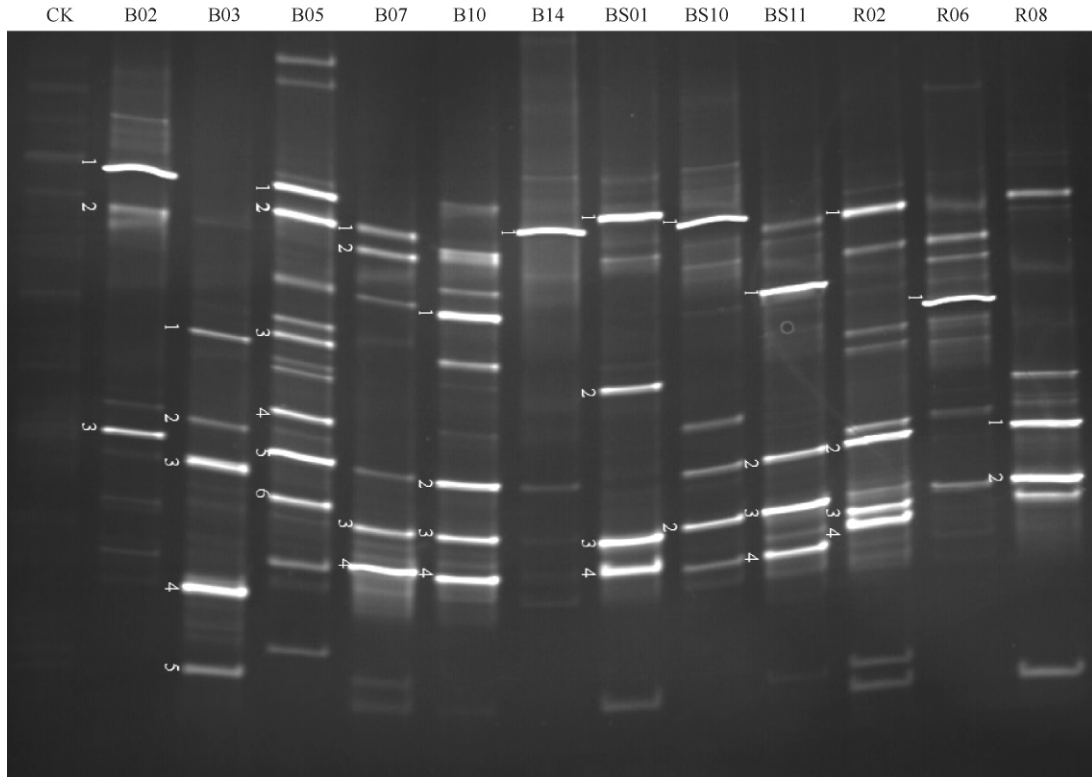


图4 北极 $C_{16}H_{33}Cl$ 降解菌群的 DGGE 分析

Fig.4 DGGE analysis of the $C_{16}H_{33}Cl$ -degrading consortia. Line CK: negative control; Line B02-R08: consortia enriched from each sampling sites.

Joostella、*Prolixibacter* 和 *Vitellibacter*; 以及 Actinobacteria 门的 *Rhodococcus* 和 *Microbacterium*。

上述种属中有 10 个种属获得了纯培养菌株, 这包括 α 变形菌门的 *Thioclava* 和 *Thalassospira*; γ 变形菌门的 *Alcanivorax*、*Salinicola*、*Marinomonas* 和 *Pseudomonas*; CFB 类群的 *Joostella*, 以及 Actinobacteria 门 2 个属。菌株降解实验结果表明, 可培养种属中的 *Alcanivorax* 和 *Rhodococcus* 对 $C_{16}H_{33}Cl$ 都有很好的效果(表 2), 其中 *Alcanivorax* 分布于多个站点中, 并且基本上是该菌群中占绝对优势的亮带 (band B02-1, B03-1, B14-1 和 R06-1), 而 *Rhodococcus* 仅在一个菌群中被检测到 (band B03-5), 虽然该属的菌株我们在 4°C 和 25°C 多个富集菌群中分离得到过纯培养菌株(图 3)。

值得注意的是, α 变形菌门的 *Parvibaculum* 分布于多个菌群中 (band B07-3、B10-3、BS10-2、BS11-3 和 R08-2), 虽然有报道表明它能够降解烷烃^[18], 但由于未获得纯培养, 暂无法判断它是否降解氯代烃。此外, α 变形菌门的 *Thioclava* 也在多个菌群中

被检出 (band B05-1、B07-2、B07-4、B10-4 和 BS11-4), 但该菌的纯培养 25B07-5-2、25BS10-1-2 和 25B10-4 在 25°C 时并不能降解 $C_{16}H_{33}Cl$ 。

3 讨论

本研究以 $C_{16}H_{33}Cl$ 为底物进行富集和筛选, 从 12 个北极表层海水样品中一共获得 112 株可培养菌株, 它们多归属于 γ -proteobacteria、 α -proteobacteria、Actinobacteria 和 Bacteroidetes 菌门, 其中 8 株菌的 16S rRNA 基因序列同源性与模式种低于 97%, 可能是潜在的新种。菌株降解实验结果表明, 能够单独降解 $C_{16}H_{33}Cl$ 的主要是 *Alcanivorax*、*Rhodococcus* 和 *Marinobacter*, 但是它们对 $C_{16}H_{33}Cl$ 的降解机理还不明确。DGGE 分析显示, 不同降解菌群组成差异较大, *Alcanivorax*, *Parvibaculum* 和 *Thioclava* 分别是多个降解菌群中的主要优势菌。

从 4°C 富集菌群中, 共分离获得 16 个属的细菌, 属于 5 个纲, 而 25°C 富集菌群中则分离获得了 4

个纲中的 31 个属。这表明,随着富集温度的提高, $C_{16}H_{33}Cl$ 降解菌群中可培养菌株的多样性显著提高,也说明温度是影响降解菌多样性的重要因素之

一。类似地,Coulon 等以泰晤士河河口的海水为材料研究发现,温度而非氮磷源是影响石油降解菌群结构变化的关键因素^[19]。

表 3 $C_{16}H_{33}Cl$ 降解菌群中 DGGE 优势亮带分析

Table 3 The analysis of DGGE preponderant band of enriched by $C_{16}H_{33}Cl$

Phyla	Band	Closest strains in GenBank	Access No.	Similarities/bp	
α -proteobacteria	B07-3	<i>Paribaculum lavamentivorans</i> DS-4 (T)	CP000774	97.0% (131/135)	
	B10-3	<i>Paribaculum lavamentivorans</i> DS-4 (T)	CP000774	97.0% (131/135)	
	BS10-2	<i>Paribaculum lavamentivorans</i> DS-4 (T)	CP000774	97.0% (131/135)	
	BS11-3	<i>Paribaculum lavamentivorans</i> DS-4 (T)	CP000774	97.0% (131/135)	
	R08-2	<i>Paribaculum lavamentivorans</i> DS-4 (T)	CP000774	97.0% (131/135)	
	B05-1	<i>Thioclava pacifica</i> TL2 (T)	AY656719	98.5% (133/135)	
	B07-2	<i>Thioclava pacifica</i> TL2 (T)	AY656719	100.0% (135/135)	
	B07-4	<i>Thioclava pacifica</i> TL2 (T)	AY656719	98.5% (133/135)	
	B10-4	<i>Thioclava pacifica</i> TL2 (T)	AY656719	98.5% (133/135)	
	BS11-4	<i>Thioclava pacifica</i> TL2 (T)	AY656719	100.0% (135/135)	
	BS11-2	<i>Mesorhizobium temperatum</i> SDW018 (T)	AF508208	100.0% (135/135)	
	R02-2	<i>Mesorhizobium temperatum</i> SDW018 (T)	AF508208	100.0% (135/135)	
	R08-1	<i>Mesorhizobium temperatum</i> SDW018 (T)	AF508208	100.0% (135/135)	
	B02-3	<i>Thalassospira tepidiphila</i> 1-4B (T)	AB265822	100.0% (135/135)	
	B05-5	<i>Thalassospira tepidiphila</i> 1-4B (T)	AB265822	100.0% (135/135)	
	B03-4	<i>Aurantimonas ureilytica</i> 5715S-42 (T)	DQ883810	100.0% (135/135)	
	B05-4	<i>Sphingosinicella vermicomposti</i> YC7378 (T)	FJ442859	100.0% (135/135)	
	BS01-2	<i>Tistrella mobilis</i> TISTR1108 (T)	AB071665	100.0% (135/135)	
	γ -proteobacteria	B02-1	<i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2 (T)	AM286690	100.0% (160/160)
		B03-1	<i>Alcanivorax dieselelei</i> B-5 (T)	AY683537	99.4% (159/160)
B14-1		<i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2 (T)	AM286690	100.0% (160/160)	
R06-1		<i>Alcanivorax jadensis</i> T9 (T)	AJ001150	98.1% (157/160)	
B03-3		<i>Salinicola salarius</i> M27 (T)	AM229316	99.4% (159/160)	
B07-1		<i>Salinicola socius</i> SMB35 (T)	DQ979342	95.6% (153/160)	
B10-1		<i>Marinomonas alcarazii</i> IVIA-Po-14b (T)	EU188442	97.5% (154/159)	
B10-2		<i>Marinomonas alcarazii</i> IVIA-Po-14b (T)	EU188442	96.2% (153/159)	
R02-3		<i>Saccharospirillum impatiens</i> EL-105 (T)	AJ315983	95.6% (153/160)	
R02-4		<i>Saccharospirillum impatiens</i> EL-105 (T)	AJ315983	95.6% (153/160)	
R02-1		<i>Methylophaga thalassica</i> DSM5690 (T)	X95460	100.0% (160/160)	
BS10-1		<i>Pseudomonas pachastrellae</i> KMM 330 (T)	AB125366	99.4% (159/160)	
B05-6		<i>Salinisphaera hydrothermalis</i> EPR70 (T)	EU740416	95.6% (153/160)	
Bacteroidetes		BS01-1	<i>Vitellibacter vladvostokensis</i> KMM3516 (T)	AB071382	98.7% (153/155)
	BS01-3	<i>Vitellibacter vladvostokensis</i> KMM3516 (T)	AB071382	98.7% (153/155)	
	BS01-4	<i>Vitellibacter vladvostokensis</i> KMM3516 (T)	AB071382	98.7% (153/155)	
	B05-2	<i>Joostella marina</i> En5 (T)	EF660761	100.0% (155/155)	
	B05-3	<i>Joostella marina</i> En5 (T)	EF660761	99.4% (154/155)	
	BS11-1	<i>Prolixibacter bellariivorans</i> F2 (T)	AY918928	100.0% (155/155)	
Actinobacteria	B03-2	<i>Microbacterium oxydans</i> DSM20578 (T)	Y17227	100.0% (140/140)	
	B03-5	<i>Rhodococcus yunnanensis</i> YIM70056 (T)	AY602219	100.0% (140/140)	

降解实验结果表明,对 $C_{16}H_{33}Cl$ 降解效果好的菌株主要是红球菌和食烷菌。红球菌属于放线菌纲,是极地环境中常见的烃类降解耐冷菌^[17],并且红球菌也是分布广泛的卤代烷烃降解菌,该属菌株间可能存在一个频繁转移的卤代烷烃降解质粒^[20];食烷菌是降解烃类的专性海洋细菌^[21]。在石油降

解菌群中往往占绝对优势^[22-23]。虽然,红球菌和食烷菌对 $C_{16}H_{33}Cl$ 具有较好的降解效果,但是 DGGE 结果分析表明,它们在 25℃ 降解菌群中并非都是优势类群,特别是红球菌仅在 B03 菌群中被检出 (band B03-5);食烷菌往往在石油降解菌群中占绝对优势地位,在本实验中食烷菌仅在 1/3 的菌群中

占优势,而且 $C_{16}H_{33}Cl$ 降解菌群中的细菌多样性比石油降解菌群要高。值得一提的 *Parvibaculum*、*Mesorhizobium*、*Aurantimonas*、*Sphingosinicella*、*Methylophaga*、*Saccharospirillum*、*Salinisphaera*、*Prolixibacter* 和 *Vitellibacter* 等 9 个未获得纯培养的属,它们在 DGGE 分析中出现,说明是降解菌群中的优势菌之一,可能参与了降解过程,而这些菌尚未见作为脱氯菌的报道,还有待获得纯培养后确定。

参考文献

- [1] McConnell G, Ferguson D, Pearson C. Chlorinated hydrocarbons and the environment. *Endeavour*, 1975, 34 (121):13.
- [2] Bayen S, Obbard JP, Thomas GO. Chlorinated paraffins: A review of analysis and environmental occurrence. *Environment International*, 2006, 32 (7):915-929.
- [3] Janssen DB, Oppentocht JE, Poelarends GJ. Microbial dehalogenation. *Current Opinion in Biotechnology*, 2001, 12 (3):254-258.
- [4] Bosma T, Damborsky J, Stucki G, Janssen DB. Biodegradation of 1,2,3-trichloropropane through directed evolution and heterologous expression of a haloalkane dehalogenase gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68 (7):3582-3587.
- [5] Keuning S, Janssen DB, Witholt B. Purification and characterization of hydrolytic haloalkane dehalogenase from *Xanthobacter autotrophicus* GJ10. *Journal of bacteriology*, 1985, 163 (2):635-639.
- [6] Yokota T, Omori T, Kodama T. Purification and properties of haloalkane dehalogenase from *Corynebacterium* sp. strain m15-3. *Journal of bacteriology*, 1987, 169 (9):4049-4054.
- [7] Kulakova AN, Larkin MJ, Kulakov LA. The plasmid-located haloalkane dehalogenase gene from *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064. *Microbiology*, 1997, 143 (Pt 1):109-115.
- [8] Nagata Y, Miyauchi K, Damborsky J, Manova K, Ansorgova A. Purification and characterization of a haloalkane dehalogenase of a new substrate class from a gamma-hexachlorocyclohexane-degrading bacterium, *Sphingomonas paucimobilis* UT26. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63 (9):3707-3710.
- [9] Jesenska A, Bartos M, Czernekova V, Rychlik I, Pavlik I, Damborsky J. Cloning and expression of the haloalkane dehalogenase gene dhmA from *Mycobacterium avium* N85 and preliminary characterization of DhmA. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68 (8):3724-3730.
- [10] Sato Y, Natsume R, Tsuda M, Damborsky J, Nagata Y, Senda T. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of a haloalkane dehalogenase, DbjA, from *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 2007, 63 (Pt 4):294-296.
- [11] Mazumdar PA, Hulecki JC, Cherney MM, Garen CR, James MN. X-ray crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* haloalkane dehalogenase Rv2579. *Biochimica et biophysica acta*, 2008, 1784 (2):351-362.
- [12] Hasan K, Fortova A, Koudelakova T, Chaloupkova R, Ishitsuka M, Nagata Y, Damborsky J, Prokop Z. Biochemical characteristics of the novel haloalkane dehalogenase DatA, isolated from the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77 (5):1881-1884.
- [13] Hesseler M, Bogdanovic X, Hidalgo A, Berenguer J, Palm GJ, Hinrichs W, Bornscheuer UT. Cloning, functional expression, biochemical characterization, and structural analysis of a haloalkane dehalogenase from *Plesiocystis pacifica* SIR-1. *Applied microbiology and biotechnology*, 2011, 91 (4):1049-1060.
- [14] Riget F, Bignert A, Braune B, Stow J, Wilson S. Temporal trends of legacy POPs in Arctic biota, an update. *Science of the Total Environment*, 2010, 408 (15):2874-2884.
- [15] 刘真, 邵宗泽. 南海深海沉积物烷烃降解菌的富集分离与多样性初步分析. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2007, 47 (5):869-873.
- [16] Lin X, Yang B, Shen J, Du N. Biodegradation of crude oil by an Arctic psychrotrophic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. P29. *Current microbiology*, 2009, 59 (3):341-345.
- [17] Bej AK, Saul D, Aislabie J. Cold-tolerant alkane-degrading *Rhodococcus* species from Antarctica. *Polar Biology*, 2000, 23 (2):100-105.
- [18] Rosario-Passapera R, Keddis R, Wong R, Lutz RA, Starovoytov V, Vetriani C. *Parvibaculum hydrocarboniclasticum* sp. nov., a mesophilic, alkane-oxidizing alphaproteobacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent on the East Pacific Rise. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2012, ijs.0.039594-0.

- [19] Coulon F, McKew BA, Osborn AM, McGenity TJ, Timmis KN. Effects of temperature and biostimulation on oil-degrading microbial communities in temperate estuarine waters. *Environment Microbiology*, 2007, 9 (1) :177-186.
- [20] Poelarends GJ, Zandstra M, Bosma T, Kulakov LA, Larkin MJ, Marchesi JR, Weightman AJ, Janssen DB. Haloalkane-utilizing *Rhodococcus* strains isolated from geographically distinct locations possess a highly conserved gene cluster encoding haloalkane catabolism. *Journal of bacteriology*, 2000, 182 (10) :2725-2731.
- [21] Head IM, Jones DM, R? ling WFM. Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4 (3) :173-182.
- [22] Wang L, Wang W, Lai Q, Shao Z. Gene diversity of CYP153A and AlkB alkane hydroxylases in oil-degrading bacteria isolated from the Atlantic Ocean. *Environment Microbiology*, 2010, 12 (5) :1230-1242.
- [23] 吴常亮,王鑫,邵宗泽. 印度洋表层海水石油降解菌的多样性分析. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2010, 50 (9) :1218-1225.

Diversity of C₁₆ H₃₃ Cl-degrading bacteria in surface seawater of the Arctic Ocean

Jianning Wang¹, Chunming Dong¹, Qiliang Lai¹, Longshan Lin², Zongze Shao^{1*}

¹Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, ²Laboratory of Marine Biology and Ecology, the Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China

Abstract: [Objective] To detect the diversity of the degradation bacteria of halogenated-alkane from the surface seawater of the Arctic Ocean. [Method] Twelve surface-water samples from the Arctic Ocean were collected and enriched using C₁₆H₃₃Cl as the sole carbon and energy source. Bacteria from the enriched cultures were isolated on marine agar, and followed by 16S rRNA gene identification and phylogenetic analysis. Further, their degradation ability was tested with C₁₆H₃₃Cl. The bacterial community structures were further examined by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). [Result] In total 112 isolates were obtained from the 12 samples, of which 19 isolates degraded C₁₆H₃₃Cl. Bacteria of *Alcanivorax* and *Rhodococcus* exerted good emulsification and degradation, whereas bacteria of *Marinobacter* also had the degradation capacity, but less. DGGE analysis revealed that *Alcanivorax*, *Parvibaculum* and *Thioclavawere* dominated in the enriched consortia. [Conclusion] The C₁₆H₃₃Cl degradation bacteria in the Arctic marine environment mainly belonged to α -proteobacteria, γ -proteobacteria, actinobacteria and bacteroidetes. This is the first report on the diversity of degradation bacteria of halogenated alkane in the Arctic Ocean. Our result contributed to the knowledge about the arctic environment and the biodiversity of degrading bacteria.

Keywords: the Arctic, surface seawater, C₁₆H₃₃Cl, biodegradation; diversity

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Young Marine Science Foundation of State Oceanic Administration of China (2012142), by the Public Welfare Project of SOA (201005032) and by the International Polar Year Chinese action plan and the Special Research Foundation for Public Welfare Marine Program (201105022-2)

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

Received: 16 March 2012/Revised: 2 May 2012