

## 一株深海热液环境来源的 PAHs 降解菌 TVG9-VII 的系统发育与降解基因

董纯明<sup>1</sup>, 陈亮<sup>1</sup>, 廖悦婷<sup>1,2</sup>, 邵宗泽<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 国家海洋局第三海洋研究所, 海洋生物遗传资源重点实验室, 厦门 361005

<sup>2</sup> 厦门大学生命科学院, 厦门 361005

**摘要:** 【目的】对一株深海热液环境来源的多环芳烃 (PAHs) 降解菌进行系统发育分析并对其降解特性和降解机制进行研究。【方法】对 16S rRNA 基因进行扩增和测序, 进行基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析; 利用 GC-MS 测定其对 PAHs 的降解率; 通过构建基因组 Fosmid 文库, 克隆 PAHs 降解基因簇; 并利用 RT-PCR 和 qPCR 研究关键降解酶基因在不同 PAHs 诱导下的表达情况。【结果】从西南太平洋劳盆地热液沉积物中分离到一株 PAHs 降解菌株 TVG9-VII, 系统发育分析结果表明, 该菌株属于新鞘氨醇杆菌属 (*Novosphingobium*), 与该属的 *Novosphingobium indicum* H25<sup>T</sup> 系统发育关系最为密切, 它们的 16S rRNA 基因序列相似性高达 99.7%。该菌株在 21 d 内对菲、荧蒽和芘的降解率分别为 95.2%、57.3% 和 69.6%。从 Fosmid 文库中筛选得到一个负责 PAHs 降解的上游基因簇, 包含了 PAHs 起始降解双加氧酶大小亚基 (*pheA1a/b*) 基因和一个脱氢酶基因; RT-PCR 和 qPCR 实验表明, 双加氧酶大亚基基因 *pheA1a* 在菲的诱导下上调表达 4.2 倍, 而在萘及高环荧蒽和芘的诱导下无上调。【结论】菌株 TVG9-VII 是 *Novosphingobium* 属深海热液来源的 PAHs 降解菌, 具有良好的降解特性, 特别是对高环 PAHs 的降解效果较好。

**关键词:** 深海热液区, 新鞘氨醇杆菌, 多环芳烃, 降解基因簇, 双加氧酶

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011) 11-1548-07

多环芳烃 (polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH) 是海洋环境中重要的持久性污染物, 对哺乳动物具有致癌性、致畸诱变作用<sup>[1]</sup>。微生物降解作为海洋环境中 PAHs 去除的重要方式, 一直以来都是研究的热点, 目前已从海洋环境中分离获得了多种 PAHs 降解菌, 如新鞘氨醇杆菌 (*Novosphingobium*), 解环菌 (*Cycloclasticus*), 鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas*), 海杆菌 (*Marinobacter*), 盐单胞菌

(*Halomonas*), 假单胞菌 (*Pseudomonas*) 和海神单胞菌属 (*Neptunomonas*)<sup>[2]</sup>。

在陆地及近海环境, 新鞘氨醇杆菌也是常见的芳香烃降解菌<sup>[3]</sup>。如分离自美国内陆 410 m 深土样中的 *N. aromaticivorans* DSM 12444<sup>T</sup> 可以降解联苯<sup>[4]</sup>, 分离自韩国近海的 *N. pentaromaticivorans* US6-1<sup>T</sup> 能够降解芘、屈、苯并芘等多种高分子量 PAHs<sup>[5-6]</sup>。本实验室则从厦门近海分离一株能够

基金项目: 国家海洋局第三海洋研究所基本科研业务费项目 (2010007); 海洋公益性行业科研专项 (201005032); 中国大洋协会项目

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

作者简介: 董纯明 (1980-), 男, 河南信阳人, 助理研究员, 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: donnytio@163.com

收稿日期: 2011-04-18; 修回日期: 2011-08-14

降解菲的菌株 *Novosphingobium* sp. phe-8<sup>[7]</sup>。深海环境中的 PAHs 降解菌报道较少,研究表明深海环境中常见的 PAHs 降解菌也是解环菌<sup>[8-9]</sup>,然而在印度洋深海水体中,我们发现 PAHs 降解菌群中 *Novosphingobium* 属的细菌常为优势菌<sup>[10]</sup>。

深海热液活动可以产生烃类物质<sup>[11-12]</sup>,PAHs 存在于深海热液烟囱及沉积物中<sup>[13-14]</sup>。但深海热液环境中 PAHs 降解菌的研究还未见报道。本实验从深海热液烟囱壁氧化物样品中分离获得了一株 PAHs 降解菌 TVG9-VII,并对其降解特性和降解机理进行了初步研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验材料:深海热液烟囱壁氧化物样品于 2007 年,由“大洋一号”调查船在西南太平洋劳海盆

(Lau Basin) 的热液活动区通过电视抓斗采集。样品为铁红色块状物,表层有黑色硫化物覆盖,为活动热液烟囱壁。

1.1.2 培养基:陈海水培养基:灭菌后的陈海水,添加  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (氮源) 和  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (磷源) 至培养基中的终浓度分别为 0.09 g/L 和 0.1 g/L,同时补加  $\text{FeSO}_4$  至培养基中的终浓度为  $0.28 \times 10^{-3}$  g/L。不同浓度 PAHs 的添加:首先将 PAHs 溶于  $\text{CHCl}_3$  中制备成母液,然后根据 PAHs 在培养基中的终浓度,向已灭菌的陈海水培养基中加入不同体积的上述母液,摇床振荡 24 h,挥发除去  $\text{CHCl}_3$  后备用。用于单菌分离培养的 M8 和 216L 培养基分别参考文献 [8, 10] 配制。

1.1.3 引物:菌株 TVG9-VII 16S rRNA、PAHs 起始降解双加氧酶大亚基基因的扩增引物,及 *pheA1a* 基因的定量引物,见表 1。

表 1 PCR 引物及其扩增产物大小

Table 1 Primers and PCR product size

Primers	Sequences (5'→3')	Annealing T/°C	Product size/bp	Target genes
16SF <sup>a</sup>	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	55	-1500	16S rRNA
16SR	ACGGCTACCTGTTACGACT			
phe8up	GGTCAGGATGGTTCGCTCGT	56	623	Initial dioxygenase genes
phe8down	TGCCAGATCTTGAAGGTGTTG			
TVG9-VII alphaF2	ACTGCGATCCACGTC AAGC	58	159	<i>pheA1a</i>
TVG9-VII alphaR2	GGTGTGGTTCCGTAGAGG			
TVG9 VII 16SF2 <sup>b</sup>	AGCGGTGGAGCATGTGGT	58	196	TVG9-VII 16S rRNA
TVG9 VII 16S R2	GGCAACTAAGGACGAGGG			

a: primers 16SF/R using for amplifying and cloning strain TVG9-VII's whole length of 16S rRNA gene; b: primers TVG9 VII 16SF2/R2 using as the reference gene specific primers in qPCR.

1.1.4 主要试剂和仪器:萘(含量 > 99.8%)、菲(> 97%)、芘(≥ 98%)、荧蒽(≥ 98.5%)均购自 Fluka 公司; Fosmid 文库构建试剂盒 CopyControl<sup>TM</sup> HTP Fosmid Library Production Kit 为 Epicentre 产品; RNAprep pure 培养细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒购自 Tiangen; 定量 PCR 相关试剂购自上海伯乐 (Bio-Rad) 公司。气质联用色谱仪为 GC-MS-QP2010 (Shimadzu); 定量 PCR 扩增仪为 Bio-Rad IQ5, 脉冲场电泳仪为 CHEF Mapper<sup>®</sup> XA Bio-Rad。

### 1.2 PAHs 降解菌群的富集及单菌分离

热液烟囱壁样品用电视抓斗采集。到甲板后,立即去除表层样品,用灭菌药勺对内部样品进行二次取样,然后在超净工作台中将大约 5 g 样品加入到 100 mL 海水培养基中,并加入 1 mL 灭菌过的原油,

常温富集 3 个月。回实验室后,转接到以萘、菲和芘为唯一碳源的海水培养基中进一步富集,并进行降解菌的分离。

### 1.3 系统发育分析

菌株 TVG9-VII 总 DNA 的抽提,16S rRNA 基因的扩增、克隆测序按文献 [8] 中方法进行。测序结果提交 NCBI 网站进行 Blastn 分析,然后将菌株 TVG9-VII 16S rRNA 全长序列及亲缘关系近缘的参考序列在软件 DNAMAN (version 6.4) 进行多序列比对,最终利用软件 MEGA (version 4.0) 中的 Neighbor joining 法构建系统进化树,其中 Bootstrap 值设定为 1 000,以检验系统发育树的可靠性。

### 1.4 PAHs 降解率测定

首先将 TVG9-VII 菌株单菌落接种到 M8 培养基

中 25 °C ,180 r/min 活化到对数生长期 ,取2 mL培养物 4 000 ×g 低速离心收集菌体 ,并用灭菌陈海水洗涤 2 次 ,重悬后接入含有 PAHs 的100 mL陈海水培养基中 ( 萘、菲、芘和荧蒹终浓度分别为 200 mg/L ,100 mg/L 20 mg/L 20 mg/L ,以及上述 4 种浓度 PAH 的混合物 ,每个处理重复 3 次 ,同时设置不接种的空白对照) 。将上述处理组和空白对照组于25 °C ,180 r/min ,避光培养21 d后 ,用90 mL三氯甲烷分 3 次萃取培养物中残余的 PAHs ,将萃取液定容到100 mL后 ,取1 μL 稀释到适当体积的萃取液进行 GC-MS 分析 ,最终根据培养基中 PAHs 的残留量和起始量进行降解率的计算。

GC/MS 分析条件如下: GCMS-QP2010 ( 岛津公司) ,毛细管色谱柱 RTX-5MS ,内径0.25 mm ,膜厚0.25 μm ,长度30 m。高纯氦气为载气 ,柱温60 °C ,以10 °C /min 升温至280 °C ,保持5 min。进样口温度250 °C ,分流比3.0 ,柱流速1.30 mL/min ,检测器温度250 °C ,选择定量分析 SIM 扫描方式 ,分别扫描相应 PAHs 的特征离子碎片。

### 1.5 Fosmid 文库构建及降解基因簇的分析

制备菌株 TVG9-VII 基因组 ,并参考试剂盒说明书构建 Fosmid 文库。根据新鞘氨醇杆菌属的 PAHs 起始降解双加氧酶大亚基基因序列设计引物 phe8up/phe8down。利用此引物对 Fosmid 文库进行筛选 ,将获得的阳性克隆送公司进行测序分析 ,随后利用 Glimmer 3.0 软件对测序结果进行 ORF 预测与 Blast 分析 ,并确定 PAHs 降解基因簇结构。

### 1.6 起始双加氧酶的诱导表达分析

**1.6.1 菌株的诱导培养条件:** 挑取菌株 TVG9-VII 的单克隆于30 mL 216 L培养基中活化12 h ,按 1% 量转接到另外 30 mL 新鲜 216 L培养基中 ,培养至  $OD_{600} \approx 0.5$  ,取1 mL培养物用无菌陈海水洗涤 2 次并重悬后 ,转接到50 mL陈海水培养基中 ,并加入溶于二甲基亚砷(DMSO)的 PAH 诱导物(终浓度均为 30 mg/L) ;此外设置添加 1% (w/v) 葡萄糖和与 PAHs 诱导组等体积 DMSO 的对照组。将上述诱导组和对照组 ,置于25 °C ,180 r/min 恒温摇床中避光诱导培养12 h。

**1.6.2 总 RNA 的分离纯化:** 将菌株 TVG9-VII 在各种 PAH 诱导培养12 h后 ,利用 Tiangen 细菌总 RNA 抽提试剂盒纯化总 RNA ,随后用 RQ1 RNase-Free DNase (Promega) 试剂去除残留的基因组 DNA。

**1.6.3 PAHs 起始降解双加氧酶大亚基的 RT-PCR 和 qPCR 分析:** cDNA 的制备按照 PrimeScript™ Reverse Transcriptase (TaKaRa) 试剂说明书进行 ,对照组和诱导组中用于反转录的总 RNA 量均为1 μg。随后 ,取1 μL制备好的 cDNA 作模板 ,利用 PAHs 起始降解双加氧酶大亚基基因引物 TVG9-VII alphaF2/R2 进行 RT-PCR 分析。反应条件:95 °C 3 min ; 95 °C 30 s , 58 °C 30 s , 72 °C 30 s ,30 个循环 ; 72 °C 10 min ;PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶进行分析。

利用伯乐 IQ5 型荧光定量 PCR 仪 ,定量分析菌株 TVG9-VII 在各种 PAH 诱导培养下 PAHs 降解关键酶——起始双加氧酶基因的诱导表达情况。定量引物为 TVG9-VII alphaF2/R2 ,16S rRNA 内参基因引物为 TVG9-VII 16SF2/R2。PCR 体系: IQ™ SYBR Green Supermix 12.5 μL ,正反向引物(10 uM) 各 0.5 μL ,cDNA 溶液 2 μL ,无菌水补加至 25 μL。反应条件: 95 °C 3 min ; 95 °C 10 s , 58 °C 30 s (荧光采集) ,40 个循环 ; 95 °C 30 s ; 50 °C 30 s ; 50 °C + 0.5 °C /循环 ,共 80 个循环。所有 PCR 反应均做 3 个重复 ,同时设置无反转录酶的反转录混合物为模板的阴性对照 (NC) ,及不加 cDNA 模板的无模板对照 (NTC) 。此诱导表达实验共做 3 次 ,最终的诱导表达结果为 3 次独立生物学重复的平均值。

## 2 结果

### 2.1 菌株 TVG9-VII 的分离和系统发育分析

将热液烟囱壁样品的 PAHs 富集液 ,稀释涂布 M8 平板 ,分离单菌落 ,并进一步接种到添加 PAHs ( 萘、菲和芘) 的陈海水培养基中 ,验证其降解能力。发现接种菌株 TVG9-VII 在25 °C ,150 r/min ,避光培养14 d后 ,培养基由无色透明变为深褐色浑浊 ,表明该菌株能够利用 PAHs 进行生长 ,是潜在的 PAHs 降解菌。

通过 PCR 克隆和测序获得了菌株 TVG9-VII 的 16S rRNA 基因序列 ,该序列在 GenBank 登录号为 JF706227。通过 Blastn 比对分析 ,发现其与多株新鞘氨醇杆菌的序列都具有较高的相似性 ,其中相似性最高的为 *Novosphingobium indicum* H25<sup>T</sup> (EF549586) ,达到 99.7%。系统发育分析(图 1) 表明 ,菌株 TVG9-VII 与 *N. indicum* H25<sup>T</sup> 类聚在一

起<sup>[15]</sup>,并具有 100% 的支持率 (Bootstrap = 1 000)。因此,初步鉴定菌株 TVG9-VII 属于新鞘氨醇杆菌。

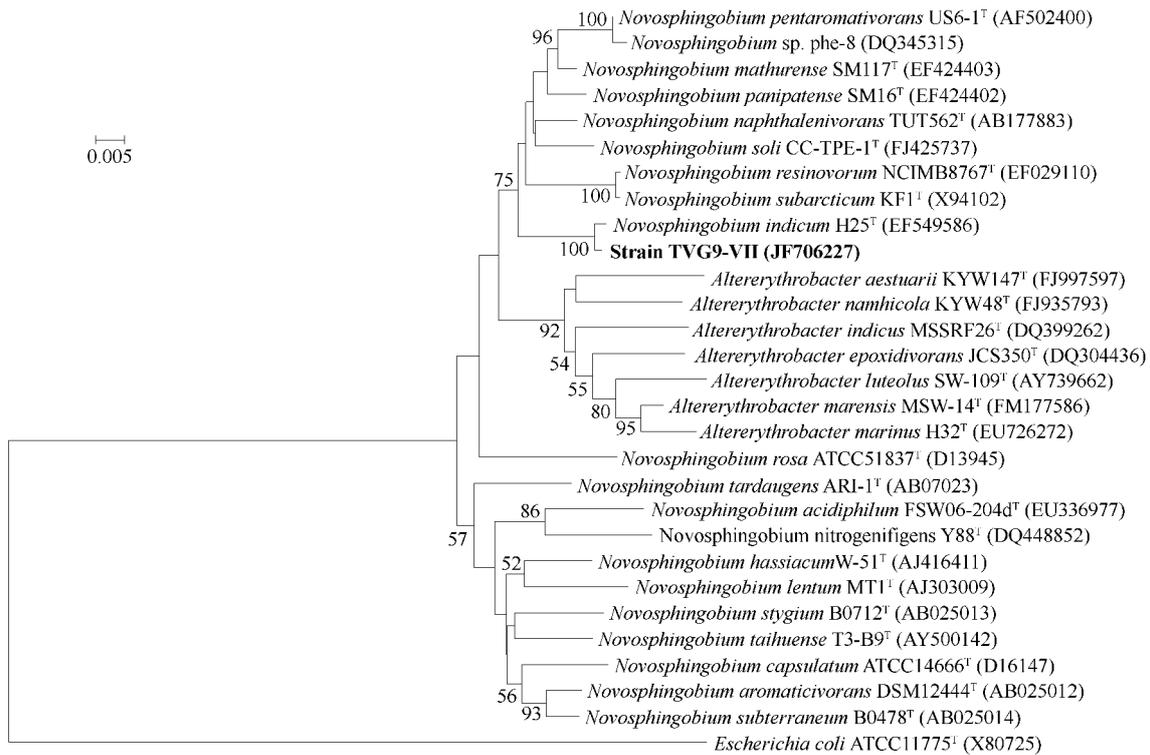


图 1 菌株 TVG9-VII 及其近缘菌株的系统发育树分析

Fig. 1 Phylogenetic tree showing the phylogenetic positions of strain TVG9-VII and related taxa based on 16S rRNA gene sequence analysis. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. Only bootstrap values  $\geq 50\%$  (1 000 replicates) are shown at the nodes. The scale bar represents 0.005 nucleotide changes per position.

## 2.2 PAHs 降解能力分析

菌株 TVG9-VII 对供试的 4 种 PAHs 均有较好的降解效果。培养 21 d 后,萘、菲、芘、荧蒹和混合 PAHs 的培养液均变浑浊,并分别呈现淡黄色、浅褐色、淡黑色、橙色和黄褐色。GC-MS 测定结果表明,在 21 d 内该菌株对菲、荧蒹和芘的降解率分别为 95.2%、57.3% 和 69.6%,对混合 PAHs 中菲、荧蒹和芘的降解率分别为 64.7%、78.1% 和 74.5%。

## 2.3 PAHs 降解基因簇的克隆

利用脉冲场电泳分离得到菌株 TVG9-VII 36 kb 左右的基因组片段,构建 Fosmid 文库。共挑取了

960 个 Fosmid 克隆子,平均插入长度为 36 - 40 kb (结果未显示)。新鞘氨醇杆菌基因组大小一般为 5 M 左右,按此估算,此文库对基因组的覆盖率约为 7 倍。

利用新鞘氨醇杆菌属 PAHs 起始降解双加氧酶引物 phe8up/phe8down 对文库进行筛选后,获得了一个阳性克隆 D3-10。对克隆 D3-10 进行基因组步测序后发现,在已经获得的 12.522 kb 序列中包含 10 个 ORFs,其中 3 个包括 *pheA1a*、*pheA1b* 和 *xylB* 位于一个 PAHs 起始降解基因簇中 (JF710635) (图 2)。

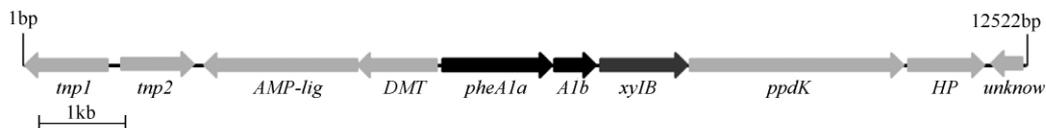


图 2 Fosmid 克隆子 D3-10 含有 PAHs 起始降解基因簇的 ORFs 排布

Fig. 2 The ORFs arrangement of PAHs degrading gene cluster with flanking sequences in Fosmid clone D3-10.

Blastn 分析表明,ORF *pheA1a*、*pheA1b* 和 *xylB* 分别是 PAHs 起始双加氧酶大小亚基基因和一个

醇类脱氢酶基因,其同源性最高的基因均来自另外一株新鞘氨醇杆菌 *N. aromaticivorans*

DSM12444<sup>T</sup>,它们在氨基酸序列水平上的同源性均高达98%(表2)。

表2 Fosmid克隆D3-10中ORF预测分析

Table 2 List of predicted ORFs retrieved from D3-10 fosmid clone

ORF name	Length/aa	Homologues	Hosts	AA identity/%
tnp1	342	transposase IS116/IS110/IS902	<i>Nitrobacter</i> sp. X14	210/334 (62%)
tnp2	300	transposase orfB	<i>Sulfitobacter</i> sp. EE-36	228/296 (77%)
AMP-lig	637	AMP-dependent synthetase and ligase	<i>Novosphingobium</i> sp. DSM12444	458/616 (74%)
DMT	335	permease	<i>Novosphingobium</i> sp. DSM12444	203/296 (68%)
pheA1a	458	ring hydroxylating dioxygenase, $\alpha$ subunit	<i>Novosphingobium</i> sp. DSM12444	453/458 (98%)
pheA1b	173	small subunit naph/bph dioxygenase	<i>Novosphingobium</i> sp. DSM12444	172/173 (99%)
xylB	364	alcohol dehydrogenase	<i>Novosphingobium</i> sp. DSM12444	362/364 (99%)
ppdK	925	pyruvate phosphate dikinase	<i>Novosphingobium</i> sp. DSM12444	874/887 (98%)
HP	190	hypothetical protein	<i>Novosphingobium</i> sp. DSM12444	174/175 (99%)
unknow		No significant similarity with the known protein		

## 2.4 双加氧酶的诱导表达分析

RT-PCR 检测结果表明 PAHs 起始降解双加氧

酶 *pheA1a* 基因在葡萄糖中有本底表达,在非诱导下的表达量明显高于萘、荧蒹和芘的诱导(图3)。

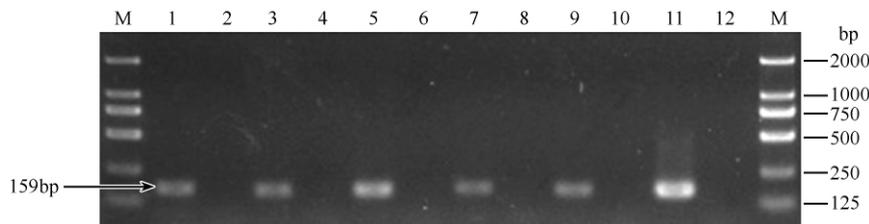


图3 起始双加氧酶基因 *pheA1a* 在不同诱导条件下的 RT-PCR 分析

Fig.3 RT-PCR analysis of the initial dioxygenase genes *pheA1a* induced by PAHs. M: DL2000 marker; Line 1, 3, 5, 7, 9: induced by glucose, naphthalene, phenanthrene, fluoranthene and pyrene, respectively; Line 2, 4, 6, 8, 10: inducing negative controls for glucose, naphthalene, phenanthrene, fluoranthene and pyrene, respectively; Line 11: positive control; Line 12: negative controls.

为了更准确地分析 *pheA1a* 基因在不同 PAHs 诱导下的表达情况,首先根据 Bio-rad 公司的“荧光定量 PCR 应用指南”优化了 TVG9-VII alphaF2/R2 和 TVG9-VII 16SF2/R2 引物的定量实验条件,确定在下列条件下:95 °C 3 min; 95 °C 10 s, 58 °C 30 s(荧光采集),40 个循环;95 °C 30 s; 50 °C 30 s;50 °C + 0.5 °C/循环,共 80 个循环,*pheA1a* 和内参 16S rRNA 基因的扩增效率(97.8%和 99.3%)能够满足定量的要求。

随后,按照 1.6 中的方法对 *pheA1a* 基因进行了定量分析。qPCR 结果表明(图4),*pheA1a* 基因在菲的诱导下,表达上调达 4.2 倍,而在萘及高环 PAHs 荧蒹和芘的诱导下未发现上调表达现象。

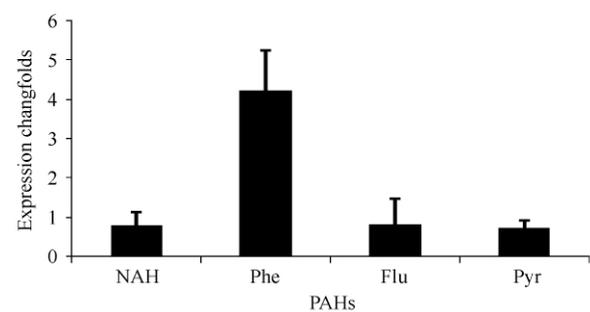


图4 起始双加氧酶基因 *pheA1a* 在不同 PAHs 诱导下的表达定量

Fig.4 Q-PCR analysis of the initial dioxygenase genes *pheA1a* induced by different PAHs. NAH, naphthalene; Phe, phenanthrene; Flu, fluoranthene; Pyr, pyrene.

## 3 讨论

新鞘氨醇杆菌(*Novosphingobium*)是一类重要的污染物降解菌。该属已报导的 PAHs 降解起始酶基

因簇无论在基因排布还是在序列同源性上都非常相似(图5)。除了本研究获得的菌株 TVG9-VII,类似菌株还包括分离自厦门近海的菌株 phe-8<sup>[7]</sup>,来自印度洋深海的菌株 H25<sup>[10]</sup>,以及已经基因组测序的菌株 *N. aromaticivorans* DSM12444<sup>T[4]</sup>。

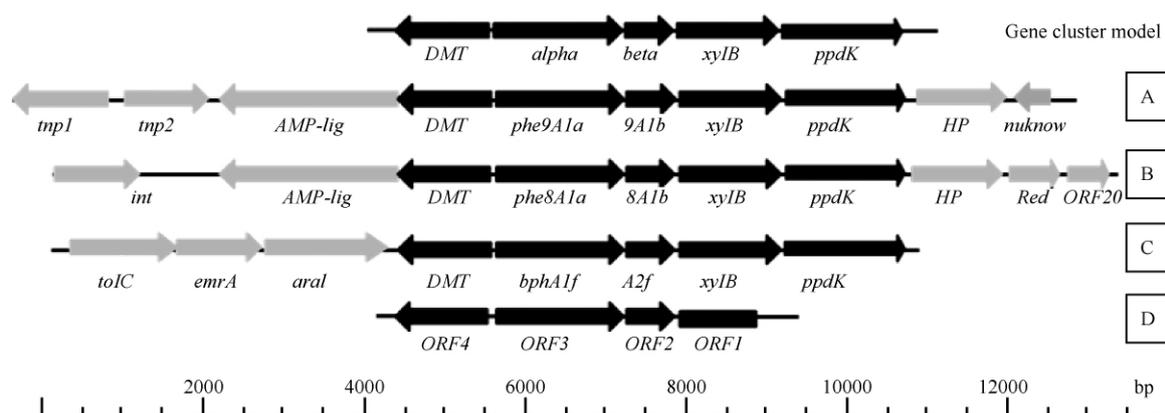


图 5 几株新鞘氨醇杆菌的 PAHs 起始双加氧酶基因簇比较

Fig. 5 The PAHs initial dioxygenase gene clusters in *Novosphingobium* bacteria. A: *Novosphingobium* sp. TVG9-VII; B: *Novosphingobium* sp. phe8; C: *N. aromaticivorans* DSM12444; D: *N. indicum* H25<sup>T</sup>.

上述基因簇中 PAHs 起始双加氧酶大小亚基氨基酸序列的同源性分别高达 96% 和 98% ,说明这些来源于不同菌株的起始双加氧酶基因十分保守,可能有相同的生物学功能。根据本文对菌株 TVG9-VII 中 *pheA1a* 基因,及前期我们对菌株 phe8 中两个类似基因的诱导表达分析(结果未发表)可知,该类基因在菲的诱导下,均上调表达。推测它们可能是新鞘氨醇杆菌重要的菲降解关键酶基因。

在菌株 DSM12444 和 phe-8 中,PAHs 降解基因簇定位在质粒上,本研究 Fosmid 克隆 D3-10 的末端序列与菌株 DSM12444 中降解质粒的序列最为同源,暗示所得到的片段可能也位于质粒上。已有研究表明,新鞘氨醇杆菌属菌株间存在着较高频率的质粒接合转移现象<sup>[16]</sup>,基因的水平转移可能是此类基因在该属不同菌株中高度同源的主要原因。

此外,菌株 TVG9-VII 可能存在其它负责高环 PAHs 降解的基因簇,可以通过蛋白质组分析,并结合已有的 Fosmid 文库来进一步研究。

## 参考文献

- [1] Baird C. Environmental Chemistry. New York: WH. Freeman and Company, 1995:276-278.
- [2] Head IM, Jones DM, Roling WF. Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4:173-82.
- [3] Takeuchi M, Hamana K, Hiraishi A. Proposal of the genus *Sphingomonas* sensu stricto and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51:1405-17.
- [4] Romine MF, Fredrickson JK, Li SM. Induction of aromatic catabolic activity in *Sphingomonas aromaticivorans* strain F199. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1999, 23:303-313.
- [5] Sohn JH, Kwon KK, Kang JH, Jung HB, Kim SJ. *Novosphingobium pentaromaticivorans* sp. nov., a high-molecular-mass polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from estuarine sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54:1483-1487.
- [6] 郑伟,黄君,郑天凌,田蕴. 芘诱导下新鞘氨醇单胞菌差异表达蛋白追踪. 厦门大学学报(自然科学版) [Journal of Xiamen University (Natural Science)], 2008, 47:49-53.
- [7] 崔志松,邵宗泽. 一株海洋新鞘氨醇杆菌 phe-8 (*Novosphingobium* sp.) 的 PAHs 降解基因和降解特性. 厦门大学学报(自然科学版) [Journal of Xiamen University (Natural Science)], 2006, 45(增刊):257-261.
- [8] Cui ZS, Lai QL, Dong CM, Shao ZZ. Biodiversity of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from deep sea sediments of the Middle Atlantic Ridge. *Environmental Microbiology*, 2008, 10:2138-2149.
- [9] Wang BJ, Lai QL, Cui ZS, Tan TF, Shao ZZ. A pyrene-degrading consortium from deep-sea sediment of the West Pacific and its key member *Cycloclasticus* sp. P1. *Environmental Microbiology*, 2008, 10:1948-63.
- [10] 袁军,赖其良,郑天凌,邵宗泽. 2008. 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.
- [11] Konn C, Charlou JL, Donval JP, Holm NG, Dehairs F, Bouillon S. Hydrocarbons and oxidized organic compounds in hydrothermal fluids from Rainbow and Lost

- City ultramafic-hosted vents. *Chemical Geology*, 2009, 258:299-314.
- [12] Proskurowski G, Lilley MD, Seewald JS, Fruh-Green GL, Olson EJ, Lupton JE, Sylva SP, Kelley DS. Abiogenic hydrocarbon production at Lost City hydrothermal field. *Science*, 2008, 319:604-607.
- [13] Simoneit BRT, Fetzer JC. High molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons in hydrothermal petroleum from the Gulf of California and Northeast Pacific Ocean. *Organic Geochemistry*, 1996, 24:1065-1077.
- [14] Simoneit BRT, Lein AY, Peresykin VI, Osipov GA. Composition and origin of hydrothermal petroleum and associated lipids in the sulfide deposits of the Rainbow field (Mid-Atlantic Ridge at 36N). *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2004, 68:2275-2294.
- [15] Yuan J, Lai QL, Zheng TL, Shao ZZ. *Novosphingobium indicum* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from a deep-sea environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59:2048-2088.
- [16] Basta T, Keck A, Klein J, Stolz A. Detection and characterization of conjugative degradative plasmids in xenobiotic-degrading *Sphingomonas* strains. *The Journal of Bacteriology*, 2004, 186:3862-3872.

## Phylogenetic and degrading genes analysis of a PAH-degrading bacterium TVG9-Ⅶ from deep-sea hydrothermal environment

Chunming Dong<sup>1</sup>, Liang Chen<sup>1</sup>, Yueting Liao<sup>1,2</sup>, Zongze Shao<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, Third Institution of Oceanography State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China

<sup>2</sup> School of Life Science, University of Xiamen, Xiamen 361005, China

**Abstract:** [Objective] The aim of this study is to identify a polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-degrading bacterium isolated from deep-sea hydrothermal environment, including its taxonomy, characteristics and mechanism involved in PAH degradation [Methods] The phylogeny was studied by 16S rRNA gene clone, and the degradation rates against different PAHs were determined by GC-MS. Meanwhile, PAH-degrading gene cluster was cloned by the genomic Fosmid library construction; the function of the key degrading-gene expression was examined by RT-PCR and qPCR to observe gene expression in the response to different PAHs. [Results] A PAH-degrading strain TVG9-Ⅶ was isolated from the hydrothermal chimney sample of the Lau basin in Southwest Pacific Ocean. It showed 99.7% similarities with 16S rRNA gene of *Novosphingobium indicum* strain H25<sup>T</sup>. The degradation rates of this strain against phenanthrene, fluoranthene and pyrene were 95.2%, 57.3% and 69.6% in 21 days, respectively. A gene cluster, containing PAHs initial dioxygenase genes *pheA1a* and *pheA1b*, was obtained from genomic fosmid library, with the insertion size of 12.522 kb. The gene *pheA1a* was enhanced by 4.2 folds in mRNA expression in presence of phenanthrene, but expression enhancement was not observed in other tested PAHs including naphthalene, pyrene and fluoranthene. [Conclusion] Strain TVG9-Ⅶ is isolated from deep-sea hydrothermal environment in genus *Novosphingobium*. It can degrade many kinds of PAHs, especially the high-weight-molecular PAHs.

**Keywords:** deep-sea hydrothermal field, *Novosphingobium*, polycyclic aromatic hydrocarbons, degradation gene cluster, dioxygenase

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Grants from the Scientific Research Foundation of Third Institute of Oceanography, SOA(2010007) and by the Public Science and Technology Research Funds Projects of Ocean (201005032)

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

Received: 18 April 2011 / Revised: 14 August 2011