



## 几株新鞘氨醇杆菌的趋化性及其相关基因组成特点

廖晓敬, 杨璐溪, Hetharua Buce, 周梦凯, 郑天凌, 田蕴\*

厦门大学滨海湿地生态系统教育部重点实验室, 生命科学学院, 福建 厦门 361102

**摘要:**【目的】选择了几株隶属于新鞘氨醇杆菌属(*Novosphingobium*)的有和没有多环芳烃(PAHs)降解能力的细菌,在基因组水平比较分析它们的趋化通路,并探究其中一些菌株对芳香化合物和三羧酸(TCA)循环中间代谢产物的趋化性。【方法】通过基因组的比较分析,研究了几株新鞘氨醇杆菌的趋化蛋白组成和趋化基因分布,并采用滴定法和游动平板法检测了相关菌对芳香族化合物和 TCA 循环中间代谢产物的趋化性。【结果】*N. pentaromativorans* US6-1、*N. pentaromativorans* F2、*Novosphingobium indicum* K13、*Novosphingobium stygium* DSM 12445、*Novosphingobium* sp. C2AC 等 5 株新鞘氨醇杆菌对芳香族化合物和 TCA 循环中间代谢物具有不同程度的趋化性;所选的 7 株已完成基因组测序的新鞘氨醇杆菌 *N. pentaromativorans* F2、*N. pentaromativorans* US6-1、*Novosphingobium* sp. PP1Y、*Novosphingobium* sp. AP12、*Novosphingobium* sp. Rr 2-17, *Novosphingobium* sp. B-7 和 *Novosphingobium* sp. DSM 19370 均含有趋化蛋白 MCP、CheW、CheA、CheB、CheR 和 CheY,且亲缘关系最近的 US6-1、F2 和 PP1Y 3 株菌的 *che* 基因簇中的基因排列一致,为 *cheW*-*Y*-*D*-*B*-*R*-*A*-(X);新鞘氨醇杆菌的趋化系统属 Fla 类型。

【结论】几株新鞘氨醇杆菌都具有较为完整的趋化通路,且对多种芳烃及其代谢物的趋化性各不相同,其中菌株 US6-1 趋化现象最明显。

**关键词:** 趋化性, 新鞘氨醇杆菌, 趋化蛋白, 芳烃化合物

细菌趋化性(chemotaxis)是指有运动能力的细菌对有利环境的趋附(正趋化)和对有害环境的避(负趋化),此行为是通过感应环境信号和调整鞭毛旋转方向获得。在大多数情况下,趋化物(chemoattractant)能作为细菌的碳源和能源。由于细菌代谢的多样性和复杂性,细菌对环境中的多

种异生物质都有趋化性,包括多环芳烃等环境污染物。近年来关于细菌对环境异生污染物的趋化性研究越来越受到关注<sup>[1-3]</sup>,已分离并鉴定了多种对环境有毒污染物具有趋化性的微生物,如 *Pseudomonas*<sup>[4-7]</sup>、*Azospirillum*<sup>[8]</sup>、*Burkholderia*<sup>[9]</sup>、*Agrobacterium*<sup>[10]</sup>、*Bradyrhizobium*<sup>[11]</sup>、*Ralstonia*<sup>[12-13]</sup>

基金项目: 国家自然科学基金(41376117);福建省自然科学基金(2013J01143)

\*通信作者。Tel/Fax: +86-592-2184528; E-mail: tianyun@xmu.edu.cn

收稿日期: 2016-07-05; 修回日期: 2016-11-05; 网络出版日期: 2016-11-29

和 *Comamonas*<sup>[14]</sup> 等属的微生物。有毒趋化物种类繁多, 从结构简单的芳香族化合物到复杂的硝基、氯代芳香族化合物, 包含了绝大部分有机污染物<sup>[12]</sup>。

二元信号系统(TCS)是细菌完成趋化功能的主要途径, TCS 由跨膜分布且具有专一性的膜传感蛋白和胞质内调节蛋白组成: 膜传感蛋白负责感受化学效应物刺激, 胞质内调节蛋白将膜传感蛋白所接受的化学刺激转变成有效的鞭毛运动信号, 进而产生相对应的趋化性运动。TCS 在大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌和枯草芽孢杆菌中研究的比较透彻。它们的趋化 TCS 跨膜传感器信号受体是甲基受体趋化蛋白(methyl-accepting chemotaxis proteins, MCPs), 胞质内调节蛋白有组氨酸激酶 CheA、偶联蛋白 CheW 和多种调节蛋白 CheY/B/R 等。细菌的一般趋化模型包括 MCP、CheW、CheA、CheY 和鞭毛相关蛋白。这些是趋化性细菌必备的核心组分, CheB 和 CheR 几乎存在于所有趋化性细菌中, 而 CheZ、CheC、CheX、CheV 和 CheD 等是趋化性细菌可能存在的组分。这些趋化蛋白根据其功能可分为 4 组: 信号识别和转导组、应激反应组、适应组和信号移除组(使 CheY-P 去磷酸化)。信号识别和转导组包含感受器和配体绑定蛋白, 应激蛋白为 CheA 和 CheY, 适应蛋白改变 CheA 的活性, 重置体系, 信号移除蛋白确保 CheY-P 水平能够随外界刺激快速调节。

新鞘氨醇杆菌(*Novosphingobium*)普遍具有降解芳烃(芳香族)化合物的特性<sup>[15-21]</sup>, 是良好的芳烃污染环境的生物修复菌, 但关于该属细菌对典型有机污染物趋化性的研究尚未见报道。为了了解该属细菌对其降解的芳香族化合物是否也具有趋化性, 本论文以新鞘氨醇杆菌属细菌为研究对象, 进行以下研究: (1) 对 *N. pentaromativorans* US6-1 和 *N. pentaromativorans* F2 及其他几株新鞘氨醇杆

菌的趋化基因和趋化蛋白进行比较分析; (2) 检测 6 株新鞘氨醇杆菌对 TCA 循环中间产物和芳烃化合物的趋化性, 以初步探究新鞘氨醇杆菌属细菌的趋化特性。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验菌株

菌株 *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1 由韩国海洋研究院惠赠, 是 1 株筛选自 Ulsan 海湾(韩国)沉积物的革兰氏染色阴性菌, 嗜盐, 菌落呈黄色, 能广谱和高效地降解 2 环至 5 环的 PAHs<sup>[18]</sup>; 菌株 *N. pentaromativorans* F2 为本实验室分离自红树林湿地沉积物的多环芳烃降解菌, 可降解 2-4 环 PAHs<sup>[22]</sup>; 菌株 *Novosphingobium* sp. C2AC, *N. stygium* DSM 12445 和 *N. indicum* K13 为石油降解菌, 由中国海洋微生物菌种保藏中心(MCCC)提供。

### 1.2 培养基

2216E 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, 磷酸高铁 0.01, 陈海水 750 mL, 蒸馏水 250 mL, pH 7.2。无机盐液体培养基(MM2): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 18 mmol/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 μmol/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 μmol/L, 陈海水 750 mL, 蒸馏水 250 mL, pH 7.2。

趋化缓冲液: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 0.696 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2654 g, EDTA 20 μmol/L, 蒸馏水 500 mL。

### 1.3 趋化性实验

**1.3.1 菌体收集:** 从冻存管中吸取 500 μL 菌液接种至 50 mL 的 2216E 液体培养基中, 于 30 °C、150 r/min 摇床培养 36 h 后转接, 同样培养 36 h, 菌液经 6000 r/min 离心 8 min 收集菌体。趋化缓冲液重悬洗涤, 离心, 反复 3 次, 最后重悬至一定浓度。

**1.3.2 滴定法(Drop assay) :**对于结构式较简单的化合物(单环化合物和 TCA 循环中间物)采用滴定平板法检测实验菌株对其趋化性反应。

MM2 作为趋化性缓冲液, 含 0.18% 的琼脂, 待 MM2 缓冲液冷却至 40 °C 左右时加入菌液至  $OD_{600}=0.6$  后立刻倒平板, 待平板冷却后在平板中央加待测物(加 10  $\mu$ L 200 mmol/L 溶于水的化合物, 不溶或微溶的化合物加固体于平板中央), 最后, 将所有平板放于 28 °C 培养箱培养, 3 h 后开始观察拍照。

**1.3.3 游动平板法(Swarm plate assay)** 对于 2 环及以上的芳烃化合物(1-羟基-2-萘甲酸、萘、菲、蒽和苯并蒽)采用游动平板法检测菌株的趋化性反应。

CHE Buffer (6.1 mmol/L  $K_2HPO_4$ 、3.9 mmol/L  $KH_2PO_4$ 、20  $\mu$ mol/L EDTA pH 7.0)为趋化缓冲液, 含 0.18% 的琼脂; 以上芳烃化合物先用 CHE Buffer 溶解 1 周以上至饱和溶解度, 再取水溶液用含 0.18% 琼脂的 CHE Buffer 稀释 400 倍倒平板, 待凝固成半固体后于平板中央加 8  $\mu$ L 菌液( $OD_{600}$  约为 20), 置于 28 °C 培养箱培养, 定期观察拍照。

## 1.4 新鞘氨醇杆菌的趋化基因及其编码蛋白的比较分析

在 NCBI 中搜索已完成全基因组测序的新鞘氨醇杆菌属的菌株, 包括: *Novosphingobium* sp. PP1Y (NC\_015580.1)<sup>[23]</sup>, *Novosphingobium* sp. AP12 (NZ\_AKKE000000000.1)<sup>[24-25]</sup>, *Novosphingobium* sp. Rr2-17 (NZ\_AKFJ000000000.1)<sup>[24]</sup>, *Novosphingobium* sp. B-7 (NZ\_APCQ000000000.1)<sup>[26]</sup>, *Novosphingobium* sp. DSM19370 (NZ\_AQWK000000000.1)<sup>[27]</sup>。将以上 5 株新鞘氨醇杆菌属细菌的全基因组信息与具有 PAHs 降解能力的 *N. pentaromativorans* US6-1 和 *N. pentaromativorans* F2 进行趋化基因分布的对比分析, 同时分析这 7 株菌及典型趋化性细菌 *E. coli*

和 *Bacillus* 属细菌的趋化蛋白组成并进行对比, 用 MiST (<http://mistdb.com/>)数据库对核心趋化蛋白 CheA 的域结构可视化并进行分析。

## 2 结果和分析

### 2.1 新鞘氨醇杆菌中趋化蛋白的组成

新鞘氨醇杆菌属中已测序的 F2、US6-1、PP1Y、Rr 2-17、AP12、B-7 和 DSM 19370 等 7 株菌及典型趋化性细菌 *Escherichia coli* 042 和 *Bacillus amyloliquefaciens* CC178 的趋化蛋白的组成情况, 如表 1 所示, 它们均含有 MCP、CheW、CheA、CheB、CheR 和 CheY, 而且 MCP 的数量均较多, 新鞘氨醇杆菌的趋化蛋白的组成与 *Bacillus* 属细菌比较相似, 均含 CheD (除 AP12 外) 和 CheC/X (除 F2 和 PP1Y 外), 而 *E. coli* 不含 CheD, 且用 CheZ 替代了 CheC/X 的功能, CheC、CheX 和 CheZ 都是 CheY 磷酸酶, 因此从近缘角度来说, 新鞘氨醇杆菌的趋化机制相对更靠近 *Bacillus* 细菌, 另外 *Bacillus* 细菌还含有 CheV, CheV 是一种偶联和适应蛋白, 由 CheW 和反应调节接收区融合而成, 兼具 CheW 偶联 MCP 和 CheA 的功能, 其反应调节区也能被磷酸化, 并在适应阶段起作用。菌株 Rr 2-17 和 DSM 19370 趋化蛋白数量多且每种关键的趋化蛋白的数量都在 2 个以上, 暗示其趋化系统更复杂, 可能有多个趋化系统。

### 2.2 新鞘氨醇杆菌中趋化基因的分布

分析了 *N. pentaromativorans* US6-1、*N. pentaromativorans* F2 及其它几株已测序的新鞘氨醇杆菌(*Novosphingobium* sp. PP1Y、*Novosphingobium* sp. AP12 和 *Novosphingobium* sp. Rr2-17)的趋化基因, 并就其排列方式绘制了趋化基因位置图。如图 1 所示, 它们的主要趋化基因均紧密相连形成 *che* 基因簇,

表 1. 几株新鞘氨醇杆菌、*E. coli* 和 *Bacillus* 属细菌中趋化相关蛋白的组成

| Table 1. Composition of chemotaxis related proteins in <i>Novosphingobium</i> bacteria, <i>E. coli</i> and <i>Bacillus</i> bacteria |         |     |      |      |      |      |       |      |      |      |      |       |
|---|---------|-----|------|------|------|------|-------|------|------|------|------|-------|
| Strain  | Size/Mb | MCP | CheW | CheA | CheR | CheB | CheCX | CheY | CheD | CheZ | CheV | Total |
| US6-1   | 5.34    | 7   | 1    | 1    | 2    | 2    | 1     | 1    | 1    |      |      | 16    |
| F2  | 5.12    | 5   | 1    | 1    | 2    | 2    |       | 2    | 1    |      |      | 14    |
| PP1Y  | 5.31    | 6   | 1    | 1    | 2    | 3    |       | 2    | 1    |      |      | 16    |
| Rr 2-17   | 4.54    | 9   | 4    | 3    | 5    | 5    | 1     | 2    | 1    |      |      | 30    |
| AP12  | 5.61    | 1   | 1    | 1    | 2    | 2    | 1     | 1    |      |      |      | 9     |
| B-7   | 4.91    | 7   | 4    | 1    | 2    | 2    |       | 18   | 1    |      |      | 35    |
| DSM 19370   | 4.15    | 9   | 2    | 2    | 2    | 3    |       | 15   | 1    |      |      | 34    |
| <i>E. coli</i> 042  | 5.36    | 5   | 1    | 1    | 1    | 1    |       | 1    |      | 1    |      | 11    |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CC178   | 3.80    | 8   | 1    | 1    | 1    | 1    | 1     | 1    | 1    |      | 1    | 16    |

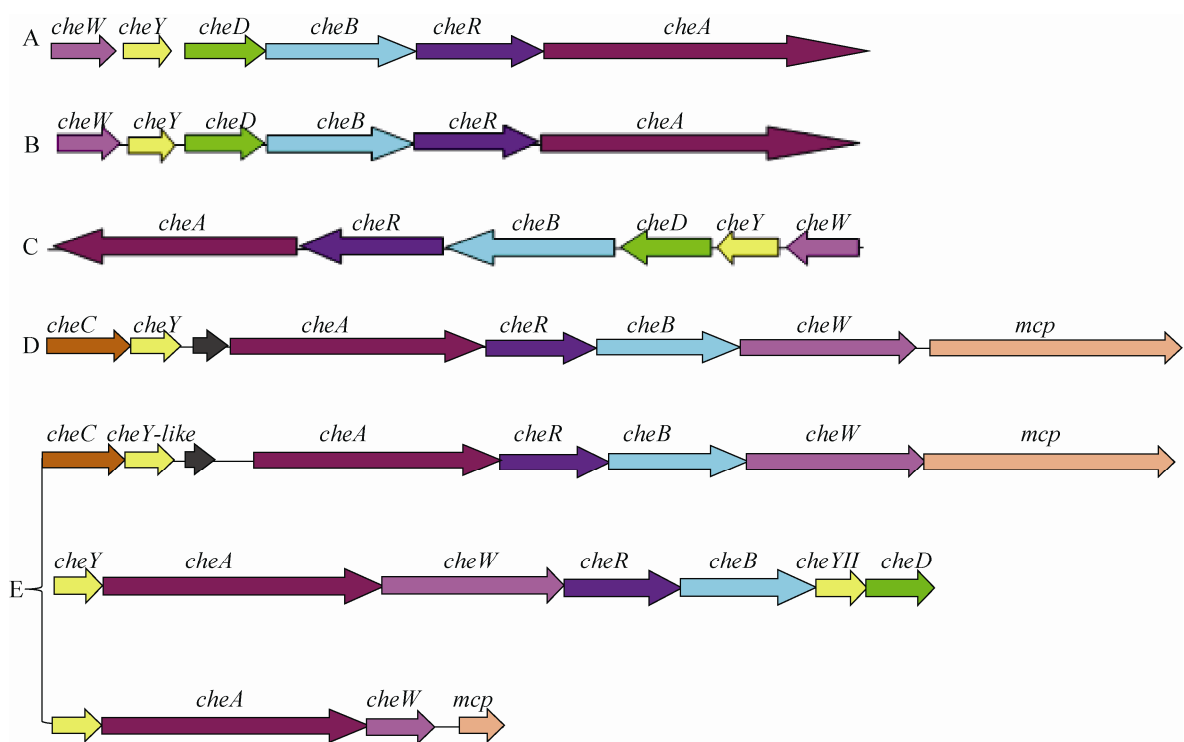


图 1. 几株新鞘氨醇杆菌的趋化基因排列顺序

Figure 1. Chemotaxis gene orders in *Novosphingobium* strains. A: US6-1; B: F2; C: PP1Y; D: AP12; E: Rr2-17.

组成 1 条完整的趋化通路。除 *Novosphingobium* sp. Rr2-17 外的其它新鞘氨醇杆菌均只有 1 个 *che* 基因簇，它们可能是趋化操纵子，其中 *N. pentaromativorans* US6-1 的 *che* 基因簇已经链特异性转录组测序证实其为趋化操纵子(数据另刊发表)。比较可发现具有 PAHs 降解能力的菌株

US6-1、F2 和 PP1Y 的 *che* 基因簇中基因排列顺序一致, 均是 *cheW-Y-D-B-R-A*, 基因簇大小也基本一致, 已知原核生物中基因顺序不保守, 因此该 3 株菌的趋化基因顺序保守的特点也反映出它们的亲缘关系较近, 只是菌株 US6-1 和 F2 的在负链上, 而菌株 PP1Y 的在正链上, 而菌株 AP12 和 Rr 2-17 的趋化基因排列顺序与菌株 US6-1 和 F2 不同, 但它们的趋化蛋白均由负链编码, 其中菌株 Rr 2-17 有 3 个 *che* 基因簇(*che1*, *che2*, *che3*), 菌株 AP12 和 Rr 2-17 的 *che1* 是以 *cheC-Y-A-R-B-W-mcp* 序列排列, 且各基因大小基本相同, *che2* 和 *che3* 基因簇上没有 *cheD* 而含 *cheC* 和 *mcp*。菌株 Rr2-17 的趋化基因簇 *che3* 仅 4 个趋化核心基因。

### 2.3 核心趋化蛋白 CheA 结构比较与分类

Wuichet 和 Zhulin<sup>[23]</sup>分析了 245 个趋化系统并将趋化系统分为 3 类: 调节鞭毛运动性的(Fla), 涉及 Tfp-based 运动性的(Tfp)和可选择性的(非运动性)细胞功能(ACF)。本文用 MiST 对已测序的不同种属细菌的 CheA 的域结构进行分析, 部分展示于图 2, 发现 Fla、Tfp 和 ACF 3 类趋化系统中的 CheA 的域结构有明显差异: Fla 类趋化系统的 CheA 包含 Hpt、Hinase\_dim、HK CA:Che 和 CheW 4 个结构域, Tfp 类趋化系统的 CheA 包含 Hpt、HK CA:Che、CheW 和 RR 4 个结构域且含多个 Hpt (一般 4 个以上), 而 ACF 类趋化系统的 CheA 包含 Hpt、HK CA:Che、CheW 和 RR 4 个结构域。从图 2 中还可以发现, Fla 类趋化系统的 CheA 的域结构在不同属细菌中有些不同, 目前技术分析下的大部分细菌仅包含 Hpt、Hinase\_dim、HK CA:Che 和 CheW 4 个结构域, 但是 *Bacillus* 细菌的 CheA 在 Hpt 和 Hinase\_dim 之间还含 1 个 P2 结构域, *Nocardioide*s 的 CheA 含 2 个 CheW, *E.*

*coli*、*Burkholderia* 和 *Bordetella* 的 CheA 在 Hpt 和 Hinase\_dim 之间还含 1 个 CheY-binding 结构域。本文研究的几株新鞘氨醇杆菌趋化蛋白 CheA 均属于 Fla 类趋化系统 CheA 类型, 说明新鞘氨醇杆菌的趋化系统属于 Fla 类。

### 2.4 新鞘氨醇杆菌对单环芳烃化合物和 TCA 循环产物的趋化性

对于新鞘氨醇杆菌(*N. pentaromativorans*) US6-1 和 F2、印度洋新鞘氨醇杆菌(*Novosphingobium indicum*) K13、冥河新鞘氨醇杆菌(*Novosphingobium stygium*) DSM 12445、新鞘氨醇杆菌(*Novosphingobium* sp.) C2AC 等 5 株细菌, 采用平板滴定法检测了它们对 TCA 循环中的 7 种中间产物和 7 种单环芳香酸的趋化性, 3 h 观察拍照, 结果如图 3 所示, 可以发现 5 株新鞘氨醇杆菌对 TCA 循环中的 7 种中间产物和 6 种单环芳香酸(除邻苯二酚外)都具有趋化现象。从图 3 中还可发现, 同一菌株对不同底物的趋化性有差异, US6-1 对琥珀酸、4-羟基苯甲酸和 3,4-二羟基苯甲酸趋化性较弱, 对其他化合物都具有较强的趋化性; F2 对草酰乙酸、4-羟基苯甲酸和 3,4-二羟基苯甲酸趋化性较弱; 而 DSM12445 的趋化性普遍很弱, 仅对水杨酸和邻苯二甲酸有较强的趋化性, 且对邻苯二酚无趋化反应; K13 和 C2AC 对琥珀酸、苯甲酸、4-羟基苯甲酸和 3,4-二羟基苯甲酸趋化性较弱, 且 C2AC 对邻苯二酚无趋化反应。此外, 不同细菌对同一化合物的趋化性也不同: 一是强弱的差异, 如仅 F2 对琥珀酸有较强的趋化性, 其他细菌对琥珀酸的趋化性都很弱; 再者是有无的差异, US6-1、F2 和 K13 对邻苯二酚有明显的趋化性, 但是 DSM12445 和 C2AC 对邻苯二酚无趋化反应。

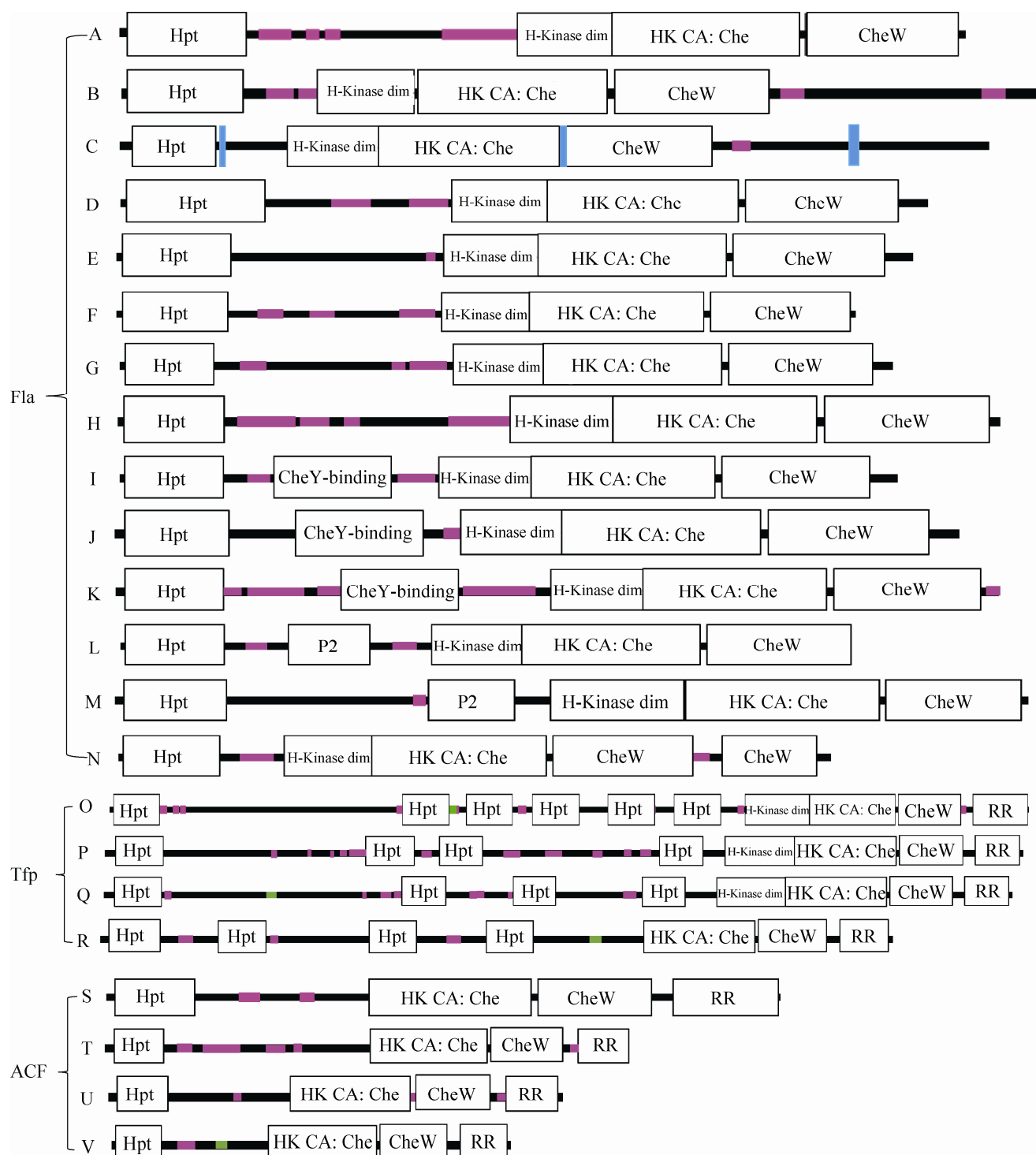


图 2. 三类趋化系统中的 CheA 的域结构

Figure 2. Domain architecture of CheA in three kinds of chemotaxis system. A: *Novosphingobium*; B: *Sphingomonas*; C: *Sphingopyxis*; D: *Pseudomonas*; E: *Beijerinckia*; F: *Vibrio*; G: *Agrobacterium*; H: *Zymomonas*; I: *Bordetella*; J: *E. coli*; K: *Burkholderia*; L: *Bacillus*; M: *Borrelia*; N: *Nocardioides*; O: *Pseudomonas*; P: *Xanthomonas*; Q: *Cellvibrio*; R: *Acinetobacter*; S: *Pseudomonas*; T: *Burkholderia*; U: *Bordetella*; V: *Hahella*.

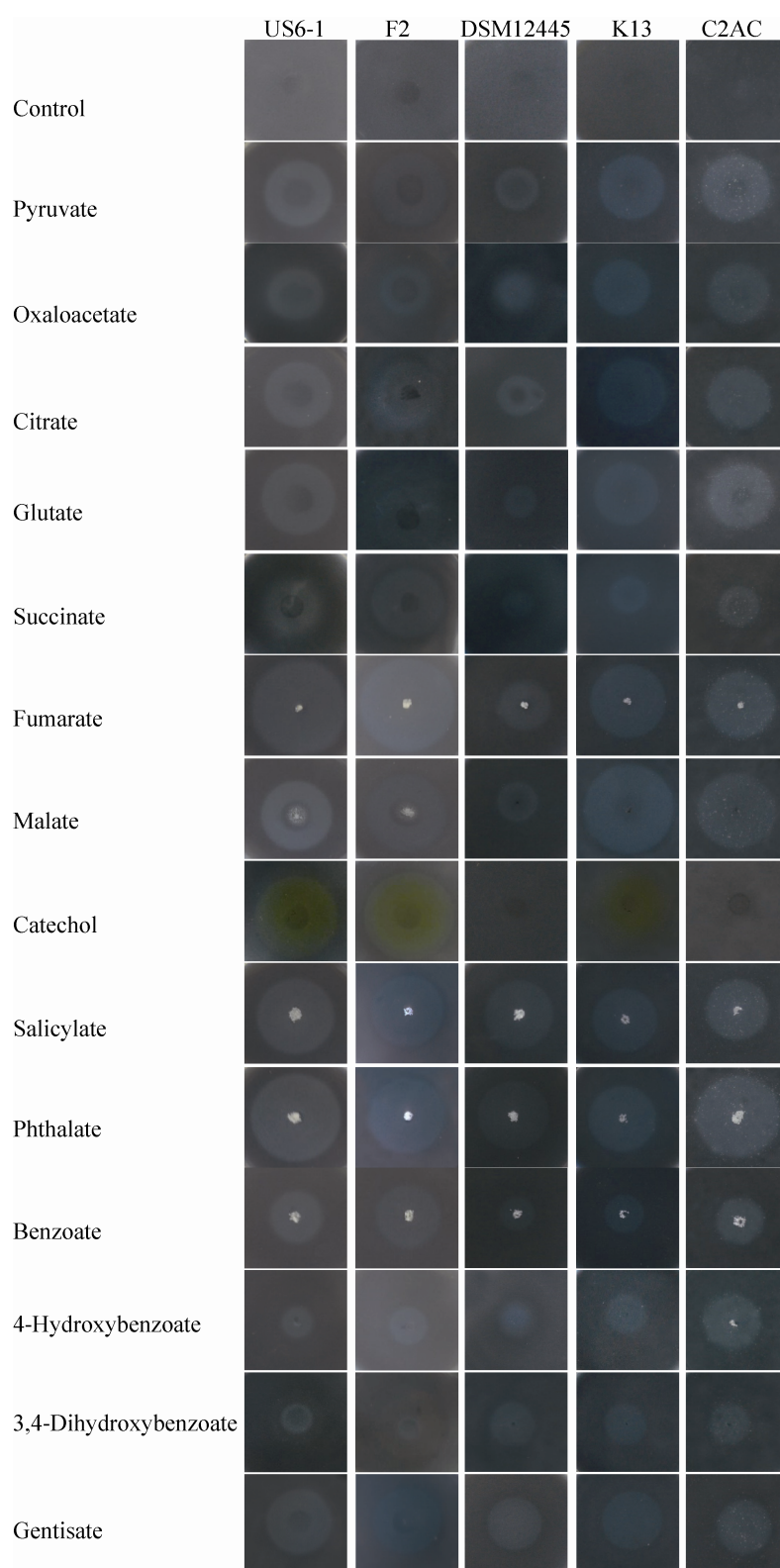


图 3. 新鞘氨醇杆菌对单环芳烃化合物和 TCA 循环中间产物的趋化现象

Figure 3. Chemotaxis phenomnon to monolycyclic aromatic hydrocarbons compound and TCA cycle intermediate metabolites by *Novosphingobium* strains.



## 2.5 *Novosphingobium* 细菌对多环芳烃化合物的趋化性

采用游动平板法检测以上 5 株新鞘氨醇杆菌对 1-羟基-2-萘甲酸(1-hydroxy-2-naphthoate)、萘(naphthalene)、菲(phenanthrene)、芘(pyrene)和苯并芘(benz(a)pyrene)等 5 种多环芳烃化合物的趋化性,定期观察拍照,结果如图 4,发现它们对多环芳烃化合物的趋化差异较大。除降解石油和柴油等烷烃类物质的 *Novosphingobium indicum* K13 和

*Novosphingobium* sp. C2AC 对被测的 5 种多环芳烃均无反应外,其他 3 株新鞘氨醇杆菌对被测物基本上都有反应,并且随着苯环数的增加,趋化反应也变慢。对萘和 1-羟基-2-萘甲酸 1 d 后开始有反应,而对菲、芘和苯并芘均在 4 d 以后才开始有反应,其中未观察菌株 F2 对苯并芘的趋化现象,对芘的趋化反应也相对较弱;*N. pentaromativorans* US6-1 对多环芳烃的趋化性最明显,暗示了细菌趋化性可能与其对 PAHs 的降解能力有关。

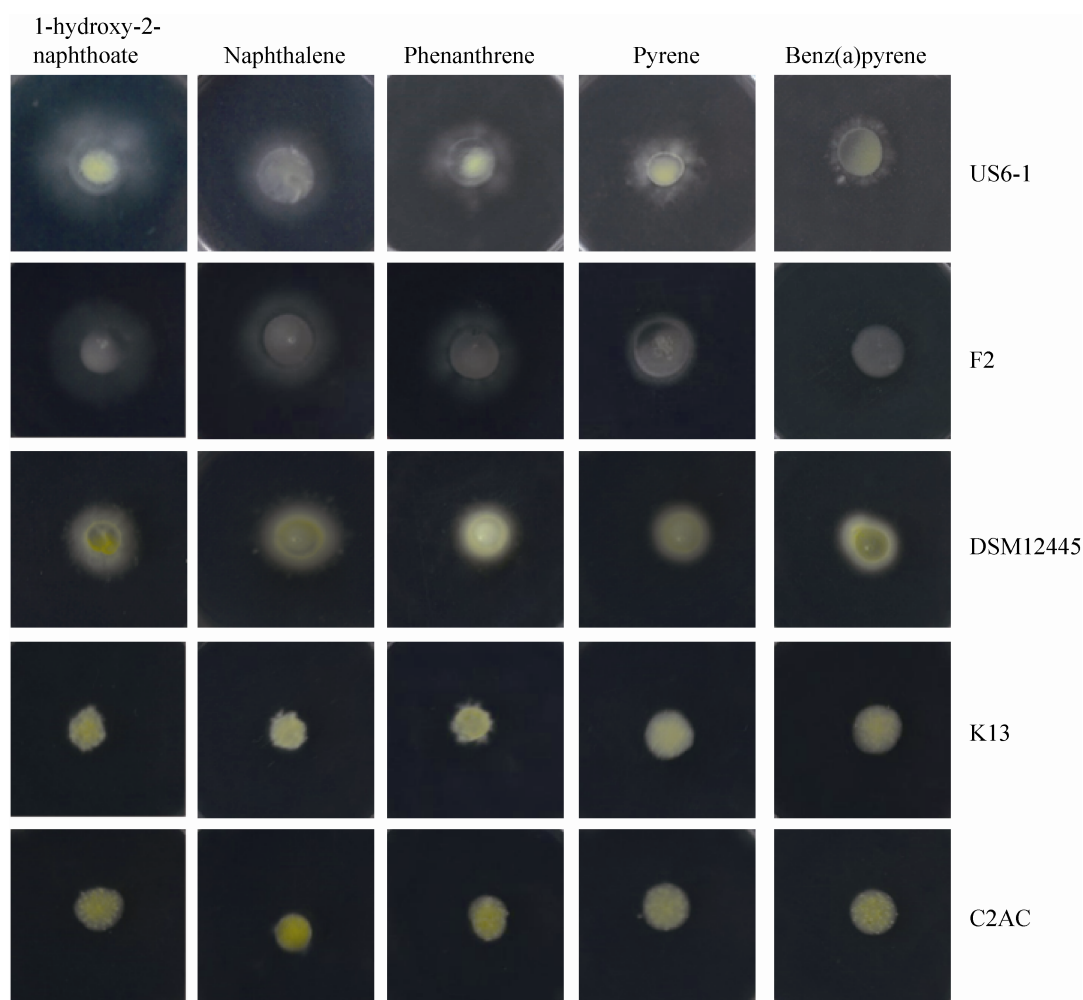


图 4. 新鞘氨醇杆菌对多环芳烃化合物的趋化现象

Figure 4. Chemotaxis phenomenon to polycyclic aromatic hydrocarbons compound by *Novosphingobium* strains.



### 3 讨论

近几十年来, 科研工作者证实了环境中的大部分芳香族污染物可以被微生物降解, 系统地研究了微生物降解芳香族化合物的基因、代谢途径和调控手段, 然而微生物对芳香族污染物的修复能否最终实现, 不仅仅依赖于其降解能力本身, 还依赖于污染物的生物可利用性, 因为芳香族有机污染物特别是多环芳烃类疏水性高, 水溶性极低, 因此在微生物降解该类污染物之前必须要有效地感应吸收它。研究发现一些污染物降解菌如 *Pseudomonas putida* G7 (萘降解菌)、*Pseudomonas putida* RKJ1 (萘和水杨酸降解菌) 和 *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816-4 对萘均有趋化行为<sup>[5-7]</sup>。趋化性是细菌适应外界化学环境变化而作出的行为反应, 是一种寻找碳源和能源的优势。

本研究中的物种进化分析表明, 具有 PAHs 降解功能的新鞘氨醇杆菌 F2、PP1Y 和 US6-1 亲缘关系非常近, 基因组大小均在 5 Mb 以上。对三者的趋化基因进行分析, 发现它们均存在 1 个趋化基因簇(*che* 簇), 猜测是 1 个趋化操纵子(菌株 US6-1 已经在链特异转录组中预测到此操纵子), 能够起实际趋化性功能, 且其上的趋化基因排列顺序一致。另外几个新鞘氨醇杆菌如 AP12 和 Rr 2-17 也至少存在 1 个 *che* 簇, 只是趋化基因的排列方式不同于前三者。Samanta 等的研究<sup>[6]</sup>证实在萘降解菌 *P. putida* RKJ1 中, 位于 83 kb 质粒上的 25 kb 的 *EcoR* I 片段编码了萘的降解基因和趋化基因, 但是本研究中我们未发现新鞘氨醇杆菌的降解相关基因与趋化基因排列在一起, 暗示新鞘氨醇杆菌的趋化性与降解功能的调节机制与 *P. putida* RKJ1 不一样, 可能受远距离调控因子调节。

MCPs、CheA、CheW 和 CheY 普遍存在于趋

化性原核生物中, 并代表了中心趋化系统的核心部分。Wuichet 和 Zhulin<sup>[23]</sup>分析发现的 245 个编码趋化蛋白的基因组中, 仅 7 个缺失编码 MCPs、CheA 或 CheW 的基因, 其中 4 个缺失 CheA 的基因组没有预测到它们形成功能性的趋化系统, 说明 CheA 是具备实际趋化性功能所必需的。本研究对新鞘氨醇杆菌的趋化蛋白的组成与典型的趋化细菌 *E. coli* 和 *Bacillus* 属细菌进行了比较, 结果发现 7 株新鞘氨醇杆菌均含有 MCP、CheW、CheA、CheB、CheR 和 CheY。新鞘氨醇杆菌的趋化性蛋白的组成与 *Bacillus* 细菌比较相似, 均含 CheD (除 AP12 外) 和 CheC (US6-1、F2 和 PP1Y 中未发现), *Bacillus* 细菌的趋化受体 MCP 必须先经 CheD 脱酰基才能有效地将信号传递给 CheA<sup>[28]</sup>, 可能新鞘氨醇杆菌也有这一类似机制; CheC 为 CheY 磷酸酶, 在信号移除阶段起作用, 存在于大部分趋化生物中。F2 和 PP1Y 中含有鞭毛马达开关蛋白 FliY, 也是一种 CheY 磷酸酶, N 端与 CheC 同源, 均能使磷酸化的 CheY 水解, 有着 CheC 的相似功能<sup>[1]</sup>, 猜测 F2 和 PP1Y 是用鞭毛马达开关蛋白 FliY 代替 CheC 功能的。而 *E. coli* 不含 CheD, 且用 CheZ 替代 CheC 的功能。CheZ 蛋白也是 CheY 磷酸酶, 在  $\beta$ -和  $\gamma$ -变形杆菌中广泛存在, 它在序列上与 CheC 和 FliY 无同源性。因此从近缘角度新鞘氨醇杆菌的趋化机制相对更靠近 *Bacillus* 细菌。另外, *Bacillus* 细菌还含有一种偶联和适应蛋白 CheV, 由 CheW 和反应调节接收区融合而成, 兼具有 CheW 偶联 MCP 和 CheA 的功能, 其反应调节区也能被磷酸化在适应阶段起作用<sup>[1]</sup>。趋化系统 CheV 取代 CheW 的现象在 *L. monocytogenes* 中被证实是有实际功效的<sup>[29]</sup>。菌株 *H. pylori* 中缺少 CheR 和 CheB, 用 CheV 代替, 在适应阶段起调节作用<sup>[30]</sup>。

从蛋白组分上也可以看出 *E. coli* 的每种 Che 蛋白均只有 1 个, 它的趋化系统最简单。菌株 Rr 2-17 和 DSM 19370 趋化蛋白数量多且关键的趋化蛋白每种基本上都在 2 个以上, 暗示其趋化系统更复杂, 图 2 也表明了菌株 Rr 2-17 有 3 个趋化基因簇, 说明 *Novosphingobium* sp. Rr 2-17 有多个趋化通路。之前也有报道过一些生物具有多个复杂的趋化系统, 如 Porter 等<sup>[31]</sup>发现 *R. sphaeroides* 含有 3 个趋化通路系统, 其中 2 个趋化操纵子 cheOp2 和 cheOp3 分别由 polar chemotaxis cluster 和 cytoplasmic chemotaxis cluster 组成, cheOp2 和 cheOp3 上编码的大部分趋化蛋白是该菌表现正常趋化性所必需的; 另外 *Myxococcus xanthus*、*Caulobacter crescentus*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Rhodobacter sphaeroides* 和 *Sinorhizobium meliloti* 也均含 2 个或 2 个以上的趋化通路系统<sup>[32]</sup>。

Wuichet 和 Zhulin<sup>[23]</sup>分析了 245 个趋化系统并将趋化系统分为 3 类: 调节鞭毛运动性的(Fla), 涉及 Tfp-based 运动性的(Tfp)和可选择性的(非运动性)细胞功能(ACF)。本论文就这些趋化系统的关键核心蛋白 CheA 激酶的域结构进行了分析, 发现 Fla、Tfp 和 ACF 3 类趋化系统中的 CheA 的域结构有明显差异, 这 3 类趋化系统中的 CheA 的域结构均有自己的特点, 我们研究的新鞘氨醇杆菌的趋化蛋白 CheA 均属于 Fla 类趋化系统 CheA 类型, 表明新鞘氨醇杆菌的趋化系统属 Fla 类型。

新鞘氨醇杆菌属是新近发现的一类广泛存在于海洋环境中的革兰氏阴性菌, 该属细菌能够降解多种芳香族化合物, 例如甲苯、胺基苯、硝基苯、氯苯、2-5 环的 PAHs 等<sup>[23-24]</sup>。新鞘氨醇杆菌属(*Novosphingobium*)和鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)菌株都归属于 Sphingomonadaceae, 许多降解异生

污染物的细菌均为这 2 个菌属的菌株<sup>[25-27]</sup>。本文研究了 5 株新鞘氨醇杆菌对芳香族化合物和 TCA 循环中间代谢物的趋化性, 发现它们均具有趋化性, 只是趋化强弱因菌株而异, 推测对降解底物的趋化性可能也是新鞘氨醇杆菌这类芳烃降解菌的共同特性。其中 PAHs 高效降解菌 *N. pentaromativorans* US6-1 对所有待测化合物都具有趋化反应, 且相比于其他菌株, 它的趋化性是最强的。降解石油和柴油等烷烃类物质的 *Novosphingobium indicum* K13 和 *Novosphingobium* sp. C2AC 对 1-羟基-2-萘甲酸、萘、菲、芘和苯并芘等芳香烃类化合物均无反应, 由此推测新鞘氨醇杆菌的趋化性可能属于代谢依赖型。

## 4 结论

对所选的几株新鞘氨醇杆菌的趋化基因进行分析发现, 它们均至少含 1 个 *che* 簇, 能够形成完整的趋化通路, 其中具有 PAHs 降解功能的菌株 F2、PP1Y 和 US6-1 的 *che* 簇中趋化基因排列顺序一致, 与亲缘关系稍远的菌株 AP12 和 Rr 2-17 的趋化基因排列不同, 验证了它们之间的亲缘关系。菌株 Rr 2-17 有 3 个趋化基因簇, 它的趋化系统较复杂。几株新鞘氨醇杆菌均含有 MCP、CheW、CheA、CheB、CheR 和 CheY, 趋化蛋白组成上与 *Bacillus* 细菌较相似, 与 *E. coli* 差别较大, 趋化系统属 Fla 类型。鉴于趋化系统的关键核心蛋白 CheA 的 HATPase\_c 和 CheW 2 个结构域高度保守, *cheA* 可以作为趋化性细菌的候选生物标记物, 用于检测环境中的趋化细菌。几株新鞘氨醇杆菌具有趋化性的共同特性, 且菌株 US6-1 的趋化性可能属于代谢依赖型, 具有 PAHs 降解功能的新鞘氨醇杆菌的趋化性与降解性之间的关联有待进一步深入研究。

## 参 考 文 献

- [1] Szurmant H, Ordal GW. Diversity in chemotaxis mechanisms among the bacteria and archaea. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2004, 68(2): 301–319.
- [2] Fenchel T. Microbial behavior in a heterogeneous world. *Science*, 2002, 296(5570): 1068–1071.
- [3] Glaeser J, Overmann J. The significance of organic carbon compounds for *in situ* metabolism and chemotaxis of phototrophic consortia. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(11): 1053–1063.
- [4] Belotte D, Curien JB, Maclean RC, Bell G. An experimental test of local adaptation in soil bacteria. *Evolution*, 2003, 57(1): 27–36.
- [5] Grimm AC, Harwood CS. NahY, a catabolic plasmid-encoded receptor required for chemotaxis of *Pseudomonas putida* to the aromatic hydrocarbon naphthalene. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(10): 3310–3316.
- [6] Samanta SK, Jain RK. Evidence for plasmid-mediated chemotaxis of *Pseudomonas putida* towards naphthalene and salicylate. *Canadian Journal of Microbiology*, 2000, 46(1): 1–6.
- [7] Grimm AC, Harwood CS. Chemotaxis of *Pseudomonas* spp. to the polyaromatic hydrocarbon naphthalene. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(10): 4111–4115.
- [8] Lopez-de-Victoria G, Lovell CR. Chemotaxis of *Azospirillum* species to aromatic compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(9): 2951–2955.
- [9] Parales RE, Ditty JL, Harwood CS. Toluene-degrading bacteria are chemotactic towards the environmental pollutants benzene, toluene, and trichloroethylene. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(9): 4098–4104.
- [10] Ashby AM, Watson MD, Loake GJ, Shaw CH. Ti plasmid-specified chemotaxis of *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 toward vir-inducing phenolic compounds and soluble factors from monocotyledonous and dicotyledonous plants. *Journal of Bacteriology*, 1988, 170(9): 4181–4187.
- [11] Parke D, Rivelli M, Ornston LN. Chemotaxis to aromatic and hydroaromatic acids: comparison of *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium trifolii*. *Journal of Bacteriology*, 1985, 163(2): 417–422.
- [12] Bhushan B, Samanta SK, Chauhan A, Chakraborti AK, Jain RK. Chemotaxis and biodegradation of 3-methyl-4-nitrophenol by *Ralstonia* sp. SJ98. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 275(1): 129–133.
- [13] Samanta SK, Bhushan B, Chauhan A, Jain RK. Chemotaxis of a *Ralstonia* sp. SJ98 toward different nitroaromatic compounds and their degradation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 269(1): 117–123.
- [14] Ni B, Huang Z, Fan Z, Jiang CY, Liu SJ. *Comamonas testosteroni* uses a chemoreceptor for tricarboxylic acid cycle intermediates to trigger chemotactic responses towards aromatic compounds. *Molecular Microbiology*, 2013, 90(4): 813–823.
- [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(8): 2084–2088.
- [16] Yan QX, Hong Q, Han P, Dong XJ, Shen YJ, Li SP. Isolation and characterization of a carbofuran-degrading strain *Novosphingobium* sp. FND-3. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, 271(2): 207–213.
- [17] Tirola MA, Busse HJ, Kämpfer P, Männistö MK. *Novosphingobium lentum* sp. nov., a psychrotolerant bacterium from a polychlorophenol bioremediation process. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(2): 583–588.
- [18] Sohn JH, Kwon KK, Kang JH, Jung HB, Kim SJ. *Novosphingobium pentaromativorans* sp. nov., a high-molecular-mass polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from estuarine sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54(5): 1483–1487.
- [19] Notomista E, Pennacchio F, Cafaro V, Smaldone G, Izzo V, Troncone L, Varcamonti M, Di Donato A. The marine isolate *Novosphingobium* sp. PP1Y shows specific adaptation to use the aromatic fraction of fuels as the sole carbon and energy source. *Microbial Ecology*, 2011, 61(3): 582–594.
- [20] Hashimoto T, Onda K, Morita T, Luxmy B, Tada K, Miya A, Murakami T. Contribution of the estrogen-degrading bacterium *Novosphingobium* sp. strain JEM-1 to estrogen removal in wastewater treatment. *Journal of Environmental Engineering*, 2010, 136(9): 890–896.
- [21] Fujii K, Satomi M, Morita N, Motomura T, Tanaka T, Kikuchi S. *Novosphingobium tardagens* sp. nov., an oestradiol-degrading bacterium isolated from activated sludge of a sewage treatment plant in Tokyo. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53(1): 47–52.
- [22] 郑伟. 来源于红树林湿地沉积物的细菌对多环芳烃(PAHs)降解的研究. 厦门大学博士学位论文, 2011.
- [23] Wuichet K, Zhulin I B. Origins and diversification of a complex signal transduction system in Prokaryotes. *Science Signaling*, 2010, 3(128): ra50.
- [24] Suzuki S, Hiraishi A. *Novosphingobium naphthalenivorans* sp. nov., a naphthalene-degrading bacterium isolated from polychlorinated-dioxin-contaminated environments. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2007, 53(4): 221–228.
- [25] Gan HM, Hudson AO, Rahman AYA, Chan KG, Savka MA. Comparative genomic analysis of six bacteria belonging to the genus *Novosphingobium*: insights into marine adaptation, cell-cell signaling and bioremediation. *BMC Genomics*, 2013, 14: 431.
- [26] Johnsen AR, Winding A, Karlson U, Roslev P. Linking of microorganisms to phenanthrene metabolism in soil by analysis of  $^{13}\text{C}$ -labeled cell lipids. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(12): 6106–6113.

- [27] Aylward FO, McDonald BR, Adams SM, Valenzuela A, Schmidt RA, Goodwin LA, Woyke T, Currie CR, Suen G, Poulsen M. Comparison of 26 sphingomonad genomes reveals diverse environmental adaptations and biodegradative capabilities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(12): 3724–3733.
- [28] Kristich CJ, Ordal GW. *Bacillus subtilis* CheD is a chemoreceptor modification enzyme required for chemotaxis. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(28): 25356–25362.
- [29] Dons L, Eriksson E, Jin Y, Rottenberg ME, Kristensson K, Larsen CN, Bresciani J, Olsen J E. Role of flagellin and the two-component CheA/CheY system of *Listeria monocytogenes* in host cell invasion and virulence. *Infection and Immunity*, 2004, 72(6): 3237–3244.
- [30] Pittman MS, Goodwin M, Kelly DJ. Chemotaxis in the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*: different roles for CheW and the three CheV paralogues, and evidence for CheV2 phosphorylation. *Microbiology*, 2001, 147(9): 2493–2504.
- [31] Porter SL, Wadhams GH, Armitage JP. *Rhodobacter sphaeroides*: complexity in chemotactic signalling. *Trends of Microbiology*, 2008, 16(6): 251–260.
- [32] Zusman DR, Scott AE, Yang ZM, Kirby JR. Chemosensory pathways, motility and development in *Myxococcus xanthus*. *Nature Reviews Microbiology*, 2007, 5(11): 862–872.

## Chemotaxis and characteristics of chemotactic genes in *Novosphingobium* strains

Xiaojing Liao, Luxi Yang, Hetharua Buce, Mengkai Zhou, Tianling Zheng, Yun Tian\*

Key Laboratory of the Ministry of Education for Coastal and Wetland Ecosystems, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, Fujian Province, China

**Abstract:** [Objective] The present study aims to analyze the chemotaxis genes and proteins of several PAH-degrading *Novosphingobium* strains, and the chemotaxis of these strains toward aromatic compounds and intermediates. [Methods] Based on genome comparative analysis, we identified the chemotaxis genes organization and proteins distribution. We used drop and swarm plate assays to detect the chemotaxis of these strains toward aromatic compounds and intermediates of TCA cycle. [Results] We found that all these *Novosphingobium* strains showed chemotaxis, but the chemotactic ability varied. The completed genome sequenced strains *N. pentaromativorans* F2, *N. pentaromativorans* US6-1, *N. pentaromativorans* PP1Y, *Novosphingobium* sp. AP12, *Novosphingobium* sp. Rr 2-17, and *Novosphingobium nitrogenifigens* DSM 19370 contained MCP, CheW, CheA, CheB, CheR and CheY. Strain F2, US6-1 and PP1Y, shared a consistent order of chemotaxis genes in “che” cluster. The chemotactic system of these *Novosphingobium* strains belonged to the Fla chemotactic system. [Conclusion] These strains all contained a complete chemotaxis pathway. Their chemotactic ability toward aromatic compounds and intermediates varied, and the chemotaxis of US6-1 was obvious.

**Keywords:** chemotaxis, *Novosphingobium*, chemotactic protein, aromatic compounds

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (41376117) and by the Natural Science Foundation of Fujian Province of China (2013J01143)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-592-2184528; E-mail: tianyun@xmu.edu.cn

Received: 5 July 2016; Revised: 5 November 2016; Published online: 29 November 2016