

研究论文

一株可利用二甲基巯基丙酸内盐生长的北极海洋细菌的分类鉴定及表型特征分析

张义和^{1,2} 曾胤新² 曲江勇¹

(¹烟台大学生命科学学院, 烟台 264003;

²中国极地研究中心, 上海 200136)

提要 二甲基巯基丙酸内盐(DMSP)是一种主要由海洋浮游植物生成的含硫化合物, 在海洋中含量丰富, 同时也是海洋细菌的重要营养物之一。采用生长选择性培养基从北极王湾海水中分离到一株细菌 DMSP-1。基于 16S rRNA 基因序列及基因组平均核苷酸一致性(Average Nucleotide Identity, ANI)分析, 将该菌鉴定为乳酸假单胞菌。该菌细胞呈杆状, 有极生鞭毛; 具有耐冷(可在 5℃较快生长, 适宜生长温度范围为 22~29℃, 最高生长温度为 38℃)、耐盐(适宜生长盐度范围为 0~4% NaCl、最高生长盐度为 8% NaCl)等特性, 表明该菌能较好地适应其所处的北极近岸环境。碳源生长实验证实该菌能以 DMSP 为唯一碳源进行生长。该菌具有乳酸假单胞菌的许多生理生化特征, 但也存在差异, 如色氨酸脱氨酶与脲酶为阳性、不能利用鼠李糖产酸等。对假单胞菌 DMSP-1 开展进一步的研究, 将推动人们对于海洋细菌降解 DMSP 的代谢机制及其在北极海洋环境中生态功能的深入认识。

关键词 北极 王湾 假单胞菌 DMSP 降解

doi: 10.13679/j.jdyj.20200037

0 引言

二甲基巯基丙酸内盐(Dimethylsulfoniopropionate, DMSP)是一种在全球海洋中含量丰富的含硫化合物^[1-2]。海洋浮游植物每年产生的 DMSP 可达 10 亿吨或更多^[3]。一些海洋细菌也能合成该物质^[4]。DMSP 可作为浮游植物的胞内渗透调节剂、抗氧化剂、冷冻保护剂或捕食者威慑物而发挥重要的生理生态作用^[1,2,5], 同时也是海洋浮游细菌的重要营养物之一, 可被细菌分解利用^[4]。释放到海水中的 DMSP, 大部分经由细菌的脱甲基途径生成 3-甲基硫代丙酸甲酯(MMPA)、再经过一系列分解代谢, 最后以含硫蛋白形式进

入微生物食物网^[6-7]。还有部分 DMSP, 可被海洋细菌裂解生成二甲基硫(DMS)与丙烯酸盐或 3-羟基丙酸辅酶 A(3HP-CoA)^[8-9]。海洋中大约 30%的 DMSP 被分解产生 DMS, 而由微生物参与所产生的 DMS 占据了海洋 DMS 总产量的 90%以上^[5,10]。作为海水中最重要还原态挥发性生源有机硫化物, DMS 在表层海水中处于高度过饱和状态, 能够以很大的通量穿过海-气界面进入大气^[11], 成为从海洋排放到大气当中含量最为丰富的含硫化合物。DMS 进入大气后, 经氧化形成硫酸盐气溶胶, 成为酸雨的重要贡献者^[12]。此外, 这些气溶胶容易吸收水分, 可以充当云的凝结核并形成更多的云层, 通过反射或散射太阳辐射使地球表面温度降低^[11], 对气候产生冷却效应^[13,14], 因此

[收稿日期] 2020 年 4 月收到来稿, 2020 年 6 月收到修改稿

[基金项目] 国家自然科学基金(41476171)资助

[作者简介] 张义和, 男, 1994 年生。硕士研究生, 主要从事极地微生物生态学研究

[通信作者] 曾胤新, E-mail: yxzeng@sina.com

DMS 又被称为气候活性气体^[15]。细菌在海洋环境中 DMSP 介导的硫循环中扮演着举足轻重的角色。

有关 DMSP 降解酶及其产生菌多样性的研究, 目前已有大量报道。DMSP 脱甲基途径中参与第一步反应的关键酶基因 *dmdA* 包含了 A~E 五个支系^[16], 其产生菌分布在 α -变形细菌中的玫瑰杆菌、红螺菌目、SAR11、SAR116, 以及 γ -变形细菌中的 OM60 等类群中^[17], 并且以玫瑰杆菌、SAR11 为主。此外, 研究人员已发现 7 种参与 DMSP 降解途径的 Ddd 酶(DMSP 依赖型产 DMS 裂解酶), 分别由 *dddD*、*dddK*、*dddL*、*dddP*、*dddQ*、*dddY* 及 *dddW* 等基因编码^[18-19], 其产生菌分布于变形细菌门的各亚纲以及真菌的子囊菌纲^[20]。但相关研究工作大多集中在中、低纬度海域, 对于涉及南、北极高纬度低温海域中的研究报道相对很少。

北冰洋与南大洋, 是大气 DMS 的巨大的源, 并且对全球硫的收支具有显著贡献^[21], 生存在这些海域中的浮游细菌, 必然在全球的硫循环中具有重要的生态学意义。在北极王湾, 涉及脱甲基途径的 *dmdA* 基因与涉及裂解途径的 *dddL* 和 *dddP* 基因, 其产生菌都与玫瑰杆菌支系密切相关^[22]。而在南极长城站近岸海域, 水体中的 *dmdA* 基因均来自玫瑰杆菌支系, 但 *dddP* 基因分别来自以 *Methylobacterium* 为代表的 α -变形细菌以及以 *Pseudomonas* 为代表的 γ -变形细菌^[23]。这些结果表明了不同极地海域中 DMSP 分解代谢细菌组成的多样性。2010 年课题组采用含 5mM DMSP 的寡营养海盐(Sigma)培养基从北极王湾海水中分离得到菌株 DMSP-1。本文通过 16S rRNA 基因序列分析及基因组比对分析、菌落形态及细胞形态观测、结合生理生化特征检测, 对该菌株进行了分类鉴定及表型特征分析。同时, 采用唯一碳源生长检测方法, 验证该菌能否以 DMSP 为唯一碳源生长。相关结果将有助于人们进一步认识该 DMSP 降解菌株的环境适应性, 以及该菌在北极海洋环境中的生态功能, 尤其是对它参与硫循环的认识。

1 材料与方法

1.1 菌种

菌株 DMSP-1 系由本课题组从 2010 年 7 月采

集的北极王湾 30m 水深海水、采用含 5mM DMSP 的寡营养海盐(Sigma)培养基, 经过 8℃避光培养 30 天后分离获得。现保藏在中国极地研究中心。

1.2 培养基

LB 培养基(美国 BD 公司)。

M9-碳源培养基: 5×M9 盐溶液($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 12.8 g, KH_2PO_4 3g, NaCl 0.5g, NH_4Cl 1g, 调 pH 值至 6.9~7.1, 再定容至 200 mL)40 mL, 1M MgSO_4 溶液 0.4 mL, 1M CaCl_2 溶液 0.02 mL, 3%NaCl 160 mL, 碳源(0.4%葡萄糖溶液, 或 10mM DMSP 溶液)。

不同碳源(母液): 分别为 20%葡萄糖溶液; 1M DMSP 溶液。

1.3 细菌分子鉴定

采用 TaKaRa MiniBEST 细菌基因组 DNA 抽提试剂盒抽提菌株 DMSP-1 的 DNA。采用通用细菌引物 27F 与 1492R 扩增细菌 16S rRNA 基因序列^[24-25]。PCR 产物经纯化回收、连接、转化及阳性克隆筛选^[26], 克隆片段送上海生工生物工程有限公司测序。所得 16S rRNA 基因序列应用 EzTaxon 服务器(<http://www.eztaxon.org>)进行比对以确定与菌株 DMSP-1 亲缘关系最近的模式菌株, 再利用 BLAST 工具在 NCBI 数据库(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)中进行同源性匹配以获取亲缘序列, 最后选择同属、不同种的模式菌的 16S rRNA 基因、采用 MEGA 5.05(<https://www.megasoftware.net>)基于邻接法进行系统发育分析并构建系统发育树, 确定细菌 DMSP-1 在属水平上的分类学位置。

1.4 基因组测序及比对

利用 Illumina Miseq 测序平台以及 PacBio RS II 三代测序平台对该菌进行全基因组测序, 相关测序工作委托上海派森诺生物科技股份有限公司实施。获得的基因组大小为 6.28Mb, G+C 含量为 60.01 mol%, 编码基因区占整个基因组 86.97%, 测序深度为 583×。基于平均核苷酸一致性(Average Nucleotide Identity, ANI)计算器(<http://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/#anib>)比较细菌 DMSP-1 基因组与同属亲缘模式菌基因组的平均核苷酸一致性(ANIB), 从而确定该菌在种水平上的分类学地位。通常 ANIB 值高于 95%时可判定为同一个种^[27]。

1.5 菌落及细胞形态

菌株 DMSP-1 于 LB 平板上在 15℃ 下培养 3 d 后,观察平板上的菌落形态,记录菌落的颜色、透明度、边缘情况及表面情况。

细菌于 2 mL LB 液体培养基中在 15℃ 下培养 36 h 后,送广东省微生物研究所进行透射电镜细胞观测。负染主要步骤为:吸取样品滴于铜网上,3 min 后用滤纸从铜网边缘吸去多余的液体;滴加 3% 磷钨酸(pH7.0)于铜网上,3 min 后用滤纸从铜网边缘吸去多余染液;滴加纯水于铜网上,再用滤纸从铜网边缘吸取多余水,待干后即可用于电镜观察。所用透射电镜为 Hitachi H-7650。

1.6 生理生化特征检测

1.6.1 适宜生长温度及最高生长温度

将 50 μ L 新鲜的 DMSP-1 菌液涂布于 LB 平板上,分别置于 5、15、25、35、36、37、38、39 和 40℃ 下培养 24 h 后,观察菌落生长情况;再将 5 μ L DMSP-1 菌液接种于 5 mL LB 培养基中,分别于 15、25 和 35℃ 下培养 48 h(每隔 12 h 测定菌悬液 OD₅₄₀ 值),了解该菌的适宜生长温度范围及最高生长温度。然后将 8 μ L DMSP-1 菌液接种于 800 μ L LB 培养基中,分别置于 18~35℃(间隔 1℃)培养 24 h 后,于波长 540 nm 处测定菌悬液浓度以检测菌株生长状况,从而确定菌株的最适生长温度。

1.6.2 适宜生长盐度及最高生长盐度

将 5 μ L 新鲜 DMSP-1 菌液分别加入到含不同 NaCl 浓度(0~10%)的 5 mL LB 液体培养基中,在 25℃ 摇床中培养,每日观察其生长状况,并在波长 540 nm 处测定菌悬液浓度。

1.6.3 DMSP 利用生长实验

将 8 μ L DMSP-1 菌液接种于 800 μ L 以 DMSP 为碳源的 M9 培养基中,于 25℃ 混匀器中培养,每日检测其生长状况,检测该菌是否能以 DMSP 为碳源进行生长。同时,以含葡萄糖为碳源的 M9 培养基作为对照。

1.6.4 生理生化

分别采用 API 20NE、API 20E 和 API ZYM 试剂条(法国梅里埃公司)对 DMSP-1 进行生理生化检测。培养温度为 25℃,培养时间为 48 h。具体操作按试剂条说明书进行。

1.7 基因登录号

菌株 DMSP-1 在 GenBank 的 16S rRNA 基因序列登录号为 KU233521,基因组登录号为 CP034425。

2 结果

2.1 菌株 DMSP-1 的分类鉴定

获得的菌株 DMSP-1 的 16S rRNA 基因片段长度为 1498bp,与模式菌 *Pseudomonas lactis* WS 4992^T 的序列同源性达 99.72%。通过与假单胞菌属已知模式菌的系统发育比对分析(图 1),可以确定菌株 DMSP-1 属于假单胞菌属。

进一步比较菌株 DMSP-1 的基因组与模式菌 *Pseudomonas lactis* WS 4992^T 的 ANI_b 值,发现该值为 95.66%(大于 95% 的阈值),因此可将菌株 DMSP-1 鉴定为乳酸假单胞菌(*Pseudomonas lactis*)。此外,菌株 DMSP-1 的 G+C 含量与模式菌 *P. lactis* WS 4992^T (60.0 mol%^[28])也是一致的。

2.2 菌株 DMSP-1 的菌落及细胞形态

在 LB 平板上培养,菌株 DMSP-1 的菌落呈圆形,湿润有光泽,边缘平整,表面光滑并呈米黄色(图 2)。透射电镜相片(图 3)显示,该菌的细胞呈杆状,无芽孢,有极性鞭毛。

2.3 菌株 DMSP-1 的生长特征

2.3.1 生长温度及生长盐度

平板培养结果显示,该菌在 5℃ 培养 6 d,有明显肉眼可见的细小菌落生成;在 15℃ 培养 2 d,即有明显细小菌落生成;在 25℃、35℃ 培养仅 1 d,即可生成密集菌落,且菌落形态较大(但在 35℃ 中长出的菌落要小于 25℃ 中的)。液体培养结果也显示,菌株 DMSP-1 在 25℃ 时生长情况优于 35℃ 时(图 4、图 5);当培养温度达到或超过 39℃,菌株 DMSP-1 无法生长。但将培养平板重新置于 25℃ 环境中,菌株可恢复生长,但长出的菌落细小,这说明超过菌株最高生长温度的高温会抑制该菌的生长、并可能对菌株造成一定程度的损伤。液体培养结果表明(图 5),菌株 DMSP-1 在 22~29℃ 的温度范围内生长最为适宜(OD₅₄₀ 吸光度值均高于 0.68)。菌株 DMSP-1 能在 5℃ 低温条件下较快生长,最适生长温度超过 15℃、但最高生长温度低于 40℃,参考 Morita^[29]及 Jay^[30]对于耐冷菌(psychrotolerant bacteria)的定义,可以将菌株 DMSP-1 划归为耐冷菌范畴。

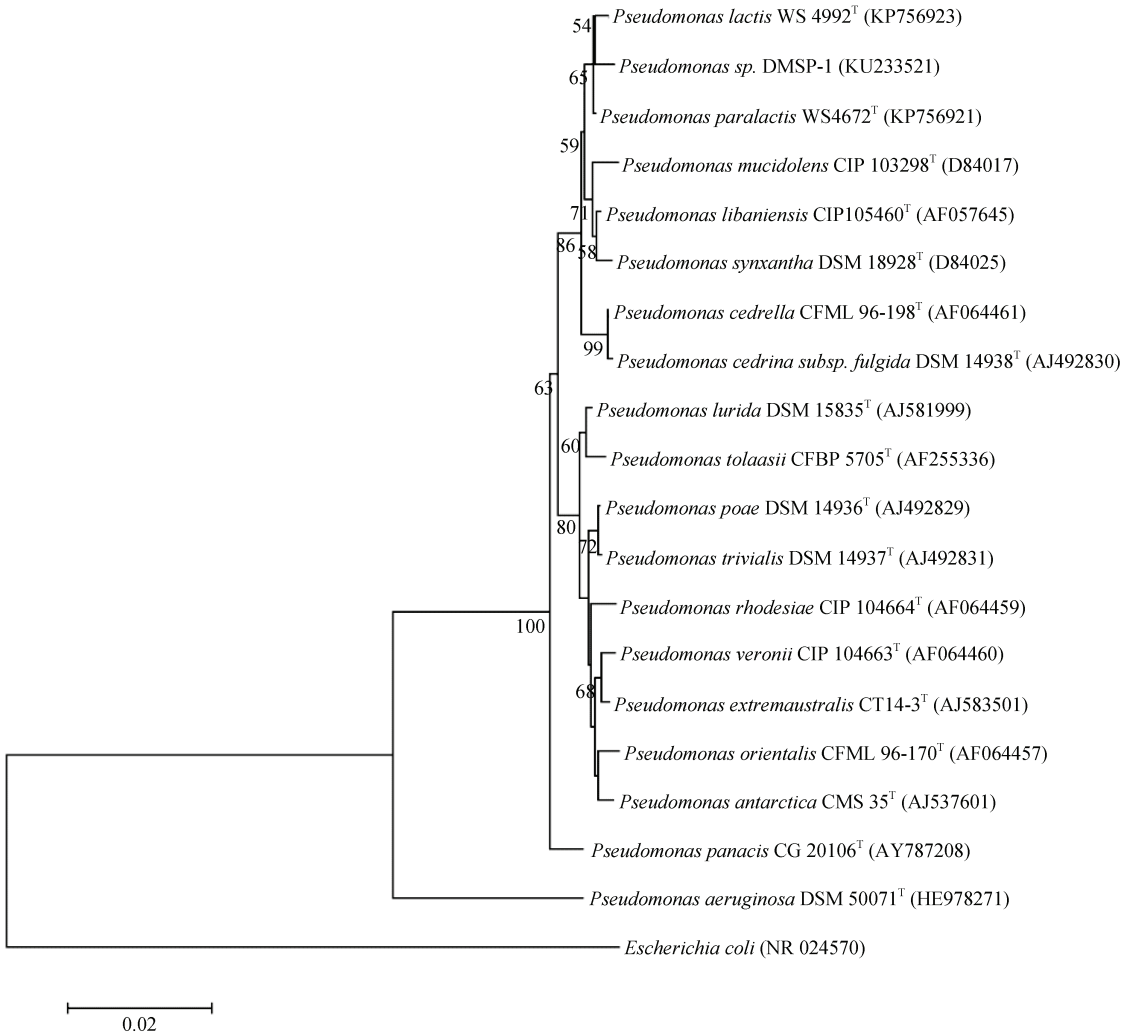


图 1 基于 16S rRNA 基因的菌株 DMSP-1 的系统发育树. 分支节点处仅显示 $\geq 50\%$ 的自展值; 以 *Escherichia coli* 模式菌作为输出对照; 刻度条表示每个位点 0.02 核苷酸替换

Fig.1. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the phylogenetic position of strain DMSP-1 among *Pseudomonas* type strains. Bootstrap values of $\geq 50\%$ are shown at branch nodes; *Escherichia coli* type strain is used as outgroup; Bar, 0.02 nucleotide substitutions per site

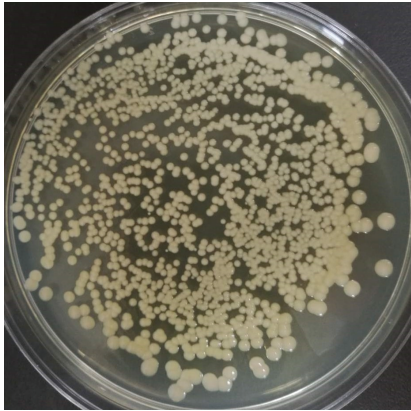


图 2 菌株 DMSP-1 在 LB 平板上的菌落照片
Fig.2. Colonies of strain DMSP-1 growing on LB agar plate



图 3 菌株 DMSP-1 的负染细胞透射电镜照片
Fig.3. Transmission electron micrograph of negatively stained cells of strain DMSP-1

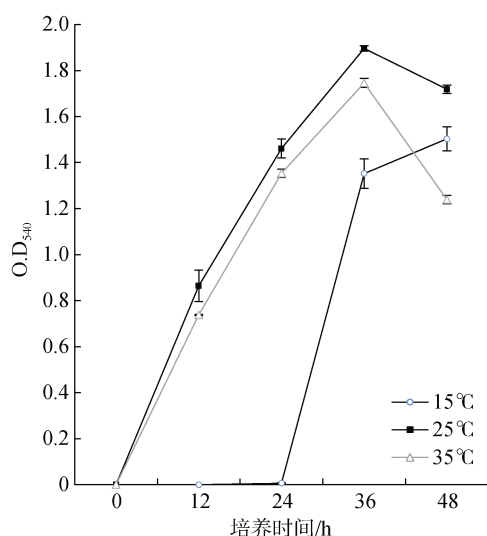


图4 菌株 DMSP-1 在不同温度下培养 48 h 的生长情况
Fig.4. Growth of strain DMSP-1 under different temperatures for 48 h

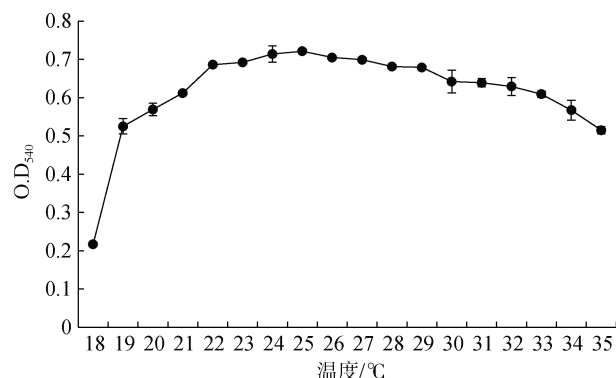


图5 菌株 DMSP-1 在不同温度下培养 24 h 的生长情况
Fig.5. Growth of strain DMSP-1 under different temperatures for 24 h

盐度实验显示, 该菌在 0~4% NaCl 条件下培养 1 d 即可生成浑浊菌液(OD_{540} 大于 1.0), 表明这一盐度范围适合菌体的生长(图 6)。最适生长盐度为 1% NaCl。在 5%~6% NaCl 中培养 2 d, 该菌也可生成浑浊菌液; 而在 7%、8% NaCl 中分别培养 3 d、5 d 后才可生成肉眼可见的明显菌液; 在盐度达到或超过 9% NaCl 时, 该菌无法生长(培养 7 d)。这表明 DMSP-1 在高盐浓度下有一个逐渐适应环境后再生长的过程, 但当盐度条件超过其自身调节适应能力, 该菌则无法生长。根据该菌耐受一定浓度的盐、但生长不依赖于盐的特性, 可以将该菌归为耐盐菌, 表明其能较好地适应淡水及海洋水生环境。

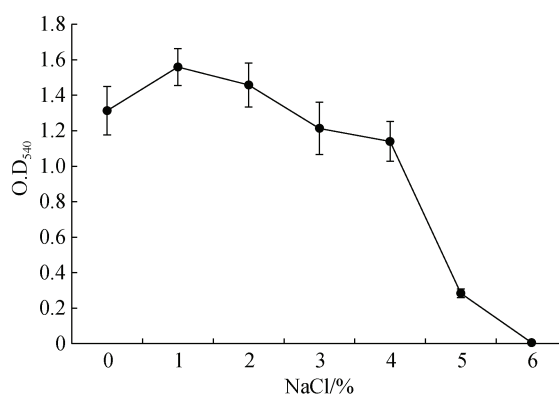


图6 菌株 DMSP-1 在不同盐度下培养 24 h 的生长情况
Fig.6. Cell growth of strain DMSP-1 in different sodium chloride concentration for 24 h

2.3.2 DMSP 利用生长实验

结果显示, 培养 1 d 后, 即可观测到 DMSP-1 在以葡萄糖作为碳源的 M9 培养基中有明显生长现象(图 7); 而在以 DMSP 为碳源的 M9 培养基中培养 4 d 后才有肉眼可见的生长现象。这一方面表明该菌以葡萄糖为碳源的生长状况明显优于以 DMSP 为碳源, 另一方面也证实该菌的确能够利用 DMSP 作为碳源进行生长。

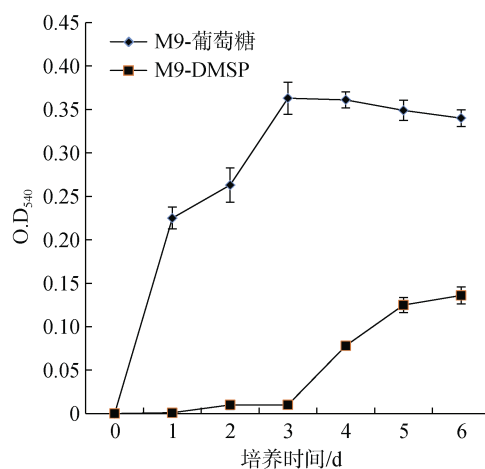


图7 菌株 DMSP-1 的碳源利用生长情况
Fig.7. Cell growth of strain DMSP-1 based on different carbon source

2.4 菌株 DMSP-1 的生理生化特征

革兰氏试纸片检测结果显示, 菌株 DMSP-1 为革兰氏阴性菌。基于 API 20E、20NE 及 ZYM 试剂条的分析结果显示, 该菌 β -葡萄糖苷酶、碱性磷酸盐酶、酯酶(C4), 类脂酯酶(C8)、白氨酸芳

胺酶、缬氨酸芳胺酶、胱氨酸芳胺酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和酸性磷酸酶为阳性,类脂酶(C14)、萘酚-AS-BI-磷酸水解酶呈微弱阳性,可同化癸酸、苹果酸和柠檬酸。该菌的许多生理生化特征与同种模式菌 *P. lactis* WS 4992^T 是相似或一致的(表 1),例如,氧化酶、过氧化氢酶、明胶酶、精氨酸双水解酶为阳性,β-半乳糖苷酶、赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶、吲哚反应、硝酸盐/亚硝酸

盐还原反应为阴性,都不产 H₂S。此外,菌株 DMSP-1 与 *P. lactis* WS 4992^T 在细胞形态、生长温度及盐度、以及基因型等方面也存在不少相近之处(表 1)。但同时,两者之间也存在一些差异,如菌株 DMSP-1 的脲酶、色氨酸脱氨酶为阳性,VP(Voges-Proskauer)反应也为阳性,而 *P. lactis* WS 4992^T 均呈阴性;菌株 DMSP-1 不能利用鼠李糖产酸,而 *P. lactis* WS 4992^T 则相反。

表 1 菌株 DMSP-1 与模式菌 *Pseudomonas lactis* WS 4992^T 的表型及基因型特征比较
Table 2. Comparison of phenotypic and genotypic characteristics between strain DMSP-1 and type strain *Pseudomonas lactis* WS 4992^T

特征	DMSP-1	<i>P. lactis</i> WS 4992 ^{T*}
表型特征		
细胞形态	杆状	杆状
可生长的NaCl范围(%)	0~8	0~6
最适生长NaCl浓度(%)	0~4	0~1
最高生长温度(℃)	38	35
最适生长温度(℃)	25~35	27~31
革兰氏染色	阴性	阴性
内生孢子	无	无
氧化酶、过氧化氢酶、明胶酶、精氨酸双水解酶	+	+
β-半乳糖苷酶、赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶	-	-
吲哚反应	-	-
硝酸盐/亚硝酸盐还原	-	-
产H ₂ S	-	-
VP(Voges-Proskauer)反应	+	-
脲酶、色氨酸脱氨酶	+	-
碳源利用: 葡萄糖、阿拉伯糖、甘露糖、甘露醇、N-乙酰-葡萄糖胺、葡萄糖酸钾	+	+
碳源利用: 麦芽糖	-	-
利用阿拉伯糖、葡萄糖、肌醇、甘露醇、山梨醇、密二糖、蔗糖产酸	+	+
利用鼠李糖产酸	-	+
基因型特征		
基因组大小(Mb)	6.28	6.73
DNA G+C含量(mol%)	60	60
基因数量	5922	6038
编码基因数量	5510	5811

*: 数据来自文献[28]; +: 阳性结果; -: 阴性结果。

3 讨论

位于北极斯匹次卑尔根群岛上新奥尔松地区的王湾(79°N, 12°E)及其邻近海域,是北冰洋水团和大西洋水团的交汇区,受极地海冰、大西洋

暖水团和北极冷水团的多重影响^[31]。王湾具有典型的北极峡湾生境,海湾深度从湾外向湾内逐渐变浅,从湾外的 360 m 逐渐减少到湾内的大约 60 m。湾内水文状况和季节变化较为复杂^[32- 33]。北大西洋海流的一个分支——西斯匹次卑尔根海流为该地区的沿岸带来了高温、高盐的海水(温度高于 3℃,盐

度高于 34.9 PSU),大西洋和北极水团在陆架区内的交换导致了王湾水温和盐度的变化;同时湾内海冰的形成和消融、以及夏季大量冰川融水的注入均影响着湾内的水文状况。本研究中分离到的菌株 DMSP-1,具有较宽的生长温度(最高生长温度 38℃)及生长盐度(0~8% NaCl)范围,反映出该菌能很好地适应王湾复杂多变的温度与盐度环境,从而能发挥出一定的生态学作用。

假单胞菌属(*Pseudomonas*)成员众多,据2015年8月原核生物名录(List of prokaryotic names with standing in nomenclature, LPSN)公布,该属包括223个种和18个亚种,还有数10个种待确认^[34]。假单胞菌广泛存在于土壤、淡水、河海水等环境中,多数假单胞菌的分布是全球性的。他们生化能力活泼,其活性在有机物质矿化方面具有重要的意义。绝大多数假单胞菌,营养要求低,代谢类型多,在一个简单的有机化合物作为唯一碳源和能源的无机培养基中就能生长,从而使该类菌能够适应不同的环境^[35]。所有的假单胞菌在中性和碱性的环境(pH为7.0~8.5)中都可生长,大多数不能在pH为6及以下的环境中生长,海生种还需要至少1% NaCl才生长,这反映出它们需要特殊的钠或渗透压,或两者都需要^[36]。淡水或土壤种则没有明确的离子和渗透压的需要^[36]。本研究中的菌株DMSP-1在0~4% NaCl条件下生长迅速、并且能够耐受8% NaCl的盐度,由此推测,该菌可能来源于陆生环境,但能够很好地适应海洋环境。通过表型(如细胞形态、生理生化特征)、基因型(如16S rRNA基因、G+C含量)以及基因组ANI值比较,菌株DMSP-1被鉴定为乳酸假单胞菌(*Pseudomonas lactis*)。该菌与乳酸假单胞菌模式菌WS4992^T在细胞形态、菌落形态、生理生化特征、G+C含量、以及基因组等方面具有大量的相似之处(表1),但DMSP-1比模式菌WS4992^T更耐盐、生长上限温度也更高。乳酸假单胞菌WS4992^T分离自牛生乳,能在0~6% NaCl环境中生长,最高生长温度为35℃^[28]。这些结果也支持了关于菌株DMSP-1来源于陆生环境的推测。同样是来源于低温海洋环境,王志娟等^[37]报道了从南极磷虾虾肉分离到一株产低温淀粉酶的乳酸假单胞菌,但由于该菌株的鉴定过程缺乏与亲缘模式菌的DNA杂交值或基因组ANI值,因

此尚不能断定该菌株确为乳酸假单胞菌。鉴于菌株DMSP-1分离自北极峡湾海水,具有耐冷、耐盐特性,而与该菌同种的模式菌WS4992^T分离自牛乳、生长不耐盐,因此菌株DMSP-1对于研究乳酸假单胞菌的生物地理分布、系统发育进化、环境适应性等无疑将会是一个有意思的材料。

通过对与珊瑚有关的细菌的研究,Raina等^[38]推断出绝大多数DMSP降解细菌属于以假单胞菌等为代表的 γ -变形细菌,其中的假单胞菌属成员含有DMSP代谢基因。赵丽军^[39]采用以DMSP为唯一碳源的培养基,从东海和黄海海水中分离到假单胞菌。同样以DMSP为唯一碳源,Curson等^[40]从大西洋鲱鱼肠道中分离到假单胞菌,发现它们具有*dddD*基因并且能将DMSP分解产生DMS。基于宏基因组方法对黄海、渤海沉积物的研究显示,DMSP裂解酶DddP是以假单胞菌和中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium*)为主^[41]。这些研究结果表明,假单胞菌属成员在海洋环境中DMSP的分解代谢中发挥着作用。

Archer等^[42]在王湾开展的研究结果显示,水体酸化可导致以*Heterocapsa rotundata*为代表的甲藻在内的浮游植物丰度升高,从而导致DMSP产量的升高。但DMS的释放并未有明显增加,这可能一部分归因于细菌生物量的升高从而需要更多的含硫蛋白用于自身合成并促使更多的DMSP进入脱甲基途径^[42]。在热带及温带水域的研究表明,当硫需求得到满足后,细菌对DMSP的代谢才会从脱甲基向裂解途径转换^[43-44]。本课题组在王湾夏季的研究结果显示,该水域脱甲基酶基因*dmdA*的丰度高于裂解酶基因*dddP*的丰度,表明该水域DMSP的分解代谢可能主要与脱甲基途径有关^[22,45]。课题组在分离自王湾海水的假单胞菌中检测到*dmdA*基因片段^[46],表明该属细菌可能通过脱甲基途径参与了王湾水域DMSP的分解代谢。而在本研究中的菌株DMSP-1中,并未检测到*dmdA*基因。虽然前期在菌株DMSP-1中检测到*dddP*基因^[22],但在后续研究中却未能再扩增到该基因,在基因组中也未找到该基因片段。原因不详。此外,课题组在该菌基因组中也未比对到任何与目前已知DMSP降解途径的各个酶基因相关的序列。而在本文中,碳源生长实验证实菌株DMSP-1的确能够以DMSP作为唯一碳源进行

生长。因此, 对于该菌是否具有新型 DMSP 降解酶类值得开展进一步的深入研究工作, 例如可考虑将基因组与转录组分析结合以寻找该菌株参与

DMSP 分解代谢的相关酶基因。相关工作无疑将进一步增进人们对于假单胞菌参与北极海洋生态系统中硫循环的认识。

参考文献

- 1 STEFELS J. Physiological aspects of the production and conversion of DMSP in marine algae and higher plants[J]. *Journal of Sea Research*, 2000, 43(3/4): 183-197.
- 2 BULLOCK H A, LUO H W, WHITMAN W B. Evolution of dimethylsulfoniopropionate metabolism in marine phytoplankton and bacteria[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8:637. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00637.
- 3 KSIONZEK K B, LECHTENFELD O J, MCCALLISTER S L, et al. Dissolved organic sulfur in the ocean: Biogeochemistry of a petagram inventory[J]. *Science*, 2016, 354(6311): 456-459.
- 4 CURSON A R, LIU J, BERMEJO MARTÍNEZ A, et al. Dimethylsulfoniopropionate biosynthesis in marine bacteria and identification of the key gene in this process[J]. *Nature Microbiology*, 2017, 2:17009. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2017.9..
- 5 李立, 汪鹏, 彭梦珺, 等. 海洋二甲基硫产生菌及其功能基因研究进展[J]. *华中农业大学学报*, 2013, 32(5): 20-28.
- 6 KIENE R P, LINN L J, GONZÁLEZ J, et al. Dimethylsulfoniopropionate and methanethiol are important precursors of methionine and protein-sulfur in marine bacterioplankton[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(10): 4549-4558.
- 7 REISCH C R, STOUDEMAYER M J, VARALJAY V A, et al. Novel pathway for assimilation of dimethylsulphoniopropionate widespread in marine bacteria[J]. *Nature*, 2011, 473(7346): 208-211.
- 8 STEFELS J, VAN BOEKEL W. Production of DMS from dissolved DMSP in axenic cultures of the marine phytoplankton species *Phaeocystis* sp[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 1993, 97(1): 11-18.
- 9 YOCH D C. Dimethylsulfoniopropionate: Its sources, role in the marine food web, and biological degradation to dimethylsulfide[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(12): 5804-5815.
- 10 KIENE R P, LINN L J, BRUTON J A. New and important roles for DMSP in marine microbial communities[J]. *Journal of Sea Research*, 2000, 43(3/4): 209-224.
- 11 LOVELOCK J E, MAGGS R J, RASMUSSEN R A. Atmospheric dimethyl sulphide and the natural sulphur cycle[J]. *Nature*, 1972, 237(5356): 452-453.
- 12 ZHANG X H, LIU J, LIU J L, et al. Biogenic production of DMSP and its degradation to DMS—their roles in the global sulfur cycle[J]. *Science China(Life Sciences)*, 2019, 62(10):1296-1319.
- 13 CHARLSON R J, LOVELOCK J E, ANDREAE M O, et al. Oceanic phytoplankton, atmospheric sulphur, cloud albedo and climate[J]. *Nature*, 1987, 326(6114): 655-661.
- 14 KETTLE A J, ANDREAE M O. Flux of dimethylsulfide from the oceans: A comparison of updated data sets and flux models[J]. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 2000, 105(D22): 26793-26808.
- 15 TANDON K, LU C Y, CHIANG P W, et al. Comparative genomics: Dominant coral-bacterium *Endozoicomonas acroporae* metabolizes dimethylsulfoniopropionate (DMSP)[J]. *The ISME Journal*, 2020, 14(5): 1290-1303.
- 16 HILL R W, DACEY J W H. Metabolism of dimethylsulfoniopropionate (DMSP) by juvenile Atlantic menhaden *Brevoortia tyrannus*[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2006, 322(1): 239-248.
- 17 曹海岩. 海洋细菌中参与二甲基巯基丙酸内盐代谢产物丙烯酰辅酶A和二甲基硫代谢关键酶的结构与催化机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2019.
- 18 SUN J, TODD J D, THRASH J C, et al. The abundant marine bacterium *Pelagibacter* simultaneously catabolizes dimethylsulfoniopropionate to the gases dimethyl sulfide and methanethiol[J]. *Nature Microbiology*, 2016, 1(8):16065. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2016.65.
- 19 JOHNSTON A W, GREEN R T, TODD J D. Enzymatic breakage of dimethylsulfoniopropionate – a signature molecule for life at sea[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2016, 31: 58-65.
- 20 YANG G P, LI C X, SUN J. Influence of salinity and nitrogen content on production of dimethylsulfoniopropionate (DMSP) and dimethylsulfide (DMS) by *Skeletonema costatum*[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2011, 29(2): 378-386.
- 21 ZUBKOV M V, FUCHS B M, ARCHER S D, et al. Linking the composition of bacterioplankton to rapid turnover of dissolved dimethylsulphoniopropionate in an algal bloom in the North Sea[J]. *Environmental Microbiology*, 2001, 3(5): 304-311.

- 22 ZENG Y X, QIAO Z Y, YU Y, et al. Diversity of bacterial dimethylsulfoniopropionate degradation genes in surface seawater of Arctic Kongsfjorden[J]. Scientific Reports, 2016, 6:33031. DOI: 10.1038/srep33031.
- 23 乔宗赞. 南极近岸海域浮游细菌重要生态功能基因的多样性分析[D]. 厦门: 集美大学, 2014.
- 24 LUDWIG W. Nucleic acid techniques in bacterial systematics and identification[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 120(3): 225-236.
- 25 LAROCHE D, VÉZINA A F, LEVASSEUR M, et al. DMSP synthesis and exudation in phytoplankton: A modeling approach[J]. Marine Ecology Progress Series, 1999, 180: 37-49.
- 26 ZENG Y X, LIU W Q, LI H R, et al. Effect of restriction endonucleases on assessment of biodiversity of cultivable polar marine planktonic bacteria by amplified ribosomal DNA restriction analysis[J]. Extremophiles, 2007, 11(5): 685-692.
- 27 HAHNKE R L, MEIER-KOLTHOFF J P, GARCÍA-LÓPEZ M, et al. Corrigendum: Genome-based taxonomic classification of Bacteroidetes[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9(304):1-17.
- 28 VON NEUBECK M, HUPTAS C, GLÜCK C, et al. *Pseudomonas lactis* sp. nov. and *Pseudomonas paralactis* sp. nov., isolated from bovine raw milk[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2017, 67(6):1656-1664.
- 29 MORITA R Y. Psychrophilic bacteria[J]. Bacteriological Reviews, 1975, 39(2): 144-167.
- 30 JAY J M. The tentative recognition of psychrotrophic Gram-negative bacteria in 48 h by their surface growth at 10°C[J]. International Journal of Food Microbiology, 1987, 4(1): 25-32.
- 31 HOP H, PEARSON T, HEGSETH E N, et al. The marine ecosystem of Kongsfjorden, Svalbard[J]. Polar Research, 2002, 21(1):167-208.
- 32 SVENDSEN H, BESZCZYNSKA-MØLLER A, HAGEN J O, et al. The physical environment of Kongsfjorden-Krossfjorden, an Arctic fjord system in Svalbard[J]. Polar Research, 2002, 21(1): 133-166.
- 33 COTTIER F, TVERBERG V, INALL M, et al. Water mass modification in an Arctic fjord through cross-shelf exchange: The seasonal hydrography of Kongsfjorden, Svalbard[J]. Journal of Geophysical Research Oceans, 2005, 110(C12):1-18.
- 34 张力群, 张俊威. 假单胞菌产生的抗生素[J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(5): 750-756.
- 35 张伟琼, 聂明, 肖明. 荧光假单胞菌生防机理的研究进展[J]. 生物学杂志, 2007, 24(3): 9-11, 24.
- 36 布坎南, 吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册(第8版)[M]. 北京: 科学出版社, 1984:287.
- 37 王文娟, 刘志东, 宁喜斌. 南极磷虾产低温淀粉酶菌株的筛选、鉴定及酶学性质研究[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(19): 38-44.
- 38 RAINA J B, TAPIOLAS D, WILLIS B L, et al. Coral-associated bacteria and their role in the biogeochemical cycling of sulfur[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(11):3492-3501.
- 39 赵丽军. 东海和黄海海水中 DMSP 降解菌的分布、多样性和降解特性的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015.
- 40 CURSON A R, SULLIVAN M J, TODD J D, et al. Identification of genes for dimethyl sulfide production in bacteria in the gut of Atlantic Herring (*Clupea harengus*)[J]. The ISME Journal, 2010, 4(1): 144-146.
- 41 SONG D L, ZHANG Y H, LIU J, et al. Metagenomic insights into the cycling of dimethylsulfoniopropionate and related molecules in the eastern China marginal seas[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11:157. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00157.
- 42 ARCHER S D, KIMMANCE S A, STEPHENS J A, et al. Contrasting responses of DMS and DMSP to ocean acidification in Arctic waters[J]. Biogeosciences, 2013, 10(3): 1893-1908.
- 43 LUCE M, LEVASSEUR M, SCARRATT M G, et al. Distribution and microbial metabolism of dimethylsulfoniopropionate and dimethylsulfide during the 2007 Arctic ice minimum[J]. Journal of Geophysical Research: Oceans, 2011, 116: C00G06. DOI: 10.1029/2010JC006914.
- 44 MOTARD-CÔTÉ J, LEVASSEUR M, SCARRATT M G, et al. Distribution and metabolism of dimethylsulfoniopropionate (DMSP) and phylogenetic affiliation of DMSP-assimilating bacteria in northern Baffin Bay/Lancaster Sound[J]. Journal of Geophysical Research: Oceans, 2012, 117: C00G11. DOI: 10.1029/2011JC007330.
- 45 刘会军, 曾胤新, 陆志波, 等. 北极王湾夏季海水中 DMSP 降解基因的丰度及分布调查[J]. 极地研究, 2020, 32(1): 37-46.
- 46 ZENG Y X. Phylogenetic diversity of dimethylsulfoniopropionate-dependent demethylase gene *dmdA* in distantly related bacteria isolated from Arctic and Antarctic marine environments[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2019, 38(8): 64-71.

IDENTIFICATION AND PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF AN ARCTIC MARINE BACTERIUM GROWN ON DIMETHYLSULFONIOPROPIONATE

Zhang Yihe^{1,2}, Zeng Yinxin², Qu Jiangyong¹

(¹ School of Life Science, Yantai University, Yantai 264003, China;

² Polar Research Institute of China, Ministry of Natural Resources, Shanghai 200136, China)

Abstract

Dimethylsulfoniopropionate (DMSP) is a highly abundant sulfur-containing compound in marine environments. It is mainly produced by marine phytoplankton, and can act as a key nutrient for marine microorganisms. Strain DMSP-1 was isolated from Arctic seawater of Kongsfjorden using a selective growth medium. Based on the 16S rRNA gene sequence and genomic ANI (Average Nucleotide Identity) analyses, the bacterium was classified and identified as the species *Pseudomonas lactis*. The bacterial cells were rods with polar flagella. The strain was psychrotrophic (growing well between 22 and 29°C with an upper temperature limit at 38°C) and halotrophic (growing well between 0 and 4% NaCl with an upper salinity limit at 8% NaCl), indicating adaptation to the local habitat. A carbon source for growth experiment confirmed that strain DMSP-1 could grow with DMSP as the sole carbon source. The bacterium showed many genotypic characteristics similar to the type strain *Pseudomonas lactis* WS 4992^T. At the same time, in contrast with *P. lactis* WS 4992^T, strain DMSP-1 showed tryptophan deaminase and urease activity, and was unable to produce acid from rhamnose. Further research on *Pseudomonas* sp. DMSP-1 will provide deep insight into the mechanism of marine bacteria degrading DMSP and their ecological functions in the Arctic marine environment.

Keywords Arctic, Kongsfjorden, *Pseudomonas*, DMSP degradation