

降解 1,2,4-三氯苯的硝基还原假单胞菌 J5-1 的分离鉴定和邻苯二酚 1,2-双加氧酶基因的克隆

宋蕾, 王慧*, 姜健, 高静思, 施汉昌

(清华大学环境科学与工程系环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 北京 100084)

摘要: 从受氯苯污染的土壤中分离到 1 株以 1,2,4-三氯苯为唯一碳源生长的细菌, 命名为 J5-1. 根据其生理生化特征和 16S rDNA (GenBank Accession No. EF107515) 序列相似性分析, 将该菌株初步鉴定为硝基还原假单胞菌 (*Pseudomonas nitroreducens*). 当 1,2,4-三氯苯初始浓度为 400 mg/L 时, J5-1 对其最大降解率接近 90%; 当 1,2,4-三氯苯浓度初始为 20 mg/L 时, 降解效果最好. J5-1 对 1,2,4-TCB 的降解服从一级反应动力学. 从 J5-1 的基因组 DNA 中克隆到 CC120 的全长序列.

关键词: 硝基还原假单胞菌 J5-1; 1,2,4-三氯苯; 生物降解; 降解动力学; 氯代邻苯二酚 1,2-双加氧酶

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)08-1878-04

Isolation, Identification of 1, 2, 4-Trichlorobenzene-Degrading Strain *Pseudomonas nitroreducens* J5-1 and Cloning of Chlorocatechol 1,2-Dioxygenase Gene

SONG Lei, WANG Hui, JIANG Jian, GAO Jing-si, SHI Han-chang

(State Key Joint Laboratory of Environmental Simulation and Pollution Control, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: A bacterium capable of utilizing 1, 2, 4-trichlorobenzene as sole carbon source was isolated from the polluted soil sample. This bacterium was identified as *Pseudomonas nitroreducens* according to its physiological & biochemical analysis and its 16S rDNA sequence (GenBank Accession No. EF107515). When the initial concentration of 1,2,4-TCB is 400 mg/L, J5-1 can achieve a maximum degradation rate of 90%. When the initial concentration of 1,2,4-TCB is 20 mg/L, the effect of degradation is the best. Degradation of 1,2,4-TCB by strain J5-1 obeys the first order dynamics. The total gene of chlorocatechol 1,2-dioxygenase was cloned from genomic DNA of J5-1.

Key words: *Pseudomonas nitroreducens* strain J5-1; 1, 2, 4-trichlorobenzene; biodegradation; degradation dynamics; chlorocatechol 1, 2-dioxygenase

氯苯类化合物通常被认为是环境外来化合物, 由于自然界中的微生物缺乏相应的降解酶, 所以难以被微生物利用^[1]. 氯苯化合物中的 1,2,4-三氯苯 (1,2,4-TCB) 由于其氯原子取代数较多, 且由于氯原子在苯环上呈较对称的特殊结构, 其化学稳定性较强, 因此生物降解成为去除 1,2,4-TCB 的主要手段. 国外报道了一些 1,2,4-TCB 的降解菌^[2,3], 国内鲜见报道. 与笔者曾筛选到的 1 株 1,2,4-TCB 的降解菌 THSL-1^[4] 相比, J5-1 的降解效果更好.

双加氧酶是芳香族化合物及其衍生物降解途径中的关键酶, 具有底物多样性, 是大多数芳香族污染物的共同降解途径^[5,6]. 对于氯苯类化合物, 起关键作用的是氯代邻苯二酚 1,2-双加氧酶 (CC120). 目前已知的 CC120 中^[7~11], 只有 TcbC (*Pseudomonas* sp. P51) 是从 1,2,4-TCB 的降解菌中克隆得到的, 其他鲜见报道. 本研究从受 1,2,4-TCB 污染的土壤中, 筛选到 1 株 1,2,4-TCB 的高效降解菌, 进一步研究了该菌株的降解特性; 利用 PCR 方法, 从 J5-1 的基因

组 DNA 中克隆到关键基因 CC120.

1 材料与方法

1.1 试剂与培养基

1,2,4-三氯苯 (购自上海试剂厂), 分析纯.

培养基采用 LB 培养基和无机盐培养基. 无机盐培养基组分: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 7 g; KH_2PO_4 2 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g; 1 mL 微量元素溶液, 其主要成分: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 600 mg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 40 mg; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 200 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20 mg; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 20 mg; H_3BO_3 3 mg; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4 mg, 加水至 1 L, pH = 7.0.

1.2 菌种富集和分离纯化

土壤样品取自天津化工厂氯苯生产车间. 样品

收稿日期: 2006-09-08; 修订日期: 2006-10-26

基金项目: 国家重点基础研究发展规划 (973) 项目 (2004CB418506); 清华大学基础研究基金项目 (JC2003011)

作者简介: 宋蕾 (1978 ~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为环境微生物学和分子生物学, E-mail: L-song02@mails.tsinghua.edu.cn
* 通讯联系人, E-mail: wanghui@tsinghua.edu.cn

稀释后直接涂布于含有1,2,4-TCB的LB平板,30℃培养.待长出菌落后,挑取单菌落在含有高浓度底物的液体培养基中驯化,于30℃、150 r/min摇床振荡培养;经过4~5 d驯化后,取1~2 mL菌液涂布于以1,2,4-TCB为唯一碳源的无机盐平板,30℃恒温培养,再从平板中挑选生长较快,个体较大的单菌落接种到以1,2,4-TCB为唯一碳源的液体无机盐培养基中振荡培养;再涂布于无机盐平板,恒温培养,如此重复2次,挑取生长旺盛的单菌落进行多次平板划线分离,直至得到单一菌株.

1.3 细菌生长和氯离子浓度测定

细菌生长用 D_{600} 表示,用离子色谱测定氯离子浓度.在降解过程中,氯离子随着1,2,4-TCB的最终矿化而得到释放,1 mol 1,2,4-TCB相应释放3 mol氯离子.因此,可以通过测定氯离子来监测菌株J5-1对1,2,4-TCB的降解.

1.4 1,2,4-TCB浓度测定

采用与水样体积比为1:1的正己烷作为萃取剂,以2 500 r/min的速度振荡12 min,然后在10 000 r/min,4℃的条件下离心10 min.取上层液体进行气相色谱的测定.气相色谱型号为Agilent 6890N;气相色谱条件:Ni63-ECD 高效电子捕获检测器;毛细色谱柱,30 m×20 μm×0.25 μm;进样口温度为250℃;检测器温度为300℃;炉温为60℃,保留3 min,然后以10℃/min的升温速度升至180℃.

1.5 细菌基因组提取

采用CTAB法提取菌株J5-1的基因组DNA.

1.6 菌株鉴定

通过对菌株J5-1的16S rDNA克隆和序列分析进行菌种鉴定.用于16S rDNA扩增的PCR反应引物为16SF:5'-AGAGTT TGA TCC TGG CTC AG-3'和16SR:5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'.PCR反应体系(25 μL)为:10×Taq缓冲液2.5 μL,25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μL,25 mmol/L dNTPs 2 μL,模板1 μL,1 mmol/L引物各1 μL,5 U/μL Taq酶0.3 μL.PCR反应条件为:94℃预变性5 min,94℃变性1 min,46℃退火1 min,72℃延伸2 min,30个循环;72℃延伸10 min.PCR产物的纯化、连接、转化分别按Promega公司试剂盒的使用方法和文献[12]的方法进行.测序由诺赛基因公司完成,最后将测序结果与Genbank中的序列进行同源性比较.

1.7 CC120 基因的克隆

根据GenBank上已经发布的有关CC120基因的序列,选择其中与所研究底物和菌株性质比较接

近的序列进行比对,利用PrimerPremier5设计引物,Oligo6对引物进行评价.由于要扩增的目标片段GC含量较高,要一次扩增全长基因,很难设计出非常合适的引物,故先扩增部分CC120片段,所用引物为游F2:5'-at(c/t)ga(c/t)gt(g/c)tgga(c/t)tc(c/g)acgcc-3';下游R2:5'-cgc(c/g)a(c/t)(c/g)tga(c/t)(c/g)gc(a/c/g)gcctt-3'.扩增全长片段引物为上游F5:5'-cgcttccgagttggtgatg-3';下游R5:5'-ttgatggtctccgcgattc-3'.由于目标片段GC含量较高,所以特别选择含高GC buffer的LA Taq酶[Takara 宝生物工程(大连)有限公司].25 μL反应体系:2×GC缓冲液12.5 μL,dNTP 200 μmol/L,引物0.25 μmol/L,LA Taq 0.7 U,模板5 ng.反应条件95℃预变性5 min,94℃变性1 min,58℃退火1 min,温度梯度 $G=(58\pm8)^{\circ}\text{C}$,72℃延伸50 s,30个循环,72℃延伸7 min.

2 结果与讨论

2.1 菌种分离鉴定

经多次单菌落平板划线分离,得到1株以1,2,4-TCB为唯一碳源的菌株,命名为J5-1.PCR扩增该菌株的16S rDNA基因,克隆后进行测序与Genbank上的序列进行同源性比对.结果表明,J5-1与硝基还原假单胞菌(*Pseudomonas nitroreducens*)亲缘关系最近,同源性为100%.结合细菌的主要生理生化特征,革兰氏阴性,明胶不能液化,硝酸盐可以还原成亚硝酸盐,氧化酶阳性,不产硫化氢,不能淀粉水解.能够利用葡萄糖、葡萄糖酸盐、2-酮类葡萄糖酸盐、乙醇、琥珀酸盐、柠檬酸盐等碳源,不能利用水杨酸、安息香酸盐、龙胆酸盐和氨基苯甲酸盐.这些特征与*Pseudomonas nitroreducens*的模式株IAM1439一致,故将J5-1鉴定为硝基还原假单胞菌.

2.2 J5-1对1,2,4-TCB的降解

将20 μL甘油保存的J5-1菌液,接种到5 mL无菌LB培养基中.30℃、150 r/min振荡培养,培养时间为16~24 h.将扩大培养后的菌液分装到1.5 mL离心管中,14 000 r/min离心10 min,弃上清,用无菌无机盐培养基清洗1~2次后,将菌体转移到含有100 mL灭菌无机盐培养基的250 mL锥形瓶中,再加入40 μL 1,2,4-TCB,使其终浓度为400 mg/L.由图1看出,J5-1对1,2,4-TCB的降解从第3 d开始,第3~10 d降解率直线上升,最大降解率接近90%;菌株的生长和降解现象基本保持同步.

2.3 1,2,4-TCB初始浓度对J5-1降解1,2,4-TCB的影响

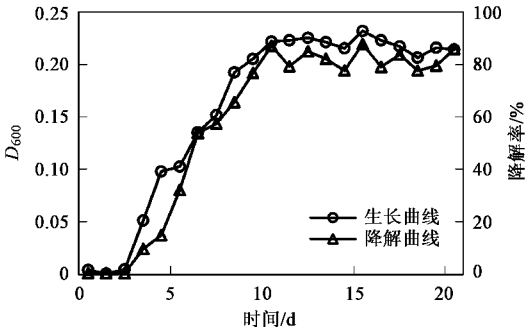


图1 菌株 J5-1 对1,2,4-TCB的降解

Fig.1 Degradation of 1,2,4-TCB by strain J5-1

在无机盐培养基中加入1,2,4-TCB,使终浓度分别为 0.2、1、4、20、100 和 400 mg/L. 于 30℃、150 r/min

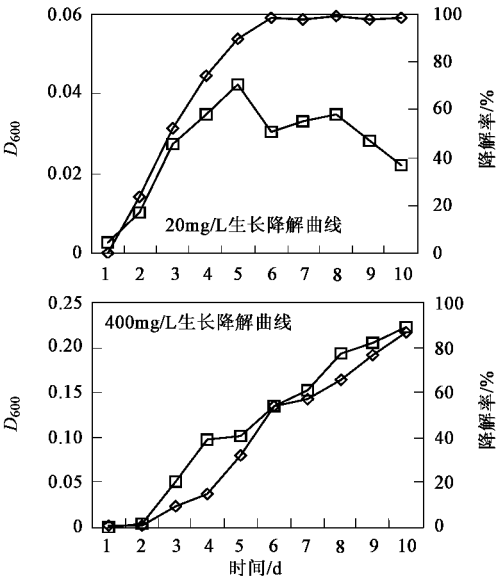
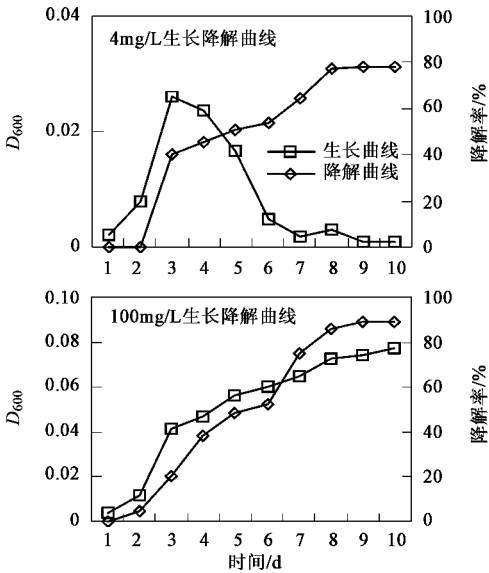


图2 菌株 J5-1 对不同浓度1,2,4-TCB的降解

Fig.2 Degradation of 1,2,4-TCB by strain J5-1 at different concentration of 1,2,4-TCB

2.4 菌株 J5-1 降解1,2,4-TCB的动力学研究

选择底物浓度分别为 4、20、100 和 400 mg/L 4 个浓度,对 J5-1 降解1,2,4-TCB的动力学进行研究. 试验方法如 2.2 节中所述. 根据初始浓度和终浓度计算出菌株在不同底物浓度下对1,2,4-TCB的平均降解速率,最后得出, J5-1 对1,2,4-TCB的平均降解速率与底物浓度有很好的线性关系,由此初步判断 J5-1 对1,2,4-TCB的降解服从一级反应动力学(表 1). 当底物浓度由 4 mg/L 上升到 400 mg/L 时, 1,2,4-TCB的降解速率常数逐渐增大,降解半衰期也逐渐缩短.

2.5 菌株 J5-1 中 CC120 基因的克隆及序列分析

以菌株 J5-1 基因组 DNA 为模板,选择 F2R2 为第 1 对引物扩增 CC120 部分片段,再以 F5R5 为第 2

恒温培养,定期取样(试验中每个浓度都有 2 个平行样,同时有空白对照),结果如图 2 所示. 在 0.2 mg/L和1 mg/L的底物浓度下, J5-1 没有生长现象. 随底物浓度的增加, J5-1 的迟滞期、生长期和平台期的时间都逐渐增长,最大光密度值逐渐增大. 当底物浓度由4 mg/L增加到 20 mg/L时,降解率逐渐升高;当底物浓度由 20 mg/L增加到 400 mg/L时,降解率又逐渐降低,即当底物浓度为 20 mg/L时,降解效果最好. 分析其原因可能是当底物浓度逐渐升高,但还没有达到对菌有抑制作用的浓度时,菌株对底物的降解率会随底物浓度的升高而提高. 当底物浓度从 20 mg/L上升到 400 mg/L时,底物毒性对菌体的抑制作用逐渐显现出来,表现为降解率的下降.

对引物扩增 CC120 全长片段(图 3). 将所得目的片段切胶回收,与 pGEMT-easy 载体连接,构建重组质粒进行测序.

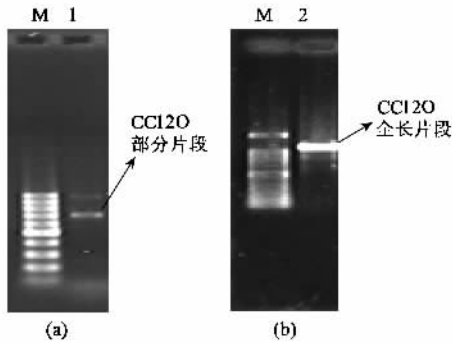
表 1 J5-1 不同底物浓度的降解动力学方程¹⁾

Table 1 Degradation dynamics equation of strain J5-1 under different substrate concentration

底物浓度/mg•L ⁻¹	降解动力学方程[$c = c_0 e^{(-kt + a)}$]
4	$c = c_0 e^{(-0.819t + 1.045)}$
20	$c = c_0 e^{(-0.872t + 1.578)}$
100	$c = c_0 e^{(-1.000t + 1.432)}$
400	$c = c_0 e^{(-1.090t + 1.000)}$

1) 方程中 k 代表速率常数

通过查找所得序列的开放读码框(ORF), 确定从 J5-1 基因组 DNA 中得到的 CC120 基因的核苷酸



(a)为 CC120 基因部分片段 PCR 结果;
(b)为 CC120 全长基因 PCR 结果

图 3 J5-1 中 CC120 基因的克隆

Fig.3 Cloning of CC120 gene in J5-1

序列全长为 747 bp.氨基酸序列全长为 248 个氨基酸.因为 J5-1 是以 1,2,4TCB 为唯一碳源生长的,所以将 J5-1 中的 CC120 基因暂时命名为 *tcbC*,登录号 EF108314.将 *tcbC* 基因的氨基酸序列与其他 CC120 基因进行同源性比对,分析它们之间的同源和差异.利用软件 MEGA3 构建基因进化树.由图 4 看出, *tcbC* 与 *mocpA*、*cbnA*、*tetC*、*tcbC* (来自 *Pseudomonas* sp. P51)在进化树中的位置比较接近,氨基酸序列也有较高的同源性,为 95% ~ 98%;而与 *tfdCII*、*clcA*、*tfdC* 的同源性比较低,范围在 56% ~ 67%.由此推断 *tcbC* 与 *mocpA*、*cbnA*、*tetC*、*tcbC* (P51)可能不同于传统的氯代邻苯二酚 1,2-加双氧酶 (*tfdC*、*clcA*).

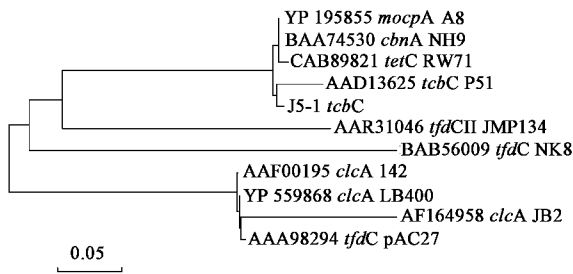


图 4 11 个 CC120 的基因进化树

Fig.4 Polygenetic tree of 11 CC120

3 结论

(1) 从受 1,2,4-TCB 污染的土壤中筛选到 1 株以 1,2,4-TCB 为唯一碳源的菌株.经过 16S rDNA 序列测定同时结合菌株的生理生化特征,初步鉴定为硝基还原假单胞菌 (*Pseudomonas nitroreducens*),命名为 J5-1.当底物浓度为 400 mg/L 时, J5-1 对 1,2,4-TCB 的最大降解率接近 90%.

(2) 随 1,24-TCB 初始浓度的增加, J5-1 的迟滞

期、生长期和平台期的时间都逐渐增长,最大光密度值逐渐增大.当底物浓度大于 20 mg/L 时,菌株的生长和降解基本同步,且随着底物浓度的升高同步性越好.当底物浓度为 20 mg/L 时,降解效果最好.

(3) J5-1 对 1,2,4-TCB 的降解服从一级反应动力学.当底物浓度由 4 mg/L 上升到 400 mg/L 时, 1,2,4-TCB 的降解速率常数逐渐增大,降解半衰期也逐渐缩短.

(4) 从 J5-1 基因组 DNA 中克隆得到的 CC120 基因的核苷酸序列全长为 747 bp,氨基酸序列全长为 248 个氨基酸,命名为 *tcbC*.根据 11 个 CC120 基因的进化树分析,得出 *tcbC* 与 *mocpA*、*cbnA*、*tetC*、*tcbC* (P51)可能不同于传统的氯代邻苯二酚 1,2-加双氧酶 (*tfdC*、*clcA*)

参考文献:

[1] 甘平,朱婷婷,樊耀波,等.氯苯类化合物的生物降解[J].环境污染治理技术与设备,2000,1(4):1~12.

[2] Van der Meer J R, Eggen R I, Zehnder A J, et al. Sequence analysis of the *Pseudomonas* sp. strain P51 *tcb* gene cluster, which encodes metabolism of chlorinated catechols: evidence for specialization of catechol 1,2-dioxygenases for chlorinated substrates [J]. J Bacteriol, 1991, 173 (8): 2425 ~ 2434.

[3] Peter S, Rolf M W, Peter F, et al. Degradation of 1,2,4-trichloro- and 1,2,4,5-tetrachlorobenzene by *Pseudomonas* strains [J]. Appl Environ Microbiol, 1991, 57(5): 1430 ~ 1440.

[4] 宋蕾,王慧,施汉昌,等.1,2,4-三氯苯降解菌的分离及其降解质粒的研究[J].中国环境科学,2005, 25(4): 385 ~ 388.

[5] Folosom B R, Chapmane P J, Pritchard P H. Phenol and trichloroethylene degradation by *Pseudomonas cepacia* G4: kinetics and interactions between substrates [J]. Appl Environ Microbiol, 1990, 56: 1279 ~ 1287.

[6] Guerin W F, Boyd S A. Maintenance and induction of naphthalene degradation activity in *Pseudomonas putida* and *Alcaligenes* sp. under different culture conditions [J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61(11): 4061 ~ 4068.

[7] Jencova V, Strnad H, Chodora Z, et al. Chlorocatechol catabolic enzymes from *Achromobacter xylosoxidans* A8 [J]. Int Biodeterior Biodegradation, 2004, 54 (2-3): 175 ~ 181.

[8] Potrawfke T, Armengaud J, Wittich R M. Chlorocatechols substituted at positions 4 and 5 are substrates of the broad-spectrum chlorocatechol 1,2-dioxygenase of *Pseudomonas chlororaphis* RW71 [J]. J Bacteriol, 2001, 183 (3): 997 ~ 1011.

[9] Hickey W J, Sabat G, Yuroff A S. Cloning, nucleotide sequencing, and functional analysis of a novel, mobile cluster of biodegradation genes from *Pseudomonas aeruginosa* strain JB2 [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67 (10): 4603 ~ 4609.

[10] Liu S, Ogawa N, Miyashita K. The chlorocatechol degradative genes, *tfdT*-CDEF, of *Burkholderia* sp. strain NK8 are involved in chlorobenzoate degradation and induced by chlorobenzoates and chlorocatechols [J]. Gene, 2001, 268 (1-2): 207 ~ 214.

[11] Trefault N, De la Iglesia R, Molina A M. Genetic organization of the catabolic plasmid pJP4 from *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) reveals mechanisms of adaptation to chloroaromatic pollutants and evolution of specialized chloroaromatic degradation pathways [J]. Environ Microbiol, 2004, 6 (7): 655 ~ 668.

[12] J 萨姆布鲁克, D W 拉塞尔.分子克隆实验指南[M].北京:科学出版社,2002.