

吡啶降解菌中质粒的功能探讨

柏耀辉, 孙庆华, 赵翠, 温东辉*, 唐孝炎

(北京大学环境科学与工程学院, 北京 100871)

摘要:为了探讨吡啶降解菌质粒的特性及其与降解的关系, 对降解吡啶的2株细菌 *Paracoccus* sp. BW001 及 *Shinella zoogloeoides* BC026 进行了质粒提取和脉冲电泳实验, 确定 BW001 含有2个190~245 kb的大质粒和1个4.5~5.0 kb的小质粒, 而 BC026 含有至少3个超过200 kb的大质粒. 通过高温-SDS法对含有质粒的2株菌进行质粒消除实验, 发现质粒消除后的细菌不再降解吡啶, 推测降解吡啶的基因可能存在于质粒上. 通过电转化将 *Paracoccus* sp. BW001 的质粒转入 *E. coli* 5 α 中, 发现转化后的菌株具有耐受吡啶的特性.

关键词: 吡啶; 生物降解; 质粒; 质粒消除; 质粒转化

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2010)07-1679-05

Study on the Function of Plasmid in Pyridine-Degrading Bacteria

BAI Yao-hui, SUN Qing-hua, ZHAO Cui, WEN Dong-hui, TANG Xiao-yan

(College of Environmental Sciences and Engineering, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: In order to identify the characteristics of the plasmids of degrading bacterial strains and the relationship between the plasmids' function and biodegradation, plasmids were isolated from two bacterial strains (*Paracoccus* sp. BW001 and *Shinella zoogloeoides* BC026) and pulse-field gel electrophoresis was used to identify the distribution of plasmids and their molecular size. Two large plasmids with 190-245 kb and one small plasmid with 4.5-5.0 kb were found in the BW001, and at least 3 large plasmids over 200 kb were harbored in the BC026. The plasmid curing was conducted by high temperature-SDS method and the results indicated the biodegradation genes might locate in the plasmids of two bacterial strains. After transforming the plasmids of BW001 into *E. coli* 5 α by electroporation, the new bacterial strain could tolerate pyridine.

Key words: pyridine; biodegradation; plasmid; plasmid curing; plasmid transformation

吡啶是一种典型的氮杂环芳烃, 吡啶及其衍生物广泛存在于煤焦油、石油、以及人工合成的工业溶剂中, 在焦化、制药等工业废水中含量较高^[1,2]. 由于吡啶及其衍生物具有较大的毒性作用及刺激性气味, 一旦释放便可能会对生态环境造成较大的危害^[3]. 生物法处理吡啶污染物被认为是一种经济、有效的方法^[4].

国内外对吡啶的微生物研究主要集中在2个方面: ①代谢途径. 对吡啶最主要的研究就是它的代谢途径, 学者们根据对不同细菌或真菌在不同外部条件下(好氧、厌氧)的实验研究, 提出了多种吡啶的微生物代谢途径^[5~8]. ②生物强化去除作用, 直接向废水处理系统中投加吡啶降解高效菌株或固定化这些菌株细胞来实现污染物的去除^[9~12].

近年来研究发现, 很多“异生物质”的降解基因都是在进化过程中通过细菌之间可移动遗传因子的水平基因转移所获得的^[13~16]. 质粒是其中研究得最多的可移动遗传因子, 质粒的接合作用可使抗性基因、降解基因在不同细菌之间转移, 从而赋予宿主菌新的代谢功能^[17~19]. 现在有些学者提出可以利用质

粒转移, 强化污染环境的生物治理及修复^[20~23]. 因此, 本研究的目的是判别细菌降解基因是位于质粒还是位于染色体, 并进一步解释吡啶的降解是否与质粒有关, 一旦阐明了这些问题, 将会对吡啶的微生物降解机制有更为深刻的认识, 以期构建降解吡啶的基因工程菌提供了理论依据.

1 材料与方法

1.1 菌株

本研究所使用的菌株为焦化废水处理系统的活性污泥中分离、筛选出来的2株吡啶降解菌: *Paracoccus* sp. BW001^[24] 及 *Shinella zoogloeoides* BC026^[25].

1.2 质粒提取

本研究采用2种裂解法. 方法一是对《分子克隆》及《QIAGEN Plasmid Purification Handbook》中的

收稿日期: 2009-09-21; 修订日期: 2009-11-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(50878001)

作者简介: 柏耀辉(1977~), 男, 博士, 主要研究方向为水污染控制及环境生物技术, E-mail: baiyh@pku.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: dhwen@pku.edu.cn

碱裂解法提取及纯化质粒方法进行修改、整合。方法二是 Kado^[26] 和 Top^[27] 等的方法,这种方法相对简单、方便,同时能有效抑制染色体的污染,但质粒提取量相对较少。

1.3 脉冲电泳测定质粒大小

取 200 mL LB^[28] 培养后的菌液,以方法一进行质粒提取,最终用 TE 溶液定容至 100 μ L。脉冲电泳仪使用 Bio-Rad CHEF MAPPERTM XA。脉冲条件为:1% 琼脂糖 (Certified megabase agarose, Bio-Rad),角度为 120°,电压为 6 V/cm,电泳缓冲液为 0.5 $\times$ TBE,温度为 14°C。电泳结束后取出胶,用 SYBR Gold (Invitrogen, 美国) 染色 30 min,在紫外透射仪 (UVP GDS 8000, 美国) 上成像。根据 NEB MidRange I PFG Marker 的大小,在软件 UVP VisionWorksLS 软件上计算出质粒的大小。

1.4 质粒消除

质粒消除采用高温-SDS 法^[29]。将带有质粒的降解菌用 LB 培养基培养至对数期,取 0.1 mL 的菌液转移至 25 mL 含一定量的 10% (g/mL) SDS 的 LB 液体培养基。不同菌质粒消除所需 SDS 的量不尽相同,经过一系列实验,确定 BW001 需 40 μ L 10% 的 SDS,BC026 需 60 μ L。将加入 SDS 及菌液的 LB 培养基在 35°C、200 r/min 下振荡过夜培养,将 0.1 mL 菌液涂布在 SDS 固体培养基 (浓度与液体相同),经多次转接 (3~6 次),挑单克隆培养,提取质粒确定是否将其消除,同时将消除后的菌液转移至液体吡啶无机盐培养基 (MSM)^[25] 中,通过考察菌体的生长状况及吡啶降解情况来确定质粒的功能。

1.5 质粒转化

本研究采用电转化来进行质粒转化实验。感受态细胞为 *E. coli* 5 α (Takara), *E. coli* JM109 (Takara)。电转化的具体操作步骤如下:

(1) 从平板上挑单克隆的 BW001 及 BC026 于 25 mL LB 培养基中,在 30°C、200 r/min 下振荡培养,待生长到对数期时,分别取 0.1 mL 菌液再转接于新鲜的灭菌 LB 培养基,振荡培养至对数期 ($3 \times 10^9 \sim 4 \times 10^9$ 个/L),各取 200 mL 菌液,立即用 QIAGEN Plasmid Midi Kit 及 QIAGEN Large-Construct Kit 提取及纯化。

(2) 取 40 μ L 感受态细胞放入离心管中,与 0.2 cm 电击杯一并放入冰中冷却,在含有感受态细胞的离心管中加入 1~2 μ L 质粒 DNA,置于冰上 30~60 s,包括所有的阳性与阴性对照。

(3) 调节电转化仪 (Bio-Rad MicroPulser, 美

国),采用 EC2 模式,电压为 2.5 kV。

(4) 将感受态细胞与质粒 DNA 的混合物加至冷的电击杯中,轻击液体使细胞与 DNA 悬液位于电击杯底部,擦干电击杯,将电击杯放入电穿孔仪。启动电穿孔仪。电击后,将电击完的样品立即取出,放入冰中,立刻加入 1 mL SOC 培养液^[28]。在 30°C、150 r/min 下振荡 90 min,取 200 μ L 已转化的感受态细胞转移到含有 200 mg/L 吡啶的无机盐培养基上。在 30°C 生化培养箱中培养,定期检查生长状况。

2 结果与分析

2.1 质粒提取

通过方法一及方法二对 2 株菌的质粒进行了检测,结果表明这 2 种方法的检测结果一致。图 1 为方法一的质粒检测结果。

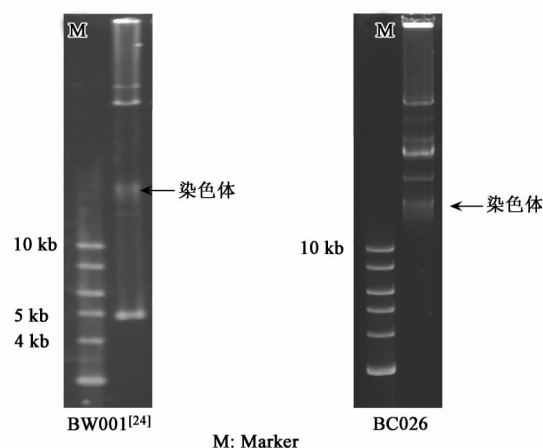


图 1 2 株菌的质粒提取结果

Fig. 1 Plasmid isolation from two bacterial strains

由于在质粒提取过程中,可能会由于机械剪切力的作用而导致大质粒发生断裂,产生螺旋、线性和开环结构,因此电泳胶含有多个条带的情况下有时很难判断是含有多个质粒,还是同一质粒的不同结构。通过 6 次以上的质粒提取结果,确定 BW001 含有 3 个质粒,分别是 2 个大质粒和 1 个小质粒。因大质粒超出了 Marker 的范围,故其大小在图中并不能准确辨别出。而小质粒通过与不同 Marker 的多次比对,确定其大小为 4.5~5.0 kb。而 BC026 确定至少含有 3 个大质粒。

2.2 脉冲电泳

本研究采用琼脂糖脉冲电泳来估计大质粒的大小。实验结果见图 2。由于提取过程中机械剪切力的作用,造成 BW001 质粒在脉冲电泳图上显示 4 条带。通过软件模拟计算结果显示: BW001 的 2 个大

质粒在 190 ~ 245 kb 之间, BC026 的质粒都在 200 kb 以上(有的已超出 Marker 的最大范围). 由于现有的相对分子质量较大的 Marker 基本上都为线性 DNA, 而超螺旋结构的质粒相对线性 DNA 而言, 在琼脂糖胶中的迁移速度要快, 因此脉冲电泳测得的质粒 DNA 长度可能比实际小. 要想较好地测定大片段质粒 DNA 的长度, 可以先将质粒抽提、纯化回收(对于多个质粒存在的情况, 需要切胶分别回收各质粒片段). 然后利用特定的工具酶使质粒线性化, 再进行脉冲电泳测定^[30]. 这种做法相对较为复杂, 不容易控制. 当然, 最精确的办法还是质粒直接测序^[31], 但是费用较为昂贵.

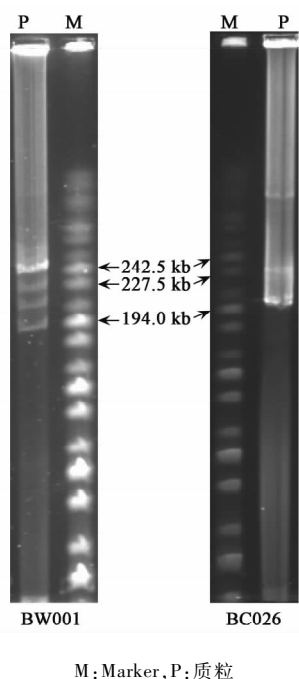


图 2 2 株菌质粒的脉冲电泳结果

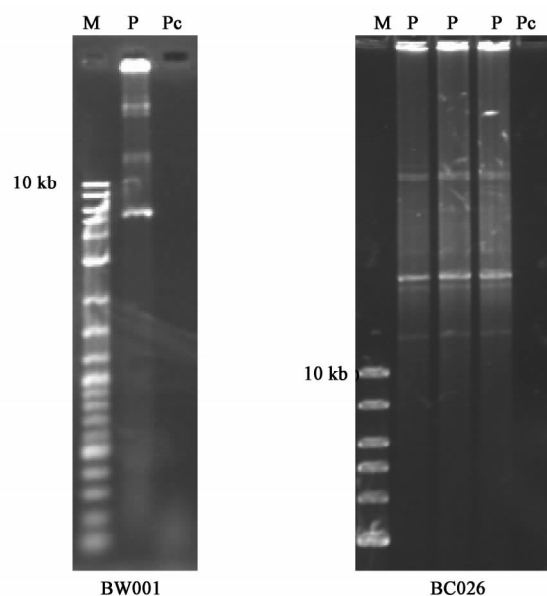
Fig. 2 Pulse-field gel electrophoresis results of two bacterial strains

2.3 质粒消除

2 株菌的质粒经过高温-SDS 的作用都能被有效去除, 见图 3(质粒提取采用方法二). BW001 和 BC026 经高温-SDS 作用, 且经过 3 次重复转接后, 便能得到质粒消除后的细菌. 在含有 200 ~ 500 mg/L 吡啶的液体培养基下培养(培养时间均大于 7 d), 发现质粒消除株没有生长, 同时吡啶的浓度也没有发生明显的变化(除去挥发外). 因此, 实验结果显示 BW001 及 BC026 的质粒可能共同或各自参与了吡啶的降解.

2.4 质粒转化

尽管不知道吡啶降解基因的相关信息, 但是质粒消除实验的结果意味着吡啶降解基因有可能在质



M: Marker, P: 消除前, Pc: 消除后

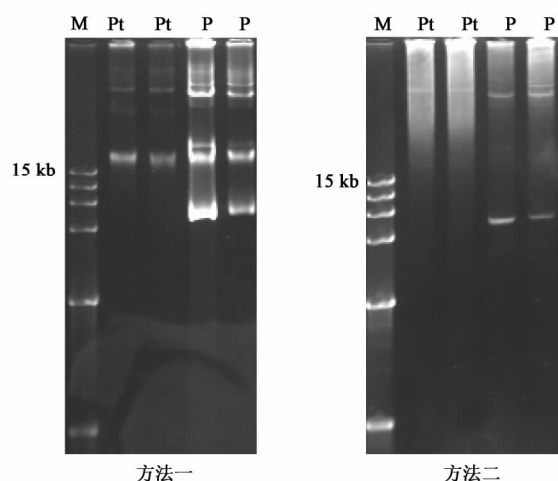
图 3 2 株菌质粒消除结果

Fig. 3 Plasmid curing results of two bacterial strains

粒上. 质粒转化实验可进一步确定降解基因的位置. 如果质粒成功转化且表达, 则直接证明降解基因编码在质粒上, 同时也为基因工程菌的构建提供了有用质粒和基因. 但是由于 BW001 及 BC026 的质粒都非常大, 很难将其转化到受体菌中. 即便可以进行质粒转化, 那么受体菌是否排斥外来质粒, 外来质粒能否在受体菌中进行复制表达等, 都影响到降解基因定位的准确判别.

实验结果表明, BW001 的质粒可能转化到 *E. coli* 5 α , 而其它的转化实验在受体菌中都提取不到质粒. BW001 的质粒转化到 *E. coli* 5 α 后, 形成的菌株能在含有 200 mg/L 吡啶的无机盐固体培养基下生长, 而阴性对照(未进行质粒转化的 *E. coli* 5 α)不能生长. 同时, 对转化后的 *E. coli* 5 α 的质粒进行了提取, 提取结果见图 4, 笔者用 2 种方法对转化前后 BW001 及 *E. coli* 5 α 的质粒同时进行了提取, 得到了相同的结果. 结果显示转化后的 *E. coli* 5 α 有一个大质粒, 与 BW001 的质粒相比, 片段大小介于 BW001 的 2 个大质粒之间, 估计在 200 kb 左右.

实验发现转化后的 *E. coli* 5 α 比较脆弱, 生长能力退化很快. 为了进一步验证转化后的 *E. coli* 5 α 的降解功能, 将其在含有 200 mg/L 吡啶的 LB 培养基富集培养后, 经离心、清洗后在含 200 mg/L 吡啶的液体 MSM 下进行降解实验, 结果表明, 经过 15 d 后, 细菌没有明显的增长, 吡啶也没有明显的降解

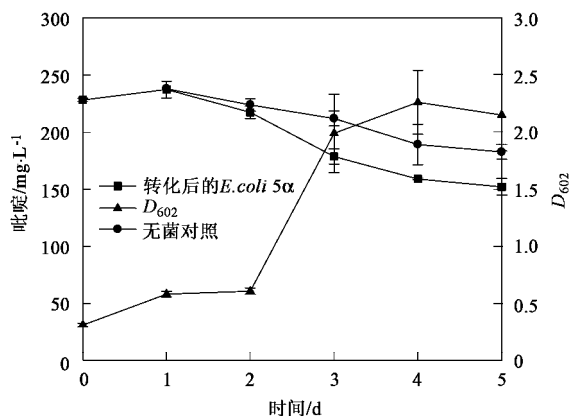


M: Marker, P: BW001 的质粒, Pt: 转化后的质粒

图4 BW001 的质粒转化

Fig. 4 Plasmid transformation of BW001

(除去吡啶的挥发). 但是, 如果向含 100 mL 含吡啶的 MSM 培养基直接移入 2 mL LB 培养基, 发现转化后的 *E. coli* 5 α 能利用 LB 培养基中有限的营养物质进行生长, 但却不能有效降解吡啶, 实验结果见图 5. 尽管经转化后的 *E. coli* 5 α 作用后吡啶的浓度比无菌对照有一定降低, 但这种降低可能源于其生物量增长所引起的吸附. 因此, 转化后的 *E. coli* 5 α 具有对吡啶的抗性, 但却不具备对吡啶的降解性.

图5 转化后的 *E. coli* 5 α 对吡啶的生物去除Fig. 5 Pyridine removal by *E. coli* 5 α after plasmid transformation

3 讨论

环境中异生物质的降解往往需要质粒的参与. 以往的研究发现萘^[13]、氯苯^[14]、2,4-二氯苯氧乙酸^[21]等污染物的降解基因都编码在质粒上. 在环境 $\bar{i}$ 压力下, 细菌质粒能通过自身转移从而将编码

的降解基因水平转移到其它物种当中, 并可能同时形成新的代谢途径^[32].

本研究对 2 株吡啶降解菌的质粒进行了提取, 发现这 2 株吡啶降解菌都含有多个质粒, 这些质粒有可能都是细菌在进化过程中通过水平基因转移而获得的. 脉冲电泳实验发现 2 株菌都含有较大的质粒, 而根据以往的文献记载, 降解质粒都是比较小的. 研究发现只要提供吡啶作为 $\bar{i}$ 压力, 这些菌的质粒就不会丢失, 这也从侧面反应了质粒可能和降解有关. 随后的质粒消除实验发现这 2 株菌的质粒可能都参与了降解. 那么降解基因是否位于质粒上, 降解与质粒有什么具体的关系? 通常分为以下 3 种情况: ①降解完全由质粒控制, 即降解基因完全在质粒上; ②降解由质粒和染色体共同控制, 染色体也带有部分降解基因, 即可能带有降解途径中某一步骤的调控基因; ③降解与质粒没有关系, 降解基因完全在染色体上.

本研究通过对 BW001 和 BC026 进行质粒消除, 发现质粒参与了吡啶的降解, 由此可以排除第 3 种情况. 进一步证明质粒是否具有全部降解基因的最好方法是质粒转化验证. 但超大质粒的转化往往非常困难, 成功的概率很低. 本研究将 BW001 的质粒转入到了 *E. coli* 5 α 中, 转化后的菌株具有对吡啶的抗性, 但不具有降解性. 另外, 由于转化菌与原菌质粒大小不一致等问题, 仍需进一步研究.

在以往对吡啶降解质粒的研究中, Mohan 等^[33]的研究发现 1 株假单胞菌含有降解吡啶的质粒, 可以通过化学转化将质粒转入 *E. coli* 5 α . 但研究并没有提供质粒的大小, 并且没有后续的研究报道. 因此, 无法全面了解其研究进展, 同时已有研究结果也存在一些疑问.

4 结论

(1) 对 2 株吡啶降解菌进行了质粒提取及脉冲电泳实验, 确定质粒分布及估计质粒大小. 结果表明 BW001 含有 3 个质粒, 分别是 2 个大小在 190 ~ 245 kb 之间的大质粒, 1 个大小为 4.5 ~ 5 kb 的小质粒; BC026 可能含有 3 个大质粒, 大小都在 200 kb 以上.

(2) 2 株菌的质粒经过高温-SDS 的作用都能被有效去除, 质粒消除后的细菌不再降解吡啶. 这说明这 2 株菌的质粒可能都与降解有关.

(3) 多次的质粒转化实验表明已经检测到的大质粒很难被转入受体菌中. 在将 BW001 的质粒经电

转化转入 *E. coli* 5 α 的实验中,通过分离、筛选得到 1 株含有 1 个大质粒的细菌,质粒片段大小介于 BW001 的 2 个大质粒之间.降解实验发现该菌不能以吡啶作为唯一的碳、氮源进行生长,但可以耐受较高浓度的吡啶.

参考文献:

- [1] Houghton C, Cain R B. Microbial metabolism of the pyridine ring. Formation of pyridinediols (dihydroxypyridines) as intermediates in the degradation of pyridine compounds by micro-organisms [J]. Biochemical Journal, 1972, **130** (3): 879-893.
- [2] Sims G K, Sommers L E. Biodegradation of pyridine-derivatives in soil suspensions [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 1986, **5** (6): 503-509.
- [3] Sims G K, Oloughlin E J. Degradation of pyridines in the environment [J]. Critical Reviews in Environmental Control, 1989, **19** (4): 309-340.
- [4] Ronen Z, Bollag J M. Biodegradation of pyridine and pyridine-derivatives by soil and subsurface microorganisms [J]. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 1995, **59** (2-4): 133-143.
- [5] Kaiser J P, Feng Y C, Bollag J M. Microbial metabolism of pyridine, quinoline, acridine, and their derivatives under aerobic and anaerobic conditions [J]. Microbiological Reviews, 1996, **60** (3): 483-498.
- [6] Fetzner S. Bacterial degradation of pyridine, indole, quinoline, and their derivatives under different redox conditions [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1998, **49** (3): 237-250.
- [7] Bai Y H, Sun Q H, Zhao C, *et al.* Microbial degradation and metabolic pathway of pyridine by a *Paracoccus* sp. strain BW001 [J]. Biodegradation, 2008, **19** (6): 915-926.
- [8] Watson G K, Cain R B. Microbial metabolism of pyridine ring - metabolic pathways of pyridine biodegradation by soil bacteria [J]. Biochemical Journal, 1975, **146** (1): 157-172.
- [9] Padoley K V, Rajvaidya A S, Subbarao T V, *et al.* Biodegradation of pyridine in a completely mixed activated sludge process [J]. Bioresource Technology, 2006, **97** (10): 1225-1236.
- [10] Rhee S K, Lee G M, Lee S T. Influence of a supplementary carbon source on biodegradation of pyridine by freely suspended and immobilized *Pimelobacter* sp. [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1996, **44** (6): 816-822.
- [11] Pandey R A, Padoley K V, Mukherji S S, *et al.* Biotreatment of waste gas containing pyridine in a biofilter [J]. Bioresource Technology, 2007, **98** (12): 2258-2267.
- [12] Bai Y H, Sun Q H, Zhao C, *et al.* Simultaneous biodegradation of pyridine and quinoline by two mixed bacterial strains [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, **82** (5): 963-973.
- [13] Herrick J B, Stuart-Keil K G, Ghiorse W C, *et al.* Natural horizontal transfer of a naphthalene dioxygenase gene between bacteria native to a coal tar-contaminated field site [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, **63** (6): 2330-2337.
- [14] Werlen C, Kohler H P E, Van der Meer J R. The broad substrate chlorobenzene dioxygenase and *cis*-chlorobenzene dihydrodiol dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. strain P51 are linked evolutionarily to the enzymes for benzene and toluene degradation [J]. Journal of Biological Chemistry, 1996, **271** (8): 4009-4016.
- [15] Top E M, Springael D, Boon N. Catabolic mobile genetic elements and their potential use in bioaugmentation of polluted soils and waters [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2002, **42** (2): 199-208.
- [16] Van der Meer J R. Environmental pollution promotes selection of microbial degradation pathways [J]. Frontiers in Ecology and the Environment, 2006, **4** (1): 35-42.
- [17] Ghigo J M. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development [J]. Nature, 2001, **412** (6845): 442-445.
- [18] Bathe S, Lebuhn M, Ellwart J W, *et al.* High phylogenetic diversity of transconjugants carrying plasmid pJP4 in an activated sludge-derived microbial community [J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, **235** (2): 215-219.
- [19] Top E M, Springael D. The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2003, **14** (3): 262-269.
- [20] Bathe S. Conjugal transfer of plasmid pNB2 to activated sludge bacteria leads to 3-chloroaniline degradation in enrichment cultures [J]. Letters in Applied Microbiology, 2004, **38** (6): 527-531.
- [21] Bathe S, Mohan T V K, Wuertz S, *et al.* Bioaugmentation of a sequencing batch biofilm reactor by horizontal gene transfer [J]. Water Science and Technology, 2004, **49** (11-12): 337-344.
- [22] Shintani M, Fukushima N, Tezuka M, *et al.* Conjugative transfer of the IncP-7 carbazole degradative plasmid, pCAR1, in river water samples [J]. Biotechnology Letters, 2008, **30** (1): 117-122.
- [23] Paul D, Pandey G, Pandey J, *et al.* Accessing microbial diversity for bioremediation and environmental restoration [J]. Trends in Biotechnology, 2005, **23** (3): 135-142.
- [24] 赵翠, 孙庆华, 柏耀辉, 等. 副球菌 BW001 的生理特性及其对吡啶的降解 [J]. 环境污染与防治, 2008, **30** (11): 17-22.
- [25] 孙庆华, 柏耀辉, 赵翠, 等. *Shinella zoogloeoides* BC026 对吡啶的降解特性研究 [J]. 环境科学, 2008, **29** (10): 2938-2943.
- [26] Kado C I, Liu S T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids [J]. Journal of Bacteriology, 1981, **145** (3): 1365-1373.
- [27] Top E, Mergeay M, Springael D, *et al.* Gene escape model: transfer of heavy metal resistance genes from *Escherichia coli* to *Alcaligenes eutrophus* on agar plates and in soil samples [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1990, **56** (8): 2471-2479.
- [28] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W, 黄培堂, 等. 分子克隆实验指南 [M]. (第三版). 北京: 科学出版社, 2002.
- [29] Ma Y F, Wang L, Shao Z Z. *Pseudomonas*, the dominant polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Antarctic soils and the role of large plasmids in horizontal gene transfer [J]. Environmental Microbiology, 2006, **8** (3): 455-465.
- [30] Basta T, Keck A, Klein J, *et al.* Detection and characterization of conjugative degradative plasmids in xenobiotic-degrading *Sphingomonas* strains [J]. Journal of Bacteriology, 2004, **186** (12): 3862-3872.
- [31] Ma Y F, Wu J F, Wang S Y, *et al.* Nucleotide sequence of plasmid pCNB1 from *Comamonas* strain CNB-1 reveals novel genetic organization and evolution for 4-chloronitrobenzene degradation [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, **73** (14): 4477-4483.
- [32] Top E M, Holben W E, Forney L J. Characterization of diverse 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid-degradative plasmids isolated from soil by complementation [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, **61** (5): 1691-1698.
- [33] Mohan S V, Sistla S, Guru R K, *et al.* Microbial degradation of pyridine using *Pseudomonas* sp. and isolation of plasmid responsible for degradation [J]. Waste Management, 2003, **23** (2): 167-171.