

一株菲降解菌的特性及相关降解基因的克隆*

何丽娟¹ 李正华² 洪青^{1**} 李顺鹏¹

(¹南京农业大学生命科学学院农业部农业环境微生物工程重点开放实验室 南京 210095)

(²江苏省宜兴市前程生物有限公司 宜兴 214253)

摘要 从石油污染土壤中分离到一株菲降解菌2F5-2. 根据该菌株生理生化特征和16S rDNA序列相似性分析, 将其初步鉴定为鞘氨醇杆菌属(*Sphingobium* sp.). 该菌株在10 h内对100 mg/L的菲的降解率为100%. 降解菲的最适温度为30 ℃, 最适pH为7. 对降解途径的初步研究显示, 该菌株通过水杨酸途径降解菲. 克隆了编码芳香烃双加氧酶 α 亚基的基因*phdA*, 它与菌株*Sphingomonas* sp. P2、*Sphingobium yanoikuyae* B1、*Sphingomonas* sp. ZP1中*phdA*的同源性分别为97.9%、98%和100%, 表明该基因具有保守性. 图6 参16

关键词 菲; 生物降解; 降解途径; *phdA*基因

CLC X172 + Q785

Characterization of A Phenanthrene-degrading Strain and Cloning of Degradation-related Gene*

HE Lijuan¹, LI Zhenghua², HONG Qing^{1**} & LI Shunpeng¹

(¹Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, College of Life Sciences,

Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

(²Yixing Qiancheng Bio-engineering Co., Ltd., Yixing 214253, Jiangsu, China)

Abstract A bacterial strain 2F5-2 capable of degrading phenanthrene was isolated from petroleum-contaminated soil. It was preliminarily identified as *Sphingobium* sp. according to its physiological & biochemical characteristics and the analysis of its 16S rRNA gene sequence. Strain 2F5-2 could degrade 100% of 100 mg/L phenanthrene within 10 h. The optimal pH and temperature for the degradation were 7 and 30 ℃, respectively. The analysis of its phenanthrene-degrading pathway revealed that strain 2F5-2 degraded phenanthrene via salicylate pathway. The aromatic-ring-hydroxylating dioxygenases α -subunit encoding gene *phdA* was cloned and analyzed. It had 97.9%, 98%, 100% identity to the *phdA* gene from *Sphingomonas* sp. P2, *Sphingobium yanoikuyae* B1 and *Sphingomonas* sp. ZP1, respectively, indicating the conservation of this gene. Fig 6, Ref 16

Keywords phenanthrene; biodegradation; degrading pathway; *phdA* gene

CLC X172 + Q785

多环芳烃(Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)是一类全球性的污染物, 广泛存在于自然环境中. 多种PAHs具有致畸性、致癌性和致突变性^[1]. 生物修复是一种低成本的环境友好型污染物去除方法. 菲作为多环芳烃中3环的代表化合物, 其生物降解一直受到科研人员的重视. 近年来, 我国的科研人员分离到一些菲降解菌株, 并对其降解途径进行了初步研究, 但是在降解相关基因方面研究较少^[2-8]. 我们从石油污染土壤中分离到一株菲降解细菌, 对其降解特性和降解途径进行了初步研究, 并对其降解相关基因进行了初步探索, 以期了解微生物在污染物消除过程中的作用和降解菌生物资源的开发利用提供基础资料.

1 材料与方法

1.1 培养基与试剂

基础培养基($\rho/g L^{-1}$): NaCl 0.5, (NH₄)₂SO₄ 1.0, K₂HPO₄ 1.5, KH₂PO₄ 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.2, 去离子水1 000

mL, pH 7.0. 富集分离培养基: 在基础培养基中添加终浓度为50 mg L⁻¹的非原药作为唯一碳源. LB培养基($\rho/g L^{-1}$): 胰蛋白胨10.0, NaCl 10.0, 酵母粉5.0, 去离子水1 000 mL, pH 7.2. 乙酸乙酯(分析纯); 菲、萘(纯度为97%, Sigma公司); 甲醇(色谱纯); 其它试剂为分析纯.

1.2 菲降解菌的筛选

采集胜利油田的石油污染土壤, 称取5 g土样加入100 mL含有菲(50 mg L⁻¹)的无机盐培养基中于180 r min⁻¹、30 ℃振荡培养, 进行菲降解菌富集. 7 d后传代, 传代2~3次后, 检测富集液对菲的降解效果, 将降解率大于90%的富集液经过系列稀释后涂布在基础固体培养基上(菲的浓度为50 mg L⁻¹), 经过培养后筛选菲降解菌. 将得到的单菌进行纯化后再验证其降解性能.

1.3 降解菌株的鉴定

菌株形态及生理生化特性测定参照文献[9]进行. 基因组DNA采用高盐法提取. 16S rDNA扩增引物为细菌16S rDNA通用引物, 正向引物: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' (*E. coli* 27F), 反向引物: 5'-TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T-3' (*E. coli* 1492R). 扩增条件参考文献[10]. PCR产物(1.5 kb左右)采用V-Gene公司的凝胶回收试剂盒切胶回收, 连接至pMD18-T Vector, 转化大肠杆菌, 挑取阳性克隆测序, 测序

收稿日期: 2008-10-08 接受日期: 2008-12-09

*国家“863”计划项目(No. 2007AA061101)和科技部自然科技资源平台项目(No. 2005DKA21201-2)资助 Supported by the National High-tech R & D Program of China (No. 2007AA061101) and the Natural Resources Collecting Project of Ministry of Science and Technology of China (No. 2005DKA21201-2)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: hongqingnjau@yahoo.com.cn)

由上海英骏生物技术有限公司完成. 将测序结果与GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)及其Ribosomal Database Project II (<http://rdp.cme.msu.edu>)上的相关16S rDNA序列进行同源性比对分析.

1.4 菲的测定

取3 mL菌液用等体积乙酸乙酯振荡萃取, 让乙酸乙酯挥发完全后用甲醇重新溶解后用HPLC检测. 检测条件: 250 mm×4.6 mm C18不锈钢色谱柱; 流动相为甲醇/水(90:10, V/V); 流速为1.0 mL/min; 柱温: 25 °C; Waters 2487紫外检测器, 检测波长为254 nm; 进样量30 μL^[11].

1.5 *phdA*基因的克隆

芳香环羟化双加氧酶是芳香烃降解途径中具有开环功能的关键酶, 一般由铁氧还蛋白还原酶、铁氧还蛋白和末端氧化酶(铁硫蛋白)这3种组分组成. 铁硫蛋白由α亚基和β亚基组成, 其中α亚基(由*phdA*基因编码)在芳香环羟化双加氧酶的催化功能上具有重要的作用, 因此引起了人们的关注^[12-14]. 根据已报道的*phdA*基因序列设计引物对菌株2F5-2中*phdA*进行PCR扩增. 以2F5-2的基因组DNA作模板: 正向引物aroF: 5'-GCGGATCCATGCGTTTGGAAACGGATCG-3'; 反向引物aroR: 5'-GCGTCGACTCAAAGCGCGAACAGG-3'. 50 μL的反应体系: DNA模板1 μL, dNTP (2.5 mmol/L) 4 μL, 引物(25 μmol/L)各1 μL, 10×Buffer 5 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 3 μL, Taq酶(5 U/μL) 0.5 μL, 超纯水35.5 μL. PCR反应条件: 94 °C预变性2 min, 进入热循环: 94 °C变性30 s, 54 °C退火50 s, 72 °C延伸1 min, 共30个循环. PCR产物的克隆、测序同1.3.

2 结果与分析

2.1 菌株2F5-2的分离与鉴定

分离到一株菲降解菌株2F5-2. 该菌株在LB培养基培养36 h后, 菌落为黄色, 直径为3 mm, 表面光滑, 边缘整齐, 易挑起, 半透明, 有光泽. 菌体为杆状, 大小为0.5~0.7 μm×1.2~1.7 μm, 有鞭毛. 革兰氏染色阴性. 该菌氧化酶阴性, 接触酶阳性, V.P试验阳性, 硝酸盐还原阴性, 不能水解淀粉, 不能液化明胶, 不发酵葡萄糖、蔗糖、乳糖. 以菌株2F5-2的基因组DNA为模板, 用16S rDNA通用引物进行PCR扩增, 得到1条约1.5 kb的片段. 测序结果为1 452 bp (GenBank accession No. EU286535). 将测序结果与GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)及其Ribosomal Database Project II (<http://rdp.cme.msu.edu>)上的相关16S rDNA序列进行同源性比对分析, 表明其与模式菌株*Sphingobium olei*的相似性最高达到98.7%. 结合生理生化特征初步鉴定2F5-2 (EU286535)为鞘氨醇杆菌属.

2.2 菌株2F5-2对菲的降解特性

在菲浓度为100 mg/L的基础盐培养基中, 以3%的接种量接入用0.1 mol/L的PBS缓冲液洗涤2次的在LB培养基中培养的2F5-2种子液($A_{600\text{nm}} \approx 2.00$), 于30 °C、180 r/min摇床培养, 每隔一定时间取样, 测定 $A_{600\text{nm}}$ 及菲的浓度. 从图1中可以看出, 2F5-2能以菲为唯一碳源进行生长, 并可将其在10 h内完全降解.

研究了初始pH、温度、初始浓度对菌株2F5-2降解菲的影响. 结果表明, 菌株2F5-2在25~37 °C的条件下24 h内降解菲

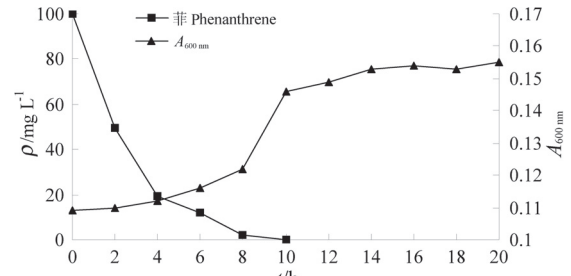


图1 菌株2F5-2以菲为唯一碳源的生长情况

Fig. 1 Utilization of phenanthrene as sole carbon source by strain 2F5-2 for its growth

的效率可达90%以上, 其中在温度为30 °C时降解效果最好(图2). 菌株2F5-2在pH为6~9的条件下, 12 h内对100 mg L⁻¹菲的降解率都可达到90%以上, 其中pH为7时降解效果最佳(图3).

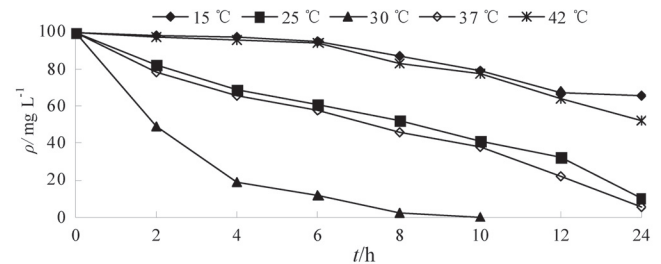


图2 温度对2F5-2降解菲的影响

Fig. 2 Effect of temperature on phenanthrene degradation by strain 2F5-2

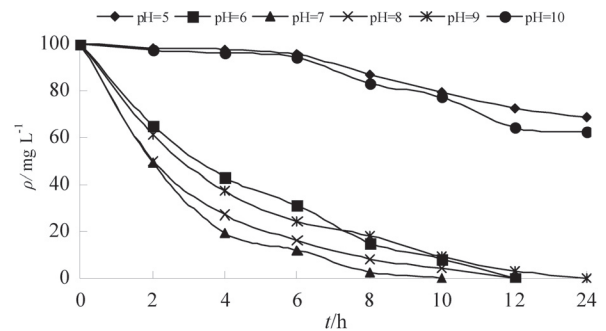


图3 pH对2F5-2降解菲的影响

Fig. 3 Effect of pH on phenanthrene degradation by strain 2F5-2

菌株2F5-2不仅对100、200、300 mg L⁻¹的菲具有很好的降解效果, 对较高浓度(500 mg L⁻¹) 72 h的降解率也可以达到69.6%. 当菲的浓度大于500 mg L⁻¹时, 降解作用受到明显的抑制(图4).

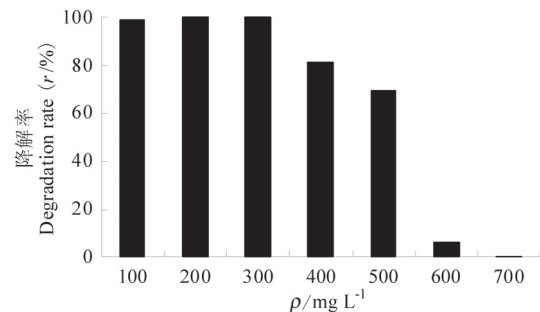


图4 初始菲浓度对2F5-2降解菲的影响

Fig. 4 Effect of initial concentration of phenanthrene on its degradation by strain 2F5-2

2.3 菌株2F5-2对菲降解途径的推测

菌对菲的降解主要有两个途径：在既能以菲为唯一碳源生长，又能以萘为唯一碳源生长的细菌中主要存在水杨酸途径；在能以菲为唯一碳源生长而不能利用萘的细菌中，则存在邻苯二甲酸途径^[15, 16]。在这两条降解途径中都会产生一些特征性的中间产物，这些中间产物大部分都具有苯环结构，通过检测菌株2F5-2对这些中间产物的降解特性，可以初步推测其对菲的降解途径。菌株2F5-2可以降解萘、苯酚、水杨酸、邻苯二酚，但是不能降解邻苯二甲酸(图5)。由此可以初步推测，菌株2F5-2对菲的降解是通过水杨酸途径进行的。

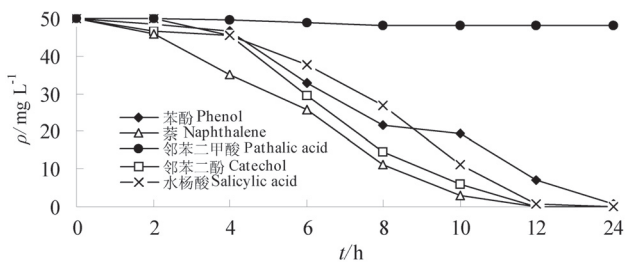


图5 菌株2F5-2对不同芳烃化合物的降解

Fig. 5 Degradation of different benzene-ring compounds by strain 2F5-2

2.4 *phdA*基因的扩增

以2F5-2的基因组DNA为模板，通过PCR扩增，获得了长度为1.3 kb的DNA片段(图6)，序列测定结果显示其准确长度为1 280 bp，序列分析显示在核苷酸水平上它与菌株*Sphingomonas* sp. P2、*Sphingobium yanoikuyae* B1、*Sphingomonas* sp. ZP1^[12, 16]中*phdA*基因的同源性分别为97.9%、98%和100%，表明该基因具有保守性。*phdA*基因的获得为克隆2F5-2菌株完整的菲降解基因簇奠定了基础。

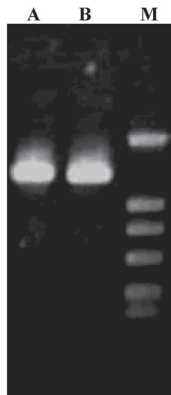


图6 *phdA* 基因的PCR扩增

Fig. 6 PCR amplification of *phdA* gene

A, B: PCR products of strain 2F5-2; M: DL2000 marker

3 结论

菲是一种典型的多环芳烃类有机污染物，其生物降解一直受到环境微生物研究者的重视。本研究分离到一株以菲为唯一碳源生长的细菌2F5-2，结合生理生化特征和16S rDNA序列同源性分析，将其初步鉴定为鞘氨醇杆菌属*Sphingobium* sp. 菌株2F5-2可以在12 h内完全降解100 mg L⁻¹的菲，对较高浓度(500 mg L⁻¹)的菲72 h的降解效率也可达到69%；与已报道

的非降解细菌^[2-8]相比，菌株2F5-2的降解速率较快，而且可降解的浓度范围也相对较宽，降解菲的最适条件为pH 7、30 ℃。对2F5-2降解途径的初步研究显示，该菌株通过水杨酸途径降解菲。通过PCR的方法克隆了2F5-2菌株芳香环羟化双加氧酶 α 亚基的基因*phdA*，序列分析显示，在核苷酸水平上它与菌株*Sphingomonas* sp. P2、*Sphingobium yanoikuyae* B1、*Sphingomonas* sp. ZP1^[12, 16]中基因的同源性分别为97.9%、98%和100%，表明该基因具有保守性。*phdA*基因的获得为克隆该菌株完整的菲降解基因簇奠定了基础。

References

- Samanta SK, Singh OV, Jain RK. Polycyclic aromatic hydrocarbons: Environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol*, 2002, **20**: 243-248
- Xia Y (夏颖), Min H (闵航), Zhou DP (周德平), Han RY (韩如畅). Characteristics and phylogenetic analysis of two phenanthrene-degrading bacteria. *China Environ Sci* (中国环境科学), 2003, **23** (2): 162-166
- Ma YF (马迎飞), Liu XL (刘训理), Shao ZZ (邵宗泽). Isolation of phenanthrene-degrading bacteria and analysis of their degrading-enzyme gene. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2005, **11** (2): 218-221
- Zhu RG (祝儒刚), Zhong M (钟鸣), Zhou QX (周启星), Liu HN (刘海宁), Li YS (李玉双). Isolation and identification of a phenanthrene-degrading bacterial strain. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 2006, **17** (11): 2117-2120
- Zhang L (仇磊), Yuan HL (袁红莉). Screening for phenanthrene-degrading bacteria and its characteristics. *Environ Sci* (环境科学), 2006, **26** (1): 159-163
- Tao XQ, Lu GN, Dang Z, Yang C, Yi XY. A phenanthrene-degrading strain *Sphingomonas* sp. GY2B isolated from contaminated soils. *Proc Biochem*, 2007, **42** (3): 401-408
- Liu L (刘磊), Li XW (李习武), Liu SJ (刘双江), Liu ZP (刘志培). Isolation and identification of a PAHs-degrading strain *Gordonia* sp. He4 and its dynamics during bioremediation of phenanthrene polluted soil. *Environ Sci* (环境科学), 2007, **28** (3): 617-622
- Gao L (高林), Xiao M (肖明), Guo LS (郭鲁申), Lu YT (陆贻通), Zhao Y (赵渝). Degrading characteristics and proteome of phenanthrene-degrading bacterium. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2008, **14** (4): 523-527
- Dong XZ (东秀珠), Cai MY (蔡妙英), Liu HR (刘澎涛). Manual of Systematic Common Bacteriology. Beijing, China (北京): Science Press (科学出版社), 2001
- Dong XJ, Hong Q, He LJ, Jiang X, Li SP. Characterization of phenol-degrading bacterial strains isolated from natural soil. *Intern Biodeter & Biodegr*, 2008, **62**: 257-262
- Balashova NV, Kosheleva IA, Golovchenko NP, Boronin AM. Phenanthrene metabolism by *Pseudomonas* and *Burkholderia* strains.

- Proc Biochem*, 1999, **35**: 291~296
- 12 Brezn B, Khan AA, Cerniglia CE. Molecular characterization of dioxygenases from polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading *Mycobacterium* sp. *FEMS Microbiol Lett*, 2003, **223**: 177~183
- 13 Furukawa K. Engineering dioxygenases for efficient degradation of environmental pollutants. *Curr Opin Biotechnol*, 2000, **11** (3): 244~249.
- 14 Tylor PM, Medd JM, Liesbeth S. Detection of known and novel genes encoding aromatic ring-hydroxylating dioxygenases in soils and in aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 2002, **216** (1): 61~66
- 15 Menn FM, Applegate BM, King JMH, Sayler G.S. plasmid-mediated mineralization of naphthalene, phenanthrene and anthracene. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**: 1931~1937
- 16 Hiroshi H, Toshio O. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003, **67** (2): 225~243

欢迎订阅 欢迎投稿

《应用与环境生物学报》(双月刊)

刊号: ISSN 1006-687X 邮发代号: 62-15
CN 51-1482/Q

《应用与环境生物学报》由中国科学院主管、中国科学院成都生物研究所主办、科学出版社出版,国内外公开发行,是我国应用生物学和环境生物学的核心刊物。主要报道生物学及相关学科在资源开发利用与可持续发展、环境整治、退化生态系统的恢复与重建,以及在农、林、牧、医、能源、轻工、化工、食品等领域的基础研究、应用基础研究和应用研究的新成果、新技术、新方法和新进展。包括研究论文、研究简报和本刊邀约的综述或述评。读者对象主要为本学科的科研人员、大专院校师生和科研管理干部。

本刊为国内外多个知名数据库收录(国外如CA, BA, CSA, PЖ, ZR, EP等,国内如CSTPCD, CSCD, CBA,《中文核心期刊要目总览》,万方数据,清华光盘,维普科技,《中国知识资源总库·科技精品期刊库》,台湾中文电子期刊服务——思博网(CCPS)等,曾荣获四川省一级学术期刊、中国期刊方阵双效期刊和中国农业期刊金犁奖学术类一等奖、中国精品科技期刊、RCCSE中国核心学术期刊等。本刊创刊于1995年,1999年由季刊改为双月刊至今,双月25日出版,每期128页,全铜版纸印刷。每期定价25.00元,年定价150.00元。全国各地邮局(所)均可订阅。新订户可向本刊编辑部补购自1995年以来的各卷期,以及1999年增刊(环境微生物学研究专辑)。

地址:四川省成都市人民南路4段9号

中国科学院成都生物研究所《应用与环境生物学报》编辑部

邮编:610041

电话:028-85237341(联系人:刘东渝)

传真:028-85237341

E-mail: biojaeb@cib.ac.cn

网址: <http://www.cibj.com>