

1 株降解 PCBs 细菌的鉴定及其 *bphA1* 序列分析

王义勋¹ 蔡三山¹ 张娟² 李晶³ 侯明生² 陈京元¹

1. 湖北省林业科学研究院, 武汉 430075; 2. 华中农业大学植物科技学院, 武汉 430070;

3. 湖北出入境检验检疫局, 武汉 430050

摘要 通过富集培养方法从受多氯联苯(polychlorinated biphenyls, PCBs)污染的首蓿根际土壤富集分离到 1 株 PCBs 降解细菌并命名为 A1。根据形态特征和 16S rDNA 序列分析, 鉴定该菌株为纽伦堡潘多拉菌 *Pandora norimbergensis*。采用休眠细胞体系测定该菌株对 Aroclor1242 的降解能力, 经 GC-MS 色谱分析, 该菌株在 72 h 内对 Aroclor1242 的总降解率为 56.7%。通过对其 *bphA1* 基因的克隆和序列分析, 结果表明: *P. norimbergensis* 的 *bphA1* 基因与 *Pandora sp.* JB1 的 *bphA1* 基因序列同源性为 100%; 核酸序列转化成氨基酸序列后, 该菌的 *bphA1* 蛋白结构预测模型与 *Comamonas testosteroni* B-356 具有 99.37% 的相似性。

关键词 多氯联苯; 根际细菌; 潘多拉菌; *bphA1* 基因; 序列分析

中图分类号 S 154.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)03-0047-05

多氯联苯(polychlorinated biphenyls, PCBs)是一类具有 2 个相联苯环结构的含氯化合物, 因氯原子在苯环 *ortho*、*meta* 或 *para* 位取代数量和位置的不同, 理论上共有 209 种同系物^[1]。由于具有高度的化学稳定性、热稳定性、抗氧化性、较低的蒸汽压和良好的电绝缘性, 故 PCBs 曾被广泛应用于多种领域。但 PCBs 在生产和消费过程中的渗漏或排放, 已造成环境污染, 是已确定的致癌剂、致畸剂和致突变剂, 被视为持久性有机污染物^[2-3]。PCBs 因急性毒效应、高残留性、高富集性、远距离扩散, 以及对生态系统和人类健康的影响, 故已被环境保护部门列入优先控制的有机污染物名单, 成为环境科学界关注的热点。

多氯联苯生物修复具有低成本、无二次污染和原位修复等特点, 现已越来越受到重视, 具有广阔的应用潜力^[4-6]。多氯联苯生物降解途径主要是脱掉苯环上氯原子和破坏苯环结构, 转化为氯苯、开环化合物和 CO₂ 等物质^[7-8]。目前, 报道 PCBs 降解菌株多数为好氧菌, 少数为厌氧菌, 如 *Burkholderia xenovorans* LB400、*Rhodococcus sp.* RHA1、*Stenotrophomonas maltophilia* PS-11、*Enterobacter sp.* LY402 等^[9-12]。这些高效 PCBs 降解菌株的获得为多氯联苯污染点的生物修复提供了丰富的生物资

源。笔者采用富集培养方法从受多氯联苯长期污染的首蓿根际土壤分离得到 1 株具有降解功能的菌株, 并对其降解能力和 *bphA1* 基因核心序列进行研究, 旨在为 PCBs 污染场地的生物修复提供菌源和理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株来源

供试菌株分离于浙江省台州市受电子产品拆解污染的首蓿根际土壤, 经固体联苯富集培养和单孢纯化得到, 并保存在湖北省林业科学研究院森林病理实验室。

1.2 无机盐培养基

参照 Bedard 等^[13]的方法配制。培养基成分为 K₂HPO₄ 4.4 g/L, KH₂PO₄ 1.7 g/L, NH₄Cl 2.1 g/L, NaCl 3.0 g/L, 酵母提取物 0.05 g/L, 固体联苯 2.0 g, 基础盐溶液 10 mL, 蒸馏水 1 000 mL。其中基础盐溶液成分为 MgSO₄ 19.5 g/L, MnSO₄ · H₂O 5.0 g/L, FeSO₄ · H₂O 1.0 g/L, CaCl₂ · H₂O 0.3 g/L, 蒸馏水 1 000 mL, 加几滴浓 H₂SO₄ 防止沉淀产生。

1.3 降解菌株的富集和分离

称取根际土壤 2.0 g, 加入到 100 mL 灭菌无机

收稿日期: 2012-11-04

基金项目: 国家林业局“948”项目(2008-4-35)

王义勋, 硕士, 助理研究员。研究方向: 植物病理和林业微生物。E-mail: yixun2002@163.com

通讯作者: 陈京元, 博士, 研究员。研究方向: 森林保护。E-mail: jingyuanchen@hotmail.com

盐培养基中,在 30 ℃、150 r/min 条件下振荡培养 5~7 d 后,取 1 mL 菌悬液加入到新的 100 mL 无机盐培养基进行继代培养。采用相同方法连续进行 7 次培养,将最后一次培养菌悬液用无菌水梯度稀释至 10^{-8} cfu/mL。在固体无机盐培养基平板上涂布,皿盖上加入固体联苯 10 g,用封口膜密封培养皿,利用固体联苯蒸气作为唯一碳源,30 ℃ 条件下培养。待有单菌落长出时,依据菌落形态和颜色不同用无菌牙签挑取单菌落,接入新的无机盐培养基继续进行振荡培养 3 次。选择变黄最快且菌体在 600 nm 处的吸光度最大值的菌液,然后在固体无机盐培养基上划线分离,得到 1 株以固体联苯为唯一碳源的菌株,命名为 A1。

1.4 菌株鉴定

1) 形态和生理生化试验。细菌形态学特征及生理生化试验根据文献[14-15]中的方法进行。

2) 16S rDNA 序列分析。按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒(购自 Tiangen 生物)操作步骤提取菌株基因组 DNA。采用细菌 16S rDNA 通用引物(27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 1492R: 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACT-3') 进行 PCR 扩增^[16]。扩增产物委托上海桑尼生物科技有限公司进行测序,将测得序列在 NCBI 中数据库利用 Blast 软件进行同源性比较,并采用生物软件 Claux 2.0 和 MAGA 4.0 构建系统发育树。

1.5 多氯联苯 Aroclor1242 的降解与测定

1) 休眠细胞制备。参照 Malterseva 等^[17]的方法进行休眠细胞制备。将在无机盐培养基中处于对数生长期的菌液离心,弃上清,用 pH 7.4、浓度为 0.05 mol/L 的磷酸缓冲液洗涤并离心,重复 2 次。最后加入一定量磷酸缓冲液混匀,浓度调整到 1.0 ($D_{600\text{ nm}}$)。在棕色玻璃瓶中加 Aroclor1242,待有机溶剂完全挥发后,取制备的休眠细胞菌液 2 mL 加入到吸附有多氯联苯的玻璃瓶中,对照样为在吸附有多氯联苯的玻璃瓶中加入相同浓度的热杀菌,盖紧瓶盖,置于 30 ℃、150 r/min 的恒温摇床中振荡培养 72 h。每个样品设 3 组平行样。

2) 气相色谱检测。向 2 mL 样品中加入 3 mL 正己烷萃取,加入 0.5 g 硫酸铵作为破乳剂,涡旋振荡 3 min,静置 30 min 后以 5 000 r/min 离心 5 min,取上层有机相 1 mL 进行气相色谱(Agilent 5975C)检测。色谱条件:色谱柱为 DB-5MS(30 m×0.25 mm×0.25 mm),以恒流方式进样,不分流;升温程

序: 60 ℃ 保持 2 min,以 7 ℃/min 的速度升温至 250 ℃,保持 2 min,再以 20 ℃/min 的速度升温至 280 ℃,保持 10 min。

1.6 bphA1 核心序列的扩增与分析

参照 Witzig 等^[18]正向引物 bphAf668-3: 5'-GTTCCGTGTAAGTGAARTWYGC-3' 和反向引物 bphAr1153-2: 5'-CCAGTTCTCGCCRTCRT-CYTGHTC-3'(由北京鼎国生物公司合成)扩增降解菌株 A1 的 bphA1 核心序列。

扩增体系: 10×Buffer 5.0 μL, dNTP 4.0 μL, ExTaq 0.25 μL, 正向引物 bphAf668-3 1 μL, 反向引物 bphAr1153-2 1 μL, DNA 模板 1 μL, 用 ddH₂O 补充体积 50 μL。PCR 反应条件: 95 ℃, 5 min; 94 ℃, 40 s; 53 ℃, 40 s; 72 ℃, 60 s; 72 ℃, 10 min; 共 30 个循环。用 1% 凝胶电泳检测,将目标条带克隆到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,委托北京鼎国生物公司测序。将测得核心序列翻译成氨基酸序列,利用 Blast 软件与 GenBank 中已知的相关序列进行同源性比较,利用 Claux 2.0 和 MAGA 4.0 软件构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 降解菌株的分离

目前对多氯联苯降解菌株的分离方法通常采用联苯固体作为多氯联苯的替代物,通过富集继代培养,能够利用联苯作为唯一碳源的菌株存活下来。通过富集继代培养,本试验初步从联苯固体培养基上挑选出生长速度较快的 10 个单菌落。在降解途径中,能够代谢产生黄色开环化合物 2-羟基-6-酮基-6-苯基-2,4-己二烯酸(HOPDA)。本试验通过无机盐液体培养过程中颜色变黄快慢作为指标进一步筛选,最终选择出 1 株生长速度快且变黄快的菌株为目的菌株,命名为 A1,然后继续进行试验。

2.2 A1 菌株形态和生理生化特征

经显微观察,A1 菌株为革兰氏阴性菌,无芽孢,直杆状。菌落白色,圆形或近圆形,凸起,边缘整齐,表面光滑,透明。菌株触酶呈阳性,不能液化明胶,不产生 H₂S,无反硝化作用,不产生吡嗪,能够水解淀粉。

2.3 A1 菌株 16S rDNA 序列

经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,PCR 产物片段大小约 1 500 bp。将扩增产物克隆测序,获得了 1 410 bp 的有效片段(GenBank No: JX995138)。通过

NCBI 核苷酸数据库 blast 同源性比对, 菌株 A116s rDNA 序列与 *Pandoraea norimbergensis*、*P. apista*、*P. pnomenusa*、*P. sputorum* 同源性均为 100%。将相关序列下载后利用 ClauX 2.0 和 MAGA 4.0 软件 Neighbour-Joining 法构建系统发育树, 该菌与

纽伦堡潘多拉菌 *P. norimbergensis* 位于同一个分支上, 表明亲缘关系最近(图 1)。

结合 A1 菌株的形态特征、生理生化特征及系统发育分析, 将其鉴定为纽伦堡潘多拉菌 *Pandoraea norimbergensis*。

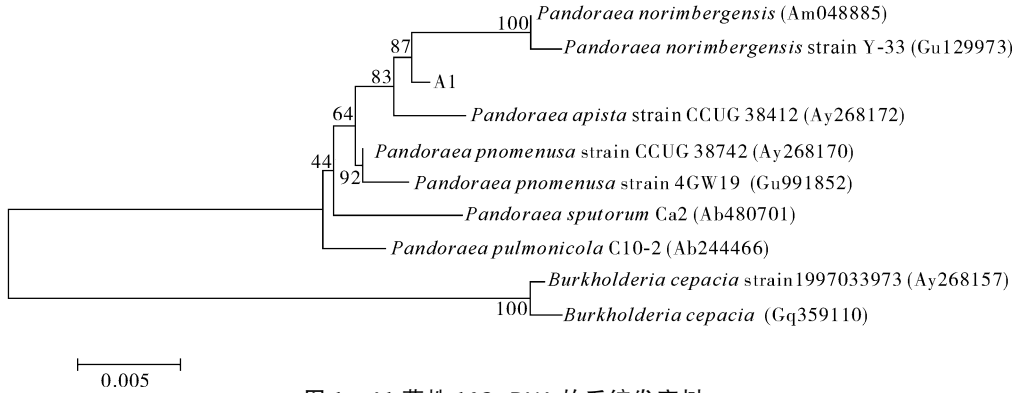


图 1 A1 菌株 16S rDNA 的系统发育树

Fig. 1 The construction of the phylogenetic tree by 16S rDNA sequence of strain A1 and related strains

2.4 多氯联苯 Aroclor1242 的降解

采用休眠细胞体系, 利用 Aroclor1242 为碳源对 A1 菌株进行降解能力测定, 经气相色谱检测, 总降解率为 56.7%。由于 Aroclor1242 主要含有 2 氯、3 氯、4 氯、5 氯、6 氯等多种 PCB 同系物, 氯原子数目和取代位点的不同对降解效果有影响, 氯取代位点增加将降低生物可利用性, 氯取代位点集中在一个苯环上的 PCBs 比氯原子质量相同且分布在不同苯环上的 PCBs 更易代谢。

2.5 *bphA1* 核心序列分析

1) *bphA1* 核酸和氨基酸序列分析。利用正向引物 *bphAf668-3* 和反向引物 *bphAr1153-2* 对菌株

基因组进行扩增, 得到约 600 bp 目标片段, 测序编辑获得 478 个有效碱基(GenBank No: JX995137)。与 Genbank 中 *bphA1* 基因的序列比对并构建系统发育树分析表明, 菌株 A1 的 *bphA1* 核心序列与 *Pandoraea* sp. JB1(GenBank No: DQ166968) 菌株的同源性最高为 100%。

将 *bphA1* 核苷酸序列转换成氨基酸序列(158AA), 利用 MAGA 4.0 软件 Neighbour-Joining 法构建系统发育树, 降解菌株 A1 与 *Pandoraea* sp. JB1 (DQ166968) 聚在同一分支上(图 2)。经 ClauX 2.0 比对发现存在保守位点, 与其他 PCBs 降解菌的 *bphA* 核心序列基本一致。

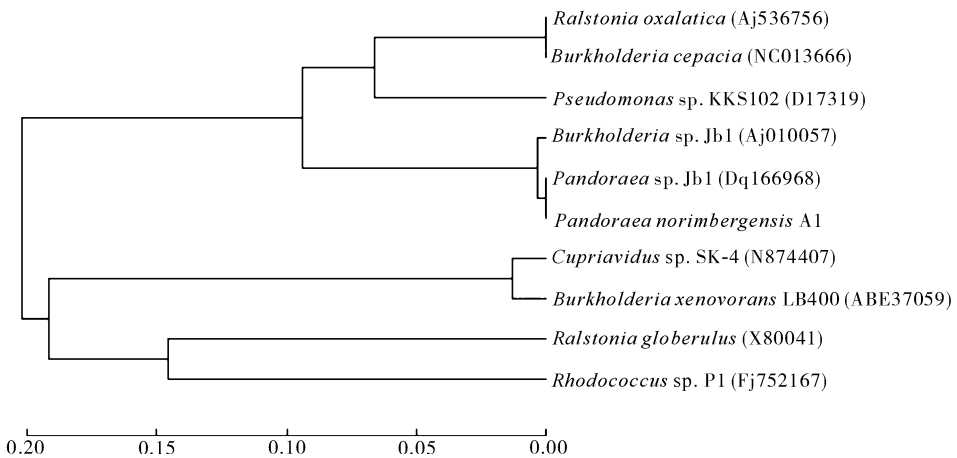


图 2 *bphA1* 核心区氨基酸序列系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on AA analysis of *bphA1* core

2) *bphA1* 蛋白结构模型预测。登录 <http://swissmodel.expasy.org/>, 通过对蛋白质结构数据库(PDB)搜索, 用同源建模方法得到 *bphA1* 氨基酸序列与多氯联苯降解菌鞣丸酮丛毛单孢菌 *Comamonas testosteroni* B-356 的 *bphA* 基因结构有 99.37% 的相似性, Evalue 为 8.54×10^{-93} , 预测模型精度(RSMD)为 1.58 Å。 *bphA1* 蛋白三级结构预测模型见图 3。



图 3 蛋白质三级结构预测模型

Fig. 3 The third structure of protein predict

3 讨论

本试验采用富集培养方法从苜蓿根际土壤分离到多氯联苯(PCBs)降解菌株 A1, 经形态学和 16S rDNA 序列分析鉴定为纽伦堡潘多拉菌 *Pandoraea norimbergensis*; 采用休眠细胞体系对 Aroclor1242 进行生物降解, 总降解效果为 56.7%。这是首次报道能够降解 PCBs 的苜蓿根际细菌 *P. norimbergensis*, 试验结果可为 PCBs 污染点的生物修复提供可利用的菌源。但是, 还需要对该菌株与污染点土著菌共生能力、在植物根际的定殖能力以及土壤污染物的浓度、土壤有机质的含量、水含量、氧含量、营养成分等因素对降解能力的影响进行深入研究, 以便更好地提高该菌株对 PCBs 污染点生物修复的能力。

联苯双加氧酶(*bphA*)是多氯联苯降解途径的关键酶^[19]。通过对 *bphA1* 基因核酸序列和氨基酸序列分析, *P. norimbergensis* A1 与 *Pandoraea* sp. JB1(DQ166968)菌株的同源性为 100%, 且在系统发育树上与 *Pandoraea* sp. JB1(DQ166968)聚在同一分支上; 通过蛋白结构模型预测, *P. norimbergensis* A1 的 *bphA1* 基因结构与多氯联苯降解菌鞣丸酮丛毛单孢菌 *Comamonas testosteroni* B-356 的 *bphA* 基因结构具有很高的相似性, 为 99.37%。这

从基因水平上佐证了 *P. norimbergensis* A1 具有多氯联苯的降解能力, 同时也说明该菌是通过 *bph* 途径代谢 PCBs。下一步需要对 *bph* 基因簇进行基因克隆, 解析 *P. norimbergensis* A1 中 PCB 相关降解基因, 从分子水平上认识其降解机理, 进而为构建高效生物降解工程菌奠定基础。

参 考 文 献

- [1] WIEGEL J, WU Q. Microbial reductive dehalogenation of polychlorinated biphenyls [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2000, 32:1-15.
- [2] HOOPER S W, PETTIGREW C A, SAYLER G S. Ecological fate, effects and prospects for the elimination of environmental polychlorinated biphenyls (PCBs) [J]. Environmental and Toxicology Chemistry, 1990, 9:655-657.
- [3] WEBER K, GOERKE H. Persistent organic pollutant (POPs) in Antarctic fish; levels, patterns, changes [J]. Chemosphere, 2003, 53:667-678.
- [4] BORJA J, TALEON D M, AURESENIA J, et al. Polychlorinated biphenyls and their biodegradation [J]. Process Biochemistry, 2005, 40:199-201.
- [5] VASILYEVA G K, STRIJAKOVA E R. Bioremediation of soils and sediments contaminated by polychlorinated biphenyls [J]. Microbiology, 2007, 76(6):639-653.
- [6] WU Q, SOWERS K R, MAY H D. Establishment of a polychlorinated biphenyls-dechlorinating microbial consortium, specific for doubly flanked chlorines, in a defined, sediment-free medium [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(1):49-53.
- [7] FAGERVOLD S K, WATTS J E M, MAY H D, et al. Effects of bioaugmentation on indigenous PCB dechlorinating activity in sediment microcosms [J]. Water Research, 2011, 45(13):3899-3907.
- [8] TSUNETTA T, LOCH-CARUSO R, QUENSEN III J F, et al. Stimulatory effects of a microbially dechlorinated polychlorinated biphenyl (PCB) mixture on rat uterine contact in vitro [J]. Environmental Research, 2008, 107(2):185-193.
- [9] PONCE B L, LATORRE V K, GONZALEZ M, et al. Antioxidant compounds improved PCB-degradation by *Burkholderia xenovorans* strain LB400 [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2011, 49(6/7):509-516.
- [10] SETO M, KIMBARA K, SHIMURA M. A novel transformation of polychlorinated biphenyls by *Rhodococcus* sp. strain RHA1 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(9):3353-3358.
- [11] 史舜燕, 冯流, 龚吉. PCBs 降解菌的筛选及其降解特性研究 [J]. 环境科学, 2012, 33(10):3627-3633.
- [12] JIA L Y, ZHENG A P, XU L, et al. Isolation and characteriza-

- tion of comprehensive polychlorinated biphenyl-degrading bacterium, *Enterobacter* sp. LY402 [J]. J Microbiol Biotechnol, 2008, 18(5): 952-957.
- [13] BEDARD D L, UNTERMAN R, BOPP L H, et al. Rapid assay for screening and characterizing microorganisms for the ability to degrade polychlorinated biphenyls [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1986, 51(4): 761-768.
- [14] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [15] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [16] 胡宝兰, 郑平, 徐向阳, 等. 一株反硝化细菌的鉴定及其厌氧氨氧化能力的证明[J]. 中国科学: C 辑, 2006, 36(6): 493-499.
- [17] MALTERSEVA O V, TSOI T V, QUENSEN J F, et al. Degradation of anaerobic reductive dechlorination products of Aroclor1242 by four aerobic bacteria [J]. Biodegradation, 1999, 10: 363-371.
- [18] WITZIG R, JUNCA H, HECHT H J, et al. Assessment of toluene/biphenyl dioxygenase gene diversity in benzene-polluted soils: links between benzene biodegradation and genes similar to those encoding isopropylbenzene dioxygenases [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(5): 3504-3514.
- [19] FURUKAWA K. Molecular genetics and evolutionary relationship of PCBs-degrading bacteria [J]. Biodegradation, 1994, 5: 289-300.

Identification of a polychlorinated biphenyls-degrading rhizobacterium and its *bphA1* sequence analysis

WANG Yi-xun¹ CAI San-shan¹ ZHANG Juan² LI Jing³
 HOU Ming-sheng² CHEN Jing-yuan¹

1. Hubei Academy of Forestry, Wuhan 430075, China;

2. College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

3. Hubei Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Wuhan 430050, China

Abstract A new PCB-degrading rhizobacterium strain named A1 was isolated from the long-term PCBs-contaminated alfalfa rhizospheric soil by enrichment culture. Through morphological observation and sequence analysis of 16S rDNA, the strain was identified as *Pandoraea norimbergensis*. GC-MS was used to determine the ability of resting cells degradation of PCBs, and it was found that the strain could totally remove 56.7% of the Aroclor1242 in 72 hours. The *bphA1* gene core, encoding the catalytic site of the large subunit of biphenyl dioxygenase, was sequenced and its third structure was also predicted. It showed that the nucleic acid sequence of *bphA1* gene had 100% homology compared with *Pandoraea* sp. JB1, and the third structure of protein had 99.37% identity compared with *Comamonas testosteroni* B356.

Key words polychlorinated biphenyls (PCBs); rhizobacterium; *Pandoraea* sp.; *bphA1* gene; sequence analysis

(责任编辑: 陈红叶)