

1,2,4-三氯苯降解菌的分离及其降解质粒的研究

宋 蕾,王 慧*,施汉昌,胡洪营 (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:以 1,2,4-三氯苯为唯一碳源,从天津化工厂氯苯生产车间的土壤中分离到 1 株 1,2,4-三氯苯的降解菌 THSL-1.通过形态观察和 16S rDNA 序列测定,该菌株被初步鉴定为施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*).经质粒检测,在菌株 THSL-1 中发现 1 条质粒条带,将所获得质粒转化到 *E.coli* JM109 中,转化子能以 1,2,4-三氯苯为唯一碳源生长,且对 1,2,4-三氯苯有降解作用.因此,可以认为该质粒携带降解 1,2,4-三氯苯的基因.选用 *Hind*III、*Bam*HI、*Xho*II 3 种限制性内切酶分别对质粒 pTHSL-1 进行单酶切、双酶切,最终确定质粒平均大小为 40.2kb.

关键词:1,2,4-三氯苯;16S rDNA;降解质粒;假单胞菌

中图分类号:X144 文献标识码:A 文章编号:1000-6923(2005)04-0385-04

Studies on isolation of 1,2,4-trichlorobenzene-degrading strain and its degradative plasmid. SONG Lei, WANG Hui*, SHI Han-chang, HU Hong-ying (State Key Joint Laboratory of Environment Simulation and Pollution Control, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China). *China Environmental Science*, 2005,25(4): 385~388

Abstract: A 1,2,4-trichlorobenzene-degrading strain THSL-1 was isolated from the soil of Tianjin chemical plant using 1,2,4-trichlorobenzene as sole carbon source. The strain was identified preliminarily as *Pseudomonas stutzeri* through morphologic survey and 16S rDNA sequence determination. A plasmid strip was found from strain THSL-1 through plasmid detection. When the plasmid obtained was transformed to *E. coli* JM109, the transformant could grow using 1,2,4-trichlorobenzene as sole carbon source and had degradation function of 1,2,4-trichlorobenzene. Therefore, it could be deemed that the plasmid carried the gene for 1,2,4-trichlorobenzene degradation. The plasmid average size was determined finally to be 40.2kb using selectively 3 kinds of restricted inscribed enzyme (*Hind*III, *Bam*HI, *Xho*II) for single cutting and double cutting the plasmid pTHSL-1 respectively.

Key words: 1,2,4-trichlorobenzene; 16S rDNA; degradative plasmid; *Pseudomonas* sp.

1,2,4-三氯苯(1,2,4-TCB)被广泛用作溶剂、杀虫剂等,其具有较高的毒性,进入自然界后易造成残留和富集,产生一系列环境问题.研究表明^[1],在氯苯类化合物中,1,2,4-TCB 对肝脏的毒性最大.另外,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,所以生物降解成为去除 1,2,4-TCB 的主要手段^[2].已见报道的 1,2,4-TCB 降解菌主要有 *Pseudomonas aeruginosa* RH01^[3]、*Pseudomonas* sp. strain PS12^[4]、*Pseudomonas* sp. strain P51^[5]、*Burholderia* sp. strain PS14^[4]、*Dehalococcoides* strain CBDB1^[6].但大多数工作主要集中在降解菌株的降解能力、降解途径等方面.除 1991 年荷兰学者 Van der Meer^[5]报道过 110kb 三氯苯的降解质粒外,一直没有关于分子

水平上三氯苯降解机理的研究报道.作者从天津化工厂的污泥中分离到一株以 1,2,4-三氯苯为唯一碳源的施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*, *P. stutzeri*)THSL-1,从中发现一个平均大小为 40.2kb 的新的降解性质粒,并对质粒性质进行了初步研究.

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.

收稿日期:2004-11-19

基金项目:国家“863”项目(2002AA601170,2002AA601150);清华大学基础研究基金(JC2003011)

* 责任作者,副教授, wanghui@tsinghua.edu.cn

培养基采用 LB 培养基和无机盐培养基.无机盐培养基组分:Na₂HPO₄·2H₂O 7g; KH₂PO₄ 2g; (NH₄)₂SO₄ 0.5g; MgSO₄·7H₂O 0.2g; 1mL 微量元素溶液(主要成分:Ca(NO₃)₂·4H₂O 600mg; CuSO₄·5H₂O 40mg; FeSO₄·7H₂O 200mg; ZnSO₄·7H₂O 20mg; MnSO₄·4H₂O 20mg; H₃BO₃ 3mg; NaMoO₄·2H₂O 4mg),加水至 1L, 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℃, 150r/min,摇床振荡培养;经过 4~5d 驯化后,取 1~2mL 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 OD₆₀₀ 表示.用离子色谱测定氯离子浓度,在测定之前,样品经过 0.45μm 微孔滤膜过滤.

1.4 菌种鉴定

通过对菌株 THSL-1 的 16S rDNA 克隆和序列分析进行菌种鉴定.实验中用牙签挑取平板上单一菌落,溶于 50mL Tris-EDTA(三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸)中,95℃,15min,水浴.用于 16S rDNA 扩增的 PCR 反应引物为正向引物 Pf: 5'>AGAGFTTGTATCCIGG-CICAG<3';反向引物 Pr: 5'>TACGG-CTACCTTGT-TACG-ACTT<3', PCR 反应体系(50μL)为 10×buffer、1.5mmol/L MgCl₂、150μmol/L dNTPs、75pmol/L 引物、Taq 酶等.PCR 反应条件为 94℃ 5min; 94℃ 1min,46℃ 1min,72℃ 2min,30 个循环;72℃ 10min. 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[7]的方法进行.测序由上海生工

生物工程有限公司完成,最后将测序结果用 Vector NTI Suite 8.0 软件与 Genbank 中的序列进行同源性比较.

1.5 质粒提取和转化

质粒提取方法按文献[7]的中量制备质粒方法;质粒转化按文献[7]的 Ca²⁺诱导大肠杆菌转化法,试验中宿主菌选用 *E.coli* JM109.

1.6 质粒大小的确定

选用 *Hind*III、*Bam*HI、*Xho*II 分别对质粒进行单酶切和双酶切,通过电泳结果对酶切条带进行逻辑分析,确定质粒的大小.具体方法按照文献[7]进行.

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 THSL-1.菌株在 LB 培养基上生长时菌落为规则的圆形,表面光滑、湿润.细胞为革兰氏阴性、杆状.

PCR 扩增菌株 THSL-1 的 16S rDNA 基因,克隆后进行测序,测序结果与 Genbank 上的序列进行同源性比对.结果表明,该菌与 *Pseudomonas stutzeri* 亲缘关系最近,同源性为 99%.同时结合细菌的形态特征,初步鉴定菌株 THSL-1 为 *Pseudomonas stutzeri*.

有报道表明,*Pseudomonas stutzeri* 的降解对象主要是对二甲苯,原油中大量存在的芳香族化合物萘和甲基萘,高分子量的石油聚乙二醇,及三氯乙烯、1,1-二氯乙烯等物质.还未有降解氯代芳香烃的报道.

2.2 THSL-1 降解 1,2,4-TCB 的能力

接种一定量 THSL-1 到以 1,2,4-TCB 为唯一碳源的无机盐培养液中,1,2,4-TCB 浓度为 4×10⁻³mol/L,于 30℃、150r/min 条件下振荡培养.定时取样测定菌体浓度和氯离子浓度.由于氯离子的释放和 1,2,4-TCB 的降解同步,所以通过氯离子浓度的增加可以反映细菌对 1,2,4-TCB 的降解能力.试验结果见图 1.

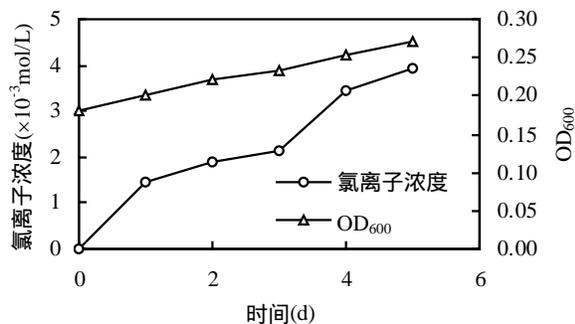


图 1 菌株 THSL-1 生长和氯离子释放

Fig.1 The growth of strain THSL-1 and the release of chloride

2.3 质粒检测和质粒转化

本试验对 THSL-1 进行质粒提取,再将质粒转化到无质粒的 *E.coli* 中,结果如图 2 所示.由图 2 可以看出,转化子中有 1 个和原质粒位置相同的质粒条带.

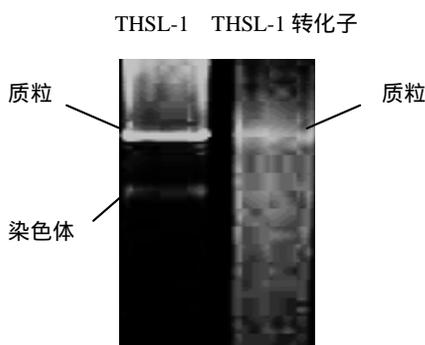


图 2 质粒和转化子

Fig.2 Plasmid and transformant

试验中选择的受体菌 *E.coli* JM109 不含质粒,不能利用 1,2,4-TCB.将所提取质粒 pTHSL-1 转化到 *E.coli* JM109 中,转化结果见表 1.由表 1 可见,对照组 2 的 *E.coli* JM109 以及试验组中未能转化的 *E.coli* JM109 只能在 LB 培养基上生长,在以 1,2,4-TCB 为唯一碳源的无机盐培养基上不能生长.不加受体菌的 pTHSL-1 DNA 对照组没有任何菌落,加质粒 DNA 和受体菌的试验组在只有 1,2,4-TCB 的无机盐平板上能够生长,说明转化子已经获得了利用 1,2,4-TCB 的能力,同时也表明该降解质粒的宿主可能比较广泛^[12],有

利于进一步的基因修饰和改造.

表 1 THSL-1 质粒转化

Table 1 Transformation of plasmid harboured in strain THSL-1

编号	质粒 DNA	受体菌	1,2,4-TCB 的无机盐培养基	LB 培养基
实验组	THSL-1	<i>E.coli</i> JM109	少数转化子	菌落密集
对照组 1	THSL-1	无菌水	-	-
对照组 2	无菌水	<i>E.coli</i> JM109	-	菌落密集

注: - 为不生长

2.4 转化子降解 1,2,4-TCB 能力的测定

试验方法如 2.3 中所述.试验周期为 4d, 1,2,4-TCB 浓度为 4×10^{-3} mol/L,于 37 °C、150r/min 条件下振荡培养,结果见图 3.从图 3 中转化子生长和氯离子浓度来看,由质粒 pTHSL-1 转化 *E.coli* JM109 后构成的重组子能够降解 1,2,4-TCB.当降解到第 4d 时,菌体密度为 0.34,氯离子浓度为 2.34×10^{-3} mol/L.由此说明质粒 pTHSL-1 上携带降解 1,2,4-TCB 的基因,该质粒为降解质粒.

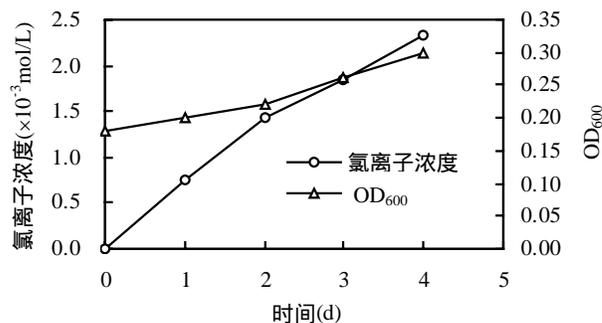


图 3 转化子生长和氯离子释放

Fig.3 The growth of transformant and the release of chloride

2.5 质粒大小的确定

质粒经 HindIII、BamHI、XhoII 分别进行单酶、双酶消化,所得片段见表 2.双酶消化质粒 DNA 的片段数应是 2 个酶单独消化所得片段数之和.根据这个原则进行逻辑分析,可以初步确定质粒大小.酶切结果如图 4 所示.该质粒所携带的遗传信息可能与早年报道的 110kb 的大质粒有所不同.且该质粒能够在 *E.coli* JM109 中复制表

达,其宿主可能比较广泛,因此在分子水平上对该质粒作进一步研究有一定指导意义。

表 2 单酶和双酶消化质粒片段及其分子量大小(kb)

Table 2 Fragments and their size of plasmid DNA digested by single and double endonucleases (kb)

片段	HindIII	BamHI	HindIII/ BamHI	XhoII	XhoII/ HindIII	XhoII/ BamHI
1	22.42	21.48	15.60	22.42	9.74	21.30
2	11.18	16.96	11.30	3.53	4.50	3.53
3	5.10	2.46	5.00	3.53	4.19	3.53
4	1.40		3.30	3.02	3.46	3.02
5	1.30		2.03	2.60	3.25	2.60
6			1.40	2.20	3.00	1.52
7			1.30	1.10	2.45	0.90
8			0.70	0.90	2.12	0.89
9				0.85	1.80	0.70
10					1.27	0.68
11					1.18	
12					1.02	
13					0.90	
14					0.80	
总计	41.40	40.90	40.63	40.15	39.68	38.67

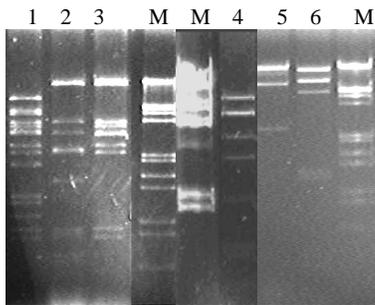


图 4 pTHSL-1 单酶和双酶消化

Fig.4 The single and double digestion of pTHSL-1
1.XhoII/HindIII 2.XhoII/BamHI 3.XhoII 4.HindIII/BamHI
5.BamHI 6.HindIII M.2.2kbmarker

根据酶切后的电泳结果,确定各片段大小,对不同内切酶消化后的片段总和取平均即得出质粒的平均大小为 40.2kb。

3 结论

3.1 从氯苯生产车间的土壤中筛选到 1 株以

1,2,4-TCB 为唯一碳源的菌株.经过 16S rDNA 序列测定,初步鉴定为施氏假单胞菌.命名 THSL-1.

3.2 将质粒 pTHSL-1 转化到 *E.coli* JM109 中,转化子能够在以 1,2,4-TCB 为唯一碳源的无机盐培养基中生长,且能够降解 1,2,4-TCB,该质粒为降解质粒。

3.3 电泳检测酶切条带,对条带进行逻辑分析,最终确定质粒平均大小为 40.2kb。

参考文献:

- [1] 刘 军,陈旭庚,李家斌,等.1,2,4-三氯苯的研究动态 [J]. 中国工业医学杂志,2002,15(3):161-170.
- [2] EPA400/5-80-028. Office of Water Regulation and Standards [S].
- [3] Brunsbach FR, Reineke W. Degradation of chlorobenzene in soil slurry by a specialized organism [J]. Applied and Microbiology Biotechnology, 1994,42:415-420.
- [4] Peter S, Wittich R M, Peter F, *et al.* Degradation of 1,2,4-trichloro- and 1,2,4,5-tetrachlorobenzene by *Pseudomonas* Strains [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991,57(5): 1430-1440.
- [5] Van der Meer J R, Van Neerven A R W, Vries E J de Vries, *et al.* Cloning and characterization of plasmid-encoded genes for the degradation of 1,2-Dichloro-, 1,4-Dichloro-, and 1,2,4-Tri-chlorobenzene of *Pseudomonas* sp. strain P51 [J]. Journal of Bacteriology, 1991,173(1):6-15.
- [6] Adrian L, Szewzyk U, Wecke J, *et al.* Bacterial dehalor-espersion with chlorinated benzenes [J]. Nature, 2000,408:580-583.
- [7] [美] J 萨姆布鲁克, D W 拉塞尔.分子克隆实验指南 [M]. 黄培堂,王嘉玺,朱厚础,等译.北京:科学出版社, 2002.
- [8] 罗如新,沈 标,李顺鹏.一氯苯的微生物厌氧降解及其降解性质粒的研究 [J]. 南京农业大学学报,1996,2(20):63-66.

作者简介:宋 蕾(1978-),女,内蒙赤峰人,蒙古族,清华大学环境科学与工程系在读博士生,主要从事环境微生物方面的研究.发表论文 3 篇。