

文章编号:1673-1689(2006)06-0001-06

萘降解细菌的分离及其降解和 转座基因的分子检测

蔡宝立, 丁蕊, 任河山, 雷虹, 严冰, 赵化冰

(南开大学 教育部生物活性材料重点实验室, 天津 300071)

摘要: 用富集培养法, 从工业废水和活性污泥中分离到9个高效降解萘的细菌菌株(ND7~ND15)。对菌株ND7、ND8、ND9和ND10所进行的16S rDNA序列分析表明, 它们都属于假单胞菌属(*Pseudomonas*)。PCR实验结果表明, 上述4个菌株都含有萘降解基因 *nahAc*、*nahG*、*nahH* 和 *catA*, ND7和ND8菌株还含有萘降解基因 *nahU*。DNA杂交实验结果表明, 上述9个萘降解菌株都含有转座酶基因 *tnpA1* 和解体酶基因 *tnpR*。这些结果表明, 萘降解细菌的降解基因和转座基因具有高度的保守性。酶学实验证明, ND7、ND8、ND9和ND10菌株都具有儿茶酚1,2-双加氧酶活力和儿茶酚2,3-双加氧酶活力, 但在不同菌株中这两种酶的比活力有明显不同。

关键词: 假单胞菌; 萘降解基因; 转座酶基因 *tnpA1*; 解体酶基因 *tnpR*; 儿茶酚1,2-双加氧酶; 儿茶酚2,3-双加氧酶

中图分类号: X 172

文献标识码: A

Isolation of Naphthalene-Degrading Bacteria and Molecular Detection of the Degradative and Transposable Genes

CAI Bao-li, DING Rui, REN He-shan, LEI Hong, YAN Bing, ZHAO Hua-bing
(Key Laboratory of Bioactive Materials, Ministry of Education, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: Nine high efficient naphthalene-degrading strains (ND7~ND15) were isolated from industrial wastewater and activated sludge by enrichment culture. 16S rDNA sequencing identified the four strains among them, ND7, ND8, ND9 and ND10, as *Pseudomonas*. PCR experiments showed that the four strains possess naphthalene catabolic genes *nahAc*, *nahG*, *nahH* and *catA*. Moreover, strains ND7 and ND8 also contained naphthalene catabolic genes *nahU*. DNA hybridization experiments proved that the nine naphthalene-degrading strains have transposase gene *tnpA1* and resolvase gene *tnpR*. These results indicated that degradative and transposable genes of the naphthalene-degrading bacteria are highly conserved. Enzymology experiments revealed that strains ND7, ND8, ND9 and ND10 could exhibit both catechol 1,2-dioxygenase and catechol 2,3-dioxygenase activities, although the specific activities of the two enzymes are different in the four strains.

Key words: *Pseudomonas*; naphthalene-degrading genes; *tnpA1*; *tnpR*; catechol 1,2-dioxygenase;

收稿日期: 2006-07-01; 修回日期: 2006-07-03.

基金项目: 国家自然科学基金项目(30270274)和南开大学学生创新基金项目(2005).

作者简介: 蔡宝立(1945-), 男, 河北兴隆人, 教授, 博士研究生导师.

catechol 2,3-dioxygenase

多环芳香烃(PAHs)是一类由2个或2个以上苯环并合在一起的化合物。由于这类化合物具有低水溶性、难降解性、潜在的致癌性和容易被环境颗粒所吸附等特点,所以被确定为主要的环境污染物,其生物降解机理和污染环境的生物修复研究受到广泛重视^[1-2]。

萘是含有两个苯环的最简单的 PAH 化合物,其生物降解主要有3种途径^[3-4]。第一种是儿茶酚间位裂解途径,上游操纵子(*nahAaAbAcAdBF-CED*)编码的酶将萘氧化成水杨酸,下游操纵子(*nahGTHINLOMKJ*)编码的酶将水杨酸降解成可进入三羧酸循环的小分子物质。下游途径的第一步反应由 *nahG* 基因编码的水杨酸羟化酶催化,将水杨酸氧化成儿茶酚;第二步反应由 *nahH* 基因编码的儿茶酚 2,3-双加氧酶(C23O)催化,使儿茶酚经间位开环变成 2-羟粘康酸半醛。萘降解的第二种途径是儿茶酚邻位裂解途径,该途径萘到儿茶酚的降解与间位途径相同,儿茶酚之后的降解步骤则不同,其中儿茶酚的开环反应由 *catA* 基因编码的儿茶酚 1,2-双加氧酶(C12O)催化。萘降解的第三种途径是龙胆酸途径,萘到水杨酸的降解与前两种途径相同,水杨酸以后的降解步骤则不同,水杨酸不转变成儿茶酚,而是转变成龙胆酸,然后在龙胆酸途径的酶的催化下继续降解。许多萘降解细菌同时含有间位和邻位裂解途径的基因,但这两个途径的相互关系和调节机制,目前并不十分清楚。

自从 1990 年 Tsuda 和 Iino^[5] 在萘降解质粒 NAH7 中发现萘降基因位于有缺陷的转座子 Tn4655 中以后,在其它萘降解质粒中也发现与萘降解基因转座有关的基因,如转座酶基因 *tnpA* 和解体酶基因 *tnpR*^[6-8]。这类转座基因在萘降解基因的进化和扩散从而使细菌适应环境的过程中起重要作用。因此,研究转座基因在萘降解细菌中存在的普遍性和转座子结构的多样性,以及它们的作用机制,具有十分重要的理论和应用价值。

在萘降解质粒 pND6-1 全序列测定和生物信息学分析的基础上^[6],通过对不同环境中分离的萘降解菌株的降解基因和酶的分析,以及与萘降解基因转座有关的基因的检测,在分子水平上阐明萘降解细菌的多样性以及降解和转座基因的保守性。

万方数据

1 材料与方法

1.1 萘降解细菌的分离和鉴定

萘降解菌株 ND7~ND15 分离自天津地区的工业废水和活性污泥,分离方法见文献[9]。假单胞菌 ND24^[9] 和 ND6^[6,10] 为作者所在实验室以前分离和保存的萘降解菌株。细菌 16S rRNA 基因的 PCR 扩增、克隆、测序和分析见文献[11]。

1.2 培养基和培养条件

含萘的无机盐培养基(MM)成分见文献[12],培养条件见文献[9]。

1.3 萘降解曲线测定

用几个装有 MM 液体培养基的摇瓶培养萘降解细菌,每隔一定时间取出 1 瓶,用异辛烷抽提其中的萘,测定抽提液的 OD₃₁₁(代表萘含量)^[13],以时间(h)为横坐标,OD₃₁₁为纵坐标作图,得萘降解曲线。

1.4 质粒 DNA 检测

按文献[6]的方法提取萘降解菌株的质粒 DNA,然后进行琼脂糖凝胶电泳。

1.5 萘降解基因的 PCR 检测

提取萘降解菌株的总 DNA,用下列 PCR 引物扩增萘降解基因。用 *nahH* 引物扩增出的 DNA 是 376 bp 的 *nahH* 基因的 5'端片段,用 *nahAc* 引物扩增出的 DNA 是 992 bp 的 *nahAc* 基因的中间片段。其它引物扩增出的 DNA 分别是 *nahG*、*nahU* 和 *catA* 的完整基因。PCR 反应条件为 94 °C 变性 1 min, 56~58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环。

nahAc 引物: 5'-TGGCGATGAAGAACTTT TCC-3'

5'-AACGTACGCTGAACCGAGTC-3'

nahG 引物: 5'-GGAGACATCATATGAAAA ACAATAAACCTGGCTTG-3'

5'-CCAATCTCGAGCCCTTGACGTAGCAC ACCC-3'

nahU 引物: 5'-GGAGACATCATATGCAAA ATTCTACTTCTGCTCTGAA-3'

5'-CCAATCTCGAGGGCCGCTTGCGCGC-3'

nahH 引物: 5'-GGGATCCAGAATAGGTGA TGTCTATGAA-3'

5'-GTCAGCATACAACCTCGAAGT-3'

catA 引物;5'-GCACCATTGAGGGCCCGCTCTAC-3'

5'-GGATATCGCCAATCAGGCCGTCA-3'

1.6 C12O 和 C23O 的检测

用 30 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH 7.4)悬浮细胞,在冰浴中超声波破碎,然后 4 °C、15 000 r/min 离心 30 min,收集上清液(粗酶液)。用分光光度法测定 C12O 和 C23O 活力,在 500 μ L 反应体系中测定,反应液成分为 30 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH 7.4)420 μ L,20 mmol/L 苯酚 10 μ L,1 mmol/L EDTA 20 μ L,粗酶液 50 μ L。测定 C12O 时,是测定其催化产物粘糠酸的产量,使用波长为 260 nm。测定 C23O 时,是测定其催化产物 2-羟基粘糠酸半醛的产量,使用波长为 375 nm。1 个酶活力单位定义为每分钟催化生成 1 nmol 产物所需的酶量。比活力定义为每毫克蛋白拥有的酶活力单位(U/mg)。蛋白质浓度测定方法见文献[14]。

1.7 转座基因的 DNA 杂交

用 PCR 方法,以萘降解菌株假单胞菌 ND6 的总 DNA 为模板,扩增转座酶基因 *tnpA1* (388 bp)和解体酶基因 *tnpR* (616 bp)。用随机引物标记试剂盒(北京博大泰克公司)和³²P- α -dCTP 标记纯化的扩增产物,然后与固定在尼龙膜上的萘降解菌株的总 DNA 杂交,进行 X-光胶片放射自显影^[15]。PCR 引物是根据萘降解质粒 pND6-1 的序列^[6]设计的。引物序列如下:

tnpA1 引物;5'-GCTGTTAGGGTTTGAGACTT-3'

5'-GTTGGGGATGGTGGTTTAGT-3'

tnpR 引物;5'-AAGCCTTACCAGCGTCGTTC-3'

5'-CGCCTGGTGTTCACCTGTT-3'

2 结果与讨论

2.1 萘降解菌株的分离和 16S rRNA 基因鉴定

用富集培养法,从天津排污河的废水中分离到萘降解菌株 ND7 和 ND8,从焦化厂废水中分离到萘降解菌株 ND9,从废水处理场的活性污泥中分离到萘降解菌株 ND10。这 4 个菌株都能以萘为唯一碳源生长,在 30~36 h 内将无机盐培养基中 2 g/L 的萘降解 99%以上(见图 1)。此外,还分离到萘降解菌株 ND11、ND12、ND13、ND14 和 ND15。

用 PCR 引物 27F 和 1492R 扩增 ND7、ND8、ND9 和 ND10 菌株的 16S rRNA 基因,得到大小分

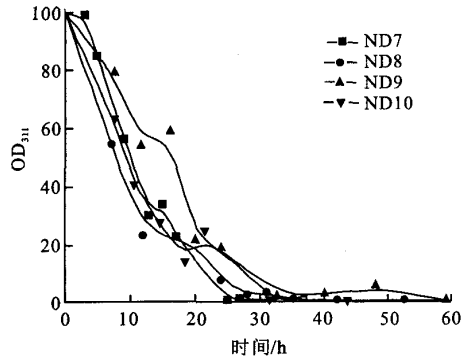


图1 ND7、ND8、ND9 和 ND10 菌株的萘降解曲线

Fig.1 Naphthalene degradation curves of strains ND7, ND8, ND9 and ND10

别为 1 459 bp、1 480 bp、1 499 bp 和 1 460 bp 的 DNA 片段,它们的 GenBank 注册号分别为 DQ660890、DQ657849、DQ657850 和 DQ832313。将这些序列与 GenBank 中的类似序列进行 Blast 比对后发现,它们与 23 个假单胞菌(*Pseudomonas*)菌株的 16S rRNA 基因的同源性在 99% 以上,所以 ND7、ND8、ND9 和 ND10 菌株均被鉴定为 *Pseudomonas* sp. 这 23 个 *Pseudomonas* 菌株的 GenBank 注册号分别是: *Pseudomonas fulva* AJ 2130 (AB047001); *P. parafulva* AJ 2130 (AB060133); *P. plecoglossicida* (AB009457); *Pseudomonas* sp. BBTR5 (DQ337600); *Pseudomonas* sp. dcm5B (AF430123); *Pseudomonas* sp. J19 (DQ127530); *Pseudomonas* sp. WBC-3 (AY040872); *Pseudomonas* sp. BCNU171 (DQ229316); *Pseudomonas* sp. BS (AB180241); *P. putida* HOT19 (AY738649); *P. putida* Dsp-1 (DQ482656); *Pseudomonas* sp. D8 (DQ127528); *Pseudomonas* sp. ML2 (AF378011); *Pseudomonas* sp. SV4 (AF251334); *P. putida* KL47 (DQ157470); *P. putida* (AF291048); *Pseudomonas* sp. 12B_3 (AY689079); *P. putida* BCNU106 (DQ229315); *Pseudomonas* sp. PALXIL09 (DQ411819); *Pseudomonas* sp. HR 13 (AY032725); *P. monteilii* CIP 104883T (AB021409); *P. Mevaloni* (AJ299216); *Pseudomonas* sp. Fa24 (AY131219)。上述 27 个菌株的 16S rRNA 基因序列的系统树如图 2 所示。

萘降解菌株的质粒 DNA 检测表明,ND7、ND8、ND9 和 ND10 都含有一个大质粒,其大小与假单胞菌 ND6 菌株的萘降解质粒 pND6-1 (102 kb) 接近(见图 3),但这些质粒是否编码萘降解途径,有待通过 DNA 杂交实验加以证明。

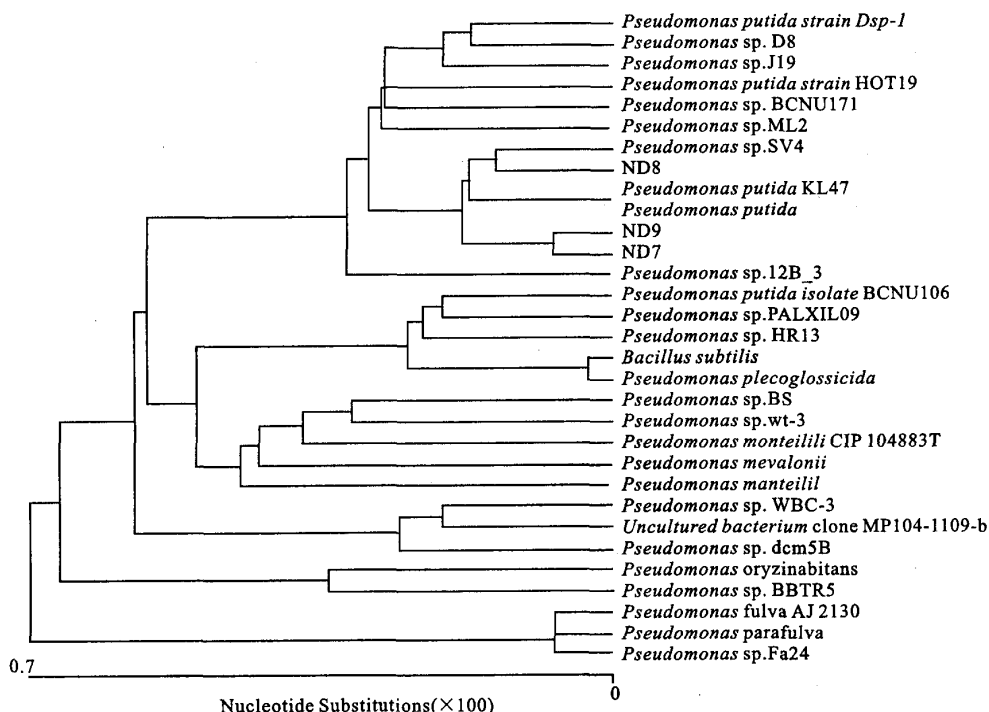
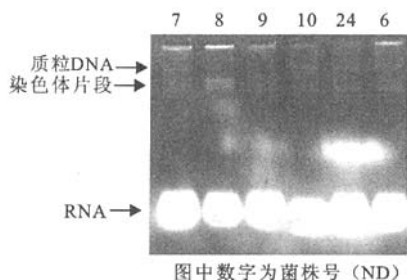


图 2 ND7、ND8、ND9、ND10 和其它相关菌株的 16S rRNA 基因序列的系统树

Fig. 2 16S rRNA gene phylogenetic tree of ND7, ND8, ND9, ND10 and related strains



图中数字为菌株号 (ND)

图 3 萘降解菌株的质粒检测

Fig. 3 The detection of plasmid of naphthalene-degrading strains

2.2 萘降解基因 *nahAc*、*nahG*、*nahU*、*nahH* 和 *catA* 的检测

萘降解上游途径的第一步反应由 *nahAcAbA-cAd* 基因编码的萘双加氧酶催化,将萘氧化成顺-二氢二羟萘,其中 *nahAc* 编码萘双加氧酶 Fe-S 蛋白大亚基。*nahG* 和 *nahH* 分别编码水杨酸羟化酶和儿茶酚 2,3-双加氧酶,催化萘降解下游途径的前两步反应^[3]。*nahU* 是 *nahG* 的同工酶基因,是在萘降解质粒 pND6-1 中发现的新降解基因,在其它萘降解细菌中是否也存在类 *nahU* 基因,是一个值得探讨的问题^[16]。此外,*catA* 基因编码儿茶酚 1,2-双加氧酶,是芳香烃儿茶酚邻位裂解途径的关键基因,

主要存在于降解苯酚、苯甲酸及其衍生物的细菌中,同时也存在于以儿茶酚间位途径为主的萘降解菌中,但对其存在的普遍性及间位和邻位途径利用的调控机制报道甚少。因此,有必要通过对不同萘降解细菌的上述基因的检测,以及儿茶酚 1,2-双加氧酶和儿茶酚 2,3-双加氧酶的活力检测,为上述问题的阐明提供有用资料。

对 ND7、ND8、ND9 和 ND10 菌株以及以前分离并鉴定的 ND6 和 ND24 菌株所进行的萘降解基因的检测表明,这 6 个菌株都含有 *nahAc*、*nahG*、*nahH* 和 *catA* 基因,但 *nahU* 基因只存在于 ND6、ND7、ND8 和 ND24 菌株中,ND9 和 ND10 菌株不含有 *nahU* (见图 4)。这可以说明以下 3 个问题:第一,*nahAc* 可以用作检测萘降解细菌的标记基因;第二,虽然 *nahH* 和 *catA* 分别是控制儿茶酚间位和邻位降解途径的关键基因,但它们可能同时存在于大多数萘降解细菌中,两个基因和两种途径的利用可能有其特殊的调节方式;第三,*nahG* 的同工基因 *nahU* 只存在于 6 个萘降解菌中的 4 个菌株中,这表明,虽然 *nahU* 对细菌适应不利环境是有益的,但它并不为每种萘降解菌所必需,这一结果与作者用 DNA 杂交实验对萘降解细菌所进行的 *nahU* 基因的检测结果一致^[16]。

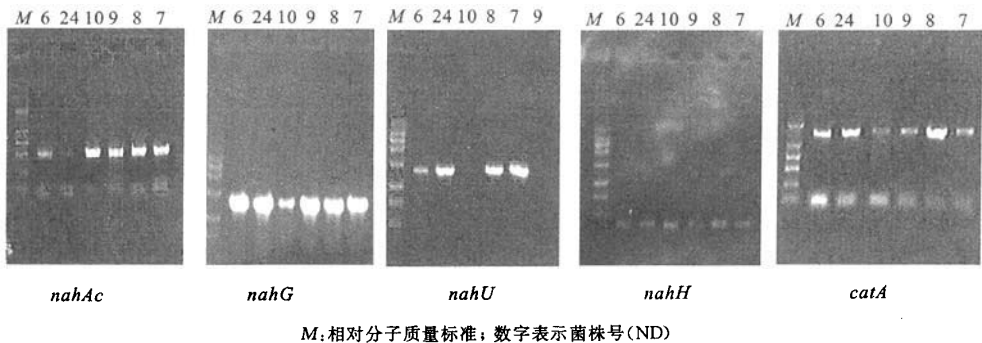


图 4 6 个菌株萘降解基因的 PCR 检测

Fig. 4 Detection of naphthalene degradation genes of six strains by PCR

2.3 萘降解菌株的 C12O 和 C23O 活力检测

对 6 个萘降解菌株 (ND6、ND7、ND8、ND9、ND10 和 ND24)粗酶液的 C12O 和 C23O 活力进行了检测。结果表明:ND9 的 C12O 和 C23O 活力都很高;ND7 和 ND8 的 C12O 活力较高,C23O 活力较低;ND10 和 ND24 的 C23O 活力较高,C12O 活力较低;ND6 的两种酶活力大体相等 (见表 1)。尽管这些菌株的 C12O 和 C23O 活力不同,但它们在萘降解能力上并没有明显区别(见图 1)。这表明这两种酶可能不是萘降解途径的主要限速酶,大多数萘降解菌可能同时利用间位和邻位两种途径,有的间位途径占优势,有的邻位途径占优势。两种途径的诱导和调控可能与细菌生长所利用的碳源种类有关。例如,当 ND6 菌株在以苯甲酸为唯一碳源生长时,能诱导 C12O 活力的增加,其粗酶液中 C12O 比活力与 C23O 比活力的比值约是 10 : 1 (49.8 U/mg : 4.8 U/mg),而该菌株在以萘为唯一碳源培养时这个比值约是 0.9 : 1 (19.3 U/mg : 22.1 U/mg)。上述结果为芳香烃代谢中邻位和间位两种途径的利用方式和调节机制提供了有用资料。

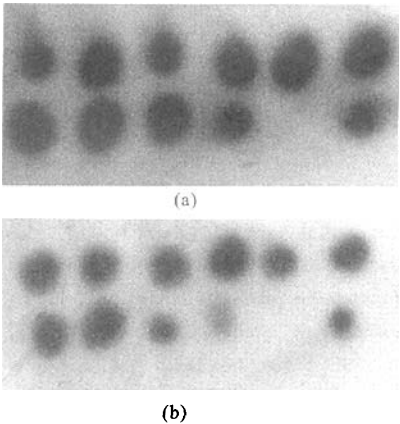
表 1 萘降解菌株粗酶液的 C12O 和 C23O 比活力

Tab. 1 Specific activities of C12O and C23O of naphthalene-degrading strains in crude extracts

菌 株	C12O 比活力/(U/mg)	C23O 比活力/(U/mg)
ND7	43.7	7.7
ND8	28.9	4.8
ND9	71.2	149
ND10	26.4	74
ND24	27.7	65.7
ND6	19.3	22.1

2.4 转座酶基因 *tnpA1* 和解体酶基因 *tnpR* 的检测

在萘降解细菌中普遍存在转座子结构,例如,假单胞菌 ND6 菌株的萘降解质粒 pND6-1 在两个位置上存在 5 个转座基因 (*tnpA1-tnpR*; *tnpC-tnpR-tnpA*)^[6]。这些转座子结构与萘降解基因的转移和重组以及降解途径的进化密切相关。因此,研究萘降解菌株中转座基因的普遍性、保守性和多样性,具有重要意义。以 pND6-1 质粒中的转座酶基因 *tnpA1* 和解体酶基因 *tnpR* 为探针所进行的 DNA 杂交实验表明,在所检测的 11 个萘降解菌株中,都含有 *tnpA1* 和 *tnpR*(见图 5),这表明萘降解细菌的转座基因具有高度的保守性。



图(a)为以 *tnpR* 为探针的检测,图(b)为以 *tnpA1* 为探针的检测;每个图中的第一行从左至右分别为 ND7、ND8、ND11、ND12、ND9 和 ND13,第二行从左至右分别为 ND15、ND10、ND14、ND24 和 ND6。

图 5 萘降解菌株转座基因 *tnpA1* 和 *tnpR* 的 DNA 杂交检测

Fig. 5 Detection of transposable genes *tnpA1* and *tnpR* of naphthalene-degrading strains by DNA hybridization

3 结 论

1)从萘污染环境中分离到9个高效降解萘的菌株,其中ND7、ND8、ND9和ND10菌株经16S rRNA基因序列分析,鉴定为假单胞菌(*Pseudomonas*)。

2) *nahAc* 可以用作检测萘降解细菌的标记基因。

3) *nahH* 和 *catA* 基因可能同时存在于大多数萘降解细菌中,两个基因的诱导和表达调控可能与细菌生长所利用的碳源有关,苯甲酸及其衍生物能够诱导和增加 *catA* 基因(儿茶酚1,2-双加氧酶)的表达。

4) *nahG* 的同工基因 *nahU* 存在于大多数萘降解细菌中, *nahU* 的存在对细菌适应不利环境是有益的,但它并不为每种萘降解细菌所必需。

参考文献:

- [1] Mueller J G, Cerniglia C E, Pritchard P H. Bioremediation of environments contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons[M]//Crawford R L, Crawford D L. Bioremediation Principles and Applications. Cambridge: Cambridge University Press, 1996.
- [2] Johnsen A R, Wickb L Y, Harmsb H. Principles of microbial PAH-degradation in soil[J]. *Environmental Pollution*, 2005, 133:71—84.
- [3] Yen K-M, Serdar C M. Genetics naphthalene catAbolism in *Pseudomonas*[J]. *CRC Crit Rev Microbiol*, 1988, 15:247—267.
- [4] 高晓莉,周宁一. 芳香烃分解代谢的龙胆酸途径[J]. *微生物学通报*, 2003, 30(3):81—85.
- [5] Tsuda M, Iino T. Naphthalene degrading genes on plasmid NAH7 are on a defective transposon[J]. *Mol Gen Genet*, 1990, 223:33—39.
- [6] Li Wei, Shi Jian-dang, Wang Xue-gang, et al. Complete nucleotide sequence and organization of the naphthalene catabolic plasmid pND6-1 from *Pseudomonas* sp. strain ND6[J]. *Gene*, 2004, 336: 231—240.
- [7] Dennis J J, Zylstra G J. Complete sequence and genetic organization of pDTG1, the 83 kilobase naphthalene degradation plasmid from *Pseudomonas putida* strain NCIB 9816-4[J]. *J Mol Biol*, 2004, 341:753—768.
- [8] Sota M, Yano H, Ono A, et al. Genomic and functional analysis of the IncP-9 naphthalene— catabolic plasmid NAH7 and its transposon Tn4655 suggests catabolic gene spread by a tyrosine recombinase[J]. *J Bacteriol*, 2006, 188:4057—4067.
- [9] 蔡宝立,李永君,梁靖,等. 降解萘的假单胞菌 ND24 菌株的分离和萘污染土壤的生物修复[J]. *食品与生物技术学报*, 2005, 24(6):6—9.
- [10] 张心平,岳晓含,黄今勇,等. 萘降解质粒 pND6 的分离和鉴定[J]. *应用与环境生物学报*, 2000, 6(2):187—190.
- [11] Jiang Yun, Yang Xiang-long, Liu Bin, et al. Catechol 2,3-Dioxygenase from *Pseudomonas* sp. ND6: gene sequence and enzyme characterization[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, 68:1798—1800.
- [12] 蔡宝立,王淑芳,黄今勇,等. 黄杆菌 ND3 菌株的分离和降解萘的研究[J]. *环境化学*, 1998, 17(5):434—438.
- [13] 潘继伦,扈健洁,蔡宝立,等. 降解萘的黄杆菌 ND3 菌株的固定化研究[J]. *离子交换与吸附*, 1999, 15(1): 49—53.
- [14] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, 72:248—254.
- [15] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, et al. Current Protocols in Molecular Biology[M]. New York: Wiley, 1989.
- [16] Zhao Hua-bing, Chen De-fu, Li Yong-jun, et al. Overexpression, purification and characterization of a new salicylate hydroxylase from naphthalene-degrading *Pseudomonas* sp. strain ND6[J]. *Microbiol Res*, 2005, 160:307—313.

(责任编辑:秦和平)