

Janibacter sp. 对活性污泥反应器中二苯并呋喃降解的强化作用 及其遗传学分析

朱 涛^{1,3} 欧阳荟² 金士威^{1,3} 徐 盈^{1,3} 宋碧玉² 徐旭东^{1,3}

(1. 中国科学院水生生物研究所 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072; 2. 武汉大学资源与环境科学学院, 武汉 430072;
3. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要:二苯并呋喃(DF)是研究二 英类化合物生物降解的模式化合物之一。本文报道了一种降解菌 *Janibacter* sp. 对活性污泥降解二苯并呋喃的强化作用,以及对其降解基因的分析结果。向反应器中添加 5% 的降解菌,与活性污泥共同作用,可在 48h 内将约 56mg/L 剂量的 DF 几乎完全降解,提高降解率 28% 以上。利用 PCR 方法,克隆和测序分析证明有 DF 降解基因丛的存在,并且发现以丰富培养基在高温下培养可去除该基因丛;丢失该基因丛的突变株同时失去利用 DF 作为唯一碳源进行生长的能力,显示其很可能位于一个大质粒上。

关键词:二苯并呋喃;降解; *Janibacter* sp.

中图分类号:Q172

文献标识码:A

文章编号:1000-3207(2007)04-0499-04

二 英类化合物通常是化工合成和不完全燃烧过程中产生的副产物,它包括多氯代二苯并二 英、多氯代二苯并呋喃和共平面多氯代联苯。其中 2,3,7,8-四氯代二苯并二 英是迄今人类发现的毒性最强的化合物,不仅具有强烈的“三致”性,而且在其极低剂量暴露下还具有内分泌干扰作用。由于高度的亲脂性,这一类物质往往积累于动物脂肪层,并通过食物链的传递危害人类^[1]。据报道,二 英类化合物可在厌氧条件下进行脱氯反应,形成低氯代或无氯代衍生物,之后实现降解。其脱氯过程可由微生物参与催化,也可能还包括有非生物参与的反应^[2,3]。

由于二苯并呋喃(DF)和二苯并二 英(DD)的化学结构实际上分别为多氯代二苯并呋喃和多氯代二苯并二 英在无氯取代情况下的母环结构,因此,在研究二 英类化合物的生物降解时它们通常被选作模式化合物。已有报道,*Sphingomonas wittichii* RW1 等菌株能分解 DD 和 DF^[4,5], *Terrabacter* sp. DBF63, YK1, YK3, *Rhodococcus* sp. strain YK2 和 *Microbacterium* sp. strain YK18 等菌株能有效分解 DF^[6]。其中 *Terrabacter* sp. YK3 降解 DF 必需的 *dfdA* 基因

丛已克隆鉴定,并发现在 *Rhodococcus* 和 *Microbacterium* 都存在同源基因。该基因丛包括 *dfdA1* (DF 双加氧酶 亚基), *dfdA2* (DF 双加氧酶 亚基), *dfdA3* (DF 双加氧酶铁氧还蛋白组分) 和 *dfdA4* (DF 双加氧酶铁氧还蛋白还原酶) 基因,至少在 *Terrabacter* sp. YK3 中位于一个大质粒 pYK3 上^[7]。我们在研究中也分离到一株快速降解二苯并呋喃的 *Janibacter* 属菌株(金士威等,待发表)。本文报道该菌株对活性污泥降解二苯并呋喃的强化作用和对降解活性的遗传学分析。

1 材料和方法

1.1 菌种和培养 *Janibacter* sp. XI-1 由金士威等从武汉东湖底泥中分离获得(待发表),以丰富培养基(BG11 + 0.5g/L 酵母粉 + 1g/L 蛋白胨)或补充了 100mg/L DF 的无机盐培养基(每升含 7.0g Na₂HPO₄ · 12H₂O, 2.0g KH₂PO₄, 0.5g (NH₄)₂SO₄, 0.2g MgSO₄ · 7H₂O, 0.005g ZnSO₄ · 7H₂O, 0.0025g Na₂MoO₄ · 2H₂O, 0.014g Ca(H₂PO₄)₂, 0.01g FeSO₄ · 6H₂O, pH 7.0) 在 30 振摇(140/min) 培养。

收稿日期:2005-11-04; 修订日期:2006-11-09

基金项目:国家 863 计划 2002AA601170

作者简介:朱涛(1981—),男,山东博兴人;硕士;研究方向为微生物学。E-mail:zhutao@ihb.ac.cn

通讯作者:徐旭东,E-mail:xux@ihb.ac.cn

1.2 投加 *Janibacter sp. XI-1* 对降解 DF 的强化作用 反应器为 250 mL 三角瓶,活性污泥取自武汉市水质净化厂(沙湖)曝气池的回流污泥。污泥及污水总体积为 150mL,悬浮固体浓度(MLSS)为 3g/L,DF 浓度为 100mg/L,用八层纱布封口,于 30°C 振摇(140r/min)。将 *Janibacter sp.* 菌液离心浓缩后悬于少量 0.067mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.0)中,在强化实验中加入反应器(菌体干重与污泥干重的比值为 1% 或 5%)。分别于不同时间取 3 mL 样品并在 -18°C 冰冻保存。测定 DF 浓度之前,对解冻样品进行萃取:每份样品加 2mL CH₂Cl₂,经超声提取 5min,离心(2500r/min),取出下层。重复萃取 3 次后,合并下层有机相,通过无水硫酸钠小柱,用一定量 CH₂Cl₂洗涤小柱,定容至 10mL。用 HP5890 气相色谱仪、HP-5 型毛细管柱和 FID 检测器检测 DF。所有数据均取三个平行实验的平均值。

1.3 PCR 和测序 50μL 的反应体系中含 10mmol/L Tris Cl (pH8.3),50mmol/L KCl,1.5mmol/L MgCl₂,引物(表 1)各 100pmol,50μmol/L dNTPs,以 *Janibacter sp.* 总 DNA 作为模板或直接加细胞,2U Taq DNA 聚合酶(MBI 公司)。反应先经过 94 5min,之后是 30 个循环:94 1min,60 1min,72 1min,最后于 72 延伸反应 4min。PCR 产物以 1.2% 琼脂糖电泳检测,经玻璃奶试剂盒纯化后克隆于 T 载体(Takara),送各片段克隆进行测序。复核某些部位 DNA 序列时直接送纯化的 PCR 产物供测序。

表 1 PCR 引物

Tab. 1 PCR primers

引物 Primers	序列(5' > 3') Sequence	引物 Primers	序列(5' > 3') Sequence
DBF-25	cttacggagtggctcac	DBF-33	ggaggcaacaatgctgactgtgaatgaca
DBF-26	ggaatcgccgactccact	DBF-34	acctactcggtggccgac
DBF-27	gtgcccgaggacgaaagg	DBF-35	ggcttagtgcgcgtgcgaca
DBF-28	gagtcgcacggatggac	DBF-36	agtcctacaaaggctgg
DBF-29	tgcctgtctatggcgcac	DBF-37	tgcgcatgtcgcttcgg
DBF-30	tccgtggacgtggctg	DBF-38	tggctcgagggtcgaga
DBF-32	gcttcatggatgacgacac	DBF-40	cgagtcggacaacaaccca

1.4 dfdA 基因丛丢失株的获得 将 *Janibacter sp. XI-1* 菌株于 37 在丰富培养基中振摇过夜,将培养液经稀释后涂平板,挑取单菌落,分别以引物 DBF-30/40 和 DBF-34/35 进行 PCR 扩增培养检测 *dfdA* 基因。经 PCR 反复检测证明丢失了 *dfdA* 基因的克隆确定为 DBF 降解基因丢失株。

2 结 果

2.1 *Janibacter sp. XI-1* 加速活性污泥反应器中 DF 的降解

Janibacter sp. XI-1 是由金士威等人分离获得的 DF 降解菌株(待发表),能利用 DF 作为唯一碳源进行生长。在本研究中,我们试图检查投加这种活菌强化 DF 的降解,探索对二 英类化合物进行处理的生物强化措施。在预备实验中我们观察到从水质净化厂获取的活性污泥对 DF 具有一定的降解能力。向活性污泥反应系统中分别添加 1% 或 5% 的 *Janibacter* 菌液,结果发现 DF 分别在 48h 和 24h 几乎完全消失,而未加菌剂的反应器中在 48h 仍有约 38% 的 DF 残留(表 2)。因此,投加 *Janibacter* 菌液显著提高了 DF 降解速率。

表 2 *Janibacter sp.* 对反应器中 DF 浓度(mg/L)的影响(n=3)Tab. 2 The effect of *Janibacter sp.* on the DF concentration (mg/L) in the reactor (n = 3)

时间 Time 投菌量 DF concentration	0h	3h	6h	12h	24h	48h
0	56.5 ± 34.6 ± 32.3 ± 27.1 ± 21.6 ± 21.4 ± 2.4	1.9	3.1	1.9	1.7	1.7
	56.5 ± 31.7 ± 14.5 ± 13.4 ± 12.1 ± 2.4	1.8	2.2	1.7	1.7	<5.6
1 %	56.5 ± 37.0 ± 32.1 ± 15.2 ± 2.4	1.8	2.0	<5.6	<5.6	
	2.4	1.8	1.8	2.0		

2.2 DF 降解基因丛

为确证 *Janibacter* 菌株对 DF 的降解作用,我们试图分析其降解基因。已报道 *Terrabacter YK3* 株中存在降解 DF 必需的 *dfdA* 基因丛,并且在其他 DF 降解菌也存在同源基因^[7]。根据其序列我们设计了一系列引物(表 1)进行 PCR 扩增和克隆测序,拼接出 4018bp 的 *dfdA1A2A3A4* 基因丛序列,其结构如图 1。与 YK3 的 *dfdA* 基因丛相比几乎完全相同,仅有 5 处发生碱基置换:*dfdA1* 基因 nt. 67 由 g 置换为 t,nt. 1231 由 c 置换为 t;*dfdA3* 基因内 nt. 103 由 g 置换为 c,nt. 352 由 g 置换为 a;*dfdA3* 终止密码子之后第 160 个碱基由 t 置换为 g。对于碱基有差异的区域均以 PCR 产物再次测序获得证实。

2.3 丧失降解能力的突变株

研究表明 YK3 菌株的 *dfdA1A2A3A4* 基因位于一个大质粒上^[7],鉴于我们使用的 *Janibacter* 菌株所携带的 *dfdA1A2A3A4* 基因与其几乎完全相同,推测该基因丛可能通过大质粒在不同菌种间发生横

向转移。为证明在 *Janibacter* 中 *dfdA1A2A3A4* 基因也位于大质粒上,我们试图通过高温培养去除质粒获得突变株。将该 *Janibacter* XI-1 株以丰富培养基在 37℃ 培养后以稀释平板法获得单菌落,任挑 21 个进行 PCR 检查发现都缺失了 *dfdA* 基因。图 2 显示其中 3 个菌落 *dfdA3A4* 区域的 PCR 检测结果。高温培养导致几乎所有细胞中该基因丛的丢失,

表明 *dfdA1A2A3A4* 基因必然位于一个质粒上。

将 3 个基因丢失株进行 DF 利用能力的检查,结果它们都不能以 DF 为唯一碳源在无机培养液中生长,而原菌株在同样条件下能够生长。图 3 显示其中一个突变株与原野生型菌株生长的差异,表明带有 *dfdA1A2A3A4* 基因的质粒的丢失伴随着 DF 降解能力的丧失。

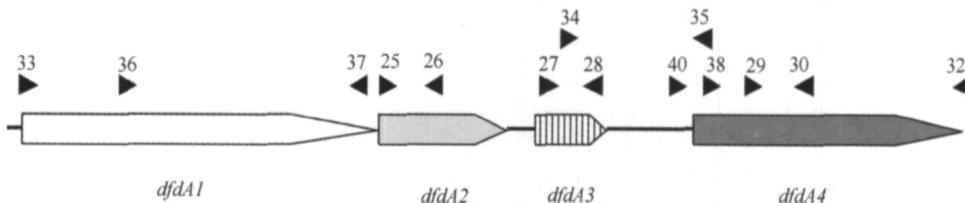


图 1 DF-降解基因丛结构

Fig. 1 The structure of DF-degrading gene cluster

箭头表示表 1 所列 PCR 引物 Arrows represent the PCR primers in Tab. 1

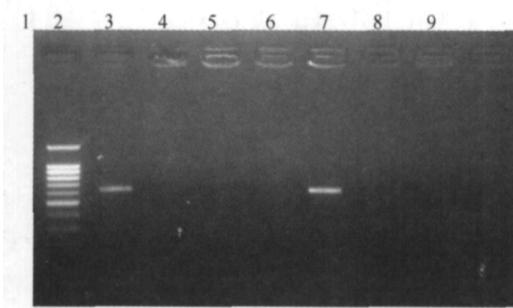


图 2 PCR 产物检测

Fig. 2 Examination of PCR products

泳道 1,100 碱基 DNA 标记;泳道 2—5,以引物 DBF30/40 扩增;泳道 6—9,以引物 DBF34/35 扩增。泳道 2 和 6,*Janibacter* sp. XI-1;

泳道 3—5 和 7—9,3 个丧失 DF 降解能力的突变株

Lane 1, 100bp ladder DNA markers; lanes 2—5, PCR using primers DBF30/40; lanes 6—9, PCR using primers DBF34/35. Lanes 2 and 6, *Janibacter* sp. XI-1; lanes 3—5 and 7—9, 3 mutants lack in DF-degrading capability.

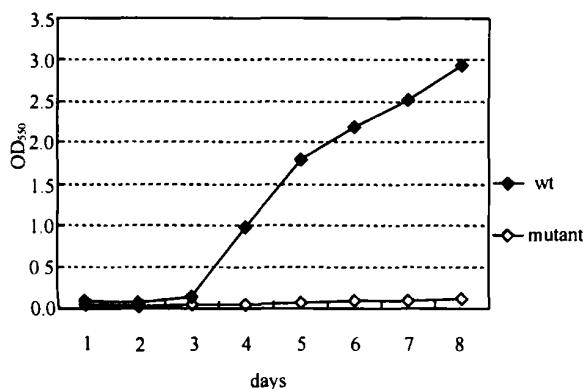


图 3 *Janibacter* sp. XI-1 和突变株利用 DF 作为唯一碳源进行生长的情况

Fig. 3 Growth of *Janibacter* sp. XI-1 and a mutant in medium with

dibenzofuran as the sole carbon source

wt, 野生型 wild type

3 讨论

二 英类化合物微生物降解的研究一般以 DD 或 DF 作为模式化合物,目前已分离到能够降解 DD 或 DF 的若干菌株。虽然这些菌株并不能直接降解多氯代二 英,但在经过厌氧脱氯之后的曝气处理过程中投加菌剂则可能达到生物强化的目的。另一方面,未来通过对催化降解反应的角双加氧酶底物特异性进行分子改造则可能逐步实现对多氯代二 英类物质的直接降解。本研究结果表明,通过投加 5% 的 *Janibacter* 菌液可以显著加强活性污泥对 DF 的降解。但我们也注意到外加菌剂处于悬浮状态,并未能吸附或渗入活性污泥中,因此应进一步使得 *Janibacter* 菌株直接参与活性污泥的形成,以利于实际操作。

已报道 *Terrabacter* YK3 株的 DF 降解基因丛由一个大质粒携带,并在其他降解菌株中有同源基因^[7]。我们通过 PCR 扩增和克隆测序确定了 *Janibacter* 中具有几乎相同的 DF 降解基因丛;并且经过高温培养获得的单菌落几乎全部都丢失了该基因丛,丧失降解能力,可以推测必然位于一个质粒上。*Terrabacter* 和 *Janibacter* 都属于放线菌(Actinomycete),这一结果显示 *dfdA* 基因丛在自然界可能通过大质粒载体在放线菌中横向转移扩散。因此,在培育活性污泥时添加 *Terrabacter* 或 *Janibacter* 菌剂可能通过外加细菌的繁殖和质粒的扩散两种途径在污泥中获得固定,形成持久的降解活性。

参考文献：

- [1] Wang X Y. Microbes degrading dioxin and related toxins [J]. *The Bulletin of Microbiology*, 2001, **28**:101—104 [王修垣. 降解二英及其相关毒物的微生物. 微生物学通报, 2001, **28**:101—104]
- [2] Wittich R. Degradation of dioxin-like compounds by microorganisms [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, **49**: 489—499
- [3] Mohn W, Tiedje J. Microbial reductive dehalogenation [J]. *Microbiol Rev*, 1992, **56**: 482—507
- [4] Wittich R, Wilkes H, Sinnwell V, et al. Metabolism of dibenz-p-dioxin by *Sphingomonas* sp. strain RW1 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**:1005—1010
- [5] Ishiguro T, Ohtake Y, Nakayama S, et al. Biodegradation of dibenzofuran and dioxins by *Pseudomonas aeruginosa* and *Xanthomonas maltophilia* [J]. *Environ Technol*, 2000, **21**:1309—1316
- [6] Iida T, Mukouzaka Y, Nakamura K, et al. Isolation and characterization of dibenzofuran-degrading actinomycetes: analysis of multiple extradiol dioxygenase genes in dibenzofuran-degrading *Rhodococcus* species [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002, **66**:1462—1472
- [7] Iida T, Mukouzaka Y, Nakamura K, Kudo T. Plasmid - borne genes code for an angular dioxygenase involved in dibenzofuran degradation by *Terrabacter* sp. strain YK3 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**: 3716—3723

ENHANCEMENT OF DIBENZOFURAN DEGRADATION BY JANIBACTER SP. IN AN ACTIVATED SLUDGE REACTOR AND GENETIC ANALYSES OF THE DEGRADING CAPABILITY

ZHU Tao^{1,3}, OUYANG Hui², JIN Shi-Wei^{1,3}, XU Ying^{1,3}, SONG Bi-Yu² and XU Xu-Dong^{1,3}

(1. *The Freshwater Ecology and Biotechnology State Key Laboratory, Institute of Hydrobiology, the Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072;*

2. *Resource and Environment College, Wuhan University, Wuhan 430072; 3. The Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)*

Abstract : Dibenzofuran (DF) is one of the model compounds for the study of biodegradation of dioxin-like pollutants. This paper presents studies of the enhancing effect of a *Janibacter* strain on the degradation of DF by activated sludge and analyses of its DF-degrading genes. When 1 % or 5 % *Janibacter* cells were added to the activated sludge reactor, DF of 56 mg/L was almost completely degraded after 48h or 24h, while in the control reactor, 38 % of the DF remained after 48h. A stretch of 4018-bp DNA region containing *dfdA1A2A3A4* cluster was cloned with PCR and sequenced and found to be almost identical to that from *Janibacter* strain YK3, except 5 substitutions. To test whether the *dfdA* cluster is located on a large plasmid, we examined 27 single colonies grown on rich medium plates at 37°C with PCR and found all tested colonies lost the *dfdA* cluster at high temperature. This result indicated that the gene cluster was readily cured from the cells, hence it must be located on an extra-chromosomal genetic element. Mutants abolished of the gene cluster were unable to grow in medium with DF as the sole carbon source. The implications of these results to the application of DF-degrading strains in activated sludge reactors are discussed.

Key words : Dibenzofuran ; Degradation ; *Janibacter* sp.