DOI:10.13758/j.cnki.tr.2006.05.024

土 壤 (Soils), 2006, 38 (5): 640~644

石油污染土壤中芳烃降解菌及邻苯二酚 2,3 双加氧酶的克隆①

吴宇澄[1,2,3]，骆永明[1,2,3*]，滕 应[1,2]，刘五星[1,2,3]，李振高[1,2]

（1 中国科学院南京土壤研究所土壤与环境生物修复研究中心，南京 210008； 2 土壤与农业可持续发展国家重点实验室 (中国科学院南京土壤研究所)，南京 210008； 3 中国科学院研究生院，北京 100049）

摘 要：石油污染土壤中的芳烃降解菌是进行土壤修复的主要生物资源，本研究对某炼油厂附近土壤中的芳烃降解菌及邻苯二酚 2, 3 双加氧酶基因进行了研究。结果表明，部分石油烃污染土壤中存在着大量的芳烃降解菌；对其中一个土壤样本中的邻苯二酚 2, 3 双加氧酶基因进行克隆，获得了 7 个不同的邻苯二酚双加氧酶基因序列，序列分析表明这些基因可能来源于土壤中的假单胞菌，且该基因在土壤中的丰度与污染水平及芳烃降解菌的数量相关。可见，土壤中芳烃降解菌数量及降解基因的丰度和多样性，可以对石油污染土壤的生物修复进行监控并为生物修复提供丰富的微生物资源。

关键词：石油污染；土壤；邻苯二酚 2, 3 双加氧酶；芳烃降解细菌

中图分类号：X172

石油是由数百种化合物组成的复合体，一般包含饱和烃（包括正链烷烃、异构烷烃和环烷烃）、芳烃（包括单环、双环和多环芳烃）、胶质（由嘧啶、喹啉、咔唑、噻吩、亚砜、氨基化合物组成的复合体）及沥青质（环烷酸、硫化物、多元酚、脂肪酸、金属卟啉的复合物）等 4 类烃类物质[1]。在石油的开采、储运、加工、使用过程中，由于泄漏造成的土壤污染事件屡有发生，从而造成多方面的不良后果：轻油成分的迁移造成地下水和大气的污染；重油成分可以在土壤环境中持久存在；降低土壤质量，破坏农业生产；对人体和环境的健康产生毒害等。在石油烃诸成分中，芳烃类物质以其较高的毒性和较难降解的特性对污染土壤生物修复提出了更高的要求。

随着土壤修复学科的快速发展，微生物对有机污染物的降解逐渐成为污染土壤修复的重要手段[2]。酶反应是有机污染物微生物降解的主要机制[3]。在细菌对芳烃的好氧降解途径中，双加氧酶（dioxygenase）催化两个关键反应：芳环双羟基化和开环。其中，邻苯二酚双加氧酶能够使邻苯二酚及其取代物氧化开环，这是细菌降解芳环化合物的关键步骤。细菌能够产生两类邻苯二酚双加氧酶，一类是内二元醇双加氧酶即邻苯二酚 1, 2-双加氧酶 (catechol 1,2-dioxygenase, C12O)，以间位（*ortho*-cleavage）形式开环；另一类是外二元醇双加氧酶即邻苯二酚 2, 3 双加氧酶（catechol 2, 3-dioxygenase, C23O)，以邻位（*meta*-cleavage）形式开环（图 1)。外二元醇双加氧酶作为芳香烃降解的一个主要途径，其催化机制[4]及进化关系[5]均已得到深入研究。

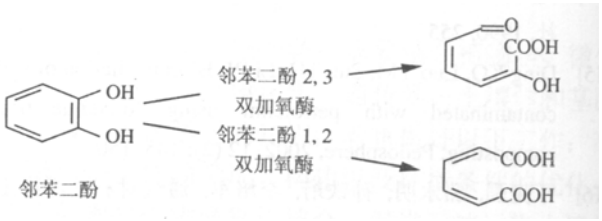


图 1 邻苯二酚的邻位与间位开环方式

Fig. 1 *Meta*-and *ortho*-cleavage of catechol

石油污染土壤中存在多样的多环芳烃 (PAHs) 降解菌，这些细菌很多具有 C23O 基因并在一定条件下表达 C23O 活性[6-8]。在石油污染土壤中可检测出明显的 C23O 酶活性[9-10]。对土壤中的 C23O 基因进行克隆和序列分析，对于土壤中芳烃降解菌的存在状况和定量具有指示性的意义。本研究采用直接扩增和克隆的分子生物学手段，对石油严重污染

①基金项目：国家自然科学基金重点项目 (40432005)、国家重点基础研究发展规划项目 (2002CB410810/9)和中国科学院知识创新项目（CXTD-Z2005-4）资助。

* 通讯作者（ymluo@issas.ac.cn）

作者简介：吴宇澄（1977—），男，江苏高淳人，博士研究生，主要从事污染土壤修复与微生物生态研究。E-mail：ycwu@issas.ac.cn

土壤中 C23O 基因的多样性进行了初步研究，旨在了解该污染土壤中芳烃降解细菌的存在状况和影响因素，并为研究土壤中有机污染物降解功能基因建立行之有效的方法。

1　材料和方法

1.1 样本采集与理化性质测定

供试土样采自南京近郊某炼油厂附近的耕层土壤 (0～20 cm)，土壤类型为潮土。采用 5 点采样法采集 QX-1～QX-8 共 8 个土壤样本，样品经风干、研磨过筛后分为两部分，一部分供土壤理化性质分析和油含量分析用，另一部分供微生物分析及分子克隆用。

土壤基本理化性质分析参照文献[11]进行。其中，有机质测定采用重铬酸钾-硫酸消化法，有效 N 测定采用碱解扩散法（碱解 N），有效 P 测定采用碳酸氢钠法，速效 K 测定采用醋酸铵提取法，阳离子交换量测定采用醋酸铵法。

土壤油含量参照文献[1]使用重量法测定。

1.2　主要试剂与引物

FastDNA® SPIN Kit for Soil 试剂盒系美国 Qbiogen 公司产品，Biospin 胶回收试剂盒为杭州博日科技有限公司产品，pMD19-T 载体购自大连宝生物工程有限公司，Taq DNA 聚合酶购自上海 Promega 公司，*E. coli* DH5α 由南京师范大学生命科学学院蒋洁蓉博士赠送，引物合成与序列测定由上海博亚生物技术有限公司完成。

1.3　芳烃降解菌分析

土壤中芳烃降解菌数量的测定参照 MPN 法[12]。

1.4　C23O 基因克隆

1.4.1　土壤样本 DNA 提取：采用 FastDNA® SPIN Kit for Soil 试剂盒（Bio101）提取土壤总 DNA[13]。

1.4.2　PCR 扩增：采用兼并引物 C23O-ORF-F（5’ AGGTGWCGTSATGAAMAAAGG 3’）和 230-ORF-R (5’ TYAGGTSAKMACGGTCAKGAA 3’）从土壤样本 DNA 扩增 C23O 基因 I.2.A 亚家族，扩增片段长 934 bp，包括了整个开放阅读框[14]。扩增反应体系包括：1×PCR 反应缓冲液，1.5 mmol/L Mg^{2+}，200 μmol/L dNTP，0.5 μmol/L 引物，1.5U Taq DNA 聚合酶及 1 μl 模板。采用降落 PCR 程序：94℃ 预变性 3 min，94℃ 变性 1 min，55℃退火 1 min，其后每个循环退火温度降低 1 ℃，72 ℃延伸 1.5 min，10 个循环，继续在 45 ℃ 退火条件下进行 20 个循环。最后 72 ℃ 延伸 10 min。

1.4.3　PCR 产物的克隆　　使用 Biospin 胶回收试剂盒对 PCR 产物进行切胶纯化，与 pMD19-T 载体进行连接并转化至 *E. coli* DH5α，将菌液涂布至含氨苄青霉素、IPTG 和 X-gal 的 LB 平板，37℃培养[15]。挑取白色菌落，划线纯化 1 次后使用 RV-M/M13-47 引物对菌落进行 PCR 以筛选阳性克隆，随机选取阳性克隆进行测序。

1.4.4　序列分析　　使用 Blast n（http://www.ncbi.nlm. nih.gov/ BLAST/）进行序列同源性比较，使用 clustalx 软件对基于 DNA 序列推算的氨基酸序列进行比较，MEGA 3.1 软件构建系统发育树。本研究中所获序列在 Genbank 的序列号为 DQ408374，DQ408375，DQ454163-DQ454167。

2　结果与讨论

2.1　供试土壤的基本理化性质与油含量

从表 1 中可见，其中 QX-1、QX-3、QX-5 3 个样本的石油含量超过 10000 mg/kg。在加拿大环境部长委员会（Canadian Council of Minsters of the Environment, CCME）制订的表层粗颗粒土壤石油烃标准中，工业用地的土壤接触生态安全标准（F4 部分）为 3300 mg/kg，上述 3 个样本显然大大超过了这一标准。其他样本的污染状况相对较轻。

2.2　供试土壤中芳烃降解菌的数量

供试污染土壤的可培养芳烃降解菌 MPN 计数结果如表 2 所示。从表 2 可以看出，QX-1 和 QX-5 两个石油污染程度很高的样本具有最高的芳烃降解菌数量，同时石油含量在 CCME 规定的 3300 mg/kg 以下的 3 个样本（QX-2，QX-6，QX-8）中的芳烃降解菌数量较低。但与 QX-1 和 QX-5 具有同样石油污染水平的 QX-3 和 QX-7 中的芳烃降解菌则要低 2～3 个数量级，这可能与土壤有机质的生物可利用性及合适的 C/N 比等参数有关（表 1），其具体原因有待进一步深入研究。

2.3　供试土壤中邻苯二酚 2,3 双加氧酶（C23O）基因的克隆

使用引物 C23O-ORF-F/C230-ORF-R 对 8 个土壤样本 DNA 进行了 PCR 扩增，仅 QX-1 和 QX-5 两个样本获得约 1000 bp 的目的条带，其余样本未能获得目的产物。对 QX-1 和 QX-5 两样本的 C23O 扩增产物进行切胶纯化，结果如图 2。该片段大小接近 1000 bp，与 C23O 基因大小相符（包括引物）。

表 1 供试土壤的主要理化性质

Table 1 physicochemical properties of soils studied

土样	pH	有机质（g/kg）	全 N（g/kg）	水解 N（mg/kg）	CEC (cmol/kg)	全 P（g/kg）	全 K（g/kg）	土壤油含量（mg/kg）
QX-1	7.4	66.7	5.96	85.05	14.53	0.87	20.43	12702
QX-2	8.4	8.9	0.46	45.08	5.60	0.72	19.96	403
QX-3	7.2	47.9	1.40	115.14	14.87	0.79	22.22	12326
QX-4	7.6	36.8	1.26	82.21	15.36	0.83	20.04	3535
QX-5	7.6	40.5	1.21	91.21	14.50	0.77	21.04	11481
QX-6	7.9	33.1	0.92	85.29	9.03	0.81	17.58	285
QX-7	6.2	61.8	1.30	139.23	14.74	0.83	21.20	12723
QX-8	8.2	24.1	1.21	78.42	14.93	0.84	21.20	164

表 2 供试土壤中芳烃降解菌数量（$\times 10^4$ cfu/g 干土）

Table 2 Biomass of aromatic hydrocarbons degraders

	QX-1	QX-2	QX-3	QX-4	QX-5	QX-6	QX-7	QX-8
芳烃降解菌数	733	0.08	6.88	445	673	0.07	0.20	0.88

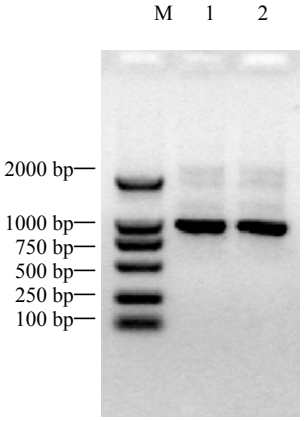


图 2 土壤 QX-1 和 QX-5 中 C23O 基因扩增结果

（M: 分子量标记 DL2000（大连宝生物工程）；1：QX-1；2：QX-5）

Fig. 2 Amplified DNA fragments of C23O from QX-1 and QX-5

根据 Junca 等[14]的结果，土壤中 C23O 基因 PCR 扩增的下限是 100 个拷贝/g 干土，因此可认为 C23O PCR 扩增的结果半定量地反映了土壤中该基因的拷贝数。如果将石油含量＞10000 mg/kg 的样本作为重污染土壤，其余作为轻污染土壤，则重污染土壤中 C23O 阳性扩增率为 50%，轻污染土壤阳性扩增率为 0。另外，芳烃降解菌丰富样本（$>10^6$ cfu/g 干土）的阳性扩增率为 67%，芳烃降解菌稀有样本（$<10^5$cfu/g 干土）的阳性扩增率为 0。这些结果表明土壤中 C23O 基因拷贝数与石油污染程度及土壤芳烃降解菌数有一定的联系。与此类似，Margesin 等[16] 利用 DNA 杂交技术发现 *P. putida* XylE 基因（C23O 基因）检出率由清洁土壤的 12.5% 增加到污染土壤中的 58.3%。Zucchi 等[9]发现油污土壤中 C23O 的丰度与多样性均有所提高，证明芳烃降解基因与污染水平具有一定的相关性。就未获扩增的 QX-4 样本而言，尽管其芳烃降解菌数与 QX-1、QX-5 比较接近，但污染程度要比后两者轻得多，影响了土样 QX-4 芳烃降解菌的数量和组成，因此导致了该土样 C23O 基因的拷贝数小于 QX-1 和 QX-5。

对 QX-1 样本 C23O 基因 PCR 产物进行 TA 克隆，随机选取 7 个阳性克隆（C23O-2、C23O-3、C23O-5、C23O-6、C23O-8、C23O-10、C23O-11）进行测序，对 DNA 序列推导的氨基酸序列进行比对并构建系统发育树，结果见图 3。

根据系统发育分析的结果，7 个序列可以分为 A 和 B 两组，A 又可以分为两个亚群，A1 和 A2。从系统发育树可见，克隆所得序列均与已知假单胞菌 C23O 序列相似，表明这些片段可能来自土壤中的假单胞菌。但与有机物降解相关的基因大多位于细菌染色体外的质粒上，由于选择压力、质粒水平转移或可移动的遗传元件等机制，它们与其宿主菌的发生关系并不是严格对应的[14, 17]，因此，这些基因确切的来源还需进一步的研究。尽管由于序列信息有限，无法准确反映出基因多样性的大小，但可以确定的是，在高度污染的土壤样本中，存在着相对多样的芳烃降解菌，是土壤生物修复的重要资源。

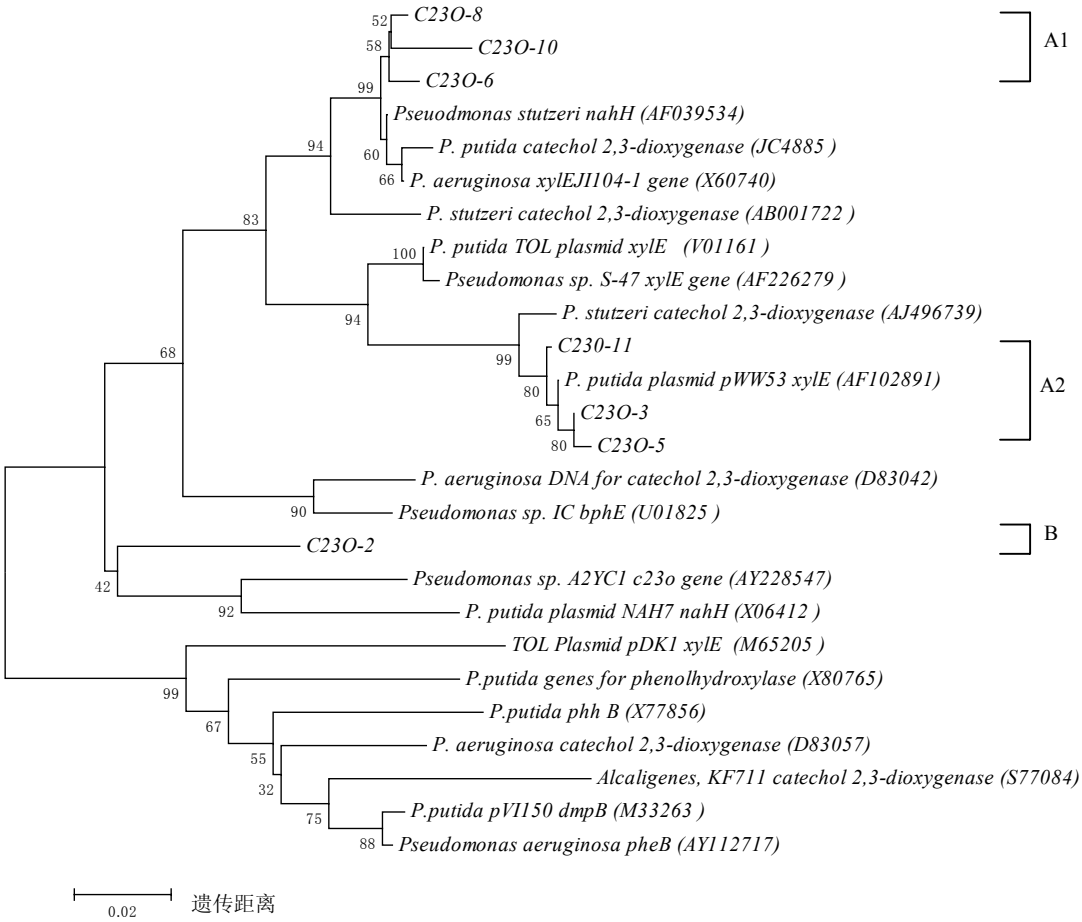


图 3　C23O 基因的系统发育树

Fig. 3　Phylogenetic tree of C23O

3　小结

本研究采用 PCR 与分子克隆的方法，对一个石油烃严重污染土壤中的 C23O 基因进行了分析。结果表明，基于培养的 MPN 计数方法获得的芳烃降解菌数量与 C23O 基因的拷贝数可能存在一定的联系，其中 QX−1 样本中的芳烃降解微生物群落可能主要由假单胞菌组成，提示可以利用定量 PCR 的方法，对土壤中的芳烃降解微生物进行定量研究。本研究也提出了一个适用于从土壤样本克隆降解功能基因的方法，采用这个方法可以实现对土壤中功能基因的克隆。

长期以来，对污染物微生物降解的了解主要来自实验室纯培养微生物。分子技术的广泛应用，突破了培养的局限，使研究的视野拓展到整个微生物群落。应用分子技术对微生物降解功能酶基因的检测，能够揭示自然界中污染物降解的多样性。尽管目前还受到降解基因序列数据不足的限制，但是，如果对功能基因的检测实现定量化[18]，并结合基因表达情况的分析（如 RT−PCR），就能够了解污染物原位降解的情况[19]，也能为污染土壤生物修复的实时监控提供有力的工具。

参考文献：

[1] Sugiura K, Ishihara M, Harayama ST. Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. Environmental Science & Technology, 1997, 31 (1): 45−51

[2] 骆永明, 滕应, 过园. 土壤修复—新兴的土壤科学分支学科. 土壤, 2005, 37 (3): 230−235

[3] Riser-Roberts E. Remediation of petroleum contaminated soils: biological, physical, and chemical process. Boca Raton: CRC Press LLC, 1998

[4] Bugg TDH. Dioxygenase enzymes: catalytic mechanisms and chemical models. Tetrahedron, 2003, 59 (36): 7075−7101

[5] Eltis LD, Bolin, JT. Evolutionary relationships among extradiol dioxygenases. Journal of Bacteriology, 1996, 178 (20): 5930−5937

[6] Xia Y, Min H, Lu ZM, Ye YF. Characterization and phylogenetic analysis of a phenanthrene-degrading strain isolated from oil-contaminated soil. Journal of Environmental Sciences-China, 2004, 16 (4): 589−593

[7] Hori MON, Amund DI. Degradation of anthracene by bacteria isolated from oil polluted tropical soils. Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences, 2000, 55 (11/12): 890−897

[8] Liu YS, Zhang J, Zhang ZZ. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons-degrading Sphingomonas sp strain ZL5. Biodegradation, 2004, 15 (3): 205−212

[9] Zucchi M, Angiolini L, Borin S, Brusetti L, Dietrich N, Gigliotti C, Barbieri P, Sorlini C, Daffonchio D. Response of bacterial community during bioremediation of an oil-polluted soil. Journal of Applied Microbiology, 2003, 94 (2): 248−257

[10] Katsivela E, Moore ERB, Maroukli D, Strompl C, Pieper D, Kalogerakis N. Bacterial community dynamics during in-situ bioremediation of petroleum waste sludge in landfarming sites. Biodegradation, 2005, 16 (2): 169−180

[11] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 1999

[12] Wrenn BA, Venosa AD. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number procedure. Canadian Journal of Microbiology, 1996, 42 (3): 252−258

[13] 滕应, 骆永明, 赵祥伟, 李振高, 宋静, 吴龙华. 重金属复合污染农田土壤 DNA 的快速提取及其 PCR-DGGE 分析. 土壤学报, 2004, 41 (3): 343−347

[14] Junca H, Pieper DH. Amplified functional DNA restriction analysis to determine catechol 2,3-dioxygenase gene diversity in soil bacteria. Journal of Microbiological Methods, 2003, 55 (3): 697−708

[15] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南. 3 版. 北京: 科学出版社, 2003

[16] Margesin R, Labbe D, Schinner F, Greer CW, Whyte LG.. Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine alpine soils. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69 (6): 3085−3092

[17] Van Hamme JD, Singh A, Ward OP. Recent advances in petroleum microbiology. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2003, 67 (4): 503−549

[18] Mesarch MB, Nakatsu CH, Nies L. Development of catechol 2,3-dioxygenase-specific primers for monitoring bioremediation by competitive quantitative PCR. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66 (2): 678−683

[19] Watanabe K, Hamamura N. Molecular and physiological approaches to understanding the ecology of pollutant degradation. Current Opinion in Biotechnology, 2003, 14: 289−295

Aromatic Hydrocarbons Degraders in Oil-contaminated Soils and Cloning of Catechol 2,3-Dioxygenase Gene

WU Yu-cheng[1, 2, 3], LUO Yong-ming[1, 2, 3], TENG Ying[1, 2], LIU Wu-xin[1, 2, 3], LI Zhen-gao[1, 2]

(1 *Soil and Environment Bioremediation Research Centre, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing* 210008, *China*;
2 *State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture* (*Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences), Nanjing* 210008, *China*;
3 *Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100049, *China*)

Abstract: Indigenous aromatic hydrocarbons degraders (AHD) are the primary member for bioremediation of oil-contaminated soils. In the present study, the aromatic hydrocarbons degraders and catechol 2,3-dioxygenase (C23O) gene were determined. Abundant degradative bacteria were detected and a 934 bp DNA fragment of C23O was amplified in two of four heavily contaminated soils (oil content＞10000 mg/kg), indicating a relationship between abundance of AHD or C23O copies and oil content. Sequences analysis of C23O gene implied a possible *pseudomonad* origin. This study suggested a possibility of monitoring bioremediation of oil-contaminated soils and screening degradative bacteria resources by determining the number of aromatic hydrocarbons and abundance or diversity of degradative genes in soil.

Key words: Oil contamination, Soil, Catechol 2,3-dioxygenase, Aromatic hydrocarbons degraders