

## 16S rDNA-RFLP 分析六氯苯好氧降解菌群的 结构及其多样性

刘 婷, 陈朱蕾\*, 曹 丽, 孙蔚旻, 沈韫芬

(华中科技大学环境科学研究所 武汉 430074)

**摘 要:** 从某化工厂排水沟底泥中取样, 经 2 个月的富集驯化得到六氯苯好氧降解菌群。通过测定该微生物菌群在降解六氯苯过程中累积耗氧量、微生物生长曲线及  $\text{Cl}^-$  浓度的变化, 证明在好氧条件下该微生物菌群能够以六氯苯为唯一碳源和能源生长。当培养温度为  $30^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}$  为 7.0 时, 该菌群能在 18d 内将无机盐培养基中浓度为  $4.5\text{mg/L}$  的六氯苯降解 55% 以上, 降解速率达到  $137.5\mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{d})$ 。对降解菌群提取总 DNA, 选择性扩增细菌 16S rDNA 片段, 建立克隆文库。通过限制性内切酶(限制性内切酶 *Hae* III 和 *Rsa* I) 分析, 得到 9 种不同的谱型, 其中 3 种谱型是主要谱型。对主要谱型的克隆子测序, 结果表明, 它们分别与 *Alcaligenes* 和 *Azospirillum* 菌属相似性最高。该菌群在去除环境中难降解的有机氯污染物方面具有应用前景。

**关键词:** 六氯苯, 好氧降解, 菌群, 16S rDNA, RFLP

中图分类号: Q938 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2006)05-0758-05

六氯苯(Hexachlorobenzene,  $\text{C}_6\text{Cl}_6$ , 简称 HCB) 是 12 种典型 POPs (Persistent Organic Pollutants, 持久性有机污染物) 之一, 在美国和欧盟均名列在优先控制污染物的“黑名单”上, 由于被普遍用于染料制造、有机合成的中间体和农业过程, HCB 广泛分布于废水和污泥、江河湖泊的水体和底泥、空气和土壤中。目前 HCB 在我国还有少量生产, 并用作化学中间体<sup>[1]</sup>。HCB 化学性质极稳定, 目前对于这种极难降解的典型 POPs 还没有特别有效的处理方法。80 年代初, 在大湖(Great Lakes)底泥泥芯样品中, 研究人员发现年代久远的泥层中二氯苯、三氯苯与 HCB、五氯苯的比率很大, 这些现象暗示了在厌氧底泥中 HCB 有一个缓慢的脱氯过程<sup>[2]</sup>。日本的研究人员也报道了河流底泥中 HCB 的脱氯现象<sup>[3]</sup>。从 80 年代至今, 已有报道说用厌氧污泥、农田土壤、厌氧培养物进行 HCB 的厌氧降解<sup>[4~6]</sup>。国外在 HCB 生物降解方面研究的较多的是 HCB 厌氧生物降解。HCB 由于苯环上有 6 个氯离子, 结构相当稳定, 通常认为不易好氧脱氯。Chen 等<sup>[7]</sup>将来源于细菌的一个细胞色素 P450 单加氧酶定点突变后获得一株突变株, 该突变酶能催化 HCB 至五氯酚(简称 PCP) 的反应, 并具有很强的活力; PCP 能够被多种微生物彻底降解, 并以其作为唯一能源和碳源生长。甘平等<sup>[8]</sup>报

道用染料厂和毛纺厂废水活性污泥驯化得到好氧微生物菌群能够降解 HCB, 降解速率是  $6\mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{d})$ 。在 HCB 的好氧脱氯方面报道较少, 目前还没有发现 HCB 好氧降解菌群多样性研究的相关报道。

本研究从武汉某化工厂排水沟底泥中驯化 HCB 好氧降解菌群, 对菌群提取总 DNA, 选择性扩增细菌 16S rDNA 片段, 在此基础上建立 16S rDNA 克隆文库, 并利用限制性内切酶分析 RFLP 法对其进行分析, 从而获得 HCB 好氧降解菌群结构及其多样性的初步信息。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 泥样的采集:** 武汉市某化工厂排水沟底泥 50g。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 六氯苯( $\text{C}_6\text{Cl}_6$ ) (分析纯), 中国天津试剂一厂生产; 溴化乙啶, 溴酚蓝, EDTA, Tri-HCl, 琼脂糖(DNA 级), SDS, DNA 纯化试剂盒购自上海生工生物工程公司; *Hae* III 和 *Rsa* I 限制性内切酶购自 MBI Fermentas 公司; pGEM-T Easy 载体试剂盒购自 Promega 公司; 核酸蛋白含量测定仪(Biophotometer 6131, Eppendorf 公司); PCR 仪(Mastecycler personal, Eppendorf 公司); 离心机

基金项目: 教育部重点项目基金资助(104250)

\* 通讯作者。Tel: 86-27-87792993; Fax: 86-27-87792151; E-mail: chenzhulei@263.net

作者简介: 刘 婷(1976-), 女, 广西北流人, 博士研究生, 主要从事 POPs 物质生物降解及分子生态学研究。E-mail: xianglt@263.net

收稿日期: 2005-10-27; 接受日期: 2006-02-10; 修回日期: 2006-01-14

(5810R, Eppendorf 公司);凝胶成像系统(GDS-8000 System UVP BioImaging Systems);耗氧量测定仪器(BODtrak, HACH 公司);ORION CHN170 氯离子复合电极(Thermo 产品);气相色谱系统为 HP6890 气相色谱仪及 HP3398A 化学工作站。

### 1.1.3 培养基 无机盐培养基参考文献[8]

## 1.2 HCB 好氧降解菌群的驯化

底泥接种至已灭菌的含有 24mL 无机盐培养基的 250mL 三角瓶中再加入一定量的用丙酮助溶的 HCB 为驯化物,加棉塞,置于摇床 30℃、避光振荡培养,频率为 150r/min,每 10d 进行一次转移接种,并逐渐增加培养基中 HCB 的浓度,直至最终浓度达到 2.5mg/L。每批做 2 个转移接种,每次接种均做不加菌种的对照。

### 1.3 菌群细胞的获得

将驯化好的能够对 HCB 有稳定降解率的菌液 4000r/min,4℃ 离心 10min 得到菌体细胞。用 50mmol/L Tri-HCl (PH7.0)清洗 2 次(每次清洗后 4000r/min,4℃ 离心 10min),之后重悬于 33mmol/L Tri-HCl (PH7.0),调整  $OD_{600}$  为 1 左右。

### 1.4 HCB 生物降解的累积耗氧量测定

用于记录生物降解过程中累积耗氧量的 BODtrak 仪有压力敏感探头,能够全过程记录培养期间氧气的消耗。在 473mL 棕色螺口瓶中分别加入 345mL 灭菌的无机盐培养基,10mL 菌悬液( $OD_{600}$  为 1 左右),再直接加入 HCB 粉末,使其浓度为 10mg/L,并做不加碳源的微生物内源呼吸累积耗氧量以作对照,30℃下培养 5d。

### 1.5 HCB 菌群降解试验

采用 250mL 三角瓶好氧培养,在已灭菌的三角瓶中加入一定量的 HCB 丙酮溶液,在通风橱中放置 2h,待丙酮完全挥发后再加入 24mL 已灭菌的无机盐培养基(pH 值约为 7.0)和 1mL  $OD_{600}$  约为 1 的菌液,最终反应体系为 25mL,其中的 HCB 浓度为 4.5mg/L。同时设有不加菌种的对照样品。培养温度为 30℃,为了避免 HCB 的挥发,采用避光静置培养。开始实验后每隔一段时间取出 3 个平行培养样品以供测定。吸光度值表征微生物的生长量,用降解过程中 HCB 的变化和  $Cl^-$  浓度的变化来表征化合物的降解。

### 1.6 HCB 分析方法

用等体积正己烷进行整瓶萃取 30min,其中的 HCB 浓度用气相色谱仪测定,每个样品平行测两次。色谱工作条件:柱温:起始温度 150℃,保持

1min,以 20℃/min 升温至 200℃,保持 10min。尾吹气 60mL/min,进样口温度 250℃,进样体积 1 $\mu$ L,检测器:电子捕获检测器,温度 300℃。

## 1.7 16S rDNA 扩增

1.7.1 降解菌群总 DNA 的提取:DNA 提取方法参考文献[9]。采用玻璃珠纯化试剂盒纯化粗提的 DNA。总 DNA 用 1% 的琼脂糖凝胶(含 0.5 $\mu$ L/mL 的 EB)进行电泳评估制备效果,并用核酸蛋白含量测定仪测定 DNA 含量及纯度。

1.7.2 16S rDNA 的 PCR 扩增:引物序列为 EUB27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1518R (5'-AAGGAGGTGATCCAACCACA-3'),由上海生工生物技术公司合成。PCR 反应条件为:94℃ 10min,94℃ 1min,53℃ 1min,72℃ 2min,30 个循环,72℃ 10min。

## 1.8 RFLP 分析

PCR 扩增得到的 DNA 片段与 pGEM-T 载体连接,转化大肠杆菌 M15 感受态细胞。蓝白斑方法用于筛选转化子。挑取白色克隆子,用通用引物 M13 进行 PCR,PCR 反应条件同 1.7.2。对阳性克隆子提取质粒,分别用 *Hae* III 和 *Rsa* I 限制性内切酶消化,37℃ 过夜。酶切 DNA 片段用 2% 的琼脂糖凝胶电泳分离,经溴化乙锭染色和凝胶成像系统照相后,所得 DNA 带型图谱在 Kodak 凝胶分析系统辅助下用人工进行比较分析。克隆文库 Coverage 值的计算公式为  $[1 - (n/N)] \times 100\%$ ,其中  $n$  为含单个克隆的 OTU 数, $N$  为总克隆数<sup>[10]</sup>。根据克隆文库中的 OTU 种类和每个 OTU 的克隆数目,计算出 Shannon-Wiener 多样性指数。计算公式为  $H = - \sum p_i \ln p_i$  ( $p_i = n_i/N$ ),其中  $n_i$  为每个 OTU 的克隆数目, $N$  为文库中的总克隆数目<sup>[10]</sup>。

## 1.9 16S rDNA 序列测序和系统进化分析

根据 RFLP 结果挑出有代表性的克隆子送上海生工生物技术有限公司测序。测定的序列用 BLAST 在 GenBank 中搜索相近序列(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)。

## 2 结果

### 2.1 驯化结果

为了保证充足的氧气,菌种的驯化是在摇床上振荡培养的,每一个驯化周期结束时将培养物以无菌操作移接至新鲜培养基中,进入下一个培养周期。微生物生长的判断采用目测法,即观察培养液是否出现可见的白色絮状浑浊,而且当将少量培养物接种到含有同样浓度的同种化合物的新鲜培养基上

时,这种浑浊又会重新出现,而空白对照反应瓶中却不出现这种可恢复的浑浊现象。在每个培养周期结束时同时测定空白对照样和驯化样中 HCB 的浓度,两个结果相比较,发现驯化样中 HCB 浓度的减少,可以认为是由于微生物利用造成的。经过 2 个月 6 批次的驯化得到对 HCB 稳定降解的菌群,每一批驯化样品的 HCB 去除率如图 1 所示。由图 1 可以看出,在驯化过程中菌群对 HCB 的去除率逐步增加并且达到稳定。去除率由最初的 2.1% 明显增加到 70.3%。这说明驯化是成功的。

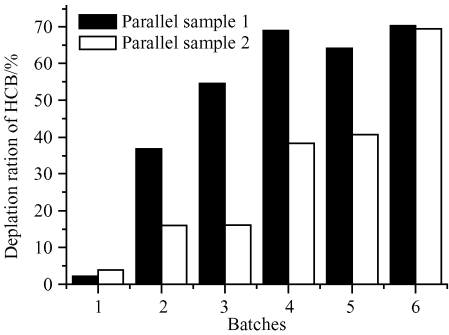


图 1 驯化过程不同批次样品对 HCB 的去除率

Fig. 1 Depletion of HCB by different batch samples during the enrichment.

2.2 HCB 降解的累积耗氧量

微生物的耗氧量是反映 HCB 生物降解性的一个重要指标。本研究以 HCB 为唯一碳源和能源,测定微生物的累积耗氧量,并作了不加目标化合物的微生物内源呼吸耗氧量作为对照。从图 2 可以看出,HCB 的累积耗氧量曲线高于不加碳源的微生物内源呼吸线,说明经过驯化的混合菌能以 HCB 为唯一碳源和能源生长。耗氧量曲线显示菌群在 2d 后耗氧量就明显大于内源呼吸的耗氧量,说明驯化后的菌群对 HCB 的利用是稳定的。

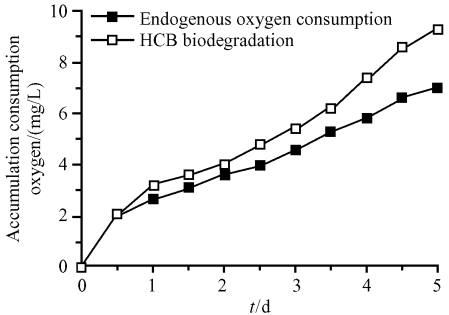


图 2 HCB 降解累积耗氧量曲线

Fig. 2 Accumulation consumption oxygen of HCB.

2.3 HCB 降解过程中微生物的生长和氯离子浓度的变化

微生物在对 HCB 的降解过程中获得生长所需的碳源和能源,并不断增殖,而降解过程伴随着脱氯作用,使溶液的氯离子浓度增加。通过测定微生物的生长曲线和氯离子浓度的变化来了解 HCB 的降解与微生物生长之间的关系(图 3,图 4)。HCB 的初始浓度为 4.5mg/L,接种微生物培养之后,HCB 的浓度降低,当培养了 18d 之后,HCB 的浓度下降到 2.025mg/L,降解率达到 55%,降解速率达到 137.5 $\mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{d})$  (远远高于甘平等报道的降解菌群对 HCB 的降解速率[约 6 $\mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{d})$ ])。与此同时,培养液的  $OD_{600}$  由开始的 0.0113A 上升到 0.06699A,  $\text{Cl}^-$  由 7.39 $\mu\text{mol}/\text{L}$  上升到 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。

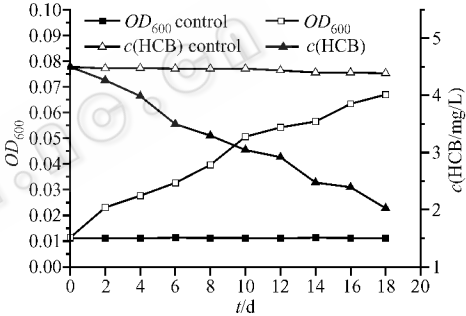


图 3 微生物的生长曲线和 HCB 浓度的变化

Fig. 3 Growth of mix culture on HCB.

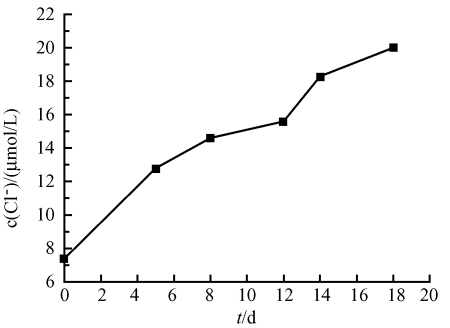


图 4  $\text{Cl}^-$  浓度变化

Fig. 4 Release of  $\text{Cl}^-$ .

2.4 16S rDNA 的 PCR 扩增

提取的 DNA  $OD_{260}/OD_{280}$  值在 1.85 ~ 2.00 之间,经 1% 的琼脂糖凝胶电泳后呈现单一区带,表明该方法提取的菌群总 DNA 在纯度上符合 PCR 的要求。用细菌通用引物对菌群总 DNA 进行 16S rDNA 扩增,得到大小约为 1500bp 的目标片段。

## 2.5 RFLP 分析和细菌 16S rDNA 测序

用 Hae III 的酶切得到的图谱相同,而根据 Rsa I 酶切分型,将得到的 81 个阳性克隆子分为 9 个 OTU 谱型(图 5),其中 3 个 OUT 是优势类型(含 5 个克隆以上),有 6 个 OUT 只有 1 个克隆。文库的 coverage 值为 93%,Shannon-Wiener 多样性指数为 0.92。对 3 个优势类型的克隆子进行了测序,得到的测序结果和 GenBank 数据库中比对分析。结果表明,克隆子 H139 和 H163 都与 *Azospirillum* 菌属亲缘关系最近,相似性为 96%。克隆子 H124 与 *Alcaligenes* 菌属亲缘关系最近,相似性为 98%。

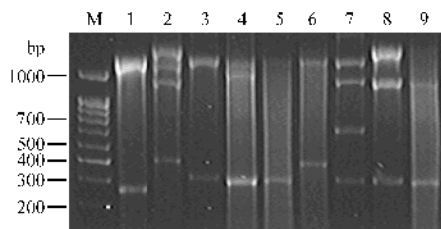


图 5 微生物群落 16S rDNA 片段的 RFLP 型(RSA I)

Fig.5 RFLP analysis of the 16S rDNA fragments of the microbial community. M, 1000bp DNA ladder; 1~9, The bands of 16S rDNA restricted by Rsa I.

## 3 讨论

HCB 降解的关键在于脱氯,由于氯原子具有强烈的吸电子特性,能够降低苯环的电子云密度,使氧化酶难以从苯环上获得电子,不易发生氧化反应,而在缺氧条件下,环境中氧化还原电位较低,这时电子云密度较低的苯环在酶的催化下很容易受到还原剂的攻击,使氯原子被取代,这是还原脱氯<sup>[11]</sup>。国外学者大多进行 HCB 的厌氧降解研究,在 HCB 的好氧降解方面报道较少,迄今为止,还没有在自然环境中筛选得到高效的 HCB 好氧降解菌。

本研究经过 2 个月的富集,从含有 HCB 的化工厂排水沟底泥中驯化得到好氧微生物群落,微生物的累积耗氧量曲线和生长曲线表明,该菌群能够以 HCB 为唯一碳源和能源生长。当 pH 值在 7.0 左右,培养温度 30℃ 时,微生物菌群能氧化脱氯,对 HCB 的降解速率达到 137.5 μg/(L·d),降解率达到 55%。结合 16S rDNA 基因的 PCR-RFLP 对 HCB 好

氧降解菌群结构进行了初步研究,菌群中的主要微生物与 *Alcaligenes* 菌属和 *Azospirillum* 菌属相似性大于 95%。该菌群在去除环境中难降解的有机氯污染物方面具有应用前景。

致谢:在该研究中,得到华中科技大学环境科学研究所解清杰讲师,中国科学院水生生物研究所缪炜副研究员和中国科学院病毒研究所阎达中博士的帮助,在此表示感谢。

## 参 考 文 献

- [1] 杨光俊,郑正,赵永富,等. γ 辐照降解六氯苯(HCB)的研究. 环境科学学报, 2004, 24(4): 750-752.
- [2] Bailey RE. Comment on "Chlorobenzenes in sediments, water, and selected fish from Lakes Superior, Huron, Erie, and Ontario." *Environ Sci Technol*, 1983, 17: 504.
- [3] Watanabe I, Kashimoto T, Tatsukawa R. Hexabromobenzene and its debrominated compounds in river and estuary sediments in Japan. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1986, 36: 778-784.
- [4] Fathepure BZ, Tiedje JM, Boyd SA. Reductive Dechlorination of Hexachlorobenzene to Tri- and Dichlorobenzenes in Anaerobic Sewage Sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54(2): 327-330.
- [5] Jayachandran G, Goerisch H, Adrian L. Dehalorespiration with hexachlorobenzene and pentachlorobenzene by *Dehalococcoides* sp. strain CBDB1. *Archives of Microbiology*, 2003, 180(6): 411-416.
- [6] Chang BV, Chen YM, Yuan SY, et al. Reductive dechlorination of hexachlorobenzene by an anaerobic mixed culture. *Water, Air, and Soil Pollution*, 1997, 100: 25-32.
- [7] Chen XH, Christopher A, Jones JP. Crystal Structure of the F87W Mutant of Cytochrome P-450cam with 1,3,5-Trichlorobenzene Bound and Further Protein Engineering for the Oxidation of Pentachlorobenzene and Hexachlorobenzene. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(40): 37519-37526.
- [8] 甘平,樊耀波,王敏健. 氯苯类化合物的生物降解. 环境科学, 2001, 22(3): 93-96.
- [9] Zhou JZ, Bruns MA, Tiedje JM. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62: 316-322.
- [10] 余跃惠,张学礼,张凡,等. 大港孔店油田水驱油藏微生物群落的分子分析. 微生物学报, 2005, 45(3): 329-334.
- [11] 甘平,朱婷婷,樊耀波,等. 氯苯类化合物的生物降解. 环境污染治理技术与设备, 2000, 1(4): 1-12.

## 16S rDNA-RFLP analysis of structure and diversity of an aerobic microbial community degrading hexachlorobenzene

LIU Ting, CHEN Zhu-lei\*, CAO Li, SUN Wei-min, SHEN Yun-fen

(*Environmental Science Research Institute, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China*)

**Abstract** Hexachlorobenzene is a chlorinated aromatic hydrocarbon that was widely used as a seed dressing for prevention of fungal growth on crops, and is also a component of fireworks, ammunition, and synthetic rubbers. Because of the bioaccumulation and persistence of hexachlorobenzene as well as its potential toxicity, hexachlorobenzene must be removed from environment. The potential for aerobic dechlorination of hexachlorobenzene by a hexachlorobenzene-adapted mixed culture was investigated. An aerobic microbial community which was able to grow at the presence of hexachlorobenzene was enriched from sediment from contaminated site after incubating about 2 months. During the growth of the mixed microorganisms on hexachlorobenzene, the accumulating consumption of oxygen, the microbial population curve and the release of  $\text{Cl}^-$  were investigated. The data suggest the rapid degradation of hexachlorobenzene to support microbial growth and the aerobic dechlorination of hexachlorobenzene was observed. The result showed that the mixed microorganisms were able to utilize hexachlorobenzene as sole carbon and energy source. It was shown that up to 55% of HCB could be degraded during 18 days incubation at 30°C in mineral salts medium (pH 7.0) with 4.5 mg/L HCB. The calculated rate of hexachlorobenzene biodegradation was  $137.5 \mu\text{g}/(\text{L} \cdot \text{d})$ . The 16S rDNA genes were amplified from community DNA by using primers specific to bacteria and were subsequently cloned. The cloned 16S rDNA fragments were reamplified, and restriction analysis was performed following separate digestion with enzymes *Hae* III and *Rsa* I. Application of restriction fragment length polymorphism screening approach revealed 9 clusters, and 3 major clusters were sequenced. Nearly complete 16S rDNA sequence analysis show that the microbial community was dominated by *Alcaligenes* and *Azospirillum* groups. This is the first report describing aerobic dechlorination of hexachlorobenzene via dehalorespiration by a microbial community which was enriched from contaminated site. The microbial community can be used to degrade highly recalcitrant chlorinated pollutants.

**Keywords** : Hexachlorobenzene ; Aerobic degradation ; Microbial community ; 16S rDNA ; RFLP