

## 一株红球菌(*Rhodococcus* sp.)二噁英降解质粒的稳定性与接合转移特性

孙娇 杨海燕 李力\*

(山东大学环境科学与工程学院 山东省水环境污染控制与资源化重点实验室 山东 济南 250100)

**摘要:**【目的】考察一株红球菌 *Rhodococcus* sp. strain p52 中的二噁英降解质粒 pDF01 (170 kb)和 pDF02 (242 kb)的稳定性与接合转移特性。【方法】在无选择压力的条件下对菌株 p52 进行连续传代培养,考察质粒 pDF01、pDF02 的丢失;以菌株 p52 为供体菌,以不同种属的菌株作受体菌,通过平板接合实验探讨质粒 pDF01、pDF02 接合转移的受体菌范围以及接合转移频率,利用菌落杂交、Southern 杂交对质粒转移结果进行确认,利用降解实验测试转移质粒降解基因的表达。【结果】质粒 pDF01 和 pDF02 在红球菌 p52 中均具有较高的稳定性,在 LB 培养基上连续传代少于 47 次时 pDF02 可保持,连续传代少于 65 次时 pDF01 可保持。质粒 pDF01 和 pDF02 具备在同属和属间接合转移的能力,可向受体菌——紫红红球菌(*Rhodococcus rhodochrous*)、红串红球菌(*Rhodococcus erythropolis*)、大地两面神菌(*Terrabacter tumescens*)和节杆菌(*Arthrobacter* sp.)转移,其中以节杆菌作受体菌时质粒 pDF01 和 pDF02 接合转移频率最高,达到  $3.5 \times 10^{-6}$  (接合子/受体菌);对节杆菌接合子质粒进行 Southern 杂交进一步确认了质粒 pDF01、pDF02 的存在。另外获得质粒 pDF01、pDF02 后的节杆菌接合子可以对二苯并呋喃高效利用,且降解能力与红球菌供体菌株 p52 相当。【结论】红球菌菌株 p52 可通过降解质粒转移强化生物修复过程,在去除环境中二噁英污染中具有良好的应用前景。

**关键词:** 生物修复, 降解质粒, 接合转移, 二噁英降解, 红球菌

## Maintenance and conjugative transfer of dioxin catabolic plasmids in a *Rhodococcus* sp.

SUN Jiao YANG Hai-Yan LI Li\*

(Shandong Provincial Key Laboratory of Water Pollution Control and Resource Reuse, School of Environmental Science and Engineering, Shandong University, Jinan, Shandong 250100, China)

**Abstract:** [Objective] To examine the stable maintenance and conjugative transfer of the dioxin-catabolic plasmids pDF01 (170 kb) and pDF02 (242 kb) harbored by *Rhodococcus* sp. strain p52. [Methods] We monitored the presence of pDF01 and pDF02 in strain p52 during continuous

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 21377069)

**\*Corresponding author:** Tel/Fax: 86-531-88364250; E-mail: lili@sdu.edu.cn

**Received:** February 19, 2017; **Accepted:** March 14, 2017; **Published online** (www.cnki.net): March 16, 2017

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(No. 21377069)

**\*通讯作者:** Tel/Fax: 86-531-88364250; E-mail: lili@sdu.edu.cn

**收稿日期:** 2017-02-19; **接受日期:** 2017-03-14; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2017-03-16

transfer in LB medium. We also performed mating experiments using strain p52 as a donor and bacterial strains belonging to different genera as recipients, and confirmed the transconjugant by colony hybridization and Southern hybridization. Further, we examined the function of catabolic genes in a transconjugant by degrading test. **[Results]** Both pDF01 and pDF02 could maintain in strain p52 after continuous transfer in LB medium less than 47 times, but pDF01 was lost after 65 times transfer in LB medium. Plasmid pDF01 and pDF02 could transfer concomitantly from strain p52 to the recipient strains, such as *Rhodococcus rhodochrous*, *Rhodococcus erythropolis*, *Janibacter terrae* and *Arthrobacter* sp., while *Arthrobacter* sp. showed the highest transconjugation frequency of  $3.5 \times 10^{-6}$  colonies per recipient. The results of Southern hybridization confirmed that *Arthrobacter* sp. transconjugant obtained pDF01 and pDF02. Furthermore, the catabolic plasmids could function in *Arthrobacter* sp. transconjugant, which could use dibenzofuran for growth comparing with the donor strain p52. **[Conclusion]** The dioxin-degrader *Rhodococcus* sp. strain p52 has potential for genetic bioaugmentation in contaminated environments.

**Keywords:** Bioremediation, Catabolic plasmid, Plasmid conjugation, Dioxin biodegradation, *Rhodococcus*

基因水平转移(Horizontal gene transfer, HGT), 通常也称为基因侧向转移, 指的是不同的生物个体间, 或单个细胞内部的细胞器之间进行遗传物质的交流<sup>[1]</sup>。基因水平转移打破了亲缘关系的界限, 即亲缘关系较近的同属不同种之间, 或者亲缘关系较远的生物种之间, 甚至没有亲缘关系的生物之间, 都可以发生基因水平转移<sup>[2-5]</sup>。随着分子生物学的发展, 发现生物在发展和进化中普遍存在着基因水平转移, 基因水平转移能够促使适应环境的优势基因在共同生活的生物体之间发生传递且保存下去<sup>[6]</sup>。目前, 国内外学者通过大量的研究发现在污染环境中存在并发生基因水平转移现象, 而污染环境中降解菌的多样性多数与降解基因的水平转移有关。这些发现表明了污染环境中微生物之间存在着广泛的降解基因交流, 从而促进更多的菌株获得降解功能<sup>[7]</sup>。基因水平转移对追踪菌株来源及其降解功能的形成、探讨菌株变迁以及不同污染地区优势菌株之间的关系等具有重要意义。细菌间基因水平转移主要是由可移动基因元件或水平基因库引起的, 其中质粒可通过接合转移在细菌间交换遗传物质, 并可在受体生物体内稳定表达且向子代传递遗传物质, 是一类重要的可移动基因元件<sup>[8]</sup>。

二噁英(Dioxin)是多氯代二苯并二噁英(Polychlorinated dibenzo-p-dioxin, PCDDs)和多氯代二苯并呋喃(Polychlorinated dibenzofuran, PCDFs)

两类物质的合称, 为强致癌、致突变性物质, 可严重干扰有机体的内分泌系统, 对人类及各类生物均存在严重的健康威胁, 是迄今为止毒性最大的化合物之一。环境中绝大部分二噁英是人工合成或工业生产的副产物, 垃圾焚烧、造纸及冶金工业等是二噁英的主要污染源, 存在于大气、土壤和水体之中的二噁英性质十分稳定, 物理、化学处理方法对其去除难度较大。微生物由于具备在各类环境中的广泛存在性、底物利用谱的多样性及对不同环境条件的适应性等特征, 决定了其在降解利用有机污染物方面有着不可替代的优势, 因此微生物降解是治理二噁英污染的一类有效方法<sup>[9]</sup>。由于二噁英毒性大、溶解性差且价格昂贵, 通常选择无氯原子取代的二苯并呋喃作为模式化合物研究二噁英的生物降解, 国内外的研究人员已经分离了大量降解二噁英的细菌, 主要包括假单胞菌(*Pseudomonas*)<sup>[10-12]</sup>、鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas*)<sup>[13-15]</sup>、红球菌(*Rhodococcus*)<sup>[16-17]</sup>、地杆菌(*Terrabacter*)<sup>[18-19]</sup>等。大多数研究考察了这些微生物降解二噁英的分子机制, 发现降解基因主要位于质粒上。

Miyakoshi 等研究呋喃/二噁英降解质粒 pCAR1 的复制、稳定性及接合转移特性发现, pCAR1 可以向其宿主菌 *Pseudomonas resinovorans* CA10 的衍生菌及 *P. putida* KT2440 转移, 证明质粒 pCAR1 具有自主转移性<sup>[20]</sup>。Shimizu 等报道联苯降解菌

*Rhodococcus* sp. strain RHA1 含有 3 个线状质粒 pRHL1 (1 100 kb)、pRHL2 (450 kb)和 pRHL3 (330 kb), 其中编码联苯降解酶类的质粒 pRHL2 可在同属菌株之间传递<sup>[17]</sup>。由于降解基因大多位于质粒上, 因此降解性质粒的转移对微生物新的降解能力的形成及其进化起着至关重要的作用, 也是对污染环境进行有效生物修复的重要手段<sup>[21]</sup>。Shintani 等将携带 *gfp* 标记的降解质粒 pBP136 和 pCAR1 的恶臭假单胞菌(*P. putida*)强化污染系统, 通过激光共聚焦显微镜追踪到质粒 pBP136-*gfp* 和 pCAR1-*gfp* 从假单胞菌供体菌转移到了其他土壤微生物中, 获得新的降解菌株, 从而加强了咔唑的降解效果<sup>[22]</sup>。

本课题组前期分离到一株以二苯并呋喃(DF)作为唯一碳源和能源生长的红球菌 *Rhodococcus* sp. strain p52, 通过研究发现 p52 中存在两个参与二噁英起始双羟化的双加氧酶基因簇 *dfdA1A2A3A4* 及 *dbfA1A2*, 且分别位于转移性质粒 pDF01 (170 kb)和 pDF02 (242 kb)上<sup>[23]</sup>。据报道 *dfdA*、*dbfA* 在多株放线菌中有分布, 除了本研究对象 *Rhodococcus* sp. strain p52, 还包括 *Rhodococcus* sp. strain HA01<sup>[16]</sup>, *Terrabacter* sp. strain YK2<sup>[24]</sup>, *Terrabacter* sp. strain DBF63<sup>[18]</sup>, 且二噁英降解途径其他关键酶的编码基因在这些菌株中具很强的保守性, 暗示了二噁英降解基因在不同菌株中通过基因水平转移而获得, 然而这些菌株中关于其降解质粒的接合转移特性目前仍缺乏充分的实验证据。鉴于此, 本研究以携带二噁英降解质粒 pDF01 和 pDF02 的红球菌菌株 p52 为研究对象, 考察 pDF01 和 pDF02 的遗传稳定性, 及其对于不同菌株的接合转移性能; 并进一步分析降解基因在接合子中的表达状况, 本研究可为菌株 p52 用于二噁英污染环境的生物修复提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂和仪器:** 分析纯( $\geq 99\%$ )二苯并呋喃(Dibenzofuran, DF)、色谱纯二甲基亚砜(DMSO)、色谱纯乙酸乙酯购自 Sigma-Aldrich, 将 DF 溶于

DMSO 配成 50 g/L 的储备液备用; *Taq* DNA 聚合酶购自大连宝生物公司; 其他分子、生化试剂购自生物工程(上海)股份有限公司。气相色谱质谱联用仪 6890-5973, Agilent 公司; 凝胶成像系统、基因扩增仪, Bio-Rad 公司; 分光光度计 6900, Unico 公司。

**1.1.2 主要菌种:** 实验所使用的菌株主要特征及来源见表 1。

**1.1.3 培养基:** LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, NaCl 10.0<sup>[25]</sup>。无机盐培养基(g/L):  $K_2HPO_4$  12.0,  $KH_2PO_4$  11.0,  $Na_2SO_4$  2.0,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2,  $NH_4NO_3$  3.0, 微量金属盐溶液 1.0 mL。微量金属盐溶液(g/L):  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$  0.3,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  0.038,  $MgCl_2 \cdot 4H_2O$  0.02,  $ZnCl_2$  0.014,  $H_3BO_3$  0.012 4,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  0.04,  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$  0.003 4。

### 1.2 方法

**1.2.1 质粒提取、Southern 杂交、菌落杂交分析:** 降解质粒提取按照 Peng 等报道的方法<sup>[23]</sup>进行。质粒提取后通过琼脂糖凝胶电泳进行检测的条件为: 0.8% 的琼脂糖浓度, TAE buffer, 4.5 V/cm 电压, 恒温 4 °C, 电泳时间 5 h。将 DNA 或菌落转膜后, 杂交方法同 Peng 等<sup>[23]</sup>, 其中探针标记、预杂交、杂交、信号检测等均使用试剂盒 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche, Germany) 按照使用手册完成。

**1.2.2 实验菌株抗生素抗性和二苯并呋喃降解能力试验:** 接合实验前分别对供体菌、受体菌进行抗生素抗性测试: 挑取各菌株 LB 平板上的单菌落分别接种于 LB 液体培养基中, 培养至  $OD_{600}=0.8$ , 以 5% 接种量分别转接到含有各种抗生素(20–50  $\mu\text{g/mL}$ )的 LB 液体培养基中作为受试组, 同时接种到不含抗生素的 LB 液体培养基中作为阴性对照组, 30 °C、180 r/min 恒温振荡培养, 间隔取样测量比较受试组与阴性对照组菌液的吸光度。接合实验前分别对供体菌、受体菌进行 DF 降解能力检测: 将各受体菌株活化后, 分别在以 DF (浓度 300 mg/L)为唯一碳源的无机盐固体培养基上划线, 于 30 °C 恒温培养箱中培养 2–7 d, 观察 DF 平板上是否有菌落生长,

同时在相同培养条件下将受体菌株接种于 LB 平板作对照; 对于 DF 平板上长出的菌落则进一步通过扩增其 16S rRNA 基因序列并测序验证其受体身份。供体菌株、受体菌株对于抗生素的抗性 & 利用 DF 的能力见表 1。

**1.2.3 平板接合实验:** 平板接合实验以菌株 p52 为供体菌, 分别以表 1 中的菌株为受体菌, 采用滤膜接合法进行接合实验<sup>[22]</sup>, 主要操作步骤如下: 挑取供体菌与受体菌的单菌落分别接种于 LB 培养基中, 培养至菌液  $OD_{600}$  达到 0.8–1.0。分别取供、受体菌液 1 mL, 12 000 r/min 离心 2 min 收集菌体, 加入 200  $\mu$ L LB 培养基重悬菌体, 将供、受体菌悬液混匀后转移至置于 LB 平板的 0.22  $\mu$ m 滤膜上, 30  $^{\circ}$ C 培养 20 h。取出滤膜以 2 mL 磷酸盐缓冲液 ( $Na_2HPO_4$  2.2 g/L,  $KH_2PO_4$  0.8 g/L,  $NH_4NO_3$  3.0 g/L) 洗脱菌体, 12 000 r/min 离心 2 min 收集菌体, 以缓冲液重悬菌体涂布于含有(仅受体菌株可耐受的)抗生素且以 DF 为唯一碳源的无机盐固体培养基, 30  $^{\circ}$ C 倒置培养 48 h, 平板上所生长出的可以利用 DF 为唯一碳源及能源生长、并对抗生素有抗性的菌落, 即为初步筛得的接合子。随机挑取初筛接合子, 以菌落 PCR 扩增其 16S rRNA 基因片段, 测序、确认接合子种属身份; 以菌落原位杂交确认降解质粒 pDF01 及 pDF02 的存在, 或者进一步将接合子

培养后提取质粒, 通过 Southern 杂交确认质粒存在。

**1.2.4 *Rhodococcus* sp. strain p52 中降解质粒的稳定性分析:** 将菌株 p52 单菌落在 LB 固体培养基上划线, 连续传代培养。对每次传代培养后的平板随机挑取单菌落进行菌落 PCR, 分别扩增位于质粒 pDF01 上的 *dfdA1* 片段和位于 pDF02 上的 *dbfA1* 片段, 检测 pDF01 及 pDF02 在菌株 p52 中的丢失状况, 并提取质粒进行 Southern 杂交确认。其中扩增 *dfdA1* 片段(1.07 kb)所使用引物为 DfdF546/DfdR4900<sup>[16]</sup>, 扩增 *dbfA1* 片段(1.48 kb)所使用引物为 DbfF1 (5'-CGCGACCCCGTCATACGAGC-3')/DbfR1 (5'-AGACTGCCCGACCAGGTGGG-3')<sup>[26]</sup>。

**1.2.5 节杆菌接合子降解实验:** 将获得的节杆菌接合子接种于 LB 培养基中, 待菌液  $OD_{600}$  为 4.0 后, 收集菌体并用无机盐培养基洗涤后重悬, 分别接种于装有 50 mL 无机盐培养基的 250 mL 锥形瓶内(初始  $OD_{600}$  约为 0.04), 加入受试底物 DF 使其终浓度为 500 mg/L, 于 30  $^{\circ}$ C、180 r/min 恒温振荡培养; 另外, 将节杆菌原受体菌接种于含 DF 的无机盐培养基中, 同样操作作为对照组; 同时以未接种菌悬液的含 DF 的无机盐培养基进行同样操作作为空白组, 实验组、对照组与空白组各设 3 份平行。间隔时间取样, 样品采用考马斯亮蓝法对菌体蛋白进行测定<sup>[27]</sup>获得菌体的生长量; 将样品以乙酸乙酯萃取

表 1 实验所用菌株及其相关特性  
Table 1 Relevant characteristics of bacterial strains used in experiments

菌株 Strains	相关特性/用途 Character /Applications	来源 Sources
红球菌 <i>Rhodococcus</i> sp. strain p52	Km <sup>S</sup> , Sm <sup>S</sup> , Em <sup>S</sup> ; DF(+)/donor	Laboratory collection <sup>[23]</sup>
紫红红球菌 <i>Rhodococcus rhodochrous</i>	Sm <sup>R</sup> , DF(-)/recipient	CGMCC 4.1147
红串红球菌 <i>Rhodococcus erythropolis</i>	Km <sup>R</sup> , DF( $\pm$ )/recipient	CGMCC 1.2362
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	Km <sup>S</sup> , Sm <sup>S</sup> , Em <sup>S</sup> ; DF(-)/recipient	CGMCC 1.1468
肿大地杆菌 <i>Terrabacter tumescens</i>	Km <sup>S</sup> , Sm <sup>S</sup> , Em <sup>S</sup> ; DF(-)/recipient	CGMCC 1.2032
大地两面神菌 <i>Janibacter terrae</i>	Sm <sup>R</sup> , DF( $\pm$ )/recipient	MCCC 1A0921
地杆菌 <i>Terrabacter</i> sp.	Km <sup>S</sup> , Sm <sup>S</sup> , Em <sup>S</sup> ; DF(-)/recipient	MCCC 1A04573
节杆菌 <i>Arthrobacter</i> sp.	Km <sup>S</sup> , Sm <sup>S</sup> , Em <sup>S</sup> ; DF(-)/recipient	Laboratory collection

注: Km: 卡那霉素; Sm: 链霉素; Em: 红霉素 <sup>R</sup> 为抗生素抗性; <sup>S</sup> 为抗生素敏感; DF(+): 利用 DF 生长; DF(-): 不利用 DF 生长; DF( $\pm$ ): 利用 DF 生长较差。

Note: Km: Kanamycin; Sm: Streptomycin; Em: Erythromycin; <sup>R</sup>: Antibic resistance; <sup>S</sup>: Antibic sensitivity; DF(+): Growth on DF; DF(-): No-growth on DF; DF( $\pm$ ): Inferior growth on DF.

后以气相色谱分析 DF 的浓度<sup>[23]</sup>, 检测 DF 的降解状况。

## 2 结果与分析

### 2.1 *Rhodococcus* sp. strain p52 中降解质粒的稳定性

将 *Rhodococcus* sp. strain p52 在无选择压力的条件下——LB 培养基中连续传代培养 47 次和 65 次后, PCR 扩增双加氧酶基因 *dbfA1* 片段和 *dfdA1* 片段的检测结果见图 1。

如图 1 所示, 经过 47 次传代培养后, 在 p52 单菌落中仍能够扩增检测到 *dbfA1* 基因片段(约 1.5 kb), 但几乎检测不到 *dfdA1* 片段(约 1 kb); 经过 65 次传代培养后, 在随机挑选的 p52 单菌落中均无法扩增检测到 *dfdA1* 和 *dbfA1* 片段。为进一步确认质粒 pDF01 和 pDF02 的丢失状况, 分别对连续传代 47 次及 65 次的 p52 菌株提取质粒 DNA, 分别与针对质粒 pDF01 的 *dfdA1* 探针和针对 pDF02 上的 *dbfA1* 探针进行 Southern 杂交, 结果如图 2 所示。经 Southern 杂交检测发现, 传代 47 次后 p52 中可检测到质粒 pDF02, 而 pDF01 丢失; 传代 65 次后 p52 中的质粒 pDF01 和 pDF02 全部丢失, Southern

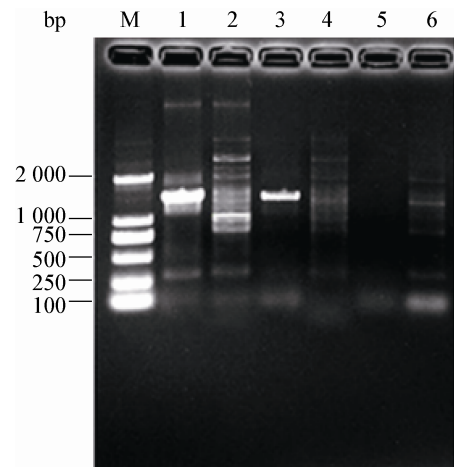


图 1 LB 培养基连续传代后 *Rhodococcus* sp. strain p52 中双加氧酶基因 *dbfA1* 和 *dfdA1* 片段的扩增结果

**Figure 1** PCR amplification of *dbfA1* and *dfdA1* fragments from *Rhodococcus* sp. strain p52 after continuous transfer in LB medium

注: 1、2: 菌株 p52 传代起始 *dbfA1* 和 *dfdA1* 基因片段扩增结果; 3、4: 传代 47 次后 p52 中 *dbfA1* 和 *dfdA1* 基因片段扩增结果; 5、6: 传代 65 次后 p52 中 *dbfA1* 和 *dfdA1* 基因片段扩增结果; M: DL2000 DNA 分子量标准。

Note: 1, 2: Amplicon of *dbfA1* and *dfdA1* fragments from strain p52 before transfer; 3, 4: Amplicon of *dbfA1* and *dfdA1* fragments from strain p52 after forty-seven times transfer in LB medium; 5, 6: Amplicon of *dbfA1* and *dfdA1* fragments from strain p52 after sixty-five times transfer in LB medium; M: DL2000 DNA Marker served as molecular mass standard.

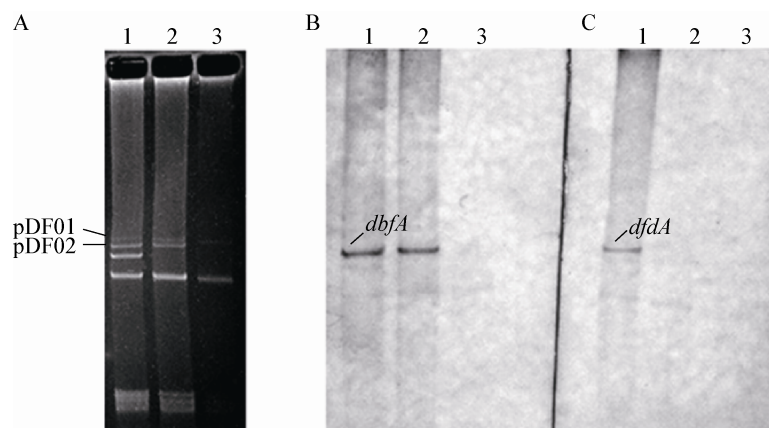


图 2 LB 培养基连续传代后 *Rhodococcus* sp. strain p52 中质粒 pDF01 和 pDF02 的 Southern 杂交检测结果

**Figure 2** Detection of pDF01 and pDF02 by Southern hybridization in *Rhodococcus* sp. strain p52 before and after continuous transfer in LB medium

注: 图 A 中 1、2、3 分别为: 菌株 p52 传递起始、传代 47 次和传代 65 次后提取质粒 pDF01 和 pDF02 的电泳检测结果; 图 B、C 分别为提取质粒 pDF02、pDF01 的 Southern 杂交结果: 1 为菌株 p52 传代起始提取质粒的 Southern 杂交结果; 2 为连续传代 47 次后菌株 p52 中提取质粒的 Southern 杂交结果; 3 为连续传代 65 次后菌株 p52 中提取质粒的 Southern 杂交结果。

Note: A: Agarose gel electrophoresis profile of plasmids extracted from strain p52 before transfer (1), after transfer forty-seven times (2) and after transfer sixty-five times (3); Detection of pDF02 (B) and pDF01 (C) by Southern hybridization for strain p52 before transfer (1), after transfer forty-seven times (2) and after transfer sixty-five times (3).

杂交结果与双加氧酶基因 *dfdA1* 和 *dbfA1* 片段的 PCR 扩增结果相吻合。

实验通过无选择压力条件下连续传代培养,考察了二噁英降解质粒 pDF01、pDF02 在宿主菌株 p52 中的稳定保持能力,结果表明菌株 p52 中的质粒 pDF01 和 pDF02 较稳定,经过连续传代(小于 47 次)培养仍可保持,其中质粒 pDF02 比 pDF01 更加稳定。

## 2.2 *Rhodococcus* sp. strain p52 中降解质粒 pDF01 和 pDF02 的接合转移特性

接合实验前对供体、受体菌株的抗生素抗性检测发现,供体菌株 p52 对所有测试抗生素均无明显抗性,其他受体菌株则对不同的抗生素抗性不同(表 1)。另外,接合实验前将受体菌株接种于含 DF 的无机盐培养基中 30 °C 恒温培养 2 d 后,发现红串红球菌和大地两面神菌可微弱生长,但与 *dfdA* 和 *dbfA* 探针无杂交信号(结果未附),表明这两株菌虽然未携带含双加氧酶基因 *dfdA1* 和 *dbfA1* 的质粒,但可能含有其他降解 DF 的基因。以菌株 p52 为供体菌,以红球菌同属或不同属的菌株为受体菌,采用滤膜接合法进行接合实验。结果表明,当以紫红红球菌、红串红球菌、大地两面神菌和节杆菌为受体菌时,筛选培养基(含 DF 及抗生素)上分别长出了类似受体菌形态的菌落,为初步认定的接合子。分别对这些初步认定的接合子一方面扩增其 16S rRNA 基因

序列并测序<sup>[28]</sup>,验证其菌属,证明与受体菌一致;另一方面对接合子菌落分别使用与 pDF01 及 pDF02 结合的探针进行菌落杂交试验(图 3),实验中以 p52 的菌落作为阳性对照、以接合实验之前的原受体菌落作为阴性对照,结果显示上述 4 种接合子与阳性对照均有杂交信号,而阴性对照均无杂交信号,表明菌株 p52 中的质粒 pDF01 和 pDF02 通过接合作用转移到上述 4 种受体菌株中,其接合转移频率见表 2。

以上研究表明二噁英降解质粒 pDF01 和 pDF02 可向紫红红球菌、红串红球菌、节杆菌和大地两面

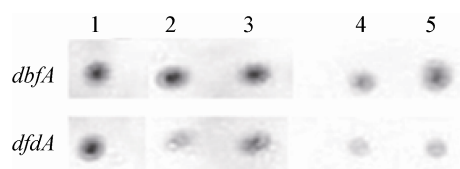


图 3 *Rhodococcus* sp. strain p52 和接合子使用 *dbfA* 和 *dfdA* 探针的菌落杂交结果

Figure 3 Colony hybridization with probes targeting *dbfA* and *dfdA* fragments for *Rhodococcus* sp. strain p52 and different transconjugants

注: 1: p52 菌落使用 *dbfA* 和 *dfdA* 探针杂交结果(阳性对照); 2、3、4、5: 紫红红球菌、红串红球菌、大地两面神菌和节杆菌菌落使用 *dbfA* 和 *dfdA* 探针的杂交结果。

Note: Colony hybridization results with probes targeting *dbfA* and *dfdA* fragments are shown for positive control p52 (1), *R. rhodochrous* transconjugant (2), *R. erythropolis* transconjugant (3), *J. terra* transconjugant (4), and *Arthrobacter* sp. transconjugant (5).

表 2 红球菌菌株 p52 中 pDF01 与 pDF02 对不同受体菌的接合转移频率

Table 2 Transconjugation frequency of pDF01 and pDF02 from *Rhodococcus* sp. strain p52 to different recipients

受体菌株 Recipient strains	接合转移频率(接合子/供体菌) Transconjugation frequency (Transconjugant/Recipient)	转移质粒及稳定性* Conjugative plasmid and plasmid stability*
紫红红球菌 <i>Rhodococcus rhodochrous</i>	$1.8 \times 10^{-7}$	pDF01, pDF02; Unstable
红串红球菌 <i>Rhodococcus erythropolis</i>	$2.6 \times 10^{-7}$	pDF01, pDF02; Unstable
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	— <sup>a</sup>	— <sup>b</sup>
肿大地杆菌 <i>Terrabacter tumescens</i>	— <sup>a</sup>	— <sup>b</sup>
大地两面神菌 <i>Janibacter terrae</i>	$3.2 \times 10^{-9}$	pDF01, pDF02; Unstable
地杆菌 <i>Terrabacter</i> sp.	— <sup>a</sup>	— <sup>b</sup>
节杆菌 <i>Arthrobacter</i> sp.	$3.5 \times 10^{-6}$	pDF01, pDF02; Stable

注: <sup>a</sup>: 接合转移频率小于  $10^{-10}$ ; <sup>b</sup>: 未得到相应的接合子; \*: 不稳定指以筛选平板传代 1-2 次即丢失。

Note: <sup>a</sup>: Transconjugation frequency less than  $10^{-10}$ ; <sup>b</sup>: No transconjugant obtained; \*: Plasmid unstability: No-growth on selective plate after transfer 1-2 times.



神菌多个菌株转移。其中紫红红球菌、红串红球菌与供体菌株 p52 为同属, 与我们对基因水平转移的一般认识相一致, 即降解质粒在同属间容易进行转移。大地两面神菌与供体红球菌同为放线菌目, 亲缘关系较近, 大地两面神菌虽然自身具有在 DF 平板上生长的能力, 但使用 *dbfA* 和 *dfdA* 探针进行菌落原位杂交未出现杂交信号, 表明自身不含有 *dbfA1* 和 *dfdA1* 基因, 而接合实验之后出现杂交信号, 证明该菌株通过质粒接合转移获得了 *dbfA1* 和 *dfdA1* 基因。这表明菌株 p52 降解质粒的接合转移宿主范围不局限于同属。节杆菌(*Arthrobacter* sp.) 与供体红球菌同为革兰氏阳性菌, 亲缘关系相对较远, 表明菌株 p52 中的二噁英降解质粒具有较宽泛的转移宿主范围。

值得一提的是, 在接合实验中有的接合子中只获得了 pDF02 质粒, 但只含 pDF02 质粒的接合子在含 DF 的无机盐培养基上生长状况较差, 在传代 1-2 代后质粒即丢失, 暗示 pDF01、pDF02 以及两套双加氧酶基因在 DF 降解过程中可能存在协作<sup>[23]</sup>。例如, 据报道在 *Rhodococcus* sp. strain HA01 中双加氧酶 DfdA 只可催化降解 3-氯代二苯并呋喃

但不可降解 2-氯代二苯并呋喃; 而双加氧酶 DbfA 可催化降解 2-氯代二苯并呋喃但不可降解 3-氯代二苯并呋喃<sup>[16]</sup>。另外, 在本研究与节杆菌受体菌株相比, 降解质粒 pDF01、pDF02 对于其他受体菌株的转移频率( $10^{-6}$ – $10^{-8}$ )较低, 且降解质粒在这些宿主菌中更易丢失。需要说明的是, 本研究接合转移实验所使用的受体菌株与供体菌株 p52 一致, 全部为革兰氏阳性菌, 目前本课题组正在研究二噁英降解质粒 pDF01 和 pDF02 能否向革兰氏阴性菌中转移。

### 2.3 节杆菌接合子中二噁英降解质粒 pDF01 及 pDF02 的检测

为了进一步确认降解质粒 pDF01 和 pDF02 从供体菌株 p52 接合转移到节杆菌受体菌株, 从所得到的节杆菌接合子中提取质粒, 同时也提取供体菌株 p52 的质粒作对照, 分别以质粒 pDF01 上的 *dfdA1* 和 pDF02 上的 *dbfA1* 的部分序列合成探针进行 Southern 杂交, 结果见图 4。

节杆菌接合子质粒电泳结果显示含有 3 条带, 前两条带大小分别对应于供体菌 p52 的降解质粒 pDF01 和 pDF02, Southern 杂交结果显示, 这两条带可分别与 *dfdA* 和 *dbfA* 探针结合, 表明节杆菌接

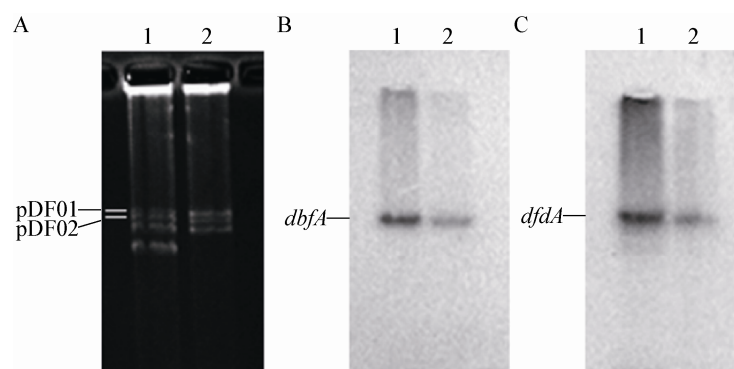


图 4 提取节杆菌接合子的质粒进行电泳及 Southern 杂交确认 pDF01 与 pDF02

Figure 4 Detection of the catabolic plasmids pDF01 and pDF02 in *Arthrobacter* sp. transconjugant by Southern hybridization

注: 图 A 中 1、2 分别为提取的 *Rhodococcus* sp. strain p52 (阳性对照) 和节杆菌接合子的质粒电泳结果; 图 B 中 1、2 分别为菌株 p52 和节杆菌接合子质粒与 *dbfA* 探针的杂交结果; 图 C 中 1、2 分别为菌株 p52 和节杆菌接合子质粒与 *dfdA* 探针的杂交结果。

Note: A: Agarose gel electrophoresis profiles of plasmids extracted from the donor *Rhodococcus* sp. strain p52 (1) as a positive control and the *Arthrobacter* sp. transconjugant (2). B: Southern hybridization results using probe targeting *dbfA* for the plasmids from the donor strain p52 (1) and the *Arthrobacter* sp. transconjugant (2). C: Southern hybridization results using probe targeting *dfdA* for the plasmids from the donor strain p52 (1) and the *Arthrobacter* sp. transconjugant (2).

合子中含有质粒 pDF01 和 pDF02。值得一提的是,对节杆菌受体菌株提取质粒进行电泳,未显示对应的质粒条带(结果未附),这与节杆菌受体菌株菌落杂交实验结果相一致,即采用与 pDF01 及 pDF02 结合的探针进行菌落杂交时不产生杂交信号,表明受体菌株自身并不含有 pDF01 和 pDF02。

#### 2.4 节杆菌接合子利用二苯并呋喃生长

为了进一步明确降解质粒是否能够在新的宿主菌中遗传表达,使得受体菌株获得降解功能,对上述节杆菌接合子降解利用二苯并呋喃作测试分析,并与节杆菌原受体菌株作比较。结果显示节杆菌接合子可以利用 DF 作为唯一碳源及能源生长,在以 DF 为唯一碳源的无机盐培养基中,节杆菌接合子的生长伴随着对 DF 的消耗,而节杆菌原受体菌株则无明显生长及对 DF 的利用,具体见图 5。

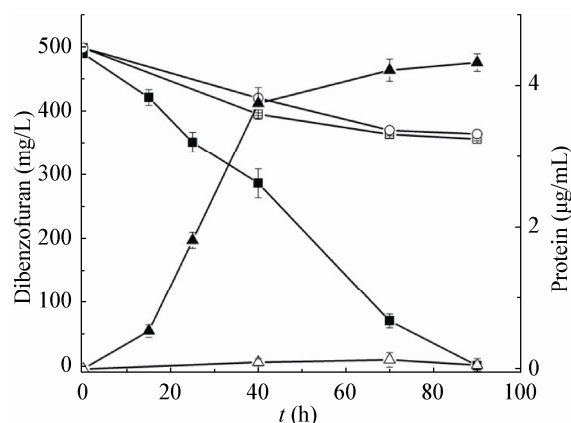


图 5 *Arthrobacter* sp.接合子及受体菌株对二苯并呋喃的利用与生长

Figure 5 Use of dibenzofuran by the *Arthrobacter* sp. transconjugant for growth comparing with the recipient strain

注:图中各曲线分别显示以气相色谱检测无机盐培养基无菌对照组二苯并呋喃浓度变化(○)、培养基中接种节杆菌接合子(■)及接种节杆菌原受体菌株(□)二苯并呋喃浓度变化;并以检测蛋白含量显示培养基中接种节杆菌接合子菌体浓度变化(▲)、接种节杆菌原受体菌株菌体浓度变化(Δ)。

Note: Decreases in the dibenzofuran levels in the non-inoculation control (○), transconjugant culture (■), recipient culture (□), and were monitored by gas chromatography. Growth is shown as an increase in the protein contents of the transconjugant (▲) and the recipient (Δ).

在接合子培养过程中,含 DF 的无机盐培养基的颜色逐渐变为橘黄色,呈现出外二醇双加酶作用的特征结果,节杆菌接合子可利用 DF 生长,经过 90 h DF 由 500 mg/L 降至检测限以下,这与供体菌株 p52 相比较,降解速率略慢,后者在 48 h 内可将 500 mg/L 的 DF 完全降解<sup>[23]</sup>。另外节杆菌原受体菌株不能利用 DF 支持生长,其 DF 浓度变化曲线与无菌空白对照基本吻合,证明降解质粒 pDF01、pDF02 上的降解基因可在新的节杆菌宿主菌中表达,使节杆菌接合子获得了 DF 降解能力。

### 3 结论

通过无选择压力条件下连续传代培养,表明菌株 p52 中二噁英降解质粒 pDF01、pDF02 在宿主菌 *Rhodococcus* sp. strain p52 中较稳定,经过连续(小于 47 次)传代培养仍可保持,其中质粒 pDF02 比 pDF01 更加稳定。以红球菌菌株 p52 为供体菌,以同属或不同属菌株为受体菌进行接合实验,证明二噁英降解质粒 pDF01 和 pDF02 可向紫红红球菌、红串红球菌、节杆菌和大地两面神菌等多个菌株转移,转移频率为  $10^{-6}$ – $10^{-8}$ ,表明菌株 p52 中的二噁英降解质粒具有较宽泛的转移宿主范围。通过提取节杆菌接合子的质粒进行 Southern 杂交进一步确认了二噁英降解质粒 pDF01、pDF02 的转移,另外通过降解实验发现节杆菌获得降解质粒后可以利用 DF 作为唯一碳源及能源生长,降解基因可在新的宿主菌中表达。上述研究表明红球菌菌株 p52 可通过降解质粒转移强化生物修复过程,在去除环境中二噁英污染中具有良好的应用前景。

### 参考文献

- [1] Thomas CM, Nielsen KM. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(9): 711-721
- [2] Davison J. Monitoring horizontal gene transfer[J]. *Nature Biotechnology*, 2004, 22(11): 1349
- [3] Poole AM. Horizontal gene transfer and the earliest stages of the evolution of life[J]. *Research in Microbiology*, 2009, 160(7): 473-480
- [4] Hotopp JCD. Horizontal gene transfer between bacteria and animals[J]. *Trends in Genetics*, 2011, 27(4): 157-163
- [5] Ou JH, Xie ZX, Chen XD, et al. Horizontal gene transfer[J].



- Hereditas, 2003, 25(5): 623-627 (in Chinese)
- 欧剑虹, 谢志雄, 陈向东, 等. 水平基因转移[J]. 遗传, 2003, 25(5): 623-627
- [6] Li ZJ, Li HQ, Diao XM. Methods for the identification of horizontal gene transfer (HGT) events and progress in related fields[J]. Hereditas, 2008, 30(9): 1108-1114 (in Chinese)
- 李志江, 李海权, 刁现民. 基因水平转移的评判方法和转移方式研究进展[J]. 遗传, 2008, 30(9): 1108-1114
- [7] Gogarten JP, Townsend JP. Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution[J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3(9): 679-687
- [8] Horiike T, Miyata D, Tateno Y, et al. Hgt-gen: a tool for generating a phylogenetic tree with horizontal gene transfer[J]. Bioinformatics, 2011, 27(5): 211-213
- [9] Jeon JR, Murugesan K, Baldrian P, et al. Aerobic bacterial catabolism of persistent organic pollutants-potential impact of biotic and abiotic interaction[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2016, 38: 71-78
- [10] Dennis JJ, Zylstra GJ. Complete sequence and genetic organization of pDTG1, the 83 kilobase naphthalene degradation plasmid from *Pseudomonas putida* strain NCIB 9816-4[J]. Journal of Molecular Biology, 2004, 341(3): 753-768
- [11] Fortnagel P, Harms H, Wittich RM, et al. Metabolism of dibenzofuran by *Pseudomonas* sp. strain HH69 and the mixed culture HH27[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1990, 56(4): 1148-1156
- [12] Resnick SM, Gibson DT. Regio- and stereospecific oxidation of fluorene, dibenzofuran, and dibenzothiophene by naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816-4[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(11): 4073-4080
- [13] Hong HB, Chang YS, Nam IH, et al. Biotransformation of 2,7-dichloro- and 1,2,3,4-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin by *Sphingomonas wittichii* RW1[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(5): 2584-2588
- [14] Keim T, Francke W, Schmidt S, et al. Catabolism of 2,7-dichloro- and 2,4,8-trichlorodibenzofuran by *Sphingomonas* sp. strain RW1[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 1999, 23(4/5): 359-363
- [15] Wilkes H, Wittich R, Timmis KN, et al. Degradation of chlorinated dibenzofurans and dibenzo-*p*-dioxins by *Sphingomonas* sp. strain RW1[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(2): 367-371
- [16] Aly HAH, Huu NB, Wray V, et al. Two angular dioxygenases contribute to the metabolic versatility of dibenzofuran-degrading *Rhodococcus* sp. strain HA01[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(12): 3812-3822
- [17] Shimizu S, Kobayashi H, Masai E, et al. Characterization of the 450-kb linear plasmid in a polychlorinated biphenyl degrader, *Rhodococcus* sp. strain RHA1[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(5): 2021-2028
- [18] Nojiri H, Kamakura M, Urata M, et al. Dioxin catabolic genes are dispersed on the *Terrabacter* sp. DBF63 genome[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002, 296(2): 233-240
- [19] Habe H, Ide K, Yotsumoto M, et al. Degradation characteristics of a dibenzofuran-degrader *Terrabacter* sp. strain DBF63 toward chlorinated dioxins in soil[J]. Chemosphere, 2002, 48(2): 201-207
- [20] Miyakoshi M, Shintani M, Terabayashi T, et al. Transcriptome analysis of *Pseudomonas putida* KT2440 harboring the completely sequenced IncP-7 plasmid pCAR1[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(19): 6849-6860
- [21] Musovic S, Dechesne A, Sorensen J, et al. Novel assay to assess permissiveness of a soil microbial community toward receipt of mobile genetic elements[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(14): 4813-4818
- [22] Shintani M, Matsui K, Inoue JI, et al. Single-cell analyses revealed transfer ranges of IncP-1, IncP-7, and IncP-9 plasmids in a soil bacterial community[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(1): 138-145
- [23] Peng P, Yang HY, Jia RB, et al. Biodegradation of dioxin by a newly isolated *Rhodococcus* sp. with the involvement of self-transmissible plasmids[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(12): 5585-5595
- [24] Iida T, Mukouzaka Y, Nakamura K, et al. Plasmid-borne genes code for an angular dioxygenase involved in dibenzofuran degradation by *Terrabacter* sp. strain YK3[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(6): 3716-3723
- [25] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 2nd Edition. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [26] Yang HY. Degradation of petroleum pollutants by *Rhodococcus* sp. strain p52[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong University, 2014 (in Chinese)
- 杨海燕. 一株红球菌(*Rhodococcus* sp. strain p52)对石油污染物的降解研究[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2014
- [27] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248-254
- [28] Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing[A]//Strackebrandt E, Goodfellow M. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics[M]. New York: Wiley, 1991.