



文章栏目：环境生物技术

DOI 10.12030/j.cjee.202204072 中图分类号 X52 文献标识码 A

陈海宁, 田伟君, 赵婧, 等. 海洋芘降解菌 *Alteromonas* sp.P7 的降解特性及基因组初步分析[J]. 环境工程学报, 2022, 16(11): 3739-3749.
[CHEN Haining, TIAN Weijun, ZHAO Jing, et al. Degradation characteristics and genome analysis of marine pyrene degrading bacteria *Alteromonas* sp. P7.[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2022, 16(11): 3739-3749.]

海洋芘降解菌 *Alteromonas* sp.P7 的降解特性及基因组初步分析

陈海宁, 田伟君[✉], 赵婧, 江俊峰, 杨淑洁, 高惠子

中国海洋大学环境科学与工程学院, 青岛 266000

摘要 以芘(PYR)为唯一碳源, 在青岛受石油烃污染的码头的海底沉积物中分离到 1 株 PYR 海洋降解菌株 P7, 经过形态学观察、16S rRNA 基因序列分析鉴定菌株 P7 属于交替单胞菌(*Alteromonas*)。该菌株在 20 d 内对 PYR 的降解率可达 44.8%。经 GC-MS 鉴定分析发现, 菌株 P7 降解芘的代谢产物中含有邻苯二甲酸和水杨酸, 且细胞代谢过程中产生邻苯二酚 2,3-双加氧酶, 由此推测出 *Alteromonas* sp. P7 对芘的降解中间产物中含有邻苯二酚, 且对芘的降解是通过邻苯二甲酸途径和水杨酸途径实现的。通过对分离得到的 *Alteromonas* sp. P7 进行测序, 得到 1 条全长 4 597 467 bp 的基因组, 对该基因序列注释, 得到编码基因 8 164 个, 平均 GC 含量为 44.26%。重将测序结果与数据库比对并检索, 菌株 P7 含有参与编码邻苯二酚 2,3-双加氧酶的基因。

关键词 芘降解菌; 交替单胞菌; 代谢产物; 双加氧酶; 基因组

多环芳烃(PAHs)是一类由 2 个或 2 个以上苯环在线性、角形或簇状排列下组成的半挥发性有机化合物^[1], 包括萘(NAP)、蒽(ANT)、菲(PHE)、芘(PYR)和苯并[a]芘(BaP)等在内的 150 余种。PAHs 的低生物利用率、疏水性和热力学稳定性等特征, 使其在环境中的降解率较低^[2]。

PYR 作为典型的四环 PAHs, 常被用作高环芳烃降解的研究基础。细菌可以在有氧或无氧条件下代谢 PYR。PYR 的有氧代谢已得到广泛研究, 尤其是在分枝杆菌和解环菌中较为常见^[3]。在有氧降解途径中, PYR 在单加氧酶或双加氧酶的催化下被氧化。双加氧酶是一种复杂的多组分酶体系, 由铁氧还蛋白、还原酶和含铁硫的末端加氧酶组成^[4]。PYR 的苯环可以被双加氧酶羟基化形成顺式二氢二醇, 然后被脱氢酶氧化为次二醇, 这些次二醇被内环裂解双加氧酶通过邻位裂解, 或通过外环裂解双加氧酶进行间位裂解, 生成常见的邻苯二酚, 然后转化为三羧酸循环(TCA)所需要的代谢物质^[3,5], 这是最常见的 PYR 细菌降解途径。其中涉及到的酶主要包括双加氧酶、二氢庚二醇脱氢酶、断裂双加氧酶、乙醇脱氢酶、乙醛脱氢酶和脱羧酶等。

目前发现能够降解 PYR 的典型细菌有假交替单胞菌属(*PseudoAlteromonas* sp.)^[6]、解环菌属(*Cycloasticus* sp.)^[7-8]、芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)^[9-12]、红球菌属(*Rhodococcus* sp.)^[13]、黄杆菌属(*Flavobacterium* sp.)^[14-15]等。本文利用 PYR 作为唯一碳源, 在被石油烃污染码头的海底沉积物中分离到一

收稿日期: 2022-04-12; 录用日期: 2022-10-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(51979255)

第一作者: 陈海宁(1997—), 女, 硕士研究生, chenaining97@163.com; ✉通信作者: 田伟君(1975—), 女, 博士, 教授, weijunas@ouc.edu.cn

株海洋 PYR 降解菌株, 对其进行了分类鉴定, 并对降解途径和基因组进行了初步分析, 以丰富芳烃化合物海洋降解菌库, 以此为海洋环境中 PAHs 污染治理等提供数据参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

主要试剂: PYR($\geq 98\%$) 购自美国 AccuStandard 公司。无机盐培养基^[16] 包括 $19\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaCl}$, $7.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $3.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{Na}_2\text{HPO}_4$, $2.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{KH}_2\text{PO}_4$, $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{NH}_4\text{NO}_3$, $0.7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{KCl}$ 以及微量元素 ($0.06\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 $0.2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$)。富集液体培养基: 无机盐培养基中加入 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蛋白胨, $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 酵母粉。富集固体培养基和无机盐固体培养基分别为富集液体培养基和无机盐培养基中添加 2% 的琼脂。

上述培养基均将 pH 调节为 7.0, 在 $121\text{ }^\circ\text{C}$ 下高压蒸汽灭菌 20 min 后使用。降解培养基和筛选固体培养基为分别在无机盐培养基和无机盐固体培养基中加入 PYR-正己烷溶液, 并挥发除去正己烷后制成。

1.2 降解菌株的分离纯化

取 5 mL 沉积物悬浊液加入 45 mL 降解培养基中, 在避光、 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下振荡培养, 培养 7d 后, 取出 5 mL 接种于新的更高浓度的 PYR 驯化培养基中, 如此反复共驯化 5 代, PYR 的质量浓度梯度为 1、5、10、20、40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 驯化结束之后, 在筛选固体培养基上涂布 100 μL 上述菌液, 放置于培养箱中于 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 避光培养。3~7 d 长出明显菌落后, 用划线分离法纯化出单菌株。菌种- $80\text{ }^\circ\text{C}$ 下用 20% 甘油保存。

1.3 菌株的鉴定

选取 1 株生长最好的菌株命名为 P7, 将菌株 P7 单菌落在筛选固体培养基上划线, $30\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养, 7 d 后进行观察并收集菌体进行 SEM 观测。利用基因组提取试剂盒提取菌株的总 DNA, 以其为模板, 用 27F 和 1492R 对 DNA 进行扩增。PCR 反应体系: 模板 2 μL , KOD OneTM PCR Master Mix 25 μL , 1 \times 引物 (10 μM each) 1.5 μL , 灭菌水 20 μL 。PCR 循环条件: 变性 $98\text{ }^\circ\text{C}$, 10 s, 退 $55\text{ }^\circ\text{C}$, 8 s, 延伸 $68\text{ }^\circ\text{C}$, 2 s, 经历 35 个循环后, 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳验证 PCR 产物。产物由科学指南针公司进行测序, 测序结果在 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 上进行比对, 若菌株在模式菌株数据库中比对相似度略低, 则利用 nt 数据库进行 1 次比对。利用菌株 P7 的 16S rDNA 的通用引物进行扩增, 得到 1361bp 的基因序列, 测序结果已提交 GenBank, 登录号为 ON573337。

1.4 PAHs 降解率及 OD_{600} 的测定

首先将 P7 菌株单菌落接种到富集液体培养基中, $30\text{ }^\circ\text{C}$, $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 富集到对数生长期 ($\text{OD}_{600}\approx 1$), 取 30 mL 培养物, $5000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 低速离心收集菌体, 并用灭菌无机盐培养基洗涤 2 次, 重悬后接入含有 PYR 的 18 mL 无机盐培养基中 (PYR 的终质量浓度为 $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 同时设置接种失活菌的培养基作为空白对照)。将上述实验组和空白对照组于 $30\text{ }^\circ\text{C}$, $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 避光培养。

每 24 h 取培养液测定 OD_{600} , 每 2 d 测定培养液中剩余 PYR 浓度。用 20 mL 正己烷分 2 次萃取培养物中残余的 PYR, 取 1 mL 萃取液经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤后进行 GC-MS 分析, 最终根据实验组和对照组培养基中 PYR 的残留量进行降解率的计算, 降解率=(对照组 PYR 浓度-实验组 PYR 浓度)/对照组 PYR 浓度。

GC/MS 分析条件如下: 色谱条件: Agilent 19091S-433 HP-5MS 色谱柱 ($30\text{ m}\times 250\text{ }\mu\text{m}\times 0.25\text{ }\mu\text{m}$); 进样口 $250\text{ }^\circ\text{C}$, 检测器 $280\text{ }^\circ\text{C}$; 初始温度 $40\text{ }^\circ\text{C}$, 以 $8\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温至 $300\text{ }^\circ\text{C}$ 并保持 10 min; 载气 (高纯氦气) 流速 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 压力 7.01 psi; 进样量 1 μL , 分流比 20:1。质谱条件: 离子源为电子轰击源, 电离电压 70 eV, 温度 $230\text{ }^\circ\text{C}$; 采集方式为选择离子; 溶剂延迟 5 min。

1.5 环境因子对降解效果的影响测定

无机盐培养基中加入一定量的 PYR-正己烷溶液, 在接种菌液之后调节 PYR 质量浓度分别为 1、5、10、20 和 40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。接种 $\text{OD}_{600}\approx 1$ 的 P7 菌悬液, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、150 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下振荡培养, 以测定底物浓度对于菌株 P7 降解率的影响。PYR 质量浓度为 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的降解培养基, 接种 1% 的菌悬液后置于温度为 4、15、20、30 和 35 $^{\circ}\text{C}$ 条件下振荡 (150 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$) 培养, 用于测定温度对于菌株 P7 降解率的影响。用缓冲体系调节 PYR 质量浓度为 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的降解培养基的 pH 分别为 4、6、7、8 和 10, 接种 1% 的菌悬液, 30 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡 (150 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$) 培养, 用于测定 pH 对于菌株 P7 降解率的影响。在 PYR 质量浓度为 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的降解培养基中, 加入一定量的 NaCl, 分别配制成盐度为 10%、20%、30%、40% 的液体培养基。接种 1% 的菌悬液, 30 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡 (150 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$) 培养, 用于测定盐度对于菌株 P7 降解率的影响。20 d 后整瓶萃取测定剩余 PYR 浓度, 实验设灭活菌作为对照, 每个处理设 3 个重复。

1.6 降解中间产物的测定

选取 P7 降解后的样品进行代谢产物的分析测定。采用等体积的正己烷对菌液萃取 2 次, 将萃取液合并后经无水硫酸钠除去水分, 取 1 mL 经 0.22 μm 滤膜过滤后, 利用 GC-MS 检测。初始温度 40 $^{\circ}\text{C}$, 以 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升至 240 $^{\circ}\text{C}$ 并保持 2 min, 后以 5 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升至 260 $^{\circ}\text{C}$ 并保持 1 min, 再以 3 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升至 300 $^{\circ}\text{C}$ 。质谱的采集方式为全扫描。

1.7 邻苯二酚双加氧酶酶活测定

将菌株 P7 接入 PYR 降解培养基中, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 10 d 后离心, 收集沉淀菌体。用磷酸盐缓冲液将菌体重悬后, 在冰浴中超声破碎, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下冷冻离心, 离心速度为 10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 取上清液作为粗酶液。以接种前的菌株的粗酶液作为对照。蛋白含量用 Bradford 法测定。

采用紫外分光光度法, 测定菌株的酶活力。测定体系为 0.2 mL 粗酶液、2.4 mL 磷酸缓冲液、0.4 mL 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 邻苯二酚溶液, 混合均匀后, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热反应。邻苯二酚 2,3-双加氧酶酶活测定: 反应 30 min 后, 测定反应液在 375 nm 波长光吸收的增加值。邻苯二酚 2,3-双加氧酶活单位: 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 时, 每分钟生成 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 2-羟基粘糠半醛所需的酶量^[17]。

1.8 基因组组装及测序

对收集好的样品进行 DNA 的提取, 并对抽提的样品送往科学指南针公司进行检测。采用试剂盒说明书中的标准 Illumina TruSeq Nano DNA LT 文库制备实验流程构建所需的基因组上机文库。本研究将拼接的而得的序列与数据库 NR、COG 和 KEGG 进行比对, 得到与给定序列具有最高序列相似性的核酸或蛋白质, 获得对应的注释信息。

2 结果与讨论

2.1 菌株 P7 的分离和系统发育分析

在青岛小港码头海底沉积物中筛选到一株高效 PYR 降解菌, 命名为 P7, P7 在富集固体培养基上的菌落大小为 1~1.5 mm, 菌落形态为规则圆形, 不透明并呈现白色, 表面湿润, 边缘整齐, 只在培养基表面生长, 边缘规则, 不向四周扩散。SEM 结果如图 1 所示, 菌株 P7 呈杆状, 长度为 10~20 μm , 无鞭毛。通过相似性比较, 根据发育树 (图 2) 并结合各个菌株的菌落形态以及生理生化特征可以得出, 菌

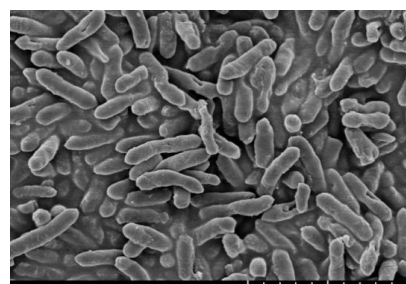


图 1 菌株 P7 的 SEM 图

Fig. 1 SEM of strain P7

株 P7 为交替单胞菌 (*Alteromonas*)。

程晓宇^[18]等在东海沉积物中也筛选到了 2 株未被报道过的具有香草醛降解功能的交替单胞菌, 此类种属细菌在海洋环境中广泛分布, 并且绝大部分具有潜在的烃类化合物降解能力。但未曾有过关于交替单胞菌降解 HMW-PAHs 的报道, 本文首次筛选分离到了具有 HMW-PAHs 降解能力的海洋交替单胞菌。目前对海洋中 HMW-PAHs 的降解菌的筛选研究报道很少。对于 *Alteromonas* sp. P7 的分离鉴定可以进一步丰富芳烃化合物海洋降解菌库, 并可为原位高效修复海洋 PAHs 污染提供菌种储备。

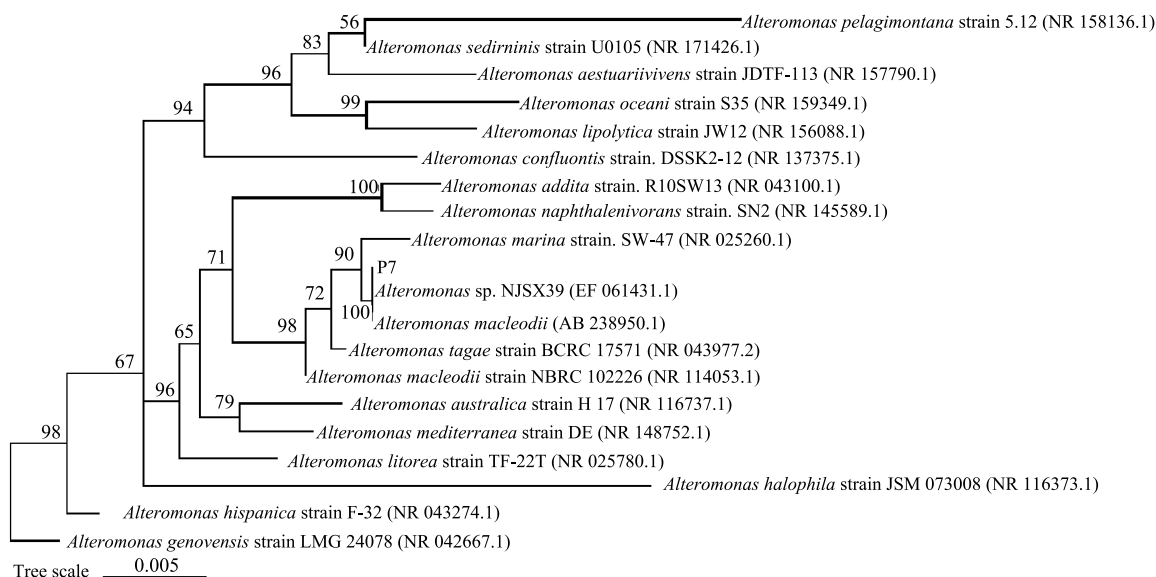


图 2 菌株 P7 及其近缘菌株的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree showing the phylogenetic positions of strain P7 and related taxa based on 16S rRNA gene sequence analysis

2.2 PYR 降解菌的降解性能

图 3 展示了菌株 P7 的生长曲线和对 PYR 的降解效果。P7 菌株在接种入含有 PYR 的无机盐培养基之后 OD_{600} 相对稳定, 菌株在此期间逐渐适应营养物质的改变; 在第 4 天开始快速增长, OD_{600} 增加; 到第 6 天时, 细菌的 OD_{600} 值达到最大, 为 0.163, 且在 5~8 d 内基本稳定, 9~20 d 内 OD_{600} 下降, 此时培养基中的底物不足以支撑菌株继续增殖, 并且存在死亡现象, 培养基中出现的絮状物可能是死亡菌体与细菌分泌物的混合体。PYR 在前 4 d 被消耗地比较缓慢, 在 4~12 d PYR 被快速降解, 在 12 d 时 PYR 的质量浓度下降到 $10.34 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 降解率为 42.5%, 之后 PYR 的浓度继续降低, 但是降解速度逐渐变慢, 培养到 20 d 时, PYR 的降解率为 44.8%。

CAO 等^[19]从中国渤海石油污染的沉积物中分离出来的 *pusillimonas* sp. T7-7, 对 PYR 的降解率达到 90%。从沙特阿拉伯海湾分离到的 *AchroMobacter Xylosoxidans* Py4-B, 对 PYR 的降解率达到 80%^[20]。Novosphingobium 是一种 α -变形菌属, 首次从韩国蔚山湾分离出来, N.

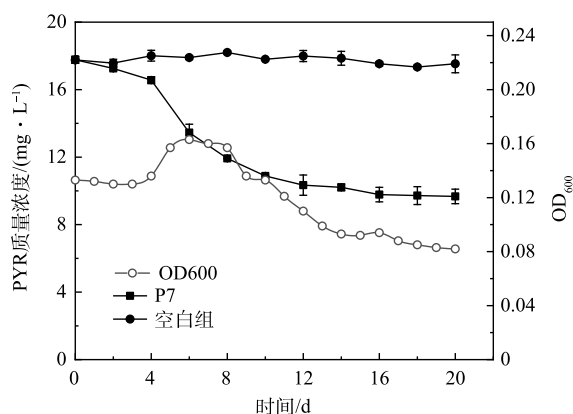


图 3 菌株 P7 对 PYR 的降解及生长曲线

Fig. 3 Degradation and growth curves of PYR by strains P7

pentaromatorans 可以在 8 d 内降解代谢 88.2%~99.9% 的 PYR^[21]; LYU 等^[22] 从蔚山湾的沉积物中分离出属于该属的另一株 *N. pentaromatorans* US6-1, 其在 36 h 内对 PYR 的降解率为 31.81%。与典型的海洋 PYR 降解菌相比, *Alteromonas* sp. P7 对 PYR 的降解率相对较低。这可能因为菌株在降解 PYR 过程中产生了有毒物质, 从而抑制细菌的生长以及进一步降解, 菌株在降解终点时的 OD₆₀₀ 值小于初始值也可支持该结论。

2.3 环境因子对降解效果的影响

温度不仅能够影响 PYR 在水中的溶解度, 还能够影响细菌对 PYR 降解的相关酶系的活性, 进而影响 PYR 的降解性能。如图 4(a) 所示, 随着温度升高, 菌株 P7 对 PYR 的降解率逐渐升高, 且在 30 °C 降解效果最好, 降解率为 44.8%。当温度继续上升至 35 °C, 降解率略有下降, 在 4 °C 和 10 °C 的条件下, 由于酶活性大幅度降低, 导致菌株的降解能力变差。

图 4(b) 反映了 PYR 初始浓度对于 P7 降解率的影响。在 1~10 mg·L⁻¹ 内, 随着底物浓度的增加, 菌株 P7 对于 PYR 的降解率增加, 当 PYR 的初始质量浓度分别为 1、5 和 10 mg·L⁻¹ 时, P7 的降解率分别为 21.6%、32%、46.3%; 随着 PYR 浓度的升高, 降解率有所下降, PYR 的初始质量浓度为 40 mg·L⁻¹ 时, 菌株 P7 降解率下降为 22.4%。菌株 P7 在 PYR 质量浓度为 10 mg·L⁻¹ 时降解率达到最大, 为 46.3%。PYR 浓度过低时, 菌株缺少可利用的碳源, 导致生长增殖缓慢, 降解效果不佳。而 PYR 浓度过高时, 细菌代谢过程中可能会产生毒性物质, 从而抑制其降解, 且部分 PYR 不溶于水难以被细菌所利用。

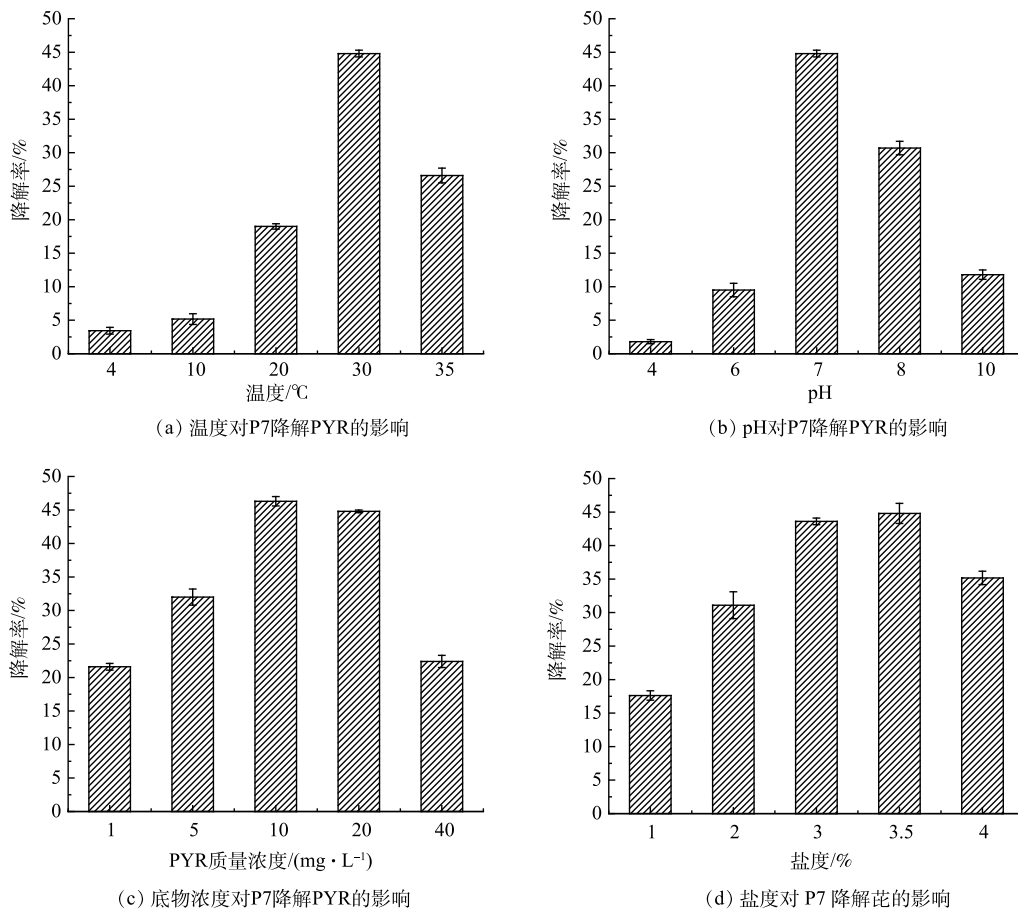


图 4 环境因素对菌株 P7 降解 PYR 的影响

Fig. 4 Effects of environmental factors on PYR degradation by strains P7

由图4(c)可以看出,在不同pH下,菌株P7对PYR的降解率差异较大。在中性和弱碱性条件下,降解率相对较高,在pH为7.0和8.0时,菌株P7的降解率分别为44.8%和30.7%;酸性条件下,降解率较低,pH为4.0和6.0时,降解率只有1.8%和9.5%;在碱性条件下,菌株P7仍对PYR具有降解效果,在pH为10.0时PYR降解率为11.8%。

盐度在细菌生长的过程中,对调节渗透压平衡起到重要作用,从而影响对PYR的降解能力^[23]。如图4(d)所示,菌株P7耐盐度范围广泛,在10%~40%的盐度下,对PYR均有一定的降解作用;在盐度为标准海水盐度(35%)时,菌株P7对PYR的降解率最高,为44.8%。菌株P7的酶活条件和渗透压等,使其在高盐度下仍具有较高的代谢活性。

2.4 PYR降解中间产物

通过GC-MS鉴定了*Alteromonas* sp. P7降解PYR过程中产生的中间代谢产物。由图5可见,与空白对照对比,*Alteromonas* sp. P7的反应体系中在第8天后的样品中发现了3种物质,保留时间在12.532、12.928和14.039 min的吸收峰经质谱对比分别为水杨酸、邻苯二甲酸和PYR。

水杨酸和邻苯二甲酸的存在说明*Alteromonas* sp. P7对PYR的降解存在2条下游途径,分别为邻苯二甲酸途径及水杨酸途径。多条降解途径有利于增强降解菌对于PYR的降解效果,并可以抵制环境的不良影响。

2.5 邻苯二酚2,3-双加氧酶活力

PAHs的种类繁多,不同种类微生物,对于PAHs的降解途径可能存在差异,因此,涉及的酶种类众多^[24-27]。其中,较为常见的有邻苯二酚双加氧酶,该加氧酶以氧作为底物,可以催化裂解邻苯二酚($C_6H_4(OH)_2$)的芳环^[28]。邻苯二酚双加氧酶根据芳香环的裂解位置分为2类:邻苯二酚1,2-双加氧酶和邻苯二酚2,3-双加氧酶。邻苯二酚1,2-双加氧酶催化2个羟基之间的碳-碳键的氧化,称为内二醇裂解,产生顺式、顺式-粘康酸。邻苯二酚2,3-双加氧酶催化2个羟基外的碳-碳键的氧化,称为外二醇裂解,产生2-羟基粘醛^[29-30]。

结果表明,*Alteromonas* sp. P7具有邻苯二酚2,3-双加氧酶活力,P7在富集培养基增殖后,邻苯二酚2,3-双加氧酶活力为 $0.231 \mu\text{mol}\cdot(\text{min}\cdot\text{mg})^{-1}$,经苾诱导后,邻苯二酚2,3-双加氧酶活力增加到 $0.537 \mu\text{mol}\cdot(\text{min}\cdot\text{mg})^{-1}$ 。由此可以推测菌株P7将代谢产物中的水杨酸或邻苯二甲酸氧化为邻苯二酚后,外断裂邻苯二酚2,3-双加氧酶对邻苯二酚2个羟基之旁开环(间位途径),形成丙酮酸和乙醛,最终进入三羧酸循环,从而实现最终降解。

2.6 基因组组装和基因组组分析

采用A5-MiSeq^[31]和SPAdes^[32]对去除接头序列的测序数据进行从头拼装,构建contig和scaffold。拼装好的*Alteromonas* sp. P7全基因组总序列长度为4 597 467 bp,GC含量百分比为44.26%。采用GeneMarkS软件对细菌基因组的蛋白质编码基因进行预测,P7开放阅读框数量为4 079,开放阅读框所占碱基数量为4 003 854 bp,基因编码密度为 $0.887 \text{基因}\cdot\text{kb}^{-1}$ 。对P7非编码RNA进行预测,对于细菌,非编码RNA(ncRNA)的类型主要为sRNA、tRNA和rRNA,其中tRNA含量最高,占基因组比例为0.1007。非编码RNA预测的结果见表1。

1) 蛋白编码基因的COG注释分析。eggNOG(COG)是evolutionary genealogy of genes: non-

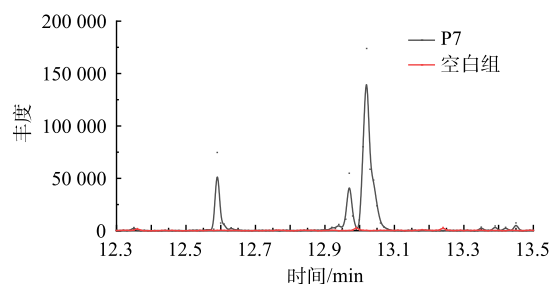


图5 菌株P7对PYR降解中间产物的GC-MS分析
Fig. 5 GC-MS chromatogram of the intermediate products of pyrene degradation by *Alteromonas* sp. P7

supervised orthologous groups 的缩写^[33]。构成每个 eggNOG 的蛋白都是被假定为来自于一个祖先蛋白, 并且是直系同源 (orthologs) 或者是旁系同源 (paralogs)。由图 6 可知, 菌株 *Alteromonas* sp. P7 基因组共注释到 3 556 个编码基因, 占总编码基因的 87.22%; 其中包含大量未知功能的基因, 说明可以进一步探索和挖掘这些基因的功能。已知编码功能的基因中, 与信号转导机制功能相关基因最多, 有 269 个, 占编码基因总数的 6.59%; 比较多的富集基因

表 1 P7 非编码 RNA 预测的数据统计
Table 1 Statistical analysis for non-coding RNA prediction of P7

非编码 RNA 类型	拷贝数量	序列平均长度/bp	序列总长度/bp	非编码 RNA 序列总长度占基因组序列百分比/%
5S rRNA	1	111	111	0.002 4
16S rRNA	1	1 529	1 529	0.033 3
23S rRNA	1	2 878	2 878	0.062 6
tRNA	59	78	4 629	0.100 7
ncRNA	24	167	4 030	0.087 6

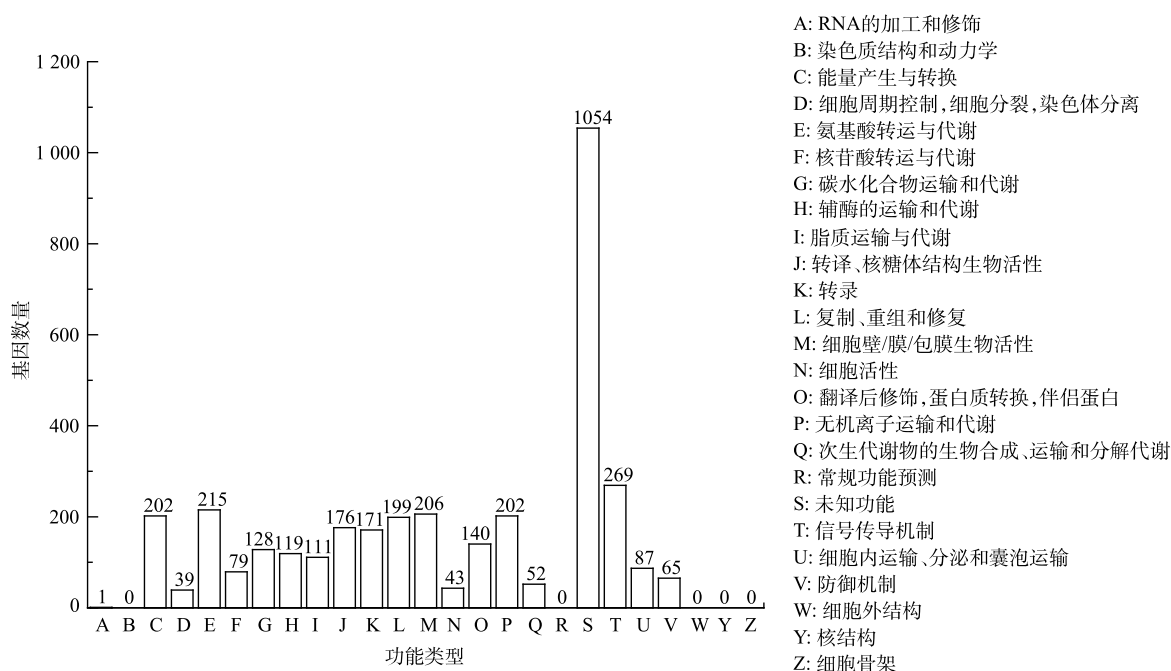


图 6 COG 功能分类图

Fig. 6 Functional classification of COG

类群还包括能量产生与转换、氨基酸运输与代谢、复制、重组和修复、细胞壁/膜/包膜生物活性、无机离子运输有关的基因较多。这可能与 *Alteromonas* sp. P7 以 PYR 为唯一能源进行能量转换有关。

2) 蛋白编码基因的 KEGG 注释分析。KEGG(kyoto encyclopedia of genes and genomes), 又称京都基因与基因组百科全书, 是基因组破译方面的数据库。对菌株 *Alteromonas* sp. P7 在 KEGG 数据库共注释到的基因共有 2 093 个, 占总编码基因的 51.31%。

图 7 为菌株 P7 的 KEGG 谢通路图。对 *Alteromonas* sp. P7 的蛋白编码基因的 KEGG 注释分析, 发现其中包含最多的有与遗传信息处理相关蛋白质组群和与信号传导和细胞代谢有关的蛋白质组群, 分别有 616 个和 590 个; 涉及的代谢通路有 1 342 个, 其中较多的有碳水化合物代谢、氨基酸代谢、辅助因子和维生素代谢以及能源代谢等类群的相关基因, 分别为 284、282、160 和 135 个。*Alteromonas* sp. P7 具有 21 个参与环境适应的基因, 将这部分基因与参与碳水化合物代谢的基因和参与外源生物降解与代谢过程的基因联系起来研究, 可以进一步为阐述 PYR 的代谢机理提供有力证据。

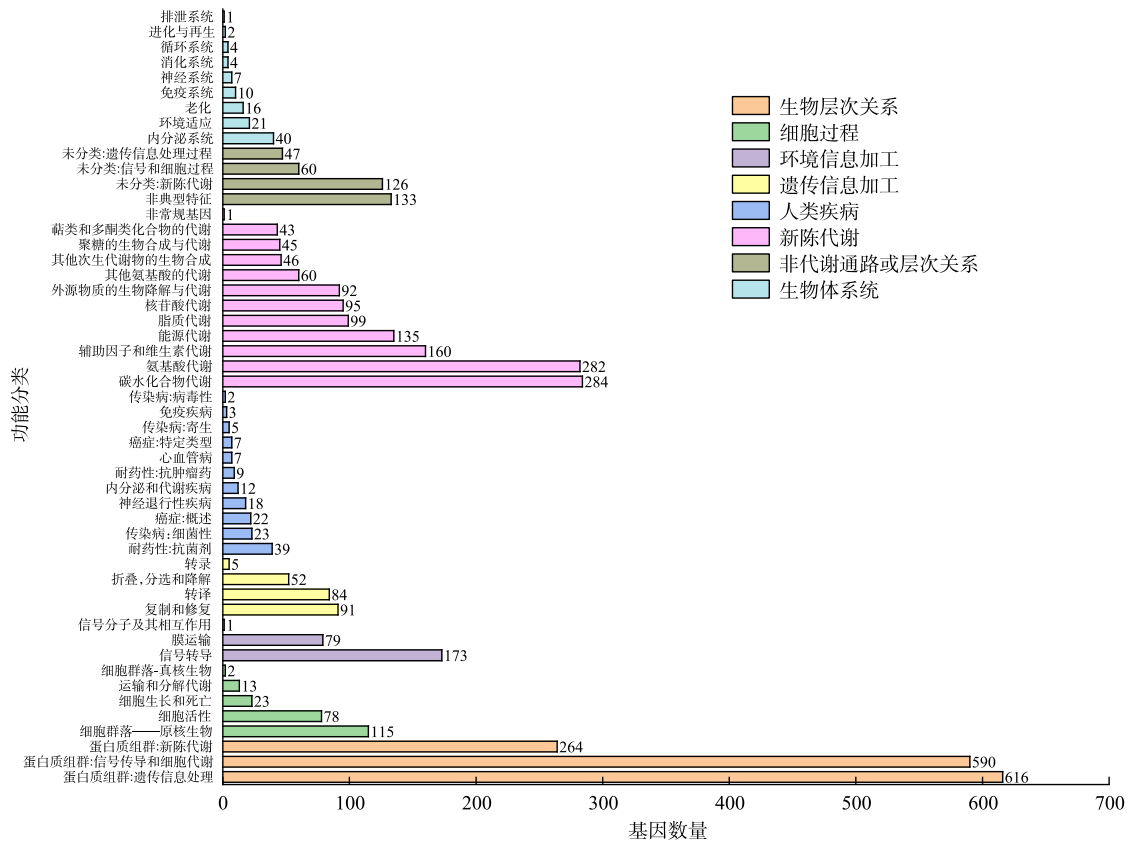


图7 KEGG 统计图

Fig. 7 KEGG statistics

3) 蛋白编码基因的 GO 注释分析。GO 是一个国际化的基因功能分类体系, 提供了一套动态更新的标准词汇表来全面描述生物体中基因和基因产物的属性。通过对菌株 *Alteromonas sp.* P7 的 GO 数据库共注释到的基因共有 2 850 个, 占总编码基因的 69.87%。

同一个基因基于不同的分类标准, 会有多种注释。由图 8 可见, 参与生物过程的基因有 2 688 个, 最多的是参与细胞氮化合物代谢和生物合成过程的基因, 分别有 992 和 963 个, 另外, 参与小分子代谢过程的基因有 732 个, 参与转运的基因有 537 个。拥有分子功能的基因有 2 568 个, 其中参与离子整合过程的基因占比最大, 有 897 个, 与氧化还原酶活性有关的有 402 个, 参与 DNA 整合的有 331 个, 与裂解酶活性有关的有 303 个。与细胞组分有关的基因有 909 个, 大部分基因与细胞体有关, 共有 897 个, 与胞内物质相关的有 599 个, 与细胞质相关的有 457 个。

4) PYR 降解基因的预测。在微生物代谢降解芳香族化合物时起作用的重要酶为双加氧酶, 其原理是利用空气中的活性因子在芳香化合物的邻位或者间位发生氧化反应, 能作用于苯系物、邻苯二酚以及联苯等物质。不同的双加氧酶对底物并没有专一的选择性, 即同一种双加氧酶可以作用多种底物, 如邻苯二酚双加氧酶不仅可以作用于邻苯二酚, 而且还可以氧化甲苯。

本研究对交替单胞菌进行了全基因组测序, 并将测序结果通过比对各种数据库进行基因功能注释。根据这些注释筛选出了可能的双加氧和酯酶等相关降解酶。表 2 中列出了这些酶蛋白的 ID 和序列长度。邻苯二酚代谢是降解天然或人工合成的芳香化合物的重要途径, 在该途径中, 邻苯二酚 2,3-双加氧酶和羧基粘康酸内酯脱羧酶酶是主要作用酶, 这些酶的编码基因存在于菌株 P7 染色体上。

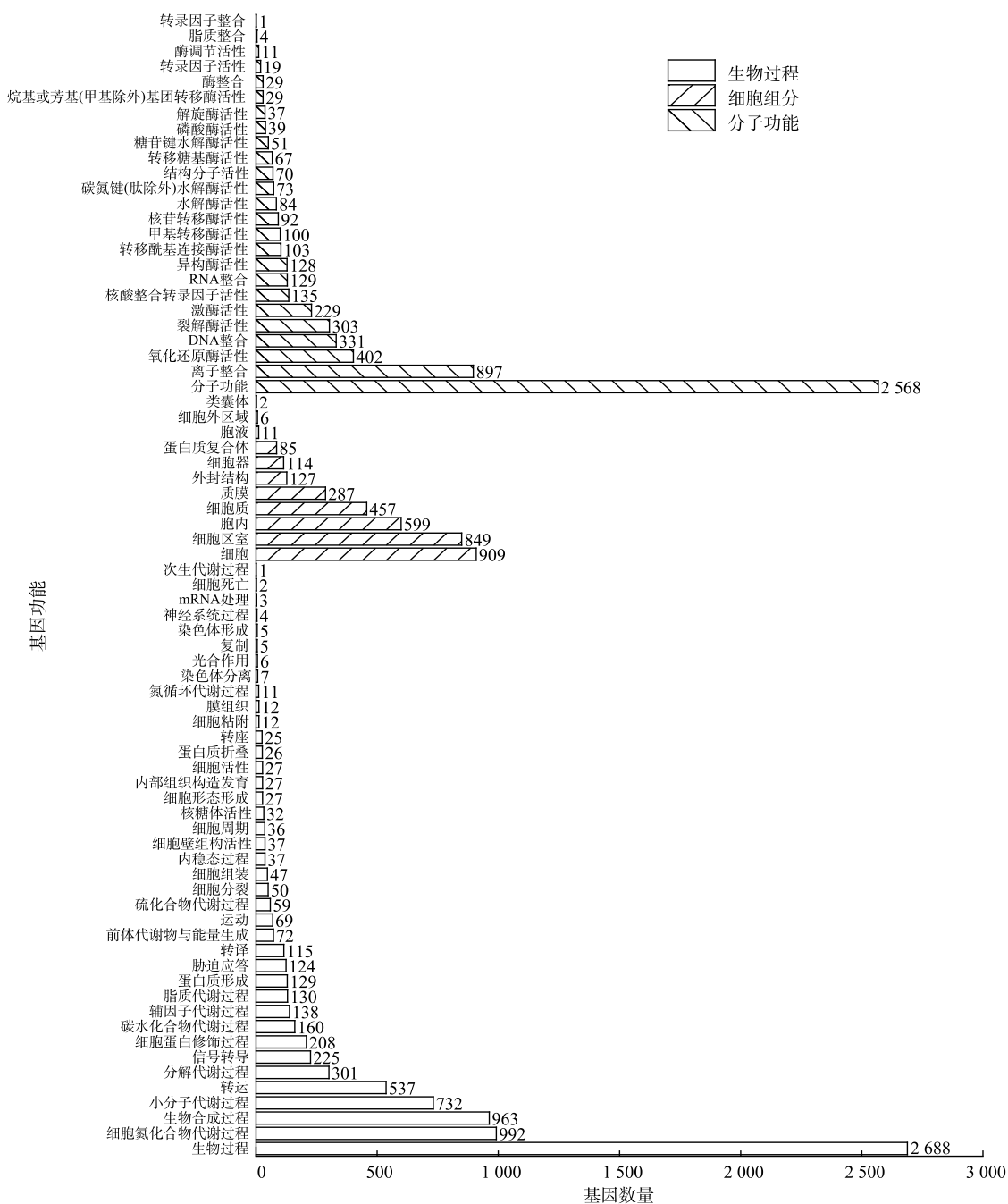


图 8 GO 注释图

Fig. 8 G comment diagram

3 结论

1) 从受船舶用油污染的海底沉积物中筛选分离出 1 株 PYR 降解菌 P7, 经鉴定为交替单胞菌属 (*Alteromonas* sp.)。当 PYR 的初始浓度为 $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, *Alteromonas* sp. P7 降解率为 44.8%。

2) 菌株 P7 降解 PYR 的最适 pH 为 7~8, 最适盐度在 3.0%~3.5%, 最适温度为 $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 在 PYR 为 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 菌株 P7 对 PYR 的降解率最高。

3) *Alteromonas* sp. P7 降解 PYR 过程中产生的中间代谢产物包括水杨酸和邻苯二甲酸, 说明 *Alteromonas* sp. P7 对 PYR 的降解存在邻苯二甲酸途径和水杨酸途径。而且 *Alteromonas* sp. P7 具有邻

表2 PYR降解相关酶的预测

Table 2 Prediction of PYR degradation related enzymes

序列名称	序列长度	NR数据库注释
WP_105930780.1	213	α -二酮戊酸双加氧酶AlkB
WP_120959161.1	284	芳香环断裂双加氧酶
WP_120959905.1	357	4-羟基苯丙酮酸双加氧酶
APD86758.1	352	芳香环断裂双加氧酶 α 亚基
HAS77371.1	446	苯甲酸盐1, 2双加氧酶大亚基
HAS77370.1	164	苯甲酸盐1, 2双加氧酶小亚基
WP_156087408.1	307	邻苯二酚-2, 3-双加氧酶
WP_105929916.1	210	芳香酸脱羧酶
WP_105932022.1	183	羧基粘康酸内酯脱羧酶

苯二酚 2,3-双加氧酶活力, 由此可以确定 *Alteromonas* sp. P7 是以邻苯二酚为中间代谢物对 PYR 进行降解。

4) *Alteromonas* sp. P7 框架图测序及其编码基因蛋白的功能注释表明, 其基因组序列长度 4 597 467 bp, 编码基因有 8 164 个, 平均 GC 含量为 44.26%。检索到含有编码芳香环断裂双加氧酶、邻苯二酚-2,3-双加氧酶、羧基粘康酸内酯脱羧酶等酶的基因。

参考文献

- [1] ZHU Q, TAO F, PAN Q. Fast and selective removal of oils from water surface via highly hydrophobic core-shell $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{C}$ nanoparticles under magnetic field[J]. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2010, 2(11): 3141-3146.
- [2] MARTINEAU D, LAGACE A, BELAND P, et al. Pathology of stranded beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the St. Lawrence Estuary, Quebec, Canada[J]. *Journal of General Plant Pathology*, 1988, 98(7): 287-311.
- [3] JIN H M, KIM J M, LEE H J. *Alteromonas* as a key agent of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in crude oil-contaminated coastal sediment[J]. *Science and Technology*, 2012, 46: 7731-7740.
- [4] FUCHS G, BOLL M, HEIDER J. Microbial degradation of aromatic compounds—from one strategy to four[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9(11): 803-816.
- [5] LEISOLA M, MEUSSDOERFFER F. Production and identification of extracellular oxidases of *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Journal of Biotechnology*, 1985(6): 379-382.
- [6] OBRISTA D, ZIELINSKAA B, PERLINGER J A, et al. Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and oxygenated PAHs (OPAHs) in organic and mineral soil horizons from four U. S. remote forests PAHs (OPAHs) in organic and mineral soil horizons from four U. S. remote forests[J]. *Chemosphere*, 2015, 134: 98-105.
- [7] CHAN K H, CHU W. The prediction of partitioning coefficients for chemicals causing environmental concern[J]. *Science of the Total Environment*[J]. 2000, 248(1): 1-10.
- [8] PRINCE R C. Bioremediation of marine oil spills[J]. *Oil & Gas Science & Technology*, 2004, 151(4): 495-512.
- [9] HEDLUND B P, STALEY J T. Isolation and characterization of *Pseudoalteromonas* strains with divergent polycyclic aromatic hydrocarbon catabolic properties[J]. *Environmental Microbiology*. 2006, 8(1): 178-182.
- [10] DYKSTERHOUSE S E, GRAY J P, HERWIG R P, et al. *Cycloclasticus pugetii* gen. nov., sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from marine sediments[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1995, 45(1): 116-123.
- [11] 王佳楠, 石妍云, 郑力燕, 等. 石油降解菌的分离鉴定及4株芽胞杆菌种间效应[J]. *环境科学*, 2015, 36(6): 2245-2251.
- [12] LI C H, WONG Y S, WANG H Y, et al. Anaerobic biodegradation of PAHs in mangrove sediment with amendment of NaHCO_3 [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2015, 30(4): 148-156.
- [13] YUAN S Y, CHANG B V. Anaerobic degradation of five polycyclic aromatic hydrocarbons from river sediment in Taiwan[J]. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 2007, 42(1): 63-69.
- [14] CHANG B V, CHANG I T, YUAN S Y. Anaerobic degradation of phenanthrene and pyrene in mangrove sediment[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2008, 80(2): 145-149.
- [15] ZHANG W, WANG H, ZHANG R, et al. Bacterial communities in PAH contaminated soils at an electronic-waste processing center in China[J]. *Ecotoxicology*, 2010, 19(1): 96-104.
- [16] SONG X H, XU Y, LI G M, et al. Isolation, characterization of *Rhodococcus* sp. P14 capable of degrading high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons and aliphatic hydrocarbons[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2011, 62(10): 2122-2128.
- [17] 张宏波, 林爱军, 刘爽, 等. 萘高效降解菌的分离鉴定及其降解特性研

- 究[J]. *环境科学*, 2010, 31(1): 243-248.
- [18] 王蕾, 聂麦茜, 王志盈, 等. 一株芽胞杆菌和一株黄杆菌代谢芘的摄取方式解析[J]. *环境科学学报*, 2009, 29(5): 924-929.
- [19] CHEN Q, LI J, MEI L, et al. Study on the biodegradation of crude oil by free and immobilized bacterial consortium in marine environment[J]. *Plos One*, 2017, 12(3): 1-23.
- [20] 张建峰, 苏凤宜, 邢新会. 邻苯二酚 2, 3-双加氧酶在恶臭假单胞杆菌整细胞催化中的酶活检测方法[J]. *化工学报*, 2008(2): 450-455.
- [21] 程晓宇, 刘伟伟, 许楹, 等. 中国东海和南海海域可培养烃类降解细菌的筛选及功能[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(5): 975-985.
- [22] CAO B, MA T, REN Y, et al. Complete genome sequence of *Pusillimonas* sp. T7-7, a cold-tolerant diesel oil degrading bacterium isolated from the Bohai Sea in China[J]. *Bacteriol.* 2011, 193 (15): 4021-4022.
- [23] NZILA A, RAMIREZ C O, MUSA M M, SANKARA S, et al. Pyrene biodegradation and proteomic analysis in *Achromobacter xylosoxidans*, PY4 strain[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2018, 130: 40-47.
- [24] SOHN J H, KWON K K, KANG J H, et al. *Novosphingobium pentaromativorans* sp. nov., a high molecular mass polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacterium isolated from estuarine sediment[J]. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*[J]. 2004, 54 (5), 1483-1487
- [25] LYU Y, ZHENG W, ZHENG T, TIAN Y. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1[J]. *PloS One* 2014, 9(10): 1.
- [26] TONY H, AMEER K, RISKY K, et al. Biodegradation of pyrene by *Candida* sp. S1 under high salinity conditions[J]. *Bioprocess & Biosystems Engineering*, 2017, 40(9): 1411-1418.
- [27] MARTIN B C, GEORGE S J, PRICE C A, et al. The role of root exuded low molecular weight organic anions in facilitating petroleum hydrocarbon degradation: Current knowledge and future directions[J]. *Science of the Total Environment*, 2014, 472(15): 642-653.
- [28] REDA, BAYOUMI A, ASHRAF, et al. Optimization of bacterial biodegradation of toluene and phenol under different nutritional and environmental conditions[J]. *Research Journal of Applied Sciences*, 2010, 6(8): 1086-1095.
- [29] JAEKEL U, MUSAT N, ADAM B, et al. Anaerobic degradation of propane and butane by sulfate-reducing bacteria enriched from marine hydrocarbon cold seeps[J]. *The ISME Journal*, 2013, 7(5): 885-895.
- [30] XIE C J, FAN B, SUN Q Q, et al. Enhancement the enzymatic activity of phenol-degrading microbes immobilized on agricultural residues during the biodegradation of phenol in petrochemical wastewater[J]. *Applied Mechanics and Materials*, 2015, 737: 549-556.
- [31] KAROLINA K, ANNA K, MAGDALENA W, et al. Biological inspirations: Iron complexes mimicking the catechol dioxygenases[J]. *Materials*, 2021, 14(12): 3250.
- [32] KITA A, KITA S, FUJISAWA I, et al. An archetypical extradiol-cleaving catecholic dioxygenase: the crystal structure of catechol 2, 3-dioxygenase (metapyrocatechase) from *Pseudomonas putida* mt-2[J]. *Structure*, 1999, 7(1): 25-34.
- [33] KOJIMA Y, ITADA N, HAYAISHI O. Metapyrocatechase: A new catechol-cleaving enzyme[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1961, 236(8): 2223-2228.
- (责任编辑: 曲娜)

Degradation characteristics and genome analysis of marine pyrene degrading bacteria *Alteromonas* sp. P7.

CHEN Haining, TIAN Weijun*, ZHAO Jing, JIANG Junfeng, YANG Shujie, GAO Huizi

College of Environmental Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266000, China

*Corresponding author, E-mail: weijunas@ouc.edu.cn

Abstract Using pyrene (PYR) as the sole carbon source, a Marine PYR degrading strain P7 was isolated from the seabed sediments of an oil-contaminated wharf in Qingdao. The strain P7 was identified as *Alteromonas* sp. by morphological observation and 16S rRNA gene sequence analysis. The degradation rate of PYR by strain P7 was 44.8% within 20 days, which was the first report of pyrene degradation by *Alteromonas*. Phthalic acid and salicylic acid were identified as the metabolites by GC/MS analysis, and catechol 2, 3-dioxygenase was produced during cell metabolism. Therefore, catechol was inferred in the intermediate products of pyrene degradation by *Alteromonas* sp. P7. Pyrene was degraded by both phthalic acid pathway and salicylic acid pathway. By sequencing the isolated *Alteromonas* sp. P7, a genome of 4 597 467 bp was obtained, and 8 164 coding genes were determined by annotating the gene sequence, with an average GC content of 44.26%. After comparing the sequencing results with the database and retrieving them, a gene involved in the encoding of catechol 2, 3-dioxygenase was found in strain P7.

Keywords pyrene degrading bacteria; *Alteromonas*; metabolites; dioxygenase; genome