

文章编号 1672-6634(2023)04-0101-10

DOI 10.19728/j.issn1672-6634.2023020003

一株 3,5,6-三氯-2-吡啶酚降解菌的全基因组测序及功能挖掘

岳彩旭,贾楠,吕雪茹,刘世豪,王圣惠

(聊城大学 生命科学学院,山东 聊城 252059)

摘 要 *Micrococcus luteus* ML 是从长期使用毒死蜱的农田土壤中分离出的一株能够降解毒死蜱及其高毒残留物 3,5,6-三氯-2-吡啶酚(TCP)的菌株。探究菌株 ML 降解机制,挖掘新型 TCP 代谢基因和特异代谢功能。采用 Illumina Novaseq PE150 和 Oxford Nanopore ONT 相结合的测序技术对菌株 ML 进行全基因组测序。该菌株有 52 个编码基因参与了异源化合物的代谢,共有 15 种酶参与了 TCP 结构类似物,如氯苯甲酸、氨基苯甲酸盐、甲苯、萘、氯代烷烃和氯代烯烃的降解。初步推测羧甲基丁内酯酶和酰胺酶分别参与了菌株 ML 对 TCP 的脱氯和脱氯产物吡啶环中氮转化为氨的反应,这为探究 *Micrococcus luteus* ML 功能基因组学研究及对 TCP 的降解特性提供了数据支持。

关键词 3,5,6-三氯-2-吡啶酚;降解;藤黄微球菌;全基因组测序;功能挖掘

中图分类号 X172

文献标识码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Whole Genome Sequencing and Functional Mining of a 3,5,6-Trichloro-2-Pyridinol Degrading Strain

YUE Caixu, JIA Na, LV Xueru, LIU Shihao, WANG Shenghui

(School of Life Science, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

Abstract *Micrococcus luteus* ML, capable of degrading chlorpyrifos and its highly toxic residue 3,5,6-trichloro-2-pyridinol(TCP), was isolated from soil where chlorpyrifos has been used for a long time. To investigate the degradation mechanism and mining novel TCP metabolic genes and specific metabolic functions of strain ML. Whole genome sequencing of strain ML with a combined sequencing technology of Illumina Novaseq PE150 and Oxford Nanopore ONT was performed. There are 52 coding genes relating to xenobiotics biodegradation and metabolism in strain ML, and a total of 15 enzymes might be involved in the degradation of TCP structural analogs, such as chlorobenzoic acid, aminobenzoates, toluene, naphthalene, chloroalkane and chloroalkene. It was speculated that carboxymethylenebutenolidase and amidase were involved in the dechlorination of TCP and the conversion of nitrogen to ammonia in pyridine ring of dechlori-

收稿日期:2023-02-03

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(41401288);山东省自然科学基金面上项目(ZR2020MD103);大学生创新创业训练项目(CXCY2022055, CXCY2022223);聊城大学畜牧学学科开放课题(319312101-19, 319312101-20)资助

通讯作者:王圣惠,女,汉族,博士,副教授,研究方向:环境污染物微生物修复, E-mail: wangshenghui@lcc.edu.cn.

nation metabolites, respectively. This article provides data for exploring the functional genomics of *Micrococcus luteus* ML and its degradation characteristics to TCP.

Key words 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol; degradation; *Micrococcus luteus*; whole-genome sequencing; functional mining

1 引言

化学农药的大量使用导致我国生态环境严重污染。毒死蜱是一种高效、低毒有机磷杀虫剂,主要用于水稻、玉米、蔬菜、果树及茶树的病虫害防治。近年来,由于毒死蜱在我国的大量生产和在农业中的超量使用,毒死蜱的高毒难降解残留物 3,5,6-三氯-2-吡啶酚(3,5,6-trichloro-2-pyridinol, TCP)的农业生态环境污染日趋严重^[1-4]。TCP 是一种典型的氯代吡啶类化合物,目前已被国际公认为持久性有机污染物^[5,6]。相比母本化合物毒死蜱,TCP 具有更长的半衰期(65-360 天),同时具有更高的水溶性和移动性,这些特性使其更易进入深层土壤及水体环境,最终导致地表水体和土壤的大面积扩散污染^[7]。

微生物修复在清除 TCP 污染方面具有效率高、成本低和无二次污染等特点。目前,国内外科研工作者已经分离和鉴定了多株 TCP 降解菌株,如 *Pseudomonas* sp. ATCC 700113、*Burkholderia* sp. KR100、*Paracoccus* sp. TRP、*Cupriavidus nantongensis* X1^T、*Bacillus thuringiensis* MB497 以及 *Trichosporon* sp. TCF 等^[8-14]。近年来,TCP 微生物降解的研究主要集中在降解菌株的分离、鉴定、代谢途径分析和相关降解基因的克隆及表达。然而,关于降解菌株新型代谢基因和特异代谢功能挖掘的研究却鲜有报道。这直接阻碍了 TCP 降解菌株降解机制的研究。

为了挖掘 TCP 降解菌株中新型 TCP 代谢基因和特异代谢功能,本研究以实验室前期筛选获得的一株 TCP 降解菌株 *Micrococcus luteus* ML 为研究对象,采用 Illumina Novaseq PE150 和 Oxford Nanopore ONT 相结合的测序技术对该菌株进行全基因组测序,基于完成图进行基因预测、功能注释及新型 TCP 代谢基因及特异代谢功能的挖掘。这不仅为 TCP 降解机制的研究奠定基础,还将为解决 TCP 及氯代芳香族化合物污染土壤及水体的微生物修复技术的开发及应用提供理论依据。

2 材料与方法

2.1 菌株

菌株 *Micrococcus luteus* ML 是前期实验室从长期使用毒死蜱的农田土壤中分离获得的 TCP 降解菌株,Genbank 登入号为 OK598003。

2.2 主要试剂及培养基

标准品:TCP(99%)购自毕得医药;3,5-二氯-2-吡啶酚(98%)购自阿拉丁试剂有限公司;6-氯吡啶-2-醇(97%)和 2-羟基吡啶(97%)购自上海麦克林生化科技有限公司。其他试剂:丙酮($\geq 99.5\%$)购自烟台远东精细化工有限公司;甲醇(HPLC 级)购自赛默飞世尔科技有限公司。Luria-Bertani(LB)培养基(g/L):蛋白胨 10.0 g、酵母粉 5.0 g、NaCl 10.0 g, pH 7.0。基础盐培养基(mineral salts medium, MSM)(g/L): NH_4NO_3 1.0 g、NaCl 0.5 g、 KH_2PO_4 0.5 g、 K_2HPO_4 1.5 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g、 MgSO_4 0.5 g、酵母粉 0.05 g, pH 7.0。固体培养基为液体培养基中加入 2%(w/v)的琼脂粉。

2.3 菌株活化与增殖

从 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱取菌株 ML 菌保液 100 μL 涂布 LB 平板, $35\text{ }^\circ\text{C}$ 培养,待长出菌落后,挑取单菌落接种 LB (TCP 100 mg/L) 平板, $35\text{ }^\circ\text{C}$ 培养 3 天,再次挑取新鲜单菌落接种 MSM (TCP 50 mg/L) 平板,最终获得活化的 ML 菌株。

挑取上述活化的菌株 ML 单菌落于 LB 培养液中,摇床 $35\text{ }^\circ\text{C}$ 、150 r/min 培养至对数生长期,室温下 10 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,并洗涤菌体 2 次,随后用新鲜 MSM 培养液重悬菌体配制成 $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 值为 0.6 的菌悬液备用。

2.4 菌株降解性能分析

无菌条件下,将活化的菌株 ML 菌悬液按 10%(v/v)接种量分别接种到以 TCP(50 mg/L)、3,5-二氯-2-

吡啶酚(50 mg/L)、6-氯吡啶-2-醇(25 mg/L)和2-羟基吡啶(50 mg/L)为唯一碳源的 MSM 培养液中,35 ℃、150 r/min 避光摇床培养,每组处理均设置三个平行。未接种菌株但含有污染物的 MSM 培养液设置为空白对照。不同时间点收集样品,采用液相色谱测定上述样品的残留。液相色谱检测条件:岛津 LC-20A 系统,DAD 二极管阵列检测器,VP-ODS C18 柱(250 mm×4.6 mm,4.6 μm),流动相为甲醇/水(80:20,V/V),柱温 40 ℃,流速 1.0 mL/min,检测波长均为 230 nm。

2.5 菌体收集及测序

从 MSM 平板(TCP 50 mg/L)挑取活化的单菌落至 LB 培养液中,35 ℃、150 rpm 摇床培养 24 h,然后取一定量菌浊液接种到新鲜 LB 培养液中进行扩大培养,摇床 35 ℃、150 r/min 培养至 OD_{600 nm} 值达到 0.7~0.8,4 ℃条件下 10 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,液氮速冻后迅速放入干冰,随后寄送至上海派森诺生物科技有限公司进行细菌基因组测序。随后,将菌株 ML 的全基因组序列上传至 NCBI 数据库,登录号为 CP101528(染色体)和 CP101529(质粒)。

2.6 基因组组分析

采用 GeneMarkS (v4.32) 软件对菌株 ML 全基因序列进行基因预测^[15];分别利用 tRNA-Scan-SE(v1.3.1)、Barrnap(v0.9)软件和 Rfam(v14.1)数据库预测 tRNA、rRNA 和 ncRNA^[16-18];通过 CRISPR finder(v20170509)软件预测全基因组中的成簇的规律间隔的短回文重复序列^[19];采用 PhiSpy(v4.2.21)软件预测基因组中存在的原噬菌体^[20];利用抗生素抗性数据库 CRAD 和 Blast(v2.5.0)软件,预测菌株抗生素抗性基因^[21]。

2.7 基因功能分析

通过 Diamond(v0.8.36)软件对 NR、Swiss-Prot 和 EggNOG 数据库进行比对,选择 E-value < 1e-6 的注释^[22-24];通过 Blast2go(v1.0)软件对 Gene Ontology(GO)数据库进行注释^[25];通过 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG)在线数据库对 KEGG 进行注释^[26]。

3 结果

3.1 菌株 ML 菌落形态

菌株 ML 在 LB 和 MSM(TCP 50 mg/L)平板上菌落形态如图 1 所示, LB 平板上菌落呈圆形、黄色,略隆起,表面光滑且不透明,如图 1(a)。MSM(TCP 50 mg/L)平板上,菌落呈白色,较小,如图 1(b),这种菌落差异可能是培养条件不同导致的。菌株 ML 能在以 TCP 为唯一碳源和能源的 MSM 平板上生长,初步证明菌株 ML 具有降解 TCP 的能力。

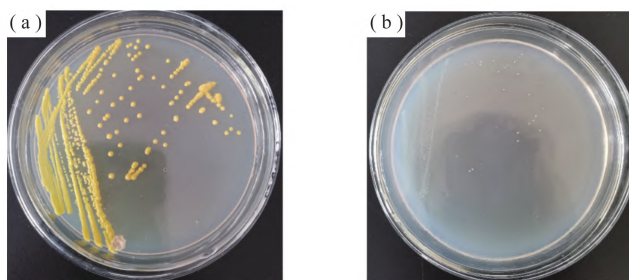


图1 菌株 ML 在 LB 平板(a)和 MSM 平板(TCP 50 mg/L)(b)上的菌落形态

3.2 菌株 ML 对吡啶类化合物的降解

采用 HPLC 分别测定不同浓度的 TCP、3,5-二氯-2-吡啶酚、6-氯吡啶-2-醇和 2-羟基吡啶,随后以浓度为横坐标(x),峰面积为纵坐标(y),绘制四种吡啶类化合物的标准曲线,并得到相对应的线性回归方程(表 1)。结果显示,在浓度为 2~100 mg/L 范围内,四种吡啶类化合物的线性回归方程均有良好的线性关系,相关系数 R² 均在 0.99 以上,检测灵敏度满足有机污染物残留检测测量标准的要求,可用于检测样品中吡啶类化合物的残留。

表 1 四种吡啶类化合物的标准曲线

吡啶类化合物名称	线性回归方程	R ²
3,5,6-三氯-2-吡啶酚(TCP)	$y = 11\,258x + 9\,879.3$	0.999
3,5-二氯-2-吡啶酚	$y = 22\,814x - 24\,623$	0.998
6-氯吡啶-2-醇	$y = 7\,143.5x - 2\,610.5$	0.998
2-羟基吡啶	$y = 6\,535.3x + 46\,789$	0.995

在上述方法下,分别以 TCP、3,5-二氯-2-吡啶酚、6-氯吡啶-2-醇和 2-羟基吡啶为唯一碳源,检测菌株 ML 对这四种吡啶类化合物的降解能力。结果如图 2 所示,菌株 ML 在 24 h 内对 50 mg/L TCP 降解效率达 73%。在 240 h 内,对 3,5-二氯-2-吡啶酚(50 mg/L)、6-氯吡啶-2-醇(25 mg/L)和 2-羟基吡啶(50 mg/L)的降解率分别为 46%、68%和 45%。以上结果表明,菌株 ML 同时具有脱氯和降解吡啶环的能力,其在氯代吡啶类污染物的生物修复中具有明显的应用潜力。

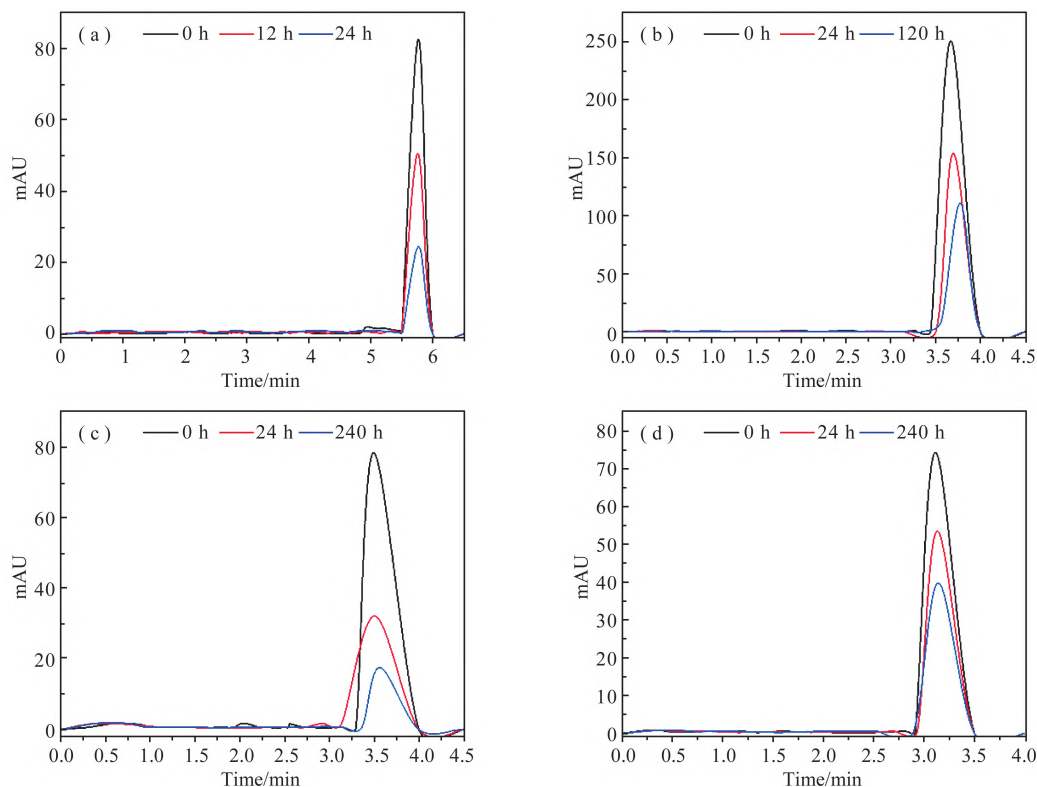


图2 菌株 ML 降解能力液相色谱图(a) TCP;(b) 3,5-二氯-2-吡啶酚;(c) 6-氯吡啶-2-醇;(d) 2-羟基吡啶

3.3 基因组测序及组装

为了进一步了解菌株 ML 的代谢功能,本研究采用 Illumina Novaseq PE150 和 Oxford Nanopore ONT 相结合的测序技术对菌株 ML 进行全基因组测序,经组装分析发现菌株 ML 含有一条染色体和一个质粒,如图 3 所示。染色体全长 2 617 598 bp,GC 含量为 72.78%,编码 2 386 个蛋白,编码序列占整个基因组序列的 88.91%,平均长度为 975.45 bp,平均覆盖深度为 771 $\times$ 。染色体基因组还包含 2 个 5S rRNA、2 个 16S rRNA、2 个 23S rRNA、49 个 tRNA 和 22 个 ncRNA,如表 2 所示。质粒全长为 38 147 bp,GC 含量为 67.54%,编码 43 个蛋白。

有研究表明,CRISPRs 是细菌特有的免疫系统,它能够提高菌株抵抗各种病毒的能力^[27],而且携带有原噬菌体基因组的细菌还具有抵抗噬菌体重复感染的能力^[28,29]。测序结果发现,菌株 ML 染色体基因组中含有 1 个 CRISPRs,其所在区域为 2 592 475~2 592 575。同时,菌株 ML 染色体基因组和质粒基因组中均存在原噬菌体,其所在区域分别为 740 052~751 828、1 942 523~1 986 187(染色体)和 903~7 004(质粒)。这些数据表明,菌株 ML 具有抵抗病毒入侵的潜能。此外,菌株 ML 染色体基因组中还含有 24 个抗生素抗性基因,包括利福平抗性基因、链霉素抗性基因、艾尔夫霉素抗性基因、达托霉素抗性基因以及吡嗪酰胺抗性基因等^[30]。综上所述,CRISPRs、原噬菌体及多种抗性基因的存在利于菌株在复杂生态环境中的生长和繁殖。这为后续将菌株 ML 实际应用于 TCP 污染的生物修复提供分子生物学依据。

表 2 菌株 ML 基因组特征

特征	染色体	质粒
基因组大小(bp)	2 617 598	38 147
GC 含量(%)	72.78	67.54
编码基因 No.	2 386	43
rRNAs No.	6	0
tRNAs No.	49	0
ncRNA No.	22	0
CRISPRs No.	1	0
原噬菌体 No.	2	1
抗生素抗性基因 No.	24	0

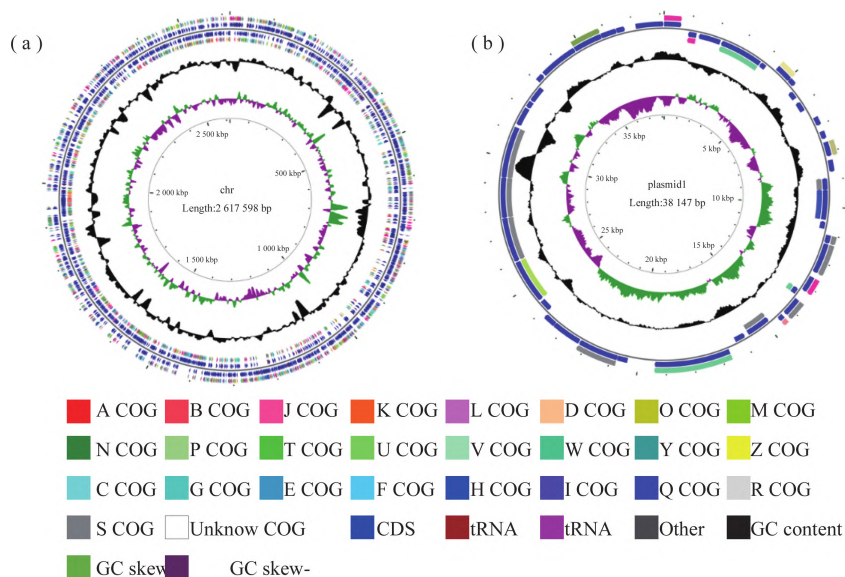


图 3 菌株 ML 的染色体(A)和质粒(B)图谱。从内到外,第一圈代表比例;第二圈代表 GC 倾斜;第三圈代表 GC 含量;第四和第七圈代表每个 CDS 所属的 COG;第五和第六圈代表 CDS(蓝色)、tRNA(红色)和 rRNA(粉色)在基因组上的位置。

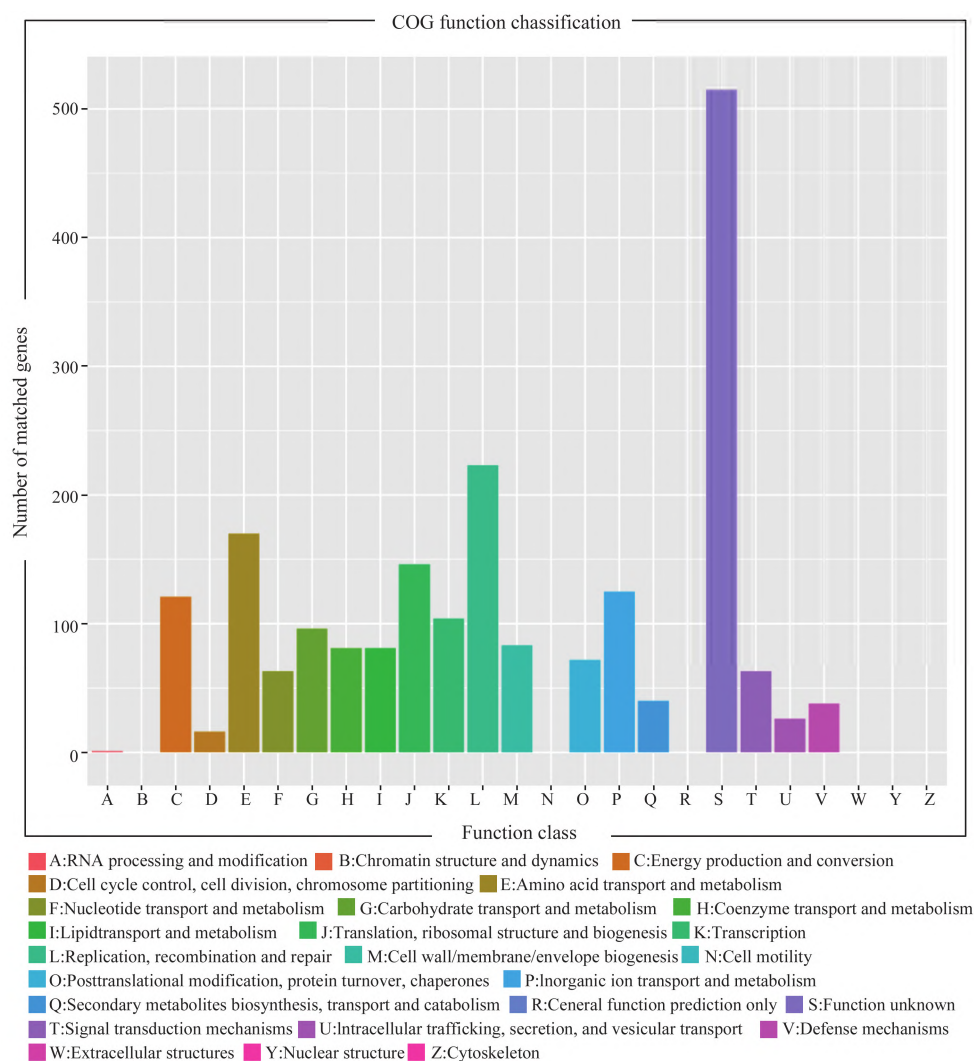


图 4 菌株 ML 的 COG 功能分类图

3.4 基因功能注释

3.4.1 COG 数据库注释。COG(Clusters of Orthologous Groups of proteins)注释是在对已完成基因组测序物种的蛋白质序列进行相互比较的基础上构建的^[31]。通过基因预测,菌株 ML 共预测得到 2 386 个蛋白编码基因,与 COG 数据库进行 blast 比对分析发现,共有 2 064 个蛋白编码基因注释到 COG 功能如图 4 所示,占基因组的 86.5%。这些基因的功能主要集中在复制/重组/修复(10.80%);氨基酸运输与代谢(8.24%);翻译、核糖体结构和生物生成(7.07%);无机离子运输与代谢(6.06%);能源生产和转化(5.86%);转录(5.04%);碳水化合物转运与代谢(4.65%)等方面。

3.4.2 GO 数据库注释。GO(Gene Ontology)注释包括细胞组分、分子功能及生物过程三大类^[25]。通过对菌株 ML 基因组进行蛋白功能分析,共有 1 763 个蛋白编码基因注释到 GO 功能,如图 5 所示,占基因组的 73.89%。其中,用于描述亚细胞结构、位置和大分子复合物的细胞组分中,膜和细胞质的组成部分注释的基因数分别为 408 和 331 个;用于描述基因及其产物功能的分子功能中,如与离子结合、DNA 结合和氧化还原酶活性相关的注释基因数分别为 527、297 和 260;用于描述基因编码产物所参与的生物过程的注释基因数较多,主要集中在细胞氮代谢(677)、生物合成(593)、小分子代谢(490)、转移(260)和分解代谢(240)等功能。

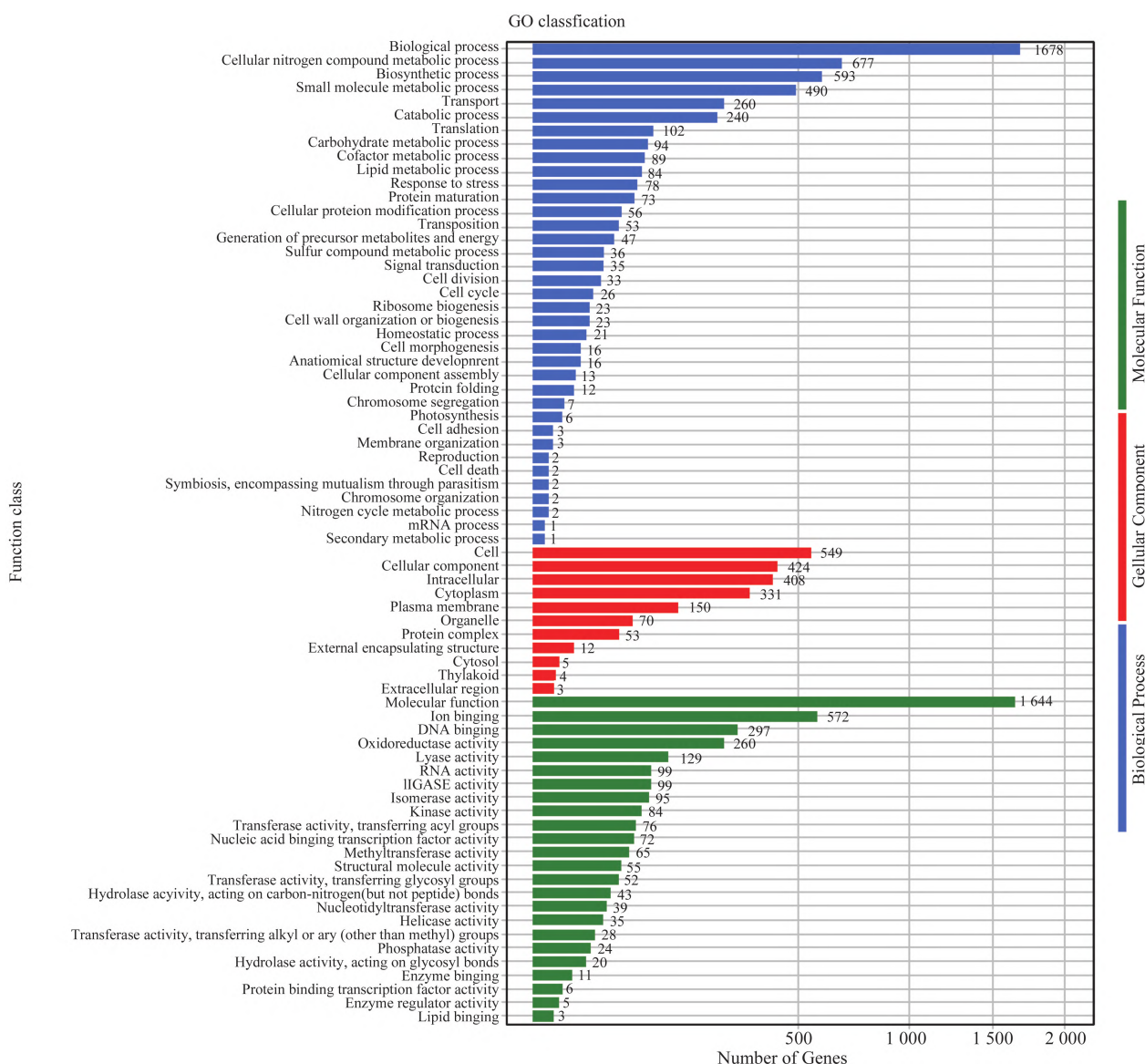


图5 菌株 ML 的 GO 功能分类图

3.4.3 KEGG 数据库注释。KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)数据库既是基因组研究方面的公共数据库,又是系统分析基因功能及关联基因组信息和功能信息的综合数据库^[32]。菌株 ML 中共有

1 248 个蛋白编码基因注释到 KEGG 功能,如图 6 所示,占基因组的 52.31%。KEGG 功能分为 8 大类,分别是层次结构(Brite hierarchies)(65.38%)、细胞过程(Cellular processes)(5.29%)、环境信息处理(Environmental information processing)(11.54%)、遗传信息处理(Genetic information processing)(16.03%)、人类疾病(Human diseases)(5.93%)、代谢(Metabolism)(84.13%)、未知功能基因(Not included in pathway or brite)(16.03%)和生物系统(Organismal systems)(4.81%)。在 KEGG 功能注释中,与代谢通路具有相关性的基因数最多,其中异源化合物生物降解和代谢(Xenobiotics biodegradation and metabolism)的基因数占注释到 KEGG 功能的蛋白编码基因的 4.17%;其中共 52 个基因参与了异源化合物的生物降解和代谢,进一步分析发现有 15 种酶参与氯代芳香族化合物,如氯苯甲酸、氨基苯甲酸盐、甲苯、萘、氯代烷烃和氯代烯烃的降解(表 3)。

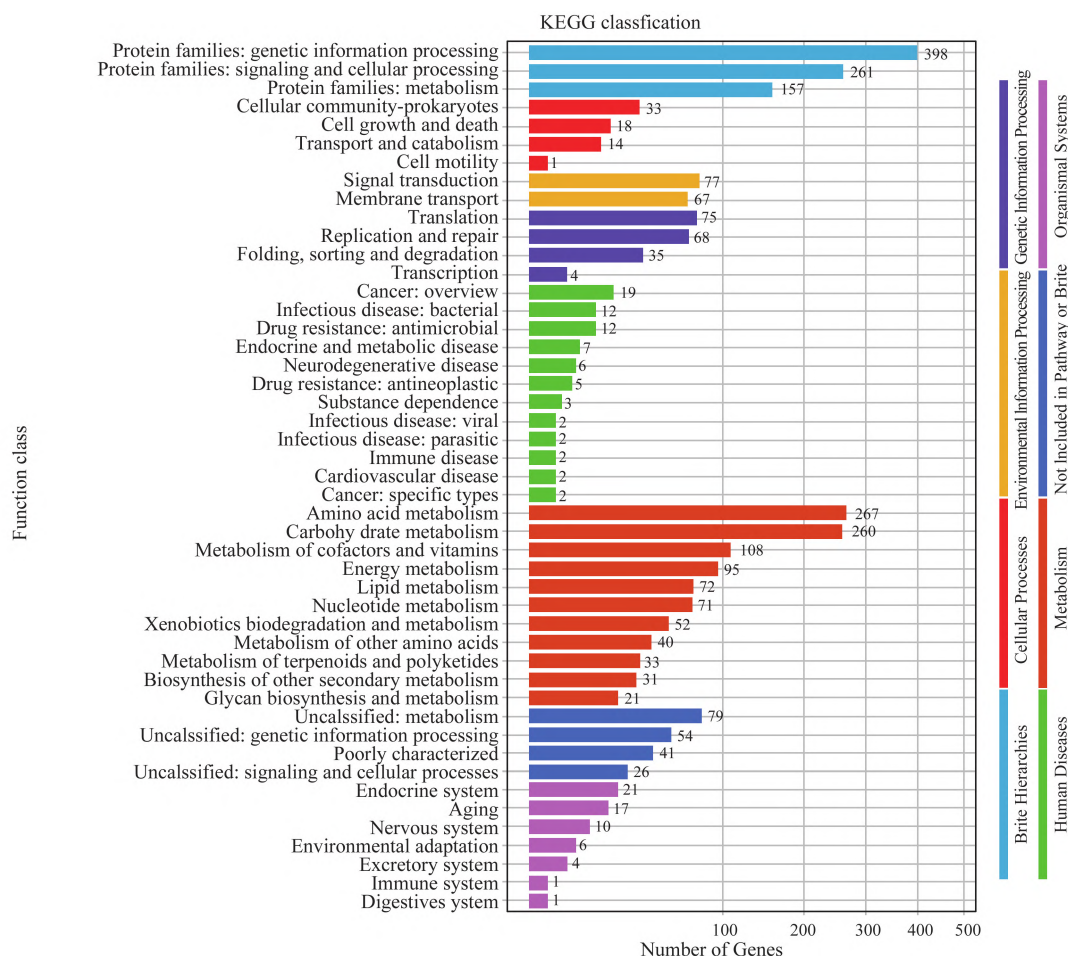


图 6 菌株 ML 的 KEGG 功能分类图

4 讨论

4.1 新型 TCP 代谢基因

目前, TCP 微生物降解的研究多集中在在 TCP 高效降解菌株的筛选及代谢途径分析,而对 TCP 降解基因的报道较少。起初,在菌株 *Cupriavidus pauculus* P2 中克隆到了一个由五个基因组成的 TCP 降解基因簇,该基因簇中的单加氧酶基因(*tcpA1*)和黄素还原酶基因(*tcpB1*)所编码的两种酶能够共同催化 TCP 降解,最终生成 3,6-二酮-2,5-二羟基吡啶^[33]。之后,在菌株 *Ralstonia* sp. T6 中也发现了两个 TCP 降解基因簇 *tcpRXA* 和 *dhpRIJK*, *tcpRXA* 编码的酶能够催化 TCP 转化为 3,6-二酮-2,5-二羟基吡啶, *dhpRIJK* 基因簇编码的酶则能够将生成的 3,6-二酮-2,5-二羟基吡啶进一步转化为 5-氨基-2,4,5-三氧戊酸,最终矿化为无毒无害的物质^[34]。随后,在菌株 *Cupriavidus nantongensis* X1^T 中鉴定了两个降解 TCP 的关键基因

tcpA 和 *fre*, 两者编码的酶能催化 3,6-二氯-2,5-二羟基吡啶的邻位和间位脱氯, 最终形成 3,6-二酮-2,5-二羟基吡啶, 从而实现 TCP 的脱毒^[12]。在本研究中, 我们通过对 *Micrococcus luteus* ML 的基因组测序、组装和注释, 发现 15 种酶可能参与了 TCP 及其类似物的降解, 并进一步推测羧甲基丁内酯酶和酰胺酶在菌株 ML 对 TCP 的脱氯降解和其脱氯产物吡啶环中氮转化为氨的反应中发挥了重要作用。目前, 已有文献发现羧甲基丁内酯酶能催化碳-卤键断裂, 它通过脱卤反应将 5-氟粘性内酯或 4-氟粘性内酯转化为 2-马来酸盐和氢氟酸, 在该反应中羟基取代氟从而形成相应的醇类物质^[35]。由此, 我们推测该酶也可能参与了菌株 ML 对 TCP 的脱氯反应; 同时, 另有文献报道, 酰胺酶能将苯甲酰胺转化为苯甲酸盐和氨^[36]。在此基础上, 我们推测酰胺酶也可能参与了菌株 ML 代谢吡啶环中氮转化为氨的反应。此外, 其它 13 种酶, 如醛脱氢酶(NAD^+)、醇脱氢酶、S-(羟甲基)谷胱甘肽脱氢酶、3-羟基丁酰辅酶 A 脱氢酶和谷胱甘肽依赖型甲醛脱氢酶属于氧化还原酶类, 这些酶主要催化两个分子间的脱氢或加氧反应^[37]; 烯酰辅酶 A 水合酶属于裂解酶催化裂解碳氧键^[38]; 而乙酰辅酶 A C-乙酰转移酶主要负责将化合物中的乙酰辅酶 A 转移到其他基团上^[39]。我们初步推测这三类酶参与了 TCP 脱氯后吡啶环的氧化裂解。上述推测, 仍需要下一步对这些酶的编码基因进行功能验证。

表 3 菌株 ML 中可能参与氯代芳香族化合物代谢途径的酶

名称	基因组位置	大小(bp)	参与代谢途径
醛脱氢酶(NAD^+)	64 795~66 309; 2 332 545~2 334 020	1 515; 1 476	氯代烷烃和氯代烯烃
醇脱氢酶	2 553 996~2 555 057	1 062	萘、细胞色素 P450、氯代烷烃和氯代烯烃
醇脱氢酶(丙醇倾向性)	2 428 899~2 429 930	1 032	萘、细胞色素 P450、氯代烷烃和氯代烯烃
S-(羟甲基)谷胱甘肽脱氢酶	72 393~72 513; 1 905 069~1 906 244	1 176; 1 176	萘、细胞色素 P450、氯代烷烃和氯代烯烃
3-羟基丁酰辅酶 A 脱氢酶	2 309 434~2 310 321	888	苯甲酸盐
谷胱甘肽独立的甲醛脱氢酶	445 096~446 289	1 194	氯代烷烃和氯代烯烃
谷氨酰辅酶 A 脱氢酶	2 585 918~2 587 144	1 227	苯甲酸盐
3-羟基酰基辅酶 A 脱氢酶	2 348 978~2 351 143	2 166	苯甲酸盐和己内酰胺
烯酰辅酶 A 水合酶	283 401~284 198	798	苯甲酸盐、氨基苯甲酸盐和己内酰胺
	869 339~87 054; 1 321 909~1 323 252	1 209; 1 344	
乙酰辅酶 A C-乙酰转移酶	2 215 877~2 217 025; 2 307 418~2 308 635	1 149; 1 218	苯甲酸盐
	2 351 202~2 352 416	1 215	
羧甲基丁内酯酶	48 909~49 634	726	氟苯甲酸盐、甲苯、氯代环己烷和氟苯
葡萄糖酸内酯酶	161592~162488	897	己内酰胺
酰胺酶	72 805~74 313	1 509	氨基苯甲酸盐和苯乙烯
单胺氧化酶	1 171 391~1 172 923	1 533	细胞色素 P450
类固醇 Delta 异构酶	1 497 964~1 499 037	1 074	类固醇

4.2 特异代谢功能

藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)广泛存在于土壤和水体环境中。目前, 有文献发现, *Micrococcus luteus* 能够耐受并去除少量的萘、菲、荧蒽和芘等环境污染物, 具广谱的土壤污染修复性能^[40]。而我们筛选的 *Micrococcus luteus* ML 不仅能降解 TCP, 还能降解 3,5-二氯-2-吡啶酚、6-氯吡啶-2-醇和 2-羟基吡啶等氯代吡啶类化合物。同时, 基因组水平 KEGG 代谢通路进一步挖掘发现该菌株还含有代谢氯代芳香族化合物, 如氯苯甲酸、氨基苯甲酸盐、甲苯、萘、氯代烷烃和氯代烯烃的代谢基因。我们的研究结果与之前文献报道一致。最近还有研究报道, 该菌属的菌株还具有促进植物生长的能力^[41]。以上结果说明藤黄微球菌属的菌株在处理氯代芳香族化合物污染土壤的环境生物修复中具有明显的应用潜力。

5 结论

本研究通过 Illumina Novaseq PE150 和 Oxford Nanopore ONT 相结合的测序技术对 TCP 降解菌株

Micrococcus luteus ML 进行全基因组测序,组装整合得到一条染色体和一个质粒。经过基因预测、功能注释发现菌株 ML 基因组中存在 52 个与异源化合物生物降解和代谢有关的基因,进一步分析发现,共有 15 种酶参与 TCP 类似物的降解。初步推测羧甲基丁内酯酶参与了 TCP 的脱氯反应,而醛脱氢酶(NAD^+)等氧化还原酶、烯酰辅酶 A 水合酶及乙酰辅酶 A C-乙酰转移酶等进一步参与了 TCP 吡啶环的氧化分解,酰胺酶则可能参与了 TCP 吡啶环中氮转化为氨的反应。下一步,这些参与 TCP 代谢的基因将在分子水平上进行功能验证。菌株 ML 不仅能降解 TCP,还能降解 3,5-二氯-2-吡啶酚、6-氯吡啶-2-醇和 2-羟基吡啶等氯代吡啶类化合物。基因组水平 KEGG 代谢通路进一步挖掘发现该菌株还可能参与了氯代芳香族化合物,如氯苯甲酸、氨基苯甲酸盐、甲苯、萘、氯代烷烃和氯代烯烃的降解。基于以上分析结果推测菌株 ML 对氯代芳香族化合物具有普遍性的降解作用,其在氯代芳香族化合物的生物修复中将具有潜在的应用价值。

参 考 文 献

- [1] RACKE K D. Environmental fate of chlorpyrifos[J]. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology,1993,131: 1-150.
- [2] C  CERES T, HE W X, NAIDU R, et al. Toxicity of chlorpyrifos and TCP alone and in combination to *Daphnia carinata*: the influence of microbial degradation in natural water[J]. Water Research,2007,41(19): 4497-4503.
- [3] 杨益军. 2018 年中国(全球)毒死蜱市场现状及预测[J]. 农药科学与管理,2019,40(1): 18-24.
- [4] 华乃震. 市场需求大的重量级杀虫剂毒死蜱综述[J]. 农药市场信息,2019,(10): 27-31.
- [5] ARMBRUST K L. Chlorothalonil and chlorpyrifos degradation products in golf course leachate[J]. Pest Management Science,2001,57(9): 797-802.
- [6] LI J Q, LIU J, SHEN W J, et al. Isolation and characterization of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol-degrading *Ralstonia* sp. strain T6[J]. Biore-source Technology,2010,101(10): 7479-7483.
- [7] BOSE S, KUMAR P S, VO D N. A review on the microbial degradation of chlorpyrifos and its metabolite TCP[J]. Chemosphere,2020,283: 131447.
- [8] FENG Y C, RACKE K D, BOLLAG J M. Isolation and characterization of a chlorinated-pyridinol-degrading bacterium[J]. Applied & Environmental Microbiology,1997,63(10): 4096-4098.
- [9] KIM J R, AHN Y J. Identification and characterization of chlorpyrifos-methyl and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol degrading *Burkholderia* sp. strain KR100[J]. Biodegradation,2009,20(4): 487-497.
- [10] XU G M, ZHENG W, LI Y Y, et al. Biodegradation of chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by a newly isolated *Paracoccus* sp. strain TRP[J]. International Biodeterioration & Biodegradation,2009,62(1): 51-56.
- [11] SHI T Z, FANG L C, QIN H, et al. Rapid biodegradation of the organophosphorus insecticide chlorpyrifos by *Cupriavidus nantongensis* X1^T[J]. International Journal of Environmental Research & Public Health,2019,16(23): 4593.
- [12] FANG L C, SHI T Z, CHEN Y F, et al. Kinetics and catabolic pathways of the insecticide chlorpyrifos, annotation of the degradation genes, and characterization of enzymes TcpA and Fre in *Cupriavidus nantongensis* X1^T[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry,2019,67(8): 2245-2254.
- [13] AMBREEN S, YASMIN A. Novel degradation pathways for chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol degradation by bacterial strain *Bacillus thuringiensis* MB497 isolated from agricultural fields of Mianwali, Pakistan[J]. Pesticide Biochemistry & Physiology,2021,172: 104750.
- [14] XU G M, LI Y Y, ZHENG W, et al. Mineralization of chlorpyrifos by co-culture of *Serratia* and *Trichosporon* spp[J]. Biotechnology Letters,2007,29(10): 1469-1473.
- [15] BESEMER J, LOMSAZ A, BORODOVSK M. GeneMarkS: a self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes. Implications for finding sequence motifs in regulatory regions[J]. Nucleic Acids Research,2001,29(12): 2607-2618.
- [16] CHAN P P, LIN B Y, MAK A J, et al. tRNAscan-SE 2.0 improved detection and functional classification of transfer RNA genes[J]. Nucleic Acids Research,2021,49(16): 9077-9096.
- [17] LIU N, ZHU L Y, ZHANG Z D, et al. Draft genome sequence of a multidrug-resistant *bla*OXA-69-producing *Acinetobacter baumannii* L13 isolated from Tarim River sample in China[J]. Journal of Global Antimicrobial Resistance,2019,18: 145-147.
- [18] NAWAZ M Z, WANG F P. Meta-omics approaches reveal unique small RNAs exhibited by the uncultured microorganisms dwelling deep-

- sea hydrothermal sediment in Guaymas Basin[J]. Archives of Microbiology,2022,204(8): 461.
- [19] GRISSA I, VERGNAUD G, POURCEL C. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats[J]. Nucleic Acids Research,2007,35: W52-W57.
- [20] AKHTER S, AZIZ R K, EDWARDS R A. PhiSpy: a novel algorithm for finding prophages in bacterial genomes that combines similarity- and composition-based strategies[J]. Nucleic Acids Research,2012,40(16): e126.
- [21] MCARTHUR A G, WAGLECHNER N, NIZAM F, et al. The comprehensive antibiotic resistance database[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy,2013,57(7): 3348-3357.
- [22] BUCHFINK B, XIE C, HUSON D H, et al. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND[J]. Nature Methods,2015,12(1): 59-60.
- [23] BAIROCH A, APWEILER R. The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000[J]. Nucleic Acids Research,2000,28(1): 45-48.
- [24] JENSEN L J, JULIEN P, KUHN M, et al. eggNOG: automated construction and annotation of orthologous groups of genes[J]. Nucleic Acids Research,2008,36: D250-D254.
- [25] ASHBURNER M, BALL C A, BLAKE J A, et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology[J]. Nature Genetics,2000,25(1): 25-29.
- [26] KANEHISA M, GOTO S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. Nucleic Acids Research,2000,28(1): 27-30.
- [27] 郑海青, 汪晶波, 刘丹, 等. 由 CRISPR-Cas 介导的细菌和古细菌的适应性免疫系统[J]. 中国免疫学杂志,2016,32(4): 605-608.
- [28] 周长林. 微生物学与免疫学[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2013.
- [29] 罗晶, 马萍. 医学免疫学与病原生物学[M]. 2 版. 上海: 上海科学技术出版社,2013.
- [30] DAVIES J, DAVIES D. Origins and evolution of antibiotic resistance[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews,2010,74(3): 417-433.
- [31] GALPERIN M Y, MAKAROVA K S, WOLF Y I, et al. Expanded microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database[J]. Nucleic Acids Research,2015,43: D261-D269.
- [32] 李阳, 马园, 王国华, 等. 一株羊口疮病毒的全基因组测序及功能分析[J/OL]. 中国动物传染病学报,2023,DOI:10.19958/j.cnki.cn31-2031/S.20220519.003.
- [33] CAO L, XU J H, WU G, et al. Identification of two combined genes responsible for dichlorination of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol(TCP) in *Cupriavidus pauculus* P2[J]. Journal of Hazardous Materials,2013,260: 700-706.
- [34] LI J Q, HUANG Y, HOU Y, et al. Novel gene clusters and metabolic pathway involved in 3,5,6-trichloro-2-pyridinol degradation by *Ralstonia* sp. strain T6[J]. Applied & Environmental Microbiology,2013,79(23): 7445-7453.
- [35] PERKINS E J, GORDON M P, CACERES O, et al. Organization and sequence analysis of the 2,4-dichlorophenol hydroxylase and dichlorocatechol oxidative operons of plasmid pJP4[J]. Journal of Bacteriology,1990,172(5): 2351-2359.
- [36] POLLMANN S, NEU D, WEILER E W. Molecular cloning and characterization of an amidase from *Arabidopsis thaliana* capable of converting indole-3-acetamide into the plant growth hormone, indole-3-acetic acid[J]. Phytochemistry,2003,62(3): 293-300.
- [37] TEUFEL R, MASCARAQUE V, ISMAIL W, et al. Bacterial phenylalanine and phenylacetate catabolic pathway revealed[J]. Biological Sciences,2010,107(32): 14390-14395.
- [38] FERRANDEZ A, MINAMBRES B, GARCIA B, et al. Catabolism of phenylacetic acid in *Escherichia coli*. Characterization of a new aerobic hybrid pathway[J]. The Journal of Biological Chemistry,1998,273(40): 25974-25986.
- [39] NESBITT N M, YANG X, FONTAN P et al. A thiolase of *Mycobacterium tuberculosis* is required for virulence and production of androstenedione and androstadienedione from cholesterol[J]. Infection and Immunity,2010,78(1): 275-282.
- [40] TOLEDO F L, CALVO C, RODELAS B, et al. Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities[J]. Systematic and Applied Microbiology,2006,29(3): 244-252.
- [41] JAMPASRI K, POKETHITIYOOK P, POOLPAK T, et al. Bacteria-assisted phytoremediation of fuel oil and lead co-contaminated soil in the salt-stressed condition by *chromolaena odorata* and *Micrococcus luteus*[J]. International Journal of Phytoremediation,2020,22(3): 322-333.

(责任编辑:刘庆松)