

文章编号: 1674-6139(2022)02-0019-04

# 苍白杆菌(*Ochrobactrum* sp.) FP1 对芳香烃化合物降解特性及相关基因研究

刘宣汝<sup>1</sup>, 王永刚<sup>2</sup>, 陈吉祥<sup>1</sup>, 郭晓鹏<sup>2</sup>, 罗旦<sup>1</sup>

(1. 兰州理工大学 石油化工学院, 甘肃 兰州 730050; 2. 兰州理工大学 生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730050)

**摘要:** 文章对分离的一株高效石油降解菌生理特性及芳香烃化合物降解特性、降解相关基因进行了研究。用细菌生理生化和 16S rDNA 序列分析初步鉴定 FP1 为苍白杆菌(*Ochrobactrum* sp.)。将菌株在含不同种类混合芳香烃基础培养基中培养 7 d 后, 用 GC-MS 分析发现菌株对芳香烃类化合物有较好利用和降解能力, 对苯、甲苯、乙苯、二甲苯、萘和联苯的降解率分别为 100.00%、60.11%、66.00%、57.72%、67.94%、77.72%。芳香烃化合物降解相关基因有 31 个, 而参与萘、甲苯、乙苯、二甲苯降解的基因占芳香烃化合物降解基因总数的 38.72%。研究结果为芳香烃污染土壤的微生物修复提供了基础。

**关键词:** 苍白杆菌; 生理特征; 多环芳烃; 降解率; 降解基因

中图分类号: X53

文献标志码: B

## Studies on Degradation Characteristics of Aromatic Compounds and Its Related Degrading Genes of An *Ochrobactrum* sp. FP1

Liu Xuanru<sup>1</sup>, Wang Yonggang<sup>2</sup>, Chen Jixiang<sup>1</sup>, Guo Xiaopeng<sup>2</sup>, Luo Dan<sup>1</sup>

(1. College of Petrochemical Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China;  
2. College of life science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China)

**Abstract:** This paper explored the degradation characteristics and related genes of a high-efficiency petroleum degrading bacterium to aromatic hydrocarbon compounds. The strain was identified using physiological and biochemical and 16S rDNA sequence analysis. GC-MS and whole genome sequencing were used to analyze the degradation characteristics and the possible degradation genes for aromatic compounds. The results showed that the strain FP1 belonged to *Ochrobactrum* sp. The bacterium was cultured in a basic medium containing different types of mixed aromatic hydrocarbons for 7 days, and the degradation rates of benzene, toluene, ethylbenzene, xylene, naphthalene, and biphenyl were 100.00%, 60.11%, 66.00%, 57.72%, 67.94%, 77.72% respectively. There are 31 genes related to the degradation of aromatic hydrocarbon compounds, and the genes involved in the degradation of naphthalene, toluene, ethylbenzene, and xylene account for 38.72% of the total number of aromatic hydrocarbon compound degradation genes. These results would provide references for the microbial remediation of the aromatic hydrocarbon compounds contaminated soils.

**Key words:** *ochrobactrum* sp; physiological and biochemical characteristics; polycyclic aromatic compounds; degrading rate; degradation genes

收稿日期: 2022-01-10

基金项目: 本研究由国家自然科学基金(31272694)资助

作者简介: 刘宣汝(1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 环境生物技术。

通讯作者: 王永刚

## 前言

多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)是由煤、石油、木材等不完全燃烧生成的一类广泛分

布并稳定存在于自然环境的“三致”有机污染物<sup>[1]</sup>。其中含两个及两个以上的闭合苯环,容易造成严重污染<sup>[2]</sup>。目前多环芳烃化合物的去除方法有:物理方法、化学方法和生物修复法,其中微生物修复是一种绿色,廉价且安全的方法<sup>[3]</sup>。

PAHs降解微生物主要包括丛毛单胞菌属(*Coccomonas* sp.)、芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)和红球菌属(*Rhodococcus* sp.)的细菌种类,已发现的细菌多环芳烃降解基因包括 *nah*、*phd*、*nag*、*phn*、*nar* 和 *nid* 等6类<sup>[4]</sup>。苍白杆菌(*Ochrobactrum*)是一类耐盐的革兰氏阴性细菌,近期研究表明,部分苍白杆菌属细菌在芳烃等有机污染物降解领域有重要应用潜力<sup>[5-6]</sup>。Nshimiyimana 等人报道苍白杆菌(*Ochrobactrum anthropi*) L1 - W 对邻苯二甲酸(2 - 乙基己基)酯(Di - 2 - ethylhexyl phthalate, DEHP)降解率为98.7%<sup>[7]</sup>,但有关该菌对芳香烃化合物的降解途径及降解相关机理研究较少。

我们从石油污染土壤中分离到一株高效石油降解菌 FP1,对菌株进行了生理生化和16S rDNA 序列分析鉴定,研究 FP1 对不同类型芳烃化合物的降解特征,并对细菌进行了全基因组测序,研究了该菌对不同种类芳烃化合物降解的相关基因,为微生物修复提供理论支持。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验菌株

菌株 FP1 为本实验室分离自辽宁抚顺石油污染土壤<sup>[8]</sup>。

### 1.2 仪器及药品

苯、甲苯、乙苯、二甲苯、萘、联苯及正己烷均购于天津希恩思生化科技有限公司,分析纯。TRACE DSQ 型气相色谱 - 质谱仪(Thermo Finnigan), T100TM Thermal Cycler 型 PCR 仪(北京爱立斯生物科技有限公司)。

### 1.3 培养基

LB 液体培养基(g/L):蛋白胨 10 g,酵母粉 5 g,氯化钠 10 g,蒸馏水 1 L,调 pH 为 7.0 ~ 7.2。

MSM 基础盐培养基(g/L):  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  3 g,

$\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 g, NaCl 0.5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{gS}_2\text{O}$  0.1 g, CaCl<sub>2</sub> 0.01 g, FeCl<sub>2</sub> 0.01 g, 蒸馏水 1 L, 调 pH 为 7.0。

混合芳烃储备液(600 mg/L): 苯 34.09  $\mu\text{L}$ , 甲苯 34.09  $\mu\text{L}$ , 乙苯 34.48  $\mu\text{L}$ , 二甲苯 34.88  $\mu\text{L}$ , 联苯 30.00 mg, 萘 30.00 mg, 用正己烷定容至 50 mL。

### 1.4 菌株生理生化鉴定

参照《常见细菌系统鉴定手册》进行生理生化试验。

### 1.5 菌株 16S rDNA 序列分析

采用试剂盒抽提菌株 DNA, 16S rRNA 基因通用引物(27F: 5' - AGA GTT TGA TCC TGC TCA G - 3'; 1492R: 5' - GGT TAC CTT GTT ACG ACT T - 3') 进行 PCR 扩增。将 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 测序结果 NCBI/BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) 数据库进行比对分析, 选取一致性在 98% 以上的近缘物种用 MEGA 6.06 软件按照邻接法(Neighbor - Joining) 构建系统发育树。

### 1.6 菌株对混合芳香烃化合物降解

菌株以 2% 的接种量接入 LB 液体培养基, 于 30℃, 150 r/min 振荡培养 10h 至生长对数期, 8 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, 用生理盐水冲洗两遍后重悬, 分别接种于含有 600 mg/L 的混合芳香烃储备液 10 mL 基础培养基中, 于 30℃, 150 r/min 振荡培养 7d, 用正己烷萃取, 测定降解率。

### 1.7 GC - MS 分析

降解 7 d 后的含混合芳香烃储备液的培养基经 8 000 r/min 离心 15 min 后取上清液, 用与培养基同比例正己烷萃取实验样品, 取上层有机相, 经无水硫酸钠脱水, 重复三次, 合并有机相, 转移至 50 mL 容量瓶定容。用 GC - MS 测定其降解率。根据保留时间和峰面积, 采用外标法计算浓度。

### 1.8 菌株降解相关基因分析

FP1 全基因组测定和分析由广州基迪奥生物科技有限公司完成。Illumina Miseq 得到的原始图像数据文件经 CASAVA 碱基识别分析转化为原始测序序列 Raw Reads。对各样本数据的质量进行质控

过滤,去除嵌合体与靶区域外序列,得到各样本的有效数据。在 NCBI 数据库中完成对萘、BTEX( 苯、甲苯、乙苯、二甲苯) 的生物降解相关基因的搜索。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌株 FP1 的生理生化及 16S rDNA 序列分析

菌株 FP1 分离自抚顺石油污染土壤,对菌株生理生化特征分析结果如表 1 所示,与人苍白杆菌属

细菌的生理特征相似。将菌株的 16S rDNA 序列测定后,用 MEGA 6.06 软件按照邻接法构建系统发育树如图 1 所示,发现 FP1 与人苍白杆菌( *Ochrobactrum anthropi* ) 细菌聚为一类,与人苍白杆菌 OAB 的 16S rDNA 序列一致性为 99%,初步确定菌株 FP1 属于苍白杆菌( *Ochrobactrum sp.* ),命名为苍白杆菌( *Ochrobactrum sp.* ) FP1。菌株 GenBank 数据库登录号为 KU257687.1。(见图 2)

表 1 苍白杆菌 FP1 的生理生化特性

相关反应/酶	苍白杆菌 FP1	人苍白杆菌
还原硝酸盐	+	+
形成吡啶	—	—
葡萄糖发酵	—	—
生成尿素	+	+
水解蛋白酶	—	—
$\beta$ -半乳糖苷酶	—	—
葡萄糖同化	—	—
生成精氨酸二水解酶	—	—
水解 $\beta$ -葡萄糖苷酶	—	—

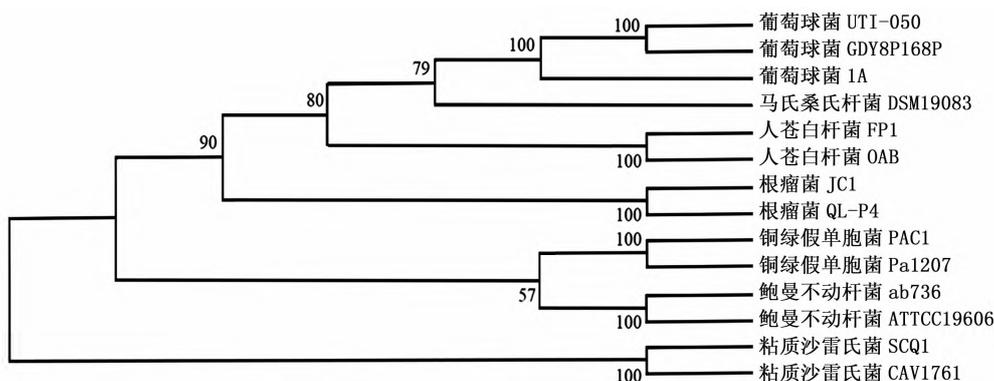


图 1 苍白杆菌 FP1 系统发育树

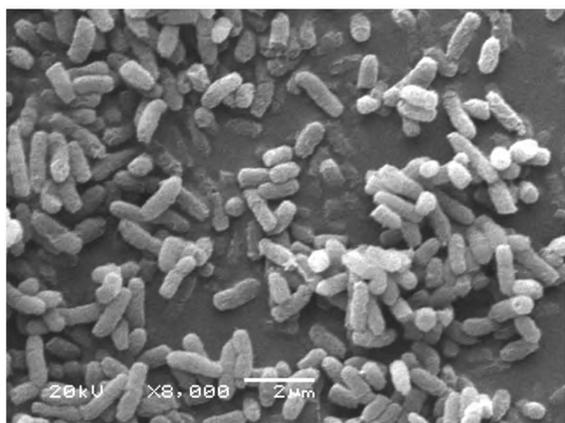
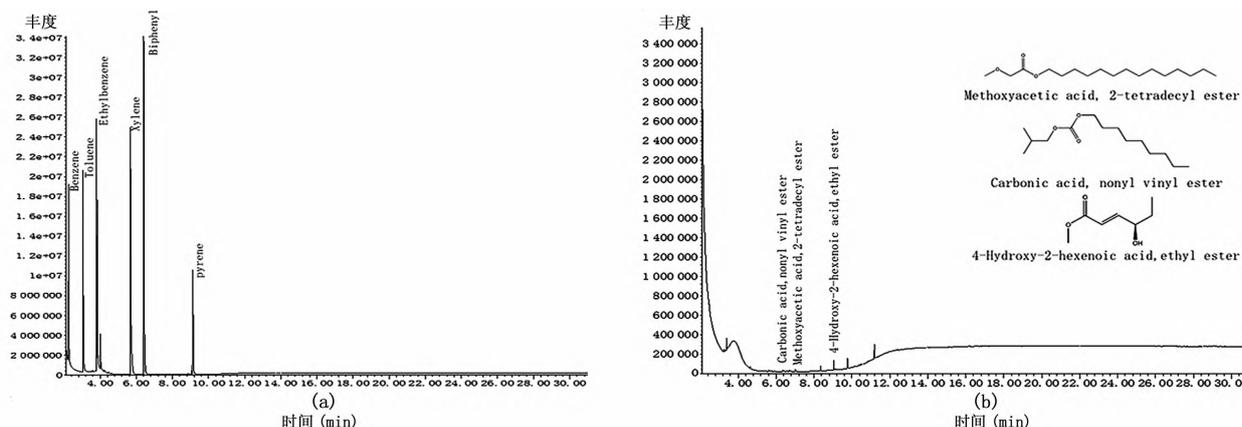


图 2 苍白杆菌 FP1 的扫描电镜观察

### 2.2 苍白杆菌 FP1 对混合芳烃的降解特征

将 FP1 在含有苯、甲苯、乙苯、二甲苯、联苯、萘等不同种类芳烃的基础培养基中培养 7 d,用 GC-MS 分析对各种芳烃的降解效果,结果发现各种芳烃都得到了不同程度的降解,其中对苯的降解率达 100.00%,甲苯为 60.11%,乙苯为 66.00%,二甲苯为 57.72%,萘为 67.94%,联苯为 77.72%,发现了碳酸壬基乙烯基酯、甲氧基乙酸 2-十四烷基酯和 4-羟基-2-己酸乙酯等中间代谢降解产物见图 3(b)。



a, 空白对照组( 苯 Benzene; 甲苯 Toluene; 乙苯 Ethylbenzene; 二甲苯 Xylene; 联苯 Biphenyl; 萘 Naphthalene) ;  
b, FP1 降解组( 碳酸壬基乙烯基酯 Carbonic acid, nonyl vinyl ester; 甲氧基乙酸 2 - 十四烷基酯 Methoxyacetic acid, 2 - tetradecyl ester; 4 - 羟基 - 2 - 己酸乙酯: 4 - Hydroxy - 2 - hexenoic acid, ethyl ester)

图 3 苍白杆菌降解混合芳烃溶液 GC - MS 分析结果

### 2.3 苍白杆菌 FP1 的芳烃降解相关基因分析

结合对已知的细菌芳香烃化合物降解通路对比, 发现在 FP1 基因组中含有 31 个芳香烃化合物降解相关基因, 其中参与萘、甲苯、乙苯、二甲苯降解的基因占芳香烃化合物降解基因总数的 38. 72% , 这些降解基因主要包括: 醇脱氢酶基因( *adh* )、水杨酸羟化酶基因( *xlnD* )、编码 3 - 羟基异丁基 - CoA 水解酶基因( *hibch* )、邻苯二酚 2,3 - 双加氧酶基因( *catE* )、醛脱氢酶基因( *ald* )、原儿茶酸双加氧酶基因( *pcaH*、*pcaG* )、细胞色素 P450 基因( *CYP97A3* )、环羟基化双加氧酶基因( *bphA1* )、谷胱甘肽脱氢酶基因( *flhA* )、醌氧化还原酶基因( *adhT* ) 等。从降解相关基因进一步证实了菌株对芳香烃类化合物的降解能力。

## 3 结论

文章对分离得到高效石油降解菌 FP1 生理特性及芳香烃化合物降解特性、降解相关基因进行研究。分析初步鉴定 FP1 为苍白杆菌( *Ochrobactrum* sp. ) , 将菌株在含不同种类混合芳烃基础培养基中培养 7 d 后, 发现菌株对苯、甲苯、乙苯、二甲苯、萘和联苯的降解率分别为 100. 00%、60. 11%、66. 00%、57. 72%、67. 94%、77. 72%。通过在 NCBI 数据库中对比菌株基因组信息, 发现芳香烃化合物降解相关基因有 31 个, 而参与萘、甲苯、乙苯、二甲苯降解的基因占芳香烃化合物降解基因总数的 38. 72%。根据分析降解基因的种类及数量, 证实 FP1 具有较强的石油降解能力。

### 参考文献:

- [1] Gbeddy G, Goonetilleke A, Ayoko G A, et al. Transformation and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in urban road surfaces: Influential factors, implications and recommendations - ScienceDirect [J]. Environmental Pollution, 2019, 257.
- [2] Wang Q, Hou J, Yuan J, et al. Evaluation of fatty acid derivatives in the remediation of aged PAH - contaminated soil and microbial community and degradation gene response - ScienceDirect [J]. Chemosphere, 2020, 248.
- [3] Yang X, Li E, Liu F, et al. Interactions of PAH - degradation and nitrate - /sulfate - reducing assemblages in anaerobic sediment microbial community [J]. Journal of Hazardous Materials, 2020, 388: 122068.
- [4] Chen H W, Xu M, Ma X W, et al. Isolation and characterization of a chlorate - reducing bacterium *Ochrobactrum anthropi* XM - 1 [J]. Journal of Hazardous Materials, 2019, 380: 120873.
- [5] 张维荣, 严康, 汪海珍, 等. 基于 1983 - 2019 年文献计量对多环芳烃降解基因研究及进展的剖析 [J]. 环境科学学报, 2020, 40(3): 1138 - 1148.
- [6] 徐兵, 俞理, 马原栋, 等. 原油降解菌苍白杆菌属的性能及菌株筛选 [J]. 新疆石油地质, 2019, 40(2): 213 - 217.
- [7] Nshimiyimana J B, Khadka S, Zou P, et al. Study on biodegradation kinetics of di - 2 - ethylhexyl phthalate by newly isolated halotolerant *Ochrobactrum anthropi* strain L1 - W [J]. BMC Research Notes, 2020, 13.
- [8] 罗旦. 红平红球菌 *rpf* 基因突变、生物活性及应用研究, 硕士学位论文 [D]. 兰州: 兰州理工大学, 2019: 33 - 36.