秦银秋,王乙橙,张慕琦,等.高效多环芳烃降解菌 *Pseudomonas jessenii* QYQ-1 的分离、鉴定及基因组分析 [J]. 中国环境科学, 2025,45(9):5163-5175.
Qin Y Q, Wang Y C, Zhang M Q, et al. Isolation, identification and genome analysis of *Pseudomonas jessenii* QYQ-1, a highly efficient polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacterium [J]. China Environmental Science, 2025,45(9):5163-5175.

高效多环芳烃降解菌 *Pseudomonas jessenii* QYQ-1 的分离、鉴定及基因组分析

秦银秋,王乙橙,张慕琦,陈猷鹏* (重庆大学环境与生态学院,重庆 400044)

摘要：从嘉陵江河床沉积物分离获得一株多环芳烃(PAHs)降解菌株 QYQ-1,经 16S rRNA 序列比对、平均核苷酸一致性值计算与全基因组系统发育分析,鉴定其为杰氏假单胞菌(*Pseudomonas jessenii*).菌株 QYQ-1 具有广泛的温度(15~40℃)和 pH 值(5~9)适应范围、优良的耐盐性(0.5%~5%)和良好的重金属抗性(Cu^{2+}、Zn^{2+}、Co^{2+}、Mn^{2+}、Cd^{2+}),尤其具有耐低温(15℃)、耐高盐(5%)和耐重金属的独特优势,其最佳降解条件为温度 35℃,pH 值为 7,可在 48h 内对 100mg/L 萘降解率达到 97.7%.此外,其还可以高效降解苯甲酸和苯酚等芳香族化合物.基因组分析表明,菌株 QYQ-1 具有多种 PAHs 降解过程中的关键基因,包括完整的苯甲酸盐降解与邻苯二酚邻位裂解通路,还含有水杨酸羟化酶、细胞色素 P450、原儿茶酸 3,4-双加氧酶等有关 PAHs 降解的关键基因.同时,还携带大量铜、锌、钴、锰、镉等重金属抗性基因.此外,菌株 QYQ-1 还具有强大的铁摄取系统.这拓展了菌株 QYQ-1 的应用范围,不仅可以用于 PAHs 污染场地的环境修复,还具有应用于重金属和 PAHs 复合污染场地环境修复的潜力.

关键词：杰氏假单胞菌；多环芳烃；降解；重金属；全基因组测序；基因组分析
中图分类号：X172 **文献标识码**：A **文章编号**：1000-6923(2025)09-5163-13

Isolation, identification and genome analysis of *Pseudomonas jessenii* QYQ-1, a highly efficient polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacterium. QIN Yin-qiu, WANG Yi-cheng, ZHANG Mu-qi, CHEN You-peng* (College of Environment and Ecology, Chongqing University, Chongqing 400044, China). *China Environmental Science*, 2025,45(9)：5163~5175

Abstract：A strain of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degrading bacteria, QYQ-1, was isolated from the sediments of the Jialing River bed. Through 16S rRNA sequence alignment, calculation of average nucleotide identity, and whole-genome phylogenetic analysis, it was identified as *Pseudomonas jessenii*. The strain QYQ-1 exhibits a wide adaptive range for temperature (15~40°C) and pH (5~9), excellent salt tolerance (0.5%~5%), and good heavy metal resistance (Cu^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+}, Cd^{2+}). It has a unique advantage in withstanding low temperatures (15°C), high salinity (5%), and heavy metals. The optimal degradation conditions are at a temperature of 35°C and a pH of 7, achieving a degradation rate of 97.7% for 100mg/L naphthalene within 48hours. Additionally, it can efficiently degrade aromatic compounds such as benzoic acid and phenol. Genomic analysis indicates that the strain QYQ-1 possesses various key genes involved in the degradation of multiple PAHs, including a complete pathway for benzoate degradation and a meta-cleavage pathway for catechol. It also contains critical genes related to PAHs degradation, such as salicylate hydroxylase, cytochrome P450, and protocatechuate 3,4-dioxygenase. Additionally, it carries a significant number of resistance genes for heavy metals such as copper, zinc, cobalt, manganese, and cadmium. Furthermore, strain QYQ-1 has a robust iron uptake system. This expands the application range of strain QYQ-1, making it suitable not only for environmental remediation of PAHs-contaminated sites but also for potential use in environments contaminated with both heavy metals and PAHs.

Key words：*Pseudomonas jessenii*；polycyclic aromatic hydrocarbons；degradation；heavy metals；whole genome sequencing；genome analysis

多环芳烃(PAHs)是环境中一类由 2 个或 2 个以上苯环组成的持久性有机污染物,主要来源于人类的能源利用过程和有机物的不完全热解等[1].PAHs 具有致畸性、致突变性和致癌性,可以通过生物累积和环境暴露等方式传递,给生态环境和人体健康造成潜在威胁[2].PAHs 能够通过干湿沉降和界面交换留存在土壤和水体中[3],大量累积在河床湿地中,部分河床沉积物或土壤中的 PAHs 浓度高于生态风险阈值[4-5].研究表明,微生物代谢在 PAHs 的迁移转化和去除过程中占有重要地位,是环境中 PAHs 去除的主要途径[6].河床湿地环境蕴藏着数量巨大,代谢类型众多与突变类型多样的微生物,是 PAHs 污染生物修复的主体,存在污染物的地方往往会出现相应的

收稿日期：2025-02-11
基金项目：重庆市自然科学基金资助项目(CSTB2023NSCQ-LZX0095)
* 责任作者, 教授, ypchen@cqu.edu.cn

降解微生物,并存在着强或弱的生物降解作用[7-8],容纳近 90% PAHs 污染的土壤环境中[9],大量微生物的作用更有待发掘.

假单胞菌(*Pseudomonas*)在外来化合物的转化和环境污染修复方面具有巨大潜力,可以降解各种有机底物,包括石油、氯水杨酸盐和抗生素等[10-11].部分假单胞菌在 PAHs 的分解中承担着重要作用,包括铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)和施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)等,其多被发现于受 PAHs 污染的土壤或水体环境中[12-13].首次报道的杰氏假单胞菌(*Pseudomonas jessenii*)是从天然矿泉水中分离的 *P. jessenii* CIP 105274^{T}[14].*P. jessenii* 是一种重要的根际促生菌,可以有效降低螺壳状丝囊霉(*Aphanomyces cochlioides*)和瓜果腐霉(*Pythium aphanidermatum*)等植物病原真菌的危害[15].同时,*P. jessenii* 对植物根结线虫(*Meloidogyne*)也有一定的抑制作用[16].此外,*P. jessenii* 还能够合成可生物降解的聚羟基烷酸酯与生物表面活性剂等[17-18],在农业与工业生产方面具有巨大的应用潜力.

迄今为止仅报道了 7 株 *P. jessenii* 的基因组草图,其研究通常聚焦在植物根际促生和抗病性,尚无比较基因组学与 PAHs 降解相关报道,*P. jessenii* 潜在的环境修复能力仍未得到评估.在本文中,从重庆市嘉陵江河床沉积物分离并鉴定到一株具有 PAHs 降解能力的新颖菌株,命名为 *P. jessenii* QYQ-1.通过基因组分析发现其具备环境修复能力,并通过实验进行了功能验证.此外,还基于比较基因组学,系统地分析了 *P. jessenii* 的遗传多样性与环境修复功能,并对分类错误的 *P. jessenii* 进行重新分类.由此,对 *P. jessenii* 的代谢能力和环境修复潜力提供新的认识,同时为其他 *P. jessenii* 的基因组的组装提供有价值的参考.

1 材料与方法

1.1 菌株 QYQ-1 的分离、培养与鉴定

1.1.1 菌株分离 菌株 QYQ-1 分离自重庆市嘉陵江河床沉积物(29.57N,106.57E),采样深度为 10cm,将沉积物样品混合后取 1g 沉积物于 10mL 无菌水中充分振荡,制备菌悬液.将菌悬液稀释 100 倍后加入 PP 液体培养基,35℃,180r/min 条件下进行富集培养.将富集培养物在 PP 固体培养基上连续划线,分离得到单菌.现菌株 QYQ-1 以甘油菌形式保藏于本实验室-80℃冰箱与中国普通微生物菌种保藏管理中心(保藏号:CGMCC 1.61914).

1.1.2 培养基与主要试剂 菌株 QYQ-1 培养于 PP 液体培养基(g/L):胰蛋白胨 10,酵母提取物 5,氯化钠 10,氨苄青霉素 0.5,两性霉素 B 0.00025.PP 固体培养基(g/L):胰蛋白胨 10,酵母提取物 5,氯化钠 10,琼脂粉 1.52%(w/v),氨苄青霉素 0.5,两性霉素 B 0.00025.无机盐培养基(g/L):$(NH_4)_2SO_4$ 2,$MgSO_4·7H_2O$ 0.2,KH_2PO_4 1.5,$Na_2HPO_4·12H_2O$ 1.5,$CaCl_2·2H_2O$ 0.01,$Fe_2SO_4·7H_2O$ 0.03,$MnSO_4·H_2O$ 0.01,$ZnSO_4·7H_2O$ 0.01, $CoSO_4·7H_2O$ 0.005.如无特殊说明,本项研究中的药剂均购买自上海麦克林生化科技股份有限公司,纯度均为分析纯.

1.1.3 菌株鉴定 菌株 QYQ-1 以 1%(v/v)接种于 PP 液体培养基,35℃,180r/min 培养 12h,用接种环挑取菌液平板划线于 PP 固体培养基继续培养至长出单菌落.然后,挑取单菌落于含有 10μL 无菌水的 EP 管中,95℃裂解 5min 后作为 PCR 扩增模板.利用细菌通用引物 27F 和 1492R 对菌株 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增,通过琼脂糖凝胶电泳验证 PCR 产物的完整性后进行 Sanger 测序.测序结果上传至美国国家生物技术信息中心(NCBI)进行 BLAST 比对,确定和其一致性最高的 16S rRNA 基因序列.利用 MEGA 7.0[19]构建 16S rRNA 基因系统发育树,采用邻位加入法,Kimur 双参数模型,1000 次 Bootstrap 来评估所建进化树的准确性.此外,还使用平均核苷酸一致性(Average Nucleotide Identity,ANI)值计算、全基因组系统发育分析和 GTDB-Tk 数据库[20]进行了菌种鉴定.

1.2 菌株 QYQ-1 的生长特性与降解实验

1.2.1 生长特性 菌株 QYQ-1 以 5%(v/v)接种于 PP 液体培养基,35℃,180r/min 震荡培养,定期取菌液测定 OD_{600},绘制生长曲线,确定其处于对数生长期(OD_{600}=1)的具体时间,便于后续取样.以同样接种、培养与取样的方法和时间,测定不同温度(15~40℃)、初始 pH 值(5~9)、盐度(NaCl 0.5~5%)与金属离子(Cu^{2+}、Zn^{2+}、Co^{2+}、Mn^{2+}、Cd^{2+} 1mmol/L)下的生长情况.本实验均设置 3 个平行,以无额外添加的 PP 液体培养基体系作为空白对照.

1.2.2　降解实验　以萘作为 PAHs 代表性污染物与唯一碳源,使用丙酮为溶剂,按 100mg/L 浓度添加到降解体系中,测定其在不同温度(15~40℃)、初始 pH 值(5~9)条件下对萘的降解情况.以苯甲酸、苯酚作为芳香族化合物代表性污染物与唯一碳源,按 100mg/L 浓度添加到降解体系中.将处于对数生长期的 QYQ-1 菌液以 5%(*v*/*v*)接种于含特定浓度的萘、苯甲酸、苯酚的无机盐培养基中,于实验设定温度、摇床转速 180r/min 条件下避光培养,定时取样测定体系中的萘、苯甲酸、苯酚的浓度.使用气相色谱仪(GC-FID)以外标法定量测定萘、苯甲酸、苯酚的浓度,每次测定均设置 3 个平行,以无额外添加的无机盐培养基体系作为空白对照.

1.2.3　脱氢酶活性测定　通过 TTC 比色法测定菌株 QYQ-1 的脱氢酶活性.于 50mL 离心管中加入反应后的溶液、Tris-HCl(pH=8.5、0.05mol/L)、葡萄糖(0.1mol/L)、无菌 TTC 溶液(0.5%)各 3mL,35℃恒温培养 4h 后加入 0.4mL 硫酸与 5mL 甲苯,以 2000r/min 离心 15min,将红色有机相分离,以 5000r/min 再次离心 10min,将离心后溶液过滤,使用分光光度计在 486nm 波长处测定 OD_{486}.

1.3　菌株 QYQ-1 的全基因组测序、组装与注释

菌株 QYQ-1 以 1%(*v*/*v*)接种于 PP 液体培养基,25 ℃,180r/min 培养 12h,使用 Bacterial/fungal DNA extraction kit (magnetic beads)(美吉生物,中国)提取基因组 DNA.使用 Illumina NovaSeq 6000 平台进行高通量全基因组测序.分别使用 FastQC v0.11.8[21]、Fastp v0.23.4[22]、SPAdes v3.15.3[23]软件对测序产生的 reads 进行质量评估、质量控制与基因组组装,使用 QUAST v5.0.2[24]评估基因组组装质量.菌株 QYQ-1 的基因组草图已经上传至 NCBI 数据库(登录号:GCA037889415.1).使用 NCBI 原核基因组注释流程(PGAP)[25]进行基因组注释,并使用 eggNOG-mapper[26]将所得蛋白质组进一步注释到碳水化合物活性酶(CAZy)、直系同源群(COG)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)数据库中.同时,使用 IslandViewer4[27]对注释基因组中的基因组岛(Genomic Islands,GIs)进行识别,使用 CRISPRCasFinder[28]对菌株 QYQ-1 和其他 8 株假单胞菌菌株基因组中的成簇规律间隔短回文重复序列(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats,CRISPR)进行识别.此外,通过 tRNAscan-Se v2.0.12[29]软件预测 tRNA,使用 CGView[30]对基因组特征进行可视化.

1.4　比较基因组分析

为了研究菌株 QYQ-1 与其他属内和种内的假单胞菌的系统发育关系和功能差异,从 NCBI 数据库下载了其他 22 株假单胞菌的基因组及其全部编码序列(CDS)进行比较基因组学分析.同时,使用 fastANI v1.31[31]对菌株 QYQ-1 与其他 22 株假单胞菌进行 ANI 值计算,使用 GTDB-Tk 构建全部 23 株假单胞菌基于全基因组的系统发育树.同时,使用 TBtools[32]对菌株 QYQ-1、DSM 17150、LMG 21605、UC 4332 进行共线性分析和可视化.为了比较菌株 QYQ-1 与其他 22 株假单胞菌的功能基因,还使用 eggNOG-Mapper 对菌株 QYQ-1 和其他 22 株假单胞菌的蛋白质组进行了全面注释.

2　结果与讨论

2.1　菌株 QYQ-1 的全基因组组装与特征

为了构建菌株 QYQ-1 的高质量基因组,在 Illumina NovaSeq 6000 平台进行了高通量全基因测序.一共获得了 3457999 条 Clean reads,Phred scores 高于 Q20 的占 97.03%.菌株 QYQ-1 基因组组装与编码基因预测结果显示,菌株 QYQ-1 基因组全长 6168333bp,GC 含量为 60.0%,含有 5581 条 CDS,全长 5431036bp,占基因组全长的 88.05%.此外,还含有 7 条 rRNA,62 条 tRNA,与 *P. aeruginosa* 相比,*P. jessenii* 的基因组具有更低的 GC 含量(表 1).

值得注意的是,菌株 *P. jessenii* QYQ-1 与其他 7 株 *P. jessenii* 的 3 条 Other RNA 均包含 1 条 ncRNA、tmRNA 和 SRP RNA,同时,菌株 QYQ-1 还具有最多 RNase P RNA.在 tRNA 前体的加工过程中,核糖核酸酶 P(RNase P)可以有效切割 5’端引导序列,催化 tRNA 成熟[33],与蛋白质酶相比,核糖核酸酶的催化效率较低,是一类较为原始的催化酶[34],这表明菌株 QYQ-1 可能具有更多的核糖核酸酶,在进化上更加保守.

CRISPR 是广泛分布于细菌和古菌基因组中的一种特殊 DNA 重复序列家族,它与 CRISPR 相关基因(CRISPR-associated, *cas*)共同构成了一种基于核酸的适应性免疫系统来抵抗病毒等外源基因的入

侵[35].菌株 QYQ−1 基因组中有 5 个 CRISPR(图 1),同时,在菌株 LMG 21605、DSM 17150、EC−S101、E2333、PAO1 分别发现 6、5、4、3、1 个 CRISPR,菌株 GO3、UC4332、LBp−160603 基因组中没有发现 CRISPR,仅在菌株 QYQ−1 中发现 *cas*3,这表明菌株 QYQ−1 具有 I−F 型 CRISPR−Cas 系统[36],可能在过去经历过外源 DNA 的入侵,现在它拥有比其他 *Pseudomonas* 更好的免疫系统.同时,CRISPR−Cas 系统也被用于微生物中的基因表达调控与环境修复功能强化[37-38].Fan 等[39]通过 CRISPR 基因编辑技术改造并优化了希瓦氏菌(*Shewanella oneidensis*)的胞外电子传递网络,其胞外电子传递能力(Extracellular electron transfer, EET)与放射性核素 U^{6+}还原能力显著提升.Li 等[40]使用 CRISPR 基因编辑技术调控 *S. oneidensis* MR−1 内 EET 相关基因的表达,增强其对有机污染物甲基橙(Methyl orange)与典型重金属 Cr^{4+}的还原能力.此外,使用 IslandPath−DIMOB 预测方法,在菌株 QYQ−1 基因组中发现 8 个 GIs,在菌株 PAO1 中发现 6 个 GIs,且包括 3 个致病岛(Pathogenicity Islands,PAIs).

表 1 假单胞菌基因组基本特征

Table 1 Genomic features of the *Pseudomonas* strains

菌株	GenBank 登录号	组装层次	长度(bp)	GC%	CDS	rRNA	tRNA	RNase P RNA	other RNA
P. jessenii QYQ−1	GCA037889415.1	Contig	6168333	60.0	5581	7	62	2	3
P. jessenii LMG 21605	GCA900104905.1	Contig	6588452	59.5	5915	26	76	1	3
P. jessenii DSM 17150	GCA002236115.1	Contig	6537026	59.5	5912	9	60	1	3
P. jessenii E2333	GCA040201735.1	Contig	6240905	60.0	5631	3	62	1	3
P. jessenii GO3	GCA003225755.1	Contig	6993317	60.0	6874	2	59	1	3
P. jessenii EC−S101	GCA006151795.1	Scaffold	6234511	60.0	5546	4	57	1	3
P. jessenii UC4332	GCA003353505.1	Scaffold	6127106	59.0	5591	9	60	1	3
P. jessenii LBp−160603	GCA003205375.1	Scaffold	6766953	59.0	5987	6	62	1	3
P. aeruginosa PAO1	GCA000006765.1	Complete	6264404	66.5	5571	13	63	1	29

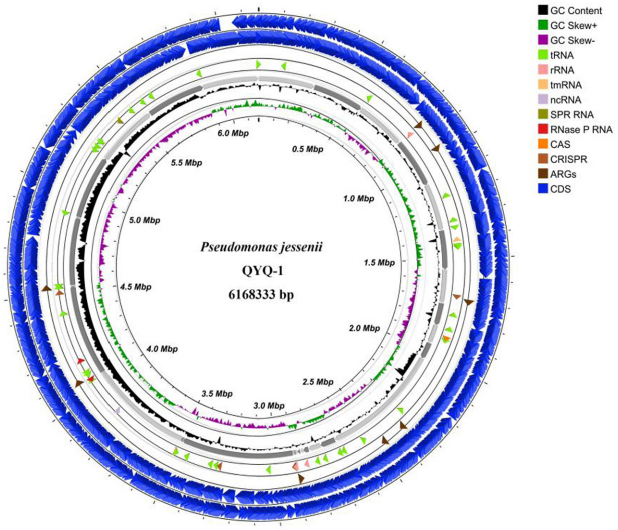


图 1 菌株 QYQ−1 的基因组图谱

Fig.1 Characteristics of the genomic of *P. jessenii* QYQ−1

2.2 菌株 QYQ−1 的系统发育与比较基因组分析

将扩增得到的菌株 QYQ−1 的 16S rRNA 基因序列上传至 NCBI 数据库中进行序列比对,菌株 QYQ−1 的 16S rRNA 序列与 *P. jessenii* 模式菌株 LMG 21605 的相似度最高(>99%),高于原核生物物种界限阈值(98.7%)[41],因此,初步鉴定菌株 QYQ−1 属于 *P. jessenii*.为了进一步确定菌株 QYQ−1 的分类学地位,我们下载了 NCBI 数据库中全部 7 株 *P. jessenii* 与部分 *Pseudomonas* 内具有代表性的 15 株菌株的全基因组序列,使用 GTDB−Tk 进行全基因组水平的物种鉴定,同时,构建基于全基因组序列的系统发育树.此外,还将全部 23 株假单胞菌进行了 ANI 值计算.

基于全基因组的 23 株假单胞菌系统发育树显示(图 2(a)),菌株 QYQ−1 与菌株 UC4332、DSM 17150 和 LMG 21605 在系统发育上最为接近,它们聚类在一个末端分支,进化距离最近,与基于 16S rRNA 的系统发育树高度相似.菌株 QYQ−1 与 *P. jessenii* 模式菌株 LMG 21605 之间的 ANI 值最高(98.5%),与菌株 UC4332、DSM 17150 之间的 ANI 值均高于 95%,菌株 UC4332、DSM 17150 与菌株 LMG 21605 之间的 ANI 值同样高于 95%(图 2(c)),表明菌株 QYQ−1、UC4332、DSM 17150 均属于 *P. jessenii*[42].此外,基于 GTDB−Tk 的全基因组菌种鉴定结果显示,菌株 QYQ−1、UC4332、DSM 17150 均属于 *P. jessenii*.值得注意的是,原先被分类为 *P. jessenii* 的菌株 LBp−160603、E2333、EC−S101 和

GO3 与其他 4 株 *P. jessenii*(菌株 QYQ-1、UC4332、DSM 17150 和 LMG 21605)在系统发育上存在分化,且与其他四株 *P.* jessenii 之间的 ANI 值较低(<85%),明显低于种内界限的 ANI 阈值(95%),此外,GTDB-Tk 结果显示菌株 LBp-160603、E2333、EC-S101、GO3 不属于 *P. jessenii*,菌株 E2333、EC-S101 分别被分类为荧光假单胞菌与恶臭假单胞菌,菌株 LBp-160603、GO3 仅被分类到 *Pseudomonas* 水平.结果表明,菌株 LBp-160603、E2333、EC-S101 和 GO3 在 NCBI 数据库中可能存在物种分类错误,建议将其重新进行物种分类.以 *P. jessenii* 模式菌株 LMG 21605 基因组作为参考序列,通过 TBtools 分析 *P. jessenii* 基因组之间的保守性和差异性(图 2(b)).结果显示,*P. jessenii* 基因组之间具有大量的同源序列,*P. jessenii* 种内遗传稳定,突变重组较少,仅有少量的易位、插入和缺失.

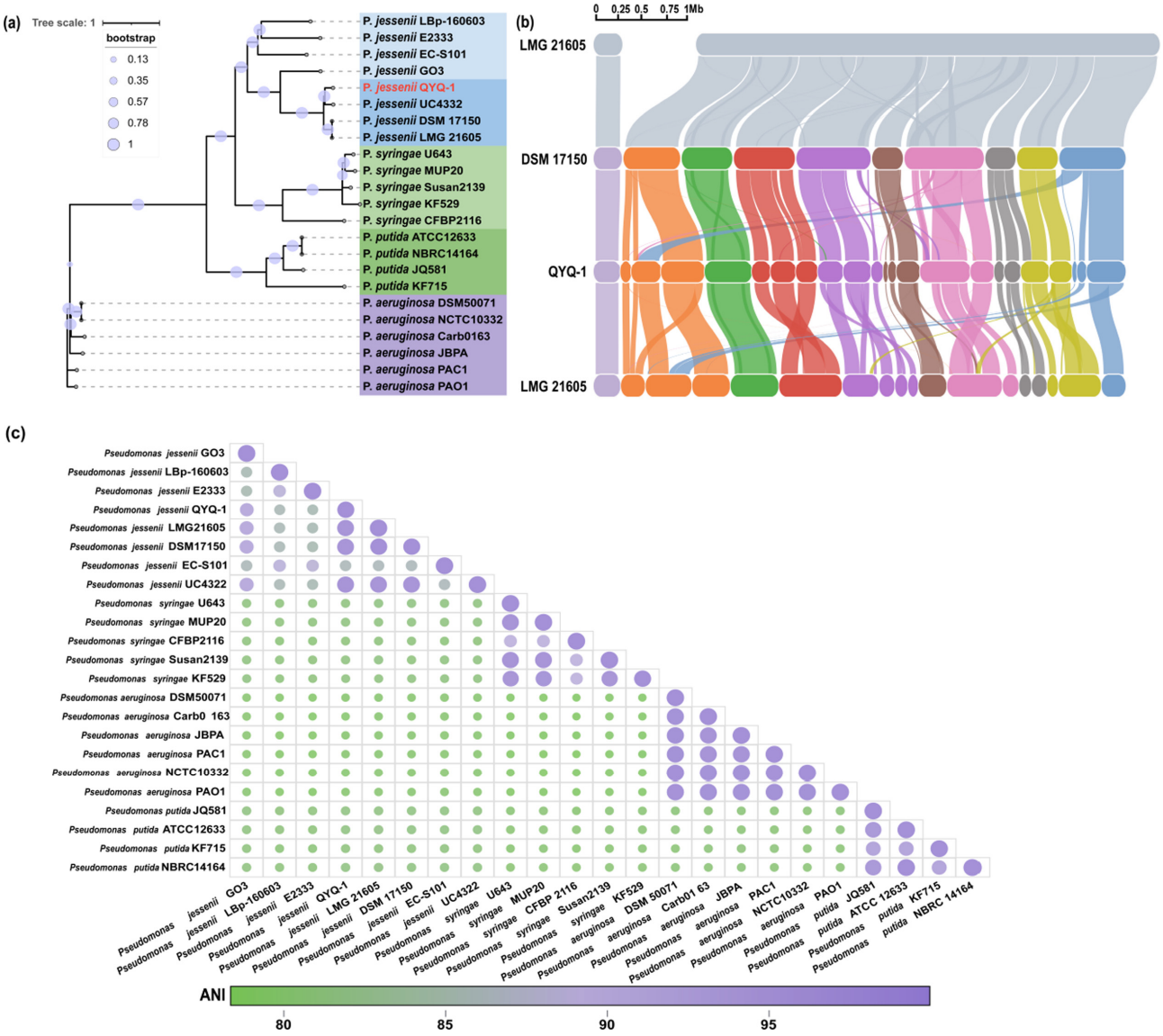


图 2　菌株 QYQ-1 的系统发育与基因组共线性分析

Fig.2　Phylogenetic and genomic collinearity analysis of strain QYQ-1

2.3　菌株 QYQ-1 的生长特性

2.3.1　菌株 QYQ-1 的生长曲线　菌株 QYQ-1 在 PP 液体培养基中接种 6h 后开始进入对数生长期(图 3),细菌数量迅速增加,在 24h 时达到峰值,后缓慢降低.综合考虑细菌的生长速度和培养基中的细菌含量,在后续测定中选择 24h 作为菌株环境适应范围的取样时间节点.

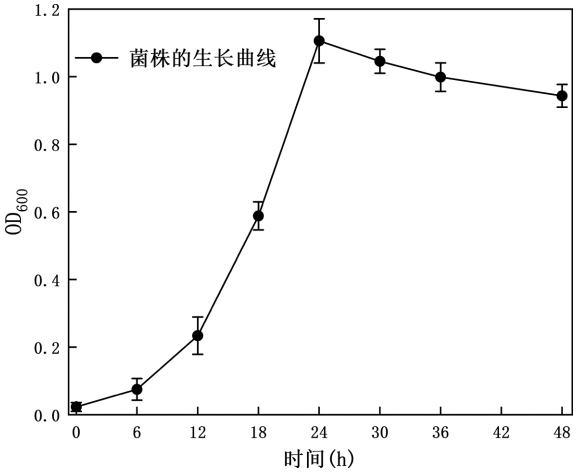


图 3 菌株 QYQ-1 的生长曲线

Fig.3 The growth curve of strain QYQ-1

2.3.2 菌株 QYQ-1 的环境适应范围 环境中的各种理化因子是影响微生物生长的重要因素.实验结果表明,菌株 QYQ-1 具有广谱的温度和酸碱度适应范围,在 15~40℃、pH 值为 5~9 均能生长,最适温度为 35℃(图 4(a)),最适 pH 值为 7(图 4(b)),广谱的温度与酸碱度适应范围有助于菌株适应各种环境,利于其在各种复杂场地中的应用.同时,菌株 QYQ-1 还拥有极强的耐盐性,在盐度 0.5%~5%均有明显的生长(图 4(c)),这有利于菌株在高盐废水中的应用.此外,菌株对多种重金属离子均有良好的抗性,在 1mmol/L 的 Cu^{2+}、Zn^{2+}、Co^{2+}、Mn^{2+}、Cd^{2+}金属离子添加下,菌株 QYQ-1 均有明显的生长((图 4d)).重金属与其他外源性有机污染物常出现复合污染的情况,良好的重金属耐受性使得菌株 QYQ-1 具有应用于重金属与其他有机污染物形成复合污染场地的潜力.

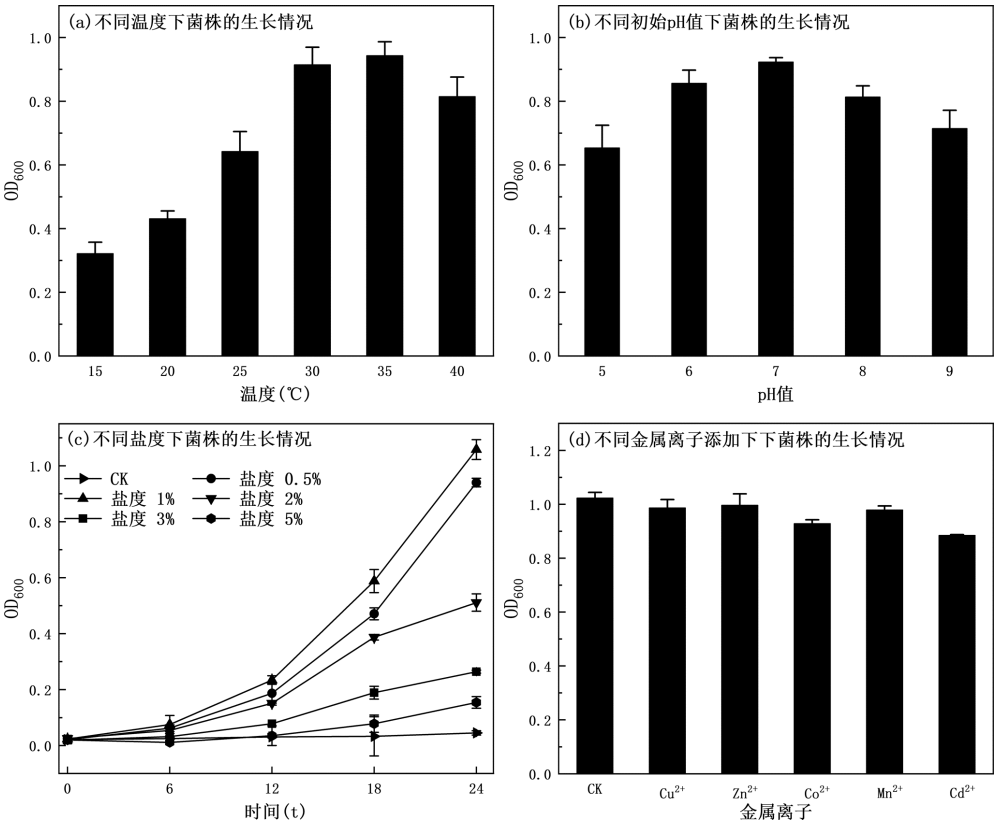


图 4 菌株 QYQ-1 的生长特性

Fig.4 The growth characteristics of strain QYQ-1

2.4 菌株 QYQ-1PAHs 降解基因鉴定与功能验证

2.4.1 菌株 QYQ-1PAHs 降解特性 选择萘作为 PAHs 代表污染物,实验共设置 6 个温度梯度(15、20、25、30、35、40℃),结果如图 5(a)所示,菌株 QYQ-1 在 15~40℃的条件下,皆可利用萘进行生长,35℃为菌株 QYQ-1 的最佳降解温度,降解率达 97.7%,30℃次之.目前许多已有的降解菌株之所以未能成功应用,其原因之一就是低温时活性差,本研究获得的菌株 QYQ-1 在 15℃和 20℃仍能发挥降解作用,即使在 15℃时,24h 仍能对 100mg/L 的萘降解率达到

65.44%,相较于其他已发现的 PAHs 降解菌株,菌株 QYQ−1 具有更好的温度适应性,有更广泛的温度应用范围.实验共设置 5 个 pH 梯度(5、6、7、8、9),其他培养条件一致,定期检测不同 pH 值条件下菌株 QYQ−1 对萘的降解效率,结果如图 5(b)所示,菌株 QYQ−1 在 pH 值 5~9 的条件下皆可利用萘进行生长,pH=7 是萘的最佳降解 pH 值,pH=6、pH=8 次之,pH=5、pH=9 条件下萘降解效率明显下降(<80%),这可能与菌株在上述情况下的长势较差有关.结果表明,中温条件 25~35℃,中性、弱酸、弱碱条件更有利于菌株 QYQ−1 对萘的降解.菌株 QYQ−1 不仅能利用萘进行生长,还具有利用苯甲酸与苯酚的能力(图 5(c)),可以在 48h 内对 100mg/L 苯甲酸和苯酚降解率达到 100%.由此可见,菌株 QYQ−1 对芳香族化合物具有广泛的降解特性,这拓宽了其应用场景.

在 PAHs 的生物降解过程中,脱氢酶可以使 PAHs 的氢原子活化并转移至特定的受氢体,使 PAHs 被氧化[43].脱氢酶活性可以一定程度上反映微生物对有机物的氧化降解能力.结果表明(图 5(d)),脱氢酶活性在前 6h 升高比较缓慢,6~36h 迅速升高,36h 后趋于平缓,菌株的脱氢酶活性、生长状况与萘的降解率表现为正相关性.

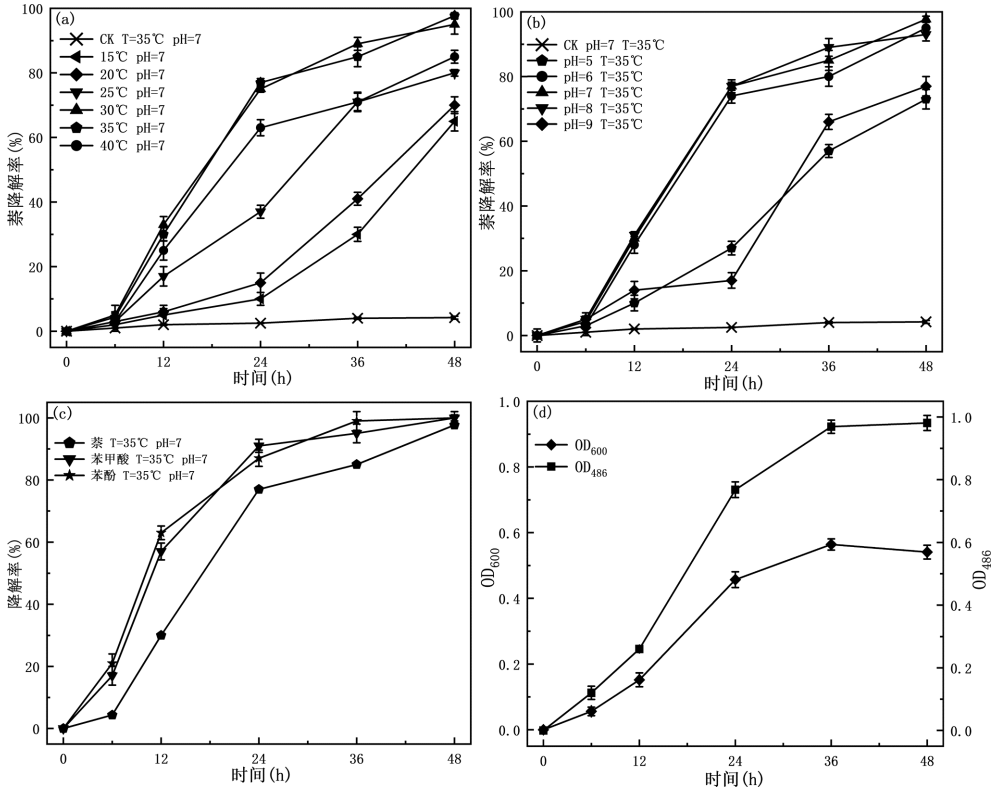


图 5　菌株 QYQ−1 的降解特性

Fig.5　Degradation characteristics of strain QYQ−1

2.4.2　菌株 QYQ−1PAHs 降解基因鉴定　菌株 QYQ−1 基因组分析结果表明,其基因组上具有苯甲酸 1,2 双加氧酶编码基因 *ben*ABC、二羟基环己二烯羧酸脱氢酶编码基因 *ben*D、儿茶酚 1,2−双加氧酶编码基因 *cat*A、黏康酸盐环异构酶编码基因 *cat*B、粘康酸内酯 D−异构酶 *cat*C、羧甲基丁烯酸内酯酶编码基因 *pca*DL、乙酰辅酶 A 酰基转移酶编码基因 *fad*AI、3−氧代己二酰辅酶 A 硫解酶编码基因 *pca*F,可以组成完整的苯甲酸盐降解和儿茶酚邻位裂解通路(图 6),这是 PAHs 重要的下游降解基因簇.此外,还发现萘与其他 PAHs 降解过程中十分重要的水杨酸羟化酶编码基因 *nah*、细胞色素 P450 编码基因 *gst*、原儿茶酸 3,4−双加氧酶编码基因 *pca*GH、乙醛脱氢酶/乙醇脱氢酶编码基因 *adh*、萘双加氧酶编码基因 *nah*Ac、2−羟基色原酮−2−羧酸异构酶编码基因 *nah*D 等 PAHs 降解的关键基因.细胞色素 P450 被证明可以介导 PAHs 产生反式二氢二醇从而降解 PAHs[44],此外,细胞色素 P450 在天然产物合成、外

源性降解、类固醇生物合成与药物代谢中起着至关重要的作用[45].水杨酸羟化酶与原儿茶酸 3,4-双加氧酶分别是 PAHs 的水杨酸途径与原儿茶酸途径中的关键基因[46].

2.4.3 菌株 QYQ-1PAHs 降解机制分析 微生物对 PAHs 的降解主要存在有氧与厌氧两种途径.PAHs 的有氧代谢途径中,氧气不仅是最终的电子受体,还直接参与芳香环羟基化和芳香环裂解[47].与之相比,PAHs 的厌氧途径则主要基于还原反应来裂解芳香环[48].已验证的 PAHs 降解菌,多数是基于加氧酶(单加氧酶或双加氧酶)催化的有氧途径实现 PAHs 的生物降解.菌株 QYQ-1 基因组中存在 *ben*ABCD、*cat*ABC、*pca*DL 与 *fad*AI 基因簇,组成完整的苯甲酸盐降解与邻苯二酚邻位裂解途径,这是 PAHs 重要的下游降解基因簇.苯甲酸在 *ben*ABC 与 *ben*D 催化下加氧脱羧为邻苯二酚,然后在 *cat*A 催化下开环裂解为顺,顺-2,4-己二烯二酸,再经 *cat*B、*cat*C 与 *pca*DL 催化异构开环生成 3-氧代己二酸,最终在 *fad*AI 与 *pca*F 共同催化下生成琥珀酰辅酶 A,进入 TCA 循环生成水和二氧化碳,实现苯甲酸盐与邻苯二酚的完全降解.此外,基因组中还携带 *gst*、*nah*、*pca*GH、*adh*、*nah*Ac、*nah*D 等 PAHs 降解的关键基因.萘双加氧酶与水杨酸羟化酶广泛存在于萘降解菌中,是萘降解速率的限制基因之一[49].细胞色素 P450、乙醛脱氢酶/乙醇脱氢酶在 PAHs 的厌氧降解过程中发挥着重要作用,且通常伴随着硝酸盐还原等还原过程[50].菌株 QYQ-1 中存在完整的同化硝酸盐还原与异化硝酸盐还原通路,推测其可能同时存在有氧与厌氧两种 PAHs 降解途径.由此推测在有氧条件下,菌株 QYQ-1 通过水杨酸途径降解 PAHs.PAHs 在加氧酶、脱氢酶和醛缩酶等酶催化作用下生成水杨酸,进入苯甲酸降解和儿茶酚邻位裂解途径,最终进入 TCA 循环实现完全降解,其潜在的厌氧降解分子机制有待进一步解析.

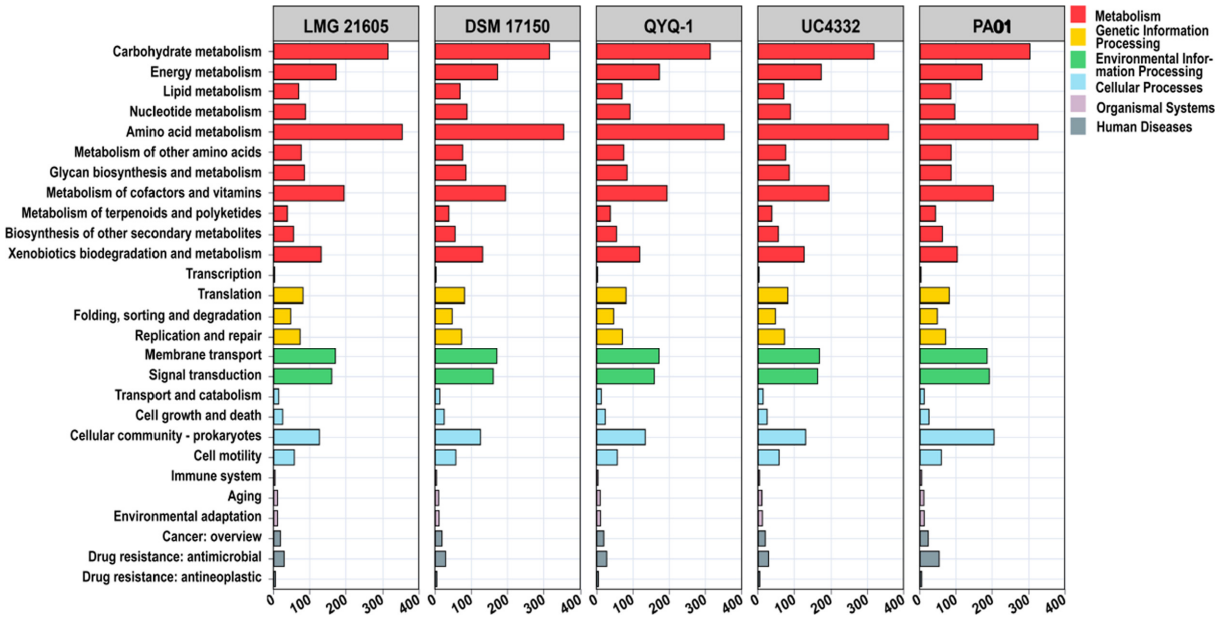


图 6 KEGG 数据库注释基因的分类条形图

Fig.6 The comparative analysis of annotated protein functions of *P. jessenii* LMG 21605, *P. jessenii* DSM 17150, *P. jessenii* QYQ-1, and *P. aeruginosa* PAO1 based on the KEGG database

2.5 菌株 QYQ-1 重金属抗性基因鉴定与分析

2.5.1 菌株 QYQ-1 重金属抗性基因鉴定 菌株 QYQ-1 对 Cu^{2+}、Zn^{2+}、Co^{2+}、Mn^{2+}、Cd^{2+}等重金属离子均具有良好的抗性(图 4(d)).通过基因组分析,在菌株 QYQ-1 基因组中鉴定出 14 个可能参与铜抗性的基因(表 2),包括 3 个编码铜抗性蛋白的基因 *pcc*A 与 *pco*BD.1 个编码铜响应转录因子 CueR 的基因(WP_102672585.1),其对维持细胞内 Cu^{2+}稳态十分重要[51].WP_340317730.1、WP_340314347.1 分别编码 P 型 Cu^{+}转运蛋白 CopA 和 P 型 Cu^{2+}转运蛋白 CopB.CopA 可以转运 Cu^{+}与 Ag^{+},不能转运二价离子,CopB 则主要转运 Cu^{2+},二者均属于 P 型 ATP 酶

家族[52].WP_340312925.1、WP_090454124.1 编码双组份调节系统 CusS/CusR.此外,还有 1 个编码多铜氧化酶的基因(WP_340314233.1),1 个编码铜周质蛋白的基因(WP_057712135.1),1 个与铜/银外排系统相关的基因簇 *cus*ABF.

锌是生命活动所必需的微量元素之一,可作为许多酶的辅助因子,高浓度的锌对细胞有毒,细菌通常采用存储或外排等策略调控锌的浓度[53].菌株 QYQ−1 基因组存在常见的锌转运蛋白系统,由 *znu*AB 基因簇与转录抑制因子 *zur* 组成,基因簇编码产物包括底物结合蛋白 ZnuA,通透酶 ZnuB 与 ATP 酶 ZnuC.基因 zur 调控细菌的锌摄取过程,位于基因 *znu*A 与 *znu*C 之间,转录方向与 *znu*BC 同向,与 *znu*A 相反[54].此外,还具有 2 个与锌/锰运输系统相关的基因(WP_057712686.1、WP_340312776.1)和 1 个编码 Zn^{2+}/Cd^{2+}输出 ATP 酶的基因(WP_340312850.1).

表 2　菌株 QYQ−1 中主要重金属抗性基因

Table 2　Heavy metal resistance related genes of strain QYQ−1

QYQ−1ORF ID	基因	功能描述
WP_057712179.1	*pcc*A	periplasmic copper chaperone A
WP_090454179.1	*pco*B	copper resistance protein B
WP_090454175.1	*pco*D	copper resistance protein D
WP_102672585.1	*cue*R	MerR family transcriptional regulator, copper efflux regulator
WP_340317730.1	*cop*A	P−type Cu^{+} transporter [EC:7.2.2.8]
WP_340314347.1	*cop*B	P−type Cu^{2+} transporter [EC:7.2.2.9]
WP_218498243.1	*cop*C	copper resistance protein C
WP_340312925.1	*cus*S	two−component system, OmpR family, heavy metal sensor histidine kinase CusS [EC:2.7.13.3]
WP_090454124.1	*cus*R	two−component system, OmpR family, copper resistance phosphate regulon response regulator CusR
WP_340314233.1	*mmc*O	multicopper oxidase [EC:1.16.3.1]
WP_057712135.1	*copZ*	copper chaperone
WP_340315694.1	*cus*A	copper/silver efflux system protein
WP_340315696.1	*cus*B	membrane fusion protein, copper/silver efflux system
WP_090454838.1	*cus*F	Cu^{+}/Ag^{+} efflux system periplasmic protein CusF
WP_057712599.1	*znu*A	zinc transport system substrate−binding protein
WP_057712600.1	*znu*B	zinc transport system permease protein
WP_007989407.1	*znu*C	zinc transport system ATP−binding protein [EC:7.2.2.20]
WP_057716421.1	*zup*T	zinc transporter, ZIP family
WP_340312850.1	*znt*A	Zn^{2+}/Cd^{2+}−exporting ATPase [EC:7.2.2.12 7.2.2.21]
WP_340315712.1	*ars*R	ArsR family transcriptional regulator, arsenate/arsenite/antimonite−responsive transcriptional repressor
WP_223532407.1	*ars*C	arsenate reductase (glutaredoxin) [EC:1.20.4.1]
WP_340315710.1	*ars*B	arsenical pump membrane protein
WP_057715353.1	*ars*H	arsenical resistance protein ArsH
WP_340312632.1	*yyd*H	putative peptide zinc metalloprotease protein
WP_057715704.1	*znt*B	zinc transporter
WP_008045818.1	*zur*	Fur family transcriptional regulator, zinc uptake regulator
WP_218494927.1	*cbi*K	nickel transport protein
WP_340312141.1	*cob*N	cobaltochelatase CobN [EC:6.6.1.2]
WP_223503310.1	*van*X	zinc D−Ala−D−Ala dipeptidase [EC:3.4.13.22]
WP_057712905.1	*pqq*L	zinc protease [EC:3.4.24.−]
WP_057716421.1	*zup*T	zinc transporter, ZIP family
WP_057714654.1	*mod*A	molybdate transport system substrate−binding protein
WP_223502676.1	*mod*C	molybdate transport system ATP−binding protein [EC:7.3.2.5]
WP_340312099.1	*mod*B	molybdate transport system permease protein
WP_340317412.1	*mod*E	molybdate transport system regulatory protein

除铜和锌外,菌株 QYQ−1 还可能对其他重金属具有抗性,如砷、铬、钴和镍等.砷离子具有强烈的生物毒性,是常见的环境污染物.菌株 QYQ−1 基因组中鉴定出与砷抗性有关的 *ars*RCBH 基因簇.该基因簇的编码产物包括调控 ars 操纵子转录过程的调控因子 ArsR,催化砷酸盐还原为亚砷酸盐的砷酸盐还原酶 ArsC 与砷抗性蛋白 ArsH[55].ArsH 是一种具有 NADPH 依赖性的 FMN 还原酶,催化三价有机砷氧

化为五价,能够效抵抗砷对细胞的氧化毒性[56].细菌一般通过铬酸盐转运蛋白 ChrA 来抵抗铬酸盐毒性[57].菌株 QYQ-1 基因组中鉴定出 2 个铬酸盐抗性基因,包括铬酸盐转运蛋白 ChrA 和铬酸盐还原酶 ChrR.此外,还鉴定出 1 个编码钴螯合酶的基因(WP_340312141.1)与 1 个编码镍转运蛋白的基因(WP_218494927.1).

2.5.2 菌株 QYQ-1 重金属抗性基因分析 重金属和 PAHs 常在环境中形成复合污染,其环境修复相比单一污染更加困难.复合污染环境中 PAHs 降解机制更加复杂,重金属可能具有不同的作用.研究发现,某些降解菌能够在重金属与 PAHs 复合污染下仍然具有高效的 PAHs 降解性能.例如,*Pseudomonas gessardii* LZ-E 可以在 10mg/L Cr^{6+}条件下,在 48h 内对 800mg/L 萘降解率达 77%[58].*Bacillus licheniformis* 和 *Bacillus sonorensis* 在 1%的多重重金属(镉、锌、铜、铬)复合污染下,在 7d 内对 100mg/L 的萘降解率达到 73%和 52%[59].甚至在某些情况下,一定浓度的重金属反而能促进 PAHs 的降解[60-61].基因组分析显示菌株 QYQ-1 携带多种重金属抗性基因和基因簇,包括铜、锌、钴、镉和砷等重金属抗性基因.迄今为止已发现在革兰氏阴性菌中存在 4 种铜抗性机制,包括 Cue、Cus、Pco 与 Cop 调控系统[62],这 4 种调控系统的相关基因均存在于菌株 QYQ-1 基因组中.完整的 Cue 调控系统需要 3 种关键蛋白(CueR、CueO、CopA).菌株 QYQ-1 中缺失 *cue*O 基因,但存在一个多铜氧化酶基因 *mmc*O,此外,*cue*O 的功能还可以由 *cop*A 替代.菌株 QYQ-1 中的 Cus 系统与 *Colibacillus* 中的类似,都包含构成 Cu/Ag 外排系统的 *cus*ABF 基因簇,编码产物包括渗透酶 CusA、周质蛋白 CusB、膜融合蛋白 CusF.Cue 与 Cop 调控系统在 *Acidithiobacillus ferrooxidans*[63] 与 *Ralstonia* spp.[64]均有过相关报道.Cop 系统由 *cop*SRABCD 基因簇构成,菌株 QYQ-1 缺少 *cop*SRD 基因,与 *Burkholderia* 中的菌株 LWK2 类似[65].Pco 系统在 *Colibacillus* 和 *P. syringae*[66]均有发现,其基因簇包含 4 个基因(*pco*ABCD),包括 1 个内膜蛋白(PcoD),1 个外膜蛋白(PcoB)和 2 个周质 Cu^{2+}结合蛋白(PcoA 和 PcoC),该系统的表达由膜感应蛋白 PcoD 与可溶性响应蛋白 PcoR 控制.菌株 *P. jessenii* QYQ-1 具有缺陷的 Pco 调控系统,其基因组中缺少 *pco*AC 基因.综上所述,菌株 QYQ-1 具有十分复杂的铜抗性系统,未来需要进一步通过实验对菌株 QYQ-1 的铜抗性机制进行深入解析.此外,菌株 QYQ-1 基因组中还发现许多与锌、砷酸盐和铬酸盐等重金属抗性相关基因.如锌转运系统相关的基因簇 *znu*ABC、砷抗性有关的基因簇 *ars*RCBH 等,表现出强大的抗重金属潜力.这说明菌株 QYQ-1 不仅可以用于 PAHs 污染场地的环境修复,对于更加难以修复的重金属与 PAHs 复合污染场地也具有潜在应用价值.

2.6 菌株 QYQ-1 铁摄取系统

菌株 QYQ-1 在 VFDB 数据库中注释到 194 个毒力因子,其中 23 个基因和铁摄取(Iron uptake)有关(图 7),参与 Pyochelin、Pyoverdine、Yersiniabactin 三种铁载体的合成.多数酶利用金属离子作为一种辅助因子来维持正常的酶活,因此,金属离子是细菌生存所必须的[67].铁载体的存在使得细菌具有强大的金属获取能力,它们产生的金属基团可以螯合环境中的金属离子,使其可以适应生长条件的变化.Pyoverdine 具有很高的铁离子亲和能力,可以高效地螯合并摄取低铁环境中的铁元素,同时, Pyoverdine 也是一种群体感应分子,其在细菌内会不断地少量产生[68].此外,其还作为信号分子来引导内切蛋白酶 *Prp*L(Endo-proteinase *Prp*L)和外毒素 A(Exotoxin A)的产生[69-70].Pyoverdine 的合成由非核糖体肽酶(Non-ribosomal peptide synthetases, NRPSs)主导[71],菌株 QYQ-1 基因组中具有合成 NRPSs 的完整 *pvd*LIJD 基因簇.此外,还含有铁载体跨膜运输的 PvdE 转运蛋白,可以将成熟的铁载体释放到细胞膜外[72].另一种铁载体是 Pyochelin,其铁离子亲和能力低于 Pyoverdine[73],且参与其生物合成的基因较少,Pyochelin 最先是在 *P. aeruginosa* 中发现的,研究表明,只有当环境中的铁离子浓度变得极低时,*P. aeruginosa* 才会合成 Pyochelin[74],Pyochelin 的存在可以使菌株 QYQ-1 更好的适应低铁环境.Yersiniabactin 是一种编码在 PAIs 上的铁载体,广泛存在耶尔森菌科(*Yersiniae*)内的细菌中,其三价铁离子结合基团包括噻唑啉、恶唑啉或甲基恶唑啉环,其合成通过非核糖体肽酶(NRPS)/聚酮合酶(Polyketide synthase,PKS)混合机制进行[75].菌株 QYQ-1 具有合成多种铁载体的潜力,这赋予其更好

的环境适应能力,使其与在同一生态位的其他生物体的竞争中更具优势.

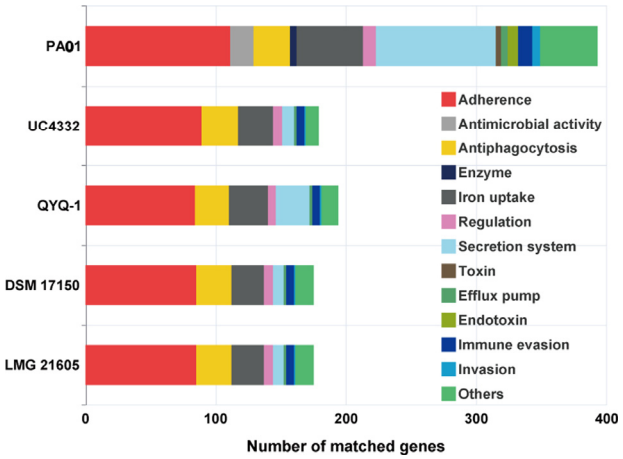


图 7　VFDB 数据库注释基因的分类条形图

Fig.7　The comparative analysis of annotated protein functions of *Pseudomonas* based on the VFDB database

3　结论

3.1　筛选出一株高效 PAHs 降解菌 *P. jessenii* QYQ−1.该菌株具有广泛的温度(15~40℃)和 pH 值(5~9)适应范围、优良的耐盐性(0.5%~5%)和良好的重金属抗性(Cu^{2+}、Zn^{2+}、Co^{2+}、Mn^{2+}、Cd^{2+}).尤其在低温(15℃)、高盐(5%)以及重金属胁迫条件下表现出显著的抗性特征,展现出优异的应用潜力.

3.2　菌株 QYQ−1 可在 35℃、pH=7、盐度 1%条件下,对 100mg/L 萘在 48h 内降解率达到 97.7%.同时,菌株 QYQ−1 还可以高效降解苯甲酸和苯酚等芳香族化合物,可以在 48h 内实现对 100mg/L 苯甲酸与苯酚的完全降解.

3.3　菌株 QYQ−1 具有多种 PAHs 降解过程中的关键基因,还携带大量铜、锌、钴、砷、镉等重金属抗性基因.此外,菌株 QYQ−1 还具有强大的铁摄取系统.这些独特优势拓展了菌株 QYQ−1 的应用范围,不仅可以用于 PAHs 污染场地的环境修复,还具有应用于重金属和 PAHs 复合污染场地环境修复的潜力.

参考文献：

[1] Sun J L, Zeng H, Ni H G. Halogenated polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment [J]. Chemosphere, 2013,90(6):1751−1760.

[2] Barbosa F, Rocha B A, Souza M C O, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): Updated aspects of their determination , kinetics in the human body , and toxicity [J]. Journal of Toxicology and Environmental Health−part B−critical Reviews, 2023,26(1): 28−65.

[3] Cheruiyot N K, Lee W, Mwangi J K, et al. An overview : Polycyclic aromatic hydrocarbon emissions from the stationary and mobile sources and in the ambient air [J]. Aerosol and Air Quality Research, 2015,15(7):2730−2762.

[4] Huang Y, Li K, Liu H, et al. Distribution, sources and risk assessment of PAHs in soil from the water level fluctuation zone of Xiangxi Bay, Three Gorges Reservoir [J]. Environmental Geochemistry and Healt, 2022,44(8):2615−2628.

[5] Pang L, Zhang S, Wang L, et al. Pollution characteristics and risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediment of wei river [J]. Environmental Earth Sciences, 2021,80(5):203−214.

[6] Ghosal D, Ghosh S, Dutta T K, et al. Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review [J]. Frontiers in Microbiology, 2016,31(7):1369−1371.

[7] Yuan S, Han X, Yin X, et al. Nitrogen transformation promotes the anaerobic degradation of PAHs in water level fluctuation zone of the three gorges reservoir in yangtze river, China: Evidences derived from in − situ experiment [J]. Science of the Total Environment, 2023,864: 161034.

[8] Cheng D, Xiong J, Dong L, et al. Spatial distribution of PAHs and microbial communities in intertidal sediments of the pearl river estuary, south china [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2024,284:109992.

[9] Okere U V, Semple K T. Biodegradation of PAHs in 'pristine' soils from different climatic regions [J]. Journal of Bioremediation & Biodegradation, 2011,1:1−11.

[10] Lv S, Li Y, Zhao S, et al. Biodegradation of typical plastics: From microbial diversity to metabolic mechanisms [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024,25(1):593−518.

[11] Xu X, Liu W, Tian S, et al. Petroleum hydrocarbon−degrading bacteria for the remediation of oil pollution under aerobic conditions: A perspective analysis [J]. Frontiers in Microbiology, 2018,9:2885−2896.

[12] Premnath N, Mohanrasu K, Rao R, et al. A crucial review on polycyclic aromatic hydrocarbons − environmental occurrence and strategies for microbial degradation [J]. Chemosphere, 2021,280:1−14.

[13] Ali M, Song X, Ding D, et al. Bioremediation of PAHs and heavy metals co−contaminated soils: Challenges and enhancement strategies [J]. Environmental Pollution, 2022, 295:118686.

[14] Qin Y, Wang D, Brandt K K, et al. Two draft genome sequences of Pseudomonas jessenii strains isolated from a copper contaminated site in Denmark [J]. Standards in Genomic Sciences, 2016,11:86−95.

[15] Deora A, Hatano E, Tahara S, et al. Inhibitory effects of furanone metabolites of a rhizobacterium, Pseudomonas jessenii, on phytopathogenic Aphanomyces cochlioides and Pythium aphanidermatum [J]. Plant Pathology, 2010,59(1):84−99.

[16] Harma I P, Sharma A K, Prashad L, et al. Natural bacterial cell−free extracts with powerful nematicidal activity on root−knot nematode [J]. Rhizosphere, 2018,5:67−70.

[17] Tobin K M, O'Leary N D, Dobson A D W, et al. Effect of heterologous

expression of phaG [(R)−3−hydroxyacyl−ACP−CoA transferase] on polyhydroxyalkanoate accumulation from the aromatic hydrocarbon phenylacetic acid in Pseudomonas species [J]. Fems Microbiology Letters, 2007,268(1):9−15.

[18] Belgacem Z B, Bijttebier S, Verreth C, et al. Biosurfactant production by Pseudomonas strains isolated from floral nectar [J]. Journal of Applied Microbiology, 2015,118(6):1370−1384.

[19] Sudhir K, Glen S, Koichiro T. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. Molecular Biology & Evolution, 2016,33(7):1870−1874.

[20] Chaumeil P A, Mussig A J, Hugenholtz P, et al. GTDB−Tk: a toolkit to classify genomes with the genome taxonomy database [J]. Bioinformatics, 2019,36(6):1925−1927.

[21] Davis M P A , Van Dongen S , Abreu−Goodger C , et al. Kraken: A set of tools for quality control and analysis of high−throughput sequence data [J]. Methods, 2013,63(1):41−49.

[22] Chen S. Ultrafast one − pass FASTQ data preprocessing, quality control, and deduplication using fastp [J]. iMeta, 2023,2(2):107−112.

[23] Bankevich A, Nurk S, Antipov D, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single−cell sequencing [J]. Journal of Computational Biology, 2012,19(5):455−477.

[24] Alexey G, Vladislav S, Nikolay V, et al. Quast: quality assessment tool for genome assemblies [J]. Bioinformatics, 2013,29(8):1072−1075.

[25] Li W, O'Neill K R, Haft D H, et al. RefSeq: expanding the prokaryotic genome annotation pipeline reach with protein family model curation [J]. Nucleic Acids Research, 2021,49(1):1020−1028.

[26] Cantalapiedra C P, Ana H, Ivica L, et al. EggNOG−mapper v2: Functional annotation, orthology assignments, and domain prediction at the metagenomic scale [J]. Molecular Biology and Evolution, 2021, 38(12):5825−5829.

[27] Claire B, Laird M R, Williams K P, et al. IslandViewer 4: expanded prediction of genomic islands for larger−scale datasets [J]. Nucleic Acids Research, 2017,45(1):30−35.

[28] Makarova K, Wolf Y, Iranzo J, et al. Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2and derived variants [J]. Nature Reviews Microbiology, 2019,18:67−83.

[29] Chan P P, Lowe T M. tRNAscan−SE: Searching for tRNA genes in genomic sequences [J]. Gene Prediction, 2019,1962:1−14.

[30] Grant J R, Enns E, Marinier E, et al. Proksee: in−depth characterization and visualization of bacterial genomes [J]. Nucleic Acids Research, 2023,51(1):484−492.

[31] Chirag, Jain, Luis M, et al. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries [J]. Nature Communications, 2018,9(1):5114−5122.

[32] Chen C, Wu Y, Li J X Z J. TBtools−II: A "one for all, all for one"bioinformatics platform for biological big−data mining [J]. Molecular Plant, 2023,16(11):1733−1742.

[33] Lan P, Zhou B, Tan M, et al. Structural insight into precursor ribosomal RNA processing by ribonuclease MRP [J]. Science, 2020, 369(6504):656−663.

[34] Hopper A K, Huang H Y. Quality control pathways for nucleus−encoded eukaryotic tRNA biosynthesis and subcellular trafficking [J]. Molecular & Cellular Biology, 2015,35(12):2052−2058.

[35] Xu C, Chen G, Luo Y, et al. Rational designs of in vivo CRISPR−Cas delivery systems [J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2021,168:3−29.

[36] Xie Y, Zhang L, Gao Z, et al. AcrIF5specifically targets DNA−bound CRISPR−Cas surveillance complex for inhibition [J]. Nature Chemical Biology, 2022,18(6):670−677.

[37] 程洲华,俞汉青.面向微生物的 CRISPR 基因编辑工具的功能应用 [J]. 自然杂志, 2024,46(5):317−329.
Cheng Z H, Yu H Q. Functional applications of CRISPR gene editing tools for microbes [J]. Chinese Journal of Nature, 2024,46(5):317−329.

[38] Wu J, Cheng Z H, Min D, et al. CRISPRi system as an efficient, simple platform for rapid identification of genes involved in pollutant transformation by aeromonas hydrophila [J]. Environmental Science and Technology, 2020,54(6):3306−3315.

[39] Fan Y Y, Tang Q, Li F H, et al. Enhanced bioreduction of radionuclides by driving microbial extracellular electron pumping with an engineered CRISPR platform [J]. Environmental Science and Technology, 2021,55(17):11997−12008.

[40] Li J, Tang Q, Li Y, et al. Rediverting electron flux with an engineered CRISPR−ddAsCpf1system to enhance pollutant degradation capacity of Shewanella oneidensis [J]. Environmental Science and Technology, 2020,54(6):3599−3608.

[41] Meier−Kolthoff J P, Goeker M. TYGS is an automated high−throughput platform for state−of−the−art genome−based taxonomy [J]. Nature Communications, 2019,10(1):2182−2192.

[42] Yoon S, Ha S, Lim J, et al. A large−scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity [J]. Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology, 2017, 110(10):1281−1286.

[43] Imam A, Suman S K, Kanaujia P K, et al. Biological machinery for polycyclic aromatic hydrocarbons degradation: A review [J]. Bioresource Technology, 2022,343:126121.

[44] Moody J D, Freeman J P, Fu P P, et al. Degradation of benzo[a]pyrene by mycobacterium vanbaalenii PYR−1 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004,70(1):340−345.

[45] Li Z, Jiang Y, Guengerich F P, et al. Engineering cytochrome P450enzyme systems for biomedical and biotechnological applications [J]. Journal of Biological Chemistry, 2020,295(3):833−849.

[46] 马 静.多环芳烃降解菌的筛选、降解机理及降解性能研究 [D]. 大连:大连理工大学, 2013.
Ma J. Isolation of PAHs−degrading bacteria and characterization of the degradation metabolism [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2013.

[47] Debajyoti G, Shreya G, Dutta T K, et al. Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review [J]. Frontiers in Microbiology, 2016,7:1369−96.

[48] Foght J. Anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons: Pathways and prospects [J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2008,15(2/3):93−120.

[49] Bosch R, García−Valdés E, Moore E. Complete nucleotide sequence and evolutionary significance of a chromosomally encoded naphthalene−degradation lower pathway from *Pseudomonas* stutzeri

AN10 [J]. Gene, 2000,245(1):65-74.

[50] Carmona M, Zamarro M T, Blazquez B, et al. Anaerobic catabolism of aromatic compounds: a genetic and genomic view [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2009,73(1):71-133.

[51] Adaikkalam V, Swarup S. Molecular characterization of an operon, cueAR, encoding a putative P1-type ATPase and a MerR-type regulatory protein involved in copper homeostasis in *Pseudomonas putida* [J]. Microbiology-SGM, 2002,148:2857-2867.

[52] Purohit R, Ross M O, Batelu S, et al. Cu+-specific CopB transporter: revising P 1B -type ATPase classification [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(9):2108-2113.

[53] Maret W. Zinc in cellular regulation: The nature and significance of "Zinc signals" [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(11):2285-2297.

[54] Hantke K. Bacterial zinc uptake and regulators [J]. Current Opinion in Microbiology, 2005,8(2):196-202.

[55] Rodionov D A, Vitreschak A G, Mironov A A, et al. Comparative genomics of the vitamin B12 metabolism and regulation in prokaryotes [J]. Journal of Biological Chemistry, 2003,278(42):41148-41159.

[56] Paez-Espino A D, Nikel P I, Chavarria M, et al. ArsH protects *Pseudomonas putida* from oxidative damage caused by exposure to arsenic [J]. Environmental Microbiology, 2020,22(6):2230-2242.

[57] Pimentel B E, Moreno-Sánchez R, Cervantes C. Efflux of chromate by Pseudomonas aeruginosa cells expressing the ChrA protein [J]. FEMS Microbiology Letters, 2002,212(2):249-254.

[58] Huang H, Wu K, Khan A, et al. A novel *Pseudomonas gessardii* strain LZ-E simultaneously degrades naphthalene and reduces hexavalent chromium [J]. Bioresource Technology, 2016,207:370-378.

[59] Staninska-Pita J, Czarny J, Piotrowska-Cyplik A, et al. Heavy metals as a factor increasing the functional genetic potential of bacterial community for polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation [J]. Molecules, 2020,25(2):319-334.

[60] Liu S H, Zeng G M, Niu Q Y, et al. Bioremediation mechanisms of combined pollution of PAHs and heavy metals by bacteria and fungi: A mini review [J]. Bioresource Technology, 2016,224:25-33.

[61] Thavamani P, Megharaj M, Naidu R. Bioremediation of high molecular weight polyaromatic hydrocarbons co-contaminated with metals in liquid and soil slurries by metal tolerant PAHs degrading bacterial consortium [J]. Biodegradation, 2012,23(6):823-835.

[62] Bondarczuk K, Piotrowska-Seget Z. Molecular basis of active copper resistance mechanisms in Gram-negative bacteria [J]. Cell Biology and Toxicology, 2013,29(6):397-405.

[63] 蔺菲菲.嗜酸性氧化亚铁硫杆菌 Cop 和 Cus 系统抗铜机制研究及铜离子生物传感器初探 [D]. 济南:山东大学, 2020.
Lin F F. Studies on the copper resistant mechanism of Cop and Cus systems in *Acidithiobacillus ferrooxidans* and preliminary study on copper biosensor [D]. Jinan: Shandong University, 2020.

[64] 王晓宁.青枯菌 copSRABCD 基因簇铜抗性作用机理及表达调控研究 [D]. 北京:中国农业科学院, 2019.
Wang X N. Research on the mechanism of copper resistance and expression regulation of *cop*SRABCD gene cluster in *Ralstonia solanacearum* [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences Dissertation, 2019.

[65] 晋婷婷,曹永清,李云玲,等.一株连香树根际促生细菌 LWK2 的分离鉴定及其全基因组序列分析 [J]. 微生物学通报, 2023,50(5):1917-1940.
Jin T T, Cao Y Q, Li Y L, et al. Isolation, identification, and whole-genome sequence analysis of a plant growth-promoting bacterium LWK2from Cercidiphyllum japonicum rhizosphere [J]. Microbiology China, 2023,50(5):1917-1940.

[66] Silver S, Ji G. Newer systems for bacterial resistances to toxic heavy metals [J]. Environmental Health Perspectives, 1994,102(3):107-113.

[67] Foster A W, Osman D, Robinson N J. Metal preferences and metallation [J]. Journal of Biological Chemistry, 2014,289(41):28095-28103.

[68] Miethke M, Marahiel M A. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2007,71(3):413-51.

[69] Wilderman P J, Vasil A I, Johnson Z, et al. Characterization of an endoprotease (PrpL) encoded by a PvdS-regulated gene in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Infection and Immunity, 2001,69(9): 5385-5394.

[70] Lamont I L, Beare P A, Ochsner U, et al. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002,99(10):7072-7077.

[71] Ackerley D F, Caradoc-Davies T T, Lamont I L. Substrate specificity of the nonribosomal peptide synthetase PvdD from *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Journal of Bacteriology, 2003,185(9):2848-2855.

[72] Yeterian E, Martin L W, Guillon L, et al. Synthesis of the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* involves a periplasmic maturation [J]. Amino Acids, 2010,38(5):1447-1459.

[73] Serino L, Reimann C, Visca P, et al. Biosynthesis of pyochelin and dihydroaeruginoic acid requires the iron-regulated *pch*DCBA operon in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Journal of Bacteriology, 1997,179(1): 248-257.

[74] 于　珊,马旅雁.铜绿假单胞菌铁摄取与生物被膜形成研究进展 [J]. 生物工程学报, 2017,33(9):1489-1512.
Yu S, Ma L Y. Iron uptake and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2017,33(9):1489-1512.

[75] Perry R D, Fetherston J D. Yersiniabactin iron uptake: Mechanisms and role in *Yersinia pestis* pathogenesis [J]. Microbes and Infection, 2011,13(10):808-817.

作者简介：秦银秋(1998-),男,重庆人,重庆大学硕士研究生,研究方向为环境微生物技术.发表论文 1 篇.qinyinqiuchina@163.com.