



## 深渊来源 *Citricoccus* sp. strain NyZ702 的分离培养及其降解 4-羟基苯甲酸的特性

凌浩 许楹\* 周宁一

上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室 上海 200240

**摘要:**【背景】深渊沉积物中存在丰富的微生物细胞和活跃的微生物碳周转,因此,分离培养微生物资源对于认识深渊中的物质循环、能量代谢具有重要意义。芳香化合物在环境中广泛存在,基于组学分析揭示了深渊中具有潜在的芳香化合物代谢菌株,然而深渊来源的芳香化合物降解微生物纯培养和相关的代谢机理研究仍然缺乏。【目的】从马里亚纳海沟沉积物样本中分离培养具有降解芳香化合物能力的微生物,对其代谢途径、中间产物和降解酶活力进行初步鉴定。【方法】以 4-羟基苯甲酸为唯一碳源对马里亚纳海沟沉积物样本中的降解菌株进行分离培养,结合形态观察、16S rRNA 基因扩增与序列分析对菌株进行鉴定,通过底物生长实验验证其降解能力,通过高效液相色谱和超高效液相色谱-飞行时间质谱联用仪初步鉴定全细胞生物转化中间产物,利用紫外分光光度计测定其粗酶液催化 4-羟基苯甲酸的活力,进而推测菌株降解 4-羟基苯甲酸的代谢途径。【结果】从深渊沉积物中分离培养获得一株好氧细菌,16S rRNA 基因序列分析显示该菌株隶属于柠檬球菌属 (*Citricoccus*),命名为 *Citricoccus* sp. strain NyZ702。该菌株在 LB 固体培养基上经 30 °C 培养 4 d 后呈柠檬黄色、不透明、表面光滑、边缘整齐、凸出于培养基表面、直径约为 1–2 mm 的圆形菌落。扫描电镜表明菌体呈球形,直径为 0.4–0.6 μm,无鞭毛结构。该菌株为耐盐菌,最适生长盐浓度范围为 2%–8% (质量体积分数)。该菌株可利用 4-羟基苯甲酸为唯一碳源进行生长,可转化 4-羟基苯甲酸至中间产物原儿茶酸,推测该菌株通过原儿茶酸途径降解 4-羟基苯甲酸。菌株 NyZ702 的粗酶液具有 4-羟基苯甲酸单加氧酶活力,对 4-羟基苯甲酸的催化反应需要还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADPH) 作为辅因子。【结论】从深渊沉积物样本分离得到一株 4-羟基苯甲酸降解菌 *Citricoccus* sp. strain NyZ702,该菌株以原儿茶酸为中间代谢产物降解 4-羟基苯甲酸,丰富了深渊来源的微生物菌种资源,为深渊中的芳香化合物降解研究提供了一定的理论基础。

**关键词:** 海斗深渊, 微生物分离, 芳香化合物降解, 原儿茶酸途径

**Foundation items:** National Key Research and Development Program of China (2018YFC0309800); National Natural Science Foundation of China (91951106)

\*Corresponding author: Tel: 86-21-34208261; E-mail: ying.xu@sjtu.edu.cn

Received: 19-02-2021; Accepted: 13-03-2021; Published online: 29-03-2021

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC0309800); 国家自然科学基金(91951106)

\*通信作者: Tel: 021-34208261; E-mail: ying.xu@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2021-02-19; 接受日期: 2021-03-13; 网络首发日期: 2021-03-29

## Isolation of a hadal trench-derived *Citricoccus* sp. strain NyZ702 capable of 4-hydroxybenzoate degradation

LING Hao XU Ying\* ZHOU Ningyi

State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

**Abstract:** [Background] Hadal trench sediments have been reported to harbor abundant microbial cells and have active microbial carbon turnover. Therefore, isolation of microbial resources from trench sediments is of great significance for understanding the biogeochemical cycle and energy metabolism in the hadal trench. It is well known that aromatic compounds are widely spread in the environments. Omics analysis has revealed possible presence of aromatics-degrading microbes in the trench environment. However, there were little reports on the pure culture of trench derived aromatics-degrading microbes nor the possible degradation mechanism. [Objective] To isolate and cultivate bacteria capable of aromatics degradation from the Mariana Trench sediments and characterize its degradation pathway. [Methods] 4-Hydroxybenzoate (4HBA) was used as the sole carbon source to isolate bacteria from the Mariana Trench sediment. Morphological observation and phylogenetic analysis were used to identify the isolate. Growth curves were conducted to verify its optimum growth conditions and degradation ability. The metabolic intermediates during whole cells transformation and the activity of crude cell extracts against the substrate were analyzed, based on which a putative catabolic pathway was reconstructed. [Results] An aerobic bacterium was isolated from the trench sediment and belonged to *Citricoccus* genus, according to the phylogenetic analysis of its 16S rRNA gene. Colonies of this bacterium, designated *Citricoccus* sp. strain NyZ702, on LB agar plate were lemon yellowish, opaque, swell, neat edge and round with a diameter of 1–2 mm after 4-day cultivation at 30 °C. Cells observed with Scanning Electric Microscope were spherical with a diameter of 0.4–0.6 μm without flagella. The strain was halotolerant with an optimal salt concentration of 2%–8% (*W/V*). The strain was able to utilize 4HBA as the sole carbon source and protocatechuate was detected as its catabolic intermediate, indicating it degraded 4HBA through the protocatechuate pathway. The cell extracts of this strain showed monooxygenase activity against 4HBA using NADPH as the cofactor. [Conclusion] A 4HBA degrading bacterium, *Citricoccus* sp. strain NyZ702 was isolated from the trench sediment and its 4HBA degradation was via protocatechuate as the intermediate metabolite. This study would enrich the microbial resources derived from the hadal trench, providing a certain theoretical foundation for the future research of aromatics degradation in the hadal trenches.

**Keywords:** hadal trench, microbial isolation, aromatics degradation, protocatechuate pathway

海斗深渊(Hadal trenches), 简称深渊, 专指海洋中深度大于 6 000 m 的海沟区域, 占据了海洋深度的 45%<sup>[1]</sup>。深渊由相邻的地壳板块挤压形成, 在板块交界处呈“V”字形截面<sup>[1-2]</sup>, 其内部具有黑暗、低温、静水压随深度增加而不断增长<sup>[3]</sup>的环境特点, 代表了地球上非常独特的海洋极端环境。由于相邻大陆板块有机质的输入、表层海水中光合作用产生的有机物垂直沉降、海洋高等生物尸体的腐肉

掉落、深渊地形和重力共同作用下大陆斜坡有机质的横向迁移以及深渊内部地质活动相关的化能合成作用, 深渊海沟被认为是有机物积累的“漏斗”, 可能在调节全球碳循环和气候变化方面发挥关键作用<sup>[4]</sup>。深渊里孕育了地球上最神秘的生态系统, 有着特有的洋流运动, 与上层海洋与海底之间存在着广泛的物质和能量交换。全球共有 37 条深海沟, 其中 9 条最深的海沟(包括马里亚纳海沟)分布在西

太平洋。

马里亚纳海沟是目前所知地球上最深的海沟,南端的挑战者深渊深度达到 11 000 m,是地球表面已知最深处。已有研究报道马里亚纳海沟沉积物中存在丰富的微生物细胞和活跃的微生物碳周转<sup>[5]</sup>,因此,探究深渊中的微生物群落组成、分离培养微生物资源对于认识深渊中的物质循环、能量代谢具有重要意义。对深渊水体及沉积物样本中原核生物小亚基核糖体 RNA (Small Subunit Ribosomal RNA, SSU rRNA)基因及特定代谢途径关键基因的测序分析结果表明: 马里亚纳海沟的微生物群落以细菌占主导地位<sup>[3,6-7]</sup>,不同微生物可能在氮循环<sup>[3]</sup>、硫循环<sup>[8]</sup>以及有机碳循环的烷烃降解<sup>[9-10]</sup>过程中发挥重要生态学功能。其中,有报道通过微生物分离培养手段从沉积物样品中获得食烷菌属 (*Alcanivorax*)的 3 株菌具有烷烃降解能力<sup>[10]</sup>。

作为地球有机碳循环的另一个重要组成部分<sup>[11-13]</sup>,芳香化合物的降解也备受关注。芳香化合物在环境中广泛存在,来源包括芳香族氨基酸、木质素分解产物、植物次级代谢产物、石油衍生物和广泛应用于工业生产的人工合成芳香化合物<sup>[14]</sup>。陆源微生物对芳香化合物的降解已经得到广泛研究: 有氧降解过程中,微生物主要通过外周代谢途径将芳香化合物转变为 3 种中心代谢产物——邻苯二酚(Catechol)、原儿茶酸(Protocatechuate)和龙胆酸(Gentisate),再经双加氧酶催化开环,生成产物进入三羧酸循环<sup>[15]</sup>; 无氧降解过程中,厌氧微生物主要通过引入还原型辅酶 A (CoASH)形成厌氧中心代谢产物,如苯甲酰辅酶 A (Benzoyl-CoA)、苯乙酰辅酶 A (Phenylacetyl-CoA),从而进入下游代谢<sup>[13]</sup>。目前对于深渊环境中芳香化合物的代谢研究则是基于测序分析揭示了深渊中具有潜在的芳香化合物代谢菌株<sup>[6,8-10,16]</sup>,特别是深渊来源的芳香化合物降解微生物纯培养仍然缺乏。

本研究从马里亚纳海沟沉积物样品中分离筛选具有 4-羟基苯甲酸降解能力的细菌,通过形态观察和分子生物学分析对该降解菌株进行鉴定,进

一步分析降解产物、检测关键酶的活力、重构该菌株对 4-羟基苯甲酸的代谢途径,以期丰富我国海洋菌种资源库,初步认识深渊中微生物驱动的芳香化合物降解机制,为深渊中的芳香化合物降解研究提供一定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品来源

样品为 2016 年采集于马里亚纳海沟挑战者深渊(10.889 5°N, 142.226 0°E) 6 300 m 的沉积物,采集深度为 16–20 cm。沉积物用无菌袋密封,常压下保存于 4 °C 冷库。

#### 1.1.2 培养基及主要试剂和仪器

LB 培养基(g/L): Yeast Extracts 5.0, Tryptone 10.0, NaCl 10.0。人工海水(Artificial Seawater, ASW)培养基的配制参照文献[17],在此基础上将 NaHCO<sub>3</sub> 替换为 0.6% (体积分数) 0.2 mol/L NaOH 以调节 pH 至 7.5。以上培养基添加 1.5% (质量体积分数) 琼脂粉制成固体培养基。磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Solution, PBS) (g/L): NaCl 8.00, KCl 0.20, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24, pH 7.4。

4-羟基苯甲酸(4-Hydroxybenzoate, 4HBA)、原儿茶酸(Protocatechuate, PCA)购自生工生物工程(上海)股份有限公司,将 2 种物质分别溶于 50 mmol/L NaOH 溶液,配制成 200 mmol/L 钠盐溶液,冻存于-20 °C。还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, NADPH)、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide, NADH)购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司。PrimeSTAR<sup>®</sup> Max DNA Polymerase 购自宝日医生物技术(北京)有限公司。引物合成由上海派森诺生物科技股份有限公司完成。

高效液相色谱仪(HPLC),沃特世科技(上海)有限公司;超高效液相色谱-飞行时间质谱联用仪(Ultra Performance Liquid Chromatography-Time of

Flight Mass Spectrometry, UPLC-TOFMS), 安捷伦科技有限公司; 拉曼图像-扫描电子显微镜联用仪, 泰思肯(中国)有限公司。

## 1.2 菌株的分离培养

将深渊沉积物样品按 2% (质量体积分数) 接种至 ASW 培养基, 添加 30 mmol/L 葡萄糖和 10 mmol/L N-乙酰葡萄糖胺, 于高压装置中(60 MPa) 15 °C 预培养 6 个月。将预培养后的固液混合物于 4 °C、1 900×g 离心 10 min 后弃上清, 用等体积的无菌 PBS (pH 7.4) 洗净沉淀并重悬, 按 10% (体积分数) 转接至以 1 mmol/L 4-羟基苯甲酸为唯一碳源的 ASW 培养基, 于高压装置中(60 MPa) 进行 15 °C 富集培养, 4 个月后取 150 μL 培养物涂布于以 1 mmol/L 4-羟基苯甲酸为唯一碳源的 ASW 固体培养基, 15 °C 静置培养 1 个月后, 从平板上挑取菌落进行二次划线, 30 °C 培养 10 d 后挑取单菌落于 LB 液体培养基中, 30 °C、180 r/min 培养 5 d, 将得到的纯培养贮存于 25% (体积分数) 甘油管, -80 °C 冻存。

## 1.3 菌株形态观察

取 1 mL  $OD_{600}$  约为 0.6 的菌液, 1 900×g 离心 5 min 收集菌体并用 PBS 缓冲液(pH 7.4) 洗涤菌体 2 次, 用等体积 3% (体积分数) 戊二醛重悬菌体并于 4 °C 静置过夜。菌体固定后, 依次使用 PBS、无水乙醇将戊二醛洗净, 再将菌体重悬于 100 μL 无水乙醇。取 2 μL 重悬液点涂于干净的盖玻片, 待乙醇挥发完全, 在上海交通大学分析测试中心进行喷金、抽真空处理, 使用拉曼图像-扫描电子显微镜联用仪进行表面形态观察。

## 1.4 16S rRNA 基因扩增与序列分析

挑取菌株单克隆至 10 mL 无菌水中, 移液枪吹打均匀后沸水浴 10 min 以裂解菌体。以 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3') 为引物, 取菌体裂解液作为 DNA 模板对菌株 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: DNA 模板 1 μL, 引

物 27F 和 1492R (10 μmol/L) 各 0.5 μL, 2×PrimeSTAR Max Premix 10 μL, ddH<sub>2</sub>O 8 μL。PCR 反应条件: 98 °C 5 min; 98 °C 15 s, 55 °C 15 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增完成后, 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, 确认后送至上海派森诺生物科技股份有限公司进行测序。将测序结果上传至 GenBank, 获得登录号为 NW559548。在 NCBI 网站利用 BLASTn 程序进行在线比对。

## 1.5 菌株的耐盐能力检测

取 1 mL  $OD_{600}$  约为 0.6 的对数生长期菌液, 按 1% (体积分数) 转接至 NaCl 浓度分别为 0%–19% (梯度为 1%) 的 LB 液体培养基中, 30 °C、180 r/min 培养, 测定 0、12、22、26、30、34、47、60、72 h 的  $OD_{600}$  并绘制生长曲线。

## 1.6 菌株的底物利用能力检测

取 1 mL  $OD_{600}$  约为 0.6 的对数生长期菌液, 1 900×g 离心 5 min 后弃去上清, 用等体积不含碳源的 ASW 培养基洗涤菌体 2 次后重悬。实验组将重悬后的菌液按 1% (体积分数) 转接至以 4HBA 为唯一碳源的 ASW 培养基中, 30 °C、180 r/min 振荡培养, 测定 0、14、22、44、56、68、80、92、104、124 h 的  $OD_{600}$  并绘制生长曲线。对照组不加底物或不接种菌株。

## 1.7 全细胞生物转化

取 1 mL  $OD_{600}$  约为 0.6 的对数生长期菌液, 按 1% (体积分数) 转接至 100 mL LB 液体培养基中, 培养至  $OD_{600}$  约为 1.0, 4 °C、1 900×g 离心菌体 10 min, 弃去上清, 用 PBS (pH 7.4) 洗涤菌体 2 次, 重悬菌体至  $OD_{600}$  约为 10.0。加入 1 mmol/L 4HBA, 于 30 °C、180 r/min 摇床中进行全细胞生物转化实验。在 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.5、4.5 h 进行取样, 每次取 600 μL 样品, 5 000×g 离心 2 min, 上清液经 0.22 μm 滤膜过滤后冻存于 -20 °C, 用于化合物检测分析。

## 1.8 粗酶活测定

### 1.8.1 细胞裂解液的制备

取  $OD_{600}$  约为 0.6 的菌液, 按 1% (体积分数)

转接至 300 mL 的 LB 液体培养基中, 培养至  $OD_{600}$  约为 1.0, 4 °C、5 000×g 离心菌体 10 min 后弃上清, 用 PBS 缓冲液(pH 7.4)洗涤菌体 2 次, 重悬菌体至  $OD_{600}$  约为 10.0。加入溶菌酶至终浓度为 1 mg/mL, 置于 30 °C、180 r/min 摇床处理 30 min 进行初步破壁。置于冰上预冷 10 min 后进行超声破碎(破碎 5 s, 暂停 3 s) 30 min。待菌液较为澄清后于 4 °C、5 000×g 离心 1 h, 取上清细胞破碎液作为粗酶液。

### 1.8.2 粗酶活测定

采用分光光度法测定粗酶液对 4HBA 的反应活性, 波长扫描区间为 200–400 nm。分别添加 NADH 或 NADPH 至终浓度为 50  $\mu$ mol/L 作为反应的辅因子, 确定反应所需的辅因子类型, 以辅因子的消耗表征酶促反应的发生。酶活单位(U)定义为每分钟消耗辅因子的摩尔量; 比活力(Specific Activity)定义为每毫克蛋白所含的酶活力单位数。反应体系为: 850  $\mu$ L PBS (pH 7.4)与 150  $\mu$ L 粗酶液, 加入 1  $\mu$ L 50 mmol/L 辅因子混合均匀, 加入 1  $\mu$ L 200 mmol/L 的 4-羟基苯甲酸起始反应, 波长扫描间隔时间为 30 s。对照杯中不加底物, 其余条件与反应杯一致。

### 1.9 化合物检测分析

使用配有 Waters e2695 Separation Module 和 2998 PDA Detector 的高效液相色谱(HPLC)定量分析 4HBA 全细胞生物转化过程中底物的下降和产物的生成。分析柱使用 Agilent ZORBAX SB-C18 (5  $\mu$ m, 4.6 mm×250 mm), 柱温设置为 30 °C。流动相为 50 mmol/L 乙酸铵(pH 4.2):甲醇=8:2 (体积比), 流速为 1 mL/min, 检测波长为 255 nm。使用超高效液相色谱-飞行时间质谱联用仪对产物与标准品原儿茶酸的保留时间和质谱结果进行比对, 以鉴定产物。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的分离与鉴定

以 4-羟基苯甲酸(4-Hydroxybenzoate, 4HBA)

为底物, 从马里亚纳海沟 6 300 m 沉积物样本中富集培养得到一株细菌。该菌株在 LB 固体培养基上经 30 °C 培养 4 d 后, 呈柠檬黄色、不透明、表面光滑、边缘整齐、凸出于培养基表面、直径约为 1–2 mm 的圆形菌落。扫描电镜观察形态如图 1 所示, 菌体呈球形, 直径为 0.4–0.6  $\mu$ m, 无鞭毛结构。

基于 NCBI 网站 BLASTn 程序在线比对结果, 该菌株的 16S rRNA 基因序列与 *Citricoccus nitrophenolicus* strain PNP<sup>T</sup> (NR117546)的 16S rRNA 基因序列具有 99.5%一致性。综合菌落形态特征和 16S rRNA 基因序列比对分析结果, 将该菌株鉴定为柠檬球菌属(*Citricoccus*), 命名为 *Citricoccus* sp. strain NyZ702。

### 2.2 菌株 NyZ702 生长盐浓度范围

检测菌株 NyZ702 于 0%–19% (质量体积分数) 盐浓度和 30 °C 条件下在 LB 液体培养基中的生长状况。该菌株在 0%–14% (质量体积分数) 盐浓度范围内均表现出一定程度的生长(图 2)。当盐浓度

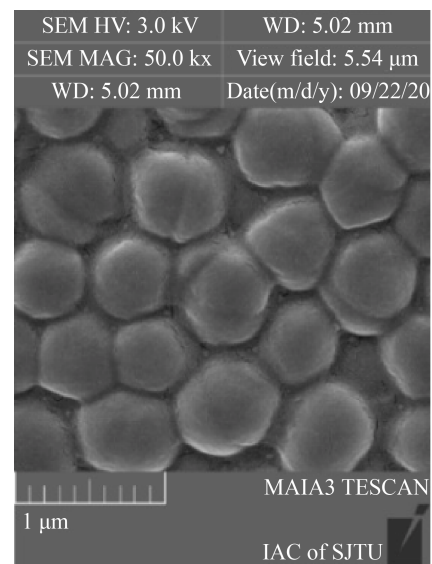


图 1 *Citricoccus* sp. strain NyZ702 在扫描电镜下的形态  
Figure 1 Morphology of *Citricoccus* sp. strain NyZ702 observed by SEM

注: 扫描电镜放大倍数为  $5 \times 10^4$  倍, 标尺为 1  $\mu$ m。菌体呈球形, 直径为 0.4–0.6  $\mu$ m

Note: The SEM magnification was  $5 \times 10^4$  with the scale bar of 1  $\mu$ m. The cells were spherical with a diameter of 0.4–0.6  $\mu$ m

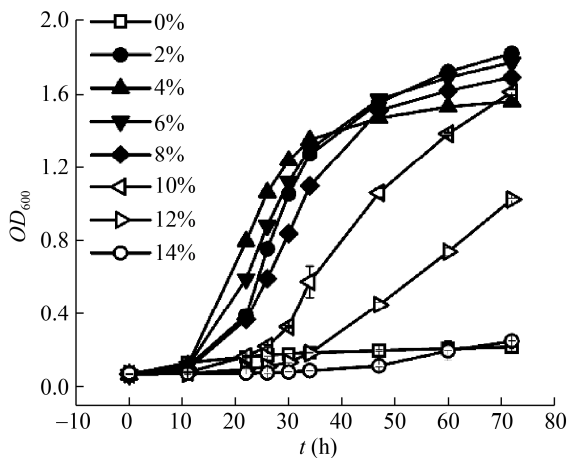


图 2 *Citricoccus* sp. strain NyZ702 在不同盐浓度 (0%–14%) LB 培养基中的生长曲线

Figure 2 Growth of *Citricoccus* sp. strain NyZ702 in liquid LB medium of different salt concentrations ranging from 0% to 14%

范围为 2%–8% (质量体积分数) 时, 菌株 NyZ702 经过大约 12 h 的生长即进入对数生长期, 并于 48 h 左右进入稳定期, 72 h 后  $OD_{600}$  最高可达到 1.8 左右。当盐浓度为 1%、9%–13% (质量体积分数) 时, 菌株 NyZ702 生长的迟滞期约为 26–48 h, 72 h 的  $OD_{600}$  在 0.6–1.6 之间。当盐浓度为 0%、14% (质量体积分数) 时, 菌株仅有较为缓慢且微弱的生长;  $\geq 15\%$  时无法生长。该结果表明菌株 NyZ702 为耐盐菌, 其生长需要一定的盐浓度, 而且最适生长盐浓度范围为 2%–8% (质量体积分数)。

### 2.3 菌株 NyZ702 利用底物生长

检测菌株 NyZ702 在添加 4HBA 为唯一碳源的 ASW 培养基中的生长情况。30 °C 条件下, 实验组中, 菌株 NyZ702 在添加 4HBA 为唯一碳源的 ASW 培养基中经过 124 h 培养,  $OD_{600}$  从 0.12 增长至 0.29。同时, 检测到 124 h 后 4HBA 浓度从最初的 0.84 mmol/L 降至 0, 菌株 NyZ702 对 4HBA 的相对去除率为 6.06 mg/(L·h· $OD_{600}$ )。然而在对照组不含碳源的 ASW 培养基中, 菌株 NyZ702 的

$OD_{600}$  无明显变化, 表明菌株并未生长, 而且未接种菌株的培养基中底物浓度不变(图 3)。以上结果表明菌株 NyZ702 可以利用 4HBA 为唯一碳源进行生长。

### 2.4 菌株 NyZ702 全细胞生物转化 4HBA 与产物鉴定

在菌株 NyZ702 对 4HBA 的全细胞生物转化实验中, 通过 UPLC-TOFMS 对产物进行分析: 产物的出峰时间为 10.992 min, 负离子模式下的  $m/z$  为 153.019 1 (图 4A); 原儿茶酸标准品的出峰时间为 11.045 min, 负离子模式下的  $m/z$  为 153.018 9 (图 4B)。产物的出峰时间、负离子模式下的质荷比与原儿茶酸标准品均在误差范围内, 因此初步鉴定产物为原儿茶酸。

利用 HPLC 对定时取样的培养物进行分析, 检测到底物(4HBA)的下降和产物(原儿茶酸)的积累, 并对其定量分析。在 2.5 h 内, 菌株 NyZ702 将 0.96 mmol/L 4HBA 彻底降解, 同时生成中间产物原儿茶酸。原儿茶酸浓度在 2 h 内积累到最大值 0.58 mmol/L, 随后逐渐下降(图 4C)。

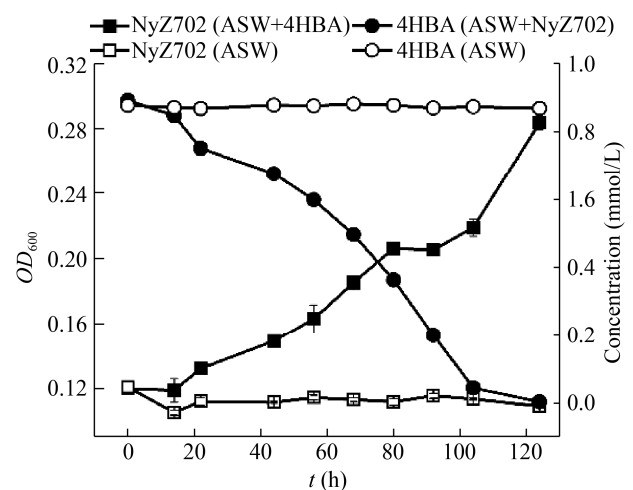


图 3 *Citricoccus* sp. strain NyZ702 以 4-羟基苯甲酸 (4HBA) 为唯一碳源进行生长

Figure 3 Growth of *Citricoccus* sp. strain NyZ702 on 4-hydroxybenzoate (4HBA) as the sole carbon source

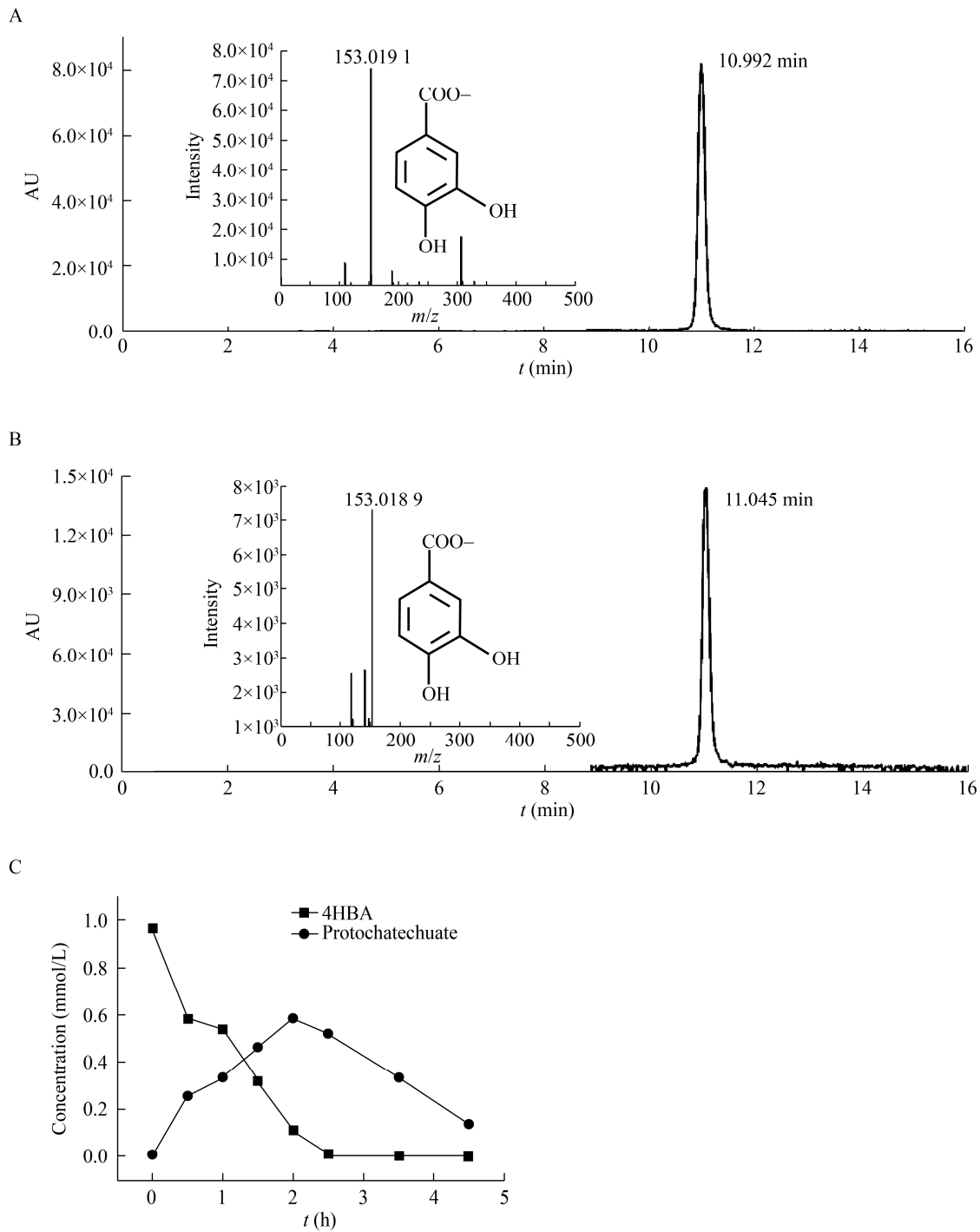


图 4 *Citricoccus* sp. strain NyZ702 对 4HBA 进行生物转化及产物鉴定

Figure 4 The whole cell biotransformation of 4HBA by *Citricoccus* sp. strain NyZ702 and the identification of the product

注: A: 生物转化产物的 UPLC-TOFMS 分析结果; B: 原儿茶酸标准品的 UPLC-TOFMS 分析结果; C: 生物转化过程中底物的消耗与中间产物原儿茶酸的浓度变化

Note: A: UPLC-TOFMS analysis of the product of biotransformation; B: UPLC-TOFMS analysis of the authentic protocatechuate; C: Concentration changes of the substrate and the intermediate protocatechuate in the biotransformation

## 2.5 菌株 NyZ702 粗酶液具有催化 4HBA 生成原儿茶酸的活力

利用紫外分光光度计检测菌株 NyZ702 粗酶液的活力, 添加 NADH 为辅因子, 反应杯与对照杯相比无辅因子的消耗; 添加 NADPH 作为辅因子, 加入底物(4HBA)起始反应后, 反应杯相比对照杯在 340 nm 处吸光值显著下降, 表明菌株 NyZ702 细胞粗提液对 4HBA 有反应活性, 而且反应需要 NADPH [ $\lambda_{\max}=340 \text{ nm}$ ,  $\epsilon_{340}=6.22 \times 10^3 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ ] 作为辅因子。通过比尔伯格吸光定律计算粗酶液与 4HBA 反应过程中每分钟消耗 NADPH 的量, 得出  $U=9.16 \times 10^{-4} \mu\text{mol}/\text{min}$ , 粗酶液比活力 (Specific Activity)  $=5.01 \times 10^{-4} \text{ U}/\text{mg}\cdot\text{protein}$ 。

## 2.6 菌株 NyZ702 降解 4HBA 代谢途径预测

底物生长实验结果表明, 菌株 NyZ702 可以利用 0.84 mmol/L 4HBA 为唯一碳源进行生长。全细胞生物转化实验中, 该菌株在 2.5 h 内将 0.96 mmol/L 4HBA 完全转化, 生成中心代谢产物原儿茶酸。同时, 野生型菌株的粗酶液对 4HBA 具有单加氧酶活性, 而且反应需要 NADPH 作为辅因子。综合以上结果, 初步表明菌株 NyZ702 以原儿茶酸为中间代谢产物降解 4HBA。根据已有的陆源微生物通过

原儿茶酸途径降解 4HBA 的研究报道<sup>[18-19]</sup>, 推测菌株 NyZ702 降解 4HBA 的代谢途径如图 5 所示, 4HBA 经单加氧反应生成原儿茶酸, 在双加氧酶的作用下开环生成 3-羧基-顺,顺-黏糠酸, 再经过内酯化化合物形成  $\beta$ -酮己二酸, 最终进入三羧酸循环。

## 3 讨论

芳香化合物在环境中广泛存在, 具有结构稳定、难降解的特点<sup>[15]</sup>。虽然基于测序的多项研究报告深渊环境中存在潜在的芳香化合物降解菌株<sup>[6,8-10,16]</sup>, 但其中的芳香化合物代谢微生物纯培养并未有报道。本研究以简单芳香化合物为底物对深渊沉积物样本进行富集培养, 通过平板稀释涂布分离得到一株放线菌纲 (*Actinomycetia*) 微球菌目 (*Micrococcales*) 微球菌科 (*Micrococcaceae*) 柠檬球菌属 (*Citricoccus*) 的菌株 NyZ702, 该菌株具有一定耐盐能力 (1%–14%), 经底物利用实验验证其具有 4-羟基苯甲酸 (4-Hydroxybenzoate, 4HBA) 降解能力。

芳香化合物降解微生物来源丰富, 根据底物分布范围的不同可分离自植物根际土壤<sup>[20]</sup>、工业生产废水<sup>[21]</sup>、河口或盐沼<sup>[22]</sup>、石油污染的水体或沉积物<sup>[23-24]</sup>等环境, 并展现出一定的环境适应性和代

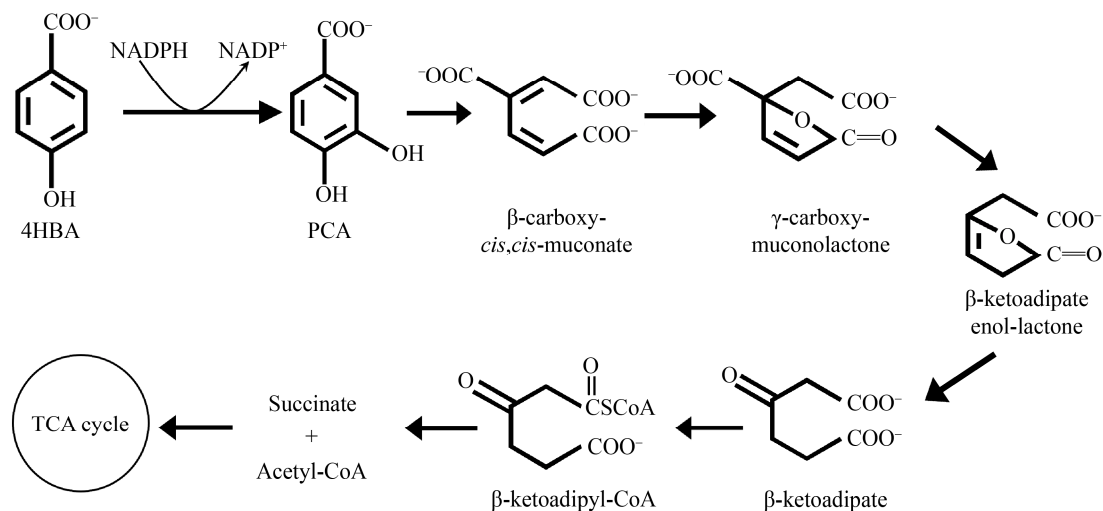


图 5 *Citricoccus* sp. strain NyZ702 通过原儿茶酸途径降解 4HBA 的代谢途径推测

Figure 5 Proposed degradation pathway of 4HBA via protocatechuate by *Citricoccus* sp. strain NyZ702



谢多样性。对于已鉴定的 4-羟基苯甲酸降解菌, 分离自植物根际的 *Pseudomonas putida* WCS358<sup>[18]</sup> 除了具备 4HBA 降解能力, 同时还可以促进植物生长<sup>[25]</sup>。分离自邻苯二甲酸酯污染的活性污泥中的 *Rhodococcus erythropolis* strain S1, 同时可降解 2-羟基苯甲酸、3-羟基苯甲酸、4-羟基苯甲酸、原儿茶酸和龙胆酸<sup>[26]</sup>, 另一株土壤来源的 *Enterobacter cloacae* P240 同样展现出对 4HBA 之外的芳香化合物降解能力<sup>[27]</sup>, 而且对不同底物的降解速率有差异。本研究中的菌株 NyZ702 分离自深渊沉积物, 其最适生长盐浓度范围(2%–8%, 质量体积分数)表现了该菌株对海洋环境(3.5%盐浓度)的适应, 但其是否适应原位高压环境和是否具有更广的底物范围仍有待进一步验证。与土壤来源的植物病原菌 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 对 4HBA 的相对去除率 $[11.26 \text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{h}\cdot\text{OD}_{600})]$ <sup>[20]</sup> 相比, 菌株 NyZ702 对 4HBA 的相对去除率 $[6.06 \text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{h}\cdot\text{OD}_{600})]$ 约为前者的一半, 推测差异的原因与底物在特定环境中的丰度有关, 但相对去除率的差异在不同菌株间是否普遍以及可能的影响因素需要更广泛的统计分析。

同时, 微生物有氧降解 4HBA 的途径主要有 3 种: (1) 原儿茶酸途径。菌株 *Pseudomonas putida* WCS358<sup>[18]</sup>、*Corynebacterium glutamicum* RES167<sup>[19]</sup> 和 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*<sup>[20]</sup> 中, 4HBA 在 4-羟基苯甲酸-3-单加氧酶作用下被转化为原儿茶酸, 经双加氧酶作用开环进入下游代谢<sup>[19]</sup>。(2) 对苯二酚途径。对于菌株 *Candida parapsilosis* CBS604<sup>[28]</sup> 和 *Enterobacter cloacae* P240<sup>[27]</sup>, 4HBA 在 4-羟基苯甲酸-1-羟化酶作用下发生羟化、脱羧反应, 生成对苯二酚进入下游代谢<sup>[29]</sup>。(3) 龙胆酸途径。*Brevibacillus laterosporus* PHB-7a 中的羟化酶可催化 4HBA 发生羧基分子内迁移, 生成龙胆酸进入下游代谢<sup>[30]</sup>。本研究通过高效液相色谱(HPLC)检测到 4HBA 生物转化产物

的积累, 经超高效液相色谱-飞行时间质谱联用仪(UPLC-TOFMS)初步鉴定菌株 NyZ702 转化 4HBA 的产物为原儿茶酸。对生物转化反应体系中的底物与产物进行定量分析, 发现底物在 2.5 h 内被完全消耗, 而产物浓度在 2 h 积累到最大值后出现下降, 推测产物可能由于结构不稳定而自发氧化或被菌株 NyZ702 继续利用进入下游代谢。粗酶活反应揭示了菌株 NyZ702 细胞粗提液与 4HBA 的应对 NADPH 而非 NADH 具有偏好性, 与已报道的 NADPH 依赖型 4-羟基苯甲酸 3-单加氧酶具有一致性<sup>[31]</sup>, 表明菌株 NyZ702 细胞粗提液具有 4-羟基苯甲酸 3-单加氧酶活性。以上结果揭示了该菌株以原儿茶酸为中间代谢产物对 4HBA 进行降解, 可能与同样利用原儿茶酸代谢途径的菌株具有相近的降解基因簇, 后续可对潜在的 4-羟基苯甲酸 3-单加氧酶基因序列设计保守引物进行分子克隆, 结合测序技术进一步鉴定菌株 NyZ702 降解 4HBA 过程中的分子机制。

柠檬球菌属广泛分布于多种环境中。Altenburger 等首次从中世纪壁画分离得到一株 *Citricoccus muralis* strain 4-0<sup>T[32]</sup>。陆地来源的该属菌株还包括分离自沙漠的 *Citricoccus alkalitolerans* strain YIM 70010<sup>T[33]</sup> 以及分离自墙壁的 *Citricoccus parietis* strain 02-Je-010<sup>T[34]</sup>。此外, 高盐废水<sup>[35]</sup>、寡营养地下水<sup>[36]</sup>、浅海沉积物<sup>[37]</sup> 等环境也有该菌属的报道。其中分离自污水处理厂的 *Citricoccus nitrophenolicus* strain PNP<sup>T</sup> 具有 4-硝基酚(4-Nitrophenol)降解能力<sup>[38]</sup>, 分离自农药废水排污口的 *Citricoccus* sp. strain TT3 可降解除草剂莠去津<sup>[39]</sup>。系统发育分析表明菌株 NyZ702 与 *Citricoccus nitrophenolicus* strain PNP<sup>T</sup> 具有较高相似度, 但菌株 NyZ702 是否也具备 4-硝基酚降解能力仍有待进一步探究。目前已有多项研究基于测序技术揭示了马里亚纳海沟中放线菌纲微生物的存在<sup>[6,40-43]</sup>, 同时 Abdel-Mageed 等从马里亚纳海沟沉积物中分离得

到 2 株放线菌 *Dermaococcus abyssi* sp. nov. strains MT1.1 和 MT1.2, 与菌株 NyZ702 同属于放线菌纲微球菌目<sup>[44]</sup>。可见菌株 NyZ702 的分离培养进一步丰富了深渊来源的微生物资源, 同时也说明了放线菌纲特别是 *Citricoccus* 属的菌株在深渊环境中占有一席之地, 可能在深渊环境中微生物驱动的物质循环中起着一定的作用。后续研究将模拟深渊高压环境对菌株 NyZ702 进行培养, 并结合生物化学和分子生物学手段对其在深渊环境中的芳香化合物降解机制进行深入探究。

#### 4 结论

本研究通过芳香化合物富集培养, 从深渊沉积物样本中分离得到一株 4-羟基苯甲酸降解菌, 经过形态观察和系统发育学分析, 将该菌株命名为 *Citricoccus* sp. strain NyZ702。通过遗传、分子和生化的方法, 证明了菌株 NyZ702 具有利用 4-羟基苯甲酸为唯一碳源生长的能力, 并初步鉴定其代谢中间产物为原儿茶酸, 检测野生型菌株细胞粗酶液具有催化 4-羟基苯甲酸生成原儿茶酸的酶活力, 推测该菌株通过原儿茶酸途径降解 4-羟基苯甲酸的代谢途径。该菌株的分离培养丰富了深渊来源的微生物菌种资源, 为深渊中的芳香化合物降解研究提供了一定基础, 未来将以该菌株为基础进一步探究其芳香化合物代谢底物范围, 模拟深渊高压条件下的生长能力和芳香化合物代谢生理生化机制等。致谢: 衷心感谢上海交通大学海洋学院张宇教授提供沉积物样品, 感谢上海交通大学生命科学技术学院肖湘教授在耐压微生物的分离和培养方面给予指导, 感谢上海交通大学分析测试中心提供设备与技术支持。

#### REFERENCES

- [1] Jamieson AJ, Fujii T, Mayor DJ, Solan M, Priede IG. Hadal trenches: the ecology of the deepest places on Earth[J]. Trends in Ecology & Evolution, 2010, 25(3): 190-197
- [2] Stern RJ. Subduction zones[J]. Reviews of Geophysics, 2002, 40(4): 1012
- [3] Nunoura T, Takaki Y, Hirai M, Shimamura S, Makabe A, Koide O, Kikuchi T, Miyazaki J, Koba K, Yoshida N, et al. Hadal biosphere: insight into the microbial ecosystem in the deepest ocean on Earth[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(11): E1230-E1236
- [4] Xu YP, Ge HM, Fang JS. Biogeochemistry of hadal trenches: recent developments and future perspectives[J]. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography, 2018, 155: 19-26
- [5] Glud RN, Wenzhöfer F, Middelboe M, Oguri K, Turnewitsch R, Canfield DE, Kitazato H. High rates of microbial carbon turnover in sediments in the deepest oceanic trench on Earth[J]. Nature Geoscience, 2013, 6(4): 284-288
- [6] Liu RL, Wang ZX, Wang L, Li ZZ, Fang JS, Wei X, Wei WX, Cao JW, Wei YL, Xie Z. Bulk and active sediment prokaryotic communities in the Mariana and mussau trenches[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1521
- [7] Hiraoka S, Hirai M, Matsui Y, Makabe A, Minegishi H, Tsuda M, Juliarni, Rastelli E, Danovaro R, Corinaldesi C, et al. Microbial community and geochemical analyses of trans-trench sediments for understanding the roles of hadal environments[J]. The ISME Journal: Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology, 2020, 14(3): 740-756
- [8] Tarn J, Peoples LM, Hardy K, Cameron J, Bartlett DH. Identification of free-living and particle-associated microbial communities present in hadal regions of the Mariana Trench[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 665
- [9] Li WL, Huang JM, Zhang PW, Cui GJ, Wei ZF, Wu YZ, Gao ZM, Han Z, Wang Y. Periodic and spatial spreading of alkanes and *Alcanivorax* bacteria in deep waters of the Mariana Trench[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2019, 85(3): e02089-e02018
- [10] Liu JW, Zheng YF, Lin HY, Wang XC, Li M, Liu Y, Yu M, Zhao MX, Pedentchouk N, Lea-Smith DJ, et al. Proliferation of hydrocarbon-degrading microbes at the bottom of the Mariana Trench[J]. Microbiome, 2019, 7(1): 1-13
- [11] Evans WC, Fuchs G. Anaerobic degradation of aromatic compounds[J]. Annual Review of Microbiology, 1988, 42(1): 289-317
- [12] González-Gaya B, Fernández-Pinos MC, Morales L, Méjanelle L, Abad E, Piña B, Duarte CM, Jiménez B, Dachs J. High atmosphere-ocean exchange of semivolatile aromatic hydrocarbons[J]. Nature Geoscience, 2016, 9(6): 438-442
- [13] González-Gaya B, Martínez-Varela A, Vila-Costa M, Casal P, Cerro-Gálvez E, Berrojalbiz N, Lundin D, Vidal M, Mompeán C, Bode A, et al. Biodegradation as an important sink of aromatic hydrocarbons in the oceans[J]. Nature Geoscience, 2019, 12(2): 119-125
- [14] 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
- [15] Cao B, Nagarajan K, Loh KC. Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 85(2): 207-228
- [16] Xue CX, Liu JW, Lea-Smith DJ, Rowley G, Lin HY, Zheng YF, Zhu XY, Liang JC, Ahmad W, Todd JD, et al. Insights into the vertical stratification of microbial ecological roles across the deepest seawater column on earth[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(9): 1309
- [17] Yang SS, Lv Y, Liu XP, Wang YZ, Fan QL, Yang ZF, Boon N, Wang FP, Xiao X, Zhang Y. Genomic and enzymatic evidence of acetogenesis by anaerobic methanotrophic Archaea[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 3941
- [18] Bertani I, Kojic M, Venturi V. Regulation of the p-hydroxybenzoic acid hydroxylase gene (*pobA*) in plant-growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358[J]. *Microbiology: Reading, England*, 2001, 147(Pt 6): 1611-1620
- [19] Huang Y, Zhao KX, Shen XH, Jiang CY, Liu SJ. Genetic and biochemical characterization of a 4-hydroxybenzoate hydroxylase from *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 78(1): 75-83
- [20] Wang JY, Zhou L, Chen B, Sun S, Zhang W, Li M, Tang HZ, Jiang BL, Tang JL, He YW. A functional 4-hydroxybenzoate degradation pathway in the phytopathogen *Xanthomonas campestris* is required for full pathogenicity[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 18456
- [21] Buswell JA, Clark JS. Oxidation of aromatic acids by a facultative thermophilic *Bacillus* sp.[J]. *Journal of General Microbiology*, 1976, 96(1): 209-213
- [22] Daane LL, Harjono I, Zylstra GJ, Häggblom MM. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria associated with the rhizosphere of salt marsh plants[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(6): 2683-2691
- [23] Kostka JE, Prakash O, Overholt WA, Green SJ, Freyer G, Canion A, Delgado J, Norton N, Hazen TC, Huettel M. Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in gulf of Mexico beach sands impacted by the deepwater horizon oil spill[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(22): 7962-7974
- [24] Cui ZS, Gao W, Xu GF, Luan X, Li Q, Yin XF, Huang DM, Zheng L. *Marinobacter aromaticivorans* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from sea sediment[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, 66(1): 353-359
- [25] Marugg JD, Van Spanje M, Hoekstra WP, Schippers B, Weisbeek PJ. Isolation and analysis of genes involved in siderophore biosynthesis in plant-growth-stimulating *Pseudomonas putida* WCS358[J]. *Journal of Bacteriology*, 1985, 164(2): 563-570
- [26] Suemori A, Nakajima K, Kurane R, Nakamura Y. *o*-, *m*- and *p*-Hydroxybenzoate degradative pathways in *Rhodococcus erythropolis*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1995, 125(1): 31-35
- [27] Matsui T, Yoshida T, Hayashi T, Nagasawa T. Purification, characterization, and gene cloning of 4-hydroxybenzoate decarboxylase of *Enterobacter cloacae* P240[J]. *Archives of Microbiology*, 2006, 186(1): 21-29
- [28] Eppink MHM, Berkel WJHV, Schreuder HA. Identification of a novel conserved sequence motif in flavoprotein hydroxylases with a putative dual function in FAD/NAD(P)H binding[J]. *Protein Science*, 2008, 6(11): 2454-2458
- [29] Eppink MH, Boeren SA, Vervoort J, Van Berkel WJ. Purification and properties of 4-hydroxybenzoate 1-hydroxylase (decarboxylating), a novel flavin adenine dinucleotide-dependent monooxygenase from *Candida parapsilosis* CBS604[J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(21): 6680-6687
- [30] Zhao H, Xu Y, Lin SJ, Spain JC, Zhou NY. The molecular basis for the intramolecular migration (NIH shift) of the carboxyl group during *para*-hydroxybenzoate catabolism[J]. *Molecular Microbiology*, 2018, 110(3): 411-424
- [31] Wang J, Ortiz-Maldonado M, Entsch B, Massey V, Ballou D, Gatti DL. Protein and ligand dynamics in 4-hydroxybenzoate hydroxylase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(2): 608-613
- [32] Altenburger P. *Citricoccus muralis* gen. nov., sp. nov., a novel actinobacterium isolated from a medieval wall painting[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52(6): 2095-2100
- [33] Li WJ, Chen HH, Zhang YQ, Kim CJ, Park DJ, Lee JC, Xu LH, Jiang CL. *Citricoccus alkalitolerans* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from a desert soil in Egypt[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(1): 87-90
- [34] Schäfer J, Martin K, Kämpfer P. *Citricoccus parietis* sp. nov., isolated from a mould-colonized wall and emended description of *Citricoccus alkalitolerans* Li et al. 2005[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(Pt 2): 271-274
- [35] Meng FX, Yang XC, Yu PS, Pan JM, Wang CS, Xu XW, Wu M. *Citricoccus zhacaiensis* sp. nov., isolated from a bioreactor for saline wastewater treatment[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010,

- 60(Pt 3): 495-499
- [36] Hayano-Kanashiro C, López-Arredondo DL, Cruz-Morales P, Alcaraz LD, Olmedo G, Barona-Gómez F, Herrera-Estrella L. First draft genome sequence of a strain from the genus *Citricoccus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(21): 6092-6093
- [37] Kalinovskaya NI, Romanenko LA, Irisawa T, Ermakova SP, Kalinovskiy AI. Marine isolate *Citricoccus* sp. KMM 3890 as a source of a cyclic siderophore nocardamine with antitumor activity[J]. *Microbiological Research*, 2011, 166(8): 654-661
- [38] Nielsen MB, Kjeldsen KU, Ingvorsen K. Description of *Citricoccus nitrophenolicus* sp. nov., *para*-nitrophenol degrading actinobacterium isolated from a wastewater treatment plant and emended description of the genus *Citricoccus* Altenburger et al. 2002[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2011, 99(3): 489-499
- [39] Yang XY, Wei HY, Zhu CX, Geng B. Biodegradation of atrazine by the novel *Citricoccus* sp. strain TT3[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 147: 144-150
- [40] Zhang WP, Watanabe HK, Ding W, Lan Y, Tian RM, Sun J, Chen C, Cai L, Li YX, Oguri K, et al. Gut microbial divergence between two populations of the hadal amphipod *Hirondellea gigas*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019. DOI:10.1128/aem.02032-18
- [41] Peoples LM, Grammatopoulou E, Pombrol M, Xu XX, Osuntokun O, Blanton J, Allen EE, Nunnally CC, Drazen JC, Mayor DJ, et al. Microbial community diversity within sediments from two geographically separated hadal trenches[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00347
- [42] Li YJ, Cao WR, Wang Y, Ma QJ. Microbial diversity in the sediments of the southern Mariana Trench[J]. *Journal of Oceanology and Limnology*, 2019, 37(3): 1024-1029
- [43] Zhang XX, Xu W, Liu Y, Cai MW, Luo ZH, Li M. Metagenomics reveals microbial diversity and metabolic potentials of seawater and surface sediment from a hadal biosphere at the Yap Trench[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2402
- [44] Abdel-Mageed WM, Milne BF, Wagner M, Schumacher M, Sandor P, Pathom-Aree W, Goodfellow M, Bull AT, Horikoshi K, Ebel R, et al. Dermacozines, a new phenazine family from deep-sea dermacocci isolated from a Mariana Trench sediment[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2010, 8(10): 2352-2362