

## 研究报告



## 红树林土壤中产聚羟基脂肪酸酯细菌的分离及其评估

郑维爽<sup>Δ\*1,2</sup> 于盛洋<sup>Δ1</sup> 翟生强<sup>1</sup> 吴远东<sup>1,2</sup> 黄艺<sup>1,2,3</sup>

1 北京大学深圳研究院海洋生物资源与环境研究所 广东 深圳 518057

2 深港产学研基地(北京大学香港科技大学深圳研修院) 广东 深圳 518057

3 北京大学环境科学与工程学院 北京 100871

**摘要:**【背景】细菌能通过合成聚羟基脂肪酸酯(Polyhydroxyalkanoates, PHA)在细胞内储存物质和能量,提高对环境的适应能力。在红树林中,由于土壤周期性受海水浸没,形成营养物质种类丰富和含量波动大的特殊生境,为细菌进化出特殊的 PHA 合成途径提供了条件。【目的】为了增加对红树林产 PHA 细菌资源的了解,获得产 PHA 细菌,使用纯培养方法分离和鉴定细菌,并评估菌株的产 PHA 能力。【方法】采集红树植物海桑根系和红树滩涂土壤样品,连续 5 周培养、分离纯化获得细菌菌株;通过 16S rRNA 基因相似性及系统进化分析鉴定细菌分类地位,利用 PHA 合成酶基因(*phaC*)鉴定细菌合成 PHA 的能力;通过基因组草图测序,分析细菌的 *phaC* 基因种类、代谢通路及系统进化关系;通过气相色谱分析细菌产 PHA 的累积量及组成。【结果】从红树林土壤样品中分离得到 97 株细菌,其中 13 株带有 *phaC* 基因,包括坚强芽孢杆菌(*Cytobacillus firmus*)、弯曲芽孢杆菌(*Bacillus flexus*)、除烃海杆菌(*Marinobacter hydrocarbonoclasticus*)和酯香微杆菌(*Microbacterium esteraromaticum*)。 *B. flexus* MN15-19 以丙酮酸盐为碳源,可累积细胞干重 11% 的 PHA,同时具有固碳功能的还原性三羧酸循环通路,有开发成为固碳产 PHA 工程菌株的潜力。酯香微杆菌可产 PHA,但是其 *phaC* 基因结构特殊,基因组注释未能识别出任何已知 *phaC* 基因。【结论】研究发现红树林土壤可培养细菌中存在未知的 PHA 合成途径,说明红树林生态系统中的细菌具有资源挖掘的重要价值。

**关键词:** 红树林生态系统, 细菌, 聚羟基脂肪酸酯, 代谢通路, *phaC* 基因

**Foundation items:** Key Program of Marine Economy Development (Six Marine Industries) Special Foundation of Department of Natural Resources of Guangdong Province (GDNRC [2020] 034); China Postdoctoral Science Foundation (2019M662806)

ΔThese authors equally contributed to this work

\*Corresponding author: E-mail: zhengws@ier.org.cn

Received: 19-01-2021; Accepted: 05-03-2021; Published online: 12-04-2021

基金项目: 广东省海洋经济发展(海洋六大产业)专项资金项目(粤自然资合[2020] 034 号); 中国博士后科学基金(2019M662806)

Δ对本文贡献相同

\*通信作者: E-mail: zhengws@ier.org.cn

收稿日期: 2021-01-19; 接受日期: 2021-03-05; 网络首发日期: 2021-04-12

## Isolation and evaluation of polyhydroxyalkanoate producing bacteria from mangrove soil

ZHENG Weishuang<sup>△\*1,2</sup> YU Shengyang<sup>△1</sup> ZHAI Shengqiang<sup>1</sup> WU Yuandong<sup>1,2</sup>  
HUANG Yi<sup>1,2,3</sup>

1 Marine Institute for Bioresources and Environment, Peking University Shenzhen Institute, Shenzhen, Guangdong 518057, China

2 PKU-HKUST Shenzhen-Hong Kong Institution, Shenzhen, Guangdong 518057, China

3 College of Environmental Sciences and Engineering, Peking University, Beijing 100871, China

**Abstract: [Background]** Bacteria can synthesize polyhydroxyalkanoates (PHA) as intracellular carbon and energy storage compounds in order to better adapt to the environment. In mangroves, the soil is periodically submerged by seawater, which forms a special habitat with abundant nutrients and fluctuating contents, providing conditions for bacteria to evolve a special PHA synthesis pathway. **[Objective]** In order to improve the understanding of PHA-producing bacterial resources, we isolated and identified the PHA-producing bacteria, and evaluated their ability to produce PHA. **[Methods]** We collected soil samples from shoal and *Sonneratia caseolaris* rhizosphere, isolated bacteria during the 5 weeks of incubation, identified them by 16S rRNA gene sequence similarity and phylogenetic tree, and determined the PHA producing ability by testing the PHA synthase gene (*phaC*). Based on the draft genome sequence data, we determined the class of *phaC* gene, the metabolic pathways and the phylogenetic relationship among different strains. We analyzed the PHA content and composition using gas chromatography. **[Results]** A total of 97 strains of bacteria were isolated, among which 13 strains were PHA-producing bacteria, including *Cytobacillus firmus*, *Bacillus flexus*, *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* and *Microbacterium esteraromaticum*. *B. flexus* MN15-19 using pyruvate as the sole carbon source could accumulate 11% PHA per dry cell weight. This strain had reverse tricarboxylic acid cycle, which is considered as carbon fixation pathway. Therefore, based on *B. flexus* MN15-19, PHA production technique directly using CO<sub>2</sub> could be developed. *Mi. esteraromaticum* was a PHA-producing bacterium, whose *phaC* gene was too unique to be identified as any known *phaC* genes. **[Conclusion]** Bacteria isolated from mangrove ecosystem have unknown PHA synthase pathway, which indicates that mangrove bacterial biological resources deserve further study.

**Keywords:** mangrove ecosystem, bacteria, polyhydroxyalkanoates, metabolism pathways, *phaC*

聚羟基脂肪酸酯(Polyhydroxyalkanoates, PHA)是由细菌、古菌、真菌和植物合成的天然高分子基材料,具有良好的生物相容性、压电性、气体阻隔性、光学活性及生物降解性<sup>[1-3]</sup>,是在医学、农业和日用品等方面具有广泛应用前景的环境友好型材料。根据单体的碳原子数,PHA可被分为单体碳原子数3-5个的短链(Short-Chain-Length, SCL)PHA和单体碳原子数6-14个的中长链(Medium-Chain-Length, MCL)PHA;SCL-PHA结晶性较好、抗拉强度差<sup>[4]</sup>,MCL-PHA弹性好、结晶性较差、熔点低<sup>[5]</sup>;由2种或2种以上单体共聚合成的PHA为共聚物,其单体间摩尔比决定了共聚PHA弹性及抗拉强度<sup>[6]</sup>。因此,为了满足不同的应用场景,

我们需要能够合成结构各异PHA的细菌。

PHA作为细胞内的能量和碳源储存物,与细胞抗逆性相关<sup>[1]</sup>,而其单体结构直接由细菌PHA合成酶(PhaC)的底物特异性决定,如铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)PHA合成酶能利用癸酸(HD)生产聚羟基十二酸酯(PHDD)<sup>[7]</sup>,食酸戴尔福特菌(*Delftia acidovorans*)以4-羟基丁酸(4HB)或1,4-丁二醇作为底物合成聚4-羟基丁酸酯(P4HB)<sup>[6]</sup>,而恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida* KT2440)能够利用葡萄糖、甘油、柠檬酸、月桂酸作为碳源,分别合成单体摩尔比不同的聚羟基癸酸羟基十二酸羟基辛酸酯(PHDHDDHO)、聚羟基癸酸羟基十二酸酯(PHDHDD)和聚羟基辛酸羟基癸酸羟基己

酸羟基十二酸酯(PHOHDHHxHDD)<sup>[8]</sup>。PhaC 的底物特异性高低直接决定是否能够通过改变培养条件调整 PHA 种类, 因此, 在工业生产中具有重要价值。

红树林是生长在热带、亚热带潮间带的木本植物群落, 其土壤处于周期性遭海水浸没的潮间带环境。红树林生态系统中的微生物进化出了独特的生理生化特征, 以适应这种特殊环境<sup>[9]</sup>。Rawte 等<sup>[10]</sup>自印度中西部沿海红树林中分离出 866 株细菌, 其中 337 株具有产 PHA 的能力, 占总细菌数目的 39%, 说明红树林作为高盐、高碳、低氮、低磷的生境蕴含着丰富的产 PHA 细菌微生物资源。Van-Thuoc 等<sup>[11]</sup>自红树林中分离出产 PHA 的太平洋杨氏菌(*Yangia pacifica* QN271)。Moorkoth 等<sup>[12]</sup>自红树林中分离出一株能使用多种碳源的芽孢杆菌(*Bacillus* sp.), 其可利用酸性废糖蜜合成聚羟基丁酸酯(PHB)和聚羟基丁酸羟基戊酸酯(PHBHV)。Lakshmanan 等<sup>[13]</sup>在红树林底泥宏基因组数据中组装得到具有广泛底物特异性的新型 PhaC 合成酶基因; 该酶在 PHB 缺陷株(*Cupriavidus necator* PHB-4)中成功表达, 实现以复合碳源合成 6 种不同的 PHA, 包括 PHB、PHBV、聚羟基丁酸 5-羟基戊酸酯(PHB5HV)、聚羟基丁酸 4-羟基丁酸酯(P3HB4HB)、聚羟基丁酸 3-羟基 4-甲基戊酸酯(PHB3H4MV)和聚羟基丁酸羟基己酸酯(PHBHHx)。挖掘红树林中丰富的产 PHA 细菌和新型 PhaC 合成酶资源, 获得能够利用廉价碳源生产功能各异 PHA 的细菌菌株, 具有重要的工业应用价值。

本研究开展红树林土壤微生物挖掘工作, 从深圳市福田区红树林保护区收集土壤样品, 使用寡营养海洋细菌分离方法<sup>[14]</sup>, 获得可培养细菌。研究进一步通过功能基因分析和发酵产物测试, 寻找产 PHA 含量高和具有特殊结构、底物特异性低、合成效率高的 PHA 合成酶菌株, 以期为大规模工业化生产 PHA 提供理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 采 样

采样点位于深圳市福田区红树林保护区(E113°78'27.69", N22°75'34.53")的一处海桑(*Sonneratia caseolaris*)红树林。采集时间为 2019 年 7 月 29 日退潮时。样品为表层 10 cm 的土壤, 其中样品 GN 来自海桑根际, 样品 MN 来自邻接无红树生长的滩涂, 每处采集 500 g, 样品在 4 °C 条件下当日运送至实验室, 开始菌株分离。

#### 1.1.2 菌株和培养基

研究使用恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) KCTC 1751 作为 PHA 阳性对照菌株, 在使用气相色谱法(Gas Chromatography, GC)分析菌株产 PHA 能力时, 对照菌株与被试菌株同步培养和提取, 以控制 PHA 的测试质量。该菌购自韩国菌种保藏中心(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)。

菌株培养的培养基<sup>[14]</sup>: NH<sub>4</sub>Cl 1.0 g, CH<sub>3</sub>COONa 2.0 g, 蛋白胨 0.2 g, 酵母粉 0.2 g, 丙酮酸钠 1.25 g, EDTA 1.0 g, MgSO<sub>4</sub> 0.1 g, 5% NaHCO<sub>3</sub> 溶液 20 mL, 5% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液 4.0 mL, pH 7.0, 陈海水补足 1 L, 1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20 min; 菌株分离使用 2216E 固体培养基, 购自青岛海博生物公司; PHA 累积使用营养肉汤(Nutrient Broth, NB)合成培养基, 购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 无机盐培养基(Minimum Mineral, MM)的配制参照文献[15], 分别添加 1%葡萄糖作为碳源(MM1)或 1%丙酮酸钠作为碳源(MM2)。

#### 1.1.3 主要试剂和仪器

2×Accurate Taq Master Mix (Dye Plus), 湖南艾科瑞生物工程有限公司; DL2000 DNA Marker, TaKaRa 公司; 3-羟基丁酸甲酯、3-羟基癸酸甲酯、苯甲酸甲酯, Sigma-Aldrich 公司; 所有引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

恒温培养箱, 上海精宏实验设备有限公司; PCR 仪, TaKaRa 公司; 凝胶电泳系统, 北京凯元信瑞仪器有限公司; 蓝光透色仪, 上海勤翔科学仪

器有限公司; 冷冻干燥仪, Christ 公司; 气相色谱仪, 岛津公司。

## 1.2 红树林细菌的分离与纯化

无菌操作下称取 1.0 g 供试土样, 溶于装有 100 mL 菌株培养的培养基锥形瓶中, 30 °C、160 r/min 恒温振荡培养 35 d。从 0 d 开始, 每周进行一次稀释涂布, 共 5 周。具体操作为: 取 1 mL 振荡均匀的培养液, 稀释至  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ , 涂布于 2216E 培养基平板上, 30 °C 恒温培养箱培养 48 h 后挑取具有不同形态特征的单菌落, 在 2216E 平板上进行划线纯化, 获得的纯化菌株于含 1% 氯化钠的 15% 甘油管内保藏于 -80 °C。菌株编号中 GN 与 MN 后的数字表示样品纯化时实际培养的天数, 例如 GN0-1 为培养 0 d 分离的编号为 1 的菌株。

## 1.3 细菌 16S rRNA 基因的鉴定

采用菌落 PCR 方法进行纯化细菌的 16S rRNA 基因片段扩增。挑取单菌落加入含 50  $\mu$ L 无菌水的灭菌 PCR 管中, 95 °C 10 min 得到菌落 PCR 模板。PCR 扩增引物为 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGC TCAG-3') 和 534R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')。PCR 反应体系:  $2\times$  Accurate Taq Master Mix (Dye Plus) 25  $\mu$ L, 正向引物 27F (100  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, 反向引物 534R (100  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, 模板 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足 50  $\mu$ L。PCR 反应条件: 94 °C 6 min; 94 °C 45 s, 54 °C 30 s, 72 °C 90 s, 31 个循环; 72 °C 10 min, 4 °C 保存。PCR 产物由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 所得序列上传 NCBI 数据库(序列号为 MW418204-MW418302), 用 BLAST 比对 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中的 16S rRNA 基因数据库确定菌株的分类地位, 经 Clustal W 进行序列联配后, 用 MEGA X 最大似然法构建系统进化树, 确定红树林土壤分离获得细菌的相似性及系统进化地位。系统发育树利用在线工具 iTOLv5 美化(<https://itol.embl.de/>)。

## 1.4 细菌 *phaC* 基因的鉴定

菌落 PCR 模板制备方法同 1.3。由于革兰氏阳性细菌和阴性细菌无通用的 *phaC* 基因引物, 因此

使用 2 对引物。第 1 对引物针对 I 型和 II 型 *PhaC*: PHACGNF<sup>[16]</sup> (5'-CCYRGATCAACAAGTTCTAC-3') 和 PHACGNR (5'-TTCCAGAACAGMAGGTCGAA GG-3'); 第 2 对引物针对芽孢菌属的 IV 型 *PhaC*: BmphaC015F<sup>[17]</sup> (5'-CGTGCAAGAGTGGGAAAA AT-3') 和 BmphaC931R (5'-TCGCAATATGATCAC GGCTA-3')。PCR 反应体系和反应条件同 1.3。PCR 产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 蓝光透色仪观察胶体, 有条带的样品即为 *phaC* 基因阳性菌株。

## 1.5 产 PHA 细菌的基因组测定和注释

7 株 *phaC* 基因阳性菌株的单菌基因组框架图由广东美格基因科技有限公司通过 Illumina 测序平台测定, 基因组上传 NCBI 数据库, 序列号为 JAEMWV000000000、JAEMWY000000000、JAEMWX000000000、JAEMEG000000000、JAEMWW000000000、JAEMWU000000000 和 JAEKJQ000000000。利用 KEGG 数据库(<https://www.kegg.jp/>)注释 7 个基因组中的功能基因, 并查询 5 株具有 I-IV 类 *PhaC* 合成酶的代表性菌株的相关信息<sup>[18]</sup>。7 株 *phaC* 阳性细菌与 5 株已知产 PHA 细菌菌株基于 16S rRNA 基因序列构建系统发育树, 方法同 1.3。5 株菌为贪铜钩虫菌 (*C. necator*=*Ralstonia eutropha* H16, T00416, I 型 *PhaC* 合成短链 PHA)、铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa* PAO1, T00035, II 型 *PhaC*)、酒色着色菌 (*Allochromatium vinosum* DSM 180<sup>T</sup>, T01168, III 型 *PhaC*) 和巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium* QM B1551, T01208, IV 型 *PhaC*)。

## 1.6 细菌产 PHA 的种类和含量

7 株 *phaC* 基因阳性菌株分别使用单一碳源(丙酮酸盐、葡萄糖)和复合碳源(来自牛肉浸膏和酵母提取物)培养。菌株接种于含有 100 mL 培养基的锥形瓶中, 在 150 r/min、30 °C 条件下培养 4 d。菌体在 5 000 r/min 条件下离心 15 min 后冻干、提取并进行气相色谱分析, 测定方法和含量计算方法参考 Juengert 等<sup>[15]</sup>。提取测试步骤主要包括: 称取冻干样品约 20 mg, 记录细胞干重 (Cell Dry Weight, CDW), 然后加入 1 mL 氯仿和 15% (体积

分数)浓硫酸的甲醇溶液, 100 °C 油浴 150 min, 进行甲酯化反应, 反应完成后冰浴冷却 5 min, 加入 1 mL 去离子水, 充分混匀 30 s, 静置 1 min, 取下层有机相 150 μL 放入 GC 小管中, 加入内标, 用于色谱分析。使用 3-羟基丁酸甲酯和 3-羟基癸酸甲酯作为气相色谱的标准品, 使用苯甲酸甲酯作为内标计算标准化峰面积, 使用 DB-WAX 型号柱 (Agilent Technologies, G6501-CTC)。PHA 含量以单位细胞干重中含 PHA 的百分比计算。

### 1.7 数据分析

研究中所有统计学分析使用 R 语言(3.5.1)的 vegan、ape 和 ggplot2 程序包完成。不同采样点和培养时间的样品之间比较采用基于 Bray-Curtis 距

离的主坐标分析(Principal Co-ordinates Analysis, PCoA), 结果显著性使用相似性分析(Analysis of Similarities, ANOSIM)检验。以序列相似度≤98.0% 的标准划分物种水平, 通过韦恩图分析 2 个采样点可培养细菌种水平的异同。

## 2 结果与分析

### 2.1 红树林土壤产 PHA 细菌的分离与筛选

从广东省深圳市福田区的红树林样品共分离 97 株细菌, 厚壁菌门(*Firmicutes*)细菌占 46%, 变形杆菌门(*Proteobacteria*)细菌占 40%, 拟杆菌门(*Bacteroidetes*)和放线菌门(*Actinobacteria*)细菌各占 6%。如图 1 所示, *phaC* 基因阳性的菌株共 13 株

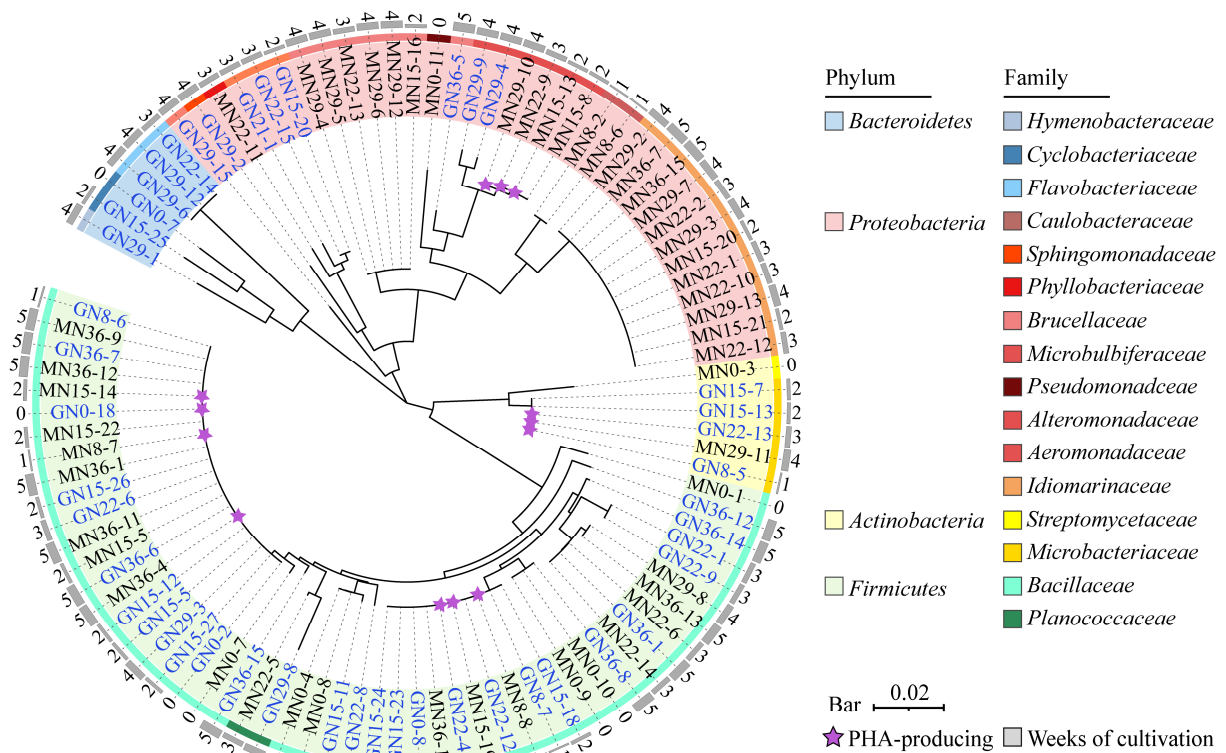


图 1 红树林海桑根际土壤和滩涂土壤中可培养细菌的 16S rRNA 基因的系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences from culturable bacteria isolated from *Sonneratia caseolaris* rhizosphere and shoal of mangrove ecosystem

注: 产 PHA 细菌以星号标记在系统发育树上; 最外圈数字表示菌株分离的样品培养时间(周); 系统发育树基于 1 000 次 Bootstrap 测试的邻接法构建, Bootstrap 值>50%以黑色圆圈表示

Note: PHA-producing bacteria are indicated by stars at the phylogenetic tree tips; The numbers at the outmost circle indicate the weeks of culturing before isolation; The neighbor-joining phylogenetic tree is based on bootstrap 1 000 replicates and bootstrap values >50% are shown by black dots at the nodes

(图 1 标星号菌株), 它们分别来自芽孢杆菌科(*Bacillaceae*)、微杆菌科(*Microbacteriaceae*)和交替单胞菌科(*Alteromonadaceae*), 占总分离细菌的 13%。

总而言之, 红树林滩涂土壤样品(MN)和海桑根际土壤样品(GN)的可培养细菌种类相差大, 图 2A 中显示, GN 和 MN 样品分布聚成两大类(椭圆的置信区间为 0.6; ANOSIM,  $R=0.3185$ ,  $P=0.007$ , Permutations=999)。图 2B 显示菌株在种水平仅有 4 个物种相同。此外, 延长培养时间使样品区系发生变化, 图 2A 中 MN0 和 GN0 样品中可培养细菌种类并不在椭圆范围内。产 PHA 细菌中只有一株(GN0-18)来自直接分离的样品, 说明延长培养时间能增加从样品中分离的细菌的多样性, 从而获得更多的产 PHA 细菌菌株。

## 2.2 产 PHA 细菌的代谢通路和 PHA 相关基因

13 株 *phaC* 阳性细菌来自 4 个科(图 1), 根据 16S rRNA 基因相似度以及菌株活化情况, 共完成

测试 7 株 *phaC* 阳性菌的基因组框架图, 菌株的分类信息及基因组特征见表 1。芽孢杆菌科包括 3 株细菌, 其中 *Cytobacillus firmus* 为 2019 年由坚强芽孢菌(*Bacillus firmus*)更名而来<sup>[19]</sup>。3 株菌都注释出了逆三磷酸循环(Reverse Tricarboxylic Acid Cycle, rTCA)通路, 说明其具有固碳的潜力(图 3)。此外, 基于 16S rRNA 基因序列全长的相似度, *C. firmus* MN36-4 为一株潜在新菌。发现除烃海杆菌(*Marinobacter hydrocarbonoclasticus* MN29-10)含有与铜绿假单胞菌相似的 *phaC* 基因, 3 株酯香微杆菌(*Microbacterium esteraromaticum*) GN22-13、GN8-5 和 MN29-11 虽然在分离阶段利用引物 PHACGN 扩增出 500 bp 的条带, 但是在基因组中未注释出任何与已知 PHA 合成有关的基因。因为使用的引物针对已知 *phaC* 基因, 推测由于该引物特异性差, 导致后续二次重新扩增 *phaC* 基因未成功。

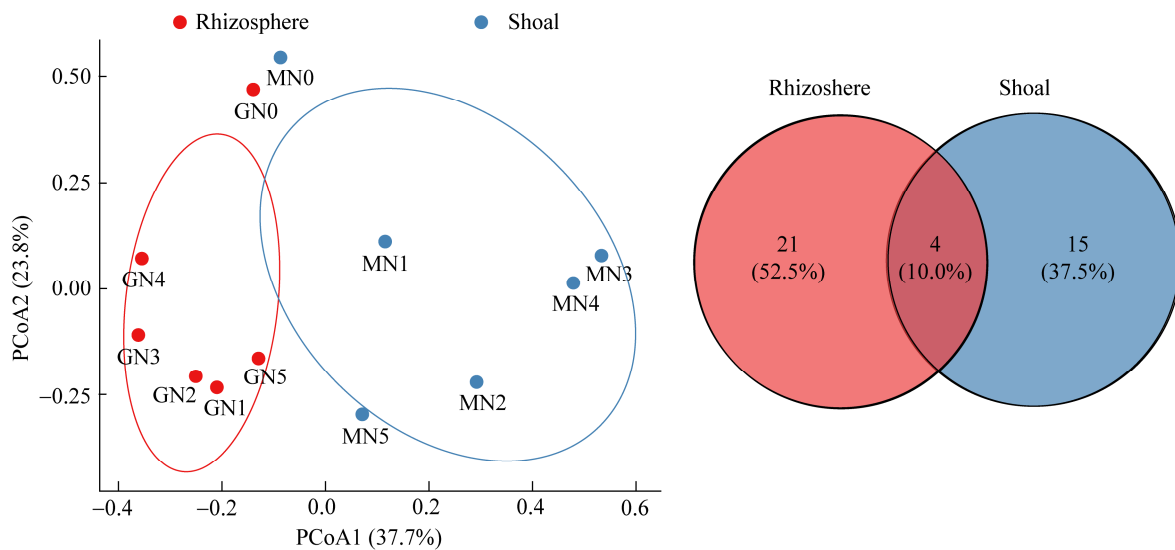


图 2 红树林样品中海桑根际土壤和滩涂土壤中细菌组成的差异

Figure 2 Differences of species composition between bacteria isolated from the soil samples collected from *Sonneratia caseolaris* rhizosphere and shoal of mangrove ecosystem

注: A: 物种组成随培养时间变化的主坐标轴分析; B: 样品在种水平上的韦恩图; GN 和 MN 分别表示样品来自根际和滩涂; 0-5 表示样品分离前培养的周数

Note: A: PCoA plot of species from 2 samples cultivated for 5 weeks; B: Venn diagram of species from 2 samples; GN and MN indicate samples from rhizosphere and shoal, respectively; 0-5 indicates the weeks of culturing before isolation



表 1 红树林土壤分离产 PHA 细菌的基因组特征

Table 1 Genome features of PHA-producing bacteria isolated from mangrove soil samples

Strain	Taxonomy	16S rRNA gene similarity (%)	Genome size (Mb)	GC (mol%)	Scaff old	Gene number
MN29-10	<i>Ma. hydrocarbonoclasticus</i>	99.7	4.24	57.1	33	3 967
GN22-4	<i>B. flexus</i>	99.9	4.07	37.8	26	4 198
MN15-19	<i>B. flexus</i>	99.1	3.95	37.9	36	4 105
MN36-4	<i>C. firmus</i>	98.5	5.00	41.9	15	5 522
GN22-13	<i>Mi. esteraromaticum</i>	98.9	3.06	68.0	6	2 861
GN8-5	<i>Mi. esteraromaticum</i>	99.2	3.06	68.0	6	2 860
MN29-11	<i>Mi. esteraromaticum</i>	99.1	3.18	67.9	3	3 014

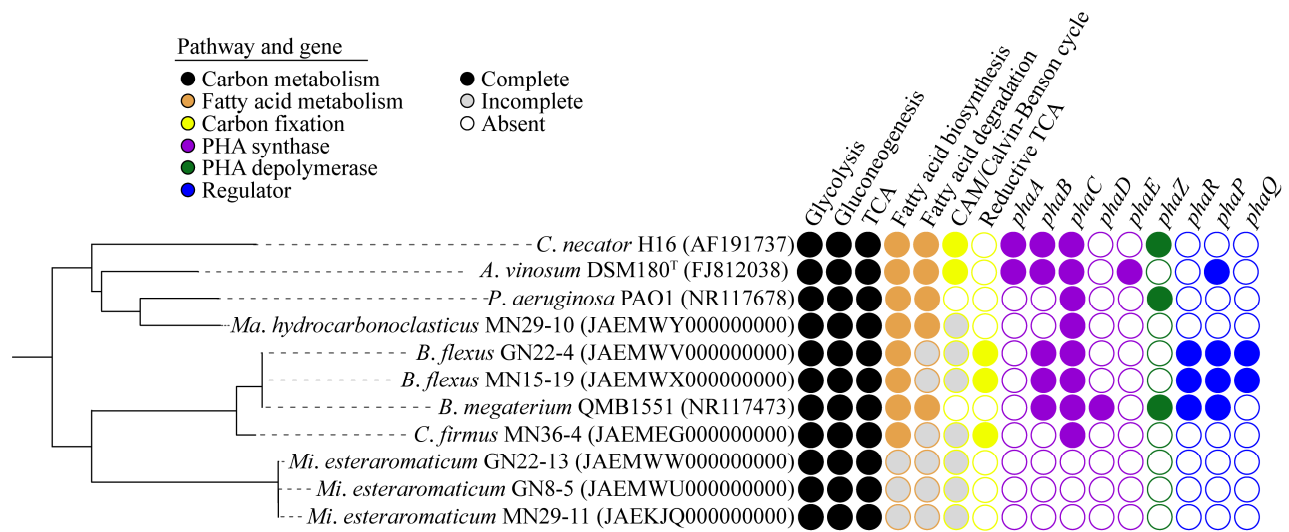


图 3 红树林产 PHA 细菌的代谢途径和 PHA 合成基因

Figure 3 Metabolic pathways and PHA synthesis genes of PHA producing bacteria isolated from mangrove ecosystem

注: 括号中标注 16S rRNA 基因序列的序列号; 7 条代谢通路信息从左至右分别对应 KEGG 代谢通路图: map00010、map00020、map00061、map00071、map00710 和 map00720

Note: Accession number of 16S rRNA gene sequences are shown in brackets. The metabolic pathways correspond to KEGG pathway maps: map00010, map00010, map00020, map00061, map00071, map00710 and map00720 in KEGG

2.3 细菌中聚羟基脂肪酸酯的含量和种类

7 株来自红树林的细菌菌株利用 3 种碳源产 PHA 的组成和含量见表 2。全部细菌合成的 PHA 由 3-羟基丁酸(3HB)和 3-羟基戊酸(3HV)构成, 碳源对菌株 PHA 的单体组成和 PHA 在细胞中的含量均有影响。利用葡萄糖作为碳源培养芽孢杆菌科细菌 MN15-19、MN36-4, 培养 4 d 的 PHA 累积量占细胞干重的比值分别达到了 11.3%和 7.0%。

3 讨论与结论

自红树林土壤样品中分离出 97 株可培养细

菌, 厚壁菌门以 46%的比例占优势地位, 其次为占比为 40%的变形菌门。研究发现近海沉积物中变形菌门占总可培养细菌的 63%<sup>[20]</sup>, 说明红树林土壤可培养细菌与近海沉积物样品有较大差别。基于宏基因组数据显示, 深港两地红树林沉积物<sup>[21]</sup>和雷州市红树林林间沉积物<sup>[22]</sup>变形菌门细菌为优势种群, 而本研究中厚壁菌门细菌占优势地位。细菌群落组成受到检测方法的影响, 当使用可培养细菌估计群落组成时, 由于变形菌门、厚壁菌门细菌更容易培养, 因此会高估其比例; 而使用免培养方法时, 由于芽孢杆菌科细菌的 DNA 较难自环境样

表 2 7 株细菌利用 3 种碳源产 PHA 的分析

Table 2 Analysis of PHA from different carbon sources in 7 strains

Strain	Carbon source	PHA content of CDW [W/W] (%)	PHA composition (mol%)	
			3HB	3HV
<i>Ma. hydrocarbonoclasticus</i> MN29-10	Pyruvate	0.5	77.6	22.4
	Glucose	0.4	37.1	62.9
	NB	0.7	43.1	56.9
<i>B. flexus</i> GN22-4	Pyruvate	ND	ND	ND
	Glucose	ND	ND	ND
	NB	0.3	44.1	55.9
<i>B. flexus</i> MN15-19	Pyruvate	<b>11.3</b>	97.9	2.1
	Glucose	<b>2.6</b>	87.6	12.4
	NB	<b>2.1</b>	94.1	5.9
<i>C. firmus</i> MN36-4	Pyruvate	0.7	51.2	48.8
	Glucose	<b>7.0</b>	97.1	2.9
	NB	<b>1.9</b>	92.4	7.6
<i>Mi. esteraromaticum</i> GN22-13	Pyruvate	1.0	75.3	24.7
	Glucose	0.8	77.0	23.0
	NB	0.2	27.7	72.3
<i>Mi. esteraromaticum</i> GN8-5	Pyruvate	<b>1.1</b>	81.4	18.6
	Glucose	1.0	47.2	52.8
	NB	0.3	19.7	80.3
<i>Mi. esteraromaticum</i> MN29-11	Pyruvate	<b>2.7</b>	57.9	42.1
	Glucose	1.0	48.9	51.1
	NB	0.8	43.2	56.8

注: NB; 营养肉汤; CDW; 细胞干重; 3HB; 3-羟基丁酸; 3HV; 3-羟基戊酸; ND: 未检出; 粗体表示 PHA 含量>1%

Note: NB: Nutrient broth; CDW: Cell dry weight; 3HB: 3-hydroxybutyric acid; 3HV: 3-hydroxyvalerate; ND: Not detected; The numbers of PHA content larger than 1% are in bold

品中提取<sup>[23]</sup>, 可能导致宏基因组数据低估了厚壁菌门细菌所占的比例。因此, 该采样点的细菌群落组成特征需要在后续研究中同步开展免培养和可培养方法进行进一步的验证。此外, 虽然基于宏基因组的研究中发现红树林中也有古菌的分布<sup>[24]</sup>, 但是由于古菌培养困难, 本研究并未分离获得任何古菌菌株。

本研究以分离产 PHA 细菌为目标研究我国红树林生态系统中的细菌资源, 获得芽孢杆菌科 (*Bacillaceae*)、微杆菌科 (*Microbacteriaceae*) 和交替单胞菌科 (*Alteromonadaceae*) 的产 PHA 细菌资源。本研究产 PHA 细菌的分离比例较低 (13%), 吴琼等<sup>[25]</sup>和 Rawte 等<sup>[10]</sup>分别自土壤、活性污泥和红树林中筛选出约 40% 的产 PHA 细菌。造成产 PHA 细菌比例差异较大的原因与分离策略有关。Anas

等<sup>[20]</sup>的研究以产 PHA 能力作为唯一标准, 未鉴定细菌的分类地位且不考虑菌株重复度, 而本研究仅将 16S rRNA 基因序列相似度差异大于 0.02% 的菌株作为个体, 避免了 PHA 阳性菌落重复计算的问题。

目前报道的产 PHA 菌以革兰氏阴性细菌为主, 革兰氏阳性的产 PHA 细菌主要来自芽孢杆菌属和链霉菌属, 蜡样芽孢杆菌 (*B. cereus* M5) 能利用甜菜糖蜜产高达 73.8% (质量分数) 的 PHA<sup>[26]</sup>, 苏云金芽孢杆菌 (*B. thuringiensis* EGU45) 利用豌豆皮废料产 55% (质量分数) 的 PHA<sup>[27]</sup>, 巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*) 利用乳业废料和海水产 11% (质量分数) 的 PHA<sup>[28]</sup>。本研究分离出 7 株产 PHA 芽孢杆菌科菌株, 占总分离产 PHA 菌的 54%, 其中 MN15-19 的 PHA 在细胞中的含量达 11.3% (质量



分数)。芽孢杆菌是常用的工业生产菌株,其生长速度快、生物量累积的能力强,因此,下一步研究中,我们将对菌株 MN15-19 产 PHA 的能力进行全面测试,评估其工业化开发的潜力。

目前细菌中的 PHA 聚合酶(PhaC)根据一级结构、底物特异性和酶的亚基构成等方面分为 4 种类型。所有 PhaC 都包含一个丝氨酸活性位点被半胱氨酸取代的脂肪酶结构(Lipase Box)。不同的细菌除了 PhaC 的类型不同,其差异也体现在 PhaC 与其他 PHA 代谢相关的基因形成的基因簇不同<sup>[29]</sup>。芽孢杆菌属细菌的 PHA 合成酶以巨大芽孢杆菌为代表,需 IV 类 PhaC 合成酶与 PhaR 亚基共同完成 PHA 合成<sup>[17]</sup>。本研究中 *B. flexus* GN22-4 和 MN15-19 中注释的 PhaC 即为此类(图 3)。然而 *C. firmus* MN36-4 虽然同属芽孢杆菌科,却仅注释出 PhaC (图 2)。2020 年基于厚壁菌门细菌的保守蛋白质序列, *Cytobacillus* 从原 *Bacillus* 中划出<sup>[19]</sup>,我们推测 *Cytobacillus* 的 PHA 合成也可能与 *Bacillus* 存在差异,不需要 PhaR 亚基的辅助。由于本研究报道的基因组数据尚未组装成环,该推测需要进一步研究确认。

本研究在 3 株芽孢杆菌科产 PHA 细菌菌株 GN22-4、MN15-19 和 MN36-4 中发现基因组中存在逆三羧酸循环(rTCA)途径。通过文献调查,我们并未发现与之类似的报道。该途径是自然界最古老的固碳途径之一,能够合成乙酰辅酶 A、丙酮酸等重要的代谢产物<sup>[30]</sup>,也是深海火山口细菌的主要固碳途径,广泛存在于绿菌目(*Chlorobiales*)、产水菌目(*Aquificales*)、 $\epsilon$ -变形杆菌纲(*Episiloproteobacteria*)、硝化螺旋菌门(*Nitrospirae*)和少量变形杆菌门的细菌中<sup>[31]</sup>。虽然目前并无基于 rTCA 固碳合成 PHA 的实例,但是已有报道自养细菌红螺细菌(*Rhodospirillum rubrum*)能够通过卡尔文循环进行光合作用并产 PHA<sup>[32]</sup>,紫色非硫细菌在补加丙酮酸的海水培养基中产 PHA,最高 PHA 含量达细胞干重的 30%<sup>[33]</sup>。后续通过对 3 株

芽孢杆菌科细菌固碳产 PHA 的进一步研究,有望发现一种新的生产 PHA 的模式。

本研究发现 3 株 *Mi. esteraromaticum* GN22-13、GN8-5 和 MN29-11 具有产 PHA 能力。查阅酯香微杆菌属的分类学信息发现,该属细菌模式菌株并未报道可产 PHA 的能力<sup>[34]</sup>。然而我们通过基因组注释结果未发现 PHA 合成代谢途径的相关基因,推测 GN22-13、GN8-5 和 MN29-11 的 PHA 途径较新颖。该推测需要进一步基于基因组完整数据确认。此外,我们对微杆菌属细菌进行第 2 次 *phaC* 基因检测未能成功获得扩增条带,推测原因为其中 PhaC 合酶较为新颖,与现有引物结合度不高,导致扩增不稳定。本研究使用菌落 PCR 特异性扩增 *phaC* 基因的方法筛选产 PHA 细菌,选择引物为文献中针对已知的 I、II 和 IV 型 PhaC 设计的引物,因此可能存在漏筛的情况,导致 PhaC 阳性菌比例偏低。在后续的研究中我们将根据本研究数据对引物进行优化,扩大识别产 PHA 细菌方法的准确度和范围。

本研究在红树林土壤样品中筛选产 PHA 细菌,获得了革兰氏阳性产 PHA 细菌、具有潜在新型 PhaC 合成酶的产 PHA 细菌以及具有固碳能力的产 PHA 细菌,进一步证实红树林生态系统中的微生物具有其特殊的生理生化特征,PhaC 合成酶基因变异度大,具有资源挖掘的重要价值。

## REFERENCES

- [1] Lee SY, Choi JI, Wong HH. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: mini-review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 1999, 25(1/3): 31-36
- [2] Steinbüchel A, Lütke-Eversloh T. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms[J]. Biochemical Engineering Journal, 2003, 16(2): 81-96
- [3] Han J, Hou J, Liu HL, Cai SF, Feng B, Zhou J, Xiang H. Wide distribution among halophilic archaea of a novel polyhydroxyalkanoate synthase subtype with homology to bacterial type III synthases[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(23): 7811-7819
- [4] De Koning G. Physical properties of bacterial

- poly(*R*)-3-hydroxyalkanoates[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1995, 41(13): 303-309
- [5] Rai R, Keshavarz T, Roether JA, Boccaccini AR, Roy I. Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future[J]. Materials Science and Engineering: R: Reports, 2011, 72(3): 29-47
- [6] Saito Y, Doi Y. Microbial synthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in *Comamonas acidovorans*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 1994, 16(2): 99-104
- [7] Agnew DE, Stevermer AK, Youngquist JT, Pflieger BF. Engineering *Escherichia coli* for production of C<sub>12</sub>-C<sub>14</sub> polyhydroxyalkanoate from glucose[J]. Metabolic Engineering, 2012, 14(6): 705-713
- [8] Wang Q, Nomura CT. Monitoring differences in gene expression levels and polyhydroxyalkanoate (PHA) production in *Pseudomonas putida* KT2440 grown on different carbon sources[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2010, 110(6): 653-659
- [9] Holguin G, Vazquez P, Bashan Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview[J]. Biology and Fertility of Soils, 2001, 33(4): 265-278
- [10] Rawte T, Padte M, Mavinkurve S. Incidence of marine and mangrove bacteria accumulating polyhydroxyalkanoates on the mid-west coast of India[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2002, 18(7): 655-659
- [11] Van-Thuoc D, Huu-Phong T, Thi-Binh N, Thi-Tho N, Minh-Lam D, Quillaguaman J. Polyester production by halophilic and halotolerant bacterial strains obtained from mangrove soil samples located in Northern Vietnam[J]. Microbiology Open, 2012, 1(4): 395-406
- [12] Moorkoth D, Nampoothiri KM. Production and characterization of poly(3-hydroxy butyrate-co-3 hydroxyvalerate) (PHBV) by a novel halotolerant mangrove isolate[J]. Bioresource Technology, 2016, 201: 253-260
- [13] Lakshmanan M, Foong CP, Abe H, Sudesh K. Biosynthesis and characterization of co and ter-polyesters of polyhydroxyalkanoates containing high monomeric fractions of 4-hydroxybutyrate and 5-hydroxyvalerate via a novel PHA synthase[J]. Polymer Degradation and Stability, 2019, 163: 122-135
- [14] Mu DS, Liang QY, Wang XM, Lu DC, Shi MJ, Chen GJ, Du ZJ. Metatranscriptomic and comparative genomic insights into resuscitation mechanisms during enrichment culturing[J]. Microbiome, 2018, 6(1): 230
- [15] Juengert JR, Bresan S, Jendrossek D. Determination of polyhydroxybutyrate (PHB) content in *Ralstonia eutropha* using gas chromatography and Nile red staining[J]. Bio-Protocol, 2018, 8(5): e2748
- [16] Martinez-Gutierrez CA, Latisnere-Barragán H, García-Maldonado JQ, López-Cortés A. Screening of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria and PhaC-encoding genes in two hypersaline microbial mats from Guerrero Negro, Baja California Sur, Mexico[J]. PeerJ, 2018, 6: e4780
- [17] Nayak PK, Mohanty AK, Gaonkar T, Kumar A, Bhosle SN, Garg S. Rapid identification of polyhydroxyalkanoate accumulating members of *Bacillales* using internal primers for *phaC* gene of *Bacillus megaterium*[J]. ISRN Bacteriology, 2013: 562014
- [18] Chen GQ, Wei DX. Microbial Polyhydroxyalkanoates[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2014: 31 (in Chinese)  
陈国强, 魏岱旭. 微生物聚羟基脂肪酸酯[M]. 北京: 化学工业出版社, 2014: 31
- [19] Patel S, Gupta RS. A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: proposal for six new genera of *Bacillus* species, *Peribacillus* gen. nov., *Cytobacillus* gen. nov., *Mesobacillus* gen. nov., *Neobacillus* gen. nov., *Metabacillus* gen. nov. and *Alkalihalobacillus* gen. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2020, 70(1): 406-438
- [20] Anas A, Nilayangod C, Jasmin C, Vinothkumar S, Parameswaran PS, Nair S. Diversity and bioactive potentials of culturable heterotrophic bacteria from the surficial sediments of the Arabian Sea[J]. 3 Biotech, 2016, 6(2): 238
- [21] Ding SL. The heavy metal pollutions and microbial communities of mangrove sediments in two major metropolis of China-Shenzhen and Hong Kong[D]. Shenzhen: Master's Thesis of Shenzhen University, 2018 (in Chinese)  
丁苏丽. 深港两地红树林沉积物中重金属污染及其与微生物群落结构的关系研究[D]. 深圳: 深圳大学硕士学位论文, 2018
- [22] Yin MQ, Feng JX, Huang XF, Cai ZH, Lin GH, Zhou J. Soil microbial community structure in natural and transplanted mangrove (*Kandelia obovata*) forests[J]. Ecological Science, 2017, 36(5): 1-10 (in Chinese)  
殷萌清, 冯建祥, 黄小芳, 蔡中华, 林光辉, 周进. 天然及人工红树林土壤微生物群落结构分析[J]. 生态科学, 2017, 36(5): 1-10
- [23] Zhang XH. Marine Microbiology[M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 2016: 98 (in Chinese)  
张晓华. 海洋微生物学[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 2016: 98
- [24] Pan J, Chen YL, Wang YM, Zhou ZC, Li M. Vertical distribution of bathyarchaeotal communities in mangrove wetlands suggests distinct niche preference of Bathyarchaeota subgroup 6[J]. Microbial Ecology, 2019, 77(2): 417-428
- [25] Wu Q, Sun SQ, Yu HH, Chen XZ, Chen GQ. Environmental dependence of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates[J]. Acta Polymerica Sinica, 2000(6):

- 751-756 (in Chinese)  
吴琼, 孙素琴, 余海虎, 陈新滋, 陈国强. 聚羟基脂肪酸酯细菌合成的生长环境依赖性[J]. 高分子学报, 2000(6): 751-756
- [26] Yilmaz M, Beyatli Y. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) production by a *Bacillus cereus* M5 strain in sugarbeet molasses[J]. Zuckerindustrie, 2005, 130(2): 109-112
- [27] Kumar T, Singh M, Purohit HJ, Kalia VC. Potential of *Bacillus* sp. to produce polyhydroxybutyrate from biowaste[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 106(6): 2017-2023
- [28] Philip S, Sengupta S, Keshavarz T, Roy I. Effect of impeller speed and pH on the production of poly(3-hydroxybutyrate) using *Bacillus cereus* SPV[J]. Biomacromolecules, 2009, 10(4): 691-699
- [29] Mezzolla V, D'Urso OF, Poltronieri P. Role of PhaC type I and type II enzymes during PHA biosynthesis[J]. Polymers, 2018, 10(8): 910
- [30] Nunoura T, Chikaraishi Y, Izaki R, Suwa T, Sato T, Harada T, Mori K, Kato Y, Miyazaki M, Shimamura S, et al. A primordial and reversible TCA cycle in a facultatively chemolithoautotrophic thermophile[J]. Science, 2018, 359(6375): 559-563
- [31] Hügler M, Sievert SM. Beyond the Calvin cycle: autotrophic carbon fixation in the ocean[J]. Annual Review of Marine Science, 2011, 3: 261-289
- [32] Heinrich D, Raberg M, Fricke P, Kenny ST, Morales-Gamez L, Babu RP, O'Connor KE, Steinbüchel A. Synthesis gas (syngas)-derived medium-chain-length polyhydroxyalkanoate synthesis in engineered *Rhodospirillum rubrum*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(20): 6132-6140
- [33] Higuchi-Takeuchi M, Numata K. Acetate-inducing metabolic states enhance polyhydroxyalkanoate production in marine purple non-sulfur bacteria under aerobic conditions[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2019, 7: 118
- [34] Takeuchi M, Hatano K. Union of the genera *Microbacterium* Orla-Jensen and *Aureobacterium* Collins et al. in a redefined genus *Microbacterium*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1998, 48(Pt 3): 739-747