

## 研究报告

## 一株对羟基苯甲酸酯海洋降解菌的关键酶基因克隆与表达

徐慧, 刘曹彤, 彭学\*

江苏师范大学生命科学学院, 江苏 徐州 221116

徐慧, 刘曹彤, 彭学. 一株对羟基苯甲酸酯海洋降解菌的关键酶基因克隆与表达[J]. 微生物学通报, 2023, 50(5): 1772-1786.

XU Hui, LIU Caotong, PENG Xue. Cloning and expression of genes encoding key enzymes of a marine paraben-degrading strain[J]. Microbiology China, 2023, 50(5): 1772-1786.

**摘要:** 【背景】对羟基苯甲酸及其酯类常作为合成多种芳香族化合物的前体物质广泛应用于多个领域, 但其难以自然降解给环境造成了污染问题, 同时这些污染物随着洋流迁移到海洋中破坏海洋生态环境。【目的】从海洋环境中筛选对羟基苯甲酸酯高效降解菌, 通过全基因组测序及注释分析, 预测对羟基苯甲酸酯代谢通路, 确定其代谢过程中的关键酶并进行功能研究。【方法】通过富集培养从海洋环境中分离对羟基苯甲酸酯降解菌, 利用基因克隆技术将降解对羟基苯甲酸酯关键酶基因在大肠杆菌中高效表达, 探究重组蛋白活性及酶学特征。

【结果】从海底泥沙中筛选到一个菌株, 经 16S rRNA 基因测序鉴定为硝化柠檬球菌 (*Citricoccus nitrophenolicus*); 该菌株能够利用多种对羟基苯甲酸酯类物质进行生长, 在甲酯为碳源条件下生长状态最好; 将羧酸酯酶基因和单加氧酶基因在大肠杆菌中进行高效表达, 重组表达的羧酸酯酶最适反应条件为: pH 8.0, 30 °C 反应 30 min; 重组表达的单加氧酶活性表达依赖于辅酶,  $Mg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  和  $Fe^{3+}$  可增强该酶活性; 经荧光定量 PCR 进一步确定 z13175、z09075 为编码羧酸酯酶的基因。【结论】羧酸酯酶和单加氧酶是对羟基苯甲酸酯类转化为原儿茶酸的关键酶, 在对羟基苯甲酸酯类生物降解过程中起到重要作用。

**关键词:** 对羟基苯甲酸酯; 羧酸酯酶; 单加氧酶; 异源表达

资助项目: 江苏师范大学科研创新计划校立项目(2021XKT0754)

This work was supported by the Jiangsu Normal University Scientific Research Innovation Program (2021XKT0754).

\*Corresponding author. E-mail: pengxue@jsnu.edu.cn

Received: 2022-07-25; Accepted: 2022-11-26; Published online: 2023-01-31

## Cloning and expression of genes encoding key enzymes of a marine paraben-degrading strain

XU Hui, LIU Caotong, PENG Xue\*

School of Life Sciences, Jiangsu Normal University, Xuzhou 221116, Jiangsu, China

**Abstract:** **[Background]** 4-hydroxybenzoic acid and its esters are precursors for various aromatic compounds. They are, however, difficult to be decomposed in the nature, causing environmental pollution. These pollutants migrate to the ocean along with ocean current, damaging the marine ecological environment. **[Objective]** To screen a 4-hydroxybenzoic acid esters-degrading strain from the marine environment, predict the metabolic pathways of 4-hydroxybenzoic acid esters by whole-genome sequencing and annotation analysis, and analyze the key enzymes in the pathways and the functions of the enzymes. **[Methods]** We isolated the 4-hydroxybenzoic acid esters-degrading strain through enrichment culture. We used gene cloning technology to express the genes encoding key enzymes in the metabolic pathways of 4-hydroxybenzoic acid esters in *Escherichia coli* and explored the activities and enzymological characteristics of the recombinant proteins. **[Results]** A strain (B1 strain) was screened out from the seabed sediment and identified as *Citricoccus nitrophenolicus* by 16S rRNA sequencing. B1 can grow with diverse 4-hydroxybenzoic acid esters, and the growth status was the best when methyl ester was the only carbon source. Genes encoding carboxylesterase and monooxygenase were successfully expressed in *E. coli*. The optimal reaction conditions of recombinant carboxylesterase were pH 8.0 and 30 °C (30 min). The activity of recombinant monooxygenase depended on coenzyme, and  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , and  $\text{Fe}^{3+}$  can enhance the activity of monooxygenase. As further identified by fluorescent quantitative PCR, z13175 and z09075 were genes encoding carboxylesterase. In the absence of oxygen, B1 strain carried out anaerobic respiration and reduced nitrate to nitrite. **[Conclusion]** Carboxylesterase and monooxygenase are key enzymes in the conversion of 4-hydroxybenzoic acid esters to protocatechuic acid, which play an important role in the biodegradation of the esters.

**Keywords:** 4-hydroxybenzoic acid esters; carboxylesterase; monooxygenase; heterologous expression

对羟基苯甲酸 (4-hydroxybenzoic acid, 4HBA) 为芳香族化合物, 易溶于醇类但极微溶于水, 常作为合成各种芳香族化合物的前体物质广泛应用于食品、药物、化妆品等多个行业, 具有广泛的抗菌活性<sup>[1]</sup>。对羟基苯甲酸酯 (4-hydroxybenzoate esters, 4HBA 酯) 包括甲酯、乙酯、丙酯、丁酯等, 在强碱性环境下会水解

生成 4HBA 和醇类。4HBA 酯随着烷基碳链的增加抗菌活性增大、毒性降低, 可作为防腐剂应用于食品行业<sup>[2]</sup>。在 20 世纪中期, 4HBA 酯首次作为抑菌剂用于药物中, 4HBA 酯含有酚羟基结构可破坏微生物细胞膜, 使细胞内蛋白质变性, 抑制呼吸酶活性, 进而影响微生物的生长繁殖<sup>[3-4]</sup>。4HBA 酯具有广谱抑菌效果, 经研究

发现其对革兰氏阳性菌的抑制效果高于革兰氏阴性菌,与传统抑菌防腐剂山梨酸钾和苯甲酸钠相比,4HBA 酯在抑制霉菌和制作成本方面具有明显优势<sup>[5]</sup>。多个国家已规定可将几种对羟基苯甲酸酯作为食品添加剂,我国在 2014 年(GB 2760—2014)批准可将对羟基苯甲酸甲酯钠、乙酯钠和丙酯钠作为防腐剂应用于食品行业<sup>[4]</sup>。

Imai 等<sup>[6]</sup>和 Ozaki 等<sup>[7]</sup>发现 4HBA 酯在人体内主要是通过羧酸酯酶(carboxylesterase)的作用代谢为 4HBA 和醇类;Koseki 等<sup>[8]</sup>通过体外表达羧酸酯酶的研究发现该酶可催化芳香族酯类的水解。4HBA 酯在好氧环境中易进行生物降解,常温条件下 4HBA 酯在羧酸酯酶的催化作用下水解生成 4HBA<sup>[9]</sup>;4HBA 可在单加氧的作用下生成原儿茶酸<sup>[10-12]</sup>;原儿茶酸的苯环可以在 2,3 位、3,4 位或 4,5 位间被打开,分别由原儿茶酸 2,3 双加氧酶<sup>[13]</sup>、3,4 双加氧酶<sup>[14]</sup>、4,5 双加氧酶<sup>[15-16]</sup>催化,每个途径的裂解产物经水解酶、羧酸酶的催化作用最终进入三羧酸循环完全氧化为二氧化碳。

4HBA 酯能够以颗粒物的形式落入到地表水中,或通过地下径流的方式污染地表水,进而经洋流迁移作用最终汇入海洋中,从而污染海洋环境,影响整个生态环境的稳定性<sup>[17]</sup>。4HBA 酯长期存在于水环境中不仅会污染环境,还会对人类健康造成危害,研究发现在人体乳房组织中检测到的 4HBA 酯浓度水平可诱导体外细胞增殖,乳腺癌的发生可能与 4HBA 酯在体内不断积聚有关<sup>[18-19]</sup>。目前,4HBA 酯的降解方法有光降解法、高级氧化法、液氯处理及生物降解等,其中液氯消毒是污水处理厂去除 4HBA 酯污染物的主要方式,但此法在处理过程中可能产生对环境有害的副产物且不易消除<sup>[20]</sup>。因此,寻找安全高效的 4HBA 酯降解

方法至关重要。

随着研究人员对 4HBA 酯生物降解的深入研究,现已报道了几种可降解 4HBA 酯的微生物,但对于降解过程中水解酶作用的报道较少。本研究通过筛选分离出一株 4HBA 酯降解菌 B1,通过高效液相色谱探究该菌对 4HBA 酯的降解特性并进行全基因组测序,对功能基因进行注释后预测 4HBA 酯代谢通路,筛选出关键酶的编码基因,通过基因工程技术克隆目的基因,构建表达载体并将其导入大肠杆菌,进一步探究羧酸酯酶和单加氧酶在 4HBA 酯降解过程中的作用,以期为微生物降解 4HBA 酯提供理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 样 品

样品为浙江省舟山市近海采集的泥沙,于无菌袋中密封,−20 °C 保存。

#### 1.1.2 培养基

LB 培养基(g/L): 酵母浸粉 5.0, 胰蛋白胨 10.0, 氯化钠 10.0, 调 pH 值至 7.0。人工海水培养基的配制参照文献[21], pH 值调至 7.6, 添加 0.05% 4HBA 甲酯即为本实验的筛选培养基。以上培养基中添加 16 g/L 的琼脂粉末可制得相应的固体培养基。

#### 1.1.3 主要试剂和仪器

PBS 缓冲液:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.27 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.42 g, NaCl 8 g, KCl 0.2 g, 加 800 mL 去离子水充分搅拌溶解, pH 值调至 7.4, 最后定容到 1 L。

AMP 浓缩液(100 mg/mL): 10 g 氨苄青霉素粉末, 完全溶解后加灭菌水定容至 10 mL, 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后分装, −20 °C 保存。

Sanprep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒和 PCR 扩增试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公

司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 无缝克隆酶和内切酶 *Nde* I、*Eco*R I, 宝生物工程(大连)有限公司; 反转录试剂盒和 RT-qPCR 试剂盒, 南京诺维赞生物科技有限公司。

高效液相色谱仪(HPLC), 沃特世公司; PCR 仪, 上海顶仪科技有限公司; 荧光定量 PCR 仪, 耶拿分析仪器(北京)有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 降解菌的富集培养及分离纯化

泥沙样品取自浙江省舟山市近海, 取 1 g 样品放入含 0.05% 4HBA 甲酯的 100 mL 人工海水培养基中, 30 °C、180 r/min 恒温振荡培养, 培养基浑浊后取 100  $\mu$ L 至新的培养基中继续摇床培养, 重复 4 次后取少量菌液于筛选固体培养基平板上进行划线分离纯化菌株, 进而获得纯培养菌株。

观察菌落特征, 挑取形态不同的单菌落进行划线培养, 革兰氏染色观察显微形态, 通过各菌株对 4HBA 甲酯的利用情况筛选出活性较强的菌株 B1。

### 1.2.2 菌株鉴定

将最终筛选到的菌株进行 16S rRNA 基因菌种鉴定, PCR 扩增引物是 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 反应体系: DNA 模板(105.6 ng/ $\mu$ L) 2  $\mu$ L, 引物 27F 和 1492R (10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L, 2 $\times$ PrimeSTAR Max Premix 25  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 21  $\mu$ L。PCR 反应条件: 98 °C 30 s; 98 °C 30 s; 65 °C 32 s; 72 °C 35 s, 35 个循环; 72 °C 2 min。PCR 扩增产物纯化后送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。将得到的基因序列在 EzBioCloud 和 NCBI 数据库检索与其序列相近的已知菌种, 然后通过 MEGA 5.0 软件进行系

统发育树的构建和分析。

### 1.2.3 探究 B1 菌株的耐盐性

B1 菌株为海洋环境中分离所得, 为探究菌株的耐盐性大小, 配制不同盐浓度的培养基, 设置添加的 NaCl 终浓度分别为 0、0.5%、1.0%、2.5%、5.0%、7.0%、10.0%, pH 7.4。将 B1 菌株接至盐浓度不同的培养基中, 菌初始浓度保持一致, 于 30 °C、180 r/min 条件下培养 16 h 后取样, 测定不同盐浓度下菌液的 *OD*<sub>600</sub> 值, 大肠杆菌为对照组。

### 1.2.4 探究 B1 菌株对 4HBA 酯的降解特性

选取 10 种 4HBA 酯类, 在含有 0.05% 4HBA 酯为唯一碳源的无机盐培养基中接入用无机盐培养基清洗后的菌悬液, 于 30 °C、180 r/min 条件下培养, 每隔 6 h 取样, 使用紫外分光光度计测菌液 *OD*<sub>600</sub> 值, 并利用高效液相色谱检测 4HBA 酯的降解情况。通过 HPLC 检测不同浓度各酯类、4HBA 的峰面积并制作标准曲线, 结合各样品中酯类降解结果, 计算出各个时间底物和中间代谢产物的浓度。

### 1.2.5 B1 菌株全基因组测序分析

对 B1 菌株进行全基因组测序分析, 送测样本经 DNA 提取、样本质检、文库构建、文库质检上机测序等进行二代、三代测序。通过 Fastp 软件将得到的原始数据进行过滤, 以获得有效数据; 通过统计学方法对过滤后的 Reads 进行碱基组成和质量值分布的统计, 可直观呈现测序质量和数据质量情况。

对 B1 菌株基因组进行综合预测, 通过 NCBI 和 Prokka 对基因组进行编码基因预测和注释, 与 Nr、Swiss-Prot、GO、KEGG、COG 5 个数据库进行比对分析后, 得到相应的功能注释信息。通过 Flye 软件对三代测序 Reads 进行拼接组装, 结合编码基因的预测与注释结果, 绘制基因组图谱。

### 1.2.6 构建表达载体

根据酶切位点及上、下游引物的  $T_m$  值设计目的基因 z13175、z09075 和 z10245 引物, 设计引物结果如表 1 所示, 引物由金唯智生物科技公司合成。以 B1 菌株基因组 DNA 为模板, 在 Q5 高保真聚合酶作用下对 2 个基因片段进行扩增, 根据引物及模板 DNA 大小确定退火温度及延伸时长, 进行 PCR 反应。

PCR 产物经核酸电泳验证后, 通过 PCR 产物纯化试剂盒进行纯化处理。基因 z13175、z09075 和 z10245 上游引物序列均包含 *Nde* I 的酶切位点, 下游引物序列包含 *EcoR* I 的酶切位点, 所以选用 *Nde* I 和 *EcoR* I 对环状载体 pCold-II 进行酶切; 将纯化后 PCR 产物和 pCold-II 质粒酶切后的线性化载体在无缝克隆酶的作用下进行酶连, 构建重组质粒 z13175-pCold-II、z09075-pCold-II 和 z10245-pCold-II。对重组质粒进行酶切验证, 将结果与预期相符的重组质粒送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 进一步确定克隆结果。

### 1.2.7 目的蛋白诱导表达与纯化

将重组质粒 z13175-pCold-II、z09075-pCold-II 和 z10245-pCold-II 分别转入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中, 挑取阳性克隆子在含有 100 mg/mL AMP 的 LB 试管中 37 °C、180 r/min 培养过夜,

按 1:100 比例转入 100 mL LB (含 100 mg/mL AMP) 液体培养基中进行扩大培养, 至菌液  $OD_{600}$  为 0.7 时取出培养瓶冰浴, 冷却后加入终浓度为 1 mmol/L 的蛋白诱导剂 IPTG, 15 °C、100 r/min 培养过夜。4 °C、6 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用 PBS 缓冲液(pH 7.4)重悬菌体, 再次 4 °C、6 000 r/min 离心 10 min 后弃上清、重悬菌体, 150 W 超声破碎 5 s、停歇 5 s, 超声裂解菌体总时长为 10 min。细胞裂解液 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min, 得到的上清液即为粗酶。

上清液中含有的杂蛋白较多, 不利于后续对目的蛋白的研究, 因此选用 Ni-NTA 镍柱对蛋白进行纯化处理。将粗酶液上样至经破菌缓冲液 (20 mmol/L Tris, 300 mmol/L NaCl, 1 mmol/L PMSF, pH 7.4) 平衡后的柱子中, 收集蛋白流出液; 然后用平衡缓冲液 (20 mmol/L Tris, 300 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, pH 7.4) 进行淋洗, 洗去未特异性结合的蛋白, 收集淋洗液; 最后用不同浓度的咪唑洗脱缓冲液洗脱目的蛋白, 分管收集流出液。将各收集管中的流出液进行 SDS-PAGE 蛋白电泳, 考马斯亮蓝 R250 染色、脱色后分析蛋白条带, 纯化后的重组蛋白于 -20 °C 短期保存, 用于后续实验。

表 1 z13175、z09075 和 z10245 引物设计

Table 1 Primer design of z13175, z09075 and z10245

引物名称	引物序列	产物长度
Primer name	Primer sequence (5'→3')	Product size (bp)
z13175F	ATCATCATCATCATATGATGACCGAACCACAGAACAC	40
z13175R	AGGTCGACAAGCTTGAATTCTCTACTTCACGGTGTAGTCGA	40
z09075F	ATCATCATCATCATCATATGCTGACGGTGGGTGAACGCGA	40
z09075R	AGGTCGACAAGCTTGAATTCTCTACTGGCCGGCGGCCCGCA	40
z10245F	ATCATCATCATCATCATATGATGGCAGATCGCGCAGACAC	40
z10245R	AGGTCGACAAGCTTGAATTCTCAGGCGTGTGGCCAGCCGG	40

### 1.2.8 酶活性检测

将 4HBA 甲酯作为酶催化反应的底物, 酶与底物反应一定时间后, 通过高效液相色谱检测底物的减少量及生成物增加量分析酶活力大小。酶活性检测反应体系(1 mL): 0.1 mL 20 mol/mL 4HBA 甲酯, 0.2 mL 酶蛋白纯化液, 0.7 mL PBS 缓冲液(pH 7.4)。通过酶与底物反应检测酶活性, 进一步探究羧酸酯酶和单加氧酶的最适温度、pH、时间等条件, 优化酶促反应条件。

### 1.2.9 RT-qPCR 验证

通过传统 RNA 提取方法(Trizol 法)抽提 B1 菌株的总 RNA, 然后通过反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA, 最后通过荧光定量 PCR 检测羧酸酯酶基因在 RNA 水平的表达量。本实验选用 16S rRNA 基因为内参基因, 实验组为 4HBA 甲酯诱导表达酯酶, 对照组为 4HBA 诱导表达羧酸酯酶。每组设置 3 个平行。PCR 反应体系: SYBR Green Mix 10  $\mu$ L, Primer 1、Primer 2 (10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L, cDNA 模板(38.6 ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L。PCR 反应条件: 93  $^{\circ}$ C 8 min; 94  $^{\circ}$ C 9 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的筛选与纯化

以 4HBA 甲酯为唯一碳源的无机盐培养基培养菌株, 进而通过平板涂布、划线方法分离得到多株降解菌。选取一株 4HBA 甲酯降解活性最强的菌株作为后续实验的研究对象, 编号为 B1。B1 菌株菌落呈白色, 形态呈圆形, 表面光滑、不透明。

经革兰氏染色, 以大肠杆菌作为阴性对照, B1 菌株染色后呈紫色, 属于阳性菌, 其形态为球状(图 1A)。为进一步确定 B1 菌株的形态, 在扫描电镜下观察其立体结构, 如图 1B 所示, B1 菌株的形态完整且呈球状, 直径约为 0.5  $\mu$ m, 与革兰氏染色的结果相符。

### 2.2 降解菌的鉴定

将得到的 16S rRNA 基因序列在 BLAST 上进行检索比对, 构建基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树(图 2)。结果表明 B1 菌株与 *Citricoccus nitrophenolicus* 亲缘关系最近, 与 *Citricoccus nitrophenolicus* PNP1 相似度为 99.58%。根据菌落形状、形态学特征及 16S rRNA 基因序列结果判定 B1 菌株为 *Citricoccus* sp., 并将其命名为 *Citricoccus nitrophenolicus* B1。

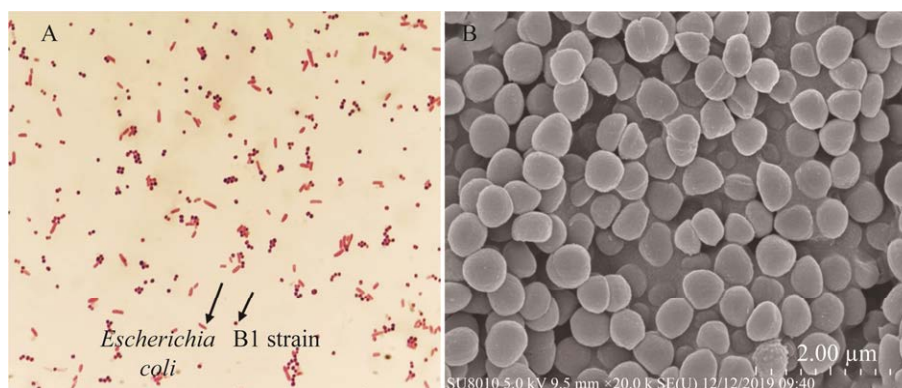


图 1 B1 菌株形态特征图 A: 大肠杆菌(阴性对照)和 B1 菌株的革兰氏染色结果图。B: B1 菌株的电镜扫描图

Figure 1 Morphological characteristics of B1 strain. A: Gram staining of *Escherichia coli* (negative control) and B1 strain. B: Scanning electron microscope of B1 strain.

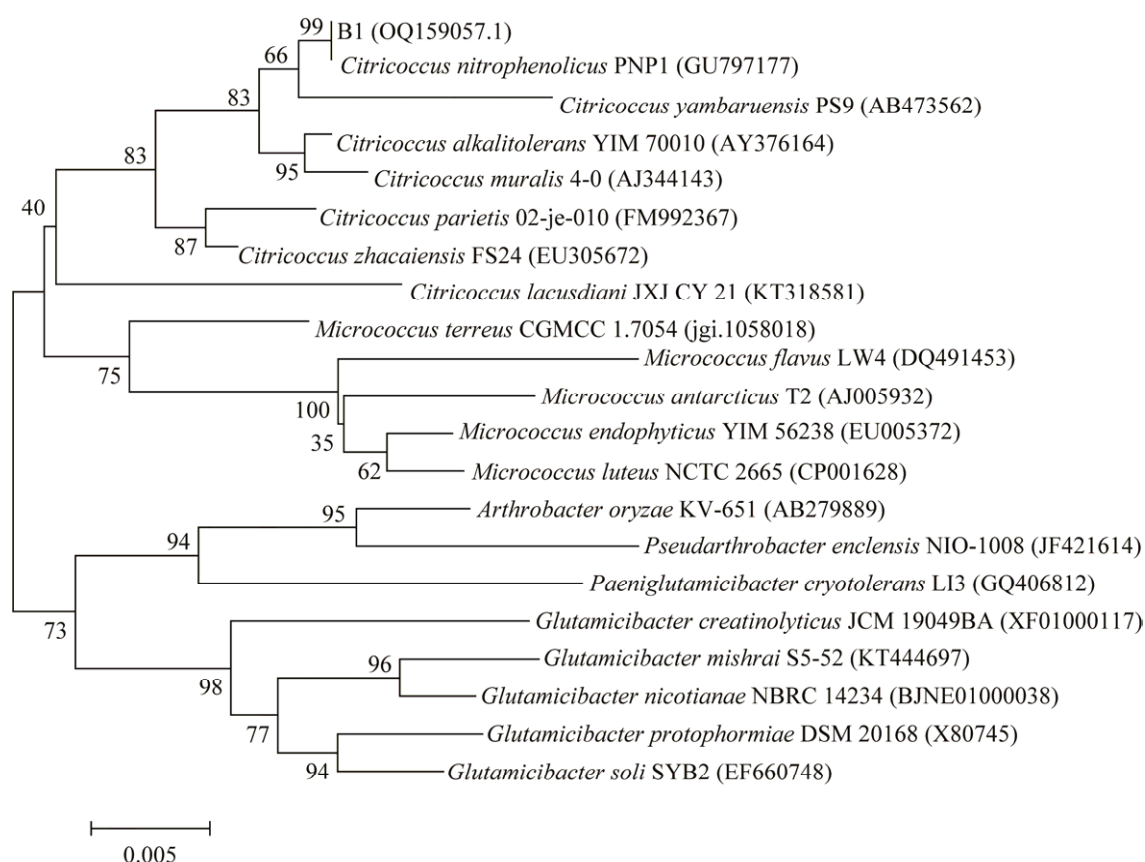


图2 B1菌株基于16S rRNA基因序列构建的系统发育树 括号里的数字代表GenBank登录号；每个分支上的数字代表进化百分数；标尺表示0.5%的序列进化差异

Figure 2 Phylogenetic tree of strain B1 based on 16S rRNA gene sequence. Numbers in parentheses represent the GenBank accession number; The number at each branch point is the percentage supported by bootstrap; The scale presents 0.5% sequence variance.

### 2.3 B1菌株耐盐性探究结果

培养16 h后测得不同盐浓度下B1菌株的菌液浓度如图3所示。与大肠杆菌相比，B1菌株在NaCl浓度为5%和7%时活性仍然较高，海水的平均盐浓度约为3.5%，即B1菌株具有一定的耐盐性，与其从海洋环境中分离得到有关。

### 2.4 B1菌株对4HBA酯的降解特性

4HBA酯在羧酸酯酶的作用下水解生成4HBA和醇类，经检测4HBA酯与4HBA的特异性吸收峰值均为255 nm，但各酯类及4HBA的出峰时间不同，因此可通过出峰时间区分各酯类与4HBA。结果如图4所示，B1菌株可以利

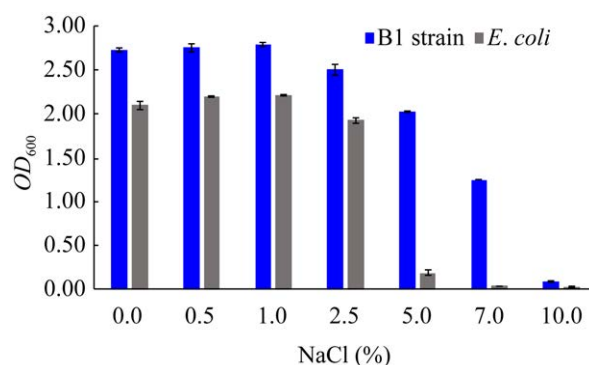


图3 不同盐浓度下B1菌株和 *Escherichia coli* 生长浓度比较

Figure 3 Comparison of growth concentrations of B1 strain and *Escherichia coli* at different salt concentrations.



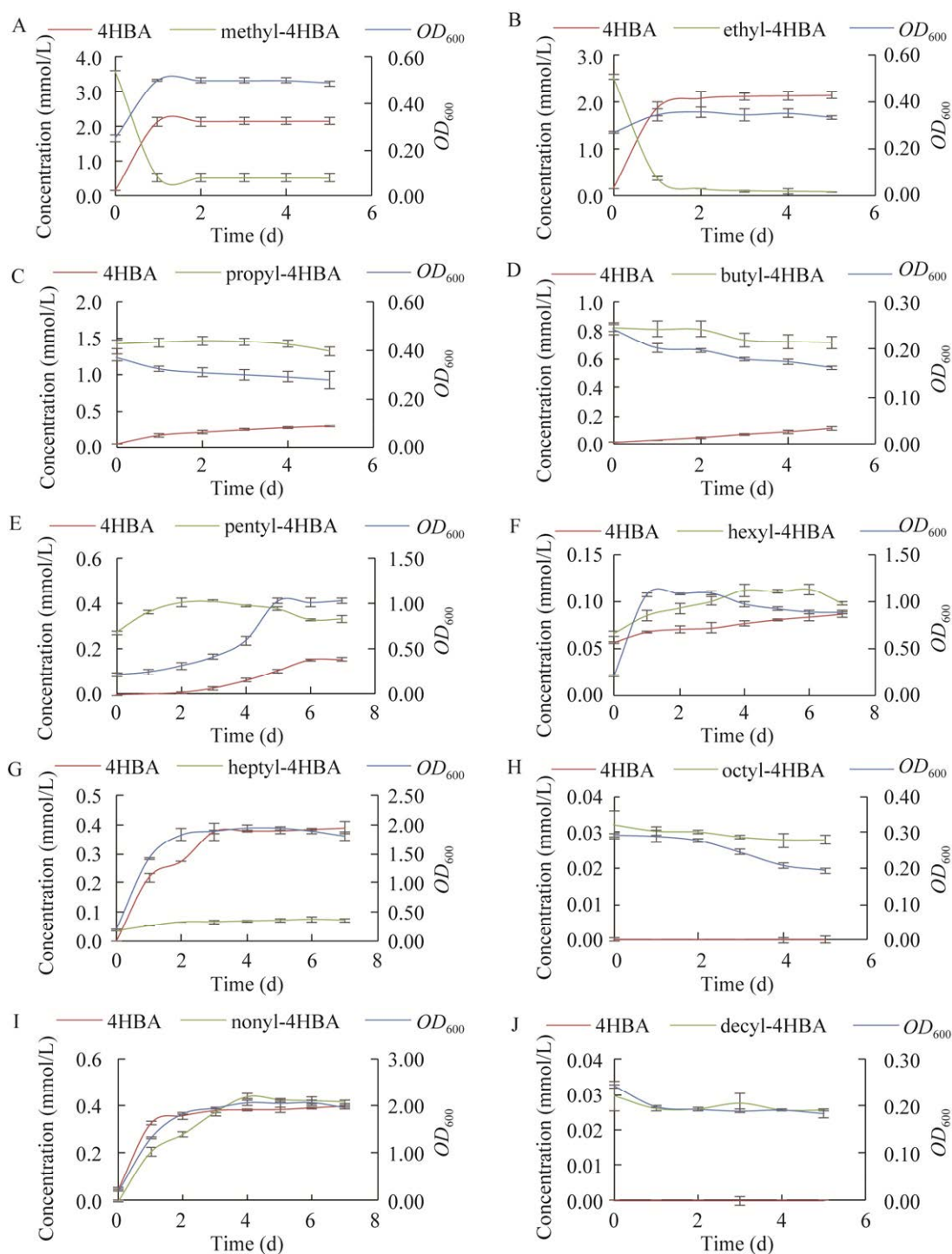


图 4 B1 菌株对不同 4HBA 酯的降解情况 A: 4HBA 甲酯. B: 4HBA 乙酯. C: 4HBA 丙酯. D: 4HBA 丁酯. E: 4HBA 戊酯. F: 4HBA 己酯. G: 4HBA 庚酯. H: 4HBA 辛酯. I: 4HBA 壬酯. J: 4HBA 癸酯

Figure 4 Degradation of different 4HBA esters by B1 strain. A: Methyl 4-hydroxybenzoate. B: Ethyl 4-hydroxybenzoate. C: Propyl 4-hydroxybenzoate. D: Butyl 4-hydroxybenzoate. E: Pentyl 4-hydroxybenzoate. F: Hexyl 4-hydroxybenzoate. G: Heptyl 4-hydroxybenzoate. H: Octyl 4-hydroxybenzoate. I: Nonyl 4-hydroxybenzoate. J: Decyl 4-hydroxybenzoate.



用 4HBA 甲酯、乙酯、丙酯、丁酯、戊酯、己酯、庚酯及壬酯进行生长,但在 4HBA 辛酯和 4HBA 癸酯为碳源的条件下不能生长。B1 菌株消耗酯类的同时有 4HBA 生成,随着菌液  $OD_{600}$  值上升至最大值,碳源减少,代谢物累积,菌液浓度开始呈下降趋势。B1 菌株对 4HBA 甲酯、4HBA 乙酯的降解效率最高,培养 2 d 后降解效率可达到 90%,随着培养时间的增加代谢物 4HBA 可被完全降解。

## 2.5 B1 菌株的全基因组分析

### 2.5.1 B1 菌株基因组特征

根据测序结果及基因注释信息分析,B1 的总基因组由一条 3 422 841 bp 的完整环状染色体组成(GenBank 登录号为 PRJNA668264)。GC 含量占比 68.90%,菌株编码基因共有 2 958 个,

编码基因总长度为 3 046 737 bp,COG 基因注释 2 021 个,KEGG 基因注释 1 628 个,GO 基因注释 1 301 个。

### 2.5.2 GO 功能注释

根据 GO 功能注释结果发现 B1 的 GO 注释中生物过程的编码基因数目最多,为 643 个。其中,代谢过程(metabolic process)编码基因最多,有 240 个,占比 37.3%;信号(signaling)相关编码基因最少,只有 1 个。

### 2.5.3 B1 菌株代谢 4HBA 酯途径预测

根据 KEGG 功能基因注释及代谢通路,结合 Valkova 等<sup>[22]</sup>、Wang 等<sup>[23]</sup>的研究,确定代谢相关酶并在数据库中寻找相应的编码基因,最终预测的 4HBA 酯代谢途径如图 5 所示。4HBA 酯类首先在限速酶羧酸酯酶的催化下生成 4HBA,

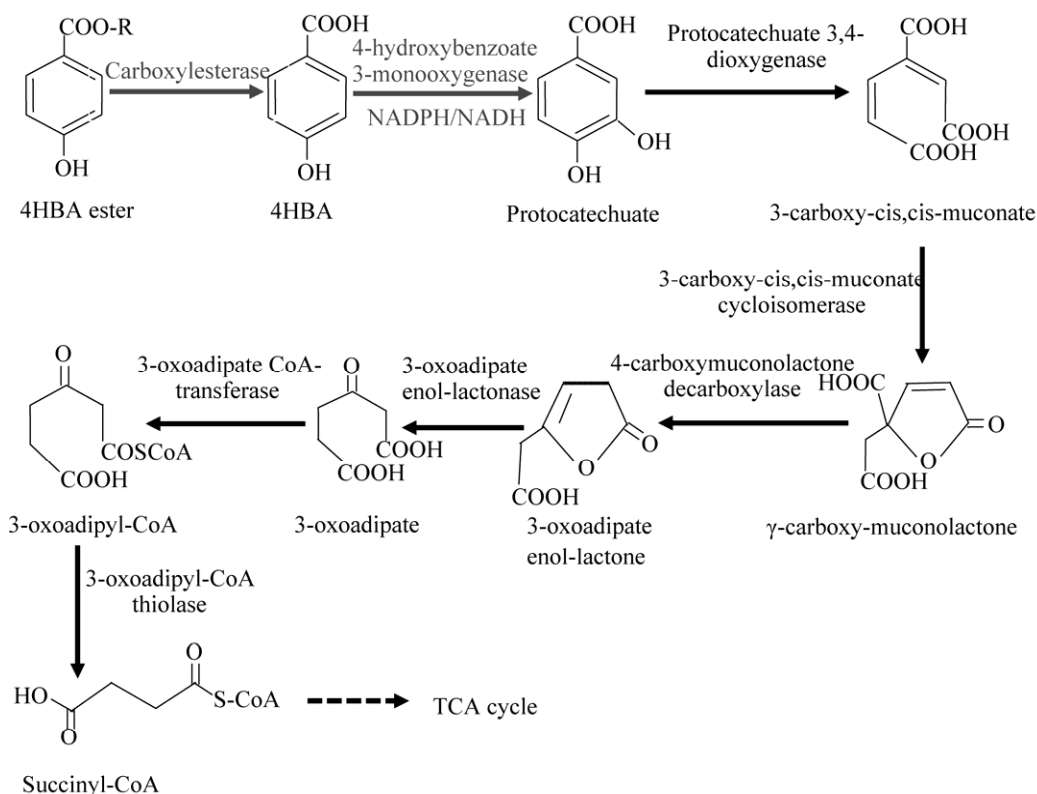


图 5 B1 菌株代谢 4HBA 酯途径

Figure 5 Pathway of B1 strain metabolizing 4HBA ester.

此为 4HBA 酯类降解的重要步骤, 其中羧酸酯酶为此反应的关键酶; 生成的 4HBA 在单加氧酶的催化作用下生成原儿茶酸; 原儿茶酸在相关酶作用下可进行开环, 开环产物进一步降解最终进入三羧酸循环。

根据基因功能和相应位置发现代谢通路的基因形成了基因簇: 基因 z10245 (*pobA*) 编码单加氧酶; 基因 z10250 (*pobH*)、z10255 (*pobG*) 编码原儿茶酸 3,4 双加氧酶; 基因 z10260 (*pobB*) 编码环化异构酶; 基因 z10265 (*pobD*)、z10280 (*pobI*)、z10285 (*pobJ*) 编码烯醇内酯酶; 基因 z10270 (*pobC*) 编码内酯脱羧酶; 基因 z10275 (*pobF*) 编码硫解酶。然而未在相应位置发现编码羧酸酯酶的基因, 推测该基因是在进化过程中插入基因组中。

根据 B1 菌株全基因组数据分析发现, 其可能存在 2 个编码羧酸酯酶的基因 z13175 和 z09075, 以及一个编码单加氧酶的基因 z10245。其中, 基因 z13175 和 z09075 编码的羧酸酯酶蛋白质分子量分别为 26.9 kDa 和 26.7 kDa, 基因 z10245 编码的单加氧酶蛋白质分子量为 45.1 kDa。本研究将对这 3 个基因进行克隆并在

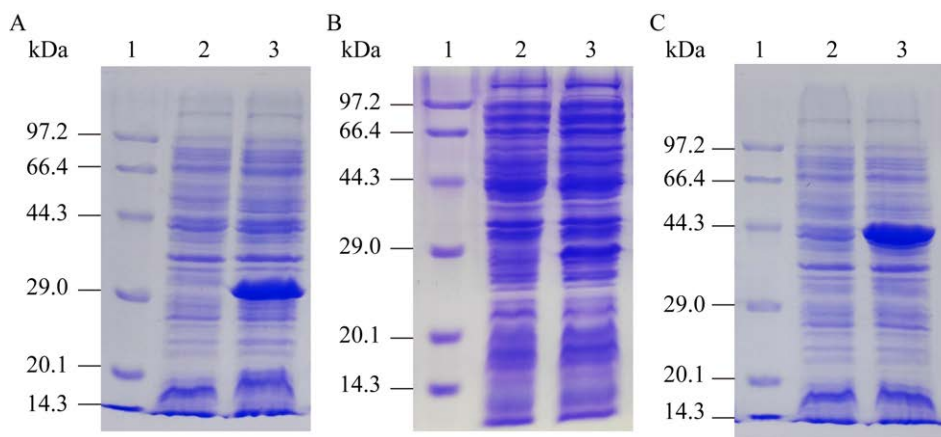
大肠杆菌中进行表达。

## 2.6 表达载体的构建

构建羧酸酯酶表达载体 z13175-pCold-II、z09075-pCold-II 和单加氧酶表达载体 z10245-pCold-II。重组质粒经 *Nde* I 和 *Eco*R I 双酶切后, 进行 1% 琼脂糖核酸电泳。经双酶切的 z13175-pCold-II 质粒理论上应得到 4 363 bp 和 756 bp 两条片段; z09075-pCold-II 质粒理论上应得到 4 363 bp 和 747 bp 两条片段; z10245-pCold-II 质粒理论上应得到 4 363 bp 和 1 224 bp 两条片段, 电泳验证结果与预期一致, 3 个表达载体均构建成功。

## 2.7 目的蛋白的诱导及纯化结果

将重组载体转入大肠杆菌, 经 IPTG 在 15 °C 低温诱导过夜后提取粗酶, 经 SDS-PAGE 电泳确定目的蛋白表达后, 将粗酶液通过镍柱亲和层析进行纯化处理。电泳结果表明 3 个目的蛋白均表达, 且纯化后均能得到目的蛋白。其中 z13175 与 z09075 编码的羧酸酯酶分子量分别为 26.9 kDa 和 26.7 kDa, z10245 编码的单加氧酶分子量为 45.1 kDa, 与电泳结果相符(图 6)。



**图 6 重组蛋白 SDS-PAGE 检测** A: Z13175 编码的羧酸酯酶重组蛋白. B: Z09075 编码的羧酸酯酶重组蛋白. C: Z10245 编码的单加氧酶重组蛋白. 1: Protein marker; 2: 诱导前蛋白粗酶; 3: 诱导后蛋白粗酶

Figure 6 SDS-PAGE detection of recombinant protein. A: Recombinant z13175-carboxylesterase. B: Recombinant z09075-carboxylesterase. C: Recombinant z10245-monooxygenase. 1: Protein marker; 2: Preinduction protein crude enzyme; 3: Crude enzyme protein after induction.

## 2.8 羧酸酯酶和单加氧酶的活性检测结果

### 2.8.1 羧酸酯酶活性检测结果

在酶活性检测反应体系中添加不同浓度的羧酸酯酶,在 30 °C条件下反应一定时间后经 HPLC 检测底物 4HBA 甲酯的残留量,在确定 z13175 与 z09075 编码的羧酸酯酶酶活性的基础上,对羧酸酯酶酶促反应条件进行优化。首先对反应体系中的缓冲液 pH 进行优化,结果表明随着 pH 值的增加底物减少量逐渐上升,羧酸酯酶在 pH 7.0–8.0 范围内活性较高,在 pH 8.0 时酶活性最大(图 7A);温度(20–40 °C)对羧酸酯酶活

性影响较为显著,在 30 °C条件下羧酸酯酶活性最高(图 7B);此外,反应时间对酶促反应也有一定影响,结果表明随着反应时间的增加底物在不断减少,但 30 min 后底物减少量无明显变化,此时羧酸酯酶酶活性有最大发挥(图 7C),所以优化后羧酸酯酶反应条件为 pH 8.0、30 °C 反应 30 min。采用优化后的酶促反应条件对羧酸酯酶进行酶活性检测,结果如图 7D 所示。经酶促反应后,底物 4HBA 甲酯减少了 0.027 mmol/L,降解率约为 1.5%,同时检测到降解产物 4HBA 的增加(图 7E)。

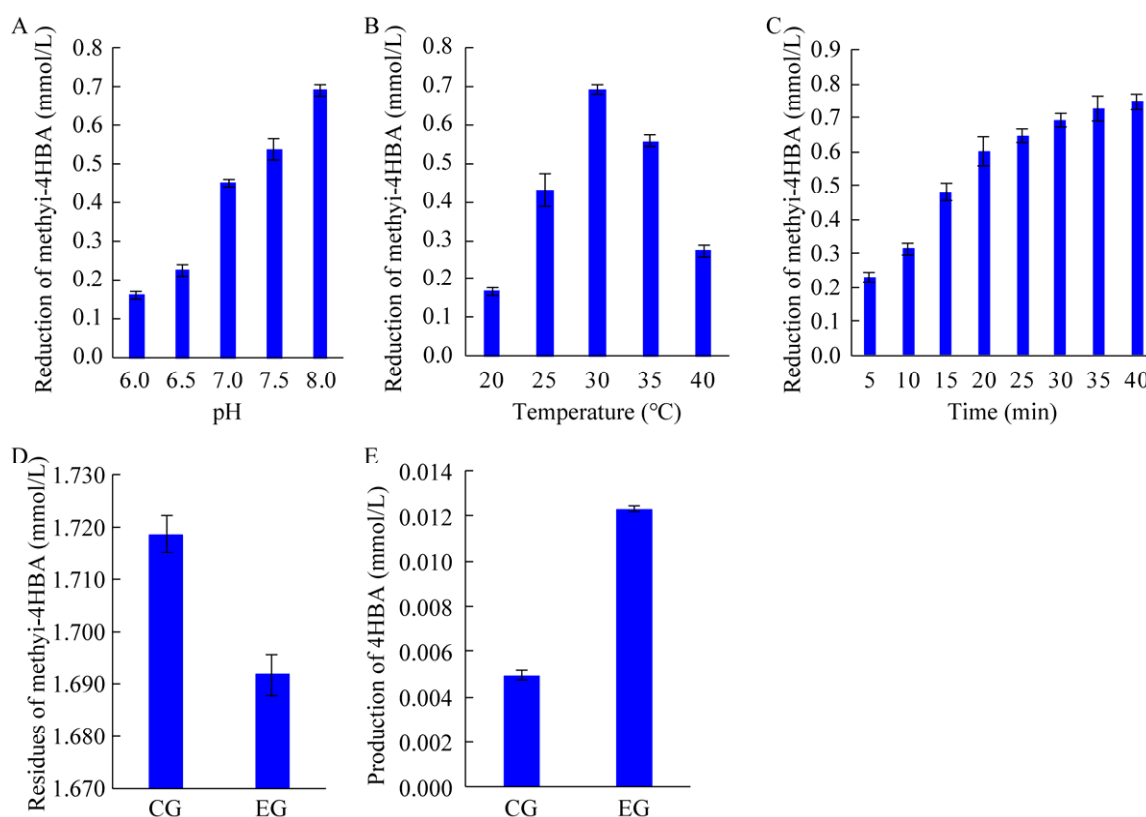
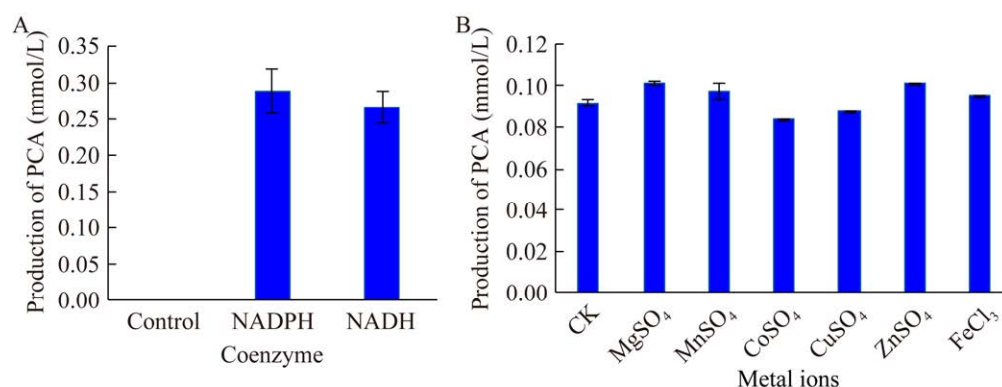


图 7 羧酸酯酶活性检测 A: pH 对羧酸酯酶活性的影响. B: 温度对羧酸酯酶活性的影响. C: 反应时间对羧酸酯酶活性的影响. D: 羧酸酯酶酶活反应优化 4HBA 甲酯剩余量. E: 4HBA 生成量. CG 为对照组; EG 为实验组

Figure 7 Detection of carboxylesterase activity. A: Effect of pH on carboxylesterase activity. B: Effect of temperature on carboxylesterase activity. C: Effect of reaction time on carboxylesterase activity. D: Optimization of 4HBA methyl ester residue by carboxylesterase activity reaction. E: Production of 4HBA in carboxylate esterase reaction of recombinant strain. CG: Control group; EG: Experimental group.



**图 8 单加氧酶活性检测** A: 测定不同辅酶对原儿茶酸(PCA)生产的影响. B: 测定了不同金属离子对原儿茶酸(PCA)生产的影响

Figure 8 Detection of monooxygenase activity. A: The effects of different coenzymes on the production of protocatechuic acid (PCA) were determined. B: The effect of different metal ions on the production of protocatechuic acid (PCA) was determined.

### 2.8.2 单加氧酶的活性检测结果

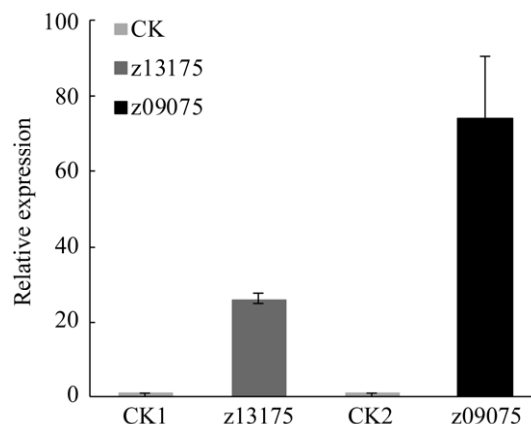
通过添加常见的辅酶如 NADPH 和 NADH 探究 z10245 编码的单加氧酶活性, 进而利用 HPLC 检测酶促反应产物原儿茶酸的增加量, 确定辅酶对单加氧酶活性的影响。酶活性检测反应体系(1 mL): 0.1 mL 10 mol/mL 4HBA 甲酯, 0.2 mL 单加氧酶蛋白液, 0.1 mL 10 mol/mL NADPH/NADH, 0.6 mL PBS 缓冲液(pH 7.4)。结果如图 8A 所示, 与对照(未添加辅酶)相比, 两种辅酶均能使单加氧酶发挥作用, 即单加氧酶需在辅酶的作用下与底物反应。同等反应条件下 NADPH 作为辅助因子时单加氧酶降解底物的效率更高。金属离子常被用作催化剂添加到酶促反应体系中, 如图 8B 所示, Mg<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>和 Fe<sup>3+</sup>对单加氧酶的活性有激活作用, 而 Co<sup>2+</sup>和 Cu<sup>2+</sup>对单加氧酶活性有明显抑制作用。

### 2.9 z13175 和 z09075 在 RNA 水平的表达量

通过 Trizol 法提取 B1 菌株的总 RNA, 经核酸电泳验证, 结果为 3 条清晰的条带, 大小分别为 23S、16S 和 5S, 说明提取的 RNA 完整可作为模板反转录合成 cDNA。

为进一步验证 z13175 和 z09075 为编码羧酸

酯酶的基因, 以 4HBA 酯类为唯一碳源培养 B1 菌株, 诱导羧酸酯酶基因表达, 通过荧光定量 PCR 检测基因 z13175 和 z09075 在 RNA 水平上的表达量是否上调。结果如图 9 所示, z13175 和 z09075 在 RNA 水平上的表达量均上调, 即可进一步确定 z13175 和 z09075 均为编码羧酸酯酶的基因。



**图 9 基因 z13175 和 z09075 RNA 水平表达量** CK1: 基因 z13175 的对照组; CK2: 基因 z09075 的对照组

Figure 9 Expression levels of genes z13175 and z09075 RNA levels. CK1: Control group of gene z13175; CK2: Control group of gene z09075

### 3 讨论与结论

芳香族化合物广泛存在于环境中,但其难以自然降解性给环境造成了污染问题。芳香族化合物降解微生物来源丰富,多存在于工业废水排放口、海洋等不同环境的沉积物中<sup>[24-25]</sup>。分离自土壤的4HBA降解菌 *Pseudomonas putida* WCS358<sup>[26]</sup>,还具有降解其他多种芳香族化合物的能力;从海洋沉积物中分离的嗜盐菌群在盐浓度为40 g/L时对低分子量的多环芳烃降解率达90%<sup>[27]</sup>。本研究中的B1菌株分离自海底泥沙,在盐浓度0.5%–5.0%范围内生长良好,对海洋环境具有适应性(海洋盐浓度约3.5%)。经底物利用实验证明B1菌株能够降解多种4HBA酯类,与 *Enterobacter cloacae* EM<sup>[28]</sup>对4HBA甲酯、乙酯相对降解速率250 mg/(L·h)相比,B1菌株对4HBA甲酯、乙酯的降解速率约为前者的1/4,差异性可能与菌株对4HBA酯的代谢途径不同有关,但降解速率的差异是否在不同代谢途径的菌株中普遍存在还需要更多信息分析验证。

微生物降解4HBA途径主要有3种:原儿茶酸开环途径<sup>[23]</sup>、龙胆酸途径<sup>[29]</sup>、苯甲酸CoA途径<sup>[30]</sup>。本研究通过高效液相色谱检测到4HBA酯类代谢过程中有原儿茶酸的生成,并探究菌株对多种4HBA酯类的降解情况,发现菌株对4HBA甲酯、乙酯降解效率最高,底物在4 d内被完全消耗。Jiménez等<sup>[31]</sup>发现芳香族化合物降解菌 *Pseudomonas putida* KT2440中的 *pobA* 是降解4HBA酯的羧酸酯酶编码基因。本研究从B1菌株中共筛选得到2个编码羧酸酯酶的基因,基因z13175与z09075以及1个编码单加氧酶的基因z10245,分别对3个基因进行克隆并构建表达载体,进而探究羧酸酯酶和单加氧酶的酶学特征。结果表明羧酸酯酶最适反应

条件为:pH 8.0, 30 °C;单加氧酶活性表达依赖于辅酶,其中NADPH为最佳辅酶,金属离子Mg<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>和Fe<sup>3+</sup>对单加氧酶的活性有激活作用。通过荧光定量PCR检测基因z13175和z09075在RNA水平上的表达量,进一步验证基因z13175和z09075为编码羧酸酯酶的基因。以上结果表明B1菌株可通过原儿茶酸途径降解4HBA酯类,后续对代谢途径中的相关酶反应条件做进一步优化,以提高4HBA酯类的降解率。

*Citricoccus* sp.广泛分布于多种环境中,2002年,Altenburger等<sup>[32]</sup>首次从壁画中分离得到 *Citricoccus muralis* 4-0(T)菌株。近年来,在土壤<sup>[33]</sup>、空气<sup>[34]</sup>、人体皮肤中<sup>[35]</sup>、海洋沉积物<sup>[36]</sup>等多种环境中发现该菌属的存在。其中分离自农药废水处理厂的 *Citricoccus nitrophenolicus* PNP1<sup>T</sup>菌株具有代谢对硝基苯酚(pNP)<sup>[37]</sup>、对氯苯酚<sup>[38]</sup>等芳香族化合物的能力,16S rRNA基因序列比对结果表明,B1菌株与 *Citricoccus nitrophenolicus* PNP1<sup>T</sup>菌株相似度最高,但尚不清楚B1菌株是否对pNP具有相同的降解能力,还需进一步探究。多项研究表明海洋环境中存在多种 *Citricoccus* 属菌株<sup>[36-37]</sup>,但目前关于 *Citricoccus* 菌属对4HBA酯类化合物的降解研究尚无报道。本研究首次报道了海洋环境来源的 *Citricoccus* 菌属细菌对4HBA酯类的降解途径,以及羧酸酯酶和单加氧酶在4HBA酯类代谢中的作用。本研究分离的B1菌株进一步丰富了海洋环境的微生物资源及芳香族化合物降解微生物资源,为海洋环境中4HBA酯类污染物的生物降解提供了一种可能。

### REFERENCES

- [1] WANG XN, WANG KY, ZHANG XS, YANG C, LI XY. 4-Hydroxybenzoic acid (4-HBA) enhances the sensitivity of human breast cancer cells to adriamycin as a specific

- HDAC6 inhibitor by promoting HIPK2/p53 pathway[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2018, 504(4): 812-819.
- [2] QUEVRAIN E, DOMART-COULON I, PERNICE M, BOURGUET-KONDRACKI ML. Novel natural parabens produced by a *Microbulbifer* bacterium in its calcareous sponge host *Leuconia nivea*[J]. Environmental Microbiology, 2009, 11(6): 1527-1539.
- [3] SONI MG, CARABIN IG, BURDOCK GA. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens)[J]. Food and Chemical Toxicology: an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association, 2005, 43(7): 985-1015.
- [4] 刘颖, 孙永波, 张丽英. 对羟基苯甲酸酯类防腐剂应用现状与展望[J]. 中国饲料, 2021(7): 13-16.  
LIU Y, SUN YB, ZHANG LY. Application status and prospect of parabens[J]. China Feed, 2021(7): 13-16 (in Chinese).
- [5] 王银环, 王征南, 钱凌, 郑小玲, 吴桐, 李珏. 普瑞巴林口服溶液抑菌效力研究与抑菌剂浓度筛选[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(3): 545-550.  
WANG YH, WANG ZN, QIAN L, ZHENG XL, WU T, LI J. Study of antimicrobial effectiveness of pregabalin oral solution and concentration screening of antimicrobial preservative[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2019, 39(3): 545-550 (in Chinese).
- [6] IMAI T, TAKETANI M, SHII M, HOSOKAWA M, KAN CB. Substrate specificity of carboxylesterase isozymes and their contribution to hydrolase activity in human liver and small intestine[J]. Drug Metabolism and Disposition: the Biological Fate of Chemicals, 2006, 34(10): 1734-1741.
- [7] OZAKI H, SUGIHARA K, WATANABE Y, FUJINO C, URAMARU N, SONE T, OHTA S, KITAMURA S. Comparative study of the hydrolytic metabolism of methyl-, ethyl-, propyl-, butyl-, heptyl- and dodecylparaben by microsomes of various rat and human tissues[J]. Xenobiotica, 2013, 43(12): 1064-1072.
- [8] KOSEKI T, HORI A, SEKI S, MURAYAMA T, SHIONO Y. Characterization of two distinct feruloyl esterases, AoFaeB and AoFaeC, from *Aspergillus oryzae*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 83(4): 689-696.
- [9] CHATURVEDI P, SHUKLA P, GIRI BS, CHOWDHARY P, CHANDRA R, GUPTA P, PANDEY A. Prevalence and hazardous impact of pharmaceutical and personal care products and antibiotics in environment: a review on emerging contaminants[J]. Environmental Research, 2021, 194: 110664.
- [10] BECKER J, WITTMANN C. A field of dreams: Lignin valorization into chemicals, materials, fuels, and health-care products[J]. Biotechnology Advances, 2019, 37(6): 107360.
- [11] PURWANTO HS, KANG MS, FERRER L, HAN SS, LEE JY, KIM HS, LEE JH. Rational engineering of the shikimate and related pathways in *Corynebacterium glutamicum* for 4-hydroxybenzoate production[J]. Journal of Biotechnology, 2018, 282: 92-100.
- [12] ERICKSON E, BLEEM A, KUATSAH E. Critical enzyme reactions in aromatic catabolism for microbial lignin conversion[J]. Nature Catalysis, 2022, 5(2): 86-98.
- [13] ZHU DC, XU LX, SETHUPATHY S, SI HB, AHMAD F, ZHANG RX, ZHANG WM, YANG B, SUN JZ. Decoding lignin valorization pathways in the extremophilic *Bacillus ligninophilus* L1 for vanillin biosynthesis[J]. Green Chemistry, 2021, 23(23): 9554-9570.
- [14] FAN X, NIE L, SHI KX, WANG Q, XIA X, WANG GJ. Simultaneous 3-/4-hydroxybenzoates biodegradation and arsenite oxidation by *Hydrogenophaga* sp. H7[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1346.
- [15] UCHENDU SN, RAFALOWSKI A, SCHICK DL, COHN EF, HASSAN BA, TAYLOR EA. Identifying metabolic pathway intermediates that modulate the gallate dioxygenase (DesB) from *Sphingobium* sp. strain SYK-6[J]. Process Biochemistry, 2021, 102: 408-416.
- [16] TSAGOIANNIS E, VANDERA E, PRIMIKYRI A, ASIMAKOULA S, TZAKOS AG, GEROTHANASSIS IP, KOUKKOU AI. Characterization of protocatechuate 4, 5-dioxygenase from *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 and *in situ* reaction monitoring in the NMR tube[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(17): 9647.
- [17] NGIGI EM, NOMNGONGO PN, NGILA JC. Recent methods used in degradation of parabens in aqueous solutions: a review[J]. International Journal of Environmental Science and Technology, 2021: 1-16.
- [18] MONTEAGUDO C, ROBLES-AGUILERA V, SALCEDO-BELLIDO I, GÁLVEZ-ONTIVEROS Y, SAMANIEGO-SÁNCHEZ C, AGUILERA M, ZAFRA-G MEZ A, BURGOS MAM, RIVAS A. Dietary exposure to parabens and body mass index in an adolescent Spanish population[J]. Environmental Research, 2021, 201: 111548.
- [19] HAGER E, CHEN JG, ZHAO L. Minireview: parabens exposure and breast cancer[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2022, 19(3): 1873.
- [20] ZHANG XY, DU Y, LU Y, WANG WL, WU QY. Characteristics of the formation and toxicity index of nine newly identified brominated disinfection byproducts



- during wastewater ozonation[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 824: 153924.
- [21] YANG S, LÜ Y, LIU X, WANG Y, FAN Q, YANG Z, ZHANG Y. Genomic and enzymatic evidence of acetogenesis by *anaerobic methanotrophic archaea*[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 1-11.
- [22] VALKOVA N, LÉPINE F, BOLLET C, DUPONT M, VILLEMUR R. *prbA*, a gene coding for an esterase hydrolyzing parabens in *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter gergoviae* strains[J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(18): 5011-5017.
- [23] 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.
- [24] MAHAN KM, LE RK, WELS JrT, ANDERSON S, YUAN JS, STOKLOSA RJ, BHALLA A, HODGE DB, RAGAUSKAS AJ. Production of single cell protein from agro-waste using *Rhodococcus opacus*[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2018, 45(9): 795-801.
- [25] WANG WP, WANG L, SHAO ZZ. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degradation pathways of the obligate marine PAH degrader *Cycloclasticus* sp. strain P1[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(21): e01261-e01218.
- [26] BERTANI I, KOJIC M, VENTURI V. Regulation of the p-hydroxybenzoic acid hydroxylase gene (*pobA*) in plant-growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS<sub>358</sub>[J]. *Microbiology*, 2001, 147(6): 1611-1620.
- [27] JAMAL MT, PUGAZHENDI A. Degradation of petroleum hydrocarbons and treatment of refinery wastewater under saline condition by a halophilic bacterial consortium enriched from marine environment (Red Sea), Jeddah, Saudi Arabia[J]. *3 Biotech*, 2018, 8(6): 276.
- [28] VALKOVA N, LÉPINE F, VALEANU L, DUPONT M, LABRIE L, BISAILLON JG, BEAUDET R, SHARECK F, VILLEMUR R. Hydrolysis of 4-hydroxybenzoic acid esters (parabens) and their aerobic transformation into phenol by the resistant *Enterobacter cloacae* strain EM[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(6): 2404-2409.
- [29] 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.
- [30] EPPINK MH, SCHREUDER HA, van BERKEL WJ. Identification of a novel conserved sequence motif in flavoprotein hydroxylases with a putative dual function in FAD/NAD(P)H binding[J]. *Protein Science: a Publication of the Protein Society*, 1997, 6(11): 2454-2458.
- [31] JIMÉNEZ JI, MIÑAMBRES B, GARCÍA JL, DÍAZ E. Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440[J]. *Environmental Microbiology*, 2002, 4(12): 824-841.
- [32] ALTENBURGER P, KÄMPFER P, SCHUMANN P, STEINER R, LUBITZ W, BUSSE HJ. *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(Pt 6): 2095-2100.
- [33] DZIURZYNSKI M, ROKOWSKA A, GORECKI A, DECEWICZ P, SZYCH A, DZIEWIT L. Draft genome sequence of arctic, heavy metal-resistant *Agrococcus* sp. strain ARC\_14 isolated from active layer of permafrost from spitsbergen (Norway)[J]. *Microbiology Resource Announcements*, 2022: e00221-22.
- [34] CHANDRASEKARAN L, DRAUTZ-MOSES DI, UCHIDA A, PURBOJATI RW, WONG A, KUSHWAHA KK, PUTRA A, GAULTIER NE, PREMKRISHNAN BNV, HEINLE CE, VETTATH VK, JUNQUEIRA ACM, SCHUSTER SC. Complete genome sequence of *Citricoccus* sp. strain SGAir0253, isolated from indoor air in Singapore[J]. *Microbiology Resource Announcements*, 2019, 8(37): e00606-e00619.
- [35] NDIAYE C, BASSENE H, CADORET F, RAOULT D, LAGIER JC, SOKHNA C. '*Citricoccus massiliensis*' sp. nov., a new bacterial species isolated from human skin by culturomics[J]. *New Microbes and New Infections*, 2018, 23: 83-85.
- [36] SILVA TRE, J NIOR LCFS, de QUEIROZ AC, MOREIRA MSA, de CARVALHO FRAGA CA, de MENEZES GCA, ROSA LH, BICAS J, de OLIVEIRA VM, DUARTE AWF. Pigments from antarctic bacteria and their biotechnological applications[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2021, 41(6): 809-826.
- [37] NIELSEN MB, KJELDSEN KU, INGORSSEN K. Description of *Citricoccus nitrophenolicus* sp. nov., a 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.
- [38] NIELSEN MB, INGORSSEN K. Biodegradation of Para-nitrophenol by *Citricoccus nitrophenolicus* strain PNP<sub>1</sub>(T) at high pH[J]. *Biodegradation*, 2013, 24(1): 79-87.