

研究报告

西太平洋多金属结核区 12 个站位沉积物中可培养潜在腐殖质转化菌的多样性

陈婷, 陈秀暖, 任娜, 薛泽豪, 朱四东, 杨季芳, 陈吉刚*

浙江万里学院生物与环境学院, 浙江 宁波 315100

陈婷, 陈秀暖, 任娜, 薛泽豪, 朱四东, 杨季芳, 陈吉刚. 西太平洋多金属结核区 12 个站位沉积物中可培养潜在腐殖质转化菌的多样性[J]. 微生物学通报, 2022, 49(5): 1541-1552

Chen Ting, Chen Xiunuan, Ren Na, Xue Zehao, Zhu Sidong, Yang Jifang, Chen Jigang. Diversity of potential culturable humic substance-transforming bacteria in sediments from 12 stations in the western Pacific polymetallic nodule province[J]. Microbiology China, 2022, 49(5): 1541-1552

摘要:【背景】海洋环境作为地球上最大的有机碳库贮藏着大量腐殖质, 其中可能蕴藏着丰富的腐殖质转化菌。【目的】从深海沉积物环境中分离具有潜在腐殖质转化能力的细菌, 为难降解天然有机多聚物的生物转化提供菌种资源。【方法】利用以腐殖质为唯一碳源的培养基, 对西太平洋多金属结核区 12 个站位沉积物样品中的腐殖质转化菌进行富集培养和纯化, 通过 16S rRNA 基因测序分析比对初步确定分离菌株的分类地位, 并利用含苯胺蓝的培养基筛选潜在的腐殖质转化菌。【结果】从 12 个沉积物样品中共分离获得菌株 276 株, 隶属于放线菌纲(*Actinobacteria*)、纤维粘网菌纲(*Cytophagia*)、黄杆菌纲(*Flavobacteria*)、 α 变形菌纲(*Alphaproteobacteria*)和 γ 变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)中的 14 个目 37 个属 56 个种(含 1 个潜在新属和 2 个新种), 其中 49 个种呈现木质素修饰酶阳性。【结论】利用以腐殖质为唯一碳源和能源的培养基可以分离获得具有较高多样性的潜在腐殖质转化菌。

关键词: 海洋环境; 腐殖质; 细菌; 鉴定

基金项目: 宁波市公益类科技计划(202002N3115); 全球变化与海气相互作用专项(二期)(GASI-04-HYDZ-02); 浙江省生物一流学科创新基金(CX2020002)

Supported by: Ningbo Public Welfare Technology Research Program (202002N3115); National Program on Global Change and Air-Sea Interaction (GASI-04-HYDZ-02); First-Class Discipline of Biological Engineering of Zhejiang Province (CX2020002)

*Corresponding author: E-mail: genomic@163.com

Received: 2021-05-19; Accepted: 2021-10-13; Published online: 2022-01-21

Diversity of potential culturable humic substance-transforming bacteria in sediments from 12 stations in the western Pacific polymetallic nodule province

CHEN Ting, CHEN Xiunuan, REN Na, XUE Zehao, ZHU Sidong, YANG Jifang, CHEN Jigang*

College of Biological & Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, Zhejiang, China

Abstract: [Background] The marine environment, as the largest organic carbon store on the earth, stores a large amount of humic substances, which may harbor abundant humic substance-transforming bacteria. [Objective] To isolate potential humic substance-transforming bacteria from marine sediments, and provide bacterial resources for the biotransformation of refractory natural organic polymers. [Methods] With humic substances as the sole carbon source, the humic substance-transforming bacteria in the sediment samples from 12 stations in the western Pacific polymetallic nodule province were enriched and purified. The taxonomic status of the purified bacteria was preliminarily identified by 16S rRNA gene sequence comparison. The potential humic substance-transforming bacteria were screened out by aniline blue-containing medium. [Results] A total of 276 strains were isolated from 12 sediment samples, belonging to 56 species, 37 genera, 14 orders of *Actinobacteria*, *Cytophagia*, *Flavobacteria*, *Alphaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria*, including 1 potential new genus and 2 new species. Of the 56 species, 49 species were lignin-modifying enzyme positive. [Conclusion] The medium with humic substances as the sole carbon and energy source can be used to isolate potential humic substance-transforming bacteria with high diversity.

Keywords: marine environment; humic substance; bacteria; identification

腐殖质(humic substance, HS)作为一种半衰期长和转化度高的天然有机物,广泛分布于土壤、沉积物和水体之中,是生物圈中碳的主要储存形式^[1]。尽管传统观点认为HS对微生物的降解具有很强的抵抗力^[2],但越来越多的研究表明,环境中存在着丰富的HS转化或降解菌群^[3],如来源于淡水及土壤环境的白腐真菌、铁还原菌、硫酸盐还原菌、棒状杆菌(*Corynebacterium*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)和芽孢杆菌(*Bacillus*)等类群^[4-5]。此外,已有研究表明,淡水及土壤中的HS能对微生物的生长产生重要影响:低浓度的溶解态HS能刺激水体中微生物的生长繁殖;陆源HS不但是土壤微生物

生长过程中的碳、氮和能量来源,同时也可作为微生物的许多生理生化反应的诱导剂,如充当微生物细胞呼吸过程中电子转移的催化剂,以及通过其结构中的醌基团催化微生物细胞内的磷酸化过程和诱导酶的合成^[6-9]。

海洋环境作为地球上最大的有机碳库贮藏着大量HS^[10],生存在该环境中的微生物势必与HS存在相互作用^[11]。研究表明,海水中的HS是由各种来源的可溶性胶体化合物组成的具有铁结合行为的异质混合物,它们是海洋微生物的重要营养物来源^[12]。此外,有学者提出HS是由生物聚合物(如木质素)在一定条件下氧化改性而形成的^[13],而海洋沉积物环境中存在丰

富的木质素降解菌^[14], 因此可以推测海洋沉积物环境应存在可转化 HS 的微生物种群。

为了寻找存在于海洋沉积物中的能转化 HS 的细菌, 本研究以 HS 为唯一碳源的培养基对西太平洋多金属结核区 12 个站位沉积物样品中的潜在 HS 转化菌进行分离、纯化与鉴定, 研究结果可为海洋环境 HS 与微生物的相互作用研究提供参考。

1 材料与方 法

1.1 样品采集

实验样品来源于中国大洋科考 40 航次 12 个站位沉积物 0–2 cm 表层泥样。40 航次 12 个站位位于西太平洋多金属结核区, 其上覆盖沉积结核, 海水深度介于 4 933–5 574 m (表 1)。样品采集方式为抓斗采集。

1.2 主要试剂和仪器

腐殖酸、缓冲试剂 HEPES, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 苯胺蓝(水物), 生工生物工程(上海)股份有限公司; 蛋白胨和酵母提取物, OXOID 公司; 2×Taq Master Mix、pMD18-T

载体、PCR 引物(27F 和 1492R; M13-47 和 RV-M), 宝生物工程(大连)有限公司; GenClean 柱式 DNA 胶回收试剂盒, 上海捷瑞生物工程有限公司; 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞, 康为世纪生物科技股份有限公司。

涡旋振荡器, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司; PCR 仪, Eppendorf 公司; 小型台式高速冷冻离心机, Starorius 公司; 恒温振荡培养箱, 上海维诚仪器有限公司。

1.3 培养基

2216E 培养基: 蛋白胨 5.0 g, 酵母粉 1.0 g, 混合维生素溶液 10 mL, 微量元素 10 mL, HEPES (pH 7.0) 2.0 mL, 用 75%人工海水+25%蒸馏水定容至 1 000 mL, 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min。

富集培养基: 腐殖酸 1 g, NaNO₃ 3 g, 混合维生素溶液 10 mL, 微量元素 10 mL, HEPES (pH 7.0) 2 mL, 用 75%人工海水+25%蒸馏水定容至 1 000 mL, 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min。

脱色培养基: 蛋白胨 2 g, 酵母粉 1 g, 苯胺蓝 0.2 g, 琼脂粉 15 g, 用 75%人工海水+25% ddH₂O 定容至 1 000 mL, 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min。

混合维生素溶液: 生物素 0.002 g, 叶酸 0.002 g, 吡哆醇 0.01 g, 硫胺素 0.005 g, 核黄素 0.005 g, 烟酸 0.005 g, Ca-D-泛酸 0.005 g, 维生素 B₁₂ 0.000 1 g, 对氨基苯甲酸 0.005 g, 硫辛酸 0.005 g, 蒸馏水 1 000 mL。

微量元素: 次氨基三乙酸 1.5 g, MgSO₄·7H₂O 3.0 g, MnSO₄·H₂O 0.5 g, NaCl 1.0 g, FeSO₄·7H₂O 0.1 g, CoSO₄·7H₂O 0.18 g, CaCl₂·2H₂O 0.1 g, ZnSO₄·7H₂O 0.18 g, CuSO₄·2H₂O 0.01 g, KAl(SO₄)₂·12H₂O 0.02 g, H₃BO₃ 0.01 g, Na₂MoO₄·2H₂O 0.01 g, NiCl₂·6H₂O 0.03 g, Na₂SeO₄·5H₂O 0.000 3 g, Na₂WO₄·2H₂O 0.000 4 g, 蒸馏水 1 000 mL。

HEPES (pH 7.0): HEPES 23.89 g 溶于蒸馏

表 1 40 航次 12 个站位沉积物样本基本信息

Table 1 Basic information of sediment samples from 12 stations of 40th cruise

Station	Longitude (E)	Latitude (N)	Depth (m)
40V-C1-BC1602	159.45°	20.02°	5 501
40V-C1-BC1603a	156.97°	20.43°	5 094
40V-C1-BC1604	157.20°	20.43°	5 403
40VI-C1-BC1606	158.47°	20.39°	5 574
40VI-C1-BC1607	160.41°	20.46°	5 123
40VI-C1-BC1608	160.34°	20.24°	4 933
40VI-C1-BC1610	160.85°	20.93°	4 993
40VI-C3-BC1613	158.98°	22.15°	5 293
40VI-C3-BC1615	160.55°	22.88°	5 590
40VI-C3-BC1617	161.09°	23.18°	5 371
40VI-C3-BC1618	160.13°	22.88°	5 528
40VI-C3-BC1621a	157.03°	22.22°	5 294

水 100 mL 中, 用固体 NaOH 调节 pH 至 7.0, 再用 0.22 μm 的无菌滤膜过滤除菌。

人工海水: NaCl 19.965 g, KCl 0.664 g, KBr 0.080 g, Na₂SO₄ 3.917 g, K₂HPO₄ 0.040 g, NaHCO₃ 0.193 g, (NH₄)₂SO₄ 1.000 g, H₃BO₃ 0.026 g, SrCl₂·6H₂O 0.040 g, MgCl₂·6H₂O 6.410 g, CaCl₂·2H₂O 1.469 g, 蒸馏水 1 000 mL。

腐殖酸人工海水: NaCl 19.965 g, KCl 0.664 g, KBr 0.080 g, Na₂SO₄ 3.917 g, K₂HPO₄ 0.040 g, NaHCO₃ 0.193 g, (NH₄)₂SO₄ 1.000 g, H₃BO₃ 0.026 g, SrCl₂·6H₂O 0.040 g, 蒸馏水 1 000 mL。

1.4 潜在腐殖质转化菌的定向富集培养与纯化

无菌称取 5 g 沉积物样品悬浮至 50 mL 无菌蒸馏水中, 涡旋振荡混匀后, 取 1 mL 涡旋混匀液加入含有 50 mL 腐殖酸液体培养基的锥形瓶中, 20 °C、80 r/min 振荡培养 30–60 d。取 5 mL 富集培养液转接到新鲜的液体培养基中培养 21–28 d, 共转接 3 次。

取富集培养液进行 10 倍梯度稀释后, 将 10⁻⁶、10⁻⁷ 和 10⁻⁸ 梯度的悬浮液均匀涂布至 2216E 固体培养基, 置于 20 °C 培养箱中培养, 直至有菌落长出。挑取菌落形态特征存在明显差异的菌落划线至 2216E 培养基上进行 2–3 代纯化培养。获得的纯化菌株接种至 2216E 的斜面培养基上, 并置于 4 °C 的环境中保存。同时制备纯化菌株的液体培养物, 加入终浓度 15%–30% 的甘油保存于 -80 °C 冰箱。

1.5 菌株 16S rRNA 基因的 PCR 扩增与测序

取纯化菌株培养液 1 mL 移入无菌 EP 管中, 4 °C、8 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 收集沉淀。沉淀中加入 500 μL 无菌水, 吹打悬浮菌体后, 置于 95 °C 高温水浴 15 min, 作为 PCR 扩增模板。用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F

(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: 2×Taq Master Mix 25 μL , 模板 2 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL , 加 ddH₂O 至总体积为 50 μL 。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 45 s, 53 °C 45 s, 72 °C 90 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经 DNA 胶回收试剂盒纯化后, 连接 pMD18-T 载体。连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 经蓝白斑筛选挑取白色单菌落后, 用 pMD18-T 载体通用引物 M13-47 (5'-CGCCAGGGTTTCCC AGTCACGAC-3') 和 RV-M (5'-GAGCGGATAAC AATTCACACAGG-3') 进行 PCR 检测, 获得阳性克隆, 委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行双向测序。

1.6 菌株 16S rRNA 基因分析及系统进化树的构建

将测序供试菌株获得的有效 16S rRNA 基因序列提交 NCBI 数据库, 获得 GenBank 登录号。将菌株的有效 16S rRNA 基因序列上传至 EzBioCloud 数据库中进行 BLAST 比对(<http://www.ezbiocloud.net/identify>)。依据相似性比对结果, 按照属和种的 16S rRNA 基因相似性分类界限值(属 94.5%^[15]; 种 97%), 初步确定菌株的分类地位。选取并下载与比对菌株相似性最高的模式菌株序列, 利用 MEGA 7.0 中的邻接法(neighbour-joining method)构建进化树^[16], 并用网站 iTOL (<https://itol.embl.de/login.cgi>)进一步完善美化进化树。

1.7 木质素修饰酶阳性菌株的筛选

利用含苯胺蓝的脱色培养基筛选木质素修饰酶(lignin-modifying enzyme, LME)阳性菌株。根据菌株的 16S rRNA 基因序列同源性比对结果, 选择隶属于不同种的代表菌株各 1 株进行实验。取处于对数生长期的菌液 2 μL 接种到脱

色培养基上, 20 °C 恒温培养箱培养 7–14 d, 培养期间观察菌落周围是否有透明圈, 以及透明圈大小随培养时间的延长的变化情况。以菌落周围有透明圈出现或能使培养平板脱色的菌株判定为 LME 阳性菌株^[17]。

为了进一步分析分离菌株的木质素降解潜力, 从 GenBank 数据库下载与实验菌株 16S rRNA 基因序列相似性最高(100%)的 18 个模式菌株的基因组序列, 委托生工生物工程(上海)股份有限公司利用 Illumina NovaSeq 测序平台进行 LME 阴性菌株 voya40th042 的基因组测序。利用 RAST 在线数据库分析上述 18 株菌的基因

组中参与木质素和芳香族降解的基因(簇)。

2 结果与分析

2.1 细菌多样性分析

利用以 HS 为唯一碳源的富集培养基, 对西太平洋多金属结核区 12 个站位沉积物样品中的细菌进行了富集培养、分离和纯化, 共获得菌株 276 株。将所获菌株 16S rRNA 基因序列提交至 NCBI 数据库, 获得 GenBank 登录号为 MT626101–MT626364。经 EzBioCloud 数据库相似度比对, 将 276 株菌归属于 37 个属(图 1)。12 个站位各包含的属数量在 5–15 个之间, 其中

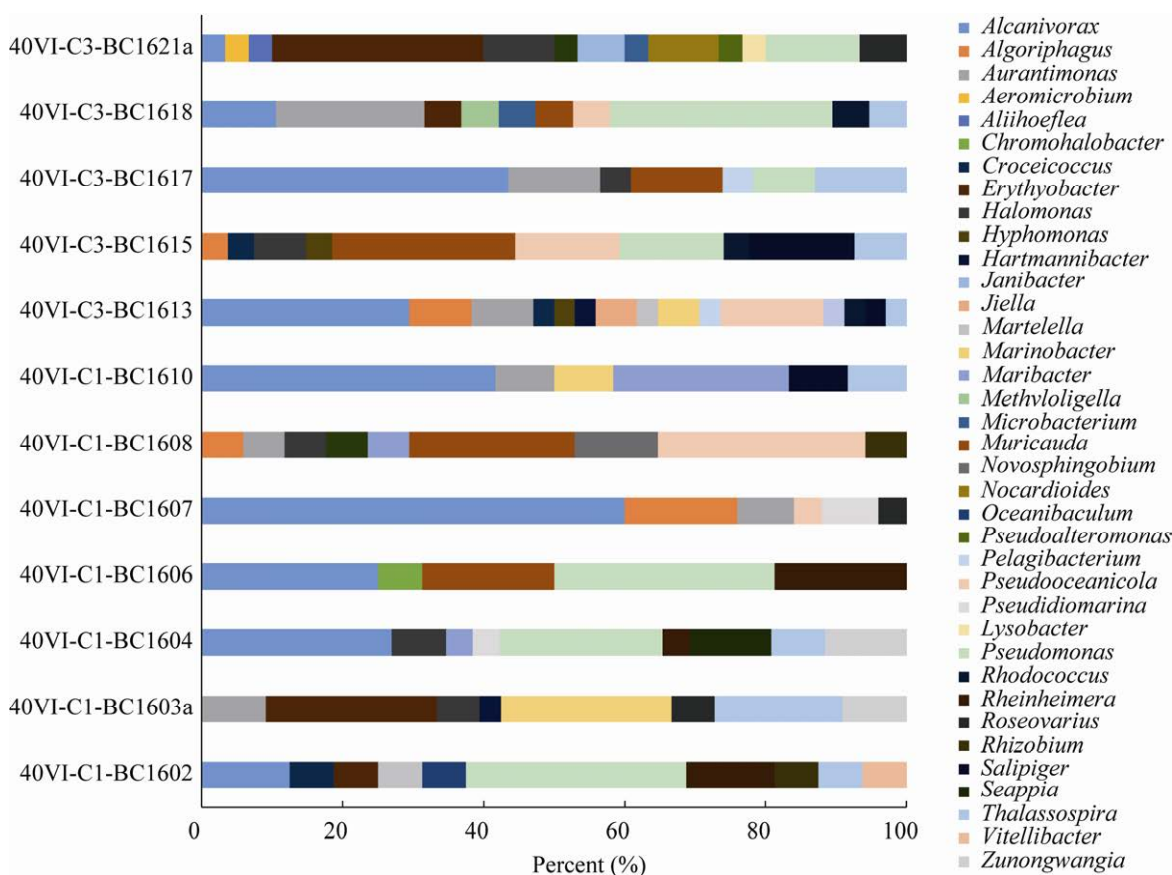


图 1 12 个站位潜在腐殖质转化菌的种属分布

Figure 1 Species distribution of potential humic substances-transforming bacteria from 12 stations.

站点 40VI-C1-BC1613 获得的属最多(15 个属), 而站点 40VI-C1-BC1606 获得的属最少(5 个属)。

276 株菌分布于放线菌纲(*Actinobacteria*)、纤维粘网菌纲 (*Cytophagia*)、黄杆菌纲 (*Flavobacteria*)、 α 变形菌纲(*Alphaproteobacteria*)

和 γ 变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)中的 37 个属, 其中 *Gammaproteobacteria* 中食烷菌属(*Alcanivorax*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)获得比率最高, 分别获得 56 株和 39 株, 分别占总菌株数的 20%和 14% (表 2)。

表 2 12 个站点可培养潜在腐殖质转化菌的群落结构组成

Table 2 Community composition of potential humic substances-transforming bacteria isolated from 12 stations

Class	Genus	Isolate	16S rRNA gene similarity (%)	
<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Aliihoeflea</i>	1	98.00	
	<i>Aurantimonas</i>	15	99.06–100.00	
	<i>Hartmannibacter</i>	2	100.00	
	<i>Jiella</i>	2	98.44–98.85	
	<i>Martelella</i>	2	100.00	
	<i>Methyloligella</i>	1	93.21	
	<i>Pelagibacterium</i>	2	100.00	
	<i>Rhizobium</i>	2	99.33–100.00	
	<i>Stappia</i>	3	98.78–99.85	
	<i>Hyphomonas</i>	2	99.85	
	<i>Roseovarius</i>	5	99.85–100.00	
	<i>Salipiger</i>	6	100.00	
	<i>Pseudoceanicola</i>	11	99.20–100.00	
	<i>Oceanibaculum</i>	1	99.85	
	<i>Thalassospira</i>	17	99.57–100.00	
	<i>Croceicoccus</i>	3	100.00	
	<i>Erythrobacter</i>	17	99.07–100.00	
	<i>Novosphingobium</i>	2	99.35–99.86	
	<i>Actinobacteria</i>	<i>Janibacter</i>	2	99.85
		<i>Microbacterium</i>	1	99.21
<i>Rhodococcus</i>		3	99.85–100.00	
<i>Aeromicrobium</i>		1	99.10	
<i>Nocardioides</i>		3	98.80–99.04	
<i>Cytophagia</i>	<i>Algoriphagus</i>	9	99.38–100.00	
<i>Flavobacteria</i>	<i>Maribacter</i>	5	99.10–99.40	
	<i>Muricauda</i>	18	98.16–100.00	
	<i>Vitellibacter</i>	1	100.00	
	<i>Zunongwangia</i>	6	98.81–100.00	
	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Marinobacter</i>	10	99.17–100.00
<i>Pseudoalteromonas</i>		1	98.91	
<i>Rheinheimera</i>		6	99.85–100.00	
<i>Lysobacter</i>		3	99.70	
<i>Alcanivorax</i>		56	99.71–100.00	
<i>Chromohalobacter</i>		1	99.03	
<i>Halomonas</i>		10	99.52–100.00	
<i>Pseudomonas</i>		39	98.76–99.40	
<i>Pseudidiomarina</i>		7	98.85–99.10	

2.2 分离菌株的遗传进化树构建

菌株 voya40th401 和 voya40th034 的 16S rRNA 基因序列与模式菌株南极鼠尾菌 (*Muricauda antarctica*) Ar-22^T 和海水纪氏菌 (*Jiella aquimaris*) LZB041^T 的 16S rRNA 基因相似度分别为 98.5% 和 98.2%，这 2 株菌已先后被确定为新种沉积物鼠尾菌 (*Muricauda sediminis*) 和太平洋纪氏菌 (*Jiella pacifica*) 的模式菌株^[18-19]。此外菌株 voya40th576 的 16S rRNA 基因序列与 EzBioCloud 数据库中模

式菌株的 16S rRNA 基因序列最高一致性仅为 93.21%，表明该菌株可能代表新的属^[15]。系统发育树显示，276 株菌隶属于 5 纲 14 目 37 属 56 种 (图 2)，其中 *Alphaproteobacteria* 包含的分类单元最丰富 (4 目 18 属 22 种)，其次依次为 *Gammaproteobacteria* (4 目 9 属 19 种)、*Actinobacteria* (4 目 5 属 6 种)、*Flavobacteria* (1 目 4 属 8 种) 和 *Cytophagia* (1 目 1 属 1 种)。在种水平上，假单胞菌属获得的种最多 (6 个，图 2)。

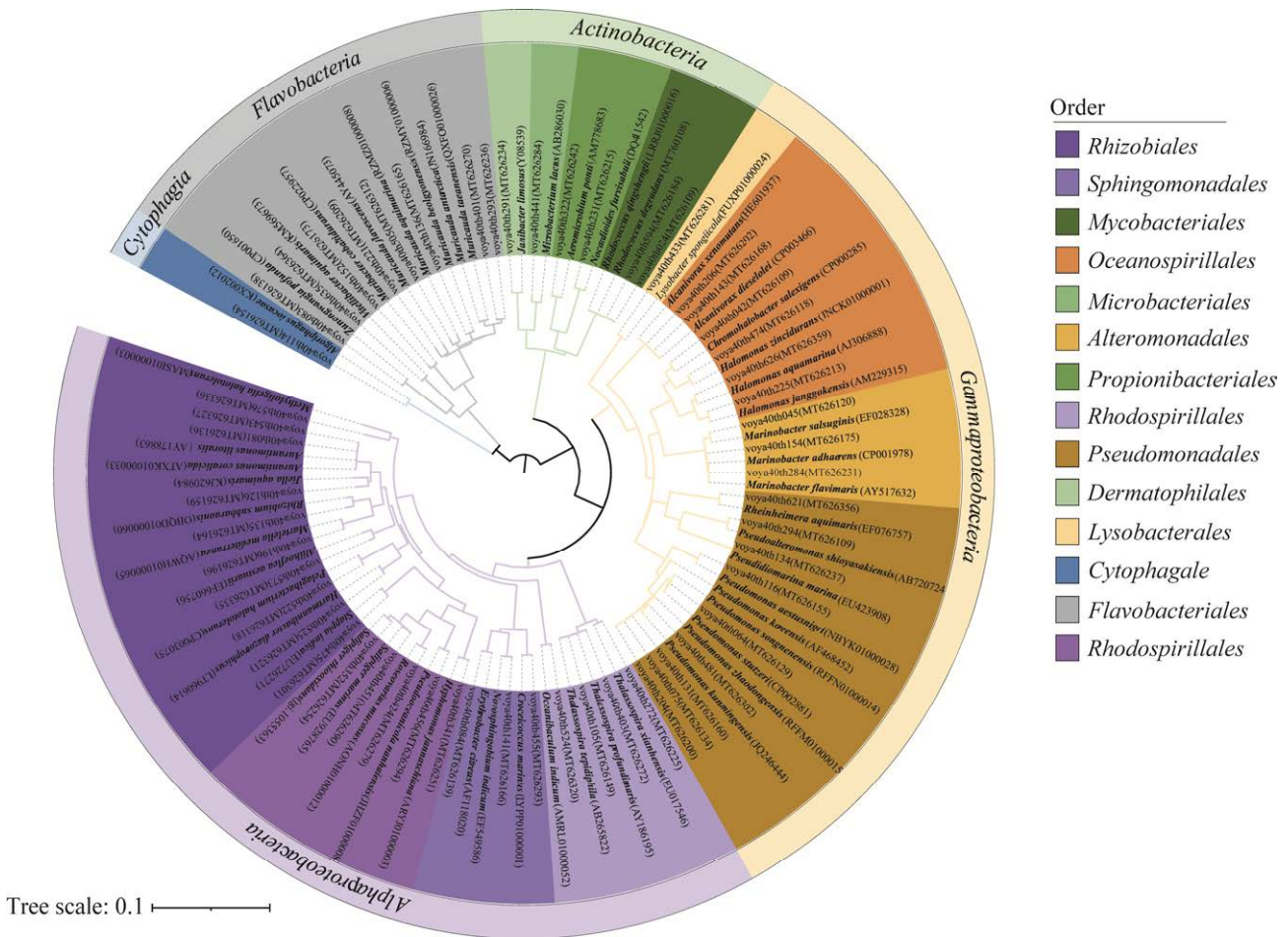


图 2 12 个站位潜在腐殖质转化菌与参考菌株的系统发育树

Figure 2 Neighbor-joining phylogenetic tree of representative cultivable potential humic substances-transforming bacteria in sediments from 12 stations and their closest relatives based on 16S rRNA gene sequences. The serial number in parentheses denotes the GenBank accession number of the strain. The nucleotide substitution rate was 0.1.

2.3 菌株的腐殖质转化菌潜力分析

利用脱色培养基对 56 株菌(代表 55 个种和 1 个潜在新属)产 LME 能力的检测结果显示,除了菌株 voya40th042、voya40th064、voya40th105、voya40th136、voya40th225、voya40th231 和 voya40th403 共 7 株菌为 LME 阴性菌株,其余 49 株菌均为 LME 阳性菌株。7 株 LME 阴性菌株中,菌株 voya40th042 能使整个培养基的蓝色加深(图 3A、3B)。培养第 7 天时, LME 阳性菌株的菌落周围均可形成较为明显的透明圈,并且随着培养时间的延长,可将整个平板脱色(图 3C、3D)。

采用 RAST 数据库对本实验相关的 18 个模式菌株的基因组进行注释,分析结果显示(表 3): (1) 3 个模式菌株基因组中含有染料脱色过氧化物酶(dye-decolorizing peroxidase, DyP)编码基因,包括菌株柴油食烷菌(*Alcanivorax dieselolei*) B5、樊庆生红球菌(*Rhodococcus qingshengii*) JCM 15477 和 *Jiella pacifica* 40Bstr34,其中,菌株 *R. qingshengii* JCM 15477 含有 DyP 编码基因的数量最多(2 个); (2) 18 个模式菌株基因组中均含有多铜氧化酶(multi-copper oxidase, MCO)编码基因,其中海洋金色球菌(*Croceicoccus marinus*) E4A9 含有的 MCO 编码基因数量最多(9 个); (3) 18 株模式菌株中,只有菌株硫氧化盐懒惰菌(*Salipiger thiooxidans*) DSM 10146 含有潜在的漆酶(laccase)编码基因; (4) 除菌株 *C. marinus* E4A9、黏着海杆菌(*Marinobacter adhaerens*) HP15 和 *Pseudomonas aestusnigri* CECT 8317 不含 β -酮己二酸途径(β -keto adipate pathway),其余菌株基因组中均含有该途径,其中菌株海洋盐懒惰菌(*Salipiger marinus*) DSM 26424 参与 β -酮己二酸途径的基因数量最多(35 个); (5) 菌株 *S. thiooxidans* DMS 10146 含有参与芳香族代谢的

途径最多,包括 β -酮己二酸代谢途径、苯甲酸盐(benzoate)代谢途径、水杨酸和龙胆酸(salicylate and gentisate)代谢途径、4-羟基苯乙酸(4-hydroxyphenylacetic acid)代谢途径、奎尼酸(quinic acid)代谢途径和联苯(biphenyl)代谢途径; (6) 模式菌株 *A. dieselolei* B5 基因组中含有 5 个酚氧化酶(phenoloxidase)编码基因。

基因组测序结果显示, LME 阴性菌株 voya40th042 的基因组大小为 3 594 070 bp (GenBank 登录号为 JAIQWZ000000000.1),其基因组中虽不含 DyP 和 laccase 编码基因,但却含有 2 个 MCO 编码基因。此外,菌株 voya40th042 基因组中还含有 β -酮己二酸途径、苯甲酸盐、水杨酸和龙胆酸代谢途径的基因簇。

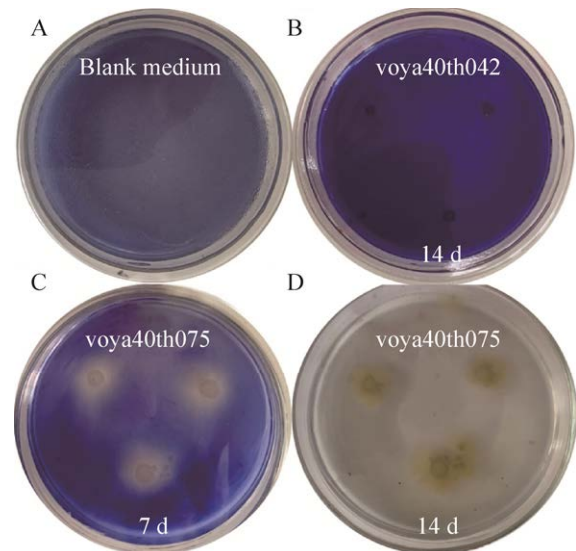


图 3 菌株在含有苯胺蓝的脱色培养基上产生的脱色圈

Figure 3 Decolourization zones of bacteria in aniline blue containing plates. A: Blank control medium; B: voya40th042 represents lignin-modifying enzymes negative bacteria after 14 days of incubation; C: voya40th075 represents lignin-modifying enzyme positive bacteria after 7 days of incubation; D: voya40th075 represents lignin-modifying enzyme positive bacteria after 14 days of incubation.

表 3 18 株模式菌株基因组中的潜在参与木质素和芳香族降解的基因

Table 3 Potential genes for lignin degradation and aromatic degradation present in genomes of 18 type strains

Strain	Type strain*	MCO		DyP		Aromatic degradation genes			
				β -ketoadipate	Benzoate	Salicylate gentisate	and 4-hydroxyphenylacetic acid	Quinate	Biphenyl
voya40th206	<i>Alcanivorax dieselolei</i> B5**	1	1	6	1	8	9	1	0
voya40th114	<i>Algoriphagus iocasae</i> DSM 102044	2	0	3	0	8	0	1	0
voya40th455	<i>Croceicoccus marinus</i> E4A9	9	0	0	0	3	0	0	10
voya40th084	<i>Qipengyuania citreus</i> CGMCC 1.8703	7	0	3	2	1	0	1	0
voya40th525	<i>Hartmannibacter diazotrophicus</i> E19	2	0	14	1	8	0	2	0
voya40th034	<i>Jiella pacifica</i> 40Bstr34	2	1	13	2	6	0	1	0
voya40th152	<i>Maribacter cobaltidurans</i> B1	4	0	15	1	11	0	1	0
voya40th154	<i>Marinobacter adhaerens</i> HP15	1	0	0	7	7	0	0	0
voya40th196	<i>Marteella mediterranea</i> DSM 17316	3	0	30	3	11	0	1	6
voya40th401	<i>Muricauda sediminis</i> 40Bstr401	3	0	2	0	6	0	1	0
voya40th522	<i>Pelagibacterium halotolerans</i> B2	1	0	20	5	10	0	3	0
voya40th116	<i>Pseudomonas aestusnigri</i> CECT 8317	3	0	0	1	3	0	1	8
voya40th594	<i>Rhodococcus qingshengii</i> JCM 15477	6	2	28	10	33	0	2	12
voya40th424	<i>Roseovarius mucosus</i> DSM 17069	3	0	10	4	10	0	1	3
voya40th352	<i>Salipiger thiooxidans</i> DSM 10146***	3	0	29	1	29	9	1	1
voya40th635	<i>Aequorivita aquimaris</i> D-24	2	0	2	0	6	0	1	0
voya40th083	<i>Zunongwangia profunda</i> SM-A87	3	0	2	0	7	0	1	0
voya40th451	<i>Salipiger marinus</i> DSM26424	5	0	35	0	6	0	1	0

注: *: 与实验菌株的 16S rRNA 基因序列一致性为 100%; **: 含有 5 个酚氧化酶(phenoloxidase)编码基因; ***: 含有 1 个漆酶编码基因; 表格中阿拉伯数字代表基因数量

Note: *: Sharing 100% 16S rRNA similarity with corresponding experimental bacteria; **: Contains five phenoloxidase coding genes; ***: Contains one laccase encoding gene; Arabic numerals in the table represent number of genes.

3 讨论与结论

太平洋多金属结核区除了富含矿产资源,还蕴含着大量的尚未被挖掘的微生物种质资源。近些年来,研究者采用多种培养策略和免培养技术对太平洋结核区沉积物中细菌多样性进行了分析。本实验采用以 HS 为唯一碳源和能源的培养基,对西太平洋多金属结核区 12 个站位沉积物样品中的可培养细菌进行了分离与鉴定。在纲水平上, α 变形菌纲呈现出最高的种属多样性(18 个属 22 个种),这一结果与 Rocker 等的研究结果一致^[20]。Rocker 等^[20]研究发现,以 HS 为唯一碳源从海洋环境样品中获得的 HS 转化菌以 α 变形菌纲为优势种群,而从河口来源样品中获得的 HS 转化菌则主要隶属于 γ 变形菌纲。本研究对从不同站位点分离获得的细菌多样性进行分析发现,不同站位间的细菌多样性存在较大差异,如在属水平上,站位 40VI-C1-BC1613 获得的属数量是站位 40VI-C1-BC1606 获得的属数量的 3 倍,其原因可能与这 2 个站位间的环境参数存在较大差异有关。此外, *Alcanivorax* 和 *Pseudomonas* 在 12 个站位中分离频率均较高,说明这 2 个属成员为该环境中的优势可培养细菌种群,而且提示这 2 个种群能够利用难降解天然有机多聚物。值得提及的是,本实验从 12 个沉积物站位中获得细菌多样性(37 属 56 种)显著高于以木质素为唯一碳源获得的细菌多样性(14 属 22 种)^[14],这说明以 HS 为唯一碳源的富集培养基可以获得更为多样的细菌种群。

HS 是土壤和水体环境中有机质的主要存在形式,占总有机碳的 94%^[21]。HS 由化学、物理、微生物降解及酚类、芳香族成分(如木质素)的(再)聚合作用形成^[22]。HS 富含苯氧基自由基,能够结合多种有机、无机分子和元素,包括氨基酸、肽、糖和木质素片段,其不但含有

氨基酸、碳水化合物和脂质等生物活性物质,还含有黑色素、酚酸、三萜、氨基、吡咯、吡啶和吡嗪等生物活性物质,因此 HS 可以作为微生物的营养物质来源^[9]。然而,从营养和生物地球化学的角度来看,HS 比许多其他碳源更难被微生物利用^[23]。尽管如此,人们已从土壤、煤或水环境中分离出众多能够转化 HS 的微生物类群,这表明 HS 的微生物转化普遍存在于各种环境中^[20]。有学者推测土壤中能够转化 HS 的细菌数量约占总微生物数量的 0.2%–3.5%^[24]。

目前对微生物转化 HS 的机制研究主要集中于真菌^[2,25]。研究表明,真菌的 HS 降解活性与其产生的木质素过氧化物酶(lignin peroxidase, LiP)、锰依赖性过氧化物酶(manganese-dependent peroxidase, MnP)、多功能过氧化物酶(versatile peroxidase)和漆酶等 LME 密切相关。LME 可以氧化酚类化合物,从而产生苯氧基和羧基自由基,产生的不稳定自由基随后发生缩合和聚合或进一步被降解^[2]。LiP 和 MnP 氧化具有高氧化还原电位的非酚类芳香化合物,而漆酶氧化具有相对较低氧化还原电位的非酚类芳香化合物。在低分子量介质的存在下,漆酶还可以氧化具有高氧化还原电位的非酚类底物^[26]。除 LME 外,某些真菌的酚氧化酶(phenoloxidase)和酯酶(esterase)也可能具有 HS 解聚功能^[27]。

目前对 HS 转化细菌的研究工作主要集中在菌株的分离与鉴定,而对细菌转化或降解 HS 的机制研究鲜有报道^[20]。目前推测可能参与 HS 转化的 LME 包括漆酶、DyP 和 MCO^[9,28-30]。基因组分析表明,与本实验相关的 18 个模式菌株的基因组中均含有 MCO 编码基因,其中 3 个模式菌株(*A. dieselolei* B5、*J. pacifica* 40Bstr34 和 *R. qingshengii* JCM 15477)还含有 DyP 编码基因。不同于其他 17 株模式菌株,菌株 *S. thiooxidans* DSM 10146 基因组中还含有一个漆酶(EC 1.10.3.2)

编码基因。与其他 MCO 家族成员相同, 漆酶含有与 4 个高度保守的基序连接的 4 个铜原子^[31]。然而, 由于目前缺少将漆酶与其他 MCO 家族成员区分开来的独特基因序列, 因此通过实验测定其对西林加锌的活性是定义漆酶的唯一方法^[30]。分析发现, 18 个模式菌株含有的 MCO 编码数量及其序列同源性存在较大的差异, 此外, 菌株 voya40th042 虽不具有 LME 活性, 但该菌株基因组中却含有 2 个 MCO 编码基因。这一分析再次表明, MCO 编码基因在细菌中广泛分布, 其不但存在于具有木质素降解活性的菌株中, 同样也存在于无木质素降解活性的菌株中^[32]。由于至今尚不清楚具有 LME 活性的 MCO 具备哪些保守的基序^[29], 因此后续唯有通过实验确定其是否具有 LME 活性。尤其值得提及的是, 模式菌株 *A. dieselolei* B5 除了含有 DyP 和 MCO 编码基因外, 还含有酚氧化酶编码基因。研究已表明, 酚氧化酶能催化 HS 中酚单元的氧化聚合, 是微生物转化 HS 的非常重要的功能酶^[27]。此外, 模式菌株 *A. dieselolei* B5 不但含有多种 LME, 而且含有多条代谢芳香族的途径, 这说明该种群可能具有高效的 HS 转化能力。

18 株模式菌株基因组中含有利用 β -酮己二酸、苯甲酸盐、水杨酸、龙胆酸、4-羟基苯乙酸、奎尼酸和联苯等多种芳香族代谢途径, 这不但为本研究以 HS 为唯一碳源的培养基有效获取 HS 转化菌提供了直接的理论依据, 而且再次说明环境中的 HS 转化似乎是一个复杂的多步骤过程^[9]。在以 HS 为唯一碳源生长的混合菌群中, LME 阳性菌群和酚氧化酶阳性菌株将 HS 解聚成低聚物或芳香族单体, 为其他不具备 HS 解聚能力但具备芳香族代谢能力的菌株提供营养。

REFERENCES

- [1] Davies G, Ghabbour EA. Humic Substances: Structures, Properties and Use[M]. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 1998
- [2] Grinhut T, Hadar Y, Chen Y. Degradation and transformation of humic substances by saprotrophic fungi: processes and mechanisms[J]. Fungal Biology Reviews, 2007, 21(4): 179-189
- [3] Van Trump JI, Sun Y, Coates JD. Microbial interactions with humic substances1[J]. Advances in Applied Microbiology, 2006, 60: 55-96
- [4] Stern N, Mejia J, He SM, Yang Y, Ginder-Vogel M, Roden EE. Dual role of humic substances as electron donor and shuttle for dissimilatory iron reduction[J]. Environmental Science & Technology, 2018, 52(10): 5691-5699
- [5] Lovley DR, Coates JD, Blunt-Harris EL, Phillips EJP, Woodward JC. Humic substances as electron acceptors for microbial respiration[J]. Nature, 1996, 382(6590): 445-448
- [6] Bai YN, Wang XN, Wu J, Lu YZ, Fu L, Zhang F, Lau TC, Zeng RJ. Humic substances as electron acceptors for anaerobic oxidation of methane driven by ANME-2d[J]. Water Research, 2019, 164: 114935
- [7] Lovley DR, Woodward JC, Chapelle FH. Rapid anaerobic benzene oxidation with a variety of chelated Fe(III) forms[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(1): 288-291
- [8] Lovley DR, Fraga JL, Coates JD, Blunt-Harris EL. Humics as an electron donor for anaerobic respiration[J]. Environmental Microbiology, 1999, 1(1): 89-98
- [9] Kulikova NA, Perminova IV. Interactions between humic substances and microorganisms and their implications for nature-like bioremediation technologies[J]. Molecules, 2021, 26(9): 2706
- [10] Fry JC, Parkes RJ, Cragg BA, Weightman AJ, Webster G. Prokaryotic biodiversity and activity in the deep seafloor biosphere[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2008, 66(2): 181-196
- [11] Coates JD, Ellis DJ, Blunt-Harris EL, Gaw CV, Roden EE, Lovley DR. Recovery of humic-reducing bacteria from a diversity of environments[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(4): 1504-1509
- [12] Krachler R, Krachler RF, Wallner G, Hann S, Laux M, Cervantes Recalde MF, Jirsa F, Neubauer E, Von Der Kammer F, Hofmann T, et al. River-derived humic substances as iron chelators in seawater[J]. Marine Chemistry, 2015, 174: 85-93

- [13] Oglesby RT, Christman RF, Driver CH. The biotransformation of lignin to humus—facts and postulates[J]. *Advances in Applied Microbiology*, 1968, 9: 171-184
- [14] 黄一哲, 任娜, 徐莹, 吴李园, 董冰夏, 朱四东, 杨季芳, 陈吉刚. 远海 50 个站位沉积物中潜在木质素降解菌的分离与鉴定[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(4): 1080-1092
Huang YZ, Ren N, Xu Y, Wu LY, Dong BX, Zhu SD, Yang JF, Chen JG. Isolation and identification of potential lignin-degrading bacteria in sediments from 50 stations of the Pelagic Ocean[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(4): 1080-1092 (in Chinese)
- [15] Yarza P, Yilmaz P, Pruesse E, Glöckner FO, Ludwig W, Schleifer KH, Whitman WB, Euzéby J, Amann R, Rosselló-Móra R. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(9): 635-645
- [16] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406-425
- [17] Xiong Y, Zhao YR, Ni KK, Shi Y, Xu QF. Characterization of ligninolytic bacteria and analysis of alkali-lignin biodegradation products[J]. *Polish Journal of Microbiology*, 2020, 69(3): 339-347
- [18] Dong BX, Zhu SD, Chen T, Ren N, Chen XN, Chen Y, Xue ZH, Shen XD, Huang YZ, Yang JF, et al. *Muricauda oceani* sp. nov., isolated from the East Pacific Ocean[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2020, 70(6): 3839-3844
- [19] Xue ZH, Zhu SD, Chen XN, Chen T, Ren N, Chen Y, Dong BX, Shen XD, Huang YZ, Yang JF, et al. *Jiella pacifica* sp. nov., isolated from the West Pacific Ocean[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2020, 70(7): 4345-4350
- [20] Rocker D, Brinkhoff T, Grüner N, Dogs M, Simon M. Composition of humic acid-degrading estuarine and marine bacterial communities[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, 80(1): 45-63
- [21] Gaffney JS, Marley NA, Clark SB. Humic and fulvic acids and organic colloidal materials in the environment[A]// *ACS Symposium Series*[M]. Washington, DC: American Chemical Society, 1996: 2-16
- [22] Van Trump JI, Rivera Vega FJ, Coates JD. Natural organic matter as global antennae for primary production[J]. *Astrobiology*, 2013, 13(5): 476-482
- [23] Hong YG, Guo J, Xu ZC, Xu MY, Sun GP. Humic substances act as electron acceptor and redox mediator for microbial dissimilatory azoreduction by *Shewanella decolorationis* S12[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007, 17(3): 428-437
- [24] Yanagi Y, Yoda K, Ogura K, Fujitake N. Population of humic acid degrading microorganisms in andosols under different vegetation types and grassland management regimens[J]. *Microbes and Environments*, 2008, 23(1): 44-48
- [25] Collado S, Oulego P, Suárez-Iglesias O, Díaz M. Leachates and natural organic matter. A review of their biotreatment using fungi[J]. *Waste Management*, 2019, 96: 108-120
- [26] D'Souza TM, Merritt CS, Reddy CA. Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(12): 5307-5313
- [27] Laborda F, Monistrol IF, Luna N, Fernández M. Processes of liquefaction/solubilization of Spanish coals by microorganisms[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, 52(1): 49-56
- [28] De Gonzalo G, Colpa DI, Habib MHM, Fraaije MW. Bacterial enzymes involved in lignin degradation[J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 236: 110-119
- [29] Granja-Travez RS, Persinoti GF, Squina FM, Bugg TDH. Functional genomic analysis of bacterial lignin degraders: diversity in mechanisms of lignin oxidation and metabolism[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(8): 3305-3320
- [30] 彭倩楠, 林璐. 木质素在海洋中的生物转化及其对海洋碳循环的影响[J]. *微生物学报*, 2020, 60(9): 1959-1971
Peng Qn, Lin L. Biotransformation of lignin in the ocean and its impact on marine carbon cycle[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(9): 1959-1971 (in Chinese)
- [31] Reiss R, Ihssen J, Richter M, Eichhorn E, Schilling B, Thöny-Meyer L. Laccase versus laccase-like multi-copper oxidase: a comparative study of similar enzymes with diverse substrate spectra[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e65633
- [32] Ausec L, Zakrzewski M, Goesmann A, Schlüter A, Mandic-Mulec I. Bioinformatic analysis reveals high diversity of bacterial genes for laccase-like enzymes[J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e25724