

研究报告

深渊沉积物中盐单胞菌(*Halomonas* sp.) NyZ771 菌株的分离培养及其降解芳香酸的研究

赖鑫婷, 凌浩, 周宁一, 许楹*

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

赖鑫婷, 凌浩, 周宁一, 许楹. 深渊沉积物中盐单胞菌(*Halomonas* sp.) NyZ771 菌株的分离培养及其降解芳香酸的研究[J]. 微生物学通报, 2022, 49(5): 1553-1562

Lai Xinting, Ling Hao, Zhou Ningyi, Xu Ying. Isolation of a bacterium degrading aromatic acids from hadal trench sediment[J]. Microbiology China, 2022, 49(5): 1553-1562

摘要:【背景】海洋是地球上最大的碳库,也是地球生物最大的栖息地。在这个庞大的生态系统中拥有多种多样的微生物,它们在全球碳循环中扮演了重要的角色。海斗深渊(海平面 6 000 m 以下的海域)由于高静水压和表层沉积汇集了大量有机质,形成了包含丰富生物资源的特殊生境。【目的】从马里亚纳海沟海斗深渊沉积物样品中分离培养能够以芳香酸为唯一碳源和能源生长的微生物,并研究其降解特性。【方法】通过模拟原位高压环境富集培养和常压条件下芳香酸选择性分离培养获得深渊来源的纯培养细菌,并根据形态学观察和 16S rRNA 基因序列系统发育分析进行种属鉴定,利用不同芳香酸进行培养和生物转化,通过 HPLC 和 LC/MS 鉴定芳香酸代谢中间产物。【结果】从马里亚纳海沟 6 300 m 沉积物样本中分离获得了一株盐单胞菌(*Halomonas* sp.) NyZ771。该菌株能够利用苯甲酸和 4-羟基苯甲酸作为唯一碳源生长。其代谢 4-羟基苯甲酸的中间产物鉴定为原儿茶酸。【结论】从深渊沉积物样本分离得到一株能降解苯甲酸和 4-羟基苯甲酸的盐单胞菌 NyZ771,丰富了深渊来源的微生物资源,为今后研究深渊中微生物的芳香酸降解及海洋微生物驱动的碳循环提供了一定的理论基础。

关键词: 海斗深渊; 微生物分离; 芳香酸; 原儿茶酸途径

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

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

*Corresponding author: E-mail: ying.xu@sjtu.edu.cn

Received: 2022-02-14; Accepted: 2022-03-06; Published online: 2022-03-17

Isolation of a bacterium degrading aromatic acids from hadal trench sediment

LAI Xinting, LING Hao, ZHOU Ningyi, XU Ying*

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

Abstract: **[Background]** The ocean is the largest reservoir of carbon and the largest habitat for life on the Earth. This vast ecosystem harbors a wide variety of microorganisms that play a key role in the global carbon cycle. Hadal trench (6 000 m below the sea level) is a special habitat containing rich biological resources owing to the high hydrostatic pressure and the accumulation of massive organic matter by surface deposition. **[Objective]** To obtain the bacterial pure culture capable of utilizing aromatic acids as the sole carbon and energy from the hadal trench sediment samples, and analyze its aromatic acid-degrading characteristics. **[Methods]** The hadal trench sediment sample was cultivated in the simulated *in situ* high-pressure environment, and then the culture was incubated on the plates with different aromatic acids under atmospheric ambient pressure. Finally, the bacterial pure culture was selected and identified based on the morphological characteristics and the phylogenetic tree constructed with the 16S rRNA gene. The strain was then incubated with different aromatic acids, and the degradation intermediates were identified by HPLC and LC/MS. **[Results]** A strain capable of utilizing benzoate and 4-hydroxybenzoate was isolated from the sediment sample from Mariana trench (6 300 m below the sea level). It belonged to the genus *Halomonas* and was designated *Halomonas* sp. strain NyZ771. The intermediate in 4-hydroxybenzoate degradation was identified as protocatechuate. **[Conclusion]** A benzoate- and 4-hydroxybenzoate-degrading bacterium, *Halomonas* sp. strain NyZ771, was isolated from the trench sediment. This study enriches the microbial resources derived from the hadal trench and provides a theoretical foundation for the future research on the aromatic acid degradation in hadal trenches and the carbon cycle driven by microorganisms in the ocean.

Keywords: hadal trench; microbial isolation; aromatic acids; protocatechuate pathway

深渊指深度超过 6 000 m 的海域,基本上由海沟组成,占据了海洋垂直深度的 45%。不同于其他深海区域(深度超过 1 000 m 的海域),“漏斗”形地貌的深渊海沟具有极端压力(静水压力超过 60 MPa)和营养物质交换缓慢的特点^[1-2],因此长久以来被认为是“生态荒漠”。近年来国际上对深海的持续探索,推动了人们对于深渊微生物群落对全球海洋环境和深海生物地球化学循环的影响的认知。目前的研究发现,深渊的底栖生物量和微生物活动都远高于深海平

原^[3],甚至可能是深海的有机碳埋藏中心^[4-6]。同时,在深海生态系统中还检测出相对高浓度的多氯联苯(polychlorinated biphenyl, PCB)、多溴联苯醚(polybrominated diphenyl ether, PBDE)等芳烃污染物^[7]。进入深海的污染物停留在沉积物中,很容易在食物链中积累,这意味着这些化合物很可能在生物体中进行生物累积并且在各个营养级中累积增加。

木质素是一种存在于大部分陆地植物木质部中复杂的高分子芳香聚合化合物,其含量大

约占陆地植物生物量的 30%^[8]。在自然界中,天然木质素通过初级降解会解聚产生大量低分子量单环芳香族化合物包括苯甲酸类芳烃衍生物^[8]、香草酸类芳烃衍生物和丁香酸类芳烃衍生物^[9]等。这些木质素衍生的芳香酸在环境中广泛分布,而细菌在这类芳香酸的矿化中起主要作用。

陆地上对于木质素衍生芳香酸降解菌的研究已有大量报道^[10],并常用其作为模型底物筛选和分离芳烃降解菌株。由于海斗深渊独特的“V”字型地貌以及高静水压力^[11],从陆地环境落入深海的木质素衍生芳香酸为微生物提供了不同的营养来源,栖息于深渊底部的微生物对芳香酸的分解代谢在生物地球化学循环和生物圈的可持续发展中变得至关重要。然而相比于陆地微生物,深海微生物和深渊微生物降解芳香酸的研究非常少。目前已通过液相色谱-质谱(liquid chromatograph-mass spectrometer, LC-MS)或气相色谱-质谱(gas chromatograph-mass spectrometer, GC-MS)分析深海来源细菌的代谢物,证明了深海中也有能够代谢木质素衍生芳香族化合物的细菌^[12];基于 16S rRNA 基因高通量测序和宏基因组等非培养手段的研究也揭示了深海极端环境中可能存在芳香酸和其他芳烃降解细菌^[13-14]。然而关于纯培养降解芳香酸的报道,仅有一株深渊来源的纯培养 *Citricoccus* 细菌可以在常压下降解 4-羟基苯甲酸^[15]。本研究对马里亚纳海沟沉积物样品进行模拟原位环境的富集培养,并通过在常压下木质素衍生芳烃分离筛选获得一株纯培养细菌,对其进行芳烃降解特性的研究,丰富了微生物资源,为探究深渊微生物驱动的深海环境中芳香族化合物降解机理和深海地球化学元素循环研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品

样品来自于马里亚纳海沟海斗深渊(10.889 5°N, 142.226 0°E) 6 300 m 底部(16–20 cm 深度)的沉积物(2016 年采集)。沉积物用无菌袋密封,常压条件下于 4 °C 冷库保存半年后用于高压富集。深渊沉积物样品使用人工海水培养基稀释后加入带胶塞的无菌注射器中,将注射器放入高压容器,通过手动加压器向密封的高压釜中注入水使静水压力达到 60 MPa,在 10–15 °C 下静置培养 6 个月。

1.2 培养基

人工海水基本培养基(g/L): NaCl 26.0, MgCl₂·6H₂O 5.0, CaCl₂·2H₂O 1.4, Na₂SO₄ 4.0, NH₄Cl 0.3, KH₂PO₄ 0.1, KCl 0.5。

人工海水培养基:在人工海水基本培养基中加入终浓度为 30 mmol/L 葡萄糖和 10 mmol/L N-乙酰葡萄糖胺。

LB 培养基(g/L)^[16-17]: 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0。

固体培养基则加入 1.2%–1.5% 琼脂。

1.3 主要试剂和仪器

苯甲酸(benzoate, BA)、3-羟基苯甲酸(3-hydroxybenzoate, 3HBA)、4-羟基苯甲酸(4-hydroxybenzoate, 4HBA)和原儿茶酸(protocatechuate, PCA), Sigma-Aldrich 公司。将上述芳烃化合物分别溶于 50 mmol/L NaOH 溶液配制成 100 mmol/L 钠盐溶液使用。PCR 试剂盒,南京诺唯赞生物科技有限公司;乙酸铵、冰乙酸、甲醇(色谱级)、戊二醛和无水乙醇,国药集团药业股份有限公司;引物合成由擎科(上海)生物科技有限公司完成;DNA 测序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(high performance liquid

chromatography, HPLC), 沃特世科技(上海)有限公司; 四极杆飞行时间液质联用系统(quadrupole time-of-flight LC/MS, Q-TOF LC/MS), 安捷伦科技有限公司; 高压容器, 炬达科技有限公司; 高分辨率扫描电子显微镜(high resolution scanning electron microscope, HRSEM), 泰思肯(中国)有限公司。

1.4 扫描电子显微镜形态观察

挑取菌株 NyZ771 单菌落接种于液体 LB 培养基中培养至 OD_{600} 值约 0.6, 使用磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)将细胞洗涤 2 次, 并重新悬浮在等体积的 3% (体积分数)戊二醛中。在 4 °C 孵育过夜固定细胞后, 用 50%–90% (质量体积分数)的乙醇洗涤戊二醛中的细胞溶液, 然后将细胞重悬于 100 μ L 无水乙醇中。将 2 μ L 重悬溶液加到干净的盖玻片上至乙醇蒸发, 进行高真空镀膜后再使用高分辨率扫描电子显微镜在 5 kV 的电子束强度下操作观察表面形态。

1.5 16S rRNA 基因扩增与系统发育分析

挑取菌株 NyZ771 单菌落至 10 μ L 无菌水中, 移液枪吹打均匀后沸水浴 10 min 以裂解菌体。使用擎科(上海)生物科技有限公司合成的 16S rRNA 基因扩增引物 27F (5'-AGAGTTTGA TCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGYTACCT GTTACGACTT-3'), 取菌体裂解液作为 DNA 模板对菌株 NyZ771 的 16S rRNA 基因进行扩增。PCR 反应体系: DNA 模板 1 μ L, 引物 27F、1492R (10 μ mol/L)各 0.5 μ L, PrimeSTAR Max Premix (2 \times) 10 μ L, ddH₂O 8 μ L。PCR 反应条件: 98 °C 5 min; 98 °C 15 s, 55 °C 15 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增完成后, 通过 1%琼脂糖凝胶电泳验证扩增产物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 并获得登录号为 OM392023。

利用 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的 BLASTn 程序及 EzBioCloud 数据库(<https://www.ezbiocloud.net/>)进行在线比对, 获取菌株 NyZ771 的 16S rRNA 基因的同源序列, 并从中选取模式菌株的 16S rRNA 基因序列。通过 ClustalW 进行多序列比对后, 截去两端不齐序列(OM392023 序列两端各裁切了 50–100 bp), 使用 MEGA 7.0 构建 neighbor-joining 进化树。

1.6 芳香酸代谢物检测与鉴定

配备 Waters e2695 分离模块和 2998 PDA 检测器的 HPLC 用于定量分析培养, 以及生物转化过程中 BA、4HBA 的降解和 PCA 的产生。使用的分析柱为 Agilent ZORBAX SB-C18 (5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm), 柱温设置为 30 °C。流动相由 80% 10 mmol/L 乙酸铵(pH 4.2)和 20% 甲醇组成, 流速为 0.8 mL/min, 进样量为 20 μ L, 4HBA 和 PCA 的检测波长为 254 nm, BA 的检测波长为 227 nm。在此条件下, 标准品 BA、4HBA 和 PCA 的保留时间分别为 12.3、12.7 和 7.4 min。

使用配备二极管阵列检测器和 HILIC 酰胺色谱柱(2.1 mm \times 150 mm, 3 mm)的 Q-TOF LC/MS 系统对 BA、4HBA 和 PCA 进行鉴定, 流动相由 0.1%乙酸(A)和甲醇(B)组成。该系统采用梯度程序(0–5 min, 流动相由 80% A 和 20% B 组成; 5–20 min, 流动相 A 从 80%下调至 10%, 流动相 B 由 20%上调至 90%; 20–25 min, 流动相由 10% A 和 90% B 组成; 25–30 min, 流动相 A 由 10%上调至 80%, 流动相 B 由 90%下调至 20%; 30–35 min, 流动相由 80% A 和 20% B 组成), 使用阴离子模式, 对应芳香酸的检测波长和 HPLC 方法相同, 进样量和流速分别为 10 μ L 和 0.4 mL/min。在此梯度条件下, BA、4HBA 和 PCA 的保留时间分别为 22.1、17.6 和 15.0 min。

2 结果与分析

2.1 深渊细菌分离培养

将马里亚纳海沟沉积物样品在人工海水培养基中富集, 并模拟原位压力为 60 MPa, 静置培养 6 个月, 然后在含 1 mmol/L 4HBA 的人工海水基本培养基中选择性富集培养 4 个月。最后, 在大气环境压力(0.1 MPa)下用含有 1 mmol/L 4HBA 的固体人工海水培养基上连续稀释涂布获得一株纯培养细菌, 命名为菌株 NyZ771。在扫描电子显微镜下观察, 菌株 NyZ771 的细胞呈短杆状, 大小约为(1.7–2.9) $\mu\text{m} \times$ (0.3–0.5) μm , 无鞭毛或菌毛结构(图 1)。

2.2 菌株 NyZ771 种属鉴定

通过 NCBI 数据库和 EzBioCloud 数据库在线序列比对, 显示菌株 NyZ771 的 16S rRNA 基因(GenBank 登录号为 OM392023)与一株来自盐单胞菌属 *Halomonas lutescens* Q1U 菌株的 16S rRNA 基因(GenBank 登录号为 NR152713.1) 具有最高的相似性(大于 99%); 同时, 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析显示菌株 NyZ771

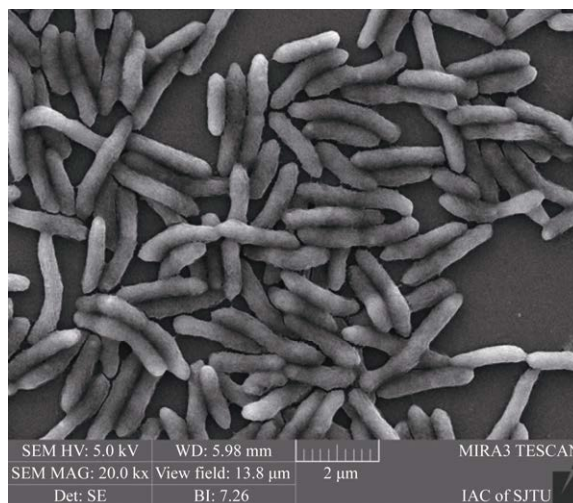


图 1 菌株 NyZ771 在扫描电子显微镜下的形态
扫描电子显微镜的放大倍率为 2×10^4 , 比例尺为 2 μm

Figure 1 Morphology of strain NyZ771 observed by SEM. The SEM magnification was 2×10^4 with a scale bar of 2 μm .

与来源于 *Halomonas* 的多个菌株均具有较近的亲缘关系(图 2), 从而表明该菌株应归类为盐单胞菌属(*Halomonas*), 因此将其命名为盐单胞菌(*Halomonas* sp.) NyZ771。

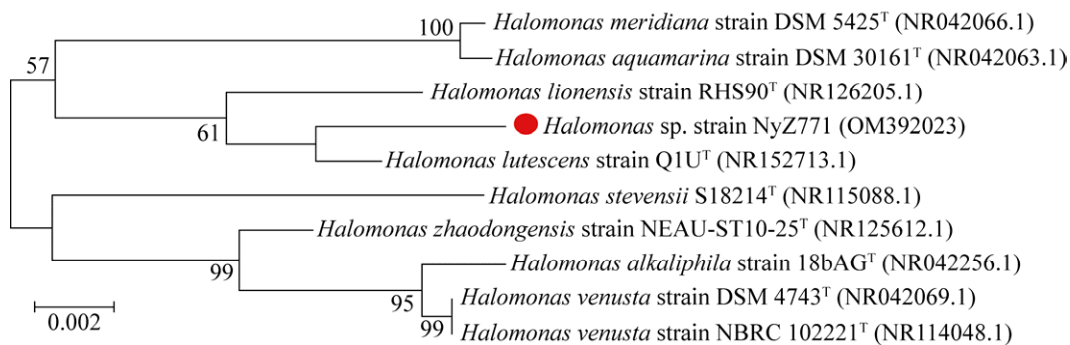


图 2 菌株 NyZ771 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 使用邻接法(neighbor-joining method)构建的系统发育树 bootstrap 检验次数设置为 1 000 次; 分支点上的数字为自展值(%); 括号中的序号表示对应菌株 16S rRNA 基因序列的 GenBank 登录号; 标尺表示每个位点 0.002 次碱基替换

Figure 2 Phylogenetic tree of strain NyZ771 was constructed based on 16S rRNA gene sequence using the neighbor-joining method. The number of bootstrap tests was set to 1 000, and bootstrap values are shown in branching points (%). GenBank accession numbers of 16S rRNA gene sequences are given in parentheses. The bar represents 0.002 substitutions per site.

2.3 菌株 NyZ771 利用芳香酸生长

将多种芳香酸及葡萄糖分别以 1 mmol/L 的终浓度添加至人工海水基本培养基中, 在常压 30 °C、180 r/min 的培养条件下, 菌株 NyZ771 能够利用 BA、4HBA 或葡萄糖作为唯一碳源和能源生长(图 3), 不能利用 3HBA 作为唯一碳源生长, 在不添加碳源的人工海水基本培养基中也不生长。根据修正后的 Gompertz 方程^[18]拟合计算菌株 NyZ771 利用不同底物生长的最大比生长速率, 菌株 NyZ771 利用葡萄糖、BA 和 4HBA 的最大比生长速率分别为 0.177 6、0.096 3、0.301 5 μ_{\max}/h 。菌株 NyZ771 利用 4HBA 生长的最大比生长速率大于其利用葡萄糖生长和 BA 生长的

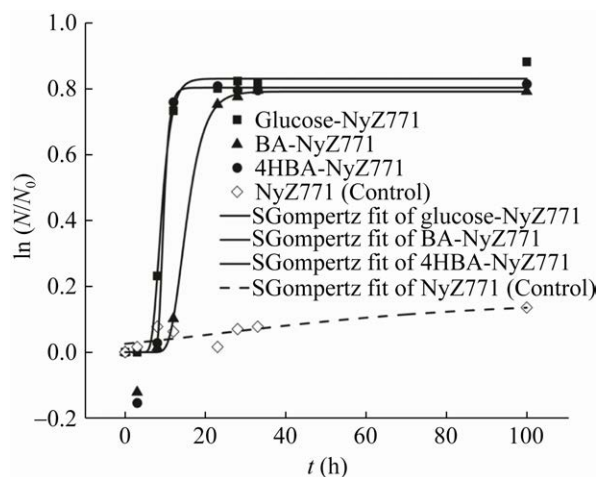


图 3 菌株 NyZ771 利用不同碳源的生长情况 N_0 表示初始细胞个数, N 表示生长过程中细胞个数。生长曲线采用 Origin 软件修正后的 Gompertz 方程拟合, 所有点代表 3 次平行实验的平均值。根据 3 次平行实验的平均值计算的最大比生长速率(μ_{\max}/h)

Figure 3 Growth curves of strain NyZ771 using different carbon source. N_0 : Initial number of cells; N : Number of cells. The growth curves were fitted by the modified Gompertz equation with Origin software, and all points represent mean values of three parallel experiments. The maximum specific growth rates (μ_{\max}/h) were also calculated based on mean values from three parallel experiments.

最大比生长速率, 表明其更易于利用 4HBA 生长。

2.4 菌株 NyZ771 芳香酸代谢中间产物检测与鉴定

2.4.1 生物转化样品 HPLC 分析

为了验证菌株 NyZ771 转化芳香酸 BA 和 4HBA 的能力, 利用全细胞生物转化实验将在 LB 培养基中培养 OD_{600} 值约为 0.6 的细胞用磷酸盐缓冲液清洗并浓缩 OD_{600} 值约为 5.0, 分别加入 BA 和 4HBA 进行生物转化。实验结果表明, 菌株 NyZ771 在 3 h 内可以将初始浓度为 1 mmol/L 的 BA 完全转化, 其在 2 h 内可以将初始浓度为 1 mmol/L 的 4HBA 完全转化, 并监测到对应的产物于 2 h 时达到累积的最大值, 之后浓度逐渐下降(图 4)。

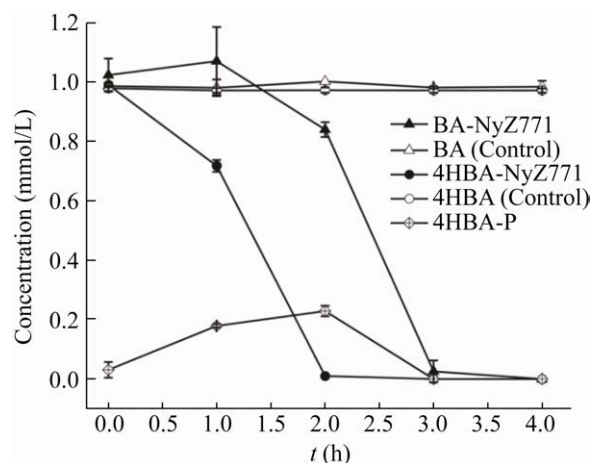


图 4 菌株 NyZ771 生物转化芳香酸过程中底物的消耗与中间产物的浓度变化 BA 在 3 h 内完全消耗; 4HBA 在 2 h 内完全消耗, 并且检测到其中间产物在 2 h 时积累到最大值, 随后逐渐减少。4HBA-P 表示由 4HBA 降解产生的中间产物

Figure 4 Substrate consumption and intermediate concentration during aromatic acids biotransformation by strain NyZ771. In the biotransformation processes, BA was totally consumed within 3 hours, 4HBA was totally consumed within 2 hours accompanied with the intermediate accumulated to the maximum in 2 hours, followed by gradual decrease. 4HBA-P: the intermediate converted from 4HBA.

2.4.2 生物转化 4HBA 产物的 LC/MS 分析

为了进一步鉴定菌株 NyZ771 代谢芳烃的中间产物, 分别选取其生物转化 BA 和 4HBA 的 2 h 和 1 h 样品进行检测分析。在菌株 NyZ771 生物转化 4HBA 的 1 h 样品中, 液相色谱检测到 2 个物质峰分别在保留时间 15.159 min 和 17.762 min, 上述两个物质峰进行质谱提取并与标准品(PCA: $m/z=153.0190$, 4HBA: $m/z=137.0244$) 比对, 确定这 2 个峰分别为代谢产物 PCA ($m/z=153.0067$) 和底物 4HBA ($m/z=137.0112$) (图 5)。在对 BA 的生物转化样品中, 未检测到代谢中间产物。

3 讨论

深渊海沟是地球上最深处的生态环境, 也是目前探索最少的栖息地之一, 蕴藏着宝贵的生物资源^[19-20], 其中存在的微生物对地球的元素循环起着重要作用^[21-22]。截至目前, 基于 16S rRNA 基因高通量测序和宏基因组学等非培养的方法, 已经揭示了海洋特别是深海区域微生物的高度多样性及其潜在的芳烃代谢途径^[13]。目前仅报道了一株来源于海斗深渊的纯培养 *Citricoccus* 细菌可以在常压下降解 4HBA^[15]。在本研究中, *Halomonas* sp. strain NyZ771 可以

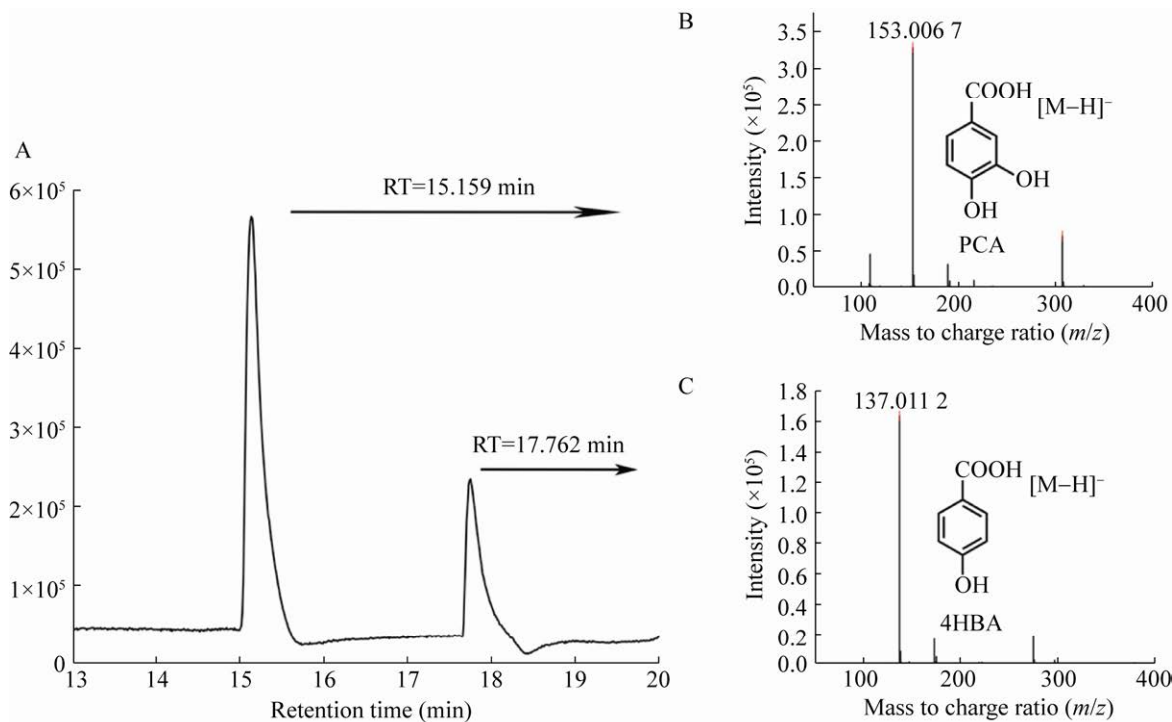


图 5 菌株 NyZ771 生物转化 4HBA 产物的检测分析 A: 生物转化 1 h 后样品的液相色谱检测; B: 对液相色谱检测中保留时间为 15.159 min 的物质峰进行质谱提取, 与标准品比对鉴定为 PCA; C: 对液相色谱检测中保留时间为 17.762 min 的物质峰进行质谱提取, 与标准品比对鉴定为底物 4HBA

Figure 5 Analysis of the product obtained from the 4HBA biotransformation by strain NyZ771. A: Liquid chromatography detection of the sample obtained after 1 hour of the biotransformation. B: The substance peak with retention time of 15.159 min in liquid chromatography detection was extracted by mass spectrometry, and was identified as PCA compared with the authentic PCA. C: The substance peak with retention time of 17.762 min in liquid chromatography detection was extracted by mass spectrometry, and was identified as 4HBA compared with the authentic 4HBA.

在常压条件下利用 2 种芳香酸(BA 和 4HBA)作为唯一碳源和能源生长。

革兰氏阴性菌 *Halomonas* 属于中等嗜盐细菌, 主要分布在盐湖、盐碱土和一些发酵食品等多种盐碱环境中, 被认为是一些相容溶质的主要生产者^[23]和芳香族化合物的降解者^[24]。基于其代谢和生理的多功能性, 盐单胞菌也是海洋中最丰富的可培养微生物之一。Kaye 等研究表明, 在深海环境中存在着丰富的包括盐单胞菌(*Halomonas*)和海杆菌(*Marinobacter*)在内的耐盐微生物群^[25], Yan 等在新不列颠海沟 8 900 m 深度的沉积物样本中也分离出了耐多重胁迫的盐单胞菌^[26]。本研究进一步证明了深渊海沟中具有可分离培养的微生物, 其中盐单胞菌可能因其代谢和生理的多功能性而获得了应对高静水压力的应力适应性。

已报道的 *Citricoccus* sp. strain NyZ702^[15] 是一株革兰氏阳性菌株, 其在常压下仅可以代谢 4HBA, 而本研究中的菌株 NyZ771 是一株革兰氏阴性菌, 其在常压下除了能够降解 4HBA, 还能够利用 BA 作为唯一碳源和能源生长, 而且更易于利用 4HBA 生长。菌株 NyZ771 与菌株 NyZ702^[15]均分离自马里亚纳海沟 6 300 m 沉积物, 而且均通过 PCA 途径代谢 4HBA。已报道的许多陆地细菌也是通过该代谢途径降解羟基取代的芳香酸^[27-28], 同时考虑到微生物在海洋中的汇集沉降及其在海斗深渊中的沉积^[3,21,29], 推测深渊海沟的细菌可能来源于陆地, 与已知的陆地细菌具有相同的芳香酸代谢途径。

目前已报道陆地细菌代谢苯甲酸主要通过 3 种途径: 第 1 种为通过间位羟基化形成 3-羟基苯甲酸; 第 2 种为通过对位羟基化形成 4-羟基苯甲酸^[30], 这二者均可以通过之后的加氧反应形成原儿茶酸^[28]、龙胆酸^[31]或对苯二酚^[32]并经双加氧酶反应开环进入下游代谢; 第 3 种途径

是通过引入还原型辅酶 A (CoASH)形成苯甲酰辅酶 A (benzoyl-CoA)从而进入下游代谢^[33-34], 该途径也存在于一些厌氧细菌中。本研究中菌株 NyZ771 代谢 BA 的中间产物通过 HPLC 和 LC/MS 方法未检测到。基于该菌株降解 4HBA 与陆地细菌具有相同的代谢途径, 推测菌株 NyZ771 可能通过以上 3 种途径之一或者未知的与陆源微生物不同的途径代谢 BA, 这有待于进一步研究。

4 结论

本研究从马里亚纳海沟 6 300 m 沉积物样品中分离培养获得一株纯培养细菌 *Halomonas* sp. strain NyZ771。在常压条件下, 该菌株能够利用葡萄糖、BA 和 4HBA 作为唯一碳源和能源进行生长, 而且更易于利用 4HBA 生长。通过 HPLC 和 LC/MS 对细菌全细胞生物转化芳香酸的样品进行检测, 鉴定了菌株 NyZ771 是通过原儿茶酸途径代谢 4-羟基苯甲酸。该菌株的分离培养丰富了深渊来源的可培养微生物菌种资源, 为今后研究深渊中微生物的芳烃降解及海洋微生物驱动的碳循环提供一定的理论基础。

致谢: 衷心感谢上海交通大学海洋学院张宇研究员提供沉积物样品, 感谢上海交大学生命科学技术学院肖湘教授在深渊来源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] Wolff T. The hadal community, an introduction[J]. Deep Sea Research: 1953, 1959, 6: 95-124
- [2] Jannasch HW, Taylor CD. Deep-sea microbiology[J]. Annual Review of Microbiology, 1984, 38: 487-514
- [3] 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
- [4] Danovaro R, Croce ND, Dell'Anno A, Pusceddu A. A depocenter of organic matter at 7 800 m depth in the SE Pacific Ocean[J]. Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers, 2003, 50(12): 1411-1420
- [5] Burdige DJ. Burial of terrestrial organic matter in marine sediments: a re-assessment[J]. Global Biogeochemical Cycles, 2005, 19(4): GB4011
- [6] Jiao N, Tang K, Cai H, Mao Y. Increasing the microbial carbon sink in the sea by reducing chemical fertilization on the land[J]. Nature Reviews Microbiology, 2011, 9(1): 75
- [7] Jamieson AJ, Malkocs T, Piertney SB, Fujii T, Zhang Z. Bioaccumulation of persistent organic pollutants in the deepest ocean fauna[J]. Nature Ecology & Evolution, 2017, 1: 51
- [8] Michalska K, Chang C, Mack JC, Zerbs S, Joachimiak A, Collart FR. Characterization of transport proteins for aromatic compounds derived from lignin: benzoate derivative binding proteins[J]. Journal of Molecular Biology, 2012, 423(4): 555-575
- [9] Kamimura N, Takahashi K, Mori K, Araki T, Fujita M, Higuchi Y, Masai EJ. Bacterial catabolism of lignin-derived aromatics: new findings in a recent decade: update on bacterial lignin catabolism[J]. Environmental Microbiology Reports, 2017, 9(6): 679-705
- [10] Janusz G, Pawlik A, Sulej J, Świdarska-Burek U, Jarosz-Wilkolańska A, Paszczyński A. Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2017, 41(6): 941-962
- [11] Fujioka K, Okino K, Kanamatsu T, Ohara Y. Morphology and origin of the challenger deep in the southern Mariana trench[J]. Geophysical Research Letters, 2002, 29(10): 10-1-10-4
- [12] Ohta Y, Nishi S, Haga T, Tsubouchi T, Hasegawa R, Konishi M, Nagano Y, Tsuruwaka Y, Shimane Y, Mori K, et al. Screening and phylogenetic analysis of deep-sea bacteria capable of metabolizing lignin-derived aromatic compounds[J]. Open Journal of Marine Science, 2012, 2(4): 177-187
- [13] Liu WW, Pan J, Feng XY, Li M, Xu Y, Wang FP, Zhou NY. Evidences of aromatic degradation dominantly via the phenylacetic acid pathway in marine benthic *Thermopfundales*[J]. Environmental Microbiology, 2020, 22(1): 329-342
- [14] Shao ZZ, Cui ZS, Dong CM, Lai QL, Chen L. Analysis of a PAH-degrading bacterial population in subsurface sediments on the Mid-Atlantic Ridge[J]. Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers, 2010, 57(5): 724-730
- [15] 凌浩, 许楹, 周宁一. 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[J]. 微生物学通报, 2021, 48(10): 3485-3496
- Ling H, Xu Y, Zhou NY. Isolation of a hadal trench-derived *Citricoccus* sp. strain NyZ702 capable of 4-hydroxybenzoate degradation[J]. Microbiology China, 2021, 48(10): 3485-3496 (in Chinese)
- [16] Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 1951, 62(3): 293-300
- [17] Bertani G. Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(3): 595-600
- [18] Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts FM, Van't Riet K. Modeling of the bacterial growth curve[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1990, 56(6): 1875-1881
- [19] Wang FP, Li M, Huang L, Zhang XH. Cultivation of uncultured marine microorganisms[J]. Marine Life Science & Technology, 2021, 3(2): 117-120
- [20] Salazar G, Sunagawa S. Marine microbial diversity[J]. Current Biology, 2017, 27(11): R489-R494
- [21] Nunoura T, Nishizawa M, Hirai M, Shimamura S, Harnvoravongchai P, Koide O, Morono Y, Fukui T, Inagaki F, Miyazaki J, et al. Microbial diversity in sediments from the bottom of the challenger deep, the Mariana trench[J]. Microbes and Environments, 2018, 33(2): 186-194
- [22] 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
- [23] Oren A. Bioenergetic aspects of halophilism[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR, 1999, 63(2): 334-348
- [24] Garcia MT, Mellado E, Ostos JC, Ventosa A. *Halomonas organivorans* sp. nov., a moderate halophile able to degrade aromatic compounds[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54(Pt 5): 1723-1728
- [25] Kaye JZ, Baross JA. High incidence of halotolerant bacteria in Pacific hydrothermal-vent and pelagic environments[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2000, 32(3): 249-260

- [26] Yan FF, Fang JS, Cao JW, Wei YL, Liu RL, Wang L, Xie Z. *Halomonas piezotolerans* sp. nov., a multiple-stress-tolerant bacterium isolated from a deep-sea sediment sample of the New Britain Trench[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2020, 70(4): 2560-2568
- [27] Harwood CS, Parales RE. The beta-ketoadipate pathway and the biology of self-identity[J]. Annual Review of Microbiology, 1996, 50: 553-590
- [28] 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
- [29] Cui GJ, Li J, Gao ZM, Wang Y. Spatial variations of microbial communities in abyssal and hadal sediments across the Challenger Deep[J]. PeerJ, 2019, 7: e6961
- [30] Van Gorcom RF, Boschloo JG, Kuijvenhoven A, Lange J, Van Vark AJ, Bos CJ, Van Balken JA, Pouwels PH, Van Den Hondel CA. Isolation and molecular characterisation of the benzoate-para-hydroxylase gene (*bphA*) of *Aspergillus niger*: a member of a new gene family of the cytochrome P450 superfamily[J]. Molecular & General Genetics: MGG, 1990, 223(2): 192-197
- [31] 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
- [32] 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
- [33] Denef VJ, Park J, Tsoi TV, Rouillard JM, Zhang H, Wibbenmeyer JA, Verstraete W, Gulari E, Hashsham SA, Tiedje JM. Biphenyl and benzoate metabolism in a genomic context: outlining genome-wide metabolic networks in *Burkholderia xenovorans* LB400[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(8): 4961-4970
- [34] Schühle K, Gescher J, Feil U, Paul M, Jahn M, Schägger H, Fuchs G. Benzoate-coenzyme A ligase from *Thauera aromatica*: an enzyme acting in anaerobic and aerobic pathways[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(16): 4920-4929