

• 微生物组测序与分析专题 •

李正军 博士, 北京化工大学教授, 博士生导师, 主要从事代谢工程与合成生物学领域的教学科研工作, 以目标导向的新型细胞工厂构建为主线, 针对组合生物合成网络的关键科学问题开展研究, 开发出一系列能够利用木糖和乙酸等非常规碳源为底物合成多种化学品的优良底盘细胞。主持国家自然科学基金和国家科技支撑计划等项目 10 余项, 在 *Metab Eng* 等期刊发表 SCI 论文 30 余篇, 申请发明专利 13 项, 获得授权 6 项。



海生杆菌属的基因组测序数据分析

王梦汝, 席威, 李正军

北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京 100029

王梦汝, 席威, 李正军. 海生杆菌属的基因组测序数据分析. 生物工程学报, 2020, 36(12): 2695-2706.

Wang MR, Xi W, Li ZJ. Analysis of the genome sequencing data of the *Marinobacterium* genus. Chin J Biotech, 2020, 36(12): 2695-2706.

摘要: 海生杆菌属首次于 1997 年鉴定, 迄今包括 18 个物种, 其中 10 个已完成全基因组序列测定。文中总结了海生杆菌属的菌种特征, 并从碳源利用、聚羟基脂肪酸酯代谢和芳香族化合物降解三个方面对基因组测序数据进行了分析。研究发现, 海生杆菌属具有完整的糖酵解途径和三羧酸循环, 缺乏木糖利用基因。所有海生杆菌属菌种均含有 I 型和 III 型聚羟基脂肪酸酯合成酶的编码基因, 表明该菌属可能具有普遍的聚羟基脂肪酸酯合成能力。海生杆菌属含有芳香族化合物的降解途径, 苯、苯酚和苯甲酸可由不同的酶催化生成邻苯二酚, 再由邻位断裂途径降解为 3-酮己二酸, 邻苯二酚也可由间位断裂途径降解为丙酮酸和乙酰辅酶 A。基因组测序数据分析加深了对海生杆菌属代谢特征的认识, 提示该菌属在聚羟基脂肪酸酯合成和海洋芳香族污染物治理方面有一定的应用前景。

关键词: 海生杆菌属, 基因组, 测序, 聚羟基脂肪酸酯, 芳香族化合物

Analysis of the genome sequencing data of the *Marinobacterium* genus

Mengru Wang, Wei Xi, and Zhengjun Li

College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

Abstract: The marine genus *Marinobacterium* was first identified in 1997, and a total of 18 species have been characterized

Received: June 22, 2020; **Accepted:** September 22, 2020

Supported by: National Key Research and Development Program of China (No. 2018YFA0900200), National Natural Science Foundation of China (No. 31870075).

Corresponding author: Zhengjun Li. Tel: +86-10-64421335; Fax: +86-10-64416428; E-mail: lizj@mail.buct.edu.cn

国家重点研发计划 (No. 2018YFA0900200), 国家自然科学基金 (No. 31870075) 资助。

so far, 10 of which have published whole-genome sequencing data. This article summarizes the characteristics of *Marinobacterium* genus and analyzes the genome sequencing data related to the carbon source utilization, polyhydroxyalkanoate metabolism, and aromatic compounds degradation. The *Marinobacterium* species possess the complete glycolysis pathway and tricarboxylic acid cycle, yet lack genes involved in xylose utilization. All strains of the *Marinobacterium* genus contain the genes encoding for the type I and type III polyhydroxyalkanoate synthases, suggesting that the genus may have ability of polyhydroxyalkanoate accumulation. The *Marinobacterium* species contain the degradation pathways of aromatic compounds. Benzene, phenol and benzoic acid can be degraded into catechol via different enzymes, subsequently catechol is converted to 3-ketoadipate through the ortho-cleavage pathway. Alternatively, catechol can be degraded into pyruvate and acetyl-CoA. The analysis of genome sequencing data of the *Marinobacterium* genus provides in-depth understanding of the metabolic characteristics, indicating that the genus may have certain applications in the synthesis of polyhydroxyalkanoate and the removal of marine aromatic compounds.

Keywords: *Marinobacterium*, genome, sequence, polyhydroxyalkanoate, aromatic compounds

海洋占据了地球表面的绝大部分, 其中蕴含着非常丰富的生物资源。能够在海洋环境中生活的微生物包括细菌、放线菌、蓝细菌、真菌和微藻等多种类群, 据估计种类达 2 亿–10 亿种^[1]。海洋微生物参与了海洋环境中的物质和能量循环, 对维持海洋系统的生态平衡发挥了重要作用。由于海洋环境的多变性、开放性和复杂性, 海洋微生物在长期进化过程中形成了适应寡营养、低温、高压和高盐等极端环境的特殊机制, 具有很高的生理代谢多样性、遗传多样性和物种多样性。从海洋微生物中筛选结构新、活性优的生理活性物质和新型降解酶类, 已经成为相关领域的研究热点^[2-3]。开发利用海洋微生物资源, 能够为新材料、新能源和新药的生产提供更多研究思路。

海洋微生物常见的种类包括弧菌属 *Vibrio*、假单胞菌属 *Pseudomonas*、螺菌属 *Spirillum*、微球菌属 *Micrococcus* 和链霉菌属 *Streptomyces* 等^[4]。海生杆菌属 *Marinobacterium* 最初是 González 等于 1997 年鉴定, 属于变形菌门、 γ 变形菌纲、海洋螺菌目、海洋螺菌科。该菌属均为革兰氏阴性细菌, 细胞为杆状, 大多数菌种的最适生长 pH 7–8、NaCl 浓度约 3%、温度约 30 °C, 能够利用糖类、脂肪酸、芳香族化合物和氨基酸等生长^[5]。代表菌种是乔治亚海生杆菌 *Marinobacterium georgiense*, 能够利用糖类、氨基酸和苯酚、苯甲酸等芳香族化合物以及香豆酸、肉桂酸等木质素相关化合物

作为唯一碳源生长^[5]。芳香族化合物结构稳定, 不易分解, 在一定条件下具有致癌、致畸和致突变性。多种微生物具有芳香族化合物降解能力, 是去除环境中芳香族污染物最有效、经济和安全的方法^[6]。能够代谢芳香族化合物生长的海生杆菌属可能在海洋芳香族污染物的自然消减中发挥作用。

到目前为止, 海生杆菌属已经扩展到 18 个菌种^[5,7-23], 部分具有在细胞内合成聚-3-羟基丁酸酯 (Poly-3-hydroxybutyrate, PHB) 的能力。PHB 是发现最早、结构最简单、研究最多的聚羟基脂肪酸酯 (Polyhydroxyalkanoate, PHA)。PHA 由微生物在生长代谢不平衡条件下在细胞内合成, 具有类似塑料的材料学性质, 可生物降解, 应用前景广泛^[24]。PHA 的生产菌种主要包括罗氏真氧菌 *Ralstonia eutropha*、嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila*、恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* 和盐单胞菌 *Halomonas* 等^[25], 其中盐单胞菌能在高盐条件下进行不灭菌发酵生产 PHA, 能够显著降低生产成本, 正在进行工业化试生产^[26]。开发新的 PHA 生产菌, 从而拓宽底物利用范围、提高发酵产量、获得新型 PHA 材料等, 对于促进 PHA 的产业化应用具有重要意义。

影响微生物适应环境和发挥功能的因素有很多, 营养元素中的碳源尤为重要。本文系统总结了海生杆菌属的菌种特征, 对已完成基因组测序

的 10 个物种的基因组数据进行了分析,重点研究了碳源代谢、PHA 合成与降解、芳香族化合物降解等基因的分布情况。基因组测序数据的分析表明,海生杆菌属普遍具有 PHA 代谢和芳香族化合物降解的基因,值得进行深入的分子生物学与代谢工程研究,有望在聚羟基脂肪酸酯合成和海洋芳香族污染物治理领域发挥重要作用。

1 材料与方法

1.1 数据库和软件

海生杆菌属的基因组数据信息来源于 NCBI 数据库 (National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。系统发育树分析使用软件 MEGA (版本 7.0)^[27], 基因组数据的保存和分析等使用软件 SnapGene (版本 4.3.6)^[28]。

1.2 系统发育树分析

在 NCBI 数据库中检索海生杆菌属各菌种的 16S rRNA 序列和 PHA 合成酶的氨基酸序列。使用 MEGA 软件的 Neighbor-Joining 法^[27]对 16S rRNA 序列和 PHA 合成酶的氨基酸序列构建相应的系统发育树。

1.3 碳源代谢相关基因分析

利用 SnapGene 软件^[28], 结合 NCBI 的 Blast 功能, 分析碳源利用途径中关键酶编码基因在海生杆菌属基因组中的分布情况。具体包括糖酵解途径中的 6-磷酸果糖激酶 (6-phosphofructokinase)、丙酮酸激酶 (Pyruvate kinase), 磷酸戊糖途径中的 6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (Glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6P dehydrogenase)、6-磷酸葡萄糖酸内酯酶 (6-phosphogluconolactonase)、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶 (6-phosphogluconate dehydrogenase), Entner-Doudoroff (ED) 途径的磷酸葡萄糖酸脱水酶 (Phosphogluconate dehydratase)、2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡萄糖醛缩酶 (2-dehydro-3-deoxy-phosphogluconate aldolase ,

KDPG aldolase), 乙酸代谢相关的乙酰辅酶 A 合成酶 (Acetate-CoA synthase)、乙酸激酶 (Acetate kinase)、磷酸乙酰基转移酶 (Phosphate acetyltransferase), 以及丙酮酸代谢相关的丙酮酸脱氢酶 (Pyruvate dehydrogenase)、丙酮酸氧化酶 (Pyruvate oxidase) 等。

1.4 聚羟基脂肪酸酯代谢相关基因分析

聚羟基脂肪酸酯代谢相关基因的分析方法如 1.3 所述, 分析的酶包括 PHA 合成酶 (PHA synthase)和 PHA 降解酶 (PHA depolymerase)。

1.5 芳香族化合物降解相关基因分析

芳香族化合物降解相关基因的分析方法如 1.3 所述, 分析的酶包括催化苯生成邻苯二酚的苯酚羟化酶 (Phenol hydroxylase), 催化苯甲酸生成邻苯二酚的苯甲酸-1,2-双加氧酶 (Benzoate 1,2-dioxygenase), 催化邻苯二酚生成 3-酮己二酸的邻苯二酚 1,2-双加氧酶 (Catechol 1,2-dioxygenase)、黏糠酸环异构酶 (Muconate cycloisomerase)、黏糠酸内酯异构酶 (Muconolactone delta-isomerase)、3-酮己二酸烯醇内酯酶 (3-oxoadipate enol-lactonase), 催化邻苯二酚生成丙酮酸和乙酰辅酶 A 的邻苯二酚 2,3-双加氧酶 (Catechol 2,3-dioxygenase)、2-羟基黏糠酸半醛脱氢酶 (2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase)、4-草酰巴豆酸互变异构酶 (4-oxalocrotonate tautomerase) 等。

2 结果与分析

2.1 海生杆菌属的特征与基因组测序

到目前为止, 海生杆菌属共发现并鉴定了 18 个物种, 表型等信息归纳总结如表 1 所示, 其中已完成基因组测序的菌种有 10 个。海生杆菌属有 16 个菌种为好氧菌, 2 个菌种为兼性厌氧菌。值得注意的是, 有 8 个菌种在鉴定时发现具有在细胞内合成 PHB 的能力。

在 NCBI 检索共得到 30 个完成基因组序列测定的海生杆菌属菌株, 其中 19 个没有确定的菌种

归属。10个已完成测序的菌种中,只有 *M. stanieri* 包括2个菌株,编号分别为 DSM7027 和 S30。本文选择10个具有确定物种归属的海生杆菌属菌株的基因组序列进行分析,其中 *M. stanieri* 选择模式菌株 DSM7027,详细信息如表2所示。10种细菌的基因组的大小差距比较大,最小的基因组为 3 653 180 bp (*M. halophilum*),最大的基因组为 5 568 156 bp (*M. lutimaris*)。海生杆菌属的 tRNA 种类比较多,有8个菌株的 tRNA 种数都超过了60种, rRNA 和 ncRNA 种类比较少,都低于10种。基因组的 GC 含量在 (54.9–58.8) mol% 之间。

2.2 海生杆菌属的 16S rRNA 系统发育分析

对已经鉴定的所有18个海生杆菌属菌种的模式菌株 16S rRNA 与同为海洋细菌的 *Marinobacter* 属和 *Neptunomonas* 属相关菌株进行系统发育树分析,结果如图1所示。整体来看,海生杆菌属与 *Neptunomonas* 属亲缘关系较近,其中 *M. marisflavi* 与 *Neptunomonas* 属亲缘关系最近,海生杆菌属与 *Marinobacter* 属亲缘关系相对较远。海生杆菌属内, *M. rhizophilum*、*M. aestuarii* 和 *M. profundum* 之间的亲缘关系比较近, *M. georgiense* 和 *M. halophilum* 之间的亲缘关系比较近。

2.3 海生杆菌属的碳源利用途径分析

了解碳源利用途径对研究微生物的生长和代谢特征以及应用开发具有重要意义。基于基因组测序数据对海生杆菌属的碳源利用途径进行分析,糖酵解途径、磷酸戊糖途径、ED 途径以及乙酸和丙酮酸代谢的部分关键酶基因座位如表3所示。海生杆菌属中9个菌种含有糖酵解途径的6-磷酸果糖激酶,全部菌种都含有丙酮酸激酶。磷酸戊糖途径和 ED 途径的关键酶,包括6-磷酸葡萄糖脱氢酶、6-磷酸葡萄糖酸内酯酶、磷酸葡萄糖酸脱水酶、KDPG 醛缩酶,在6个菌种中有发现,在 *M. georgiense*、*M. halophilum*、*M. stanieri* 和 *M. jannaschii* 等4个菌种中缺失。10个菌种都没有发现催化6-磷酸葡萄糖酸生成5-磷酸核酮糖

的6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶,提示它们不能将葡萄糖单独通过磷酸戊糖途径进行分解。乙酸代谢方面,全部菌种都能找到乙酰辅酶A合成酶、乙酸激酶和磷酸乙酰基转移酶,表明海生杆菌属具有利用乙酸的能力,且两条乙酸利用途径同时存在。海生杆菌属都含有丙酮酸脱氢酶和完整的柠檬酸循环。五碳糖利用方面,没有发现与木糖代谢相关的木糖异构酶 (*Xylose isomerase*) 和木糖脱氢酶 (*Xylose dehydrogenase*) 等,提示海生杆菌属不具有发酵木糖的能力。

2.4 海生杆菌属的聚羟基脂肪酸酯代谢分析

根据海生杆菌属的菌种鉴定文献,8个菌种具有 PHB 合成能力(表1)。微生物可以利用糖类和脂肪酸等不同碳源经由多种代谢途径形成羟基酯酰辅酶A单体,再由 PHA 合成酶催化合成聚酯。PHA 合成酶的性质决定了聚合物的单体组成、比例和分子量等,是 PHA 合成途径的最关键酶。PHA 合成酶根据其结构、亚基组成和底物特异性等可分为4种类型。对来源于假单胞菌的 PHA 合成酶进行定向进化,实现了2-羟基酯酰辅酶A单体的聚合,合成出乳酸和3-羟基丁酸共聚酯、乳酸和乙醇酸共聚酯等^[29-30]。PHA 分解再利用的第一步是由 PHA 降解酶催化聚合物酯键水解释放羟基脂肪酸单体。本文重点关注在天然能够合成聚酯的菌种中普遍存在的 PHA 合成酶和 PHA 降解酶,对海生杆菌属基因组测序数据进行分析,相关基因座位如表4所示。海生杆菌属的全部菌种都含有2–3个 PHA 合成酶,对其与4种类型 PHA 合成酶的代表进行系统发育树分析(图2),结果发现9个菌种都分别含有3个 PHA 合成酶,其中2个为I型,1个为III型。III型合成酶包含2个亚基,编码基因形成一个操纵子转录,并且毗邻 PHA 合成阻遏蛋白。海生杆菌属的2个I型 PHA 合成酶之间的序列一致性较低,系统发育树中2个I型 PHA 合成酶 PhaC1 和 PhaC2 位于相对独立的分支中,提示其可能属于旁系同源。海生杆菌属的 PHA 合成酶组成和分布情况与同为

表 1 海生杆菌属的表型特征

Table 1 Phenotypic characteristics of the *Marinobacterium* genus

Strain	Growth range			Relationship with O ₂	PHB accumulation	Identification	Genome sequencing	References
	Temperature (°C)	pH	NaCl (%)					
<i>M. georgiense</i>	4–41 (37)	5.5–9.5 (7.5)	0.1–11.7 (0.6–2.9)	Aerobic	–	1997	2016	[5]
<i>M. stanieri</i>	40	ND	ND	Aerobic	+	1983	2011	[7,9]
<i>M. jannaschii</i>	ND	ND	ND	Aerobic	–	1984	2014	[8–9]
<i>M. halophilum</i>	4–37	5.3–9.3	3.0–12.0	Aerobic	ND	2007	2018	[10]
<i>M. litorale</i>	8–42 (30)	5.0–12.0 (9)	1.0–7.5 (3.0–3.5)	Facultatively anaerobic	–	2007	2013	[11]
<i>M. rhizophilum</i>	5–30 (25)	6.0–9.0 (7.0)	1.0–5.0 (3.0)	Aerobic	+	2008	2013	[12]
<i>M. marisflavi</i>	15–42 (30)	5.0–11.0 (7.0–8.0)	1.5–7.5 (2.5–3.0)	Aerobic	–	2009	ND	[13]
<i>M. maritimum</i>	7–37 (25–28)	5.5–9.0 (7.5–8.0)	0.5–7.0 (1.0–2.0)	Aerobic	ND	2009	ND	[14]
<i>M. sediminicola</i>	15–42 (35)	6.0–9.5 (7.0)	0.5–7.5 (1.0–3.0)	Aerobic	+	2009	ND	[15]
<i>M. nitratireducens</i>	15–40 (35)	5.5–9.5 (7.0–8.0)	0.5–7.5 (1.0–3.0)	Aerobic	+	2009	ND	[15]
<i>M. lutimaris</i>	15–40 (25–30)	6.0–8.0 (6.5–7.5)	1.0–10.0 (2.0–5.0)	Aerobic	+	2010	2016	[16]
<i>M. coralli</i>	15–42 (20–40)	ND	1.0–7.0	Aerobic	ND	2011	ND	[17]
<i>M. mangrovicola</i>	4–42 (28–37)	5.5–10.0 (6.5–8.0)	0–18.0 (1.0–4.0)	ND	+	2014	2019	[18]
<i>M. aestuariivivens</i>	10–40 (30)	6.0 (7.0–8.0)	0.5–8.0 (0.5–2.0)	Aerobic	ND	2016	ND	[19]
<i>M. profundum</i>	4–32 (25–30)	6.0–9.0 (7.0–7.5)	1.0–4.0 (3.0)	Aerobic	ND	2016	2016	[20]
<i>M. zhoushanense</i>	15–43 (37–40)	5.5–9.5 (6.5–7.5)	0.25–9.0 (1.0–1.5)	Facultatively anaerobic	+	2016	ND	[21]
<i>M. aestuarii</i>	4–35 (20–25)	5.0–9.0 (7.0–8.0)	1.0–8.0 (3.0)	Aerobic	ND	2018	2016	[22]
<i>M. boryeongense</i>	15–45 (25)	5.5–10.0 (6.0)	1.0–9.0 (3.0)	Aerobic	+	2019	ND	[23]

+: positive; -: negative; ND: no data available from the reference. Values in parentheses represent optimal growth conditions.

表 2 海生杆菌属的基因组概况

Table 2 The genome overview of the *Marinobacterium* genus

	<i>M. mangrovicola</i>	<i>M. lutimaris</i>	<i>M. rhizophilum</i>	<i>M. stanieri</i>	<i>M. georgiense</i>	<i>M. litorale</i>	<i>M. halophilum</i>	<i>M. profundum</i>	<i>M. jannaschii</i>	<i>M. aestuarii</i>
Size (bp)	DSM27697 4 979 440	DSM22012 5 568 156	DSM18822 5 360 582	DSM7027 4 679 482	DSM11526 3 922 811	DSM23545 4 378 172	DSM17586 3 653 180	PAMC27536 5 637 742	DSM6295 5 174 280	ST58-10 5 191 608
GC content (%)	57.1	57.4	58.5	55.6	54.9	56.4	56.0	57.2	55.2	58.8
Genes (total)	4 518	5 129	4 768	4 380	3 742	4 252	3 443	5 061	4 705	4 617
CDSs (total)	4 443	5 047	4 691	4 296	3 673	4 179	3 365	4 968	4 629	4 512
CDSs (protein)	4 414	5 002	4 604	4 259	3 625	4 114	3 326	4 863	4 569	4 459
tRNAs	68	69	66	73	56	57	71	82	62	83
rRNAs	ND	4	6	6	8	9	3	5	8	18
ncRNAs	7	9	5	5	5	7	4	6	6	4

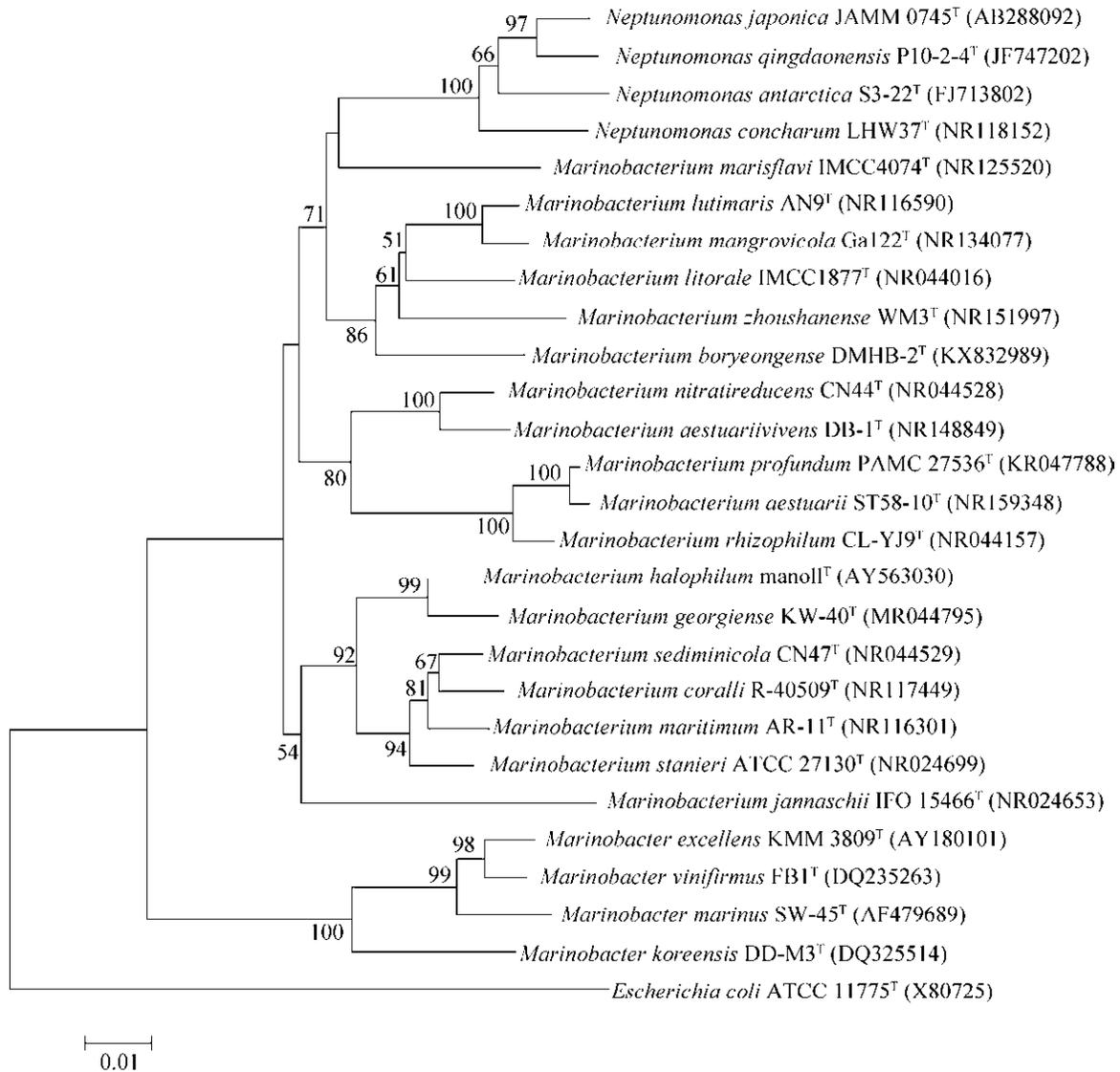


图 1 海生杆菌属的 16S rRNA 系统发育树

Fig. 1 Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequences showing the phylogenetic relationships of the *Marinobacterium* genus and some other related taxa. *Escherichia coli* ATCC 11775^T (X80725) was used as the outgroup. The GenBank accession numbers were in the parentheses after bacterial names. Numbers at the branch ends are the bootstrap values based on 1 000 replicates. The scale bar indicates the number of nucleotide substitution per site.

海洋细菌的 *Neptunomonas* 属十分类似, 与罗氏真氧菌、嗜水气单胞菌和恶臭假单胞菌等传统 PHA 生产菌有很大差别^[31]。此外, 海生杆菌属普遍存在 PHA 降解酶基因, 表明其具有重新分解利用细胞内积累的聚羟基脂肪酸酯的能力, 不过有 3 个菌种的 PHA 降解酶基因没有找到, 可能与基因组测序数据的质量有关。

2.5 海生杆菌属的芳香族化合物代谢分析

作为海生杆菌属的代表菌种, 乔治亚海生杆菌能够利用苯酚等芳香族化合物作为唯一碳源生长^[5]。基于基因组测序数据对海生杆菌属的芳香族化合物降解途径进行分析, 发现该菌属普遍具有苯、苯酚和苯甲酸的降解途径 (表 5)。芳香族化合物经过以邻苯二酚为中间代谢物的途径进行

表 3 海洋杆菌属中碳源代谢相关基因的基因座位

Table 3 The locus tags of enzymes related to carbon metabolism in the *Marinobacterium* genus

Enzyme name	<i>M. georgiense</i>										<i>M. staniieri</i>										<i>M. jannaschii</i>										<i>M. halophilum</i>										<i>M. litorale</i>										<i>M. rhizophilum</i>										<i>M. lutimaris</i>										<i>M. mangrovicola</i>										<i>M. profundum</i>										<i>M. aestuarii</i>																													
	DSM11526	DSM7027	DSM6295	DSM17586	DSM23545	DSM18822	DSM22012	DSM27697	PAMC27536	ST58-10	DSM11526	DSM7027	DSM6295	DSM17586	DSM23545	DSM18822	DSM22012	DSM27697	PAMC27536	ST58-10	DSM11526	DSM7027	DSM6295	DSM17586	DSM23545	DSM18822	DSM22012	DSM27697	PAMC27536	ST58-10	DSM11526	DSM7027	DSM6295	DSM17586	DSM23545	DSM18822	DSM22012	DSM27697	PAMC27536	ST58-10	DSM11526	DSM7027	DSM6295	DSM17586	DSM23545	DSM18822	DSM22012	DSM27697	PAMC27536	ST58-10	DSM11526	DSM7027	DSM6295	DSM17586	DSM23545	DSM18822	DSM22012	DSM27697	PAMC27536	ST58-10	DSM11526	DSM7027	DSM6295	DSM17586	DSM23545	DSM18822	DSM22012	DSM27697	PAMC27536	ST58-10	DSM11526	DSM7027	DSM6295	DSM17586	DSM23545	DSM18822	DSM22012	DSM27697	PAMC27536	ST58-10	DSM11526	DSM7027	DSM6295	DSM17586	DSM23545	DSM18822	DSM22012	DSM27697	PAMC27536	ST58-10																														
6-phosphofructokinase	RS16265	RS19815	RS0121735	RS09325	RS0118635	RS0108970	RS222575	RS19675	NA	RS19875	RS09215	RS18250	RS0122890	RS07430	RS0106800	RS0104495	RS18890	RS15015	RS14810	RS12415	NA	NA	NA	NA	RS0115305	RS0111030	RS00095	RS21800	RS16710	RS11110	NA	NA	NA	NA	RS0115300	RS0111035	RS11295	RS11725	RS16705	RS11105	NA	NA	NA	NA	RS0115285	RS0110140	RS11305	RS11715	RS13685	RS11775	NA	NA	NA	NA	RS0115290	RS0111040	RS11300	RS11720	RS16700	RS11100	RS02360	RS20015	RS0112200	RS12750	RS0103075	RS0112780	RS13510	RS09460	RS04525	RS04115	RS07295	RS11655	RS24355	RS04290	RS0104140	RS0115065	RS16970	RS20745	RS07240	RS17275	RS07300	RS11650	RS0102680	RS04285	RS0104145	RS0115070	RS16965	RS20740	RS07245	RS17270	RS07985	RS01365	RS0121835	RS03690	RS0117295	RS0120165	RS16425	RS20180	RS23800	RS05075	RS07990	RS01360	RS0121830	RS03685	RS0117290	RS0120170	RS16420	RS20175	RS23795	RS05080	RS07995	RS01355	RS0121825	RS03680	RS0117285	RS0120175	RS16415	RS20170	RS23790	RS05085

The prefix part of the locus tag indicating the strain is omitted. NA: no sequence available through the genome analysis.

表 4 海洋杆菌属中聚羟基脂肪酸酯代谢相关基因的基因座位

Table 4 The locus tags of genes associated with polyhydroxyalkanoate metabolism in the *Marinobacterium* genus

Enzyme name	<i>M. georgiense</i>										<i>M. staniieri</i>										<i>M. jannaschii</i>										<i>M. halophilum</i>										<i>M. litorale</i>										<i>M. rhizophilum</i>										<i>M. lutimaris</i>										<i>M. mangrovicola</i>										<i>M. profundum</i>										<i>M. aestuarii</i>									
	DSM11526	DSM7027	DSM6295	DSM17586	DSM23545	DSM18822	DSM22012	DSM27697	PAMC27536	ST58-10	DSM11526	DSM7027	DSM6295	DSM17586	DSM23545	DSM18822	DSM22012	DSM27697	PAMC27536	ST58-10	DSM11526	DSM7027	DSM6295	DSM17586	DSM23545	DSM18822	DSM22012	DSM27697	PAMC27536	ST58-10	DSM11526	DSM7027	DSM6295	DSM17586	DSM23545	DSM18822	DSM22012	DSM27697	PAMC27536	ST58-10	DSM11526	DSM7027	DSM6295	DSM17586	DSM23545	DSM18822	DSM22012	DSM27697	PAMC27536	ST58-10	DSM11526	DSM7027	DSM6295	DSM17586	DSM23545	DSM18822	DSM22012	DSM27697	PAMC27536	ST58-10	DSM11526	DSM7027	DSM6295	DSM17586	DSM23545	DSM18822	DSM22012	DSM27697	PAMC27536	ST58-10	DSM11526	DSM7027	DSM6295	DSM17586	DSM23545	DSM18822	DSM22012	DSM27697	PAMC27536	ST58-10	DSM11526	DSM7027	DSM6295	DSM17586	DSM23545	DSM18822	DSM22012	DSM27697	PAMC27536	ST58-10										
PHA synthase PhaC1	RS03545	RS05215	RS0119885	RS05365	RS0108580	RS0105515	RS02135	RS07845	RS07445	RS13030	RS03730	RS05405	NA	RS04860	RS0108390	RS0116830	RS01960	RS08020	RS08540	RS12595	RS03395	RS05055	RS0119725	RS05500	RS0108735	RS0105665	RS02285	RS07695	RS07595	RS12880	RS03390	RS05050	RS0119720	RS05505	RS0108740	RS0105670	RS02290	RS07690	RS07600	RS12875	RS03400	RS05060	RS0119730	RS05495	RS0108730	RS24915	RS02280	RS07700	RS07590	RS12885	NA	NA	RS0119360	NA	RS0109630	RS0108745	RS11455	RS11555	RS09845	RS10290																																								

The prefix part of the locus tag indicating the strain is omitted. NA: no sequence available through the genome analysis.

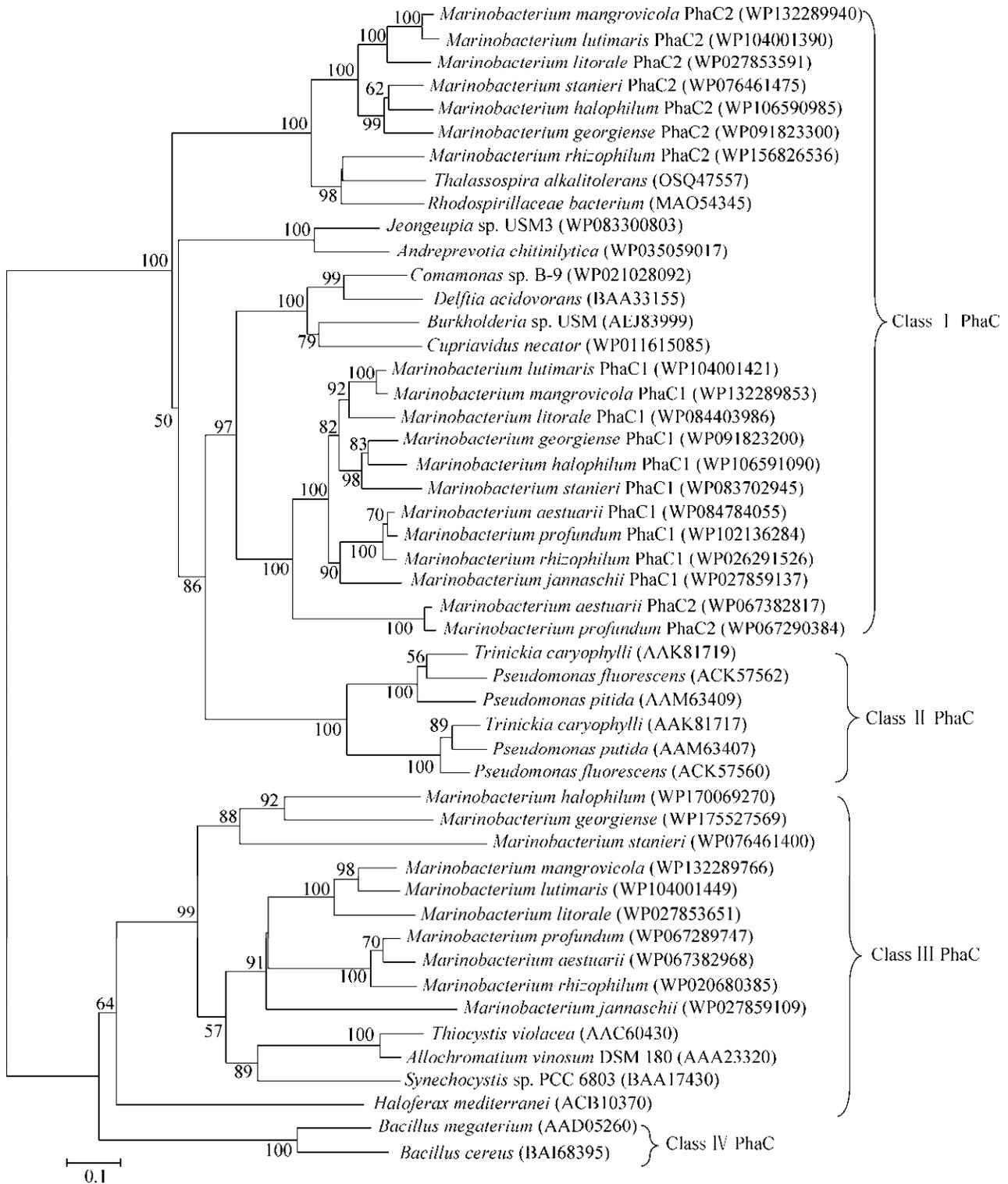


图2 海生杆菌属 PHA 合成酶及其他代表性 PHA 合成酶的发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of the PHA synthases from the *Marinobacterium* genus and related taxa using amino acid sequence. The GenBank accession numbers were in the parentheses after bacterial names. Numbers at the branch ends are the bootstrap values based on 1 000 replicates. The scale bar indicates the number of amino acid substitution per site.

表 5 海生杆菌属中芳香族化合物降解相关基因的基因座位
Table 5 The locus tags of enzymes related to degradation of aromatic compounds in the *Marinobacterium* genus

Enzyme name	<i>M. georgiense</i>	<i>M. stanieri</i>	<i>M. jannaschii</i>	<i>M. halophilum</i>	<i>M. litorale</i>	<i>M. rhizophilum</i>	<i>M. profundum</i>	<i>M. aestuarii</i>
	DSM11526	DSM7027	DSM6295	DSM17586	DSM23545	DSM18822	PAMC27536	ST58-10
Phenol hydroxylase	RS06070	RS11270	RS0100825	RS11105	RS0106405	NA	RS09750	RS10400
	RS06075	RS11265	RS0100830	RS11100	RS0106400	NA	RS09745	RS10405
	RS06080	RS11260	RS0100835	RS11095	RS0106395	NA	RS09740	RS10410
	RS06085	RS11255	RS0100840	RS11090	RS0106390	NA	RS09735	RS10415
	RS06090	RS11250	RS0100845	RS11085	RS0106385	NA	RS09730	RS10420
Benzoate 1,2-dioxygenase	RS06095	RS11245	RS0100850	RS11080	RS0106380	NA	RS09725	RS10425
	RS18325	RS11410	NA	RS11205	RS0101480	RS0106495	RS09635	RS10505
	RS18330	RS11405	NA	RS11200	RS0101485	RS0106500	RS09630	RS10510
	RS18335	RS11400	NA	RS11195	RS0101490	RS0106505	RS09625	RS10515
	RS18340	RS11395	NA	RS11190	RS0101495	RS0106510	RS09620	RS10520
Catechol 1,2-dioxygenase	NA	NA	NA	NA	NA	RS0106490	RS11360	RS13505
Muconolactone D-isomerase	NA	NA	NA	NA	NA	RS0106485	RS11365	RS13510
Muconate cycloisomerase	NA	NA	NA	NA	NA	RS0106480	RS11370	RS13515
3-oxoadipate enol-lactonase	NA	NA	NA	NA	NA	RS0121670	RS04860	RS03785
Catechol 2,3-dioxygenase	RS01380	RS11325	RS0100860	RS11070	RS0106365	NA	RS20120	NA
2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase	RS01345	RS11375	RS0100865	RS11175	RS0106320	NA	RS20140	NA
4-oxalocrotonate tautomerase	RS01330	RS11350	RS0100890	RS11150	RS0106290	NA	RS20165	NA
2-oxo-3-hexenedioate decarboxylase	RS01335	RS11355	RS0100885	RS11155	RS0106295	NA	RS20160	NA
2-oxopent-4-enoate hydratase	RS01340	RS11370	RS0100870	RS11170	RS0106310	NA	RS20145	NA
4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase	RS01320	RS11360	RS0100880	RS11160	RS0106300	NA	RS20155	NA
Acetaldehyde dehydrogenase	RS01325	RS11365	RS0100875	RS11165	RS0106305	NA	RS20150	NA

The prefix part of the locus tag indicating the strain is omitted. NA: no sequence available through the genome analysis.

降解,相关基因以基因簇的形式存在。苯和苯酚由苯酚羟化酶催化生成邻苯二酚;苯甲酸由苯甲酸-1,2-双加氧酶催化生成邻苯二酚。邻苯二酚经由邻位断裂途径降解为3-酮己二酸,或者由间位断裂途径降解为丙酮酸和乙酰辅酶A。邻位断裂途径包括4个酶:邻苯二酚1,2-双加氧酶、黏糠酸环异构酶、黏糠酸内酯异构酶和3-酮己二酸烯醇内酯酶;3-酮己二酸可以进一步与辅酶A缩合,再分解成琥珀酸和乙酰辅酶A,从而进入三羧酸循环被彻底氧化。间位断裂途径包括邻苯二酚2,3-双加氧酶、2-羟基黏糠酸半醛脱氢酶、4-草酰巴豆酸互变异构酶等7个酶,将邻苯二酚降解为丙酮酸和乙酰辅酶A,再进入三羧酸循环氧化。据报道,同为海洋细菌的 *Neptunomonas* 属也有芳香族化合物的降解途径,邻苯二酚由间位断裂途径降解^[31]。在某些假单胞菌中,可以同时具有邻位断裂和间位断裂两条途径,在高浓度苯甲酸底物存在时,两条途径能够同时发挥降解作用^[32]。海生杆菌属具体的芳香族化合物降解能力需要进一步实验研究。

3 结论

本文总结了海生杆菌属已鉴定的18个菌种的特征,并对其中10个完成基因组测序的数据进行了分析。研究结果发现,海生杆菌属普遍含有聚羟基脂肪酸酯合成酶和降解酶基因,表明该菌属可能具有聚羟基脂肪酸酯合成能力,后续选择合适的菌株建立遗传操作方法和代谢工程改造,有望开发能够在海洋高盐条件下生产聚羟基脂肪酸酯的新型底盘细胞。另外,基因组测序数据分析还表明,海生杆菌属具有降解芳香族化合物的相关酶类,含有将苯、苯酚和苯甲酸等经邻苯二酚中间体降解的代谢途径,具有在海洋环境中降解芳香族化合物的功能。本研究加深了对海生杆菌属基因组特征的认识,为该菌属在聚羟基脂肪酸酯合成和海洋芳香族化合物污染治理等方面的

应用提供了研究基础。

REFERENCES

- [1] Zhang S, Zhang CS, Tian XP, et al. The study of diversities of marine microbes in China. *Bull Chin Acad Sci*, 2010, 25(6): 651–658 (in Chinese).
张偲, 张长生, 田新朋, 等. 中国海洋微生物多样性研究. *中国科学院院刊*, 2010, 25(6): 651–658.
- [2] Wen X, Zhou SL, Yang XJ, et al. Research progress on polysaccharide-degrading enzymes from marine microorganism. *Biotechnol Bull*, 2016, 32(11): 38–46 (in Chinese).
文霞, 周少璐, 杨秀苙, 等. 海洋微生物多糖降解酶的研究进展. *生物技术通报*, 2016, 32(11): 38–46.
- [3] Fan ML, Yu BY, Gu JF. Research advances of the antibiotics substances of marine microorganisms. *World Notes Antibiot*, 2014, 35(4): 145–148 (in Chinese).
樊梦霖, 余伯阳, 顾觉奋. 海洋微生物抗菌活性物质研究进展. *国外医药: 抗生素分册*, 2014, 35(4): 145–148.
- [4] Ding YJ, Ding MD, Zhang JD, et al. Quorum sensing in marine microorganisms. *Bull Sci Technol*, 2019, 35(6): 1–6 (in Chinese).
丁雅娟, 丁蒙丹, 张佳娣, 等. 海洋微生物中的群体感应. *科技通报*, 2019, 35(6): 1–6.
- [5] González JM, Mayer F, Moran MA, et al. *Microbulbifer hydrolyticus* gen. nov., sp. nov., and *Marinobacterium georgiense* gen. nov., sp. nov., two marine bacteria from a lignin-rich pulp mill waste enrichment community. *Int J Syst Evol Microbiol*, 1997, 47(2): 369–376.
- [6] Meynet P, Head IM, Werner D, et al. Re-evaluation of dioxygenase gene phylogeny for the development and validation of a quantitative assay for environmental aromatic hydrocarbon degraders. *FEMS Microbiol Ecol*, 2015, 91(6): fiv049.

- [7] Baumann P, Bowditch RD, Baumann L, et al. Taxonomy of marine *Pseudomonas* species: *P. stanieri* sp nov.; *P. perfectomarina* sp nov., nom. rev.; *P. nautica*: and *P. doudorofii*. Int J Syst Evol Microbiol, 1983, 33(4): 857–865.
- [8] Bowditch RD, Baumann L, Baumann P. Description of *Oceanospirillum kriegii* sp. nov. and *O. jannaschii* sp. nov. and assignment of two species of *Alteromonas* to this genus as *O. commune* comb. nov. and *O. vagum* comb. nov. Curr Microbiol, 1984, 10(4): 221–229.
- [9] Satomi M, Kimura B, Hamada T, et al. Phylogenetic study of the genus *Oceanospirillum* based on 16S rRNA and *gyrB* genes: emended description of the genus *Oceanospirillum*, description of *Pseudospirillum* gen. nov., *Oceanobacter* gen. nov. and *Terasakiella* gen. nov. and transfer of *Oceanospirillum jannaschii* and *Pseudomonas stanieri* to *Marinobacterium* as *Marinobacterium jannaschii* comb. nov. and *Marinobacterium stanieri* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol, 2002, 52(3): 739–747.
- [10] Chang HW, Nam YD, Kwon HY, et al. *Marinobacterium halophilum* sp. nov., a marine bacterium isolated from the Yellow Sea. Int J Syst Evol Microbiol, 2007, 57(1): 77–80.
- [11] Kim H, Choo YJ, Song J, et al. *Marinobacterium litorale* sp. nov. in the order *Oceanospirillales*. Int J Syst Evol Microbiol, 2007, 57(7): 1659–1662.
- [12] Kim YG, Jin YA, Hwang CY, et al. *Marinobacterium rhizophilum* sp. nov., isolated from the rhizosphere of the coastal tidal-flat plant *Suaeda japonica*. Int J Syst Evol Microbiol, 2008, 58(1): 164–167.
- [13] Kim H, Oh HM, Yang SJ, et al. *Marinobacterium marisflavi* sp. nov., isolated from a coastal seawater. Curr Microbiol, 2009, 58(5): 511–515.
- [14] Kim SJ, Park SJ, Yoon DN, et al. *Marinobacterium maritimum* sp. nov., a marine bacterium isolated from Arctic sediment. Int J Syst Evol Microbiol, 2009, 59(12): 3030–3034.
- [15] Huo YY, Xu XW, Cao Y, et al. *Marinobacterium nitratireducens* sp. nov. and *Marinobacterium sediminicola* sp. nov., isolated from marine sediment. Int J Syst Evol Microbiol, 2009, 59(5): 1173–1178.
- [16] Kim JM, Lee SH, Jung JY, et al. *Marinobacterium lutimaris* sp. nov., isolated from a tidal flat. Int J Syst Evol Microbiol, 2010, 60(8): 1828–1831.
- [17] Chimento LA, Cleenwerck I, Brocchi M, et al. *Marinobacterium coralli* sp. nov., isolated from mucus of coral (*Mussismilia hispida*). Int J Syst Evol Microbiol, 2011, 61(1): 60–64.
- [18] Alfaro-Espinoza G, Ullrich MS. *Marinobacterium mangrovicola* sp. nov., a marine nitrogen-fixing bacterium isolated from mangrove roots of *Rhizophora mangle*. Int J Syst Evol Microbiol, 2014, 64(12): 3988–3993.
- [19] Park S, Jung YT, Kim S, et al. *Marinobacterium aestuariivivens* sp. nov., isolated from a tidal flat. Int J Syst Evol Microbiol, 2016, 66(4): 1718–1723.
- [20] Hwang CY, Yoon SJ, Lee I, et al. *Marinobacterium profundum* sp. nov., a marine bacterium from deep-sea sediment. Int J Syst Evol Microbiol, 2016, 66(3): 1561–1566.
- [21] Han SB, Wang RJ, Yu XY, et al. *Marinobacterium zhoushanense* sp. nov., isolated from surface seawater. Int J Syst Evol Microbiol, 2016, 66(9): 3437–3442.
- [22] Bae SS, Jung J, Chung D, et al. *Marinobacterium aestuarii* sp. nov., a benzene-degrading marine bacterium isolated from estuary sediment. Int J Syst Evol Microbiol, 2018, 68(2): 651–656.
- [23] Kang JY, Kim MJ, Chun J, et al. *Marinobacterium boryeongense* sp. nov., isolated from seawater. Int J Syst Evol Microbiol, 2019, 69(2): 493–497.
- [24] Che XM, Situ W, Yu LS, et al. Application perspectives of polyhydroxyalkanoates. Chin J Biotech, 2018, 34(10): 1531–1542 (in Chinese).
车雪梅, 司徒卫, 余柳松, 等. 聚羟基脂肪酸酯的应用展望. 生物工程学报, 2018, 34(10): 1531–1542.

- [25] Li ZJ, Wei XX, Chen GQ. Microbial cell factories for production of polyhydroxyalkanoates. *Chin J Biotech*, 2010, 26(10): 1426–1435 (in Chinese).
李正军, 魏晓星, 陈国强. 生产聚羟基脂肪酸酯的微生物细胞工厂. *生物工程学报*, 2010, 26(10): 1426–1435.
- [26] Zhang MY, Li YH, Zhan YL, et al. Research advances in biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by halophilic bacteria. *Biotechnol Bull*, 2019, 35(6): 172–177 (in Chinese).
张梦颖, 李雅慧, 詹元龙, 等. 嗜盐菌生物合成聚羟基脂肪酸酯 (PHAs) 的研究进展. *生物技术通报*, 2019, 35(6): 172–177.
- [27] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*, 2016, 33(7): 1870–1874.
- [28] Daigneault B, Vilarino M, Rajput S, et al. 79 CRISPR gene editing in bovine zygotes—mutation confirmation by integration of protein expression and DNA sequencing analyses. *Reprod Fert Dev*, 2019, 31(1): 165.
- [29] Choi SY, Park SJ, Kim WJ, et al. One-step fermentative production of poly(lactate-co-glycolate) from carbohydrates in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(4): 435–440.
- [30] Taguchi S, Yamada M, Matsumoto K, et al. A microbial factory for lactate-based polyesters using a lactate-polymerizing enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(45): 17323–17327.
- [31] Pu N, Li W, Li ZJ. Complete genome sequence of *Neptunomonas concharum* JCM17730^T: an acetate assimilating bacterium isolated from a dead ark clam. *Mar Genom*, 2020, 53: 100754.
- [32] Cao B, Geng AL, Loh KC. Induction of *ortho*- and *meta*-cleavage pathways in *Pseudomonas* in biodegradation of high benzoate concentration: MS identification of catabolic enzymes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 81(1): 99–107.

(本文责编 郝丽芳)