

引用格式:王梦汝,顾嘉怡,王雅欣,等.海神单胞菌属的基因组测序数据分析[J].北京化工大学学报(自然科学版),2022,49(1):70-78.

WANG MengRu, GU JiaYi, WANG YaXin, et al. Analysis of the genome sequencing data of the *Neptunomonas* genus[J]. Journal of Beijing University of Chemical Technology (Natural Science), 2022,49(1):70-78.

海神单胞菌属的基因组测序数据分析

王梦汝 顾嘉怡 王雅欣 李正军*

(北京化工大学 生命科学与技术学院,北京 100029)

摘 要:海神单胞菌属(*Neptunomonas*)于1999年被首次鉴定,目前包含8个菌种,其中6个已经完成全基因组测序。本文总结了海神单胞菌属的菌种特征和基因组信息,并利用基因组测序数据对该菌属的碳源利用途径、聚羟基脂肪酸酯代谢途径和芳香族化合物降解途径进行了分析。研究发现,海神单胞菌属具有完整的糖酵解和乙酸利用途径,普遍含有I型和III型的聚羟基脂肪酸酯合成酶,存在芳香族化合物的降解途径。基因组测序数据分析结果可以为海神单胞菌属在聚羟基脂肪酸酯合成与环境治理保护等领域的应用提供理论依据。

关键词:海神单胞菌属;基因组测序;聚羟基脂肪酸酯;芳香族化合物

中图分类号:Q939.97 **DOI:**10.13543/j.bhxbzr.2022.01.009

引 言

海神单胞菌属(*Neptunomonas*)最初由Hedlund等^[1]于1999年定名,代表菌株是从被杂酚油污染的港口沉积物中分离出的食萘海神单胞菌 *N. naphthovorans* NAG-2N-126,其具有降解多环芳烃的能力。海神单胞菌属为革兰氏阴性,杆状,有鞭毛,氧化酶和过氧化氢酶呈阳性^[2]。迄今为止,共有8个海神单胞菌属菌种被发现和鉴定,分别为 *N. naphthovorans*^[1]、*N. concharum*^[3]、*N. japonica*^[4]、*N. acidivorans*^[5]、*N. antarctica*^[6]、*N. qingdaonensis*^[7]、*N. marina*^[8]和 *N. phycophila*^[9],其中6个菌种已经完成全基因组测序^[2,4,7-10]。

芳香族化合物是分子中至少含有一个离域键的环状化合物,如苯、萘、蒽、菲及其衍生物等。芳香族化合物的结构较为稳定、不易分解,且普遍存在“三致效应”,在环境中的残留物质进入食物链会对人体健康产生一定的危害^[11]。海神单胞菌属的部分

菌株可以降解多环芳烃,可能在去除海洋和土壤等环境中的芳香族化合物污染物方面发挥一定作用。Li等^[12-13]研究了食萘海神单胞菌对菲的降解,发现添加表面活性剂能够在一定程度上提高菲在培养基中的可溶性,由此提高菲的生物可利用性和菌株对菲的降解速度。目前仅有极少数研究者关注到海神单胞菌对多环芳烃的降解,缺少关于其代谢途径、关键降解酶和降解机理等方面的研究。

聚羟基脂肪酸酯(polyhydroxyalkanoate,PHA)是微生物生长代谢不平衡时在细胞内合成的一种储能用高分子生物材料。PHA具有生物相容性、生物可降解性和生物可再生性等优良特性,在包装材料与组织工程领域具有广阔的应用前景。目前PHA的生产成本高于石油来源的不可降解塑料,限制了其大规模商业化生产和应用开发。研究新型的PHA生产菌种,开发低成本的生产工艺日益受到学术界和工业界的关注。在海神单胞菌中,*N. antarctica* S3-22能够以果糖为碳源合成聚-3-羟基丁酸酯(polyhydroxybutyrate,PHB),但该菌株的最适生长温度为15℃左右,发酵成本高,不利于大规模工业化生产^[14]。另一种海神单胞菌 *N. concharum* JCM17730的最适生长温度为37℃,对乙酸和丁酸具有较好的利用能力,能够以高浓度丁酸为底物进行不灭菌发酵合成PHB,产量超过15 g/L^[15]。考虑到乙酸和丁酸等短链挥发性脂肪酸可利用生物质资源或通过合

收稿日期:2021-06-04

基金项目:国家重点研发计划(2018YFA0900200);国家自然科学基金(31870075)

第一作者:女,1996年生,硕士生

*通信联系人

E-mail: lizj@mail.buct.edu.cn

基因组数据,使用软件 SnapGene(版本 4.3.6)^[17]对其保存和分析。

在 NCBI 数据库中检索海神单胞菌属相关菌种的 16S rRNA 序列并下载,利用软件 MEGA(版本 7.0)对系统发育树进行分析,使用 Neighbor-Joining 法对 16S rRNA 序列构建相应的系统发育树^[18]。

利用工具 EzGenome (<http://www.ezbiocloud.net/ezgenome/ani>) 分析海神单胞菌相关菌种的全基因组序列信息的平均核苷酸一致性 (average nucleotide identity, ANI)^[19]。

海神单胞菌属中可能的碳源代谢、芳香族化合物代谢及聚羟基脂肪酸酯代谢的路径如图 1 所示。利用 SnapGene 软件和 NCBI 网站的 Blast 功能,分析代谢途径中关键酶的编码基因在海神单胞菌属各菌种基因组中的分布情况。

[illegible]

Fig. 1 The possible metabolic pathways in the *Neptunomonas* genus

酮酸脱氢酶(pyruvate dehydrogenase)等。

1.4.2 芳香族化合物降解途径

芳香族化合物在有氧条件下的生物降解一般经过邻苯二酚或其衍生物,再开环形成直链分子进入中心代谢途径分解。相关酶主要包括苯酚羟化酶(phenol hydroxylase)、2-辛烷基-6-甲氧基苯酚羟化酶(2-octaprenyl-6-methoxyphenol hydroxylase)、4-羟基苯丙酮酸双加氧酶(4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase)、邻苯二酚 2,3-双加氧酶(catechol dioxygenase)、4-羧基黏糠酸内酯脱羧酶(4-carboxymucon-

lactone decarboxylase)、羧基黏糠酸内酯脱羧酶(carboxymuconolactone decarboxylase)、4-草酰乙酸脱羧酶(4-oxaloacetate decarboxylase)、4-草酰巴豆酸酯互变异构酶(4-oxalocrotonate tautomerase)等。

1.4.3 聚羟基脂肪酸酯代谢途径

聚羟基脂肪酸酯代谢的关键酶是 PHA 合成酶 (PHA synthase) 和 PHA 降解酶 (PHA depolymerase),前者催化酯酰辅酶 A 单体的聚合,后者催化 PHA 的胞内分解再利用。

2 结果与讨论

2.1 海神单胞菌属的基本特征和基因组测序分析

在目前已发现和鉴定的 8 个海神单胞菌属菌种中,*N. qingdaonensis* 为好氧菌,其余均为兼性厌氧菌;多数菌种的最适生长温度为 20 ~ 30 ℃,有的菌种具有在细胞内积累聚-3-羟基丁酸酯的能力(表 1)。不同菌种之间生长温度和需氧情况的差异可能与其长期的生存环境和生活习性有关。

表 1 海神单胞菌属的表型特征
Table 1 Phenotypic characteristics of the *Neptunomonas* genus

菌株	生长条件			需氧情况	PHB 积累能力	基因组测序时间	文献
	温度/℃	pH	NaCl 质量浓度/(g·L ⁻¹)				
<i>N. concharum</i>	10 ~ 45 (37)	6.0 ~ 10.0 (7.0 ~ 8.0)	10 ~ 80 (20)	兼性厌氧	+	2019	[2-3]
<i>N. japonica</i>	5 ~ 25 (20)	7.0 ~ 8.5 (7.5)	10 ~ 50 (20)	兼性厌氧	+	2013	[4]
<i>N. acidivorans</i>	10 ~ 39 (29)	6.0 ~ 9.0 (7.0)	0 ~ 70 (25)	兼性厌氧	ND	ND	[5]
<i>N. antarctica</i>	4 ~ 25 (15)	6.0 ~ 8.0 (6.5 ~ 7.0)	5 ~ 50 (20 ~ 30)	兼性厌氧	+	2015	[6,10]
<i>N. qingdaonensis</i>	4 ~ 33 (20)	6.5 ~ 8.0 (7.0)	5 ~ 120 (30 ~ 40)	好氧	+	2016	[7]
<i>N. naphthovorans</i>	4 ~ 24	6.5 ~ 8.5 (7.5)	17.5 ~ 70	兼性厌氧	ND	ND	[1]
<i>N. marina</i>	15 ~ 40 (30 ~ 35)	6.0 ~ 10.0 (6.5 ~ 8.0)	0 ~ 80 (20 ~ 50)	兼性厌氧	+	2019	[8]
<i>N. phycophila</i>	4 ~ 40 (30)	5.0 ~ 11.0 (8.0)	5 ~ 80 (20)	兼性厌氧	+	2016	[9]

+ 表示阳性,ND 表示参考文献中没有相关数据,生长条件项下括号内的数字表示最适生长条件,基因组测序时间均从 NCBI 数据库中获得。

海神单胞菌属的 6 个菌种已经有公开的基因组序列。*N. phycophila* 包括 3 个菌株,*N. marina* 包含 1 个菌株,其余 4 个菌种(*N. concharum*、*N. japonica*、*N. qingdaonensis* 和 *N. antarctica*)均包含 2 个菌株。本文对其中的 11 个菌株的基因组序列进行分析,结果如表 2 所示。可以看出,这些菌株的基因组大小差距较大;*N. antarctica* DSM22306 的基因组最大,为 4 569 005 bp;*N. concharum* JCM17730 的基因组最小,为 3 561 992 bp。基因组 GC 含量在 43.7% ~ 50.5% (摩尔分数)之间。对已测序的海神单胞菌的全基因组序列进行平均核苷酸一致性分析,结果如表 3 所示。海神单胞菌属各个菌种之间的平均核苷酸一致性均在 69% 以上,同一菌种不同菌株的平均核苷酸一致性均在 90% 以上。基因组大小的差异暗示了海神单胞菌属不同菌株在基因功能上可能存在差别。对基因组最小的 *N. concharum* 和较大的 *N. qingdaonensis* P10-2-4、*N. antarctica* S3-22 进行特有基因分析,结果如表 4 所示。发现

N. qingdaonensis 和 *N. antarctica* 在氨基酸、糖类和脂质的转运与代谢、细胞壁和细胞膜合成以及信号传递等方面的特有基因较多。

表 2 海神单胞菌属的基因组概况
Table 2 Genome overview of the *Neptunomonas* genus

菌株	基因组大小/bp	GC 含量/%
<i>N. japonica</i> DSM18939	4 390 752	43.7
<i>N. japonica</i> JAMM1380	4 095 481	43.7
<i>N. concharum</i> JCM17730	3 561 992	46.4
<i>N. phycophila</i> Scap09	3 976 465	45.5
<i>N. phycophila</i> CECT8716	3 876 499	45.5
<i>N. phycophila</i> 3CM2.5	3 999 042	45.3
<i>N. qingdaonensis</i> CGMCC1.10971	4 448 790	46.2
<i>N. qingdaonensis</i> P10-2-4	4 457 478	46.2
<i>N. antarctica</i> DSM22306	4 569 005	45.7
<i>N. antarctica</i> S3-22	4 568 828	45.7
<i>N. marina</i> HPM-16	3 681 425	50.5

表 3 海神单胞菌属基因组平均核苷酸一致性分析

Table 3 Analysis of the average nucleotide identity of the genome of *Neptunomonas* genus

菌株	平均核苷酸相似度/%										
	<i>N. japonica</i>	<i>N. japonica</i>	<i>N. concharum</i>	<i>N. phycophila</i>	<i>N. phycophila</i>	<i>N. phycophila</i>	<i>N. qingdaonensis</i>	<i>N. qingdaonensis</i>	<i>N. antarctica</i>	<i>N. antarctica</i>	<i>N. marina</i>
	DSM18939	JAMM1380	JCM17730	Scap09	CECT8716	3CM2.5	CGMCC1.10971	P10-2-4	DSM22306	S3-22	HPM-16
<i>N. japonica</i> DSM18939	100	90.72	71.63	70.36	70.48	70.50	76.66	76.80	75.62	75.75	70.25
<i>N. japonica</i> JAMM1380	90.72	100	71.84	70.80	70.64	70.59	76.39	76.62	75.64	75.72	70.41
<i>N. concharum</i> JCM17730	71.63	71.84	100	70.51	70.36	70.36	71.92	71.74	71.59	71.58	70.55
<i>N. phycophila</i> Scap09	70.36	70.80	70.51	100	98.79	98.84	70.24	70.31	70.19	69.92	69.79
<i>N. phycophila</i> CECT8716	70.48	70.64	70.36	98.79	100	98.98	70.46	70.39	70.08	70.00	69.87
<i>N. phycophila</i> 3CM2.5	70.50	70.59	70.36	98.84	98.98	100	70.10	70.32	70.01	69.95	69.99
<i>N. qingdaonensis</i> CGMCC1.10971	76.66	76.39	71.92	70.24	70.46	70.10	100	99.97	77.32	77.62	70.27
<i>N. qingdaonensis</i> P10-2-4	76.80	76.62	71.74	70.31	70.39	70.32	99.97	100	77.47	77.48	70.36
<i>N. antarctica</i> DSM22306	75.62	75.64	71.59	70.19	70.08	70.01	77.32	77.47	100	99.96	70.09
<i>N. antarctica</i> S3-22	75.75	75.72	71.58	69.92	70.00	69.95	77.62	77.48	99.96	100	70.01
<i>N. marina</i> HPM-16	70.25	70.41	70.55	69.79	69.87	69.99	70.27	70.36	70.09	70.01	100

表 4 海神单胞菌属 3 个菌种特有基因的同源蛋白簇(COG)功能分类

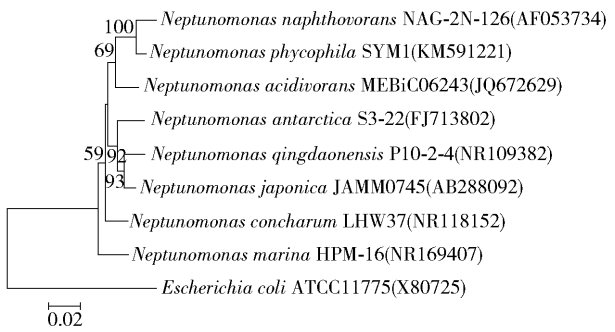
Table 4 COG function classification of the specific genes of three strains of *Neptunomonas* genus

功能类型	基因数目		
	<i>N. concharum</i> (3 561 992 bp)	<i>N. qingdaonensis</i> (4 457 478 bp)	<i>N. antarctica</i> (4 568 828 bp)
Energy production and conversion	29	28	24
Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	2	2	1
Amino acid transport and metabolism	28	34	66
Nucleotide transport and metabolism	3	4	2
Carbohydrate transport and metabolism	12	12	32
Coenzyme transport and metabolism	11	6	19
Lipid transport and metabolism	8	10	28
Translation, ribosomal structure and biogenesis	13	7	9
Transcription	49	34	70
Replication, recombination and repair	13	22	12
Cell wall/membrane/envelope biogenesis	18	29	30
Cell motility	14	3	7
Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	23	27	13
Inorganic ion transport and metabolism	29	29	31
Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	7	14	24
General function prediction only	32	43	50
Function unknown	33	28	30
Signal transduction mechanisms	51	41	74
Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	7	–	2
Defense mechanisms	16	23	23
Extracellular structures	7	–	2
Mobilome; prophages, transposons	7	22	23
Cytoskeleton	1	NA	NA
RNA processing and modification	NA	NA	NA
Chromatin structure and dynamics	NA	NA	1

NA—基因组分析中没有可用的序列。

2.2 海神单胞菌属的系统发育分析

对海神单胞菌属已经鉴定的 8 个菌种的模式菌株的 16S rRNA 序列和作为外群的大肠杆菌(*Escherichia coli*)的 16S rRNA 序列构建系统发育树,结果如图 2 所示。在海神单胞菌属内,*N. qingdaonensis*、*N. japonica* 和 *N. antarctica* 的亲缘关系较近,*N. acidivorans* 和 *N. phycophila* 的亲缘关系较近,而 *N. marina* 和同一属内其他菌种的亲缘关系较远。由 16S rRNA 构建系统发育树得到的亲缘关系结论与基因组平均核苷酸一致性的分析结果类似。



大肠杆菌 ATCC 11775 (X80725)用作外群;括号中给出 GenBank 登录号;系统发育树中树枝节点处的数字代表重复 1 000 次计算得到的自展值;标尺 0.02 表示每个位点的核苷酸取代数。下同。

图 2 海神单胞菌属的 16S rRNA 系统发育树
Fig. 2 A 16S rRNA-based phylogenetic tree of the *Neptunomonas* genus

2.3 海神单胞菌属代谢途径关键酶基因分析

2.3.1 碳源代谢相关基因

基于基因组测序数据对海神单胞菌属各代表菌株的碳源代谢途径相关基因进行分析,糖酵解途径、Entner-Doudoroff 途径、磷酸戊糖途径、乙酸和丙酮酸代谢途径的部分关键酶的基因座位如表 5 所示。海神单胞菌属中,已测序的菌种都含有糖酵解途径中的关键酶,包括丙酮酸激酶、3-磷酸甘油醛脱氢酶、磷酸甘油酸激酶和磷酸甘油酸变位酶等(图 1),表明糖酵解途径在海神单胞菌属中普遍存在。但是,部分海神单胞菌的磷酸转移酶系统不完整,例如 *N. concharum* JCM17730 和 *N. japonica* JAMM 1380 仅有 PtsH 蛋白,缺少细胞膜上运输葡萄糖的 PtsG 蛋白,提示它们不具有利用葡萄糖的能力。根据基因组测序数据可知,磷酸戊糖途径的关键酶葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、Entner-Doudoroff 途径的关键酶磷酸葡萄糖酸脱水酶只在 *N. antarctica* S3-22 和 *N. phycophila* Scap09 中被发现。另外,基因组分析表明,海神单胞菌普遍缺少木糖转运和利用的关键基因,表明海神单胞菌属的糖代谢普遍不活跃。

乙酸代谢途径的关键酶乙酸激酶和丙酮酸代谢途径的丙酮酸脱氢酶在已测序的菌种中也都有发现,提示海神单胞菌属具有利用乙酸的能力。细菌以乙酸为唯一碳源时,一方面通过三羧酸循环将乙

表 5 海神单胞菌属中碳源代谢相关酶的基因座位

碳源代谢相关酶	基因座位					
	<i>N. concharum</i>	<i>N. japonica</i>	<i>N. antarctica</i>	<i>N. phycophila</i>	<i>N. marina</i>	<i>N. qingdaonensis</i>
	JCM17730	JAMM 1380	S3-22	Scap09	HPM-16	CGMCC1.10971
6-磷酸果糖激酶	FOU83_RS14735	NEJAP_RS17060	Nant_RS11955	NA	EOE65_RS17525	BM099_RS20055
丙酮酸激酶	FOU83_RS16220	NEJAP_RS18165	Nant_RS04510	FLM49_RS10390	EOE65_RS14350	BM099_RS17750
				FLM49_RS16445		
3-磷酸甘油醛脱氢酶	FOU83_RS08245	NEJAP_RS10220	Nant_RS10395	FLM49_RS10385	EOE65_RS07640	BM099_RS09285
	FOU83_RS06550	NEJAP_RS11135	Nant_RS08850	FLM49_RS10205	EOE65_RS02285	BM099_RS11045
磷酸甘油酸激酶	FOU83_RS01520	NEJAP_RS01510	Nant_RS16035	FLM49_RS02020	EOE65_RS05925	BM099_RS01830
磷酸甘油酸变位酶	FOU83_RS14870	NEJAP_RS17200	Nant_RS12090	FLM49_RS01025	EOE65_RS17405	BM099_RS19850
乙酸激酶	FOU83_RS13290	NEJAP_RS15505	Nant_RS06470	FLM49_RS13220	EOE65_RS10810	BM099_RS11410
	FOU83_RS04250	NEJAP_RS04610	Nant_RS02360		EOE65_RS12455	BM099_RS18755
丙酮酸脱氢酶	FOU83_RS12060	NEJAP_RS04615	Nant_RS02770	FLM49_RS04510	EOE65_RS12460	BM099_RS17160
	FOU83_RS13235	NEJAP_RS15460	Nant_RS06430		EOE65_RS12465	BM099_RS11455

NA—基因组分析未找到相关序列。

酰辅酶 A 彻底氧化以提供能量,另一方面启动乙醛酸循环合成琥珀酸等中间体用于生物合成反应,基因组测序分析发现了乙醛酸循环相关的异

柠檬酸裂解酶和苹果酸合成酶的存在。此外,丙酸代谢相关的丙酰辅酶 A 合成酶也普遍存在,且有多个拷贝。

2.3.2 芳香族化合物代谢相关基因

基于基因组测序数据对海神单胞菌属各代表菌株的芳香族化合物代谢途径相关基因进行分析,其中涉及的部分关键酶的基因座位如表 6 所示。海神单胞菌属普遍含有苯、苯酚、苯甲酸的降解途径,与大多数细菌一样采用双加氧酶进行多环芳烃的降

解,而真菌往往采用单加氧酶进行降解。苯和苯酚通过苯酚羟化酶催化生成邻苯二酚^[20],该酶在两个菌种 *N. concharum* JCM17730 和 *N. japonica* JAMM 1380 中存在。苯甲酸由苯甲酸双加氧酶催化生成邻苯二酚,但该酶只在菌种 *N. phycophila* Scap09 中被发现。

表 6 海神单胞菌属中芳香化合物降解相关酶的基因座位
Table 6 The locus tags of enzymes related to degradation of aromatic compounds in the *Neptunomonas* genus

芳香化合物降解相关酶	基因座位					
	<i>N. concharum</i> JCM17730	<i>N. japonica</i> JAMM 1380	<i>N. antarctica</i> S3-22	<i>N. phycophila</i> Scap09	<i>N. marina</i> HPM-16	<i>N. qingdaonensis</i> CGMCC1. 10971
苯酚羟化酶	FOU83_RS03000	NEJAP_RS03385 NEJAP_RS03390				
	FOU83_RS03005	NEJAP_RS03395 NEJAP_RS03400	NA	NA	NA	NA
	FOU83_RS03020	NEJAP_RS03405 NEJAP_RS03410				
2-辛烷基-6-甲氧基苯酚羟化酶	F0U83_RS15990	NEJAP_RS17920	Nant_RS04725	FLM49_RS17390	EOE65_RS14580	BM099_RS18425
4-羟基苯丙酮酸双加氧酶	F0U83_RS10645	NEJAP_RS10485	Nant_RS07280	NA	EOE65_RS16410	NA
邻苯二酚 2,3-双加氧酶	F0U83_RS03035	NEJAP_RS03420	NA	NA	NA	NA
4-羧基黏糠酸内酯脱羧酶	F0U83_RS11940	NEJAP_RS13900	Nant_RS02905	FLM49_RS12035	EOE65_RS00555	BM099_RS05245
羧基黏糠酸内酯脱羧酶	F0U83_RS00030	NEJAP_RS09170	Nant_RS15310	FLM49_RS09415	EOE65_RS17050	NA
4-草酰乙酸脱羧酶	F0U83_RS02965	NEJAP_RS03355	Nant_RS18155	FLM49_RS03140	EOE65_RS11265	BM099_RS04225
4-草酰巴豆酸酯互变异构酶	F0U83_RS03065	NEJAP_RS03450	Nant_RS05565	NA	NA	NA

NA—基因组分析未找到相关序列。

邻苯二酚有两条降解途径:邻位降解和间位降解。邻位降解是将邻苯二酚转化为 3-酮己二酸,再与辅酶 A 缩合,分解为琥珀酸和乙酰辅酶 A,进入三羧酸循环被彻底氧化,涉及的酶包括邻苯二酚 1,2-双加氧酶、黏糠酸环异构酶、黏糠酸内酯异构酶等,该途径关键酶的编码基因只在 *N. phycophila* Scap09 中被发现。间位降解是将邻苯二酚降解为丙酮酸和乙酰辅酶 A,进入三羧酸循环氧化分解,其中涉及的酶有邻苯二酚-2,3-双加氧酶、4-草酰乙酸脱羧酶、4-草酰巴豆酸酯互变异构酶等(图 1)。在大部分海神单胞菌属的菌种中能找到间位降解途径所涉及到的酶,例如 *N. concharum* JCM17730 和 *N. japonica* JAMM 1380 都有完整的将苯酚降解为丙酮酸和乙酰辅酶 A 的间位降解代谢途径,但缺少邻位降解途径。目前,已报道的好氧条件下降解多环芳烃的菌属超过 100 个,研究主要集中在 *Pseudomonas*、*Sphingomonas*、*Burkholderia*、*Mycobacterium* 和 *Rhodococcus* 等少数几个菌属,降解途径中关键酶如多环芳烃羟基化双加氧酶、邻苯二酚双加氧酶等也有结构解

析^[21]。但是,对于包括海神单胞菌在内的其他菌属的报道较少,因此还需深入研究不同菌属对芳香族化合物的降解途径、降解机理以及在自然条件下菌群迁移转化和协同作用等。

2.3.3 聚羧基脂肪酸酯代谢相关基因

碳源可通过多种代谢途径转化为羟基脂酰辅酶 A 单体,由 PHA 合成酶催化聚合得到 PHA^[22-23]。PHA 合成酶是 PHA 生物合成途径中最为关键的酶,其底物特异性决定了脂酰辅酶 A 单体的类型,也是控制 PHA 聚合物单体组成和分子量的关键因素^[22]。微生物在碳源缺乏时,PHA 降解酶催化细胞内积累的 PHA 分解再利用。本文对海神单胞菌属各代表菌株的 PHA 合成酶和 PHA 降解酶的基因组测序数据进行了分析,相关基因座位见表 7。对 PHA 合成酶序列进行系统发育树分析,结果见图 3。由表 7 可以看出,海神单胞菌属的全部菌种均含有 2~3 个 PHA 合成酶,并且在基因组上分散排布;海神单胞菌属普遍含有 PHA 降解酶基因,表明其具有对 PHA 降解再利用的能力。

表 7 海神单胞菌属中聚羟基脂肪酸酯代谢相关酶的基因座位

Table 7 The locus tags of enzymes related to polyhydroxyalkanoate metabolism in the *Neptunomonas* genus

PHA 代谢相关酶	基因座位					
	<i>N. concharum</i> JCM17730	<i>N. japonica</i> JAMM 1380	<i>N. antarctica</i> S3-22	<i>N. phycophila</i> Scap09	<i>N. marina</i> HPM-16	<i>N. qingdaonensis</i> CGMCC1.10971
PHA 合成酶(PhaC1)	F0U83_10705	NEJAP_RS06525	Nant_RS19860	FLM49_RS09995	EOE65_RS09710	BM099_RS06540
PHA 合成酶(PhaC2)	F0U83_07770	NEJAP_RS09565	Nant_RS13255	FLM49_RS08845	NA	BM099_RS09975
PHA 合成酶(PhaC)	F0U83_07590	NEJAP_RS10370	Nant_RS07000	FLM49_RS08655	EOE65_RS03685	BM099_RS13020
PHA 合成酶(PhaE)	F0U83_07595	NEJAP_RS10365	Nant_RS06995	FLM49_RS08650	EOE65_RS03690	BM099_RS13015
PHA 合成抑制因子(PhaR)	F0U83_07585	NEJAP_RS10375	Nant_RS07005	FLM49_RS08660	NA	BM099_RS13025
PHA 降解酶(PhaZ)	F0U83_14195	NEJAP_RS16410	Nant_RS08000	FLM49_RS14025	EOE65_RS13210	BM099_RS15140

NA—基因组分析未找到相关序列。

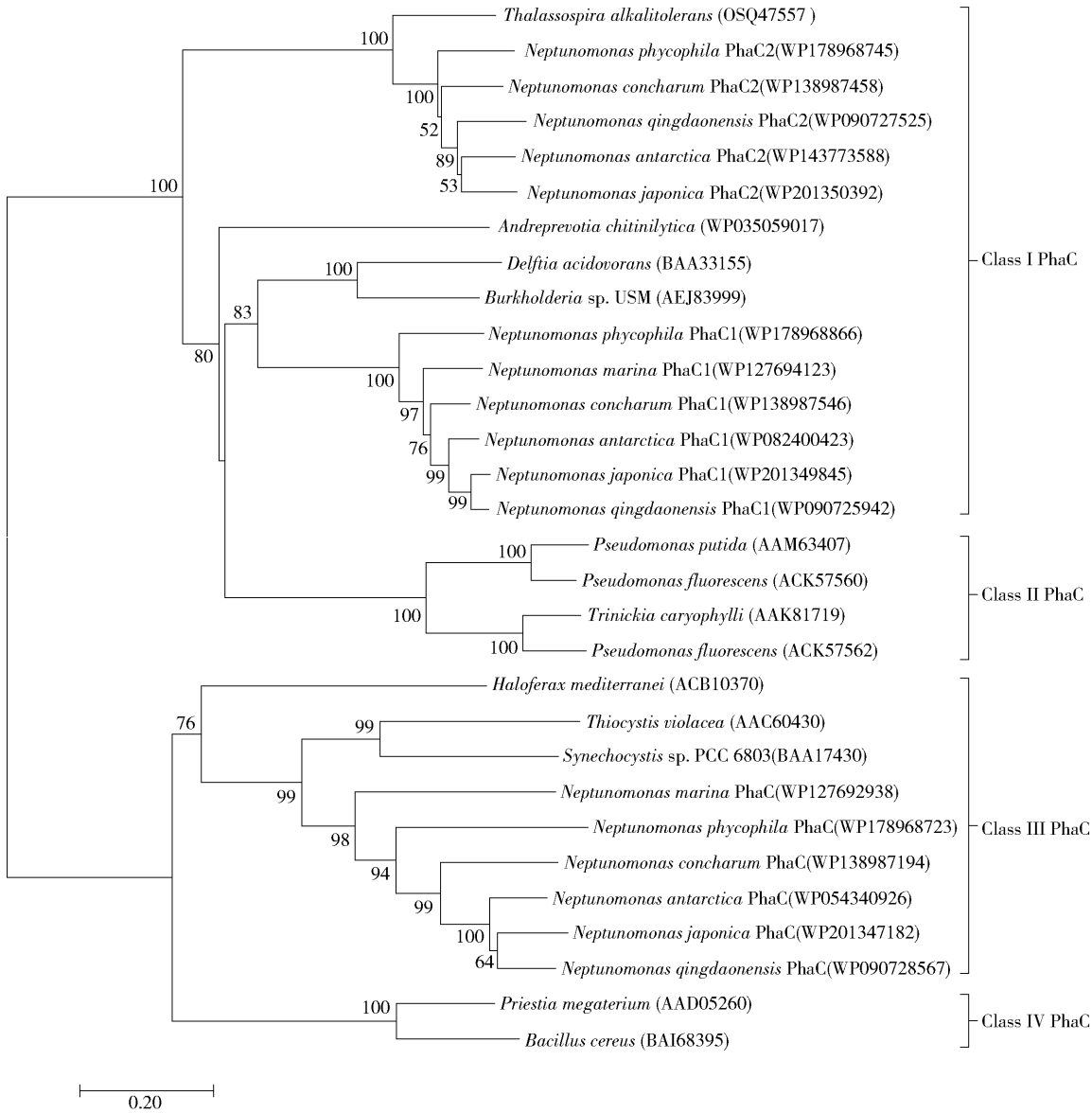


图 3 海神单胞菌属的 PHA 合成酶及其他代表性 PHA 合成酶的发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of the PHA synthases from the *Neptunomonas* genus and other representative strains

PHA 合成酶根据结构、亚基组成和底物特异性,可分为 4 种类型。其中,Ⅰ型合成酶由一个亚基组成,Ⅱ型合成酶是包含 2 个亚基的异源二聚体^[24]。在一些 PHA 合成菌株中,PHA 合成酶与代谢途径中的其他基因紧密相连。例如,罗氏真养菌 H16(*Ralstonia eutropha* H16)中 PHA 聚合酶与硫解酶、乙酰乙酰辅酶 A 还原酶的基因组成一个操纵子,紫色色杆菌(*Chromobacterium violaceum*)中 PHA 聚合酶与硫解酶的基因组成一个操纵子。由图 3 发现 3 个 PHA 合成酶中 2 个为Ⅰ型、1 个为Ⅲ型,Ⅲ型合成酶 PhaC 和 PhaE 的基因在基因组中前后相连。海神单胞菌中 PHA 合成酶的分布情况与海生杆菌属(*Marinobacterium*)^[25]较为相似,两个菌属同为海洋螺菌科,具有较近的亲缘关系。

3 结论

本文对海神单胞菌属已鉴定的 6 个菌种的特征进行了系统总结,并对其基因组测序数据进行了分析。研究发现海神单胞菌属的菌种普遍具有降解芳香族化合物的相关基因,理论上可将苯、苯酚和苯甲酸等通过以邻苯二酚为中间体的间位降解途径进行分解,可在降解芳香族化合物方面发挥作用。另外,海神单胞菌属具有完整的糖酵解和乙酸利用途径;普遍含有聚羟基脂肪酸酯的合成酶和降解酶基因,表明其具有潜在的合成聚羟基脂肪酸酯的能力。相关分析结果可以为海神单胞菌属的进一步代谢工程改造用于生产 PHA 提供参考。

参考文献:

- [1] HEDLUND B P, GEISELBRECHT A D, BAIR T J, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a new marine bacterium, *Neptunomonas naphthovorans* gen. nov., sp. nov. [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(1): 251–259.
- [2] PU N, LI W, LI Z J. Complete genome sequence of *Neptunomonas concharum* JCM17730^T: an acetate assimilating bacterium isolated from a dead ark clam[J]. Marine Genomics, 2020, 53: 100754.
- [3] LEE H W, SHIN N R, LEE J, et al. *Neptunomonas concharum* sp. nov., isolated from a dead ark clam, and emended description of the genus *Neptunomonas* [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62(Pt_11): 2657–2661.
- [4] MIYAZAKI M, NOGI Y, FUJIWARA Y, et al. *Neptunomonas japonica* sp. nov., an *Osedax japonicus* symbiont-like bacterium isolated from sediment adjacent to sperm whale carcasses off Kagoshima, Japan [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58(4): 866–871.
- [5] YANG S H, SEO H S, LEE J H, et al. *Neptunomonas acidivorans* sp. nov., isolated from sediment, and emended description of the genus *Neptunomonas* [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64(Pt_11): 3650–3654.
- [6] ZHANG X Y, ZHANG Y J, YU Y, et al. *Neptunomonas antarctica* sp. nov., isolated from marine sediment [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60(8): 1958–1961.
- [7] LIU A, ZHANG X Y, CHEN C X, et al. *Neptunomonas qingdaonensis* sp. nov., isolated from intertidal sand [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013, 63(Pt_5): 1673–1677.
- [8] CHEN W M, HSIEH T Y, SHEU S Y. *Neptunomonas marina* sp. nov., isolated from seawater [J]. Archives of Microbiology, 2019, 201(8): 1053–1060.
- [9] FROMMLET J, GUIMARÃES B, SOUSA L, et al. *Neptunomonas phycophila* sp. nov. isolated from a culture of *Symbiodinium* sp., a dinoflagellate symbiont of the sea anemone *Aiptasia tagetes* [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(Pt_3): 915–919.
- [10] RONG J C, LIU M, LI Y, et al. Insight into the genome sequence of a sediment-adapted marine bacterium *Neptunomonas antarctica* S3–22^T from Antarctica [J]. Marine Genomics, 2016, 25: 29–31.
- [11] 厉舒祯, 邓晔, 张照婧, 等. 生物降解芳香族化合物的分子检测技术研究进展 [J]. 中国环境科学, 2019, 39(6): 2577–2587.
- [12] LI S Z, DENG Y, ZHANG Z J, et al. Advances in molecular detection on aromatic bioremediation [J]. China Environmental Science, 2019, 39(6): 2577–2587. (in Chinese)
- [13] LI J L, CHEN B H. Effect of nonionic surfactants on biodegradation of phenanthrene by a marine bacteria of *Neptunomonas naphthovorans* [J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 162(1): 66–73.
- [14] LI J L, BAI R. Effect of a commercial alcohol ethoxylate surfactant (C_{11–15}E₇) on biodegradation of phenanthrene in a saline water medium by *Neptunomonas naphthovorans* [J]. Biodegradation, 2005, 16(1): 57–65.
- [15] LIU X J, ZHANG J, HONG P H, et al. Microbial pro-

- duction and characterization of poly-3-hydroxybutyrate by *Neptunomonas antarctica*[J]. PeerJ, 2016, 4: e2291.
- [15] PU N, HU P, SHI L L, et al. Microbial production of poly(3-hydroxybutyrate) from volatile fatty acids using the marine bacterium *Neptunomonas concharum*[J]. Biore-source Technology Reports, 2020, 11: 100439.
- [16] 杨昊. 代谢工程大肠杆菌利用乙酸合成丙酮与异丙醇的途径优化[D]. 上海: 华东理工大学, 2019.
- YANG H. Optimization of the synthesis pathway of acetone and isopropanol from acetate by metabolically engineered *Escherichia coli*[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2019. (in Chinese)
- [17] 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[J]. Reproduction, Fertility and Development, 2019, 31(1): 165.
- [18] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870–1874.
- [19] LEE I, KIM Y O, PARK S C, et al. OrthoANI: an improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(2): 1100–1103.
- [20] KILPI S, BACKSTRÖM V, KORHOLA M. Degradation of catechol, methylcatechols and chlorocatechols by *Pseudomonas* sp. HV3[J]. FEMS Microbiology Letters, 1983, 18(1–2): 1–5.
- [21] 黄勇. 细菌好氧降解多环芳烃上游途径基因多样性研究[D]. 北京: 清华大学, 2015.
- HUANG Y. Diversity and organization of genes involved in the upper pathway of PAHs degradation[D]. Beijing: Tsinghua University, 2015. (in Chinese)
- [22] PU N, WANG M R, LI Z J. Characterization of polyhydroxyalkanoate synthases from the marine bacterium *Neptunomonas concharum* JCM17730[J]. Journal of Biotechnology, 2020, 319: 69–73.
- [23] LI Z J, SHI Z Y, JIAN J, et al. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) from unrelated carbon sources by metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. Metabolic Engineering, 2010, 12(4): 352–359.
- [24] ZOU H B, SHI M X, ZHANG T T, et al. Natural and engineered polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase: key enzyme in biopolyester production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101: 7417–7426.
- [25] 王梦汝, 席威, 李正军. 海生杆菌属的基因组测序数据分析[J]. 生物工程学报, 2020, 36(12): 2695–2706.
- WANG M R, XI W, LI Z J. Analysis of the genome sequencing data of the *Marinobacterium* genus[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2020, 36(12): 2695–2706. (in Chinese)

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

WANG MengRu GU JiaYi WANG YaXin LI ZhengJun*

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

Abstract: *Neptunomonas* genus was identified for the first time in 1999. At present, a total of eight species have been discovered, and six of them have completed whole genome sequencing. This paper summarizes the phenotypic characteristics and genomic information of the *Neptunomonas* genus, and analyzes the carbon source utilization pathway, polyhydroxyalkanoate metabolism pathway and aromatic compound degradation pathway by using genomic sequencing data. It was found that the *Neptunomonas* genus has a complete glycolysis and acetic acid utilization pathway, generally contains type I and type III polyhydroxyalkanoate synthase, and there is a degradation pathway for aromatic compounds. The results of genome sequencing data analysis can provide a theoretical basis for the application of *Neptunomonas* genus in the synthesis of polyhydroxyalkanoate and environmental protection.

Key words: *Neptunomonas* genus; genome sequencing; polyhydroxyalkanoate; aromatic compounds

(责任编辑: 于少云)