

研究报告

微泡菌属菌株 YPW1 和 YPW16 多糖降解特性分析

田春苗^{#1}, 龙思琪^{#2}, 王健鑫^{1,2}, 汪江琦³, 王定全⁴, 周圣凯², 朱尚宁², 曲武^{*1,2}

1 浙江海洋大学比萨海洋研究生学院, 浙江 舟山 316022

2 浙江海洋大学海洋科学与技术学院, 浙江 舟山 316022

3 温州市沙城高级中学, 浙江 温州 325000

4 无锡药明生物技术股份有限公司, 浙江 杭州 310000

田春苗, 龙思琪, 王健鑫, 汪江琦, 王定全, 周圣凯, 朱尚宁, 曲武. 微泡菌属菌株 YPW1 和 YPW16 多糖降解特性分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(9): 3747-3770.

TIAN Chunmiao, LONG Siqi, WANG Jianxin, WANG Jiangqi, WANG Dingquan, ZHOU Shengkai, ZHU Shangning, QU Wu. Characterization of genes involved in polysaccharide degradation by *Microbulbifer* sp. YPW1 and YPW16[J]. Microbiology China, 2023, 50(9): 3747-3770.

摘要: 【背景】海洋环境中分离到的微泡菌属菌株具有多糖降解能力, 在环境中可以作为糖类代谢的重要执行者参与海洋碳循环过程。【目的】测定 2 株微泡菌属菌株的多糖降解活性, 通过与微泡菌属其他菌株基因组比较分析 2 株菌的多糖降解基因特征。【方法】通过 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)定糖法测定多糖降解活性, 同时利用高通量测序技术对菌株基因组序列进行测定与组装, 并与其他基因组注释结果进行比较分析。【结果】分离得到 2 株微泡菌属菌株 YPW1 和 YPW16, 二者均为潜在新种。结果表明, 菌株 YPW1 能够降解琼胶、褐藻胶、果胶、几丁质、木聚糖、淀粉、普鲁兰等 7 种多糖, 而菌株 YPW16 仅可降解淀粉和普鲁兰。基因组分析表明, YPW1 具有上述 7 种多糖的降解酶基因, 但菌株 YPW16 只具有淀粉酶与普鲁兰酶降解基因。相较于其他微泡菌属菌株, 菌株 YPW1 多糖降解范围、多糖降解酶基因种类与丰度较高, 但菌株 YPW16 多糖降解范围却较为狭窄。由此可知, 多糖降解酶基因在微泡菌属基因组中的分布差异性较大。【结论】本研究为微泡菌属提供了 2 株潜在的新型菌株资源, 为生物多糖降解提供了生化工具, 也为研究微泡菌属菌株中多糖降解基因分布与相关菌属的生态功能奠定基础。

关键词: 微泡菌属; 多糖降解; 最适条件; 基因组

资助项目: 浙江省“尖兵”“领雁”研发攻关计划(2022C02040); 浙江省自然科学基金(LQ22D060004); 浙江省教育厅一般科研项目(Y202147737); 舟山市科技局项目(2022C13048); 大学生创新创业训练项目(202210340013)

[#]对本文贡献相同

This work was supported by the “Pioneer” and “Leading Goose” Research and Development Program of Zhejiang Province (2022C02040), the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LQ22D060004), the Scientific Research Fund of Zhejiang Provincial Education Department (Y202147737), the Project of Zhoushan Science and Technology Bureau (2022C13048), and the College Students’ Innovative Entrepreneurial Training Program (202210340013).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: quwu2165@zjou.edu.cn

Received: 2023-01-02; Accepted: 2023-02-08; Published online: 2023-04-28

Characterization of genes involved in polysaccharide degradation by *Microbulbifer* sp. YPW1 and YPW16

TIAN Chunmiao^{#1}, LONG Siqu^{#2}, WANG Jianxin^{1,2}, WANG Jiangqi³, WANG Dingquan⁴, ZHOU Shengkai², ZHU Shangning², QU Wu^{*1,2}

1 Pisa Marine Graduate School, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, Zhejiang, China

2 Marine Science and Technology College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, Zhejiang, China

3 Wenzhou Shacheng High School, Wenzhou 325000, Zhejiang, China

4 Wuxi Biologics, Hangzhou 310000, Zhejiang, China

Abstract: [Background] *Microbulbifer* species isolated from the marine environments have the ability to degrade polysaccharides. They participate in the marine carbon cycle as an important player of carbohydrate metabolism in the environment. [Objective] To analyze the polysaccharide-degrading activities and genomics information of two *Microbulbifer* strains. [Methods] The 3,5-dinitrosalicylic acid colorimetry (DNS method) was employed to determine the polysaccharide-degrading activity. High-throughput sequencing was performed to sequence and assemble the genome sequence of the strains. [Results] Two strains of *Microbulbifer* species, namely YPW1 and YPW16, were isolated in this work, both of which were potential new species. YPW1 degraded 7 polysaccharides (agar, alginate, pectin, chitin, xylan, starch, and pullulan), while YPW16 only degraded starch and pullulan, with the activity lower than YPW1 under the experimental conditions. The genome comparison with other *Microbulbifer* strains showed that YPW1 had a wider polysaccharide degradation range due to its abundant genes for polysaccharide degradation. However, the polysaccharide degradation range of YPW16 was narrower. Moreover, the genes involved in polysaccharide degradation presented uneven distribution in the genomes of *Microbulbifer* species. [Conclusion] This study provided two potential new strain resources of *Microbulbifer* and a biological tool for polysaccharide degradation, laying a foundation for studying the distribution of polysaccharide degradation genes and the ecological functions of *Microbulbifer*.

Keywords: *Microbulbifer*; polysaccharide degradation; optimized conditions; genome

微泡菌属(*Microbulbifer*)广泛分布于海洋及其相关环境中,如红树林^[1]、海洋藻类^[2]、深海沉积物^[3]等。近年来的研究表明,微泡菌属菌株在许多方面具有重要的应用潜力。例如, *M. hydrolyticus* IRE-31 可以降解以低密度聚乙烯为主要成分的塑料^[4];从 *Microbulbifer* sp. DC3-6 发酵液中可以提取到 3 种新型烷酰基咪唑化合物,这些化合物对于革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌、真菌、P388 小鼠白血病细胞均具

有抑制效应^[5]。由此可见,微泡菌属菌株在海洋污染修复、活性物质提取等方面具有一定的应用价值。

微泡菌属菌株的多糖降解能力同样引人注目。例如,在 *M. degradans* 2-40、*Microbulbifer* sp. 6532A 和 *Microbulbifer* sp. JAMB-A7 等菌株中分别发现了降解几丁质^[6]、褐藻胶^[7]和琼胶^[3]的相关酶基因,因此在相关寡糖生产方面具有一定的工业应用价值。此外,一些微泡菌属菌株还

具有多种多糖降解能力。如 *M. mangrovi* DD-13 菌株能够同时降解包括琼胶、褐藻胶、卡拉胶、几丁质、木聚糖、普鲁兰、纤维素、淀粉、果胶在内的多种多糖^[1]。由此可见, 一些微泡菌属菌株是相关环境中的多糖代谢及碳循环重要的潜在参与者。

近年来, 由于测序成本的不断下降, 基因组分析已经成为揭示菌株代谢特征的重要手段^[8-9], 同时也是研究细菌分类、进化的关键依据^[10-12]。本研究旨在测定 2 株微泡菌属菌株的多糖降解能力与最适降解条件, 基于多糖降解基因序列、家族、数量等信息揭示二者的多糖降解特征, 为微泡菌属菌株在多糖代谢利用及碳循环角色方面的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

本试验用于菌株分离培养的沉积物采集自浙江省温州市苍南县沿浦湾红树林(27.5°N, 120.3°E)。使用无菌药勺取红树林中心位置沉积物约 50 g, 置于 50 mL 无菌离心管中。将离心管置于冰上保存, 待运输回实验室后放置于 4 °C 冰箱中保存, 并在一周内完成分离培养工作, 以防止样品变质。

1.1.2 培养基

本试验分离、培养菌株所用培养基分别为 2216E 固体和液体培养基。2216E 液体培养基(g/L): 蛋白胨 5.00, 酵母膏 1.00, 磷酸高铁 0.01, 陈海水配制, 调节 pH 值至 7.2–7.4。在 2216E 液体培养基中加入 15.0 g/L 琼脂即 2216E 固体培养基。上述培养基于 121 °C 灭菌 20 min 后使用。

1.1.3 主要试剂和仪器

蛋白胨、琼脂、磷酸高铁、酵母膏、NaCl、Na₂HPO₄, 中国医药集团有限公司; 细

菌基因组 DNA 提取试剂盒 TIANamp Bacteria DNA Kit, 天根生物科技有限责任公司; PCR 所用试剂 *Ex Taq*[®], TaKaRa 公司; 琼脂糖, Biowest 公司; SQK-LSK109 Ligation Sequencing Kit, Oxford Nanopore 公司。GridION 测序仪, Oxford Nanopore 公司; Illumina MiSeq 测序仪, Illumina 公司; 恒温培养箱、恒温水浴锅, 上海一恒科学仪器有限公司; 酶标仪, Bio-Rad 公司; 水平电泳仪, 北京六一生物技术有限公司; 超微量分光光度计(NanoDrop 2000), 赛默飞世尔科技公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株分离、培养和纯化

使用无菌海水将沉积物样品梯度稀释至 10⁻⁶, 随后涂布于 2216E 固体平板上, 于 28 °C 中倒置培养 24 h。挑取菌落在新 2216E 固体平板划线纯化 2 次, 将纯化后的单菌落接种于 2216E 液体培养基中, 28 °C、200 r/min 培养 24 h。最后, 将菌液保存于终浓度为 20% 的无菌甘油中, 置于 -80 °C 超低温冰箱中长期保存。

1.2.2 菌株 16S rRNA 基因鉴定

使用 TIANamp Bacteria DNA Kit 提取菌株基因组 DNA, 提取过程严格按照该试剂盒说明书进行。利用 1% (质量体积分数) 琼脂糖电泳(电压 90 V, 电泳时间 45 min)和 NanoDrop 2000 测定基因组 DNA 的完整性与纯度, 从而评估提取效果。使用 *Ex Taq*[®] 对基因组中的 16S rRNA 基因进行扩增。使用 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') 和 1492R (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 对目标序列进行扩增, PCR 反应体系和反应条件参照文献[13-14]进行。将 PCR 产物送往上海美吉生物有限公司进行序列测定, 并将获得的序列在 EzBioCloud 数据库(<https://www.ezbiocloud.net/>)中进行比对, 将最佳比对结果作为该菌株

的鉴定结果。

1.2.3 菌株多糖降解活性及最适条件测定

将目标菌株在 28 °C、200 r/min 培养 24 h, 随后 4 °C、5 000 r/min 离心 15 min, 取上清液备用。将包括琼胶、褐藻胶、木聚糖、淀粉、普鲁兰、几丁质、果胶在内的多糖制备成 1% (质量体积分数) 溶液, 取上述上清液 1 mL 分别与 9 mL 不同的多糖溶液混匀, 置于 28 °C 反应 24 h。将 250 µL 反应液与等体积 3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitro-2-hydroxybenzoic acid, DNS)^[15] 溶液混合, 100 °C 加热 10 min 后置于冰上冷却 5 min。依据文献[16]测定溶液在 550 nm 波长下的吸光值, 以此反映多糖经酶液降解后生成还原糖的量, 并评估菌株对不同多糖的降解能力。将上述反应液置于不同温度(10–70 °C)反应 24 h, 并按照上述方式测定吸光值, 确定最适反应温度。使用不同 pH 缓冲液(pH 2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 和 8.0 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液, pH 9.0、9.5 和 10.0 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液)配制上述多糖溶液, 并按照上述方法测定吸光值, 确定最适反应 pH。

1.2.4 菌株基因组序列测定与分析

利用 SQK-LSK109 Ligation Sequencing Kit 构建测序文库, 随后在 GridION 三代测序平台上进行序列测定。此外, 利用 Illumina MiSeq 二代平台进行序列测定并用于三代测序序列矫正。测序过程由北京百迈客公司依据标准流程

执行。序列组装由 Unicycler 软件执行。使用 Prodigal、Aragorn、Barrnap 和 Infernal 软件分别对基因组序列中的编码基因、tRNA 基因、rRNA 和 mRNA 基因进行预测。通过 COG (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)、KEGG (<https://www.kegg.jp/>)、CAZy (<http://www.cazy.org/>)、NCBI NR (<https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/FASTA/nr>) 和 dbCAN (<http://csbl.bmb.uga.edu/dbCAN/annotate.php>) 数据库对基因组中的基因功能进行注释。利用 <https://www.ezbiocloud.net/tools/ani> 和 https://tygs.dsmz.de/user_requests/new 网站分别对基因组的平均核苷酸相似性(average nucleotide identity, ANI)和 DNA-DNA 杂交(DNA-DNA hybridization, DDH)指数进行计算。

1.2.5 微泡菌属菌株系统进化及多糖降解酶比较分析

选择 NCBI Genome 和 Assembly 数据库中所有已报道的微泡菌属菌株基因组, 共下载 48 个基因组(包括 2 株目标菌株), 具体菌株及基因组信息请见表 1。基因组分析方法与 1.2.4 部分保持一致, 从中选出琼胶酶、几丁质酶、果胶裂解酶、褐藻胶裂解酶、普鲁兰酶、淀粉酶、木聚糖酶等与多糖降解相关的酶基因, 并统计上述基因的数量及 CAZy 家族信息。使用 ContEst16S (<https://www.ezbiocloud.net/tools/contest16s>) 提取基因组中完整的 16S rRNA 基因序列。利用 MEGA 5.0 软件使用邻接(neighbor-joining, NJ)法对菌株中提取到的完整

表 1 微泡菌属菌株基因组信息

Table 1 The genome information of *Microbulbifer* species

菌株 Strain	GenBank 登录号 GenBank accession No.	分离来源 Isolation source	基因组大小 Genome size (Mb)
YPW1	CP055157.1	红树林 Mangrove	4.58
YPW16	CP089928.1	红树林 Mangrove	4.20
KCTC12973	CP087715.1	黄海 Yellow sea	4.35
IRE-31	CP047491.1	黑液 Black liquor sample	4.21

(待续)

(续表 1)

菌株 Strain	GenBank 登录号 GenBank accession No.	分离来源 Isolation source	基因组大小 Genome size (Mb)
CCB-MM1	CP014143.1	红树林 Mangrove	3.86
DAU221	CP014864.1	海水 Seawater	3.94
GP101	CP019650.1	海水 Seawater	4.26
DSM6810	CP088953.1	海水 Seawater	4.13
ATCC700307	AQYJ00000000.1	海藻 Marine alga	4.84
WRN-8	LRFG00000000.2	黄海 Yellow sea sediment	3.64
CGMCC1.10657	FNQO00000000.1	NA	3.98
CGMCC1.10658	FNFH00000000.1	NA	3.67
CGMCC1.7063	FQVA00000000.1	东海 East China sea	4.31
HB161719	VANI00000000.1	海岸沙滩 Coastal sand	4.67
CECT8799	JACHWZ000000000.1	根际 Rhizosphere	5.35
NBU-8HK146	JACZCR000000000.1	红树林 Mangrove	4.72
LMG26125	JACZFR000000000.1	海岸土壤 Coastal soil	4.82
DD-13	LZDE00000000.1	红树林 Mangrove	4.51
LD25	PREV00000000.1	热泉 Hot spring	4.27
SN0-2	JA EKJR000000000.1	近岸沉积物 Offshore sediment	3.98
SCSIO43006	CP092418.1	丛生棘杯珊瑚 <i>Galaxea fascicularis</i>	4.86
A4B17	CP029064.1	港口海水 Harbor seawater	5.04
GL-2	AP019807.1	海鱼肠道 Marine fish intestine	4.95
SH-1	CP046948.1	海岸土壤 Coastal soil	4.69
THAF38	CP045369.1	珊瑚碎片 Coral fragment	4.79
ALW1	CP047569.1	海带 <i>Laminaria japonica</i>	4.69
DSM11525	JACHHR000000000.1	NA	4.19
DSM19189	FOKT00000000.1	海湾 Gulf	3.93
SaN0-4	JAIVKJ000000000.1	红树林 Mangrove	4.24
PORT2	JACASI000000000.1	海水 Seawater	4.16
KCTC12793	JAKJXI000000000.1	海盐场 Marine solar saltern	4.29
DP3N0-2	JAIUZM000000000.1	浅海 Shallow sea	3.89
DP4N21-6	JAHVKO000000000.1	浅海 Shallow sea	4.12
DP3N7-3	JAHVKG000000000.1	浅海 Shallow sea	4.16
DP5N0-1	JAIUZG000000000.1	浅海 Shallow sea	4.06
S89	AFPJ00000000.1	海水 Seawater	3.86
SaN7-12	AFPJ00000000.1	红树林 Mangrove	4.81
Q7	LROY00000000.1	海参 Sea cucumber	3.95
HZ11	JELR00000000.1	海水 Seawater	4.22
ZGT114	LQBR00000000.1	盐-海交界面 Brine-seawater interface	3.64
CAU1566	JELR00000000.1	土壤 Soil	4.41
TT30	JAJS AO000000000.1	沉积物 Sediment	4.13
L3	JAJS AQ000000000.1	沉积物 Sediment	3.66
TT37	JAJS AP000000000.1	沉积物 Sediment	3.85
SaN0-8	JAIVKK000000000.1	红树林 Mangrove	4.80
GXH0434	JELR00000000.1	根际土壤 Rhizospheric soil	4.99
OS29	JALBWM000000000.1	地层沉积物 Bottom sediments	5.00

NA: 在公开数据库中未显示菌株来源

NA: The source of the strain is not available in the public database.

16S rRNA 基因序列及多糖降解酶蛋白质序列构建系统发育树, bootstrap 值设置为 1 000。

2 结果与分析

2.1 细菌分子生物学鉴定

在分离得到的菌株中获得 2 株属于微泡菌属的目标菌株, 分别命名为 YPW1 和 YPW16。在基因组中提取完整 16S rRNA 基因序列并进行比对, YPW1 (GenBank 登录号为 OQ826493) 和 YPW16 (GenBank 登录号为 OQ826495) 的 16S rRNA 基因分别与 *M. mangrovi* DD-13 (98.63%) 和 *M. hydrolyticus* DSM 11525 (97.74%) 具有最大相似性。因此, 将菌株 YPW1 和 YPW16 鉴定为微泡菌属菌株。此外, 基于基因组序列计算得到 YPW1 和 YPW16 最大 ANI 指数分别为 89.02% 和 74.46%, 最大 DDH 指数分别为 36.8 和 24.4, 均低于对应的新种阈值(ANI<95%–96%; DDH<70%)。结合 16S rRNA 基因相似度、ANI 和 DDH 结果可知, YPW1 和 YPW16 是微泡菌属 2 株潜在的新种, 即 *Microbulbifer* sp. YPW1 和 *Microbulbifer* sp. YPW16。

2.2 菌株 YPW1 和 YPW16 的系统发育树

基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树表明, YPW1 与 *M. mangrovi* DD-13 具有最近的遗传距离, 而 YPW16 与 *Microbulbifer* sp. TT30 具有最近的遗传距离。基于基因组核心基因的典型株系统进化分析表明, YPW1 仍旧与 *M. mangrovi* DD-13 具有最近的遗传距离, YPW16 与 *M. yueqingensis* CGMCC 1.10658 具有最近的遗传距离(图 1)。

2.3 菌株 YPW1 和 YPW16 多糖降解活性分析

结果显示, 菌株 YPW1 的发酵液可以增加多糖溶液中还原糖的含量, 因此其具有琼胶、几丁质、淀粉、普鲁兰、果胶、木聚糖和褐藻

胶的降解活性(图 2)。但是菌株 YPW16 除了可以降解淀粉和普鲁兰外, 不具备其他多糖的降解功能。菌株 YPW1 发酵液中多糖降解酶的最适温度在 30–50 °C 范围内, 其中琼胶的最适降解温度最高(50 °C), 木聚糖的最适降解温度最低(30 °C); 其最适 pH 值在 6.0–8.0 范围内, 其中琼胶酶的最适 pH 值低(pH 6.0), 淀粉的最适 pH 值最高(pH 8.0) (表 2)。两株菌在淀粉和普鲁兰降解方面的最适温度与最适 pH 值较为相近, 但菌株 YPW16 的降解活性较低。

2.4 微泡菌属菌株多糖降解酶基因数量

所有已报道的微泡菌属菌株基因组中都注释到了多糖降解酶基因, 注释数量最多的为淀粉酶基因, 数量最少的为琼胶酶基因(图 3–9)。不同菌株基因组中存在的多糖降解酶的类型有较大差异。例如, *M. thermotolerans* DSM 19189 基因组中能够注释到琼胶酶基因(图 3)、几丁质酶基因(图 5)、果胶裂解酶基因(图 6)、普鲁兰酶基因(图 7)、木聚糖酶基因(图 8)和淀粉酶基因(图 9), 但未发现褐藻胶裂解酶基因(图 4); 再如, *Microbulbifer* sp. OS29 基因组中能够注释到普鲁兰酶基因(图 4)、几丁质酶基因(图 5)、果胶裂解酶基因(图 6)和淀粉酶基因(图 9), 但未发现琼胶酶基因(图 3)、果胶裂解酶基因(图 6)和木聚糖酶基因(图 8)。

菌株 YPW1 与微泡菌属其他菌株相比具有较为广泛的多糖降解潜力, 在其基因组中注释到了上述所有多糖的降解酶基因, 包括 1 条琼胶酶基因、3 条几丁质酶基因、3 条淀粉酶基因、1 条普鲁兰酶基因、5 条果胶裂解酶基因、3 条木聚糖酶基因和 2 条褐藻胶裂解酶基因, 这与其系统发育相近的菌株 *M. mangrovi* DD-13 相似(图 3–9)。但是, 菌株 YPW16 基因组中却只注释到了 3 条淀粉酶基因和 1 条普鲁兰酶基因, 其多糖降解范围较为狭窄, 这与 *Microbulbifer*

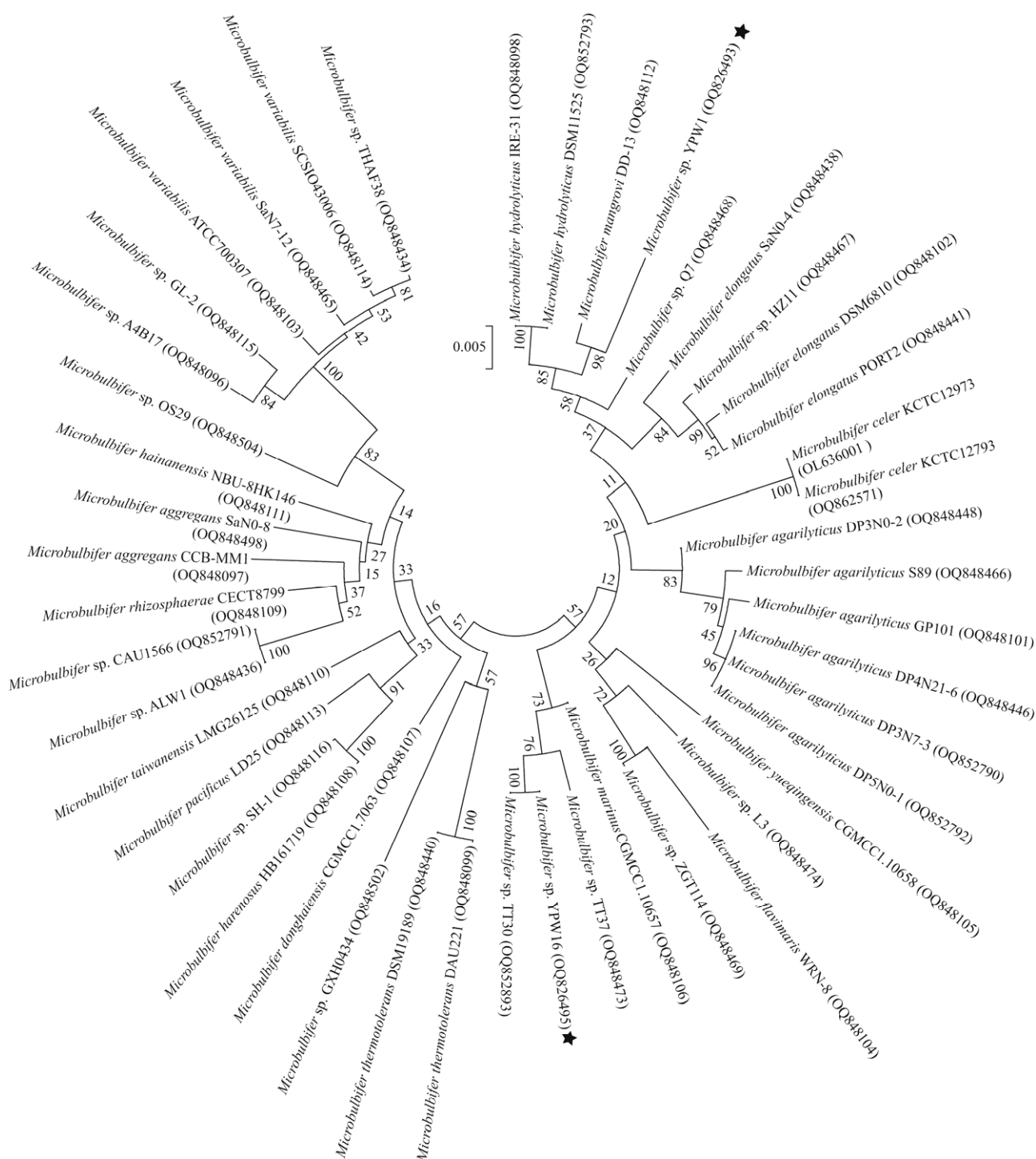


图1 菌株 YPW1 和 YPW16 基于 16S rRNA 基因构建的系统发育树 进化树的比例尺表示进化距离单位; 节点处的数值为 bootstrap 检验值; 实心五角星标出的为目标菌株. 下同

Figure 1 Phylogenetic analysis of YPW1 and YPW16 strains. The scale of the evolutionary tree indicated their evolutionary distance unit; The numerical value at the node was the bootstrap test values; The star indicated the target strains. The same below.

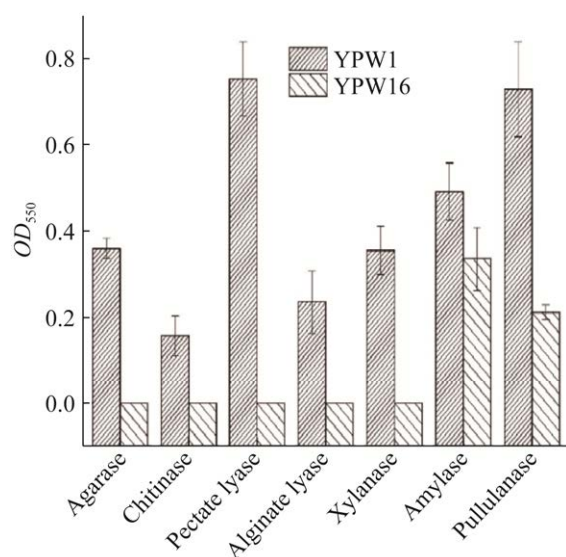


图2 菌株 YPW1 和 YPW16 多糖降解活性测定
Figure 2 The polysaccharide-degrading activities of YPW1 and YPW16 strains.

sp. TT30、*Microbulbifer* sp. TT37 等菌株较为相似(图 3–9)。

2.5 微泡菌属菌株多糖降解酶基因家族及系统发育分析

微泡菌属基因组中琼胶酶基因的数量相对较少(图 10),但具有丰富的褐藻胶裂解酶基因(图 11)、淀粉酶基因(图 12)、几丁质酶基因(图 13)、果胶裂解酶基因(图 14)、普鲁兰酶基因(图 15)和木聚糖酶基因(图 16)。在微泡菌属

基因组中注释到的琼胶酶基因属于 GH50 和 GH86 家族(图 10),褐藻胶裂解酶基因属于 PL6、PL17 和 PL38 家族(图 11),淀粉酶基因和普鲁兰酶基因均属于 GH13 家族(图 12、图 15),几丁质酶基因属于 GH18 和 GH19 家族(图 13),果胶裂解酶基因属于 PL1、PL3 和 PL10 家族(图 14),木聚糖酶基因属于 GH10 和 GH43 家族(图 16)。此外,微泡菌属多糖降解酶均基于各自的 CAZy 家族聚类,而非基于菌株来源聚类(图 10–16)。

3 讨论与结论

本研究通过纯培养手段从沿浦湾红树林沉积物中分离得到 2 株微泡菌属菌株,分别为 *Microbulbifer* sp. YPW1 和 *Microbulbifer* sp. YPW16。基于基因组 ANI 和 DDH 指数可知,菌株 YPW1 和 YPW16 是微泡菌属潜在的新种。经过降解试验可知,这 2 株菌对若干多糖具有降解作用,而降解产生的寡糖和单糖在生物医药^[17–18]、化妆品^[19]、能源^[19–20]等领域具有重要应用价值。除了工业价值,本研究获得的 2 株菌可以通过多糖降解,为周围菌株提供额外的可利用碳源,成为微生物互作网络中潜在的关键种^[21],具有较强的生态学价值。

表2 菌株 YPW1 和 YPW16 最适降解条件测定

Table 2 The optimum conditions of YPW1 and YPW16 strains

Item	YPW1		YPW16	
	Optimum temperature (°C)	Optimum pH	Optimum temperature (°C)	Optimum pH
Agarase	50	6.0	NA	NA
Chitinase	45	7.0	NA	NA
Pectate lyase	55	6.5	NA	NA
Alginate lyase	40	7.0	NA	NA
Xylanase	30	7.5	NA	NA
Amylase	35	8.0	30	7.0
Pullulanase	35	7.5	35	7.5

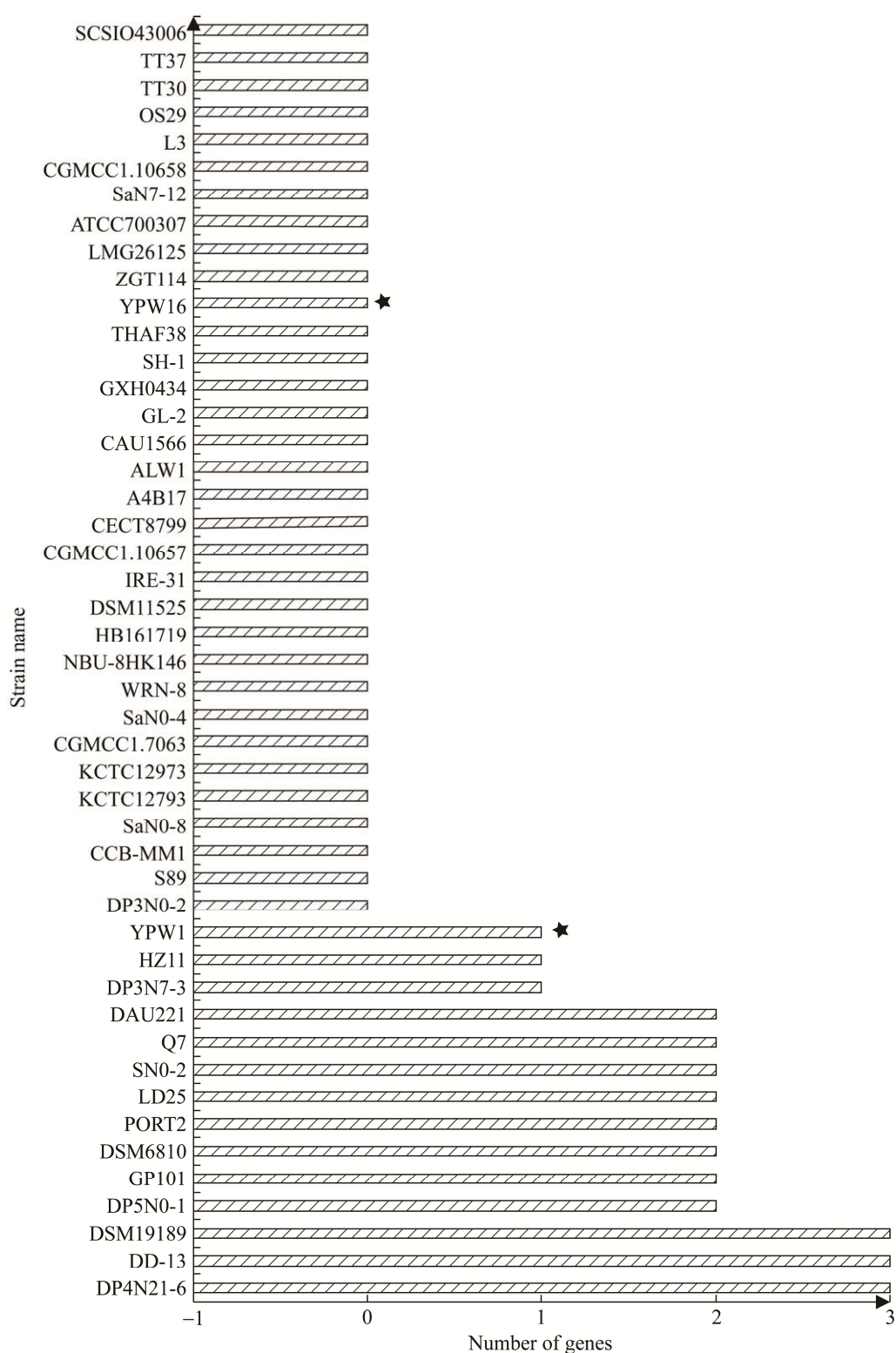


图 3 微泡菌属菌株基因组中琼胶酶基因数量统计分析

Figure 3 The number of agarase gene in the genomes of *Microbulbifer* species.

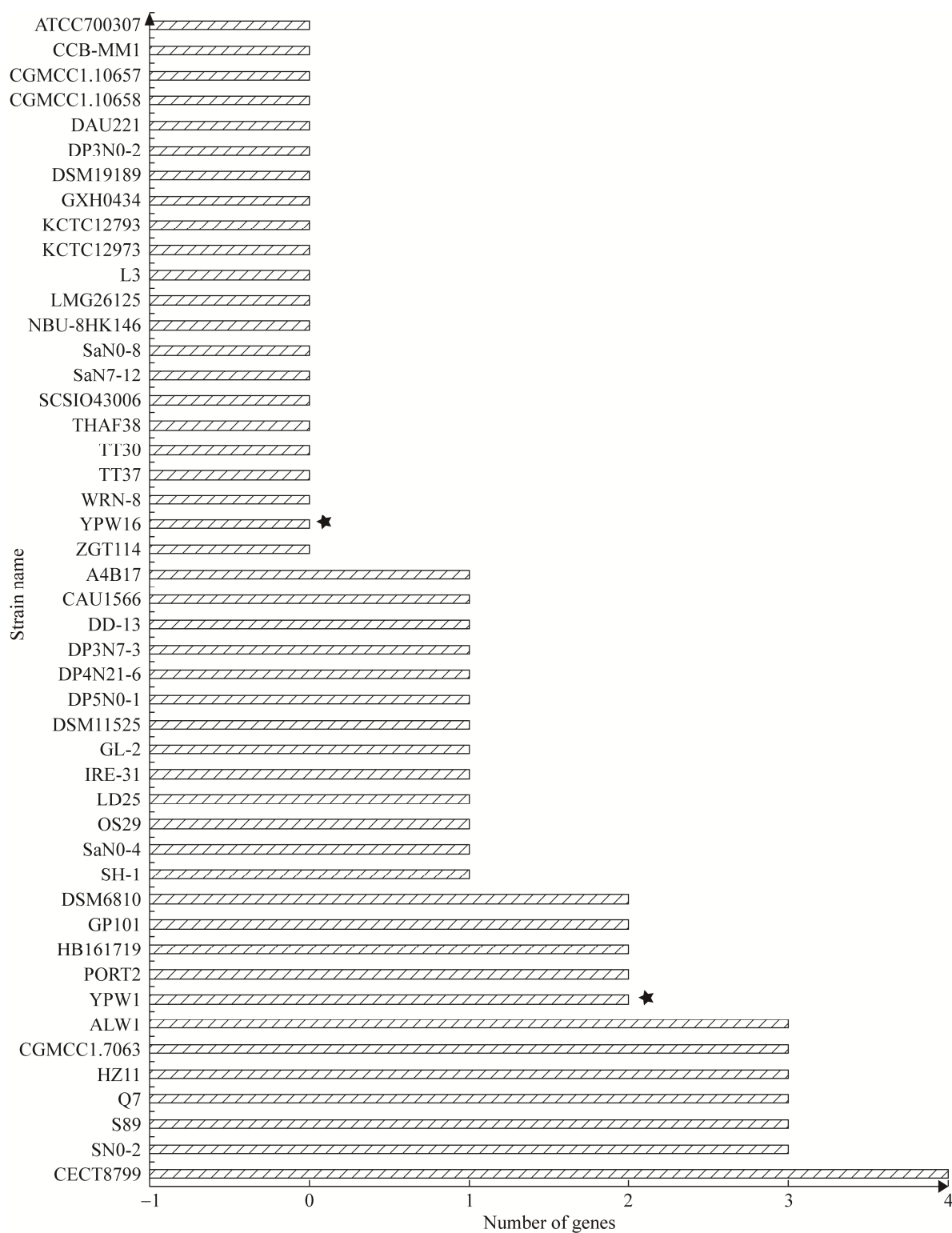


图 4 微泡菌属菌株基因组中褐藻胶裂解酶基因数量统计分析

Figure 4 The number of alginate lyase gene in the genomes of *Microbulbifer* species.

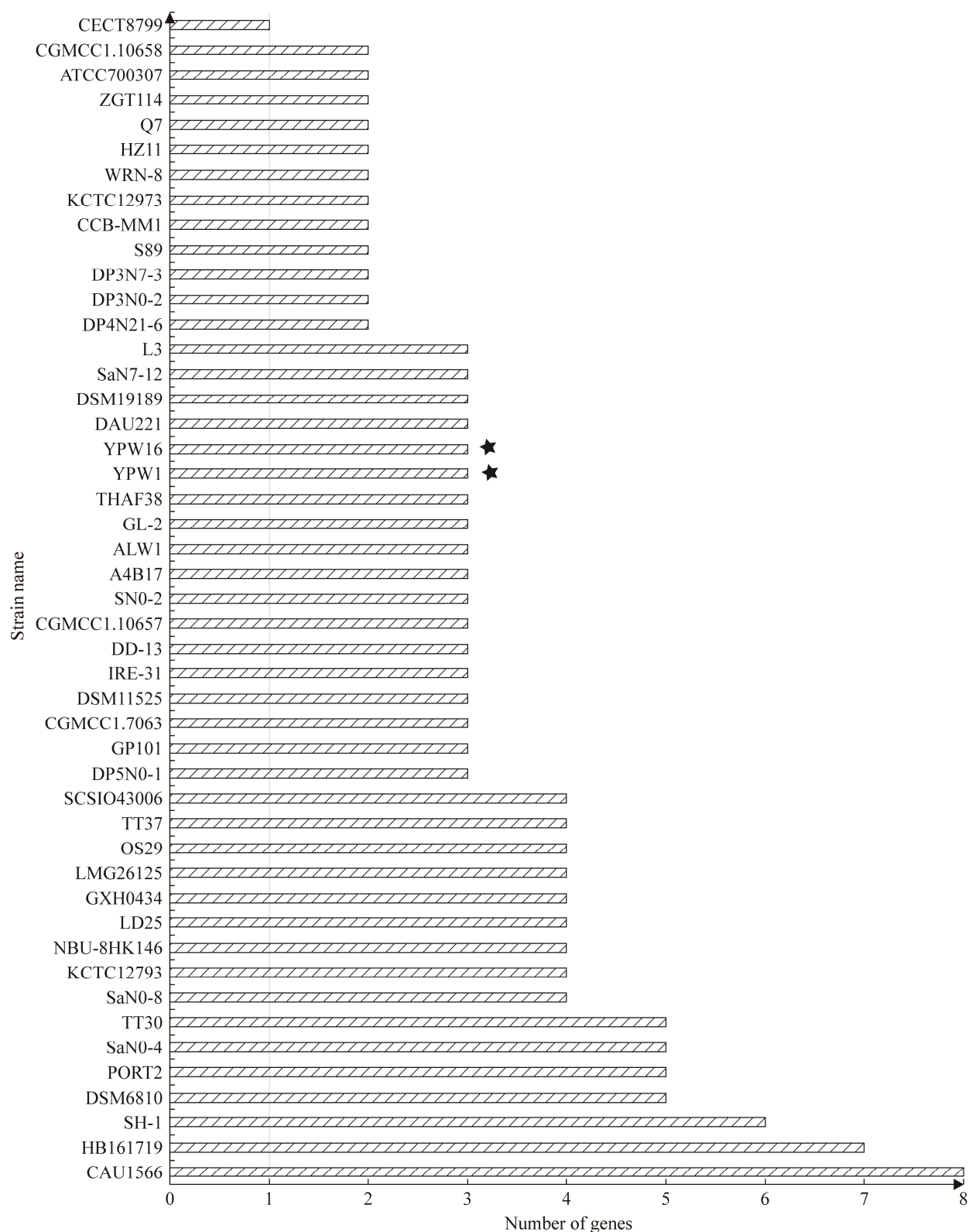


图 5 微泡菌属菌株基因组中几丁质酶基因数量统计分析

Figure 5 The number of chitinase gene in the genomes of *Microbulbifer* species.

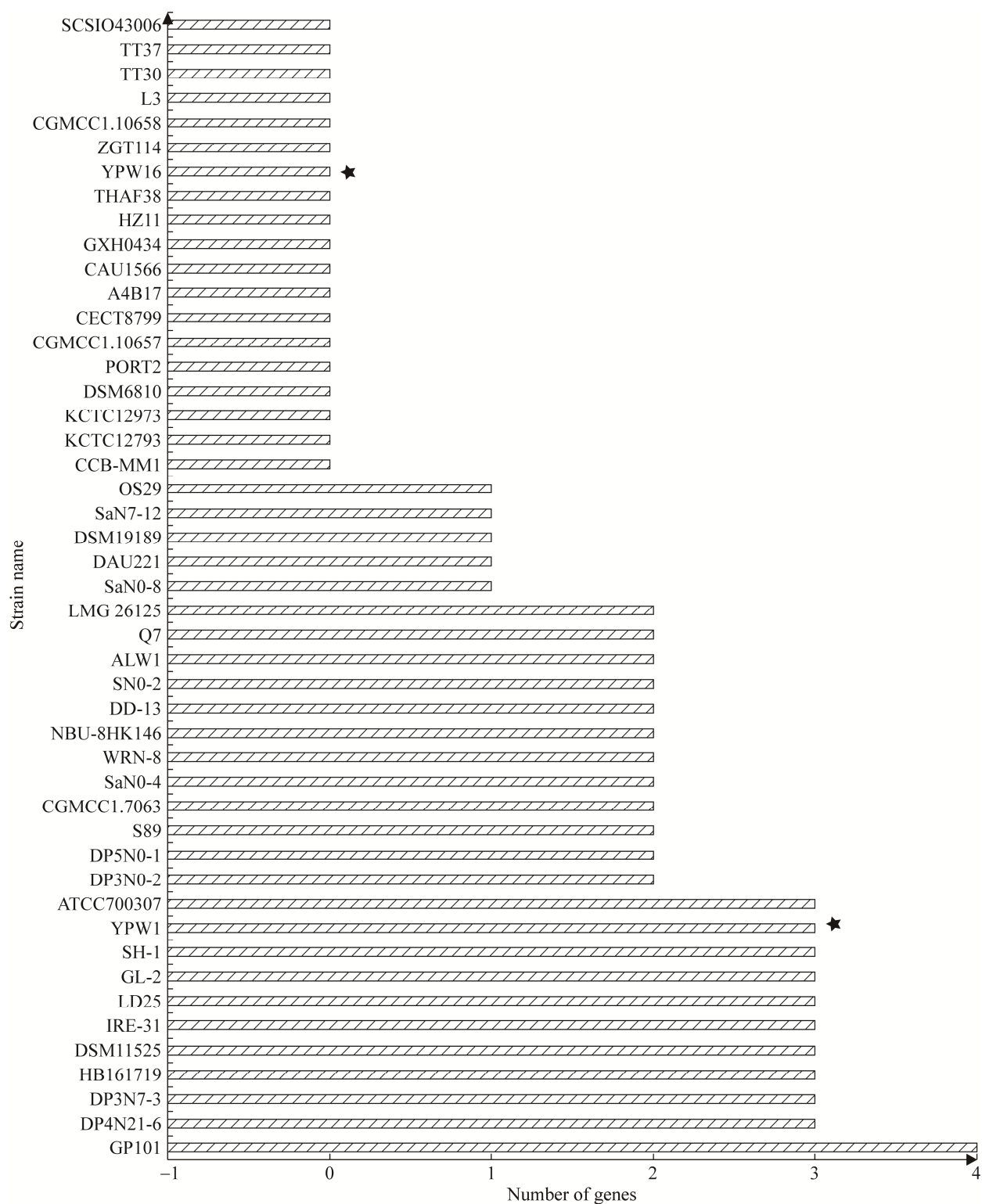


图 6 微泡菌属菌株基因组中果胶裂解酶基因数量统计分析

Figure 6 The number of pectate lyase gene in the genomes of *Microbulbifer* species.

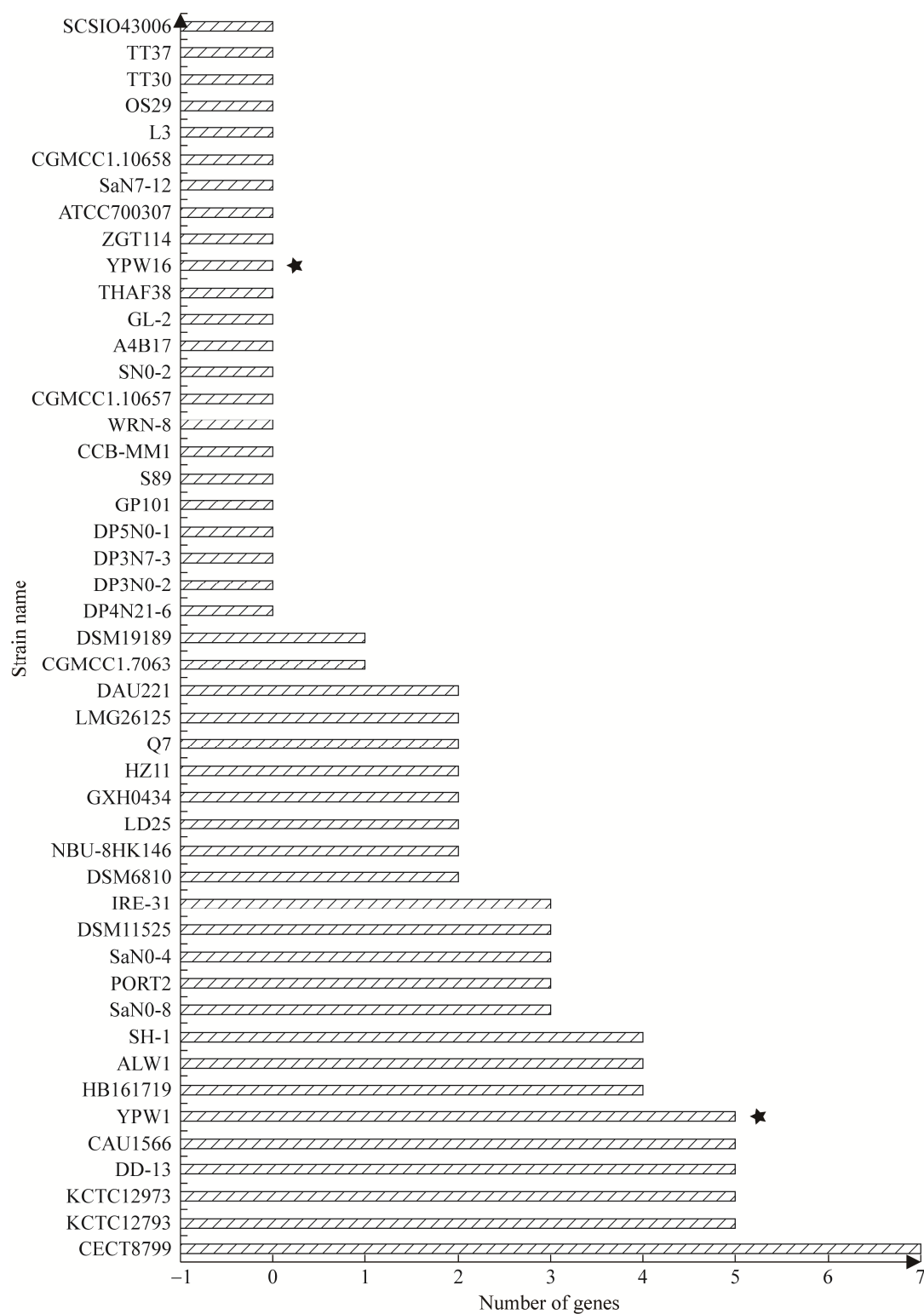


图 7 微泡菌属菌株基因组中普鲁兰酶基因数量统计分析

Figure 7 The number of pullulanase gene in the genomes of *Microbulbifer* species.

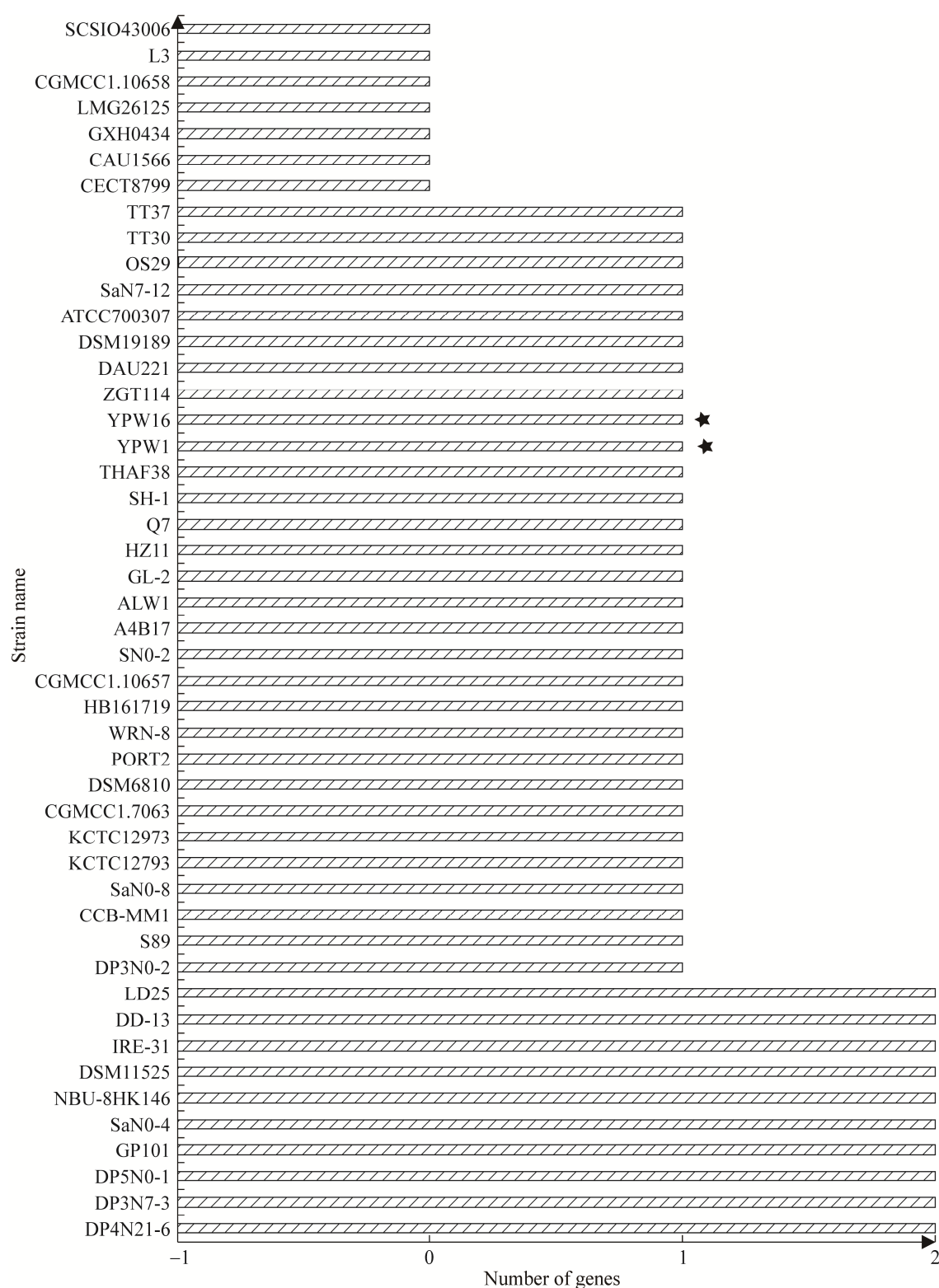


图 8 微泡菌属菌株基因组中木聚糖酶基因数量统计分析

Figure 8 The number of xylanase gene in the genomes of *Microbulbifer* species.

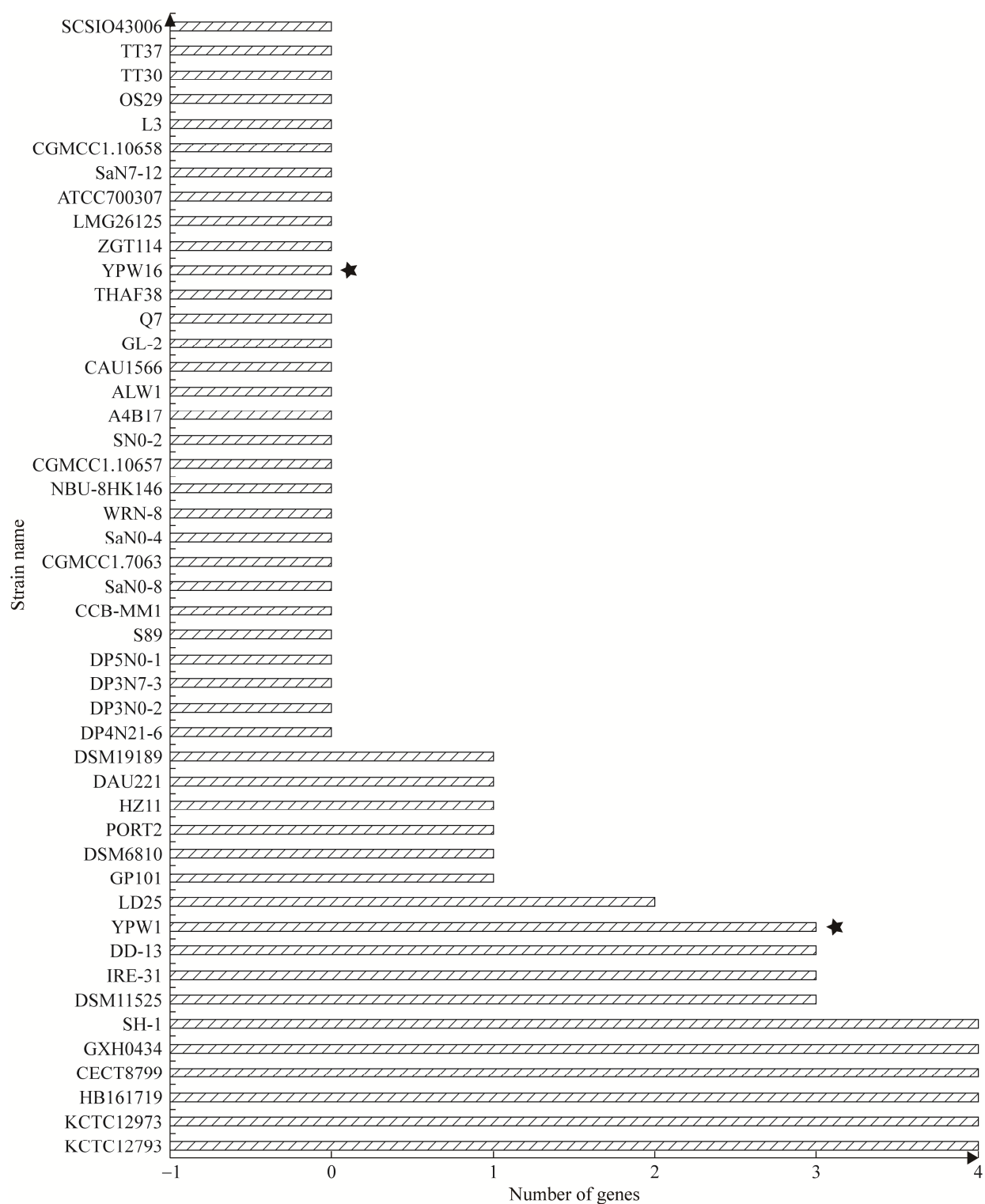


图 9 微泡菌属菌株基因组中淀粉酶基因数量统计

Figure 9 The number of amylase gene in the genomes of *Microbulbifer* species.

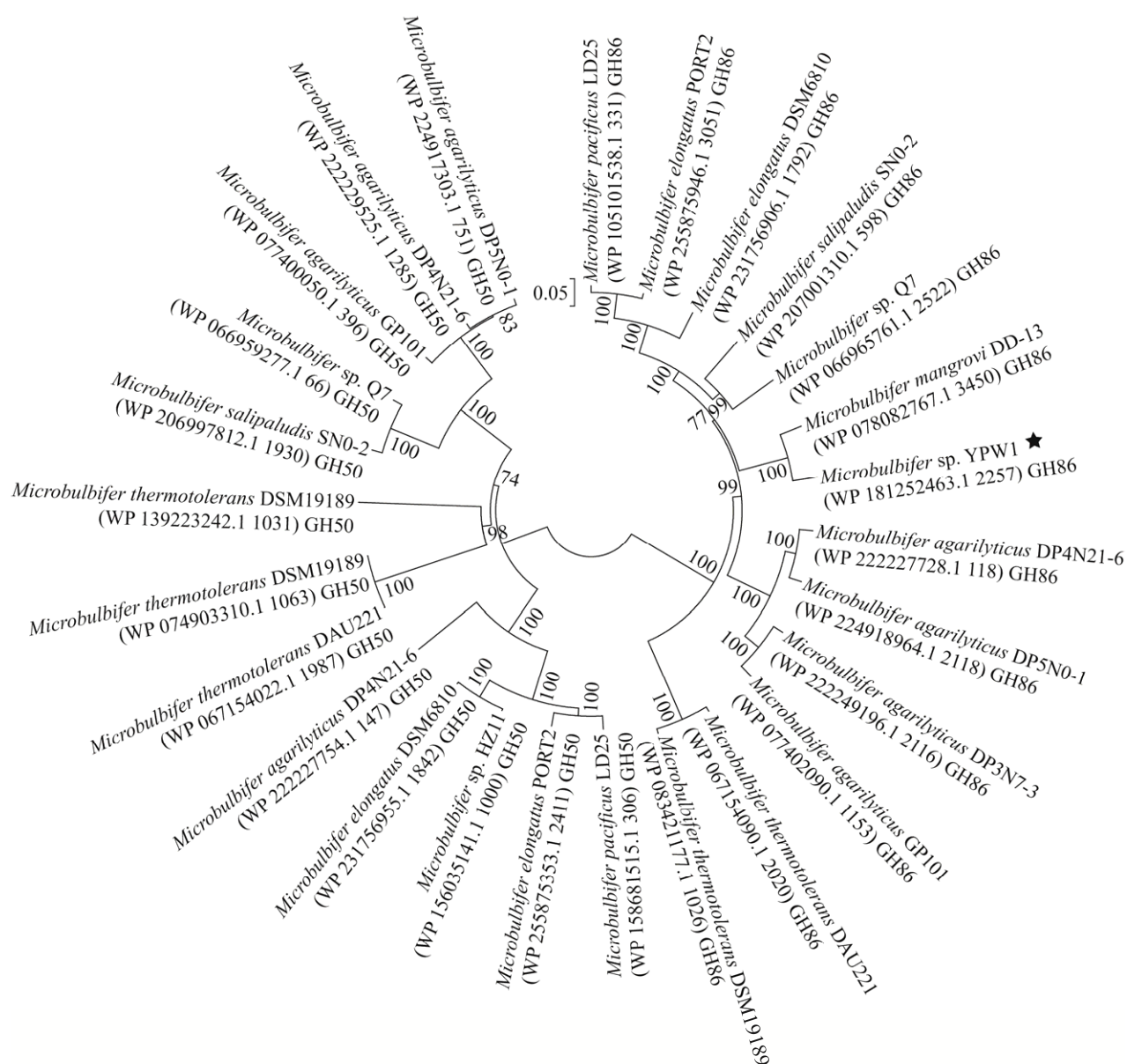


图 10 微泡菌属菌株基因组中琼胶酶基因系统发育分析 进化树的比例尺表示进化距离单位；节点处的数值为 bootstrap 检验值；括号中为菌株序列号；实心五角星标出的为目标菌株

Figure 10 The phylogenetic analysis of the agarase gene in the genomes of *Microbulbifer* species. The scale of the evolutionary tree indicated their evolutionary distance unit; The numerical value at the node was the bootstrap test values; The sequence number of the strain is in parentheses; The star indicated the target strains.

通过与其他菌株的比较和多糖降解试验结果可知，菌株 YPW1 和 YPW16 具有不同的多糖降解基因特征。菌株 YPW1 能够降解广泛类型的多糖，而菌株 YPW16 相较于微泡菌属的

一些其他菌株，其多糖降解范围狭窄，只能降解有限类型的多糖(如淀粉和普鲁兰)。这些特征说明相较于 YPW16，YPW1 在多糖降解、利用方面的应用及生态价值可能更高。此外，

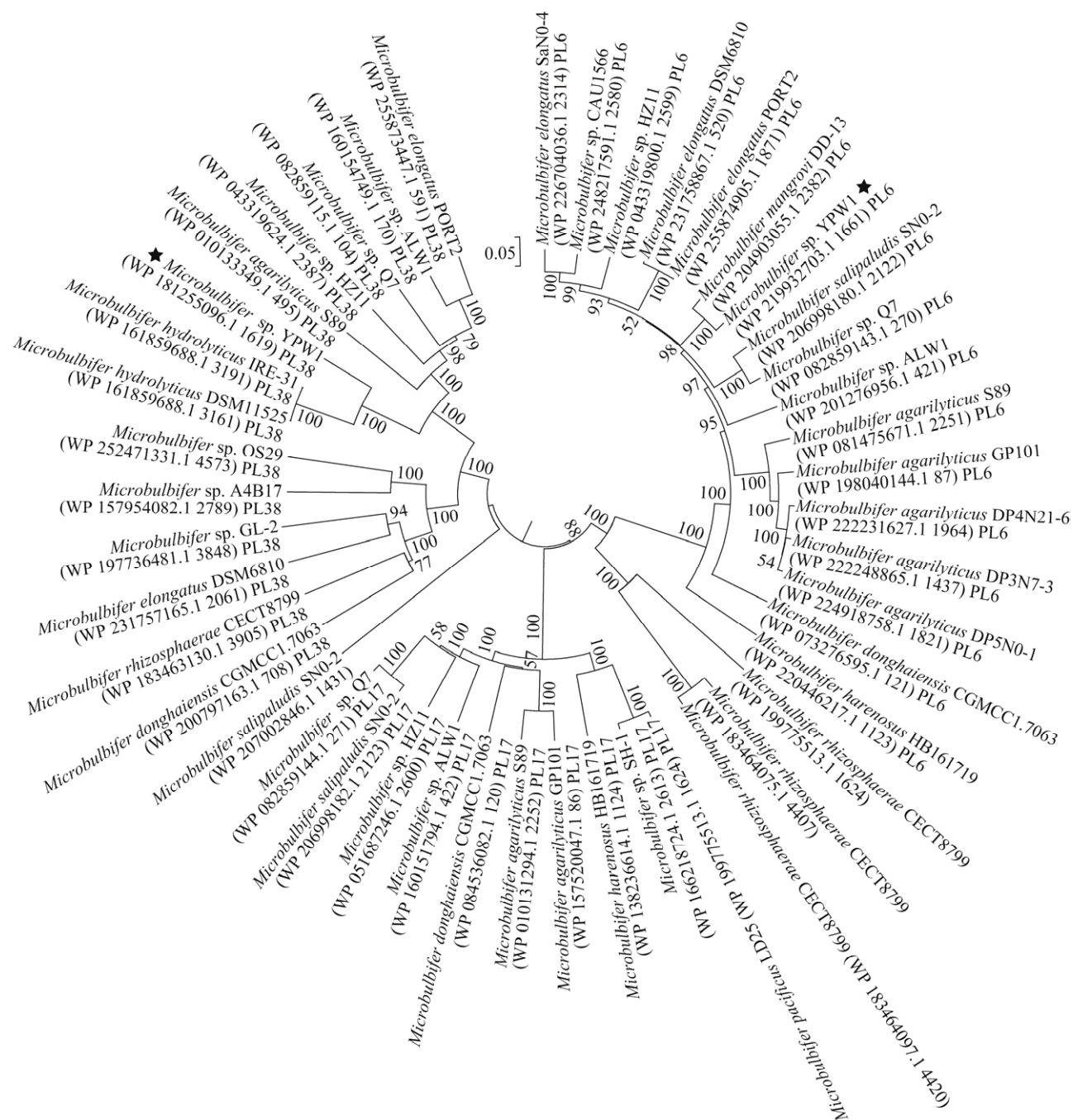


Figure 11 The phylogenetic analysis of the alginate lyase gene in the genomes of *Microbulbifer* species. The scale of the evolutionary tree indicated their evolutionary distance unit; The numerical value at the node was the bootstrap test values; The sequence number of the strain is in parentheses; The star indicated the target strains.



图 12 微泡菌属菌株基因组中淀粉酶基因系统发育分析 进化树的比例尺表示进化距离单位；节点处的数值为 bootstrap 检验值；括号中为菌株序列号；实心五角星标出的为目标菌株

Figure 12 The phylogenetic analysis of the amylase gene in the genomes of *Microbulbifer* species. The scale of the evolutionary tree indicated their evolutionary distance unit; The numerical value at the node was the bootstrap test values; The sequence number of the strain is in parentheses; The star indicated the target strains.

该分析结果还表明，目前报道的微泡菌属菌株基因组中虽均可以注释到多糖降解相关酶基因，但其种类与数量的分布不均一，呈现出明显的差异性。

虽然多糖降解酶基因在微泡菌属菌株中的分布差异较大，但本文的分析结果证明，包括菌株 YPW1、DD-13、DSM 19189 和 OS29 在内的多种微泡菌属菌株基因组中均存在多种多糖

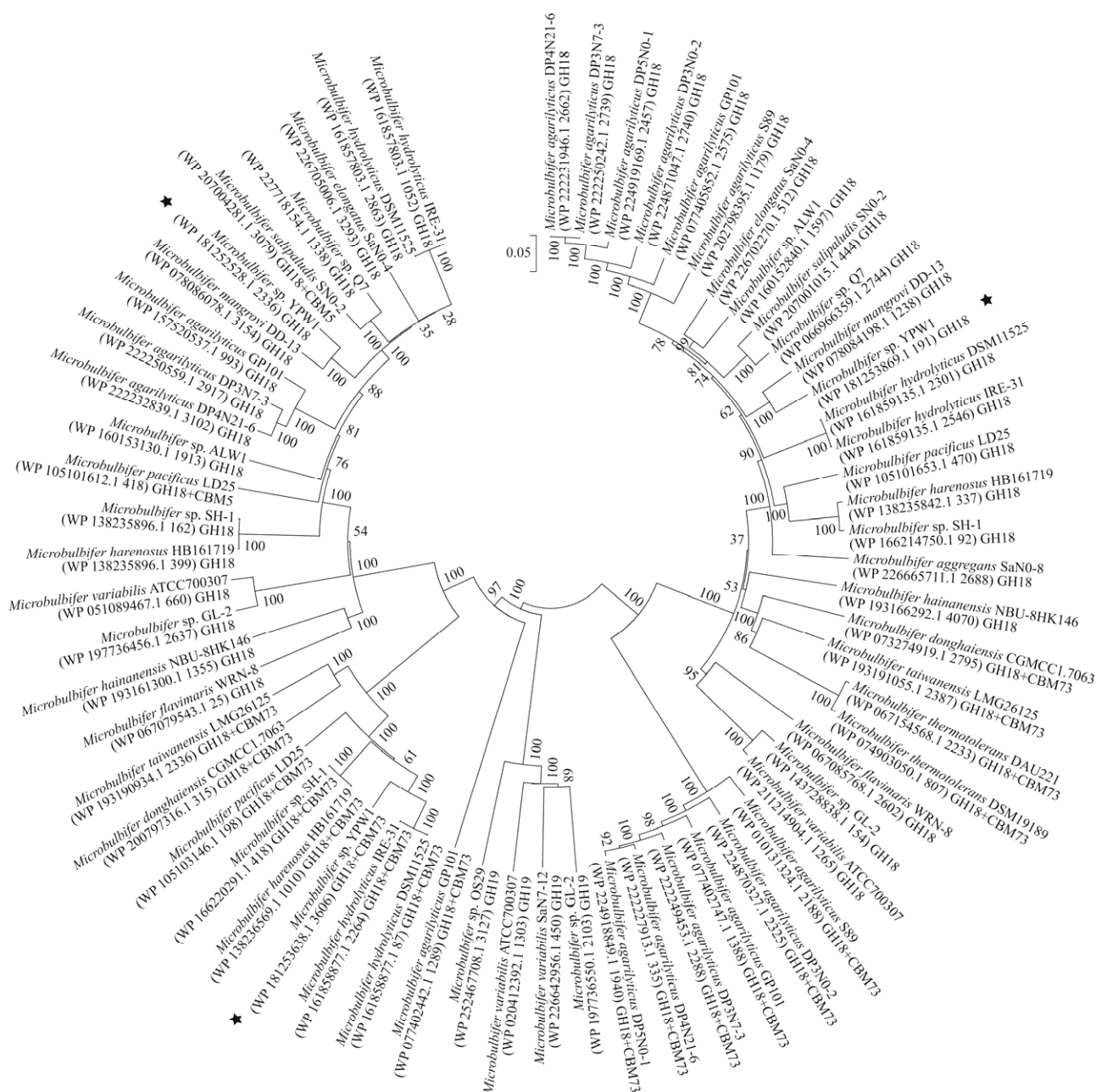


图 13 微泡菌属菌株基因组中几丁质酶基因系统发育分析 进化树的比例尺表示进化距离单位; 节点处的数值为 bootstrap 检验值; 括号中为菌株序列号; 实心五角星标出的为目标菌株

Figure 13 The phylogenetic analysis of the chitinase gene in the genomes of *Microbulbifer* species. The scale of the evolutionary tree indicated their evolutionary distance unit; The numerical value at the node was the bootstrap test values; The sequence number of the strain is in parentheses; The star indicated the target strains.



图 14 微泡菌属菌株基因组中果胶裂解酶基因系统发育分析 进化树的比例尺表示进化距离单位; 节点处的数值为 bootstrap 检验值; 括号中为菌株序列号; 实心五角星标出的为目标菌株

Figure 14 The phylogenetic analysis of the pectate lyase gene in the genomes of *Microbulbifer* species. The scale of the evolutionary tree indicated their evolutionary distance unit; The numerical value at the node was the bootstrap test values; The sequence number of the strain is in parentheses; The star indicated the target strains.

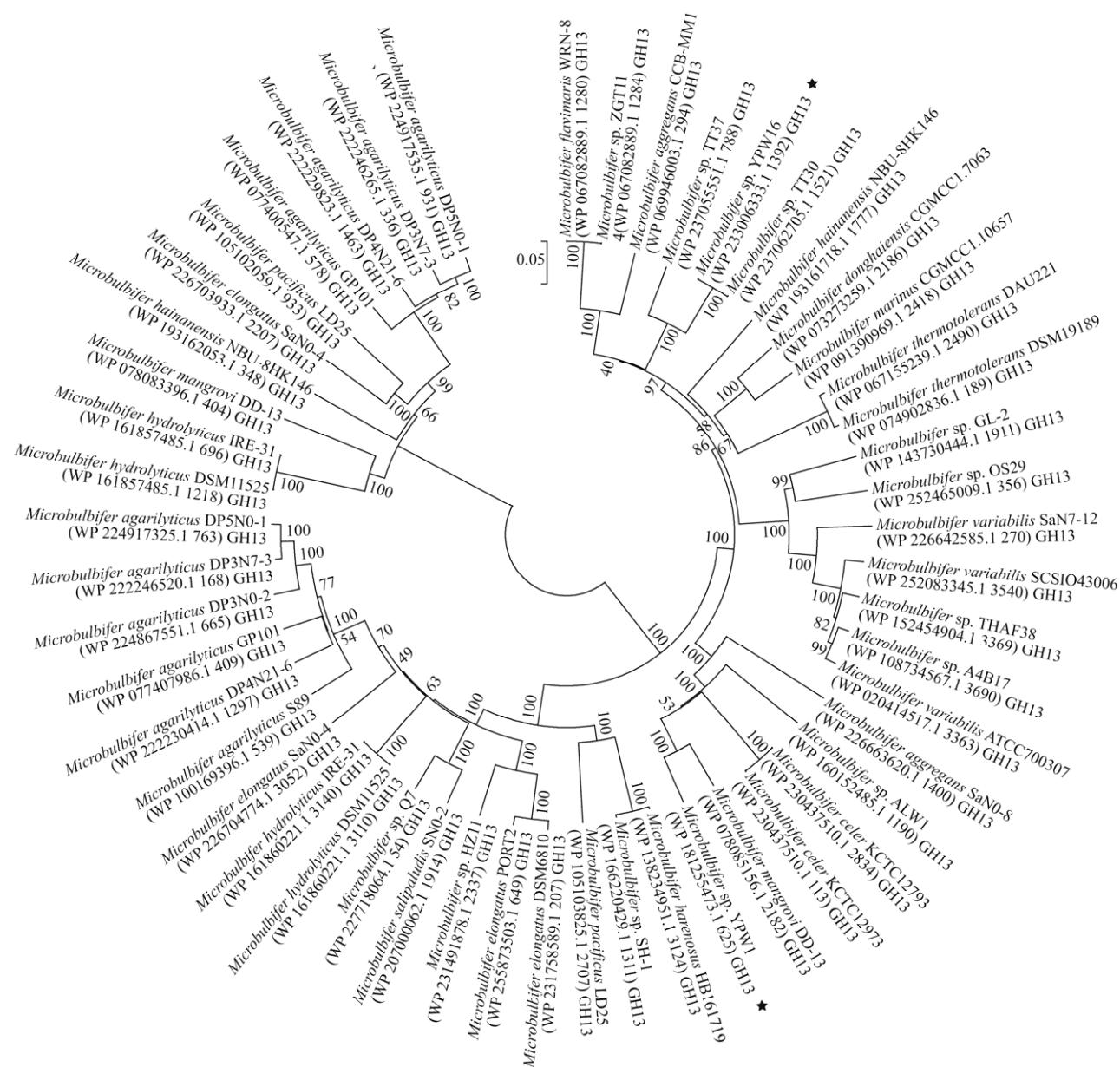


Figure 15 The phylogenetic analysis of the pullulanase gene in the genomes of *Microbulbifer* species. The scale of the evolutionary tree indicated their evolutionary distance unit; The numerical value at the node was the bootstrap test values; The sequence number of the strain is in parentheses; The star indicated the target strains.

文献已证明 *M. mangrovi* DD-13 等单个菌株可以通过降解多种多糖从而参与海洋碳循环^[1]。本研究进一步证明微泡菌属中多种菌株均可以作为碳循环参与者执行多种多糖降解。

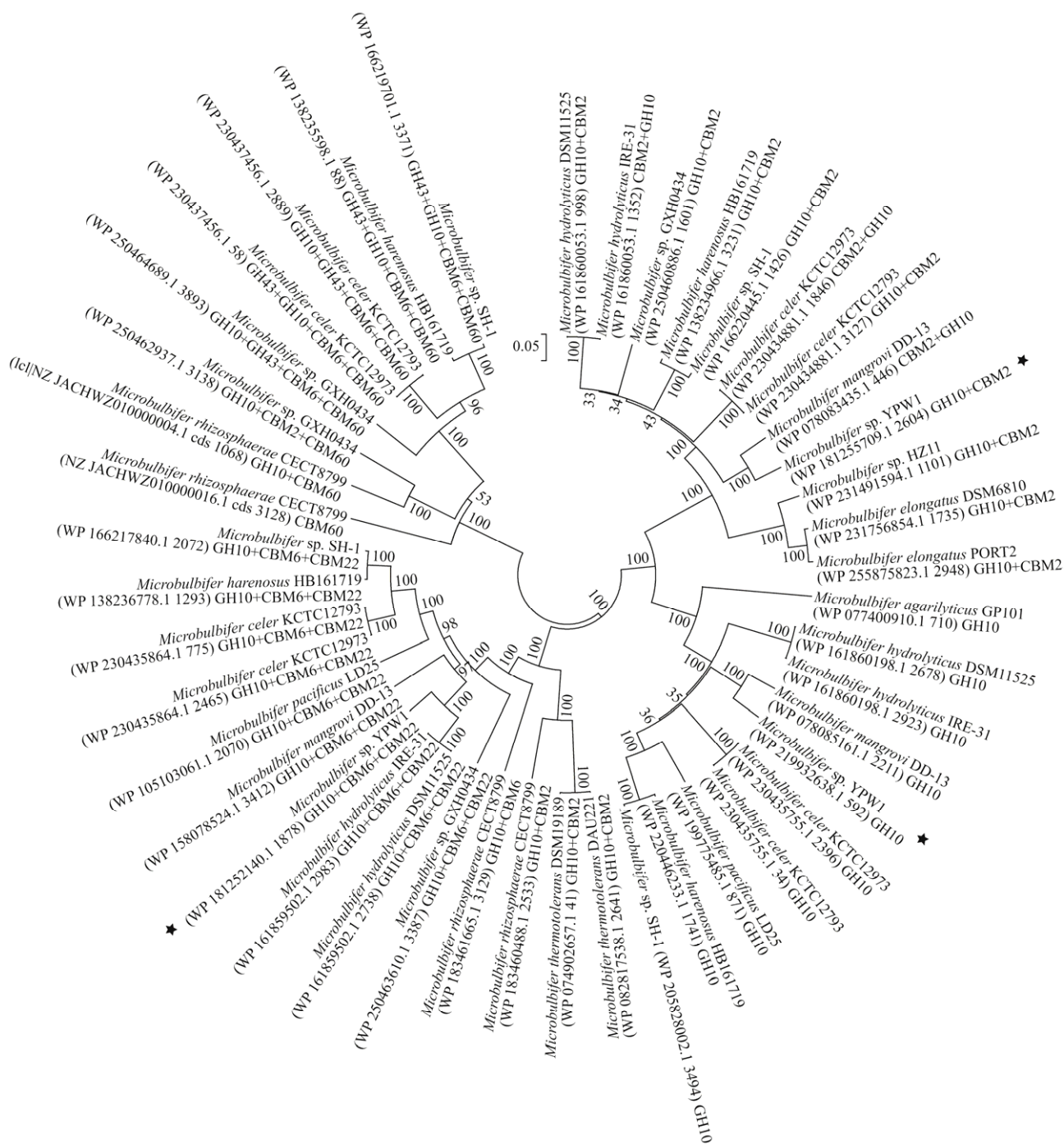


图 16 微泡菌属菌株基因组中木聚糖酶基因系统发育分析 进化树的比例尺表示进化距离单位；节点处的数值为 bootstrap 检验值；括号中为菌株序列号；实心五角星标出的为目标菌株

Figure 16 The phylogenetic analysis of the xylanase gene in the genomes of *Microbulbifer* species. The scale of the evolutionary tree indicated their evolutionary distance unit; The numerical value at the node was the bootstrap test values; The sequence number of the strain is in parentheses; The star indicated the target strains.

总而言之, 本研究分离得到的 2 株微泡菌属菌株为相关寡糖及单糖的制备提供了新的生物工具, 扩充了微泡菌属的菌种资源。此外, 多种微泡菌属菌株具有多种多糖降解潜力, 但其基因组中多糖降解基因的数量与种类差异较大。导致多糖降解基因不均匀分布的原因尚未可知, 需要在未来的研究中进一步揭示其相关机制, 以便于能够更加深入地了解微泡菌属的工业价值、进化途径与生态学功能。

REFERENCES

- [1] IMRAN M, PANT P, SHANBHAG YP, SAWANT SV, GHADI SC. Genome sequence of *Microbulbifer mangrovi* DD-13^T reveals its versatility to degrade multiple polysaccharides[J]. *Marine Biotechnology*, 2017, 19(1): 116-124.
- [2] NISHIJIMA M, TAKADERA T, IMAMURA N, KASAI H, AN KD, ADACHI K, NAGAO T, SANO H, YAMASATO K. *Microbulbifer variabilis* sp. nov. and *Microbulbifer epialgicus* sp. nov., isolated from Pacific marine algae, possess a rod-coccus cell cycle in association with the growth phase[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59(Pt 7): 1696-1707.
- [3] OHTA Y, HATADA Y, NOGI Y, MIYAZAKI M, LI Z, AKITA M, HIDAKA Y, GODA S, ITO S, HORIKOSHI K. Enzymatic properties and nucleotide and amino acid sequences of a thermostable β -agarase from a novel species of deep-sea *Microbulbifer*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 64(4): 505-514.
- [4] LI ZY, WEI R, GAO MX, REN YR, YU B, NIE KL, XU HJ, LIU L. Biodegradation of low-density polyethylene by *Microbulbifer hydrolyticus* IRE-31[J]. *Journal of Environmental Management*, 2020, 263: 110402.
- [5] KARIM MRU, HARUNARI E, OKU N, AKASAKA K, IGARASHI Y. Bulbimidazoles A-C, antimicrobial and cytotoxic alkanoyl imidazoles from a marine gammaproteobacterium *Microbulbifer* species[J]. *Journal of Natural Products*, 2020, 83(4): 1295-1299.
- [6] HOWARD MB, EKBORG NA, TAYLOR LE, WEINER RM, HUTCHESON SW. Genomic analysis and initial characterization of the chitinolytic system of *Microbulbifer degradans* strain 2-40[J]. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(11): 3352-3360.
- [7] SWIFT SM, HUDGENS JW, HESELPOTH RD, BALES PM, NELSON DC. Characterization of AlgMsp, an alginate lyase from *Microbulbifer* sp. 6532A[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e112939.
- [8] 唐昊, 郑莉, 雷露, 王明珺, 李沅秋, 罗朝兵. 纤维素降解菌烟曲霉 HZ1 的基因组测序及生物信息学分析[J]. *微生物学报*, 2021, 61(8): 2382-2396.
- TANG H, ZHENG L, LEI L, WANG MJ, LI YQ, LUO CB. Genome sequencing and bioinformatics analysis of cellulolytic fungus *Aspergillus fumigatus* HZ1[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(8): 2382-2396 (in Chinese).
- [9] 肖康, 彭云峰, 罗玲, 彭方, 万霞. 产 EPA 海洋细菌 *Shewanella baltica* 6-42 全基因组测序及比较基因组分析[J]. *中国油料作物学报*, 2017, 39(3): 404-413.
- XIAO K, PENG YF, LUO L, PENG F, WAN X. Whole genome sequencing and comparative genomics analysis of EPA-producing marine bacteria *Shewanella baltica* 6-42[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2017, 39(3): 404-413 (in Chinese).
- [10] 刘巍, 郭海朋, 董鹏生, 燕孟琛, 张德民. 别样玫瑰变色杆菌(*Aliiroseovarius* sp.) Z3 基因组测序及比较基因组分析[J]. *热带海洋学报*, 2022, 41(1): 52-61.
- LIU W, GUO HP, DONG PS, YAN MC, ZHANG DM. Draft genome sequence and comparative genome analysis of *Alliroseovarius* sp. Z3[J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2022, 41(1): 52-61 (in Chinese).
- [11] 王春玲, 冯广达, 姚青, 李安章, 朱红惠. 粘细菌基因组学研究进展[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(9): 2394-2403.
- WANG CL, FENG GD, YAO Q, LI AZ, ZHU HH. Research progress in genomics of *Myxobacteria*[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(9): 2394-2403 (in Chinese).
- [12] 郭鹤宝, 王星, 何山文, 张晓霞. 表型特征结合基因组分析鉴定不同菌落形态 *Bacillus velezensis* ACCC 19742[J]. *生物技术通报*, 2020, 36(2): 142-148.
- GUO HB, WANG X, HE SW, ZHANG XX. Phenotypic characteristics combined with genomic analysis to identify different colony morphology *Bacillus velezensis* ACCC 19742[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2020, 36(2): 142-148 (in Chinese).
- [13] HONGOH Y, YUZAWA H, OHKUMA M, KUDO T. Evaluation of primers and PCR conditions for the analysis of 16S rRNA genes from a natural

- environment[J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 221(2): 299-304.
- [14] 朱飞舟, 陈利玉, 陈汉春. 16S rRNA 基因序列分析法鉴定病原细菌[J]. 中南大学学报(医学版), 2013, 38(10): 1035-1041.
- ZHU FZ, CHEN LY, CHEN HC. Identification of pathogenic microorganism by sequencing 16S rRNA gene[J]. Journal of Central South University (Medical Science), 2013, 38(10): 1035-1041 (in Chinese).
- [15] MILLER GL. Modified DNS method for reducing sugars[J]. Analytical Chemistry, 1959, 31(3): 426-428.
- [16] WANG DQ, WANG JX, SHUI BN, ZHU LQ, WANG JQ, JIN LX, QU W. Complete genome sequence of *Microbulbifer* sp. YPW₁ from mangrove sediments in Yanpu Harbor, China[J]. Archives of Microbiology, 2021, 203(10): 6143-6151.
- [17] XU Q, CHAO YL, WAN QB. Health benefit application of functional oligosaccharides[J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 77(3): 435-441.
- [18] 赵小亮, 王钰婷, 肖宁, 王莎, 张伟杰. 海洋寡糖及其衍生物活性的研究进展[J]. 生物技术进展, 2018, 8(6): 477-488.
- ZHAO XL, WANG YT, XIAO N, WANG S, ZHANG WJ. Progress on activities of marine oligosaccharides and their derivatives[J]. Current Biotechnology, 2018, 8(6): 477-488 (in Chinese).
- [19] 文霞, 周少璐, 杨秀荭, 孙廷丽, 谢小保. 海洋微生物多糖降解酶的研究进展[J]. 生物技术通报, 2016, 32(11): 38-46.
- WEN X, ZHOU SL, YANG XJ, SUN TL, XIE XB. Research progress on polysaccharide-degrading enzymes from marine microorganism[J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(11): 38-46 (in Chinese).
- [20] 许超, 熊亚茹, 卢明倩, 廖威, 张云开, 黄庶识. 一株具有褐藻胶降解能力的海洋细菌的筛选鉴定及其多糖利用能力研究[J]. 生物技术通报, 2017, 33(4): 198-204.
- XU C, XIONG YR, LU MQ, LIAO W, ZHANG YK, HUANG SS. Screening and identification of a marine alginate-degrading bacterium and the utilization capacity of polysaccharide[J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(4): 198-204 (in Chinese).
- [21] BANERJEE S, SCHLAEPPI K, van der HEIJDEN MGA. Keystone taxa as drivers of microbiome structure and functioning[J]. Nature Reviews Microbiology, 2018, 16(9): 567-576.
- [22] 焦念志, 汤凯, 张瑶, 张锐, 徐大鹏, 郑强. 海洋微型生物储碳过程与机制概论[J]. 微生物学通报, 2013, 40(1): 71-86.
- JIAO NZ, TANG K, ZHANG Y, ZHANG R, XU DP, ZHENG Q. Microbial processes and mechanisms in carbon sequestration in the ocean[J]. Microbiology China, 2013, 40(1): 71-86 (in Chinese).
- [23] WU J, QU W, LAI Q, PEI S, ZHANG T, ZHUANG Y, CHAN Z, ZENG R. *Vibrio ziniensis* sp. nov., isolated from mangrove sediments[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2021, 71(4): 004777.