

微泡菌属(*Microbulbifer*)产铁载体海洋细菌的系统发育多样性及相关功能基因簇分析

汤倩^{1,2}, 陈锦华^{1*}, 邓丽颖^{1,3}, 达春瑶¹, 刘祝祥^{1*}, 陈义光¹

1 吉首大学 生物资源与环境科学学院, 湖南 吉首

2 益阳万源明达高级中学, 湖南 益阳

3 张家界学院 医学院, 湖南 张家界

汤倩, 陈锦华, 邓丽颖, 达春瑶, 刘祝祥, 陈义光. 微泡菌属(*Microbulbifer*)产铁载体海洋细菌的系统发育多样性及相关功能基因簇分析[J]. 微生物学报, 2025, 65(4): 1616-1634.

TANG Qian, CHEN Jinhua, DENG Liying, DA Chunyao, LIU Zhuxiang, CHEN Yiguang. Phylogenetic diversity and functional biosynthetic gene clusters of marine siderophore-producing bacteria of *Microbulbifer*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(4): 1616-1634.

摘要:【目的】阐明分离自南海雷州湾硃洲岛潮汐带沉积物的 12 株产铁载体细菌的系统发育多样性, 并探测这些实验菌株及微泡菌属(*Microbulbifer*)已知物种代表性菌株的铁载体生物合成基因簇的组成、功能、遗传多样性及其演化模式。【方法】采用常规方法观察主要表型特征并进行产铁载体活性验证; 利用 16S rRNA 基因序列分析法了解实验菌株的系统发育多样性(包括类群多样性、物种多样性和遗传多样性); 测定代表性实验菌株 JSM ZJ756 的基因组框架图, 通过比较基因组学技术对比分析实验菌株与其系统发育关系密切的典型菌株的 G+C 含量、平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)和数码 DNA-DNA 杂交估值(digital DNA-DNA hybridization, dDDH), 以更准确地判定其系统分类地位; 采用 antiSMASH 7.0、BLASTn、BLASTp 和 MEGA 11 等生物信息学工具, 对次级代谢产物合成基因簇(secondary metabolite biosynthetic gene clusters, BGCs)进行快速鉴定、功能注释和序列比对, 以探测其产铁载体相关功能基因簇的组成、功能、遗传多样性及其演化模式。【结果】实验菌株均为严格好氧、不产芽孢、具有产铁载体活性的革兰氏阴性杆菌。16S rRNA 基因序列和全基因组序列分析结果表明, 12 株菌均属于微泡菌属, 归为 6-8 个物种, 与该属的典型菌株构成 4 个进化系(clade), 其中 JSM ZJ756 为舟山微泡菌(*Microbulbifer zhoushanensis*)的新成员。通过 antiSMASH 基因簇分析发现, JSM ZJ756 及 9 个微泡

资助项目: 国家自然科学基金(31660003, 31460004); 湖南省自然科学基金(2020JJ4501); 湖南省教育厅科技项目(22A0770); 湖南省研究生科研创新项目(CX20231081)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31660003, 31460004), the Natural Science Foundation of Hunan Province (2020JJ4501), the Foundation of Hunan Provincial Education Department (22A0770), and the Scientific Research Project of Hunan Graduate Research Innovation Project (CX20231081).

*Corresponding authors. E-mail: CHEN Jinhua, cjh_jsu@jsu.edu.cn; LIU Zhuxiang, liuzhuxiang@126.com

Received: 2024-11-12; Accepted: 2024-12-11; Published online: 2025-02-06

菌属代表性菌株各具有 1 个铁载体生物合成基因簇(NI-siderophore), 其中 8 个与已知同类型基因簇的相似性在 40% 及以下。根据与已知基因簇的种类和相似性差异, 这 10 个铁载体基因簇可分为 5 个功能亚型: JSM ZJ756 等 3 株为 Ochrobactin 亚型(序列号 JYFX01000060.1, 相似性 28%), *M. mangrove* DD-13^T 和 *M. epialgicus* DSM 18651^T 为 Vibrioferriin 亚型(AB082123.1, 100%; CP005094.1, 85%), *M. agarilyticus* GP101 为 Putrebactin 亚型(NIBS01000001.1, 40%), *M. echini* JCM 30400^T 为 Aerobactin 亚型(AB199785.1, 22%), 而 *M. variabilis* ATCC 700307^T 等 3 株未发现与之相匹配的已知铁载体合成相关功能基因簇(未知功能亚型)。BLASTn 和 BLASTp 搜索显示, 这些基因簇的核心基因具有独特的序列, 能编码新颖的功能蛋白; 基于核心基因序列的遗传演化分析表明, 这些 NI-siderophore 基因簇具有较高的遗传多样性; 在核心基因发育树上, 菌株 *M. agarilyticus* GP101 的铁载体合成基因簇的遗传演化路径相对孤立, 而其他 9 个分属于 3 个较独立的遗传演化群。对比分析发现, 这些 NI-siderophore 基因簇的遗传演化模式与相应菌株的 16S rRNA 基因序列系统发育模式基本一致。【结论】本研究表明分离自南海雷州湾硃洲岛潮汐带沉积物的 12 株产铁载体菌株属于微泡菌属, 具有较高的系统发育多样性, 其中 JSM ZJ756 为舟山微泡菌的新成员; JSM ZJ756 及微泡菌属(代表性菌株)的 NI-siderophore 基因簇具有较高的多样性和新颖性, 具有产生新颖多样铁载体的较大潜力; JSM ZJ756 及 9 个微泡菌属代表性菌株的 NI-siderophore 基因簇的生物功能、遗传演化, 以及这些菌株的系统发育之间存在较高的正向关联性。因此, 包括 12 个产铁载体实验菌株在内的微泡菌属菌株是一类典型的新资源微生物, 其系统分类、铁载体代谢机制和遗传演化模式, 以及生物技术潜力值得进一步探讨。

关键词: 微泡菌属; 产铁载体海洋细菌; 系统发育多样性; 铁载体合成基因簇; 遗传演化; 新资源微生物

Phylogenetic diversity and functional biosynthetic gene clusters of marine siderophore-producing bacteria of *Microbulbifer*

TANG Qian^{1,2}, CHEN Jinhua^{1*}, DENG Liying^{1,3}, DA Chunyao¹, LIU Zhuxiang^{1*}, CHEN Yiguang¹

1 College of Biology and Environmental Sciences, Jishou University, Jishou, Hunan, China

2 Yiyang Wanyuan Mingda High School, Yiyang, Hunan, China

3 School of Medicine, Zhangjiajie College, Zhangjiajie, Hunan, China

Abstract: [Objective] To reveal the phylogenetic diversity of 12 marine siderophore-producing bacteria isolated from intertidal sediment samples of Naozhou Island in Leizhou Bay of South China Sea, and to unravel the components, functions, genetic diversity and genetic evolution of siderophore biosynthetic gene clusters (BGCs) of the isolates as well as representatives of *Microbulbifer*. **[Methods]** The phenotypic characteristics as well as the siderophore-producing activity of the strains were observed by conventional methods. The phylogenetic diversity (including taxon, species, and genetic diversity) of the strains was analyzed based on 16S rRNA gene sequences. Then, the exact phylogenetic status of the representative strain JSM ZJ756 was

investigated comprehensively by means of comparative genomics analysis based on whole-genome sequences, including comparisons of G+C content, average nucleotide identity (ANI), and digital DNA-DNA hybridization (dDDH) estimated values. We then used multiple bioinformatic tools including antiSMASH 7.0, BLASTn, BLASTp, and MEGA 11 for rapid identification, annotation, and sequence alignment of BGCs, thus exploring the components, functions, genetic diversity, and genetic evolution of siderophore BGCs. **[Results]** All the 12 isolates were Gram-negative, aerobic, non-sporulating and slightly halophilic rods with siderophore-producing activity. The results of phylogenetic analyses based on 16S rRNA gene sequences as well as whole-genome sequences showed that all the 12 strains belonged to *Microbulbifer*, representing 6 to 8 species and forming 4 clades with *Microbulbifer* type strains in the phylogenetic tree. Among them, strain JSM ZJ756 should be a new member of *Microbulbifer zhoushanensis*. JSM ZJ756 and 9 representative strains of *Microbulbifer* each carried one copy of NI-siderophore BGCs, and 8 out of the 10 NI-siderophore BGCs shared the similarities $\leq 40\%$ with known BGCs. According to the types and the similarities of known BGCs with the NI-siderophore BGCs identified in this study, the 10 NI-siderophore BGCs could be categorized into 5 functional subtypes: Ochrobactin (JSM ZJ756 and 2 type strains, JYFX01000060.1, similarity of 28%), Vibrioferin (*M. mangrove* DD-13^T, AB082123.1, 100%; *M. epialgicus* DSM 18651^T, CP005094.1, 85%), Putrebactin (*M. agarilyticus* GP101, NIBS01000001.1, 40%), Aerobactin (*M. echini* JCM 30400^T, AB199785.1, 22%), and unknown functional subtype (3 type strains including *M. variabilis* ATCC 700307^T). The results of BLASTn and BLASTp analyses showed that the core biosynthetic gene sequences of the NI-siderophore BGCs identified were unique, and encoded novel proteins. The results of genetic evolution analysis showed that the core biosynthetic genes of the NI-siderophore BGCs found exhibited high genetic diversity. In the phylogenetic tree based on core biosynthetic gene sequences, 9 out of the 10 NI-siderophore BGCs were grouped to 3 clades, but *M. agarilyticus* GP101 exhibited an independent evolution path. The comparative analysis revealed the genetic evolution of NI-siderophore BGCs being consistent with that predicted based on the 16S rRNA sequences. **[Conclusion]** All the 12 siderophore-producing strains isolated from intertidal sediment samples of Naozhou Island in Leizhou Bay of South China Sea belong to *Microbulbifer*, demonstrating high phylogenetic diversity, and JSM ZJ756 is a new member of *M. zhoushanensis*. The NI-siderophore BGCs of JSM ZJ756 and representative strains of *Microbulbifer* are novel and showcase high diversity, which indicates that those strains possess high potential of producing a variety of novel siderophores. Moreover, strong positive correlations exist between the biological functions and genetic evolution of the NI-siderophore BGCs and the phylogeny of JSM ZJ756 and 9 representative strains of *Microbulbifer*. Therefore, we hypothesize that the 12 marine siderophore-producing bacteria and the representatives of *Microbulbifer* are typical new-resource microbes, and the taxonomy of *Microbulbifer*, and the metabolic mechanism and genetic evolution as well as the biotechnological potential of the NI-siderophore BGCs are worth being further explored.

Keywords: *Microbulbifer*; marine siderophore-producing bacteria; phylogenetic diversity; siderophore biosynthetic gene cluster; genetic evolution; new-resource microbe

铁是所有生物体必需的元素之一,在三羧酸循环、电子传递链、氧化磷酸化、固氮作用和光合作用等重要基本生命活动中发挥着至关重要的作用^[1-2],能调节叶啉、维生素、抗生素、细胞色素、铁载体、芳香族化合物和致病因子等代谢物质的合成^[3-4],并在微生物核酸合成、菌膜和孢子形成过程中发挥重要调节作用^[5]。铁占地壳总元素含量的约 5%,但在有氧环境中大多以难溶的氧化态或氢氧化态高价铁(Fe^{3+})形式存在,生物可直接利用的铁浓度仅为 10^{-17} mol/L,无法满足微生物的生长需求^[6-7]。为了在缺铁条件下生存,微生物进化出各种机制来获取及利用这种必需的微量元素^[8]。这些机制主要有 4 类:(1)通过基于铁载体(siderophore)的转运系统富集低铁环境中的铁元素;(2)利用自身的氧化还原系统将 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+} ;(3)从宿主的乳铁蛋白、转铁蛋白或铁蛋白中获取铁;(4)利用宿主血红素以及血红蛋白作为铁源。微生物最广泛采用的策略是利用铁载体转运系统来转运和富集低铁环境中的铁元素。铁载体是微生物在缺铁条件下产生并分泌到环境中的一类高效螯合铁离子的小分子有机化合物,具有分子量低(<10 kDa)、能与 Fe^{3+} 特异性螯合、其生物合成受铁离子浓度调节等特性^[9-10]。铁载体能从不同生境中高效捕获 Fe^{3+} ,形成铁载体-铁复合体,与细胞膜上的特异受体结合,被相应的转运系统运输到细胞质后被还原为可溶性的 Fe^{2+} ,再释放到细胞质中,参与相应的生物过程^[8]。当铁过载或缺乏时,生物的许多生命活动都会受到影响,因此对铁的争夺成为了微生物之间竞争的一个重要因子^[11]。

铁载体不仅与微生物本身的生存竞争、致病性及抗菌性等生命活动密切相关,而且在生态学、农业、环境修复、生物传感器和生物医药等众多领域具有极大的应用价值。在微生物

生态学方面,采用与产铁载体细菌共培养的方法,或者单独添加铁载体作为生长因子,可以分离纯化出一些新颖的不产铁载体的未培养微生物^[12-13]。在农业领域,一些产铁载体细菌能促进植物对可利用铁的摄入,从而促进植物生长,因此被用作植物生长促进菌剂^[14-15]。铁载体能牢固结合铁元素,从而减少植物病原菌的铁摄入,因此能被用作控制一些植物病原菌的高效生物防治剂^[8,16]。铁载体的主要作用是螯合 Fe^{3+} ,同时它们也能结合多种有毒金属离子,如 Cr^{3+} 、 Al^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Eu^{3+} 和 Pb^{2+} 等,从而在重金属污染样品的脱毒中发挥重要作用。因此,铁载体能用作重要的生态友好型重金属污染环境修复剂^[10,17-19]。铁载体还能用于检测多种环境中的 Fe^{3+} 含量,展现出其作为生物传感器的应用潜力^[20-21]。在医学领域,铁载体用于控制抗生素耐药菌和治疗一些人类疾病,具有重要的应用价值。运用“特洛伊木马”策略(“Trojan Horse” strategy)^[22],铁载体能借助可降解连接基团与抗生素等药物连接成铁载体-抗生素偶联物,依靠铁载体主动运输系统选择性地进入病原体细胞,随即连接基团被降解,药物被释放并发挥药效,从而杀死耐药性病原菌^[5,8,23-24]。有许多铁载体-抗生素偶联物陆续进入临床试验,其中头孢地尔(cefiderocol)成为第一个被美国食品及药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准进入临床应用的铁载体头孢菌素。该药物对耐碳青霉烯的肠杆菌目细菌、鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌和嗜麦芽窄食单胞菌等具有广谱强效的抗菌活性,可用于治疗由革兰氏阴性细菌引起的复杂性尿路感染和院内获得性细菌性肺炎/呼吸机相关细菌性肺炎^[25-26]。过载的铁会催化产生活性氧,对细胞造成致命毒害^[27]。一些铁载体能协助治疗铁过载性疾病(iron overload disease),如重型地中海贫血和镰

状细胞性贫血^[28]。此外,铁载体还具有抗疟疾^[8,29]、体内铀等元素的清除^[8]和癌症辅助治疗^[30]等作用。

海洋是严重缺铁的环境,海洋表层水的可溶性铁浓度仅为 0.01–0.02 nmol^[31]。铁载体介导的铁吸收机制使海洋微生物能够在这种缺铁环境中增殖和生存,海洋细菌产生了海水中大部分的有机铁螯合剂,在铁的生物地球化学循环中发挥了重要作用^[10,32–33]。汤倩^[34]开展了低生物可利用铁情况下硃洲岛潮汐带沉积物中细菌多样性及分布规律的研究,从雷州湾硃洲岛潮汐带沉积物中分离筛选得到 246 株产铁载体细菌。基于 16S rRNA 基因序列的系统发育研究表明,这些菌株展现出较高的类群多样性、物种多样性和遗传多样性,其中还包括一批代表潜在新分类单元(potential novel taxa)的新菌株;在这些产铁载体菌株中,革兰氏阳性细菌占优势,特别是厚壁菌门的芽孢杆菌科(*Bacillaceae*);而在革兰氏阴性菌中,微泡菌科(*Microbulbiferaceae*)的微泡菌属(*Microbulbifer*)菌株占比较大^[34]。微泡菌属^[35]归属于假单胞菌门(*Pseudomonadota*)的 γ 变形菌纲(*Gammaproteobacteria*),目前已有 32 个有效发表种(validly published under the ICNP, <https://lpsn.dsmz.de/genus/microbulbifer>, 2024-10-30)。微泡菌属菌株因具有多糖和塑料等聚合物分解能力而备受关注,而基因组分析进一步表明,这些细菌是一个值得开发的新颖天然产物宝库^[36–38],但其产铁载体的研究成果鲜见报道。汤倩^[34]先后从雷州湾硃洲岛潮汐带沉积物中分离纯化到多株微泡菌属菌株,其中 JSM ZJ756 等 12 株具有较强的产铁载体活性。为了进一步阐明这些菌株的系统发育地位,并了解微泡菌属菌株铁载体生物合成相关的功能,为该微生物资源的进一步研究、种质保护和生物技术利用奠定基础,在 16S rRNA 基因序列

系统发育分析的基础上,还基于基因组框架图进行了深入的比较基因组学分析。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

琼脂粉,北京鼎国昌盛生物技术有限公司;铬天青 S,上海三爱思试剂有限公司;脱脂奶粉、Marine agar 2216 (以下简称 MA)和 Marine broth 2216 (以下简称 MB)培养基, BD 公司;DNA 提取和纯化、PCR 所用试剂、酶和引物,生工生物工程(上海)股份有限公司。

高压蒸汽灭菌锅,三洋电机株式会社;生物安全柜,苏州安泰空气技术有限公司;生化培养箱,上海精宏实验设备有限公司;真空冷冻干燥器, ThermoFisher Scientific 公司;恒温培养摇床,上海知楚仪器有限公司;光学显微镜, Leica Microsystems 公司;台式离心机, Eppendorf 公司;紫外分光光度计, Shimadzu Corporation 公司;PCR 仪和电泳仪, Bio-Rad 公司。

1.2 菌株来源及培养

菌株 JSM ZJ756 等 12 个实验菌株是在本实验室对雷州湾硃洲岛进行细菌多样性调查期间,采用 MA 等多种复合培养基从潮汐带沉积物样品中分离得到的,继而采用铬天青 S (chrome azurol sulfonate, CAS)琼脂平板法筛选出产铁载体细菌^[34]。通过形态特征和 16S rRNA 基因序列分析确认这些菌株归属于微泡菌属。这些菌株在含 MA 培养基的平板上进行活化和传代培养,并保存在牛奶管中。

1.3 表型特征观察和产铁载体活性验证

将菌株接种于 MA 平板上,于 30 °C 培养 14 d,每天记录菌落特征,包括直径、颜色、边缘是否圆整、表面是否凸起、是否湿润以及是否产生可溶性色素等。根据菌落的均一性和纯

度初步判断菌株的纯度(菌落纯)。采用标准染色法和 KOH 溶解法观察革兰氏反应^[39], 并根据细胞形态和革兰氏染色的单一性进一步判断纯度(细胞纯); 通过配制不同 NaCl 浓度的营养琼脂和 MA 平板观察菌株的耐盐性; 采用 MA 平板和 MB 摇瓶观察菌株对温度和酸碱的耐受性; 采用悬滴法和半固体平板湿室培养法观察菌株的运动性; 将菌株接种于添加 0.1% NaNO₃ 及 1% 葡萄糖的 MA 平板上, 使用 BBL 厌氧培养系统按标准操作进行厌氧培养; 使用 3% H₂O₂ 和氧化酶试剂分别检测过氧化氢酶(catalase)和氧化酶(oxidase)活性; 其他生化特征, 如多聚物水解和硝酸盐还原等, 参照《常见细菌系统鉴定手册》^[40]进行表征。将菌株点接于改良 CAS 琼脂平板上^[41], 于 30 °C 培养 14 d, 每天观察。若产生黄色晕圈, 则判定为产铁载体阳性。所有试验均设置 3 次重复。

1.4 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析

采用酶法小量提取基因组 DNA, 并按常规方法 PCR 扩增 16S rRNA 基因^[42]。扩增产物经过琼脂糖凝胶电泳检测合格后, 委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行一代测序。16S rRNA 基因扩增和测序使用细菌通用引物 Primer A (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 Primer B (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')。使用 BioEdit 软件查看序列峰形图、检查测序质量; 采用 DNASTar 软件包中的 SeqMan 程序进行序列拼接, 并对照峰形图对序列中的个别碱基进行手工校正。切除首尾引物序列后, 保存为 Fasta 文件, 并上传至 GenBank 等公共数据库以获取序列号(accession number)。在 EzBioCloud 数据库(<https://www.ezbiocloud.net/taxonomy>)采用 BLAST (megablast)进行序列两两比对和相似性计算。下载相似性较高的序列, 连同目标序列

构建同源序列集。用 Clustal X 进行多重比对; 采用 MEGA 11 进行系统发育分析并构建系统发育树。使用 1 000 次重复的 bootstrap 检验评估发育树拓扑结构的稳定性。

1.5 菌株基因组测序分析和参考菌株基因组下载

选取产铁载体活性较强的 JSM ZJ756 菌株为代表, 进行基因组框架图测序和比较基因组学分析。采用 MB 摇瓶培养菌株 JSM ZJ756 细胞(30 °C、180 r/min 培养 3–4 d), 随后在室温 4 000 r/min 离心 15 min 收集菌体。菌体经 0.85% NaCl 无菌盐水洗涤 3 次后, 分装于 2.0 mL EP 管中, 并于 -70 °C 超低温冰箱冷冻 2 d。之后, 用干冰包裹样品, 送至生工生物工程(上海)股份有限公司采用二代测序技术进行基因组框架图(draft genome)的测定。实验流程严格遵循 Illumina 公司提供的标准操作指南, 包括基因组 DNA 的提取与质量检测、小片段 DNA 文库的构建与质量控制、桥式 PCR 扩增、Illumina 测序、下机原始数据的质控与组装。利用软件 Prodigal v2.6.3 进行编码基因预测, 使用 RepeatMasker v4.0.5 将细菌基因组与已知重复序列数据库(如 Repbase)进行比对, 以搜索基因组中的重复序列, 采用 Infernal v1.1.3 根据协方差模型在 Rfam 数据库(<https://rfam.org/>)中预测 RNA 基因, 并使用 tRNAscan-SE v2.0 预测基因组中的 tRNA 基因; 利用 IslandPath-DIMOB v0.2、PhiSpy v2.3 和 CRT v1.2 分别预测基因组中基因组岛(genomic island)、前噬菌体(prophage)和 CRISPR (clustered regularly interspaced palindromic repeats)。

在 16S rRNA 基因序列分析结果的基础上, 根据最新的微泡菌属物种名录(List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, <https://lpsn.dsmz.de/genus/microbulbifer>), 以有效物种的

学名在 NCBI 基因组数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/>)中搜索下载其典型菌株或代表性菌株的基因组数据,用于对比研究。

1.6 基因组系统分类特征比较

通过在线工具计算 G+C/A+T+G+C 获得基因组 DNA 的 G+C 含量。采用 EzBioCloud 在线网络服务(<https://www.ezbiocloud.net/tools/ani>)进行基因组两两对比分析(in pairs),按 OrthoANI 算法估算基因组间平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)^[43-44]。原核生物物种之间的 ANI 阈值设定为 95%–96%,大于此阈值的 2 个菌株被认为属于同一物种^[45]。同时,利用 DSMZ 在线服务平台(<https://ggdc.dsmz.de/distcalc2.php>)、采用 Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC) 4.0 进行数码 DNA-DNA 杂交值(digital DNA-DNA hybridization, dDDH)的估算,其中 Formula 2 (identities/HSlength)的估值被用于全基因组序列同源性比较^[46]。原核生物物种之间的 DNA 同源性阈值设定为 dDDH 70%,低于此阈值的菌株被归类为不同物种^[47-48]。

1.7 次级代谢产物合成基因簇分析

采用 antiSMASH (antibiotics & secondary metabolite analysis shell)细菌版 7.0 软件(<https://antismash.secondarymetabolites.org/#!/start>)^[49]在线进行基因组次级代谢产物合成基因簇(secondary metabolite biosynthetic gene clusters, BGCs)的快速鉴定和功能注释。本研究在全部基因组数据库中选用广泛接受的中等检测严格度“relaxed”进行搜索和分析。针对每个基因簇的生物合成核心基因(core biosynthetic gene),在 NCBI 标准数据库(standard databases)中利用 BLASTn (megablast)对其核酸序列进行搜索,以查找同源基因序列;对核心基因编码的功能蛋白质的氨基酸序列进行 BLASTp (protein-protein BLAST)搜索,以寻找最为接近的同功能蛋白。

基于核心基因序列的系统发育分析方法同 16S rRNA 基因序列分析。

2 结果与分析

2.1 主要表型特征和产铁载体活性

实验菌株均为严格好氧、无芽孢的革兰氏阴性菌。细胞生长期为短杆状,而生长后期则转变为球状。这些菌株具有轻度嗜盐性,在复合培养基上所能耐受的最高盐度为 NaCl 体积分数 10%–20%,而最适生长盐浓度则在 2%–8% NaCl 之间。此外,它们的生长温度和酸碱度偏好均为中性。在蓝色 CAS 平板上,所有菌株均产生了明显的黄色晕圈,表明这些菌株均具备一定的产铁载体活性,其中菌株 JSM ZJ756、844 和 1002 的产铁载体活性较强。其他主要形态特征见表 1。

2.2 产铁载体海洋细菌的系统发育多样性

测定了 12 个实验菌株几乎全长的 16S rRNA 基因序列,并将这些序列存储于公共数据库中,同时获得了相应的 GenBank/EMBL/DDBJ 序列号,见表 2。利用 EzBioCloud 在线服务进行 16S rRNA 基因序列的两两比对,结果显示这些菌株均归属于微泡菌属(*Microbulbifer*),分别与该属的 9 个已知物种的典型菌株具有最为密切的系统发育关系(16S rRNA 基因序列相似性 $\geq$ 98.65%),但其 16S rRNA 基因序列之间却展现出了较大的遗传多样性,相似性范围在 98.78%–99.45%,可以归为 6–8 个不同的物种(表 2)。

尽管实验菌株与其系统发育上密切相关的典型菌株之间的 16S rRNA 基因序列相似性均超过了区分原核生物物种的阈值(98.65%)^[50],但它们仍然展现出了丰富的系统发育多样性。在基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树(图 1)

表1 实验菌株主要表型特征比较

Table 1 Comparison of main phenotypic characteristics of the 12 marine isolates studied

Phenotypic characteristic	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Colony color	W	B	Y	G-Y	C	L-Y	G-B	B	G	C	L-Y	B
Motility	–	–	–	–	+	–	+	–	–	–	–	+
Catalase	+	+	+	+	–	+	+	–	+	+	–	+
Oxidase	–	+	+	–	+	–	+	+	–	+	+	–
Nitrate to nitrite	–	+	–	+	+	+	–	+	–	+	–	+
Growth temperature (°C)												
Range	10–40	15–45	10–45	15–45	15–40	10–45	10–40	15–40	10–45	15–45	15–45	15–40
Optimum	30	30–35	30	35	25–30	30	25	25–30	30	35	35	25–30
pH for growth												
Range	6.0–10.0	6.0–10.0	5.0–10.0	5.0–10.0	6.0–10.0	6.0–11.0	6.0–11.0	5.0–11.0	6.0–10.0	5.0–10.0	6.0–10.0	6.0–11.0
Optimum	7.5	7.0	7.0–8.0	7.0–7.5	7.5	7.0	7.0–7.5	7.5–8.0	7.0	7.0–8.0	7.5	7.0
Growth with NaCl (%)												
Range	1–15	1–15	0–10	1–15	0–10	0–7	0–20	1–20	1–15	0–10	0–10	0–7
Optimum	3–5	3–6	2–3	2–4	2–4	2–3	5–8	3–6	3–6	2–3	2–4	2–3
Hydrolysis												
Aesculin	–	+	–	–	+	–	–	–	–	+	–	–
Casein	–	–	–	+	–	–	+	–	–	–	–	+
Gelatin	+	+	–	–	+	+	+	–	+	+	–	–
Tween-20	+	–	+	–	+	+	+	–	+	–	+	+
Tween-40	+	+	–	–	–	+	–	–	+	+	+	–
Tween-60	–	+	+	–	+	+	–	+	–	+	+	–
Tween-80	+	–	–	–	+	–	–	+	+	–	–	–
Urea	–	+	–	+	–	+	+	–	–	+	–	+
Diameter of yellowish cycle on CSA plate (mm)	10	11	9	7	10	12	25	21	14	24	17	15

The strains of the serial numbers 1 to 12 referred to were in sequences of JSM ZJ388/395/511/528/529/576/756/844/972/1002/1192/1199. Colony color: B, brown; C, cream; G-B, grayish brown; G-Y, grayish yellow; L-Y, light yellow; W, white; Y, yellow. +, Positive; –, Negative.

上，实验菌株或与微泡菌属的典型菌株形成进化簇，并在其中占据独立的进化分支 (JSM ZJ756)；或 2–4 个菌株相互聚集形成较为独立的亚簇后，再与其他典型菌株构成更大的进化簇。具体来说，菌株 JSM ZJ756 与 *M. zhoushanensis* TT30^T (99.38%)、*M. sediminum* TT37^T (98.41%)、*M. yueqingensis* CGMCC 1.10658^T (96.88%)

和 *M. celer* ISL-39^T (96.67%)较松散地聚为一簇 (cluster)，其中前 3 个菌株形成紧密的亚簇 (subcluster)。然而，菌株 JSM ZJ756 在系统发育树上形成了相对独立进化分支；其他 11 个实验菌株则相互聚集于 3 个较大进化簇中。菌株 JSM ZJ576 等 4 株与 *M. echini* AM134^T 等 4 个典型菌株聚为一个大簇，菌株 JSM ZJ388 等 4 株

表2 微泡菌属12株产铁载体海洋细菌与其系统发育关系密切典型菌株的16S rRNA基因序列相似性

Table 2 Similarities of 16S rRNA gene sequences of 12 marine siderophore-producing bacteria vs. phylogenetically close type strains of the genus *Microbulbifer*

序号 Number	菌株(序列号) Strain (accession number)	密切相关物种/典型菌株(top3) (序列号) Closely relative species/type strain (top3) (accession number)	相似性 Similarity (%)
1	JSM ZJ388 (PQ533015)	<i>Microbulbifer elongates</i> DSM 6810 ^T (AF500006)	99.03
		<i>Microbulbifer salipaludis</i> SM1 ^T (AF479688)	98.54
		<i>Microbulbifer hydrolyticus</i> DSM 11525 ^T (AJ608704)	98.26
2	JSM ZJ395 (PQ533016)	<i>Microbulbifer elongates</i> DSM 6810 ^T (AF500006)	98.82
		<i>Microbulbifer salipaludis</i> SM1 ^T (AF479688)	98.34
		<i>Microbulbifer hydrolyticus</i> DSM 11525 ^T (AJ608704)	98.06
3	JSM ZJ511 (PQ533017)	<i>Microbulbifer mangrove</i> DD-13 ^T (LZDE01000120)	99.36
		<i>Microbulbifer salipaludis</i> SM1 ^T (AF479688)	98.58
		<i>Microbulbifer hydrolyticus</i> DSM 11525 ^T (AJ608704)	98.44
4	JSM ZJ528 (PQ533018)	<i>Microbulbifer agarilyticus</i> JAMBA3 ^T (AB158515)	99.45
		<i>Microbulbifer salipaludis</i> SM1 ^T (AF479688)	97.58
		<i>Microbulbifer elongates</i> DSM 6810 ^T (AF500006)	93.31
5	JSM ZJ529 (PQ533019)	<i>Microbulbifer salipaludis</i> SM1 ^T (AF479688)	98.81
		<i>Microbulbifer hydrolyticus</i> DSM 11525 ^T (AJ608704)	98.81
		<i>Microbulbifer mangrove</i> DD-13 ^T (LZDE01000120)	98.46
6	JSM ZJ576 (PQ533020)	<i>Microbulbifer variabilis</i> Ni-2088 ^T (AB167354)	98.82
		<i>Microbulbifer echini</i> AM134 ^T (KJ789957)	98.61
		<i>Microbulbifer epialgicus</i> F-104 ^T (AB266054)	98.47
7	JSM ZJ756 (PQ516908)	<i>Microbulbifer zhoushanensis</i> TT30 ^T (OM349535)	99.38
		<i>Microbulbifer sediminum</i> TT37 ^T (OM349539)	98.41
		<i>Microbulbifer hydrolyticus</i> DSM 11525 ^T (AJ608704)	97.09
8	JSM ZJ844 (PQ533021)	<i>Microbulbifer variabilis</i> Ni-2088 ^T (AB167354)	98.79
		<i>Microbulbifer echini</i> AM134 ^T (KJ789957)	98.52
		<i>Microbulbifer epialgicus</i> F-104 ^T (AB266054)	98.38
9	JSM ZJ972 (PQ533022)	<i>Microbulbifer hydrolyticus</i> DSM 11525 ^T (AJ608704)	98.93
		<i>Microbulbifer salipaludis</i> SM1 ^T (AF479688)	98.78
		<i>Microbulbifer mangrove</i> DD-13 ^T (LZDE01000120)	98.28
10	JSM ZJ1002 (PQ533023)	<i>Microbulbifer hydrolyticus</i> DSM 11525 ^T (AJ608704)	98.97
		<i>Microbulbifer salipaludis</i> SM1 ^T (AF479688)	98.83
		<i>Microbulbifer mangrove</i> DD-13 ^T (LZDE01000120)	98.35
11	JSM ZJ1192 (PQ533024)	<i>Microbulbifer variabilis</i> Ni-2088 ^T (AB167354)	99.03
		<i>Microbulbifer epialgicus</i> F-104 ^T (AB266054)	98.83
		<i>Microbulbifer echini</i> AM134 ^T (KJ789957)	98.76
12	JSM ZJ1199 (PQ533025)	<i>Microbulbifer variabilis</i> Ni-2088 ^T (AB167354)	99.24
		<i>Microbulbifer epialgicus</i> F-104 ^T (AB266054)	99.04
		<i>Microbulbifer echini</i> AM134 ^T (KJ789957)	98.97

与 *M. agarilyticus* JAMBA3^T 和 *M. elongates* DSM 6810^T 聚为另一个簇, JSM ZJ511 等 3 株与 *M. mangrove* DD-13^T 等 3 个典型菌株聚为第 3 簇。

2.3 基因组测序和系统分类特征比较

为了更准确地判定实验菌株的系统发育地位, 选择了产铁载体活性较强的 JSM ZJ756 为代表, 测定了其基因组框架图, 并进行了基因

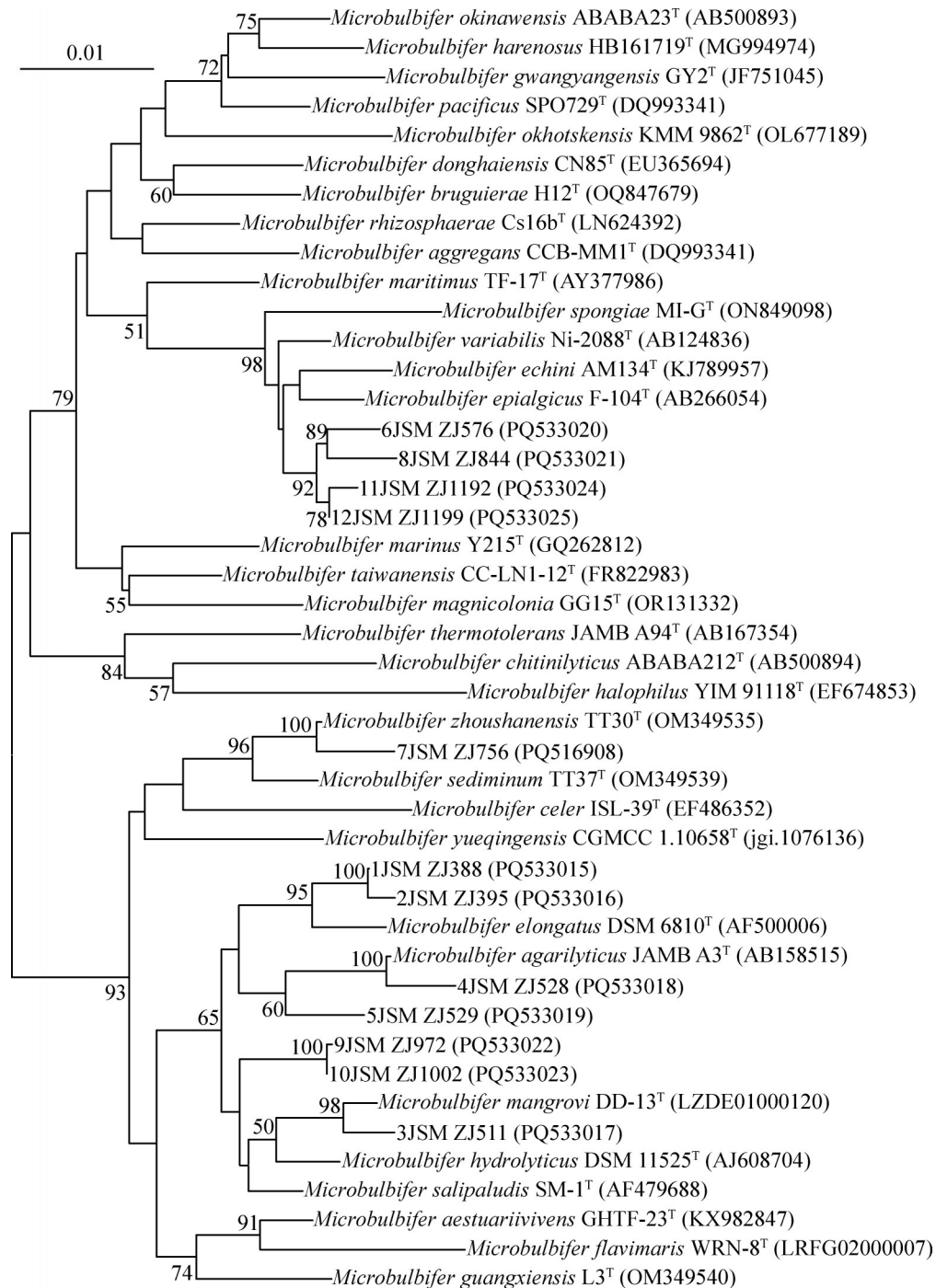


图1 采用邻接法基于16S rRNA基因序列构建的12株产铁载体海洋细菌和微泡菌属所有已知物种典型菌株的系统发育树

Figure 1 Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequences showing the phylogenetic relationship of 12 marine siderophore-producing bacteria with type strains of all known species of the genus *Microbulbifer*. Numbers at nodes indicate bootstrap values (>50%) based on neighbor-joining analyses of 1 000 resampled datasets.

型特征的比较。菌株 JSM ZJ756 的基因组大小为 4 221 651 bp, 由 34 个重叠群(contig)构成; N50 长度为 310 838 bp; G+C 含量为 61.25%。含 3 684 个蛋白质编码序列 (protein coding sequence, CDS), 总长度为 3 674 302 bp, 占全长的 87.03%; 含 54 个 tRNA 基因和 4 个 rRNA 基因(包括 2 个 5S rRNA, 1 个 16S rRNA 和 1 个 23S rRNA)。该基因组数据已被存储于 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome>, JBISER010000000)。菌株 JSM ZJ756 与其系统发育关系密切的 10 个微泡菌属已知物种典型菌株基因组之间的 ANI 值和 dDDH 值见表 3。可以看出, 菌株 JSM ZJ756 仅与 *M. zhoushanensis* TT30^T 的 ANI 或 dDDH 估值明显高于细菌物种划分所普遍认可的阈值(ANI 为 95%–96%; dDDH 为 70%) (表 3)。

2.4 产铁载体相关基因簇分析

在微泡菌属的 32 个有效种中, 尽管部分物种如 *M. chitinilyticus*、*M. gwangyangensis*、*M. maritimus* 和 *M. okinawensis* 缺乏基因组数据,

而 *M. agarilyticus*、*M. hydrolyticus* 和 *M. salipaludis* 仅有非典型菌株(non-type strain)的基因组数据, 但仍有 25 个已知物种公布了其典型菌株的基因组数据 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/>, 2024-10-31)。为深入了解菌株 JSM ZJ756 及微泡菌属的产铁载体功能, 将该属的 25 个典型菌株和 3 个非典型菌株(以下统称为代表性菌株)的基因组均用于 BGCs 分析。这 29 个菌株基因组的序列号, 其 antiSMASH 7.0 在线 BGCs 分析结果概览图、各菌株 BGCs 组成、功能及分布的原始数据均已存储在国家微生物科学数据中心(<https://nmbc.cn/resource/attachment/>), 编号为 NMDCX0001729。在 29 个基因组中共发现 23 大类 179 个拷贝的 BGCs, 平均每菌拥有 4.9 类 6.2 个; 菌株 JSM ZJ756 拥有 6 类 7 个 BGCs。较广泛分布(广布型) BGCs 主要有 RiPP-like (所有 29 个菌株都有, 共 58 个拷贝)、Ectoine (26 菌)、NRPS (12 菌)、NRPS-like (11 菌)、NI-siderophore (10 菌)和 Resorcinol (9 菌); 菌株 JSM ZJ756 拥有除 NRPS 外的其他 5 类广布型

表3 菌株JSM ZJ756与系统发育关系密切的微泡菌属已知物种典型菌株基因组两两比对(top10)

Table 3 Pairwise comparisons of genomes of strain JSM ZJ756 vs. top 10 related type strains of the genus *Microbulbifer*

序号 Number	物种及其代表性菌株 Species/representative strain	基因组序列号 Accession number	基因组大小 Size (bp)	G+C content (%)	ANI (%)	dDDH (formula 2, %)
1	<i>Microbulbifer zhoushanensis</i> TT30 ^T	GCA_021729055.1	4 127 908	61.28	99.42	96.00 (94.6–97.0)
2	<i>Microbulbifer sediminum</i> TT37 ^T	GCA_021729035.1	3 854 156	60.87	84.75	28.80 (26.5–31.3)
3	<i>Microbulbifer hydrolyticus</i> IRE31 [*]	GCA_009931115.1	4 209 307	57.60	74.78	21.60 (19.3–24.0)
4	<i>Microbulbifer salipaludis</i> SN0-2 [*]	GCA_017303155.1	3 979 573	58.35	74.73	21.40 (19.1–23.8)
5	<i>Microbulbifer yueqingensis</i> CGMCC 1.10658 ^T	GCA_900100355.1	3 664 854	62.01	81.26	24.40 (22.1–26.8)
6	<i>Microbulbifer mangrovi</i> DD-13 ^T	GCA_002009015.1	4 507 547	57.15	74.67	21.80 (19.5–24.2)
7	<i>Microbulbifer celer</i> KCTC 12973 ^T	GCA_020991125.1	4 346 001	57.18	71.15	21.40 (19.2–23.9)
8	<i>Microbulbifer marinus</i> CGMCC 1.10657 ^T	GCA_900107725.1	3 982 390	59.75	77.16	21.90 (19.6–24.3)
9	<i>Microbulbifer aestuariivivens</i> NBRC 112533 ^T	GCA_039545115.1	3 405 539	59.65	76.98	21.80 (19.6–24.3)
10	<i>Microbulbifer elongates</i> DSM 6810 ^T	GCA_021165935.1	4 196 952	57.57	74.95	21.40 (19.2–23.9)

^{*}: 非典型菌株。

^{*}: Non-type strain.

BGCs。其中与适应(海洋)盐环境直接相关的是相容性溶质四氢嘧啶(ectoine)生物合成基因簇(Ectoine 基因簇),与铁载体产生直接相关的是铁载体生物合成基因簇(NI-siderophore 基因簇)。本研究对铁载体生物合成功能基因簇 NI-siderophore 进行了较深入的分析。

2.4.1 菌株 JSM ZJ756 及微泡菌属代表性菌株铁载体合成基因簇结构

在菌株 JSM ZJ756 及 9 个代表性菌株基因组中各发现一个铁载体生物合成基因簇(NI-siderophore)。这 10 个菌株的 BGCs 组成和功能数据已提交国家微生物科学数据中心(编号:NMDCX0001729),各菌株 NI-siderophore 基因簇的结构如表 4 所示。所有 NI-siderophore 基因簇均含有铁载体生物合成核心基因、附加基因和其他未分类基因,半数菌株含有调节基因;除了菌 12(*M. agarilyticus* GP101)只含 1 个核心基因且无转运基因外,其他菌株各有 2 个核心

基因和 1-3 个转运基因(表 4)。

2.4.2 菌株 JSM ZJ756 及微泡菌属代表性菌株铁载体合成基因簇功能多样性

根据匹配已知基因簇的种类及其相似性,菌株 JSM ZJ756 及 9 个微泡菌属代表性菌株的 NI-siderophore 基因簇可以分为 5 个功能亚型(表 5)。菌株 JSM ZJ756、*M. zhoushanensis* TT30^T 和 *M. sediminum* TT37^T 含有的 NI-siderophore 均 28% 相似于 *Ochrobactrum anthropi* 的 Ochrobactin 合成基因簇(序列号:JYFX01000060.1)^[51];菌 6 和菌 26 的 NI-siderophore 分别 100% 和 85% 相似于 *Vibrio parahaemolyticus* 或 *Azotobacter vinelandii* CA 的 Vibrioferrin (AB082123.1; CP005094.1)^[52-53];菌 12 和 25 的 NI-siderophore 分别与 Putrebactin (NIBS01000001.1; 相似性 40%) 和 Aerobactin (AB199785.1; 22%) 相似^[54-55];未发现与菌 22、29 和 32 相匹配的已知铁载体合成相关功能基因簇。一般认为低于 85% 相似度的基因簇具有独

表4 菌株JSMZJ756和9个微泡菌属已知物种代表性菌株铁载体合成基因簇结构

Table 4 BGC-type NI-siderophores of strain JSM ZJ756 and representatives of nine known species of the genus *Microbulbifer*

序号 Number	菌株(基因组序列号) Strain (accession number for the genome)	大小 Size (bp)	基因簇结构 Structure of BGC-type NI-siderophore				
			核心合成基因 Core biosynthetic (bp)	附加合成 基因 Biosynthetic- additional	调节基因 Regulatory	转运 基因 Transport	其他 Others
J	JSM ZJ756 (JBISER010000000)	32 781	2 (1 710, 1 836)	9	0	1	12
1	<i>M. zhoushanensis</i> TT30 ^T (GCA_021729055.1)	32 781	2 (1 710, 1 836)	9	0	1	12
2	<i>M. sediminum</i> TT37 ^T (GCA_021729035.1)	32 730	2 (1 863, 1 848)	8	0	1	12
6	<i>M. mangrovi</i> DD-13 ^T (GCA_002009015.1)	20 840	2 (1 002, 1 335)	3	3	2	17
12 ^S	<i>M. agarilyticus</i> GP101 (GCA_001999945.1)	3 012	1 (2 412)	5	1	0	20
22	<i>M. variabilis</i> ATCC 700307 ^T (GCA_000380565.1)	32 698	2 (1 821, 1 866)	8	1	1	17
25	<i>M. echini</i> JCM 30400 ^T (GCA_041447225.1)	32 776	2 (1 821, 1 944)	6	1	1	15
26	<i>M. epialgicus</i> DSM 18651 ^T (GCA_041447265.1)	29 529	2 (1 743, 1 806)	2	0	3	19
29	<i>M. okhotskensis</i> OS29 ^T (GCA_023895975.1)	9 179	2 (1 821, 1 866)	2	0	1	4
32	<i>M. spongiae</i> MI-G ^T (GCA_030440425.1)	32 716	2 (1 824, 1 866)	6	1	2	14

^S: 非典型菌株。

^S: Non-type strain.

表5 菌株JSM ZJ756和9个微泡菌属已知物种代表性菌株铁载体合成基因簇功能分型*

Table 5 Function-based sup-types of BGC-type NI-siderophores of strain JSM ZJ756 and representatives of 9 known species of the genus *Microbulbifer**

基因簇类型 [#]	最相似已知基因簇 [§]	J	1	2	6	12 [§]	22	25	26	29	32
Type of BGCs [#]	Most similar known cluster [§]										
NI-siderophore (1)	Ochrobactin (JYFX01000060.1)	28	28	28	-	-	-	-	-	-	-
NI-siderophore (2)	Vibrioferrin (AB082123.1; CP005094.1)	-	-	-	100	-	-	-	85	-	-
NI-siderophore (3)	Putrebactin (NIBS01000001.1)	-	-	-	-	40	-	-	-	-	-
NI-siderophore (4)	Aerobactin (AB199785.1)	-	-	-	-	-	-	22	-	-	-
NI-siderophore (5)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+

*第一行序数所指代菌株同表3; [#]带括号序号表示基因簇功能亚型(sup-type); [§]某菌株相应基因簇的数值表示与最相似已知基因簇的相似性(%); [§]非典型菌株; +: 检测到; -: 未检测到。

*: One of the ordinal numerals on the first line was designated for the same strain as in Table 3; [#]: That with a serial number in parentheses was a sup-type; [§]: The value relevant to a strain as well as the relative BGC was the similarity with the most similar known cluster (%); [§]: Non-type strain. +: Detected; -: Not detected.

特的基因序列, 具有产生新颖生物活性物质的潜力^[56-57]。基于 NI-siderophore 核心基因编码功能蛋白氨基酸序列的 BLASTp 分析结果显示, 除了菌株 12 (*M. agarilyticus* GP101)的核心基因只编码 1 个核心功能蛋白 GNAT family N-acetyltransferase 外, 其他菌株均编码 2 个铁载体合成功能蛋白。另外, BLASTp 搜索显示共计 19 个核心功能蛋白中有高达 12 个(63.2%)与数据库中同类酶氨基酸序列的相似性低于 85%, BLASTn 分析发现有 6 个核心基因(31.6%)未搜索到匹配序列(no significant similarity found)(编号: NMDCX0001729)。总之, antiSMASH 7.0 分析发现的 NI-siderophore 型生物合成基因簇与多种不同已知基因簇存在显著相似性差异, BLASTp 和 BLASTn 分析发现不同菌株 NI-siderophore 基因簇的核心蛋白和核心基因序列存在丰富的多样性。这些结果提示菌株 JSM ZJ756 及微泡菌属代表性菌株 NI-siderophore 基因簇具有较高的功能多样性和突出的新颖性。

2.4.3 菌株 JSM ZJ756 及微泡菌属代表性菌株铁载体合成基因簇遗传多样性及其演化

菌株 JSM ZJ756 和 9 个微泡菌属代表性菌

株的 NI-siderophore 基因簇中共包含 19 个核心基因, 其中菌株 12 (*M. agarilyticus* GP101)仅含有 1 个较大的核心基因(2 412 bp), 而其他菌株均拥有 2 个核心基因(较大的标识为-1, 较小的为-2)。BLASTn 分析发现, 这 19 个核心基因中, 有 7 个(36.8%)与数据库中同源序列的相似性低于 83%, 更有 6 个(31.6%)未搜索到匹配序列(no significant similarity found)(编号: NMDCX0001729), 表明菌株 JSM ZJ756 及微泡菌属代表性菌株的 NI-siderophore 基因簇具有较为新颖的核心基因序列。基于核心基因序列的 NI-siderophore 遗传演化分析结果, 发现除了菌株 JSM ZJ756 和 *M. zhoushanensis* TT30^T 的 NI-siderophore 核心基因高度相似外, 其他 9 个 NI-siderophore 基因簇的核心基因均展现出较高的遗传多样性。在基于核心基因序列构建的系统发育树上, 9 个菌株分别聚集成 3 个相对独立的系统进化簇(cluster), 而菌株 12 (*M. agarilyticus* GP101)占据 1 个孤立进化分支(图 2)。具体而言, 菌株 JSM ZJ756、1 和 2 形成一个独立进化簇(簇 I, 红色), 菌株 22、25、29 和 32 聚集成簇 II (绿色), 菌株 6 和 26 聚集成簇 III (蓝色)。

相对而言, 簇 I 和 II 的系统发育关系较为紧密, 而簇 III 较为独立。然而, 簇 I 和 II 菌株的 NI-siderophore 基因簇中的 2 个核心基因分别形成了独立的簇群, 而簇 III 菌株的 2 个核心基因则聚在同一个簇内。此外, 菌株 12 (*M. agarilyticus* GP101) 的 NI-siderophore 基因簇较为独特, 仅含有 1 个核心基因, 并且该基因与簇 I 和 II 菌株中较小的核心基因在系统发育关系上较为密切, 在其外围形成了一个进化分支。以上结果表明, 菌株 JSM ZJ756 和微泡菌属代表性菌株的 NI-siderophore 基因簇具有较丰富的遗传多样性, 其中 9 个菌株的 NI-siderophore 基因簇形成了 3 个独立的遗传演化簇群, 而菌株 12 (*M. agarilyticus* GP101) 的 NI-siderophore 基因簇则呈现出相对独立的演化路径。

进一步对比分析发现, 拥有相同 NI-siderophore 功能亚型的菌株(表 5)在基于其核心基因序列构建的发育树上也聚在一起(图 2), 即 Ochrobactin 亚型(包括 JSM ZJ756、菌 1、菌 2)和 Vibrioferin 亚型(包括菌 6、菌 26)菌株组分别对应核心基因发育树上的 I 簇和 III 簇, 未知亚型(包括菌 22、菌 29、菌 32)和 Aerobactin 亚型(菌 25)对应簇 II, 而 Putrebactin 亚型(菌 12)对应树上菌 12 的独立进化分支。这一结果明确显示了这些 NI-siderophore 基因簇的生物功能与遗传背景之间的统一性。另外, 在核心基因进化树上成簇的菌株(图 2), 在基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树上也基本聚在一起(图 1)。具体而言, 核心基因发育树上的簇 I 和簇 II 菌株在 16S rRNA 基因系统发育树上分别形

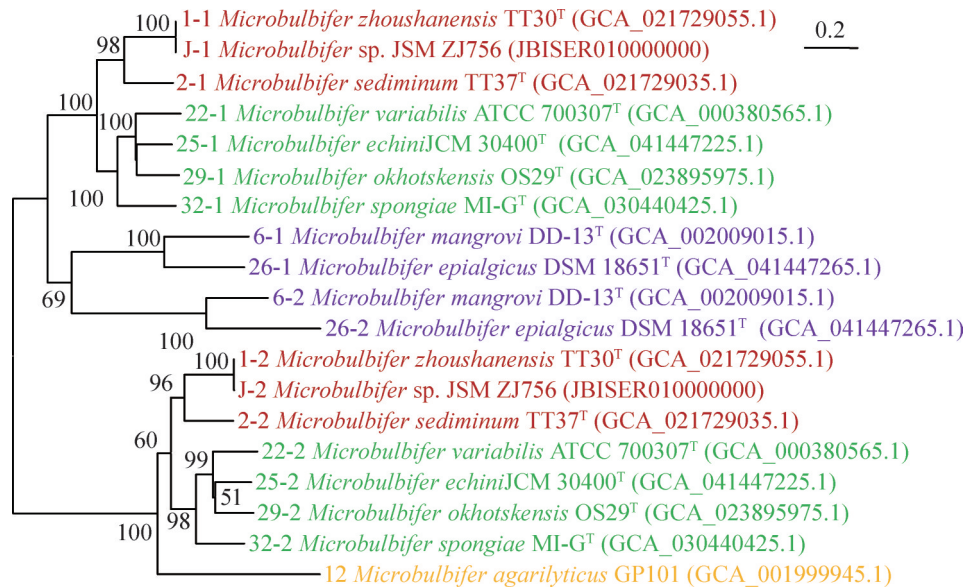


图2 采用邻接法基于JSM ZJ576及9个微泡菌属已知物种代表性菌株铁载体基因簇核心基因序列构建的系统发育树。种名前的编号为菌株序号-基因序号, 同表3。

Figure 2 Neighbor-joining tree based on core biosynthetic gene sequences of BGCs-type NI-siderophore showing the phylogenetic relationship of strain JSM ZJ756 with 9 representatives of the genus *Microbulbifer*. The strain serial numbers of 1–32 before species names were respectively designated to the same species as in Table 3, and the flowed-1 or -2 were respectively designated to one of the two core biosynthetic genes of a BGCs-type NI-siderophore. Numbers at nodes indicate bootstrap values (>50%) based on neighbor-joining analyses of 1 000 resampled datasets.

成独立的系统发育支系(clade); 菌株 12 也形成相对独立的进化分支; 只是簇 III 的 2 个菌株分开了, 其中菌 25 与簇 III 菌株聚在一起, 而菌株 6 则与 2 个无铁载体菌株(菌 3、菌 4)较稳定地聚在一起。相比之下, 绝大多数不含铁载体或无基因组数据的菌株则分别分布于其他簇群中(编号: NMDCX0001729)。这一结果表明, 多数含铁载体基因簇的微泡菌属菌株的铁载体合成功能的遗传演化与这些菌株的系统发育史存在较大的一致性。

3 讨论与结论

海洋微生物为了应对独特的海洋环境, 演化出了多种多样的环境适应策略, 如耐盐和铁摄取等关键功能。微泡菌属(*Microbulbifer*)作为常见的海洋细菌, 除了 *M. hydrolyticus*^[35] 和 *M. halophilus*^[58] 分别分离自内陆高盐土壤和高盐造纸废水池沉积物外, 其他 30 个物种均源自海洋环境, 特别是海洋沉积物, 如潮汐带、盐沼、红树林、入海口、湾区、深海和晒盐池等, 该属的部分物种也被发现于海岸沙土、盐沼植物根际以及海洋动植物(如海胆、海绵、海藻)体内。本研究对分离自雷州湾硇洲岛潮汐带沉积物的 12 株产铁载体革兰氏阴性菌株进行了系统发育分析, 结果显示这些菌株均隶属于微泡菌属, 并与该属的 9 个已知物种存在紧密的系统发育关系, 但展现出较高的系统发育多样性, 可划分为 6–8 个物种, 其中菌株 JSM ZJ756 属于舟山微泡菌(*M. zhoushanensis*)^[59]。次级代谢产物生物合成基因簇分析发现, 菌株 JSM ZJ756 及 28 个具有基因组数据的微泡菌属代表性菌株(涵盖 25 个典型菌株和 3 个非典型菌株)共含有 23 大类、179 个 BGCs, 平均每菌拥有 4.9 类、6.2 个; 广布型 BGCs 主要有 RiPP-like、Ectoine、NRPS、NRPS-like、NI-siderophore 和 Resorcinol;

菌株 JSM ZJ756 拥有除 NRPS 外的其他 5 类广布型 BGCs; 有 25 株菌(86.2%)拥有与适应(海洋)盐环境直接相关的相容性溶质四氢嘧啶(ectoine)生物合成基因簇(Ectoine 基因簇), 而 10 株菌拥有与铁载体产生直接相关的生物合成基因簇(NI-siderophore 基因簇)。

antiSMASH 7.0 分析发现, 菌株 JSM ZJ756 及 9 个微泡菌属代表性菌株的 NI-siderophore 基因簇与多种已知基因簇存在显著的相似性差异, 并可被划分为 5 个功能亚型: 菌株 JSM ZJ756、*M. zhoushanensis* TT30^T 和 *M. sediminum* TT37^T 含有 Ochrobactin 亚型(序列号 JYFX01000060.1, 相似性 28%); 菌 6 和菌 26 为 Vibrioferrin 亚型(AB082123.1. 100%; CP005094.1 85%); 菌 12 为 Putrebactin 亚型(NIBS01000001.1, 40%); 菌 25 为 Aerobactin 亚型(AB199785.1, 22%); 而菌 22、29 和 32 的 NI-siderophore 基因簇未发现相匹配的已知铁载体合成相关功能基因簇(未知亚型)。一般认为, 相似度低于 85% 的基因簇具有独特的基因序列, 并具备产生新颖生物活性物质的潜力^[56–57]。BLASTn 和 BLASTp 分析进一步证实了不同菌株 NI-siderophore 基因簇的核心基因序列和核心功能蛋白的多样性。基于 NI-siderophore 基因簇核心基因序列的 BLASTn 分析发现, 19 个核心基因中有 7 个(36.8%)与数据库中同源序列的相似性低于 83%, 更有 6 个(31.6%)未搜索到匹配序列(no significant similarity found), 表明菌株 JSM ZJ756 及微泡菌属代表性菌株 NI-siderophore 基因簇核心基因序列的独特性; BLASTp 搜索显示, 有高达 12 个核心基因编码功能蛋白(63.2%)的氨基酸序列与数据库中同类酶的相似性低于 85%, 提示该类蛋白功能的新颖性。

基于核心基因序列的遗传演化分析结果进一步证实了菌株 JSM ZJ756 和 9 个微泡菌属代

表性菌株的 NI-siderophore 基因簇存在较高的遗传多样性。其中, 9 个菌株的 NI-siderophore 基因簇核心基因分别归属于 3 个独立的遗传演化群, 而菌株 12 (*M. agarilyticus* GP101) 的 NI-siderophore 基因簇则展现出相对独立的演化路径。对比分析发现, 同一遗传演化群的菌株(图 2)往往拥有相同功能亚型的 NI-siderophore 基因簇(表 5), 明确显示了这些 NI-siderophore 基因簇的生物功能与其遗传背景的一致性。此外, 在核心基因进化树上成簇的菌株(图 2), 在基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树上也基本聚在一起(图 1), 提示多数含铁载体基因簇的微泡菌属菌株的铁载体合成功能的遗传演化与这些菌株的系统发育史存在一致性。综合分析结果显示, 本研究中的 12 个具铁载体活性的实验菌株与微泡菌属含铁载体代表性菌株的系统发育关系密切(表 2、图 1、图 3)。在 16S rRNA 基因系统发育树上, 菌株 JSM ZJ756 与核心基因遗传演化群 I 的菌株形成了稳定的进化簇, JSM ZJ576 等 4 个实验菌株与演化群 II 的菌株聚在一起, JSM ZJ388 等 4 个菌株与含铁载体的 *M. agarilyticus* JAMBA3^T 以及 1 个不含铁载体菌株聚在一起, 其他 3 个实验菌株则与演化群 III 中含铁载体菌之一的 *M. mangrovi* DD-13^T 及 2 个不含铁载体的菌株系统发育关系密切。而在不含铁载体的菌株形成的进化簇群中, 未发现实验菌株的分布(图 1)。这一结果进一步支持了微泡菌属菌株铁载体相关功能的演化与其系统发育存在密切的正向关联, 并提示这些实验菌株具有较高的产铁载体功能多样性。

综上所述, 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析和比较基因组学分析结果表明, 本研究中的 12 个实验菌株均隶属于微泡菌属, 具有较高的遗传多样性和物种多样性, 可归属于 6-8 个物种, 分属于微泡菌属的 4 个进化系

(clade), 其中菌株 JSM ZJ756 被确认为舟山微泡菌的新成员。antiSMASH 基因簇分析发现, 菌株 JSM ZJ756 及 9 个微泡菌属代表性菌株各具有一个铁载体生物合成基因簇(NI-siderophore), 且多数与已知同类型基因簇的相似性在 40% 及以下, 可被划分为 5 个功能亚型; BLASTn 和 BLASTp 搜索结果显示, 这些基因簇具有独特的核心基因序列和编码新颖功能蛋白的能力。基于核心基因序列的遗传演化分析表明, 其中 9 个 NI-siderophore 基因簇属于 3 个独立的遗传演化群, 而菌株 *M. agarilyticus* GP101 的演化路径则相对独立。综合以上分析, 分离自雷州湾硇洲岛潮汐带沉积物的 12 个产铁载体菌株属于微泡菌属, 具有较高的系统发育多样性; 菌株 JSM ZJ756 及微泡菌属(代表性菌株)的铁载体生物合成基因簇具有较高的多样性和突出的新颖性, 具有较大的产生新颖多样铁载体的潜力。因此, 包括实验菌株在内的微泡菌属微生物是一类值得进一步研究和生物技术利用的新微生物资源^[38,60]。此外, 本研究还发现菌株 JSM ZJ756 及 9 个微泡菌属代表性菌株的 NI-siderophore 基因簇的生物功能、遗传演化, 以及这些菌株的系统发育之间存在较高的正向关联性。这些基因簇的具体功能演化历史及其与相关属种系统发育史的内在联系值得进一步深入探讨。

作者贡献声明

汤倩: 菌株分离纯化, 系统发育分析, 论文写作; 陈锦华: 菌株鉴定, 比较基因组学分析, 论文指导和修改; 邓丽颖: 菌株分离纯化, 次级代谢活性筛选; 达春瑶: 菌株保存, 次级代谢基因簇分析; 刘祝祥: 样品采集, 实验设计和指导; 陈义光: 系统发育、核心基因演化及其对比分析, 论文修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] CHHABRA R, SAHA A, CHAMANI A, SCHNEIDER N, SHAH R, NANJUNDAN M. Iron pathways and iron chelation approaches in viral, microbial, and fungal infections[J]. *Pharmaceuticals*, 2020, 13(10): 275.
- [2] LIU LL, WANG W, WU SH, GAO HC. Recent advances in the siderophore biology of *Shewanella*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 823758.
- [3] SANDY M, BUTLER A. Microbial iron acquisition: marine and terrestrial siderophores[J]. *Chemical Reviews*, 2009, 109(10): 4580-4595.
- [4] KHASHEI B, MAHMOODI P, MOHAMMADZADEH A. Siderophores: importance in bacterial pathogenesis and applications in medicine and industry[J]. *Microbiological Research*, 2021, 250: 126790.
- [5] CAI Y, WANG R, AN MM, LIANG BB. Iron-depletion prevents biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* through twitching motility and quorum sensing[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2010, 41(1): 37-41.
- [6] 胡碧惠, 赵春贵, 杨素萍. 铁对产铁载体的沼泽红假单胞菌光合色素与铁载体合成的影响[J]. *微生物学报*, 2014, 54(4): 408-416.
HU BH, ZHAO CG, YANG SP. Influence of iron on siderophore and photosynthetic pigments biosynthesis by siderophore-producing *Rhodospirillum rubrum* [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(4): 408-416 (in Chinese).
- [7] KHAN A, SINGH P, SRIVASTAVA A. Synthesis, nature and utility of universal iron chelator-siderophore: a review[J]. *Microbiological Research*, 2018, 212: 103-111.
- [8] FAN D, FANG QJ. Siderophores for medical applications: imaging, sensors, and therapeutics[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2021, 597: 120306.
- [9] AHMED E, HOLMSTRÖM SJM. Siderophores in environmental research: roles and applications[J]. *Microbial Biotechnology*, 2014, 7(3): 196-208.
- [10] 张笑雨, 朱建明, 蔡中华, 周进. 海洋微生物铁载体的研究进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2022, 49(9): 1658-1671.
ZHANG XY, ZHU JM, CAI ZH, ZHOU J. The research advance of siderophores in marine microbes[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2022, 49(9): 1658-1671 (in Chinese).
- [11] GOLONKA R, YEOH BS, VIJAY-KUMAR M. The iron tug-of-war between bacterial siderophores and innate immunity[J]. *Journal of Innate Immunity*, 2019, 11(3): 249-262.
- [12] KAEFERLEIN T, LEWIS K, EPSTEIN SS. Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment[J]. *Science*, 2002, 296(5570): 1127-1129.
- [13] D'ONOFRIO A, CRAWFORD JM, STEWART EJ, WITT K, GAVRISH E, EPSTEIN S, CLARDY J, LEWIS K. Siderophores from neighboring organisms promote the growth of uncultured bacteria[J]. *Chemistry & Biology*, 2010, 17(3): 254-264.
- [14] BENEDUZI A, AMBROSINI A, PASSAGLIA LMP. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents[J]. *Genetics and Molecular Biology*, 2012, 35(S4): 1044-1051.
- [15] TRIVEDI P, LEACH JE, TRINGE SG, SA TM, SINGH BK. Plant-microbiome interactions: from community assembly to plant health[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(11): 607-621.
- [16] 邓声坤, 雷锋杰, 龙漪萍, 张焕荣, 姜懿轩, 张爱华. 细菌铁载体拮抗植物病原真菌及促生作用研究进展[J]. *微生物学通报*, 2023, 50(7): 3198-3210.
DENG SK, LEI FJ, LONG YP, ZHANG HR, JIANG YX, ZHANG AH. Bacterial siderophores antagonize phytopathogenic fungi and promote plant growth: a review[J]. *Microbiology China*, 2023, 50(7): 3198-3210 (in Chinese).
- [17] TANG YK, KANG HY, QIN ZY, ZHANG KX, ZHONG YX, LI HL, MO LH. Significance of manganese resistant *Bacillus cereus* strain WSE01 as a bioinoculant for promotion of plant growth and manganese accumulation in *Myriophyllum verticillatum*[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 707: 135867.
- [18] ROSKOVA Z, SKAROHLID R, MCGACHY L. Siderophores: an alternative bioremediation strategy? [J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 819: 153144.
- [19] 李玉霞, 宋柳霆, 张雅琴, 刘骥源, 陈海洋, 杨洁, 左锐. 铁载体在环境污染与资源利用中的应用研究进展[J]. *地球科学与环境学报*, 2023, 45(6): 1330-1340.
LI YX, SONG LT, ZHANG YQ, LIU QY, CHEN HY, YANG J, ZUO R. Review on the application of siderophores in environmental pollution and resource utilization[J]. *Journal of Earth Sciences and Environment*, 2023, 45(6): 1330-1340 (in Chinese).
- [20] CHUNG CHUN LAM CK, JICKELLS TD, RICHARDSON DJ, RUSSELL DA. Fluorescence-based siderophore biosensor for the determination of bioavailable iron in oceanic waters[J]. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(14): 5040-5045.
- [21] NOSRATI R, DEGHANI S, KARIMI B, YOUSEFI M, TAGHDISI SM, ABNOUS K, ALIBOLANDI M, RAMEZANI M. Siderophore-based biosensors and nanosensors; new approach on the development of diagnostic systems[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2018, 117: 1-14.
- [22] MÖLLMANN U, HEINISCH L, BAUERNFEIND A, KÖHLER T, ANKEL-FUCHS D. Siderophores as drug delivery agents: application of the "Trojan horse" strategy [J]. *BioMetals*, 2009, 22(4): 615-624.
- [23] HUANG YZ, JIANG YF, WANG HY, WANG JX, SHIN MC, BYUN Y, HE HN, LIANG YQ, YANG VC. Curb challenges of the "Trojan horse" approach: smart strategies in achieving effective yet safe cell-penetrating peptide-based drug delivery[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013, 65(10): 1299-1315.

- [24] NEGASH KH, NORRIS JKS, HODGKINSON JT. Siderophore-antibiotic conjugate design: new drugs for bad bugs?[J]. *Molecules*, 2019, 24(18): 3314.
- [25] AOKI T, YOSHIZAWA H, YAMAWAKI K, YOKOO K, SATO J, HISAKAWA S, HASEGAWA Y, KUSANO H, SANO M, SUGIMOTO H, NISHITANI Y, SATO T, TSUJI M, NAKAMURA R, NISHIKAWA T, YAMANO Y. Cefiderocol (S-649266), a new siderophore cephalosporin exhibiting potent activities against *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative pathogens including multi-drug resistant bacteria: structure activity relationship[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, 155: 847-868.
- [26] 邹俊扬, 王晓娟, 王辉. 头孢地尔: 新型铁载体头孢菌素抗多重耐药革兰阴性杆菌感染[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(3): 990-1003.
KUAI JY, WANG XJ, WANG H. Cefiderocol: a novel siderophore cephalosporin against multi-drug resistant Gram-negative bacilli infections[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(3): 990-1003 (in Chinese).
- [27] IMLAY JA. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, 11(7): 443-454.
- [28] PIETRANGELO A. Mechanism of iron toxicity[M]// *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Boston, MA: Springer US, 2002: 19-43.
- [29] TSAFACK A, LIBMAN J, SHANZER A, CABANTCHIK ZI. Chemical determinants of antimalarial activity of reversed siderophores[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1996, 40(9): 2160-2166.
- [30] MIETHKE M, MARAHIEL MA. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2007, 71(3): 413-451.
- [31] 门晋名. 铁载体高产菌的筛选及铁载体的分离纯化[D]. 青岛: 青岛科技大学硕士学位论文, 2013.
MEN JM. The selection of high-yield siderophores production strains and separation and purification of the siderophores[D]. Qingdao: Master's Thesis of Qingdao University of Science & Technology, 2013 (in Chinese).
- [32] BOYD PW, JICKELLS T, LAW CS, BLAIN S, BOYLE EA, BUESSELER KO, COALE KH, CULLEN JJ, de BAAR HJW, FOLLOWS M, HARVEY M, LANCELOT C, LEVASSEUR M, OWENS NPJ, POLLARD R, RIVKIN RB, SARMIENTO J, SCHOEMANN V, SMETACEK V, TAKEDA S, et al. Mesoscale iron enrichment experiments 1993-2005: synthesis and future directions[J]. *Science*, 2007, 315(5812): 612-617.
- [33] MAWJI E, GLEDHILL M, MILTON JA, TARRAN GA, USSHER S, THOMPSON A, WOLFF GA, WORSFOLD PJ, ACHTERBERG EP. Hydroxamate siderophores: occurrence and importance in the Atlantic Ocean[J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(23): 8675-8680.
- [34] 汤倩. 硃洲岛潮汐带沉积物中产铁载体细菌多样性及相关功能基因分析[D]. 吉首: 吉首大学硕士学位论文, 2020.
TANG Q. Diversity of siderophore-producing bacteria and function genes analysis in which isolated from intertidal sediment from Naozhou Island[D]. Jishou: Master's Thesis of Jishou University, 2020 (in Chinese).
- [35] GONZÁLEZ JM, MAYER F, MORAN MA, HODSON RE, WHITMAN WB. *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[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1997, 47(2): 369-376.
- [36] HATADA Y, MIZUNO M, LI ZJ, OHTA Y. Hyperproduction and characterization of the ι-carrageenase useful for ι-carrageenan oligosaccharide production from a deep-sea bacterium, *Microbulbifer thermotolerans* JAMB-A94T, and insight into the unusual catalytic mechanism[J]. *Marine Biotechnology*, 2011, 13(3): 411-422.
- [37] LI ZP, DU ZP, LI HB, CHEN YH, ZHENG MJ, JIANG ZD, DU XP, NI H, ZHU YB. Characterisation of marine bacterium *Microbulbifer* sp. ALW1 with *Laminaria japonica* degradation capability[J]. *AMB Express*, 2022, 12(1): 139.
- [38] ZHONG WM, AGARWAL V. Polymer degrading marine *Microbulbifer* bacteria: an un(der)utilized source of chemical and biocatalytic novelty[J]. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 2024, 20: 1635-1651.
- [39] GREGERSEN T. Rapid method for distinction of Gram-negative from Gram-positive bacteria[J]. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 1978, 5(2): 123-127.
- [40] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
DONG XZ, CAI MY. Handbook of Identification of Common Bacterial Systems[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese).
- [41] 王卫星, 周晓伦, 李忠玲, 王明鹏, 王卫卫. CAS平板覆盖法检测氢氧化细菌铁载体[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(8): 1692-1697.
WANG WX, ZHOU XL, LI ZL, WANG MP, WANG WW. Detection of siderophore production from hydrogen-oxidizing bacteria with CAS overlay plate method[J]. *Microbiology China*, 2014, 41(8): 1692-1697 (in Chinese).
- [42] CUI XL, MAO PH, ZENG M, LI WJ, ZHANG LP, XU LH, JIANG CL. *Streptimonospora salina* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Nocardiopsaceae*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51(2): 357-363.
- [43] LEE I, OUK KIM Y, PARK SC, CHUN J. OrthoANI: an improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, 66(2): 1100-1103.
- [44] YOON SH, HA SM, LIM J, KWON S, CHUN J. A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2017, 110(10): 1281-1286.
- [45] RICHTER M, ROSSELLÓ -MÓRA R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(45): 19126-19131.
- [46] MEIER-KOLTHOFF JP, CARBASSE JS, PEINADO-OLARTE RL, GÖKER M. TYGS and LPSN: a database

- tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(D1): D801-D807.
- [47] WAYNE LG, MOORE WEC, STACKEBRANDT E, KANDLER O, COLWELL RR, KRICHEVSKY MI, TRUPER HG, MURRAY RGE, GRIMONT PAD, BRENNER DJ, STARR MP, MOORE LH. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1987, 37(4): 463-464.
- [48] MEIER-KOLTHOFF JP, GÖKER M. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 2182.
- [49] BLIN K, SHAW S, AUGUSTIJN HE, REITZ ZL, BIERMANN F, ALANJARY M, FETTER A, TERLOUW BR, METCALF WW, HELFRICH EJN, van WEZEL GP, MEDEMA MH, WEBER T. antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51(W1): W46-W50.
- [50] KIM M, OH HS, PARK SC, CHUN J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(2): 346-351.
- [51] MEIER-KOLTHOFF JP, HAHNKE RL, PETERSEN J, SCHEUNER C, MICHAEL V, FIEBIG A, ROHDE C, ROHDE M, FARTMANN B, GOODWIN LA, CHERTKOV O, REDDY T, PATI A, IVANOVA NN, MARKOWITZ V, KYRPIDES NC, WOYKE T, GÖKER M, KLENK HP. Complete genome sequence of DSM 30083(T), the type strain (U5/41(T)) of *Escherichia coli*, and a proposal for delineating subspecies in microbial taxonomy[J]. *Standards in Genomic Sciences*, 2014, 9: 2.
- [52] TOBIAS NJ, MISHRA B, GUPTA DK, KE LP, THINES M, BODE HB. Draft genome sequence of *Ochrobactrum anthropi* strain ML7 isolated from soil samples in vinhphuc province, Vietnam[J]. *Genome Announcements*, 2015, 3(2): e00218-15.
- [53] TANABE T, FUNAHASHI T, NAKAO H, MIYOSHI SI, SHINODA S, YAMAMOTO S. Identification and characterization of genes required for biosynthesis and transport of the siderophore vibrioferrin in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(23): 6938-6949.
- [54] BAARS O, ZHANG XN, MOREL FMM, SEYEDSAYAMDOST MR. The siderophore metabolome of *Azotobacter vinelandii*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 82(1): 27-39.
- [55] HIRSCHMANN M, GRUNDMANN F, BODE HB. Identification and occurrence of the hydroxamate siderophores aerobactin, putrebactin, avaroferrin and ochrobactin C as virulence factors from entomopathogenic bacteria[J]. *Environmental Microbiology*, 2017, 19(10): 4080-4090.
- [56] SUZUKI K, TANABE T, MOON YH, FUNAHASHI T, NAKAO H, NARIMATSU S, YAMAMOTO S. Identification and transcriptional organization of aerobactin transport and biosynthesis cluster genes of *Vibriohollissae*[J]. *Research in Microbiology*, 2006, 157(8): 730-740.
- [57] 刘超兰, 黎江华, 郭义东. 2株小双孢菌新种的全基因组测序分析与抗菌活性测定[J]. *微生物学通报*, 2021, 8(5): 1662-1673.
- LIU CL, LI JH, GUO YD. Whole genome sequencing and antibacterial activity determination of two novel species of *Microbispora*[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(5): 1662-1673 (in Chinese).
- [58] TANG SK, WANG Y, CAI M, LOU K, MAO PH, JIN X, JIANG CL, XU LH, LI WJ. *Microbulbifer halophilus* sp. nov., a moderately halophilic bacterium from north-west China[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58(9): 2036-2040.
- [59] FU YH, WU ZC, KONG YH, XU XW, SUN C, WU YH. *Microbulbifer zhoushanensis* sp. nov., *Microbulbifer sediminum* sp. nov. and *Microbulbifer guangxiensis* sp. nov., three marine bacteria isolated from a tidal flat[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2023, 73: 005842.
- [60] 赵心清, 彭楠. 新资源微生物: 微生物资源的发现和应用[J]. *微生物学报*, 2022, 62(11): 4091-4094.
- ZHAO XQ, PENG N. Preface for special issue on new-resource microbes: discovery and applications of microbial resources[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(11): 4091-4094 (in Chinese).