

研究报告

一株海洋源皮特不动杆菌的分离鉴定及其全基因组测序分析

龙赞而, 潘瑞雪, 赵一宁, 马浩天, 马驿, 彭金菊*

广东海洋大学 滨海农业学院, 广东 湛江 524000

龙赞而, 潘瑞雪, 赵一宁, 马浩天, 马驿, 彭金菊. 一株海洋源皮特不动杆菌的分离鉴定及其全基因组测序分析[J]. 微生物学通报, 2025, 52(6): 2501-2516.

LONG Yun'er, PAN Ruixue, ZHAO Yining, MA Haotian, MA Yi, PENG Jinju. Isolation, identification, and whole genome sequencing of a marine-derived strain of *Acinetobacter pittii*[J]. Microbiology China, 2025, 52(6): 2501-2516.

摘要:【背景】海洋是一个巨大的微生物资源库,其造就了适应高盐、高压和低温环境的微生物,从中可以分离出对动物病原菌具有抑菌活性的微生物。【目的】广东省湛江市近海底泥中分离出对动物病原菌有拮抗作用的海洋细菌,对抑菌活性强的细菌进行全基因组序列分析,以期挖掘其产细菌素等功能特性基因。【方法】采用 M10 培养基、P3 培养基和 BHI 固体培养基从广东省湛江市海底泥样品中分离细菌,采用固体琼脂打孔法从分离细菌中筛选对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)和乙型副伤寒沙门氏菌(*Salmonella paratyphi* B)等动物病原菌有拮抗作用的细菌,PCR 扩增拮抗菌的 16S rRNA 基因并进行测序分析。选择抑菌效果最好的细菌进行全基因组测序分析,通过序列组装、基因预测、功能注释、anti-SMASH 挖掘潜在的细菌素基因簇及潜在的作用机制,分析其产细菌素的潜能。

【结果】从广东省湛江市近海底泥中分离得到 317 株有抑菌效果的菌株,包括芽胞杆菌属(*Bacillus*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、弧菌属(*Vibrio*)等;筛选抑菌效果最好的菌株 AM3-2;全基因组测序鉴定菌株 AM3-2 为皮特不动杆菌(*Acinetobacter pittii*),基因组大小为 3 426 922 bp, G+C 含量为 39.84%。共预测到 3 631 个蛋白质编码基因、6 个 rRNA、64 个 tRNA;基因组中含有 6 个与抗氧化活性相关基因,以及 8 个与调控免疫和炎症信号通路相关的基因;预测 AM3-2 存在 2 个相关细菌素合成基因簇。【结论】菌株 AM3-2 是一株潜在的产细菌素菌株,为进一步研究其抗菌特性提供了理论基础。

关键词: 抑菌活性; 分离; 鉴定; 全基因组; 功能注释

资助项目: 广东省自然科学基金(2023A1515012181)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (2023A1515012181).

*Corresponding author. E-mail: pengjinju74@163.com

Received: 2024-09-30; Accepted: 2024-11-03; Published online: 2024-12-05

Isolation, identification, and whole genome sequencing of a marine-derived strain of *Acinetobacter pittii*

LONG Yun'er, PAN Ruixue, ZHAO Yining, MA Haotian, MA Yi, PENG Jinju*

College of Coastal Agricultural Sciences, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524000, Guangdong, China

Abstract: [Background] The ocean is a huge microbial resource bank, which creates microorganisms adapted to high salt, high pressure and low temperature environment, from which microorganisms with antibacterial activity against animal pathogens can be isolated. [Objective] To isolate marine bacteria with antagonistic effects on animal pathogens from the offshore sediment of Zhanjiang, Guangdong and analyze the whole genome sequences of the strains with strong antibacterial activity to mine the functional genes involved in bacteriocin production and other activities. [Methods] We used the M10 medium, P3 medium, and BHI solid medium to isolate bacterial strains from the sediment samples. The bacteria with antagonism to *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, and *Salmonella paratyphi* B were screened by the disk diffusion test. The 16S rRNA gene of the antagonistic strains was amplified by PCR and analyzed by sequencing. The strain with the strongest bacteriostatic effect was selected for whole genome sequencing, and its bacteriocin production potential was analyzed by sequence assembly, gene prediction, and functional annotation, as well as by mining of potential biosynthetic gene clusters (BGCs) for bacteriocin and deciphering of potential mechanism through anti-SMASH. [Results] A total of 317 strains with antibacterial effects were isolated from the offshore sediment in Zhanjiang, Guangdong, including *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, and *Vibrio*. The strain AM3-2 with the strongest bacteriostatic effect was screened out. The whole genome sequencing identified strain AM3-2 as *Acinetobacter pittii*, which had a genome size of 3 426 922 bp and the G+C content of 39.84%. The genome of this strain was predicted to carry a total of 3 631 protein-coding genes, 6 rRNAs and 64 tRNAs. The genome contained 6 genes related to antioxidant activity and 8 genes associated with the regulation of immune and inflammatory signaling pathways. In addition, the strain was predicted to carry 2 BGCs for bacteriocin. [Conclusion] AM3-2 was a potential bacteriocin-producing strain, which provided a theoretical basis for further study of its antibacterial properties.

Keywords: antibacterial activity; isolation; identification; whole genome; functional annotation

海洋占据了地球表面的 70%，海洋资源是一个巨大的生物生命库。据美国国家海洋和大气管理局(National Oceanic and Atmospheric Administration)估计，80%的海洋仍未被开发^[1]。由于海洋具有独特的盐度、压力、营养、温度等条件使海洋微生物有别于其他区域微生物，

海洋中存在的未开发的生物资源可能是解决细菌抗生素耐药性不断增加的有效手段^[2]。目前，从海洋资源中获取天然生物活性药物主要集中于海绵、软体动物、被膜动物和大型藻类^[3]。然而，此类大型生命体中的活性物质可能来自相关的海洋微生物^[4]。因此，发掘更多海洋微生物资

源具有重要意义。细菌是极具前途的新型微生物,因其新陈代谢具有可变性与可塑性^[5],并需要与其他海洋微生物竞争而产生大量次级代谢产物。不动杆菌属(*Acinetobacter*)是一种需氧的革兰氏阴性细菌,其具有多途径的代谢特性,可分解多种天然化合物^[6],产生各种具有抗菌活性的代谢物和肽。近年来,研究者利用全基因组测序技术对不动杆菌进行研究,挖掘菌株基因组信息,预测菌株功能^[7]。本研究从广东省湛江市海域采集近海底泥样品,进行细菌的分离鉴定,挑选对动物病原菌有较强拮抗作用的细菌,对其进行全基因组测序和功能注释,通过 anti-SMASH 在线数据库预测其潜在细菌素基因,以期为新型海洋源抗菌药物的研发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品

采集广东省湛江市沿海 4 个区域的近海泥样品,采样点位于中澳友谊花园、海滨公园、渔港公园和金海岸观海长廊,分别命名为 A、B、C、D。每个位点采集 20 份样品,分别用自封袋包装好后带回实验室。大肠杆菌(*Escherichia coli*) CMCC(B)44103、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 25923 和乙型副伤寒沙门氏菌(*Salmonella paratyphi* B) CMCC(B)50094,广东环凯微生物科技有限公司。蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) CICC 20551,中国工业微生物菌种保藏管理中心。

1.2 培养基

M10 培养基(g/L): 可溶性淀粉 10.00, 水解酪素 0.50, 复合盐母液 0.01, 琼脂 14.00, 用去离子水溶解。P3 培养基(g/L): 燕麦粉 2.00, 复合盐母液 0.01, 琼脂 14.00, 用去离子水溶解。复合盐母液(g/L): KNO₃ 100.0, K₂HPO₄ 50.0, NH₄NO₃ 10.0, MgSO₄·7H₂O 50.0, NaCl 50.0, FeSO₄ 1.0, MnCl₂·H₂O 0.1, ZnSO₄·7H₂O 0.1, 用去离子水溶解。脑心浸液肉汤(brain-heart infusion broth, BHI)培养基,北京索莱宝科技有

限公司; LB 液体培养基和 LB 固体培养基,北京陆桥技术股份有限公司; 发酵培养基(g/L): 葡萄糖 40.0, 牛肉膏 5.0, 酵母浸粉 5.0, 蛋白胨 15.0, NaH₂PO₄·2H₂O 0.2, Na₂HPO₄·2H₂O 0.5, Mg₂SO₄·7H₂O 0.5, CaCl₂ 0.2, MnSO₄ 0.2, 用蒸馏水溶解; 羊血琼脂平板(g/L): 酪蛋白胰酶消化物 10.0, 心胰酶消化物 3.0, 玉米淀粉 1.0, 肉胃酶消化物 5.0, 酵母浸粉 5.0, 氯化钠 5.0, 琼脂 15.0, 无菌脱纤维羊血 70.0, 用蒸馏水溶解。

1.3 主要试剂和仪器

MagPure 细菌 DNA 试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司; 0.22 μm 滤膜,天津市科亿隆实验设备有限公司; 磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS),武汉赛维尔生物科技有限公司。超净化工作台,苏净集团苏州安泰空气技术有限公司; 生化培养箱,上海福絮实验室仪器设备厂; 恒温振荡器,上海一恒科学仪器有限公司; Qubit 4.0 荧光计核酸定量仪,Life Technologies 公司; 电泳仪,北京市六一生物科技有限公司; 生物电泳图像分析系统,上海复日科技有限公司; 微型漩涡混合仪,上海沪西分析仪器厂有限公司。

1.4 菌株的分离与筛选

从每份海泥样品中称取 2 g,用灭菌水稀释 1 000 倍后均匀涂布于 P3 培养基和 M10 培养基中,用灭菌水稀释 100 倍后均匀涂布于 BHI 固体培养基中,28 °C 培养 5 d。每天挑取不同形态单菌落接种于 LB 液体培养基中,37 °C 培养 16 h。将大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌、沙门氏菌作为指示菌,分别以 1% 接种量加入未凝固的 LB 固体培养基中,采用琼脂扩散法(打孔器直径 8 mm),将 200 μL 挑取的菌液加入孔中,37 °C 培养 24 h,观察并测量抑菌圈直径(mm)。

1.5 16S rRNA 基因的扩增与系统发育分析

采用水煮法提取具有良好抑菌活性菌株的基因组 DNA,采用通用引物 27F (5'-AGAGTTT GATCMTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACC

TTGTTACGACTT-3')进行 16S rRNA 基因序列 PCR 扩增。PCR 反应体系(30 μ L): 1 $\times$ Premix Ex Taq PCR 酶 26.0 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1.0 μ L, DNA 模板 2.0 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 51 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 30 次循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序分析。序列经 NCBI 数据库进行比对, 选取同源性最高菌株的序列作为参比对象, 运用 MEGA 11.0 软件构建系统发育树。

1.6 广谱菌株抑菌效果的测定

将广谱菌株在 LB 液体培养基中复活, 按 2%的接种量转接至 50 mL 发酵培养基中, 30 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养 48 h, 取发酵液于 4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 30 min 吸取上清, 上清液在无菌条件下使用 0.22 μ m 滤膜过滤 4 遍, 以充分除去上清中的菌体, 得到无细胞发酵上清液。采用 1.4 中的抑菌测定方法, 每组均设定 3 个重复, 用抑菌圈平均直径(mm)来评价各待测菌株的抑菌活性。

1.7 溶血活性的测定

将 1.4 分离的菌株 AM3-2 接种于 LB 液体培养基中, 按 1.6 中的方法得到无细胞发酵上清液。采用琼脂扩散法(打孔器直径 8 mm), 将 100 μ L 无细胞发酵上清液加入 7%羊血琼脂平板孔中, 以 1% Triton X-100 作为阳性对照, PBS 磷酸缓冲盐溶液作为阴性对照, 37 $^{\circ}$ C 培养 48 h 后观察平板的溶血情况, 重复 3 次。加样孔周围由于红细胞的不完全破裂出现绿色光晕(α -溶血)或不产生抑制晕(γ -溶血)可以被归类为非溶血, 加样孔周围由于红细胞的完全破裂形成界宽大、透明、显著的溶血环(β -溶血)被归类为溶血^[8]。

1.8 基因组 DNA 的提取

将菌株 AM3-2 于 LB 固体培养基上进行平板划线, 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h, 挑选生长良好的单菌落于 LB 液体培养基中, 30 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养 16 h 后送生工生物工程(上海)股份有限公司进行后续检测及文库构建。使用 MagPure 细菌

DNA 试剂盒提取 DNA, 采用 Qubit 4.0 荧光计核酸定量仪测定 DNA 浓度, 通过 1%琼脂糖凝胶电泳评估 DNA 完整性。

1.9 文库的构建及测序

使用 MGI DNBSEQ-T7 进行文库的构建和测序。将全基因组 DNA 随机片段化, 平均大小为 200–400 bp。通过溶菌酶和蛋白酶共同作用下裂解消化、按 1.5 中方法进行 PCR 扩增筛选出目的片段。用磁珠纯化后采用 Qubit 4.0 荧光计核酸定量仪对文库进行鉴定, 并通过 2%琼脂糖凝胶电泳评估文库的长度。合格的文库在 MGI DNBSEQ-T7 平台上进行测序。

1.10 菌株 AM3-2 系统发育树的构建

使用 BLAST 将基因预测得到的 16S rRNA 基因序列与 NCBI 数据库进行比对, 设置参数 identify>95。然后选取 identify 最高的前 30 条 16S rRNA 基因序列(不足则全取), 并利用 mafft 软件进行序列多重比对并剪切后采用 FastTree 软件构建系统发育树。

1.11 基因组圈图绘制

将测序得到的基因组序列、编码基因预测及非编码 RNA 等信息文件组装成 GBK 文件, 通过 Proksee (<https://proksee.ca/>)绘制基因组圈图。

1.12 生物信息学分析

采用 GO 数据库(<http://geneontology.org/>)、KEGG 数据库 (<https://www.kegg.jp/>)、COG (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/research/cog/>)、非冗余蛋白序列数据库 NR (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/>)、转运蛋白分类数据库(transporter classification database, TCDB) (<http://www.tcdb.org/>)、碳水化合物活性酶(carbohydrate-active enzymes, CAZy)数据库(<http://www.cazy.org/>)、毒力因子数据库(Virulence Factors of Pathogenic Bacteria, VFDB) (<http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/v5/main.cgi>)对海洋源菌株 AM3-2 编码基因进行功能注释。

1.13 抑菌物质预测分析

利用 anti-SMASH 在线数据库(<http://antismash.>

secondarymetabolites.org/)预测菌株 AM3-2 的次级代谢产物生物合成基因簇,并对次级代谢产物合成基因簇进行分析。

2 结果与分析

2.1 有抑菌活性菌株的筛选

从广东省湛江市附近海域4个采样点的海泥中分离出1 920株细菌,有抑菌活性的细菌共317株(数据存储在国家微生物科学数据中心,编号为NMDCX0001740,链接为<https://nmdc.cn/resource/genomics/attachment/detail/NMDCX0001740>)。位点A分离出有抑菌活性的细菌85株,位点B分离出有抑菌活性的细菌100株,位点C分离出有抑菌活性的细菌81株,位点D分离出有抑菌活性的细菌51株。具有广谱抑菌性的菌株共24株,其中位点A有2株,位点B有8株,位点C有8株,位点D有6株;其中对4种指示菌均有抑菌性的有6株,分别为AM3-2、CB4-1、DB2-4、DP15-5、DM12-11和DM20-3,6株广谱菌株的抑菌活性见表1。

2.2 有抑菌活性菌株的系统发育分析

有抑菌活性的317株细菌被分为26个属,包括芽孢杆菌属(*Bacillus*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、弧菌属(*Vibrio*)等。其中芽孢杆菌属占比最大为54%,不动杆菌属占15%,肠杆菌属占13%。对上述具有广谱抑菌效果的6株菌构建系统发育树,如图1所示,菌株AM3-2和CB4-1为不

动杆菌属(*Acinetobacter*),菌株DM12-11为假单胞菌属(*Pseudomonas*),菌株DB2-4、DP15-5和DM20-3均为芽孢杆菌属(*Bacillus*)。

2.3 菌株发酵上清液抑菌效果

对6株广谱菌株的发酵上清液的抑菌能力进行测定,筛选上清液抑菌能力最好的菌株进行后续实验。结果如图2所示,6株广谱抑菌菌株中AM3-2、DP15-5和DM20-3的上清液具有抑菌效果。其中菌株AM3-2的上清液对4种指示菌均有较好的抑菌效果,对大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、乙型副伤寒沙门氏菌(*Salmonella paratyphi B*)和蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)的平均抑菌圈直径分别为(15.04±0.14)、(19.56±0.35)、(20.39±0.21)和(11.83±1.46) mm。菌株DP15-5和DM20-3的上清液则仅对金黄色葡萄球菌和蜡样芽孢杆菌具有抑菌效果,所以选择菌株AM3-2进行后续的实验。

2.4 菌株AM3-2发酵上清液的溶血活性

如图3所示,菌株AM3-2无细胞发酵上清液在羊血平板中出现草绿色圈,为 α -溶血。

2.5 菌株AM3-2基因组组分及其全基因组序列登录号

如图4所示,菌株AM3-2基因组大小为3 426 922 bp, G+C含量为39.84%。共预测到3 631个蛋白质编码基因、6个rRNA、64个tRNA。将菌株AM3-2全基因组序列提交至NCBI基因组数据库,并获得BioSample accession: SAMN44353140。

表1 海泥中分离6株广谱菌株的抑菌活性

Table 1 Antibacterial activity of six broad-spectrum strains isolated from sea mud

菌株 Strain	抑菌圈直径 Antibacterial circle diameter (mm)			
	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	乙型副伤寒沙门氏菌 <i>Salmonella paratyphi B</i>	蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>
AM3-2	14	15	13	20
CB4-1	20	13	13	34
DB2-4	25	25	16	21
DP15-5	22	30	40	19
DM12-11	20	25	18	17
DM20-3	18	20	18	15

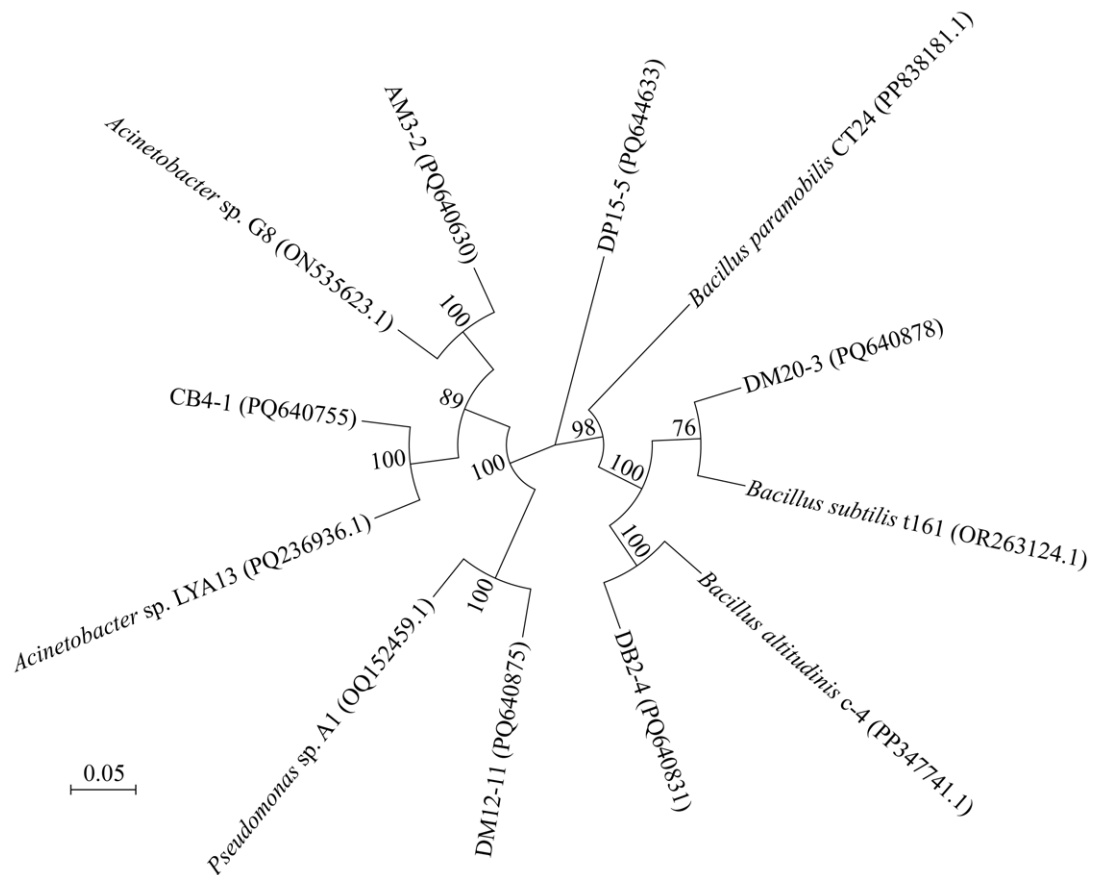


图1 基于广谱抑菌活性细菌的 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 分支上的数字表示 bootstrap 值 (1 000 次重复); 括号内为 GenBank 登录号; 标尺表示进化距离。

Figure 1 Phylogenetic tree constructed based on 16S rRNA gene sequence of broad-spectrum antibacterial bacteria. The number on each node represents the bootstrap value (1 000 repetitions); The serial numbers in parentheses are GenBank accession numbers; The scale bar represents evolutionary distance.

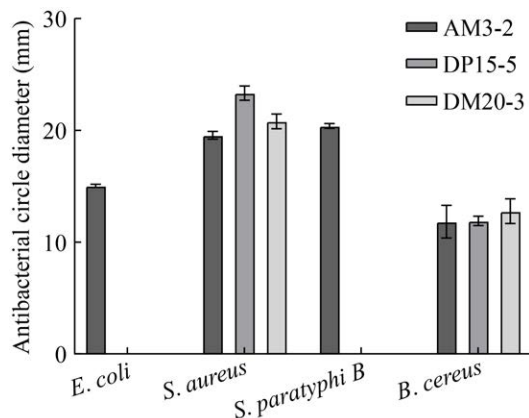


图2 广谱菌株对 4 种指示菌的抑菌圈直径
Figure 2 Diameter of antibacterial circle diameter of broad-spectrum strains against four indicator bacteria.



图3 菌株 AM3-2 发酵上清液的溶血活性
Figure 3 Hemolytic activity of strain AM3-2 cell-free fermentation supernatant.

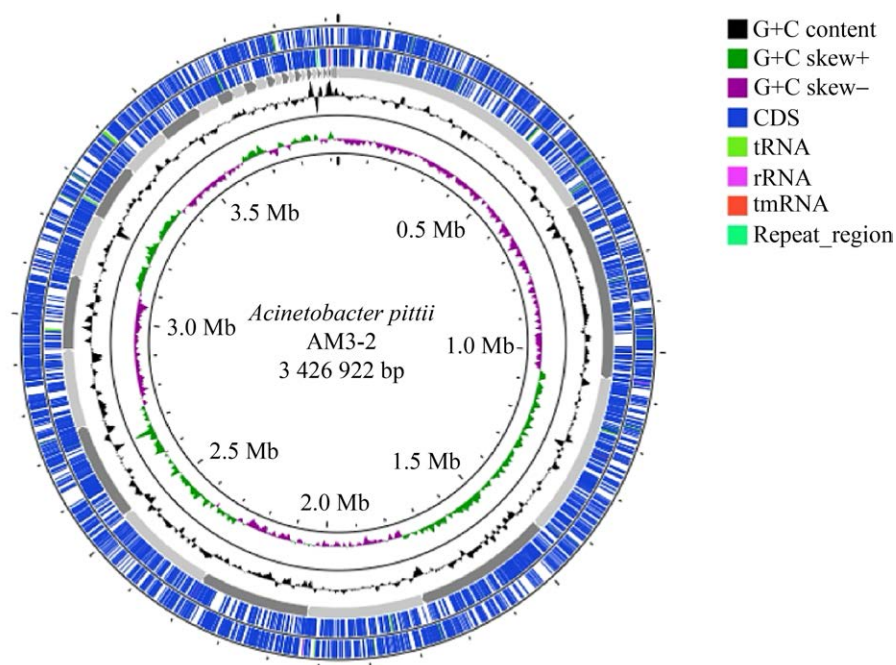


图 4 菌株 AM3-2 的全基因组框架图

Figure 4 Whole genome framework of strain AM3-2.

2.6 菌株 AM3-2 的基因注释

对预测得到的编码基因在 NR、COG、GO、KEGG、CAZy、VFDB 和 TCDB 数据库进行功能注释,如表 2 所示,菌株 AM3-2 在 NR 数据库中共注释到 3 628 个基因,在 COG 数据库中共注释到 2 470 个基因,在 GO 数据库中共注释到 953 个基因,在 KEGG 数据库中共注释到 1 047 个基因,在 CAZy 数据库中共注释到 53 个基因;在 VFDB 数据库中共注释到 252 个基因;在 TCDB 数据库中共注释到 459 个基因。

2.6.1 NR 数据库注释及系统发育分析

如图 5 所示,有 2 340 个基因注释为皮特不动杆菌(*Acinetobacter pittii*)。基于 NCBI 数据库已知的 *Acinetobacter pittii* 全基因组和菌株 AM3-2 的全基因组,采用 FastTree 软件构建系统发育树如图 6 所示,菌株 AM3-2 与 *Acinetobacter pittii* PHEA-2 的亲缘关系最近,因此,将其命名为 *Acinetobacter pittii* AM3-2。

2.6.2 COG 数据库注释

菌株 AM3-2 共有 2 470 个基因被注释。

表 2 菌株 AM3-2 基因功能统计分析

Table 2 Statistical analysis of strain AM3-2 gene functions

数据库	基因数量
Database	Number of gene
NR	3 628
COG	2 470
GO	953
KEGG	1 047
CAZy	53
VFDB	252
TCDB	459

其中,参与翻译后修饰、蛋白质转换、伴侣(posttranslational modification, protein turnover, chaperones)的基因有 103 个,参与细胞壁/膜/包膜生物发生(cell wall/membrane/envelope biogenesis)的基因有 151 个,参与翻译、核糖体结构和生物合成(translation, ribosomal structure and biogenesis)的基因有 170 个,这 3 个功能相关的基因与细菌素的产生密切相关(图 7)。

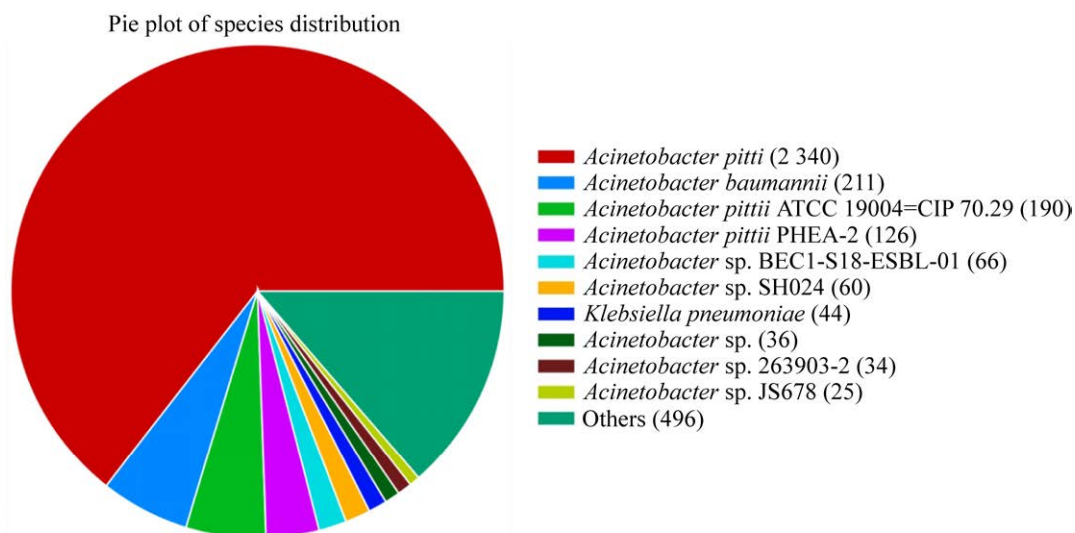


图5 菌株 AM3-2 的 NR 数据库基因注释

Figure 5 Gene annotation of NR database for strain AM3-2.

2.6.3 GO 数据库注释

如图 8 所示, 将基因产物功能分为 3 个大类别, 细胞组分(cellular component, CC)、分子功能(molecular function, MF)、生物过程(biological process, BP), 从 GO 数据库中共注释到 953 个基因, 其中 BP 中注释到 2 488 个基因, CC 中注释到 461 个基因; MF 中注释到 1 264 个基因。生物过程的前 3 种功能注释依次是代谢过程、细胞过程和单一生物过程。细胞组分部分的前 3 种功能注释分别是细胞核膜、细胞器和细胞部分。最后, 分子功能的前 3 种功能注释包括受体活性、结合电子载体活性和抗氧化活性。与抗氧化活性相关的基因有 6 个分别为 *ctg00002_00750*、*ctg00003_01105*、*ctg00004_01508*、*ctg00008_02513*、*ctg00012_03189* 和 *ctg00014_03337*。

2.6.4 KEGG 数据库注释

Pathway 分为 5 个分支: 细胞过程(cellular processes)、环境信息处理(environmental information processing)、遗传信息处理(genetic information processing)、代谢(metabolism)和有机系统(organismal systems)。如图 9 所示, 菌株 AM3-2 共有 1 047 个基因被注释到五大功能的

28 个通路。与细菌素和免疫相关的通路、功能描述和基因如表 3 所示, 谷氨酰胺会促进细菌素的合成, 在与通路 ko00471 (D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢)相关的基因中发挥正向激活作用。涉及抗生素生物合成的基因包括通路 ko00253 (四环素生物合成)、ko00970 (万古霉素类抗生素的生物合成)、ko00261 (单内酰胺生物合成)和 ko00521 (链霉素生物合成), 参与了抗生素的制造。细胞色素 P450 可以参与异物质的代谢, 其中相关基因在调控免疫和炎症通路 ko03320 (PPAR 信号通路)中发挥作用。ABC 转运蛋白通过 ABC 运输通路 ko02010 参与将细菌素运送至细胞外。

2.6.5 CAZy 数据库注释

如图 10 所示, 菌株 AM3-2 共有 53 个基因被注释, 其中糖苷水解酶基因有 6 个, 糖基转移酶基因有 15 个, 糖类酯解酶基因有 19 个, 氧化还原酶基因有 13 个。

2.6.6 TCDB 数据库注释

转运蛋白属于膜蛋白中的一类, 其在代谢产物释放等细胞活动中发挥着不可替代的作用。如图 11 所示, 将 *Acinetobacter pittii* AM3-2 在转运蛋白分类数据库中进行注释, 共注释到 459 个

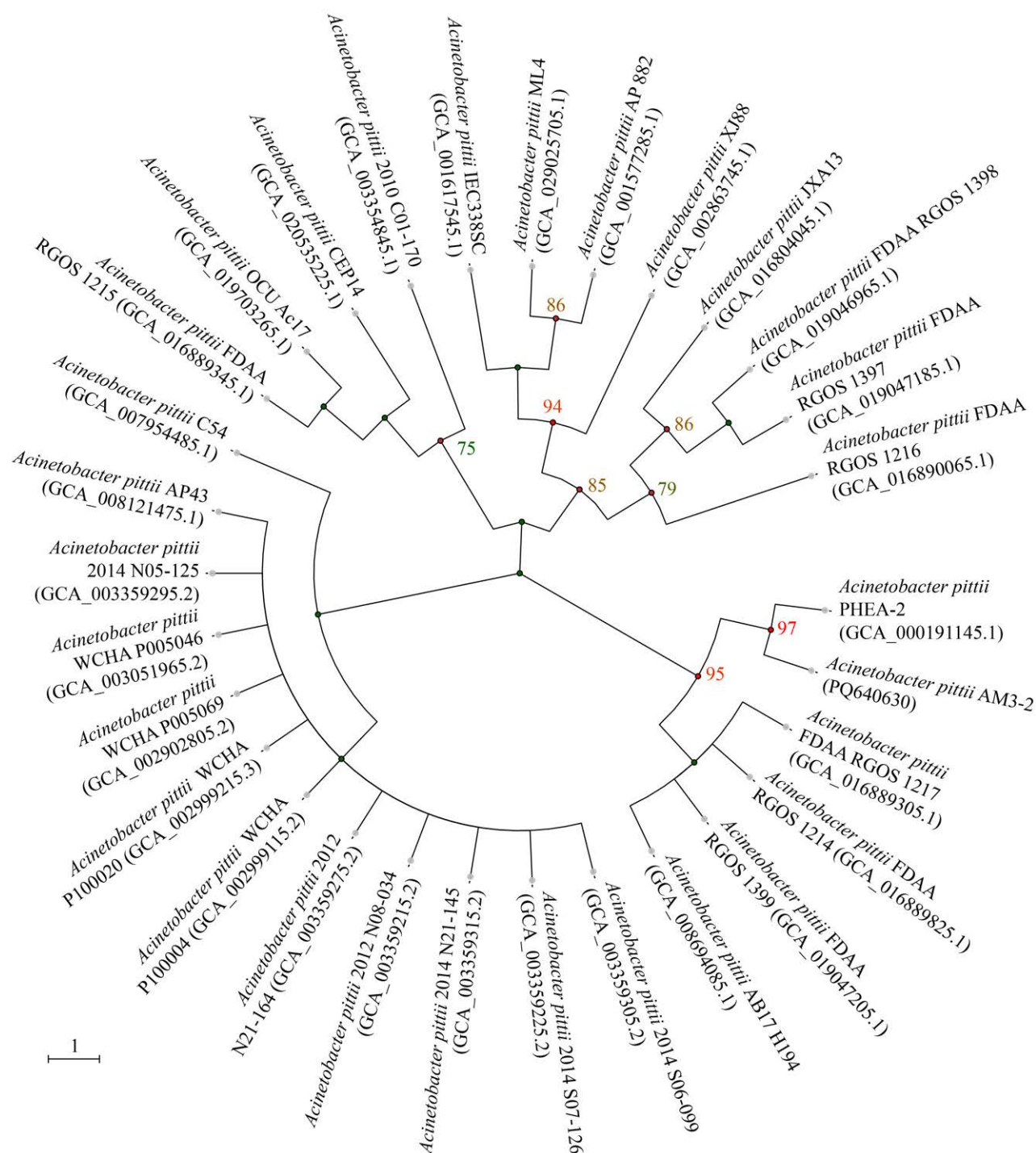


图 6 基于 16S rRNA 基因序列的环形进化树 分支上的数字表示 bootstrap 值(1 000 次重复);括号内为 GenBank 登录号;标尺表示进化距离。

Figure 6 Circular evolutionary tree based on 16S rRNA gene sequence. The number on each node represents the bootstrap value (1 000 repetitions); The serial numbers in parentheses are GenBank accession numbers; The scale bar represents evolutionary distance.

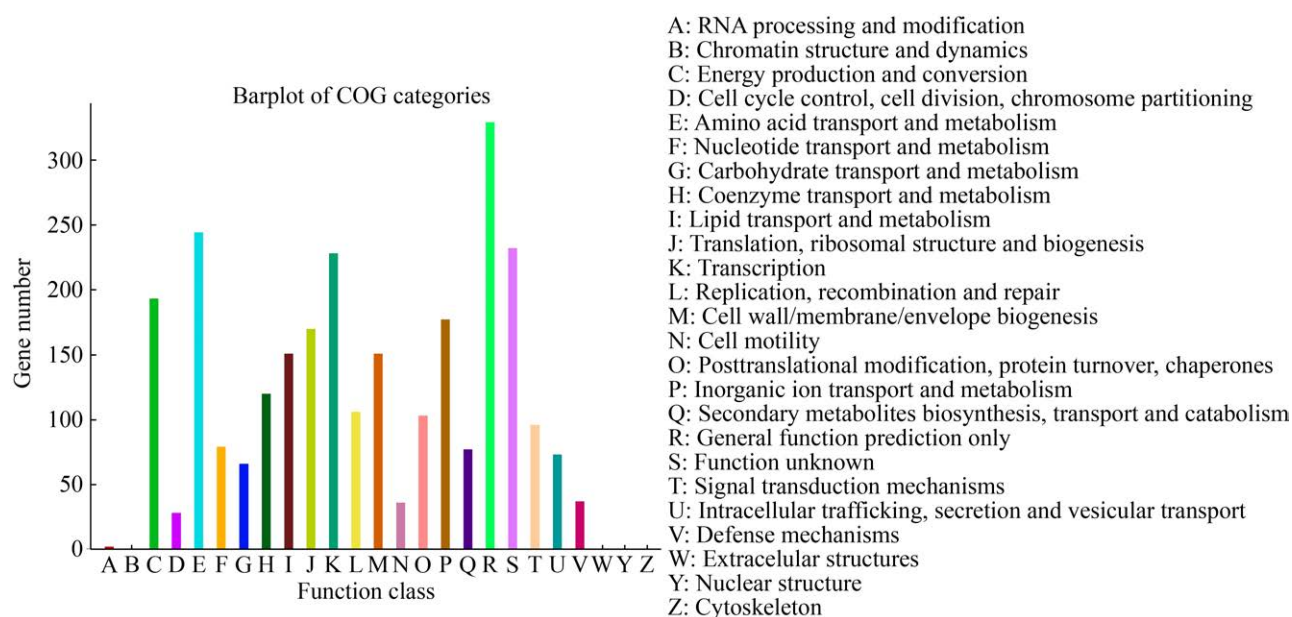


图 7 菌株 AM3-2 基因功能注释 COG 功能分类

Figure 7 Functional annotation of strain AM3-2 gene COG functional.

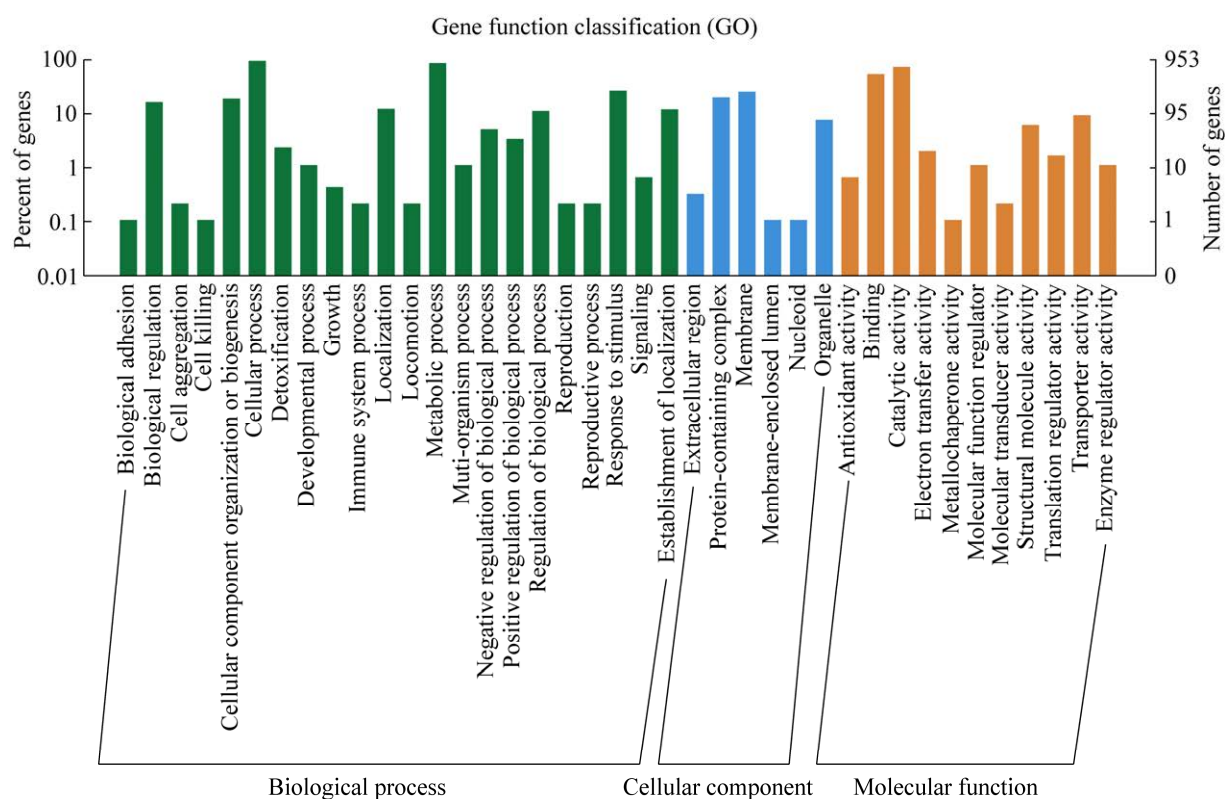


图 8 菌株 AM3-2 基因功能注释 GO 功能分类

Figure 8 Strain AM3-2 gene functional annotation GO functional classification.

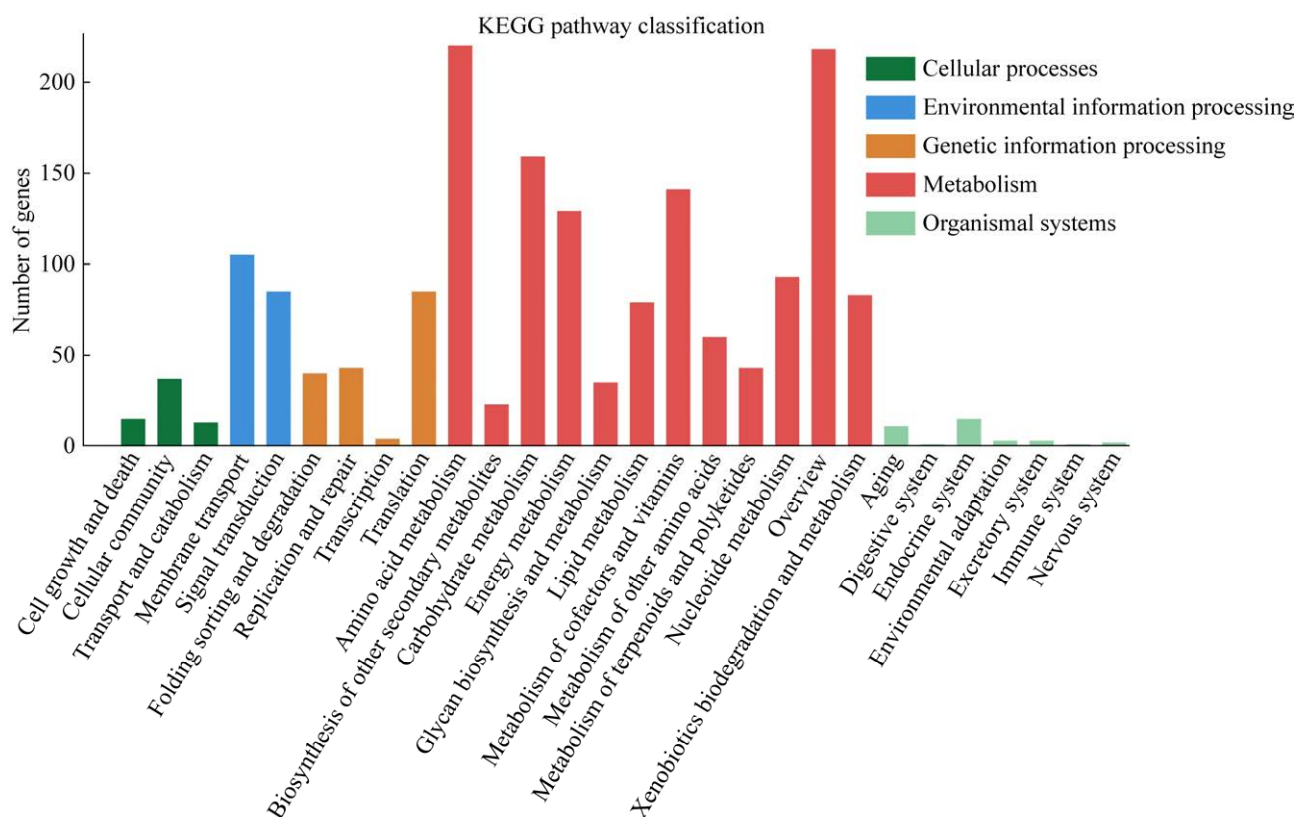


图9 菌株 AM3-2 基因功能注释 KEGG 代谢通路图

Figure 9 Strain AM3-2 gene function annotation KEGG metabolic pathway.

基因，其中电化学电位驱动的转运蛋白最多为 212 个，初级活性转运蛋白相关基因次之有 143 个。

2.6.7 VFDB 数据库注释

毒力因子包括细菌毒素、调节细菌附着的细胞表面蛋白、保护细菌细胞表面的碳水化合物，以及蛋白质和水解酶等，进一步比较基因组分析能够发现更多关于微生物进化的信息。根据 VFDB 数据库，在菌株 AM3-2 的核心基因中共注释到 252 个毒力基因，约占总基因数的 6.9%，落入 182 个毒力因子条目中。菌株 AM3-2 携带了防御性毒力因子 *kata*、毒力相关的调节基因 *phop*、双组分调控系统基因 *bfmrs* 和非特异性毒力因子 *Pyoverdine* 等。其中，对比到非特异性毒力因子水溶性荧光素铁载体为 18 个，肠菌素为 1 个，耶尔森毒素为 2 个，螯铁蛋白为 2 个，这 4 类毒力因子与细菌对铁的获取有关；共有 8 个基因比对到黏附相关毒力因子藻酸盐，这类

毒力因子会影响海藻酸的生物合成和调节；与 IV 型分泌系统形成相关的基因有 22 个，该系统可以提高细菌对环境的适应能力。

2.7 AM3-2 次级代谢基因簇预测

如图 12 所示，通过 anti-SMASH 在线数据库对菌株 AM3-2 的全基因数据进行分析，预测到 2 种未知的核糖体合成和翻译后修饰的肽产物(ripp-like)的基因簇与细菌素合成相关。

3 讨论

由于在动物生产和医疗的抗生素被错误和过度使用，在世界各地的细菌种群中可以观察到抗生素耐药性的急剧上升^[9]。抗生素耐药性是全球健康的主要威胁，耐药微生物感染不仅会导致更高的发病率和死亡率，而且治疗成本和时间更高，迫切需要新的策略来对抗耐药病原体^[10]。海洋占据全球大部分面积，蕴含着丰

表 3 菌株 AM3-2 中抗菌和免疫调控通路相关基因

Table 3 Genes related to antimicrobial and immunoregulatory pathways in strain AM3-2

编号 Number	KEGG 通路 ID KEGG pathway ID	功能 Function	基因 ID Gene ID
1	ko00471	D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢 D-glutamine and D-glutamate metabolism	ctg00004_01586、ctg00003_01210、ctg00002_00780 等 6 个相关基因 ctg00004_01586, ctg00003_01210, ctg00002_00780, etc. (6 related genes)
2	ko00253	四环素生物合成 Tetracycline biosynthesis	ctg00004_01391、ctg00009_02692、ctg00014_03335 等 5 个相关基因 ctg00004_01391, ctg00009_02692, ctg00014_03335, etc. (5 related genes)
3	ko00980	细胞色素 P450 对异种物质的代谢 Metabolism of heterogeneous substances by cytochrome P450	ctg00005_01660、ctg00006_01900、ctg00019_03567 等 15 个相关基因 ctg00005_01660, ctg00006_01900, ctg00019_03567, etc. (15 related genes)
4	ko00970	万古霉素类抗生素的生物合成 Biosynthesis of vancomycin antibiotics	ctg00002_00636、ctg00011_03057、ctg00015_03461 等 26 个相关基因 ctg00002_00636, ctg00011_03057, ctg00015_03461, etc. (26 related genes)
5	ko03320	PPAR 信号通路 PPAR signaling pathway	ctg00011_03048、ctg00001_00560、ctg00001_00558 等 8 个相关基因 ctg00011_03048, ctg00001_00560, ctg00001_00558, etc. (8 related genes)
6	ko02010	ABC 运输工具 ABC transport	ctg00008_02584、ctg00001_00060、ctg00018_03541 等 72 个相关基因 ctg00008_02584, ctg00001_00060, ctg00018_03541, etc. (72 related genes)
7	ko00261	单内酰胺生物合成 Monolactam biosynthesis	ctg00002_00730、ctg00007_02182、ctg00003_01246 等 8 个相关基因 ctg00002_00730, ctg00007_02182, ctg00003_01246, etc. (8 related genes)
8	ko00521	链霉素生物合成 Streptomycin biosynthesis	ctg00010_02889、ctg00010_02888、ctg00010_02887 等 6 个相关基因 ctg00010_02889, ctg00010_02888, ctg00010_02887, etc. (6 related genes)

富的海洋微生物资源, 其含有巨大的新型抗菌药物开发潜力。由于海洋细菌群落遇到独特的环境压力, 其次级代谢产物与陆地细菌具有一定的差别^[11]。Mikhailov 等^[12]在日本海域中发现产细菌素的海洋细菌菌株; Longeon 等^[13]从法国海域分离出一株海洋细菌 X153, 其对人类皮肤病致病菌株和各种鱼类致病菌弧菌等海洋细菌具有较高的抑菌活性; Iqbal 等^[14]从阿拉伯海水中分离出的黄瓜金黄杆菌(*Chryseobacterium*

cucumeris) MW-6 对动物源性细菌病原体表现出广谱抗菌活性。本研究从广东省湛江市海域海底泥中共分离出 1 920 株细菌, 其中 317 株具有抑菌活性, 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌和蜡样芽胞杆菌这 4 种指示菌均有抑菌效果的有 6 株菌, 对其中 3 种指示菌有抑菌效果的有 24 株菌。本研究分离的有抑菌活性的细菌共分为 26 个属, 包括芽孢杆菌属、不动杆菌属、肠杆菌属等, 其中芽孢杆菌属占比最大

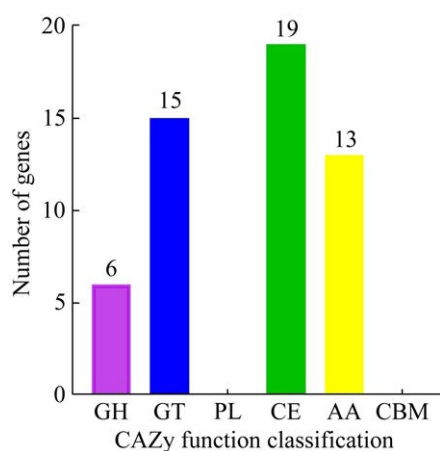


图 10 菌株 AM3-2 CAZy 注释 GH: 糖苷水解酶; GT: 糖基转移酶; PL: 糖裂解酶; CE: 糖类酯解酶; AA: 氧化还原酶; CBM: 碳水化合物结合结构域。

Figure 10 Strain AM3-2 CAZy annotation. GH: Glycoside hydrolase; GT: Glycosyltransferase; PL: A glycolase; CE: Carbohydrate esterase; AA: An oxidoreductase; CBM: Carbohydrate binding domain.

为 54%，不动杆菌属次之为 15%。Guan 等^[15]从南海海水样本中获得 72 株细菌，隶属于 3 门 4 纲 7 目 10 科 15 属，芽孢杆菌属含量最高占 51.39%；Das 等^[16]在印度东海岸采集的 28 个水和土壤样本中获得 4 个厚壁菌门(*Firmicutes*)和 3 个变形菌门(*Proteobacteria*)分离菌株，其具有

≥8%的 NaCl 胁迫耐受性；Bibi 等^[17]从沙特阿拉伯吉达沿海地区收集的海草中分离到 13 个不同属的细菌。以上研究均表明，海洋细菌中存在多种具有抑菌活性物质的细菌种类，这不仅揭示了海洋微生物的生物多样性，还为开发新型抗菌药物提供了宝贵的资源。

新型抗菌药物的研究日益成为热点，细菌在生长过程中能够产生多种次级代谢产物，其次级代谢产物中有许多具有抑菌效果的蛋白和肽类^[18]，如细菌素有望为新型抗菌药物的研究提供帮助。细菌素是细菌通过核糖体合成机制产生的一类由 20 种常见氨基酸编码并具有抑菌活性的多肽^[19]。本研究对 AM3-2、CB4-1、DB2-4、DP15-5、DM12-11 和 DM20-3 这 6 株广谱菌株进行筛选，得到菌株 AM3-2 的无细胞上清液对 4 种指示菌均有较好的抑菌效果，经测序鉴定菌株 AM3-2 为皮特不动杆菌。不动杆菌是一种广泛分布于自然界中的革兰氏阴性菌，可存在于动物、人类和各种环境中。近年来，皮特不动杆菌在医学领域逐渐成为一种重要的研究对象^[20]，但其在兽医领域报道极少。

目前，结合全基因组测序技术与数据库比对分析的方法在挖掘潜在抑菌物质的研究中引起了广泛的关注。这一方法不仅能够深入解析微生物的遗传信息，还可以通过与已知抑菌活

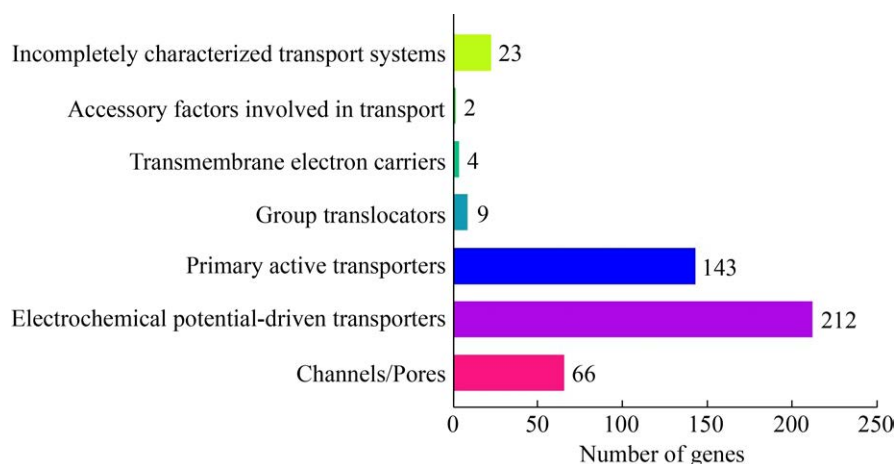


图 11 菌株 AM3-2 TCDB 注释

Figure 11 Annotation of strain AM3-2 TCDB.

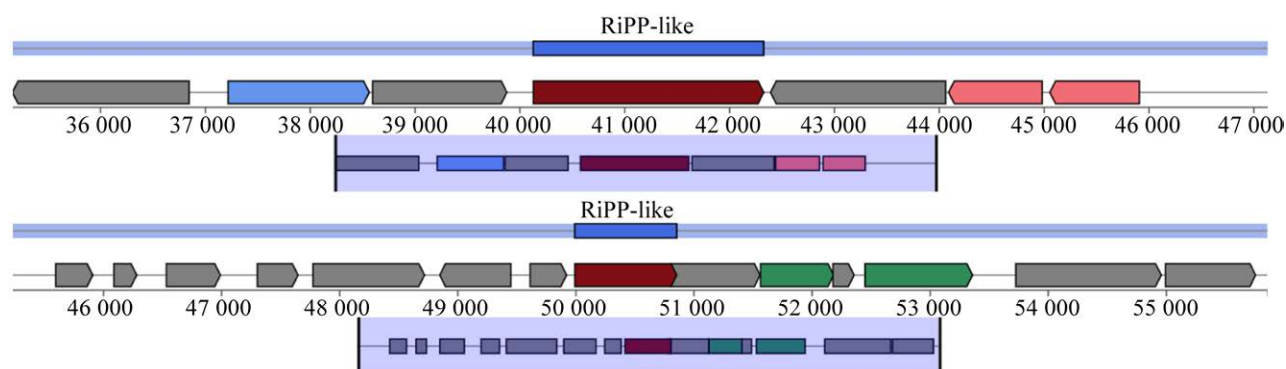


图 12 菌株 AM3-2 基因组 antiSMASH 比对结果

Figure 12 Alignment results of strain AM3-2 genome using antiSMASH.

性物质的基因组进行比对, 识别出具有抗菌特性的基因簇。Li 等^[21]通过全基因组测序技术挖掘了植物乳植杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*) WUH3 和植物乳植杆菌 M4L1 的 pediocin、plantaricin K 和 plantaricin EF 的编码基因是沉默的, 这对后续表达调节细菌素的合成并提高产量具有重大意义; Li 等^[22]通过全基因组测序技术揭示了植物乳植杆菌 Y42 的潜在益生菌机制, 是其益生菌功能挖掘和实际应用的理论基础; Major 等^[23]利用全基因组测序筛选出高概率的功能基因簇, 共鉴定出 387 种编码推定的细菌素生产菌株。本研究对皮特不动杆菌 AM3-2 进行全基因组测序, 并将其基因组数据与 COG、GO、KEGG、CAZy 和 VFDB 等多个数据库进行注释分析。

在 COG 数据库中注释到 424 个与产生细菌素密切相关的基因。在 KEGG 数据库中, 我们发现多个与抗生素和细菌素合成相关的代谢通路得到注释。其中, 通路 ko00471 中皮特不动杆菌 AM3-2 中共注释到 6 个相关基因, 谷氨酰胺合成与细菌素的生物合成存在密切的关联。这一联系表明, 谷氨酰胺作为一种重要的氨基酸, 其浓度的降低不仅会干扰细菌的正常生理功能, 还将显著影响细菌素的合成途径^[24]。通路 ko02010 中皮特不动杆菌 AM3-2 中共注释到 72 个相关基因, 该通路在 ABC 转运蛋白的合成中发挥着关键作用, 而 ABC 转运蛋白被认为是

细菌素合成过程中不可或缺的核心蛋白。这些转运蛋白不仅在细菌素的生物合成和分泌中发挥重要作用, 通常还具备显著的抗菌活性^[25], 因此, 皮特不动杆菌 AM3-2 具有产细菌素的潜力。通路 ko03320 (PPAR 信号通路) 在调节免疫反应和炎症过程方面发挥着至关重要的作用, 该通路还与能量代谢、细胞分化、增殖、凋亡及炎症反应等多个生物过程密切相关^[26]。在本研究中, 我们发现皮特不动杆菌 AM3-2 在 KEGG 数据库中被注释为与该通路相关的基因有 8 个。这些发现指向了皮特不动杆菌 AM3-2 在调控宿主的能量代谢及免疫反应方面的潜在作用。已有研究表明, 某些细菌能够显著改善动物的抗氧化能力, 并增强其免疫系统功能^[27]。

CAZy 数据库与水化合物活性酶有关, 其具有糖类化合物降解、修饰及生成糖苷键的功能, 是糖类物质代谢通路中的基本功能单元^[28], 其中皮特不动杆菌 AM3-2 共有 53 个基因被注释, 其中糖类酯解酶基因最多有 19 个, 糖基转移酶基因和氧化还原酶基因次之, 还有少量糖苷水解酶基因, 从而保持了皮特不动杆菌 AM3-2 的催化活性。TCDB 数据库中皮特不动杆菌 AM3-2 共注释到 459 个基因, 其中参与电化学位驱动的转运蛋白最多为 212 个, 初级活性转运蛋白相关基因次之。这些结果与 KEGG 分析的结果一致, 表明皮特不动杆菌 AM3-2 的运输功能主要取决于主动运输和离子泵的相互作

用。VFDB 数据库共注释 252 个毒力基因, 其中非特异性毒力因子被注释最多, 与致病相关的 II 型和 III 型分泌系统毒力因子较少。

传统上, 鉴定新的具有良好抑菌能力的细菌素是基于表型筛选分析, 这往往是高工作量高耗时的^[29]。基因组学和生物信息学的最新进展使这些挑战得以克服, 并为基于基因组挖掘的细菌素和其他新型天然产物的发现提供了巨大的机会^[30]。利用 anti-SMASH^[31]等基因组挖掘工具, 寻找细菌素基因簇中遗传元件的保守结构域, 在众多的微生物群中发现新的细菌素^[32-34]。通过 anti-SMASH 在线数据库比对, 共预测到 2 个相关细菌素合成基因簇。合成细菌素的基因由染色体或质粒编码, 并且通常与编码基因共定位^[35], 这 2 个核心蛋白都属于 IIb 类细菌素。产生 IIb 类细菌素需要编码细菌素前体的结构基因、编码 ABC 转运器中免疫蛋白的基因, 以及编码排列在一个或多个操作子中的副蛋白的基因, 这些基因可能参与细菌素的免疫和转运^[36]。

4 结论

本研究从广东省湛江市海底泥中分离得到皮特不动杆菌 AM3-2 携带有与抗生素合成和细菌素合成有关的基因, 同时包含调节免疫与炎症相关通路的基因, 这为新型抗菌药物的开发与应用提供了生物信息基础, 为进一步开发皮特不动杆菌 AM3-2 生成细菌素提供了理论基础。

作者贡献声明

龙赞而: 数据采集与分析、论文撰写和修改; 潘瑞雪: 数据分析; 赵一宁: 数据分析; 马浩天: 论文修改; 马驿: 研究构思与设计、论文修改; 彭金菊: 研究构思与设计、提供资源。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无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。

REFERENCES

- [1] SANTOS JD, VITORINO I, REYES F, VICENTE F, LAGE OM. From ocean to medicine: pharmaceutical applications of metabolites from marine bacteria[J]. *Antibiotics*, 2020, 9(8): 455.
- [2] LIU MM, EL-HOSSARY EM, OELSCHLAEGER TA, DONIA MS, QUINN RJ, ABDELMOHSEN UR. Potential of marine natural products against drug-resistant bacterial infections[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2019, 19(7): e237-e245.
- [3] CARROLL AR, COPP BR, DAVIS RA, KEYZERS RA, PRINSEP MR. Marine natural products[J]. *Natural Product Reports*, 2020, 37(2): 175-223.
- [4] HAYGOOD MG, SCHMIDT EW, DAVIDSON SK, FAULKNER DJ. Microbial symbionts of marine invertebrates: opportunities for microbial biotechnology[J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 1999, 1(1): 33-43.
- [5] MEDEMA MH, FISCHBACH MA. Computational approaches to natural product discovery[J]. *Nature Chemical Biology*, 2015, 11(9): 639-648.
- [6] van der KOLK JH, ENDIMIANI A, GRAUBNER C, GERBER V, PERRETEEN V. *Acinetobacter* in veterinary medicine, with an emphasis on *Acinetobacter baumannii*[J]. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2019, 16: 59-71.
- [7] BRIGMON M, JINADATHA C, CHOI H, KAYE KS, ALLTON Y, KILGORE PE, BEAVER R, DHAR S, CHATTERJEE P. 1451. genetic analysis of antibiotic resistance profiles of *Acinetobacter baumannii* using whole genome sequencing[J]. *Open Forum Infectious Diseases*, 2020, 7(Supplement_1): S728.
- [8] MARGALHO LP, FELICIANO MD, SILVA CE, ABREU JS, PIRAN MVF, SANT'ANA AS. Brazilian artisanal cheeses are rich and diverse sources of nonstarter lactic acid bacteria regarding technological, biopreservative, and safety properties: insights through multivariate analysis[J]. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(9): 7908-7926.
- [9] van BOECKEL T, PIRES J, SILVESTER R, ZHAO C, SONG J, CRISCUOLO N, GILBERT M, BONHOEFFER S, LAXMINARAYAN R. Global trends in antimicrobial resistance in animals in low- and middle-income countries[J]. *International Journal of Infectious Diseases*, 2020, 101: 19.
- [10] CHOWDHURY FR, FINDLAY BL. Fitness costs of antibiotic resistance impede the evolution of resistance to other antibiotics[J]. *ACS Infectious Diseases*, 2023, 9(10): 1834-1845.
- [11] BAINDARA P, DINATA R, MANDAL SM. Marine bacteriocins: an evolutionary gold mine to payoff antibiotic resistance[J]. *Marine Drugs*, 2024, 22(9): 388.
- [12] MIKHAILOV VV, ANDRYUKOV BG, LYAPUN IN. Search and selection of bacteriocin-producing strains of marine bacteria in the aquatic ecosystems of the sea of Japan[J]. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 2019, 34(4): 216-219.
- [13] LONGEON A, PEDUZZI J, BARTHELEMY M, CORRE S, NICOLAS JL, GUYOT M. Purification and partial identification of novel antimicrobial protein from marine bacterium *Pseudoalteromonas* species

- strain X153[J]. Marine Biotechnology, 2004, 6(6): 633-641.
- [14] IQBAL S, VOHRA MS, JANJUA HA. Whole-genome sequence and broad-spectrum antibacterial activity of *Chryseobacterium cucumeris* strain MW-6 isolated from the Arabian Sea[J]. 3 Biotech, 2021, 11(12): 489.
- [15] GUAN LM, WANG HX, CHEN JH, YANG FY, YANG J, LI JH, JIN L. Isolation and identification of culturable bacteria from South China Seawater and preliminary screening of marine biocontrol bacteria[J]. Microorganisms, 2023, 11(12): 2933.
- [16] DAS P, CHATTERJEE S, BEHERA BK, DANGAR TK, DAS BK, MOHAPATRA T. Isolation and characterization of marine bacteria from east coast of India: functional screening for salt stress tolerance[J]. Heliyon, 2019, 5(6): e01869.
- [17] BIBI F, NASEER MI, HASSAN AM, YASIR M, AL-GHAMDI AAK, AZHAR EI. Diversity and antagonistic potential of bacteria isolated from marine grass *Halodule uninervis*[J]. 3 Biotech, 2018, 8(1): 48.
- [18] VACA J, ORTIZ A, SANSINENEA E. *Bacillus* sp. bacteriocins: natural weapons against bacterial enemies[J]. Current Medicinal Chemistry, 2022, 29(12): 2093-2108.
- [19] LI YJ, YU S, WENG PF, WU ZF, LIU YN. Purification and antimicrobial mechanism of a novel bacteriocin produced by *Lactiplantibacillus plantarum* FB-2[J]. LWT, 2023, 185: 115123.
- [20] CHAPARTEGUI-GONZÁLEZ I, LÁZARO-DÍEZ M, RAMOS-VIVAS J. Genetic resistance determinants in clinical *Acinetobacter pittii* genomes[J]. Antibiotics, 2022, 11(5): 676.
- [21] LI HB, GUO LD, ZHANG XY, MU HQ, SHA SF, LIN Y, HOU HW, WANG LP. Whole-genome sequencing combined with mass spectrometry to identify bacteriocin and mine silent genes[J]. LWT, 2022, 169: 113975.
- [22] LI JY, ZHANG LJ, MU GQ, TUO YF. Interpretation of safety and potential probiotic properties of *Lactiplantibacillus plantarum* Y42 based on genome-wide sequencing[J]. Food Bioscience, 2023, 56: 103249.
- [23] MAJOR D, FLANZBAUM L, LUSSIER L, DAVIES C, CALDO KMP, ACEDO JZ. Transporter protein-guided genome mining for head-to-tail cyclized bacteriocins[J]. Molecules, 2021, 26(23): 7218.
- [24] CRUZ VL, RAMOS J, MARTINEZ-SALAZAR J, MONTALBAN-LOPEZ M, MAQUEDA M. The role of key amino acids in the antimicrobial mechanism of a bacteriocin model revealed by molecular simulations[J]. Journal of Chemical Information and Modeling, 2021, 61(12): 6066-6078.
- [25] TIETZ JI, SCHWALEN CJ, PATEL PS, MAXSON T, BLAIR PM, TAI HC, ZAKAI UI, MITCHELL DA. A new genome-mining tool redefines the lasso peptide biosynthetic landscape[J]. Nature Chemical Biology, 2017, 13(5): 470-478.
- [26] DEROSA G, SAHEBKAR A, MAFFIOLI P. The role of various peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands in clinical practice[J]. Journal of Cellular Physiology, 2018, 233(1): 153-161.
- [27] LIU J, WANG B, LAI QF, LU YT, LI L, LI YH, LIU SJ. Boosted growth performance, immunity, antioxidant capacity and disease resistance of crucian carp (*Carassius auratus*) by single or in combination dietary *Bacillus subtilis* and xylo-oligosaccharides[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2022, 256: 109296.
- [28] 许俊杰, 蔡中华, 周进. 海洋细菌 CAZymes 的研究进展[J]. 微生物学报, 2022, 62(4): 1286-1307.
- XU JJ, CAI ZH, ZHOU J. Research progress of carbohydrate-active enzymes on marine bacteria[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(4): 1286-1307 (in Chinese).
- [29] CUI YL, LUO LL, WANG X, LU YY, YI YL, SHAN YY, LIU BF, ZHOU Y, LÜ X. Mining, heterologous expression, purification, antibactericidal mechanism, and application of bacteriocins: a review[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2021, 20(1): 863-899.
- [30] WILLIAMS AN, SOROUT N, CAMERON AJ, STAVRINIDES J. The integration of genome mining, comparative genomics, and functional genetics for biosynthetic gene cluster identification[J]. Frontiers in Genetics, 2020, 11: 600116.
- [31] BLIN K, SHAW S, KAUTSAR SA, MEDEMA MH, WEBER T. The antiSMASH database version 3: increased taxonomic coverage and new query features for modular enzymes[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(D1): D639-D643.
- [32] ANGELOPOULOU A, WARDA AK, O'CONNOR PM, STOCKDALE SR, SHKOPOROV AN, FIELD D, DRAPER LA, STANTON C, HILL C, ROSS RP. Diverse bacteriocins produced by strains from the human milk microbiota[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 788.
- [33] MOKHTAR NFK, HASHIM AM, HANISH I, ZULKARNAIN A, RAJA NHARI RMH, ABDUL SANI AA, ABBASILIASI S, ARIFF A, MUSTAFA S, RAHIM RA. The discovery of new antilisterial proteins from *Paenibacillus polymyxa* Kp10 via genome mining and mass spectrometry[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 960.
- [34] VEZINA B, REHM BHA, SMITH AT. Bioinformatic prospecting and phylogenetic analysis reveals 94 undescribed circular bacteriocins and key motifs[J]. BMC Microbiology, 2020, 20(1): 77.
- [35] WAMBUI J, STEVENS MJA, SIEBER S, CERNELA N, PERRETEN V, STEPHAN R. Targeted genome mining reveals the psychrophilic *Clostridium estertheticum* complex as a potential source for novel bacteriocins, including cesin A and estercticin A[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 12: 801467.
- [36] NISSEN-MEYER J, OPPEGÅRD C, ROGNE P, HAUGEN HS, KRISTIANSEN PE. Structure and mode-of-action of the two-peptide (class-IIb) bacteriocins[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2010, 2(1): 52-60.