

研究报告

基于基因组的非盐环境嗜盐菌 JSM 102089 的系统发育和次级代谢潜力分析

达春瑶¹, 陈锦华^{*1}, 冯立国^{1,2}, 邓丽颖^{1,3}, 张丽¹, 邹文海^{1,3}, 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 416000

2 中华供销合作总社 湖南省食用菌研究所, 湖南 长沙 410031

3 张家界学院 医学院, 湖南 张家界 427000

达春瑶, 陈锦华, 冯立国, 邓丽颖, 张丽, 邹文海, 刘祝祥, 陈义光. 基于基因组的非盐环境嗜盐菌 JSM 102089 的系统发育和次级代谢潜力分析[J]. 微生物学通报, 2025, 52(4): 1775-1795.

DA Chunyao, CHEN Jinhua, FENG Ligu, DENG Liying, ZHANG Li, ZOU Wenhai, LIU Zhuxiang, CHEN Yiguang. Genome-based analysis of the phylogeny and secondary metabolic potential of a halophilic bacterium JSM 102089 isolated from non-saline environment[J]. Microbiology China, 2025, 52(4): 1775-1795.

摘要:【背景】菌株 JSM 102089 分离自湖南省吉首市德夯峡谷非盐性耕作土壤, 中度嗜盐、兼性厌氧、不能运动、产芽孢, 脲酶、明胶水解和革兰氏染色阳性。其系统发育地位独特, 并具有产铁载体活性。【目的】确定菌株 JSM 102089 的系统发育地位, 了解其次级代谢潜力。【方法】采用基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析法, 辅之以表型特征比较, 初步了解菌株 JSM 102089 的系统分类地位; 测定其基因组框架图, 采用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)和数字 DNA-DNA 杂交值(digital DNA-DNA hybridization, dDDH), 并进行基因组系统发育分析, 更为准确地判定菌株 JSM 102089 的系统发育地位; 采用 antiSMASH 7.0、BLASTn 和 BLASTp 等多种生物信息学工具进行次级代谢产物合成基因簇(biosynthetic gene clusters, BGCs)的快速鉴定、功能注释和序列比对, 探测其次级代谢潜能。【结果】16S rRNA 基因序列分析表明, 菌株 JSM 102089 应归属于芽孢杆菌科(Bacillaceae), 与其系统发育关系最密切的是假嗜碱芽孢杆菌属(*Pseudalkalibacillus*)的 *P. sedimenti* FJAT-53715^T (16S rRNA 基因序列相似性, 99.72%)、*P. spartinae* FJAT-53046^T (99.64%)和花津浦滩假嗜碱芽孢杆菌(*P. hwajinpoensis*) SW-72^T (99.59%), 其次是嗜碱盐芽孢杆菌属(*Alkalihalobacillus*)的球海

资助项目: 国家自然科学基金(31460004); 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 (31460004), 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; CHEN Yiguang, mchen@jsu.edu.cn

Received: 2024-07-10; Accepted: 2024-11-03; Published online: 2024-12-02

胆嗜碱盐芽孢杆菌(*A. hemicentroti*) JSM 076093^T (98.64%)。在基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树上, 这些菌株形成了稳定的进化支系。其中 JSM 102089 与 *P. sedimenti* FJAT-53715^T 和 *P. spartinae* FJAT-53046^T 聚类为稳定的亚支系, 但 JSM 102089 在该亚支系的外周占据独立的进化分支; 菌株 JSM 102089 的化学分类特征符合芽孢杆菌科特征, 但其耐盐特性、运动性、明胶水解和脲酶活性等重要生物学特征明显区别于系统发育关系最密切的典型菌株; 比较基因组学分析发现, 菌株 JSM 102089 与系统发育关系密切的典型菌株之间的 ANI 和 dDDH 值均明显低于普遍认可的细菌物种划分阈值(ANI, 95%–96%; dDDH, 70%), 说明该菌株代表了芽孢杆菌科一个新的独立物种。在基因组系统发育树上, 菌株 JSM 102089 也与 *P. sedimenti* FJAT-53715^T 和 *P. spartinae* FJAT-53046^T 聚在一起, 但该菌株形成了独立的物种簇, 说明该实验菌株是假嗜碱芽孢杆菌属的一个新成员。BGCs 分析表明, 在菌株 JSM 102089 及其密切相关的假嗜碱芽孢杆菌属和嗜碱盐芽孢杆菌属 13 个代表性菌株基因组中分布有铁载体、III 型聚酮合酶和萜类等 19 类 86 个 BGCs, 多数具有突出的新颖性和较高的多样性, 特别是菌株 JSM 102089 专有 2 个结构上非常独特、功能上特别新颖的复合型 BGCs。

【结论】综合 16S rRNA 基因序列、表型特征和比较基因组学分析结果, 明确显示分离自非盐环境的产铁载体嗜盐菌 JSM 102089 代表了芽孢杆菌科假嗜碱芽孢杆菌属的 1 个潜在新种(新基因组种); BGCs 分析结果显示菌株 JSM 102089 及其密切相关的假嗜碱芽孢杆菌属和嗜碱盐芽孢杆菌属代表性菌株的多数 BGCs 具有突出的新颖性和较高的多样性, 其中菌株 JSM 102089 部分 BGCs 的结构和功能具有明显的独特性, 提示它们具有较大的产生新颖多样次级代谢产物的潜力。因此, 菌株 JSM 102089 是一株典型的新资源微生物, 其系统分类、耐盐机制、次级代谢功能和生物技术潜力值得进一步探索。本研究还发现, 嗜碱盐芽孢杆菌属及其部分物种的系统发育和分类地位有待重新考量, 并对此提出了针对性建议。

关键词: 非盐环境嗜盐菌; 比较基因组学; 系统发育; 新基因组种; 次级代谢产物合成基因簇; 新资源微生物

Genome-based analysis of the phylogeny and secondary metabolic potential of a halophilic bacterium JSM 102089 isolated from non-saline environment

DA Chunyao¹, CHEN Jinhua^{*1}, FENG Ligu^{1,2}, DENG Liying^{1,3}, ZHANG Li¹, ZOU Wenhai^{1,3}, LIU Zhuxiang¹, CHEN Yiguang^{*1}

¹ College of Biology and Environmental Sciences, Jishou University, Jishou 416000, Hunan, China

² Hunan Institute of Edible Fungi, All China Federation of Supply and Marketing Cooperatives, Changsha 410031, Hunan, China

³ School of Medicine, Zhangjiajie College, Zhangjiajie 427000, Hunan, China

Abstract: [Background] Strain JSM 102089 was a moderately halophilic, siderophore-producing, facultatively anaerobic, non-motile, endospore-forming and Gram-positive bacterium, isolated from a non-saline cultivated soil sample collected from the Dehang Canyon (28°15'–28°43'N, 109°30'–109°45'E) in Jishou, Hunan, China. The strain was positive for gelatin hydrolysis and

urease activity, and exhibited a unique phylogenetic relationship with the members of the family *Bacillaceae*. **[Objective]** To find out the phylogenetic status of JSM 102089 and unravel its secondary metabolic potential on the basis of the draft genome. **[Methods]** The phylogeny of JSM 102089 was primarily analyzed by 16S rRNA gene sequencing and comparison of phenotypic characteristics. Then, the exact phylogenetic status 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, as well as by phylogenomic analysis. To investigate the secondary metabolic potential of JSM 102089, we used multiple bioinformatics tools such as antiSMASH 7.0, BLASTn and BLASTp for rapid genome-wide identification, annotation, and analysis of biosynthetic gene clusters (BGCs) for secondary metabolites. **[Results]** The results of the phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences showed that JSM 102089 belonged to the family *Bacillaceae* and was closely related to the type strains of 3 known species of the genus *Pseudalkalibacillus*, i.e. *P. sedimenti* FJAT-53715^T (16S rRNA gene sequence similarity, 99.72%), *P. spartinae* FJAT-53046^T (99.64%) and *P. hwajinpoensis* SW-72^T (99.59%), followed by *Alkalihalobacillus hemicentroti* JSM 076093^T (98.64%). These 5 strains formed an obvious clade in the phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences. Specifically, strains JSM 102089, *P. sedimenti* FJAT-53715^T and *P. spartinae* FJAT-53046^T formed a distinct subclade, but JSM 102089 made a separated branch on the outskirts of the subclade. Chemotaxonomic data of JSM 102089 were consistent with its assignment to *Bacillaceae*, while JSM 102089 could be distinguished from its closest relatives by a number of important characteristics, such as salt tolerance, motility, urease activity and hydrolysis of gelatin. The results of comparative genomics analysis showed that both of the ANI and dDDH estimated values between JSM 102089 and type strains of phylogenetically closely known species of *Pseudalkalibacillus* and *Alkalihalobacillus* were well lower than the generally recognized thresholds of bacterial species (ANI, 95%–96%; dDDH, 70%), which strongly supported JSM 102089 representing a potential new species of *Bacillaceae*. The results of the phylogenomic analysis also showed that JSM 102089 clustered together with *P. sedimenti* FJAT-53715^T and *P. spartinae* FJAT-53046^T but the strain studied made a distinctly separated species cluster, which suggested that JSM 102089 represented a new species of the genus *Pseudalkalibacillus*. A total of 86 BGCs belonging to 19 function-types including NI-siderophores, type III polyketide synthases (T3PKSs) and terpenes, were mined from the genomes of JSM 102089 and 13 representative strains of *Pseudalkalibacillus* and *Alkalihalobacillus*. Most of the BGCs exhibited prominent novelty compared with known BGCs as well as high function diversity between each other. Particularly, two strain-exclusive BGCs of JSM 102089 were relatively unique in structure as well as particularly novel in function. **[Conclusion]** The combination of the results of phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences, comparison of phenotypic characteristics and comparative genomics analysis showed definitely that JSM 102089 cannot be designated to any of the recognized species of *Bacillaceae*, but represents a potential new species (or new genomospecies) of *Pseudalkalibacillus*; Most of the BGCs of JSM 102089 and closest representatives of

Pseudalkalibacillus and *Alkalihalobacillus* exhibit prominent novelty compared with known BGCs as well as high function diversity between each other, and parts of the BGCs of JSM 102089 exhibit unique structures and novel functions, which all clearly show that these strains have the biosynthesis potential of a variety of novel secondary metabolites. Therefore, we think JSM 102089 should be a typical example of new-resource microbes, and the systematic taxonomy, salt-tolerant mechanism, secondary metabolism and biotechnological potential of the new strain is worth being further explored. Moreover, it is evident that the phylogeny and taxonomy of the genus *Alkalihalobacillus* and/or some known *Alkalihalobacillus* species should be re-examined, and on this a few of well-targeted suggestions are proposed by us.

Keywords: halophilic bacteria from non-saline environments; comparative genomics; phylogeny; new genomospecies; secondary metabolite biosynthetic gene clusters; new-resource microbe

微生物是地球上起源最早、分布最广、物种多样性最丰富且适应性最强的生物。尽管大多数微生物只能在中性环境中生存,但类群多样的微生物却能在极端酸碱、极端温度、高盐、高压和/或厌氧等极端环境中生活,被称为极端微生物或嗜极菌^[1]。近几十年来,对极端环境微生物生态学、生理学、分子生物学及进化等全方位进行了广泛和深入的研究,诸多研究成果有力地证实了该类生物基因类型独特、生理机制特殊、代谢产物新颖,它们不仅是研究起源和进化的模式材料,更是一类具有很大开发潜力的生物资源^[1-5]。

嗜盐菌作为常见极端微生物代表之一,是一类需要一定盐浓度才能良好生长的微生物,其最适生长盐浓度达 0.2 mol/L 及以上^[6-7]。嗜盐菌广泛分布在盐环境中,诸如海洋、海水日光盐场、盐湖和地下盐矿(岩盐和卤水)等^[8-9]。嗜盐菌凭借其独特的细胞构造和代谢机制,能够在高盐环境中繁衍,在维持生存环境的生态系统中发挥积极作用。因嗜盐菌具有盐耐受性强、生长速度快、对无菌培养条件要求不严苛等特点,使其在耐盐酶、细菌视紫质、相容性溶质和新型药物开发利用,以及高盐废水处理和高盐发酵食品等领域具有广泛的应用前景^[10-14]。

Echigo 等^[15]于 2005 年从日本的林地、牧场、果园和草坪等普通的非盐环境土壤样品中分离到 176 株能耐受 20% NaCl 的嗜盐菌,经 16S rRNA 基因序列分析表明这些分离菌株都属于芽孢杆菌科(*Bacillaceae*)。自 2009 年以来,本团队针对我国代表性非盐性土壤和人类粪便等非盐环境样品的嗜盐菌进行了较为系统的分离纯化和系统发育多样性研究,发现我国非盐环境中嗜盐菌类群多样性较丰富,其中不仅有占优势的芽孢杆菌科菌株,还存在放线菌和革兰氏阴性菌,并蕴藏着一批具有抗菌、高产胞外酶活性和代表新分类单元(新种)的新菌株^[16-19]。近年来,其他学者也相继从人类肠道、内陆河水、空气和植物内生环境样品中分离到嗜盐细菌和古菌^[20-23]。总之,在普通非盐环境中,同样蕴含着较为丰富的嗜盐菌资源,其中芽孢杆菌科占绝对优势,至少归属于该科的 27 个属;也分离到少量嗜盐的放线菌、革兰氏阴性菌和古菌^[15-23]。这些研究成果从新的视野诠释了微生物分布“everything is everywhere”的理念,同时提示我们,在普通的非盐环境中也可能存在着新颖独特且极具生物技术潜力的嗜盐菌资源。

菌株 JSM 102089 是本团队采用高盐复合培养基从湖南省吉首市德夯峡谷非盐性耕作土

壤样品中分离到的产芽孢革兰氏阳性中度嗜盐菌^[24]。铬天青 S (chrome azurol sulfonate, CAS) 琼脂平板法检测到该菌株具有分泌铁载体活性, 为了阐明该菌株的系统发育地位、了解其次级代谢产物合成潜力, 本研究在 16S rRNA 基因序列系统发育分析和表型特征比较的基础上, 进一步测定该菌株基因组框架图, 深入开展比较基因组学研究。

1 材料与方法

1.1 样品

实验菌株 JSM 102089 是本实验室对我国部分典型非盐环境中嗜盐菌多样性调查期间, 采用含 20% NaCl 的 marine agar 2216 (MA)^[24]培养基分离自湖南省吉首市德夯峡谷的非盐性耕作土壤样品。该菌株为产芽孢的革兰氏阳性杆菌, 中度嗜盐, 在含 0.5%–20.0% NaCl 的复合培养基上生长良好(最适合盐浓度 4%–8%)。实验选用 4 株与实验菌株系统发育关系最密切的典型菌株作为平行实验的参考菌株, 其来源如下: *Pseudalkalibacillus sedimenti* GDMCC 1.3076^T 和 *Pseudalkalibacillus spartinae* GDMCC 1.3077^T 由广东省微生物菌种保藏中心 (Guangdong Microbial Culture Collection Center, GDMCC) 惠赠; 花津浦滩假嗜碱芽孢杆菌 (*Pseudalkalibacillus hwajinpoensis*) DSM 16206^T 由德国微生物和细胞培养物保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany, DSMZ) 惠赠; 球海胆嗜碱盐芽孢杆菌 (*Alkalihalobacillus hemicentroti*) JSM 076093^T 由本实验室分离、鉴定和保存。

1.2 主要试剂和仪器

琼脂粉, 北京鼎国昌盛生物技术有限公司; 胰蛋白胨、酸解蛋白胨、大豆蛋白胨、酪蛋白胨、酵母膏和营养琼脂, 北京奥博星生物技术

有限责任公司; M153-氧化酶试剂, 北京路桥技术股份有限公司; 铬天青 S, 上海三爱思试剂有限公司; 硝酸盐还原试剂、Voges-Proskauer 和甲基红试剂, 广东环凯微生物科技有限公司; 脱脂奶粉, 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; 生化培养箱, 上海精宏实验设备有限公司; 恒温培养摇床, 上海知楚仪器有限公司; 台式离心机, Eppendorf 公司; 真空冷冻干燥器, Thermo Fisher Scientific 公司; 紫外分光光度计, Shimadzu 公司; 光学显微镜, Leica 公司; PCR 仪和电泳仪, Bio-Rad 公司; 厌氧培养系统, BD 公司; 微生物自动鉴定系统 (Microbial Identification System, MIDI), Biolog Life Science Institute 公司。

1.3 培养基

marine agar 2216 (MA) 和 marine broth 2216 (MB) 培养基, BD 公司。MA5 和 MB5: 在 MA 或 MB 基础上添加 50 g/L NaCl。

改良 CAS 琼脂培养基: NaCl 20.0 g, 复合盐 A 液 20 mL, 复合盐 B 液 1 mL, 其他按文献[25]配制。

复合盐 A 液: 柠檬酸铁 5.0 g, Na₂CO₃ 8.0 g, KCl 27.5 g, 去离子水 1 000 mL。

复合盐 B 液: (NH₄)₂SO₄ 1.6 g, Na₂SiO₃ 4.0 g, Na₂HPO₄ 8.0 g, H₃BO₃ 22.0 g, SrCl 34.0 g, KBr 80.0 g, 去离子水 1 000 mL。

营养琼脂(g/L): 蛋白胨 10.0, 牛肉膏 3.0, 琼脂粉 15.0, NaCl 5.0, pH 7.2–7.4。

1.4 菌株的培养和验证

用 MA 和 MA5 平板活化保存于牛奶管中的菌株, 并用 MA5 平板进行传代培养; 用 MB5 30 °C、180 r/min 培养 3–4 d, 室温 4 000 r/min 离心 15 min 收集菌体, 用 0.85% NaCl 无菌盐

水洗3次,用于化学指标检测和基因组测序;用改良CAS琼脂培养基^[25]检验产铁载体活性。实验菌株和参考菌株活化后,通过菌落形态和革兰氏染色镜检观察纯度,并测定其16S rRNA基因序列进行验证。

1.5 16S rRNA基因的PCR扩增和测序分析

采用酶法小量提取基因组DNA、按常规方法PCR扩增16S rRNA基因^[26]。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)股份有限公司采用一代测序技术进行序列测定。16S rRNA基因的扩增和测序采用正向引物(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和反向引物(5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')。

用BioEdit软件查看序列峰型图、检查测序质量;采用DNASTar软件包中的SeqMan程序进行序列拼接,对照峰型图对序列中的个别碱基进行手工校正。切除首尾质量较差序列,保存为fasta格式备用,并上传GenBank等公共数据库,获得序列号。在NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)和EZBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/taxonomy>)采用BLAST进行相似性搜索,下载并以fasta格式保存相似性较高的序列,连同目标序列构建成同源序列集。用Clustal X进行多重比对。采用MEGA 11软件包中的邻接(neighbor-joining, NJ)法、最大似然(maximum-likelihood, ML)法和最大简约(maximum-parsimony, MP)法构建系统发育树。用1 000次重复的bootstrap检验以评估进化树拓扑结构的稳定性。

1.6 表型特征观察

以JSM 102089为实验菌株,与4个参考菌株在相同条件下进行表型特征测试和观察。除非特别说明,有关实验均用MA5和/或MB5为基础培养基。采用标准染色法和KOH溶解法观

察革兰氏反应^[27];使用相差物镜观察芽孢;配制不同NaCl浓度的营养琼脂和MA平板观察耐盐性;采用MA5平板和MB5摇瓶观察温度和酸碱耐受性;采用悬滴法、半固体琼脂柱穿刺培养法和半固体平板湿室培养法观察运动性;接种于补充1 g/L NaNO₃和10 g/L葡萄糖的MA平板,采用厌氧培养系统按标准操作进行厌氧培养;用3% H₂O₂和氧化酶试剂分别检测过氧化氢酶和氧化酶活性;脲酶、多聚物水解和硝酸盐还原等其他生化特征的表征参照《常见细菌系统鉴定手册》^[28]进行。采用MIDI系统进行新鲜菌体的全细胞脂肪酸测定;新鲜菌体冷冻干燥后,采用常规方法提取检测磷脂和呼吸醌^[29]。菌株点接于改良CAS琼脂平板,30℃培养7 d,观察黄色晕圈,推断其产铁载体能力。

1.7 基因组序列测定和组分分析

基因组测序所需菌体培养方法同1.4,离心和洗涤后,分装于1.5 mL EP管,−70℃超低温冰箱冷冻2 d后,用干冰包裹,寄送生工生物工程(上海)股份有限公司采用二代测序技术测定基因组框架图。实验流程按照Illumina公司提供的标准操作指南执行,依次包括基因组DNA提取和质量检测、小片段DNA文库构建和质量控制、桥式PCR扩增和Illumina测序等步骤。通过Trimmomatic 0.33软件进行原始数据质量控制,过滤掉低质量的reads;用Spades 3.6.2软件对过滤后的reads进行组装。通过软件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进行比对来搜索基因组中的重复序列,使用Infernal v1.1.3根据协方差模型在Rfam数据库预测RNA基因,用tRNAscan-SE v2.0预测基因组中tRNA基因;使用IslandPath-DIMOB v0.2、PhiSpy v2.3和CRT v1.2分别预测基因组中基因组岛、前噬菌体和CRISPR。

1.8 基因组系统分类特征比较

通过在线计算 G+C/A+T+G+C 而获得基因组 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), 基因组间平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)按 OrthoANI 算法估算^[30-31]。原核生物物种之间的界限 ANI 阈值是 95%–96%, 低于这一范围可以推测 2 个菌株不是同一物种^[32]。把实验菌株基因组和与其系统发育关系密切的典型菌株基因组上传到 DSMZ 网络平台服务(<https://ggdc.dsmz.de/distcalc2.php>), 采用 Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC) 4.0 进行数字 DNA-DNA 杂交值(digital DNA-DNA hybridization, dDDH)估算, 采信 Formula 2 (identities/HSP length)估值进行全基因组序列同源性比较^[33]。原核生物物种之间的 DNA 同源性阈值采用 70% dDDH, 低于这一阈值的菌株归属于不同物种^[34-35]。

1.9 基因组选择和基因组系统发育分析

为了进一步阐明菌株 JSM 102089 在芽孢杆菌科的系统发育地位, 从公共数据库中选择基因组数据, 采用 Type Strain Genome Server 网站(<https://tygs.dsmz.de>)在线服务进行基因组系统发育分析。具体方法为: 基于 16S rRNA 基因分析结果, 从该平台提供的数据中人工选择最多 10 个与实验菌株系统发育关系密切的典型菌株基因组, 并用 MASH 算法自动选择数据库中的典型菌株基因组, 连同实验菌株基因组一起构建基因组集; 采用 RNAmmer 提取各基因组中的 16S rRNA 基因序列; 采用 Genome Blast Distance Phylogeny (GBDP) d5 进化距离模型、用‘trimming’算法计算基因组序列中 16S rRNA 基因序列之间以及基因组全序列间的进化距离(100 次重复), 用于推断菌株间的系统发育关系; 用 FASTME 2.1.6.1 构建基因组系统

发育树^[33,35]。

1.10 次级代谢产物合成基因簇分析

采用 antiSMASH 细菌版 7.0 软件 (<https://antismash.secondarymetabolites.org/#!/start>)^[36] 基于不同类型基因簇基因的隐马尔可夫模型在线进行基因组次级代谢产物合成基因簇(biosynthetic gene clusters, BGCs)的快速鉴定、功能注释和序列分析。软件 antiSMASH 是目前鉴定与分析细菌和真菌基因组序列中生物合成基因簇所最广泛使用的工具, 提供了 3 个级别的检测严格度, 即 strict、relaxed 和 loose。本研究选择被普遍采用的中等严格度“relaxed”、勾选平台提供的所有附加分析特性, 在数据库的全部基因组中进行搜索和分析。继而分析不同菌株的基因簇组成, 了解不同类型基因簇的基本结构和功能; 在 NCBI 标准数据库对各个基因簇生物合成核心基因的核酸序列进行 BLASTn 搜索, 查找同源基因; 对其编码的蛋白质氨基酸序列进行 BLASTp 搜索, 查找最相近的功能蛋白, 深入了解基因簇的潜在功能。

2 结果与分析

2.1 基于 16S rRNA 基因的系统发育分析

测得菌株 JSM 102089 几乎全长的 16S rRNA 基因序列为 1 491 bp, 存储于公共数据库获得 GenBank/EMBL/DDBJ 序列号为 KM199864。在线 BLASTn 分析表明, 菌株 JSM 102089 应归属于芽孢杆菌科, 但其系统分类归属比较复杂, 与其 16S rRNA 基因序列相似性最高的 10 个典型菌株分别属于该科的 5 个属(表 1)。其中与 JSM 102089 系统发育关系最为密切的是假嗜碱芽孢杆菌属(*Pseudalkalibacillus*)和嗜碱盐芽孢杆菌属(*Alkalihalobacillus*), 有 5 个已知物种的典型菌株与菌株 JSM 102089 的 16S rRNA 基因序列相似性大于 97% (表 1)。

表 1 菌株 JSM 102089 和系统发育关系密切典型菌株的 16S rRNA 基因序列相似性(Top 10)

Table 1 Top 10 similarities of 16S rRNA gene sequences of strain JSM 102089 vs. phylogenetically close type strains

序号 No.	物种及其典型菌株 Species and type strain	序列号 Accession number	相似性 Similarity (%)
1	<i>Pseudalkalibacillus sedimenti</i> FJAT-53715 ^T	OQ457525	99.72
2	<i>Pseudalkalibacillus partinae</i> FJAT-53046 ^T	OR195743	99.64
3	<i>Pseudalkalibacillus hwajinpoensis</i> SW-72 ^T	AF541966	99.59
4	<i>Alkalihalobacillus hemisentroti</i> JSM 076093 ^T	HM460885	98.64
5	<i>Alkalihalobacillus algicola</i> KMM 3737 ^T	AY228462	98.02
6	<i>Pseudalkalibacillus caeni</i> HB172195 ^T	MK249707	96.59
7	<i>Anaerobacillus isosaccharinicus</i> NB2006 ^T	KJ852652	95.77
8	<i>Halalkalibacter kiskunsagensis</i> B16-24 ^T	LN610501	95.74
9	<i>Desertibacillus haloalkaliphilus</i> KJ1-10-99 ^T	KC989945	95.50
10	<i>Anaerobacillus alkaliphilus</i> B16-10 ^T	LN610499	95.41

进一步分析可以看出, 菌株 JSM 102089 与假嗜碱芽孢杆菌属的 *P. sedimenti*^[37]、*P. spartinae*^[37] 和 *P. hwajinpoensis*^[38] 及嗜碱盐芽孢杆菌属的 *A. hemisentroti*^[39] 系统发育关系最为密切, 与其典型菌株之间的 16S rRNA 基因序列相似性超过或接近原核生物物种界限阈值(98.65%)^[40]。这 5 个菌株在基于 16S rRNA 基因序列的 NJ 树上形成稳定的进化支系, 其中菌株 JSM 102089 与 *P. sedimenti* 和 *P. spartinae* 关系最为密切, 形成了稳定的亚支系, 但菌株 JSM 102089 在该亚系的外周形成独立进化分支(图 1)。ML 和 MP 树也形成相似的拓扑结构, 见图 1 中“*”或“m”标识的进化分支。ML 和 MP 树储存于国家微生物科学数据中心 (<https://nmdc.cn/resource/ncov/attachment/NMDCX0001723>), 编号为 NMDCX0001723。以上基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析结果表明, 菌株 JSM 102089 归属于芽孢杆菌科, 与该科假嗜碱芽孢杆菌属系统发育关系最为密切, 其次为嗜碱盐芽孢杆菌属, 但无法归属于任何已知物种。

2.2 表型特征

菌株 JSM 102089 为不能运动、兼性厌氧、

氧化酶和过氧化氢酶阳性的革兰氏阳性杆菌, 具有铁载体活性。形成椭圆型芽孢, 孢子体膨大、中生或偏端生。在 MA5 (pH 7.5) 平板上于 30 °C 培养 5 d, 形成圆整、扁平、稍有皱纹、直径约 3–5 mm 的土黄色菌落。中度嗜盐, 在含有多种微量元素的复合培养基上 NaCl 耐受浓度范围为 0.5%–20.0%, 最适为 4.0%–8.0%。其生长温度和 pH 值分别为 10–45 °C (最适 30–35 °C) 和 6.0–11.0 (最适 7.5–8.0)。脲酶和硝酸盐还原阳性, 但亚硝酸盐还原、甲基红、Voges-Proskauer、吲哚和 H₂S 产生为阴性; 能水解七叶苷、淀粉、明胶、吐温-20 和吐温-40, 不能水解酪素、纤维素、吐温-60 和吐温-80。菌株 JSM 102089 在运动性、脲酶活性、耐盐特性和多聚物水解(明胶, 吐温-60, 吐温-80)方面明显区别于密切相关的典型菌株(表 2)。

菌株 JSM 102089 的化学分类表征符合芽孢杆菌科特征。其主要呼吸醌为甲基萘醌 MK-7; 极性脂包括磷脂酰甘油、双磷脂酰甘油和磷脂酰乙醇胺; 其全细胞脂肪酸组成与其系统发育密切相关典型菌株基本相似, 但其主要脂肪酸种类和含量也具有区分于密切相关典型菌株的

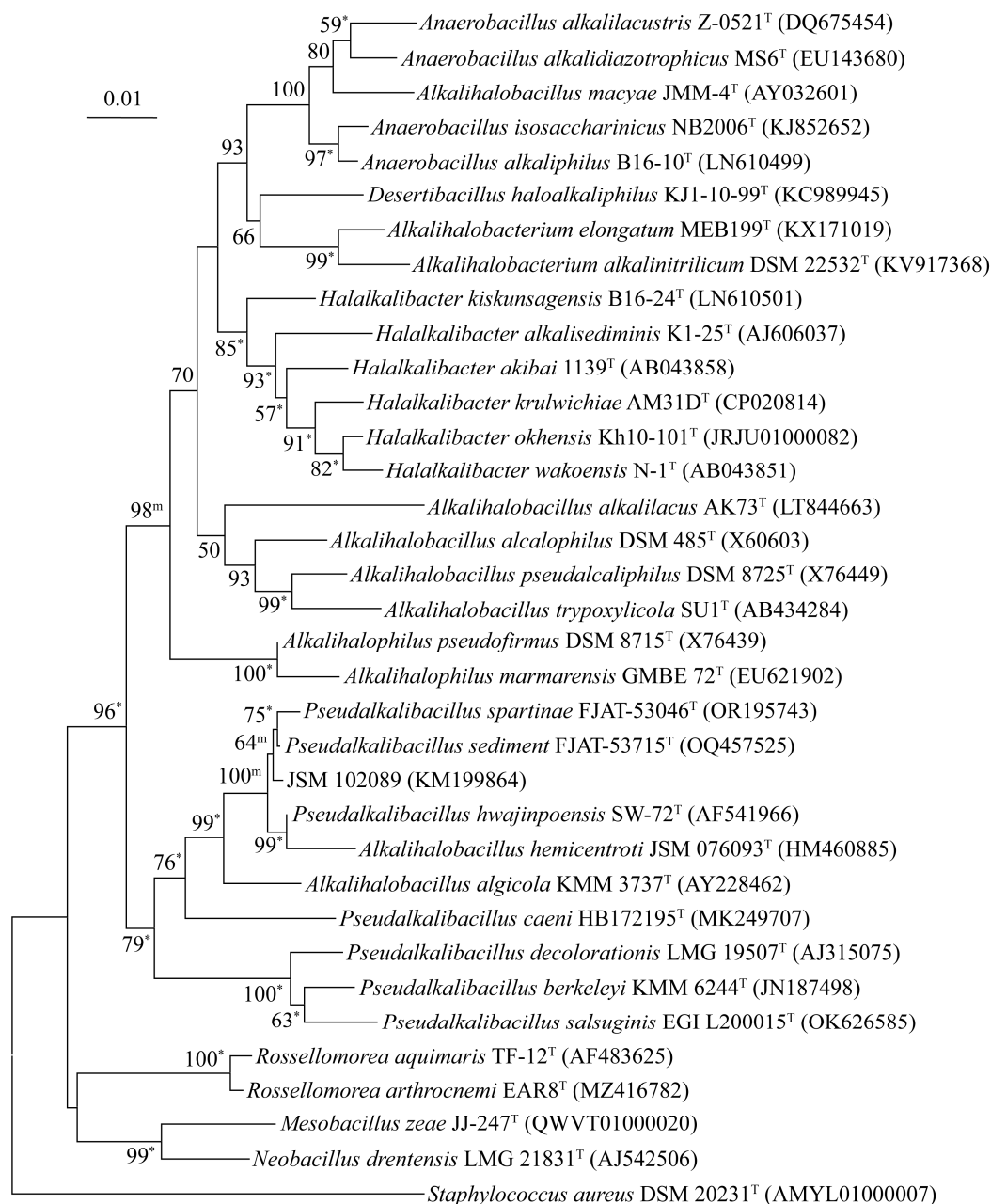


图 1 用邻接法基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 JSM 102089 的系统发育树 ^m: 与最大似然法进化上相同的节点; *: 邻接法、最大似然法和最大简约法相同的节点; 节点上的数值表示 1 000 次重复分析聚类百分比, 只标出了>50%的数值。

Figure 1 Phylogenetic tree of strain JSM 102089 constructed based on 16S rRNA gene sequence using neighbor-joining method. ^m: branches that were also found with the maximum-likelihood algorithms; *: branches that were recovered with all the three methods, i.e. neighbor-joining, maximum-likelihood as well as maximum-parsimony algorithms. Numbers at nodes indicate bootstrap values (>50%) based on neighbour-joining analyses of 1 000 resampled data sets.

表 2 菌株 JSM 102089 区别于与其系统发育关系最密切典型菌株的表型特征

Table 2 Phenotypic characteristics distinguishing strain JSM 102089 from its closest phylogenetic relatives

表型特征 Phenotypic characteristic	JSM 102089	<i>P. sedimenti</i> GDMCC 1.3076 ^T	<i>P. spartinae</i> GDMCC 1.3077 ^T	<i>P. hwajinpoensis</i> DSM 16206 ^T	<i>A. hemisentroti</i> JSM 076093 ^T
pore position	Central to subterminal	Subterminal	Central	Central to subterminal	Subterminal
Motility	—	+	+	+	—
Oxidase	+	+	+	+	—
Facultatively anaerobic	+	+	—	—	+
Methyl red test	—	—	—	+	+
Nitrate to nitrite	+	+	—	—	+
Urease	+	—	—	—	+
NaCl range (%)	0.5–20.0	0–8.0	0–8.0	0.5–15.0	0.5–25.0
NaCl optimum (%)	4.0–8.0	1.0–3.0	1.0–3.0	3.0–6.0	5.0–8.0
pH range	6.0–11.0	5.5–10.0	6.0–11.0	6.0–10.0	6.0–10.5
pH optimum	7.5–8.0	7.5	7.5–8.0	7.5–8.0	8.0
Temperature range (°C)	10–45	5–40	15–40	5–40	5–40
Temperature optimum (°C)	30–35	30	35	30–35	30–35
Hydrolysis of					
Aesculin	+	+	—	+	+
Casein	—	—	—	+	+
Gelatin	+	—	—	+	+
Tween 60	—	+	+	+	+
Tween 80	—	+	+	+	—
Habitat	Non-saline cultivated soil	*Mangrove sediment	*Mangrove sediment	†Sea water	§Sea urchin

+: 阳性; —: 阴性; 标注*、†和§的数据分别引自文献[37-39]; 其他数据为本研究平行实验结果。

+: Positive; —: Negative; Data marked with *, † and § were taken from the references [37-39], respectively; All other data were taken from this study in parallel tests.

特点。菌株 JSM 102089 主要脂肪酸(≥10%)为 anteiso-C_{15:0}、anteiso-C_{17:0} 和 iso-C_{14:0} (表 3)。

总之, 菌株 JSM 102089 在运动性、厌氧生长、硝酸盐还原、脲酶活性、耐盐特性和明胶水解等主要生物学特征上明显区别于与其系统发育关系最密切的典型菌株(表 2); 菌株 JSM 102089 的化学分类特征符合芽孢杆菌科特征, 但其主要脂肪酸种类和含量也具有区别于密切相关典型菌株的特点(表 3); 另外, 菌株 JSM 102089 分离自非盐环境(内陆耕作土壤), 而其他菌株均来自盐环境(海洋)。以上生物学特征方面的差异佐证了 16S rRNA 基因序列分析结果, 即菌株

JSM 102089 明显区别于与其系统发育密切相关的 4 个芽孢杆菌科已知种的典型菌株。

2.3 基因组结构和组成

菌株 JSM 102089 基因组大小为 4 398 021 bp, 由 39 个重叠群构成; N50 和 N90 分别为 363 494 bp 和 68 355 bp, 重复序列 5 918 bp (占基因组全长的 0.13%); G+C 含量为 39.87%。含 4 463 个蛋白质编码序列, 总长度为 3 799 773 bp, 占全长的 86.40%, 平均 851 bp (Max, 5 514; Min, 60); 含 86 个 tRNA 基因, 分属 34 个基因家族; 9 个 rRNA 基因(5S 7 个, 16S 和 23S 各 1 个), 分属 3 个基因家族。预测出 4 个基因组岛、2 个

表 3 菌株 JSM 102089 及其密切相关典型菌株全细胞脂肪酸比较表
Table 3 Fatty acid composition of strain JSM 102089 and its closest relatives

Fatty acid	JSM 102089	<i>P. sedimenti</i> GDMCC 1.3076 ^T	<i>P. spartinae</i> GDMCC 1.3077 ^T	<i>P. hwajinpoensis</i> DSM 16206 ^T	<i>A. hemicentroti</i> JSM 076093 ^T
13:0 anteiso	0.59	—	0.66	—	0.41
14:0 iso	13.04	8.80	8.63	13.81	12.01
14:0	0.55	0.56	0.41	—	0.58
15:0 iso	6.82	5.15	5.06	6.81	5.68
15:0 anteiso	54.71	52.00	55.01	44.30	50.82
16:1 w7c alcohol	1.31	2.93	1.26	6.59	3.85
16:0 iso	4.44	8.27	6.97	10.83	8.59
16:1 w11c	—	0.36	—	0.95	—
16:0	1.67	1.59	0.95	1.06	1.02
17:0 iso	1.11	—	2.25	2.58	—
17:0 anteiso	13.46	16.61	16.90	10.49	13.55
18:0	0.39	0.59	0.28	—	0.67
Summed feature 3	0.55	0.57	—	0.51	0.64
Summed feature 4	—	0.83	0.25	0.32	0.52

—: 未检测到; 数值为脂肪酸含量百分比, 加粗表示主要成分(≥10%), 所有菌株均<0.50%的被省略。所有数据来自平行试验。
—: Not detected; Data are percentages of the total fatty acids, those representing <0.50% in all strains being omitted, and those in bold were major fatty acids (≥10%). All data were from the present study.

前噬菌体、4 类 50 个拷贝的 CRISPR 序列。该基因组被存储于国家微生物科学数据中心 (<https://nmdc.cn/resource/zh/genomics/genome/detail/NMDC60154745>)和美国 NCBI 基因组数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/>; JBEWYW010000000)。

2.4 菌株 JSM 102089 及密切相关菌株的比较基因组学分析

与 JSM 102089 系统发育关系密切的假嗜碱芽孢杆菌属和嗜碱盐芽孢杆菌属各有 7 个有效种(<https://lpsn.dsmz.de/>; 2024-09-30), 其中碱湖嗜碱盐芽孢杆菌(*Alkalihalobacillus alkalilacus*)没有基因组数据, 居藻嗜碱盐芽孢杆菌(*Alkalihalobacillus algicola*)只有非典型菌株 AmN0-13 的基因组数据, 其他 12 个已知物种均公布了典型菌株基因组数据(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/>; 2024-09-30; 表 4)。

为深入了解实验菌株的系统发育地位, 这 12 个典型菌株和 1 个非典型菌株(以下合称代表性菌株)的基因组均用于本研究。

2.4.1 基因组系统分类特征

菌株 JSM 102089 与系统发育关系密切的假嗜碱芽孢杆菌属和嗜碱盐芽孢杆菌属已知物种的 13 个代表性菌株基因组之间, 各 ANI 值和 dDDH 值均明显低于普遍认可的细菌物种划分阈值(ANI, 95%–96%; dDDH, 70%) (表 4), 清楚说明菌株 JSM 102089 应该代表了芽孢杆菌科 1 个新独立物种。

2.4.2 基因组系统发育学

将实验菌株 JSM 102089 基因组框架图上传到 Type Strain Genome Server 网站在线进行基因组系统发育分析, 在其数据库中经人工选择和自动筛选, 共获得芽孢杆菌科 12 个属 32 个已知物种典型菌株的基因组序列集(图 2)。

表 4 菌株 JSM 102089 与系统发育关系密切的芽孢杆菌科 13 个已知物种的代表性菌株基因组两两比对
Table 4 Pairwise comparisons of genomes of strain JSM 102089 vs. 13 related representatives of the family Bacillaceae

菌株序号 Serial number	物种及其代表性菌株 Species and representative strain	序列号 Accession number	G+C (%)	ANI (%)	dDDH (formula 2; %)
1	<i>P. sedimenti</i> FJAT-53715 ^T	GCA_028610665.1	40.28	81.24	24.10 (21.8–26.6)
2	<i>P. spartinae</i> FJAT-53046 ^T	GCA_028610625.1	40.19	80.95	23.70 (21.4–26.1)
3	<i>P. hwajinpoensis</i> DSM 16206 ^T	GCA_020524205.2	39.96	78.01	21.70 (19.4–24.1)
4	<i>P. caeni</i> HB172195 ^T	GCA_005747095.1	40.92	69.36	19.40 (17.2–21.7)
5	<i>P. decolorationis</i> DSM 14890 ^T	GCA_024609785.1	39.54	68.11	22.60 (20.3–25.1)
6	<i>P. Berkeleyi</i> KCTC 12718 ^T	GCA_021608225.1	39.18	68.37	19.30 (17.1–21.7)
7	<i>P. salsuginis</i> EGI L200015 ^T	GCA_021646685.1	41.58	67.80	19.60 (17.4–21.9)
8	<i>A. hemicentroti</i> DSM 23007 ^T	GCA_030404055.1	39.84	77.78	21.20 (19.0–23.7)
9	<i>A. algicola</i> AmN0-13	GCA_020171805.1	40.73	73.86	18.90 (16.7–21.3)
10	<i>A. tryposylicola</i> KCTC 13244 ^T	GCA_001590785.1	35.74	67.42	23.40 (21.1–25.9)
11	<i>A. pseudocaliphilus</i> DSM 8725 ^T	GCA_028610675.1	37.92	67.44	21.50 (19.3–24.0)
12	<i>A. alcalophilus</i> CGMCC 1.3604 ^T	GCA_004802515.1	37.19	67.70	19.70 (17.5–22.1)
13	<i>A. macyae</i> DSM 16346 ^T	GCA_001039475.1	39.85	77.90	21.50 (19.2–23.9)

以 70% dDDH 阈值^[34]进行物种水平聚类、以 79% dDDH 阈值^[41]进行亚种水平聚类, 菌株 JSM 102089 和 32 个典型菌株共产生 32 个物种簇和亚种簇; 除了 *P. hwajinpoensis* DSM 16206^T 与梅西嗜碱盐芽孢杆菌(*Alkalihalobacillus macyae*) DSM 16346^T 一起形成统一物种簇和亚种簇外, 包括 JSM 102089 在内的其他菌株各自形成了独立物种簇(图 2)。在基因组系统发育树上, 无论是基于 16S rRNA 基因序列(图 2A), 还是基于全基因组序列(图 2B), 菌株 JSM 102089 均与假嗜碱芽孢杆菌属的 *P. sedimenti* 和 *P. spartinae* 相聚成簇, 但该菌株在其外围形成了独立进化分支(图 2)。因此, 基于基因组的系统发育分析结果明确表示, 菌株 JSM 102089 属于芽孢杆菌科假嗜碱芽孢杆菌属, 代表了该属 1 个潜在新种。由于这一结论是基于全基因组序列进行基因型比较分析得出的, 称之为新基因组种更为合适。

2.5 菌株 JSM 102089 及密切相关属次级代谢产物合成基因簇分析

为了较全面地了解菌株 JSM 102089 的生

物技术潜力, 菌株 JSM 102089 及其密切相关属种 13 个代表性菌株均被纳入对比分析, 采用多种生物信息学工具(antiSMASH 7.0, BLASTn, BLASTp)对其 BGCs 组成和分布、与已知 BGCs 的整体相似性、核心基因编码功能蛋白(以下简称核心蛋白)种类差异和氨基酸序列相似性以及核心基因同源性等多个层次进行深入分析。部分 BGCs 的基础数据或详细分析数据储存于国家微生物科学数据中心(NMDCX0001723)。

2.5.1 菌株 JSM 102089 及密切相关属的 BGCs 组成和分布

菌株 JSM 102089 及 13 个代表性菌株基因组 antiSMASH 7.0 在线分析结果概览已提交国家微生物科信数据中心(NMDCX0001723), 各菌株的 BGCs 组成统计如表 5。在全部 14 个基因组中共发现 19 类 86 个 BGCs。总体上, 菌株间 BGCs 类型分布较为均衡(类型范围 4–7 类; 平均每菌 5 类), 而数量范围较大(4–9 个; 平均每菌 6 个)。在假嗜碱属和喜盐碱属两个类群之间, BGCs 类型数和总数分布较均衡, 分别为

5.3 类 6 个和 5.5 类 6.3 个。

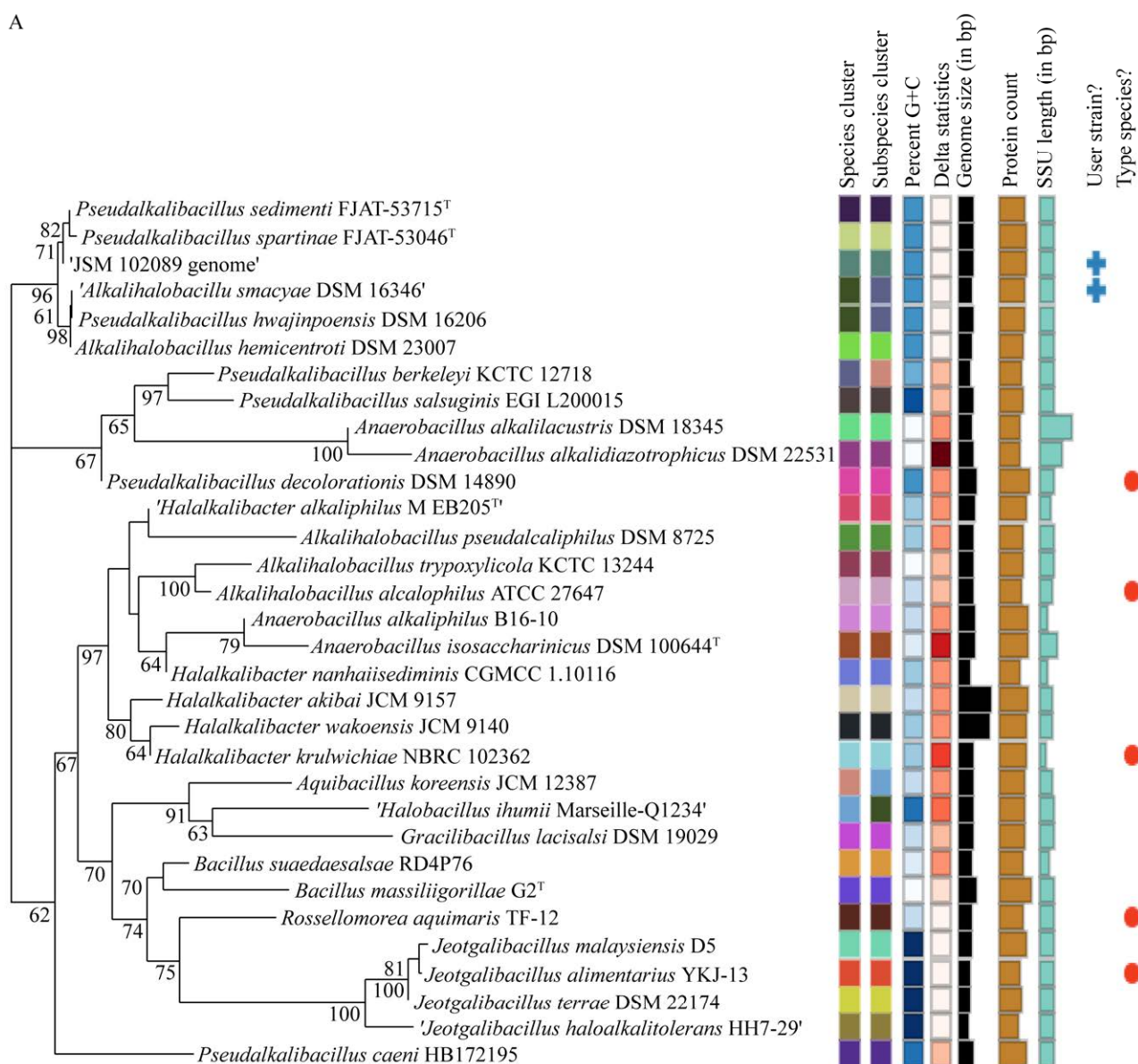
T3TKS、terpene 和 NI-siderophore 为广泛分布型(10–14 个菌), lassopeptide 等 5 类为常见型(4–6 个菌), RiPP-like 等 3 类为稀有型(2–3 个菌), 而 arylpolyene 等 8 类则为菌株专属型。多数常见和稀有 BGCs 的分布存在较突出的属间差异, 如全部 LAP (5 个)和 RiPP-like (4 个)都分布在假喜碱属, 而 2 个 hserlactone 都在喜盐碱属; 8 个专属型 BGCs 在菌株间和类群间分布也

不均衡, 集中在 JSM 102089 等 5 个菌株, 其中 3 个菌株各含 2 个。多数专属型 BGCs (5 个)属于喜盐碱属(表 5)。

2.5.2 菌株 JSM 102089 及密切相关属 BGCs 功能多样性

antiSMASH 7.0 分析发现的 19 类 86 个 BGCs 中(NMDCX0001723; 表 5), 与已知基因簇的相似性较高的有 2 个(占总数的 2.3%), 即菌 5 的 opine-like-metallophore 100%相似于

A



B

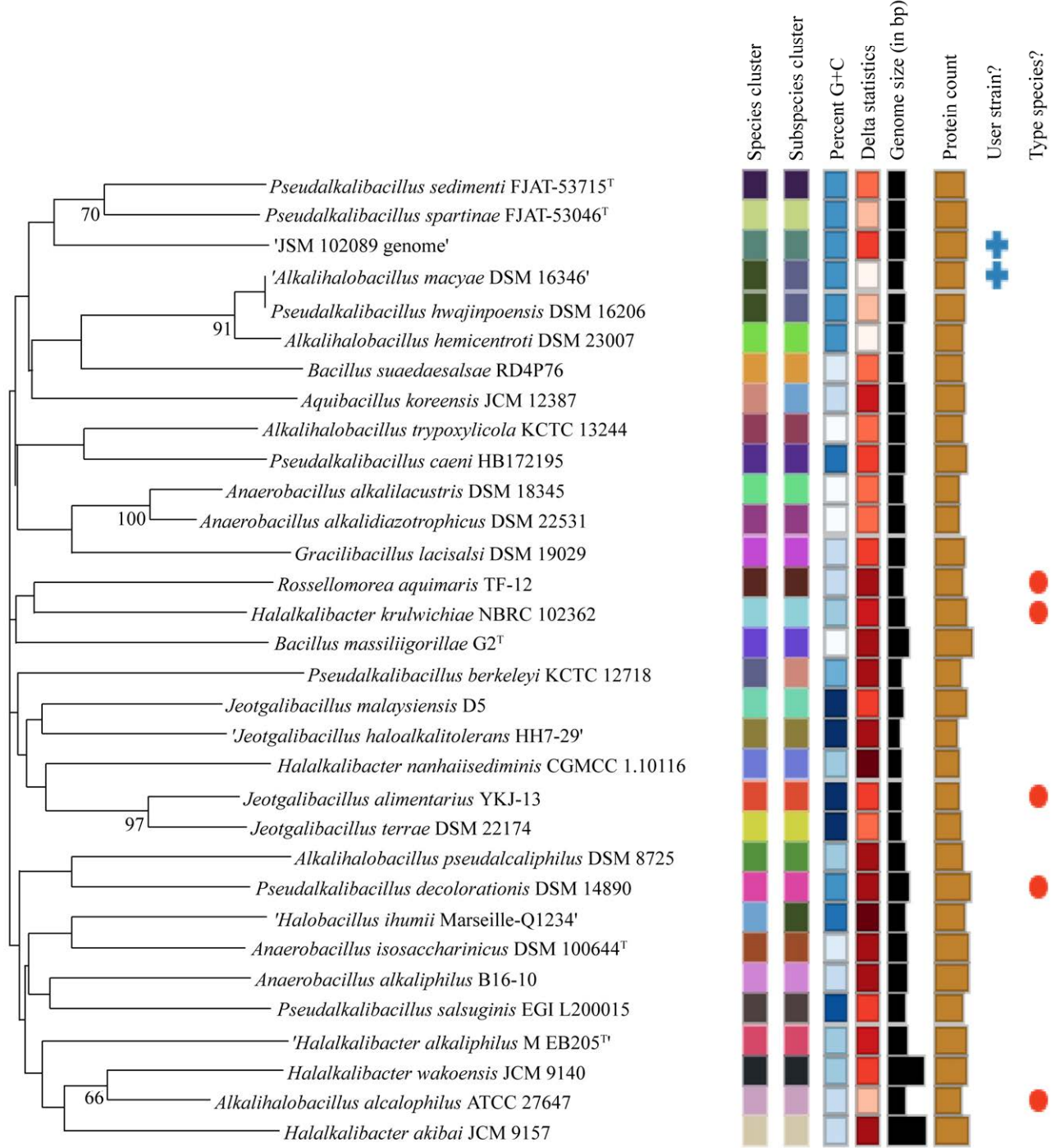


图 2 菌株 JSM 102089 基于基因组框架图构建的基因组系统发育树 A: 基于 16S rRNA 基因序列; B: 基于基因组全序列。

Figure 2 Genomic phylogenetic tree of strain JSM 102089 constructed based on genomic framework diagram. A: 16S rRNA gene sequence-based; B: Genome sequence-based.

表 5 菌株 JSM 102089 及密切相关的芽孢杆菌科 13 个代表性菌株的 BGCs 组成

Table 5 Components of BGCs of JSM 102089 and 13 related representatives of the family *Bacillaceae*

基因簇类型 Type of BGCs	J	1	2	3	4	5	6	7	8	9*	10	11	12	13	菌株数 Total of strains
T3PKS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14
Terpene	++	++	++	++	++	+	+	+	++	++	++	+	-	++	13
NI-siderophore	+	+	+	+	-	+	+	+	++	+	-	-	-	++	10
Lasso peptide	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	6
LAP	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	5
Betalactone	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	4
Ectoine	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	4
Opine-like-metallophore	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	4
RiPP-like	-	-	-	-	-	+	++	+	-	-	-	-	-	-	3
Hserlactone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	2
Lanthipeptide-class-II	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	2
Arylpolyene	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
HR-T2PKS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	1
Lanthipeptide-class-I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1
Lanthipeptide-class-III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	1
Opine-like-metallophore & LAP	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Phosphonate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1
RRE-containing & thiopeptide	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Thiopeptide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	1
Sum of types of BGCs	6	6	7	5	5	7	6	6	7	7	5	6	4	9	

*: 非典型菌株; +或++: 1 或 2 个同类型 BGC 被检测到; -: 未检测到; J: JSM 102089; 菌株序号 1–13 各自所代表菌株同表 4。

*: Non-type strain; + or ++: One or two BGCs belonged to the same type were detected; -: Not detected; J: JSM 102089; the strain serial numbers of 1–13 were respectively designated to the same strains as Table 4.

bacillopaline 基因簇(序列号: CP002869.1)、菌 3 的 *teperne* 83%相似于 *carotenoid* (FJ040212.1); 相似性中等的 23 个(26.7%),即 8 个 NI-siderophore 60%–66%相似于 *schizokinen* (BA000019.2)、6 个 *terpene* 50%–66%相似于 *carotenoid* (FJ040212.1)、5 个 *lassopeptide* 60%–66%相似于 *paeninodin* (AHKH01000064.1)、3 个 *ectoine* 66%相似于 *ectoine* (AF316874.1)、1 个 *lanthipeptide-class-II* 41%相似于 *cerecidins* (KJ000001.1); 相似性极低(3%–8%)的 11 个(12.8%); 包括所有专属型在内的其他 50 个(58.1%)没有发现与之相似的已知 BGCs。特别突

出的是 14 个广布型 T3PKS,只有 3 个有匹配的已知 BGCs,并且相似性极低(3%–4%)。一般认为低于 85%相似度的基因簇具有独特的基因序列,具有产生新颖生物活性物质的潜力^[42-43]。另外,BLASTn 分析发现共计 133 个核心基因中有多达 63 个(47.4%)没有发现匹配序列; BLASTp 搜索显示有 60 个(45.1%)核心蛋白与数据库中同类酶氨基酸序列的相似性低于 80% (NMDCX0001723)。以上 antiSMASH 7.0 分析发现不同菌株或者同一菌株不同拷贝的同类 BGCs 与已知基因簇存在相似性差异,以及 BLASTp 分析发现其核心蛋白方面多样化,提

示这些 BGCs 具有较高的功能多样性和突出的新颖性。

2.5.3 菌株 JSM 102089 的 BGCs 组成和次级代谢潜力

共在菌株 JSM 102089 基因组的 5 个重叠群中检测到 5 类 6 个 BGCs, 包括 3 类 4 个广布型和 2 类 2 个专属型(NMDCX0001723, 表 5)。如上文所述, 菌株 JSM 102089 具有假喜碱属和喜盐碱属次级代谢潜力方面共有的特点, 即含有 3 类 4 种广布型 BGCs (T3TKS, terpene, NI-siderophore), 并且多数 BGCs 未发现匹配的已知基因簇或相似性极低(NMDCX0001723, 表 5)。同时, 其 BGCs 又具有明显的独特性。(1) 类型上, 菌株 JSM 102089 没有常见型和稀有型, 但具有较多专属型 BGCs (2 类); (2) 结构上, 本研究发现的 2 个复合型基因簇为 JSM 102089 专属; (3) 功能上, 该菌专属基因簇 opine-like-metallophore & LAP 和 RRE-containing & thiopeptide 功能具有突出的新颖性: 在其他菌株中没有发现 RRE-containing (表 5); 部分菌株具有独立的 opine-like-metallophore、LAP 或 thiopeptide, 但其核心生物合成功能蛋白明显不同(NMDCX0001723); 没有发现与 RRE-containing & thiopeptide 5 个核心基因匹配的核酸序列, 而且该基因簇的 5 个核心蛋白与数据库中类似酶的相似性极低(27.5%–30.5%; 表 S1)。总之, 菌株 JSM 102089 既具有假喜碱属和喜盐碱属共有的次级代谢功能和潜力, 其部分 BGCs 又具有结构上的独特性和功能上的新颖性, 是该类新资源微生物的突出代表。

3 讨论

原核微生物分类从 20 世纪初开始的以形态特征为主、生理生化特征为辅的表型分类, 发展到 20 世纪中后期逐渐成熟的系统分类方法-多相

分类。它是以基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析和基于 DNA-DNA 杂交 (DNA-DNA hybridization, DDH) 的 DNA 同源性分析为主, 包括表型(形态特征、培养特征、生理生化和化学分类特征)和基因型特征相结合的组合分类技术体系^[44-46]。DDH 值是一种采用实验方法对菌株之间基因组 DNA 整体相似性(同源性)评估的间接量度^[47-48]。因为该估值能提供一个清晰和客观的定量阈值, 近 60 年来一直以 70% DDH 值作为原核生物物种界定的金标准 (gold standard)^[34,49]。不少学者发现 DDH 值和核糖体小亚基 rRNA 基因(16S rRNA 基因)序列相似性之间存在一定的正向关联, 先后把对应于 70% DDH 值的 16S rRNA 基因序列相似性估算为 97%^[50]、98.7%–99.0%^[51]或 98.65%^[40]。菌株之间的 70% 基因组 DDH 值和相应的 16S rRNA 基因序列相似性估值, 一直以来被作为原核生物物种基因型界定标准其分类学实践中被广泛应用。

然而, DNA-DNA 杂交实验技术要求高、耗时长、费人工, 且不同实验人员和不同实验方法所得结果重现性差^[52-53], 16S rRNA 基因序列信息量小、种内分辨率较低且部分原核生物存在基因内异质性^[54-55]。因此, 寻求更为科学准确的原核生物物种基因型界定新标准势在必行。基因组序列是微生物系统分类的最根本的信息, 采用计算机进行的全基因组序列相似性比较, 相对于常规实验 DDH 估值而言具有明显优势^[40]。相对于常规 DNA-DNA 杂交和传统的 16S rRNA 基因序列分析, 基于全基因组序列的比较基因组学分析, 在用于评估菌株间的基因型同源性, 多数情况下准确性更高、能更客观地反映菌株之间的系统进化关系, 已然成为原核生物系统分类中不可或缺的重要手段^[56-57]。基于全基因组序列的 70% dDDH 和 60%–65% ANI 估值, 业已替代传统实验 DDH 估值和 16S

rRNA 基因序列相似性成为原核生物物种界定新的金标准; 基于多个管家基因的多位点序列分析, 以及基于核心基因组或全基因组序列的基因组系统发育分析, 也成为基于 16S rRNA 基因序列的传统系统发育分析法的重要补充^[32,58-61]。本研究综合应用这些现代原核生物系统分类学新技术, 才确定了嗜盐菌株 JSM 102089 的系统发育地位。16S rRNA 基因序列分析结果表明, JSM 102089 归属于芽孢杆菌科, 与该科的假嗜碱芽孢杆菌属和嗜碱盐芽孢杆菌属的部分典型菌株的系统发育关系密切, 但无法明确该菌株准确系统分类地位。继而测定了该菌株的基因组框架图, 基于全基因组的 dDDH 和 ANI 比较分析清晰地表明该菌株代表了芽孢杆菌科的一个潜在新种(基因组种), 基因组系统发育分析结果进一步确定菌株 JSM 102089 属于假嗜碱芽孢杆菌属。

随着基于全基因组序列的基因组系统发育学和比较基因组学技术快速发展和推广应用, 以传统的 DNA-DNA 同源性和 16S rRNA 基因序列分析为主要手段建立起来的原核生物系统分类体系逐步得到完善。如本研究涉及的与菌株 JSM 102089 系统发育关系最密切的嗜碱盐芽孢杆菌属和假嗜碱芽孢杆菌属就是基于基因组系统发育和比较基因组学框架从芽孢杆菌属(*Bacillus*)独立出来的芽孢杆菌科新成员。2020 年 Patel 等^[62]基于芽孢杆菌科 352 个基因组进行了全面的基因组系统发育和比较基因组学分析, 构建了基于 16S rRNA 基因序列、全基因组序列和 4 类组成型蛋白质序列的系统进化树, 从芽孢杆菌属中找到 6 个新的单源进化系(monophyletic clade), 建议成立了包括嗜碱盐芽孢杆菌属在内的 6 个新属; 次年, 嗜碱盐芽孢杆菌属又被 Joshi 等^[63]进一步细分, 新成立了包括与菌株 JSM 102089 密切相关的假嗜碱芽孢杆菌属在内

的耐碱可可芽孢杆菌属(*Alkalicoccobacillus*)、嗜碱盐杆菌属(*Alkalihalobacterium*)、嗜碱盐菌属(*Alkalihalophilus*)、嗜碱杆菌属(*Halalkalibacter*)、嗜碱小杆菌属(*Halalkalibacterium*)、(*Pseudalkalibacillus*)和秀彻氏杆菌属(*Shouchella*)这 7 个属。

然而, 我们在本研究中发现其中有些分类单元/物种的系统分类地位还值得商榷。以嗜碱盐芽孢杆菌属为例, 该属目前有 7 个有效种, 即嗜碱嗜碱盐芽孢杆菌(*Alkalihalobacillus alcalophilus*) (典型种)、居藻嗜碱盐芽孢杆菌(*A. algicola*)、碱湖嗜碱盐芽孢杆菌(*A. alkalilacus*)、*A. hemicentroti*、梅茜嗜碱盐芽孢杆菌(*A. macyae*)、假嗜碱嗜碱盐芽孢杆菌(*A. pseudalcaliphilus*)和居叉犀金龟嗜碱盐芽孢杆菌(*A. trypoxylicola*) (<https://lpsn.dsmz.de/genus/alkalihalobacillus>; 2024-09-30)。除了 *A. algicola* 和 *A. alkalilacus* 的典型菌株没有基因组数据, 我们把其他 5 个种进行了进一步的比较基因组学分析。结果发现, 无论是在传统的基于 16S rRNA 基因序列的系统进化树(图 1)、还是在基因组系统发育树(图 2), 都显示这 5 个物种不是单系同源的(monophyletic)。在图 1 上, *A. macyae* 与厌氧芽孢杆菌属(*Anaerobacillus*)聚在一起, *A. hemicentroti* 与假嗜碱芽孢杆菌属紧密相聚, 其他 3 个嗜碱盐芽孢杆菌属物种聚在一起。但在基因组系统发育树上, 无论是基于 16S rRNA 基因序列(图 2A)、还是基于全基因组序列(图 2B), *A. hemicentroti* 和 *A. macyae* 都与假嗜碱芽孢杆菌属聚在一起, 与该属的 *P. hwajinpoensis* 系统发育关系最为密切, 其中 *A. macyae* DSM 16346^T 和 *P. hwajinpoensis* DSM 16206^T 形成了 1 个物种簇; 而其他 3 个嗜碱盐芽孢杆菌属物种则分散于芽孢杆菌科其他进化分支之间。但是, *A. hemicentroti* 和 *A. macyae* 与 *P. hwajinpoensis* 相互之间的 ANI 和 dDDH 值都低于物种界定相

应阈值,表明它们是3个独立物种。以上分析说明,嗜碱盐芽孢杆菌属及其部分已知物种确切的系统发育和分类地位有待进一步考察。对此提出如下3点思考和建议:(1)估计*A. macyae*典型菌株的16S rRNA基因序列或全基因组序列有错误,必须重新测定加以核实;补充测定*A. algicola*和*A. alkalilacus*典型菌株全基因组序列,必要时重新测定它们的16S rRNA基因序列。(2)基于可靠的16S rRNA基因和全基因组数据,进行深入的分子系统分类学分析,包括基于16S rRNA基因序列的系统发育分析、基于全基因组的ANI、dDDH和基因组系统发育分析;必要时再进行MLSA和核心基因组分析。全面分析嗜碱盐芽孢杆菌属、及与其密切相关的假嗜碱芽孢杆菌属和厌氧芽孢杆菌属等芽孢杆菌科属内和属间的系统发育关系。(3)基于原有分子数据的分析结果,我们推测*A. macyae*和*A. hemicentroti*可能属于假嗜碱芽孢杆菌属的独立物种。但为了明确它们准确的系统分类地位,需要新的系统发育分析结果基础上,全面审视*A. macyae*和*A. hemicentroti*的表型特征,尤其是化学分类特征,并与假嗜碱芽孢杆菌属等芽孢杆菌科相关分类单元进行比较,必要时重新测定和核实部分关键分子和表型数据,然后再对它们的分类地位进行全面审查,甚至重分类。

新物种或新菌株往往具备独特的遗传背景和生态适应策略,可能产生新颖的生物活性物质,是极具生物技术潜力的新资源微生物^[64]。采用独特分离方法从特殊环境样品中分离新物种或新菌株,已经成为微生物资源研究和开发利用最重要的基础工作。菌株JSM 102089是采用高盐培养基从内陆非盐环境中分离的嗜盐菌,具有产铁载体生物活性,并代表了芽孢杆菌科的一个潜在新种,属于典型的新资源微生物。

为了较全面地了解菌株JSM 102089的生物技术潜力,本研究把菌株JSM 102089及其密切相关的假喜碱属和喜盐碱属的13个代表性菌株的基因组均纳入对比分析。antiSMASH 7.0分析共发现19大类86个BGCs,其中T3PKS、terpene和NI-siderophore为广泛分布型;与已知基因簇比较,本研究发现的BGCs多数较为新颖,只有2个与已知BGCs相似性较高(100%和83%),其他的等于或低于66%,其中11个只有3%~8%,更有50个没有发现与之相似的已知BGCs;BLASTn或BLASTp分析表明,高达47.7%的生物合成核心基因没有发现匹配序列、45.1%的核心功能蛋白与同类酶的相似性低于80%。以上结果明确表明,菌株JSM 102089及其密切相关属BGCs具有较高的多样性和突出的新颖性,提示该类微生物具有较大的产生新颖多样次级代谢产物的潜力。菌株JSM 102089不仅具备假喜碱属和喜盐碱属BGCs基本组成和新颖性,而且其BGCs具有2个明显的特点。一是所有86个BGCs中的2个复合基因簇为该菌株专属,二是其中一个复合基因簇RRE-containing & thiopeptide功能极其新颖。因此,菌株JSM 102089是该类新资源微生物的突出代表。

4 结论

基于16S rRNA基因序列的系统发育分析发现菌株JSM 102089属于芽孢杆菌科,与该科的假嗜碱芽孢杆菌属和嗜碱盐芽孢杆菌属关系最为密切;表型特征比较发现,菌株JSM 102089的化学分类特征与芽孢杆菌科一致,但其耐盐特性、运动性、脲酶活性和明胶水解等重要生物学特征明显区别于与其系统发育关系密切的典型菌株;比较基因组学分析结果明确显示菌株JSM 102089代表了假嗜碱芽孢杆菌属一个潜在新种。由于这一结论主要是基于基因型信息

分析得到的,在此称之为新基因组种更为合适,其准确的系统分类地位需要进一步进行多相分类研究才能确定。

次级代谢产物合成基因簇分析结果表明,菌株 JSM 102089 及其密切相关的假嗜碱芽孢杆菌属和嗜碱盐芽孢杆菌属的 BGCs 具有较高的多样性和突出的新颖性,提示该类微生物具有较大的产生新颖多样次级代谢产物的潜力;其中 JSM 102089 部分 BGCs 具有结构上的独特性和功能上的新颖性,是这类新资源微生物的突出代表。

总之,菌株 JSM 102089 既是分离自非盐环境的嗜盐菌又是潜在新种,且具有产生新颖独特次级代谢产物的潜力,是一株典型的新资源微生物,其系统分类、耐盐机理和生物技术潜力值得进一步探索。此外,我们还发现嗜碱盐芽孢杆菌属及其部分已知物种的系统发育和分类地位有待重新考量,并对此提出了相应的研究思路和实施建议。

REFERENCES

- [1] 曹军卫, 沈萍, 李朝阳. 嗜极微生物[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 2004.
- CAO JW, SHEN P, LI CY. Extremophiles[M]. Wuhan: Wuhan University Press, 2004 (in Chinese).
- [2] RAWAT M, CHAUHAN M, PANDEY A. Extremophiles and their expanding biotechnological applications[J]. Archives of Microbiology, 2024, 206(6): 247.
- [3] CHEN GQ, JIANG XR. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2018, 50: 94-100.
- [4] THAKUR N, SINGH SP, ZHANG CY. Microorganisms under extreme environments and their applications[J]. Current Research in Microbial Sciences, 2022, 3: 100141.
- [5] COWAN DA, ALBERS SV, ANTRANIKIAN G, ATOMI H, AVERHOFF B, BASEN M, DRIESSEN AM, JEBBAR M, KELMAN Z, KEROU M, LITTLECHILD J, MÜLLER V, SCHÖNHEIT P, SIEBERS B, VORGIAS K. Extremophiles in a changing world[J]. Extremophiles, 2024, 28(2): 26.
- [6] KUSHNER DJ, KAMEKURA M. Physiology of halophilic eubacteria[M]//Halophilic Bacteria Volume I. Boca Raton: CRC Press, 1988: 109-140.
- [7] KUSHNER DJ. Growth and nutrition of halophilic bacteria[M]//The Biology of Halophilic Bacteria. Boca Raton: CRC Press, 2020: 87-103.
- [8] VENTOSA A, MÁRQUEZ MC, GARABITO MJ, ARAHAL DR. Moderately halophilic gram-positive bacterial diversity in hypersaline environments[J]. Extremophiles, 1998, 2(3): 297-304.
- [9] ZHENG XW, WU ZP, SUN YP, WANG BB, HOU J, CUI HL. *Halorussus vallis* sp. nov., *Halorussus aquaticus* sp. nov., *Halorussus gelatinilyticus* sp. nov., *Halorussus limi* sp. nov., *Halorussus salilacus* sp. nov., *Halorussus salinisoli* sp. nov.: six extremely halophilic Archaea isolated from solar saltern, salt lake and saline soil[J]. Extremophiles, 2022, 26(3): 32.
- [10] MA YH, GALINSKI EA, GRANT WD, OREN A, VENTOSA A. Halophiles 2010: life in saline environments[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(21): 6971-6981.
- [11] YIN J, CHEN JC, WU Q, CHEN GQ. Halophiles, coming stars for industrial biotechnology[J]. Biotechnology Advances, 2015, 33(7): 1433-1442.
- [12] CORRAL P, AMOOZEGAR MA, VENTOSA A. Halophiles and their biomolecules: recent advances and future applications in biomedicine[J]. Marine Drugs, 2019, 18(1): 33.
- [13] 冯莉, 许楹, 周宁一. 嗜盐古菌 *Haloferax* sp. D1227 中超氧化物歧化酶功能鉴定及其增强细菌耐盐性的研究[J]. 微生物学通报, 2018, 45(8): 1611-1620.
- FENG L, XU Y, ZHOU NY. Enhancement of bacterial salt tolerance by a newly identified superoxide dismutase from Archaea *Haloferax* sp. D1227[J]. Microbiology China, 2018, 45(8): 1611-1620 (in Chinese).
- [14] THOMPSON TP, GILMORE BF. Exploring halophilic environments as a source of new antibiotics[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2024, 50(3): 341-370.
- [15] ECHIGO A, HINO M, FUKUSHIMA T, MIZUKI T, KAMEKURA M, USAMI R. Endospores of halophilic bacteria of the family Bacillaceae isolated from non-saline Japanese soil may be transported by Kosa event (Asian dust storm)[J]. Saline Systems, 2005, 1: 8.
- [16] 陈奇辉, 刘祝祥, 彭清忠, 黄苛, 贺建武, 张丽, 李文均, 陈义光. 小溪自然保护区非盐环境中嗜盐和耐盐菌多样性[J]. 微生物学报, 2010, 50(11): 1452-1459.
- CHEN QH, LIU ZX, PENG QZ, HUANG N, HE JW, ZHANG L, LI WJ, CHEN YG. Diversity of halophilic and halotolerant bacteria isolated from non-saline soil collected from Xiaoxi National Natural Reserve, Hunan Province[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(11): 1452-1459 (in Chinese).
- [17] CHEN YG, CHEN J, CHEN QH, TANG SK, ZHANG YQ, HE JW, LI WJ, LIU YQ. *Yaniella soli* sp. nov., a new actinobacterium isolated from non-saline forest soil in China[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2010, 98(3): 395-401.
- [18] CHEN YG, ZHANG YQ, CHEN QH, KLENK HP, HE JW, TANG SK, CUI XL, LI WJ. *Bacillus xiaoxiensis* sp. nov., a slightly halophilic bacterium isolated from non-saline forest soil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61(Pt 9): 2095-2100.
- [19] LIU ZX, CHEN JH, YANG LL, FENG YZ, DENG LY, HE JW, TANG SK, CHEN YG. *Halomonas faecis* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from human faeces[J]. Extremophiles, 2022, 26(2): 20.
- [20] TIQUIA SM, DAVIS D, HADID H, KASPARIAN S,

- ISMAIL M, SAHLY R, SHIM J, SINGH S, MURRAY KS. Halophilic and halotolerant bacteria from river waters and shallow groundwater along the Rouge River of southeastern Michigan[J]. *Environmental Technology*, 2007, 28(3): 297-307.
- [21] 崔春晓, 戴美学, 夏志洁. 盐地碱蓬内生中度嗜盐菌的分离与系统发育多样性分析[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(2): 204-210.
CUI CX, DAI MX, XIA ZJ. Phylogenetic diversity of endophytic moderately halophilic bacteria isolated from *Suaeda salsa* L[J]. *Microbiology China*, 2010, 37(2): 204-210 (in Chinese).
- [22] KHELAIFIA S, CAPUTO A, ANDRIEU C, CADORET F, ARMSTRONG N, MICHELLE C, LAGIER JC, DJOSSOU F, FOURNIER PE, RAOULT D. Genome sequence and description of *Haloferax massiliense* sp. nov., a new halophilic archaeon isolated from the human gut[J]. *Extremophiles*, 2018, 22(3): 485-498.
- [23] 陆月盈, 杨建楼, 付玉明, 张兰涛, 刘红. 航天器组装环境中极端微生物的筛选与特性[J]. *应用与环境生物学报*, 2022, 28(6): 1400-1407.
LU YY, YANG JL, FU YM, ZHANG LT, LIU H. Screening and characterization of extremophiles in spacecraft assembly environment[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2022, 28(6): 1400-1407 (in Chinese).
- [24] ATLAS RM, ATLAS RM. *Handbook of Microbiological Media*[M]. Boca Raton: CRC Press, 2004.
- [25] 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).
- [26] 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 Nocardioptaceae[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51(Pt 2): 357-363.
- [27] 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.
- [28] 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).
- [29] WU QL, CHEN JH, DENG LY, LIU ZX, HE JW, LIU ZX, YANG LL, TANG SK, CHEN YG. *Sediminibacillus terrae* sp. nov., a moderate halophile isolated from non-saline farm soil[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2020, 70(2): 1139-1144.
- [30] LEE I, KIM YO, 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.
- [31] 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.
- [32] 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.
- [33] 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.
- [34] 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.
- [35] 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.
- [36] 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.
- [37] LIU GH, HAN S, LI B, LI RL, SHI H, CHEN QQ, ALWATHNANI HA, RENSING C, ZHOU SG. Two novel alkalitolerant species *Pseudalkalibacillus spartinae* sp. nov. and *Pseudalkalibacillus sedimenti* sp. nov.[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2023. DOI: 10.1099/ijsem.0.006159.
- [38] YOON JH, KIM IG, KANG KH, OH TK, PARK YH. *Bacillus hwajinpoensis* sp. nov. and an unnamed *Bacillus* genomospecies, novel members of *Bacillus* rRNA group 6 isolated from sea water of the East Sea and the Yellow Sea in Korea[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54(Pt 3): 803-808.
- [39] CHEN YG, ZHANG YQ, HE JW, KLENK HP, XIAO JQ, ZHU HY, TANG SK, LI WJ. *Bacillus hemicentroti* sp. nov., a moderate halophile isolated from a sea urchin[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61(Pt 12): 2950-2955.
- [40] 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(Pt 2): 346-351.
- [41] 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.
- [42] 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, 48(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).
- [43] GONTANG EA, GAUDÊNCIO SP, FENICAL W, JENSEN PR. Sequence-based analysis of secondary-metabolite biosynthesis in marine Actinobacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(8): 2487-2499.
- [44] COLWELL RR. Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species[J]. *Journal of Bacteriology*, 1970, 104(1): 410-433.
- [45] STACKEBRANDT E, WOESE CR. Towards a phylogeny of the actinomycetes and related organisms[J]. *Current Microbiology*, 1981, 5(4): 197-202.
- [46] WOESE CR, STACKEBRANDT E, MACKE TJ, FOX GE. A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 1985, 6(2): 143-151.
- [47] MCCARTHY BJ, BOLTON ET. An approach to the measurement of genetic relatedness among organisms[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1963, 50(1): 156-164.
- [48] SCHILDKRAUT CL, MARMUR J, DOTY P. The formation of hybrid DNA molecules and their use in studies of DNA homologies[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1961, 3(5): 595-616.
- [49] TINDALL BJ, ROSSELLÓ-MÓRA R, BUSSE HJ, LUDWIG W, KÄMPFER P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(Pt 1): 249-266.
- [50] STACKEBRANDT E, GOEBEL BM. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1994, 44(4): 846-849.
- [51] ERKO S, EBERS J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards[J]. *Microbiology Today*, 2006, 33: 152-155.
- [52] STACKEBRANDT E, FREDERIKSEN W, GARRITY GM, GRIMONT PAD, KÄMPFER P, MAIDEN MCJ, NESME X, ROSSELLÓ-MORA R, SWINGS J, TRÜPER HG, VAUTERIN L, WARD AC, WHITMAN WB. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52(Pt 3): 1043-1047.
- [53] GEVERS D, COHAN FM, LAWRENCE JG, SPRATT BG, COENYE T, FEIL EJ, STACKEBRANDT E, van de PEER Y, VANDAMME P, THOMPSON FL, SWINGS J. Opinion: re-evaluating prokaryotic species[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(9): 733-739.
- [54] ACINAS SG, MARCELINO LA, KLEPAC-CERAJ V, POLZ MF. Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(9): 2629-2635.
- [55] CILIA V, LAFAY B, CHRISTEN R. Sequence heterogeneities among 16S ribosomal RNA sequences, and their effect on phylogenetic analyses at the species level[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1996, 13(3): 451-461.
- [56] 周冬生, 杨瑞馥. 细菌比较基因组学和进化基因组学[J]. *微生物学杂志*, 2003, 23(5): 31-34, 43.
- ZHOU DS, YANG RF. Comparative and evolutionary genomics in bacterial systems[J]. *Journal of Microbiology*, 2003, 23(5): 31-34, 43 (in Chinese).
- [57] THOMPSON CC, CHIMETTO L, EDWARDS RA, SWINGS J, STACKEBRANDT E, THOMPSON FL. Microbial genomic taxonomy[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 913.
- [58] KONSTANTINIDIS KT, RAMETTE A, TIEDJE JM. The bacterial species definition in the genomic era[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 2006, 361(1475): 1929-1940.
- [59] GORIS J, KONSTANTINIDIS KT, KLAPPENBACH JA, COENYE T, VANDAMME P, TIEDJE JM. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(Pt 1): 81-91.
- [60] CHUN J, OREN A, VENTOSA A, CHRISTENSEN H, ARAHAL DR, Da COSTA MS, ROONEY AP, YI HN, XU XW, de MEYER S, TRUJILLO ME. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2018, 68(1): 461-466.
- [61] 陈锦华, 刘细寒, 邓丽颖, 冯玉周, 刘祝祥, 陈义光. 多位点序列和比较基因组学分析对盐单胞菌科菌株 JSM 104105 的系统发育学研究[J]. *微生物学报*, 2023, 63(2): 683-699.
- CHEN JH, LIU XH, DENG LY, FENG YZ, LIU ZX, CHEN YG. Phylogenetics of Halomonadaceae strain JSM 104105 based on multilocus sequence analysis and comparative genomics analysis[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(2): 683-699 (in Chinese).
- [62] PATEL S, GUPTA RS. A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new Genera of *Bacillus* species, *Peribacillus* gen. nov., *Cytobacillus* gen. nov., *Mesobacillus* gen. nov., *Neobacillus* gen. nov., *Metabacillus* gen. nov. and *Alkalihalobacillus* gen. nov.[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2020, 70(1): 406-438.
- [63] JOSHI A, THITE S, KARODI P, JOSEPH N, LODHA T. *Alkalihalobacterium elongatum* gen. nov. sp. nov.: an Antibiotic-Producing Bacterium Isolated From Lonar Lake and Reclassification of the Genus *Alkalihalobacillus* Into Seven Novel Genera[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 722369.
- [64] 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).