

贝莱斯芽孢杆菌 LG37 全基因组测序分析及无机氮代谢相关候选基因的筛选

刘广鑫¹, 董晏君², 赵丽娟³, 邓益琴¹, 程长洪¹, 马红玲¹, 江建军¹, 冯娟¹, 郭志勋¹, 林鑫³

1. 中国水产科学研究院南海水产研究所/农业农村部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东广州 510300
2. 肇庆市水产技术推广中心, 广东肇庆 526040
3. 仲恺农业工程学院 动物科技学院/广东省水环境与水产品安全工程技术研究中心/广州市水产病害与水禽养殖重点实验室, 广东广州 510225

摘要: 前期研究发现贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) LG37 可高效同化无机氮, 但其机理尚不清楚。为解读其高效同化无机氮的机理, 结合三代 PacBio RS II 和二代 Illumina HiSeq 2000 测序技术对贝莱斯芽孢杆菌 LG37 进行全基因组测序, 在此基础上利用 NR、KEGG、eggNOG、GO 和 CARD 数据库进行序列注释、分析, 并通过本地 Blast+ 对无机氮代谢相关基因进行挖掘。测序结果表明: 1) 贝莱斯芽孢杆菌 LG37 的基因组为 3 929 697 bp 的环状染色体, GC 含量为 46.5%, 包含 3 854 个蛋白质编码基因、86 个 tRNA 基因和 27 个 rRNA 基因。2) 共筛选出无机氮代谢相关候选基因 94 个, 主要涉及编码感应蛋白、转录调控因子、转运蛋白、氧化还原酶和同化酶等, 并对这些基因的 GO 功能进行了注释分析。综上, LG37 全基因组测序及无机氮代谢相关基因的分析为芽孢杆菌降低养殖水体中无机氮的研究提供了基因水平数据, 为芽孢杆菌微生态制剂降低水体中无机氮的应用研究提供了理论依据。

关键词: 贝莱斯芽孢杆菌; 全基因组测序; 无机氮; 代谢通路

中图分类号: S 949

文献标志码: A

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Sequencing of whole genome of *Bacillus velezensis* LG37 and screening of inorganic nitrogen metabolism candidate genes

LIU Guangxin¹, DONG Yanjun², ZHAO Lijuan³, DENG Yiqin¹, CHENG Changhong¹, MA Hongling¹, JIANG Jianjun¹, FENG Juan¹, GUO Zhixun¹, LIN Li³

1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences/Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510300, China
2. Zhaoqing Fisheries Technology Extension Center, Zhaoqing 526040, China
3. Zhongkai University of Agriculture and Engineering/Guangdong Provincial Water Environment and Aquatic Products Security Engineering Technology Research Center/Guangzhou Key Laboratory of Aquatic Animal Diseases and Waterfowl Breeding, Guangzhou 510225, China

收稿日期: 2021-05-20; 修回日期: 2021-07-07

基金项目: 中国水产科学研究院南海水产研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助 (2020TS04); 广东省重点领域研发计划项目 (2019B020215001); 中国-东盟海上合作基金 (CAMC-2018F); 广东省海洋与渔业厅项目 (D21822202); 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系资助 (CARS-48)

作者简介: 刘广鑫 (1988—), 男, 助理研究员, 博士, 从事渔业生物病害防治研究。E-mail: Guangxin_liu1988@163.com

通信作者: 郭志勋 (1970—), 男, 研究员, 博士, 从事渔业生物病害防治研究。E-mail: guozhixun1@163.com

林鑫 (1970—), 男, 教授, 博士, 从事渔业生物病害防治研究。E-mail: linli@zhku.edu.cn

Abstract: It has been found that *Bacillus velezensis* can assimilate inorganic nitrogen efficiently. However, the underlying mechanism of inorganic nitrogen assimilation remains enigmatic. In order to elucidate the mechanism, we sequenced the complete genome of LG37 by PacBio RS II and Illumina HiSeq 2000, and then annotated and analyzed the sequence by the database of NR, KEGG, eggNOG, GO and CARD. Finally, we screened the genes related to inorganic nitrogen metabolism by local Blast+. The results show that: 1) The genome contained one circular chromosomal with a size of 3 929 697 bp and a GC-content of 46.5%. Gene prediction and annotation was performed to acquire a total of 3 854 protein-coding genes, 86 tRNA genes and 27 rRNA genes. 2) A total of 94 inorganic nitrogen metabolism candidate genes were screened by local Blast+. These genes were involved into coding sensing protein, transcriptional regulator, transporter, oxidoreductase and assimilator, etc.. In conclusion, the whole genome sequencing and data analysis of LG37 provide data at gene level and theoretical basis for functional study and application of *Bacillus* in reducing inorganic nitrogen in aquaculture water.

Keywords: *Bacillus velezensis*; Whole genome sequence; Inorganic nitrogen; Metabolic pathway

高密度的养殖模式中,池塘中残余的饲料蛋白和水生动物的排泄物等均含有大量的含氮化合物。这些累积的含氮化合物在养殖水体中被慢慢分解,并产生氨基酸,氨基酸再被微生物脱氨产生氨氮,最终养殖水体的氮源会以分子氨(NH₃-N)、离子铵(NH₄⁺-N)、亚硝态氮(NO₂⁻-N)、硝态氮(NO₃⁻-N)、氮气(N₂)及有机氮化物(R-NH₂)的形式以动态平衡的方式存在^[1-3]。而NH₃和NH₄⁺之间可相互转化: NH₄⁺+OH⁻⇌NH₃·H₂O⇌NH₃+H₂O,当水体pH值和温度升高时,水体中NH₃的比例增加。NH₃和NO₂⁻对经济动物组织、器官有直接毒害作用,是造成机体免疫力下降并导致疾病爆发的关键因素之一^[4-5]。通过绿色、高效的生物方式降低水体中无机氮的浓度达到水质净化的目的,是提高水生动物成活率的主要方法之一。

芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)作为异养微生物,是一种广泛存在于自然界中,并能够高效利用无机氮实现自身生长、增殖的革兰氏阳性菌,也是水产养殖领域中研究最多、应用最广泛的菌种之一^[6]。随着研究的深入,芽孢杆菌同化无机氮的代谢途径逐渐被挖掘,同化代谢过程中涉及的多种特异性功能蛋白的作用被发现,例如特异性感应蛋白、转运蛋白、氧化还原蛋白、同化蛋白等,但其作用机理尚不清晰^[7]。

全基因组测序(Complete genome sequence)是指将生物的基因组进行随机打断、测序和拼接,从而获得完整基因组序列的技术,通过序列分析和功能基因注释(包括NR、KEGG、eggNOG、GO和CARD等),以便从基因水平深入了解菌株表型的机理^[8-9]。目前,随着生物技术和信息学的有机结合,全基因组测序技术已经发展成为一种高效、准确的信息获得手段,在生物研究领域中的应用广泛,

例如肠道菌群分析、微生态群系组成、特异性表型分析、功能基因的预测及核心基因的挖掘等^[10-13]。

利用芽孢杆菌降低水体中无机氮的浓度具有绿色、持续、无二次污染等特点,被学者和养殖户普遍认可^[14]。尽管芽孢杆菌同化无机氮的效果得到了很好验证,但其代谢途径和特异性功能蛋白等仍有待深入解析和验证。贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*) LG37 筛选于华中农业大学教学实习基地养殖池塘中,前期研究发现 LG37 可通过无机氮作为唯一氮源的最小培养基进行培养,并具有高效同化无机氮的能力^[7]。基于此,本研究结合三代 PacBio RS II 和二代 Illumina HiSeq 2000 测序技术,对 LG37 进行全基因组测序分析,并对获得的数据进行 NR、KEGG、eggNOG、GO、CARD 数据库注释、分析,旨在深入揭示 LG37 在无机氮代谢过程中的关键功能基因和代谢通路信息,为其在无机氮代谢研究和水产养殖中的应用提供参考信息和科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株

贝莱斯芽孢杆菌 LG37 为实验室于华中农业大学教学实习基地水产养殖池塘中筛选获得。

1.1.2 相关试剂和仪器设备

LB (Luria-Bertani) 培养基; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司。PacBio RS II (Pacific Biosciences, Menlo Park, CA, USA)。

1.2 实验方法

1.2.1 LG37 基因组 DNA 提取

利用 LB 固体培养基对 LG37 进行活化培养,

挑取长势良好的单菌落接种于 LB 液体培养基, 培养至对数期时, 通过离心的方式对培养菌液进行集菌及 DNA 提取, DNA 提取的具体操作流程根据天根生化试剂盒说明书进行。利用 NanoDrop 2000/2000c (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) 对提取、纯化的 LG37 基因组质量进行分析。其 DNA ($OD_{260/280}$) 值在 1.8~2.0, 质量浓度 $\geq 20 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 可用于后续的建库测序。

1.2.2 系统进化树分析

将扩增获得的 LG37 16S rDNA 序列与 NCBI 中的芽孢杆菌 16S rDNA 序列运用 DNAMAN 软件进行比对分析。应用 MEGA 6.0 软件对 LG37 和下载的 16S rDNA 进行遗传进化分析。其中序列比对采用 Clustal W 多重比较法进行, 基于邻接法 (Neighbor-joining) 构建系统进化树, 确定菌株的进化分类^[15]。

1.2.3 文库构建和库检

采用三代 PacBio RS II 结合二代 Illumina HiSeq 2000 测序的方法对 LG37 进行全基因组测序, 其完成单位为上海欧易生物医学科技有限公司^[16]。经质检合格的 DNA 样品采用 PacBio RS II single-molecule real-time (SMRT) 测序技术 (Pacific Biosciences, Menlo Park, CA, USA) 对其进行全基因组测序。然后通过分级基因组装配 (The hierarchical genome-assembly process, HGAP) 对随机打断的测序读段进行装配, 以期获得超长的测序读段。接下来使用二代测序技术 Illumina HiSeq 2000 进行测序^[17], 并利用 Bowtie2 (v2.3.0) 将 Illumina 基因片段与组装的 SMRT-contigs 进行比对^[18], 从而获得完整的环状全基因组序列信息。用 Glimmer 3.02 进行基因预测和注释^[19], 用 tRNAscan-SE 进行 tRNA genes 的预测和筛选^[20], 用 RNAmmer 进行 rRNA 的预测分析^[21]。

1.2.4 本地 Blast+功能基因比对

通过 NCBI 下载本地 Blast+, 即“基本局部对比搜索工具” (Basic Local Alignment Search Tool, <https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/executables/blast/>)。首先对于基因组测序获得的蛋白注释信息进行模型建库, 然后将 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 UniProt (<https://www.uniprot.org/>) 数据库相关信息进行下载、比对、筛选和分析, 获得无机氮代谢相关候选基因, 并注释其 GO 分子功能^[22]。

2 结果

2.1 LG37 基因组组装

通过三代 PacBio RS II 结合二代 Illumina HiSeq 2000 测序平台对 LG37 进行全基因组测序分析 (表 1)。97 382 个平均长度 3 016 nt 的测序读段被最终拼装成一条重叠基因组序列, 长度为 3 949 250 bp。通过测序比对分析, 最终获得一条 3 929 697 bp 的环状染色体基因组, GC 含量为 46.5%, 总基因数 3 967 个 (图 1)。其中蛋白编码基因 3 854 个, 编码区域长度为 3 495 864 bp, 占总长度的 89.0%, GC 含量为 47.3%。RNA 基因 113 个, 其中 tRNA 基因 86 个, rRNA 基因 27 个。基因间隔区域长度 433 833 bp, 占总长度的 11.0%。该 LG37 菌株无载体。

表 1 贝莱斯芽孢杆菌 LG37 基因组特性
Table 1 Genome features of *B. velezensis* LG37 strain

特性 Feature	数值 Value
基因组大小 Genome size/bp	3 929 697
GC-含量 GC-content	46.5%
质粒数量 Plasmid number	0
总基因 Total genes	3 967
蛋白编码基因 Protein-coding genes	3 854
转运 RNA tRNA	86
核糖体 RNA rRNA	27
编码区域大小 Coding region size/bp	3 495 864
编码区域GC-含量 GC-content of coding region	47.3%
编码区域/全基因组 Coding region/Genome length	89.0%
间隔区域大小 Intergenic region size/bp	433 833
间隔区域占比 Ratio of intergenic region	11.0%

2.2 LG37 系统进化树分析

经全基因组测序结果显示, 其 16S rDNA 基因序列长度为 1 445 bp。通过 NCBI→Blast→Nucleotide Blast 在线分析软件比对数据库中已收录的 16S ribosomal RNA sequences, 并结合基因组测序数据匹配分析。结果表明, 筛选的芽孢杆菌菌株为水源贝莱斯芽孢杆菌 (*B. velezensis*), 菌株命名为 LG37。将 LG37 菌株与 NCBI 数据库中进化关系较近的芽孢杆菌的 16S rDNA 序列进行比对, 并通过 MEGA 6.0 软件中的邻接法构建系统发育树 (图 2)。发现 LG37 与 *B. velezensis* FZB42 亲缘关系最近,

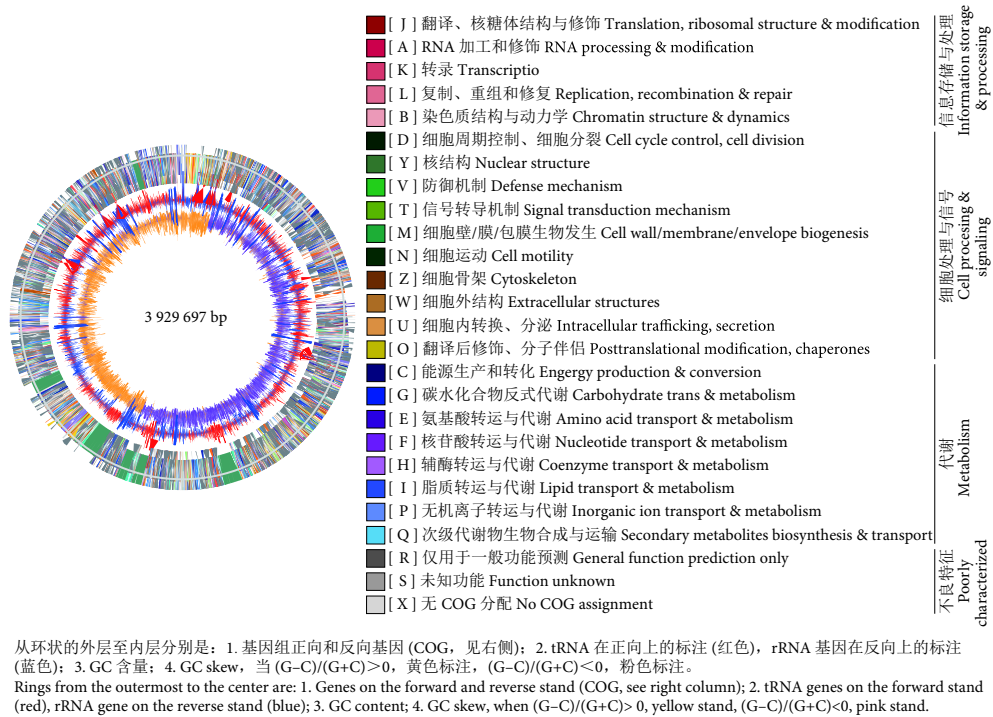


图1 LG37 环状基因组图谱

Fig. 1 Circular genome map of *B. velezensis* LG37 strain

16S rDNA 序列相识度高达 100%。

2.3 LG37 基因功能注释

对全基因组测序获得的蛋白编码基因, 通过搜寻 NCBI 的 nr 库、KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome) 蛋白数据库以及 SEED 蛋白数

据库进行基因功能注释分析, 利用 CDD 数据库进行 COG (Clusters of Orthologous Groups) 分类, 并通过 KEGG 数据库构建代谢通路。全基因组测序共获得 3 854 个蛋白编码基因, 具有明确生物学功能的蛋白编码基因 3 057 个, 具有 KEGG 的 ortho-

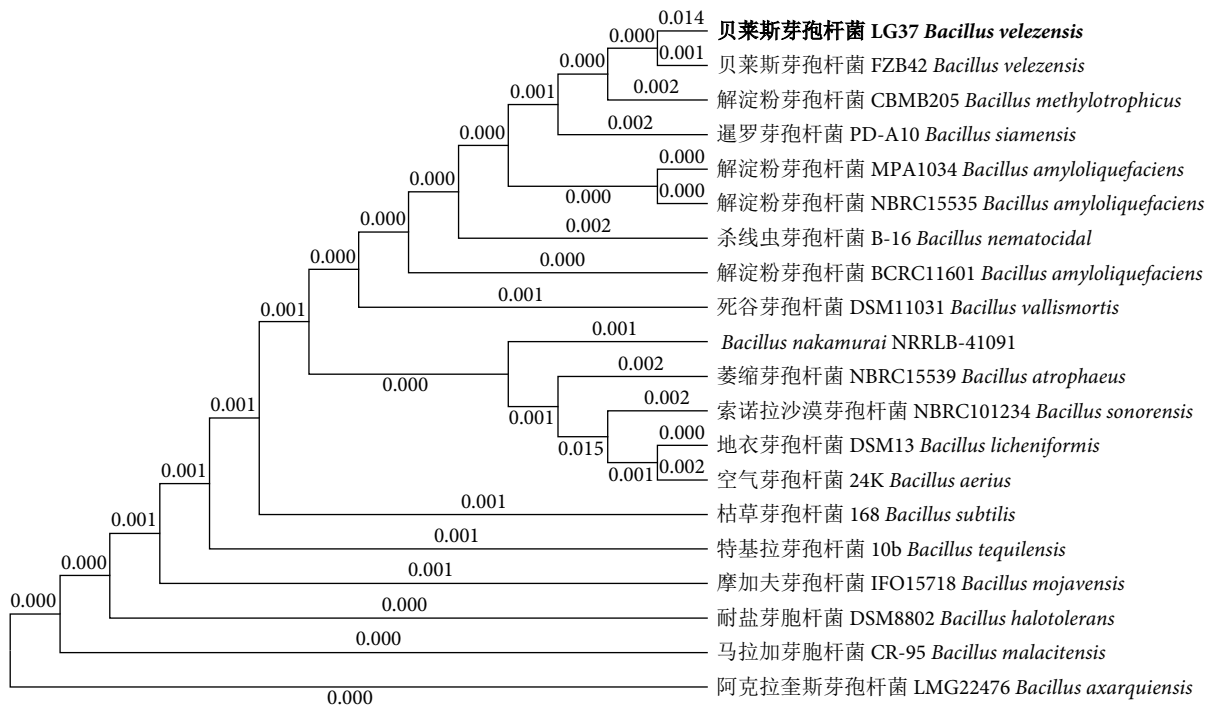


图2 贝莱斯芽孢杆菌基于16S rDNA 序列构建的系统进化树

Fig. 2 Neighbor-joining tree of *B. velezensis* LG37 based on 16S rDNA sequences

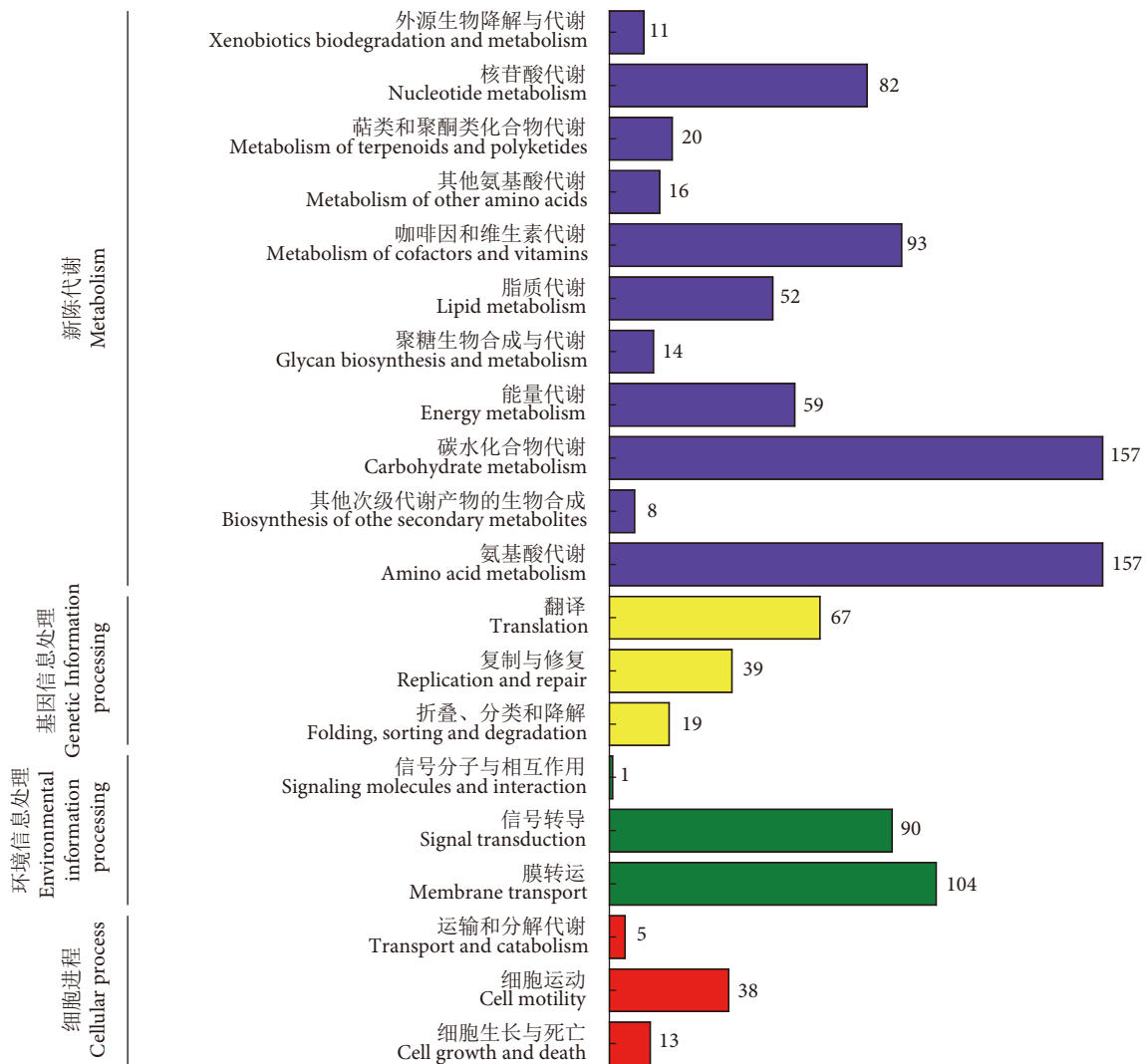


图4 LG37基因功能注释KEGG代谢通路

Fig. 4 Gene KEGG pathway classification map of LG37

基因 8 个，同化蛋白编码基因 6 个及其他无机氮代谢相关基因 (表 3)。

3 讨论

近年，随着高密度养殖等模式的逐步完善，我国水产养殖单位面积产量呈逐年上升趋势，但高产

出的同时也伴随着饲料营养的大量投入，其每天产生氨氮的量可根据公式初步计算^[23-25]： $Q = F \times R \times 0.144$ [Q 为氨氮产生的总量；F 为配合饲料投喂总量 ($\text{kg} \cdot \text{d}^{-1}$)；R 为饲料中蛋白质所占比例；式中蛋白氮含量约 16%，0.144 是指 90% 的被经济动物吸收的氮作为氨和尿素氮排出]。养殖水体中由于

表2 LG37 基因组氮代谢通路及其相关基因

Table 2 Related genes of nitrogen metabolism pathways of LG37

通路 Pathway ID	KEGG 描述 KEGG description	基因 Gene
ko00910	氮代谢 Nitrogen metabolism	<i>orf00490, orf00539, orf00544, orf00545, orf00546, orf00547, orf00817, orf01213, orf01254, orf01968, orf02226, orf02227, orf02368, orf03807, orf03808, orf03809, orf03810, orf03811</i>
M00531	同化硝酸盐还原 Assimilatory nitrate reduction	<i>orf00539, orf03807, orf03809</i>
M00530	异化硝酸盐还原 Dissimilatory nitrate reduction	<i>orf00544, orf00545, orf00547, orf03808, orf03809, orf03810, orf03811</i>
M00529	反硝化 Denitrification	<i>orf00544, orf00545, orf00547, orf03809</i>
M00804	完全硝化 Complete nitrification	<i>orf03809</i>

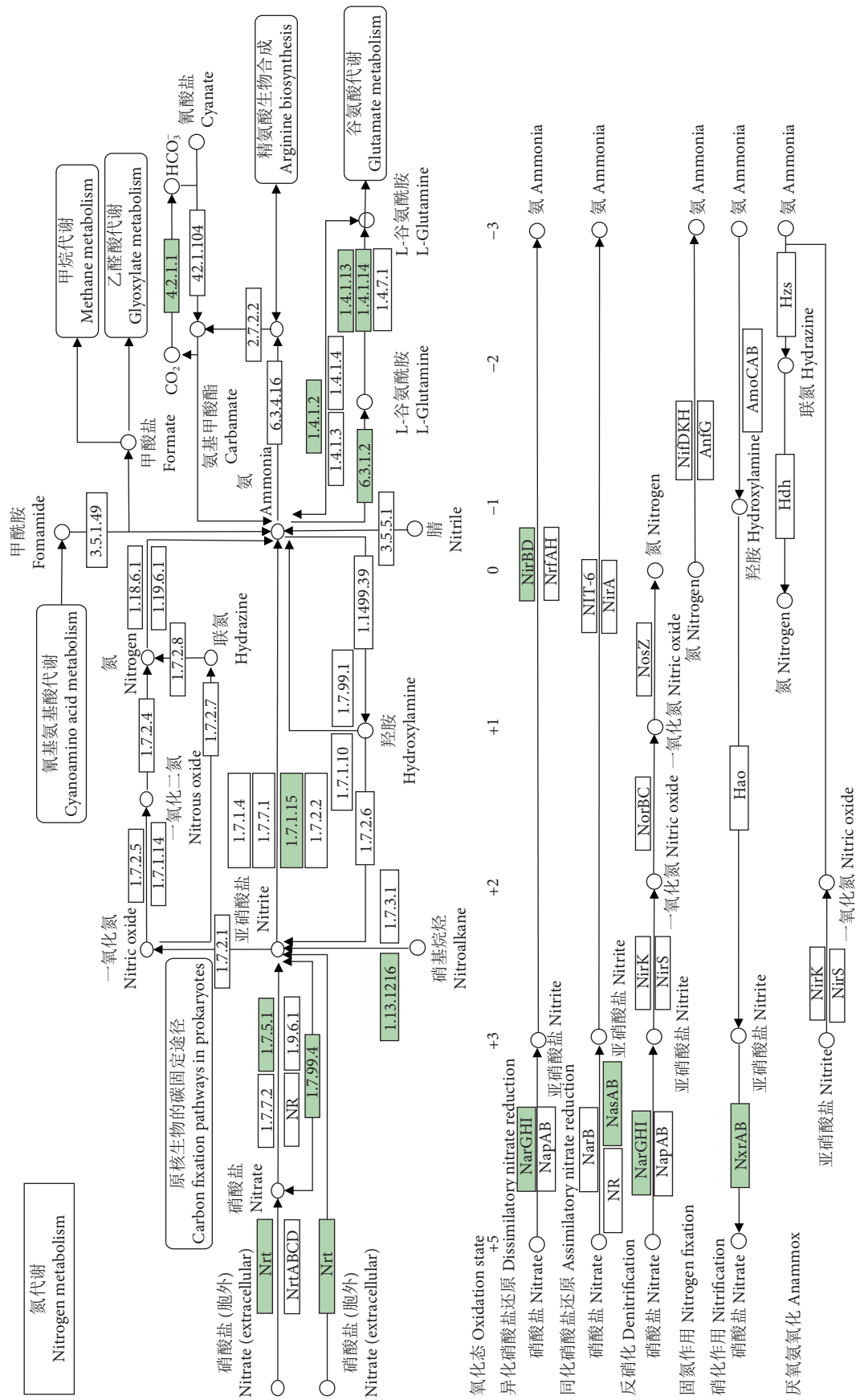


图5 氮代谢通路 (ko00910)

Fig. 5 Nitrogen metabolism (ko00910)

KEGG 中的基因 (绿色标注)。 Genes of KEGG (green stand).

表3 无机氮代谢候选基因
Table 3 Candidate genes of inorganic nitrogen metabolism

基因 Gene	大小 Size/bp	蛋白 Protein	GO-分子功能 GO-Molecular function
<i>orf00084</i>	741	Type III pantothenate kinase YacB	泛酸激酶活性
<i>orf00106</i>	246	Putative septation protein SpoVG	分子功能的负调控
<i>orf00148</i>	885	Pyridoxal 5'-phosphate synthase subunit PdxS	谷氨酰胺水解活性
<i>orf00173</i>	2 004	Nitrate reductase YyaE	硝酸还原酶活性
<i>orf00246</i>	1 416	Arginine utilization regulatory protein RocR	转录因子结合
<i>orf00250</i>	1 206	Ornithine aminotransferase RocD	鸟氨酸氧转氨酶活性
<i>orf00316</i>	963	Iron(3+)-hydroxamate-binding protein YxeB	无机离子转运与代谢
<i>orf00379</i>	1 017	Respiratory nitrate reductase NarI	硝酸还原酶活性
<i>orf00490</i>	1 287	Glutamate dehydrogenase RocG	谷氨酸脱氢酶 (NAD ⁺) 活性
<i>orf00535</i>	1 377	Cytochrome cd1-nitrite reductase-like YwhL	亚硝酸盐还原酶活性
<i>orf00539</i>	1 131	Nitrate transporter NarT	跨膜转运
<i>orf00544</i>	3 687	Nitrate reductase alpha chain NarG	硝酸还原酶活性
<i>orf00545</i>	1 464	Nitrate reductase beta chain NarH	硝酸还原酶活性
<i>orf00546</i>	558	Nitrate reductase NarJ	未折叠蛋白结合
<i>orf00547</i>	672	Nitrate reductase gamma chain NarI	硝酸还原酶活性
<i>orf00608</i>	318	Urease subunit gamma	氨基酸转运与代谢
<i>orf00609</i>	375	Urease subunit beta	氨基酸转运与代谢
<i>orf00610</i>	1 710	Urease subunit alpha	氨基酸转运与代谢
<i>orf00623</i>	351	Nitrogen regulatory protein P-II GlnB	酶调节活性
<i>orf00624</i>	1 212	Ammonium transporter NrgA	铵跨膜转运蛋白活性
<i>orf00630</i>	282	Stage III sporulation protein D SpoIIID	DNA结合转录因子活性
<i>orf00783</i>	726	Glucosamine-6-phosphate deaminase NagB	葡萄糖胺-6-磷酸脱氨酶活性
<i>orf00817</i>	582	YvdA	无机离子转运与代谢
<i>orf00959</i>	2 112	YvgW	阳离子转运ATP酶活性
<i>orf00966</i>	1 716	Sulfite reductase [NADPH] CysI	亚硫酸盐还原酶 (NADPH) 活性
<i>orf00998</i>	1 047	ABC transporter permease protein YvrB	转运体活性
<i>orf01042</i>	357	Uncharacterized protein YusI	氧化还原酶活性
<i>orf01058</i>	1 398	ABC transporter ATP-binding protein	ATP结合
<i>orf01105</i>	237	Nitrogen-fixing NifU domain-containing protein	铁硫簇结
<i>orf01175</i>	2 403	Cation:proton antiporter	单价无机阳离子跨膜转运蛋白活性
<i>orf01213</i>	1 032	Nitronate monooxygenase Ncd2	硝酸单加氧酶活性
<i>orf01254</i>	549	YtiB	无机离子转运与代谢
<i>orf01262</i>	813	Nitrate transport system permease protein YtdD	跨膜转运蛋白活性
<i>orf01263</i>	783	Nitrate ABC transporter permease YtlC	跨膜转运
<i>orf01264</i>	1 005	Nitrate ABC transporter periplasmic protein YtlA	ATP酶活性
<i>orf01290</i>	753	Quaternary-amine-transporting ATPase	传输ATP酶活性的季铵盐化合物
<i>orf01357</i>	1 191	Nitric oxide dioxygenase	一氧化氮双加氧酶活性
<i>orf01435</i>	1 962	Threonine--tRNA ligase 1 ThrS	ATP结合
<i>orf01491</i>	225	Spore germination protein GerE	DNA结合
<i>orf01591</i>	657	GlnP	氨基酸转运与代谢
<i>orf01592</i>	651	GlnM	氨基酸转运与代谢
<i>orf01593</i>	828	GlnH	氨基酸转运与代谢
<i>orf01617</i>	801	Formate/nitrite transporter	跨膜转运蛋白活性
<i>orf01659</i>	726	RNA polymerase sigma factor	DNA结合转录因子活性
<i>orf01864</i>	855	Nitrogen assimilation regulatory protein nac	DNA结合转录因子活性
<i>orf01911</i>	450	Ferric uptake regulation protein	DNA结合转录因子活性

续表 3

to be continued

基因 Gene	大小 Size/bp	蛋白 Protein	GO-分子功能 GO-Molecular function
orf01968	1 275	Glutamate dehydrogenase RocG	谷氨酸脱氢酶硝酸还原酶活性
orf02215	1 983	Nitrate reductase	硝酸还原酶活性
orf02225	903	HTH-type transcriptional regulator GltC	DNA结合转录因子活性
orf02226	903	Glutamate synthase (NADPH/NADH) GltB	谷氨酸合酶 (NADPH) 活性
orf02227	4 560	Glutamate synthase (NADPH/ NADH) GltD	谷氨酸合酶 (NADPH) 活性
orf02368	1 335	Glutamine synthetase GlnA	谷氨酸氨连接酶活性
orf02369	405	HTH-type transcriptional regulator GlnR	DNA结合
orf02384	315	Ammonium compound efflux SMR transporter	膜的组成部分
orf02385	354	Ammonium compound efflux SMR transporter	膜的组成部分
orf02417	261	Stage V sporulation protein S	核酸结合
orf02418	795	2',3'-cyclic-nucleotide 2'-phosphodiesterase Ymdb	2',3'-环核苷酸2'-磷酸二酯酶活性
orf02465	723	Uridylate kinase PyrH	ATP结合
orf02483	363	Chemotaxis protein CheY	磷脂酶信号转导系统
orf02588	783	RNA polymerase sigma factor	DNA结合转录因子活性
orf02638	930	Glutaminase	氨基酸转运与代谢
orf02680	666	Potassium uptake protein KtrA	阳离子跨膜转运蛋白活性
orf02747	1 914	YkvW	阳离子转运ATP酶活性
orf02756	342	Putative transcriptional regulator	转录调控, DNA模板
orf02787	1 353	YkrM	阳离子跨膜转运蛋白活性
orf02794	783	Uncharacterized membrane protein YkoY	膜的组成部分
orf02804	742	HTH-type transcriptional regulator TnrA	核心启动子结合
orf02828	315	Ammonium compound efflux SMR transporter	膜的组成部分
orf02830	339	Ammonium compound efflux SMR transporter	膜的组成部分
orf02854	999	Anion permease	无机磷酸盐跨膜转运蛋白活性
orf03008	396	ArsC family transcriptional regulator SpxA	电子转移活性
orf03161	1 215	Cation/H (+) antiporter YhaU	溶质: 质子逆向转运活性
orf03186	396	Putative fluoride ion transporter CrcB	无机阴离子跨膜转运蛋白活性
orf03187	360	Putative fluoride ion transporter CrcB	无机阴离子跨膜转运蛋白活性
orf03209	435	HTH-type transcriptional regulator NsrR	DNA结合
orf03262	834	ABC-type nitrate transport system	离子跨膜转运
orf03263	990	Putative binding protein SsuA	ATP酶活性
orf03264	768	Aliphatic sulfonates import protein SsuB	阴离子跨膜转运蛋白活性
orf03448	720	Probable transcriptional regulatory protein	转录调控, DNA模板
orf03546	330	Ammonium compound efflux SMR transporter	膜的组成部分
orf03547	315	Ammonium compound efflux SMR transporter	膜的组成部分
orf03597	963	Arsenic resistance protein	无机阴离子跨膜转运蛋白活性
orf03677	822	Probable manganese catalase YdbD	无机离子转运与代谢
orf03682	366	Ammonium compound efflux SMR transporter	膜的组成部分
orf03807	1 206	Assimilatory nitrate reductase NasA	硝酸铁氧还蛋白还原酶活性
orf03808	2 328	Nitrite reductase large subunit NasB	亚硝酸盐还原酶 [NAD(P)H] 活性
orf03809	2 133	Assimilatory nitrate reductase NasC	硝酸还原酶活性
orf03810	2 418	Nitrite reductase [NAD(P)H] NasD	亚硝酸盐还原酶 [NAD(P)H] 活性
orf03811	321	Assimilatory nitrite reductase [NAD(P)H] NasE	亚硝酸盐还原酶 [NAD(P)H] 活性
orf03812	1 440	NasF	辅酶代谢
orf03840	1 257	Transport system atp-binding protein opuaa	传输ATP酶活性的季铵盐化合物
orf03889	984	Glutaminase 1 GlsA1	谷氨酰胺酶活性
orf03890	1 437	GlnT	假定的钠/谷氨酰胺转运体
orf03963	1 434	Sodium-independent anion transporter	次级活性硫酸盐跨膜转运蛋白活性

4种无机氮之间可相互转化,且因水体中多种理化指标及微生物等多重作用因素而处于动态平衡状态,因此,虽然水体中 NH_3 和 NO_2^- 对水生动物有毒害作用,但不能仅降低 NH_3 和 NO_2^- 的浓度,而应在降低 NH_3 或 NO_2^- 浓度的同时改良水体中的微生物菌落组成和水中总无机氮含量^[2-3],实现降低无机氮浓度的目的。

贝莱斯芽孢杆菌不仅可降低无机氮的浓度,而且对养殖水体中病原微生物的生长、繁殖起到很好的抑制效果。雷阳等^[26]在对虾养殖池塘中筛选获得一株可高效同化氮的芽孢杆菌,后经鉴定并命名为贝莱斯芽孢杆菌FS017。Zhu等^[27]筛选获得一株贝莱斯芽孢杆菌CPA1-1,可以很好地降低养殖水体中氨氮和亚硝态氮的浓度。同时,贝莱斯芽孢杆菌可对副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、哈维氏弧菌(*V. harveyi*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)等常见水生动物病原菌起到很好的抑制效果^[28]。表明贝莱斯芽孢杆菌在水产养殖领域具有较高的应用价值,因此对其无机氮同化机理进行研究非常必要。

为从基因水平探讨贝莱斯芽孢杆菌同化无机氮的机理,本研究对LG37的基因组进行了测序分析。结果显示,该菌株基因组序列全长3 929 697 bp,经过基因功能注释,共有3 057个蛋白具有明确的生物学功能,所有蛋白匹配的同源蛋白来源于75个物种,其中贝莱斯芽孢杆菌FZB42比例最高(78.4%)^[29]。通过基因注释和本地Blast+的筛选、分析,3 057个功能蛋白编码基因中,与NCBI和UniProt数据库中记录的无机氮代谢相关基因相匹配的共有94个,约占功能基因的3.1%。其中涉及多种特异性无机氮同化功能蛋白的编码基因,包括感应蛋白(GlnK)、转运蛋白(MnrA、NarT和NrgA)、氧化还原蛋白(NasABD、NarIGHK)等相应编码基因^[7],其通路下游涉及的同化蛋白和调节蛋白等不仅参与无机氮的同化代谢,同时也参与有机氮的同化代谢。本结果表明LG37同化无机氮的代谢途径与有机氮的代谢途径之间,仅在通路上游的感应、转运、氧化还原至氨的相关节点的功能蛋白上具有特异性,而对氨下游涉及的氮化合物合成代谢相关途径中,不论氮源是无机氮还是有机氮,其代谢途径均一致,涉及的蛋白的功能和作用也一致。

氮元素在微生物新陈代谢过程中必不可少^[30],

进化过程中为适应环境因子的变化和氮源的多样性,微生物对氮元素的同化代谢已逐渐发展成为多元、互补、交叉及全局性的补偿性代谢网络途径,进而实现对不同种类氮源的利用^[31-33]。微生物在代谢过程中涉及的相关功能蛋白,其在基因组上的编码基因或基因簇往往处于相临或相近的位置^[34-35],以此提高微生物的代谢效率,实现营养物质的高效利用,同时降低自身的能量损耗^[36-37]。本研究发现,orf00316—orf00630和orf03597—orf03963两个区段基因翻译的蛋白功能主要涉及无机氮的转运和氧化还原,并最终生成 NH_3 或 NH_4^+ ,说明该区段内的基因翻译蛋白主要行使的功能是微生物对环境无机氮的感知、转运、氧化还原、吸收同化等;而筛选的其他基因翻译的蛋白在无机氮或有机氮的代谢途径中均行使相应的功能。

综上,贝莱斯芽孢杆菌LG37基因组序列的解析为深入研究其同化无机氮的关键功能基因提供了参考依据,为进一步研究其无机氮的代谢途径提供了理论数据。后续将聚焦于orf00316—orf00630和orf03593—orf03963基因区段的研究,即LG37感知、转运、氧化还原等无机氮同化途径。

参考文献:

- [1] 胡晓娟, 王国樑, 田雅洁, 等. 不同培养条件下菌株NB5对氨氮的去除效果研究[J]. 南方水产科学, 2020, 16(6): 89-96.
- [2] 方金龙, 王元, 房文红, 等. 氨氮胁迫下白斑综合征病毒对凡纳滨对虾的致病性[J]. 南方水产科学, 2017, 13(4): 52-58.
- [3] 肖炜, 李大宇, 徐杨, 等. 慢性氨氮胁迫对吉富罗非鱼幼鱼生长、免疫及代谢的影响[J]. 南方水产科学, 2015, 11(4): 81-87.
- [4] 郭国强, 孙红飞, 张永耀. 分子氨对草鱼鱼种红细胞渗透脆性的影响[J]. 水产科学, 2010, 29(8): 489-491.
- [5] 孙侦龙, 朱永祥, 刘大勇, 等. 非离子氨氮和亚硝酸盐氮对暗纹东方鲀稚鱼的急性毒性试验[J]. 水产科学, 2015, 34(3): 135-139.
- [6] KUEBUTORNYE F K A, ABARIKE E D, LU Y. A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture[J]. Fish Shellfish Immunol, 2019, 87: 820-828.
- [7] LIU G X, VIJAYARAMAN S B, DONG Y J, et al. *Bacillus velezensis* LG37: transcriptome profiling and functional verification of GlnK and MnrA in ammonia assimilation[J]. BMC Genom, 2020, 21(1): 215.
- [8] GOODWIN S, MCPHERSON J D, MCCOMBIE W R. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies[J]. Nat Rev Genet, 2016, 17(6): 333-51.
- [9] GALPERIN M Y, KRISTENSEN D M, MAKAROVA K S, et al. Microbial genome analysis: the COG approach[J]. Brief Bioin-

- form, 2019, 20(4): 1063-1070.
- [10] CASTAÑEDA C D, GAMBLE J N, WAMSLEY K G S, et al. *In ovo* administration of *Bacillus subtilis* serotypes effect hatchability, 21-day performance, and intestinal microflora[J]. *Poult Sci*, 2021, 100(6): 101125.
- [11] TAKAMI H, TOYODA A, UCHIYAMA I, et al. Complete genome sequence and expression profile of the commercial lytic enzyme producer *Lysobacter enzymogenes* M497-1[J]. *DNA Res*, 2017, 24(2): 169-177.
- [12] MOLTON J S, LEE I R, BERTRAND D, et al. Stool metagenome analysis of patients with *Klebsiella pneumoniae* liver abscess and their domestic partners[J]. *Int J Infect Dis*, 2021, 107: 1-4.
- [13] 朱玉玲, 彭晶, 唐诗哲, 等. 宏基因组技术在极端环境酯酶挖掘中的应用 [J]. *生命科学研究*, 2021, 25(2): 169-175.
- [14] 魏大鹏, 单洪伟, 马甦, 等. 混料设计优化复合菌剂比例的研究 [J]. *南方水产科学*, 2014, 10(1): 86-91.
- [15] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. *Mol Biol Evol*, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [16] NAKANO K, SHIROMA A, SHIMOJI M, et al. Advantages of genome sequencing by long-read sequencer using SMRT technology in medical area[J]. *Hum Cell*, 2017, 30(3): 149-161.
- [17] GAN Y Q, ZHANG T, GAN Y Q, et al. Complete genome sequences of two *Enterococcus faecium* strains and comparative genomic analysis[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(3): 2019-2028.
- [18] BENNETT J P Jr, KEENEY P M, BROHAWN D G. RNA sequencing reveals small and variable contributions of infectious agents to transcriptomes of postmortem nervous tissues from amyotrophic lateral sclerosis, Alzheimer's disease and Parkinson's disease subjects, and increased expression of genes from disease-activated microglia[J]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 235.
- [19] EMSLEY C, KING S, NYULASI I, et al. A GLIMmer of insight into lung transplant nutrition: enhanced detection of malnutrition in lung transplant patients using the GLIM criteria[J]. *Clin Nutr*, 2021, 40(5): 2521-2526.
- [20] CHAN P P, LOWE T M. tRNAscan-SE: searching for tRNA genes in genomic sequences[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1962: 1-14.
- [21] LAGESEN K, HALLIN P, RØDLAND E A, et al. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes[J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(9): 3100-8.
- [22] CAMACHO C, COULOURIS G, AVAGYAN V, et al. BLAST+: architecture and applications[J]. *BMC Bioinformatics*, 2009, 10: 421.
- [23] NAYAK V S. Nonelectrolytic production of caustic soda and hydrochloric acid from sodium chloride[J]. *Ind Eng Chem Res*, 1996, 35(10): 3808-3811.
- [24] 张静, 高婷婷, 李勇, 等. 蛋白营养对工业养殖大菱鲆 (*Scophthalmus maximus* L.) 幼鱼生长、氨氮排泄及肌肉氨基酸的效应 [J]. *渔业科学进展*, 2016, 37(6): 34-41.
- [25] EBELING J M, TIMMONS M B, BISOGNI J J. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems[J]. *Aquaculture*, 2006, 257(1/2/3/4): 346-358.
- [26] 雷阳, 张倩, 陈钰, 等. 对虾养殖高效降解氨氮微生物的筛选与鉴定 [J]. *福建农业科技*, 2019(10): 16-20.
- [27] ZHU X H, ZHANG S M, ZHOU L Y, et al. Probiotic potential of *Bacillus velezensis*: antimicrobial activity against non-O1 *Vibrio cholerae* and immune enhancement effects on *Macrobrachium nipponense*[J]. *Aquaculture*, 2021, 541: 736817.
- [28] 张德锋, 高艳侠, 可小丽, 等. 贝莱斯芽孢杆菌 LF01 基因组序列分析及其代谢产物的生防作用 [J]. *水产学报*, 2022, 46(2): 196-206.
- [29] FAN B, BLOM J, KLENK H P, et al. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* form an "operational group *B. amyloliquefaciens*" within the *B. subtilis* species complex[J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 22.
- [30] MURUKE M S H, CAMP H J O D, SEMESI A K, et al. The level of enzymes involved in the allantoin metabolism of *Bacillus fastidiosus* grown under different conditions[J]. *Curr Microbiol*, 1995, 30(1): 45-7.
- [31] NIU T, LV X, LIU Z, et al. Synergetic engineering of central carbon and nitrogen metabolism for the production of N-acetylglucosamine in *Bacillus subtilis*[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2020, 67(1): 123-132.
- [32] WANG B, ZHANG D, CHU S, et al. Genomic analysis of *Bacillus megaterium* NCT-2 reveals its genetic basis for the bioremediation of secondary salinization soil[J]. *Int J Genomics*, 2020, 2020: 4109186.
- [33] MASSAD R S, LOUBET B, TUZET A, et al. Relationship between ammonia stomatal compensation point and nitrogen metabolism in arable crops: current status of knowledge and potential modeling approaches[J]. *Environ Pollut*, 2008, 154(3): 390-403.
- [34] TANG Y, YE Z, WEI Y, et al. Vertebrate paralogous CRMPs in nervous system: evolutionary, structural, and functional interplay [J]. *J Mol Neurosci*, 2015, 55(2): 324-34.
- [35] 顾志良, 耿拓宇. 鸡重要性状主效基因和 QTL 的研究进展 [J]. *中国家禽*, 2003(S1): 130-134.
- [36] AWADA H, THAPA B, VISCONTE V. The genomics of myelodysplastic syndromes: origins of disease evolution, biological pathways, and prognostic implications[J]. *Cells*, 2020, 9(11): 2512.
- [37] 丁忠涛, 张锐, 郭三堆. 棉花抗逆相关基因 *GhDr1* 的克隆及生物信息学分析 [J]. *生物技术通报*, 2011(1): 99-106.