



微小杆菌属(*Exiguobacterium*)细菌的能量代谢途径分析

赵芮^{1,2}, 李登辉³, 李学恭¹, 张维佳¹, 赵苑^{4,5*}, 吴龙飞^{1,6*}

1 中国科学院深海科学与工程研究所 深海微生物细胞生物学实验室, 海南 三亚 572000

2 中国科学院大学, 北京 101408

3 青岛华大基因研究院, 山东 青岛 266555

4 中国科学院海洋研究所 海洋生态与环境科学重点实验室, 山东 青岛 266071

5 中国科学院海洋大科学研究中心, 山东 青岛 266071

6 Aix-Marseille University, CNRS, LCB, IMM, Marseille 13402, France

赵芮, 李登辉, 李学恭, 张维佳, 赵苑, 吴龙飞. 微小杆菌属(*Exiguobacterium*)细菌的能量代谢途径分析[J]. 微生物学报, 2023, 63(6): 2078-2093.

ZHAO Rui, LI Denghui, LI Xuegong, ZHANG Weijia, ZHAO Yuan, WU Long-Fei. Energy metabolism pathways in *Exiguobacterium*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(6): 2078-2093.

摘要:【目的】微小杆菌属(*Exiguobacterium*)细菌广泛分布于海洋及非海洋环境中, 具有多种代谢途径以适应复杂多样的生境。本研究从能量代谢途径角度出发, 探究该属菌株对不同生境的适应能力。【方法】从美国国家生物科技数据中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库中获取 146 个 *Exiguobacterium* 属菌株的基因组, 查找并统计光营养、厌氧呼吸和底物代谢等多种能量代谢途径的关键蛋白或关键酶基因在各菌株基因组中的分布, 包括光营养型的视紫红质基因、厌氧呼吸营养型的钼辅因子合成蛋白基因, 以及底物代谢营养型中乙醛酸分流途径的异柠檬酸裂解酶及苹果酸合酶基因等。根据对应的氨基酸序列构建视紫红质、MoaC 和异柠檬酸裂解酶的系统发育树, 分析不同能量代谢途径在该属菌株进化过程中的保守性, 推测其对于该属菌株的重要性。【结果】*Exiguobacterium* 属中 50% 的种具有视紫红质基因, 其中分离自非海洋生境的菌株更趋向于含有视紫红质基因。本研究所统计的全部非海洋生境菌株中, 含有视紫红质基因的菌株占比约为 70%, 而在海洋生境菌株中该比例仅为 19%。*Exiguobacterium* 属约 27% 的种存在钼辅因子合成蛋白基因, 分离自海洋

资助项目: 国家自然科学基金(42176121, 42076139)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (42176121, 42076139).

*Corresponding authors. ZHAO Yuan, Tel/Fax: +86-532-82898714, E-mail: yuanzhao@qdio.ac.cn;

WU Long-Fei, Tel/Fax: +86-898-88380067, E-mail: wu@imm.cnrs.fr

Received: 2022-11-03; Accepted: 2023-03-17; Published online: 2023-03-28

环境的菌株有该类蛋白的可能性更高(32%:21%), 具有完整钼辅因子合成途径的菌株集中于进化树同一分支上的少数种。该属约 61%的种存在乙醛酸分流途径相关酶基因, 这些种隶属进化树的同一分支, 且种内所有菌株都具备相关基因, 表明乙醛酸分流途径在 *Exiguobacterium* 属的分布具有种特异性。【结论】*Exiguobacterium* 属细菌具有多种能量代谢途径相关基因, 包括基于视紫红质的光营养型能量代谢途径、基于钼酶的厌氧呼吸型能量代谢途径和底物代谢营养型能量代谢途径中的乙醛酸分流途径。能量代谢途径多样性可能是 *Exiguobacterium* 属细菌适应复杂多样生境的机制之一。此外, 本研究发现 *Exiguobacterium* 属中不同种、同种不同菌株间存在能量代谢途径差异, 且能量代谢途径在该属内的分布多不具备种特异性, 表明仅通过 16S rRNA 基因种属鉴定来预测目标菌株的代谢类型可能有较大偏差和局限性。

关键词: 微小杆菌属; 能量代谢; 视紫红质; 钼酶; 钼辅因子; 乙醛酸分流

Energy metabolism pathways in *Exiguobacterium*

ZHAO Rui^{1,2}, LI Denghui³, LI Xuegong¹, ZHANG Weijia¹, ZHAO Yuan^{4,5*}, WU Long-Fei^{1,6*}

1 Laboratory of Deep-sea Microbial Cell Biology, Institute of Deep-sea Science and Engineering, Chinese Academy of Sciences, Sanya 572000, Hainan, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101408, China

3 BGI-Qingdao, BGI-Shenzhen, Qingdao 266555, Shandong, China

4 CAS Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, Shandong, China

5 Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, Shandong, China

6 Aix-Marseille University, CNRS, LCB, IMM, Marseille 13402, France

Abstract: [Objective] Bacteria of *Exiguobacterium* are ubiquitous in marine and non-marine environments and display versatile metabolism pathways to adapt to complex and diverse habitats. In this study, we explored the adaptability of *Exiguobacterium* to different habitats from the perspective of energy metabolism pathways. **[Methods]** The genomes of a total 146 *Exiguobacterium* strains available at National Center for Biotechnology Information (NCBI) database were downloaded for the mining of the genes encoding key enzymes of multiple energy metabolism pathways. The encoded enzymes mainly included rhodopsin for phototrophy, molybdenum cofactor synthesis protein for anaerobic respiration, and isocitrate lyase and malate synthase for glyoxylate shunt. We then built the phylogenetic trees based on the amino acid sequences of rhodopsin, MoaC, and isocitrate lyase to analyze the conservation of different energy metabolism pathways. **[Results]** Fifty percent of *Exiguobacterium* species possessed rhodopsin gene. The strains isolated from non-marine habitats tended to carry rhodopsin gene, accounting for about 70%, while the strains carrying rhodopsin gene from marine habitats accounted for only 19%. Approximately 27% of species possessed the gene encoding molybdenum cofactor synthesis protein, and the strains isolated from marine habitats (32%) carrying this gene were more than those from non-marine habitats (21%). The strains

with complete molybdenum cofactor synthesis pathway concentrated in several species, sharing the same branch on the phylogenetic tree. The glyoxylate shunt existed in approximately 61% of the species, which clustered in the same branch of the phylogenetic tree. All the strains of such species possessed related genes, which indicated that this pathway had species specificity in *Exiguobacterium*. **[Conclusion]** The key genes for energy metabolism vary in different species or different strains of *Exiguobacterium*. The diversity of energy metabolism pathways may, to some extent, facilitate the adaptation of these bacteria to complex habitats. Furthermore, the distribution of most energy metabolism pathways is not species-specific for this genus. This finding suggests that the prediction of metabolic types of targeted strains by 16S rRNA gene-based species identification alone may be biased and limited.

Keywords: *Exiguobacterium*; energy metabolism; rhodopsin; molybdoenzyme; molybdenum cofactor; glyoxylate shunt

微小杆菌属(*Exiguobacterium*)细菌的生境广泛,包括海洋、湖泊、冻土、冰川、盐湖、工业废水、土壤、沉积物和大气气溶胶等,在深海热液喷口、黄石公园热泉等多种极端环境中也分离出了该属菌株。鉴于该属菌株对差异巨大的生境具有广泛的适应性,对其环境适应机制的研究引起广泛关注。Zhang 等^[1]对 147 株分离自不同生境的 *Exiguobacterium* 属菌株进行了比较基因组分析并构建了基因组系统发育树,根据系统发育和平均核苷酸一致性(average nucleotide consistency, ANI)分析将该属菌株划分为 27 个种,属于 Group I 和 Group II 两大遗传类群,并从碳、氮源利用和转运蛋白家族扩展等方面分析了该属菌株的抗环境胁迫能力,发现该属菌株具有广泛的多糖和蛋白质代谢能力,而 Group I 菌株相比 Group II 具有更多样的转运蛋白,可在维持离子平衡、抵抗重金属和药物毒性等多方面发挥作用。这可能意味着 *Exiguobacterium* 属内 2 个遗传类群的菌株具有不同的环境适应机制。

近期,作者所属课题组自西南印度洋和中印度洋热液喷口硫化物样品中分离得到 18 株细菌,16S rRNA 基因鉴定均属于 *Exiguobacterium profundum* (未发表数据)。在相同培养条件下这

18 株 *E. profundum* 的生长速率并不一致,表明 *Exiguobacterium* 属同种不同菌株的代谢途径存在差异,可能是该属菌株对不同生境的适应机制之一。此表型代谢差异也提示了根据 16S rRNA 基因序列确定种群分类,并笼统分析代谢能力可能存在一定局限性。

Zhang 等^[1]的研究从糖类、蛋白质代谢的角度分析了 *Exiguobacterium* 属菌株可能的环境适应机制。而除底物代谢外,能量代谢同样在细菌对环境的适应中起到重要作用,但目前 *Exiguobacterium* 属不同种群在各种环境中的能量代谢状况尚无报道。细菌中常见的能量代谢途径有 3 种,分别是光能营养、氧化磷酸化和底物水平磷酸化(图 1)。光能营养以光作为能量来源,通过叶绿素、菌绿素或视紫红质等光合色素驱动质子跨膜形成质子梯度,促进 ATP 合成^[2]。氧化磷酸化依靠电子传递链驱动质子梯度产生,可根据末端电子受体不同分为好氧呼吸和厌氧呼吸,前者需在有氧环境中使用氧分子作为终电子受体,后者则可在缺氧环境中以多种有机或无机化合物作为终电子受体进行能量代谢^[3]。底物水平磷酸化则通过将底物代谢过程中产生的高能磷酸基团直接转移给 ADP (或 GDP)以合成 ATP (或 GTP)^[4]。

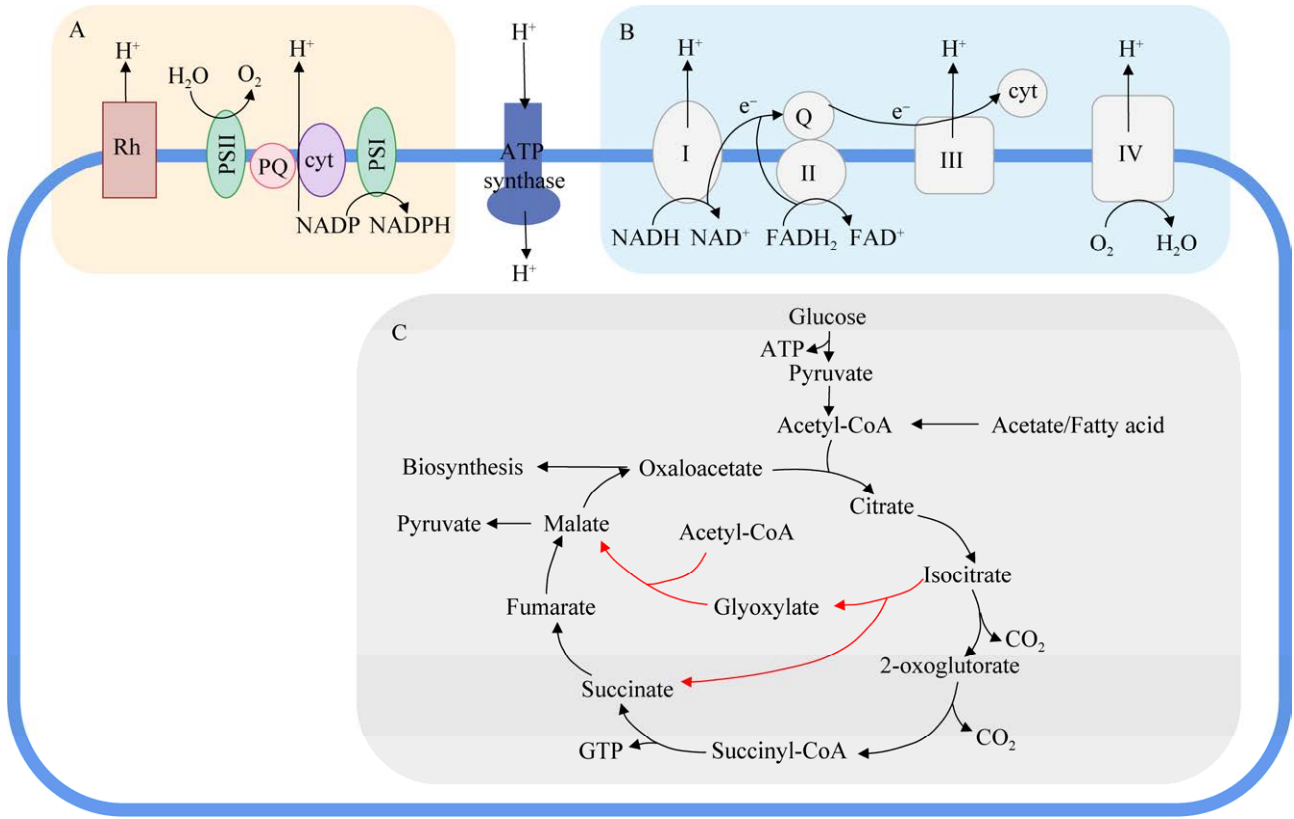


图 1 细菌内常见的 3 种能量代谢途径

Figure 1 Three common energy metabolism pathways in bacteria. A: Phototrophic metabolism pathway, in which the left pattern depends on rhodopsin and the right patterns on chlorophyll. Light drives the translocation of protons across the cytoplasmic membrane to form a proton motive force, which is used for ATP synthase, flagella rotation and other cell processes. B: Oxidative phosphorylation, via respiratory electron transport chain, which also generates the proton motive force. C: A series of reactions in TCA cycle, contributing to substrate phosphorylation. In the process of substrate metabolism, enzymes directly transfer phosphate group to ADP to form ATP. When the cellular energy attends a certain level, isocitrate is derived to glyoxylate shunt (red arrows) to increase carbon-biomass conversion, instead to release two carbons in form of CO_2 .

本研究拟从上述 3 种能量代谢途径入手, 探究能量代谢在 *Exiguobacterium* 属对环境的适应能力中发挥的作用, 针对其中的关键酶或关键蛋白开展研究, 从而判断各能量代谢途径在 *Exiguobacterium* 属菌株中的存在和分布情况。该属部分菌株具有视紫红质, 且能够在缺氧、营养贫瘠的极端环境中生存^[5-6], 意味着对光能的利用、厌氧呼吸和非糖类底物的代谢可能在其生存策略中占据重要地位。因此本研究针对性选择视紫红质、钼酶和乙醛酸分流途径关键酶作为光

营养型能量代谢、厌氧呼吸能量代谢及底物磷酸化能量代谢的标志, 综合统计视紫红质、钼酶必需组分钼辅因子的合成蛋白、乙醛酸分流关键酶异柠檬酸裂解酶和苹果酸合酶在 *Exiguobacterium* 属各菌株内的分布, 并根据这些关键基因的氨基酸序列构建蛋白系统发育树, 以分析不同能量代谢途径在该属菌株中的存在和分布, 剖析种内和种间的能量代谢途径差异, 探究能量代谢在 *Exiguobacterium* 属菌株对环境的适应能力中可能发挥的作用。

1 材料与方 法

1.1 基因组获取及进化树的构建

从美国国家生物科技数据中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载 147 株 *Exiguobacterium* 属菌株的基因组文件(.fna 文件),使用 CheckM (v1.0.12)^[7]检验基因组质量,筛选完整性>95%、污染程度<5%的 146 个基因组为有效数据,并统计对应菌株的分离位点信息[数据存贮于国家微生物科学数据中心(National Data Center for Microbial Sciences, NMDC),数据编号 NMDCX0000185,链接为 <https://nmdc.cn/resource/genomics/attachment/detail/NMDCX0000185>].使用 GTDB-Tk-1.7.0 软件对 146 株 *Exiguobacterium* 属菌株进行物种分类^[8],并使用 FastANI v1.33 (fragLen 1 000,其余参数默认)分析其平均核苷酸一致性^[9],以 95%作为划分同种的标准,对 GTDB 分类结果进行补充。

使用 GTDB-Tk 软件,导入基因组文件,筛选出 120 个单拷贝蛋白并对其氨基酸序列进行比对(参数默认)。将比对文件导入 FastTree (version 2.1.11),使用默认参数,基于最大似然(maximum likelihood, ML)法构建基因组进化树^[10-11]。选择 *Citromicrobium* sp. JLT1363 和 *Gillisia limnaea* 作为外类群。使用 iTOL 进化树在线修饰网站(<https://itol.embl.de/>)将进化树可视化^[12],并进行修饰,使用不同颜色标注物种分类和菌株来源信息。

1.2 基因组进化树的标注

1.2.1 视紫红质及钼辅因子合成蛋白基因的标注

从 NCBI 数据库下载上述 148 株菌的基因组注释文件(.gff 文件)和蛋白序列文件(.faa 文件),在文件中检索关键词“rhodopsin”、“MoaA”-“MoaE”、“MoeA”、“MogA”等,找到对

应蛋白,即代表基因组中存在对应基因。使用 iTOL 在基因组进化树上以不同图形标注含有视紫红质和钼辅因子合成蛋白基因的菌株。

1.2.2 乙醛酸分流关键酶基因的标注

以本课题组分离自深海热液喷口样品的 *E. profundum* 菌株 SWIR-3 中注释为异柠檬酸裂解酶和苹果酸合酶的蛋白序列作为参考,与上述 148 株菌的蛋白序列文件进行 BLASTp 比对,若比对成功即认为存在对应基因。使用 BLASTp 程序^[13],设置 E value 小于 $1e-5$,一致性(identity)大于 50%,舍弃比对长度过短(小于参考序列长度 10%)的序列。使用 iTOL 在基因组进化树上以不同图形标注比对成功的菌株。

1.3 蛋白系统发育树的构建

1.3.1 视紫红质系统发育树的构建

使用 MEGA X 软件,将 1.2.1 中检索到的视紫红质蛋白序列及 9 个从 NCBI 数据库搜索到的外属菌株的视紫红质蛋白序列进行比对并构建系统发育树^[14]。序列比对使用 MUSCLE 算法,选择默认参数。系统发育树使用 ML 法构建,选择自助抽样法(bootstrap method),重复次数(bootstrap replications)设为 1 000 次,其余参数默认。使用 iTOL 将系统发育树可视化、标注物种分类和分离来源信息,并根据视紫红质中关键位点的保守氨基酸将视紫红质序列分类,在系统发育树上以不同颜色进行标注。

1.3.2 MoaC 系统发育树的构建

使用 MEGA X 软件,将 1.2.1 中检索到的 MoaC 蛋白序列进行比对并构建系统发育树,参数设置和建树方法同 1.3.1。使用 iTOL 将系统发育树可视化并进行修饰,标注物种分类和来源信息。

1.3.3 aceA 编码异柠檬酸裂解酶系统发育树的构建

使用 MEGA X 软件,将 1.2.2 中比对成功的 148 株菌中的异柠檬酸裂解酶蛋白序列与

SWIR-3 中异柠檬酸裂解酶蛋白序列进行比对并构建系统发育树, 参数设置和建树方法同 1.3.1。使用 iTOL 将系统发育树可视化并进行修饰, 标注物种分类和来源信息。

1.4 基因得失情况分析

使用 OrthoFinder 软件(version 2.3.8)对 146 株 *Exiguobacterium* 属菌株的基因家族进行聚类^[15], 在直系同源组群(cluster of orthologous group, COG)数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/research/cog/>)中对基因家族的功能进行注释^[16]。找到视紫红质、钼辅因子合成蛋白 MoaC 和异柠檬酸裂解酶所属基因家族, 在 Count 软件中基于 Dollo parsimony 方法分析其获得、丢失情况^[17]。

1.5 进化树修饰

使用 Adobe Photoshop CS6 软件对所有系统发育树进行进一步修饰, 标注菌株所属遗传类群并添加图注。后续分析中如有需特别标注的菌株也通过 Photoshop 进行标注。

2 结果与分析

2.1 *Exiguobacterium* 属内 3 种能量代谢途径关键酶的分布

根据 CheckM 分析, 本研究共筛选出 146 个合格的 *Exiguobacterium* 属菌株的基因组用于构建基因组进化树, 并根据 GTDB 分类和 ANI 分析结果, 在进化树上将这 146 株菌标注为 26 个种, 包括 13 个在 LPSN 数据库(<https://lpsn.dsmz.de/>)有记录的物种和 13 个假定物种(N1–N13) (图 2)。63.7%的菌株分离自海洋环境, 其余分离自非海洋环境, 包括陆地、淡水、冰川等。不同能量代谢途径的标志蛋白或酶以不同颜色图形标注并展示在图 2 中。

视紫红质基因在 *Exiguobacterium* 属中分布较为广泛, 但在同属不同种、同种不同菌株间存在分布差异。26 个种有 13 个发现了视紫红质基

因, 占总种数的 50%; 这 13 个种包括 83 个基因组, 其中 55 个含有视紫红质基因, 占比为 66.3%。9 个种 100%的菌株含有视紫红质基因, 但其中 8 个种所含菌株数均少于 4 株。丰度最高的 2 个种 *E. indicum* 和 *E. profundum* 分别有 100% 和 36.4%的菌株含有视紫红质基因, 而同样丰度较高的 *E. mexicanum* 和 *E. oxidotolerans* 中所有菌株均不含视紫红质基因, 表明视紫红质基因在同属不同种、同种不同菌株之间分布差异较大。

钼辅因子合成蛋白在 *Exiguobacterium* 属中的分布不广泛, 且同属不同种、同种不同菌株之间同样存在分布差异。146 个 *Exiguobacterium* 属菌株中, 41 株含有钼辅因子合成相关基因, 占总菌株数的 28.1%。这 41 株菌分属 7 个种, 占总种数的 26.9%, 其中 6 个种含有 *moaA*、*moaB*、*moaC*、*moaD*、*moaE*、*moeA* 和 *mogA* 基因, 另 1 个种含有 *moaB* 基因, 而所有的种都不含有 *moeB* 基因。在含有上述基因的菌株中, 73.2%的菌株同时含有 *moaA*、*moaB*、*moaC*、*moaD*、*moaE*、*moeA* 和 *mogA* 基因, 其表达蛋白参与钼辅因子合成的全部 3 个步骤^[18-19], 具有合成钼辅因子的完整途径; 其余菌株仅具有 1 个或少数几个编码基因, 均不具备完整的钼辅因子合成途径。而含有完整合成途径的菌株集中于 *E. aurantiacum* (60%)、*E. chiriquicha* (71.4%)、*E. mexicanum* (33.3%)、*E. profundum* (45.5%)、*N5* (100%)、*N6* (100%), 显示出较大的种内差异。

Exiguobacterium 属中乙醛酸分流相关基因分布广泛, 且具有种特异性。146 株菌中, 有 90 株含有乙醛酸分流途径的 2 种关键酶基因, 占总菌株数的 61.6%; 这些菌株分属 16 个种, 占总种数的 61.5%。这 90 株菌除了菌株 HF60 以外均属于 Group II 类群, 且每个种的所有菌株均 100%含有 2 种酶基因, 表明乙醛酸分流途径在该属进化过程中可能较为保守。

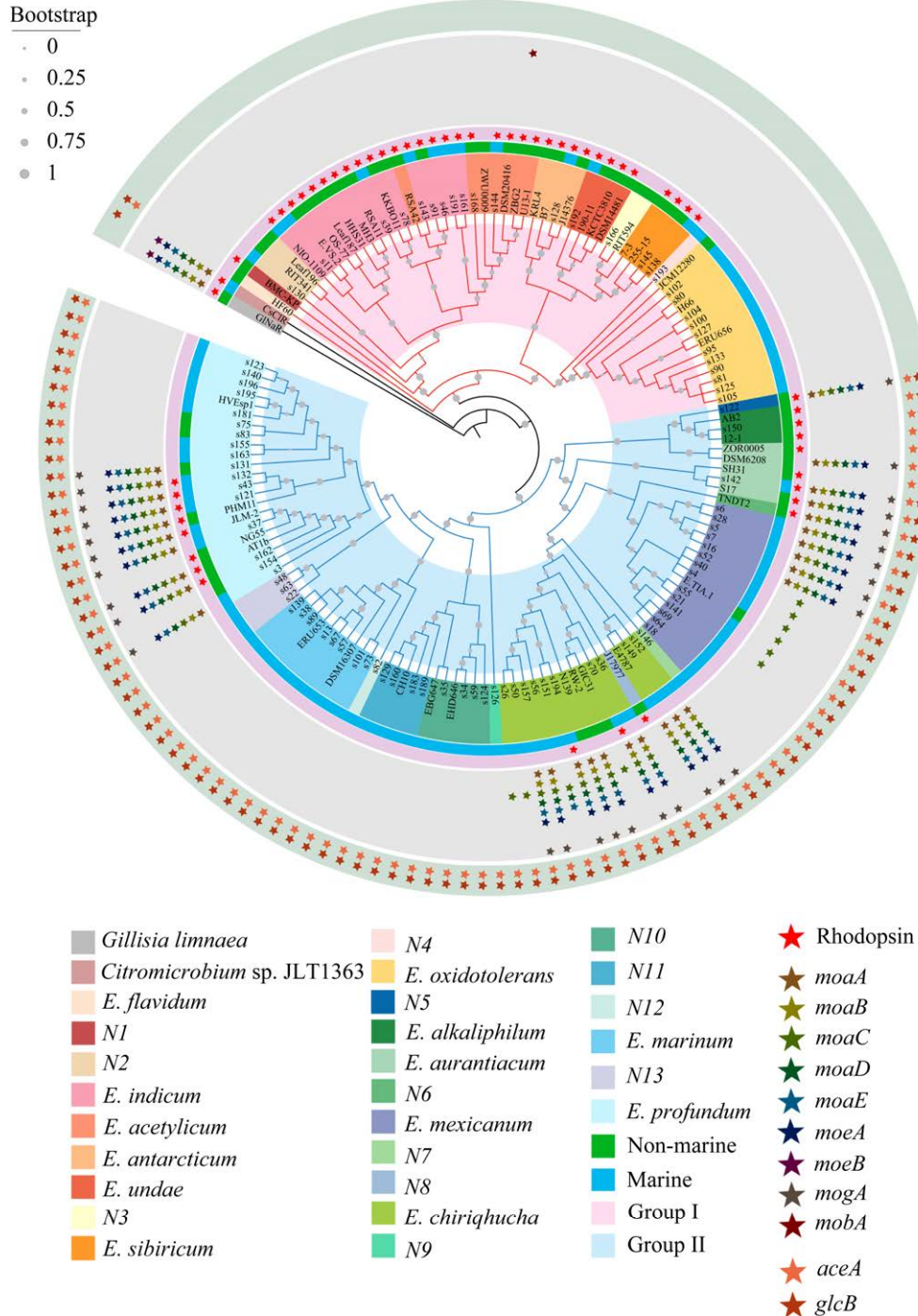


图 2 *Exiguobacterium* 属内视紫红质、钼辅因子合成蛋白及乙醛酸分流相关酶基因的分布

Figure 2 Distribution of rhodopsin genes and 9 genes involved in molybdenum cofactor synthesis, 2 genes required for glyoxylate shunt in *Exiguobacterium* genus. Phylogenetic tree was built using 120 essential single copy protein of 146 *Exiguobacterium* strains and 2 other phyla strains that working as the outgroup. The branch lengths are not proportional to the distance of evolution relatedness for the purpose of a clear view of the branches. The genomes containing rhodopsin and different genes are indicated by different color stars, shown in three outer circles. The non-marine and marine strains are shown by green and blue color in the 4th outer circle, respectively. The genomes belonging to the same species are indicated by the same color in 5th outer to inner circle. The group I genomes have bigger genome size than those of the group II. They are indicated by pink and blue color on the inner circle, respectively.

2.2 视紫红质在 *Exiguobacterium* 属内的系统发育

视紫红质在 *Exiguobacterium* 属中较为保守。参考 Inoue 等^[20]基于细菌视紫红质(bacteriorhodopsin, BR)中位点 85、89、96 的关键保守氨基酸及其在不同视紫红质中的对应保守氨基酸类型对视紫红质进行分类的方式,本研究对系统发育树中的 66 条序列进行了多序列比对,并根据关键保守氨基酸类型将其归类为 6 种不同视紫红质,包括钠离子泵型(保守氨基酸为 NDQ)、氯离子泵型(保守氨基酸为 NTQ)、质子泵-DTD 型(保守氨基酸为 DTD)、质子泵-DTE 型(保守氨基酸为 DTE)、质子泵-DTK 型(保守氨基酸为 DTK)及日光视紫红质(保守氨基酸为 ESL)^[21],同时发现 *Exiguobacterium* 属菌株所含的视紫红质大部分为质子泵-DTK 型。例外的是菌株 s128 和 J14376,这 2 株菌属于 *E. antacticum*,同时含有 2 种不同类型的视紫红质,除了质子泵-DTK 型视紫红质以外,还有日光视紫红质。对上述 2 种视紫红质进行的基因得失分析(图 3,图 4)表明该属菌株具有的质子泵-DTK 型视紫红质属于同一基因家族,且来源于同一祖先基因,在系统发育中通过垂直转移获得,较为保守;而 2 条日光视紫红质序列则属于另一基因家族,且为系统发育过程中获得的外来基因,意味着菌株 s128 和 J14376 中可能存在基因的水平转移。

非海洋生境中的菌株更趋向具有视紫红质。在 146 株 *Exiguobacterium* 属菌株中,分离自海洋生境的菌株多于非海洋生境,但海洋菌株中含有视紫红质的比例低于非海洋菌株(19.4%:69.8%); Group I 中非海洋菌株比例高于海洋(54.4%:45.6%), Group II 中非海洋菌株比例低于海洋(24.7%:75.3%),但 2 个 Group 中非海

洋菌株含有视紫红质的比例都高于海洋菌株(Group I: 68.6%:31.4%; Group II: 65%:35%)。从此结果中可以推断,非海洋生境,即陆地及淡水生境中的 *Exiguobacterium* 属菌株更趋向于具有视紫红质。

2.3 钼辅因子合成蛋白 MoaC 在 *Exiguobacterium* 属内的系统发育

钼辅因子合成蛋白 MoaC 在 *Exiguobacterium* 属中分布稀少,且多分布于海洋生境菌株中。基因组进化树显示,所有钼辅因子合成蛋白中 MoaC 丰度最高,另因其负责钼辅因子合成第一步^[22],故选择 MoaC 作为钼辅因子合成途径的标志来构建系统发育树。如图 5 所示,含有 MoaC 的 40 株菌属于 6 个种,占总菌株数的 27.4%,总种数的 23.1%,可能意味着钼辅因子合成途径在该属中并不广泛,钼酶介导的厌氧氧化磷酸化反应并非 *Exiguobacterium* 属菌株能量代谢的主要途径。这 40 株菌中 70%来自海洋环境,且其中 30 株有完整钼辅因子合成途径的菌株中有 66.7%来自海洋,表明相较于陆地和淡水环境,生活在营养贫瘠的海洋环境中的菌株具有更加丰富的能量代谢途径。

钼辅因子合成蛋白 MoaC 在 *Exiguobacterium* 属部分菌株内保守。MoaC 蛋白系统发育树中大部分菌株的聚类与基因组进化树基本一致,对 MoaC 蛋白进行的基因得失分析(图 4)也表明 *Exiguobacterium* 属所含的 40 条 MoaC 序列均属同一基因家族,且来源于同一祖先基因,在 *Exiguobacterium* 属内通过垂直转移传递。另一方面,该结果也显示 *Exiguobacterium* 属中有大量菌株在进化过程中丢失了 MoaC 蛋白,这佐证了上文中对钼酶介导的厌氧氧化磷酸化反应并非 *Exiguobacterium* 属菌株主要能量代谢途径的推测。

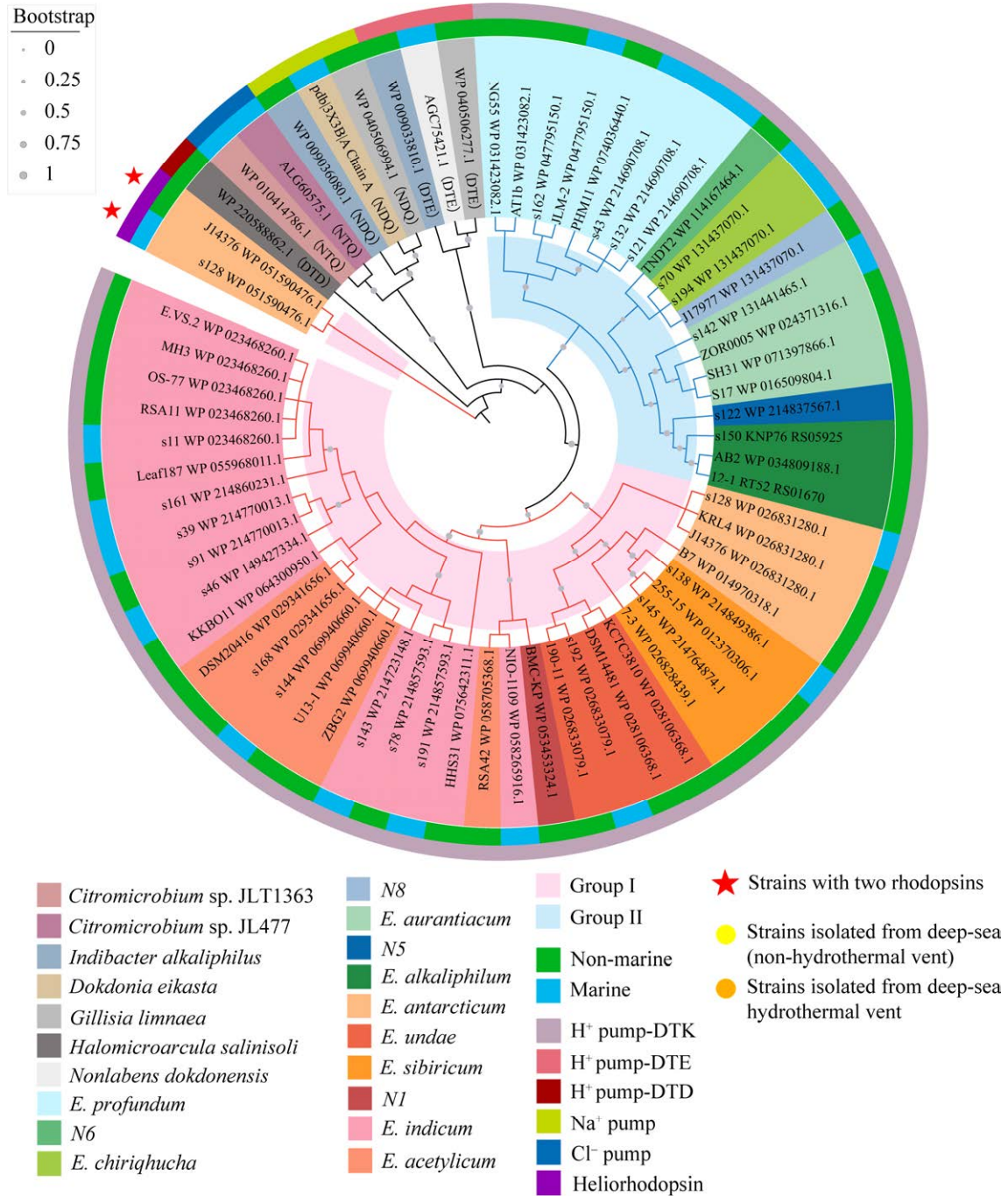


图3 视紫红质在 *Exiguobacterium* 属内的系统发育

Figure 3 The phylogenetic tree of rhodopsins in the genus *Exiguobacterium*. This tree contains 57 rhodopsin sequences of 2 rhodopsin types from *Exiguobacterium* strains and 9 sequences of 4 other rhodopsin types from different phyla. The branch lengths are not proportional to the distance of evolution relatedness. The outer red “★” represents two strains with two different rhodopsins. Different rhodopsin types (classified by conserved amino acid 85, 89, 96) are indicated by different colors, shown in the outer circle. The non-marine and marine strains are shown by green and blue color respectively in the 2nd outer circle, with yellow and orange circles showing four bacteria isolated from deep-sea environments. The strains belonging to the same species are indicated by the same color in 3rd outer circle, and the same species is indicated in the same color in this tree and in figure 2. The inner circle represents the classification of the 55 strains, pink represents Group I, while blue represents Group II.

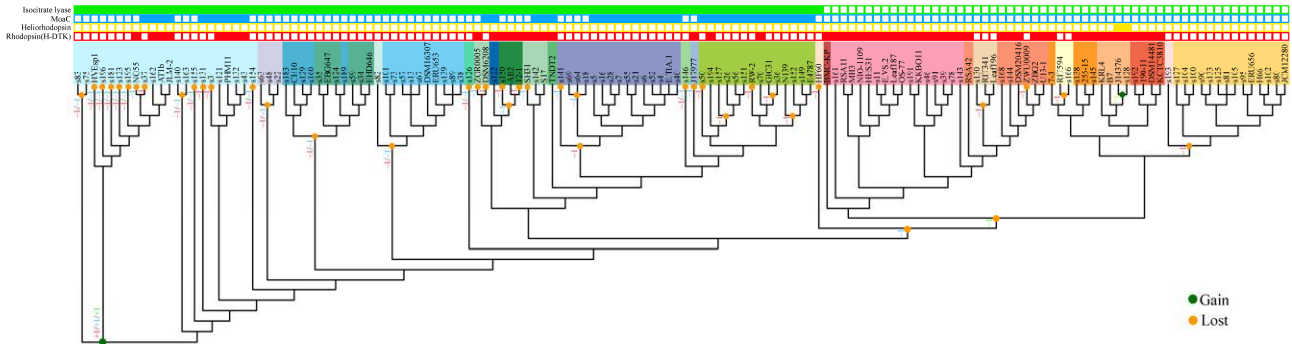


图 4 *Exiguobacterium* 属 146 株菌中视紫红质、钼辅因子合成蛋白 MoaC、异柠檬酸裂解酶的基因得失

Figure 4 Gene gain and loss of rhodopsin, MoaC and isocitrate lyase in 146 *Exiguobacterium* strains. The boxes on the top represent the gene families of H-DTK rhodopsin (red), heliorhodopsin (yellow), MoaC (blue) and isocitrate lyase (green). Solid and hollow boxes indicate the existence or absence of corresponding gene families, respectively. The dots at the nodes indicate the occurrence of gene gain (green) or loss (orange) events. The numbers on the branches indicate the number of genes gained or lost at that node, with the color of number corresponding to the gene family. The tree topology is based on maximum likelihood tree generated from FastTree.

2.4 异柠檬酸裂解酶在 *Exiguobacterium* 属内的系统发育

由 *aceA* 编码的异柠檬酸裂解酶在 *Exiguobacterium* 属中分布广泛, 且主要集中于同一遗传类群中。乙醛酸分流途径的第一步由异柠檬酸裂解酶介导^[23], 故选择异柠檬酸裂解酶作为该途径的标志构建系统发育树。如图 6 所示, 146 株菌中有 90 株具有潜在的异柠檬酸裂解酶, 表明在 *Exiguobacterium* 属中乙醛酸分流途径广泛存在。值得注意的是, 除了菌株 HF60 属于 Group I 的 *E. flavidum*, 其余 89 株菌均属于 Group II, 这可能意味着异柠檬酸裂解酶及其参与的乙醛酸分流途径在 *Exiguobacterium* 属的进化过程中通过垂直转移传递。

异柠檬酸裂解酶在 *Exiguobacterium* 属菌株进化过程中较为保守。将系统发育树中的分支与基因组进化树进行对照, 发现大部分菌株的聚类

关系与基因组进化树基本一致。对异柠檬酸裂解酶的基因得失分析(图 4)表明该属菌株具有的 90 条异柠檬酸裂解酶序列属于同一基因家族, 且来源于同一祖先基因。虽然在系统发育过程中部分菌株丢失了该基因, 但大部分菌株通过垂直转移保留了该基因, 且未发生来自外界的基因转移, 表明异柠檬酸裂解酶在 *Exiguobacterium* 属中较为保守, 尤其是在 Group II 类群中。此外, 蛋白质序列比对结果显示, 除菌株 HF60 的序列相似性在 80% 以上, 其余 89 条序列与 SWIR-3 中异柠檬酸裂解酶序列的相似性均在 90% 以上, 也证明了该蛋白在 *Exiguobacterium* 属菌株进化过程中的保守性。这种序列高相似性意味着构建系统发育树时氨基酸序列的微小差异将被放大, 可能导致少数菌株聚类出现偏差, 这可能是造成蛋白质系统发育树与基因组进化树聚类存在一定差异的原因。

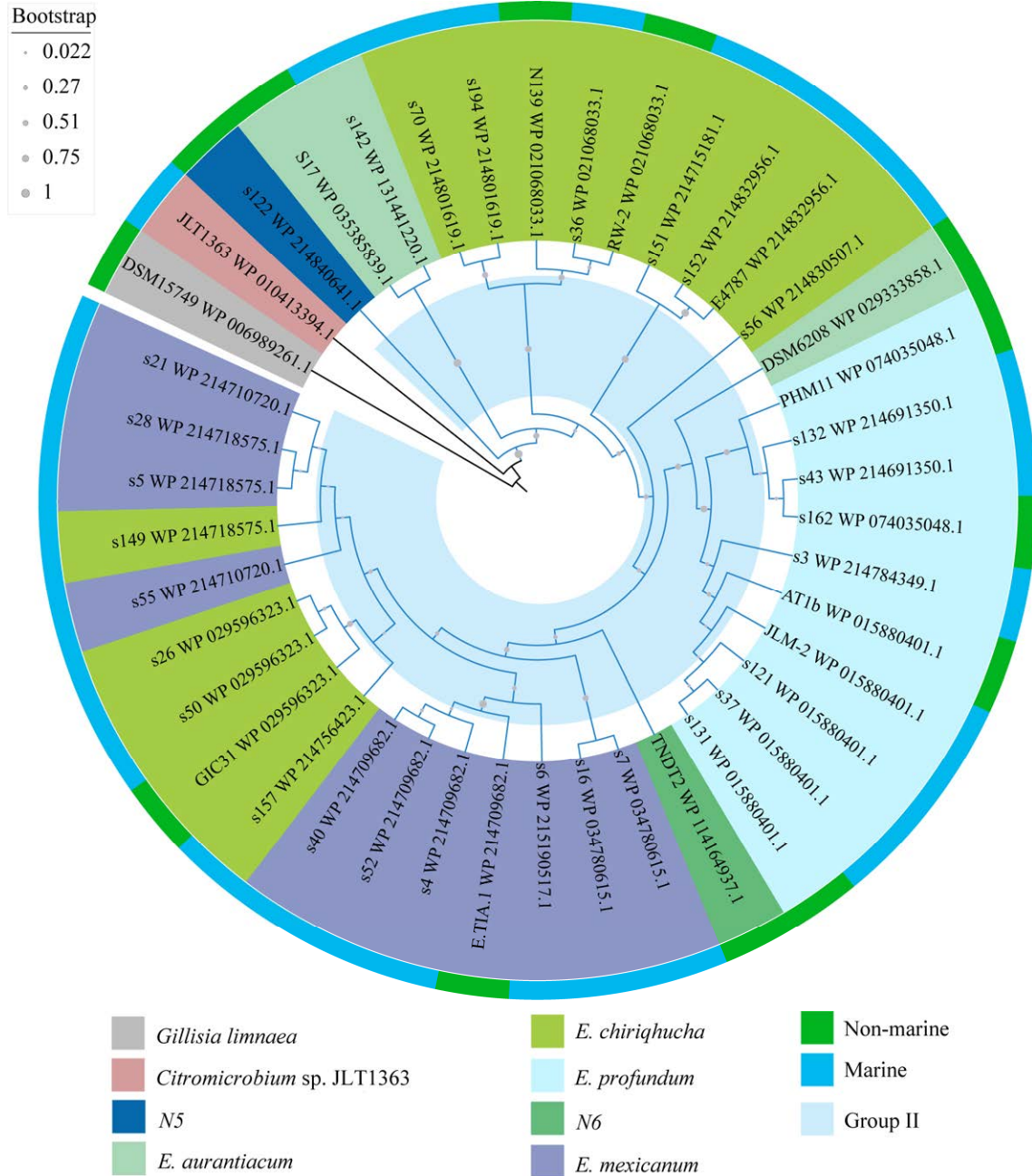


图 5 MoaC 在 *Exiguobacterium* 属内的系统发育

Figure 5 The phylogenetic tree of MoaC in the genus *Exiguobacterium*. This tree contains 40 MoaC sequences from *Exiguobacterium* strains and 2 from different phyla as the outgroup. The branch lengths are not proportional to the distance of evolution relatedness. The non-marine and marine strains are shown by green and blue color respectively in the outer circle. The strains belonging to the same species are indicated by the same color in 2nd outer circle, and the same species is indicated in the same color in this tree and in figure 2. The inner circle represents the classification of the *Exiguobacterium* strains, indicating that all of the 40 strains belong to Group II.

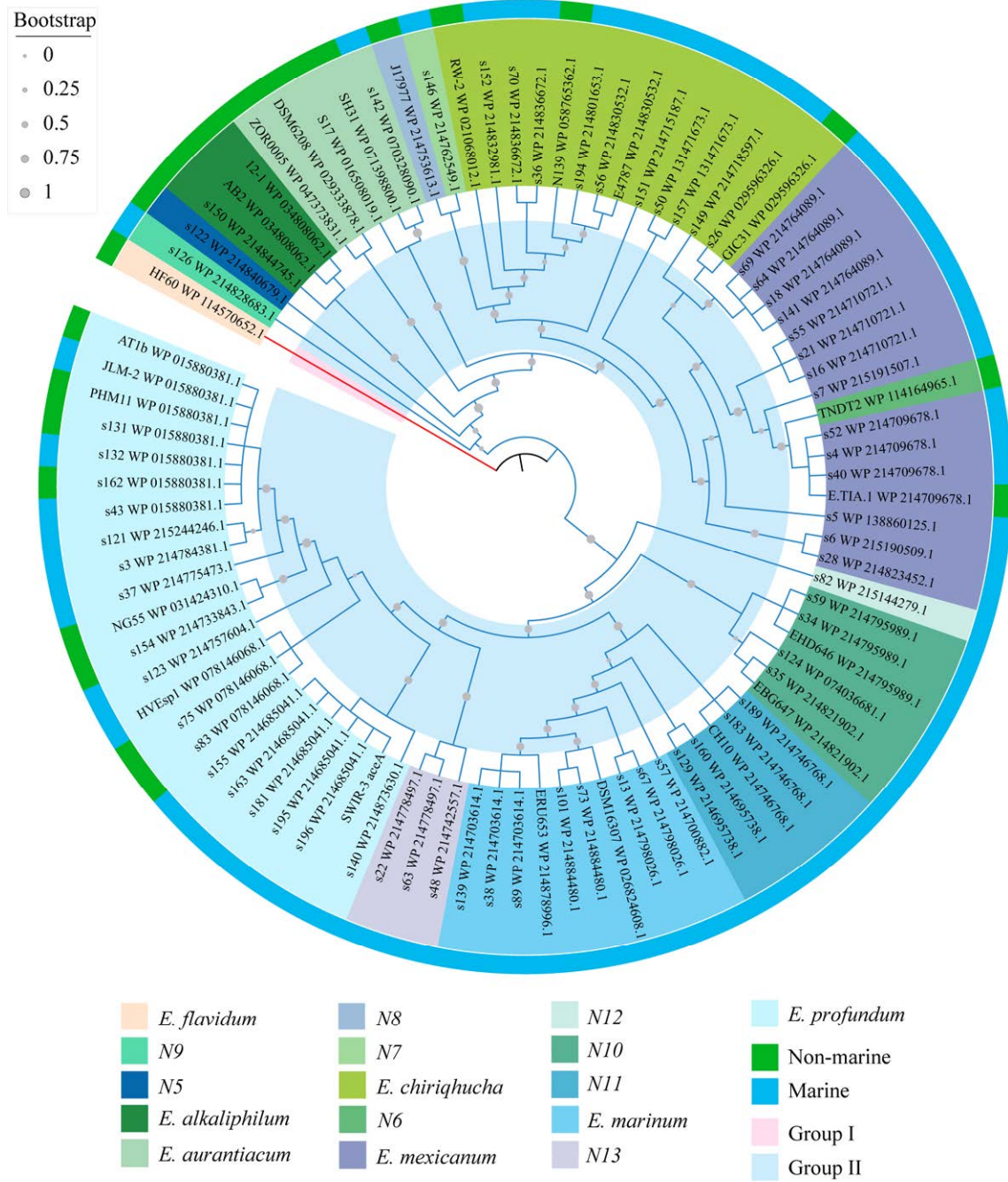


图 6 *aceA* 编码的异柠檬酸裂解酶在 *Exiguobacterium* 属内的系统发育

Figure 6 The phylogenetic tree of isocitrate lyase (coded by *aceA*) in the genus *Exiguobacterium*. This tree contains 91 isocitrate lyase sequences from *Exiguobacterium* strains. The branch lengths are not proportional to the distance of evolution relatedness. The non-marine and marine strains are shown by green and blue color respectively in the outer circle. The strains belonging to the same species are indicated by the same color in 2nd outer circle, and the same species is indicated in the same color in this tree and in figure 2. The inner circle represents the classification of the *Exiguobacterium* strains, pink represents Group I, while blue represents Group II.

3 讨论

3.1 视紫红质光营养型能量代谢途径对 *Exiguobacterium* 属菌株的意义

视紫红质基因多存在于陆地及淡水环境中,而在海洋环境中较少,这可能意味着生活在有光环境中的细菌更趋向于具有视紫红质光营养型能量代谢途径,以增加自身生存优势。相比陆地和淡水环境,海洋环境中光分布的区域极为有限,海平面以下 100 m 内为透光层,可支撑浮游植物和大型藻类的光合作用,1 000 m 以内光合作用产生的能量已不足以弥补呼吸作用的消耗,1 000 m 以下为完全无光环境。而视紫红质多吸收蓝绿光^[24-27],意味着视紫红质光能菌能够利用光能的区域主要集中于上层海水中。除了上层海水以外,还有研究发现深海热液喷口可发出可见光和红外光,可能存在潜在的光能微生物^[28]。本课题组在对采集自深海热液喷口的样品进行的宏基因组分析中发现了 4 条潜在的 PR (质子泵-DTE 型)序列,证明了这一观点,且这 4 条序列根据关键氨基酸判断其中 3 条为蓝光吸收型,1 条为绿光吸收型^[29]。本研究统计的具有视紫红质的菌株多来源于陆地、淡水或上层海水,仅有 4 株来自深海,且其中 2 株来自热液喷口(图 3),表明菌株是否含有视紫红质介导的光营养能量代谢途径与其分布环境中是否有光存在相关性,环境中存在光时菌株更可能具有光能代谢途径。此外,有研究表明 ESR (质子泵-DTK 型)相比其他质子泵型视紫红质能够在更宽的 pH 范围内发挥功能^[30],这可能也帮助了 *Exiguobacterium* 属菌株适应多变的环境,尤其是深海热液口附近多变的 pH 环境。

3.2 基于钼酶的厌氧呼吸型能量代谢途径对 *Exiguobacterium* 属菌株的意义

钼酶催化厌氧呼吸的能力可能是

Exiguobacterium 属菌株适应极端环境的重要手段。同时,生活在厌氧环境中的细菌在进化过程中可能倾向于获取更多的厌氧能量代谢途径以提高自身生存率。许多细菌具备在厌氧条件下进行呼吸的能力,这与其利用多种底物作为氧化磷酸化末端电子受体的能力有关^[31],有机化合物(如 DMSO、TMAO)、无机化合物(如硝酸盐和硫)、甚至有毒金属都可以作为细菌厌氧呼吸的电子受体,在这类能量代谢反应中,DMSOR、SO 家族的多种钼酶起到重要的催化作用^[32-35]。此外,研究表明钼酶可以在大范围的氧化还原电位中发挥功能,如硫代硫酸盐氧化酶可以在 -400 mV 的电位催化反应,而高氯酸还原酶等能够在高达 700 mV 的电位下保持活性并进行催化^[19],这也为细菌在极端酸性或碱性环境下的生存提供了保障。本研究发现具有钼辅因子合成途径的菌株分离生境多样,包括深海热液喷口、盐碱地和废水等缺氧、pH 过酸或过碱的极端环境,这表明钼酶在宽 pH 范围内以不同底物作为电子受体催化厌氧呼吸的能力可能是帮助 *Exiguobacterium* 属菌株适应不同生境,尤其是较为苛刻的生境的重要手段。此外,相比于陆地和淡水环境,分离自缺氧的海洋环境中的菌株含有钼辅因子合成途径的比例略高,这可能是海洋细菌适应缺氧环境的一种进化方向。

另一方面,研究发现钼辅因子合成蛋白在 *Exiguobacterium* 属内的分布主要集中于少数几个种,属内有数个菌株不具备完整的合成途径,仅有单个或数个相关蛋白,可能来自于基因的水平转移^[36],在这类菌株中是否存在其他蛋白能够代替缺失的钼辅因子合成蛋白行使功能亟待进一步验证。*Exiguobacterium* 属内还有部分菌株完全不具备钼辅因子合成途径,这与目前研究普遍认为的钼酶在几乎所有原核和真核生物中广泛存在^[36]的观点存在出入,对于这类菌株而

言,是否有其他蛋白能够代替钼酶在厌氧呼吸代谢中起作用,抑或是该菌株可通过外源途径获取钼酶,这些问题仍需进一步研究。

3.3 底物代谢途径中乙醛酸分流对 *Exiguobacterium* 属菌株的意义

乙醛酸分流可能是具有较小基因组的菌株应对胁迫的重要方式。*Exiguobacterium* 属内乙醛酸分流途径的分布具有较高的种特异性,基因组进化树两大分支中的 Group II 全部具有相关酶,而 Group I 则除菌株 HF60 以外均不具有。Zhang 等^[1]的研究表明 Group I 的菌株比 Group II 具有更大的基因组,这是由于 Group I 菌株具有更丰富的转运蛋白家族,用于应对陆地环境中的复杂胁迫;另一方面,有研究表明海洋细菌为了适应营养贫瘠的环境倾向于简化基因组,以减少在非必需遗传物质上的代谢^[37-38],这可能也导致了 Group II 菌株具有更小的基因组。据此,推测 Group II 菌株在进化过程中简化了基因组,保留了相对较少的抗胁迫手段,作为替代,乙醛酸分流成为了它们应对胁迫的一种重要且普遍的方式。有研究发现异柠檬酸裂解酶和苹果酸合酶的表达在受到环境胁迫时出现上调,如铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)在受到氧化胁迫时 *aceA* 表达上调,经抗生素处理后 *glcB* 表达上调,而在铁饥饿条件下 *aceA* 和 *glcB* 表达均上调^[39];结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)受氧化胁迫后乙醛酸分流也出现了上调^[40]。在含有乙醛酸分流途径的 *Exiguobacterium* 属菌株中可能存在类似机制,帮助它们抵抗不同的环境胁迫。此外,乙醛酸分流是细菌利用乙酸、脂肪酸等作为碳源时必不可少的代谢途径^[23,41],还能够调控碳通量在能量代谢和生物量合成之间的平衡^[42],这同样有助于 *Exiguobacterium* 属更好地适应营养贫瘠的生活环境。

4 总结与展望

本研究从能量代谢角度揭示了 *Exiguobacterium* 属适应环境的机制,分析了基于视紫红质的光营养型能量代谢途径、基于钼酶的厌氧呼吸型能量代谢途径和底物代谢营养型能量代谢途径中的乙醛酸分流途径在该属中的分布情况,并探讨了以上 3 种能量代谢途径在该属菌株的适应机制中可能发挥的功能。这为解释其他分布广泛的细菌对不同环境的适应机制提供了一个思路,也为分析细菌在极端环境中的生存策略提供了参考。此外,能量代谢途径在不同种、不同菌株之间的分布差异也提示了仅通过种属鉴定结果推测目的菌株的代谢类型有较大局限性,要确定代谢途径是否存在需通过相关蛋白或酶的存在与否进行判断。

在本研究中也存在问题尚未得到解答:3 种代谢途径在 *Exiguobacterium* 属内的分布均存在一定的种特异性或菌株特异性,同属不同种、同种不同菌株之间代谢途径存在差异,其原因尚不明确。本研究推测这可能受到进化和环境的双重影响,在进化过程中,菌株当前所处生境中不必要的代谢途径被精简,然而环境对进化过程产生的影响及其作用方式目前尚不明确。为此,在后续研究中拟扩大样本量,加入与该属亲缘关系较近的其他属菌株,观察这种特异性是否普遍存在于细菌中,并进一步研究该属不同能量代谢途径关键蛋白或关键酶的系统发育情况,分析菌株具有的代谢途径的来源及环境因素在其进化过程中的影响。

致谢

感谢陈红(上海交通大学)在课题组前期工作中从深海热液喷口样品中分离出 18 株 *E. profundum* 菌株,并参与了部分菌株的测序工作。感谢国家基因库(China National GeneBank)提供的分析平台。

参考文献

- [1] ZHANG DC, ZHU ZL, LI YJ, LI XD, GUAN ZY, ZHENG JS. Comparative genomics of *Exiguobacterium* reveals what makes a cosmopolitan bacterium[J]. *mSystems*, 2021, 6(4): e0038321.
- [2] KIRCHMAN DL, HANSON TE. Bioenergetics of photoheterotrophic bacteria in the oceans[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2013, 5(2): 188-199.
- [3] HADDOCK BA. Microbial energetics[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 1980, 290(1040): 329-339.
- [4] FERNIE AR, CARRARI F, SWEETLOVE LJ. Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2004, 7(3): 254-261.
- [5] PETROVSKAYA LE, BALASHOV SP, LUKASHEV EP, IMASHEVA ES, DIOUMAEV AK, RUBIN AB, DOLGIKH DA, GORDELIY VI, LANYI JK, KIRPICHNIKOV MP. ESR—a retinal protein with unusual properties from *Exiguobacterium sibiricum*[J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2015, 80(6): 688-700.
- [6] DICK GJ. The microbiomes of deep-sea hydrothermal vents: distributed globally, shaped locally[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17(5): 271-283.
- [7] PARKS DH, IMELFORT M, SKENNERTON CT, HUGENHOLTZ P, TYSON GW. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes[J]. *Genome Research*, 2015, 25(7): 1043-1055.
- [8] CHAUMEIL PA, MUSSIG AJ, HUGENHOLTZ P, PARKS DH. GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database[J]. *Bioinformatics*, 2020, 36(6): 1925-1927.
- [9] JAIN C, RODRIGUEZ-R LM, PHILLIPPY AM, KONSTANTINIDIS KT, ALURU S. High throughput ANI analysis of 90 K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 5114.
- [10] PRICE MN, DEHAL PS, ARKIN AP. FastTree 2: approximately maximum-likelihood trees for large alignments[J]. *PLoS One*, 2010, 5(3): e9490.
- [11] CARMEL L, ROGOZIN IB, WOLF YI, KOONIN EV. A maximum likelihood method for reconstruction of the evolution of eukaryotic gene structure[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2009, 541: 357-371.
- [12] LETUNIC I, BORK P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(W1): W293-W296.
- [13] HU G, KURGAN L. Sequence similarity searching[J]. *Current Protocols in Protein Science*, 2019, 95(1): e71.
- [14] KUMAR S, STECHER G, LI M, KNYAZ C, TAMURA K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [15] EMMS DM, KELLY S. OrthoFinder: solving fundamental biases in whole genome comparisons dramatically improves orthogroup inference accuracy[J]. *Genome Biology*, 2015, 16(1): 157.
- [16] LIN HY, YU M, WANG XL, ZHANG XH. Comparative genomic analysis reveals the evolution and environmental adaptation strategies of *Vibrios*[J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 135.
- [17] CSÜÖS M. Count: evolutionary analysis of phylogenetic profiles with parsimony and likelihood[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(15): 1910-1912.
- [18] IOBBI-NIVOL C, LEIMKÜHLER S. Molybdenum enzymes, their maturation and molybdenum cofactor biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013, 1827(8-9): 1086-1101.
- [19] LEIMKÜHLER S, IOBBI-NIVOL C. Bacterial molybdoenzymes: old enzymes for new purposes[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2016, 40(1): 1-18.
- [20] INOUE K, KATO Y, KANDORI H. Light-driven ion-translocating rhodopsins in marine bacteria[J]. *Trends in Microbiology*, 2015, 23(2): 91-98.
- [21] PUSHKAREV A, INOUE K, LAROM S, FLORES-URIBE J, SINGH M, KONNO M, TOMIDA S, ITO S, NAKAMURA R, TSUNODA SP, PHILOSOF A, SHARON I, YUTIN N, KOONIN EV, KANDORI H, BÉJÀ O. A distinct abundant group of microbial rhodopsins discovered using functional metagenomics[J]. *Nature*, 2018, 558(7711): 595-599.
- [22] HOVER BM, TONTHAT NK, SCHUMACHER MA, YOKOYAMA K. Mechanism of pyranopterin ring formation in molybdenum cofactor biosynthesis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(20): 6347-6352.
- [23] DOLAN SK, WELCH M. The glyoxylate shunt, 60 years on[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2018, 72: 309-330.
- [24] TRIVEDI S, CHOUDHARY OP, GHARU J. Different proposed applications of bacteriorhodopsin[J]. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences*, 2011, 5(1): 35-40.
- [25] PETROVSKAYA LE, LUKASHEV EP, CHUPIN VV, SYCHEV SV, LYUKMANOVA EN, KRYUKOVA EA, ZIGANSHIN RH, SPIRINA EV, RIVKINA EM, KHATYPOV RA, EROKHINA LG, GILICHINSKY DA, SHUVALOV VA, KIRPICHNIKOV MP. Predicted bacteriorhodopsin from *Exiguobacterium sibiricum* is a functional proton pump[J]. *FEBS Letters*, 2010, 584(19): 4193-4196.

- [26] 王宁, 兰艳黎, 王伟武. 变形菌视紫红质十年的回顾与展望[J]. 生物物理学报, 2010, 26(11): 1036-1046.
WANG N, LAN YL, WANG WW. The review and prospect of proteorhodopsin in ten years[J]. Acta Biophysica Sinica, 2010, 26(11): 1036-1046 (in Chinese).
- [27] WANG WW, SINESHCHEKOV OA, SPUDICH EN, SPUDICH JL. Spectroscopic and photochemical characterization of a deep ocean proteorhodopsin[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(36): 33985-33991.
- [28] WHITE SN, CHAVE AD, REYNOLDS GT. Investigations of ambient light emission at deep-sea hydrothermal vents[J]. Journal of Geophysical Research: Solid Earth, 2002, 107(B1): 2001.
- [29] CHEN H, LI DH, JIANG AJ, LI XG, WU SJ, CHEN JW, QU MJ, QI XQ, DAI J, ZHAO R, ZHANG WJ, LIU SS, WU LF. Metagenomic analysis reveals wide distribution of phototrophic bacteria in hydrothermal vents on the ultraslow-spreading southwest Indian Ridge[J]. Marine Life Science & Technology, 2022, 4(2): 255-267.
- [30] SASAKI S, TAMOGAMI J, NISHIYA K, DEMURA M, KIKUKAWA T. Replaceability of Schiff base proton donors in light-driven proton pump rhodopsins[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2021, 297(3): 101013.
- [31] HAREL A, HÄGGBLÖM MM, FALKOWSKI PG, YEE N. Evolution of prokaryotic respiratory molybdoenzymes and the frequency of their genomic co-occurrence[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2016, 92(12): fiw187.
- [32] van VLIET DM, von MEIJENFELDT FAB, DUTILH BE, VILLANUEVA L, SINNINGHE DAMSTÉ JS, STAMS AJM, SÁNCHEZ-ANDREA I. The bacterial sulfur cycle in expanding dysoxic and euxinic marine waters[J]. Environmental Microbiology, 2021, 23(6): 2834-2857.
- [33] BARRETT EL, KWAN HS. Bacterial reduction of trimethylamine oxide[J]. Annual Review of Microbiology, 1985, 39: 131-149.
- [34] COELHO C, ROMÃO MJ. Structural and mechanistic insights on nitrate reductases[J]. Protein Science: a Publication of the Protein Society, 2015, 24(12): 1901-1911.
- [35] McGRATH AP, LAMING EL, CASAS GARCIA GP, KVANSAKUL M, GUSS JM, TREWHELLA J, CALMES B, BERNHARDT PV, HANSON GR, KAPPLER U, MAHER MJ. Structural basis of interprotein electron transfer in bacterial sulfite oxidation[J]. eLife, 2015, 4: e09066.
- [36] PENG T, XU YZ, ZHANG Y. Comparative genomics of molybdenum utilization in prokaryotes and eukaryotes[J]. BMC Genomics, 2018, 19(1): 691.
- [37] GETZ EW, TITHI SS, ZHANG LQ, AYLWARD FO. Parallel evolution of genome streamlining and cellular bioenergetics across the marine radiation of a bacterial phylum[J]. mBio, 2018, 9(5): e01089-18.
- [38] GROTE J, THRASH JC, HUGGETT MJ, LANDRY ZC, CARINI P, GIOVANNONI SJ, RAPPÉ MS. Streamlining and core genome conservation among highly divergent members of the SAR11 clade[J]. mBio, 2012, 3(5): e00252-12.
- [39] HA S, SHIN B, PARK W. Lack of glyoxylate shunt dysregulates iron homeostasis in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Microbiology, 2018, 164(4): 587-599.
- [40] WU MY, SHAN WY, ZHAO GP, LYU LD. H₂O₂ concentration-dependent kinetics of gene expression: linking the intensity of oxidative stress and mycobacterial physiological adaptation[J]. Emerging Microbes & Infections, 2022, 11(1): 573-584.
- [41] COZZONE AJ, EL-MANSI M. Control of isocitrate dehydrogenase catalytic activity by protein phosphorylation in *Escherichia coli*[J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2005, 9(3-4): 132-146.
- [42] BOYLE NR, SENGUPTA N, MORGAN JA. Metabolic flux analysis of heterotrophic growth in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. PLoS One, 2017, 12(5): e0177292.

吴龙飞, 中国科学院深海科学与工程研究所研究员, 法国研究中心马赛地中海微生物研究所主任研究员, 主要从事微生物代谢、海洋趋磁细菌生理、生态及基因组学特征、深渊微生物生命特征及对极端环境的适应机制研究, 主持并完成欧盟第五、第六框架细胞工程计划、人类前沿科学计划等多项国际科研项目, 在国际刊物上发表论文 100 余篇。

