



# 一株太平洋表层海水来源阿拉伯海假交替单胞菌 N1230-9 的全基因组测序及比较基因组学分析

徐莹, 兰肖敏, 周敏婕, 陈秀暖, 金佳凡, 朱四东, 杨季芳, 陈吉刚\*

浙江万里学院生物与环境学院, 浙江 宁波 315100

徐莹, 兰肖敏, 周敏婕, 陈秀暖, 金佳凡, 朱四东, 杨季芳, 陈吉刚. 一株太平洋表层海水来源阿拉伯海假交替单胞菌 N1230-9 的全基因组测序及比较基因组学分析[J]. 微生物学报, 2024, 64(6): 1691-1703.

XU Ying, LAN Xiaomin, ZHOU Minjie, CHEN Xiunuan, JIN Jiafan, ZHU Sidong, YANG Jifang, CHEN Jigang. Genome sequencing and comparative genomic analysis of *Pseudoalteromonas arabiensis* N1230-9 isolated from the surface seawater of the Pacific Ocean[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(6): 1691-1703.

**摘要:** 【目的】阐述阿拉伯海假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas arabiensis*)的分子进化与生态适应策略。【方法】借助 Illumina HiSeq X Ten 和 Oxford Nanopore PromethION 测序平台对一株分离自太平洋表层海水的菌株 *Pseudoalteromonas arabiensis* N1230-9 进行全基因组测序, 利用相关生物信息学分析软件对原始数据进行组装和基因组注释, 并与一株分离自深海沉积物环境的模式菌株 *Pseudoalteromonas arabiensis* JCM 17292 进行比较基因组分析。【结果】菌株 N1230-9 基因组由 2 条染色体组成, 基因组大小为 4 627 470 bp, G+C 含量为 40.85%, 共编码 4 202 个蛋白。功能基因注释结果显示, 菌株 N1230-9 具有适应海洋环境的多种类型功能基因, 包括重金属抗性基因、多种铁离子摄取系统编码基因、多种噬菌体防御系统编码基因、种类丰富的水解酶编码基因、多种碳水化合物代谢相关基因, 以及数量众多的二元信号传导系统编码基因。通过比较基因组分析发现, 菌株 N1230-9 和菌株 JCM 17292 拥有适应不同生态位的特有基因, 这些基因主要涉及血红素摄取、重金属抗性、噬菌体防御、二元信号系统传导和横向基因水平转移。【结论】来自表层海水的菌株 *P. arabiensis* N1230-9 已演化出了适应其生态位的特有基因。

**关键词:** 太平洋; 假交替单胞菌; 全基因组测序; 比较基因组分析

资助项目: 浙江省生物工程一流学科创新基金(CX2022026); 宁波市自然科学基金(2023J301); 全球变化与海气相互作用专项(二期)(GASI-04-HYDZ-02)

This work was supported by the First-class Discipline of Biological Engineering of Zhejiang Province (CX2022026), the Ningbo Natural Science Foundation (2023J301), and the National Program on Global Change and Air-sea Interaction (Phase II) (GASI-04-HYDZ-02).

\*Corresponding author. E-mail: jgchen@zww.edu.cn

Received: 2023-11-01; Accepted: 2024-01-19; Published online: 2024-01-22

# Genome sequencing and comparative genomic analysis of *Pseudoalteromonas arabiensis* N1230-9 isolated from the surface seawater of the Pacific Ocean

XU Ying, LAN Xiaomin, ZHOU Minjie, CHEN Xiunuan, JIN Jiafan, ZHU Sidong, YANG Jifang, CHEN Jigang\*

College of Biological & Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, Zhejiang, China

**Abstract:** [Objective] To detail the molecular evolution and ecological adaptation of *Pseudoalteromonas arabiensis*. [Methods] Illumina HiSeq X Ten and Oxford Nanopore PromethION were used for the whole genome sequencing of *Pseudoalteromonas arabiensis* N1230-9 isolated from the surface seawater of the Pacific Ocean. Bioinformatics tools were used to assemble and annotate the original sequencing data, and the type strain *Pseudoalteromonas arabiensis* JCM 17292 was used for comparative genomic analysis. [Results] The genome of strain N1230-9 consisted of two chromosomes, with a size of 4 627 470 bp and the G+C content of 40.85%, encoding a total of 4 202 proteins. Genome annotation showed that strain N1230-9 carried functional genes contributing to the adaptation to the marine environment. These genes were mainly involved in heavy metal resistance, iron-uptake systems, anti-phage defense systems, hydrolytic enzymes, carbohydrate metabolism, and two-component signaling systems. Comparative genomic analysis revealed that strain N1230-9 and strain JCM 17292 possessed unique genes conferring adaptation to different ecological niches. These genes were primarily involved in heme uptake, heavy metal resistance, anti-phage defense, two-component signaling, and horizontal gene transfer. [Conclusion] *P. arabiensis* N1230-9 isolated from surface seawater has evolved unique genes for adaptation to its ecological niche.

**Keywords:** Pacific Ocean; *Pseudoalteromonas arabiensis*; whole genome sequencing; comparative genome analysis

假交替单胞菌属 (*Pseudoalteromonas*) 成员广泛分布于全球海洋多种生境, 存在寄生、共生、颗粒附着和营浮游生活等多种生活方式<sup>[1]</sup>。它们是海洋细菌群落的重要组成部分, 约占海洋表层和深海细菌群落总数的 2% 和 14%<sup>[2]</sup>, 以及约占颗粒附着细菌群落的 20%<sup>[3]</sup>。假交替单胞菌属中不但存在能适应深海和南北极等极端环境的种群<sup>[4-6]</sup>, 也含有能产生具有生物活性天然产物的种群<sup>[7-9]</sup>。假交替单胞菌普遍拥有 2 套染色体, 采用特殊的基因组复制策略, 并展现

出多样的营养物代谢能力<sup>[10-11]</sup>。

通过基因组测序和比较基因组学分析, 加深了我们对假交替单胞菌的分子进化、代谢潜力和生态适应的理解。如对南极细菌游海假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas haloplanktis*) TAC125 的基因组测序分析, 探究了该菌株的低温适应策略<sup>[5]</sup>; 对分离自海藻表面的 *Pseudoalteromonas tunicata* 的基因组分析, 阐述了该种群的藻类附着生活策略<sup>[12]</sup>; 对深海沉积细菌 *Pseudoalteromonas* sp. SM9913 的基因组分

析, 探讨了该菌株深海沉积物表面附着的生存策略<sup>[13]</sup>。

对同种内不同生态型菌株进行比较基因组学分析, 可更精确地理解假交替单胞菌的分子进化和生态适应<sup>[14]</sup>。阿拉伯海假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas arabiensis*) 在近海及远海表层海水和沉积物环境中均有分布 (<https://mccc.org.cn/BacteriaService/Service1>)<sup>[15]</sup>, 并可能存在共生、颗粒附着和浮游生活等多种生活方式<sup>[3]</sup>, 因此该种群是研究假交替单胞菌分子进化和生态适应的理想模式菌株。为此, 本研究以分离自太平洋表层海水的 *P. arabiensis* N1230-9 为目标菌株, 通过基因组测序和比较基因组学分析, 探讨了同种内 2 个不同生态型的菌株适应不同微环境的遗传学差异。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

实验菌株 N1230-9 为本实验室成员在参加大洋 54 航次科考期间, 利用以几丁质为唯一碳源的培养基, 从太平洋某站位 (178.71°W, 12.51°N) 表层海水中筛选获得的一株具有几丁质降解功能的菌株。该菌株以甘油菌的形式保存于实验室的 -80 °C 超低温冰箱。

### 1.2 试剂和培养基

无机盐溶液 (g/L):  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.500,  $\text{NaCl}$  30.000,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  3.000,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  2.000,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.200,  $\text{CaCl}_2$  0.010,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.006,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.005,  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.004, Tris 6.000。

MM 培养基: 无机盐溶液中添加以某种碳源为唯一碳源的培养基, 该碳源包括胶体几丁质、淀粉、糊精、麦芽糊精、棉子糖、纤维二糖、海藻糖、麦芽糖、蜜二糖、乳糖、蔗糖、D-葡萄糖、D-半乳糖、N-乙酰氨基葡萄糖、N-

乙酰氨基半乳糖、D-核糖、D-木糖、D-果糖、L-鼠李糖、L-岩藻糖、L-阿拉伯糖、D-山梨醇、木糖醇、D-葡萄糖酸盐、乳酸盐、柠檬酸钠、琥珀酸钠、丙酮酸钠、L-苹果酸、N-乙酰胞壁酸、琥珀酸和牛磺酸共 32 种碳源中的任意一种, 其中胶体几丁质的添加终浓度为 3% (质量体积分数), 淀粉、糊精和麦芽糊精添加终浓度均为 0.1% (质量体积分数), 其余碳源的添加终浓度均为 10 mmol/L。

血红素培养基: 将无机盐溶液中的  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  替换为氯化血红素 (0.006 g/L), 并加入 10 mmol/L 终浓度的 N-乙酰氨基葡萄糖。

氯化铁培养基: 无机盐溶液中加入 10 mmol/L 终浓度的 N-乙酰氨基葡萄糖。

无铁培养基: 不含  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  的无机盐溶液中加入终浓度为 10 mmol/L 的 N-乙酰氨基葡萄糖。

Marine Broth 2216 培养基, BD Difco 公司; 几丁质、N-乙酰胞壁酸, Sigma-Aldrich® 公司; 氯化血红素, 生工生物工程(上海)股份有限公司。氯化血红素用 70%乙醇溶解后, 采用无菌针头滤器过滤除菌。

### 1.3 菌株的碳源利用能力分析

挑取单菌落接种至 Marine Broth 2216 培养基, 于 25 °C、180 r/min 振荡培养至细菌对数生长期中期 ( $OD_{600}$  约为 0.5)。取细菌培养物, 5 000 r/min 离心 3 min 收集菌体。菌体用无菌海水洗涤 2 次后, 再用无菌海水将细胞浓度调整  $OD_{600}$  至 0.5。将菌悬液按照 1:100 的体积比接种至含不同碳源的 MM 培养基中, 于 25 °C、180 r/min 培养 60 h。培养期间定时取样, 用分光光度法检测培养物的  $OD_{600}$  值。每一种 MM 培养基均设 3 个生物平行。

### 1.4 基因组测序、组装及注释

挑取单菌落接种至 Marine Broth 2216 培

培养基, 于 25 °C、180 r/min 振荡培养过夜。取 2 mL 细菌培养液, 10 000×g 离心 1 min, 收集菌体用于基因组 DNA 提取。基因组 DNA 提取参照美国能源部联合基因组研究所(Department of Energy-Joint Genome Research Center, DOE JGI)网站提供的十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)法(<https://jgi.doe.gov/userprogram-info/pmo-overview/protocols-sample-preparationinformation/>)进行。基因组测序与组装委托上海美吉生物医药科技有限公司进行。使用的测序平台为 Illumina HiSeq X Ten 和 Oxford Nanopore PromethION。利用短序列组装软件 SOAPdenovo2 对二代测序后的优化序列进行拼接。利用 Unicycler v0.4.8 软件对测序产生的 reads 进行从头组装, 获得基因组完成图。基因组注释利用美吉生物云平台完成。将基因组序列分别提交至 JGI 网站(<https://genome.jgi.doe.gov/portal/>), 进行比较基因组学分析。比较基因组分析选用的参考菌株为 *P. arabiensis* JCM 17292 (JGI-IMG 登录号为 89378), 该菌株分离自阿拉伯海沉积

物(-3 615 m)<sup>[15]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 碳源利用能力分析

碳源代谢作为微生物生长最基本的一种代谢和产能途径, 其中糖代谢的一些中心代谢途径在很多微生物中普遍存在, 对其进行详细研究有利于阐明微生物对碳源利用的多样性机制, 有助于加深理解微生物在适应环境过程中进化出的遗传优势<sup>[16]</sup>。碳源利用能力检测结果显示, 菌株 N1230-9 能够在以胶体几丁质、淀粉、糊精、麦芽糊精、纤维二糖、海藻糖、麦芽糖、蔗糖、D-葡萄糖、N-乙酰氨基葡萄糖、N-乙酰氨基半乳糖、L-岩藻糖、L-阿拉伯糖、柠檬酸钠、琥珀酸钠、丙酮酸钠、L-苹果酸、N-乙酰胞壁酸和琥珀酸共 19 种碳源中的任意一种为唯一碳源的培养基中生长(图 1)。检测结果还显示, 菌株 N1230-9 对所测试碳源的利用效率存在差异, 如菌株对几丁质的利用效率高于其他多糖, 对麦芽二糖的利用效率高于其他二

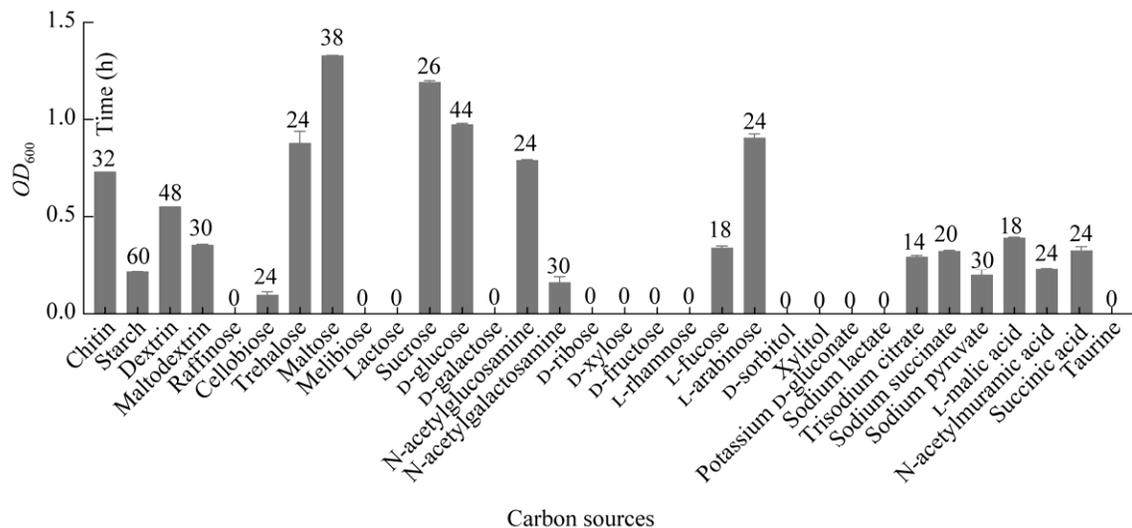


图 1 菌株 N1230-9 在不同碳源中的生长表型

Figure 1 Growth phenotypes of strain N1230-9 on various carbon sources. Maximal difference between initial and final optical density ( $OD_{600}$ ) values are shown as bar height with the growth time in hours indicated at the top of each bar.

糖, 以及对 N-乙酰氨基葡萄糖和 L-阿拉伯糖的利用效率高于其他单体碳源(图 1), 这说明菌株 N1230-9 对不同碳源的利用存在偏好。

## 2.2 基因组基本特征

菌株 N1230-9 基因组由两条染色体 Chr I 和 Chr II 组成(图 2), 大小分别约为 3.7 Mb (GenBank 登录号为 CP090419.1)和 0.9 Mb (GenBank 登录号为 CP090420.1), G+C 含量为 40.85%。该菌株与模式菌株 *P. arabiensis* JCM 17292 的 16S rRNA 基因相似性、平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)、数字

DNA-DNA 杂交(digital DNA-DNA hybridization, *d*DDH)值最高, 分别为 100.00%、95.69%和 84.60%, 将菌株 N1230-9 命名为 *Pseudoalteromonas arabiensis* N1230-9。

菌株 *P. arabiensis* N1230-9 基因组共编码 4 202 个蛋白, 其中 Chr I 和 Chr II 分别编码 3 419 个和 783 个蛋白, 编码基因总长度为 4 144 635 bp, 占基因组总长度的 89.57%。8 个 rRNA 操纵子、102 个 tRNA 基因和 19 个 sRNA 均位于 Chr I。2 201 个蛋白获得 KEEG 通路注释, 其中隶属于氨基酸代谢(amino acid metabolism,

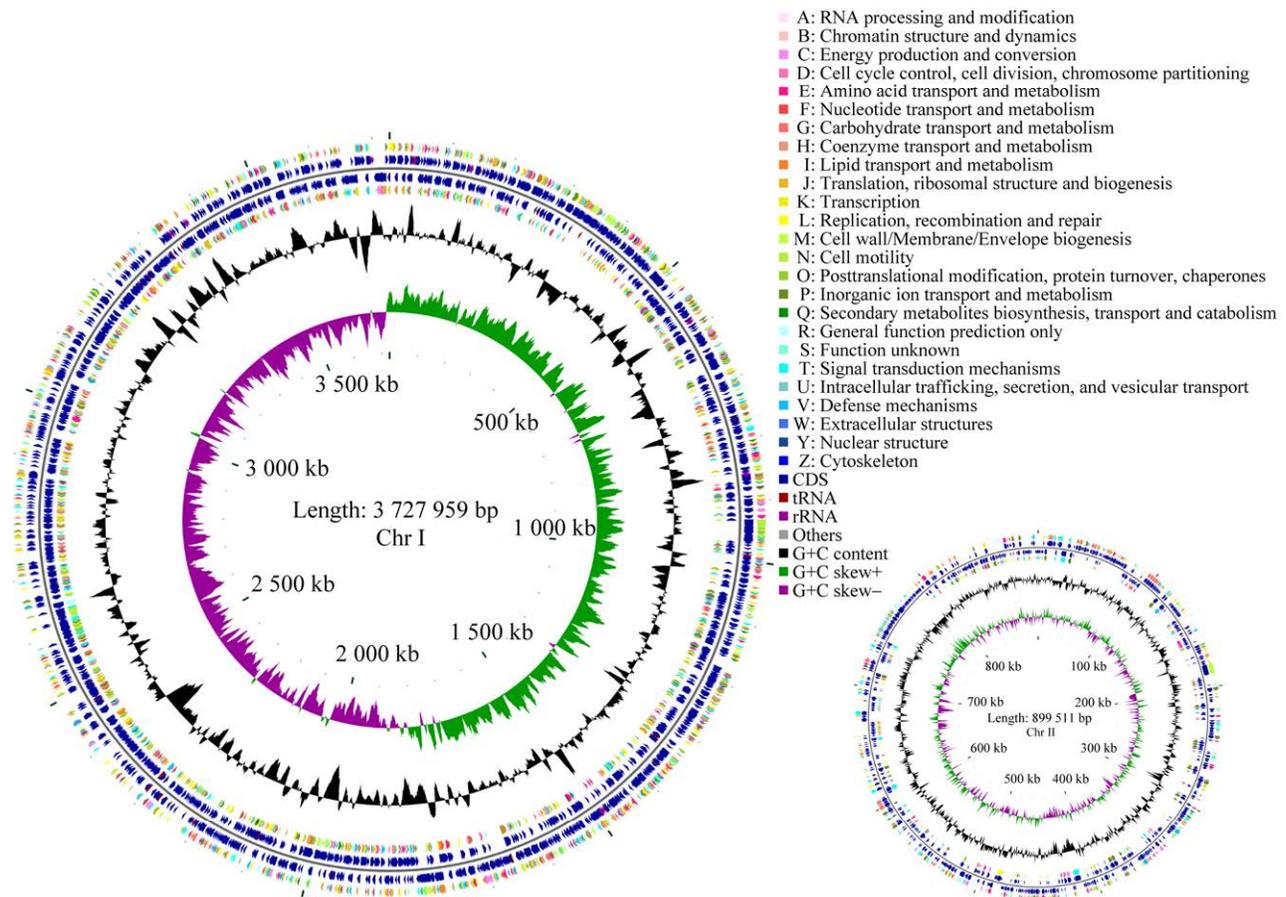


图 2 菌株 *Pseudoalteromonas arabiensis* N1230-9 基因组图谱

Figure 2 Genome mapping of *Pseudoalteromonas arabiensis* N1230-9. Circular representation of *Pseudoalteromonas arabiensis* N1230-9. Based on tRNA and rRNA, GO, KEEG, and COG results, circular diagrams of chromosomes are drawn. The concentric circles show (reading outwards) G+C skew, G+C content, tRNA and rRNA, GO, KEEG, COG, genes, and DNA coordinates.

208 个)通路的蛋白数量最多, 其次依次为碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism, 186 个)、信号转导(signal transduction, 169 个)、辅因子和维生素代谢(metabolism of cofactors and vitamins, 161 个)、细胞运动(cell motility, 115 个)、能量代谢(energy metabolism, 108 个)和细胞通讯(cellular community, 103 个)通路。此外, 菌株 N1230-9 基因组共编码 785 个转运蛋白、1 002 个跨膜蛋白和 232 个分泌蛋白。

### 2.3 水解酶编码基因分析

基因组注释结果表明, 菌株 *P. arabiensis* N1230-9 拥有较多数量的肽酶和糖苷水解酶, 包括隶属于 31 个家族的 75 个肽酶和隶属于 19 个家族的 47 个糖苷酶, 表明该菌株不但具有分解各种肽和蛋白质的能力, 还能够水解多种碳水化合物。菌株 N1230-9 拥有多个具有信号肽的糖苷酶, 包括几丁质酶、糖原磷酸化酶、糖原脱支酶、阿拉伯呋喃糖苷酶、阿拉伯糖苷酶和 *p*-1,3-葡聚糖苷酶, 说明该菌株可以胞外水解几丁质、淀粉、麦芽糊精等多糖。菌株 N1230-9 还含有 10 个脂肪酶编码基因和 25 个酯酶编码基因, 其中包括 1 个磷脂酶 A、1 个羧基酯酶和 3 个磷酸酯酶编码基因。比较基因组分析数据显示, 菌株 N1230-9 和 JCM 17292 所拥有的肽酶、糖苷水解酶、脂肪酶和酯酶的数量略有差异。菌株 N1230-9 虽拥有较多的氨基肽酶、胞壁质内肽酶和自溶肽酶编码基因, 但含有的  $\beta$ -葡萄糖苷酶、脂酶和酯酶编码基因却相对较少。

### 2.4 碳源利用能力及其碳源代谢通路相关基因分析

基因组注释结果表明, 菌株 *P. arabiensis* N1230-9 拥有完整的糖酵解途径(Embden-Meyerhof-Parnas, EMP)、柠檬酸循环(citric acid cycle, TCA)、磷酸戊糖途径(pentose phosphate

pathway, PPP)和去氧酮糖酸途径(deoxykebolic acid pathway, EDP) (图 3)。与菌株的碳源利用实验结果一致, 菌株 N1230-9 含有参与代谢几丁质、淀粉、糊精、麦芽糊精、纤维二糖、海藻糖、麦芽糖、蔗糖、D-葡萄糖、N-乙酰氨基葡萄糖、N-乙酰氨基半乳糖、L-岩藻糖、L-阿拉伯糖、柠檬酸钠、琥珀酸(钠)、丙酮酸钠、L-苹果酸和 N-乙酰胞壁酸的关键酶编码基因。对菌株 N1230-9 中负责碳源代谢的关键酶所处的周围环境进行分析, 发现参与几丁质、淀粉、麦芽糊精、纤维二糖、蔗糖、海藻糖、N-乙酰氨基半乳糖和 L-阿拉伯糖代谢的关键酶的周围普遍存在主要协助转运蛋白超家族(mainly assists in the transporter superfamily, MFS)转运蛋白和 TonB 依赖性受体(TonB-dependent receptors, TBDR), 而且这 2 种转运蛋白与希瓦氏菌属(*Shewanella*)的相应碳源转运蛋白具有较高序列一致性<sup>[15,17]</sup>。基于基因组注释结果, 并结合对希瓦氏菌属的碳源代谢通路<sup>[17]</sup>分析, 绘制了菌株 N1230-9 的 8 种可利用碳源的代谢通路图(图 3)。

### 2.5 铁摄取相关基因分析

在含氧海水中, 铁以三价羟基氧化铁的形式存在, 其溶解度极低, 并且有被沉降颗粒物进一步清除的趋势, 这导致全球大部分海域中的溶解态的铁浓度极低( $<0.4 \mu\text{mol/L}$ ), 因此, 铁被认为是海洋细菌的限制性营养素<sup>[18]</sup>。此外, 由于海洋微生物可利用的微量溶解铁几乎完全与有机配体结合<sup>[19]</sup>, 为此海洋细菌已进化出从外界环境中获取铁配体复合物的多种途径。通过合成铁载体(siderophores)从铁配体复合物中获取铁是很多海洋细菌摄取铁的主要途径<sup>[20]</sup>。菌株 N1230-9 和 JCM 17292 基因组中均含有一个铁载体合成基因簇, 说明两株菌具有利用铁载体从环境中摄取铁的潜力。

除了利用铁载体摄取外界铁外, 某些细菌还进化出通过摄取血红素或血红蛋白作为从环

境中获取铁的策略<sup>[21]</sup>。细菌的血红素摄取是通过使用类似于铁载体和维生素 B<sub>12</sub> 摄取途径的

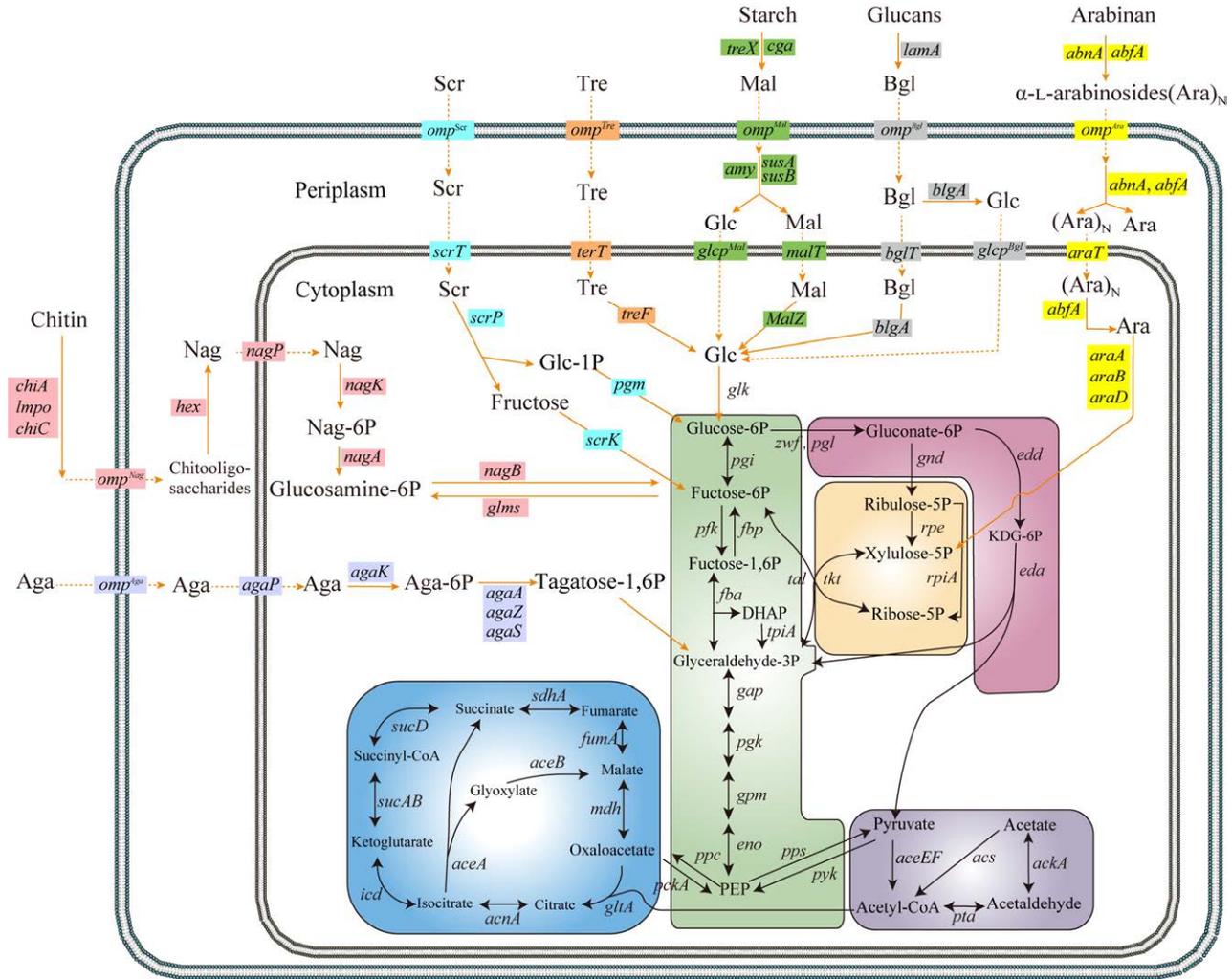


图3 菌株 *Pseudoalteromonas arabiensis* N1230-9 对 8 种碳源的利用通路

Figure 3 Pathways of eight carbon sources utilization in *Pseudoalteromonas arabiensis* N1230-9. Abbreviations for carbohydrates and enzymy-coding genes are followed: Glc, Glucose; Nag, N-acetylglucosamine; Bgl,  $\beta$ -glucosides (cellobiose); Ara, arabinose (arabinosides); Aga, N-acetylgalactosamine; Tre, trehalose; Scr, sucrose; Mal, maltodextrins; *agaK*, N-acetylgalactosamine kinase; *agaA*, N-acetylgalactosamine-6-phosphate deacetylase; *agaZ*, tagatose-6-phosphate kinase; *agaS*, galactosamine-6-phosphate isomerase; *chiC*, chitinase C; *lmpo*, lytic polysaccharide monooxygenase; *chiA*, chitinase A; *hex*, hexosaminidase; *nagK*, N-acetylglucosamine kinase; *nagA*, N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase; *nagB*, glucosamine-6-phosphate deaminase; *glmS*, glutamine-fructose-6-phosphate transaminase; *scrP*, sucrose phosphorylase; *scrK*, fructokinase; *pgm*, phosphoglucomutase; *treF*, trehalase; *cga*, glycogen phosphorylase; *treX*, isoamylase; *amy*,  $\alpha$ -amylase; *susA*, neopullulanase; *susB*,  $\alpha$ -glucosidase; *malZ*, maltodextrin glucosidase; *glcA* (*lamA*), glucan endo-1,3- $\beta$ -glucosidase; *blgA*,  $\beta$ -glucosidase; *abnA*, arabinan endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinosidase; *abfA*,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase; *araA*, L-arabinose isomerase; *araB*, ribulokinase; *araD*, L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase.

机制来实现的<sup>[22-23]</sup>。就海洋细菌而言,玫瑰杆菌属(*Roseobacter*)的血红素摄取系统 HmuRSTUV 已被充分表征<sup>[24]</sup>,其中 HmuR 是血红素的 TonB 依赖性外膜受体,负责从胞外环境选择性地将血红素转运到周质空间,而 HmuTUV 则是一种内膜 ABC 转运蛋白复合体(ABCT),该复合体由周质结合蛋白(HmuT)、膜通透酶(HmuU)和 ATP 酶(HmuV)组成,负责将血红素从周质空间转运到胞质中,进入胞质内的血红素继而被血红素加氧酶(HmuS)降解。基于基因组注释和同源比对,发现菌株 N1230-9 拥有一个潜在的 HmuRSTUV 系统,其中 *hmuRS* 与 *fecI* 和 *fecR* 形成一个潜在的操纵子 *fecI-fecR-humRS*,而 *hmuTUV* 则与 *hutZ* 形成一个潜在的操纵子 *hmuTUV-hutZ*,这 2 个操纵子相隔约 2.96 Mb。除此之外,菌株 N1230-9 基因组中还存在一个染料脱色型过氧化物酶(dye-decolorizing peroxidase)编码基因 *yfeX*。*yfeX* 与内膜  $Fe^{3+}$  ABC 转运蛋白复合体编码基因 *afuABC*,以及转录调控因子基因 *argR* 形成一个操纵子 *afuABC-yfeX-argR*。研究已证明,大肠杆菌(*Escherichia coli*)的 YfeX 可通过脱螯合作用从铁卟啉中除去铁离子<sup>[25]</sup>。因此我们推测,YfeX-AfuABC 系统可能是菌株 N1230-9 的血红素摄取系统,其中 YfeX 负责从铁原卟啉中解离铁离子,而 AfuABC 则负责铁离子的跨内膜运输。基于基因组注释和同源比对,菌株 JCM 17292 不存在 HmuRSTUV 系统,但存在 YfeX-AfuABC 系统。

利用血红素培养基和无铁培养基对菌株 N1230-9 的生长能力进行测试,结果表明菌株 N1230-9 在无铁培养基中的生长明显受到抑制(图 4),说明外源铁离子是菌株 N1230-9 有效生长所必需的。需要指出的是,尽管实验中最大限度地排除无铁培养基中铁离子的污染,但不

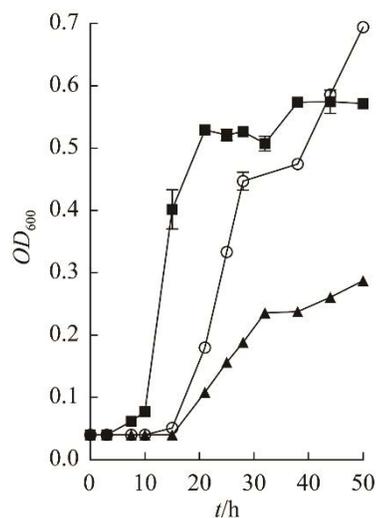


图 4 菌株 *Pseudoalteromonas arabiensis* N1230-9 在不同铁源培养基中的生长表现

Figure 4 *Pseudoalteromonas arabiensis* N1230-9 growth in various iron source medium. Growth on  $Fe^{3+}$ -free medium (filled triangles),  $FeCl_3$  medium (filled squares), and chlorohemin medium (open circles). All treatments were performed in duplicate, and error bars are standard deviations of the means. Most error bars are within the size of the symbol.

可避免培养基中仍有痕量铁离子的存在,因此菌株 N1230-9 在无铁培养基中仍有生长迹象(图 4)。生长曲线还显示,菌株 N1230-9 在血红素培养基中的延滞期明显长于在氯化铁培养基中的延滞期,但在血红素培养基中的最高生物量却明显高于在氯化铁培养基中的最高生物量(图 4),这一数据说明菌株 N1230-9 确实可以利用血红素,该菌株对血红素的摄取要明显滞后于对氯化铁的摄取,其原因可能是血红素摄取需要动员更多的基因表达,而且这一摄取过程需要消耗更多的能量。

## 2.6 运动性相关基因分析

海洋中的大分子和营养物质常以聚集成颗粒的形式积累,导致营养丰富的颗粒或点源微环境在营养缺乏的微环境中不断形成<sup>[26-28]</sup>。然而,由于这些微环境通常是短暂且容易耗

尽的<sup>[29]</sup>, 因此海洋细菌对营养源的有效趋化对于它们的生存至关重要<sup>[30]</sup>。细菌对营养物质的趋化始于化学效应物(配体)与甲基化趋化受体蛋白(methyl- accepting chemotaxis protein, MCP)的特异性结合, 结合后产生的刺激信号经趋化信号通路传递给鞭毛马达后方能调节细菌的运动方向<sup>[31-32]</sup>。基因组注释表明, 菌株 N1230-9 和 JCM 17292 均拥有 48 个与趋化有关的蛋白编码基因, 包括 28 个 *mcp*、2 个 *cheA*、2 个 *chiB*、1 个 *chiD*、3 个 *chiR*、2 个 *chiV*、3 个 *chiW*、1 个 *chiX*、5 个 *cheY* 和 1 个 *chiZ*, 其中 6 个“*chi*”基因(*cheABDRWY*)和 1 个 *mcp* 处于一个基因簇。除了具有完整的趋化信号通路外, 两菌株还均含有 2 个独立的合成鞭毛的基因簇, 其中一个基因簇中除了含有一套马达蛋白编码基因 *motAB* 外, 还含有多个趋化蛋白编码基因, 包括 *chiA*、*chiB*、*chiZ*、*cheW*、*chiY*、*chiV* 和 *chiR*。

## 2.7 噬菌体抗性相关基因分析

噬菌体感染是细菌进化的主要驱动因素<sup>[33]</sup>。为了应对噬菌体侵染这种强大的进化压力, 细菌“开发”出了一系列抗噬菌体系统, 为宿主提供对噬菌体的部分或全部抗性<sup>[33]</sup>。CRISPR-Cas 系统是原核生物进化产生的适应性免疫系统<sup>[34]</sup>。CRISPR immunity 在线软件预测结果表明, 菌株 N1230-9 含有一个“未知(unclear)”类型的 CRISPR-Cas 系统, 该系统由 CRISPR 序列和 3 个 Cas 蛋白组成。此外, 菌株 N1230-9 还拥有 6 个“孤儿(orphan)”型 CRISPR 序列。

限制-修饰(restriction-modification, R-M)系统是一种普遍存在且极其多样化的抗噬菌体模式, 包括 I-IV 共 4 种类型, 它们通常由限制性内切酶和甲基转移酶组成<sup>[35]</sup>。除了 IV 型 R-M 系统可切割甲基化修饰的外源 DNA 外, 其余 3 种类型的 R-M 系统中的限制性内切酶均切割

未被甲基化修饰的外源 DNA。细菌的 DNA 通常在复制时被甲基化酶修饰, 因此避免了被限制性内切酶的裂解<sup>[35]</sup>。功能基因注释发现, 菌株 N1230-9 含有 1 个限制性内切酶编码基因, 以及 4 个 DNA 甲基化酶编码基因, 这些内切酶和甲基化内切酶编码基因彼此分离, 具有 II 型 R-M 系统特征。虽然 JCM 17292 不存在与菌株 N1230-9 的 II 型 R-M 系统具有同源性的编码基因, 但该菌株却拥有 I 型 R-M 系统编码基因, 包括限制性酶 S 亚基编码基因 *hsdS*、限制性酶 R 亚基编码基因 *hsdR* 和限制性酶 M 亚基编码基因 *hsdM*。此外, 菌株 JCM 17292 的 I 型 R-M 系统操纵子中还含有一个 II 型 R-M 系统限制性内切酶编码基因 *mrr*。

流产感染(abortive infection, Abi)系统也是大部分细菌普遍采用的抗噬菌体系统<sup>[36]</sup>。Abi 系统是指当噬菌体成功注入 DNA 后, 其繁殖受到阻断, 导致子代噬菌体繁殖和释放失败, 从而避免其他细菌被噬菌体感染<sup>[36]</sup>。菌株 N1230-9 和 JCM 17292 基因组中分别含有 2 个 Abi 编码基因(*abiQ* 和 *abiH*)和 1 个未知的 Abi 编码基因。在原核生物中普遍存在的 TA 系统也属于流产感染系统<sup>[37]</sup>。根据毒素抗毒素的性质以及中和毒素的方式, TA 系统被分为 I-VIII 共 8 种类型<sup>[38-39]</sup>, 其中 II 型 TA 是目前研究最为广泛的 TA 系统。II 型 TA 是由位于同一操纵子下的抗毒素编码基因和毒素编码基因组成, 抗毒素基因通常位于毒素基因的上游, 抗毒素通过直接的蛋白-蛋白互作中和毒素的毒性<sup>[40]</sup>。菌株 N1230-9 基因组中含有 5 个潜在的 TA 基因座, 包括分布在 Chr I 中的 *higBA*、*ratA/h* 和 *relb/parE*, 以及分布在 Chr II 染色体中的 *yefM/yoeB* 和 *brnT/hp*。菌株 N1230-9 的 5 个 TA 系统中均属于 II 型 TA 系统, 其中 2 个 TA 中的潜在抗毒素未获得注释(以“hp”命名), 这些未知

蛋白是否具有中和毒素的功能尚不清楚。JCM 17292 除了拥有 *mazEF*、*parDE*、*cptB/hp*、*parDE*、*yefM/parE*、*relB/parE* 和 *yefM/yoeb* 共 7 个 II 型 TA 基因座外，还含有 1 个 IV 型 TA 系统“孤儿毒素”*AbiEii* 编码基因。

除了上述 3 种抗噬菌体系统外，菌株 N1230-9 和 JCM 17292 均拥有 1 个 dCTP 脱氨酶和 2 个 dGTPase。dCTP 和 dGTPase 可分别降解 dCTP 和 dGTP，从而剥夺噬菌体基因组复制所需要的分子砌块，因此这 2 种酶也被描述为抗噬菌体系统的效应物<sup>[41]</sup>。

## 2.8 信号传导基因和移动元件分析

远海表层海水环境不但营养匮乏，而且环境条件变化幅度大，因此生活在其中的微生物需利用丰富的信号传导系统对环境条件变化作出快速反应。双组分信号转导系统是细菌使用最广泛的传感系统，该系统由信号传感器组氨酸激酶(histidine kinase, HK)和反应调节器组成。基因组注释结果表明，菌株 N1230-9 包含 71 个 HK 编码基因，而菌株 JCM 17292 仅含有 40 个 HK 编码基因，这表明菌株 N1230-9 比菌株 JCM 17292 具有更强的环境信号感应能力。与菌株 N1230-9 相比，尽管菌株 JCM 17292 的基因组尚不完整，但该菌株却拥有更多的移动元件，包括 1 个整合酶编码基因和 19 个转座酶编码基因，这进一步支持转座酶编码基因在深海环境更加丰富的观点<sup>[42]</sup>。

## 3 讨论

基于菌株 N1230-9 对测试碳源的利用能力，结合基因组注释和序列比对分析不难确定该菌株中参与某碳源代谢的关键酶。然而，由于与希瓦氏菌的种属差异较大，以及菌株 N1230-9 拥有比希瓦氏菌更多的 MFS 转运蛋白和 TBDR，导致利用该策略难以确定菌株

N1230-9 的碳源转运蛋白。当以希瓦氏菌的某碳源转运蛋白对 N1230-9 的编码蛋白进行同源比对搜索时，通常会获得多条一致性差异不大的匹配序列，而且某些具有最高序列一致性的转运蛋白编码基因并不位于碳源代谢基因簇内，比如 *omp<sup>Nag</sup>* 和 *nagP*。菌株 N1230-9 潜在的某些碳源转运蛋白的种类也与希瓦氏菌存在较大差异。比如，希瓦氏菌可利用位于同一基因簇中的 ABC 转运复合体(AraUVWZ)和 MFS 家族转运蛋白(AraT)转运阿拉伯糖<sup>[17]</sup>，而菌株 N1230-9 仅存在与 AraT 具有较高氨基酸序列一致性的 MFS 家族转运蛋白。再如，希瓦氏菌可利用磷酸转移酶系统(phosphotransferase system, PTS)和 MFS 转运蛋白转运葡萄糖，但是菌株 N1230-9 的 PTS 并不完整(只含有 EIIA 组分)。无论是营养物的跨外膜转运还是跨内膜转运，菌株 N1230-9 似乎更倾向于使用同种类型的转运蛋白，并且一种碳源的转运可能涉及多个同类型转运蛋白。

颗粒附着或浮游植物附着的海洋细菌，如拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、弧菌属(*Vibrio*)、玫瑰杆菌属普遍拥有 HmuRSTUV 系统，而游离状态的浮游细菌，如遍在远洋杆菌(*Pelagibacter ubique*)和 *Silicibacter pomeroyi*，则普遍缺失该系统<sup>[24,43-44]</sup>。完整的 HmuRSTUV 系统至少由 8 个基因组成，包括 *hmuRSTUV* 及其 TonB 系统编码基因(*tonB*、*exbB* 和 *exbD*)，其中 TonB 系统作为血红素摄取的能量提供单位<sup>[44]</sup>。尽管我们尚不清楚菌株 *P. arabiensis* N1230-9 是否存在颗粒附着生活方式，但是基于同源比对发现该菌株不但拥有完整的 HmuRSTUV 系统，还存在可为血红素跨膜转运供给能量的 TonB 系统。然而，菌株 N1230-9 血红素摄取系统编码基因的组织方式明显不同于先前已表征的玫瑰杆菌，*hmuTUV* 所在的基因簇中还包含一个

HutZ 编码基因。HutZ 在具有血红素摄取能力的弧菌中也有发现, 该蛋白已被证明具有类似 HmuS 的功能<sup>[45]</sup>。除此之外, 菌株 N1230-9 基因组中还存在一个潜在的铁原卟啉摄取系统 (YfeX-AfuABC), 该系统在海洋细菌中尚未见报道。后续分析菌株 N1230-9 潜在血红素摄取系统缺失菌株对不同类型血红素的摄取能力, 可进一步明确这两种血红素摄取系统的功能。

比较基因组分析表明, 隶属同一个种的菌株 N1230-9 和 JCM 17292 拥有众多的特有基因。与菌株 JCM 17292 相比, 菌株 N1230-9 拥有更多的 rRNA 操纵子。此外, 菌株 N1230-9 还含有发酵呼吸转换蛋白编码基因 *frsA*、重金属抗性基因和血红素摄取系统编码基因等特有基因, 以及拥有更丰富的二元信号传导系统编码基因, 如组氨酸激酶编码基因。菌株 JCM 17292 则拥有特有的 I 型 R-M 系统编码基因, 以及拥有更多的移动元件、脂酶和酯酶编码基因。菌株 N1230-9 和 JCM 17292 所拥有的差异基因可以反映出两菌株对两种完全不同生存环境的适应。来自表层海水的 N1230-9 无固定的栖息地, 更多的 rRNA 操纵子可以确保该菌在到达营养丰富环境中时能够快速繁殖, 从而占据种群上的优势。海水中的铁相对于沉积物中更加匮乏, 因此不难理解菌株 N1230-9 拥有多种铁配体化合物摄取途径, 尤其是拥有 2 个不同的血红素摄取系统。远海表层海水中的营养物质浓度低, 菌株 N1230-9 拥有更多的二元信号传导系统编码基因可保证菌株对偶然出现的营养物质作出快速响应。菌株 N1230-9 具备的多种重金属抗性基因, 尤其是大量钴离子和锰离子抗性基因的存在, 这可能与该菌分离自太平洋铁锰结核区的表层海水有关, 即该菌株可能起源于铁锰结核区沉积物环境。海藻糖是海水生活细菌的易得碳源, 而该碳源由于微生物的

降解难以到达深海, 因此不难理解菌株 N1230-9 拥有 JCM 17292 所不具备的海藻糖代谢相关基因。相对于菌株 N1230-9, 菌株 JCM 17292 则拥有更多的脂酶和酯酶编码基因, 这意味着菌株 JCM 17292 能够更加有效地降解沉积物环境中的磷脂和羧基酯, 以满足菌株对碳源和磷源的需求。此外, 菌株 JCM 17292 基因组中噬菌体来源的移动元件要明显多于菌株 N1230-9, 说明沉积物中噬菌体侵染方式引起的水平基因转移事件要比海水中发生的更加频繁, 这也驱动菌株 JCM 17292 进化出了比菌株 N1230-9 更加多样的抗噬菌体策略。比较基因组分析还显示, 菌株 N1230-9 和 JCM 17292 基因组中的前噬菌体序列和 TA 系统种类明显不同。细菌的 TA 系统通常是通过噬菌体侵染这一基因横向转移途径获得<sup>[33]</sup>。两株阿拉伯海假交替单胞菌拥有不同的噬菌体序列和 TA 系统说明它们曾受到不同类型噬菌体的侵染。

## 4 结论

基因组分析发现, 菌株 *P. arabiensis* N1230-9 已进化出极其多样的海洋环境适应策略, 包括具有多套 rRNA 操纵子, 具有数量众多且种类各异的水解酶, 具有代谢利用多种碳源的代谢通路, 拥有数量众多的转运蛋白, 拥有丰富的二元信号通路编码基因, 含有 2 套独立的鞭毛合成基因簇, 具有多种铁摄取策略, 以及具有多样的噬菌体防御系统。比较基因组分析发现, 处于表层海水和沉积物环境两种不同生态位中的两株阿拉伯海假交替单胞菌拥有适应各自所在生活环境的特有基因。

## 参考文献

- [1] ZHENG K, DONG Y, LIANG Y, LIU Y, ZHANG X, ZHANG W, WANG Z, SHAO H, SUNG YY, MOK WJ, WONG LL, McMINN A, WANG M. Genomic

- diversity and ecological distribution of marine *Pseudoalteromonas phages*[J]. *Marine Life Science & Technology*, 2023, 5(2): 271-285.
- [2] WEI WX, WANG L, FANG JS, LIU RL. Population structure, activity potential and ecotype partitioning of *Pseudoalteromonas* along the vertical water column of the New Britain Trench[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2021, 368(13): fnab078.
- [3] DUHAIME MB, SOLONENKO N, ROUX S, VERBERKMOES NC, WICHELS A, SULLIVAN MB. Comparative omics and trait analyses of marine *Pseudoalteromonas* phages advance the phage OTU concept[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1241.
- [4] LIU J, ZHENG Y, LIN H, WANG X, LI M, LIU Y, YU M, ZHAO M, PEDENTCHOUK N, LEA-SMITH DJ, TODD JD, MAGILL CR, ZHANG WJ, ZHOU S, SONG D, ZHONG H, XIN Y, YU M, TIAN J, ZHANG XH. Proliferation of hydrocarbon-degrading microbes at the bottom of the Mariana Trench[J]. *Microbiome*, 2019, 7(1): 47.
- [5] MÉDIGUE C, KRIN E, PASCAL G, BARBE V, BERNSEL A, BERTIN PN, CHEUNG F, CRUVEILLER S, D'AMICO S, DUILIO A, FANG G, FELLER G, HO C, MANGENOT S, MARINO G, NILSSON J, PARRILLI E, ROCHA EP, ROUY Z, SEKOWSKA A, et al. Coping with cold: the genome of the versatile marine Antarctica bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125[J]. *Genome Research*, 2005, 15(10): 1325-1335.
- [6] HUSTON AL, KRIEGER-BROCKETT BB, DEMING JW. Remarkably low temperature optima for extracellular enzyme activity from Arctic bacteria and sea ice[J]. *Environmental Microbiology*, 2000, 2(4): 383-388.
- [7] FEHÉR D, BARLOW R, McATEE J, HEMSCHIEDT TK. Highly brominated antimicrobial metabolites from a marine *Pseudoalteromonas* sp.[J]. *Journal of Natural Products*, 2010, 73(11): 1963-1966.
- [8] ZENG ZS, GUO XP, LI BY, WANG PX, CAI XS, TIAN XP, ZHANG S, YANG JL, WANG XX. Characterization of self-generated variants in *Pseudoalteromonas lipolytica* biofilm with increased antifouling activities[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(23): 10127-10139.
- [9] LOVEJOY C, BOWMAN JP, HALLEGRAEFF GM. Algicidal effects of a novel marine *Pseudoalteromonas* isolate (class *Proteobacteria*, gamma subdivision) on harmful algal bloom species of the genera *Chattonella*, *Gymnodinium*, and *Heterosigma*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(8): 2806-2813.
- [10] YU Y, YANG J, TENG ZJ, ZHENG LY, SHENG Q, LI PY, FU HH, LI CY, CHEN Y, ZHANG YZ, DING JM, CHEN XL. D-alanine metabolism via D-Ala aminotransferase by a marine *Gammaproteobacterium*, *Pseudoalteromonas* sp. strain CF6-2[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2022, 88(3): e0221921.
- [11] XIE BB, RONG JC, TANG BL, WANG SS, LIU GM, QIN QL, ZHANG XY, ZHANG WP, SHE QX, CHEN Y, LI FC, LI SY, CHEN XL, LUO HW, ZHANG YZ. Evolutionary trajectory of the replication mode of bacterial replicons[J]. *mBio*, 2021, 12(1): e02745-20.
- [12] THOMAS T, EVANS FF, SCHLEHECK D, MAI-PROCHNOW A, BURKE C, PENESYAN A, DALISAY DS, STELZER-BRAID S, SAUNDERS N, JOHNSON J, FERRIERA S, KJELLEBERG S, EGAN S. Analysis of the *Pseudoalteromonas tunicata* genome reveals properties of a surface-associated life style in the marine environment[J]. *PLoS One*, 2008, 3(9): e3252.
- [13] QIN QL, LI Y, ZHANG YJ, ZHOU ZM, ZHANG WX, CHEN XL, ZHANG XY, ZHOU BC, WANG L, ZHANG YZ. Comparative genomics reveals a deep-sea sediment-adapted life style of *Pseudoalteromonas* sp. SM9913[J]. *The ISME Journal*, 2011, 5(2): 274-284.
- [14] KOKATE PP, BALES E, JOYNER D, HAZEN TC, TECHTMANN SM. Biogeographic patterns in populations of marine *Pseudoalteromonas atlantica* isolates[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2023, 370: fnad081.
- [15] MATSUYAMA H, MINAMI H, KASAHARA H, KATO Y, MURAYAMA M, YUMOTO I. *Pseudoalteromonas arabiensis* sp. nov., a marine polysaccharide-producing bacterium[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63(5): 1805-1809.
- [16] 李丹. 假交替单胞菌属碳源利用和生长速率的比较研究[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2015.
- LI D. Comparative study of carbon utilization and growth rate of *Pseudoalteromonas*[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong University, 2015 (in Chinese).
- [17] RODIONOV DA, YANG C, LI X, RODIONOVA IA, WANG Y, OBRAZTSOVA AY, ZAGNITKO OP, OVERBEEK R, ROMINE MF, REED S, FREDRICKSON JK, NEALSON KH, OSTERMAN AL. Genomic encyclopedia of sugar utilization pathways in the *Shewanella* genus[J]. *BMC Genomics*, 2010, 11: 494.
- [18] BOYD P, ELLWOOD M. The biogeochemical cycle of iron in the ocean[J]. *Nature Geoscience*, 2010, 3: 675-682.
- [19] HOGLE SL, BARBEAU KA, GLEDHILL M. Heme in the marine environment: from cells to the iron cycle[J]. *Metallomics*, 2014, 6(6): 1107-1120.

- [20] BARBEAU K, RUE EL, BRULAND KW, BUTLER A. Photochemical cycling of iron in the surface ocean mediated by microbial iron(III)-binding ligands[J]. *Nature*, 2001, 413: 409-413.
- [21] MANCK LE, ESPINOZA JL, DUPONT CL, BARBEAU KA. Transcriptomic study of substrate-specific transport mechanisms for iron and carbon in the marine copiotroph *Alteromonas macleodii*[J]. *mSystems*, 2020, 5(2): e00070-20.
- [22] STOJILJKOVIC I, HANTKE K. Hemin uptake system of *Yersinia enterocolitica*: similarities with other TonB-dependent systems in Gram-negative bacteria[J]. *The EMBO Journal*, 1992, 11(12): 4359-4367.
- [23] KÖSTER W. ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B<sub>12</sub>[J]. *Research in Microbiology*, 2001, 152(3-4): 291-301.
- [24] ROE KL, HOGLE SL, BARBEAU KA. Utilization of heme as an iron source by marine *Alphaproteobacteria* in the *Roseobacter clade*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(18): 5753-5762.
- [25] DAILEY HA, SEPTER AN, DAUGHERTY L, THAMES D, GERDES S, STABB EV, DUNN AK, DAILEY TA, PHILLIPS JD. The *Escherichia coli* protein YfeX functions as a porphyrinogen oxidase, not a heme dechelataase[J]. *mBio*, 2011, 2(6): e00248-11.
- [26] BLACKBURN N, FENCHEL T, MITCHELL J. Microscale nutrient patches in planktonic habitats shown by chemotactic bacteria[J]. *Science*, 1998, 282(5397): 2254-2256.
- [27] FENCHEL T. Microbial behavior in a heterogeneous world[J]. *Science*, 2002, 296(5570): 1068-1071.
- [28] FAROOQ A. Microbial control of oceanic carbon flux: the plot thickens[J]. *Science*, 1998, 280(5364): 694-696.
- [29] STOCKER R, SEYMOUR JR. Ecology and physics of bacterial chemotaxis in the ocean[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 2012, 76(4): 792-812.
- [30] YAWATA Y, CARRARA F, MENOLASCINA F, STOCKER R. Constrained optimal foraging by marine bacterioplankton on particulate organic matter[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(41): 25571-25579.
- [31] BI S, LAI L. Bacterial chemoreceptors and chemoeffectors[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2015, 72(4): 691-708.
- [32] HUANG Z, PAN X, XU N, GUO M. Bacterial chemotaxis coupling protein: structure, function and diversity[J]. *Microbiological Research*, 2019, 219: 40-48.
- [33] GEORJON H, BERNHEIM A. The highly diverse antiphage defence systems of bacteria[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2023, 21: 686-700.
- [34] HILLE F, RICHTER H, WONG SP, BRATOVIČ M, RESSEL S, CHARPENTIER E. The biology of CRISPR-Cas: backward and forward[J]. *Cell*, 2018, 172(6): 1239-1259.
- [35] TOCK MR, DRYDEN DT. The biology of restriction and anti-restriction[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2005, 8(4): 466-472.
- [36] AFRAMIAN N, ELDAR A. Abortive infection antiphage defense systems: separating mechanism and phenotype[J]. *Trends in Microbiology*, 2023, 31(10): 1003-1012.
- [37] GERDES K, CHRISTENSEN SK, LØBNER-OLESEN A. Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3: 371-382.
- [38] JURĖNAS D, FRAIKIN N, GOORMAGHTIGH F, van MELDEREN L. Biology and evolution of bacterial toxin-antitoxin systems[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2022, 20: 335-350.
- [39] 叶乐, 甄向凯, 欧阳松应. 原核生物VII型毒素-抗毒素系统研究进展[J]. *微生物学报*, 2023, 63(3): 993-1007. YE L, ZHEN XK, OUYANG SY. Progress of type VII toxin-antitoxin system in prokaryotes[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(3): 993-1007 (in Chinese).
- [40] KAMRUZZAMAN M, WU AY, IREDELL JR. Biological functions of type II toxin-antitoxin systems in bacteria[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(6): 1276.
- [41] TAL N, MILLMAN A, STOKAR-AVIHAIL A, FEDORENKO T, LEAVITT A, MELAMED S, YIRMIYA E, AVRAHAM C, BRANDIS A, MEHLMAN T, AMITAI G, SOREK R. Bacteria deplete deoxynucleotides to defend against bacteriophage infection[J]. *Nature Microbiology*, 2022, 7: 1200-1209.
- [42] WORDEN AZ, CUVELIER ML, BARTLETT DH. In-depth analyses of marine microbial community genomics[J]. *Trends in Microbiology*, 2006, 14(8): 331-336.
- [43] HOGLE SL, BRAHAMSHA B, BARBEAU KA. Direct heme uptake by phytoplankton-associated *Roseobacter* bacteria[J]. *mSystems*, 2017, 2(1): e00124-16.
- [44] HOPKINSON BM, ROE KL, BARBEAU KA. Heme uptake by *Microscilla marina* and evidence for heme uptake systems in the genomes of diverse marine bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(20): 6263-6270.
- [45] WYCKOFF EE, SCHMITT M, WILKS A, PAYNE SM. HutZ is required for efficient heme utilization in *Vibrio cholerae*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 86(13): 4142-4151.