

枯草芽孢杆菌SNBS-3全基因组测序及其 抑菌物质预测分析

纪帅奇^{1,2}, 乌日娜^{1,2,3}, 张淘崴^{1,3}, 娄梦雪^{1,3}, 丁瑞雪^{1,2}, 马颖^{1,2}, 武俊瑞^{1,2,3,*}

(1.沈阳农业大学食品学院, 辽宁 沈阳 110866; 2.辽宁省食品发酵技术工程研究中心, 辽宁 沈阳 110866;

3.沈阳市微生物发酵技术创新重点实验室, 辽宁 沈阳 110866)

摘要: 为了详细解析枯草芽孢杆菌SNBS-3的基因组特征, 本研究在前期研究基础上, 采用Illumina二代测序技术和第三代高通量Pacbio测序平台, 对从传统豆酱中筛选得到的枯草芽孢杆菌SNBS-3进行全基因组测序, 获得菌株基因组特征信息、基因功能注释及分类、系统发育进化和次级代谢产物等关键信息。结果表明: SNBS-3的基因组为一条环状闭合DNA, 大小为4 076 387 bp, 共有4 000个蛋白质编码基因, 在直系同源集、基因本体论、京都基因与基因组百科全书、碳水化合物活性酶、抗生素耐药性数据库和致病毒力因子数据库分别注释到3 209、2 824、2 560、147、12个和4个功能基因。应用在线软件AntiSMASH和Bage14发现其除具有合成Surfactin、Mycosubtilin、Plipastatin、Bacilysin和Bacillaene等多种抑菌物质的相关基因外, 还具有一条完整的细菌素Subtilosin A合成基因簇, 结合抑菌实验和蛋白酶K实验结果推测枯草芽孢杆菌SNBS-3具有合成细菌素Subtilosin A的能力。综上, 枯草芽孢杆菌SNBS-3全基因组测序结果表明其本身可产生多种抑菌物质, 是1株具有生防潜力的微生物, 相关分析结果可为包括细菌素Subtilosin A在内的多种抑菌物质的进一步开发应用提供理论基础。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 全基因组; 细菌素; 合成基因簇;

Whole Genome Sequencing of *Bacillus subtilis* SNBS-3 and Prediction of Its Antimicrobial Substances

Ji Shuaiqi^{1,2}, Wu Rina^{1,2,3}, Zhang Taowei^{1,3}, Lou Mengxue^{1,3}, Ding Ruixue^{1,2}, Ma Ying^{1,2}, Wu Junrui^{1,2,3,*}

(1. College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China;

2. Liaoning Engineering Research Center of Food Fermentation Technology, Shenyang 110866, China;

3. Shenyang Key Laboratory of Microbial Fermentation Technology Innovation, Shenyang 110866, China)

Abstract: As an extension of the previous research, this study aimed to comprehensively characterize the genome of *Bacillus subtilis* SNBS-3. Illumina second-generation sequencing technology and the third-generation high-throughput Pacbio sequencing platform were used for whole-genome sequencing of *B. subtilis* SNBS-3 isolated from traditional bean paste to obtain the key information of genome characteristics, gene function annotation and classification, phylogenetic evolution, and secondary metabolites. The results showed that the genome of SNBS-3 was a closed circular DNA of 4 076 387 bp in length containing 4 000 protein-coding genes. A total of 3 209, 2 824, 2 560, 147, 12 and 4 functional genes were annotated in the Clusters of Orthologous Groups (COG), Gene Ontology (GO), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), Carbohydrate-Active Enzymes (CAZyme), Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) and Virulence Factor Database (VFDB), respectively. Using the online software AntiSMASH and Bage14, we found that it contained genes related to the synthesis of surfactin, mycosubtilin, plipastatin, bacilysin and bacillaene, as well as a complete gene cluster for the synthesis of the bacteriocin subtilosin A. Based on the results of antimicrobial test and proteinase K test, it was hypothesized that *B. subtilis* SNBS-3 had the ability to synthesize subtilosin A. In conclusion, the whole genome sequencing results of *B. subtilis* SNBS-3 show that it can produce a variety of bacteriostatic substances and thus

收稿日期: 2023-04-09

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32172279); 沈阳市科技创新平台项目(21-103-0-14; 21-104-0-28)

第一作者简介: 纪帅奇(1998—)(ORCID: 0000-0001-5093-0351), 男, 博士研究生, 研究方向为食品微生物。

E-mail: shuaiqiji@126.com

*通信作者简介: 武俊瑞(1977—)(ORCID: 0000-0003-3419-0108), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品微生物。

E-mail: junruiwu@126.com

have biocontrol potential. The results from this study provide a theoretical basis for further development and application of various bacteriostatic substances including the bacteriocin subtilisin A.

Keywords: *Bacillus subtilis*; whole genome; bacteriocin; synthetic gene cluster

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230409-075

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 02-0057-07

引文格式:

纪帅奇, 乌日娜, 张淘崴, 等. 枯草芽孢杆菌SNBS-3全基因组测序及其抑菌物质预测分析[J]. 食品科学, 2024, 45(2): 57-63. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230409-075. <http://www.spkx.net.cn>

Ji Shuaiqi, WU Rina, ZHANG Taowei, et al. Whole genome sequencing of *Bacillus subtilis* SNBS-3 and prediction of its antimicrobial substances[J]. Food Science, 2024, 45(2): 57-63. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230409-075. <http://www.spkx.net.cn>

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 是一类细长杆状、内生孢子的革兰氏阳性细菌, 本身可产生多种具有良好广谱抑菌性、稳定性和安全性的抑菌物质, 例如, 对金黄色葡萄球菌和单核细胞增生李斯特菌等多种食源性致病菌有良好抑制作用的细菌素Subtilisin A, 其已被认为是未来可替代传统抗生素的重要物质^[1-3]。此外, 由于枯草芽孢杆菌可产生多种抑菌物质, 在发酵黄豆酱中能够抑制有害菌的生长, 提高发酵黄豆酱的品质, 因此, 枯草芽孢杆菌在食品防腐保鲜方面发挥着重要作用^[4]。

随着计算机技术和生物信息学技术的飞速发展, 高通量测序技术在微生物基因组中得到广泛应用, 使人们能准确、高效解析微生物基因组信息, 进而更好挖掘微生物功能及其作用机制^[5-8]。近年来, 研究者利用全基因组测序技术对不同芽孢杆菌开展菌株生物学特性研究, 挖掘菌株基因组信息, 预测菌株功能, 这对深入挖掘细菌素合成基因簇、鉴定细菌素特定基因以及细菌素功能基因组学等方面具有重要的意义^[9-13]。

为了详细解析枯草芽孢杆菌基因组信息, 本研究对从豆酱中分离的1株具有优良抑菌特性的枯草芽孢杆菌SNBS-3进行全基因组测序, 获得基因组信息的同时, 结合直系同源集 (Clusters of Orthologous Groups, COG)、基因本体论 (Gene Ontology, GO)、京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)、碳水化合物活性酶 (Carbohydrate-Active Enzymes, CAZyme)、抗生素耐药性数据库 (Comprehensive Antibiotic Resistance Database, CARD) 和致病力因子数据库 (Virulence Factor Database, VFDB) 等, 详细地解析基因组和菌株次级产物信息, 应用AntiSMASH和Bagel4软件发现枯草芽孢杆菌SNBS-3具有完整合成细菌素的基因簇, 结合抑菌实验和蛋白酶实验结果验证该菌具有合成细菌素的能力。旨在更好地为开发枯草芽孢杆菌SNBS-3提供生物信息基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

枯草芽孢杆菌SNBS-3分离于辽宁省沈阳市传统发酵豆酱, 保存于沈阳农业大学食品学院菌库, 沙门氏菌 (*Salmonella*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)、痢疾志贺氏菌 (*Shigella dysenteriae*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 同为本实验室保存菌种。

LB培养基 上海源叶生物科技有限公司; 细菌基因组DNA提取试剂盒 中科瑞泰 (北京) 生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪、TDE超低温冰箱 美国赛默飞世尔科技公司; TGL-168高速台式离心机 德国艾本德公司。

1.3 方法

1.3.1 体外抑菌实验

枯草芽孢杆菌SNBS-3培养24 h收集上清液。指示菌制成活菌数为 10^6 CFU/mL的菌悬液, 采用打孔法测定上清液抑菌特性, 菌悬液涂布后在孔内滴加50 μ L上清液, 培养24 h后测量抑菌圈直径^[14]。

1.3.2 蛋白酶实验

蛋白酶K酶液 (20 mg/mL) 与离心后的上清液按1:20比例混合, 45 $^{\circ}$ C水浴30 min后取出, 对照组为不加蛋白酶K、45 $^{\circ}$ C水浴30 min的上清液, 进行抑菌实验, 测量抑菌圈直径^[15]。

1.3.3 菌株DNA提取

将枯草芽孢杆菌SNBS-3培养24 h, 离心收集菌体, 采用细菌基因组DNA提取试剂盒提取菌株DNA, 用1%琼脂糖凝胶电泳检测提取后的DNA纯度和浓度^[16-17]。

1.3.4 全基因组测序

本次测序委托上海美吉生物科技有限公司完成。样

本质检合格后,采用二代测序技术和第三代高通量测序平台完成测序分析,原始数据的接头去除及低质量序列等工作使用质量统计软件来进行优化。

1.3.5 基因组组装

基于三代测序数据,使用软件Unicycler v 0.4.8进行组装,组装过程中会借助Pilonjin v1.22软件进行序列校正,得到初步组装结果,使用SOAPdenovo 2软件对组装结果进一步校正,得最终组装结果^[18-19]。

1.3.6 基因预测

通过GeneMarkS软件对基因组中的编码序列进行预测。利用tRNAscan-SE v2.0和Barrnap软件分别对基因组中tRNA和rRNA进行预测,获得基因组中tRNA和rRNA序列信息^[20-22]。

1.3.7 基因组圈图绘制

将测序得到的基因组序列、编码基因预测及非编码RNA等信息文件组装成GBK文件,通过CGView软件绘制单个样本基因组圈图,全面展示测序基因组特征^[23]。

1.3.8 基因功能分析

预测的编码蛋白序列分别与COG、GO、KEGG、CAZyme数据库中的蛋白序列进行BLAST比对和注释。预测的基因组序列分别与CARD进行序列比对,完成耐药基因分析。预测的氨基酸序列与VFDB进行比对,完成毒力基因注释结果^[24-29]。

1.3.9 抑菌物质预测分析

应用在线软件AntiSMASH和Bagel4对菌株SNBS-3全基因组中抑菌物质合成基因簇进行挖掘,参数均设置为默认参数^[30-31]。

2 结果与分析

2.1 枯草芽孢杆菌的体外抑菌效果

由图1可知,枯草芽孢杆菌上清液中的抑菌物质对6种指示菌均有影响,其中对革兰氏阳性菌的抑制效果比革兰氏阴性菌效果更好,对金黄色葡萄球菌抑制效果最好。

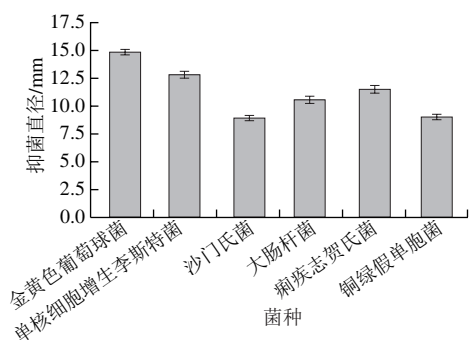


图1 枯草芽孢杆菌SNBS-3体外抑菌实验

Fig. 1 *In vitro* antimicrobial activity of *B. subtilis* SNBS-3

2.2 蛋白酶对枯草芽孢杆菌上清液抑菌能力的影响

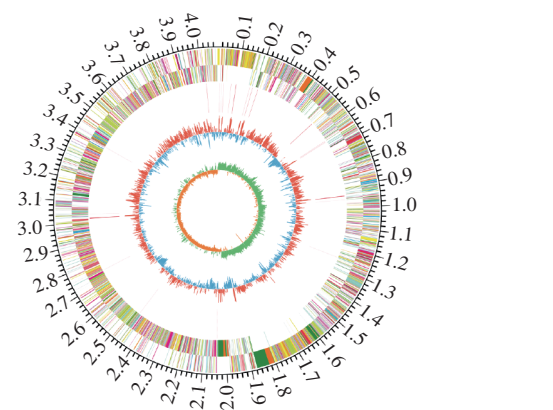
由表1可知,枯草芽孢杆菌SNBS-3上清液经过蛋白酶K处理前后对6种指示菌的抑制能力下降较大,均超过50%,说明上清液含有的抑菌物质为蛋白质或肽类。

表1 蛋白酶对上清液抑菌能力的影响
Table 1 Effect of protease on the antibacterial activity of the fermentation supernatant of *B. subtilis* SNBS-3

指标	金黄色葡萄球菌	单核细胞增生李斯特菌	沙门氏菌	大肠杆菌	痢疾志贺氏菌	铜绿假单胞菌
未加蛋白酶K抑菌圈直径/mm	13.65	11.62	7.57	9.51	10.24	8.24
加入蛋白酶K抑菌圈直径/mm	6.61	5.27	3.24	4.37	4.29	4.09
抑菌能力下降率/%	51.58	54.65	57.12	54.05	58.1	50.4

2.3 基因组组成与信息

由图2可知,枯草芽孢杆菌SNBS-3的基因组为一条环状闭合DNA,大小为4 076 387 bp,共预测到4 000个蛋白质编码基因、86个tRNA基因、30个rRNA基因、91个sRNA。由图3可知,基因平均长度为897.02 bp,最短基因长度为90 bp,最长基因长度为16 545 bp,长度大于等于500 bp的基因有2 815个,长度大于等于1 000 bp的基因有1 328个;串联重复序列为34个,重复比例为0.8%;散在重复序列为35个,重复比例为0.07%。



- A: RNA加工修饰
- P: 无机离子转运代谢
- B: 染色质结构和动力学
- Q: 次级代谢物生物合成、转运和代谢
- C: 能量生成和转换
- R: 主要功能(预测)
- D: 细胞周期控制、细胞分裂和染色体分裂
- S: 未知功能
- E: 氨基酸转运代谢
- T: 信号传导机制
- F: 核苷酸转运和代谢
- U: 细胞内运输、分泌和囊泡运输
- G: 碳水化合物转运代谢
- V: 防御机制
- H: 辅酶转运和代谢
- W: 细胞外结构
- I: 脂肪转运代谢
- X: 移动元件: 原噬菌体、转座子
- J: 翻译、核糖体结构和生物合成
- Y: 细胞核结构
- K: 转录
- Z: 细胞骨架
- L: 复制、重组和修复
- 16S_rRNA
- M: 细胞壁/膜/被膜的生物合成
- 23S_rRNA
- N: 细胞运动
- 5S_rRNA
- O: 翻译后修饰、蛋白质折叠和伴侣蛋白
- tRNA

图2 枯草芽孢杆菌SNBS-3基因组图

Fig. 2 Genome map of *B. subtilis* SNBS-3

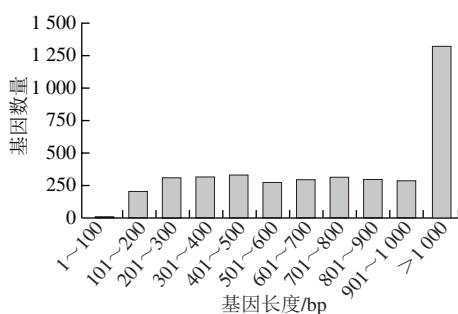


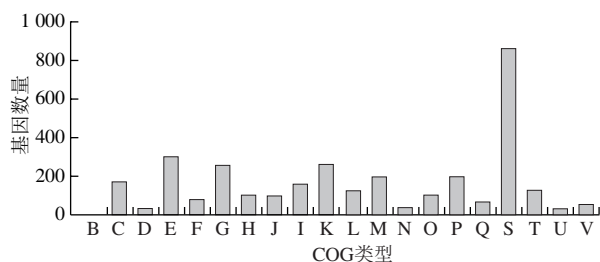
图3 枯草芽孢杆菌SNBS-3基因长度图

Fig. 3 Lengths of genes from *B. subtilis* SNBS-3

2.4 基因功能注释

2.4.1 COG数据库注释

将菌株SNBS-3基因组中的蛋白编码基因在COG数据库注释,共有3 209个蛋白质编码基因得到注释,结果如图4所示。



B.染色质结构和动力学; C.能量生产和转换; D.细胞周期控制、细胞分裂、染色体分裂; E.氨基酸转运和代谢; F.核苷酸转运和代谢; G.碳水化合物的运输和代谢; H.辅酶的运输和代谢; I.脂质运输和代谢; J.翻译、核糖体结构和生物合成; K.转录; L.复制、重组和修复; M.细胞壁/膜/包膜的生物合成; N.细胞运动; O.翻译后修饰,蛋白质折叠和伴侣蛋白; P.无机离子传输和代谢; Q.次级代谢物的生物合成、运输和分解; S.未知功能; T.信号转导机制; U.细胞内运输、分泌和囊泡运输; V.防御机制。

图4 枯草芽孢杆菌SNBS-3 COG注释分类

Fig. 4 Classification of COG annotations of *B. subtilis* SNBS-3

由图4可知,注释结果共有20类,分别有1、172、34、302、80、255、103、97、159、260、124、196、39、103、196、67、859、127、32、54个基因注释分类到B~V。其中未知功能基因最多,共859个,占注释基因总数的26.77%,接下来注释基因数量较多的功能分类依次:氨基酸转运与代谢(E)302个(占比9.41%)、转录(K)260个(占比8.1%)、碳水化合物运输和代谢(G)255个(占比7.95%)、细胞壁/细胞膜/细胞被膜(M)和无机离子的转运与代谢(P)各占196个(占比6.11%)。

2.4.2 GO数据库注释

将菌株SNBS-3基因组中的氨基酸序列与GO数据库进行比对分析,共有2 824个功能基因得到注释,结果如图5所示。

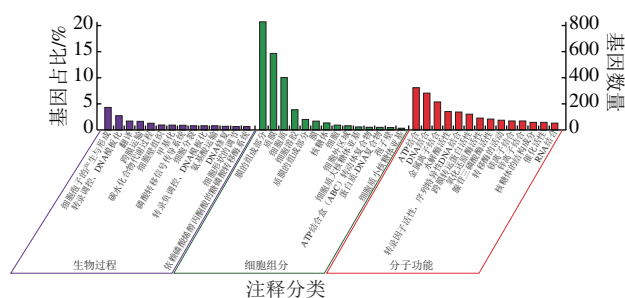


图5 枯草芽孢杆菌SNBS-3 GO注释分类

Fig. 5 Classification of GO annotations of *B. subtilis* SNBS-3

由图5可知,2 258、1 645个和1 638个功能基因分别注释到分子功能、生物过程和细胞组分。在分子功能中,分类到ATP结合和DNA结合功能基因占比最多,分别为324个(占比8.1%)和283个(占比7.08%)。在生物过程中,分类到细胞孢子的产生与形成和转录调控、DNA模板化功能基因占比最多,分别为172个(占比4.3%)和108个(占比2.7%)。在细胞组分中,分类到膜整体组件和质膜功能基因占比最多,分别为809个(占比20.73%)和587个(占比14.68%)。

2.4.3 KEGG数据库注释

由图6可知,注释结果显示共有2 560个基因在KEGG途径中富集到细胞过程、新陈代谢、人类疾病、遗传信息处理、有机系统和环境信息处理五大功能中,共计42条代谢通路。其中注释到新陈代谢的相关基因最多,共计1 780个,其次依次为环境信息处理、遗传信息处理、细胞过程、人类疾病和有机系统,相关基因依次为300、191、150、93个和46个。

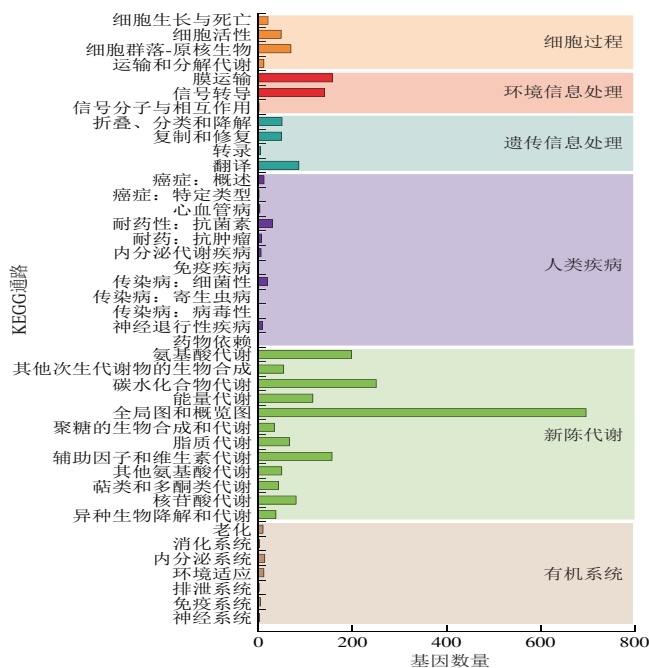


图6 枯草芽孢杆菌SNBS-3 KEGG注释分类

Fig. 6 Classification of KEGG annotations of *B. subtilis* SNBS-3

2.4.4 CAZyme数据库注释

将菌株SNBS-3中基因组数据与CAZyme数据库进行比对分析,发现基因组中共有147个基因编码的蛋白质结构域属于CAZyme家族,注释结果如表2所示。

由表2可知,糖苷水解酶最多,其次分别为糖基转移酶、碳水化合物酯酶、多糖裂解酶、氧化还原酶和碳水化合物化合物结合域。在糖苷水解酶中,纤维素酶基因(GH5家族基因)共有1个,淀粉酶基因(GH13家族基因)有8个。

表2 枯草芽孢杆菌SNBS-3 CAZyme注释结果

Table 2 Results of CAZyme annotations of *B. subtilis* SNBS-3

种类	基因数量	占比/%
氧化还原酶	7	4.76
碳水化合物结合域	3	2.04
碳水化合物酯酶	29	19.73
糖苷水解酶	53	36.05
糖基转移酶	47	31.97
多糖裂解酶	8	5.44

2.4.5 CARD注释

CARD是目前使用最为广泛、包含最为全面的细菌耐药基因数据库,通过CARD数据库注释,以identity≥80%为条件,CARD注释结果如表3所示。菌株SNBS-3的基因组有耐药基因12个,其中ykkC、blt、bmr、ykkD、vmlR基因具有多重耐药性,含有多个耐药受体,推测SNBS-3可能具有一定耐药性。

表3 枯草芽孢杆菌SNBS-3 CARD注释结果

Table 3 Results of CARD annotations of *B. subtilis* SNBS-3

基因编号	耐药基因	抗生素耐药性	耐药机制
gene1436	ykkC	氨基糖苷; 苯酚; 四环素	抗生素外流
gene2604	blt	多柔比星; 氟喹诺酮	抗生素外流
gene0931	mprF	肽类抗生素	抗生素靶标改变
gene2408	bmr	吡啶染料; 氟喹诺酮; 核昔; 苯酚	抗生素外流
gene0333	lmrB	林可酰胺	抗生素外流
gene1437	ykkD	氨基糖苷; 苯酚; 四环素	抗生素外流
gene0380	tmrB	核苷类	抗生素渗透性降低
gene0659	vmlR	林可酰胺; 大环内酯; 恶唑烷酮; 苯酚; 截短侧耳素; 链霉素; 四环素	靶靶失活
gene2624	aadK	氨基糖苷类	抗生素失活
gene0317	mphK	大环内酯类	抗生素失活
gene0318	mphK	大环内酯类	抗生素失活
gene4089	tet(L)	四环素	抗生素外流

2.4.6 VFDB注释

将菌株SNBS-3中基因组数据与VFDB进行比对分析,以identity≥70%作为筛选条件,结果如表4所示。基因组中共发现有4个毒力因子。其中clpC毒力基因与细菌黏附相关^[32],clpP毒力基因与菌株生长代谢相关^[33],bslA和capsule两个毒力基因的功能注释未知,还有待研究。

表4 枯草芽孢杆菌SNBS-3 VFDB注释结果

Table 4 Results of VFDB annotations of *B. subtilis* SNBS-3

基因编号	VFDB编号	基因	概述	相似性	得分
gene3087	VFG045350 (gb NP_390986)	bslA (VF0411)		100	6.5×10 ⁻⁹⁵
gene0114	VFG000079 (gb NP_463763)	clpC (VF0072)	一种ATP酶,可促进巨噬细胞早期逃离吞噬体;clpC也是黏附和入侵所必需,可能是通过调节inlA、inlB和laccA的表达实现	78.9	0
gene3581	VFG000681 (gb AAF13662)	capsule (VF0141)		78.4	1.6×10 ⁻⁵⁹
gene3438	VFG000077 (gb NP_465991)	clpP (VF0074)	丝氨酸蛋白酶参与蛋白水解,是高压环境下生长所必需的蛋白酶	76.1	8.1×10 ⁻⁵³

2.5 抑菌物质预测分析

通过在线软件AntiSMASH和Bage14挖掘发现SNBS-3产生的抑菌物质信息如表5所示,其细菌素合成基因簇如图7所示。由表5可看出,枯草芽孢杆菌SNBS-3可能产生抑菌物质Subtilosin A、Surfactin、Plipastatin、Mycosubtilosin、Bacilysin、Bacillaene。由图7可知,SNBS-3具有完整合成Subtilosin A基因簇。其中sboA是编码细菌素Subtilosin A结构基因,翻译后的前体结构没有抑菌活性,需经切割加工为成熟蛋白才有活性^[34]。albA对Subtilosin A前体翻译后进行修饰,起到结合金属离子和酶辅因子的作用。albB、albC和albD对菌株起到保护作用,抵御自身分泌的细菌素和环境中的抗菌剂的作用^[35-36]。albE、albF和albG负责调控Subtilosin A的合成,与Subtilosin A产量有关^[37]。通过前期抑菌实验和蛋白酶K实验结果可知,上清液抑菌能力下降原因可能是Subtilosin A或其他多肽类抑菌物质被蛋白酶K分解失去活性,而剩下的抑菌活性为不受蛋白酶K影响的其他抑菌物质保留的,因此枯草芽孢杆菌SNBS-3具有合成包括细菌素在内的多种抑菌物质的能力,具有生防菌的潜力。

表5 抑菌物质相关基因及其功能注释汇总

Table 5 Summary of genes related to bacteriostatic substances and their function annotations

抑菌物质	基因	功能注释汇总
Subtilosin A	albA、albB、albC、albD、albE、albF、albG等	细菌素Subtilosin A合成; 细胞溶解; 抑菌; 胞外; 细菌素免疫; 肽酶活性; 金属离子结合; 4Fe-4S簇结合; 膜的组成; ABC转运蛋白; 细菌素转运; ATP酶活性; 锌蛋白酶; 抗李斯特细菌素Subtilosin成熟酶AlbA、AlbB、AlbC、AlbD、AlbE、AlbF、AlbG
Surfactin	iscA、sufB、iscU (sufU)、sufC、sufD、sufS等	Fe-S簇结合; 细胞铁离子稳态; CysMet代谢PLP依赖酶; β-消除裂解酶; 半胱氨酸代谢; 磷酸吡哆醛结合; ATP酶活性; ABC转运蛋白; Fe-S簇组装蛋白SufB、SufD; Fe-S簇组装ATP酶SufC; 锌依赖性硫转移酶SufU; 半胱氨酸脱硫酸酶SufS
Mycosubtilin	itnB等	Iturin家族脂肽合成; 非核糖体肽合成/聚酮合成; AMP依赖合成酶连接酶; Mycosubtilosin合成亚单位B、C
Plipastatin	ppsA、ppsB、ppsC、ppsD、ppsE等	Fengycin家族脂肽合成; 非核糖体肽合成; AMP合成酶; 磷酸泛乙稀结合; 非核糖体plipastatin合成酶PpsA、PpsB、PpsC、PpsD、PpsE
Bacilysin	bacA、bacB、bacC、bacD、bacE、bacF、bacG等	抗生素生物合成; 抗夹膜素连接酶; 铁离子、钴离子结合; 转氨C=C键; 羧基裂解酶活性; 跨膜转运蛋白; 乙酰辅酶A羧化酶生物素羧化酶; 二氢抗夹膜素7-脱氢酶; Bacilysin合成蛋白BacB、外向转运蛋白BacE、转氨酶BacF; NADPH依赖还原酶BacG
Bacillaene	pksC、pksE、acpK、pksF、pksG、pksH、pksI、pksJ、pksL、pksM、pksR等	非核糖体肽合成; 抗生素聚酮生物合成; 类异戊二烯生物合成; 甲基化; 转移除氨基酰基以外的酰基; 酰基载体蛋白; 聚酮生物合成丙二酰ACP脱羧酶PksF、烯酰辅酶A水合酶PksH、合成酶PksL、PksM

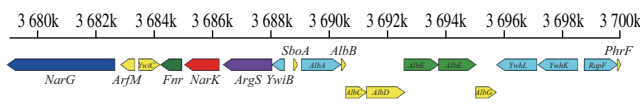


图7 细菌素合成基因簇

Fig. 7 Gene cluster for bacteriocin synthesis

3 讨论与结论

目前, 作为一项高效检测技术, 全基因组测序已广泛应用于芽孢杆菌抑菌物质预测与挖掘。Johny等^[38]对从海洋中分离的贝莱斯芽孢杆菌FTL7进行全基因组测序, 证明了其具有产生细菌素的能力并阐明了其抑菌机制。Dindhorja等^[39]对地衣芽孢杆菌MCC 2514进行全基因组测序, 发现该菌株具有多种脂肽和细菌素的基因簇, 具有一定防腐的能力。Iqbal等^[40]对从土壤中分离得到具有抗菌活性的矮芽孢杆菌SF-4进行测序和分析, 获得与功能多样性、进化和生物合成潜力相关基因组的同时, 准确预测到菌株基因组内多种抑菌物质合成基因簇。

本研究通过全基因组测序发现SNBS-3含有Surfactin、Mycosubtilosin、Plipastatin、Bacilysin、Bacillaene和Subtilosin A等多种抑菌物质的基因簇。这些抑菌物质在芽孢杆菌或其他菌株均有相关报道, 其中Surfactin是目前已知的表面活性最强的生物表面活性剂之一, 可有效破坏细菌的生物膜^[41]; Mycosubtilin是一种由非核糖体合成的Iturin家族脂肽, Yu Chenjie等^[42]发现枯草芽孢杆菌ATCC6633中产生的Mycosubtilin对引起谷物作物疾病的稻谷镰刀菌和黄萎病镰刀菌具有良好抑制作用。Plipastatin是Fengycin家族脂肽, 参与抑制磷脂酶A2和生物膜的形成, 可有效抑制常见食源性致病菌^[43]。Bacilysin是一种由芽孢杆菌产生的二肽抑菌物质, 其可通过抑制葡萄糖胺6-磷酸合酶而发挥对革兰氏阴性食源性致病菌的抑制效果^[44]。Bacillaene是一种多烯抗生素, 通过抑制蛋白合成发挥作用, 本身对光、温度、氧气等因素十分敏感^[45]。细菌素Subtilosin A是一种由核糖体合成的抑菌物质, Guo Yaoqi等^[46]发现Subtilosin A对多种细菌具有杀菌活性, 在食品保鲜方面具有潜在的应用价值。以上结果表明, 通过全基因组测序推测SNBS-3产生的抑菌物质较多, 种类广泛, 具有良好的生防潜力。

综上, 本研究对具有良好抑菌能力的枯草芽孢杆菌SNBS-3进行全基因组测序, 通过与多种数据库比对, 发现其基因组为一条环状闭合DNA, 大小为4 076 387 bp, GC含量为43.82%, 预测共有4 000个蛋白质编码基因、86个tRNA基因、30个rRNA基因和91个sRNA基因。应用AntiSMASH和Bagel4在线分析软件, 快速且准确地从

基因层面预测枯草芽孢杆菌SNBS-3产抑菌物质及其细菌素Subtilosin A的合成基因簇。解析SNBS-3基因组的同时也有助于未来实现Subtilosin A的异源表达, 降低细菌素的生产成本, 提高菌株在食品防腐和生物防治方面的应用价值。

参考文献:

- [1] KIMURA K, YOKOYAMA S. Trends in the application of *Bacillus* in fermented foods[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2019, 56: 36-42. DOI:10.1016/j.copbio.2018.09.001.
- [2] LIU J J, MADEC J Y, BOUSQUET-MELOU A, et al. Destruction of *Staphylococcus aureus* biofilms by combining an antibiotic with subtilisin A or calcium gluconate[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 6225. DOI:10.1038/S41598-021-85722-4.
- [3] WU W J, PARK S M, AHN B Y. Isolation and characterization of an antimicrobial substance from *Bacillus subtilis* BY08 antagonistic to *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*[J]. Food Science and Biotechnology, 2013, 22(2): 433-440. DOI:10.1007/s10068-013-0098-5.
- [4] 邱博书, 乌日娜, 史海粟, 等. 抗青霉芽孢杆菌的筛选及抑菌物质分析[J]. 食品科学, 2019, 40(22): 62-67. DOI:10.7506/spkx.1002-6630-20181121-254.
- [5] ZHOU S, GAN M, ZHU J Y, et al. Assessment of bioleaching microbial community structure and function based on next-generation sequencing technologies[J]. Minerals, 2018, 8(12): 596. DOI:10.3390/min8120596.
- [6] RABBEE M F, BAEK K H. Antimicrobial activities of lipopeptides and polyketides of *Bacillus velezensis* for agricultural applications[J]. Molecules, 2020, 25(21): 4973. DOI:10.3390/molecules25214973.
- [7] PURUSHOTHAMAN S, MEOLA M, EGLI A. Combination of whole genome sequencing and metagenomics for microbiological diagnostics[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(17): 9834. DOI:10.3390/ijms23179834.
- [8] WU C S, YIN Y Z, ZHU L L, et al. Metagenomic sequencing-driven multidisciplinary approaches to shed light on the untapped microbial natural products[J]. Drug Discovery Today, 2022, 27(3): 730-742. DOI:10.1016/j.drudis.2021.11.008.
- [9] COLLINEAU L, BOERLIN P, CARSON C A, et al. Integrating whole-genome sequencing data into quantitative risk assessment of foodborne antimicrobial resistance: a review of opportunities and challenges[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1107. DOI:10.3389/fmicb.2019.01107.
- [10] QI T, WANG S P, DENG L L, et al. Controlling pepper soft rot by *Lactobacillus paracasei* WX322 and identification of multiple bacteriocins by complete genome sequencing[J]. Food Control, 2021, 121: 107629. DOI:10.1016/j.foodcont.2020.107629.
- [11] LI S W, CHEN Y S, LEE Y S, et al. Comparative genomic analysis of bacteriocin-producing *Weissella cibaria* 110[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(3): 1227-1237. DOI:10.1007/s00253-016-8073-8.
- [12] MAJOR D, FLANZBAUM L, LUSSIER L, et al. Transporter protein-guided genome mining for head-to-tail cyclized bacteriocins[J]. Molecules, 2021, 26(23): 7218. DOI:10.3390/molecules26237218.
- [13] SORNCHUER P, SANINJUK K, PRATHAPHAN P, et al. Antimicrobial susceptibility profile and whole-genome analysis of a strong biofilm-forming *Bacillus* sp. B87 strain isolated from food[J]. Microorganisms, 2022, 10(2): 252. DOI:10.3390/microorganisms10020252.

- [14] 谢丽源, 彭卫红, 黄忠乾, 等. 猴头真菌(*Hericium erinaceus*)抑菌活性菌株筛选研究[J]. 西南农业学报, 2014, 27(2): 758-762. DOI:10.16213/j.cnki.scjas.2014.02.067.
- [15] KIM S W, HA Y J, BANG K H, et al. Potential of bacteriocins from *Lactobacillus taiwanensis* for producing bacterial ghosts as a next generation vaccine[J]. Toxins, 2020, 12(7): 432. DOI:10.3390/toxins12070432.
- [16] 孙鹏亮, 潘姣姣, 陈荟旭, 等. 品质异常奶粉中芽孢杆菌的分离和鉴定[J]. 现代畜牧兽医, 2021(1): 8-13. DOI:1672-9692(2021)01-0008-06.
- [17] 王露露, 李斌, 彭雪菲, 等. 纳豆及其制品的安全性研究[J]. 中国食品学报, 2022, 22(8): 325-333. DOI:10.16429/j.1009-7848.2022.08.035.
- [18] WICK R R, JUDD L M, GORRIE C L, et al. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads[J]. PLoS Computational Biology, 2017, 13(6): e1005595. DOI:10.1371/journal.pcbi.1005595.
- [19] LUO R B, LIU B H, XIE Y L, et al. SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read *de novo* assembler[J]. Gigascience, 2012, 1: 18. DOI:10.1186/2047-217X-1-18.
- [20] BESEMER J, LOMSADZE A, BORODOVSKY M. GeneMarkS: a self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes. Implications for finding sequence motifs in regulatory regions[J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(12): 2607-2618. DOI:10.1093/nar/29.12.2607.
- [21] LOWE T M, EDDY S R. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(5): 955-964. DOI:10.1093/nar/25.5.955.
- [22] LAGESEN K, HALLIN P, RODLAND E A, et al. RNAMmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes[J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35(9): 3100-3108. DOI:10.1093/nar/gkm160.
- [23] STOTHARD P, WISHART D S. Circular genome visualization and exploration using CGView[J]. Bioinformatics, 2005, 21(4): 537-539. DOI:10.1093/bioinformatics/bti054.
- [24] TATUSOV R L, KOONIN E V, LIPMAN D J. A genomic perspective on protein families[J]. Science, 1997, 278(5338): 631-637. DOI:10.1126/science.278.5338.631.
- [25] CARBON S, DOUGLASS E, DUNN N, et al. The Gene Ontology resource: 20 years and still going strong[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47: D330-D338. DOI:10.1093/nar/gky1055.
- [26] OGATA H, GOTO S, SATO K, et al. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes[J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27(1): 29-34. DOI:10.1093/nar/27.1.29.
- [27] LOMBARD V, RAMULU H G, DRULA E, et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(D1): D490-D495. DOI:10.1093/nar/gkt1178.
- [28] JIA B F, RAPHENYA A R, ALCOCK B, et al. CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database[J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45: D566-D573. DOI:10.1093/nar/gkw1004.
- [29] LIU B, ZHENG D D, ZHOU S Y, et al. VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors[J]. Nucleic Acids Research, 2022, 50(D1): D912-D917. DOI:10.1093/nar/gkab1107.
- [30] 孙天拥. 细菌界次级代谢产物生物合成基因簇的基因组学注释和比较研究[D]. 济南: 山东大学, 2016: 14-32.
- [31] LI H B, GUO L D, ZHANG X Y, et al. Whole-genome sequencing combined with mass spectrometry to identify bacteriocin and mine silent genes[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 169: 113975. DOI:10.1016/j.lwt.2022.113975.
- [32] XU X J, HUANG L X, SU Y Q, et al. The complete genome sequence of *Vibrio aestuarianus* W-40 reveals virulence factor genes[J]. Microbiologyopen, 2018, 7(3): e00568. DOI:10.1002/mbo3.568.
- [33] ROY S, ZHU Y C, MA J L, et al. Role of ClpX and ClpP in *Streptococcus suis* serotype 2 stress tolerance and virulence[J]. Microbiological Research, 2019, 223: 99-109. DOI:10.1016/j.micres.2019.04.003.
- [34] LI S, HE P, FAN H C, et al. A real-time fluorescent reverse transcription quantitative PCR assay for rapid detection of genetic markers' expression associated with fusarium wilt of banana biocontrol activities in *Bacillus*[J]. Journal of Fungi, 2021, 7(5): 353. DOI:10.3390/JOF7050353.
- [35] 张荣岭. 枯草芽孢杆菌LF-11及其细菌素的研究[D]. 济南: 山东大学, 2022: 13-26.
- [36] ALAJLANI M M. Characterization of subtilisin gene in wild type *Bacillus* spp. and possible physiological role[J]. Scientific Reports, 2022, 12(1): 10521. DOI:10.1038/s41598-022-13804-y.
- [37] ISHIDA K, NAKAMURA A, KOJIMA S. Crystal structure of the AlbEF complex involved in subtilisin A biosynthesis[J]. Structure, 2022, 30(12): 1637-1646. DOI:10.1016/j.str.2022.10.002.
- [38] JOHNY L C, SURESH P V. Complete genome sequencing and strain characterization of a novel marine *Bacillus velezensis* FTL7 with a potential broad inhibitory spectrum against foodborne pathogens[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2022, 38(9): 164. DOI:10.1007/s11274-022-03351-z.
- [39] DINDHORIA K, KUMAR S, BALIYAN N, et al. *Bacillus licheniformis* MCC 2514 genome sequencing and functional annotation for providing genetic evidence for probiotic gut adhesion properties and its applicability as a bio-preservative agent[J]. Gene, 2022, 840: 146744. DOI:10.1016/j.gene.2022.146744.
- [40] IQBAL S, VOLLMERS J, JANJUA H A. Genome mining and comparative genome analysis revealed niche-specific genome expansion in antibacterial *Bacillus pumilus* strain SF-4[J]. Genes, 2021, 12(7): 1060. DOI:10.3390/genes12071060.
- [41] ZHANG B, XU L L, DING J L, et al. Natural antimicrobial lipopeptides secreted by *Bacillus* spp. and their application in food preservation, a critical review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2022, 127: 26-37. DOI:10.1016/j.tifs.2022.06.009.
- [42] YU C J, LIU X, ZHANG X Y, et al. Mycosubtilin produced by *Bacillus subtilis* ATCC6633 inhibits growth and mycotoxin biosynthesis of *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides*[J]. Toxins, 2021, 13(11): 791. DOI:10.3390/toxins13110791.
- [43] BATOOL M, KHALID M H, HASSAN M N, et al. Homology modeling of an antifungal metabolite plipastatin synthase from the *Bacillus subtilis* 168[J]. Bioinformation, 2011, 7(8): 384-387. DOI:10.6026/97320630007384.
- [44] WANG T, LIU X H, WU M B, et al. Molecular insights into the antifungal mechanism of bacilysin[J]. Journal of Molecular Modeling, 2018, 24(5): 118. DOI:10.1007/s00894-018-3645-4.
- [45] LI H Y, HAN X, DONG Y J, et al. Bacillaenes: decomposition trigger point and biofilm enhancement in *Bacillus*[J]. ACS Omega, 2021, 6(2): 1093-1098. DOI:10.1021/acsomega.0c03389.
- [46] GUO Y Q, HUANG E, YANG X, et al. Isolation and characterization of a *Bacillus atropheus* strain and its potential use in food preservation[J]. Food Control, 2016, 60: 511-518. DOI:10.1016/j.foodcont.2015.08.029.