



比较基因组学分析鱼源荧光假单胞菌的致病和适应性

刘静聪¹, 冯立芳¹, 吴诗媛¹, 朱军莉^{1*}, 励建荣², 李婷婷³

(1. 浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江省食品安全重点实验室, 浙江 杭州 310018;

2. 渤海大学食品科学研究院, 辽宁 锦州 121013;

3. 大连民族大学生命科学学院, 辽宁 大连 116600)

摘要: 为探究荧光假单胞菌的强致病和环境适应性, 实验通过分析 2 株海水鱼源荧光假单胞菌的蛋白酶活性和挥发性盐基氮 (TVB-N) 的形成, 并采用比较基因组学方法解析致病和适应机制。结果显示, 荧光假单胞菌 PF07 和 PF08 在冷藏鱼汁中的蛋白酶活性强, 积累较多 TVB-N。经全基因组测序、组装和功能注释后, 得到 PF07 基因组长度为 6.13 Mb, GC 含量 61.4 %。通过泛基因组分析可知, PF07 与 PF08 核心基因共 4 980 个, 独特基因分别有 516 和 470 个。COG 和 KEGG 注释显示 2 株致病菌基因组中参与氨基酸代谢基因占比最高, PF07 独特基因参与无机离子转运代谢居多。碳水化合物活性酶 CAZy 注释表明, 2 株荧光假单胞菌基因组中糖苷转移酶与糖苷水解酶基因均占比最高, 还鉴定得到大量分解碳水化合物、蛋白质和脂质等多种底物的酶和相关蛋白基因, 特别有碱性金属蛋白酶 AprA、多胺 ABC 转运蛋白渗透酶 PotC、精氨酸与鸟氨酸脱羧酶等多种降解蛋白酶。另外, 2 株致病菌分布有 *rpoS*、*rpoN* 和 *rpoD* 多种 σ 因子。2 株鱼源荧光假单胞菌表现出强的致病性, 研究通过比较基因组学方法解析荧光假单胞菌分布多种编码蛋白酶和腐胺形成的氨基酸代谢基因、分解糖原和脂肪的基因及环境适应调控因子。本研究从基因水平初步揭示了荧光假单胞菌强分解蛋白质等多种底物的分子基础, 有助于深入探究该菌的代谢特征和致病机制。

关键词: 荧光假单胞菌; 全基因组测序; 致病; 适应性

中图分类号: Q 781; S 983

文献标志码: A

嗜冷微生物的生命活动是养殖鱼类低温贮藏品质下降的重要原因之一。在有氧冷藏条件下, 假单胞菌 (*Pseudomonas* spp.) 多为淡水和部分海水鱼的特定腐败菌。荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*) 是假单胞菌属中代表性的腐败菌, 属革兰氏阴性好氧杆菌, 正常生长温度为 25~30 °C, 在 4 °C 仍能生长, 是典型的耐冷菌。据研究报道, 大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)、大麻哈鱼属鱼类 (*Oncorhynchus*)、大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 及鲆 (*Silurus*

asotus) 等在有氧冷藏中分离到优势腐败菌荧光假单胞菌^[1-3]。荧光假单胞菌能分泌蛋白酶和酯酶等代谢酶系, 还能产生嗜铁素、黏液、色素等产物, 促进分解生鲜食品中的蛋白、碳水化合物和脂肪等营养成分, 生成氨 (胺)、酯、酮、醛、有机酸和含硫化物等多种腐臭特征产物, 导致感官品质下降、色泽改变, 甚至产生毒性。

随着高通量测序技术的发展, 越来越多的菌株完成了全基因组测序。通过全基因组序列分析

收稿日期: 2021-11-26 修回日期: 2022-03-30

资助项目: 浙江省属高校基本科研业务费专项 (XRK21001); 浙江省公益技术项目 (LGN20C200007)

第一作者: 刘静聪 (照片), 从事食品细菌生物被膜控制方面研究, E-mail: 2736387079@qq.com

通信作者: 朱军莉, 从事食品微生物检测和安全控制方面研究, E-mail: junlizhu0305@163.com



食源性致腐菌的基因信息, 有助于了解其致病、致腐、耐药和适应性的分子基础。Andereani 等^[4]通过基因组学技术分析肉源荧光假单胞菌色素表型的相关基因簇分布以确定部分荧光假单胞菌产色素的潜在基因。Li 等^[5]报道了波罗的海希瓦氏菌 (*Shewanella baltica*) 128 的全基因组测序主要注释与氨基酸运输和代谢有关, 并鉴定三甲胺代谢、硫代谢、腐胺代谢等与腐败相关的代谢途径相关的基因以及特定调控基因。比较基因组是生物信息学中的常见工具, 以相关物种基因组的相似性为基础, 能够识别菌株及其来源间的联系, 通过基因组信息推测基因数目、功能及表达机制^[6]。此外, 利用比较基因组学构建物种核心基因组集和泛基因组集, 可以获得物种的直系同源序列, 以便深入了解基因的改变, 这些变化会促进菌株在不同生态中进化及增强其对环境适应性。

目前, NCBI 数据库已公布基因组完成图的致腐荧光假单胞菌约 30 株, 来自水产品的仅有大菱鲆分离株 PF08。鉴于此, 本研究以腐败大黄鱼分离的荧光假单胞菌 PF07 为对象, 比较这 2 株鱼源荧光假单胞菌的致腐性, 通过全基因组测序获得 PF07 详细的基因组遗传信息, 利用比较基因组学探究 2 株菌致腐和环境适应性基因的分布及特征, 为解析假单胞菌在水产鱼类品质劣变中的作用机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌株及培养条件

荧光假单胞菌 PF07 菌株分离自冷藏的腐败大黄鱼^[7], 序列号 NMDC60033463, 由本实验室保藏。荧光假单胞菌 PF08 菌株由渤海大学励建荣教授惠赠, NCBI 参考序列号为 NZ_CP032618.1。将 2 株保藏的荧光假单胞菌菌种接种于 TSB 肉汤, 25 °C 摇床 (180 r/min) 振荡培养进行连续活化 24 h, 活化后菌株用于致腐性分析和全基因组测序。

1.2 无菌鱼汁的制备

参照毕伟伟等^[8]的方法, 无菌均质袋中以 1:2 比例加入新鲜大黄鱼脊背肉与无菌水, 用均质机拍打成匀浆液后加热煮沸 5 min, 离心过滤后取上清液调节 pH 为 6.8, 每 100 mL 上清液中加入 1.6 g 氧化三甲胺, 40 mg *L*-甲硫氨酸和 40 mg *L*-半胱氨酸, 121 °C 高压灭菌后制备成新鲜大黄鱼灭菌鱼汁。

1.3 鱼汁中蛋白酶和 TVB-N 测定

将荧光假单胞菌 PF07、PF08 分别以 $10^4 \sim 10^5$ CFU/mL 接种于鱼汁中, 置于 4 °C 条件下贮藏。分别取冷藏 0、3 和 7 d 的鱼汁 1.5 mL, 离心过滤后参照顾春涛等^[9]的方法测定蛋白酶活性, 并参照 GB/T 5009.44—2003^[10]方法的半微量定氮法测定鱼汁中 TVB-N 生成量, 表示为 mg N/100 mL 鱼汁。

1.4 基因组测序与组装

将 PF07 接种至 TSB, 于 20 °C 培养 18 h 后, 收集对数期的菌液 2 mL, 按照 FastPure Bacteria DNA Isolation Mini Kit DNA 提取试剂盒 (南京诺唯赞生物科技有限公司) 步骤进行 DNA 提取, 采用 NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) 核酸浓度检测仪测定 DNA 样品的浓度与纯度。将符合要求的高质量荧光假单胞菌 DNA 构建基因组小片段文库 (350 bp), 采用 Illumina PE150 平台进行全基因组测序。分别用 FastQC、Trimmomatic 和 BLESS 软件对原始数据质量进行初步评价、质量控制与 reads 修正。使用 SOAPdenovo 和 GapCloser 软件进行基因组组装与补洞。使用 SSPACE 软件进行基因组 scaffold 连接。细菌基因组建库和测序工作由北京诺禾致源科技股份有限公司完成。

1.5 基因预测与功能注释

用 geneMarkS 进行原核生物基因预测, 通过 Rfam、RNAmmer 和 tRNAscan-SE 软件分析全基因组特征。预测的蛋白质通过 Clusters of Orthologous Groups of proteins (COG)、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 和 Carbohydrate-Active enZymes (CAZy) 进行功能注释。

1.6 泛基因组分析与基因比对

通过 Prokka 软件进行快速原核基因组注释, roary 进行泛基因组分析。将核心基因与独特基因分析结果通过 TBtools 软件绘制韦恩图。下载参考基因的蛋白质序列, 构建数据库, 通过 Ubuntu 本地 BLAST 进行 blastp 比对, 输出结果 *e*-value 值为 1×10^{-5} 。

1.7 数据分析

鱼汁中蛋白酶和 TVB-N 值测定设 3 个重复组, 采用 GraphPad Prism 9.0.0.121 软件进行数据分析并作图, 采用 SPSS Statistics 20 软件的 AVOVA 进行方差分析, $P < 0.05$ 表示有统计学显著差异。

2 结果

2.1 蛋白酶活性和 TVB-N 形成

2 株荧光假单胞菌在冷藏鱼汁中的蛋白酶活性和 TVB-N 积累的变化如图 1 所示, PF07 与 PF08 蛋白酶活性在冷藏前 3 天增长缓慢, 冷藏第 3~7 天增长趋势加快, 第 7 天时分别达到 19.54 和 23.54 个活力单位。PF07 与 PF08 在第 0 与第 3 天

时, 蛋白酶活性无显著差异 ($P>0.05$), 第 7 天时 PF08 蛋白酶活性显著高于 PF07 ($P<0.05$)。TVB-N 为鱼肉腐败过程中蛋白质和其他含氮化合物的降解形成胺类的积累, 随着肉类贮藏时间延长而含量增加^[1]。2 株假单胞菌在冷藏第 0~3 天时 TVB-N 含量积累缓慢, 冷藏第 3~7 天积累速率加快, 第 7 天 PF07 的 TVB-N 值显著高于 PF08 ($P<0.05$), 分别达到 12.37 和 10.4 mg N/100 mL (图 1)。

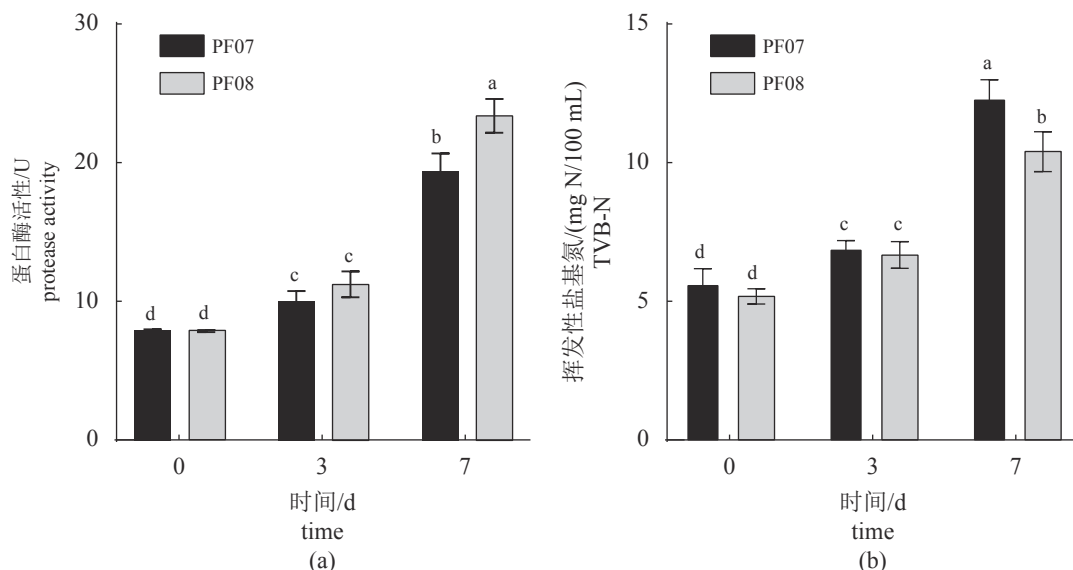


图 1 2 株荧光假单胞菌在冷藏鱼汁中的蛋白酶活性与 TVB-N 变化

小写字母为所有时间点组间比较, 不同字母表示有显著差异 ($P<0.05$)

Fig. 1 Changes of proteolytic activity and TVB-N value of two *P. fluorescens* isolates in refrigerated fish juice

The lowercase letters in the figures are the overall comparison of all time points, different letters mean significant differences ($P<0.05$)

2.2 基因组一般特征分析

PF07 基因组组装长度为 6 128 761 bp, 重叠群数目为 64, GC 含量 61.4 %, 编码基因 5 573 个, tRNA 60 个。

2.3 泛基因组分析

泛基因组可以分为核心基因组和辅助基因组, 核心基因组被确定为所有生物体共享的一组基因, 而辅助基因组则是存在于生物体子集或单个生物体中的一组基因。荧光假单胞菌 PF07 与 PF08 菌株共预测到 5 966 个基因, 其中核心基因有 4 980 个, 占预测总基因数的 83.47 %, 而辅助基因分别为 516 和 470 个, 是 2 株菌的独特基因 (图 2)。

2.4 COG 聚类分析

COG (Clusters of orthologous groups) 数据库是对基因产物进行同源分类的数据库, 识别直系同源基因, 通过已知蛋白对未知序列进行功能注释。

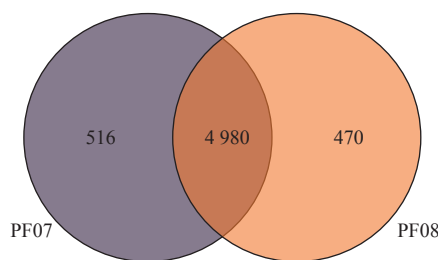


图 2 2 株荧光假单胞菌泛基因组分析

Fig. 2 Pan genome of two *P. fluorescens* isolates

选取荧光假单胞菌 PF07 的核心基因 COG 注释分类如图 3 所示, 除主要功能预测与未知作用基因外, 核心基因比重占前 3 的分类为 [E] 氨基酸转运代谢、[P] 无机离子转运代谢以及 [C] 能量生成和转换, 其中 [E] 氨基酸转运代谢占比最大, 达到 14.4 %。在 [E] 氨基酸转运代谢方面, PF07 与 PF08 最丰富的 3 个 COG 聚类一致, 分别为 COG0765 (ABC 型氨基酸转运系统、渗透酶组分 HisM)、

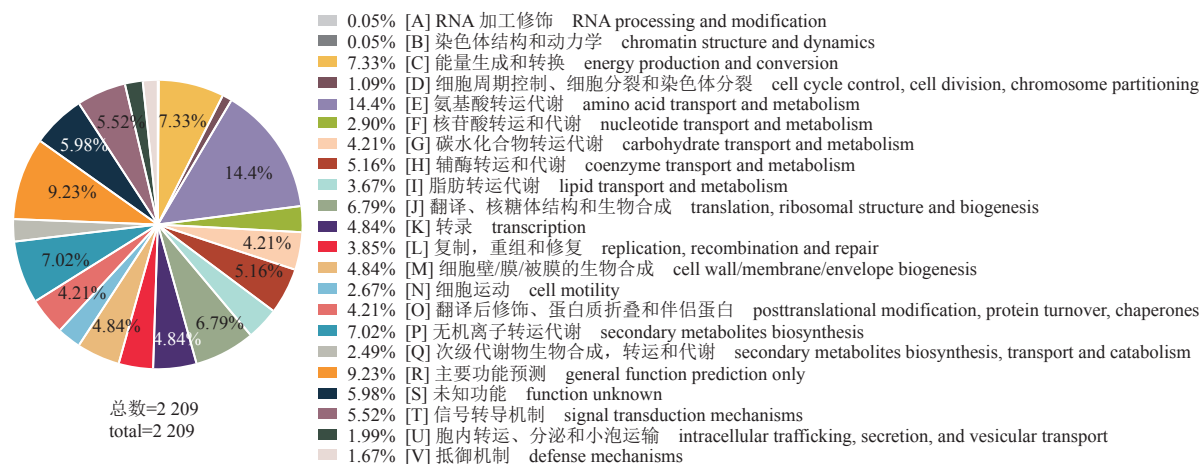


图3 荧光假单胞菌 PF07 核心基因组 COG 注释

Fig. 3 COG classification of core-genome of *P. fluorescens* PF07

COG3283 (芳香族氨基酸代谢, 转录调控因子 TyrR)、COG4215 (ABC 型精氨酸转运系统, 渗透酶组分, ArtQ)。

对荧光假单胞菌 PF07 和 PF08 的独特基因进行 COG 注释, 结果发现, PF07 基因组中 516 个独特基因注释到 COG 的 19 个功能类别, [P] 无机离子转运代谢占比最多, 其次为 [E] 氨基酸转运代谢与 [L] 复制、重组和修复。而 PF08 基因组中 470 个独特基因仅注释到 COG 的 11 个功能类别, 被归类为 [R] 主要功能预测与 [S] 未知作用基因比例最高, 其余各类别基因数均小于 5 (图 4)。

2.5 KEGG 注释分析

KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 是一个集合基因和蛋白质的分子功能与细胞和有机体的高级功能的数据库资源, 用于基因组序列和其他高通量数据的生物学解释^[12]。部分注释结果如表 1 显示, 2 株荧光假单胞菌的基因涉及最多通路的均为氨基酸代谢、碳水化合物代谢和膜转运通路代谢。这与荧光假单胞菌强的氨基酸和碳水化合物代谢与膜转运能力有关, 该细菌繁殖过程中能够促进利用鱼肉中糖原、蛋白质等多种底物代谢分解, 从而导致其捕捞后贮运的品质下降。此外, 在 10 个通路中, PF07 的基因数量少于 PF08, 而细胞运动性通路的基因多于 PF08, 荧光假单胞菌的致病能力差异也会受到调控基因数量与环境因素的影响。

进一步分析 2 株荧光假单胞菌 KEGG 注释中的氨基酸代谢通路相关基因。PF07 氨基酸代谢中参与基因最多的为缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解途径, 其次为甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢;

而 PF08 中参与基因最多的为甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢, 其次为半胱氨酸和蛋氨酸代谢 (图 5)。

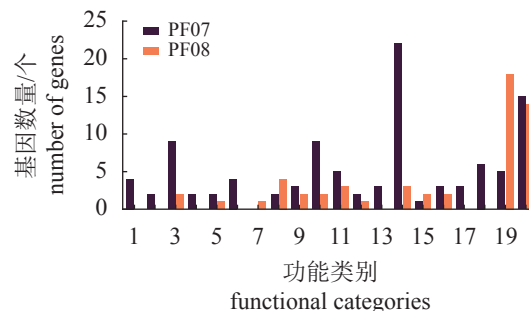


图4 2株荧光假单胞菌独特基因 COG 注释

1. [C] 能量生成和转换, 2. [D] 细胞周期控制、细胞分裂和染色体分裂, 3. [E] 氨基酸转运代谢, 4. [F] 核苷酸转运和代谢, 5. [G] 碳水化合物转运代谢, 6. [H] 辅酶转运和代谢, 7. [I] 脂肪转运代谢, 8. [J] 翻译, 核糖体结构和生物合成, 9. [K] 转录, 10. [L] 复制, 重组和修复, 11. [M] 细胞壁/膜/被膜的生物合成, 12. [N] 细胞运动, 13. [O] 翻译后修饰, 蛋白质折叠和伴侣蛋白, 14. [P] 无机离子转运代谢, 15. [Q] 次级代谢物生物合成, 转运和代谢, 16. [T] 信号转导机制, 17. [U] 胞内转运、分泌和小泡运输, 18. [V] 抵御机制, 19. [R] 主要功能预测, 20. [S] 未知功能

Fig. 4 COG classification of unique genes of two *P. fluorescens* isolates

1. [C] energy production and conversion, 2. [D] cell cycle control, cell division, chromosome partitioning, 3. [E] amino acid transport and metabolism, 4. [F] nucleotide transport and metabolism, 5. [G] carbohydrate transport and metabolism, 6. [H] coenzyme transport and metabolism, 7. [I] lipid transport and metabolism, 8. [J] translation, ribosomal structure and biogenesis, 9. [K] transcription, 10. [L] replication, recombination and repair, 11. [M] cell wall/membrane/envelope biogenesis, 12. [N] cell motility, 13. [O] posttranslational modification, protein turnover, chaperones, 14. [P] inorganic ion transport and metabolism, 15. [Q] secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism, 16. [T] signal transduction mechanisms, 17. [U] intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport, 18. [V] defense mechanisms, 19. [R] general function prediction only, 20. [S] function unknown

表 1 2 株荧光假单胞菌 KEGG 注释
Tab. 1 KEGG classification of two *P. fluorescens* isolates

通路名称 pathway	二级功能分类 secondary function	PF07	PF08
新陈代谢 metabolism	氨基酸代谢 amino acid metabolism	209	280
	碳水化合物代谢 carbohydrate metabolism	194	240
环境信息处理 environmental information processing	膜转运 membrane transport	185	210
	信号转导 signal transduction	143	176
人类疾病 human diseases	耐药性: 抗菌药 drug resistance: antimicrobial	41	42
	传染病: 细菌 infectious disease: bacterial	25	30
细胞过程 cellular processes	细胞群落 cellular community - prokaryotes	90	99
	细胞运动性 cell motility	61	56
遗传信息处理 genetic information processing	翻译 translation	69	83
	复制和修复 replication and repair	41	54
有机体系统 organismal systems	内分泌系统 endocrine system	19	22
	环境适应性 environmental adaptation	18	18

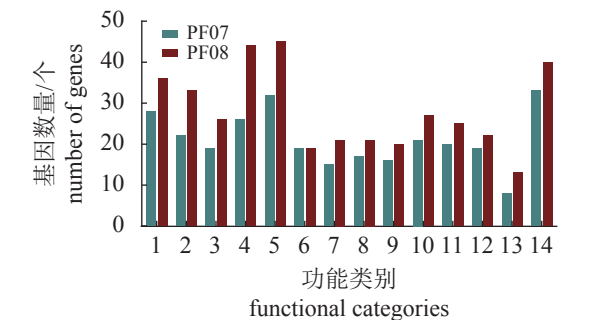


图 5 2 株荧光假单胞菌 KEGG 注释氨基酸代谢分析
1. 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢, 2. 精氨酸和脯氨酸代谢, 3. 精氨酸生物合成, 4. 半胱氨酸和蛋氨酸代谢, 5. 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢, 6. 组氨酸代谢, 7. 赖氨酸生物合成, 8. 赖氨酸降解, 9. 苯丙氨酸代谢, 10. 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成, 11. 色氨酸代谢, 12. 酪氨酸代谢, 13. 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成, 14. 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解

Fig. 5 Amino acid metabolism in KEGG classification of two *P. fluorescens* isolates
1. alanine, aspartate and glutamate metabolism, 2. arginine and proline metabolism, 3. arginine biosynthesis, 4. cysteine and methionine metabolism, 5. glycine, serine and threonine metabolism, 6. histidine metabolism, 7. lysine biosynthesis, 8. lysine degradation, 9. phenylalanine metabolism, 10. phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis, 11. tryptophan metabolism, 12. tyrosine metabolism, 13. valine, leucine and isoleucine biosynthesis, 14. valine, leucine and isoleucine degradation

2.6 CAZy 注释分析

碳水化合物活性酶 (carbohydrate-active enZymes, CAZy) 数据库是主要包含能够合成或者分解复杂碳水化合物和糖复合物的酶类数据库。图 6 注释结果显示 PF07 与 PF08 基因组中占比最高的均为糖苷转移酶与糖苷水解酶基因, 多糖裂

解酶基因最少。碳水化合物活性酶种类繁多, 参与碳水化合物合成 (糖基转移酶)、修饰 (碳水化合物酯酶) 和分解 (糖苷水解酶和多糖裂解酶)。糖基转移酶参与基质多糖生物合成, 糖苷水解酶通过水解多糖的糖苷键起作用^[13-14]。

2.7 致腐和环境耐受相关基因分析

2 株荧光假单胞菌包含多种致腐基因, 包括碳水化合物、蛋白质和脂质 3 种代谢途径, 以及

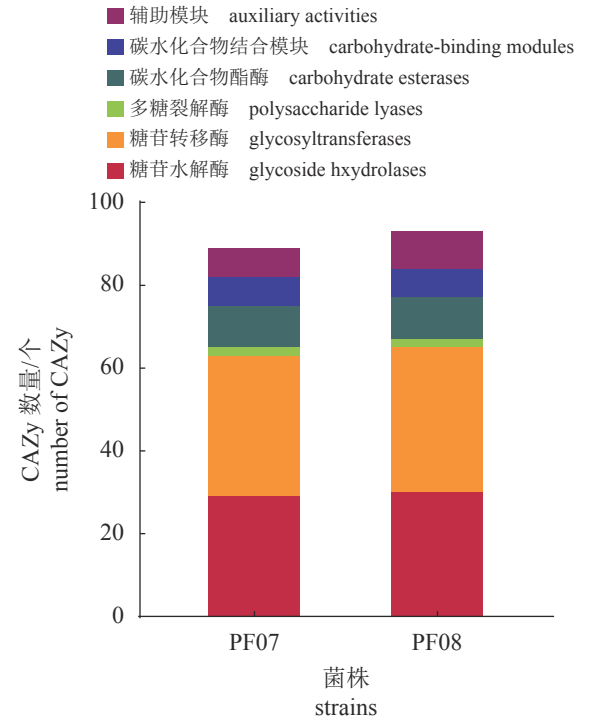


图 6 2 株荧光假单胞菌 PF07 和 PF08 的 CAZy 注释
Fig. 6 CAZy classification of two *P. fluorescens* isolates

环境适应相关基因。比较分析发现, 2 株致腐菌共享大部分重要致病相关基因, 比如编码碱性金属蛋白酶的 *apr* 基因、调控胺类转运的 *pot* 基因、编码脂肪酶的 *lip* 基因、色素 *trp* 基因、嗜铁素 *pvd* 基因以及抗胁迫 *rpo* 基因 (表 2)。2 株鱼源荧光假单胞菌致病相关基因高度相似, 还发现 13 个与蛋白质降解相关的酶和调控蛋白。

3 讨论

鱼肉品质劣变与微生物活动密切相关, 据估计每年因微生物生长和蛋白质分解/脂肪分解代谢造成的鱼类产品损失约 10%^[15]。细胞外分泌的蛋白酶降解含氮底物, 导致氨、三甲胺、硫化氢、己醛和 2, 4-庚二烯的产生, 脂肪酶导致异味酯的产生, 使食物品质劣变^[16]。假单胞菌属广泛分布于多种生鲜食品中, 是重要的腐败菌, 且具有强适应能力^[16]。因此, 深入了解假单胞菌致病性和环境适应性的分子基础, 有助于为其控制提供前提。研究表明, 2 株来源于大黄鱼和大菱鲆的荧光假单胞菌在冷藏鱼汁中均表现出较强的蛋白酶活性, 与杨兵等^[3]报道一致。

本研究重点采用比较基因组学方法分析菌株中主要致病和适应性基因的分布和差别, 其中核心基因组与泛基因组比率可估计分离株多样性。荧光假单胞菌 PF07 与 PF08 菌株核心基因组比率高达 83.47%, 显示 2 株鱼源分离株同源基因组序列差异不大。核心基因组中参与氨基酸转运代谢的基因比例最高, 这可能与荧光假单胞菌较强的蛋白分解能力密切相关。全基因组分析也证明荧光假单胞菌具有较多与碳水化合物合成和分解能力相关的基因, KEGG 注释中参与碳水化合物代谢的基因比重占第二, CAZy 注释也发现糖苷水解酶与糖苷转移酶占比较高。另外, PF07 菌株的大部分独特基因参与无机离子转运代谢, PF08 独特基因则归类为主要功能预测与未知作用基因居多。Stanborough 等^[17]提出隆德假单胞菌 (*P. lundensis*) 与莓实假单胞菌 (*P. fragi*) 全基因组中复制、重组和修复相关基因可能会区分 2 株菌的遗传特性, 氨基酸转运代谢与无机离子转运代谢相关基因可能会引起菌种间的代谢差异。

假单胞菌的糖水解、蛋白水解、脂解能力促进冷链中鱼肉营养成分降解。致病假单胞菌最先利用葡萄糖作为底物, 主要通过 Entner-Doudoroff (ED) 代谢途径分解葡萄糖^[18]。ED 途径的基因操

纵子由 *edd*、*glk* 和 *gltR* (PF07_003695, 003697) 编码, 代谢与转运过程受 PtxS、HexR、GtrS/GltR 与 GntR 4 种特定的调节系统调节^[19]。当葡萄糖和乳酸耗尽时, 假单胞菌则分泌胞外蛋白酶, 分解肌肉纤维间的结缔组织, 从而渗透到肌肉组织中^[20]。AprA 蛋白是假单胞菌属重要的胞外蛋白酶之一, 该家族的碱性金属蛋白酶 (APR) 由 *aprA-DEFI* (PF07_001491-PF07_001495) 基因所在的操纵子编码^[21]。鱼肉蛋白能被微生物生长作为底物消耗, 产生各种有毒有害的代谢物, 其中包括生物胺^[22]。食品中生物胺主要通过微生物脱羧酶对特定游离氨基酸进行脱羧反应而产生。2 株荧光假单胞菌中均发现编码腐胺代谢相关基因, 包括编码 ABC 型亚精胺腐胺转运系统的 *potGHI* (PF07_000779-PF07_000781) 基因、编码精氨酸脱羧酶与鸟氨酸脱羧酶的 *speA* (PF07_001898) 与 *speC* (PF07_002214) 基因。腐胺一般作为评价鱼类产品腐败程度的指标之一, 而精胺和亚精胺的形成相对复杂, 且合成受精氨酸酶、鸟氨酸脱羧酶和亚精胺合成酶等多种酶的调控^[23], 2 株荧光假单胞菌中, PF07 参与该代谢的 *potF* 和 *puuB* 基因略多。荧光假单胞菌分泌的蛋白酶和脱羧酶会导致低温储运过程中鱼类等水产品蛋白、多肽分解, 游离氨基酸水平的降低与肌肉蛋白水解有关^[21]。另外, 2 株菌中还发现含有脂肪酶相关基因 *lipA* (PF07_002419) 与 *lipB* (PF07_002420), 其为 2 株菌中脂肪酶的主要调控基因。

假单胞菌在鱼类、肉类和牛奶的腐败进程中分泌多种胞外酶、色素及黏液, 造成冷链生鲜产品的感官质量下降^[24]。Andreani 等^[4]发现产蓝色素的荧光假单胞菌菌株中存在色氨酸合成的 *trp* 基因参与蓝色色素的产生。PF07 和 PF08 都含有参与色氨酸生物合成途径的 *trpABI* (PF07_002802-PF07_002804) 与 *trpE* (PF07_000507) 基因, 可能参与调控 2 菌株的色素形成。另外, 2 株菌中均发现 *pvdI* (PF07_004924、PF07_005451、PF07_004258) 与 *pvdH* (PF07_003088) 等产嗜铁素相关基因, 其中 PF07 *pvdI* 基因多 1 个。铁载体是可以用铁限制条件结合和运输铁的小分子, 它们由许多不同的生物体产生, 荧光假单胞菌菌株产生的荧光素是一类具有高亲和力铁螯合能力的铁载体^[25]。

研究还发现 2 株荧光假单胞菌均编码多种 RNA 聚合酶 σ 因子, 包括 *rpoS*、*rpoD* 和 *rpoN*。RpoS 是多种细菌应答多元胁迫反应的重要调控蛋

表 2 2 株荧光假单胞菌的腐败相关蛋白及基因

Tab. 2 Spoilage-related proteins and genes in two *P. fluorescens* isolates

作用功能 function	蛋白描述 protein-description	基因 genes	PF07	PF08
碳水化合物 carbohydrate	葡萄糖激酶 glucokinase	<i>glk</i>	PF07_003696	PF08_004217
	磷酸葡萄糖酸脱水酶 phosphogluconate dehydratase	<i>edd</i>	PF07_003695	PF08_004218
	双组分系统响应调节器GltR two-component system response regulator GltR	<i>gltR</i>	PF07_003697	PF08_004216
	DNA结合转录抑制因子GntR DNA-binding transcriptional repressor GntR	<i>gntR</i>	PF07_005230	PF08_004078
	转录调控因子 transcriptional regulator	<i>ptxS</i>	PF07_001624	PF08_002820
	DNA结合转录调节因子HexR DNA-binding transcriptional regulator HexR	<i>hexR</i>	PF07_003812	PF08_004100
	碱性金属蛋白酶 alkaline metalloproteinase	<i>aprADEFI</i>	PF07_001491-PF07_001495	PF08_002691- PF08_002695
蛋白质 protein	氮调节蛋白 nitrogen regulation protein	<i>glnG</i>	PF07_002508	PF08_000287
	ABC转运蛋白(渗透酶) ABC transporter (permease)	<i>glnP</i>	PF07_002618	PF08_000182
	外膜通透性因子YhdP outer membrane permeability factor YhdP	<i>yhdP</i>	PF07_002159	PF08_004556
	氨基酸ABC转运蛋白 amino acid ABC transporter	<i>yhdY</i>	PF07_002012	PF08_004410
	多胺转运蛋白ATP结合蛋白PotA polyamine transporter ATP-binding protein PotA	<i>potA5</i>	PF07_000514	PF08_004920
	多胺ABC转运蛋白渗透酶PotC polyamine ABC transporter permease PotC	<i>potC2</i>	PF07_000511	PF08_004917
	腐胺ABC转运蛋白胞浆结合蛋白 putrescine ABC transporter periplasmic binding protein	<i>potF</i>	PF07_002697 PF07_000783 PF07_000782	PF08_005425
	ABC型亚精胺腐胺转运系统 ABC-type spermidine putrescine transport system	<i>potGHI</i>	PF07_000779-PF07_000781	PF08_005185-PF08_005187
	谷氨酰胺合成酶 glutamine synthetase	<i>puuA</i>	PF07_000787	PF08_005193
	γ -谷氨酰腐胺氧化酶 gamma-glutamylputrescine oxidase	<i>puuB</i>	PF07_000148 PF07_001825	PF08_003595
	精氨酸脱羧酶 arginine decarboxylase	<i>speA</i>	PF07_001898	PF08_000568
	鸟氨酸脱羧酶 ornithine decarboxylase	<i>speC</i>	PF07_002214	PF08_004612
	内酯化脂肪酶 lactonizing lipase	<i>lipA</i>	PF07_002419	PF08_004762
	脂酰(辛酰基)转移酶LipB lipoyl (octanoyl) transferase LipB	<i>lipB</i>	PF07_002420	PF08_004763
色素 pigment	色氨酸合酶亚基 tryptophan synthase subunit	<i>trpABI</i>	PF07_002802- PF07_002804	PF08_000034- PF08_000036
	邻氨基苯甲酸合酶组分 I anthranilate synthase component I	<i>trpE</i>	PF07_000507	PF08_004913
嗜铁素 siderophore	水溶性荧光素侧链非核糖体肽合成酶PvdI pyoverdine sidechain non-ribosomal peptide synthetase PvdI	<i>pvdI</i>	PF07_004258 PF07_004924 PF07_005451	PF08_002040 PF08_002051
	水溶性荧光素生物合成蛋白PvdH pyoverdine biosynthesis protein PvdH	<i>pvdH</i>	PF07_003088	PF08_001974
环境适应 environmental adaptation	RNA聚合酶 σ 因子RpoS RNA polymerase sigma factor RpoS	<i>rpoS</i>	PF07_000927	PF08_005334
	RNA聚合酶因子 σ -54 RNA polymerase factor sigma-54	<i>rpoN</i>	PF07_002145	PF08_004542
	DNA指导的RNA聚合酶亚基 β' DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	<i>rpoD</i>	PF07_000538	PF08_004944

白, 而 RpoN 参与调节氮代谢、运动性和毒力等多种功能。Liu 等^[26] 研究发现荧光假单胞菌 *rpoS* (PF07_000927) 可调节对多种胁迫条件的耐受性、胞外酰化高丝氨酸内酯 (AHL) 水平、胞外蛋白酶活性, 而致腐希瓦氏菌中 RpoN 影响鞭毛组装、抗生素敏感性及腐蚀性^[27]。

本研究系统解析了从腐败大黄鱼中分离的荧光假单胞菌 PF07 降解糖原、蛋白质和脂肪的分解酶及环境耐受的基因潜在定位, 以 NCBI 数据库已公布基因组完成图的大菱鲆分离株 PF08 为参考, 揭示 PF07 和 PF08 具有高度同源性。核心基因组中调控基因比例较高, 其致腐能力与编码碱性金属蛋白酶和氨基酸脱羧酶等多种蛋白酶、ED 途径葡萄糖水解酶、脂肪酶、色素合成等基因密切相关, 从基因层面上阐明 PF07 株强致腐能力的分子基础。研究为致腐假单胞菌分离株的基因组结构中的相似性和差异性提供了线索, 为后续假单胞菌代谢特征、致腐机理和调控通路研究奠定了良好的基础。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Dalgaard P. Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1995, 26(3): 319-333.
- [2] Ge Y, Zhu J, Ye X, *et al.* Spoilage potential characterization of *Shewanella* and *Pseudomonas* isolated from spoiled large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*)[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2017, 64(1): 86-93.
- [3] 杨兵, 李婷婷, 励建荣. 大菱鲆优势腐败菌的分离鉴定及其群体感应[J]. *中国食品学报*, 2017, 17(7): 139-145.
- Yang B, Li T T, Li J R. Isolation, identification and quorum sensing of dominant spoilage bacteria from *Sco-phthalmus maximus*[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2017, 17(7): 139-145 (in Chinese).
- [4] Andreani N A, Carraro L, Martino M E, *et al.* A genomic and transcriptomic approach to investigate the blue pigment phenotype in *Pseudomonas fluorescens*[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 213: 88-98.
- [5] Li J P, Yu H L, Yang X Y, *et al.* Complete genome sequence provides insights into the quorum sensing-related spoilage potential of *Shewanella baltica* 128 isolated from spoiled shrimp[J]. *Genomics*, 2020, 112(1): 736-748.
- [6] Walker B J, Abeel T, Shea T, *et al.* Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e112963.
- [7] Tang R, Zhu J L, Feng L F, *et al.* Characterization of LuxI/LuxR and their regulation involved in biofilm formation and stress resistance in fish spoilers *Pseudomonas fluorescens*[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2019, 297: 60-71.
- [8] 毕伟伟, 冯立芳, 石双妮, 等. 波罗的海希瓦氏菌和杀鲑气单胞菌致腐性及TorA还原酶差异比较[J]. *水产学报*, 2020, 44(3): 495-504.
- Bi W W, Feng L F, Shi S N, *et al.* Comparison of spoilage potential and TorA protein between *Shewanella baltica* and *Aeromonas salmonicida*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(3): 495-504 (in Chinese).
- [9] 顾春涛, 毕伟伟, 朱军莉. 冷鲜牛肉贮藏中菌群结构及优势菌致腐性的分析[J]. *食品科学*, 2019, 40(18): 7.
- Gu C T, Bi W W, Zhu J L. Evaluation of microbial diversity and spoilage potential of dominant bacteria in chilled beef[J]. *Food Science*, 2019, 40(18): 7 (in Chinese).
- [10] 王竹天, 兰真, 鲁杰, 等. GB/T 5009-2003《食品卫生检验方法》理化部分简介[J]. *中国食品卫生杂志*, 2005, 17(3): 193-211.
- Wang Z T, Lan Z, Lu J, *et al.* Introduction of GB/T 5009-2003 methods of food hygienic analysis-physical and chemical section[J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2005, 17(3): 193-211 (in Chinese).
- [11] Bekhit A E D A, Holman B W B, Giteru S G, *et al.* Total volatile basic nitrogen (TVB-N) and its role in meat spoilage: a review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2021, 109: 280-302.
- [12] Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, *et al.* KEGG as a reference resource for gene and protein annotation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(D1): 457-462.
- [13] Minic Z. Physiological roles of plant glycoside hydrolases[J]. *Planta*, 2008, 227(4): 723-740.
- [14] 黄红卫, 刘艳丽, 李春. 糖苷酶的研究及其改造策略[J]. *生物技术通报*, 2010(5): 55-60.
- Huang H W, Liu Y L, Li C. Progress in glycosidase and

- modification of strategies[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2010(5): 55-60 (in Chinese).
- [15] Love D C, Fry J P, Milli M C, *et al.* Wasted seafood in the United States: quantifying loss from production to consumption and moving toward solutions[J]. *Global Environmental Change*, 2015, 35: 116-124.
- [16] Myszka K, Tomáš N, Wolko Ł, *et al.* *In situ* approaches show the limitation of the spoilage potential of *Juinnerperus phoenicea* L. essential oil against cold-tolerant *Pseudomonas fluorescens* KM24[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(10): 4255-4268.
- [17] Stanborough T, Fegan N, Powell S M, *et al.* Genomic and metabolic characterization of spoilage-associated *Pseudomonas* species[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2018, 268: 61-72.
- [18] 张若煜, 董鹏程, 朱立贤, 等. 生鲜肉中假单胞菌致腐机制的研究进展[J]. *食品科学*, 2020, 41(17): 291-297.
- Zhang R Y, Dong P C, Zhu L X, *et al.* Progress in understanding the mechanism by which *Pseudomonas* spp. causes the spoilage of raw meat[J]. *Food Science*, 2020, 41(17): 291-297 (in Chinese).
- [19] Daddaoua A, Krell T, Ramos J L. Regulation of glucose metabolism in *Pseudomonas*: the phosphorylative branch and entner-doudoroff enzymes are regulated by a repressor containing a sugar isomerase domain[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(32): 21360-21368.
- [20] Wickramasinghe N N, Ravensdale J, Coorey R, *et al.* The predominance of psychrotrophic pseudomonads on aerobically stored chilled red meat[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2019, 18(5): 1622-1635.
- [21] Wang G Y, Li Q, Tang W Q, *et al.* AprD is important for extracellular proteolytic activity, physicochemical properties and spoilage potential in meat-borne *Pseudomonas fragi*[J]. *Food Control*, 2021, 124: 107868.
- [22] Houicher A, Bensid A, Regenstein J M, *et al.* Control of biogenic amine production and bacterial growth in fish and seafood products using phytochemicals as biopreservatives: a review[J]. *Food Bioscience*, 2021, 39: 100807.
- [23] Li B B, Lu S L. The importance of amine-degrading enzymes on the biogenic amine degradation in fermented foods: a review[J]. *Process Biochemistry*, 2020, 99: 331-339.
- [24] Wickramasinghe N N, Hlaing M M, Ravensdale J T, *et al.* Characterization of the biofilm matrix composition of psychrotrophic, meat spoilage pseudomonads[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 16457.
- [25] Guo W B, Li F, Xia J M, *et al.* Complete genome sequence of a marine-derived bacterium *Pseudomonas* sp. SXM-1 and characterization of its siderophore through antiSMASH analysis and with mass spectroscopic method[J]. *Marine Genomics*, 2021, 55: 100802.
- [26] Liu X X, Xu J, Zhu J L, *et al.* Combined transcriptome and proteome analysis of RpoS regulon reveals its role in spoilage potential of *Pseudomonas fluorescens*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 94.
- [27] Feng L F, Bi W W, Chen S, *et al.* Regulatory function of sigma factors RpoS/RpoN in adaptation and spoilage potential of *Shewanella baltica*[J]. *Food Microbiology*, 2021, 97: 103755.

Comparative genomics revealed spoilage characteristics and adaptability of *Pseudomonas fluorescens* isolated from fish

LIU Jingcong¹, FENG Lifang¹, WU Shiyuan¹, ZHU Junli^{1*}, LI Jianrong², LI Tingting³

(1. Food Safety Key Lab of Zhejiang Province, College of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, China;

2. College of Food Science Research Institute, Bohai University, Jinzhou 121013, China;

3. College of Life Science, Dalian Nationality University, Dalian 116600, China)

Abstract: *Pseudomonas* spp. are specific spoilage bacteria of various fish from freshwater and marine during aerobic chilled storage. The behavior of psychrotrophic *Pseudomonas* is one of the common causes of quality deterioration in refrigerated fish products. *P. fluorescens* as a typical psychrotrophic spoilage bacterium, is main dominant spoilage *Pseudomonas* in aquatic product. Whole genome sequence analysis of genetic information is helpful to understand the molecular basis of spoilage, drug resistance and adaptation of foodborne spoilage bacteria. Currently, about 30 strains of *P. fluorescens* with complete genome map have been published in NCBI database, of which only an isolate *P. fluorescens* PF08 comes from *Scophthalmus maximus*. To explore the strong spoilage potential and environmental adaptability of *P. fluorescens*, the proteolytic activity and total volatile basic nitrogen (TVB-N) production of two isolates of *P. fluorescens* PF07 and PF08 from marine fish were measured and the mechanisms of spoilage and adaptation were explored deeply by comparative genomics. *P. fluorescens* PF07 and PF08 showed strong proteolytic activity and produced high TVB-N in refrigerated fish juice. After sequencing, assembly and functional annotation of whole genome, the length of the PF07 genomic was 6.13 Mb, and GC content was 61.4%. According to pan genome analysis, there were 4980 core genes in the two isolates, and 516 and 470 unique genes in PF07 and PF08, respectively. The highest proportion of genes was involved in amino acid metabolism both in the two isolates by COG and KEGG annotations, while the most unique genes belonged to inorganic ion transport and metabolism in PF07. Glycosyltransferases and glycoside hydrolases genes accounted for the highest proportion among carbohydrate active enzyme in the two genomes based on CAZy annotation. In addition, many genes of enzymes and related protein associated with degrading various substrates of carbohydrates, proteins, and lipids were founded, such as alkaline metalloproteinase AprA, polyamine ABC transporter permease PotC, arginine and ornithine decarboxylase, etc. Several genes of sigma factors, including *rpoS*, *rpoN* and *rpoD*, were also distributed in the two strains. Two *P. fluorescens* isolators indicated strong spoilage potential, and had many genes encoding protease and putrescine formation and amino acid metabolism, and decomposing glycogen and fat, were distributed in the two isolates, as well as environmental adaptation regulators. This work preliminarily clarified the molecular basis of *P. fluorescens* with strong degradation of fish nutrition substrates at the genetic level, and revealed the metabolic characteristics and spoilage mechanism in *P. fluorescens*, which will provide a theoretical basis for exploring the spoilage mechanism of *Pseudomonas* in aquatic fish.

Key words: *Pseudomonas fluorescens*; whole genome sequencing; spoilage; adaptability

Corresponding author: ZHU Junli. E-mail: junlizhu0305@163.com

Funding projects: Fundamental Research Funds for the Zhejiang Province Universities (XRK21001); Public Projects of Zhejiang Province (LGN20C200007)