

金枪鱼源莓实假单胞菌 MS-10 全基因组测序及分析

崔方超¹, 王芸婷¹, 刘佳宜¹, 王当丰¹, 檀茜倩¹, 李秋莹¹, 励建荣^{1*}, 李婷婷^{2*}

(¹渤海大学食品科学与工程学院 生鲜农产品贮藏加工及安全控制技术国家地方联合工程研究中心

中国轻工业海水鱼加工重点实验室 辽宁锦州 121013

²大连民族大学生命科学院 辽宁大连 116600)

摘要 分析莓实假单胞菌环境适应及腐败相关基因,为后续研究其致腐机制提供理论依据。从腐败的冷藏金枪鱼中分离腐败菌,利用根瘤农杆菌 KYC55 筛选具有群体感应的分离株并用气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)检测其分泌的 *N*-酰基高丝氨酸内酯(AHLs),利用 16S rRNA 比对及平均核苷酸一致性(ANI)分析确定菌株类型;通过全基因组测序,确定菌株的基因功能及注释信息;利用嗜铁素检测(CASAD)平板法和紫外法检测不同温度下菌株分泌的嗜铁素量;检测接种 MS-10 的冷藏金枪鱼中菌落总数及挥发性盐基氮变化,结合腐败代谢物产量因子($Y_{\text{TVB-N/CFU}}$)分析 MS-10 的致腐能力。结果表明:分离株为莓实假单胞菌(MS-10),能够分泌群体感应信号分子 C_8 -HSL 和 C_{10} -HSL,其基因组大小为 5.25 Mb,GC 占比为 58.2%。比对多个数据库发现,MS-10 的功能基因主要集中在生物代谢、信号转导以及环境应激等方面,包含群体感应调控基因 *traIR* 及大量致腐相关基因。低温条件更有利于 MS-10 分泌嗜铁素。接种 MS-10 的金枪鱼块在冷藏期间菌落总数和 TVB-N 值相比于空白组明显增加,其 $Y_{\text{TVB-N/CFU}}$ 值为 2.77×10^{-7} mg/CFU。结论:莓实假单胞菌 MS-10 具有群体感应系统,为耐冷致腐菌,从基因水平上证明其具有较强的致腐潜力及环境适应性。研究结果为进一步探究 MS-10 群体感应调控机制,开展其致腐性研究提供数据支撑。

关键词 金枪鱼; 莓实假单胞菌; 全基因组测序; 群体感应; 嗜铁素

文章编号 1009-7848(2024)08-0457-16 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.08.041

金枪鱼(*Thunnus obesus*)分布于印度洋、太平洋及大西洋中部的广阔海域。金枪鱼肉质细嫩,含有大量的蛋白、维生素、不饱和脂肪酸等营养成分,是一类重要的远洋性商品食用鱼^[1]。就整体而言,金枪鱼的肉质具有低脂、高蛋白的特性,是一种较好的优质蛋白来源^[2]。在日本,人们常将金枪鱼切成生鱼片或制成寿司食用,是目前最普遍的食用方式。这种食用方式,使得金枪鱼在加工、储运及售卖等过程中更容易受到微生物的侵染,加速其腐败变质的进程,使其货架期缩短及经济价值下降^[3-4]。

冷藏储存的金枪鱼肉中微生物种群具有多样性,随着储藏时间的延长,鱼肉逐渐出现腐败现

象,在此过程中一些环境适应性强、繁殖速度快并能够在储藏环境中利用鱼肉代谢生成异味和腐败物质的菌群占主导地位,成为金枪鱼在特定储藏条件下的优质腐败菌,也称特定腐败菌(Specific spoilage organisms, SSOs)^[5-6]。研究发现,冷藏储存下金枪鱼的微生物主要由莓实假单胞菌(*Pseudomonas fragi*)以及其它假单胞菌属组成,还有弧菌属、热死环丝杆菌、产 H₂S 细菌和肠杆菌科等,后者的数量相对较少^[7]。

莓实假单胞菌是一种需氧、短杆状且具有耐冷性的革兰氏阴性菌,生长的温度范围在 2~35℃,其具有较好的营养基质适应性,能够利用多种氮源及碳源完成生长繁殖^[8]。莓实假单胞菌在生长繁殖过程中分泌大量的蛋白酶,这一特性是其成为肉类和乳制品优势腐败菌的主要原因^[9]。研究发现,在冷链物流肉品中分离得到的腐败菌中,莓实假单胞菌占 56.7%至 79.0%之间^[10]。梅佳林等^[11]通过高通量测序技术分析不同贮藏时期冷藏三文鱼的菌相组成,结果显示莓实假单胞菌为 4℃下冷藏三文鱼的优势腐败菌。王光宇等^[12]从腐败冷藏

收稿日期: 2023-08-10

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(U20A2067);辽宁省自然科学基金博士科研启动基金计划项目(2022-BS-301)

第一作者: 崔方超,男,博士,副教授

通信作者: 励建荣 E-mail: lijr6491@163.com

李婷婷 E-mail: tingting780612@163.com

鸡肉中分离获得1株具有较强腐败特性的菌株,经鉴定为莓实假单胞菌,并利用PacBio RSII测序平台对其进行全基因组测序分析。然而,从水产品中分离的莓实假单胞菌全基因组测序及相关分析还未见报道。其致水产品腐败的作用机制缺乏数据支撑。

本文基于前期对冷藏金枪鱼的菌落结构和多样性的研究,从冷藏腐败金枪鱼中分离得到1株莓实假单胞菌MS-10,对其进行De novo全基因组测序,并通过测序确定其环境适应、群体感应以及腐败相关基因,为今后开展其致腐性研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

莓实假单胞菌MS-10,由冷藏腐败金枪鱼中分离获得。根癌农杆菌KYC55(*Agrobacterium tumefaciens* KYC55)由渤海大学水产品贮藏加工研究所保藏。

LB液体、固体培养基,广州苏玛生物科技有限公司;X-gal,深圳市益百顺科技有限公司;四环素、大观霉素、铬天青S(CAS),上海麦克林生化科技有限公司;庆大霉素,北京欣盛百泰科技有限公司;细菌基因组DNA磁珠抽提试剂盒,北京中冉旭升科技发展有限公司。

1.2 仪器与设备

Legend Micro21R台式微量离心机,美国Thermo公司;Imark酶标仪,美国Bio-Rad公司;HZQ-X300C型恒温振荡器,上海一恒科技有限公司;WH-1微型旋涡混合仪,上海浦予工业科技有限公司;Eppendorf 5331梯度PCR仪,德国Eppendorf公司;Qubit荧光计核酸定量仪,美国Life Technologies公司;Ge1Doc XR+全自动凝胶成像系统,美国Bio Rad公司。

1.3 试验方法

1.3.1 菌株培养方法 菌株均按1%接种量接种于LB肉汤中28℃、160 r/min摇床过夜培养,培养至对数生长期,即OD_{595nm}为0.8左右时使用;KYC55培养时需向培养基中添加相应量抗生素(终质量浓度为2 μg/mL四环素、100 μg/mL大观霉素以及100 μg/mL庆大霉素)。

1.3.2 菌种分离鉴定 将购买的冷冻金枪鱼(真空包装)在无菌环境下切块,分装在无菌袋中并密封,在4℃下冷藏直至腐败,对腐败鱼块中的腐败菌进行分离,平板划线挑取单一菌落纯化保藏。

通过N-酰基-高丝氨酸内酯类化合物(AHLs)高效报告菌株筛选具有群体感应的分离株。将分离株及根癌农杆菌KYC55过夜活化2次后培养至对数生长期,在含有20 mg/mL X-gal溶液的固体培养基上平行划线,置于生化培养箱中28℃培养24 h,用长链AHLs(如C₁₀-HSL)作阳性对照。参考Li等^[13]的方法通过GC-MS检测分离株分泌的AHLs类型。

将筛选后的分离株过夜活化2次,提取菌株DNA配制50 μL体系通过PCR扩增该菌株的16S rRNA以确定其物种信息。

1.3.3 基因组DNA提取 待测菌液于10 000 r/min、4℃下离心1 min后保留沉淀细菌菌体,加入适量PBS溶液进行清洗去除杂质。使用细菌基因组DNA磁珠抽提试剂盒提取待测菌的基因组DNA。

1.3.4 琼脂糖凝胶电泳检测 按比例配制1%琼脂糖溶液,加入4S Green核酸染色剂制备凝胶并放入电泳槽中。将1.3.3节所提取的基因组DNA样品快速点样于孔中,在90 V电压下电泳30 min后利用凝胶成像系统进行拍照。

1.3.5 DNA质量检测 经1.3.4节检测合格的DNA样品被送至上海生工生物工程有限公司,利用Qubit定量检测DNA样本浓度,检测提取DNA质量是否满足二代测序文库构建要求。

1.3.6 基因组测序、组装及注释 基因组DNA质量检测合格后进行全基因组测序分析,主要流程如下:

测定基因组总量约为500 ng,确定DNA总量后插入片段500 bp左右用于文库构建,对DNA进行稀释而后吸取130 μL于Covaris DNA破碎管中,将DNA破碎成建库所需的片段大小。使用1倍的Hieff NGS™ DNA Selection Beads富集回收DNA破碎片段,纯化后进行质量检测。检测完成后的DNA片段构建SMRT Bell文库,按比例配制PCR体系,修复DNA末端并在3'端加A尾,而后继续配制体系利用PCR连接接头,并使

用 HiSeq™ DNA Selection Beads 磁珠对 DNA 片段进行纯化并进行 PCR 富集纯化, 加入 TE 溶解磁珠。对得到的文库浓度及大小进行测定, 确认高质量测定结果。随后通过 Illumina HiSeq 测序平台上机检测, 并对原始数据进行质量、剪切、拼接以及组装。利用平均核苷酸相似度 (Average nucleotide identity, ANI) 从基因组水平进一步验证 MS-10 的物种信息。将 MS-10 全基因组测序结果与基因组库中的 11 株莓实假单胞菌全基因组序列上传到 ANI 分析网站 (<https://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/>), 选择基于 Blast 计算 ANI 值。通过 Prokka (<https://github.com/tseemann/prokka>) 调用 Prodigal、Aragorn、RNAmmer 对编码基因、tRNA 和 rRNA 进行预测。基因功能注释信息通过 NCBI Blast+ (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 与 COG (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>)、GO (<http://www.geneontology.org>)、KEGG (<http://www.kegg.jp>) 等多个数据库比对分析得到。采用 HMMER3 (v3.1b1) 比对 CAZy (<http://www.cazy.org/>) 数据库得到碳水化合物酶注释信息。采用 antiSMASH (<https://antismash.secondarymetabolites.org>) 在线预测软件寻找基因组序列中可能存在的次级代谢产物生物合成基因簇。

1.3.7 不同温度下 MS-10 嗜铁素分泌量的测定
将菌株 MS-10 过夜活化后, 按 1% 接种量接种于 LB 肉汤中, 分别于 4, 15, 28 °C 温度条件下, 160 r/min 振荡培养 24 h, 利用 CASAD 平板法和紫外法测定上清液中的嗜铁素分泌量。

CAS 蓝色检测液及 CASAD 检测平板参考 Shin 等^[14]的配方制备。将上述菌株 MS-10 的上清液与 CAS 蓝色检测液等体积混合, 在室温下置于暗处反应 1~2 h, 检测波长 630 nm 处的吸光值记为 A , 另取空白培养基与等体积 CAS 蓝色液体检测液混合均匀, 在同样条件下测波长 630 nm 处的吸光值记为 A_r , 按照公式(1)计算上清液中的嗜铁素相对含量。

$$\text{嗜铁素相对含量}(\%) = \frac{A_r - A}{A_r} \times 100 \quad (1)$$

1.3.8 低温下 MS-10 腐败能力的验证

1.3.8.1 制备菌悬液 将 MS-10 培养到对数生长期, 划线培养挑取单一菌落接种于 LB 肉汤, 28

°C、160 r/min 摇床培养, 取菌液于低温下 5 000 r/min 离心 30 min, 保留沉淀与底部的菌体, 再通过无菌生理盐水将菌液稀释至大约为 10^6 CFU/mL 后置于 4 °C 下备用。

1.3.8.2 制备无菌鱼块 于无菌操作台中将金枪鱼肉用无菌水清洗干净, 滤纸吸干, 切成大小形状一致 (25~30 g/块) 后喷酒精, 在酒精灯上烤 2~3 s, 要求菌落总数 $<10^2$ CFU/g。

1.3.8.3 接种与贮藏 无菌鱼块置于菌悬液中, 使其充分接触 10~20 s, 取出沥干水分, 以无菌生理盐水为空白组, 分装至无菌蒸煮袋中 4 °C 冰箱密封储存 10 d。每 2 d 取出鱼块测定菌落总数及挥发性盐基氮值。按照公式(2)计算腐败代谢物产量因子 $Y_{\text{TVB-NCFU}}$ 以定量 MS-10 的腐败能力^[6]。

$$Y_{\text{TVB-NCFU}} = \frac{\omega_s - \omega_0}{N_s - N_0} \quad (2)$$

式中: ω_s 、 ω_0 分别为冷藏初始及结束时挥发性盐基氮含量, mg/g; N_s 、 N_0 分别为冷藏初始及结束时菌落总数, CFU/g。

2 结果与分析

2.1 待测菌株群体感应现象检测

图 1 为利用信号分子生物报告菌根瘤农杆菌 KYC55 及 GC-MS 检测分离株信号分子的结果图。从图 1a 中可以看出, 当 KYC55 检测到环境中的标准品 C_{10} -HSL 时, 会产生蓝色反应, 而分离株与 KYC55 有同样的现象, 说明菌株能够产生信号分子, 并且其种类应该为长链或是酰基侧链 C-3 位有羰基取代的 AHLs。如图 1b 所示, GC-MS 检测到了菌株分泌的群体感应信号分子主要为 C_8 -HSL 及 C_{10} -HSL, 符合报告菌株 KYC55 的检测结果, 证实分离株中存在由信号分子介导的群体感应 (Quorum sensing, QS) 系统。

2.2 16S rRNA 检测

NCBI 在线 Blast 比对分析分离株的 16S rRNA 序列, 结果如图 2a 所示。菌株 MS-10 与多株莓实假单胞菌的序列相似度高达 99% 以上, 该比对结果说明菌株为莓实假单胞菌, 因此将其命名为莓实假单胞菌 MS-10。通过 MEGA 5.0 Neighbour-Joining 聚类对菌株 MS-10 系统发育树进行构建, MS-10 与其它假单胞菌属间的系统发

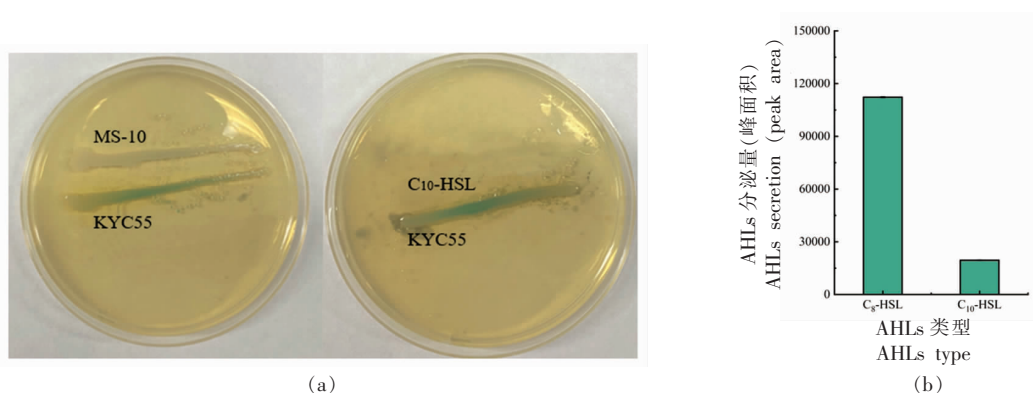


图1 报告平板划线(a)和GC-MS(b)检测信号分子

Fig.1 Report plate scribing (a) and GC-MS (b) assays for the production of AHLs in test strain

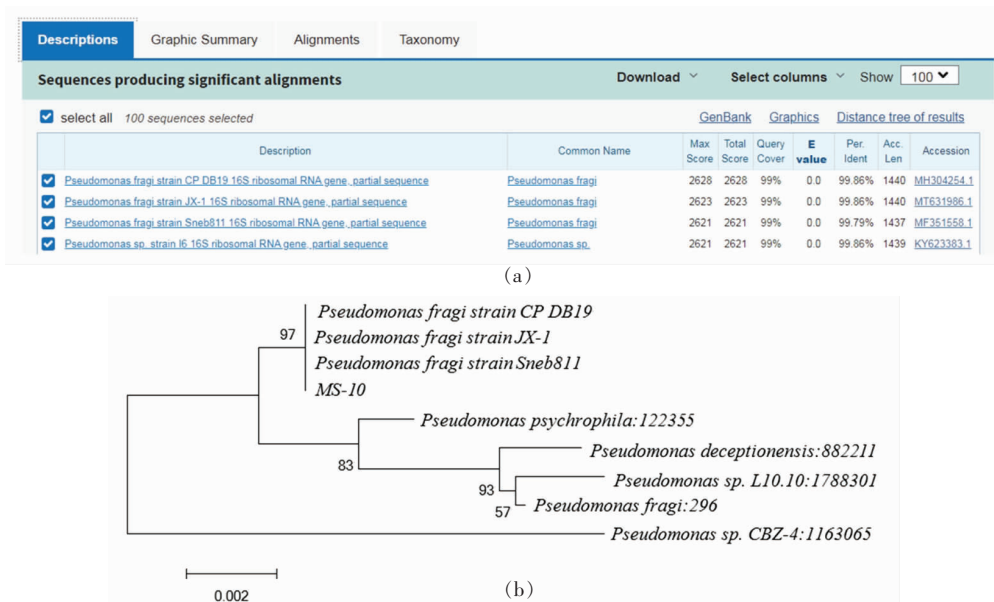


图2 菌株 MS-10 的 Blast 结果(a)和系统发育树(b)

Fig.2 The Blast result (a) and phylogenetic tree (b) of strain MS-10

育关系如图 2b 所示。同时,试验结果证明分离所得菌株没有受到污染。

2.3 DNA 质量检测

利用磁珠法提取莓实假单胞菌 MS-10 基因组 DNA,首先经溶菌酶和蛋白酶处理,使细菌裂解消化,后经结合液和磁珠共同作用对 DNA 进行提纯。图 3 为莓实假单胞菌 MS-10 的琼脂糖凝胶电泳检测图。由图可以看出,样品主条带单一、清晰明亮,说明 DNA 样品没有降解。经测定,样品 DNA 质量浓度为 $0.106 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。综上,初步判断所提 DNA 样品的质量浓度及纯度达到要求,可以用于后续构建二代文库。

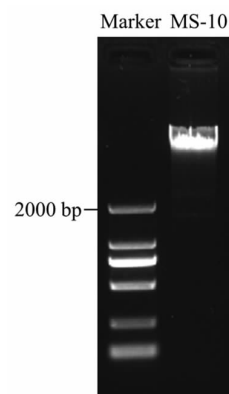


图3 菌株 MS-10 基因组 DNA 的琼脂糖凝胶电泳图

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of the genomic DNA of strain MS-10

2.4 MS-10 基因组序列分析

基因是控制生物性状的基本遗传单位^[15]。原核生物的基因组具有小而密度高的特点,重复序列的数量较少,并且一个基因是由编码一个蛋白质或 RNA 的开放阅读框构成,中间一般不会出现间断现象^[16-17]。菌株 MS-10 经过 Illumina Hiseq 测序平台得到原始测序序列后,对原始数据质量值等信息进行统计,并使用 FastQC 对样本的测序数据质量进行可视化评估。菌株 MS-10 的基因组大小为 5 250 003 bp,约为 5.25 Mb,GC 含量占比为 58.2%,总基因数为 4 906 个,其中编码序列(Cod-

ing sequence, CDS)共 4 762 个,包含 5 个 rRNA 以及 75 个 tRNA。通过 ANI 分析网站 JSpeciesWS 将 MS-10 与 NCBI 数据库中 11 个莓实假单胞菌株的基因组进行两两比对,结果见图 4。ANI 值 65%为属的分界线,90%为种的分界线,96%为亚种的分界线。包含 MS-10 在内的 12 个菌株间的 ANI 值均在 90%以上,可确认为同一种,均为莓实假单胞菌,与 2.1 节 16S rRNA 检测结果一致,以 ANI 值 96%为分界线,这 12 个菌株可分为 4 个亚种。

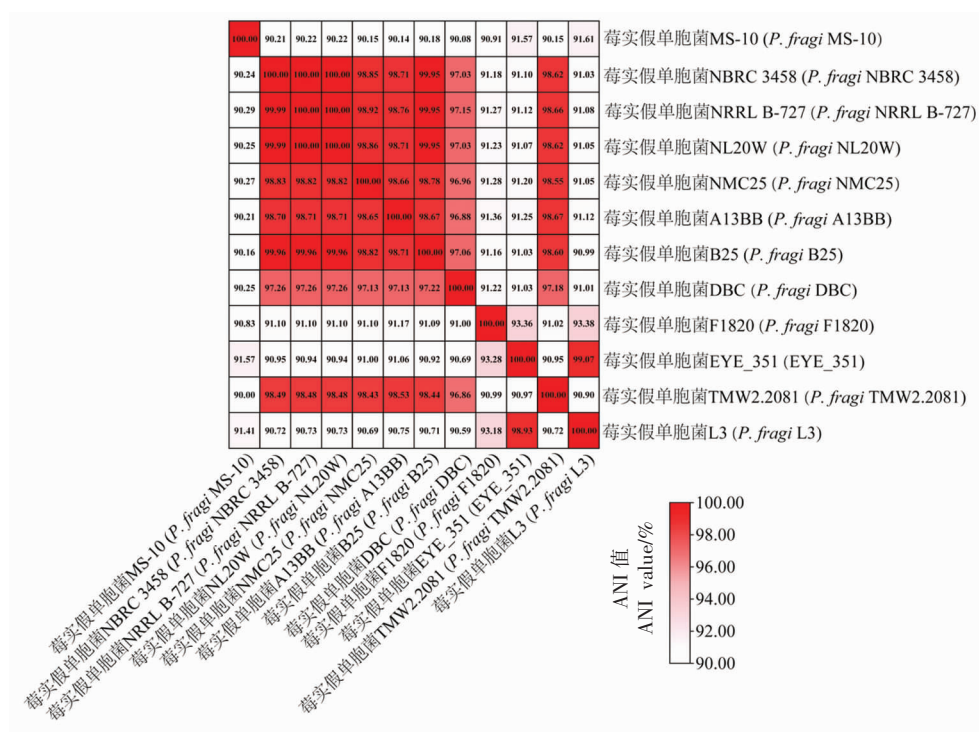


图 4 菌株 MS-10 与参比菌株基因组的 ANI 分析

Fig.4 ANI matrix between the genomes of strain MS-10 and the reference strains

2.5 MS-10 基因功能注释分析

2.5.1 COG 聚类分析 COG(Clusters of orthologous groups of proteins)是 NCBI 中关于原核生物基因结合生物进化关系的直系同源关系的注释系统。COG 库中不同物种来源的同源基因被分类定义为不同的簇,而同一簇中的基因具有相同的功能,按照蛋白质功能的不同被分为 26 类,通过上传蛋白序列与数据库进行比对,能够确定该蛋白归属于某一个特定的 COG 簇,进而通过 COG 簇的直系同源序列推测该序列的功能^[18]。通过试验

预测得到菌株 MS-10 共有 4 762 个蛋白基因,将所有预测得到的蛋白序列与上传至 NCBI 中的 COG 数据库进行 BLASTp 在线比对。菌株 MS-10 基因组的 COG 注释结果如图 5a 所示。在所有预测得到的蛋白基因中有 3 683 个蛋白质基因成功进行了 COG 功能注释,占总数的 77.34%。从图 5a 中可看出,菌株 MS-10 中去除仅一般功能预测蛋白数量(R)外,参与氨基酸转运及代谢(E)的蛋白基因最多,数量为 351 个,占总体预测蛋白基因的 9.53%,因此高蛋白的金枪鱼适宜该菌生长。其次,

与转录(K)、无机盐转运及代谢(P)以及信号转导机制(T)相关蛋白基因也较多,数量分别为 333, 245,221 个,占 9.04%,8.85%,6.65%和 6.00%。有研究表明,腐败菌在肉类储存过程中产生的挥发性有机化合物均与氨基酸代谢有关,这些挥发性物质会产生嗅觉影响,达到一定浓度后就会引发令

人不快的气味^[9]。试验结果说明菌株 MS-10 的上述几种生物活性较高,此外结合图中参与碳水化合物转运及代谢(G)以及脂质转运及代谢(I)等的蛋白基因占比,综合说明菌株 MS-10 中存在细菌间信号转导系统并且具有一定的腐败活性。



图5 菌株 MS-10 基因组的 COG(a)、GO(b)、KEGG(c)和 CAZy(d)功能分类注释

Fig.5 The functional categories annotated using COG (a), GO (b), KEGG (c) and CAZy (d) of strain MS-10 genome

2.5.2 GO 注释分析 GO (Gene ontology) 具有国际化标准, 是能够描述生物体中基因及其产物属性的基因功能分类系统^[20]。GO 包含 3 个本体, 分别为参与的生物过程、组成的细胞组分以及基因的分子功能。将菌株 MS-10 的序列上传至 GO 数据库进行在线比对, 共计获得 14 135 个基因注释信息, 而后利用 GO 数据库对获得的注释信息进行统计分类, 分类结果如图 5b 所示。由图 5b 可知, 根据 GO 数据库注释结果, 莓实假单胞菌 MS-10 中的基因在生物过程的分类中, 细胞加工、代谢过程和单一生物过程中注释到的基因最多, 数量分别为 2 264, 2 127, 954 个, 占注释总数的 16.02%, 15.0, 5%, 6.75%。在细胞组分的分类结果与绝大多数生物一样, 细胞、细胞组分和膜等与细胞器功能相关的蛋白基因较多, 数量为 2 075, 2 075, 1 124 个, 占蛋白注释总数的 14.68%, 14.68%, 7.95%。在分子功能类别中, 催化活性、结合和转运器活性等蛋白基因数量较多, 分别有 1 984, 1 822, 526 个, 占总体的 14.07%, 12.89%, 3.72%, 提示菌株 MS-10 在生物代谢、催化以及结合与转运等方面活性较高, 能通过调控体内各项生物反应维持自身生长繁殖。并且, 菌株 MS-10 在应激反应分类中有 517 个注释信息, 在信号转导活性等与 QS 相关功能的分类中也分别得到了 170 个和 29 个注释信息。这种蛋白分布情况可能对应了菌株 MS-10 对于寒冷、营养条件匮乏等极端环境的适应能力, 说明该菌株能够对不同的生长环境进行应答, 通过调节基因表达和体内代谢水平, 保证自身对营养物质正常的运输代谢, 以维持正常的生长需要。此外, 在菌株 MS-10 的基因注释结果中还发现了关于铁离子体内稳态、外界感应、结合、转运以及铁螯合物的代谢等注释信息共 414 个, 嗜铁素生物合成、转运以及代谢基因共计 137 个, 这一结果说明了菌株 MS-10 具有一定的环境竞争能力, 能够在微生物的竞争作用中占领一定的主导地位。

2.5.3 KEGG 注释分析 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 是整合了基因组系统功能信息和化学物质的综合数据库, 搜集了所有已知完整基因组中的基因蛋白序列, 能够用于分析细胞内的基因代谢产物和途径, 判断产物的基

本生物学功能^[21]。KEGG Pathway 数据库是 KEGG 中的核心数据库, 其将生物通路分成 7 类, 并且将每类再进行细分, 组成一套完整的注释系统。通过 BLAST 软件, 将菌株 MS-10 的蛋白序列上传至 KEGG 数据库进行比对, 根据编码蛋白序列的同源性将基因定位在不同的代谢通路上, 选择其中最优化比对结果进行注释统计。在菌株 MS-10 的基因组中, 共有 2 109 条基因序列与 KEGG 匹配注释成功, 占总注释基因的 44.29%。菌株 MS-10 的 KEGG 代谢通路分类见图 5c, 基因分布在新陈代谢分类中的氨基酸的代谢以及碳水化合物的代谢最多, 数量分别为 493 个以及 458 个, 占 KEGG 注释成功总数的 23.38% 和 21.72%。其次数量较多的是在环境信息处理分类中的信号转导以及膜运输, 数量为 300 个和 270 个, 占 KEGG 总体的 14.22% 和 12.80%。

2.5.4 CAZy 注释分析 CAZy (Carbohydrate-active enzymes database) 是碳水化合物活性酶数据库, 包含催化碳水化合物生物合成、修饰、以及降解相关的酶家族^[22]。使用 HMMER3 软件将菌株 MS-10 蛋白序列上传至 CAZy 数据库进行比对, 将注释成功的对应碳水化合物活性酶信息进行统计分析。如图 5d 所示, 在菌株 MS-10 基因组中糖基转移酶的数量最多, 该酶的功能是催化活化糖与不同受体的结合, 参与细菌分泌胞外多糖^[23], 并且该酶与糖苷酶的共同作用能够干预受体分子糖基化, 对膜蛋白形成保护屏障, 从而帮助菌株实现对外界环境的应激反应^[24]。

2.5.5 次级代谢产物基因簇分析 antiSMASH 是一种在线分析软件, 能够整合上传的基因组序列与已知的次级代谢产物生物合成基因簇进行比对, 从而预测目标基因组中的潜在基因簇^[25]。从菌株 MS-10 的 antiSMASH 预测结果中发现 7 个基因簇, 包括 *N*-乙酰谷氨酰胺谷氨酰胺 (*N*-acetylglutaminylglutamine amide, NAGGN) 基因簇、核糖体合成和翻译后修饰的肽类 (RiPP-like) 基因簇、芳基多烯 (Aryl polyene cluster) 基因簇、氧化还原辅酶 (Redox-cofactor) 基因簇、 β -内酯酶 (β -lactone containing protease inhibitor) 基因簇、LAP [Linear azol(in)e-containing peptides] 基因簇和嗜铁素 (Siderophore) 基因簇。芳基多烯是一种

由革兰氏阴性细菌分泌的次级代谢产物,能保护细菌应对氧化应激压力^[26]。 β -内酯基因簇与芬芥素(Fengycin)、脂肽抗生素的iturin家族(Mycosubtilin)以及大侧柏素(Plipastatin)基因簇的相似率分别达到20%,20%,15%,LAP基因簇与假吡咯啉碱B(Pseudopyronine B)基因簇相似,以上4种物质都具有一定的抗菌活性,说明菌株MS-10可能生成一些细菌素,抑制其它微生物生长。另外,NAGGN基因簇、RiPP-like基因簇和氧化还原

辅酶基因簇虽然在MS-10基因组中预测到,但没有和已报道的基因簇比对上,有待后续的研究探索。值得注意的是,通过比对铁载体基因簇后发现其与水稻黄单胞菌KACC 10331中的黄单胞菌铁蛋白(Xanthoferrin)基因簇以及副溶血性弧菌中的弧菌铁蛋白(Vibrio ferrin)基因簇相似度高达100%及60%(图6)。其中,弧菌铁蛋白曾在多种海洋生物中分离得到,可在低铁环境下,与其它细菌竞争性的争夺铁元素,维持细菌的抗逆生长^[27-29]。

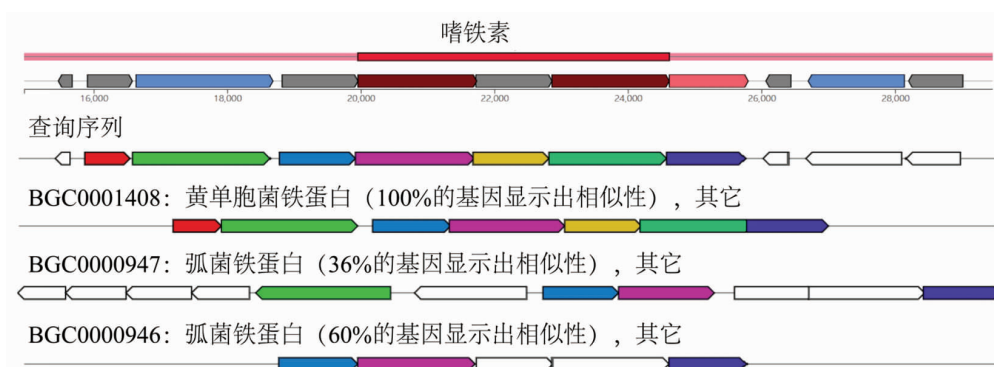


图6 菌株MS-10基因组中的嗜铁素合成基因簇及相似的已知基因簇

Fig.6 Siderophore gene cluster from strain MS-10 genome and similar known gene clusters

2.6 MS-10 群体感应及相关基因功能分析

MS-10 群体感应及相关基因的基本信息见表1。

2.6.1 群体感应 群体感应是细菌在自身分泌或外源信号分子的介导下,根据种群密度调控相关基因表达进而对环境改变迅速应答的一种生理行为。多数革兰氏阴性菌采用LuxI/R型QS系统来调控自身的生理行为,如生物膜形成、趋化性、运动等^[5]。2.5节的试验结果证实了MS-10能够分泌AHLs(AI-1类信号分子),存在QS系统。根据全基因组分析结果,MS-10中确实含有LuxI/R型系统TraI/R。TraI是AHLs合成的关键酶,而与之匹配的TraR蛋白则作为AHLs的受体蛋白^[30]。在MS-10基因组中还鉴定出了LuxR solos蛋白:Cs-gD、MalT和SdiA。在部分革兰氏阴性菌中存在LuxR solos蛋白,即没有LuxI与之配对的LuxR型受体蛋白,它们能够响应自身产生的AHLs或窃听外源AHLs甚至其它种类的信号分子,从而扩大QS通讯网络并增加基因调控范围^[31]。除了常见的LuxI/R系统,MS-10基因组中还存在QseB/C

双组分调控系统,其中组氨酸激酶QseC作为受体蛋白,能够感应AI-3(Autoinducer-3)类QS信号分子、肾上腺素和去甲肾上腺素并与之结合,启动自磷酸化反应以激活响应调节蛋白QseB,调控黏附力、运动性及毒性蛋白释放等相关基因^[32]。在基因组中虽然检测到编码AI-2信号分子受体蛋白RbsB的基因,但未发现编码AI-2合成酶LuxS的基因,推测MS-10虽然可能不分泌AI-2,但可以通过RbsB感应其它细菌产生的AI-2,从而与其进行合作或竞争。

2.6.2 生物膜形成 磷酸盐特异性转运系统(Phosphate specific transporter system, Pst system)参与细菌生物膜的形成。在MS-10基因组中发现参与检测环境磷酸盐Pi并调控磷元素代谢平衡的7个基因:*pstS*, *pstC*, *pstA*, *pstB*, *phoU*, *phoR*和*phoB*。胞膜外磷酸盐浓度感知蛋白PstS、胞膜通道蛋白PstA和PstC、ATP结合蛋白PstB构成Pst系统,共同调控细菌对胞外Pi的摄取。磷酸盐调节子(Pho regulon)主要由PhoR/PhoB双组分

表 1 菌株 MS-10 基因组中预测的群体感应及相关基因

Table 1 Predicted quorum sensing genes and related genes in the strain MS-10 genome

基因分类	基因名称	基因长度/bp	基因描述	基因位置/bp	
群体感应	<i>traI</i>	2 496	共轭转移松弛酶	26 842~29 337 ⁻	
	<i>traR</i>	213	结合转移蛋白	23 382~23 594 ⁻	
	<i>csgD</i>	1 275	细菌调节蛋白, LuxR 家族	20 033~21 307 ⁺	
	<i>malT</i>	783	LuxR 家族转录调节器	155 997~156 779 ⁺	
	<i>sdiA</i>	336	DNA 结合转录激活剂	127 790~128 125 ⁺	
	<i>qseB</i>	684	响应调节器	270 955~271 638 ⁺	
	<i>qseC</i>	1 326	双组分传感器组氨酸激酶	271 635~272 960 ⁺	
	<i>rbsB</i>	954	ABC 型糖类运输系统, 外膜部分	153 306~154 259 ⁺	
	生物膜形成	<i>pstS</i>	987	磷酸盐结合蛋白	28 964~29 950 ⁻
		<i>pstC</i>	2 286	磷酸盐转运系统渗透酶蛋白	26 461~28 746 ⁻
		<i>pstA</i>	1 671	磷酸盐转运系统渗透酶蛋白	24 775~26 445 ⁻
		<i>pstB</i>	834	磷酸盐转运器 ATP 结合蛋白	23 786~24 619 ⁻
		<i>phoU</i>	762	磷酸盐摄取调节器	22 939~23 700 ⁻
		<i>phoR</i>	1 323	磷酸盐调节传感器激酶	67 014~68 336 ⁻
<i>phoB</i>		693	磷酸盐调节转录调节蛋白	68 381~69 073 ⁻	
<i>ycdT</i>		1 581	c-di-GMP 环化酶	25 867~27 447 ⁻	
<i>pleD</i>		1 989	c-di-GMP 合成酶	8 056~10 044 ⁺	
<i>gmr</i>		1 668	磷酸二酯酶	15 292~16 969 ⁺	
<i>algA</i>		1 443	海藻酸盐生物合成蛋白	62 552~63 994 ⁺	
<i>algQ</i>		471	转录调节蛋白	34 758~35 228 ⁺	
<i>algJ</i>		1 149	海藻酸盐生物合成蛋白	16 369~17 517 ⁺	
鞭毛合成及运动		<i>fliD</i>	1 362	鞭毛冠蛋白	2 166~3 527 ⁺
	<i>fliS</i>	390	鞭毛蛋白	3 624~4 013 ⁺	
	<i>fliT</i>	294	鞭毛组装蛋白	4 030~4 323 ⁺	
	<i>fliE</i>	333	鞭毛钩-基体复合蛋白	8 947~9 279 ⁺	
	<i>fliF</i>	1 785	鞭毛基体 M 环蛋白	9 295~11 079 ⁺	
	<i>fliG</i>	1 029	鞭毛马达开关蛋白	11 066~12 094 ⁺	
	<i>fliH</i>	759	鞭毛组装蛋白	12 095~12 853 ⁺	
	<i>fliJ</i>	453	鞭毛组装蛋白	14 208~14 660 ⁺	
	<i>fliL</i>	492	鞭毛基体相关蛋白	18 259~18 750 ⁺	
	<i>fliM</i>	969	鞭毛马达开关蛋白	18 760~19 728 ⁺	
	<i>fliN</i>	465	鞭毛马达开关蛋白	19 787~20 251 ⁺	
	<i>fliO</i>	435	鞭毛生物合成蛋白	20 252~20 686 ⁺	
	<i>fliP</i>	744	鞭毛生物合成蛋白	20 686~21 429 ⁺	
	<i>fliQ</i>	270	鞭毛生物合成蛋白	21 434~21 703 ⁺	
	<i>fliR</i>	783	鞭毛生物合成蛋白	21 704~22 486 ⁺	
	<i>flhA</i>	2 136	鞭毛生物合成蛋白	31 009~33 144 ⁺	
	<i>flhB</i>	1 137	鞭毛生物合成蛋白	22 489~23 625 ⁺	
	<i>motA</i>	852	鞭毛运动蛋白	18 337~19 188 ⁺	
	<i>motB</i>	987	鞭毛运动蛋白	19 192~20 178 ⁺	
嗜铁素合成	<i>fecA</i>	2 025	依赖于 TonB 的嗜铁素受体	16 663~18 687 ⁺	
	<i>luc</i>	1 782	lucA/lucC 家族嗜铁素生物合成蛋白	19 958~21 739 ⁺	
	<i>rhcC</i>	1 761	铁载体	22 863~24 623 ⁺	
	<i>pvsE</i>	1 185	III 型 5-磷酸吡哆醇 (PLP) 依赖酶	24 620~25 804 ⁺	
	<i>mfs</i>	1 443	MFS 转运器	26 700~28 142 ⁻	

(续表 1)

基因分类	基因名称	基因长度/bp	基因描述	基因位置/bp
蛋白酶	<i>sprT</i>	630	锌依赖金属蛋白酶	61 852~62 481 ⁺
	<i>clpX</i>	1 284	ATP 依赖 Clp 蛋白酶	68 030~69 313 ⁻
	<i>aprE</i>	1 311	碱性蛋白酶	71 295~72 605 ⁻
	<i>glpG</i>	873	膜相关丝氨酸蛋白酶	71 768~72 640 ⁺
	<i>lonB</i>	2 439	Lon 蛋白酶	83 400~85 838 ⁻
脂肪酶	<i>pldB</i>	942	溶血磷脂酶	35 557~36 498 ⁺
	<i>mglL</i>	945	单甘油酯脂肪酶	35 921~36 865 ⁻
	<i>plcC</i>	1 677	磷脂酶	20 512~22 188 ⁻
	<i>lip3</i>	2 031	脂肪酶	107 419~109 449 ⁺
	<i>lipS</i>	882	脂肪酶	223 959~224 840 ⁺
环境应答	<i>cheA</i>	2 310	趋化蛋白组氨酸激酶及相关激酶	13 974~16 283 ⁻
	<i>cheY</i>	1 011	趋化反应调节蛋白-谷氨酸甲基酯酶	12 967~13 977 ⁻
	<i>rpoS</i>	1 005	RNA 聚合酶 σ 因子	44 452~45 456 ⁻
	<i>relA</i>	2 256	GTP 焦磷酸激酶	45 364~47 619 ⁻
	<i>ahpC</i>	564	过氧化氢酶	31 866~32 429 ⁺
	<i>sspA</i>	618	严谨饥饿蛋白 A	294 870~295 487 ⁻
	<i>sspB</i>	414	严谨饥饿蛋白 B	294 439~294 852 ⁻
	<i>cusS</i>	1 380	双组分传感器组氨酸激酶	264 619~265 998 ⁺
	<i>merR</i>	411	MerR 家族转录调节器	23 684~24 094 ⁺
	<i>cspA</i>	210	主要冷激蛋白	96 123~96 332 ⁻
	<i>cspC</i>	213	冷激蛋白	161 486~161 698 ⁻
<i>cspD</i>	279	冷激蛋白	130 410~130 688 ⁻	

注：“-”表示转录从 3'端开始；“+”表示转录从 5'端开始。

系统调控。PhoU 调控蛋白位于细胞膜内,是 Pi 信号通路的负调节因子,对 PhoB 磷酸化蛋白的去磷酸化以及磷酸盐调节子在高磷酸盐环境中的调控至关重要^[33]。环二鸟苷酸(Cyclic diguanylate, c-di-GMP)作为第 2 信使,介导广泛的细菌过程,如细胞运动、生物膜形成、毒力表达等^[34]。在 MS-10 中检测到 c-di-GMP 合成和代谢过程中关键酶的编码基因,包括 c-di-GMP 环化酶、c-di-GMP 合成酶和磷酸二酯酶,表明 MS-10 中存在 c-di-GMP 调控通路。在 MS-10 基因组中还发现一些海藻酸盐合成基因,包括 AlgA、AlgQ 和 AlgJ。在生物膜形成的初始阶段,高含量的海藻酸盐有助于细菌定植,并且海藻酸盐和某些胞外蛋白形成的网状骨架有助于维持生物膜的机械稳定性^[35]。

2.6.3 鞭毛合成和运动 鞭毛能够驱动细菌游动来躲避抗生素或免疫细胞等攻击,也是影响细菌黏附作用的重要因素,从而帮助细菌定植来提升致病能力。在 MS-10 中与鞭毛合成和运动相关的基因包括 *flhD/S/T/E/F/G/H/J*、*flhL/M/N/O/P/Q/R*、*flhA/B*、*motA/B*。FliF 蛋白形成了嵌在鞭毛基部的细胞质膜中的 m 型环,位于环中的完整膜蛋白(Fli-hA、FliB、FliP、FliQ、FliR 和 FliO)和可溶性蛋白(FliL、FliH、FliJ)形成鞭毛的输出装置;MotA 和 MotB 是跨膜蛋白,与 FliG、FliM、FliN 一起构成鞭毛的动力装置,控制鞭毛转动进而影响细菌运动的方向和进退^[36]。

2.6.4 嗜铁素合成 根据 COG、GO、KEGG 数据库的基因注释结果分析以及次级代谢产物基因簇预测结果,莓实假单胞菌 MS-10 基因组中含有一组与已知同源序列完全相同的嗜铁素合成基因簇和多个嗜铁素转运及结合受体蛋白,该基因簇位于总体基因组的 2 605~2 615 位基因,包含 *fecA*、*luc*、*rhbC*、*pvsE* 及 *mfs*。将基因簇中主要蛋白序列上传至 NCBI 数据库进行 Blast 比对验证,结果如图 7 所示,经过 Blast 比对的结果与 GO、COG、KEGG 等数据库注释结果相同。由此证明莓实假单胞菌具有嗜铁素合成能力,能分泌至少一种嗜铁素,使得菌株在环境中具有较强的竞争优势,成

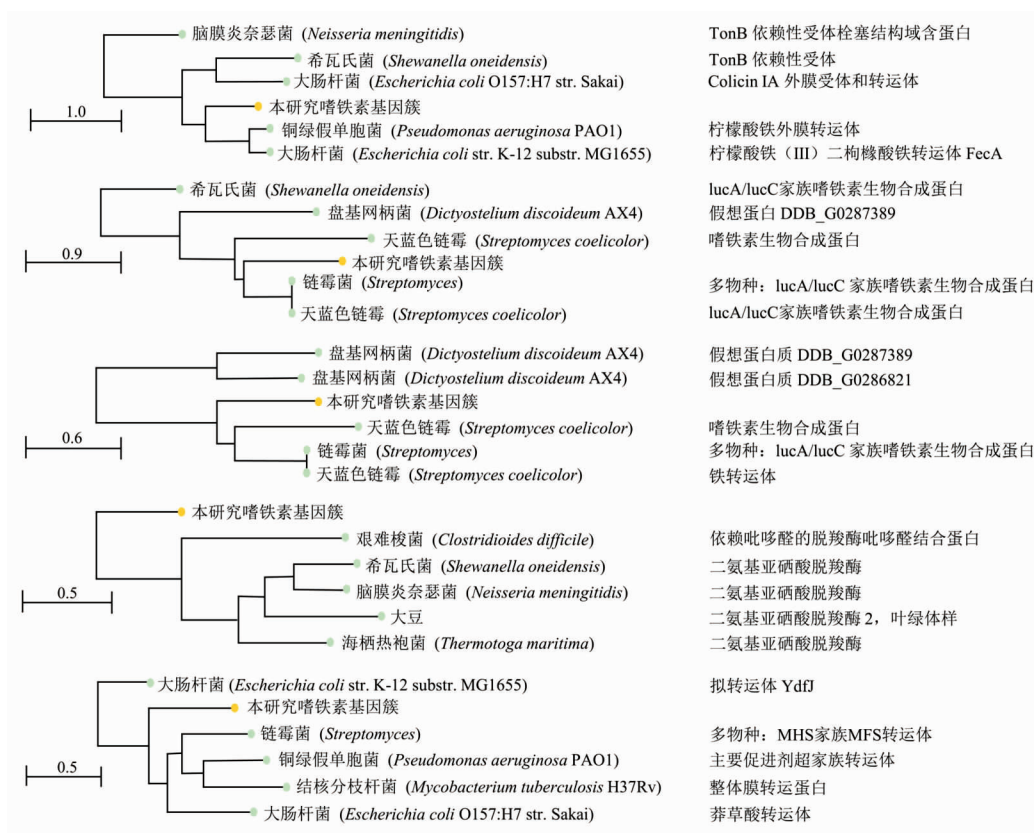


图 7 菌株 MS-10 嗜铁素合成基因簇 Blast 分析

Fig.7 The Blast analysis of siderophore biosynthesis gene clusters of strain MS-10

为冷藏金枪鱼中主要的腐败菌之一。

2.6.5 蛋白酶及脂肪酶 细菌分泌的胞外蛋白酶是重要的致腐因子,其中碱性蛋白酶是导致食物腐败的最重要的蛋白酶类型。在 MS-10 基因组中鉴定出多个蛋白酶编码基因,包括锌依赖金属蛋白酶基因 *sprT*、ATP 依赖 Clp 蛋白酶基因 *clpX*、碱性蛋白酶基因 *aprE*、膜相关丝氨酸蛋白酶基因 *glpG* 和 Lon 蛋白酶基因 *lonB*。除了这些典型的蛋白酶基因外,MS-10 中还有一些与腐败相关的脂肪酶编码基因,如溶血磷脂酶基因 *pldB*、单甘油酯脂肪酶基因 *mgll*、磷脂酶基因 *plcC*、脂肪酶基因 *lip3* 和 *lipS*。这些脂肪酶可以降解水产品中的脂肪和脂蛋白,产生游离脂肪酸、甘油和胆碱,从而加速其腐败。

2.6.6 环境应答 趋化性是细菌趋利避害的基本生理反应,是对环境改变的应答,通过专一的趋化性蛋白接收环境信号,再利用双组分调控系统将信号转导到鞭毛传动器上来控制细菌的运动行

为^[37]。在 MS-10 基因组中发现重要的双组分系统 CheA/Y,组氨酸激酶 CheA 接收环境信号,其同源响应调节器 CheY 调节靶基因的表达;还发现 RpoS 和 RelA,它们是典型的环境应答调节因子。在 MS-10 基因组中还检测到一些与环境应答反应相关的基因,如抗氧化蛋白编码基因 *ahpC*、严谨饥饿蛋白编码基因 *sspA* 和 *sspB*,以及重金属解毒相关基因 *cusS* 和 *merR*。在 MS-10 基因组中发现 3 个典型的冷激蛋白 CspA、CspC 和 CspD 的编码基因,其中 CspA 作为最主要的冷激蛋白,在低温下参与细菌运动及生物膜形成。结合 2.6.5 节的分析,在 MS-10 的蛋白酶及脂肪酶中可能存在低温酶。这些基因的存在可能是 MS-10 具有环境适应性和竞争优势的潜在原因之一。

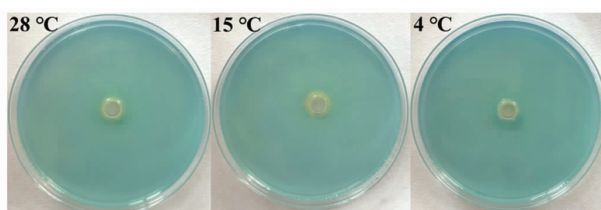
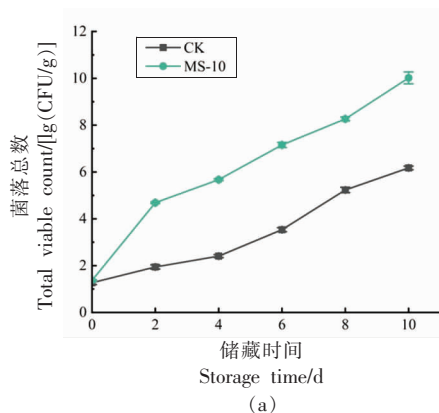
2.7 不同温度对 MS-10 嗜铁素分泌量的影响

嗜铁素是水产品优势腐败菌假单胞菌属和希瓦氏菌在腐败过程中的重要致腐因子,其能够在生存竞争中取胜的关键就在于嗜铁素的竞争优

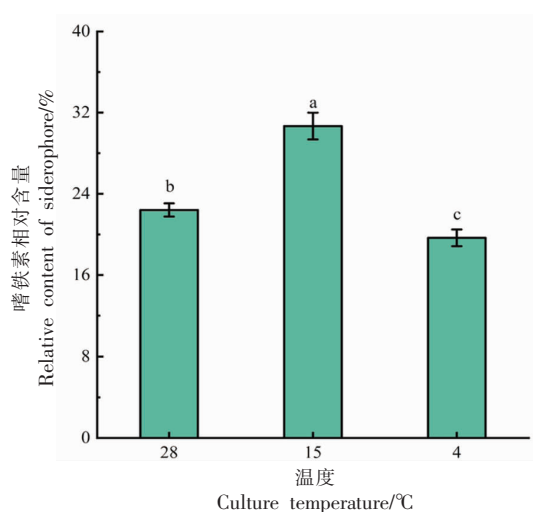
势,而大部分的水产优势腐败菌的嗜铁素分泌受到QS系统的参与。图8所示为不同温度条件下MS-10嗜铁素分泌情况。由图8可知,温度对嗜铁素的影响依次为 $15\text{ }^{\circ}\text{C}>28\text{ }^{\circ}\text{C}>4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。与对照组 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下相比,温度条件为 $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,菌株MS-10嗜铁素产量大幅增加。并且当培养温度为 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,其嗜铁素分泌量仅略有下降。结果说明,过高的温度并不适宜菌株MS-10分泌嗜铁素,低温条件更有利于其嗜铁素的产生,并且在冷藏温度下该菌仍能保持较高的嗜铁素分泌水平。这可能是由于MS-10是一种耐冷菌,在低温环境的胁迫下菌株中的一些应激蛋白,如冷激蛋白等刺激了其嗜铁素分泌系统,进而使其分泌更多的嗜铁素来抵抗不利环境以维持自身的生长需要。试验也验证了2.5.5节的预测结果,证明了MS-10中有嗜铁素合成基因能够分泌嗜铁素。

2.8 低温下MS-10腐败能力的验证

图9a为接种菌株MS-10的无菌金枪鱼块在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏条件下的菌落总数的变化情况,由图可知,空白组的TVC值随贮藏时间延长而呈现缓慢升高的状态,而接种MS-10的无菌鱼块在0~2d内菌落总数呈现激增状态,并且在此后的贮藏时间内菌落总数仍处于持续增长的状态,在贮藏大约第5天时,其中的菌落总数达到了 $6.0\text{ lg}(\text{CFU}/\text{g})$,超过了限定标准。可能是MS-10含有冷激蛋白等环境应答基因使其能快速适应低温环境,生物被膜基因及运动基因使其能定植于鱼肉表面并快速繁殖。



(a)CASAD 平板测定嗜铁素分泌量



(b)紫外法测定嗜铁素相对含量

注:不同字母表示各组之间差异显著($P<0.05$)。

图8 不同温度对菌株MS-10嗜铁素分泌量的影响
Fig.8 Effect of different temperature on siderophores production of strain MS-10

金枪鱼作为一种高蛋白海产品,通过检测腐败过程中的TVB-N值能够有效地反应其品质的变化程度。当海水鱼TVB-N值低于 $13\text{ mg}/100\text{ g}$ 时,为一级鲜度;而当超过 $30\text{ mg}/100\text{ g}$ 时,视为完

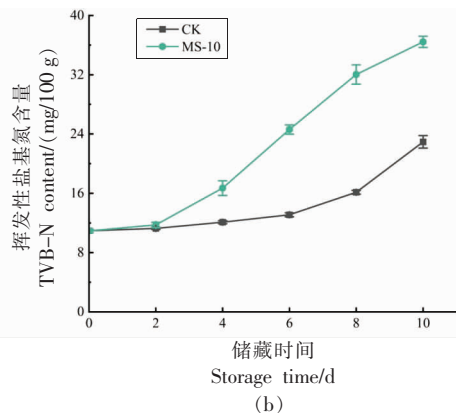


图9 接种MS-10的金枪鱼冷藏期间菌落总数(a)和TVB-N(b)的变化

Fig.9 Changes in total viable count (a) and TVB-N (b) of tuna inoculated with MS-10 during refrigeration

全腐烂,不可食用。图 9b 为接种菌株 MS-10 的无菌金枪鱼块在 4 °C 冷藏条件下的 TVB-N 值变化情况。从图中可以看出,空白组的 TVB-N 值上升呈平缓状态,在第 6 天时到达一级鲜度的临界值。接种 MS-10 的 TVB-N 值随贮藏时间的延长呈持续上升的趋势,且数值增长的速率明显高于空白组,在贮藏前 2 d 内,数值增长缓慢,属于一级鲜度;在储藏大约第 3 天时,TVB-N 值超过一级鲜度的临界值,而在大约第 7 天时超出二级鲜度的临界值,即不可食用。推测在第 3 天时 MS-10 中环境应答相关基因开始调控其分泌多种蛋白酶从而导致鱼肉加速腐败。

接种 MS-10 的无菌金枪鱼块的 TVC 值和 TVB-N 值与空白组相比明显增加,并且菌株 MS-10 的 YTVB-N/CFU 为 2.77×10^{-7} mg/CFU,证实了菌株 MS-10 能够导致金枪鱼的腐败变质,具有较强的腐败能力和低温适应性。

3 结论

本研究从腐败的冷藏金枪鱼中分离腐败菌,利用生物报告菌株根瘤农杆菌 KYC55 从分离株中筛选到一株具有群体感应的菌株,通过 16S rRNA 测序鉴定为莓实假单胞菌,命名为 MS-10。对菌株 MS-10 全基因组进行测序,其基因组大小为 5.25 Mb,GC 占比为 58.2%,共由 4 906 条基因组成,其中编码序列(CDS)有 4 762 条。基于 ANI 分析,将 MS-10 与 11 个莓实假单胞菌的基因组进行比对,确认 MS-10 为莓实假单胞菌,与 16S rRNA 结果相符。通过对预测的蛋白质进行 COG、GO、KEGG、CAZy 等数据库功能注释结果得出,菌株 MS-10 的功能基因主要集中在生物代谢、信号转导以及环境应激等方面。MS-10 基因组中含有数量较多的双组份信号转导调控系统,赋予其更强的环境适应性以及致腐能力。通过 antiSMASH 在线预测软件分析基因组中可能存在的次级代谢产物基因簇,发现其含有一条与已知基因簇相似度高达 100%的嗜铁素合成基因簇,还存在其它调控嗜铁素合成与转运的基因,说明菌株 MS-10 能够分泌并利用嗜铁素,提高自身营养摄入的能力和竞争能力。基于基因功能注释信息,发现 MS-10 中含有 TraI/R 群体感应系统,以及大量与生物

膜形成、鞭毛合成、运动、环境应答相关的基因,这些基因可能是其成为金枪鱼优势腐败菌的原因。通过 CASAD 平板法和紫外法验证了该菌能够分泌嗜铁素,且在低温下更有利于其分泌,推测菌株中的冷激蛋白在低温胁迫下刺激了嗜铁素分泌。MS-10 在冷藏金枪鱼中生长快速同时加速了鱼块腐败,与空白组对比,接种了 MS-10 的金枪鱼块产生了更多的 TVB-N,其产量因子 $Y_{\text{TVB-N/CFU}}$ 为 2.77×10^{-7} mg/CFU,说明 MS-10 在低温环境中依旧有致腐能力,是一株耐冷致腐菌。本文通过 MS-10 全基因组测序结果分析确定其环境适应、群体感应以及腐败相关基因,为今后开展其致腐性的研究提供数据支撑,也为进一步探究 MS-10 群体感应调控机制提供了理论依据。

参 考 文 献

- [1] SILBANDE A, ADENET S, SMITH-RAVIN J, et al. Quality assessment of ice-stored tropical yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) and influence of vacuum and modified atmosphere packaging[J]. Food Microbiol, 2016, 60: 62-72.
- [2] WANG X Y, XIE J. Evaluation of water dynamics and protein changes in bigeye tuna (*Thunnus obesus*) during cold storage[J]. LWT, 2019, 108: 289-296.
- [3] 章缜, 杨胜平, 谢晶, 等. 金枪鱼保鲜技术及其假单胞菌适冷机制的研究进展[J]. 食品工业科技, 2017, 38(8): 369-373.
ZHANG Z, YANG S P, XIE J, et al. Research progress on keeping fresh technology of tuna and the cold-adapted mechanism of *Pseudomonas* spp.[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(8): 369-373.
- [4] WANG X Y, XIE J. Growth kinetics and spoilage potential of co-culturing *Acinetobacter johnsonii* and *Pseudomonas fluorescens* from bigeye tuna (*Thunnus obesus*) during refrigerated storage[J]. Curr Microbiol, 2020, 77(8): 1637-1646.
- [5] 励建荣, 杨兵, 李婷婷. 水产品优势腐败菌及其群体感应系统研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(19): 255-259.
LI J R, YANG B, LI T T. Advances in quorum sensing of dominant spoilage bacteria from aquatic

- products[J]. Food Science, 2015, 36(19): 255-259.
- [6] 刘爱芳, 谢晶, 钱韻芳. 冷藏金枪鱼优势腐败菌致腐败能力[J]. 食品科学, 2018, 39(3): 7-14.
LIU A F, XIE J, QIAN Y F. Spoilage potential of dominant spoilage bacteria from chilled tuna (*Thunnus obesus*)[J]. Food Science, 2018, 39(3): 7-14.
- [7] ALEXI N, HVAM J, LUND B W, et al. Potential of novel cadaverine biosensor technology to predict shelf life of chilled yellowfin tuna (*Thunnus albacares*)[J]. Food Control, 2021, 119: 107458.
- [8] 杨洋, 包昌杰, 李柯欣, 等. 耐低温菌株的鉴定、低温生长特征及耐低温机理初步研究[J]. 中国酿造, 2022, 41(5): 47-51.
YANG Y, BAO C J, LI K X, et al. Identification, low temperature growth characteristics and tolerance mechanism of low temperature-resistant strain [J]. China Brewing, 2022, 41(5): 47-51.
- [9] 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.
- [10] WANG G Y, MA F, ZENG L Y, et al. Modified atmosphere packaging decreased *Pseudomonas fragi* cell metabolism and extracellular proteolytic activities on meat[J]. Food Microbiology, 2018, 76: 443-449.
- [11] 梅佳林, 李婷婷, 张星晖, 等. 芳樟醇对三文鱼源莓实假单胞菌的抑菌机理[J]. 食品科学, 2022, 43(9): 199-206.
MEI J L, LI T T, ZHANG X H, et al. Antibacterial mechanism of linalool against *Pseudomonas fragi* from salmon[J]. Food Science, 2022, 43(9): 199-206.
- [12] 王光宇, 邱伟芬, 徐幸莲, 等. 冷鲜鸡肉中莓实假单胞菌 NMC25 的全基因组测序及分析[J]. 食品科学, 2021, 42(16): 233-238.
WANG G Y, QIU W F, XU X L, et al. Whole genome sequencing and analysis of *Pseudomonas fragi* NMC25 from chilled chicken[J]. Food Science, 2021, 42(16): 233-238.
- [13] LI T T, WANG D F, REN L K, et al. Involvement of exogenous *N*-acyl-homoserine lactones in spoilage potential of *Pseudomonas fluorescens* isolated from refrigerated turbot[J]. Front Microbiol, 2019, 10: 2716.
- [14] SHIN S H, LIM Y, LEE S E, et al. CAS agar diffusion assay for the measurement of siderophores in biological fluids[J]. J Microbiol Methods, 2001, 44(1): 89-95.
- [15] MEYDAN S, VAZQUEZ-LASLOP N, MANKIN A S. Genes within genes in bacterial genomes[J]. Microbiol Spectr, 2018, 6(4): RWR-0020.
- [16] SETUBAL J C, ALMEIDA N F, WATTAM A R. Comparative genomics for prokaryotes [J]. Methods Mol Biol, 2018, 1704: 55-78.
- [17] KIRCHBERGER P C, SCHMIDT M L, OCHMAN H. The ingenuity of bacterial genomes[J]. Annu Rev Microbiol, 2020, 74: 815-834.
- [18] GALPERIN M Y, KRISTENSEN D M, MAKAROVA K S, et al. Microbial genome analysis: The COG approach[J]. Brief Bioinform, 2019, 20(4): 1063-1070.
- [19] CASABURI A, PIOMBINO P, NYCHAS G J, et al. Bacterial populations and the volatilome associated to meat spoilage[J]. Food Microbiol, 2015, 45(Pt A): 83-102.
- [20] ZHAO Y W, WANG J, CHEN J, et al. A literature review of gene function prediction by modeling gene ontology[J]. Front Genet, 2020, 11: 400.
- [21] KANEHISA M. Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms[J]. Protein Sci, 2019, 28(11): 1947-1951.
- [22] DRULA E, GARRON M L, DOGAN S, et al. The carbohydrate-active enzyme database: Functions and literature [J]. Nucleic Acids Res, 2022, 50(D1): D571-D577.
- [23] SOUMYA M P, NAMPOOTHIRI K M. An overview of functional genomics and relevance of glycosyltransferases in exopolysaccharide production by lactic acid bacteria[J]. Int J Biol Macromol, 2021, 184: 1014-1025.
- [24] DIAZ-JIMENEZ D F. Fungal mannosyltransferases as fitness attributes and their contribution to virulence [J]. Curr Protein Pept Sci, 2017, 18(11): 1065-1073.
- [25] BLIN K, SHAW S, KLOOSTERMAN A M, et al. antiSMASH 6.0: Improving cluster detection and comparison capabilities[J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49(W1): W29-W35.
- [26] CIMERMANCIC P, MEDEMA MARNIX H, CLAESSEN J, et al. Insights into secondary metabolism from a global analysis of prokaryotic biosynthetic gene clusters[J]. Cell, 2014, 158(2): 412-421.

- [27] AMIN S A, GREEN D H, KUPPER F C, et al. Vibrioferrin, an unusual marine siderophore: Iron binding, photochemistry, and biological implications [J]. *Inorg Chem*, 2009, 48(23): 11451–11458.
- [28] PUENTES B, BALADO M, BERMUDEZ-CRESPO J, et al. A proteomic analysis of the iron response of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* reveals metabolic adaptations to iron levels changes and novel potential virulence factors [J]. *Vet Microbiol*, 2017, 201: 257–264.
- [29] TANABE T. Regulation of the expression of iron-acquisition system genes in pathogenic *Vibrio* species[J]. *Yakugaku Zasshi*, 2016, 136(11): 1525–1532.
- [30] BARTON I S, EAGAN J L, NIEVES-OTERO P A, et al. Co-dependent and interdigitated: Dual quorum sensing systems regulate conjugative transfer of the Ti plasmid and the at megaplasmid in *Agrobacterium tumefaciens* 15955[J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 605896.
- [31] VENTURI V, SUBRAMONI S, SABAG-DAIGLE A, et al. Methods to study solo/orphan quorum-sensing receptors[J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1673: 145–159.
- [32] PARKER C T, RUSSELL R, NJOROGE J W, et al. Genetic and mechanistic analyses of the periplasmic domain of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* QseC histidine sensor kinase [J]. *J Bacteriol*, 2017, 199(8): e00861–16.
- [33] VOGELEER P, VINCENT A T, CHEKABAB S M, et al. Regulation of *waaH* by PhoB during Pi starvation promotes biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7[J]. *J Bacteriol*, 2019, 201(18): e00093–19.
- [34] LIU X B, CAO B, YANG L, et al. Biofilm control by interfering with c-di-GMP metabolism and signaling[J]. *Biotechnology Advances*, 2022, 56: 107915.
- [35] MAHAJAN S, SUNSUNWAL S, GAUTAM V, et al. Biofilm inhibitory effect of alginate lyases on mucoid *P. aeruginosa* from a cystic fibrosis patient [J]. *Biochem Biophys Rep*, 2021, 26: 101028.
- [36] 卢惠芳, 黄健, 闵迅. 细菌的鞭毛运动及其调控机制研究进展[J]. *医学综述*, 2022, 28(14): 2711–2716.
- LU H F, HUANG J, MIN X. Research progress of bacterial flagellar motility and its regulatory mechanism[J]. *Medical Recapitulate*, 2022, 28(14): 2711–2716.
- [37] HATA H, NISHIHARA Y, NISHIYAMA M, et al. High pressure inhibits signaling protein binding to the flagellar motor and bacterial chemotaxis through enhanced hydration[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 2351.

Whole Genome Sequencing and Analysis of *Pseudomonas fragi* MS-10 from *Thunnus obesus*

Cui Fangchao¹, Wang Yunting¹, Liu Jiayi¹, Wang Dangfeng¹, Tan Xiqian¹,
Li Qiuying¹, Li Jianrong^{1*}, Li Tingting^{2*}

(¹College of Food Science and Technology, Bohai University, National & Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products, China Light Industry Key Laboratory of Marine Fish Processing, Jinzhou 121013, Liaoning

²College of Life Science, Dalian Minzu University, Dalian 116600, Liaoning)

Abstract To analyze the environmental adaptation and spoilage-related genes of *Pseudomonas fragi*, and to provide a theoretical basis for the subsequent study of its spoilage-causing mechanism, spoilage bacteria were isolated from spoiled frozen tuna, and the isolates with quorum sensing were screened using *Agrobacterium tumefaciens* KYC55 and then their secreted AHLs were detected by GC-MS. The strain type was determined using 16S rRNA comparison and ANI analysis. Gene function and annotation were determined by sequencing the whole genome. The content of siderophore secreted by the strain at different temperatures was measured by CASAD plate and UV detection. The changes of total viable count and total volatile basic nitrogen in frozen tuna inoculated with MS-10 were detected, and the putrefactive ability of MS-10 was analyzed in combination with the spoilage metabolite yield factor $Y_{TVB-NCFU}$. Results: The isolated strain was *P. fra-*

gi, named MS-10, secreting quorum sensing signals, mainly C₈-HSL and C₁₀-HSL. Its genome size was 5.25 Mb, with 58.2% GC. Comparison of multiple databases revealed that the gene functions of MS-10 were mainly focused on biometabolism, signal transduction and environmental stress, including quorum sensing regulatory genes *traI/R* and a large number of spoilage-related genes. Low temperature conditions were more favorable for strain MS-10 to secrete siderophore. Tuna blocks inoculated with MS-10 showed a significant increase in total viable count and TVB-N values during refrigeration compared to the blank group, with $Y_{\text{TVB-N/CFU}}$ values measuring 2.77×10^{-7} mg/CFU. Conclusion: *P. fragi* MS-10 possessed a quorum sensing system and was a cold-tolerant putrefactive bacterium. It was demonstrated that it had strong putrefactive potential and environmental adaptability at the genetic level, which could help to further investigate the regulatory mechanism of MS-10 quorum sensing and to provide data support for future research on its putrefactive properties.

Keywords *Thunnus obesus*; *Pseudomonas fragi*; whole genome sequencing; quorum sensing; siderophore