



鱼源致病菌皮特不动杆菌 Ap-W20 的全基因组序列及其毒力特征分析

王超杰¹, 黎洁¹, 王旭¹, 王至诚¹, 王卫民¹, 罗毅^{1,2*}

(1. 华中农业大学水产学院, 农业动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 湖北 武汉 430070;
2. 农业微生物学国家重点实验室, 湖北 武汉 430070)

摘要: 皮特不动杆菌是一种新兴的鱼源致病菌, 为了对该菌的致病机理进行研究并为该菌引起的鱼类疾病防治提供技术储备, 实验选取皮特不动杆菌菌株 Ap-W20 进行了全基因组测序, 并对其毒力特征进行了分析。结果发现, Ap-W20 全基因组序列总长为 4 399 705 bp, GC 含量为 38.78%, 共预测到 4 230 个编码序列 (CDS), 存在 4 个质粒, GenBank 数据库登录号为 CP027658~CP027662。ANI 分析结果证实, Ap-W20 属于皮特不动杆菌, 且 Ap-W20 与已知人源皮特不动杆菌 AP_882(96.69%) 和环境源皮特不动杆菌 PHEA-2(96.55%) 相似度较高。Ap-W20 与 AP_882、PHEA-2 的比较基因组学分析发现, Ap-W20 中的基因岛、前噬菌体和质粒数量最多, 这很可能与它们各自的分离环境和致病力有关。通过与毒力因子数据库 (VFDB) 比对, 在 Ap-W20 全基因组中预测到 286 个毒力基因, 主要与黏附和抗吞噬等有关。Ap-W20 中还存在着 I、II 和 VI 型分泌系统、多套双组分调控系统以及细菌素合成基因簇等, 表明鱼源皮特不动杆菌可能存在复杂的致病机制。本研究对鱼源皮特不动杆菌全基因组进行了毒力特征分析, 为该菌引起的鱼类疾病防治奠定了基础。

关键词: 皮特不动杆菌; 全基因组测序; ANI 分析; 比较基因组学; 毒力特征

中图分类号: Q 785; S 941.42

文献标志码: A

近年来, 不动杆菌 (*Acinetobacter*) 已经成为人类临床中常见的机会致病菌, 可引起一系列的感染, 如肺部感染、菌血症、腹腔感染和外伤口感染等, 是医源性重要致病菌^[1]。在不动杆菌属中, 乙酸钙不动杆菌 (*A. calcoaceticus*)、鲍曼不动杆菌 (*A. baumannii*)、皮特不动杆菌 (*A. pittii*)、医院不动杆菌 (*A. nosocomialis*)、洛菲不动杆菌 (*A. seifertii*) 和约翰不动杆菌 (*A. dijkschoorniae*) 等 6 种不动杆菌最为常见, 且表型和基因型十分接近, 所以将它们统一归类为“乙酸钙—鲍曼不动杆菌复合体 (*A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex, ACB complex)”^[2-3]。

鲍曼不动杆菌在医源性感染中所占比例最

高, 也是目前研究最多的不动杆菌^[4]。近几年, 皮特不动杆菌、医院不动杆菌等在医院临床暴发流行的研究报道越来越多, 正在成为发病率仅次于鲍曼不动杆菌的临床感染菌株^[5-7]。由于医院不动杆菌多数具有广谱的耐药性和顽强的生存能力, 所以对于不动杆菌的研究多集中于耐药性和各种抗性表型, 而对毒力的研究则相对较少。目前研究较为深入的不动杆菌毒力因子包括内毒素、外膜蛋白 A、生物膜、铁摄取系统等, 同时新的毒力因子如 K1 荚膜多糖、磷脂酶 D、RecA 蛋白等也逐渐被认识^[8]。鲍曼不动杆菌主要通过黏附、侵袭各种真核细胞发挥其致病作用, 外膜蛋白 A 可以通过侵袭人体上皮细

收稿日期: 2020-02-04 修回日期: 2020-05-02

资助项目: 国家自然科学基金 (31570078)

通信作者: 罗毅, E-mail: luoyi@mail.hzau.edu.cn

胞和树突细胞的线粒体导致细胞凋亡,也可以作用于细胞核发挥其细胞毒性作用,生物膜相关蛋白则在黏附至支气管上皮细胞的过程中发挥促进作用^[8-11]。

尽管不动杆菌与人类的临床感染密切相关,但其作为鱼类致病菌却少有报道。1995年,顾天钊等^[12]首次从广东某地患病鳊(*Siniperca chuatsi*)中分离出了一株不动杆菌,经鉴定后确定为鲍曼不动杆菌。随后,相继有文献报道不动杆菌感染斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)和异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)的情况^[13-14]。近年来,琼式不动杆菌(*A. junii*)、约翰逊不动杆菌(*A. johnsonii*)、洛菲不动杆菌(*A. lwoffii*)也被发现是导致养殖场暴发鱼类疾病的致病菌^[15-16]。这些发现表明不动杆菌作为一种新兴的鱼类致病菌,已成为水产养殖新的威胁。

本实验室在前期研究中,从江苏、湖北、河南等地多个养殖池塘患病团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)及泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)中分离出百余株病原菌,其中80余株经鉴定为皮特不动杆菌,这也是首次报道皮特不动杆菌会导致鱼类发生严重感染并死亡^[17-18]。为进一步从全基因组层面分析、研究作为新兴鱼类致病菌的皮特不动杆菌的毒力特征,实验选取了一株从患病团头鲂中分离获得的高毒力菌株 Ap-W20 进行了全基因组测序,分析其潜在的毒力因子,为鱼源皮特不动杆菌病原学研究以及疾病防控提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

实验所使用的菌株 Ap-W20 由本实验室从江苏常州和桥一个暴发细菌性败血症的团头鲂专养池塘分离得到。实验室前期通过 16S *rRNA* 和 *rpoB* 基因序列测定将该菌株鉴定为皮特不动杆菌,斑马鱼(*Danio rerio*)和秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)模型攻毒实验表明 Ap-W20 为高毒力菌株^[17]。菌株 Ap-W20 由华中农业大学水产学院保藏并提供。

1.2 菌株培养与基因组 DNA 的提取

分离得到单菌落后,于 LB 培养基中 28 °C 培养 18 h,按照 TIANamp Bacteria DNA Kit 细菌基因组 DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)

有限公司]步骤提取菌株 Ap-W20 基因组 DNA。基因组 DNA 用 NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) 核酸浓度检测仪检测纯度,确保 OD_{260/280} 为 1.8~2.0,浓度大于 10 μg。

1.3 全基因组测序及组装

菌株 Ap-W20 基因组 DNA 检测合格后,首先构建基因组小片段文库(350 bp),然后利用 Illumina 公司的 HiSeq2500 测序平台进行双末端测序,测序深度 200X。获得的原始数据去除引物、接头和筛除低质量的数据之后,利用短序列组装软件 SOAPdenovo2 (<http://soap.genomics.org.cn/>)对二代测序后的优化序列拼接,得到最优的 contigs 组装结果。contigs 之间的拼接组装由 PCR 扩增及测序的方式完成。细菌基因组测序及前期的组装工作由上海美吉生物医药科技有限公司完成。

1.4 ANI 分析

ANI 全称 Average Nucleotide Identity,即平均核苷酸一致性,是最强有力的鉴定细菌基因组亲缘关系远近的测量指标之一,反映基因组之间的进化距离关系^[19]。利用 JSpecies 软件中的 Blast 相似度对比方法 (ANIb) 对不动杆菌属多个种的 ANI 值进行分析,从而对菌株 Ap-W20 进行进一步鉴定^[20-22]。从 NCBI 数据库中下载已知全基因组序列的 27 株不动杆菌基因组序列进行 ANI 比对。

1.5 基因预测及功能注释分析

使用 Glimmer 预测染色体基因组中的 CDS,使用 GeneMarkS 预测质粒基因组中的编码序列。利用 tRNAscan-SE v2.0 软件 (<http://trna.ucsc.edu/software/>)对基因组中包含的转运 RNA (tRNA) 进行预测,利用 Barnap 软件 (<https://github.com/tseemann/barnap>)对基因组中包含的核糖体 RNA (rRNA) 进行预测。对预测得到的编码序列进行功能注释后,与 GO (gene ontology)、COG (clusters of orthologous groups) 和 KEGG (kyoto Encyclopedia of genes and genomes) 数据库进行 Blast 比对,完成蛋白序列功能注释。

1.6 基因组组分析

用 antiSMASH (<http://antismash.secondarymetabolites.org/#!/start>)对次级代谢产物合成基因簇进行鉴定、注释和分析。集中蛋白功能数据库注释结果,筛选与分泌系统相关蛋白进行单独注

释, 确定 Ap-W20 中是否含有 TNSS(Type N Secretion Systems) 分泌系统。利用抗性基因数据库 CARD (<http://arpcard.Mcmaster.ca>, Version 1.1.3) 对耐药基因进行预测, 利用转运蛋白分类数据库 TCDB (<http://www.tcdb.org/>) 对转运蛋白进行预测, 双组分调控系统由 hmmer3 (https://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/hmmer3_search) 预测分析, 通过与毒力因子数据库 VFDB (<http://www.mgc.ac.cn/VFfs/>) 进行比对得到毒力基因的注释结果。

1.7 基因组共线性分析

下载 NCBI 数据库上公布的 AP_882 (NZ_CP014477) 和 PHEA-2 (NC_016603) 2 株与 Ap-W20 亲缘关系较近的皮特不动杆菌基因组序列, 与 Ap-W20 基因组进行 Mauve (Version 2.1.0) 共线性分析。

1.8 移动相关元件分析

基因组岛 (genomic island, GI)、前噬菌体、CRISPR-Cas 是细菌 3 种典型的可移动元件, 在细菌的环境耐受、黏附侵袭、胞内感染等毒力因子中有重要作用^[23]。分别利用 IslandViewer、PHAST、Minced 对 Ap-W20 全基因组中的可移动元件进行预测分析。

2 结果

2.1 Ap-W20 基因组概况

Ap-W20 全基因组长 4 399 705 bp, GC 含量为 38.78%, 共预测到 4 230 个 CDS。全基因组中有 73 个 tRNA, 18 个 rRNA (5S *rRNA*、16S *rRNA* 和 23S *rRNA* 各 6 个)(表 1)。在 Ap-W20 全基因组中检测到 4 个之前从未报道过的质粒 (pApW20-1、pApW20-2、pApW20-3 和 pApW20-4) (图 1), 大

小从 7.68 kb 到 237.5 kb 不等, GC 含量为 33.11%~40.33%。Ap-W20 全基因组在 GenBank 的登录号为 CP027658~CP027662。

2.2 ANI 分析

为了在全基因组测序基础上, 进一步对菌株 Ap-W20 进行准确的种属鉴定, 本实验对其他已知的 18 株同属不同种的不动杆菌及 9 株皮特不动杆菌全基因组进行了 ANI 分析。结果显示, Ap-W20 与 ACB complex 中已知不动杆菌更为接近, 并且与皮特不动杆菌位于同一个分支上 (图 2), 表明 Ap-W20 属于 ACB complex, 确为皮特不动杆菌。此外, Ap-W20 与 AP_882 和 PHEA-2 的亲缘关系较近, 分别为 96.69% 和 96.55%。其中, 菌株 AP_882 是 2014 年在马来西亚从患病人体分离而来, 属于人源致病菌^[24]; 菌株 PHEA-2 则是在 2000 年从工业废水中分离得到的, 为环境源菌株^[25]。

2.3 Ap-W20 基因功能注释分析

将 Ap-W20 预测的蛋白序列分别与 COG、GO 和 KEGG 数据库比对, 获得相应的功能注释结果。根据与 COG 数据库比对分析, 发现共有 3 338 个基因 (占全基因组的 78.91%) 具有 COG 功能分类, 分为 21 类。其中, 参与细菌转运与代谢相关过程 (包括氨基酸、核苷酸、碳水化合物、辅酶、脂质、无机离子次级代谢产物的转运与代谢) 一共有 1 000 个基因, 占较大比例, 达到 COG 功能分类的 29.96%; 此外, 30.35% 的基因 COG 分类缺乏明显特征, 功能尚不明确 (图 3)。

通过与 GO 数据库比对, 发现共有 2 970 个基因 (占全基因组的 70.21%) 从 GO 数据库中获得

表 1 Ap-W20 基因组基本信息

Tab. 1 Genome features of *A. pittii* strain Ap-W20

特征 features	染色体 chromosome	质粒 plasmid			
		pApW20-1	pApW20-2	pApW20-3	pApW20-4
长度/bp length	3 991 129	237 519	147 574	8 123	7 680
GC含量/% G+C content	38.80	37.92	40.33	36.26	33.11
CDS数量 no. of CDS	3 811	257	165	12	10
tRNA数量 no. of tRNAs	73	-	-	-	-
rRNA数量 no. of rRNAs	18	-	-	-	-
GenBank登录号 accession numbers	CP027658	CP027659	CP027660	CP027661	CP027662

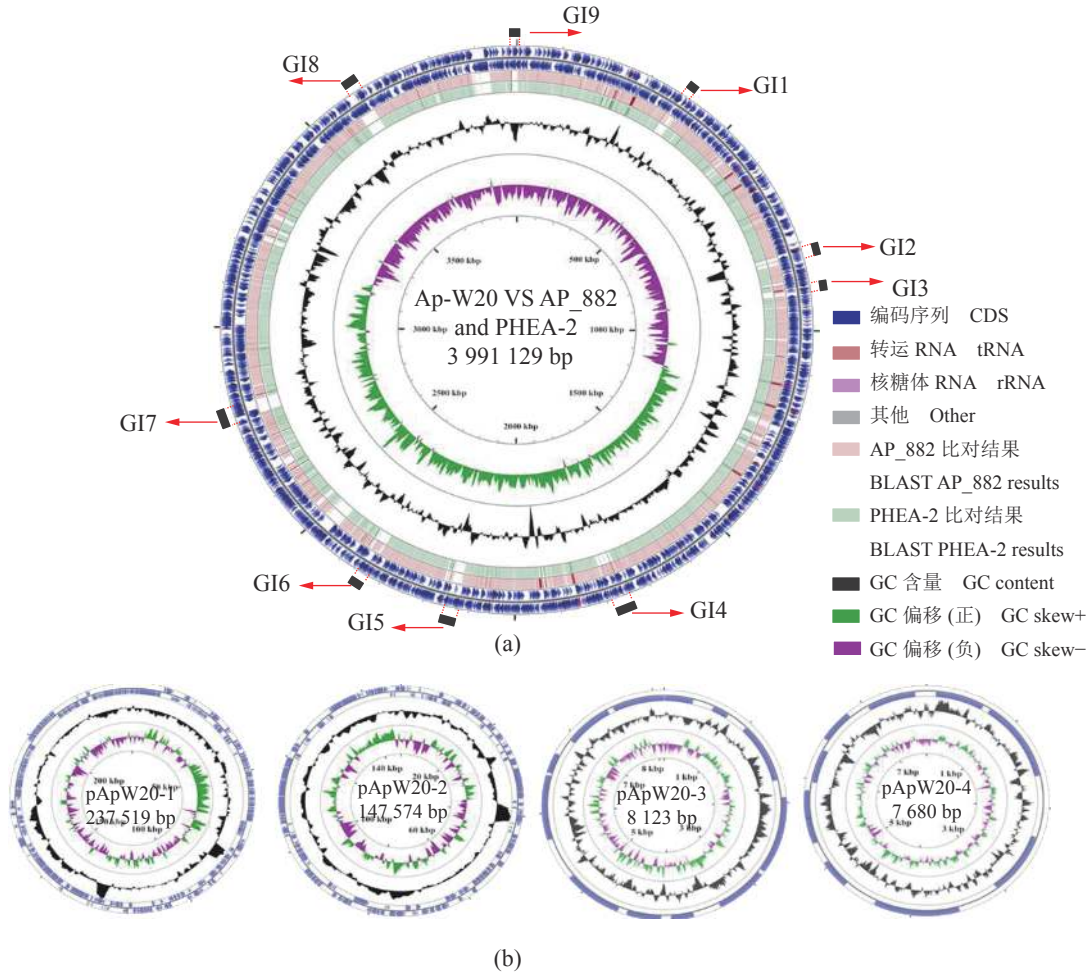


图 1 菌株 Ap-W20 全基因组圈图

(a) 鱼源菌株 Ap-W20 染色体基因组圈图和医源菌株 AP_882、环境源菌株 PHEA-2 的比较基因组; (b) Ap-W20 四个质粒基因组圈图

Fig. 1 Circular genome map of *A. pittii* strain Ap-W20

(a) circular genome map of the chromosome of strain Ap-W20 and the BLAST results with clinical strain AP_882 and environmental strain PHEA-2; (b) circular genome map of the four plasmids of strain Ap-W20

注释信息, 其中参与细胞组分、分子功能和生物过程的基因个数分别为 1 416、2 397 和 2 249 个。在 GO 注释中, 归类为代谢过程、细胞过程、细胞膜、催化活性等的基因数量占有较大优势, 表明菌株活性多集中于代谢和酶催化过程 (图 4)。

与 KEGG 数据库比对发现, Ap-W20 基因组中 CDS 参与了 38 类代谢通路, 可归纳为 6 大类。其中, 参与代谢过程的基因最多; 参与有机体系 (免疫系统、内分泌系统等) 的基因共有 37 个; 参与细胞过程 (细胞生长死亡、细胞群落、转运和代谢等) 共有 109 个基因; 参与疾病方面的基因共有 113 个, 这些基因主要参与了细菌感染、影响宿主内分泌和代谢、免疫疾病等。其中, 参与疾病方面的谷胱甘肽 S 转移酶 (glutathione S-transferase, locus_tag: C7A15_02465、05405、

06415、07715、12 130、13 855、17 380) 和沙雷氏蛋白酶 (serralysin, locus_tag: C7A15_12 115) 等被认为是细菌重要的毒素, 可以破坏宿主的组织和免疫系统 [26-27] (图 5)。这些基因和通路的存在为研究 Ap-W20 的毒力特征提供了依据。

2.4 比较基因组分析

为了研究 Ap-W20 的基因组特征, 实验选取了与 Ap-W20 亲缘关系较近、且分别来自于人源和环境源的菌株 AP_882 和 PHEA-2, 对 3 个菌株的全基因组进行了共线性分析。结果表明, Ap-W20、AP_882 和 PHEA-2 全基因组共线性关系较好, 相似度较高, 匹配度较好。从染色体基因组长度上来看, 相较于从患病个体 (鱼和人) 分离的 Ap-W20 和 AP_882, 分离自环境的菌株 PHEA-2

Tree scale: 0.1

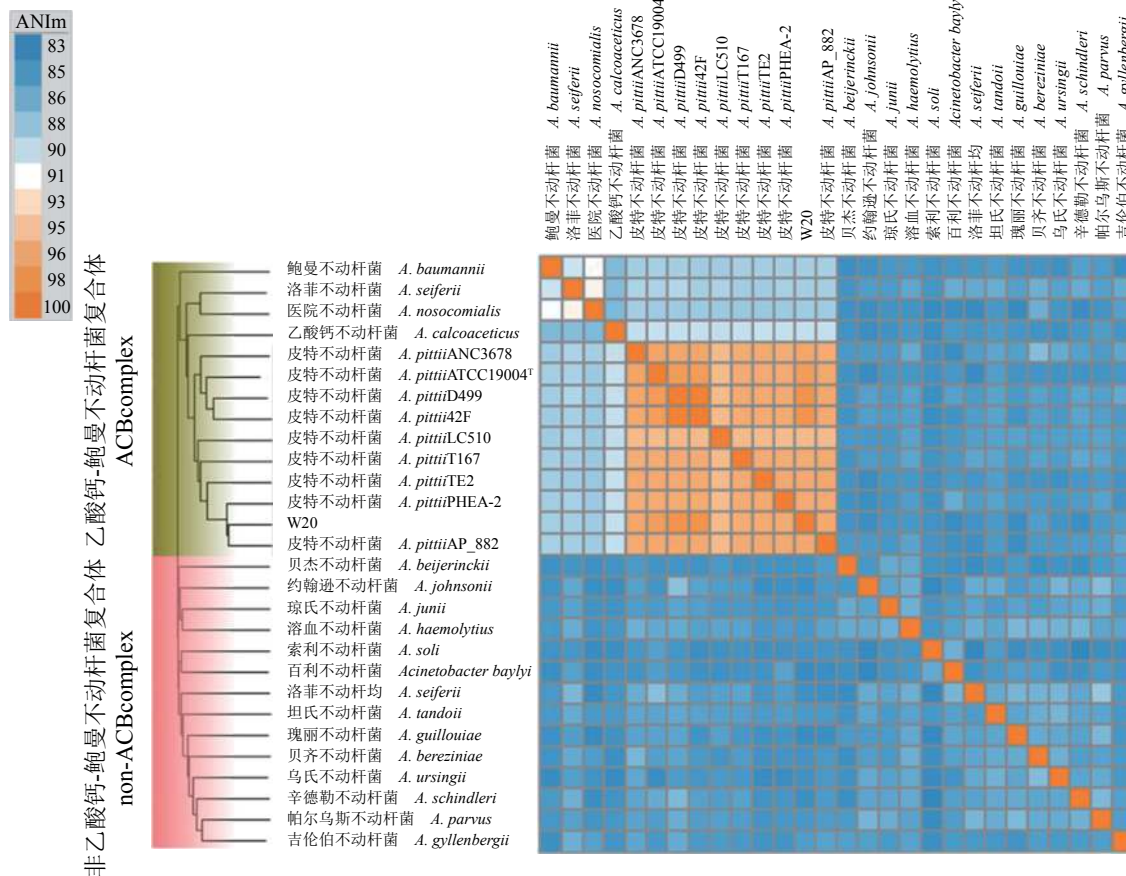


图 2 28 株不动杆菌的平均核苷酸分析

Fig. 2 Average nucleotide identity of 28 strains of *Acinetobacter*

存在明显的 DNA 片段缺失 (图 6)。

通过对 3 个菌株的可移动元件进行比较发现, 皮特不动杆菌 Ap-W20 中存在 4 个质粒、39 个基因岛以及 2 个完整和 3 个不完整的前噬菌体; AP_882 中存在 2 个质粒、15 个基因岛以及 1 个不完整的前噬菌体; PHEA-2 基因组中不存在质粒和前噬菌体, 有 13 个基因岛 (表 2)。

在 Ap-W20 共预测到的 39 个基因岛中, 有 5 个位于质粒上 (3 个位于 pApW20-1、2 个位于 pApW20-2)。Ap-W20 染色体上有 9 个基因岛 (图 1-a: GI1~GI9) 特征明显, 除 GI4 是 Ap-W20 和 AP_882 所共有、PHEA-2 没有外, 其余的基因岛均是 Ap-W20 所特有。GI4 和 GI6 中含有重金属抗性基因簇 (resistance to toxic/chromium compounds; *chrA/chrB*, locus_tag: C7A15_11 315~11 310)。GI7 和 GI8 中分别存在一个完整的前噬菌体基因簇 (locus_tag: C7A15_13410~13665; C7A15_17560~17815), 表明该前噬菌体基因簇可能是从其他菌株水平转移而来。

2.5 Ap-W20 的毒力因子分析

毒力基因分析 依据 VFDB 数据库, 在 Ap-W20 全基因组中共预测到 286 个毒力基因, 其中 279 个位于染色体上, 7 个位于质粒上。在 286 个毒力基因中, 142 个被归为四大类 (表 3)。

在所预测的毒力基因中, 进攻性毒力基因 (offensive virulence genes) 分为 4 类, 共 71 个基因, 其中 48 个与黏附相关, 如热休克蛋白 60 基因 *hsp60*(C7A15_01085)、IV 型菌毛基因 *pilT*(C7A15_10140)、凝集因子基因 (C7A15_09305)、N-乙酰氨基葡萄糖糖转移酶基因 (参与多糖细胞间黏附素合成, C7A15_02515) 等; 3 个与毒素相关, 如环化酶分泌 ATP 结合蛋白基因 *atp*(C7A15_00155)、溶血素腺苷酸环化酶基因 *cya*(C7A15_12115) 等; 17 个与分泌系统相关, 表明黏附和分泌系统在 Ap-W20 进攻性毒力因子中占有重要地位。

防御性毒力基因 (defensive virulence gens) 分为 3 类, 共 25 个基因, 其中 16 个与抗吞噬相关, 如糖基转移酶基因 *cpsE*(C7A15_05955)、荚膜多糖

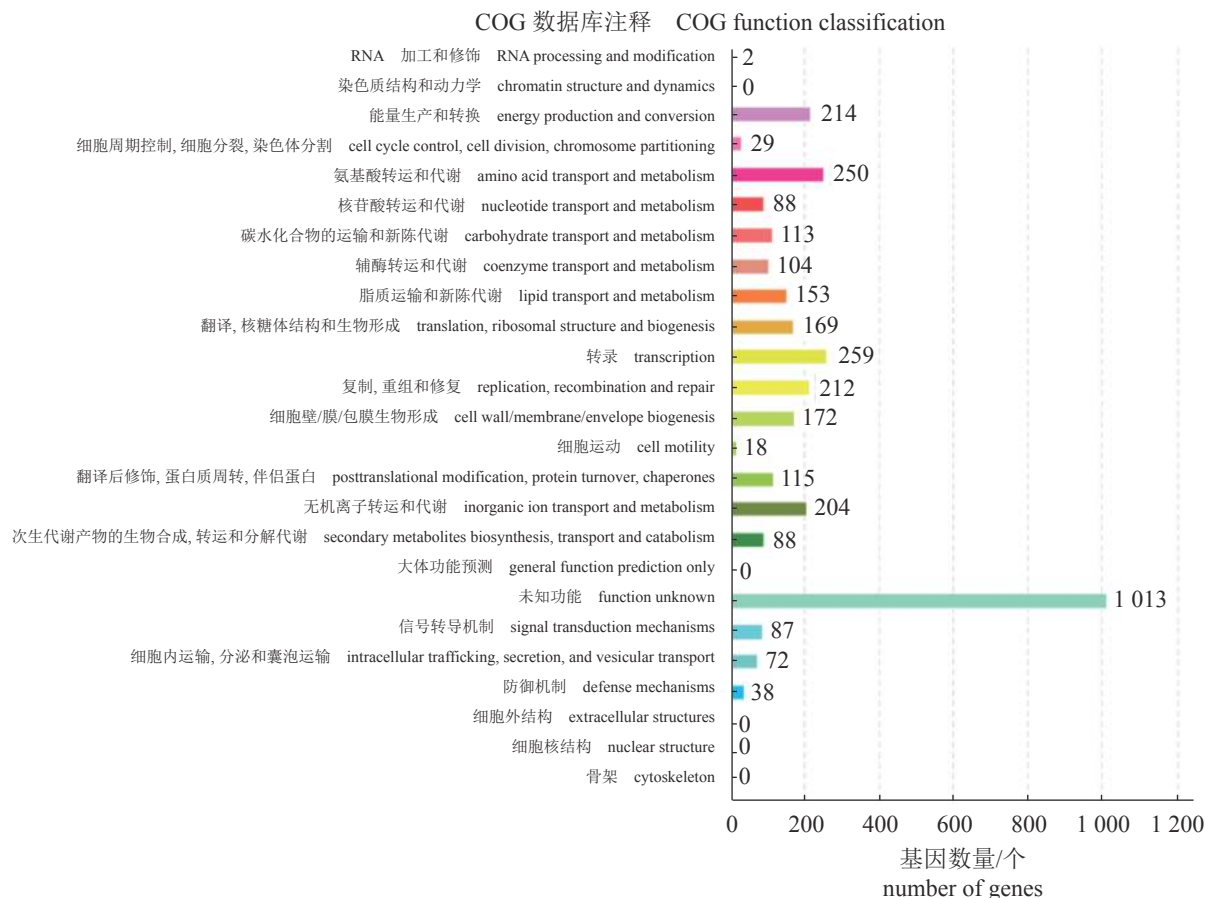


图 3 Ap-W20 的 COG 功能分类

Fig. 3 Gene distribution based on COG function classification of strain Ap-W20

合成酶基因 *cap8P*、*cap8J*、*cap8B* (C7A15_00370、01245、05870) 等, 表明在 Ap-W20 的生存环境中, 最大的威胁可能来自于宿主的吞噬。

非特异性毒力基因 (nonspecific virulence gene) 共 39 个, 主要包括铁摄取相关基因。毒力相关的调节基因共 7 个, 其中包括 5 个拷贝的 *phoP* 基因 (C7A15_04120、13745、17875、18255 和 18625), 该基因的表达产物被认为是细菌双组份系统的重要调节因子, 在病原菌如鼠疫耶尔森氏菌 (*Yersinia pestis*) 的毒力表达中起到了重要的调控作用^[28]。

此外, Ap-W20 中还存在丝氨酸蛋白酶, 溶血性磷脂酶 C, 与溶血素合成相关的酰基-ACP-还原酶 CylG、转运蛋白 CylA 和 Hemolysin B, 与 RTX 毒素相关的转运蛋白 RtxB, 以及参与肠杆菌素 (enterobactin) 合成和群体感应系统 (quorum-sensing) 等相关基因。这些基因共同构成了 Ap-W20 的毒力基因系统。

与菌株毒力有关的次级代谢产物基因簇

经 antiSMASH 分析发现, 在 Ap-W20 中存在次级代谢产物细菌素 (bacteriocin) 和铁载体 (siderophore) 的基因簇。细菌素基因簇含有 16 个相关基因, 铁载体基因簇含有 11 个相关基因。

分泌系统 Ap-W20 中预测共有 2330 个分泌蛋白 (secreted protein), 632 个转运蛋白 (transport proteins) 和 875 个跨膜蛋白 (TMHMM protein)。

分泌系统作为重要的毒力因子分泌途径, 在细菌的致病性方面发挥重要作用^[29]。Ap-W20 中存在 I 型、II 型和 VI 型分泌系统。其中, 基因 *tolC* (C7A15_06960) 参与了 I 型分泌系统的形成, 有 12 个基因参与了 II 型分泌系统的形成, 存在 3 个 VI 型分泌系统的效应蛋白基因 *vgrG* (C7A15_06060、10390 和 12980)。

Sec 分泌途径是细菌中蛋白分泌跨膜转运的主要途径^[30]。在 Ap-W20 中, 与 Sec-SRP 分泌途径相关的基因有 11 个。双精氨酸转运 (Tat) 是另外一种蛋白分泌跨膜转运系统, 常与致病细菌毒力蛋白分泌有关, Tat 途径广泛存在于病原菌中,

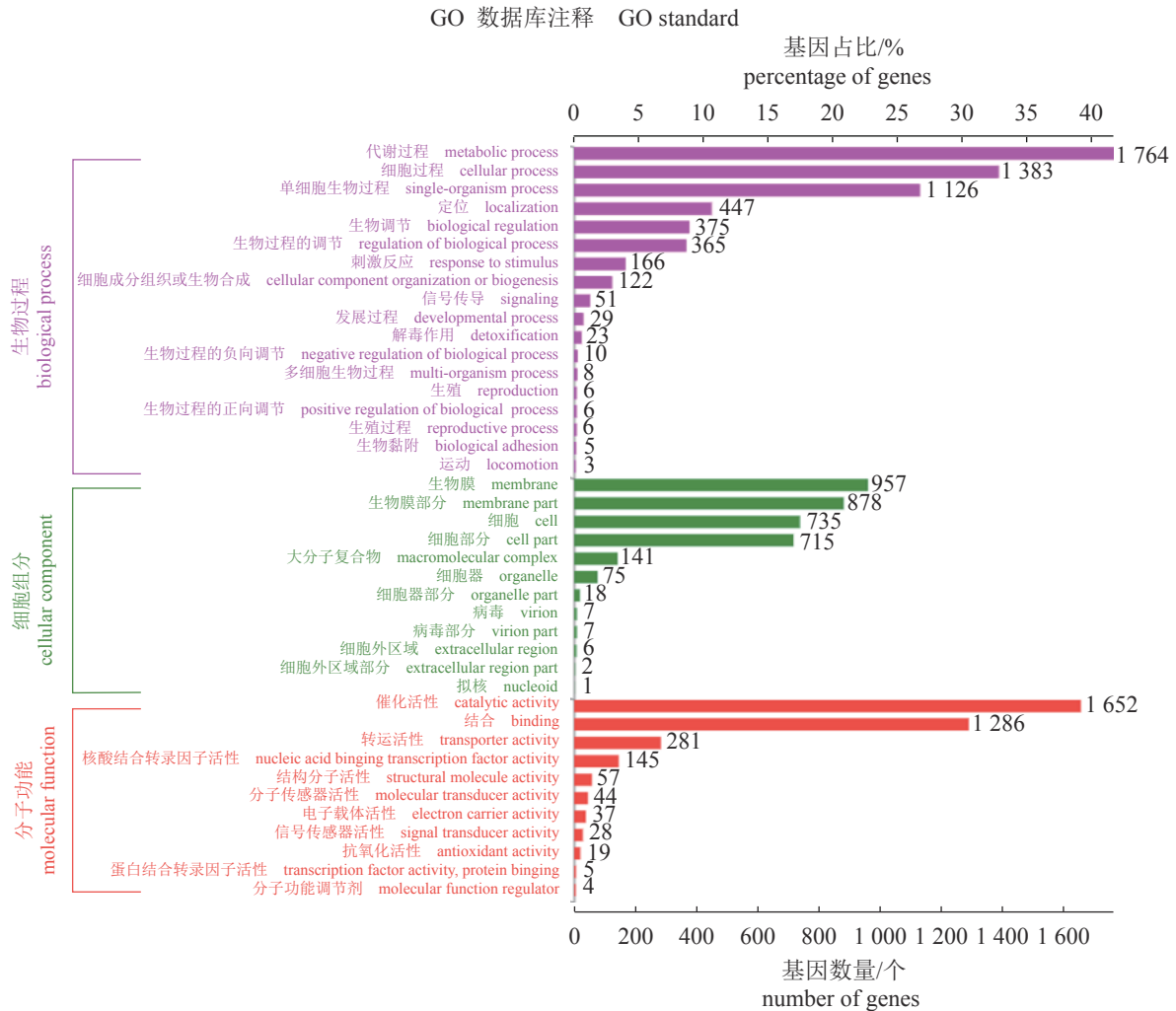


图 4 Ap-W20 的 GO 功能分类

Fig. 4 Gene distribution based on GO function classification of strain Ap-W20

它可作为一个毒力决定因素^[31]。在 Ap-W20 中，有 3 个基因 *tatA*、*tatB* 和 *tatC*(C7A15_08025-08035) 参与了 Tat 系统的形成。

双组分调控系统 双组分调控系统使细菌能够感知、响应和适应广泛的环境、压力源和生长条件。双组分系统通过组氨酸激酶磷酸化反应调节子完成信号转导。典型的双组分调节系统由感受蛋白和调节蛋白组成，它们由两个不同的基因编码，通常这两个编码基因是相邻的，并且组成一个操纵子^[32]。分析发现，Ap-W20 中存在 67 个双组分调控相关基因，其中有 21 个组氨酸激酶基因，39 个反应调节子基因和 7 个组氨酸激酶—反应调节子功能域杂合蛋白基因。其中，有一个组氨酸激酶基因位于质粒 pApW20-1 上。

质粒中的毒力因子 Ap-W20 中存在 4 个

以前从未报道过的质粒(图 1-b)。致病菌的质粒上常常有编码毒力因子的相关基因^[33]。除了上述分析的基因岛等元件的存在，VFDB 数据库分析发现，在质粒 pApW20-1 和 pApW20-2 上还存在 7 个毒力相关基因：在 pApW20-1 上存在 1 个 IV 型分泌系统偶联蛋白基因 *dotL* 和 2 个 IV 型分泌系统外膜复合蛋白基因 (*dotC* 和 *dotH*)；在 pApW20-2 上存在鞭毛修饰蛋白 A 基因、荚膜多糖脂酰合酶基因、铁转运蛋白基因和 IV 型分泌系统效应蛋白基因 *bepA*。

3 讨论

不动杆菌已成为水产养殖中重要的条件致病菌，实验室前期研究结果表明皮特不动杆菌可对水产养殖造成严重威胁^[17-18]。本实验以分离获得的高毒力菌株 Ap-W20 为研究对象，从全基

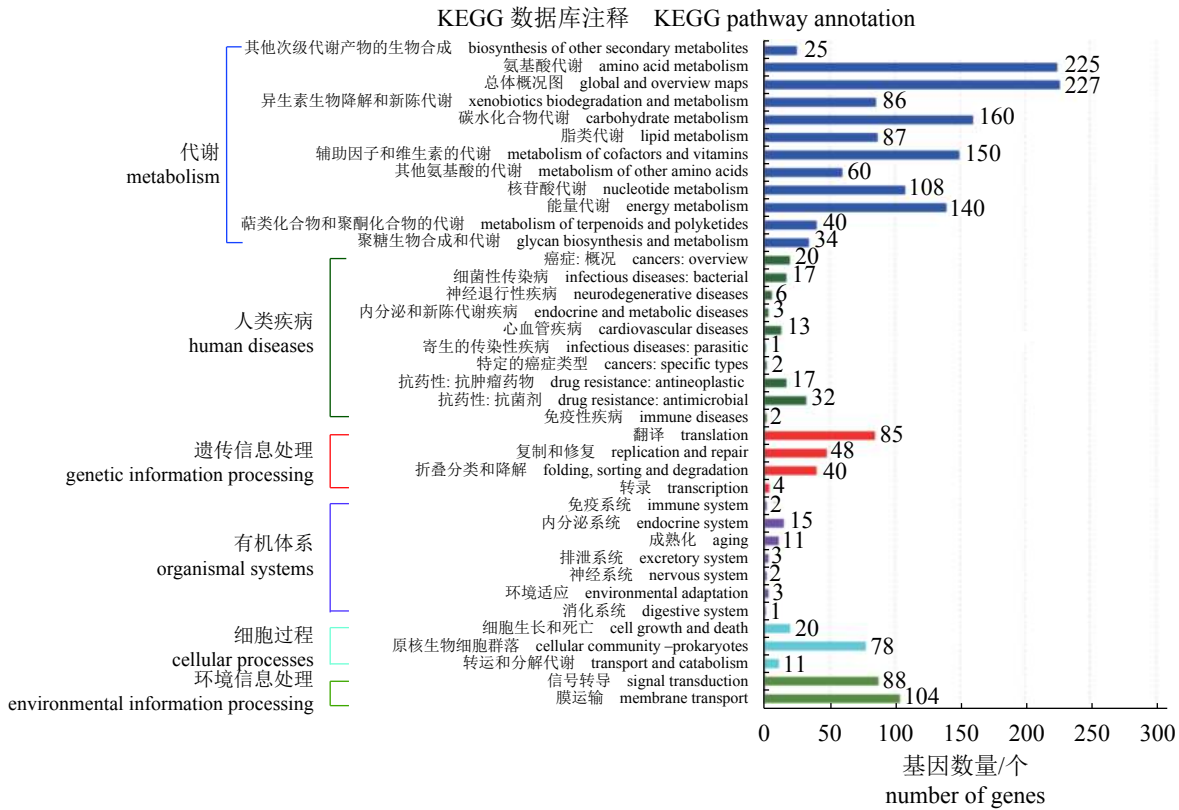


图 5 Ap-W20 的 KEGG 功能分类

Fig. 5 Gene distribution based on KEGG function classification of strain Ap-W20

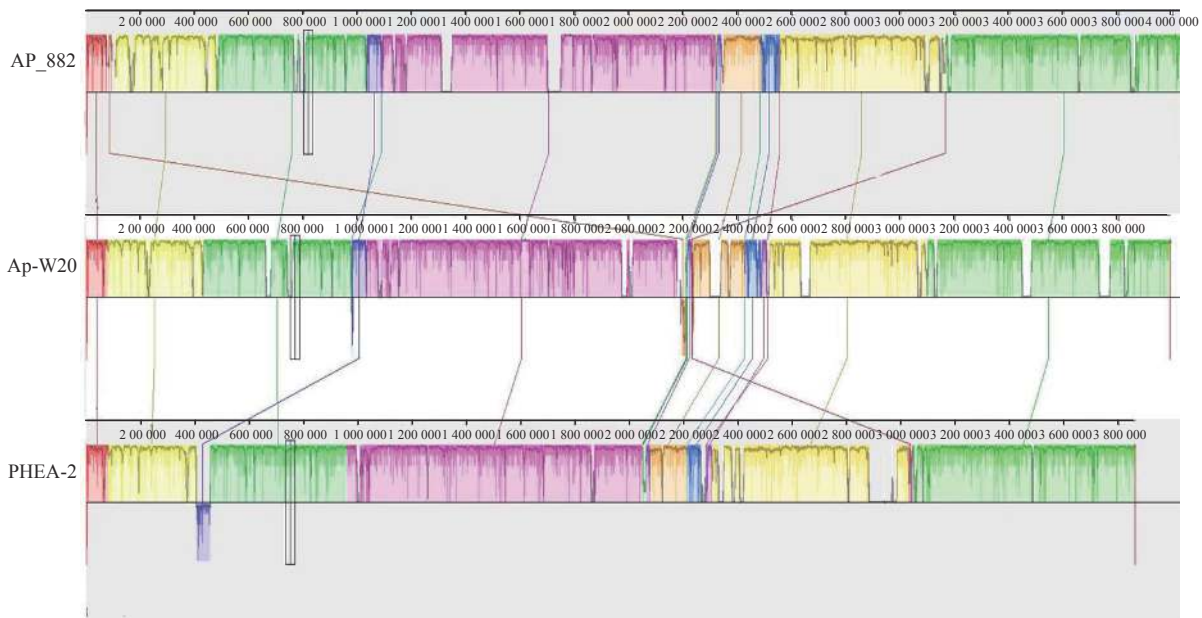


图 6 Ap-W20、AP_882 和 PHEA-2 共线性分析

Fig. 6 Collinear analysis result of strains Ap-W20, AP_882 and PHEA-2

基因组层面分析作为新兴鱼源致病菌——皮特不动杆菌的毒力特征。NCBI 数据库中已收录的 20 株皮特不动杆菌全基因组 GC 含量比较稳定 (38.60%~

39.03%), 相比之下 Ap-W20 全基因组 GC 含量处于中间水平。但从基因组全长来看, Ap-W20 比目前所有已收录的皮特不动杆菌 (3.86~4.32 Mb)

表 2 Ap-W20、AP_882 和 PHEA-2 基因组中可移动元件的比较

Tab. 2 Comparison of the mobile elements in the genomes of strains Ap-W20, AP_882 and PHEA-2

菌株 strain	质粒数/个 plasmid number	基因岛数目/个 island number		完整的前噬菌体/个 intact prophage	不完整的前噬菌体/个 incomplete prophage
		染色体 chromosome	质粒 plasmid		
Ap-W20	4	34	5	2	3
AP_882	2	12	3	0	1
PHEA-2	0	13	0	0	0

表 3 Ap-W20 的毒力基因预测分类统计表

Tab. 3 Virulence genes of *A. pittii* strain Ap-W20 predicted by VFDB

毒力因子一级分类 level 1		毒力因子二级分类 level 2		基因数量/个 gene no.
防御性毒力因子 defensive virulence factors		抗吞噬 anti-phagocytosis		16
		压力蛋白 stress protein		8
		细胞代谢 cellular metabolism		1
进攻性毒力因子 offensive virulence factors		黏附 adherence		48
		分泌系统 secretion system		17
		毒素 toxin		3
		入侵 invasion		3
非特异性毒力因子 nonspecific virulence factor		铁摄取系统 iron uptake system		39
毒力调节相关基因 regulation of virulence-associated genes		调节 regulation		7
其他 others				144

都要长，这极有可能与 Ap-W20 携带 4 个质粒和 5 个前噬菌体有关。

Ap-W20、AP_882 和 PHEA-2 3 个菌株亲缘关系较近，但分离源却不同 (图 2)。除了核心基因编码必备的代谢相关基因，基因组同时拥有大量的附属基因。这些附属基因多通过水平转移获得，细菌多受益于这些基因^[34]。比较基因组分析发现，Ap-W20 中含有丰富的可移动元件，质粒、前噬菌体和基因岛的数量要多于人源的 AP_882，特别是环境源菌株 PHEA-2 不含有前噬菌体和质粒。通过水平转移进入细菌基因组的这些可移动元件往往在细菌进化过程中起着重要作用。据文献报道，作为可移动元件的质粒、前噬菌体和基因岛，常常对增强致病菌的毒力、细菌生存能力和进化、基因组序列的多样性等具有重要意义^[35]。有研究表明，鲍曼不动杆菌的非必须基因组具有获取外源性遗传物质的倾向，可以使非必须基因组不断扩增^[36]。鲍曼不动杆菌流行菌株内含有多种外源性毒力基因，表明其可通过从毒力更强的细菌获得外源性毒力基因

来增强自身的致病能力和耐药性^[37-38]。相较于 AP_882 和 PHEA-2，Ap-W20 全基因组中较多的可移动元件，极有可能是由于非必需基因组的扩张、在进化过程中为了适应环境的选择压力从胞外摄取的，这些水平转移而来的基因可能是鱼源皮特不动杆菌拥有特征表型的关键原因。

基于 RAST 分析，位于基因岛 GI4 和 GI6 中的重金属抗性基因簇被划分为“毒力、疾病和防御”子系统，表明这些基因簇可能参与了细菌对环境变化的适应。根据文献报道，重金属对不动杆菌基因组的进化有较大影响^[39]。质粒 pApW20-1 和 pApW20-2 中含有抗有毒化合物 [汞离子还原酶、汞运输蛋白 MerC、抗汞操纵子调控蛋白、抗汞操纵子辅助调节蛋白、钴/锌/镉抵抗蛋白 CzcD 和 Cd(II)/Pb(II) 响应转录调节因子] 相关基因簇，同样可以帮助 Ap-W20 应变在各种环境中生存繁殖。而在人源菌株 AP_882、特别是环境源菌株 PHEA-2 中，抗有毒化合物相关基因要少得多。

在 Ap-W20 的毒力基因分析结果中，黏附相

关基因在进攻性毒力因子中占有重要比例(67.6%)。毒力基因预测显示, Ap-W20 中存在许多菌毛形成相关基因。菌毛有助于生物膜形成、增加细菌的黏附能力,从而增强细菌的致病力^[40-41]。荚膜属于防御性毒力因子,其通过阻断结合和内存,保护致病菌免于巨噬细胞、中性粒细胞、上皮细胞及树突细胞的吞噬作用^[42-43]。特别的,比较基因组分析时发现,荚膜形成相关基因 *ABZJ-00085*、*ABZJ-00086* 在从患病个体(鱼和人)分离的 Ap-W20 和 AP_882 中存在,而在环境源的 PHEA-2 中不存在,表明该荚膜形成相关基因可能为致病菌株提供了抵抗宿主的吞噬作用、对环境适应性的优势,可能是致病性皮特不动杆菌感染宿主的关键毒力因子之一。

分泌系统也属于进攻性毒力因子。Ap-W20 中存在 I 型、II 型和 VI 型分泌系统。I 型分泌系统(T1SS)相对简单,代表了革兰氏阴性菌细胞膜上普遍的蛋白分泌模式。Ap-W20 中存在的 RTX 毒素,其分泌可能需要 T1SS^[44]。II 型分泌系统(T2SS)对于很多毒力因子的分泌都必不可少,如气溶素、蛋白酶、溶血素、果胶酶等,从而破坏宿主细胞,引起组织损伤和坏死;同时, T2SS 在细菌的运动性及生物被膜形成等方面也发挥重要功能^[45]。Ap-W20 中有 12 个基因参与了 T2SS 的形成,推测是毒力因子的重要组成部分。VI 型分泌系统(T6SS)的主要作用是提高细菌对环境的适应能力,介导细菌对宿主细胞的致病力^[46]。有研究表明,通过同源重组缺失了 T6SS 结构基因和转位基因的鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*),缺失株的存活率和致病力均明显低于野生株^[47]。效应蛋白 VgrG 是 T6SS 中一种能够破坏宿主细胞骨架从而诱导其凋亡的 ADP-核糖基化毒素,是 T6SS 的核心组分^[48-49]。在 Ap-W20 中,存在 3 个拷贝的效应蛋白 VgrG 基因,推测该效应蛋白通过 T6SS 在 Ap-W20 的致病力中发挥了重要作用。人源菌株 AP_882 中同样存在以上 3 种分泌系统,而在环境源菌株 PHEA-2 中仅发现存在 T1SS 和 T2SS,暗示 T6SS 可能在致病中发挥了重要作用。

此外,在 Ap-W20 的质粒中还存在 IV 型分泌系统(T4SS)部分形成基因,包括 T4SS 效应蛋白基因 *bepA*。T4SS 通过参与遗传物质的细胞间转移,对细菌生存、增殖和致病等发挥重要作用^[50-51]。Ap-W20 是否可以形成完整、有功能的 T4SS,还

有待进一步研究。在人源菌株 AP_882 和环境源菌株 PHEA-2 中均未发现有 T4SS 合成相关基因。

Tat 途径广泛存在于病原菌中,它可以作为一个毒力决定因素。遗传操作缺失掉该途径后,可导致细菌一系列的生理缺陷,如毒力因子分泌、生物被膜形成、运动性、铁摄取、压力应激和感染等^[52]。目前在哺乳动物中没有发现该系统,这就为专门针对病原菌的抗菌药物或抑制剂的开发提供了可能性^[53]。与 Sec 途径相比, TAT 途径的显著优点是它只分泌已正确折叠的蛋白,而未正确折叠的蛋白则不能通过该系统分泌,这样就保证了分泌产物在结构上的正确性^[54]。有研究搜集了 19 株迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)和 2 株鲑爱德华氏菌(*E. ictaluri*),发现 *tatABCD* 广泛存在于所研究的爱德华氏菌株中,而 *tatE* 则仅存在于强毒株中^[52]。在 Ap-W20 中,发现存在 *tatABC*,但是并没有发现 *tatE* 的存在。因此,在皮特不动杆菌中, *tatE* 的存在是否与高毒力表型相联系有待后续研究。

细菌素是细菌在核糖体中合成、在细胞外释放,用来杀死或抑制原核生物生长的一种小分子量生物活性抗菌肽^[55]。在 Ap-W20 中存在细菌素合成基因簇,其可以帮助 Ap-W20 在水体养殖环境或鱼类的肠道中形成菌群优势,从而发挥毒力。铁是大多数生物生长必需的重要元素。有研究表明,细菌铁载体获得铁的效率的提高是细菌毒力增加的主要因素,细菌致病性跟细菌摄取铁的能力有很强的关联^[56-57]。作为致病菌的鼠疫耶尔森氏杆菌(*Yersinia pestis*)正是因为具有高效能的摄铁系统,极大增强了其在宿主体内存活的机率,进一步增殖导致宿主的感染^[58-60]。Ap-W20 中存在的铁载体基因簇或铁摄取系统,也会极大增强 Ap-W20 感染宿主的机率。

Ap-W20 中存在多套双组分调控系统,共 67 个相关基因。细菌通常会同时拥有多套双组分调节系统,以响应不同的刺激,全方位地调控对外界环境的适应性^[61]。温度、镁离子、磷酸盐、渗透压和宿主激素等都可在致病菌侵染过程中发挥调控作用。病原菌在侵染不同阶段对微环境的适应不仅需要表达特定的毒力因子,还需要对代谢过程进行紧密的调控,在这些过程中,双组分调节系统都起到了重要作用^[62]。

在本实验中, ANI 分析进一步确定了该新兴病原菌确为皮特不动杆菌,同时也表明了菌

株 Ap-W20 与人类致病菌株 AP_882 最近的亲缘关系 (图 2)。研究还发现, Ap-W20 对模式生物斑马鱼及秀丽隐杆线虫均具有高致病力^[17]。综合以上对 Ap-W20 基因组毒力特征的分析, 推测作为鱼源致病菌的 Ap-W20 同样可能引起人类发生感染。所以, 从事水产养殖的人员应该注意操作安全, 对皮特不动杆菌感染的病鱼进行无害化处理。

王超杰和黎洁为并列第一作者。

参考文献 (References):

- [1] Peleg A Y, Seifert H, Paterson D L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2008, 21(3): 538-582.
- [2] Lee Y C, Huang Y T, Tan C K, *et al.* *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genospecies 13TU and 3 bacteriaemia: comparison of clinical features, prognostic factors and outcomes[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2011, 66(8): 1839-1846.
- [3] Cosgaya C, Mari-Almirall M, Van Assche A, *et al.* *Acinetobacter dijkschoorniae* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex mainly recovered from clinical samples in different countries[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, 66(10): 4105-4111.
- [4] Doughari H J, Ndakidem P A, Human I S, *et al.* The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview[J]. *Microbes and Environments*, 2011, 26(2): 101-112.
- [5] Gu D X, Hu Y J, Zhou H W, *et al.* Substitutions of Ser83Leu in GyrA and Ser80Leu in ParC associated with quinolone resistance in *Acinetobacter pittii*[J]. *Microbial Drug Resistance*, 2015, 21(3): 345-351.
- [6] Sung J Y, Koo S H, Kim S, *et al.* Emergence of *Acinetobacter pittii* harboring New Delhi metallo- β -lactamase genes in Daejeon, Korea[J]. *Annals of Laboratory Medicine*, 2015, 35(5): 531-534.
- [7] Wang X H, Chen T, Yu R J, *et al.* *Acinetobacter pittii* and *Acinetobacter nosocomialis* among clinical isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex in Sichuan, China[J]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2013, 76(3): 392-395.
- [8] Erbay A, İdil A, Gözel M G, *et al.* Impact of early appropriate antimicrobial therapy on survival in *Acinetobacter baumannii* bloodstream infections[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2009, 34(6): 575-579.
- [9] Seifert H, Strate A, Pulverer G. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: clinical features, epidemiology, and predictors of mortality[J]. *Medicine*, 1995, 74(6): 340-349.
- [10] Trotter V, Segura P G, Namias N, *et al.* Outcomes of *Acinetobacter baumannii* infection in critically ill burned patients[J]. *Journal of Burn Care & Research*, 2007, 28(2): 248-254.
- [11] Wisplinghoff H, Perbix W, Seifert H. Risk factors for nosocomial bloodstream infections due to *Acinetobacter baumannii*: a case-control study of adult burn patients[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 1999, 28(1): 59-66.
- [12] 顾天钊, 陆承平, 陈怀青. 鲍氏不动杆菌——鳊鱼暴发性死亡的新病原[J]. *微生物学通报*, 1997, 24(2): 83, 104-106.
- Gu T Z, Lu C P, Chen H Q. *Acinetobacter baumannii* a novel pathogen of acute epidemic in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*)[J]. *Microbiology China*, 1997, 24(2): 83, 104-106(in Chinese).
- [13] 陆文浩, 陈辉, 王习达, 等. 异育银鲫致病性鲍曼不动杆菌的鉴定和系统发育分析[J]. *中国兽医科学*, 2009, 39(4): 303-309.
- Lu W H, Chen H, Wang X D, *et al.* Identification and phylogenetic analysis of the pathogenic *Acinetobacter baumannii* from hybridized prussian carp[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2009, 39(4): 303-309(in Chinese).
- [14] Xia L, Xiong D M, Gu Z M, *et al.* Recovery of *Acinetobacter baumannii* from diseased channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in China[J]. *Aquaculture*, 2008, 284(1-4): 285-288.
- [15] 毛芝娟, 毛甬州, 汪建萍. 两株鱼源琼氏不动杆菌的分离、鉴定和耐药特性分析[J]. *水产学报*, 2013, 37(10): 1572-1578.
- Mao Z J, Mao Y Z, Wang J P. Isolation, identification and drug-resistance genes detection of *Acinetobacter junii* from fish[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(10): 1572-1578(in Chinese).
- [16] Kozińska A, Paździor E, Pękala A, *et al.* *Acinetobacter johnsonii* and *Acinetobacter lwoffii* - the emerging fish pathogens[J]. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 2014, 58(2): 193-199.
- [17] Li J, Cao J L, Wang X, *et al.* *Acinetobacter pittii*, an emerging new multi-drug resistant fish pathogen isolated from mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) in China[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2014, 68(12): 2813-2818.

- ated from diseased blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala* Yih) in China[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(6): 6459-6471.
- [18] Wang X, Li J, Cao X J, *et al.* Isolation, identification and characterisation of an emerging fish pathogen, *Acinetobacter pittii*, from diseased loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) in China[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2020, 113(1): 21-32.
- [19] Kim M, Oh H S, Park S C, *et al.* Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(2): 346-351.
- [20] Kurtz S, Phillippy A, Delcher A L, *et al.* Versatile and open software for comparing large genomes[J]. *Genome Biology*, 2004, 5(2): R12.
- [21] Richter M, Rosselló-Móra R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(45): 19126-19131.
- [22] Yoon S H, Ha S M, Lim J, *et al.* A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2017, 110(10): 1281-1286.
- [23] 陈健舜, 江玲丽, 方维焕. 李斯特菌毒力因子及其进化[J]. *微生物学报*, 2007, 47(4): 738-742.
- Chen J S, Jiang L L, Fang W H. Virulence determinants and its evolution of the genus *Listeria*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47(4): 738-742(in Chinese).
- [24] Ang G Y, Yu C Y, Cheong Y M, *et al.* Emergence of ST119 *Acinetobacter pittii* co-harboring NDM-1 and OXA-58 in Malaysia[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2016, 47(2): 168-169.
- [25] Zhan Y H, Yan Y L, Zhang W, *et al.* Genome sequence of *Acinetobacter calcoaceticus* PHEA-2, isolated from industry wastewater[J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(10): 2672-2673.
- [26] Allen T C, Granville L A, Cagle P T, *et al.* Expression of glutathione S-transferase π and glutathione synthase correlates with survival in early stage non-small cell carcinomas of the lung[J]. *Human Pathology*, 2007, 38(2): 220-227.
- [27] 张琳桓, 王伟, 孙晶晶, 等. 沙雷氏蛋白酶MP及其抑制剂LupI的复合物纯化及结晶[J]. *渔业科学进展*, 2019.
- Zhang L H, Wang W, Sun J J, *et al.* Purification and crystallization of complex of serralyisin-like MP and its inhibitor LupI[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2019(in Chinese).
- [28] 张义全. 鼠疫耶尔森氏菌 PhoP-RovA-*psa* 转录调控环路研究 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2011.
- Zhang Y Q. Molecular characterization of the transcriptional regulation of *psa* locus by PhoP and RovA in *Yersinia pestis*[D]. Beijing: Academy of Military Medical Sciences, 2011 (in Chinese).
- [29] 尹磊, 祁克宗, 宋祥军, 等. 大肠杆菌III型分泌系统2毒力岛研究进展[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(12): 3031-3037.
- Yin L, Qi K Z, Song X J, *et al.* Type III secretion system 2 pathogenicity islands of *Escherichia coli*[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(12): 3031-3037(in Chinese).
- [30] Tjalsma H, Antelmann H, Jongbloed J D H, *et al.* Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the "secrets" of the secretome[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2004, 68(2): 207-233.
- [31] Sargent F. Constructing the wonders of the bacterial world: biosynthesis of complex enzymes[J]. *Microbiology*, 2007, 153(3): 633-651.
- [32] Zschiedrich C P, Keidel V, Szurmant H. Molecular mechanisms of two-component signal transduction[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2016, 428(19): 3752-3775.
- [33] Majumdar T, Chattopadhyay P, Saha D R, *et al.* Virulence plasmid of *Aeromonas hydrophila* induces macrophage apoptosis and helps in developing systemic infection in mice[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2009, 46(2): 98-107.
- [34] 李相辰. 根瘤菌中共生相关基因和真菌中次生代谢基因簇的水平转移研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
- Li X C. Horizontal gene transfer of Rhizobial symbiosis-related genes and fungal secondary metabolic gene clusters[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2019 (in Chinese).
- [35] 魏大伟. 中国沿海地区副溶血弧菌流行病学调查及遗传多样性分析 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.
- Wei D W. Epidemiological investigation and genetic diversity of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from coastal areas of China[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2018 (in Chinese).
- [36] Jang T N, Lee S H, Huang C H, *et al.* Risk factors and

- impact of nosocomial *Acinetobacter baumannii* bloodstream infections in the adult intensive care unit: a case-control study[J]. *Journal of Hospital Infection*, 2009, 73(2): 143-150.
- [37] Jung J Y, Park M S, Kim S E, *et al.* Risk factors for multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia in patients with colonization in the intensive care unit[J]. *BMC Infectious Diseases*, 2010, 10: 228.
- [38] Falagas M E, Kasiakou S K, Rafailidis P I, *et al.* Comparison of mortality of patients with *Acinetobacter baumannii* bacteraemia receiving appropriate and inappropriate empirical therapy[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2006, 57(6): 1251-1254.
- [39] Mindlin S, Petrenko A, Kurakov A, *et al.* Resistance of permafrost and modern *Acinetobacter lwoffii* strains to heavy metals and arsenic revealed by genome analysis[J]. *Biomed Research International*, 2016, 2016: 3970831.
- [40] Paczosa M K, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2016, 80(3): 629-661.
- [41] Li B, Zhao Y L, Liu C T, *et al.* Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Future Microbiology*, 2014, 9(9): 1071-1081.
- [42] Ko K S. The contribution of capsule polysaccharide genes to virulence of *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Virulence*, 2017, 8(5): 485-486.
- [43] Clegg S, Murphy C N. Epidemiology and virulence of *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Microbiology Spectrum*, 2016, 4(1): UTI-0005-2012.
- [44] Lowry R, Balboa S, Parker J L, *et al.* *Aeromonas* flagella and colonisation mechanisms[J]. *Advances in Microbial Physiology*, 2014, 65: 203-256.
- [45] Francetic O, Belin D, Badaut C, *et al.* Expression of the endogenous type II secretion pathway in *Escherichia coli* leads to chitinase secretion[J]. *The EMBO Journal*, 2000, 19(24): 6697-6703.
- [46] 岑雪, 丁雪燕, 娄昆鹏, 等. 细菌分泌系统研究进展[J]. *中国预防兽医学报*, 2019, 41(3): 317-322, 327.
- Cen X, Ding X Y, Lou K P, *et al.* The research progress of the bacterial secretion systems[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2019, 41(3): 317-322, 327(in Chinese).
- [47] Weber B, Hasic M, Chen C, *et al.* Type VI secretion modulates quorum sensing and stress response in *Vibrio anguillarum*[J]. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(12): 3018-3028.
- [48] Suarez G, Sierra J C, Kirtley M L, *et al.* Role of Hcp, a type 6 secretion system effector, of *Aeromonas hydrophila* in modulating activation of host immune cells[J]. *Microbiology*, 2010, 156(12): 3678-3688.
- [49] 肖亚中. VI型分泌系统核心组分VgrG的致病功能[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(9): 2105.
- Xiao Y Z. Function of type VI secretion system core component VgrG on the pathogenicity of avian *Escherichia coli*[J]. *Microbiology China*, 2016, 43(9): 2105(in Chinese).
- [50] Grohmann E, Christie P J, Waksman G, *et al.* Type IV secretion in gram-negative and gram-positive bacteria[J]. *Molecular Microbiology*, 2018, 107(4): 455-471.
- [51] Aguilar J, Zupan J, Cameron T A, *et al.* *Agrobacterium* type IV secretion system and its substrates form helical arrays around the circumference of virulence-induced cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(8): 3758-3763.
- [52] 王亚敏. 迟钝爱德华氏菌双精氨酸转运系统的功能[D]. 上海: 华东理工大学, 2013.
- Wang Y M. Functional characterization of *Edwardsiella tarda* twin-arginine translocation system[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2013 (in Chinese).
- [53] De Buck E, Lammertyn E, Anné J. The importance of the twin-arginine translocation pathway for bacterial virulence[J]. *Trends in Microbiology*, 2008, 16(9): 442-453.
- [54] Economou A. Bacterial preprotein translocase: mechanism and conformational dynamics of a processive enzyme[J]. *Molecular Microbiology*, 1998, 27(3): 511-518.
- [55] Konisky J. Colicins and other bacteriocins with established modes of action[J]. *Annual Review of Microbiology*, 1982, 36: 125-144.
- [56] Shon A S, Bajwa R P S, Russo T A. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Virulence*, 2013, 4(2): 107-118.
- [57] 李叶芳, 白灏, 彭开松, 等. 禽致病性大肠杆菌强毒力岛摄铁功能与致病性关系的研究[J]. *中国兽医科学*, 2012, 42(9): 906-910.
- Li Y F, Bai H, Peng K S, *et al.* Relationship between the iron uptake function of high pathogenicity island and the pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli*

- strains[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2012, 42(9): 906-910(in Chinese).
- [58] Osorio C R, Juiz-Río S, Lemos M L. A siderophore biosynthesis gene cluster from the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* is structurally and functionally related to the *Yersinia* high-pathogenicity island[J]. *Microbiology*, 2006, 152(11): 3327-3341.
- [59] Hacker J, Blum-Oehler G, Mühldorfer I, *et al.* Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution[J]. *Molecular Microbiology*, 1997, 23(6): 1089-1097.
- [60] Carniel E, Guilvout I, Prentice M. Characterization of a large chromosomal "high-pathogenicity island" in biotype 1B *Yersinia enterocolitica*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(23): 6743-6751.
- [61] 吕远志. 迟钝爱德华氏菌双组分系统的毒力调控机制 [D]. 上海: 华东理工大学, 2013.
- Lv Y Z. Virulence regulation by two-component systems in *Edwardsiella tarda*[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2013 (in Chinese).
- [62] Beier D, Gross R. Regulation of bacterial virulence by two-component systems[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2006, 9(2): 143-152.

Complete genome sequence of an emerging fish pathogen *Acinetobacter pittii* strain Ap-W20 and its virulence characteristics

WANG Chaojie¹, LI Jie¹, WANG Xu¹, WANG Zhicheng¹, WANG Weimin¹, LUO Yi^{1,2*}

(1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction, Ministry of Education, Wuhan 430070, China;
2. State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Wuhan 430070, China)

Abstract: In order to make a further study of the pathogenic mechanism of *Acinetobacter pittii* an emerging fish pathogen and provide technical reserves for the prevention and control of fish diseases caused by *A. pittii*, we selected *A. pittii* strain Ap-W20 for the whole genome sequencing and analysis of its virulence characteristics. The results showed that strain Ap-W20 contained a chromosome of 4 399 705 bp with an average G+C content of 38.78% and 4 230 coding sequences (CDS). Particularly, Ap-W20 carries four previously unreported plasmids. The GenBank accession numbers of Ap-W20 are CP027658–CP027662. The ANI analysis result confirmed that Ap-W20 belonged to *A. pittii*, and Ap-W20 had close similarities with *A. pittii* AP_882 from human (96.69%) and *A. pittii* PHEA-2 (96.55%) from environment. Comparative genomic analysis of Ap-W20 with AP_882 and PHEA-2 found that the numbers of gene islands, prophages and plasmids in Ap-W20 were the largest, which is likely related to their respective isolation environments and specific pathogenicity. In comparison with the VFDB database, 286 virulence genes were predicted in the entire genome of Ap-W20, mainly related to adhesion and anti-phagocytosis. Ap-W20 also has Type I, II and VI secretion systems, multiple sets of two-component regulatory system, and bacteriocin synthesis gene cluster, etc., which suggests that there may be complex pathogenic mechanisms in *A. pittii* derived from fish. This study demonstrates the complete genome sequence and the virulence characteristics of *A. pittii* from fish, which may provide a basis for the disease control caused by *A. pittii*.

Key words: *Acinetobacter pittii*; whole genome sequencing; ANI analysis; comparative genomics; virulence characteristics

Corresponding author: LUO Yi. E-mail: luoyi@mail.hzau.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31570078)