



基于比较基因组学分析大黄鱼来源波罗的海希瓦氏菌的防御系统

徐敏慧, 朱昕熠, 陈子嫣, 朱军莉, 曲道峰, 冯立芳*

浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310018

徐敏慧, 朱昕熠, 陈子嫣, 朱军莉, 曲道峰, 冯立芳. 基于比较基因组学分析大黄鱼来源波罗的海希瓦氏菌的防御系统. 微生物学报, 2022, 62(5): 1876–1891.

XU Minhui, ZHU Xinyi, CHEN Ziyang, ZHU Junli, QU Daofeng, FENG Lifang. Comparative genomics of defense system in *Shewanella baltica* isolated from large yellow croaker. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(5): 1876–1891.

摘要:【目的】波罗的海希瓦氏菌是冷藏海产品中常见的腐败菌, 通过全基因组测序和转录组测序, 分析它们的规律成簇间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)系统和限制修饰(restricted modification, R-M)系统, 为波罗的海希瓦氏菌的基础生物学研究和海产品中微生物的致腐机制提供理论基础。【方法】分析大黄鱼来源波罗的海希瓦氏菌 SB-19 株和 W-3 株的致腐能力, 对 W-3 株的全基因组序列进行测序、组装和注释, 结合已报道的 SB-19 株和 27 株希瓦氏菌的全基因组序列, 采用比较基因组学方法探究它们的 CRISPR 和 R-M 系统的差异, 进而对 SB-19 株和 W-3 株在不同生长时期进行转录组测序, 以及两株菌内致腐相关基因的共进化分析。【结果】灭菌大黄鱼汁中产生挥发性盐基总氮和三甲胺值显示波罗的海希瓦氏菌 SB-19 株和 W-3 株分别为强致腐能力和弱致腐能力菌株; 平均核苷酸一致性证实 SB-19 株和 W-3 株为波罗的海希瓦氏菌, 但基于全基因组构建的系统发育树则发现二者之间存在遗传信息上的差异; SB-19 株具有相对完善的 CRISPR 系统, 而 W-3 株则有更丰富的 R-M 系统; 转录组测序反映出 SB-19 株在对数期和平台期的生长阶段具有更为活跃的新陈代谢能力和环境适应能力; 但是这 2 株细菌中与致腐相关基因在进化过程中较为保守。【结论】CRISPR 系统和 R-M 系统为异养型的波罗的海希瓦氏菌提供了较好的异源遗传信息入侵屏障, 在维持物种遗传稳定性方面发挥了重要作用, 但不参与该菌致腐能力差异的进化过程。

关键词: 大黄鱼; 波罗的海希瓦氏菌; 比较基因组; 规律成簇间隔短回文重复序列; 限制修饰系统

基金项目: 浙江省自然科学基金(LY19C200003); 国家自然科学基金(32172188)

Supported by the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (LY19C200003) and by the National Natural Science Foundation of China (32172188)

*Corresponding author. Tel: +86-571-28008964; E-mail: fenglifang@mail.zjgsu.edu.cn

Received: 17 October 2021; Revised: 27 December 2021; Published online: 7 January 2022

Comparative genomics of defense system in *Shewanella baltica* isolated from large yellow croaker

XU Minhui, ZHU Xinyi, CHEN Ziyan, ZHU Junli, QU Daofeng, FENG Lifang

School of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] *Shewanella baltica* is a specific spoilage organism commonly found in seafood during cold storage. To figure out the defense system of *S. baltica* isolated from large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*), we analyzed the clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs) and restriction-modification (R-M) system of this bacterium, aiming to provide a theoretical basis for the research on *S. baltica* and the spoilage mechanism of seafood. [Methods] The spoilage abilities of *S. baltica* strains SB-19 and W-3 were determined. The whole-genome sequences of the two strains were compared with 27 *Shewanella* strains, and their CRISPRs and R-M system were analyzed through comparative genomics tools. Finally, the transcriptomes of SB-19 and W-3 strains in different growth phases were sequenced, and the coevolution of spoilage-related genes in the two strains was analyzed. [Results] The total volatile basic nitrogen and trimethylamine produced in the sterilized fish juice showed that the SB-19 and W-3 had strong and weak spoilage abilities, respectively. The values of average nucleotide identity confirmed that both SB-19 and W-3 were *S. baltica*, while the phylogenetic tree based on the whole genomes showed genetic differences between them. SB-19 had a complete CRISPR system, while W-3 had an abundant R-M system. Transcriptome sequencing results indicated that SB-19 had more active metabolism and environmental adaptability in the logarithmic phase and stationary phase. The spoilage-related genes in these two strains were relatively conserved during evolution. [Conclusion] The CRISPRs and R-M system in heterotrophic *S. baltica* provide a good barrier against the invasion of heterologous genetic information and play a role in maintaining the genetic stability of species. However, they are not involved in the evolutionary process of the spoilage ability differences between *S. baltica* strains.

Keywords: large yellow croaker; *Shewanella baltica*; comparative genomics; clustered regularly interspaced short palindromic repeats; restriction-modification system

希瓦氏菌属(*Shewanella*)下的细菌为海水和淡水中常见的革兰氏阴性菌,隶属于交替单胞菌目(*Alteromonadales*)、希瓦氏菌科(*Shewanellaceae*)^[1]。尽管希瓦氏菌早在1931年既已被鉴定,但当时却归在弧菌科(*Vibrionaceae*)里,迟至1985年由MacDonell和Colwell在基于核糖体5S rRNAs序列计算后所构建的系统发育树而新划分出来^[2],目前希瓦氏菌属有47个物种,包括大黄

鱼(*Pseudosciaena crocea*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)等海产品冷藏过程中常见的特定腐败菌——波罗的海希瓦氏菌(*Shewanella baltica*)和腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)^[3-4]。

希瓦氏菌为异养微生物,在从外界获取营养的过程中面临异源基因的侵扰。为保持自身基因组的稳定性和完整性,细菌进化出多种机制以抵御异源核酸的入侵,比如规律成簇间隔短回文重复序

列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR), 它由 23–47 nt 的短重复序列(repeats)和区间序列(spacers)所组成, 约 40% 的细菌和大部分古细菌中都含有 CRISPR^[5–6]。短重复序列具有保守的回文结构或发夹结构, 区间序列往往与外源的噬菌体或质粒等遗传因子有高度的同源性。CRISPR 旁侧还常有 CRISPR-associated (*cas*) 基因, 具有解旋酶、聚合酶和核酸酶等功能^[7]。CRISPR 系统先摄入部分外源遗传因子作为区间序列, 接着 CRISPR 的核酸内切酶把 long precursor RNA 切割为短 CRISPR RNA (crRNAs), 后者与 Cas 蛋白组成复合物; 一旦 crRNAs 与外源核酸片段互补, Cas 蛋白复合物就将外源核酸降解, 形成了细菌和古细菌的免疫系统^[8]。目前在空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)^[9]、保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*)^[10]、阪崎肠杆菌(*Cronobacter sakazakii*)^[11]、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)^[12]等细菌中鉴定的 CRISPR 结构中含有异源噬菌体遗传信息, 具有识别并抵御噬菌体侵袭的能力。

细菌和古细菌中存在另一种防御异源遗传因子入侵的系统——限制修饰(restricted modification, R-M)系统; CRISPR-Cas 系统具有后天获得性特征, R-M 系统则表现为先天性防御属性^[13]。R-M 系统共有 4 种类型: I 型 R-M 系统编码产生的酶兼具甲基化和限制性切割内源与外源 DNA 的功能, 包括 3 个宿主特异性决定型(host specificity determinant)基因 *hsdR*、*hsdM* 和 *hsdS*, 分别编码限制性内切酶、DNA 甲基转移酶和特异性序列绑定识别亚基^[14]。II 型 R-M 系统最为有名, 其编码产生的限制性内切酶在入侵核酸特定的短回文序列酶切位点进行切割而产生 5'-P 或 3'-OH 末端, 或是编码产生的甲基转移酶来保护宿主自身核酸, 其中限制性内切酶已广泛应用于分子生物学领域^[15]。III 型 R-M 系统仅由 2 个亚单位组

成, 甲基转移酶(Mod)亚单位可以独立地行使甲基转移酶活性, 限制性(Res)亚单位须与 Mod 形成复合物才可以识别和剪切 DNA^[16]。IV 型 R-M 系统仅由限制性核酸内切酶组成, 不含甲基转移酶, 它可以切割经特定甲基化修饰的 DNA^[17]。

在海产品的腐败过程中, 波罗的海希瓦氏菌会将氧化三甲胺还原为三甲胺, 产生硫化氢、胺类化合物, 加速海产品的腐败变质^[18]。全球各地的诸多海产品在冷藏货架期终点都能分离到该菌, 比如中国黄海的凡纳滨对虾和大黄鱼^[3–4]、澳大利亚东海岸的贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)^[19]、欧洲波罗的海的大西洋鳕鱼(*Gadus morhua*)和鳎鱼(*Pleuronectes platessa*)^[20]、希腊爱琴海的金头鲷(*Sparus aurata*)^[21]。波罗的海希瓦氏菌遍布世界各地且维持相同的生物学表型特征, 说明这是一种进化历程中出现较早、高度保守的细菌。然而, 不同的波罗的海希瓦氏菌分离株具有不同的致腐能力^[3], Li 等^[22]发现 74 个与腐败进程相关的基因, 它们可能与该菌致腐能力呈现差异密切相关。在食源性致病菌中, CRISPR 系统有助于阻止毒力基因质粒的转移、抑制毒力菌株的产生和扩散^[23]以及抵御异源基因对致病菌的侵袭^[24]。目前, 关于波罗的海希瓦氏菌这一进化保守的菌株中 CRISPR 系统和 R-M 系统的防御机制研究未见报道, 以及这些防御机制与细菌的不同致腐能力之间是否存在相关性亦尚未知。本实验通过对分离的波罗的海希瓦氏菌进行全基因组测序, 并与 NCBI 数据库中公布的希瓦氏菌基因组信息进行比较, 探明希瓦氏菌中的 CRISPR 系统和 R-M 系统, 进而对波罗的海希瓦氏菌在不同生长时期进行转录组测序, 并分析致腐相关基因的表达水平和进化压力, 以期为腐败微生物的防御系统结构演化和功能研究提供基础信息。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

波罗的海希瓦氏菌(*S. baltica*) SB-19 株为本课题组前期分离自冷藏的大黄鱼,经生化鉴定和 *gyrB* 基因扩增测序验证,菌株保存于-80 °C 冰箱^[25]。波罗的海希瓦氏菌 W-3 株同样分离自冷藏的大黄鱼,鉴定过程与前期实验一致^[25]。LB 肉汤购自青岛海博生物技术有限公司;PCR 扩增、DNA 抽提试剂盒购自宝日医生物技术(北京)有限公司;其余生化试剂购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 灭菌大黄鱼汁中挥发性盐基总氮(TVB-N)和三甲胺(TMA)的测定

灭菌大黄鱼汁的制作过程参照前期实验所述:新鲜大黄鱼的背肌肉与纯净水按照 1:2 的质量体积比混合,均质机拍打成匀浆后煮沸,离心过滤取上清液,每升上清液中添加至终浓度为 0.100 mol/L 的磷酸缓冲液(0.056 mol/L KH_2PO_4 , 0.044 mol/L K_2HPO_4 , pH 6.6)、0.020 mol/L 的氧化三甲胺、0.400 mmol/L 的 L-半胱氨酸、0.300 mmol/L 的 L-甲硫氨酸,最后经 121 °C 的高压灭菌制备成灭菌大黄鱼汁。将活化的 SB-19 株和 W-3 株按照 1%接种量接种于灭菌大黄鱼汁中,置于 4 °C 的生化培养箱中培养 5 d,大黄鱼汁中的 TVB-N 生成量采用半微量定氮法测定,大黄鱼汁中的 TMA 生成量采用苦味酸法测定^[26]。

1.3 细菌的全基因组测序和基因注释

波罗的海希瓦氏菌 SB-19 株的全基因组测序和基因注释工作前期已由本课题组完成,W-3 株为本实验测序完成,其操作流程参照前期的 SB-19 株进行^[25]。W-3 活化菌株按照 1%接种量接种于 LB 肉汤中,并在 30 °C 摇床 160 r/min 进行过夜培养,随后提取细菌的基因组 DNA。经电泳和 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent

Technologies, USA)对核酸质量检测后,交由北京诺禾致源科技股份有限公司进行建库和测序,测序平台为 Illumina HiSeq2500。所得测序数据经 Trimmomatic 软件去除低质量 reads 和 FastUniq 软件去除重复 reads 后,由 SOAPdenovo2 软件组装拼接成基因组,基因预测采用 GeneMarkS 软件完成。波罗的海希瓦氏菌 W-3 株的基因组测序数据已上传至 NCBI 数据库(检索号:PRJNA735119)。将预测得到的蛋白质序列与直系同源基因簇数据库 COG (clusters of orthologous groups)进行比对($E\text{-value} < 1e^{-5}$),对蛋白序列进行功能注释。

1.4 平均核苷酸一致性的计算

平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)可用于评估物种的遗传多样性程度。从 NCBI 数据库下载 27 株希瓦氏菌属的全基因组序列,并与波罗的海希瓦氏菌 SB-19 株和 W-3 株一起进行 ANI 值的计算,操作过程参照[27]。

1.5 系统发育树的构建

采用 OrthoMCL 软件对上述 29 株细菌进行同源基因的聚类分析,采用 MAFFT 程序进行多序列的比对,采用 Gblocks 程序提取多序列比对的保守位点,采用 RaxML 程序构建系统发育树,最后用 FigTree 程序来绘制系统发育树,所有运行参数参照我们前期的报道^[28]。

1.6 CRISPR 系统和 R-M 系统分析

在 CRISPRs Database 数据库(<http://crispr.i2bc.paris-saclay.fr/crispr/>)中对上述 29 株希瓦氏菌 CRISPR 中的重复序列(repeats)和间隔序列(spacers)进行预测,分析其中的 CRISPR 位点,并在 CRISPRcas++数据库(<https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/>)中进一步确认 CRISPR 结构和 Cas 蛋白的位置。在 REBASE 数据库(<http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>)中对上述 29 株希瓦氏菌的 R-M 系统进行预测。

1.7 细菌的转录组测序和差异表达基因分析

波罗的海希瓦氏菌 SB-19 株的转录组测序和差异表达基因分析前期已由本课题组完成, W-3 株为本实验测序完成, 其操作流程参照前期的 SB-19 株进行^[25]。W-3 活化菌株按照 1% 接种量接种于 LB 肉汤中, 并在 30 °C 摇床 160 r/min 进行培养, 随后在迟缓期、对数期和平台期收集菌体, 用 Trizol 提取细菌总 RNA。样品交由晶能生物技术(上海)有限公司, 使用 MICROBExpress™ 去除 rRNA, 得到纯化的 mRNA, 经反转录获得 cDNA, 随后构建 PE 文库并测序。所得测序数据经 Trimmomatic 软件去除低质量 reads 和 FastUniq 软件去除重复 reads 后, 用 TopHat 软件进行比对; 以迟缓期为对照组, 用 Cuffdiff 软件计算细菌全基因组的基因在对数期和平台期的差异表达, 显著性水平设置为 $P < 0.05$ 。转录组测序数据上传至 NCBI 数据库(检索号: PRJNA735119)。

1.8 K_a/K_s 计算

选取波罗的海希瓦氏菌 SB-19 株和 W-3 株中与致腐相关的基因, 采用 ClustalW 软件对这些基因进行序列比对, 随后用 DnaSP 软件计算

它们的 K_a/K_s ^[29], 所有参数为默认。

2 结果与分析

2.1 波罗的海希瓦氏菌 SB-19 株和 W-3 株的致腐能力差异比较

水产品含有丰富的蛋白质、不饱和脂肪酸、维生素和微量元素等营养物质, 其中的高质量蛋白质是人体氨基酸需求的重要来源。海产品中蛋白质在腐败过程中会分解为氨和胺类等碱性含氮的物质, 即生成挥发性盐基氮(total volatile basic nitrogen, TVB-N); 而且海水鱼还含有丰富的氧化三甲胺(trimethylamine N-oxide, TMAO), 其在腐败菌的作用下会还原成具有臭味的三甲胺(trimethylamine, TMA), 故 TVB-N 和 TMA 值已成为评价海产品新鲜度的重要指标^[18]。在 4 °C 的冷藏条件下, 接种 SB-19 株大黄鱼汁内的 TVB-N 和 TMA 值均随着储藏时间的延长而快速持续增加, 而接种 W-3 株大黄鱼汁内的这 2 个数值增长幅度较为缓慢(图 1)。在储藏的第 3 天, 接种 SB-19 株的大黄鱼汁内 TVB-N 值为 (31.69 ± 3.83) mg/100 mL, 超过了 30 mg/100 mL 的感官可接受阈值^[30]; 而接种 W-3 株的大黄鱼

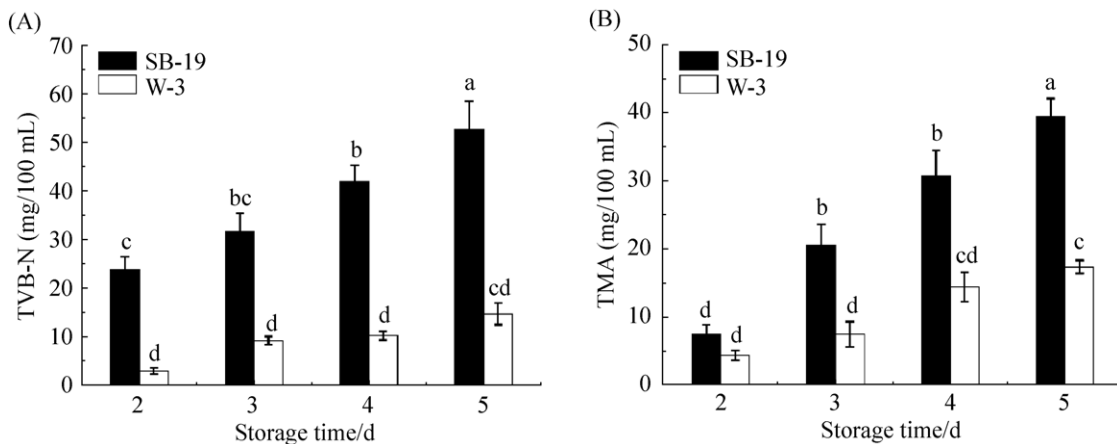


图 1 接种波罗的海希瓦氏菌 SB-19 株或 W-3 株的灭菌大黄鱼汁生成 TVB-N (A) 和 TMA (B)

Figure 1 The amount of TVB-N (A) and TMA (B) produced by sterilized fish juice of large yellow croaker inoculated with *S. baltica* SB-19 strain or W-3 strain. Error bars represented the standard deviation of sample mean. Lowercase letters presented significant difference in mean values of the samples ($P < 0.05$).

汁在储藏期的终点仍未达到此阈值。对于 TMA 值而言, 接种 W-3 株的大黄鱼汁在储藏期终点的第 5 天, 其值为(17.41±0.97) mg/100 mL, 显著低于同时期接种 SB-19 株的大黄鱼汁。Zhu 等从冷藏大黄鱼中分离出 40 株波罗的海希瓦氏菌, 其接种灭菌大黄鱼汁后产生不同的 TVB-N 值^[25]; Zhu 等从冷藏凡纳滨对虾中分离出 14 株波罗的海希瓦氏菌, 其接种灭菌凡纳滨对虾汁后也表现为产生不同 TMA 值的现象, 这说明波罗的海希瓦氏菌的不同分离菌株具有不同的致腐能力^[3]。在本实验中, 波罗的海希瓦氏菌的 SB-19 株和 W-3 株分别归类为强致腐能力的菌株和弱致腐能力的菌株。

2.2 29 株希瓦氏菌的基因组比较

波罗的海希瓦氏菌 W-3 株基因组序列经组

装后, 其 GC 含量为 46.23%, 与 SB-19 株的 46.27%接近。在 Dikow 对希瓦氏菌属内细菌基因组同源性和系统发育关系分析的基础上, 从 NCBI 数据库中下载 27 株已完成全基因组测序的希瓦氏菌^[1]。对波罗的海希瓦氏菌 W-3 株的基因组进行注释, 并与 SB-19 株和上述 27 株希瓦氏菌共同评估物种的遗传多样性。平均核苷酸一致性(ANI)值已发展成菌株分类的一个指标, 一般认为物种间 ANI 值>95%为同一个种或者亚种; Jain 等对 80 亿个原核生物基因组进行分析, 发现 ANI 值判断的准确率高达 99.80%^[31]。在本实验中, 所有波罗的海希瓦氏菌均聚在一起, 它们的 ANI 值为 95.87%–96.40%, 且 SB-19 株与 W-3 株之间的 ANI 值为 96.43% (图 2), 这说明

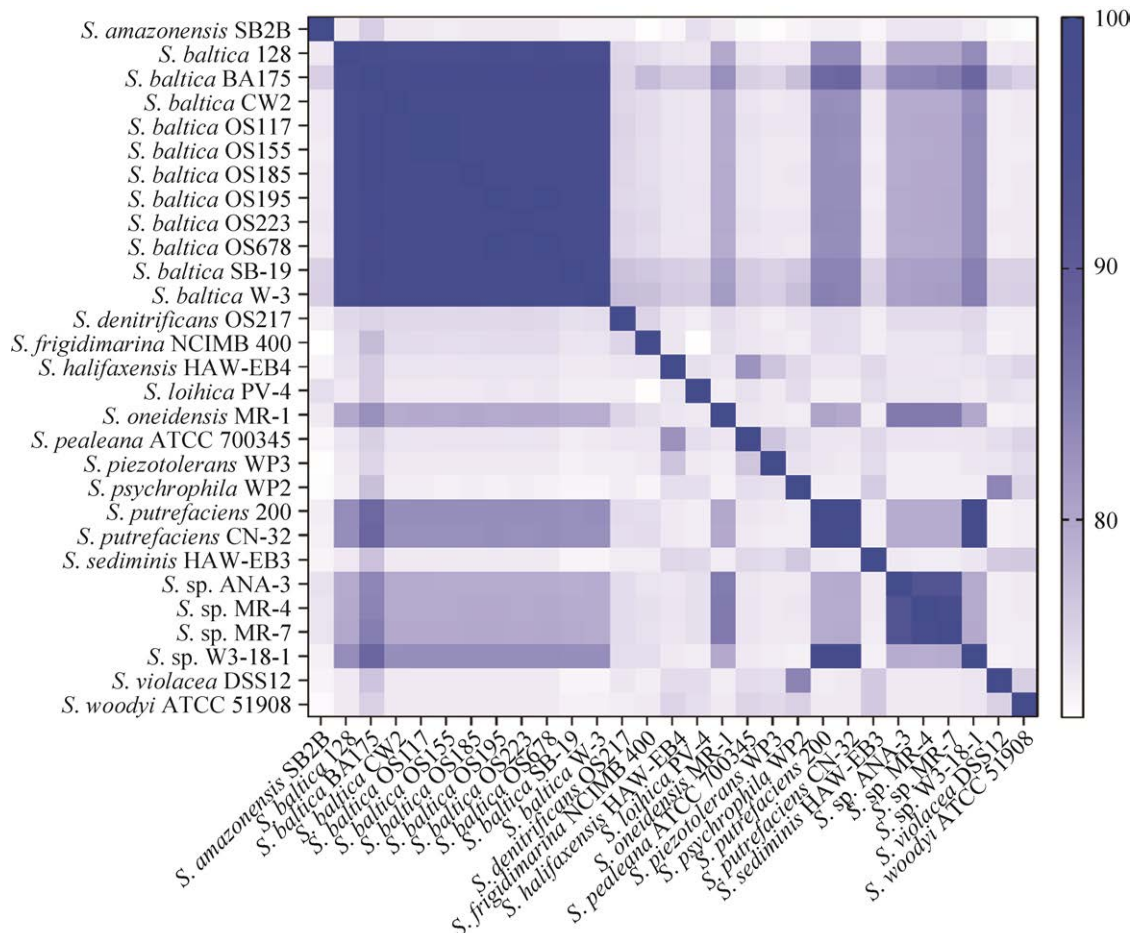


图 2 29 株希瓦氏菌的 ANI 值

Figure 2 The ANI value of 29 *Shewanella* strains.

本实验分离的 SB-19 株和 W-3 株均为波罗的海希瓦氏菌的分离株。

为进一步分析希瓦氏菌属内细菌的群体遗传结构，本实验基于 29 株细菌的全基因组测序结果构建系统发育树(图 3)。波罗的海希瓦氏菌单独聚为一个分支，然而 SB-19 株和 W-3 株却

并未紧密聚在一起，而是分属该分支的上下两端，这提示我们：波罗的海希瓦氏菌的不同致病能力菌株间的遗传信息存在差异。进而产生疑问：是否由于波罗的海希瓦氏菌在进化过程中因为不同菌株之间防御机制的差异，导致外源遗传信息入侵程度的不同，从而形成不同的致病能力？

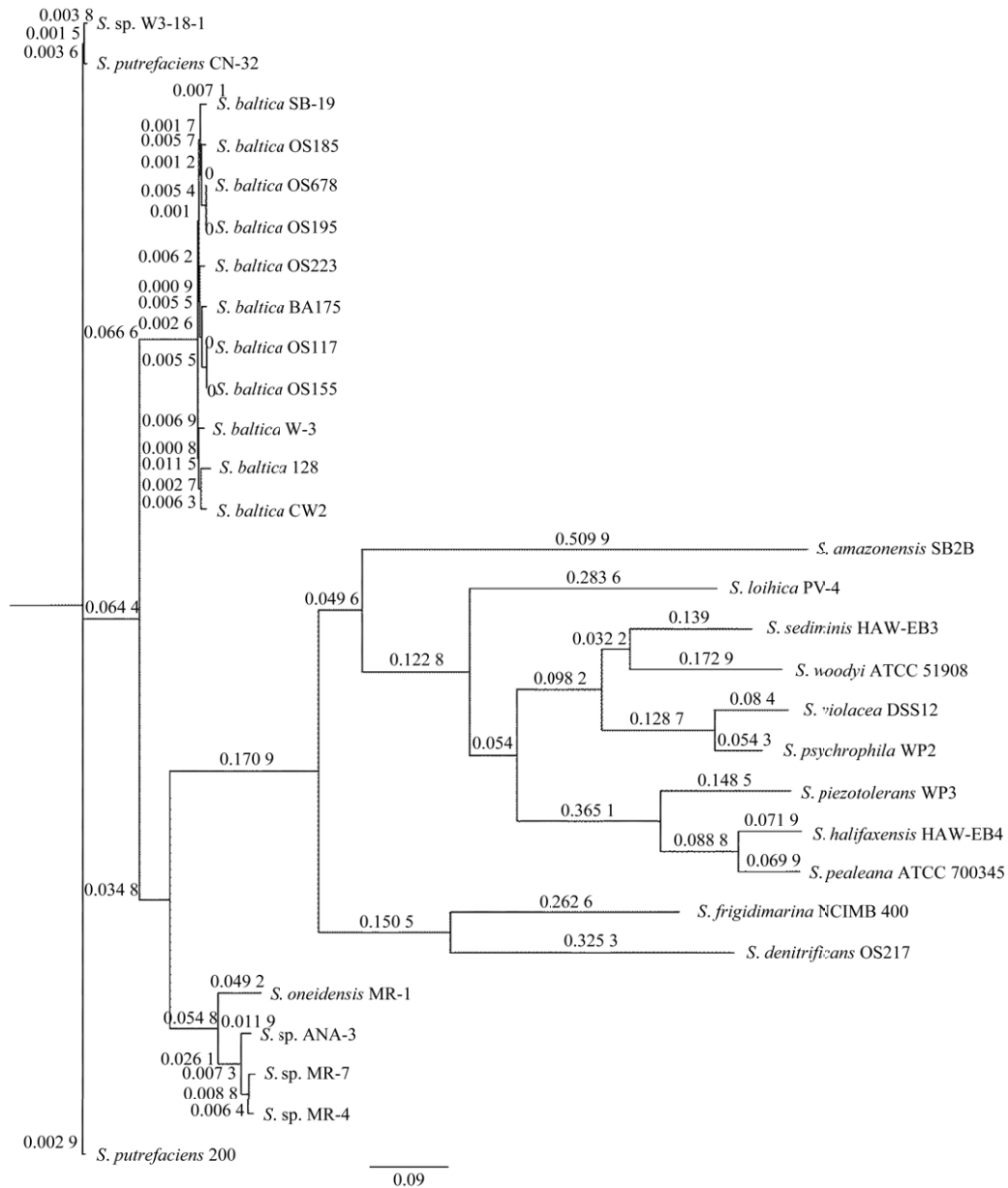


图 3 29 株希瓦氏菌的系统发育关系

Figure 3 Phylogenetic tree based on genome-wide protein sequences of 29 *Shewanella* strains.

2.3 29 株希瓦氏菌内 CRISPR 结构的分布情况

对 29 株已经完成全基因组测序的波罗的海希瓦氏菌 CRISPR 结构进行分析(表 1), 一共发现 122 个 CRISPR 座位, 其中只有 8 株菌含有 11 个 CRISPR 真座位, 分别为 *S. baltica* OS185、*S. baltica* OS195、*S. baltica* OS678、*S. baltica*

SB-19、*S. putrefaciens* 200、*S. putrefaciens* CN-32、*S. sp.* ANA-3、*S. sp.* W3-18-1, 其余 21 个菌株仅包含疑似座位。对于区间序列而言, 几乎所有的菌株都不太一致; 在 11 株的波罗的海希瓦氏菌中, 仅 *S. baltica* BA175 和 *S. baltica* OS185、*S. baltica* OS195 和 *S. baltica* OS678 以及 *S. baltica* 128 和 *S. baltica* SB-19 这 3 对含有

表 1 29 株希瓦氏菌内 CRISPR 结构分布

Table 1 The CRISPR loci distributed in 29 *Shewanella* strains

Strains	NCBI accession number	Number of CRISPR loci ^a	Number of repeats ^b	Number of <i>cas</i> genes	Type of <i>cas</i> gene ^c
<i>S. amazonensis</i> SB2B	NC_008700	0+5	2+2+2+2+2	0	none
<i>S. baltica</i> BA175	NC_017571	0+3	2+2+2	0	none
<i>S. baltica</i> OS117	NC_017579	0+2	2+2	0	none
<i>S. baltica</i> OS155	NC_009052	0+2	2+3	0	none
<i>S. baltica</i> OS185	NC_009665	1+1	2+84	6	I-F
<i>S. baltica</i> OS195	NC_009997	1+1	2+52	6	I-F
<i>S. baltica</i> OS223	NC_011663	0+1	2	0	none
<i>S. baltica</i> OS678	NC_016901	1+1	2+47	6	I-F
<i>S. baltica</i> CW2	NZ_CP028355	0+5	2+2+2+2+2	0	none
<i>S. baltica</i> 128	NZ_CP028730	0+3	2+2+2	0	none
<i>S. baltica</i> SB-19	PRJNA553343	1+6	2+2+5+2+4+2+2	0	ND
<i>S. baltica</i> W-3	PRJNA735119	0+1	2	0	none
<i>S. denitrificans</i> OS217	NC_007954	0+3	2+2+2	0	none
<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	NC_008345	0+3	2+2+2	0	none
<i>S. halifaxensis</i> HAW-EB4	NC_010334	0+8	2+2+2+2+2+2+2+2	0	none
<i>S. loihica</i> PV-4	NC_009092	0+2	2+2	0	none
<i>S. oneidensis</i> MR-1	NC_004347	0+5	2+2+2+2+2	0	none
<i>S. pealeana</i> ATCC 700345	NC_009901	0+6	2+2+2+2+2+2	0	none
<i>S. piezotolerans</i> WP3	NC_011566	0+5	2+4+2+2+2	0	none
<i>S. psychrophila</i> WP2	NZ_CP014782	0+8	2+2+2+2+2+2+2+2	0	none
<i>S. putrefaciens</i> 200	NC_017566	3+2	28+22+2+2+86	9	I-F, III-B
<i>S. putrefaciens</i> CN-32	NC_009438	1+2	82+2+2	3	I-F
<i>S. sediminis</i> HAW-EB3	NC_009831	0+9	2+2+2+2+2+2+2+2+2	0	none
<i>S. sp.</i> ANA-3	NC_008577	1+1	2+6	0	ND
<i>S. sp.</i> MR-4	NC_008321	0+2	2+2	0	none
<i>S. sp.</i> MR-7	NC_008322	0+1	2	0	none
<i>S. sp.</i> W3-18-1	NC_008750	2+5	3+2+2+2+26+18+2	6	I-F
<i>S. violacea</i> DSS12	NC_014012	0+12	2+2+2+2+4+2+2+2+2+2+2+2+2	0	none
<i>S. woodyi</i> ATCC 51908	NC_010506	0+9	2+2+2+2+2+2+3+2+3	0	none

a: the number of CRISPR coli, including real and questionable loci. b: the number of repeats in each CRISPR loci. c: the number of *cas* gene: ND: real and questionable loci, but no *cas* gene was predicted; none: only questionable loci were found, and no *cas* gene was predicted.

相同长度的区间序列(附表 1), 然而 *S. baltica* BA175 和 *S. baltica* OS185 以及 *S. baltica* 128 和 *S. baltica* SB-19 这两对分离株在全基因组构建的系统发育树上并不聚类在一起(图 3)。这说明 CRISPR 的区间序列不适合用于评估希瓦氏菌的物种亲缘关系。

虽然 CRISPR 结构的真座位和疑似座位结构保守, 但它们无规律地分散在不同的希瓦氏菌中, 加之区间序列长度不一地插入 CRISPR 内(附表 1), 表明 CRISPR 结构在希瓦氏菌中呈现多样性, 不适宜作为希瓦氏菌属或是波罗的海希瓦氏菌种内的一个细菌分类指标, 这与我们之前对副溶血性弧菌分析的结果是类似的, 即 CRISPR 同样不适宜作为该菌的一项分类指标^[28]。然而在部分细菌中却并非如此, 例如吴瑜凡等对 88 株空肠弯曲菌进行分析, 其中 38 株菌含有 CRISPR 结构, 并可分为 7 个 CRISPR 谱型, 且间隔序列的排列方式在不同谱型中较为保守, 推测 CRISPR 结构可能是空肠弯曲菌分子分型的一个特征^[9]。

希瓦氏菌属内细菌所含有的重复序列数量在 2–140 个之间, SB-19 株有 19 个, 而 W-3 株仅含 2 个(表 1)。不同物种所含 CRISPR 结构中的重复序列数量存在较大差异, 例如副溶血性弧菌内重复序列数量较少, 基本上每个分离株含 2 个^[28]; 而福氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*)所含重复序列数量较多, 每个分离株含有 11–15 个, 宋内志贺氏菌(*Shigella sonnei*)甚至含有 16 个重复序列^[24]。对于重复序列的长度而言, 希瓦氏菌属内细菌的重复序列长度为 23–55 nt(附表 1), SB-19 株为 25–54 nt, 而 W-3 株为 25 nt; 显示波罗的海希瓦氏菌不同致病能力菌株的 CRISPR 结构中重复序列在数量和长度方面差异较大。

重复序列转录生成的 RNA 会形成类似茎环

的二级结构, 并与其旁侧的区间序列结合组成“repeat-spacer”单元, 之后根据重复序列之间的互补方式来添加异源遗传信息至区间序列、或删除区间序列; 有时候 Cas 蛋白也会参与区间序列的增减^[32]。对表 1 中 29 株细菌的重复序列进行二级结构预测, 发现其形成 4 种类型的二级结构: 一个大环(图 4A)、一大一小共两环(图 4B)、一大二小共三环(图 4C)以及一大三小共四环(图 4D); 而且这 4 种类型在波罗的海希瓦氏菌中均有分布。然而我们前期在 24 株副溶血性弧菌中只发现 2 种类型的二级结构: 一大一小共两环和一大二小共三环^[28], 这说明不同菌种的 RNA 二级结构存在较大差异。

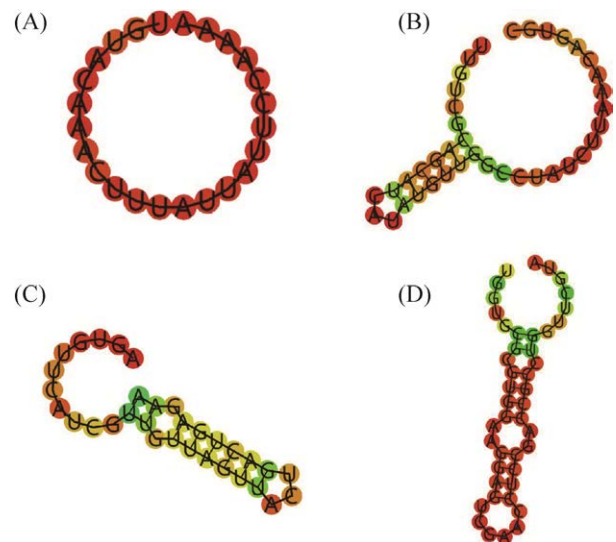


图 4 希瓦氏菌 CRISPR 座位上重复序列的 RNA 二级结构预测

Figure 4 Prediction of RNA secondary structure of repeats in CRISPR locus of *Shewanella*. A: single large ring, predicted from NC_017579_2b of *S. baltica* OS117 strain; B: two rings including one large and one small, predicted from NZ_CP028355_2b of *S. baltica* CW2 strain; C: three rings including one large and two small, predicted from NC_017579_5b of *S. baltica* OS117 strain; D: four rings including one large and three small, predicted from SB-19_4b of *S. baltica* SB-19 strain.

CRISPR 结构旁侧的 Cas 蛋白, 具有切割并降解核酸的能力, 组成的 CRISPR-Cas 系统在应对噬菌体等异源遗传信息入侵的过程分为 3 个阶段: 适应、表达和干扰; 细菌的 CRISPR-Cas 系统分为 6 个类型(I-VI)和 33 个亚型^[8,33]。在 29 株希瓦氏菌中, 仅 *S. baltica* OS185、*S. baltica* OS195、*S. baltica* OS678、*S. putrefaciens* 200、*S. putrefaciens* CN-32、*S. sp.* W3-18-1 这 6 株菌的 CRISPR 系统含有 *cas* 基因, 它们以 I-F 亚型为主, *S. putrefaciens* 200 兼具 III-B 亚型(表 1, 图 5)。I 型和 III 型均形成多亚基复合物来监测入侵的异源遗传物质, 二者主要区别在于干扰阶段: I 型系统将 HD 核酸酶结构域与 Cas3 解旋酶融合, III 型系统则是不同的 HD 核酸酶与 Cas10 融合, 之后再各自切割和降解靶标核酸^[7,34]。杨兰等对 6 株干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)的全基因组进行分析, 发现 6 株菌的染色体上均含有完

整的 CRISPR-Cas 系统, 且每株菌包含 4 个 *cas* 基因^[35]。但是希瓦氏菌内含有 *cas* 基因的完整 CRISPR-Cas 系统相对较少, 只占总量的 20.7%, 而波罗的海希瓦氏菌 SB-19 株和 W-3 株中均没有预测到 *cas* 基因, 说明不同细菌含有完整程度不一的 CRISPR-Cas 系统。

2.4 29 株希瓦氏菌内限制修饰系统的分布

29 株希瓦氏菌均含有 R-M 系统, 其编码 R-M 系统的基因数量少至 2 个(*S. amazonensis* SB2B), 多至 13 个(*S. pealeana* ATCC 700345)(表 2)。*S. baltica* OS117 和 *S. baltica* OS155 这 2 株菌拥有全部 4 种类型的 R-M 系统, 但它们却只含有 2 个 CRISPR 疑似座位, 并没有鉴定到 *cas* 基因; 在含有完整 CRISPR-Cas 系统的 6 株希瓦氏菌(*S. baltica* OS185、*S. baltica* OS195、*S. baltica* OS678、*S. putrefaciens* 200、*S. putrefaciens* CN-32、*S. sp.* W3-18-1)中, 它们有 6-9 个编码

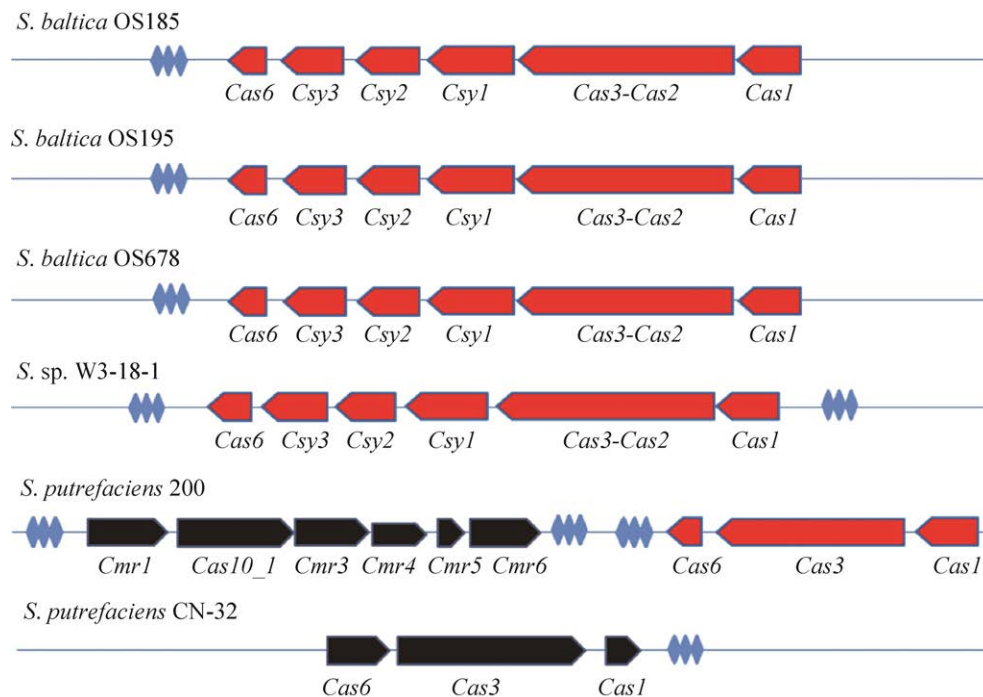


图 5 6 株希瓦氏菌中的 CRISPR-Cas 结构示意图

Figure 5 Schematic diagram of CRISPR-Cas loci distributed in 6 *Shewanella* strains. The black and red arrows indicated genes in different DNA strands. The blue diamonds indicated the repeat-spacer sequence.

表 2 29 株希瓦氏菌内 R-M 系统分布

Table 2 R-M systems distributed in 29 *Shewanella* strains

Strains	Type I	Type II	Type III	Type IV	Total	Note
<i>S. amazonensis</i> SB2B	0	2	0	0	2	
<i>S. baltica</i> 128	4	2	0	1	7	
<i>S. baltica</i> BA175	1	3	0	1	5	
<i>S. baltica</i> CW2	5	0	0	1	6	
<i>S. baltica</i> OS117	3	1	1	1	6	
<i>S. baltica</i> OS155	4	2	1	1	8	
<i>S. baltica</i> OS185	2	2	0	3	7	
<i>S. baltica</i> OS195	0	7	0	0	7	
<i>S. baltica</i> OS223	3	3	0	2	8	
<i>S. baltica</i> OS678	0	6	0	0	6	
<i>S. baltica</i> SB-19	1	1	0	0	2	
<i>S. baltica</i> W-3	4	1	0	1	6	
<i>S. denitrificans</i> OS217	1	3	0	0	4	
<i>S. frigidimarina</i> NCIMB 400	3	1	0	2	6	
<i>S. halifaxensis</i> HAW-EB4	0	2	0	1	3	
<i>S. loihica</i> PV-4	0	2	1	1	4	orphan M
<i>S. oneidensis</i> MR-1	2	6	0	1	9	
<i>S. pealeana</i> ATCC 700345	0	13	0	0	13	
<i>S. piezotolerans</i> WP3	0	2	0	1	3	
<i>S. psychrophila</i> WP2	0	4	0	0	4	
<i>S. putrefaciens</i> 200	3	2	0	1	6	
<i>S. putrefaciens</i> CN-32	5	3	0	1	9	
<i>S. sediminis</i> HAW-EB3	0	2	0	1	3	
<i>S. sp.</i> ANA-3	3	2	0	0	5	
<i>S. sp.</i> MR-4	0	3	1	0	4	
<i>S. sp.</i> MR-7	2	1	0	0	3	
<i>S. sp.</i> W3-18-1	2	3	0	1	6	
<i>S. violacea</i> DSS12	0	1	0	1	2	
<i>S. woodyi</i> ATCC 51908	1	2	1	0	4	
Total	49	82	5	22	158	

R-M 系统的基因, 略高于平均数 5.4 个。由此可见, 希瓦氏菌的 CRISPR-Cas 系统的存在不影响 R-M 系统是否需要减少或保留, 或者缺乏 CRISPR-Cas 系统就必须大幅度增加 R-M 系统中基因的含量, 即希瓦氏菌的 CRISPR-Cas 系统与 R-M 系统之间没有明显的相关性。王宇等分析的 27 株嗜热链球菌中 CRISPR-Cas 系统和 R-M 系统亦无显著相关性^[12], 说明后天获得性防御

系统 CRISPR-Cas 与天然防御系统 R-M 可能通过各自独立的进化方式存留在细菌中。

希瓦氏菌的 4 种 R-M 系统在其属内分布多样化, 即使在 11 株波罗的海希瓦氏菌这一物种中也没有完全一致的 4 种 R-M 系统类型。I 型 R-M 系统所编码的酶功能复杂, 具有甲基化和限制性切割的双重功能, 在 29 株希瓦氏菌中 65.5% 有此类型, 但这一比例显著低于 27 株嗜

热链球菌中的占比(96.3%)^[12]; 在 11 株波罗的海希瓦氏菌中, *S. baltica* OS195 和 *S. baltica* OS678 中缺乏此类型, 而 *S. baltica* CW2 则含有 5 个; 说明不同细菌对 I 型 R-M 系统倚重程度不一, 即使同一物种内的差异也甚大。II 型 R-M 系统在希瓦氏菌中不仅数量最多(82 个), 而且占比也最高(96.6%), 显著高于嗜热链球菌的 70.4%^[12]; 另外, *S. amazonensis* SB2B、*S. baltica* OS195、*S. baltica* OS678、*S. pealeana* ATCC 700345、*S. psychrophila* WP2 这 5 株细菌具有的唯一一种 R-M 系统就是此类型, 且除 *S. baltica* OS678 外其余 4 种还缺乏完整的 CRISPR-Cas 系统, 这说明 II 型 R-M 系统在希瓦氏菌中具有极其重要的防御作用。在 *S. baltica* CW2 中没有鉴定到 II 型 R-M 系统, 但其存在一个孤儿甲基转移酶基因(orphan M), 有学者认为该基因可能源自丢失的 II 型 R-M 系统, 其仍具有限制性内切酶的作用^[36]。仅 5 株希瓦氏菌有 III 型 R-M 系统, 且每株菌只有 1 个 III 型系统, 数量偏少的原因可能是 III 型所编码产生的甲基转移酶和限制性内切酶与 I 型和 II 型在功能上有所重合, 导致 III 型因为功能冗余而不形成或者形成后丢失。IV 型 R-M 系统仅由限制性核酸内切酶组成, 且功能与前面 3 种 R-M 类型有差异, 可切割经甲基化修饰后的 DNA, 在 29 株希瓦氏菌中有 62.1% 拥有此类型。

就波罗的海希瓦氏菌的 SB-19 株和 W-3 株而言, 强致腐能力 SB-19 株的 CRISPR 结构有 1 个真座位和 3 个疑似座位, 弱致腐能力 W-3 株的 CRISPR 结构为 1 个疑似座位, 即前者多于后者; 对于 R-M 系统而言, SB-19 株有 1 个 I 型、1 个 II 型、缺失 IV 型 R-M 系统, W-3 株则有 4 个 I 型、1 个 II 型和 1 个 IV 型 R-M 系统。即强致腐能力的波罗的海希瓦氏菌有相对完善的 CRISPR 结构, 而弱致腐能力的波罗的海希瓦氏

菌则有更丰富的 R-M 系统。

2.5 波罗的海希瓦氏菌 SB-19 株和 W-3 株之间致腐相关基因功能分析

迟缓期、对数期和平台期为波罗的海希瓦氏菌的 3 个重要生理时期, 可以模拟该菌的不同腐败阶段, 而分析这些时期的全基因组基因表达水平有助于揭示该菌的致腐机制^[25]。本实验对波罗的海希瓦氏菌 SB-19 株和 W-3 株这 3 个重要生理时期进行转录组测序, 进而分析了 74 个与波罗的海希瓦氏菌致腐相关基因的表达水平(图 6, 附表 2)。相较于迟缓期而言, SB-19 株在对数期和平台期表达水平升高 2 倍以上的基因分别有 10 个和 17 个, 降低 2 倍以上的基因分别有 6 个和 14 个; W-3 株在对数期和平台期表达水平升高 2 倍以上的基因分别有 11 个和 19 个, 降低 2 倍以上的基因分别有 12 个和 18 个。在对数期, SB-19 株中表达水平高于 W-3 株的基因主要为 *ttrB* 和 *ttrC*, 这 2 个基因在鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)中为连四硫酸还原酶的结构基因, *ttrB* 能够结合 4 个[4Fe-4S]簇、*ttrC* 为含有一个醌氧化位点的膜蛋白, 它们赋予该菌以四氢硫酸盐做为电子受体为细菌提供能量^[37]; 在平台期, SB-19 株中表达水平高于 W-3 株的基因主要为 *torE* 和 *csgB*, 前者 *torE* 基因在奥奈达希瓦氏菌(*S. oneidensis*)中为 *torECAD* 操纵子的重要成员, 此操纵子在氧化三甲胺还原为三甲胺的过程中所摄取电子是细菌呼吸电子传递链的重要组分, 高表达 *torE* 基因有助于增强细菌适应复杂环境^[38]; 后者 *csgB* 基因是编码卷曲蛋白的重要组分, 该基因的高表达有利于奥奈达希瓦氏菌聚集, 促进形成致密有序的生物被膜^[39]。总体而言, 相较于弱致腐能力的 W-3 株, 强致腐能力的 SB-19 株在生长阶段具有更为活跃的新陈代谢能力和环境适应能力。

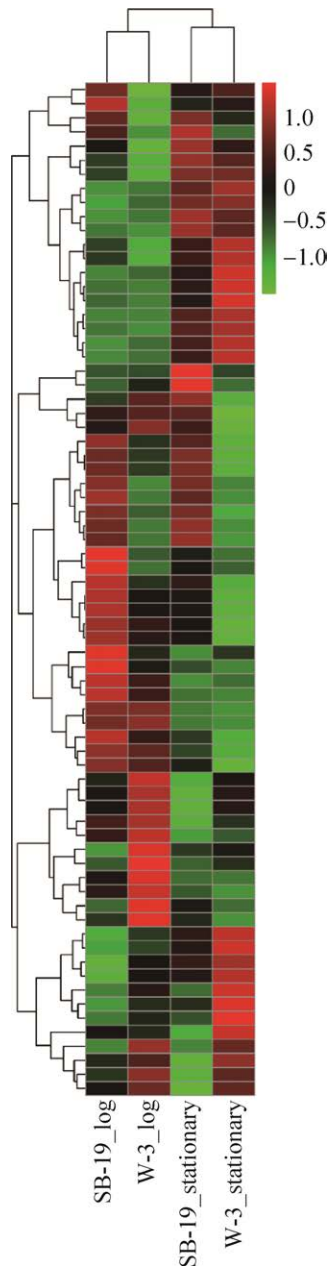


图6 波罗的海希瓦氏菌 SB-19 株和 W-3 株中 74 个与致腐相关基因在生长时期的转录组测序比较

Figure 6 Comparison of transcriptome sequencing of 74 genes related to the spoilage of *S. baltica* SB-19 and W-3 strains during growth stages. SB-19_log and SB-19_stationary indicated the expression levels of 74 genes related to the spoilage of *S. baltica* SB-19 strain at log phase and stationary phase, respectively. W-3_log and W-3_stationary indicated the expression levels of 74 genes related to the spoilage of *S. baltica* W-3 strain at log phase and stationary phase, respectively.

2.6 波罗的海希瓦氏菌 SB-19 株和 W-3 株之间致腐相关基因的共进化分析

DNA 中核苷酸的变异是基因进化的原动力,改变的遗传密码若不产生氨基酸的改变称为同义突变,不受自然选择的影响,反之则为非同义突变,受自然选择的作用。非同义突变速率(K_a)与同义突变速率(K_s)之间的比值(K_a/K_s)可判断自然选择作用对基因的影响,若 $K_a/K_s > 1$,则为正选择作用;若 $K_a/K_s = 1$,则为中性选择;若 $K_a/K_s < 1$,则为纯化选择作用^[29]。生物个体在生长发育过程中发生差异表达变化的基因,对其在同一种属间进行比较,往往会呈现更高的 K_a/K_s 值,即这类基因更易产生突变^[40]。本实验中 74 个与致腐相关基因在对数期和平台期的表达变化差异较大(图 6),但它们的 K_a/K_s 值却均远小于 1(图 7,附表 2),说明这些基因在维持波罗的海希瓦氏菌的致腐功能方面较为稳定,同时也反映出波罗的海希瓦氏菌 SB-19 株和 W-3 株的 CRISPR 系统和 R-M 系统在抵御异源遗传信息的入侵方面发挥了重要作用。

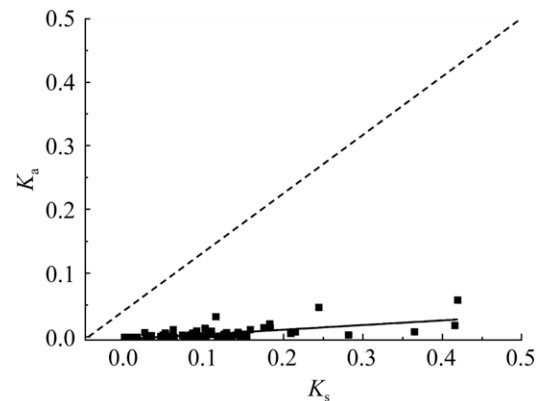


图7 74 个与波罗的海希瓦氏菌致腐相关基因的 K_a 和 K_s 值

Figure 7 Distribution of K_a and K_s values of 74 genes related to the spoilage of *S. baltica*. The black straight line was the fitting straight line distributed by the K_a/K_s values of 74 genes, and K_a/K_s ratios < 1 were below the dotted line.

3 讨论与结论

波罗的海希瓦氏菌 SB-19 株和 W-3 株均分离自货架期终点的冷藏大黄鱼, 两株菌接种于灭菌大黄鱼汁, 前者所产生的 TVB-N 和 TMA 显著多于后者, 即分别为强致腐能力菌株和弱致腐能力菌株。对这 2 株菌与 27 株希瓦氏菌的全基因组序列进行比较, ANI 值结果证实 SB-19 株和 W-3 株均为波罗的海希瓦氏菌, 但全基因组系统发育树发现二者并不聚在一起, 存在遗传结构的差异。进而对这两株菌与 27 株希瓦氏菌的 CRISPR-Cas 系统和 R-M 系统进行分析, 发现 SB-19 株具有相对完善的 CRISPR-Cas 结构, 包含 1 个真座位和 3 个疑似座位; 而 W-3 株则有更丰富的 R-M 系统, 具备 4 个 I 型、1 个 II 型和 1 个 IV 型结构, 初步表明强弱致腐能力不同的波罗的海希瓦氏菌拥有不同侧重的防御机制。针对波罗的海希瓦氏菌中 74 个致腐相关的基因, 转录组测序结果表明, 相较于弱致腐能力的 W-3 株, 强致腐能力的 SB-19 株中注释为能量代谢和生物被膜的基因在生长阶段具有更高的表达水平、菌株具有更为活跃的新陈代谢能力和环境适应能力; 但是共进化分析却发现, 这些与致腐相关的基因在进化过程中较为保守。这初步说明无论是 SB-19 株倚赖的 CRISPR-Cas 结构、抑或是 W-3 株偏好的 R-M 系统, 均可有效抵御异源遗传信息对致腐相关基因的入侵, 但这些致腐相关基因在进化过程中出现的表达水平差异则非由此防御系统决定, 即不同分离株呈现的致腐能力强弱现象与该菌的防御系统无关。本实验为波罗的海希瓦氏菌的基础生物学研究和海产品微生物的致腐机制提供理论基础。

参考文献

- [1] Dikow RB. Genome-level homology and phylogeny of *Shewanella* (Gammaproteobacteria: a Iteromonadales: Shewanellaceae). *BMC Genomics*, 2011, 12: 237.
- [2] MacDonell MT, Colwell RR. Phylogeny of the *Vibrionaceae*, and recommendation for two new genera, *Listonella* and *Shewanella*. *Systematic and Applied Microbiology*, 1985, 6(2): 171–182.
- [3] Zhu SQ, Zhang CL, Wu HH, Jie JX, Zeng MY, Liu ZY, Wang CY, Yang HC. Spoilage of refrigerated (4 °C) *Litopenaeus vannamei*: cooperation between *Shewanella* species and contribution of cyclo-(L-Pro-L-Leu)-dependent quorum sensing. *International Journal of Food Science & Technology*, 2017, 52(6): 1517–1526.
- [4] Zhu JL, Zhao AF, Feng LF, Gao HC. Quorum sensing signals affect spoilage of refrigerated large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) by *Shewanella baltica*. *International Journal of Food Microbiology*, 2016, 217: 146–155.
- [5] Mojica FJM, Rodriguez-Valera F. The discovery of CRISPR in archaea and bacteria. *The FEBS Journal*, 2016, 283(17): 3162–3169.
- [6] 胡丽, 陈实. 细菌 CRISPR-Cas 系统的研究进展. *微生物学报*, 2017, 57(11): 1643–1652.
Hu L, Chen S. Research progress of CRISPR-Cas system in bacteria. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(11): 1643–1652. (in Chinese)
- [7] 冯欢欢, 单彩龙, 李金月, 陆佳静, 王茜璐, 沈沁浩, 焦红梅, 阴银燕, 孔桂美, 郭亭亭, 李国才. CRISPR 系统中 Cas 蛋白的分类及作用机制. *中国病原生物学杂志*, 2018, 13(6): 652–654, 663.
Feng HH, Shan CL, Li JY, Lu JJ, Wang XL, Shen QH, Jiao HM, Yin YY, Kong GM, Guo TT, Li GC. Classification and function mechanisms of Cas proteins in a CRISPR system. *Journal of Pathogen Biology*, 2018, 13(6): 652–654, 663. (in Chinese)
- [8] Shivram H, Cress BF, Knott GJ, Doudna JA. Controlling and enhancing CRISPR systems. *Nature Chemical Biology*, 2021, 17(1): 10–19.
- [9] 吴瑜凡, 申进玲, 崔思宇, 郭 , 吴福平, 王翔, 邵景东. 空肠弯曲菌中规律成簇间隔短回文重复序列 (CRISPR) 的检测与结构分析. *食品科学*, 2018, 39(24): 139–144.
Wu YF, Shen JL, Cui SY, Guo Y, Wu FP, Wang X, Shao JD. Detection and structural analysis of clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) regions in *Campylobacter jejuni*. *Food Science*, 2018, 39(24): 139–144. (in Chinese)
- [10] 程娜, 蔡针华, 吕加平, 贾震虎, 逢晓阳. 保加利亚

- 乳杆菌 CRISPR 位点的序列分析. 生物技术通报, 2018, 34(5): 87–93.
- Cheng N, Cai ZH, Lü JP, Jia ZH, Pang XY. Sequence analysis on the CRISPR sites of *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnology Bulletin*, 2018, 34(5): 87–93. (in Chinese)
- [11] Zeng HY, Zhang JM, Li CS, Xie TF, Ling N, Wu QP, Ye YW. The driving force of prophages and CRISPR-Cas system in the evolution of *Cronobacter sakazakii*. *Scientific Reports*, 2017, 7: 40206.
- [12] 王宇, 赵洁, 孙志宏, 孙天松, 张和平. 基于比较基因组学分析嗜热链球菌的遗传多样性和防御系统. 微生物学报, 2020, 60(5): 924–938.
- Wang Y, Zhao J, Sun ZH, Sun TS, Zhang HP. Comparative genomics of genetic diversity and defense system in *Streptococcus thermophilus*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(5): 924–938. (in Chinese)
- [13] Dupuis MÈ, Villion M, Magadán AH, Moineau S. CRISPR-Cas and restriction-modification systems are compatible and increase phage resistance. *Nature Communications*, 2013, 4: 2087.
- [14] De Ste Croix M, Vacca I, Kwun MJ, Ralph JD, Bentley SD, Haigh R, Croucher NJ, Oggioni MR. Phase-variable methylation and epigenetic regulation by type I restriction-modification systems. *FEMS Microbiology Reviews*, 2017, 41(Supp_1): S3–S15.
- [15] Negri A, Jąkowski M, Szczuka A, Pryszyk LP, Mruk I. Transcriptome analyses of cells carrying the Type II Csp231I restriction-modification system reveal cross-talk between two unrelated transcription factors: C protein and the Rac prophage repressor. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(18): 9542–9556.
- [16] Fox KL, Dowd SJ, Erwin AL, Srikhanta YN, Smith AL, Jennings MP. *Haemophilus influenzae* phasevarions have evolved from type III DNA restriction systems into epigenetic regulators of gene expression. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(15): 5242–5252.
- [17] Loenen WAM, Raleigh EA. The other face of restriction: modification-dependent enzymes. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(1): 56–69.
- [18] 王晓阳, 郭全友, 姜朝军, 杨絮. 养殖大黄鱼鲜度保持及特定腐败菌特征研究进展. 包装工程, 2020, 41(17): 15–24.
- Wang XY, Guo QY, Jiang CJ, Yang X. Advances in research on freshness maintenance and characteristics of specific spoilage organisms of cultured large yellow croaker. *Packaging Engineering*, 2020, 41(17): 15–24. (in Chinese)
- [19] Odeyemi OA, Burke CM, Bolch CJS, Stanley R. Evaluation of spoilage potential and volatile metabolites production by *Shewanella baltica* isolated from modified atmosphere packaged live mussels. *Food Research International*, 2018, 103: 415–425.
- [20] Vogel BF, Venkateswaran K, Satomi M, Gram L. Identification of *Shewanella baltica* as the most important H₂S-producing species during iced storage of Danish marine fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(11): 6689–6697.
- [21] Tryfinopoulou P, Tsakalidou E, Vancanneyt M, Hoste B, Swings J, Nychas GJE. Diversity of *Shewanella* population in fish *Sparus aurata* harvested in the Aegean Sea. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 103(3): 711–721.
- [22] Li JP, Yu HL, Yang XY, Dong RY, Liu ZY, Zeng MY. Complete genome sequence provides insights into the quorum sensing-related spoilage potential of *Shewanella baltica* 128 isolated from spoiled shrimp. *Genomics*, 2020, 112(1): 736–748.
- [23] 刘伟奇, 王旭, 刘海泉, 潘迎捷, 赵勇. 常见食源性致病菌 CRISPR 系统结构与功能研究进展. 食品科学, 2017, 38(1): 276–281.
- Liu WQ, Wang X, Liu HQ, Pan YJ, Zhao Y. Advances in structures and functions of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) in common foodborne pathogenic bacteria. *Food Science*, 2017, 38(1): 276–281. (in Chinese)
- [24] 曲道峰, 陆诗铤, 陈跃文, 黄东萍, 龚俏玲, 易松强, 韩剑众. 志贺氏菌 CRISPR 位点的比较基因组学及与质粒数量的相关性分析. 中国食品学报, 2020, 20(5): 242–250.
- Qu DF, Lu SY, Chen YW, Huang DP, Gong QL, Yi SQ, Han JZ. Comparative genomics analysis of relationship between CRISPR loci and plasmid in *Shigella*. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(5): 242–250. (in Chinese)
- [25] Zhu JL, Zhang YW, Deng JM, Jiang HY, Zhuang LM, Ye W, Ma JY, Jiang JY, Feng LF. Diketopiperazines synthesis gene in *Shewanella baltica* and roles of diketopiperazines and resveratrol in quorum sensing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(43): 12013–12025.
- [26] 毕伟伟, 冯立芳, 石双妮, 缪晨豪, 朱军莉, 田迪英. 波罗的海希瓦氏菌和杀鲑气单胞菌致病性及 TorA 还原酶差异比较. 水产学报, 2020, 44(3): 495–504.
- Bi WW, Feng LF, Shi SN, Miao CH, Zhu JL, Tian DY.

- Comparison of spoilage potential and TorA protein between *Shewanella baltica* and *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(3): 495–504. (in Chinese)
- [27] Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje JM. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(Pt 1): 81–91.
- [28] 葛彩云, 陆海霞, 曲道峰, 朱军莉, 袁冬霞, 冯立芳. 副溶血性弧菌群中规律成簇间隔短回文重复序列的比较分析. *基因组学与应用生物学*, 2015, 34(8): 1712–1722.
- Ge CY, Lu HX, Qu DF, Zhu JL, Yuan DX, Feng LF. Comparative analysis of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) in the genomes of *Vibrio parahaemolyticus* group. *Genomics and Applied Biology*, 2015, 34(8): 1712–1722. (in Chinese)
- [29] Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio JC, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins SE, Sánchez-Gracia A. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular Biology and Evolution*, 2017, 34(12): 3299–3302.
- [30] Lou XW, Zhai DD, Yang HS. Changes of metabolite profiles of fish models inoculated with *Shewanella baltica* during spoilage. *Food Control*, 2021, 123: 107697.
- [31] Jain C, Rodriguez-R LM, Phillippy AM, Konstantinidis KT, Aluru S. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nature Communications*, 2018, 9: 5114.
- [32] Sorek R, Kunin V, Hugenholtz P. CRISPR—a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(3): 181–186.
- [33] Xue CY, Sashital DG. Mechanisms of type I-E and I-F CRISPR-Cas systems in *Enterobacteriaceae*. *EcoSal Plus*, 2019, 8(2): ecosalplus.ESP-8.
- [34] Fagerlund RD, Wilkinson ME, Klykov O, Barendregt A, Pearce FG, Kieper SN, Maxwell HWR Capolupo A, Heck AJR, Krause KL, Bostina M, Scheltema RA, Staals RHJ, Fineran PC. Spacer capture and integration by a type I-F Cas1-Cas2-3 CRISPR adaptation complex. *PNAS*, 2017, 114(26): E5122–E5128.
- [35] 杨兰, 杨洋, 李伟勋, Obaroakpo JOY, 逢晓阳, 吕加平. 干酪乳杆菌 CRISPR 基因座分析. *中国农业科学*, 2019, 52(3): 521–529.
- Yang L, Yang Y, Li WX, Joy O, Pang XY, Lü JP. CRISPR locus analysis of *Lactobacillus casei*. *Scientia Agricultura Sinica*, 2019, 52(3): 521–529. (in Chinese)
- [36] Murphy J, Mahony J, Ainsworth S, Nauta A, Van Sinderen D. Bacteriophage orphan DNA methyltransferases: insights from their bacterial origin, function, and occurrence. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(24): 7547–7555.
- [37] Hensel M, Hinsley AP, Nikolaus T, Sawers G, Berks BC. The genetic basis of tetrathionate respiration in *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology*, 1999, 32(2): 275–287.
- [38] Lemaire ON, Honoré FA, Jourlin-Castelli C, Méjean V, Fons M, Iobbi-Nivol C. Efficient respiration on TMAO requires TorD and TorE auxiliary proteins in *Shewanella oneidensis*. *Research in Microbiology*, 2016, 167(8): 630–637.
- [39] Lin ZX, Long ML, Liu W, Liu TX, Li FB, Wu YD. Distinct biofilm formation regulated by different culture media: implications to electricity generation. *Bioelectrochemistry*, 2021, 140: 107826.
- [40] Zhao N, Dong QL, Nadon BD, Ding XY, Wang XT, Dong YZ, Liu B, Jackson SA, Xu CM. Evolution of homeologous gene expression in polyploid wheat. *Genes*, 2020, 11(12): 1401.

(本文责编 张晓丽)

补充材料

附表 1 29 株希瓦氏菌内 CRISPR 结构的间隔序列、重复序列和 *cas* 基因信息表

附表 2 74 个与波罗的海希瓦氏菌致腐相关基因在对数期和平台期的转录测序表达水平及其 K_d/K_r 值

本文补充材料见网络版 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>。补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责。