

王茜月,管飘萍,陈诗涵,等. 1 株溶血色杆菌的分离鉴定与基因组分析[J]. 江苏农业科学,2022,50(12):42-50.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.12.007

1 株溶血色杆菌的分离鉴定与基因组分析

王茜月¹,管飘萍^{1,2},陈诗涵^{1,2},黄紫贝^{1,2},郭鑫^{1,2},赵以恒¹,罗健雅¹,王欣宇¹,崔颖月¹,
刘金彪¹,王海燕³,刘文博^{1,2}

(1. 扬州大学兽医学院,江苏扬州 225009; 2. 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心,江苏扬州 225009;

3. 江苏农牧科技职业学院,江苏泰州 225300)

摘要:从池塘中分离、纯化了 1 株具有极强溶血活性的革兰氏阴性杆菌 BB2,在 TSA 培养基上菌落呈灰色、半透明圆形,经 16S rRNA 基因序列分析确定为色杆菌属,但无法确定到种;进一步全基因组测序结果表明,该菌株与 GenBank 中唯一的 1 株稻根色杆菌基因组同源性最高,但生物学特性又不一致。文献逆索发现其命名为稻根色杆菌主要是由于其分离于水稻根部,这对分类造成了困惑。最终依据细菌形态特征、生理生化特性、16S rRNA 和全基因组序列分析及文献分析等综合信息,确定分离菌 BB2 为溶血色杆菌,这提醒研究者在细菌鉴定时应谨慎使用 GenBank 数据序列数据,一定要对相关参考文献进行全面认真研读,获取必要的证据,为最终分类提供科学依据。本研究也为进一步研究该分离株的生物学特性和应用提供了参考和基础。

关键词:池塘;溶血色杆菌;全基因组序列;比较基因组分析

中图分类号:S182 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)12-0042-09

溶血色杆菌,属于色杆菌属(*Chromobacterium*),革兰氏染色阴性,可以在多种类型的琼脂平板上生长(羊血琼脂、巧克力平板培养基、胰酪大豆胨琼脂培养基、木炭酵母提取物培养基),菌落呈灰色、圆形。在血琼脂平板上呈现出大约 5 mm 的明显溶血区^[1-3]。目前,色杆菌属共有 14 个成员,分别是稻根色杆菌^[4]、链烷炔色杆菌^[5]、亚马逊色杆菌^[6]、水生色杆菌^[7]、氟色杆菌^[8]、紫色色杆菌^[9]、鱼腥草色杆菌^[9]、伪紫色色杆菌^[9]、溶血色杆菌^[1]、沼泽色杆菌^[10]、睑炎色杆菌^[10]、痘苗色杆菌^[11]、球形色杆菌^[11]和枯草色杆菌^[12]。其中,紫色色杆菌和溶血色杆菌因可以引起哺乳动物感染而受到重视^[1,13-14]。由于溶血色杆菌的一些分离株能够感染人类,引起坏死性筋膜炎^[1]、直肠结肠炎^[15]和肺炎^[3],故有必要对该菌进行更深入的研究。溶血色杆菌对 β -内酰胺类抗生素有较大的耐药性^[1,15]。有报道称,温带地区的河水是人感染溶血色杆菌的主要来源^[2]。

16S rRNA 基因因其保守性和稳定性,成为微生物分类鉴定中的重要分子标记^[16],但这种方法在区分相似性很高的菌种时有局限性,全基因组分析的方法或许可以克服这一缺点^[17-18],高通量测序技术的发展为微生物分类提供了新的方法和思路。平均核苷酸同源性方法具有方便、错误率低、分辨率高的特点,该方法通过计算 2 个基因组之间同源基因的相似性,认为 ANI 值接近或高于 95% 属于同一菌种^[19]。同时,有研究表明,ANI 与 DDH(一般认为 DDH 值接近或高于 70% 属于同一菌种)具有较好的一致性。然而,由于成本等问题基因序列库中全基因组数据比较少,可能会由于比对时数据缺少而造成分类错误。

本研究从池塘水样中分离出 1 株溶血活性很强的细菌,确定为色杆菌属,但在确定其种时却因为数据、文献问题造成了困惑,最终综合其 16S rRNA 序列、全基因组序列、生物学特性和文献综合分析,确定为溶血色杆菌,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器 生物安全柜购自 Thermo 公司;电子天平购自上海精密仪器仪表有限公司;奥林巴斯显微镜购自日本奥林巴斯公司;高压灭菌锅购自

收稿日期:2021-08-16

基金项目:江苏高校优势学科建设工程(2018)。

作者简介:王茜月(1999—),硕士,江苏泰州人,主要从事传染病流行病学研究。E-mail:Biyouyusy@outlook.com。

通信作者:刘文博(1975—),男,博士,副教授,主要从事传染病防控。

E-mail:lwb@yzu.edu.cn。

Tomy 公司;PCR 仪 2720 购自美国 ABI 公司;电泳仪和凝胶成像系统购自美国伯乐公司。

1.1.2 主要试剂 血平板购自江门市凯林贸易有限公司;TSA 琼脂购自青岛海博生物技术有限公司;16s rDNA Bacterial Identification PCR Kit 购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 细菌分离、纯化、16S rRNA 基因扩增

2019 年 8 月,采集扬州大学文汇路校区农学大楼和兽医学院大楼中间池塘内的水样,4 000 r/min 离心后取上清液,接种于含有 10% 血清的血平板中,于 37 ℃ 条件下培养 24 h。挑取单个菌落,接种血平板、TSA 等进行菌落特性研究,连续纯化 3 代,对单个菌落进行革兰氏染色、镜检,扩增 16S rRNA 基因,送往擎科生物技术公司测序。

1.3 16S rRNA 基因序列比对

基于 EZBioCloud 16S 数据库(<https://www.ezbiocloud.net/>),对细菌进行 16S rRNA 基因比对,使用 MEGA-X 软件,构建 Neighbor-Joining 系统进化树进行遗传进化分析。

1.4 基因组 DNA 的提取

挑取单个菌落,提取高质量基因组 DNA,利用 Nanodrop、Quibit 和 0.35% 琼脂糖凝胶电泳验证后,送武汉贝纳科技服务公司测序。

1.5 基因组测序和组装

对 Nanopore 测序仪测得的原始数据进行过滤,去除接头、短片段及低质量数据。使用 unicycler (0.4.8)^[20] 软件对过滤后的 reads 进行组装。使用 bwa^[21] 软件将二代测序 illumina 短序列比对到拼接完成的基因组上,使用 minimap2 将 3 代测序的长序列比对到拼接完成的基因组上,使用 samtools depth 工具,以 2 000 bp 为一滑窗在基因组上滑动,统计平均测序深度。通过 Prokka 软件对组装后的基因组进行编码基因预测。利用预测得到的基因组信息,如基因组测序深度、GC 分布及基因组结构注释进行整合,用 R 包 circlize 绘制基因组圈图。将全基因组序列信息上传 NCBI 数据库,GenBank 登录号为 CP061849。

1.6 基因组成分初步分析

通过 PHAST 软件来预测前噬菌体基因^[22];通过 RepeatMasker 软件对基因组进行重复序列预测^[23];通过 IslandView4 网站预测基因组中存在的基因岛^[24]。

1.7 抗性基因预测

通过 Comprehensive Antibiotic Resistance

Database(CARD)^[25] 数据库对细菌的抗性基因进行筛查,获得基因的抗性类型、抗性谱等详细信息,预测细菌的耐药基因。

1.8 比较基因组分析

1.8.1 全基因组序列比较及共线性分析 从 GenBank 数据库中查找色杆菌属可获得全基因组序列的菌株,包括稻根色杆菌(*C. rhizoryzae* JP2-74)、溶血色杆菌(*C. haemolyticum* CH06-BL)、紫色色杆菌(*C. violaceum* ATCC 12472)、痘苗色杆菌(*C. vaccinia* 21-1)的基因组信息,与分离菌的基因组序列直接进行比较分析,统计基因组基本特征,计算平均核苷酸同源性(ANI)及 DNA-DNA 杂交值(DDH)。采用 Mauve 软件,构建参考菌株和分离菌的全基因组序列共线性比对^[26]。

1.8.2 基因家族比较分析 利用 OrthoVenn2 在线工具^[27](<https://orthovenn2.bioinfotoolkits.net/>)对分离菌和“1.8.1”节所选参考菌株的蛋白序列进行直系同源聚类分析(参数: $e\text{-value} \leq 1 \times 10^{-5}$, Inflation value ≤ 1.5)。

2 结果与分析

2.1 细菌分离、纯化和 16S rRNA 基因扩增

从池塘水样中划线分离培养出不同菌落形态的多种细菌,其中有 1 种细菌在 TSA 培养基上呈灰色、半透明的圆形菌落(图 1),多次纯化后,该菌可以在血琼脂平板上产生非常明显的溶血环(图 2),符合溶血色杆菌的形态学特点和溶血特性。16S rRNA 基因扩增成功。



图1 分离株 BB2 在 TSA 培养基上的形态

2.2 16S rRNA 基因序列比对结果

通过扩增细菌的 16S rRNA 基因并测序得到其序列,进行 BLAST 比对,结果表明为色杆菌属,下载相关的 16S rRNA 基因进行比对分析,结果发现该细

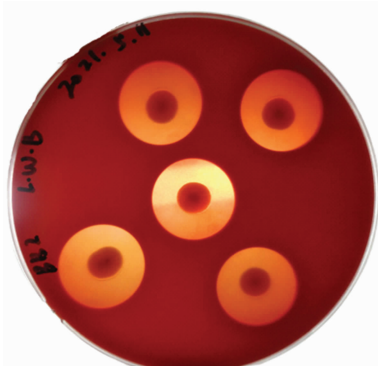


图2 分离株 BB2 形成的溶血环

菌的 16S rRNA 基因序列与 *Chromobacterium haemolyticum* MDA0585、*Chromobacterium rhizoryzae* LAM1188、*Chromobacterium alkanivorans* IITR - 71、*Chromobacterium aquaticum* CC - SEYA - 1 较为接近,相似度分别为 99.38%、99.30%、99.09%、98.56%。将分离到的细菌命名为 BB2,遗传进化树见图 3。

2.3 测序结果统计并绘制基因组圈图

高通量测序仪测序得到 5 635 123 条序列,过滤后得到 5 625 367 条序列,二代测序平均测序深度为 321.35 X,三代测序平均测序深度约为 154.41 X。过滤后细菌基因组总长度为 5 230 650,GC 含量为 63.09%,基因组中重复序列含量极少,总长为 59 951 bp,占基因组序列全长的 1.15%。经预测,细菌基因组含有 4 859 个编码基因,4 690 个 CDS,87 个 tRNA,25 个 rRNA,1 个 tmRNA,绘制基因组圈图如图 4 所示。

2.4 基因组成分初步分析

2.4.1 前噬菌体分析 PHASTER 预测结果显示,分离菌中含有 5 个完整的前噬菌体,分离菌作为溶源性细菌,与病原菌共同培养时,前噬菌体可能会从宿主染色体上切割下来,大量复制,成为成熟的噬菌体,通过噬菌体的传染,导致病原菌裂解、死亡。分离菌还含有 4 个非完整的前噬菌体,分别含有 19、12、20、14 个 CDS,可能是在此发生了基因突变,导致产生了非完整的前噬菌体。此外,分离菌还存在 1 个有争议的前噬菌体,含有 21 个 CDS。具体情况见表 1。

2.4.2 基因岛预测 基因岛通常被认为通过水平转移获得,这些区域常包含抗生素抗性及相关基因。基因岛预测对细菌的进化分析,以及在进化过程中可能获得的特异功能的研究有重要意义。分离菌的全基因组中共预测到了 37 个基因岛,其

中,IslandPath - DIMOD 方法预测到 15 个基因岛, SIGI - HMM 方法预测到 16 个基因岛,IslandPick 方法预测到 6 个基因岛,这些基因岛可能对细菌适应不同的环境和抗生素耐药性有重要作用。预测结果见图 5。

2.5 抗性基因预测结果

根据 CARD 抗性基因数据库预测结果,该菌株含有 adeF 外排泵和抗生素靶点改变机制(抗磺胺类药物)。

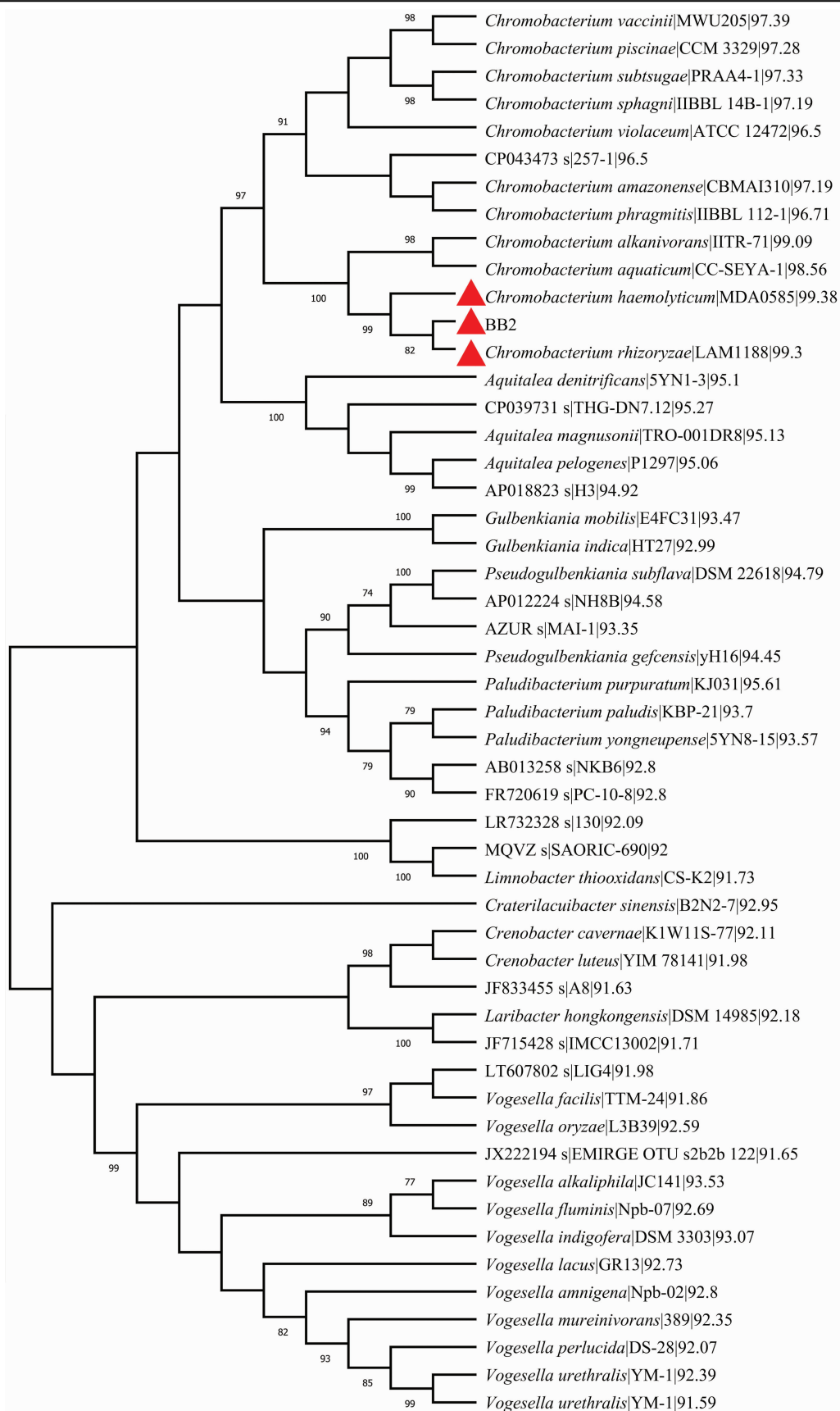
2.6 比较基因组分析

2.6.1 全基因组序列比较分析 由表 2 可见,分离菌的基因组大小和 GC 含量与 *C. rhizoryzae* JP2 - 74 和 *C. haemolyticum* CH06 - B 较为接近,*C. violaceum* ATCC 12472 与其他菌株基因组基本特征差异较大。一般认为 ANI 值接近或高于 95% 划分为同一菌种^[16],令人惊讶的是,按照此标准,分离菌和 *C. rhizoryzae* JP2 - 74 及 *C. haemolyticum* CH06 - BL 均属于同一菌种,而和 *C. violaceum* ATCC 12472 及 *C. vaccinia* 21 - 1 显然不属于同一菌种。DDH 预测值认为物种边界的阈值为 70% 左右,高于 70% 被认为属于同一菌种^[19],DDH 值预测结果与 ANI 值的结果具有一致性。

通过共线性分析可以进一步识别菌种全基因组的一致性和变异性,体现基因组的共同起源。分离菌与 4 株参考菌株的共线性分析结果见图 6。由图 6 可见,分离菌与 *C. rhizoryzae* JP2 - 74、*C. haemolyticum* CH06 - BL 存在大量同源性区域,但也存在缺失、插入和重排区域,与 *C. violaceum* ATCC 12472、*C. vaccinia* 21 - 1 差异较大。

2.6.2 直系同源聚类分析 OrthoVenn2 直系同源聚类分析结果显示,共得到 5 324 个基因簇,2 462 个同源基因簇(至少包含 2 个物种)以及 2 862 个单拷贝基因簇。由图 7 可以看出,5 株菌的共有基因簇(核心基因簇)有 2 898 个,分离菌和 *C. rhizoryzae* JP2 - 74 及 *C. haemolyticum* CH06 - BL 的共有基因簇较多,和 *C. vaccinia* 21 - 1 的共有基因簇较少。相似矩阵热图(图 8)也显示,分离菌和 *C. rhizoryzae* JP2 - 74 及 *C. haemolyticum* CH06 - BL 具有较高的聚类。

以上结果均表明全基因组分类方法可以区分溶血色杆菌、紫色色杆菌和痘苗色杆菌。虽然溶血色杆菌和稻根色杆菌在基因组的组成上极为相似,单靠全基因组测序分析方法仍无法做出判断,但是



分离菌 BB2、溶血性杆菌和稻根色杆菌模式菌株用红色三角标记标出

图3 分离株与同属细菌的遗传发生分析

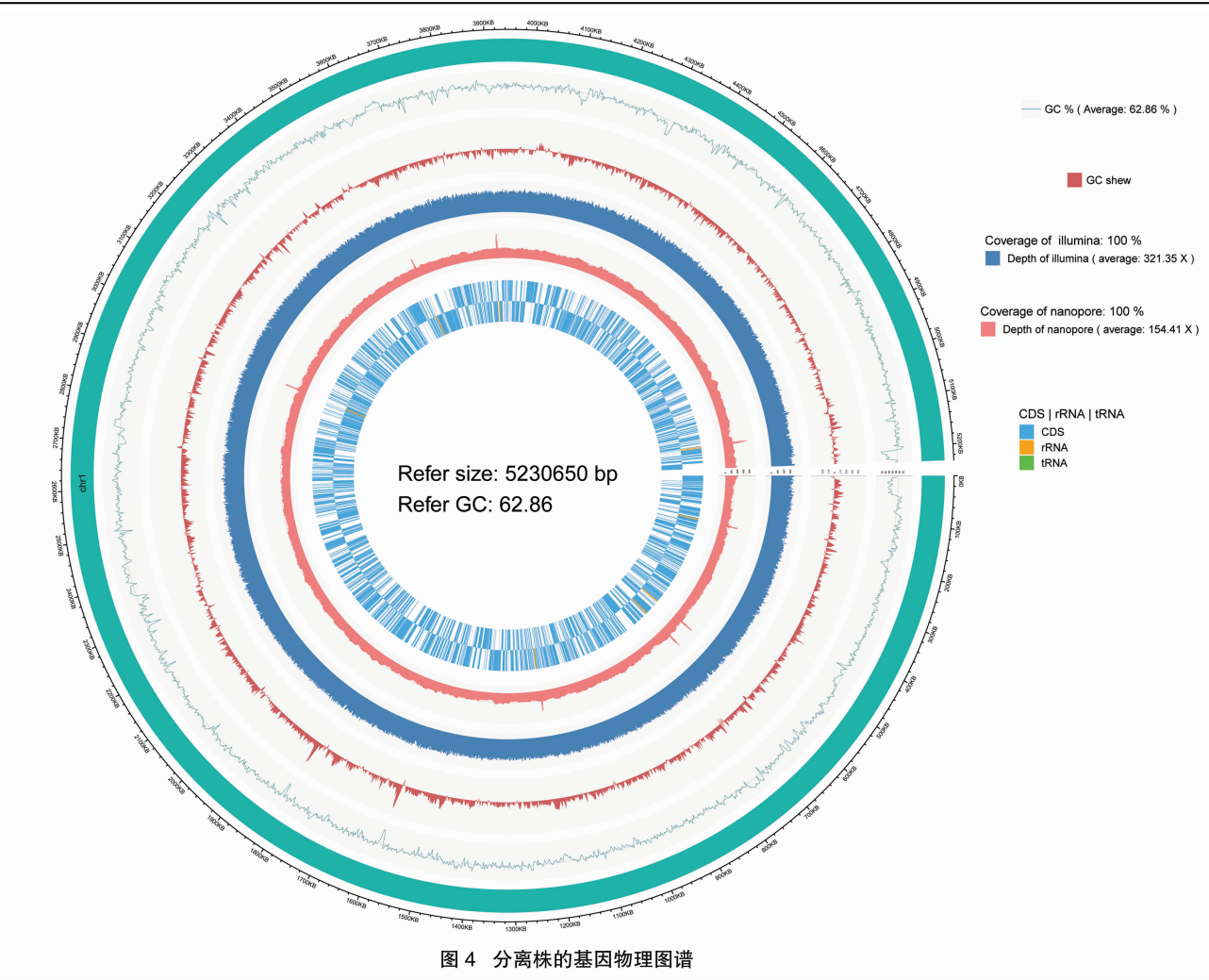


图 4 分离株的基因物理图谱

表 1 分离菌基因组前噬菌体预测

编号	完整性	起始位点	结束位点	编码基因数量 (个)	GC 含量 (%)
1	完整	1 488 454	1 509 956	28	62.43
2	完整	3 499 748	3 534 714	47	61.63
3	完整	3 747 160	3 774 710	35	63.10
4	完整	4 031 382	4 062 441	38	62.87
5	完整	4 924 435	4 951 907	30	62.65
6	存在争议	2 306 279	2 324 051	21	59.75
7	非完整	2 282 153	2 304 380	19	58.25
8	非完整	3 703 332	3 715 343	12	55.43
9	非完整	4 003 568	4 043 635	20	61.92
10	非完整	4 823 665	4 835 263	14	60.99

由于稻根色杆菌目前仅有从水稻根部分离出的报道^[4],且基因库中相关的全基因组序列很少,进一步进行文献综合分析,结合分离菌的细菌生物学特征和极强的溶血特性,认为 BB2 应该属于溶血色杆菌。

3 讨论

通过 16S rRNA 基因序列和遗传关系鉴定细菌、确定菌种已成为常用的细菌分类手段,但其分类仅仅能够到属,无法确定到种,现在很多研究者对

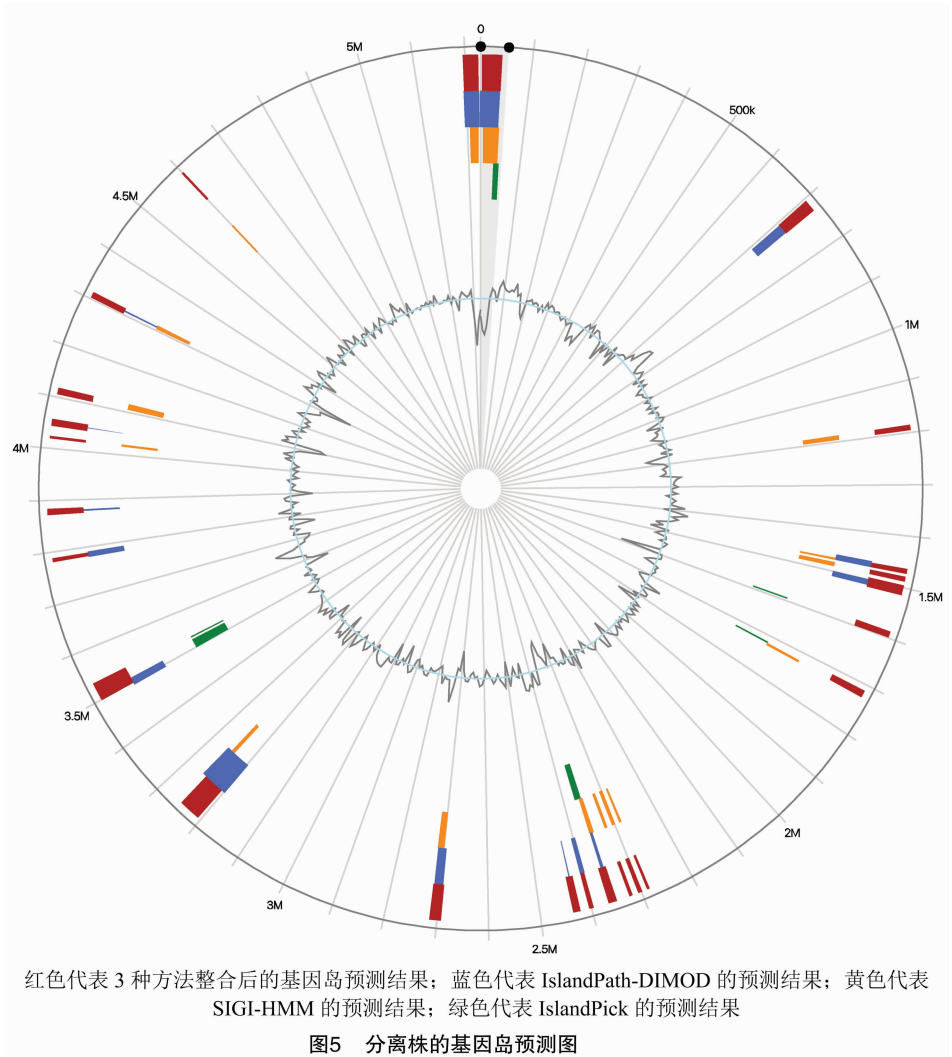


图5 分离株的基因岛预测图

表 2 分离菌与相近菌株的全基因组特征比较

菌株名称	大小 (Mb)	GC 含量 (%)	编码蛋白数量 (个)	ANI (%)	DDH (%)
<i>C. haemolyticum</i> BB2	5.23	62.86	4 690		
<i>C. rhizoryzae</i> JP2 - 74	5.17	62.90	4 640	99.15	94.1
<i>C. haemolyticum</i> CH06 - BL	5.31	62.60	4 767	98.81	88.6
<i>C. violaceum</i> ATCC 12472	4.75	64.80	4 314	79.51	26.7
<i>C. vaccinii</i> 21 - 1	5.04	64.30	4 622	79.65	26.0

该方法的原理并不清楚,在 GenBank 进行 BLAST, 同源性最高的就确认到种,这种文章现在越来越多, 但并未深究其因。然而,GenBank 中的数据均为测定 者上传,全面性和准确性值得商榷,且其分类依据也 是依赖于以往的基因库,这就造成了以讹传讹的后 果。16S rRNA 序列作为细菌分类的依据,一般分别 以 97% 和 95% 作为划分一种新种和新属的依据^[28], 2006 年划分新种的标准被提高到了 98.7%^[29],这一 标准和 DDH 结果有较好的一致性^[30]。但是仅仅依

赖于 16S rRNA 基因序列不能够确定到种,只能作为 参考。本研究中细菌纯化后测定的序列表明分离株 BB2 为色杆菌属。基于 EZBioCloud 16S 数据库 (<https://www.ezbiocloud.net/>) 对该分离株的 16S rRNA 基因进行比对以鉴定菌种,结果发现该细菌的 16S rRNA 基因序列与 *Chromobacterium haemolyticum* MDA0585、*Chromobacterium rhizoryzae* LAM1188、 *Chromobacterium alkanivorans* IITR - 71、 *Chromobacterium aquaticum* CC - SEYA - 1 较为接近,

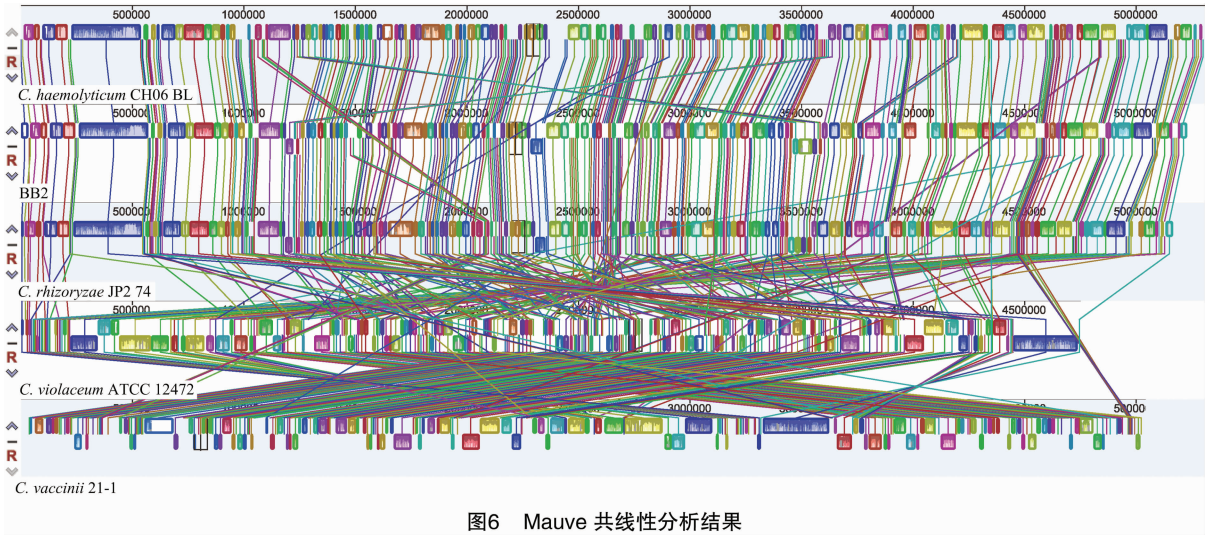


图6 Mauve 共线性分析结果

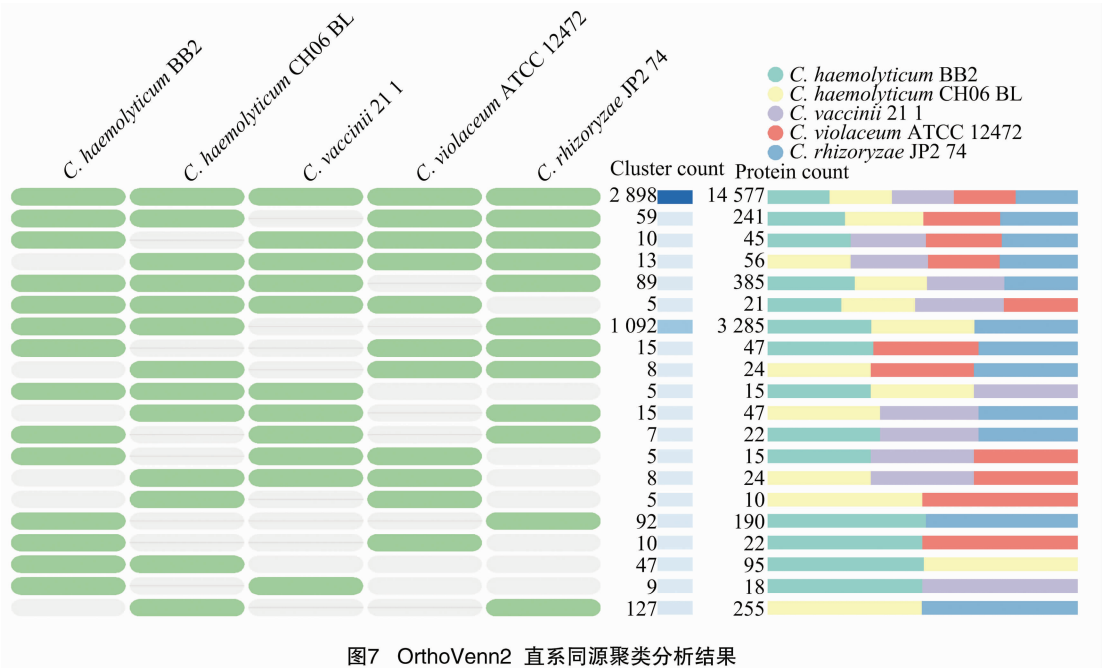


图7 OrthoVenn2 直系同源聚类分析结果

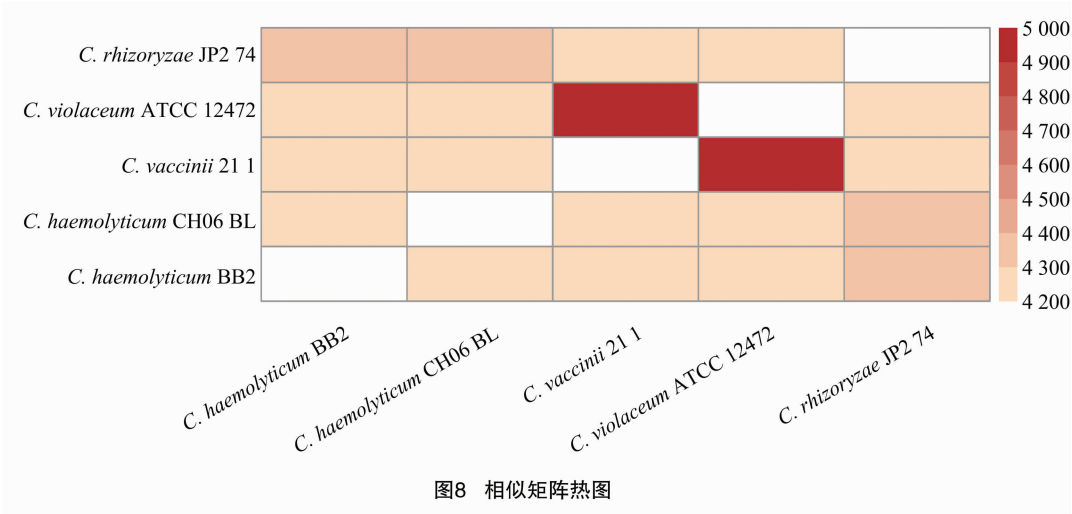


图8 相似矩阵热图

相似度分别为 99.38%、99.30%、99.09%、98.56%。确定分离菌属于色杆菌属,但无法确定菌种,这也体现出了 16S rRNA 序列比对在区分同属不同种细菌之间的局限性。

随后的全基因组序列测定结果与 GenBank 中可获得的色杆菌属成员进行基因组比较分析,结果显示,分离菌和唯一的 1 株稻根色杆菌 *Chromobacterium rhizoryzae* LAM1188 基因组特征最相似,遗传关系很近。但是很多参考菌株并没有测定全基因组序列,缺少大量的序列证据,无法对其进行种的确定,进一步回顾将稻根色杆菌确定为新种的报道^[4],发现其依据主要是表型、DNA-DNA 杂交值和 16S rRNA 序列比对,其中,报道中用来比较的 2 株模式菌株稻根色杆菌 *C. rhizoryzae* LAM1188 和溶血色杆菌 *C. haemolyticum* MDA0585 16S rRNA 序列相似度为 98.7%,这个值恰好是确定细菌为新种的边界值,这说明 16S rRNA 序列比对在本研究中确实不能作为鉴定菌种的证据。该报道最终是以表型和 DNA-DNA 杂交试验来确定菌种的,稻根色杆菌在 TSA 培养基上呈现黄褐色,但溶血色杆菌在 TSA 培养基上呈现灰色。本研究中分离菌 BB2 在 TSA 培养基上也呈现灰色,故最终确定 BB2 为溶血色杆菌。

在平常的菌种鉴定过程中,依据 GenBank 中的序列进行细菌分类,主要包括 16S rRNA 序列比对和基因组分析方法。但在本研究中,如果仅仅依据 16S rRNA 序列比对和基因组分析方法,很有可能会得出分离菌 BB2 属于稻根色杆菌的错误结论。造成这种情况的原因可能有 2 点,一是稻根色杆菌和溶血色杆菌基因组组成极其相近;二是数据库中登记信息有误,实际上这株稻根色杆菌应是 1 株溶血色杆菌。因为稻根色杆菌的模式菌株基因组序列未见上传,且由于生物材料缺乏,也无法进行 DNA-DNA 杂交试验验证,故具体原因仍待进一步探究。这提醒研究者们如果完全依据 GenBank 上的序列数据进行分类,不去考虑表型和生理生化特性,会造成偏差和错误,应依据细菌形态特征、生理生化特性、16S rRNA 和全基因组等综合分类,有困惑时一定要对相关参考文献进行全面认真研读,获取必要的证据,做出准确判断。已知溶血色杆菌能够感染人类,稻根色杆菌仅有 1 篇报道,未有感染性报道。本研究为谨慎使用 GenBank 数据和文献提供了一些证据,也为进一步研究该溶血色杆菌分离

株提供了参考和基础。

参考文献:

- [1] Han X Y, Han F S, Segal J. *Chromobacterium haemolyticum* sp. nov., a strongly haemolytic species [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58 (6): 1398 - 1403.
- [2] Kanamori H, Aoyagi T, Kuroda M, et al. *Chromobacterium haemolyticum* pneumonia associated with near-drowning and river water, Japan [J]. Emerging Infectious Diseases, 2020, 26 (9): 2186 - 2189.
- [3] Takenaka R, Nureki S I, Ueno T, et al. *Chromobacterium haemolyticum* pneumonia possibly due to the aspiration of runoff water [J]. Japanese Journal of Infectious Diseases, 2015, 68 (6): 526 - 529.
- [4] Zhou S, Guo X, Wang H M, et al. *Chromobacterium rhizoryzae* sp. nov., isolated from rice roots [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66 (10): 3890 - 3896.
- [5] Bajaj A, Kumar A, Yadav S, et al. Isolation and characterization of a novel Gram-negative bacterium *Chromobacterium alkanivorans* sp. nov., strain IITR-71T degrading halogenated alkanes [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66 (12): 5228 - 5235.
- [6] Menezes C B A, Tonin M F, Corrêa D B A, et al. *Chromobacterium amazonense* sp. nov. isolated from water samples from the Rio Negro, Amazon, Brazil [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2015, 107 (4): 1057 - 1063.
- [7] Young C C, Arun A B, Lai W A, et al. *Chromobacterium aquaticum* sp. nov., isolated from spring water samples [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58 (4): 877 - 880.
- [8] Moss M O, Ryall C, Logan N A. The classification and characterization of chromobacteria from a lowland river [J]. Journal of General Microbiology, 1978, 105 (1): 11 - 21.
- [9] Kämpfer P, Glaeser S P, Soby S D. *Chromobacterium pseudoviolaceum* is a later heterotypic synonym of *Chromobacterium violaceum* Bergonzini 1880 [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2018, 68 (9): 2967 - 2968.
- [10] Blackburn M B, Farrar R R Jr, Sparks M E, et al. *Chromobacterium paludis* sp. nov., a novel bacterium isolated from a Chesapeake Bay marsh [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2020, 70 (12): 6142 - 6146.
- [11] Soby S D, Gadagkar S R, Contreras C, et al. *Chromobacterium vaccinii* sp. nov., isolated from native and cultivated cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) bogs and irrigation ponds [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013, 63 (Pt 5): 1840 - 1846.
- [12] Martin P A W, Gundersen - Rindal D, Blackburn M, et al. *Chromobacterium subtsugae* sp. nov., a betaproteobacterium toxic to Colorado potato beetle and other insect pests [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57 (5):

- 993 – 999.
- [13] 修云芳, 邵良平, 李碧春, 等. 紫色色杆菌感染大熊猫引起肺炎的临床调查[J]. 兽类学报, 2011, 31(1): 108 – 112.
- [14] Okada M, Inokuchi R, Shinohara K, et al. *Chromobacterium haemolyticum* – induced bacteremia in a healthy young man[J]. BMC Infectious Diseases, 2013, 13: 406.
- [15] Tanpowpong P, Charoenmuang R, Apiwattanakul N. First pediatric case of *Chromobacterium haemolyticum* causing proctocolitis[J]. Pediatrics International, 2014, 56(4): 615 – 617.
- [16] Ramasamy D, Mishra A K, Lagier J C, et al. A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacterial species[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64(Pt 2): 384 – 391.
- [17] Tindall B J, Rosselló – Móra R, Busse H J, et al. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60(Pt 1): 249 – 266.
- [18] Chun J, Oren A, Ventosa A, et al. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2018, 68(1): 461 – 466.
- [19] Meier – Kolthoff J P, Auch A F, Klenk H P, et al. Genome sequence – based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions[J]. BMC Bioinformatics, 2013, 14: 60.
- [20] Wick R R, Judd L M, Gorrie C L, et al. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads[J]. PLoS Computational Biology, 2017, 13(6): e1005595.
- [21] Li H, Durbin R. Fast and accurate long – read alignment with Burrows – Wheeler transform[J]. Bioinformatics, 2010, 26(5): 589 – 595.
- [22] Zhou Y, Liang Y J, Lynch K H, et al. PHAST: a fast phage search tool[J]. Nucleic Acids Research, 2011, 39(Web Server issue): 347 – 352.
- [23] Tarailo – Graovac M, Chen N S. Using repeatmasker to identify repetitive elements in genomic sequences[M]//Current protocols in bioinformatics. New York: John Wiley & Sons, 2009.
- [24] Bertelli C, Laird M R, Williams K P, et al. IslandViewer 4: expanded prediction of genomic Islands for larger – scale datasets[J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(W1): 30 – 35.
- [25] Alcock B P, Raphenya A R, Lau T T Y, et al. CARD 2020: antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 48(D1): 517 – 525.
- [26] Darling A C E, Mau B, Blattner F R, et al. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements[J]. Genome Research, 2004, 14(7): 1394 – 1403.
- [27] Xu L, Dong Z B, Fang L, et al. OrthoVenn2: a web server for whole – genome comparison and annotation of orthologous clusters across multiple species[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(W1): 52 – 58.
- [28] Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity G M, et al. Report of the ad hoc committee for the re – evaluation of the species definition in bacteriology[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2002, 52(Pt 3): 1043 – 1047.
- [29] Stackebrandt E, Ebers J. Taxonomic parameters revisited: Tarnished gold standards[J]. Microbiology Today, 2006, 8(4): 6 – 9.
- [30] Rosselló – Mora R. DNA – DNA reassociation methods applied to microbial taxonomy and their critical evaluation molecular identification, systematics, and population structure of prokaryotes[M]. Berlin: Springer, 2006: 23 – 50.