

研究报告

林麝源蜡样芽孢杆菌 SCBCM001 株的分离鉴定及全基因组序列分析

刘洁¹, 伍茜¹, 丁慧¹, 李依濛¹, 付文龙², 周磊², 程建国², 吴杰²,
杨凯惟¹, 罗燕^{*1}

1 四川农业大学动物医学院, 四川 成都 611130

2 四川养麝研究所, 四川 都江堰 611800

刘洁, 伍茜, 丁慧, 李依濛, 付文龙, 周磊, 程建国, 吴杰, 杨凯惟, 罗燕. 林麝源蜡样芽孢杆菌 SCBCM001 株的分离鉴定及全基因组序列分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(9): 4090-4108.

LIU Jie, WU Xi, DING Hui, LI Yimeng, FU Wenlong, ZHOU Lei, CHENG Jianguo, WU Jie, YANG Kaiwei, LUO Yan. Isolation, identification, and whole genome sequencing of *Bacillus cereus* SCBCM001 from forest musk deer (*Moschus berezovskii*)[J]. Microbiology China, 2023, 50(9): 4090-4108.

摘要: 【背景】细菌性疾病是林麝规模化养殖的重要制约因素, 蜡样芽孢杆菌曾在林麝化脓灶中检出, 但是目前对林麝源蜡样芽孢杆菌的研究报道很少。【目的】对分离自病死林麝肝脏中的一株疑似蜡样芽孢杆菌进行分离鉴定和全基因组序列分析, 为林麝相关疾病的防治奠定基础。【方法】将病原菌纯化培养后, 对病原菌进行生化试验、药敏试验和小鼠致病性试验; 并通过第 3 代单分子测序技术进行全基因组测序, 根据测序结果进一步评估物种间的亲缘关系, 并进行基因功能注释和遗传进化分析。【结果】该病原菌经平均核苷酸相似度分类和系统发育树分析属于蜡样芽孢杆菌群, 生化结果符合蜡样芽孢杆菌的一般特征, 将分离菌株命名为 SCBCM001。该菌株对小鼠的半数致死量为 8.3×10^7 CFU, 对大多数 β -内酰胺类、四环素和磺胺异噁唑耐药, 对氨基糖苷类、头孢氨苄、头孢哌酮和亚胺培南等药物敏感; 全基因组测序结果表明该菌株的染色体大小为 5 292 570 bp, GC 含量为 35.37%, 多位点序列分型显示该菌株属于 ST427 序列类型。在菌株 SCBCM001 基因组内发现 *hblA*、*hblC*、*hblD*、*nheA*、*nheB*、*clo* 和 *cytK* 等多种毒力因子, 同时菌株携带对 β -内酰胺类、万古霉素和四环素等多种药物的耐药基因, 与耐药表型不完全相符。菌株 SCBCM001 基因组还包含 6 个质粒, 其中一个质粒上存在一个较完整的噬菌体区域。【结论】该研究分离了林麝源蜡样芽孢杆菌并对其进行了全基因组测序及分析, 为林麝细菌性疾病防治和治疗提供了参考依据。

关键词: 林麝; 蜡样芽孢杆菌; 致病性; 全基因组序列分析

资助项目: 四川省科技厅省级科研院所科技成果转化项目(2023JDZH0029)

This work was supported by the Science and Technology Achievements Transfer Project from Scientific Research Institutions of Sichuan Provincial Science and Technology Department (2023JDZH0029).

*Corresponding author. E-mail: Lycjg@163.com

Received: 2023-05-02; Accepted: 2023-05-15; Published online: 2023-06-16

Isolation, identification, and whole genome sequencing of *Bacillus cereus* SCBCM001 from forest musk deer (*Moschus berezovskii*)

LIU Jie¹, WU Xi¹, DING Hui¹, LI Yimeng¹, FU Wenlong², ZHOU Lei², CHENG Jianguo², WU Jie², YANG Kaiwei¹, LUO Yan^{*1}

1 College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan, China

2 Sichuan Institute of Musk Deer Breeding, Dujiangyan 611800, Sichuan, China

Abstract: [Background] Bacterial diseases are major factors limiting the large-scale cultivation of forest musk deer. *Bacillus cereus* has been detected in abscesses of forest musk deer. However, there are few studies about the *B. cereus* from forest musk deer. [Objective] We isolated, identified, and sequenced the whole genome of a suspected *B. cereus* strain from the liver of a dead forest musk deer, aiming to provide a foundation for the prevention and treatment of diseases caused by *B. cereus* in forest musk deer. [Methods] After strain purification, we conducted biochemical tests, drug sensitivity tests, and mouse pathogenicity tests on the pathogen. We then employed the third-generation sequencing to reveal its whole genome and phylogenetic relationship. Furthermore, gene function annotation and genetic evolution analysis were conducted. [Results] The average nucleotide identity (ANI) and phylogenetic tree suggested that the pathogen belonged to the *B. cereus* group, and the biochemical test results of the strain conformed to the general characteristics of *B. cereus*. The isolate was thus named SCBCM001. The strain showed the median lethal dose of 8.3×10^7 CFU for mice. It was resistant to most β -lactams, tetracycline, and sulfamethoxazole and sensitive to cephalixin, cefoperazone, imipenem, and aminoglycosides. The chromosome size of the strain was 5 292 570 bp, with the GC content of 35.37%. Multilocus sequence typing showed that SCBCM001 was a strain of ST427. The genome of SCBCM001 carried a variety of virulence genes such as *hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB*, *clo*, and *cytK* and the genes conferring the resistance to antibiotics such as β -lactams, vancomycin, and tetracycline, which were not completely consistent with the drug-resistant phenotype. In addition, the genome of strain SCBCM001 contained 6 plasmids, one of which had a relatively complete phage region. [Conclusion] The whole genome of a *B. cereus* strain isolated from forest musk deer was sequenced and analyzed, which provided a basis for the prevention and treatment of bacterial diseases in forest musk deer.

Keywords: forest musk deer; *Bacillus cereus*; pathogenicity; whole genome sequencing

蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)是一种革兰氏阳性、能运动、产芽孢的条件性致病菌,在自然界中广泛存在,通常引起人食物中毒,导致呕吐和腹泻,在免疫力低下的人群中还可能

引起局部、全身感染^[1]。同时蜡样芽孢杆菌也能引发哺乳仔猪腹泻^[2]、马颈部脓肿^[3]、中华鳖“摇头病”^[4]、牛猝死^[5]、蛋鸡产蛋率下降^[6]等多种动物疾病,对畜禽养殖生产造成严重损失。

林麝 (*Moschus berezovskii*) 是偶蹄目 (*Artiodactyla*) 麝科 (*Moschidae*) 麝属 (*Moschus* spp.) 中体型最小的哺乳动物, 俗称獐子^[7]。雄麝腹部长有麝香腺, 能够分泌麝香(musk), 麝香是传统名贵中药材和高级动物香料。野生林麝种群因分泌的麝香而遭受乱捕滥猎, 再加之生境破碎化及食源减少等问题导致中国野生林麝种群数量锐减^[8]。人工养麝是实现资源保护和可持续利用最有效的途径之一, 疾病是阻碍林麝人工养殖的主要原因。临床上最为常见的是由细菌性病原引起的肺炎和化脓性疾病^[9], 林麝化脓性疾病病原多样、病因复杂, 有研究显示从发病林麝的脓灶中检出了多种细菌, 蜡样芽孢杆菌是其中之一^[10]。但是目前尚无蜡样芽孢杆菌单独感染引起林麝发病死亡的报道, 并且在美国国家生物技术信息中心(National Center of Biotechnology Information, NCBI)数据库中尚无林麝源蜡样芽孢杆菌的全基因组测序数据。

本研究从病死林麝的肝脏中分离出一株致病性蜡样芽孢杆菌, 进行了生化特性、药敏检测等试验和全基因组测序, 根据测序结果进行平均核苷酸相似度(average nucleotide identity, ANI)、多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)、耐药基因和毒力因子分析, 以期丰富并完善蜡样芽孢杆菌生物学数据并为圈养麝防治该类疾病提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料来源

四川雅安某林麝养殖场陆续有林麝死亡。为了确定病因, 将一头病死的 6 月龄雄麝送往实验室进行相关诊断。

1.1.2 主要试剂、仪器和培养基

LB 肉汤培养基、MH 肉汤(Mueller-Hinton

broth)培养基、细菌染色试剂、甘露醇卵黄多粘菌素琼脂基础(mannitol yolk polymyxin agar base, MYP)培养基及配套试剂、HBI 蜡样芽孢杆菌生化鉴定条及配套试剂, 青岛海博生物技术有限公司; 药敏纸片, 杭州微生物试剂有限公司; 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS), 北京索莱宝科技有限公司; 一水合硫酸锰($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 重庆吉元化学有限公司。

Quantity One 凝胶成像仪, Bio-Rad 公司; 电泳仪, 北京六一仪器厂; 立式蒸汽压力灭菌器, 上海博迅医疗生物仪器股份有限公司; 水浴恒温摇床, 常州市金坛友联仪器研究所; 生物显微镜, Olympus 公司。

硫酸锰营养琼脂培养基按照 GB 4789.14—2014《食品卫生微生物学检验 蜡样芽孢杆菌检验》中的方法配制^[11]。

5%兔血琼脂培养基: LB 肉汤培养基添加琼脂粉 15 g/L, 121 °C 灭菌 20 min 后冷却至 50 °C 左右, 无菌操作加入 5%脱纤维兔血混匀后倒平板。

1.1.3 试验动物

六周龄 SPF 级昆明小鼠(Kunming mice, KM)共 56 只(雌性 28 只, 雄性 28 只)购自成都达硕试验动物有限公司。根据有关试验动物护理和使用的所有机构和国家指南, 四川农业大学科技管理处动物福利委员会批准了动物试验(批准编号为 20230190)。

1.2 林麝病理剖检和病原菌的分离培养

无菌解剖病死林麝, 并将明显病灶区域切下, 浸泡在 4%甲醛固定液中, 送成都里来生物公司进行病理切片分析。将病料分别划线接种于 LB 培养基和 5%兔血琼脂培养基, 于 37 °C 培养 24 h, 根据菌落形态特征和革兰氏染色结果, 挑取单菌落进一步纯化、保存。

1.3 生化试验

依据 GB 4789.14—2014《食品微生物学检验 蜡样芽孢杆菌检验》^[11]进行生化鉴定试验和蛋白质毒素结晶试验,生化试验步骤按照 HBI 蜡样芽孢杆菌生化鉴定条说明书进行。

1.4 药敏试验

采用 Kirby-Barer 纸片法测定菌株的药物敏感性,选取青霉素、阿莫西林、氨苄西林、头孢氨苄、头孢唑林、头孢噻肟、头孢他啶、头孢哌酮、亚胺培南、链霉素、妥布霉素、丁胺卡那、阿奇霉素、红霉素、四环素、氯霉素、氟苯尼考、氧氟沙星、环丙沙星、磺胺异噁唑和呋喃妥因,参照美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)鉴定手册^[12]筛选分离菌的药物敏感性。

1.5 小鼠致病性试验

菌液的制备:挑取鉴定后的单菌落至 6 mL LB 液体培养基中,37 °C、150 r/min 培养 12 h 后按 1%的接种量转接至 35 mL LB 培养基中,相同条件下培养至 OD_{600} 为 0.6–0.8,8 000 r/min 离心 10 min 弃上清,用无菌 PBS 重悬细菌沉淀,使用平板计数法计算菌液浓度。将菌液浓度调整为 10^{10} CFU/mL,并用 PBS 将菌液稀释成 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 和 10^9 CFU/mL。

小鼠攻毒方式:采取体重分层随机分组法将小鼠分为 7 组,8 只/组(雌雄各半),试验组分别腹腔注射不同浓度的菌液,0.4 mL/只,同时设置腹腔注射等量的 PBS 作为对照组。记录 7 d 内每组小鼠的死亡数,并使用 Bliss 法计算半数致死量(median lethal dose, LD_{50})。

1.6 病原菌全基因组测序

采用全基因组鸟枪法(whole genome shotgun, WGS)策略,利用第 3 代单分子测序技术(Oxford Nanopore ONT 测序平台)测序,测序模式为双末端(paired-end, PE)测序。将 3 代下机数据使用

软件 UniCycler 和 Flye 进行拼装得到完整序列。基因组测序工作由上海派森诺生物科技股份有限公司完成。

1.7 基因组分析

1.7.1 ANI 比对和系统发育树构建

使用 OAT: OrthoANI Tool v0.93.1^[13],将菌株 SBCM001 与该属其他代表菌株进行 ANI 比对,并用 TBtools v1.1.16^[14]绘制热图;使用 PubMLST 数据库(<https://pubmlst.org>)用于菌株 SCBCM001 的序列类型测定,并选取 NCBI 中的 33 株相关菌株,使用 MEGA X 软件基于各个菌株的管家基因进行多基因联合构建最大似然(maximum likelihood, ML)法系统发育树,设置 bootstrap 检验(1 000 次重复)。

1.7.2 毒力基因和耐药基因注释

采用 BLAST 软件,用毒力因子数据库(www.mgc.ac.cn/VFs/)和综合抗生素耐药性数据库(<https://card.mcmaster.ca>)对其携带的毒力基因和耐药基因进行注释,毒力因子数据库 BLAST 比对设定参数 E -value 为 $1e-5$,氨基酸序列的一致性在 60%以上,且序列比对的长度与其对应毒力因子相关基因序列长度的比值不低于 70%,比对的 gap 长度小于序列比对长度的 10%;综合抗生素耐药性数据库 BLAST 比对设定参数 E -value 为 $1e-6$,氨基酸序列的一致性在 50%以上,且序列比对的长度与其序列长度的比值不低于 70%。

1.7.3 COG 和 KEGG 聚类分析

使用 diamond BLASTp 将基因编码蛋白序列与 clusters of orthologous groups (COG)数据库中的蛋白序列进行比对,序列比对的临界值选取为 $1e-6$,选取一个最佳 hits 的 eggNOG 编号赋值给相应的蛋白编码基因;蛋白编码基因的 Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG)注释主要采用 KEGG automatic annotation server (KAAS)

自动化注释系统完成(<http://www.genome.jp/kegg/>)。

1.7.4 原噬菌体预测

采用在线网站 PHASTER (<http://phaster.ca/>) 预测基因组中存在的原噬菌体。

2 结果与分析

2.1 林麝病理剖检及菌株分离情况

林麝死亡解剖后发现肝脏肿大, 表面有大小不一黑色斑点(图 1A), 肺脏有病变(图 1B)。通过对肝脏和肺脏组织病理切片观察, 发现主要病理学变化表现为: 肝脏部分中央静脉周围和局部肝窦可见局灶性的肝窦极度扩张淤血, 周围肝细胞受压迫萎缩, 肝索排列紊乱, 门管区血管扩张淤血、出血, 周围少量肝细胞变性坏死(图 2A); 肺脏间质少量炎性细胞浸润, 以淋巴细胞为主, 局部血管扩张, 管腔内见由红细胞、炎性细胞和浆液性渗出物混合而成的较大栓塞, 周围少量小血管有轻微栓塞(图 2B)。

将各脏器接种兔血平板, 仅在肝脏接种的平板上有疑似蜡样芽孢杆菌群细菌的单菌落生长, 挑取该菌落进行划线分离培养, 分离株编号为 SCBCM001。

2.2 形态及染色特性

菌株 SCBCM001 在 LB 琼脂培养基上呈白色、不透明的大菌落(图 3A); 挑单菌落进行革兰氏染色镜检, 显示其为革兰氏阳性、中等大小杆菌, 多成对或链状排列(图 3B)。

2.3 培养及生化特性

菌株 SCBCM001 在血平板上 37 °C 培养 24 h 后出现较宽的透明溶血环(图 4A), 表明该菌株具有溶血酶活性, 在 MYP 琼脂平板上 37 °C 培养 16 h 后菌落呈现淡粉色(图 4B), 表明该菌株不发酵甘露醇; 周围有沉淀环, 表明该菌株产卵磷脂酶能水解卵磷脂; 在蛋白质毒素结晶试验中观察有游离芽胞(浅红色), 但芽孢旁边无染成深红色的菱形或不规则的蛋白结晶体, 表明菌株 SCBCM001 不产生伴孢晶体(图 4C)。

使用 HBI 蜡样芽孢杆菌生化鉴定条对菌株 SCBCM001 进行生化鉴定, 过氧化氢酶试验、淀粉水解、动力试验、明胶液化试验、溶菌酶耐性试验、V-P 试验和葡萄糖利用(厌氧)试验结果均为阳性; 柠檬酸酸盐利用、硝酸盐还原和甘露醇产酸试验结果均为阴性。根据 GB 4789.14—2014^[1] 的生化分型将菌株 SCBCM001 分为 4 型。

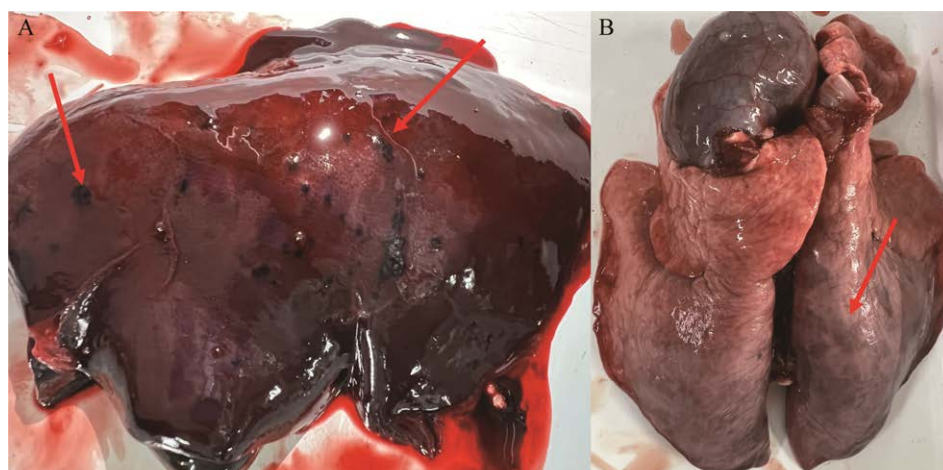


图 1 剖检死亡林麝器官病理变化 A: 肝脏表面黑色斑点. B: 肺脏病变

Figure 1 Pathological changes in organs of dead forest musk deer after autopsy. A: Black macules on liver surface. B: Lesions of lungs.

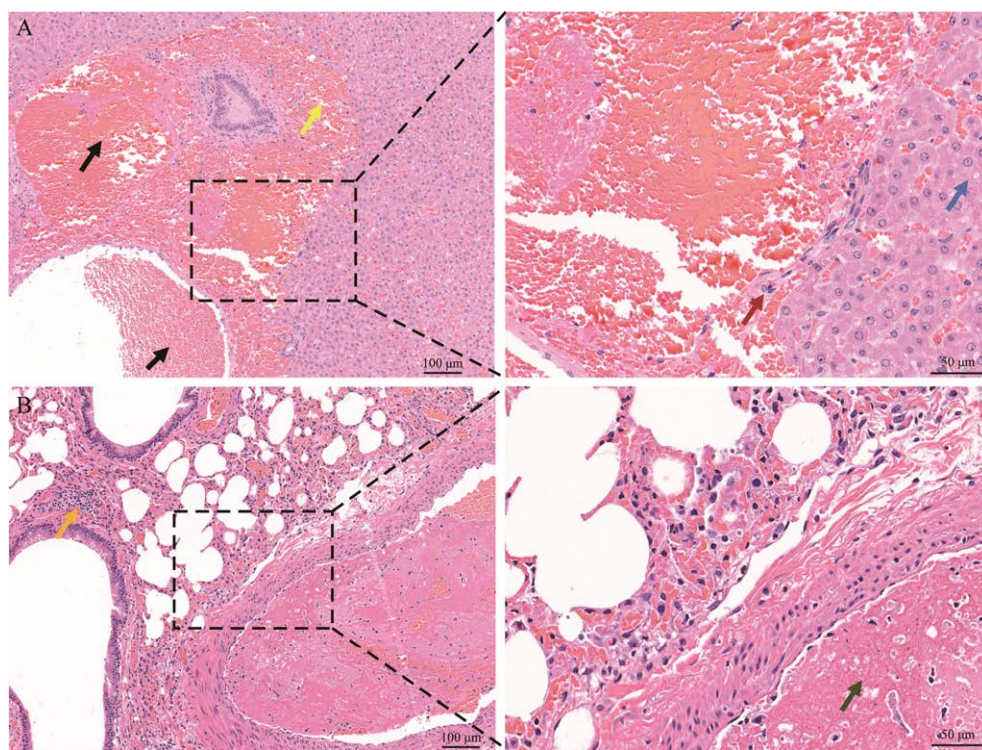


图2 林麝肝脏和肺脏病理切片图(左侧 HE 100×, 右侧 HE 400×) A: 肝脏病理切片. 血管扩张淤血(黑色箭头), 血管出血(黄色箭头), 肝细胞坏死(红色箭头), 肝细胞胞质脂滴(蓝色箭头). B: 肺脏病理切片. 炎性细胞浸润(橙色箭头), 血管栓塞(绿色箭头)

Figure 2 Pathological sections of liver and lung of forest musk deer (left HE 100×, right HE 400×). A: Liver pathological sections. Vasodilatory congestion (black arrow), vessel hemorrhage (yellow arrow), hepatocyte necrosis (red arrow), hepatocyte cytoplasmic lipid droplets (blue arrow). B: Lung pathological sections. Inflammatory cell infiltration (orange arrows), vascular embolization (green arrows).

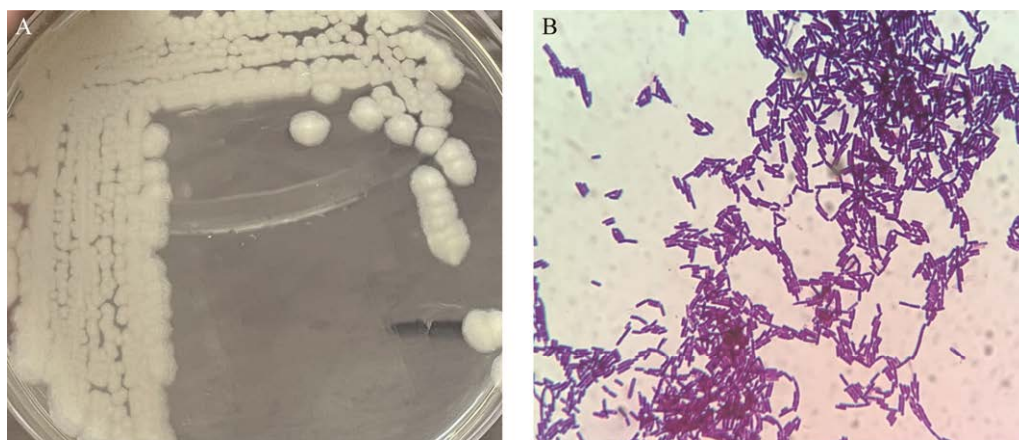


图3 菌株 SCBCM001 的形态特征 A: LB 琼脂培养基上菌落形态. B: 革兰氏染色结果(1 000×)

Figure 3 The morphology of SCBCM001. A: Colony morphology on LB agar medium. B: Gram staining of SCBCM001 strain (1 000×).

2.4 药敏试验结果

如表 1 所示, 药敏试验结果表明, 该菌株对呋喃妥因、少数 β -内酰胺类药物(头孢氨苄、头孢哌酮和亚胺培南)、大环内酯类药物(红霉素、阿奇霉素)、喹诺酮类药物(氧氟沙星、环

丙沙星)和多种氨基糖苷类药物(链霉素、妥布霉素和丁胺卡钠)敏感。对四环素、磺胺异噁唑和多种 β -内酰胺类药物(青霉素、氨苄西林、阿莫西林、头孢唑林、头孢噻肟和头孢他啶)耐药。



图 4 菌株 SCBCM001 的生化特征 A: 菌株 SCBCM001 在血平板上. B: 菌株 SCBCM001 在 MYP 琼脂平板上. C: 蛋白质毒素结晶试验结果(1 000 \times)

Figure 4 Biochemical characteristics of SCBCM001. A: SCBCM001 cultured on blood agar plate. B: SCBCM001 cultured on MYP plate. C: Protein toxin crystallization test results (1 000 \times).

表 1 药敏试验结果

Table 1 Antibiotic susceptibility test results

抗生素类别 Antibiotics category	药物名称 Drug names	抑菌圈直径 Diameter of antibacterial circle (mm)	结果 Results
β -lactam antibiotics	Penicillins	Penicillin	R
		Amoxicillin	R
		Ampicillin	R
	Cephalosporins	Cephalexin	S
		Cefazolin	I
		Cefotaxime	R
		Ceftazidime	R
		Cefoperazone	S
		Imipenem	S
Aminoglycosides	Carbapenems	Streptomycin	S
		Tobramycin	S
		Amikacin	S
		Azithromycin	S
Macrolide		Erythromycin	S
		Tetracycline	I
Tetracyclines		Tetracycline	I
Amphenicols		Chloramphenicol	S
Quinolones		Florfenicol	S
		Ofloxacin	S
		Ciprofloxacin	S
Sulfonamides		Sulfamethoxazole	R
Nitrofurans		Furantoin	S

S: 敏感; I: 中介; R: 耐药

S: Sensitive; I: Intermediary; R: Resistance.

2.5 菌株 SCBCM001 对小鼠的致病性

试验组注射活菌液后, 各组小鼠死亡及存活情况见表 2。其中高剂量组(7×10^9 CFU/mL) 4 只小鼠在 4 h 内呈现萎靡状, 8 h 左右出现明显抱团昏睡, 食欲饮欲不振, 12 h 内全部死亡, 对照组小鼠未见明显异常。无菌剖检病死小鼠, 在脏器中均分离到大量蜡样芽孢杆菌。各脏器病理组织切片见图 5, 心脏局部心肌纤维轻微变性(图 5A); 肝脏中央静脉淤血, 中央静脉周围肝索排列紊乱, 部分肝细胞变性坏死(图 5B); 脾脏红髓血窦淤血扩张, 见脾血窦内充满红细胞(图 5C); 肺脏血管充血淤血, 肺泡内毛细血管充血、扩张(图 5D); 肾脏可见间质内以淋巴细胞为主的少量炎性细胞浸润(图 5E), 其他未见明显病变。采用 Bliss 法计算得知, 该菌对小鼠的 LD_{50} 为 8.3×10^7 CFU。

表 2 攻毒后 7 d 内小鼠死亡数量

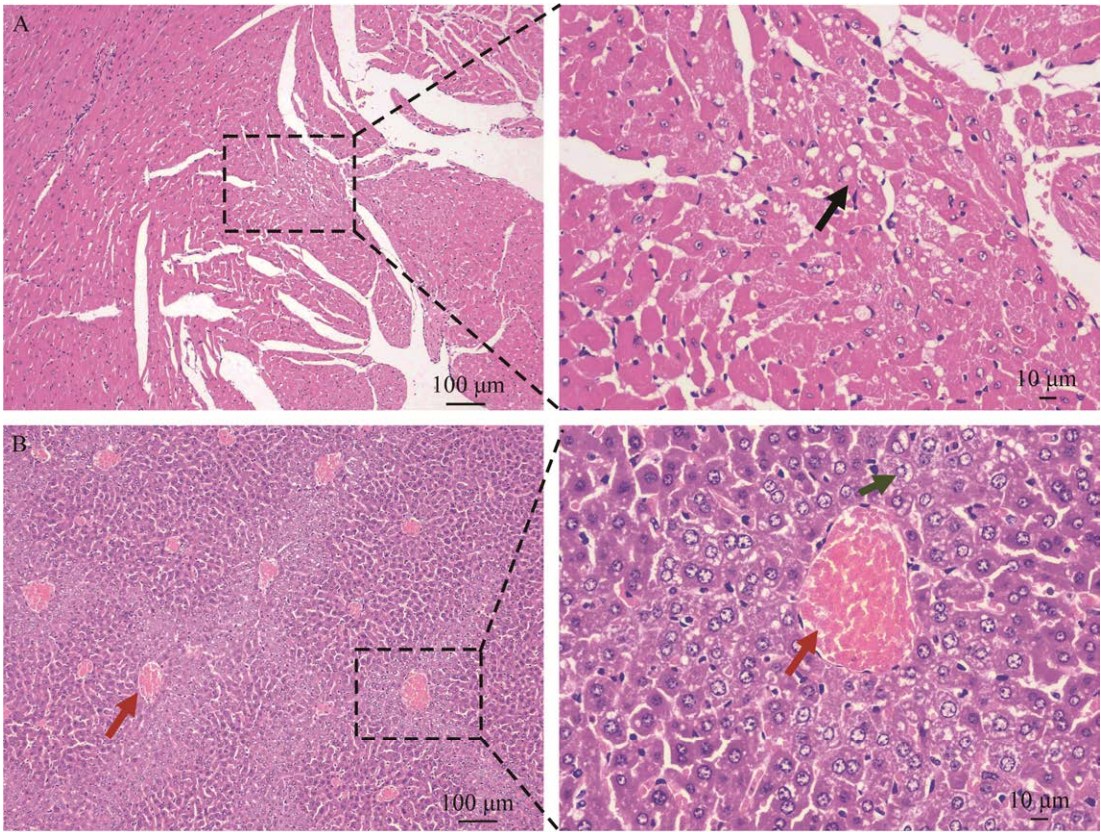
Table 2 Number of deaths in mice within 7 days of challenge

菌液浓度 Concentration of bacterial (CFU/mL)	死亡数量 Number of deaths
7×10^4	0/8
7×10^5	0/8
7×10^6	0/8
7×10^7	0/8
7×10^8	8/8
7×10^9	8/8

2.6 全基因组测序及分析结果

2.6.1 菌株 SCBCM001 全基因组基本信息

基因组测序结果显示菌株 SCBCM001 的基因组包含一条环状染色体(5 292 570 bp)和 6 个环状质粒, 拼接结果显示染色体和质粒的测序深度(覆盖倍数)均为 168 倍。数据上传 NCBI 数据



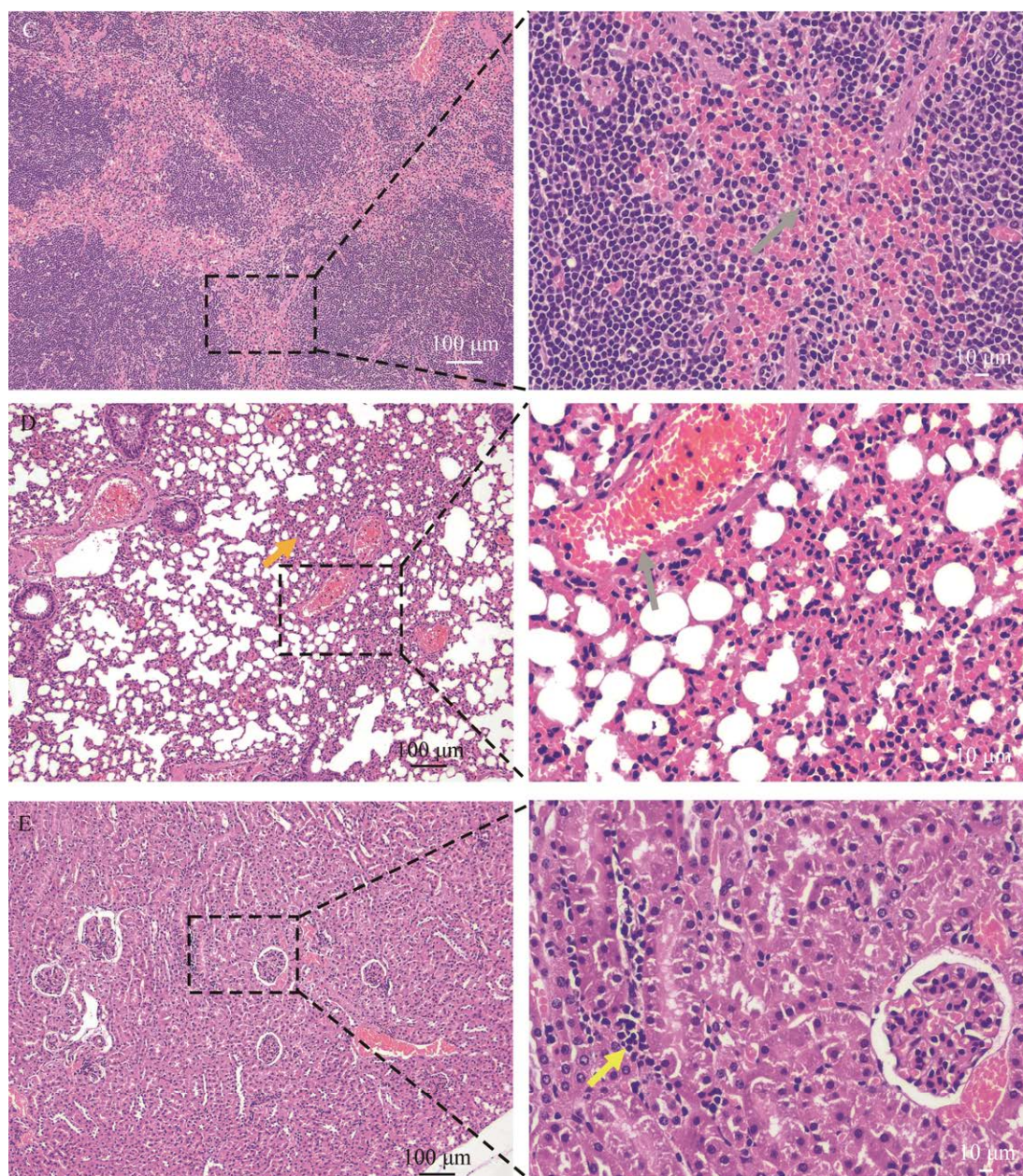


图5 小鼠各器官病理切片图(左侧 HE 100 \times , 右侧 HE 400 \times) A: 心脏病理切片. 心肌纤维变性(黑色箭头). B: 肝脏病理切片. 中央静脉淤血(红色箭头), 肝细胞变性坏死(绿色箭头). C: 脾脏病理切片. 红细胞充盈(灰色箭头). D: 肺脏病理切片. 肺泡隔增厚(黄色箭头), 红细胞充盈(灰色箭头). E: 肾脏病理切片. 炎性浸润, 淋巴细胞(黄色箭头)

Figure 5 Pathological sections of mouse organs (left HE 100 \times , right HE 400 \times). A: Pathological sections of the heart. Myocardial fibrosis (black arrow). B: Pathological sections of liver. Central venous congestion (red arrow), degeneration and necrosis of hepatocytes (green arrow). C: Pathological sections of spleen. Erythrocyte filling (gray arrow). D: Lung pathology sections. Alveolar septum thickening (yellow arrow), red cell filling (gray arrow). E: Pathological sections of kidney. Inflammatory infiltration, lymphocytes (yellow arrow).

库, 获得序列登录号为 CP120958–CP120964, 基因组具体信息见表 3。

2.6.2 ANI 分析结果

根据分离菌株的生物学特性, 初步确定该菌株为蜡样芽孢杆菌群细菌。分别选取蜡样芽孢杆菌(23 株)、苏云金芽孢杆菌(7 株)和芽孢杆菌属的其他菌株(8 株)进行比较分析。结果显示, 从基因组相似性上看, 蜡样芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌都与菌株 SCBCM001 非常相似, ANI 值均大于 90%, 两者的代表菌株与菌株 SCBCM001 的 ANI 值均大于 96% (图 6), 仅从 ANI 分析上不能区分蜡样芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌。

2.6.3 MLST 分型和系统发育分析结果

采用 7 个管家基因(*glp*、*gmk*、*ilv*、*pta*、*pur*、*pyc* 和 *tpi*)进行 MLST 分析, 结果显示该菌株为 ST427 型, 检索 MLST 数据库, 发现与 2018 年广东分到的一株蜡样芽孢杆菌(ID: 5328) ST 型相同, 但是未找到该菌株全基因组的相关信息。

由管家基因串联建立系统进化树, 本次从林麝分离的菌株 SCBCM001 与 2015 年从南非分离的蜡样芽孢杆菌菌株 HRT7.7 和 2018 年从中国台湾分离的苏云金芽孢杆菌 GA-A07 亲缘关系最近, 再次表明了蜡样芽孢杆菌群基因水平极为相似(图 7)。

2.6.4 毒力因子注释结果

菌株 SCBCM001 毒力因子检测统计结果如表 4 所示, 包括与免疫逃避相关的金属蛋白酶基因(*inhA1*、*inhA2*)、肠毒素相关基因、溶血素 BL 基因(*hblA*、*hblC* 和 *hblD*)、非溶血性肠毒素 Nhe 基因(*nheA*、*nheB*)和细胞毒素 K 基因(*cytK*), 还发现与细胞膜成孔相关的基因(*clo*)、细菌定殖的细胞壁锚定蛋白基因(*htpB*、*lap* 和 *groEL*)、铁载体生物合成相关基因(*asbA-F*、*dhb* 和 *mbtH*)等, 未检测到苏云金芽孢杆菌特有的参与伴胞晶体蛋白合成的 *cry* 和 *cyt* 基因。

2.6.5 耐药基因注释结果

在菌株 SCBCM001 中检测到多种耐药基因, 与 β -内酰胺类、万古霉素、甲氧苄啶、氟喹诺酮、四环素和利福平等药物相关, 还包括与杆菌肽耐药外排泵 ABC 转运蛋白(ATP-binding cassette transporter)相关的两个基因(*bcrA*、*bcrB*)和一个多药耐药外排泵(表 5)。

2.6.6 蛋白编码基因的 eggNOG 和 KEGG 注释结果

通过与数据库的比对分析, 共有 4 722 个基因被注释到 21 组 COG 的功能中, 其中 3 112 个蛋白与已知蛋白或假设蛋白同源, 1 610 个蛋白功能未知, 此外数量最多的是转录相关蛋白和氨基酸转运、代谢相关的蛋白, 分别是 366 个

表 3 菌株 SCBCM001 基因组基本信息

Table 3 Basic information of strain SCBCM001 genome

GenBank 登录号 GenBank accession No.	序列名称 Sequence ID	序列长度 Sequence length (bp)	GC 含量 GC content (%)	开放阅读框数量 ORF number
CP120958	Chromosome	5 292 570	35.37	5 348
CP120959	Plasmid1	382 731	33.66	387
CP120960	Plasmid2	41 241	35.56	60
CP120961	Plasmid3	16 013	36.13	12
CP120962	Plasmid4	9 518	31.60	13
CP120963	Plasmid5	9 190	31.43	11
CP120964	Plasmid6	3 166	33.13	3

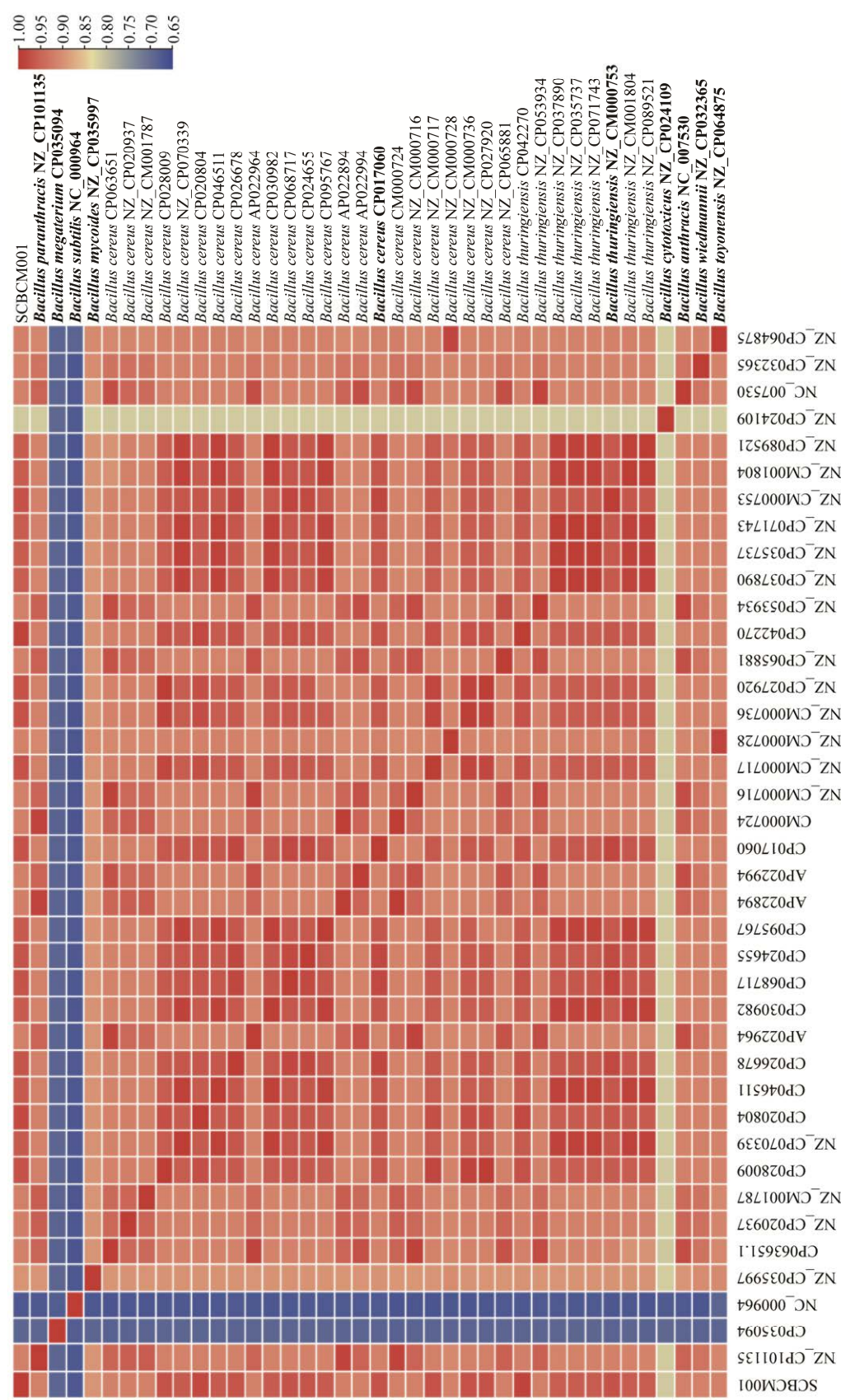


图 6 菌株 SCBCM001 与蜡样芽孢杆菌群的菌株 ANI 比对 加粗字体为 NCBI 上该菌的代表菌株
Figure 6 Comparison of ANI results between strain SCBCM001 and *Bacillus cereus* group. Representative strains of NCBI are shown in bold.

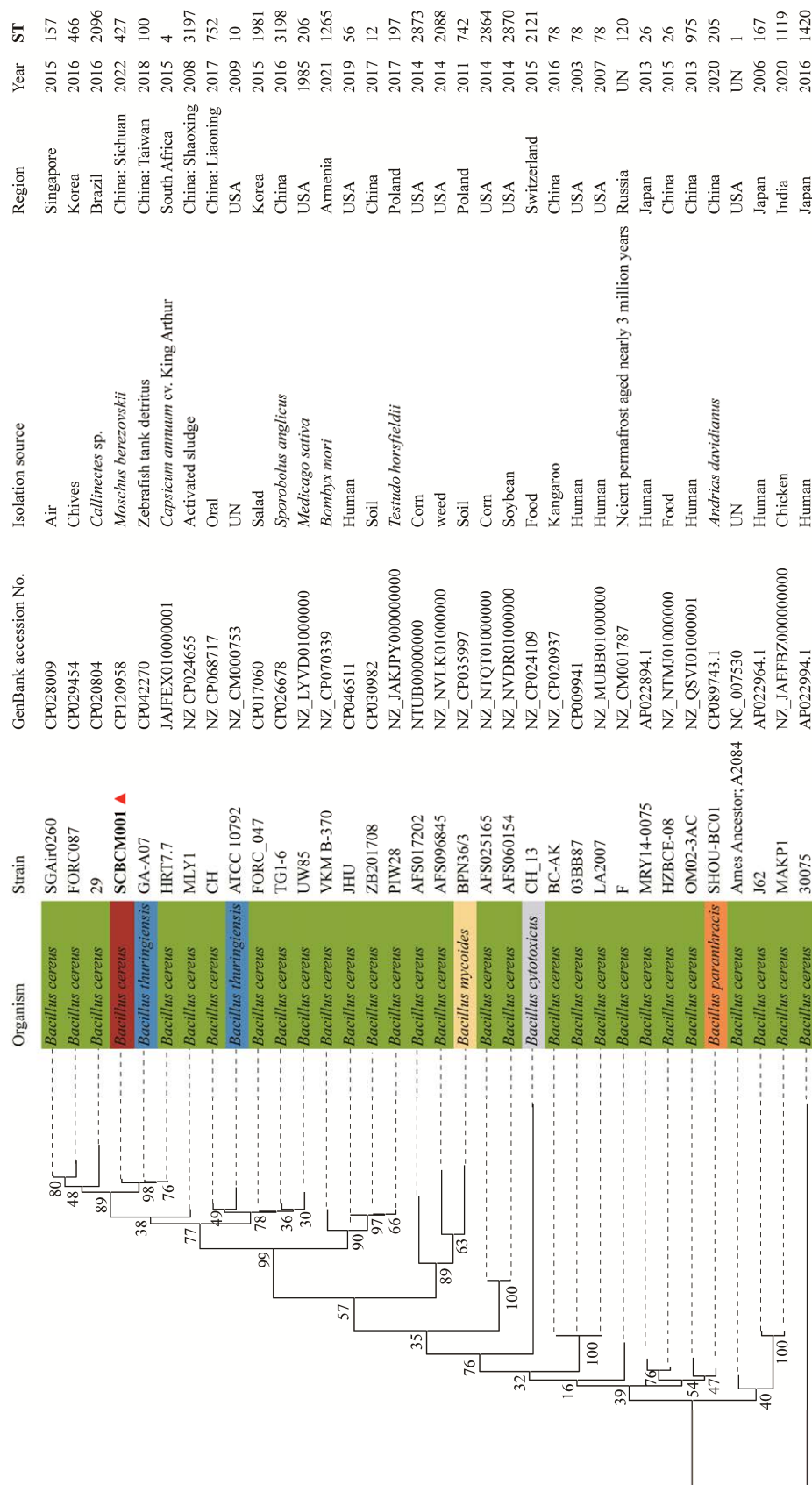


图 7 基于管家基因构建的系统发育树 ▲ 为本研究分离的菌株SCBCM001; UN: 未知; ST: 序列类型. 分支点上的数字表示 bootstrap 检验的置信度. 不同颜色代表不同蜡样芽孢杆菌群的菌株
Figure 7 Phylogenetic tree based on housekeeping genes. ▲ represents the SCBCM001 strain isolated in this study; UN: Unknown; ST: Sequence type. The number on the branch point represents the confidence level of the Bootstrap test. Different colors represent different strains of *Bacillus cereus*.

表 4 菌株 SCBCM001 基因组中的毒力因子
Table 4 Virulence factors in strain SCBCM001 genome

毒力因子类别 VF category	毒力因子 Virulence factors	相关基因 Related genes
Stress survival	ClpC	<i>clpC</i>
	ClpP	<i>clpP</i>
Nutritional/Metabolic factor	Petrobactin	<i>asbA</i> , <i>asbB</i> , <i>asbC</i> , <i>asbD</i> , <i>asbE</i> , and <i>asbF</i>
	Bacillibactin	<i>dhbA</i> , <i>dhbB</i> , <i>dhbC</i> , <i>dhbE</i> , and <i>dhbF</i>
	Mycobactin	<i>mbtH</i>
	LplA1	<i>lplA1</i>
Antiphagocytosis	Capsule	<i>galE</i> , <i>cps4I</i> , and <i>cpsC</i>
Inflammatory signaling pathway	Lipooligosaccharide (LOS)	<i>galE</i>
	Lipopolysaccharide (LPS)	<i>wbtM</i> , <i>rfbA</i>
Exotoxin	Cereolysin O	<i>clo</i>
	Haemolysin BL	<i>hblA</i> , <i>hblC</i> , and <i>hblD</i>
	Nonhemolytic enterotoxin	<i>nheA</i> , <i>nheB</i>
	Cytotoxin K	<i>cytK</i>
Protease	Immune inhibitor A	<i>inhA1</i> , <i>inhA2</i>
Cell wall anchored protein	Hsp60	<i>htpB</i>
	Listeria adhesion protein	<i>lap</i>
	GroEL	<i>groEL</i>
Others	Isocitrate lyase	<i>icl</i>

表 5 菌株 SCBCM001 耐药基因预测
Table 5 Prediction of resistance gene in strain SCBCM001

耐药基因类型 Antibiotic type	耐药基因 Resistant gene
Bacitracin-resistance	<i>bacA</i>
β-lactam antibiotics-resistance	<i>BcI</i> , <i>BcII</i>
Vancomycin-resistance	<i>vanS</i> , <i>vanRM</i> , <i>vanZF</i> , <i>vanRG</i> , and <i>vanYF</i>
Trimethoprim-resistance	<i>dfrG</i> , <i>dfrE</i>
Daptomycin-resistance	<i>rpoB</i> , <i>rpoC</i>
Fluoroquinolones-resistance	<i>griA</i> , <i>griB</i> , and <i>gyrA</i>
Elfamycin-resistance	<i>EF-Tu</i>
Rifampin-resistance	<i>rphA</i>
Streptomycin-resistance	<i>strA</i>
Tetracycline-resistance	<i>tetB(P)</i>
Antibiotic efflux pump	<i>Blt</i> , <i>bcrA</i> , and <i>bcrB</i>

和 338 个(图 8)。同时有 2 574 个基因被注释到 KEGG orthology (KO)功能分类中，与新陈代谢有关的蛋白数量最多，有 1 505 个；BRITE 数据库将注释到的蛋白进行功能层级分类，其中与遗传和信息处理相关的蛋白最多，占 651 个

分类，有 475 个蛋白未包含在 BRITE 数据库和代谢通路中(图 9)。

2.6.7 原噬菌体预测结果

原噬菌体预测结果显示，在菌株 SCBCM001 基因组中发现 4 个噬菌体基因组区域的存在，

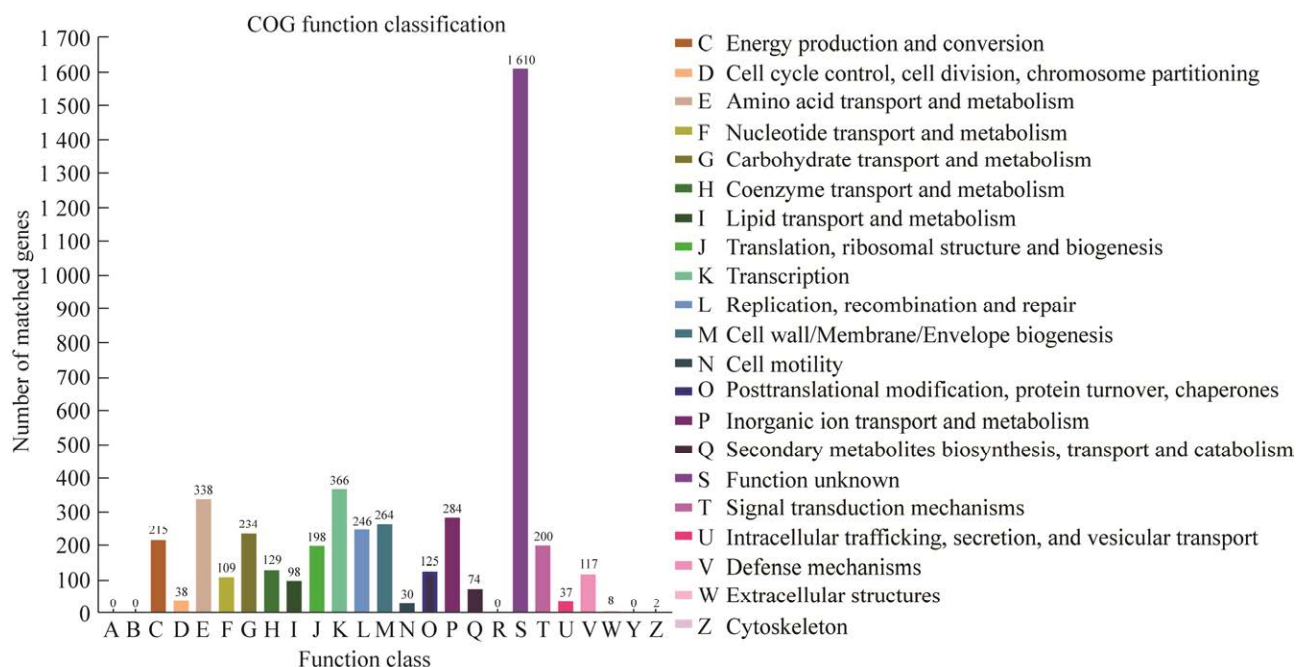


图 8 eggNOG (COG)功能分类图

Figure 8 eggNOG (COG) function classification.

但是只有一个区域的完整性总分大于 70, 可以判断为完整的噬菌体(图 10), 位于 Plasmid2 的 1-41 225 bp 处, 该区域长度为 41.2 kb, 包含 62 个 CDS, GC 含量为 35.56%, 完整性得分为 120, 最相似的噬菌体是李斯特菌噬菌体 LP-030-2 (GenBank 登录号为 NC_021539)。

3 讨论与结论

蜡样芽孢杆菌群(*B. cereus* group)属于芽孢杆菌属(*Bacillus*), 由多种基因组序列及生物学特性非常相似的芽孢杆菌种组成。随着基因测序技术的发展, 蜡样芽孢杆菌群包含的种还在不断增加, 直到 2013 年蜡样芽孢杆菌群增加到 8 个种: 炭疽杆菌(*B. anthracis*)、蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)、细胞毒芽孢杆菌(*B. cytotoxicus*)、蕈状芽孢杆菌(*B. mycoides*)、假真菌样芽孢杆菌(*B. pseudomycoides*)、苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*)、东洋芽孢杆菌(*B. toyonensis*)

和维德曼芽孢杆菌(*B. wiedmannii*)^[15-16]。2017 年后, WGS 在基因组测序中的普及使 NCBI 数据库中的蜡样芽孢杆菌基因组的菌种数量扩大到了 20 多种^[16]。目前该菌群缺乏标准化的分类框架和识别新基因物种的标准方法, 为了避免菌株 SCBCM001 在分类学上产生歧义, 采用了 Carroll 等^[16]的研究结果, 结合美国食品和药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)针对蜡样芽孢杆菌的细菌分析手册(bacteriological analytical manual, BAM)、ANI、MLST 分型和基因组内特定毒力基因筛选等方法进行分类。菌株 SCBCM001 在蜡样芽孢杆菌组中进行物种划分时, 采用常规的 95% ANI 划定种界限^[17-18], 结果显示该菌株与苏云金芽孢杆菌代表菌株和蜡样芽孢杆菌代表菌株的 ANI 均大于分类阈值, 两种菌株在系统发育树中的距离也表明其亲缘关系非常接近, 无法将菌株 SCBCM001 在蜡样芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌中进行准确地

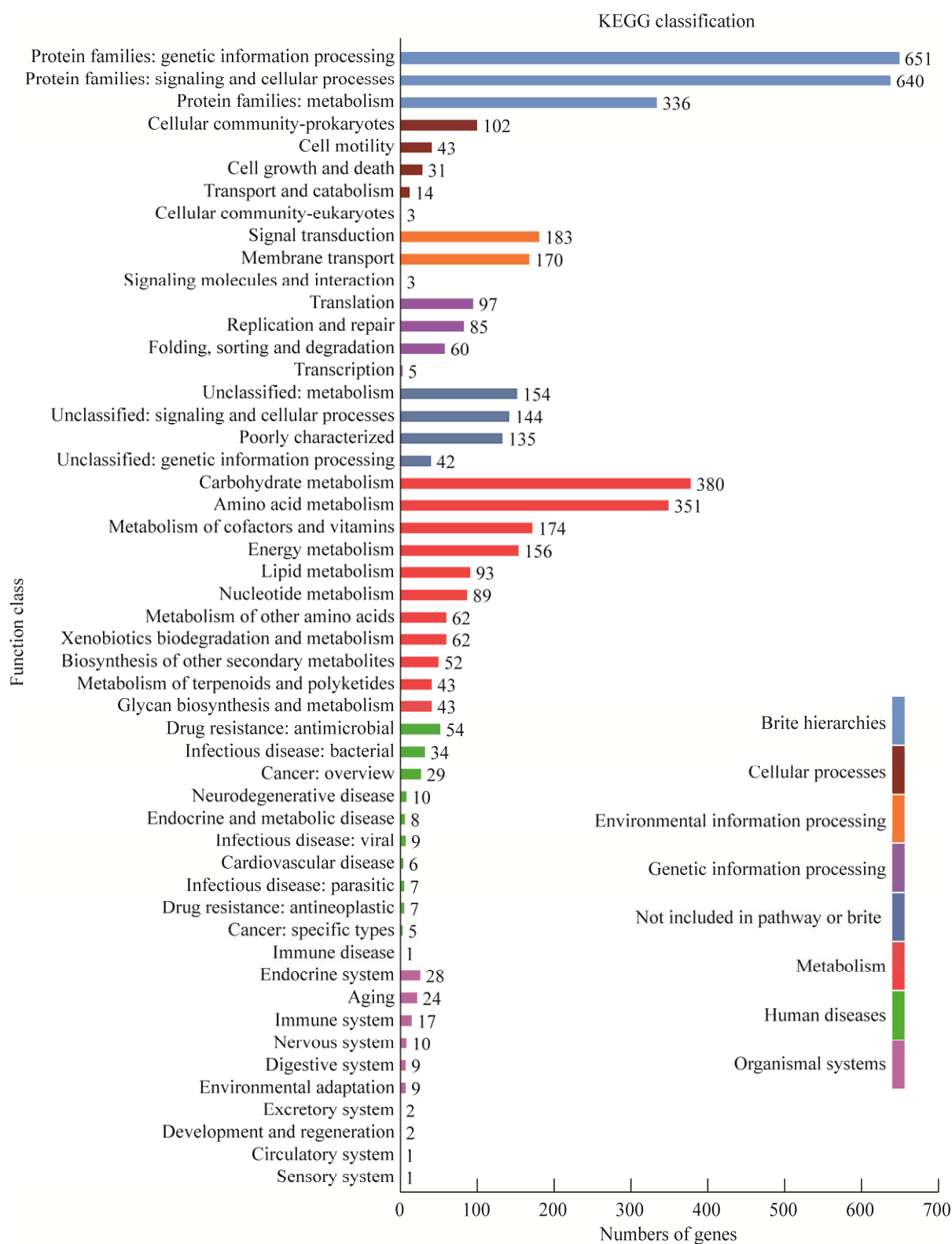


图9 KEGG 统计图

Figure 9 KEGG cartogram.

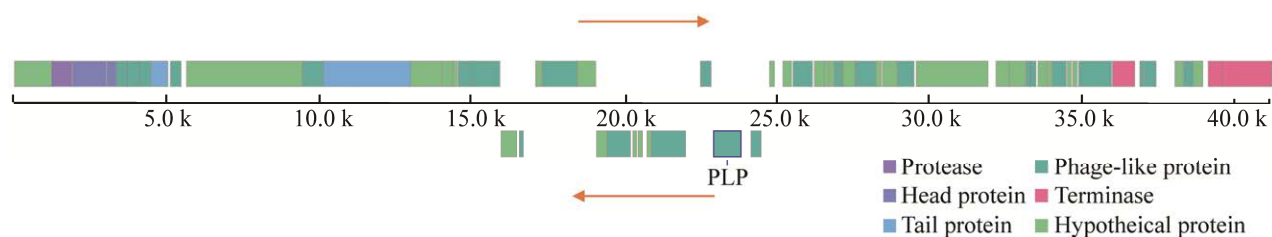


图 10 菌株 SCBCM001 原噬菌体视图和噬菌体元件注释

Figure 10 The prophage view and phage elements annotation of strain SCBCM001.

区分, 这种情况在蜡样芽孢杆菌群的分类上比较常见^[19]。Carroll 等^[20]为了解决蜡样芽孢杆菌群分类中的物种重叠问题, 提议降低 ANI 的分类阈值, 将 92.5% ANI 作为菌种界限, 使蜡样芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌合并为一个种。使用 FDA 针对蜡样芽孢杆菌群的分类方法, 将菌株 SCBCM001 确定为蜡样芽孢杆菌, 其蛋白质毒素结晶试验结果为阴性, 与产生伴胞晶体的苏云金芽孢杆菌区分开^[21]。

蜡样芽孢杆菌根据毒力因子差异引起的疾病症状不同, 通常分为呕吐型和腹泻型^[22]。蜡样芽孢杆菌呕吐毒素(cereulide)是一种稳定的环形小分子肽, 对物理化学因素不敏感, 由位于质粒上的 *ces* 基因簇编码^[23], 被宿主吸收后穿过血脑屏障影响中枢神经系统导致呕吐, 或者分布在各个器官, 严重的可能造成横纹肌溶解、肝损伤和多器官衰竭^[24-25]。引起腹泻的菌株产生 3 种腹泻毒素: 溶血素 BL (haemolysin BL, HBL)、非溶血性肠毒素(non-haemolytic enterotoxin, NHE)和细胞毒素 K (CytK)。溶血素 BL 基因(*hblC*、*hblD* 和 *hblA*)组成一个操纵子, 含有溶血素 BL 基因的蜡样芽孢杆菌能裂解血细胞, 在血平板上产生溶血^[26]; 非溶血性肠毒素基因(*nheA*、*nheB* 和 *nheC*)组成一个操纵子, 其分泌的蛋白能够通过靶向宿主细胞质膜的机制诱导 NLRP3 炎症小体的激活和凋亡, NHE 亚基组装形成一个功能孔, 驱动胞质钾的流出,

NHE 和 HBL 还能协同作用以诱导炎症^[27]; 细胞毒素 K 是一种单一的蛋白, 属于 β 桶穿孔毒素家族(β -barrel pore-forming toxin family), 能在细胞磷脂双分子层上形成孔洞^[28]。

此次分离的菌株 SCBCM001 携带多种毒力因子, 不仅包含上面 3 种腹泻毒素, 还携带 *clo* 基因编码的溶血素 O (cereolysin O, CLO), CLO 属于胆固醇依赖性溶细胞素(cholesterol-dependent cytolysin, CDCs)家族, 以可溶性、稳定的单体形式分泌, 与真核细胞膜中存在的胆固醇结合, 单体聚集在细胞膜中产生孔洞, 有助于突破上皮屏障^[29-30]。由毒力基因筛选可知菌株 SCBCM001 包含黏附、免疫逃避、环境适应以及必需营养物质摄取的次要毒力基因, 使细菌的侵袭有了前提条件, 主要毒力因子腹泻毒素和 CLO 直接导致宿主病理损伤, 是产生机体炎症和器官出血的主要原因, 这与小鼠试验结果一致。

由耐药基因检测结果可知菌株 SCBCM001 存在 β -内酰胺类和链霉素的耐药基因, 表型上对 β -内酰胺类的大多数药物耐药, 但对头孢哌酮、头孢氨苄和亚胺培南敏感, 对链霉素也敏感, 存在表型和基因型不一致的结果。菌株 SCBCM001 基因组编码的 β -内酰胺酶有两种: 丝氨酸 β -内酰胺酶 BcI 和金属 β -内酰胺酶 BcII^[31]。表型上对少部分 β -内酰胺类药物敏感的原因可能是 BcI 和 BcII 水解活性相对有限^[32-33], 有研究显示 BcII 序列与超广谱 β -内酰胺酶有一

定相似性,但存在的差异可能使酶的活性功能发生了变化,不足以赋予亚胺培南和广谱 β -内酰胺类抗性^[34]。菌株 SCBCN001 携带一个链霉素抗性基因^[35],与流血嗜血杆菌的链霉素抗性基因 *strA* 序列(GenBank 登录号为 M86701)相似度为 71%,但是基因组中缺少 *strB* 基因,无法形成 *strA-strB* 基因对,*strB* 基因的缺失导致链霉素耐药性急剧降低,因此对链霉素表现为敏感^[36-37]。

由 COG 和 KEGG 注释可知,菌株 SCBCM001 具有强新陈代谢能力和抗逆性。原噬菌体预测结果显示菌株在染色体和质粒上可能存在多个完整或不完整的噬菌体插入片段,这些插入片段使细菌基因组变得多样化,表明细菌和噬菌体的染色体存在一定共同进化关系^[38]。

本研究对分离株 SCBCM001 的全基因组序列分析显示了蜡样芽孢杆菌种群间的高度相关性,菌株携带的毒力因子种类不仅包括了导致人类腹泻的食源性蜡样芽孢杆菌的常见毒力因子,还携带 CLO,多种毒力因子的存在使蜡样芽孢杆菌具有一定致病性。目前关于林麝源蜡样芽孢杆菌的研究尚不足,菌株 SCBCM001 的基因组测序和注释将有助于研究蜡样芽孢杆菌在环境及动物健康中的影响,同时为林麝相关疾病的防控提供参考。

REFERENCES

- [1] GLASSET B, HERBIN S, GRANIER SA, CAVALIÉ L, LAFEUILLE E, GUÉRIN C, RUIMY R, CASAGRANDE-MAGNE F, LEVAST M, CHAUTEMPS N, DECOUSSER JW, BELOTTI L, PELLOUX I, ROBERT J, BRISABOIS A, RAMARAO N. *Bacillus cereus*, a serious cause of nosocomial infections: Epidemiologic and genetic survey[J]. *PLoS One*, 2018, 13(5): e0194346.
- [2] 赵振宇,戴荣四,刘东友,邓治邦,李润成,尹崇.一株猪源致病性蜡样芽孢杆菌的分离与鉴定[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2014,40(3): 311-315.
- ZHAO ZY, DAI RS, LIU DY, DENG ZB, LI RC, YIN C. Isolation and characterization of a pathogenic *Bacillus cereus* from a piglet with diarrhea[J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences Edition)*, 2014, 40(3): 311-315 (in Chinese).
- [3] 崔一龙,石芸,杨达汉,尹有勤,薛江东,霍晓伟,马德慧.马源蜡样芽孢杆菌的分离鉴定及毒力基因检测[J].浙江农业学报,2019,31(2): 216-221.
- CUI YL, SHI Y, YANG DH, YIN YQ, XUE JD, HUO XW, MA DH. Isolation, identification of horse *Bacillus cereus* and its virulence genes detection[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2019, 31(2): 216-221 (in Chinese).
- [4] 李延利.中华鳖“摇头病”病原的分离鉴定及其对中华鳖 4 个免疫相关基因的影响研究[D].重庆:西南大学硕士学位论文,2020.
- LI YL. Isolation and identification of a pathogen causing “head-shaking syndrome” of *Pelodiscus sinensis* and its effect on four immune-related genes of *Pelodiscus sinensis*[D]. Chongqing: Master’s Thesis of Southwest University, 2020 (in Chinese).
- [5] 霍晓伟,宋扬,刘杰,范培超,史量全,蒙小刚,刘锴,温树波,鲁会军.一株牛源致病性蜡样芽孢杆菌的分离鉴定与部分生物学特性分析[J].中国病原生物学杂志,2020,15(11): 1252-1256.
- HUO XW, SONG Y, LIU J, FAN PC, SHI LQ, MENG XG, LIU K, WEN SB, LU HJ. Identification and analysis of the biological characteristics of a *Bacillus cereus* strain from cattle[J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2020, 15(11): 1252-1256 (in Chinese).
- [6] 张飘,李涛,杨霞,胡安东,潘吉脉,刘妍罕,曾茂芹,文明.引起某蛋鸡场产蛋率下降的病原分离鉴定[J].家畜生态学报,2021,42(2): 62-67.
- ZHANG P, LI T, YANG X, HU AD, PAN JM, LIU YH, ZENG MQ, WEN M. Isolation and identification of pathogens causing a drop in laying rate in a layer farm[J]. *Journal of Domestic Animal Ecology*, 2021, 42(2): 62-67 (in Chinese).
- [7] 彭红元,陈伟才,张修月.麝的分类研究概述[J].玉林师范学院学报,2010,31(2): 66-72.
- PENG HY, CHEN WC, ZHANG XY. A review on the classification of musk deer[J]. *Journal of Yulin Normal University*, 2010, 31(2): 66-72 (in Chinese).
- [8] 吴科君,吴世磊,苏宇,蔡永华,杨营,龚杭,蒋桂枚.林麝的种群分布及食源研究概况和进展[J].南方农业,2022,16(8): 166-169.
- WU KJ, WU SL, SU Y, CAI YH, YANG Y, GONG H, JIANG GM. General situation and progress of

- population distribution and food source research of forest musk deer[J]. South China Agriculture, 2022, 16(8): 166-169 (in Chinese).
- [9] 罗燕, 程建国, 李秋波, 陈三, 蔡永华, 贾炼, 赵翠. 麝沙门氏菌性化脓病的病原分离鉴定[J]. 中国兽医杂志, 2007, 43(2): 22-23.
- LUO Y, CHENG JG, LI QB, CHEN S, CAI YH, JIA L, ZHAO C. Isolation and identification of the pathogen of *Salmonella* musk deer purulent disease[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2007, 43(2): 22-23 (in Chinese).
- [10] 赵克雷, 李旭鑫, 帕哈尔定·帕拉哈提, 曾博, 张修月, 岳碧松. 圈养林麝脓肿病原菌分离鉴定及药敏分析[J]. 四川动物, 2011, 30(4): 522-526.
- ZHAO KL, LI XX, PALAHATI P, ZENG B, ZHANG XY, YUE BS. Isolation and identification on pathogens of musk deer abscess disease and antibiotic susceptibility assay[J]. Sichuan Journal of Zoology, 2011, 30(4): 522-526 (in Chinese).
- [11] 食品安全国家标准 食品微生物学检验 蜡样芽孢杆菌检验: GB 4789.14—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.
- National food safety standard-food microbiological examination-*Bacillus cereus*: GB 4789.14—2014[S]. Beijing: Standards Press of China, 2015 (in Chinese).
- [12] Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 26th Edition: CLSI M100-S26[S]. Clinical And Laboratory Standards Institute, 2019.
- [13] LEE I, OUK KIM Y, PARK SC, CHUN J. OrthoANI: an improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(2): 1100-1103.
- [14] CHEN CJ, CHEN H, ZHANG Y, THOMAS HR, FRANK MH, HE YH, XIA R. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. Molecular Plant, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [15] BIGGEL M, JESSBERGER N, KOVAC J, JOHLER S. Recent paradigm shifts in the perception of the role of *Bacillus thuringiensis* in foodborne disease[J]. Food Microbiology, 2022, 105: 104025.
- [16] CARROLL LM, CHENG RA, WIEDMANN M, KOVAC J. Keeping up with the *Bacillus cereus* group: taxonomy through the genomics era and beyond[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022, 62(28): 7677-7702.
- [17] LIU Y, DU J, LAI QL, ZENG RY, YE DZ, XU J, SHAO ZZ. Proposal of nine novel species of the *Bacillus cereus* group[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2017, 67(8): 2499-2508.
- [18] JAIN C, RODRIGUEZ-R LM, PHILLIPPY AM, KONSTANTINIDIS KT, ALURU S. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries[J]. Nature Communications, 2018, 9: 5114.
- [19] TORRES MANNO MA, REPISO GD, MAGNI C, DUNLAP CA, ESPARIZ M. The assessment of leading traits in the taxonomy of the *Bacillus cereus* group[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2020, 113(12): 2223-2242.
- [20] CARROLL LM, WIEDMANN M, KOVAC J. Proposal of a taxonomic nomenclature for the *Bacillus cereus* group which reconciles genomic definitions of bacterial species with clinical and industrial phenotypes[J]. mBio, 2020, 11(1): e00034-e00020.
- [21] RASKO DA, ALTHERR MR, HAN CS, RAVEL J. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2005, 29(2): 303-329.
- [22] ZHANG M, LIU J, YIN ZZ, ZHANG L. Phylogenetic and protein prediction analysis reveals the taxonomically diverse distribution of virulence factors in *Bacillus cereus* strains[J]. PLoS One, 2022, 17(5): e0262974.
- [23] EHLING-SCHULZ M, FRICKER M, GRALLERT H, RIECK P, WAGNER M, SCHERER S. Cereulide synthetase gene cluster from emetic *Bacillus cereus*: structure and location on a mega virulence plasmid related to *Bacillus anthracis* toxin plasmid pXO1[J]. BMC Microbiology, 2006, 6: 20.
- [24] MESSELHÄUSSER U, FRENZEL E, BLÖCHINGER C, ZUCKER R, KÄMPF P, EHLING-SCHULZ M. Emetic *Bacillus cereus* are more volatile than thought: recent foodborne outbreaks and prevalence studies in Bavaria (2007–2013)[J]. BioMed Research International, 2014, 2014: 465603.
- [25] TSCHIEDEL E, RATH PM, STEINMANN J, BECKER H, DIETRICH R, PAUL A, FELDERHOFF-MÜSER U, DOHNA-SCHWAKE C. Lifesaving liver transplantation for multi-organ failure caused by *Bacillus cereus* food poisoning[J]. Pediatric Transplantation, 2015, 19(1): 11-14.
- [26] 程俊. 一株溶血性蜡状芽孢杆菌 WH2015 全基因组测序分析及其溶血基因筛选[D]. 湛江: 广东海洋大学硕士学位论文, 2016.
- CHENG J. Genome analysis of a hemolytic *Bacillus*

- cereus* and screen its hemolysis genes[D]. Zhanjiang: Master's Thesis of Guangdong Ocean University, 2016 (in Chinese).
- [27] FOX D, MATHUR A, XUE YS, LIU YQ, TAN WH, FENG SY, PANDEY A, NGO C, HAYWARD JA, ATMOSUKARTO II, PRICE JD, JOHNSON MD, JESSBERGER N, ROBERTSON AAB, BURGIO G, TSCHARKE DC, FOX EM, LEYTON DL, KAAKOUSH NO, MÄRTLBAUER E, et al. *Bacillus cereus* non-haemolytic enterotoxin activates the NLRP3 inflammasome[J]. Nature Communications, 2020, 11: 760.
- [28] HARDY SP, LUND T, GRANUM PE. CytK toxin of *Bacillus cereus* forms pores in planar lipid bilayers and is cytotoxic to intestinal epithelia[J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 197(1): 47-51.
- [29] CHRISTIE MP, JOHNSTONE BA, TWETEN RK, PARKER MW, MORTON CJ. Cholesterol-dependent cytolysins: from water-soluble state to membrane pore[J]. Biophysical Reviews, 2018, 10(5): 1337-1348.
- [30] RAMARAO N, SANCHIS V. The pore-forming haemolysins of *Bacillus cereus*: a review[J]. Toxins, 2013, 5(6): 1119-1139.
- [31] BUSH K, JACOBY GA. Updated functional classification of β -lactamases[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2010, 54(3): 969-976.
- [32] CHEN YH, SUCCI J, TENOVER FC, KOEHLER TM. β -lactamase genes of the penicillin-susceptible *Bacillus anthracis* Sterne strain[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(3): 823-830.
- [33] PALZKILL T. Metallo- β -lactamase structure and function[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2013, 1277(1): 91-104.
- [34] TORKAR KG, BEDENIĆ B. Antimicrobial susceptibility and characterization of metallo- β -lactamases, extended-spectrum β -lactamases, and carbapenemases of *Bacillus cereus* isolates[J]. Microbial Pathogenesis, 2018, 118: 140-145.
- [35] JANA S, DEB JK. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 70(2): 140-150.
- [36] CHIOU CS, JONES AL. Expression and identification of the *strA-strB* gene pair from streptomycin-resistant *Erwinia amylovora*[J]. Gene, 1995, 152(1): 47-51.
- [37] ZHAO J, DANG H. Identification of a globally distributed clinical streptomycin-resistance plasmid and other resistance determinants in a coastal bay of China[J]. Letters in Applied Microbiology, 2011, 52(1): 1-8.
- [38] CANCHAYA C, FOURNOUS G, BRÜSSOW H. The impact of prophages on bacterial chromosomes[J]. Molecular Microbiology, 2004, 53(1): 9-18.