



一株自中国大鲵的副炭疽芽孢杆菌分离和鉴定

袁璐^{1,2#}, 张晓妍^{1#}, 吕宇飞², 郭艳², 陈杰^{1,2}, 汪立平¹, 王恒樑^{1,2}, 王东澍^{2*}, 刘先凯^{2*}

1 上海海洋大学食品学院, 上海 201306

2 军事科学院军事医学研究院生物工程研究所, 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071

袁璐, 张晓妍, 吕宇飞, 郭艳, 陈杰, 汪立平, 王恒樑, 王东澍, 刘先凯. 一株自中国大鲵的副炭疽芽孢杆菌分离和鉴定. 微生物学报, 2022, 62(9): 3613–3630.

Yuan Lu, Zhang Xiaoyan, Lyu Yufei, Guo Yan, Chen Jie, Wang Liping, Wang Hengliang, Wang Dongshu, Liu Xiankai. Isolation and identification of a *Bacillus paranthracis* strain from Chinese giant salamander. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(9): 3613–3630.

摘要:【目的】对陕西某大鲵养殖场患病的中国大鲵腹水中分离培养得到的一株蜡样芽孢杆菌群细菌疑似菌株进行鉴定, 明确该菌生长特性和种类。【方法】无菌解剖患病大鲵, 取肠道、腹水、皮肤等各部位的样品均质稀释并分离纯化, 从腹水中获得疑似蜡样芽孢杆菌群细菌的纯菌株, 命名为 SHOU-BC01。对该菌株进行形态与染色特性、培养与生化特性、生物膜形成能力、芽孢形成、药敏检测、全基因组测序等试验鉴定, 并根据测序结果进行平均核苷酸相似度(average nucleotide identity, ANI)、数字 DNA-DNA 杂交(digital DNA-DNA hybridization, dDDH)、多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)、全基因组 SNP 聚类 and 毒力因子分析。【结果】菌株 SHOU-BC01 为革兰氏阳性杆菌, 表面粗糙; 具有蛋白酶、卵磷脂酶和溶血酶活性; 能够发酵 L-阿拉伯糖、D-核糖、D-木糖等多种糖类, 能利用色氨酸、丙酮酸盐等; 有较强生物膜形成能力; 120 h 的芽孢形成率达到 70.60%; 该菌株对青霉素 G、头孢噻吩、万古霉素等 15 种抗生素耐药, 对哌拉西林、头孢唑啉、庆大霉素等 25 种抗生素敏感; 根据生物学特性结合 ANI、dDDH 及全基因组 SNP 聚类分析, 鉴定菌株 SHOU-BC01 为副炭疽芽孢杆菌(*Bacillus paranthracis*), 经 MLST 分型, 该菌株属于 ST205 序列型; 该菌株含有鞘磷脂酶、CytK 和 NheC 毒素、多糖荚膜、PlcR-PapR 群感效

基金项目: 国家自然科学基金(81871619, 82102412)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81871619, 82102412)

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. Tel: +86-10-66948835; E-mail: WANG Dongshu, wangdongshu@foxmail.com, LIU Xiankai, liuxk007@163.com

Received: 27 January 2022; Revised: 7 March 2022; Published online: 30 May 2022

应系统及VII型分泌系统等毒力因子。【结论】成功从中国大鲵腹水中分离出副炭疽芽孢杆菌，丰富了大鲵副炭疽芽孢杆菌数据。

关键词： 中国大鲵；副炭疽芽孢杆菌；分离；鉴定

Isolation and identification of a *Bacillus paranthracis* strain from Chinese giant salamander

YUAN Lu^{1,2#}, ZHANG Xiaoyan^{1#}, LYU Yufei², GUO Yan², CHEN Jie^{1,2}, WANG Liping¹, WANG Hengliang^{1,2}, WANG Dongshu^{2*}, LIU Xiankai^{2*}

1 College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

2 State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100071, China

Abstract: [Objective] A bacterial strain likely affiliated with the *Bacillus cereus* group was isolated from the ascites of Chinese giant salamander from a giant salamander farm in Shaanxi Province and was investigated for the biological characteristics. [Methods] The diseased giant salamander was aseptically dissected, and the samples taken from intestine, ascites, skin and other parts were homogeneously diluted, separated and purified. A pure strain of suspected *B. cereus* group bacteria was obtained from the ascites, which was named SHOU-BC01. The strain was identified for morphological and staining characteristics, culture and biochemical characteristics, biofilm formation ability, spore formation, drug susceptibility, and whole genome sequencing. Based on the sequencing results, average nucleotide identity (ANI), digital DNA-DNA hybridization (dDDH), multilocus sequence typing (MLST), whole-genome SNP based clustering and virulence factor analysis were performed. [Results] Strain SHOU-BC01 is a Gram-positive bacillus with rough surface, with protease, lecithinase and fibrinolysin activities. It can ferment L-arabinose, D-ribose, D-xylose and other carbohydrates, and can utilize tryptophan and pyruvate, with strong biofilm formation ability. Its spore formation rate reached 70.60% in 120 h. The strain was resistant to 15 antibiotics including penicillin G, cephalothin and vancomycin, and sensitive to 25 antibiotics including piperacillin, cefazolin and gentamicin. According to biological characteristics combined with ANI, dDDH and whole-genome SNP based clustering analysis, strain SHOU-BC01 was identified as *B. paranthracis*, and the MLST typing showed that the strain belonged to ST205 sequence type. It contains virulence factors such as sphingomyelinase, CytK and NheC toxin genes, polysaccharide capsular, PlcR-PapR quorum-sensing system and type VII secretion system. [Conclusion] *B. paranthracis* was successfully isolated from the ascites of Chinese giant salamander, which enriched the data of *B. paranthracis*.

Keywords: Chinese giant salamander; *Bacillus paranthracis*; isolation; identification

中国大鲵(*Andrias davidianus*)俗称娃娃鱼，是中国特有的一种珍贵两栖动物，被列为国家二级重点保护野生动物^[1]。中国大鲵不仅在观

赏和科研等方面有着重大价值，而且具有极高药用和营养价值。随着野生中国大鲵急剧减少，人工大鲵养殖增多，在养殖过程中经常出现各

种疾病^[2-3]。

蜡样芽孢杆菌群(*Bacillus cereus* group)是芽孢杆菌属的一个分支, 包括多个芽孢杆菌的种, 其基因组序列及生物学特性非常相似。其中研究最多的分别是炭疽芽孢杆菌(人畜共患炭疽病的病原菌)、蜡样芽孢杆菌(人腹泻病的病原菌)和苏云金芽孢杆菌(昆虫病的病原菌)^[4-5]。Yang 等发现蜡样芽孢杆菌群的 9 个新种, 将蜡样芽孢杆菌群包含的近缘种从原来的 12 个扩增到 21 个, 并首次报道了副炭疽芽孢杆菌(*Bacillus paranthracis*)^[5]。之后, 在人类粪便^[6]、埃博拉病毒(EVD)病例的血液^[7]、书页表面^[8]、糠床(nukadoko)^[9]等样本中发现副炭疽芽孢杆菌, 但其生物学特性的研究很少。目前, 副炭疽芽孢杆菌被确定为条件致病病原菌和引起人类腹泻的原因之一^[8]。本实验室前期研究中, 从食物中毒死亡病人的食物残渣中分离到一株高毒力副炭疽芽孢杆菌 BC307, 序列分型为 ST26, 能够产呕吐毒素, 对人和动物具有强致病性。这表明对副炭疽芽孢杆菌的生长需求、生物学功能、芽孢形成、耐药性、毒力基因分布等特征进行研究非常必要, 为分析副炭疽芽孢杆菌致病机制和寻找合适的治疗药物奠定重要基础。

贺胜英等从患病大鲵体分离出一株蜡样芽孢杆菌, 这是唯一报道在大鲵体发现蜡样芽孢杆菌群细菌的文献^[10]。本实验首次从大鲵体分离并鉴定出副炭疽芽孢杆菌, 对其进行形态与生化特性、生物膜形成能力、芽孢形成、药敏检测、全基因组测序等试验鉴定, 并根据测序结果进行平均核苷酸相似度(average nucleotide identity, ANI)、数字 DNA-DNA 杂交(digital DNA-DNA hybridization, dDDH)、多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)、全基因组 SNP 聚类 and 毒力因子分析, 丰富并完善了副炭疽芽孢杆菌生物学数据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 病料采集

从陕西某中国大鲵人工养殖场, 采集病死大鲵于-20 °C 冷冻带回实验室。

1.1.2 主要试剂与培养基

酵母提取物、蛋白胨, 哥伦比亚血琼脂平板(Columbia Blood Agar Plate), 购自 OXOID 公司; NaCl, 购自广东西陇科学股份有限公司; 琼脂粉、脱脂奶粉、革兰氏染色试剂盒, 购自北京索莱宝公司; TSB 培养基、DifcoTM Nutrient Broth, 购自 BD 公司; 甘露醇卵黄多粘菌素琼脂(MYP)平板, 购自青岛海博生物技术有限公司; 药敏纸片, 购自北京天坛药物生物技术开发公司; API 生理生化鉴定试剂盒, 购自梅里埃生物公司; Wizard DNA 提取试剂盒, 购自 Promega 公司。

LB 琼脂培养基(g/L): 蛋白胨 10、NaCl 10、酵母粉提取物 5、琼脂粉 15, 121 °C 灭菌 20 min。

牛奶琼脂培养基: LB 琼脂培养基(121 °C 灭菌 20 min)添加脱脂奶粉 10 g/L (115 °C 灭菌 15 min), 二者分别高压灭菌, 使用前混合后倒平板。

DSM 液体培养基(g/L): 营养肉汤(DifcoTM Nutrient Broth) 8, KCl 1, MgSO₄·7H₂O 0.25, 琼脂粉 15, 121 °C 灭菌 20 min, 用时添加过滤除菌的 5×10⁻⁴ mol/L CaCl₂, 0.002 g/L MnCl₂·4H₂O, 1×10⁻⁶ mol/L FeSO₄。

1.1.3 试验仪器

生物安全柜, 购自 ESCO 公司; 恒温培养箱, 购自上海跃进医疗器械厂; 恒温振荡培养箱, 购自成都一科设备有限公司; Naono Drop 微量分光光度计, 购自 Thermo Scientific 公司; 光学显微镜, 购自北京中晟天成科技公司; 核酸电泳仪, Infinite F50 酶标仪, 购自 Tecan 公司。

1.2 菌株分离培养

无菌解剖大鲵的各个部位,取肠道、腹水、脚部、肝脏的样各 2 g,用 18 mL 无菌生理盐水均质样品,并按 10 倍梯度递增稀释至 10^{-6} 。吸取每个样品的各个梯度稀释液 100 μL ,涂布至 LB 琼脂培养基上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,进行单菌落划线分离培养^[11]。挑选出疑似蜡样芽孢杆菌群细菌菌落保存起来,命名为 SHOU-BC01。

1.3 形态与染色特性

挑取 SHOU-BC01 单菌落,划线接种于 LB 琼脂培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,观察菌落形态、颜色、外观等;挑取菌落制片,进行革兰氏染色,用光学显微镜观察其染色情况和菌体形态^[12]。

1.4 培养与生化特性

蛋白酶活性鉴定:吸取 5 μL 菌液接种于牛奶琼脂培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,观察菌落周围透明环形成情况^[13];溶血活性鉴定:挑取菌落划线于哥伦比亚血琼脂平板,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,观察菌落周围溶血环形成情况^[14];卵磷脂酶活性鉴定:挑取菌落划线于 MYP 平板,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,观察菌落的颜色及周围沉淀环形成情况^[15]。

利用梅里埃 API 50CHB 试剂条和 API 20E 试剂条对菌株 SHOU-BC01 进行糖代谢评价和氨基酸利用谱分析。

1.5 生物膜形成能力分析

采用结晶紫染色法测定生物膜形成能力,将培养至 T_3 时期(对数期与稳定期拐点设置为 T_0 ,之后第 3 个小时为 T_3)的 SHOU-BC01 菌液用无菌 TSB 培养基稀释至 $OD_{595}=0.05$;将稀释好的菌液加入细胞培养 12 孔板中,每孔 2 mL,每组 3 个重复,TSB 培养基作为空白对照,37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 24 h;移液枪轻轻吸弃悬浮的菌液,用 2 mL 蒸馏水洗涤 3 次;加入 2 mL 95%甲醇固定 10 min,吸弃甲醇,清洗并烘干;加入 2 mL 0.1%结晶紫染液染色 10 min,用 2 mL 蒸馏水洗

涤 3 次并烘干;加入 2 mL 95%乙醇脱色 10 min,充分溶解结晶紫;将溶解后的样品稀释适当倍数转移至 96 孔板中,每个样品设 3 个复孔,每孔 200 μL ,测定样品及空白对照孔的 OD_{595} 值。测定生物膜 OD_{595} 值并以空白对照组 OD_{595} 值进行校正。 OD_{595} 值 <0.2 为非成膜株,在 0.2–0.4 为弱成膜株, >0.4 为强成膜株^[16–17]。

1.6 芽孢形成率分析

挑取 SHOU-BC01 单菌落接种于 LB 液体培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养 13 h,并传代 1 次培养至 T_3 时期;按 1%接种量转接至 50 mL DSM 液体培养基,30 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养。在 12 h 时吸取 1 mL 菌液,取其中的 100 μL 用梯度稀释计数法获得总菌量 N ;分别在 48 h 和 120 h 时吸取 1 mL 菌液,在 70 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 灭活繁殖体后,用梯度稀释计数法获得总菌量 n_1 和 n_2 ,则芽孢形成率为 $n/N \times 100\%$ 。进行 3 次生物学重复实验并采用软件 GraphPad Prism 7.0 绘制芽孢形成率柱形图^[18]。

1.7 药敏试验

采用 K-B 纸片法测定菌株 SHOU-BC01 的药物敏感性^[19]。挑取 SHOU-BC01 单菌落接种于 5 mL LB 液体培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养至 T_3 时期;将菌悬液 OD_{595} 值调整至 0.3,吸取 500 μL 均匀涂布在 LB 琼脂培养基上;待菌液晾干后,贴上药敏纸片,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h,观察抑菌圈大小并记录。

1.8 全基因组提取及测序

挑取 SHOU-BC01 单菌落接种于 LB 液体培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养至对数期。收集菌体,采用 Wizard DNA 提取试剂盒提取 DNA,利用 1.5%琼脂糖凝胶电泳和 Nano Drop 微量分光光度计(OD_{260})对提取的 DNA 样品质量进行检验,将合格的 DNA 样品送武汉菲沙基因信息有限公司进行全基因组测序。

表 1 菌株 SHOU-BC01 的糖代谢结果

Table 1 Sugar metabolism results of strain SHOU-BC01

Number	Substrates	Results	Number	Substrates	Results
0	Negative control	-	25	Esculin/ferric citrate	+
1	Glycerol	+	26	D-salicin	-
2	Erythritol	-	27	Cellobiose	+
3	D-arabinose	-	28	D-maltose	+
4	L-arabinose	+	29	D-lactose	-
5	D-ribose	+	30	D-melibiose	+
6	D-xylose	+	31	D-saccharose	-
7	L-xylose	-	32	D-trehalose dihydrate	+
8	D-ribitol	-	33	Inulin	-
9	Methyl- β -D-xylopyranoside	-	34	D-melezitose	-
10	D-galactose	+	35	D-raffinose	-
11	D-glucose	+	36	Amylum	-
12	D-fructose	+	37	Glycogen	-
13	D-mannose	+	38	Xylitol	-
14	L-sorbose	-	39	D-gentiobiose	-
15	L-rhamnose	-	40	D-toulon sugar	-
16	Dulcitol	-	41	D-(-)-lyxose	+
17	Inositol	-	42	D-(-)-tagatose	-
18	D-mannitol	-	43	D-fucose	+
19	Sorbitol	-	44	L-fucose	-
20	Methyl- α -D-mannopyranoside	-	45	D-arabinitol	-
21	Methyl- α -D-glucoopyranoside	-	46	L-arabinitol	-
22	N-acetyl glucosamine	-	47	Potassium gluconate	-
23	Amygdalin	-	48	2-ketogluconate	-
24	Arbutin	-	49	5-ketogluconate	-

+: positive reaction; -: negative reaction.

1.9 全基因组测序分析

采用三代测序(PacBio sequel II)和二代测序(Illumina NovaSeq 6000)相结合的方式对 SHOU-BC01 全基因组进行测序。然后采用 HGAP4 和 Canu (v.1.6)对三代测序数据进行拼接, 运用 Pilon-1.22 软件使用二代测序数据对三代拼接数据进行校正和清洗, 最终获得基因组序列数据, 上传到 NCBI (National Center for Biotechnology Information)数据库, 采用基因组标准注释流程进行基因组注释。

目前平均核苷酸相似度(average nucleotide identity, ANI)和数字 DNA-DNA 杂交(digital DNA-DNA hybridization, dDDH)使用最广泛^[20]。本研究使用 FastANI-V1.3 本地分析 ANI^[5,21-22];

在线(<https://ggdc.dsmz.de/ggdc.php>)进行 dDDH 分析^[23-25]; 采用 7 个看家基因(*glp*、*gmk*、*ilv*、*pta*、*pur*、*pyc*、*tpi*)进行 MLST 分型^[26]; 采用 Parsnp-V1.2 在 Linux 系统下进行全基因组 SNP 聚类分析; 采用毒力因子数据库(the virulence factors database, VFDB)在线(<http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>)分析菌株 SHOU-BC01 的毒力因子^[27]。

2 结果与分析

2.1 病死大鲵症状及菌株分离情况

大鲵死亡时, 腹部肿胀, 皮肤表面有溃疡, 解剖后发现腹腔内有大量积水, 内脏有病变、肿胀(图 1)。腹腔积水均质物稀释涂布的 LB 琼

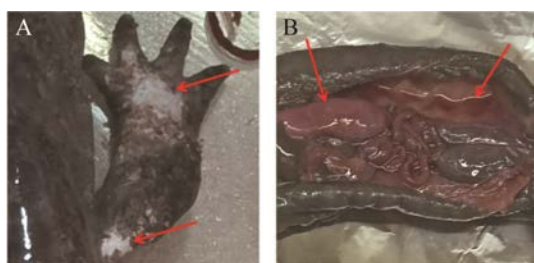


图 1 病死大鲵症状

Figure 1 Symptoms of dead Chinese giant salamander. A: epidermal ulcers, exfoliation; B: a lot of ascites, lesions in the internal organs.

脂培养基, 培养 24 h 后有较均一的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, 分离株命名为 SHOU-BC01。

2.2 形态及染色特性

菌株 SHOU-BC01 在 LB 琼脂培养基上 37 °C 培养 24 h 后的菌落呈灰白色、较大、不透明、表面扁平、较粗糙、可形成圆形或近似圆形单菌落(图 2A); SHOU-BC01 的革兰氏染色为紫色, 属于革兰氏阳性杆菌, 呈链状排列或散列, 菌体两端较平整(图 2B)。

2.3 培养及生化特性

菌株 SHOU-BC01 在哥伦比亚血平板上 37 °C 培养 24 h 后形成完全溶血环(图 3A), 表示该菌株具有溶血酶活性。菌株 SHOU-BC01

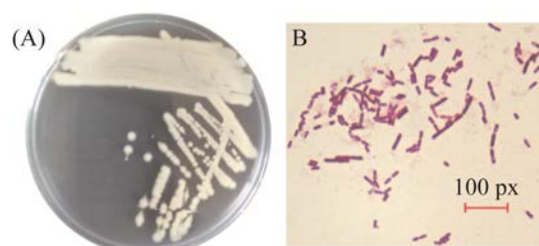


图 2 SHOU-BC01 的形态特征

Figure 2 The morphology of SHOU-BC01. A: SHOU-BC01 cultured on LB agar plate; B: Gram staining of SHOU-BC01 strain. Optical microscope, 100 pixels.

在 MYP 琼脂平板上 37 °C 培养 24 h 后菌落呈现粉红色(图 3B), 表示该菌株不发酵甘露醇; 菌落周围环绕粉红色沉淀环(图 3B), 表示该菌株有卵磷脂酶产生, 可分解卵磷脂。菌株 SHOU-BC01 在牛奶琼脂平板上 37 °C 培养 24 h 后形成透明溶解环(图 3C), 表示该菌株具有蛋白酶活性。

利用梅里埃 API 50CHB 试剂条对菌株 SHOU-BC01 进行糖代谢评价, 从 LB 琼脂培养基上刮取新鲜菌体制成高浓度菌悬液, 加入 0.85% NaCl (5 mL) 中制备成 2 Mcforland (麦氏比浊度) 的菌悬液, 按照说明书将菌悬液和试剂接种于 50 个测定管, 37 °C 孵育, 分别在 24 h 和 48 h 时观察试纸条颜色变化并拍照记录(图 4A)。

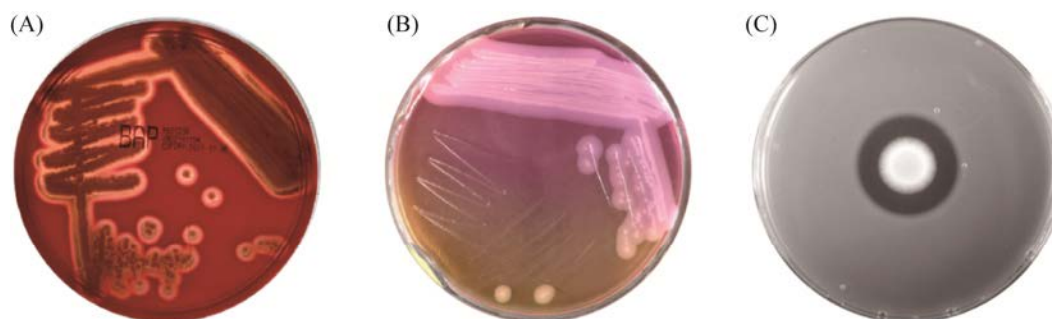


图 3 SHOU-BC01 的生物学功能

Figure 3 The biological function of SHOU-BC01. A: SHOU-BC01 cultured on Columbia blood agar plate; B: SHOU-BC01 cultured on MYP plate; C: SHOU-BC01 cultured on milk agar plate.

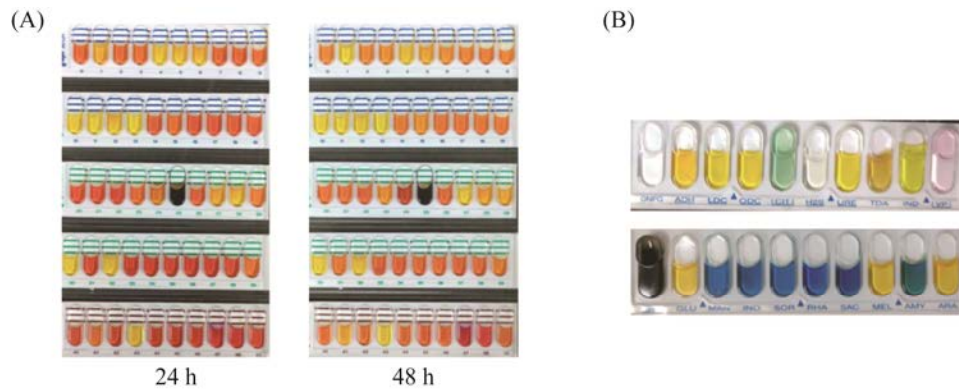


图 4 利用 API 试剂盒分析菌株 SHOU-BC01 的糖代谢和氨基酸利用谱

Figure 4 Analysis of sugar metabolism and amino acid utilization spectrum of strain SHOU-BC01 using API Kit. A: API50CHB test strip for analyzing sugar metabolism, photographed results 24 h and 48 h after inoculation with SHOU-BC01; B: API20E test strip for analyzing amino acid utilization spectrum, and the photographic results 12 h after inoculation with SHOU-BC01.

结果显示, 在测定的 49 种底物中该菌能发酵丙三醇、L-阿拉伯糖、D-核糖、D-木糖、D-半乳糖、D-葡萄糖、D-果糖、D-甘露糖、七叶灵/柠檬酸铁、D-纤维二糖、D-麦芽糖、D-密二糖、D-海藻糖、D-来苏糖、D-岩藻糖等(表 1)。

利用梅里埃 API 20E 试纸条检测菌株 SHOU-BC01 的氨基酸利用谱, 从 LB 琼脂培养基上挑取单克隆至 5 mL 0.85% NaCl 中, 重悬至菌悬液均一, 按照说明书将菌悬液和试剂接种于 20 个测定管, 37 °C 孵育 12 h, 观察变化并拍照记录(图 4B)。结果显示, 在测定的 20 种底物

中该菌能利用色氨酸(表明该菌有色氨酸脱氢酶活性)、丙酮酸盐、明胶; 能够发酵葡萄糖、密二糖、阿拉伯糖, 与糖代谢结果一致(表 2)。

菌株 SHOU-BC01 的培养及生化特性符合蜡样芽孢杆菌群细菌特性, 与文献中副炭疽芽孢杆菌鉴定结果相似^[5,7]。

2.4 生物膜形成能力

利用结晶紫染色法测定菌株 SHOU-BC01 的生物膜形成能力(图 5), 经计算得出 OD_{595} 为 1.43 (>0.4), 表明 SHOU-BC01 为强成膜株; 在其固-液处形成生物膜, 如箭头处所示(图 5B)。

表 2 菌株 SHOU-BC01 的氨基酸利用谱

Table 2 Amino acid utilization spectrum of strain SHOU-BC01

Codes	Substrates	Results	Codes	Substrates	Results
NOPG	2-nitrophenyl β -D-galactopyranoside	-	GEL	Gelatin	+
ADH	Arginine	-	GLU	Glucose	+
LDC	Lysine	-	MAN	Mannitol	-
ODC	Ornithine	-	INO	Inositol	-
CIT	Trisodium citrate dihydrate	-	SOR	Sorbitol	-
H2S	Sodium thiosulfate	-	RHA	L-rhamnose	-
URE	Urea	-	SAC	Sucrose	-
TDA	Tryptophan (0.38 mg/cup)	+	MEL	Melibiose	+
IND	Tryptophan (0.19 mg/cup)	-	AMY	Amygdalin	-
VP	Pyruvate	+	ARA	Arabinose	+

+: positive reaction; -: negative reaction.

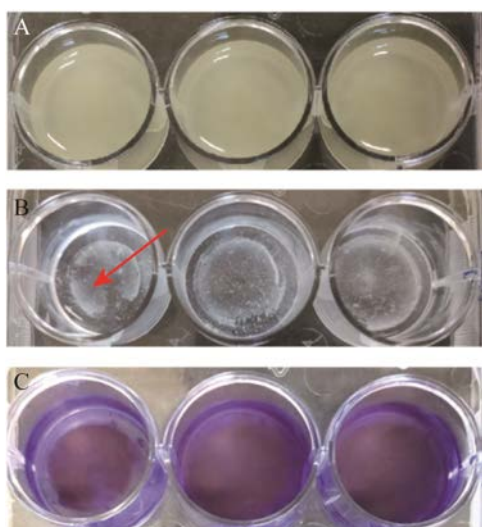


图 5 SHOU-BC01 的生物膜形成能力

Figure 5 The biofilm-forming ability of SHOU-BC01. A: biofilm formation of SHOU-BC01 in TSB medium; B: adherent biofilm after aspirating the bacterial suspension; C: crystal violet stained biofilm of SHOU-BC01 in TSB medium.

2.5 芽孢形成率分析

利用 DSM 液体培养基培养菌株 SHOU-BC01 120 h, 取 12 h 的菌液稀释涂板计数得到总菌量 $N=3.48 \times 10^8$ CFU, 分别取 48 h 和 120 h 的菌液灭活稀释涂板计数得到总菌量 $n_1=3.16 \times 10^7$ CFU 和 $n_2=2.44 \times 10^8$ CFU, 经计算得到 48 h 和 120 h 的芽孢形成率分别为 9.07% 和 70.60% (图 6A)。用 5%孔雀石绿和番红 O 染液分别对 12、48、120 h 的菌液进行染色。光学显微镜下观察发现, 菌株 SHOU-BC01 培养 12 h 后尚没有芽孢形成, 培养 48 h 后有少许芽孢形成, 当培养至 120 h 后芽孢形成量明显增多(图 6B), 与芽孢形成率结果一致。

2.6 药敏鉴定

采用 K-B 纸片法测定菌株 SHOU-BC01 的药物敏感性, 在实验的 49 种抗生素中, 菌株 SHOU-BC01 对青霉素 G、氨苄西林、羧苄西林、阿莫西林/克拉维酸、阿莫西林、头孢噻吩、头

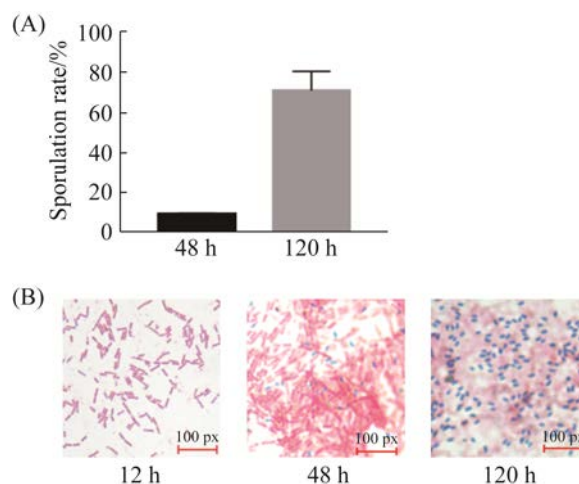


图 6 芽孢形成率的测定

Figure 6 Determination of sporulation rate. A: sporulation rate of SHOU-BC01 cultured in DSM for 48 h and 120 h. Values shown are means “+” standard deviations (SDs) of three biological replicates of sporulation rates, SDs calculates the dispersion of the three sporulation rates values from the arithmetic mean; B: strain SHOU-BC01 cultures (12, 48, 120 h) were stained with 5% malachite green and safranin O. Spores and vegetative cells are stained green and red, respectively. Optical microscope, 100 pixels.

孢他啶、头孢呋辛钠、万古霉素、去甲万古霉素、磺胺、利福平、多粘菌素 B、杆菌肽、利特灵等 15 种抗生素耐药(表 3); 菌株 SHOU-BC01 对哌拉西林/他唑巴坦、哌拉西林、阿洛西林、头孢唑林、头孢拉定、链霉素、庆大霉素、阿米卡星、卡那霉素、奈替米星、妥布霉素、小诺霉素、多西环素、环丙沙星、左氧氟沙星、依诺沙星、洛美沙星、诺氟沙星、氧氟沙星、培氟沙星、红霉素、克拉霉素、麦迪霉素、克林霉素、氯霉素等 25 种抗生素敏感(表 3)。

2.7 全基因组测序及分析

2.7.1 基因组提取

提取的基因组样品完整性较好(图 7), 可送公司进行全基因组测序。

表 3 药敏实验结果

Table 3 Antibiotic susceptibility test results

Antibiotics	Antibiotics content/tablets	Diameter of antibacterial circle/mm	Antibiotic resistance
Peillin G	10 IU	12	R
Ampicillin	10 µg	11	R
Carbenicillin	100 µg	12	R
Piperacillin/tazobactam	100/10 µg	21	S
Piperacillin	100 µg	18	S
Azlocillin	75 µg	22	S
Oxacillin	1 µg	11	I
Amoxicillin/clavulanic acid	20/10 µg	15	R
Amoxicillin	10 µg	13	R
Cefazolin	30 µg	20	S
Cephalothin	30 µg	14	R
Cefoperazone	75 µg	20	I
Ceftriaxone sodium	30 µg	14	I
Ceftazidime	30 µg	13	R
Cefradine	30 µg	23	S
Cefuroxime sodium	30 µg	12	R
Streptomycin	10 µg	15	S
Gentamicin	10µg	19	S
Amikacin	30 µg	18	S
Kanamycin	30 µg	19	S
Netilmicin	30 µg	20	S
Tobramycin	10 µg	15	S
Micronomicin sulfate	10 µg	18	S
Tetracycline	30 µg	17	I
Doxycycline	30 µg	20	S
Minocycline	30 µg	15	I
Ciprofloxacin	5 µg	24	S
Levofloxacin	5 µg	25	S
Enoxacin	10 µg	20	S
Lomefloxacin	10 µg	22	S
Norfloxacin	10 µg	23	S
Ofloxacin	5 µg	22	S
Fleroxacin	5 µg	17	I
Pefloxacin	10 µg	18	S
Erythromycin	15 µg	25	S
Roxithromycin	15 µg	24	I
Azithromycin	15 µg	14	I
Klaricid	15 µg	20	S
Josamycin	15 µg	19	I
Aboren	15 µg	20	S
Vancomycin	30 µg	14	R
Norvancomycin	30 µg	14	R
Sulfanilamide	300 µg	7	R
Clindamycin	2 µg	21	S
Rifampin	5 µg	13	R
Polymyxin B	300 IU	8	R
Chloramphenicol	30 µg	23	S
Bacitracin	0.04 IU	7	R
Furazolidone	300 µg	13	R

R: resistant; I: intermediary; S: susceptible.

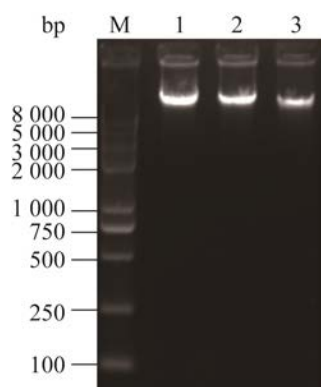


图 7 SHOU-BC01 基因组提取电泳示意图

Figure 7 Schematic diagram of SHOU-BC01 genome extraction electrophoresis. M: marker; lanes 1, 2 and 3 are SHOU-BC01.

2.7.2 全基因组测序及分析

(1) 基因组基本信息: 基因组测序获得基因组序列数据, 结果显示菌株 SHOU-BC01 的基因组包含一条环状染色体(5 170 206 bp)和一个环状质粒(6 042 bp)。拼接结果显示染色体和质粒的测序深度(覆盖倍数)都为 1 743 倍。数据上传 NCBI 数据库, 获得序列登录号 CP089743 和 CP089744。采用网站上的标准原核微生物基因组标准注释流程进行基因组注释, 基因组具体信息见表 4。

(2) ANI 和 dDDH 分析: 使用 FastANI-V1.3 本地分析 ANI; 在线分析 dDDH (<https://ggdc.dsmz.de/ggdc.php>)。一般情况下 ANI 值大于 95%或

dDDH 值大于 70%可以确定为一个种。根据我们分离菌株的生物学特性, 初步确定该菌株可能为蜡样芽孢杆菌群细菌, 我们分别选取炭疽芽孢杆菌(10 株)、蜡样芽孢杆菌(10 株)、苏云金芽孢杆菌(10 株)和副炭疽芽孢杆菌(30 株)进行比较分析。结果显示, 从基因组相似性上看, 我们分离的这个菌株为副炭疽芽孢杆菌(*B. paranthracis*), 见表 5。(菌株 SHOU-BC01 已经交于中国医学细菌保藏管理中心(CMCC)保存, 保藏号为 CMCC63613)

(3) MLST 分析: 采用 7 个看家基因(*glp*、*gmk*、*ilv*、*pta*、*pur*、*pyc*、*tpi*)进行 MLST 分析, 结果显示该菌株为 ST205 型, 与 parBA-C21 为相同的序列型, 目前无法获得该菌株的详细信息, 其他参与分析的 28 株副炭疽芽孢杆菌中有 13 株菌是 ST26 型, 其余的副炭疽芽孢杆菌菌株都具有不同的 ST 型。把 7 个序列串联起来, 使用 MEGA 10 软件进行聚类分析, 构建最小进化树, 在线(<https://itol.embl.de/>)进行树图编辑。从 MLST 聚类树的结构上看, 本次分离的菌株与副炭疽芽孢杆菌具有最近的进化关系, 且大部分副炭疽芽孢杆菌菌株聚类到相同的分支, 因而 MLST 方法可以用于副炭疽芽孢杆菌的爆发调查(图 8)。

对从 NCBI 下载的全部 240 株炭疽芽孢杆菌(*B. anthracis*, BA)、1 118 株蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*, BC)、622 株苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*, BT)和 31 株副炭疽芽孢杆菌(*B. paranthracis*, parBA)的全基因组进行 MLST 分析, 对能够分型菌株的 ST 型进行统计, 结果如表 6。BA、BC、BT 和 parBA 分别有 231、714、542 和 28 株菌获得了 MLST 分型, 其中 BA 分布在 ST1-3、ST933、ST2004-2007 共 8 个 ST 型中, 这几个序列型中没有 BC、BT 和 parBA 菌株的分布, 这说明 BA 具有独享的 ST 型; ST1、

表 4 SHOU-BC01 基因组基本信息

Table 4 Basic information of SHOU-BC01 genome

Feature	Chromosome (CP089743)	pXO1 (CP089744)
Size/bp	5 170 206	6 042
GC content/%	35.53	33.66
Total number of genes	5 325	8
5S rRNA	14	0
16S rRNA	14	0
23S rRNA	14	0
tRNAs	104	0

表 5 SHOU-BC01 与近缘菌株 ANI 和 dDDH 比较分析的结果

Table 5 The results of comparative analysis of SHOU-BC01 and related strains “ANI and dDDH”

Query genome	Reference genome	ANI value/%	dDDH/%
CP089743	CP089743	100.00	100.00
CP089743	BA01-AmesAncestor	95.46	62.30
CP089743	BA02-Ames	95.47	62.40
CP089743	BA03-Sterne	95.46	62.30
CP089743	BA04-CDC684	95.43	62.30
CP089743	BA05-A0248	95.48	62.30
CP089743	BA06-H9401	95.45	62.30
CP089743	BA07-BF1	95.47	62.40
CP089743	BA08-A16R	95.45	62.30
CP089743	BA09-A16	95.46	62.30
CP089743	BA10-CZC5	95.46	62.30
CP089743	BC01-ATCC14579	91.90	45.30
CP089743	BC02-ATCC10987	95.96	66.00
CP089743	BC03-E33L	95.76	64.00
CP089743	BC04-Q1	97.91	80.70
CP089743	BC05-B4264	91.83	45.40
CP089743	BC06-AH187	97.74	79.30
CP089743	BC07-G9842	91.56	44.30
CP089743	BC08-AH820	95.51	62.30
CP089743	BC09-03BB102	95.29	61.30
CP089743	BC10-CI	95.61	63.30
CP089743	BT01-97-27	95.61	62.80
CP089743	BT02-AI-Hakam	95.30	61.40
CP089743	BT03-BMB171	91.95	45.40
CP089743	BT04-CT43	91.69	44.70
CP089743	BT05-HD771	91.54	44.30
CP089743	BT06-HD789	91.55	44.30
CP089743	BT07-MC28	90.85	42.70
CP089743	BT08-407	91.71	44.70
CP089743	BT09-HD73	91.64	45.00
CP089743	BT10-IS5056	91.72	44.70
CP089743	parBA01-TypeStrain	97.21	80.10
CP089743	parBA02-MN1F	97.71	79.30
CP089743	parBA03-CFSAN068816	97.69	79.10
CP089743	parBA04-PR1	96.64	70.80
CP089743	parBA05-BC307	97.72	78.90
CP089743	parBA06-Mn5	98.51	85.80
CP089743	parBA07-MGYG-HGUT02283	98.85	89.50
CP089743	parBA08-16-0193	98.57	86.10
CP089743	parBA09-44088	99.04	92.10
CP089743	parBA10-44107	99.01	91.90
CP089743	parBA11-DE0086	97.87	80.70
CP089743	parBA12-EFR4	97.67	78.70
CP089743	parBA13-C21	99.17	92.60

(待续)

(续表 5)

CP089743	parBA14-43863	97.67	78.90
CP089743	parBA15-ELWA3-3298	97.75	79.50
CP089743	parBA16-43858	98.51	86.10
CP089743	parBA17-M2	97.70	78.90
CP089743	parBA18-DE0088	97.68	78.70
CP089743	parBA19-43921	97.61	78.70
CP089743	parBA20-43848	97.84	80.40
CP089743	parBA21-16-00174	97.66	79.00
CP089743	parBA22-43909	97.65	78.80
CP089743	parBA23-16-00176	97.66	79.10
CP089743	parBA24-ICIS279	97.77	79.50
CP089743	parBA25-16-00221	98.48	86.80
CP089743	parBA26-43889	97.68	78.90
CP089743	parBA27-NCCP15910	98.78	88.30
CP089743	parBA28-MHSD3	97.92	80.80
CP089743	parBA29-A2	97.69	79.10
CP089743	parBA30-NEU1062	96.44	70.40

B. anthracis begins with “BA”; *B. cereus* begins with “BC”; *B. thuringiensis* begins with “BT”; *B. paranthracis* begins with “parBA”.

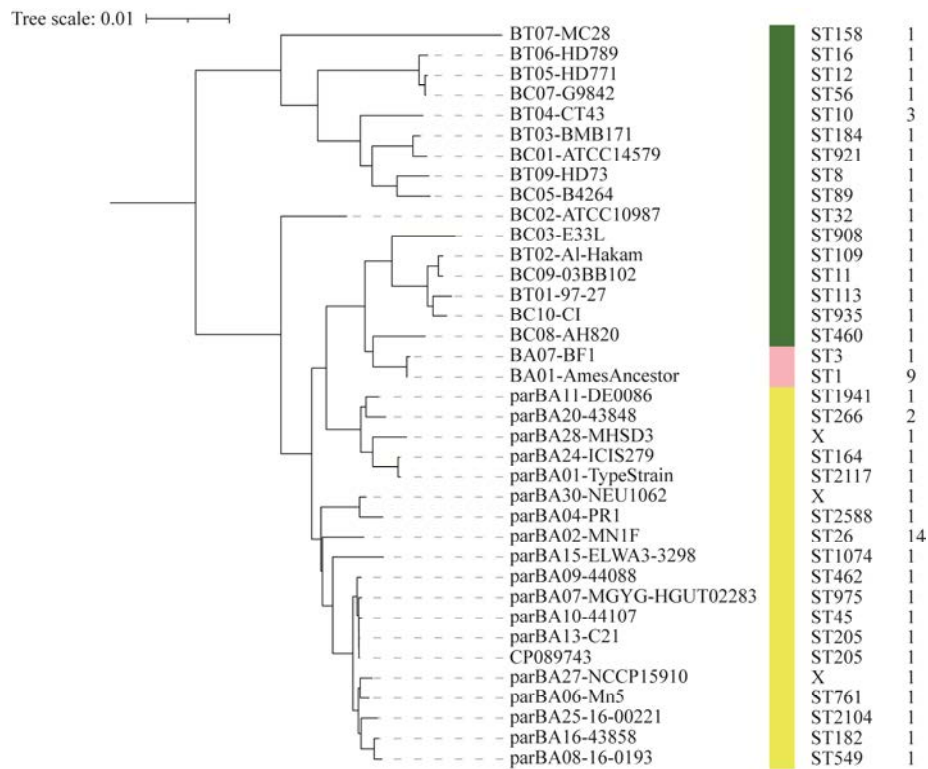


图 8 SHOU-BC01 及其相关近缘菌株的 MLST 分析

Figure 8 MLST analysis of SHOU-BC01 and its related strains. Concatenated sequences for seven genes (*glp*, *gmk*, *ilv*, *pta*, *pur*, *pyc*, and *tpi*) were downloaded from the publicly available *B. cereus* database at pubmlst.org. Green strip represent *B. cereus* and *B. thuringiensis*, pink strip represent *B. anthracis*, and yellow strip represent *B. paranthracis*.

表 6 蜡样芽孢杆菌群细菌 MLST 分型统计
Table 6 Statistics on MLST typing of *Bacillus cereus* group bacteria

ST Type	BA	BC	BT	parBA
ST1	192	0	0	0
ST3	18	0	0	0
ST2	12	0	0	0
ST933	5	0	0	0
ST2004	1	0	0	0
ST2005	1	0	0	0
ST2006	1	0	0	0
ST2007	1	0	0	0
ST26	0	33	0	13
ST266	0	31	0	1
ST1990	0	20	0	0
ST118	0	19	0	0
ST744	0	17	0	0
ST1576	0	15	1	0
ST506	0	13	0	0
ST1956	0	13	0	0
ST8	0	11	40	0
ST56	0	5	33	0
ST15	0	3	32	0
ST16	0	0	27	0
ST23	0	4	25	0
ST10	0	0	17	0
ST206	0	1	17	0
ST12	0	2	10	0
ST213	0	0	10	0
ST25	0	2	8	0
ST13	0	1	9	0
ST1006	0	0	8	0
ST927	0	0	7	0
ST1148	0	0	6	0
ST1276	0	0	6	0
ST1578	0	0	5	0
ST1582	0	0	5	0
ST138	0	11	0	0
ST18	0	10	3	0
ST168	0	9	0	0
ST1957	0	9	0	0
ST1673	0	8	1	0
ST205	0	8	0	2

B. anthracis begins with “BA”; *B. cereus* begins with “BC”; *B. thuringiensis* begins with “BT”; *B. paranthracis* begins with “parBA”. Due to limited space, only part of the data is listed.

ST2、ST3 为 BA 的优势 ST 型；BC 的优势 ST 型为 ST26、ST266、ST1990 等；BT 的优势 ST 型为 ST8、ST56、ST15、ST16 等；parBA 的优势 ST 型为 ST26，这也是 BC 的优势 ST 型，parBA 的 ST205 型目前只有 2 株菌株，其中就包括我们的分离株 SHOU-BC01。从表中还可以看出一些 ST 型中 BC、BT 和 parBA 的菌株都有分布(比如 ST26、ST8、ST56、ST15 等)，这再次说明蜡样芽孢杆菌群细菌基因组水平的相似性及这个群中细菌菌种的复杂性。

(4) 全基因组 SNP 聚类分析：采用 Parsnp v1.2 对选取的炭疽芽孢杆菌(10 株)、蜡样芽孢杆菌(10 株)、苏云金芽孢杆菌(10 株)和副炭疽芽孢杆菌(30 株)进行全基因组 SNP 聚类分析(图 9)。从全基因组 SNP 水平看，结果与 7 位点 MLST 分析的结果相同，分离株 SHOU-BC01 属于副炭疽芽孢杆菌。从聚类树的结构上看，所有参与分析的副炭疽芽孢杆菌全都聚类到一个大分支中，并且与炭疽芽孢杆菌具有很近的进化关系。

(5) 毒力因子分析：毒力因子数据库(the virulence factors database, VFDB)在线(<http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>)分析 SHOU-BC01 毒力因子。结果如表 7，与其他蜡样芽孢杆菌相比较该菌株含有较少种类的蛋白酶类，只含有鞘磷脂酶(SMase)；含有免疫逃避的相关毒力因子胞外多糖(BPS)和多糖荚膜；含有铁摄取相关毒力因子芽孢杆菌素(bacillibactin)和表面蛋白(IlsA)；毒性类蛋白种类也较少，只含有细胞毒素(CytK)和非溶血性肠毒素(Nhe) 2 种毒素；还含有 PlcR-PapR 群感效应系统(PlcR-PapR quorum sensing)和 VII 型分泌系统(type VII secretion system)。

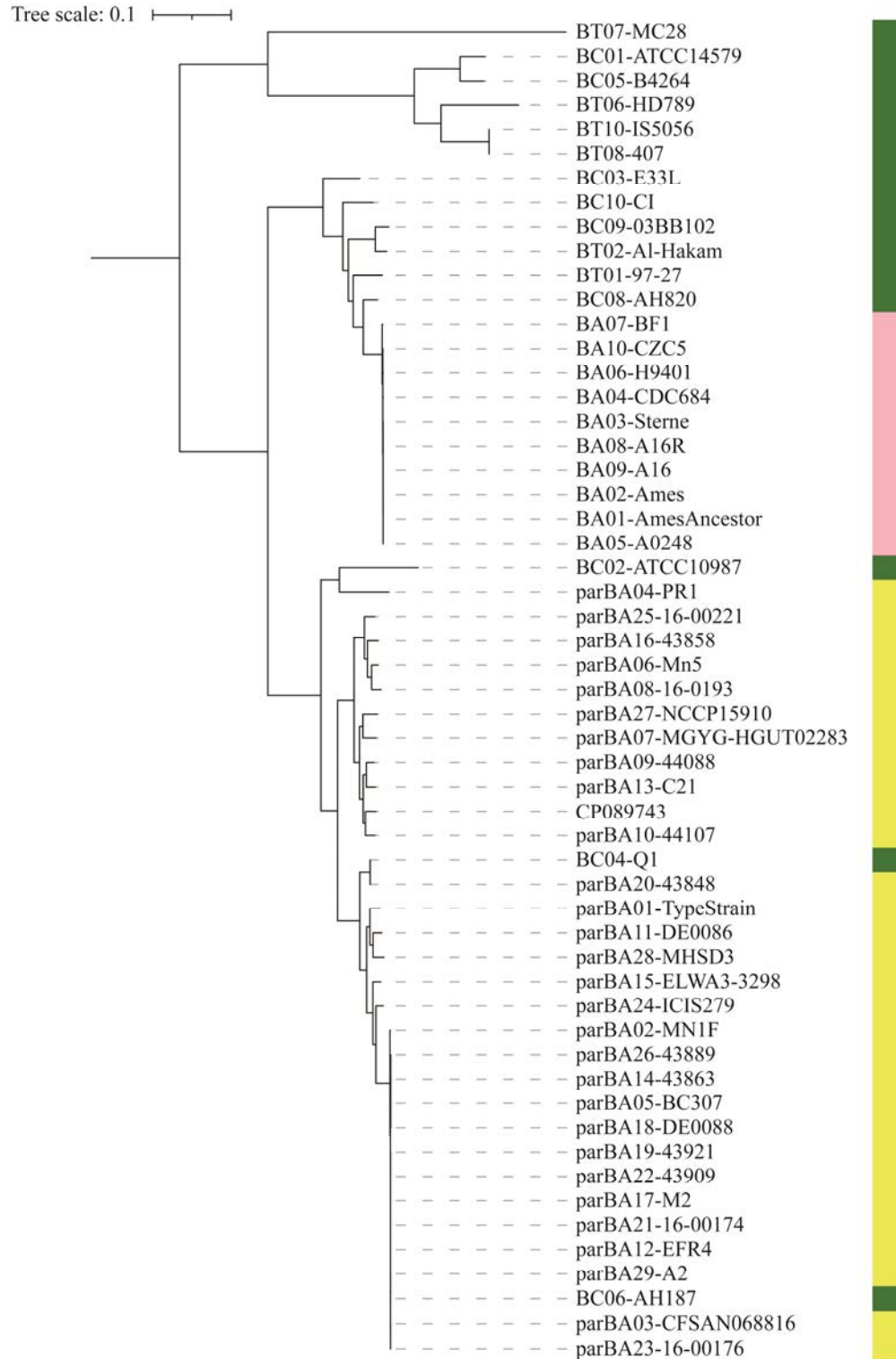


图9 SHOU-BC01及其相关近缘菌株全基因组SNP聚类分析

Figure 9 Whole-genome SNP clustering analysis of SHOU-BC01 and its related closely related strains. Green strip represent *B. cereus* and *B. thuringiensis*, pink strip represent *B. anthracis*, and yellow strip represent *B. paranthracis*.

表 7 SHOU-BC01 毒力因子分析

Table 7 Analysis of SHOU-BC01 virulence factors

VFclass	Virulence factors	Related genes	SHOU-BC01
Enzyme	Sphingomyelinase (SMase)	<i>sph</i>	orf04582
Immune evasion	<i>B. cereus</i> exo-polysaccharide (BPS) Polysaccharide capsule	<i>bpsC</i>	orf00220
		<i>Undetermined</i>	orf00216;
			orf00217;
Iron acquisition	Bacillibactin	<i>dhbA</i>	orf02998
		<i>dhbB</i>	orf02995
		<i>dhbC</i>	orf02997
		<i>dhbE</i>	orf02996
		<i>dhbF</i>	orf02994
		<i>ilsA</i>	orf03946
Regulation	PlcR-PapR quorum sensing	<i>papR</i>	orf00144
		<i>plcR</i>	orf00143
		–	orf03148
Secretion system	Type VII secretion system	–	orf03146
		<i>essC</i>	orf03150
		<i>esxB</i>	orf03149
		<i>esxL</i>	orf03145
		<i>cytK</i>	orf04161
Toxin	Cytotoxin K (hemolysin IV)	<i>cytK</i>	orf04161
	Non-hemolytic enterotoxin (Nhe)	<i>nheC</i>	orf03428

3 讨论

广义的蜡样芽孢杆菌群(*Bacillus cereus sensu lato* group)主要包括 21 种密切相关的芽孢形成革兰氏阳性细菌, 因其在害虫管理、食品生产中的重要性以及对人类健康的影响, 一直备受关注^[28]。副炭疽芽孢杆菌最初从太平洋沉积物中分离出来^[5], 后又在人类粪便中发现^[6], 并与菌血症和腹泻病例有关^[7], 使其成为一种潜在的病原体。目前从植物根际、土壤、人类身上等样本中都分离出过副炭疽芽孢杆菌, 但由于它在 2017 年才首次被报道, 所以人们对这种生物体知之甚少^[5,8]。研究表明, 副炭疽芽孢杆菌具有生物膜形成能力及多种毒力因子, 能够引

起其他致病芽孢杆菌属细菌类似临床情况^[8]。已有文献大多只是简单报道新分离副炭疽芽孢杆菌的来源、基因组序列或 ST 分型情况, 对其功能鉴定及毒力详细研究等鲜有报道。

ANI 和 dDDH 这 2 种方法软件容易获得, 计算结果与传统 DNA-DNA 杂交(DNA-DNA hybridization, DDH)的一致性非常好。一般认为定义一个新物种的界值为 ANI>95%, dDDH>70%。MLST 是通过 5–10 个管家基因的 DNA 片段测序来对分离菌株进行分子分型的方法。将获得的序列与 MLST 数据库中的管家基因核酸序列进行比对, 每个序列会根据其发现的时间顺序给一个数字编号, 即每个管家基因的等位基因型; 然后, 将每个菌株所有等位基因型

按特定的排列次序组合起来, 赋予这个菌的序列型(sequence type, ST), 这样得到的每个 ST 均代表一组管家基因的核苷酸序列信息, 以此用于对每株细菌进行标识与分型。本研究采用 ANI 和 dDDH 鉴定分离株 SHOU-BC01 属于副炭疽芽孢杆菌, MLST 分析该菌属于 ST205 序列型。目前已知并能够参与分型的副炭疽芽孢杆菌共有 28 株, 分布在 ST26、ST45、ST164、ST185、ST205、ST266、ST462、ST549、ST761、ST975、ST1074、ST1941、ST2104、ST2117、ST2588 等 15 种 ST 型中。其中副炭疽芽孢杆菌的优势 ST 型为 ST26, 含有 13 株菌株, 这个型也是蜡样芽孢杆菌的优势 ST 型; ST205 型含有 2 株菌株, 其中就包括本研究的分离株 SHOU-BC01; 剩下的 13 种 ST 型均只含有 1 株菌株。

生物膜是细菌耐药的利器, 具有极强的抗菌性, 会导致病程延长, 具有一定的毒力, 还可逃避免疫系统的“捕捉”^[29]。本研究对分离自中国大鲵腹水中的一株副炭疽芽孢杆菌 SHOU-BC01 进行生物膜形成、药敏鉴定及毒力因子分析等试验。研究表明菌株 SHOU-BC01 具有强生物膜形成能力, 与已报道的副炭疽芽孢杆菌特性相符^[8]。此外, 该菌含有多种类型耐药基因, 如耐药外排泵类、 β -内酰胺酶类、万古霉素类和杆菌肽基因簇等^[8]。药敏结果显示菌株 SHOU-BC01 对临床上多种常用抗生素已经产生较强耐药性, 如青霉素 G、氨苄西林、万古霉素等。该菌的耐药性分析对于指导临床应用药有重要意义。毒力分析显示 SHOU-BC01 菌株含有鞘磷脂酶(SMase)、多糖荚膜、芽孢杆菌素(bacillibactin)、表面蛋白(IlsA)、细胞毒素(CytK)、非溶血性肠毒素(Nhe)、PlcR-PapR 群感效应系统和 VII 型分泌系统(type VII secretion system)等多种毒力因子。SMase 是蜡样芽孢杆菌群细菌体外细胞毒性和体内致病性的重要因

子, 能引起败血症^[30]。多糖荚膜负责阻止细菌被宿主免疫细胞吞噬, 是炭疽芽孢杆菌主要毒力因子^[31]。Bacillibactin 和 IlsA 在铁蛋白利用方面协同作用, 普遍存在于芽孢杆菌属成员中^[32]。CytK 是穿孔毒素, 可致细胞死亡, 能够引起腹泻型食物中毒, 是蜡样芽孢杆菌的主要毒力因子^[33]。Nhe 存在于大多数蜡样芽孢杆菌中, 是主要毒力因子之一, SMase 和 Nhe 在致病性蜡样芽孢杆菌中协同作用, 导致疾病^[30]。PlcR-PapR 群感效应系统控制蜡样芽孢杆菌群中不同物种的胞外毒力因子表达, 其选择和进化在杆菌的适应和生态中起着重要作用^[34]。Type VII secretion system 是致病分枝杆菌的主要毒力因子, 对毒性和生存能力至关重要, 有摄取代谢物和免疫逃避功能^[35]。本研究虽未检测 SHOU-BC01 菌株的致病力, 不能判断其致病力强弱, 但根据其含有的多种毒力因子可推测该菌有强致病性的潜在可能。对毒力因子的分析可为后续致病机制的研究提供一定参考。本文未对该菌株进行回归感染实验, 菌株 SHOU-BC01 是否是病原菌需要进一步的实验验证。

本研究对分离株 SHOU-BC01 的全基因组序列分析将支持我们理解副炭疽芽孢杆菌在食品、环境及人类健康中的影响。本研究首次从中国大鲵身上分离出副炭疽芽孢杆菌, 希望为现有大鲵身上蜡样芽孢杆菌群细菌种类增加一定的补充以及为副炭疽芽孢杆菌的分析提供一定的数据支持。

参考文献

- [1] 吴学祥, 温贵兰, 文明, 龚新勇, 徐雨. 大鲵致病性嗜水气单胞菌的分离鉴定与耐药性分析. *黑龙江畜牧兽医*, 2014(7): 108–110.
Wu XX, Wen GL, Wen M, Gong XY, Xu Y. Isolation, identification and drug sensitivity analysis of pathogenic *Aeromonas hydrophila* in giant salamander.

- Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2014(7): 108–110. (in Chinese)
- [2] 王文博, 刘品, 窦玲玲, 王平, 宁越, 惠瑞敏, 冯亚龙, 李爱华, 张义兵. 中国大鲵研究概况. 水生生物学报, 2021, 45(2): 464–472.
Wang WB, Liu P, Dou LL, Wang P, Ning Y, Hui RM, Feng YL, Li AH, Zhang YB. A survey of Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*). *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2021, 45(2): 464–472. (in Chinese)
- [3] 李蔚, 董传甫. 中国大鲵传染性疾病的病原研究进展. 广东农业科学, 2014, 41(3): 136–139, 144.
Li W, Dong CF. Research progress on pathogens of infectious disease in China giant salamander (*Andrias davidianus*). *Guangdong Agricultural Sciences*, 2014, 41(3): 136–139, 144. (in Chinese)
- [4] Marrollo R, Fazii P, Savini V, D'Antonio D, Astolfi, Polilli. About the *Bacillus cereus* group. *Internal Medicine*, 2013, 52(5): 649–649.
- [5] Yang L, Du J, Lai Q, Zeng R, Ye D, Xu J, Shao Z. Proposal of nine novel species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 2017, 67(8): 2499.
- [6] Bukharin O, Perunova N, Andryuschenko S, Ivanova E, Chainikova I. Genome sequence announcement of *Bacillus paranthracis* strain ICIS-279, isolated from human intestine. *Microbiology Resource Announcements*, 2019, 8(44): e00662-19.
- [7] Matson M, Anzick S, Feldmann, Martens C, Munster V. *Bacillus paranthracis* isolate from blood of fatal Ebola virus disease case. *Pathogens*, 2020, 9(6): 475.
- [8] Sousa L. Genomic and pathogenicity of a *Bacillus paranthracis* isolated from book page surface. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 2021, 92(20): 104867.
- [9] Fukuda D, Nolasco-Hipolito C. Draft genome sequence of *Bacillus paranthracis* strain DB-4, isolated from nukadoko, fermented rice bran for Japanese pickles. *Microbiology Resource Announcements*, 2021, 10(40): e0070521.
- [10] 贺胜英, 叶华, 游玲. 大鲵烂鳃病原菌的分离鉴定及药敏试验. 贵州农业科学, 2014, 42(6): 109–112.
He SY, Ye H, You L. Isolation and identification of pathogenic bacteria of gill rot disease from *Andrias davidianus* and drug sensitivity test. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2014, 42(6): 109–112. (in Chinese)
- [11] 王佰涛, 权淑静, 杨文玲, 李珊珊, 雷高, 刘德海. 1株蜡样芽孢杆菌的分离鉴定及其生物学功能研究. 饲料研究, 2021, 44(14): 88–92.
Wang BT, Quan SJ, Yang WL, Li SS, Lei G, Liu DH. Isolation and identification of a strain of *Bacillus cereus* and study on its biological function. *Feed Research*, 2021, 44(14): 88–92. (in Chinese)
- [12] 张锋, 于倩, 徐艳, 顾敏, 杨静. 淀粉质食品中蜡样芽孢杆菌的分离鉴定. 安徽农业科学, 2015, 43(13): 263–266, 312.
Zhang F, Yu Q, Xu Y, Gu M, Yang J. Isolation and identification of *Bacillus cereus* in starches. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2015, 43(13): 263–266, 312. (in Chinese)
- [13] Saran S, Isar J, Saxena RK. A modified method for the detection of microbial proteases on agar plates using tannic acid. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2007, 70(4): 697–699.
- [14] Pomerantsev AP, Kalnin KV, Osorio M, Leppla SH. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C and sphingomyelinase activities in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Infection and Immunity*, 2003, 71(11): 6591–6606.
- [15] Peng H, Ford V, Frampton EW, Restaino L, Shelef LA, Spitz H. Isolation and enumeration of *Bacillus cereus* from foods on a novel chromogenic plating medium. *Food Microbiology*, 2001, 18(3): 231–238.
- [16] 陆颖, 朱志军, 朱梅. 肺炎克雷伯菌的耐药性及其与生物膜形成的关系. 医学信息, 2021, 34(13): 65–69.
Lu Y, Zhu ZJ, Zhu M. Drug resistance of *Klebsiella pneumoniae* and its relationship with biofilm formation. *Journal of Medical Information*, 2021, 34(13): 65–69. (in Chinese)
- [17] 王晓景, 王东澍, 吕宇飞, 冯尔玲, 潘超, 朱力, 王恒禄, 刘先凯. 蜡样芽孢杆菌 *plcR* 基因功能及其无义突变株特征分析. 军事医学, 2020, 44(2): 116–121.
Wang XJ, Wang DS, Lü YF, Feng EL, Pan C, Zhu L, Wang HL, Liu XK. Biological characteristics of *Bacillus cereus plcR* gene nonsense mutant strain. *Military Medical Sciences*, 2020, 44(2): 116–121. (in Chinese)
- [18] Liang XD, Zhu J, Zhao ZZ, Zheng F, Zhang EM, Wei JC, Ji Y, Ji YD. A single nucleotide polymorphism is involved in regulation of growth and spore formation of *Bacillus anthracis* Pasteur II strain. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, 7: 270.
- [19] Hu Q, Dou MN, Qi HY, Xie XM, Zhuang GQ, Yang MDetection, isolation, and identification of cadmium-resistant bacteria based on PCR-DGGE. *Journal of Environmental Sciences*, 2007(9): 1114–1119.

- [20] Wayne L, Brenner D, Colwell R, Grimont P, Kandler O, Krichevsky M, Moore L, Moore W, Murray L, Stackebrandt E. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1987, 37(4): 463–464.
- [21] Chun J, Oren A, Ventosa A, Christensen J, Arahal D, Da C, Rooney A, Yi H, Xu W, De M. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2018, 68(1): 461.
- [22] 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(1): 5114.
- [23] Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk HP, Göker M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics*, 2013, 14: 60.
- [24] 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.
- [25] Richter M, Rosselló-Móra R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *PNAS*, 2009, 106(45): 19126–19131.
- [26] Liu Y, Lai QL, Du J, Shao ZZ. Genetic diversity and population structure of the *Bacillus cereus* group bacteria from diverse marine environments. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 689.
- [27] Diale MO, Kayitesi E, Serepa-Dlamini MH. Genome *In silico* and *in vitro* analysis of the probiotic properties of a bacterial endophyte, *Bacillus paranthracis* strain MHSD3. *Frontiers in Genetics*, 2021, 12: 672149.
- [28] Torres Manno MA, Repizo GD, Magni C, Dunlap CA, Espariz M. The assessment of leading traits in the taxonomy of the *Bacillus cereus* group. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2020, 113(12): 2223–2242.
- [29] 周晓慧. 细菌生物膜——细菌耐药的利器. *中华养生保健*, 2014(2): 21.
Zhou XH. Bacterial biofilms — a weapon for bacterial resistance. *Chinese Health Care*, 2014(2): 21. (in Chinese)
- [30] Doll VM, Ehling-Schulz M, Vogelmann R. Concerted action of sphingomyelinase and non-hemolytic enterotoxin in pathogenic *Bacillus cereus*. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61404.
- [31] 张玲艳, 宋丽丽, 贾伟娟, 王学理. 炭疽芽孢杆菌的研究进展. *黑龙江畜牧兽医*, 2020(15): 43–47.
Zhang LY, Song LL, Jia WJ, Wang XL. Research advances of *Bacillus anthracis*. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2020(15): 43–47. (in Chinese)
- [32] Segond D, Abi Khalil E, Buisson C, Daou N, Kallassy M, Lereclus D, Arosio P, Bou-Abdallah F, Nielsen Le Roux C. Iron acquisition in *Bacillus cereus*: the roles of IIsA and bacillibactin in exogenous ferritin iron mobilization. *PLoS Pathogens*, 2014, 10(2): e1003935.
- [33] 范培超, 路雅菲, 刘春雨, 马德慧, 薛江东. 3株蜡样芽孢杆菌的分离鉴定及毒力基因分布和致病性检测. *中国生物制品学杂志*, 2020. DOI: 10.13200/j.cnki.cjb.003211.
Fan PC, Lu YF, Liu CY, Ma DH, Xue JD. Isolation and identification of three strains of *Bacillus cereus* and detection of virulence gene distribution and pathogenicity. *Chinese Journal of Biologicals*, 2020. DOI: 10.13200/j.cnki.cjb.003211 (in Chinese)
- [34] Bouillaut L, Perchat S, Arold S, Zorrilla S, Slamti L, Henry C, Gohar M, Declerck N, Lereclus D. Molecular basis for group-specific activation of the virulence regulator PlcR by PapR heptapeptides. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(11): 3791–3801.
- [35] Winden V, Vincent J, Ummels R, Piersma S, Connie R, Konstantin V, Bitter W, Houben E. Mycosins are required for the stabilization of the ESX-1 and ESX-5 type VII secretion membrane complexes. *mBio*, 2016, 7(5): e01471-16.