Bioprocess 生物过程, 2025, 15(1), 99-106
Published Online March 2025 in Hans. https://www.hanspub.org/journal/bp
https://doi.org/10.12677/bp.2025.151014

环境源蜡样芽孢杆菌全基因组测序分析及生物学特性研究

刘雨情，姚佳怡，朱轶靓，杨鑫韬，宋　璇，葛　奇*

滁州学院生物与食品工程学院，安徽 滁州

收稿日期：2025年2月22日；录用日期：2025年3月18日；发布日期：2025年3月25日

摘　要

对此前医院环境中分离筛选得到的一株蜡样芽孢杆菌进行全基因组测序分析。对其基因组进行COG、GO、KEGG通路分析、CAZy、TCDB、CARD对比分析，获得相应注释基因。结果表明该株蜡样芽孢杆菌(ZJ4)基因组大小为584,719,145 bp，编码DNA序列(CDS) 6063个，含有107个tRNA基因，45个rRNA基因。基因平均长度为809.19 bp，质粒数量有6个，遗传间区GC含量是16.09%。拥有14个基因组岛，10个位于染色体上，4个位于质粒上。通过CAZy数据库的比对共获得ZJ4碳水化合物酶基因数量共为124个；TCDB数据库比对转运蛋白共有七类，948个基因。CARD软件对ZJ4进行抗生素耐药基因预测ZJ4耐药基因共计353个，分为11类，在KEGG数据库中ZJ4共检测出13个基因，其中位于Sec-SRP分泌系统的居多，属于Tat分泌系统相对较少。结论：医疗环境中分离的蜡样芽孢杆菌活性强适应性好，具有溶血活性和较为复杂的蛋白质表达调控、耐药基因也相对较多，容易引起医院二次感染。

关键词

蜡样芽孢杆菌，基因组测序，毒力基因，耐药性

Genomic Sequencing Analysis and Biological Characterization Study of *Bacillus cereus* Isolated from Environmental Sources

Yuqing Liu, Jiayi Yao, Yiliang Zhu, Xintao Yang, Xuan Song, Qi Ge*

School of Biological Science and Food Engineering, Chuzhou University, Chuzhou Anhui

Received: Feb. 22nd, 2025; accepted: Mar. 18th, 2025; published: Mar. 25th, 2025

*通讯作者。

文章引用: 刘雨情, 姚佳怡, 朱轶靓, 杨鑫韬, 宋璇, 葛奇. 环境源蜡样芽孢杆菌全基因组测序分析及生物学特性研究[J]. 生物过程, 2025, 15(1): 99-106. DOI: 10.12677/bp.2025.151014

Abstract

Whole genome sequencing analysis was performed on a previously isolated *Bacillus cereus* strain from a hospital environment. Comparative genomic analyses including COG, GO, KEGG pathway annotation, CAZy, TCDB, and CARD were conducted to annotate functional genes. Results showed that the genome size of this *B. cereus* strain (ZJ4) is 584,719,145 bp, containing 6063 coding DNA sequences (CDS), 107 tRNA genes, and 45 rRNA genes. The average gene length was 809.19 bp, with six plasmids identified. The GC content of intergenic regions was 16.09%. 14 genomic islands were detected, 10 located on the chromosome and 4 on plasmids. 124 carbohydrate-active enzyme genes were revealed through CAZy database analysis. TCDB annotation identified 948 transporter genes classified into seven categories. 353 antibiotic resistance genes across 11 classes were predicted by CARD software. KEGG pathway analysis detected 13 secretion system-related genes, predominantly in the Sec-SRP pathway, with fewer in the Tat pathway. Conclusion: The *Bacillus cereus* strain isolated from the medical environment exhibits strong adaptability, hemolytic activity, complex protein expression regulation mechanisms, and a high abundance of antibiotic resistance genes, making them prone to causing nosocomial secondary infections.

Keywords

***Bacillus cereus*, Genome Sequencing, Virulence Genes, Antibiotic Resistance**

1. 引言

蜡样芽孢杆菌菌群(*Bacillus cereus* group)在自然界中广泛存在，其中研究最多的细菌是炭疽芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌[1]。蜡样芽孢杆菌菌群细菌的菌体成杆状，长度一般是 1.8~7.8 μm，宽度一般是 0.2~2.0 μm，生长温度范围是 4℃~50℃，最适生长温度一般在 30℃，生长盐度(NaCl)范围一般是 0%~9% [2] [3]。其形成的内生芽孢对高温、低温、pH 以及其他环境压力有很强的耐受性，因此蜡样芽孢杆菌菌群细菌在自然界中分布十分广泛，腐烂的有机物、动植物、食品、淡水、海水、以及无脊椎动物胃肠道中都有这些菌群分布，甚至可以在自然栖息地之外发现[4]-[6]。蜡样芽孢杆菌的致病性是建立在一系列致病因素的基础上的，这些致病因素远未被了解，导致一系列人类疾病[7] [8]。各种蜡样芽孢杆菌外毒素与致病性有关，到目前为止，四种蜡样芽孢杆菌外毒素已被明确地证实与食物中毒有关。这些毒素对人类、家畜和野生动物等的健康造成严重威胁，造成一定的社会、经济和环境负担[9] [10]。

关于蜡样芽孢杆菌的相关研究在食物源和环境源中的报道屡见不鲜，但医疗环境中的相关研究还不是很多，本实验通过研究医疗环境中境蜡样芽孢杆菌的污染情况，分析其生物特征以及耐药情况。为今后潜在的致病性蜡样芽孢杆菌所引发的毒性机制研究提供了借鉴和参考。提高人们对医疗环境源中蜡样芽孢杆菌消杀的重视，加强医疗微环境卫生的管理。

2. 材料方法

2.1. 实验菌株

医院各消杀环境中取样分离培养鉴定的一株蜡样芽孢杆菌 ZJ4。

2.2. 扫描电镜及透射电镜观察细菌形态结构

将分离纯化的菌体挑入含有 10 mL NB 液体培养基中，振荡培养 12 h；培养后吸取 800 μL 菌液离心，3000 rpm 离心 3 min，去上清，加入 500 μL PBS 洗 2~3 次。随后向沉淀中加入 4%戊二醛 1 mL，4℃静置过夜；3000 rpm 离心 3 min，去上清；随后向沉淀中缓慢加入 2%戊二醛 500 μL，4℃放置 1 h；3000 rpm 离心 3 min，使用 20%，50%，80%，100%乙醇梯度脱水，每次脱水 10 min，3000 rpm 离心 3 min；用叔丁醇置换乙醇 2~3 次，乙醇菌液离心后，去上清，加 200 μL 100%叔丁醇 4℃放置 30 min，利用扫描电镜 JSM-7800F 透射电镜 JEM-2100 分析蜡样芽孢杆菌菌体形态和结构特征。

2.3. 生长曲线及生化检测

利用 NAOH、HCL、柠檬酸等配制好不同 pH (5~10)的 NB 培养基对细菌 ZJ4 进行培养观察。并在特定时间段检测 OD600 的吸光度，绘制蜡样芽孢杆菌 ZJ4 在不同 pH 下的生长曲线。将活化后的蜡样芽孢杆菌，取 5 μL 菌悬液滴在琼脂含量为 0.3%和 0.5%的 LB 培养基平板中央，正放在 30℃恒温培养箱中过夜培养，观察蜡样芽孢杆菌的泳动(Swimming)和涌动(Swarming)拍照记录。

溶血性检测：将活化后的蜡样芽孢杆菌及其上清液直接接种于血琼脂平板上，设置 PBS 对照，于 28℃过夜培养，观察细菌及上清液溶血情况。

2.4. 基因组 DNA 提取及进化树构建

根据 Vazyme FastPure Bacteria DNA Isolation Mini Kit DC103 说明书提取细菌 ZJ4 基因组 DNA，进行电泳检测。利用细菌 16S rDNA 基因通用引物进行 16S rDNA 序列 PCR 扩增。扩增体系(总体积：50 μl)如下：ddH_2O，16 μl；引物 8 F，2 μl；引物 U1492R，2 μl；2 × Rapid Taq Master Mix，25.0 μl；模板 DNA，5 μl；放于 PCR 仪上，设置程序 95℃预变性，5 min；95℃变性，50 sec；58℃退火，20 sec；72℃延伸，40 sec；35 个循环；72℃延伸，5 min。将 PCR 产物送样测序。将 DNA 测序结果输入到 NCBI 网站进行序列比对，利用 mega 软件(version 11)进行进化树构建。

2.5. 全基因组测序

收集足量的菌体后，送样至上海美吉生物科技有限公司进行全基因组测序，并将测序结果利用 COG、GO、KEGG 通路分析工具、CAZy、TCDB、CARD 进行对比分析，获得相应基因组注释信息。

3. 结果与分析

3.1. 细菌形态鉴定结果

通过形态鉴定实验可知细菌 ZJ4 菌落较大，呈乳白色，表面干燥，蜡状不光滑，边缘不规则根据透射电镜结构可以看出 ZJ4 细胞壁有清晰的三层结构，周围有细小的鞭毛；扫描电镜可以准确地观察出 ZJ4 的立体形态为杆状表面粗糙不光滑(图 1)。

3.2. 细菌生长曲线及运动性与溶血活性鉴定

根据细菌在不同 pH (5~10)生长情况，绘制生长曲线(如图 2(A))，当 pH 在 7 左右时 ZJ4 生长状态最好。当 pH 在 6.0 以下时细菌生长受到严重抑制，而当 pH 在 7 以上时 ZJ4 虽不如 pH = 7 时生长旺盛，仍可以继续生长。故可得出细菌 ZJ4 是一种耐碱不耐酸的菌。同时该菌的平缓生长期在 0~6 h 时，对数生长期在 6~18 h 时，稳定生长期在 18~24 h 时，24 h 之后进入衰败期。

30℃过夜培养后，根据图 2(B)可以看出该菌在 0.3%琼脂的 LB 平板培养基中飞速增长，在 0.5%琼脂 LB 平板培养基中生长相对平缓；图 2(C)中细菌 ZJ4 可以产生透明圈，表明细菌能够溶解血琼脂培养基，

具有溶血功能。其分泌的上清液也有一些溶血现象(图 2(D))，表明细菌 ZJ4 的基因组中可能含有溶血素基因，并且能够分泌溶血蛋白。

Figure 1. Morphological characteristics of *Bacillus cereus* strain ZJ4 revealed by electron microscopy. (A) Transmission electron microscopy (TEM) image of ZJ4; (B) Scanning electron microscopy (SEM) image of ZJ4
图 1. 蜡样芽孢杆菌 ZJ4 显微形态特征。(A) ZJ4 透射电子显微镜图像(TEM)；(B) ZJ4 扫描电子显微镜图像(SEM)

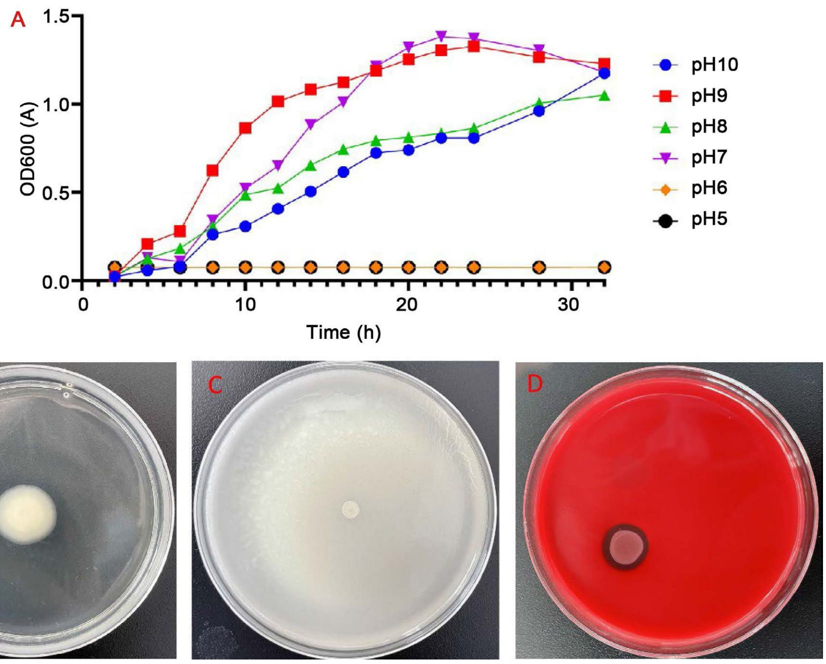
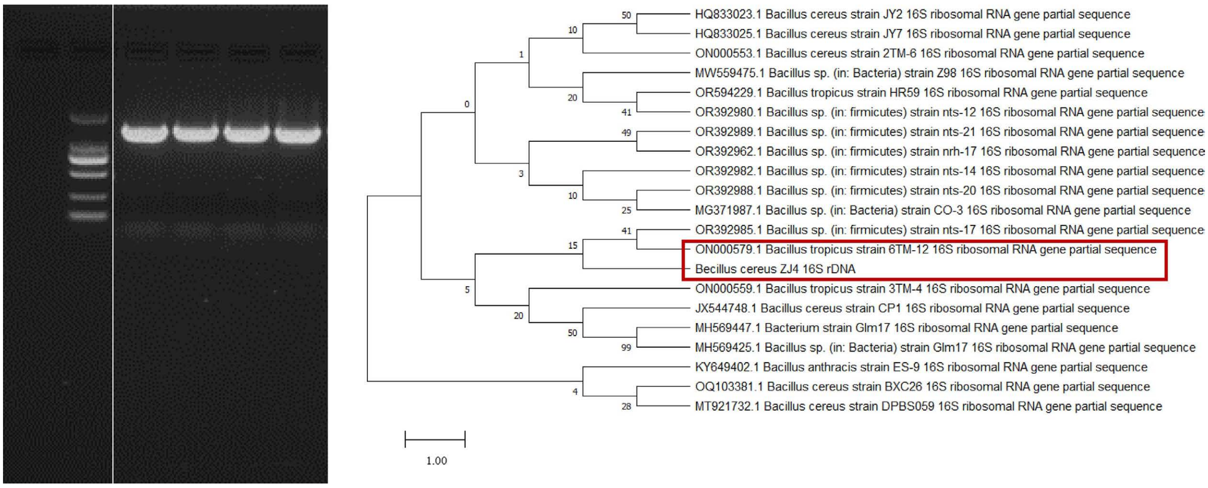


Figure 2. Growth characteristics, motility, and hemolytic activity of bacterial strain ZJ4. (A) Growth curves of ZJ4 under different pH conditions; (B) Swarming ability assay of ZJ4; (C) Swimming ability determination of ZJ4; (D) Hemolytic activity analysis of ZJ4
图 2. 细菌 ZJ4 生长特性、运动能力及溶血活性分析。(A) 不同 pH 条件下 ZJ4 的生长曲线；(B) ZJ4 涌动能力检测；(C) ZJ4 泳动能力测定；(D) ZJ4 溶血活性分析

3.3. 16S rDNA 序列比对与进化树的构建结果

16S rDNA 基因 PCR 扩增测序结果显示细菌 ZJ4 16S rDNA 大小为 1457 bp (图 3(A))。进化树结果表明细菌 ZJ4 与 2TM-6、BC-1、JY2 蜡样芽孢杆菌的亲缘关系较近(图 3(B))。



(A) (B)

Figure 3. Molecular identification and phylogenetic analysis of strain ZJ4 using 16S rDNA gene. (A) Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA fragment; (B) Phylogenetic tree constructed by neighbor-joining method

图 3. ZJ4 菌株 16S rDNA 基因鉴定与系统发育分析。(A) 16S rDNA PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图谱；(B) 基于邻接法构建的系统进化树

3.4. 蜡样芽孢杆菌全基因组测序分析

全基因组测序结果显示 ZJ4 的基因组大小为 584,719,145 bp，编码 DNA 序列(CDS)是 6063 个，含有 107 个 tRNA 基因，45 个 rRNA 基因。在 COG 分类中，功能未知的单基因最多有 1136 种。在正常的生理细胞代谢有关 DNA 序列中，最大的 COG 组是氨基酸转运和代谢，含有 365 个单基因。在 GO 注释中，细胞组成共富集到 2329 个基因，分子功能中共富集到 3304 个基因，另外还有 2973 个基因被富集到生物学进程类别中。KEGG 注释分析结果，有 2471 个基因被富集到 42 个 KEGG 代谢通路中。主要为代谢、环境信息处理、细胞过程等途径。基因组岛分析中结果表明 ZJ4 有 14 个基因组岛，染色体上有 10 个，质粒上有 4 个，共计含有编码基因数量为 222 个。

如图 4(A)所示 ZJ4 在 CAZymes 中注释最多的是碳水化合物酯酶，有 47 个基因，其次为糖基转移酶，32 个基因，糖苷水解酶，28 个基因，辅助活性酶，16 个基因，以及多糖裂解酶，1 个基因，总计 ZJ4 碳水化合物酶基因数量共为 124 个。如图 4(B)所示 ZJ4 转运蛋白共有七类，转运蛋白上基因数量中被注释最多的为主动转运蛋白，412 个基因；其次为化学电位驱动转运蛋白，280 个基因；通道蛋白，65 个基因；转运蛋白组，37 个基因，综合 ZJ4 转运蛋白共有 948 个基因。耐药基因预测结果表明其共有 353 个耐药基因(图 4(C))，分布于大环内酯类抗生素、四环素类抗生素、头霉素类抗生素等抗生素耐药种类。选取 12 种不同类型的抗生素进行最小抑菌实验，结果表明蜡样芽孢杆菌对大环内酯类抗生素耐药性最强。

4. 讨论

本研究从医疗环境中分离出来的菌株 ZJ4 属于蜡样芽孢杆菌属，与蜡样芽孢杆菌 2TM-6 亲缘关系较近，在 0.3%琼脂的 LB 平板培养基生长状态好，具有溶血活性，16S rDNA 大小为 1457 bp。利用 Illumina 和单分子 PacBio 结合进行全基因组结果显示 ZJ4 的基因组大小为 584,719,145 bp，编码 DNA 序列(CDS)是 6063 个，这与刘珊等人研究的菌株 GW-01 [11]基因组大小为 5,244,145 bp，共编码 5314 个基因，在基因组岛分析中 ZJ4 基因组中共预测到了相关基因组岛 14 个，10 个位于 ZJ4 染色体组上，4 个位于质粒基因组中，共计含有编码基因数量为 222 个。基因组岛的功能通常只与抗生素抗性以及共生适应性等特性

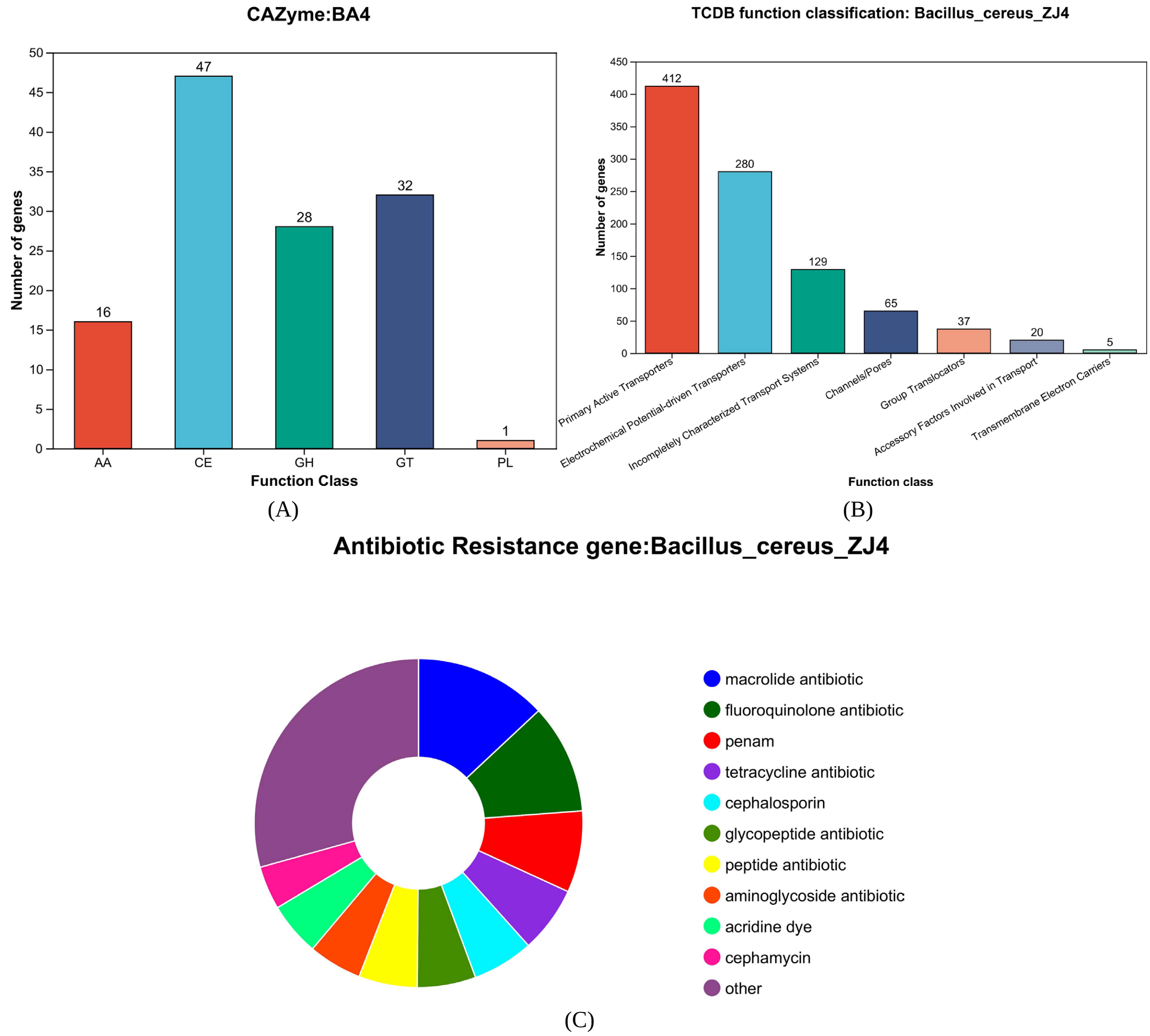


Figure 4. Functional genome annotation analysis of strain ZJ4. (A) Annotation profile of carbohydrate-active enzymes (CAZymes); (B) Functional classification of transport proteins; (C) Distribution characteristics of antibiotic resistance genes
图 4. ZJ4 菌株功能基因组注释分析。(A) 碳水化合物活性酶注释分布；(B) 转运蛋白系统功能分类；(C) 抗生素耐药基因分布特征

相关[12]，但是在致病性病原菌中，毒力岛作为基因组岛的一个亚类，对病原菌的毒性是至关重要的[13]。基因组岛是细菌染色体中通过基因水平转移获得的 DNA 片段，通常携带抗生素抗性基因，毒力基因等[14]。在医疗环境内长期使用低剂量抗生素可能会激活细菌 ZJ4 基因组岛上的 SOS 响应元件，促进基因重组与抗性累积。另外，这些基因组岛上的基因也可能在不同环境压力下被激活或者转移，以此增强细菌本身的环境适应性和进化潜力[15]。

通过 COG、GO、KEGG 等数据库完成了功能注释与比对分析可知蜡样芽孢杆菌 ZJ4 具有较强的代谢水平和生物学功能。其中碳水化合物酶基因数量共为 124 个，注释最多的是碳水化合物酯酶(Carbohydrate Esterases, CEs) 47 个基因；转运蛋白共有七类，948 个基因，其中注释最多是动转运蛋白(Primary Active Transporters)有 412 个基因。耐药基因共计 353 个，分为 11 类，其中占比分布最大的在大环内酯类抗生素(macrolide antibiotic)有 52 个基因，由此可见蜡样芽孢杆菌 ZJ4 能够对多种抗生素产生耐

药性。

由此可见本实验对医疗环境源中蜡样芽孢杆菌的了解已取得初步成功，有关蜡样芽孢杆菌在医疗环境下生物污染的解决仍在同步进行。通过对毒力基因进行深入分析，我们能够识别出与已知的蜡样芽孢杆菌毒力因子不同的独特遗传特征。这些新型毒力基因为蜡样芽孢杆菌提供更强的病原性和适应性，使其在环境中具有更高的存活和传播潜力[16]-[19]。通过全基因组测序以及生信分析，为抑制蜡样芽胞杆菌在医疗环境中的存在提供相关基础。进一步引起对医疗环境中病原微生物污染的关注，加强对医疗环境的安全管理，防止获得性感染的发生。

5. 展望

通过本研究，对医疗微环境中的蜡样芽孢杆菌的基因组信息及生物学特性取得一定研究成果，但仍需深入研究其功能基因。这为未来针对蜡样芽孢杆菌的防治策略提供新的方向。后续可根据基因组测序鉴定的毒力基因进一步深入探究，如研究不同种毒力基因的致病机制，以及位于质粒上的毒力基因在进化、水平转移中的机制，从多角度深化对蜡样芽孢杆菌的研究。根据蜡样芽孢杆菌基因功能，结合其转录、翻译等实验研究更深层次地探究其具体功能。蜡样芽孢杆菌耐药性为研制针对蜡样芽孢杆菌的专一性抗生素提供关键的数据支持，从而为解决蜡样芽孢杆菌对在医疗环境的污染问题作出贡献。

基金项目

本文系滁州学院 2024 年度大学生创新创业训练计划，项目编号：2024CXXL127。安徽省高等学校科学研究项目，项目编号：2024AH051415，滁州学院科研启动基金项目，项目编号：2024qd43。

参考文献

[1] Ceuppens, S., Boon, N. and Uyttendaele, M. (2013) Diversity of *Bacillus cereus* Group Strains Is Reflected in Their Broad Range of Pathogenicity and Diverse Ecological Lifestyles. *FEMS Microbiology Ecology*, **84**, 433-450. https://doi.org/10.1111/1574-6941.12110

[2] Ehling-Schulz, M., Lereclus, D. and Koehler, T.M. (2019) The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic Potential. *Microbiology Spectrum*, **7**, 1128. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0032-2018

[3] Liu, Y., Du, J., Lai, Q., Zeng, R., Ye, D., Xu, J., *et al.* (2017) Proposal of Nine Novel Species of the *Bacillus cereus* Group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **67**, 2499-2508. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001821

[4] 毛志鹏, 韩继, 林赟, 等. 皂甙快速检测法处置东北油豆加工不当引起中毒案例分析[J]. 中国乡村医药, 2024, 31(9): 69-70.

[5] Jessberger, N., Kranzler, M., Da Riol, C., Schwenk, V., Buchacher, T., Dietrich, R., *et al.* (2019) Assessing the Toxic Potential of Enteropathogenic *Bacillus cereus*. *Food Microbiology*, **84**, Article ID: 103276. https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103276

[6] 李雁飞, 郭莹, 王蒋丽, 等. 学生午餐中蜡样芽孢杆菌污染状况毒力基因及耐药性分析[J]. 医学动物防制, 2023, 39(11): 1068-1071, 1076.

[7] 卢晓芸, 施怡茹, 吴丽珠, 等. 89 株蜡样芽孢杆菌食品分离株携带毒力基因情况及 PFGE 分型研究[J]. 检验医学与临床, 2023, 20(1): 18-21.

[8] Tirloni, E., Stella, S., Celandroni, F., Mazzantini, D., Bernardi, C. and Ghelardi, E. (2022) *Bacillus cereus* in Dairy Products and Production Plants. *Foods*, **11**, Article 2572. https://doi.org/10.3390/foods11172572

[9] 王佳, 李明聪. 微生物菌肥在植物减肥增效中的应用研究进展: 以果树为例[J]. 微生物学通报, 2024, 51(11): 4394-4415.

[10] 高志胜, 严隽德, 倪大新, 等. 一起因蜡样芽孢杆菌污染水源引起的中毒[J]. 江苏预防医学, 1999(3): 35-36.

[11] 刘珊, 蒋杨丹, 颜佶沙, 等. 蜡样芽孢杆菌 GW-01 全基因组测序及生物学特性分析[J]. 食品工业科技, 2024, 45(7): 167-176.

[12] 杨代泽. 内蒙古某地区奶牛乳腺炎源病原菌分离鉴定及蜡样芽孢杆菌耐药和毒力特性研究[D]: [硕士学位论文].

扬州: 扬州大学, 2023.

[13] 袁玉华, 孙伟. 白腐乳加工中蜡样芽孢杆菌的污染分布及空气洁净度的监测[J]. 食品安全导刊, 2024(4): 30-33.

[14] Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U. and Hacker, J. (2004) Genomic Islands in Pathogenic and Environmental Microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, **2**, 414-424. https://doi.org/10.1038/nrmicro884

[15] Gal-Mor, O. and Finlay, B.B. (2006) Pathogenicity Islands: A Molecular Toolbox for Bacterial Virulence. *Cellular Microbiology*, **8**, 1707-1719. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00794.x

[16] 李煜, 赵素娟, 张鹏, 等. 17 株蜡样芽孢杆菌安全性评价[J]. 毒理学杂志, 2012, 26(3): 233-235.

[17] 艾鹏飞, 王珊, 高辉明, 等. TaqMan 多重实时定量 PCR 快速检测 3 种常见食源性病原菌[J]. 中国食品学报, 2024, 24(5): 373-380.

[18] Raghupathy, S., Sivalingam, A., Brahma, N, *et al.* (2024) Phytochemical Analysis of Silver Nanoparticles of *Psidium guajava* Leaf Extract and Evaluation for Its Antibacterial Property. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, **16**, S1256-S1262. https://doi.org/10.4103/jpbs.jpbs_565_23

[19] Ulrich, S., Gottschalk, C., Dietrich, R., *et al.* (2019) Identification of Cereulide Producing *Bacillus cereus* by MALDI-TOF MS. *Food Microbiology*, **82**, 75-81.