

食源性疾病

2014—2019年岳阳市食源性蜡样芽胞杆菌溶血素 *hblA* 与
磷脂酶 C *plc* 基因特征分析谢伟岸¹, 吴日明², 段洁¹, 陈露¹, 李小曼¹, 张风华¹

(1. 湖南师范大学生命科学学院, 湖南长沙 410081; 2. 岳阳市疾病预防控制中心, 湖南岳阳 414000)

摘要:目的 了解湖南省岳阳市 2014—2019 年食源性蜡样芽胞杆菌菌株病原学特征, 并为蜡样芽胞杆菌引起的食物中毒事件的科学防控提供依据。方法 对 2014—2019 年分离自湖南省岳阳市城区餐饮门店的 26 株蜡样芽胞杆菌菌株的致病毒力因子溶血素 BL 的 *hblA* 基因和磷脂酶 C 的 *plc* 基因进行序列扩增和测序, 并使用 Seqman 和 MEGA X 软件对蜡样芽胞杆菌的 *hblA* 和 *plc* 基因进行遗传进化分析。结果 从岳阳市分离到的蜡样芽胞杆菌 *hblA*、*plc* 毒力基因的同源性均与 GenBank 中的蜡样芽胞杆菌群相比均大于 93.0%。结论 岳阳市分离的蜡样芽胞杆菌的 *hblA* 和 *plc* 基因与 GenBank 中的蜡样芽胞杆菌群的同源性高, 具有一定的亲缘关系。本研究为进一步了解和科学防控蜡样芽胞杆菌引起的食物中毒事件奠定了研究基础。

关键词: 蜡样芽胞杆菌; 溶血素 *hblA*; 磷脂酶 C; 基因特征; 食源性致病菌; 湖南省; 岳阳市

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2024)04-0478-08

DOI: 10.13590/j.cjfh.2024.04.018

Genetic characterization analysis of *hblA* and *plc* genes of foodborne *Bacillus cereus* in Yueyang City from 2014 to 2019XIE Weian¹, WU Riming², DUAN Jie¹, CHEN Lu¹, LI Xiaoman¹, ZHANG Fenghua¹

(1. College of Life Science, Hunan Normal University, Hu'nan Changsha 410081, China;

2. Yueyang Center for Disease Control and Prevention, Hu'nan Yueyang 414000, China)

Abstract: Objective To provide a genetic basis for scientific prevention and control of food poisoning caused by *Bacillus cereus*, the pathogenic characteristics of foodborne *Bacillus cereus* strains isolated in Yueyang City Hu'nan Province from 2014 to 2019 were understood. **Methods** The virulence genes hemolysin A (*hblA*) and phospholipase C (*plc*) were sequenced and amplified from 26 *Bacillus cereus* strains isolated from catering stores in Yueyang City from 2014 to 2019. Seqman and MEGA X software were used to analyze the nucleotide sequences of *hblA* and *plc* genes of *Bacillus cereus*. **Results** The homology between the coding product of genes *hblA* and *plc* of *Bacillus cereus* isolated from Yueyang City and corresponding *Bacillus cereus* protein sequences in GenBank were greater than 93.0%. **Conclusion** The *hblA* and *plc* genes of *Bacillus cereus* isolated from Yueyang City have high homology with *Bacillus cereus* gene sequences in GenBank, indicating relatively closer genetic relationship. This study lays the research foundation for further understanding and scientific prevention and control of food poisoning events caused by *Bacillus cereus*.

Key words: *Bacillus cereus*; hemolysin *hblA*; phospholipase C; genetic characteristics; foodborne pathogenic bacteria; Hunan province; Yueyang City

蜡样芽胞杆菌 (*Bacillus cereus*) 是一类需氧、能形成芽胞的革兰阳性杆菌。在自然界中, 蜡样芽胞杆菌是引起人类食物中毒的常见致病菌^[1-3]。蜡样

芽胞杆菌引起人类食物中毒的类型有两类: 一类是呕吐型, 以恶心和呕吐为特征; 另一类是腹泻型, 以痢疾和腹痛为特征^[4-5]。土壤、水和食品如米粉、米饭、肉类和蔬菜等, 都是蜡样芽胞杆菌的储藏场所。在一些免疫缺陷的病人中, 蜡样芽胞杆菌可以引起菌血症、心内膜炎和脑膜炎的感染, 外科手术后的病人, 还可以引起眼部感染, 引起全眼球炎^[6], 此外, 与蜡样芽胞杆菌相关的新生儿败血症尤其严重, 可导致新生儿的死亡^[7-8]。因此, 蜡样芽胞杆菌也会被

收稿日期: 2023-03-21

基金项目: 湖南省教育厅基金资助项目(2014SK3129, 19C1160)

作者简介: 谢伟岸 男 实验师 研究方向为食品发酵及科学

E-mail: lushanyu168@163.com

通信作者: 张风华 女 副编审 研究方向为微生物学

E-mail: 386959951@qq.com

认为是条件致病菌。

蜡样芽胞杆菌、苏云金芽胞杆菌、炭疽芽胞杆菌三者都属于蜡样芽胞菌群^[9-10]。有研究表明,三者的形态特征、生理生化特征、16S rRNA 等有高度的相似性,并有极高的 DNA 同源性,因其携带质粒的大小和数量不同,在宿主特异性和致病性方面表现出很大差异^[11-13]。IVANOVA 等^[13]发现毒力在三种芽胞杆菌之间传递和交叉,提出三种细菌很可能就是一个种的不同变种或突变株。目前,蜡样芽胞杆菌作为一种条件致病菌和常见的食品污染菌正在引起国际社会的广泛关注,特别是近年来国内外出现了蜡样芽胞杆菌引起类似炭疽样感染的临床报道^[14-15]。因此,研究蜡样芽胞杆菌具有重要的现实意义。

目前报道较多的蜡样芽胞杆菌的毒素有几种类型:呕吐毒素(cereulide);肠毒素类,包括溶血素 BL(Hemolysin BL, Hbl)、非溶血性的肠毒素 Nhe、细胞毒素 K(cytK)、肠毒素 T(bceT)、肠毒素 II(HlyII)和肠毒素 FM(entFM);酶类,如磷脂酶 C(phospholipase C, PLC)。Hbl 为引起腹泻的主要毒素,由 4 个不同的结构基因 *hblA*、*hblB*、*hblC*、*hblD* 编码的蛋白组成,其中 *hblA* 基因在蜡样芽胞杆菌中广泛分布,具有基因型和表型间的异质性,可以作为分子检测的基础^[16-17]。而 PLC 是磷脂酰肌醇信号通路的关键酶,催化磷脂 C 的磷脂酰键水解断裂,可将神经鞘磷脂水解,导致膜磷脂水解,损伤细胞膜引起溶血、组织坏死、血管内皮损伤^[18-19]。因此,本研究选择 *hblA* 和 *plc* 这两个毒力基因作为蜡样芽胞杆菌的主要研究对象。

蜡状芽胞杆菌的致病性与其携带的毒力基因密切相关,并不是所有的蜡状芽胞杆菌都含有全部毒力基因,而是存在菌株间的差异^[20-21]。为了分析从湖南省岳阳市米饭与米粉样品中获取的 26 株蜡样芽胞杆菌菌株样本的病原学特征及致病机理,本研究首先在 GenBank 中获悉了三大类蜡样芽胞杆菌的 8 株菌株及其登录号,然后,以蜡样芽胞杆菌 ATCC 10987 株(NC 003909)的 *plc*、*hblA* 基因为模板设计引物,对 26 株蜡样芽胞杆菌菌株样本的毒力基因 *plc*、*hblA* 进行扩增,对其基因进行测序后与上述 8 株菌株的同源基因的核酸序列以及蛋白质序列分别进行了比对,从基因水平上对其进行研究和探讨,为进一步了解和防控岳阳市蜡样芽胞杆菌引起的食物中毒事件提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

本研究所用蜡样芽胞杆菌为湖南省岳阳市疾

病预防控制中心 2014—2019 年分离的菌株,样品为岳阳市城区范围内各餐饮门店的大米制品(含米饭、米粉等)。

1.2 主要仪器与试剂

主要仪器:低温冷冻离心机(美国 Thermo 公司);2311PCR 仪(Mastercycler Personal, Eppendorf);HICLAVE HVE-50 全自动高压灭菌锅(日本 Hirayama 公司);CenceL530 台式离心机、TGL-16M 冷冻离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);Hoefer PS300-B 型电泳仪(美国 Hoefer 公司);GIS-1000 数码凝胶图像分析系统(上海天能科技有限公司);生物安全柜(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司);LabTower EDI 超纯水仪(美国 Thermo Scientific 公司);VITEK-2 全自动细菌鉴定仪(法国梅里埃公司)。

主要试剂:DNA Marker、PCR 扩增试剂盒(上海生工生物工程技术有限公司);引物由英韦创津生物工程技术有限公司合成;细菌 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司);Cycle Pure Kit(Omega, 广州飞扬生物工程有限公司);Pfu 酶以及限制性内切酶 *HinfI* 和 *RsaI*(大连宝生物工程有限公司);琼脂糖、营养琼脂培养基、LB 琼脂培养基(索莱宝科技公司);无菌脱纤维羊血(杭州四季清生物有限公司);其他药品均为国产分析纯。

1.3 菌株鉴定

按照国家标准《食品安全国家标准 食品微生物学检验 蜡样芽胞杆菌检验》(GB 4789.14—2014)^[22]所述方法,同时结合 VITEK-2 全自动细菌鉴定仪进行菌株鉴定。

1.4 菌株基因组 DNA 提取

使用细菌 DNA 提取试剂盒进行蜡状芽胞杆菌菌株的核酸提取。先将提取的蜡状芽胞杆菌的单菌落接种于 5 mL LB 液体培养基中,于 35 °C 培养 24 h 至对数期。取 1 mL 菌液于 1.5 mL 无菌离心管中,10 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,再用 1×PBS 洗涤 2 次,最后用等体积 1×PBS 重悬,制得菌悬液备用。细菌 DNA 的提取按照试剂盒说明操作,提取的细菌基因组 DNA 作为 PCR 扩增模板,置于 -20 °C 保存备用。

1.5 核酸扩增

使用 PCR 扩增试剂盒进行蜡样芽胞杆菌 *plc* 和 *hblA* 基因扩增,操作按照试剂盒说明书进行。引物由广州英韦创津生物工程技术有限公司合成。引物序列及 PCR 扩增条件详见表 1。PCR 产物经 Cycle Pure Kit 纯化后,送至上海生物工程技术有限公司进行测序。

表1 PCR引物序列和反应条件

Table 1 PCR primers and reaction conditions

引物名称	引物序列(5'→3')	PCR反应条件
<i>plc</i> -F	CCCGTCCAGTTCTCCGCC	94 °C 5 min; 94 °C 40 s, 50 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30个循环; 72 °C延伸10 min
<i>plc</i> -R	CTCCCGTGTCTCCCATC	
<i>hbla</i> -F	CGTGTACTACGTGTACCT	94 °C 5 min; 94 °C 40 s, 50 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30个循环; 72 °C延伸10 min
<i>hbla</i> -R	GGACCTGATGAAAAACCT	

1.6 序列分析

hbla 和 *plc* 基因的测序结果使用 EditSeq、Seqman 软件(Lasergene 7.1.0)编辑和处理。从 GenBank 下载芽胞杆菌属代表性的菌株序列,包括苏云金芽胞杆菌 97-27 株(NC 005957)、苏云金芽胞杆菌 AI Hakam 株(NC 008600)、炭疽芽胞杆菌 Ames 株(NC 003997)、炭疽芽胞杆菌 Sterne 株(AE 017225)、蜡样芽胞杆菌 E33L 株(NC 006274)蜡样芽胞杆菌 ATCC 10987 株(NC 003909)、蜡样芽胞杆菌 ATCC Q1 株(NC 011969)、蜡样芽胞杆菌 ATCC 14579 株(NC 004722)。使用 MEGA X 软件(MEGA 10.1.8)解析 *plc* 和 *hbla* 基因,并选择邻接(Neighbour-joining, NJ)法构建分子遗传进化树,bootstrap 重复值设置为 1 500。

2 结果

2.1 大米制品蜡样芽胞杆菌污染情况

通过分离鉴定,从 1 000 份检测样品中共检出蜡样芽胞杆菌 26 株,检出率为 2.6%。对 26 株蜡样芽胞杆菌在羊血平板经溶血性检测有 21 株表现有溶血环,溶血率为 80.77%。

2.2 两种毒素基因在被检测菌株中的分布

以蜡样芽胞杆菌 ATCC 10987 株(NC 003909)的 *plc*、*hbla* 基因为模板设计两个基因的正反向引物,以分离得到的 26 株蜡样芽胞杆菌基因组 DNA 为模板,进行两个基因的 PCR 扩增。PCR 反应结束后,PCR 扩增产物采用 EB 染色的 1% 凝胶电泳进行分离,并用紫外凝胶成像系统拍照,凝胶成像仪观察结果如图 1 所示。有 15 株菌获得了 *plc* 基因片段,有 9 株获得了 *hbla* 基因片段。其中,最左侧的条带为 DL2000 DNA Marker,右侧的条带为分离

到的蜡样芽胞杆菌基因片段。经测序表明,*plc* 基因大小为 852 bp,*hbla* 基因大小为 840 bp。

2.3 *plc* 基因及其进化

将扩增得到的各蜡样芽胞杆菌 *plc* 基因扩增产物送英韦创津生物公司测序,其中 12 株菌测序成功并获得了 *plc* 基因序列。将蜡样芽胞杆菌的 *plc* 核酸序列与参考性菌株的核酸序列进行比对。核酸序列比对分析如表 2 所示。从岳阳米粉中分离到的蜡样芽胞杆菌的基因序列与 GenBank 中的参考性菌株的基因序列同源性很高,为 93.2%~100.0%,只有极少数碱基发生了变异;从岳阳米粉样品中分离到的蜡样芽胞杆菌群的基因序列同源性为 93.4%~100.0%;其中,Yueyang-12 菌株与苏云金芽胞杆菌 97-27(NC 005957)致病株同源性达 100%,与炭疽芽胞杆菌 Ames 株(NC 003997)、炭疽芽胞杆菌 Sterne 株的同源性均为 98.1%;Yueyang-6 与上述二株炭疽杆菌毒力基因的同源性均为 97.4%。氨基酸序列比对结果如图 2 和表 2 所示,与参考性菌株相比,从岳阳分离到的蜡样芽胞杆菌只有个别氨基酸发生了突变,氨基酸同源性为 95.1%~100.0%。*plc* 基因进化树分析发现(图 3):蜡样芽胞杆菌 ATCC 14579(NC 004722)无毒株占据了进化树的最高端,同时本文分离到的 Yueyang-4、Yueyang-3、Yueyang-2、Yueyang-1、Yueyang-6 也占据了进化树的较高端;Yueyang-12 与苏云金芽胞杆菌 97-27(NC 005957)进入了同一个进化支的分支,亲缘关系较近,同时,它与蜡样芽胞杆菌 E33L(NC 006274)、炭疽芽胞杆菌 Sterne 株(AE017225)、苏云金芽胞杆菌 AI Hakam(NC008600)、炭疽芽胞杆菌 Ames 株(NC 003997)等致病菌株进入同一个大进化分支的不同小分支,表明有较近的亲缘关系。

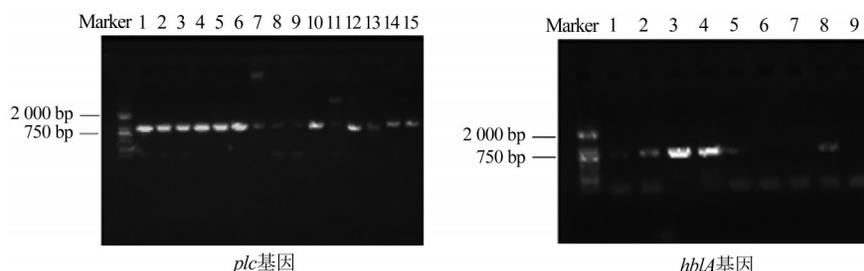
图1 *plc*、*hbla* 基因的 PCR 扩增结果的 DNA 鉴定Figure 1 DNA identification of PCR amplification results of *plc* and *hbla* genes

表2 蜡样芽胞杆菌 *plc* 和 *hblA* 基因核酸、氨基酸同源性分析
Table 2 Homology analysis of nucleic acid and amino acid of *plc* and *hblA* gene of *Bacillus cereus*

基因	分离菌株内部同源性比较/%		分离菌株与参考株比较/% ^a	
	核酸	氨基酸	核酸	氨基酸
<i>plc</i>	93.4~100.0	95.4~100.0	93.2~100	95.1~100.0
<i>hblA</i>	93.1~100.0	97.5~100.0	93.0~99.9	97.5~100.0

注:a:参考株为苏云金芽胞杆菌 97-27株(NC 005957)和 AI Hakam 株(NC 008600);炭疽芽胞杆菌 Ames 株(NC 003997)和 Sterne 株(AE017225);蜡样芽胞杆菌 ATCC Q1株(NC 011969)、ATCC 10987株(NC 003909)、E33L株(NC 006274)和 ATCC 14579株(NC 004722)

2.4 *hblA* 基因及其进化

将扩增得到的各蜡样芽胞杆菌的 *hblA* 基因扩增产物送英韦创津生物公司测序,其中 8 株测序成功并获得了 *hblA* 基因序列。将测序后的蜡样芽胞杆菌的 *hblA* 核酸序列与参考菌株的核酸序列进行

比对。核酸序列比对分析发现(表 2),从岳阳米粉中分离到的蜡样芽胞杆菌的基因与参考菌株的基因同源性很高,为 93.0%~99.9%;岳阳米粉中分离出来的蜡样芽胞杆菌群的基因的同源性为 93.1%~100.0%。氨基酸序列比对分析发现(表 2、图 4),从岳阳米粉中分离到的蜡样芽胞杆菌只有极少数氨基酸发生了变异,与代表性菌株相比,氨基酸同源性为 97.5%~100%。*hblA* 进化树分析发现(图 5):蜡样芽胞杆菌 ATCC Q1 株(NC 011969)处于进化树的最高端,与分离到的 Yueyang-10 处于一个小分支,亲缘关系较近;Yueyang-5、Yueyang-7 处于同一个进化树分支中的小分支,Yueyang-3 和 Yueyang-4 处于同一个进化树分支中的小分支;Yueyang-1、Yueyang-2、Yueyang-3、Yueyang-4 与蜡样芽胞杆菌 ATCC 14579 位于一个大进化分支的不同小分支。

ATCC10987	1	MKKKVLALAAITVVAPLQSVAFAHENDGGSKIKIVHRWSAEDKHKEGVNSHLWIVNRAIDIMSRNTLVKQDRVAQLNEWRTLENGIYAADYENPPYD	100
ATCC14579	1L.....QRFQVIP.....L.....	100
E33L	1L.....	100
97-27	1L.....	100
Q1	1	100
AlHakam	1L.....N.....	100
Sterne	1L.....N.....	100
Ames	1L.....N.....	100
Yueyang-1	1L.....QRFQVIP.....L.....	100
Yueyang-2	1L.....QRFQVIP.....L.....	100
Yueyang-3	1L.....QRFQVIP.....L.....	100
Yueyang-4	1L.....QRFQVIP.....L.....	100
Yueyang-6	1L.....	100
Yueyang-8	1	100
Yueyang-10	1	100
Yueyang-11	1	100
Yueyang-12	1L.....	100
Yueyang-13	1	100
Yueyang-16	1	100
Yueyang-18	1	100
ATCC10987	101	NSTFASHFYDPDNGKTYIPFAKQAKETGAKYFKLAGESYKNKDMKQAFFYLGLSLHYLGDVNPMAAANFTNLSYPQGFHISKYENFVDITIKDNYKVTIDGN	200
ATCC14579	101Y.....	200
E33L	101	200
97-27	101	200
Q1	101	200
AlHakam	101	200
Sterne	101H.....	200
Ames	101H.....	200
Yueyang-1	101Y.....	200
Yueyang-2	101Y.....	200
Yueyang-3	101Y.....	200
Yueyang-4	101Y.....	200
Yueyang-6	101	200
Yueyang-8	101	200
Yueyang-10	101	200
Yueyang-11	101	200
Yueyang-12	101	200
Yueyang-13	101	200
Yueyang-16	101	200
Yueyang-18	101	200
ATCC10987	201	GYWNWKGINPEEWIHGAAVAKQDYSIGIVNDNTKDFVKAASVQSEYADKWRAEVIPMTGKRLMDAQRVTAGYIQLWFDYGDGR	* 284
ATCC14579	201D.....A.....R.....N.....	* 284
E33L	201D.....	* 284
97-27	201A.....	* 284
Q1	201	* 284
AlHakam	201D.....I.....	* 284
Sterne	201D.....	* 284
Ames	201D.....	* 284
Yueyang-1	201D.....A.....R.....	* 284
Yueyang-2	201D.....A.....R.....	* 284
Yueyang-3	201D.....A.....R.....	* 284
Yueyang-4	201D.....A.....R.....	* 284
Yueyang-6	201	* 284
Yueyang-8	201	* 284
Yueyang-10	201	* 284
Yueyang-11	201	* 284
Yueyang-12	201A.....	* 284
Yueyang-13	201D.....	* 284
Yueyang-16	201	* 284
Yueyang-18	201	* 284

图2 *plc* 基因的氨基酸序列对比分析

Figure 2 Comparative analysis of amino acid sequence of *plc* gene

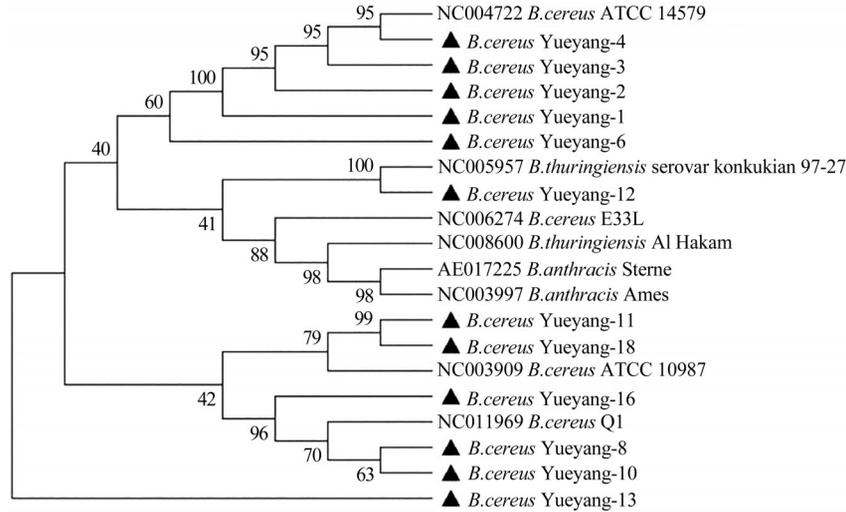


图3 *plc* 基因进化树分析

Figure 3 *plc* gene evolution tree analysis

ATCC10987	1	MSAKKERVDVLLVERGLIETREKAKRAIMAGLVYANEMRLDKPGEKIPQDTEITVKGQVMPYVSRGGYKLEKALETFHLDLQDKVMIDIGSSTGGFTDCA	100
ATCC14579	1S.....	100
E33L	1	100
97-27	1H.....	100
Q1	1	100
AlHakam	1	100
Sterne	1	100
Ame	1	100
Yueyang-1	1	.N.....S.....	100
Yueyang-2	1	.N.....S.....	100
Yueyang-3	1	.N.....S.....	100
Yueyang-4	1	.N.....S.....	100
Yueyang-5	1N.....	100
Yueyang-6	1	100
Yueyang-7	1N.....	100
Yueyang-10	1	100
ATCC10987	101	LQNGAKLSYALDVGYNQLAWKLRQDERVVMERTNFRYVTPADLERGLPQFASIDVSFISLKLILPVLKTLMPNGDVAALIKPQFEAGREQVGGKGVIR	200
ATCC14579	101	200
E33L	101	200
97-27	101	200
Q1	101	200
AlHakam	101	200
Sterne	101	200
Ame	101	200
Yueyang-1	101	200
Yueyang-2	101	200
Yueyang-3	101	200
Yueyang-4	101	200
Yueyang-5	101	200
Yueyang-6	101	200
Yueyang-7	101	200
Yueyang-10	101	200
ATCC10987	201	DRKVHEAVVEMIVDFAIKEGYDVEGLTFSPITGGDGNIEFLHLKWHGERENGENHSPVSEQVVEAHDVLKQKKGGE * 280	
ATCC14579	201E..L.....I.I.....E..... * 280	
E33L	201 * 280	
97-27	201 * 280	
Q1	201 * 280	
AlHakam	201 * 280	
Sterne	201 * 280	
Ame	201 * 280	
Yueyang-1	201E..L.....I.I.....E..... * 280	
Yueyang-2	201E..L.....I.I.....E..... * 280	
Yueyang-3	201E..L.....I.I.....E..... * 280	
Yueyang-4	201E..L.....I.I.....E..... * 280	
Yueyang-5	201E..L.....K.....I.I.....E..... * 280	
Yueyang-6	201 * 280	
Yueyang-7	201K.....I..... * 280	
Yueyang-10	201 * 280	

图4 *hblA* 基因的氨基酸对比分析

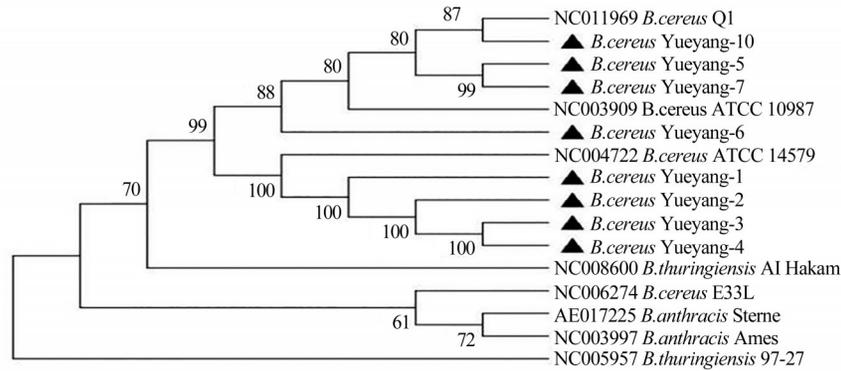
Figure 4 Comparative analysis of amino acid sequence of *hblA* gene

3 讨论

蜡样芽胞杆菌、炭疽芽胞杆菌和苏云金芽胞杆菌在表型性状和基因组上具有较高的相似性。系统发育分析表明,它们属于“近亲”,是由共同的祖先进化而来的,传统及现代的细菌分类方法均难对其进行区分与鉴定^[23-25]。然而,三者致病性上有

明显的差别:蜡样芽胞杆菌作为一种条件致病菌,基因组上常含有呕吐毒素、肠毒素等相关基因;炭疽芽胞杆菌是炭疽病的“罪魁祸首”,对人和家畜有强致病性;苏云金芽胞杆菌产生伴胞晶体而作为一种微生物源的低毒杀虫剂^[26-28]。

与 GenBank 中的参考性菌株相比,从岳阳米粉

图5 *hblA* 基因进化树分析Figure 5 *hblA* gene evolution tree analysis

中分离出来的蜡样芽胞杆菌群的 *plc* 基因的同源性为 93.2%~100.0%，氨基酸同源性为 95.1%~100.0%；*hblA* 基因与参考性菌株相比基因同源性为 93.0%~99.9%，氨基酸同源性为 97.5%~100.0%；GenBank 中的这 8 例代表性菌株的这两个基因的同源性均在 93.6%~100.0%。这表明本文分离到的蜡样芽胞杆菌和苏云金芽胞杆菌、炭疽芽胞杆菌的 *plc*、*hblA* 这两个基因的同源性很高，这与前人的研究结果基本一致^[23-24]。

plc 基因的进化树分析结果与其核酸序列同源性分析比较的结果也相一致。非致病蜡样芽胞杆菌 ATCC 14579 (NC 004722) 很早就开始分离，占据了进化树的最高端，而本文分离到的 Yueyang-4、Yueyang-3、Yueyang-2、Yueyang-1 等 4 株样品同时也占据了进化树的最高端，表明它们之间亲缘关系较近，这和它们与蜡样芽胞杆菌 ATCC 14579 (NC 004722) 的基因同源性高达 99.6% 的结果相一致。Yueyang-12 菌株与苏云金芽胞杆菌 97-27 (NC 005957) 株进入了同一个进化分支，亲缘关系很近，两者之间的基因同源性达到了 100%，同时它与炭疽芽胞杆菌 Sterne 株 (AE017225)、炭疽芽胞杆菌 Ames 株 (NC 003997) 等致病菌株进入同一进化分支的不同小支，也有较近的亲缘关系，这可能是因为 Yueyang-12 的 PLC 在氨基酸的 222 位置发生了有义突变 V222A，这个突变使得 Yueyang-12 的 PLC 与上述致病菌株亲缘关系较近，反而与自己的同类尤其是无毒菌株蜡样芽胞杆菌 ATCC 14579 (NC 004722)、蜡样芽胞杆菌 ATCC Q1 (NC 011969)、蜡样芽胞杆菌 ATCC 10987 (NC 003909) 在姐妹进化分支血缘关系相对较远。

hblA 基因的进化树分析结果表明，蜡样芽胞杆菌 ATCC Q1 株 (NC 011969) 处于进化树的最高端，Yueyang-10 菌株处于同一个进化小分支，与其亲缘关系较近，这与其基因同源性高达 100% 相一致。蜡样芽胞杆菌 ATCC 10987 (NC 003909) 处于进化树

的次高端，与蜡样芽胞杆菌 ATCC Q1、Yueyang-10、Yueyang-5、Yueyang-7 处于同一个大的进化分支，亲缘关系相对较近，其基因同源性高达 98.8% 以上。而蜡样芽胞杆菌 ATCC 14579 (NC 004722) 很早就开始分离，属于非致病蜡样芽胞杆菌的另外一支，与本文分离到的 Yueyang-1、Yueyang-2、Yueyang-3、Yueyang-4 处于同一个大分支的不同小分支，亲缘关系较近，它们之间的基因同源性也高达 99.4% 以上。而强致病株炭疽芽胞杆菌 Sterne 株 (AE017225)、炭疽芽胞杆菌 Ames 株 (NC 003997)、苏云金芽胞杆菌 AI Hakam (NC 008600)、蜡样芽胞杆菌 E33L (NC 006274)、苏云金芽胞杆菌 97-27 (NC 005957) 则处于进化树的最低端，但其基因同源性也与本文分离到的样品之间也高于 93.0%。

有研究发现，许多蜡样芽胞杆菌的污染能导致病人产生类似炭疽样感染^[14-15]。研究者发现，毒力在蜡样芽胞杆菌、炭疽芽胞杆菌、苏云金芽胞杆菌三种芽胞杆菌之间传递和交叉，这群细菌所致的疾病以及宿主特异性多由其携带的质粒引起，而和染色体没有必然联系^[12-13]。RASKO 等^[12]认为蜡样芽胞杆菌细菌中，染色体上的基因组对致病的影响已有所降低，不同菌株的致病力也许源于各自不同的调节网络的一些细微改变。随着对三者细菌遗传多态性的关注和研究，以及对代表菌株基因库数量的不断补充，人们对蜡样芽胞杆菌群的认识会更清晰。

本文对从湖南省岳阳米粉中分离到的蜡样芽胞杆菌的 *plc* 和 *hblA* 基因与 GenBank 中的蜡样芽胞杆菌、炭疽芽胞杆菌、苏云金芽胞杆菌菌株进行了基因进化比较研究，结果表明，从岳阳米粉中分离到的蜡样芽胞杆菌与炭疽芽胞杆菌和苏云金芽胞杆菌无论从基因水平还是进化分析上都没有明显的界线，有个别分离到的菌株如 Yueyang-12 与苏云金芽胞杆菌 97-27 (NC 005957) 基因同源性达到 100%，同时也与致病的炭疽芽胞杆菌 Sterne 株

(AE017225)、炭疽芽胞杆菌 Ames 株有较近的亲缘关系。本文对蜡样芽胞杆菌毒力因子进行比较和分析,使公共卫生群体性食物中毒的预测成为可能,为科学防控蜡样芽胞杆菌引起的食物中毒事件奠定了研究基础。

参考文献

- [1] 王欣茹,黄琼.食品中蜡样芽胞杆菌污染的预测模型及风险评估进展[J].中国食品卫生杂志,2022,34(6):1366-1374.
WANG X R, HUANG Q. Research progress in prediction models and risk assessment of *Bacillus cereus* contamination in food[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2022, 34(6): 1366-1374.
- [2] 何文艳,裘娟萍,赵春田.蜡状芽胞杆菌毒株的致病机理及检测方法[J].科技通报,2012,28(1):86-90.
HE W Y, QIU J P, ZHAO C T. Pathogenesis mechanism and detection methods of *Bacillus cereus*[J]. Bulletin of Science and Technology, 2012, 28(1): 86-90.
- [3] 贾伟娟,宋丽丽,张玲艳,等.蜡样芽胞杆菌毒素的最新研究进展[J].中国抗生素杂志,2022,47(6):534-542.
JIA W J, SONG L L, ZHANG L Y, et al. Research progress of the toxins from *Bacillus cereus*[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2022, 47(6): 534-542.
- [4] 周幅萍,梁天光,丁淑娟.1986—2007年中国299起蜡样芽胞杆菌食物中毒案例分析[J].中国食品卫生杂志,2009,21(5):450-454.
ZHOU G P, LIANG T G, DING S J. Analysis on 299 *Bacillus cereus* food poisoning cases in 1986—2007[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2009, 21(5): 450-454.
- [5] 刘成诚.食源性蜡样芽胞杆菌风险评估及生物膜形成能力的研究[J].广州:暨南大学,2018.
LIU C C. Study on risk assessment and biofilm formation ability of food-borne *Bacillus cereus*[J]. Guangzhou: Jinan University, 2018.
- [6] MURSALIN M H, LIVINGSTON E T, CALLEGAN M C. The cereus matter of *Bacillus endophthalmitis*[J]. Experimental Eye Research, 2020, 193: 107959.
- [7] LOTTE R, HÉRISSE A L, BERROUANE Y, et al. Virulence analysis of *Bacillus cereus* isolated after death of preterm neonates, nice, France, 2013[J]. Emerging Infectious Diseases, 2017, 23(5): 845-848.
- [8] RAMARAO N, BELOTTI L, DEBOSCKER S, et al. Two unrelated episodes of *Bacillus cereus* bacteremia in a neonatal intensive care unit[J]. American Journal of Infection Control, 2014, 42(6): 694-695.
- [9] EHLING-SCHULZ M, LERECLUS D, KOEHLER T M. The *Bacillus cereus* group: *Bacillus* species with pathogenic potential[J]. Microbiology Spectrum, 2019, 7(3): 10.1128/microbiolspec.gpp3-0032-2018.
- [10] SLAMTI L, PERCHAT S, GOMINET M, et al. Distinct mutations in PlcR explain why some strains of the *Bacillus cereus* group are nonhemolytic[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(11): 3531-3538.
- [11] 喻子牛,王阶平,何进.苏云金芽胞杆菌基因组研究[J].微生物学杂志,2013,33(2):1-6.
YU Z N, WANG J P, HE J. Advance in genome research of *Bacillus thuringiensis*[J]. Journal of Microbiology, 2013, 33(2): 1-6.
- [12] RASKO D A, ALTHERR M R, HAN C S, et al. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2005, 29(2): 303-329.
- [13] IVANOVA N, SOROKIN A, ANDERSON I, et al. Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*[J]. Nature, 2003, 423(6935): 87-91.
- [14] BRÉZILLON C, HAUSTANT M, DUPKE S, et al. Capsules, toxins and AtxA as virulence factors of emerging *Bacillus cereus* biovar anthracis[J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2015, 9(4): e0003455.
- [15] CARROLL L M, MARSTON C K, KOLTON C B, et al. Strains associated with two 2020 welder *Anthrax* cases in the United States belong to separate lineages within *Bacillus cereus* sensu lato[J]. Pathogens, 2022, 11(8): 856.
- [16] THAENTHANE S, WONG A C L, PANBANGRED W. Phenotypic and genotypic comparisons reveal a broad distribution and heterogeneity of hemolysin BL genes among *Bacillus cereus* isolates[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 105(2): 203-212.
- [17] 王远洋,刘钟栋,陈国培,等.食品中蜡样芽胞杆菌的毒力基因分布研究[J].基因组学与应用生物学,2018,37(12):5304-5310.
WANG Y Y, LIU Z D, CHEN G P, et al. Study on distribution of virulence genes of *Bacillus cereus* in food[J]. Genomics and Applied Biology, 2018, 37(12): 5304-5310.
- [18] SEO K H, RHEE J I. High-level expression of recombinant phospholipase C from *Bacillus cereus* in *Pichia pastoris* and its characterization[J]. Biotechnology Letters, 2004, 26(19): 1475-1479.
- [19] DURBAN M A, SILBERSACK J, SCHWEDER T, et al. High level expression of a recombinant phospholipase C from *Bacillus cereus* in *Bacillus subtilis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 74(3): 634-639.
- [20] VAGNER V, DERVYN E, EHRlich S D. A vector for systematic gene inactivation in *Bacillus subtilis*[J]. Microbiology, 1998, 144(11): 3097-3104.
- [21] 卢晓芸,施怡茹,吴丽珠,等.89株蜡样芽胞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.
LU X Y, SHI Y R, WU L Z, et al. Study on virulence genes carrying status and PFGE typing of 89 strains of *Bacillus cereus* isolated from foods[J]. Laboratory Medicine and Clinic, 2023, 20(1): 18-21.
- [22] 国家卫生和计划生育委员会.食品安全国家标准食品微生物学检验 蜡样芽胞杆菌检验:GB 4789.14—2014[S].北京:中国标准出版社,2015.
National Health and Family Planning Commission. National food safety standard-Microbiological examination of food-Examination of *Bacillus cereus*: GB 4789.14—2014[S]. Beijing: Standards

- Press of China, 2015.
- [23] HELGASON E, OKSTAD O A, CAUGANT D A, et al. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*—one species on the basis of genetic evidence[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(6): 2627-2630.
- [24] RASKO D A, RAVEL J, ØKSTAD O A, et al. The genome sequence of *Bacillus cereus* ATCC 10987 reveals metabolic adaptations and a large plasmid related to *Bacillus anthracis* pXO1[J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32(3): 977-988.
- [25] ASH C, FARROW J A E, DORSCH M, et al. Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1991, 41(3): 343-346.
- [26] STENFORS ARNESEN L P, FAGERLUND A, GRANUM P E. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2008, 32(4): 579-606.
- [27] COLLIER R J, YOUNG J A T. Anthrax toxin [J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2003, 19: 45-70.
- [28] 石磊. 苏云金芽胞杆菌的伴胞晶体形成过程分析[J]. 陕西农业科学, 2012, 58(4): 78-80.
- SHI L. Analysis on the formation process of companion crystal of *Bacillus thuringiensis*[J]. Shaanxi Journal of Agricultural Sciences, 2012, 58(4): 78-80.