

张润泽, 周明, 焦陇玲, 等. 牛源林氏棒状杆菌分离株 LSKT01 鉴定及全基因组测序 [J]. 畜牧与兽医, 2026, 58 (2): 80-91.

ZHANG R Z, ZHOU M, JIAO L L, et al. Isolation, identification and whole genome sequencing of *Corynebacterium hindlerae* strain LSKT01 from cattle [J].

Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2026, 58 (2): 80-91.

## 牛源林氏棒状杆菌分离株 LSKT01 鉴定及全基因组测序

张润泽, 周明, 焦陇玲, 李永健, 李柯爽, 杜梦颖, 蔡锦纯, 齐亚银\*

(石河子大学动物科技学院, 新疆 石河子 832000)

**摘要:** 旨在分离鉴定疑似林氏棒状杆菌并分析其全基因组特征。采集新疆奎屯某奶牛场疑似病患牛组织样本, 分离细菌, 进行培养特性、生化特性、革兰染色、电镜观察, 以及 16S rRNA 及烯酰辅酶 A 水合酶 A8 (*echA8*) 基因 PCR 鉴定; 进一步对分离菌采用微量肉汤稀释法进行药物敏感性试验, 以及 Illumina TruSeq 测序并进行基因组组装与注释相关生物信息学分析。结果: 成功分离到 1 株棒状杆菌; 经 16S rRNA 和 *echA8* 基因 PCR 鉴定为林氏棒状杆菌, 16S rRNA 基因测序结果与 GenBank 中林氏棒状杆菌相应序列的同源性达 98.64%~99.86%; 系统进化树结果显示, 分离菌与林氏棒状杆菌在同一个进化分支上, 亲缘关系最近, 命名为 LSKT01; 药敏结果显示, 分离菌对万古霉素、庆大霉素、利奈唑胺、四环素、多西环素高度敏感, 对红霉素、青霉素、利福平表现中介, 对克林霉素、莫西沙星、环丙沙星、头孢噻肟、头孢曲松表现耐药; 测序结果表明, 分离株 LSKT01 的全基因组大小为 2 608 509 bp, 平均 G+C 含量为 58.81%; 预测到的编码基因有 2 482 个, 含有 52 个 tRNA, 1 个 5S rRNA, 1 个 16S rRNA, 1 个 23S rRNA, 1 个规律成簇间隔短回文重复序列相关蛋白 (CRISPR-Cas) 及 15 个前噬菌体。运用同源蛋白质群 (COG)、基因本体论 (GO)、京都基因和基因组百科全书 (KEGG)、非冗余蛋白质 (NR)、瑞士蛋白质序列 (Swiss-Prot) 等数据库, 对编码基因进行基因功能比对注释, 分别注释到 2 033、846、1 353、2 419、1 513 个基因。综上, 本试验分离鉴定出 1 株林氏棒状杆菌并揭示了其基因组特征。

**关键词:** 林氏棒状杆菌; 全基因组测序; 药物敏感性

中图分类号: S852.6

文献标志码: A

文章编号: 0529-5130(2026)02-0080-12

### Isolation, identification and whole genome sequencing of *Corynebacterium hindlerae* strain LSKT01 from cattle

ZHANG Runze, ZHOU Ming, JIAO Longling, LI Yongjian, LI Keshuang,  
DU Mengying, CAI Jinchun, QI Yayin\*

(College of Animal Science and Technology of Shihezi University, Shihezi 832000, China)

**Abstract:** The aim of this study was to isolate and identify the suspected *Corynebacterium hindlerae*, to analyze its whole genome characteristics. The tissue samples of suspected patients in a dairy farm in Kuitun, Xinjiang were collected aseptically. Then, the suspected colonies were identified by culture characteristics, biochemical characteristics, Gram staining and transmission electron microscopy. Next, the purified bacterial liquid was identified by 16S rRNA and *echA8* gene PCR. Finally, the drug sensitivity test of the isolated bacteria was carried out using the micro-broth dilution method, and Illumina TruSeq sequencing was performed for genome assembly and annotation-related bioinformatics analysis. The results showed that a *Corynebacterium* strain was successfully isolated; it was identified as *Corynebacterium lindtii* by 16S rRNA and *echA8* genes, and the homology of the strain with GenBank was 98.64%~99.86%. The results of the phylogenetic tree showed that the isolated bacteria and *Corynebacterium lindleyi* were in the same evolutionary branch and had the closest genetic relationship. The results of the drug sensitivity showed that the isolates were highly sensitive to vancomycin, gentamicin, linezolid, tetracycline and doxycycline, were moderately sensitive to erythromycin, penicillin and rifampicin, and were resistant to clindamycin, moxifloxacin, ciprofloxacin, cefotaxime and ceftriaxone. The sequencing results showed that the whole genome size of the isolate LSKT01 was 2 608 509 bp, and its average G+C content was 58.81%. There were 2 482 predicted coding genes, including 52 tRNAs, 1 5S rRNA, 1 16S rRNA, 1 23S rRNA, 1 CRISPR-Cas and 15 prophages. The COG, GO, KEGG, NR and Swiss-Prot databases were used to annotate the gene function of the coding genes which annotated 2 033, 846, 1 353, 2 419 and 1 513 genes, respectively. In summary, a strain of *Corynebacterium hindlerae* was

收稿日期: 2025-08-29; 修回日期: 2025-11-28

基金项目: 天山英才创新团队项目 (2024D14009); 兵团农业关键核心技术攻关项目 (2023AA310); “科技包县”-兵财农-40 号 (CZ004701)

第一作者: 张润泽, 男, 硕士研究生

\* 通信作者: 齐亚银, 博士, 教授, 研究方向为预防兽医学, E-mail: 75997921@qq.com.

successfully isolated and identified in this study, and the genetic information of the LSKT01 strain was revealed.

**Keywords:** *Corynebacterium hindlerae*; whole genome sequencing; drug sensitivity

牛放线菌病又称大颌病,呈地方性流行,主要通过接触传播,是一种重要的家畜慢性传染病<sup>[1]</sup>。该病在全球范围内广泛分布,主要病原菌为牛放线菌、化脓性放线菌、林氏棒状杆菌及金黄色葡萄球菌,病变部位多见于皮肤和皮下组织,但也可能侵入深部组织和器官<sup>[2-3]</sup>。在家畜中,动物皮肤受伤或换牙期间,易引发疾病,表现为慢性化脓性肉芽肿疾病<sup>[4]</sup>。

棒状杆菌广泛存在于动物和环境中,随着基因组学技术的发展,全基因组测序也已成为鉴定和分类棒状杆菌的重要手段<sup>[5]</sup>。在诊断中,若放线菌除感染患牛皮肤外还能感染软组织,则考虑林氏棒状杆菌(*Corynebacterium hindlerae*)<sup>[6]</sup>。林氏棒状杆菌是一种革兰阳性球杆菌,与分枝杆菌、游动放线菌和嗜皮菌同为棒状杆菌属,是一种兼性细胞内寄生菌。除了皮肤,该菌会引起胸腺、肺、软组织器官的软组织病,感染后,典型症状为牛的体表出现化脓性病变,会导致病牛消瘦、精神不振、动作迟缓、生产性能下降等<sup>[7]</sup>。目前,林氏棒状杆菌很少有系统分离鉴定的研究报道,且其分类地位、基因组特征及潜在生物学功能也未有相关研究。

本研究旨在从疑似患放线菌病的牛中采集渗出脓液,通过分离培养、形态学观察、分子生物学鉴定等方法对可疑放线菌进行鉴定,分析其药物敏感性,并对其进行全基因组测序分析,以期为新疆牛放线菌病防控提供一定理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

样本采集自新疆奎屯某规模化奶牛场5头患牛,每头牛选取鼻面部病变区域进行采样。剔除病灶周围5 cm×5 cm区域毛发,消毒,待自然干燥后,用无菌手术刀片轻刮病灶表面去除表层污染物,使用采集管采集溃疡灶深处渗出脓液,分类编号,于-20℃

保存。

### 1.2 主要试剂

2×Taq Plus Mastermix II 购自南京诺维赞生物科技股份有限公司;DNA Maker 购自北京全式金生物技术有限公司;生化鉴定管由杭州滨和微生物试剂有限公司提供;肉汤培养基(LB)、哥伦比亚血琼脂培养基、脑心浸液培养基(BHI)、脱纤维绵羊血、脱纤维马血均购自青岛高科园海博生物科技有限公司;Super Rde 核酸染液购自合肥兰杰柯科技有限公司;抗生素药物购自北京索莱宝有限公司。

### 1.3 细菌分离鉴定

将脓液接于BHI液体培养基中以制备菌悬液,置于37℃恒温摇床160 r/min培养12 h。将培养结束的菌悬液分别划线接种于含5%裂解马血的哥伦比亚血琼脂培养基、5%绵羊血的TSA培养基、BHI培养基、LB培养基中,并将培养至对数生长期的纯化菌液稀释 $1 \times 10^4$  CFU/mL后取100 μL涂布至BHI培养基,培养24 h后观察菌落形态。用接种环挑取纯化菌液并涂片镜检。依据《伯杰氏细菌系统鉴定手册》及商品化生化鉴定试剂盒说明书,对菌株进行生化鉴定。

### 1.4 透射电镜

对样本进行树脂包埋切片,经过重金属铅、铀染色后于透射电镜观察并记录图像。

### 1.5 PCR 鉴定

提取细菌DNA,使用16S rRNA基因通用引物(表1)进行PCR鉴定,引物由北京睿博兴科生物技术有限公司合成。根据林氏棒状杆菌烯酰辅酶A水合酶A8(*echA8*)基因(GenBank: CP059833.1)设计特异性引物,具体引物信息见表1。反应体系20 μL: 2×TaqPlus Mastermix II 10 μL,双蒸水6.0 μL,上下游引物各1.0 μL, DNA模板2 μL。

表1 PCR引物列表

基因	引物名称	引物序列(5'→3')	产物大小/bp	退火温度/℃
16S rRNA	27F	AGAGYTTAGATCCTGGCTCAG	1 541	55
	1492R	TACGGCTACCTTGTACGACTT		
<i>echA8</i>	F1	TCCAGTAAAGGGCGGCTAG	331	60
	R1	TGATGTCGCAGGCAAGAGC		

PCR 反应产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳 30 min 后, 通过凝胶成像系统观察条带结果。切下条带, 使用 PCR 产物凝胶提取试剂盒对产物纯化并送测序。将获得的基因序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对。使用 MEGA 11 软件, 通过 Neighbor-Joining 法与其他棒状杆菌属中同源性较高的 16S *rRNA* 基因序列构建系统发育树。

## 1.6 分离菌的药物敏感性试验

### 1.6.1 MH-F 肉汤与药物储备液制备

准备阳离子调节的 MHB 培养基, 将培养基冷却至 42~45 °C 后, 每升培养基中加入 100 mL 50% 的溶解马血和 1 mL  $\beta$ -NAD 储备液。选取药物粉末, 按照美国临床实验室标准化委员会 (CLSI) 选取溶剂进行配制及稀释。配制的药液用 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤后, 分装, -20 °C 冷冻保存备用。

### 1.6.2 初始菌液制备

平板计数法计算细菌数量, 用无菌生理盐水将菌液稀释至  $1 \times 10^6$  CFU/mL。

### 1.6.3 最小抑菌浓度 (MIC) 测定

用微量肉汤稀释法进行 MIC 的测定, 每种抗菌药物重复 3 个平行。培养结束后观察并统计结果, 采用分光光度计检测各组菌液培养前后  $OD_{600\text{nm}}$  值的变化, 药物的 MIC 值为孔内刚好澄清无针尖大小细菌生长的浓度。根据 EUCAST 欧盟药敏试验标准与中华人民共和国卫生行业标准中规定的敏感性折点值, 对菌株不同抗菌药物的敏感性进行判定。

## 1.7 小鼠致病性试验

30 只昆明小鼠购自湖南莱克景达实验动物有限公司。将小鼠随机分为 1 个空白对照组和 5 个试验组, 每组 6 只。5 个试验组小鼠分别腹腔注射  $1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^5$  CFU/mL 的菌液 1 mL, 空白对照组小鼠则注射生理盐水 1 mL。攻毒后继续观察, 记录存活率、临床症状及死亡时间。死亡小鼠立即解剖, 观察肝、脾、肺等器官病理变化。采集脏器并对样品进行 PCR 检测。

## 1.8 分离菌全基因组测序

将培养至对数生长期的菌液 12 000 r/min 离心 5 min, 收集菌体沉淀, 提取基因组 DNA。采用 Illumina TruSeq™ Nano DNA Sample Prep Kit 方法构建文库。使用 Trimmomatic 软件对原始测序数据进行质控<sup>[8]</sup>。使用 ABySS 拼接软件对优化序列进行多个 Kmer 参数的拼接, 得到最优的组装结果<sup>[9]</sup>。运用

GapCloser 软件对组装结果进行局部内洞填充和碱基校正<sup>[10]</sup>。

## 1.9 生物信息学分析

### 1.9.1 基因组分分析

使用 GeneMarkS 软件预测编码基因<sup>[11]</sup>。利用 RNAmmer-1.2<sup>[12]</sup> 和 tRNAscan-SE2.0.4<sup>[13]</sup> 软件对基因组中包含的 rRNA 和 tRNA 进行预测。分别用 Island Viewer<sup>[14]</sup>、Minced<sup>[15]</sup>、Phage Finder<sup>[16]</sup>, 对菌株的基因组岛、规律成簇间隔短回文重复序列 (CRISPR) 数量和前噬菌体个数进行预测。

### 1.9.2 基因组功能注释

利用同源蛋白质群 (COG) 数据库检测获得基因所对应的 COG 注释结果, 并根据 COG 注释结果对蛋白进行功能归类。利用京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 数据库检测基因参与的具体生物学通路。利用基因本体论 (GO) 数据库对蛋白序列进行注释, 然后提取 eggNOG 注释结果内的 GO 信息<sup>[17]</sup>。利用碳水化合物活性酶 (CAZy)、联合利用非冗余蛋白质 (NR)、转运蛋白分类 (TCDB)、瑞士蛋白质序列 (Swiss-Prot) 数据库对得到的序列进行比对与功能注释<sup>[18-19]</sup>。

### 1.9.3 菌株安全性分析

预测获得的所有基因蛋白质序列, 使用 BLASTP 软件, 通过综合的抗生素抗性基因 (CARD) 数据库<sup>[20]</sup>, 鉴定其致病因子与抗性基因。通过病原与宿主互作 (PHI)、毒力因子 (VFDB) 数据库对其毒力基因进行分析<sup>[21]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 细菌分离

分离菌在有氧及 5% CO<sub>2</sub> 环境中均生长良好, 在含 5% 裂解马血哥伦比亚血琼脂上形成光滑湿润、圆形凸起的白色或淡黄色菌落, 接种环挑取菌落时, 可观察到轻微黏丝现象, 如图 1 所示。

在 BHI 琼脂培养基 37 °C 培养 24 h 后, 分离菌形成光滑不透明的黄色菌落; 菌落呈扁平圆形, 表面光滑湿润, 边缘整齐无扩散性, 如图 2 所示。

在含 5% 绵羊血的 TSA 琼脂培养基中分离菌生长良好, 形成细小的乳白色不透明菌落, 菌落呈圆形隆起, 边缘整齐无扩散, 表面光滑湿润, 如图 3 所示。

在 LB 固体培养基 37 °C 培养, 分离菌株形成针尖大小的白色菌落, 菌落呈圆形微隆起, 边缘整齐无扩散, 表面光滑湿润, 如图 4 所示。

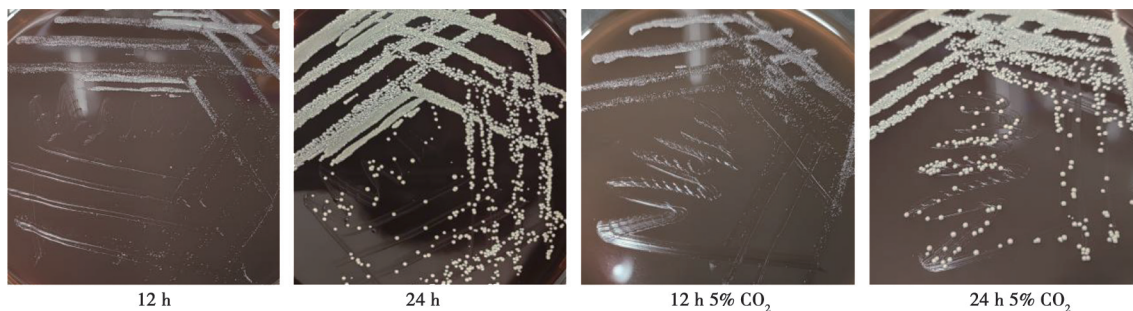


图1 分离菌在含5%裂解马血哥伦比亚血琼脂上生长的菌落形态

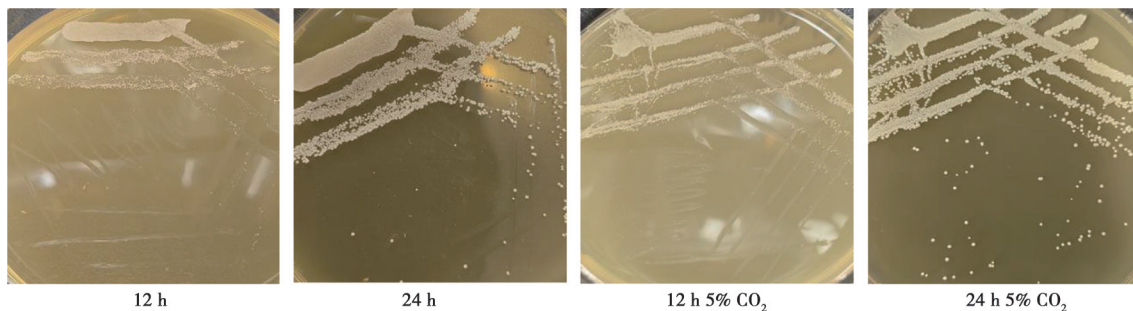


图2 分离菌在BHI琼脂培养基上生长的菌落形态

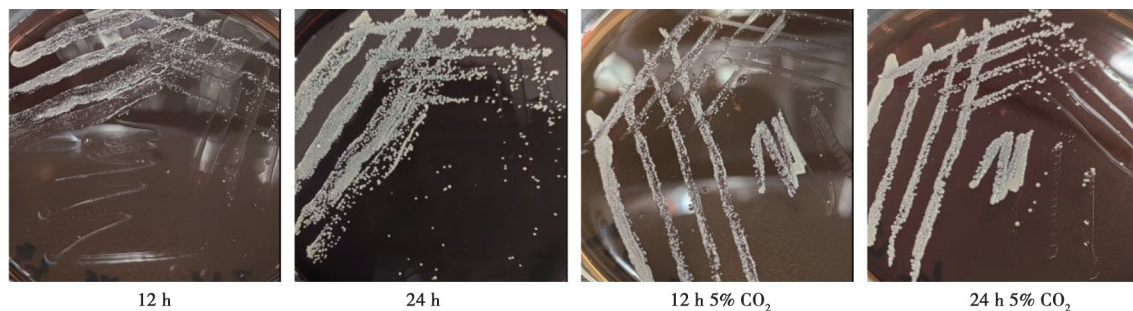


图3 分离菌在含5%绵羊血TSA琼脂培养基上生长的菌落形态

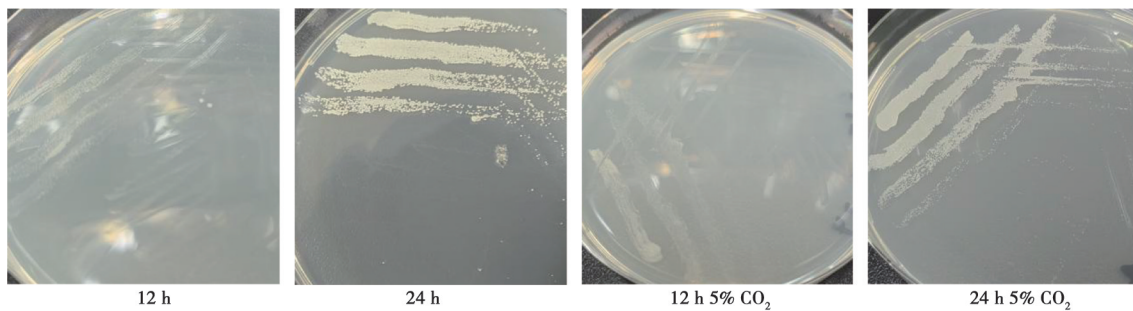


图4 分离菌在LB琼脂培养基上生长的菌落形态

镜检结果显示，分离菌在革兰染色后呈阳性，染色不均匀，且在老化的培养物中易褪色。单个菌体形态呈尖细畸形短杆状或球杆状，多数呈单在、V形或

一排排平行的栅栏状排列，如图5所示。该形态特征与《伯杰氏细菌系统鉴定手册》中棒状杆菌属放线菌亚群的典型表型一致。

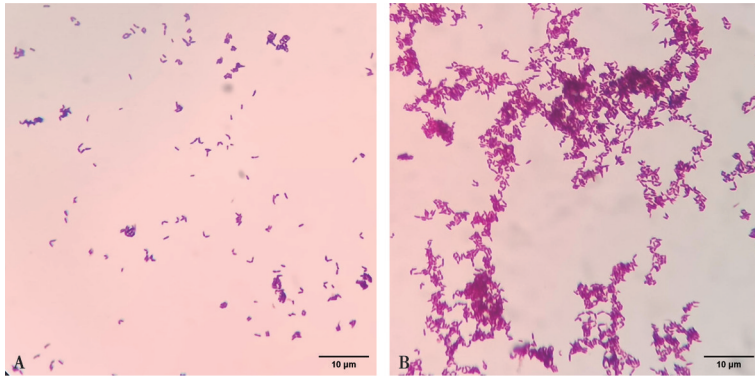


图5 分离菌培养 12 h (A) 和 24 h (B) 革兰染色镜检结果

分离菌的生化试验结果如表 2 所示。分离菌株能够发酵半乳糖、蔗糖、阿拉伯糖、葡萄糖、乳糖、果糖、麦芽糖和甘露醇，但不能发酵木糖和棉子糖。在酶活性方面，硝酸盐还原、淀粉水解、甲基红和硫化氢试验结果为阳性，而过氧化氢酶、七叶苷水解、V-P、尿素酶和木醇发酵试验均为阴性。

表 2 生理生化特性鉴定

项目	林氏棒状杆菌	项目	林氏棒状杆菌
半乳糖	+	硫化氢	+
蔗糖	+	淀粉水解	+
阿拉伯糖	+	硝酸盐还原	+
葡萄糖	+	甲基红	+
乳糖	+	甘油	+
果糖	+	七叶苷水解	-
甘露醇	+	V-P	-
麦芽糖	+	尿素酶	-
木糖	-	木醇发酵	-
棉子糖	-	过氧化氢酶	-

注：+为阳性，-为阴性。

### 2.2 细菌电镜观察

菌体呈球杆状，平均长度约 0.9~1.5 μm，直径约为 0.5~0.7 μm，未见明显分枝。高倍图像显示其细胞壁结构致密，厚度均匀，约为 20~30 nm，未发现异常增厚或破损。表面无鞭毛或荚膜结构，表面光滑，细胞膜紧贴细胞壁，细胞内可见散在异染物质。菌体以单个分散为主，偶见成对排列，未形成链状或簇状聚集，二分裂中期特征表明其处于活跃增殖状态，如图 6 所示。

### 2.3 分离菌的 PCR 鉴定

对 3 株疑似菌进行 16S *rRNA* 和 *echA8* 基因的 PCR 鉴定。电泳结果显示，分别在 1 541 bp (16S *rRNA*) 及 331 bp (*echA8*) 出现目的条带，与预期大小相符，如图 7 所示。测序结果在 NCBI 网站进行 BLAST 比对，分析结果显示，分离菌与林氏棒状杆菌同源性最高，同源性为 98.64%~99.86%。采用 Neighbor-Joining 法构建 16S *rRNA* 基因的系统进化树，系统进化树结果显示，棒状杆菌在同一个进化分支上，亲缘关系最近 (图 8)。分离株与 2 株林氏棒状杆菌聚为一簇，从分子水平上证实该分离菌株为林氏棒状杆菌，命名为 LSKT01。

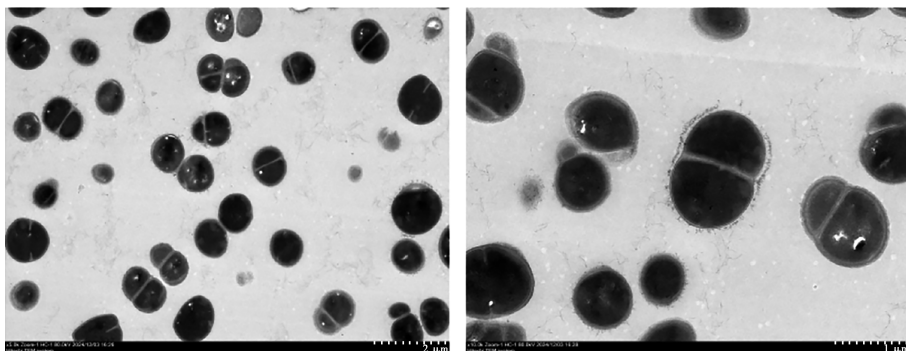
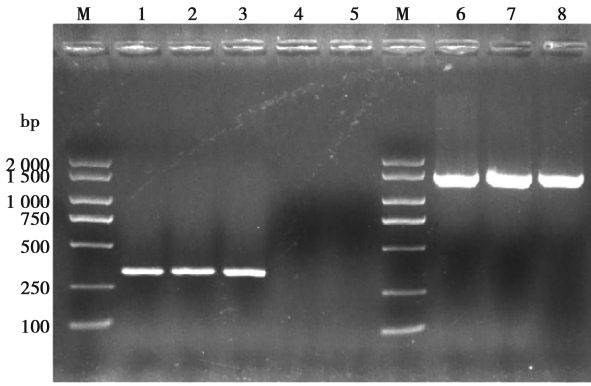
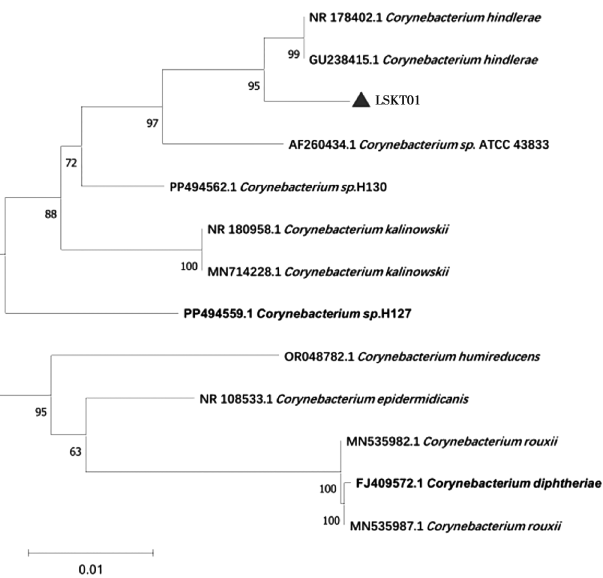


图 6 分离菌透射电镜观察结果



M. Marker DL2000; 1~3. 分离株 *echA8* 基因; 4~5. 空白无样品; 6~8. 分离株 16S *rRNA* 基因。

图7 *echA8*、16S *rRNA* 基因 PCR 产物电泳结果



▲. 本试验分离菌株。

图8 林氏棒状杆菌 LSKT01 的 16S *rRNA* 基因系统进化树

### 2.4 分离菌的药物敏感性试验

如表3所示,分离菌均对糖肽类的万古霉素、氨基糖苷类的庆大霉素、恶唑烷酮类的利奈唑胺以及四环素类药物高度敏感,对大环内酯类的红霉素、β-内酰胺类的青霉素、安沙霉素类的利福平表现中介,对林可酰胺类的克林霉素以及喹诺酮类、头孢菌素类药物表现耐药。代表分离菌的药敏试验结果如表3所示。

### 2.5 小鼠致病性试验

空白对照组全部存活,无异常症状;接种  $1 \times 10^8$  CFU/mL 菌液的试验组3只小鼠于24~28 h死亡,接种  $1 \times 10^9$  CFU/mL 菌液的6只小鼠均于12 h内死亡。死前小鼠无食欲,弓背、被毛凌乱、活动显著减少,

排泄功能异常,粪便干结并紧密黏附于肛周区域,眼部红肿睁开困难,且伴有脓性分泌物。低剂量组小鼠全部存活,被毛凌乱、轻度嗜睡、摄食量下降。解剖发现,死亡小鼠肝脏显著变白,表面可见针尖状坏死灶;肺部变白,肺叶表面及切面呈弥漫性苍白色。采集死亡小鼠的各脏器,可以从各脏器中分离鉴定出形态特征相同的菌株,表明分离菌株具有致病性及侵袭能力。

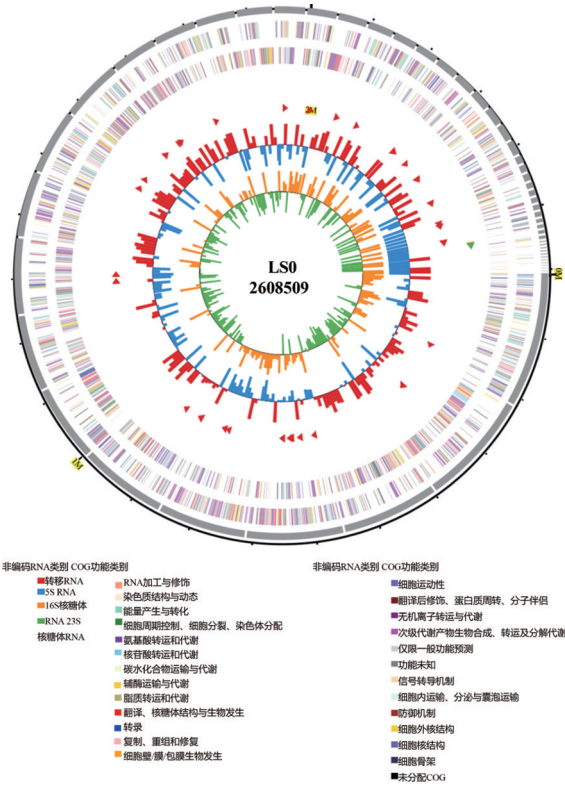
表3 分离菌的药敏试验结果

药物类型	药物名称	MIC 折点/ ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	敏感性
糖肽类	万古霉素	0.5	S
大环内酯类	红霉素	1	I
氨基糖苷类	庆大霉素	4	S
恶唑烷酮类	利奈唑胺	2	S
林可酰胺类	克林霉素	8	R
β-内酰胺类	青霉素	0.5	I
安沙霉素类	利福平	2	I
四环素类	多西环素	1	S
	四环素	1	S
喹诺酮类	莫西沙星	2	R
	环丙沙星	4	R
头孢菌素类	头孢噻肟	8	R
	头孢曲松	4	R

注: S 表现为敏感, I 表现为中介, R 表现为耐药。

### 2.6 LSKT01 菌株的基因组信息

LSKT01 菌株的基因组圈图如图9所示,结果表明分离株 LSKT01 的全基因组大小为 2 608 509 bp,平均 G+C 含量为 58.81%。共编码 2 482 个编码基因,所有编码基因总长度为 2 332 002 bp,编码基因平均长度为 939 bp,编码基因在基因组上的密度为 0.951 个/kb,编码基因的 GC 含量为 59.7%,编码区总长度占基因组总长度的 89.4%;正义链上基因数量为 1 182,负义链上基因数量为 1 300。含有 52 个 tRNA,1 个 5S rRNA,1 个 16S rRNA,1 个 23S rRNA,23S rRNA 序列总长度占基因组序列总长度为 0.11%;1 个 CRISPR-Cas,CRISPR1 所在区域为 13 041~14 229 bp,含有 20 个重复序列,重复序列平均长度为 28 bp,间隔序列数为 19,间隔序列平均长度 33 bp。LSKT01 含有 15 个前噬菌体,最长前噬菌体长度为 21 123 bp。菌株全基因组序列已上传至 NCBI 数据库(登录号: PRJNA1314966)。



圈图的最外面一圈为基因组大小的标识；第2圈和第3圈为正链、负链上的CDS，不同的颜色表示CDS不同的COG的功能分类；第4圈为rRNA和tRNA；第5圈为GC含量；最内一圈为GC skew (GC含量偏移)。

图9 LSKT01菌株基因组圈图

## 2.7 LSKT01菌株的基因注释

### 2.7.1 LSKT01菌株功能注释

利用COG、GO、KEGG、NR、Swiss-Prot数据库，对2482个编码基因进行基因功能比对注释，结果显示(图10)，NR数据库注释出了2419个基因，覆盖率最高，达97.46%；其次分别为COG、Swiss-Prot、KEGG数据库，覆盖率分别为81.91%、60.96%、54.51%；GO数据库注释覆盖率最低，为34.09%。

### 2.7.2 GO功能注释和分类

如图11所示，GO注释包括细胞组分(cellular component)、分子功能(molecular function)和生物过程(biological process)3个方面的内容。在细胞组成方面，细胞外围(cell periphery)相关基因占比最高，达44.32%；生物膜(membrane)相关基因占比48.81%。在分子功能方面，转移酶活性(transferase activity)和离子结合(ion binding)是富集程度最高的2个途径，分别占比20.44%与20.33%。生物过程方面，细胞代谢过程(cellular metabolic process)相关基因数量最多，占比57.91%；其次为有机物质代谢过程(organic substance metabolic process)，占比

56.61%；此外，氧化还原过程(oxidation-reduction process)相关基因占比9.69%。

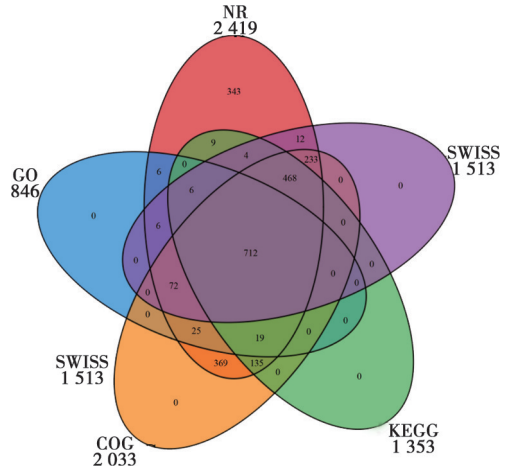


图10 基础数据库共有和特有注释分析韦恩图

### 2.7.3 COG功能注释和分类

COG结果显示(图12)，除16.97%的基因未注释到具体功能外，LSKT01菌株的基因主要集中在氨基酸转运与代谢(amino acid transport and metabolism)(10.18%)、无机离子运输与代谢(inorganic ion transport and metabolism)(9.54%)、转录(transcription)(8.76%)等关键代谢和调控过程。其次，有159个基因与翻译、核糖体结构和生物合成(translation, ribosomal structure and biogenesis)(7.82%)相关，如图12所示。

### 2.7.4 KEGG功能注释和分类

LSKT01菌株的KEGG注释结果见图13。结果表明，在KEGG功能注释中，与代谢通路相关的基因最多，包括全局概览图谱(global and overview maps)(89.5%)、碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)(15.48%)、氨基酸代谢(amino acid metabolism)(15.08%)相关基因；其次为遗传信息处理相关基因，最多为复制与修复(replication and repair)(1.17%)相关基因。此外还发现18个基因与萜类与聚酮类化合物代谢(metabolism of other amino acids)有关。

### 2.7.5 CAZy功能注释和分类

LSKT01菌株编码基因在CAZy数据库注释结果见图14。结果显示共有60个基因被注释到4类活性酶中，其中，30个基因被注释为糖基转移酶(glycosyltransferases)，占50%；25%的基因被注释为糖苷水解酶(glycoside hydrolases)；23.33%的基因被注释为碳水化合物酯酶(carbohydrate esterases)；还有1.67%的基因被注释为碳水化合物酶结合模块(carbohydrate-binding module)。

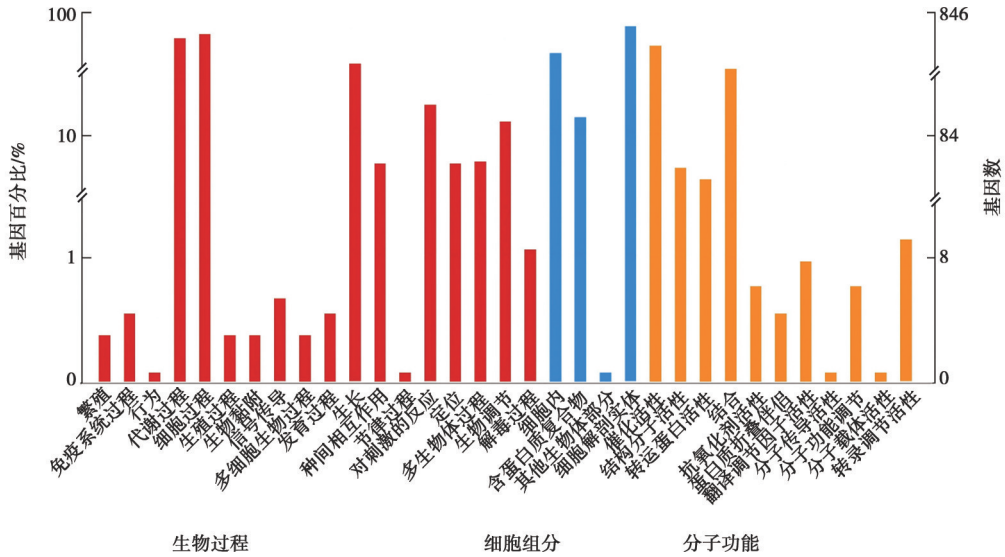


图 11 GO 功能注释

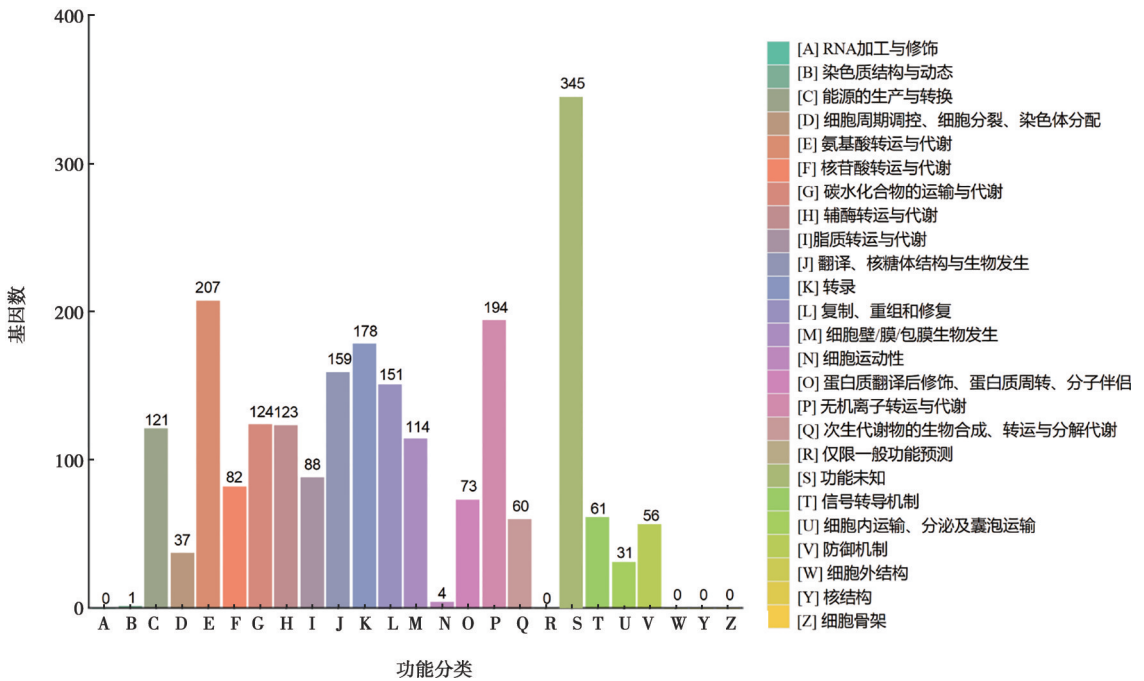


图 12 COG 功能注释

### 2.7.6 TCDB 功能注释和分类

LSKT01 菌株的 TCDB 分析结果显示 (图 15), 共有 474 个基因被注释。其中主要有 212 个基因编码初级主动转运蛋白, 占比最高, 为 44.73%; 电化学位驱动转运蛋白次之, 占 26.58%; 此外, 有 31 个基因与通道蛋白相关。

### 2.8 LSKT01 菌株的安全性分析

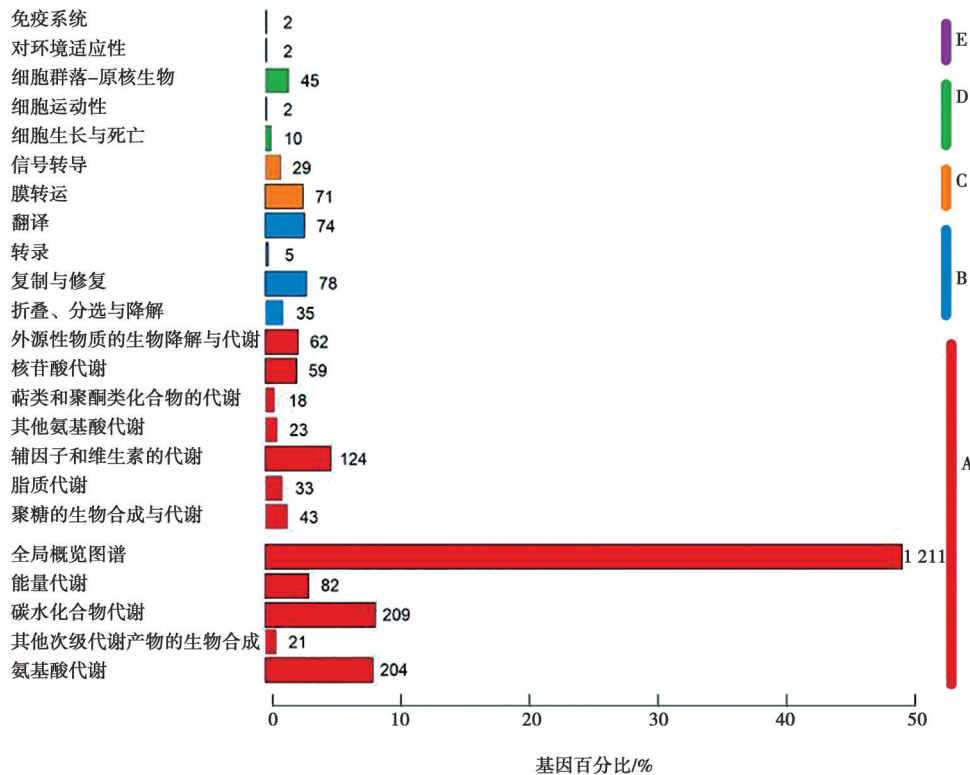
经 CARD 分析发现 (图 16), LSKT01 菌株含有 60 个与耐药性相关的基因, 这些基因与多种抗生素类别有关, 如大环内酯类抗生素 (*carA*、*macB*)、双环霉素类抗生素 (*bcr-1*)、头孢菌素类抗生素

(*IreK*)、截短侧耳素类抗生素 (*TaeA*) 相关基因等。其中磷酸类抗生素与大环内酯类抗生素含有抗生素基因占比最高, 达 10.0%; 其次为氟喹诺酮类抗生素, 占 8.33%。

VFDB 分析结果显示 (表 4), LSKT01 菌株可能含有的 26 个毒力因子, 包括介导铁摄取、黏附作用、氨基酸和嘌呤代谢、应激生存因子、免疫逃逸等蛋白。其中铁摄取系统 (iron uptake) 相关的基因占比最高, 其次为调控系统 (regulatory system), 分别为 45.16% 和 16.13%。PHI 分析结果显示 (图 17), 分离株 LSKT01 共注释到 16 个基因, 其中有 4 个基因

突变后导致菌株毒力增强，突变后导致菌株致病性丧失或者毒力减弱的基因分别有 1 个和 7 个，突变不会

影响菌株致病性的基因有 4 个，如图 17 所示。



A. 代谢通路; B. 遗传信息处理; C. 环境信息处理; D. 细胞过程; E. 生物系统。

图 13 KEGG 功能注释

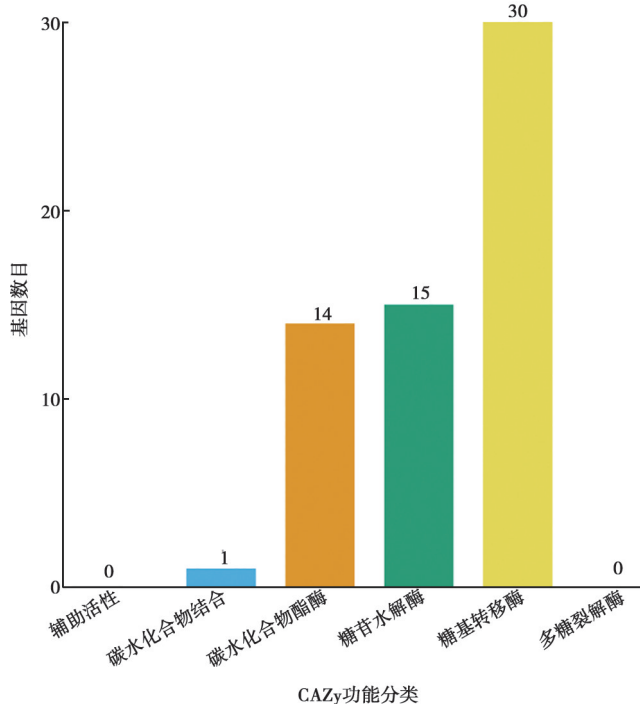


图 14 CAZy 功能注释

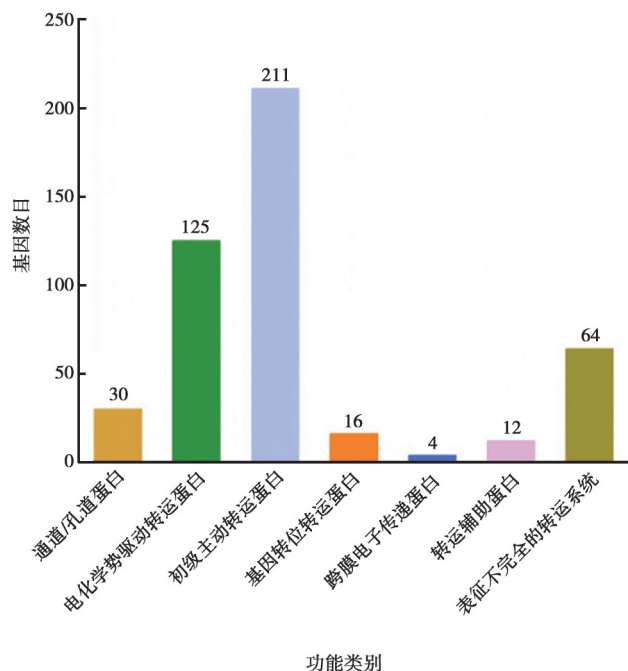


图 15 TCDB 功能注释图

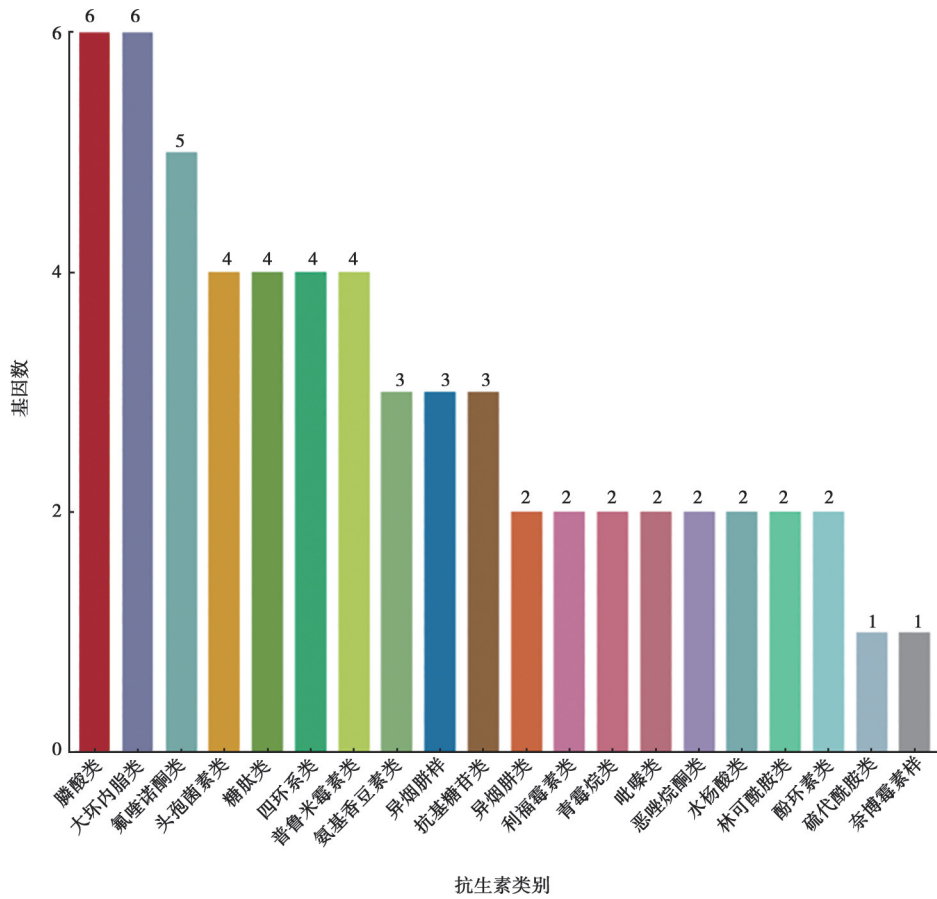


图 16 CARD 结果注释

表 4 VFDB 注释结果

毒力因子类别	毒力因子名称	相关基因	毒力因子类别	毒力因子名称	相关基因
黏附	<i>SpaA</i> 型菌毛	<i>srtA</i>	氨基酸和嘌呤代谢	赖氨酸合成	<i>lysA</i>
	<i>SpaD</i> 型菌毛	<i>srtB</i> 、 <i>srtC</i>	细胞表面成分	<i>GPL</i> 基因座	<i>rmlA</i>
铁摄取	ABC 转运蛋白	<i>fagA</i>		海藻糖循环 ABC 转运蛋白	<i>sugC</i>
		<i>fagB</i>	铜摄取	铜外排蛋白	<i>ctpV</i>
		<i>fagC</i>	免疫逃逸	荚膜	<i>rmlB</i>
		<i>fagD</i>	脂质与脂肪酸代谢	泛酸合成	<i>panC</i>
	ABC 型血红素转运蛋白	<i>hmuT</i>	其他	毒力相关蛋白 (巴尔通体属)	<i>vapA5</i>
	<i>hmuU</i>	吞噬体滞留	酪氨酸磷酸酶	<i>ptpA</i>	
	<i>hmuV</i>	蛋白酶	蛋白酶体相关蛋白	<i>mpa</i>	
调控系统	白喉毒素阻遏蛋白 <i>DtxR</i>	<i>dtxR</i>			<i>pafA</i>
	<i>SenX3</i>	<i>senX3</i>	应激生存因子	过氧化氢酶	<i>katA</i>
	<i>Sigma A</i>	<i>sigA/rpoV</i>			
	<i>Sigma D</i>	<i>sigD</i>			
	<i>WhiB3</i>	<i>whiB3</i>			

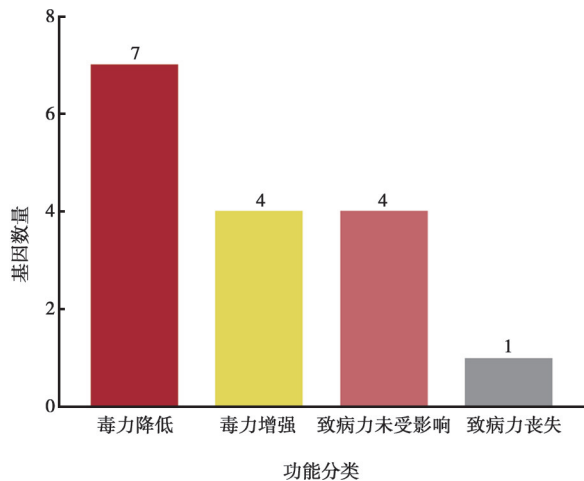


图 17 PHI 结果注释图

### 3 讨论

林氏棒状杆菌引起的慢性皮肤传染病，常导致放线菌肿和慢性化脓<sup>[22]</sup>。本研究从新疆奎屯某规模化牛场患有皮肤病变的肉牛中分离出目的菌株，进行 16S *rRNA* 测序分析、菌落形态、菌体形态观察及生化试验，成功分离鉴定出林氏棒状杆菌。分离纯化与鉴定结果显示，分离菌在有氧及 5% CO<sub>2</sub> 环境中均生长良好，在血琼脂培养基与通用培养基中均能良好生长；该结果与伪结核棒状杆菌相似，菌落在血平板呈黄白色、不透明样<sup>[23-24]</sup>。研究表明，该菌虽然能在改良 Tinsdale 培养基（modified Tinsdale medium, MTM）上形成具有黑色晕圈黑色菌落，但是其与白喉棒状杆菌没有密切的亲缘关系，且不携带白喉毒素基因<sup>[25]</sup>。生化结果与 Bernard 等<sup>[25]</sup> 研究基本相似，本试验分离菌过氧化氢酶呈阴性，且能够发酵甘露醇，系不同菌株之间存在生化特性差异。本试验镜检结果、电镜结果与棒状杆菌属的典型形态一致，未观察到放线菌特征的分枝或分生孢子结构。棒状杆菌可根据其致病性形成明显聚类，致病菌株与非致病菌株在进化树上分属不同分支；16S *rRNA* 基因的系统进化树结果显示，卡利诺夫斯基棒状杆菌与表皮致病菌对于林氏棒状杆菌具有较高的亲属关系，在同一分支上，显示 LSKT01 菌株的致病能力；与工业菌株谷氨酸棒状杆菌亲属关系较远。

本试验药敏结果显示分离菌对多种常用抗生素表现出不同程度的耐药性，尤其是林可酰胺类的克林霉素以及喹诺酮类、头孢菌素类药物；与 Bernard 等<sup>[25]</sup> 结果相比，两菌株均对万古霉素、庆大霉素、利奈唑胺和四环素类抗生素表现敏感，均对环丙沙星耐药，在其他抗菌药物敏感性上存在一定差异，可能存在不同地理位置差异。研究表明，棒状杆菌属细菌对多种

抗菌药物的敏感性存在差异，且对头孢菌素有较高的耐药性<sup>[26]</sup>，本研究结果与之相符。氨基糖苷类药物难以穿透脓肿，因此不推荐使用<sup>[27]</sup>。Pires 等<sup>[28]</sup> 研究发现，牛棒状杆菌对 β-内酰胺类抗生素敏感，使用阿莫西林克拉维酸钾可以有效抑制牛棒状杆菌在小鼠皮肤上的持续感染，并且在停止治疗后，小鼠皮肤微生物组能够恢复。白玉等<sup>[29]</sup> 研究结果表明，使用碘液对病变皮肤进行局部涂抹，能够改善皮肤病变。本试验小鼠致病性试验结果表明，林氏棒状杆菌具有一定的致病性，当攻毒剂量为 1×10<sup>8</sup> CFU/mL 时，能够在短时间内导致小鼠死亡。

本试验 KEGG 注释结果表明，与代谢通路相关的基因最多，18 个基因与萜类和聚酮化合物的代谢有关，可能参与具有抗菌作用的次级代谢产物。GO 注释结果中，细胞组成方面的细胞外围、生物膜相关基因占比最高，表明 LSKT01 菌株广泛参与细胞膜结构与跨膜运输功能，在与外界环境物质交换及细胞内物质代谢方面较活跃；在分子功能方面，其在催化生化反应、信号传递的过程中功能丰富。COG 结果与上述注释结果相似，表明其有显著的环境适应性，能够高效利用环境中的碳源和氮源来维持生存及生长，能在微环境改变时切换代谢状态。Pal 等<sup>[30]</sup> 通过比较基因组学分析发现，致病性棒状杆菌的核心基因在代谢、宿主-病原互作相关通路中更为富集，LSKT01 表现的这些功能与致病性相关密切。CAZy 注释进一步表明，LSKT01 菌株具有如糖基转移酶和糖苷水解酶等的活性酶，可能参与其在碳水化合物降解和转化。TCDB 分析结果表明，LSKT01 菌株以直接能量消耗进行初级主动运输为主，次级主动运输为辅。

本试验 CARD 注释结果表明，LSKT01 菌株拥有多种抗生素类别和耐药机制，可能对耐药基因关联的抗生素具有抗性，包括常见的氟喹诺酮类、大环内酯类、氨基糖苷类、头孢菌素类等。*MacB* 属于 VII 型 ABC 转运蛋白超家族，其不直接跨内膜转运底物，而是利用胞质 ATP 水解的能量进行驱动周质的机械运动，最初因介导大环内酯耐药被发现<sup>[31]</sup>。*IreK* 基因编码一种跨膜激酶，能够维持细胞壁完整性，调控肽聚糖合成与代谢，携带该基因菌株对 β-内酰胺类，尤其对三代头孢表现为固有耐药<sup>[32]</sup>。药敏试验结果显示对氟喹诺酮类、头孢菌素类抗生素表现耐药，对大环内酯类抗生素表现中介，该菌株耐药基因预测结果与药敏试验结果基本一致。VFDB 分析的结果表明，与黏附、铁摄取相关的毒力因子在许多棒状杆菌属中普遍存在，主要功能可能为适应特定生态环境<sup>[33]</sup>；而荚膜（*rmlB*）、酪氨酸磷酸酶（*ptpA*）、过氧化氢酶（*katA*）等多种免疫逃避相关基因，显示出

## LSKT01 菌株持久感染的的能力。

综上, 本研究成功从新疆奎屯某牛场患皮肤病变牛中分离并鉴定出 1 株林氏棒状杆菌, 并揭示了该菌株的遗传信息, 为进一步探究该菌生物学特性和致病机制提供基础数据。

## 参考文献:

- [1] WATTS J L, LOWERY D E, TEEL J F, et al. Phylogenetic studies on *Corynebacterium bovis* isolated from bovine mammary glands [J]. *J Dairy Sci*, 2001, 84 (11): 2419-2423.
- [2] FERNANDEZ-PITTOL M, BOSCH J, MUÑOZ J, et al. Skin infection by *Corynebacterium diphtheriae* and *Streptococcus pyogenes*: an unusual association [J]. *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed)*, 2019, 37 (10): 678-679.
- [3] 栗福星. 牛放线菌病的防治策略分析 [J]. *中国畜禽种业*, 2022, 18 (2): 152-153.
- [4] GABAY S, TENE Y, BEN-AMI R, et al. *Corynebacterium bovis* surgical site infection and brain abscess: the first case report and literature review [J]. *IDCases*, 2023, 33: e01782.
- [5] DE OLIVEIRA MOURA E, DO NASCIMENTO RANGEL A H, DE MELO M C N, et al. Evaluation of microbiological, cellular and risk factors associated with subclinical mastitis in female buffaloes [J]. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2017, 30 (9): 1340-1349.
- [6] 王建新. 牛放线菌病的诊断与防治技术 [J]. *当代畜牧*, 2022 (3): 91-92.
- [7] 褚洪忠, 刘建明, 马军, 等. 牛放线菌病的诊断与治疗 [J]. *当代畜牧*, 2022 (4): 19-20.
- [8] BOLGER A M, LOHSE M, USADEL B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30 (15): 2114-2120.
- [9] SIMPSON J T, WONG K, JACKMAN S D, et al. ABySS: a parallel assembler for short read sequence data [J]. *Genome Res*, 2009, 19 (6): 1117-1123.
- [10] XU M, GUO L, GU S, et al. TGS-GapCloser: a fast and accurate gap closer for large genomes with low coverage of error-prone long reads [J]. *Gigascience*, 2020, 9 (9): gaa094.
- [11] BESEMER J, BORODOVSKY M. GeneMark: web software for gene finding in prokaryotes, eukaryotes and viruses [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: W451-W454.
- [12] LAGESEN K, HALLIN P, RØDLAND E A, et al. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35 (9): 3100-3108.
- [13] GAO Y, LIU X, LI J. Targeting tRNA methyltransferases: from molecular mechanisms to drug discovery [J]. *Sci China Life Sci*, 2025, 68 (9): 2550-2567.
- [14] BERTELLI C, LAIRD M R, WILLIAMS K P, et al. IslandViewer 4: expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45: W30-W35.
- [15] GRISSA I, VERGNAUD G, POURCEL C. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35: W52-W57.
- [16] FOUTS D E. Phage\_Finder: automated identification and classification of prophage regions in complete bacterial genome sequences [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34 (20): 5839-5851.
- [17] JENSEN L J, JULIEN P, KUHN M, et al. eggNOG: automated construction and annotation of orthologous groups of genes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 36: D250-D254.
- [18] ALTSCHEL S F, GISH W, MILLER W, et al. Basic local alignment search tool [J]. *J Mol Biol*, 1990, 215 (3): 403-410.
- [19] HUSSEIN A, ZHANG X, STOKES D L. Numerical model for electrogenic transport by the ATP-dependent potassium pump KdpFABC [J]. *Biophys Rep*, 2024, 4 (3): 100169.
- [20] JIA B, RAPHENYA A R, ALCOCK B, et al. CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45 (D1): D566-D573.
- [21] CHEN L, XIONG Z, SUN L, et al. VFDB 2012 update: toward the genetic diversity and molecular evolution of bacterial virulence factors [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: D641-D645.
- [22] 魏小利. 牛放线菌病的诊断与治疗 [J]. *现代农村科技*, 2022 (3): 51.
- [23] 刘泽武, 樊月圆, 袁嘉芮, 等. 1 株羊源伪结核棒状杆菌的分离鉴定及耐药性分析 [J]. *中国畜牧兽医*, 2025, 52 (3): 1405-1415.
- [24] 陈关雄, 李双洪, 李继明, 等. 圭山山羊伪结核棒状杆菌的分离及鉴定 [J]. *云南畜牧兽医*, 2024 (6): 5-9.
- [25] BERNARD K A, BURDZ T, PACHECO A L, et al. *Corynebacterium hindlerae* sp. nov., derived from a human granuloma, which forms black colonies and black halos on modified Tinsdale medium but is not closely related to *Corynebacterium diphtheriae* and related taxa [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2021, 71 (8). DOI: 10.1099/ijsem. 0.004919.
- [26] KLEYMANN A M, ZAWADZKI N A, FONG D L, et al. *Corynebacterium bovis* growth in tissue culture conditions and media [J]. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2024, 63 (6): 655-661.
- [27] HENNART M, PANUNZI L G, RODRIGUES C, et al. Population genomics and antimicrobial resistance in *Corynebacterium diphtheriae* [J]. *Genome Med*, 2020, 12 (1): 107.
- [28] PIRES E M, PUGAZHENTHI U, FINK M K, et al. Antibiotic treatment of *Corynebacterium bovis*-associated clinical disease in NSG mice [J]. *Comp Med*, 2023, 73 (6): 461-465.
- [29] 白玉, 尹良宏, 卢胜明. 牛棒状杆菌感染及其防治措施 [J]. *实验动物科学*, 2015, 32 (1): 51-54.
- [30] PAL S, SARKAR I, ROY A, et al. Comparative evolutionary genomics of *Corynebacterium* with special reference to *Codon* and amino acid usage diversities [J]. *Genetica*, 2018, 146 (1): 13-27.
- [31] GREENE N P, KAPLAN E, CROW A, et al. Antibiotic resistance mediated by the MacB ABC transporter family: a structural and functional perspective [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 950.
- [32] IANNETTA A A, MINTON N E, UITENBROEK A A, et al. IreK-mediated, cell wall-protective phosphorylation in *Enterococcus faecalis* [J]. *J Proteome Res*, 2021, 20 (11): 5131-5144.
- [33] NASIM F, DEY A, QURESHI I A. Comparative genome analysis of *Corynebacterium* species: the underestimated pathogens with high virulence potential [J]. *Infect Genet Evol*, 2021, 93: 104928.