

## 研究报告

## 成都市市售食品中蜡样芽胞杆菌污染状况与毒力基因分析

白凤岚,罗梦幽,屈云,陈娟,唐俊妮

(西南民族大学生命科学与技术学院 青藏高原动物遗传资源保护与  
利用教育部重点实验室,四川 成都 610041)

**摘要:**目的 研究成都市市售食品中蜡样芽胞杆菌毒力基因携带及对抗生素的耐药情况。方法 2014—2016年,在成都市农贸市场和路边摊点共采集食品样品 330 份,按照 GB 4789.14—2014《食品安全国家标准 食品微生物学检验 蜡样芽胞杆菌检验》分离疑似菌株,应用管家基因和 16S rDNA 测序鉴定蜡样芽胞杆菌,并针对分离菌株携带的毒力基因及对抗生素的耐药性进行检测。结果 2014—2016 年,蜡样芽胞杆菌总检出率为 17.6% (58/330),不同类型食品蜡样芽胞杆菌检出率差异有统计学意义( $\chi^2 = 29.683, P < 0.01$ ),不同年份的食品样品蜡样芽胞杆菌的分离率差异无统计学意义( $\chi^2 = 5.835, P > 0.05$ )。米面制品、即食凉拌类和腌卤制品是蜡样芽胞杆菌的主要污染食品。腹泻型毒素基因(*hbl, nhe, bceT, cytK, entFM*)的检出率远高于呕吐型毒素基因(*ces* 和 *cer*)。分离菌株对四环素、红霉素、克林霉素的耐药率分别为 29.3% (17/58)、24.1% (14/58) 和 22.4% (13/58)。结论 成都市市售食品中蜡样芽胞杆菌分离菌株携带毒力基因类型多样,对四环素、红霉素、克林霉素的耐药率较高,对食品安全具有潜在威胁。

**关键词:**食品;蜡样芽胞杆菌;分离;毒力基因;耐药;成都

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2019)05-0429-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2019.05.006

Contamination of *Bacillus cereus* in food and virulence genes analysis in Chengdu

BAI Fenglan, LUO Mengyou, QU Yun, CHEN Juan, TANG Junni

(Key Laboratory of Qinghai-Tibet Plateau Animal Genetic Resource and Utilization, College of Life Sciences and Technology, Southwest Minzu University, Sichuan Chengdu 610041, China)

**Abstract: Objective** The virulence genes and the antibiotic resistance of *Bacillus cereus* isolates from commercially available foods in Chengdu from 2014 to 2016 were investigated in this study. **Methods** From 2014 to 2016, 330 food samples were collected from farmers' market in Chengdu and roadside food stalls. Suspected strains were isolated according to the GB 4789.14-2014. The house-keeping genes detection and 16S rDNA were sequenced to further identify *B. cereus* isolates. The specific virulence genes and resistance to antibiotics of *B. cereus* were also detected. **Results** From 2014 to 2016, the total isolation rate of *B. cereus* was 17.6% (58/330); the *B. cereus* detection rates in different food types was significantly different ( $\chi^2 = 29.683, P < 0.01$ ). The *B. cereus* isolation rates in different years was not significantly different ( $\chi^2 = 5.835, P > 0.05$ ). Rice noodles, ready-to-eat salads and marinated products were the main contaminated foods for *B. cereus*. From 2014 to 2016, the detection rates of diarrhea-type toxin genes (*hbl, nhe, bceT, cytK, entFM*) were much higher than that of vomiting toxin genes (*ces* and *cer*). The resistance rates of the isolated strains to tetracycline (TCY), erythromycin (ERY) and clindamycin (CLI) were 29.3% (17/58), 24.1% (14/58) and 22.4% (13/58), respectively. **Conclusion** The result of this study indicated that the virulence genes of *B. cereus* isolated from the commercially available foods in Chengdu were diverse, and the resistance rate of *B. cereus* to TCY, ERY and CLI was relatively high, which posed a potential threat to food safety.

**Key words:** Food; *Bacillus cereus*; isolate; virulence genes; antimicrobial resistance; Chengdu

收稿日期:2019-08-01

基金项目:国家重点研发计划(2018YFD0500500);四川省科技计划项目(2019YJ0261,2018JY0540);西南民族大学中央高校基本科研业务费重点项目(2018NZD14)

作者简介:白凤岚 女 硕士生 研究方向为食品安全 E-mail:977708798@qq.com

通信作者:唐俊妮 女 教授 研究方向为食品安全与食品微生物 E-mail:junneytang@aliyun.com

蜡样芽胞杆菌是一种能形成芽胞的革兰阳性细菌,大多数菌株可在6~42℃范围内生长,并且能够在10~21℃和pH值6.0~8.5范围内产生肠毒素<sup>[1-2]</sup>。引起食物中毒的蜡样芽胞杆菌可分泌不同毒素,如腹泻毒素相关的溶血素BL、肠毒素T、肠毒素FM、细胞毒素K以及呕吐毒素cereulide等<sup>[3]</sup>。腹泻型食物中毒主要由肠毒素引起,其症状为腹泻、腹部痉挛和疼痛。呕吐型食物中毒由呕吐毒素cereulide引起,cereulide是一种耐热、耐酸碱和耐蛋白酶的多肽毒素<sup>[4]</sup>,是由cer和ces两个基因编码的产物<sup>[5]</sup>,食品被热处理也不能灭活此毒素<sup>[6]</sup>,中毒症状为恶心和呕吐,偶尔伴有腹泻和腹痛,严重则可引起横纹肌溶解和肝脏功能衰竭等<sup>[7]</sup>。另外,由蜡样芽胞杆菌引起的食物中毒与食物类型也有关联,呕吐型食物中毒通常与淀粉类食物有关,腹泻型食物中毒通常与乳制品、蔬菜和肉类有关<sup>[4]</sup>。

为了解近几年成都市市售食品中蜡样芽胞杆菌的污染状况,及时发现食品安全隐患,本研究对2014—2016年间收集的食品样品中蜡样芽胞杆菌的污染情况、毒力基因携带以及分离株的药敏情况等进行分析,以掌握成都市市售食品中流行的蜡样芽胞杆菌毒力特征。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品来源

2014—2016年期间从成都市菜市场、超市、路边小吃摊共采集330份食品样品,其中即食凉拌类68份、生肉类44份、蔬菜类68份、速冻食品类21份、米面制品类46份、腌卤制品34份、豆制品类43份、其他6份。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

HZQ-F160全温振荡培养箱、GHP-9080隔水式恒温培养箱均购自上海齐欣科学仪器有限公司,SW-CJ-2FD洁净工作台,202-3-5电热恒温干燥箱,MLS-3020高压灭菌锅,AKHL-III-24艾柯超纯水机,PL303电子天平,Eppendorf5804R型冷冻离心机,GalanzWD800B型微波炉。

甘露醇卵黄多黏菌素(MYP)培养基、多黏菌素B、50%卵黄、胰蛋白胍大豆肉汤(TSB)培养基均购自海博生物技术有限公司,Regular Agarose G-10型琼脂糖(西班牙Biowest),Gelview核酸染料、DL2000 Marker均购自宝生物工程(大连)有限公司,Master Mix(北京擎科新业科技有限公司),8种抗生素纸片(英国Oxoid Limited),50%甘油(天津市瑞金

特化学品有限公司),0.85%生理盐水,聚合酶链式反应(PCR)引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 蜡样芽胞杆菌的分离与纯化

按照GB 4789.14—2014《食品安全国家标准食品微生物学检验 蜡样芽胞杆菌检验》<sup>[8]</sup>进行。取25g样品,置于225ml生理盐水中混匀,取适当的稀释度接种到MYP琼脂平板上,(30±1)℃培养24~48h,蜡样芽胞杆菌在MYP平板上的典型菌落特征为粉红色,周围有白色至淡粉色沉淀环,从平板上挑取疑似菌落进行确证试验,并再次纯化进行后续分子鉴定。

#### 1.2.2 蜡样芽胞杆菌PCR分子鉴定及毒力基因检测

将分离活化后的菌株于TSB培养液37℃培养18~24h后,采用实验室建立的微波法提取菌株DNA<sup>[9]</sup>。以细菌的通用引物16S rDNA进行PCR扩增。引物序列(5'-3'):16S-27-F:AGAGTTTGATCC TGGCTCAG和16S-1492-R:GGTTACCTTGTTACGA CTT。PCR反应体系(20μl):PCR Mix 10μl,灭菌超纯水8.2μl,上下游引物各0.4μl,分离菌株模板DNA 1μl。PCR反应程序:95℃预变性5min;95℃变性40s,53℃退火50s,72℃延伸40s,35个循环;72℃再延伸10min。扩增产物用1%琼脂凝胶电泳检测,同时送样到生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序分析,序列进化树由DNAMAN(Version 8.0)软件比对分析并构建。用同样的方法检测蜡样芽胞杆菌的4个管家基因(*groEL*,*gyrB*,*urrA*,*rpoB*)<sup>[6]</sup>和蜡样芽胞杆菌不同的毒力基因<sup>[10-15]</sup>,引物序列、片段长度及退火温度见表1,扩增产物采用1%琼脂糖电泳和凝胶成像系统进行检测。

#### 1.2.3 蜡样芽胞杆菌药敏检测

药敏试验根据美国临床和实验室标准协会(CLSI)推荐的K-B纸片扩散法进行,药物敏感性试验结果严格参照CLSI M100-S27标准<sup>[16]</sup>进行判读,本研究采用的抗生素名称及浓度详见表2。

### 1.3 统计学分析

采用统计软件SPSS 18.0和Excel对检测结果进行分析,细菌耐药率进行卡方检验,以P<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 食品样品的分离与鉴定结果

330份食品样品中共58份样品检出蜡样芽胞杆菌(58株),总检出率为17.6%,见表3。不同年

表 1 蜡样芽胞杆菌管家基因和特异性毒力基因引物序列

Table 1 Primer sequences of *B.cereus* house-keeping genes and specific virulence genes

基因名称	引物名称	引物序列(5'-3')	产物长度/bp	退火温度/℃	参考文献
<i>groEL</i>	<i>groEL</i> -F	AGCTATGATTCGTGAAGGT	236	54	[6]
	<i>groEL</i> -R	AAGTAATAACGCCGTCGT			
<i>gyrB</i>	<i>gyrB</i> -F	ATTGGTGACACCGATCAAACA	365	51	[6]
	<i>gyrB</i> -R	TCATACGTATGGATGTTATTC			
<i>urrA</i>	<i>urrA</i> -F	GCGCGTTTCATTTGATTCATAG	300	55	[6]
	<i>urrA</i> -R	CACAACCTACCACCAATGGCACA			
<i>rpoB</i>	<i>rpoB</i> -F	CCACCAACAGTAGAAAATGC	174	52	[6]
	<i>rpoB</i> -R	AATTTACCAGTTTCTGGATC			
<i>nheA</i>	<i>nheA</i> -F	TACGCTAAGGAGGGGCA	475	55	[10]
	<i>nheA</i> -R	GTTTTTATTGCTTCATCGGCT			
<i>nheB</i>	<i>nheB</i> -F	CTATCAGCACTTATGGCAG	328	55	[10]
	<i>nheB</i> -R	ACTCCTAGCGGTGTTCC			
<i>nheC</i>	<i>nheC</i> -F	CGGTAGTGATTTGCTGGG	557	55	[10]
	<i>nheC</i> -R	CAGCATTCGTACTTGCCAA			
<i>bceT</i>	<i>bceT</i> -F	TTACATTACCAGGACGTGCTT	303	50	[11]
	<i>bceT</i> -R	TGTTTGTGATTGTAATTCAGG			
<i>entFM</i>	<i>entFM</i> -F	ATGAAAAAAGTAATTTGCAGG	596	50	[12]
	<i>entFM</i> -R	TTAGTATGCTTTTGTGTAACC			
<i>hblA</i>	<i>hblA</i> -F	AAGCAATGGAATACAATGGG	884	55	[12]
	<i>hblA</i> -R	AGAATCTAAATCATGCCACTGC			
<i>hblB</i>	<i>hblB</i> -F	AAGCAATGGAATACAATGGG	834	55	[12]
	<i>hblB</i> -R	AATATGTCCCAGTACACCCG			
<i>hblC</i>	<i>hblC</i> -F	GATACTAATGTGGCAACTGC	695	55	[12]
	<i>hblC</i> -R	TTGAGACTGCTGTCTAGTTG			
<i>hblD</i>	<i>hblD</i> -F	ACCGGTAACACTATTCATGC	1 081	55	[12]
	<i>hblD</i> -R	GAGTCCATATGCTTAGATGC			
<i>cytK</i>	<i>cytK</i> -F	AACAGATATCGGTCAAAAATGC	389	55	[13]
	<i>cytK</i> -R	CCAACCCAGTTACCAGTTCC			
<i>cer</i>	<i>cer</i> -F	CAAGTCAAGATAAGAGGCTTC	370	55	[14]
	<i>cer</i> -R	AAAGCTCTTGCCAAATAACC			
<i>ces</i>	<i>ces</i> -F	GCATTTCTGTAAGCAGAGGT	405	55	[15]
	<i>ces</i> -R	CCCTTTATCCCTTCGATGT			

表 2 8 种抗生素药物及其使用浓度与判定标准

Table 2 Antibiotic drugs and their concentrations with evaluation standards

抗生素名称	抗生素缩写	剂量/ $\mu\text{g}$	抑菌圈直径/mm		
			耐药(R)	中介(I)	敏感(S)
克林霉素	CLI	2	$\leq 14$	15~20	$\geq 21$
阿米卡星	AK	30	$\leq 14$	15~16	$\geq 17$
氯霉素	CHL	30	$\leq 12$	13~17	$\geq 18$
环丙沙星	CIP	5	$\leq 15$	16~20	$\geq 21$
四环素	TCY	30	$\leq 11$	12~14	$\geq 15$
亚胺培南	IPM	10	$\leq 13$	14~15	$\geq 16$
红霉素	ERY	15	$\leq 13$	14~22	$\geq 23$
庆大霉素	GEN	10	$\leq 12$	13~14	$\geq 15$

份的蜡样芽胞杆菌检出率差异无统计学意义( $\chi^2 = 5.835, P > 0.05$ ), 不同类型食品中蜡样芽胞杆菌检出率差异有统计学意义( $\chi^2 = 29.683, P < 0.01$ )。米面制品、即食凉拌类和腌卤制品是蜡样芽胞杆菌的主要污染食品。分离菌株经 16S rDNA PCR 扩增产物测序后, 登录美国生物技术信息中心(NCBI)网站进行 BLAST 比对, 结果与进化树中相邻的蜡样芽胞

杆菌 16S rDNA 同源性可达 100%, 与其他同源性达 99%。利用 DNAMAN 软件构建分离菌株的系统进化树见图 1。另外, 58 株分离菌株的 4 个管家基因(*groEL*, *gyrB*, *urrA*, *rpoB*)检出率均为 100.0%。结合管家基因检测和 16S rDNA 测序比对, 分离菌株可鉴定为蜡样芽胞杆菌。

## 2.2 分离菌株毒力基因检测结果

58 株分离菌株经 PCR 检测, 不同毒力基因的检测结果显示见表 4。分离菌株携带多个毒力基因的主要类型见表 5。

进一步分析毒力基因随时间的检出情况, 发现 2014 年分离的菌株中, 溶血素 *hbl* 基因(除 *hblB* 外)、非溶血性 *nhe* 基因、肠毒素 *bceT* 基因以及细胞毒素 *cytK* 基因更为流行; 2015 年分离的菌株中, 非溶血性 *nhe* 基因、溶血素 *hblD* 基因相对流行; 2016 年分离的菌株中, 溶血性 *hbl* 基因(除 *hblB* 外)、非溶血性肠毒素 *nhe* 基因、细胞毒素 *cytK* 基因、肠毒素 *entFM* 基因较为流行。2014—2016 年, *cytK*、*hblA*、*hblD*、*nheA*、*nheB*、*nheC* 和 *bceT* 基因的携带率整体偏

表3 2014—2016年不同食品类型蜡样芽胞杆菌检出率(%)

Table 3 Isolation results of *B.cereus* strains during the year of 2014-2016

样品种类	2014年(7~9月)	2015年(7~11月)	2016年(4~9月)	合计
生肉	4.0 (1/25)	0.0 (0/9)	0.0 (0/10)	2.3 (1/44)
蔬菜	11.1 (3/27)	3.8 (1/26)	0.0 (0/15)	5.9 (4/68)
速冻食品	25.0 (1/4)	0.0 (0/7)	10.0 (1/10)	9.5 (2/21)
米面制品	55.6 (5/9)	66.7 (2/3)	23.5 (8/34)	32.6 (15/46)
豆制品	22.2 (2/9)	7.7 (1/13)	19.0 (4/21)	16.3 (7/43)
腌卤制品	37.5 (3/8)	9.5 (2/21)	60.0 (3/5)	23.5 (8/34)
即食凉拌类	57.1 (8/14)	25.0 (5/20)	20.6 (7/34)	29.4 (20/68)
其他	25.0 (1/4)	0.0 (0/1)	0.0 (0/1)	16.7 (1/6)
合计	24.0 (24/100)	11.0 (11/100)	17.7 (23/130)	17.6 (58/330)

注:括号中的数据为检出样品份数/检测样品份数

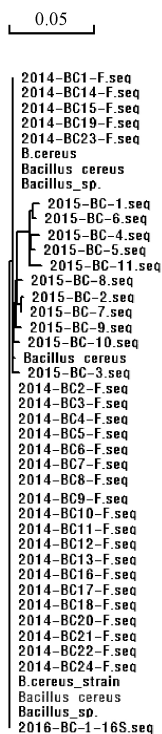


图1 部分菌株16S rDNA的序列比对进化树

Figure 1 16S rDNA sequence alignment phylogenetic tree of partial *B.cereus* isolates

高(>30%), *hblB* 基因始终未检出;分离菌株携带的腹泻型毒素基因(*hbl*, *nhe*, *bceT*, *cytK*, *entFM*)检出率远高于呕吐型毒素基因(*ces* 和 *cer*)。

### 2.3 分离菌株药敏检测结果

根据药敏检测及判定结果,58株菌株对8种抗生素存在不同程度的耐药,见图2。分离菌株对TCY、ERY和CLI的耐药率较高,分别为29.3%(17/58)、24.1%(14/58)和22.4%(13/58)。2014年的24株蜡样芽胞杆菌,对TCY、CIP和ERY的耐药率分别为37.5%(9/24)、25.0%(6/24)和25.0%(6/24);敏感率较高的为AK、IPM和GEN,敏感率均为79.2%(19/24)。2015年的11株蜡样芽胞杆菌,对TCY、CLI和ERY的耐药率分别为27.3%(3/11)、18.2%(2/11)和18.2%(2/11);所有菌株均对AK、CHL、IPM敏感。2016年的23株蜡样芽胞杆菌,对CLI、TCY、ERY的耐药率分别为26.1%(6/23)、21.7%(5/23)和21.7%(5/23);所有菌株均对AK和IPM敏感。可见,2014—2016年分离的蜡样芽胞杆菌对TCY、ERY和CLI的耐药率均较高。分离菌株中同时耐2种及以上抗生素的耐药类型主要有5种类型,详见表6。

表4 2014—2016年分离菌株毒力基因携带率(%)

Table 4 Results of virulence genes detection in *B.cereus* isolates during the year of 2014-2016

毒力基因名称	2014年(7~9月)	2015年(7~11月)	2016年(4~9月)	合计
<i>ces</i>	4.2 (1/24)	0.0 (0/11)	8.7 (2/23)	5.2 (3/58)
<i>cer</i>	4.2 (1/24)	0.0 (0/11)	8.7 (2/23)	5.2 (3/58)
<i>cytK</i>	54.2 (13/24)	0.0 (0/11)	43.5 (10/23)	39.7 (23/58)
<i>hblA</i>	41.7 (10/24)	0.0 (0/11)	34.8 (8/23)	31.0 (18/58)
<i>hblB</i>	0.0 (0/24)	0.0 (0/11)	0.0 (0/23)	0.0 (0/58)
<i>hblC</i>	37.5 (9/24)	0.0 (0/11)	34.8 (8/23)	29.3 (17/58)
<i>hblD</i>	37.5 (9/24)	90.9 (10/11)	47.8 (11/23)	51.7 (30/58)
<i>nheA</i>	37.5 (9/24)	81.8 (9/11)	60.9 (14/23)	55.2 (32/58)
<i>nheB</i>	41.7 (10/24)	54.5 (6/11)	69.6 (16/23)	55.2 (32/58)
<i>nheC</i>	100.0 (24/24)	36.4 (4/11)	60.9 (14/23)	72.4 (42/58)
<i>bceT</i>	50.0 (12/24)	0.0 (0/11)	39.1 (9/23)	36.2 (21/58)
<i>entFM</i>	0.0 (0/24)	0.0 (0/11)	69.6 (16/23)	27.6 (16/58)

表5 分离菌株携带多个毒力基因的主要类型( $n=58$ )

Table 5 Main types of multiple virulence genes

毒力基因类型	携带菌株数	携带率/%
<i>nheA+nheB+nheC</i>	23	39.7
<i>becT+cytK</i>	15	25.9
<i>hblA+hblC+hblD</i>	10	17.2
<i>cytK+entFM</i>	9	15.5
<i>bect+entFM</i>	8	13.8
<i>ces+cer</i>	3	5.2

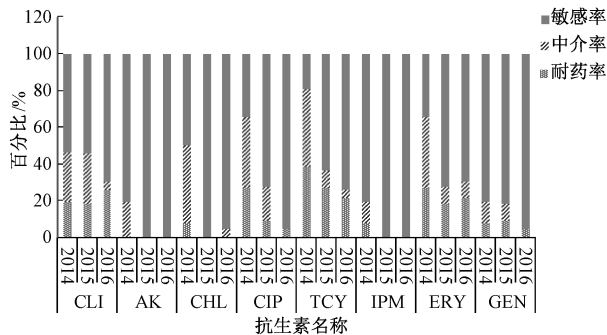


图2 2014—2016年分离的蜡样芽胞杆菌对8种抗生素的耐药情况

Figure 2 Drug sensitivity to 8 antibiotics of *B.cereus* isolates from 2014-2016

表6 分离菌株的耐药类型

Table 6 Main drug resistance types of *B.cereus* isolates

耐药类型	菌株数
TCY+CLI	2
CLI+GEN	1
GEN+ERY+CLI	1
CHL+CIP+IPM+ERY	1
CHL+CIP+TCY+IPM+ERY+GEN	1

### 3 讨论

近年来,我国各省市均有蜡样芽胞杆菌食物中毒的事件发生。陆子春等<sup>[17]</sup>在2011—2013年对佳木斯市学校食堂、超市、周边市场及路边小吃随机抽取餐饮食品、乳及乳制品和婴幼儿食品进行蜡样芽胞杆菌的检测,检出率为19.32%,发现煮熟米面制品污染最严重,其次为盒饭、凉拌米面制品和炒熟米面制品。解希帝等<sup>[18]</sup>2011—2015年对呼和浩特市消费市场随机抽取流动样品进行检测,蜡样芽胞杆菌总检出率为6.61%,其中熟制米面制品污染最严重,其次为乳粉制品及婴幼儿食品。常虹等<sup>[19]</sup>2012—2014年在达州市监测网点抽检熟制米面制品、婴幼儿配方米粉、巴氏消毒乳、奶粉类食品,蜡样芽胞杆菌检出率为18.05%,三年检出率分别为16.13%、28.00%和16.46%。刘顺等<sup>[20]</sup>2012—2014年针对湖北省鄂州市抽检肉及肉制品、地方性食品以及餐饮食品等,蜡样芽胞杆菌总检出率为

13.84%,且三年检出率呈逐年上升趋势。MERZOUGUI等<sup>[21]</sup>对2008—2010年摩洛哥地区抽取的牛奶和奶制品、香料、米饭、沙拉等样品进行检测,蜡样芽胞杆菌检出率为15.9%,其中牛奶及奶制品、沙拉、米饭的污染较为严重。TEWARI等<sup>[22]</sup>2013年从印度地区随机抽取生肉和肉制品进行检测,蜡样芽胞杆菌检出率高达30.9%。本研究于2014—2016年共采集成都市农贸市场和路边摊小吃各类食品330份,采样时间为夏秋季,蜡样芽胞杆菌总检出率为17.6%,结果与其他研究接近。米面制品、凉拌即食类和腌卤制品为成都市蜡样芽胞杆菌主要污染食品,也与其他研究结论相似。米面制品、凉拌即食类食品在售卖过程中长时间暴露于环境中,易被蜡样芽胞杆菌污染。本研究在一定程度上反映了成都市食品中蜡样芽胞杆菌的污染状况,应当引起相关部门重视。

现有研究<sup>[23]</sup>表明蜡样芽胞杆菌同时携带*hblA*、*hblC*、*hblD*基因时,菌株就能产生溶血性毒素BL。本研究分离的58株菌株中,有10株菌株同时携带上述*hbl*基因,说明这10株菌株具备产生溶血性毒素BL的能力,如果消费者食用携带该菌的食物,可能会引起食物中毒,应引起重视。携带非溶血性的肠毒素*nhe*基因、溶血毒素*hbl*基因是成都市蜡样芽胞杆菌的流行特征。REIS等<sup>[24]</sup>对从巴氏灭菌奶和奶粉中分离的蜡样芽胞杆菌*hbl*基因和BL毒素表达进行检测,发现分离菌株的BL高表达。孙婷婷等<sup>[25]</sup>对辽宁省婴幼儿配方食品和谷类辅助食品中蜡样芽胞杆菌进行检测,发现非溶血性的肠毒素*nhe*基因、溶血毒素*hbl*基因、肠毒素*bceT*基因和细胞毒素*cytK*基因是辽宁省乳源蜡样芽胞杆菌主要携带的毒力基因,携带2种以上毒力基因菌株的检出率为100%。刘成诚<sup>[26]</sup>从食用菌中分离蜡样芽胞杆菌,发现腹泻型基因的携带率高于呕吐型基因携带率,也与本研究结果一致。

菌株对抗生素的耐药性可能与使用抗生素的频率密切相关。曹飞扬<sup>[27]</sup>对腐乳中的蜡样芽胞杆菌进行药敏检测,发现腐乳中蜡样芽胞杆菌对青霉素(100%)和苯唑西林(100%)均耐药。诸葛石养等<sup>[28]</sup>2014年对广西米面制品中蜡样芽胞杆菌的耐药表型进行检测,发现菌株对CHL(32.20%)、TCY(30.05%)、GEN(25.42%)均有不同程度耐药,与本研究结果类似。MERZOUGUI等<sup>[21]</sup>对蜡样芽胞杆菌的抗生素耐药情况调查发现,分离菌株对氨苄青霉素(98.4%)、TCY(90.6%)、苯唑西林(100.0%)、头孢吡肟(100.0%)及青霉素(100.0%)耐药率均较高,对CHL(67.2%)、ERY(84.4%)和GEN

(100.0%)较为敏感。CHON等<sup>[29]</sup>在2012年对从韩国食物中分离的蜡样芽胞杆菌进行药敏检测,发现所有菌株均对 $\beta$ -内酰胺类抗生素有较高的耐药性。KIM等<sup>[15]</sup>在2015年对从发酵大豆中分离的蜡样芽胞杆菌进行药敏检测,发现菌株对氨苄西林、头孢吡肟、苯唑西林和青霉素均表现为耐药。不同国家和地区的研究结果虽有差异,但分离的蜡样芽胞杆菌均具有较高的耐药性,应引起相关部门注意。

本研究通过连续3年对成都市市售食品中蜡样芽胞杆菌进行分离检测,初步掌握成都市食品中蜡样芽胞杆菌的污染水平,为成都市蜡样芽胞杆菌引起食物中毒的风险评估和治疗措施提供一定的参考价值,也可为相关部门的防控和管理提供参考。

## 参考文献

- [1] DUPORT C, JOBIN M, SCHMITT P. Adaptation in *Bacillus cereus*: from stress to disease [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7:1550.
- [2] GRIFFITHS M W. Toxin production by psychrotrophic *Bacillus* spp. present in milk [J]. *Journal of Food Protection*, 1990, 53(9):790-792.
- [3] 田万帆,张荣,龙虎,等.生鲜食品中蜡样芽胞杆菌毒力基因及耐药性研究[J].*食品工业科技*,2018,39(6):135-139,151.
- [4] JUNEJA V K, GOLDEN C E, MISHRA A, et al. Predictive model for growth of *Bacillus cereus* at temperatures applicable to cooling of cooked pasta [J]. *Journal of Food Science*, 2019, 84(3):590-598.
- [5] ZDEMIR F, ARSLAN S. Molecular characterization and toxin profiles of *Bacillus* spp. isolated from retail fish and ground beef [J]. *Journal of Food Science*, 2019, 84(3):548-556.
- [6] 白凤岚,陈松,罗梦幽,等.食品中蜡样芽胞杆菌的分离及携带毒力基因的检测[J].*现代食品科技*, 2018, 34(10):204, 247-252.
- [7] 李红娜,袁飞,张峰,等.食品中蜡样芽胞杆菌的检测方法研究进展[J].*食品工业*, 2016, 37(8):240-244.
- [8] 中华人民共和国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,2014.
- [9] 王琼,唐俊妮,汤承,等.一种采用微波炉加热快速提取细菌DNA用于PCR扩增的方法[J].*西南民族大学学报(自然科学版)*, 2015, 41(2):150-155.
- [10] BANERJEE M, NAIR G B, RAMAMURTHY T. Phenotypic & genetic characterization of *Bacillus cereus* isolated from the acute diarrhoeal patients [J]. *Indian Journal of Medical Research*, 2011, 133(1):88-95.
- [11] AGATA N, OHTA M, ARAKAWA Y, et al. The *bceT* gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxigenic protein [J]. *Microbiology*, 1995, 141(4):983-988.
- [12] ASANO S I, NUKUMIZU Y, BANDO H, et al. Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(3):1054-1057.
- [13] GUINEBRETIÈRE M H, BROUSSOLLE V, NGUYEN-THE C. Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and foodborne *Bacillus cereus* strains [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40(8):3053-3056.
- [14] LUND T, DE BUYSER M L, GRANUM P E. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis [J]. *Molecular Microbiology*, 2000, 38(2):254-261.
- [15] KIM G H, FORGHANI F, OH D H. Rapid detection of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains using triple-primer polymerase chain reaction (PCR) assay [J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2013, 7(8):620-625.
- [16] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: M100-S27 [S]. Wayne: CLSI, 2017.
- [17] 陆子春,赵继民,周长艳.2011—2013年佳木斯地区部分食品中蜡样芽胞杆菌污染状况调查分析[J].*中国初级卫生保健*, 2015, 29(4):96-97.
- [18] 解希帝,周斌,杨海荣,等.2011—2015年呼和浩特市售食品中蜡样芽胞杆菌污染监测与分析[J].*疾病监测与控制*, 2017, 11(1):44,47.
- [19] 常虹,李德华,周汉洪,等.2012—2014年达州市部分市售食品中蜡样芽胞杆菌检测结果分析[J].*寄生虫病与感染性疾病*, 2016, 14(1):39-41.
- [20] 刘顺,孙强,罗瑜,等.鄂州市2012—2014年食源性致病菌的污染状况[J].*公共卫生与预防医学*, 2015, 26(5):89-91.
- [21] MERZOUGUI S, LKHIDER M, GROSSET N, et al. Prevalence, PFGE typing, and antibiotic resistance of *Bacillus cereus* group isolated from food in Morocco [J]. *Foodborne Pathogens & Disease*, 2014, 11(2):145-149.
- [22] TEWARI A, SINGH S P, SINGH R. Incidence and enterotoxigenic profile of *Bacillus cereus* in meat and meat products of Uttarakhand, India [J]. *Journal of Food Science & Technology*, 2015, 52(3):1796-1801.
- [23] 王利国,王琦,齐俊生,等.几种芽胞杆菌溶血素BL基因及其溶血素的检测[J].*微生物学杂志*, 2007, 27(3):21-23.
- [24] REIS A L, MONTANHINI M T, BITTENCOURT J V, et al. Gene detection and toxin production evaluation of hemolysin BL of *Bacillus cereus* isolated from milk and dairy products marketed in Brazil [J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2014, 44(4):1195-1198.
- [25] 孙婷婷,王伟杰,韩佳敏,等.2016年辽宁省婴幼儿配方食品及谷类辅助食品中蜡样芽胞杆菌毒力基因的鉴定[J].*中国微生态学杂志*, 2018, 30(7):791-794.
- [26] 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[D].广州:暨南大学,2018.
- [27] 曹飞扬.北京市腐乳中蜡样芽胞杆菌检测及毒力基因和耐药性研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2017.
- [28] 诸葛石养,苏爱荣,李秀桂.广西米面制品蜡样芽胞杆菌污染分布及耐药性研究[J].*中国卫生检验杂志*, 2014, 24(18):2661-2662.
- [29] CHON J W, KIM J H, LEE S J, et al. Toxin profile, antibiotic resistance, and phenotypic and molecular characterization of *Bacillus cereus*, in *Sunsik* [J]. *Food Microbiology*, 2012, 32(1):217-222.