

食品中蜡样芽孢杆菌的分离及携带毒力基因的检测

白凤岚, 陈松, 罗梦幽, 曾宝锋, 唐俊妮

(西南民族大学生命科学与技术学院, 四川成都 610041)

摘要: 为了确定成都市食品中蜡样芽孢杆菌所携带的毒力基因情况, 本实验对市售食品共采样 130 份, 通过菌落在 MYP 培养基上形态特征对蜡样芽孢杆菌进行初步分离, 再利用 16S rRNA 测序结果进行比对分析, 并检测分离菌株携带的管家基因 *gyrB*、*rpoB*、*VrrA*、*groEL* 进一步确认, 最后检测分离菌株携带毒力基因情况。结果表明 130 份样品中共检出 23 株蜡样芽孢杆菌, 检出率为 17.7%; 23 株分离菌株中, 蜡样芽孢杆菌的 4 个管家基因 *gyrB*、*rpoB*、*VrrA*、*groEL* 检出率为 100%, 毒力基因的检测结果表明, *nheB* 和 *entFM* 在 16 株分离菌株中检出, 检出率为 69.6%; *nheA* 和 *nheC* 在 14 株分离菌株中检出, 检出率为 60.9%; *hblD* 在 11 株分离菌株中检出, 检出率为 47.8%; *cytK* 在 10 株分离菌株中检出, 检出率为 43.5%; *bceT* 在 9 株分离菌株中检出, 检出率为 39.1%; *hblA* 和 *hblC* 在 8 株分离菌株中检出, 检出率为 34.8%; *cer* 和 *ces* 在 2 株分离菌株中检出, 检出率为 8.7%; 未发现分离菌株携带 *hblB* 和 *Hly* 基因。研究结果表明市售食品中分离的蜡样芽孢杆菌毒力基因携带率较高, 对食品安全具有潜在威胁, 应当引起有关部门注意。

关键词: 蜡样芽孢杆菌; 食品; 分离鉴定; 毒力基因

文章编号: 1673-9078(2018)10-247-252

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.10.033

Identification and Virulence Genes Detection of *Bacillus Cereus*

Food Isolates

BAI Feng-lan, CHEN Song, LUO Meng-you, ZENG Bao-feng, TANG Jun-ni

(College of Life Science and Technology Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China)

Abstract: To identify the virulence genes of *Bacillus cereus* food isolates, a total of 130 food samples were collected in Chengdu city in this study. The isolation of *Bacillus cereus* strains was performed according to the colony morphology on MYP medium. Then 16S rRNA sequencing analysis and *Bacillus cereus* housekeeping genes (*gyrB*, *rpoB*, *VrrA*, *groEL*) were used to identify the isolates. Finally, the virulence genes of *Bacillus cereus* isolates were detected. The results showed that 23 *Bacillus cereus* isolates were identified from 130 collected food samples. The isolation rate was 17.7%. Twenty-three *Bacillus cereus* isolates carried all four housekeeping genes (*gyrB*, *rpoB*, *VrrA*, *groEL*). The virulence genes detection showed *nheB* and *entFM* were found in 16 isolates and the detection rates were relatively high (16/23, 69.6%); the *nheA* and *nheC* genes were detected in 14 isolated strains and the detection rates were 60.9%; the *hblD* gene was detected in 11 isolates and the detection rate was 47.8%; the *cytK* gene was detected in 10 isolates and the detection rate was 43.5%; the *bceT* gene was detected in 9 isolates and the detection rate was 39.1%; the *hblA* and *hblC* genes were detected in 8 strains and the detection rates were 34.8%; the *cer* and *ces* genes were detected in 2 isolated strains, and the detection rates were 8.7%; the *hblB* and *Hly* genes were not found in any isolates. This study indicated that the occurrence rates of virulence genes in *Bacillus cereus* food isolates were relatively high, which had a potential threat to food safety. The regulatory authority should pay attention to *Bacillus cereus* contamination.

Key words: *Bacillus cereus*; food; isolation and identification; virulence genes

蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 是一种革兰氏阳性菌, 能形成芽孢的条件致病菌, 广泛存在于土壤、

收稿日期: 2018-06-07

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFD0500500); 西南民族大学研究生创新课题 (GX2018SZ18)

作者简介: 白凤岚 (1994-), 女, 硕士, 研究方向: 食品加工与安全专业
通讯作者: 唐俊妮 (1971-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全与食品微生物

空气、水及植物源、动物源加工的食品中, 导致腹泻型或呕吐型食物中毒, 是一种常见食源性条件致病菌^[1,2]。蜡样芽孢杆菌腹泻型毒素是一种多元化毒素, 目前鉴定出的主要包括溶血素 HBL (Hemolysin BL)、非溶血性肠毒素 Nhe (Nonhemolytic enterotoxin)、细胞毒素 CytK (Cytotoxin K)、肠毒素 T (BceT) 和肠毒素 FM (EntFM) 等。溶血素 Hbl 基因组成一个操纵子, 通常由 *hblA*、*hblB*、*hblC*、*hblD* 四个基因组成,

也有的缺失 *hblB* 基因, 只由 *hblA*、*hblC*、*hblD* 三个基因组成, 分别编码 L2 蛋白、L1 蛋白、B 蛋白。非溶血性肠毒素 (NHE) 由 *nheA*、*nheB*、*nheC* 三个基因组成一个操纵子, 其分泌的蛋白能引起食物中毒。细胞毒素 K 是一类穿孔毒素, 能在细胞磷脂双分子上形成孔洞, 破坏细胞的完整性以及离子平衡, 对细胞产生致死作用^[3-5]。蜡状芽孢杆菌呕吐毒素 *Cereulide* 是一种环形的小分子肽, 抗热性强, 对各种物理和化学因素不敏感, 一般的食品加工过程无法将其破坏, 引发食物中毒, 并伴有呕吐症状。呕吐型蜡状芽孢杆菌的目标基因为 *ces* 和 *cer*。另外, 蜡状芽孢杆菌的看家基因 *groEL*、*gyrB*、*rpoB*、*vrpA* 在所有菌株中可检出, 用于菌株的辅助鉴定^[6]。目前在我国食品安全相关标准中, 对蜡状芽孢杆菌的限量值并没有明确规定, 致使食品生产过程中对该菌的控制不明确, 因此, 有必要了解食品中蜡状芽孢杆菌的潜在毒性及威胁。

本实验通过对成都市售卖的食品进行采样并分离污染的蜡状芽孢杆菌, 检测其毒力基因, 以了解成都市食品中蜡状芽孢杆菌的污染状况。获得的数据对食品中蜡状芽孢杆菌的防控措施具有指导意义。

1 材料与方法

1.1 培养基及试剂

氯化钠、异戊醇、冰乙酸购于天津市致远化学试剂有限公司; 甘露醇卵黄多粘菌素培养基 (MYP)、多粘菌素 B、胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB) 购于青岛高科园海博生物科技有限公司; SDS 购于成都市科龙化工试剂厂; Tris 饱和酚购于北京博奥拓达科技有限公司; 无水乙醇购于成都海兴化学试剂厂; 1×TE 缓冲液; 1×TAE 缓冲液; 甘油购于天津市瑞金特化学品有限公司; REGULAR AGAROSE G-10 型琼脂糖购于 BIOWEST 公司; GELVIEW 核酸染料及 DL 2000 Marker 购于宝生物工程(大连)有限公司; PCR 引物购于上海生物工程有限公司; Master Mix 购于北京擎科新业科技有限公司。

1.2 仪器及设备

SW-CJ-2FD 洁净工作台购于苏净集团苏州安泰空气技术有限公司; HP-9080 水式恒温培养箱购于上海齐欣科学仪器有限公司; HZQ-F160 全温振荡培养箱购于江苏省太仓市实验设备厂; AKHL-III-24 艾柯超纯水机 (台湾艾柯) 购于成都康宁实验专用纯水设备; MLS-3020 电热自动灭菌锅购于日本 SANYO 公司; Eppendorf 冷冻离心机 5804 R 型购于 Eppendorf

中国有限公司; Applied Biosystems 2720 购于 Thermal Cycler 基因有限公司; 凝胶成像仪、SC-15 数控超级恒温槽购于宁波新芝生物科技股份有限公司; DYY-6C 型电泳仪购于北京六一仪器厂; PL 303 电子天平购于梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司; WD 800B 型微波炉购于顺德市格兰仕微波炉电器有限公司; 恒宇 202-3-5 型电热恒温干燥箱购于上海跃进医疗器械。

1.3 方法

1.3.1 食品样品的采集

样品采集时间为 2016 年 4 月至 2016 年 9 月。在成都市附近的农贸市场及路边小摊共采集不同生鲜食品样品 130 份, 样品包括: 米面制品 52 份, 熟肉制品 33 份, 豆制品 24 份, 凉拌食品 15 份, 生肉 3 份, 奶制品 3 份。采集的样品当天送入实验室进行分离培养。

1.3.2 蜡状芽孢杆菌的分离与培养纯化

所有采集样品均在无菌条件下进行处理。按照 GB 4789.14-2014 《食品微生物学检验 蜡状芽孢杆菌检验》进行检验。

1.3.3 细菌的 16S rRNA 鉴定

无菌吸取 100 μ L 保菌液接种到 TSB 培养基中, 于 (37 \pm 1) $^{\circ}$ C 振荡培养箱恒温活化培养 12 h~18 h, 采用 Tris-饱和酚-氯仿法提取细菌的 DNA^[7]。利用细菌的 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增, 引物序列(5' \rightarrow 3')为: 16S-27-F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG; 16S-1492-R: GGTTACCTTGTTACGACTT。反应体系为 20 μ L, 其中 MIX 10 μ L, 超纯水 8.2 μ L, 上游引物 16S-27-F 0.4 μ L, 下游引物 16S-1492-R 0.4 μ L, 分离菌株 DNA 1 μ L, 空白对照组不加模板 DNA, 用无菌超纯水补水补足至 20 μ L 体积。PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 5 min, 95 $^{\circ}$ C 40 s, 53 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min。以 TAE 为电泳缓冲液, 在 120 V 电压, 90 mA 电流下, 对 PCR 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 并利用凝胶成像系统检测, 将剩余的扩增产物送往成都擎科生物公司进行测序比对, 利用 BLAST 确定分离菌株菌属。

1.3.4 蜡状芽孢杆菌携带看家基因和毒力基因的检测

利用蜡状芽孢杆菌不同的毒力基因引物进行 PCR 扩增, 反应体系为 20 μ L, 其中 MIX 10 μ L, 超纯水 8.2 μ L, 上游引物 0.4 μ L, 下游引物 0.4 μ L, 分离菌株 DNA 模板 1 μ L, 空白对照组用无菌超纯水补足至 20 μ L。引物序列和退火温度及其扩增产物大小见表 1。PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 5 min, 95 $^{\circ}$ C 40 s, 不

同退火温度 50 s, 72 °C 40 s, 35 个循环, 72 °C 10 min。对 PCR 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 并利用凝胶成像系统检测。

表 1 本研究所用的引物

Table 1 The primers used in this study

基因名称	引物名称	引物序列 (5'→3')	退火温度/°C	产物长度/bp	参考文献
<i>groel</i>	<i>groEL-F</i>	AGCTATGATTCGTGAAGGT	54	236	[6]
	<i>groEL-R</i>	AAGTAATAACGCCGTCGT			
<i>gyrB</i>	<i>gyrB-F</i>	ATTGGTGACACCGATCAAACA	51	365	[6]
	<i>gyrB-R</i>	TCATACGTATGGATGTTATTC			
<i>VrrA</i>	<i>VrrA-F</i>	GCGCGTTTCATTTGATTCATAG	55	300	[6]
	<i>VrrA-R</i>	CACAACCTACCACCAATGGCACA			
<i>rpoB</i>	<i>rpoB-F</i>	CCACCAACAGTAGAAAATGC	52	174	[6]
	<i>rpoB-R</i>	AATTCACCAGTTTCTGGATC			
<i>cer</i>	<i>cer-F</i>	CAAGTCAAGATAAGAGGCTTC	52	370	[6]
	<i>cer-R</i>	AAAGCTCTTGCCAAATAACC			
<i>ces</i>	<i>ces-F</i>	GCATTTCTGTAAGCAGAGGT	55	699	[6]
	<i>ces-R</i>	CCCTTTATCCCCTTCGATGT			
<i>cytK</i>	<i>cytK-F</i>	AACAGATATCGGTCAAAAATGC	54	812	[6]
	<i>cytK-R</i>	CCAACCCAGTTACCAGTTCC			
<i>entFM</i>	<i>entFM-F</i>	ATGAAAAAAGTAATTTGCAGG	48	1269	[6]
	<i>entFM-R</i>	TTAGTATGCTTTTGTGTAACC			
<i>bceT</i>	<i>bceT-F</i>	TTACATTACCAGGACGTGCTT	51	428	[6]
	<i>bceT-R</i>	TGTTTGTGATTGTAATTCAGG			
<i>hly-II</i>	<i>hly-F</i>	ACATATGGCAGATCTAAAGGAACTGTAGAAAATC	57	867	[6]
	<i>hly-R</i>	CAAGCTTATCAGATTTTTTAAATCTCAATATAAAGG			
<i>hblA</i>	<i>hblA-F</i>	AAGCAATGGAATACAATGGG	52	1154	[6]
	<i>hblA-R</i>	AGAATCTAAATCATGCCACTGC			
<i>hblB</i>	<i>hblB-F</i>	AAGCAATGGAATACAATGGG	53	2684	[6]
	<i>hblB-R</i>	AATATGTCCCAGTACACCCG			
<i>hblC</i>	<i>hblC-F</i>	GATACTCAATGTGGCAACTGC	55	740	[6]
	<i>hblC-R</i>	TTGAGACTGCTCGTCTAGTTG			
<i>hblD</i>	<i>hblC-F</i>	ACCGGTAACACTATTCATGC	53	829	[6]
	<i>hblC-R</i>	GAGTCCATATGCTTAGATGC			
<i>nheA</i>	<i>nheA-F</i>	TACGCTAAGGAGGGGCA	53	500	[6]
	<i>nheA-R</i>	GTTTTTATGCTTCATCGGCT			
<i>nheB</i>	<i>nheB-F</i>	CTATCAGCACTATGGCAG	53	770	[6]
	<i>nheB-R</i>	ACTCCTAGCGGTGTCC			
<i>nheC</i>	<i>nheC-F</i>	CGGTAGTGATTTGCTGGG	53	582	[6]
	<i>nheC-R</i>	CAGCATTCGTAATTGCCAA			

2 结果与分析

2.1 食品样品中蜡样芽孢杆菌的分离与初步

鉴定

由于蜡样芽孢杆菌不能利用 D-甘露醇, 因此不产酸, 在 MYP 选择培养基中酚红指示剂作用下, 菌落形态为典型的粉红色。此外, 由于蜡样芽孢杆菌产生卵磷脂酶, 在 MYP 培养基中卵黄乳液作用下, 会在菌落周围产生 2~5 mm 沉淀环, 菌落较大, 表面比较干燥。通过形态学分析, 结合 16S rDNA 的测序结果。

本研究从成都市市售食品 130 份样品中分离得到 23 株蜡样芽孢杆菌分离菌株, 检出率为 17.7%。其中, 分离菌株大多数来自于肉制品、米面制品及豆制品类。具体样品来源和样品名称及采样时间详见表 2。

表 2 采样来源及采样时间

Table 2 The Sampling sources and time

菌株编号	样品来源	样品名称	采样时间
BC-16-1	农贸市场	卤鸡爪	2016年4月22日
BC-16-2	农贸市场	豆皮	2016年4月22日
BC-16-3	农贸市场	奶油蛋糕	2016年4月30日
BC-16-4	农贸市场	卤鸡肠	2016年4月30日
BC-16-5	农贸市场	猪肉馅包子	2016年5月15日
BC-16-6	农贸市场	凉面	2016年5月15日
BC-16-7	路边小摊	扬州炒饭	2016年5月18日
BC-16-8	农贸市场	酱香饼	2016年5月18日
BC-16-9	路边小摊	烤冷面	2016年5月29日
BC-16-10	农贸市场	枣糕	2016年7月13日
BC-16-11	农贸市场	凉皮	2016年7月14日
BC-16-12	农贸市场	豆腐	2016年7月14日
BC-16-13	农贸市场	卤豆干	2016年7月14日
BC-16-14	路边小摊	豆浆	2016年7月17日
BC-16-15	农贸市场	米豆腐	2016年7月17日
BC-16-16	农贸市场	豆腐	2016年7月17日
BC-16-17	路边小摊	炒饭	2016年7月17日
BC-16-18	路边小摊	凉面	2016年7月17日
BC-16-19	路边小摊	炒河粉	2016年9月10日
BC-16-20	路边小摊	炒饭	2016年9月11日
BC-16-21	农贸市场	发糕	2016年9月24日
BC-16-22	路边小摊	牛肉丸	2016年9月24日
BC-16-23	农贸市场	凉粽	2016年9月24日

2.2 蜡样芽孢杆菌毒力基因鉴定结果

对分离的 23 株蜡样芽孢杆菌菌株进行 4 个管家基因 *gyrB*、*rpoB*、*VrrA*、*groEL* 的检测, 结果表明 23 株蜡样芽孢杆菌分离菌株的 4 个管家基因 *gyrB*、*rpoB*、*VrrA*、*groEL* 检出率为 100%。进一步确认 23 株分离菌株为蜡样芽孢杆菌。随后, 对以上 23 株分离菌株进行毒力基因检测, 结果详见表 3, 由表 3 可以看出: 23 株分离菌株中, 有 19 株至少检测出一种及以上的毒力基因, 有 4 株不携带任何待检的毒力基因。在 13

种检测的毒力基因中, *nheB* 和 *entFM* 在 16 株分离菌株中出现, 检出率为 69.6%; *nheA* 和 *nheC* 在 14 株分离菌株中出现, 检出率为 60.9%; *hblD* 在 11 株分离菌株中出现, 检出率为 47.8%; *cytK* 在 10 株分离菌株中出现, 检出率为 43.5%; *bceT* 在 9 株分离菌株中出现, 检出率为 39.1%; *hblA* 和 *hblC* 在 8 株分离菌株中出现, 检出率为 34.8%; *cer* 和 *ces* 在 2 株分离菌株中出现, 检出率为 8.7%; 未发现分离菌株携带 *hblB* 和 *hly-II* 基因。

表 3 蜡样芽孢杆菌分离菌株中毒力基因的携带情况

Table 3 The detection results of virulence genes in *Bacillus cereus* food isolates

菌株号	基因名称													合计
	<i>ces</i>	<i>cer</i>	<i>cytK</i>	<i>hblA</i>	<i>hblB</i>	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>bceT</i>	<i>entFM</i>	<i>hly-II</i>	
BC-16-1	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	8
BC-16-2	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	8

转下页

接上页

BC-16-3	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	6
BC-16-4	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	3
BC-16-5	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1
BC-16-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
BC-16-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
BC-16-8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
BC-16-9	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	8
BC-16-10	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	5
BC-16-11	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	5
BC-16-12	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	9
BC-16-13	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	8
BC-16-14	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	6
BC-16-15	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	8
BC-16-16	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	5
BC-16-17	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	4
BC-16-18	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	4
BC-16-19	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	4
BC-16-20	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	9
BC-16-21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	1
BC-16-22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
BC-16-23	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	8
合计	2	2	10	8	0	8	11	14	16	14	9	16	0	
检出率/%	8.70	8.70	43.48	34.78	0	34.78	47.82	60.87	69.57	60.87	39.13	69.57	0	

3 结论

3.1 近年来,我国各省市都有报道由蜡样芽孢杆菌引起的食物中毒事件,对各省市各类食品进行采样都有检出蜡样芽孢杆菌污染。如刘桂丹和范正轩^[8]对自贡市婴幼儿食品、水及水产品、乳及乳制品等进行食源性致病微生物检测,发现蜡样芽孢杆菌检出率为12.70%;宋曼丹等^[9]对广东省婴幼儿食品进行检测,检出率为28.67%。刘琪等^[10]对采自市场上的13个发酵豆制品进行蜡样芽孢杆菌进行检测,发现几类发酵豆制品中均检出了蜡样芽孢杆菌,总检出率高达84.6%。赵薇等^[11]对2011~2015年吉林省不同地区各流通环节的样品进行蜡样芽孢杆菌检测,总检出率为32.9%。本研究的采样时间是2016年4~9月期间,共采集了成都市农贸市场及路边小摊的各类食品样品130份,包括米面制品、肉制品、豆制品和奶制品等,采集的样品中蜡样芽孢杆菌的检出率为17.7%。我们的结果与王君^[12]对成都市食品中蜡样芽孢杆菌的检出率20%以及田万帆等^[6]2014年从成都市农贸市场和路边小摊采集的食品中蜡样芽孢杆菌的检出率为24%比较接近。说明成都市售卖的各种食品中存在一定的

蜡样芽孢杆菌污染。通过进一步对本研究检出的蜡样芽孢杆菌样品进行分析,发现米面制品及豆制品的污染情况比较严重,我们的结果与上述其他研究结果较为一致。蜡样芽孢杆菌主要以孢子状态广泛存在于自然界和食品中,尤其是谷物等淀粉含量高的食品^[13]。其他文献也报道,米粉、米线、凉皮和盒饭等含有米饭或米制品的食品为蜡样芽孢杆菌污染的主要食品种类^[6,11]。在 multicase 蜡样芽孢杆菌食物中毒事件中,被污染的食品主要为剩米饭(44.6%)和开水泡饭(17.0%)^[14]。在夏季,米饭和凉拌食品如凉面、凉皮等原料本身容易被蜡样芽孢杆菌污染,加上长时间暴露于高温环境中,引起食物中毒的风险大大增加,应当给予重视。中国疾病预防控制中心的《食源性疾病预防工作手册》也将米饭和米粉中的蜡样芽孢杆菌作为重点监测项目。

3.2 蜡样芽孢杆菌是内生孢子型细菌种类,可产生许多种毒素,最容易引起食物中毒的两种毒素是不耐热肠毒素(容易被热破坏)和致吐毒素(食品被热处理也不能灭活此毒素)^[15]。本研究中,对于分离的23株蜡样芽孢杆菌所携带的毒力基因进行检测发现,呕吐型蜡样芽孢杆菌检测的目的基因 *ces* 和 *cer* 检出率

较低 (8.7%), 仅在 BC-16-14 和 BC-16-16 中出现, 其产生的致吐毒素 Cereulide 在一般的食品加工过程中不能灭活, 因此, 还是应当引起足够的重视。王利国^[16]等研究认为只有当菌株含有 *hblA*, *hblC*, *hblD* 全部三个毒力基因时, 该菌株才会产生溶血毒素 Hbl。我们的检测结果可以看到, 23 株分离菌株中有 7 株菌株 (BC-16-1、BC-16-2、BC-16-9、BC-16-12、BC-16-13、BC-16-20、BC-16-23) 含有全部三个基因, 说明这 7 株分离菌株是可以产生溶血毒素 Hbl, 对消费者会产生危害。此外, 非溶血性肠毒素 *nhe* 基因的检出率较高, *nheA* 和 *nheC* 为 60.9%, *nheB* 为 69.6%, 同样能引起消费者腹泻等不良反应, 不可忽视。李毅等^[17]针对温州地区食品中蜡样芽孢杆菌的污染情况进行研究, 检出蜡样芽孢杆菌 39 株, 发现所有的菌株携带至少一个毒素基因, 其中, 12.8% 的菌株携带呕吐毒素基因并同时携带复合型非溶血性肠毒素 *nhe* 基因, 他们的研究认为非溶血性肠毒素 *nhe* 基因、*entFM* 基因、*bceT* 基因是分离菌株主要毒素基因。我们的研究结果同样发现 *nhe*, *cytK*, *entFM* 和 *bceT* 基因的检出率偏高。这些毒力基因编码的毒素也被认为是我国食源性蜡样芽孢杆菌的主要毒力因子^[5]。如果消费者不小心摄入了被上述蜡样芽孢杆菌污染的食品, 引起食物中毒的风险较大, 且产生腹泻等不良反应的可能性高于呕吐等不良反应。综上, 本实验通过对成都市售卖食品进行采样, 进行了蜡样芽孢杆菌的分离鉴定, 并对其携带的毒力基因进行调查, 了解了成都市食品中蜡样芽孢杆菌的污染情况, 获得的数据对蜡样芽孢杆菌引起的食品安全问题具有指导意义。

参考文献

- [1] 黄品菁, 罗静, 何宏轩. 蜡样芽孢杆菌检测方法研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(3): 635-642
HUANG Jing-jing, LUO Jing, HE Hong-xuan. Research progress on detection methods for bacillus cereus [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2018, 45(3): 635-642
- [2] 李凡. 食源性蜡样芽孢杆菌毒力基因调研及基于 aPCR 裸眼检测方法的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2017
LI Fan. Research on virulence genes of food borne *Bacillus cereus* and the naked eye detection method based on aPCR [D]. Nanchang: Nanchang University, 2017
- [3] 程俊. 一株溶血性蜡状芽孢杆菌 WH2015 全基因组测序分析及其溶血基因筛选[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2016
CHENG Jun. Genome Analysis of a Hemolytic *Bacillus cereus* and screen its hemolysis genes [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2016
- [4] 胡晓敏, 蔡亚君, 周帼萍, 等. 蜡状芽孢杆菌菌株中部分病原相关因子的检测[J]. 微生物学报, 2007, 47(3): 392-395
HU Xiao-min, CAI Ya-jun, ZHOU Guo-ping, et al. Detection of some pathogenic factors in bacillus cereus strains [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2007, 47(3): 392-395
- [5] 庄子慧, 何丽, 郭云昌, 等. 我国食源性蜡样芽孢杆菌毒力基因和药物敏感性研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2013, 25(3): 198-201
ZHUANG Zi-hui, HE Li, GUO Yun-chang, et al. Virulent gene profiles and antibiotic susceptibility of foodborne *Bacillus cereus* in China [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2013, 25(3): 198-201
- [6] 田万帆, 张荣, 龙虎, 等. 生鲜食品中蜡样芽孢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
TIAN Wan-fan, ZHANG Rong, LONG Hu, et al. Analysis of virulence gene detection and antimicrobial susceptibility of *Bacillus cereus* isolated from fresh food [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(6): 135-139, 151
- [7] 熊明华, 朱继荣, 王光利, 等. 一种快速经济提取革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌基因组 DNA 的方法[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(2): 385-390
XIONG Ming-hua, ZHU Ji-rong, WANG Guang-li, et al. A Rapid economic method to extract genomic DNA from gram-negative and gram-positive bacteria [J]. Genomics and Applied Biology, 2016, 35(2): 385-390
- [8] 刘桂丹, 范正轩. 2010~2015 年自贡市食源性致病菌污染情况分析[J]. 预防医学情报杂志, 2017, 33(8): 793-796
LIU Gui-dan, FAN Zheng-xuan. Food-borne pathogen contamination in Zigong, 2010-2015 [J]. Journal of Preventive Medicine Information, 2017, 33(8): 793-796
- [9] 宋曼丹, 陈秋霞, 杨冰, 等. 2012 年广东省婴幼儿食品中 3 种食源性致病菌污染状况调查[J]. 华南预防医学, 2013, 39(6): 17-19, 23
SONG Man-dan, CHEN Qiu-xia, YANG Bing, et al. Contamination levels of foodborne pathogens in infant food in Guangdong Province, 2012 [J]. South China Journal of Preventive Medicine, 2013, 39(6): 17-19, 23
- [10] 刘琪, 陈静, 张佩娜, 等. 发酵豆制品中蜡样芽孢杆菌的调查分析[J]. 农产品加工, 2018, 8: 56-59
LIU Qi, CHEN Jing, ZHANG Pei-na, et al. Investigation and analysis of bacillus cereus in fermented bean products [J]. Farm Products Processing, 2018, 8: 56-59
- [11] 赵薇, 孙景昱, 刘思洁, 等. 吉林省 2011~2015 年食品中蜡样芽孢杆菌污染监测数据分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(12): 2155-2160
ZHAO Wei, SUN Jing-yu, LIU Si-jie, et al. Analysis of bacillus cereus contamination monitoring data in food in Jilin Province, 2011-2015 [J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2018, 9(12): 2155-2160

- 2018,9(5):1190-1194
- ZHAO Wei, SUN Jing-yu, LIU Si-jie, et al. Analysis on the monitoring data of *Bacillus cereus* in food in Jilin province during 2011~2015 [J]. Food Safety and Quality Detection Technology, 2018, 9(5): 1190-1194
- [12] 王君.全国食品中蜡样芽孢杆菌的污染分布规律及遗传多样性研究[D].广州:广东工业大学,2013
- WANG Jun. Study on contamination distribution and genetic diversity of bacillus cereus Isolated from food in China [D]. Guangzhou: Guangdong University of Technology, 2013
- [13] 林宇斌.鲜湿米粉中蜡样芽孢杆菌定量风险评估[D].长沙:中南林业科技大学,2015
- LIN Yu-bin. Quantitative risk assessment for *bacillus cereus* in wet rice noodle [D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2015
- [14] 黄丹阳,曹慧,徐斐,等.米饭中蜡样芽孢杆菌生长模型的建立[J].上海预防医学,2017,29(6):431-434
- HUANG Dan-yang, CAO Hui, XU Fei, et al. *Bacillus cereus* growth model established in cooked rice [J]. Shanghai Journal of Preventive Medicine, 2017, 29(6): 431-434
- [15] 顿玉慧,赵更峰,郑启伟.蜡样芽孢杆菌致吐毒素的研究现状[J].食品科学,2009,30(9):259-263
- DUN Yu-hui, ZHAO Geng-feng, ZHENG Qi-wei. Research status of emetic toxin of *bacillus cereus* [J]. Food Science, 2009, 30(9): 259-263
- [16] 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(3):21-23
- WANG Li-guo, WANG Qi, QI Jun-sheng, et al. Detection of hemolysinbl genes and hemolysin in several *bacillus spccies* [J]. Journal of Microbiology, 2007, 3: 21-23
- [17] 李毅,章乐怡,吴可可,等.温州地区食源性蜡样芽孢杆菌生化分型、毒素和耐药性分析[J].中国卫生检验杂志,2014, 24(20):3010-3012
- LI Yi, ZHANG Le-yi, WU Ke-ke, et al. Research on biochemical typing, toxin and antibiotic resistance of food borne *bacillus cereus* in Wenzhou [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2014, 24(20): 3010-3012