

鸽屠宰加工环节金黄色葡萄球菌肠毒素、生物膜形成能力及其相关基因的检测

豆涛, 刘英玉*, 王金泉*, 马兰, 张柳青, 胡芸

(新疆农业大学动物医学学院, 新疆草食动物新药研究与创制重点实验室, 新疆乌鲁木齐 830052)

摘要: 为了解鸽屠宰加工环节中金黄色葡萄球菌的肠毒素、生物被膜形成能力、肠毒素及生物被膜形成相关基因的情况。采用金黄色葡萄球菌肠毒素酶联免疫分析试剂盒和结晶紫染色法检测 41 株金黄色葡萄球菌的肠毒素含量和生物被膜形成能力, 同时通过 PCR 方法扩增金黄色葡萄球菌 12 种肠毒素基因和 10 种生物被膜形成相关基因。41 株金黄色葡萄球菌在肠毒素酶联免疫法检测中, 有 30 株为产肠毒素的菌株。肠毒素基因的检测中, 有 35 株菌含肠毒素基因, 检出率为 85.36%, 且有携带一种或多种肠毒素基因的情况。经典肠毒素基因的检出率分别为: *sea* (29.27%)、*seb* (29.27%)、*sec* (4.88%)、*sed* (65.85%) 和 *see* (2.44%); 新型肠毒素基因的检出率分别为: *sel* (36.59%)、*seg* (29.27%)、*sem* (17.07%)、*seu* (17.07%)、*sei* (14.63%)、*seh* (7.32%) 和 *sek* (0.00%)。结晶紫染色法测定菌株生物被膜形成能力弱、中等和强的检出率分别为 39.02%、43.90% 和 17.07%。生物被膜形成相关基因的检测中, *clfB*、*luxS* 和 *clfA* 的检出率最高均为 100.00%, 其次是 *sarA* 和 *ccp* 均为 97.56%, *sigB*、*cna*、*icaA*、*agrC* 的检出率分别为 85.37%、65.85%、41.46%、2.44%, *bap* 未检出。此外, 所有菌株均有携带多种生物被膜相关基因的情况, 以携带 7 种基因的菌株最多 (15/41, 36.59%)。鸽屠宰加工环节污染中金黄色葡萄球菌存在较多的肠毒素且生物被膜形成能力较高, 预测该鸽屠宰加工环节中金黄色葡萄球菌具有致病性, 存在引起食物中毒的潜在风险。

关键词: 金黄色葡萄球菌; 肠毒素; 生物被膜形成能力; 生物被膜形成相关基因

文章编号: 1673-9078(2024)10-370-378

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.10.1145

Detection of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins, Biofilm-forming Ability and Associated Genes in Pigeon Slaughtering and Processing

DOU Tao, LIU Yingyu*, WANG Jinquan*, MA Lan, ZHANG Liuqing, HU Yun

(College of Veterinary Medicine, Xinjiang Key Laboratory of Herbivore Drug Research and Creation, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

Abstract: To understand the enterotoxins, biofilm-forming ability and biofilm formation related genes of *Staphylococcus aureus* in pigeon slaughter and processing. The enterotoxin contents and biofilmforming abilities of 41 strains

引文格式:

豆涛, 刘英玉, 王金泉, 等. 鸽屠宰加工环节金黄色葡萄球菌肠毒素、生物膜形成能力及其相关基因的检测 [J]. 现代食品科技, 2024, 40(10): 370-378.

DOU Tao, LIU Yingyu, WANG Jinquan, et al. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins, biofilm-forming ability and associated genes in pigeon slaughtering and processing [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(10): 370-378.

收稿日期: 2023-09-21

基金项目: 中央引导地方科技发展专项资金项目 (ZYYD2022C13); 自治区重大科技专项——新疆畜禽疫病防控体系质量提升工程 (2023A02007)

作者简介: 豆涛 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 畜产品质量安全, E-mail: 1647555257@qq.com

通讯作者: 刘英玉 (1984-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 病原分子流行病学和畜产品质量安全, E-mail: xjlyy1028@163.com; 共同通讯

作者: 王金泉 (1975-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 动物生长发育调控及保健, E-mail: 523136221@qq.com

of *Staphylococcus aureus* were determined using the *Staphylococcus aureus* enterotoxin enzyme-linked immunoassay kit and crystal violet staining method. Meanwhile, 12 enterotoxin genes and 10 biofilm formation-related genes of *Staphylococcus aureus* were also amplified by PCR. Among the 41 strains of *Staphylococcus aureus*, 30 strains were enterotoxin-producing strains in enterotoxin enzyme-linked immunoassays. In the detection of enterotoxin genes, 35 strains of bacteria contained enterotoxin genes (with the detection rate being 85.36%), and have carried one or more enterotoxin genes. The detection rates of classical enterotoxin genes were *sea* (29.27%), *seb* (29.27%), *sec* (4.88%), *sed* (65.85%) and *see* (2.44%), respectively; The detection rates of novel enterotoxin genes were *sel* (36.59%), *seg* (29.27%), *sem* (17.07%), *seu* (17.07%), *sei* (14.63%), *she* (7.32%) and *sek* (0.00%), respectively. The detection rates of the strains with weak, moderate and strong biofilm-forming abilities determined by crystalline violet staining were 39.02%, 43.90% and 17.07%, respectively. In the detection of biofilm formation related genes, the detection rates of *clfB*, *luxS* and *clfA* were the highest (all at 100.00%), followed by *sarA* and *ccp* (both at 97.56%); the detection rates of *sigB*, *cna*, *icaA* and *agrC* were 85.37%, 65.85%, 41.46% and 2.44%, respectively, and *bap* was not detected. In addition, all strains were found to carry multiple biofilm-related genes, and the number of the strains carrying 7 genes was the highest (15/41, 36.59%). The *Staphylococcus aureus* contaminated in the pigeon slaughtering and processing had more enterotoxins and higher biofilm-forming ability. It was predicted that the *Staphylococcus aureus* found in the pigeon slaughter and processing was pathogenic and had potential risk of causing food poisoning.

Key words: *Staphylococcus aureus*; enterotoxin; biofilm forming ability; biofilm formation-related genes

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 是一种常见的食源性病原体, 在熟食品及其加工阶段都存在, 当误食了被其污染的食物, 会造成食物中毒和感染。有研究表明, 由金黄色葡萄球菌引起的食物中毒多半与肠毒素有着密切的关系。在欧洲, 50% 以上的与细菌毒素相关的食源性疫情暴发几乎都是由葡萄球菌肠毒素引起的, 在我国, 由金黄色葡萄球菌及其毒素引起的食物中毒事件位居食源性疾病的第三^[1]。目前为止, 已发现的肠毒素和类肠毒素多达 28 种, 其中 *sea-see* 等经典肠毒素基因是最早被发现的, 之后其他肠毒素 / 类肠毒素也相继被发现。因肠毒素具有多样性和普遍性的特点, 其引发的食物中毒在治疗和防御方面存在很大的难度, 因此成为食源性污染监测中的重点监测对象^[2]。此外, 金黄色葡萄球菌也是易形成生物被膜的常见菌^[3,4], 在加工设备的表面常形成生物被膜, 并且其中含有一定数量的病原微生物, 对产品质量和人体健康构成威胁^[5]。形成生物被膜的金黄色葡萄球菌在致病性和耐药性方面都有明显的增强, 而且还能够对机体的免疫功能做出躲避, 并延长在体内存活的时间, 从而导致慢性感染的出现, 提高了对食源性疾病的治疗难度^[6]。

细菌生物被膜 (Bacterial Biofilm, BF) 是细菌在适应生存环境的过程中附着在生物组织或表面而形成的结构性细菌群落, 具有黏附性强、环境适应能力强和保护细菌等特点^[7]。早在 1676 年, 生物被

膜便在牙菌斑中被观察到, 但直到 1978 年生物被膜的相关理论才正式被提出, 之后在 1999 年出现了生物被膜模型^[8]。生物被膜的形成过程是一个复杂动态的过程, 主要包括: 定植、生长、成熟和脱落扩散 4 个阶段^[9,10], 每个阶段并表现出不同的生理生化特性。生物被膜在形成过程中会受到多种因素的影响, 其中生物被膜基质的主要成分胞间多糖黏附素 (Polysaccharide Intercellular Adhesin, PIA), 对生物被膜形成有着很大的影响。PIA 的主要作用是通过调控 *ica* 操纵子 (*icaA*、*icaB*、*icaC*、*icaD*) 使其诱导合成葡萄糖胺转移酶, 并在细胞间粘附中起到作用, 使生物被膜具有完整性^[11]。*ica* 操纵子又受到生物被膜调控基因的影响, 如 *sarA*、*agrC* 和 *sigB*。此外, 还存在其他与生物被膜形成有关的蛋白和凝集因子, 如 *bap*、*clfB* 和 *clfA*, 在菌体形成生物被膜的过程中都起着粘附生长的作用。生物被膜形成能力的检测方法有结晶紫染色法和刚果红琼脂培养法^[12]。其中结晶紫染色法是一种常用的生物被膜半定量检测方法, 具有操作简单、高效、可靠的优点, 但易受人为因素的影响; 而刚果红琼脂培养法快速简单, 肉样即可观察结果, 但灵敏性较低, 一般利用其判断菌株是否能形成生物被膜。

目前, 与疾病相关的金黄色葡萄球菌菌株形成生物被膜的研究很多, 但与食品相关的相对较少, 尤其是从食品、食品加工环境或暴露于加工环境的食品中分离出金黄色葡萄球菌的能力^[13]。本研究以

新疆某鸽屠宰加工场中分离的 41 株金黄色葡萄球菌为研究对象, 采用金黄色葡萄球菌肠毒素酶联免疫分析试剂盒和结晶紫染色法对分离株进行肠毒素含量和生物被膜形成能力的检测, 同时通过 PCR 方法对肠毒素基因和生物被膜形成相关基因进行检测, 了解屠宰加工环节的金黄色葡萄球菌肠毒素基因、生物被膜形成能力及相关基因的分布情况, 为食品加工安全的把控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

从新疆某鸽屠宰加工场中分离鉴定出 41 株金黄色葡萄球菌, 其中刀具拭子分离株 1 株, 工人手拭子分离株 6 株, 生产器具拭子分离株 4 株, 胴体拭子分离株 15 株, 鸽肉样分离株 13 株, 鸽熟肉制品分离株 2 株。所有菌株均用甘油保存在实验室 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

1.1.2 主要试剂

胰蛋白胨大豆肉汤 (Tryptic Soy Broth, TSB)、质量分数 7.5% 氯化钠肉汤、Baird-Parker 琼脂, 海博生物技术有限公司; 1% 结晶紫水溶液, 北京索莱宝科技有限公司; 金黄色葡萄球菌肠毒素酶联免疫分析试剂盒, 上海源桔生物科技公司; 琼脂糖, 北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; 核酸染料, 北京百泰克生物有限公司; $50\times\text{TAE}$, 白鲨生物技术有限公司; $2\times\text{Taq Master Mix}$ 、 ddH_2O 和 DNA Maker, 北京全式金生物技术股份有限公司。

1.1.3 主要仪器

LDZX-50 KB 立式压力蒸汽高压锅, 购自上海申安医疗器械厂; SW-CJ-2FD 博迅净化工作台, 购自上海博迅实业有限公司; DHP-9162 恒温培养箱, 购自上海一恒科学仪器有限公司; C100 TOUCH PCR 仪, 购自美国 BIO-RAD 公司; STAT-FAX2100 酶标仪, 购自 Awareness Technology Inc.USA。

1.2 方法

1.2.1 金黄色葡萄球菌肠毒素的检测

1.2.1.1 酶联免疫法

金黄色葡萄球菌用质量分数 7.5% 氯化钠肉汤培养 10~11 h 后, 用分光光度计测定菌液 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 值为 1 左右, $7\ 500\ \text{r/min}$ 离心 10 min 后, 弃上清

液, 加 PBS, 振荡混匀, 用细胞超声破碎仪将菌液破碎, 破碎时超声 3 s 停顿 5 s, 变幅杆为 3, 超声功率为 25%, 破碎 3 min 左右, 破碎后在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 $7\ 500\ \text{r/min}$ 离心 10 min, 取上清液进行检测。检测方法根据金黄色葡萄球菌肠毒素酶联免疫分析试剂盒说明书进行。

1.2.1.2 肠毒素基因 PCR 检测法

按参考文献^[14,15]合成金黄色葡萄球菌的 12 种肠毒素基因 (*sea*、*seb*、*sec*、*sed*、*see*、*seg*、*seh*、*sel*、*sei*、*sek*、*sem*、*seu*) 的引物。引物序列见表 1。

PCR 反应体系: 共 $25\ \mu\text{L}$, 包括 $2\times\text{Taq Master Mix}$ $13\ \mu\text{L}$, ddH_2O $9\ \mu\text{L}$, 上下引物各 $1\ \mu\text{L}$, DNA 模板 $1\ \mu\text{L}$ 。

PCR 反应条件: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 退火温度根据表 1 的 T_m 值设定 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 35 个循环; 最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

取 PCR 产物 $6\ \mu\text{L}$ 于 1 wt. % 凝胶中进行电泳, 凝胶成像系统进行结果判定。

1.2.2 金黄色葡萄球菌生物被膜的检测

1.2.2.1 结晶紫染色法检测生物被膜的形成能力

按伍晔晖等^[16]的方法, 采用结晶紫染色法对 41 株金黄色葡萄球菌的生物被膜形成能力进行检测。步骤如下: 将 $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 在 1 左右的菌液以 1:100 的比例转接于 TSB 肉汤中, 重复吹吸混匀, 取稀释液 $200\ \mu\text{L}$ 接种于 96 孔板, 每株菌每列 6 孔, 余下作为空白对照, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 24 h。取出后用 1% PBS 进行洗板, 重复 3 次后, 放入 $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘干固定 1 h, 再用质量分数 1% 结晶紫溶液染色 5~15 min, 冲洗晾干, 吸取 $200\ \mu\text{L}$ 体积分数 95% 乙醇于 96 孔板进行溶解, 酶标仪测定 $\text{OD}_{570\text{ nm}}$ 值。

按桂中玉等^[17]的方法对生物被膜形成能力的强弱进行判断, 用临界值 OD_c (空白对照的平均值加上 3 倍空白对照的标准差) 与 $\text{OD}_{570\text{ nm}}$ 相比较来判断, 具体分为: $\text{OD}_{570\text{ nm}} \leq \text{OD}_c$ 时, 为无生物被膜形成能力; $\text{OD}_c < \text{OD}_{570\text{ nm}} \leq 2\text{OD}_c$ 时, 为生物被膜形成能力较弱; $2\text{OD}_c < \text{OD}_{570\text{ nm}} \leq 4\text{OD}_c$ 时, 为生物被膜形成能力中等; $4\text{OD}_c < \text{OD}_{570\text{ nm}}$ 时, 为生物被膜形成能力强。

1.2.2.2 生物被膜形成相关基因的检测

按参考文献^[18-20]合成金黄色葡萄球菌的 10 种生物被膜形成相关基因 (*clfB*、*clfA*、*sarA*、*icaA*、*cna*、*luxS*、*ccp*、*sigB*、*agrC*、*bap*) 的引物。引物序列见表 1。

表 1 金黄色葡萄球菌肠毒素基因和生物膜相关基因引物序列

Table 1 Primer sequences for enterotoxin genes and biofilm-related genes in *S. aureus*

基因	引物序列 (5'-3')	退火温度/℃	长度/bp
<i>sea</i>	F-GAAAAAAGTCTGAATTGCAGGGAACA	57	560
	R-CAAATAAATCGTAATTAACCGAAGGTTTC		
<i>seb</i>	F-ATTCTATTAAGGACACTAAGTTAGGGA	57	404
	R-ATCCCGTTTCATAAGGCGAGT		
<i>sec</i>	F-GTAAAGTTACAGGTGGCAAAACTTG	56	297
	R-CATATCATACCAAAAAGTATTGCCGT		
<i>sed</i>	F-GAGGTGTCACTCCACACGAA	56	349
	R-TGAAGGTGCTCTGTGGATAATG		
<i>see</i>	F-ACCGATTGACCGAAGAAAAA	56	264
	R-ATTGCCCTTGAGCATCAAAC		
<i>seg</i>	F-AGAATTAGCTAACAATTATAAAGATAAAAAAG	52	496
	R-TCAGTGAGTATTAAGAAATACTTCCAT		
<i>seh</i>	F-TGATTTAGCTCAGAAGTTTAAAAATAAAAAATG	52	466
	R-TTTCTTAGTATATAGATTTACATCAATATG		
<i>sel</i>	F-CACCAGAATCACACCGCTTA	54	205
	R-CTGTTTGATGCTTGCCATTG		
<i>sei</i>	F-TGGAACAGGACAAGCTGAAA	53	529
	R-TGTTTGCCATTAACCCAAA		
<i>sek</i>	F-ATGAATCTTATGATTTAATTCAGAATCAA	51	545
	R-ATTTATATCGTTTCTTTATAAGAAATATCG		
<i>sem</i>	F-ATGAAAAGAATACTTATCATTGTTGTTTTATTG	53	720
	R-CTTCAACTTTCGTCCTTATAAGATATTC		
<i>seu</i>	F-AAACATTAAGCCCAAGAG	48	215
	R-ACACCGCCATACATACAC		
<i>clfB</i>	F-TGCAAGTGCAGATTCCGAAAAAAC	50	194
	R-CCGTCGGTTGAGGTGTTTCATTG		
<i>clfA</i>	F-ATTGGCGTGGCTTCAGTGCT	57	292
	R-CGTTTCTCCGTAGTTGCATTG		
<i>sarA</i>	F-ATGGCAATTACAAAAATCAATGATTGC	50	375
	R-TTATAGTTCAATTTTCGTTGTTTGC		
<i>icaA</i>	F-CCTAACTAACGAAAGGTAG	50	1 314
	R-AAGATATAGCGATAAGTGC		
<i>cna</i>	F-AAAGCGTTGCCTAGTGGAGAC	50	228
	R-AGTGCCTTCCCAAACCTTTT		
<i>luxS</i>	F-GTCATTCACAAATACGACATTCG	50	365
	R-CCTGTACCGAAAACATCATGCC		
<i>ccp</i>	F-ATGATGTAGCAAGAGAAGCGCG	50	456
	R-TAACTGATGCTATATGTGCATCC		
<i>sigB</i>	F-CGGATCCGGTGTGACAATCAGTATGAC	58	937
	R-CGGAATTCGCGACATTTATGTGGATACAC		
<i>agrC</i>	F-TAGTGACCATGATCATAATGTATTTGAG	45	399
	R-CTTCTTGATTCGTTTGTATTTTCATCTC		
<i>bap</i>	F-CCCTATATCGAAGGTGTAGAATTGCAC	59	971
	R-GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC		

PCR 反应体系：(1) *clfB*、*sarA*、*icaA*、*cna*、*luxS*、*ccp* 基因反应体系：共 20 μL，包括 2×Taq Master Mix 10 μL，ddH₂O 7 μL，上下引物各 1 μL，DNA 模板 1 μL。(2) *sigB* 基因反应体系：共 25 μL，包括 2×Taq Master Mix 12 μL，ddH₂O 9 μL，上下引物各 1 μL，DNA 模板 2 μL。(3) *agrC*、*bap* 基因反应体系：共 25 μL，包括 2×Taq Master Mix 12.5 μL，ddH₂O 10.5 μL，上下引物各 0.5 μL，DNA 模板 1 μL。(4) *clfA* 基因反应体系：共 25 μL，包括 2×Taq Master Mix 13 μL，ddH₂O 9 μL，上下引物各 1 μL，DNA 模板 1 μL。

PCR 反应条件：(1) *clfB*、*sarA*、*icaA*、*cna*、*luxS*、*ccp* 基因反应条件：95 °C 预变性 5 min，95 °C 变性 1 min，退火 30 s，72 °C 延伸 30 s，35 个循环；最后 72 °C 延伸 10 min。(2) *sigB* 基因反应条件：94 °C 预变性 5 min，94 °C 变性 30 s，退火 30 s，72 °C 延伸 30 s，30 个循环；最后 72 °C 延伸 10 min。(3) *agrC* 基因反应条件：95 °C 预变性 5 min，95 °C 变性 1 min，退火 30 s，72 °C 延伸 30 s，36 个循环；最后 72 °C 延伸 10 min。(4) *bap* 基因反应条件：94 °C 预变性 5 min，94 °C 变性 10 s，退火 30 s，72 °C 延伸 30 s，35 个循环；最后 72 °C 延伸 10 min。(5) *clfA* 基因反应条件：94 °C 预变性 5 min，94 °C 变性 30 s，退火 30 s，72 °C 延伸 30 s，35 个循环；最后 72 °C 延伸 10 min。各基因退火温度见表 1。

取 PCR 产物 6 μL 于 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳，凝胶成像系统进行结果判定。

1.2.3 数据分析

所有实验数据采用 Office 2019 Excel 进行统计分析，GraphPad Prism 8.0 作图。

2 结果与讨论

2.1 金黄色葡萄球菌肠毒素检测结果

2.1.1 酶联免疫法检测结果

参考张从超^[21]的方法用临界值（阴性对照值 +0.15）与样品 OD 值比较来判断结果，当 OD 值小于临界值时判为阴性，OD 值大于或等于临界值时判为阳性。对 41 株金黄色葡萄球菌进行肠毒素酶联免疫法的检测，共筛选出 30 株产肠毒素菌株，结果见表 2。

2.1.2 肠毒素基因 PCR 检测结果

对 41 株金黄色葡萄球菌进行 12 种肠毒素基因

的检测，有 35 株菌检出携带肠毒素基因，检出率为 85.36%。这一结果与酶联免疫法的检测结果存在一定的差异，检测时发现酶联免疫法可以很快的检测出肠毒素的情况，但此法仅能对肠毒素的含量进行快速检测，对鉴定肠毒素的具体类型却不适用，而 PCR 扩增方法能很好的鉴定出肠毒素的类型，因此在检测肠毒素时，可将两种方法相结合进行检测。

表 2 41 株金黄色葡萄球菌菌株编号与 OD 值
Table 2 Number and OD value of 41 strains of *Staphylococcus aureus*

菌株编号	OD 值	菌株编号	OD 值
SA 肉 2-1	0.268	SAT2-2	0.297
SA 肉 3-2	0.226	SAT1-1	0.352
SA 肉 4-1	0.216	SAB2-2	0.199
SA 肉 5-2	0.843	SAC5-2	0.395
SA 肉 6-1	0.455	SAM1-2	0.468
SA 肉 8-1	0.256	SAC3-2	0.286
SA 肉 10-1	0.274	SAD6-3	0.320
SA 肉 11-1	0.221	SAD8-2	0.249
SA 肉 14-1	0.271	SAE1-2	0.267
SA 肉 15-1	0.208	SAD1-1	0.423
SA 肉 16-1	0.277	SAH1-1	0.654
SA 肉 17-1	0.537	SAH2-1	0.273
SA 肉 18-2	0.281	SAH3-1	0.232
SAP10-1	0.316	SAH4-1	0.267
SAK5-1	0.293	SAH5-2	0.458
SAP16-1	0.267	SAN3-1	0.333
SAM5-1	0.281	SAN4-3	0.889
SAM7-1	0.225	SAN5-1	0.246
SAT7-1	0.211	SAN6-2	0.279
SAA9-3	0.302	空白对照	0.051
SAC6-2	0.896	阴性对照	0.113
SAC7-1	0.283		

12 种肠毒素基因的检出率见图 1，其中经典肠毒素基因以 *sed* 的检出率最高达 65.85%，其次是 *sea* 和 *seb* 检出率均为 29.27%、*sec* 检出率为 4.88%、*see* 检出率为 2.44%；新型肠毒素基因中检出率从高到低依次为：*sel* (36.59%)、*seg* (29.27%)、*sem* 和

seu (都是 17.07%)、*sei* (14.63%)、*seh* (7.32%)、*sek* (0.00%)。此外, 35 株肠毒素阳性菌有携带一种或多种肠毒素基因的情况 (表 4), 其中有 10 株金黄色葡萄球菌只携带 1 种肠毒素基因, 主要为 *sed* 基因; 有 9 株菌携带 2 种肠毒素基因, 以 *seb-sed* 为主; 存在 2 株菌携带 7 种肠毒素基因。本研究中经典肠毒素的检出情况与吴健灏等^[1]、张婧等^[2]报道的上海市食源性金黄色葡萄球菌中 *seb* 的检出率最高存在差异, 新型肠毒素的检出情况与王琦等^[22]、张鹏飞等^[23]报道的北京市食源性金黄色葡萄球菌和陕西省肉鸡屠宰环节中 *sek* 和 *sep* 的检出率最高也存在差异, 表明不同地区、不同来源的样品中金黄色葡萄球菌肠毒素的携带情况存在差异。该地区的鸽屠宰加工环节中金黄色葡萄球菌肠毒素的检出率较高, 存在肠毒素引发食物中毒的潜在危险。

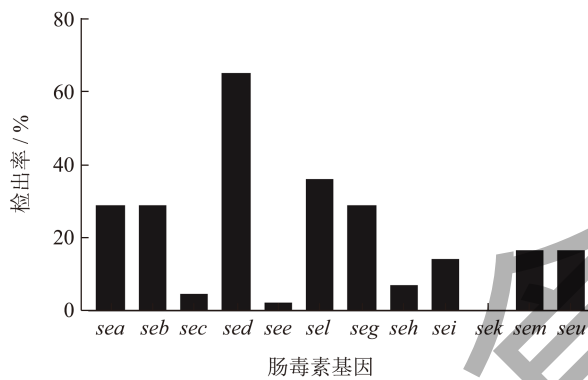


图 1 41 株金黄色葡萄球菌肠毒素基因的检出率
Fig.1 Detection rate of enterotoxin genes in 41 strains of *S. aureus*

2.2 金黄色葡萄球菌生物被膜检测结果

2.2.1 生物被膜形成能力检测结果

采用结晶紫染色法对 41 株金黄色葡萄球菌的生物被膜形成能力进行结晶紫定量检测, 发现 96 孔板底附着不同形状和程度的紫色固着物如图 2。紫色固着物是结晶紫染色后的生物膜, 颜色越深生物被膜形成能力越强, 反之生物被膜形成能力越弱。根据各菌株的 OD 值与临界值 OD_c 相比较结果见表 3, 41 株菌均有形成生物被膜的能力, 但形成能力有强弱之分。其中成膜能力中等的菌株最多, 有 18 株占 43.90%, 其次是成膜能力弱的菌株有 16 株占 39.02%, 成膜能力强的菌株只有 7 株占 17.07%, 均有成膜能力^[24,25], 但与 Costa 等^[26]、伍晔晔等^[16]的结果存在差异, 成膜能力低于本研究, 表

明不同地区和不同来源样品的金黄色葡萄球菌具有的成膜能力存在差异性。

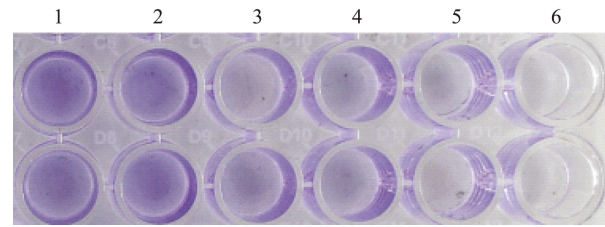


图 2 代表性分离菌株生物被膜的结晶紫染色结果
Fig.2 Crystalline violet staining results of biofilms of representative isolates

注: 1~2: 强成膜能力; 3~4: 中等成膜能力; 5: 弱成膜能力; 6: 空白对照。

表 3 金黄色葡萄球菌生物被膜形成能力

Table 3 Biofilm formation capacity of *S. aureus*

生物被膜形成能力	检出率 (%) / 检出株数 (株)			
	胴体接触面拭子 (n=11)	胴体表面拭子 (n=15)	鸽肉样 (n=15)	总计 (n=41)
弱	54.54 (6/11)	20.00 (3/15)	46.67 (7/15)	39.02 (16/41)
中等	36.36 (4/11)	66.67 (10/15)	26.66 (4/15)	43.90 (18/41)
强	9.09 (1/11)	13.33 (2/15)	26.66 (4/15)	17.07 (7/41)

不同来源菌株生物被膜形成能力存在一定差异, 鸽肉样和胴体表面的菌株较胴体接触面的菌株形成生物被膜能力强。胴体接触面和鸽肉样中生物被膜形成能力弱的菌株较多, 分别为 54.54% (6/11) 和 46.67% (7/15), 胴体表面中生物被膜形成能力中等的菌株较多, 为 66.67% (10/15)。本研究从三种不同来源的样品中均检测到生物被膜形成能力强的菌株, 其中鸽肉样中检出较多。综上所述, 不同来源的菌株生物被膜形成能力存在较大差异。因此, 在对不同样品相关生产设备进行清洗时, 要区别对待。

2.2.2 生物被膜相关基因检测结果

本研究对 41 株金黄色葡萄球菌进行 10 种生物被膜形成相关基因的检测, 除 *bap* 基因外, 其他基因均检出, 其中 *clfB*、*luxS* 和 *clfA* 的检出率为 100.00% 最高, 其次为 *sarA*、*ccp*、*sigB* 和 *cna* 基因, 检出率分别是 97.56%、97.56%、85.37% 和 65.85% (图 3)。此外, 每株菌均携带 4~8 种不等

的生物被膜形成相关基因，共有 8 种生物被膜相关基因谱型（表 4）。其中基因谱 *clfA-clfB-luxS-sarA-ccp-cna-icaA-sigB* 和 *clfA-clfB-luxS-sarA-ccp-cna-sigB* 的检出较高，分别为 31.71%（13/41）和 26.83%（11/41）。

生物被膜的形成是复杂动态的，受到多种因素的影响，其机制分为 PIA 依赖型和 PIA 非依赖型。其中 PIA 依赖型的表达主要通过 *ica* 操纵子编码，本研究中 41.46% 的菌株携带 *icaA* 基因。然而，本研究发现并不是所有能形成生物被膜的菌株均能检出 *icaA*^[27]。由此表明了生物被膜的形成也存在 PIA 非依赖型机制。此外，*ica* 的表达还受 *sigB*、*sar* 和 *agr* 的调控，在本研究中携带 *icaA* 的菌株同时也携带 *sigB*、*sarA* 和 *agrC* 这三种基因，证实了这一说法。本研究中 *clfA* 和 *clfB* 的检出均为 100%，高于张鹏飞^[19]对该基因的检出率，由此可推断 *clfA* 和 *clfB* 基因在生物被膜形成过程中起着很重要的作用。*bap* 基因能诱导生物被膜的

形成，但目前 *bap* 的检出只在奶牛乳房炎的分株中存在，很少在其他来源的菌株中检出，本研究中的分离株并未检出 *bap* 基因，这与 Chen 等^[28]的研究结果相似。本研究中 *luxS* 的检出率为 100%，但目前的研究未能明确 *luxS* 基因对金黄色葡萄球菌生物被膜形成是否有关，因此有待进一步研究。

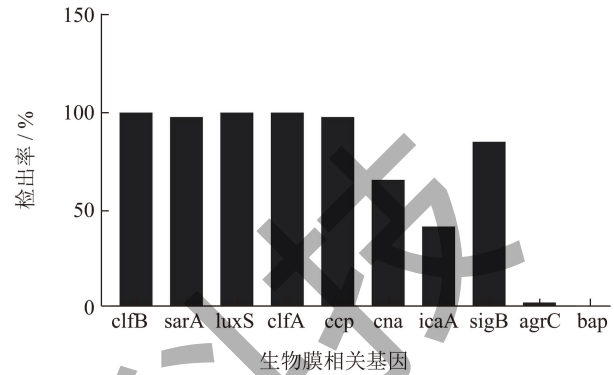


图 3 41 株金黄色葡萄球菌生物被膜形成相关基因的检出率
Fig.3 Detection rate of genes related to biofilm formation in 41 strains of *Staphylococcus aureus*

表 4 肠毒素、生物被膜相关基因谱及生物被膜形成能力

Table 4 Enterotoxins, biofilm-related gene profiles and biofilm-forming ability

样品来源	菌株编号	肠毒素基因谱	酶联免疫法	生物被膜相关基因谱	结晶紫染色法
	SA 肉 2-1	<i>sel</i>	阳	<i>clfA-clfB-luxS-sarA-ccp-cna-sigB</i>	++
	SA 肉 3-2	/	阴	<i>clfA-clfB-luxS-sarA-ccp-icaA-sigB</i>	+
	SA 肉 4-1	<i>seg</i>	阴	<i>clfA-clfB-luxS-sarA-ccp</i>	+
	SA 肉 5-2	<i>sel-seg</i>	阳	<i>clfA-clfB-luxS-sarA-ccp-cna-icaA-sigB</i>	+++
	SA 肉 6-1	<i>sed</i>	阳	<i>clfA-clfB-luxS-sarA-ccp-sigB</i>	++
	SA 肉 8-1	<i>sed</i>	阴	<i>clfA-clfB-luxS-sarA-ccp-icaA-sigB</i>	+
	SA 肉 10-1	<i>sed</i>	阳	<i>clfA-clfB-luxS-sarA-ccp-sigB</i>	+
鸽肉样	SA 肉 11-1	<i>sea-sed-sel</i>	阴	<i>clfA-clfB-luxS-sarA-ccp-sigB</i>	+
	SA 肉 14-1	/	阳	<i>clfA-clfB-luxS-sarA-ccp-sigB</i>	+++
	SA 肉 15-1	<i>sea-sed-sel</i>	阴	<i>clfA-clfB-luxS-sarA-ccp-sigB</i>	+
	SA 肉 16-1	/	阳	<i>clfA-clfB-luxS-sarA-ccp-cna-icaA-sigB</i>	+
	SA 肉 17-1	<i>sel</i>	阳	<i>clfA-clfB-luxS-sarA-ccp-cna-sigB</i>	+++
	SA 肉 18-2	<i>sea-sed</i>	阳	<i>clfA-clfB-luxS-sarA-ccp-icaA-sigB</i>	+++
	SAP10-1	/	阳	<i>clfA-clfB-luxS-sarA-ccp-cna-icaA-sigB</i>	++
	SAP16-1	<i>sed-sel</i>	阳	<i>clfA-clfB-luxS-sarA-ccp-cna-sigB</i>	++

续表 4

样品来源	菌株编号	肠毒素基因谱	酶联免疫法	生物被膜相关基因谱	结晶紫染色法
鸽胴体表面	SAA9-3	<i>sed</i>	阳	<i>clfA-clfB-luxS-sarA-ccp-cna-sigB</i>	+
	SAC6-2	/	阳	<i>clfA-clfB-luxS-sarA-ccp-cna-icaA-sigB</i>	+
	SAC7-1	<i>sea</i>	阳	<i>clfA-clfB-luxS-sarA-ccp-cna-sigB</i>	+
	SAB2-2	<i>seb-sed</i>	阴	<i>clfA-clfB-luxS-sarA-ccp-cna-sigB</i>	++
	SAC5-2	<i>seb-sed</i>	阳	<i>clfA-clfB-luxS-sarA-ccp-cna-icaA-sigB</i>	++
	SAC3-2	<i>seg-sem</i>	阳	<i>clfA-clfB-luxS-sarA-ccp-cna-icaA-sigB</i>	++
	SAH1-1	<i>seb-sed-sel-seg</i>	阳	<i>clfA-clfB-luxS-sarA-ccp</i>	++
	SAH2-1	<i>seb-sed-sel-seg-seu</i>	阳	<i>clfA-clfB-luxS-sarA-ccp-sigB</i>	++
	SAH3-1	<i>sea-seb-sed-sel-seg</i>	阴	<i>clfA-clfB-luxS-sarA-ccp-cna</i>	++
	SAH4-1	<i>seb-sed-sel</i>	阳	<i>clfA-clfB-luxS-sarA-ccp</i>	++
	SAH5-2	<i>seb-sed-sel</i>	阳	<i>clfA-clfB-luxS-sarA-ccp</i>	++
	SAN3-1	<i>sea-sec-sed-sel-seh</i>	阳	<i>clfA-clfB-luxS-sarA-ccp-cna-sigB</i>	+++
	SAN4-3	<i>sea-sec-sed-sel-seh</i>	阳	<i>clfA-clfB-luxS-sarA-ccp-cna-icaA-sigB</i>	+++
	SAN5-1	<i>sea-sed-sel-seh-seu</i>	阴	<i>clfA-clfB-luxS-sarA-ccp-cna-icaA-sigB</i>	++
	SAN6-2	<i>sea-sed-see-seg-sei-sem-seu</i>	阳	<i>clfA-clfB-luxS-sarA-ccp-cna-sigB-agrC</i>	++
胴体接触面	SAK5-1	<i>sed</i>	阳	<i>clfA-clfB-luxS-sarA-ccp-cna-sigB</i>	++
	SAM5-1	/	阳	<i>clfA-clfB-luxS-sarA-ccp-icaA-sigB</i>	+
	SAM7-1	<i>sed-sel</i>	阴	<i>clfA-clfB-luxS-sarA-ccp-cna-sigB</i>	+
	SAT7-1	<i>sed</i>	阴	<i>clfA-clfB-luxS-sarA-ccp-cna-icaA-sigB</i>	+
	SAT2-2	<i>sea-seb</i>	阳	<i>clfA-clfB-luxS-cna</i>	+++
	SAT1-1	<i>seb-sed</i>	阳	<i>clfA-clfB-luxS-sarA-ccp-cna-sigB</i>	+
	SAM1-2	<i>seb-seg-sei-sem</i>	阳	<i>clfA-clfB-luxS-sarA-ccp-cna-sigB</i>	++
	SAD6-3	<i>sed-seg-sei-sem-seu</i>	阳	<i>clfA-clfB-luxS-sarA-ccp-cna-icaA-sigB</i>	+
	SAD8-2	<i>sea-sed-seg-sei-sem-seu</i>	阴	<i>clfA-clfB-luxS-sarA-ccp-cna-icaA-sigB</i>	+
	SAE1-2	<i>sea-seb-sed-seg-sei-sem-seu</i>	阳	<i>clfA-clfB-luxS-sarA-ccp-cna-icaA-sigB</i>	++
SAD1-1	<i>seb-sed-seg-sei-sem-seu</i>	阳	<i>clfA-clfB-luxS-sarA-ccp-cna-icaA-sigB</i>	++	

注: +: 弱; ++: 中等; +++: 强。

3 结论

本研究对南疆鸽源 41 株金黄色葡萄球菌进行肠毒素检测, 酶联免疫法共检出 30 株产肠毒素菌株; PCR 扩增法共检出 35 株肠毒素阳性菌, 检出率均较高, 说明该地区存在肠毒素引发食物中毒的潜在危险。对不同来源的金黄色葡萄球菌进行生物被膜形成及相关基因的检测, 发现不同来源金黄色葡萄球菌普遍能形成生物被膜, 且不同来源菌株生物被膜形成能力存在差异; 生物被膜相关基因的检测, 发现在不同来源菌株中均有不同比例的分布, 并且菌株生物被膜的形成存在 PIA 非依赖型机制, 说

明该地区食源性金黄色葡萄球菌的生物被膜形成复杂, 这一发现也为防治金黄色葡萄球菌引起的相关感染提供理论支持。

参考文献

- [1] 吴健灏, 李欣, 徐馨雨, 等. 食源性金黄色葡萄球菌肠毒素基因分布、耐药性及分型研究[J]. 实用预防医学, 2023, 30(3): 257-261.
- [2] 张婧, 张易, 施春雷. 食源性金黄色葡萄球菌肠毒素基因及其表达检测[J]. 中国食品学报, 2020, 20(1): 246-251.
- [3] AYERIM G, CARLOS M, ROSA I J, et al. Methicillin resistance and biofilm production in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative *Staphylococcus*

- in mexico [J]. *Biomedica*, 2019, 39(3): 513-523.
- [4] ONEILL E, POZZI C, HOUSTON P, et al. Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, 45(5): 1379-1388.
- [5] DIANA G, SUSANA D, DANIEL V S, et al. Incidence of *Staphylococcus aureus* and analysis of associated bacterial communities on food industry surfaces [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(24): 8547-8554.
- [6] SHE P F, LIU Y Q, WANG Y X, et al. Antibiofilm efficacy of the gold compound auranofin on dual species biofilms of *Staphylococcus aureus* and candida sp [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2020, 128(1): 88-101.
- [7] SURESH M K, BISWAS R, BISWAS L. An update on recent developments in the prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms [J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2018, 309(1): 1-12.
- [8] 王心磊. 超声杀菌技术对大肠杆菌O157:H7及其生物膜的杀菌机制研究[D]. 南京: 江苏大学, 2020.
- [9] 赵瑞利, 曾君, 于恩远, 等. 不同毒力副猪嗜血杆菌生物被膜形成能力及特性[J]. *中国兽医杂志*, 2022, 58(7): 1-8, 13.
- [10] SAMROT A V, ABUBAKAR A, FARADJEVA E, et al. Mechanisms and impact of biofilms and targeting of biofilms using bioactive compounds a review [J]. *Medicina*, 2021, 57(8): 839.
- [11] 刘美慧, 李建科, 刘柳. 金黄色葡萄球菌生物膜形成相关基因及检测方法的研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2016, 42(2): 265-269.
- [12] 韩国全, 吴任之, 张翼, 等. 猪肉源金黄色葡萄球菌生物膜能力与MLST分型检测[J]. *中国食品学报*, 2023, 23(7): 353-362.
- [13] 孙孟娇, 王稳航. 肉类食品生物膜的形成机制及预防措施[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(4): 375-383.
- [14] 胥兰, 刘英玉, 麦多, 等. 新疆牛羊产业链中金黄色葡萄球菌的污染调查与毒力基因检测[J]. *新疆农业科学*, 2021, 58(1): 182-189.
- [15] VARSHNEY A K, MEDIAVILLA J R, ROBIOU N, et al. Diverse enterotoxin gene profiles among clonal complexes of *Staphylococcus aureus* isolates from the Bronx, New York [J]. *Applied Environmental Microbiology*, 2009, 75(21): 6839-6849.
- [16] 伍晔晖, 孟庆玲, 乔军, 等. 奶牛源金黄色葡萄球菌临床分离株的耐药特性、生物膜及其相关基因分布研究[J]. *西南农业学报*, 2018, 31(7): 1530-1535.
- [17] 桂中玉, 李琳, 李冰, 等. 金黄色葡萄球菌耐药性与生物被膜能力的鉴定[J]. *现代食品科技*, 2014, 30(3): 69-75.
- [18] 赵琴. 乌鲁木齐地区乳源金黄色葡萄球菌污染调查及生物膜形成特性检测[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2023.
- [19] 张鹏飞, 王婷, 钟楠, 等. 食源性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌生物被膜的形成及相关基因的检测[J]. *现代食品科技*, 2020, 36(10): 41-49.
- [20] 李延荣, 陈伟. 新疆南疆地区奶牛乳腺炎性金黄色葡萄球菌生物膜形成及其相关基因的检测[J]. *塔里木大学学报*, 2012, 24(4): 1-6.
- [21] 张从超. 生牛乳中金黄色葡萄球菌的快速检测及耐药性研究[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2017.
- [22] 王琦, 郝民, 王恒伟, 等. 2009-2020年北京市朝阳区113株食源性金黄色葡萄球菌耐甲氧西林和肠毒素/类肠毒素基因携带与分子分型分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(5): 1670-1677.
- [23] 张鹏飞, 徐旭, 王婷, 等. 肉鸡屠宰环节中金黄色葡萄球菌的流行及分子特征和耐药性[J]. *食品科学*, 2022, 43(14): 302-310.
- [24] 张静玲, 李国明, 邱景富. 金黄色葡萄球菌生物膜形成能力及其耐甲氧西林相关性[J]. *中国消毒学杂志*, 2018, 35(1): 14-16.
- [25] 潘红, 罗欲承, 赵建忠, 等. 金黄色葡萄球菌临床分离株生物膜形成能力及其相关基因的检测[J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2012, 22(4): 332-335.
- [26] COSTA R A, LIRA J V, ARAGAO M F. Biofilm-formation by drug-resistant *Staphylococcus aureus* from cow milk [J]. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 2019, 14(1): 63-69.
- [27] SALINA A, GUIMARAES F F, PEREIRA V B, et al. Detection of icaA, icaD, and bap genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* and non-aureus *Staphylococci* isolated from subclinical and clinical bovine mastitis [J]. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia*, 2020, 72(3): 1037-1038.
- [28] CHEN Q, XIE S M, LOU X Q, et al. Biofilm formation and prevalence of adhesion genes among *Staphylococcus aureus* isolates from different food sources [J]. *MicrobiologyOpen*, 2020, 9(1): 946.