

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20231231001

婴幼儿配方乳粉及婴幼儿米粉中的蜡样芽胞杆菌 流行情况、耐药性及分子特征研究

陈丽雯^{1#}, 黄宝莹^{2#}, 严家俊², 张娟², 蔡艳², 周臣清²,
周仨^{3,4}, 郑兰娟⁵, 蒋爱民³, 吴炜亮^{1*}

[1. 南方医科大学公共卫生学院, 食物安全与健康研究中心, 广东省热带病研究重点实验室, 广州 510515; 2. 国家食品质量监督检验中心(广东), 广东省食品生物危害因素检测工程技术研究中心, 广东产品质量监督检验研究院, 佛山 528300; 3. 华南农业大学食品学院, 畜禽产品精准加工与安全控制技术国家地方联合工程研究中心, 广州 510642; 4. 广州市食品药品审评中心, 广州 510410; 5. 浙江农业商贸职业学院农业经济管理系, 绍兴 312000]

摘要: **目的** 了解流通环节市售婴幼儿配方乳粉和婴幼儿米粉中的蜡样芽胞杆菌流行情况、抗生素耐药性和毒力基因等分子特征。**方法** 采用 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》对样品中的蜡样芽胞杆菌进行检测与生化鉴定。进一步通过抗生素敏感实验和全基因组测序对 11 株代表性分离株进行研究, 获得耐药表型及耐药、毒力基因等分子特征信息。**结果** 婴幼儿配方乳粉和婴幼儿米粉中蜡样芽胞杆菌的检出率分别为 11.97% (56/468) 和 20.74% (28/135)。11 株代表性蜡样芽胞杆菌均为多重耐药菌株, 全基因组测序结果发现 11 株分离株共携带 8 个耐药基因和 14 个毒力基因, 其中主要携带磷霉素、 β -内酰胺类抗生素抗性基因, 以及肠毒素基因(*hbl* 和 *nhe*), 另发现 1 株携带 *ces* 基因簇蜡样芽胞杆菌菌株。多位点序列分型表明, 11 株分离株具有遗传多样性, 分属 10 个 ST 型。**结论** 婴幼儿配方乳粉和婴幼儿米粉中的蜡样芽胞杆菌检出率较低, 但代表菌株的耐药谱和遗传特征具有多样性, 应进一步加强监测及采取有效措施进行控制, 以保障相关食品的安全性。

关键词: 蜡样芽胞杆菌; 全基因组测序; 抗生素抗性; 多重耐药; 毒力因子

Study on the occurrence, antimicrobial resistance profiles and genomic feature of *Bacillus cereus* in infant formula milk powder and rice cereal

CHEN Li-Wen^{1#}, HUANG Bao-Ying^{2#}, YAN Jia-Jun², ZHANG Juan², QI Yan²,
ZHOU Chen-Qing², ZHOU Quan^{3,4}, ZHENG Lan-Juan⁵, JIANG Ai-Min³, WU Wei-Liang^{1*}

[1. Food Safety and Health Research Center, Guangdong Provincial Key Laboratory of Tropical Disease Research, School of Public Health, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. National Testing Center of Food Quality Supervision (Guangdong), Guangdong Provincial Engineering Technology Research Center for Food Biohazard Factor Detection, Guangdong Testing Institute of Product Quality Supervision, Foshan 528300, China; 3. College of Food Science, National Local Joint Engineering Research Center for Precision Machining and Safety of Livestock and Poultry, Guangzhou 510642, China;

基金项目: 广东省基础与应用基础研究重大项目(2020B0301030005)、广东省粤北食药资源利用与保护重点实验室开放基金资助项目(FMR2022002M)

Fund: Support by the Guangdong Major Project of Basic and Applied Basic Research (2020B0301030005), and the Open Fund of the Guangdong Provincial Key Laboratory of Utilization and Conservation of Food and Medicinal Resources in Northern Region (FMR2022002M)

#陈丽雯和黄宝莹为共同第一作者

#CHEN Li-Wen and HUANG Bao-Ying are Co-first Authors

*通信作者: 吴炜亮, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全与检测技术。E-mail: wu1108@smu.edu.cn

*Corresponding author: WU Wei-Liang, Ph.D, Senior Engineer, Food Safety and Health Research Center, School of Public Health, Southern Medical University, No.1023-1063, Shatai Road S., Guangzhou 510515, China. E-mail: wu1108@smu.edu.cn

4. Guangzhou Center for Food and Drug Evaluation, Guangzhou 510410, China; 5. Department of Agricultural Economics and Management, Zhejiang Agricultural Business College, Shaoxing 312000, China]

ABSTRACT: Objective To comprehensively investigate the prevalence and the molecular characteristics of *Bacillus cereus* in commercially available infant formula milk powder and infant rice cereal, including antibiotic resistance and virulence. **Methods** The *Bacillus cereus* in the samples was detected and biochemical identified by GB 4789.14—2014 *Food safety national standard-food microbiological test-Bacillus cereus test*. Further research was conducted on 11 representative isolates through antibiotic sensitivity experiments and whole-genome sequencing to obtain molecular characteristic information such as resistance phenotype and resistance and virulence genes. **Results** The detection rates of *Bacillus cereus* in both infant formula milk powder and infant rice cereal were 11.97% (56/468) and 20.74% (28/135), respectively. Furthermore, multi-drug resistance was observed in the 11 typical strains of *Bacillus cereus* identified in this study. The results of whole-genome sequencing revealed that these strains totally carried 8 antibiotic resistance genes and 14 virulence genes. Fosfomycin and β -lactam were identified as major resistance genes, while the enterotoxin gene of *hbl* and *nhe* were found to be the predominant virulence factors among the isolated strains; additionally, one strain carried the *ces* gene cluster as well. Multilocus sequence typing indicated genetic diversity among the 11 isolates which could be classified into 10 different ST types. **Conclusion** The detection rate of *Bacillus cereus* in infant formula powder and infant rice powder is low, but the resistance spectrum and genetic characteristics of the representative strains are diverse, so it is necessary to further strengthen monitoring and take effective measures to control, so as to ensure the safety of related food.

KEY WORDS: *Bacillus cereus*; whole-genome sequencing; antibiotic resistance; multi-drug resistant; virulence factor

0 引言

致病微生物引起的食源性疾病是世界各国重点防控的食品安全问题^[1]。其中,蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)是一种革兰氏阳性、能运动且产芽孢的食源性致病菌。根据欧洲食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)2016年的年度报告,16%~20%由细菌毒素引起的食物中毒事件可归因于蜡样芽胞杆菌的感染^[2]。我国食源性疾病暴发监测系统收集的2021年食源性疾病暴发数据显示,在导致食源性疾病暴发的微生物致病因子中,蜡样芽胞杆菌引起的暴发事件数位居第5位^[3]。蜡样芽胞杆菌主要引起两类食源性疾病,包括由催吐毒素 Cereulide 引起的呕吐型食源性疾病和溶血性溶血素(hemolysin BL, Hbl)、非溶血性肠毒素(nonhemolytic enterotoxin, Nhe)和细胞毒素 K (cytotoxin K, CytK)等腹泻型毒素引起的腹泻型食源性疾病^[4-5]。

蜡样芽胞杆菌广泛存在于土壤、灰尘和水体中,生长繁殖的条件较宽松,且在严苛条件下可产生防御性芽孢,因此在多种预包装食品中发现蜡样芽胞杆菌的污染,如米面制品、乳制品和肉制品等。近年来,食品安全风险监测和相关研究发现,婴幼儿配方乳粉亦受蜡样芽胞杆菌的污染^[6-9],提示应关注由此而引起的食源性疾病暴发风险。此外,国内外文献报道^[10-13],自婴幼儿配方乳粉和婴幼儿谷

类辅助食品中分离的蜡样芽胞杆菌,经全基因组测序发现其携带的耐药基因逐渐增多,且普遍携带多种毒力基因,增加造成婴幼儿食源性疾病的风险。因此,亟需对婴幼儿配方乳粉和婴幼儿米粉中蜡样芽胞杆菌污染进行监测,并明晰其中的耐药特性和分子特征,为保障婴幼儿配方乳粉和婴幼儿米粉的安全提供技术支撑。

为此,本研究根据 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》对流通环节市售婴幼儿配方乳粉和婴幼儿米粉中的蜡样芽胞杆菌流行情况进行监测,并基于全基因组测序对其中分离到的典型蜡样芽胞杆菌进行序列分析,系统研究蜡样芽胞杆菌的耐药基因、毒力基因以及分子进化特征。本研究通过明晰国产及进口婴幼儿配方乳粉与婴幼儿米粉中的蜡样芽胞杆菌流行情况,并对其中典型的蜡样芽胞杆菌进行全基因组分析及耐药检测,旨在为婴幼儿食品中的食源性致病微生物防控提供科学数据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2021年至2023年期间,于流通环节采集市售婴幼儿配方乳粉及婴幼儿米粉共603份。其中,婴幼儿配方乳粉468份(国产:443份;进口:25份),幼儿米粉135份(国产:122份;进口:13份)。进口婴幼儿配方乳粉和婴幼儿米粉

均标称原装进口。

1.2 材料与试剂

蜡样芽胞杆菌(ATCC 14579, 广东省微生物菌种保藏中心); 甘露醇卵黄多粘菌素平板(mannitol yolk polymyxin, MYP)、胰酪胨大豆羊血琼脂平板(trypticase soy sheep blood, TSSB)、蜡样芽胞杆菌生化试剂盒(广东环凯微生物科技有限公司); 细菌 DNA 提取试剂盒(广州迈宝生物科技有限公司); 革兰氏阳性菌药敏板条[复星诊断科技(上海)有限公司]。

1.3 仪器与设备

XPR4001S/AC 电子天平(精度 0.1 g, 瑞士梅特勒-托利多有限公司); BKQ-B50II 高压蒸汽灭菌锅(山东博科消毒设备有限公司); BHCII型 A2 生物安全柜(苏州市金净净化设备科技有限公司); GZP-450Y 生化培养箱(上海精宏实验设备有限公司); WMS-1037 显微镜(上海无陌光学仪器有限公司); SY-2230 恒温振荡水浴锅(苏州捷美电子有限公司); VITEK 2 电子比浊仪[梅里埃诊断产品(上海)有限公司]; MD-86L458 超低温冰箱(合肥美的生物医疗有限公司); Illumina NovaSeq 6000 基因测序仪(美国 Illumina 公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 蜡样芽胞杆菌检测及鉴定

婴幼儿配方乳粉及婴幼儿米粉中的蜡样芽胞杆菌定量方法依据 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》第一法蜡样芽胞杆菌平板计数法进行检测。由于我国尚未制定婴幼儿配方乳粉及婴幼儿米粉的蜡样芽胞杆菌限量值, 因此参考澳大利亚新西兰食品标准局制定的婴儿配方食品中蜡样芽胞杆菌限量值($n=5$ 、 $c=0$ 、 $m=100$ CFU/g)进行判定^[14]。从阳性样品中分离获得的蜡样芽胞杆菌疑似株根据 GB 4789.14—2014 进行生化鉴定, 并以蜡样芽胞杆菌(ATCC 14579)作为参考菌株。生化结果鉴定为蜡样芽胞杆菌的分离株纯化后用 20%甘油水于超低温冰箱保存, 用于后续实验。

1.4.2 抗生素敏感实验

采用微量肉汤法对从婴幼儿配方乳粉及婴幼儿米粉中分离获得的 11 株生化特征典型的蜡样芽胞杆菌分离株进行抗生素敏感实验。于革兰氏阳性菌药敏板条中设置各种抗生素的系列倍比稀释浓度, 并根据说明书加入麦氏浊度为 0.5 的蜡样芽胞杆菌分离株菌悬液, 于 35℃生化培养箱中孵育 16~20 h 后, 对药敏板条进行判读, 得其最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)值, 并参考 2016 年美国临床实验室标准化委员会的标准及相关文献^[15-16]得到分离株对抗生素的耐药性结果, 包括敏感(S)、中介(I)和耐药(R)。观察分离株对 27 种抗生素的敏感性, 抗生素种类、名称及浓度见表 1。

表 1 抗生素敏感实验所用抗生素种类、名称及浓度范围
Table 1 Group, name and concentration range of antibiotics used in antibiotic susceptibility tests

抗生素种类	抗生素名称	质量浓度范围/($\mu\text{g/mL}$)
β -内酰胺类	氨苄西林	0.25~8
	青霉素	0.06~4
	亚胺培南	1~32
	美罗培南	1~32
	阿莫西林-克拉维酸	2/1~64/32
	头孢唑林	1~32
	头孢替坦	2~64
	头孢曲松	0.25~32
	头孢吡肟	2~64
	头孢西丁	0.5~32
氨基糖苷类	庆大霉素	1~32
	卡那霉素	2~64
喹诺酮类	阿米卡星	4~128
	链霉素	4~32
多肽类	环丙沙星	0.016~32
	左氧氟沙星	0.5~16
大环内酯类	万古霉素	0.5~32
	替考拉宁	0.5~32
链阳霉素类	红霉素	0.25~16
	泰利霉素	0.25~4
硝基呋喃类	奎奴普丁	1~16
	呋喃妥因	4~128
酰胺醇类	克林霉素	0.25~16
	氯霉素	2~64
磺胺类	复方磺胺	0.25/4.75~16/304
四环素类	四环素	0.5~32
利福霉素类	利福平	0.5~32

1.4.3 全基因组测序

根据细菌全基因组提取试剂盒说明书对婴幼儿配方乳粉及婴幼儿米粉的蜡样芽胞杆菌分离株 DNA 进行提取。全基因组测序由广东美格基因科技有限公司使用 Illumina NovaSeq 6000 测序仪完成。测序流程为: 将 DNA 打断为 350 bp 大小的 DNA 片段, 连接接头后通过聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增技术扩增, 最后将构建好的文库进行 cluster 制备和上机测序。

1.4.4 基因组组装与注释及聚类分析

过滤原始数据中质量值低的 reads, 得到 Clean Data, 而后利用工具 SPAdes v3.13.0 进行 de novo 拼接。最后将组装好的序列在对应基因库中进行毒力基因(virulence factors of pathogenic bacteria, VFDB)和耐药基因(antibiotic resistance genes database, ARDB)功能预测并注释。获得序列后, 采用 mafft(v7.471)进行多序列比对后, 使用 FastTree (v2.1.10)最大似然法做树, MEGAN 11 作图。

1.4.5 蜡样芽胞杆菌多位点序列分型

将 11 株菌中的对应 7 个管家基因(*glp*、*gmk*、*ilv*、*pta*、*pur*、*pyc*、*tpi*)序列上传至 PubMLST 进行比对(<https://pubmlst.org/>)获得 ST 型: 将管家基因序列提交至 PubMLST 后, 获得等位基因序列号, 如果提交的序列无精确的等位

基因序列, 则分配新的等位基因序列号。每个分离株的多位点序列类型为 7 个管家基因等位基因号排列。如果提交的 ST 的等位基因序号排列未匹配到现有的 STs, 亦分配新的 ST 型编号。本研究中检测得到的所有新等位基因序列和 ST 型均已提交到 PubMLST 数据库, 并获得新编号。

1.5 数据处理

采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计分析。检出率两两比较, 采用 χ^2 检验, 当 $P < 0.05$ 时, 差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 婴幼儿配方乳粉及婴幼儿米粉中蜡样芽胞杆菌的流行情况

如表 2 所示, 于 56 份婴幼儿配方乳粉中检出蜡样芽胞杆菌, 检出率为 11.97% (56/468), 而于 28 份婴幼儿米粉中检出蜡样芽胞杆菌, 检出率为 20.74% (28/135), 婴幼儿米粉的蜡样芽胞杆菌检出率显著高于婴幼儿配方乳粉的蜡样芽胞杆菌检出率 ($P < 0.05$)。对于产地而言, 进口婴幼儿配方乳粉的蜡样芽胞杆菌检出率高于国产婴幼儿配方乳粉的蜡样芽胞杆菌检出率, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 国产婴幼儿米粉产品的蜡样芽胞杆菌检出率高于进口产品的蜡样芽胞杆菌检出率, 但差异亦无统计学意义 ($P > 0.05$)。参考澳大利亚新西兰食品标准局制定的蜡样芽胞杆菌限量值进行判定, 国产婴幼儿配方乳粉和婴幼儿米粉分别有 3 份和 12 份样品超过参考限量。

从表 2 所示的结果及以往的研究^[17-19]可知, 流通环节市售婴幼儿配方乳粉和婴幼儿米粉中的蜡样芽胞杆菌污染水平较低, 但存在一定的检出, 提示仍需进一步加强婴幼儿配方乳粉和婴幼儿米粉生产过程中蜡样芽胞杆菌的防控。此外, “婴幼儿米粉中的蜡样芽胞杆菌检出率高于婴幼儿配方乳粉中蜡样芽胞杆菌的检出率”这一结果, 与汤晓召等^[20]和李莹等^[21]的报道相异, 可能与婴幼儿米粉所使用的原料大米以及相关辅料蔬菜、水果等易受蜡样芽胞杆菌污染相关。对于婴幼儿配方乳粉而言, 本研究中发现进口婴幼儿配方乳粉的检出率较国产配方乳粉高, 虽然进口产品的监测份数较少, 但亦在一定程度上表明我国对于婴幼儿配方乳粉的监管措施产生成效。

2.2 蜡样芽胞杆菌的抗生素耐药谱

根据生化鉴定结果, 筛选 11 株代表性的蜡样芽胞杆菌分离株进行抗生素耐药谱和全基因组测序研究。分离株编号为 A01 至 A11, 其中 A01 至 A06 为从婴幼儿米粉中分离的蜡样芽胞杆菌分离株, A07 至 A11 为从婴幼儿配方乳粉中分离的蜡样芽胞杆菌分离株。抗生素药物敏感实验结果如图 1 所示, 11 株分离株均对青霉素和氨苄西林 2 种抗生素耐药, 其次大部分菌株对头孢吡肟 (90.91%, 10/11)、复方磺胺 (81.82%, 9/11)、头孢唑林 (63.64%, 7/11) 和头孢曲松 (54.55%, 6/11) 耐药, 提示蜡样芽胞杆菌对第一代、第三代和第四代头孢类抗生素的代表抗生素具有较高的耐药性, 结果与之前的研究报道相似^[22]。此外, 个别菌株对某种抗生素耐药, 如 A02 对链霉素耐药, A09 对氯霉素耐药。11 株蜡样芽胞杆菌分离株对利福平、万古霉素、替考拉宁、红霉素、泰利霉素、左氟氧沙星、奎奴普丁、环丙沙星、阿莫西林克拉维酸、美罗培南、亚胺培南、庆大霉素、阿米卡星、呋喃妥因、卡那霉素 15 种抗生素敏感。其中, 11 株分离株均对利福平敏感的结果, 与 GAO 等^[23]、ZHANG 等^[24]和 KONG 等^[25]报道的结果存在差异, 可能是与蜡样芽胞杆菌的来源不同有关。

2.3 蜡样芽胞杆菌的多重耐药特征

11 株蜡样芽胞杆菌分离株均为多重耐药菌株, 且多重耐药表型多样, 不同多重耐药的菌株, 具有多种耐药谱表型。如表 3 所示, 由婴幼儿米粉分离的蜡样芽胞杆菌菌株以五重耐药为主, 占比为 27.27% (3/11); 在婴幼儿配方乳粉分离的蜡样芽胞杆菌菌株中发现 2 株四重耐药菌株, 占比为 18.18% (2/11), 其次为 1 株六重耐药菌株, 1 株七重耐药菌株以及 1 株八重耐药菌株。其中, 八重耐药菌株的耐药谱为青霉素-复方磺胺-头孢曲松-氨苄西林-头孢唑林-头孢替坦-头孢吡肟-氯霉素。婴幼儿配方乳粉分离的 1 株七重耐药菌株, 1 株六重耐药菌株和婴幼儿米粉分离的 1 株七重耐药菌株具有相似的耐药谱, 均对青霉素-复方磺胺-头孢曲松-氨苄西林-头孢唑林-头孢吡肟耐药。3 株五重耐药菌株的耐药表型均不相同, 表现出多重耐药表型多样性。相关结果表明, 婴幼儿配方乳粉和婴幼儿米粉受多重耐药的蜡样芽胞杆菌污染较为严重。

表 2 婴幼儿配方乳粉及婴幼儿米粉中蜡样芽胞杆菌的流行情况和检出率

Table 2 Prevalence and detection rate of *Bacillus cereus* in infant formula milk powder and rice cereal

类别	检出率/%	污染情况		>100 CFU/g 样品百分比/%
		≤100 CFU/g	>100 CFU/g	
婴幼儿配方乳粉	11.97 (56/468)	53	3	0.64
国产	11.29 (50/443)	47	3	0.68
进口	24.00 (6/25)	6	0	0
婴幼儿米粉	20.74 (28/135)	16	12	5.92
国产	22.12 (27/122)	15	12	6.56
进口	7.69 (1/13)	1	0	0

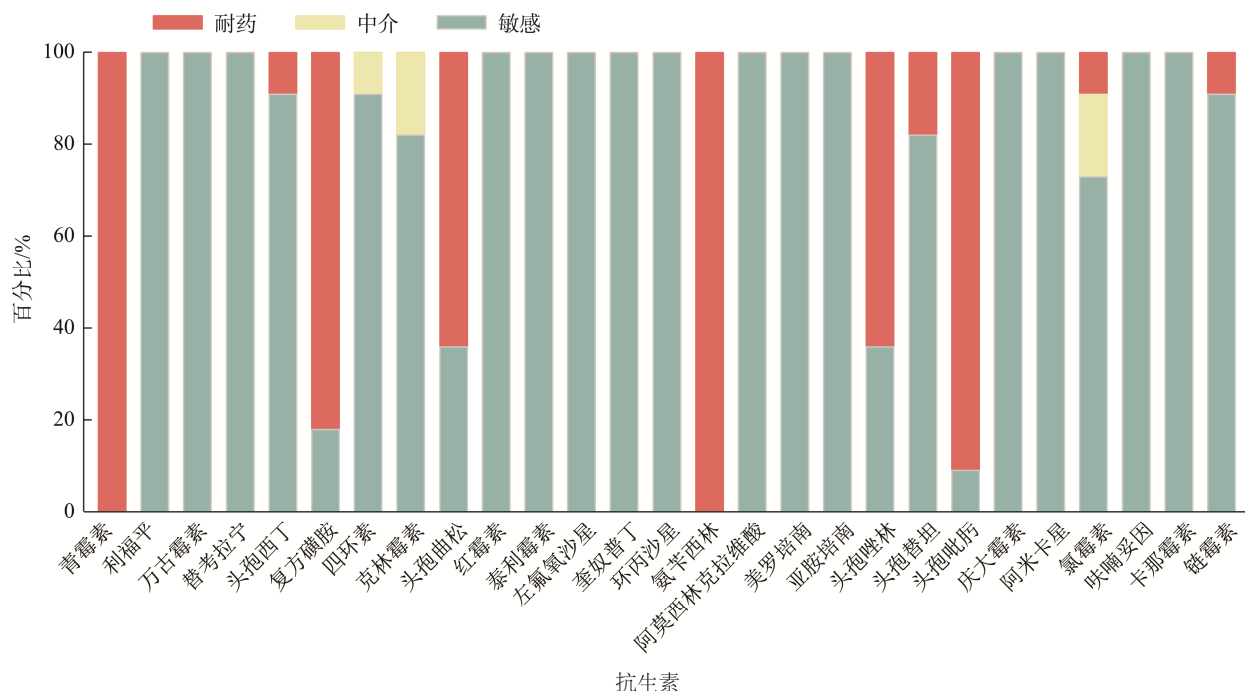


图 1 11 株蜡样芽胞杆菌分离株的耐药情况

Fig.1 Antimicrobial resistance of 11 strains of *Bacillus cereus*

表 3 蜡样芽胞杆菌的多重耐药谱分布

Table 3 Distribution of multi-drug resistance profiles in *Bacillus cereus*

菌株编号	青霉素	头孢西丁	复方磺胺	头孢曲松	氨苄西林	头孢唑林	头孢替坦	头孢吡肟	氯霉素	链霉素
A01	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-
A02	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+
A03	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
A04	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
A05	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-
A06	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-
A07	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-
A08	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-
A09	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
A10	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
A11	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-

注: +代表菌株对该种抗生素耐药, -代表菌株对该种抗生素敏感。

2.4 蜡样芽胞杆菌的抗生素耐药基因分子特征

如表 4 所示, 全基因组测序结果表明, 11 株蜡样芽胞杆菌分离株共携带 8 种抗生素耐药基因。其中, *Bcl* 和 *Bla1* 编码 β -内酰胺类抗生素分解酶基因, 而 *BclII* 则编码青霉素和头孢类抗生素水解酶基因, 提示蜡样芽胞杆菌可能对这些抗生素产生抗性; *FosB* 为微生物对磷霉素等抗生素产生耐药性的基因之一; *Bacillus Cluster A intrinsic macrolide phosphotransferase (Bacillus Cluster A intrinsic mph)* 为大环内酯磷酸转移酶的编码基因; *mcr-4* 基因编码一种磷酸乙醇胺转移酶, 通过磷酸乙醇胺转移到脂质 A 中, 改变脂质 A 的结构, 使细菌对多黏菌素产生耐药, 其与 *vanRA* 相似, 可使细菌对万古霉素等糖肽类抗生素产生抗性。此外, 全基因组测序还发现个别蜡样芽胞杆菌分离株携带编码抗生

素外排泵基因 *fexA*。

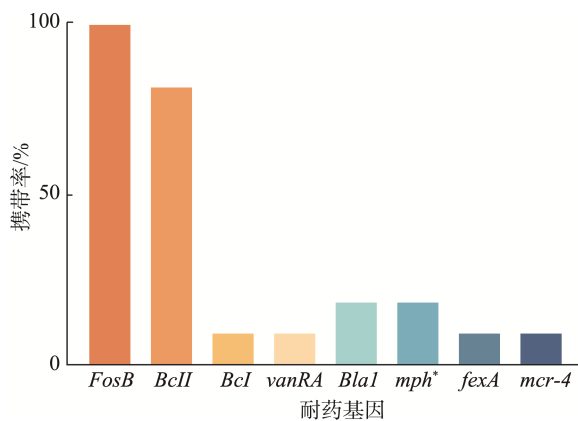
由表 4 和图 2 所示, 11 株蜡样芽胞杆菌分离株均携带 *FosB* 基因, 而 9 株分离株携带 *BclII* 基因, 携带率为 81.82% (9/11)。除 A01 仅携带 *FosB* 一种耐药基因外, 其他菌株均携带两种及以上耐药基因。值得注意的是, A09 携带了 5 种耐药基因, 分别是 *FosB*、*BclII*、*Bacillus Cluster A intrinsic mph*、*fexA* 和 *mcr-4*。

结合耐药表型和基因型进行分析, 蜡样芽胞杆菌分离株 A01 在全基因组测序中未发现携带编码青霉素、头孢曲松和复方磺胺等抗生素抗性的基因, 但也表现出了对 β -内酰胺类等抗生素的耐药性, 这可能与分离株复杂的耐药机制有关。蜡样芽胞杆菌分离株 A09 和 A11 携带了 *Bacillus Cluster A intrinsic mph* 耐药基因, 虽未表现出对红霉素的

表 4 11 株蜡样芽胞杆菌分离株的耐药基因分子特征
Table 4 Molecular characteristics of drug resistance genes in 11 *Bacillus cereus* strains

菌株编号	<i>FosB</i>	<i>BcII</i>	<i>Bcl</i>	<i>vanRA</i>	<i>BlaI</i>	<i>Bacillus Cluster A intrinsic mph</i>	<i>fexA</i>	<i>mcr-4</i>
A01	+	-	-	-	-	-	-	-
A02	+	+	-	-	-	-	-	-
A03	+	-	+	-	-	-	-	-
A04	+	+	-	+	+	-	-	-
A05	+	+	-	-	+	-	-	-
A06	+	+	-	-	-	-	-	-
A07	+	+	-	-	-	-	-	-
A08	+	+	-	-	-	-	-	-
A09	+	+	-	-	-	+	+	+
A10	+	+	-	-	-	-	-	-
A11	+	+	-	-	-	+	-	-

注: +代表携带相应的抗生素抗性基因, -代表未携带相应的抗生素抗性基因。



注: *为 *Bacillus Cluster A intrinsic mph*。

图 2 11 株蜡样芽胞杆菌分离株的耐药基因携带率
Fig.2 Prevalence of drug resistance genes in 11 strains of *Bacillus cereus*

耐药,但是对比抗生素药物敏感实验结果发现,2 株菌株的 MIC 值高于其他菌株,表明基因型与表型具有一致性。携带 5 种耐药基因的 A09 分离株确实显示出了多重耐药表型,其耐药谱为青霉素-复方磺胺-头孢曲松-氨苄西林-头孢唑林-头孢替坦-头孢吡肟-氯霉素。

表 5 11 株蜡样芽胞杆菌分离株的毒力基因分子特征
Table 5 Molecular features of virulence genes in 11 strains of *Bacillus cereus*

菌株编号	<i>ces</i> 基因簇	<i>hblA</i>	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>cytK</i>
A01	-	+	+	+	+	+	+	-
A02	-	-	-	-	+	+	+	-
A03	-	+	+	+	+	+	+	+
A04	-	-	-	-	+	+	+	+
A05	+	-	-	-	+	+	+	-
A06	-	-	-	-	+	+	+	-
A07	-	-	-	-	+	+	+	+
A08	-	-	-	-	+	+	+	-
A09	-	-	-	-	+	+	+	+
A10	-	-	-	-	+	+	+	+
A11	-	+	+	+	-	-	-	+

注: +代表携带相应的毒力基因, -代表未携带相应的毒力基因。

2.5 蜡样芽胞杆菌的毒力基因分子特征

如表 5 所示,全基因组测序结果表明,11 株蜡样芽胞杆菌分离株中共发现 14 种毒力基因,分别为 *ces* 基因簇(*cesA*、*cesB*、*cesC*、*cesD*、*cesH*、*cesP*、*cesT*)、*hblA*、*hblC*、*hblD*、*nheA*、*nheB*、*nheC* 和 *cytK*。其中,11 株分离株中仅有 A05 分离株携带编码呕吐毒素的 *ces* 基因簇;A01、A03 和 A11 分离株携带编码腹泻毒素基因簇(*hblA*、*hblC*、*hblD*);除 A11 外,其他 10 株分离株均携带 *nhe* 基因簇(*nheA*、*nheB*、*nheC*)。此外,6 株蜡样芽胞杆菌分离株携带编码产细胞毒素的基因 *cytK*,提示这 6 株分离株的侵袭力增加,可使微生物穿过宿主细胞的防御屏障而感染宿主。

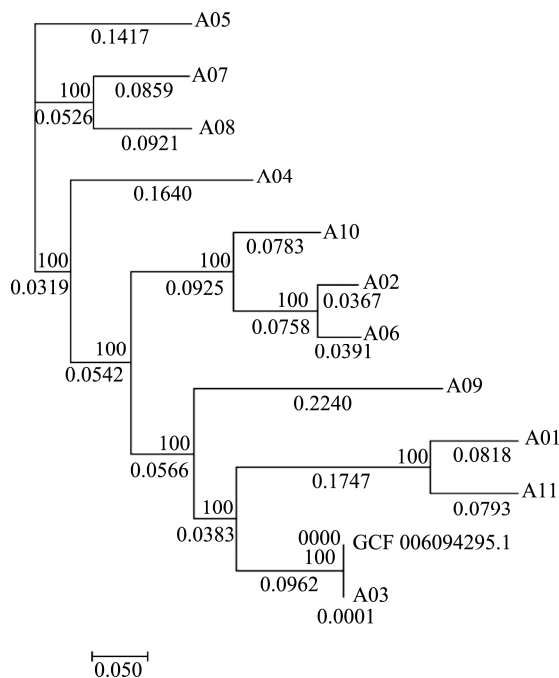
据文献报道,携带呕吐毒素编码基因簇 *ces* 的蜡样芽胞杆菌分离株相对少见^[26],本次发现的分离株来源于进口婴幼儿米粉。3 株携带 *hbl* 腹泻毒素基因簇的蜡样芽胞杆菌分离株中,A01 和 A03 分离自国产婴幼儿米粉,而 A11 来源于国产婴幼儿乳粉。其中 A01 和 A03 同时携带编码溶血性肠毒素 *hblA*、*hblC*、*hblD* 基因和非溶血性肠毒素的 *nheA*、*nheB*、*nheC* 基因。根据相关研究^[27],由于 A03 分离株同时携带编码细胞毒素基因 *cytK*,其引起腹泻型食源性疾病的潜在风险更高。

2.6 蜡样芽胞杆菌的多位点序列分型及聚类分析

11株蜡样芽胞杆菌共获得10个序列型,可见研究中的蜡样芽胞杆菌分离株ST型具有高度多样性,与先前的研究结果一致^[28]。其中,A03为ST4、A05为ST26、A02和A06为ST92、A04为ST371、A11为ST378、A08为ST611、A09为ST1421、A01为ST2196、A07为ST2622,A10为新发现的序列型,赋予的ST型编号为3277。通过多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)分型后发现,A05为有引起呕吐型食源性疾病潜在危害的ST26型菌株,有研究表明ST26型与蜡样芽胞杆菌引起呕吐型食源性疾病暴发事件密切相关^[29]。BIANCO等^[30]的研究表明,ST4也为潜在呕吐毒株的分型,但在本研究中A03的毒力基因型中并未检测到*ces*基因簇,具体原因还有待研究与分析。PubMLST数据分析结果显示,在引起食源性疾病事件的蜡样芽胞杆菌分离株和病人分离株中,以呕吐型症状为主,占55.3%,腹泻型占31.2%,呕吐和腹泻复合型占12.7%^[31]。

2.7 蜡样芽胞杆菌的系统发育进化分析

如图3所示,11株蜡样芽胞杆菌与标准菌株ATCC14579构成的系统发育进化树,主要由3个进化分支组成,其中A07与A08聚为一类,A02与A06聚为一类,A01与A11聚为一类,A03与标准菌株ATCC14579聚为一类。结合毒力基因分析发现,聚类至同一簇的菌株携带的毒力基因存在差别,可见菌株具有高度多样的遗传性^[32]。其余菌株间的亲缘关系都较为疏远,表明从各样品中分离的蜡样芽胞杆菌具有较高的遗传进化多样性,这与之前的研究相符^[33-35]。



注: GCF 006094295.1 为标准菌株 ATCC14579。

图3 11株蜡样芽胞杆菌系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of 11 strains of *Bacillus cereus*

3 结论

控制婴幼儿配方乳粉和婴幼儿米粉中的蜡样芽胞杆菌污染对于保障产品的安全至关重要。虽然近年来关于蜡样芽胞杆菌在各种食品中的流行情况等数据在不断增加^[36],然而,目前对婴幼儿配方乳粉和婴幼儿米粉中的蜡样芽胞杆菌流行情况、分子特征尚未系统明晰。本研究通过采集流环节市售的婴幼儿配方乳粉和婴幼儿米粉,对其中的蜡样芽胞杆菌污染情况进行监测,并基于全基因组测序,明晰其中代表性蜡样芽胞杆菌的分子特征。研究结果表明,婴幼儿配方乳粉和婴幼儿米粉均有一定比例的蜡样芽胞杆菌检出,其中少量样品的污染水平大于100 CFU/g。抗生素敏感实验和全基因组测序结果表明,11株代表性蜡样芽胞杆菌分离株均为多重耐药菌株,具有耐药谱多样性,且耐药表型和耐药基因型具有较好的一致性。对于毒力基因而言,蜡样芽胞杆菌毒力基因的携带具有多样性,且发现了携带编码呕吐毒素基因的分离株。MLST分型结果表明,蜡样芽胞杆菌遗传具有多样性,表现为多种ST型。综上所述,婴幼儿配方乳粉和婴幼儿米粉生产企业应采取有效控制措施防控蜡样芽胞杆菌的污染,食品安全监管部门需进一步加强相关产品蜡样芽胞杆菌的监测,必要时制定相应的限量标准控制其污染。

参考文献

- [1] GALANIS E, LOFO-WONG DM, PATRICK ME, *et al.* Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000—2002 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12(3): 381—388.
- [2] YANG S, WANG Y, LIU Y, *et al.* Cereulide and emetic *Bacillus cereus*: Characterizations, impacts and public precautions [J]. *Foods*, 2023, 12(4): 833.
- [3] 李红秋, 贾华云, 赵帅, 等. 2021年中国大陆食源性疾病暴发监测资料分析[J]. *中国食品卫生杂志*, 2022, 34(4): 816—821. LI HQ, JIA HY, ZHAO S, *et al.* Analysis of foodborne disease outbreaks in Chinese Mainland in 2021 [J]. *Chin J Food Hyg*, 2022, 34(4): 816—821.
- [4] DIETRICH R, JESSBERGER N, EHLING-SCHULZ M, *et al.* The food poisoning toxins of *Bacillus cereus* [J]. *Toxins*, 2021, 13(2): 98.
- [5] ARNESEN PS, FAGERLUND A, GRANUM PE. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins [J]. *Fems Microbiol Rev*, 2008, 32(4): 579—606.
- [6] ZHAO SJ, CHEN JL, FEI P, *et al.* Prevalence, molecular characterization, and antibiotic susceptibility of *Bacillus cereus* isolated from dairy products in China [J]. *J Dairy Sci*, 2020, 103(5): 3994—4001.
- [7] ZHANG YJ, CHEN C, FENG L, *et al.* Quantitative prevalence, phenotypic and genotypic characteristics of *Bacillus cereus* isolated from retail infant foods in China [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2017, 14: 564—572.
- [8] ZHANG ZL, FENG H, XU C, *et al.* Detection of viable enterotoxin-producing *Bacillus cereus* and analysis of toxigenicity from ready-to-eat foods and infant formula milk powder by multiplex PCR [J]. *J Dairy Sci*, 2016, 99: 1047—1055.
- [9] 王伟杰, 孙婷婷, 李雪, 等. 2017—2019年辽宁省市售食品中食源性致病菌监测结果分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(9): 3522—3528. WANG WJ, SUN TT, LI X, *et al.* Analysis on surveillance results of foodborne pathogens in foods sold in Liaoning province from 2017 to 2019 [J]. *J Food Qual Saf*, 2021, 12(9): 3522—3528.

- [10] BURSOVÁ Š, NECIDOVÁ L, HARUŠTIÁKOVÁ D, *et al.* Growth and toxin production of *Bacillus cereus* strains in reconstituted infant milk formula [J]. *Food Control*, 2018, 93: 334–343.
- [11] HEINI N, STEPHAN R, EHLING-SCHULZ M, *et al.* Characterization of *Bacillus cereus* group isolates from powdered food products [J]. *Int J Food Microbiol*, 2018, 283: 59–64.
- [12] PEI X, YANG S, ZHAN L, *et al.* Prevalence of *Bacillus cereus* in powdered infant and powdered follow-up formula in China [J]. *Food Control*, 2018, 93: 101–105.
- [13] ALANBER MN, ALHARBI NS, KHALED JM. Evaluation of multidrug-resistant *Bacillus* strains causing public health risks in powdered infant milk formulas [J]. *J Infect Public Heal*, 2020, 13(10): 1462–1468.
- [14] 周少君, 陈秋霞, 宋曼丹, 等. 广东省婴幼儿配方食品中蜡样芽孢杆菌的 5 年污染情况分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2017, 27(14): 2091–2094. ZHOU SJ, CHEN QX, SONG MD, *et al.* A five-year survey of *Bacillus cereus* contamination in infant and young children formula food in Guangdong Province [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2017, 27(14): 2091–2094.
- [15] BIANCO A, CAPOZZI L, MONNO MR, *et al.* Characterization of *Bacillus cereus* group isolates from human bacteremia by whole-genome sequencing [J]. *Front Microbiol*, 2021, 11: 599524.
- [16] JENSEN LB, BALODA S, BOYE M, *et al.* Antimicrobial resistance among *Pseudomonas* spp. and the *Bacillus cereus* group isolated from Danish agricultural soil [J]. *Environ Int*, 2001, 26(7–8): 581–587.
- [17] IBRAHIM AS, HAFIZ NM, SAAD MF. Prevalence of *Bacillus cereus* in dairy powders focusing on its toxigenic genes and antimicrobial resistance [J]. *Arch Microbiol*, 2022, 204(6): 339.
- [18] HWANG JY, PARK JH. Characteristics of enterotoxin distribution, hemolysis, lecithinase, and starch hydrolysis of *Bacillus cereus* isolated from infant formulas and ready-to-eat foods [J]. *J Dairy Sci*, 2015, 98(3): 1652–1660.
- [19] WANG P, ZHAO X, QU T, *et al.* Insight into *Bacillus cereus* associated with infant foods in Beijing [J]. *Foods*, 2022, 11(5): 719.
- [20] 汤晓召, 杨祖顺, 范璐, 等. 2012—2016 年云南省婴幼儿食品及即食食品中蜡样芽孢杆菌污染状况调查评估[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(10): 3785–3789. TANG XZ, YANG ZS, FAN L, *et al.* Investigation and assessment of *Bacillus cereus* contamination in infants and young children foods and ready-to-use foods in Yunnan from 2012 to 2016 [J]. *J Food Qual Saf*, 2017, 8(10): 3785–3789.
- [21] 李莹, 裴晓燕, 杨大进, 等. 中国八省婴幼儿食品中蜡样芽孢杆菌污染状况研究[J]. *卫生研究*, 2014, 43(3): 4. LI Y, FEI XY, YANG DJ, *et al.* Occurrence of *Bacillus cereus* in infants and young children foods in 8 provinces in China [J]. *J Hyg Res*, 2014, 43(3): 4.
- [22] BIANCO A, CAPOZZI L, MONNO MR, *et al.* Characterization of *Bacillus cereus* group isolates from human bacteremia by whole-genome sequencing [J]. *Front Microbiol*, 2021, 11: 599524.
- [23] GAO TT, DING Y, WU QP, *et al.* Prevalence, virulence genes, antimicrobial susceptibility, and genetic diversity of *Bacillus cereus* isolated from pasteurized milk in China [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 533.
- [24] ZHANG Y, CHEN M, YU P, *et al.* Prevalence, virulence feature, antibiotic resistance and MLST typing of *Bacillus cereus* isolated from retail aquatic products in China [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 1513.
- [25] KONG L, YU S, YUAN X, *et al.* An investigation on the occurrence and molecular characterization of *Bacillus cereus* in meat and meat products in China [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2021, 18(5): 306–314.
- [26] HUANG Y, FLINT SH, YU S, *et al.* Phenotypic properties and genotyping analysis of *Bacillus cereus* group isolates from dairy and potato products [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2021, 140(5): 110853.
- [27] JENNIFER SC, CORREA MM, ACEVES-DIEZ AE, *et al.* Enterotoxin gene distribution and genotypes of *Bacillus cereus sensu lato* isolated from cassava starch [J]. *Toxins*, 2023, 13(2): 131.
- [28] YANG Y, YU X, ZHAN L, *et al.* Multilocus sequence type profiles of *Bacillus cereus* isolates from infant formula in China [J]. *Food Microbiol*, 2017, 62: 46–50.
- [29] PRUCKLER JM, LETA H, GEE JE, *et al.* Genetic diversity of clinical isolates of *Bacillus cereus* using multilocus sequence typing [J]. *Bbc Microbiol*, 2008, 8(1): 191.
- [30] BIANCO A, CAPOZZI L, MICCOLUPO A, *et al.* Multi-locus sequence typing and virulence profile in *Bacillus cereus sensu lato* strains isolated from dairy products [J]. *Ital J Food Saf*, 2021, 9(4): 8401.
- [31] 张红芝, 刘雪薇, 顾其芳, 等. 基于全基因组测序的蜡样芽孢杆菌食品分离株分子特征及耐药性研究[J]. *中国食品卫生杂志*, 2021, 33(5): 529–535. ZHANG HZ, LIU XW, GU QF, *et al.* Molecular characteristics and antibiotic resistance of *Bacillus cereus* from foods using whole genome sequencing [J]. *Chin J Food Hyg*, 2021, 33(5): 529–535.
- [32] CASTULO-ARCOS DA, ADAME-GÓMEZ R, CASTRO-ALARCÓN N, *et al.* Genetic diversity of enterotoxigenic *Bacillus cereus* strains in coriander in southwestern Mexico [J]. *Peer J*, 2022, 10: e13667.
- [33] SÁNCHEZ-CHICA J, CORREA MM, ACEVES-DIEZ AE, *et al.* Genetic and toxigenic diversity of *Bacillus cereus* group isolated from powdered foods [J]. *J Food Sci Technol*, 2021, 58(5): 1892–1899.
- [34] SAMAPUNDO S, HEYNDRICKX M, XHAFERI R, *et al.* Incidence, diversity and toxin gene characteristics of *Bacillus cereus* group strains isolated from food products marketed in Belgium [J]. *Int J Food Microbiol*, 2011, 150(1): 34–41.
- [35] CARROLL LM, PIERNEEF R, MATHOLE A, *et al.* Genomic sequencing of *Bacillus cereus* Sensu Lato strains isolated from meat and poultry products in south Africa enables inter- and intranational surveillance and source tracking [J]. *Microbiol Spectr*, 2022, 10(3): e0070022.
- [36] CARROLL LM, WIEDMANN M, KOVAC J. Proposal of a taxonomic nomenclature for the *Bacillus cereus* group which reconciles genomic definitions of bacterial species with clinical and industrial phenotypes [J]. *Mbio*, 2020, 11(1): e00034-20.

(责任编辑: 韩晓红 张晓寒)

作者简介



陈丽雯, 硕士研究生, 主要研究方向为食品微生物检测研究。
E-mail: 2718189927@qq.com



黄宝莹, 硕士, 主要研究方向为食品及食品相关产品质量安全检验与风险评估。
E-mail: baoying05@163.com



吴炜亮, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全与检测技术。
E-mail: wu1108@smu.edu.cn