

# 糙米中蜡样芽孢杆菌的分离鉴定及其毒力基因与药敏性检测

杨高继<sup>1</sup>, 刘欢欢<sup>1</sup>, 马艳<sup>1</sup>, 石艺琦<sup>1</sup>, 夏效东<sup>1,2</sup>, 张春玲<sup>1</sup>

(1. 西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西杨凌 712100) (2. 大连工业大学食品学院, 辽宁大连 116034)

**摘要:** 本文从一份糙米样品中分离纯化出 5 株细菌, 分别命名为 BR1、BR2、BR3、BR4 和 BR5, 对其进行形态学观察、生理生化鉴定、16S rRNA 及 *gyrB* 基因测序鉴定, 并对其毒力基因及药物敏感性等生物学特征进行研究。结果表明, 5 株分离菌株生化特性符合蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 的特性, 结合 16S rRNA 及 *gyrB* 基因测序结果, 菌株 BR1 和 BR4 鉴定为蜡样芽孢杆菌。毒力基因的 PCR 检测结果表明, 菌株 BR1 和 BR4 携带肠毒素基因 (*hbl*, *nhe*, *entFM* 和 *bceT*) 和细胞毒素 K 基因 (*cytK*), 未检测到呕吐型毒力基因 (*cer* 和 *ces*)。菌株 BR1 和 BR4 对青霉素、氨苄西林和头孢噻肟等药物耐药, 对阿莫西林中度敏感, 对诺氟沙星、环丙沙星和庆大霉素等药物敏感。本研究通过分离鉴定糙米源蜡样芽孢杆菌, 发现分离菌株携带多种毒力基因, 并且对青霉素类、头孢菌素类及磺胺类等药物耐药, 表明糙米中的蜡样芽孢杆菌有引起食源性疾病的风险。

**关键词:** 糙米; 蜡样芽孢杆菌; 分离鉴定; 毒力基因; 药敏性

文章编号: 1673-9078(2020)10-290-299

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.10.0266

## Isolation, Identification of *Bacillus cereus* from Brown Rice and Its Virulence Genes Detection and Antibiotic Susceptibility

YANG Gao-ji<sup>1</sup>, LIU Huan-huan<sup>1</sup>, MA Yan<sup>1</sup>, SHI Yi-qi<sup>1</sup>, XIA Xiao-dong<sup>1,2</sup>, ZHANG Chun-ling<sup>1</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

(2. School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

**Abstract:** In this study, five strains of bacteria were isolated and purified from one sample of brown rice, which were named BR1, BR2, BR3, BR4 and BR5, respectively. Morphology, biochemical tests, and 16S rRNA combined with *gyrB* gene sequencing were performed to identify the bacteria. Virulence genes detection and drug sensitivity testing were also performed on the bacteria. The results showed that the biochemical characteristics of the five isolates were consistent with *Bacillus cereus*, and the strains BR1 and BR4 were identified as *B. cereus* by sequence analysis of 16S rRNA gene and *gyrB* gene. The detection results of virulence gene PCR showed that the strains BR1 and BR4 harbor virulence-coding genes *hbl*, *nhe*, *entFM*, *bceT* and *cytK*. Drug sensitivity testing showed that the strains BR1 and BR4 were resistant to multiple drugs such as penicillin, ampicillin, cefotaxime, etc., moderately sensitive to amoxicillin, sensitive to multiple drugs such as norfloxacin, ciprofloxacin, gentamicin, etc. This study indicated that a variety of virulence genes in *B. cereus* brown rice isolates were detected, and the strains were resistant to penicillins, cephalosporins and sulfonamides, which had a potential threat to food safety.

**Key words:** *Bacillus cereus*; brown rice; isolation and identification; virulence genes; drug sensitivity

引文格式:

杨高继, 刘欢欢, 马艳, 等. 糙米中蜡样芽孢杆菌的分离鉴定及其毒力基因与药敏性检测[J]. 现代食品科技, 2020, 36(10): 290-299

YANG Gao-ji, LIU Huan-huan, MA Yan, et al. Isolation, identification of *Bacillus cereus* from brown rice and its virulence genes detection and antibiotic susceptibility [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(10): 290-299

收稿日期: 2020-03-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31801658); 陕西省重点研发计划项目 (2018YBXM-SF-17-8); 陕西省自然科学基金基础研究计划项目 (2020JQ-269)

作者简介: 杨高继 (1996-), 男, 硕士, 研究方向: 食品微生物

通讯作者: 夏效东 (1981-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全与营养; 共同通讯作者: 张春玲 (1985-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品质量与安全

糙米是稻谷脱壳后的产品,由米糠层、胚芽和胚乳三大部分组成<sup>[1]</sup>。糙米具有许多营养保健功能性因子,包括谷胱甘肽、 $\gamma$ -谷维醇、 $\gamma$ -氨基丁酸、米糠脂多糖、米糠纤维等<sup>[2]</sup>。由于糙米中的米糠有令人不快米糠味,且因含较多纤维,糙米蒸煮性、口感和吸收性较差,食用价值降低,限制了糙米在食品工业中的应用。发芽糙米是糙米经发芽、干燥所得全谷物制品,发芽显著提高了糙米中的 $\gamma$ -氨基丁酸含量,并且可降解部分纤维,改善糙米口感,使营养价值显著提高<sup>[3,4]</sup>。然而,糙米在发芽过程中由于适宜的环境温度和湿度条件为微生物的大量滋生提供了温床,而且糙米本身含有丰富的营养物质更为微生物的生长繁殖提供了有利条件。有研究表明,污染糙米和发芽糙米的优势菌群是蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)<sup>[5]</sup>。

蜡样芽孢杆菌是一种广泛分布于水、空气、土壤、饲料和各类食物中的革兰氏阳性、兼性需氧芽孢杆菌,是淀粉类食品中常见污染菌和条件致病菌之一<sup>[6]</sup>。近年来各种食源性致病菌污染食品导致的中毒事件频繁发生,其中报道最多的是蜡样芽孢杆菌引起的食物中毒,居我国细菌性食物中毒第三位<sup>[7]</sup>。蜡样芽孢杆菌引起的食物中毒主要症状为恶心、呕吐和腹痛、腹泻等胃肠道疾病,严重时还会引起其他病原菌的机会性感染从而引发败血症、肺炎和脑膜炎<sup>[8]</sup>。其引起的食物中毒根据临床主要表现可分为呕吐型和腹泻型,分别由蜡样芽孢杆菌产生的呕吐毒素和腹泻毒素所致。腹泻型毒素是一种多元化毒素,目前鉴定出与其相关的毒力因子主要包括溶血素 BL 基因(*hbl*)、非溶血性肠毒素 Nhe 基因(*nhe*)、细胞毒素 K 基因(*cytK*)、肠毒素 T 基因(*bceT*)和肠毒素 FM 基因(*entFM*)等<sup>[9]</sup>。与这些毒素相关的毒力基因依次为:溶血素 BL 基因(*hblA*、*hblB*、*hblC*、*hblD*,有的菌株缺失 *hblB* 基因)、非溶血性肠毒素基因(*nheA*、*nheB*、*nheC*)、细胞毒素 K 基因(*cytK*)、肠毒素 T 基因(*bceT*)和肠毒素 FM 基因(*entFM*)<sup>[10]</sup>。目前,针对呕吐型蜡样芽孢杆菌毒力基因检测的目标基因有 *ces* 和 *cer*<sup>[11]</sup>。本试验从糙米中分离筛选病原菌,对其进行形态观察、生理生化 and 分子鉴定,并对其携带的毒力基因和耐药性进行研究,为蜡样芽孢杆菌的分子流行病学特征的研究提供参考,为食源性疾病的预防和治疗提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

从当地超市采集一份糙米样品,产地黑龙江。PCR

试验阳性对照菌株 *Bacillus cereus* ATCC 14579 和药敏试验质控菌株 *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 均购于美国模式菌种收集中心(American Type Culture Collection, ATCC)。

### 1.2 主要试剂及培养基

蜡样芽孢杆菌 HBI 微生物生化鉴定条(GB 2014)(3%过氧化氢酶试剂、西蒙氏柠檬酸盐、动力培养基、硝酸盐肉汤培养基、VP 试验、明胶培养基、淀粉水解、溶菌酶肉汤、甘露醇、葡萄糖)V-P 试剂、硝酸盐还原试剂、0.5%碱性复红染液、无菌液体石蜡、硫酸锰营养琼脂培养基、甘露醇卵黄多粘菌素琼脂培养基(MYP)(50%卵黄乳液、多粘菌素 B 10000 IU)、胰酪胨大豆羊血(TSSB)琼脂、芽孢染色剂(5%孔雀石绿水溶液和 0.5%番红染色液)购于青岛海博生物有限公司;胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA)、胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB)、营养琼脂培养基(NA)等购于北京陆桥技术股份有限公司;DNA marker、2×Taq PCR Master Mix 和 GelRed 核酸染料购于上海近岸蛋白质科技有限公司;琼脂糖购于美国海普生物公司;抗生素药敏试纸购于杭州微生物试剂有限公司。

### 1.3 主要仪器设备

AL204 电子天平购于梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;YDS-10 PCR 仪购于乐山市东亚机电工贸有限公司;1645050 基础电泳仪、552BR 垂直电泳槽购于美国 BIO-RAD 公司;JS680B 凝胶成像分析系统购于上海培清科技有限公司;GHX-9050B-2 生化培养箱购于上海福玛实验设备有限公司;BX51+DP70 光学显微镜购于奥林巴斯有限公司。

### 1.4 试验方法

#### 1.4.1 菌株分离纯化

采集样品均在无菌条件下进行处理。随机称取 100 g 糙米放入已灭菌烧杯内,按糙米与水质量比为 1:2 比例加入无菌水浸泡,并盖上 8 层无菌纱布,将烧杯放入 30 ℃ 恒温箱中 24 h 取出。将浸泡液收集于 50 mL 离心管中离心(8000 r/min, 5 min, 4 ℃),弃去上清液加入生理盐水重悬浮,吸取 100  $\mu$ L 悬液于 900  $\mu$ L 无菌生理盐水中混合均匀进行梯度稀释,得到  $10^{-1}$ ~ $10^{-6}$  稀释度的悬液。参照 GB4789.14-2014《食品微生物学检验 蜡样芽孢杆菌检验》,吸取各稀释液 100  $\mu$ L 涂布到 MYP 培养基上,置于 37 ℃ 培养 24 h 后,从 MYP 平板中挑取至少 5 个典型菌落,分别划线接种于营养琼脂平板做纯培养,30 ℃ 培养 24 h。挑

选的5个典型菌落均来源于一份糙米样品。

#### 1.4.2 形态学观察

观察菌株在 MYP 培养基、营养琼脂上的菌落形态;把菌株接种到 TSSB 平板上置于 37℃ 条件下培养 24 h 后观察溶血现象;对菌株进行芽孢染色和蛋白质毒素结晶试验染色,用光学显微镜观察其菌体形态和染色特点。

#### 1.4.3 分离菌株生化鉴定

采用蜡样芽孢杆菌 HBI 微生物生化鉴定条(GB 2014)对疑似菌株进行生化鉴定,包括 3%过氧化氢酶试剂、西蒙氏柠檬酸盐、动力培养基、硝酸盐肉汤培养基、VP 试验、明胶培养基、淀粉水解、溶菌酶肉汤、甘露醇和葡萄糖 10 项生化反应。

#### 1.4.4 分离菌株分子生物学鉴定

##### 1.4.4.1 16S rRNA 基因序列分析

挑取待检测菌株和 *Bacillus cereus* ATCC 14579 标准菌株单菌落于 500 μL 的双蒸水中制成菌悬液,100℃水浴 10 min,立即冰浴 20 min,12000 r/min 离心 10 min,取上清液作 PCR 扩增模板,-20℃保存备用<sup>[12]</sup>。

16S rRNA 基因 PCR 扩增引物分别为 27F: 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',反向引物为 1492R: 5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 反应体系:2×Mix 取 10 μL;27F 引物为 0.4 μL;1492R 引物为 0.4 μL;5 株分离菌株 DNA 模板 1 μL,阳性对照组加入 1 μL 标准菌株 DNA 模板,阴性对照组加入 1 μL 双蒸水,最后以双蒸水补足,进行 PCR 扩增。PCR 扩增条件如下:95℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,56℃退火 30 s,72℃延伸 1 min 30 s,共 35 个循环,之后 72℃延伸 10 min,扩增结束。PCR 产物经 1%的琼脂糖凝胶电泳,染料 GelRed 染色后在全自动凝胶成像分析系统检测。PCR 产物的纯化与测序由杨凌天润奥科生物科技有限公司完成。测得的序列通过

NCBI 和 EzBioCloud 核酸数据库上的 BLAST 方法与数据库中已知的 16S rRNA 基因序列进行同源性比较与分析。并从数据库获得相关属、相关种的 16S rRNA 基因序列,建立系统发育树,进行同源性分析鉴定。

##### 1.4.4.2 *gyrB* 基因序列分析

由于 16S rDNA 分子较小,信息量具有局限性,仅能区别属水平上的细菌,无法说明关系较近的种间关系。很多细菌中存在的 *gyrB* 基因是一个蛋白编码基因,呈单拷贝,在细菌系统发育分析和鉴别中常被用到<sup>[13]</sup>。故结合 *gyrB* 基因序列对分离菌株进行进一步确认。*gyrB* 基因 PCR 扩增引物分别为 F: 5'-ATTGGTGACACCGATCAAACA-3', R: 5'-TCATACGTATGGATGTTATTC-3'。PCR 反应体系参考 1.4.1.1。PCR 反应条件:95℃、5 min;94℃、20 s;52℃、20 s;72℃、1 min 30 s;35 个循环;72℃ 10 min。4℃保存产物。使用 NCBI 数据库中的 Blastn 工具,在 GenBank 中进行同源性序列检索,挑选同源性最近的基因序列,运用 MEGA 7.0 邻接法构建系统发育进化树。

##### 1.4.5 分离菌株毒力基因的检测

采用田万帆等<sup>[14]</sup>的方法合成 *hblA*、*hblB*、*hblC*、*hblD*、*nheA*、*nheB*、*nheC*、*entFM*、*cytK*、*bceT*、*ces* 和 *cer* 等关于蜡样芽孢杆菌 12 对毒力基因的引物。引物由杨凌天润奥科生物科技有限公司合成,引物信息见表 1。PCR 反应体系及条件如 1.4.4.1 所述,PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳和凝胶成像系统检测。其中 *hblB* 基因的 PCR 反应体系为:2×Mix 取 10 μL;上游引物为 0.4 μL;下游引物为 0.4 μL;分离菌株 BR1 和 BR4 的 DNA 模板 1 μL,阳性对照组加入 1 μL 标准菌株 DNA 模板,阴性对照组加入 1 μL 双蒸水;最后以双蒸水补足 20 μL,进行 PCR 扩增。PCR 扩增条件如下:95℃预变性 5 min;95℃变性 1 min,52℃退火 30 s,72℃延伸 1 min 30 s,共 35 个循环,72℃ 10 min。

表 1 蜡样芽孢杆菌的检测毒力基因引物

Table 1 Primers used for detection of virulence genes in *B. cereus*

| 基因名称        | 引物名称          | 引物序列 (5'→3')           | 退火温度/℃ | 产物长度/bp |
|-------------|---------------|------------------------|--------|---------|
| <i>hblA</i> | <i>hblA-F</i> | AAGCAATGGAATACAATGGG   | 52     | 1154    |
|             | <i>hblA-R</i> | AGAATCTAAATCATGCCACTGC |        |         |
| <i>hblB</i> | <i>hblB-F</i> | AAGCAATGGAATACAATGGG   | 52     | 2684    |
|             | <i>hblB-R</i> | AATATGTCCCAGTACACCCG   |        |         |
| <i>hblC</i> | <i>hblC-F</i> | GATACTCAATGTGGCAACTGC  | 52     | 740     |
|             | <i>hblC-R</i> | TTGAGACTGCTCGTCTAGTTG  |        |         |
| <i>hblD</i> | <i>hblD-F</i> | ACCGGTAACACTATTTCATGC  | 52     | 829     |
|             | <i>hblD-R</i> | GAGTCCATATGCTTAGATGC   |        |         |

转下页

|              |                |                       |    |      |
|--------------|----------------|-----------------------|----|------|
| 接上页          |                |                       |    |      |
| <i>nheA</i>  | <i>nheA-F</i>  | TACGCTAAGGAGGGGCA     | 52 | 500  |
|              | <i>nheA-R</i>  | GTTTTTATGTCTTCATCGGCT |    |      |
| <i>nheB</i>  | <i>nheB-F</i>  | CTATCAGCACTTATGGCAG   | 52 | 770  |
|              | <i>nheB-R</i>  | ACTCCTAGCGGTGTTC      |    |      |
| <i>nheC</i>  | <i>nheC-F</i>  | CGGTAGTGATTGCTGGG     | 52 | 582  |
|              | <i>nheC-R</i>  | CAGCATTCGTACTTGCCAA   |    |      |
| <i>entFM</i> | <i>entFM-F</i> | ATGAAAAAAGTAATTTGCAGG | 52 | 1269 |
|              | <i>entFM-R</i> | TTAGTATGCTTTTGTGTAACC |    |      |
| <i>cytK</i>  | <i>cytK-F</i>  | AACAGATATCGGTCAAAATGC | 56 | 812  |
|              | <i>cytK-R</i>  | CCAACCCAGTTACCAGTTCC  |    |      |
| <i>bceT</i>  | <i>bceT-F</i>  | TTACATTACCAGGACGTGCTT | 56 | 428  |
|              | <i>bceT-R</i>  | TGTTTGTGATTGTAATTCAGG |    |      |
| <i>ces</i>   | <i>ces-F</i>   | GCATTTCTGTGAAGCAGAGGT | 56 | 699  |
|              | <i>ces-R</i>   | CCCTTTATCCCCTTCGATGT  |    |      |
| <i>cer</i>   | <i>cer-F</i>   | CAAGTCAAGATAAGAGGCTTC | 56 | 370  |
|              | <i>cer-R</i>   | AAAGCTCTTGCCAAATAACC  |    |      |

表 2 蜡样芽孢杆菌抑菌圈直径解释标准

Table 2 Interpretation criterion of inhibition zone diameter of *B. cereus*

| 抗生素种类  | 抗生素浓度         | 抑菌圈直径解释标准/mm |       |       |
|--------|---------------|--------------|-------|-------|
|        |               | 敏感(S)        | 中介(I) | 耐药(R) |
| 青霉素    | 10 U          | ≥29          | -     | ≤28   |
| 阿莫西林   | 25 μg         | ≥15          | 13~14 | ≤12   |
| 氨苄西林   | 10 μg         | ≥29          | -     | ≤28   |
| 头孢噻肟   | 30 μg         | ≥24          | 21~23 | ≤20   |
| 头孢他啶   | 30 μg         | ≥18          | 15~17 | ≤14   |
| 头孢克肟   | 5 μg          | ≥19          | 16~18 | ≤15   |
| 诺氟沙星   | 10 μg         | ≥17          | 13~16 | ≤12   |
| 环丙沙星   | 5 μg          | ≥21          | 16~20 | ≤15   |
| 萘啶酸    | 30 μg         | ≥19          | 14~18 | ≤13   |
| 庆大霉素   | 10 μg         | ≥15          | 13~14 | ≤12   |
| 链霉素    | 10 μg         | ≥15          | 13~14 | ≤12   |
| 四环素    | 30 μg         | ≥19          | 15~18 | ≤14   |
| 红霉素    | 15 μg         | ≥23          | 14~22 | ≤13   |
| 克林霉素   | 2 μg          | ≥21          | 15~20 | ≤14   |
| 万古霉素   | 30 μg         | ≥12          | 10~11 | ≤9    |
| 复方新诺明  | 23.75/1.25 μg | ≥16          | 11~15 | ≤10   |
| 氯霉素    | 10 μg         | ≥18          | 13~17 | ≤12   |
| 利福平    | 5 μg          | ≥20          | 17~19 | ≤16   |
| 多粘菌素 B | 300 IU        | ≥12          | 8~11  | ≤7    |

#### 1.4.6 药物敏感性试验

采用美国临床实验室标准化协会 (CLSI) 推荐的 K-B 纸片扩散法对蜡样芽孢杆菌临床常见的 19 种抗生素进行抑菌圈直径的测定。19 种抗生素包括: 青霉素、阿莫西林、氨苄西林、头孢噻肟、头孢他啶、头

孢克肟、诺氟沙星、环丙沙星、萘啶酸、庆大霉素、链霉素、四环素、红霉素、克林霉素、万古霉素、复方新诺明、氯霉素、利福平和多粘菌素 B。药敏判定标准参照 CLSI M100-S21 葡萄球菌属抑菌圈直径。蜡样芽孢杆菌分离菌株的抑菌圈直径解释标准见表 2。



药敏试验质控菌株为金黄色葡萄球菌(ATCC 29213)。

1.4.7 统计学分析

药敏试验每株菌和每个药片平行重复3次,结果以平均值±SD表示,数据采用SPSS 24.0统计软件处理。

2 结果与讨论

2.1 分离菌株形态特征

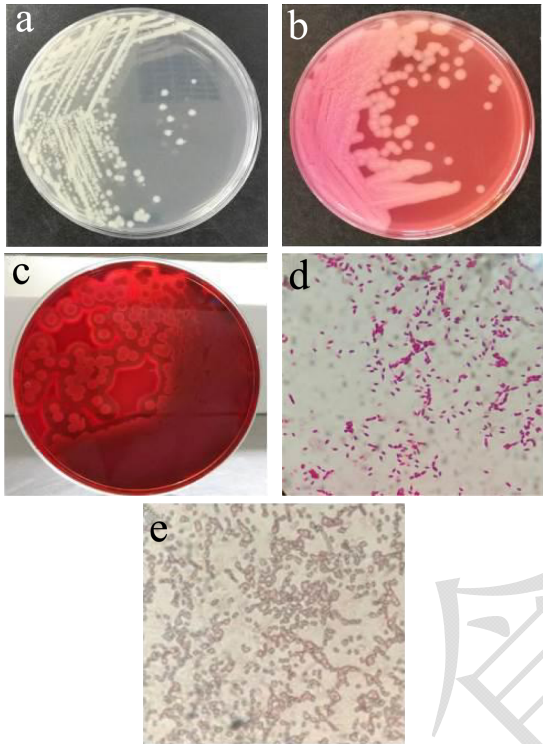


图1 分离菌株形态学特征:(a) 营养琼脂;(b) 甘露醇卵黄多粘菌素琼脂培养基;(c) 胰酪胨大豆羊血琼脂;(d) 蛋白质毒素结晶染色;(e) 芽孢染色

Fig.1 Morphological characteristics of isolated strains: (a) NA; (b) MYP; (c) TSSB; (d) Protein toxin crystal staining; (e) Spore staining

如图1所示,在营养琼脂平板37℃培养24h后分离菌株的菌落呈乳白色,表面粗糙,且不透明似融蜡状,边缘不规整(图1a);在培养12~18h后,分离菌株在MYP琼脂平板上的典型菌落为微粉红色(表示不发酵甘露醇),周围有白色至淡粉红色沉淀环(表示产卵磷脂酶)(图1b);在TSSB培养基平板上菌落呈不透明浅灰色,似白色毛玻璃状,周围有明显的草绿色溶血环(图1c)。蛋白质毒素结晶试验染色镜检后,观察发现有游离芽孢(浅红色),但无染成深红色的菱形蛋白结晶体形成,排除了苏云金芽孢杆菌的可能性(图1d)。菌株培养一段时间后,芽孢染色镜检发现,部分被染成绿色,表明有芽孢形成(图1e)。

分离菌株形态特征与蜡样芽孢杆菌符合,这与张明明等<sup>[15]</sup>从即食米面制品中分离的蜡样芽孢杆菌形态特征一致。

2.2 分离菌株生理生化鉴定结果

根据生化鉴定结果(表3)可知,分离菌株能分解淀粉、可利用葡萄糖,硝酸盐还原、西蒙氏柠檬酸盐产碱、V-P试验、溶菌酶、动力试验、明胶液化和过氧化氢酶等测定结果均呈阳性,甘露醇产酸试验结果则为阴性。5株分离菌各项生化反应结果均与蜡样芽孢杆菌特征完全一致,因此可初步判断该5株分离菌为蜡样芽孢杆菌疑似菌株。

表3 分离菌株生理生化鉴定结果

Table 3 Biochemical test results of isolated strains

| 试验项目      | 菌株  |     |     |     |     |
|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|
|           | BR1 | BR2 | BR3 | BR4 | BR5 |
| 硝酸盐还原     | +   | +   | +   | +   | +   |
| 淀粉水解      | +   | +   | +   | +   | +   |
| 西蒙氏柠檬酸盐   | +   | +   | +   | +   | +   |
| V-P 试验    | +   | +   | +   | +   | +   |
| 葡萄糖利用(厌氧) | +   | +   | +   | +   | +   |
| 甘露醇       | -   | -   | -   | -   | -   |
| 溶菌酶肉汤     | +   | +   | +   | +   | +   |
| 动力试验      | +   | +   | +   | +   | +   |
| 明胶        | +   | +   | +   | +   | +   |
| 过氧化氢酶     | +   | +   | +   | +   | +   |

2.3 分离菌株分子生物学鉴定结果

2.3.1 菌株16S rRNA基因PCR扩增结果及进化树分析

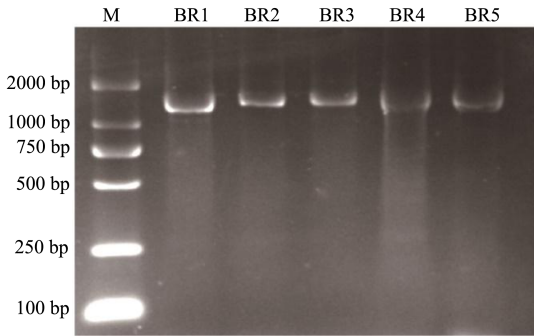


图2 分离菌株的16S rRNA基因PCR扩增产物的电泳结果

Fig.2 PCR amplification of 16S rRNA gene of strains

常用细菌的分类主要从菌落的形态特征及一系列生理生化试验来确定<sup>[16]</sup>。然而传统的分类鉴别方法步骤繁琐、鉴定周期较长,且大多性状由主观来判断,易给试验结果判定带来误差。由于16S rDNA的信息量足够大,序列大小适中(1.5 kb),在进化上速度慢,

并且在本质上和功能上具有高度的保守性,因而被选作生物进化过程中的标尺,常用于生物的系统分类<sup>[17]</sup>。鉴定的5株分离菌BR1、BR2、BR3、BR4和BR5 16S rRNA基因PCR扩增产物凝胶电泳结果如图2所示。由图2可知,5株分离菌在1500 bp位置都出现宽亮条带,测序结果表明菌株BR1、BR2、BR3、BR4和BR5的16S rRNA基因序列长度均在1500 bp左右。将测得的16S rRNA基因序列提交到NCBI和EzBioCloud核酸数据库中行BLAST在线分析。运用MEGA 7.0软件,将测出的序列与16S rRNA基因序列进行同源性对比。菌株BR1、BR2、BR3、BR4和BR5的16S rRNA基因序列系统发育树如图3所示。根据图3中16S rRNA基因序列分析结果,菌株BR1、BR2、BR3、BR4和BR5 16S rRNA基因序列与多种芽孢杆菌如蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus* ATCC 14579)、蕈状芽孢杆菌(*Bacillus mycoides* DSM 2048)及苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis* ATCC 10792)等同源性均很高,因此可初步将5株分离菌株归类为芽孢杆菌属,然而无法确定5株分离菌株具体为哪一种菌。

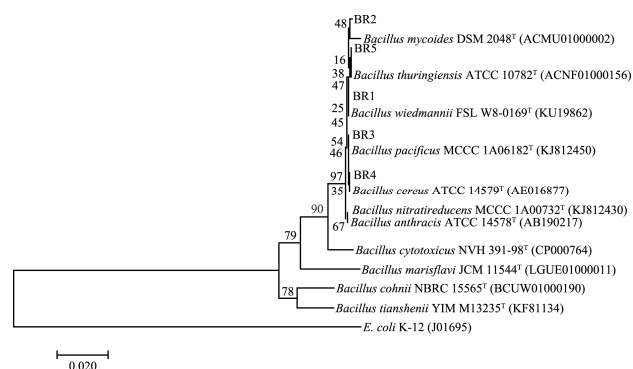


图3 分离菌株的16S rRNA基因序列系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of strains based on the 16S rRNA gene sequence

### 2.3.2 *gyrB* 基因PCR扩增结果及进化树分析

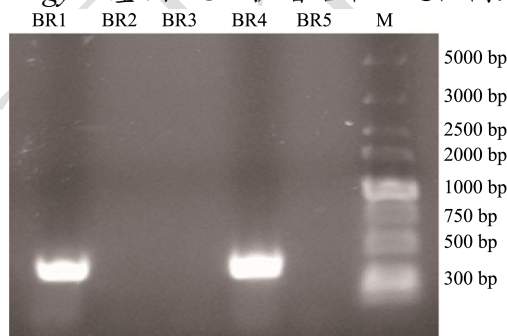


图4 分离菌株的 *gyrB* 基因PCR扩增产物的电泳结果

Fig.4 PCR amplification of *gyrB* gene of strains

鉴于16S rRNA基因序列间过高的相似度,此方法难以区别亲缘关系接近的菌种。本文在利用分离菌株16S rRNA基因序列进行同源性对比时发现5株分离

菌株与其他芽孢杆菌属同源性高度接近,无法确定其具体种属。研究表明 *gyrB* 基因的分子进化速率大于16S rRNA基因,因而 *gyrB* 基因也非常适合近缘种属的鉴定<sup>[18]</sup>。对 *gyrB* 基因进行PCR扩增,扩增产物的电泳结果见图4。由图4可看出,菌株BR1和BR4条带明显,测序结果表明其 *gyrB* 基因序列片段长度为分别为371 bp和374 bp,而菌株BR2、BR3和BR5均没有扩增出 *gyrB* 基因。将菌株BR1和BR4测得的 *gyrB* 基因序列提交到NCBI核酸数据库中行BLAST在线分析。运用MEGA 7.0软件,将测出的序列与 *gyrB* 基因序列进行同源性对比。图5为根据 *gyrB* 基因序列对比结果建立的系统发育树。本研究挑选了相似度达95%以上的多个不同菌株 *gyrB* 基因序列进行分析,构建系统发育树。由图5可知,菌株BR1和BR4与蜡样芽孢杆菌ATCC 14579标准菌株同源性达到100%。因此,结合生理生化和分子生物学鉴定结果可确定菌株BR1和BR4为蜡样芽孢杆菌。喻国辉等利用16S rDNA结合 *gyrA* 和 *gyrB* 基因对生防芽孢杆菌R31进行快速鉴定<sup>[19]</sup>。卢佳琦等通过16S rDNA与 *gyrB* 基因序列联合法从凝结芽孢杆菌活菌片中分离鉴定出一株蜡样芽孢杆菌<sup>[13]</sup>。在鉴定区分蜡样芽孢杆菌与其亲缘关系密切种属如苏云金芽孢杆菌、炭疽芽孢杆菌等过程中,可以利用 *gyrB* 基因作为诊断标记进行快速检测<sup>[20]</sup>。

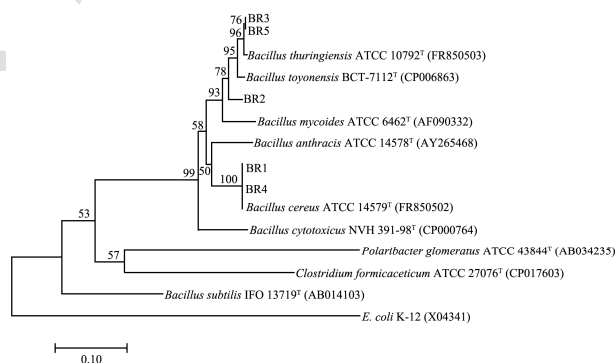


图5 分离菌株的 *gyrB* 基因系统发育树

Fig.5 Phylogenetic tree of strains based on the *gyrB* gene sequence

### 2.4 蜡样芽孢杆菌毒力因子扩增结果

蜡样芽孢杆菌在自然界分布广泛,不同菌株之间的致病性差异较大<sup>[21]</sup>。有些无毒菌株可作为益生菌,通过影响肠道免疫细胞对细胞因子的分泌,并且可产生脂肽类、肽类、磷脂类、细菌素等抗菌物质来增强机体的免疫能力<sup>[22]</sup>。而有些菌株也是重要的食源性致病菌,可造成人类患呕吐、腹泻等胃肠道疾病,严重时还会引起其他病原菌的机会性感染从而引发败血

症、肺炎和脑膜炎<sup>[8]</sup>。蜡样芽孢杆菌毒力基因和潜在的致病性研究,国内外已有不少报道。目前已检测到食源蜡样芽孢杆菌的主要毒力基因包括溶血素 BL、非溶血性肠毒素 Nhe、细胞毒素 K、肠毒素 T 基因和呕吐基因等<sup>[23]</sup>。

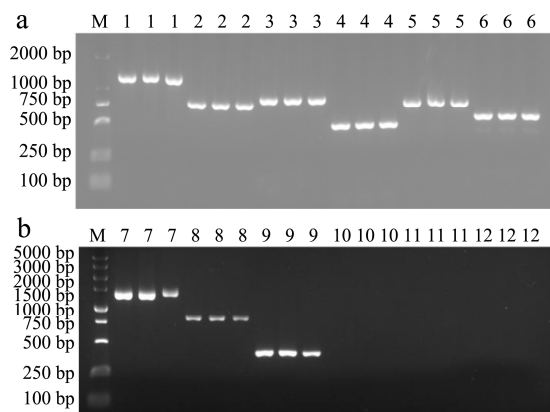


图6 菌株BR1毒力基因PCR扩增结果

Fig.6 Results of virulence gene PCR amplification of strain BR1

注: 1: *hblA*; 2: *hblC*; 3: *hblD*; 4: *nheA*; 5: *nheB*; 6: *nheC*; 7: *entFM*; 8: *cytK*; 9: *bceT*; 10: *ces*; 11: *cer*; 12: *hblB*。

经 PCR 检测, 试验结果表明分离菌株 BR1 的 DNA 中除 *hblB*、*ces* 和 *cer* 外, 剩余 9 种毒力基因 *hblA*、*hblC*、*hblD*、*nheA*、*nheB*、*nheC*、*entFM*、*cytK* 和 *bceT* 均能检测到。并测得 9 种毒力基因片段大小分别为 1154、740、829、500、770、582、1269、812 和 428 bp 左右 (图 6)。分离菌株 BR4 的 DNA 中除 *ces* 和 *cer* 外, 剩余 10 种毒力基因均存在 (图 7)。由此可知, 菌株 BR1 携带溶血性肠毒素毒力基因 *hblA*、*hblC*、*hblD*, 非溶血性肠毒素毒力基因 *nheA*、*nheB*、*nheC* 及肠毒素毒力基因 *entFM*、*bceT*, 细胞毒素毒力基因 *cytK*, 不携带呕吐型毒素毒力基因 *ces*、*cer*。菌株 BR4 还含有溶血性肠毒素毒力基因 *hblB*。蜡样芽孢杆菌的致病性与其携带的毒力基因直接相关, 溶血性肠毒素 BL (Hbl) 和非溶血性肠毒素 (Nhe) 均为复合型毒素, 全部组分的共同参与能使其毒力达到最大, 有研究显示只有含有 Hbl 全部基因的菌株才会产生溶血效应<sup>[12]</sup>。毒力基因检测结果表明, 菌株 BR1 和 BR4 含有 Hbl 三个全部基因, 说明这两株分离菌株能够产生溶血毒素 Hbl, 对消费者会产生危害。此外, 非溶血性肠毒素 *nhe* 基因 (*nheA*、*nheB*、*nheC*)、肠毒素毒力基因 *entFM*、*bceT* 和细胞毒素毒力基因 *cytK* 均在菌株 BR1 和 BR4 中被检出, 这些毒素基因同样能引起消费者腹泻等不良反应。本研究毒力基因携带结果与崔一龙等<sup>[24]</sup>、宋丽丽等<sup>[25]</sup>结果基本一致, 即 *hbl*、*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<sup>[12]</sup>。张明明等<sup>[15]</sup>针对餐饮服务场所即食米面制品中蜡样芽孢杆菌的污染状况进行研究, 检出蜡样芽孢杆菌 49 株, 结果发现所有分离菌株均检出两种或两种以上的毒力基因, 其中非溶血性肠毒素基因 *nhe* 和 *entFM* 检出率最高, 同时携带 *nhe* 三个基因又携带 *hblA*、*hblC* 和 *hblD* 基因的强毒株有 7 株, 占 4.29%。本研究中菌株 BR1 和 BR4 都同时携带 3 种及以上 BL 和 Nhe 毒力基因, 表明其具有强致腹泻功能。综上所述, 溶血性肠毒素 BL 基因、非溶血性肠毒素 Nhe 基因和细胞毒素基因是目前淀粉质食物糙米中蜡样芽孢杆菌菌株携带的主要毒素基因, 以引起消费者腹泻等不良反应为主。

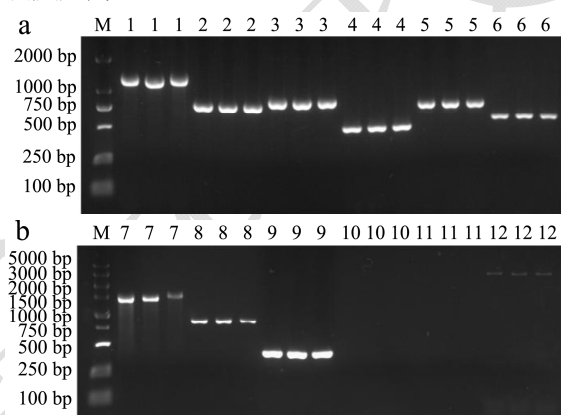


图7 菌株BR4毒力基因PCR扩增结果

Fig.7 Results of virulence gene PCR amplification of strain BR4

注: 1: *hblA*; 2: *hblC*; 3: *hblD*; 4: *nheA*; 5: *nheB*; 6: *nheC*; 7: *entFM*; 8: *cytK*; 9: *bceT*; 10: *ces*; 11: *cer*; 12: *hblB*。

## 2.5 药敏试验结果

分离菌株 BR1 和 BR4 对 19 种抗生素的敏感性具体结果如表 4 所示, 菌株 BR1 对青霉素、氨苄西林、头孢噻肟、头孢他啶、头孢克肟、复方新诺明和利福平 7 种药物耐药, 对阿莫西林中度敏感, 对诺氟沙星、环丙沙星、萘啶酸、庆大霉素、链霉素、四环素、红霉素、克林霉素、万古霉素、氯霉素和多粘菌素 B 11 种药物敏感; 而菌株 BR4 除对四环素中度敏感外, 对其余 18 种药物敏感性结果与菌株 BR1 一致。田万帆等<sup>[14]</sup>研究表明生鲜食品来源的蜡样芽孢杆菌分离菌株对多肽类、磺胺类和青霉素类药物耐药性较高。庄子慧等<sup>[12]</sup>对我国不同地区 2011 年收集的 238 株蜡样芽孢杆菌进行药敏试验, 结果发现食源性蜡样芽孢杆菌对庆大霉素、万古霉素、环丙沙星、复方新诺明等药物敏感性较高, 对氨苄西林和头孢噻肟的耐药性较高。本研究中菌株 BR1 和 BR4 的药敏试验结果与王琰等关于具有致病性蜡样芽孢杆菌的药物敏感性研究结果基本一致<sup>[23,26-28]</sup>。而对阿莫西林、四环素、红霉

素和多粘菌素 B 等抗生素药敏性存在一定差异,这可能与不同地区分离来源的菌株差异有关。近年来,对于食品中蜡样芽孢杆菌的耐药性研究主要集中于动物

制品,但蜡样芽孢杆菌淀粉质食物等来源分离菌株的耐药性却不容忽视。

表 4 分离菌 BR1 和 BR4 药敏试验结果

Table 4 The results of antimicrobial susceptibility test for isolates BR1 and BR4

| 分类    | 药物名称   | BR1        |     | BR4        |     |
|-------|--------|------------|-----|------------|-----|
|       |        | 抑菌圈直径/mm   | 敏感性 | 抑菌圈直径/mm   | 敏感性 |
| 青霉素类  | 青霉素    | 10.00±1.00 | R   | 11.00±1.00 | R   |
|       | 阿莫西林   | 13.33±0.58 | I   | 14.33±0.58 | I   |
|       | 氨苄西林   | 11.33±1.53 | R   | 11.00±1.00 | R   |
| 头孢菌素类 | 头孢噻肟   | 11.33±0.58 | R   | 10.67±0.58 | R   |
|       | 头孢他啶   | 0.00±0.00  | R   | 0.00±0.00  | R   |
|       | 头孢克肟   | 0.00±0.00  | R   | 0.00±0.00  | R   |
|       | 诺氟沙星   | 26.67±1.53 | S   | 29.33±0.58 | S   |
| 喹诺酮类  | 环丙沙星   | 29.00±2.65 | S   | 31.67±0.58 | S   |
|       | 萘啶酸    | 19.67±0.58 | S   | 22.00±1.73 | S   |
| 氨基糖苷类 | 庆大霉素   | 26.33±1.53 | S   | 27.00±1.00 | S   |
|       | 链霉素    | 23.33±3.79 | S   | 24.00±1.73 | S   |
| 四环素类  | 四环素    | 25.00±1.00 | S   | 17.33±0.58 | I   |
| 大环内酯类 | 红霉素    | 29.33±0.58 | S   | 28.67±0.58 | S   |
| 林可胺类  | 克林霉素   | 26.00±1.00 | S   | 23.67±2.08 | S   |
| 糖肽类   | 万古霉素   | 16.67±0.58 | S   | 18.00±1.00 | S   |
| 磺胺类   | 复方新诺明  | 0.00±0.00  | R   | 0.00±0.00  | R   |
| 氯霉素类  | 氯霉素    | 23.33±1.53 | S   | 21.67±0.58 | S   |
| 利福霉素类 | 利福平    | 14.33±0.58 | R   | 12.00±0.00 | R   |
| 多肽类   | 多粘菌素 B | 13.00±1.00 | S   | 12.33±0.58 | S   |

### 3 结论

3.1 本研究从一份糙米样品中分离获得菌株 BR1、BR2、BR3、BR4 和 BR5,经过形态学观察及生理生化试验鉴定表明 5 株分离菌株符合蜡样芽孢杆菌形态特征。通过 16S rRNA 基因序列分析发现难以有效鉴定出 5 株分离菌株具体属于哪一种菌,进一步通过 *gyrB* 基因序列分析对分离菌株的种属进行确认,结果表明菌株 BR1 和 BR4 为蜡样芽孢杆菌。研究表明仅通过 16S rRNA 基因序列分离鉴定糙米中蜡样芽孢杆菌存在不足,还需要利用 *gyrB* 等特异性基因序列进一步鉴定,并且结合有特异性的形态特征及生理生化鉴定才比较可靠。菌株 BR1 和 BR4 携带溶血性肠毒素毒力基因 *hblA*、*hblC*、*hblD*,非溶血性肠毒素毒力基因 *nheA*、*nheB*、*nheC*,肠毒素毒力基因 *entFM*、*bceT* 及细胞毒素毒力基因 *cylK*,不携带呕吐型毒素毒力基因 *ces*、*cer*;另外,菌株 BR4 还携带溶血性肠毒素毒力基因 *hblB*,表明分离菌株 BR1 和 BR4 具有较强的致病能力。药敏试验结果发现,分离菌株 BR1 和 BR4

对青霉素、氨苄西林、头孢噻肟、头孢他啶、头孢克肟、复方新诺明和利福平 7 种药物耐药,对阿莫西林中度敏感,对诺氟沙星、环丙沙星、萘啶酸、庆大霉素、链霉素、红霉素、克林霉素、万古霉素、氯霉素和多粘菌素 B 10 种药物敏感。综上所述,糙米源分离获得的蜡样芽孢杆菌携带多种毒力基因,且对青霉素类、头孢菌素类及磺胺类等药物耐药,存在引起食源性疾病的风险。

3.2 本次研究也表明谷物类食物中致病性蜡样芽孢杆菌的潜在危害,相关管理部门应加强此类食品中的蜡样芽孢杆菌的监测,从而为今后谷物类食品微生物安全风险评估奠定基础。

### 参考文献

- [1] 唐淑芬,刘香云.发芽糙米研究进展[J].粮食加工,2011,36(6): 22-24  
TANG Shu-fen, LIU Xiang-yun. Research advances in germinated brown rice [J]. Grain Processing, 2011, 36(6): 22-24



- [2] 张守文.糙米的营养保健功能[J].粮食与饲料工业,2003,12: 38-41  
ZHANG Shou-wen. Nutrition and health function of brown rice [J]. Cereal & Feed Industry, 2003, 12: 38-41
- [3] 姚森,郑理,赵思明,等.发芽条件对发芽糙米中  $\gamma$ -氨基丁酸含量的影响[J].农业工程学报,2006,22(12):211-215  
YAO Sen, ZHENG Li, ZHAO Si-ming, et al. Effect of germination conditions on  $\gamma$ -aminobutyric acid content of germinated brown rice [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2006, 22(12): 211-215
- [4] Moongngarm A, Saetung N. Comparison of chemical compositions and bioactive compounds of germinated rough rice and brown rice [J]. Food Chemistry, 2010, 122(3): 782-788
- [5] 付湘晋,李秀明,李忠海,等.糙米发芽过程中优势细菌分离鉴定[J].粮食与油脂,2011,4:41-43  
FU Xiang-jin, LI Xiu-ming, LI Zhong-hai, et al. Screening and identification of dominant bacterial of germinated brown rice [J]. Journal of Cereals & Oils, 2011, 4: 41-43
- [6] 黄晶菁,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
- [7] 褚发军,冉陆,马莉,等.2008-2010 年全国突发公共卫生事件网络报告食物中毒流行病学分析[J].中国食品卫生杂志,2012,24(4):387-390  
CHU Fa-jun, RAN Lu, MA Li, et al. Analysis on the reported food poisoning incidents in public health emergency events surveillance system in China, 2008-2010 [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2012, 24(4): 387-390
- [8] Hoffmaster A R, Hill K K, Gee J E, et al. Characterization of *Bacillus cereus* isolates associated with fatal pneumonias: Strains are closely related to *Bacillus anthracis* and harbor *B. anthracis* virulence genes [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2006, 44(9): 3352-3360
- [9] 白凤岚,陈松,罗梦幽,等.食品中蜡样芽孢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):247-252  
BAI Feng-lan, CHEN Song, LUO Meng-you, et al. Identification and virulence genes detection of *Bacillus cereus* food isolates [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(10): 247-252
- [10] 闫韶飞,闫旭,甘辛,等.我国市售婴儿配方乳粉中蜡样芽孢杆菌污染及其毒力基因调查[J].中国食品卫生杂志,2015, 27(3):286-291  
YAN Shao-fei, YAN Xu, GAN Xin, et al. Survey on contamination of *Bacillus cereus* and its virulence gene profiles isolated from retail infant formula in China [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2015, 27(3): 286-291
- [11] 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
- [12] 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
- [13] 卢佳琦,李市场,王大红,等.16S rDNA 与 *gyrB* 序列联合法鉴定一株蜡样芽孢杆菌[J].河南科技大学学报(自然科学版),2018,39(1):73-77  
LU Jia-qi, LI Shi-chang, WANG Da-hong, et al. Identification of a strain of *Bacillus cereus* by combination of 16s rDNA and *gyrB* sequence [J]. Journal of Henan University of Science and Technology (Natural Science), 2018, 39(1): 73-77
- [14] 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  
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
- [15] 张明明,梁美丹,肖剑,等.即食米面制品中蜡样芽孢杆菌分离鉴定及毒力基因研究[J].食品工业科技,2019,40(22):144-150  
ZHANG Ming-ming, LIANG Mei-dan, XIAO Jian, et al. Isolation, identification and virulence genes investigation of *Bacillus cereus* from ready-to-eat products of rice and wheat [J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(22): 144-150
- [16] 杜昕波,赵耘,李伟杰.菌种保藏中的细菌鉴定方法[J].中国兽药杂志,2009,43(3):50-52  
DU Xin-bo, ZHAO Yun, LI Wei-jie. Methods of bacterial identification in the program of culture collection [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2009, 43(3): 50-52
- [17] 潘康成,冯兴,崔恒敏,等.利用 16S rDNA 序列对两种芽孢杆菌的鉴定[J].中国兽医科学,2009,39(6):550-554

- PAN Kang-cheng, FENG Xing, CUI Heng-min, et al. Identification of two species of *Bacillus* using 16 S ribosomal DNA sequence [J]. Chinese Veterinary Science, 2009, 39(6): 550-554
- [18] 李献梅,王小芬,杨洪岩,等.促旋酶(*gyrase*)B 亚单位基因 *gyrB* 在鉴别细菌近缘种中的应用[J].微生物学报,2008,5: 701-706
- LI Xian-mei, WANG Xiao-fang, YANG hong-yan, et al. Application of *gyrB* in the identification of closely related bacteria-A review [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 5: 701-706
- [19] 喻国辉,牛春艳,陈远凤,等.利用 16S rDNA 结合 *gyrA* 和 *gyrB* 基因对生防芽孢杆菌 R31 的快速鉴定[J].中国生物防治,2010,26(2):160-166
- YU Guo-hui, NIU Chun-yan, CHEN Yuan-fen, et al. Use of 16S rDNA, *gyrA* and *gyrB* gene sequence to identify a biocontrol *Bacillus* sp. strain R31 [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2010, 26(2): 160-166
- [20] Yamada S, Ohashi E, Agata N, et al. Cloning and nucleotide sequence analysis of *gyrB* of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, and *B. anthracis* and their application to the detection of *B. cereus* in rice [J]. Applied Environmental Microbiology, 1999, 65(4): 1483-1490
- [21] 赵振宇.猪源蜡样芽孢杆菌的分离鉴定[D].长沙:湖南农业大学动物科学技术学院,2014
- ZHAO Zhen-yu. Isolation and characterization of *Bacillus cereus* from piglet [D]. Changsha: College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, 2014
- [22] 谷笑笑,王振华,潘康成.益生芽孢杆菌对动物免疫功能影响研究进展[J].微生物学通报,2016,43(9):2079-2085
- GU Xiao-xiao, WANG Zhen-hua, PAN Kang-cheng. Advances in applying probiotic *Bacillus* to animal immune modulation [J]. Microbiology, 2016, 43(9): 2079-2085
- [23] 王琰,高四合,单建杰,等.半滑舌鳎源蜡样芽孢杆菌毒性检测及药敏试验[J].水产科学,2018,37(1):59-65
- WANG Yan, GAO Si-he, SHAN Jian-jie, et al. Virulence and drug susceptibility of a pathogenic bacterium from half-smooth tongue-sole [J]. Fisheries Science, 2018, 37(1): 59-65
- [24] 崔一龙,石芸,杨达汉,等.马源蜡样芽孢杆菌的分离鉴定及毒力基因检测[J].浙江农业学报,2019,31(2):49-54
- CUI Yi-long, SHI Yun, YANG Da-han, et al. Isolation, identification of horse *Bacillus cereus* and its virulence genes detection [J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2019, 31(2): 49-54
- [25] 宋丽丽,张玲艳,贾伟娟,等.1 株牛源蜡样芽孢杆菌的分离鉴定及毒力基因检测[J].西北农业学报,2019,28(11):1735-1741
- SONG Li-li, ZHANG Ling-yan, JIA Wei-juan, et al. Isolation, identification and virulence gene detection of *Bacillus cereus* in cattle [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2019, 28(11): 1735-1741
- [26] 吕耀平,金晶,施倩,等.棘胸蛙致病性蜡样芽孢杆菌的分离鉴定及病理组织观察[J].水生生物学报,2018,42(1):26-32
- LYU Yao-ping, JIN Jin, SHI Qian, et al. Isolation and identification of *Bacillus cereus* and pathological observation from rotten-skin disease of *Quasipaa spinosa* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2018, 42(1): 26-32
- [27] 江地科,项明源,王印,等.猪源蜡样芽孢杆菌的分离鉴定与部分生物学特性分析[J].中国预防兽医学报,2019,41(10): 1063-1066
- JIANG Di-ke, XIANG Ming-yuan, WANG Yin et al. Identification and biological characteristics analysis of a *Bacillus cereus* strain from swine [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2019, 41(10): 1063-1066
- [28] 陈丰,黄亚冬,孙敬锋,等.鲫鱼肠道蜡样芽孢杆菌的分离鉴定及生物学特征[J].江苏农业科学,2019,47(18):191-194
- CHEN Feng, HUANG Ya-dong, SUN Jin-feng, et al. Isolation, identification and biological characteristics analysis of *Bacillus cereus* in the intestinal tract of *Carassius auratus* [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2019, 47(18): 191-194