

预制食品中蜡样芽孢杆菌的污染情况与分离菌株的毒力及多位点序列分型分析

郑茵^{1*}, 陈颖茵¹, 杨长堃¹, 李淳¹, 欧仕益¹, 李理²

(1. 广州工商学院工学院, 广东佛山 528138) (2. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 为探究市售预制食品中蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*, *B. cereus*) 的污染情况, 根据国标 GB 4789.14-2014 对样品进行蜡样芽孢杆菌的检测及分离菌株的生化鉴定, 并采用聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 方法对分离菌株进行毒力及多位点序列分型 (Multi-Locus Sequence Typing, MLST) 分析。结果表明, 佛山市某地区 97 份预制食品中蜡样芽孢杆菌检出率为 36.08%, 其中冷冻类食品的检出率最高 (54.17%)。97.14% 的阳性样品污染水平超过 3 log CFU/g, 40.00% 的阳性样品污染水平超过 5 log CFU/g, 存在较为严重的食品安全风险。35 株代表性分离菌株均携带特征基因 (*gyrB*) 和肠毒素基因 (*hblD*, *nhe*, *entFM*, *cytK*), 其中发现 1 株菌株携带呕吐毒素合成酶基因 (*cesA*)。MLST 结果显示, 分离菌株可分为 18 个序列型 (Sequence Type, ST)。其中, ST177 和 ST2056 为优势 ST 型, ST-205 为优势克隆复合体, 7 株菌株确认为新的 ST 型, 大多来源于冷冻类预制食品。综上, 冷冻类预制食品的蜡样芽孢杆菌检出率及污染水平均较高, 分离菌株携带多种毒力基因, 呈现 ST 型多样性, 需加强对预制食品中蜡样芽孢杆菌的风险监测与防控。

关键词: 预制食品; 肠毒素; 呕吐毒素; 呕吐毒素合成酶基因; MLST

文章编号: 1673-9078(2026)3-351-358

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.3.1908

Contamination Status of *Bacillus cereus* in Prefabricated Foods and the Toxigenic Profiles and Multi-locus Sequence Typing of Isolated Strains

ZHENG Yin^{1*}, CHEN Yingyin¹, YANG Changkun¹, LI Chun¹, OU Shiyi¹, LI Li²

(1. School of Engineering, Guangzhou College of Technology and Business, Foshan 528138, China)

(2. School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: To characterize the contamination status of *Bacillus cereus* in commercially available prefabricated foods, its presence and the biochemical identification of isolated strains were investigated according to China's national food and safety standard (GB 4789.14-2014). The toxigenic profiles and multi-locus sequence typing (MLST) of isolated strains were detected via PCR. Results showed that *B. cereus* was widely present in 97 samples of prefabricated foods obtained from Foshan City, China, with an overall detection rate of 36.08%. The detection rate was highest in frozen food products (54.17%). Among the positive samples, 97.14% were detected with viable counts >3 log CFU/g, and those of 40.00% were >5 log CFU/g, indicating a high food

引文格式:

郑茵, 陈颖茵, 杨长堃, 等. 预制食品中蜡样芽孢杆菌的污染情况与分离菌株的毒力及多位点序列分型分析[J]. 现代食品科技, 2026, 42(3): 351-358.

ZHENG Yin, CHEN Yingyin, YANG Changkun, et al. Contamination status of *Bacillus cereus* in prefabricated foods and the toxigenic profiles and multi-locus sequence typing of isolated strains [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(3): 351-358.

收稿日期: 2024-12-23; 修回日期: 2025-02-15; 接受日期: 2025-02-26

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (32502380); 佛山市自筹经费类科技创新项目 (2420001004679); 广州工商学院校级科研项目 (KYYB202430); 广东省重点建设学科科研能力提升项目 (2024ZDJS089); 广东省工程技术研究中心 (2024GCZX011)

作者简介: 郑茵 (1992-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品微生物安全, E-mail: zhengyin2@gzgs.edu.cn; 共同第一作者: 陈颖茵 (2001-), 女, 学士, 研究方向: 食源性致病菌检测, E-mail: 17666380230@163.com

safety risk. All 35 representative isolated strains carried the feature (*gyrB*) and enterotoxin genes (*hblD*, *nhe*, *entFM*, *cytK*), and the cereulide synthetase gene (*cesA*) was detected in one strain. The MLST results showed that the isolated strains could be classified into 18 sequence types (STs), with ST177 and ST2056 being predominant and ST-205 representing the main clonal complex. Seven strains were identified as new STs, most of which were isolated from frozen prefabricated foods. In conclusion, the distribution and contamination levels of *B. cereus* in frozen prefabricated foods are relatively high. The isolated strains carried multiple virulence genes and exhibited ST type diversity, highlighting the need for monitoring and preventing *B. cereus* contamination in prefabricated foods.

Key words: prefabricated foods; enterotoxin; cereulide; *ces* gene; multi-locus sequence typing

蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 是全球最为常见的食源性致病菌之一, 极易污染谷物、乳品、肉类等食品, 污染率高达 23%~92%^[1]。在中国, 由蜡样芽孢杆菌引起的食物中毒事件在食源性疾病中排名第三位^[2], 主要致病机理在于其产生的呕吐毒素 (Cereulide) 和肠毒素 (Enterotoxin), 分别由致呕型和致泄型蜡样芽孢杆菌产生^[3,4]。肠毒素包括腹泻型毒素——溶血素 BL (Hemolysin BL, HBL)、非溶血性肠毒素 (Non-Hemolytic Enterotoxin, NHE) 和细胞毒素 K (Cytotoxin K, CytK) 等, 可引起腹泻、腹痛等腹泻型食物中毒症状^[5]。我国由蜡样芽孢杆菌引起的食源性疾病以呕吐毒素引发的呕吐型症状为主, 呕吐毒素由基因 *ces* 编码, 其可损害中枢神经系统^[6], 严重者可导致肝损伤、器官衰竭甚至死亡^[7-9]。大多数情况下, 在摄入的食物中蜡样芽孢杆菌的含量超过 5 log CFU/g 时会引起食物中毒^[1], 然而, 少数病例报告中发现, 蜡样芽孢杆菌的含量低于 2 log CFU/g 时依然能够引起呕吐症状^[10], 这可能是由于菌株产生的呕吐毒素具有较强的热稳定性和酸稳定性, 常规的食品加工方法无法完全将其去除或灭活^[11]。此外, 呕吐毒素还可能与蜡样芽孢杆菌产生的高稳定性生物膜有关联, 这使得呕吐毒素在食品的生产加工甚至包装销售阶段更加难以清除, 危害极大^[12]。

近年来, 预制食品因其快捷方便、易于保存等特点, 成为当今各个家庭和餐厅的流行食品^[13]。为了保持产品的风味、营养和感官质量, 大多数预制食品通常在加工后不进行杀菌处理或者只进行巴氏杀菌。然而, 巴氏杀菌等低强度热灭菌技术不能有效杀死致病菌 (如蜡样芽孢杆菌、产气芽孢杆菌和肉毒杆菌等), 存在食品微生物污染风险^[13]。预制食品在生产、储藏、运输、配送和销售等各种环节都有控制低温的需要, 以防止微生物过度生长^[14]。然而, 在其加工运输过程中的温度波动和人员操作都会存在潜在的安全隐患, 如操作车间卫生条件差、人员操作不规范、运输过程冷链环节断开、销售环节环境差等, 这些隐患均可导致致病菌大量繁殖。随着我国民众对于预制食品的微

生物污染关注度逐渐增加, 对食品中蜡样芽孢杆菌污染状况的相关研究也逐渐增多, 然而, 这些研究大多局限于单品类食品^[15-18], 缺乏对大宗食品全面深入的剖析。

本研究拟对佛山市某地区的预制食品进行随机采样, 分析不同种类预制食品中蜡样芽孢杆菌的污染情况, 通过分离及生化鉴定获得蜡样芽孢杆菌菌株, 并对菌株进行毒力基因与多位点序列分型 (Multi-Locus Sequence Typing, MLST) 分析, 旨在为预制食品的蜡样芽孢杆菌防控研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

97 份预制食品购自佛山市部分地区的市场。蜡样芽孢杆菌标准菌株 *Bacillus cereus* ATCC14579 (ATCC14579) 由暨南大学生命科学技术学院丁郁教授惠赠。

甘露醇卵黄多粘菌素琼脂基础 (Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar Base, MYP)、多粘菌素、胰酪大豆胨液体培养基 (Trypticase Soy Broth, TSB)、营养琼脂、LB 肉汤、革兰氏染色液均购自广东环凯生物科技有限公司; 50% 卵黄液购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司; 无菌脱纤维羊血购自上海源叶生物科技有限公司; 0.5% 碱性复红购自广州检测科技科技有限公司; DNA 小量抽提试剂盒、SYBR Green qPCR Mix 均购自碧云天生物技术公司; DNA Ladder DSTM2000、琼脂糖均购自东盛生物有限公司; GoldView 核酸染料购自翌圣生物科技上海股份有限公司; 50×TAE Buffer 购自生工生物工程上海股份有限公司; 氯化钠 (分析纯) 购自天津市永大化学试剂有限公司; 无水乙醇 (分析纯) 购自广东光华科技股份有限公司; 甘油 (分析纯) 购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 主要仪器设备

TL-08X 拍打式无菌均质器, 江苏天翎仪器有限公司; XSP-8CA/310 万像素电子显微镜, 上海光学仪

器一厂; TGL-16B 高速离心机, 上海安亭科学仪器厂; HH.S21-4 恒温水浴锅, 广州市正一科技有限公司; HCC-90A 菌落计数器, 天津市恒奥科技有限公司; SHZ-82A 气浴恒温振荡器, 常州金坛宏华仪器厂; GZX-9070MBE 电热鼓风干燥箱, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; FQD-96A 荧光定量 PCR 仪, 杭州博日科技有限公司; DYY-6C 电泳仪, 北京六一生物科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 采样

2023 年, 根据随机采样原则, 在佛山某地区的 3 个食品安全量化分级 A 级市场采集预制食品样品 97 份, 样品具有完整包装 (袋装或盒装), 其中包括 30 份预制肉类 (黑椒鸡肉、梅菜扣肉、猪杂等)、24 份预制冷冻食品 (牛肉丸、鱼丸、叉烧包、糯米鸡等)、22 份预制米面类 (方便面、湿米粉、年糕等)、16 份预制蔬菜 (酸菜、凉拌蔬菜、豆干等) 以及 5 份其他类 (调料包等)。采集样品质量均大于 100 g, 采样温度保持食品原有的贮存温度 (4 ℃冷藏 /-18 ℃冷冻 / 常温), 且保证采样时间在 2 h 内完成。

1.3.2 蜡样芽孢杆菌计数

使用生理盐水将所有预制食品样品进行均质, 将样品匀液以 0.1 mL 接种量移入 MYP 琼脂平板, 30 ℃ 培养 24 h, 进行典型菌落总数的计数。蜡样芽孢杆菌形成的典型菌落呈现出浅粉色, 并伴随着白色至浅粉色的沉淀环。根据国标 GB 4789.14-2014 《食品安

全国家标准——食品微生物学检验 蜡样芽孢杆菌检验》^[19]对样品进行计数。

1.3.3 生化鉴定

从各平板中随机挑取典型菌落进行分离和纯化, 将纯化的单个菌落用甘油放入 -20 ℃ 冷冻保存。以蜡样芽孢杆菌 ATCC14579 为阳性对照菌, 根据国标 GB 4789.14-2014 《食品安全国家标准——食品微生物学检验 蜡样芽孢杆菌检验》方法^[19]对分离菌株进行生化鉴定。

1.3.4 毒力基因测定

将蜡样芽孢杆菌菌株接种到 LB 肉汤中, 置于 37 ℃ 气浴恒温振荡器中培养 14~16 h。取 0.75 mL 菌液于 1.5 mL 离心管中, 8 000×g 离心 1 min 获得菌体, 根据基因组 DNA 小量抽提试剂盒使用说明书对分离菌株进行基因组 DNA 的提取。以提取的 DNA 片段为模板, 采用 SYBR Green 荧光定量 PCR 法对分离菌株进行管家基因 *gyrB* 及毒力基因的测定。基因扩增引物由北京六合华大基因科技有限公司进行合成 (表 1)。采用的 qPCR 反应体系为: DNA 模板 1 μL, 上游引物 (3 μmol·L⁻¹) 1 μL, 下游引物 1 μL, BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix 10 μL, 超纯水 6 μL; qPCR 反应程序: 50 ℃ 酶处理 5 min; 95 ℃ 预变性 2 min, 1 个循环; 95 ℃ 变性 15 s, 60 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 45 个循环; 熔解段: 95 ℃ 15 s、60 ℃ 15 s、95 ℃ 15 s。根据 qPCR 扩增结果, 以循环阈值 (Cycle Threshold, CT) 在 10~35 范围内作为判断标准, ≤30 判定为阳性, >35 判定为阴性结果。CT 值结果在 30~35 范围的扩增产物通过 1.5% (m/V) 琼脂糖凝胶电泳进一步验证。

表 1 基因扩增引物及相关片段长度
Table 1 Primers of genes and the related fragment length

基因	引物名称	寡核苷酸序列 (5'~3')	片段长度/bp	引物来源
<i>gyrB</i>	<i>gyrB</i> -F	GCCCTGGTATGTATATTGGATCTAC	246	[20]
	<i>gyrB</i> -R	GGTCATAATAACTTCTACAGCAGGA		
<i>cesA</i>	<i>cesA</i> -F	CGTAGTGGCAATTCGCAT	197	[21]
	<i>cesA</i> -R	GATTACGTTCGATTATTTGAAG		
<i>hblD</i>	<i>hblD</i> -F	CCCCGAAGGACTAAAGAAAGC	128	本研究
	<i>hblD</i> -R	CCCCCTCTGAGCCTAAATTGAT		
<i>nhe</i>	<i>nhe</i> -F	AGCGGCTCTTCGTATTCA	78	[22]
	<i>nhe</i> -R	GCCTCTGCTTCAGTTTGT		
<i>entFM</i>	<i>entFM</i> -F	ATTGCAGGTTTAGCAGCAGCTT	85	[22]
	<i>entFM</i> -R	GCGCTTCATTGAAACTTGTGC		
<i>cytK</i>	<i>cytK</i> -F	GCGCTGATAAACAGATTGCCGT	105	[22]
	<i>cytK</i> -R	TAGCGCCAGGGATTGGGTAGTT		

表 2 管家基因扩增引物及相关片段长度
Table 2 Primers of housekeeping genes and the related fragment length

管家基因	引物名称	寡核苷酸序列（5'~3'）	片段长度 /bp	引物来源
<i>glpF</i>	<i>glpF</i> -F	GCGTTTGTGCTGGTGTAAAGT	372	[16]
	<i>glpF</i> -R	CTGCAATCGGAAGGAAGAAG		
<i>gmk</i>	<i>gmk</i> -F	ATTTAAGTGAGGAAGGGTAGG	504	
	<i>gmk</i> -R	GCAATGTTACCAACCACAA		
<i>ilvD</i>	<i>ilvD</i> -F	CGGGGCAAACATTAAGAGAA	393	
	<i>ilvD</i> -R	GGTTCGTGTCGTTTCCATTC		
<i>pta</i>	<i>pta</i> -F	GCAGAGCGTTTAGCAAAAGAA	414	
	<i>pta</i> -R	TGCAATGCGAGTTGCTTCTA		
<i>pur</i>	<i>pur</i> -F	CTGCTGCGAAAAATCACAAA	348	
	<i>pur</i> -R	CTCACGATTCGCTGCAATAA		
<i>pycA</i>	<i>pycA</i> -F	GCGTTAGGTGGAACGAAAG	363	
	<i>pycA</i> -R	CGCGTCCAAGTTTATGGAAT		
<i>tpi</i>	<i>tpi</i> -F	GCCCAGTAGCACTTAGCGAC	435	
	<i>tpi</i> -R	CCGAAACCGTCAAGAATGAT		

1.3.5 分离菌株多位点序列分型 (MLST)

以细菌基因组 DNA 为模板, 根据蜡样芽孢杆菌的管家基因扩增引物 (表 2) 对分离菌株的七个管家基因进行 PCR 扩增。PCR 的反应体系包括: DNA 模板 2 μL , 上游引物 ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 1.2 μL , 下游引物 ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 1.2 μL , BeyoFusion™ PCR Master Mix 15 μL , 超纯水 11 μL ; PCR 反应程序: 92 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 1 个循环; 92 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 35 个循环; 68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 1 个循环。扩增结束后, 取 5 μL 扩增产物进行电泳检测, 合格的扩增产物进行双向测序。在测序完成后, 将拼接好的管家基因序列结果上传至 PubMLST (<http://pubMLST.org/bcereus/>), 获得等位基因序列编码 (allele number), 将七个管家基因序列拼接并按顺序上传至 PubMLST, 获得菌株的 ST 型。新等位基因编码及 ST 型提交至数据库, 获得新序列编号 (ID)。利用 phyloviz-2.0 软件构建分离菌株的系统发育树。

1.3.6 数据分析

数据分析采用 Excel 2019 软件, 图形绘制采用 Origin 2018 软件和 Morpheus 在线绘图软件 (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>)。

2 结果与讨论

2.1 预制食品中蜡样芽孢杆菌的污染状况

在采集的 97 份预制食品中, 蜡样芽孢杆菌

的阳性检出份数为 35 份, 总体检出率为 36.08% (表 3), 与已有报道即食食品的蜡样芽孢杆菌污染率相近^[16]。其中, 冷冻类预制食品的蜡样芽孢杆菌检出率最高 (54.17%), 其次为肉类 (36.67%) 和米面类 (31.82%), 蔬菜最低 (18.75%)。近年, 预制食品中蜡样芽孢杆菌污染的研究大多聚焦于即食米面制品, 如糕点、面条等^[23], 对多种类全覆盖的预制食品的分析较少^[17,24,25]。Yu 等^[16]在 860 份即食食品中检出蜡样芽孢杆菌 (检出率 35%), 其中米面制品检出率最高 (50%), 其次是熟肉制品 (34%)。Lin 等^[24]发现约 20.5% 的植物类食品检出蜡样芽孢杆菌。Rahnama 等^[25]经过文献调查发现蜡样芽孢杆菌的总体检出率约为 23.7%, 其中谷物类食品占比约 41.5%。Guo 等^[18]发现 598 份速冻食品中蜡样芽孢杆菌检出率约为 32.3%, 其中加工类食品如包子 (65.7%)、饺子 (45.9%) 等检出率较高。相似的是, 本研究中蜡样芽孢杆菌污染较高的食品主要集中在冷冻类和谷物米面类^[23], 而较少出现在蔬菜类食品^[24], 检出率的差异可能是由于不同的地区、食品类型以及贮存温度引起的。

在 35 份阳性样品中, 蜡样芽孢杆菌的总体污染水平为 2.3 至 6.6 log CFU/g, 平均值为 4.6 log CFU/g (表 3)。其中, 40.00% (14/35) 的阳性样品其污染水平 >5 log CFU/g, 已超出国标 GB 31607-2021 规定的蜡样芽孢杆菌安全限量值^[26]。香港食品安全中心将即食食品中蜡样芽孢杆菌含量在 <3 log CFU/g、3~5 log CFU/g 和 5 log CFU/g 判定为“满意”、“临界值”及“不合格”

三个微生物安全层级^[27]；欧洲标准对即食食品中蜡样芽孢杆菌含量的限定更为严格，基本认为含量小于 3 log CFU/g 为“安全”^[28]。在本研究中，97.14%（34/35）的阳性样品其蜡样芽孢杆菌污染水平超过 3 log CFU/g，因此，存在较为严重的食品安全风险。

已有研究通常采用 MPN 法对蜡样芽孢杆菌的菌数水平进行评估。Guo 等^[18]在蜡样芽孢杆菌阳性样品发现有 0.3% 的样品污染水平大于 1 100 MPN/g，Yu 等^[16]发现约 10% 的阳性样品污染水平大于 1 100 MPN/g，主要出现在肉类或米面类食品。本研究采用了平板计数法对蜡样芽孢杆菌污染水平进行测定，发现较高的蜡样芽孢杆菌污染水平（>3 log CFU/g）也主要出现在冷冻类（50.00%，12/24）、肉类（36.67%，11/30）和米面类（22.73%，5/22）食品中，说明蜡样芽孢杆菌在这三类预制食品中同时具有较高的检出率和污染水平。不同的食品基质成分营造了不同的生长环境，可能会影响蜡样芽孢杆菌的生存及产毒状况^[29]。米面类制品通常由谷物（cereal）或淀粉（starch）基质制备而成，是蜡样芽孢杆菌高污染的常见食品类型，尤其是即食或预制米面产品，造成了较多的食物中毒事件^[25]。肉制品富含蛋白质，其蜡样芽孢杆菌的污染来源主要来自养殖过程中动物的粪便污染^[30]，而后期屠宰工人的卫生操作、预制菜加工期间的工作人员以及环境的卫生状况、包装卫生情况、运输及储存的温度等也会影响预制肉制品的微生物污染状态^[25]。冷冻类食品通常也由肉和面粉混合制成，因此推测，蜡样芽孢杆菌可能更适于

在蛋白质或淀粉含量丰富的食品中生存^[9,23]。

2.2 蜡样芽孢杆菌分离菌株的生化鉴定结果

生化试验作为蜡样芽孢杆菌的经典鉴定方法，目前已经被大量应用于蜡样芽孢杆菌的分离和鉴定当中^[18,31,32]。本研究从 35 份蜡样芽孢杆菌阳性食品中共分离得到 118 株蜡样芽孢杆菌疑似菌株，其中从冷冻类中分离出 45 株，肉类中分离出 42 株，米面类中分离出 22 株，蔬菜类中分离出 6 株，其它类中分离出 3 株（图 1）。根据 GB 4789.14-2014，蜡样芽孢杆菌在四项典型生化鉴定试验中结果为过氧化氢试验阳性、动力试验阳性、溶血试验阳性、蛋白质毒素结晶试验阴性^[19]，标准菌 ATCC14579 均符合以上特性。118 株疑似菌株的生化鉴定结果显示，冷冻类、肉类、米面类、蔬菜类与其他类分别有 43 株、37 株、22 株、4 株和 2 株符合蜡样芽孢杆菌生化鉴定特征（图 1），与蜡样芽孢杆菌生理生化特性一致^[18,31,32]。因此，共计 108 株符合生化鉴定特征，判定为蜡样芽孢杆菌。

2.3 分离菌株的毒力基因分析

本研究从分离获得的 108 株蜡样芽孢杆菌中，根据菌株生长活力大小从每份蜡样芽孢杆菌阳性样品中筛选出 1 株高活力菌株，共计 35 株，根据 CT 值以及电泳结果判断，35 株分离菌株均携带管家基因 *gyrB*（100.00%）。由于该基因通常也作为特征基因用于蜡样芽孢杆菌的鉴定，因此进一步确定所筛选出的 35 株阳性菌为蜡样芽孢杆菌^[33]。

表 3 预制食品中蜡样芽孢杆菌的污染状况

Table 3 Contamination status of *Bacillus cereus* in fabricated foods

类别	采样量/份	污染率/%	蜡样芽孢杆菌含量				最大值 /(log CFU/g)	最小值 /(log CFU/g)
			log CFU≤3	3<log FU≤4	4<log FU≤5	log CFU>5		
肉类	30	11/30 (36.67)	0/30	4/30	2/30	5/30	6.6	3.3
冷冻类	24	13/24 (54.17)	1/24	1/24	7/24	4/24	6.2	2.3
米面类	22	7/22 (31.82)	0/22	0/22	2/22	5/22	5.9	4.2
蔬菜类	16	3/16 (18.75)	0/16	2/16	1/16	0/16	4.6	3.3
其他类	5	1/5 (20.00)	0/9	0/9	1/9	0/9	4.2	4.2
总计	97	35/97 (36.08)	1/97	7/97	13/97	14/97	6.6	2.3

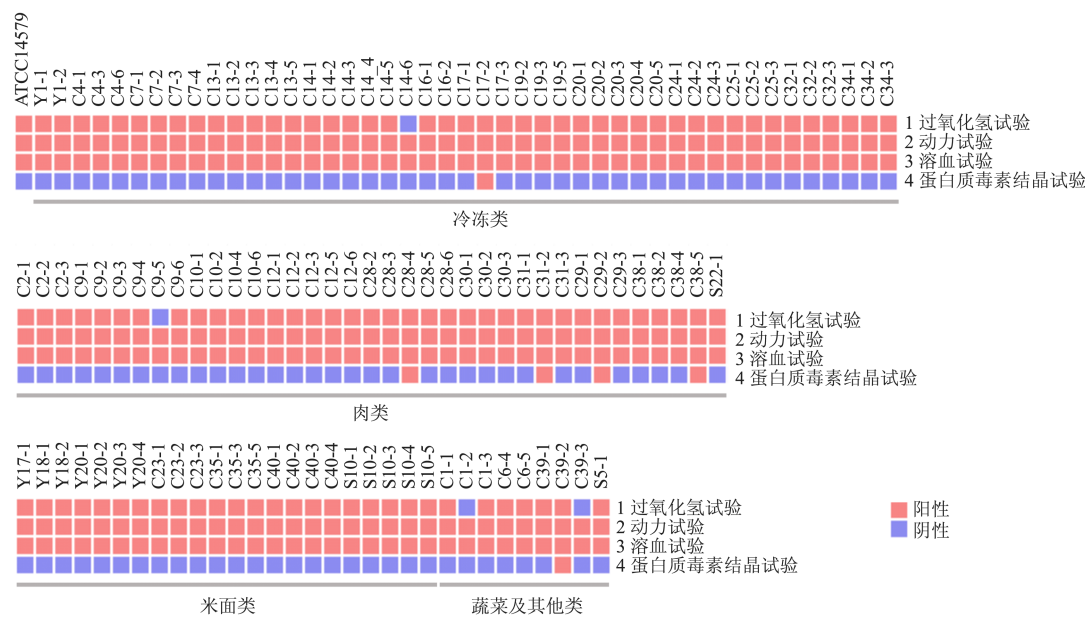


图 1 蜡样芽孢杆菌分离菌株的生化鉴定结果
Fig.1 Biochemical identification results of *B. cereus* isolates

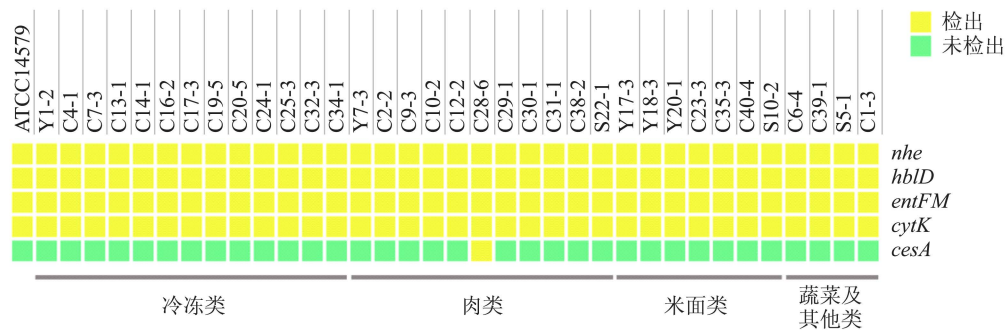


图 2 蜡样芽孢杆菌分离菌株的毒力基因分布情况
Fig.2 Distribution of virulence genes in *B. cereus* isolates

35 株分离菌株的毒力基因分析结果显示，分离菌株均携带肠毒素基因 *nhe*、*hblD*、*entFM* 与 *cytK*（检出率 100.00%），仅有 1 株分离菌株（C28-6）携带呕吐毒素合成酶基因 *cesA*（检出率 2.86%），鉴定为致呕型菌株，该菌株来源于肉类预制食品（图 2）。近年来，已有相关研究对食源性蜡样芽孢杆菌分离菌株进行毒力分析，但对分离自预制食品的菌株研究较少。Yu 等^[16]发现蔬菜源蜡样芽孢杆菌分离菌株的肠毒素基因检出率均大于 80%，而仅有 3% 的菌株含有 *ces* 基因。Yu 等^[17]在即食食品中分离获得的蜡样芽孢杆菌仅 4% 检出 *ces* 基因。Guo 等^[18]从速冻食品中分离的菌株其 *nhe* 基因与 *hblD* 基因的携带率为 100% 和 75%，仅有 7% 菌株检出 *ces* 基因。金泽坤^[31]从腐乳中分离的菌株其 *nhe* 基因和 *entFM* 基因携带率达到 100%，而未检出 *ces* 基因。本研究亦得出相似结果，说明肠毒素基因在蜡样芽孢杆菌中普遍存在，而呕吐毒素基因则相

对较少。同时，本研究中致呕型菌株 C28-6 来源于肉类样品，说明呕吐毒素基因更易于在含肉类成分的食品中检出^[17,18]，这可能是由于致呕型蜡样芽孢杆菌更适于在蛋白质丰富的食品中生存。

2.4 分离菌株的MLST分型分析

预制食品中蜡样芽孢杆菌的 ST 型分布结果显示，35 株分离菌株被归入 18 个 ST 型，呈多样性（图 3）。其中，7 株菌株确认为新的 ST 型，大多来源于冷冻类预制食品（4/7），分别为 ST3308、ST3309、ST3310、ST3311、ST3312、ST3313 和 ST3314。在 35 株分离菌株中，ST177（5/35）和 ST2056（5/35）为优势 ST 型，各占总数的 14.29%。聚类分析将 35 株菌株分成 4 个克隆复合体（Clone Complex, CC）和 17 个单体（图 4）。其中，以克隆复合体 ST-205 为主（10 株，28.57%），其次是 ST-142 克隆复合体（7 株，20.00%）

和 ST-8 克隆复合体（1 株，2.86%），其余 17 株为单一群，占总数的 48.57%。在新发现的 7 个 ST 型中，只有 ST3314 被归于 ST-142 克隆复合体，其余均为单一群。

与本研究结果相似，Carroll 等^[34]通过对南非的肉类和家禽产品中分离出的蜡样芽孢杆菌进行研究，发现其中两个 ST177 菌株分别是来自不同地区的牛肉精制品中分离出来；Zhang 等^[35]对蜡样芽孢杆菌的 MLST 研究发现，ST-205 克隆复合体在中国的分布是非常广泛的；Nakayama 等^[36]对越南胡志明市鸡肉中的蜡样芽孢杆菌进行分型研究，发现其中占主导地位的是 ST-205 克隆复合体；Yu 等^[17]对中国即食食品中蜡样芽孢杆菌的分型研究也发现，ST-205 和 ST-142 克隆复合体占据主导地位。因此 ST177 与 ST-205 分别为蜡样芽孢杆菌的优势 ST 型和优势克隆复合体。此外，有研究表明，引起呕吐型食源性疾病的蜡样芽孢杆菌可能与 ST26 型菌株有关^[18]。本研究中发现的致呕型菌株 C28-6（携带呕吐毒素合成酶基因 *cesA*）为 ST2224 型，属于 ST-205 克隆复合体，其致病性有待进一步研究。

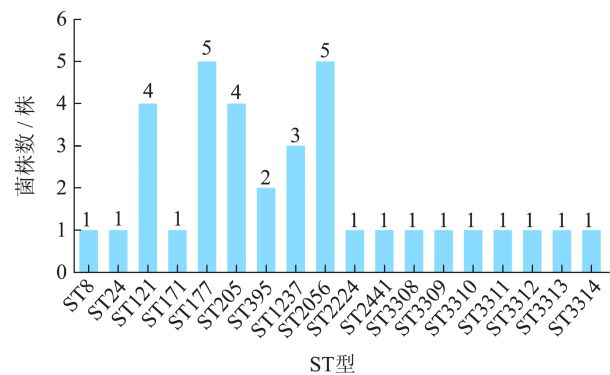


图 3 分离菌株的 ST 型分布情况

Fig.3 ST distribution of isolated strains

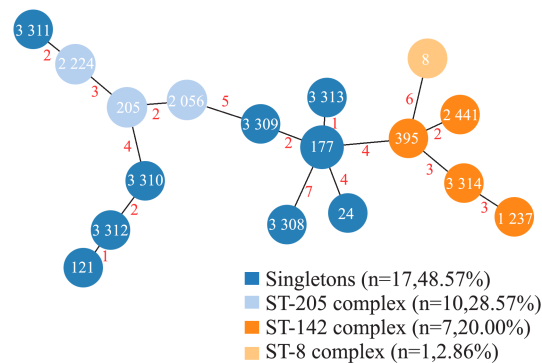


图 4 预制食品中蜡样芽孢杆菌的最小生成树

Fig.4 Minimum spanning tree and genetic diversity of *B. cereus* from fabricated foods

3 结论

本研究针对蜡样芽孢杆菌开展了其在预制食品中污染情况的调查。研究发现，蜡样芽孢杆菌在佛山市某地区预制食品中广泛存在，污染水平超出多项国际标准。其中，污染水平较高的食品集中在冷冻类和肉类。分离菌株同时携带多种毒力基因，其中 1 株鉴定为致呕型蜡样芽孢杆菌。分离菌株的 MLST 分型呈现多样性，7 个新 ST 型菌株主要来自冷冻类预制食品。本研究结果表明，需重点关注预制食品中蜡样芽孢杆菌的污染及其可能带来的毒素问题，加强对预制食品中蜡样芽孢杆菌的风险监测与防控，为我国的食品安全提供保障。

参考文献

[1] OLIVEIRA M, CARVALHO M, TEIXEIRA P. Characterization of the toxigenic potential of *Bacillus cereus* sensu lato isolated from raw berries and their products [J]. Foods, 2023, 12(21): 4021.

[2] 胡金宇,王锐.2010—2019年全国细菌性食物中毒事件流行病学特征分析[J].中国食品卫生杂志,2023,35(8):1225-1230.

[3] SCHREIBER N, HACKL G, REISINGER A C, et al. Acute liver failure after ingestion of fried rice balls: A case series of *Bacillus cereus* food poisonings [J]. Toxins, 2022, 14(1): 12.

[4] JOVANOVIC J, ORNELIS V F M, MADDER A, et al. *Bacillus cereus* food intoxication and toxicoinfection [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2021, 20(4): 3719-3761.

[5] 杨晓燕,全志琴,李会,等.河南省洛阳市餐饮食品中蜡样芽孢杆菌污染状况及毒力基因分析[J].预防医学论坛,2023,29(5):379-384.

[6] HUO L, YE Z, LIU M, et al. Brain circuits for retching-like behavior [J]. National Science Review, 2023, 11(1): nwad256.

[7] ROUZEAU-SZYNALSKI K, STOLLEWERK K, MESSELHÄUSSER U, et al. Why be serious about emetic *Bacillus cereus*: Cereulide production and industrial challenges [J]. Food Microbiology, 2020, 85: 103279.

[8] YANG S, WANG Y, LIU Y, et al. Cereulide and emetic *Bacillus cereus*: characterizations, impacts and public precautions [J]. Foods, 2023, 12(4): 833.

[9] JESSBERGER N, DIETRICH R, GRANUM P E, et al. The *Bacillus cereus* food infection as multifactorial process [J]. Toxins, 2020, 12(11): 701.

[10] EHLING-SCHULZ M, MESSELHÄUSSER U. 7-One pathogen but two different types of foodborne outbreak: *Bacillus cereus* in catering facilities in Germany [M] Case Studies in Food Safety and Authenticity. England: Woodhead Publishing, 2012: 63-70.

[11] WANG Y, LIU Y, YANG S, et al. Effect of temperature, pH, and av on cereulide synthesis and regulator genes transcription with respect to *Bacillus cereus* growth and cereulide production [J]. Toxins, 2024, 16(1): 32.

- [12] REN F, CHEN Y, YANG S, et al. Characterization of emetic *Bacillus cereus* biofilm formation and cereulide production in biofilm [J]. Food Research International, 2024, 192: 114834.
- [13] YI B, XU H. Research and development status of prepared foods in China: A review [J]. Applied Sciences, 2023, 13(14): 7998.
- [14] ZHAO Y, ZHANG X, XU X. Application and research progress of cold storage technology in cold chain transportation and distribution [J]. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2020, 139(2): 1419-1434.
- [15] 王萍,陈琳,乔勇升,等.2020—2022年泰州市售预包装食品中蜡样芽孢杆菌毒力基因及耐药性[J].卫生研究,2024,53(1):55-59.
- [16] YU P, YU S, WANG J, et al. *Bacillus cereus* isolated from vegetables in China: Incidence, genetic diversity, virulence genes, and antimicrobial resistance [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 948.
- [17] YU S, YU P, WANG J, et al. A Study on prevalence and characterization of *Bacillus cereus* in ready-to-eat foods in China [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 3043.
- [18] GUO H, YU P, YU S, et al. Incidence, toxin gene profiling, antimicrobial susceptibility, and genetic diversity of *Bacillus cereus* isolated from quick-frozen food in China [J]. LWT, 2021, 140: 110824.
- [19] GB4789.14-2014食品安全国家标准食品微生物学检验蜡样芽孢杆菌检验[S].
- [20] 李聪.食源性蜡样芽孢杆菌和志贺氏菌适体的筛选及检测方法的建立[D].保定:河北农业大学,2019.
- [21] DOMMEL M K, LÜCKING G, SCHERER S, et al. Transcriptional kinetic analyses of cereulide synthetase genes with respect to growth, sporulation and emetic toxin production in *Bacillus cereus* [J]. Food Microbiology, 2011, 28(2): 284-290.
- [22] JIN Z, LI L, ZHENG Y, et al. Diallyl disulfide, the antibacterial component of garlic essential oil, inhibits the toxicity of *Bacillus cereus* ATCC 14579 at sub-inhibitory concentrations [J]. Food Control, 2021, 126: 108090.
- [23] NAVANEETHAN Y, EFFARIZAH M E. Prevalence, toxigenic profiles, multidrug resistance, and biofilm formation of *Bacillus cereus* isolated from ready-to eat cooked rice in Penang, Malaysia [J]. Food Control, 2021, 121: 107553.
- [24] LIN Y, CHA X, BRENNAN C, et al. Contamination of plant foods with *Bacillus cereus* in a province and analysis of its traceability [J]. Microorganisms, 2023, 11: 2763.
- [25] RAHNAMA H, AZARI R, YOUSEFI M H, et al. A systematic review and meta-analysis of the prevalence of *Bacillus cereus* in foods [J]. Food Control, 2023, 143: 109250.
- [26] GB31607-2021食品安全国家标准散装即食食品中致病菌限量[S].
- [27] CENTRE FOR FOOD SAFETY. Microbiological Guidelines for Food for Ready to-eat Food in General and Specific Food Items: [S]. Hong Kong: Centre for Food Safety, Food and Environmental Hygiene Department, 2014.
- [28] EFSA BIOHAZ. Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs [J]. EFSA Journal, 2016, 14(7): 4524.
- [29] ZHENG Y, XU W, GUO H, et al. The potential of lactose to inhibit cereulide biosynthesis of emetic *Bacillus cereus* in milk [J]. International Journal of Food Microbiology, 2024, 411: 110517.
- [30] DOYLE M P, DIEZ-GONZALEZ F, HILL C. Food microbiology: fundamentals and frontiers, 5th edition [M]. Washington, DC, USA: ASM Press, 2022.
- [31] 金泽坤.腐乳中蜡样芽孢杆菌的分离鉴定、毒性分析及大蒜精油的抑菌作用与机理研究[D].广州:华南理工大学,2021.
- [32] 洗佳露,李理.三类传统发酵食品中蜡样芽孢杆菌的污染状况研究[J].中国酿造,2023,42(12):33-37.
- [33] 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):247-252,204.
- [34] CARROLL L M, 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]. Microbiology Spectrum, 2022, 10(3): 1-21.
- [35] 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]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1513.
- [36] NAKAYAMA T, YAMAGUCHI T, JINNAI M, et al. Untargeted phylogenetic group III of multi-drug-resistant *Bacillus cereus* isolated using fraser medium from retail chickens in Ho Chi Minh city [J]. Current Microbiology, 2021, 78(8): 3115-3123.