



研究报告

动物用芽孢杆菌微生态制剂中蜡样芽孢杆菌的分离及安全性

邓凤如^{Δ1,2,3} 陈韵声^{Δ1,2,3} 范琳^{1,2,3} 赵乐怡^{1,2,3} 邓诣群^{*1,2,3} 文继开^{*1,2,3}

1 华南农业大学生命科学学院 广东省农业生物蛋白质功能与调控重点实验室 广东 广州 510642

2 华南农业大学农业部人畜共患病重点实验室 广东 广州 510642

3 华南农业大学岭南现代农业科学与技术广东省实验室 广东 广州 510642

摘要:【背景】芽孢杆菌是仅次于乳酸菌常用于微生态制剂中的菌种,然而部分芽孢杆菌微生态制剂规范不严,应用存在安全隐患。【目的】调查我国在售动物用芽孢杆菌微生态制剂中蜡样芽孢杆菌携带情况,揭示蜡样芽孢杆菌应用的潜在风险。【方法】对微生态制剂预处理,选择性筛选分离蜡样芽孢杆菌,通过全基因组测序测绘细菌毒素基因谱与耐药基因谱,细胞计数试剂盒-8法测定菌株对细胞的毒性,利用微量肉汤稀释法确定菌株耐药值。【结果】从50份微生态制剂产品中筛选分离得到23株蜡样芽孢杆菌群细菌,它们对氨苄西林、林可霉素和泰妙菌素3种抗生素均耐药,主要毒力基因 *nhe*、*hbl*、*cytK*、*ces* 的检出率分别为100%、30%、39%和4%,分离株均有溶血性且39%菌株产生热稳定毒素,不同菌株对非洲绿猴肾细胞呈现出不同程度的毒性。【结论】微生态制剂来源的蜡样芽孢杆菌毒性与耐药性严重,携带毒素基因与耐药基因广泛,多株菌株呈高细胞毒性且产生热稳定毒素。芽孢杆菌微生态制剂存在安全性问题,应加强对蜡样芽孢杆菌的质量安全监管力度,规范微生态制剂的市场秩序,杜绝安全隐患。

关键词: 微生态制剂, 蜡样芽孢杆菌, 毒性, 耐药性

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2017YFC1600305); National Natural Science Foundation of China (31802246); Special Scientific Research Project of Guangzhou Science and Technology Plan (201804010207)

ΔThese authors equally contributed to this work

*Corresponding authors: Tel: 86-20-85201331

E-mail: DENG Yiqun: yqdeng@scau.edu.cn; WEN Jikai: jkwen@scau.edu.cn

Received: 24-12-2020; **Accepted:** 18-01-2021; **Published online:** 26-03-2021

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFC1600305); 国家自然科学基金(31802246); 广州市科技计划科学研究专项(201804010207)

Δ对本文贡献相同

*通信作者: Tel: 020-85201331

E-mail: 邓诣群: yqdeng@scau.edu.cn; 文继开: jkwen@scau.edu.cn

收稿日期: 2020-12-24; 接受日期: 2021-01-18; 网络首发日期: 2021-03-26

Toxicity and antimicrobial resistance of *Bacillus cereus* group from microecological preparations for animal use

DENG Fengru^{Δ1,2,3} CHEN Yunsheng^{Δ1,2,3} FAN Lin^{1,2,3} ZHAO Leyi^{1,2,3}
DENG Yiqun^{*1,2,3} WEN Jikai^{*1,2,3}

1 Guangdong Provincial Key Laboratory of Protein Function and Regulation in Agricultural Organisms, College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China

2 Key Laboratory of Zoonosis of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China

3 Guangdong Laboratory for Lingnan Modern Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China

Abstract: [Background] *Bacillus* is commonly used in microecological preparations next to lactic acid bacteria. However, some *Bacillus* spp. are not strictly regulated and pose potential safety hazards in application. [Objective] To study the prevalence of *Bacillus cereus* in *Bacillus* microecological preparations on sale from all over the country, and reveal the potential risks of the application of *B. cereus*. [Methods] *B. cereus* group strains were isolated and identified from the pretreated microecological preparations. Toxicity and antimicrobial resistance of *B. cereus* group strains were analyzed using whole-genome sequence. The cytotoxicity was evaluated via Cell Counting Kit-8 assay. Antimicrobial susceptibility was determined by broth microdilution methods. [Results] Twenty-three *B. cereus* group strains were isolated from 50 microecological preparations, which are resistant to ampicillin, lincomycin and tiamulin, and the detection rates of major virulence genes *nhe*, *hbl*, *cytK*, *ces* were 100%, 30%, 39% and 4%, respectively. All isolates were hemolytic and showed varying degrees of toxicity to Vero cell, 9 of which produced heat-stable toxins. [Conclusion] The widespread of toxin and resistance genes, and apparent observations of hemolytic activity, cytotoxic, and heat-stable toxin production in *B. cereus* group isolates from *Bacillus* microecological preparations, pose great threat to food safety and human safety. The findings highlights need for enhanced efforts required in the surveillance of risk factors, virulence factors and antimicrobial resistance in *B. cereus* from microecological preparations.

Keywords: microecological preparation, *Bacillus cereus*, toxicity, antimicrobial resistance

抗生素的使用显著地改善了动物的生活质量,降低了禽畜病害的发生,在很长一段时间,抗生素作为动物促生长剂被广泛应用于动物养殖中^[1]。随着使用抗生素的弊端在畜禽养殖中的突显,我国已经明确限制其在养殖业中的使用,2015年农业农村部发起遏制细菌耐药国家行动计划。2019年7月,农业农村部发布第194号公告,明确自2020年1月起,停止所有促生长类药物饲料添加剂的生产与进口;自2020年7月起,停止含促生长类药物饲料添加剂的饲料生产。为了保障畜禽养殖的产量和质量,寻找安全有效的抗生素替代物是目前的研究热点。微生态制剂以其绿色天然、安全高效、无污染残留等优点受到

人们的推崇,成为替代抗生素的首选。

芽孢杆菌(*Bacillus*)是除乳酸菌外常被用作益生菌株的细菌^[2],因其可在逆境中形成抗逆性强的芽孢,能耐受生产、应用和储藏过程中的不良环境^[3],同时能够合成活性较强的消化酶,降解饲料中复杂的碳水化合物,便于动物吸收利用^[4]。部分枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)在生长过程中会产生枯草菌素、多粘菌素、短杆菌肽等活性物质,降低肠道氧化还原电位,刺激机体免疫反应,能明显抑制肠道内条件致病菌及其他致病菌在肠道中的繁殖^[5]。然而,并非所有芽孢杆菌菌种都适合制成微生态制剂,有些益生菌如蜡样芽孢杆菌的部分菌株可能会产生致腹泻的

毒素, 从而对动物体造成毒害作用。出于安全考虑, 2012年12月, 我国农业部出台2045号公告《饲料添加剂品种目录(2013)》, 目录中规定枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌等34种微生物菌种可直接用于动物养殖。

大多数芽孢杆菌属无害细菌, 但有一部分对人和动物具有致病性, 如蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*), 其作为一种条件致病菌可引起食物中毒, 常作为主要监测的食源性致病菌之一, 其中毒后最主要的症状表现为腹泻和呕吐, 与金黄色葡萄球菌食物中毒症状相似。蜡样芽孢杆菌可通过菌体和芽孢的形式存在于养殖生产链中的各个阶段, 并且不容易被清除, 因此, 由蜡样芽孢杆菌引起的食物中毒十分普遍, 但病症的短暂性导致蜡样芽孢杆菌引起的食物中毒并不受重视。导致呕吐的主要毒素是致吐毒素(Cereulide, Ces), 其为非核糖体肽合成酶控制合成的十二环肽, 化学性质十分稳定, 可在一定程度上抵抗高温和酸性环境^[6]。导致腹泻的主要毒素是非溶血性肠毒素(Non Haemolytic Enterotoxin, Nhe)、溶血性肠毒素 BL (Hemolysin BL, Hbl)^[7]和细胞毒素 K (Cytotoxin K, CytK)^[8], 这3种毒素主要是芽孢在肠道萌发而产生, 从而导致腹泻发生。蜡样芽孢杆菌还会引起毒血症、呼吸道感染、细菌性眼内炎等疾病, 随着蜡样芽孢杆菌耐药性增强, 感染治疗的难度加大。已有相关报道, 益生蜡样芽孢杆菌中存在耐药移动元件, 可将其自身的耐药性转移至其他细菌中, 存在细菌耐药性扩散的风险^[9]。例如 Esporafeed Plus[®]产品益生蜡样芽孢杆菌因存在可移动的四环素耐药基因而被禁止添加至动物饲料中^[10]。

目前芽孢杆菌在市场上应用广泛, 但很大部分芽孢杆菌微生物生态制剂存在菌株标识不清, 使用菌株相关信息缺失等问题, 尤其对蜡样芽孢杆菌使用需慎重评估其安全性风险。针对芽孢杆菌微生物生态制剂中蜡样芽孢杆菌细菌毒素与耐药性的问

题, 本研究注重评估微生物生态制剂中存在的蜡样芽孢杆菌毒力表征, 细胞毒性与细菌耐药性, 揭示芽孢杆菌微生物生态制剂应用的潜在风险, 为更加科学、安全、绿色地将芽孢杆菌微生物生态制剂应用于动物生产提供更多的参考依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

自2018–2020年从全国13个省(直辖市/自治区)收集动物用微生物生态制剂共计50份, 其中兽用34份(编号1–34)、水产用16份(编号35–50), 所有制剂标签上均标明含有芽孢杆菌或蜡样芽孢杆菌。

Triton X-100, 北京索莱宝生物科技有限公司; 氨苄青霉素、链霉素、万古霉素等, 上海麦克林生化科技有限公司; 牛肉膏、蛋白胨等培养基粉末及引物合成, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 脱纤维羊血, 广州昂飞生物科技有限公司; 琼脂糖, Biowest公司; 蜡样芽孢杆菌筛选培养基, 上海欣中生物工程有限公司; DNA抽提试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 细胞计数试剂盒-8, 上海翊圣生物科技有限公司; 胶体金免疫层析片 Duopath[®] *Cereus* Enterotoxins, Millipore公司; 细菌生化鉴定试剂盒, 生物梅里埃公司; VAHTS Universal DNA Library Prep Kit, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

生化培养箱, Memmert公司; 多功能酶标仪, Molecular Devices公司; 全基因组测序, 北京赛默百合生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 蜡样芽孢杆菌的分离筛选

微生物生态制剂粉末(或试剂)与磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline, PBS)按1:10(体积比)互溶后, 涂布于蜡样芽孢杆菌筛选培养基, 于37℃倒置培养12–24h, 挑选蓝色或白色, 有白色晕环, 表面呈毛玻璃状的菌落初步判断为芽孢杆菌属细菌^[11]。每一个产品选取5个以上菌落在LB肉汤37℃、200 r/min振荡培养过夜后, 通过

测定每个菌株 16S rRNA 基因与多位点序列分型 (Multi-Locus Sequence Typing, MLST) 及生化鉴定初步确定菌株是否为该产品的主要芽孢杆菌。用 DNA 抽提试剂盒提取目标菌株的基因组 DNA, 以进行后续研究。

1.2.2 细菌全基因组测序

基因组经凝胶电泳纯化后, 使用 VAHTS Universal DNA Library Prep Kit 构建测序文库, 使用 Illumina NovaSeq 6000 对筛选的蜡样芽孢杆菌进行全基因组测序, 测序完成后对菌株基因组进行拼接与基因注释, 并使用平均核酸一致性分析最终确定细菌种属。

1.2.3 蜡样芽孢杆菌肠毒素表达测定

挑取蜡样芽孢杆菌单克隆接种于 1% 葡萄糖的水解酪蛋白酵母培养基 (Cassitone Glucose Yeast Extract Medium, CGY)^[12] 中, 32 °C、150 r/min 培养 6 h。收集上清液加热煮沸 10 min, 冷却至室温, 使用胶体金免疫层析片定性产肠毒素蜡样芽孢杆菌。将层析条锡箔袋撕开, 放置在平台上, 标记上待测样品名称, 2 h 内完成测试。将煮沸后又冷却好的上清液 150–200 μL 滴入测试片上的反应槽, 等待 30 min 观察结果。30 min 内, 控制线 (C) 显示红色则表明测试片正常工作。样品阳性时, 检测线 (T) 和控制线 (C) 同时显示红色; 样品阴性时, 检测线 (T) 不显色, 而控制线 (C) 显示红色。

1.2.4 细胞毒性检测

蜡样芽孢杆菌分离株与蜡样芽孢杆菌 ATCC14579 接种于加入 1% 葡萄糖的 CGY 培养基中, 32 °C、150 r/min 培养 6 h。发酵完成的菌液在 4 °C、8 000 r/min 离心 20 min 去除菌体, 制得的上清液为蜡样芽孢杆菌毒素, 保存于 -80 °C 待检。

溶血性测试, 取 5 mL 羊血于 4 °C、3 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加入等体积 1×PBS 溶液重悬, 4 °C、3 000 r/min 离心 10 min, 重复该步骤 1 次, 最后加入等体积 1×PBS 溶液重悬制成红细

胞悬液。再取上述红细胞悬液 1.6 mL 于 18.4 mL 1×PBS 溶液中, 混匀, 制成 8% 红细胞悬液。设置热处理组与无处理组。热处理组: 蜡样芽孢杆菌毒素在 100 °C 下处理 10 min; 无处理组: 蜡样芽孢杆菌毒素在室温下放置 10 min。取上述各组 200 μL 蜡样芽孢杆菌毒素与等体积 8% 红细胞悬液混匀, 在 37 °C 孵育 1 h, 不加毒素的 4% 红细胞悬液为阴性对照, 加入 Triton X-100 与等体积 8% 红细胞悬液为阳性对照, 在波长 576 nm 下检测吸光值。溶血率计算公式: 溶血率 (%) = $(OD_{\text{Sample}} - OD_{\text{Negative}}) / (OD_{\text{Positive}} - OD_{\text{Negative}}) \times 100$ 。所有实验重复 3 次, 取计算平均值, 控制误差小于 5%。

细胞毒性测试, 使用非洲绿猴肾细胞 (Vero) 检测蜡样芽孢杆菌毒素毒性, 非洲绿猴肾细胞自液氮保存罐中取出并进行复苏, 传代至细胞状态良好后, 使用胰蛋白酶酶解细胞制成细胞悬液, 按 10^4 个/孔细胞量接种 100 μL 细胞悬液至 96 孔板, 第 1 孔加入 10 μL 蜡样芽孢杆菌毒素然后倍比稀释至第 10 孔, 第 11 与 12 孔为阳性与阴性对照。于 37 °C 和 5% CO₂ 条件下培养 24 h 后, 用细胞计数试剂盒-8 测定细胞存活率, 确定该毒素在半致死浓度 (IC_{50}) 下毒素稀释的倍数。所有实验重复 3 次, 计算平均值。

1.2.5 蜡样芽孢杆菌分离株的最小抑菌浓度测定

采用美国临床和实验室标准化委员会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 推荐的肉汤释释法^[13], 测定蜡样芽孢杆菌分离株的 β 内酰胺类、氨基糖苷类、大环内酯类、四环素类、氯霉素类等 11 类 13 种抗生素药物敏感性, 最小抑菌浓度 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) 结果判断主要参照 CLSI M100-S28 (2018), 以金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 为质控菌株, 同时参照其药敏折点值。

抗菌药物测定范围以及 MIC 判定标准见表 1。

表 1 抗菌药物测定范围以及判定标准

Table 1 Antimicrobial susceptibility test ranges and breakpoints

药物名称 Antimicrobial agent	质控范围 Range of control ($\mu\text{g/mL}$)	测定范围 Range of test ($\mu\text{g/mL}$)	判定标准 Breakpoint ($\mu\text{g/mL}$)		
			敏感 Susceptible	中介 Intermediate	耐药 Resistant
氨苄西林 Ampicillin	0.50–2.00	0.50–256	≤ 4.00	8	≥ 16
庆大霉素 Gentamicin	0.13–1.00	0.25–128	≤ 4.00	8	≥ 16
链霉素 Streptomycin	0.13–1.00	0.25–128	≤ 0.50	1–2	≥ 4
红霉素 Erythromycin	0.25–1.00	0.25–128	≤ 0.50	1–4	≥ 8
四环素 Tetracycline	0.13–1.00	0.50–256	≤ 4.00	–	≥ 8
替加环素 Tigecycline	0.03–0.25	0.25–128	≤ 4.00	8	≥ 16
氯霉素 Chloramphenicol	2.00–8.00	1.00–512	≤ 8.00	–	≥ 32
环丙沙星 Ciprofloxacin	0.13–0.50	0.13–64	≤ 4.00	–	–
万古霉素 Vancomycin	0.50–2.00	0.13–64	≤ 1.00	2	≥ 4
利奈唑胺 Linezolid	1.00–4.00	0.25–128	≤ 4.00	–	≥ 32
林可霉素 Lincomycin	0.06–0.25	0.13–64	≤ 0.50	1–2	≥ 4
泰妙菌素 Tiamulin	0.50–2.00	0.25–128	≤ 4.00	–	≥ 32
利福平 Rifampin	0.01–0.02	0.03–16	≤ 1.00	–	≥ 4

注：–：CLSI 未给出确定药敏值

Note: –: The CLSI has not provided MIC breakpoint values

2 结果与分析

2.1 芽孢杆菌的分离、筛选与鉴定

自 2018–2020 年从全国收集含芽孢杆菌微生物生态制剂产品共 50 份，来自我国北京、广西、河南、黑龙江、湖南、江苏、江西、山东、四川、台湾、天津、浙江、重庆 13 个省(直辖市/自治区)。其中兽用微生物生态制剂 34 份，水生动物用微生物生态制剂 16 份，多数为饲料添加剂或水质改良剂，而且功能注重在维持胃肠道健康、催肥促长和改善养殖环境。共分离出蜡样芽孢杆菌群细菌 23 株，其中从 34 种兽用产品中分离出 15 株蜡样芽孢杆菌群细菌，分离率为 44%；从 16 种水生动物产品中分离出 8 株蜡样芽孢杆菌，分离率 50%。

根据平均核酸一致性分析，分离株与标准株基因组序列相似性 $>95\%$ 可认为是同一种细菌^[14](表 2 和图 1)，本文分离株基因组序列已上传至国家微生物科学数据中心(Bioproject: NMDC10017720)。蜡样芽孢杆菌与苏云金芽孢杆菌、炭疽芽孢杆菌有高度的遗传相似性，尽管它们有高度相似的基

因组及 75%–80%共有基因，但二者之间显示出强烈的表型差异^[15]。23 株蜡样芽孢杆菌中均未检出 *cry* 伴孢晶体基因与 *cya* 炭疽水肿毒素基因，所有菌株显示出 β 溶血性，因此排除分离株为苏云金芽孢杆菌与炭疽芽孢杆菌。23 株分离株中有 21 株为 *B. cereus*，1 株为 *B. toyonensis*，其中 *Bacillus* sp. 15-1 未能鉴定到种水平，其与假蕈状芽孢杆菌同源，为蜡样芽孢杆菌群细菌，来自兽用产品。以上分离株从 22 份不同的微生物生态制剂中分离获得，微生物生态制剂的有效成分除 48 号样品外均未明确说明使用蜡样芽孢杆菌作为活性菌株，而且全部样品并未标出使用的菌株编号。微生物生态制剂产品存在标签信息模糊、使用菌株不明、产品用菌与实际不符等问题。

2.2 蜡样芽孢杆菌群毒力基因携带情况

分离得到的 23 株蜡样芽孢杆菌群细菌携带多种毒力基因，其中大多数为毒素基因。对基因组进行毒力基因注释汇总(图 2)，发现所有菌株均含有非溶血性肠毒素基因 *nhe* (*nheA*、*nheB*、*nheC*)，

表 2 微生态制剂来源的 23 株蜡样芽孢杆菌菌群分离株信息

Table 2 Characteristics of 23 *B. cereus* group isolates from commercial microecological preparations

产品 Product	用途 Usage	来源地 Place of origin	分离株 Isolates
1	Feed additive for livestock	Meishan, Sichuan, China	<i>B. cereus</i> 1-1
2	Feed additive for livestock and poultry	Changsha, Hunan, China	<i>B. cereus</i> 2-1
3	Feed additive for livestock and poultry	Xinxiang, Henan, China	<i>B. cereus</i> 3-1
4	Feed additive for livestock	Daqing, Heilongjiang, China	<i>B. cereus</i> 4-1
5	Feed additive for poultry	Xinghua, Jiangsu, China	<i>B. cereus</i> 5-1
6	Feed additive for poultry	Zhenjiang, Jiangsu, China	—
7	Feed additive for swine	Heze, Shandong, China	—
8	Feed additive for livestock and poultry	Yichun, Jiangxi, China	—
9	Feed additive for poultry	Yichun, Jiangxi, China	—
10	Feed additive for swine	Taian, Shandong, China	<i>B. cereus</i> 10-1
11	Feed additive for livestock and poultry	Taian, Shandong, China	<i>B. cereus</i> 11-1
12	Feed additive for poultry	Yichun, Jiangxi, China	<i>B. cereus</i> 12-1
13	Feed additive for livestock	Zhengzhou, Henan, China	—
14	Feed additive for livestock and poultry	Zhengzhou, Henan, China	<i>B. cereus</i> 14-1, <i>B. cereus</i> 14-2
15	Feed additive for poultry	Zhengzhou, Henan, China	<i>Bacillus</i> sp. 15-1
16	Feed additive for livestock and poultry	Zhengzhou, Henan, China	<i>B. toyonensis</i> 16-1
17	Feed additive for livestock and poultry	Tianjin, China	<i>B. cereus</i> 17-1
18	Feed additive for livestock and poultry	Taizhou, Jiangsu, China	—
19	Feed additive for poultry	Taizhou, Jiangsu, China	—
20	Feed additive for livestock and poultry	Taizhou, Jiangsu, China	—
21	Feed additive for livestock	Taizhou, Jiangsu, China	—
22	Feed additive for livestock and poultry	Xinyu, Jiangxi, China	—
23	Feed additive for poultry	Hangzhou, Zhejiang, China	—
24	Feed additive for poultry	Zhengzhou, Henan, China	<i>B. cereus</i> 24-1
25	Feed additive for livestock and poultry	Zhengzhou, Henan, China	—
26	Feed additive for poultry	Nanchang, Jiangxi, China	—
27	Feed additive for livestock and poultry	Luoyang, Henan, China	—
28	Feed additive for livestock and poultry	Luoyang, Henan, China	<i>B. cereus</i> 28-1
29	Feed additive for livestock and poultry	Luoyang, Henan, China	—
30	Feed additive for livestock and poultry	Chengdu, Sichuan, China	—
31	Feed additive for swine	Chongqing, China	—
32	Feed additive for livestock and poultry	Zhengzhou, Henan, China	—
33	Feed additive for livestock and poultry	Beijing, China	—
34	Feed additive for poultry	Beijing, China	—
35	Water purification for aquaculture	Beijing, China	—
36	Water purification for aquaculture	Changzhou, Jiangsu, China	—
37	Water purification for aquaculture	Zhengzhou, Henan, China	—
38	Water purification for aquaculture	Zhengzhou, Henan, China	<i>B. cereus</i> 38-1
39	Water purification for aquaculture	Zhengzhou, Henan, China	<i>B. cereus</i> 39-1
40	Water purification for aquaculture	Zhengzhou, Henan, China	<i>B. cereus</i> 40-1
41	Water purification for aquaculture	Xinyu, Jiangxi, China	—
42	Aquatic feed additive	Zhengzhou, Henan, China	<i>B. cereus</i> 42-1
43	Water purification for aquaculture	Hangzhou, Zhejiang, China	—
44	Water purification for aquaculture	Nanjing, Jiangsu, China	—
45	Water purification for aquaculture	Nanjing, Jiangsu, China	<i>B. cereus</i> 45-1
46	Aquatic feed additive	Zhoushan, Zhejiang, China	<i>B. cereus</i> 46-1
47	Water purification for aquaculture	Taiwan, China	<i>B. cereus</i> 47-1
48	Aquatic feed additive	Nanning, Guangxi, China	<i>B. cereus</i> 48-1
49	Water purification for aquaculture	Zhengzhou, Henan, China	—
50	Water purification for aquaculture	Zhengzhou, Henan, China	—

注: —: 未分离出蜡样芽孢杆菌

Note: —: *B. cereus* isn't isolated from the corresponding product

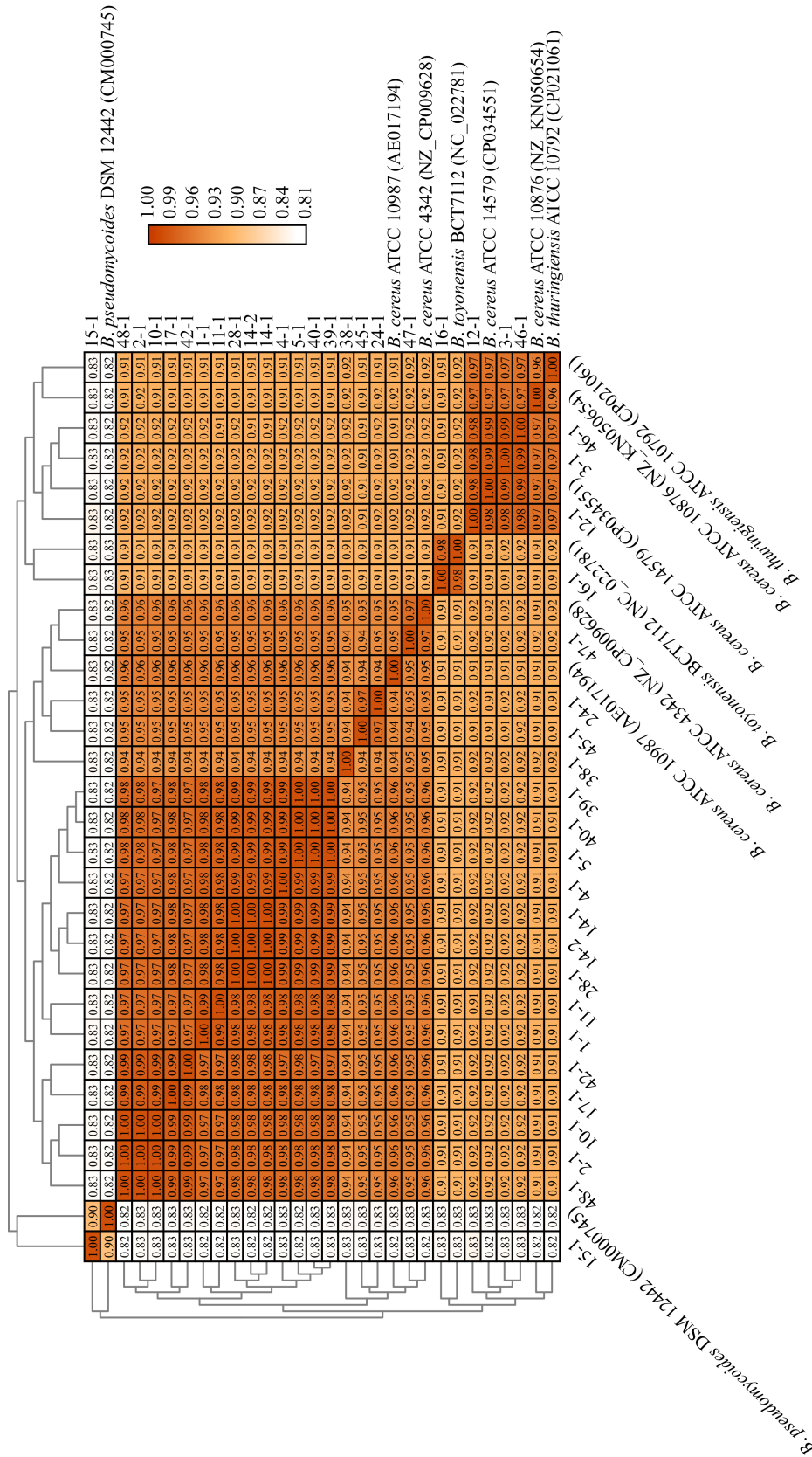


图 1 蜡样芽孢杆菌平均核酸一致性分析
Figure 1 Average nucleotide identity analysis of *B. cereus* group isolates

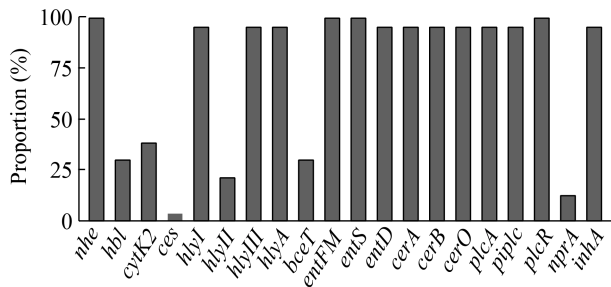


图2 蜡样芽孢杆菌群毒力基因汇总

Figure 2 Virulence genes profile of *B. cereus* group isolates

检出率 100% (23/23); 7 株分离株含有溶血性肠毒素基因 *hbl* (*hblC*、*hblD*、*hblA*), 检出率为 30.4% (7/23); 共 9 株分离株含有细胞毒素 K 相关基因 *cytK2*, 检出率为 39.1% (9/23); 其中 *B. cereus* 4-1 携带呕吐毒素基因 *ces*, 同时带有 17 个毒素表达或调控毒素表达相关基因。所有分离株均携带 9 个或以上的毒力基因, 其中 *B. cereus* 3-1 与 46-1 携带毒力基因数量最多, 两者均携带了 22 个毒力基因。有研究报道, 携带 *hlyII* 毒力基因的蜡样芽孢杆菌更有可能为致病性蜡样芽孢杆菌^[16]。本研究有 5 株分离株 *B. cereus* 3-1、24-1、38-1、46-1 与 47-1 携带 *hlyII* 毒力基因, 这类菌株可能具有更严重的食品安全隐患。

分离株根据自身携带的肠毒素与细胞毒素基因主要分为 5 种类型: I 型 *nhe*、*hbl*、*cytK*; II 型 *nhe*、*cytK*、*ces*; III 型 *nhe*、*hbl*; IV 型 *nhe*、*cytK*; V 型 *nhe*。V 型菌株占比最多, 为 43.5%; 其次为 I 与 IV 型菌株, 分别占 17.4%。

2.3 毒素表达验证与细胞毒性测定

21 株蜡样芽孢杆菌分离株能正常表达自身携带的肠毒素基因, 而 *B. cereus* 15-1 携带溶血性肠毒素与非溶血性肠毒素, 但均不表达; *B. cereus* 16-1 携带溶血性肠毒素基因但不表达。23 株蜡样芽孢杆菌群分离株均表现出不同程度的溶血性, 其中有 9 株蜡样芽孢杆菌毒素在热处理后仍具有

溶血性, 说明这类菌株存在污染食物或饲料后其产生的毒素无法通过加热去除毒性的风险。8 株蜡样芽孢杆菌分离株所产毒素对 Vero 细胞毒性大于标准株所产生的细胞毒性, 不同分离株的毒素对细胞有不同程度的毒性, 推测这与菌株自身所产毒素的类型、浓度等有关。此外, 分离自用于动物肠道健康的兽用产品的 *B. cereus* 28-1 分离株所产毒素的细胞毒性最强, 约为标准株的 2 倍 (表 3)。

2.4 药物敏感性与耐药基因携带情况

测试 23 株蜡样芽孢杆菌分离株对常用 13 种抗生素药物敏感性 (图 3), 所有蜡样芽孢杆菌均耐受氨苄西林、林可霉素与泰妙菌素这 3 类药物, 对替加环素、庆大霉素、链霉素、环丙沙星、利奈唑胺、万古霉素和利福平表现为敏感, 各有 1 株分离株分别表现对四环素、氯霉素、红霉素耐药, 耐药率为 4.3%。

所有蜡样芽孢杆菌分离株主要携带 3 种耐药基因, 包括 β 内酰胺类耐药基因 *bla2*、磷霉素耐药基因 *fosB* 和不完整的万古霉素耐药基因簇 *vanA*。 β 内酰胺类耐药基因 *bla2* 表达 β 内酰胺类水解酶 Bla 水解青霉素类、头孢类和碳青霉烯类抗生素, 携带 *bla2* 基因的分离株有 22 株, 携带率为 95.6%; 磷霉素耐药基因 *fosB* 产生硫醇基转移酶导致环氧结构开环使磷霉素失活, 全部蜡样芽孢杆菌分离株均携带 *fosB* 基因, 携带率为 100%; 万古霉素耐药基因簇 *vanA* 能改变肽聚糖前体末端降低万古霉素的亲和力, 所有蜡样芽孢杆菌分离株均携带不完整的万古霉素耐药基因簇 *vanA*, 携带率为 100%。完整的万古霉素耐药基因簇 *vanA* 为 *vanRSHWXYZ*, 而所有分离株均只携带 *vanRSYZ* 中的一个或多个基因, 缺少 *vanA* 基因簇中的核心基因 *vanHAX*, 其中 14 株携带 *vanRZ*, 7 株携带 *vanR*, 2 株携带 *vanRSYZ*。

表 3 蜡样芽孢杆菌分离株肠毒素与细胞毒性概况

Table 3 Distribution of toxin genes and cytotoxicity of *B. cereus* group isolates

分离株 Isolates	肠毒素基因/肠毒素表达 ^a Genotype and phenotype of enterotoxin ^a		溶血率 Hemolysis rate (%)	溶血率 ^b Hemolysis rate ^b (%)	细胞毒性 ^c Cytotoxicity ^c
	<i>nhe</i> /Nhe	<i>hbl</i> /Hbl			
1-1	+/+	-	68	65	140.15
2-1	+/+	-	62	0	91.08
3-1	+/+	+/+	78	67	45.52
4-1	+/+	-	76	68	64.26
5-1	+/+	-	59	0	47.34
10-1	+/+	-	61	0	97.98
11-1	+/+	-	72	69	175.56
12-1	+/+	+/+	75	0	107.83
14-1	+/+	-	88	10	40.25
14-2	+/+	-	79	0	49.20
15-1	+/-	+/-	49	0	34.90
16-1	+/+	+/-	55	0	60.72
17-1	+/+	-	56	0	82.86
24-1	+/+	-	65	52	141.64
28-1	+/+	-	50	0	209.35
38-1	+/+	+/+	57	0	72.54
39-1	+/+	-	63	0	62.39
40-1	+/+	-	66	0	61.96
42-1	+/+	-	51	0	157.68
45-1	+/+	-	64	58	172.49
46-1	+/+	+/+	64	49	116.61
47-1	+/+	+/+	55	52	124.50
48-1	+/+	-	68	0	87.20

注: ^a: 是否携带相应肠毒素基因或相应肠毒素是否正常表达, +为阳性, -为阴性; ^b: 毒素热处理后溶血率; ^c: 细胞半数致死下毒素稀释倍数, 如 *B. cereus* ATCC 14579 IC_{50} 下毒素稀释倍数为 112.4

Note: ^a: Whether the corresponding enterotoxin gene is carried or whether the corresponding enterotoxin is expressed normally, + means positive, - means negative; ^b: Hemolysis rate of toxin after heat treatment; ^c: Toxin dilution fold when the cells are half lethal, such as *B. cereus* ATCC 14579, the toxin dilution fold is 112.4

B. cereus 1-1 携带四环素类外排泵基因 *tet* (45) 可介导四环素耐药, 药敏值为 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$; *Bacillus* sp. 15-1 携带氯霉素乙酰转移酶基因 *cat*, 表现出氯霉素耐药表型, 药敏值为 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。另外有 5 株分离株携带红霉素耐药基因 *mphL*, 2 株分离株携带多重耐药基因 *lsaB*, 可介导氯霉素类、大环内酯类、截短侧耳素类、林可胺类等 7 类药物耐受, 其中 1 株分离株同时携带 *mphL* 与 *lsaB*。

3 讨论与结论

微生态制剂有望作为抗生素的替代物, 其具有较好的生物活性, 可用以预防动物疾病发生, 但微生态制剂中存在使用菌株标识不清及安全性评

价不足等问题, 严重地制约了微生态制剂的发展。本研究收集的 50 份含芽孢杆菌的微生态制剂存在活性成分不明、标签信息不完整、活菌数量与标签不符等现象, 相似的问题也有多次报道, 应该引起监管部门与使用者的注意, 加强微生态制剂生产与运输环节的质量监控^[17-18]。芽孢杆菌微生态菌剂在国内外作物种植、动物养殖等方面均有广泛的使用, 然而并非所有芽孢杆菌都具有良好的安全性, 能作为微生态制剂使用的菌株。其中, 蜡样芽孢杆菌群细菌在自然界中分布广泛, 有部分菌株被用作益生菌, 用以维持动物肠道健康等^[19]; 但同时蜡样芽孢杆菌是一种条件致病菌,

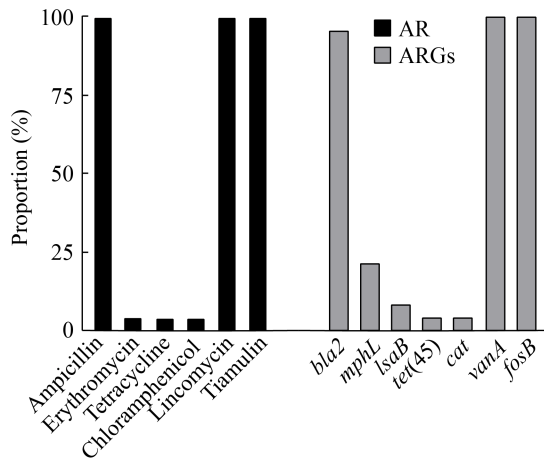


图3 蜡样芽孢杆菌耐药率与耐药基因携带情况
Figure 3 Phenotypal and genetic profiles of antimicrobial resistance in *B. cereus* group isolates

注: AR: 耐药; ARGs: 耐药基因

Note: AR: Antimicrobial resistance; ARGs: Antimicrobial resistance genes

可以通过泥土、灰尘、昆虫或不洁用具以及从业人员的手传播,使得食品容易在加工、运输、储存和销售等过程中受到污染。中国食源性疾病预防网报告资料显示,2003–2007年期间,1 060起细菌性食源性中毒事件中有121起是由蜡样芽孢杆菌引起,占11.4%,居第3位^[20]。由于食源性病症能快速自愈,其引起的食物中毒常被人们忽视,然而蜡样芽孢杆菌具有侵袭宿主机体的潜能,可造成毒血症、细菌性眼内炎等疾病发生^[21]。

本研究从50份市售微生态制剂产品筛选分离到了23株蜡样芽孢杆菌,所有分离株均呈现不同程度的溶血性与细胞毒性。利用全基因组测序确定各分离株毒力基因特征,发现所有蜡样芽孢杆菌分离株均携带9个或以上的毒力基因,而且均携带至少一种肠毒素基因并有95.7%的分离株能正常表达肠毒素,其中*B. cereus* 28-1的细胞毒性约为标准株的2倍。根据欧洲食品安全局在2018年发布的指导手册规定,只要菌株携带有功能的毒素基因均不能用作益生菌用途^[22],因此,上述所有蜡样芽孢杆菌分离株均不符合要求。此外,*B. cereus* 4-1携带致吐毒素基因簇*ces*,其基因簇

与pBCE4810质粒上的致吐毒素基因簇相似性达99.9%,同时携带*nhe*与*cytK2*基因。据报道,大多数致吐毒株都携带*nhe*基因,这就解释了致吐毒株会引起呕吐与腹泻病症的同时发生^[23–24];致吐毒素性质十分稳定,能耐受高温和酸性环境及蛋白酶水解作用;因此,致吐毒素在食品加工过程和胃肠道中不易被分解,毒性作用在较长一段时间内仍存在^[25]。本研究发现除致吐毒株*B. cereus* 4-1外,另有8株分离株产热稳定毒素,推测其为致吐毒素类似的非核糖体肽类毒素^[26],因此,通过加工过程中的热处理不能降低该类毒素产生的毒性,微生态制剂中存在这一类产热稳定毒素的蜡样芽孢杆菌是一个巨大的隐患。

23株蜡样芽孢杆菌分离株的药物敏感性结果与已报道的蜡样芽孢杆菌药物敏感性结果相似,分离的23株芽孢杆菌对氨苄西林、林可霉素和泰妙菌素全部耐药,对红霉素、四环素与氯霉素耐药率各为4.3%。有研究表明枯草芽孢杆菌对林可胺类天然耐药,这主要由ATP结合转运蛋白所介导^[27],蜡样芽孢杆菌可能也由相同的机制产生耐药性,也有相关研究发现蜡样芽孢杆菌与枯草芽孢杆菌有相似的林可霉素耐药表型^[28],蜡样芽孢杆菌是否也具有林可胺类天然耐药性仍需进一步研究。95.6%的分离株普遍带有 β 内酰胺类水解酶基因,这导致了蜡样芽孢杆菌对青霉素类药物耐药,符合先前报道的蜡样芽孢杆菌对氨苄西林的耐药情况^[11]。*B. cereus* 1-1携带了*tet*(45)四环素外排泵基因,经比对序列发现该基因与之前报道的*B. cereus* 9i移动性*tet*(45)相似度达99.85%^[9],而与之不同的是,*B. cereus* 1-1分离自四川来源的微生态制剂,*B. cereus* 9i分离自河北来源的微生态制剂,这提示我们益生蜡样芽孢杆菌所携带的耐药性移动元件极有可能广泛传播,进一步说明携带耐药移动元件的益生芽孢杆菌不可应用于微生态制剂中,其有扩散细菌耐药性的风险,因此需要更加谨慎地选取益生菌候选株。

本研究较为全面地评价了动物用芽孢杆菌微生态制剂中蜡样芽孢杆菌的毒力表征、细胞毒性与耐药性,提示了市场上动物用微生态制剂的安全性评价不足,存在使用菌株具有毒性与耐药性的现象,为进一步加强微生态制剂管理提供了参考依据。

REFERENCES

- [1] Zhang QQ, Ying GG, Pan CG, Liu YS, Zhao JL. Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China: source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance[J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(11): 6772-6782
- [2] Jeżewska-Fraćkowiak J, Seroczyńska K, Banaszczyk J, Jedrzejczak G, Żylicz-Stachula A, Skowron PM. The promises and risks of probiotic *Bacillus* species[J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2018, 65(4): 509-519
- [3] Nicholson WL, Munakata N, Horneck G, Melosh HJ, Setlow P. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, 64(3): 548-572
- [4] Du XY, Zhao K, Zhao ZM, Zhao J. Progress on *Bacillus subtilis* microbial ecological agents by fermentation[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(3): 903-914 (in Chinese)
杜晓雨, 赵恺, 赵志敏, 赵吉. 枯草芽孢杆菌微生态制剂发酵研究进展[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(3): 903-914
- [5] Mingmongkolchai S, Panbangred W. *Bacillus* probiotics: an alternative to antibiotics for livestock production[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2018, 124(6): 1334-1346
- [6] Vangoitsenhoven R, Rondas D, Crèvecoeur I, D'Hertog W, Baatsen P, Masini M, Andjelkovic M, Van Loco J, Matthys C, Mathieu C, et al. Foodborne cereulide causes beta-cell dysfunction and apoptosis[J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e104866
- [7] Granum PE, Lund T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, 157(2): 223-228
- [8] Hardy SP, Lund T, Granum PE. CytK toxin of *Bacillus cereus* forms pores in planar lipid bilayers and is cytotoxic to intestinal epithelia[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 197(1): 47-51
- [9] Zhu K, Hölzel CS, Cui YF, Mayer R, Wang Y, Dietrich R, Didier A, Bassitta R, Märtilbauer E, Ding SY. Probiotic *Bacillus cereus* strains, a potential risk for public health in China[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 718
- [10] Scientific Committee on Animal Nutrition. Assessment by the Scientific Committee on Animal Nutrition (SCAN) of a Micro-organisms Product: Esporafeed Plus[®], Directorate B-Scientific Health Opinions[R]. Brussel, Belgium: European Commission Directorate-General for Health and Food Safety, 1999
- [11] Cui YF, Liu XY, Dietrich R, Märtilbauer E, Cao J, Ding SY, Zhu K. Characterization of *Bacillus cereus* isolates from local dairy farms in China[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2016, 363(12): fnw096
- [12] Beecher DJ, Wong AC. Improved purification and characterization of hemolysin BL, a hemolytic dermonecrotic vascular permeability factor from *Bacillus cereus*[J]. *Infection and Immunity*, 1994, 62(3): 980-986
- [13] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-eight informational supplement[S]. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018
- [14] Jain C, Rodriguez-R LM, Phillippy AM, Konstantinidis KT, Aluru S. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 1-8
- [15] Gohar M, Gilois N, Graveline R, Garreau C, Sanchis V, Lereclus D. A comparative study of *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus anthracis* extracellular proteomes[J]. *Proteomics*, 2005, 5(14): 3696-3711
- [16] Cadot C, Tran SL, Vignaud ML, De Buyser ML, Kolstø AB, Brisabois A, Nguyen-Thé C, Lereclus D, Guinebretière MH, Ramarao N. InhA1, NprA, and HlyII as candidates for markers to differentiate pathogenic from nonpathogenic *Bacillus cereus* strains[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010, 48(4): 1358-1365
- [17] Weese JS, Martin H. Assessment of commercial probiotic bacterial contents and label accuracy[J]. *The Canadian Veterinary Journal*, 2011, 52(1): 43-46
- [18] Huys G, Botteldoorn N, Delvigne F, De Vuyst L, Heyndrickx M, Pot B, Dubois JJ, Daube G. Microbial characterization of probiotics: advisory report of the working group "8651 probiotics" of the Belgian superior health council (shc)[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2013, 57(8): 1479-1504
- [19] Altmeyer S, Kröger S, Vahjen W, Zentek J, Scharek-Tedin L. Impact of a probiotic *Bacillus cereus* strain on the jejunal epithelial barrier and on the NKG2D expressing immune cells during the weaning phase of piglets[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2014, 161(1/2): 57-65
- [20] Mao XD, Hu JF, Liu XM. Epidemiological characteristics of bacterial foodborne disease during the year 2003-2007 in China[J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2010, 22(3):

- 224-228 (in Chinese)
毛雪丹, 胡俊峰, 刘秀梅. 2003-2007 年中国 1060 起细菌性食源性疾病流行病学特征分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2010, 22(3): 224-228
- [21] Enosi Tuipulotu D, Mathur A, Ngo C, Man SM. *Bacillus cereus*: epidemiology, virulence factors, and host-pathogen interactions[J]. Trends in Microbiology, 2020. DOI: 10.1016/j.tim.2020.09.003
- [22] EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (feedap), Rycken G, Aquilina G, Azimonti G, Bampidis V, Bastos ML, Bories G, Chesson A, Cocconcelli PS, Flachowsky G, Gropp J, et al. Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms[J]. EFSA Journal, 2018, 16(3): e05206
- [23] Glasset B, Herbin S, Guillier L, Cadel-Six S, Vignaud ML, Grout J, Pairaud S, Michel V, Hennekinne JA, Ramarao N, et al. *Bacillus cereus*-induced food-borne outbreaks in France, 2007 to 2014: epidemiology and genetic characterisation[J]. Eurosurveillance, 2016, 21(48): 30413
- [24] Ceuppens S, Boon N, Uyttendaele M. Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2013, 84(3): 433-450
- [25] Rouzeau-Szynalski K, Stollewerk K, Messelhäuser U, Ehling-Schulz M. Why be serious about emetic *Bacillus cereus*: cereulide production and industrial challenges[J]. Food Microbiology, 2020, 85: 103279
- [26] Marxen S, Stark TD, Frenzel E, Rüttschle A, Lücking G, Pürstinger G, Pohl EE, Scherer S, Ehling-Schulz M, Hofmann T. Chemodiversity of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2015, 407(9): 2439-2453
- [27] Ohki R, Tateno K, Takizawa T, Aiso T, Murata M. Transcriptional termination control of a novel ABC transporter gene involved in antibiotic resistance in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(17): 5946-5954
- [28] Deng FR, Chen YS, Sun T, Wu YT, Su YT, Liu CY, Zhou JY, Deng YQ, Wen JK. Antimicrobial resistance, virulence characteristics and genotypes of *Bacillus* spp. from probiotic products of diverse origins[J]. Food Research International, 2021, 139: 109949