

基于 *gyrB* 基因鉴定分析污染中药的芽孢杆菌

甘永琦¹, 刘成², 朱斌¹, 樊兰艳¹, 农浚¹, 黄结¹, 零文超¹, 卢曼曼^{3*} (1. 广西壮族自治区药品检验研究院, 南宁 530021; 2. 广西医科大学药学院, 南宁 530021; 3. 广西壮族自治区农业科学院甘蔗研究所, 南宁 530004)

摘要:目的 鉴定分析污染中药的芽孢杆菌种类。方法 筛选更适用于 *gyrB* 基因扩增条件的反应体系, 并对污染中药制剂、中药材、饮片和中药提取物的芽孢杆菌进行测序, 通过对比基因序列和构建系统发育树分析污染菌的种类和同源性。结果 枯草芽孢杆菌是各类样品中最常见的污染菌, 其次为贝莱斯芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌等, 并检出条件致病菌蜡样芽孢杆菌; *gyrB* 基因对芽孢杆菌各种、亚种具有较好的分辨力, 能够有效区分同一种污染菌在不同生产企业间的菌株亲缘关系, 并呈现来源的相关性。结论 为保证中药产品的质量和安全性, 生产企业需加强从生产过程的源头控制原辅料带来的污染, 根据中药品种的特性选择适宜的灭菌工艺。

关键词: 芽孢杆菌; *gyrB* 基因; 中药; 微生物鉴定

doi: 10. 11669/cpj. 2025. 03. 006 中图分类号: R282 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2025)03-0244-06

Identification and Analysis of *Bacillus* Species Contaminating Traditional Chinese Medicine Based on *gyrB* Gene

GAN Yongqi¹, LIU Cheng², ZHU Bin¹, FAN Lanyan¹, NONG Jun¹, HUANG Jie¹, LING Wenchao¹, LU Manman^{3*} (1. Guangxi Institute for Drug Control, Nanning 530021, China; 2. School of Pharmaceutical, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 3. Sugarcane Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To identify and analyze *Bacillus* species and their characteristics contaminating traditional Chinese medicine. **METHODS** Screening for a reaction system more suitable for *gyrB* gene amplification conditions and sequencing *Bacillus* species in contaminated traditional Chinese medicine preparations, medicinal herbal, herbal pieces and extracts. Analyzing the types and homogeneity of contaminating bacteria through comparing gene sequences and constructing a phylogenetic tree. **RESULTS** The results indicate that the prevalence of *Bacillus subtilis* as the most common contaminating bacterium across various sample types, followed by *Bacillus velezensis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus licheniformis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. Additionally, pathogenic bacterium *Bacillus cereus* was also detected in this analysis. The *gyrB* gene demonstrates good discriminatory power for various *Bacillus* species and subspecies, effectively distinguishing same contaminating strains relationships among diverse production enterprises, showing relevance of sources. **CONCLUSION** To ensure the quality and safety of traditional Chinese medicine products, production enterprises must enhance control measures at the source during the production process and select appropriate sterilization processes tailored to the characteristics of traditional Chinese medicine varieties.

KEY WORDS: *Bacillus*; *gyrB* gene; traditional Chinese medicine; microbial identification

中药制剂的原料以中药饮片、提取物和有效成分或部位等为主。中药材多源于天然植物、动物和矿物等, 因其自身营养、基质等容易受到微生物污染, 而不同来源的中药材其微生物污染源不同。如根茎类药材带有土壤的微生物较多; 叶、花、果实类药材常有空气中的各类微生物。中药材及饮片在其种植、采收、加工等过程会引入微生物污染, 虽然通过净选、洗润、干燥、炮制等过程, 可降低所携带的微生物

负载量, 但在适宜的温度和湿度下, 若存放不当则会引起微生物再次生长繁殖^[1]。研究表明, 污染中药饮片的耐热菌^[2-3]和中药制剂的微生物^[4-5]均以芽孢杆菌为主。

芽孢杆菌属(*Bacillus*)多数为革兰阳性杆菌, 广泛存在于自然界, 是土壤和植物微生物的优势种群之一^[6], 可产生内生孢子, 能够抵抗生存环境中由于干燥、加热和辐射所造成的伤害, 维持自身能力不

基金项目: 广西食品药品监督管理局科研计划项目资助(桂药监科 2020-04)

作者简介: 甘永琦, 男, 硕士, 副主任药师 研究方向: 生物检验及研究 * 通讯作者: 卢曼曼, 女, 硕士, 助理研究员 研究方向: 生化与分子生物学 Tel: (0771) 3899005

受影响,导致它们对环境^[7]、药品^[8]和食品^[9]等造成污染。大部分芽孢杆菌根据《伯杰氏系统细菌学手册》测定菌种的基本特征和16S *rRNA* 基因序列进行鉴定。传统的生化试验法进行微生物鉴定耗时费力,结果易受菌株活性影响,并且对于亲缘关系密切的种群很难区分^[10]。而芽孢杆菌种间的16S *rRNA* 序列因同源性太高,通常不能准确分辨群内的各个种^[11]。研究表明,芽孢杆菌各种、亚种的 *gyrB* 基因比16S *rRNA* 有更好的区分效果^[12-13],可作为该种群鉴定的靶基因。本实验筛选了更适用于 *gyrB* 基因扩增条件的反应体系,并对污染中药制剂、中药饮片和中药提取物的芽孢杆菌进行测序,通过对比基因序列和构建系统发育树分析污染菌的种类和同源性,为药品微生物污染的风险评估和标准制定提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 样品信息

中药制剂分别来自天王补心丸33家生产企业的193批样品,冠脉宁制剂(片、胶囊)9家生产企业的119批样品,石斛夜光丸18家生产企业的146批样品,桂林西瓜霜1家生产企业的15批样品;中药饮片分别来自1家生产企业的黄芩饮片、黄连饮片和西瓜霜,共15批样品;中药提取物分别来自2家生产企业的生发片中药提取物,共3批样品。

1.2 主要试剂和仪器

胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA,德国默克密理博公司)、胰酪大豆胨液体培养基(TSB,德国默克密理博公司)、细菌基因组DNA提取试剂盒[货号DP302,天根生化科技(北京)有限公司]、2×F8 FastLong PCR Master Mix(F8,货号PC80-2,北京艾德莱生物科技有限公司)、PrimeSTAR Max DNA Polymerase [PrimeSTAR,货号R045B, TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司]、Q5 热启动超保真2×预混液[Q5,货号M0494L, NEB(北京)有限公司]、Platinu II Hot-Start Green PCR Master Mix (2×)(Platinu II,货号14001013,美国 Thermo Fisher 公司)。

琼脂糖凝胶电泳仪及成像系统(美国 Bio-Rad 公司)、聚合酶链式反应(PCR)仪(德国 Eppendorf 公司)、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS) microfls LT 型(美国布鲁克公司)、BD400 生化培养箱(德国 BINDER 公司)、AC2-

6S1 生物安全柜(新加坡 ESCO 公司)。

1.3 样本制备

从需氧菌总数检查项中,分离纯化胰酪大豆琼脂平板上生长的微生物,采用 MALDI-TOF-MS^[14] 或染色镜检的方法,对芽孢杆菌进行初步鉴定。将筛查到的芽孢杆菌转接至胰酪大豆胨液体培养基(TSB)中,于33℃培养48~72h增菌。按细菌基因组DNA提取试剂盒说明书操作提取TSB增菌液的DNA,保存至-20℃备用。

1.4 测序分析

分别使用通用引物扩增16S *rRNA* 基因^[15](引物序列27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',1492R:5'-GGTACCTTGTACGACTT-3')和 *gyrB* 基因^[16](引物序列 *gyrB*-F:5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNGGNGGNAARTTYGA-3', *gyrB*-R:5'-AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTCACR TC-NGCRTCNGTCAT-3'),并使用测序引物(引物序列 Seq-*gyrB*-F:5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCA-3', Seq-*gyrB*-R:5'-AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCC-3')对 *gyrB* 基因进行测序,委托北京乐八科技有限公司完成。从 Genbank 下载部分菌株序列,包括枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) MT119760.1、贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) CP017775.1、沙福芽孢杆菌(*Bacillus safensis*) AY167878.1、耐受盐芽孢杆菌(*Bacillus halotolerans*) MW879358.1、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) MW462193.1、短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*) MF784848.1、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) MW418529.1、副地衣芽孢杆菌(*Bacillus paralicheniformis*) MT949532.1、红豆杉尔菌(*Niallia taxi*) CP102589.1、莫哈韦芽孢杆菌(*Bacillus mojaviensis*) DQ309297.1、高地芽孢杆菌(*Bacillus altitudinis*) KJ809604.1、深褐芽孢杆菌(*Bacillus atrophaeus*) GU994861.1、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) KX346713.1、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*) EU711066.1 和解淀粉类芽孢杆菌(*Paenibacillus amylolyticus*) CP107037.1。采用 MAGE 6.0 软件进行基因序列的比对与系统进化分析,以邻位相连法(neighbor-joining)绘制系统发育树。

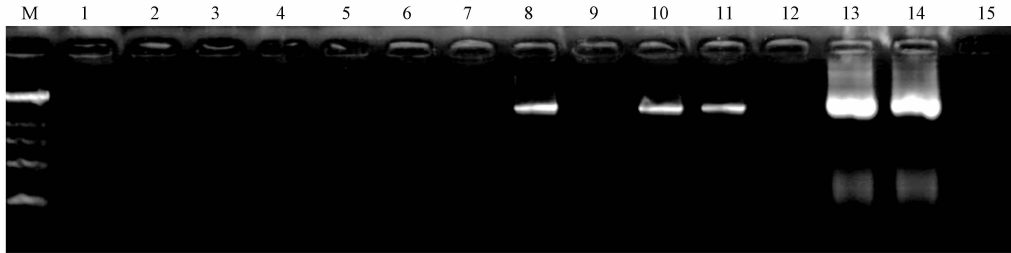
2 结果

2.1 筛选扩增 *gyrB* 基因的反应体系

考察4个不同品牌的PCR预混液扩增2株芽孢杆菌(TB1和TB2) *gyrB* 基因的效率,同时用F8预混液扩增样本TB1和TB2的16S *rRNA* 基因作为

阳性对照,以纯化水为样本进行 PCR 扩增作为阴性对照。PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果显示,采用 Platinu II 预混液对 2 个菌株的 *gyrB* 基因进行 PCR 扩增,得到微弱条带;而其他品牌的预混液,除了 Q5 预混液在扩增样本 TB1 有微弱条带外,基本没有清晰可见条带;用 F8 预混液扩增菌株 TB1 和 TB2 的 16S *rRNA* 基因,得到清晰明亮的条带(图 1)。在

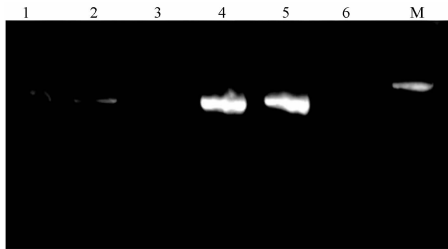
Platinu II 预混液的 25 μL 反应体系中加入 1.25 μL 的 Platinum GC Enhancer,PCR 产物条带的亮度明显提升(图 2)。实验表明,由于 *gyrB* 基因的扩增引物带有较多的兼并碱基序列,导致部分样本的 PCR 扩增难度增加,使用含 Platinum GC Enhancer 的 Platinu II 预混液可提高扩增的特异性和产量,更适用于 *gyrB* 基因的扩增条件。



M - 2 000 bp marker; 1 ~ 3 - F8 预混液的 TB1、TB2 和阴性对照; 4 ~ 6 - PrimeSTAR 预混液的 TB1、TB2 和阴性对照; 7 ~ 9 - Q5 预混液的 TB1、TB2 和阴性对照; 10 ~ 12 - Platinu II 预混液的 TB1、TB2 和阴性对照; 13 ~ 15 - F8 预混液扩增 TB1、TB2 和阴性对照的 16S *rRNA* 基因样品。
M - 2 000 bp marker; 1 - 3 - TB1, TB2 and negative control using F8 PCR master mix; 4 - 6 - TB1, TB2 and negative control using PrimeSTAR max DNA polymerase; 7 - 9 - TB1, TB2 and negative control using Q5 PCR master mix; 10 - 12 - TB1, TB2 and negative control using platinu II PCR master mix; 13 - 15 - Amplification of 16S *rRNA* genes of TB1, TB2, and negative control using F8 PCR master mix.

图 1 不同品牌聚合酶链式反应(PCR)预混液扩增 *gyrB* 基因的电泳结果

Fig. 1 Electrophoretic results of *gyrB* gene amplification using PCR premixes from different brands



M - 2 000 bp marker; 1 ~ 3 - 不含 GC 增强剂的 TB1、TB2 和阴性对照; 4 ~ 6 - 含 GC 增强剂的 TB1、TB2 和阴性对照。
M - 2 000 bp marker; 1 - 3 - TB1, TB2 and negative control without GC enhancer; 4 - 6 - TB1, TB2 and negative control containing GC enhancer.

图 2 加入 Platinum GC enhancer 扩增 *gyrB* 基因的电泳结果
Fig. 2 Electrophoretic results of adding Platinum GC Enhancer to amplify *gyrB* gene

2.2 芽孢杆菌鉴定

本次通过对目标菌的 *gyrB* 基因进行测序,在 NCBI 上比对分析不同菌株基因序列,从中药制剂、中药饮片和中药提取物中共检出 273 株芽孢杆菌,分别归属于 15 个种。其中枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*, 占比 36.3%) 的检出率最高,是各类样品中常见的污染菌;其次为贝莱斯芽孢杆菌 (*B. velezensis*, 占比 8.8%) 和巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*, 占比 8.4%);还有地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*, 占比 7.0%)、耐受盐芽孢杆菌

(*B. halotolerans*, 占比 6.6%)、莫哈韦芽孢杆菌 (*B. mojavensis*, 占比 6.6%)、短小芽孢杆菌 (*B. pumilus*, 占比 6.2%) 和解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*, 占比 5.1%) 等;此外,蜡样芽孢杆菌 (*B. cereus*) 在 3 种中药制剂中被检出(图 3)。

2.3 基因序列系统进化分析

以 *gyrB* 基因的测序引物进行双向核酸序列测定,获得的基因序列进行校核和拼接,通过测序引物定位和截齐基因序列。把序列导入 MAGE 6.0 分析软件,构建系统进化树。聚类分析结果显示,检出的 15 种芽孢杆菌均各自聚类为 1 个分支,说明其核酸序列中存在特异性单核苷酸多态性(SNP)位点,在种的水平具有较高的分辨力;聚类分析不同样本中分离得到的芽孢杆菌基因序列,*gyrB* 基因能够有效区分同一种污染菌在不同生产企业间的菌株亲缘关系,并呈现来源的相关性,提示其核酸序列在亚种水平具有一定的分辨力(图 4)。

3 讨论

微生物控制是药品质量体系中不可或缺的组成部分。芽孢杆菌是污染中药的主要微生物之一^[2-5]。16S *rRNA*、*gyrB*、*gyrA*、*rpoB* 等基因涵盖芽孢杆菌的各个种,为菌株的鉴别提供了多样化选择^[11,17]。其

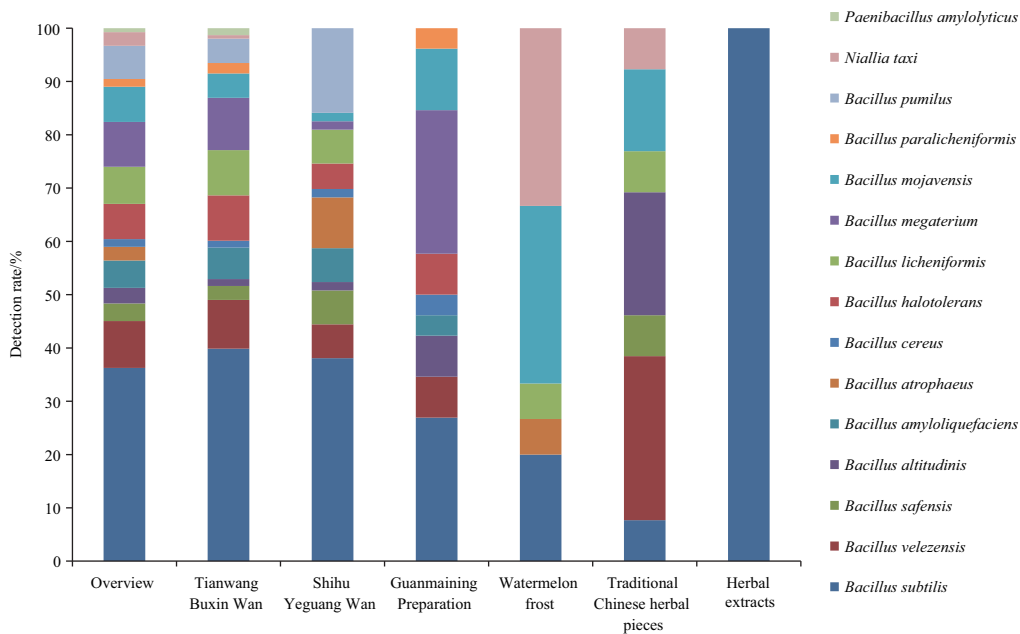
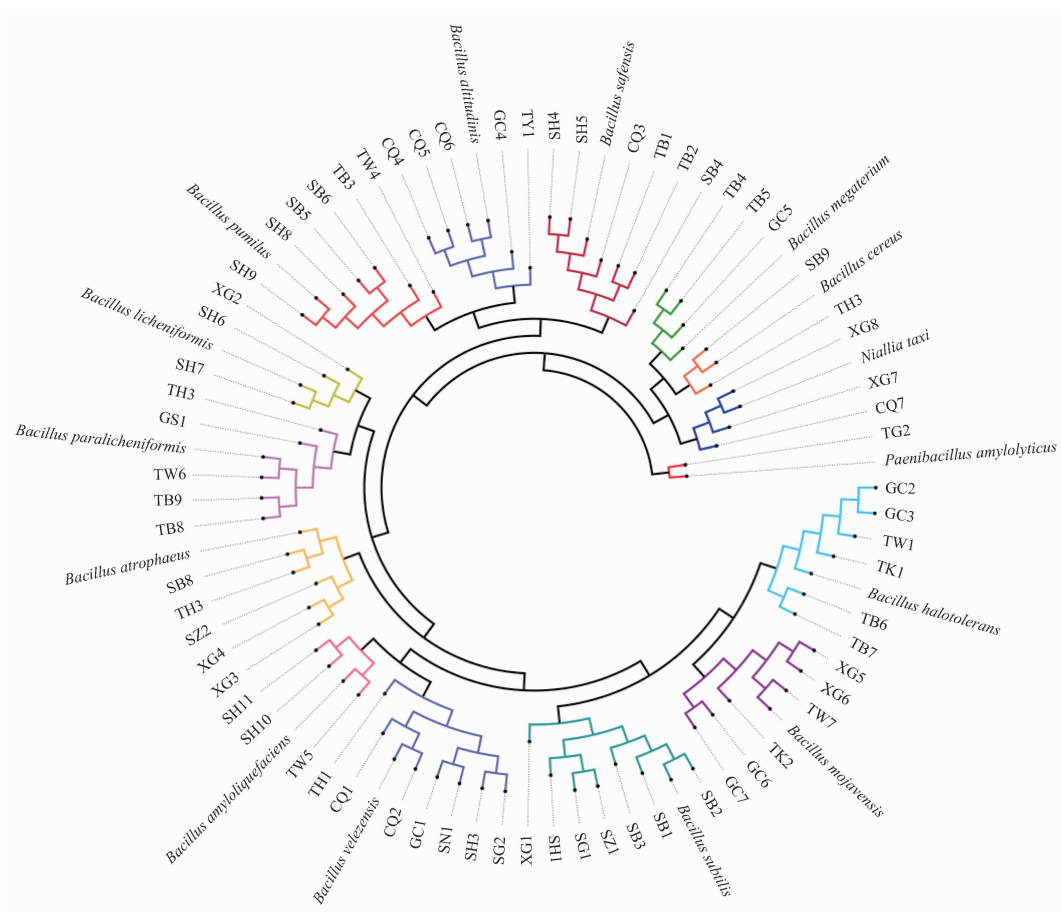


图3 污染中药的芽孢杆菌分布

Fig. 3 Distribution of *Bacillus* species contaminating traditional Chinese medicine



菌株编号中第一个字母S - 石斛夜光丸、T - 天王补心丸、G - 冠脉宁制剂、X - 西瓜霜、C - 中药饮片; 第二个字母代表生产企业简称; 数字代表不同菌株。

The first letter S in the strain number - Shihu Yeguang Wan, T - Tianwang Buxin Wan, G - Guanmaining Preparation, X - Watermelon frost, and C - Traditional Chinese herbal pieces; The second letter represents the abbreviation of the production enterprise; Numbers represent different strains of bacteria.

图4 不同菌株的 *gyrB* 基因进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic tree analysis of *gyrB* gene in different strains

中, *gyrB* 基因对芽孢杆菌各种、亚种具有较好的分辨力, 可用于鉴定芽孢杆菌不同种。本实验通过筛选适宜的反应体系或利用多基因序列进行综合分析进而避免由于 *gyrB* 基因的扩增引物带有兼并碱基序列而造成的非特异扩增, 因此, 可真实反映本实验样品中芽孢杆菌群各个分类单元的差异^[18-19]。

本实验芽孢杆菌鉴定结果表明, 枯草芽孢杆菌是各类样品中最常见的污染菌, 其次为贝莱斯芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌等, 它们广泛分布在土壤或腐败的有机物中, 对粮食安全、人体及动植物无危害, 可应用于动物饲料、净化水质、医药和植物病害的生物防治^[20-24]; 红豆杉尼尔菌最初分离于红豆杉的根部^[25-26], 在此次分析中, 桂林西瓜霜的多个批次均检出该菌且亲缘关系较近, 提示它可能为这类产品的特征污染菌; 此外, 蜡样芽孢杆菌在 3 种中药制剂中均有检出, 是环境和食品常见污染菌^[27], 该类菌可引起呕吐、腹泻和肠绞痛等为主要症状的食物中毒^[28], 其产生的致吐毒素甚至可耐受高温加热^[29]。可通过检测与致病性相关的毒素基因, 如非溶血性肠毒素的 *nhe* 基因、溶血素 BL 的 *hbl* 基因和呕吐型毒素的 *ces* 基因等^[30], 进一步关注该类菌对中药污染的潜在风险。

在药品微生物过程控制中, 企业需从源头控制原辅料带来的污染, 如严格执行净制工艺、控制产品水分活度等, 降低微生物的污染水平; 可通过比较净制、烘干等炮制工艺前后的微生物负载情况, 建立合理的生产工序。除此之外, 包装材料、设备或者环境等带入的污染也不容忽视, 每次带入的包装材料应对其进行表面消毒、生产环境也应定期进行消毒, 并定期更换消毒剂, 关注芽孢菌的消杀。虽然近 10 年来, 辐照灭菌因其效率高、效果好、低成本等优势成为中药灭菌领域的主要手段^[31], 但该灭菌工艺的广泛使用可能是造成中药制剂总体微生物负载水平低, 芽孢杆菌为主要污染菌^[5]的重要因素。建议结合辐照灭菌对药材的化学性质改变情况、产品本身芽孢杆菌污染机会以及对芽孢杆菌的清除情况等因素^[32-33]综合选择适宜的灭菌工艺, 严格控制中药产品的微生物污染水平。

REFERENCES

[1] HU C Q. Current situation and the trend in pharmaceutical microbial control system[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2021, 38(5): 513-519.
[2] GAN Y Q, NONG J, FAN L Y, et al. Analysis of microbial

community of heat resistant microorganisms in Chinese herbal pieces[J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2018, 43(11): 2274-2281.

[3] DENG H Y, GONG Y X, LI L F, et al. Research progress on microbial contamination of decoction pieces and identification of typical bacteria[J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2019, 50(9): 2242-2250, 2256.
[4] CHEN Z Y, XIA J, XI A D. Establishment of microbial limit test for Bazhen preparations and analysis of the test results[J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2016, 36(4): 739-747.
[5] FAN L Y, GAN Y Q, NONG J, et al. Microbial limit test of Qi-pi Pills and analysis of microbial contamination[J]. *Chin J Pharm*(中国医药工业杂志), 2023, 54(11): 1646-1651.
[6] MAUGHAN H, VAN DER AUWERA G. Bacillus taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading[J]. *Infect Genet Evol*, 2011, 11(5): 789-797.
[7] GAN Y Q, RUAN B, LING W C, et al. Identification and analysis of sedimentary bacteria of clean environment of production workshop in pharmaceutical manufacturers[J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2020, 40(9): 1684-1691.
[8] CEHN K, CHEN M, LIN L, et al. Analysis of microbial community characteristics in 9 kinds of Chinese herbal pieces based on 16S rRNA high throughput sequencing[J]. *Guid J Tradit Chin Med Pharm*(中医学导报), 2022, 28(9): 53-56, 61.
[9] EHLING-SCHULZ M, LERECLUS D, KOEHLER T M. The *Bacillus cereus* group: *Bacillus* species with pathogenic potential[J]. *Microbiol Spectr*, 2019, 7(3). DOI: 10.1128/microbiol-spec.gpp3-0032-2018.
[10] SHAHI S K, ZAREI K, GUSEVA N V, et al. Microbiota analysis using two-step PCR and next-generation 16S rRNA gene sequencing[J]. *J Vis Exp*, 2019(152): e59980.
[11] MOHKAM M, NEZAFAT N, BERENJIAN A, et al. Identification of *Bacillus* probiotics isolated from Soil Rhizosphere using 16S rRNA, *recA*, *rpoB* gene sequencing and RAPD-PCR[J]. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 2016(8): 8-18.
[12] ZONG K, SHENG X, YOU Z H, et al. Identification of related species of *Bacillus* by *gyrB* genes[J]. *China Port Sci Technol*(中国口岸科学技术), 2020(10): 52-57.
[13] CAO F M, YANG X H, MA M C, et al. Advances in the identification of *Bacillus subtilis* and closely related species[J]. *Microbiol China*(微生物学通报), 2014, 41(5): 968-974.
[14] GAN Y Q, NONG J, FAN L Y, et al. Analysis of bile salt tolerant microbial community based on MALDI-TOF-MS and high-throughput sequencing[J]. *Gen Appl Biol*(基因组学与应用生物学), 2020, 39(7): 3087-3092.
[15] CHELO I M, ZÉ-ZÉ L, TENREIRO R. Congruence of evolutionary relationships inside the *Leuconostoc-Oenococcus-Weissella* clade assessed by phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene, *dnaA*, *gyrB*, *rpoC* and *dnaK*[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007, 57: 276-286.
[16] YAMAMOTO S, HARAYAMA S. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61(3): 1104-1109.
[17] DE CLERCK E, VANHOUTTE T, HEBB T, et al. Isolation, characterization, and identification of bacterial contaminants in semifinal gelatin extracts[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70

- (6):3664.
- [18] 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]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(4):1483-1490.
- [19] BORRIS R, CHEN X H, RUECKERT C, *et al.* Relationship of *Bacillus amyloliquefaciens* clades associated with strains DSM 7T and FZB42 T; a proposal for *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* subsp. nov. and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* subsp. nov. based on complete genome sequence comparisons[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2011, 61: 1786-1801.
- [20] YAN Y, LIU Y J, CHEN F. An overview of the application research of *Bacillus subtilis*[J]. *Bio Teach*(生物学教学), 2019, 44(2):2-3.
- [21] CAI G L, ZHANG F, OUYANG Y X, *et al.* Research progress on *Bacillus velezensis*[J]. *North Hortic*(北方园艺), 2018(12): 162-167.
- [22] LIU L, LI L, YAN H X, *et al.* Research progress of application of *Bacillus megaterium*[J]. *J North Agric* (北方农业学报), 2016, 44(4):117-120.
- [23] HE J T, CHENG Y C, REN W Y, *et al.* Research progress in regulation of gastrointestinal microecology in ruminants by *Bacillus licheniformis* [J]. *Chin J Anim Nutr* (动物营养学报), 2023, 35(10):6188-6197.
- [24] WANG S W, WANG Q H, ZHENG C X, *et al.* Advance in the drug form, preparation and application of *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. *J Sci Teachers' Coll Univ*(高师理科学刊), 2023, 43(11):60-65.
- [25] GUPTA R S, PATEL S, SAINI N, *et al.* Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus species* clades, proposed as novel *Bacillaceae genera*, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus limiting* it only to the members of the *Subtilis* and *Cereus* clades of species[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2020, 70:5753-5798.
- [26] TUO L, LIU F, YAN X R, *et al.* *Bacillus taxi* sp. nov., a novel endophytic bacterium isolated from root of *Taxus chinensis* (Pilger) Rehd [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2020, 70(1):481-486.
- [27] YAN Z Y, TAN Y X, LININ J H, *et al.* Evaluation of the application value of metagenomic sequencing in identification and tracing of bacteria contaminating drugs[J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2024, 59(11):1041-1046.
- [28] ENOSI TUIPULOTU D, MATHUR A, NGO C, *et al.* *Bacillus cereus*: epidemiology, virulence factors, and host-pathogen interactions [J]. *Trends Microbiol*, 2020. DOI: 10.1016/j.tim.2020.09.003
- [29] WATSON D H. *Natural Toxicants in Food*[M]. London: Sheffield Academic Press, 1998; 133.
- [30] LI Y F, GUO Y, WANG J L, *et al.* Isolation, identification and virulence genes detection of *Bacillus cereus* from food and beverage provided by catering industry in Chengde[J]. *J Med Pest Control* (医学动物防制), 2023, 39(3): 253-257.
- [31] LIAO X, WANG S, CAI Y, *et al.* Knowledge graph analysis of current situation and trend in Chinese medicine sterilization[J]. *J Radiat Res Radiat Proc*(辐射研究与辐射工艺学报), 2022, 40(6):31-41.
- [32] WU M, LIN G H, HUANG M. Study on effect of ⁶⁰Co-γ radiation sterilization on effective components of Shaoshangling Tincture based on HPLC fingerprints[J]. *Food Drug* (食品与药品), 2022, 24(2): 152-158.
- [33] DING W, HE J, HUANG D P, *et al.* Study on effect of ⁶⁰Co-γ radiation sterilization on active ingredients of *Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix* based on HPLC fingerprint[J]. *Mod Chin Med* (中国现代中药), 2021, 23(6): 1029-1035.

(收稿日期:2024-05-07)