

## 调查研究

生食蔬菜模拟污染米饭样本中蜡样芽胞杆菌和呕吐毒素基因  
分布状况研究李颖<sup>1,2</sup>, 全菲<sup>1,2</sup>, 崔涓涓<sup>3</sup>, 王园园<sup>1,2</sup>, 王苗<sup>1,2</sup>, 荆红波<sup>1,2</sup>, 刘盛田<sup>1,2</sup>, 彭涛<sup>1</sup>, 逢波<sup>2,4</sup>(1. 北京市顺义区疾病预防控制中心, 北京 101300; 2. 北京市顺义区疾病预防控制中心微生物感染性疾病  
检测工作站, 北京 101300; 3. 包头医学院, 内蒙古包头 010040; 4. 中国疾病预防控制中心  
传染病预防控制所, 北京 102206)

**摘要:**目的 分析被生食蔬菜模拟污染的米饭样本中蜡样芽胞杆菌(*Bc*)和呕吐毒素基因(*ces*)的分布状况, 为 *Bc* 食物中毒科学防控提供基础数据。方法 采集生食蔬菜样本 50 件, 每件样本用 0.85% 生理盐水盥洗后污染“新煮熟米饭”, 置于 30 °C、70% RH 培养箱中放置 24 h。对生食蔬菜和“污染米饭”进行 *Bc* 的定量计数、荧光 PCR 检测和数字 PCR 检测。对基于不同采集地点、不同蔬菜类型分组的生食蔬菜样本和及其污染的“污染米饭”的各项检出率指标进行统计学分析。结果 生食蔬菜样本中 *Bc* 检出率为 80.00%(40/50), *ces* 基因和 *Bac16s RNA* 基因检出率分别为 0(0/50)和 10.00%(5/50); “污染米饭”样本 *Bc* 检出率为 94.00%(47/50), *ces* 基因和 *Bac16s RNA* 基因检出率分别为 14.00%(7/50)和 90.00%(45/50)。采集自农贸市场和农户土地的 2 组生食蔬菜中 *Bc* 检出率差异有统计学意义( $\chi^2=11.063, P=0.00088$  校正), 被上述 2 组生食蔬菜类污染的“污染米饭”*Bac16s RNA* 基因检出率和 *ces* 基因检出率差异均有统计学意义( $\chi^2=3.926, P=0.0475$  校正;  $\chi^2=5.444, P=0.0196$  校正)。7 件“污染米饭”基于荧光 PCR 检测 *ces* 基因阳性, Ct 值介于 24.12~37.73, 数字 PCR 结果介于 6.8 copes/ $\mu$ L~ $6.2 \times 10^6$  copes/ $\mu$ L。结论 被生食蔬菜模拟污染的米饭样本可具有导致 *Bc* 食物中毒风险的病原学特征。

**关键词:** 蜡样芽胞杆菌; 米饭; 生食蔬菜; 呕吐毒素

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2024)04-0440-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2024.04.012

**Distribution of *Bacillus cereus* and vomiting toxin gene in cooked rice samples which simulated contaminated by raw vegetables**LI Ying<sup>1,2</sup>, QUAN Fei<sup>1,2</sup>, CUI Juanjuan<sup>3</sup>, WANG Yuanyuan<sup>1,2</sup>, WANG Miao<sup>1,2</sup>, JING Hongbo<sup>1,2</sup>,  
LIU Shengtian<sup>1,2</sup>, PENG Tao<sup>1</sup>, PANG Bo<sup>2,4</sup>(1. Shunyi District Center for Disease Control and Prevention, Beijing 101300, China; 2. Workstation for  
Microbial Infectious Disease, Beijing 101300, China; 3. Baotou Medical College, Inner Mongolia Baotou  
010040, China; 4. National Institute for Communicable Disease Control and Prevention,  
Beijing 102206, China)

**Abstract: Objective** To analyze the distribution of *Bacillus cereus* (*B. cereus*) and vomiting toxin gene (*ces*) in cooked rice samples which simulated contaminated by raw vegetables, and provide basic data for prevention of food poisoning caused by *B. cereus*. **Methods** Fifty raw vegetable samples were collected in this study. Simulate method was as contaminated “freshly cooked rice” with 0.85% physiological saline solution from washing raw vegetables, and then place it in a 30 °C 70% RH environment for 24 h to prepare a sample of “contaminated rice”. Plate counting, real time PCR and digital PCR were performed for raw vegetable and “contaminated rice” samples. Statistical analysis was performed on the detection rates grouped by different vegetable types for raw vegetable samples and “contaminated rice” contaminated with them. **Results** The detection ratios of *B. cereus*, *ces* gene and *Bac16s RNA* gene in raw vegetables was 80.00% (40/50), 0(0/50) and 10.00% (5/50). The detection ratios of *B. cereus*, *ces* gene and *Bac16s RNA* gene in

收稿日期: 2023-08-31

基金项目: 基于病原细菌基因组的传染病网络化监测技术体系研究(2018ZX10714-002-001)

作者简介: 李颖 男 副主任技师 研究方向为食源性疾病检测 E-mail: liying19830805@126.com

通信作者: 逢波 男 研究员 研究方向为病原微生物 E-mail: pangbo@icdc.cn

“contaminated rice” was 94.00% (47/50), 14.00% (7/50) and 90.00% (45/50). There was significant difference in the detection ratio of *B. cereus* between raw vegetables collected from agricultural markets and farmland ( $\chi^2=11.063$ ,  $P=0.00088$  correction), and the difference in the detection rates of *Bac16s RNA* gene and *ces* genes in “contaminated rice” contaminated with the two groups of raw vegetables mentioned above is statistically significant ( $\chi^2=3.926$ ,  $P=0.0475$  correction;  $\chi^2=5.444$ ,  $P=0.0196$  correction). Seven “contaminated rice” were tested positive for the *ces* gene using real time PCR, with Ct values ranging from 24.12 to 37.73, and digital PCR results ranging from 6.8 copes/ $\mu$ L- $6.2 \times 10^6$  copes/ $\mu$ L.

**Conclusion** Cooked rice samples which simulated contaminated by raw vegetables might be has the etiology characteristics that lead to a risk of food poisoning caused by *B. cereus*.

**Key words:** *Bacillus cereus*; rice; raw vegetables; vomiting toxin

蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*, Bc)广泛存在于土壤、空气、水及植物源、动物源加工的食品中,是重要的食源性条件致病菌<sup>[1]</sup>。Bc可导致呕吐型、腹泻型以及呕吐腹泻混合型食物中毒<sup>[2-3]</sup>,其中呕吐型食物中毒的致病因子为呕吐毒素基因(*ces*)编码的呕吐毒素(Cereulide),呕吐型食物中毒占Bc导致食物中毒事件的80%以上<sup>[4]</sup>。呕吐型Bc食物中毒潜伏期短(0.5~3 h),症状严重,甚至有死亡病例相关报告<sup>[5]</sup>,*ces*基因是Cereulide重要的分子生物学检测靶标<sup>[6]</sup>。

呕吐型Bc食物中毒多与米、面等高淀粉主食相关<sup>[5,7-9]</sup>,此类食物中毒多因“剩米饭”被长时间放置产生Cereulide。该毒素具有高度亲脂性和极强的耐热性,在pH=2~11时稳定,在121℃下持续2 h后也不会失去活性,对胃蛋白酶和胰蛋白酶具有抵抗力,即使食物在加热烹饪中高温可杀灭Bc,Cereulide也几乎不能被食品加工手段去除或灭活<sup>[10-12]</sup>,继而导致食物中毒。Bc中毒极少有由“新煮熟米饭”导致<sup>[5]</sup>,多由“剩米饭”所导致,说明Bc污染极有可能发生在“剩米饭”的“放置”过程中,并在“放置”中发生Bc增殖并产生Cereulide。米饭可能并不是Bc最初污染源,而是为Bc增殖和Cereulide的产生提供营养环境。文献报道携带*ces*的Bc广泛分布于一些植物的根/茎中<sup>[13-14]</sup>,这提示生食蔬菜也有可能作为Bc中毒的污染来源。本研究采集50份北京市某区生食蔬菜样本,并在实验室中模拟生食蔬菜污染米饭的实验,对生食蔬菜和被生食蔬菜污染的米饭进行Bc和*ces*基因等定性和定量检测,探索被生食蔬菜污染的米饭在一定环境中放置后是否具有导致Bc中毒的风险病原学特征,为科学防控Bc食物中毒提供基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本采集

采集生食蔬菜样本50件,样本具体分布情况为:来源于北京市某区不同农贸市场和不同农户土地中样本分别为24件和26件;叶菜类(包含菠菜、

油菜、韭菜、小葱、蒜苗、茴香、乌塌菜、养心菜)和根茎类(包含萝卜和莲藕)分别为29件和21件。样本采集后保存于无菌塑封袋,4℃环境下运送至疾病预防控制中心(District Center for Disease Control and Prevention)进行实验室检测。用于开展污染实验的米饭为购买自市场的袋装生米,并在实验室中用高压锅制熟。

### 1.2 试剂和仪器

主要试剂:甘露醇卵黄多黏菌素培养基(Mannitol yolk polymyxin agar base, MYP)、胰酪大豆琼脂(Casein soya bean digest agar, TSA)为北京陆桥生物科技有限公司产品;蜡样芽胞杆菌和毒素基因(*Bac16sRNA*和*ces*)双重荧光检测试剂盒为北京卓成惠生生物科技有限公司产品;全自动核酸提取试剂盒为江苏硕世生物科技股份有限公司产品。

主要仪器:恒温恒湿培养箱(Thermo公司);全自动核酸提取仪(SSNP-9600A,硕世生物科技股份有限公司);实时荧光PCR仪(CFX96Tough,美国伯乐公司);数字PCR仪(美国伯乐公司);飞行时间质谱(Auto Flex Speed,美国布鲁克公司)。

### 1.3 检测方法

#### 1.3.1 生食蔬菜污染米饭实验

每件生食蔬菜样本均取200g左右放置于无菌均质袋中,每件生食蔬菜均用1L 0.85%生理盐水盥洗,每份盥洗液均取1mL分别污染一份100g的“新煮熟米饭”(已冷却至室温26℃)样本,置于30℃ 70% RH培养箱中放置24h。完成上述操作的样本简称“污染米饭”。

#### 1.3.2 生食蔬菜和“污染米饭”中Bc定量计数、荧光PCR检测和数字PCR检测

生食蔬菜和“污染米饭”均进行Bc的定量计数、荧光PCR检测和数字PCR检测。Bc定量计数方法参照GB 4789.14—2014平板计数法<sup>[15]</sup>,菌株鉴定使用荧光PCR方法检测分离菌株的*Bac16s RNA*基因和*ces*基因,并对分离株进行飞行时间质谱鉴定,未进行污染实验的米饭样本作为空白对照。生食蔬

菜和“污染米饭”样本的核酸提取均使用全自动核酸提取仪,生食蔬菜直接用灌洗液 200  $\mu\text{L}$  加入全自动核酸提取试剂盒提取 DNA;“污染米饭”样本搅拌均匀后取 1 g 溶解于 1 mL 0.85% 生理盐水中瞬时离心,取 200  $\mu\text{L}$  混悬液加入全自动核酸提取试剂盒提取 DNA。每份核酸样本都进行荧光 PCR 检测;全部基于荧光 PCR 检测 *ces* 基因阳性样本进行数字 PCR 检测,选择相同数量 *ces* 基因阴性样本同步开展数字 PCR 检测;未进行污染实验的米饭样本作为空白对照。荧光 PCR 和数字 PCR 的体系构建和扩增方法均参照试剂盒说明书。

#### 1.4 统计学分析

使用 Excel 2010 记录样本信息及检测结果,使用 SPSS22.0 进行统计学分析。率比较使用  $\chi^2$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 样本中 Bc、*Bac16sRNA* 基因和 *ces* 基因整体检出情况分布

本研究中共采集生食蔬菜样本 50 件,Bc 检出率为 80.00%(40/50),MYP 平板计数定量值中位数

值为  $5.0 \times 10^3$  CFU/g,MYP 平板计数均值为  $1.8 \times 10^4$  CFU/g;荧光 PCR 检测 *ces* 基因和 *Bac16s RNA* 基因检出率分别为 0(0/50)和 10.00%(5/50)。“污染米饭”样本 Bc 检出率为 94.00%(47/50),MYP 平板计数定量值中位数值为  $5.2 \times 10^6$  CFU/g,MYP 平板计数均值为  $1.1 \times 10^7$  CFU/g;荧光 PCR 检测 *ces* 基因和 *Bac16s RNA* 基因检出率分别为 14.00%(7/50)和 90.00%(45/50)。

本次采集的 50 件生食蔬菜样本按种类分成 2 组,其中叶菜类 29 件,根茎类 21 件;2 组生食蔬菜 Bc 检出率分别为 86.21% 和 71.43%,差异无统计学意义( $\chi^2=0.867, P=0.352$  校正);*Bac16s RNA* 基因检出率分别为 3.45% 和 19.05%,差异无统计学意义( $\chi^2=1.788, P=0.181$  校正);2 组生食蔬菜均未检出 *ces* 基因。被叶菜类和根茎类生食蔬菜污染的“污染米饭”的 Bc 检出率分别为 93.10% 和 95.24%,差异无统计学意义( $\chi^2=0.0838, P=0.772$  校正);*Bac16s RNA* 基因检出率为 93.10% 和 85.71%,差异无统计学意义( $\chi^2=0.146, P=0.702$  校正);*ces* 基因检出率为 17.24% 和 9.52%,差异无统计学意义( $\chi^2=0.132, P=0.716$  校正)。见表 1。

表 1 不同分组样本 Bc、*Bac16sRNA* 基因和 *ces* 基因检出率分布

Table 1 Distribution of detection rates of Bc, *Bac16sRNA* genes, and *ces* genes in samples of different groups

| 分类     | 生食蔬菜样本                           |                                     |                               | “污染米饭”样本                       |                                     |                                |
|--------|----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
|        | Bc 检出率/<br>(%, P/T)              | <i>Bac16sRNA</i> 基因检<br>出率/(%, P/T) | <i>ces</i> 基因检出<br>率/(%, P/T) | Bc 检出率/<br>(%, P/T)            | <i>Bac16sRNA</i> 基因检出率/<br>(%, P/T) | <i>ces</i> 基因检出率/<br>(%, P/T)  |
| 生食蔬菜分类 |                                  |                                     |                               |                                |                                     |                                |
| 根茎类    | 71.43(15/21)                     | 19.05(4/21)                         | 0(0/21)                       | 95.24(20/21)                   | 85.71(18/21)                        | 9.52(2/21)                     |
| 叶菜类    | 86.21(25/29)                     | 3.45(1/29)                          | 0(0/29)                       | 93.10(27/29)                   | 93.10(27/29)                        | 17.24(5/29)                    |
|        | $\chi^2=0.867, P=0.352$<br>校正    | $\chi^2=1.788, P=0.181$<br>校正       | —                             | $\chi^2=0.0838, P=0.772$<br>校正 | $\chi^2=0.146, P=0.702$<br>校正       | $\chi^2=0.132, P=0.716$<br>校正  |
| 采集地点分类 |                                  |                                     |                               |                                |                                     |                                |
| 农贸市场   | 58.33(14/24)                     | 12.50(3/24)                         | 0(0/24)                       | 87.50(21/24)                   | 79.17(19/24)                        | 0(0/24)                        |
| 农户土地   | 100.00(26/26)                    | 7.69(2/26)                          | 0(0/26)                       | 100.00(26/26)                  | 100.00(26/26)                       | 26.92(7/26)                    |
|        | $\chi^2=11.063, P=0.00088$<br>校正 | $\chi^2=0.0089, P=0.925$<br>校正      | —                             | $\chi^2=1.596, P=0.206$<br>校正  | $\chi^2=3.926, P=0.0475$<br>校正      | $\chi^2=5.444, P=0.0196$<br>校正 |

按照样本采集地点生食蔬菜分为农贸市场和农户土地 2 组,2 组生食蔬菜 Bc 检出率分别为 58.33% 和 100.00%,差异有统计学意义( $\chi^2=11.063, P=0.00088$  校正);*Bac16s RNA* 基因检出率分别为 12.50% 和 7.69%,差异无统计学意义( $\chi^2=0.0089, P=0.925$  校正);2 组生食蔬菜均未检出 *ces* 基因。被采集自农贸市场和农户土地生食蔬菜污染的“污染米饭”的 Bc 检出率分别为 87.50% 和 100.00%,差异无统计学意义( $\chi^2=1.596, P=0.206$  校正);*Bac16s RNA* 基因检出率分别为 79.17% 和 100.00%,差异有统计学意义( $\chi^2=3.926, P=0.0475$  校正);*ces* 基因检出率分别为 0 和 26.92%,差异均有统计学意义( $\chi^2=, 3.926, P=0.0475$  校正; $\chi^2=5.444, P=0.0196$  校正)。见表 1。

### 2.2 荧光 PCR 检测 *ces* 基因阳性“污染米饭”样本的数字 PCR 检测结果分布

50 件“污染米饭”样本中 7 件基于荧光 PCR 检测 *ces* 基因阳性,Ct 值介于 24.12~37.73;*ces* 基因数字 PCR 结果介于  $6.8 \sim 6.2 \times 10^6$  copies/ $\mu\text{L}$ ;上述 7 件样本 *Bac16s RNA* 基因也均为阳性,Ct 介于 16.52~20.38;*Bac16sRNA* 基因数字 PCR 结果介于  $1.1 \times 10^4 \sim 5.3 \times 10^6$  copies/ $\mu\text{L}$ ;上述 7 件样本 *ces* 和 *Bac16s RNA* 基因 Ct 值的差值介于 7.31~20.26。另选 7 件 *Bac16s RNA* 基因 Ct 值介于 16~21,但 *ces* 基因阴性的“污染米饭”同步开展数字 PCR 检测,其 *ces* 基因数字 PCR 结果介于  $3.3 \sim 6.4$  copies/ $\mu\text{L}$ ,其 *Bac16sRNA* 基因数字 PCR 结果介于  $6.0 \times 10^4 \sim 4.1 \times 10^6$  copies/ $\mu\text{L}$ 。见表 2。

表2 不同蔬菜的MYP平板计数、荧光PCR结果和数字PCR结果

Table 2 Result of MYP plate counting, qPCR and digital PCR in samples of different vegetable

| 分组 <sup>a</sup> | 样本编号 | 生食蔬菜名称 | 种类  | 生食蔬菜样本检测结果                   |                   |            | “污染米饭”检测结果                   |                   |            |                 |                              |                              |
|-----------------|------|--------|-----|------------------------------|-------------------|------------|------------------------------|-------------------|------------|-----------------|------------------------------|------------------------------|
|                 |      |        |     | MYP平板计数/(CFU/g)              | 荧光PCR(Ct值)        |            | MYP平板计数/(CFU/g)              | 荧光PCR(Ct值)        |            |                 | 数字PCR/(copies/ $\mu$ L)      |                              |
|                 |      |        |     |                              | <i>Bac16s</i> RNA | <i>ces</i> |                              | <i>Bac16s</i> RNA | <i>ces</i> | 差值 <sup>b</sup> | <i>Bac16s</i> RNA            | <i>ces</i>                   |
| ces 基因阳性组       | 32   | 萝卜     | 根茎类 | 1.0 $\times$ 10 <sup>3</sup> | —                 | —          | 7.0 $\times$ 10 <sup>6</sup> | 16.81             | 24.12      | 7.31            | 8.0 $\times$ 10 <sup>5</sup> | 6.2 $\times$ 10 <sup>4</sup> |
|                 | 31   | 蒜苗     | 叶菜类 | 1.1 $\times$ 10 <sup>5</sup> | —                 | —          | 1.1 $\times$ 10 <sup>7</sup> | 16.65             | 26.43      | 9.78            | 1.6 $\times$ 10 <sup>6</sup> | 2.0 $\times$ 10 <sup>2</sup> |
|                 | 2    | 养心菜    | 叶菜类 | 2.9 $\times$ 10 <sup>4</sup> | —                 | —          | 3.5 $\times$ 10 <sup>7</sup> | 19.12             | 33.66      | 14.54           | 3.2 $\times$ 10 <sup>5</sup> | 60                           |
|                 | 3    | 乌塌菜    | 叶菜类 | 2.0 $\times$ 10 <sup>3</sup> | —                 | —          | 4.1 $\times$ 10 <sup>7</sup> | 20.23             | 33.80      | 13.57           | 8.1 $\times$ 10 <sup>4</sup> | 33                           |
|                 | 50   | 萝卜     | 根茎类 | 4.5 $\times$ 10 <sup>4</sup> | —                 | —          | 2.3 $\times$ 10 <sup>7</sup> | 17.71             | 35.39      | 17.68           | 6.7 $\times$ 10 <sup>5</sup> | 11                           |
|                 | 47   | 养心菜    | 叶菜类 | 4.0 $\times$ 10 <sup>3</sup> | 32.7              | —          | 4.6 $\times$ 10 <sup>7</sup> | 16.52             | 36.78      | 20.26           | 5.3 $\times$ 10 <sup>6</sup> | 12                           |
| ces 基因阴性组       | 49   | 韭菜     | 叶菜类 | 1.2 $\times$ 10 <sup>4</sup> | —                 | —          | 1.9 $\times$ 10 <sup>7</sup> | 20.38             | 37.73      | 17.35           | 1.1 $\times$ 10 <sup>4</sup> | 6.8                          |
|                 | 48   | 萝卜     | 根茎类 | 1.5 $\times$ 10 <sup>3</sup> | —                 | —          | 1.6 $\times$ 10 <sup>7</sup> | 16.59             | —          | —               | 4.1 $\times$ 10 <sup>6</sup> | 4.2                          |
|                 | 29   | 菠菜     | 叶菜类 | 4.5 $\times$ 10 <sup>3</sup> | —                 | —          | 4.5 $\times$ 10 <sup>7</sup> | 16.84             | —          | —               | 7.7 $\times$ 10 <sup>5</sup> | 4.1                          |
|                 | 36   | 小葱     | 叶菜类 | 4.8 $\times$ 10 <sup>5</sup> | —                 | —          | 4.0 $\times$ 10 <sup>5</sup> | 17.62             | —          | —               | 6.1 $\times$ 10 <sup>5</sup> | 5.6                          |
|                 | 23   | 萝卜     | 根茎类 | 3.1 $\times$ 10 <sup>4</sup> | —                 | —          | 4.2 $\times$ 10 <sup>7</sup> | 18.26             | —          | —               | 4.1 $\times$ 10 <sup>5</sup> | 3.3                          |
|                 | 20   | 茴香     | 叶菜类 | 1.5 $\times$ 10 <sup>4</sup> | —                 | —          | 9.3 $\times$ 10 <sup>6</sup> | 19.47             | —          | —               | 1.5 $\times$ 10 <sup>5</sup> | 6.4                          |
|                 | 38   | 茴香     | 叶菜类 | 2.0 $\times$ 10 <sup>5</sup> | —                 | —          | 1.2 $\times$ 10 <sup>7</sup> | 20.27             | —          | —               | 1.5 $\times$ 10 <sup>5</sup> | 5.4                          |
|                 | 25   | 油菜     | 叶菜类 | 5.0 $\times$ 10 <sup>3</sup> | —                 | —          | 2.9 $\times$ 10 <sup>7</sup> | 20.23             | —          | —               | 6.0 $\times$ 10 <sup>4</sup> | 3.8                          |
| 阴性对照组           | —    | 未污染米饭1 | —   | <10                          | —                 | —          | <10                          | —                 | —          | —               | 3.8                          | 3.6                          |
|                 | —    | 未污染米饭2 | —   | <10                          | —                 | —          | <10                          | —                 | —          | —               | 4.7                          | 4.3                          |

注:<sup>a</sup>:基于荧光PCR检测 *ces* 基因阴性或阳性进行分组;<sup>b</sup>:差值指同一份样本荧光PCR检测 *ces* 基因 Ct 值-*Bac16s*RNA 基因 Ct 值

### 3 讨论

米、面等高淀粉食品被认为是导致 Bc 中毒的高风险食品,也是许多 Bc 食物中毒事件中最终溯源到的导致中毒食品,食品中 Bc 定量值 $\geq 10^5$  CFU/g 是目前此类事件判定的病原学诊断标准<sup>[15]</sup>。全菲等<sup>[16]</sup>的研究中发现生食蔬菜中广泛分布 Bc 并可检测到 *ces* 基因(基于对生食蔬菜进行特异性增菌后, Bc 检出率 84.17%, *ces* 基因检出率为 10.00%)。本研究中同样证明生食蔬菜样本中广泛分布 Bc,生食蔬菜 Bc 定量值的中位数值仅为  $5 \times 10^3$  CFU/g,但生食蔬菜污染米饭 Bc 定量值的中位数值为  $5.2 \times 10^6$  CFU/g,远超过 Bc 食物中毒事件判定的定量值;生食蔬菜和其污染米饭呕吐毒素 *ces* 基因检出率也从 0 上升至 14.00%。可见生食蔬菜污染米饭 Bc 迅速增殖,部分未达到 *ces* 基因检出限的生食蔬菜样本也在污染米饭达到了检出限以上,因此 *ces* 基因检出率提升。被生食蔬菜模拟污染的米饭样本可具有导致 Bc 食物中毒风险的病原学特征。本研究采取用生食蔬菜盥洗液污染米饭的方法,并在与北京 8、9 月(Bc 中毒高发季节<sup>[5,15]</sup>)类似温湿度条件下进行放置的方法模拟污染和增殖,此模拟过程和现实中米饭被污染的实际过程可能存在差异,这也是本研究存在的局限性。

采集自农户土地生食蔬菜中 Bc 检出率显著高于采集自农贸市场生食蔬菜,被农户土地生食蔬菜污染的“污染米饭”中 *ces* 基因检出率显著高于被农贸市场生食蔬菜污染的“污染米饭”,可见被农户土地生食蔬菜污染的“污染米饭”导致 Bc 中毒的风险更高。Bc 广泛分布在土壤中<sup>[11]</sup>,采集自农户土地中

的生食蔬菜相较农贸市场中的生食蔬菜可能更容易携带泥土或携带泥土的量更大,这可能是导致其更易携带 Bc 以及 *ces* 基因的原因。

生食蔬菜样本 Bc 检出率和 *Bac16s*RNA 基因检出率分别为 80.00%(40/50)和 10.00%(5/50),可见在 Bc 载量较低的生食蔬菜中,基于 MYP 培养法的检测敏感性高于基于 *Bac16s* RNA 基因为靶标的荧光 PCR 方法。被上述生食蔬菜污染的“污染米饭”样本中 Bc 检出率和 *Bac16s* RNA 基因检出率分别为 94.00%(47/50)和 90.00%(45/50),检出率较为接近,这也证明在 Bc 载量较高时,荧光 PCR 结果和培养法结果较为接近。生食蔬菜中 Bc 特征基因荧光 PCR 方法还有待进一步优化,提升检测敏感性。

全菲等<sup>[16]</sup>基于胰酪大豆多黏菌素肉汤对生食蔬菜增菌后进行荧光 PCR 检测发现 *ces* 基因在生食蔬菜样本中广泛分布,但 *ces*+Bc 菌株在同一份样本中的构成比远低于 *ces*-Bc 菌株<sup>[16]</sup>。本研究基于用生食蔬菜样本污染米饭后进行 *ces* 基因检测,其中 7 件携带 *ces* 基因的“污染米饭”荧光 PCR *ces* 基因 Ct 值均高于同样本 *Bac16s* RNA 基因 Ct 值(Ct 值差值介于 7.31-20.26),可见每一份样本中 *ces*+Bc 菌株构成比远低于 *ces*-Bc 菌株,与全菲等<sup>[16]</sup>的研究结果一致。说明与胰酪大豆多黏菌素肉汤类似,本研究中具有“增殖”Bc 作用的米饭可能不具备使 *ces*+Bc 菌株优势生长的作用。既往 Bc 食物中毒中曾报道在导致中毒食品增菌液中检测到 *ces* 基因<sup>[17]</sup>,并发现 *ces*+Bc 在中毒食品中并非优势构成。可见 *ces*+Bc 菌株在菌群中的“低比例构成现象”在生食蔬菜、“污染米饭”以及其他导致中毒食品中都存在。基于

Bc 平板计数 $>10^5$  CFU/g 进行 Bc 中毒事件的诊断依据可能存在一定的不科学性, *ces* 基因、Cereulide 的定性, 甚至定量检测是呕吐型 Bc 食物中毒事件判定迫切需要检测指标, 应关注其相关检测技术的开发。

本研究对使用荧光 PCR 检测 *ces+* 的 7 件“污染米饭”样本同步开展了数字 PCR 检测, 可见这些样本中每件样本的 *ces* 基因绝对定量值都远低于 *Bac16s* RNA 基因, *ces+* 定量值最高 32 号样本 *ces* 基因定量值 ( $6.2 \times 10^4$  copies/ $\mu$ L) 比 31 号样本 *ces* 基因定量值 ( $2.0 \times 10^2$  copies/ $\mu$ L) 高 2 个数量级, 但 *Bac16s* RNA 基因却是 31 号样本 ( $1.6 \times 10^6$  copies/ $\mu$ L) 大于 32 号样本 ( $8.0 \times 10^5$  copies/ $\mu$ L), Bc 平板计数也是 31 号样本 ( $1.1 \times 10^7$  CFU/g) 大于 32 号样本 ( $7.0 \times 10^6$  CFU/g)。可见无论 Bc 的平板定量计数值还是 *Bac16s* RNA 基因的绝对定量值, 与 *ces* 基因定量值可能并不具备较好的相关性。这也反映目前基于 Bc 平板计数值进行食物中毒事件判定存在较为严重的缺陷。本研究中仅获得 7 件 *ces+* 样本, 未来应进行更大样本量研究, 基于统计学分析深入研究上述检测指标之间的相关性, 深入剖析目前该病原检测方法和疾病诊断之间可能存在的问题。

综上, 被生食蔬菜模拟污染的米饭样本可具有导致 Bc 食物中毒风险的病原学特征, 应关注 *ces* 基因及 Cereulide 相关定性和定量检测技术的建立和优化, 提升 Bc 食物中毒应对能力。

## 参考文献

- [1] 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.  
BAI F L, CHEN S, LUO M Y, et al. Identification and virulence genes detection of *Bacillus cereus* food isolates[J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(10): 247-252, 204.
- [2] James M. Jay. 现代食品微生物学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2008: 486-488.  
James M. Jay. Modern food microbiology [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2008: 486-488.
- [3] 周幅萍, 袁志明. 蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)污染及其对食品安全的影响[J]. 食品科学, 2007, 28(3): 357-361.  
ZHOU G P, YUAN Z M. Review on *Bacillus cereus* contamination effects on food safety[J]. Food Science, 2007, 28(3): 357-361.
- [4] 刘成诚. 食源性蜡样芽孢杆菌风险评估及生物膜形成能力的研究[D]. 广州: 暨南大学, 2018.  
LIU C C. Study on risk assessment and biofilm-forming ability of foodborne *Bacillus cereus*[D]. Guangzhou: Jinan University, 2018.
- [5] 周幅萍, 梁天光, 丁淑娟. 1986—2007年中国299起蜡样芽孢杆菌食物中毒案例分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2009, 21(5): 450-454.  
ZHOU G P, LIANG T G, DING S J. Analysis on 299 *Bacillus cereus* food poisoning cases in 1986-2007[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2009, 21(5): 450-454.
- [6] 袁珊珊, 楼永良, 钟毓红, 等. PCR法快速鉴定眼源性蜡样芽孢杆菌[J]. 中国微生态学杂志, 2012, 24(3): 273-277, 282.  
YUAN S S, LOU Y L, ZHONG Y H, et al. PCR Assay for rapid detection of *Bacillus cereus* from eye infection [J]. Chinese Journal of Microecology, 2012, 24(3): 273-277, 282.
- [7] Berthold-Pluta A, Pluta A, Garbowska M, et al. Prevalence and toxicity characterization of *Bacillus cereus* in food products from Poland[J]. Foods, 2019, 8(7): 269.
- [8] 崔霞, 王莉莉, 刘平, 等. 蜡样芽孢杆菌呕吐毒素引发的米面制品食物中毒快速确证方法研究[J]. 卫生研究, 2023, 52(4): 573-578.  
CUI X, WANG L L, LIU P, et al. Rapid confirmation method of food poisoning caused by *Bacillus cereus* cereulide in rice and flour products[J]. Journal of Hygiene Research, 2023, 52(4): 573-578.
- [9] 吃炒饭也会食物中毒煮熟的米饭室温下不应超2小时[J]. 中国食品, 2021, 828(20): 152.  
Eating fried rice can also cause food poisoning, cooked rice should not exceed 2 hours at room temperature [J]. China Food, 2021(20): 152.
- [10] GLASSET B, HERBIN S, GUILLIER L, et al. *Bacillus cereus*-induced food-borne outbreaks in France, 2007 to 2014: epidemiology and genetic characterisation[J]. Euro Surveill, 2016, 21(48): 30413.
- [11] 种婷. 蜡样芽孢杆菌呕吐毒素 Cereulide 研究进展[J]. 现代食品, 2022, 28(10): 61-63.  
CHONG T. The emetic toxin cereulide of *Bacillus cereus* research progress[J]. Modern Food, 2022, 28(10): 61-63.
- [12] RAJKOVIC A, UYTENDAELE M, VERMEULEN A, et al. Heat resistance of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide[J]. Letters in Applied Microbiology, 2008, 46(5): 536-541.
- [13] 赵新, 兰青阔, 陈锐, 等. 生菜中蜡样芽孢杆菌污染水平风险分析[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(20): 203-210.  
ZHAO X, LAN Q K, CHEN R, et al. Analysis of contamination level of *Bacillus cereus* in fresh lettuce [J]. Food Research and Development, 2018, 39(20): 203-210.
- [14] 陆德源. 医学微生物学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 178.  
LU D Y. Medical Microbiology [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002: 178.
- [15] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 蜡样芽孢杆菌检验: GB 4789.14—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.  
National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. National Standard for Food Safety Food microbiological examination: *Bacillus cereus*: GB 4789.14—2014[S]. Beijing: China Standards Press, 2014.
- [16] 全菲, 付诗琪, 康颖, 等. 北京市某区2021年5—9月生鲜蔬菜中蜡样芽孢杆菌检出情况和耐药特征分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2024, 36(1): 15-20.  
QUAN F, FU S Q, KANG Y, et al. Contamination and drug resistance characteristics of *Bacillus cereus* isolated from raw vegetable from May to September 2021 in a district in Beijing[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2024, 36(1): 15-20.
- [17] 甄国新, 范佳欣, 袁凯丽, 等. 一起G I型诺如病毒混合感染多克隆蜡样芽孢杆菌致急性胃肠炎暴发事件实验室分析[J]. 疾病监测, 2021, 36(8): 845-850.  
ZHEN G X, FAN J X, YUAN K L, et al. Laboratory study for one gastroenteritis outbreak caused by norovirus GI and *Bacillus cereus*[J]. Disease Surveillance, 2021, 36(8): 845-850.