

椰毒假单胞菌酵米面亚种在湿米粉及其原料中的生长产毒规律及风险分析

陈荣桥, 陈汉金, 胡均鹏, 冼燕萍*, 吴玉銮, 梁明, 侯向昶, 王莉

(广州质量监督检测研究院, 广州市食品安全风险动态监测与预警研究中心, 广州市食品安全检测技术重点实验室, 广东广州 511447)

摘要: 采用在湿米粉及其原料米和米浆中分别接入不同浓度 (10^3 、 10^5 和 10^7 cfu/mL) 椰毒假单胞菌酵米面亚种 (简称“椰毒假单胞菌”), 在最佳产毒温度 ($26\text{ }^\circ\text{C}$) 和最佳生长温度 ($36\text{ }^\circ\text{C}$) 中培养并检测毒素米酵菌酸含量变化等技术, 研究分析了椰毒假单胞菌在三种食物基质中的生长产毒规律以及相关风险。结果表明: 椰毒假单胞菌产米酵菌酸的量与食物基质中椰毒假单胞菌量呈正相关, 与食物性状、含水量等有较大相关性; 相同接菌量、培养温度和时间下, 湿米粉中米酵菌酸含量高于原料米和米浆 (最高约 5000 多倍); 湿米粉和原料米分别接菌 10^5 cfu/mL、 $26\text{ }^\circ\text{C}$ 和 $36\text{ }^\circ\text{C}$ 培养, 培养 48 h 时湿米粉中米酵菌酸含量可高达 27 mg/kg, 风险较高, 原料米培养期间 (35 d) 米酵菌酸含量约在 0.7~16 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 风险较低。研究提示应从原料、生产、储运、经营和消费全链条来加强防控湿米粉被椰毒假单胞菌污染产毒。

关键词: 椰毒假单胞菌酵米面亚种; 米酵菌酸; 湿米粉; 原料米; 产毒规律

文章编号: 1673-9078(2022)05-320-327

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.5.0128

Risk Analysis of Toxin Production by *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermantans* Cultured in Wet Rice Noodle and Its Raw Materials

CHEN Rongqiao, CHEN Hanjin, HU Junpeng, XIAN Yanping*, WU Yuluan, LIANG Ming, HOU Xiangchang, WANG Li

(Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, Guangzhou City Research Center of Risk Dynamic Detection and Early Warning for Food Safety, Guangzhou City Key Laboratory of Detection Technology for Food Safety, Guangzhou 511447, China)

Abstract: To study and analyze the growth and toxin production law of *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermantans* (hereinafter referred to as “*Pseudomonas cocovenenans*”) and the associated risks in three food matrixes, different concentration (10^3 , 10^5 and 10^7 cfu/mL) *Pseudomonas cocovenenans* was added into wet rice noodle, its raw rice and rice pulp, then these foods were cultured at the best toxin production temperature ($26\text{ }^\circ\text{C}$) and the best growth temperature ($36\text{ }^\circ\text{C}$) and toxin (i.e., bongkrek acid) content changes among them were determined. The result shows that bongkrek acid production of *Pseudomonas cocovenenans* was positively correlated with the quantity of *Pseudomonas cocovenenans* in food matrix and had a great correlation with food properties and water content. Bongkrek acid production in wet rice noodle is much higher than that in its raw rice and rice pulp under the situation of same quantity of strain, cultured temperature and time (Up to about 5000 times). When the inoculation concentration in wet rice noodle was 10^5 cfu/mL and cultured at $26\text{ }^\circ\text{C}$ and $36\text{ }^\circ\text{C}$ for 48 hours,

引文格式:

陈荣桥, 陈汉金, 胡均鹏, 等. 椰毒假单胞菌酵米面亚种在湿米粉及其原料中的生长产毒规律及风险分析[J]. 现代食品科技, 2022, 38(5): 320-327

CHEN Rongqiao, CHEN Hanjin, HU Junpeng, et al. Risk analysis of toxin production by *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermantans* cultured in wet rice noodle and its raw materials [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(5): 320-327

收稿日期: 2022-02-10

基金项目: 国家市场监督管理总局技术保障专项项目 (2021YJ017)

作者简介: 陈荣桥 (1992-), 男, 硕士, 研究方向: 食品安全, E-mail: 844247943@qq.com

通讯作者: 冼燕萍 (1975-), 女, 教授级高级工程师, 硕士, 研究方向: 食品安全, E-mail: 13642613459@139.com

bongkre acid content could reach 27 mg/kg, it was high risk level, bongkre acid content in raw rice during 35 days cultured was in the range of 0.7~16 $\mu\text{g}/\text{kg}$, it was low risk level. The study suggests that the whole chain of raw materials, production, storage and transportation, management and consumption should be strengthened to prevent and control the pollution of wet rice noodle by *Pseudomonas cocovenenans*.

Key words: *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermantans*; bongkre acid; wet rice noodle; raw rice; toxin production pattern

椰毒假单胞菌为革兰氏阴性短杆菌, 易在食品表面生长, 最佳生长温度为 36 $^{\circ}\text{C}$, 最佳产毒温度为 26 $^{\circ}\text{C}$, 主要产生剧毒毒素米酵菌酸, 米酵菌酸通过作用细胞线粒体膜, 抑制线粒体中腺嘌呤核苷酸转位酶, 影响细胞正常代谢^[1-3]。米酵菌酸耐高温, 无法通过烹煮消除其毒性。人或动物误食含有米酵菌酸食物后, 米酵菌酸会快速的损害肝肾功能, 进而导致全身脏器的衰竭, 最终导致死亡^[4,5]。米酵菌酸中毒发病潜伏期一般为 30 min~12 h, 少数长达 1~2 d, 主要表现为上腹部不适、恶心、呕吐、腹泻、头痛、全身无力, 轻则腹泻、重则休克死亡, 至今尚无有效解毒药^[4], 事故死亡率很高, 某些案例死亡率高达 100%^[6]。

20 世纪 30 年代荷兰学者首次在椰子制品中分离出椰毒假单胞菌^[7], 此后非洲和我国分别在发酵玉米粉饮品和糯米面中毒事件的相关样品中分离出了椰毒假单胞菌和检出米酵菌酸^[8,9]。2018 年以前我国引起米酵菌酸中毒的食品主要有糯米面、糯米粉、吊浆粩、浸泡的木耳和银耳等^[10-14], 均为家庭自制食品。2018 年和 2020 年, 广东发生了多起因食用企业生产的湿米粉引起米酵菌酸中毒事件^[15,16], 导致多人死亡。在湿粉相关污染研究中, 发现生产湿米粉的原料米中椰毒假单胞菌的检出率为 7.7%^[17], 是主要污染源, 并建立了灵敏准确的、适用于米和湿米粉基质中痕量米酵菌酸的液相色谱串联质谱检测方法^[18], 以及研究了浸洗米工艺对椰毒假单胞菌的去除作用^[19]等。此外, 目前相关文献报道主要集中在研究毒素生物合成基因簇的进化和形成过程^[20]、市售米面制品、淀粉及其制品中椰毒假单胞菌的污染情况调研^[15]等, 缺少椰毒假单胞菌污染原料米、米浆和湿米粉后的生长与产毒规律研究, 导致从工厂防控到政府监管缺乏科学的理论指导。

因此, 本研究根据湿米粉的生产工艺, 通过在原料米、浸泡后湿米、米浆和湿米粉中接入不同浓度椰毒假单胞菌, 考察不同培养温度和时间下椰毒假单胞菌的生长与产毒规律, 并进行风险分析, 为企业和监管部门进行风险防控提供科学技术支持。

1 材料与方法

1.1 菌株

实验用 2 株菌株编号为 S12-7 和 L2-2, 从 2 个不

同产地的湿米粉原料米中分离得到^[17], 并根据 GB/T 4789.29-2003《食品卫生微生物学检验 椰毒假单胞菌酵米面亚种检验》, 经过 viteck 2 compact 和毒性试验鉴定为椰毒假单胞菌。

1.2 原料

原料米样品采自湿粉生产企业^[17], 米浆和湿米粉样品通过该原料米样品自制。

1.3 试剂与设备

马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基, 广东环凯微生物科技有限公司; 米酵菌酸标准品 (1 mg/mL), Sigma Aldrich; 甲醇和乙腈 (HPLC 级), 德国 Merck 公司; 甲酸 (HPLC 级), 德国 CNW 公司; 氨水 (分析纯), 广州化学试剂厂; MAX 固相萃取小柱 (6 mg/3 mL), Waters 公司; 超纯水 (18.2 M $\Omega\cdot\text{cm}$), 实验室 Milli-Q 自制。

生物安全柜, Thermo Scientific; 高压灭菌锅, Hirayama HVE 50; 恒温培养箱, Binder; 天平, PL6001E; 移液枪, transfeppette; ACQUITYTM 超高效液相色谱仪和 Waters XevoTM TQ MS 三重四极杆串联质谱仪, Waters 公司; FE28-Standard pH 计, METTLER TOLEDO。

1.4 实验方法

1.4.1 湿米、米浆和湿米粉的制备

模拟企业生产湿米粉工艺, 选择同一批次原料米制备浸泡后湿米、米浆和湿米粉样品。称取 1000 g 米于 2500 mL 烧杯中, 加入 1500 mL 水浸泡 1 h, 弃去浸泡液, 再用 1500 mL 水冲洗 1 次, 弃去冲洗液, 最后加入 1500 mL 水, 将米和水置于磨浆机中研磨成米浆, 混匀并调节米浆波美度至 16~16.5。获得湿米和米浆样品。由于米、湿米和米浆在高压灭菌后会发很大的性状改变, 因此采用不灭菌进行接种实验。

取适量米浆平铺于蒸煮平板, 厚度约为 2 mm, 沸腾蒸汽蒸煮 2 min 成型, 冷却后切成 1×1 cm 的湿米粉方块, 重复制备, 约制得 500 g 湿米粉样品。将湿米粉样品放置于高压灭菌锅中 121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min, 待接种实验。

1.4.2 样品接入椰毒假单胞菌与培养

分别挑取菌株 L2-2 和 S12-7 于灭菌生理盐水中涡旋震荡, 配制比浊度为 1.8~2.2 的菌悬液, 再通过梯度稀释法将菌悬液稀释成 7 个梯度。各选取三种浓度 (10^3 cfu/mL、 10^5 cfu/mL 和 10^7 cfu/mL) 的菌液进行后续接种操作。

(1) 湿米粉接种组

1) 接种试验 A: 分别称取 6 组 (编号为 A1、A2.....A6)、每组 20 份 (2 g/份) 灭菌后的湿米粉样品于 50 mL 无菌离心管中, 在 A1 和 A2 组、A3 和 A4 组、A5 和 A6 组分别接入浓度为 10^3 cfu/mL、 10^5 cfu/mL、 10^7 cfu/mL 的 L2-2 菌株悬液 200 μ L, 把 A1、A3 和 A5 组放置在 36 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中连续培养 5 d, 把 A2、A4 和 A6 组放置在 26 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中连续培养 5 d, 培养湿度为 40%~65%, 每天从每组样品中取出 4 份样品, 其中 2 份用于检测米酵菌酸含量、2 份用于菌落计数。研究不同污染水平、不同培养温度和时间下湿米粉中椰毒假单胞菌的生长和产米酵菌酸的规律。

2) 湿米粉空白对照组: 称取 2 组各 10 份 (2 g/份) 湿米粉样品, 分别加入 200 μ L 灭菌生理盐水作为空白对照组。将两组样品分别放置于 26 $^{\circ}$ C 和 36 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中连续培养 5 d, 培养湿度为 40%~65%, 每天各组取 2 份, 分别做米酵菌酸检测和菌落计数。

3) 接种试验 B: 称取 24 份 (2 g/份) 灭菌后湿米粉样品于 50 mL 无菌离心管中, 接入浓度为 10^5 cfu/mL 的 L2-2 菌株悬液 200 μ L, 放置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中连续培养 6 d, 每天取出 2 份检测米酵菌酸含量, 第 6 d 结束时将剩余样品中的 6 份放置于 26 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中连续培养 3 d, 另外 6 份样品放置于 36 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中连续培养 3 d, 培养湿度为 40%~65%, 每天各取 2 份检测米酵菌酸。研究低温冷藏、最佳生长温度和最佳产毒温度对湿米粉中椰毒假单胞菌产毒的影响。

对于菌株 S12-7, 也按照上述相同步骤进行接种实验。

(2) 米接种组

1) 接种试验 C: 分别称取 6 组 (编号为 C1、C2.....C6) 各 4 份 (2 g/份) 浸泡后湿米样品和 6 组 (编号为 C7、C8.....C12) 各 4 份 (2 g/份) 原料米样品于 50 mL 无菌离心管中, 在 C1、C2、C7 和 C8 组接入浓度为 10^3 cfu/mL 的 L2-2 菌株悬液 200 μ L, 在 C3、C4、C9 和 C10 组接入浓度为 10^5 cfu/mL 的 L2-2 菌株悬液 200 μ L、在 C5、C6、C11 和 C12 组接入浓度为 10^7 cfu/mL 的 L2-2 菌株悬液 200 μ L, 把 C1、C3、C5、C7、C9 和 C11 组放置在 36 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中连续培养 2 d, 把 C2、C4、C6、C8、C10 和 C12 组放置

在 26 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中连续培养 2 d, 培养湿度为 40%~65%, 每天从每组样品中取出 2 份样品, 检测米酵菌酸含量。研究不同污染水平、不同水分含量、不同培养温度和时间对米中椰毒假单胞菌产毒的影响。

2) 米空白对照组: 分别称取 2 组 (编号为 C13 和 C14) 各 2 份 (2 g/份) 浸泡后湿米样品和 2 组 (编号为 C15 和 C16) 各 2 份 (2 g/份) 原料米样品于 50 mL 无菌离心管中, 加入 200 μ L 灭菌生理盐水作为空白对照组, 把 C13 和 C15 组放置在 36 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中连续培养 2 d, 培养湿度为 40%~65%, 把 C14 和 C16 组放置在 26 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中连续培养 2 d, 每天各取 1 份检测米酵菌酸。

3) 接种试验 D: 称取 2 组 (编号为 D1 和 D2) 各 26 份 (2 g/份) 原料米样品于 50 mL 无菌离心管中, 接入 10^5 cfu/mL 的 L2-2 菌液 200 μ L, 把 D1 组放置在 36 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中连续培养 35 d, 把 D2 组放置在 26 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中连续培养 35 d, 培养湿度为 40%~65%, 定期各取 2 份检测米酵菌酸。考察被椰毒假单胞菌污染的原料米在长时间存放过程中米酵菌酸含量的变化规律。

对于菌株 S12-7, 也按照上述相同步骤进行接种实验。

(3) 米浆接种组

1) 接种试验 E: 分别称取 6 组 (编号为 E1、E2.....E6) 各 4 份 (2 g/份) 波美度为 16.5 的米浆样品于 50 mL 无菌离心管中, 在 E1 和 E2 组接入浓度为 10^3 cfu/mL 的 L2-2 菌株悬液 200 μ L、在 E3 和 E4 组接入浓度为 10^5 cfu/mL 的 L2-2 菌株悬液 200 μ L、在 E5 和 E6 组接入浓度为 10^7 cfu/mL 的 L2-2 菌株悬液 200 μ L, 把 E1、E3 和 E5 组放置在 36 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中连续培养 2 d, 把 E2、E4 和 E6 组放置在 26 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中连续培养 2 d, 培养环境湿度为 40%~65%, 每天各取出 2 份检测米酵菌酸。研究不同污染水平、不同培养温度和时间下米浆中椰毒假单胞菌的产毒规律。

菌株 S12-7 按以上试验方法同样处理。

2) 米浆空白对照组: 称取米浆样品 2 组各 2 份 (2 g/份) 于 50 mL 无菌离心管中, 加入 200 μ L 灭菌生理盐水作为空白对照组, 将两组样品分别放置在 26 $^{\circ}$ C 和 36 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中连续培养 2 d, 培养环境湿度为 40%~65%, 每天各组取 1 份检测米酵菌酸。

1.4.3 椰毒假单胞菌的计数实验

按照 GB 4789.2-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》对菌落总数进行计数。

1.4.4 米酵菌酸的测定

米酵菌酸测定：首先采用 100 °C 蒸汽对各培养后样品灭菌 30 min，再参考 GB 5009.189-2016《食品安全国家标准 食品中米酵菌酸的测定》进行样品前处理，采用液相色谱-质谱法对样品进行检测^[17]，方法检出限为 0.2 μg/kg。

1.4.5 样品中水分含量的测定

参考 GB 5009.3-2016《食品安全国家标准 食品中水分的测定》，称取原料米、浸泡后湿米、米浆、湿米粉各 2~10 g，采用直接干燥法测定水分，平行试验 2 次。

1.4.6 米浆 pH 值的测定

按 1.4.2 中米浆的接种浓度，配制三种接种浓度的米浆各 2 份（100 mL/份），混匀后采用 pH 计测量米浆初始 pH 值，然后，每种接种浓度各取 1 份分别放置于 26 °C 和 36 °C 培养箱中培养，测量培养 24 h 和 48 h 时米浆的 pH 值。

1.4.7 数据处理

数据图片均采用 origin 2021 进行处理。

2 结果与讨论

2.1 试样的水分含量

湿米粉水分含量为 60.1%，符合广东省食品安全地方标准 DBS44/012-2019《食品安全地方标准 湿米

粉》规定的水分含量（≤70%）要求。原料米、浸泡后湿米、米浆的水分含量分别为 11.83%、29.86% 和 68.39%。

2.2 椰毒假单胞菌在原料米和浸泡后湿米中的产毒规律

2.2.1 原料米存放过程中椰毒假单胞菌产毒规律

原料米中接入 3 种浓度椰毒假单胞菌在不同温度/时间条件下培养产生的米酵菌酸量如表 1 所示。2 株椰毒假单胞菌虽然来源于不同产地的米，但在同一条件下产生米酵菌酸的量差异不明显，产毒能力表现相似，米酵菌酸的产量均与椰毒假单胞菌的量呈正相关，接种浓度为 10⁷ cfu/mL 时，米酵菌酸含量最高，在 36 °C 和 26 °C 两种温度下米酵菌酸含量可以达到 216~865 μg/kg，是接种浓度为 10⁵ cfu/mL 时的 25~135 倍。由于米在接种前没有灭菌，米样中微生物体系复杂，可能含有与椰毒假单胞菌竞争生长或抑制椰毒假单胞菌产米酵菌酸的微生物，因此，在接种量较小时，椰毒假单胞菌可能难以成为优势菌，故米酵菌酸产量较少；当接入椰毒假单胞菌量较大时，可能较易生长成为优势菌，从而产生较多的米酵菌酸。

表 1 原料米中 3 种浓度菌株在不同温度/时间条件下产米酵菌酸量

Table 1 Bongkrek acid production of three concentration strains in rice with different temperature/time

接种浓度/(cfu/mL)	菌株 L2-2, 米酵菌酸含量/(μg/kg)				菌株 S12-7, 米酵菌酸含量/(μg/kg)			
	36 °C/24 h	36 °C/48 h	26 °C/24 h	26 °C/48 h	36 °C/24 h	36 °C/48 h	26 °C/24 h	26 °C/48 h
10 ³	0.83	1.27	0.65	1.64	0.93	1.18	1.23	3.81
10 ⁵	4.42	6.82	10.87	10.95	1.64	4.63	10.74	12.87
10 ⁷	258.16	675.68	660.12	865.46	216.62	324.16	267.42	499.72

表 2 原料米中接种 10⁵ cfu/mL 后放置 35 d 米酵菌酸含量的变化

Table 2 Changes of bongkrek acid content in rice with 10⁵ cfu/mL strain during 35 days

接种	培养温度/°C	米酵菌酸含量/(μg/kg)												
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	7 d	9 d	11 d	15 d	20 d	25 d	30 d	35 d
L2-2	36	4.41	6.82	5.76	7.27	6.12	4.88	6.32	3.28	1.45	7.19	4.95	2.77	6.53
	26	10.83	10.91	7.94	12.34	5.74	9.29	11.18	12.73	7.43	6.95	4.32	7.32	9.12
S12-7	36	1.64	4.63	7.86	2.77	6.98	4.20	5.19	2.65	7.16	5.23	0.78	5.34	2.71
	26	10.75	12.87	14.87	6.28	15.81	10.50	5.50	9.33	3.22	9.62	11.69	13.45	15.14

表 1 数据显示，在相同培养时间下，26 °C 的米酵菌酸含量高于 36 °C，这是因为椰毒假单胞菌的最佳产毒温度为 26 °C，但椰毒假单胞菌在最佳生长温度 36 °C 下也同样会产毒；在相同接种浓度和培养温度下，米酵菌酸含量均随时间呈增加趋势，因此实验进一步考察了原料米被椰毒假单胞菌污染后长时间存储

过程中米酵菌酸含量变化规律（具体实验操作见 1.4.2 的米接种实验 D）。实验结果见表 2，2 株菌株污染原料米后，在 35 d 的存储过程中产毒表现基本一致，在 2 种温度下米酵菌酸含量均低于 20 μg/kg，且随着存储时间的延长并无明显增长，这与本项目组前期在湿粉生产企业采集到的原料米中检出的米酵菌酸含量水

平基本一致^[17]。米在种植过程中可能易受环境中椰毒假单胞菌污染, 椰毒假单胞菌虽可以在米表面存活^[17], 但推测可能由于米水分含量较少, 质构致密, 且微生物体系复杂, 椰毒假单胞菌生长产毒能力可能受到抑制, 所产生的米酵菌酸处于较低风险水平。

2.2.2 椰毒假单胞菌在浸泡后湿米中的产毒规律

分别在浸泡 1 h 后湿米中接入 3 种浓度的 2 株椰毒假单胞菌, 在不同温度/时间培养下米酵菌酸检出值如表 3 所示。由表 3 可见, 2 株椰毒假单胞菌在湿米中整体产米酵菌酸的趋势与在干米中的趋势类似, 即米酵菌酸的含量与椰毒假单胞菌的量呈正相关、接种浓度为 10⁷ cfu/mL 时米酵菌酸含量最高、26 °C 时米酵

菌酸含量高于 36 °C, 但是, 椰毒假单胞菌在湿米中米酵菌酸含量比在干米中高, 接种浓度为 10⁷ cfu/mL 时米酵菌酸含量最高可达到 14 mg/kg, 这已是一个相当高风险水平。推测可能由于湿米含水量 (29.83%) 比干米含水量 (11.86%) 高, 米表面质构软化, 更利于椰毒假单胞菌生长繁殖, 这可进一步推测如果已被椰毒假单胞菌污染的原料米存放不当, 被雨淋或受潮, 就有可能为椰毒假单胞菌生长繁殖创造了一个有利的环境, 增加风险隐患, 非洲发生的玉米粉饮品米酵菌酸中毒事件也主要是由于原料玉米粉在存放过程中曾被洪水浸泡^[9]。由于湿米在 26 °C 和 36 °C 下存放 2 d 后已发生腐败, 本研究没有开展长时间放置实验。

表 3 浸泡后湿米中 3 种浓度菌株在不同温度/时间条件下产生米酵菌酸的量

Table 3 Bongkrek acid production of three concentration strains in soaked rice with different temperature/time

接种浓度/(cfu/mL)	菌株 L2-2, 米酵菌酸含量/(μg/kg)				菌株 S12-7, 米酵菌酸含量/(μg/kg)			
	36 °C/24 h	36 °C/48 h	26 °C/24 h	26 °C/48 h	36 °C/24 h	36 °C/48 h	26 °C/24 h	26 °C/48 h
10 ³	0.63	2.24	3.83	12.94	1.12	6.26	3.34	6.53
10 ⁵	11.81	12.86	12.92	68.86	2.45	7.12	23.25	46.85
10 ⁷	741.20	5065.53	2885.91	7997.23	644.96	2798.18	6641.95	14010.86

表 4 米浆中菌株 L2-2 和 S12-7 在不同温度和时间条件下产生米酵菌酸量

Table 4 Bongkrek acid production of L2-2 and S12-7 strain in rice pulp with different temperature/time

接种浓度/(cfu/mL)	菌株 L2-2, 米酵菌酸含量/(μg/kg)				菌株 S12-7, 米酵菌酸含量/(μg/kg)			
	36 °C/24 h	36 °C/48 h	26 °C/24 h	26 °C/48 h	36 °C/24 h	36 °C/48 h	26 °C/24 h	26 °C/48 h
10 ³	0.34	1.46	2.10	2.93	0.95	2.57	10.57	15.82
10 ⁵	1.22	175.78	10.94	265.88	8.93	86.73	18.61	463.66
10 ⁷	1769.24	6042.19	2235.87	8963.42	879.91	4462.92	1377.14	11862.71

2.3 椰毒假单胞菌在米浆中的产毒规律

表 5 米浆 pH 值随温度/时间的变化

Table 5 Changes of rice pulp pH with temperature/time

样品类型+ 接种浓度	初始 pH 值	24 h 后 pH 值		48 h 后 pH 值	
		26 °C	36 °C	26 °C	36 °C
纯米浆+0	6.12	5.21	4.83	5.01	4.76
纯米浆+10 ³ cfu/mL	6.13	5.14	4.89	4.97	4.80
纯米浆+10 ⁵ cfu/mL	6.13	5.26	4.94	5.07	4.82
纯米浆+10 ⁷ cfu/mL	6.12	5.19	4.86	5.03	4.70

分别在米浆中接入 3 种不同浓度的 2 株椰毒假单胞菌, 在不同温度/时间培养下米酵菌酸含量如表 4 所示。可见, 2 株椰毒假单胞菌在米浆中整体产米酵菌酸的趋势与在湿米、干米中的趋势类似, 即米酵菌酸的含量与椰毒假单胞菌的量呈正相关、接种浓度为 10⁷ cfu/mL 时米酵菌酸的含量最高、26 °C 时米酵菌酸含量高于 36 °C, 但是, 椰毒假单胞菌在米浆中米酵菌酸含量比在湿米和干米中高, 接种浓度为 10⁵ cfu/mL、培养 48 h 后米酵菌酸含量比在湿米和干米中的高一个

数量级, 接种浓度为 10⁷ cfu/mL 时米酵菌酸含量最高约为 12 mg/kg, 这已是较高风险水平。推测可能由于米浆水分含量高, 且在性状质构上比湿米和干米更适于椰毒假单胞菌生长繁殖, 导致产生更多的米酵菌酸。

本研究在不同 pH 值的培养基中接入椰毒假单胞菌进行试验, 发现培养基 pH ≤ 4.5 会抑制椰毒假单胞菌生长, 培养基 pH 3.8 时椰毒假单胞菌基本不生长, 这与赵梦馨^[21]和 Buckle 等^[22]的研究结论一致。米浆中营养物质丰富、微生物体系复杂, 在室温放置过程中, 各种微生物易大量生长繁殖产酸, 导致米浆 pH 值下降。本研究考察了接入不同浓度椰毒假单胞菌的米浆分别于 36 °C 和 26 °C 放置培养 2 d 的米浆 pH 值的变化情况, 实验结果见表 5, 可见米浆及接种后的米浆放置 2 d 后 pH 值的变化情况相似, 26 °C 时 pH 值由原来的 6.1 下降到 5.0 左右, 36 °C 时 pH 值下降略快, 2 d 后 pH 值下降到 4.7 左右, 但这个 pH 值尚未对椰毒假单胞菌生长繁殖产生很大影响。因此, 在湿米粉生产中, 应尽量阻遏原料米中可能存在的椰毒假单胞菌向下端工艺 (浸泡米和米浆等) 传递或交叉污染。

2.4 椰毒假单胞菌在湿米粉中的生长产毒规律

2.4.1 椰毒假单胞菌在湿米粉中的生长规律

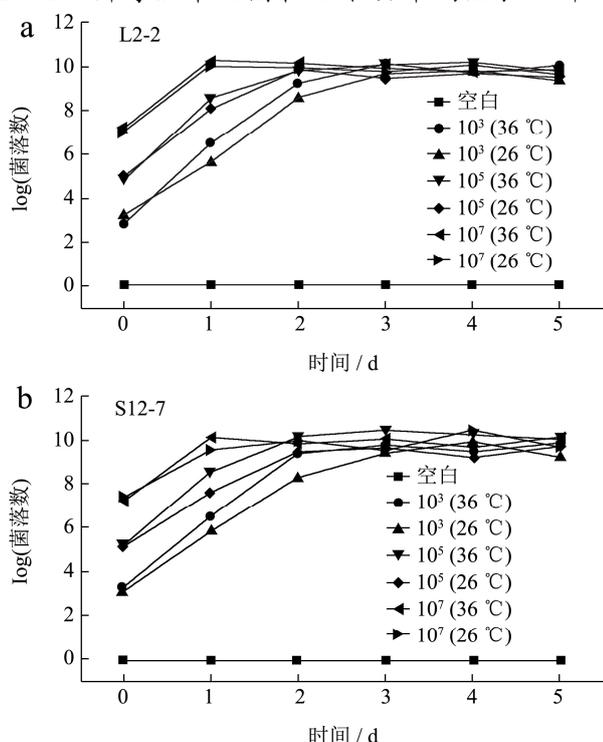


图1 菌株 L2-2 和 S12-7 的生长规律

Fig 1 The growth law of L2-2 and S12-7

椰毒假单胞菌在湿米粉基质中分别于 26 °C 和

36 °C 中培养 5 d 的生长规律如图 1 所示。可见，不同浓度的菌株 L2-2 与菌株 S12-6 在湿米粉基质中生长规律一致，均符合典型微生物的生长曲线^[23]；24 h 内，椰毒假单胞菌在 36 °C 的生长速度明显快于 26 °C；接种浓度越高，椰毒假单胞菌越快达到稳定期，接种浓度为 10⁷ cfu/mL 时，在 24 h 内就可以达到稳定状态 (10⁹ cfu/g~10¹⁰ cfu/g)。

2.4.2 椰毒假单胞菌在湿米粉中的产毒规律

分别在湿米粉中接入 3 种浓度椰毒假单胞菌，在不同温度/时间培养下米酵菌酸检出值见表 6。可见，湿米粉中米酵菌酸含量与椰毒假单胞菌的量呈正相关、与培养时间也呈正相关，26 °C 时米酵菌酸含量高于 36 °C，接种浓度为 10⁷ cfu/mL、培养 24 h 后米酵菌酸含量最高可达 30 mg/kg，远高于在米浆、湿米和干米中的含量。推测可能由于湿米粉水分含量高，表面粘性大，在性状质构上比米浆、湿米和干米更利于椰毒假单胞菌生长繁殖，导致产生更多的米酵菌酸。

《美国毒理学手册》研究表明，人体血液中米酵菌酸浓度达到 200~300 μg/L 时就可以中毒致死，一般成人的血液量相当于人体重量的 7%~8%，以 60 kg 体重计，若湿粉中含有约 30 mg/kg 米酵菌酸，则只需食用约 50 g 湿米粉就可以中毒身亡，且微生物在自然界通常表现为典型的群居特征，可能就是聚集在几克或十几克的食物范围内。因此，湿米粉被椰毒假单胞菌污染后，在较高室温下放置较长时间后存在很大的食用中毒风险。

表 6 湿米粉中菌株 L2-2 和 S12-7 产米酵菌酸量

Table 6 Bongkrek acid production of L2-2 and S12-7 strain in rice noodle

接种浓度/(cfu/mL)	菌株 L2-2, 米酵菌酸含量/(μg/kg)				菌株 S12-7, 米酵菌酸含量/(μg/kg)			
	36 °C/24 h	36 °C/48 h	26 °C/24 h	26 °C/48 h	36 °C/24 h	36 °C/48 h	26 °C/24 h	26 °C/48 h
10 ³	613.33	6739.76	800.49	8285.96	427.62	987.55	674.61	2104.65
10 ⁵	1314.81	11871.18	1745.76	26912.62	1133.55	4875.27	1264.33	4187.33
10 ⁷	5477.75	19700.91	6809.93	30553.94	7253.26	10245.78	7121.27	11372.67

表 7 湿米粉中椰毒假单胞菌 (10⁵ cfu/mL) 在温度变化过程中米酵菌酸含量变化

Table 7 Bongkrek acid production changes of *Pseudomonas cocovenenans* subsp *farinofervantans* in rice noodle with temperature

菌株	米酵菌酸含量/(μg/kg)													
	1 d/4 °C	2 d/4 °C	3 d/4 °C	4 d/4 °C	5 d/4 °C	6 d/4 °C	7 d/36 °C	7 d/26 °C	8 d/36 °C	8 d/26 °C	9 d/36 °C	9 d/26 °C		
L2-2	0	0	0	0	0	0	25.74	0.55	38276.45	18.35	54217.75	6842.65		
S12-7	0	0	0	0	0	0	17.42	1.22	8698.65	7.43	13254.45	4416.23		

有研究报道椰毒假单胞菌在 4 °C 基本不生长。本研究进一步考察了在湿米粉接种 10⁵ cfu/mL 后，置于 4 °C 冷藏 6 d 再分别转置于 26 °C 和 36 °C 培养 3 d 的米酵菌酸含量情况，结果如表 7 所示。可见，湿米粉于 4 °C 存放 6 d 中均未检出米酵菌酸 (方法检出限为 0.2 μg/kg)；将湿米粉转置于 36 °C 和 26 °C 分别放置 1 d

后，开始检出米酵菌酸，36 °C 放置 2 d (即表 7 中 8 d/36 °C) 检出米酵菌酸含量最高约为 38 mg/kg，26 °C 放置 3 d (即表 7 中 9 d /26 °C) 检出米酵菌酸含量最高约为 6.84 mg/kg。实验结果表明，在较低温度 4 °C 以下可以抑制椰毒假单胞菌生长产毒，但若离开冷藏条件放置在室温下，适宜的温度就会促进椰毒假单胞

菌生长产毒,因此建议流通和消费环节全程严格按照湿米粉产品保存条件存放,并在保质期内食用,避免存储过程污染风险。

3 结论

本研究采用在食物基质中接入椰毒假单胞菌培养的方式进行实验,结果表明:(1)椰毒假单胞菌在湿米粉中的生长规律符合微生物生长模型,在2 d内达到对数生长静止期;椰毒假单胞菌在湿米粉及其原料米、湿米、米浆中产生米酵菌酸的量与椰毒假单胞菌的量呈正相关,与培养时间和食品水分含量也呈一定的正相关,米酵菌酸产量由高到低依次为湿米粉、米浆、湿米和原料米。(2)原料米接菌 10^5 cfu/mL、26 °C和36 °C培养35 d,期间米酵菌酸含量约在0.7~16 μg/kg,表明原料米被椰毒假单胞菌污染后,在干燥通风条件下仓储过程中产生米酵菌酸的量一般较低,风险较低;当原料米浸泡后或磨成米浆后,水分含量增加,质构发生变化,这可能更有利于椰毒假单胞菌生长繁殖,产生更多米酵菌酸,增加风险隐患,故要尽量阻遏椰毒假单胞菌进一步向湿米生产的下端工艺传递和交叉污染。(3)湿米粉被椰毒假单胞菌污染后,在低温4 °C以下冷藏可以抑制椰毒假单胞菌生长,在室温或较高温度下存放时椰毒假单胞菌则会快速生长繁殖并大量产毒,存在很高风险;椰毒假单胞菌在湿米粉基质中产毒效率比在米浆、湿米和干米中的高(最高约5000多倍),这可能与湿米粉的水分含量、性状质构以及微生物菌群等因素有关。因此,湿米粉的椰毒假单胞菌污染风险防控需从原料、生产、储运、经营和消费全链条来加强管控。

参考文献

- [1] Lauquin G J M, Duplaa A M, Klein G, et al. Isobongkrekic acid, a new inhibitor of mitochondrial ADP-ATP transport: radioactive labeling and chemical and biological properties [J]. *Biochemistry*, 1976, 15(11): 2323-2327
- [2] Anwar M, Kasper, A, Steck A R, et al. Bongkrekic acid - a review of a lesser-known mitochondrial toxin [J]. *J Med Toxicol*, 2017, 13(2): 173-179
- [3] ZHOU Ershun, SUN Youpeng, FU Yiwu, et al. Bongkrekic acid induced neutrophil extracellular traps via p38, ERK, PAD4, and P2X1-mediated signaling [J]. *Toxicol Appl Pharm*, 2021, 423: 115580-115580
- [4] Shi Ruijuan. Bongkrekic acid poisoning: severe liver function damage combined with multiple organ failure caused by eating spoiled food [J]. *Legal Med*, 2019, 41: 101622
- [5] Maldonado E N, DeHart D N, Patnaik J, et al. ATP/ADP Turnover and Import of glycolytic ATP into mitochondria in cancer cells is independent of the adenine nucleotide translocator [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(37): 19642-19650
- [6] 杨桦. 试论椰毒假单胞菌引发食物中毒的成因及防治措施-以黑龙江省鸡西市“酸汤子”食物中毒事件为例[J]. *现代食品*, 2021, 16: 168-170, 175
- [7] LIU Xiumei. An overview on bongkrekic acid food poisoning [J]. *Biomed Environ Sci*, 2001, 14(1): 152-153
- [8] ZHAO Naixin, MA Maisheng, ZHANG Yupei, et al. Comparative description of *Pseudomonas cocovenenans* (van Damme, Johannes, Cox, and Berends 1960) NCIB 9450T and strains isolated from cases of food poisoning caused by consumption of fermented corn flour in China [J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1990, 40(4): 452-455
- [9] Gudo E S, Cook K, Kasper A M, et al. Description of a mass poisoning in a rural district in Mozambique: the first documented bongkrekic acid poisoning in Africa [J]. *Clin Infect Dis*, 2018, 66(9): 1400-1406
- [10] 刘志涛, 万蓉, 胡太芬, 等. 一起椰毒假单胞菌酵米面亚种引起的食物中毒调查分析[J]. *职业与健康*, 2013, 29(5): 582-583
- [11] LIU Zhitao, WAN Rong, HU Taifen, et al. Investigation on a food poisoning incident induced by *Pseudomonas cocovenenans subsp farinofermentans* [J]. *Occupation and Health*, 2013, 29(5): 582-583
- [12] 孟昭赫, 刘秀梅, 陈晓明, 等. 酵米面、银耳等食品中椰毒假单胞菌及其毒素的污染调查[J]. *卫生研究*, 1993, 2: 99-101, 127-128
- [13] MENG Zhaohe, LIU Xiumei, CHEN Xiaoming, et al. Investigation on the contamination of *Pseudomonas cocovenenans subsp. farinofermentans* and its toxin in fermented rice noodles, white fungus and other foods [J]. *Journal of Hygiene Research*, 1993, 2: 99-101, 127-128
- [14] 刘秀梅. 我国椰毒假单胞菌酵米面亚种食物中毒流行趋势浅析[J]. *中华预防医学杂志*, 1996, 6: 372-374
- [15] LIU Xiumei. Analysis on the epidemic trend of food poisoning of *Pseudomonas cocovenenans subsp farinofermentans* [J]. *Chin J Prev Med*, 1996, 6: 372-374
- [16] 王静, 刘秀梅. 椰毒假单胞菌酵米面亚种及米酵菌酸的研究进展(综述)[J]. *中国食品卫生杂志*, 1996, 2: 43-46, 49

- WANG Jing, LIU Xiumei. Research progress on *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans* and bongkreic acid (review) [J]. Chin J Food Hyg, 1996, 2: 43-46, 49
- [14] 周帼萍,梁泉,黄庭轩,等.云南省文山州广南县吊浆粳食物中毒事件的病原学分析[J].中国食品卫生杂志,2017,29(1): 71-75
ZHOU Guoping, LIANG Quan, HUANG Tingxuan, et al. Etiology analysis of an outbreak caused by fermented corn flour in Guangnan county, Wenshan city, Yunnan province [J]. Chin J Food Hyg, 2017, 29(1): 71-75
- [15] 苏嘉妮,杨丹婷,李婉珊,等.2018年广东省米面制品、淀粉及其制品中椰毒假单胞菌酵米面亚种的调查分析[J].食品安全质量检测学报,2019,10(13):4112-4118
SU Jiani, YANG Danting, LI Wanshan. Investigation and analysis of *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans* from rice flour products and starch and its products in Guangdong province in 2018 [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 10(13): 4112-4118
- [16] 王海燕,宋曼丹,王建,等.广东省首起米粉米酵菌酸中毒病原菌鉴定研究[J].中国食品卫生杂志,2019,31(4):394-398
WANG Haiyan, SONG Mandan, WANG Jian, et al. Identification of the pathogen in rice noodles in relation to food poisoning caused by bongkreic acid in Guangdong province [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2019, 31(4): 394-398
- [17] 陈荣桥,陈汉金,胡均鹏,等.米和食用淀粉中椰毒假单胞菌酵米面亚种污染调查与风险分析[J].现代食品科技,2021, 37(1):260-267
CHEN Rongqiao, CHEN Hanjin, HU Junpeng, et al. Investigation and risk analysis of *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans* from rice and edible starch [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(1): 260-267
- [18] LIANG Ming, CHEN Rongqiao, XIAN Yanping, et al. Determination of bongkreic acid and isobongkreic acid in rice noodles by HPLC-Orbitrap HRMS technology using magnetic halloysite nanotubes [J]. Food Chemistry, 2020, 344: 128682
- [19] 陈汉金,陈荣桥,朱文信,等.湿粉生产中浸洗米工艺去除椰毒假单胞菌酵米面亚种污染分析[J].现代食品科技,2021, 37(6):320-325
CHEN Hanjin, CHEN Rongqiao, ZHU Wenxin, et al. Analysis of the removal of *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans* by soaking raw rice in wet rice noodles production process [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(6): 320-325
- [20] Peng Zixin, Dottorini T, Hu Yue, et al. Comparative genomic analysis of the foodborne pathogen *Burkholderia gladioli* pv. *cocovenenans* harboring a bongkreic acid biosynthesis gene cluster [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 628538-628538
- [21] 赵梦馨.玉米面及其相关样品中唐菖蒲伯克霍尔德氏菌的检测、鉴定及序列分析研究[D].武汉:武汉轻工大学,2019
ZHAO Mengxin. Detection, identification and sequence analysis of *Burkholderia gladioli* in corn flour products and related samples [D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2019
- [22] Buckle, K A, Kartadarma E K. Inhibition of bongkreic acid and toxoflavin production in tempe bongkreik containing *Pseudomonas cocovenenans* [J]. Journal of Applied Bacteriology, 2010, 68(6): 571-576

(上接第 125 页)

- [26] Sun X, Zhou T, Wei C, et al. Antibacterial effect and mechanism of anthocyanin rich Chinese wild blueberry extract on various foodborne pathogens [J]. Food Control, 2018, 94: 155-161
- [27] Cui H, Zhang C, Li C, et al. Antimicrobial mechanism of clove oil on *Listeria monocytogenes* [J]. Food Control, 2018, 94: 140-146
- [28] Gunduz G T, Tuncel G. Biofilm formation in an ice cream plant [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2006, 89(3-4): 329-336