

唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种污染调查 及其生长与产毒特性分析

李兵^{1,2}, 叶青华^{2*}, 赵美平³, 陈维³, 黄乙卿¹, 吴清平², 张菊梅^{2*}

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 广东省科学院微生物研究所, 华南应用微生物国家重点实验室, 广东省微生物安全与健康重点实验室, 农业农村部农业微生物组学与精准应用重点实验室, 广东广州 510070)
(3. 广东省微生物分析检测中心, 广东广州 510070)

摘要: 唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病种 (*Burkholderia gladioli* pathovar *cocovenenans*, BGC) 是迄今我国发现的发病率和死亡率最高的食源性致病菌。为调查广州市市售湿米面制品、银耳及木耳中 BGC 的污染状况, 同时掌握在不同培养条件下 BGC 的生长与产毒规律, 依据 GB 4789.29-2020 对 100 份食品样品进行定性分析; 通过测定 BGC 菌株在各培养条件下菌液的 OD₆₀₀ 值和毒素含量, 分析了不同的温度、时间、pH 及 NaCl 浓度下 BGC 的生长状况与产毒能力。结果表明, 100 份食品样品中共检出 1 份 (湿木耳) BGC 阳性样品, 污染率为 1% (1/100); BGC 的生长与产毒受培养基的影响较大, 碱性 (pH 值为 9.5~10.5) 与一定渗透压 (NaCl 质量浓度为 0.02~0.04 g/mL) 环境下, BGC 在马铃薯葡萄糖水中能生长, 而在脑心浸液肉汤中几乎不生长, BGC 在马铃薯半固体琼脂中的产毒量 (231.24 μg/mL) 远大于 BHI 半固体琼脂和 LB 半固体琼脂; BGC 适宜生长和产毒的温度为 20~37 °C、适宜 pH 值为 4~8.5, 其中最适生长温度与 pH 值分别为 37 °C、6.0, 最佳产毒温度与 pH 值为 30 °C、7.0; BGC 在低温 (4~15 °C) 下仍能存活, 且有少量的毒素产生 (2.11 μg/mL); 当 NaCl 质量浓度为 0.005 g/mL 时, 产毒量从未添加前的 139.80 降至 52.27 μg/mL, 达到 0.04 g/mL 时, 产毒为 0。结果提示, 广州市市售木耳中存在 BGC 污染的风险, 在食品加工或贮存过程中添加一定浓度的 NaCl 可减少由 BGC 引起的食物中毒。

关键词: 唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种; 污染调查; 生长特性; 产毒能力

文章编号: 1673-9078(2022)10-283-289

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.10.1366

Contamination of *Burkholderia gladioli* pathovar *cocovenenans* in Retail Foods and Its Growth and Toxicity Characteristics

LI Bing^{1,2}, YE Qinghua^{2*}, ZHAO Meiping³, CHEN Wei³, HUANG Yiqing¹, WU Qingping², ZHANG Junmei^{2*}

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Safety and Health, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Institute of Microbiology Guangdong Academy of Sciences, Key Laboratory of Agricultural Microbiomics and Precision Application, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510070, China)

(3. Guangdong Detection Center of Microbiology, Guangzhou 510070, China)

Abstract: *Burkholderia gladioli* pathovar *cocovenenans* (BGC) is a food-borne pathogen with the highest morbidity and mortality found
引文格式:

李兵, 叶青华, 赵美平, 等. 唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种污染调查及其生长与产毒特性分析[J]. 现代食品科技, 2022, 38(10): 283-289

LI Bing, YE Qinghua, ZHAO Meiping, et al. Contamination of *Burkholderia gladioli* pathovar *cocovenenans* in retail foods and its growth and toxicity characteristics [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(10): 283-289

收稿日期: 2021-12-03

基金项目: 广东省重点研发计划项目 (2018B020205001); 广东省重点实验室 (2020B121201009); 广东省自然科学基金项目 (2022A1515011740); 广东省科学院创新发展专项 (2020GDASYL-20200401002)

作者简介: 李兵 (1995-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品微生物安全, E-mail: 764739204@qq.com

通讯作者: 叶青华 (1983-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 食品微生物安全与健康, E-mail: yeqinghua2002@163.com; 共同通讯作者: 张菊梅 (1968-), 女,

博士, 研究员, 研究方向: 食品微生物安全与健康, E-mail: zhangjm128@126.com

in China. Outbreaks of severe, BGC-caused food-poisoning have been reported every year in Guangdong Province from 2018 to 2020. The prevalence of BGC in commercial wet rice flour products, white tremella, and agaric in Guangzhou and growth and toxin production characteristics of the pathogen under various conditions were determined. One hundred food samples were subjected to qualitative analysis for BGC using the national food safety standard food microbiological examination (GB 4789.29-2020). By measuring the OD₆₀₀ values and the contents of toxins under different culture conditions, the growth and the toxin-producing abilities of BGC under different incubation temperatures and durations, pH values, and NaCl concentrations were evaluated. Of the 100 food samples, one sample (in agaric) tested positive for BGC. The growth and toxin production of BGC were greatly affected by the culture medium. BGC grew in potato dextrose, but hardly grew in brain heart infusion broth in an alkaline environment (pH value 9.5~10.5) and at NaCl concentrations of 0.02~0.04 g/mL. The toxin production of BGC in potato glucose semisolid agar (231.24 μg/mL) was much higher than that in BHI and LB semisolid agar (38.84 μg/mL). The growth and toxin production temperature and pH value suitable for growth of BGC were 20~37 °C and 4~8.5; optimal growth temperature and pH value were 37 °C and 6.0; and the optimal toxin production temperature and pH value were 30 °C and 7.0, respectively. BGC survived and produced toxins (2.11 μg/mL) at low temperatures (4~15 °C). The toxin production of BGC was obviously inhibited at high NaCl concentrations. When the NaCl concentration was 0.005 g/mL, the toxin production decreased from 139.80 μg/mL to 52.27 μg/mL; at 0.04 g/mL, no toxins were produced. There is a risk of BGC contamination in agaric in Guangzhou. BGC-caused food-poisoning outbreaks can be reduced by adding NaCl during food processing or storage.

Key words: *Burkholderia gladioli* pathovar *cocovenans*; contamination, growth characteristics; toxin production

唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种 (*Burkholderia gladioli* pathovar *cocovenans*, BGC), 国内又称为椰毒假单胞菌酵米面亚种、椰酵假单胞菌^[1,2], 是唐菖蒲伯克霍尔德菌 (*Burkholderia gladioli*) 中能引起严重食物中毒的致病型, 也是迄今我国发现的发病率和死亡率最高的食源性致病菌^[2,3]。该菌产生一种高度不饱和三羧酸脂肪酸即米酵菌酸 (Bongkrekic Acid) 是引起食物中毒和死亡的主要毒性代谢物^[4,5]。

米酵菌酸是一种无臭、无味、热稳定的物质^[6], 受污染的食物具有正常的外观、气味和风味, 因此, 米酵菌酸在食品制备和消费过程中很难被察觉到。由唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种引起的食物中毒在我国东北地区、广西、云南、甘肃、贵州、四川、山东^[3]、浙江^[7]、及广东等地皆有发生, 中毒食物有发酵变质的米面制品、变质银耳和长时间泡发的木耳等。以往由该菌引起的食物中毒多发生在老少边穷地区, 近年来由 BGC 引发的食物中毒事件多次出现在经济发达地区, 导致人们对它的关注度持续上升。其中, 广东省在 2018^[8]、2019^[9]和 2020^[10]年连续三年发生了因食用被污染变质的湿米粉和长时间泡发的木耳而引起米酵菌酸中毒事件。因此, 唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种及其产生的米酵菌酸已经对我国公民健康和食品安全造成严重威胁。而目前对于该菌的研究报道, 仍多限于疾病暴发与米酵菌酸的生物合成^[11,12]及其毒理^[13,14], 对其在食品中的污染状况、存活与产毒特性及机制鲜有报道。

本研究调查了 2020 年广州市市售米面、淀粉制品和木耳、银耳中唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种的

污染情况, 分析了在不同培养基、培养温度、培养时间、pH 和 NaCl 浓度下该菌的生长和产毒情况, 旨在掌握 BGC 在食品中的分布规律与生长及产毒特性, 对预防和控制食品中唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种的污染提供借鉴和参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

根据 GB 4789.1-2016^[15]中样品的采集规则进行采样。于 2020 年 8~9 月, 从广州市越秀区、荔湾区、增城区、从化区, 采集四大类食品样品共 100 份, 其中淀粉类 73 份, 面粉类 12 份, 湿木耳 9 份, 湿银耳 6 份。样品均采自当地超市或市场, 同一地点同类样品只采集一份。采样时为避免二次污染, 对于小包装规格的产品整包购买, 大包装、散装规格的产品则从最新开封的产品中取适量样品后装入无菌均质袋并密闭包装, 每份样品至少 500 g。

1.1.2 仪器和试剂

Synergy HTX 多功能微孔板检测仪, 美国伯腾仪器有限公司; MALDI-TOF MS AutoflexSpeed 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱微生物鉴定仪, 德国布鲁克公司; 生物安全柜, Thermo scientific; 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。

GVC 增菌液、马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基、改良马铃薯葡萄糖琼脂 (mPDA)、PCFA 培养基、马

铃薯葡萄糖半固体琼脂培养基、BHI、PD、LB 肉汤、玻璃纸, 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 (2 mg/mL), Waters 公司; 超纯水 (18.2 M Ω ·cm), 实验室 Milli-Q 自制。

1.1.3 标准菌株

唐菖蒲伯克霍尔德氏菌 (CICC 10574)、唐菖蒲伯克霍尔德氏菌 (ATCC 33664) 由广东省科学院微生物研究所菌种保藏中心提供。

1.2 实验方法

1.2.1 唐菖蒲伯克霍尔德菌的分离和鉴定

参照 GB 4789.29-2020 的方法稍许修改^[16], 取 25 g 米面、淀粉制品样品或 1 g 湿木耳、银耳加入到 225 mL 或 20 mL GVC 增菌液中, 37 °C 增菌培养 24~48 h 后, 分别划线接种于 mPDA 平板、PCFA 平板, 再分别挑取 5 个以上典型或可疑菌落 (低于 5 个全选), 接种于 PDA 平板, 从纯培养的 PDA 平板上挑取菌落用 MALDI-TOF MS 进行菌种鉴定。

1.2.2 产毒培养和米酵菌酸的测定

产毒培养参照 GB 4789.29-2020 的方法^[16]: 将鉴定为唐菖蒲伯克霍尔德菌的菌株接种于 PDA 平板, 37 °C 培养 24 h 后, 挑取适量菌苔于 3 mL 无菌生理盐水中, 充分涡旋, 配成 1 麦氏浓度的菌悬液 (约为 10⁸ CFU/mL), 吸取 0.5 mL 滴在铺好无菌玻璃纸的直径 150 mm 的马铃薯葡萄糖半固体平板上, 涂布均匀, 26 °C 培养 5 d。培养结束后, 取下带菌的玻璃纸, 将半固体平板置于 100 °C 流动蒸汽中灭菌 30 min, 待室温冷却后, 置于 -20 °C 冰箱过夜。过夜后将冰冻好的半固体平板于室温融化, 吸出冻融液过滤至无菌试管中 (此为毒素粗提液), 4 °C 下避光保存。

取粗提的毒素上清液 50 μ L, 使用超高效液相色谱-质谱/质谱法进行米酵菌酸测定^[12-17]。先将 20 μ L 米酵菌酸标准系列工作液注入液相色谱仪中, 测定相应的峰面积, 以标准工作液的浓度为横坐标, 以峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。再将毒素粗提液制成的试样溶液注入液相色谱仪中, 以保留时间定性, 同时记录峰面积, 根据标准曲线得到待测液中米酵菌酸浓度。

1.2.3 生长曲线的测定

选取唐菖蒲伯克霍尔德菌标准菌株 ATCC33664 和 CICC10574, 进行生长曲线的测定。菌株分别接种于 PDA 平板, 37 °C 培养 24 h, 挑取单菌落接种至 10 mL BHI, 于 37 °C, 200 r/min 培养约 24 h; 取 10 μ L

菌液转移到 10 mL BHI 液体培养基中混匀 (稀释 1 000 倍), 取 200 μ L 稀释后的菌液加到 96 孔板样品孔中 (8 个平行孔), 同时以 BHI 肉汤为空白对照, 置于多功能微孔板检测仪中进行测定。结果以培养时间为横坐标, OD₆₀₀ 值为纵坐标, 绘制生长曲线。

1.2.4 培养条件对 BGC 生长和产毒的特性分析

1.2.4.1 菌株的活化

将保存于 4 °C 菌株 ATCC33664 接种于 PDA 平板, 37 °C 培养 24 h, 挑取单菌落接种于 BHI 肉汤中, 于 37 °C, 200 r/min, 培养至对数期后待用。

1.2.4.2 培养基对 BGC 生长和产毒的分析

取 10 μ L 培养至对数期的菌液分别接种至 10 mL PD、BHI、LB 液体培养基, 37 °C 培养 48 h, 培养结束后测定菌液的 OD₆₀₀ 值。同时, 将培养至对数期的菌液配成 1 麦氏浓度的菌悬液分别涂布到铺有玻璃纸的 PD 半固体平板、BHI 半固体平板与 LB 半固体平板上, 26 °C 培养 5 d, 培养结束后进行米酵菌酸的含量测定。

1.2.4.3 培养时间对 BGC 产毒的分析

将培养至对数期的菌液配成 1 麦氏浓度的菌悬液在铺有玻璃纸的马铃薯葡萄糖半固体平板上涂布均匀后, 26 °C 培养 1、2、3、4、5、6、7、10、15 d, 培养结束后进行米酵菌酸的含量测定。

1.2.4.4 温度对 BGC 生长和产毒的分析

取 10 μ L 培养至对数期的菌液接种于 10 mL BHI 液体培养基, 4、15、20、25、30、37、42 °C 培养 48 h, 培养结束后测定各温度下菌液的 OD₆₀₀ 值。同时, 将配成 1 麦氏浓度的菌悬液涂布于铺有玻璃纸的马铃薯葡萄糖半固体平板, 4、15、20、25、30、37、42 °C 培养 5 d, 培养结束后进行米酵菌酸的含量测定。

1.2.4.5 pH 对 BGC 生长和产毒的分析

将 BHI 与 PD 液体培养基及马铃薯葡萄糖半固体培养基 pH 值分别调至 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、11.0, 取 10 μ L 培养至对数期的菌液分别接种于 BHI 与 PD 液体培养基, 37 °C 培养 48 h, 培养结束后测定各 pH 值下菌液的 OD₆₀₀ 值。同时, 将配成 1 麦氏浓度的菌悬液分别涂布于铺有玻璃纸调好 pH 的马铃薯葡萄糖半固体平板, 26 °C 培养 5 d, 培养结束后进行米酵菌酸的含量测定。

1.2.4.6 NaCl 浓度对 BGC 生长和产毒的分析

在 BHI 与 PD 液体培养基及马铃薯葡萄糖半固体培养基中分别添加质量浓度为 0、0.005、0.01、0.015、0.02、0.025、0.03、0.035、0.04、0.05、0.06 g/mL 的 NaCl 的溶液, 取 10 μ L 培养至对数期的菌液分别接种

于 10 mL BHI 与 PD 液体培养基, 37 °C 培养 48 h, 培养结束后测定各 NaCl 浓度下菌液的 OD₆₀₀ 值。同时, 将配成 1 麦氏浓度的菌悬液涂布于铺有玻璃纸添加 NaCl 的马铃薯葡萄糖半固体平板, 26 °C 培养 5 d, 培养结束后进行米酵菌酸的含量测定。

1.2.5 数据处理

每个试验重复 3 次, 通过 IBS SPSS 24.0 软件进行数据分析, 并用 Duncan 检验比较组间差异, 采用 Excel 2010、Origin 2019 软件制作作图。

2 结果与讨论

2.1 BGC 的污染调查

从 100 份样品中共检出 4 份唐菖蒲伯克霍尔德菌阳性样品, 阳性率为 4%, 按照食品类型分析 (表 1), 木耳^[18]、银耳及淀粉类样品的检出率分别为 20%、14.29%、1.33%, 面粉类样品则无检出。4 份阳性样本共分离出 12 株唐菖蒲伯克霍尔德菌, 经产毒培养与毒素测定, 1 株 (S6, 分离自木耳) 米酵菌酸含量为 14.9 μg/mL, 其它菌株的含量均 < 0.005 μg/mL。需要

注意的是, 两株唐菖蒲伯克霍尔德菌标准株中, CICC10574 的含量 < 0.005 μg/mL, 而 ATCC33664 的米酵菌酸含量为 131 μg/mL, 且生长稳定、产毒量大, 适合作为后续试验的标准株使用。

2018 年广东省首次因食用河粉引起米酵菌酸中毒事件, 同年苏嘉妮等^[19]调查分析了广东省 1570 份米面制品、淀粉及其制品中 BGC 的污染情况, 检出率为 0.06% (1/1570)。陈荣桥等^[20,21]调查我国南方部分省份食品工业中常用的米和食用淀粉中 BGC 污染情况, 检出率为 3.1% (4/129), 4 份阳性样本全部来自于进口碎米; 并利用全基因组重测序与单核苷酸多态性分析菌株的同源关系, 表明原料米中 BGC 的基因组序列与产地溯源具有较大相关性, 在湿粉生产加工过程中存在 BGC 污染传递的风险。近年来我国暴发了多起因食用泡发 2~3 d 的干木耳引起米酵菌酸中毒事件, 并有多例重症和死亡病例^[22]。黑木耳是我国栽培产量第二大的食用菌品种^[23], 随机抽查的木耳中检出唐菖蒲伯克霍尔德菌和 BGC, 表明木耳中存在较高的被唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种污染的风险。

表 1 按照食品类型分类的 BGC 阳性样本分布

Table 1 Distribution of BGC positive samples classified by food type

样品类别	样品数量	唐菖蒲伯克霍尔德菌		BGC	
		阳性样本数/%	分离菌株数/株	阳性样本数/%	分离菌株数/株
淀粉类	73	1(1.37)	2	0(0)	0
面粉类	12	0(0)	0	0(0)	0
湿木耳	9	2(22.22)	7	1(11.11)	1
湿银耳	6	1(16.67)	3	0(0)	0
总计	100	4(4)	12	1(1)	1

2.2 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌的生长曲线

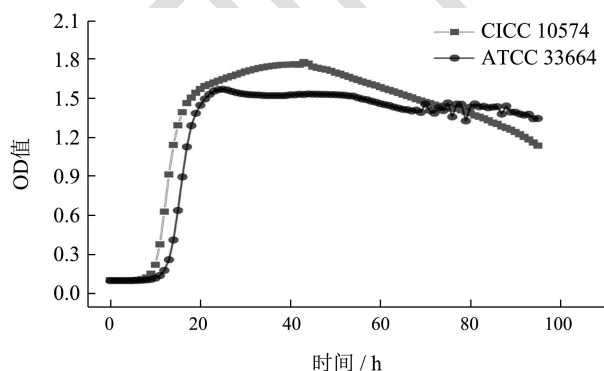


图 1 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌的生长曲线

Fig.1 The growth curve of *Burkholderia gladiolus*

如图 1 所示, 产毒株 ATCC33664 和不产毒株 CICC10574 在培养 0~10 h 内均处于延迟期, 生长缓慢, 在培养约 10 h 后先后进入对数生长期, 并持续到

约

20 h, 20~50 h 时进入稳定期, 50 h 后进入衰亡期。产毒株与不产毒株的唐菖蒲伯克霍尔德氏菌在生长趋势上无明显区别。

2.3 培养条件对 BGC 生长和产毒的特性分析

2.3.1 不同培养基对 BGC 生长和产毒的影响

如图 2, BGC 在 BHI、PD 和 LB 中均生长良好, 且在 BHI 中生长最好, 其次为 LB、PD 水; 产毒培养中, 培养于 PD 半固体琼脂 (马铃薯半固体琼脂) 的菌株产毒量 (231.24 μg/mL) 明显大于 BHI 半固体琼脂 (55.85 μg/mL) 和 LB 半固体琼脂 (38.84 μg/mL), 说明马铃薯半固体琼脂更适宜椰毒假单胞菌酵米面亚种的产毒。间接证实了 BGC 主要污染的食品类型为富含多糖、淀粉类的发酵米面制品、银耳、木耳等。

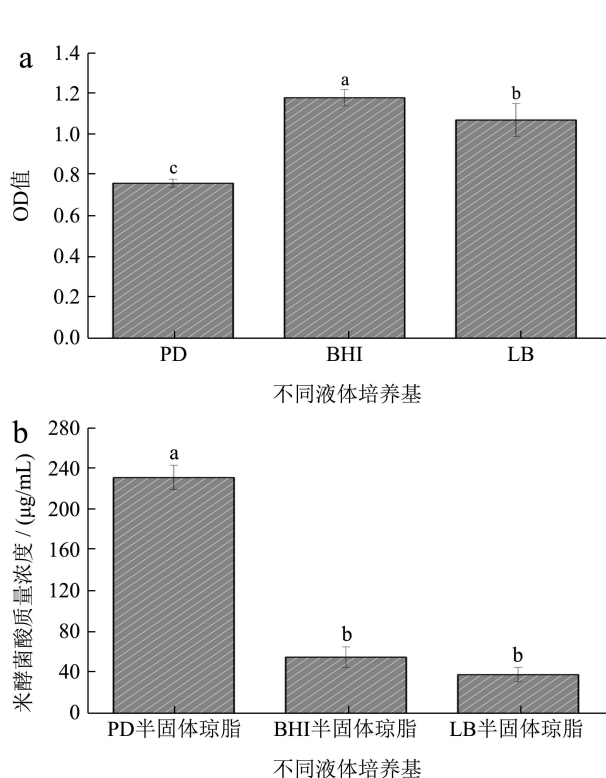


图2 BGC (ATCC 33664) 在不同培养基中的生长与产毒情况
Fig.2 Growth and toxin production of BGC (ATCC 33664) in different media

注: a: 不同培养基中的生长情况; b: 不同培养基中的产毒情况。

2.3.2 培养时间对 BGC 产毒的影响

如图3所示,前3d仅有微量的米酵菌酸的生成(0.56~1.84 µg/mL),从第4d开始,米酵菌酸大量产生(40.63 µg/mL),并在第5d达到最高值(606.9 µg/mL);继续进行产毒培养,6~15d米酵菌酸的含量仍然处于高含量范围(435.19~515.86 µg/mL),无明显下降趋势,且在第15d时,半固体培养基表面仍有少量淡黄绿色菌苔生长。提示消费者们,为最大限度降低或消除风险隐患,不可食用长时间泡发的米面制品、银耳木耳等。

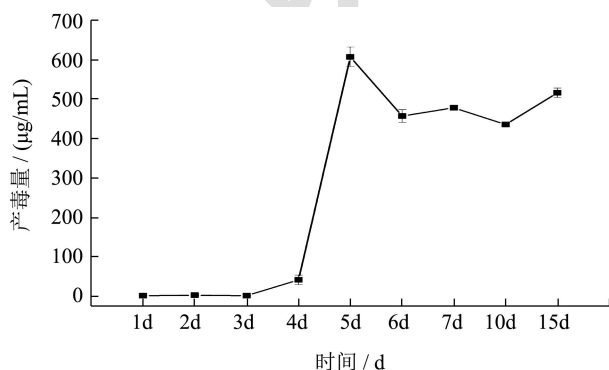


图3 BGC (ATCC 33664) 在不同培养时间下的产毒情况
Fig.3 Toxin production of BGC (ATCC 33664) under different

culture time

2.3.3 温度对 BGC 生长和产毒的影响

由图4a可以看出,在4、15℃培养2d, BGC的OD₆₀₀值增长缓慢;20~37℃温度下,随着温度的升高该菌的OD₆₀₀值逐渐增大,在37℃时增至最大;在温度达到42℃时,该菌的OD₆₀₀值趋近于0,说明该菌的适宜生长温度为20~37℃,最适生长温度为37℃,低于15℃或高于42℃条件下,生长缓慢或几乎不生长。

由图4b可以看出, BGC在4℃下不产米酵菌酸(<0.005)、15℃下产生米酵菌酸的含量较低(2.11 µg/mL);20~30℃范围内,随着温度的升高,产毒量逐渐增大(23.03~1225.17 µg/mL);随着温度的进一步提升,产毒量逐渐下降,37℃下该菌的产毒量仍然维持在较高的状态(528.3 µg/mL),直至42℃,仅极微量米酵菌酸产生(0.28 µg/mL);说明该菌的适宜产毒温度在20~37℃,最适产毒温度为30℃,低于15℃或高于42℃条件下,产毒量较少或几乎不产毒。BGC在低温环境下(4~15℃)仍然存活,且产生少量的米酵菌酸,需引起消费者的注意。

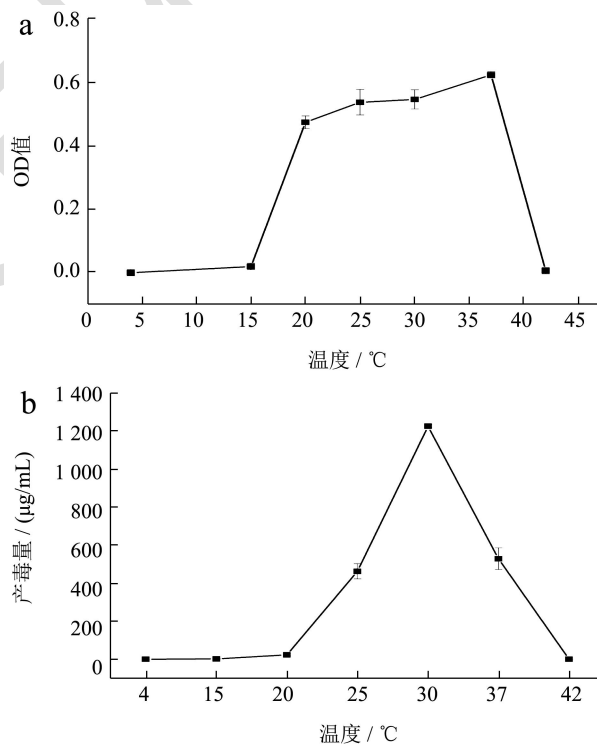


图4 BGC (ATCC 33664) 在不同培养温度下的生长与产毒情况
Fig.4 Growth and toxin production of BGC (ATCC 33664) under different culture temperatures

注: a: 不同温度下的生长情况; b: 不同温度下的产毒情况。

2.3.4 pH 对 BGC 生长和产毒的影响

由图5a可以看出, pH值在1.0~3.5和9.0~10.5时, BGC在BHI中的生长受到了明显的抑制, OD₆₀₀值几乎接近于0,而在PD水中 BGC在pH值为

9.0~10.5 的条件下仍能较好生长,说明 BGC 在碱性环境下(9.0~10.5)的生长受培养基的影响较大;pH 值在 4.0~8.5 时,BGC 在 BHI 与 PD 中均生长良好;当 pH 值为 11.0 时,BGC 在 BHI 与 PD 水中的 OD₆₀₀ 值均趋于 0。

BGC 在不同 pH 值的马铃薯葡萄糖半固体琼脂上的产毒情况与在 PD 水中的生长趋势一致,如图 5b 所示,在 pH 值 ≤ 3.5 时,BGC 几乎不产毒(0.004 $\mu\text{g/mL}$);当 pH 值在 4.0~7.0 时,随着 pH 值的升高,产毒量迅速上升(36.98~425.61 $\mu\text{g/mL}$),并在 pH 值为 7.0 时达到最大值(425.61 $\mu\text{g/mL}$);继续增大 pH 值至 10.0 时,该菌的产毒量仍然处于较高水平(227.81~348.5 $\mu\text{g/mL}$),当 pH 值为 11 时,BGC 几乎不生长,产毒量也下降趋至 0。

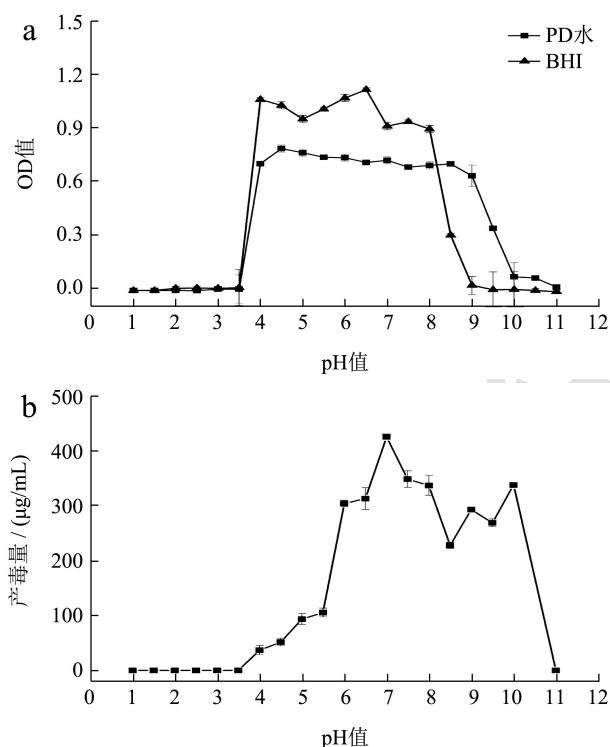


图 5 BGC (ATCC 33664) 在不同 pH 值下的生长与产毒情况
Fig.5 Growth and toxin production of BGC (ATCC 33664) under different pH

注: a: 不同 pH 值下的生长情况; b: 不同 pH 值下的产毒情况。

2.3.5 NaCl 浓度对 BGC 生长和产毒的影响

由图 6a 可以看出,在 BHI 和 PD 水中添加 0~0.02 g/mL 质量浓度的 NaCl 时,随着 NaCl 的增加,OD₆₀₀ 值均逐渐降低;当 NaCl 质量浓度 ≥ 0.02 g/mL 时,在 BHI 中的 OD₆₀₀ 值开始趋于 0,而在 PD 水中 NaCl 质量浓度为 0.02~0.04 g/mL 时,该菌仍然生长较好,直到质量浓度 ≥ 0.04 g/mL 时,才趋于 0。在产毒方面,NaCl 的添加严重抑制 BGC 的产毒:当 NaCl

质量浓度 ≤ 0.035 g/mL 时,该菌仍然有一定的产毒量(52.27~37.44 $\mu\text{g/mL}$),直到 0.04 g/mL 时,才趋于 0。

唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种是一种发病率和死亡率极高的食源性致病菌,易对米面发酵品、变质银耳、长时间泡发的木耳及薯类制品等造成污染。因此开展食品中唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种的污染调查工作,是保障食品安全与公共卫生的重要措施之一。本研究针对广东地区居民饮食中常见的湿淀粉类与湿面制品、湿木耳与银耳进行 BGC 分离鉴定。结果显示,从 100 份样品中检出 4 份唐菖蒲伯克霍尔德菌阳性样品,总检出率为 4% (4/100),检出 1 份 BGC 阳性样品(产毒量为 14.9 $\mu\text{g/mL}$),总检出率为 1% (1/100),其中湿木耳的检出率为 11.11% (1/9),银耳与淀粉类制品无检出。

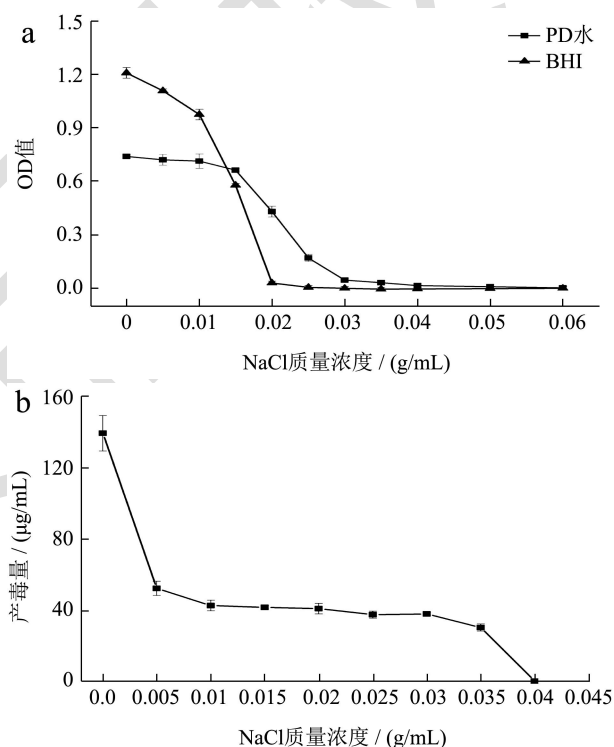


图 6 BGC (ATCC 33664) 在不同 NaCl 浓度下的生长与产毒情况
Fig.6 Growth and toxin production of BGC (ATCC 33664) under different NaCl concentrations

注: a: 不同 NaCl 浓度下的生长情况; b: 不同 NaCl 浓度下的产毒情况。

由唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种引起的食物中毒多发生在偏远、经济相对落后的地方,近年来,由该菌产生的毒素所引起的食物中毒偶有发生在经济发达地区,也因此人们对它的关注度持续上升。本研究分析了 BGC 在不同环境条件下的生长和产毒情况,结果显示,该菌的生长与产毒受培养基的影响较大;在碱性(pH 值为 9.0~10.5)与一定渗透压(NaCl 质量浓度为 0.02~0.04 g/mL)环境下,BGC 在 PD 中能

生长,而在 BHI 几乎不生长; BGC 最适生长温度与 pH 值分别为 37 °C、6.0,最佳产毒温度与 pH 值为 30 °C、7.0; BGC 在低质量浓度的 NaCl (0~0.02 g/mL) 环境下生长良好,当 NaCl 质量浓度 ≥ 0.025 g/mL, BGC 的生长受到抑制,同时 NaCl 的添加对 BGC 的产毒具有明显的抑制,当 NaCl 质量浓度达到 0.04 g/mL 时,则完全抑制米酵菌酸的产生。结果提示在食品加工或贮存过程中添加一定浓度的 NaCl 以及营造低温环境可有效减少由米酵菌酸引起的食物中毒。对相应食品在生产、运输、储存、销售等环节提出了切实建议,为相关部门在各环节加强安全监管,保障人民的身体健康和饮食安全提供了理论基础。

3 结论

本研究对广州地区淀粉类,面粉类,湿木耳及湿银耳中唐菖蒲伯克霍尔德菌椰毒致病变种的污染情况进行了调查,并对 BGC 在不同培养条件下的生长与产毒特性进行了分析,初步了解了 BGC 的污染与分布情况,掌握了 BGC 在不同培养基、培养时间、培养温度、pH 和 NaCl 浓度下的生长与产毒规律。对市售的米面制品、木耳银耳等进行了风险预警,为相关企业加强防控,相关部门规范管理提供了参考。同时,对于该菌在不同环境下的存活机理和产毒机制的研究将是下一步的工作重点。

参考文献

- [1] 陈佳.椰毒假单胞菌中毒机理及其预防措施研究[J].现代食品,2019,13:102-104
- [2] 彭沛穰,景雪梅,冶晓燕,等.唐菖蒲伯克霍尔德氏菌致病变种的危害及预防[J].生物学通报,2021,56(6):1-3
- [3] 耿雪峰,张晶,庄众,等.2002-2016 年中国椰毒假单胞菌食物中毒报告事件的流行病学分析[J].卫生研究,2020,49(4):648-650
- [4] Huang Q, Z Wu. Safe Eating of Fermented Corn and Coconut Food: Mechanism, Clinical Manifestations and Inhibition of Food Poisoning Involved in Bongkrekkic Acid [J]. E3S Web of Conferences, 2021, 267
- [5] Kano A, T Iwasaki, M Shindo. Bongkrekkic acid facilitates glycolysis in cultured cells and induces cell death under low glucose conditions [J]. Biochemistry and Biophysics Reports, 2019, 20(C): 100683
- [6] Zhou E, Sun Y, Fu Y, et al. Bongkrekkic acid induced neutrophil extracellular traps via p38, ERK, PAD4, and P2X1-mediated signaling [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2021, 423: 115580

- [7] 申屠平平,朱珈慧,徐小民,等.一起椰毒假单胞菌酵米面亚种引起的食物中毒调查[J].上海预防医学,2019,31(6):466-468,478
- [8] 王海燕,宋曼丹,王建,等.广东省首起米面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
- [9] 姜楠.木耳泡发时间不宜过长[N].健康报,2019-10-11(004)
- [10] 施蕊娟,戴运达,张能培,等.米酵菌酸中毒引起急性肝功能损害死亡 1 例[J].法医学杂志,2020,36(3): 396-398
- [11] 彭子欣.唐菖蒲伯克霍尔德菌米酵菌酸生物合成机制[J].卫生研究,2020,49(2): 336-338
- [12] Nadine Moebius, Claudia Ross, Kirstin Scherlach, et al. Biosynthesis of the respiratory toxin bongkrekkic acid in the pathogenic bacterium *Burkholderia gladioli* [J]. Chemistry & Biology, 2012, 19(9): 1164-1174
- [13] Satoshi Fujita, Masaki Suyama, Kenji Matsumoto, et al. Synthesis and evaluation of simplified functionalized bongkrekkic acid analogs [J]. Tetrahedron, 2017, 74(9): 962-969
- [14] Ruijuan Shi, Ruijuan Shi, Chaoyang Long, et al. Bongkrekkic acid poisoning: Severe liver function damage combined with multiple organ failure caused by eating spoiled food [J]. Legal Medicine, 2019, 41: 101622
- [15] GB 4789.1-2016,食品安全国家标准 食品微生物学检验总则[S]
- [16] GB 4789.29-2020,食品安全国家标准 食品微生物学检验 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(椰毒假单胞菌酵米面亚种)[S]
- [17] 王俊虎,陈骁鹏,仇雅静,等.超高效液相色谱-串联质谱法快速测定建曲中的米酵菌酸[J].药物分析杂志,2020,40(6): 1025-1031
- [18] 李发俊,黄煜强,雷柳冰,等.食品中椰毒假单胞菌的污染原因及其检测方法[J].广东化工,2021,48(6):145-146
- [19] 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
- [20] 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
- [21] 陈荣桥,陈汉金,洗燕萍,等.基于全基因组序列的污染事件中椰毒假单胞菌酵米面亚种溯源分析[J].食品安全质量检测学报,2021,12(9):3854-3859
- [22] 金溪.黑木耳泡发不当可致中毒[J].江苏卫生保健,2020,7: 45
- [23] 孟煦东,郭城宇,马吉瑶,等.我国黑木耳制品研究现状[J].食品工业,2021,42(10):257-259