

# 云南省一例唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(椰毒假单胞菌 酵米面亚种)食物中毒事件调查分析

范璐, 栾杰\*

(云南省疾病预防控制中心, 昆明 650022)

**摘要:** **目的** 调查分析云南省一例唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(椰毒假单胞菌酵米面亚种)食物中毒事件。**方法** 参照 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》对样品进行唐菖蒲伯克霍尔德氏菌检测。按照 GB 5009.189-2016《食品安全国家标准 食品中米酵菌酸的测定》检测样品中的米酵菌酸, 采用液相色谱法对样品进行检测。用 VITEK 2COMPACT 全自动微生物生化鉴定仪和飞行时间质谱进行微生物鉴定。**结果** 2份样品鉴定结果为唐菖蒲伯克霍尔德氏菌。2份样品均检测出米酵菌酸, 含量分别为 18.0 和 24.2 mg/kg。**结论** 本次食物中毒源于食源性唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(椰毒假单胞菌酵米面亚种)污染。**关键词:** 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(椰毒假单胞菌酵米面亚种); 食物中毒; 米酵菌酸

## Investigation and analysis for an event of *Burkholderia gladioli* (*Pseudomonas cocovenenans* subtype *Farino fermentans*) food poison in Yunnan province

FAN Lu, LUAN Jie\*

(Yunnan Center for Disease Control and Prevention, Kunming 650022, China)

**ABSTRACT: Objective** To investigate and analyze an event of *Burkholderia gladioli* (*Pseudomonas cocovenenans* subtype *Farino fermentans*) in Yunnan province. **Methods** *Burkholderia gladioli* in samples were detected according to GB/T 4789.29-2003 *Food hygiene-Microbiological test-Pseudomonas cocovenenans. Farino fermentans*. The bongkreki acid in samples was detected according to GB 5009.189-2016 *National food safety standard-Determination of bongkreki acid in Food*. The microbiological identification was conducted by VITEK 2COMPACT automatic microbial biochemical analyzer and time-of-flight mass spectrometry. **Results** The results of 2 samples were identified as *Burkholderia gladioli*. The bongkreki acid was detected in 2 samples, and the content were 18.0 and 24.2 mg/kg, respectively. **Conclusion** This food poisoning accident is originated from the contamination of by *Burkholderia gladioli* (*Pseudomonas cocovenenans*. Subtype. *Farino fermentans*). **KEY WORDS:** *Burkholderia gladioli* (*Pseudomonas cocovenenans* subtype *Farino fermentans*); food poisoning; bongkreki acid

## 1 引言

唐菖蒲伯克霍尔德氏菌 *Burkholderia gladioli* (椰毒假

单胞菌酵米面亚种, *Pseudomonas cocovenenans* subtype *Farino fermentans*) 简称椰毒假单胞菌, 是谷物发酵品、变质银耳及薯类制品食物中毒的病原菌<sup>[1,2]</sup>。椰毒假单胞菌酵

\*通讯作者: 栾杰, 硕士, 检验技师, 主要研究方向为食品检验。E-mail: 250453179@qq.com

\*Corresponding author: LUAN Jie, Technician, College of Food Inspection, Yunnan Center for Disease Control and Prevention, Kunming 650022, China. E-mail: 250453179@qq.com

米面亚种在 1999 年被划为唐菖蒲伯克霍尔德氏菌的一个病原型<sup>[3]</sup>。该菌引起的食物中毒平均死亡率达 41.80%, 个别中毒事件中死亡率达 100%, 是迄今我国病死率极高的一种细菌性食物中毒。1977 年黑龙江从臭米面食品中发现椰毒假单胞菌, 证实该菌产生的毒素米酵菌酸是引起食物中毒和死亡的主要毒性代谢产物<sup>[4]</sup>。近几年, 由椰毒假单胞菌引起的食物中毒在云南偶有发生, 发生地多为偏远、经济相对落后的地方, 以受污染的糯米汤圆粉及吊浆面为主<sup>[5,6]</sup>。2013 年云南省红河州发生过吊浆粑引起的聚集性的食物中毒事件, 死亡 5 人<sup>[7]</sup>。2014 年云南省文山州发生一起由汤圆引起的食物中毒, 死亡 6 人<sup>[8]</sup>。2 起由椰毒假单胞菌中毒致人死亡的事件中, 给家庭造成了重大损失, 给社会带来了极大影响。

本研究采用快速和传统方法检测现场采样的玉米面粉中的椰毒假单胞菌, 同时采用高效液相色谱法对样品中的椰毒假单胞菌产生的毒素米酵菌酸进行了测定, 以期为我国唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(椰毒假单胞菌酵米面亚种)食物中毒快速鉴定提供科学依据。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料与仪器

#### 2.1.1 样品

未食用生吊浆面 2 份。该样品来自 2018 年 6 月 2 日云南省文山州广南县黑支果乡马稍村委会梁子上小组发生一起家庭聚集性食物中毒事件, 中毒人数 3 人, 死亡 2 人。中毒食物为包谷面粉自制的吊浆粑面汤圆, 中毒者出现头晕、眼花、恶心、呕吐、腹痛等症状, 疑为椰毒假单胞菌食物中毒。广南县疾病预防控制中心现场采集可疑吊浆面送到云南省疾病预防控制中心实验室进行检验。

#### 2.1.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂 PDA 平板(英国 Oxoid 公司); GVC 增菌液(广东环凯股份有限公司); 卵黄琼脂(北京陆桥技术公司); 自制改良 PDA 中添加龙胆紫(1:100000, *V:V*)和氯霉素水溶液(终浓度为 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。

#### 2.1.3 主要仪器

VITEK2 COMPACT 全自动微生物生化鉴定仪(法国梅里埃公司); 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); 1290 超高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); BD240 生化培养箱(日本 Binder 公司)。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 分离鉴定方法

按照 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》<sup>[9]</sup>中规定的方法进行增菌、平板分纯, 用 VITEK 2COMPACT 全自动微生物生化鉴定

仪和飞行时间质谱微生物鉴定仪(automatic microbial biochemical identification instrument-time-of-flight mass spectrometer, MALDI-TOF)进行鉴定。

#### 2.2.2 米酵菌酸测定

米酵菌酸检测参考方法为 GB 5009.189-2016《食品安全国家标准 食品中米酵菌酸的测定》<sup>[10]</sup>, 采用高效液相色谱法对样品开展米酵菌酸毒素检测。

仪器条件为色谱柱: Agilent  $C_{18}$  柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ )不锈钢柱; 流动相: 甲醇:水(75:25, *V:V*), 水用冰乙酸调 pH 至 2.5; 检测器: 指二极管阵列检测器(diode array detector, DAD)波长 267 nm; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30  $^{\circ}\text{C}$ 。

#### 2.2.3 实验方法

称取一定量的粉末(精确至 0.0001 g)样品, 置于锥形瓶中, 加入 100 mL 甲醇-氨水溶液, 混匀, 室温下避光浸泡 1 h, 置于超声波震荡提前 30 min, 过滤。置 80  $^{\circ}\text{C}$  水浴中浓缩至 3 mL。

试样的净化: 将浓缩后的试样全部转移到已经活化的固相萃取柱(阴离子交换柱 60 mg/3 mL 或等效品)中, 依次用 5 mL 水和 5 mL 甲醇淋洗, 弃去流出液, 抽干萃取柱, 用 6 mL 甲酸-甲醇液洗脱, 收集洗脱液, 于 40  $^{\circ}\text{C}$  水浴中氮吹至干, 然后加入 1 mL 甲醇, 混匀, 经微孔滤膜过滤后进行高效液相色谱分析。

上机测定, 据保留时间定性, 外标峰面积法定量。

## 3 结果与分析

### 3.1 分离鉴定结果

#### 3.1.1 快速分离法

2 份样品(吊浆面)稀释后直接涂布在改良 PDA 平板, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h 后, 各种杂菌生长, 包括酵母也生长。挑取紫色或者中心颜色深, 周边颜色浅, 湿润, 边缘整齐的可疑菌落直接用飞行时间质谱微生物鉴定仪鉴定。结果鉴定为唐菖蒲伯克霍尔德菌(*Burkholderia gladioli*)。唐菖蒲伯克霍尔德菌 MALDI-TOF 鉴定分值为 2.225。唐菖蒲伯克霍尔德菌标准菌株与样品比对图谱见图 1。

#### 3.1.2 传统分离法

按照 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》<sup>[9]</sup>, 将样品加入 GVC 增菌液增菌 48 h 后, 划线接种 PDA 平板和改良 PDA 平板培养 24 h, PDA 平板上形成的可疑菌落大小约 1~1.5 mm, 呈灰白色、湿润、表面光滑、边缘整齐。改良 PDA 平板上形成的可疑菌落呈紫色或者中心颜色深, 周边颜色浅, 湿润, 边缘整齐。挑取可疑单个菌落, 接种卵黄琼脂平板。在卵黄琼脂平板上, 可见形成表面光滑及湿润的菌落。置 36  $^{\circ}\text{C}$  温箱内培养 48 h 后, 菌落周围形成乳白色混浊环, 对日光斜视可见环表面呈明显虹彩现象。

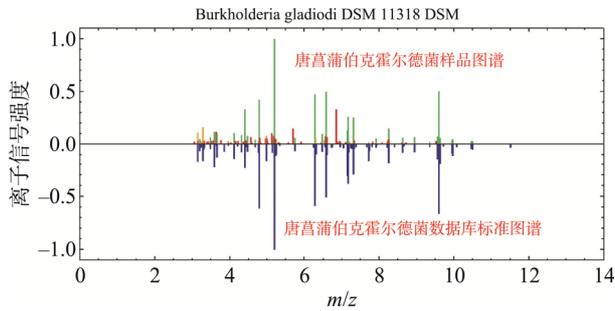


图 1 唐菖蒲伯克霍尔德菌质谱图

Fig.1 Chromatogram of *Burkholderia gladioli* by the flight time mass spectrometer microbiological identification instrument

### 3.1.3 生化试验

将可疑菌接种 PDA 斜面置(36±1) °C温箱内培养 24 h, 挑取少量菌苔, 做相关生化实验, 动力+, 氧化酶-, 靛基质-, V-P, -O/F 试验(O 型)+, 葡萄糖-, 果糖-, 半乳糖-, 阿拉伯糖-, 甘露醇+, 硝酸盐还原+, 尿素-, 侧金盏花醇-, 柠檬酸盐利用+, 精氨酸+, 5 °C和 41 °C不生长(+表示阳性结果, -表示阴性结果)。VITEK2 COMPACT 鉴定结果为唐菖蒲伯克霍尔德菌。

### 3.2 米酵菌酸测定

采用液相色谱法对样品开展椰酵假单胞菌产生的米酵菌酸毒素检测, 从送检的 2 份样品中均检出了米酵菌酸。2 份样品的含量分别为 18.0 和 24.2 mg/kg。米酵菌酸色谱图见图 2。参考 GB 7096-2014《食品安全国家标准 食用菌及其制品》, 米酵菌酸含量必须≤0.25 mg/kg<sup>[11]</sup>, 检出的样品中米酵菌酸含量均远高于此标准。

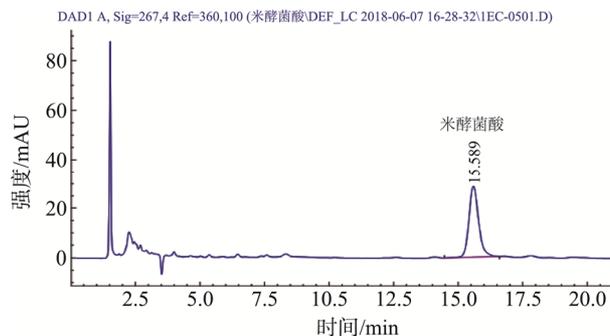


图 2 米酵菌酸高效液相色谱图

Fig.2 Chromatogram of rice yeast acid

## 4 结论与讨论

本次中毒事件检测中, 采用传统方法与快速检测方法的结合, 最大程度保证目标菌不被漏检, 互相验证结果的准确性。本研究采用的快速分离法<sup>[12]</sup>是本实验室根据椰酵假单胞菌检测经验, 对 PDA 培养基进行改良, 分别加入胆胆紫和氯霉素水溶液, 使培养基选择性更强, 菌落特征

显著, 利于鉴别。通过直接涂布在改良的 PDA 平板上, 酵母少量生长, 目标菌明显。挑取可疑菌落用飞行时间质谱微生物鉴定仪鉴定, 几分钟内即可得到鉴定结果, 整个鉴定过程仅需要 24 h。这与传统增菌-选择性培养基分离-生化鉴定的方法需要 5~6 d 时间相比, 节约了大量的时间, 操作简便, 准确性高, 可以较早、较好地得到检验结果。同时按传统方法进行分离, 通过生化试验, 也分离到椰酵假单胞菌。2 种方法结合, 保证了实验结果的准确性。

本研究中, 利用 VITEK2 COMPACT 全自动微生物生化鉴定仪和飞行时间质谱微生物鉴定仪鉴定, 其结果为唐菖蒲伯克霍尔德菌(*Burkholderia gladioli*)。椰酵假单胞菌和唐菖蒲伯克霍尔德菌致病型菌株的典型株在生化特征上差异极微。比较椰酵假单胞菌 16SrRNA 基因序列后, 根据细菌的系统分类将其划归为唐菖蒲伯克霍尔德菌的一个病原型, 还建议划分椰酵假单胞菌米酵菌酸产毒株及不产毒株为唐菖蒲伯克霍尔德菌的一个或几个生物变种或新的生物型。说明椰酵假单胞菌和唐菖蒲伯克霍尔德菌致病型菌株的典型株在生化特征上差异很小, 支持了椰酵假单胞菌与唐菖蒲伯克霍尔德菌更为近缘这一结论。本实验结果跟上述研究报道一致<sup>[13-15]</sup>, 椰酵假单胞菌即唐菖蒲伯克霍尔德菌。

本次中毒事件中, 实验室间采用微生物快速检测椰酵假单胞菌与高效液相色谱法 2 种方法相结合检测主要代谢产物米酵菌酸, 同时对中毒样品的毒物进行了确认。采用理化检测技术手段与微生物检测技术手段相结合的方法, 用不同方法相互印证, 保证了突发性公共卫生中毒事件中毒物检测的准确性, 为紧急医疗救治方案提供更佳合理、可靠的实验室支持。同时为将来的酵米面中毒突发公共卫生应急处置提供实验室检测的技术依据。

对本次中毒事件的分析鉴定, 为相关部门中毒事件应急处置采取及时有效的控制措施提供科学依据, 同时为有效控制食源性疾病的发生、流行提供技术支持。针对近几年在云南由椰酵假单胞菌产生的毒素所引起的食物中毒时有发生, 提供以下建议: 一是加强对重点地区食品安全的监督和宣传: 不用霉变的玉米、糯米等制备酵米面, 保持卫生, 储存放置地点要通风防潮; 二是建立和完善食品安全污染源及食源性疾病监测网络, 为国家及地方食源性疾病的监测提供科学依据。

### 参考文献

- [1] 孟昭赫. 食品卫生检验方法注解 微生物学部分[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1990.  
Meng ZH. Food hygiene inspection method notes microbiology section [M]. Beijing: People's Health Publishing House, 1990.
- [2] 黄伟峰, 黄玉兰, 杨祖顺, 等. 椰酵假单胞菌酵米面亚种选择性分离培养基的比较研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2018, (4): 391-395.  
Huang WF, Huang YL, Yang ZS, et al. Comparative study of selective culture medium of *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *Farinofermentans* [J]. Chin J Food Hyg, 2018, (4): 391-395.

- [3] 陈炳卿, 刘志诚, 王茂起. 现代食品卫生学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001.  
Chen BQ, Liu ZC, Wang MQ. Modern food hygiene [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2001.
- [4] 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.  
Liu XM. Analysis of the trends of *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *Farinofermentans* from food poisoning accident in China [J]. Chin J Prev Med, 1996, (6): 372-374.
- [5] 彭敏, 刘志涛, 李娟娟, 等. 2012~2016 年云南省食源性致病菌污染状况[J]. 职业与健康, 2017, (21): 69-72.  
Feng M, Liu ZT, Li JJ, et al. Pollution status of food-borne pathogens in Yunnan province from 2012-2016 [J]. Occup Health, 2017, (21): 69-72.
- [6] 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, (1): 71-75.  
Zhou GP, Liang Q, Huang TX, 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, (1): 71-75.
- [7] 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, (5): 582-583.  
Liu ZT, Wang R, Hu TF, et al. Investigation on a food poisoning incident induced by *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *Farinofermentans* [J]. Occup Health, 2013, (5): 582-583.
- [8] 杨庆文, 国译丹, 周惠新, 等. 云南省首起唐菖蒲伯克霍尔德氏菌食物中毒的鉴定与分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, (17): 3363-3364.  
Yang QW, Guo YD, Zhou HX, et al. Identification and analysis of the first *Burkholderia gladioli* strain from food poisoning in Yunnan [J]. Chin J Health Lab Technol, 2013, (17): 3363-3364.
- [9] 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[S].  
GB/T 4789.29-2003 Microbiological examination of food hygiene-Examination of *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *Farinofermentans* [S].
- [10] GB 5009.189-2016 食品安全国家标准 食品中米酵菌酸的测定[S].  
GB 5009.189-2016 Food safety national standard-Determination of rice yeast acid in food safety national standard [S].
- [11] GB 7096-2014 食品安全国家标准 食用菌及其制品[S].  
GB 7096-2014 Food safety national standard-Edible fungi and their products [S].
- [12] 李晓琍, 杨祖顺, 国译丹, 等. 椰毒假单胞菌酵米面亚种食物中毒的病原分离鉴定[J]. 中国食品卫生杂志, 2016, 28(1): 36-39.  
Li XL, Yang ZS, Guo YD, et al. Isolation and identification of *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *Farino fermentans* from food poisoning accident [J]. Chin J Food Hyg, 2016, 28(1): 36-39.
- [13] 李晓琍, 杨祖顺, 国译丹, 等. 一起椰毒假单胞菌酵米面亚种食物中毒分离鉴定方法的改进[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, (9): 1251-1253.  
Li XL, Yang ZS, Guo YD, et al. An improvement on isolation and identification method for an event of *Pseudomonas cocovenenans* subtype *Farino fermentans* food poison [J]. Chin J Health Lab Technol, 2016, (9): 1251-1253.
- [14] 焦振泉, 曹玮, 余东敏, 等. 椰毒假单胞菌与唐菖蒲伯克霍尔德菌 16S-23S rRNA 基因间区序列的比较研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2008, 20(3): 197-203.  
Jiao ZQ, Cao W, Yu DM, et al. Study on comparison of 16S-23S rRNA gene ISR sequence of *Pseudomonas cocovenenans* subsp *farino fermentans* Strains and *Burkholderia gladioli* strains [J]. Chin J Food Hyg, 2008, 20(3): 197-203.
- [15] 焦振泉, 刘秀梅, 杨瑞馥, 等. 椰毒假单胞菌酵米面亚种 16SrDNA 序列测定与分析[J]. 卫生研究, 1999, 28(4): 232-234.  
Jiao ZQ, Liu XM, Yang RF, et al. Sequencing and analysis of 16SrDNA sequences for *P.cocovenenans* subsp *farinofermentans* [J]. J Hyg Res, 1999, 28(4): 232-234.

(责任编辑: 陈雨薇)

## 作者简介



范璐, 硕士, 主管技师, 主要研究方向为微生物检验。  
E-mail: 273886578@qq.com



栾杰, 硕士, 检验技师, 主要研究方向为食品理化检验。  
E-mail: 250453179@qq.com