

# 1 株唐菖蒲伯克霍尔德氏菌在湿米粉中的产毒规律分析

陈子慧<sup>1,2</sup>, 王海燕<sup>3</sup>, 陈少威<sup>2</sup>, 黄芮<sup>2</sup>, 蒋琦<sup>2</sup>, 王萍<sup>2</sup>, 袁俊<sup>4</sup>, 张永慧<sup>1,3\*</sup>

(<sup>1</sup>南方医科大学公共卫生学院 广州 510515

<sup>2</sup>广东省疾病预防控制中心 广东省公共卫生研究院 广州 511430

<sup>3</sup>广东省疾病预防控制中心 广东省新发传染病应急检测技术研究与应用重点实验室 广州 511430

<sup>4</sup>广州市疾病预防控制中心 广州 511440)

**摘要** 目的:了解防腐剂(脱氢乙酸、 $\epsilon$ -聚赖氨酸盐酸盐)和培养温度对唐菖蒲伯克霍尔德氏菌在湿米粉培养基上生长及产毒的影响。方法:以 1 株自食物中毒事件样品中分离得到的唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(椰毒假单胞菌酵米面亚种)菌株为研究对象,分别接种至添加脱氢乙酸(1.0 g/kg)、添加  $\epsilon$ -聚赖氨酸盐酸盐(0.25 g/kg)以及未添加防腐剂的湿米粉培养基中,置于 10、26、36 °C 条件下培养,研究其在湿米粉中生长及产毒情况。采用修正的 Gompertz 模型构建初级生长模型。结果:在 10 °C 条件下该菌生长缓慢且未产生米酵菌酸;在 26 °C 条件下培养至 96 h,该菌对照组和各试验组产生的毒素均超过 500  $\mu$ g/kg,在添加脱氢乙酸的样品中最早产生米酵菌酸,其最高质量浓度(1 484  $\mu$ g/kg)略低于对照组(2 561  $\mu$ g/kg)和  $\epsilon$ -聚赖氨酸盐酸盐组(2 762  $\mu$ g/kg);在 36 °C 条件下该菌生长最为快速,各组产毒量均低于 350  $\mu$ g/kg。结论:湿米粉在 10 °C 贮存可有效降低产生米酵菌酸的风险,脱氢乙酸、 $\epsilon$ -聚赖氨酸盐酸盐均未能阻止唐菖蒲伯克霍尔德氏菌的生长和产毒,需进一步探索能起作用的防腐剂,制定多手段结合的控制措施。

**关键词** 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌;湿米粉;米酵菌酸;影响因素

**文章编号** 1009-7848(2023)12-0070-07 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.12.008

唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(椰毒假单胞菌酵米面亚种)<sup>[1]</sup>,革兰氏阴性需氧杆菌,最早是在 20 世纪 30 年代由荷兰学者从食物中毒样品中分离得到。我国于 1961 年首次分离出“黄色菌”,1979 年暂命名为酵米面黄杆菌<sup>[2]</sup>,1987 年易名为椰毒假单胞菌酵米面亚种<sup>[3]</sup>,2020 年起该菌被命名为唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(椰毒假单胞菌酵米面亚种),*Burkholderia gladioli*(*Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofementans*)<sup>[4]</sup>。唐菖蒲伯克霍尔德氏菌可产生米酵菌酸(Bongkrekic acid, BA)和毒黄素(Toxoflavin, TF),研究<sup>[5-7]</sup>发现,BA 毒性比 TF 强,1~1.5 mg 即可能对人类致命,且在相同条件下,该菌产生 BA 的量远大于 TF。BA 所致中毒的重症病人出现肝昏迷、中枢神经麻痹、呼吸衰竭等症状,病死率高达 45.21%。唐菖蒲伯克霍尔德氏菌在自然界普遍存在,常污染富含淀粉质的食

品并在适宜条件下产毒,导致中毒的主要食品为玉米粳、糯玉米汤圆、河粉类制品及木耳等<sup>[8]</sup>。其中,由河粉类制品引起的中毒事件集中于广东省,且均为加工制品<sup>[9-10]</sup>。

本研究以自食物中毒样品中分离到的 1 株唐菖蒲伯克霍尔德氏菌为研究对象,以大米磨浆、添加或不添加防腐剂(脱氢乙酸、 $\epsilon$ -聚赖氨酸盐酸盐)后,经蒸煮、冷却后制作成湿米粉培养基,接种上述菌株后置于不同温度下培养,分析其在湿米粉中的生长及产毒规律,以期为湿米粉中唐菖蒲伯克霍尔德氏菌的生长预测方法的建立及其风险评估等提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

唐菖蒲伯克霍尔德氏菌菌株自食物中毒样品中分离得到,已完成生化、16s rDNA 鉴定及产毒试验的阳性菌株,在广东省疾病预防控制中心以冻存珠(-80 °C)保存。

脱氢乙酸,青岛大伟生物工程有限公司; $\epsilon$ -聚赖氨酸盐酸盐,浙江新银象生物工程有限公司;营

收稿日期:2023-08-02

基金项目:广东省自然科学基金项目(2020A1515010663, 2021A1515012193)

第一作者:陈子慧,女,博士生,主任医师

通信作者:张永慧 E-mail: zi9614@163.com

养肉汤、血平板、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;米醇菌酸标准品(Lot: 06191801, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),美国 Sigma 公司; ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH C18 色谱柱(2.1 mm $\times$ 150 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ),美国 Waters 公司。

## 1.2 仪器与设备

DENSIMAT<sup>®</sup>比浊仪(99234),法国梅里埃;恒温培养箱(GH12-2),美国 SHELLAB;高压灭菌锅(SX-300),日本 TOMY;液相色谱-串联质谱仪(TRIPLE QUAD 4500),美国 AB SCIEX。

## 1.3 方法

1.3.1 菌种活化与接种菌液的制备 取出 1 冻存珠置于 4 mL 营养肉汤中,36  $^{\circ}\text{C}$ 活化 12 h。用血平板划线,培养 36  $^{\circ}\text{C}$ 、24 h。取少量菌,用 5 mL 无菌生理盐水制成菌悬液,用比浊仪测定,调菌液浓度为 0.5 MCF,透光率为 80%。取 1 mL 菌液加至 9 mL 无菌生理盐水中,混匀即 10 倍稀释液,再依次稀释至 1 000 倍,作为接种菌液。

1.3.2 湿米粉培养基质的制备 以大米为原料,浸泡磨浆后分为 3 组:A 组为添加脱氢乙酸(1.0 g/kg),B 组为添加  $\epsilon$ -聚赖氨酸盐酸盐(0.25 g/kg)及空白对照组。将米浆搅拌均匀后,分装于培养皿中。蒸箱水沸后,将装有米浆的培养皿放入,蒸煮 9 min。取出,盖上培养皿盖,置于灭菌锅中 121  $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min。灭菌后迅速将培养皿倒置移至超净工作台,使冷凝水流至皿盖,完全冷却后,倒去冷凝水,备用。

1.3.3 试验方案 对样品编号,每份用无菌枪头均匀接种菌悬液 100  $\mu\text{L}$ ,涂抹混匀,使接种浓度为  $10^2\sim 10^3$  CFU/g。接种后分别置于 10, 26, 36  $^{\circ}\text{C}$  条件下培养,取样时间分别为 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144 h。以上每个时间点均取 2 个平行样,依试验设定时间称取 25 g 样品于无菌均质袋中,加入 50 mL 无菌水,用均质器拍打 30 s,作为本样品菌落计数的原液。取原液 1 mL 加至 9 mL 无菌生理盐水中,混匀即 10 倍稀释液。依次稀释,选择 3 个合适的稀释度,取 1 mL 接种至无菌 PDA 平皿,以无菌接种棒涂布均匀。每个稀释度接种 3 个平皿。同时,分别吸取 1 mL 空白稀释液,加

入两个无菌平皿内作空白对照。静置 20~30 min,倒置于 36  $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 48 h。计数和结果报告方法参照 GB 4789.2《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》第 7 章。另外,取菌落计数的原液 1.5 mL 于 EP 管中,100  $^{\circ}\text{C}$  30 min 处理,作为测定 BA 的样品,采用液相色谱-串联质谱法测定 BA 浓度。

## 1.4 生长预测模型的建立

1.4.1 初级预测模型的建立 采用 Gompertz 模型对不同条件下唐菖蒲伯克霍尔德氏菌的生长情况进行模型拟合。Gompertz 模型表达式为:

$$Y=Y_0+a\times\exp\{-\exp[-b\times(X-c)]\} \quad (1)$$

式中: $X$ ——培养时间,h; $Y$ ——在  $X$  时,微生物的对数值,lg(CFU/g); $Y_0$ ——初始微生物的对数值,lg(CFU/g); $a$ 、 $b$ 、 $c$ ——模型的参数。为了进一步构建二级预测模型,从初级预测模型中获得最大比生长速率( $\mu_{\max}$ ,  $\text{h}^{-1}$ )和迟滞期( $\lambda$ , h),两者的表达式分别如下:

$$\mu_{\max}=a\times b/e \quad (2)$$

$$\lambda=(b\times c-1)/e \quad (3)$$

式中: $a$ 、 $b$ 、 $c$ ——Gompertz 模型参数; $e$ ——自然常数。

1.4.2 模型评价 采用决定系数( $R^2$ )、准确度( $A_f$ )、偏差度( $B_f$ )、均方根误差(root mean square error, RMSE)来评价建立模型的拟合效果。 $R^2$ 用于描述预测值和实测值的相关程度, $R^2$ 越趋近于 1,表明预测模型参考价值越高。 $A_f$ 反映实测值与预测值间的接近程度, $A_f$ 越趋近于 1,精确度越高。 $B_f$ 表示预测模型的结构性偏差,用于评价预测值偏离等值线的程度, $B_f$ 越趋近于 1,拟合效果越好。RMSE 反映模型预测值的离散程度, RMSE 越小,可靠性越高。

## 1.5 统计学处理

采用 WPS 软件和 R 语言(4.1.0 版本)整理唐菖蒲伯克霍尔德氏菌在湿米粉基质中生长的相关数据,绘制生长曲线。采用 Origin 9.1 软件拟合唐菖蒲伯克霍尔德氏菌初级模型。选用 Gompertz 模型,列文伯格-马夸尔特法进行数据迭代运算,计算模型参数。

## 2 结果

### 2.1 不同温度条件下唐菖蒲伯克霍尔德氏菌在湿米粉基质中生长及产毒的关系

在 10、26、36 °C 条件下,唐菖蒲伯克霍尔德氏菌在湿米粉基质(未添加防腐剂)中的生长及产毒情况见图 1。结果显示,在 10 °C 条件下,湿米粉中的唐菖蒲伯克霍尔德氏菌生长非常缓慢,至 144 h 仍未进入对数生长期,且一直未产毒素。在 26 °C 条件下,唐菖蒲伯克霍尔德氏菌生长速度较为迅速,无明显的迟滞期。初始接种量约 2.8 lg

(CFU/g),稳定期的菌浓度约为 9.0 lg(CFU/g)。检测到 BA 产生的时间为 48 h,此时菌浓度约为 9.6 lg(CFU/g),其后毒素浓度持续上升,至 144 h 约为 2 561  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在 36 °C 条件下,唐菖蒲伯克霍尔德氏菌生长无明显的迟滞期,并快速进入对数生长期。初始接种量约为 2.7 lg (CFU/g),稳定期的菌浓度约为 9.6 lg(CFU/g),96 h 后进入衰亡期。检测到 BA 产生的时间为 36 h,此时菌浓度为 9.6 lg (CFU/g)左右,其后毒素持续产生并维持在较低水平(<320  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )。

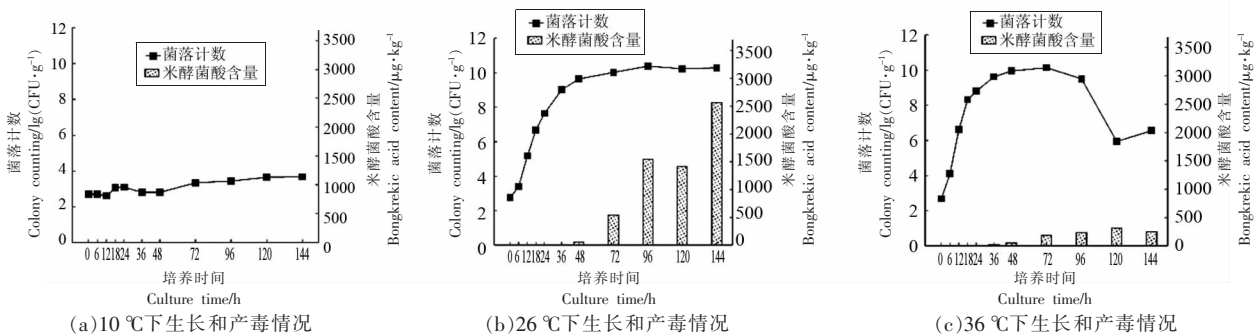


图 1 不同温度条件下唐菖蒲伯克霍尔德氏菌在湿米粉基质(无防腐剂)中的生长和产毒情况

Fig.1 Growth and toxin production of *Burkholderia gladioli* in wet rice flour matrix (without preservative) under different temperature conditions

### 2.2 脱氢乙酸对唐菖蒲伯克霍尔德氏菌在湿米粉基质中生长及产毒的影响

唐菖蒲伯克霍尔德氏菌在添加脱氢乙酸(1.0 g/kg)的湿米粉基质中,不同温度条件下的生长及产毒情况见图 2。在 10 °C 条件下,唐菖蒲伯克霍尔德氏菌生长非常缓慢,至 144 h 有上升趋势,一直未产生毒素。在 26 °C 条件下,唐菖蒲伯克霍尔德

氏菌生长速度较为迅速,无明显迟滞期。初始接种量约为 2.7 lg(CFU/g),稳定期的菌浓度约为 9.5 lg(CFU/g)。检测到 BA 产生的时间为 36 h,此时菌浓度约为 8.9 lg (CFU/g),其后毒素浓度持续上升,至 144 h 约为 1 484  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在 36 °C 条件下,唐菖蒲伯克霍尔德氏菌生长无明显的迟滞期,快速进入对数生长期。初始接种量约为 2.7 lg(CFU/

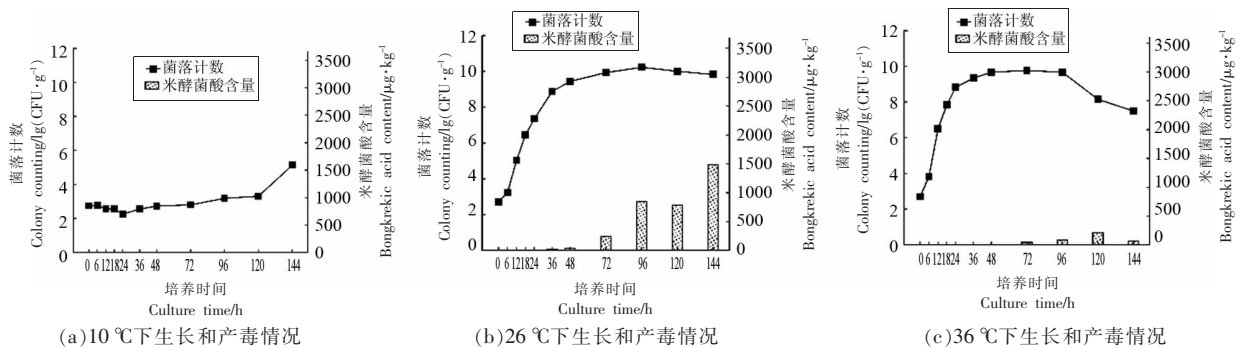


图 2 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌在湿米粉基质(添加脱氢乙酸 1.0 g/kg)中的生长及产毒情况

Fig.2 Growth and toxin production of *Burkholderia gladioli* in a wet rice flour substrate supplemented (with dehydroacetic acid 1.0 g/kg)



g), 稳定期的菌浓度为  $9.3 \lg(\text{CFU/g})$  左右, 96 h 后进入衰亡期。检测到 BA 产生的时间为 72 h, 此时菌浓度约为  $9.8 \lg(\text{CFU/g})$ , 其后毒素持续产生但维持在较低水平 ( $<220 \mu\text{g/kg}$ )。

### 2.3 $\epsilon$ -聚赖氨酸盐酸盐对唐菖蒲伯克霍尔德氏菌在湿米粉基质中生长及产毒的影响

唐菖蒲伯克霍尔德氏菌在添加  $\epsilon$ -聚赖氨酸盐酸盐 ( $0.25 \text{ g/kg}$ ) 的湿米粉基质中, 不同温度条件下的生长及产毒情况见图 3。10  $^{\circ}\text{C}$  条件下, 湿米粉中的唐菖蒲伯克霍尔德氏菌生长非常缓慢, 至 144 h 有上升趋势, 未产生毒素。在 26  $^{\circ}\text{C}$  条件下, 湿米粉中的唐菖蒲伯克霍尔德氏菌生长速度较为

迅速, 无明显的迟滞期。初始接种量约为  $2.8 \lg(\text{CFU/g})$ , 稳定期的菌浓度为  $9.1 \lg(\text{CFU/g})$  左右。检测到 BA 产生的时间为 48 h, 此时菌浓度约为  $9.1 \lg(\text{CFU/g})$ , 其后毒素浓度持续上升, 至 144 h 约为  $2762 \mu\text{g/kg}$ 。在 36  $^{\circ}\text{C}$  条件下, 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌生长无明显的迟滞期, 快速进入对数生长期。初始接种量约为  $2.7 \lg(\text{CFU/g})$ , 稳定期的菌浓度约为  $9.2 \lg(\text{CFU/g})$ , 96 h 后进入衰亡期。检测到 BA 产生的时间为 72 h, 此时菌浓度约为  $10.0 \lg(\text{CFU/g})$ , 其后毒素持续产生但维持在较低水平 ( $<60 \mu\text{g/kg}$ )。

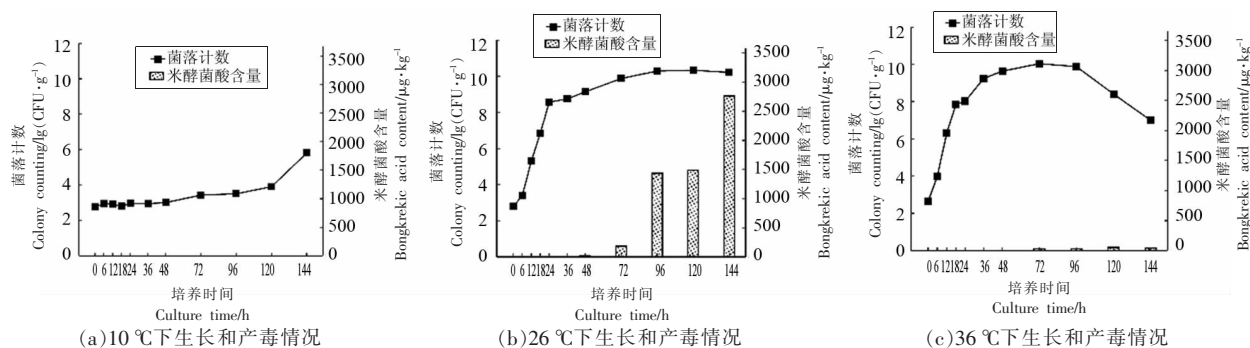


图 3 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌在湿米粉基质 (添加  $\epsilon$ -聚赖氨酸盐酸盐  $0.25 \text{ g/kg}$ ) 中的生长及产毒情况

Fig.3 Growth and toxin production of *Burkholderia gladiolus* on wet rice flour substrate (supplemented with  $\epsilon$ -polylysine hydrochloride  $0.25 \text{ g/kg}$ )

### 2.4 初级预测模型

以培养时间 0~96 h 的唐菖蒲伯克霍尔德氏菌生长数据进行模型拟合。Gompertz 模型对于 26, 36  $^{\circ}\text{C}$  温度条件下唐菖蒲伯克霍尔德氏菌生长的拟合效果较好,  $R^2$  均超过 0.98, 对于 10  $^{\circ}\text{C}$  条件, 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌生长的拟合效果较差, 对照组、A 组和 B 组 3 组  $R^2$  分别为 0.56, 0.09, 0.86。其它参数详见表 1。

在 26, 36  $^{\circ}\text{C}$  条件下, 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌在米粉培养基的生长未见明显的迟滞期。相同温度下, 与对照组相比, A 组和 B 组的最大比生长速率 ( $\mu_{\text{max}}$ ) 虽波动, 但未发生明显变化。

## 3 讨论与结论

本研究结果显示, 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌在 36  $^{\circ}\text{C}$  条件下生长最为快速, 培养 72 h 后 26  $^{\circ}\text{C}$  条

件下产生的 BA 浓度明显高于 36  $^{\circ}\text{C}$ , 表明 26  $^{\circ}\text{C}$  更适宜该菌产毒, 与既往报道的结果基本相符<sup>[11]</sup>。现有研究结果<sup>[12]</sup>表明, 4  $^{\circ}\text{C}$  能有效抑制菖蒲伯克霍尔德氏菌。本研究考虑湿米粉类产品实际经营、销售条件, 设定 10  $^{\circ}\text{C}$  为低温培养条件, 在此条件下该菌的生长受到明显抑制。144 h 内试验组和对照组样品均未检出 BA, 表明该温度作为关键控制条件是可行的。

在 26  $^{\circ}\text{C}$  和 36  $^{\circ}\text{C}$  条件下, 采用 Gompertz 初级预测模型对唐菖蒲伯克霍尔德氏菌生长的拟合效果较好,  $R^2$  均大于 0.98。模型拟合结果显示, 3 组最大比生长速率 ( $\mu_{\text{max}}$ ) 为  $0.24\sim 0.40/\text{h}$ , 提示试验组和对照组中的唐菖蒲伯克霍尔德氏菌均能快速生长, 其中, 36  $^{\circ}\text{C}$  条件下 3 组  $\mu_{\text{max}}$  为  $0.31\sim 0.40/\text{h}$ , 稍高于 26  $^{\circ}\text{C}$  ( $\mu_{\text{max}}$  为  $0.24\sim 0.31/\text{h}$ )。而 3 组样品生长迟滞期 ( $\lambda$ ) 均较低, 为  $0.06\sim 0.19 \text{ h}$ , 提示在 26  $^{\circ}\text{C}$  和

表1 不同分组唐菖蒲伯克霍尔德氏菌初级预测模型及相关参数

Table 1 Primary prediction model and related parameters for *Burkholderia gladioli* in different groups

组别	Gompertz 方程	$\mu_{\max}$	$\lambda$	$R^2$	$A_f$	$B_f$	RMSE
对照组							
10 °C	$Y=2.71+2.23\exp\{-\exp[-0.01(X-101.24)]\}$	0.01	0.13	0.56	1.39	1.00	0.16
26 °C	$Y=2.76+7.33\exp\{-\exp[-0.09(X-13.85)]\}$	0.25	0.11	0.99	1.52	0.94	0.20
36 °C	$Y=2.68+7.11\exp\{-\exp[-0.15(X-8.94)]\}$	0.40	0.14	0.99	1.51	0.97	0.21
A 组							
10 °C	$Y=2.77+0.75\exp\{-\exp[-0.06(X-86.23)]\}$	0.02	1.69	0.09	1.32	0.76	0.20
26 °C	$Y=2.73+7.25\exp\{-\exp[-0.09(X-14.47)]\}$	0.24	0.12	0.99	1.53	0.94	0.20
36 °C	$Y=2.69+6.93\exp\{-\exp[-0.15(X-9.42)]\}$	0.39	0.16	1.00	1.35	0.97	0.15
B 组							
10 °C	$Y=2.77+1.56\exp\{-\exp[-0.02(X-73.91)]\}$	0.01	0.08	0.86	1.19	1.01	0.08
26 °C	$Y=2.80+6.91\exp\{-\exp[-0.12(X-12.46)]\}$	0.31	0.19	0.98	1.97	0.96	0.35
36 °C	$Y=2.65+7.10\exp\{-\exp[-0.12(X-9.65)]\}$	0.31	0.06	0.98	1.81	0.94	0.29

36 °C条件下唐菖蒲伯克霍尔德氏菌无明显的生长迟滞期。26 °C条件下,添加了脱氢乙酸的样品最早(36 h)检出BA,在96 h及其后各时间点,其毒素浓度低于其它两组。培养144 h后空白对照组、A组、B组样品BA的含量依次为:2 561,1 484,2 762  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。36 °C条件下整个试验周期3组样品中BA浓度均较低,最高含量在320  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下。以上结果表明,3组样品中,唐菖蒲伯克霍尔德氏菌在不同温度下的生长、产毒规律基本一致。未观察到脱氢乙酸和 $\epsilon$ -聚赖氨酸盐酸盐对该菌株生长起有效抑制作用。脱氢乙酸对米酵菌酸的产生有一定的影响,毒素浓度水平仍较高。

脱氢乙酸及其钠盐是我国使用较为广泛的防腐剂。WHO(世界卫生组织)和JECFA(联合国粮农组织和世界卫生组织下的食品添加剂联合专家委员会)等权威机构尚未制定脱氢乙酸及其钠盐的健康指导值。有学者<sup>[13]</sup>指出脱氢乙酸及其钠盐经口摄入急性毒性虽属于低毒,但具有亚急性、亚慢性、慢性毒性,以及主要表现为导致仔代体质量降低及抑制骨骼发育的生殖发育毒性,亟需开展危害评估并确立健康指导值,对其作为食品添加剂使用进行全面、科学的风险评估。根据GB 2760《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》的规定,可用于淀粉制品、面包、糕点等12类食品,不包括大米及其制品。相关中毒事件流行病学调研结果<sup>[9]</sup>表明:部分引起中毒的河粉中添加了脱

氢乙酸钠。也有学者<sup>[14]</sup>报道在广州市售散装米粉制品中脱氢乙酸的检出率达62.5%(75/120),显示脱氢乙酸滥用问题较为严重。本研究发现脱氢乙酸在26 °C条件下对唐菖蒲伯克霍尔德氏菌的产毒有一定影响,但不能有效抑制毒素的产生。考虑到脱氢乙酸及其钠盐的潜在风险,以及试验结果表明未能对高风险致病微生物起到有效抑制作用,建议对其在湿米粉等大米制品中的滥用行为进行严厉管控,以保证群众的饮食安全。

$\epsilon$ -聚赖氨酸盐酸盐是一种抑菌能力强、抑菌范围广、水溶性好、热稳定性强的生物防腐剂,GB 2760允许其使用于大米及其制品。本研究尚未观察到 $\epsilon$ -聚赖氨酸盐酸盐对唐菖蒲伯克霍尔德氏菌的抑制作用。有研究<sup>[15-16]</sup>表明 $\epsilon$ -聚赖氨酸盐酸盐与其它防腐剂的联用具有协同抑制作用,可增强对蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌等病原菌的抑制作用。或可考虑进一步尝试探索防腐剂联用对唐菖蒲伯克霍尔德氏菌的影响。

综上,低温条件对唐菖蒲伯克霍尔德氏菌生长、产毒的抑制作用明显,10 °C贮存条件可有效降低米酵菌酸中毒的风险。现实情形中,由于食品行业冷链物流尚不完善且成本较高,因此河粉等湿大米制品的生产经营者更倾向于使用防腐剂以达到常温状态下延长货架期的目的。为解决实际需求,需寻找可作用于唐菖蒲伯克霍尔德氏菌的防腐剂,探索多手段结合的控制措施,以行业更容易

接受的成本来提高风险管控水平。

### 参 考 文 献

- [1] 王夏, 孟昭赫, 胡文娟, 等. 米酵菌酸中毒国外研究进展[J]. 国外医学(卫生学分册), 1987(1): 1-4. WANG X, MENG Z H, HU W J, et al. Research progress of rice yeast acidosis abroad[J]. Foreign Medicine (Health Branch), 1987(1): 1-4.
- [2] 孟昭赫. 酵米面(原称臭米面)中毒病因的研究报告——发现一种新的食物中毒菌——酵米面黄杆菌(*Flavobacterium fari nofermentans nou.sp*)[J]. 卫生研究, 1981, 2(2): 1-12. MENG Z H. A study on the etiology of fermented rice noodle poisoning: *Flavobacterium fari nofermentans nou. sp* found in food[J]. Health Research, 1981, 2(2): 1-12.
- [3] 孟昭赫, 刘秀梅, 王淑真, 等. 椰毒假单胞菌酵米面亚种食物中毒病原及预防的研究[J]. 医学研究通讯, 1997, 26(12): 10-11. MENG Z H, LIU X M, WANG S Z, et al. Study on the etiology and prevention of food poisoning caused by *Pseudomonas cocovenenans* subsp [J]. Medical Research Communication, 1997, 26 (12): 10-11.
- [4] 国家市场监督管理总局, 国家卫生健康委员会. 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)检验: GB 4789.29-2020[S]. 北京: 中国标准出版社, 2020: 1-17. State Administration for Market Regulation, National Health Commission. National standard for food safety - Microbiological Inspection of food *Burkholderia canorus* (*Pseudomonas coenovenosa* fermented rice subspecies): GB 4789.29-2020[S]. Beijing: Standards Press of China, 2020: 1-17.
- [5] ZHOU E, SUN Y, FU Y, et al. Bongkreki acid induced neutrophil extracellular traps via p38, ERK, PAD4, and P2X1-mediated signaling[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2021, 423: 1-6.
- [6] ANWAR M, KASPER A, STECK A R, et al. Bongkreki acid—a review of a lesser-known mitochondrial toxin[J]. J Med Toxicol, 2017, 13 (2): 173-179.
- [7] 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, 30(6): 54-56. LIU X M. Analysis on the epidemic trend of food poisoning caused by *Pseudomonas cocovenenans* fermented rice subspecies in China[J]. Chin J Preventive Med, 1996, 30(6): 54-56.
- [8] 陈晖, 傅锁洁, 王琦, 等. 2005-2020年我国唐菖蒲伯克霍尔德氏菌中毒事件流行病学分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2022, 34(6): 1336-1341. CHEN H, FU Y J, WANG Q, et al. Epidemiological analysis of *Burkholderia gladiolus* poisoning events in China from 2005 to 2020[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2022, 34(6): 1336-1341.
- [9] 陈子慧, 黄芮, 梁骏华, 等. 2018-2020年广东省河粉类食品米酵菌酸中毒事件流行病学分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2022, 34(1): 158-162. CHEN Z H, HUANG R, LIANG J H, et al. Epidemiological analysis of rice yeast acidosis in rice flour products in Guangdong province from 2018 to 2020[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2022, 34(1): 158-162.
- [10] LI J H, ZHOU L U, LONG C, et al. An investigation of Bongkreki acid poisoning caused by consumption of a nonfermented rice noodle product without noticeable signs of spoilage[J]. Journal of Food Protection, 2019, 2(10): 1650-1654.
- [11] 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 R Q, CHEN H J, HU J P, et al. Growth and virulence of *Pseudomonas cocovenenans* leaven rice subspecies in wet rice flour and its raw materials and risk analysis[J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(5): 320-327.
- [12] 严琼英, 李乐诗, 孙钰涵, 等. 一株椰毒假单胞菌酵米面亚种在湿米粉基质中的产毒情况和酸度分析[J]. 中国粮油学报, 2002, 38(6): 1-7. YAN Q Y, LI L S, SUN Y H, et al. Analysis of virulence and acidity of a fermented rice noodling subspecies of *Pseudomonas cocovenenans* in wet rice flour Matrix[J]. Chinese Journal of Cereals and Oils, 2002, 38(6): 1-7.
- [13] 肖潇, 李国君, 宋雁, 等. 基于系统文献检索食品添加剂脱氢乙酸及其钠盐危害识别[J]. 中国食品卫生杂志, 2020, 32(5): 582-588.

- XIAO X, LI G J, SONG Y, et al. Hazard identification of food additive dehydroacetic acid and its sodium salt based on systematic literature search[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2020, 32(5): 582-588.
- [14] 张维蔚, 刘于飞, 梁伯衡, 等. 广州市米粉制品超范围使用脱氢乙酸情况调查及居民暴露水平分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2018, 28(18): 2293-2295, 2298.
- ZHANG W W, LIU Y F, LIANG B H, et al. Investigation on excessive use of dehydroacetic acid in rice flour products and analysis of residents' exposure level in Guangzhou[J]. Chin J Health Lab, 2018, 28(18): 2293-2295, 2298.
- [15] 许超群, 陈飞平, 梁旭茹, 等. 肉桂醛与  $\epsilon$ -聚赖氨酸酸盐的抑菌活性及其协同抑菌机制初探[J]. 现代食品科技, 2023, 39(7): 1-8.
- XU C Q, CHEN F P, LIANG X R, et al. Preliminary Study on the antibacterial activity of cinnamaldehyde and  $\epsilon$ -polylysine hydrochloride and their synergistic antibacterial mechanism[J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(7): 1-8.
- [16] 史文艳, 孙震.  $\epsilon$ -聚赖氨酸酸盐与 Nisin 对蜡状芽孢杆菌的协同作用及机理[J]. 食品与机械, 2019, 35(3): 15-19, 103.
- SHI W Y, SUN Z. Synergistic effect of  $\epsilon$ -polylysine hydrochloride and Nisin on *Bacillus cereus* and its mechanism[J]. Food and Machinery, 2019, 35(3): 15-19, 103.

### Analysis of the Toxic Production of *Burkholderia gladiolus* in Wet Rice Flour Culture Medium

Chen Zihui<sup>1,2</sup>, Wang Haiyan<sup>3</sup>, Chen Shaowei<sup>2</sup>, Huang Rui<sup>2</sup>, Jiang Qi<sup>2</sup>,  
Wang Ping<sup>2</sup>, Yuan Jun<sup>4</sup>, Zhang Yonghui<sup>1,3\*</sup>

(<sup>1</sup>School of Public Health, Southern Medical University, Guangzhou 510515

<sup>2</sup>Guangdong Provincial Institute of Public Health, Guangdong Provincial Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 511430

<sup>3</sup>Guangdong Provincial Key Laboratory of Pathogen Detection for Emerging Disease Response, Guangdong Provincial Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 511430

<sup>4</sup>Guangzhou Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 511440)

**Abstract** Objective: To investigate the effects of preservative (dehydroacetic acid and  $\epsilon$ -polylysine hydrochloride) and incubation temperature on the growth and toxin production of *Burkholderia gladiolus* on wet rice flour medium. Methods: A *Burkholderia acorus* (*P. coenovenae*) strain isolated from a food poisoning event was used as the research object. The strains were inoculated into wet rice flour medium supplemented with dehydroacetic acid (1.0 g/kg),  $\epsilon$ -polylysine hydrochloride (0.25 g/kg) and no preservative, and cultured at 10, 26 and 36 °C to study the growth and virulence of the strains in wet rice flour. The modified Gompertz model was used to construct the primary growth model. Results: At 10 °C, the strain grew slowly and did not produce bongkreikic acid. At 26 °C, the strain produced toxin more than 500  $\mu$ g/kg in the control group and all experimental groups when cultured to 96 h. The strain produced bongkreikic acid the earliest in the samples with dehydroacetic acid, and its maximum concentration (1 484  $\mu$ g/kg) was slightly lower than that in the control group (2 561  $\mu$ g/kg) and  $\epsilon$ -polylysine hydrochloride group (2 762  $\mu$ g/kg). The most rapid growth was observed at 36 °C, but the production of toxin was lower than 350  $\mu$ g/kg. Conclusion: Storage of wet rice flour at 10 °C can effectively reduce the risk of producing rice kreikic acid. Both dehydroacetic acid and  $\epsilon$ -polylysine hydrochloride failed to prevent the growth and toxin production of *Burkholderia gladiolus*. It is necessary to further explore effective preservatives to develop multi-means control measures.

**Keywords** *Burkholderia gladiolus*; wet rice flour; bongkreikic acid; influencing factors