

# 從食品中檢驗 *Burkholderia gladioli* pathovar. *cocovenenans* (唐菖蒲伯克氏菌椰毒病原變種)

資料整理：台美檢驗 2024/04/11

- 一、前言
- 二、分類變化
- 三、唐菖蒲伯克氏菌 (*Burkholderia gladioli*) 的生物學性狀
- 四、唐菖蒲伯克氏菌 (*Burkholderia gladioli*) 的致病性與致病機轉
- 五、從食品中檢驗唐菖蒲伯克氏菌 (*Burkholderia gladioli*) 的流程
- 六、影響唐菖蒲伯克氏菌的米麩菌酸 (Bongkrek acid) 產生因素
- 七、米麩菌酸的去毒試驗
- 八、中國早期酵米麵食品中毒的流行病學
- 九、唐菖蒲伯克氏菌椰毒病原變種及其毒素米麩菌酸對食品的汙染
- 十、從臨床檢體分離唐菖蒲伯克氏菌的方法以及鑑定技術
- 十一、參考文獻
- 十二、台美檢驗公司可提供的食品服務

## 一、前言

*Burkholderia gladioli* pathovar. *cocovenenans* (唐菖蒲伯克氏菌椰毒病原變種)是中國發現的一個新的食物中毒菌，常從中毒酵米麵中分離出來。近年來從糯玉米、小米、黃米、高粱米、銀耳及環境中也分離到此菌。酵米麵是中國東北地區農村調劑膳食的一種食品。製作時是將粗糧（主要是玉米）加水浸泡10~30天發酵，然後水洗磨漿，經紗布過濾，沉澱，去水晾乾成白色玉米麵粉，略帶酸味，稱酵米麵（或臭米麵）。利用此麵粉，可做麵條、餃子等食品。該食品引發的食品中毒，稱為酵米麵中毒。研究指出，本菌也可引起變質銀耳及醋涼粉中毒。唐菖蒲伯克氏菌 (*Burkholderia gladioli*) 以前被稱為 *Pseudomonas gladioli* 和 *Pseudomonas marginata*，最早被描述為一種植物病原菌。

## 二、分類變化

1970年，Ballard 等人研究了 *Pseudomonas alliicola* 和 *P. marginata* 的 DNA-DNA 雜交和表型特徵，並提出前者應被視為異名(synonym)。

Hildebrand 等人更正了之前對 *P. marginata* 的描述，發現它與 *P. gladioli* 的描述相同；因此，他們建議將這兩個名稱與 *P. gladioli* 同名。隨後，Yabuuchi 等人根據多相(polyphasic)分類學研究，提議將包括 *P. gladioli* 在內的第2組假單胞菌 (*Pseudomonas* RNA homology group 2) 中的7個種歸入新的伯克氏菌屬 (*Burkholderia*) (分類學變化如圖1所示)。唐菖蒲伯克氏菌 (*Burkholderia gladioli*) 有三種病原菌，所有病原菌都被認為是主要的植物病原菌：*B. gladioli* pathovar *gladioli*，它能引起桔梗腐爛病；*B. gladioli* pathovar *alliicola*，會導致洋蔥球莖腐爛；以及 *B. gladioli* pathovar *agaricicola*，會導致栽培蘑菇快速軟腐。Van Damme 等人首次將椰毒假單胞菌(*Pseudomonas cocovenenans*)描述為

一種食物中毒細菌。其可產生兩種劇毒化合物：毒黃素(toxoflavin)和邦克瑞克酸(bongkrek acid)。1970 年代，在中國的東北和西南地區，偶爾會有因食入發酵玉米或變質的銀耳[(*Tremella fuciformis* Berk, 俗稱白木耳(white jelly fungi)]而導致食物中毒的高致死率(超過 40%)的報導。Meng 等人證實，食物中毒是由一種產黃色色素革蘭氏陰性桿菌引起的，這種細菌當時暫時被稱為 "*Flavobacterium farinofermentans*"。後來證明，"*F. Farinofermentans*" 與椰毒假單胞菌(*Pseudomonas cocovenenans*) 相同。

1995 年，Gillis 等人將 *P. cocovenenans* 菌歸入 *Burkholderia* 屬，即 *B. cocovenenans*。1999 年，Coenye 等人用全細胞蛋白測定法(whole-cell protein assays)和 DNA-DNA 雜交法研究了 *B. gladioli* 和 *B. cocovenenans* 之間的關係，並得出結論，後者是前者的同義詞。不過，在該研究中，使用 *B. gladioli* pathovar，而沒有考慮致病性。

最近的 Jiao 等人採用遺傳學、化學分類學和表型學等方法進行了多相分類研究，並利用從中國食品中毒病例中收集的所有病原菌的參照菌株和其研究室的分離菌，重新評估了唐菖蒲伯克氏菌和椰毒伯克氏菌之間的關係。在此，我們描述了產生致命毒素的菌株的新病原菌 *B. gladioli* pathovar *cocovenenans*，並提供了食物中毒病原菌與植物致病病原菌的不同特徵。

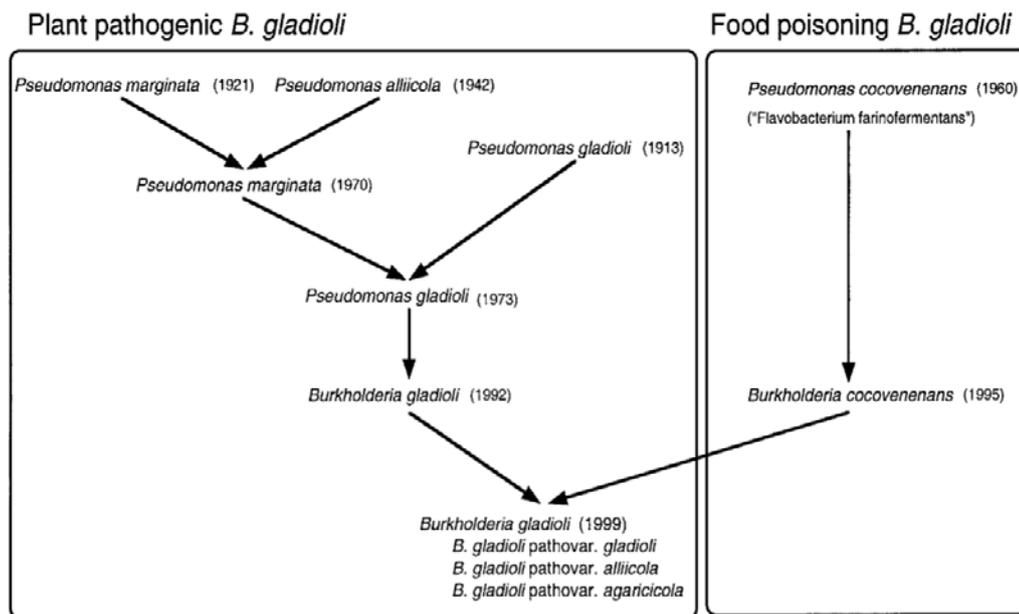


圖 1. 唐菖蒲伯克氏菌 (*Burkholderia gladioli*) 及相關菌種的分類變化 (Taxonomic changes of *Burkholderia gladioli* and related species)。括號中的數字為出版年份。

### 三、唐菖蒲伯克氏菌 (*Burkholderia gladioli*) 的生物學性狀

#### (一) 形態學

唐菖蒲伯克氏菌 (*Burkholderia gladioli*) 為革蘭氏陰性桿菌，多形態，大小 0.3~0.5×1.0~3.0 μm，為單個排列的短狀或稍彎曲，兩端鈍圓，有的菌兩端有濃染顆

粒。無芽胞，有運動性，有鞭毛呈極生、亞極生及側生鞭毛，此菌鞭毛在 1% PDA 瓊脂 (pH 5~6)，25°C 培養三天生長良好。本菌在電子顯微鏡下見有細胞壁，具管狀結構，並含有大量的脂肪顆粒。

### (二) 培養特性

唐菖蒲伯克氏菌 (*Burkholderia gladioli*) 生長溫度 25~37°C，以 37°C 生長最好，但產毒溫度以 26°C 為宜。在馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基(PDA)上菌落表面光滑、濕潤、凸起、有光澤、邊緣整齊、不透明，呈檸檬黃色。在 King A 及 B 培養基上和沙氏葡萄糖培養基上，26°C 培養 48 小時，產黃色素最佳，在普通瓊脂培養基上不產生色素。本菌菌落在紫外光下有黃色螢光，在 37°C 培養者生長較快。唐菖蒲伯克氏菌 (*Burkholderia gladioli*) 在各種培養基上的生長情況如表 1。

表 1. 唐菖蒲伯克氏菌 (*Burkholderia gladioli*) 在各種培養基上菌落形態特徵 (37°C 24 小時)

培養基	菌落形態
馬鈴薯葡萄糖瓊脂平板 (PDA)	菌落為灰白色或乳白色光滑濕潤，生長較快，菌落直徑 1~2 mm，有黃綠色色素，擴散到基質內，在紫外燈下觀察 (波長 365 μm) 菌落呈黃色
沙氏葡萄糖瓊脂平板(SDA)	菌落圓形略扁平有的呈鈕扣狀，表面光滑，但較乾燥 (有的濕潤) 肉眼觀察菌落呈檸檬黃色，直徑 1~1.5 mm，在菌落背面有一乳白色沉澱帶 (三天後)
卵黃瓊脂平板(Egg yolk agar)	菌落表面光滑濕潤，48 小時後，在菌周圍形成乳白色混濁環，在環表層，有一特殊的虹彩環
察氏瓊脂平板(Czapek Dox Agar)	菌落圓形乳白色或黃綠色，光滑生長緩慢，直徑 0.5~1.0 mm (26°C，48 小時)
營養瓊脂平板(nutrient agar)	菌落為圓形光滑濕潤，邊緣整齊，灰白色或無色半透明，有的菌株 48 小時後產生黃色色系，菌落直徑為 1 mm 左右，生長緩慢
血瓊脂平板(blood agar) (兔血)	菌落灰白色或乳白色，光滑濕潤圓形邊緣整齊，直徑 0.5~1.0 mm 左右，不溶血或 α 型溶血
EMB 瓊脂平板	菌落圓形光滑濕潤、粉色扁平，直徑 0.5~1.0 mm
SS 瓊脂平板	不生長或生長微弱
MacConkey 瓊脂平板	菌落圓形淡黃色或無色透明，光滑濕潤，直徑 0.5~1.0 mm，基質有淡黃色素

### (三) 血清學性狀

利用常規方法，取代表菌株 10 株，製備 O 抗原 (煮沸 2 小時)，做成 10<sup>10</sup> 個菌/ml 菌體懸浮液免疫家兔。取其抗血清進行試管滴度測定，結果相互間都出現凝集，滴度從 1:40~1:1280，說明這些菌株間有共同抗原性。但對其他常見致病菌，一般不凝集或低度凝集，但對副溶血性弧菌卻有較高的凝集 (1: 80~160)。

#### 四、唐菖蒲伯克氏菌 (*Burkholderia gladioli*) 的致病性與致病機轉

唐菖蒲伯克氏菌 (*Burkholderia gladioli*) 的毒力和培養物的毒性。中毒剩餘的酵米麵或本菌複製的酵米麵對小白鼠、狗的毒性與本菌 PDA 半固體培養物的濾液的毒性相一致。在狗灌胃 1~2 小時後，出現精神萎靡，不進食，嘔吐，臥立不安，後肢麻痺，陣發性抽搐，最後昏迷致死。小白鼠的中毒症狀，幾乎與狗相同。二者死亡後病理變化與酵米麵中毒死亡的屍檢病變相一致，但活菌 ( $26 \times 10^{13}/\text{mL}$ ) 或加熱 ( $100^\circ\text{C}$ , 20 分鐘) 死菌，均不能使小白鼠致死。胡等人從濾液中提取、純化和鑒定，證明此致死毒素為米酵菌酸 (Bongkrek acid)。用小白鼠經口試驗，結果  $\text{LD}_{50}$  為 3.16 mg/kg。其致病機轉，通過試驗證明米酵菌酸對氧化磷酸化抑制部位不在呼吸鏈，而是在線粒體上 ADP 轉運過程。增加了 ADP 與線粒體內膜的親和力，形成了複合物，從而阻斷 ADP 向內轉運。本菌還產生另一種毒素名叫毒黃素 (toxoflayin)，其毒性較低為 8.39 mg/kg。王等人證明本菌的產毒能力與血清型有一定關係，其產毒能力 V 型 > IV 型 > III 型。孟等人證明本菌的毒素與椰毒假單胞菌所產的米酵菌酸二者完全一致。

#### 五、從食品中檢驗唐菖蒲伯克氏菌 (*Burkholderia gladioli*) 的流程

(一) 檢驗流程如圖 2 與圖 3。

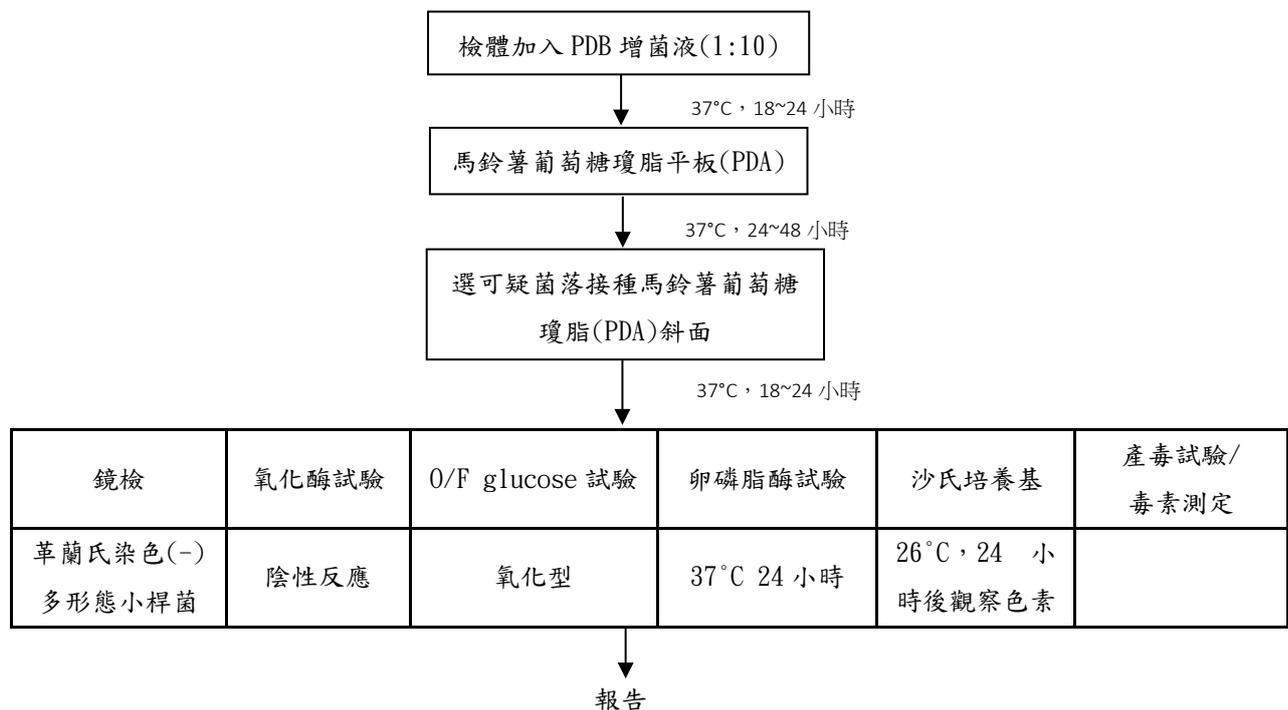


圖 2. 唐菖蒲伯克氏菌 (*Burkholderia gladioli*) 椰毒病原變種的檢驗程序

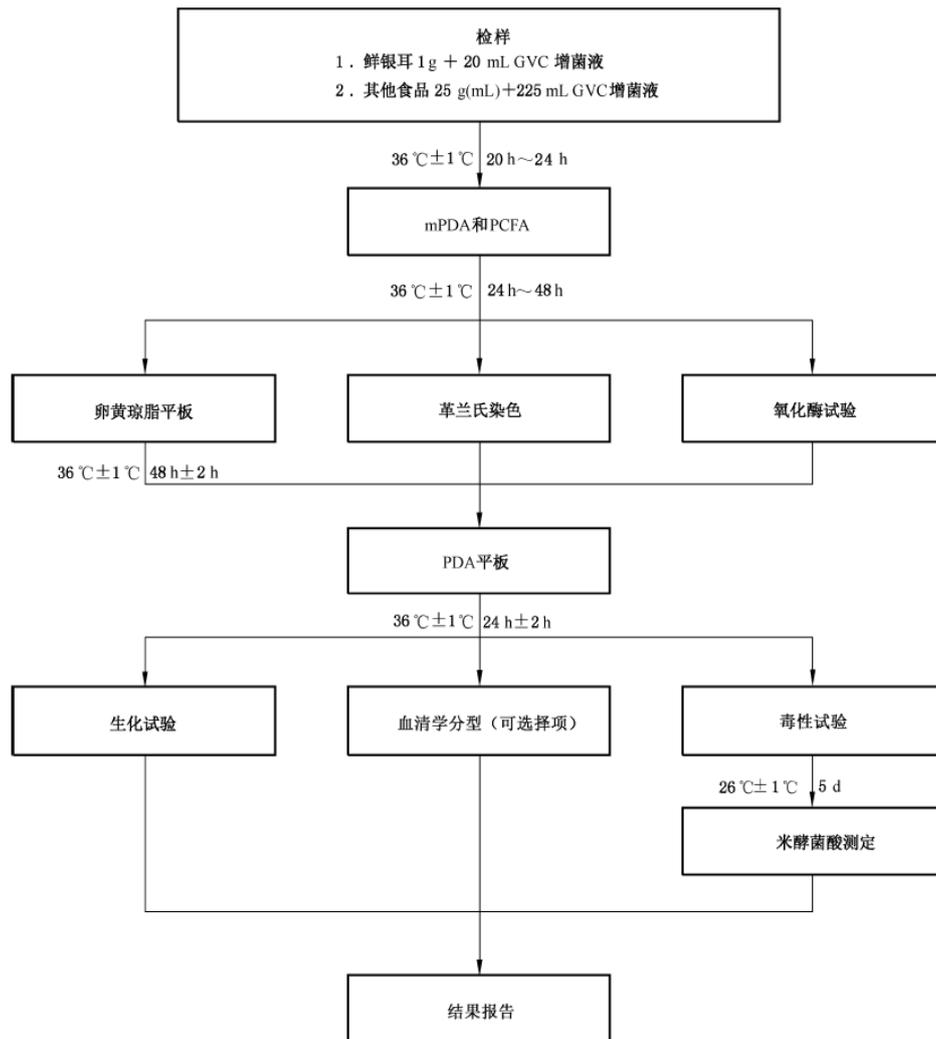


圖 3. 唐菖蒲伯克霍爾德氏菌(椰毒假單胞菌酵米麵亞種)檢驗步驟(中國國標方法)。

## (二) 檢驗的操作步驟

1. 樣品採集和處理：在無菌操作下採取中毒食品或環境污染物的棉拭，放無菌容器內立即送檢。

2. 增菌培養：食物樣品按 1/10 量製成生理鹽水懸浮液或 PDB（如 25 g 檢體加至 225 mL 的增菌液），置 37°C 18~24 小時進行增菌培養，然後移種馬鈴薯葡萄糖瓊脂平板(PDA)進行分離培養。

3. 分離培養：馬鈴薯葡萄糖瓊脂平板在 37°C，24~48 小時培養後，選取灰白色或乳白色光滑濕潤凸起型、直徑為 1~2 mm 菌落，置於 PDA 瓊脂斜面進行純培養，然後操作下試驗。

4. 革蘭氏染色鏡檢：樣品及純培養菌進行革蘭氏染色鏡檢，唐菖蒲伯克氏菌 (*Burkholderia gladioli*) 為革蘭氏陰性桿菌，大小為 0.5×1.0~3.0 μm，呈桿狀或稍彎曲，兩端頓圓，有的兩端呈濃染顆粒，無芽胞，有動力。鞭毛染色可見有極毛，亞極生及側生鞭毛。

5. 氧化酶試驗：取白色潔淨濾紙沾取菌落或用火柴棒挑取菌落放於濾紙上，加氧化酶試劑一滴，陽性呈藍色，陰性於兩分鐘內不變色。本菌氧化酶試驗呈陰性。

6. 卵磷脂酶試驗：取 PDA 平板上的可疑菌落或純培養菌，接種在卵黃瓊脂平板上，置 37°C 48 小時後觀察菌落。卵磷脂酶陽性者在菌落周圍形成乳白色混濁環，於環的表面上側面觀察可見到一種特殊的虹彩環。

7. 色素觀察：取 PDA 平板上的可疑菌落，接種在沙氏瓊脂平板上，置 26°C 48 小時後觀察色素。菌能產生黃綠色素，有時擴散到基質內，在紫外燈下觀察（波長 365 μm），菌落呈黃色。

8. O/F 試驗：本菌在有氧環境下有能力代謝糖類（表現產酸），在無氧環境下，不能分解糖，此點有助於該菌的鑑別。將純培養菌接種兩支 O/F w/1% 葡萄糖半固體發酵培養基，其中一管表面加一層滅菌礦物油（0.5~1.0 cm），將兩管同時置於 37°C 培養 24~48 小時觀察結果。不加礦物油的試管產酸，加礦物油的試管不產酸，顏色不變，故此菌為氧化型。

9. 生化試驗：將純培養菌作生化試驗。此菌對各種糖類分解比腸道細菌慢，一般 2~4 天，遲者可達 10~15 天才出現陽性結果。本菌生化特性見表 3 及表 4。

表 3. 六種常見 *B. cepacia* complex（洋蔥伯克氏菌複合群）之初步鑑定特性

試驗項目	菌株陽性%					
	<i>B. cepacia</i> （洋蔥伯克氏菌）複合群（基因變種）					
	<i>B. cepacia</i> （洋蔥伯克氏菌）	<i>B. multivorans</i> （多食伯克氏菌）	<i>B. cenocepacia</i> （新洋蔥伯克氏菌）	<i>B. vietnamiensis</i> （越南伯克氏菌）	<i>B. dolosa</i> （多羅莎伯克氏菌）	<i>B. gladioli</i> （唐菖蒲伯克氏菌）
Oxidase（氧化酶）	100	98	98	99	98	14
生長於：						
BCSA	100	100	100	98	100	69
42°C (TSA)	43	100	84	100	100	4
Lysine decarboxylase medium （賴氨酸脫羧酶）	98	50	97	99	0	1
從醣類產酸：						
TSI（三糖鐵斜面瓊脂）產酸	0	0	0	0	0	0
O/F maltose （麥芽糖氧化）	70 (39)	99 (98)	86 (78)	100 (97)	100	0
O/F lactose （乳糖氧化）	91	99	92	99	98	8

表 4: 較唐菖蒲伯克氏菌(*B. gladioli*)與六種常見 *B. cepacia* complex 的其他鑑定特性(孟等人測試 *B. gladioli* 40 株)

生化試驗	洋蔥伯克氏菌複合群	唐菖蒲伯克氏菌
Citrate	-	+
Urease	-	+
Indole	+	-
Ornithine decarboxylase	v	-
Lysine decarboxylase	+*	-
O/F Inositol	-	+
O/F Sorbitol	-	+
O/F Adonitol	-	+
Phenylalanine	+	-
Lecithinase	-	+
Nitrate reduction	-	+

### (三)產毒試驗：

取此菌的 24 小時培養菌製成懸浮液，接種於含有 0.5% 葡萄糖馬鈴薯半固體瓊脂平板上面，覆蓋無菌玻璃紙，進行產毒培養，在 26°C 培養 5 日，取出培養平板，將護蓋的玻璃紙取出，將平板置於 100°C，滅菌 15~20 分鐘。冷卻後，放低溫冰箱冷凍，然後析出上清液（粗毒素），將粗毒素原液或濃縮 5 倍，做為動物試驗用。

動物試驗小白鼠體重 18~20 g，進行灌胃，每隻 0.5~1.0 ml，灌胃後兩小時內發病。小白鼠如產生精神萎靡、興奮躁動、走路不穩、肢體癱瘓、抽搐（角弓反張），先後在 2~5 小時左右死亡者，即為產毒試驗陽性。

### (四)毒素檢測：

取 5~10 g 中毒食物或非中毒食物，經提取液提取，再用酸調 pH 至 2~3，用石油醚(Petroleum ether)提取，將石油醚提取液在 35°C 水浴上減壓吹氣濃縮至乾燥，加一定量甲醇溶解。然後在進行薄層層析（Thin layer chromatography, TLC，又稱為薄層色譜法）測定，測其濃度。同時取一份樣品在 45°C 烘烤 12 小時，將乾燥的樣品放在乳鉢中磨成粉，稱取 0.5 g 樣品，提取的步驟和測定與新鮮樣品相同。

陽性樣品的提取液進一步經薄層層析純化後，用甲醇洗脫，將洗脫液用紫外分光光度計（Ultraviolet spectroscopy）在 200~400 nm 波長範圍內掃描，結果出現米酵菌酸（Bongkrek acid）標準的兩大吸收峰，譜圖相一致（波長分別為 267 nm 和 236 nm）。

經薄層純化後的提取液，按薄層色譜測定所含毒素計算，給每隻體重 15 g 小白鼠半數致死量的毒素灌胃。試驗組和對照組每組各三隻小白鼠，對照組灌生理鹽水，結果應為試驗組動物全部死亡，其症狀與產毒試驗中的動物出現的症狀相同。對照組無一死亡。

## 六、影響唐菖蒲伯克氏菌的米麵菌酸（Bongkrek acid）產生因素

### (一) 不同因素對產毒的影響：

孟等採用正交設計法〔Orthogonal experimental design，是根據正交性從全面試驗中挑選出部分有代表性的點進行試驗，這些有代表性的點具備了“均勻分散，齊整可比”的特點，正交試驗設計是分式析因設計的主要方法〕，用三個菌株，以半固體做為基礎培養基，在三個不同的溫度(15~18°C、26°C與37°C)、pH(6.0、7.0與8.0)、培養時間(5、7與10日)的條件下，做平行培養。然後用加鹽法提取，利用紫外分光光度法測定結果。結果指出影響產毒大小的順序為：菌株>溫度>培養基>pH值>時間。

#### (二) 不同菌株產情況：

測試40個菌株，產毒情況因菌株不同而異。產毒量從200 µg/mL至<50 µg/mL。

#### (三) 不同培養基對產毒的影響：

用3個菌株接種在11種培養基上，結果指出除了PDA培養基產毒較多外，其他培養基產毒量都較少(表5)。

表5. 不同培養基對唐菖蒲伯克氏菌產米麴菌酸(Bongkrek acid)毒素的影響

培養基名稱	實驗次數	平均產毒量(µg/mL)
馬鈴薯葡萄糖瓊脂(PDA)	1	14.5
沙氏培養基	2	1.6
營養瓊脂	1	1.7
察氏培養基	1	1.2
玉米培養基	2	1.6
蛋白胨培養基	2	2.0
馬鈴薯培養基		
(含2.5%馬鈴薯粉)	1	3.0
(含2.0%馬鈴薯粉)	1	1.7
(含1.0%馬鈴薯粉)	1	1.3
(含0.5%馬鈴薯粉)	1	1.2

#### (四) 在自然基質中產毒情況：

選用市售不同糧食及可能產毒食品，粉碎後通過40目篩，製成5%的半固體培養基(銀耳粉2.5%不加瓊脂)，接種3個菌株，在26°C培養7天，用微生物法及動物試驗(小鼠經胃管餵)，測毒結果發現其中一株菌株，除雞蛋粉、乳兒粉、肉粉中不能產毒外，在其他糧食和食品中(包括玉米、高粱米、大米、大豆粉、豆腐粉、牛奶粉、肉粉、雞蛋白粉、銀耳粉、PDA培養菌)，均可產毒，並可使小鼠致死。

### 七、米麴菌酸的去毒試驗

#### (一) 去毒劑的篩選及其應用效果

中國研究者王等人利用米麴菌酸對真菌(黑曲黴)有抑菌作用的特點，利用抑菌試驗方法，進行藥物去毒的篩選，結果指出次氯酸鈣5%及1%具有良好的去毒效果

(表 6)。進一步調查次氯酸鈣的最低去毒濃度，進行動物試驗，結果指出 0.625%的次氯酸鈣，可使全部實驗動物得到保護，而 0.5%次氯酸鈣，則不能去除毒素的致死作用(表 7)。為了確切瞭解去毒劑的去毒效果，又進行了作用時間與去毒效果的觀察，結果見表 8。另外，利用薄層掃描，2%次氯酸鈣溶液 5、3、2.5 與 1  $\mu\text{L}$ ，均能使 3  $\mu\text{g}$  的米酵菌酸色點完全消失。

表 6. 利用微生物學測毒方法篩選去毒劑的效果(試驗菌株:黑曲霉)

試劑	濃度(%)	1	2	3	4	5	差值(1~5)
次氯酸鈣 (calcium hypochlorite)	5%與 1%	40*	0	14	14	0	40
次氯酸鈉 (sodium hypochlorite)	5%與 1%	45	45	20	44	26	19
高錳酸鉀 (Potassium permanganate)	0.5 與 0.1%	40	0	0	30	30	10
過氧乙酸 (Peroxyacetic acid)	10%與 2%	44	15	20	34	0	44
氫碘酸 (Hydroiodic acid)	10%與 2%	42	16	25	38	32	14
硫酸 (sulfuric acid)	10%與 2%	40	0	0	32	20	20
乙酸 (acetic acid)	10%與 2%	40	0	15	37	28	12
亞硫酸鈉 (Sodium sulfite)	5%與 2%	40	0	0	33	30	10

註：1，對照組，毒素稀釋 2 倍；2，低濃度去毒劑；3，高濃度去毒劑；4，試驗組：毒素+低濃度去毒劑；5，試驗組：毒素+高濃度去毒劑。

\*：表中數值是抑菌環的直徑 (mm)，其差值 1~5 表示去毒效果，數值越高，去毒效果越好。

表 7. 不同濃度次氯酸鈣去毒效果 (20°C, 12 小時)

次氯酸鈣%	實驗動物數	動物死亡數
5	10	0
2.5	10	0
1.25	10	0
1.0	10	0
0.625	10	0
0.5	10	7
毒素(1:2)對照	10	10
2.5%次氯酸鈣(對照)	8	0

表 8. 不同濃度和作用時間的次氯酸鈣去毒效果(20°C)

濃度%	作用時間(分鐘)	實驗動物數	死亡數
2.5	60	5	0
2.5	30	5	0
2.5	5	5	0
1.0	5	5	0
<b>1.0</b>	<b>即刻</b>	<b>35</b>	<b>0</b>
0.75	即刻	40	0
0.5	30	10	7
毒素(X2)	--	10	10
1%次氯酸鈣	--	5	0

### (二) 紫外線及日光的去毒效果

王等人利用點毒濾紙片法，測試紫外線去毒效果，結果，在波長 254 nm 紫外燈下，照射 60 或 30 分鐘(12 W 距離 10 cm，兩面各照 30 或 15 分鐘)均不形成抑菌圈，陳等人將銀耳剪成小塊用日光照射，結果指出，鮮變質銀耳日曬兩天，可使 95.3~97.6%的毒素被破壞，而乾銀耳經日曬只可破壞 57.3%，曝曬 8 天方可達到 94.2~94.4%的毒素去毒(表 9)。

表 9. 日曬對有毒銀耳的去毒作用

編號	種類	採樣量(g)	日曬 天數	米酵菌酸含量(ppm)		去毒效果(%)
				曬前	曬後	
1	鮮銀耳	1.5	2	178	5.9	96.7
2	鮮銀耳	1.5	2	178	5.9	96.7
3	鮮銀耳	2.0	2	960	23.3	96.6
4	鮮銀耳	2.0	2	768	21.3	97.2
5	鮮銀耳	4.0	2	316	8.9	97.2
6	鮮銀耳	4.0	2	285.2	8.0	97.2
7	鮮銀耳	4.0	2	426.7	20.0	95.3
8	鮮銀耳	4.0	2	420.7	11.1	97.3
9	乾銀耳	0.5	2	2255.7	962.1	57.3
10	乾銀耳	0.5	2	2255.7	842.1	62.7
11	乾銀耳	0.5	8	2255.7	130	94.2
12	乾銀耳	0.5	8	2255.7	126.9	94.4

## 八、中國早期酵米麵食品中毒的流行病學

### (一) 酵米麵中毒

酵米麵是大陸東北地區一種傳統的民間食品，是粗糧細做的產品。製作方法是將玉米，高粱米、或小米，放在缸裡加水浸泡，發酵 10~20 天左右，然後用清水沖洗，磨漿，經紗布過濾，待沉澱後，晾曬成粉，稱做酵米麵。偶而因食用此粉的製品而中毒，稱為酵米麵中毒。

中國早期酵米麵食品中毒的流行情形如表 10。在 1953 年黑龍江省首次報告吃酵米麵引起的中毒。其後 1956 年、1959 年分別在吉林和遼寧兩省相繼報告。到 1975 年，根據不完全統計，僅東北三省就發生了 226 起酵米麵中毒，1842 人發病，死亡 703 人，平均病死率達 38.1%，個別引起致死率高達 100%。1979 年後，先後在廣西、山西、河北、內蒙、四川九個省區，相繼發現酵米麵中毒。

變質銀耳中毒是 1985 年於山東首先發現，繼之河南也發生了中毒。臨床症狀與酵米麵中毒相一致，只是症狀較輕，致死率較低，經過實驗證明，也屬於同類細菌毒素所引起。另外，陝西省發生的醋涼粉中毒，經證明也是由於唐菖蒲伯克氏菌椰毒病原變種所引起。

根據不完全統計直至 1983 年八個省的酵米麵中毒，共發生 263 起，中毒人數達 2109 人，死亡人數為 876 人，致死率達 41.54%，變質銀耳到 1985 年統計，共發生七起，中毒人數達 139 人，死亡 20 人，致死率較低，為 14.4%。

酵米麵中毒發生的月份，最早是 5 月，最晚到 10 月，一般多集中在 6~8 月。原因食品絕大部分是酵米麵引起的。各年齡組和性別在發病方面無明顯差別。

(二) 潛伏期：各期中毒的潛伏期有些不同，根據 13 起中毒，130 個患者的統計，短者一小時，長者可超過 48 小時，一般在 1~10 小時為最多，占 70.4%。

食用量與發病的關係：從 91 例中毒者資料分析，進食量與中毒症狀的輕重，有密切關係，進食少者發病輕，進食多者則發病重。調查發現食入 25 g 者之發病率為 60%，而 100 g 者為 96%。

表 10. 早期中國的酵米麵和變質銀耳中毒的流行情況

地區	年度	中毒食品	引起件數	中毒人數	死亡人數	病死率(%)
黑龍江省	1953~1964	酵米麵	75	568	247	43.5
	1973~1974	酵米麵	11	97	41	42.3
吉林省	1956~1975	酵米麵	132	997	373	37.6
	1977~1981	酵米麵	11	68	44	64.7
遼寧省	1959~1965	酵米麵	8	186	42	22.6
廣西壯族自治區	1966~1980	糍粑	15	150	98	65.3
山西省	1982	霉變小米粉	1	7	4	57.1
河北省	1982	酵米麵	1	3	3	100.0
	1983	酵米麵	6	6	4	66.7
內蒙古自治區	1982	酵米麵	1	12	7	58.3
四川省		湯圓	2	21	13	61.9
山東省	1984	變質銀耳	1	105	8	7.6

河南省	1984	變質銀耳	1	5	1	20.
河南省	1985	變質銀耳	5	29	11	37.9
共計	1953~1985		270	2248	896	39.8

### (三) 酵米麵中毒的臨床症狀及屍檢

進食後，開始患者感到上腹部不適，全身無力等症狀。少數患者出現腹瀉，但症狀輕微。嘔吐物多為咖啡色，嚴重者出現黃疸、昏迷、譫語、四肢抽搐、少尿、血尿、閉尿、血便和尿儲留。有的發病很急，呈現中毒性休克而死亡。

一般體溫不高，少數重症患者有中等度發燒，肝腫大，**肝功能有明顯改變**，血清轉氨酶(aminotransferase) [包括 aspartate aminotransferase(AST, GOT)及 alanine aminotransferase (ALT, GPT)] 明顯增高，鞏膜變黃、皮膚黃疸。心律較快，有時出現心律不整。肺部在病後期可出現濕性羅音。有皮下出血。

重症患者出現血壓下降，潮式呼吸 (Cheyne-Stokes respiration) (註:呼吸逐步減弱以至停止和呼吸逐漸增強兩者交替出現，周而復始，呼吸呈潮水漲落樣)，呼吸麻痹而死亡。紅血球和血色素一般在正常範圍，少數病例白血球增加。

在酵米麵食物中毒的死亡患者，進行三例屍檢，肉眼觀察及病理組織學切片鏡檢，結果如表 11。

表 11. 屍檢的肉眼觀察及病理組織切片鏡檢

臟器種類	肝	腎	腦	心	肺	胃腸	脾
肉眼觀察	質軟、暗紅色、無光澤，表面有不均等出血，呈紅黃相間的斑紋狀	腎皮質腫大，髓質充血，脂肪囊出血，包膜不易剝離	中毒性腦水腫、腦疝 (Brain herniation，顱內壓過高的併發症)、軟腦膜及蛛網膜充血、水腫	心肌軟、濁腫、心內、外膜出血	肺水腫，切面可見大量粉紅色泡沫及液體流出，肺不張 (肺葉萎縮)	胃內有咖啡樣物，十二指腸、空腸黏膜點狀出血，腸系膜淋巴結腫大	瘀血較正常大一倍

病理切片 鏡檢	急性中度 性肺壞 死，細胞 變性壞 死，以肝 小葉中心 帶及中間 帶為主	中毒性腎 病，近側 曲管上皮 細胞變 性，壞死 崩解，脂 肪變性， 遠曲管壞 死，並有 顆粒及透 明管形成	中毒性腦 病，水腫， 神經細胞退 變，壞死	心肌濁 腫變 性，局 部心肌 纖維斷 裂，心 內外膜 斑狀及 點狀出 血	肺水腫瘀 血，肺胞 擴張，內 充以血 球，在大 量白血球 的細胞漿 中，含有 中毒顆粒	胃點狀出 血，迴腸 漿細胞有 斑狀及點 狀出血， 黏膜下的 肌肉層及 漿膜層水 腫瘀血	瘀血
------------	---	---	--------------------------------	---	---	---	----

#### (四)病原菌的探討

依食品微生物學及化學方法進行採樣及檢驗，結果未發現常見的化學毒物及農藥，也未發現常見的致病菌，但是在培養真菌的馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基(Potato dextrose agar)上發現一種少見的產黃色素的小菌落，純化後從 32 起中毒檢樣中分離到 40 株產毒菌，經過產毒試驗、病理觀察，結果證實了這種產黃色素菌的毒素是引起酵米麵的病因。其證實的檢驗程序見圖 4。

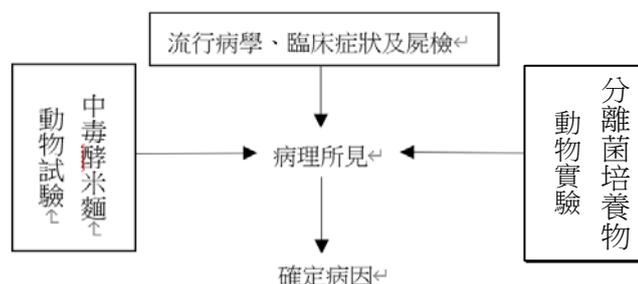


圖 4. 酵米麵中毒檢驗程序圖

根據引起中毒的產毒菌形態，培養特性、生理生化性狀，DNA 的 G-C 克分子百分比值及抗 O 血清性狀，將它暫命名為酵米麵黃桿菌 (*Flavobacterium farinofermentans* nor. sp., 1979)。1987 年孟等人鑑於本菌所產的毒素是米酵菌酸 (Bongkrek acid) 與印尼的椰毒假單胞菌相一致，於 1986 年與英國引進一株椰毒假單胞菌與酵米麵黃桿菌進行多方面的對比，結果指出，本菌與椰毒假單胞菌除了生態環境和側金盞花醇(adonitol)不同外，其他生理、生化、血清學性狀、分子雜交、毒素的化學測定(紫外分光光譜)等二者結果完全一致，遵照國際命名法原則，建議命名為椰毒假單胞菌酵米麵亞種(*Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans* Meng & Wang et al, 1987)。後來的分類變遷如圖 1。

#### 九、唐菖蒲伯克氏菌椰毒病原變種及其毒素米酵菌酸對食品的汙染

中國大陸 1986-1987 曾經調查食品中唐菖蒲伯克氏菌椰毒亞種及其毒素米酵菌酸對食品的汙染，兩年間共檢測 2013 件(其中玉米和酵米麵共 1,142 件，其他糧食

236 件，鮮、乾銀耳 635 件)，調查結果如表 12。

在銀耳的病原菌污染中，以鮮銀耳較多。檢出陽性率為 4%，檢出米酵菌酸陽性達 8.2%；玉米/酵米麵的病原菌檢出率低，而米酵菌酸檢出率為 1.2%。在糧食的污染中，除酵米麵外，還在糯米、黃豆中檢出了米酵菌酸，檢出率為 1.5%(2/130)。另外，在環境中屋內牆壁、地面及環境土壤中檢出產毒菌，在這三種環境檢樣共 357 份檢體中，檢出 4 株毒菌(1.1%)。

表 12. 各種食品樣品中唐菖蒲伯克氏菌椰毒亞種(椰毒病原變種)及其毒素米酵菌酸的汙染情況

樣品種類	唐菖蒲伯克氏菌椰毒病原變種			米酵菌酸		
	樣品數	陽性數	檢出率 (%)	樣品數	陽性數	檢出率 (%)
玉米 / 酵米麵	1142	1	0.09	572	7	1.2
<b>鮮銀耳</b>	<b>371</b>	<b>15</b>	<b>4.0</b>	<b>341</b>	<b>28</b>	<b>8.2</b>
乾銀耳	264	1	0.4	214	0	0
其他糧食	236	0	0	130	2	1.5
合計	2013	17	0.8	1157	37	3.2

## 十、唐菖蒲伯克氏菌的臨床感染及鑑定技術

### (一) 唐菖蒲伯克氏菌(*B. gladioli*)的臨床感染

唐菖蒲伯克氏菌為常見的植物病原菌，但它也被認為能夠引起 CF (Cystic fibrosis, 囊腫纖維症) 或 CGD (chronic granulomatous disease, 慢性肉芽腫病) 患者的感染，偶爾也會引起免疫力低下患者的感染。沒有記錄的報導稱，CF 患者的急性肺部惡化和復發性軟組織膿腫以及嚴重的肺移植後感染都可能唐菖蒲伯克氏菌引起的。

歷史上，由於難以準確識別唐菖蒲伯克氏菌，人們一直無法更全面地瞭解 CF 患者中此菌感染的流行病學和臨床意義，此菌偶爾能(通常不能)在用於分離洋蔥伯克氏菌複合群的選擇性培養基上(BCSA)生長，並且常被商業鑑定系統錯誤鑑定為是洋蔥伯克氏菌複合群的成員。通過基因方法對這此菌進行更準確的鑑定指出，與洋蔥伯克氏菌複合群中的大多數菌種[多殺性伯克氏菌(*B. multivorans*)和新洋蔥伯克氏菌(*B. cenocepacia*)除外]相比，唐菖蒲伯克氏菌在 CF 患者感染中的發病率要高得多。

### (二) 唐菖蒲伯克氏菌(*B. gladioli*)的鑑定

表型上也很難將洋蔥伯克氏菌複合群 (*B. cepacia* complex, BCC) 與唐菖蒲伯克氏菌 (*B. gladioli*) 和潘朵拉菌屬 (*Pandorea* 潘朵拉菌屬) 區分。細胞脂肪酸分析亦無法區分。大多唐菖蒲伯克氏菌菌株的氧化酶為陰性，且大多數菌株不能氧化麥芽糖與乳糖。潘朵拉菌屬 (*Pandorea*) 中的菌種不氧化麥芽糖、乳糖、木糖、蔗糖或側金盞花醇(adonitol)，而且大多數 ONPG 陰性。

洋蔥伯克氏菌複合群 (BCC) 目前由 23 個密切相關的菌種組成，其與唐菖蒲伯克氏菌 (*Burkholderia gladioli*) 可對囊性纖維化 (CF) 患者造成嚴重且難以治療的感染。

基質輔助鐳射解吸電離飛行時間質譜 (MALDI-TOF) 是臨床實驗室最近引入的一種快速鑑定細菌種類的方法。研究者評估 Biotyper 和 VITEK MS 系統的 MALDI-TOF 與 *recA* 基因測序 (目前被認為是 BCC 鑑定的黃金標準) 相比，對代表 22 個 BCC 菌種和 *B. gladioli* 的 100 個分離菌進行鑑定，結果指出：在屬層次，Biotyper 和 VITEK MS 系統分別將 100% 和 97.0% 的分離菌屬正確鑑定為伯克氏菌，但鑑定至種的層次，僅分別為 26.0% 和 67.0% 被正確鑑定。總之，目前的 MALDI-TOF 系統經常無法準確鑑定伯克氏的菌種類別。

## 十一、參考文獻

1. Z Jiao, Y Kawamura, N Mishima, R Yang, N Li, X Liu, T Ezaki. Need to Differentiate Lethal Toxin-Producing Strains of *Burkholderia gladioli*, Which Cause Severe Food Poisoning: Description of *B. gladioli* Pathovar *cocovenenans* and an Emended Description of *B. gladioli*. *Microbiol. Immunol.* 47(12), 915 – 925, 2003.
2. 孟昭赫。食品衛生檢驗方法註解。人民衛生出版社。1988。
3. 梁多恩，歐柏廷，蔡岳廷，蔡文城。建立藥品中 *Burkholderia cepacia* Complex 的實用診斷流程。檢驗及品保雜誌。2019; 8:93~103。
4. Carroll KC *et al.* 2019. *Manual of Clin Microbiol*, ASM P. 807~828.
5. 中國食品安全國家標準。食品微生物學檢驗：唐菖蒲伯克霍爾德氏菌 (椰毒假單胞菌酵米麵亞種) 檢驗。2020。

## 十二、台美檢驗科技股份有限公司提供的檢驗服務

1. 食品中唐菖蒲伯克氏菌 (*Burkholderia gladioli*) 的檢驗  
檢體：包括黑木耳、白木耳(銀耳)、粉粿條、玉米、小米、高粱米、椰果製品、酵米麵、霉變小米粉、糍巴等，食品至少 50 g(mL)。  
環境棉拭(牆壁、冰箱底部的汙染水漬、儲存食品冰箱的內壁塗抹拭子)等，每項棉拭至少 2 支。
2. 食品中唐菖蒲伯克氏菌 (*Burkholderia gladioli*) 的微生物檢驗
3. 唐菖蒲伯克氏菌 (*Burkholderia gladioli*) 表型鑑定
4. 唐菖蒲伯克氏菌 (*Burkholderia gladioli*) 的 PCR 鑑定(約 5 月 1 日取得引子後開辦)