

食品工业用菌的病原性研究*

李凤琴 计融 李玉伟 于洲 韩春卉 张静 杨华 罗雪云

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021)

摘要:为研究食品工业用真菌的致病性,将不同浓度的米曲霉和黑曲霉孢子经小鼠尾静脉注射,观察 14 d 内动物出现的中毒症状、死亡和体重变化,实验终结时测定脑、肝、肾、脾中的生存菌数,同时作病理组织学检查。结果表明,2 个菌种对小鼠造成的主要损害为肾脏化脓性病变,1 × 10⁵ 以上剂量组小鼠 2 个以上脏器同时检出活菌。米曲霉 1 × 10⁵ 以上剂量组动物出现了中毒症状和死亡,黑曲霉实验组动物未见中毒和死亡。致病性随染孢子量的增加而加重,呈正剂量 - 反应关系。本研究为完善我国食品工业用菌安全性评价体系提供了依据。

关键词:曲霉;米;曲霉,黑;曲霉病;小鼠

中图分类号:R15;TS201.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1004 - 8456(2002)04 - 0003 - 05

食品新资源的开发利用导致了新的食品工业用菌种不断涌现。随着我国加入 WTO 和农产品、食品国际贸易自由化的进一步发展,国内农产品及食品贸易市场将面临对外开放的巨大压力,国外大量用微生物生产的食品业已或即将进入我国市场,工业真菌在食品加工使用中的安全性问题日益受到广泛的关注。目前我国在食品工业用菌的食用安全控制方面,从管理到技术支持均存在大片空白,缺乏相应的法规和管理手段,对菌种的使用放任自流。因此,食品工业用菌的安全性基本处于失控状态,更谈不上与食品工业保持同步发展和保证食品的食用安全性,在很大程度上阻止了食品工业的发展。即使是一些投产时认为安全的菌种,在长期的传代使用过程中也可能发生变异。加上管理部门缺乏相应的系统性安全监测评价方法,致使不安全菌种流入食品生产加工业的事件屡屡发生,在很大程度上影响了我国食品工业在国际上的声誉,也使我国难以将国外一些用不安全真菌菌种生产的食品拒于国门之外。鉴于食品工业用菌突出的安全隐患,本研究拟对目前我国评价食品工业用菌安全控制技术进行改进,建立与国际接轨的检测技术,为完善菌种的安全性评价提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 实验菌种

米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)、黑曲霉 (*Aspergillus*

niger) 两个食品工业生产菌种,由某保健食品生产厂家提供。菌种分别转种于查氏培养基斜面,于 28 培养 7 d 后,用 0.85% 的生理盐水制成孢子悬液,1 000 r/min 离心 3 min 去除菌丝,上清液转于另一试管中混匀进行孢子计数,按原液、10、100、1 000、10 000 倍依次稀释制成 5 个浓度的孢子悬液备用,以生理盐水作对照。取不同浓度的孢子悬液各 0.1 mL 于灭菌平皿中,同时将马铃薯 - 葡萄糖 - 琼脂培养基倾注于平皿,于 28 培养进行活孢子计数。计数结果表明,孢子悬液原液中含有约 1 × 10⁸ 个孢子。

1.2 实验动物的饲养及处理

将 132 只体重为 16 ~ 18 g 的雌性昆明种小鼠(动物许可证编号:京动许字 99001),按体重随机分成 5 个米曲霉试验组,5 个黑曲霉试验组,一个共用对照组,共 11 组 ($n = 12$)。饲养驯化 3 d 后,经尾静脉一次注入孢子悬液,每只注射 0.1 mL,动物分组及染菌剂量见表 1。染菌开始日动物体重范围为

表 1 实验动物分组及染菌情况

| 菌种 | 各组分物数 | 剂 量 | | |
|--------------------|-------|------------------|----------|---------------------|
| | | 稀释水平 | 注入量 mL/只 | 孢子量/只 |
| 生理盐水对照 | 12 | - | 0.1 | 0 |
| | 12 | 原液 | 0.1 | 1 × 10 ⁷ |
| | 12 | 10 ⁻¹ | 0.1 | 1 × 10 ⁶ |
| | 12 | 10 ⁻² | 0.1 | 1 × 10 ⁵ |
| | 12 | 10 ⁻³ | 0.1 | 1 × 10 ⁴ |
| 实验组 ⁽¹⁾ | 12 | 10 ⁻³ | 0.1 | 1 × 10 ⁴ |
| | 12 | 10 ⁻⁴ | 0.1 | 1 × 10 ³ |

注:(1) 2 菌种实验动物数、孢子悬液的制备和孢子注入量相同。

*科技部“十五”攻关重大课题基金资助项目(2001BA804A02)

18.7~23.1 g,染菌后动物自由进食、饮水,14 d后颈椎脱臼处死。

1.3 观察指标

动物染菌后持续观察 3 h,5 h 后观察 1 次,以后每天观察 1~2 次。记录实验期间动物的一般状态、体重增长情况、出现的中毒反应及死亡情况。对濒临死亡的小鼠颈椎脱臼处死后,检查各脏器是否有肉眼可见的异常,同时摘取脑、肝、脾、肾和解剖时发现异常的脏器,置 10%福尔马林溶液中固定备用。

1.4 病理组织学检查

实验期间死亡和实验终处死小鼠的脑、肝、脾、肾,经福尔马林固定、石蜡包埋、切片、常规 HE 染色后进行病理组织学检查。此外,对大体解剖时确认为异常的其他脏器,进行同样的病理组织学检查。

1.5 生存菌数测定

取解剖所得脑、肝、肾、脾 4 个脏器各少许,用剪子剪碎,分别置于 2 个 PDA 平行平皿中,用 L 棒均匀涂开,置 28℃温箱中培养,计算培养后生长的菌落数。

2 结果

2.1 一般症状及死亡

米曲霉 1×10^5 剂量组 2 号小鼠于染菌后 4 d 出现萎靡不振,肢体活动不灵,行走时身体向左前歪斜、头部震颤、不能自主饮水、进食等,处死。解剖见脑血管充盈扩张,并可见散在的出血点,左侧尤为严重;左侧小脑萎缩;肝脏表面偶见 2~3 个针尖大灰黄色斑点;肾被膜下可见出血点。同时, 1×10^6 和 1×10^7 组小鼠也于染毒后 4 d 相继出现活动欠佳、自发性运动亢进、有激惹现象、肢体及头部震颤,行走极度困难、体态姿势发生改变如头部着地、拖跨并向左侧歪斜等。 1×10^6 组小鼠从实验第九天开始陆续出现死亡,实验终结时只有 2 号和 11 号 2 只存活,死亡率为 83.33%,而 1×10^7 组小鼠至实验第十天时全部死亡。解剖可见小脑底部血管纹理增加、淤血,个别广泛出血;脑干下出血;大脑右侧颞叶基底部分点状出血,个别者从延脑、桥脑、蛛网膜和中脑均可见大面积出血。肝脏表面和肝内瘀血;肾表面颜色灰白、两侧大小不一;大体解剖未见脾脏异常。

和米曲霉相比,黑曲霉实验组动物中毒症状出现较晚, 1×10^7 组小鼠于实验第八天出现自发性运动亢进或减弱、行走时头向右侧歪斜、拖跨等。试验结束时 1×10^7 组动物 3 只死亡 (25%),其它组动物未见死亡。

2.2 对体重的影响

2 个菌种的孢子对小鼠体重的影响见图 1。由图 1 可见,米曲霉 1×10^6 、 1×10^7 组小鼠体重与对照组相比差异有显著性 ($P < 0.05$),黑曲霉 1×10^7 组小鼠体重低于对照组。因此高剂量孢子可导致小鼠体重降低。

2.3 脏器生存活菌数

实验中濒临死亡和实验终存活的小鼠对其脑、肝、脾、肾 4 个脏器进行生存活菌数测定,结果见表 2。由表 2 可见,随染孢子量增加,小鼠各脏器中检出的活菌数增多,其中 1×10^5 及其以上剂量组的小鼠开始出现 2 个或 2 个以上脏器同时检出活孢子,且有正剂量反应关系。

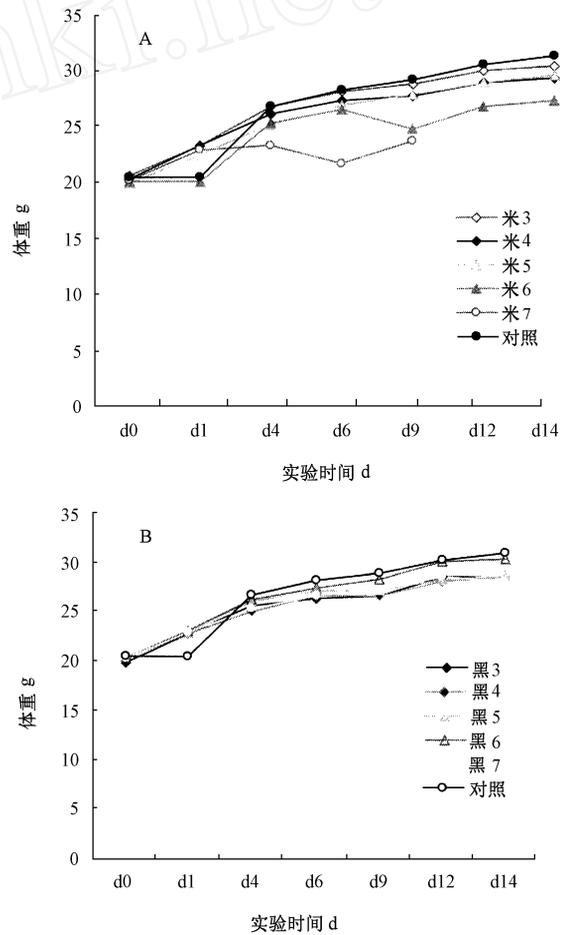


图 1 真菌孢子对小鼠体重的影响
A 米曲霉 B 黑曲霉

2.4 病理组织学改变

2.4.1 肾脏 米曲霉 1×10^6 和 1×10^7 剂量组,黑曲霉 1×10^7 剂量组动物的肾盂、肾髓质和乳头区、肾皮质等出现了不同程度的异常变化(见表 3),而低剂量组动物未见异常;2 个菌种各剂量组未见肾小球病变。由表可见,米曲霉孢子所致动物肾脏异常的剂量较黑曲霉低,受累及动物多,病变程度严重。

表2 各脏器生存菌数

| 剂量组别 | 肝 | 肾 | 脑 | 脾 |
|--------------------|--------------|------------|------------|-------------|
| 米曲霉 | | | | |
| 1 ×10 ³ | 0.04 ±0.14 | - | 0.04 ±0.14 | 0.08 ±0.29 |
| 1 ×10 ⁴ | 0.08 ±0.29 | - | - | 0.10 ±0.21 |
| 1 ×10 ⁵ | 0.25 ±0.34 | 0.04 ±0.14 | 0.12 ±0.43 | 0.33 ±0.39 |
| 1 ×10 ⁶ | 1.33 ±0.73 | 0.46 ±0.45 | 0.04 ±0.14 | 2.75 ±1.80 |
| 1 ×10 ⁷ | 5.54 ±2.89 | 0.83 ±1.23 | 0.29 ±0.26 | 9.42 ±3.50 |
| 黑曲霉 | | | | |
| 1 ×10 ³ | - | - | - | - |
| 1 ×10 ⁴ | - | - | 0.04 ±0.14 | - |
| 1 ×10 ⁵ | 0.23 ±0.34 | 0.14 ±0.23 | 0.09 ±0.30 | 0.05 ±0.15 |
| 1 ×10 ⁶ | 4.00 ±4.37 | 1.44 ±1.74 | 0.75 ±0.96 | 7.81 ±17.38 |
| 1 ×10 ⁷ | 17.50 ±19.28 | 2.38 ±1.83 | 1.67 ±1.94 | 3.92 ±4.19 |

注:2个以上脏器同时检出活菌的小鼠见于1 ×10⁵及其以上剂量组。“-”表示阴性。

表3 各组动物肾脏病理改变

| 组别 | 出现异常的动物数 | | | | | | | |
|------------------------|----------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 肾盂积液 | 化脓性肾盂炎 | 肾盂周围炎 | 肾盂霉菌菌丝 | 髓质间质性炎 | 肾小管内脓栓 | 髓质霉菌菌丝 | 皮质间质性炎 |
| 米曲霉 | | | | | | | | |
| 1 ×10 ³ | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 1 ×10 ⁴ | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 1 ×10 ⁵ | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 1 ×10 ⁶ | 7/12 | 12/12 | 7/12 | 7/12 | 7/12 | 7/12 | 5/12 | - |
| 1 ×10 ⁷ (1) | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 9/10 | 10/10 |
| 黑曲霉 | | | | | | | | |
| 1 ×10 ³ | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 1 ×10 ⁴ | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 1 ×10 ⁵ | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 1 ×10 ⁶ | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 1 ×10 ⁷ | 4/12 | 4/12 | 2/12 | 2/12 | 2/12 | 3/12 | 2/12 | 1/12 |
| 对照组 | - | - | - | - | - | - | - | - |

注:(1)有2只动物因死后时间较长,组织发生自溶,未作病理切片。“-”表示阴性。

2.4.2 脑 部分标本可见蛛网膜内血管扩张充血,某些区域有散在的点、片状出血,少数动物脑室内可见较多的红细胞聚集,脑膜未见炎性细胞浸润。脑实质中可见神经细胞的轻度变性和血管轻度扩张,部分标本有点状和片状出血区。未见明显的化脓性炎症变化和霉菌菌丝。所有实验动物(包括对照)均有脑血管充血现象。

2.4.3 肝 肝脏结构基本正常。少数可见小血管和肝窦扩张充血并伴随肝细胞轻度变性,有散在的单核细胞灶状浸润。未见明显的化脓性变化和霉菌菌丝。

2.4.4 脾 部分标本脾窦轻度扩张,窦内见较多的白细胞聚集。

3 讨论

近年来,食品工业生产水平的不断提高和转基因技术在工业菌种改造中的应用,促使新的食品工

业菌种的不开发。工业用菌的安全性评价应包括两方面的内容,一是菌种本身对人和动物无致病性,二是不产生对人和动物健康造成危害的有毒代谢产物或活性物质,两者缺一不可。目前我国对菌种毒理学评价的方法是将菌种接种于几种产毒培养基中,在一定温度下培养2周后,用培养液一次性灌胃染毒小鼠,观察试验期间动物的中毒情况。该方法实际上是评价菌种产生毒素的能力和毒素对动物的急性毒性作用,缺憾是不能反映菌种本身对动物的致病性,致使一些产生毒素的水平不足以使动物发生急性中毒,而低剂量长期暴露对人和动物有危害的产毒菌株成为漏网之鱼,其安全性无从评价。世界上一些发达国家如日本和丹麦,菌种的致病性和产毒实验是工业用菌安全性评价程序的重要组成部分。相比之下,我国的方法只反映了程序中的一个方面。另外,美国环境保护局规定,只有来自官方认可的标准菌种保藏中心的菌种方可允许被用于食品

肾盂 部分标本中,肾盂粘膜上皮几乎完全坏死脱落,并可见少量残留化生的鳞状上皮。下方肌层和纤维结缔组织直接暴露于表面,有较多炎性细胞浸润。肾盂腔内有大量脓性物质积聚,并掺杂有明显的霉菌菌丝。

肾髓质和乳头区 部分标本的间质内有较多的炎性细胞浸润,肾小管内腔充满脓性管型,并可见霉菌菌丝。肾小管上皮因变性坏死而部分或完全脱落。病变严重区域可见成片的肾组织坏死,间或可见小脓肿。脓肿内肾组织结构消失,脓性物质中含有霉菌菌丝。

肾皮质 多数标本皮质结构保持正常,部分动物的肾小管和间质内有炎性细胞浸润,未见霉菌菌丝。

工业生产。^[1]目前我国食品生产用菌的管理混乱,菌种来源非常复杂,一些生产厂家受利益的驱使,将从自然界中分离到的、具有致病性甚至能产生对人和动物有害代谢产物或未经安全性评价的菌种用于食品生产,严重危害了消费者的健康和生命安全。即使从官方菌种保藏单位所购菌种也非绝对安全,如20世纪70年代我国曾发生生产酱油用真菌菌种在发酵基质上不产生黄曲霉毒素,而在其他基质上产毒的事件。为杜绝不安全菌种流入食品生产企业,确保食品的安全性,保护消费者健康,对新开发或虽已经有关部门认可但长期传代使用的菌种必须进行安全性评价,建立规范化的工业用菌安全性检测体系已是当务之急。

在亚洲,米曲霉用于生产酱油、大酱、白酒等食品的生产已有两千多年的历史。20世纪初,欧洲一些国家也开始用米曲霉、黑曲霉生产焙烤和酿造用酶制剂。1987年,FAO/WHO/JECFA批准米曲霉和黑曲霉可用于食品工业用酶制剂的生产。美国环境保护局对米曲霉与其他物种的分类关系、对人类健康和环境的危害和工业应用的风险性评价结果表明,米曲霉对动植物无致病性。^[1]但由于米曲霉是曲霉属黄曲霉群中的一个种,有专家甚至认为米曲霉即是黄曲霉的驯化变种,与其野生原代有92%的DNA同源。由于该菌缺乏在环境中生存的结构(如形成菌核或产生黄曲霉毒素以抑制昆虫的侵袭),不易形成孢子,因此该菌与黄曲霉不同,极少从自然界分离到。但由于两者的形态极其相似,难免鉴定错误,从环境中分离到的米曲霉极有可能是黄曲霉。鉴于米曲霉与黄曲霉的同源性和黄曲霉可产生黄曲霉毒素这一事实,使人们特别重视对米曲霉毒力的检测。虽未见工业用米曲霉产生黄曲霉毒素的正式报道,但El-Hag和Morse的研究显示,野生的米曲霉菌株NRRL1988可产生黄曲霉毒素,这一发现引起了人们的广泛注意。^[2]此外,某些米曲霉菌株可产生其他真菌毒素如-硝基丙酸、曲酸和圆弧偶氮酸等。-硝基丙酸能不可逆地抑制琥珀酸脱氢酶活性,引起组织局部贫血,圆弧偶氮酸对肌肉、肝和脾组织有毒性。Orth对16株工业用米曲霉的产毒试验结果表明,有8株(50%)可产生圆弧偶氮酸;另外,47株中的19株(40%)可产生有强心作用的曲酸。^[3]由于各生产企业的生产条件、生产用原料不同,发酵时间各异,即使用安全的工业菌株,曲酸对产品的污染也不容忽视。黑曲霉的某些菌种如炭黑曲霉(*A. carbonarius*)可产生对肾脏有毒性的代谢产物赭曲霉毒素A,^[4]该毒素对其终产品的污染调查有待进一步研究。本实验用2个菌株产毒素的能力将另

文报道。

目前普遍认为米曲霉为非致病性真菌,但有报道从患曲霉病患者体内分离到该菌。此外,米曲霉作为病原菌引起人类曲霉性脑膜炎、巩膜炎、支气管炎、外耳道炎等感染许多国家均有报道。^[5]1988年,我国上海报道了一例米曲霉感染后患曲霉性肺炎的病例。^[6]在日本一些小型的家庭食品发酵厂,工人由于吸入生产过程中散发出来的米曲霉孢子而患曲霉性支气管肺炎。^[5]虽然有些作者强调个体差异在米曲霉感染发病中的作用,但该菌作为致病菌从患者病灶检出这一事实说明,米曲霉孢子对人和动物有一定的致病性。

丹麦的研究者给小鼠染毒工业用米曲霉菌株A1560孢子,结果显示,1×10⁵及其以上剂量组小鼠出现中毒症状,死亡仅见于1×10⁷剂量组;1×10³和1×10⁴组除个别动物精神欠佳外,病理解剖未见异常。本实验米曲霉1×10⁷组所有动物均死亡,1×10⁶组仅2只小鼠存活,1×10⁵剂量组也出现小鼠死亡。相比之下,本研究用米曲霉的致病性高于丹麦的A1560菌株。因此,同一菌种不同菌株的致病性存在着地域和来源的差异。日本用黄曲霉、烟曲霉和溜曲霉进行小鼠的致病性研究结果表明,实验菌株对动物造成的危害以肾脏为主;孢子表面粗糙者较光滑者致病性强,成熟孢子的致病性较未成熟孢子强。^[7]本实验两菌株对动物的损害也以肾脏为主,但孢子光滑的米曲霉对小鼠的致病性却较孢子粗糙的黑曲霉强。因此,不同菌种间致病性的差异有待进一步探讨。本实验中包括对照组小鼠均出现了脑血管充血,考虑到小鼠处死方式为颈椎脱臼致死,脑部血管因机械牵拉造成充血的可能性大,建议在以后的实验中改变处死动物的方式(可采取断头)。病理组织检查结果显示,2个菌种1×10⁵以上剂量组动物均出现不同程度的肾脏病变,因此,化脓性肾炎引起的肾衰竭可能是动物死亡的主要因素。

FDA规定,作为一般认为是安全(generally recognized as safe, GRAS)的物质,其评判标准有二,一是该物质于1958年前已在食品加工中使用;二是基于科学的评价程序。如同评价食品添加剂一样,该程序必需提供充分、完整的证据以证明该物质的安全性。GRAS物质既可由FDA认定,也可由有资格的专家判定。作为GRAS物质,米曲霉和黑曲霉已被列入FDA认可的工业用食品微生物和微生物产品名单。日本的研究表明,经口和腹腔注射染菌均不是评价工业用菌致病性的染毒途径,静脉内注射能充分体现真菌孢子对动物造成的危害。菌种的致病性研究工作在我国尚未开展,本研究选用FDA认

可的工业用安全菌种进行致病性探索,必将为以后开展各种工业用真菌的安全性评价提供参考依据。

参考文献:

- [1] US Environmental Protection Association. Final risk assessment of *Aoryzea*[Z]. 1997.
- [2] El-Hag N, Morse R E. Aflatoxin production by a variant of *Aoryzea* (NRRL strain 1988) on cowpeas (*vigna inensis*) [J]. Science, 1976, 192: 1345—1346.
- [3] Orth R. Mycotoxins of *Aoryzea* strains for use in the food industry as starters and enzyme producing molds[J]. Ann Nutr Alim, 1977, 31: 617—624.
- [4] JECFA. Evaluation of certain mycotoxins in food[Z]. Fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 2001, 26—35.
- [5] Barbesgaard P, Heldt-Hansen H P, Diderichsen B. On the safety of *Aspergillus oryzea*: a review [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1992, 36: 569—572.
- [6] Liao W Q, Shao J Z, Li S Q, et al. Microbiological identification of pulmonary aspergilloma caused by *Aspergillus oryzea* with proliferating heads [J]. Chin Med J, 1988, 101: 601—604.
- [7] 日本农林水产技术会议事務局. 动物性饲料和微生物饲料安全性评价方法的开发[Z]. 1987, 64—69.

Study on the pathogenicity of fungi used in the production of foods/Li Fengqin, Ji Rong, Li Yuwei, et al. // Chinese Journal of Food Hygiene. - 2002, 14(4): 3~7.

Abstract: This study was designed to evaluate the pathogenicity of fungi (*Aspergillus oryzea* and *Aspergillus niger*) used in the production of foods to mice. One-tenth milliliter per head of the suspension with different levels of spores was administered intravenously to groups of 12 mice and the individuals were observed for two weeks. Mortalities, clinical symptoms and signs (or abnormal behavior) and the body weight were recorded throughout the experiment. Surviving animals were subjected to a necropsy at the termination of the study. The brain, liver, kidney and spleen were collected for histopathological examination and colony-counting. The results indicated that mortality and abnormal behavior were found in mice dosed *Aoryzea* at the level of 1×10^5 spores or more. Additionally, it should be pointed out that suppurative inflammation is the principal histopathological changes found in kidney of mice administered 1×10^5 spores or above. There is a positive relationship between pathogenicity and dosage. The data obtained in this study will provide the scientific basis for the safety assessment of fungi used in food processing industry.

Author's address: Li Fengqin, Institute of Nutrition and Food Safety, China CDC, Beijing 100021, PRC.

Key Words: *Aspergillus oryzea*; *Aspergillus niger*; Aspergillosis; Mice

[收稿日期:2002-03-23]

[上接本期导读]

食品用油问题一直是个大问题,有人用工业油代替,有人用毛油,有人在食用油中掺杂使假。而用废弃食用油脂现又成为一些人降低成本的途径。油这种物质,不同的人用不同的方法,在不同的方面表现出来不同的违法行为。欢迎大家根据贯彻落实卫生部的“食品生产经营单位废弃食用油脂管理的规定”后的情况,将工作整理成文投稿。