

粮食中白曲霉的污染和毒性研究

王志刚 童 哲
程苏云 丛黎明

浙江省食品卫生监督检验所 (310009)

摘要 对浙江省各地的51份大米和46份面粉进行白曲霉污染量测定, 平均含量分别是200和590 CFU/g。对分离的28株白曲霉进行产黄曲霉毒素测定, 未发现产毒菌株。又对这些菌株进行卤虫急性毒性试验, 有11株菌对卤虫幼虫有较高的毒性(1.36mg培养物/ml剂量, 死亡率在10%以上)。面粉中分离的产毒株比率比大米的高。文中还对粮食中的白曲霉产毒性和危害性作了讨论。

粮食中的正常霉菌菌相, 随着黄曲霉等产毒霉菌的研究进展, 在不断地修改。白曲霉过去认为是粮食的正常贮藏真菌之一。近年来, 白曲霉的产毒性能已有不少研究报道。我国著名学者孙鹤龄教授^[1]在进行胃癌病因研究时, 发现一些白曲霉培养物的Ames试验阳性; 另有两次报道^[2, 3]白曲霉能产生黄曲霉毒素。为此, 本文报道了目前浙江各地市场销售大米、面粉的白曲霉污染情况, 及白曲霉菌株的黄曲霉毒素产生性能和卤虫急性毒性测定情况, 并对白曲霉的产毒性和危害性作了讨论。

1 材料与方法

1.1 粮食样品来源 本省各地(市)防疫站食品卫生监督员从当地粮店、粮库采集共51份大米、46份面粉。送本实验室进行白曲霉含量测定。

1.2 实验方法

白曲霉含量测定 按国家标准方法〔GB 4789.15—84〕记数测定; 分离的菌株按Raper^[4]专著分类鉴定。

大米内部白曲霉检出率测定 取10克大米, 用无菌水洗涤10次, 点种高盐察氏培养基, 28℃培养, 待菌落生长后, 分离鉴定。

白曲霉产毒培养和毒物提取 参照

Bjeldanes^[5]的方法稍加改进, 取50克正常大米作培养基, 121℃湿热灭菌20分钟, 接种白曲霉菌株, 28℃培养2周后, 加氯仿250毫升, 提取过夜, 分离氯仿层, 于60℃水浴蒸干, 提取物溶于2毫升二甲亚砜中, 供黄曲霉毒素测定和卤虫毒性试验用。以未接种的大米培养基作对照。

白曲霉培养物的黄曲霉毒素测定

参照国家标准方法〔GB5009.22—85〕进行。以上提取液用氯仿作1:50稀释, 吸取5微升点薄层板。每块板点AFB₁ 0.2和0.04 μg/ml二种浓度各10微升作阳性对照。展开后, 在紫外线下观察定量。证实试验加三氟乙酸进行。按以上稀释度推算, 白曲霉培养物的检测最低AFB₁浓度为0.16mg/Kg。

白曲霉培养物的卤虫急性毒性测定 卤虫卵由哈尔滨医科大学提供。测定过程如下: 参考Visonti^[6]的卤虫毒性试验浓度。以上提取液按1:50 e²和1:50 e⁴分别稀释, 再配成含二甲亚砜稀释提取液2.5%的人造海水。加卤虫幼虫, 以10只幼虫/0.25ml为一个试验孔, 每10孔为一组试验。27℃培养24小时, 观察死亡率。按以上稀释度推算, 每毫升试验液含1.36和0.18mg的白曲霉培养物, 以这两个剂量进行毒性测定。

2 结果

2.1 大米、面粉的白曲霉含量情况 大米的白曲霉检出率达 86.3%; 平均含量是 200CFU/g, 最高达 28000CFU/g。面粉的白曲霉检出率达 97.8CFU/g; 平均含量是 590CFU/g, 最高达 45000CFU/g。面粉的白曲霉含量比大米的高, 统计学分析 ($t=2.66 > 1.98$, $P < 0.05$) 差异明显 (见表 1)。

大米内部白曲霉浸染情况 51 份大米中, 内部未浸染白曲霉的占 43.1%, 每百粒米浸染白曲霉粒数在 1—9 粒的占 31.4%, 在 10—29 粒的占 15.7%, 在 30 粒以上的占 9.8%。

2.2 白曲霉产黄曲霉毒素性能 从本次分离的 90 株白曲霉中, 随机抽取 28 株, 进行大米产毒培养, 测定培养物中的 AFB₁ 含量。结果未发现产黄曲霉毒素的菌株。

2.3 白曲霉的卤虫毒性测定情况 用卤虫对以上白曲霉培养物进行了生物毒性测定; 发现 11 株菌的培养物在 1.36mg/ml 剂量时, 引起卤虫 10% 以上的死亡率 (以对照组自然死亡平均数加 3 个标准差计算, 高于此数就可认为有毒性), 为产毒株。其中, 从大米中分离的白曲霉, 产毒株只占 13.3%, 而从面粉中分离的白曲霉, 产毒株达 69.2%, 明显不同 (见表 2)。

对两个白曲霉培养物 (11.29 号菌) 做了毒性剂量效应试验, 结果培养物的自然对数浓度和卤虫死亡率呈直线相关, 相关系数分别是 0.98 和 0.99。由此计算出白曲霉培养物对卤虫的 LC₅₀ 值分别是 2080 和 3450 μ g/ml。表 3 中还显示了汞作为毒性阳性对照, 对卤虫的毒性作用。

3 讨论

3.1 白曲霉产黄曲霉毒素情况 现在公认的产黄曲霉毒素菌类是曲霉属、围绕亚属 (Subgenus *Circumdati* Gams et al, 1985), 黄绿组 (Section *Flavi* Gams et al, 1985) 的黄曲霉和寄生曲霉。最近还报道了在形态上和黄曲霉非常接近的两个新的产黄曲霉毒素菌, 集蜂曲霉 (*Aspergillus nomius*) 和肇庆

曲霉 (*A. zhaoqingensis*)^[7]。在黄绿组 (旧称黄曲霉群) 之外的产黄曲霉毒素菌类, 虽有报道, 被证实的几乎没有。白曲霉按正规分类系统虽然和黄曲霉一样属于围绕亚属, 但在不同的组中, 属于白组 (section *Candidi* Gams et al, 1985)。1979 年 Samajpati^[2] 报道了白曲霉能产生黄曲霉毒素, 1990 年 Jayaraman^[3] 又报道 1 株产黄曲霉毒素的白曲霉。为此本次对白曲霉进行了产毒试验, 在 28 株白曲霉中, 未检出产黄曲霉毒素的菌株, 但有 7 株菌可产生 Rf 值和 AFB₁ 相同的蓝紫色荧光物质, 此物质经三氟乙酸证实试验, 不是 AFB₁。所以作者认为对白曲霉的产黄曲霉毒素性能必须谨慎对待。

3.2 白曲霉的产毒性 近年来已有不少白曲霉产毒性报道, 除了上面谈到的产黄曲霉毒素外, 还能产生三苯素类 (P-terphenyls), 细胞毒物, 抑制 DNA 和 RNA 的合成; 黄子囊素 (Xanthoascins)^[8]。心脏和肝脏毒物; 桔青霉素 (Citrimin)^[9], 肾脏毒物; ACT₁(C₁₈H₁₅ClO₁₇)^[10], 细胞毒物等等 5 类 10 种毒素和毒性代谢产物。为此, 本次采用卤虫对白曲霉进行广谱性的生物毒性测定。参考 Visonti^[6] 用 10mg 霉菌培养物/ml 剂量水平进行霉菌的卤虫毒性测定, 采用 1.36 和 0.18mg 霉菌培养物/ml 两个剂量进行测定。有 39.3% 的菌株在第一个剂量时, 引起卤虫 10% 以上的死亡率。产毒株比率是很高的。表 4 还显示了这些白曲霉培养物的毒性是很高的。另外, 从面粉中分离的菌株的产毒株比率比大米的高得多, 其原因待进一步研究 (表 4)。

3.3 白曲霉在粮食中的危害性

大米 白曲霉检出率是 86.3%, 平均含量是 200CFU/g, 但产毒比率不高, 只占 13.3%; 并且大米内部检出率也不高, 内部未检出白曲霉的占 43.1%。白曲霉污染主要在粮粒表面。通常大米在做成米饭前, 先经洗涤, 这样在一定程度上可以减少白曲霉的污染及由此产生的危害性。

表1 大米、面粉的白曲霉污染量

白曲霉含量 (CFU/g)	大米 (份)	面粉 (份)
<10	7	1
10 — 99	11	4
100 — 999	23	27
1000 — 4999	7	9
>5000	3	5
合 计	51	46

表2 白曲霉培养物的卤虫毒性

菌株	来源	卤虫死亡率 (%)	
		剂量 1	剂量 2
01	大米	0.8	0.7
02	大米	5.2	0
03	大米	1.6	0.8
04	大米	2.6	0
05	大米	1.4	3.1
06	大米	25.9	2.5
07	大米	5.2	2.2
08	大米	3.9	3.9
09	大米	2.7	5.8
10	大米	1.9	0
11	大米	46.7	0.7
12	大米	1.2	0.7
13	大米	7.2	2.6
14	大米	2.2	0
15	大米	0.9	2.0
18	面粉	0.8	3.7
19	面粉	1.9	0
20	面粉	61.4	0
21	面粉	20.4	1.0
22	面粉	45.9	1.6
23	面粉	1.0	2.9
24	面粉	1.8	0
25	面粉	40.6	0
26	面粉	32.6	2.0
27	面粉	40.6	0
28	面粉	48.5	0.8
29	面粉	41.4	3.5
30	面粉	70.4	0
培养基对照		0.7	1.4
海水对照		1.9	—
二甲亚砷对照		1.5	—
汞毒性对照		64.6	—

剂量 1 每毫升含 1.36mg 白曲霉培养物。

剂量 2 每毫升含 0.18mg 白曲霉培养物。

面粉 白曲霉检出率达 97.8%, 平均含量达 590CFU/g; 产毒株比率很高, 达 69.2%; 白曲霉污染明显比大米严重, 并且产毒的危害性更大。另一方面, 面粉不象大米那样可以洗涤, 白曲霉和它的毒性产物最终还是留在面粉食品中。所以从两种粮食污染状况的分析中, 可以认为, 目前有效地控制面粉的白曲霉污染, 显得更为重要。

表3 白曲霉培养物和汞(对照)对卤虫毒性的剂量效应关系

样 品	剂 量 (μ g/ml)	卤虫死亡率 (%)	相关系数 (r)	LC ₅₀ 值 (μ g/ml)
11号培养物	400	22.5	0.98	2080
	2000	47.5		
	10000	68.5		
29号培养物	1350	41.4	0.99	3450
	3680	50.4		
	10000	60.5		
汞 (HgCl ₂)	24	18.6	0.97	37
	40	65.0		
	64	79.6		

表4 白曲霉培养物与文献记载的霉菌毒素对卤虫毒性比较

毒 物 名 称	LC ₅₀ 值 (μ g/ml)	毒性比较 (mg/Kg)
11号菌培养物	2080	—
T—2 毒素	0.13	63
黄曲霉毒素 B ₁	1.4	670
桔青霉素	3.6	17300
HgCl ₂	37	17700
展青霉素	160	76900

参 考 文 献

(1) Sun HL, et al. • Studies on Fungal Spectrum of Sour Thin Pancake and Detection of Nitrosamine by Using Ames Test • Proceedings of the First China—Japan International Congress of Mycology 1987;158

(2) Samajpati N, et al. • Aflatoxin Produced by Five Species of *Aspergillus* on Rice • Naturwissenschaften 1979;66(7):365—366

(下接第 21 页)