

椰毒假单胞菌酵米面亚种在自然 环境中的污染调查

中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所(北京 100050)

刘秀梅 杜春明 王玉华 俞世荣 余东敏 孟昭赫

提要 本文报告了山东省章丘县外环境中椰毒假单胞菌酵米面亚种的污染情况。共采集土壤、树皮杂草、谷物秸秆等698份样品。分离得到9株椰毒假单胞菌,阳性分离率为1.21%,菌株产毒率100%,最高产毒量达57.86 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。经抗O因子血清分型试验表明,该地区自然环境中存在的主要为O—Ⅰ型椰毒假单胞菌。

关键词 椰毒假单胞菌 酵米面 米酵菌酸 外环境

椰毒假单胞菌酵米面亚种(*Pseudomonas Cocovenenans* Subsp. *farinofermentans*)简称椰毒假单胞菌(原酵米面黄杆菌, *Flavobacterium farinofermentans*),是酵米面、变质鲜银耳及多种自制发酵食品食物中毒的病原菌^(1,2)。近年来,已报告的椰毒假单胞菌中毒及被污染区域已涉及到全国17个省(区)。为了解椰毒假单胞菌在自然界中的分布及污染情况,我们于1989年10月对无椰毒假单胞菌中毒史的山东省章丘县10个村庄的外环境进行了调查。现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品 采自章丘县的10个村庄,其中外环境土壤253份,枯树叶38份,枯树皮137份,麦秸、稻草78份,干玉米叶98份,野生杂草94份,共计698份。

1.1.2 标准菌株及毒素 Co14(椰毒假单胞菌代表株,本室保存)米酵菌酸(*Bongkric acid*)21.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (本室制备)。

1.1.3 培养基及试剂 营养琼脂、卵黄琼脂、PDA(美国 Difco)、青霉素(日本 Banyu)、链霉素(日本, Meiji)、氯霉素(日本, Sankyo)、放线酮(美国, Sigma)、鞭毛染色液(本

室配制)、硅胶GF254(西德, Merk)、薄层层析展开剂(本室配制)。

1.1.4 仪器 恒温振荡器(江苏太仓, THZ-82型)、紫外光灯254 nm、紫外分光光度计。

1.2 方法

1.2.1 椰毒假单胞菌的分离、纯化和鉴定 取适量样品(土样1g,其它样品剪碎与土样同体积)加入盛有10ml灭菌盐水的试管中,室温振荡1 min,使其充分混匀,静止10~20 min。用毛吸管取上清液滴于含青霉素、链霉素、氯霉素、放线酮等4种抗生素的PDA平板表面,用接种环均匀划线涂抹,置35 $^{\circ}\text{C}$ 温箱培养2~5天。挑取产生柠檬黄色素的典型菌落分离纯化,并点种于卵黄琼脂平板,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养48h。取卵磷脂酶阳性,边缘带典型虹彩环的菌落做进一步鉴定。

1.2.2 生化试验及鞭毛染色 按常规标准方法⁽³⁾。

1.2.3 血清学试验 制备抗O型特异性因子血清抗原:将椰毒假单胞菌Co7、Co40接种于PDA平板,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养24h。用接种环刮下菌苔,加生理盐水充分混匀,煮沸2h,离心沉淀3次。抗O血清:Co7型、Co8型、Co14型,由卫生部食品卫生监督检验所提供。吸收试验:将抗O血清加入适量生理盐水稀释,与

洗涤后的菌体抗原混匀,置 37℃温箱 2 h,取出放 4℃冰箱过夜,以 3500r/min 离心 20min,取上清。

试管凝集试验:按常规方法⁽⁴⁾。

1.2.4 米酵菌酸的分离与测定 按常规方法制备粗毒素。取粗毒素液 1 ml,分别给体重 18~22g 的小白鼠(昆明种)经口灌胃,0.5~1 h 后观察急性毒性。净化与样液的制备,按胡文娟等⁽⁵⁾石油醚提取法提取、甲醇定容。用薄层色谱法和紫外分光光度法测定米酵菌酸含量。

2 结果

2.1 生化特性 在 698 份外环境样品中,分别从土壤、干玉米叶、稻草杆和野生杂草中分离得到 9 株典型的椰酵假单胞菌:SD 891、SD892、SD893、SD894、SD895、SD896、SD897、SD898、SD899。其主要生化特征为,革兰氏染色阴性、短小杆菌;O/F 试验为氧化型;有动力,鞭毛着生方式为极生(多数为单鞭毛,少数为双极毛或单端丛毛);卵磷脂酶阳性,菌落边缘有虹彩环;培养 48h 后产水溶性黄绿色素,扩散到培养基中。

2.2 分型 用抗 O 型特异性因子血清与已分离纯化的椰酵假单胞菌菌体抗原做试管凝集试验。除 SD892 有菌体自凝现象,暂未判定其抗原型外,有 6 株为 O—Ⅲ型菌,占菌株数的 66.7%,2 株为 O—Ⅳ型菌,占菌株数的 22.2%。

2.3 菌株产毒试验(表 1) 9 株椰酵假单胞菌均为产毒株。各菌株产毒培养物的小白鼠急性动物试验、薄层色谱法半定量及紫外分光全定量试验的结果一致,符合率 100%。其中,SD892、SD893、SD897 3 组小白鼠急性毒性试验,给药 0.5h 后曾一度出现发病症状(精神萎靡、行走不稳),后又缓解,可能与菌株的产毒力有密切关系。

3 讨论

1986年至1987年,曾在全国22个省市部分地区进行了玉米、大米、黄豆、糯米粉及其它发酵食品中椰酵假单胞菌及米酵菌酸的污染调查。从 1378 份样品中仅分离到 1 株椰酵假单

表 1 9株椰酵假单胞菌的产毒能力

菌株号	小白鼠 平均体重 (g)	灌胃 剂量 (ml)	小白鼠 死亡数 (只)	产毒量	
				薄层 色谱法	紫外分光定量 (μg/ml)
SD891	20	1	3/3*	++++	—
SD892	21	1	0/3	++	19.74
SD893	20	1	0/3	+	3.24
SD894	18	1	3/3	++++	—
SD895	22	1	3/3	++++	—
SD896	20	1	3/3	++++	57.86
SD897	20	1	1/3	+++	26.47
SD898	20	1	3/3	++++	—
SD899	21	1	3/3	++++	—
标准毒素				++	21.6

注:表中“—”为未测项目,*分子为死亡数,分母为试验动物数

胞菌,分离率为 0.07%。河南、广西、吉林的环境样品(土壤、水)694份中分离到4株椰酵假单胞菌,分离率为0.58%。本次调查从山东省章丘县的外环境采集了不同来源的 698 份样品,不仅从户外土壤,而且首次从干玉米叶、野生杂草中分离到 9 株典型的椰毒假单胞菌酵米面亚种,阳性分离率 1.21%,菌株产毒率 100%。该结果表明,椰酵假单胞菌在自然界的分布广泛,对进一步全面了解其生态分布情况具有实际意义。

9 株椰酵假单胞菌的菌体抗原特异血清型以 O—Ⅲ型菌居多(6/9 株),2 株 O—Ⅳ型菌(2/9 株)。1984 年山东省东坪县发生的首起变质鲜银耳中毒也是由 O—Ⅲ型椰酵假单胞菌(原酵米面黄杆菌)而引起的。提示山东省部分地区自然环境中主要存在着 O—Ⅲ型椰酵假单胞菌的污染。

经化学测定,9 株椰酵假单胞菌的产毒培养物均检出米酵菌酸。但检出量高低悬殊,最低量 3.24μg/ml(SD893),最高量 57.86 μg/ml(SD896)。小白鼠急性毒性试验结果也确证其中 6 株为强毒株,3 株为弱毒株。说明自然界中不同椰酵假单胞菌菌株间的产毒能力有明显差异。

为了提高椰酵假单胞菌的阳性分离率,本次分离方法不同于常规方法。在 PDA 培养基中加入 4 种不同浓度的抗菌素,对抑制其它细

菌及部分霉菌的生长起到了良好的作用。所得菌株基本为纯培养物,容易转种、保存。同时,也说明了椰酵假单胞菌具有很强的耐药性和顽强的生长能力。

本调查首次从无中毒发生史区域内的野生杂草和谷物秸秆中分离到产毒的椰酵假单胞菌,对流行病学研究有重要的指导意义。

(本室郝玲君参加采样,李秀芳等协助分离,微量元素室的朴建华协助测定毒素,卫生部食检所提供抗O原血清,在此一并致谢。)

参 考 文 献

1. 酵米面中毒研究协作组. 酵米面中毒病因的研究—发现一种新的食物中毒菌—酵米面黄杆菌 (*Flavobacterium farinofermentans* nov. sp.). 中国医学科学院学报 1980; 2: 77.
2. 刘秀梅. 变质银耳中毒病因的研究. 卫生研究 1985; 14(4): 25.
3. 卫生部. 食品卫生检验方法微生物学部分. 北京: 标准出版社, 1987; 128.
4. 白竟玉. 酵米面黄杆菌血清学研究—O血清分型及分布. 中国预防医学杂志 1983; 17(3): 138.
5. 胡文娟. 酵米面、银耳、玉米中黄杆菌毒素A的薄层及高压液相色谱测定法. 卫生研究 1986; 15(2): 31.

(1990-05-14收稿 1990-05-28修回)

关于新生儿病死亡率的计算公式

浙江省上虞县卫生防疫站(312300) 张鑫培

不少学者在计算新生儿病死亡率时用了下列公式:

新生儿病死亡率

$$= \frac{\text{某年新生儿病死亡人数}}{\text{同年平均人口数}} \times 100,000/10万 \quad (1)$$

如《中国公共卫生》1990年第2期93页,《中华流行病学杂志》1988年特刊1号224页,《中国疾病监测》1990年第3期47页,《中国卫生统计》1990年第1期36页,等等。显然,式(1)来源于某病死亡专率计算公式。

卫生部有关卫生统计汇编资料,如《中国卫生年鉴》、《中国卫生统计提要》等,计算新生儿病死亡率时则用:

$$\text{新生儿病死亡率} = \frac{\text{某年新生儿病死亡人数}}{\text{同年活产婴儿数}} \times 100,000/10万 \quad (2)$$

新生儿病指发生于新生儿期的疾病。北京协和医院WHO疾病分类合作中心在《国际疾病分类指导手册死因分类部分》中建议,在“新生儿病小计”里的疾病,主要包括0~6天的孩子,但为了便于统计,也放宽到1周岁以内的婴儿。既然很明确地规定了新生儿病死亡的年龄统计范围,根据率的定义,如同婴儿死亡率计算公式一样,其分母应用活产婴儿数。因此计算新生儿病死亡率应通用式(2)较为妥当。否则由于计算公式中分母的不同,致使各地报道的新生儿病死亡率可相差几十倍。

编后: 张鑫培同志的意见是对的。在计算新生儿病死亡率时,只能用卫生部规定的公式(即稿中第(2)个公式),包括本刊用错过,说明不少作者和刊物编辑都忽视了这个区别,这就更说明了张鑫培同志意见的普遍意义。

(1990-09-18收稿)