

酵米面中毒病原菌的毒黄素

赵乃昕¹ 王春德¹ 李在连¹ 王凤山¹ 林黎明² 于欣虹³

酵米面食物中毒在我国东北、广西等地时有发生。我国酵米面中毒的病因已经阐明^[1,2,3],为一种产生水溶性黄色素的革兰氏阴性无芽胞杆菌。在分类鉴定中有人认为应归于黄杆菌属^[3,4],也有人认为应定为假单胞菌属^[5,6]。胡文娟等^[7]证明此菌之主要毒素为米酵菌酸(bongkrekic acid)。

我们在研究酵米面中毒病原菌的生物学性状时发现其黄色素的产生与振荡通气关系密切,其产生条件与椰毒假单胞菌(*Pseudomonas cocovenenans*)产生毒黄素(toxoflavin)的情况相似^[8],我们进一步提取获得了结晶纯品,其理化性状及毒性等与毒黄素一致^[8,9],因而认为酵米面中毒病原菌的水溶性黄色素即是毒黄素。而毒黄素的产生条件在假单胞菌属和椰毒假单胞菌间又极为一致,因而初步认为这两个中毒菌可能为同一菌种或者在分类学上极为接近之菌种。

材料与方法

一、菌种: T7707—6株,1977年7月分离自黑龙江省通河县引起中毒的食物。经形态、生理、生化试验及底物利用试验证明与其他菌株一致^[6]而具有代表性。

二、产毒黄素培养基: 为作者设计之马铃薯蛋白胨甘油培养基(简称PPG),其成分为:在5%马铃薯浸液中加入多胨1%,甘油2%,氯化钠0.3%,pH为7.0。500ml三角瓶中每瓶装100ml。灭菌,接种之后在恒温摇瓶机于28℃下180转/分钟振荡培养48小时。

三、毒黄素的提取: 参照Van Damme等^[8]的提取法,将培养物以硫酸铵饱和,离心,过滤,滤液以氯仿提取3~4次。合并氯

仿提取物,减压浓缩成1/10的量,再加入二倍量的石油醚并用水提取。水液再经适当稀释以硫酸铵饱和,重复离心过滤和氯仿提取。将最后的氯仿提取物减压蒸干,在正丙醇中于-5℃形成结晶。

四、毒黄素的鉴定

(一)溶剂: 试验毒黄素在常用溶剂中的溶解性。

(二)pH对毒黄素的影响: 在pH1,2,……11的条件下观察毒黄素的颜色变化及稳定性。

(三)紫外光谱: 将毒黄素溶于水中以岛津UV-210A型紫外分光光度计扫描。

(四)红外光谱: 将结晶毒黄素用IR-435型红外分光光度计,在KBr中于 $\bar{U}2000-697\text{cm}^{-1}$ 进行扫描

(五)毒黄素的抗生素性能: 以试管法抑菌试验检查其抗生素性能。

(六)毒黄素的毒性: 取体重18—22克的小白鼠随机分为五组,每组10只,按每公斤体重10.50毫克,8.40毫克,6.70毫克,5.38毫克,4.30毫克5个不同剂量灌胃,观察各组在48小时内的死亡个数,计算LD₅₀。

结 果

一、毒黄素的产生及提取

酵米面中毒病原菌在PPG中振荡培养48小时产生毒黄素极为丰富,颜色呈深黄,并显示马铃薯和甘油为促进此毒素产生的主要条件,以葡萄糖代替甘油时毒素产生减少。振荡通气亦为产生大量毒素所必需,静置的液体培

养, 细菌虽可大量繁殖, 但毒素产生不多, 说明细菌的繁殖与此毒素产生不总是平行的, 这与椰毒假单胞菌产生毒黄素的情况^[8]一致。

二、毒黄素的理化性质

提得之毒黄素为亮黄色片状或粒状结晶, 溶于水、甲醇、乙醇、氯仿、乙酸乙酯, 微溶于苯, 不溶于石油醚、乙醚和二甲苯。它在

pH3~8 之间稳定, pH低于 2 时经一周失去黄色。pH10 以上时立即失去黄色, 但 pH 低于 9.5 时又显黄色, 呈现出 pH 指示剂的性质。

以紫外分光光度计测定有两个吸收峰分别为 258nm(ϵ 16000)和 394nm (ϵ 2500)。如图 1。

毒黄素在KBr中的红外光谱如图 2。

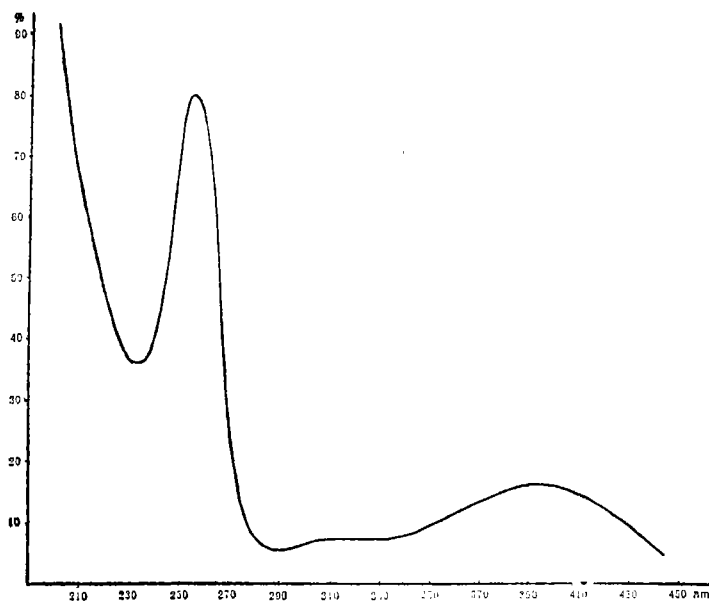


图 1 毒黄素在水中的紫外吸收光谱

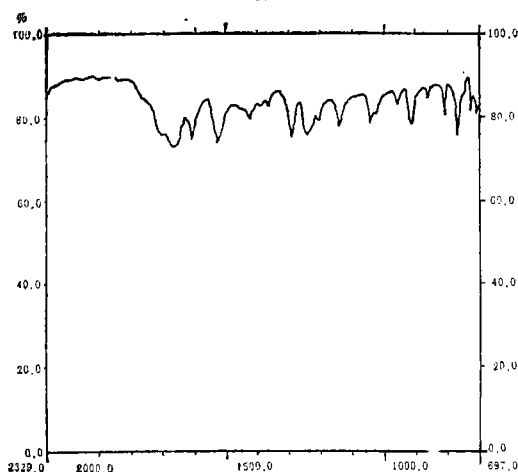


图 2 毒黄素的红外吸收光谱

三、毒黄素的抗生素性质: 在试管抑菌试

验中其最低抑菌浓度 (MIC/ml) 为:

大肠杆菌0.5微克 金黄色葡萄球菌2微克
伤寒杆菌0.3微克 绿脓杆菌30微克
变形杆菌10微克

四、毒黄素对小白鼠的毒性: 口服LD₅₀ 为 8.39mg/kg。急性中毒的主要表现为: 小白鼠匍匐在地, 呼吸急而深, 打圈搔鼻, 全身震颤, 继而倒地全身痉挛而死亡。

讨 论

酵米面中毒病原菌毒黄素的产生条件与椰毒假单胞菌产生毒黄素是一致的。我们鉴于酵米面中毒菌在 PDA 上产生黄色素而在营养琼脂上几乎不产色素是与前者中含马铃薯成分有关, 因而在培养基中加入马铃薯浸液, 作成PPG

培养基促使毒黄素产生较为丰富。同理,在制备 PDA 培养基时,如以甘油代替葡萄糖(称 PGA)则色素(毒黄素)产生更好,与在 PDA 上数日后色素扩散到培养基中菌落变得无色的情况不同,在 PGA 上菌落一直保有较深的橙黄色。

使用上述提取法得到的亮黄色结晶其紫外与红外光谱^[8], pH 变色范围及其他理化性状皆与毒黄素一致^[8, 9]; 其抗菌谱和小鼠 LD₅₀ 也与毒黄素一致,所致急性中毒之症状与中毒酵母面所致之急性中毒基本一致^[2],因而证明酵母面中毒病原菌之黄色素即毒黄素。

酵母面中毒的病原菌,我们根据它为革兰氏阴性极毛杆菌^[6, 10],菌体中有聚β羟丁酸盐颗粒^[6, 11],未发现有脂溶性色素,不需要生长因子,在营养上呈多能性^[6],氧化酶阴性, G+C mol% 约为 70^[6, 12],认为不符合黄杆菌属^[13, 14, 16],而符合假单胞菌的定义^[14, 15],因而定为酵母面假单胞菌(*Pseudomonas farinofermentans*)^[6, 6],从其底物利用谱、生化反应及其 DNA 杂交试验看,与类鼻疽假单胞菌呈 54% 的相关性^[6],接近于类鼻疽菌群。

酵母面中毒病原菌的生长条件及其产生的米酵菌酸和毒黄素又都是抗生物质,可以抑制其他菌类而使本身得到优势生长,它是专性需氧菌,要求一定的湿度,酵母面在室温下的带湿存放、阴湿天气或鲜银耳的翻动晾晒时,恰为此菌创造了通风和传播的条件,造成大量繁殖。因此建议不要制备食用酵母面,或忌潮湿存放,要快速干燥。

毒黄素的形成条件对此菌的中毒机理提示了进一步的认识。由于酵母面中毒菌与椰假单胞菌皆产生米酵酒酸和毒黄素,两菌的致中毒情况及毒黄素的产生条件类似,在分类学上似为接近之菌种。

(此研究得到中科院微生物所蔡妙英副研指导和山东大学王祖农教授、青岛医学院田浩

泉教授、预防医学科学院流研所刘秉阳教授、卫生部药品生物制品鉴定所丁绍卿主任等的母校,表示感谢)

参 考 文 献

1. 金家香, 发霉变质发酵米面食物中毒的病源学研究的初步报告. 卫生防疫工作, 第 41 号 辽宁省卫生防疫站. 1963.
2. 黑龙江省卫生防疫站. 臭米面食物中毒的病因研究. 黑龙江医药 1978; 第 4 期.
3. 酵母面病因研究协作组. 酵母面中毒病因的研究. 中国医学科学院学报 1980; 2(2).
4. 黑龙江省卫生防疫站, 等. 臭米面中毒病原菌—产毒黄杆菌. 黑龙江医药 1978; 第 6 期.
5. 徐迪诚, 等. 酵母面黄杆菌分类学位置的进一步研究. 哈尔滨医药 1982; 2(2).
6. Zhao Naixin et al Study on the fermented corn flour poisoning bacteria The Microbiological Journal 1985; 1(1).
7. 胡文娟, 等. 酵母面黄杆菌毒素 A 的提纯及鉴定. 卫生研究 1984; 13(4).
8. van Damme, et al. On toxoflavin, the yellow poison of *Pseudomonas cocovenenans*, Rec Trav Chim Bays-Bas 1960:79 255—267.
9. Martha Windholz (editor) The Merck Index ninth ed. 1229 Merck & Co USA 1976
10. 金家香, 等. 臭米面食物中毒的病因研究(三). 辽宁医药 1979, 第 4 期.
11. 王夏, 等. 食物中毒菌—酵母面黄杆菌的系统研究 卫生研究 1985; 14(5).
12. 刘聿太, 等. 用热变性温度法测定五个细菌新种 DNA 的 GC 含量. 微生物学通报 1981; (5).
13. Weeks OB Genus *Flavobacterium*, Bergey, et al, 1923, P357 in RE Buchanan and NE Gibbons(ed) Bergey's manual of determinative bacteriology 8th ed The William & Wilkins Co., Baltimore, 1974.
14. Rubin JS, et al. Glucose-nonfermenting Gram-negative bacteria, P263 in Manual of clinical microbiology 3rd ed American Society for Microbiology, Washington DC 1980
15. Doudoroff M and Palleroni NI Genus 1 *Pseudomonas* Migula 1894, P217 in Bergey's manual of determinative bacteriology 8th ed The William & Wilkins Co., Baltimore, 1974
16. Holmes B et al Genus *Flavobacterium*, Bergey et al 1923, P353 in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Noel R. Krieg (ed) The William & Wilkins Co., Baltimore 1984

(收稿: 1986.3.16, 修回: 1986.9.6.
责任编辑 陈静)

酵米面中毒病原菌的毒黄素

赵乃昕, 等. 昌潍医学院

在中国发现的引起酵米面中毒的病原菌是一种不引起葡萄糖发酵的革兰氏阴性黄色杆菌。其形态学、生理学和生化表型特性与假单胞菌符合。它产生酵米霉酸。其弥散分布的黄色素经证明为毒黄素。椰毒假单胞菌也产生这两种毒性物质, 且影响产生毒黄素的因索也相似。因此, 我们认为引起酵米面中毒的病原菌与椰毒假单胞菌相同, 或者它们是密切相关的菌种。

Toxoflavin of the Pathogenic Bacteria in Fermented-corn-flour Food Poisoning

Zhao Naixin, et al.

Changwei Medical College

The pathogenic bacteria causing fermented-corn-flour food poisoning in China is a kind of glucose-nonfermenting Gram negative, yellowish pigmented bacillus. Its morphological, physiological and biochemical phenotypic characteristics are conformable to *Pseudomonas*. It produces bongkrek acid and its diffuse yellow pigment was found to be toxoflavin.

These two toxic substances had also been produced by *Pseudomonas cocovenenans* and factors influencing the production of toxoflavin are also similar. So we think that the bacteria causing fermented-corn-flour food poisoning is identical to *P. cocovenenans* or they are closely related species.

黑龙江省海林县林区莱姆病的流行病学调查

艾承绪, 等. 军事医学科学院微生物流行病学研究所

本文报告1986年4月至8月在黑龙江省海林县进行的一次莱姆病的流行病学调查。在调查的1572名居民中, 发现132例(8.4%)有慢性游走性红斑。男性患病率比女性显著为高。发病率最高者为30—39岁。在5月到8月间发病。以每10天计算病例分布发现与被叮咬有关。神经病学异常和关节炎的发生率分别为4.6%和6.6%。调查结果表明在黑龙江省海林县林区存在莱姆病。

An Epidemiological Study of Lyme Disease in Hailin County, Heilongjiang Province, China

Ai Chengxu, et al.

Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences

An epidemiological study of Lyme disease was carried out from April through August 1986 in Hailin County, Heilongjiang Province. Of 1,572 residents surveyed, 132 cases with erythema chronicum migrans (ECM)(8.4%) were observed. The prevalence rate in the males was significantly higher than that in the females. The highest prevalence rate was seen in the age group of 30—39 years. Time distribution of the incidence in ten-day periods is correlated to that of the persons bitten by ticks. The prevalence rates of neurological abnormalities and arthritis were 4.6% and 6.6% respectively. These results suggest that Lyme disease exists in the forest region in Hailin County, Heilongjiang Province.