

# 椰毒假单胞菌酵米面亚种及米酵菌酸的研究进展(综述)

王 静 刘秀梅 中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所 (100050)

不酵菌酸(Bongkrekic acid, BA)和母甾系(loxoflavin, TF)。1951~1990年,印尼爪哇中部约有1000人因食用椰毒假单胞菌污染的发酵食品而死亡。1975年,据我国东北三省不完全资料统计,酵米面中毒226起,中毒人数1842人,死亡703人,平均病死率为38.1%。1979年我国酵米面中毒病因研究协作组经过五年的共同努力,发现了新的食物中毒菌,暂定名为酵米面黄杆菌(*Flavobacterium farinofermentans nov. sp.* 1980)<sup>[1,2]</sup>。1984年,刘秀梅<sup>[3]</sup>首次报告了变质银耳中毒也是由该产毒菌引起。1987年孟昭赫等<sup>[4]</sup>将此中毒菌与从英国引进的椰毒假单胞菌进行了生理生化、血清学、产毒性能、DNA同源性等对比研究,证明这两种菌除生态学及侧金盏花醇分解不同外,其他特性基本相同,故建议命名为椰毒假单胞菌酵米面亚种(*Pseudomonas cocovenenans subsp. farinofermentans* 1987),简称椰酵假单胞菌。截止1993年,我国16个省、自治区发生因椰酵假单胞菌污染酵米面、变质银耳、醋凉粉、糯米团、汤元、玉米淀粉等不同类食品引起的食物中毒480多起,中毒人数约3000人,死亡约1200人,平均病死率高达40%。1986~1987年,对全国21个省(市)、自治区调查表明,17个省(区)的酵米面、银耳、玉米及多种食品被椰酵假单胞菌及其毒素污染,占调查区域的80.95%,而且在非发病区也分离到产毒菌及毒素。<sup>[5~8]</sup>因此,研究椰酵假单胞菌,阐明它的产毒机制和毒性作用机理,掌握快速检测、杀菌、去毒方法,预防该菌及其毒素的污染,成为诸多学者研究的重点。现将近年来的主要研究进展综述如下。

## 1 椰酵假单胞菌的研究

### 1.1 椰酵假单胞菌的生物学性状

#### 1.1.1 菌落培养特征

起,呈草帽状或放射状花纹;菌落周围有黄绿色素产生并扩散到基质中。在365nm紫外灯下有黄绿色荧光。

卵黄琼脂平板	菌落表面光滑,湿润,48h后,菌落周围形成乳白色混浊环,斜射日光下可见环的表面呈虹彩现象
SS琼脂平板	不生长

自1980年,酵米面中毒病因研究协作组对病原菌进行初步鉴定以来,孟昭赫等对该菌的菌落培养特征、生理生化性状等进行了全面系统的研究,并于1994年正式列入国家食品卫生标准《椰毒假单胞菌酵米面亚种检验方法》<sup>[19]</sup>。详见表1、表2。

表2 椰酵假单胞菌的生理生化性状

阳性	阴性
动力 O/F 试验(O型)葡萄糖	氧化酶 肌醇
果糖明胶液化 卵磷脂酶	尿素 靛基质
木糖 半乳糖 阿拉伯糖 过氧化氢酶	V-P MR
甘露醇 淀粉 苯丙氨酸 侧金盏花醇	H <sub>2</sub> S 产生
柠檬酸盐 精氨酸 石蕊牛乳 卫茅醇	5℃不生长
硝酸盐还原 37℃生长	41℃不生长

#### 1.1.2 生理生化性状 见表2。

#### 1.1.3 超微结构<sup>[9,10]</sup>

在光学显微镜下观察,该菌为革兰氏阴性短杆状,大小0.4×1~2.5μm,两端钝圆,胞浆中含浓染颗粒及空泡。

在透射电镜下观察,可见异染颗粒、脂质颗粒、板层状内膜结构等特殊结构。值得注意的是,板层状内膜系统仅见于少数菌属,如紫色光合细菌、硝化细菌、甲烷氧化菌等,其功能与光合作用及氧化磷酸化过程有关,在椰毒假单胞菌中的功能尚不清楚。

#### 1.1.4 对抗生素的耐受性<sup>[11]</sup>

课题为卫生部科研基金资助课题。

在 PDA 上生长的椰酵假单胞菌,对金霉素、土霉素、四环素、庆大霉素较为敏感,对青霉素、红霉素、合霉素、氯霉素、新霉素具有很强的抗性。尤其是对革兰氏阴性菌的广谱抗生素 $\text{k}$  氯霉素,在适宜浓度下能使椰酵假单胞菌在 PDA 培养基上生长更旺盛,显示了其菌体构造和新陈代谢体系的特殊性。

#### 1.1.5 毒素分泌<sup>[12,13]</sup>

已经证实,在适宜条件下(如 PDA 半固体,26℃),椰酵假单胞菌在生长繁殖过程中向胞外基质分泌至少两种毒素:米酵菌酸(BA)和毒黄素(TF)。一般细菌的外毒素为蛋白质或多肽,而椰酵假单胞菌的两种外毒素却是脂肪酸类的小分子物质,且具有剧毒,提示椰酵假单胞菌在能量代谢过程中的特殊性。

#### 1.1.6 血清学特征

椰酵假单胞菌具有 O、K、H 三种抗原。O 抗原为菌体抗原,耐热,凝集反应出现较慢,聚集物呈颗粒状。H 抗原为鞭毛抗原,不耐热,凝集反应发生迅速,凝块呈疏松絮状。K 抗原为表面抗原。在三种抗原中,研究得最多的是 O 抗原。

1982 年,白竞玉等<sup>[14]</sup>采用血清学吸收试验法制备出五种因子血清,其中 O—Ⅱ 因子与 O—Ⅲ、O—Ⅳ 一起,不能制备出单因子血清,为非型特异性抗原;O—Ⅲ、O—Ⅳ、O—Ⅴ 可分别制备出单一因子血清,具有型特异性;从理论上推测椰酵假单胞菌应含有共同抗原 O—I,但无法获得 O—I 因子血清。1989 年后,王淑贞<sup>[15]</sup>、白竞玉<sup>[16]</sup>、刘秀梅<sup>[17]</sup>等又分别发现了该菌的新血清型,并证实了 O—Ⅵ、O—Ⅶ 和 O—Ⅷ 型特异性因子的存在。1994 年,刘秀梅等<sup>[18]</sup>运用杂交瘤技术,证实了椰毒假单胞菌及其酵米面亚种均含有 O—I 因子,并研制出 O—I 单克隆抗体,经间接 ELISA 法证明了 O—I 单抗的种特异性。迄今已证实该菌具有 7 种 O 抗原因子,划分为 6 种 O 抗原型。

#### 1.2 椰酵假单胞菌的鉴定

椰酵假单胞菌的鉴定,<sup>[19]</sup>首先是根据细菌的形态学特征及生理生化性状,然后进行血清学分型鉴定:用多价血清做玻片凝集试验,与多价血清凝集者,依次用 O—Ⅲ、O—Ⅳ、O—Ⅴ、O—Ⅵ、O—Ⅶ 等因子血清做试管凝集试验,以判定 O 抗原型。在生理盐水中自凝的菌株不能被分型。生化性状符合,但不能与以上血清凝集者,需进一步作产毒培养和毒素测定。

菌体抗原的多克隆抗体、单克隆抗体的制备及酶联免疫吸附试验方法的应用,使椰酵假单胞菌血清学的分型研究和菌体抗原检测手段进入了一个新阶段。刘秀梅椰毒假单胞菌酵米面亚种及米酵菌酸的研究进展(综述)——王 静 刘秀梅

梅<sup>[20]</sup>等在制备了抗不同血清型菌体抗原的抗体和辣根过氧化物酶结合物的基础上,建立了检测椰酵假单胞菌的间接非竞争法、直接非竞争法和双抗夹心 ELISA 法。其中单克隆抗体间接 ELISA 法初步应用结果表明,<sup>[21]</sup>经生化试验鉴定为椰酵假单胞菌的菌株,100% 含有 O—I 因子。联合使用种间(O—I)和型间特异性单克隆抗体进行 ELISA 检测,可同时定种分型,方法灵敏,快速,重复性良好。

#### 1.3 椰酵假单胞菌产毒的影响因素

影响细菌产毒的因素很多。实验室研究和调查发现,椰酵假单胞菌不仅可以在合适的培养基上产毒,而且至少可在 8 种常见食品基质上产毒,在其他培养条件相同的条件下,产毒量依次为:银耳粉、土豆粉、玉米粉、牛奶粉、豆腐粉、小米、高粮米和大米。在可可粉中也分离到椰酵假单胞菌并检测到毒素。说明在一定条件下,这些食品有可能被椰酵假单胞菌污染并产生毒素。孟昭赫等<sup>[22]</sup>用正交实验研究了实验室中影响产毒的因素,对产毒的影响按程度依次为:菌株、培养基、温度、pH 值和时间。实验证明,BA 产量在对数生长静止期后两天达到恒定;37℃ 是椰酵假单胞菌的适宜生长温度,而 26~28℃ 最适该菌产毒。椰酵假单胞菌最适产毒培养条件为:在 PDA 半固体上 26℃ 静止培养 5 天时,BA 产毒量最高。

Buklie 等<sup>[23]</sup>的研究表明,酸化培养基和增加盐浓度可抑制椰毒假单胞菌的产毒。在 pH6.9 的椰子培养基(CCM)中,BA 的产量远高于 TF。当用乙酸将培养基 pH 调到 5.5 时,BA 产量下降,并检测不到 TF;当 pH4.5 时,BA、TF 均检测不出。在 pH6.9 的 CCM 中,NaCl 最终浓度为 1%,BA、TF 产毒量均下降;2%NaCl 时,检测不到 TF。当 NaCl 浓度为 2%,pH 值为 5.0 或 4.5 时,BA、TF 均不能产生。

俞世荣等<sup>[24]</sup>研究发现,紫外照射能降低椰酵假单胞菌的产毒能力;1‰ 的薰香灵的抑菌作用不明显,但能抑制毒素的产生。

王夏等<sup>[25]</sup>认为,椰酵假单胞菌产毒能力的强弱与血清型(V 型>Ⅳ 型>Ⅲ 型)、菌体中脂肪颗粒的多少、内膜系统发达与否有关。细菌的内膜系统与氧化磷酸化作用密切相关。BA、TF 为不饱和脂肪酸,可能是细菌能量代谢过程的中间产物。弱产毒株(如 Co33)膜系统发达,脂肪颗粒较少,胞浆膜由两个单位膜组成,细菌代谢机能旺盛,氧化作用强,对毒素分解较快,故产毒量低;强产毒株(如 Co14)膜系统不发达,脂肪颗粒较多,毒素不能及时氧化而聚集,故产毒量高。陈卫真等<sup>[26]</sup>对椰酵

假单胞菌的脂肪酸组成进行了研究,发现产毒力强弱及血清型不同的椰酵假单胞菌的脂肪酸组成上有所不同;饱和脂肪酸含量高者产毒量大。 $C_{16}:O$ 与BA的合成密切相关, $X-A(094)$ 可能是BA的生物合成前体或部分前体。

#### 1.4 化学和生物因素的抑菌作用

王夏、孟昭赫等<sup>[27]</sup>研究表明,椰酵假单胞菌对一般常用的消毒剂都很敏感,但鉴于许多消毒剂本身的毒性和残留问题,仅可用于实验室消毒。亚硫酸氢钠对椰酵假单胞菌具有较强的抑菌和杀菌作用,可用于某些食品加工过程的消毒。

为探讨用生物学方法抑制椰酵假单胞菌的生长,抑制其对自然环境及食品的污染,刘秀梅等<sup>[28]</sup>从北京的湖水及河水中分离到了该菌的寄生菌k噬菌蛭弧菌,并发现一种形态特异的瓜子形细菌,两者均可裂解椰酵假单胞菌。对椰酵假单胞菌寄生菌的研究报道极少,但初步研究结果提示,寄生菌的存在可能与椰酵假单胞菌的地理分布有关,对进一步探讨利用生物学方法控制椰酵假单胞菌的污染,预防椰酵假单胞菌食物中毒有一定实际意义。

## 2 毒素的研究<sup>[29,30]</sup>

### 2.1 BA、TF的理化性状

米酵菌酸(BA)和毒黄素(TF)均为小分子脂肪酸类毒素,对人和动物细胞具有毒性作用。

BA为白色晶体,耐热性强,难溶于水,易溶于各种有机溶剂。它的分子量为486,分子式为 $C_{28}H_{38}O_7$ ,化学名称为:3-羧基-17-甲氧基-6,18,21-三甲基廿二碳-2,4,8,12,14,18,20-七烯二酸。TF的分子量193,分子式为 $C_7H_7N_5O_2$ 。

BA的小鼠经口 $LD_{50}$ 为3.16mg/kg B. W. (95%可信限为1.63~6.15mg/kg B. W.),TF为8.39 mg/kg B. W.。BA毒性比TF强,且在相同条件下,BA产生量远大于TF,是引起酵米面和变质银耳等多种食物中毒致死的主要病因。

### 2.2 BA的检测方法

胡文娟等<sup>[31]</sup>建立了BA的TLC和HPLC测定法,其方法灵敏度分别为0.25 $\mu$ g/mL与0.1~0.25  $\mu$ g/

0.38 $\mu$ g;在0.5~9.0 $\mu$ g范围内与HPLC结果比较,相对误差平均为 $\pm 11.2\%$ 。此法简便易行,样品无需复杂的纯化处理,便于基层用于大量样品的筛选。

Lin Li Ming等<sup>[34]</sup>用线性结合函数紫外分光光度法同时测定BA和TF,提高了同时分析多种化合物的混合物的选择性、灵敏度和精确度。BA和TF的最低检出浓度分别为2.65 $\mu$ g/mL和2.24 $\mu$ g/mL,线性检测范围为2.65~9.28 $\mu$ g/mL和2.24~13.4 $\mu$ g/mL。

刘秀梅等<sup>[35]</sup>制备了米酵菌酸牛血清白蛋白结合物(BA-BSA)、卵清蛋白结合物(BA-EA),经免疫后,获得了抗BA半抗原的多克隆抗体,血清效价可达 $1:12 \times 10^4$ 和 $1:8 \times 10^4$ ;建立的检测BA的直接和间接竞争ELISA法,最低检出浓度分别为0.1 $\mu$ g/mL和0.01 $\mu$ g/mL,线性范围分别为0.1~1 $\mu$ g/mL和0.01~1 $\mu$ g/mL。间接法的最低检出量可达1 ng/孔。运用杂交瘤技术,刘秀梅等<sup>[36]</sup>又成功地获得了抗BA单克隆抗体细胞株。BA多克隆抗体和单克隆抗体的制备成功及ELISA检测方法的建立,为椰酵假单胞菌食物中毒提供了快速诊断方法。

### 2.3 BA的去毒方法

王夏等<sup>[37]</sup>进行的BA去毒方法的实验室研究结果表明,次氯酸钙和过氧乙酸去毒效果较好,硫酸、次氯酸铜次之。陈晓明等<sup>[38]</sup>报告了用日晒法去除银耳中BA的实验结果,鲜银耳日晒2天可去毒95%~97%,干银耳日晒2天去毒57%~62%,日晒8天去毒94%。俞世荣等<sup>[23]</sup>在实验室条件下证实,短波紫外线照射对BA有明显去毒作用。

## 小结

综上所述,椰酵假单胞菌及其毒素的生物学性状及检测方法等方面的研究均已取得很大进展。然而致病因子在自然环境中广泛分布,潜在的食品安全性问题仍不容忽视,有必要进一步深入研究它的产毒机制,寻找安全经济的抑菌、去毒方法,探索有效的特异性解毒方法。特别是有关椰酵假单胞菌产毒的生化机理,毒素的分子遗传学,BA和TF两种毒素在分泌过程和毒性作用中的相互关系等方面的研究有待深入探讨。

- 2 Meng Z. H, Li Z. P, Jin J. X, et al. Studies on Fermented Corn Flour Poisoning in Rural Areas of China Bio. Medi. Environ. Sci, 1988, 1: 101~104
- 3 刘秀梅, 陈晓明, 胡文娟, 等. 变质银耳中毒病因的实验室研究. 卫生研究, 1985, 14(4): 25~28
- 4 孟昭赫, 苏翠华, 李兆普, 等. 酵米面黄杆菌与椰毒假单胞菌的对比研究. 卫生研究, 1987, 16(6): 17~22
- 5 白克贞, 柳小萍, 陈卫真, 等. 醋凉粉中毒病因及中毒菌污染途径的研究. 卫生研究, 1989, 18(6): 31
- 6 刘秀梅, 杜春明, 王玉华, 等. 椰毒假单胞菌酵米面亚种在自然环境中的污染调查. 中国公共卫生, 1991, 7(4): 155~157
- 7 孟昭赫, 刘秀梅, 陈晓明, 等. 酵米面、银耳等食品中椰毒假单胞菌及其毒素的污染调查. 卫生研究, 1993, 22(2): 99~101
- 8 刘秀梅, 孟昭赫. 鲜银耳中椰毒假单胞菌的污染状况分析及对策, 中华预防医学杂志. 1993, 27(4): 227~229
- 9 王夏, 孙纪申, 孟昭赫, 等. 食物中毒菌 $\beta$ 酵米面黄杆菌的系统研究. 卫生研究, 1985, 14(5): 29~32
- 10 谢念铭, 等. 椰毒假单胞菌的电镜观察. 微生物学报, 1990, 30(6): 450~454
- 11 陈卫真, 孟昭赫, 白克贞, 等. 椰毒假单胞菌酵米面亚种增菌液的研究. 中国公共卫生, 1989, 8(4): 242
- 12 胡文娟, 张光世, 朱繁生. 酵米面黄杆菌毒素 A 的提纯. 卫生研究, 1984, 13(1): 28~31
- 13 赵乃听, 等. 酵米面中毒病原菌的毒黄素. 中国公共卫生, 1987, 6(2): 65~67
- 14 白竞玉, 刘秀梅, 李兆普, 等. 酵米面中毒菌血清学研究 $\beta$  O 血清分型与分布. 中华预防医学杂志, 1983, 17(3): 138~140
- 15 王淑贞, 杨宝兰, 王淑颖, 等. 酵米面黄杆菌新血清型(O—VI)的研究. 卫生研究, 1989, 18(3): 27~29
- 16 白竞玉, 傅萍, 李志刚. 椰毒假单胞菌种新血清型的研究. 中国食品卫生杂志, 1990, 2(4): 21
- 17 刘秀梅, 文卫华, 田禾菁, 等. 椰毒假单胞菌新血清型(O—VIII)的研究. 卫生研究, 1993, 22(4): 231~233
- 18 刘秀梅, 文卫华, 田禾菁, 等. 椰毒假单胞菌种特异性 O 抗原因子(O—I)的研究. 中华微生物学和免疫学杂志, 1995, 15(2): 102~103
- 19 中华人民共和国卫生部. 椰毒假单胞菌酵米面亚种的检验, GB/T 4789. 29~94. 1994 $\beta$  08 $\beta$  01
- 20 刘秀梅, 文卫华, 余东敏, 等. ELISA 检测椰毒假单胞菌菌体抗原的研究, 中国卫生检验杂志, 1993, 3(2): 73~75
- 21 刘秀梅, 文卫华, 杨宝兰, 等. 用单克隆抗体验证椰毒假单胞菌酵米面亚种 O 抗原型的初步研究. 中国食品卫生杂志, 1995, 7(2): 21~23
- 22 孟昭赫, 王夏. 实验室中影响酵米面黄杆菌产毒因素的研究, 中华预防医学杂志, 1987, 21(2): 80~82
- 23 Buckle K. A, et al. Inhibition of bongkrek acid and toxoflavin production in tempe bongkrek containing *Pseudomonas cocovenenans*. J. Appl. Bacteriol, 1990, 68: 571~576
- 24 俞世荣, 刘秀梅, 杜春明, 等. 安全银耳生产的研究. 卫生研究, 1993, 22(2): 101~104
- 25 王夏, 孟昭赫. 酵米面黄杆菌产毒性能与菌株血清型的关系. 中华微生物学和免疫学杂志, 1987, 7(1): 54~55
- 26 陈卫真, 周方, 孟昭赫, 等. 椰毒假单胞菌毒素 $\beta$ 米酵菌酸形成机理的探讨. 中华微生物学和免疫学杂志, 1991, 11(3): 151~154
- 27 王夏, 孟昭赫. 适用于食品加工过程中椰毒假单胞菌消毒剂的选择. 中国酿造, 1986, 3: 29~30
- 28 刘秀梅, 谢念铭, 杜春明, 等. 椰毒假单胞菌酵米面亚种寄生菌的研究. 卫生研究, 1991, 20(4): 28~30
- 29 Hu W. J, et al. Purification and Partial Characterization of Flavotovin A. Appl. Environ Microbiol, 1984, 10: 690~693
- 30 胡文娟, 陈晓明, 王玉华, 等. 酵米面黄杆菌毒素 A 的提纯及鉴定. 卫生研究, 1984, 13(4): 34~37
- 31 胡文娟, 陈晓明, 王玉华. 酵米面、银耳、玉米中

(下接第 48 页)