

论著

山东临沂部分地区 2012 年产花生真菌污染调查

韩小敏,王伟,李凤琴,李玉伟,张靖,张宏元,赵熙,韩春卉,徐进

(国家食品安全风险评估中心 卫生部食品安全风险评估重点实验室,北京 100021)

摘要:目的 对山东临沂地区 5 个花生主产区 2012 年产花生真菌污染情况进行调查。方法 分别采集收获前 1 个月的花生和土壤样品,及收获期、收获后储存 1 个月、收获后储存 3 个月的花生样品,分别以点种法(花生样品)和稀释法(土壤样品)接种于马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)平板,于(28±1)℃培养 5 d 后进行菌落计数并鉴定。结果 临沂部分地区花生样品 100% 受真菌污染。不同地区花生样品污染真菌的菌相不同,同一地区不同采样期花生样品污染的菌相也有差异;但各采样期花生样品中黄曲霉污染水平均较低(平均 4.38%)。结论 山东临沂部分地区花生样品虽受黄曲霉污染较轻,但其它真菌污染严重,因此应加强花生种植、采摘、贮藏过程的防霉管理。

关键词:真菌;黄曲霉;污染;花生;调查;食品安全

中图分类号:R155.5;TS201.6 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2013)06-0501-04

Survey on fungi contamination of peanut harvested in 2012 collected from parts of Linyi district in Shandong

HAN Xiao-min, WANG Wei, LI Feng-qin, LI Yu-wei, ZHANG Jing, ZHANG Hong-yuan, ZHAO Xi, HAN Chun-hui, XU Jin

(Key Lab of Food Safety Risk Assessment of Ministry of Health, China National Centre for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To study the fungi contamination of shell peanuts harvested in 2012 collected from 5 regions in Linyi district, Shandong Provinces. **Methods** Unshelled peanuts and soil samples collected at preharvest, harvest time, 1 and 3 months postharvest from different regions were inoculated onto PDA medium and the colony-forming unit of fungi were enumerated, classified and identified after incubation for 5 days at (28±1)℃. **Results** The fungi contamination frequencies of the peanuts were approximately up to 100%. The species of fungi isolated from peanut kernels varied from region to region, and even different in the samples collected at different time from the same region. The contamination of peanut kernels by *Aspergillus flavus* was very low at the average percentage of 4.38%. **Conclusion** The peanuts kernels collected from Linyi district of Shandong Province were severely contaminated by fungi but seldom by *Aspergillus flavus*. It was suggested that some important measures of mold prevention during storage should be taken.

Key words: Fungi; *Aspergillus flavus*; contamination; peanut; survey; food safety

粮食中真菌污染是一个全球性食品安全问题。据联合国粮食及农业组织(FAO)报道,全球每年约有 25% 的农作物遭受霉菌及其毒素的污染,约有 2% 的农作物因污染严重不能食用或失去经济价值^[1]。花生为我国重要的经济作物,其生长、收获、贮藏乃至加工过程中,在温度和湿度合适的情况下,易受到黄曲霉污染而产生黄曲霉毒素。黄曲霉毒素主要是由黄曲霉(*Aspergillus flavus*)、寄生曲霉

(*A. paraticus*)和少数集蜂曲霉(*A. nomius*)产生的水溶性次级代谢产物,对肝脏剧毒,并有致畸、致癌和致突变作用,1993 年被世界卫生组织癌症研究机构定为 I 类致癌物(人类致癌物)^[2-4],2002 年该机构又对其进行重新评价,将黄曲霉毒素 B₁ 和 M₁ 均列为天然存在的 I 类致癌物^[5]。

早在 1967 年,Shank 等^[6]对泰国和中国香港 50 种食品原料和加工制品共计 3 000 份样品的真菌分布和黄曲霉毒素含量进行调查,发现花生和玉米最容易受黄曲霉污染,216 份花生样品中黄曲霉检出率为 81%,62 份玉米样品中黄曲霉检出率为 58%。上世纪 70 年代,中国医学科学院卫生研究所食品卫生研究室微生物组对广西、辽宁、山西昔阳三地的粮食及油料作物中真菌污染情况进行调

收稿日期:2013-09-10

基金项目:“十二五”科技攻关课题(2012BAK17B13)

作者简介:韩小敏 女 博士 研究方向为食品微生物

E-mail:hanxiaomin@cfsa.net.cn

通讯作者:徐进 男 研究员 研究方向为食品微生物

E-mail:xujin@cfsa.net.cn

查^[7],发现广西部分地区粮食和油料作物均受到霉菌不同程度污染,其中玉米样品的黄曲霉检出率最高,其次为稻谷和花生仁。同时发现辽宁和山西昔阳县玉米中霉菌菌相分布与广西不同,并且黄曲霉的检出率均低于广西。目前国内的研究主要集中在抗黄曲霉侵染花生品种的筛选、黄曲霉毒素检测方法改进和黄曲霉毒素生物合成途径及控制等研究方面^[8-10],关于花生中污染的真菌菌相分布研究较少。本研究针对山东临沂地区5个花生主产区在花生生长、收获和储藏期不同阶段采集的花生和土壤样品中真菌污染水平及菌相分布进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

160份花生样品和50份土壤样品均于2012年采自临沂地区平邑县、沂南县、沂水县、莒南县、临沭县5个花生主产区。

1.1.2 主要仪器与试剂

生化培养箱、生物安全柜、15.0 cm 一次性无菌培养皿、玻璃试管。

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(北京三药科技开发公司)、察氏培养基(Sigma公司)、苯酚、乳酸、甘油。

1.2 方法

1.2.1 样品采集

花生样品:选取种植面积广、花生产量高、能够代表山东乃至北方地区气候条件和花生种植情况的山东临沂地区的平邑县、沂南县、沂水县、莒南县、临沭县5个县,每个县选10个农户作为采样点,每个农户选择2块地,每块地分别取5个点,分别于收获前1个月和收获期在每个点各采集0.50 kg新鲜带壳花生样品。同时在每个农户中分别采集收获后储存1个月和3个月晒干的带壳花生样品,花生去壳后装入无菌采样袋内并尽快送至实验室检验,或置4℃冰箱保存待测。

土壤样品:分别在采样地区的每块农田四周及中央共5个点取样,取样深度为表层土下0~20 cm、每个点取50 g土样,混合后放入无菌采样袋中,编号后运回实验室及时分离,或置4℃冰箱保存待测。

1.2.2 真菌分离及鉴定

花生样品:花生去壳后取适量花生仁放入无菌自封袋,倒入75%乙醇浸泡消毒30 s后,弃去乙醇,用无菌蒸馏水充分洗涤10次,每次1~2 min。以无菌操作将经表面消毒除菌的花生样品胚部向下接种于PDA平板上,每块平板5粒,每份样品共接种25粒,接种后的平板置(28±1)℃培养5~7 d观察结果。

土壤样品:以无菌操作称取土壤样品25.0 g,置225.0 ml 无菌生理盐水中,充分振摇混匀后取1.0 ml于盛有9.0 ml 无菌生理盐水的试管中,充分涡旋混匀,制成1:10样品匀液,按此操作进行10倍梯度稀释,制备系列样品稀释匀液,并取各稀释度的样品稀释液1.0 ml于无菌培养皿中,加入冷却至40~45℃的PDA培养基15.0~20.0 ml,充分混匀凝固后倒置于(28±1)℃培养5 d进行菌落计数。

菌相鉴定:从培养皿中挑取待鉴定的真菌,分别接种至PDA或察氏培养基平板,置(28±1)℃培养5 d后,观察并记录菌落生长速度、菌落形态、颜色等特性,同时挑取少许菌落制片,在显微镜下观察并记录待鉴定真菌的显微下结构特征,进行菌相鉴定。

2 结果

2.1 临沂地区花生样品中真菌污染及菌相分布

临沂地区不同时期采集的花生样品中污染的主要优势真菌菌相各异。收获前1个月最常污染的真菌为根霉和镰刀菌;收获期最常污染的真菌为桔青霉、根霉和毛霉;储藏1个月后最常污染的真菌为桔青霉和黑酵母;储藏3个月花生中污染的优势菌为根霉和毛霉,具体见表1。

不同地区同一时期采集的花生样品中污染的主要真菌菌相基本相同但也存在差异。如收获前1个月5个地区的优势菌均为根霉和镰刀菌,但平邑和沂南地区样品还检出较多的灰绿曲霉,莒南地区样品检出较多的黑酵母,临沭地区样品则污染较多的毛霉,而沂水地区的镰刀菌作为优势菌占所有分离菌的69.7%(486/697);收获期5个地区花生样品中的优势菌为桔青霉,但平邑和沂南地区的样品还污染较多的根霉,沂水和莒南地区的样品则检出较多的毛霉;储藏1个月后5个地区花生样品中优势菌为桔青霉,不同的是临沭地区样品中黑曲霉污染达65.3%(263/403);此外,平邑地区储藏3个月花生样品中的优势菌为根霉和毛霉。

2.2 花生样品中黄曲霉污染情况

5个花生主产区花生样品中黄曲霉的污染情况见表2。由表2可知,5个花生主产区的2012年产花生样品中黄曲霉的平均污染率为4.38%(7/160),其中收获前1个月采集的50份样品中仅临沭地区的1份样品检出黄曲霉,收获期50份样品中仅平邑地区的3份样品检出黄曲霉,储藏1个月时采集的50份样品中仅平邑和沂南地区各有1份样品检出黄曲霉,储藏3个月的样品中仅平邑地区的1份样品检出黄曲霉。

对同一地区不同时期所采集样品的分析发现,

表 1 临沂地区花生样品污染的真菌菌相分布

Table 1 Fungi invasion of peanut kernels from Linyi

真菌种类	菌相分布百分比/% (目标菌落数/检出菌落总数)			
	收获前 1 个月	收获期	储藏 1 个月	储藏 3 个月
根霉	21.21 (126/594)	14.49 (101/697)	—	37.14 (13/35)
桔青霉	—	64.56 (450/697)	88.34 (356/403)	2.86 (1/35)
黑曲霉	0.51 (3/594)	0.57 (4/697)	7.44 (30/403)	—
黄曲霉	0.17 (1/594)	1.29 (9/697)	0.50 (2/403)	2.86 (1/35)
赭曲霉	0.17 (/594)	0.14 (1/697)	—	—
灰绿曲霉	6.06 (40/594)	—	—	2.86 (1/35)
杂色曲霉	—	—	—	—
圆弧曲霉	0.17 (1/594)	—	0.25 (1/403)	2.86 (1/35)
产黄青霉	—	1.72 (12/697)	—	—
绳状青霉	—	0.14 (1/697)	—	—
草酸青霉	—	0.14 (1/697)	—	—
镰刀菌	54.55 (324/594)	0.57 (4/697)	—	—
毛霉	4.04 (33/594)	6.17 (43/697)	0.50 (2/403)	31.43 (11/35)
黑酵母	0.84 (5/594)	—	0.25 (1/403)	—
木霉	0.17 (1/594)	—	—	—
其它曲霉	0.84 (5/594)	—	—	—
其它青霉	6.40 (38/594)	1.43 (10/697)	0.74 (3/403)	—
其它霉菌	4.88 (29/594)	8.75 (61/697)	1.99 (8/403)	20.00 (7/35)

注:—表示未检出该菌

表 2 临沂地区花生样品中黄曲霉污染情况

Table 2 The invasion of peanut kernels by *Aspergillus flavus* in 5 regions of Linyi

地区	黄曲霉污染率/% (阳性样品数/分析样品数)				
	收获前 1 个月	收获期	储藏 1 个月	储藏 3 个月	总计
平邑	0(0/10)	30(3/10)	10(1/10)	10(1/10)	12.5(5/40)
沂南	0(0/10)	0(0/10)	10(1/10)	—	3.3(1/30)
沂水	0(0/10)	0(0/10)	0(0/10)	—	0(0/30)
莒南	0(0/10)	0(0/10)	0(0/10)	—	0(0/30)
临沭	10(1/10)	0(0/10)	0(0/10)	—	3.3(1/30)

注:—表示未采集样品

平邑地区花生中黄曲霉污染率最高达 12.5% (5/40),其次为沂南和临沭地区,检出率均为 3.3% (1/30),沂水和莒南地区样品中均未检出黄曲霉,因此临沂地区花生样品受黄曲霉污染较轻。对不同时期采集的所有样品的分析发现,收获期花生中黄曲霉污染率最高达 6% (3/50),这与杨文兰等^[11]报道的河北昌黎地区花生黄曲霉的田间污染水平较高的报道不同。

2.3 土壤样品中黄曲霉污染情况

本试验对 50 份土壤样品的研究发现,花生生长期土壤样品中黄曲霉污染水平较低,仅 4 份样品检出黄曲霉(平邑 1 份、沂南 1 份、临沭 2 份),平均污染率为 8% (4/50),除黄曲霉外污染的其它主要真菌为半知菌类、青霉和黑酵母等,此外还分离到毛壳霉、葡萄状穗霉、芽枝霉、白地霉、烟曲霉、交链孢霉、新月弯胞霉、微紫青霉等多种从花生样品中未分离到的菌株,具体见表 3。

表 3 临沂花生主产区土壤样品中真菌菌相分布

Table 3 The distribution of fungi isolated from soil in Linyi

真菌种类	阳性样品数				
	平邑	沂南	沂水	莒南	临沭
根霉	4	2	1	0	4
黑曲霉	2	0	10	0	24
黄曲霉	1	1	0	0	2
烟曲霉	3	1	20	0	28
聚多曲霉	5	1	0	0	0
镰刀菌	2	2	0	2	0
毛霉	4	0	8	5	10
黑酵母	0	6	7	3	92
微紫青霉	0	0	0	0	5
葡萄状穗霉	1	4	0	1	0
芽枝霉	1	1	2	0	0
毛壳霉	1	1	0	5	1
交链孢霉	0	1	0	0	0
白地霉	2	1	0	0	0
木霉	12	20	0	33	10
青霉	95	15	45	102	47
其它霉菌	126	318	395	287	163

3 讨论

由于黄曲霉毒素的强致癌作用,目前世界发达地区和国家对花生及制品中毒素的含量均制定了限量标准,并有逐渐严格的趋势。如欧盟对进口花生原料及花生制品中黄曲霉毒素总量的限量由原来的 20 和 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 统一降至 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[12]。近年来,我国花生出口稳居世界首位,占全球花生贸易量的 30% 以上^[13]。然而我国出口花生因黄曲霉毒素问题而屡屡遭到欧盟、日本等国家的警告和退货,不仅造成重大的经济损失,还影响我国在国际上的声誉,因此花生中真菌毒素的污染已成为制约

我国花生出口的瓶颈^[14]。

真菌毒素与其它污染物不同,是由真菌产生,因此监测花生中黄曲霉毒素产生菌的污染情况,可以预测花生被黄曲霉毒素污染的可能性及严重程度,有助于弥补单纯对毒素表观指标进行检测的不足,为收获后花生中黄曲霉毒素污染的早期预警提供依据。杜献明等 2008—2009 年对临沂各产区花生样品中黄曲霉毒素分析结果表明,东区(莒南、临沭)黄曲霉毒素污染率较高,平均 17.3%,北区(沂水、沂南)污染率较低,约 2.2%,西区(平邑)则未检出^[15-16]。而本次调查发现,不同时期采集的临沂 5 个地区花生样品中黄曲霉污染水平均较低,其中平邑、沂南、临沭的花生样品同时检测到了黄曲霉,验证了临沭、沂南地区的黄曲霉毒素污染与黄曲霉侵染的相关性;同时发现平邑地区样品具有潜在的黄曲霉毒素污染的风险。沂水和莒南两个地区的花生样品中均未检测到黄曲霉,这也说明了黄曲霉毒素的污染影响因素的复杂性。由于本试验对花生被黄曲霉侵染情况调查只进行了一年的检测,且黄曲霉的侵染受气候影响较大,有必要进行多年连续定点调查和毒素检测的综合研究。

本次调查同时发现土壤中存在多种可引起花生病害和真菌毒素产生的真菌,如易引起种腐和根腐的青霉和镰刀菌、易引起冠腐病的黑曲霉、易产生真菌毒素的烟曲霉、交链孢霉等。由于土壤中真菌菌相和分布水平对花生样品中同类真菌的污染影响较大。因此,控制花生生长和收获期间土壤中真菌菌相变化,收获期避免荚果损伤接触到污染的土壤等,是预防花生中真菌及其毒素污染的有效措施。

综上所述,山东临沂地区花生样品虽受黄曲霉菌污染较轻,但其他真菌污染严重。因此,花生种植、采摘、贮藏过程中应该执行良好的农业操作规范,加强防霉管理,以降低花生中黄曲霉毒素的污染,减少人类膳食暴露。

参考文献

- [1] 许艳丽,鲍蕾,梁成珠,等.黄曲霉毒素检测及其生物防治方法的研究进展[J].安徽农业科学,2007,35(32):1021-1021.
- [2] Kurtzman C P, Horn B W, Hesselstine C W. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1987, 53(3):147-158.
- [3] Ono E Y, Ono M A, Funo F Y, et al. Evaluation of fumonisin-aflatoxin co-occurrence in Brazilian corn hybrids by ELISA[J]. Food Additives & Contaminants, 2001, 18(8):719-729.
- [4] A AC00677411. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins [M]. WHO, 1993.
- [5] Medicines I S T H. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene [J]. Summary of Data Reported and Evaluation, 2002, 82:1-556.
- [6] Shank R C, Bhamarapravati N, Gordon J E, et al. Dietary aflatoxins and human liver cancer. IV. Incidence of primary liver cancer in two municipal populations of Thailand [J]. Food and cosmetics toxicology, 1972, 10(2):171-179.
- [7] 中国医学科学院卫生研究所食品卫生研究室微生物组.三个不同地区粮食霉菌污染调查[J].卫生研究,1978,7(3):177-183.
- [8] Siame B A, Mpuchane S F, Gashe B A, et al. Occurrence of aflatoxins, fumonisin B1, and zearalenone in foods and feeds in Botswana[J]. Journal of Food Protection, 1998, 61(12):1670-1673.
- [9] 高国庆,蔡秀英.花生品种抗黄曲霉毒素的研究[J].西南农业学报,1995,8(2):70-74.
- [10] 徐进,罗雪云.黄曲霉毒素生物合成的分子生物学[J].卫生研究,2003,32(6):628-631.
- [11] 杨文兰,马桂珍.花生黄曲霉与其他寄生真菌的种群及动态分析[J].河北职业技术师范学院学报,2003,17(3):19-22.
- [12] Fernane F, Sanchis V, Marín S, et al. First report on mould and mycotoxin contamination of pistachios sampled in Algeria [J]. Mycopathologia, 2010, 170(6):423-429.
- [13] 万书波.花生产业经济学[M].北京:中国农业出版社,2010.
- [14] 胡东青,庞国兴,张治宇,等.出口花生黄曲霉毒素污染的预防与控制[J].花生学报,2011,40(1):36-38.
- [15] 杜献明,裴道国,姚知渊,等.临沂地区花生生长期黄曲霉毒素污染状况及控制措施[J].花生学报,2011,(3):46-48.
- [16] 杜献明,韩青,魏海,等.不同剥壳模式对花生籽仁霉菌污染的影响[J].花生学报,2010,(4):5-8.

·法规文件·

国家卫生计生委关于印发《新食品原料申报与受理规定》和《新食品原料安全性审查规程》的通知

国卫食品发[2013]23号

各省、自治区、直辖市卫生厅局(卫生计生委),新疆生产建设兵团卫生局,委直属有关单位:

为规范新食品原料安全性审查和许可工作,根据《中华人民共和国食品安全法》和《新食品原料安全性审查管理办法》的规定,我委组织制定了《新食品原料申报与受理规定》和《新食品原料安全性审查规程》(可从国家卫生计生委网站政务信息栏目下载)。现印发给你们,请遵照执行,并将执行中的有关问题及时反馈我委。

《新食品原料申报与受理规定》

《新食品原料安全性审查规程》

(相关链接:<http://www.nhfpcc.gov.cn/sps/s3585/201311/e8dc7f4ec58444f8bbf32ec079d7e905.shtml>)

国家卫生和计划生育委员会
二〇一三年十月十五日