文章编号: 1001-0580(2007)01-0052-02 中图分类号: R 994.6 文献标志码: A 【论 著】

温度和 pH 的交互作用对黄绿青霉菌产毒影响*

侯海峰,齐永秀,李群伟

摘 要: **目的** 在实验室条件下观察温度、pH 对黄绿青霉菌(PCV)产毒的影响及其交互作用。**方法** 采用析因实验设计,用察氏培养基培养黄绿青霉菌,二氯甲烷提取黄绿青霉素(CIT),高效液相色谱法检测 CIT 毒素含量。**结果** 黄绿青霉菌在高温、低温、酸性及碱性条件下均可产毒,产毒量 60.30～336.10 μg/g 培养基;高温、碱性条件下产毒量较高,是低温条件的 2 倍以上。**结论** 温度和 pH 对黄绿青霉菌产毒量有较大影响,且有交互作用。

关键词: 黄绿青霉菌;黄绿青霉素:产毒;交互作用

Interaction of temperature and pH on toxin production of penicillium citreoviridin *HOU Hai-feng, QI Yong-xiu, LI Qun-wei. Institute of Epidemiology, Taishan Medical College (Taian 271000, China)*

Abstract: **Objective** Observe the effect of temperature, pH and their interaction on Penicillium citreoviridin's (P. C. V.) toxin production in laboratory. **Methods** P. C. V. was cultured in Charles culture medium in different conditions according to the factorial experiment for two factors. CIT was extracted by dichloromethane and quantitated by HPLC method. **Results** P. C. V. produced CIT in all Charles culture medium. Quantities of CIT produced by P. C. V. were 60.30～336.10 μg/g medium. P. C. V. produced more CIT in warm condition in acid Charles culture medium. **Conclusion** Quantities of CIT produced by P. C. V. were affected by temperature, pH and their interaction.

Key words: penicillium citreoviridin (PCV); citreoviridin (CIT); production of toxin; interaction

黄绿青霉菌(Penicillium citreoviridin, PCV)属单轮青霉群,是污染粮食常见的真菌之一,尤其是在大米、小米霉变过程中经常可检出黄绿青霉菌,该菌污染的粮食外观呈黄绿色。黄绿青霉菌产生的黄绿青霉素(Citreoviridin, CIT)是一种具有心脏血管毒性、神经毒性、遗传毒性的真菌毒素[1]。相关研究表明,CIT 是导致克山病的可疑病因[2],并且温度、培养时间、酸碱度等黄绿青霉菌产毒条件与克山病病区环境条件十分类似[3]。为进一步探讨黄绿青霉菌产毒特征,本文对温度、pH 对该菌产毒的交互作用进行观察。现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)菌株:黄绿青霉菌菌株(中科院微生物研究所),菌株号为 3.4033。(2)培养基:黄绿青霉菌培养采用察氏培养基,120 ℃高压灭菌 20 min。待温度降至 60 ℃左右时,加入青霉素 100 U/ml,混匀。无菌条件下分装入培养皿,制成平板待用[4]。(3)标准溶液:CIT 标准品(美国 Sigma 公司)分别用流动相配成 1,2,5,10,40 和 100 mg/L 的标准溶液,冷藏待检。(4)仪器与试剂:Waters600 液相色谱仪;Waters2996 二极管阵列检测器,4.6 mm ×150 mm,5 μm Hypersil 硅胶色谱柱(大连依利特公司)。

1.2 方法

1.2.1 培养条件控制 菌株培养在本所生物培养室进行,温度分别控制在 30 和 8 ℃;通过高压灭菌前添加 NaOH 和 HCl 溶液,分别配制成 pH 5.0 和 9.0 的培养基。采用 2 ×2 析因设计方法观察温度、pH 对产毒的独立作用及交互作用;每种条件下培养 5 份,培养时间 2 周。

1.2.2 样品提取[5,6] 将培养物搅碎,移入具塞三角烧瓶,加入 50 ml 二氯甲烷,塞紧磨沙塞,振荡 10 min,避光静置 30 min。过滤,取滤液 2 ml,在避光、通风条件下挥干,得到粗毒素,定容后上机检测。

1.2.3 分析条件[5,6] 采用高效液相色谱法检测标准溶液及样品中的 CIT 含量,流动相为乙酸乙酯:正己烷(7∶3, V/V);流速为 1 ml/min;检测波长为 383 nm;分析时间 10 min。

1.3 统计分析 采用 Waters Empower 软件采集检测数据;采用 SPSS 12.0 软件进行统计分析。

2 结 果

2.1 CIT 含量与色谱峰面积关系标准曲线 以标准溶液浓度(mg/L)为自变量,色谱图峰面积(mV ×s)为应变量,建立标准曲线方程: $y = 24.400x + 3.020$,相关系数(r)为 0.999 94,线性关系较好。

2.2 不同温度及 pH 条件下黄绿青霉菌产毒量 在高温、低温、酸性及碱性环境条件下黄绿青霉菌均可产生 CIT 毒素,产毒量分别为:高温酸性条件下(92.14 ±16.00)μg/g;高温碱性条件下(234.76 ±70.79)μg/g;低温酸性条件下(101.70 ±5.57)μg/g;低温碱性条件下(91.02 ±26.70)μg/g。

2.3 析因设计方差分析结果(表 1) 温度和 pH 影响黄绿青霉菌产毒,高温碱性条件下黄绿青霉菌产毒量高于低温酸性下产毒量($P < 0.01$)。温度和 pH 对黄绿青霉菌产毒的影响存在交互作用($P < 0.01$)。

表 1 温度、pH 对黄绿青霉菌产毒量影响析因设计方差分析结果

变异来源	SS	υ	MS	F	P 值
温度	22 505.34	1	22 505.34	14.98	< 0.001
pH	21 769.21	1	21 769.21	14.48	< 0.002
交互作用	29 376.11	1	29 376.11	19.55	< 0.001

3 讨 论

本实验发现,温度和 pH 因素对黄绿青霉菌产毒的影响存在交互作用,黄绿青霉菌在高温碱性条件下比在酸性温下更易产毒,此结果与前期观察相同[3]。结果表明,黄绿青霉菌

*基金项目: 国家自然科学基金(30271151)
作者单位: 泰山医学院流行病学研究所,山东泰安 271000
作者简介: 侯海峰(1979 -),男,山东泰安人,硕士在读,研究方向:真菌毒素与人类疾病。
通讯作者: 李群伟

在高温(30 ℃)或变温(8～30 ℃)、弱碱性或中性条件下,只要有充足的营养,约 10 d 左右即可产生大量 CIT 毒素。文献提示,克山病病区的地理特点是,病区的纬度与海拔高度呈相反关联特征,即高纬度的低海拔和低纬度的高海拔,这种海拔高度与纬度之间的配置关系表现为,病区内湿度较大;谷物收获期恰逢多雨天气;并且病区属大陆性气候,昼夜温差较大,在 0～20 ℃之间波动[7]。克山病病区这种环境条件与本实验观察到的黄绿青霉菌产毒特性十分相似,提示在这种气温变化较大,环境酸碱度不稳定的自然条件下,黄绿青霉菌可以生长并产生大量毒素,一旦污染粮食,人畜食入该粮食后发生中毒,并引发克山病。本文结果为克山病与 CIT 关系的研究提供了实验室依据。

参考文献

[1] 李群伟. 真菌毒素与人类健康[M]. 北京:人民军医出版社,2005:102 - 106.
[2] 杨建伯,杨秋慧. 克山病病因研究[J]. 中国地方病学杂志,2000,19(5):350 - 355.
[3] 侯海峰,李群伟,齐永秀. 黄绿青霉菌产毒影响因素的观察[J]. 中国公共卫生,2006,待发表.
[4] 王绍萍,鲍文生,唐晓波,等. 黄绿青霉菌不同培养基上产毒能力差异的实验研究[J]. 黑龙江医学,2002,26(7):498.
[5] 李德安,孙树秋,李晓丹,等. 黄绿青霉素的高效液相色谱法检测[J]. 中国地方病学杂志,2004,23(2):160 - 162.
[6] 侯海峰,齐永秀,费洪荣,等. 黄绿青霉毒素的高效液相色谱检测法的改进[J]. 泰山医学院学报,2004,29(6):530 - 531.
[7] 中国地方病防治研究中心. 地方病学[M]. 哈尔滨:黑龙江人民出版社,1999:26 - 30.

收稿日期: 2006-04-27　(孔繁学编辑　张亚莲校对)

文章编号: 1001-0580(2007)01-0053-01　**中图分类号**: R 115　**文献标志码**: A

【检验技术】

多种肠道致病菌初筛鉴定培养基研制*

何颖[1],廖文[1],高海燕[1],杜丽霞[2]

肠道杆菌是寄居在人类和动物肠道中生物学性状近似的革兰阴性杆菌,是引起腹泻病的病原菌。大多数肠道杆菌是肠道的正常菌群,但当宿主免疫力降低或细菌侵入肠道外部等特定条件下也可成为条件致病菌而引起疾病或食物中毒。在肠道菌的鉴定方面,致病性的肠道菌所用的初筛培养基对变形杆菌族的细菌无特殊的鉴别意义。为简化细菌鉴定实验手段,提高工作效率,我们利用细菌的各种生长特性,研制出一种简单、快速、易于掌握、特异性和稳定性强的鉴别培养基。现将结果报告如下。

材料与方法　(1) 菌株:标准菌株 63 株(国家菌种保存中心、哈尔滨铁路中心医院);临床参考菌株 164 株(辽宁省疾病预防控制中心、哈尔滨铁路中心医院、沈阳市传染病医院、沈阳市和平区疾病预防控制中心等单位从标本中分离)。所有菌株均按常规保存和培养。(2) 培养基配制(g):肉膏 4;蛋白胨 15;葡萄糖 1;乳糖 10;色氨酸 2;氯化钠 5;硫代硫酸钠 0.03;硫酸亚铁 0.2;酚红 0.02;琼脂粉 15 和蒸馏水 1 000 ml。pH 7.4～7.6。配制后的培养基经高压灭菌后,置高层和斜面各一半。(3) 方法:将新鲜菌落接种到此培养基,穿刺高层,涂抹斜面,37 ℃培养 24 h 后观察结果,见表 1。同时对每种生化试验的结果进行质控,以尽量减少系统误差和避免随机误差。

结果与讨论　(1) 菌属判定大肠埃希菌属的细菌:分解葡萄糖和乳糖产酸产气,不产 H_2S,不产 IPA;沙门菌属的细菌:不分解乳糖,分解葡萄糖产酸,产 H_2S 不定,产气不定,不产 IPA;志贺菌属的细菌:不分解乳糖,分解葡萄糖产酸,不产 H_2S,不产气,不产 IPA;变形菌族的细菌:不分解乳糖,分解葡萄糖产酸,产 H_2S 不定,产气不定,产生 IPA。此培养基在观察葡萄糖、乳糖的分解情况,是否产 H_2S 和是否产气同时,变形菌族的细菌全部产生 IPA,可一目了然地被鉴别出来。(2) 采用标准菌株和临床参考菌株共 227 株,用此培养基进行实验,用已知的结果评价该培养基的实用性和准确性。其中大肠埃希菌 98 株,符合率达 100 %;志贺菌 72 株,符合率达 100 %;沙门菌 8 株,符合率达 87.5 %;变形菌族细菌 12 株,符合率达 100 %,其他菌株 37 株,符合率达 100 %(其中包括产气肠杆菌、阴沟肠杆菌、肺炎克雷伯氏菌、费氏柠檬酸杆菌、蜂房哈夫尼亚菌、深红沙雷菌、粘质沙雷菌、迟钝爱德华菌、小肠结肠炎耶尔森菌)。(3) 培养基特性:该培养基在对埃希菌属、沙门菌属、志贺菌属进行鉴定的同时也可对变形菌族的细菌进行鉴定,使一种培养基在充分利用细菌生长特性基础上最大的发挥其作用。具有简便、价廉、节省时间、准确等优点,2 种方法判定结果的符合率达 98 %以上。

本方法具有先进性、科学性,不仅提高肠道菌的鉴定质量,还能应对突发事件中的流行病学调查,适合在基层医疗卫生单位使用。不足之处是收集的临床菌株数量和种类不够多,在今后的工作中应不断的进行补充,使此培养基在应用中更加完善。

表 1　多种肠道致病菌初筛鉴定培养基试验结果的判定

试验项目	观察部位	阳性结果	阴性结果
葡萄糖	高层	由浅红变黑或变黄	红色
产气	高层	由气泡或出现断裂	无气泡
乳糖	斜面	由浅红变黄	红色
H_2S *	高层	变黑	无黑色
靛基质丙酮酸(IPA)反应	高层和斜面结合部	褐色环	无变

注: *伤寒沙门菌只在高层上部或凝固水中分产 H_2S

质控:发酵葡萄糖和乳糖和乳糖产酸产气:大肠埃希菌;不发酵葡萄糖和乳糖产酸:铜绿假单胞菌;产 H_2S:弗氏柠檬酸杆菌;不产 H_2S:大肠埃希菌;产生 IPA 反应:变形菌族各个属(变形杆菌属、普罗菲登斯菌属、摩根氏菌属);不产生 IPA 反应:大肠埃希菌

收稿日期: 2006-04-16　(刘铁编辑　张亚莲校对)

*基金项目: 辽宁省鞍山市科技局立题项目(2005WS20)

作者单位: 1. 辽宁省鞍山市疾病预防控制中心,114002; 2. 辽宁省沈阳市和平区疾病预防控制中心

作者简介: 何颖(1962 -),女,辽宁鞍山人,主任检验师,大专,主要从事微生物检验工作。

中国公共卫生 Chin J Public Health