

# 2014年山东临沂地区花生真菌及黄曲霉毒素污染调查

韩春卉, 韩小敏, 王伟, 张靖, 陈思瑶, 张宏元, 江涛, 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** 对山东临沂地区五个花生主产区 2014 年花生真菌及黄曲霉毒素污染情况进行调查。**方法** 分别采集收获前 1 个月的花生和土壤样品和收获期、收获后贮藏 1 个月及 3 个月的花生样品, 花生和土壤真菌菌相调查分别采用点种法和稀释法接种马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)平板, 于  $28\pm 1$  °C 培养 5 d 后进行菌落计数并鉴定; 黄曲霉毒素含量采用高效液相色谱法测定。**结果** 临沂不同地区花生和土壤样品污染的真菌菌相不同, 土壤样品真菌菌相较为丰富, 但黄曲霉(7%)及黄曲霉毒素(1%)侵染水平均较低。**结论** 山东临沂部分地区花生样品受黄曲霉及黄曲霉毒素侵染较轻, 但仍需注意土壤中其他真菌污染。

**关键词:** 真菌; 黄曲霉; 黄曲霉毒素; 侵染; 花生

## Survey on fungi and aflatoxin infection of peanut harvested in 2014 collected from parts of Linyi district of Shandong province

HAN Chun-Hui, HAN Xiao-Min, WANG Wei, ZHANG Jing, CHEN Si-Yao,  
ZHANG Hong-Yuan, JIANG Tao, XU-Jin\*

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

**ABSTRACT: Objective** To study the fungi and aflatoxin infection of shell peanuts harvested in 2014 collected from 5 regions in Linyi district, Shandong province. **Methods** Unshelled peanuts and soil samples collected at 1 month before harvest, peanuts samples collected at harvest, 1 and 3 month after harvest from different regions were inoculated onto PDA medium. The colony-forming unit of fungi germinated were enumerated, classified and identified after incubation for 5 d at  $28\pm 1$  °C; aflatoxin was detected by high performance liquid chromatography. **Results** The species of fungi isolated from peanut kernels and soil varied from region to region, and the fungal species from soil were more various. While the invasion of peanut kernels by *Aspergillus flavus* and aflatoxin was very low at the average percentage of 7% and 1%, respectively. **Conclusion** The peanuts kernels collected from Linyi district of Shandong province were slightly infected by *Aspergillus flavus* and aflatoxin, but the other fungi invasion still need to be taken.

**KEY WORDS:** fungi; *Aspergillus flavus*; aflatoxin; infection; peanut

基金项目: “十二五”科技攻关课题项目(2012BAK17B13)

**Fund:** Supported by the National Technique Foundation during the 12<sup>th</sup> Five-Year Plan Period (2012BAK17B13)

\*通讯作者: 徐进, 研究员, 主要研究方向为食品微生物。E-mail: xujin@cfsa.net.cn

\*Corresponding author: XU Jin, Researcher, Key Lab of Food Safety Risk Assessment, Ministry of Health, China National Centre for Food Safety Risk Assessment No.7 Panjiayuan Nanli, Chaoyang District, Beijing 100021, China. E-mail: xujin@cfsa.net.cn

## 1 引言

黄曲霉毒素主要是由黄曲霉(*Aspergillus flavus*)和寄生曲霉(*A.paraticus*)等产生的水溶性次级代谢产物,1993年和2002年世界卫生组织癌症研究机构两次对其进行评价,将其列为I类致癌物(人类致癌物)<sup>[1-3]</sup>。黄曲霉毒素主要污染粮油制品和动植物食品,如花生、玉米、大米、小麦、豆类、坚果类、肉类、乳及乳制品、水产品等。天然污染的黄曲霉毒素主要是B组和G组,代表性的毒素有AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>和AFG<sub>2</sub><sup>[4-6]</sup>。花生为我国重要的油料作物和经济作物,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,易受到黄曲霉侵染而产生黄曲霉毒素。高秀芬等对中国部分地区花生样品中黄曲霉毒素AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>和AFG<sub>2</sub>的含量检测发现,样品中黄曲霉毒素的阳性率为58.38%,平均浓度为91.74 μg/kg,4种毒素中AFB<sub>1</sub>阳性率和平均浓度最高<sup>[7]</sup>。

黄曲霉毒素是我国食品安全污染物风险监测的重要内容,由其导致的粮食损失及潜在的致病风险一直是我国面临的主要食品安全问题。在2012年对山东临沂五个地区花生主产区的收获花生和土壤样品真菌污染水平及菌相分布研究的基础上<sup>[8]</sup>,本文继续采用相同的方法对2014年所调查的临沂地区花生和土壤样品的真菌及黄曲霉毒素污染水平进行分析。为我国食品安全污染物风险监测的花生样品黄曲霉及黄曲霉毒素的污染控制提供技术支持。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

#### 2.1.1 样品来源

100份花生样品和50份土壤样品均于2014年采自山东临沂地区平邑县、沂南县、沂水县、莒南县、临沭县五个花生主产区。

#### 2.1.2 仪器与主要试剂

生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司)、生物安全柜(北京东方照生科技有限公司)、15.0 cm 一次性无菌培养皿(青岛金典生化器材有限公司)、玻璃试管(海门海泰实验器材有限公司)、Waters600 高效液相色谱系统(美国 Waters 公司)、hypersil BDS C<sub>18</sub> 色谱柱(大连依利特分析仪器有限公司)、Waters2475 荧光检测器(美国 Waters 公司)。

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 股份有限公司)、苯酚(国药集团化学试剂有限公司)、乳酸(国药集团化学试剂有限公司)、甘油(国药集团化学试剂有限公司)、甲醇(色谱纯,美国 Fisher)、乙腈(色谱纯,美国 Fisher)、去离子水(Millipore)、黄曲霉毒素总量免疫亲和柱(ROMER 国际贸易北京有限公司)、黄曲霉毒素混合标准品 AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub>(中检维康生物技术有限公司)、吐温-20(国药集团化学试剂有限公司)、磷酸盐缓冲液(PBS,北京索莱宝科技有限公司)。

### 2.2 方法

#### 2.2.1 样品采集

2014年8月~2014年12月在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(10个农户/县,2块地/农户),分别采集收获前1个月、收获期、收获后贮藏1个月和3个月的花生样品,每个采集点各采集500g带壳花生样品。花生去壳后立即装入高压灭菌的牛皮纸袋,密封送至实验室检测。

土壤样品:分别在上述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0~20cm、每个点取50g土样,混合后放入无菌采样袋中,置4℃冰箱保存。

#### 2.2.2 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30s后,弃去乙醇,用无菌蒸馏水充分洗涤10次,每次1~2min。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5d~7d观察结果。

土壤样品:以无菌操作取土壤样品25.0g,置225.0mL无菌生理盐水中,充分振荡混匀后取1.0mL于盛有9.0mL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1.0mL于无菌培养皿中,加入冷却至40℃~45℃的PDA培养基15.0~20.0mL,充分混匀凝固后倒置于28℃±1℃培养5d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5d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,以对菌相进行鉴定。

### 2.2.3 黄曲霉毒素测定

#### 2.2.3.1 标准溶液的配制

黄曲霉毒素混合标准品(AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub>)配置:取1 mL混合标准品原液到10 mL棕色容量瓶中,用HPLC级甲醇涡旋后定容至刻度,得到浓度为260 μg/L(其中AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub>分别为100 μg/L、30 μg/L、100 μg/L、30 μg/L)的储备液,使用时,用1:1的甲醇水溶液将上述储备液稀释,配制成质量浓度分别为130 μg/L、52 μg/L、26 μg/L、10.4 μg/L、2.6 μg/L的系列混合标准工作溶液。

#### 2.2.3.2 黄曲霉毒素的提取

将花生样品粉碎,称取10 g加40 mL 84:16(V:V)乙腈/去离子水,200 r/min震荡提取60 min后3000 r/min离心15 min,玻璃纤维滤纸过滤调节pH至6~8,取2 mL样品提取液与23 mL 1%吐温-20 PBS缓冲液涡旋混匀,以1~2滴/s的流速通过免疫亲和柱,10 mL PBS淋洗免疫亲和柱并抽干小柱,纯甲醇洗脱免疫亲和柱2次,每次0.5 mL,收集洗脱液,超纯水洗脱免疫亲和柱2次,每次0.5 mL,收集淋洗液与洗脱液混合均匀,取10 μL进行检测。

#### 2.2.3.3 黄曲霉毒素的液相色谱检测

色谱柱:反相C<sub>18</sub>(4.6 mm×150 mm, 5 μm),柱温

28 °C;流动相:甲醇:水(47:53),超声脱气;流速:1.0 mL/min;荧光检测器:激发波长360 nm,发射波长440 nm;进样量:10 μL,检出限为0.5 μg/kg,不同水平黄曲霉毒素的加标回收率范围为70%~80%。

## 3 结果与分析

### 3.1 2014年临沂地区花生样品中真菌侵染及菌相分布

5个花生主产区花生样品的真菌侵染情况见表1。临沂5个花生主产区样品在收获前、收获期和贮藏一个月后的真菌平均侵染率分别为:28.9%、29.6%和14.0%。不同时期采集的花生样品最常见的侵染真菌为根霉、毛霉,其次为绳状青霉、黑曲霉和黄曲霉。

### 3.2 2014年临沂地区花生样品中黄曲霉侵染及黄曲霉毒素检测情况

2014年临沂5个花生主产区花生样品中黄曲霉的侵染情况见表2。100份花生样本中有7份样本检测出了黄曲霉,其中4份样本来自花生收获前,3份样本来自花生收获后一个月。7份样本中有6份样本来自沂水县。只在沂水地区贮藏一个月花生的一份样本中检出黄曲霉毒素,其中黄曲霉毒素B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>)的含量为60.5 μg/L,黄曲霉毒素B<sub>2</sub>(AFB<sub>2</sub>)的含量为10.1 μg/L。

表1 2014年临沂部分地区花生样品真菌菌相分析  
Table 1 Fungi infection of peanut kernels from Linyi in 2014

菌落数	收获前一个月					收获期			贮藏一个月			
	沂水	临沭	莒南	沂南	平均(%)	沂水	临沭	平均(%)	沂水	临沭	平邑	平均(%)
污染率(%)	51.2	19.3	18.0	27.3	28.9	50.8	8.4	29.6	25.2	5.2	11.6	14.0
根霉	122	22	2	18	19.0	117	6	28.0	45	—	10	16.2
毛霉	122	28	4	14	13.7	121	7	21.4	44	1	11	16.2
绳状青霉	—	6	21	7	3.0	—	4	0.8	7	4	—	1.5
黑曲霉	—	1	—	9	1.0	—	2	0.4	10	2	—	1.6
黄曲霉	3	—	—	1	0.4	—	—	—	3	—	—	0.4
木霉	—	—	1	—	0.1	1	2	0.6	2	—	—	0.3
交链胞霉	—	1	—	—	0.1	—	—	—	1	1	3	0.7
毛壳	2	—	4	—	0.6	—	2	0.4	1	—	1	0.3
其他霉菌	—	—	10	15	2.5	—	—	—	—	—	2	0.3

注 “—”代表未检测到该菌。

### 3.3 2014年临沂地区土壤样品真菌菌相分布

临沂花生主产区土壤样品中真菌菌相分布,见表3。结果显示,局限青霉、芽枝霉和根霉是临沂花生主产区土壤中较常见的侵染真菌,其次为绳状青霉、白曲霉和毛霉;黄曲霉侵染较低。从地区来看,沂水花生

主产区土壤中的侵染真菌以芽枝霉、根霉和木霉为主,临沭县的侵染真菌以局限青霉、芽枝霉和绳状青霉为主,莒南县的侵染真菌以局限青霉、根霉和绳状青霉为主,平邑县的侵染真菌以局限青霉、根霉和木霉为主,沂南县的侵染真菌以局限青霉、芽枝霉和毛壳为主。

表2 2014年临沂部分地区花生样品中黄曲霉侵染情况  
Table 2 The infection of peanut kernels by *A.flavus* in Linyi in 2014

	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	平均检出率(%)
沂水	30(3/10)	0(0/10)	30(3/10)	—	20(6/30)
临沭	0(0/10)	0(0/10)	0(0/10)	—	0(0/30)
平邑	—	—	—	0(1/10)	0(0/10)
沂南	10(1/10)	—	—	—	10(1/10)
莒南	0(0/10)	—	—	—	0(0/10)

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	菌相分布百分比%(目标菌落数/检出菌落总数)					
	沂水	临沭	莒南	平邑	沂南	平均
局限青霉	—	37.90(274/723)	20.90(28/134)	53.07(147/277)	18.26(40/219)	32.89
芽枝霉	8.96(12/134)	15.21(110/723)	2.24(3/134)	0.36(1/277)	27.40(60/219)	12.51
根霉	13.43(18/134)	6.92(50/723)	18.66(25/134)	18.05(50/277)	9.13(20/219)	10.96
绳状青霉	1.49(2/134)	12.45(90/723)	14.18(19/134)	3.25(9/277)	0.91(2/219)	8.20
白曲霉	—	9.27(67/723)	3.73(5/134)	5.05(14/277)	0.91(2/219)	5.92
毛霉	7.46(10/134)	6.92(50/723)	7.46(10/134)	3.61(10/277)	2.28(5/219)	5.72
木霉	19.40(26/134)	—	3.73(5/134)	7.22(20/277)	2.28(5/219)	3.77
串珠镰刀菌	2.24(3/134)	4.29(31/723)	2.24(3/134)	—	0.91(2/219)	2.62
毛壳	—	0.14(1/723)	—	—	14.61(32/219)	2.22
淡紫青霉	—	—	17.91(24/134)	—	—	1.61
头孢霉	—	2.77(20/723)	—	0.36(1/277)	0.46(1/219)	1.48
拟青霉	—	0.55(4/723)	—	3.97(11/277)	—	1.01
聚多曲霉	0.75(1/134)	—	4.48(6/134)	1.44(4/277)	1.37(3/219)	0.87
帚霉	—	0.14(1/723)	—	—	4.57(10/219)	0.74
草酸青霉	—	—	—	—	5.02(11/219)	0.74
结节青霉	—	—	0.75(1/134)	3.61(10/277)	—	0.74
犁头霉	—	—	—	—	4.57(10/219)	0.67
黑曲霉	2.24(3/134)	0.14(1/723)	—	—	0.46(1/219)	0.34
黄曲霉	2.24(3/134)	0.14(1/723)	—	—	—	0.27
常见青霉	—	—	0.75(1/134)	—	0.91(2/219)	0.20
酵母	—	—	1.49(2/134)	—	—	0.13
橘青霉	—	—	—	—	0.46(1/219)	0.07
橘灰青霉	—	—	0.75(1/134)	—	—	0.07
其他青霉	—	—	—	—	4.57(10/219)	0.67
其他霉菌	41.79(56/134)	3.18(23/723)	0.75(1/134)	—	0.91(2/219)	5.51

注:“—”代表未检测到该菌。

## 4 讨 论

花生是我国重要的油脂和食品原料, 也是我国具有国际市场竞争力的出口创汇经济作物, 占全球花生贸易量的 30% 以上<sup>[9]</sup>。基于黄曲霉毒素对消费者健康风险, 欧盟对进口花生原料及制品中黄曲霉毒素总量的限量由原来的 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  和 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  统一降至 4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[10]</sup>。

本研究显示, 山东临沂花生主产区土壤中常见的侵染真菌为局限青霉、芽枝霉和根霉, 与 2012 年同一地区的调查结果不同: 2012 年该地区土壤真菌侵染以青霉、黑酵母、烟曲霉和黑曲霉为主。2014 年侵染花生的主要霉菌在收获前一个月以根霉和毛霉为主, 收获期为根霉、毛霉和绳状青霉, 储藏一个月后为根霉、毛霉、绳状青霉和黑曲霉, 而 2012 年花生收获前一个月以镰刀菌和根霉侵染为主, 收获期为橘青霉和根霉, 储藏一个月后为橘青霉和黑曲霉。尽管两次的调查发现真菌菌相不尽相同, 但花生样品中黄曲霉的侵染水平总体较低。

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。因此研究花生生长期间的土壤中真菌菌相分布, 有助于花生中真菌及其毒素的有效预防。本研究显示以临沂为代表的山东地区花生产区土壤黄曲霉污染较低, 同时花生果实受到黄曲霉侵染也较低。除了土壤中真菌菌相的影响外, 气候因素也是影响真菌侵染花生及其制品的重要原因。一般来说, 南方花生生产区受高温高湿气候条件影响, 是黄曲霉及黄曲霉毒素多发和易发区, 而辽宁、山东、河北、河南等北方地区花生不易受到黄曲霉毒素侵染总体污染水平不高<sup>[11-15]</sup>。本研究结果证实山东地区花生黄曲霉等产毒真菌和真菌毒素黄曲霉毒素的侵染水平较低, 符合历年来山东地区花生样品调查结果。

综上分析, 山东临沂地区花生样品受黄曲霉菌和黄曲霉毒素的侵染较轻, 土壤样品却易受其它真菌侵染, 因此需要监测花生生长、贮藏期土壤的真菌菌相变化。在花生的种植、采摘、贮藏过程中执行良好的农业操作规范, 降低土壤有害真菌侵染水平, 收获期避免荚果损伤而接触到污染的土壤等, 从而预防花生中真菌及其毒素污染。

### 参考文献

[1] Kurtzman CP, Horn BW, Hesseltine CW. *Aspergillus nomius*, a

new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamari* [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1987, 53(3): 147-158.

- [2] IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Non-ionizing Radiation. Static and Extremely Low-frequency (ELF) Electric and Magnetic Fields [Z]. *Int Agency Res Cancer*, 2002.
- [3] CAC. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins[Z]. WHO, 1993.
- [4] Ueno Y. Trichothecenes. Chemical, biological and toxicological aspects[Z]. Elsevier, 1983.
- [5] Zöllner P, Mayer-Helm B. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1136(2): 123-169.
- [6] 林怡, 黎乐群, 彭涛. 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 代谢及致肝癌机制的研究进展[J]. *中国现代医药杂志*, 2007, 9(12): 131-133.  
Lin Y, Li HQ, Peng T. Research progress on metabolism of aflatoxin B<sub>1</sub> and its mechanism of enhanced hepatocarcinogenesis [J]. *Mod Med J China*, 2007, 9(12): 131-133.
- [7] 高秀芬, 荫士安, 计融. 中国部分地区花生中 4 种黄曲霉毒素污染调查[J]. *中国公共卫生*, 2011, 27(5): 541-542.  
Gao XF, Yin SA, Ji R. Contamination of aflatoxins peanuts from some regions in China [J]. *China Public Health*, 2011, 27(5): 541-542.
- [8] 韩小敏, 王伟, 李凤琴, 等. 山东临沂部分地区 2012 年产花生真菌污染调查[J]. *中国食品卫生杂志*, 2013, 25(6): 501-504.  
Han XM, Wang W, Li FQ, *et al.* Survey on fungi contamination of peanut harvest in 2012 collect from parts of Linyi district, Shandong province [J]. *Chin J Food Hyg*, 2013, 25(6): 501-504.
- [9] 万书波. 花生产业经济学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2010.  
Wan SB. *Peanut industry economics* [M]. Beijing: China Agriculture Publishing House, 2010.
- [10] 白芝珍, 丁小霞, 李培武, 等. 应用暴露限值法评估中国花生黄曲霉毒素风险[J]. *中国油料作物学报*, 2013, 35(2): 211-216.  
Bai YZ, Ding XX, Li PW, *et al.* Risk assessment of peanut aflatoxins exposure by margin of exposure n China [J]. *J China Oil Crops*, 2013, 35(2): 211-216.
- [11] 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.  
Hu DQ, Pang GX, Zhang ZY, *et al.* The prevention and control of alatoxin contamination on export peanut products [J]. *J Peanut*

- Sci, 2011, 40(1): 36-38.
- [12] 蔡骥业. 花生黄曲霉毒素污染及去毒方法综述[J]. 广西农学报, 1996, 1: 7-12.
- Cai JY. A general overview of aflatoxin contamination of peanut [J]. J Guangxi Agric, 1996, 1: 7-12.
- [13] 周桂元, 梁炫强. 收获前花生黄曲霉综合预防控制技术[J]. 花生学报, 2004, 32(B11): 386-389.
- Zhou GY, Liang XQ. The prevention and control aflatoxin contamination in preharvest peanut [J]. J Peanut Sci, 2004, 32(B11): 386-389.
- [14] 李晓岚, 李炎, 侯天亮, 等. 辽宁花生黄曲霉毒素污染水平及分布[J]. 检验检疫科学, 2009, (4): 55-57.
- Li XR, Li Y, Hou TL, *et al.* The Contamination and distribution of aflatoxin for peanut in Liaoning [J]. J Inspection Quarantine, 2009, (4): 55-57.
- [15] 庞国兴, 丁雷霞, 姜军, 等. 青岛地区花生种植地黄曲霉毒素

污染调查分析[J]. 检验检疫科学, 2008, 18(2): 64-65.

Pang GX, Ding LX, Jiang J, *et al.* Survey on aflatoxin contamination for the landing of growing peanut [J]. Inspection Quarantine Sci, 2008, 18(2): 64-65.

(责任编辑: 白洪健)

## 作者简介



韩春卉, 副主任技师, 主要研究方向为食品卫生。

E-mail: hanchunhui@cfsa.net.cn



徐进, 研究员, 主要研究方向为食品微生物。

E-mail: xujin@cfsa.net.cn