

刘晓慧,郭凤柳,贾月梅,等.金黄色葡萄球菌在蔬菜中生长状况分析[J].江苏农业科学,2015,43(8):304-307.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.08.101

金黄色葡萄球菌在蔬菜中生长状况分析

刘晓慧¹,郭凤柳¹,贾月梅²,熊蕊¹,王建华¹,赵同欣¹,王娜¹,颜红¹,吕燕¹

(1.保定出入境检验检疫局,河北保定 071051;2.河北经贸大学,河北石家庄 050061)

摘要:菠菜是生活中常见的蔬菜,但金黄色葡萄球菌对其污染严重,可引起危及生命的败血症及严重的转移性感染,金黄色葡萄球菌产生的毒素更是稳定性极高,对人体健康造成了危害;因此,为了保证人们的食物安全,须从源头上控制金黄色葡萄球菌对菠菜的污染。参照国际上风险评估的经验,采用蒙特卡洛法建立了菠菜中金黄色葡萄球菌的生长预测模型;在 10℃ 时建立了 Linear 模型,15、20、25℃ 条件下建立了 Gompertz 模型,并且对其二级模型也进行了分析。研究中还从危害特征描述和暴露评估等方面客观地对菠菜中金黄色葡萄球菌的生长状况进行了分析,以期为控制金黄色葡萄球菌对人体的危害提供科学的理论及预测方法。

关键词:菠菜;金黄色葡萄球菌;生长状况分析

中图分类号: TS201.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)08-0304-04

随着食品贸易的日益全球化,食源性疾病和食品污染是一个巨大的、不断扩大的世界性公共卫生问题。金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA)广泛分布于自然界,是引起食品污染和细菌性食物中毒中极为重要的细菌之一,是导致食物污染和中毒的重要致病菌,也是造成人和动物感染的主要病原菌之一^[1]。葡萄球菌肠毒素(*Staphylococcus aureus* enterotoxins, SE)导致的中毒现象已成为世界性的食品卫生问题。由此引起的食物中毒在美国占整个细菌性食物中毒的 33%,在加拿大占 45%,而在我国占 50%^[2-3]。2013 年于洁报道了一起在山东地区由金黄色葡萄球菌引起的食物中毒事件^[4]。近十年来国外发达国家利用其检测技术优势建立严格的技术壁垒,其中包含各类微生物的限量指标。而我国菠菜产品具有品种齐全、质量好、价格较低的优势,每年速冻菠菜出口到日本 2 万 t 以上,还部分出口到俄罗斯、欧盟等国家和地区,加工出口前景广阔。菠菜的生产过程包括菠菜种植、原料选择、运输、贮藏、工厂加工等环节,每个环节都可能受到金黄色葡萄球菌的污染。应用食品安全微生物风险分析手段对菠菜生产加工过程中感染金黄色葡萄球菌进行风险分析,将有利于更好地对菠菜进行安全管理。本研究应用食品安全微生物风险分析手段对菠菜中金黄色葡萄球菌从危害识别、流行病例、暴露评估和风险识别等方面进行分析,为菠菜中的金黄色葡萄球菌风险管理提供依据。

1 危害识别

1992—2010 年对 13 个监测地区食源性疾病暴发上报资料进行回顾性分析,结果这十几年间共上报 9 692 起食源性

疾病暴发事件,涉及的患者人数达 268 536 人。微生物引起的食源性疾病暴发事件数和患者数最多,分别占 41.5% 和 58.8%。微生物事件中,以副溶血性弧菌为主,其他依次为沙门氏菌、变形杆菌、蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌及其毒素。按事件发生数统计,家庭是食源性疾病暴发起数和死亡人数最多的地方,而集体食堂是患者数最多的地方,其中引起金黄色葡萄球菌中毒的事件尤其多,这可能与中国人的饮食习惯有关,人们在家里用餐的时间多,而在集体食堂发生一次中毒事件就会牵扯到很多人。在金黄色葡萄球菌中毒事件中,由于新鲜果蔬营养成分丰富,富于微生物生长,而人们在食用过程中没有洗干净直接食用或者烹饪不完全都会受到金黄色葡萄球菌及其毒素的危害,甚至发生中毒。

金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)广泛存在于自然界、空气、水和土壤中,是革兰氏阳性球菌中的典型代表。金黄色葡萄球菌在普通培养基上就能生长良好,平板上菌落厚、有光泽、圆形凸起,直径 0.5~1.0 mm,显微镜下排列成葡萄串状。血平板菌落周围形成透明的溶血环。在 20% CO₂ 环境中,有利于毒素产生。其最低生长温度为 7℃,最适生长温度为 35~37℃,最高生长温度为 50℃,产毒温度为 10~48℃,最适为 40~45℃,最适生长 pH 值为 7.4~7.6。在摄入生长有 *S. aureus* 的食物 1~6 h 后会出现恶心、呕吐、不同程度的腹部痛性痉挛和腹泻的症状^[5]。*S. aureus* 产生的肠毒素还可以引起肠胃炎,因此 *S. aureus* 被列为世界上引起肠胃炎的祸首之一^[6]。

2 危害特征描述

金黄色葡萄球菌是在人类化脓感染中常见的病原菌,有 30%~50% 的菌株可以产生肠毒素和外毒素,可引起化脓感染、肠炎、肺炎、心包炎,甚至脓毒症、败血症。如果肠毒素进入人体,可引起急性胃肠炎等,而且使人体对肠毒素更敏感。金黄色葡萄球菌的致病力强弱主要取决于其产生的毒素和侵袭性酶。

金黄色葡萄球菌肠毒素是个世界性卫生问题,我国每年

收稿日期:2014-08-06

基金项目:河北出入境检验检疫局自主立项项目(编号:HE2012K003)。

作者简介:刘晓慧(1980—),女,河北沧州人,博士,兽医师,主要研究方向为动物检疫和食品微生物学。Tel:(0312)3110331;E-mail:dlxh@163.com。

发生的此类中毒事件也非常多。例如,2004 年河北省石家庄市某大学发生一起食物中毒事件,经流行病学调查、临床诊断和病原学鉴定,证实为一起由金黄色葡萄球菌和变形杆菌引起的食物中毒事件;2005 年 4 月浙江省宁波市某校学生在学校小卖部就餐,发生一起食物中毒事件,共 4 名学生发生食物中毒,经证实为一起产 A 型肠毒素金黄色葡萄球菌引起的食物中毒事件;2009 年 9 月广西柳州地区民族高中部分师生及周边居民 50 多人发生食物中毒事件,“罪魁祸首”已经确定,致病菌为金黄色葡萄球菌;2011 年 5 月 8 日宁夏永宁县一场婚宴上数十名群众先后出现恶心、呕吐、腹泻等症状,疑似食物中毒,经鉴定引起这次中毒事件的为纽波特沙门氏菌和金黄色葡萄球菌;2012 年 3 月江苏省江阴市某中学食堂发生一起 240 人细菌性食物中毒事件,经流行病学调查分析和实验室病原菌检验,并结合患者临床症状,证实这是一起由金黄色葡萄球菌肠毒素引起的食物中毒事件;2013 年 9 月 26 日江苏省苏州市食品安全办公室对市区市场蔬菜、肉及制品、乳制品、蛋及蛋制品、大米、水果、水产品、熟食卤菜等 33 大类进行抽检,在盒饭、熟食卤菜中检出金黄色葡萄球菌。

3 暴露评估

3.1 在种植的环境下暴露

(1) 菠菜种植地以及周边环境的污染是引起菠菜种植过程中感染金黄色葡萄球菌的主要原因。环境的污染主要是指肥料和水源的污染。金黄色葡萄球菌通过污染施肥用的粪便或灌溉用水间接感染菠菜。(2) 种植人员患局部化脓性感染(如疥疮、手指化脓等)、上呼吸道感染(如鼻窦炎、化脓性肺炎、口腔疾病等)等疾病,却不加注意卫生,造成间接感染。(3) 菠菜采摘人员在上完厕所后未洗手就去采摘菠菜、雨水将排泄物从饲养动物的农场冲到菠菜种植地里等均均为金黄色葡萄球菌的繁殖提供了条件。

3.2 在流通过程中的暴露

菠菜在流通过程中主要通过 2 种渠道进入到消费者手中:(1) 菠菜在流通过程中作为原料,从种植区运送到蔬菜产品加工厂后,没有立刻进行加工,也没有放入冷库低温冷藏,造成金黄色葡萄球菌繁殖;在工厂中的加工过程是决定菠菜产品质量和安全的重要环节,工厂内部的各环节人员健康状况、环境卫生情况、工艺控制、交叉污染情况等都容易造成菠菜产品受金黄色葡萄球菌的污染;在运输和销售过程中包装不严,运输和销售人员自身带菌、运输车辆和用具被金黄色葡萄球菌污染等均可间接污染蔬菜产品,产生肠毒素,引起食物中毒;在餐馆、路边小吃摊等环境卫生条件差的地方就餐,厨师等接触到菠菜的人员在烹调菠菜前,未对手和刀、砧板等用具进行消毒并且制备食物时生熟食品未分开加工,生熟用具也未分开使用;菠菜在烹饪前清洗不干净或者焯过菠菜的水又作为饮用或烹饪用水,造成金黄色葡萄球菌污染。(2) 从种植地采摘的新鲜菠菜未进行任何加工,直接贩卖到消费者手中。消费者在烹饪菠菜前,手、菠菜和厨房用具未进行消毒,菠菜在烹饪过程中加热不完全,手又接触餐具等造成厨房与就餐区域被金黄色葡萄球菌污染。

图 1 展示了从菠菜生长到最后食用可能会感染 *S. aureus* 的过程:原料菠菜中的浓度→加工过程中的变化→贮藏过程中的变化→消费的剂量→消费时摄入的剂量。

如表 1 所示,通过对河北省保定市及周边地区的菠菜种植产地、生产加工企业以及市场、超市等场所采集的 325 份菠菜样品,按照国标检验方法对 325 份菠菜样品进行金黄色葡萄球菌检测,结果检出率达 16.3%;同时利用 mini VIDAS 检测仪对阳性样品进行肠毒素的检测,结果阳性率为 56.6%。鉴于该菌的广泛存在及传播可以对菠菜造成污染,因此,将金黄色葡萄球菌确定为菠菜中的特征性致病菌对其进行风险评估研究。

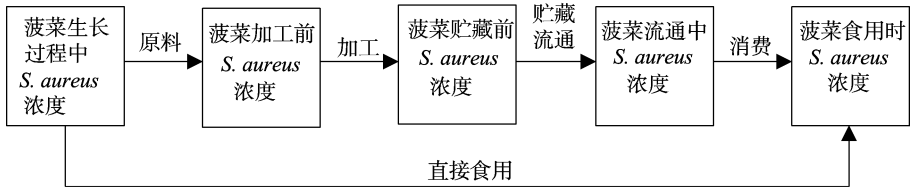


图1 菠菜中金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 的过程风险示意

表 1 不同来源的菠菜金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 及其肠毒素检出率

样品名称	采样场所	样品数量 (份)	金黄色葡萄球菌检测结果		阳性样品中肠毒素检测结果	
			阳性数(份)	阳性率(%)	阳性数(份)	阳性率(%)
新鲜菠菜	超市	80	13	16.3	5	38.5
	农户	50	5	10.0	2	40.0
	农贸市场	80	17	21.3	11	64.7
冷冻密封菠菜	超市	69	12	17.4	8	66.7
	加工企业	37	5	13.5	3	60.0
	餐饮场所	9	1	11.1	1	100.0
合计		325	53	16.3	30	56.6

3.3 采用蒙特卡洛法建立菠菜中金黄色葡萄球菌的预测模型

称取 200 g 经致病菌检测结果为阴性的新鲜菠菜分别置

于灭菌大烧杯中,接种菌数为 $10^3 \sim 10^4$ CFU/mL 的 *S. aureus* 菌悬液 5 mL,充分混合,用灭菌的纱布封口,注意所有的操作在生物安全柜中进行。将盛有样品的烧杯分别置于 4、10、

15、20、25 ℃ 恒温储藏,4 ℃ 条件下每隔 24 h 检测 1 次 *S. aureus* 的生长情况;10、15、20 ℃ 条件下每隔 12 h 检测 1 次,25 ℃ 条件下每隔 6 h 检测 1 次,每条生长曲线至少检测 10 个点以上。每个温度条件下的样品均做 2 组平行。

参考 GB 4789. 10—2010《食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验》^[7] 的方法,采用 Baird - Parker 平板和 3M 金黄色葡萄球菌快速测试片分别对在菠菜上生长一定时间的金黄色葡萄球菌进行计数。并用 SN/T 1869—2007《食品中多种致病菌快速检测方法 PCR 法》^[8] 中的聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 方法代替生化鉴定试验中的血浆凝固酶试验。

利用蒙特卡洛法将测定的生长曲线数据分别拟合 Gompertz 方程、Logistic 方程、Richards 方程和 Linear 方程建立生长模型。通过对 Gompertz、Logistic、Richards、Linear 这 4 种模型的标准差 s 和相关系数 r 比较,确定最适模型;再由最适生长模型计算出金黄色葡萄球菌的生长参数^[9-11]。

将模拟的 4 种模型的标准差 (s) 和相关系数 (r) 进行比较,10 ℃ 时 Linear 模型的标准差最小、相关系数最大,拟合性也较其他 3 个模型好,这是因为在低温条件下微生物生长缓慢。15、20、25 ℃ 条件下 Gompertz 模型的标准差最小、相关系数最大,拟合性也最好,其次是 Logistic 模型,而 Linear 模型的拟合性最差。由此说明,在温度较低的情况下应该选择 Linear 模型进行拟合。随着温度的升高,迟滞期 (Lag) 变短,最大生长速率 (μ_{\max}) 变大,因此加工企业可以通过这些生长参数对整个加工流程的时间进行控制,降低金黄色葡萄球菌对食品造成污染的概率。4 ℃ 时,金黄色葡萄球菌几乎不生长,不能进行拟合。

Gompertz 方程的数学描述为:

$$L(t) = A + C \exp \{ - \exp [- B(t - M)] \}。$$

式中: $L(t)$ 为菌数自然对数值 (ln CFU/g); A 为初始菌数自然对数值 (ln CFU/g); C 为细菌最大生长量自然对数值 (ln CFU/g); M 为细菌生长率最大时对应时间 (h); t 为时间 (h); B 为 M 时刻生长率自然对数值 [ln CFU/(g · h)]。

Linear 方程的数学描述:

$$y = \mu_{\max} t。$$

其中, t 为时间 (h); μ_{\max} 为微生物生长的最大比生长速率 (h⁻¹)。

表 2 菠菜中金黄色葡萄球菌的最适生长模型

温度 (℃)	模型名称	回归模型
10	Linear 模型	$y = -2.200 + 1.797x$
15	Gompertz 模型	$y = 2.507 \exp [- \exp (1.608 - 3.516 9x)]$
20	Gompertz 模型	$y = 2.970 \exp [- \exp (1.467 - 4.392 9x)]$
25	Gompertz 模型	$y = 3.027 \exp [- \exp (1.488 - 6.728 3x)]$

注: $y = \ln (N_t/N_0)$; $x = t$ 。

通过最适生长模型计算出金黄色葡萄球菌的迟滞期 (M)、最大生长速率 (B) 以及相对最大细菌浓度 (A)。由表 3 可以看出,随着贮藏温度的升高, B 逐渐增加,而 M 则逐渐减小。

对于二级模型的建立,这里采用二级响应面方程 (多项式方程),以自然对数的方式进行结合。应用二级响应面方

表 3 由最适模型方程得到的生长参数

温度 (℃)	M (h)	B (h ⁻¹)	ln 相对最大细菌浓度 (CFU/mL)
10	—	2.129 5	—
15	0.173	3.243 9	2.507
20	0.106	4.800 2	2.970
25	0.073	7.493 2	3.027

程,对一级模型中参数 B 和 M 的对数形式建立二级模型,形式如下 (图 2、图 3):

$$\ln B = 6.106 + 1.178x + 1.780x^2 (r = 0.999);$$

$$\ln M = 2.990 - 4.403x + 8.690x^2 (r = 0.996)。$$

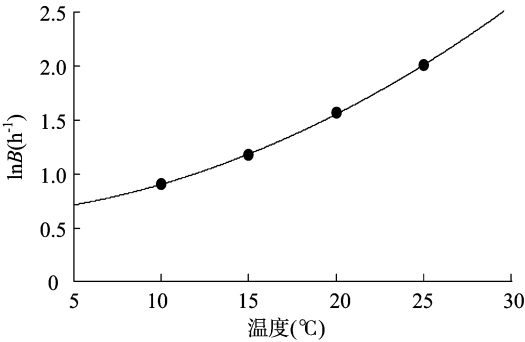


图 2 一级模型中最大生长速率 B 的自然对数与温度的关系

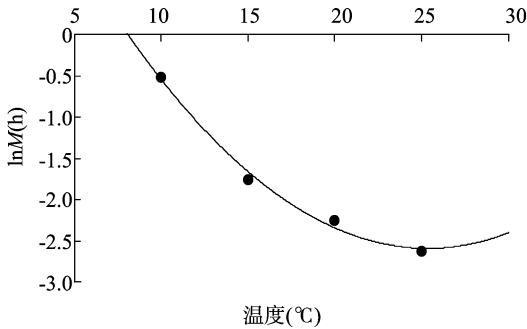


图 3 一级模型中迟滞期 M 的自然对数与温度的关系

由图 2 和图 3 可以看出,随着温度的升高,一级模型中生长速率逐渐增大,但是增长的幅度慢慢减小;迟滞期 M 逐渐减小,证明达到最大生长速率的时间逐渐缩短,降幅也逐渐变小。

4 风险特征描述

菠菜含有丰富的维生素 A、维生素 C 及矿物质,尤其维生素 A、维生素 C 含量是所有蔬菜类之冠,人体造血物质铁的含量也比其他蔬菜多,对于胃肠障碍、便秘、痛风、皮肤病、各种神经疾病、贫血有特殊食疗效果,对解酒毒及防止齿槽脓漏现象亦具有食疗效果。本研究采集了各种可能的食用菠菜样品,进行了感染 *S. aureus* 的比例检测,结果表明市场上还是流通着很多感染 *S. aureus* 的蔬菜,下面就上述的危害识别、暴露评估等分析菠菜中 *S. aureus* 的风险特征。

金黄色葡萄球菌是抵抗力最强的无芽孢菌之一,在环境中广泛分布,是人类的正常菌丛成分,有时附着于皮肤,特别

是寄居鼻腔,成为住院病人发生感染的显著危险因素,是常见的化脓性球菌,寄生在大多数人的皮肤上,常引起皮肤、软组织感染,细菌可侵入淋巴管及血液,引起危及生命的败血症及严重的转移性感染如心内膜炎、关节炎、骨髓炎、肺炎、脑膜炎等。某些金黄色葡萄球菌可产生毒素,引起皮疹或多系统功能障碍,如中毒性休克综合征。根据上述的预测模型预测菠菜在不同温度环境下 *S. aureus* 菌的增长系数,从而估计菌量,减少食用量,达到预防 *S. aureus* 菌及其毒素对身体影响的目的。金黄色葡萄球菌的易感人群主要是有创口的外科病人、严重烧伤患者、新生儿、老年人、免疫缺陷者、血液病、恶性肿瘤及糖尿病患者,或患流感、麻疹伴肺部病变者;病后免疫力不强,可反复感染;其中 31~40 岁感染率最高,其次是 21~30 岁年龄段,而男性的感染率要高于女性。

通过 HACCP 风险分析研究后发现,若在菠菜的种植、加工、销售和食用中监管不严或处理不当,就会导致感染金黄色葡萄球菌的几率增大。直接食用的菠菜应在低温和通风良好的条件下贮藏,以防肠毒素形成;在气温高的春夏季,冷藏或通风阴凉的地方放置菠菜也不能超过 6 h,在食用前要彻底加热。在菠菜加工过程中要定期对其生产加工人员进行健康检查,患金黄色葡萄球菌疑似症状的人员要调换岗位或暂时停止其工作。在整个过程中,如果不能对菠菜的质量安全进行控制,导致金黄色葡萄球菌大量繁殖,并产生肠毒素,虽然彻底蒸煮会杀灭金黄色葡萄球菌,但由于肠毒素的耐高温性,食用后仍会发生金黄色葡萄球菌中毒的情况。此外,无论冷冻菠菜的生产过程如何,菠菜中 *S. aureus* 的初始浓度也是引起风险的最根本因素和敏感性分析中很大的风险因素,因此从源头上控制该菌的初始浓度是最为有效的预防措施。

(上接第 194 页)

- [6] 沈浩,刘登义. 遗传多样性概述[J]. 生物学杂志,2001,18(3):5-7.
- [7] King J N, Yeh F C, Heaman J H. Selection of growth and yield traits in controlled crosses of coastal Douglas - fir[J]. *Silvae Genetica*, 1998,37(3/4):158-164.
- [8] Gomez O J, Blair M W, Frankow - Lindberg B E, et al. Molecular and phenotypic diversity of common bean landraces from Nicaragua[J]. *Crop Science*, 2004,44(4):1412-1418.
- [9] 施建敏,叶学华,陈伏生,等. 竹类植物对异质生境的适应——表型可塑性[J]. 生态学报,2014,34(20):5687-5695.
- [10] 周超. 小蓬竹克隆种群在不同喀斯特生境下的适应性[D]. 贵阳:贵州大学,2008.
- [11] 周超,刘济明,蒙朝阳,等. 不同喀斯特生境条件下小蓬竹构件生物量研究[J]. 安徽农业科学,2008,36(5):1835-1836.
- [12] 刘济明,池馨,王敏,等. 喀斯特地区濒危小蓬竹的小生境变化特征[J]. 贵州农业科学,2013,41(9):53-57.
- [13] 徐雪娇,刘济明,徐国瑞,等. 不同小生境中小蓬竹的含水率及生物量分配规律[J]. 贵州农业科学,2010,38(10):163-166.
- [14] 朱守谦. 喀斯特森林生态研究: I [M]. 贵阳:贵州科技出版社,1993.
- [15] 王敏,刘济明,徐雪娇,等. 濒危竹种小蓬竹群落不同小生境的小气候变化特征[J]. 贵州农业科学,2013,41(6):78-82.
- [16] 谢元贵,刘济明,陈洪,等. 不同喀斯特生境小蓬竹无性系构

参考文献:

- [1] 李文杰,黄和,傅洪锐,等. 模拟蟹肉中金黄色葡萄球菌生长模型的建立[J]. 食品与发酵工业,2008,34(12):10-12,17.
- [2] 闫军,遇晓杰,苏华,等. 原料乳中金黄色葡萄球菌风险评估基础研究[J]. 中国公共卫生管理,2010,26(1):39-40.
- [3] Hill W E. Chapter 24: Identification of foodborne bacterial pathogens by gene probes [M/OL]//FDA - CFSAN. Bacteriological analytical manual. [2014-07-15]. <http://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm2006949.htm>.
- [4] 于洁. 一起由金黄色葡萄球菌引起的食物中毒[J]. 中国伤残医学,2013,21(8):436-437.
- [5] Stewart C M. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcal* enterotoxins, in foodborne microorganisms of public health significance [M]. 6th ed. AIFST (NSW) Branch Sydney, 2003:359-380.
- [6] Doyle M P, Beuchat L R, Montville T J. Food microbiology: fundamentals and frontiers [M]. Washington DC: ASW Press, 1997:524-535.
- [7] GB 4789.10—2010 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验[S].
- [8] SN/T 1869—2007 食品中多种致病菌快速检测方法 PCR 法[S].
- [9] Trautmann M, Lepper P M, Schmitz F J. Three cases of bacterial meningitis after spinal and epidural anesthesia[J]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2002,21(1):43-45.
- [10] Atanassova V, Meindl A, Ring C. Prevalence of staphylococcus aureus and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham - a comparison of classical culturing detection and RFLP - PCR[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2001,68(1/2):105-113.
- [11] 闫军,许晓曦,汤岩. 原料乳中金黄色葡萄球菌生长预测模型的研究[J]. 中国乳品工业,2008,36(11):11-13.
- [12] 潘杰. 地涌金莲种群遗传多样性研究[D]. 北京:中国林业科学研究院,2007.
- [13] 杨树华,郭宁,葛维亚,等. 新疆东天山地区宽刺蔷薇居群表型多样性分析[J]. 植物遗传资源学报,2013,14(3):455-461.
- [14] 阎爱民,陈文新. 苜蓿、草木樨、锦鸡儿根瘤菌的表型多样性分析[J]. 生物多样性,1999,7(2):112-118.
- [15] 杨艳,刘强,尹翔,等. 湖南白檀居群形态多样性及与环境的相关性[J]. 植物遗传资源学报,2015,16(1):80-86.
- [16] 马玉敏,陈学森,何天明,等. 中国板栗 3 个野生居群部分表型性状的遗传多样性[J]. 园艺学报,2008,35(12):1717-1726.
- [17] Baeilieri R, Ducousso A, Kremer A. Genetic morphological ecological and phonological differentiation between *Quercus petraea* (Matt.) Label. and *Quercus robur* L. in a mixed stand of north - west of France[J]. *Silvae Genetica*, 1995,44(1):1-10.
- [18] 王娅丽,李毅,陈晓阳. 祁连山青海云杉天然群体表型性状遗传多样性分析[J]. 林业科学,2008,44(2):70-77.
- [19] 李俊清,臧润国,蒋有绪. 欧洲水青冈 (*Fagus sylvatica* L.) 构型与形态多样性研究[J]. 生态学报,2001,21(1):151-155.
- [20] Peterson B J, Graves W R, Sharma J. Phenotypic and genotypic diversity of eastern leatherwood in five populations that span its geographic distribution [J]. *The American Midland Naturalist*, 2011,165(1):1-21.