

黄曲霉毒素 B1 降解菌的分离鉴定及培养条件优化

王 燕¹,张美丽¹,毛 勇¹,李 胜²,赵 毅²,李 飞¹,
邓 媛¹,杨汉卿²,张志敏^{1*}

(1. 陕西省微生物研究所,陕西 西安 710043; 2. 陕西省饲料监测所,陕西 西安 710016)

摘要:为筛选能降解黄曲霉毒素 B1 (AFB1) 的细菌,对 AFB1 污染的饲料进行生物脱毒。以 AFB1 结构类似物香豆素为唯一碳源和能源进行初筛,将含有标品 AFB1 (500 μg/L) 的发酵液进行复筛,通过菌落形态观察、生理生化试验及 16S rRNA 序列分析进行菌种鉴定,根据波长 600 nm 处测定的菌液的吸光值大小进行培养基成分优化。结果表明,分离到 1 株稳定的 AFB1 降解菌,通过形态、生理生化特征和 16S rRNA 序列同源性分析鉴定,该菌株为甲基营养型芽孢杆菌 *Bacillus methylotrophilus*,命名为 WZ-4,该菌株 16S rRNA 基因序列 GenBank 登录号为 KJ855772。在温度 36 ℃、pH 值 7.0、接种量 5% 条件下,在含有 500 μg/L 的 AFB1 发酵培养基中培养 72 h,WZ-4 菌的降解率为 75.25%。该菌生长的最佳碳源为麦芽糖,最佳氮源为蛋白胨。0.05% 的 Mg²⁺、Ca²⁺、Cu²⁺ 以及 Fe³⁺ 对该菌株的生长均有抑制作用,其中 Mg²⁺ 的抑制作用最小,Cu²⁺ 的抑制作用最大。

关键词:黄曲霉毒素 B1; 生物脱毒; 鉴定; 培养条件; 优化

中图分类号: S852.66 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2015)04-0139-05

Isolation and Identification of an Aflatoxin B1 Degradation Bacterial Strain and Optimization of Its Culture Conditions

WANG Yan¹,ZHANG Meili¹,MAO Yong¹,LI Sheng²,ZHAO Yi²,LI Fei¹,DENG Yuan¹,
YANG Hanqing²,ZHANG Zhimin^{1*}

(1. Shaanxi Province Institute of Microbiology,Xi'an 710043,China;
2. Feed Monitor Insitute of Shaanxi,Xi'an 710016,China)

Abstract: To screen an aflatoxin B1 (AFB1) degradation bacteria,the AFB1 polluted feedwas detoxificated by biological way. At the first screening,AFB1 structural analogues coumarin was the sole carbon source and energy. The growing bacteria was selected in the nutrient solution with 500 μg/L AFB1 for the second screening. The species was identified according to the colony morphology observation, physiological and biochemical test and 16S rRNA sequence analysis. The medium components were optimized according to absorbance value at wavelength of 600 nm. The results showed that a stable AFB1 degradation bacteria was isolated and was identified as *Bacillus methylotrophilus*. The bacteria was named WZ-4 and its 16S rRNA gene sequence registration number in GenBank was KJ855772. The degradation rate of WZ-4 was 75.25% when the temperature was 36 ℃,pH value was 7.0,inoculation quantity was 5%,AFB1 content

收稿日期:2014-09-22
基金项目:陕西省科技厅科技攻关项目(2014k01-18-01);西部之光人才培养项目(2011DF02);陕西省科学院青年基金项目(2013k-31)
作者简介:王 燕(1986-),女,陕西西安人,助理研究员,硕士,主要从事微生物学分析检测工作。
E-mail:349007181@qq.com
张美丽(1983-),女,陕西大荔人,实习研究员,主要从事微生物学分析检测工作。
E-mail:345280910@qq.com
* 通讯作者:张志敏(1977-),女,河南许昌人,副研究员,主要从事微生物技术研究工作。E-mail:2463942259@qq.com

was 500 $\mu\text{g/L}$ and the fermentation time was 72 h. The best carbon source was maltose, and the best nitrogen source was peptone. 0.05% Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} and Fe^{3+} could inhibit the growth of the strain, Mg^{2+} had the minimal inhibitory effect, Cu^{2+} had the largest.

Key words: AFB1; biological detoxification; identification; culture conditions; optimization

黄曲霉毒素(AFT)是一类由真菌如黄曲霉(*Aspergillus flavus*)和寄生曲霉(*Aspergillus parasiticus*)等产生的次级代谢产物,包括B和G两族20余种衍生物,其中以AFB1分布最广、毒性最强,因而AFB1被世界卫生组织癌症研究机构划定为IA级危险物^[1-2]。AFB1广泛存在于农产品和饲料食品中,据联合国粮农组织(FAO)估计,全世界每年有25%的谷物受到霉菌毒素的污染,平均有2%不能食用;加之因毒素污染导致动物中毒引起的疾病和死亡,给粮食业和畜牧业造成巨大的经济损失^[3]。畜禽食用含AFB1的饲料轻则引发慢性中毒,如免疫力下降、不孕、消化机制紊乱;重则引发急性中毒,其表现为肝脏病变、流产死胎甚至死亡。AFB1还可通过动物的肉、蛋、奶传递到人体内部。据亚洲和非洲疾病研究机构的研究表明,人类长时间食用含低浓度AFT的食物被认为是导致肝癌、胃癌、肠癌等疾病的主要原因^[4]。由此可见,AFB1对粮食业和畜牧业造成了严重经济损失,对人类及动物的健康带来巨大的威胁,如何解决AFB1对谷物、粮食和饲料的污染已经成为世界性难题。

传统的AFB1脱毒法,如碱处理、氧化处理、高温处理以及原料稀释等,存在降低饲料的营养价值、影响饲料的感官品质或者脱毒不彻底等缺点。吸附剂吸附法虽然可有效吸附毒素,但这种简单的吸附在条件改变时毒素极易从吸附剂上解离导致毒性依然存在,并且该法影响机体对维生素和微量元素的吸收,甚至会造成环境蓄积化影响。因此,采取更为有效和安全的方法对AFB1进行脱毒处理成为解决问题的关键。近年来人们开始利用微生物及其代谢产物进行生物降解脱毒,通过微生物发酵或者其代谢产生的酶将霉菌毒素降解为低度或者无毒的物质,从而达到脱毒的目的。Smiley等^[5]报道,橙黄色杆菌(*Flacobacterium aurantiacum*)的粗蛋白提取物在水溶液中可降解74.5%的AFB1。Teniola等^[6]报道分支杆菌(*Mucobacteroum fluoranthenicorans*)胞外提取物与AFB1混合4h后,可降解90%的毒素。Alberts等^[7]对红串红球菌(*Rhodococcus erythropolis*)胞外代谢物降解AFB1研究发现,反应72h可降解66.8%的AFB1。李俊霞等^[8]分离出9株对AFB1有较高降解活性的菌,其中嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas* sp.)通过生物酶作用降解AFB1。朱新贵等^[9]研究了常用的几种有益微生物降解

AFT的能力,结果显示,枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、乳酸菌(*Lactobacillus*)和醋酸菌(*Cusuanjun*)的AFT降解能力最强,培养60h后,AFB1的去除率分别为89%、88%和81%。李超波等^[10]分离出1株施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)也能够降解AFB1。

筛选具有良好降解AFB1特性的菌株是进行生物脱毒的前提。鉴于此,以猪肠道及其内容物为研究对象,分离筛选能够降解AFB1的菌株,并对其培养基成分进行优化,为探索解决饲料、粮食中AFB1污染问题奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集 从陕西咸阳市肉类联合加工厂、陕西万盛肉类加工有限公司等采集猪肠道及其内容物20份,每份200g。

1.1.2 主要试剂和仪器 香豆素为北京恒业中远化工有限公司产品,AFB1为Fermentek公司产品,AFB1 ELISA试剂盒为北京华安麦科生物技术有限公司产品,DNA提取试剂盒、DNA胶回收试剂盒、DNA Marker为TaKaRa公司产品。

DG5033A型酶联免疫检测仪由北京鸿苑鑫仪科技有限公司生产,PCR仪由Applied Biosystems公司生产,722可见分光光度计由上海仪电分析仪器有限公司生产。

1.1.3 培养基 初筛培养基: KH_2PO_4 0.25 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g、 KNO_3 0.50 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.50 g、 CaCl_2 0.005 g、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.003 g、琼脂粉18 g,超纯水1000 mL,pH值7.0,121℃灭菌20 min。用沸水溶解香豆素,按1:3的比例加入香豆素溶液使其最终含量为0.1%^[8]。

发酵培养基:牛肉膏3.00 g、蛋白胨10.00 g、葡萄糖2.00 g、NaCl 8.50 g、 KH_2PO_4 1.00 g、超纯水1000 mL,pH值6.5,121℃灭菌20 min^[11]。

1.2 方法

1.2.1 AFB1标准品的配置 将10 mg AFB1溶解于100 mL的苯-乙腈(98:2),质量浓度为100 $\mu\text{g/mL}$, -20℃存储备用。

1.2.2 菌种初筛 称取5.0 g样品放置于含有45 mL生理盐水的200 mL丝口瓶中(1:10),振荡摇匀,从中吸取1 mL置于含9 mL的生理盐水管中,

梯度稀释至 1:100 000,每个稀释度吸取 0.1 mL 涂布于初筛培养基平板上,36 ℃ 培养 7 d。选取生长良好的菌株,连续 3 次划线于初筛培养基平板上,纯化并保存菌株。

1.2.3 菌种复筛 取初筛菌株一环接种于 10 mL 种子培养基中,36 ℃、150 r/min 培养 24 h,取 50 μ L 菌体种子液接种于含有 945 mL 发酵培养液的 1.5 mL 发酵管中,加入 5 μ L 质量浓度为 100 μ g/mL 的 AFB1,使其终质量浓度为 500 μ g/L,36 ℃、150 r/min 培养 72 h,12 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液,用甲醇-水(1:9)溶解并稀释 1 000 倍,待测 AFB1 含量。

1.2.4 AFB1 含量测定 用酶联免疫检测仪检测 AFB1 含量,具体步骤见 ELISA 试剂盒说明书。计算 AFB1 降解率, AFB1 降解率 = (对照组 AFB1 含量 - 试验组 AFB1 含量)/对照组 AFB1 含量 \times 100%。

1.2.5 菌种鉴定

1.2.5.1 形态及生理生化特征的鉴定 观察降解菌菌落形态特征,进行生理生化鉴别试验,参照《常见细菌系统鉴定手册》^[12]和《伯杰细菌鉴定手册》(8 版)^[13]进行属和种的鉴别。

1.2.5.2 16S rRNA 序列分析 将纯化的降解菌接种于营养肉汤培养基中,摇床 36 ℃ 过夜培养,12 000 r/min 离心 10 min 收集菌体。使用 DNA 提取试剂盒操作说明提取降解菌基因组 DNA。以细菌 16S rRNA 通用引物对基因组 DNA 进行 PCR 扩增。扩增引物为 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R(3'-TGCGGCTGGATCACCTCCTT-5'),引物由北京华大基因生物技术有限责任公司合成。PCR 反应体系为 50 μ L,反应条件为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,56 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 45 s,30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。RCR 扩增产物经过纯化后,进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 扩增产物送到北京华大生科技技术有限责任公司进行测序。

1.2.5.3 基于 16S rRNA 序列的系统发育分析 将 PCR 扩增得到的 16S rRNA 序列用 NCBI 的 BLAST 程序进行序列同源性比对,并用 ClustalW 1.83 和 MEKE 4.1 软件进行 UPGMA 分析并构建基于 16S rRNA 序列的系统发育树,用 Bootstrap 法(1 000 次重复)检验。

1.2.6 培养条件的优化

1.2.6.1 不同碳源对目标菌株生长的影响 接种目标菌种单克隆至 10 mL 营养肉汤中,36 ℃、150 r/min 培养 24 h,作为种子液待用(所有影响因素均用该种子液)。将 5% 的种子液加入到分别以葡萄糖、蔗糖、乳糖、淀粉、麦芽糖为唯一碳源的培养液中,添加量均

为 0.5%,以不加种子液的各碳源培养液为对照,36 ℃、150 r/min 培养 24 h 后,用 722 可见分光光度计在波长 600 nm 处测量吸光值,吸光值变化越大,说明菌液越浑浊,菌株生长越良好。

1.2.6.2 不同氮源对目标菌株生长的影响 将 5% 的种子液加入到分别以蛋白胨、胰蛋白胨、硫酸铵、尿素为唯一氮源的培养液中,添加量均为 1.0%,以不加种子液的各氮源培养液为对照,36 ℃、150 r/min 培养 24 h 后,用 722 可见分光光度计在波长 600 nm 处测量吸光值,吸光值变化越大,说明菌液越浑浊,菌株生长越良好。

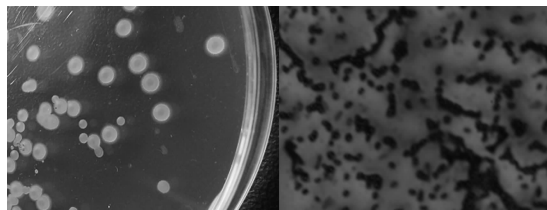
1.2.6.3 不同金属离子对目标菌株生长的影响

将 5% 的种子液加入到分别添加 $MgCl_2$ 、 $CaCl_2$ 、 $CuSO_4$ 、 $FeCl_3$ 为唯一金属离子的培养液中,添加量均为 0.05%,以不加种子液的基础培养液(碳源为葡萄糖,氮源为蛋白胨,不含其他金属离子)为对照,36 ℃、150 r/min 培养 24 h 后,用 722 可见分光光度计在波长 600 nm 处测量吸光值(吸光值高于对照值,说明对菌生长有促进作用;反之,有抑制作用)。

2 结果与分析

2.1 降解菌株的鉴定

经过 3 次分离纯化,得到 1 株能在以香豆素为唯一碳源和能源的培养基上稳定生长的菌株,对其进行复筛,结果显示在温度 36 ℃、pH 值为 7.0、接种量为 5% 时,在含有 500 μ g/L AFB1 的发酵培养基中培养 72 h,降解率为 75.25%,将该菌命名为 WZ-4。该菌株多为圆形半透明菌落,表面隆起,隆起部分为黏稠状,似蜡油,不易挑取,挑起时有丝状(图 1A)。革兰氏染色结果为阳性、杆菌(图 1B)。初步推断该菌为芽孢杆菌。进一步分析,该菌株能在以甲醇为唯一碳源的培养基上生长;能利用葡萄糖、乳糖和甘露醇,不能利用柠檬酸盐;能水解淀粉,但不能水解酪蛋白;能将硝酸盐还原为亚硝酸盐,能液化明胶,能分别在含 0.7%、10% NaCl 的蛋白胨水中生长;接触酶、氧化酶试验为阳性;M-R 反应和 V-P 反应均为阴性(表 1)。



A. 菌落形态; B. 革兰氏染色形态($\times 100$)

图 1 菌株 WZ-4 的形态特征

表 1 降解菌株 WZ - 4 的生理生化特征结果

生理生化特征	结果
甲醇碳源能源试验	+
葡萄糖产酸	+
甘露醇产酸	+
乳糖发酵	+
葡萄糖厌氧发酵	-
V - P 试验	-
M - R 试验	-
明胶液化试验	+
硝酸盐还原	+
柠檬酸盐利用	-
酪蛋白水解	-
接触酶试验	+
氧化酶试验	+
动力试验	+
淀粉水解	+
无盐胨水试验	+
7% NaCl 试验	+
10% NaCl 试验	+
pH5.7 试验	+

注：+ 为阳性反应；- 为阴性反应。

2.2 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析

以 WZ - 4 基因组 DNA 为模板,用细菌 16S rRNA 通用引物进行扩增,得到长度为 1 433 bp 的 PCR 扩增产物(图 2)。根据数据库中发表的模式菌株序列,构建系统发育树(图 3)。分析结果显示,菌株 WZ - 4 为 *Bacillus methylotrophicus*,该菌株与甲基营养型芽孢杆菌相聚于同一个系统发育分支,2 株菌之间的系统发育关系非常密切。根据系统发育分析结果,结合生理生化及形态学特征,将该菌鉴定为 *Bacillus methylotrophicus*,命名为 WZ - 4,该菌株 16S rRNA 基因序列已登录至 GenBank,其基因登录号为 KJ855772。甲基营养型芽孢杆菌在《伯杰细菌鉴定手册》(8 版)^[13]中没有记录。

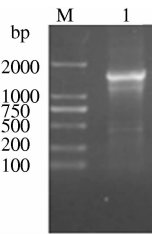


图 2 16S rRNA PCR 结果

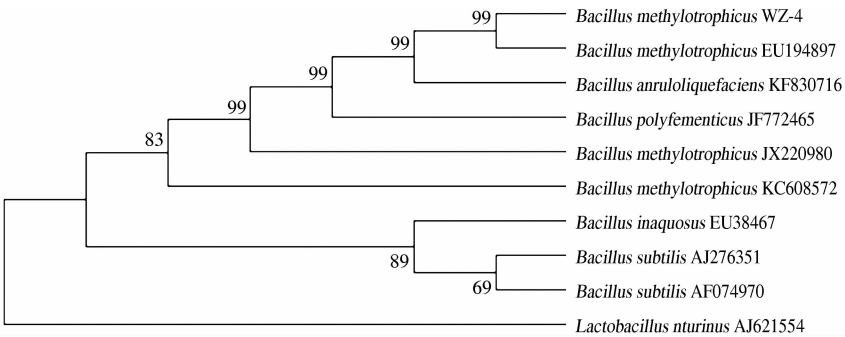


图 3 WZ - 4 的系统进化树

2.3 WZ - 4 培养条件的优化

2.3.1 不同碳源对菌株 WZ - 4 生长的影响 碳源对微生物生长代谢的作用主要是为细胞提供碳架,提供细胞生命活动所需的能量,是微生物生长代谢的首要营养元素。由图 4 可知,不同碳源对 WZ - 4 菌株生长的影响大小不一,麦芽糖的吸光值变化最大,为 0.395,为最佳碳源,葡萄糖次之,淀粉最差。因为微生物一般不能直接吸收淀粉,一些微生物要产生胞外淀粉水解酶,将淀粉转化为葡萄糖再进行利用。

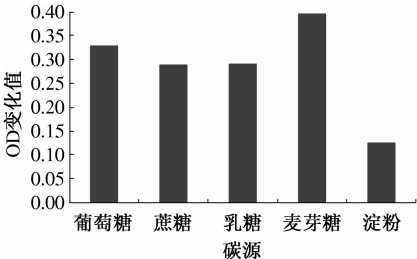


图 4 碳源对菌株 WZ - 4 生长的影响

2.3.2 不同氮源对菌株 WZ - 4 生长的影响 氮源主要用于构成微生物生长所必须的细胞物质如氨基酸、蛋白质、核酸及含氮代谢物等。由图 5 可知,不同氮源对 WZ - 4 菌株生长的影响大小不一。蛋白胨的吸光值变化最大,为 0.328,即该菌株的生长量最大,胰蛋白胨次之,而硫酸铵和尿素的吸光值变化特别小,说明 WZ - 4 菌株对有机氮源的利用较好,基本不利用无机氮源。

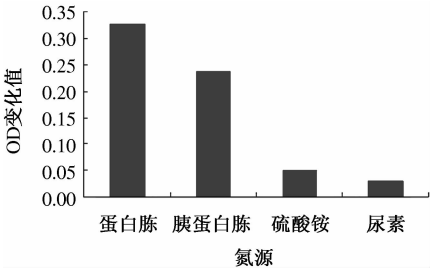


图 5 氮源对菌株 WZ - 4 生长的影响

2.3.3 不同金属离子对菌株 WZ-4 生长的影响

金属离子是微生物生理活性的组成物质或生理活性作用的调节物,有些对微生物生长有促进作用,如 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} ,有些则会抑制其生长,例如重金属离子 Cr^{2+} 和 Pb^{2+} 。但是如果这些金属离子浓度特别高,就会对微生物生长起到明显的抑制作用。由图 6 可知,当分别添加 0.05% 的 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 时,菌株 WZ-4 的吸光值均低于对照吸光值,而 0.05% Mg^{2+} 的吸光值与对照相比变化最小,0.05% Cu^{2+} 的吸光值与对照相比变化最大。说明,当 0.05% 的 3 种离子单独存在时,该菌株生长均受到抑制, Mg^{2+} 的抑制作用最小, Cu^{2+} 的抑制作用最大。

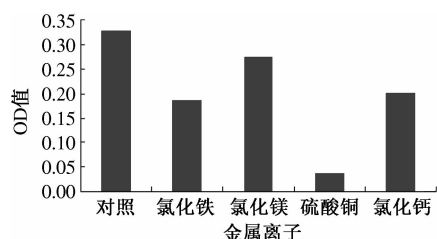


图 6 不同金属离子对菌株 WZ-4 生长的影响

3 讨论

饲料中普遍存在霉菌毒素,为了减少毒素在动物体内的积累,畜禽体内的正常菌群除了对毒素产生耐受性外,体内还会存在降解毒素能力的菌株,动物才能适应环境生存下来。因此,长期接触霉菌毒素的动物肠道内容物中可能存在霉菌毒素的降解菌。本研究以猪肠道及其内容物为筛选样品是可行的,而且成功分离到 1 株能够降解 AFB1 的细菌 WZ-4。

本研究分离到的 WZ-4 菌株经鉴定为甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophilus*),该菌在《伯杰细菌鉴定手册》(8 版)^[13]中没有记录。近几年该菌才被发现,多用于植物病虫害的治理^[14-16],也有报道用于对罗非鱼片保鲜^[17]、水中重金属污染的修复^[18],还有报道该菌具有抑菌效果^[19]。考虑到芽孢杆菌除具有一定的 AFB1 解毒作用外,同时具有自身的益生作用,本研究分离的甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophilus*) WZ-4 菌株,未来有望在开发微生物新型饲料和食品添加剂方面应用。今后还需要对该菌株的耐热性、耐酸性、在肠道中的定植性以及 AFB1 的降解条件、降解特性以及降解机制等内容进行深入研究,为 WZ-4 菌株在 AFB1 生物降解中的应用奠定基础。

参考文献:

[1] 谢光洪,陈承祯,徐闯,等. 黄曲霉毒素检测方法的研

究[J]. 饲料工业,2007,28(6):53-56.

- [2] 计成. 饲料中霉菌毒素生物降解的研究进展[J]. 中国农业科学,2012,45(1):153-158.
- [3] Zjalic S, Reverberi M, Ricelli A, et al. *Trametes versicolor*: A possible tool for aflatoxin control[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 107(3):243-249.
- [4] 李荣启,范自营. 粮食中黄曲霉毒素污染[J]. 粮食与油脂,2006(8):17-19.
- [5] Smiley R D, Dranghon F A. Preliminary evidence that degradation of aflatoxin B1 *Flavobacterium aurantiacum* is enzymatic[J]. *Journal of Food Protection*, 2000, 63(3):415-418.
- [6] Teniola O D, Addo P A, Brost I M, et al. Degradation of aflatoxin B1 by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthenorans* sp. nov. DSM44556T [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 105(2):111-117.
- [7] Alberts J F, Engelbrecht Y, Steyn P S, et al. Biological degradation of aflatoxin B1 by *Rhodococcus erythropolis* cultures[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 109(1/2):121-126.
- [8] 李俊霞,梁志宏,关舒,等. 黄曲霉毒素 B1 降解菌株的筛选及鉴定[J]. 中国农业科学,2008,41(5):1459-1463.
- [9] 朱新贵,林捷. 几种食品微生物降解黄曲霉毒素作用的研究[J]. 食品科学,2001,22(10):65-68.
- [10] 李超波,李文明,杨文华,等. 黄曲霉毒素 B1 降解菌的分离鉴定及其降解特性[J]. 微生物学报,2012,52(9):1129-1136.
- [11] 杨文华,刘晓华,李文明,等. 施氏假单胞菌 F4 产黄曲霉毒素 B1 降解酶条件的优化[J]. 食品科学,2013,34(9):256-261.
- [12] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001:43-273.
- [13] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8 版. 北京:科学出版社,1984:729-830.
- [14] 刘伟. 抗烟草青枯病菌的芽孢杆菌筛选、鉴定及其抑菌活性初探[D]. 西安:西北农林科技大学,2013.
- [15] 刘利强,杨士玲,陈强,等. 30 亿个/g 甲基营养型芽孢杆菌可湿性粉剂防治黄瓜灰霉病田间药效试验[J]. 现代农业科技,2014(9):256-261.
- [16] 周登博,井涛,谭昕,等. 6 种基质拮抗菌发酵液对香蕉枯萎病及相关防御酶的影响[J]. 热带作物学报,2013,34(5):947-951.
- [17] 吴燕燕,张岩,李来好,等. 甲基营养型芽孢杆菌抗菌肽对罗非鱼片保鲜效果的研究[J]. 食品工业科技,2013,34(2):315-318.
- [18] 陈佳亮,刘晓文,张雅静,等. 耐性细菌的分离鉴定及重金属污染修复初步研究[J]. 生态环境学报,2014,23(7):1199-1204.
- [19] 陈新春,张喜喜,汪钱龙,等. 蔬菜根际细菌 R2-2 的鉴定及其抑菌活性[J]. 生态环境学报,2012,38(2):177-180.