

# 黄曲霉菌株 (Q101) 的筛选、鉴定及产毒条件的研究

张瑞菊 陆振宏 陈正元

(江苏省启东肝癌防治研究所)

张纪忠 祁克勤 盛宗斗

(上海复旦大学生物系)

据报道<sup>[1,2]</sup>,黄曲霉毒素 M<sub>1</sub>(AFTM<sub>1</sub>) 的致癌性仅次于黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>(AFTB<sub>1</sub>)。AFTM<sub>1</sub> 是 AFTB<sub>1</sub> 的代谢产物。目前对 AFTB<sub>1</sub> 在动物体内的代谢过程和作用机制的研究很重视。AFTM<sub>1</sub> 标准品在流行病学调查及食品(特别是乳制品、肉类等)卫生检测工作中的需要量较大。为了满足需要,我们对 AFTM<sub>1</sub> 的产毒菌株进行了筛选、鉴定及产毒条件的研究,并选出了产毒量较高的 Q101 菌株。现将结果报道如下。

## 材料与方 法

### 一、菌株来源

1980 年从启东县大丰公社采集了 56 份玉米样品,用薄层层析法<sup>[3]</sup>进行了 AFTB<sub>1</sub> 的检测,发现其中一份样品的 AFTB<sub>1</sub> 含量为 3300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,而且在 AFTB<sub>1</sub> 荧光点以下还有较强的荧光点,与 AFTM<sub>1</sub> 标准品 Rf 值相同。经反复筛选得到了产毒量较高的 AFTM<sub>1</sub> 产毒菌株——启东 101 号(简称 Q101)。

### 二、培养基

#### (一) 筛选培养基

1. 花生-察氏培养基\*。
2. 玉米粉培养基: 在 1g 玉米粉中加入蒸

馏水 0.5ml。

#### (二) 鉴定培养基

即用察氏培养基。

### 三、筛选方法

将玉米粒分成两半,用波长 365nm 荧光灯挑选,取荧光强的玉米粒用无菌水冲洗 10 次,去杂菌。取处理的玉米粒 2 粒研成粉状,加 45ml 无菌水搅匀作为原液。吸 1ml 原液依次稀释成  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ …… $10^{-8}$  的 8 个浓度,分别取各浓度的稀释液于平皿中,然后每皿倾注 45℃ 的花生-察氏培养基 20ml,摇匀,置 27℃ 培养 6 天。取单个菌落分别转种于花生-察氏培养基斜面及玉米粉培养基斜面,共接种 107 管。27℃ 培养 7 天后,将斜面保存于 4℃。在玉米粉斜面中加入 5ml 氯仿,捣碎培养基,60℃ 水浴 5 分钟,待冷过滤,滤液用薄层层析法测定其产毒量。

### 四、鉴定方法

主要根据 Raper 和 Fennell 的方法<sup>[4]</sup>。

本文显微摄影照片由复旦大学生物系摄影室拍摄。扫描电镜照片由同济大学电镜室拍摄,特一并致谢。

\* 培养基成分 (g): 蔗糖 30, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1, KCl 0.5, NaNO<sub>3</sub> 3, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.01, 无霉花生粉 100, 琼脂 20, 蒸馏水 1000ml。

## 五、分生孢子头形态的观察方法<sup>[5]</sup>

1. 固定: 取培养 10 天的菌株加 6% 戊二醛固定 48 小时, 然后用 0.1M 磷酸缓冲液清洗二次。

2. 脱水: 分别用 30、50、70、90、100% 的乙醇脱水各 20 分钟。

3. 喷金: 待脱水后菌体的乙醇挥发干后, 挑取少量菌体, 用导电胶把它固定在台上喷金。

## 结 果

### 一、菌株的筛选

经分离培养, 107 管中以 101 管的菌株产毒量最高, AFTM<sub>1</sub> 原代为 15mg/kg, 第二代为 20 mg/kg。该菌株在花生-察氏培养基上生长快, 菌落丰满, 初为白色, 中心略呈乳黄色, 培养 4—5 天时边缘呈白色, 中心呈黄绿色, 7 天后逐渐变为暗黄绿色。菌落直径约 5cm 左右。

### 二、产毒条件

1. 加锌与不加锌对产毒量的影响: 将 Q101 菌株接种在加锌和 不加锌的 8 种不同组分的培养基上, 27℃ 培养 7 天后进行了产毒量的比较, 结果见表 1。表 1 说明, 花生粉及花生粉中加等量玉米粉或大米粉的培养基均能使 AFT 的产量提高一倍, 而加锌后未见明显差异。

2. 不同加水量对产毒量的影响: 由于培养

表 1 加锌与不加锌对 AFT 产量的影响

培养基成分	加水量 (%)	AFT(mg/kg)			
		加锌 *		不加锌	
		B <sub>1</sub>	M <sub>1</sub>	B <sub>1</sub>	M <sub>1</sub>
玉米粉	50	1500	20	1500	20
米 粉	40	1500	20	1500	20
黄豆粉	50	50	—	50	—
黄豆粉, 麸皮	50	50	—	50	—
黄豆粉, 玉米粉	50	750	10	750	10
花生粉	30	3000	40	2666	40
花生粉, 玉米粉	40	3000	40	2666	40
花生粉, 米粉	50	3000	40	2666	40

\* 加入的锌按 8μg/ml 溶解于水中。

表 2 培养基中加水量与产毒量的关系

加水量 (%)	培养基		花生粉	
	AFT 的产量 (mg/kg)		B <sub>1</sub>	M <sub>1</sub>
	B <sub>1</sub>	M <sub>1</sub>	B <sub>1</sub>	M <sub>1</sub>
20	—	—	2000	20
30	500	5	3000	40
40	1000	15	3000	40
50	1500	20	2000	25
60	1300	15	1000	10
70	600	5	40	—

基的含水量不同, 加水量亦不同。如花生粉培养基以加水量 30—40% 为宜, 玉米粉培养基以加水 50% 为宜(表 2)。

另有报道指出, 玉米培养基中添加花生油蔗糖和牛肉汤, 也能提高 AFT 的产量<sup>[6]</sup>。我们通过实验, 未见 AFTB<sub>1</sub> 或 AFTM<sub>1</sub> 有所提高。是何原因还有待进一步研究。

### 三、菌株鉴定

Q101 菌株菌落在察氏培养基上 27℃ 培养 10 天, 直径达 5.5—6.5cm, 黄色至黄绿色, 由薄而质地坚密的基部菌丝组成, 扁平或略具放射状皱纹, 产生丰富的分生孢子头结构, 反面无色到略带粉褐色(图版 I-1)。产生的菌核初为白色菌丝球, 渐变至深暗红褐色, 直径 500—700 μm(图版 I-2)。幼龄的分生孢子头呈黄色, 老后变成深暗黄绿, 呈疏松放射状, 渐变为疏松的柱状, 直径一般在 300—400 μm, 极少在 500—600 μm, 较小的呈圆柱状(图版 I-3, 4)分生孢子梗长度小于 1mm, 壁厚, 无色, 极粗糙(图版 I-3, 5)。顶囊晚期近球形, 直径达 25—45 μm(图版 I-5)。双层瓶梗占优势, 长 5.5—9.5 × 4—5 μm。分生孢子呈球形, 具小刺, 直径 3—6 μm, 多数在 3.5—4.5 μm(图版 I-5)。根据 Q101 菌株菌落的形态特征及分生孢子形态结构特征和颜色的变化, 可以认定该菌株属黄曲霉群中的黄曲霉 (*Aspergillus flavus* Link)。

## 讨 论

1. 关于 Q101 菌株的 AFT 产量问题, 据

国外报道<sup>[1,6]</sup>,黄曲霉菌株产 AFT 的量一般为 1.5—2g/kg,其中 AFTM(M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub>) 为 AFTB<sub>1</sub> 产量的 0.7—2%,而本实验的 Q101 菌株 AFT 的产量为 3g/kg,其中 AFTM<sub>1</sub> 的产量为 AFTB<sub>1</sub> 的 1.3%,显示了 Q101 菌株产生 AFTB<sub>1</sub> 与 AFTM<sub>1</sub> 的优势。

2. 本实验证明, Q101 菌株在花生粉及花生粉加玉米粉或大米粉的培养基上产毒量最高。其次是玉米、大米培养基。这与文献 [1, 2, 6] 报道一致。

### 参 考 文 献

[1] Heatheote, J. G. et al.: Aflatoxins: Chemical and

Biological. Aspecys. Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, Oxford, New York, p. 1—27, 83—108, 131—149, 1978.

[2] Purchase, I. F. H.: Mycotoxins, Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, Oxford, New York, p. 1—24, 1974.

[3] 上海商品检验局主编:《食品化学分析》,上海科学技术出版社,155—157页,1979。

[4] Raper, K. B. et al.: The Genus *Aspergillus*, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, p. 13—67, 357—404, 1965.

[5] 洪涛主编:《生物医学超微结构与电子显微镜技术》,科学出版社,北京,184—186页,1980。

[6] 居乃琰:《黄曲霉毒素》,轻工业出版社,北京,22—71页,1980。