

黄曲霉毒素 B₁ 脱毒菌株 LAB-10 的分离、 鉴定及降解能力分析

吉小凤¹ 张巧艳¹ 李文均² 程晔¹ 周育^{1,2*}

(1. 浙江省农业科学院农产品质量标准研究所 浙江省食品安全重点实验室 浙江 杭州 310021)

(2. 云南大学 云南微生物研究所 西南微生物多样性教育部重点实验室 云南 昆明 650091)

摘要: 【目的】从乳酸菌群含量丰富的动物肠道中筛选具有黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁) 脱毒应用前景的乳酸菌种。【方法】通过设计脱毒乳酸菌种特异性富集分离培养基, 从肉鸡肠道粪便中筛选具有 AFB₁ 脱毒能力的微生物菌种, 对脱毒菌种进行脱毒机理初步分析, 并通过形态学、生理生化和系统发育学方法, 鉴定脱毒菌种的系统分类学地位。【结果】脱毒菌株 LAB-10 经脱毒机理及降解能力测试分析, 初步确定其 AFB₁ 的脱毒机理为生物降解作用, 菌株 LAB-10 对 14 μg/L 浓度 AFB₁ 在 48 h 的降解率为 63.4%。形态学、生理生化及系统发育学研究结果表明, 菌株 LAB-10 系统分类学地位为乳酸杆菌属的发酵乳杆菌。【结论】发酵乳杆菌 LAB-10 属于益生菌群, 生物安全性高, 该菌株在黄曲霉毒素降解测试培养基中显示出显著的 AFB₁ 降解能力, 具有一定的应用潜力。

关键词: AFB₁, 生物脱毒, 乳酸菌, 鉴定

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31000001); 中国博士后科学基金特别资助项目(No. 201104708); 浙江省农业科学院重点实验室项目

*通讯作者: Tel: 86-571-86404049; 信箱: microbes@yahoo.cn

收稿日期: 2011-12-01; 接受日期: 2012-01-19

Isolation, identification and bio-detoxification analysis of an aflatoxin B₁ degradative strain LAB-10

Ji Xiao-Feng¹ ZHANG Qiao-Yan¹ LI Wen-Jun² CHENG Ye¹ ZHOU Yu^{1,2*}

(1. Zhejiang Provincial Key Laboratory for Food Safety, Institute of Quality and Standard for Agro-products, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou, Zhejiang 310021, China)

(2. Key Laboratory for Microbial Resources of the Ministry of Education, Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming, Yunnan 650091, China)

Abstract: [Objective] Lactic acid bacterium with aflatoxin B₁ detoxification abilities was isolated and evaluated from chicken gut for the present study. [Methods] A special enrichment and isolation technology was designed for aflatoxin B₁ detoxified lactic acid bacteria, and the aflatoxin B₁ detoxification strain was further determined for its taxonomical position using morphological, physiological and biochemical characteristics combined with phylogenetic analysis. [Results] A lactic acid bacterium strain, which designated LAB-10, displayed aflatoxin B₁ detoxification ability was isolated by the present technology. The detoxification analysis results displayed that strain LAB-10 was a aflatoxin B₁ degradative bacterium and there was 63.4% of aflatoxin B₁ could be decomposed by the strain under the concentration of 14 µg/L, within 48 hours. On the base of taxonomical analysis results, the new isolated strain LAB-10 was identified as *Lactobacillus fermentum*. [Conclusion] The isolate LAB-10 of the present study was *Lactobacillus fermentum* and the bio-safety characteristics implied that the degradative stain has potential values for the application of aflatoxins detoxification.

Keywords: AFB₁, Bio-detoxification, Lactic acid bacteria, Identification

黄曲霉毒素主要由黄曲霉(*Aspergillus flavus*)、寄生曲霉(*A. Parasiticus*)、烟曲霉(*A. nomius*)和少数温特曲霉(*A. wentii*)菌株产生。从化学结构上看,是一组由二呋喃环和香豆素组成的结构类似物^[1]。黄曲霉毒素污染严重的农作物包括大豆、稻谷、玉米和棉籽,另外各种坚果,如花生、杏仁和核桃等也是黄曲霉毒素容易污染的对象^[1-2]。1993年,黄曲霉毒素被世界卫生组织(WHO)癌症研究机构划定为 I 类致癌物,其毒性相当于氰化钾的 10 倍,砒霜的 68 倍。其中黄曲霉毒素 B₁(AFB₁)又是黄曲霉毒素中致癌性最强的天然物质,尤其对动物肝脏具有极强致癌性。黄曲霉毒素对生物体可能造成的危害包括降低动物产乳及产蛋

量,导致动物免疫力低下,致癌、致畸和致突变性^[1,3]。目前,世界上约有 100 个国家对食品中黄曲霉毒素提出了严格限量要求,我国规定玉米和花生制品中 AFB₁ 的最大限量为 20 µg/kg,其它农副产品及食品中 AFB₁ 含量不得超过 5.0-10.0 µg/kg^[4]。因而,农产品中黄曲霉毒素脱毒方法研究对污染原料再利用,缓解粮食危机,保证人畜和环境安全具有重要的理论和应用价值。

研究通过 AFB₁ 富集培养基,从浙江嘉兴地区的肉鸡肠道粪便中筛选得到一株对 AFB₁ 具有脱毒能力的乳酸菌株,对该菌株的 AFB₁ 脱毒机理和降解特性做了初步研究;在此基础上,进一步对菌株的生理生化和系统发育学特征进行了

详细的分析,确定新分离的乳酸脱毒菌株为发酵乳杆菌。

1 材料与方 法

1.1 样品采集和菌种分离培养基

菌株分离样品采自浙江嘉兴地区一个养鸡场,在养鸡场中随机选取人工饲养肉鸡一只,将活鸡带回实验室宰杀后取肠道粪便样品作为 AFB₁ 脱毒菌种的富集培养材料。

AFB₁ 富集培养基(g/L): 蛋白胨 5.00, 酵母粉 2.50, 葡萄糖 5.00, 吐温-80 0.50 mL, K₂HPO₄ 1.00, 柠檬酸铵 1.00, NaAc·3H₂O 2.50, MnSO₄·4H₂O 0.05, MgSO₄·7H₂O 0.20, 适量的 AFB₁ (20–50 μg/L), pH 6.2–6.5。

AFB₁ 分离培养基(g/L): 蛋白胨 10.00, 酵母粉 5.00, 葡萄糖 10.00, NaAc·3H₂O 5.00, 柠檬酸铵 2.00, 吐温-80 1.00 mL, MgSO₄·7H₂O 0.58, MnSO₄·4H₂O 0.28, AFB₁ 终浓度为 20 μg/L, pH 6.2–6.5, 固体培养基加 2.0%的琼脂粉。

AFB₁ 降解测试培养基: 具体配方同富集培养基, 调整 AFB₁ 添加浓度约为 15 μg/L。

乳酸菌常规培养基(MRS, g/L): 蛋白胨 10.00, 酵母粉 5.00, 葡萄糖 20.00, 吐温-80 1.00 mL, K₂HPO₄ 2.00, 柠檬酸铵 2.00, NaAc·3H₂O 5.00, MnSO₄·4H₂O 0.05, MgSO₄·7H₂O 0.20, pH 6.2–6.5。

以上培养基均在 1×10⁵ Pa 条件下高压灭菌 15 min, 使用前添加无菌 AFB₁ 毒素标准溶液至规定浓度。

1.2 AFB₁ 脱毒菌种的富集筛选

取肠道粪便 0.5 g 加入 150 mL 富集培养基中 (AFB₁ 含量约为 20 μg/L), 在 37 °C 恒温培养箱中富集培养 7 d, 每天轻轻摇动富集培养液 1 次。第 1 次富集培养结束后, 取 5 mL 富集培养液接种到 150 mL 新鲜的 AFB₁ 富集培养基中, 将 AFB₁ 添加浓度增加到 30 μg/L, 在相同条件下继续富集

培养 7 d。以相同的富集方法完成第 3 次富集培养实验, 提高 AFB₁ 添加浓度至 50 μg/L。富集培养结束后, 用无菌水将富集培养液做梯度稀释, 将梯度稀释液涂布于 AFB₁ 固体分离培养基, 37 °C 条件下培养 3 d。培养结束后, 取出平板置于紫外光下观察每个菌落周围 AFB₁ 荧光变化, 挑取菌落周围具有荧光水解圈的菌株做进一步的脱毒能力验证实验。

1.3 AFB₁ 脱毒菌种降解能力测试

在 AFB₁ 固体分离培养基上连续活化待测菌种 2 代, 将活化后的菌种接种于 5 mL 的 AFB₁ 液体分离培养基培养过夜, 获得新鲜菌液。将 10 μL 新鲜菌液接种于 4 mL 黄曲霉毒素测试培养基(培养基 AFB₁ 浓度统一配成约 15.0 μg/L 后进行分装), 将接种后的试管于 37 °C 条件下静置培养 24、48 和 72 h, 每 24 h 轻轻摇动培养液一次, 每个降解实验设置 3 个重复和不接菌的空白对照。培养结束后, 取出试管立即进行毒素残留量检测或冷冻于-20 °C 冰箱中待检。

1.4 AFB₁ 残留量的测定

取 24、48 和 72 h 培养菌液 2 mL 于 5 mL 干净的离心管中, 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 将上清液全部转移至另一干净的离心管中待测。以 0.5 mL 甲醇重新悬浮菌体, 剧烈振荡 5 min 提取菌体吸附的残余 AFB₁, 8 000 r/min 离心 10 min, 将上清液转移至另一个干净的离心管, 弃去沉淀菌体, 向提取液中加入 1.5 mL 色谱级纯净水, 混匀待测。采用张巧艳等报道的免疫荧光快速检测方法测定培养上清液和菌体提取液中 AFB₁ 的残留量, 同时测定不接菌空白对照培养基中 AFB₁ 的残留量, 初步判断菌种的脱毒机理并计算脱毒效率^[5]。

1.5 菌种形态学观察

将菌种划线接种于 MRS 固体培养基, 37 °C 培养 24 h 取出观察菌落形态。菌落形态观察后,

挑取新鲜菌体采用结晶紫草酸铵染色方法对菌种进行革兰氏染色^[6]。同时, 采用透射电镜(Hitachi, H-7650)方法观察菌体的细胞形态特征。透射电镜制备方法为醋酸铀负染法: 加 1 滴无菌水于单菌落上, 静置 5 min, 让菌体细胞自由游出来, 吸附于铜网上, 静置 1 min, 用醋酸铀染色 1 min, 用滤纸吸去多余染色液, 晾干后于透射电镜下观察菌体细胞形态。

1.6 生理生化特征分析

采用法国梅里埃公司生产的 API 20E 快速检测试剂盒和东秀珠等主编的《常见细菌系统鉴定手册》的标准方法检测脱毒菌株的生理生化特征^[6]。API 20E 快速检测试剂盒的操作步骤和结果判定按使用说明书进行。最适生长温度测定: 以 5% 的接种量将新鲜菌液接种于 MRS 培养基, 于不同温度下(5 °C、10 °C、25 °C、30 °C、35 °C、37 °C、40 °C、42 °C 和 45 °C)静置培养 24 h, 取出培养液, 8 000 r/min 离心收集菌体, 以等体积的蒸馏水重悬菌体后, 用 721 分光光度计测定 OD₆₀₀ 吸收值, 确定菌种温度生长范围和最适生长温度。将 MRS 培养基 NaCl 浓度分别调节至 0~5% 范围内的 5 组浓度梯度, 接种新鲜菌液至不同 NaCl 浓度的改良 MRS 液体培养基, 37 °C 条件下静置培养 24 h, 测定各浓度梯度下 OD₆₀₀ 吸光值检测盐浓度生长范围和最适盐浓度。

1.7 降解菌种系统发育学分析

参考 Marmur 于 1961 年报道的方法, 提取菌株基因组总 DNA^[7]。菌种的 16S rRNA 基因 PCR 扩增引物 16F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 16R (5'-TTAAGGTGATCCAGCCGCA-3'), 由上海英骏生物技术有限公司合成。PCR 扩增条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 54 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 共 35 个循环; 72 °C 10 min。16S rRNA 基因扩增产物经纯化后, 用 ABI PRISM™3730XL DNA Sequencer (Applied Biosystems) 测序。将测

得的序列与 GenBank/EzTaxon Server version 2.1 数据库进行比对^[8], 将所获得的有效发表菌种 16S rRNA 基因序列采用 ClustalX 软件进行多重比对分析^[9], 比对后的文件应用 MEGA 4.0 软件包^[10], 分别采用邻位连接法(Neighbour-Joining)和最大简约法(Maximum-Parsimony)进行系统发育树的构建和系统发育关系分析。

2 结果与分析

2.1 脱毒菌株分离结果与脱毒能力测试

实验设计适合乳酸菌生长的富集培养基及分离培养基, 经过 3 轮的富集培养和最后筛选, 分离得到一株对 AFB₁ 具有显著脱毒能力的菌株 LAB-10, 对该菌株进行 16S rRNA 基因测序和数据库比对分析, 初步确定该菌株属于乳酸杆菌属菌种。

LAB-10 在降解测试培养基中对 AFB₁ 脱毒效果如图 1 所示, 该菌株 48 h 时对约 14 μg/L 的 AFB₁ 去毒率达到 63.4%, 继续延长培养时间去毒效率并未有显著的提高。根据现有的文献报道, 乳酸菌种对黄曲霉毒素的去毒机理大多为菌体细胞的物理吸附, 而并不是实质的生物降解作用^[11-12]。针对乳酸菌的脱毒特点, 本实验在检测培养上清液 AFB₁ 残留量的同时, 将培养后的菌体细胞所吸附的毒素用甲醇提取检测, 结果显示 LAB-10 菌体细胞吸附的残留毒素量是非常有限的(图 1A), 初步证明该菌株对 AFB₁ 的脱毒机理为生物降解作用。菌株 LAB-10 对 AFB₁ 的 48 h 降解率约为 64%, 继续延长培养时间降解效率也没有显著提高, 与国内外报道的黄曲霉毒素高效降解菌种相比, 脱毒能力并不算高效^[13-14]。本研究的特色之处在于菌株 LAB-10 是依据乳酸菌富集分离方法获得的乳酸菌类脱毒菌种, 这类菌种是国际公认的益生菌群, 生物安全性较高, 在此基础上本文对菌种 LAB-10 详细的系统分类学地位做了进一

步探讨。

2.2 菌落和细胞形态学特征

菌株 LAB-10 在 MRS 固体培养基上菌落近似圆形、凸起, 中等大小(直径 2 mm–3 mm), 边缘不整齐, 乳白色、湿润。革兰氏染色为阳性。将菌体在 MRS 培养基上 37 °C 条件下, 培养 24 h

后在电镜下观察, 细胞学形态特征如图 2 所示。菌体特征包括: 细胞形态呈杆状, 两端钝圆, 宽约 0.8 μm –1.2 μm , 长约 1.5 μm –2.5 μm , 以二等分裂方式繁殖, 单生或对生, 无鞭毛, 不运动。在相同培养条件下, 继续延长培养时间, 在光学显微镜下观察, 菌体细胞内未发现产生内生孢子。

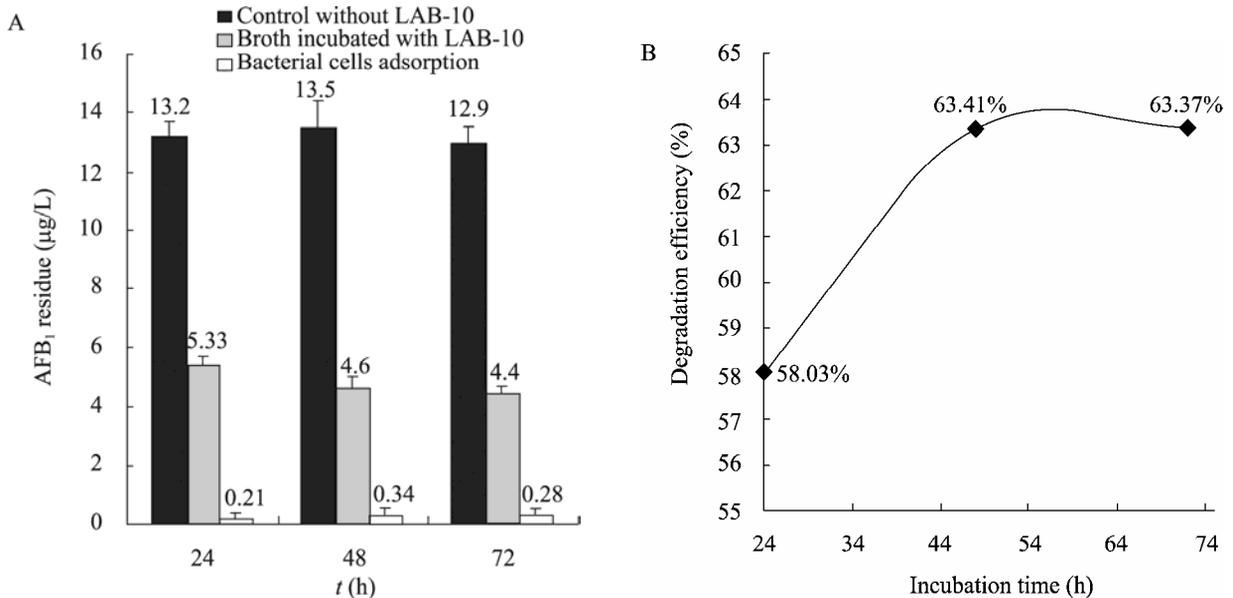


图 1 菌株 LAB-10 在不同培养时间下对 AFB₁ 的降解结果

Fig. 1 AFB₁ degradation results of LAB-10 under different incubation time

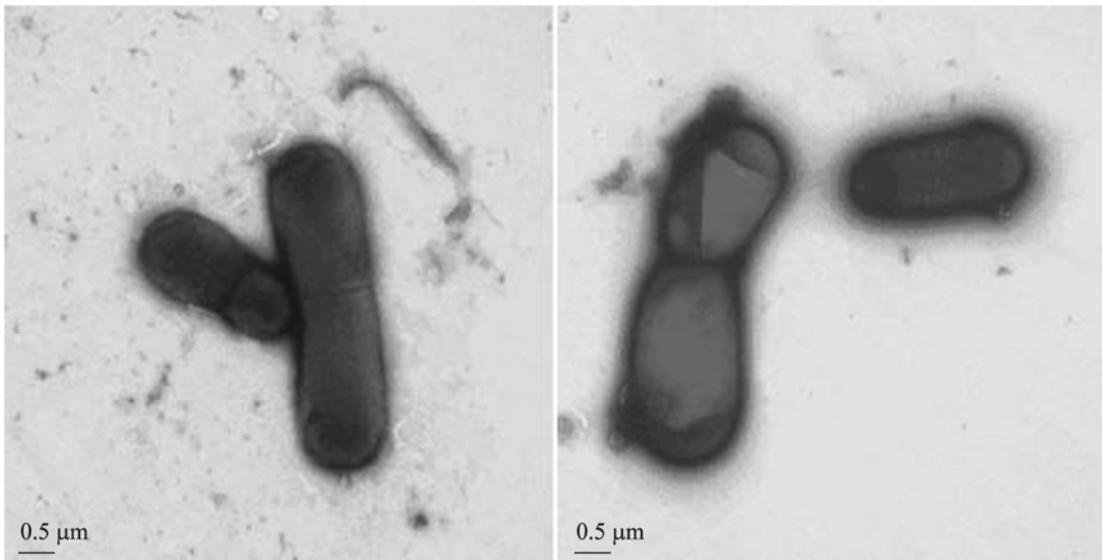


图 2 菌株 LAB-10 在 MRS 平板上 37 °C 培养 24 h 后的透射电镜照片

Fig. 2 Transmission electron micrograph of strain LAB-10 on MRS agar for 24 hours at 37 °C

2.3 菌株生理生化性状

菌株 LAB-10 在 MRS 液体培养基中, 静置和摇瓶培养下均能生长, 在静置培养条件下生长更好。菌株 LAB-10 能够在以石蜡油密封的静置试管中生长, 属于兼性厌氧微生物类群。LAB-10 最适生长温度为 37 °C–40 °C, 生长温度范围为 30 °C–45 °C; 最适盐离子浓度范围为 2%–3% (NaCl, W/V), 盐离子生长浓度范围为 0–4% (NaCl, W/V); 最适生长 pH 为 6.0–6.5, 能够在

pH 3.0 的条件下生长, 具有较强的耐酸特性。LAB-10 详细的生理生化特征见表 1。如表 1 所示, LAB-10 的 β -半乳糖苷酶和精氨酸双水解酶反应为阳性, 二乙酰试验(V-P)为阳性, 白明胶酶实验结果阴性, 硝酸盐和亚硝酸盐还原能力检测结果为阴性, 能够发酵乳糖、葡萄糖、甘露醇、蔗糖、淀粉等多种碳水化合物产酸。根据 API 试剂盒和传统生化检测结果, 初步鉴定菌株 LAB-10 为乳酸杆菌属菌种(*Lactobacillus* sp.)^[6]。

表 1 菌株 LAB-10 的生理生化特征
Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain LAB-10

| 酶活性反应 Enzyme activity | 测定结果 Detection results | 碳源利用与发酵 Carbohydrates utilization and fermentation | 测定结果 Detection results |
|--|---------------------------|---|---------------------------|
| β -半乳糖苷酶 ONPG | + | 柠檬酸盐 CIT | (+) |
| 精氨酸双水解酶 ADH | + | 葡萄糖 GLU | + / 产酸 |
| 赖氨酸脱羧酶 LDC | - | 甘露醇 MAN | + / 产酸 |
| 鸟氨酸脱羧酶 ODC | - | 肌醇 INO | + / 产酸 |
| 尿素酶 URE | - | 山梨醇 SOR | + / 产酸 |
| 过氧化氢酶 H ₂ O ₂ | - | 鼠李糖 RHA | + / 产酸 |
| 氧化酶 Oxise | - | 蔗糖 SAC | + / 产酸 |
| 苯丙氨酸脱氨酶 TDA | - | 蜜二糖 MEL | + / 产酸 |
| 吲哚产生 IND | - | 淀粉 AMY | + / 产酸 |
| 二乙酰试验 V-P | + | 阿拉伯糖 ARA | + / 产酸 |
| 明胶液化 GEL | - | 乳糖 LAC | + / 产酸 |
| H ₂ S 产生实验 H ₂ S | - | 麦芽糖 MAL | + / 产酸 |
| 硝酸盐还原 NO ₃ ⁻ | - | 鼠李糖 RHA | + / 产酸 |
| 亚硝酸盐还原 NO ₂ ⁻ | - | 半乳糖 GAL | + / 产酸 |

注: +: 代表阳性反应; -: 代表阴性反应; (+): 代表弱阳性反应。

Note: +: Positive; -: Negative; (+): Weak positive.

2.4 LAB-10 系统发育学分析

依据细菌基因组 DNA 提取及 16S rRNA 基因通用扩增方法, 扩增得到菌株 LAB-10 的 16S rRNA 基因近似全长序列(1 471 bp)。将获得的 16S rRNA 基因在 GenBank/EzTaxon Server version 2.1 数据库进行比对分析, 从数据库中调取有效发表模式菌株序列, 构建系统发育树(图 3)。分析结果显示菌株 LAB-10 为乳酸杆菌属菌种, 该菌株与

发酵乳杆菌的两个菌株相聚于乳酸杆菌属的同一系统发育分支, 3 个菌株之间的系统发育关系非常相近。从 16S rRNA 基因序列相似性来看, 菌株 LAB-10 与发酵乳杆菌模式菌株 *Lactobacillus fermentum* CECT 562^T 的同源性为 99.9%, 与 *Lactobacillus fermentum* NBRC 3956 同源性为 99.8%。根据系统发育学分析结果, 结合上文生理生化及形态学特征, 将该菌株鉴定为发酵乳杆

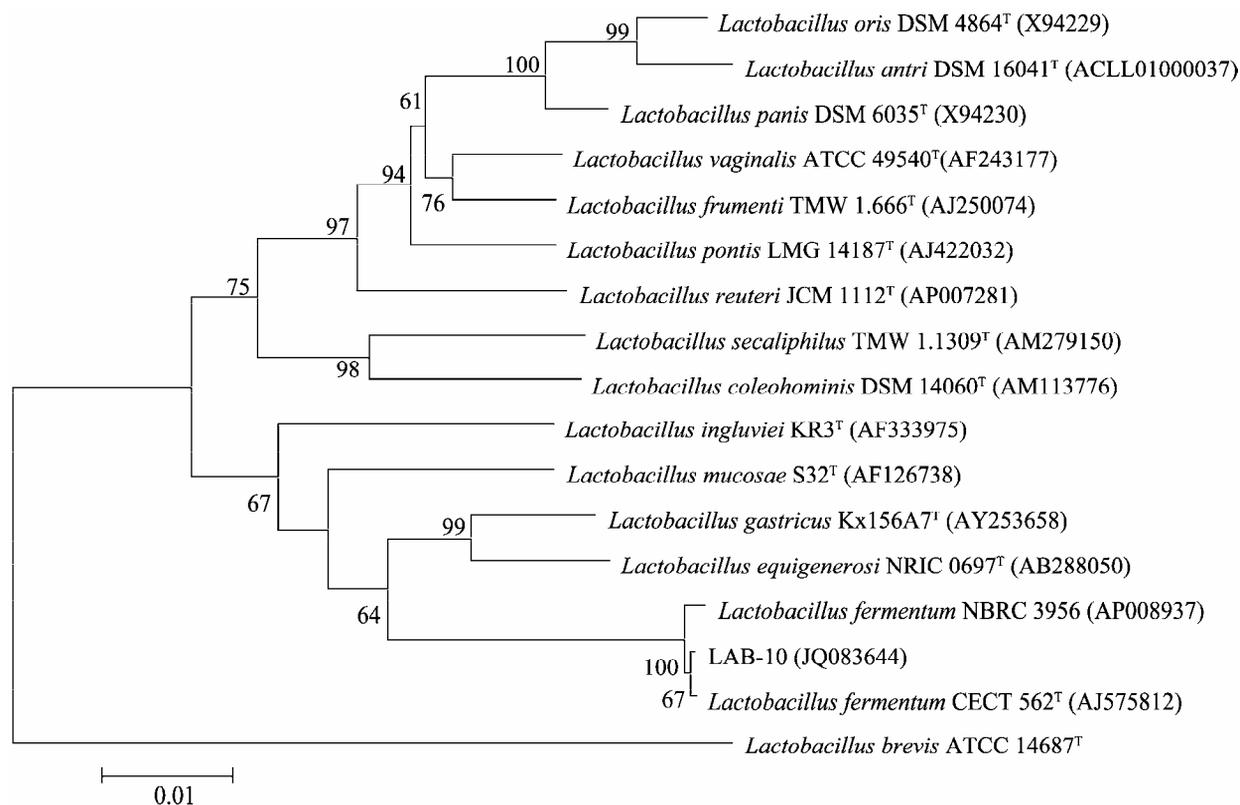


图 3 基于 16S rRNA 基因构建的 LAB-10 邻位连接法系统进化树图

Fig. 3 Neighbour-Joining phylogenetic tree of strain LAB-10 based on 16S rRNA gene sequences

Note: Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. Numbers at the nodes indicate the bootstrap values on neighbor-joining analysis of 1 000 resampled data sets. Bar 0.01 represent sequence divergence.

菌，其详细的系统发育地位为：厚壁菌门 (Firmicutes)，乳酸杆菌目 (Lactobacillales)，乳酸杆菌科 (Lactobacillaceae)，乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*)，发酵乳酸杆菌 (*Lactobacillus fermentum*)。

3 讨论

国内外研究结果显示，黄曲霉毒素乳酸脱毒菌种的脱毒机理绝大多数为物理吸附作用，乳酸杆菌体吸附毒素形成菌体-毒素复合物，复合物的稳定性与菌种细胞特征密切相关，不同菌种吸附位点和作用方式会有一定的差异。菌体细胞与毒素形成稳定的复合物后，可以在一定程度上减少生物机体对黄曲霉毒素的吸收与代谢作用，被吸附的毒素可随菌体排出体外，降低黄曲霉毒素对

机体的毒害作用，具有一定的应用前景^[11-12]。乳酸菌吸附脱毒的不足之处为：菌体吸附能力依赖于温度和菌体浓度，毒素吸附与释放是可逆的，在不同的生物体环境中可能再次释放到机体中^[15]。生物降解能够在体外将污染毒素进行不可逆的脱毒处理，与生物吸附脱毒相比，具有更广泛的应用前景。本研究应用乳酸菌选择性分离培养基，从肉鸡肠道粪便中筛选到一株乳杆菌属 (*Lactobacillus* sp.) 脱毒菌株 LAB-10。经初步脱毒机理研究，发现该菌株对 AFB₁ 的脱毒机理为生物降解作用，在静置培养条件下 48 h 内，对约 14 μg/L 的 AFB₁ 去毒率达到 63.4%，与国内外报道的研究结果相比虽不算高效脱毒菌种^[13-14]，但是该菌株经初步鉴定隶属于乳杆菌属菌种，生物安全性高，仍具有较高的研究价值，因此我们对

该菌株做了进一步的系统分类学研究。系统分类学分析结果显示, 菌株 LAB-10 的系统分类学地位为发酵乳杆菌。发酵乳杆菌作为异型发酵乳酸菌, 属于益生菌群, 具有半乳糖苷酶活力, 能够发酵葡萄糖、蔗糖、淀粉等多种碳水化合物^[16], 因此, 该菌株在工农业生产领域具有一定的脱毒应用潜力。根据目前国内外真菌毒素生物脱毒技术的研究进展来看, 生物脱毒技术从实验室走向生产应用存在的制约因素包括: 降解菌种的脱毒效率不高, 毒素代谢产物仍然剧毒(即无实质性的脱毒应用价值), 脱毒菌种自身安全性低或者脱毒菌种在实际生产中难以培养等。本研究中所筛选的乳酸杆菌 LAB-10 安全性高, 在乳制品及发酵制品中易于生长繁殖, 也具有较显著的脱毒效率, 菌株 LAB-10 对 AFB₁ 的代谢产物毒性分析将对其应用前景具有决定性的影响, 也是下一步工作的重点研究内容。

参 考 文 献

- [1] Steyn PS. Mycotoxins, general view, chemistry and structure[J]. Toxicology Letters, 1995, 82/83: 843-851.
- [2] Ominski KH, Marquardt RR, Sinah RN, et al. Ecological aspects of growth and mycotoxin production by storage fungi[M]//Miller JD, Trenholm HL, eds. Mycotoxins in Grain-compounds other than Aflatoxin. St. Paul: Eagan Press, 1994: 287-312.
- [3] IARC (International Agency for Research on Cancer). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins[R]. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1993, 56: 489-521.
- [4] 中华人民共和国国家标准. 食品中真菌毒素限量[S]. 中华人民共和国卫生部, 2011年10月, 1-7.
- [5] 张巧燕, 王钊, 陈建文, 等. 杭州市粮油类农产品真菌毒素快速检测与安全性评估[J]. 浙江农业学报, 2011, 23(3): 582-587.
- [6] 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: 349-398.
- [7] Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms[J]. Journal of Molecular Biology, 1961, 3(2): 208-218.
- [8] Chun J, Lee JH, Jung Y, et al. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences[J]. International Journal of Systematic and Evolution Microbiology, 2007, 57(10): 2259-2261.
- [9] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [10] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Molecular Biology Evolution, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [11] Hernandez-Mendoza A, Garcia HS, Steele JL. Screening of *Lactobacillus casei* strains for their ability to bind aflatoxin B₁ [J]. Food and Chemical Toxicology, 2009, 47(6): 1064-1068.
- [12] Kankaanpää P, Tuomola E, El-Nezami H, et al. Binding of aflatoxin B₁ alters the adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in a Caco-2 model[J]. Journal Food Protection, 2000, 63(3): 412-414.
- [13] 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.
- [14] Teniola OD, Addo PA, Brost IM, et al. Degradation of aflatoxin B₁ by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthenorans* sp. nov. DSM44556^T[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 105(2): 111-117.
- [15] El-Nezami H, Kankaanpää P, Salminen S, et al. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B₁[J]. Food and Chemical Toxicology, 1998, 36(4): 321-326.
- [16] Lin WH, Yu B, Jang SH, et al. Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry[J]. Anaerobe, 2007, 13(3/4): 107-113.