

网络出版时间:2018-01-26 10:32

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2018.05.003

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20180126.0952.006.html>

# 抑制黄曲霉菌的乳酸菌的分离及鉴定

尹雪<sup>1</sup>, 郭雪峰<sup>1,2</sup>, 帕提古丽·毛拉红<sup>1</sup>, 刘俊峰<sup>1,2</sup>, 张秀萍<sup>1,2</sup>, 席琳乔<sup>1,2</sup>

(1 塔里木大学 动物科学学院, 新疆 阿拉尔 843300; 2 新疆生产建设兵团塔里木畜牧科技重点实验室, 新疆 阿拉尔 843300)

**【摘要】**【目的】从新疆传统发面面肥中分离筛选出能够抑制黄曲霉菌生长的乳酸菌, 为改善和提高青贮饲料品质提供优良菌种。【方法】采用实验室纯培养方法对新疆传统发面面肥样品进行乳酸菌的分离, 采用双层平板法筛选对发霉花生、玉米和变质青贮饲料中黄曲霉菌具有抑制作用的乳酸菌, 并对其进行生理生化鉴定及同源性分析, 构建系统发育树, 明确各菌株的分类地位。【结果】从新疆传统发面面肥中分离出 12 株乳酸菌, 通过抑菌试验筛选出 F3、F11 和 F12 3 株对黄曲霉菌具有抑制作用的菌株。生理生化试验发现, 3 株菌株均能在 5、10、40 和 45 °C 温度条件下生长, 在 NaCl 为 3% 和 6.5%, pH 4~7 条件下能良好生长, 并且这 3 株菌均能利用多种碳源。经 16S rDNA 序列同源性分析, 菌株 F3 与类芽孢杆菌(*Paenibacillus* sp.) MD9B2 的同源性为 100%, 菌株 F11 与屎肠球菌(*Enterococcus faecium*) V9-156 的同源性为 100%, 菌株 F12 与乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*) 25F1 的同源性为 100%。【结论】从新疆传统发面面肥中筛选出能够抑制黄曲霉菌的 3 株乳酸菌, 经鉴定分别为类芽孢杆菌(*Paenibacillus* sp.)、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*) 和乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)。

**【关键词】** 乳酸菌; 黄曲霉菌; 抑菌活性

**【中图分类号】** S816.32

**【文献标志码】** A

**【文章编号】** 1671-9387(2018)05-0016-07

## Isolation and identification of *Aspergillus flavus* inhibiting lactic acid bacteria

YIN Xue<sup>1</sup>, GUO Xuefeng<sup>1,2</sup>, PA Tiguli · Maolahong<sup>1</sup>,  
LIU Junfeng<sup>1,2</sup>, ZHANG Xiuping<sup>1,2</sup>, XI Linqiao<sup>1,2</sup>

(1 College of Animal Science, Tarim University, Alar, Xinjiang 843300, China; 2 Key Laboratory of Animal Husbandry Science and Technology, Xinjiang Production & Construction Corps, Alar, Xinjiang 843300, China)

**Abstract:**【Objective】Lactic acid bacteria inhibiting *Aspergillus flavus* were isolated and screened from Xinjiang traditional sourdough samples to provide good strains for silage quality improvement. 【Method】Lactic acid bacteria were isolated from traditional fermentation dough sample by traditional method, and the strains with antimicrobial activity against *Aspergillus flavus* were screened from the moldy peanuts, moldy maize and deteriorative silage by the double-layer plate method. Physiological and biochemical characteristics as well as homology of lactic acid bacteria were determined, phylogenetic trees was established, and taxonomic position of the strains was confirmed. 【Result】A total of 12 lactic acid bacteria strains were isolated from the samples, and three of them could inhibit *Aspergillus flavus*. All the three strains could grow at the temperatures of 5, 10, 40 and 45 °C, pH of 4~7, NaCl concentrations of 3% and

**【收稿日期】** 2017-03-03

**【基金项目】** 新疆生产建设兵团科技创新中青年领军人才项目(2016BC001); 新疆生产建设兵团塔里木畜牧科技重点实验室项目(HS201613); 新疆生产建设兵团塔里木大学研究生科研创新项目(TDGR1201710)

**【作者简介】** 尹雪(1990—), 女, 新疆伊犁人, 在读硕士, 主要从事抑制青贮饲料中黄曲霉菌生长的乳酸菌筛选和鉴定研究。  
E-mail: 1186027456@qq.com

**【通信作者】** 郭雪峰(1980—), 女, 内蒙古卓资人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事反刍动物瘤胃调控技术及饲料添加剂的开发利用研究。E-mail: gxfdky@126.com

6.5%, and various carbon sources. Based on 16S rDNA gene sequence and homology analysis, F3 and *Paenibacillus* sp. MD9B2 had the similarity of 100%, F11 and *Enterococcus faecium* V9-156 had the homology of 100%, and F12 and *Lactococcus lactis* 25F1 had the similarity of 100%. 【Conclusion】 Three lactic acid bacteria with ability of inhibiting *Aspergillus flavus* were isolated and screened from Xinjiang traditional sourdough samples and they were identified as *Paenibacillus* sp., *Enterococcus faecium* and *Lactococcus lactis*.

**Key words:** lactic acid bacteria; *Aspergillus flavus*; antibacterial activity

真菌是一类生命力极强的腐败微生物<sup>[1]</sup>,关于由酵母菌和霉菌污染所导致的饲料损失已有大量报道。目前已经确定有超过200种霉菌在特定食品、动物饲料中生长时会产生对人和动物有害的物质,主要有黄曲霉毒素类、串珠镰刀菌素、赭曲霉毒素类、棒曲霉素、单端孢霉烯类和玉米赤霉烯酮6大类<sup>[2]</sup>。由于这些毒素具有致癌致畸性,对神经、肝肾也有毒害作用,因此这些腐败真菌在造成巨大经济损失的同时,也对公众的健康构成了极大威胁。如发生在20世纪60年代英国鸡场的“火鸡X病”,几个月内10多万只雏火鸡相继死亡,结果1963年由Spensley证实这种病由黄曲霉菌产生的黄曲霉毒素B1(*Aflatoxin* B1)引起<sup>[3]</sup>。国内外对抑制黄曲霉毒素进行了大量研究,例如物理方法,包括干燥、冷冻干燥、热处理、红外线处理、微波辐射、气调储藏等,或添加化学防腐剂如乳酸、乙酸、山梨酸、苯甲酸、丙酸等<sup>[4-5]</sup>。但是这些传统方法都存在一定的弊端,如物理方法会造成营养成分的损失,化学防腐剂则会对人和动物的健康及环境带来危害,而且随着化学防腐剂的大量应用,有研究发现一些真菌已经对其产生了抗性,一些酵母甚至可以利用苯甲酸、山梨酸和丙酸这些常用的防腐剂,部分青霉属的菌株可以在山梨酸钾存在条件下生长,而一些霉菌具有降解山梨酸酯的能力<sup>[6]</sup>。现有研究表明,微生态制剂具有最小的不良反应和最佳的适口性等特点,已成为替代抗生素的主要添加剂;乳酸菌作为微生物来源的添加剂,被公认为是目前最传统、最安全的添加剂,已被广泛用于医药、食品和饲料等领域<sup>[7]</sup>。本研究从新疆传统发面面肥中分离筛选出能够抑制黄曲霉菌生长的乳酸菌,旨在对其生理生化特性及分类地位进行深入研究,进而为改善青贮饲料发酵品质及抑制黄曲霉菌生长提供乳酸菌资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品与菌种

样品来源:2016年7月从新

疆阿克苏地区随机采集发面面肥、发霉花生、发霉玉米及变质青贮饲料样品。将样品封存于密封袋中,贴上标签标明采样时间和地点后运回实验室,于4℃条件下,由塔里木大学畜牧科技重点实验室草食家畜营养研究室保存备用。

菌种来源:从发面面肥样品中分离获得乳酸菌,从发霉花生、玉米及变质青贮饲料中分离获得黄曲霉菌,由塔里木大学畜牧科技重点实验室草食家畜营养研究室保存备用。

1.1.2 主要试剂和仪器 主要试剂:细菌提取试剂盒、质粒小提试剂盒、T4连接盒和通用型DNA纯化回收试剂盒,均购自天根深化科技有限公司;引物FA-27F:5'-GCAGAGTTCTCGGAGTCACGAAGAG-TTTGATCCTGGCTCAG-3', RA-1495R: 5'-AGCG-GATCACTTCACACAGGACTACGGGTACCTTGTTACGA-3',均购自北京英俊生物技术公司。

主要仪器:超净工作台(SW-CJ-2FD,上海博迅实业有限公司),电子天平(XP603S,瑞士梅特勒-托利多中国公司),高压灭菌锅(SX-500,上海法润科学仪器有限公司),电热恒温培养箱(DNP9162,上海精宏实验设备有限公司),紫外可见光分光光度计(T6,北京普析通用仪器有限责任公司),PCR仪(Eppendorf,德国),离心机(Eppendorf,德国),旋涡混合器(HMS-350,金坛市科析仪器有限公司),电泳仪(JY-300C,北京君意东方电泳设备有限公司),凝胶成像仪(GEL DOC XR,北京赛百奥科技有限公司),pH计(PHSJ-5,上海仪电科学仪器有限公司),超低温冰箱(海尔集团公司)。

1.1.3 培养基 MRS固体培养基:蛋白胨10g,牛肉膏10g,酵母粉5g,葡萄糖20g,柠檬酸二铵2g,硫酸镁0.05g,磷酸氢二钾2g,乙酸钠5g,吐温-801g,硫酸锰0.05g,碳酸钙1g,琼脂15g,溶于1L去离子水,121℃灭菌20min。参考凌代文<sup>[8]</sup>《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》中所描述的配方配制。

马铃薯葡萄糖(PDA)固体培养基:马铃薯200g,葡萄糖20g,琼脂8g,溶于1L去离子水,121℃

灭菌 20 min。参考张国华<sup>[9]</sup>所描述的配方配制。

曲霉菌琼脂(AFPA)固体培养基:酵母粉 20 g,蛋白胨 10 g,柠檬酸铁铵 0.5 g,0.2%二氯硝基苯胺 1 mL,氯霉素 0.1 g,琼脂 15 g,溶于 1 L 去离子水,121℃灭菌 15 min。参考李院<sup>[10]</sup>所描述的配方配制。

## 1.2 方 法

1.2.1 发面面肥中乳酸菌的分离与纯化 根据《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》<sup>[8]</sup>、《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[11]</sup>和《乳酸细菌:基础、技术和应用》<sup>[12]</sup>所描述的乳酸菌菌株形态进行乳酸菌菌株的分离鉴定。无菌操作称取 10 g 发面面肥样品放入 90 mL 无菌蛋白胨水中,密封,置于摇床上以 120 r/min 摇动 2 h,吸取 1 mL 上清液加入到 9 mL 无菌蛋白胨水中,漩涡振荡,依次稀释成  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  4 个梯度,分别取 4 个梯度的菌液 100  $\mu$ L 涂布于固体 MRS 平板培养基表面,30℃培养 48~72 h。通过观察菌落颜色、大小、光泽、是否有透明圈等挑取单菌落,在 MRS 固体培养基上划线,30℃恒温培养 48~72 h,重复划线分离培养 3 次,得到纯化的单菌株<sup>[13-14]</sup>。用 MRS 液体培养基富集(30℃培养 24 h),与等体积的甘油混合,封装,-70℃保存备用。

1.2.2 发霉花生、玉米及变质青贮饲料中黄曲霉菌的分离与纯化 使用曲霉菌琼脂(AFPA)固体培养基对发霉花生、玉米及变质青贮饲料稀释液进行分离。无菌操作称取各样品 10 g 放入 90 mL 无菌蒸馏水中,按 1.2.1 节方法稀释成  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  4 个梯度的菌悬液,分别取 4 个梯度的菌悬液 100  $\mu$ L 涂布于 AFPA 固体培养基表面,置于霉菌恒温培养箱中,28℃培养 4~7 d,挑取少许霉菌所产孢子到曲霉菌琼脂(AFPA)固体培养基上进行划线分离、纯化。纯化的霉菌单菌落生长 4~7 d 后,用接种环挑取少量带孢子的菌丝,用乳酸石碳酸棉兰染色,对霉菌的菌体和菌丝进行显微镜形态观察<sup>[15]</sup>。挑选 AFPA 培养基背面呈亮橙色、霉菌孢子呈淡黄色的霉菌孢子进行保存备用。

1.2.3 霉菌孢子液的制备 将保存备用的黄曲霉菌菌株接种在 PDA 斜面培养基表面,28℃恒温培养 3~5 d 至大量孢子产生,加入 5 mL 灭菌生理盐水于斜面试管,漩涡振荡 5 min,用无菌纱布过滤去除营养菌丝体<sup>[16]</sup>。采用血球计数板测定孢子浓度,将孢子浓度调整为  $10^5$  个/mL,备用。

1.2.4 筛选抑制黄曲霉菌活性的乳酸菌 采用双层平板法<sup>[10]</sup>筛选对黄曲霉菌具有抑制作用的乳酸菌。先将 MRS 固体培养基倒入培养皿中作为下层

平板,待其凝固后,用接种环沾取生长至对数期的乳酸菌菌液在平板上划 2 条 2~3 cm 的平行直线,于 37℃培养 24~36 h 至长出菌苔。然后将含有孢子浓度为  $10^5$  个/mL 的 PDA 半固体培养基倒入培养皿中,覆盖在含有乳酸菌菌苔的下层培养基上,于 28℃培养 48~72 h,检测乳酸菌生长条带周围是否出现抑菌圈,挑选有抑菌效果的乳酸菌进行后期试验。同时,本试验还将具有抑菌作用的乳酸菌菌液以 1%接种量,按 1:1 比例两两组合后进行抑菌试验。

1.2.5 乳酸菌的生理生化鉴定 乳酸菌的生理生化鉴定包括:产气试验、耐酸耐盐试验、温度生长试验,以及 D-葡萄糖、D-麦芽糖、乳糖、D-甘露糖、D-半乳糖、L-山梨糖、D-松二糖、D-松三糖、纤维二糖、木糖醇、D-棉籽糖、D-甘露醇、D-果糖、蔗糖、L-鼠李糖、D-木糖、D-山梨醇、D-蜜二糖等碳水化合物碳源发酵试验<sup>[17]</sup>。

1.2.6 乳酸菌 DNA 的提取与鉴定 对具有抑制黄曲霉菌作用的乳酸菌菌液提取基因组 DNA<sup>[18]</sup>。以乳酸菌菌株基因组 DNA 为模板,利用细菌通用引物 FA-27F 和 RA-1495R,对细菌的 16S rDNA 进行 PCR 扩增。PCR 扩增程序:95℃预变性 3 min;94℃变性 1 min,53℃退火 1 min,72℃延伸 90 s,30 个循环;72℃延伸 8 min。用 1.0%琼脂糖凝胶对扩增的 PCR 产物进行电泳检测。回收 PCR 产物,连接 pMD-18T 载体并转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,经蓝白斑筛选,将阳性克隆送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.2.7 同源性分析与系统发育树的构建 采用核酸 Blast 技术,将所测序列信息与 NCBI 网站的 GenBank 数据库进行对比,获得与所测序列同源性最高的已知分类地位的菌种。然后从 GenBank 数据库中获得已知菌株的 16S rDNA 基因序列,与所测菌株的 16S rDNA 序列一起,采用 Clustal 进行比对,绘制系统发育树,确定各菌株的分类地位<sup>[19]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 乳酸菌的分离与纯化

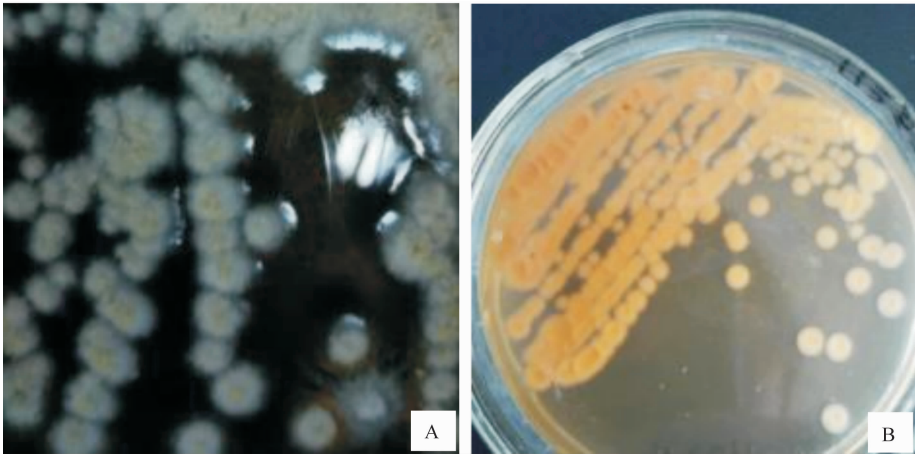
试验所筛选的 12 株乳酸菌菌株单菌落均为圆形,其中菌株 F3 菌落表面凹凸不平,淡黄色,边缘不整齐,质地黏稠且半透明;菌株 F1、F2、F4、F6、F7、F8、F9 菌落均为灰白色,边缘整齐,质地粗糙,无光泽且不透明;菌株 F5、F10、F11、F12 菌落均为白色,边缘整齐,质地黏稠,有光泽且不透明。所有

菌株革兰氏染色均为阳性,且接触酶反应均为阴性;菌株 F1、F2、F4、F5、F7、F9、F11、F12 均是球菌,F3 细胞形态呈短杆状,F6、F8、F10 细胞形态呈长杆状。

2.2 黄曲霉菌的分离与纯化

试验发现,在发霉花生、玉米及变质青贮饲料 10<sup>-3</sup> 稀释菌悬液对应的平板上,均长出了培养基背

面呈亮橙色且具有黄曲霉菌特征的菌落,进一步对其进行菌落特征观察,结果如图 1 所示。由图 1 可知,黄曲霉菌菌落呈放射状,孢子呈淡黄色,在 AF-PA 培养基上生长,培养基背面呈亮橙色。本试验从发霉花生、玉米及变质青贮饲料中分离出 4 株菌落形态基本一致的黄曲霉菌。



A. 黄曲霉菌在 AFPA 培养基上的单菌落形态;B. 黄曲霉菌在 AFPA 培养基上的背面照(亮橙色)  
A. Single colony morphology of *Aspergillus flavus* on AFPA medium;B. The back photos of *Aspergillus flavus* on the AFPA medium (Bright orange)

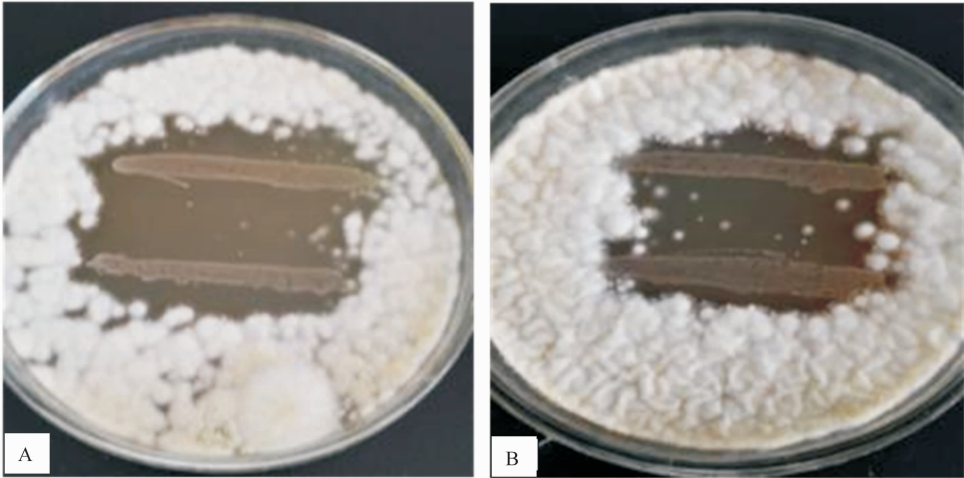
图 1 黄曲霉菌的菌落形态

Fig.1 Colony of *Aspergillus flavus*

2.3 筛选具有抑制黄曲霉活性的乳酸菌

在对黄曲霉菌具有抑制活性的乳酸菌筛选试验中发现,F3、F11 和 F12 3 株乳酸菌对黄曲霉菌有抑制作用(图 2 和表 1)。由表 1 可以看出,与单乳酸菌菌株相比,将具有抑菌作用的 3 株乳酸菌菌液两

两混合后其抑菌效果显著提高,其中 F3 与 F11 组合的抑菌效果最好,抑菌区直径可达到 5.3 cm(图 2-A),单个菌株中 F11 的抑菌效果显著高于其他单个菌株( $P<0.05$ ),抑菌区直径达到 4.5 cm(图 2-B)。



A. 菌株 F3 与 F11 菌液混合后对黄曲霉菌的抑制效果;B. 菌株 F11 对黄曲霉菌的抑制效果  
A. Inhibition effect of hybrid F3 and F11 strains of lactic acid bacteria on *Aspergillus flavus*;  
B. Inhibition effect of F11 strain of lactic acid bacteria on *Aspergillus flavus*

图 2 乳酸菌对黄曲霉菌的抑制作用

Fig.2 Inhibition of lactic acid bacteria on *Aspergillus flavus*

表 1 乳酸菌对黄曲霉菌的抑制效果

Table 1 Inhibitory effect of lactic acid bacteria on *Aspergillus flavus*

| 乳酸菌<br>Lactic acid bacteria | 抑菌区直径/cm<br>Inhibition zone diameter |
|-----------------------------|--------------------------------------|
| F3                          | 2.3±0.14 e                           |
| F11                         | 4.5±0.46 bc                          |
| F12                         | 1.8±0.10 f                           |
| F3+F11                      | 5.3±0.18 ab                          |
| F3+F12                      | 5.0±0.12 b                           |
| F11+F12                     | 3.0±0.10 d                           |
| F3+F11+F12                  | 6.2±0.24 a                           |

注:同列数据后标不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

Note: Different lowercases mean significant difference ( $P<0.05$ ).

2.4 具有抑菌活性乳酸菌的鉴定

2.4.1 生理生化鉴定 对具有抑菌活性的 3 株乳酸菌的生理生化指标及碳源利用方式进行鉴定,结

果如表 2 和表 3 所示。由表 2 可以看出,3 株乳酸菌发酵葡萄糖均不能产气,为同型发酵乳酸菌;3 株乳酸菌均能在 5℃条件下弱生长,在 10℃条件下除菌株 F11 生长良好,其余 2 株菌生长较弱,在 40 和 45℃,3 株乳酸菌均能良好生长;NaCl 为 3%和 6.5%时 3 株菌均能良好生长;在 pH=3 时 3 株乳酸菌均不能生长,在 pH=4 时 3 株乳酸菌均能弱生长,pH 值为 5~7 时 3 株乳酸菌均能良好生长。由表 3 可知:3 株乳酸菌均可利用 D-葡萄糖、D-麦芽糖、D-甘露糖、纤维二糖、D-甘露醇、D-果糖、蔗糖、D-山梨醇;F3 菌株不能利用醇乳糖、D-半乳糖、L-山梨糖、D-松三糖、木糖醇、D-棉籽糖、L-鼠李糖、D-木糖、D-蜜二糖;F11 菌株不能利用醇 L-山梨糖、D-松二糖、木糖醇、D-棉籽糖、L-鼠李糖;F12 菌株不能利用 L-山梨糖、木糖醇、D-棉籽糖、L-鼠李糖、D-木糖。

表 2 3 株乳酸菌生理生化指标的测定结果

Table 2 Physiological and biochemical indexes of lactic acid bacteria

| 鉴定项目<br>Identification project | 乳酸菌 Lactic acid bacteria       |                                |                                |
|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
|                                | F3                             | F11                            | F12                            |
| 产气试验<br>Gas experiments        | —                              | —                              | —                              |
| 发酵类型<br>Fermentation type      | 同型发酵<br>Same-type fermentation | 同型发酵<br>Same-type fermentation | 同型发酵<br>Same-type fermentation |
| 5℃                             | W                              | W                              | W                              |
| 10℃                            | W                              | +                              | W                              |
| 40℃                            | +                              | +                              | +                              |
| 45℃                            | +                              | +                              | +                              |
| 3% NaCl                        | +                              | +                              | +                              |
| 6.5% NaCl                      | +                              | +                              | +                              |
| pH 3                           | —                              | —                              | —                              |
| pH 4                           | W                              | W                              | W                              |
| pH 5                           | +                              | +                              | +                              |
| pH 6                           | +                              | +                              | +                              |
| pH 7                           | +                              | +                              | +                              |

注:“+”表示可以生长,“—”表示不生长,“W”表示弱生长。下同。

Note:“+”Growth,“—”No growth,“W”Weak growth. The same below.

表 3 乳酸菌碳源发酵试验结果

Table 3 Carbon source test of lactic acid bacteria

| 碳源<br>Carbon source     | 乳酸菌 Lactic acid bacteria |     |     |
|-------------------------|--------------------------|-----|-----|
|                         | F3                       | F11 | F12 |
| D-葡萄糖 D-Glucose         | +                        | +   | +   |
| D-麦芽糖 D-Maltose         | +                        | +   | +   |
| 乳糖 Lactose              | —                        | +   | +   |
| D-甘露糖 D-Mannose         | +                        | +   | +   |
| D-半乳糖 D-Galactose       | —                        | +   | +   |
| L-山梨糖 L-Yamanashi sugar | —                        | —   | —   |
| D-松二糖 D-Turanose        | +                        | —   | +   |
| D-松三糖 D-Melezitose      | —                        | +   | +   |
| 纤维二糖 Cellobiose         | +                        | +   | +   |
| 碳源<br>Carbon source     | 乳酸菌 Lactic acid bacteria |     |     |
|                         | F3                       | F11 | F12 |
| 木糖醇 Xylitol             | —                        | —   | —   |
| D-棉籽糖 D-Raffinose       | —                        | —   | —   |
| D-甘露醇 D-Mannitol        | +                        | +   | +   |
| D-果糖 D-Fructose         | +                        | +   | +   |
| 蔗糖 Sucrose              | +                        | +   | +   |
| L-鼠李糖 L-Rhamnose        | —                        | —   | —   |
| D-木糖 D-Xylose           | —                        | +   | —   |
| D-山梨醇 D-Sorbitol        | +                        | +   | +   |
| D-蜜二糖 D-Melibiose       | —                        | +   | +   |

2.4.2 16S rDNA 序列同源性分析 对具有黄曲霉菌抑制活性的乳酸菌菌株 16S rDNA 测序后进行

同源性分析,构建系统发育树,以确定菌株的分类,结果见图 3。由图 3 可以看出,菌株 F3 与类芽孢杆

菌(*Paenibacillus* sp.)MD9B2 的同源性为 100%,菌株 F11 与屎肠球菌(*Enterococcus faecium*) V9-156 的同源性为 100%,菌株 F12 与乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)25F1 的同源性为 100%。依据

16S rDNA 基因序列的同源性分析,确定菌株 F3 为类芽孢杆菌,菌株 F11 为屎肠球菌,菌株 F12 为乳酸乳球菌。

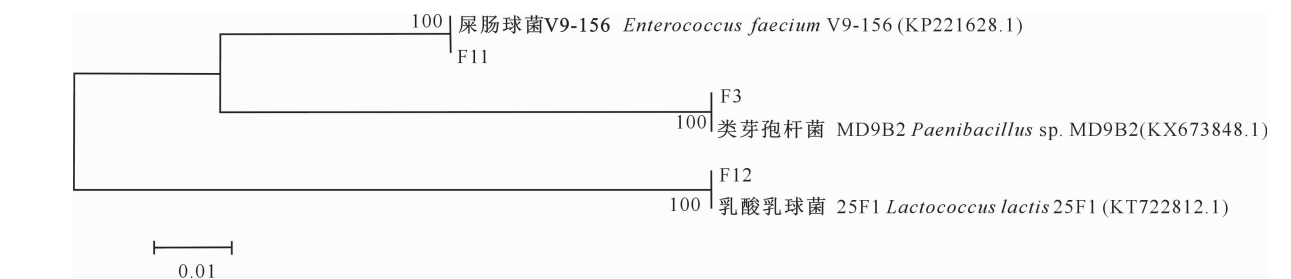


图 3 菌株 F3、F11 和 F12 的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of strains F3, F11 and F12

3 讨 论

本研究所用发面面肥样品是从新疆阿克苏地区随机采样获得,共筛选出 12 株乳酸菌菌株,其中球菌 8 株,杆菌 4 株,说明球菌是发面面肥中的优势菌群。本试验所分离的优势乳酸菌与其他研究者的结果略有不同。张国华<sup>[9]</sup>对我国 5 个不同地区发酵面团中的优势菌群进行研究发现,除安徽地区的优势菌为明串珠菌(*Leueonostoe*)外,河南、山西、甘肃及黑龙江等地区均以乳杆菌(*Lactobacillus*)为优势菌。王雪婷等<sup>[20]</sup>选取河南周口和山西运城的传统酸面团进行分离鉴定,结果显示其优势菌群为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)和面包乳杆菌(*Lactobacillus crustorum*)。这可能是由于各地区发面面肥的制作工艺和水土环境具有一定的差异,因而导致细菌组成差别较大。黄曲霉(*Aspergillus flavus*)主要存在于霉变的谷物、花生、种子及动物饲料中<sup>[21]</sup>。本研究利用 AFPA 培养基结合菌落形态,从发霉花生、玉米和变质青贮饲料中分离筛选出 4 株黄曲霉菌,这与雷明霞<sup>[22]</sup>的研究结果基本一致。

本研究利用从新疆发面面肥中分离出的 12 株乳酸菌进行黄曲霉菌抑菌试验,筛选出 F3、F11 和 F12 3 株对黄曲霉菌具有抑制作用的乳酸菌,经 16S rDNA 序列分析发现,3 株乳酸菌分别为类芽孢杆菌(F3)、屎肠球菌(F11)和乳酸乳球菌(F12)。饶胜其等<sup>[23]</sup>从酸菜、火腿、香辛料等原料中筛选出 9 株对黄曲霉菌具有较强抑制作用的产芽孢杆菌,这与本试验所分离类芽孢杆菌的抑菌效果基本一致。相比较而言,目前研究者对于乳杆菌抑菌作用的研究较为深入。Elnezami 等<sup>[24]</sup>研究发现,*Lactobacillus rhamnosus* LGG 和 LC-705 对黄曲霉毒素 B1

(AFB1)有较强的吸附作用,这 2 株菌分别使 AFB1 下降 54% 和 44%。Adel Hamidi 等<sup>[25]</sup>研究发现,*Lactobacillus pentosus* 和 *Lactobacillus beveris* 2 株乳酸菌能够很好地抑制黄曲霉菌的生长。本研究分离出对黄曲霉菌具有抑菌作用的 3 株乳酸菌,其抑菌有效物质还有待进一步研究,才能使其能更好地应用于优质青贮饲料的制作。

4 结 论

本研究从采自新疆阿克苏地区的发面面肥样品中分离出 12 株乳酸菌,通过黄曲霉菌抑菌试验筛选出 3 株对黄曲霉菌具有抑制作用的乳酸菌菌株。将具有抑菌作用的 F3、F11 和 F12 3 株乳酸菌菌液以 1:1 比例两两组合后其抑菌效果显著提高,其中将 3 株菌混合后抑菌效果最显著。经鉴定 3 株乳酸菌分别为类芽孢杆菌(*Paenibacillus* sp.)(F3)、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)(F11)和乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)(F12)。

[参考文献]

[1] Li P,Zhou Q,Wang T,et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay method specific for the detection of G-group Aflatoxins [J]. Toxins Basel,2016,8(1):1-11.  
[2] Dalié D K D,Deschamps A M,Richard-Forget F,et al. Lactic acid bacteria-potential for control of mold growth and mycotoxins;a review [J]. Food Control,2010,21(4):370-380.  
[3] Galarza-Seeber R,Latorre J D,Bielke L R,et al. Leaky gut and mycotoxins:Aflatoxin B1 does not increase gut permeability in broiler chickens [J]. Front Vet Sci,2016,3:10.  
[4] Brul S,Coote P. Preservative agents in foods;mode of action and microbial resistance mechanisms [J]. International Journal of Food Microbiology,1999,50(1/2):1-17.  
[5] Hesse S J A,Ruijter G J G,Dijkema C,et al. Intracellular pH homeostasis in the filamentous fungus *Aspergillus niger* [J].

- European Journal of Biochemistry, 2002, 269(14): 3485-3494.
- [6] Gerez C L, Torres M J, Valdez G F D, et al. Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria [J]. Biological Control, 2013, 64(3): 231-237.
- [7] Yuliana N, Dizon E I. Phenotypic identification of lactic acid bacteria isolated from *Tempoyak* (Fermented Durian) made in the philippines [J]. International Journal of Biology, 2011, 3(2): 145-152.
- [8] 凌代文. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 117-127.
- Ling D W. Classification and identification of lactic acid bacteria and method [M]. Beijing: China Light Industry Press, 1999: 117-127.
- [9] 张国华. 不同地区传统面食发酵剂中菌群结构及优势菌种代谢的研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- Zhang G H. Microbial communities in traditional sourdoughs from different areas of China and metabolic activity of dominant microorganism [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2014.
- [10] 李 院. 酱菜中抑菌菌的乳酸菌分离、鉴定及抑菌活性物质分析 [D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2015.
- Li Y. The isolation, identification and analysis of antimicrobial component of lactic acid bacteria inhibiting fungi in pickles [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2015.
- [11] 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: 364-370.
- Dong X Z, Cai M Y. Common bacteria manual system identification [M]. Beijing: Science Press, 2001: 364-370.
- [12] 张 刚. 乳酸细菌: 基础、技术和应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 40-43.
- Zhang G. Lactic acid bacteria: based technology and application [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007: 40-43.
- [13] 席琳乔, 吴书奇, 史卉玲, 等. 青贮玉米优良乳酸菌的分离与筛选 [J]. 贵州农业科学, 2016(3): 102-105.
- Xi L Q, Wu S Q, Shi H L, et al. Solation and identification of good lactic acid bacteria from silage maize [J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2016(3): 102-105.
- [14] Gu C T, Li C Y, Yang L J, et al. *Lactobacillus mudanjiangensis* sp. nov., *Lactobacillus songhuajiangensis* sp. nov. and *Lactobacillus nenjiangensis* sp. nov., isolated from Chinese traditional pickle and sourdough [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013, 63(12): 4698-4706.
- [15] 李 院, 魏新元, 王 静, 等. 抑制青霉菌乳酸菌的分离、鉴定及抑菌物质分析 [J]. 食品科学, 2015(21): 150-155.
- Li Y, Wei X Y, Wang J, et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria inhibiting *Penicillium* and analysis of their antimicrobial components [J]. Food Science, 2015(21): 150-155.
- [16] 姚 婉, 赵方红, 刘丽娜, 等. 不同浓度硒含量的富硒乳酸菌抑制黄曲霉菌生长以及产毒效果的研究 [J]. 中国饲料, 2016(12): 19-21.
- Yao W, Zhao F H, Liu L N, et al. Different concentrations of selenium in SE-enriched lactic acid bacteria inhibit the growth of *Aspergillus flavus* toxin-producing effects [J]. China Feed, 2016(12): 19-21.
- [17] 刘 慧. 现代食品微生物学实验技术 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2011: 260-284.
- Liu H. Modern food microbiology experiment technology [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2011: 260-284.
- [18] Melo Pereira G V, Beux M, Pagnoncelli M G, et al. Isolation, selection and evaluation of antagonistic yeasts and lactic acid bacteria against ochratoxigenic fungus *Aspergillus westerdijkiae* on coffee beans [J]. Lett Appl Microbiol, 2016, 62(1): 96-101.
- [19] Li D, Ni K, Pang H, et al. Identification and antimicrobial activity detection of lactic acid bacteria isolated from corn stover silage [J]. Asian-Australas J Anim Sci, 2015, 28(5): 620-631.
- [20] 王雪婷, 廖钰婷, 何 瑞, 等. 传统酸面团中优良菌种的筛选、鉴定及在苦荞麸皮馒头中的应用 [J]. 食品科技, 2017(2): 156-164.
- Wang X T, Liao Y T, He R, et al. Screening and identification of the dominant bacteria from Chinese traditional sour doughs and application in tartary buckwheat bran steamed bread [J]. Food Science and Technology, 2017(2): 156-164.
- [21] Bertuzzi T, Rastelli S, Mulazzi A, et al. Evaluation and improvement of extraction methods for the analysis of *Aflatoxins* B1, B2, G1 and G2 from naturally contaminated maize [J]. Food Analytical Methods, 2012, 5(3): 512-519.
- [22] 雷明霞. 植物乳杆菌 F22 吸附饲料中黄曲霉毒素 B1 效果研究 [D]. 四川雅安: 四川农业大学, 2014.
- Lei M X. The effect of *Lactobacillus plantarum* F22 adsorption of *Aflatoxin* B1 in feed [D]. Ya'an, Sichuan: Sichuan Agricultural University, 2014.
- [23] 饶胜其, 陈素雅, 高 璐, 等. 一株黄曲霉拮抗细菌 F1 的筛选、鉴定及其抑菌特性 [J]. 现代食品科技, 2015(12): 99-105.
- Rao S Q, Chen S Y, Gao L, et al. Screening, identification, and antifungal properties of a bacterial strain F1 with antagonistic activities against *Aspergillus flavus* [J]. Modern Food Science and Technology, 2015(12): 99-105.
- [24] Elnezami H, Mykkänen H, Kankaanpää P, et al. Ability of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* strains to remove *Aflatoxin* B1 from the chicken duodenum [J]. Journal of Food Protection, 2000, 63(4): 549-552.
- [25] Hamidi A, Mirnejad R, Yahaghi E, et al. The *Aflatoxin* B1 isolating potential of two lactic acid bacteria [J]. Asian Pac J Trop Biomed, 2014, 5(13): 1877-1884.