

黄曲霉毒素 B1 高效降解菌株的筛选鉴定及其降解

关 心¹ 何剑斌¹ 董 双¹ 臧 健² 龙 森¹

1. 沈阳农业大学畜牧兽医学院, 沈阳 110866; 2. 沈阳农业大学分析测试中心, 沈阳 110866

摘要 以香豆素为唯一碳源,利用微生物去毒法,初步筛选出 32 株生长良好的活性菌株,再添加 AFB1 标准品(菌液毒素终质量浓度 2.5 $\mu\text{g/mL}$),通过高效液相色谱(HPLC)检测 AFB1 降解率,结果显示,从鸡粪中分离并命名为 F6 的菌株高效降解黄曲霉毒素 B1,降解率达 83%。对菌株 F6 进行细胞形态及生理生化特性鉴定,初步判断为芽胞杆菌属,16S rRNA 序列同源性比对分析,与蔬菜芽胞杆菌国际标准株 ATCC700005(登录号 NR043325.1)核苷酸同源性为 99.3%,由此可确定,F6 菌株为蔬菜芽胞杆菌,命名为 *Bacillus oleronius* GX01(登录号 KP297896)。分离菌株 F6 发酵液各组分,检测得上清液 AFB1 降解率达 83%,而菌悬液、胞内液的 AFB1 分别仅为 22.8%、17.4%,初步鉴定其降解活性成分可能为胞外酶。

关键词 黄曲霉毒素 B1; 生物降解; 蔬菜芽胞杆菌; 分离; 鉴定

中图分类号 S 852.6 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)02-0090-07

黄曲霉毒素(aflatoxin,简称 AFT)属于真菌毒素^[1],是由黄曲霉(*Aspergillus flavus*)、寄生曲霉(*Aspergillus parasiticus*)、集蜂曲霉(*Aspergillus nomius*)和溜曲霉(*Aspergillus tamarii*)等丝状真菌产生的一类结构类似的强毒性次级代谢产物^[2],广泛分布于自然界中,主要侵染花生、玉米等粮油作物,每年给全球造成巨大的经济损失。黄曲霉毒素具有强肝毒性,低剂量可抑制动物免疫机能,使消化系统紊乱^[3]等,高剂量会诱导机体癌变、畸变甚至死亡。现已分离鉴定出 20 多种黄曲霉毒素,其中 B1、B2、M1、M2、G1、G2 这 6 种自然环境下较为常见,以 B1(AFB1)毒性最强,也最为常见,1993 年世界卫生组织癌症研究机构(IARC)将 AFB1 划定为 IA 类致癌物^[4]。尽管黄曲霉毒素种类繁多,但是它们均是二氢呋喃香豆素的衍生物,都含有氧杂萜邻酮(香豆素)的致癌结构和二呋喃环的基本毒性结构^[5],因此,可利用香豆素初步替代黄曲霉毒素进行解毒的研究。

黄曲霉毒素自 1960 年在英国东南部农村暴发死亡的火鸡身上发现至今已有半个多世纪^[6]。由于霉菌环境适应力好、繁殖能力强,在适宜条件下便可产生大量毒素^[7],而我国多数地区,气候温热潮湿,

适合霉菌的生长,极易受到黄霉菌毒素的污染,因此,黄曲霉毒素解毒至关重要。国内外去除黄曲霉毒素的方法主要有紫外线照射、热处理、吸附剂脱毒等物理法,及强碱、强酸、抗氧化剂处理等化学法,但这些理化方法不仅成本高、效率低,且部分方法还伴有毒性物质产生。随着科技的不断发展,微生物去毒法成为近年来的研究热点。微生物去毒是利用细菌、真菌等微生物及其代谢产物降解饲料、食品中污染的霉菌毒素。生物去毒法对原料无污染、具有高度专一性、同时避免毒素重新产生,因此是一种高效、安全的去毒方法^[8]。大部分微生物去毒是通过分泌降解酶与毒素反应,达到解毒的作用。目前国内已报道的降解 AFT 的真菌包括假蜜环菌(*Armillariella tabescens*)^[9]、糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*)等食用真菌,树状指孢霉(*Dactylium dendroides*)等孢霉属菌及黑曲霉(*Aspergillus niger*)等曲霉属菌^[10]。能降解 AFT 的细菌主要有类棒状杆菌诺卡氏菌(*Nocardia corynebacterioides*) DSM12676、红串红球菌(*Rhodococcus erythropolis*)、橙色粘球菌(*Myxococcus fulvus*)、嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)、施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)、萎缩芽胞杆菌(*Ba-*

收稿日期: 2015-05-31

基金项目: 国家自然科学基金项目(31201961; 31302152); 中国博士后科研基金项目(2014M551125); 辽宁省教育厅科学研究一般项目(L2014561)

关 心,硕士研究生,研究方向: 临床兽医学, E-mail: guanxin19900903@qq.com

通信作者: 龙 森,博士,讲师,研究方向: 动物营养代谢病及中毒病, E-mail: longjlau@126.com

cillus atrophaeus)、枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)及弯曲乳杆菌(*Lactobacillus curvatus*)等^[11-13]。

笔者以 AFB1 为对象,通过大量筛选得到降解香豆素的细菌,进一步筛选出高效降解 AFB1 的菌株,对高效降解菌株进行鉴定,初步研究其对 AFB1 的降解,旨在为进一步分离降解酶及研究降解机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1)样品。采集沈阳地区发霉的玉米、猪粪、鸡粪、鸡肠、不同生境土壤样品。

2)主要试剂。香豆素购自上海迈坤化工有限公司,AFB1 标准品购自 BBI 公司,细菌 DNA out 试剂盒购自上海生工生物工程有限公司,生化鉴定管购自杭州滨和微生物试剂有限公司。

3)培养基。菌株扩增选用营养肉汤培养基。初筛培养基为改良 Hormisch 筛选培养基(KH_2PO_4 0.25 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g, KNO_3 0.5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.005 g, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.003 g, pH 7.0, H_2O 1 000 mL)^[14], 121 ℃ 高压灭菌 20 min 后加入 1 g 香豆素。发酵培养基(蛋白胨 10 g, 牛肉膏 3 g, NaCl 8.5 g, KH_2PO_4 1 g, 葡萄糖 1 g, pH 6.5, H_2O 1 000 mL)。

1.2 AFB1 降解菌株的分离筛选

1)初筛。样品以 10 倍无菌生理盐水稀释混匀,处理液按 5%接种量接种于营养肉汤培养基,160 r/min 37 ℃ 培养 24 h。菌液按 2%接种量接种于初筛培养基,逐步提高香豆素的质量浓度(1、1.5、2、2.5、3 mg/mL),160 r/min、37 ℃ 培养 5 d,进行富集培养。富集 5 次后在初筛平板上多次划线分离培养。观察细菌生长情况,根据菌落形态、颜色、光滑度等因素挑取单菌落,接种于营养琼脂上,−20 ℃ 保存菌种。

2)复筛。初筛菌株接种于肉汤培养基,37 ℃ 培养 24 h。按 5%接种量接种于发酵培养基,37 ℃ 发酵培养 48 h。1.5 mL 灭菌避光离心管中加入 25 μL AFB1 标准品(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)及 975 μL 发酵菌液,使菌液内毒素终质量浓度为 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,设置无菌发酵培养基为空白对照,37 ℃ 暗处培养 72 h。4 ℃ 8 000 r/min 离心 15 min,取上清液检测。

1.3 HPLC 检测 AFB1 降解率

待测发酵上清液经 0.22 μm 滤膜过滤后进样。

色谱条件:色谱柱为 C18 反向吸附柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),进样量 20 μL ,流动相为水:甲醇=1:1(V/V),流速 1 mL/min,检测波长 365 nm。降解率公式:AFB1 降解率=(对照组 AFB1 峰面积−样品中 AFB1 峰面积)/对照组 AFB1 峰面积) × 100%。

1.4 菌株的鉴定

1)细胞形态鉴定。接菌在营养琼脂上,37 ℃ 培养 48 h 后观察菌落形态、色泽等。挑取单菌落,制成涂片,进行革兰氏染色,显微观察细胞形态与染色结果。

2)生理生化鉴定。主要进行糖醇类发酵、O/F、吲哚、MR、过氧化氢酶、柠檬酸盐、接触酶、脲酶、氨基酸脱羧酶与水解酶、硝酸盐还原、明胶液化、石蕊牛乳、酸碱度耐受、盐度耐受等试验。

3)细菌 16S rRNA 基因序列测定及同源性分析。使用细菌 DNA out 试剂盒提取 F6 菌株基因组 DNA。PCR 扩增引物为通用引物 27f:5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1492r:5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 扩增反应体系 30 μL :F6 菌株 DNA 模板 1 μL ,上下游引物 27 f 与 1492r 各 1 μL ,Taq DNA 聚合酶 15 μL ,ddH₂O 12 μL 。PCR 扩增程序:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 45 s,60 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 90 s,25 个循环;72 ℃ 延伸 5 min。反应结束后,5 μL PCR 产物上样于 1%琼脂糖凝胶,120 V 电压电泳 25 min 后经凝胶成像系统检测结果。将阳性克隆菌液送至上海生工生物有限公司测序。

序列的数据处理与分析:利用 NCBI 的 Blast 工具从 GenBank 数据库中搜索已知同源性较高序列,将目标序列与搜索到的同源序列用 ClustalX 2.0 去掉两端引物序列后,用 DNASTar 程序和 MEGA5.1 软件的邻接法(neighbor-joining method)进行序列比对与同源性分析,构建系统发生树。

1.5 F6 菌株降解特性研究

5 mL F6 菌株发酵液,4 ℃ 8 000 r/min 离心 20 min,分离 F6 上清液和菌体。菌体用无菌蒸馏水洗涤、离心,重复操作 3 次后加入 5 mL 无菌蒸馏水制成 F6 菌悬液。菌体加入 5 mL 无菌蒸馏水混匀,超声波破碎 30 min 后离心,离心上清液过 0.22 μm 滤膜,制得 F6 胞内液。将 F6 发酵液、上清液、菌悬液、胞内液进行复筛培养 72 h 后,检测各组分 AFB1 降解率。

2 结果与分析

2.1 菌株初筛结果

通过以香豆素为唯一碳源的初筛,获得 32 株生长良好的活性菌株,其中 1 株菌分离于发霉玉米,5 株菌分离于猪粪,6 株菌分离于鸡粪,2 株菌分离于鸡肠,18 株菌分离于土壤。

2.2 菌株复筛与 HPLC 结果

在本文材料与方法“1.3”的色谱条件下,处理后的样品得到了充分洗脱与分离。从图 1 可看出,AFB1 的色谱峰对称性良好,有较高的分辨率,AFB1 出峰时间为 11 min。初筛获得的 32 株菌株均具有 AFB1 降解能力(图 2),其中分离自鸡粪的 F6 菌株降解能力最强,降解率达到 83%,分离自土

壤的 B3 菌株的降解能力次之,达 54%。选择高降解的 F6 菌株做进一步研究。

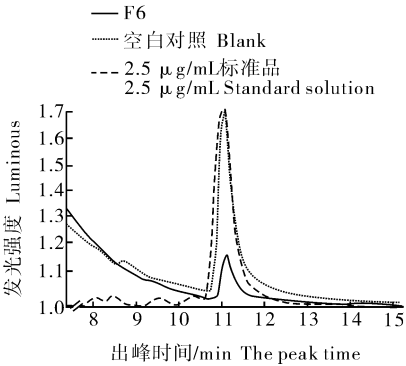


图 1 AFB1 的 HPLC 色谱图
Fig.1 HPLC chromatogram of AFB1

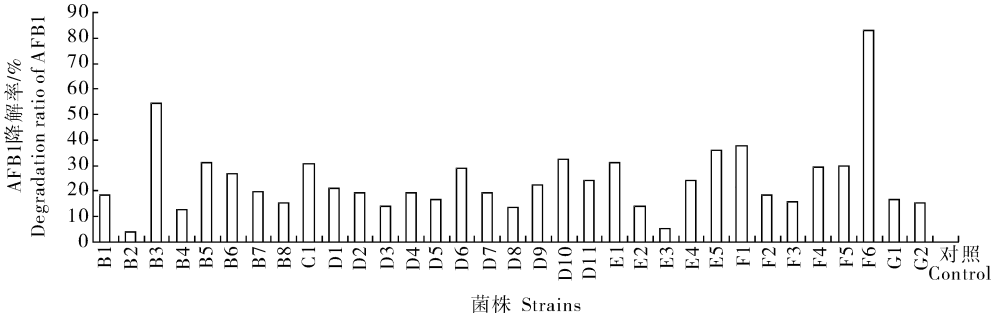


图 2 各菌株降解 AFB1 的能力
Fig.2 The degradation of AFB1 in each strain

2.3 F6 菌株的鉴定结果

1)形态及生理生化鉴定。F6 菌株在营养琼脂培养基上为灰白色的圆形菌落(图 3),菌落边缘整齐,表面膜状有同心环轻度隆起,显微镜下细胞形态为杆状,有芽胞,革兰氏染色呈阳性(图 4)。生理生化试验结果表明,F6 菌株能利用葡萄糖、果糖等大部分碳源,其主要生理生化特性见表 1。参照《伯杰

氏细菌鉴定手册》(8 版)初步判断 F6 菌株为芽胞杆菌属。

2)菌液 PCR 鉴定结果。F6 菌株 PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳,结果显示:扩增的 DNA 在 Marker 的 2 000 bp 与 1 000 bp 中间可见与预期大小相符的单一一条带(图 5),且条带整齐清晰,亮度较好。

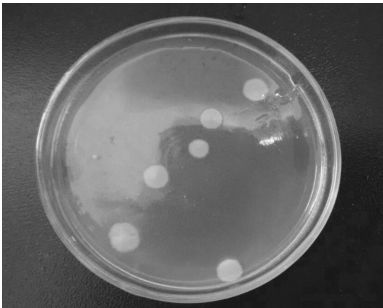


图 3 F6 菌落形态 (培养 72 h)
Fig.3 The colony morphology of F6 strain (Cultured 72 h)

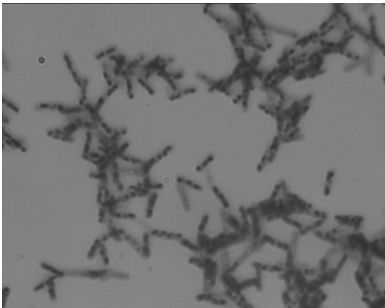


图 4 F6 菌株镜检涂片(1 600×)
Fig.4 F6 strain microscopic examination (1 600×)

表 1 F6 生理生化鉴定结果

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of isolate F6

项目 Experiment	结果 Result	项目 Experiment	结果 Result
葡萄糖 Glucose	+	O/F 试验 O/F test	+
果糖 Fructose	+	吡哌试验 Benzpyrole test	—
淀粉 Starch	—	MR 试验 MR test	+
甘露糖 Mannitose	+	硫化氢 Hydrogen sulfide	—
乳糖 Lactose	+	过氧化氢酶 Catalase	+
蜜二糖 Melibiose	—	脲酶 Urease	+
纤维二糖 Cellobiose	+	石蕊牛乳 Litmus milk	+
棉子糖 Raffinose	—	硝酸盐还原 Nitrate reduction	+
蔗糖 Sucrose	—	明胶水解 Gelatin hydrolyze	—
鼠李糖 Rhamnose	—	柠檬酸盐 Citrate	+
木糖 Xylose	—	三糖铁 Triple sugar iron	+
草糖 Trehalose	—	ONPG 试验 ONPG test	—
麦芽糖 Maltose	—	精氨酸脱羧酶 Arginine decarboxylase	+
脱氧核糖 Deoxyribose	+	鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	—
阿拉伯糖 Arabinose	—	赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	+
木醇 Methanol	—	精氨酸双水解酶 Arginine double hydrolase	—
侧金盏花醇 Adonitol	—	苯丙氨酸酶 Enzyme phenylalanine	—
卫矛醇 Dulcitol	—	pH 5.5	—
肌醇 Myoinositol	—	pH 9.5	—
山梨醇 Sorbitol	—	2% NaCl	+
甘露醇 Mannitol	+	5% NaCl	+
水杨素 Salicin	+	7% NaCl	+
七叶苷 Esculin hydrate	+	10% NaCl	—

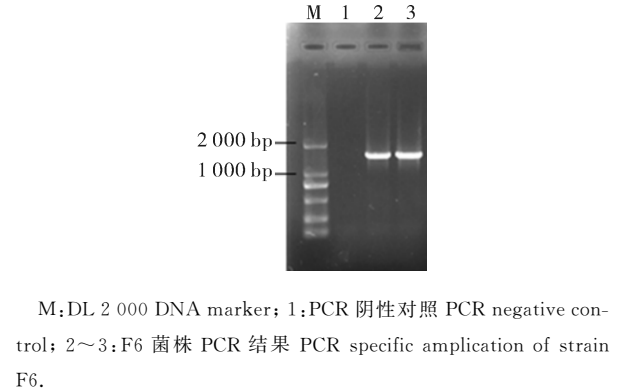


图 5 F6 菌液 PCR 电泳图

Fig.5 PCR specific amplification of strain F6

表 2 参考菌株信息

参考菌株 Reference strains	GenBank 登录号 GenBank accession No.
蔬菜芽胞杆菌分离株 11 <i>Bacillus oleronius</i> isolate 11	EU430987.1
蔬菜芽胞杆菌国际标准株 700005 <i>Bacillus oleronius</i> strain ATCC 700005	NR_043325.1
芽胞杆菌属 CL33 2.1.1 <i>Bacillus</i> sp. CL33 2.1.1	FJ688409.1
蔬菜芽胞杆菌 FHGXJ12-2 <i>Bacillus oleronius</i> strain FHGXJ12-2	KF527198.1
蔬菜芽胞杆菌 W22 <i>Bacillus oleronius</i> strain W22	KC441834.1
蔬菜芽胞杆菌 30N2-10 <i>Bacillus oleronius</i> strain 30N2-10	JN366727.1
蔬菜芽胞杆菌 55N3-2 <i>Bacillus oleronius</i> strain 55N3-2	JN366717.1
蔬菜芽胞杆菌 Gx8 <i>Bacillus oleronius</i> strain Gx8	JF833092.2
未纯化细菌克隆 CU21 Uncultured bacterium clone CU21	KC414647.1
蔬菜芽胞杆菌分离株 2 <i>Bacillus oleronius</i> isolate 2	EU430985.1

3)DNA 测序与序列分析。PCR 产物经上海生工生物有限公司测序得知,扩增出的片段长度为 1 456 bp,用 DNASTar 软件对 F6 菌株基因与 GenBank 中以公布的序列比对分析,生成系统发生树。由图 6、7 可知,F6 菌株与蔬菜芽胞杆菌 CL33 2.1.1、FHGXJ12-2、30N2-10 菌株属于同一分支,核苷酸同源性最高,分别为 99.7%、99.7%、99.3%,与另一分支的蔬菜芽胞杆菌 W22、CU21 的核苷酸同源性分别为 99.2%、99.2%,与蔬菜芽胞杆菌国际标准株 ATCC 700005 核苷酸同源性为99.3%。由此可确定,F6 菌株为蔬菜芽胞杆菌,命名为 *Bacillus oleronius* GX01(GenBank KP297896)。

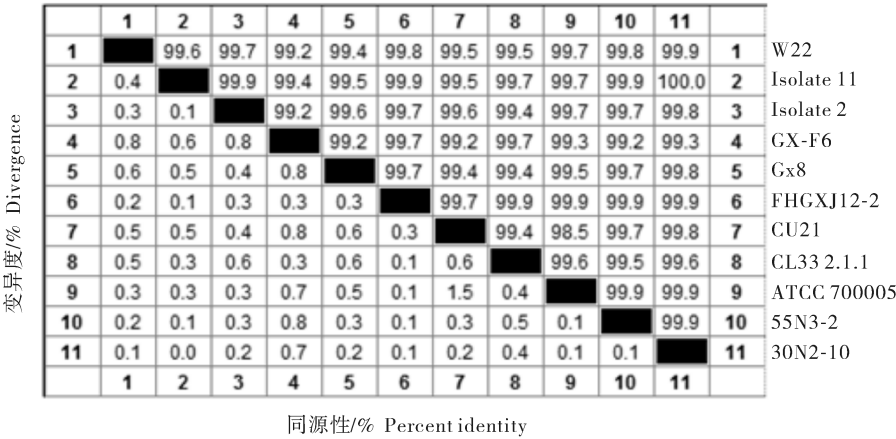


图 6 F6 菌株与参考株序列同源性分析

Fig. 6 Sequences homology analysis of strain F6 and reference strains

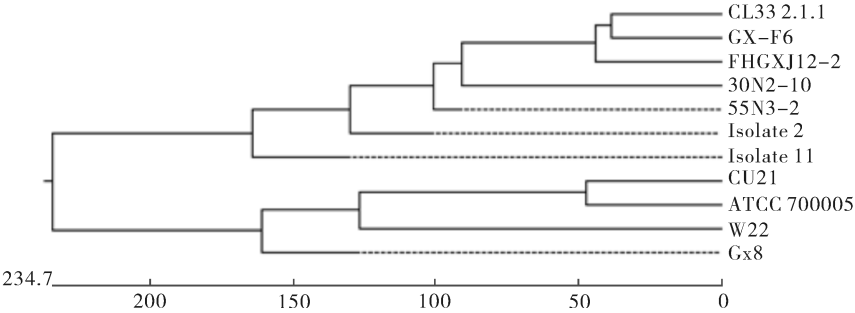


图 7 F6 基因系统发生树

Fig. 7 Neighbour-joining phylogenetic tree showing relationships of strain F6

2.4 F6 菌株降解特性

比较 F6 菌株的发酵菌液、上清液、菌悬液、胞内液降解 AFB1 的能力,如图 8 所示。结果发现菌液与去除胞体的上清液降解能力很强,分别达到 83.3%、83.0%,菌悬液与胞内液也有一定的降解能力,但相对较弱,分别为 22.8%、17.4%。由此判断,F6 菌株降解 AFB1 不是依赖胞体的吸附作用,

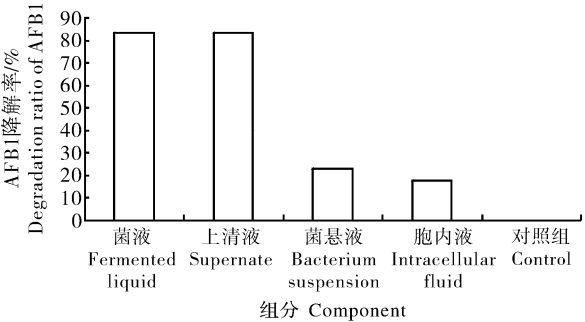


图 8 F6 各组分对 AFB1 的降解能力

Fig. 8 Degradation of AFB1 in each component of F6

而是细胞代谢产生并分泌至胞外的活性物质主导的生物降解作用。

3 讨论

AFB1 标准品毒性极强、对操作者有危险并且价格昂贵,所以在初步的定向筛选时,选取结构相似的香豆素作为唯一碳源。香豆素是一种可人工合成的化工原材料,较安全,价格低廉。黄曲霉毒素比较稳定,却没有在自然界无限积累,这是由于环境因素及微生物的降解作用。土壤中微生物资源丰富,污染物使土壤微生物产生选择性,进而富集有降解活性的微生物。孙玲玉等^[15]从泰山土壤中分离出高效降解 AFB1 的泰山枯草芽胞杆菌。动物消化道内的微生物具有降低毒素的吸收、降解毒素的能力,因此选取肠道、粪便筛选 AFB1 降解菌株。雷元培等^[16]从动物肠道分离株中筛选出的 1 株枯草芽胞

杆菌可高效降解黄曲霉毒素 B1、G1 和 M1。李俊霞等^[17]从马来貘粪便中筛得降解 AFB1 效果好的嗜麦芽窄食单胞菌。微生物降解 AFB1 的活性物质主要为其产生的降解酶, 根据其分泌后排放位置不同分为胞内酶和胞外酶。计成等^[18]分离纯化的黏细菌黄曲霉素解毒酶(MADE)是国内首次发现的降解黄曲霉毒素的细菌胞外酶。李超波等^[19]从施氏假单胞菌 F4 中分离出的 AFB1 降解活性物质为一种胞内酶。

本研究以香豆素作为唯一碳源, 共有 32 株菌能利用香豆素并生长良好。递增香豆素的培养浓度来驯化菌株, 使菌株分解氧杂萜邻酮的能力提高。构建 HPLC 检测 AFB1 方法, 结果表明 32 株菌都具有降解 AFB1 的能力, 分离于鸡粪的 F6 菌株降解率最高, 达 83.3%。通过细胞形态、理化鉴定及 16S rRNA 序列比对分析, 鉴定为蔬菜芽胞杆菌, F6 菌株命名为 *Bacillus oleronius* GX01 (登录号 KP297896)。目前国内没有关于蔬菜芽胞杆菌的报道, 这也是国内首次发现蔬菜芽胞杆菌能降解黄曲霉毒素。国外仅 Jarmuda 等^[20]报道该菌与蠕形螨的侵染致病作用有关。通过各组脱毒活性的比较, F6 菌株降解 AFB1 是菌体细胞代谢产生并分泌至胞外的活性物质主导的生物降解作用, 提示 F6 降解物质可能是一种胞外酶, 为今后该菌株降活性物质的分离纯化、大规模生产并应用于饲料脱毒奠定基础。

参 考 文 献

- [1] LEONTOPOULOS D, SIAFAKA A, MARKAKI P. Black olives as substrate for *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin B1 production[J]. Food Microbiology, 2003, 20(1): 119-126.
- [2] GROOPMAN J D, WOGAN G N. Aflatoxin and hepatocellular carcinoma[C]// PENNING T M. Chemical Carcinogenesis. SI: Humana Press, 2011: 113-133.
- [3] BATA Á, LÁSZTITY R. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms[J]. Trends in Food Science & Technology, 1999, 10(6): 223-228.
- [4] ONO E Y S, ONO M A, FUNO F Á Y, et al. Evaluation of fumonisin-aflatoxin co-occurrence in Brazilian corn hybrids by ELISA[J]. Food Additives & Contaminants, 2001, 18(8): 719-729.
- [5] TRIPATHI S, MISHRA H N. Studies on the efficacy of physical, chemical and biological aflatoxin B1 detoxification approaches in red chilli powder[J]. International Journal of Food Safety, Nutrition and Public Health, 2009, 2(1): 69-77.
- [6] NESBITT B F, O'KELLY J, SARGEANT K, et al. *Aspergillus flavus* and turkey X disease. Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*[J]. Nature, 1962, 195: 1062-1063.
- [7] JUAN C, ZINEDINE A, MOLTO J C, et al. Aflatoxins levels in dried fruits and nuts from Rabat-Salé area, Morocco[J]. Food Control, 2008, 19(9): 849-853.
- [8] 操庆国, 郭钦. 微生物降解黄曲霉毒素前景展望[J]. 粮油加工, 2009(3): 87-91.
- [9] 左振宇, 刘大岭, 胡亚冬, 等. 密码子优化的重组黄曲霉素解毒酶(rADTZ)在毕氏酵母中组成型分泌表达的研究[J]. 中国农业科技导报, 2007, 9(5): 87-94.
- [10] 李冰, 董征英, 常维山. 黑曲霉对黄曲霉毒素 B1 的降解及应用研究[J]. 饲料博览, 2013(11): 6-10.
- [11] ALBERTS J F, GELDERBLOM W C A, BOTHA A, et al. Degradation of aflatoxin B1 by fungal laccase enzymes[J]. International Journal Food Microbiology, 2009, 135(1): 47-52.
- [12] 刘丁. 萎缩芽孢杆菌(*Bacillus atrophaeus*)抑制黄曲霉的作用研究[D]. 雅安: 四川农业大学图书馆, 2013.
- [13] DOWN P F, VEGA F E, NELSEN T C, et al. Dusky sap beetle mediated dispersal of *Bacillus subtilis* to inhibit *Aspergillus flavus* and aflatoxin production in maize *Zea mays* L. [J]. Bio-control Science Technology, 1998, 8(2): 221-235.
- [14] HORMISCH D, BROST, KOHRING G W, et al. *Mycobacterium fluorantheneivorans* sp. nov., a fluoranthene and aflatoxin B1 degrading bacterium from contaminated soil of a former coal gas plant[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2004, 27(6): 653-660.
- [15] 孙玲玉, 李超, 郝海玉, 等. 泰山枯草芽孢杆菌的分离鉴定及其对黄曲霉毒素 B1 的降解研究[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(8): 246-250.
- [16] 雷元培, 赵丽红, 马秋刚, 等. 降解黄曲霉毒素枯草芽孢杆菌的解毒性、抗菌性及抗逆性研究[J]. 饲料工业, 2012, 32(24): 23-27.
- [17] 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.
- [18] 计成, 赵丽红. 黄曲霉毒素生物降解的研究及前景展望[J]. 动物营养学报, 2010, 22(2): 241-245.
- [19] 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.
- [20] JARMUDA S, MCMAHON F, ZABA R, et al. Correlation between serum reactivity to Demodex-associated *Bacillus oleronius* proteins, and altered sebum levels and Demodex populations in erythematotelangiectatic rosacea patients[J]. Journal of Medical Microbiology, 2014, 63(2): 258-262.

Isolation, identification and preliminary degradation of
aflatoxin B1 degrading bacterial strain

GUAN Xin¹ HE Jianbin¹ DONG Shuang¹ ZANG Jian² LONG Miao¹

1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shenyang Agricultural University,
Shenyang 110866, China;

2. Analysing and Testing Center of Shenyang Agricultural University,
Shenyang 110866, China

Abstract To select strains capable of degrading aflatoxin B1 (AFB1) efficiently, 32 bacteria strains were isolated from different sources which display AFB1 reduction activity, using coumarin as the sole carbon source and biodegradation technology. AFB1 degradation effectiveness was detected by high-performance liquid chromatography (HPLC) after AFB1 standard was added (final concentration of culture supernatant was 2.5 $\mu\text{g/mL}$). The bacteria strain isolated from chicken manure was named as F6, which could degrade AFB1 by 83.3%. Based on the morphologic, physiological, biochemical characteristics, the isolated strain F6 was preliminary identified as *Bacillus*. The analysis of 16S rRNA gene sequence homology revealed that, the nucleotide identity between strain F6 and *Bacillus oleronius* international standard strain ATCC700005 (accession number NR043325.1) was 99.3%. Thus, strain F6 was determined as *B. oleronius* and named as *B. oleronius* GX01 (Accession No. KP297896). The components of the fermentation broth of F6 were then isolated and detected. The results showed that the culture supernatant could degrade 83% AFB1, while the degradation rates of bacterial suspension and intracellular were 22.8% and 17.4%, respectively, suggesting that the degradation activity of *B. oleronius* strain F6 was exoenzyme.

Keywords aflatoxin B1; biodegradation; *Bacillus oleronius*; isolate; identification

(责任编辑:边书京)