

文章编号:1000-8551(2013)02-0208-05

七种培养基对黄曲霉分离效果的比较

张初署^{1,2} 刘 阳¹ 邢福国¹ 杨庆利² 杨勃扬¹(¹中国农业科学院农产品加工研究所,北京 100081; ²山东省花生研究所,山东 青岛 266100)

摘要:为了筛选出适宜黄曲霉分离的培养基,比较了7种常用于霉菌分离的培养基对10个花生土壤样品的黄曲霉分离效果,这7种培养基为氯硝胺18%甘油培养基(DG18)、高盐察氏培养基(SCDA)、马铃薯琼脂培养基(PDA)、改良的孟加拉红培养基(M-RB)、YES培养基、孟加拉红培养基(RB)、氯硝胺孟加拉红琼脂(DRBC)。研究发现7种培养基对黄曲霉菌培养效果差别很大,培养效果最好的是DG18,黄曲霉的培养数是PDA的7.3倍。同时DG18能很好的抑制毛霉的生长,与DRBC培养基相比,能抑制81%的毛霉菌生长。因此DG18培养基能最大限度的保证黄曲霉的生长分离,同时也能更好地抑制毛霉的生长,更适用于黄曲霉种群、遗传方面的研究应用。

关键词:黄曲霉菌;土壤;分离

Comparison of Seven Media for the Isolation of *Aspergillus Flavus* Group

ZHANG Chu-shu^{1,2} LIU Yang¹ XING Fu-guo¹ YANG Qing-li² YANG Bo-yang¹(¹ Institute of Agro-products processing and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081;² Shandong Peanut Research Institute, Qingdao 266100)

Abstract: Seven agar media used to isolate mould were compared for utility in isolating the *Aspergillus flavus* from peanut-cropped soils. The seven agar media were Dicloran 18% glycerol medium salt capek Dox agar, Patato dextrose agar medium, Modified Rose Bengal medium, YES medium, Rose Bengal medium, Dicloran Rose Bengal medium. The results showed that seven media have apparent difference on isolating *Aspergillus flavus*. DG18 was the most suitable medium for studying the population biology of this group because it permitted both identification of the greatest number of *Aspergillus flavus* group strains and growth of the fewest competing fungi. DG18 supported about 7.3 times more *Aspergillus flavus* colonies than the PDA while reducing the number of mucorales colonies by 81% than the DRBC. So DG18 should be the most useful for studies on the population biology of the *Aspergillus flavus* group.

Key words: *Aspergillus flavus*; Soil; Isolation

黄曲霉菌群在自然界中分布很广,常常存在于土壤和其它基质中,并能随之侵染粮食、油料作物的种子、食品及饲料,有些菌株侵染这些基质后能产生黄曲霉毒素。据报道黄曲霉毒素可使人类和多种动物诱发实验性肝癌,是目前已发现的最强的化学致癌物,此外黄曲霉毒素还是一种剧毒物,其急性毒性为砒霜的68

倍,氰化钾的10倍,可在短期内使肝脏严重受损而造成死亡^[1]。据统计,全世界每年平均有2%的谷物由于黄曲霉污染而不能食用^[2]。

由于黄曲霉毒素对经济和社会造成重大危害,对黄曲霉毒素产生菌的种群结构研究已成为国内外研究热点^[3]。已鉴定出一些不同的黄曲霉菌株,同时研究发现黄曲霉所占的比例不同会影响其感染能力^[4]。

收稿日期:2012-07-12 接受日期:2012-11-28

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(201203037);国家科技支撑计划(2012BAK17B13)

作者简介:张初署(1981-),女,山东泰安人,博士研究生,研究方向为食品安全控制。E-mail: zcs.2003@163.com

通讯作者:刘阳(1965-),男,辽宁本溪人,研究员,博士生导师,研究方向为粮油真菌毒素的防制与脱毒。Tel: 010-62815874

Barros G 等^[5]对阿根廷花生土壤真菌曲霉属的种群结构研究发现黄曲霉是优势种群;其它研究表明用不产毒的黄曲霉可以抑制产毒菌的生长,减少产毒菌的数量,降低产毒菌的侵染能力。所有这些研究,都涉及到黄曲霉种群问题。然而对黄曲霉种群研究时,植物或土壤中存留有其它微生物会影响其分离及计数,故适宜培养基的选择至关重要。

本研究选择 7 种常用于霉菌分离计数的培养基对中国 10 个花生种植地土壤样品分离黄曲霉菌的效果进行比较,筛选出适宜黄曲霉分离和种群研究的培养基,为黄曲霉的研究及其毒素的控制提供技术支持。

1 材料与方 法

1.1 培养基制备

1.1.1 氯硝胺 18% 甘油培养基(DG18 培养基) 酪蛋白胨 5.0g,无水葡萄糖 10.0g,磷酸二氢钾 1.0g,硫酸镁 0.5g,氯硝胺 0.002g,琼脂 15.0g,氯霉素 0.1g,用蒸馏水 1000mL 溶解,再加入 200.0g 的甘油,混匀,121℃ 灭菌。

1.1.2 高盐察氏培养基 硝酸钠 2.0g,磷酸二氢钾 1.0g,七水合硫酸镁 0.5g,氯化钾 0.5g,硫酸亚铁 0.01g,氯化钠 60.0g,蔗糖 30.0g,琼脂 20.0g,蒸馏水 1000mL,121℃ 灭菌 20min。

1.1.3 马铃薯琼脂培养基(含氯霉素)(PDA) 购于青岛海博生物技术有限公司。其配方(L⁻¹)为马铃薯粉 6.0g,葡萄糖 20.0g,氯霉素 0.1g,琼脂 20.0g。

1.1.4 改良的孟加拉红培养基(M-RB)^[6] 3.0g 蔗糖,3.0g 硝酸钠,0.3g 磷酸二氢钾,0.7g 磷酸氢二钾,0.5g 七水合硫酸镁,0.5g 氯化钾,10.0g 氯化钠,20.0g 琼脂粉,50.0mg 氯霉素,微量营养物质,抗生素。

培养基配制:蔗糖、无机盐和微量营养物质以及 5.0mL 的孟加拉红溶于一定体积的去离子水中,调节 pH 值至 6.5,加入琼脂,加热搅拌直至溶解,然后加入氯霉素,121℃ 灭菌 15min,培养基放凉至 50~60℃,然后加入氯硝胺(10mg·L⁻¹)和链霉素(50mg·L⁻¹),5~10min 后到平板(15~20mL/个)。

微量营养元素:每 1L 0.7mg 硼砂,0.5mg 钼酸铵,10.0mg 硫酸铁,0.3mg 五水硫酸铜,0.11mg 一水硫酸锰,17.5mg 七水硫酸锌。微量元素用 pH 为 2.0(用 HCL 调)溶解。在灭菌前将 1mL 微量营养元素溶液加入到 1L 培养基上。

氯硝胺溶液:0.25g 氯硝胺溶解在 10mL 丙酮中,

再用丙酮定容至 25mL。

孟加拉红溶液:0.5g 孟加拉红溶于 30mL 95% 的乙醇中,用蒸馏水定容至 100mL。

链霉素溶液:1.0g 硫酸链霉素用蒸馏水溶解定容至 100mL,用前过滤。

氯霉素液:2.5g 氯霉素用 95% 乙醇溶液溶解,再用 95% 的乙醇定容至 100mL。

链霉素和微量元素溶液保存到 -15~-10℃ 中。

1.1.5 YES 培养基(L⁻¹)^[7] 酵母提取物 1.0g,蔗糖 10.0g,氯化钠 60.0g,琼脂 20.0g,灭菌后加入 7.0mg 五水硫酸铜,10.0mg 的硫酸锌,20.0mg 氯硝胺,链霉素 100.0mg。

1.1.6 孟加拉红培养基(RB, L⁻¹) 蛋白胨 5.0g,葡萄糖 10.0g,磷酸二氢钾 1.0g,硫酸镁 0.5g,琼脂 20.0g,1/3000 孟加拉红溶液 100mL,蒸馏水 1000mL,氯霉素 0.1g。上述各成分加入蒸馏水中溶解后,再加孟加拉红溶液。另用少量乙醇溶解氯霉素,加入培养基中,121℃ 灭菌 20min。

1.1.7 DRBC 琼脂培养基(DRBC, L⁻¹) 购于青岛海博生物技术有限公司。用于食品中霉菌和酵母菌的分离,其配方为 3 号月示豚 5.0g,葡萄糖 10.0g,磷酸二氢钾 1.0g,氯硝胺 2.0mg,硫酸镁 0.5g,虎红 25.0mg,琼脂 15.0g。

1.2 土壤样品的采集

于 2011 年分别在广东、湖北、山东的 10 个花生种植地采样点采集土壤样品。每个采样点距离在 100km 以外。每个采样点采集 1 个样品。样品(100g)在 10×10m 的范围内按对角线法取 5 个子样品(2cm 宽,5cm 深的土壤),混合作为一个样品。将采集的样品装进塑料袋中,扎些针孔以有利于气体交换,运至实验室,放于 4℃ 保存。

1.3 七种培养基对土壤中黄曲霉分离效果的比较

取 10 克土样,加入 90mL 0.1% 蛋白胨无菌水(w/v),在摇床震荡 30min,取 0.1mL 菌液,涂布在 7 种培养基上,30℃ 黑暗培养 5~7d,每种培养基 6 个平行。挑取黄曲霉在 AFPA 培养基上进行黄曲霉菌株的鉴定。记录每个平板上黄曲霉、毛霉和真菌的数量。分别计算出 1g 土壤样品各微生物在 7 种培养基上的菌落数。

2 结果与分析

将 10 个土壤样品的菌悬液分别涂布在 7 种培养基上,30℃ 黑暗培养 5~7d,分别记录平板上的黄曲

霉、毛霉和总的真菌菌落数,得到每 1g 土壤样品中菌落数($\text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}$),结果见表 1、表 2 和表 3。

表 1 7 种培养基对土壤中黄曲霉培养效果的比较

Table 1 Population levels of *Aspergillus flavus* in diverse soils with seven media ($\text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}$)

样品 Sample	采样地 Collected site	DG18	高盐 SCDA	PDA	M-RB	YES	RB	DRBC
1	山东	50a	100a	33a	50a	17a	33a	67a
2	山东	350bc	400c	17a	233bc	367bc	183ab	283bc
3	湖北	750d	450bc	33a	267b	617cd	50a	350b
4	湖北	483cd	450cd	0a	600d	517d	167ab	333bc
5	湖北	716d	416bc	200ab	367abc	500cd	133a	417bc
6	湖北	900b	883b	233a	1267c	916b	1283c	1300c
7	广东	283d	183bc	83 ab	183bc	167abc	17a	167abc
8	广东	617c	533bc	0a	567bc	533bc	300b	350bc
9	广东	350cd	467d	0a	317cd	416cd	50ab	233bc
10	广东	117a	50a	33a	83a	100a	117a	50a
平均 Mean		462	393	63	393	415	233	355

DG18 代表氯硝胺 18% 甘油培养基;SCDA 代表高盐察氏培养基;PDA 代表马铃薯葡萄糖琼脂培养基;M-RB 代表改良的孟加拉红培养基;YES 代表 YES 培养基;RB 代表孟加拉红培养基;DRBC 代表氯硝胺孟加拉红培养基。a, b, c, d 为显著性分析所得,字母相同代表没有显著性差异,不相同代表有显著性差异。下同

从表 1 可以看出,7 种培养基对黄曲霉菌培养效果差别很大,效果最好的是 DG18 培养基,每克土壤中能培养出来的黄曲霉菌落数为 462cfu,而 PDA 培养基的培养效果差,每克土壤中能培养出来的黄曲霉菌落数为 63cfu,黄曲霉的培养数 DG18 是 PDA 的 7.3 倍。DG18 培养基所选用的酪蛋白胨能提供黄曲霉生长所需的碳源和氮源,除加了氯霉素抑制细菌的生长,氯硝胺抑制霉菌菌落的蔓延生长外,还加了甘油,使培养基维持较低的渗透压,因此 DG18 培养基用于常用于培养干燥食品和半干燥食品中耐旱霉菌的低水活性的选择性培养基,且黄曲霉比其他霉菌更耐旱。因此 DG18 培养基更适宜于黄曲霉的生长。表 2 也表明 DG18 培养基能很好的抑制毛霉的生长,土壤中能培养出毛霉

菌落数为 $75\text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ 。而 DRBC 培养基毛霉的菌落数最多,为 $392\text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}$,与 DRBC 相比,DG18 培养基能抑制 85% 的毛霉菌生长。表 3 为 7 种培养基对土壤中真菌的培养效果,表 3 的结果表明,除 YES 和 PDA 培养基培养的真菌数量较少外,其他 5 种培养基培养的真菌数量差异不大。DG18 培养基对土壤真菌的培养数为 $8765\text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}$,是由于这种培养基比较适宜酵母的生长,在实验中发现,培养基上长了很多酵母菌,但酵母菌落很少和黄曲霉菌菌落重叠在一块,基本不会增加黄曲霉的分离纯化难度。

从 7 种培养基对黄曲霉的培养效果和抑制毛霉菌的生长分析,DG18 培养基能最大限度的保证黄曲霉的生长分离,同时也能更好的抑制毛霉的生长,更适用

表 2 7 种培养基对土壤中毛霉培养效果的比较

Table 2 Population levels of *mocur* in diverse soils with seven media ($\text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}$)

样品 Sample	采样地 Collected site	DG18	高盐 SCDA	PDA	M-RB	YES	RB	DRBC
1	山东	17a	0a	300bc	383c	16a	183b	317bc
2	山东	83a	83a	167a	350b	350b	50a	50a
3	湖北	333a	300a	83	800b	367a	317a	367a
4	湖北	183ab	67a	533ab	333abc	167ab	583c	450bc
5	湖北	0a	200ab	50a	633c	0a	283b	633c
6	湖北	0a	0a	83ab	433c	0a	183a	333c
7	广东	17a	0a	550a	433	433b	616c	650c
8	广东	17a	0a	-	158b	0a	-	400b
9	广东	50a	183ab	-	266c	260c	-	367bc
10	广东	50a	0a	483b	0a	0a	66a	350b
平均 Mean		75	83	281	379	159	285	392



图 1 黄曲霉菌在 DG18 培养基上的菌落形态

Fig. 1 The colony morphology of *Aspergillus flavus* on DG18

于黄曲霉种群的研究。图 1 为黄曲霉菌在 DG18 培养基上的菌落形态,从图中可以看出,黄曲霉在 DG18 上产生明显的黄绿色孢子,很容易辨认。Barros^[8]和 Pildain^[9]等都将 DG18 用于黄曲霉分离、种群和遗传研究。YES 培养基对土壤中黄曲霉的培养效果仅次于 DG18,为 $415\text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}$,马忠华等^[7]曾用 YES 培养基分离花生土壤中的黄曲霉。由表 2 显示 YES 培养基对毛霉的抑制效果不如 DG18,毛霉的生长率是 DG18 的

2 倍,但表 3 的结果显示 YES 培养基对抑制土壤中其他真菌的效果要明显好于 DG18 培养基,因此 YES 培养基可以应用于毛霉较少、竞争性真菌较多的样品黄曲霉的培养分离。

M-RB 培养基和高盐察氏培养基对黄曲霉的培养效果相同,为 $393\text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ 土壤。M-RB 培养基是 Cotty PJ^[4,6]研制出来的分离黄曲霉的培养基,是对孟加拉红琼脂进行了改良,以硝酸盐作为唯一的碳源,同时添加链霉素和氯硝胺来抑制细菌和毛霉菌的生长已用于对土壤中麦曲要菌的分离^[10]。Cotty^[6]比较了 M-RB、CZ-RB 琼脂、BC-RB 琼脂和 AFPA 琼脂对黄曲霉的分离效果,结果表明改良的孟加拉红培养基比未改良的孟加拉红培养基黄曲霉的培养率高,而对毛霉菌和其他真菌的培养率低。本试验也得出相同的实验结果,改良的孟加拉红培养基(M-RB)对土壤黄曲霉的培养数是未做改良的孟加拉红培养基(CZ-RB)的 1.69 倍。但 Cotty 只比较了 4 种培养基,且主要是孟加拉红培养基。本实验的研究表明 DG18 培养基和 YES 培养基比 M-RB 培养基对黄曲霉的培养效果好,培养率分别比 M-RB 高出 17% 和 5%,对毛霉的培养率分别减少 80.2% 和 58%。

表 3 七种培养基对土壤中真菌培养效果的比较

Table 3 Population levels of fungus in diverse soils with seven media

($\text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}$)

样品 Sample	采样地 Collected scite	DG18	高盐 SCDA	PDA	M-RB	YES	RBe	DRBC
1	山东	4933b	8666b	1434a	10000b	1434a	7266b	12066b
2	山东	2116a	2103a	1066a	4266bc	2333ab	5866c	8534d
3	湖北	6934ab	7333ab	3934a	15466d	9866bc	13134cd	14133cd
4	湖北	10934c	7534b	1634a	5067ab	3600a	7866bc	15200d
5	湖北	7600cd	9466bc	2300a	10800cd	5734ab	14266f	12534df
6	湖北	10266c	6566b	1667a	7700b	2600a	12000cd	13000d
7	广东	23200c	35066d	-	7166a	3900a	10000ab	15000b
8	广东	9900c	6133b	-	1800a	1113a	-	11400d
9	广东	6166bc	7366c	-	5534b	3600a	-	3600a
10	广东	5600c	3566b	700a	2933b	1000a	3533b	5000c
平均 Mean		8765	9380	1819	7073	3518	9241	10147

高盐察氏培养基主要用于真菌的培养,由于加入了高浓度的氯化钠,可以抑制微生物菌的生长。由表 1 可以看出,对 10 个样品黄曲霉的平均培养数 $393\text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}$,黄曲霉的培养效果不如 DG18 和 YES 培养基,但对毛霉的抑制效果较好,毛霉数为 $83\text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}$,对

毛霉的抑制效果仅次于 DG18。

DRBC 培养基一般用于食品中霉菌和酵母菌的分离培养,也有学者将 DRBC 培养基用于黄曲霉的分离^[8]。从表 1 可以看出 DRBC 对 10 个土壤样品中黄曲霉的平均培养数为 $355\text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}$,比 DG18、YES、高盐

察氏、M-RB 培养基都低;且 DRBC 培养基不能很好的抑制毛霉菌的生长,毛霉数为 $392\text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}$,数量最多,增加黄曲霉分离纯化的困难。

PDA 培养基是一种常用的培养基,宜培养酵母菌、霉菌、蘑菇等真菌。Reddy 等^[11]曾用 PDA 培养基分离大米中的黄曲霉菌。从本实验的研究结果看,PDA 培养基对黄曲霉的培养效果最差,黄曲霉数为 $63\text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}$,仅为 DG18 的 16%。且 PDA 培养基由于营养丰富,在实验培养过程中,酵母、毛霉和黑曲霉几乎长满整个平板,不利于黄曲霉的培养和分离。

3 讨论

培养基是人工配制的适合微生物生长繁殖或积累代谢产物的营养基质。任何培养基中均需含有微生物所必须的能源、碳源、氮源、矿质元素、水和生长因素,但不同营养类型、不同种类的微生物对营养元素的要求又有很大差异,特别是对复杂体系中特定微生物的分离,选择适宜的培养基尤为重要。黄曲霉是半知菌类丛梗孢目曲霉属的真菌,为温暖地区常见的优势的霉菌,广泛存在于土壤、灰尘、植物及其果实上。本研究通过 7 种培养基对土壤中黄曲霉分离效果的比较,发现黄曲霉具有很强的生长能力,既能在低水分活度的培养基(DG18 培养基)上强势生长,也能在高盐分的培养基(高盐察氏培养基和 YES 培养基)上生长旺盛,而上述培养基则能很好的抑制毛霉菌的生长,毛霉能在培养基上广泛蔓延,无假根或匍匐菌丝,如果不能抑制毛霉的生长,毛霉会长满整个平板,抑制黄曲霉的生长,因此,对于黄曲霉的分离,应选择低水分或者高盐的培养基为宜。

4 结论

通过 7 种常用于霉菌分离的培养基对 10 个土壤样品的黄曲霉分离效果的比较,发现 7 种培养基对黄曲霉菌培养效果差别很大,培养效果最好的是 DG18,

培养的黄曲霉数是 PDA 的 7.3 倍。同时 DG18 能很好地抑制毛霉的生长,与 DRBC 培养基相比,能抑制 81% 的毛霉菌生长。DG18 培养基能最大限度的保证黄曲霉的生长分离,同时也能更好地抑制毛霉的生长,更适用于黄曲霉种群、遗传方面的研究应用。

参考文献:

- [1] 秦文彦. 潜藏性产黄曲霉毒素真菌的多重 PCR 检测体系构建及真菌 DNA 提取技术的改进[D]. 杭州:浙江大学,2007
- [2] 丁小霞. 中国产后黄曲霉毒素污染与风险评估方法研究[D]. 北京:中国农业科学院,2011
- [3] Griffin G J, Smith E P, Robinson T J. Population patterns of *Aspergillus flavus* group and *A. niger* group in field soils [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2001, 33: 253 - 257
- [4] Cotty P J. Variability within *Aspergillus flavus* populations influence aflatoxin contamination [J]. Proceeding of the Beltwide Cotton Production Conference, 1991, 345
- [5] Barror G G. Genetic diversity within *Aspergillus flavus* strains isolated from peanut-cropped soils in Argentina [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2006, 38: 145 - 152
- [6] Cotty P J. Comparison of four media for the isolation of *Aspergillus flavus* group fungi [J]. Mycopathologia, 1994, 125: 157 - 162
- [7] 马忠华, 蒋金花, 尹蕾艳, 尹燕妮. 一种不产黄曲霉毒素的黄曲霉菌株及其用途, CN 101363006 B[P], 2010
- [8] Barror G. G., Torres A., Chulze S. *Aspergillus flavus* population isolated from soil of Argentina's peanut-growing region. Sclerotia production and toxigenic profile [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2005, 85: 2349 - 2353
- [9] Pildain M B, Vaamonde G, Cabral D. Analysis of population structure of *Aspergillus flavus* from peanut based on vegetative compatibility, geographic origin, mycotoxin and sclerotia production [J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 93: 31 - 40
- [10] Ehrlich K C, Kobbeman K, Beverly G. Aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Thailand [J]. International Journal of Food Microbiology 2007, 114: 153 - 159
- [11] Reddy K R N, Surendhar Ch, Reddy P, Kumar N. Genetic variability of aflatoxin B1 producing *Aspergillus flavus* strains isolated from discolored rice grains [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009, 25: 33 - 39