

## 湖北省典型花生种植区土壤中 黄曲霉菌分布及产毒力研究

朱婷婷<sup>1 2 3</sup> 陈琳<sup>1 2 3</sup> 岳晓凤<sup>1 2 3</sup> 白艺珍<sup>1 2 3</sup> 丁小霞<sup>1 2 3 4 5\*</sup> 李培武<sup>1 2 3 4 5\*</sup> 张奇<sup>1 2 3 4 5</sup> 张文<sup>1 3 4 5</sup>

(1. 中国农业科学院油料作物研究所 湖北 武汉 430062; 2. 农业农村部油料产品质量安全风险评估实验室

(武汉) 湖北 武汉 430062; 3. 农业农村部生物毒素检测重点实验室 湖北 武汉 430062;

4. 国家农业检测基准实验室(生物毒素) 武汉 430062; 5. 农业农村部油料及制品质量监督检验测试中心 湖北 武汉 430062)

**摘要:** 为掌握湖北省花生种植区土壤中黄曲霉菌的分布和产毒特征,从罗田、红安、钟祥、襄阳四个典型花生种植区采集土壤样品 40 份,并进行黄曲霉菌分离、鉴定和产毒力研究。研究结果表明:湖北省不同花生种植区共分离鉴定到黄曲霉菌 51 株,土壤中黄曲霉菌落数为 127.5 cfu/g。不同种植区土壤中黄曲霉菌分布存在显著差异,钟祥土壤中黄曲霉菌落数最高,罗田最低;鉴定获得黄曲霉菌株中产毒菌株占 96%,产毒量范围 0 ~ 227.81 μg/L,不产毒菌株占 4%;产毒菌株分为只产 AFB<sub>1</sub>、产 AFB<sub>1</sub> + AFB<sub>2</sub>、产 AFB<sub>1</sub> + AFB<sub>2</sub> + AFG<sub>1</sub> 和产 AFB<sub>1</sub> + AFB<sub>2</sub> + AFG<sub>1</sub> + AFG<sub>2</sub> 毒素 4 种类型,其中以产 AFB<sub>1</sub> + AFB<sub>2</sub> 的菌株占比最高,为 65%;不同种植区黄曲霉菌株产毒力研究发现,钟祥每克土壤中黄曲霉菌产 AFB<sub>1</sub> 的量最高,达 11 679.70 μg/L。本研究可为湖北花生黄曲霉毒素污染预警和防控提供理论依据。

**关键词:** 花生; 土壤; 黄曲霉菌; 湖北省; 分布; 产毒力

中图分类号: S432.1 文献标识码: A 文章编号: 1007 - 9084(2019)02 - 0255 - 06

### Distribution , aflatoxin production of *Aspergillus flavus* in soils of typical peanut planting area in Hubei Province

ZHU Ting - ting<sup>1 2 3</sup> , CHEN Lin<sup>1 2 3</sup> , YUE Xiao - feng<sup>1 2 3</sup> , BAI Yi - zhen<sup>1 2 3</sup> ,  
DING Xiao - xia<sup>1 2 3 4 5\*</sup> , LI Pei - wu<sup>1 2 3 4 5\*</sup> , ZHANG Qi<sup>1 2 3 4 5</sup> , ZHANG Wen<sup>1 2 3 4 5</sup>

(1. Oil Crops Research Institute of the Chinese Academy of Agriculture , Wuhan 430062 , China; 2. Laboratory of Risk Assessment for oilseeds Products( Wuhan) , Ministry of Agriculture and Rural Affairs , Wuhan 430062 , China; 3. Key Laboratory of Detection for Mycotoxins , Ministry of Agriculture and Rural Affairs , Wuhan 430062 , China; 4. National Agricultural Testing Benchmark Laboratory ( Biotoxin ) , Wuhan 430062 , China; 5. China Quality Inspection and Test Center for Oilseeds Products , Ministry of Agriculture and Rural Affairs , Wuhan 430062 , China)

**Abstract:** To study the occurrence and distribution of aflatoxin by *Aspergillus flavus* in soils , samples from the typical peanut areas in Hubei Province were collected. In total 40 soil samples from Luotian , Hongan , Zhongxiang and Xiangyang were collected for *A. flavus* isolation , identification and aflatoxin detection. Results showed that 51 strains were isolated from the 4 areas. The population density of *A. flavus* was 127.5 cfu/g in one gram soil. But the population of *A. flavus* in soils of different peanut areas were significantly different. The highest populations of *A. flavus* colonies were found in Zhongxiang , and those from Luotian were the lowest. Among the strains , aflatoxigenic strains accounted for 96% , with AFT content of 0 - 227.81 μg/L , and atoxigenic strains was 4% . There were 4 types of aflatoxigenic strains , which were strains only producing AFB<sub>1</sub> , strains producing AFB<sub>1</sub> + AFB<sub>2</sub> , strains producing AFB<sub>1</sub> + AFB<sub>2</sub> + AFG<sub>1</sub> and strains producing AFB<sub>1</sub> + AFB<sub>2</sub> + AFG<sub>1</sub> + AFG<sub>2</sub>. Among them , strains

收稿日期: 2017-12-02

基金项目 “十三五”国家重点研发计划(2017YFC1601201); 国家自然科学基金(31601573、31701726)

作者简介: 朱婷婷(1991 - ) ,女,山东临沂人,硕士研究生,研究方向为农产品质量安全风险评估, E - mail: m15963982330@163.com

\* 通讯作者: 丁小霞(1978 - ) ,女,副研究员,博士,硕士生导师,主要从事农产品质量安全风险评估, E - mail: dingxiaoxia@cass.cn

李培武(1961 - ) ,男,研究员,博士,博士生导师,主要从事农产品质量安全标准与检测技术研究, E - mail: peiwuli@oilcrops.cn

producing AFB<sub>1</sub> + AFB<sub>2</sub> accounted for the highest proportion, reaching 65%. Studies on aflatoxin production in different planting areas found that the highest amount of AFB<sub>1</sub> contamination per gram of soil was in Zhongxiang, reaching 11 679.70 μg/L. This study provided a theoretical base for predicting and controlling of aflatoxin contamination in typical peanut planting areas in Hubei Province.

**Key words:** peanut; soil; *Aspergillus flavus*; Hubei Province; distribution; aflatoxin production

花生是我国重要的油料和经济作物,在保障植物油脂和蛋白质供给、提高农业生产效益中居重要地位。2016年我国花生种植面积为472.9万公顷,花生产量达到1729万吨。花生种植面积占世界总种植面积的20%,居第2位;产量占世界总产量的40%,居第1位<sup>[1-3]</sup>。然而花生极易遭受黄曲霉毒素的污染,严重威胁消费安全、产业安全以及对外出口贸易<sup>[2]</sup>。1960年英国“火鸡X病”事件爆发,黄曲霉毒素污染问题受到了广泛关注<sup>[4]</sup>。

黄曲霉毒素(aflatoxin, AFT)主要是由黄曲霉菌(*Aspergillus flavus*)、寄生曲霉菌(*A. parasiticus*)、集峰曲霉菌(*A. nanius*)、黑曲霉菌(*A. niger*)和溜曲霉菌(*A. tamarii*)等真菌产生的一类具有二氢呋喃环结构的次级代谢产物<sup>[5,6]</sup>,其中以黄曲霉菌和寄生曲霉菌分布和研究最为广泛。黄曲霉菌主要分布在亚热带和温带地区,而高纬度地区如我国东北地区黄曲霉菌数量相对较少<sup>[7,8]</sup>。黄曲霉菌对环境要求不高,最适生长温度和产毒温度不一致<sup>[9]</sup>,产毒类型主要为B族黄曲霉毒素<sup>[9,10]</sup>。寄生曲霉菌在我国分布相对较少<sup>[11]</sup>,其菌株能产生B族和G族黄曲霉毒素<sup>[10]</sup>。

花生作为一种地上开花地下结果的作物,果针下扎土壤后,发育中的花生荚果与土壤中腐生的黄曲霉菌直接接触,受土壤中黄曲霉菌的侵染机率较大<sup>[12]</sup>。研究表明土壤是花生黄曲霉菌的主要来源,花生荚果中的黄曲霉菌与土壤中的黄曲霉菌有直接的联系<sup>[8,13]</sup>。黄曲霉菌在土壤中营腐生生活,以菌核或分生孢子在土壤中越冬或以菌丝体在植物残体上越冬。花生播种后,温度逐渐升高,存在于邻近花生果际或根际的土壤层中的黄曲霉孢子或菌核在特定的条件下萌发长出新的菌丝,并产生大量分生孢子<sup>[14]</sup>。这些黄曲霉菌的菌丝或孢子能在花生生长发育的各个不同的生育期和不同的器官上侵染花生,比如通过花和果针侵染,当果针下扎到土壤后,菌丝或孢子能通过荚果壁侵染发育中的果实和种子,土壤中分生孢子还能在土壤翻动和雨水冲刷的作用下快速传播,引发更加广泛的侵染。

本实验室对2009-2015年我国产后花生黄曲霉毒素污染分布研究发现,长江流域产区花生黄曲

霉毒素污染较重<sup>[15]</sup>,湖北省是长江流域主要的花生产区之一,2016年花生种植面积为20.61万公顷,种植面积居于长江流域产区的第二位<sup>[16]</sup>,由于收获前一个月易遭高温干旱胁迫,花生黄曲霉毒素污染风险较高。因此为掌握湖北省花生土壤中黄曲霉菌的分布和产毒特征,本研究以罗田、红安、钟祥、襄阳四个典型花生种植区为研究对象,开展湖北省典型花生种植区土壤中黄曲霉菌株的分布及产毒力研究,为湖北省花生黄曲霉毒素污染预警和精准防控提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂

DG-18琼脂培养基、曲霉素琼脂(AFPA)培养基、沙氏液体培养基和察氏琼脂培养基均购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司;黄曲霉毒素标品B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>(标准品)美国Sigma公司;甲醇(色谱级)安徽时联特种溶剂股份有限公司;免疫亲和柱,本实验室自主研制;其他试剂均为分析纯,市售。

### 1.2 仪器

电子分析天平(德国Sartorius公司),涡旋振荡器(意大利VELP公司),锥形瓶、烧杯、试管,Mili-Q超纯水系统(美国Millipore公司),KS4000i control摇床(德国IKA公司),Agilent 1100液相色谱仪(美国安捷伦公司)。

### 1.3 土壤样品采集与保存

按照分层随机抽样方法,选取湖北省典型花生种植区罗田(砂质壤土,pH5.6)、红安(砂质壤土,pH5.8)、钟祥(粘质壤土,pH7.1)、襄阳(壤质粘壤,pH6.8)作为采样点。每个采样点随机选取10个村作为采样地<sup>[2]</sup>。每个采样地的花生田块采用五点取样法取样5个子样混成作为一个样品。每个采样点分别采集样品10份,共计40份。各采样点根据收获时间分批取样。采集时先拨开土表的枯枝落叶及0~1cm的土壤,在花生根和果际采集土壤样品,深度为3~8cm。样品采集后,去掉植物残渣和大颗粒石子后,放入无菌密封袋密封装好,低温冷链运回放于4℃冰箱内保存。

#### 1.4 土壤悬浮液体的制备

取 10g 土样, 加入 90mL 灭菌水, 在室温用涡旋振荡器振荡 30min, 制成菌悬浮液; 再取 1mL 菌悬浮液加入 9mL 灭菌水试管中, 制备出  $10^{-2}$  稀释度的土壤菌悬浮液。

#### 1.5 黄曲霉菌的分离与纯化

每个稀释度取 50 $\mu$ L 菌液, 涂布在 DG-18 培养基上, 28 $^{\circ}$ C 霉菌培养箱内培养 5d, 每个稀释度重复 3 次。挑取外观长有黄色孢子的菌落在察氏培养基上进行分离纯化, 直至得到单个菌落。

#### 1.6 黄曲霉菌鉴定

挑取单个菌落的菌株于 AFPA 培养基上, 28 $^{\circ}$ C 培养 3d 后进行观察, 然后挑选 AFPA 培养基背面为橘黄色透明的菌株, 进一步在察氏培养基上 28 $^{\circ}$ C 培养 5d 后进行菌株 ITS (internal transcribed spacer) 鉴定, PCR 扩增引物序列为 ITS1: 5' - TCCGTAGGT-GAACCTGCGG - 3', ITS4: 5' - TCCTCCGCTTATT-GATATGC - 3'。

#### 1.7 黄曲霉菌产毒培养

将黄曲霉菌接种于察氏培养基, 28 $^{\circ}$ C 培养 7d 后, 用含 0.1% 的吐温 80 无菌水将孢子从培养基上冲洗下来, 制备黄曲霉菌分生孢子悬浮液备用。

将制备好的黄曲霉菌分生孢子液在光学显微镜下用血球计数板计数, 将孢子液的浓度调整为  $1.5 \times 10^7$  个/mL。吸取 1mL 孢子悬浮液加入含 30mL 沙氏液体培养基的锥形瓶中, 在 28 $^{\circ}$ C, 200r/min 摇床培养 7d。

培养过滤后的产毒培养液取 1mL 加 9mL 水定容至 10mL, 通过免疫亲和柱, 控制流速为 2~3mL/min, 用 10mL 水依次洗脱, 洗脱完后将洗脱液弃去, 用洗耳球将水排尽, 再加 1mL 纯甲醇洗脱, 收集洗脱液, 待液相上机。

#### 1.8 产毒培养液中黄曲霉毒素的测定

采用高效液相色谱法测定黄曲霉菌株产毒能力<sup>[17]</sup>。色谱条件为: 色谱柱为 Eclipse XDB-C18 (5 $\mu$ m  $\phi$  4.6mm  $\times$  150mm); 柱温为 35 $^{\circ}$ C; 流动相为甲醇: 水 (V: V = 40: 60); 流速为 0.7mL/min; 采用柱后光化学衍生法: 光化学衍生器 254nm; 以荧光检测器检测, 激发波长 360nm, 发射波长 440nm, 进样量 10 $\mu$ L。

## 2 结果与分析

### 2.1 黄曲霉菌的分离纯化

采用稀释涂布方法, 对采自罗田、红安、钟祥、襄阳共 40 份土壤样品中的黄曲霉菌进行分离、纯化,

得到 127 株能够产生黄色孢子的菌株。

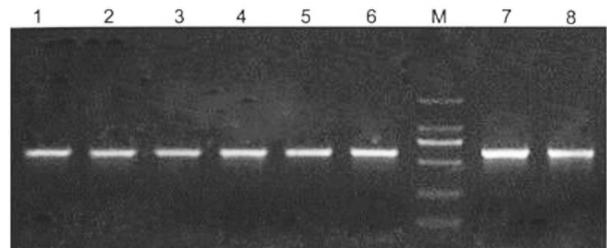
### 2.2 黄曲霉的形态学和分子生物学鉴定

将 127 株可产生黄色孢子的菌株接种到 AFPA 培养基上, 28 $^{\circ}$ C 培养 3d, 黄曲霉菌和寄生曲霉菌在 AFPA 培养基背面产生橘黄色透明菌落(图 1)。



图 1 黄曲霉菌在 AFPA 上的菌落形态(背面)  
Fig. 1 Colony morphology of *A. flavus* on AFPA

利用真菌 ITS 鉴定方法, 扩增在 AFPA 培养基上呈橘黄色菌落形态的菌株(图 2), 经 PCR 产物纯化、测序, 并与 NCBI 核酸数据库中的数据进行 Blast 比对分析, 鉴定得到了黄曲霉菌株 51 株, 寄生曲霉菌株 0 株。



注: 1~8 菌落 PCR 产物; M: DL2000

Note: 1~8 ITS PCR from 8 colonies; M: DL2000 marker

图 2 黄曲霉菌 ITS 序列扩增结果

Fig. 2 ITS sequence amplification results of *A. flavus*

### 2.3 湖北省典型花生种植区土壤中黄曲霉菌分布

土壤中黄曲霉的菌落数 (cfu/g) 反映了土壤中黄曲霉菌的多少, 检出率反映的是土壤中黄曲霉分布的广泛性<sup>[18]</sup>。湖北省 4 个典型花生种植区土壤中黄曲霉菌落数存在差异, 钟祥花生土壤中鉴定获得黄曲霉菌株数最多, 为 19 株, 菌落数范围为 0~1 200cfu/g, 平均值为 190cfu/g, 黄曲霉检出率为 60%; 其次为襄阳, 黄曲霉菌株数为 16 株, 菌落数范围为 0~1 000cfu/g, 平均值为 160cfu/g, 检出率为 70%; 再次是红安, 黄曲霉菌株数为 11 株, 菌落数范

围为 0 ~ 300cfu/g ,平均值为 110cfu/g ,黄曲霉检出率最高为 80% ;最低的是罗田 ,黄曲霉菌株数为 5 株 ,菌落数范围为 0 ~ 200cfu/g ,黄曲霉检出率最低 ,为 40% 。

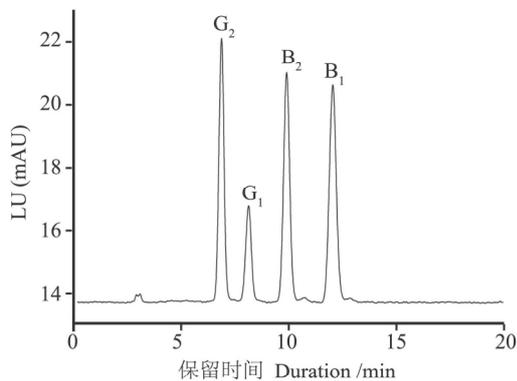
表 1 湖北省花生土壤中黄曲霉菌的分布  
Table 1 Distribution of *A. flavus* in peanut fields in Hubei Province

采样地 Sampling site	黄曲霉菌株数 Number of <i>A. flavus</i> strains	菌落数 cfu/g Colony number		检出率/% Detectable rate
		范围 Range	平均值 Average value	
罗田 Luotian	5	0 ~ 200	50	40
红安 Hongan	11	0 ~ 300	110	80
钟祥 Zhongxiang	19	0 ~ 1 200	190	60
襄阳 Xiangyang	16	0 ~ 1 000	160	70
总数 Total	51	0 ~ 525	127.5	62.5

注: 每克土壤中黄曲霉的菌落数 = 平板的菌落数 / 0.05 / 稀释倍数  
Note: Colony number in each gram of soil = colony number on plate / 0.05 / dilution fold

## 2.4 黄曲霉毒素标准曲线

在所选用色谱条件下 ,黄曲霉毒素得到良好的基线分离 ,4 种毒素在 15min 内出峰 ,先后顺序为 AFG<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFB<sub>1</sub> ,图 3 为黄曲霉毒素标准品色谱图。



注: 黄曲霉毒素标准样品 AFG<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFB<sub>1</sub> 的浓度均为 50μg/L

Note: Standard sample ( AFG<sub>2</sub> , AFG<sub>1</sub> , AFB<sub>2</sub> and AFB<sub>1</sub> ) are all 50μg/L

图 3 黄曲霉毒素混合标准品的 HPLC 图

Fig. 3 HPLC chromatogram of aflatoxin standard sample

黄曲霉毒素混合标准品 AFG<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFB<sub>1</sub> 的浓度稀释成 11 个梯度 ,分别为 5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100μg/L。量取不同浓度梯度的黄曲霉毒素混合标准品 1mL ,采用高效液相色谱法进样检测 ,以黄曲霉毒素的色谱峰面积 (Y) 为纵坐标 ,质量浓度 (X ,μg/L) 为横坐标 ,绘制 AFG<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFB<sub>1</sub> 标准曲线 ,得到线性回归方程 (表 2)。

表 2 黄曲霉毒素混合标准品的线性回归方程

Table 2 Linear regression equation of aflatoxin standard sample

黄曲霉毒素混合标准品 The aflatoxin of mixed standard	线性回归方程 Equation	相关系数 Correlation coefficient
AFG <sub>2</sub>	Y = 2.590 147 75X - 1.948 814 8	0.999 31
AFG <sub>1</sub>	Y = 0.945 694 13X - 0.354 246 1	0.999 19
AFB <sub>2</sub>	Y = 2.814 547 17X - 1.824 124 0	0.999 45
AFB <sub>1</sub>	Y = 2.863 203 47X - 1.493 813 0	0.999 02

## 2.5 湖北典型花生种植区土壤中黄曲霉菌产毒特征

对本研究鉴定的 51 株黄曲霉菌进行产毒特征分析 ,结果发现 ,能产生黄曲霉毒素的菌株所占的比例为 96%。根据菌株产毒种类 ,分为 4 种类型 :只产 AFB<sub>1</sub> 的黄曲霉菌 ,占比 21% ;产生 AFB<sub>1</sub> 和 AFB<sub>2</sub> 两种类型的黄曲霉菌 ,占比最高为 65% ;产 AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub> 和 AFG<sub>1</sub> 三种类型的黄曲霉菌 ,占比 8% ;同时产 AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub> 和 AFG<sub>2</sub> 四种类型黄曲霉菌 ,占比 2% ;有 4% 的黄曲霉菌未检测到黄曲霉毒素产生 (图 4)。

根据本研究菌株产 AFT 含量 ,将其产毒能力划分为 4 个水平 ,并根据菌株产毒含量分别命名为高产毒菌 (>100μg/L)、中产毒菌 (50 ~ 100μg/L)、低产毒菌 (0 ~ 50μg/L) 和不产毒菌 (ND)。湖北省 4 个典型花生种植区土壤中黄曲霉菌产毒能力分布见图 5 ,从 4 个种植区分离的黄曲霉菌株中 ,均以产 AFT 含量在 0 ~ 50μg/L 范围的菌株 (低产毒菌株) 所占的比例最高 ;高产毒菌株主要分布在红安、钟祥和襄阳 ,不产毒菌株所占的比例最低 ,主要分布在钟祥、襄阳两地。

对土壤中菌株产 AFB<sub>1</sub> 含量比较分析发现 ,湖北省 4 个不同花生种植区每克土壤中菌株产 AFB<sub>1</sub> 的量存在差异 (表 3) ,最高的为钟祥 ,菌株平均产 AFB<sub>1</sub> 的量为 61.47μg/L ,每克土壤中黄曲霉菌产 AFB<sub>1</sub> 的量为 11 679.70μg/L ,其次为红安 ,再次为襄阳 ,最低的为罗田 ,菌株平均产 AFB<sub>1</sub> 的量为 23.68μg/L ,每克土壤中产 AFB<sub>1</sub> 的量为 1 184.13 μg/L。

## 3 讨论与结论

黄曲霉菌广泛分布在纬度 26° ~ 35° 的温暖地带 ,适宜生长温度范围为 25 ~ 42℃ ,适宜水分活度 (water activity  $a_w$ ) 为 0.86 ~ 0.96 ,最适产毒温度为

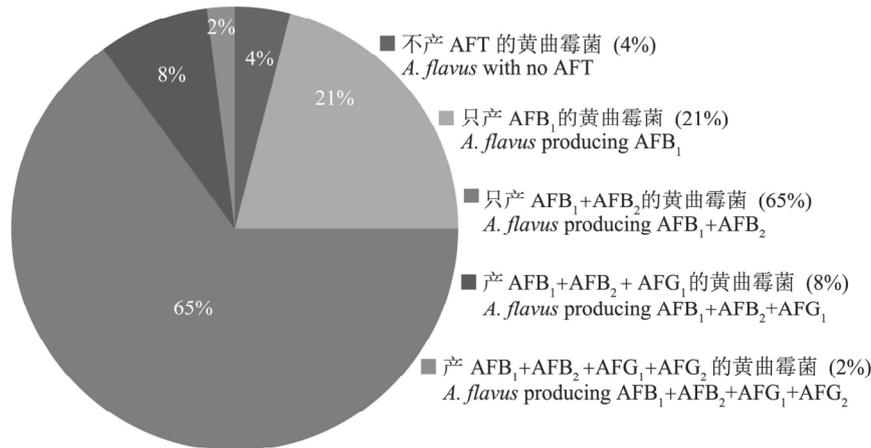


图4 湖北省典型花生种植区土壤中黄曲霉菌产毒类型分布

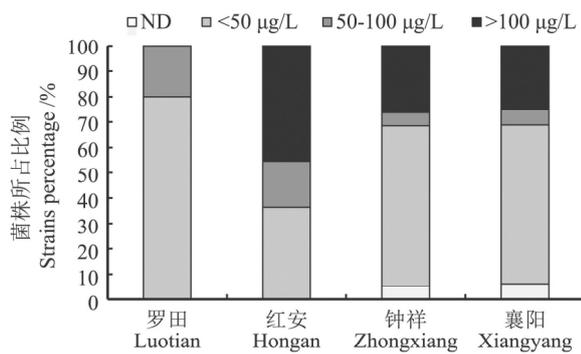
Fig. 4 Distribution of aflatoxin – producing types of *A. flavus* in soils of typical peanut planting areas in Hubei Province

图5 湖北4个典型花生种植区土壤中黄曲霉菌产AFT含量分布

Fig. 5 Distribution of aflatoxins of *A. flavus* strains isolated from soils of typical peanut planting areas in Hubei Province表3 湖北省典型花生种植区黄曲霉菌株产 AFB<sub>1</sub> 的量Table 3 Quantities of AFB<sub>1</sub> produced by *A. flavus* isolated from soils of typical peanut planting area in Hubei Province

采样地 Sampling site	黄曲霉菌株数 Number of <i>A. flavus</i> strains	菌落数 cfu/g Colony number	平均产 AFB <sub>1</sub> 的量/(µg/L) Average quantities of AFB <sub>1</sub>	平均每克土壤产 AFB <sub>1</sub> 的量/(µg/L/g) Quantities of AFB <sub>1</sub> per gram of soil
罗田 Luotian	5	50	23.68	1 184.13
红安 Hong'an	11	110	76.91	8 459.72
钟祥 Zhongxiang	19	190	61.47	11 679.70
襄阳 Xiangyang	16	160	36.32	5 810.47

注: 菌株平均产 AFB<sub>1</sub> 的量(µg/L) = 采样地所有菌株产 AFB<sub>1</sub> 的总和/菌株数; 平均每克土壤中产 AFB<sub>1</sub> 的量(µg/L/g) = 菌株平均产 AFB<sub>1</sub> 量 × 每克土壤中的黄曲霉的菌落数

Note: Average AFB<sub>1</sub> production (µg/L) of strains = Total AFB<sub>1</sub> from strains of the location/stain numbers; Average AFB<sub>1</sub> production in soil (µg/L/g) = Average production of strains × strain numbers in each gram of soil

中钟祥花生土壤中鉴定到的黄曲霉菌株数最多为 19 株, 菌落数范围为 0 ~ 1 200cfu/g, 罗田的最低为 5 株, 菌落数范围为 0 ~ 200cfu/g。菌株分布差异可能与各地土壤类型不同有关, 钟祥土壤粘性较大, 利于土壤水分的保持, 使土壤的含水量适宜黄曲霉菌的生长; 而罗田种植区属砂质土壤, 保水性差, 土壤中含水量较低, 不利于黄曲霉的生长。

黄曲霉毒素生物合成至少包括 21 步酶促反应,

28℃<sup>[19-20]</sup>。Zhang 等对我国四个生态区土壤中黄曲霉菌分布研究发现, 黄曲霉菌在长江流域各产区数量最多, 分布最广泛<sup>[21]</sup>。湖北省位于中纬度地带, 属于典型的北亚热带季风气候, 花生收获前一个月处于七八月份, 平均温度在 28℃ 左右, 这时高温干旱胁迫作用有利于土壤中黄曲霉菌生长繁殖和侵染定殖, 花生受黄曲霉毒素污染风险较高。本研究基于团队 2009 至 2015 年湖北省产后花生黄曲霉毒素污染分布情况, 选取湖北省罗田、红安、钟祥、襄阳作为采样点, 进行黄曲霉菌分离、纯化、鉴定, 研究湖北花生土壤中黄曲霉菌分布及产毒特征。研究共获得黄曲霉菌 51 株, 土壤中平均菌落数为 127.5cfu/g。不同产区花生土壤中黄曲霉菌的分布差异较大, 其

多达 30 个基因参与。研究发现, 黄曲霉菌株产毒基因簇存在大片段基因缺失、重排或点突变等多种变异形式, 导致菌株产毒能力降低或失去产毒能力<sup>[22-26]</sup>。本研究通过高效液相色谱法对分离自湖北省的菌株产毒力研究发现, 51 株黄曲霉菌中产毒菌株占 96%, 不产毒菌株占 4%。产毒菌株根据产毒类型分为 4 类, 分别为只产 AFB<sub>1</sub>, 产 AFB<sub>1</sub> 和 AFB<sub>2</sub>, 产 AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub> 和 AFG<sub>1</sub>, 产 AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>

和 AFG<sub>2</sub> 的菌株。产毒菌株中以产 AFB<sub>1</sub> 和 AFB<sub>2</sub> 的菌株的比例最高。不产毒黄曲霉菌株主要分布在钟祥、襄阳两地,高产毒菌株(AFT > 100 μg/L) 主要分布在红安、钟祥、襄阳。湖北省菌株产 AFB<sub>1</sub> 的范围为 0 ~ 272.45 μg/L, 菌株平均产 AFB<sub>1</sub> 的量最高的为钟祥,最低的为罗田。

本研究下一步将进一步探索湖北省典型花生产区土壤中黄曲霉菌株分布及产毒差异原因及其与地理来源的关系,为湖北省花生黄曲霉毒素污染预警和精准防控提供理论依据,促进花生质量水平提高、花生产业健康发展。

#### 参考文献:

- [1] 中国贸易技术措施网[OL]. <http://www.tbtt-sps.gov.cn/Pages/home.aspx>.
- [2] 都晓慧,丁小霞,周海燕,等. 产后花生黄曲霉毒素污染监测抽样方法研究[J]. 中国油料作物学报, 2015, 37(6): 876-880.
- [3] 王后苗. 花生抗黄曲霉产毒机制研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2016.
- [4] Blount W P, J Br. Turkey "X" disease[J]. Turk Fed, 1961, 9: 52-55.
- [5] 王后苗,廖伯寿. 农作物收获前黄曲霉毒素污染与控制措施[J]. 作物学报, 2012, 38(1): 1-9.
- [6] 武琳霞,都晓慧,丁小霞,等. 花生黄曲霉毒素污染预警技术研究进展[J]. 中国油料作物学报, 2016, 38(1): 120-126.
- [7] Klich M A. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin[J]. Mol Plant Pathol 2007, 8(6): 713-722.
- [8] 姬宁. 花生油中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 碱炼脱毒及安全性评价[D]. 泰安: 山东农业大学, 2015.
- [9] 丁小霞. 中国产后花生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.
- [10] Amaike S, Keller N P. *Aspergillus flavus* [J]. Annu Rev Phytopathol 2011, 49: 107-133.
- [11] 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.
- [12] 戴显红. 典型区果际土壤微生态环境对花生黄曲霉毒素污染影响的初步研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2017.
- [13] Henry S H, Bosch F X. Aflatoxin, hepatitis and worldwide liver cancer risks [J]. Adv Exp Med Biol, 2002: 504(48): 229-233.
- [14] 李秉鸿,李筠. 去除饲料黄曲霉毒素的方法[J]. 中国饲料, 1997, 21: 33-34.
- [15] Ding X X, Wu L X, Li P W, et al. Risk assessment on dietary exposure to aflatoxin B<sub>1</sub> in post-harvest peanuts in the Yangtze River Ecological Region [J]. Toxins, 2015, 7: 4 157-4 174.
- [16] 2017 中国统计年鉴[OL]. <http://www.stats.gov.cn/tjsj/ndsj/2017/indexch.htm>.
- [17] 杨生瑞. 黄曲霉菌株分离、鉴定及产毒能力分析[J]. 中国粮油学报, 2015, 27(6): 110-114.
- [18] 张初署. 中国四个生态区花生土壤中黄曲霉菌分布、产毒特征及遗传多样性研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.
- [19] Klich M A. *Aspergillus flavus*: The major producer of aflatoxin[J]. Mol Plant Pathol 2007, 8(6): 713-722.
- [20] Hedayati M T, Pasqualotto A C, Warn P A, et al. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer[J]. Microbiology 2007, 153: 1 677-1 692.
- [21] Zhang C S, Selvaraj J N, Yang Q L, et al. A survey of aflatoxin-producing *Aspergillus* sp. from peanut field soils in four agroecological zones of China [J]. Toxins 2017, 9(1): 40.
- [22] Bhatnagar D, Ehrlich K C, Cleveland T E, et al. Molecular genetic analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 61(2): 83-93.
- [23] Wei D D, Zhou L, Selvaraj J N, et al. Molecular characterization of atoxigenic *Aspergillus flavus* isolates collected in China [J]. J Microbiol 2014, 52(7): 559-565.
- [24] Yin Y, Lou T, Yan L, et al. Molecular characterization of toxigenic and atoxigenic *Aspergillus flavus* isolates, collected from peanut fields in China [J]. J Appl Microbiol, 2009, 107(6): 1 857-1 865.
- [25] Donner M, Atehnkeng J, Sikora R, et al. Molecular characterization of atoxigenic strains for biological control of aflatoxins in Nigeria [J]. Food Add Contamin, 2010, 27(5): 576-590.
- [26] 陈茹,刘钟滨. 黄曲霉菌 *aflR* 基因启动子序列变异与黄曲霉毒素产生相关联[J]. 细胞生物学杂志, 2006, 28(6): 912-916.

(责任编辑: 郭学兰)