

不产毒黄曲霉菌对产毒黄曲霉菌产毒抑制效果分析

魏丹丹, 周露, 张初署, 刘阳

(农业部农产品加工综合性重点实验室, 中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 100193)

摘要: 本实验6株菌分离自广东、山东、辽宁和湖北四省的花生土壤中, 通过形态学和分子生物学鉴定均为黄曲霉菌, HPLC测定其产毒能力, 其中GZ-6为产毒菌, GZ-15、WF-5、WF-20、JZ-2和YC-8为不产毒菌。分别以花生和玉米为培养基, 将不产毒黄曲霉菌和产毒菌(孢子浓度: $10^4:10^5$ 或 $10^5:10^5$)进行混合培养, 测定不产毒菌对产毒黄曲霉产毒的抑制效果。结果显示: 不产毒菌对产毒菌产毒的抑制率随着其孢子浓度的增加而明显加强, 当孢子浓度比为 $10^5:10^5$ (不产毒菌:产毒菌)时, 5株不产毒菌在玉米培养基上对产毒菌产毒的抑制率为34.55%~75.94%, 在花生培养基上对产毒菌产毒的抑制率为38.03%~83.03%, 其中WF-5、WF-20和GZ-15这三株不产毒菌对产毒黄曲霉产毒的抑制效果均达到75.00%以上, 可以作为田间防治黄曲霉毒素污染的候选菌株。

关键词: 黄曲霉菌; 黄曲霉毒素; 不产毒黄曲霉菌; 高效液相色谱; 生物防治

文章编号: 1673-9078(2014)6-92-97

Atoxicogenic *Aspergillus flavus* Competitively Reduce Aflatoxin Production by the Toxigenic *Aspergillus flavus*

WEI Dan-dan, ZHOU Lu, ZHANG Chu-shu, LIU Yang

(Key Laboratory of Agro-Products Processing, Ministry of Agriculture, Institute of Agro-Products Processing Science & Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: Six *Aspergillus flavus* isolates were collected from Guangdong, Shandong, Liaoning and Hubei Provinces in China, and identified through morphology and molecular biology. The aflatoxin production ability of these isolates was detected by HPLC. The results showed that GZ-6 was a toxigenic isolate, while GZ-15, WF-5, WF-20, JZ-2 and YC-8 were atoxicogenic. To analyze the inhibitory effect of the atoxicogenic strain on the toxigenic strain, the atoxicogenic strain with the toxigenic strain were co-inoculated at the spore concentration ratio of $10^4:10^5$ or $10^5:10^5$ on peanuts and maize, respectively. The results showed that the inhibitory effect of the atoxicogenic strain on the toxigenic strain was significantly enhanced as the spore concentration increased. At the ratio of $10^5:10^5$ (atoxicogenic: toxigenic), the five atoxicogenic *A. flavus* reduced 34.55~75.94% aflatoxin production by GZ-6 on maize and 38.03% ~83.03% aflatoxin production by GZ-6 on peanuts. WF-5, WF-20 and GZ-15 could prevent more than 75.00% aflatoxin production by GZ-6 and could probably be exploited as effective agents for aflatoxin control in field.

Key words: *Aspergillus flavus*; aflatoxin; atoxicogenic strain; high performance liquid chromatography; biocontrol

黄曲霉毒素是由黄曲霉、寄生曲霉、集蜂曲霉、黑曲霉和溜曲霉等产生的一类具有致癌、致畸、致突变作用的次生代谢产物^[1]。黄曲霉毒素不是单一的化合物, 而是一大群结构十分相似的化合物, 目前已发现的黄曲霉毒素有 20 种左右, 但食品中常见且危害极大的有黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 4 种^[2], 其中 AFB₁

收稿日期: 2013-12-16

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201203037); 国家重点基础研究发展计划(2013CB127800); 国家自然科学基金项目(31301478)

作者简介: 魏丹丹(1989-), 女, 硕士, 研究方向: 食品质量与安全; 周露为并列第一作者

通讯作者: 刘阳(1965-), 男, 博士生导师, 研究员, 主要从事农产品真菌毒素防控与脱毒理论与技术研究

毒性最强, 其毒性为氰化钾的 10 倍, 砒霜 68 倍^[3]。1993 年国际癌症组织(IARC)将黄曲霉毒素确定为一级致癌物质, 其中 AFB₁ 致癌力是标准致癌物二甲基亚硝胺 75 倍。鉴于其巨大的危害性, 各国都制定了黄曲霉毒素的最高限量标准以保障消费者的健康。中国规定玉米、花生及其制品中 AFB₁ 的含量不得超过 20 μg/kg。

黄曲霉毒素不仅对人类健康危害极大, 而且通过污染农作物给国民经济造成巨大损失, 因此需要快速高效的去除黄曲霉毒素的方法。传统的黄曲霉毒素去除方法有物理和化学方法, 包括氨化法、碱法、高温法、氧化法、吸附法, 这些方法存在效果不稳定、营养成分损失较大以及难以规模化生产等缺点^[4]; 目前,

生物防治是一项预防作物收获前黄曲霉毒素污染的有效措施^[5]。早在1992年, Dorner等^[6]就已经提出将不产毒的寄生曲霉菌株播撒在花生

生长的土壤中能够使花生黄曲霉毒素含量降低83%~85%。同样, 在土壤中引入不产毒的黄曲霉菌株也可以降低棉花种子中的黄曲霉毒素含量^[7]。目前, 美国环境保护协会注册了两株不产毒黄曲霉菌株用来防治田间棉花和花生黄曲霉毒素污染的问题, 并在美国多个州的试验田中广泛试用^[8-9]。

通过引入不产毒黄曲霉和寄生曲霉来控制土壤中的微生物菌群, 在农作物生长过程中优先替代土壤中原有的产毒菌株, 对于降低收获前黄曲霉毒素的污染是有效的^[8]。本实验旨在通过分析不产毒黄曲霉对产毒黄曲霉产毒的抑制效果, 来筛选具有高竞争力的不产毒黄曲霉菌, 从而为我国田间生物防治黄曲霉毒素的污染提供生物材料。

1 材料与方 法

1.1 试剂

曲霉素琼脂培养基 (AFPA)、麦芽浸膏琼脂 (MEA), 青岛海博生物有限公司; YES 培养基 (酵母提取物 20 g/L, 蔗糖 150 g/L, 琼脂 15 g/L); 氯化苄, 美国 Sigma 公司; Gotag, 美国 Promega 公司; 黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ (标准品), 美国 Sigma 公司; 甲醇 (色谱级), 美国 Fisher 公司; 免疫亲和柱, 华安麦科生物技术有限公司; 其他试剂均为分析纯, 市售。

1.2 仪器

PCR 仪, 日本 Takara 公司; Waters 2695 高效液相色谱仪、Waters 2475 荧光检测器、C18 柱, 美国 Waters 公司; 电子天平; 微型高速万能粉碎机; 回旋振荡器 HY-5。

1.3 菌株来源、鉴定

1.3.1 菌株来源

本实验所选 6 株黄曲霉菌株是从广东、山东、辽宁和湖北四省花生种植土壤中筛选获得。其中 GZ-6 和 GZ-15 来源于广东省广州市, WF-5 和 WF-20 来源于山东省潍坊市, JZ-2 来源于辽宁省锦州市, YC-8 来源于湖北省宜城市。

1.3.2 菌株鉴定

将分离到的菌株利用 AFPA 培养基进行形态学鉴定; 黄曲霉和寄生曲霉在 AFPA 培养基上背面会产生

亮橘色的颜色, 然后选择 AFPA 培养基背面为亮橘色的菌株通过钙调蛋白基因 (CL1: GARTWCAAG GAGGCCTTCTC 和 CL2A: TTTTTGCATCATGA GTTGGAC) 序列对菌株进行分子鉴定^[10]。

1.3.3 菌株产毒能力鉴定

将黄曲霉接种到 YES 培养基^[11]上, 30 °C 黑暗条件下培养 7 d。从培养好的平板上用直径 8 mm 的打孔器均匀的取 3 块琼脂放入 4 mL 的离心管中, 加入 1 mL 的甲醇, 用高振荡器高速震荡 60 min, 然后用灭过菌的滤纸进行过滤, 用蒸馏水将滤液进行稀释后, 再用微纤维滤纸过滤; 取 10 mL 滤液加入到免疫亲和柱中, 使液体以 2~3 mL/min 的速度流出; 待液体排干后, 用蒸馏水或去离子水洗 2 次, 每次 10 mL, 流速 3~4 mL/min; 待液体排干后, 上样 1 mL 甲醇 (色谱级), 用样品瓶接洗脱液, 流速 1 mL/min; 洗脱后液体将用 0.45 μm 的滤膜过滤, 滤液利用 HPLC 测定黄曲霉毒素的含量。高效液相色谱条件为: C18 色谱柱 (4.6 mm×150 mm, 5 μm); 荧光检测器 2475 型, 激发波长 360 nm, 发射波长: 440 nm; 柱温: 30 °C; 流动相: 以甲醇:水 (1:1, V/V) 为流动相; 进样量: 20 μL; 流速: 1.0 mL/min。

1.4 在玉米和花生上竞争培养

1.4.1 玉米和花生的准备

挑选完整的没有破损的玉米和花生颗粒, 然后分别称取 10 g 大小均匀的花生和玉米, 用 75% 酒精进行表面消毒 2 min, 用无菌滤纸吸干后放入到灭过菌的 150 mL 的三角瓶内; 将样品中的水分含量调整到 25%^[12], 瓶子用生物用安全膜密封, 在恒温恒湿箱中黑暗条件下 30 °C 下培养 7 d, 观察表面消毒的效果, 如果花生和玉米表面没有任何杂菌的生长, 将用此方法用于后续试验中样品的表面消毒。

1.4.2 菌悬液的制备

将黄曲霉菌接种于 MEA 斜面试管培养基上^[13], 28 °C 培养 5 d, 然后用灭过菌的棉签蘸取培养基上的孢子于无菌水中, 利用涡旋振荡器震荡均匀, 然后用血球计数板将孢子浓度分别调整到 2×10⁵ 孢子/mL 和 2×10⁴ 孢子/mL, 备用。

1.4.3 竞争培养

挑选完整的没有破损的玉米和花生颗粒, 然后分别称取 10 g 大小均匀的花生和玉米, 用 75% 酒精进行表面消毒 2 min 用无菌滤纸吸干后放入到灭过菌的 150 mL 的三角瓶内, 向三角瓶中分别加入 1 mL 不产毒菌和产毒菌 (10⁴:10⁵, 10⁵:10⁵) 孢子菌悬液作为实验组。然后向三角瓶中加入 1 mL 产毒菌 (10⁵) 和无

菌水等体积混合的孢子菌悬液作为阳性对照组，温育后样品的水分含量为 25%。每个做三个平行，30 ℃，黑暗条件下培养 14d。

1.4.4 黄曲霉毒素含量测定

将培养好的玉米和花生样品放入高压灭菌锅里 121 ℃，30 min 下进行灭菌（使黄曲霉失活）；将灭完菌的玉米用放入高速万能粉碎机中捣碎，然后并向三角瓶中加入 50 mL 80% 的甲醇，用振荡器高速震荡 30 min，再用灭过菌的滤纸进行过滤，处理方法如 1.3.3 所述，提取液用 HPLC 进行测定。

1.5 数据分析

Excel 2003 软件，采用 LSD 法对数据进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 黄曲霉菌的鉴定



图 1 黄曲霉菌在 AFPA 上（背面）的菌落形态

Fig.1 Colony morphology of *Aspergillus flavus* on AFPA

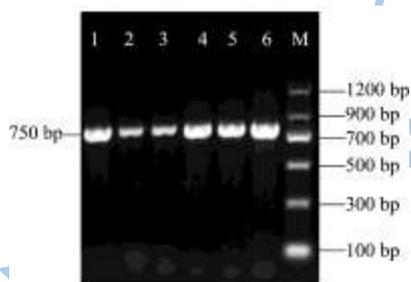


图 2 黄曲霉钙调基因 PCR 扩增电泳图

Fig.2 Electrophoresis of calmodulin gene

注：1~6 的顺序依次为：GZ-6、GZ-15、WF-5、WF-20、JZ-2 和 YC-8。

菌株 GZ-6、GZ-15、WF-5、WF-20、JZ-2 和 YC-8 在 AFPA 培养基背面都产生亮橘色的颜色（图 1），提示它们可能是黄曲霉菌。6 株菌钙调蛋白基因通过 PCR 扩增，核酸电泳如图 2 所示，其测序结果在 GeneBank 中做 Blast 比对分析，结果与黄曲霉 NRRL3357 和黄曲霉 NRRL21882 相似度都达到 99% 以上(表 1)。在用 HPLC 检测菌株产生黄曲霉毒素含量方面，通过与黄曲霉毒素标准品的 HPLC 图谱比对(图

3)，结果表明菌株 GZ-6 为产毒菌，菌株 GZ-15、WF-5、WF-20、JZ-2 和 YC-8 为不产毒菌（图 4）。

表 1 黄曲霉钙调蛋白基因在 Genebank 中的比对结果

Table 1 The blast result of calmodulin gene in *A.flavus* in

菌株名称	Genebank		鉴定结果
	与标准菌株 NRRL 3357 相似度/%	与标准菌株 NRRL 21882 相似度/%	
GZ-6	99	99	黄曲霉
GZ-15	99	99	黄曲霉
WF-5	99	99	黄曲霉
WF-20	99	99	黄曲霉
JZ-2	99	99	黄曲霉
YC-8	99	99	黄曲霉

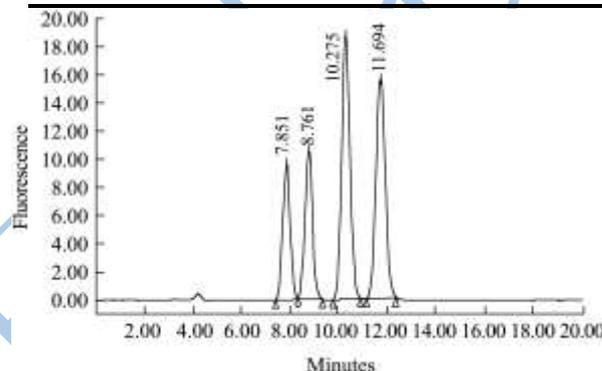


图 3 黄曲霉毒素混合标准品的 HPLC 图

Fig.3 The HPLC chromatogram of the aflatoxin standard sample

注：AFB₁ 和 AFG₂ 的浓度为 10 μg/kg，AFB₂ 和 AFG₁ 浓度为 5 μg/kg，从左到右出峰顺序依次是 AFG₂、AFG₁、AFB₂ 和 AFB₁。

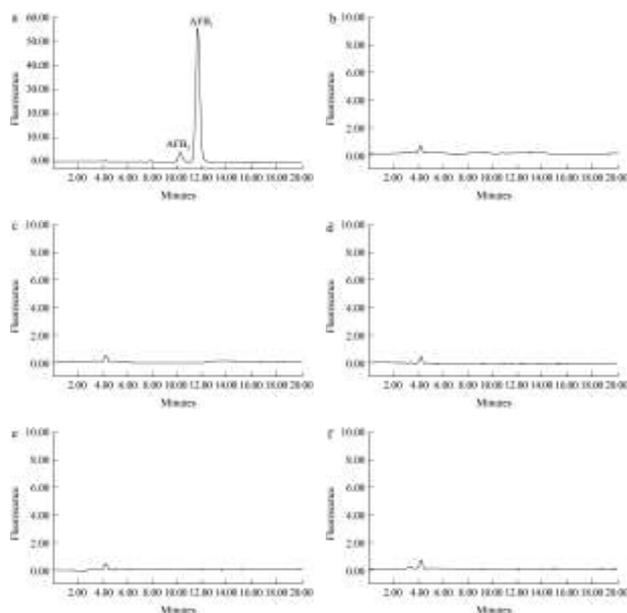


图 4 6 株黄曲霉的 HPLC 图

Fig.4 The HPLC chromatogram of 6 *A.flavus* isolates

注: a: GZ-6; b: GZ-15; c: WF-5; d: WF-20; e: JZ-2; f: YC-8。

2.2 不产毒菌在玉米上的竞争结果

表 2 不产毒黄曲霉菌在玉米培养基上对产毒菌产毒的抑制效果

Table 2 Aflatoxin content and reduction in maize kernels co-inoculated with atoxigenic *A. flavus* and toxigenic *A. flavus*

GZ-6 under laboratory conditions			
菌株名称	产毒量/($\mu\text{g/g}$)	抑制产毒量/($\mu\text{g/g}$)	抑制产毒率/%
GZ-6	33.34 \pm 0.97		
GZ-15:GZ-6($10^4:10^5$)	27.42 \pm 1.13	5.92 \pm 1.13	17.76 \pm 3.40 ^d
GZ-15:GZ-6($10^5:10^5$)	16.40 \pm 1.86	16.94 \pm 1.86	50.81 \pm 5.57 ^b
WF-5:GZ-6($10^4:10^5$)	15.91 \pm 1.40	17.43 \pm 1.40	52.28 \pm 4.19 ^b
WF-5:GZ-6($10^5:10^5$)	7.91 \pm 0.59	25.43 \pm 0.59	76.27 \pm 1.76 ^a
WF-20:GZ-6($10^4:10^5$)	22.73 \pm 2.05	10.61 \pm 2.05	31.82 \pm 1.79 ^e
WF-20:GZ-6($10^5:10^5$)	8.02 \pm 0.54	25.32 \pm 0.54	75.94 \pm 1.63 ^a
JZ-2:GZ-6($10^4:10^5$)	28.89 \pm 1.56	4.45 \pm 1.56	13.35 \pm 4.67 ^d
JZ-2:GZ-6($10^5:10^5$)	21.82 \pm 1.94	11.52 \pm 1.94	34.55 \pm 5.83 ^c
YC-8:GZ-6($10^4:10^5$)	20.96 \pm 1.55	12.38 \pm 1.55	37.13 \pm 4.65 ^c
YC-8:GZ-6($10^5:10^5$)	15.42 \pm 1.02	17.92 \pm 1.02	53.75 \pm 3.06 ^b

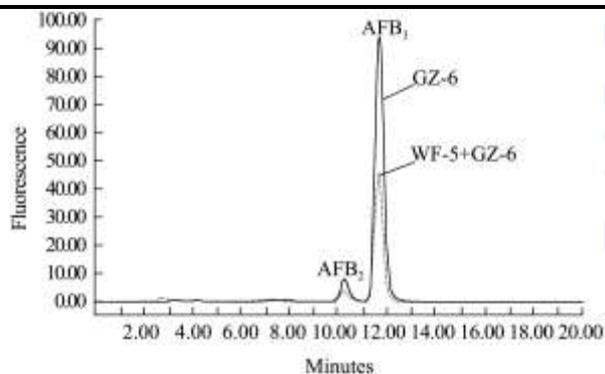


图 5 WF-5 在玉米培养基上对 GZ-6 产毒的抑制效果

Fig.5 The inhibitory effect of co-inoculating of WF-5 with GZ-6 on maize at the spore concentration of $10^4:10^5$

注: WF-5 与 GZ-6 的孢子浓度比为 $10^4:10^5$ 。

由表 2 可以看出, 不产毒菌对产毒菌产毒的抑制率随着其孢子浓度的增加而增加。当不产毒菌浓度较低时(不产毒菌: 产毒菌, $10^4:10^5$)时, 5 株不产毒菌对产毒菌产毒的抑制率为 13.35%~52.28%, 随着不产毒菌浓度升高(不产毒菌: 产毒菌, $10^5:10^5$), 5 株不产毒菌对产毒菌产毒的抑制率也增加到 34.55%~75.94%, 比孢子浓度为 $10^4:10^5$ (不产毒菌: 产毒菌)的抑制率高 20.00%以上。其中, 当孢子浓度比为 $10^4:10^5$ (不产毒菌:产毒菌)时, WF-5 对产毒菌 GZ-6 产毒的抑制效果最好,使 GZ-6 的产毒量从 33.34

$\mu\text{g/g}$ 降低到 15.91 $\mu\text{g/g}$, 抑制率为 52.28% (图 5)。而当孢子浓度比为 $10^5:10^5$ (不产毒菌: 产毒菌)时, WF-5 和 WF-20 对 GZ-6 产毒的抑制效果非常显著, 使 GZ-6 的产毒量从 33.34 $\mu\text{g/g}$ 分别降低到 7.91 $\mu\text{g/g}$ 和 8.02 $\mu\text{g/g}$, 抑制率分别为 76.27%(图 6)和 75.94%。总体来说, 在玉米为培养基的条件下, WF-5 对产毒菌 GZ-6 产毒的抑制效果最好(表 2)。

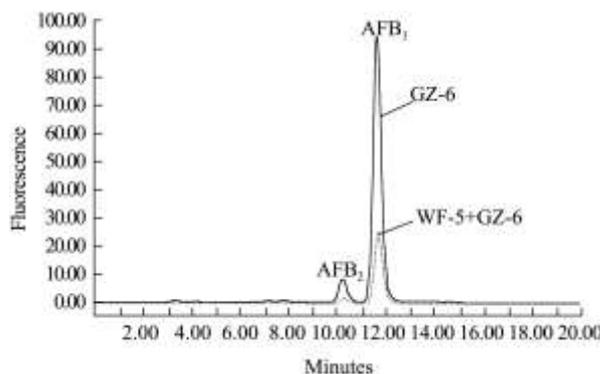


图 6 WF-5 在玉米培养基上对 GZ-6 产毒的抑制效果

Fig.6 The inhibitory effect of co-inoculating of WF-5 with GZ-6 on maize at the spore concentration of $10^5:10^5$

注: WF-5 与 GZ-6 的孢子浓度比为 $10^5:10^5$ 。

2.3 不产毒菌在花生上的竞争结果

表 3 不产毒黄曲霉菌在花生培养基上对产毒菌的抑制效果

Table 3 Aflatoxin content and reduction in peanut kernels co-inoculated with atoxigenic *A. flavus* and toxigenic *A. flavus*

GZ-6 under laboratory conditions			
菌株名称	产毒量/($\mu\text{g/g}$)	抑制产毒量/($\mu\text{g/g}$)	抑制产毒率/%
GZ-6	148.89 \pm 4.42		
GZ-15:GZ-6($10^4:10^5$)	66.99 \pm 4.52	81.90 \pm 4.52	55.01 \pm 3.04 ^b
GZ-15:GZ-6($10^5:10^5$)	37.04 \pm 4.12	111.85 \pm 4.12	75.12 \pm 2.76 ^a
WF-5:GZ-6($10^4:10^5$)	131.38 \pm 4.16	17.51 \pm 4.16	11.76 \pm 2.79 ^d
WF-5:GZ-6($10^5:10^5$)	74.39 \pm 4.49	74.50 \pm 4.49	50.04 \pm 3.02 ^{bc}
WF-20:GZ-6($10^4:10^5$)	125.92 \pm 3.07	22.97 \pm 3.07	15.43 \pm 2.06 ^d
WF-20:GZ-6($10^5:10^5$)	25.26 \pm 4.31	123.63 \pm 4.31	83.03 \pm 2.89 ^a
JZ-2:GZ-6($10^4:10^5$)	131.71 \pm 4.35	17.18 \pm 4.35	11.54 \pm 2.92 ^d
JZ-2:GZ-6($10^5:10^5$)	92.27 \pm 3.47	56.62 \pm 3.47	38.03 \pm 2.33 ^c
YC-8:GZ-6($10^4:10^5$)	127.95 \pm 2.36	20.94 \pm 2.36	14.06 \pm 1.58 ^d
YC-8:GZ-6($10^5:10^5$)	69.47 \pm 1.89	79.42 \pm 1.89	53.34 \pm 1.27 ^b

由表 3 可以看出, 在以花生为培养基的条件下, 不产毒菌对产毒菌产毒的抑制率随着其孢子浓度的增加而增加。当不产毒菌浓度较低时(不产毒菌: 产毒菌, $10^4:10^5$)时, 5 株不产毒菌对产毒菌产毒的抑制率为 11.54%~55.01%, 当不产毒菌浓度升高(不产毒菌: 产毒菌, $10^5:10^5$), 5 株不产毒菌对产毒菌产毒的

抑制效果达到 38.03%~83.03%，比孢子浓度为 $10^4:10^5$ （不产毒菌：产毒菌）的抑制率高约 30.00%。当孢子浓度比为 $10^5:10^5$ （不产毒菌：产毒菌）时，WF-20 对产毒菌 GZ-6 产毒的抑制效果最显著，使 GZ-6 的产毒量从 148.89 $\mu\text{g/g}$ 分别降低到 25.26 $\mu\text{g/g}$ ，抑制率为 83.03%（图 7）。而 GZ-15 在孢子浓度比为 $10^4:10^5$ （不产毒菌：产毒菌）时，对产毒菌 GZ-6 产毒的抑制率就达到 50.00% 以上（图 8）。

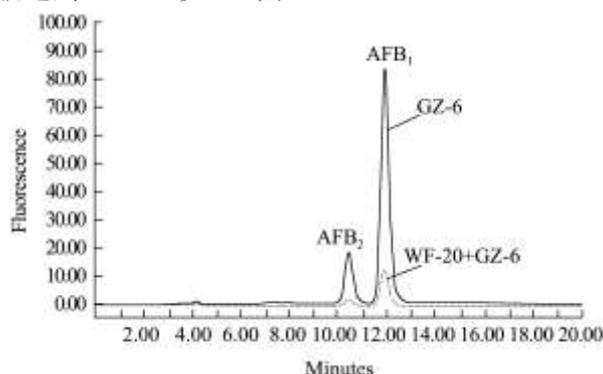


图 7 WF-20 在玉米培养基上对 GZ-6 产毒的抑制效果

Fig.7 The inhibitory effect of co-inoculating of WF-20 with GZ-6 on maize at the spore concentration of $10^5:10^5$

注：WF-20 与 GZ-6 的孢子浓度比为 $10^5:10^5$ 。

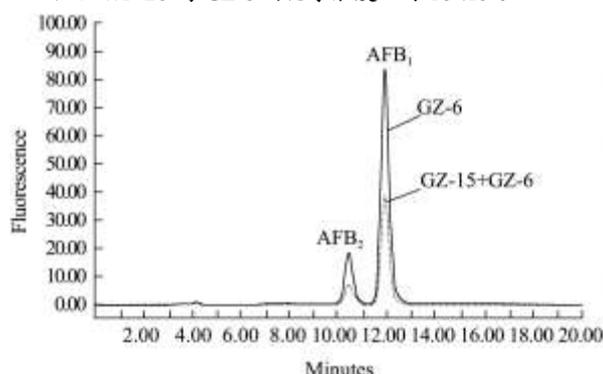


图 8 GZ-15 在玉米培养基上对 GZ-6 产毒的抑制效果

Fig.8 The inhibitory effect of co-inoculating of GZ-15 with GZ-6 on maize at the spore concentration of $10^4:10^5$

注：GZ-15 与 GZ-6 的孢子浓度比为 $10^4:10^5$ 。

目前采用不产毒的黄曲霉和寄生曲霉可有效防治作物收获前黄曲霉毒素的污染，并已得到应用。近年来，美国环境保护协会还注册了两株不产毒的黄曲霉菌株（AF36 and NRRL 21882）来防治棉花和花生黄曲霉毒素污染问题，并在美国多个州的试验田中广泛试用。然而来源不同的不产毒菌具有其自己的适应性，所以在施用不产毒菌时也存在一定的局限性。因此，需要挖掘更多的不产毒黄曲霉菌，以适应各种不同的需求^[8]。

本实验中选用的 5 株不产毒菌都是从花生种植土壤中分离鉴定而来的，其中包括山东省的两株，湖北

省、广东省和辽宁省各一株。其中以玉米为培养基时，从山东和湖北两省分离鉴定得到的三株不产毒菌（WF-5、WF-20、YC-8）对产毒菌产毒的抑制效果都高于从广东省分离得到不产毒菌（GZ-15）对产毒菌（GZ-6）产毒的抑制效果，且当孢子浓度比为 $10^5:10^5$ （不产毒菌：产毒菌）时，三株不产毒菌对产毒黄曲霉产毒的抑制率都达到 50.00% 以上；当孢子浓度比 $10^4:10^5$ （不产毒菌：产毒菌）时，WF-5 对产毒菌产毒的抑制率依然达到 50.00% 以上。以花生为培养基时，广东省的不产毒菌（GZ-15）和山东省的两株不产菌（WF-5、WF-20）对产毒菌 GZ-6 产毒的抑制率高于 50.00%。在孢子浓度比为 $10^5:10^5$ （不产毒菌：产毒菌）时，WF-20 对 GZ-6 产毒的抑制率高达 83.03%，且 GZ-15 在孢子浓度比为 $10^4:10^5$ 的时候，对产毒菌产毒的抑制效果就达到 50.00% 以上，所以不产毒菌 WF-20 和 GZ-15 可能更适用于田间防治花生中黄曲霉毒素的污染。

但是基质不同，不产毒菌对产毒菌的竞争能力也不同。WF-5 在玉米上对 GZ-6 产毒的抑制率高达 76.27%，但是在同样的浓度下，在花生上对产毒菌产毒的抑制率就减小到 50.04%；同样 WF-20 在花生上对产毒菌产毒的抑制率高达 83.03%，在玉米上的抑制率就降低到 75.94%。这可能是由于花生和玉米的主要成分不同，花生中脂肪含量较高，能诱导黄曲霉菌的生长和产毒，从而使不同的不产毒菌对黄曲霉的竞争能力发生变化。

由于田间的产毒黄曲霉菌更具有多样性，所以通过施加单一的不产毒菌黄曲霉菌来去除田间黄曲霉毒素的污染还是有一定的风险，因此不产毒黄曲霉菌，如 WF-5、WF-20 和 GZ-15，可以混合起来用于竞争田间的产毒黄曲霉，从而为我国田间生物防治黄曲霉毒素的污染提供一定的技术支持。

3 结论

3.1 本实验选用的 5 株不产毒菌在花生和玉米培养基上，对产毒菌产毒的抑制效果有显著性差别，且随着不产毒菌孢子浓度的增加，抑制效果越明显。当孢子浓度比为 $10^5:10^5$ （不产毒菌：产毒菌）时，5 株不产毒菌在玉米培养基上对产毒菌产毒的抑制率为 34.55%~75.94%，在花生培养基上对产毒菌产毒的抑制率为 38.03%~83.03%。其中 WF-5、WF-20 和 GZ-15 这三株不产毒菌对产毒黄曲霉产毒的抑制率均达到 75.00% 以上，可以作为田间防治黄曲霉毒素污染的候选菌株。

3.2 本实验下一步将继续研究不产毒菌混合物对产毒菌产毒的抑制效果，寻找不产毒菌对产毒菌产毒抑制效果最好的比例，从而为我国田间生物防治黄曲霉毒

素的污染提供一定的技术支持。

参考文献

- [1] Cary J W, Klich M A, Beltz S B. Characterization of aflatoxin-producing fungi outside of *Aspergillus* Section flavi [J]. Mycologia, 2005, 97: 425-432
- [2] Abbas H K, Zablutowicz R M, Bruns H A, et al. Biocontrol of aflatoxin in corn by inoculation with non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates [J]. Biocontrol Science and Technology, 2006, 16(5): 437-449
- [3] IARC-WHO. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines, and mycotoxins [J]. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Lyon France, 1993, 56: 245-362
- [4] 李培武,张道宏,杨扬,等.粮油制品中黄曲霉毒素脱毒研究进展[J].中国油料作物学报,2010,32(2):315-319
LI Pei-wu, ZHANG Dao-hong, YANG Yang, et al. A review of the detoxification of aflatoxins in cereal and oilseed products [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2010, 32(2): 315-319
- [5] 刘付香,李玲,梁炫强.生物防治黄曲霉毒素污染研究进展[J].中国生物防治,2010,26(1):96-101
LIU Fu-xiang, LI Ling, LIANG Xuan-qiang. Advances on biological control of aflatoxin contamination [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2010, 26(1): 96-101
- [6] Dorner J W, Cole R J, Blankenship P D. Use of a biocompetitive agent to control preharvest aflatoxin in drought stressed peanuts [J]. Journal of Food Protection, 1992, 55: 888-892
- [7] Cotty P J. Influence of field application of an atoxigenic strain of *Aspergillus flavus* on the populations of *A. flavus* infecting cotton bolls and the aflatoxin content of cottonseed [J]. Phytopathology, 1994, 84: 1270-1277
- [8] Chang P K, Hua S S T. Nonaflatoxigenic *Aspergillus flavus* TX9-8 competitively prevents aflatoxin accumulation by *A. flavus* isolates of large and small sclerotial morphotypes [J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 114: 275-279
- [9] Dorner J W. Biological control of aflatoxin contamination of crops [J]. Toxin Reviews, 2004, 23: 425-450
- [10] Rodrigues P, Santos C, Venâncio A, et al. Species identification of *Aspergillus* section flavi isolates from portuguese almonds using phenotypic, including MALDI - TOF ICMS, and molecular approaches [J]. Journal of Applied Microbiology, 2011, 111: 877-892
- [11] Rodrigues P, Venâncio A, Kozakiewicz Z, et al. A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section flavi isolated from portuguese almonds [J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 129: 187-193
- [12] Probst C, Bandyopadhyay R, Price L, et al. Identification of atoxigenic *Aspergillus flavus* isolates to reduce aflatoxin contamination of maize in kenya [J]. Plant Disease, 2011, 95: 212-218
- [13] Zhang C S, Xing F G, Selvaraj J N, et al. The effectiveness of ISSR profiling for studying genetic diversity of *Aspergillus flavus* from peanut-cropped soils in China [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2013, 50: 147-153