DOI:10.12441/spyswjs.20220429002 [文章编号] 1673-1689(2024)12-0071-10

暹罗芽孢杆菌DY3123的分离、鉴定及其降解黄曲霉毒素B_1的效果研究

倪 正[1] 张黎黎[2]

(1. 合肥理工学院 生物医药学院,安徽 合肥 230031; 2. 安徽新莱蒂克司法鉴定中心,安徽 合肥 230012)

摘要:【目的】筛选能够降解黄曲霉毒素B_1(AFB_1)的微生物菌株,并分析其降解AFB_1的机理。**【方法】**以香豆素为唯一碳源,从松墨天牛(鞘翅目天牛科)幼虫肠道中分离、筛选对AFB_1具有降解能力的菌株,同时对其降解AFB_1的机理进行研究。**【结果】**通过初筛和复筛,成功获得一株对AFB_1的降解率高达94.71%的菌株,鉴定为暹罗芽孢杆菌(*Bacillus siamensis*,*B. siamensis*)DY3123。不同细胞组分降解AFB_1的试验结果表明,降解AFB_1的主要活性物质来自暹罗芽孢杆菌DY3123无细胞培养基上清液;上清液降解AFB_1的最适温度为80 ℃,最适初始pH为8.0,最适反应时间为36 h;Cu^{2+}可以提高上清液的降解活性,Zn^{2+}、Mg^{2+}和Fe^{3+}会抑制其降解活性。此外,采用3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(methyl thiazolyl tetrazolium,MTT)法测定了降解产物对淋巴细胞存活率的影响,结果表明降解产物对细胞存活率无显著影响。**【结论】**该研究为暹罗芽孢杆菌DY3123在食品和动物饲料行业中的应用提供了参考。

关键词:黄曲霉毒素B_1;暹罗芽孢杆菌;生物降解;香豆素;筛选

Isolation, Identification of *Bacillus siamensis* DY3123 and Its Degradation Effect on Aflatoxin B_1

NI Zheng[1] *ZHANG Lili*[2]

(1. School of Biomedical and Pharmaceutical Sciences, Hefei Institute of Technology, Hefei 230031, China; 2. Anhui Xinlaidike Forensic Identification Center, Hefei 230012, China)

Abstract: [**Objective**] This study aimed to screen out a microbial strain capable of degrading aflatoxin B_1 (AFB_1) and decipher the degradation mechanism. [**Method**] With coumarin as the sole carbon source, AFB_1-degrading strains were isolated and screened from the larval gut of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae), and the degradation mechanism for AFB_1 was investigated. [**Result**] After primary screening and re-screening, a strain with the degradation rate reaching 94.71% for AFB_1 was obtained, and this strain was identified as *Bacillus siamensis* (*B. siamensis*) DY3123. The results of experiments on the degradation of AFB_1 by different cellular components indicated that the main active substances responsible for degrading AFB_1 were from the cell-free culture supernatant of *B. siamensis* DY3123, which showed the optimum degradation performance at 80 ℃ and pH 8.0 after 36 h. Cu^{2+} improved the degradation activity of the cell-free supernatant, while Zn^{2+}, Mg^{2+}, and Fe^{3+} exerted inhibitory effects. In addition, the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) assay was employed to examine the effects of the degradation products on the viability of lymphocytes, which indicated that the degradation products had no significant impact on cell viability. [**Conclusion**] The findings lay a foundation for the application of *B. siamensis* DY3123 in the food and animal feed industry.

基金项目:安徽省高校自然科学研究重点项目(2022AH053062);安徽省教育厅重点项目(KJ2021A0881)。

通信作者:倪正(1985—),男,硕士,讲师,主要从事微生物资源开发与利用研究。E-mail:nzlzll@163.com

收稿日期:2022-04-29 **修回日期:**2022-06-14

Keywords: aflatoxin B_1; *Bacillus siamensis*; biodegradation; coumarin; screening

黄曲霉毒素（aflatoxin，AFT）主要是由黄曲霉（*Aspergillus flavus*）和寄生曲霉（*Aspergillus parasiticus*）等多种真菌产生的剧毒次级代谢产物[1]。AFB_1、黄曲霉毒素 B_2（AFB_2）、黄曲霉毒素 G_1（AFG_1）、黄曲霉毒素 G_2（AFG_2）是 4 种主要的天然毒素，其中 AFB_1 的毒性最强、分布最广，由于其具有肝毒性、致癌性、致畸性和免疫抑制性等危害，且可在农作物的生长、收获、运输及贮藏等多个环节中发生污染，世界卫生组织国际癌症研究机构已将其列为 I 类致癌物[2-3]。因此，急需寻找安全、高效的 AFB_1 去除方法[4-5]。

目前，去除食品和饲料中 AFB_1 的方法主要有物理法、化学法和微生物法[4]。虽然物理法和化学法可有效去除 AFB_1，但这些方法存在一定的局限性，例如可能导致营养流失、产生化学污染物、影响食品品质以及增加处理成本等问题，从而限制了其应用范围[6]。微生物法具有反应条件温和、特异性强、效率高、降解产物无毒或毒性较低等优点，逐渐成为工业化去除食品和饲料中 AFB_1 的替代方法[7]。研究表明，多种微生物具有降解 AFB_1 的能力，包括真菌类的花色栓菌[8]、镰刀菌[5]、酵母菌[9]，以及细菌类的红串红球菌[10]、地衣芽孢杆菌[11]、枯草芽孢杆菌[12]、乳酸菌[13]、芬氏纤维微菌[14]等。

作者以香豆素为唯一碳源，从植食性昆虫——松墨天牛的幼虫肠道中分离、纯化出能降解 AFB_1 的菌株，采用生理生化、核酸测序的方法对菌株鉴定，并对该菌株降解 AFB_1 的特性和机理进行研究，为微生物降解 AFB_1 的实际应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

从安徽省滁州市沙河集林业站野外采集松墨天牛三龄幼虫，采回后立即取出幼虫肠道并破碎，并参照 Huang 等[15]的方法进行匀浆。

1.1.2 菌株与细胞

黄曲霉菌株 3.6305、寄生曲霉菌株 3.6155：中国普通微生物菌种保藏管理中心；淋巴细胞：基尔顿生物科技（上海）有限公司。

1.1.3 主要试剂与仪器

AFB_1 标准品：生工生物工程（上海）股份有限公司；二甲基亚砜（DMSO）、甲醇（色谱纯）：安徽天地高纯溶剂有限公司；其他试剂（分析纯）：国药集团化学试剂有限公司；DNA 快速提取试剂盒：天根生化科技（北京）有限公司。

KG203 高效液相色谱（HPLC）仪：LC-8A 型，日本岛津公司；VP-ODS C18 色谱柱（250 mm×4.6 mm×5 μm）：日本岛津公司。

1.1.4 培养基

初筛培养基：香豆素 1.0 g、KNO_3 0.5 g、KH_2PO_4 0.25 g、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25 g、$CaCl_2$ 0.005 g、$(NH_4)_2SO_4$ 0.5 g、$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.003 g、蒸馏水 1 L、琼脂 20 g，pH 7.0；营养肉汤（NB）培养基：蛋白胨 10 g、牛肉膏 3.0 g、葡萄糖 1.0 g、NaCl 8.5 g、KH_2PO_4 1.0 g、蒸馏水 1 L，pH 7.0；马铃薯葡萄糖琼脂（PDA）培养基：去皮马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、氯霉素 0.2 g、蒸馏水 1 L。以上培养基均经 121 ℃、15 min 灭菌后使用。

1.2 AFB_1 降解菌的分离与筛选

1.2.1 初筛

用无菌超纯水将 1 g 肠道匀浆样品连续稀释 1×10^1~1×10^9 倍，将 100 μL 稀释液涂抹在初筛培养基上[16]，于 30 ℃培养 5~7 d，直到培养基上出现肉眼可见的菌落，挑取生长良好的单个菌落在初筛培养基上继续培养。重复上述过程 3~4 次，即得到初筛后的菌株。

1.2.2 复筛

初筛挑选出的菌株接种于 NB 培养基中，30 ℃振荡培养 20 h。取 1.9 mL 培养液，加入 100 μL AFB_1 储备液（10 mg/L 溶于甲醇的 AFB_1）作为试验组；NB 培养基中加入等体积 AFB_1 储备液作为空白对照组。将样品置于 30 ℃下避光振荡（180 r/min）培养 96 h，8 000 *g* 离心 20 min 后吸取上清液。为测定上清液中残留的 AFB_1，用氯仿萃取 4 次，并溶解于 1 mL 甲醇，用 0.22 μm 滤膜过滤后于 4 ℃保存备用。

1.3 AFB_1 降解率的测定

参照文献[4]中的方法，用 HPLC 仪测定不同菌株培养基上清液中 AFB_1 质量浓度，从中筛选

AFB_1降解率最高的菌株，用于下一步研究。流动相为水-乙腈-甲醇混合液（体积比为1.0∶1.5∶1.5），流量为1 mL/min，激发和发射波长分别为365、418 nm。按式（1）计算AFB_1降解率。

$$R=\frac{1-S_1}{S_0}\times 100\% \quad (1)$$

式中：

R——AFB_1降解率，%；

S_0——空白对照组AFB_1峰面积；

S_1——样品AFB_1峰面积。

1.4　AFB_1降解菌株的鉴定

对挑选出的降解AFB_1能力最强的菌株进行鉴定。参照姚丽莉等[17]的方法，依据《伯杰氏系统细菌学手册》和《常见细菌系统鉴定手册》对筛选出的菌株进行生理生化鉴定。使用DNA快速提取试剂盒筛选菌株的全部基因组，以DNA为模板，使用细菌16S rRNA通用引物1492R（5′-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3′）和27F（5′-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′）[18]进行PCR反应，PCR产物送至生工生物工程（上海）股份有限公司进行测序。测序结果与NCBI和EzBioCloud服务器[19]中的序列进行比对，采用MEGA 7软件中的最大似然法构建系统发育树[20]。16S rRNA基因序列已提交GenBank数据库，登录号为MG839278。

1.5　菌株DY3123对AFB_1的降解试验

1.5.1　菌株DY3123对黄曲霉拮抗活性的测定

参照Shi等[21]的方法。取30 g花生粒置于250 mL烧瓶中，121 ℃下高压灭菌20 min，冷却至室温后，接种0.5 mL黄曲霉菌株3.6305分生孢子悬浮液（5×10^6 CFU/mL）；样品平均分为2份：一份加入10 mL菌株DY3123培养液，另一份加入等体积NB培养基作为对照组。所有样本均在28 ℃培养7 d，收集样品，90 ℃下干燥5 d后研磨待测。

采用平板对峙法，选取培养5 d的黄曲霉菌株3.6305和寄生曲霉菌株3.6155平板，使用无菌打孔器在菌落边缘打取直径为5 mm的菌饼，置于PDA平板中央，并在距离菌饼3 cm的4个等距位置接种菌株DY3123，于28 ℃培养7 d。

1.5.2　菌株培养条件对AFB_1降解率的影响试验

向NB培养基中加入AFB_1至终质量浓度为0.5 mg/L，将过夜培养的菌株DY3123种子液以体积分数1%接种至培养基，在一定温度下于180 r/min培养一定时间。

1）培养温度：设置培养基初始pH为7，培养时间为96 h，考察不同培养温度（26、28、30、32、37 ℃）对AFB_1降解率的影响。

2）pH：设置培养温度为30 ℃，培养时间为96 h，考察不同培养基初始pH（5、6、7、8、9）对AFB_1降解率的影响。

3）培养时间：设置培养基初始pH为7，培养温度为30 ℃，考察不同培养时间（6、12、24、48、72、96 h）对AFB_1降解率的影响。

1.5.3　菌株DY3123各组分对AFB_1降解率的影响试验

参照Farzaneh等[12]的方法，研究细胞悬浮液（含完整菌体细胞）、菌株DY3123无细胞培养基上清液和细胞提取物对AFB_1降解率的影响。菌株DY3123培养液于8 000 g离心20 min，分离上清液和菌体，上清液用0.22 μm滤膜过滤备用；用无菌超纯水洗涤菌体3次，并加入磷酸盐缓冲液（0.1 mol/L，pH 7），获得细胞悬浮液。将细胞悬浮液低温超声破碎15 min，10 000 g离心40 min，收集上清液，经0.22 μm滤膜过滤获得细胞提取物。将AFB_1分别加入菌株DY3123无细胞培养基上清液、细胞悬浮液和细胞提取物中至终质量浓度为0.5 mg/L，30 ℃避光反应72 h后检测AFB_1降解率。

1.5.4　反应时间、pH、温度和金属离子对AFB_1降解率的影响试验

1）反应时间：将AFB_1加入菌株DY3123无细胞培养基上清液至终质量浓度为0.5 mg/L，以含0.5 mg/L AFB_1的NB培养基作为对照组，在80 ℃分别反应1、3、6、9、12、24、36 h，考察反应时间对AFB_1降解率的影响。

2）温度：以添加AFB_1的NB培养基作为对照组，设置菌株DY3123无细胞培养基上清液反应时间为36 h，考察不同温度（20、30、40、50、60、70、80、90 ℃）对AFB_1降解率的影响。

3）pH：以添加AFB_1且具有相同pH的NB培养基作为对照组，设置温度为80 ℃，反应时间为36 h，考察不同初始pH（4、5、6、7、8、9、10）的菌株DY3123无细胞培养基上清液对AFB_1降解率的影响。

4）金属离子：设置温度为80 ℃，反应时间为36 h，向菌株DY3123无细胞培养基上清液中分别

添加 Mg^{2+}（$MgCl_2$）、Cu^{2+}（$CuSO_4$）、Mn^{2+}（$MnCl_2$）、Zn^{2+}（$ZnSO_4$）、Fe^{3+}（$FeCl_3$），至培养基中金属离子终浓度为 10 mmol/L，考察金属离子对 AFB_1 降解率的影响。

1.5.5 热处理、十二烷基硫酸钠（SDS）和蛋白酶 K 对 AFB_1 降解率的影响试验

将菌株 DY3123 无细胞培养基上清液煮沸 30 min 或置于高压灭菌锅中 121 ℃灭菌 30 min，研究热处理对 AFB_1 降解率的影响。灭菌完成后，将 AFB_1 加入该上清液中至终质量浓度为 0.5 mg/L，同时向该上清液中分别添加蛋白酶 K（终质量浓度为 1 mg/mL）和 SDS（终质量浓度为 1 g/dL）。在 80 ℃下反应 36 h，研究菌株 DY3123 无细胞培养基上清液对 AFB_1 的降解能力，同时以 NB 培养基作为空白组，以菌株 DY3123 无细胞培养基上清液加入 AFB_1 作为对照组，具体操作参照 Guan 等[16]的方法。

1.5.6 降解产物的细胞毒性分析

采用 MTT 法对降解产物进行细胞毒性试验[22]。向 180 μL 淋巴细胞悬浮液中加入植物血凝素-P（终质量浓度 10 mg/mL），转移到 96 孔板中。制备 AFB_1 溶液：AFB_1 储备液经氮气吹干后用 DMSO 溶解，然后用 NB 培养基将 AFB_1 稀释至 2.5 mg/L，用 0.22 μm 滤膜过滤除菌后备用；制备菌株 DY3123 无细胞培养基上清液：菌株 DY3123 无细胞培养基上清液与 AFB_1 反应 36 h，冷冻干燥后用 DMSO 溶解，然后用 NB 培养基将 AFB_1 稀释至 2.5 mg/L，用 0.22 μm 滤膜过滤除菌后备用。分别取不同体积（20、40、80 μL）的 AFB_1 溶液、菌株 DY3123 无细胞培养基上清液以及菌株 DY3123 培养液加到 96 孔板中，分别记为 AFB_1STD 组、DY312 培养基上清液组、DY3123 培养物组，以未经处理的淋巴细胞作为对照组，并向每个孔中添加 160 μL 培养基，将 96 孔板置于 37 ℃、体积分数 5% 的 CO_2 培养箱中分别培养 24、48、72 h。培养完成后，向每个孔中加入 30 μL 溶解于 0.14 mol/L PBS 的 5 mg/mL MTT 溶液，继续培养 3 h。最后，向每个孔加入 50 μL DMSO，继续培养 2 h，结束后用酶标仪测定 560 nm 处的吸光度，按式（2）计算细胞存活率。

$$R_C=(A_S/A_C)\times 100\% \quad (2)$$

式中：

R_C——细胞存活率，%；

A_S——样品处理组的吸光度；

A_C——对照组的吸光度。

1.5.7 AFB_1 降解产物的分析

采用 LC-MS/MS 方法分析 AFB_1 降解产物，色谱柱为 VP-ODS C18 柱（250 mm×4.6 mm×5 μm）。以体积分数 0.1% 甲醇和体积分数 0.1% 乙腈作为流动相，流量 1 mL/min。MS 参数：正离子模式，m/z 为 50~800，离子喷射电压 4.5 kV，气体流量 36 L/min，辅助气体流量 10 L/min，毛细管温度 300 ℃。

1.6 数据分析

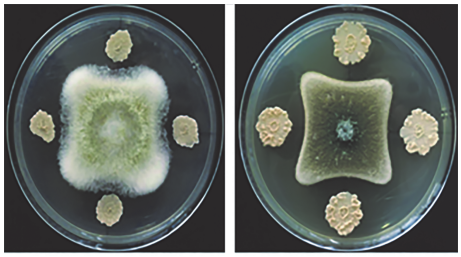
所有试验重复 3 次，采用平均值±标准误差（SEM）表示。使用 SPSS 18.0 软件对数据进行方差分析。

2 结果与讨论

2.1 AFB_1 降解菌株的筛选与鉴定

从松墨天牛幼虫的肠道中分离出 21 种细菌，复筛结果表明，菌株 DY3123 降解能力最高，在 30 ℃下培养 96 h 后，AFB_1 的降解率为（94.71±3.54）%，这比铜绿假单胞菌（82.8%）[23]、氟虫分枝杆菌（70%~80%）[24]的降解能力更强，与地衣芽孢杆菌 CFR_1（94.7%）[11]、镰刀菌 WCQ3361（95.38%）[5]的降解能力相似。由图 1 可知，菌株 DY3123 能显著抑制黄曲霉菌株 3.6305 和寄生曲霉菌株 3.6155 的生长。在菌株 DY3123 和黄曲霉菌株 3.6305 的共培养物中，AFB_1 的产生受到明显抑制（减少 87.45%），见表 1。因此，选择该菌株进行深入研究。

根据 16S rRNA 基因序列和系统进化分析，菌株 DY3123 与暹罗芽孢杆菌（AJVF01000043）



(a) 黄曲霉 (b) 寄生曲霉

图 1 菌株 DY3123 对黄曲霉和寄生曲霉生长的抑制

Fig. 1 Inhibition of strain DY3123 on the growth of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*

表1　菌株DY3123对黄曲霉共培养物中AFB_1的抑制作用

Table 1　Inhibitory effects of strain DY3123 on AFB_1 in the co-cultures with *Aspergillus flavus*

黄曲霉共培养物	AFB_1质量分数/(μg/g)	AFB_1抑制率/%
花生+NB培养基	—	
花生+菌株DY3123	—	
花生+黄曲霉菌株3.6305	5.18±0.32	
花生+黄曲霉菌株3.6305+菌株DY3123	0.65±0.11	87.45

注：“—”表示未检测到；“空白”表示未测量。

在一个分支中，同源性99%，见图2。因此，该菌株最终被鉴定为暹罗芽孢杆菌（*B. siamensis*）DY3123，暹罗芽孢杆菌是一种革兰氏阳性、杆状、内孢子细菌，可产生脂肽生物表面活性剂[25]。

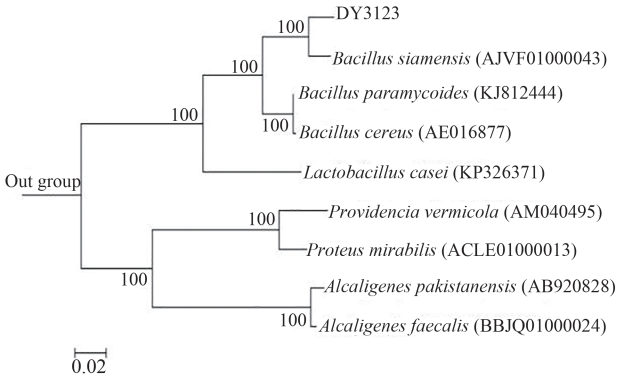


图2　菌株DY3123的系统发育树

Fig. 2　Phylogenetic tree of strain DY3123

2.2　培养条件对暹罗芽孢杆菌DY3123降解AFB_1的影响

暹罗芽孢杆菌DY3123降解AFB_1的能力测定结果见图3。随着培养时间的延长，AFB_1的降解率逐渐升高，在30 ℃下培养96 h后，超过90%的AFB_1降解；对照组中AFB_1的降解率在整个培养期内无明显变化。表明AFB_1的降解确实是由暹罗芽孢杆菌DY3123引起的。

温度、pH对菌株降解AFB_1的影响见图4。如图4(a)所示，所有培养温度下暹罗芽孢杆菌DY3123均可降解AFB_1，且降解率随着温度的升高先增加后降低，30 ℃时降解率最高，达96.08%。表明该菌株降解AFB_1的最佳温度为30 ℃。如图4(b)所示，AFB_1降解率受培养基初始pH的影响，AFB_1降解率随着pH的升高先增加后降低，当pH为7时，AFB_1降解率最高，为94.42%，pH为5时，AFB_1降解率最低，为78.33%。表明该菌株降解AFB_1的培养基最佳初始pH为7，超过或低于该pH都不利于暹罗芽孢杆菌DY3123对AFB_1的降解。

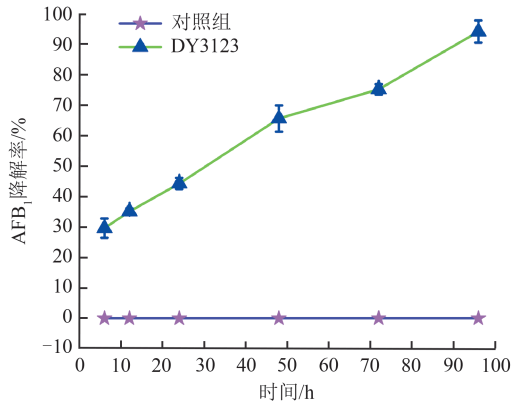


图3　暹罗芽孢杆菌DY3123降解AFB_1的动力学曲线

Fig. 3　Degradation kinetics of *B. siamensis* DY3123 for AFB_1

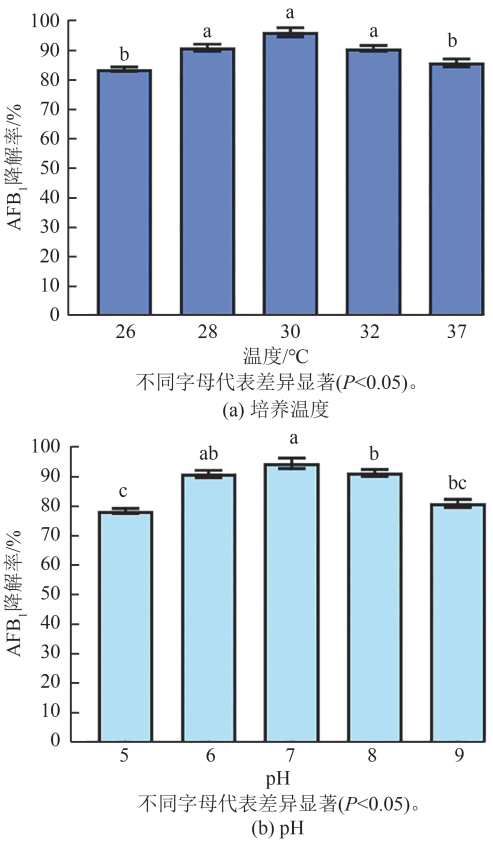
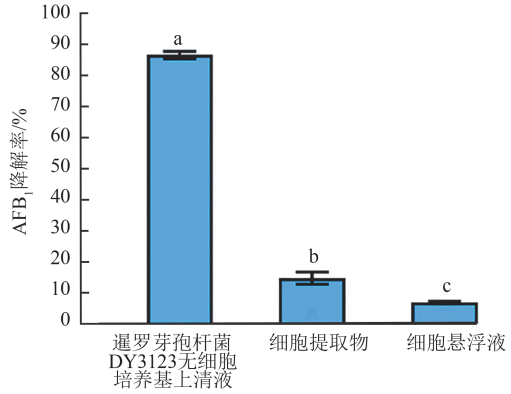


图4　不同温度和培养基初始pH对暹罗芽孢杆菌DY3123降解AFB_1的影响

Fig. 4　Effects of different culture temperatures and pH on the degradation of AFB_1 by *B. siamensis* DY3123

2.3 暹罗芽孢杆菌 DY3123 各组分降解 AFB_1 的效果分析

如图 5 所示，经过 72 h 的降解，3 种组分均能降解 AFB_1，与细胞悬浮液和细胞提取物相比，暹罗芽孢杆菌 DY3123 无细胞培养基上清液对 AFB_1 的降解更有效，表明暹罗芽孢杆菌 DY3123 无细胞培养基上清液中的活性组分可能在降解 AFB_1 中起主要作用。Rao 等[11]研究发现，地衣芽孢杆菌 CFR1 培养上清液处理 72 h 后，约 94.73% 的 AFB_1 被降解；同样，也有研究发现金黄色杆菌的无细胞上清液处理 24 h 后可降解 74.5% 的 AFB_1[26]。由此推测暹罗芽孢杆菌 DY3123 分泌的胞外活性物质促进了 AFB_1 的降解，而不是将其吸附至细胞壁。因此，使用暹罗芽孢杆菌 DY3123 无细胞培养基上清液进行后续试验。



不同字母代表差异显著(P<0.05)。

图 5 暹罗芽孢杆菌 DY3123 各组分降解 AFB_1 的特性

Fig. 5 Degradation activity of AFB_1 by each component of *B. siamensis* DY3123

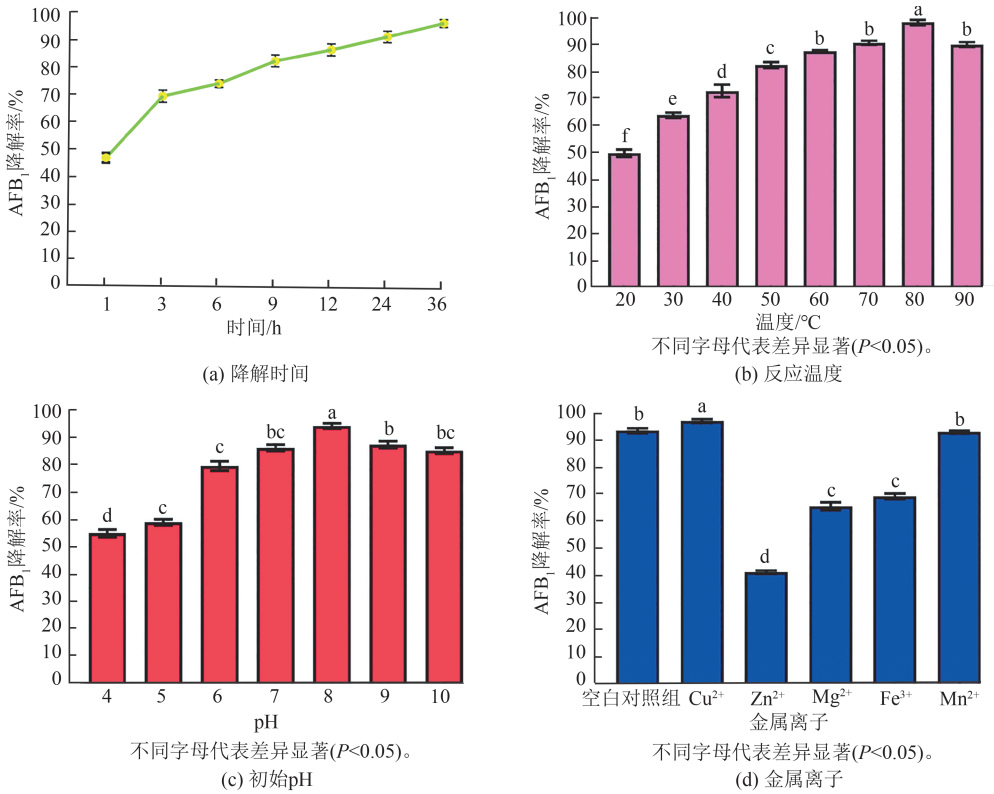
2.4 反应时间、pH、温度和金属离子对暹罗芽孢杆菌 DY3123 降解 AFB_1 的影响

如图 6(a)所示，暹罗芽孢杆菌 DY3123 无细胞培养基上清液对 AFB_1 的降解是一个相对快速且持续的过程，在最初的 1 h 内，47.37% 的 AFB_1 被降解，培养 36 h 后，AFB_1 降解率达到 97.56%。如图 6(b)所示，暹罗芽孢杆菌 DY3123 无细胞培养基上清液降解 AFB_1 的过程对温度较为敏感，降解率随着温度的升高先增加后降低，并在 80 ℃时达到最高(97.91%)。此外，暹罗芽孢杆菌 DY3123 无细胞培养基上清液具有较好的热稳定性，90 ℃时仍具有较好的 AFB_1 降解能力，大多数已报道的菌株在较小的温度范围内具有 AFB_1 降解能力，如枯草杆菌 UTBSP1 的培养上清液在 20~40 ℃时可降解 60%~80% 的 AFB_1[12]。试验中，暹罗芽孢杆菌 DY3123 无细胞培养基上清液在 50~90 ℃均表现出很强的 AFB_1 降解能力(>80%)，且降解率随着温度的升高先增加后降低，在 80 ℃时达到最高，主要原因可能是暹罗芽孢杆菌 DY3123 无细胞培养基上清液的活性成分可以在较大的温度范围内发挥作用，或者暹罗芽孢杆菌 DY3123 无细胞培养基上清液中存在多个成分，且具有不同温度的耐受性。另外，热处理并未破坏暹罗芽孢杆菌 DY3123 无细胞培养基上清液的降解活性，反而能提高降解能力，表明暹罗芽孢杆菌 DY3123 无细胞培养基上清液中的活性成分热稳定性强。此外，当铜绿假单胞菌培养上清液经过热处理(沸水浴 10 min)后，黄曲霉毒素的降解能力并未降低，反而得到增强，进一步证明参与降解 AFB_1 的蛋白质或酶具有良好的热稳定性[23]。

由图 6(c)可知，在酸性环境下，AFB_1 的降解率急剧下降，pH 为 4 时降解率最低(55.25%)。AFB_1 降解率随着 pH 的升高先增加后降低，并在 pH 为 8 时最高(94.47%)。此外，碱性环境下暹罗芽孢杆菌 DY3123 无细胞培养基上清液对 AFB_1 的降解效果明显高于酸性环境，说明参与降解 AFB_1 的蛋白质或酶具有较强的耐碱性。研究表明，pH 也影响地衣芽孢杆菌 CFR1 培养上清液对 AFB_1 的降解[11]，AFB_1 的降解率随着 pH 的降低而降低，pH 为 7 时降解率最高(91.24%)，pH 为 4 时降解率最低(22.01%)；嗜麦芽链球菌培养上清液在 pH 为 8 时降解率最高(84.12%)，在 pH 为 4 时降解率最低(14.3%)[16]。酶在最适 pH 范围内表现出最大活性，超出最适范围可能会削弱酶的活性，暹罗芽孢杆菌 DY3123 无细胞培养基上清液在较大的 pH 范围内(pH 为 6~10 时)具有较强的降解活性(AFB_1 降解率超过 80%)，表明参与降解 AFB_1 的酶在该 pH 范围内能保持稳定的活性。

金属离子对暹罗芽孢杆菌 DY3123 无细胞培养基上清液降解 AFB_1 的影响见 6(d)。Cu^{2+} 对 AFB_1 的降解率比空白对照组提高了 6.53%，而 Zn^{2+}、Mg^{2+} 和 Fe^{3+} 对 AFB_1 的降解率比空白对照组分别降低了 52.18%、27.85%、24.14%，说明其显著抑制了暹罗芽孢杆菌 DY3123 降解 AFB_1 的活性，而 Mn^{2+} 对其降解能力无显著影响。

Cu^{2+}可促进暹罗芽孢杆菌DY3123无细胞培养基上清液对AFB_1的降解活性，这与金属离子对铜绿假单胞菌[20]和镰刀菌WCQ3361[5]的降解活性的影响一致。相比之下，Zn^{2+}、Mg^{2+}和Fe^{3+}可以显著抑制其降解能力，在金黄色杆菌[26]和镰刀菌[5]的研究中也发现类似现象。推测可能是Cu^{2+}作为酶的激活剂，参与维持蛋白质的结构完整性，而Zn^{2+}会引起酶活性位点构象的变化，并导致和底物的亲和力降低[27]。总之，金属离子对暹罗芽孢杆菌DY3123无细胞培养基上清液降解AFB_1活性的影响可进一步证实酶参与了AFB_1的降解。



(a) 降解时间

(b) 反应温度

不同字母代表差异显著(P<0.05)。

(c) 初始pH

(d) 金属离子

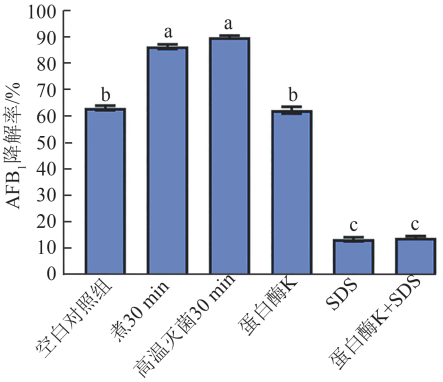
不同字母代表差异显著(P<0.05)。

图6　不同条件下暹罗芽孢杆菌DY3123无细胞培养基上清液降解AFB_1的效果

Fig. 6　Effect of cell-free culture supernatant of *B. siamensis* DY3123 on the degradation of AFB_1 under different conditions

2.5　热处理、SDS和蛋白酶K对AFB_1降解的影响

如图7所示，与空白对照组相比，经SDS处理或蛋白酶K+SDS处理后，培养基上清液降解AFB_1的能力显著降低（P<0.05），分别降低78.54%、77.57%。蛋白酶K处理时，AFB_1降解率略有降低，但无显著影响（P>0.05）。此外，暹罗芽孢杆菌DY3123无细胞培养基上清液经过热处理后降解活性显著增强，煮30 min处理和高温灭菌30 min处理分别增加36.53%、42.25%。暹罗芽孢杆菌DY3123无细胞培养基上清液经SDS处理和蛋白酶K+SDS处理显著抑制AFB_1的降解，这与地衣芽孢杆菌[11]、铜绿假单胞菌[20]和红毛雷氏菌[10]的研究结果相似。研究发现，经蛋白酶K处理的红毛雷氏菌的无细胞



不同字母代表差异显著(P<0.05)。

图7　热处理、蛋白酶K处理、SDS处理、蛋白酶K+ SDS处理对暹罗芽孢杆菌DY3123无细胞培养基上清液降解AFB_1的影响

Fig. 7　Effects of heat, proteinase K, SDS, and proteinase K+SDS treatments on the degradation of AFB_1 by cell-free culture supernatant of *B. siamensis* DY3123

上清液仍保持较低的降解活性，但当同时添加SDS时，活性被完全破坏[10]。蛋白酶K或蛋白酶K+SDS处理可显著抑制降解活性，表明蛋白质可能参与无细胞培养基上清液对AFB_1的降解。

2.6 降解产物的细胞毒性分析

由于某些降解产物可能与母体化合物一样会产生毒性，因此也有必要研究真菌毒素降解产物的细胞毒性和致突变性。MTT结果见图8，在分别培养24、48、72 h后，细胞存活率与溶液中AFB_1的质量浓度呈负相关，培养24 h后，AFB_1溶液的细胞存活率分别降低了18.12%（20 μL）、20.21%（40 μL）和24.41%（80 μL）。经暹罗芽孢杆菌DY3123无细胞培养基上清液处理的AFB_1降解产物的细胞存活率均达到对照组的90%以上，说明暹罗芽孢杆菌DY3123无细胞培养基上清液能对AFB_1进行有效的生物解毒，并且在供试质量浓度下，降解产物对淋巴细胞无毒。由于暹罗芽孢杆菌DY3123产生的降解或转化产物的毒性低于母体化合物AFB_1，且该上清液在抑制AFB_1诱导的细胞毒性方面有效，因此暹罗芽孢杆菌DY3123可作为食品工业中AFB_1生物降解的候选菌株。然而在该研究中，未能确定AFB_1的任何分解产物，而其他研究中也暂未鉴定到降解产物[11-12,23]。因此，需要进一步研究以确定分解产物，并阐明暹罗芽孢杆菌DY3123降解AFB_1的确切机制。

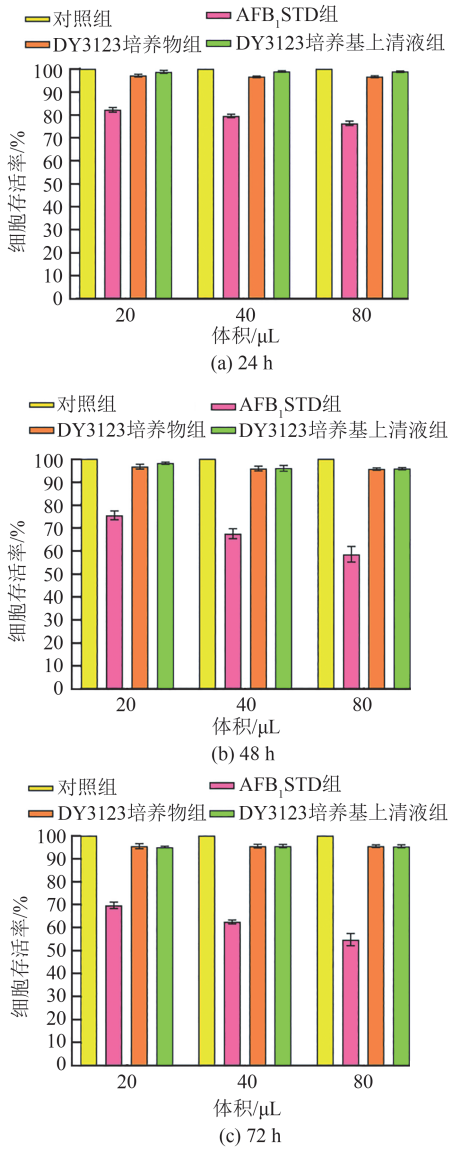


图8 降解产物对细胞存活率的影响

Fig. 8 Effect of degradation products on the cytotoxicity

2.7 AFB_1降解产物的分析

由图9可知，虽然AFB_1存在于降解产物的提取物中，但与AFB_1相比，AFB_1降解产物的相对强度明显降低，进一步证实了暹罗芽孢杆菌DY3123无细胞培养基上清液对AFB_1的降解效果较好。

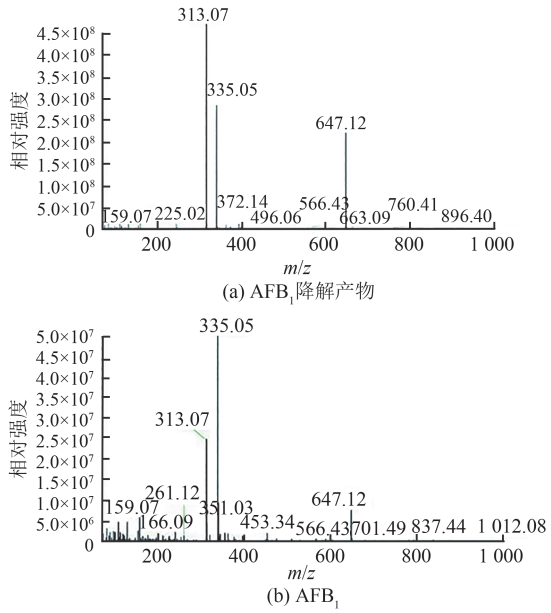


图9 AFB_1及其降解产物的质谱分析

Fig. 9 Mass spectra of AFB_1 and its degradation products

3 结论

以香豆素为唯一碳源，从松墨天牛幼虫肠道中分离、筛选出对AFB_1降解能力最强的细菌，通过生理生化鉴定和16S rRNA序列比对分析，鉴定该菌株为暹罗芽孢杆菌DY3123。暹罗芽孢杆菌

DY3123培养基上清液对AFB_1的降解活性较高，上清液中起降解作用的蛋白质或酶具有较大的温度耐受范围、pH耐受性以及优异的热稳定性，且降解产物的细胞毒性低。因此，暹罗芽孢杆菌DY3123培养基上清液中的蛋白质或酶在去除AFB_1污染方面具有潜在的应用价值。未来还需进一步分离和鉴定培养上清液中具有AFB_1降解活性的酶或蛋白质，以拓展暹罗芽孢杆菌DY3123在食品工业中的用途。

参考文献

[1] 杨阳，邱天宇，袁晓，等. 黑曲霉降解黄曲霉毒素B_1的研究及转录组分析[J]. 食品与生物技术学报，2021，40(9)：16-25.
YANG Y，QIU T Y，YUAN X，et al. Biodegradation of aflatoxin B_1 by *Aspergillus niger* and transcriptome analysis [J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2021，40(9)：16-25.(in Chinese)

[2] 邵铮铮，周威，赵岩岩，等. 钾离子通道在黄曲霉菌孢子萌发中的作用[J]. 食品与生物技术学报，2020，39(2)：32-38.
SHAO Z Z，ZHOU W，ZHAO Y Y，et al. Effect of potassium ion channels into the spore germination in *Aspergillus flavus* [J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2020，39(2)：32-38.(in Chinese)

[3] 宋根娣，王佳伟，周斌，等. 链霉菌SG17代谢产物对玉米黄曲霉的抑制作用及其稳定性分析[J]. 食品与生物技术学报，2022，41(3)：46-52.
SONG G D，WANG J W，ZHOU B，et al. Inhibitory effect and stability analysis of *Streptomyces* SG17 metabolites against *Aspergillus flavus* in corns[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2022，41(3)：46-52.(in Chinese)

[4] XIA X S，ZHANG Y，LI M Y，et al. Isolation and characterization of a *Bacillus subtilis* strain with aflatoxin B_1 biodegradation capability[J]. Food Control，2017，75：92-98.

[5] WANG C Q，LI Z Y，WANG H，et al. Rapid biodegradation of aflatoxin B_1 by metabolites of *Fusarium* sp. WCQ3361 with broad working temperature range and excellent thermostability [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture，2017，97(4)：1342-1348.

[6] 唐璎，邓展瑞，黄佳，等. 黄曲霉毒素B_1降解菌株的鉴定及降解产物研究[J]. 食品与发酵工业，2021，47(7)：64-70.
TANG Y，DENG Z R，HUANG J，et al. Screening and identification of an AFB_1-dergrading strain and product analysis[J]. Food and Fermentation Industries，2021，47(7)：64-70.(in Chinese)

[7] MOON Y S，KIM H M，CHUN H S，et al. Organic acids suppress aflatoxin production *via* lowering expression of aflatoxin biosynthesis-related genes in *Aspergillus flavus* [J]. Food Control，2018，88：207-216.

[8] ZJALIC S，REVERBERI M，RICELLI A，et al. *Trametes versicolor*：a possible tool for aflatoxin control[J]. International Journal of Food Microbiology，2006，107(3)：243-249.

[9] MARTÍNEZ M P，GONZÁLEZ PEREYRA M L，JURI M G F，et al. Probiotic characteristics and aflatoxin B_1 binding ability of *Debaryomyces hansenii* and *Kazaschtania exigua* from rainbow trout environment[J]. Aquaculture Research，2018，49(4)：1588-1597.

[10] ALBERTS J F，ENGELBRECHT Y，STEYN P S，et al. Biological degradation of aflatoxin B_1 by *Rhodococcus erythropolis* cultures[J]. International Journal of Food Microbiology，2006，109(1/2)：121-126.

[11] RAO K R，VIPIN A V，HARIPRASAD P，et al. Biological detoxification of aflatoxin B_1 by *Bacillus licheniformis* CFR1 [J]. Food Control，2017，71：234-241.

[12] FARZANEH M，SHI Z Q，GHASSEMPOUR A，et al. Aflatoxin B_1 degradation by *Bacillus subtilis* UTBSP1 isolated from pistachio nuts of Iran[J]. Food Control，2012，23(1)：100-106.

[13] ADEBO O A，NJOBEH P B，MAVUMENGWANA V. Degradation and detoxification of AFB_1 by *Staphylococcus warneri*，*Sporosarcina* sp. and *Lysinibacillus fusiformis*[J]. Food Control，2016，68：92-96.

[14] SUN L H，ZHANG N Y，SUN R R，et al. A novel strain of *Cellulosimicrobium funkei* can biologically detoxify aflatoxin B_1 in ducklings[J]. Microbial Biotechnology，2015，8(3)：490-498.

[15] HUANG S W，SHENG P，ZHANG H Y. Isolation and identification of cellulolytic bacteria from the gut of *Holotrichia parallela* larvae (Coleoptera：Scarabaeidae) [J]. International Journal of Molecular Sciences，2012，13(3)：2563-2577.

[16] GUAN S，JI C，ZHOU T，et al. Aflatoxin B_1 degradation by *Stenotrophomonas maltophilia* and other microbes selected using coumarin medium [J]. International Journal of Molecular Sciences，2008，9(8)：1489-1503.

[17] 姚丽莉，许齐纯，刘晓萌，等. 一株产CoQ_{10}的类球红细菌分离鉴定及诱变选育[J]. 食品与生物技术学报，2021，40(2)：32-40.
YAO L L，XU Q C，LIU X M，et al. Isolation，identification and mutation of a *Rhodobacter sphaeroides* with high yield of coenzyme Q_{10} [J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2021，40(2)：32-40.(in Chinese)

[18] 李云，朱少华，管政兵，等. 产耐热β-半乳糖苷酶蜜源芽

孢杆菌的鉴定及酶学性质[J]. 食品与生物技术学报，2019，38(7)：49-57.
LI Y，ZHU S H，GUAN Z B，et al. Identification of thermostable β-galactosidase-producing *Bacillus* strain from honey and enzymatic properties[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2019，38(7)：49-57.(in Chinese)

[19] YOON S H，HA S M，KWON S，et al. Introducing EzBioCloud：a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology，2017，67(5)：1613-1617.

[20] 于泽洋. 棘孢木霉T46的筛选、生产及诱导山新杨抗性机理研究[D]. 哈尔滨：东北林业大学，2021.

[21] SHI L，LIANG Z H，LI J X，et al. Ochratoxin A biocontrol and biodegradation by *Bacillus subtilis* CW14[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture，2014，94(9)：1879-1885.

[22] 霍超，卢海强，刘晓宇，等. 短小芽孢杆菌漆酶基因的克隆表达及重组漆酶降解黄曲霉毒素M_1研究[J]. 食品科学，2019，40(10)：92-98.
HUO C，LU H Q，LIU X Y，et al. Cloning and expression of laccase gene from *Bacillus pumilus* and degradation of aflatoxin M_1 by recombinant laccase[J]. Food Science，2019，40(10)：92-98.(in Chinese)

[23] SANGARE L，ZHAO Y J，FOLLY Y M E，et al. Aflatoxin B_1 degradation by a *Pseudomonas* strain[J]. Toxins，2014，6(10)：3028-3040.

[24] HORMISCH D，BROST I，KOHRING G W，et al. *Mycobacterium fluoranthenivorans* sp. nov.，a fluoranthene and aflatoxin B_1 degrading bacterium from contaminated soil of a former coal gas plant[J]. Systematic and Applied Microbiology，2004，27(6)：653-660.

[25] VARADAVENKATESAN T，MURTY V R. Production of a lipopeptide biosurfactant by a novel *Bacillus* sp. and its applicability to enhanced oil recovery[J]. ISRN Microbiology，2013，2013：621519.

[26] D'SOUZA D H，BRACKETT R E. The role of trace metal ions in aflatoxin B_1 degradation by *Flavobacterium aurantiacum*[J]. Journal of Food Protection，1998，61(12)：1666-1669.

[27] 蔡运涛. AFB_1降解微生物聚生体的筛选及其降解作用的研究[D]. 雅安：四川农业大学，2020.

（责任编辑：闫林红）

关于副主编职务变动的公告

尊敬的读者、作者及学界同仁：

本刊副主编江波教授因同时兼任《Food Bioscience》执行主编，工作量繁重，为减轻其工作压力，同意江波教授辞去本刊副主编职务。我们衷心感谢江波教授任职期间为《食品与生物技术学报》做出的重要贡献。

自即日起，范柳萍教授接任副主编一职，全面协助陈卫主编开展期刊工作。范柳萍副主编将负责组织专题策划、稿件终审、学术质量把控等核心职责，并持续推进期刊国际化发展。范柳萍教授拥有丰富的学术经验和深厚的专业背景，相信她的加入将为本刊带来全新的学术视角和蓬勃的活力，进一步提升期刊的学术水平和影响力。

《食品与生物技术学报》编辑部

2024年12月12日

附：范柳萍教授简介



范柳萍，女，博士，江南大学食品学院教授，博士生导师，江南大学食品学院食品功能评价与调控团队负责人。江苏省“青蓝工程”中青年学术带头人，江苏省“六大人才高峰”高层次人才。主要从事食品营养、功能食品、方便食品等领域的研究与开发工作。近年来，先后主持了“十四五”国家重点研发计划课题、国家自然科学基金项目、江苏省农业科技自主创新项目、江苏省现代农业项目等省部级以上课题十余项；在国内外期刊发表论文150多篇，其中SCI论文80多篇，获授权专利30余项，获得省部级以上奖励10余项。