

中文核公期刊/CSCD

请通过网上投稿系统投稿 网址:http://www.aes.org.cn

呕吐毒素降解菌A4的分离及降解特性研究

于阳光, 胡俊强, 王刚, 高红侠, 邱涵, 张宇航, 刘馨, 史建荣, 徐剑宏

引用本文:

于阳光, 胡俊强, 王刚, 高红侠, 邱涵, 张宇航, 刘馨, 史建荣, 徐剑宏. 呕吐毒素降解菌A4的分离及降解特性研究[J]. 农业环境 科学学报, 2022, 41(12): 2648-2659.

在线阅读 View online: https://doi.org/10.11654/jaes.2022-1134

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

具氯氰菊酯降解功能的植物内生细菌分离鉴定及降解特性研究

孙丽娜, 黄开华, 高新华, 陈伟, 白娜玲, 吕卫光 农业环境科学学报. 2020, 39(1): 70-77 https://doi.org/10.11654/jaes.2019-0760

嗜盐碱高环PAHs降解菌的分离及其降解特性研究

范瑞娟, 刘雅琴, 张琇 农业环境科学学报. 2019, 38(6): 1280-1287 https://doi.org/10.11654/jaes.2018-1023

毒死蜱降解菌降解特性及其降解条件优化

杜晓敏, 王金花, 朱鲁生, 王军, 杨莉莉, 林琳 农业环境科学学报. 2020, 39(10): 2437-2445 https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0212

花生化感物质降解菌的筛选、鉴定与降解特性研究

钱娜, 王小兵, 汪晓丽, 封克, 陈盾, 苏金成, 崔梦涵 农业环境科学学报. 2019, 38(6): 1288-1295 https://doi.org/10.11654/jaes.2018-1358

多环芳烃降解菌的细胞融合及降解性能研究

卢静,侯彬,郭楚玲 农业环境科学学报.2015(6):1134-1141 https://doi.org/10.11654/jaes.2015.06.017



关注微信公众号,获得更多资讯信息

于阳光, 胡俊强, 王刚, 等. 呕吐毒素降解菌 A4的分离及降解特性研究[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(12):2648-2659. YU Y G, HU J Q, WANG G, et al. Isolation and degradation characteristics of deoxynivalenol degrading strain A4[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2022, 41(12):2648-2659.



呕吐毒素降解菌A4的分离及降解特性研究

于阳光1,2, 胡俊强2,3, 王刚1,2, 高红侠2, 邱涵2,3, 张宇航2, 刘馨1,2, 史建荣1,2, 徐剑宏1,2,3*

(1.江苏大学食品与生物工程学院,江苏镇江 212013;2.江苏省食品质量安全重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地/ 农业农村部农产品质量安全控制技术与标准重点实验室/江苏省现代粮食流通与安全协同创新中心,南京 210014;3.南京农业 大学生命科学学院,南京 210095)

摘 要:为了给呕吐毒素(DON)污染的谷物和饲料脱毒提供菌株资源,本研究从赤霉病污染区域的小麦田采集土壤样品,通过富集培养,分离筛选到一株DON降解菌,通过形态、16SrDNA、gyrB基因序列对降解菌进行菌种鉴定,液相色谱串联质谱和核磁共振鉴定降解产物,明确其降解途径和解毒机制,通过菌株生长特性、降解特性和基因组间差异分析比较DON降解菌A4、A8和A16之间的差异。结果表明:分离筛选获得DON降解菌A4,该菌能在10h内降解9.7 μg·mL⁻¹DON,降解率高达97%。经鉴定,A4为德沃斯氏菌(Devosia sp.)。A4通过降解DON为3-keto-DON进行脱毒。A4的最适生长温度为35℃,最适NaCl浓度为2%,其耐热性和耐盐性优于菌株A8和A16。A4的最适降解温度为35℃、最适降解pH为8.0,其降解速率高于菌株A8和A16。通过平均核苷酸相似度(ANI)分析,A4与A8和A16之间的ANI分别为81.54%和77.87%,均低于95%,因此属于不同种的菌株。研究表明,筛选得到的新型DON脱毒菌株A4具有良好的抗逆性,为DON的污染控制提供了新的降解菌资源。

关键词:脱氧雪腐镰刀菌烯醇;德沃斯氏菌;降解特性;基因组间差异分析

中图分类号:X172 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2022)12-2648-12 doi:10.11654/jaes.2022-1134

Isolation and degradation characteristics of deoxynivalenol degrading strain A4

YU Yangguang^{1,2}, HU Junqiang^{2,3}, WANG Gang^{1,2}, GAO Hongxia², QIU Han^{2,3}, ZHANG Yuhang², LIU Xin^{1,2}, SHI Jianrong^{1,2}, XU Jianhong^{1,2,3*}

(1. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 2. Jiangsu Key Laboratory for Food Quality and Safety-State Key Laboratory Cultivation Base, Ministry of Science and Technology/Key Laboratory for Control Technology and Standard for Agro-product Safety and Quality, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Collaborative Innovation Center for Modern Grain Circulation and Safety, Nanjing 210014, China; 3. College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The purpose of this study was to isolate deoxynivalenol (DON) degrading strain and to evaluate its degradation characteristics and mechanism, so as to provide strain resources for the detoxification of DON-contaminated grains and feeds. Soil samples were collected from wheat fields contaminated with gibberella, and DON degrading bacteria were isolated through enrichment culture; they were identified by morphology and 16S rDNA, *gyrB* gene sequence. Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry and nuclear magnetic resonance

收稿日期:2022-11-08 录用日期:2022-12-06

作者简介:于阳光(1997—),男,安徽宿州人,硕士研究生,从事毒素降解研究。E-mail:yuyangguang1997@163.com

^{*}通信作者:徐剑宏 E-mail:xujianhongnj@126.com

基金项目:国家自然科学基金项目(32161143034,31872914,31901805);国家重点研发计划项目(2018YFE0206000);江苏省农业自主创新项目 (CX(21)1005);江苏省科技厅项目(BA2022034);国家农产品安全风险评估项目(GJFP20220105,GJFP20220102)

Project supported : The National Natural Science Foundation of China(32161143034,31872914,31901805); The National Key Research and Development Program of China(2018YFE0206000); Jiangsu Agriculture Science and Technology Program(CX(21)1005); The Jiangsu Province Science and Technology Support Program (BA2022034); National Special Project for Agro-product Safety Risk Evaluation of China (GJFP20220105, GJFP20220102)

were used to identify degradation products, determine degradation pathways, and understand the detoxification mechanisms. The differences between degrading bacteria A4 and DON degrading bacteria A8 and A16 were compared by analyzing strain growth and degradation characteristics, and intergenomic differences. The degradation rate for the DON degrading bacteria, A4, was reported to be 9.7 μ g · mL⁻¹ which increased by more than 97% within 10 h. A4 was identified as *Devosia* sp., that produces 3–keto–DON in the process of degrading DON, thus reducing toxicity. A4 had an optimal growth temperature of 35 °C and an optimal NaCl concentration of 2%. Its heat resistance and salt tolerance were found to be better than those of strains A8 and A16. To degrade DON, A4 requires an optimum pH and temperature of 8.0 and 35 °C, respectively. In terms of degradation characteristics, A4 had highter rate than A8 and A16. Comparison between the average nucleotide similarity (ANI) analyses of the three strains showed that the ANI between A4, and A8 and A16 were 81.54% and 77.87%, respectively. The ANI was lower by 95%, indicating that A4 was genetically different from the other two strains, implying it belongs to a different strain. This study has thus screened a novel DON detoxification strain, with good stress resistance, and provides new degrading bacteria resources for DON pollution control.

Keywords: deoxynivalenol; Devosia sp.; degradation characteristic; genomic difference analysis

脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)又被称为呕吐毒素, 其化学名称为12,13-环氧-3α,7α,15-三羟基单端孢 霉-9-烯-8-酮,主要由禾谷镰刀菌(Fusarium graminearum)、黄色镰刀菌(Fusarium culmorum)、尖孢镰 刀菌(Fusarium oxysporum)、燕麦镰刀菌(Fusarium avenaceum)、蔷薇镰刀菌(Fusarium briar)和雪腐镰刀菌 (Fusarium snow rot)等镰刀菌产生,是粮食、饲料和食 品中主要的霉菌毒素之一^[1-4]。

DON 纯品为白色针状结晶,分子式为 C₁₅H₂₀O₆, 相对分子质量为 296.32,熔点为 151~153 ℃,化学性 质稳定^[5]。DON 易溶于甲醇、乙腈和乙醇等极性溶 剂,不溶于正己烷、丁醇、石油醚等弱极性溶剂,其毒 性主要与 12、13位的环氧基团,3位的羟基以及9、10 位的双键有关^[6-7]。DON 具有急性毒性、慢性毒性、细 胞毒性、免疫毒性、神经毒性等多种毒性,对人畜健康 具有极大的危害^[8-9]。

研究发现,西班牙食品中DON的暴露量高,突出 表现为在西班牙婴幼儿食品中DON含量的超标¹⁰⁰。 随机采样检测发现阿根廷的小麦样品中DON的检出 率较高¹¹¹。MAHDJOUBI等¹¹²¹对阿尔及利亚市场上的 谷物样品污染情况进行调查,发现DON是主要的霉 菌毒素之一。通过对2018年至2020年我国各省饲料 中DON含量进行调查,发现DON的检出率为96.4%, 平均浓度为458.0~1925.4 µg·kg^{-1[13]}。WANG等¹¹⁴¹对 我国饮食中DON暴露情况进行研究,发现在采集的 各类谷物样品中,小麦粉污染最为严重,DON平均浓 度为250.8 µg·kg⁻¹。陆晶晶等¹¹⁵¹从全国28个省(自治 区、直辖市)取样,在5678份小麦粉中,DON的检出 率为58.74%,超标率为4.60%,平均含量为317 µg· kg⁻¹,含量范围为0~56.1 mg·kg⁻¹。刘凤芝等¹¹⁶¹针对 2017年上半年我国部分地区饲料及饲料原料中霉菌 毒素的污染状况进行分析,发现 DON 超标率为 51.8%。通过分析江淮流域的环境条件及小麦赤霉病的分布情况,发现气候条件对镰刀菌侵染小麦起主 要影响作用¹¹⁷¹。

DON 在低 pH 和高温状态下不易被破坏,因此如何去除食品和饲料中的 DON 污染一直是研究的焦点^[18]。生物降解法具有效率高、特异性强、对饲料和环境无二次污染等优点,是食品安全领域的研究热点。WANG等^[19]报道了一株对 DON、3-乙酰-DON 和 15-乙酰-DON 具有降解能力的 Devosia sp. A16,发现A16可将 DON 及其衍生物降解为 3-keto-DON。徐剑宏等^[20]报道了一株 Devosia sp. DDS-1可降解液体培养基中 95% 以上的 DON,对小麦饲料中的 DON 毒素降解率也达到了 75.47%。GARCÍA等^[21]发现 Lactobacillus rhamnosus RC007 可降解 DON,将其作为饲料添加剂可以降低 DON 对肠道的毒性。ZHANG等^[22]报道了一株新的 DON 降解菌株 Nocardioides sp. ZHH-013,该菌可将 DON 代谢为 3-keto-DON 和 3-epi-DON。

本实验拟从土壤中分离出一株可用于高效降解 DON的菌株,明确菌株对DON的初步降解机制,验证 其对DON的降解特性及其性能,并讨论其应用于实 际生产的可能性。

1 材料与方法

1.1 降解菌的分离与鉴定

1.1.1 土壤样品与菌株

土壤样品采集自宿州市、徐州市、淮安市三地受 赤霉病污染的小麦田块。土样具体来源如表1所示。

菌株 Devosia sp. A8 和 Devosia sp. A16 是实验室 前期分离到的 DON 降解菌^[19-20,23]。

农业环境科学学报 第41卷第12期

		•	
编号Number	样品来源 Sources of soil samples	编号Number	样品来源 Sources of soil samples
1	宿州市埇桥区褚兰镇桂山村	10	徐州市丰县宋楼镇康庄村
2	宿州市埇桥区褚兰镇宝光寺村	11	徐州市丰县宋楼镇孙洼村
3	宿州市埇桥区褚兰镇王菜园村	12	徐州市丰县师寨镇史月堤村
4	宿州市埇桥区褚兰镇凤山村	13	徐州市铜山区棠张镇马庄
5	宿州市埇桥区杨庄镇闫庄村	14	徐州市铜山区棠张镇付庄
6	宿州市埇桥区杨庄镇韩楼村	15	徐州市铜山区张集镇黄庄
7	宿州市埇桥区栏杆镇新庄村	16	徐州市铜山区张集镇水口村
8	宿州市埇桥区栏杆镇石相村	17	淮安市盱眙县盱城镇新华村
9	徐州市丰县宋楼镇李庄村	18	淮安市盱眙县邱集镇演法村

表1 土壤样品来源 Table 1 Sources of soil samples

1.1.2 试剂与培养基

DON 通过大孔吸附树脂联合高速逆流色谱制 备^[24],制备DON的浓度根据Sigma公司的DON标准品 进行标定;胰蛋白胨、酵母提取物购自赛默飞世尔科 技(中国)有限公司;无机盐试剂、琼脂购自生工生物 工程(上海)股份有限公司;色谱甲醇购自上海安谱实 验科技股份有限公司。

无机盐培养基(Minimal salt medium, MSM): NaNO₃ 0.5 g·L⁻¹, KH₂PO₄ 1 g·L⁻¹, Na₂HPO₄ 1.6 g·L⁻¹, CaCl₂· 2H₂O 0.025 g·L⁻¹, MgSO₄·7H₂O 0.5 g·L⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 0.5 g·L⁻¹, 加去离子水定容至1 L, pH 7.0。LB培养基: 酵母粉5 g·L⁻¹, 胰蛋白胨 10 g·L⁻¹, NaCl 10 g·L⁻¹, 在 LB液体培养基的基础上添加 1.5%的琼脂即为LB 固 体培养基。上述培养基均于121 ℃高温灭菌 20 min。 1.1.3 仪器设备

Waters 1525 高效液相色谱仪、2489 紫外可见光 (UV/Vis)检测器[沃特世科技(上海)有限公司],SB-C18液相色谱柱[安捷伦科技(中国)有限公司],Power-Pac凝胶电泳仪[伯乐生命医学产品(上海)有限公 司],LabCycler 系列 PCR 仪(SensoQuest GmbH), Tanon-3500 凝胶成像系统(上海天能科技有限公 司),HYL-C恒温摇床(太仓市强乐实验设备有限公 司),5810R高速冷冻离心机(艾本德中国有限公司), Waters Delta Prep 600 制备型高效液相色谱系统(美 国 Waters公司),DRX-600型核磁共振光谱仪(德国 Bruker光谱公司),Waters alliance e2695分析兼半制 备液相色谱仪(杭州瑞析科技有限公司),EVO MA 10 扫描电镜(德国蔡司集团),Shimadzu 20AD XR(岛津 公司),液相色谱串联质谱(AB Sciex triple QUAD[™] 6500,上海 AB Sciex 公司)。

1.1.4 降解菌的筛选与分离

将采集的各土壤样本分别称取 0.5 g 置于 20 mL

MSM 培养基中,30 ℃、180 r・min⁻¹条件下振荡1h,室 温下静置 30 min。吸取 0.5 mL上清液,加入 DON 浓 度为 10 µg・mL⁻¹的 4.5 mL MSM 中,30 ℃、180 r・min⁻¹ 培养7d,每组处理重复3次。从每个培养液中吸取 0.5 mL富集液,加入 0.5 mL乙酸乙酯萃取 2次,氮吹 后用甲醇复溶,高效液相色谱(HPLC)检测培养液中 的 DON 浓度。

将具有 DON 降解能力的富集液梯度稀释,分别 涂布于 LB 培养基和含有 10 μg·mL⁻¹ DON 的 MSM 培 养基上,30℃培养7 d。挑选表型不同的单菌落分别 在 LB和 MSM 平板上划线纯化分离,30℃培养3~5 d。 挑选单菌落于含有 10 μg·mL⁻¹ DON 的 MSM 培养基 中,30℃培养后,通过 HPLC 检测培养基中 DON 的含 量,以此判断菌株是否具有 DON 降解能力。

1.1.5 DON的HPLC检测方法

DON的HPLC检测参照《食品安全国家标准食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其乙酰化衍生物的测定》 (GB 5009.111—2016),在甲醇/水(20/40, *V*/*V*)中以0.6 mL·min⁻¹的流速洗脱,柱温35℃,检测波长218 nm。

使用外标法定量DON,所有实验数据均以3次重复的平均值±SD表示。DON降解率根据以下公式计算:

降解率=
$$\frac{C_0 - C}{C_0} \times 100\%$$

式中: C_0 为空白对照组DON浓度, $\mu g \cdot m L^{-1}$;C为实验组DON浓度, $\mu g \cdot m L^{-1}$ 。

标准曲线绘制:以浓度分别为1、2、5、10、15、20 µg·mL⁻¹的DON标准液,建立峰面积与DON浓度之间 的一元线性回归方程,以此计算不同处理中DON的 浓度。

1.1.6 A4的鉴定

形态鉴定:将菌株 A4 在 LB 平板上划线,在 30 ℃ 条件下培养 3~5 d,观察菌落的颜色、大小、形状,并通

过扫描电子显微镜观察菌株的微观形态。

分子生物学鉴定:使用CTAB/NaCl法抽提A4的 基因组 DNA^[25],采用细菌 16S rDNA 通用引物(27F: 5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3'; 1492R: 5' -TACCTTGTTACGACTT-3'),扩增A4的16SrDNA序 列。PCR反应体系: 2×Tag Master Mix 25 µL, Primer1 2 μL, Primer2 2 μL, ddH₂O 20 μL, Template DNA 1 μL。PCR反应程序:95 ℃预变性 3 min,95 ℃变性 15 s.58 ℃退火15 s.72 ℃延伸90 s.30 个循环:72 ℃延伸 10 min。利用 DiaSpin 柱式 PCR 产物纯化试剂盒(生 工)纯化PCR产物,并对产物进行TA克隆,将连接产 物通过热激法转化至E. coli DH5α感受态中,涂布在 含100 µg·mL⁻¹氨苄青霉素的LB平板上,于37 ℃倒 置培养14h,通过蓝白斑筛选阳性克隆,验证后送上 海生工生物有限公司测序。将测序结果上传至NCBI 数据库进行序列比对,选取同源序列,使用 MEGA 11.0软件构建系统发育树。

1.1.7 降解产物的制备和分析

将A4接种到LB培养基,30℃、180 r・min⁻¹条件 下培养至OD₆₀₀为1.45,离心收集菌体。菌体经PBS 漂洗后接种至100 mL含有100 µg・mL⁻¹DON的MSM 培养基中。分别以未接菌的MSM培养液(100 µg・ mL⁻¹DON)和接入菌体但不含DON的MSM培养基作 对照组。于30℃、180 r・min⁻¹摇床振荡培养5d。分 别冷冻干燥全部培养液,用1 mL甲醇复溶后过0.22 µm滤膜。利用Waters半制备液相色谱仪结合Waters XBridge[™] Prep C18 色谱柱(19 mm×100 mm,5 µm)分离纯化降解产物。产物制备过程中流动相为 甲醇/水(50/50,*V/V*),流速为2 mL・min⁻¹。收集各个 组分后分别进行冷冻干燥。使用毛细管蘸取部分样 品,用甲醇复溶后使用质谱进行检测,剩余所有样品 用CDCl₃复溶后进行核磁检测。

质谱检测条件:通过Shimadzu 20AD XR 联合 AB Sciex triple QUAD[™] 6500 质谱检测器检测 DON 及其 降解产物,色谱柱为 Agilent XDB-C18 分析柱(2.1 mm×150 mm,3.5 μ m)。以甲醇/水为流动相,以5%的 甲醇-水溶液在 10 min 内梯度提升至 90%,随后以 90%的甲醇-水溶液等度洗脱 3 min;流速为 0.2 mL· min⁻¹。毛细管电压为4 kV(正离子),雾化器压力为 206.85 kPa,毛细管温度为 300 ℃。采用 Analyst 1.6.1 软件进行数据采集和处理。

核磁检测条件:利用 Bruker DRX-600 核磁共振 光谱仪(Nuclear magnetic resonance, NMR)分别在600 MHz 和 150 MHz 条件下测量 'H-NMR 和 ¹³C-NMR 光 谱。化学位移(δ,×10⁻⁶)以溶剂信号[δ(H)7.26 和δ(C) 77.16]为参考,另外偶联常数(J)以Hz 为单位测量。

1.2 A4、A8、A16生长与降解特性的比较

本研究分离的DON降解菌A4和实验室前期分离 到的A8和A16都属于德沃斯氏菌(Devosia sp.),通过 比较3株降解菌的生长、降解特性以及基因组序列,确 定A4和A8、A16是否存在区别,及是否存在优势。 1.2.1 A4、A8、A16生长特性的比较

生长曲线的绘制:取OD₆₀₀为1.45的A4、A8、A16 菌液各1mL,分别接入到100mLLB培养基中,在 30℃、180r·min⁻¹条件下培养。每隔4h取样一次,测 定600nm处的吸光值并记录数据。

温度对降解菌生长的影响:取OD₆₀₀为1.45的 A4、A8、A16菌液各1 mL,分别接入到100 mL pH为 7.0的LB培养基中,在20、25、30、35、40、45 ℃,180 r・ min⁻¹条件下分别培养,每隔2h取样一次,测定600 nm处吸光值并记录数据。

初始 pH 对降解菌生长的影响:取 OD₆₀₀ 为 1.45 的 A4、A8、A16 菌液各 1 mL,分别加到初始 pH 为 4.0、 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 的 100 mL LB 培养基中, 30 ℃、180 r・min⁻¹条件下培养,每隔 2 h取样一次,测 定 600 nm 处吸光值并记录数据。

不同 NaCl浓度对降解菌生长的影响:配制 NaCl浓度为0、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%的 LB 培养基。取 OD₆₀₀为 1.45的 A4、A8、A16 菌液各 1 mL,分别加到 100 mL不同 NaCl浓度的 LB 培养基中,在 30 ℃、180 r•min⁻¹条件下培养,每隔 2 h 取样一次,测定 600 nm 处吸光值并记录数据。

1.2.2 A4、A8、A16对DON降解特性的比较

降解曲线的绘制:吸取200 μL 菌液,经无菌 PBS 漂洗后加到含有10 μg·mL⁻¹ DON的 MSM 培养基中, 在30 ℃、180 r·min⁻¹条件下培养,每隔1h取样500 μL,加入乙酸乙酯萃取 DON,氮吹干后用等体积色谱 级甲醇复溶,过0.22 μm滤膜,HPLC检测 DON浓度。

温度对菌株降解 DON 的影响:吸取 200 μL 菌液, 经无菌 PBS 漂洗后加到含 10 μg·mL⁻¹ DON 的 MSM 培 养基(pH 7.0)中,分别在 20、25、30、35、40、45 ℃,180 r· min⁻¹条件下培养,每隔1h取样一次,检测 DON浓度。

pH 对菌株降解 DON 的影响:吸取 200 μL 菌液, 用无菌 PBS漂洗。分别添加到 pH 为 4.0、5.0、6.0、7.0、 8.0、9.0、10.0的培养基中,在不同 pH 条件下分别设置 含有毒素不含有降解菌的对照组,30 ℃、180 r・min⁻¹

2651

www.ger.org.cn

1GS 2652

条件下培养,每隔1h取样一次,检测DON浓度。

1.3 降解菌全基因组序列比较

将 A4、A8 和 A16 菌株送杭州沃森生物技术有限 公司进行全基因组测序。

使用 Kostas lab 在线工具[Kostas lab | Tools(gatech.edu)],两两比对 A4、A8和A16之间的平均核苷酸 相似度(Average Nucleotide Identity, ANI),根据计算 结果判断3株菌之间的亲缘关系。

2 结果与讨论

2.1 降解菌的筛选与鉴定

2.1.1 DON降解菌株的富集与分离

以 DON 为唯一碳源富集培养降解菌,从4号样品 中筛选到一株可以独立降解 DON 的菌株,命名为 A4。将该降解菌接入10 mL含有10 μg·mL⁻¹ DON 的 MSM 培养基中,在30 ℃、180 r·min⁻¹条件下振荡培 养,12 h内即可以将培养基中的DON毒素降解完全。



图1 A4降解DON的HPLC图谱

Figure 1 HPLC profile of DON degradation by A4

如图1所示,在7.8 min处有DON吸收峰。

2.1.2 菌株的形态鉴定

将菌株 A4 在 LB 固体培养基上划线,培养4 d。 如图 2 所示,菌落呈现蜡黄色、略透明,菌体饱满,表 面光滑。电镜图如图 3 所示,菌体细胞呈短杆状,长 度约 1.2 μm,宽约 0.4 μm,无鞭毛。

在NCBI官网上对A4的16SrDNA和gyrB基因测序



图2 菌株A4在固体培养基上的形态





图 3 菌株 A4的扫描电镜图 Figure 3 Scanning electron microscopy(SEM) images of A4



图4 基于菌株 A4的 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树





图5 基于菌株A4的gyrB基因序列构建的发育树

Figure 5 Phylogenetic tree of A4 based on the gyrB gene sequences

结果进行 Blast 分析,选取近缘序列构建基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树(图4)和基于 gyrB 基因序列的发育树(图5)。

结合A4的菌落、细胞形态及16SrDNA系统发育 树结果进行综合分析,参考《伯杰氏系统细菌学手 册》^[26],最终将A4鉴定为*Devosia*sp.。

2.1.3 DON标准曲线的绘制

用 HPLC 检测浓度为 $1,2,5,10,15,20 \mu g \cdot m L^{-1}$ 的 DON 标准样品,如图 6 所示,得到峰面积与浓度之间的一元线性回归方程为 $y=0.372 0x-0.055 27, R^2=$ 0.998 2,表明在 $1-20 \mu g \cdot m L^{-1}$ 的浓度范围内,DON 浓度与对应的峰面积有良好的线性关系,可用于 DON 浓度的定量。



2.1.4 降解产物分析

通过LC-MS/MS检测降解产物的分子量,如图7 所示,化合物在正离子模式下的质荷比([M+H]⁺)为 295.12,与DON的分子量(296.32)相差两个氢原子。

利用核磁共振光谱仪检测降解产物,'H-NMR



和¹³C-NMR的化学位移如表2所示。¹H-NMR图谱 与DON的图谱非常相似(图8)。降解产物的H-3[δ (H) 4.356(td, 10.8, 4.8, 4.2)]没有出现质子信号,而 H-4[δ(Hα) 2.29(d, 19.5),δ(Hβ) 3.13(d, 19.5)]的两 个质子信号发生了位移,推测降解产物是DON在3号 碳原子上形成了酮基。对该化合物的¹³C-NMR进行 分析,如图9所示,DON结构上C₃的信号为64.5×10⁻⁶, 但降解产物上的C₃信号却转移到了212.2×10⁻⁶,表明 DON 原本结构上的羟基被氧化成了酮基。综上所 述,将DON的降解产物鉴定为3-keto-DON。

2.2 降解菌 A4、A8、A16 相关特性比较

2.2.1 降解菌 A4、A8、A16 生长特性比较

A4、A8和A16在培养基中的生长曲线如图10所示,随着培养时间的延长,3株菌的菌体浓度开始逐渐升高。A8从接种后8h开始进入对数生长期,在接种后的18h进入平台期;A16的生长速度仅次于A8,在接种后8h也进入对数生长期,并在接种后32h进入平台期;A4的生长速度最为缓慢,在接种后16h开始进入对数生长期,并在接种后48h进入平台期。由

www.aer.org.cn

表2 DON 降解产物的 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据分析结果

Table 2 ¹H-NMR and ¹³C-NMR assignments for

3-keto-DON in CDCl₃

位置	¹³ C化学位移	H化学位移
Position	δ(¹³ C)/×10 ⁻⁶	$\delta({}^{1}H)^{a}/\times 10^{-6}$
1		
2	80.3	3.52(s)
3	212.2	
4	49.6	2.29(<i>d</i> , <i>J</i> =19.5 Hz)
		3.13(<i>d</i> , <i>J</i> =19.5 Hz)
5	46.5	
6	52.7	
7	74.2	4.91(<i>d</i> , <i>J</i> =1.3 Hz)
7-0H		3.81(<i>d</i> , <i>J</i> =1.5 Hz)
8	199.4	
9	136.8	
10	137.8	6.55(dd, J=6.0, 1.5 Hz)
11	70.6	4.57(<i>d</i> , <i>J</i> =6.0 Hz)
12	64.5	
13	48.0	3.23(<i>d</i> , <i>J</i> =4.2 Hz)
		3.36(<i>d</i> , <i>J</i> =4.2 Hz)
14	14.0	1.34(3H,s)
15	62.1	3.75(<i>d</i> , <i>J</i> =11.6 Hz)
		3.91(<i>d</i> , <i>J</i> =11.6 Hz)
16	15.4	1.90(3H,s)





于3株菌生长曲线具有差异性,接种后进入对数生长期的时间差异较大,为明确3株菌的生长特性差异, A4、A8、A16分别取生长28、16、24h处记录的OD600数 据进行比较。



农业环境科学学报

第41卷第12期

0



图 10 A4、A8和 A16的生长曲线 Figure 10 Growth curve of A4, A8 and A16 cultured in LB medium

如图11所示,当温度在20~45 ℃范围内,降解菌 A4、A8、A16的菌体浓度都呈现先升高再降低的趋 势。其中,A4的最适生长温度是35℃,A8和A16的 最适生长温度为30℃。

如图 12 所示,当培养基的初始 pH 在 4.0~5.0 时, 菌体生长缓慢;随着培养基的初始 pH 升高,3 株菌的 菌体浓度都呈现先升高再降低的趋势。在 pH 为 4.0 时,3 株菌几乎不生长;当 pH 上升后,A16 率先生长, 在 5.0~9.0 范围内,A16 均能生长,最适生长 pH 为 7.0, A4 在 6.0~9.0 范围内均能生长,最适生长 pH 为 7.0, A8 在 7.0~9.0 范围内能生长,最适生长 pH 为 8.0。

如图 13 所示,随着培养基中 NaCl浓度的提高, A4 的菌体浓度在 NaCl浓度为 2.0% 处达到最高,A8 的菌体浓度在 NaCl浓度为 0.5% 处达到最高,OD600 为



同组数据中不同小写字母表示处理间差异显著(P<0.05)。下同 Values in a column followed by the different lowercase letters indicate significantly different (P<0.05). The same below

图11 不同温度对A4、A8和A16生长的影响

Figure 11 Effects of different temperatures on the growth of A4, A8 and A16



图12 不同 pH对 A4、A8和 A16 生长的影响

Figure 12 Effects of different pH values on the growth of A4, A8 and A16





1.83,A16在不添加NaCl时达到最高,OD₆₀₀为1.84。 2.2.2 降解菌A4、A8、A16对DON降解特性的比较

A4、A8、A16的降解曲线如图 14 所示。由于 A8 需要在吡咯喹啉醌(PQQ)作辅因子条件下,才可以降 解 DON,因此后续实验 A8 组中都加入了 PQQ。QU

等^[27]报道的降解菌 Lactobacillus rhamnosus SHA113 对 DON的降解率仅约为60%; WANG等^[28]筛选到的 Bacillus licheniformis YB9可在48 h内降解 82.67% 以上 的1 μg·mL⁻¹ DON; HE 等^[29]报道了一株具有 DON转 化能力的菌株 Aspergillus tubingensis NJA-1,7 d 后的

www.aer.org.cn

2656



图 14 A4、A8、A16对 DON 的降解曲线 Figure 14 DON degradation curves by A4, A8, and A16

降解率在 50% 以上,14 d以后的平均降解率为 94.4%; IKUNAGA 等^[30]分离筛选到一株 Nocardioides WSN05-2,培养 10 d后其可将 1 000 µg·mL⁻¹的 DON 完全转化为 3-epi-DON; WANG 等^[31]首次分离到一株 Paradevosia shaoguanensis, DDB001,并发现 DDB001 可完全降解 200 µg·mL⁻¹的 DON,但该菌以 DON 为唯 一碳源生长。本实验筛选到的 A4 仅在7 h内对 10 µg· mL⁻¹ DON 的降解率就可以达到 95.42%,可以 DON 为 唯一碳源进行生长。相对上述 DON 降解菌, A4 具有 极大的优势。

由于3株菌的降解曲线具有差异性,为明确3株 菌对DON的降解特性差异,取A4、A8、A16培养5h样 品中的DON浓度数据进行比较。

温度对菌体的 DON 降解效果的影响如图 15 所 示。当温度从 20 ℃上升到 35 ℃时, A4、A8、A16 对 DON 的降解率均有升高; 当温度继续升高时, 3 株菌 的降解率都呈现下降趋势。这表明, 3 株菌对 DON 的 最适降解温度均为 35 ℃, 这与最适生长温度不完全 一致。结合前人研究结果可知, 这种差异主要是因为 农业环境科学学报 第41卷第12期

DON 降解酶的最适作用温度与菌株最适生长温度间的差异所导致^[32]。

由图 16可以看出,培养基的 pH 对菌体降解 DON 的影响较为明显。在 pH 为4.0时,3株菌对 DON 基本 没有降解效果;随着 pH 升高,A4、A8、A16 3株菌的降 解率均有提升,最适降解 pH 分别为 8.0、9.0 和 7.0。

2.3 降解菌全基因组分析

通过分析不同菌株基因组间的进化关系,对物种进行物种分类和亲缘关系比较。基因组间的ANI反映了物种间的亲缘关系,在近缘物种之间有较高的区分度。JAIN等^[33]对9万个基因组进行分析,发现大多数谱系种内与种间存在一个明显的ANI分界线,相同物种的基因组ANI大于95%。使用Kostas lab 在线工具计算的3株菌之间的ANI结果如图17所示,A4和A8之间的ANI为81.54%;A4和A16之间的ANI为77.87%;A8和A16之间的ANI为77.87%。这表明A4、A8、A163株菌在亲缘关系上较远,属于不同种的细菌。

2.4 菌株应用讨论

目前,已有一些研究人员明确了DON降解菌的 实际应用效果和解毒能力,例如:LI等¹³⁴¹对从土壤中 筛选到的Devosia sp. ANSB714进行毒理学和安全性 评价,确认该菌株无毒后,将Devosia sp. ANSB714发 酵液加入到饮用水中给猪饮用,发现该菌株可有效降 低猪血清、肝脏和肾脏中的DON残留,改善DON对猪 的中毒症状;赖根生等¹³⁵¹报道了一株降解菌Bacilus velezensis BL-14,将其与Lactic acid bacteria NJ8、Lactic acid bacteria RS1协同发酵饲料,饲料中的DON含 量从3.81 mg·kg⁻¹降到1.39 mg·kg⁻¹;LI等¹³⁶¹研究发现 食用DON污染的饲料后,猪的生长性能显著下降(P< 0.05),肝脏和肾脏的相对器官质量显著增加(P<









图16 不同pH对菌株降解DON的影响

Figure 16 Effects of different pH on DON degradation by A4, A8 and A16



图 17 3株菌全基因组 ANI 对比 Figure 17 Genome-wide ANI comparison between three strains

www.aer.org.cn

19<u>2658</u>

0.05),肠屏障的完整性也受到损害,而当饲料中添加了DON降解菌*Clostridium* sp. WJ06后,上述生长性能和器官毒害均有所减轻。

分离 DON 降解菌,研究其生长特性和降解特性 的主要目的是为了将降解菌运用于实际生产,解决粮 食和饲料中的 DON 污染问题。因此,后续将对降解 菌进行毒理学评价和安全性评价,以降解菌为材料研 发降解菌剂,并应用到实际生产中以解决 DON 毒素 污染问题。

3 结论

(1)本研究从宿州市、徐州市、淮安市3地被赤霉 病污染的小麦田土壤中分离到一株 DON 降解菌 A4。 通过形态、16S rDNA、gyrB 序列构建的系统进化树综 合分析,A4被鉴定为德沃斯氏菌(Devosia sp.)。通过 分离纯化 A4 对 DON 的降解产物,采用 LC-MS/ MS、¹H-NMR、¹³C-NMR等对降解产物进行测定,发现 原本结构上的羟基被转化成了酮基,因此推测 A4将 DON 降解为 3-keto-DON。

(2)对比 Devosia sp.A4、Devosia sp.A8、Devosia sp. A16的相关特性,发现在生长特性方面,A4的最适生 长温度(35℃)、最适 NaCl浓度(2.0%)要高于A8 (30℃,0.5%)和A16(30℃,0),表明A4具有更好的抗 逆性;在降解特性方面,A4在7h时对10 μ g·mL⁻¹DON 的降解率高达95.42%,降解速度略快于A8、A16。A4 对DON的最适降解pH为8.0,A8为9.0,A16为7.0。

(3)通过对比3株降解菌的ANI发现,A4和A8之间的ANI为81.54%;A4和A16之间的ANI为77.87%; A8和A16之间的ANI为77.87%,均低于95%,表明3 株菌属于不同的菌种。

参考文献:

- VESONDER R F, CIEGLER A, JENSEN A H. Isolation of the emetic principle from *Fusarium*-infected corn[J]. *Applied Microbiology*, 1973, 26(6):1008-1010.
- [2] CHEN Y, KISTLER H C, MA Z. Fusarium graminearum trichothecene mycotoxins: Biosynthesis, regulation, and management[J]. Annual Review of Phytopathology, 2019, 57:15–39.
- [3] KHANEGHAH A M, MARTINS L M, HERTWIG A M V, et al. Deoxynivalenol and its masked forms: Characteristics, incidence, control and fate during wheat and wheat based products processing: A review [J]. Trends in Food Science & Technology, 2018, 71:13-24.
- [4] PINTON P, OSWALD I P. Effect of deoxynivalenol and other type B trichothecenes on the intestine: A review[J]. *Toxins*, 2014, 6(5):1615– 1643.

- [5] 仝国辉, 谭壮生, 杨庆, 等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇对健康影响的危害 评估[J]. 毒理学杂志, 2021, 35(5):373-378. TONG G H, TAN Z S, YANG Q, et al. Hazard assessment of the effects of deoxynivalenol on health[J]. *Toxicol October*, 2021, 35(5):373-378.
- [6] 刘水灵,车丽涛,张春勇,等. 饲料中霉菌毒素的研究进展[J]. 安徽 农业科学, 2018, 46(31):4-7. LIU S L, CHE L T, ZHANG C Y, et al. Research progress of mycotoxin in feed[J]. Anhui Agriculture Science, 2018, 46(31):4-7.
- [7] HE P, YOUNG L G, FORSBERG C. Microbial transformation of deoxynivalenol (vomitoxin) [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(12):3857–3863.
- [8] 杨婉莹. 呕吐毒素经 p38-ERK1/2 途径诱导断奶仔兔肠道黏膜损伤 机制的研究[D]. 泰安:山东农业大学, 2020:5. YANG W Y. Study on the mechanism of intestinal mucosal damage induced by vomitotoxin via p38-ERK1/2 pathway in weaning rabbits[D]. Tai'an: Shandong Agriculture Univesty, 2020:5.
- [9] FRANKIC T, PAJK T, REZAR V, et al. The role of dietary nucleotides in reduction of DNA damage induced by T-2 toxin and deoxynivalenol in chicken leukocytes[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2006, 44 (11):1838-1844.
- [10] ALFONSO N, LUIGI C, LUANA I, et al. Deoxynivalenol contamination in cereal-based foodstuffs from Spain:Systematic review and meta-analysis approach for exposure assessment[J]. Food Control, 2022, 132:108521.
- [11] PALACIOS S A, ERAZO J G, CIASCA B, et al. Occurrence of deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside in durum wheat from Argentina[J]. Food Chemistry, 2017, 230:728-734.
- [12] MAHDJOUBI C K, ARROYO-MANZANARES N, HAMINI-KADAR N, et al. Multi-mycotoxin occurrence and exposure assessment approach in foodstuffs from Algeria[J]. *Toxins*, 2020, 12(3):194.
- [13] ZHAO L, ZHANG L, XU Z J, et al. Occurrence of aflatoxin B1, deoxynivalenol and zearalenone in feeds in China during 2018—2020
 [J]. Journal of Animal Science and Biotechnology, 2021, 12(1):74.
- [14] WANG X D, YANG D J, QIN M, et al. Risk assessment and spatial analysis of deoxynivalenol exposure in chinese population[J]. *Mycotoxin Research*, 2020, 36(4):419–427.
- [15] 陆晶晶,杨大进. 2013年中国小麦粉中脱氧雪腐镰刀菌烯醇污染 调查[J]. 卫生研究, 2015, 44(4):658-660. LU J J, YANG D J. Pollution investigation of deoxynivalenol in wheat flour of China in 2013-2015[J]. Journal of Hygiene Research, 2015, 44(4):658-660.
- [16] 刘凤芝,李锋,王永丽.2017年上半年我国部分地区饲料及饲料原料中霉菌毒素的污染状况分析[J]. 粮食与饲料工业,2017(11):46-50. LIUFZ, LIF, WANGYL. Investigation of mycotoxins contamination in feeds and feed ingredients in the first half of 2017 in some parts of China[J]. Cereal & Feed Industry, 2017(11):46-50.
- [17] CUI L, SELVARAJ J N, XING F, et al. A minor survey of deoxynivalenol in *Fusarium* infected wheat from Yangtze-Huaihe river basin region in China[J]. *Food Control*, 2013, 30(2):469–473.
- [18] MISHRA S, DIXIT S, DWIVEDI P D, et al. Influence of temperature and pH on the degradation of deoxynivalenol(DON) in aqueous medium: Comparative cytotoxicity of DON and degraded product[J]. Food

Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment, 2014, 31(1):121–131.

- [19] WANG G, WANG Y, JI F, et al. Biodegradation of deoxynivalenol and its derivatives by *Devosia insulae* A16[J]. *Food Chemistry*, 2018, 276: 436-422.
- [20] 徐剑宏, 祭芳, 王宏杰, 等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇降解菌的分离和 鉴定[J]. 中国农业科学, 2010, 43(22):4635-4641. XU J H, JI F, WANG H J, et al. Isolation and identification of deoxynivalenol degradation strains[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(22):4635-4641.
- [21] GARCÍA G R, PAYROS D, PINTON P, et al. Intestinal toxicity of deoxynivalenol is limited by *Lactobacillus rhamnosus* RC007 in pig jejunum explants[J]. Archives of Toxicology, 2018, 92(2):983–993.
- [22] ZHANG H H, ZHANG H, QIN X, et al. Biodegradation of deoxynivalenol by *Nocardioides* sp. ZHH-013: 3-keto-deoxynivalenol and 3epi-deoxynivalenol as intermediate products[J]. *Frontiers in Microbiol*ogy, 2021, 12:658421.
- [23] WANG Y X, WANG G, DAI Y J, et al. Biodegradation of deoxynivalenol by a novel microbial consortium[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10:2964.
- [24] 王刚, 胡俊强, 史建荣, 等. 利用大孔吸附树脂与高速逆流色谱联 用技术大量制备脱氧雪腐镰刀菌烯醇的方法[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(23):207-211. WANG G, HU J Q, SHI J R, et al. Preparative purification of deoxynivalenol by conbined use of macroporous resin and high-speed countcurrent chromatography[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2018, 46(23):207-211.
- [25] 刘璇,张富春,马纪.一种提取荒漠拟步甲昆虫基因组 DNA 的新 方法[J]. 干旱区研究, 2009, 26(4):582-585. LIU X, ZHANG F C, MA J. A new method for extracting genomic DNA for desert tenebrionid insects[J]. Arid Zone Research, 2009, 26(4):582-585.
- [26] BUCHANAN R E, GIBBONS N E. Bergey's manual of determinative bacteriology[M]. 8th Edition. Baltimore: The Williams & Wilins Company, 1974.
- [27] QU R, JIANG C M, WU W Q, et al. Conversion of DON to 3-epi-DON in vitro and toxicity reduction of DON in vivo by Lactobacillus rhamnosus[J]. Food & Function, 2019, 10:2785-2796.

- [28] WANG S W, HOU Q Q, GUO Q Q, et al. Isolation and characterization of a deoxynivalenol-degrading *Bacterium Bacillus licheniformis* YB9 with the capability of modulating intestinal microbial flora of mice[J]. *Toxins*, 2020, 12:184.
- [29] HE C H, FAN Y H, LIU G F, et al. Isolation and identification of a strain of Aspergillus tubingensis with deoxynivalenol biotransformation capability[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2009, 9 (12):2366-2375.
- [30] IKUNAGA Y, SATO I, GROND S, et al. Nocardioides sp. strain WSN05-2, solated from a wheat field, egrades deoxynivalenol, producing the novel intermediate 3-epi-deoxynivalenol[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89(2):419-427.
- [31] WANG Y, ZHANG H H, ZHAO C, et al. Isolation and characterization of a novel deoxynivalenol-transforming strain *Paradevosia shao*guanensis DDB001 from wheat field soil[J]. Letters in Applied Microbiology, 2017, 65(5):414-422.
- [32] LI B B, DUAN J Q, REN J, et al. Isolation and characterization of two new deoxynivalenol-degrading strains, *Bacillus* sp. HN117 and *Bacillus* sp. N22[J]. *Toxins*, 2022, 14:781.
- [33] JAIN C, RODRIGUEZ R L, PHILLIPPY A M, et al. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries[J]. Nature Communications, 2018, 9(1):5114.
- [34] LI X Y, GUO Y P, ZHAO L H, et al. Protective effects of *Devosia* sp. ANSB714 on growth performance, immunity function, antioxidant capacity and tissue residues in growing-finishing pigs fed with deoxynivalenol contaminated diets[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2018, 121:246-251.
- [35] 赖根生,李洁,刘子睦,等.一株降解 DON 芽孢菌的筛选鉴定及其 发酵饲料应用[J]. 饲料工业, 2021, 42(24):18-24. LAI G S, LI J, LIU Z M, et al. Screening and identification of a deoxynivalenol-degraging *Bacillus* strain and its application in fermented feed[J]. *Feed Industry Magazin*, 2021, 42(24):18-24.
- [36] LI F C, WANG J Q, HUANG L B, et al. Effects of adding *Clostridium* sp. WJ06 on intestinal morphology and microbial diversity of growing pigs fed with natural deoxynivalenol contaminated wheat[J]. *Toxins*, 2017, 9:383.

(责任编辑:李丹)