

蜡样芽孢杆菌 XZ30-2 发酵液对黑曲霉的控制及安全性评价

伊艳杰, 刘阳, 侯志鹏, 赵书云, 陆恒, 贾劲, 李瑞芳*

(河南工业大学生物工程学院, 郑州市生物医药功能分子重点实验室, 河南郑州 450001)

摘要: 该研究测定了蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) XZ30-2 对黑曲霉的抑制活性, 制备 XZ30-2 的发酵液并分析其稳定性, 进一步研究发酵液冻干粉对小麦感染黑曲霉的防治效果, 并开展发酵液的动物安全性评价。结果表明: 蜡样芽孢杆菌 XZ30-2 对黑曲霉有较强的抑制活性, 拮抗带宽 5.32 mm, 发酵液抑菌率为 54.31%; XZ30-2 发酵液对紫外光、日光、pH 为 5~9 时具有较强的耐受性, 当温度升高到 70 °C 时发酵液的抑菌活性开始下降; 每 100 mL 发酵液可制备 150 mg 冻干粉; 利用冻干粉对郑麦 366 进行黑曲霉防治测定, 与对照组相比, 处理组无明显可见的黑曲霉菌落, 显示 XZ30-2 发酵液具有良好的防霉效果。发酵液对小鼠的安全性评价中, 采用 5000 mg/kg·bw 最大剂量灌胃 14 d 内发现小鼠体态正常、体重增加正常、未出现行为异常和死亡现象; 解剖并检查对照组和处理组小鼠的脏器, 均未发现可见病变, 脏器指数和血清学生理指标均差异不显著, 初步确定 XZ30-2 发酵液的动物安全性。研究结果可为蜡样芽孢杆菌 XZ30-2 发酵液作为食品防霉剂的进一步开发应用提供理论参考。

关键词: 蜡样芽孢杆菌; 发酵液; 黑曲霉; 控制; 安全性

文章编号: 1673-9078(2022)01-36-43

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.1.1350

Control and Safety Evaluation of *Bacillus cereus* XZ30-2 Fermentation Supernatant against *Aspergillus niger*

YI Yanjie, LIU Yang, HOU Zhipeng, ZHAO Shuyun, LU Heng, JIA shao, LI Ruifang*

(School of Biological Engineering, Key Laboratory of Functional Molecules for Biomedical Research, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: The inhibitory activity of *Bacillus cereus* XZ30-2 against *Aspergillus niger* was evaluated and the stability of its fermentation supernatant was analyzed. The control effect of lyophilized powder prepared from the fermentation supernatant against *A. niger* was also studied, and its safety was evaluated in mice. *B. cereus* XZ30-2 strongly inhibited *A. niger* growth. The antagonistic bandwidth was 5.32 mm and the inhibitory rate of the fermentation supernatant was 54.31%. The XZ30-2 fermentation supernatant was stable under conditions of ultraviolet light irradiation, sunlight, and pH 5~9. Its antifungal activity began to decrease at 70 °C. A total of 150 mg lyophilized powder could be prepared from 100 mL fermentation supernatant. The biocontrol efficacy of the lyophilized powder was evaluated using Zhengmai 366. In comparison with the control group, there was no obvious formation of *A. niger* colonies in the treatment group, indicating good antifungal properties of the XZ30-2 fermentation supernatant. The safety evaluation revealed that even after 14 days of XZ30-2 fermentation supernatant administration by gavage (maximum dose: 5000 mg/kg body weight), the mice demonstrated normal behavior and posture, normal weight gain, no signs of behavioral abnormalities, and no death. No pathological changes were noted in the organs harvested from the mice of the control and treatment groups. The organ and serological physiological indices were also comparable. Thus, XZ30-2 fermentation supernatant appeared to be

引文格式:

伊艳杰,刘阳,侯志鹏,等蜡样芽孢杆菌 XZ30-2 发酵液对黑曲霉的控制及安全性评价[J].现代食品科技,2022,38(1):36-43

YI Yanjie, LIU Yang, HOU Zhipeng, et al. Control and safety evaluation of *Bacillus cereus* XZ30-2 fermentation supernatant against *Aspergillus niger* [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(1): 36-43

收稿日期: 2021-11-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81973417); 河南工业大学创新基金支持计划专项资助项目 (2020ZKCJ23)。

作者简介: 伊艳杰 (1978-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品霉菌的微生物防治, E-mail: yiyanjie@haut.edu.cn

通讯作者: 李瑞芳 (1971-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品绿色防霉保鲜, E-mail: lrf@haut.edu.cn

safe. Collectively, these results provide theoretical basis for the further development and application of *B. cereus* XZ30-2 fermentation supernatant as an antifungal agent in food.

Key words: *Bacillus cereus*; fermentation supernatant; *Aspergillus niger*; control; safety

由霉菌引起的粮油食品变质给食品工业造成了重大经济损失^[1,2]。霉菌属中最常见的是黑曲霉,它是粮食储藏过程中的优势微生物,可以污染不同阶段的农产品,如收获前、收获后、加工和处理阶段,它的存在对储藏粮食的品质影响甚大^[3,4]。根据联合国粮农组织的统计数据,每年全球平均有 2%的粮食因为霉变而不能食用,有的粮油食品从外表上虽然看不出有霉变,但已受霉菌毒素污染,当毒素被人体误食或被皮肤吸收后,常会引起人体机能减退、患病甚至导致死亡^[5-7]。

在过去几十年中,使用化学防腐防霉剂作为抗菌剂来控制粮食变质已成为一种常用手段。然而,随着消费者对天然、健康食品的日益关注,食品加工商开始寻找更安全的替代品来取代化学添加剂^[1,8]。生物防治已被逐渐应用于食品安全控制中^[9],芽孢杆菌属(*Bacillus* spp.)在自然界中广泛存在,与传统的益生菌相比,芽孢杆菌发挥主要成份是芽孢体,对温度具有较高耐受性,可以在室温下长期储存,也可以在不同的pH环境下储存^[10]。詹艺舒等^[11]从空气、竹子内生细菌中筛选出一株甲基营养型芽孢杆菌Z21,发现该菌株的无菌发酵液对黑曲霉、康氏木霉、绿色木霉等病菌有较强的抑制作用;Podile等^[12]研究的枯草芽孢杆菌AF1使黑曲霉的细胞壁受损,进而抑制黑曲霉的生长;Hassan等^[13]研究的地衣芽孢杆菌BL350-2不仅可以抑制黑曲霉MC5的生长,并且可以降低真菌毒素的合成;Öztopuz等^[14]分离出6株芽孢杆菌可以抑制黑曲霉EGE-K-213的孢子萌发和菌体生长。蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)产生的多种活性物质,例如低分子多肽、脂肽类抗生素和抗菌蛋白等^[15,16],可以有效抑制多种病原微生物的生长,具有良好的研究和应用价值。蜡样芽孢杆菌在小麦的黑曲霉防治应用方面鲜见报道。本研究对蜡样芽孢杆菌XZ30-2的发酵液进行稳定性分析、小麦黑曲霉防治效果测定和动物安全性评价,以推动菌株XZ30-2发酵液在食品安全控制领域的开发和应用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

蜡样芽孢杆菌 XZ30-2 (MZ646135) 和黑曲霉均为本实验室-80 °C 保存菌株; KM 小鼠(许可证号

SCXK(豫)2015-0004), 体重 18~22 g, 购自河南省实验动物中心, SPF 级, 雌雄各半, 健康状况良好。

葡萄糖、可溶性淀粉, 天津市瑞金特化学品有限公司; NaCl, 天津市德恩化学试剂有限公司; 豆粕, 市售; 蛋白胨、酵母浸粉, 北京奥博星生物技术有限责任公司; 琼脂粉, 北京索莱宝科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 生防细菌的抑菌能力检测

采用平板对峙法测定蜡样芽孢杆菌 XZ30-2 的抑菌活性^[17], 在平板中央接种黑曲霉, 28 °C 培养 1 d 后, 在十字线适当距离接种细菌 XZ30-2, 每组 3 次重复, 在 28 °C 培养箱培养 5 d 后, 测量拮抗菌与病原菌之间的距离即拮抗带, 拮抗带的大小反映 XZ30-2 对黑曲霉的抑制能力。

1.2.2 发酵液的制备及抑菌活性测定

参考 Shen 等^[18]方法, 将拮抗细菌 XZ30-2 活化培养后, 挑取单菌落于 20/100 mL LB 液体培养基中, 37 °C, 160 r/min 摇瓶培养 10~12 h。然后按照发酵液 4% 的接种量, 接种到 100/250 mL LB 液体培养基中, 36 °C, 160 r/min 摇瓶培养 48 h。经 4 °C, 11000 r/min 离心 15 min, 0.22 μm 无菌滤膜过滤, 收集上清液, 4 °C 冰箱保存备用。采用生长速率法^[19]测定不同因素处理下发酵液的抑菌率。

1.2.3 发酵液的稳定性分析

参考赵雅等^[20]方法进行 XZ30-2 发酵液的稳定性测定。

(1) 热稳定性

将发酵液分别在室温约 20 (对照)、50、60、70、80、90 和 100 °C 等条件下恒温 2 h, 每个处理重复 3 次。采用生长速率法^[19]测定不同温度处理下发酵液的抑菌率。

(2) 酸碱稳定性

将发酵液用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 分别调整 pH 值为 1、3、5、7、9、11 和 13, 静置 2 h 后调至 pH 值为 7 (自然 pH), 以 pH 为 7 处理的发酵液作为对照, 每个处理重复 3 次。采用生长速率法^[19]测定不同 pH 处理下发酵液的抑菌率。

(3) 紫外光稳定性

将发酵液分成 5 等份, 置于距离 20 W 紫外灯 30 cm 处, 分别照射 30、60、90、120 和 150 min, 以未

经紫外线处理的发酵液为对照, 每个处理重复3次。采用生长速率法^[19]测定不同紫外光处理下发酵液的抑菌率。

(4) 自然光稳定性

将发酵液分成7等份, 放置于4500 lx光照培养箱正中央, 依次经过0、1、2、4、8、16和32 h白光照射后取出, 每个处理重复3次。采用生长速率法^[19]测定不同日光处理下发酵液的抑菌率。

1.2.4 发酵液冻干粉的制备及其对黑曲霉防治效果测定

将 XZ30-2 的发酵液经真空冷冻干燥制备成冻干粉于-20 ℃保存备用。发酵液冻干粉对小麦感染黑曲霉的防治研究参照袁远等^[21]的方法并适当修改。对照组和处理组小麦分别加入4%的黑曲霉孢子悬浮液混匀, 处理组小麦中加入5 mL 1%的冻干粉和15 mL 无菌水混合均匀, 对照组小麦中加入20 mL 无菌水混合均匀, 用保鲜膜密封后置于28 ℃培养箱培养, 7 d后观察小麦感染黑曲霉的发病状况。

1.2.5 动物安全性分析

KM 小鼠饲养于温度22 ℃, 相对湿度40%~70%的动物房。动物食用饲料和饮用水经高压灭菌处理, 参照田原等^[22]的方法饲养小鼠。

1.2.5.1 急性经口毒性实验

采用最大剂量耐受法^[23,24], 以5 000 mg/kg-bw 剂量为最大剂量, 取0.5 g 发酵液冻干粉溶于9.5 mL 无菌水中, 得到5%浓度的发酵液溶液。每组动物10只, 雌雄各半。适应性饲养3 d后, 处理组用发酵液冻干粉溶液20 mL/kg-bw 灌胃, 对照组用同体积无菌水灌胃。分别于第0、2、4、8和14 d称量各组小鼠体重, 观察小鼠的中毒表现及死亡情况, 记录小鼠的毛皮、眼睛、肢体活动和行为等改变情况, 注意是否出现抽搐、腹泻、流涎、嗜睡和昏迷等症状, 记录中毒体征出现和消失的时间以及死亡时间。

1.2.5.2 小鼠血液生理指标测定

小鼠经过14 d灌胃处理后, 取血样前16 h断食, 不断水, 采用乙醚麻醉后, 进行心脏取血装入灭菌的1.5 mL离心管, 将血样静置1~3 h, 经3000 r/min离心10 min, 用移液器吸取血清, 使用生化分析仪测定各项血清学生理指标^[25,26], 包括谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、尿素氮 (BUN) 和肌酐含量 (CREA) ^[27,28]。

1.2.5.3 病理学检查

14 d后对用乙醚麻醉后的小鼠进行尸检, 摘取心脏、肝脏、脾脏和肾脏等脏器, 观察各组脏器器官的颜色, 形态是否异常, 针对病变的脏器需要进行组织

病理学检测, 最后用生理盐水冲洗脏器, 滤纸吸干后称重, 测得各组器官的脏器指数^[29]。

$$\text{脏器指数} / \% = \frac{\text{脏器重量}(g)}{\text{体重}(g)} \times 100\%$$

1.3 数据分析

运用 SPSS 20.0 分析各组实验数据的方差, 并采用 Duncan 氏新复极差法分析实验数据的差异显著性^[30]。

2 结果与讨论

2.1 蜡样芽孢杆菌 XZ30-2 对黑曲霉的抑制

采用平板对峙法检测 XZ30-2 对黑曲霉的抑制, 由图1可知, 拮抗带宽5.32 mm, 说明蜡样芽孢杆菌 XZ30-2 菌株对黑曲霉有较强的抑制作用。通过生长速率法测出 XZ30-2 发酵液对黑曲霉的抑制率为54.31%。

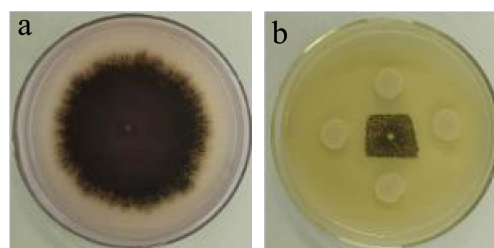


图1 蜡样芽孢杆菌 XZ30-2 对黑曲霉的抑制效果

Fig.1 Inhibitory effect of *Bacillus cereus* XZ30-2 on *Aspergillus niger*

注: a: 黑曲霉; b: 蜡样芽孢杆菌 XZ30-2 对黑曲霉的抑制。

2.2 发酵液的稳定性分析

2.2.1 温度对发酵液抑菌稳定性的影响

不同温度处理与对照组(室温)相比, 当发酵液经过50、60 ℃处理后, 其对黑曲霉的抑菌活性无显著变化, 当处理温度上升到70 ℃后, 抑菌活性开始降低, 经过100 ℃处理后, 抑菌率降低了31.86%, 与对照组相比差异显著(见图2a), 表明发酵液经过高温处理后不具有良好的耐热性。黄伟等^[31]研究发现, 贝莱斯芽孢杆菌 JK19 发酵液经过80 ℃处理后抑菌圈直径开始下降, 抑菌圈直径下降了28%; 贾淑颖等^[32]研究苏云金芽孢杆菌 Bt185 和 HD-1 菌株的发酵上清液, 经过50 ℃处理后, 抑菌圈明显变小, 80 ℃处理后几乎没有抑菌圈, 即抑菌物质逐渐失活。表明发酵液中含有易受温度影响的物质, 可能是某种多糖或者蛋白质^[33,34]。

2.2.2 酸碱对发酵液抑菌稳定性的影响

发酵液在 pH 5~9 范围处理时, 其抑菌活性相对稳定。在强酸或强碱条件下, 发酵液对黑曲霉的抑菌率降低, 与对照相比呈显著性差异 (见图 2b), 表明发酵液不耐强酸和强碱, 适宜 pH 为 5~9, 抑菌率为 48.59%。与 Jiang 等^[35]研究中的 *Aspergillus* As-75 的发酵液在 pH 为 6 的弱酸性条件下, 抗菌活性稳定, 在强酸和强碱条件下, 抑菌圈最大降低 9.9 mm 结果相似。随着 pH 的变化, 发酵液会出现沉淀的现象, 可能是脂肽类物质发生了酸沉淀^[36]。

2.2.3 紫外光照射对发酵液抑菌稳定性的影响

发酵液经不同时间紫外光照射后, 随着照射处理时间延长至 150 min, 抑菌率降低了 1.69%, 与对照组相比其抑菌活性无显著影响 (见图 2c), 表明发酵液对紫外光长时间的照射有较好的稳定性。这一结果与 Liu 等^[37]研究的 *Marine Streptomyces* GB-2 发酵液经紫外光照射处理 24 h 抑菌直径基本不变的现象相同。

2.2.4 日光照射对发酵液抑菌稳定性的影响

发酵液经不同日光照射处理 0~32 h 后, 与对照组相比, 其抑菌活性未发生变化。当日光持续照射 32 h 后, 其抑菌率为 52.45% (见图 2d)。表明发酵液具有较好的自然光稳定性。与刘小玉等^[38]研究的解淀粉芽孢杆菌 ck-05 在自然光持续照射 24 h 后抑菌率为 64.81%, 与对照组相比无明显变化趋势的结论保持一致。

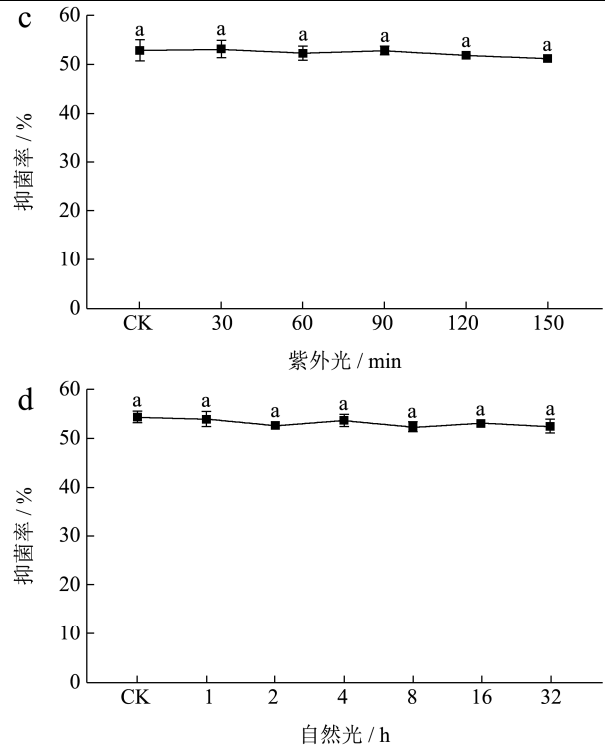
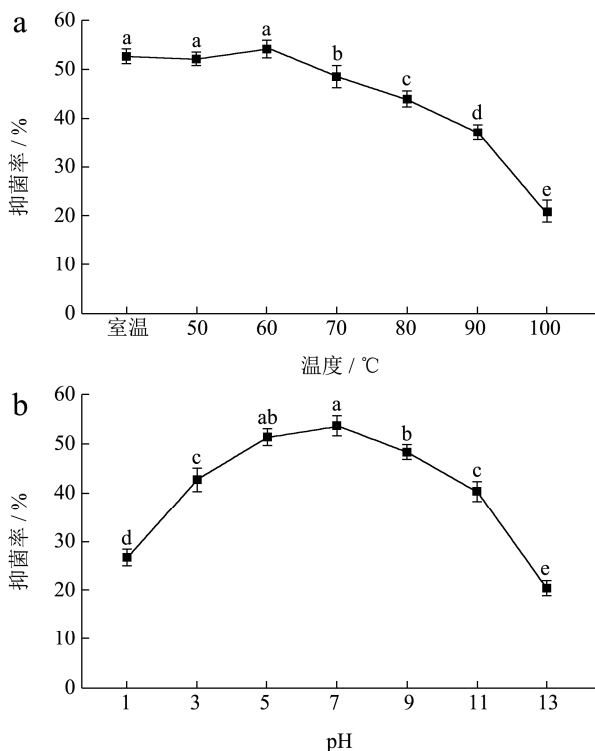


图 2 不同处理因素对发酵液的抑菌活性影响

Fig.2 Effects of different treatment factors on the antifungal activity of fermentation supernatant

注: a: 温度; b: pH; c: 紫外光; d: 自然光; 图中不同字母表示存在显著差异性 ($p < 0.05$)。

2.3 蜡样芽孢杆菌 XZ30-2 发酵液冻干粉对黑

曲霉的防治效果



图 3 XZ30-2 发酵液冻干粉对黑曲霉的防治效果

Fig.3 The control effect of lyophilized powder from fermentation supernatant against *Aspergillus niger*

注: a: 对照; b: 处理。

蜡样芽孢杆菌 XZ30-2 的发酵液经过冷冻干燥, 每 100 mL 发酵液可得 150 mg 冻干粉, 混合黑曲霉孢子悬浮液的小麦籽粒经过发酵液冻干粉溶液处理后, 在 28 °C 培养 7 d 后, 和对照组相比, 没有大片明显的黑曲霉菌落 (见图 3)。说明该发酵液对高水分含量的小麦有着明显的防霉效果。

表1 XZ30-2 发酵液对各组小鼠生长情况的影响

Table 1 Effects of XZ30-2 fermentation supernatant on the growth of mice in each group

项目	天数/d					
	0	2	4	8	14	
体重	对照♂	19.84±1.75 ^a	22.05±1.21 ^a	24.02±1.88 ^a	27.79±1.88 ^{ab}	35.79±1.83 ^a
	处理♂	19.21±1.41 ^a	21.12±1.84 ^{ab}	23.73±1.00 ^a	28.64±1.46 ^a	36.02±1.24 ^a
	对照♀	19.23±1.68 ^A	20.58±1.55 ^A	23.18±1.50 ^A	26.76±1.82 ^A	32.86±1.02 ^A
	处理♀	18.74±1.93 ^{AB}	20.34±1.81 ^A	22.12±1.76 ^{AB}	26.39±1.95 ^A	32.69±1.80 ^A
行为动作	进食正常 活动自如 毛皮整洁	进食正常 活动自如 毛皮整洁	进食正常 活动自如 毛皮整洁	个别小鼠灌胃后活动减少、 次日外观活动均恢复正常		个别小鼠灌胃后活动减少、 次日外观活动均恢复正常
体态观察	正常	正常	正常	正常		正常
死亡记录	0	0	0	0		0

注：同列右肩不同的大小写字母分别表示同一性别组内具有显著差异 ($p < 0.05$)。

2.4 蜡样芽孢杆菌 XZ30-2 发酵液的动物安全

性评价

2.4.1 XZ30-2 发酵液冻干粉对小鼠的生长和死亡的影响

小鼠在动物房经过两天适应性饲养，各组小鼠的体重之间差别不明显，说明该实验动物具有可实验性。小鼠经过发酵液灌胃后，采取自由饮食，在 0、2、4、8 和 14 d 同一时间对小鼠进行称重，在早期灌胃后，小鼠体重增加速率稍有降低，在第 8 d 后恢复正常生长速度。第 14 d 试验组与对照组相比，体重变化差异不显著(见表 1)，说明发酵液对小鼠并无促进发育或抑制发育的情况，且各组均没有出现死亡。周淑贞等^[39]研究的短小芽孢杆菌 B102 口服菌液对小白鼠无致病性，生长期间未出现死亡，与本研究结果一致，表明 XZ30-2 发酵液对小鼠生长无致病性。

2.4.2 XZ30-2 发酵液冻干粉对小鼠器官指数的影响

在对小鼠进行发酵液灌胃的 14 d 后，解剖观察小鼠脏器。结果显示，处理组小鼠脏器颜色、大小和形态与对照组一致，处理组与对照组均无可见病变，与林松泉等^[40]研究的凝结芽孢杆菌 ZC-1 安全性实验中剖检小鼠，未见任何器官、消化道出现病变结果一致；Shobharani 等^[41]研究的弯曲芽孢杆菌 MCC2427 和地衣芽孢杆菌 MCC2512 对大鼠进行 90 d 的灌胃，生命器官组织的颜色、大小、硬度正常，未发生病变。本实验结果表明，小鼠经过发酵液 14 d 灌胃后，脏器组织无明显病理变化，经过称重计算得出脏器指数如表 2，处理组与对照组数据均无显著性差异，说明蜡样芽孢杆菌 XZ30-2 发酵液对小鼠的脏器指数没有显著影

响，表明其对小鼠是安全的，无毒副作用。

表 2 XZ30-2 发酵液对各组小鼠脏器指数的影响

Table 2 Effects of XZ30-2 fermentation supernatant on organ index of mice in each group

组别	脏器/%			
	心脏	肝脏	脾脏	肾脏
对照♂	0.56±0.01 ^a	4.19±0.12 ^{ab}	0.19±0.00 ^{ab}	1.56±0.05 ^a
处理♂	0.58±0.01 ^a	4.88±0.16 ^a	0.23±0.01 ^a	1.41±0.03 ^{ab}
对照♀	0.50±0.00 ^{AB}	4.56±0.01 ^A	0.22±0.00 ^A	1.60±0.00 ^A
处理♀	0.55±0.01 ^A	4.00±0.00 ^{AB}	0.22±0.00 ^A	1.29±0.00 ^{AB}

注：同列右肩不同的大小写字母分别表示同一性别组内具有显著差异 ($p < 0.05$)。

2.4.3 XZ30-2 发酵液冻干粉对小鼠血清生理指标的影响

在对小鼠进行发酵液灌胃的 14 d 后，检验小鼠血清生理指标 ALT、AST、BUN 和 CREA。如表 3 所示，与参照范围形成对比，KM 小鼠雄性的 ALT 高于参照值，但是处理组和对照组相比差异不大，说明 XZ30-2 发酵液对 ALT 不具有显著影响，可能是外界因素的影响导致小鼠 ALT 上升。另外小鼠的 BUN 均高于正常值；CREA 均低于正常值，雌性处理组的 BUN 和对照组含量 14.50 mmol/L 相比，BUN 降低了 5.14 mmol/L。BUN 是蛋白质代谢的重要产物，蛋白质的被利用程度是反映机体适应力大小的指标之一^[42]，雌性的 BUN 下降说明 XZ30-2 发酵液可以提高雌性机体的适应能力；王岩等^[43]研究的解淀粉芽孢杆菌 SSY1 对小鼠进行了急性毒性和慢性毒性试验，CREA 均低于参照值，但和对照组相比不具有显著性，基本体现小鼠正常的生理状态。由此表明，该剂量对小鼠机体未造成损伤，XZ30-2 发酵液对动物的安全性良好。

表3 小鼠的血清生理指标

Table 3 The serological physiological indexes of mice in each group

组别	指标			
	ALT/(U/L)	AST/(U/L)	BUN/(mmol/L)	CREA/(μ mol/L)
对照♂	91.37±9.23 ^a	161.53±17.42 ^b	12.20±2.43 ^a	17.30±3.01 ^{ab}
处理♂	95.23±14.86 ^a	201.03±23.13 ^a	12.76±0.66 ^a	19.20±2.48 ^a
对照♀	41.94±2.01 ^A	120.24±9.90 ^B	14.50±2.42 ^A	20.44±1.63 ^{AB}
处理♀	37.23±5.83 ^{AB}	174.20±13.79 ^A	9.36±1.33 ^B	26.00±6.25 ^A

注: KM 小鼠生理生化指标参考范围: ALT(♂: 20.56~74.04 U/L; ♀: 30.52~40.38 U/L); AST(♂: 99.73~237.17 U/L; ♀: 89.27~204.23 U/L); BUN(♂: 6.51~7.76 mmol/L; ♀: 5.62~7.04 mmol/L); CREA(♂: 30.65~39.34 μ mol/L; ♀: 27.96~35.14 μ mol/L)。同列右肩不同的大小写字母分别表示同一性别组内具有显著差异 ($p < 0.05$)。

3 结论

蜡样芽孢杆菌 XZ30-2 对黑曲霉具有较好的抑菌效果, 发酵液抑菌率为 54.31%。蜡样芽孢杆菌 XZ30-2 发酵液对紫外光、日光、pH 5~9 具有较强的耐受性, 随着温度升高至 70 °C 时抑菌效果开始下降。在对郑麦 366 进行防霉测定中, 处理组相比对照组无大面积明显可见的黑曲霉菌落, XZ30-2 发酵液具有良好的防霉效果。采用发酵液冻干粉溶液对小鼠进行 14 d 灌胃期间, 小鼠行为动作和体态正常、体重增加正常, 未出现异常行为和死亡现象; 小鼠经解剖后, 处理组小鼠脏器的颜色、大小和形态与对照组一致, 处理组与对照组均无可见病变; XZ30-2 发酵液未对小鼠的肝功能和肾功能指标产生负面影响, 确定 XZ30-2 发酵液是安全、无毒的, 可以被进一步开发应用。

参考文献

- [1] Ribes S, Fuentes A, Talens P, et al. Influence of emulsifier type on the antifungal activity of cinnamon leaf, lemon and bergamot oil nanoemulsions against *Aspergillus niger* [J]. Food Control, 2017, 73: 784-795
- [2] Pei X, Tekliye M, Dong M. Isolation and identification of fungi found in contaminated fermented milk and antifungal activity of vanillin [J]. Food Science and Human Wellness, 2021, 10(2): 214-220
- [3] Gil-Serna J, García-Díaz M, Vázquez C, et al. Significance of *Aspergillus niger* aggregate species as contaminants of food products in Spain regarding their occurrence and their ability to produce mycotoxins [J]. Food Microbiology, 2019, 82: 240-248
- [4] Jahani M, Pira M, Aminifard M H. Antifungal effects of essential oils against *Aspergillus niger* in vitro and in vivo on pomegranate (*Punica granatum*) fruits [J]. Scientia Horticulturae, 2020, 264: 109188
- [5] Ferdes M, Juhaimi A L, Özcan M M, et al. Inhibitory effect of some plant essential oils on growth of *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Mucor pusillus* and *Fusarium oxysporum* [J]. South African Journal of Botany, 2017, 113: 457-460
- [6] 闫佳, 牛延菲, 史正军, 等. 滇产 5 种植物精油的抑菌性能及其成分分析 [J]. 林业工程学报, 2021, 6(1): 98-104
- [7] YAN Jia, NIU Yanfei, SHI Zhengjun, et al. The mold inhibitory properties and composition analysis of five plant essential oils produced in Yunnan [J]. Journal of Forestry Engineering, 2021, 6(1): 98-104
- [7] Navale V, Vamkudoth K R, Ajmera S, et al. *Aspergillus* derived mycotoxins in food and the environment: prevalence, detection, and toxicity [J]. Toxicology Reports, 2021, 8: 1008-1030
- [8] Alizadeh M A, Hashempour-Baltork F, Khaneghah A M, et al. New perspective approaches in controlling fungi and mycotoxins in food using emerging and green technologies [J]. Current Opinion in Food Science, 2021, 39: 7-15
- [9] Bu S W, Munir S, He P F, et al. *Bacillus subtilis* L1-21 as a biocontrol agent for postharvest gray mold of tomato caused by *Botrytis cinerea* [J]. Biological Control, 2021, 157: 104568
- [10] Yossef S, Clark F, Bubeck S S, et al. An oral formulation of the probiotic, *Bacillus subtilis* HU58, was safe and well tolerated in a pilot study of patients with hepatic encephalopathy [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020: 1463108
- [11] 詹艺舒, 李婕, 褚秀丹, 等. 一株真菌拮抗细菌 Z21 的筛选与鉴定及其发酵条件优化 [J]. 微生物学通报, 2020, 47(5): 1503-1514
- ZHAN Yishu, LI Jie, CHU Xiudan, et al. Screen, identification and fermentation optimization of an antifungal bacterium Z21 [J]. Microbiology China, 2020, 47(5): 1503-1514

- [12] Podile A R, Prakash A P. Lysis and biological control of *Aspergillus niger* by *Bacillus subtilis* AF1 [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1996, 42(6): 533-538
- [13] Hassan Z U, Thani R A, Alnaimi H, et al. Investigation and application of *Bacillus licheniformis* volatile compounds for the biological control of toxigenic *Aspergillus* and *Penicillium* spp [J]. ACS Omega, 2019, 4(17): 17186-17193
- [14] Öztöpuz Ö, Pekin G, Park R D, et al. Isolation and evaluation of new antagonist *Bacillus* strains for the control of pathogenic and mycotoxigenic fungi of fig orchards [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2018, 186(3): 692-711
- [15] Leite J A, Tulini F L, Reis-Teixeira F B D, et al. Bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Bacillus cereus*: preliminary characterization and application of partially purified extract containing BLIS for inhibiting *Listeria monocytogenes* in pineapple pulp [J]. LWT - Food Science and Technology, 2016, 72: 261-266
- [16] Dabiré Y, Somda N S, Compaoré C S, et al. Molecular screening of bacteriocin-producing *Bacillus* spp. isolated from soumbala, a fermented food condiment from *Parkia biglobosa* seeds [J]. Scientific African, 2021, 12: e836
- [17] 王蕊,胡辉帆,陈文兰,等.一株甲基营养型芽孢杆菌抑菌活性物质鉴定[J].中国调味品,2020,45(9):5-10
WANG Rui, HU Huifan, CHEN Wenlan, et al. Identification of antibacterial active substances of a strain of *Bacillus methylotrophicus* [J]. China Condiment, 2020, 45(9): 5-10
- [18] Shen S, Li W. The inhibitory effects of metabolites from *Bacillus pumilus* on potato virus Y and the induction of early response genes in *Nicotiana tabacum* [J]. AMB Express, 2020, 10(1): 152
- [19] Tian P P, Lv Y Y, Lv A, et al. Antifungal effects of fusion puroindoline B on the surface and intracellular environment of *Aspergillus flavus* [J]. Probiotics Antimicrob Proteins, 2021, 13: 249-260
- [20] 赵雅,张岱,杨志辉,等.贝莱斯芽孢杆菌HN-Q-8菌株发酵液稳定性测定及抑菌活性成分分析[J].微生物学通报,2020, 47(2):490-499
ZHAO Ya, ZHANG Dai, YANG Zhihui, et al. Determination of the stability of fermentation broth and analysis of active components of *Bacillus velezensis* HN-Q-8 [J]. Microbiology China, 2020, 47(2): 490-499
- [21] 袁远,张佩,何鹏飞,等.黄曲霉毒素B1降解菌的筛选及在玉米贮藏中的应用[J].微生物学报,2019,59(2):395-404
YUAN Yuan, ZHANG Pei, HE Pengfei, et al. Screening and application of an antagonistic bacterium against *Aspergillus flavus* [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2019, 59(2): 395-404
- [22] 田原,季子非,郭浩南,等.副干酪乳杆菌L1的安全性及益生性评价[J].食品工业科技,2019,40(12):120-127
TIAN Yuan, JI Zifei, GUO Haonan, et al. Safety and probiotic evaluation of *Lactobacillus paracasei* L1 [J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(12): 120-127
- [23] 李威,吴美玲,杨艳,等.桉叶油素可溶液剂急性毒性安全性评价[J].中国生物防治学报,2018,34(5):802-806
LI Wei, WU Meiling, YANG Yan, et al. Acute toxicity evaluation of cineole soluble concentrate [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2018, 34(5): 802-806
- [24] Li Y, Guo B Z, Li C, et al. Isolation of a highly efficient antigenic-protein-degrading *Bacillus amyloliquefaciens* and assessment of its safety [J]. Animals, 2020, 10(7): 1144
- [25] Ayed H B, Nasri R, Jemil N, et al. Acute and sub-chronic oral toxicity profiles of lipopeptides from *Bacillus mojavensis* A21 and evaluation of their *in vitro* anticoagulant activity [J]. Chemico-Biological Interactions, 2015, 236: 1-6
- [26] Metlakunta A S, Soman R J. Safety evaluation of *Bacillus coagulans* SNZ 1969 in Wistar rats [J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2020, 110: 104538
- [27] 裘纪莹,陈相艳,杨金玉,等.解淀粉芽孢杆菌NCPSJ7对小鼠的急性毒性评价[J].食品科技,2017,42(4):13-16
QIU Jiying, CHEN Xiangyan, YANG Jinyu, et al. Acute toxic effect of *Bacillus amyloliquefaciens* NCPSJ7 on experimental mice [J]. Food Science and Technology, 2017, 42(4): 13-16
- [28] 曹治,于吉峰,谢晶,等.中药提取物对小鼠维生素A急性中毒中晚期的影响[J].西南农业学报,2020,33(12):2800-2806
CAO Ye, YU Jifeng, XIE Jing, et al. Effect of Chinese herbal extracts on middle and late stage of hyper vitamin A disease in mice [J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2020, 33(12): 2800-2806
- [29] 聂启玉,邵宗泽,宋旗,等.生防细菌独岛枝芽孢杆菌1A00493发酵液对小鼠的急性毒理作用[J].应用与环境生物学报,2017,23(1):41-45
NIE Qiyu, SHAO Zongze, SONG Qi, et al. Acute toxicity of an antagonistic bacterium *Virgibacillus dokdonensis* 1A00493 on mice [J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2017, 23(1): 41-45
- [30] Zmantar T, Slama R B, Fdhila K, et al. Modulation of drug resistance and biofilm formation of *Staphylococcus aureus* isolated from the oral cavity of Tunisian children [J]. The

- Brazilian Journal of Infectious Diseases, 2017, 21(1): 27-34
- [31] 黄伟,张丽娟,秦新政,等.贝莱斯芽孢杆菌JK19 发酵液稳定性及抑菌物质初步分析[J].中国生物防治学报,2021:1-9
HUANG Wei, ZHANG Lijuan, QIN Xinzheng, et al. Preliminary analysis of stability and antimicrobial substances in fermentation broth of *Bacillus velezensis* JK19 [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2021: 1-9
- [32] 贾淑颖,郝再彬,陈圣怡,等.苏云金芽孢杆菌发酵上清液抑菌谱及稳定性[J].食品与生物技术学报,2018,37(6):661-665
JIA Shuying, HAO Zaibin, CHEN Shengyi, et al. Study on *Bacillus thuringiensis* fermentation supernatant antimicrobial spectrum and stability [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2018, 37(6): 661-665
- [33] He Z G, Kislak D, Zhang L W, et al. Isolation and identification of a *Paenibacillus polymyxa* strain that coproduces a novel lantibiotic and polymyxin [J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(1): 168-178
- [34] 李亮亮,雷高,李磊,等.一株花生白绢病菌拮抗细菌的筛选、鉴定及发酵液中活性物质稳定性研究[J].花生学报,2021, 50(1):12-18
LI Liangliang, LEI Gao, LI Lei, et al. Screening and identification of an antagonistic bacterium against *Sclerotium rolfsii*, and studies on the stability of bioactive substances in fermentation broth [J]. Journal of Peanut Science, 2021, 50(1): 12-18
- [35] Jiang B, Wang Z Y, Xu C X, et al. Screening and identification of *Aspergillus* activity against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and analysis of antimicrobial components [J]. Journal of Microbiology, 2019, 57(7): 597-605
- [36] Wang N N, Yan X, Gao X N, et al. Purification and characterization of a potential antifungal protein from *Bacillus subtilis* E1R-J against *Valsa mali* [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2016, 32(4): 1-10
- [37] Liu S, Lu Y J, Lu Z X, et al. Antibacterial activity and property of the fermentation product of marine *Streptomyces* sp. GB-2 [J]. Chinese Journal of Bioengineering, 2007, 23(6): 1077-1081
- [38] 刘小玉,付登强,刘立云,等.解淀粉芽孢杆菌ck-05 发酵液的抑菌活性[J].江苏农业科学,2021,49(4):78-81
LIU Xiaoyu, FU Dengqiang, LIU Liyun, et al. Antibacterial activity of fermentation broth of *Bacillus amyloliquefaciens* ck-05 strain [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2021, 49(4): 78-81
- [39] 周淑贞,李成应,谢志恒,等.短小芽孢杆菌B102 的分离鉴定、抑菌活性及安全性试验研究[J].饲料研究,2021,44(16): 89-94
ZHOU Shuzhen, LI Chengying, XIE Zhiheng, et al. Isolation, identification, antimicrobial activity and safety of *Bacillus pumilus* B102 [J]. Feed Research, 2021, 44(16): 89-94
- [40] 林松泉,庄若飞,刘兵,等.1 株凝结芽孢杆菌ZC-1 生物学特性研究[J].饲料研究,2021,44(17):70-74
LIN Songquan, ZHUANG Ruofei, LIU Bing, et al. Study on biological characteristics of a strain of *Bacillus coagulans* ZC-1 [J]. Feed Research, 2021, 44(17): 70-74
- [41] Shobharani P, Muthukumar S P, Kizhakayil D, et al. Strain-specific quantification of native probiotic *Bacillus* spp. and their effect on liver function and gut microflora of experimental rats [J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2019, 11(2): 478-492
- [42] 李秀林,熊伟,谢成超. L-精氨酸对大鼠递增负荷运动至疲劳后血清NO、BUN等指标的影响[J].广州体育学院学报, 2006,6:85-87
LI Xiulin, XIONG Wei, XIE Chengchao. The effect of L-arginine on the indexes of NO and BUN in serum of rats if increase by degree load motion to fatigue [J]. Journal of Guangzhou Sport University, 2006, 6: 85-87
- [43] 王岩,陈楠楠,侯美如,等.解淀粉芽孢杆菌SSY1 株的安全性试验[J].中国畜牧兽医,2017,44(3):928-934
WANG Yan, CHEN Nannan, HOU Meiru, et al. Evaluation of safety of *Bacillus amyloliquefaciens* SSY1 [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2017, 44(3): 928-934