

# 生物降解呕吐毒素的肠杆菌筛选与鉴定

李晓凤<sup>1,2</sup>, 刘思利<sup>2</sup>, 谭景耀<sup>2</sup>, 李靖<sup>2</sup>, 朋贤<sup>2</sup>, 唐语谦<sup>2</sup>

(1. 华南理工大学制浆造纸国家重点实验室, 广东广州 510640)

(2. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 呕吐毒素, 又名脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (deoxynivalenol, DON), 主要污染小麦和大麦等作物。为了筛选得到具有呕吐毒素降解能力的菌株, 实验搜集了 50 份土壤, 通过菌株的富集、筛选和纯化得到一株白色菌株, 命名为 W-D, 该菌株能在无机盐培养基中以 DON (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 作为唯一碳源进行生长。对分离得到的菌株进行 DON 毒素降解能力检测发现, 在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 下作用于 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 DON, 经过 7 d 反应降解率可达 40.40%。对该菌株进行相关鉴定, 发现该菌株为革兰氏阴性菌, 显微镜下呈短杆状, 扫描电镜观察菌株为形状不一的杆状结构, 大小约为  $0.5 \times (1.0 \sim 3.0) \mu\text{m}$ 。生理生化鉴定结果表明 W-D 基本符合肠杆菌的特征。对 W-D 的 DNA 进行 PCR 扩增 16S rDNA 得到一段长度约为 1500 bp 的片段, 测序后进行同源性分析表明该菌株属肠杆菌 *Enterobacter*, 与阴沟肠杆菌 *Enterobacter cloacae* 的亲缘关系最近。

**关键词:** 呕吐毒素; 生物降解; 菌株筛选; 鉴定

文章篇号: 1673-9078(2017)6-125-132

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.6.019

## Screening and Identification of a Deoxynivalenol-degrading *Enterobacter* Strain

LI Xiao-feng<sup>1,2</sup>, LIU Si-li<sup>2</sup>, TAN Jing-yao<sup>2</sup>, LI Jing<sup>2</sup>, PENG Xian<sup>2</sup>, TANG Yu-qian<sup>2</sup>

(1. State Key Laboratory of Pulp and Paper Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640,

China) (2. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** The mycotoxin deoxynivalenol, also called deoxynivalenol (DON), contaminates various crops including wheat and barley. In order to identify a bacterial strain capable of DON biodegradation, a total of 50 soil samples were collected. One white strain was obtained after enrichment, screening, and purification of bacterial strains and was named W-D; it could grow in an inorganic culture medium with DON (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) as the sole carbon source. Analysis of DON degradation ability of the isolated bacterial strain showed that the degradation rate could reach 40.40% after the strain acted on DON (60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) at 180 r/min for seven days at 37  $^{\circ}\text{C}$ . Microscopic analysis showed that the strain W-D was gram-negative and had a short rod-shaped structure. Scanning electron microscopy (SEM) revealed that the strain had a rod-like structure with varying shapes, and a size of about  $0.5 \times 1.0 \sim 3.0 \mu\text{m}$ . Further analysis showed that the physiological and biochemical characteristics of W-D were essentially consistent with those of *Enterobacter* spp. PCR amplification of the 16S ribosomal DNA (16S rDNA) of W-D strain yielded a fragment of  $\sim 1500$  bp. Subsequent phylogenetic tree analysis indicated that the strain belonged to the genus *Enterobacter*, and was the most closely related to *Enterobacter cloacae*.

**Key words:** deoxynivalenol; degradation; screening of bacterial strains; identification

收稿日期: 2017-05-10

基金项目: 广东省科技发展计划项目 (2060302); 中央高校基本科研业务费面上项目 (D2171300)

作者简介: 李晓凤 (1977-), 女, 博士, 教授, 主要从事微生物学, 食品质量与安全及全细胞催化等方面的研究; 刘思利 (1992-), 女, 研究生, 主要从事微生物学, 食品质量与安全及生物降解真菌毒素等方面的研究 (共同第一作者)

通讯作者: 唐语谦 (1979-), 女, 博士, 副研究员, 主要从事微生物学, 食品质量与安全及生物降解真菌毒素等方面的研究

呕吐毒素 (deoxynivalenol, DON), 又名脱氧雪腐镰刀菌烯醇, 主要是由禾谷镰刀菌和黄色镰刀菌产生的 B 类单端孢霉烯毒素, 多分布于大麦、小麦和玉米等谷物籽实当中, 也可通过饲料进入动物体内而导致肉制品的污染<sup>[1,2]</sup>。2015 年, 百奥明公司采集全国各地 1319 份饲料和原料进行真菌毒素的检测, 发现 DON 在晋陕地区玉米中的阳性均值高达 0.91 mg/kg, 同时 DON 在玉米槽 (DDGS)、小麦面粉以及豆粕棉粕中都有检出<sup>[3]</sup>。奥迈实验分析中心对 2016 年上半年

饲料及原料的真菌毒素污染情况进行统计发现, DON 检出率高达 100%, 玉米副产物中的 DON 含量超标严重, 为 81.94%<sup>[4]</sup>。为应对全球范围内的 DON 污染, 各国都制定了相应的 DON 限量标准。美国规定供人食用的 DON 含量不能超过 2 mg/kg<sup>[5]</sup>, 我国也于 2011 年颁布了新的标准, 规定 DON 的含量不得超过 1 mg/kg<sup>[6]</sup>, 欧盟限定玉米粉等谷物中含量不得超过 0.75 mg/kg。

全球范围内的 DON 污染严重危害了人和动物的健康。DON 可以影响动物的消化系统, 带来呕吐、拒食、腹泻、食管穿孔以及营养吸收不良等症状<sup>[7,8]</sup>; 同时, DON 对原核细胞、真核细胞、植物细胞和肿瘤细胞等都具有明显的细胞毒性, 能作用于和免疫毒性以及神经毒性; 此外, 高浓度的 DON 会导致动物免疫抑制从而发生休克死亡<sup>[9]</sup>。

因此, 如何防治和降低诸如 DON 等的真菌毒素带来的危害成了研究的重点。目前, 国内外针对 DON 的脱毒方法主要有机械处理法、物理吸附法以及生物脱毒法等<sup>[10]</sup>。物理吸附法对 DON 的吸附效率差, 且吸附作用仅是对 DON 等毒素进行简单螯合, 并未改变毒性大小, 并且被动物排出后还会对土壤造成二次污染<sup>[11~13]</sup>。随着对 DON 毒性机理的进一步研究, 生物脱毒法成为了新的趋势, 生物脱毒法是通过微生物释放的胞外酶作用于 DON, 并将其转化为更低毒性的代谢产物的方法, 一般通过筛选出具有高效降解 DON 的菌株, 并期望将其中的 DON 降解酶运用于实际生产生活当中。

早期报道的 DON 降解菌以微生物混合物为主, 且以肠道和瘤胃中分离出来的厌氧菌种居多。厌氧菌群虽然可以作用于 DON 并具有较好的降解效果, 但由于厌氧菌的严谨与苛刻的反应条件并不适合大规模的 DON 生物脱毒<sup>[14]</sup>。本研究从广东部分地区采集的多份土壤中分离纯化得到一株肠杆菌, 能在有氧条件下单独作用于 DON, 这为呕吐毒素生物降解菌的发现与应用提供了新的研究资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

50 份土壤样品: 10 份玉米土壤、10 份水稻土壤和 10 份菜田土壤采自华南农业大学; 10 份水稻土壤和 10 份菜田土壤采自广东阳江。

呕吐毒素 (DON) 标准品, 购自 Sigma 公司, 用无菌蒸馏水将 DON 标准品配置成 1 mg/mL 的储备液, 置于 4 °C 下保存。相关酶系、PCR 纯化试剂盒及基因

组抽提试剂盒, 均购自 TaKaRa 公司; 其他试剂均为实验室常用试剂。

### 1.2 培养基

富集培养基: 称取 10 g 蛋白胨, 1 g NaCl, 1 g 葡萄糖, 溶解于 1000 mL 无菌蒸馏水中, 调节 pH 至 7.0, 121 °C 下灭菌 15 min。

无机盐培养基: 称取 0.5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.2 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.05 g CaCl<sub>2</sub>, 2.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 及 1.52 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 溶解于 1000 mL 无菌蒸馏水中, 调节 pH 至 7.0, 121 °C 下灭菌 15 min。

休和利夫森二氏培养基: 称取 2 g 蛋白胨, 5 g NaCl, 10 g 葡萄糖, 0.2 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 溶解于 1000 mL 无菌蒸馏水中, 添加 1% 的溴百里酚蓝指示剂 3 mL, 115 °C 下灭菌 20 min。糖醇类发酵实验时, 葡萄糖以被测 1% 的糖醇代替。

甲基红和 V.P 培养基: 称取 5 g 蛋白胨, 5 g 葡萄糖, 5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 溶解于 1000 mL 无菌蒸馏水中, 115 °C 下灭菌 20 min。

淀粉培养基: 在肉汁培养基中加入 0.2% 的可溶性淀粉, 121 °C 下灭菌 20 min。

L-色氨酸脱氢酶及脲酶检测培养基: 称取 3 g L-色氨酸, 5 g NaCl, 1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 加入 10 mL、95% 的乙醇, 溶于 1000 mL 蒸馏水中, 121 °C 下灭菌 20 min。另将尿素溶于 100 mL 水中, 过滤灭菌, 待培养基灭菌后加入到培养基中。

硫化氢检测培养基: 称取 7.5 g 牛肉膏, 10 g 蛋白胨, 5 g NaCl, 120 g 明胶, 溶于 1000 mL 无菌蒸馏水中, 121 °C 下灭菌 20 min。待培养基灭菌后加入 5 mL 10% 的 FeCl<sub>2</sub> (过滤灭菌)。

### 1.3 仪器设备

DHP-9162 型恒温培养箱及 TH2-C 型恒温摇床, 购自太仓市科教仪器所; 3730XL 型测序仪及 PCR 仪, 购自 Applied Biosystems 公司; DYCP-31DN 型 DNA 电泳槽及 DYY-5 型稳压电泳槽, 购自北京六一仪器厂; HC-2518R 型冷冻高速离心机, 购自 BBI 公司; NOVA NANOSEM 430 型扫描电镜, 购自美国 FEI 公司。

### 1.4 实验方法

#### 1.4.1 菌株的富集

将土壤样品过 40 目筛后, 分别取 1 g 用 3 mL 生理盐水混匀。取 100 μL 悬浮液, 加至 5 mL 含有 10 μg/mL DON 的富集培养基中, 设定三种不同的温度:

25 °C、30 °C和37 °C，并在180 r/min下培养72 h。

## 1.4.2 菌株的筛选

### 1.4.2.1 涂布法筛选菌株

分别吸取100 μL培养3 d的富集液，3000 r/min离心5 min后弃上清，用100 μL含20 μg/mL的DON无机盐液体培养基悬浮沉淀，涂布于平板上，分别于25 °C、30 °C和37 °C下培养24 h。

### 1.4.2.2 平板划线筛选菌株

待培养基灭菌后，将DON标准溶液过0.22 μm微孔滤膜后加入培养基中，使DON终浓度为20 μg/mL。挑取单菌落接种于无机盐培养基中，分别在25 °C、30 °C和37 °C培养箱培养24 h。再次挑选单菌落，划线于无机盐培养基上培养24 h，如此反复划线以纯化菌株。

挑选培养18~24 h的新鲜单菌落进行革兰氏染色，显微镜下观察菌种生理形态。将单菌落接种至无机盐培养基中过夜培养，5000 r/min离心5 min后弃上清，用适量的蒸馏水悬浮菌体，5000 r/min离心5 min，重复上述操作一次，弃上清后用2 mL无菌蒸馏水悬浮菌体，冷冻干燥得到菌粉，用扫描电镜进行观察。

## 1.4.3 DON降解率的测定

### 1.4.3.1 DON降解反应

取上述纯化后的菌株，接种于2 mL含40 μg/mL DON的液体培养基中分别培养3 d和7 d，扩大DON浓度（60 μg/mL）重复实验。以无机盐培养基作为阴性对照，以含有40 μg/mL和60 μg/mL DON的无机盐培养基作为阳性对照。

### 1.4.3.2 HPLC测DON降解率

取1 mL培养液过0.22 μm微孔滤膜后，用带有紫外检测器的HPLC检测降解后培养基中DON含量。高效液相色谱检测DON的条件为：采用Agilent ZORBAX SB-C18的色谱柱（4.6×150 mm，5 μm），流动相采用甲醇/水为20/80（V/V）。测试时的柱温为35 °C，流量为0.9 mL/min，检测器的波长为218 nm。采用下列公式计算DON降解率：

$$\text{相对降解率}(\%) = \frac{\text{DON的添加量} - \text{DON的残留量}}{\text{DON的添加量}} \times 100\%$$

DON标准曲线的绘制：取DON储备液（1 mg/mL）分别稀释至4、10、20、50和100 μg/mL的工作液，进样20 μL，重复测定三次取平均值。根据浓度与峰面积关系绘制DON标准曲线。

## 1.4.4 分离菌株的鉴定

### 1.4.4.1 生化特性分析

按照文献<sup>[15]</sup>中常见菌株鉴定方法对白色菌株进行生理生化实验。

葡萄糖及其他糖醇类的氧化发酵：将培养了18~24 h W-D新鲜单菌落穿刺接种于休和利夫森二氏培养基中，用灭菌的凡士林石蜡油封盖，约0.5~1 cm厚，以隔绝空气，同时设计不做封油的实验组验证菌株的氧化发酵类型。室温培养1、2、3、7和14 d后，观察颜色变化。分别用乳糖、麦芽糖、甘露糖、阿拉伯糖、果糖、木糖和蔗糖代替葡萄糖，检测菌株的糖醇类利用情况。

甲基红及VP测定：接种W-D单菌落于培养液中，适温培养2 d和6 d，在培养基中加入一滴甲基红试剂，变红为阳性；取培养液和40%的NaOH等量混合，并加入少许的肌酸，10 min内出现红色则为VP实验阳性。

淀粉水解：取新鲜单菌落点种于淀粉培养基上，适温培养2~5 d，形成明显菌落后，在平板上滴加碘液，观察菌落周围是否有不变色的透明圈。

氧化酶及接触酶：取培养了18~24 h的新鲜单菌落，涂抹在被1%盐酸二甲基对苯二胺水溶液润湿的滤纸上，10 s内观察颜色变化；取新鲜单菌落涂抹在已滴有10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的玻片上，观察有无气泡产生。

L-色氨酸脱氢酶与脲酶检测：接种新鲜单菌落培养24 h，若培养液由黄变红，则有脲酶存在；取2~4滴培养液与三氯化铁溶液（33%）混合，观察颜色变化，如呈红褐色，则有L-色氨酸脱氢酶存在。

明胶液化和硫化氢实验：取新鲜单菌落穿刺接种，于适温下培养1、3和7 d，观察培养基颜色变化，变黑为硫化氢阳性；同时观察明胶是否出现液化。

### 1.4.4.2 菌株的16S rDNA基因序列测定

采用基因组抽提试剂盒提取菌株培养液的全基因组，设计上游引物27F：AGAGTTTGATCMTGGCTCAG和下游引物1492R：TACGGYTACCTTGTTACGACTT，进行PCR扩增反应，反应体系为：2.5 μL的基因组DNA，2.5 μL的10×Buffer（with Mg<sup>2+</sup>），1 μL的dNTPs（10 mol/L），0.2 μL的酶（5 U/μL），上下游引物（10 mol/L）各0.5 μL，添加无菌蒸馏水至25 μL。PCR反应条件如下：94 °C预变性4 min，94 °C变性45 s，55 °C退火45 s，72 °C延伸60 s，30个循环后于72 °C继续延伸10 min，扩增产物通过1%的琼脂糖凝胶电泳进行检测。将扩增产物用PCR纯化试剂盒进行纯化，并送至美吉生物有限公司进行测序。将测序结果提交到GenBank中进行BLAST比对，选取同源性较高的菌株采用MEGA软件进行进化树分析。

### 1.4.5 数据统计分析

以上数据重复测定三次取平均值，测试结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示，利用Origin 85对实验数据进行统计分析和

处理,采用 GenBank 和 MEGA 7.0 对序列同源性进行分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 降解 DON 菌株的分离

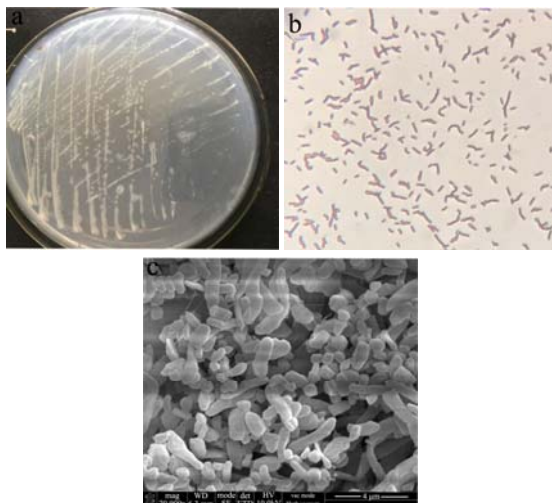


图1 菌株形态图

Fig.1 Morphology of the strain as observed on a solid medium, and under a light microscope and SEM

注: a 表示平板上菌落形态; b 表示显微镜下菌体形态; c 表示扫描电镜下菌体形态 (20000×)。

在无机盐培养基上,菌株生长只能利用 DON 作为唯一的碳源,以此为基础,可以将能降解 DON 的菌株从平板上分离出来。将菌种富集液在含有 20 μg/mL 的 DON 无机盐固体培养基上培养 24 h 后,在 37 °C 的培养基中的菌落生长最快,挑选单菌落进行划线纯化。通过反复的划线纯化从广东阳江水稻土壤中筛选出了一株白色菌株,在基础无机盐培养基上菌株的生长情况如图 1a 所示,菌落呈圆形,直径在 1 mm 左右,边缘整齐,表面湿润有光泽,呈灰白色。通过革兰氏染色在显微镜下进行观察,菌体形态如图 1b 所示,该菌株为革兰氏阴性菌,形态呈短杆状。将离心后的菌体冷冻干燥后,用 SEM 对干燥的菌粉进行观察,在 20000×的倍数下,菌体呈长短不等排列不规则的短杆状,两端钝圆,大小在 0.5×1~3 μm (图 3c)。该菌株能够以 DON 作为唯一的碳源进行生长,说明可能具有降解 DON 的能力。将该菌株命名为 W-D,并接种至含 DON 的液体培养基中培养并测定其降解能力。

### 2.2 HPLC 测菌株的 DON 降解能力

表 1 HPLC 测不同反应条件下菌株 DON 降解

Table 1 HPLC determination of DON degradation under different reaction conditions

DON 浓度 / (μg/mL)	反应时间 / d	DON 降解率 / %
40	3	17.81±0.11
	7	21.47±0.08
60	3	7.18±0.12
	7	40.40±0.25

表 2 菌株的生理生化特性

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of W-D strain

项目	结果
氧化-发酵 (O/F)	发酵型
葡萄糖	+
乳糖	+
麦芽糖	+
甘露醇	+
阿拉伯糖	-
果糖	+
木糖	+
蔗糖	+
淀粉水解	+
VP 实验	+
M.R 实验	-
明胶水解	+
硫化氢	-
氧化酶	-
接触酶	+
脲酶	+
L-色氨酸脱氨酶	-

注:“+”表示结果为阳性;“-”表示结果为阴性。

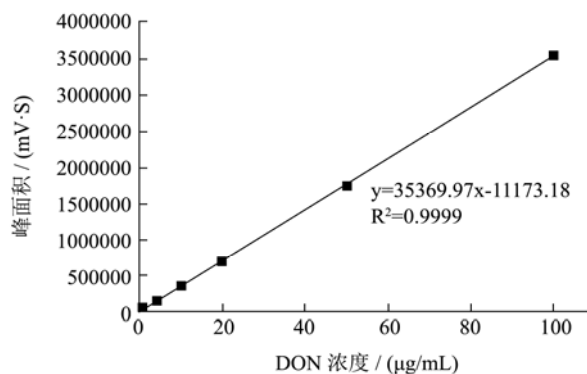


图2 DON 标准曲线图

Fig.2 Standard curve of DON

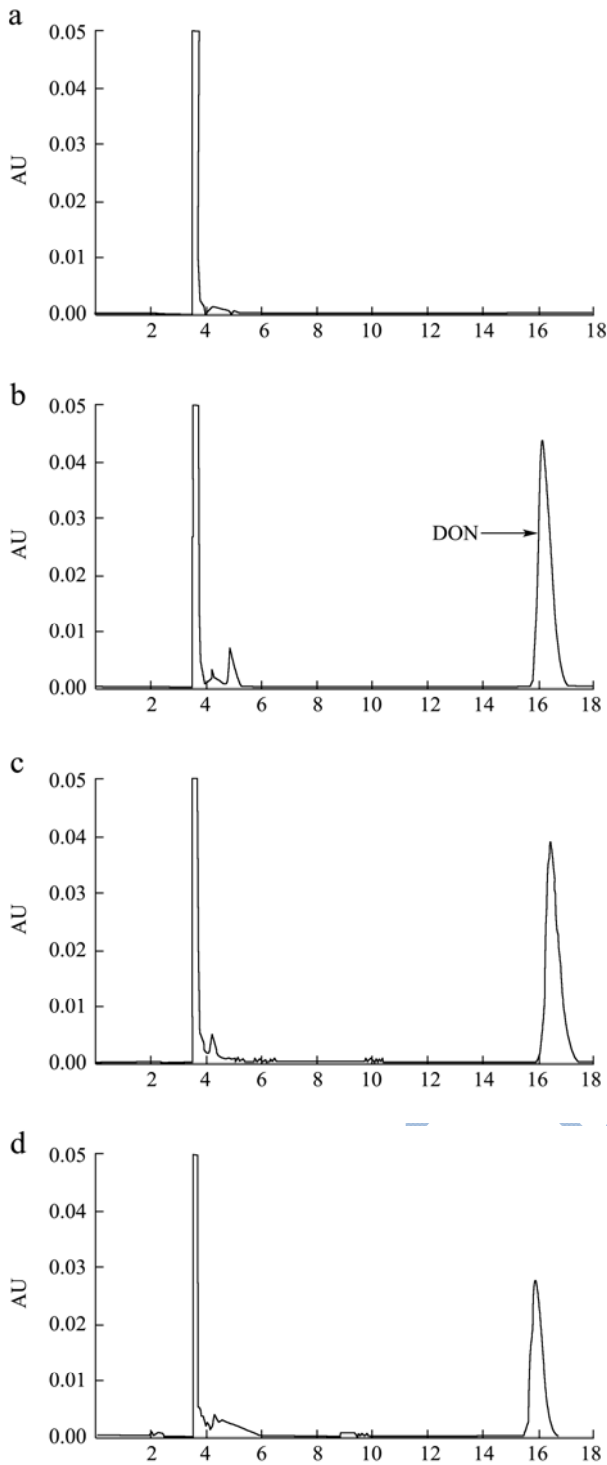


图3 HPLC 检测反应前后 DON 含量 (初始浓度为 60 μg/mL)

Fig.3 HPLC analysis of DON (60 μg/mL) content before and after the degradation reaction

注: a 表示阴性对照; b 表示 DON (阳性对照); c 表示反应 3 d; d 表示反应 7 d。

分别配置浓度为 4、10、20、50 和 100 μL/mL 的 DON 工作液,测得 DON 浓度与峰面积关系标准曲线,如图 2 所示,相关系数  $R^2=0.9999$ 。采用 HPLC 检测 W-D 的 DON 降解能力,结果见表 1,接种 W-D 单菌

落至终浓度分别为 40 和 60 μg/mL 的 DON 反应 3 d 和 7 d 后, DON 浓度均出现不同程度的下降,表明 W-D 具有明显降解 DON 的能力。HPLC 结果显示,以不含 DON 的无机盐培养基作为阴性对照 (图 3a), DON 的出峰时间约为 16.20 min (图 3b), 当 DON 初始浓度为 60 μg/mL 时,反应 3 d 后降解率为 7.1% (图 3c), 7 d 后高达 40.40% (图 3d)。因此选择该菌株做进一步鉴定。

### 2.3 菌株鉴定结果

#### 2.3.1 生化特性分析

菌株的生理生化结果见表 2, 糖醇类发酵实验是鉴定细菌最主要和最基本的实验,特别是对肠杆菌科细菌的鉴定尤为重要,实验表明, W-D 为发酵型菌株,可以利用葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇、果糖、木糖和蔗糖等,不能利用阿拉伯糖。M.R 实验主要是为了检验菌种利用葡萄糖产生乳酸,琥珀酸、醋酸和甲酸等大量酸性产物的能力,实验结果为阴性,表明 W-D 菌株可能为一株产气型菌株。V.P 实验为阳性,表明菌株将葡萄糖分解为丙酮酸,进而脱羧生成乙酰甲基乙醇,最后与 NaOH 反应生成红色化合物。W-D 菌株还能水解淀粉并且作用于半固体的明胶生成液体氨基酸,可产生接触酶和脲酶,不产生氧化酶和 L-色氨酸脱氢酶。实验结果基本符合肠杆菌的生化特征,初步确定 W-D 菌株属于肠杆菌科<sup>[15,16]</sup>。

#### 2.3.2 16S rDNA 序列分析

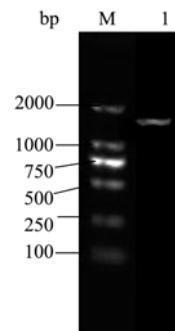


图4 菌株的 16S rDNA 片段 PCR 扩增结果

Fig.4 PCR amplification of 16S rDNA sequence from the DON-degrading strain

注: M 表示 DL2000 Marker; 泳道 1 表示 16S rDNA 片段扩增产物。

采用细菌 DNA 抽提试剂盒对新鲜 W-D 培养液中的细菌 DNA 进行提取,以菌株的基因组 DNA 作为模板,按照 1.2.4.2 中的 PCR 体系进行 PCR 扩增,通过 1%琼脂糖凝胶电泳发现产物在约 1500 bp 处出现一条特异性条带,如图 4 所示。将纯化后的 PCR 产物进行测序,输出峰图,将序列结果提交至 GenBank 进行

BLAST 比对, 发现该菌株与肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*) 具有较高的同源性, 选取其中 16 株序列同源性在 98% 以上的菌株, 通过 MEGA7.0.25 软件构建进化树, 进化树结果见图 5, 结果显示 W-D 菌株与肠杆菌属 (*Enterobacter*) 和西地

西菌属 (*Cedeceadavisae*) 处于同一主分支, 但从遗传距离分析与肠杆菌属的阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*) 亲缘关系更近, 因此, 将菌株 W-D 鉴定为肠杆菌, 这与 W-D 的生理生化实验结果相符合。

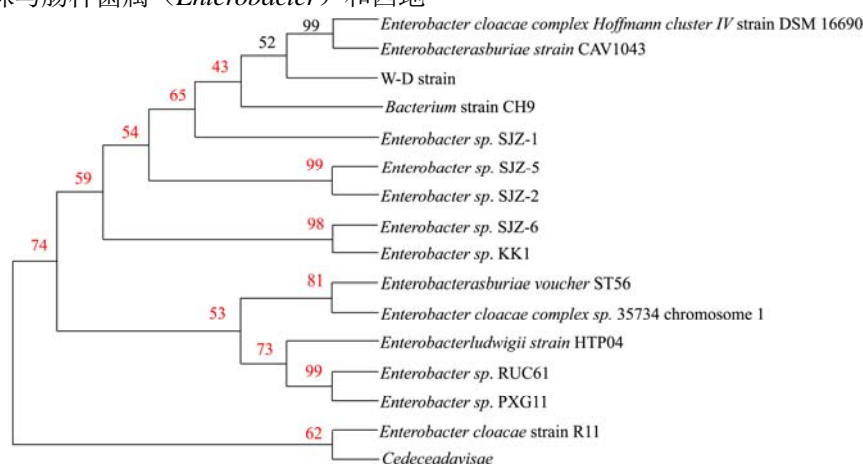


图 5 基于 16S rDNA 构建的系统遗传进化树

Fig.5 Phylogenetic tree analysis based on 16S rDNA sequences by the neighbor-joining method

### 3 讨论

呕吐毒素作为一种真菌毒素, 其污染范围和污染程度仅次于黄曲霉毒素。为了应对 DON 对粮食及饲料的污染, 国内外进行了大量的研究工作。研究表明, 常用的天然硅铝酸盐吸附剂对 DON 的吸附作用受 pH 影响, 仅在 pH 3.0 的环境下时可少量吸附 DON, 且吸附率根据矿物质的不同最高不超过 50%<sup>[17]</sup>, 学者们尝试对硅铝酸盐吸附剂进行改性, 但效果并不明显。目前, 市面上吸附剂产品种类繁多, 除了硅铝酸盐, 其他吸附剂对 DON 的吸附效果也并不理想<sup>[18]</sup>。在研究 IPEC-J2 细胞时, 活性炭可吸附 0.5 和 1 mg/kg 的 DON 消除其对 IPEC-J2 细胞的细胞毒性<sup>[19]</sup>。但由于活性炭在吸附 DON 的同时也会吸附饲料及食品中的营养物质如维生素等, 当活性炭吸附达到饱和时就失去了对 DON 的吸附能力。

面对众多物理化学法的缺陷, 生物脱毒法应运而生成为主要的研究方法。目前发现的微生物对 DON 生物降解主要有两大途径: 一是瘤胃或肠道厌氧菌将 DON 降解成为去环氧化合物 DOM-1, 二是好氧菌将 DON 氧化成 3-酮-DON, 其中 3-酮-DON 的免疫毒性仅为 DON 的十分之一<sup>[20,21]</sup>。厌氧微生物可作用于 DON 将其转化为去环氧环化合物 DOM-1, 研究表明, DOM-1 的毒性仅为 DON 的 1/55, 也是目前 DON 生物降解得到的毒性最低的产物<sup>[22]</sup>。其次是好氧菌。Fuchs 等分离得到真菌 BBSH797 可降解饲料中 DON 的菌株<sup>[23]</sup>。余祖华等从霉变秸秆、土壤和粪便样品中

分离得到一株能降解 DON 的芽孢杆菌 B.JG05, 对无机盐培养基中的 DON 降解率可达 80.61%, 而对饲料中 DON, 采用该菌株发酵 60 h 后降解率可达 82.68%<sup>[24]</sup>。Sato 等发现土壤中的类诺昔氏菌属 (*Nocardioides*) 和德沃斯氏菌属 (*Devosia*) 可降解 DON, 其中, *Devosia* 是一株肠杆菌, 可在有氧环境中将 DON 降解为 3-keto-DON 和 3-epi-DON, 且降解产物的毒性小于 DON<sup>[25]</sup>。徐剑宏等也从感染赤霉病的土壤中分离得到一株德沃斯氏菌 DDS-1, 对饲料中的 DON 降解率可达 75.47%<sup>[26]</sup>, 同时, 实验发现用 DDS-1 可将 DON 氧化成 3-AC-DON, 进而降解成为 3-keto-DON<sup>[27]</sup>。通过菌种鉴定我们发现 W-D 菌株也为一株好氧型肠杆菌, 德沃斯氏菌对 DON 的降解途径与机理的研究为我们后续的研究带来了极大的参考价值与意义。数据显示, 早期发现的 DON 降解菌以厌氧型混合微生物为主, 由于厌氧条件的苛刻以及混合物成分的复杂性, 难于大规模应用。虽然国内外开始着眼于能降解 DON 的好氧菌的开发, 但对于好氧菌中关键作用酶的研究较为有限, 此前报道中已有其他肠杆菌的 DON 降解研究, 这也为 W-D 的研究提供了相关资料。本研究旨在筛选出一株具有降解 DON 作用的好氧菌, 并在今后的工作中深入开展关键作用酶的机理探讨。

### 4 结论

本文从广东阳江的水稻土壤样品中筛选得到一株能有效降解 DON 的菌株 W-D, 在 37 °C 与 60 μg/mL

的 DON 反应 3 d 后, 降解率为 7.18%, 7 d 后降解率可达 40.40%。通过生理生化实验和 16S rDNA 基因鉴定表明 W-D 菌株为一株肠杆菌, 目前在国内外研究的 DON 降解菌中并未见过关于肠杆菌的相关报道。另外, 本研究仅对 DON 降解菌 W-D 进行了初步筛选的工作, 并未对它的培养基或者培养条件进行优化, 实验发现, 该菌株在现有的培养条件下生长比较缓慢, 因此降解效率不高, 仅为 40.40%, 但后续的工作可针对菌株进行优化培养, 有望提高其 DON 降解效率。同时, 本研究发现 DON 降解菌 W-D 为一株发酵型肠杆菌, 可在氧气环境中作用于 DON, 据报道, 目前研究的 DON 降解好氧菌可作用于 DON 并将其氧化成 3-酮-DON<sup>[13]</sup>, 这也为 W-D 对 DON 的生物降解机理提供了理论依据和指导方向。此后课题组也将进一步分析菌株降解 DON 后的分解产物, 探讨其生物降解机理。

#### 参考文献

- [1] Liddell C M, Leonard K J, Bushnell W R. Systematics of *Fusarium* species and allies associated with *Fusarium* head blight [J]. 2003
- [2] 刘绍伟, 罗仕欢. 浅谈霉菌呕吐毒素[J]. 湖南饲料, 2006, 2: 26-27  
LIU Shao-wei, LUO Shi-huan. Talking about the vomitoxin [J]. Hunan Feed, 2006, 2: 26-27
- [3] 王金勇, 王小艳, 李成, 等. 2015 年中国饲料和原料霉菌毒素检测报告[J]. 今日养猪业, 2016, 4: 73-76  
WANG Jin-yong, WANG Xiao-yan, LI Cheng, et al. Report of mycotoxin detection of feed and raw materials in China in 2015 [J]. Pigs Today, 2016, 4: 73-76
- [4] 谢文梅, 苏永腾, 钱英, 等. 2016 年 1~6 月饲料及原料霉菌毒素分析报告[J]. 养猪, 2016, 4: 17-19  
XIE Wen-mei, SU Yong-teng, QIAN Ying, et al. Report of mycotoxin detection of feed and raw materials in China from 2016.1 to 2016.5 [J]. Swine Production, 2016, 4: 17-19
- [5] 朱克卫, 任尧. 粮食作物中真菌毒素及其检测与脱除方法研究进展[J]. 粮食与油脂, 2014, 27(8): 66-70  
ZHU Ke-wei, REN Yao. Research progress on mycotoxins in food crop and its detection and removal methods [J]. Journal of Cereals and Oils, 2014, 27(8): 66-70
- [6] GB 2761-2011, 食品中真菌毒素限量[S]  
GB 2761-2011, Limited mycotoxins in food [S]
- [7] Rotter B A. Invited review: Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin) [J]. Journal of Toxicology and Environmental Health Part A, 1996, 48(1): 1-34
- [8] Awad W A, Aschenbach J R, Setyabud: F, et al. *In vitro* effects of deoxynivalenol on small intestinal D-glucose uptake and absorption of deoxynivalenol across the isolated jejunal epithelium of laying hens [J]. Poultry Science, 2007, 86(1): 15-20
- [9] 黄凯, 黄明明, 朱祖贤, 等. 呕吐毒素毒性研究进展[J]. 饲料博览, 2013, 12: 8-11  
HUANG Kai, HUANG Ming-ming, ZHU Zu-xian, et al. Research progress on toxicity of DON [J]. Feed Review, 2013, 12: 8-11
- [10] 武传欣, 程小丽, 孙伟. 粮食中呕吐毒素的研究进展[J]. 粮食加工, 2016, 4: 48-51  
WU Chuan-xin, CHENG Xiao-li, SUN Wei. Research progress of deoxynivalenol in grain [J]. Grain Processing, 2016, 4: 48-51
- [11] Kolosova A, Stroka J. Substances for reduction of the contamination of feed by mycotoxins: a review [J]. World Mycotoxin Journal, 2011, 215(4): 225-256
- [12] Dr. Sven Dänicke, Tanja Goyarts, Hana Valenta. On the specific and unspecific effects of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent on piglets when fed with uncontaminated or with *Fusarium* toxins contaminated diets [J]. Archives of Animal Nutrition, 2007, 61(4): 266-275
- [13] 万晶, 邓波, 吴杰, 等. 饲料呕吐毒素脱毒方法研究进展[J]. 浙江农业科学, 2014, 9: 1450-1454  
WAN Jing, DENG Bo, WU Jie, et al. Research progress on degradation of DON [J]. Zhejiang Nongye Kexue, 2014, 9: 1450-1454
- [14] 计成, 赵丽红, 李笑樱, 等. 呕吐毒素生物降解研究进展[J]. 饲料工业, 2015, 36(10): 1-5  
JI Cheng, ZHAO Li-hong, LI Xiao-ying, et al. Research advance of deoxynivalenol biodegradation [J]. Feed Industry, 2015, 36(10): 1-5
- [15] 蔡妙英, 东秀珠. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001  
CAI Miao-ying, DONG Xiu-zhu. Bergey's manual of systematic bacteriology [M]. Beijing: The Science Publishing, 2001
- [16] 布坎南. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1984  
Breed R E. Bergey's manual of determinative bacteriology [M]. Beijing: The Science Publishing, 1984
- [17] Bočarovstančić' A, Adamović' M, Salma N, et al. *In vitro* efficacy of mycotoxins' adsorption by natural mineral adsorbents [J]. Biotechnology in Animal Husbandry, 2011, 27(3): 1241-1251

- [18] Boudergue C, Burel C, Dragacci S, et al. Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety [J]. EFSA Supporting Publications, 2009, 6(9)
- [19] Dr. Sven Dänicke, Tanja Goyarts, Hana Valenta. On the specific and unspecific effects of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent on piglets when fed with uncontaminated or with *Fusarium* toxins contaminated diets [J]. Archives of Animal Nutrition, 2007, 61(4): 266-275
- [20] McCormick S P. Microbial detoxification of mycotoxins [J]. Journal of Chemical Ecology, 2013, 39(7): 907
- [21] Islam R, Zhou T, Young J C, et al. Aerobic and anaerobic de-epoxydation of mycotoxin deoxynivalenol by bacteria originating from agricultural soil [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28(1): 7-13
- [22] He J, Zhou T, Young J C, et al. Chemical and biological transformations for detoxification of trichothecene mycotoxins in human and animal food chains: a review [J]. Trends in Food Science & Technology, 2010, 21(2): 67-76
- [23] Fuchs E, Binder E M, Heidler D, et al. Structural characterization of metabolites after the microbial degradation of type A trichothecenes by the bacterial strain BBSH 797 [J]. Food Additives & Contaminants, 2002, 19(4): 379
- [24] 余祖华,丁轲,刘赛宝,等.一株降解呕吐毒素蜡样芽孢杆菌的筛选与鉴定[J].食品科学,2016,37(5):121-125  
YU Zu-hua, DING Ke, LIU Sai-bao, et al. Screening and identification of a *Bacillus cereus* strain able to degrade deoxynivalenol [J]. Food Science, 2016, 37(5): 121-125
- [25] Sato I, Ito M, Ishizaka M, et al. Thirteen novel deoxynivalenol-degrading bacteria are classified within two genera with distinct degradation mechanisms [J]. Fems Microbiology Letters, 2012, 327(2): 110-117
- [26] 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 Jian-hong, JI Fang, WANG Hong-jie, et al. Isolation and identification of deoxynivalenol degradation strains [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2010, 43(22): 4635-4641
- [27] 徐剑宏,潘艳梅,胡晓丹,等.降解菌 DDS-1 产 3-AC-DON 氧化酶的酶学特性[J].中国农业科学,2013,46(11):2240-2248  
XU Jian-hong, PAN Yan-mei, HU Xiao-dan, et al. Enzymatic characteristics of 3-acetyl deoxynivalenol oxidase by *Devosia* sp. DDS-1 [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2013, 46(11): 2240-2248