

# 一株防治花生采后黄曲霉污染的拮抗菌的 筛选及其防控效果

郑爱芳<sup>1,2,3,4</sup>, 何欢<sup>1</sup>, 高晔<sup>1</sup>, 张名雪<sup>1</sup>, 王煦<sup>1</sup>, 赵凯<sup>1,2</sup>

(1. 安庆师范大学生命科学学院, 安徽 安庆 246011; 2. 安徽省一带一路流域生物多样性保护与利用国际合作基地, 安徽 安庆 246011; 3. 皖西南生物多样性研究与生态保护安徽省重点实验室, 安徽 安庆 246011; 4. 安庆市林业科技创新研究院, 安徽 安庆 246011)

**摘要:**为预防花生储藏过程中的黄曲霉污染,从农田土中分离出2株拮抗芽孢杆菌,通过平板对峙法优选出1株作为研究对象,研究其对黄曲霉的抑制效果及对花生采后黄曲霉污染的防控效果。采用平板对峙法检测拮抗菌的抑菌广谱性并绘制生长曲线,并通过生理生化实验、形态特征观察及16S rDNA序列分析对该菌株进行鉴定。结果表明:优选出拮抗菌B419作为研究对象,其可有效抑制黄曲霉的生长,在拮抗菌浓度为 $1.0 \times 10^6$  CFU/mL,黄曲霉孢子浓度为 $1.0 \times 10^3$  CFU/mL时,黄曲霉孢子萌发抑制率达到98%;相比拮抗菌无菌发酵滤液和拮抗菌细胞悬浮液,拮抗菌发酵液防治花生黄曲霉污染效果最好;该菌株对互隔交链孢霉、枝孢霉、青霉、拟盘多毛孢等多种霉菌都有抑制作用,对大肠杆菌、酵母菌也有抑制作用;该菌株在培养4 h后进入对数期,14 h达到最大,26 h后进入衰亡期;该菌株被鉴定为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)。综上,分离的拮抗菌B419对多种微生物都有抑制作用,不仅可以用来预防花生储藏过程中的真菌污染,在防治植物微生物病害方面也具有好的应用潜力。

**关键词:**芽孢杆菌;生防菌;花生;黄曲霉;贝莱斯芽孢杆菌

中图分类号:Q939.92; Q939.95 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2024)02-0056-07

## Screening of biocontrol bacteria against peanut postharvest *Aspergillus flavus* contamination and its prevention effect

ZHENG Aifang<sup>1,2,3,4</sup>, HE Huan<sup>1</sup>, GAO Ye<sup>1</sup>, ZHANG Mingxue<sup>1</sup>,  
WANG Xu<sup>1</sup>, ZHAO Kai<sup>1,2</sup>

(1. College of Life Science, Anqing Normal University, Anqing 246011, Anhui, China; 2. The Belt and Road Model International Science and Technology Cooperation Base for Biodiversity Conservation and Utilization in Basins of Anhui Province, Anqing 246011, Anhui, China; 3. Provincial Key Laboratory of the Biodiversity Study and Ecology Conservation in Southwest Anhui, Anqing 246011, Anhui, China; 4. Anqing Academy of Forestry Science and Technology Innovation, Anqing 246011, Anhui, China)

收稿日期:2022-11-01;修回日期:2023-09-25

基金项目:安徽高校自然科学基金项目(KJ2019A0551);皖西南生物多样性和生态保护安徽省重点实验室开放基金资助项目(Wxn202308);安庆师范大学“敬敷育英”创新创业引领计划项目(210014-2020);国家级大学生创新创业训练计划项目(202210372033,202110732032)

作者简介:郑爱芳(1980),女,副教授,硕士生导师,硕士,研究方向为微生物资源开发(E-mail) aifangzheng@126.com。

通信作者:赵凯,教授,硕士生导师(E-mail) zhaokai1911@126.com。

**Abstract:** In order to prevent *Aspergillus flavus* (*A. flavus*) contamination of peanut during storage, two antagonist *Bacillus* sp. were isolated from farmland soil, and one was screened as the subject to study its inhibitory effect on *A. flavus* and its preventive and control effect on *A. flavus* contamination of postharvest peanut by plate confrontation method. The inhibitory broad-spectrum of the antagonistic bacterium was detected by plate confrontation method and its growth curve was plotted. The

strain was identified through physiological and biochemical test, colony morphological characteristics observation and 16S rDNA gene sequences analysis. The results showed that B419 was screened as the antagonistic bacteria on *A. flavus*; it could inhibit the growth of *A. flavus*, and the inhibition rate of *A. flavus* spore germination could reach 98% when the concentration of antagonistic bacteria was  $1.0 \times 10^6$  CFU/mL and the concentration of *A. flavus* spores was  $1.0 \times 10^3$  CFU/mL. Compared with antagonistic bacteria sterile fermentation filtrate and antagonistic bacteria cell suspension, antagonistic bacteria fermentation broth had the best prevention effect on peanut *A. flavus*. This strain had inhibitory effects on various molds such as *Alternaria alternata*, *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp. and *Pestalotiopsis* sp., as well as on *Escherichia coli* and yeast. The strain entered the logarithmic phase after 4 h of incubation, reached a maximum at 14 h, and entered the decay phase after 26 h of incubation. The strain was identified as *Bacillus velezensis*. In summary, the isolated antagonistic bacteria B419 has inhibitory effects on various microorganisms, it can not only be used to prevent fungal contamination during peanut storage, but also has good potential in the control of plant microbial diseases.

**Key words:** *Bacillus* sp.; biocontrol bacteria; peanut; *Aspergillus flavus*; *Bacillus velezensis*

花生在储藏过程中容易受到黄曲霉污染而产生黄曲霉毒素(AFT, Aflatoxin), AFT化学性质稳定, 280℃左右的高温才能分解, 毒性远高于氰化物, 同时还具有极强的致癌性<sup>[1]</sup>。研究表明, 花生酱、花生糖等加工制品的AFT检出率明显高于带壳花生和花生仁等原料<sup>[2]</sup>, 食用被AFT污染的食物会导致人类急性或者慢性中毒<sup>[3]</sup>, 给人们的健康造成威胁<sup>[4]</sup>。花生黄曲霉的污染防控是一项世界性难题。科研工作者对全国大部分地区花生和花生油及其制品中AFT污染情况进行了调查, 发现在我国花生主产区(北方尤其是东北产区), 采后花生AFT污染较轻, 而南方产区的花生在生产环节容易发生黄曲霉的污染, 主要原因与南方地区梅雨季节时温湿度较高且持续时间长有关<sup>[5-6]</sup>。虽然我国北方地区花生AFT污染的程度较低, 但是储存条件不当, 也会提高污染的发生率<sup>[7]</sup>。

目前控制花生采后黄曲霉污染的主要方法有物理法、化学法和生物法。物理法主要是控制湿度和温度, 此方法耗时长、成本高<sup>[8]</sup>; 化学法主要采用化学杀菌剂, 容易导致药物残留且病原菌容易产生耐药性<sup>[9]</sup>; 生物法主要利用植物源化合物和微生物等对黄曲霉的不利作用, 抑制AFT的产生, 具有高效、对环境友好等特点。近年来利用微生物防控食品真菌感染成为一个重要的研究方向<sup>[10-12]</sup>, 且研究多为将木霉属真菌、芽孢杆菌属细菌等微生物应用于花生采收前的防控<sup>[13]</sup>, 或者利用微生物来分解花生等食品中的AFT, 而将拮抗菌应用于花生采后黄曲霉污染防控方面的研究较少, 因此开发高效的生防菌资源具有现实意义。由于芽孢杆菌在环境中的抗逆性比较强, 更容易适应复杂的环境, 本研究拟从环境中筛

选出具有抑菌活性的芽孢杆菌作为研究对象, 探究其生物学特性及对采后花生黄曲霉污染的防治效果, 以期找到有效的花生黄曲霉污染的生物防控方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 菌种及花生

黄曲霉(*Aspergillus flavus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)、互隔交链孢霉(*Alternaria alternata*)、枝孢霉(*Cladosporium* sp.)、青霉(*Penicillium* sp.)、拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis* sp.)等菌株, 课题组保存; 花生, 购于本地市场。

#### 1.1.2 培养基与试剂

NA培养基: 牛肉膏 3 g/L、蛋白胨 10 g/L、氯化钠 5 g/L、琼脂粉 20 g/L。改良NA培养基: 牛肉膏 3 g/L、酵母膏 1 g/L、蛋白胨 5 g/L、葡萄糖 10 g/L、琼脂粉 20 g/L。改良NB液体培养基: 去除NA培养基配方中的琼脂粉。牛肉膏、琼脂粉、氯化钠, 北京奥博星生物技术有限责任公司; 酵母膏, 安琪酵母股份有限公司; 葡萄糖, 天津市致远化学试剂有限公司; 蛋白胨, 上海博微生物科技有限公司。

#### 1.1.3 仪器与设备

SW-CJ-2G超净工作台, 苏州净化设备有限公司; FA2204电子天平, 上海力辰仪器科技有限公司; DSX-30L-1高压蒸汽灭菌锅, 上海申安医疗器械厂; 721G-100紫外可见分光光度计, 上海仪电分析仪器有限公司; AXTGL16M台式高速冷冻离心机, 上海赵迪生物科技有限公司; XSP-11CF生物显微镜, 上海光学仪器一厂; BSD-YX2200智能精密摇床、HPX-9271MBE电热恒温培养箱, 上海博

讯实业有限公司医疗设备厂; EasyCycler Gradient 96 PCR 仪, Biometra GmbH 公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 土壤样品的采集及拮抗菌的初筛

取深度为 10 cm 左右、有机质丰富的农田土, 置于采样袋中, 于 4 °C 冰箱保存备用。

取 1 g 土于三角瓶中, 加入 99 mL 无菌水, 摇床 150 r/min 下振荡 20 min, 静置后取 0.1 mL 上清液涂布于改良 NA 培养基平板上, 于 28 °C 培养, 观察平板上微生物之间有无拮抗现象(土壤中微生物含量丰富, 彼此可以作为指示菌), 将有拮抗作用的菌株经过多次平板划线分离保存, 并通过简单染色或者芽孢染色观察有无芽孢。

### 1.2.2 拮抗菌的优选

采用平板对峙法, 在改良 NA 培养基平板中间接种黄曲霉, 在距离黄曲霉两侧 2 cm 处接种初筛的拮抗菌, 置于 28 °C 培养箱中培养 4 d, 测定抑菌带宽, 考察拮抗菌对黄曲霉的抑制效果。

### 1.2.3 黄曲霉孢子悬液及拮抗菌培养物的制备

#### 1.2.3.1 黄曲霉孢子悬液

用无菌棉签蘸取无菌水, 从培养 5 d、长满孢子的黄曲霉平板上刮取孢子, 在装有 50 mL 无菌水的三角瓶中洗脱孢子, 然后用 8 层无菌纱布通过漏斗过滤到无菌三角瓶中, 获得初始黄曲霉孢子悬液, 用血球计数板计数, 用无菌水将其浓度调整为  $1 \times 10^6$  CFU/mL 的孢子悬液, 置于 4 °C 冰箱保存。

#### 1.2.3.2 拮抗菌发酵液、拮抗菌细胞悬浮液及无菌发酵滤液

参照文献[14]的方法进行。

拮抗菌发酵液的制备: 用接种环从拮抗菌斜面取 3 环接种到含有 30 mL 改良 NB 液体培养基的 150 mL 三角瓶中, 于 35 °C、150 r/min 摇床中培养 12 h, 经平板划线法检验是否染菌, 从未染杂菌的发酵液中取 2 mL 加入到装有 200 mL 改良 NB 液体培养基的 500 mL 的三角瓶中, 共 3 瓶, 置于 35 °C、150 r/min 摇床中培养 55 h, 获得拮抗菌发酵液, 调整浓度为  $1.0 \times 10^6$  CFU/mL。

拮抗菌细胞悬浮液的制备: 将拮抗菌发酵液混合后离心(4 °C, 10 000 r/min, 10 min), 收集上清液, 下层菌体用无菌生理盐水悬浮、洗涤、离心 2 次, 最后用无菌生理盐水悬浮, 通过平板计数法计算活菌数, 并调整菌体的浓度为  $1.0 \times 10^6$  CFU/mL。

拮抗菌无菌发酵滤液的制备: 用 50 mL 无菌针筒吸取拮抗菌细胞悬浮液制备过程中离心后的上清液, 过 0.22 μm 滤膜后获得无菌发酵滤液, 用平板

划线法做滤液活菌检测来确保滤液中无活菌。

### 1.2.4 液体培养基中拮抗菌对黄曲霉的抑制效果分析

参照武利勤等<sup>[15]</sup>的方法, 用打孔器在黄曲霉平板上打取若干 6 mm 的黄曲霉菌饼, 向 6 个装有 30 mL 改良 NB 液体培养基的 150 mL 三角瓶中分别接入 1 个 6 mm 的黄曲霉菌饼, 其中 3 个三角瓶中分别加入 5 mL 拮抗菌发酵液, 以不加拮抗菌的 3 个三角瓶作为对照, 于 28 °C、150 r/min 摇床中培养 1 d, 观察发酵液澄清度及菌体生长情况。

### 1.2.5 拮抗菌对黄曲霉孢子萌发的抑制作用分析

将黄曲霉孢子悬液做梯度稀释, 最终浓度分别为  $1.0 \times 10^3$ 、 $1.0 \times 10^4$ 、 $1.0 \times 10^5$  CFU/mL。取 3 只 50 mL 离心管, 分别加入 5 mL 拮抗菌发酵液, 再分别加入 5 mL 不同浓度的黄曲霉孢子悬液、2 mL 改良 NB 培养基, 置于 28 °C、150 r/min 摇床中培养 12 h, 取样, 显微观察孢子的萌发情况, 计算萌发和未萌发的孢子数, 观察至少 10 个视野。计算孢子萌发抑制率, 孢子萌发抑制率为未萌发孢子数占孢子总数的比例。

### 1.2.6 拮抗菌对花生黄曲霉污染的抑制效果分析

参照谢海涛<sup>[16]</sup>的方法对花生进行预处理。先用无菌水浸泡洗涤花生种子 2 min, 再用 75% 的酒精消毒 5 min, 然后用 3% 的次氯酸钠处理 10 min, 用无菌水洗涤 5 次。

将处理好的花生种子分装到 5 个无菌三角瓶中, 每瓶装 18 粒。拮抗菌发酵液和拮抗菌细胞悬浮液浓度为  $1.0 \times 10^6$  CFU/mL, 黄曲霉孢子悬液浓度为  $1.0 \times 10^2$  CFU/mL。分别做如下处理: CK1. 无菌水浸泡花生种子 10 min, 倒掉无菌水后加入黄曲霉孢子悬液浸泡 10 min; CK2. 无菌水浸泡花生种子 20 min; 处理 1. 拮抗菌发酵液浸泡花生种子 10 min, 倒掉发酵液后加入黄曲霉孢子悬液浸泡 10 min; 处理 2. 拮抗菌细胞悬浮液浸泡花生种子 10 min, 倒掉悬浮液后加入黄曲霉孢子悬液浸泡 10 min; 处理 3. 拮抗菌无菌发酵滤液浸泡花生种子 10 min, 倒掉无菌发酵滤液后加入黄曲霉孢子悬液浸泡 10 min。上述处理之后, 每个平板放 6 粒种子, 每种处理做 3 个平行, 置于培养箱中培养(28 °C, 湿度 70% ~ 80%) 7 d, 观察花生的黄曲霉感染程度。

### 1.2.7 拮抗菌抑菌广谱性检测

用实验室保藏的互隔交链孢霉、枝孢霉、青霉、拟盘多毛孢等病原霉菌以及酿酒酵母、胶红酵母、大肠杆菌与拮抗菌做平板对峙实验, 检测拮抗菌的抑菌广谱性。青霉菌不容易形成大菌落, 采用涂布法,

孢子制取过程参考 1.2.3.1,青霉菌孢子的浓度为  $1.0 \times 10^6$  CFU/mL;酵母菌和大肠杆菌采用划线法接种,拮抗菌采用点接法接种。

### 1.2.8 拮抗菌生长曲线的测定

将菌种从斜面接入装有 100 mL 改良 NB 液体培养基的 500 mL 三角瓶中,于  $37^\circ\text{C}$ 、150 r/min 的摇床中培养 12 h 后,取 10 mL 加入到含有 200 mL 无菌液体牛肉膏蛋白胨培养基的 500 mL 三角瓶中,做 3 个平行,置于  $37^\circ\text{C}$ 、150 r/min 的摇床中培养。每隔 2 h 从每个三角瓶中取 2 mL 发酵液,采用梯度稀释涂平板法计算样品中的菌落形成单位(CFU),测定 34 h 内菌株的生长规律。以培养时间为横坐标,菌落形成单位的对数值作为纵坐标绘制生长曲线。

### 1.2.9 拮抗菌的鉴定

#### 1.2.9.1 拮抗菌生理生化及形态特征的观测

根据《常见细菌鉴定手册》对拮抗菌生理生化特征进行鉴定。参考文献[17-18]将菌株接种到改良 NA 培养基平板上(以 NA 培养基为对照),于  $37^\circ\text{C}$  培养一定时间后观察菌落形态特征,将拮抗菌革兰氏染色之后镜检,观察其显微形态。

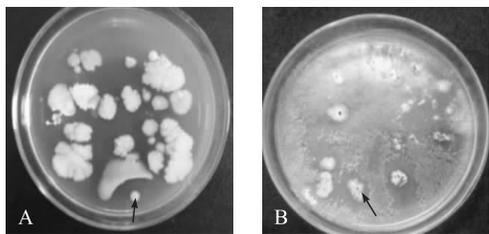
#### 1.2.9.2 拮抗菌分子鉴定和发育树的构建

将拮抗菌接种到改良 NB 培养基中,于  $37^\circ\text{C}$  培养 24 h,按照细菌 DNA 提取试剂盒说明书提取菌株总 DNA 后,进行 PCR 扩增<sup>[19]</sup>,PCR 产物用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测,阳性样品送上海凌恩生物科技有限公司进行测序。将测得序列在 GenBank 中与已知种属 BLAST 作同源性比对和分析,利用 MEGA7.0 软件对其进行系统发育分析,采用邻接(Neighbor-joining)法构建系统发育树,自举法(Bootstrap)对系统树进行 1 000 次循环来检验发育树的准确性<sup>[20]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 拮抗菌初筛

拮抗菌的初筛主要利用土壤中丰富的微生物种群作为指示菌,发现 2 个平板上有 2 株菌对其他菌有拮抗作用,如图 1 所示。



注:箭头所指为具有拮抗效果的菌株

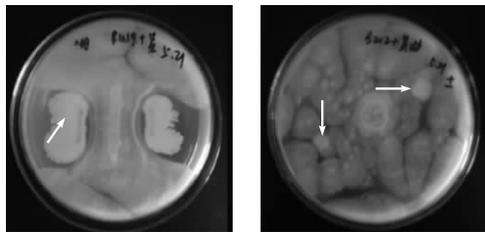
图 1 初筛平板上具有拮抗效果的菌株

由图 1 可知:A 平板中分离的菌株都比较湿润,

其中 1 株细菌对其他细菌有拮抗作用,命名为 B212;B 平板上有绿色霉菌和细菌,其中 1 株细菌对霉菌有抑制效果,命名为 B419。实验发现,2 株菌株均为芽孢杆菌属细菌。

### 2.2 拮抗菌优选

2 种拮抗菌对黄曲霉的抑制效果如图 2 所示。



a) B419+黄曲霉

b) B212+黄曲霉

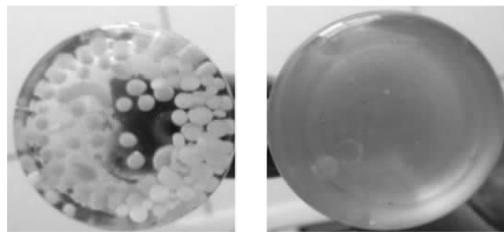
注:箭头所指为拮抗菌

图 2 2 种拮抗菌对黄曲霉的抑制效果

由图 2 可知,固体培养基上菌株 B419 对黄曲霉的抑菌带宽为 2 mm 左右,菌株 B212 对黄曲霉抑制效果不明显,因此选择菌株 B419 作为研究对象。

### 2.3 液体培养基中拮抗菌对黄曲霉的抑制效果

液体培养基中拮抗菌对黄曲霉的抑制效果如图 3 所示。



a) 对照

b) 加入B419

图 3 液体培养基中拮抗菌对黄曲霉的抑制效果

由图 3 可知,未加 B419 菌株的三角瓶中发酵液澄清,有大量黄曲霉菌丝球,而加有 B419 菌株的三角瓶中 B419 菌株大量繁殖,发酵液呈浑浊状态,静置后,三角瓶底部未见黄曲霉菌丝球,只有 1 个之前接入的黄曲霉菌饼,这表明拮抗芽孢杆菌 B419 菌株能有效抑制黄曲霉的生长。

### 2.4 拮抗菌对黄曲霉孢子萌发的抑制效果

将不同浓度的黄曲霉孢子悬液与拮抗菌发酵液共培养,考察拮抗菌对不同浓度的黄曲霉孢子萌发的抑制率,结果如表 1 所示。

表 1 拮抗菌对不同浓度的黄曲霉孢子萌发的抑制率

拮抗菌/ (CFU/mL)	黄曲霉孢子/ (CFU/mL)	孢子萌发 抑制率/%
$1.0 \times 10^6$	$1.0 \times 10^5$	50
$1.0 \times 10^6$	$1.0 \times 10^4$	80
$1.0 \times 10^6$	$1.0 \times 10^3$	98

由表 1 可知,当拮抗菌细胞浓度为  $1.0 \times 10^6$  CFU/mL,黄曲霉孢子浓度为  $1.0 \times 10^5$  CFU/mL 时,孢子萌发抑制率仅为 50%,黄曲霉孢子浓度为  $1.0 \times 10^4$  CFU/mL 时,孢子萌发抑制率为 80%,黄曲霉孢子浓度为  $1.0 \times 10^3$  CFU/mL 时,孢子萌发抑制率达到 98%。

## 2.5 拮抗菌对花生黄曲霉污染的抑制效果

不同拮抗菌处理方式对花生黄曲霉污染的抑制效果如表 2 所示。

表 2 不同拮抗菌处理方式对花生黄曲霉污染的抑制效果

编号	花生黄曲霉污染程度
CK1	+++
CK2	-
处理 1	-
处理 2	+
处理 3	++

注:+++代表 100% 污染; ++代表 50% 污染; +代表 5% 污染; -代表无污染

由表 2 可知,培养 7 d 后,CK2 没有染菌,CK1 中黄曲霉生长最旺盛,处理 1 预防效果最好,花生表面基本没有黄曲霉生长,处理 2 略差,但是优于处理 3。原因可能是:处理 1 中不仅有拮抗菌菌体,而且发酵液中可能含有抗菌物质,抑制黄曲霉孢子萌发的能力最强;处理 2 中只含有拮抗菌菌体,无抗菌物质,降低了对黄曲霉孢子萌发的抑制能力;处理 3 中仅含有发酵滤液,没有菌体,对黄曲霉孢子萌发的抑制能力较弱,说明发酵滤液中抗菌物质的抑菌能力较弱或者浓度较低,但不论是拮抗菌菌体还是发酵滤液对黄曲霉的生长和孢子的萌发均有抑制作用,当拮抗菌发酵液与黄曲霉孢子的浓度比大于  $1 \times 10^4:1$  时能有效抑制黄曲霉的生长。

## 2.6 拮抗菌抑菌广谱性

拮抗菌对部分霉菌的抑制作用如图 4 所示。

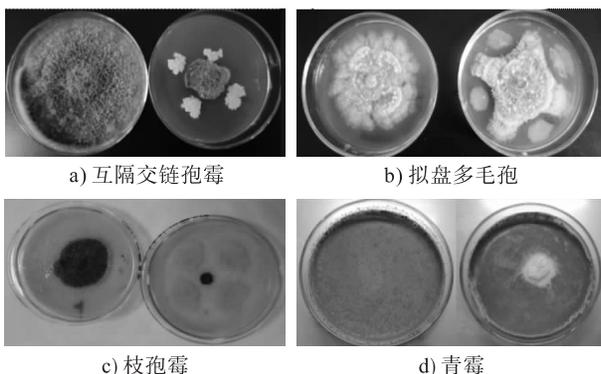


图 4 拮抗菌对部分霉菌的抑制作用

由图 4 可知,拮抗菌与霉菌互隔交链孢霉拮抗后形成的抑菌带宽约为 5 mm,与拟盘多毛孢形成的抑菌带宽约为 6 mm,与枝孢霉形成的抑菌带宽约为

8 mm,枝孢霉菌丝基本不生长,对青霉的抑菌圈直径为 26 mm,拮抗菌菌落直径为 16 mm。从拮抗菌与各种霉菌的平板对峙结果看,拮抗菌与霉菌没有接触,说明拮抗菌能够产生某种或某些对霉菌菌丝生长有抑制作用的物质。

拮抗菌对部分细菌和酵母菌的抑制作用如图 5 所示。

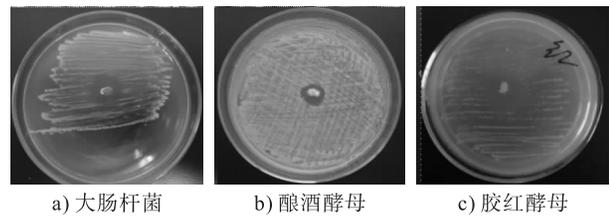


图 5 拮抗菌对部分细菌和酵母菌的抑制作用

由图 5 可知:拮抗菌对大肠杆菌抑菌圈直径为 16 mm,菌落直径为 6 mm;对酿酒酵母抑菌圈直径为 15 mm,菌落直径为 6 mm;对胶红酵母抑菌圈直径为 25 mm,菌落直径为 6 mm。

以上结果说明拮抗菌的抑菌谱较广。

## 2.7 拮抗菌的生长曲线

拮抗菌在 37℃ 摇床中培养,其生长曲线如图 6 所示。

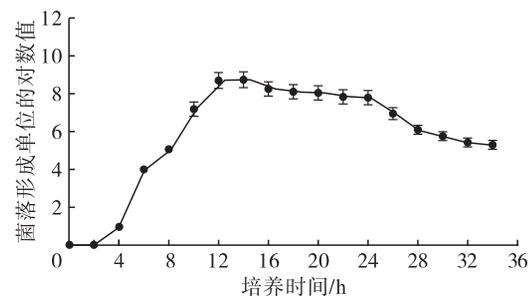


图 6 拮抗菌的生长曲线

由图 6 可知:拮抗菌在 0~4 h 时生长较为迟缓,为延滞期;4 h 之后菌株开始增殖,进入对数期;培养 14 h 时数量达到高峰,之后进入稳定期;26 h 后活菌数开始减少,进入衰亡期。

## 2.8 拮抗菌的鉴定

### 2.8.1 生理生化特征及形态特征

拮抗菌的生理生化特征如表 3 所示。

表 3 拮抗菌的生理生化特征

项目	结果	项目	结果
V-P 实验	+	糖发酵实验	
甲基红实验	-	葡萄糖	+
淀粉水解实验	+	果糖	+
硝酸盐还原实验	+	麦芽糖	+
接触酶实验	+	好氧性	兼性
硫化氢产气实验	-		

注: + 代表阳性; - 代表阴性

由表3可看出,拮抗菌的接触酶实验、V-P实验、硝酸盐还原实验、淀粉水解实验、糖发酵实验结果均为阳性,硫化氢产气实验和甲基红实验结

果为阴性,兼性好氧,这些特征都与贝莱斯芽孢杆菌特征相似。

拮抗菌的显微和菌落形态特征如图7所示。

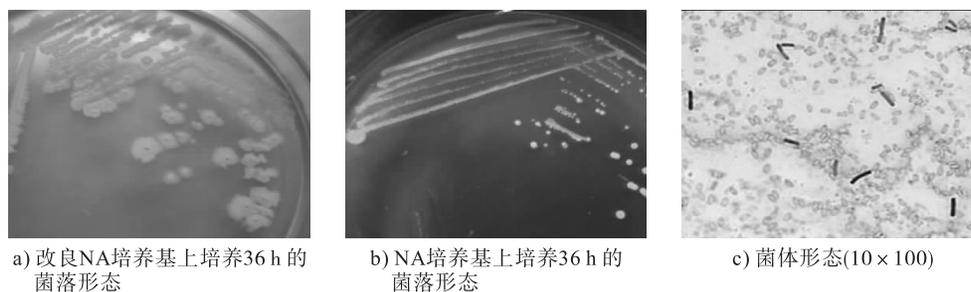


图7 拮抗菌的形态特征

由图7可知,在改良NA培养基上培养36h,菌落直径为3~5mm,呈乳白色不透明、圆形或椭圆形,边缘不规则,中间有褶皱凸起,表面粗糙,其明显区别于在NA培养基上培养的菌落形态(菌落较小,直径为2~3mm,菌落为圆形,外缘向中间卷曲,中间无凸起)。结果说明不同的营养成分对该菌株的菌落形态有明显影响。培养48h,拮抗菌B419革兰氏染色为阳性,在显微镜下菌体大小为(0.5~1.0)  $\mu\text{m}$   $\times$  (1.5~3.0)  $\mu\text{m}$ 。

### 2.8.2 分子鉴定

测得拮抗菌B419的16S rDNA基因序列长为

1441 bp (GenBank 收录号 KX345794),与电泳结果吻合。通过同源性比对和分析发现,菌株B419与贝莱斯芽孢杆菌FZB42菌株(GenBank 收录号 NR075005)相似性最高,序列相似性达99%,聚在一个分支。结合菌株显微形态、菌落特征、生理生化特征及16S rDNA基因序列特点,将菌株B419鉴定为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)。图8为邻接法构建的基于16S rDNA基因序列的菌株B419的系统发育树。

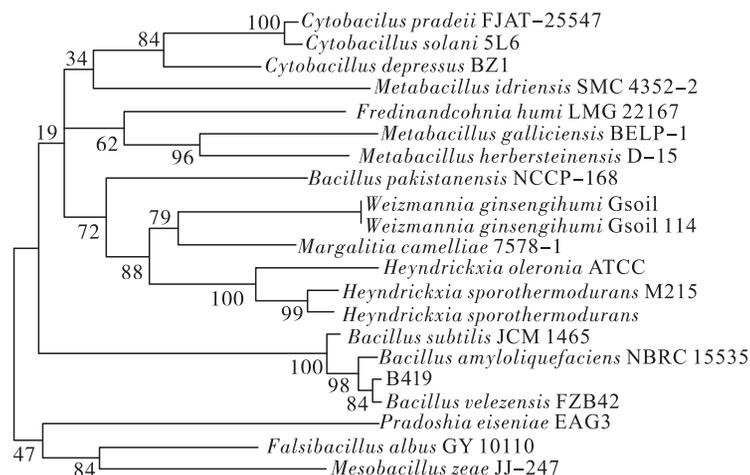


图8 邻接法构建的基于16S rDNA基因序列的菌株B419的系统发育树

### 3 结论

本研究从农田土中分离得到一株芽孢杆菌B419,对黄曲霉孢子的萌发抑制率可以达到98%,能有效控制花生采后黄曲霉污染,同时该菌株抑菌谱较广,能抑制多种植物病原真菌以及大肠杆菌、酵母菌等微生物的生长,具有开发为生物农药的潜力。最终依据菌株显微形态、菌落特征、生理生化特征及16S rDNA基因序列分析,将该菌株鉴定为贝莱斯芽孢杆菌。

### 参考文献:

[1] 刘配莲,张刚,陈焱,等. 食品与饲料中黄曲霉毒素脱除

技术的研究进展[J]. 中国油脂, 2021, 46(10): 92-97.

[2] CHEN Y C, LIAO C D, LIN H Y, et al. Survey of aflatoxin contamination in peanut products in Taiwan from 1997 to 2011 [J]. J Food Drug Anal, 2013, 21(3): 247-252.

[3] MAGZOUB R A M, YASSIN A A A, ABDEL-RAHIM A M, et al. Photocatalytic detoxification of aflatoxins in Sudanese peanut oil using immobilized titanium dioxide [J]. Food Control, 2019, 95: 206-214.

[4] MUTEGI C, WAGACHA M, KIMANI J, et al. Incidence of aflatoxin in peanuts (*Arachis hypogaea* Linnaeus) from markets in Western, Nyanza and Nairobi Provinces of

- Kenya and related market traits [J]. *J Stored Prod Res*, 2013, 52: 118 – 127.
- [5] 杨博磊, 耿海荣, 王刚, 等. 我国花生土壤黄曲霉菌分布与产后花生黄曲霉毒素污染相关性研究[J]. *核农学报*, 2021, 35(4): 863 – 869.
- [6] 郭志青, 吴菊香, 张霞, 等. 山东省花生产区土壤和荚果中黄曲霉菌及其毒素污染状况调查[J]. *中国油料作物学报*, 2019, 41(5): 765 – 772.
- [7] 王海鸥, 陈守江, 胡志超, 等. 花生黄曲霉毒素污染与控制[J]. *江苏农业科学*, 2015, 43(1): 270 – 273.
- [8] GONG A D, DONG F Y, HU M J, et al. Antifungal activity of volatile emitted from *Enterobacter asburiae* Vt-7 against *Aspergillus flavus* and aflatoxins in peanuts during storage[J/OL]. *Food Control*, 2019, 106: 106718[2022 – 11 – 01]. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106718>.
- [9] MA W, ZHAO L, ZHAO W, et al. (*E*)-2-hexenal, as a potential natural antifungal compound, inhibits *Aspergillus flavus* spore germination by disrupting mitochondrial energy metabolism[J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(4): 1138 – 1145.
- [10] 邢福国, 李旭, 张晨曦. 黄曲霉毒素的产生机制及污染防治策略[J]. *食品科学技术学报*, 2021, 39(1): 13 – 26, 64.
- [11] ZABKA M. Antifungal efficacy and convenience of *Krameria lappacea* for the development of botanical fungicides and new alternatives of antifungal treatment [J/OL]. *Agronomy*, 2022, 12(11): 2599 [2022 – 11 – 01]. <https://doi.org/10.3390/agronomy12112599>.
- [12] YAO Y, GAO S, DING X, et al. The microbial population structure and function of peanut peanut and their effects on aflatoxin contamination [J/OL]. *LWT – Food Sci Technol*, 2021, 148: 111285[2022 – 11 – 01]. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111285>.
- [13] 崇兴雨. 花生内生细菌分离鉴定及生物活性研究[D]. 郑州: 河南工业大学.
- [14] 申光辉, 冯孟, 张志清, 等. 一株蜂粮源拮抗细菌的分离鉴定及其抑菌物质特性[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(10): 2197 – 2206.
- [15] 武利勤, 尚宏忠, 顾海科. 拮抗匍枝根霉的生防菌 R1B 的筛选鉴定和抑菌活性分析[J]. *生物技术通报*, 2019, 35(4): 29 – 35.
- [16] 谢海涛. 三株生防细菌对花生寄生曲霉的拮抗作用及促进花生萌发新菌株的筛选[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2008.
- [17] 周德庆, 胡宝龙. 微生物学实验教程[M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 2006.
- [18] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [19] 汤健蓉. 湛江地区蓖麻真菌性病害病原鉴定[D]. 广东 湛江: 广东海洋大学, 2021.
- [20] 张文双, 孟宇飞, 胡申才. 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 降解菌的筛选鉴定及发酵条件优化[J]. *中国酿造*, 2022, 41(8): 143 – 148.
- [14] LIU R, XU Y, CHANG M, et al. Interactions between  $\alpha$ -tocopherol and  $\gamma$ -oryzanol in oil-in-water emulsions [J/OL]. *Food Chem*, 2021, 356: 129648 [2022 – 09 – 22]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129648>.
- [15] 食品安全国家标准 食品中抗坏血酸的测定: GB 5009.86—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- [16] 食用植物油中叔丁基对苯二酚(TBHQ)的测定: GB/T 21512—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [17] MCCLEMENTS D J, JAFARI S M. Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review [J]. *Adv Colloid Interface Sci*, 2018, 251: 55 – 79.
- [18] WANG L, YU X, GENG F, et al. Effects of tocopherols on the stability of flaxseed oil-in-water emulsions stabilized by different emulsifiers: Interfacial partitioning and interaction [J/OL]. *Food Chem*, 2022, 374: 131691 [2022 – 09 – 22]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131691>.
- [19] 陈雪琪, 王梦如, 于航, 等. 抗坏血酸再生叔丁基对苯二酚抗氧化能力的研究[J]. *中国粮油学报*, 2022, 37(4): 121 – 127.
- [20] 易建华, 孙艺飞, 朱振宝, 等. 不同极性抗氧化剂对油包水乳液氧化稳定性的影响[J]. *现代食品科技*, 2015, 31(12): 185 – 190.
- [21] WANG Y, WU C, ZHOU X, et al. Combined application of gallate ester and  $\alpha$ -tocopherol in oil-in-water emulsion: Their distribution and antioxidant efficiency [J]. *J Dispers Sci Technol*, 2020, 41(6): 909 – 917.
- [22] JAYASINGHE C, GOTOH N, SHUN W. Pro-oxidant/antioxidant behaviours of ascorbic acid, tocopherol, and plant extracts in *n*-3 highly unsaturated fatty acid rich oil-in-water emulsions [J]. *Food Chem*, 2013, 141(3): 3077 – 3084.
- [23] 郝晓丽, 许申鸿, 杭瑚. TBHQ 与 VE 抗氧化协同作用的研究[J]. *青岛大学学报(工程技术版)*, 2003, 18(3): 53 – 55.

(上接第 24 页)