

降解玉米赤霉烯酮的芽孢杆菌筛选

葛婵婵^{1,2},熊 捷¹,赵 晨²,汪 洋²,申 琳³,张晓琳²

(1. 华南理工大学 轻工与食品学院,广东 广州 510641;2. 国家粮食局科学研究院,北京 100037;

3. 中国农业大学 食品科学与营养工程学院,北京 100083)

摘要:利用96孔板,通过菌株与毒素共培养的方法,从217株芽孢菌中,经初筛和复筛得到两株具有很好降解效果的菌株,即T-246和T-420,它们分别能够在6h和9h内将15 μg/mL的玉米赤霉烯酮完全降解。通过16S rDNA序列分析鉴定,T-246和T-420分别为同温层芽孢杆菌(*Bacillus stratosphericus*)和短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)。对其降解机理的初步研究表明,这两株菌对玉米赤霉烯酮都具有一定程度的吸附作用,但主要作用源于胞外酶的酶促降解。

关键词:玉米赤霉烯酮;芽孢杆菌;筛选;降解

中图分类号:TS 201.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1007-7561(2015)03-0090-05

Screening of bacillus being able to degrade zearalenone

GE Chan- chan^{1,2},XIONG Jian¹,ZHAO Chen²,WANG Yang²,SHEN Lin³,ZHANG Xiao- lin²

(1. College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology,

Guangzhou Guangdong 510641;2. Academy of State Administration of Grain, Beijing 100037;

3. College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083)

Abstract:Two bacillus T-246 and T-420, which possess very good degradation effect, have been screened from 217 strains of bacillus, which were cultured in 96-well micro plate with strain and viral co-culture, by primary screen and rescreen. It was confirmed that 15 μg/mL zearalenones (ZEN) could be degraded by these strains within 6 h and 9 h, respectively. These two strains were identified as *Bacillus stratosphericus* and *Bacillus pumilus* based on 16S rDNA sequence analysis. In addition, the preliminary study on their degradation mechanism showed that they were able to bind ZEN, but the main effect of scavenging ZEN was due to the degradation activity of extracellular enzyme.

Key words:zearalenone; bacillus; screening; degradation

玉米赤霉烯酮(Zearalenone, ZEN)又称F-2毒素,是镰刀菌产生的雌激素类真菌毒素。ZEN最初从感染赤霉病的玉米中分离得到,可引起谷物及其加工产品的污染。ZEN主要由禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)产生,此外,三线镰刀菌(*Fusarium tricinctum*)、黄色镰刀菌(*Fusarium culmorum*)、克鲁克威尔镰刀菌(*Fusarium crookwellense*)等多种镰刀菌也会产生ZEN。

据统计,全世界约有25%的谷物受到真菌的污染^[1],且ZEN在全世界的谷物和农产品中均有检出^[2]。熊凯华^[3]曾对采集的玉米和小麦样品进行分析,结果表明:玉米和小麦样品中ZEN的检出率

分别为78.6%和69.3%。真菌毒素污染的谷物被人或家畜摄入,会引起慢性或者急性疾病^[4]。有报道称ZEN能够影响家畜的繁殖性能,人经常误食含ZEN的食物能引发乳腺癌、造成DNA损伤、诱导染色体失常等^[5-7]。ZEN污染不仅造成经济上的损失,更是严重威胁机体健康,因此,如何解决ZEN对粮食和饲料的污染,对改善动物生产性能、提高人类食品安全有非常重要的意义。目前对ZEN的脱毒研究主要有物理、化学和生物方法。物理和化学脱毒不能彻底去除ZEN的毒性,还会造成营养物质的流失,同时存在一些未知的二次污染。生物脱毒则是微生物通过生物代谢将ZEN降解成为一些低毒或者无毒的物质,是一种更为高效、安全的方法^[8]。目前,国内外关于ZEN生物降解的研究已有诸多报道,具有ZEN降解能力的菌株不仅种类多样,降解

收稿日期:2014-11-13

基金项目:国家自然科学基金(31302007);“十二五”农村领域国家科技计划课题(2011BAD26B002-5)

作者简介:葛婵婵,1990年出生,女,硕士研究生。

通讯作者:张晓琳,1974年出生,女,研究员。

能力也有所差异。Kriszt R^[9]等人对具有ZEN降解能力的链霉菌(*Streptomyces*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、红球菌(*Rhodococcus*)和戈登氏菌(*Gordonia*)的降解能力和降解产物进行比较,发现链霉菌(*Streptomyces*)和红球菌(*Rhodococcus*)能够高效降解ZEN,且其降解产物无毒。K. J. Cho^[10]等分离出一株芽孢杆菌(*Bacillus*),在液体培养基中对1 mg/kg的ZEN降解率达到99%,在固态发酵中对0.25 mg/kg的ZEN降解率达95%。另外,有研究表明一些微生物对ZEN的清除作用来自菌体本身的吸附,El-Nezami H等^[11]发现鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus* strain) GG和LC750对ZEN及其衍生物的清除作用并不是微生物降解而是细胞壁的吸附,且这种吸附作用和细胞的浓度有关。有文献报道,一些根霉菌(*Rhizopus*)和粉红粘帚菌(*Gliocladium roseum*)对ZEN也具有降解作用^[12]。

本研究主要是以中国农业大学食品科学与营养工程学院985平台菌种保藏与应用中心分离、保藏的217株芽孢菌为研究材料,通过菌株和毒素共培养的方法,筛选能够高效降解ZEN的菌株,并对其降解机理做初步研究,为谷物中真菌毒素的污染控制提供新的菌种资源。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

菌株:217株芽孢菌均为中国农业大学食品科学与营养工程学院985平台菌种保藏与应用中心分离、保藏的菌株。

LB培养基:胰蛋白胨10 g,酵母提取物5 g,NaCl 10 g,pH 7.0~7.2,121℃灭菌30 min。

主要试剂:胰蛋白胨、酵母提取物购自英国Oxoid公司;色谱纯乙腈、甲醇购自Dikma公司;ZEN标准品购自Sigma公司;引物27F、1495R购自英潍捷基公司。

1.2 仪器设备

高效液相色谱仪(Waters515/717/474):美国Waters公司;控温控湿摇床(ISF1-X):Adolf Kuhner公司;高速离心机(8510R):德国艾本德股份公司;PCR仪(22331):德国艾本德股份公司;高压细胞破碎机(TS2/40/AA/AA):英国Constant Systems公司。

1.3 实验方法

1.3.1 ZEN降解菌株的筛选

(1)ZEN降解菌株的初筛:将217株芽孢杆菌

分别接种到LB液体培养基中,于37℃、250 r/min条件下进行活化。12 h后,将新鲜种子液接种到含有ZEN(10 μg/mL)的LB液体培养基中,使接种后培养基的OD₆₀₀值为0.05(用未接种的LB液体培养基做空白对照),以96孔板作为培养载体,于37.0℃、250 r/min、85% RH条件下进行脱毒培养。72 h后,取样以备HPLC检测残余毒素含量,同时以未接种并含有相同ZEN浓度的LB培养基为对照。

(2)ZEN降解菌株复筛:将ZEN的浓度增加到15 μg/mL,按照(1)中的方法对初筛得到的菌株进行复筛。每种菌株做3个平行。

1.3.2 ZEN的检测^[13]

取待测样品,加入等体积的甲醇,混合后静置1 h,充分浸提。然后于14 000 r/min的条件下离心15 min,取其上清进行HPLC检测。对照做同样处理。

检测条件:安捷伦C18柱(5.0 μm,150×4.6 mm);流动相,乙腈:水:甲醇=46:46:8;流速,1.0 mL/min;进样量,10 μL;检测波长,激发波长274 nm,发射波长440 nm;ZEN标准曲线为 $y = 2\,576.61 + 41\,347.74x$, $R^2 = 0.998\,5$, x 为ZEN浓度(μg/mL), y 为峰面积(mv·s),标准曲线在1.0~50.0 μg/mL浓度范围内线性关系良好。

ZEN降解率=(空白对照组ZEN含量-样品组ZEN含量)/空白对照组ZEN含量×100%。

1.3.3 ZEN降解菌株的16S rDNA序列分析

将ZEN降解率较高的菌株于LB液体培养基中培养12 h后,按照Promega公司的基因组DNA纯化试剂盒操作说明书提取基因组DNA,提取的DNA作为16S rDNA片段扩增模板。扩增引物为:27F(5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'),1495R(5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3')。PCR反应条件:变性(95℃,30 s),退火(55℃,30 s),延伸(72℃,2 min),30个循环。PCR扩增片段经纯化、转化、酶切验证等一系列常规分子生物学操作,获得阳性转化子,送样至英潍捷基(Invitrogen)公司进行测序。阳性转化子测序结果经拼接处理后在NCBI上使用Blast比对,获知降解菌株的分类地位。

1.3.4 降解菌株生长曲线及其ZEN降解曲线的绘制

芽孢杆菌生长曲线的绘制:将活化的菌株接种到液体培养基中,使接种后的培养基OD值为0.05(用未接种的LB液体培养基做空白对照),于

37 ℃、250 r/min 振荡培养,每隔 1 h 取样,选用 600 nm 波长进行光电比浊测定。对细胞密度大的培养液适当稀释后测定。

取降解率较高的菌株,按照 1.3.1(1)中的方法,每个样品做 3 个重复,通过在不同的培养时间(1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、12.0、24.0 h)取样进行 HPLC 检测,研究 ZEN(15 μg/mL)降解率和培养时间的关系。

1.3.5 降解菌株对 ZEN 吸附情况的研究

将培养至稳定期的 LB 液体培养物进行等分,一份于 121 ℃ 高压灭菌 15 min 的条件下进行灭活处理;另一份暂不作任何处理。然后,将上述两份细胞培养物做如下处理:4 000 r/min,离心 10 min,弃上清后,用等量 PBS 清洗菌体 3 次后加入无菌水清洗菌体 3 次,后用含 ZEN(15 μg/mL)的等量无菌水悬浮菌体。以含 ZEN 的无菌水为空白对照,37 ℃、250 r/min 振荡培养 72.0 h,取样,14 000 r/min 离心 10 min,取上清,进行液相检测。每个样品做 3 个重复。

1.3.6 ZEN 降解酶的定位实验

(1)取培养好的菌液,4 500 r/min、4 ℃ 离心 20 min,上清过 0.22 μm 的水系滤膜,4 ℃ 保存备用,下层细胞用 Tris-HCl 重新悬浮,4 000 r/min、4 ℃ 离心 15 min,重复 3 次,冲洗 3 次后用 Tris-HCl 重新悬浮。将重新悬浮的细胞于 4 ℃ 下用高压细胞破碎仪破碎 3 次。破碎后的细胞 12 000 r/min、4 ℃ 离心 15 min,上层清液过 0.22 μm 的水系滤膜。在过完膜后的细胞内容物和原保留无细胞上清中加入一定量的 ZEN(终浓度为 10 μg/mL),于 30 ℃、20 r/min 下共培养 48 h,细胞内容物和无细胞上清分别作为阴性参照,Tris-HCl + ZEN 和 LB 培养基 + ZEN 为阳性参照。于不同时间取样,进行 HPLC 检测。

(2)根据 1.3.6(1)中的结果,确定是无细胞上清对 ZEN 具有降解作用还是细胞内容物对 ZEN 具有降解作用。将具有降解作用的无细胞上清或者细胞内容物分为三个部分进行不同处理:1. 用蛋白酶 K 处理无细胞上清或者细胞内容物(65 ℃ 水浴 2 h);2. 沸水浴处理无细胞上清或者细胞内容物(100 ℃,2 h);3. 同时用蛋白酶 K 和沸水浴处理无细胞上清或者细胞内容物(65 ℃ 处理 2 h 后,100 ℃ 处理 2 h)。将处理好的无细胞上清或者细胞内容和 ZEN(10 μg/mL)共培养,没有处理的无细胞上清

或者细胞内容物作为对照,每个样品做 3 个重复,培养 48 h 后取样进行液相检测。

2 结果与分析

2.1 ZEN 降解菌株的筛选

将已有的 217 株芽孢杆菌按照 1.3.1(1)中的方法,在 LB 培养基中与 ZEN 共培养,并按照 1.3.2 中的方法检测,液相色谱图显示(图 1):ZEN 峰保留时间为 5.87 min,且当菌株与 ZEN(10 μg/mL)共培养 72 h 时,217 株芽孢杆菌中有 5 株芽孢菌(T-246、T-373、T-415、T-420、T-434)ZEN 峰完全消失,说明这 5 株菌对 ZEN 的清除率达到 100%。将初筛得到的 5 株菌株进行复筛,结果如图 2 所示,当 ZEN 的含量为 15 μg/mL 时,这 5 株菌对 ZEN 的降解率都达到 85% 以上,ZEN 降解率的相对标准偏差都在 3.3% 以下,重复性良好。其中菌株 T-246 和 T-420 对 ZEN 的降解效果最好,在 72 h 内能够将 15 μg/mL 的 ZEN 完全清除。

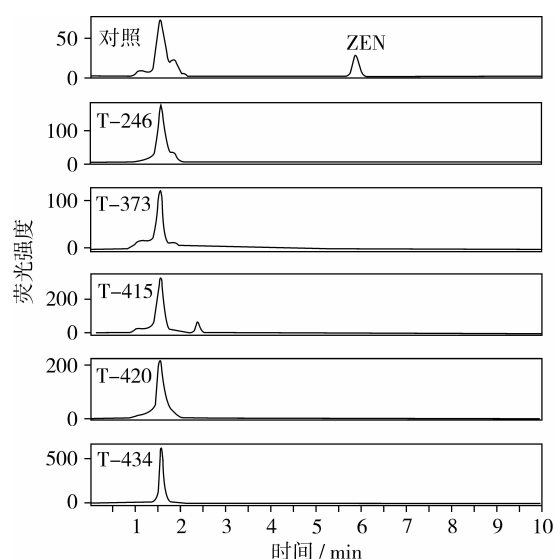


图1 菌株 T-246、T-373、T-415、T-420 和 T-434 与 ZEN(10 μg/mL) 共培养 72 h 后的液相色谱图

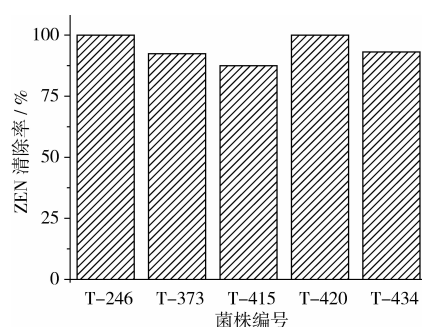


图2 菌株 T-246、T-373、T-415、T-420 和 T-434 对 15 μg/mL ZEN 的清除率

2.2 ZEN 降解菌株的 16S rDNA 序列分析

使用 Clone Manager 8 对获得的测序结果进行分析处理,去掉重叠区域,质粒序列,得到 16S rDNA 部分序列。T-246 和 T-420 序列长度分别为 1 588 bp 和 1 598 bp。将测序结果在 NCBI 上经过 BLAST 比对分析,结果显示菌株 T-246 和 T-420 分别和同温层芽孢杆菌 (*Bacillus stratosphericus*) 及短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) 的 16S rDNA 序列的相似性最高,达到 99%。目前普遍认为当 16S rDNA 序列同源性高于 97% 时,可以认为是属内的同种,依据这一原则将 T-246 与 T-420 分别暂定为同温层芽孢杆菌和短小芽孢杆菌。

2.3 降解菌株生长曲线及其 ZEN 降解曲线的绘制

图 3 为菌株 T-246 和 T-420 的生长曲线,在 LB 培养基中于 37 ℃、250 r/min 条件下培养,菌株 T-246 和 T-420 都为芽孢杆菌,且生长曲线比较一致,2~13 h 为对数期,13 h 后进入稳定期。

由图 4 可以看出,在相同的初始菌体浓度下,菌株 T-246 和 T-420 分别能在 6 h 和 9 h 内将 15 $\mu\text{g/mL}$ 的 ZEN 完全降解。两株菌株均在 0~3 h 时开始表现出一定的降解能力,在 3 h 时,二者的 ZEN 降解率分别达到 9.4% 和 4.7%。但在 3~6 h 内, T-246 的 ZEN 降解速率有较大幅度的增加,由 9.4% 上升至 100%;菌株 T-420 在此时间段的 ZEN 降解速率也有所增加,由 4.7% 上升至 24.1%,但增幅不及 T-246,菌株 T-420 在 6~9 h 降解速率最大,从 24.1% 上升至 100%,由此可见菌株 T-246 对 ZEN 的降解能力要优于菌株 T-420。结合菌株 T-246 和 T-420 的生长曲线可知,两株菌在 0~3 h 时之所以对 ZEN 降解速率较低,可能是由于菌株处在延滞期,细胞数量少,且相关毒素降解酶活力较低;而在 3~9 h 时菌株进入对数期,细胞代谢能力强,酶系活力高,降解速率较高。

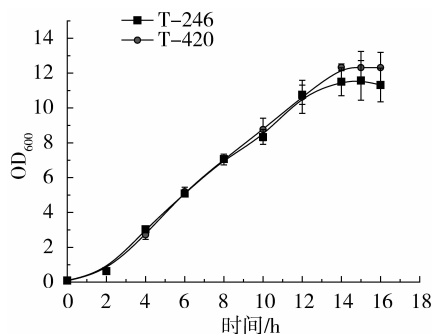


图3 菌株 T-246 和 T-420 的生长曲线

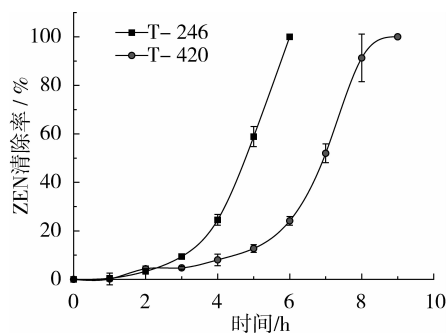


图4 不同培养时间菌株 T-246 和 T-420

对 ZEN (15 $\mu\text{g/mL}$) 的清除率

2.4 降解菌株对 ZEN 吸附情况的研究

通过研究 T-246 和 T-420 的活细胞及失活细胞对 ZEN 的清除率,发现:高温失活的 T-246 和 T-420 细胞对 ZEN 都具有清除作用,失活细胞排除了生物活性物质降解 ZEN 的可能性,表明 T-246 和 T-420 对 ZEN 都具有吸附作用(表 1)。同时, T-246 和 T-420 的活细胞对 ZEN 的清除能力都高于失活细胞,但差异并不显著 ($P > 0.05$),这可能是由于经过处理后的活细胞不仅对 ZEN 具有吸附作用,而且产生了能够降解 ZEN 的活性物质,而经高温失活的细胞对 ZEN 只有吸附作用,所以活细胞对 ZEN 的清除能力高于失活细胞;然而,由于用无菌水和 PBS 清洗后的活细胞,缺乏营养物质,细胞活力及代谢能力不高,所以活细胞对 ZEN 的清除能力虽高于失活细胞,但是并不显著。另外, T-246 的活细胞和失活细胞对 ZEN 的清除能力显著高于菌株 T-420 的活细胞和失活细胞 ($P < 0.05$),且四者清除率都在 20%~33% 之间。

表1 菌株 T-246 和 T-420 失活细胞及活细胞

菌株	对 15 $\mu\text{g/mL}$ ZEN 的清除率	
	ZEN 清除率/%	
	活细胞	失活细胞
T-246	32.38 $\pm$ 5 ^c	30.44 $\pm$ 1 ^{bc}
T-420	25.35 $\pm$ 2 ^{ab}	20.68 $\pm$ 5 ^a

注:含不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

2.5 ZEN 降解酶的定位

(1)如图 5 所示,菌株 T-246 和 T-420 的无细胞上清和细胞内容物与 ZEN 共培养 48 h,于 24 h 时取样检测发现两种菌株的无细胞上清能够将 10 $\mu\text{g/mL}$ 的 ZEN 完全降解,而细胞内容物对 ZEN 的降解率还不到 10%,48 h 后,细胞内容物对 ZEN 的降解率也没有明显的增加。结果表明:菌株 T-246 和 T-420 之所以能够降解 ZEN,是由于这两株菌的胞外活性物质对 ZEN 具有降解作用。

(2)上述验证了两株菌对ZEN起降解作用的主要是无细胞上清,对两株菌的无细胞上清分别用蛋白酶K、加热或蛋白酶K和加热共同处理,结果见图6。与ZEN共培养48 h后,菌株T-246和T-420的无细胞上清能够将10 $\mu\text{g/mL}$ 的ZEN完全降解,然而经过蛋白酶K、加热或蛋白酶K和加热共同处理,严重影响到无细胞上清对ZEN的降解率,由此可见,降解ZEN的T-246和T-420的胞外活性物质能够被蛋白酶K水解,并且高温会使其变性失去活性。因此推断,T-246和T-420之所以能够降解ZEN源自于这两株菌分泌的一种或几种胞外酶能使ZEN降解。

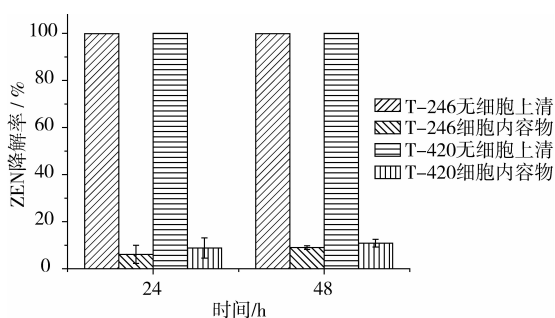


图5 菌株T-246和T-420无细胞上清和细胞内容物对ZEN(10 $\mu\text{g/mL}$)的降解率

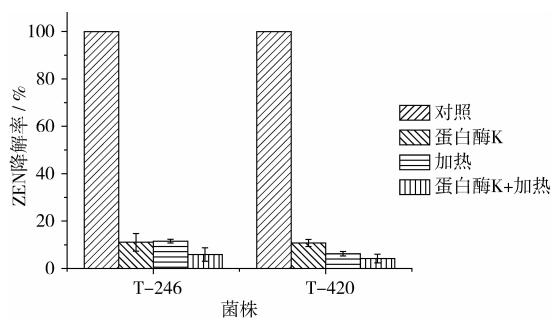


图6 不同方式处理的菌株T-246和T-420无细胞上清对ZEN(10 $\mu\text{g/mL}$)的降解率

3 结论

本研究主要通过菌株与毒素共培养的方法,筛选出一株同温层芽孢杆菌(*Bacillus stratosphericus*) T-246和一株短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*) T-420,它们分别能在6 h内和9 h内将15 $\mu\text{g/mL}$ 的ZEN完全降解。对其毒素清除机理的初步研究表明,这两株菌可以通过菌体细胞的吸附和酶活作用共同清除ZEN。Tinyiro S E等^[14]曾筛选出一株枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* 168)和一株纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto* CICC 24640),对ZEN(20 $\mu\text{g/L}$)的降解率分别为95%和78%。之后研究发现这两株菌菌体和代谢产物对ZEN存在不同程度的吸附和降解作用^[15],所得结果与本实验结果相似,但从对ZEN的清除能力来看,本实验中筛选出的菌株

T-246和T-420对ZEN的清除能力要优于上述的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* 168)和纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto* CICC 24640)。

本研究获得的两株芽孢杆菌具有高效降解ZEN的能力,为今后的机理和应用研究提供实验材料。后续研究中,我们将进一步从分子水平阐述其降解机制,为ZEN生物脱毒的研究提供新的理论,同时在应用研究方面,拟对菌株的固态发酵的实际脱毒效果进行测评,并开发出相关的微生物脱毒剂,为ZEN含量超标的谷物无害化处理提供新的思路和技术策略。

参考文献:

- [1] Mannon J, Johnson E. Fungi down on the farm[J]. New Scientist, 1985, 105: 12-16.
- [2] 柳永振,朱风华,宁雪娇,等. 饲料中玉米赤霉烯酮污染状况及其毒性的研究进展[J]. 饲料博览,2012,(9):42-45.
- [3] 熊凯华. 粮食中脱氧雪腐镰刀菌烯醇和玉米赤霉烯酮的污染调查及降解毒素微生物的筛选[D]. 南昌:南昌大学,2010.
- [4] Bryden W L. Mycotoxins in the food chain: human health implications[J]. Asia Pac J Clin Nutr, 2007, 16(1): 95-101.
- [5] 单妹,许梓荣,冯建蕾. 玉米赤霉烯酮对家畜繁殖性能和人体健康的影响[J]. 中国畜牧兽医,2006,33(1):3-5.
- [6] 肖治军. 猪玉米赤霉烯酮中毒与繁殖障碍[J]. 中国畜牧兽医, 2005,32(2):45-46.
- [7] 余增丽,张立实,吴德生. 玉米赤霉烯酮对乳腺癌细胞MCF-7增殖和凋亡的影响[J]. 中华预防医学杂志,2005,39(5):328-331.
- [8] 唐语谦,钟风,陈艺,等. 玉米赤霉烯酮(ZEN)生物降解及其机制的研究进展[OL]. 中国科技论文在线, <http://www.paper.edu.cn/html/releasepaper/2013/01/1224/>.
- [9] Krifaton C, Kriszt B, Risa A, et al. Application of a yeast estrogen reporter system for screening zearalenone degrading microbes[J]. Journal of Hazardous Materials, 2013, 244: 429-435.
- [10] Cho K J, Kang J S, Cho W T, et al. In vitro degradation of zearalenone by *Bacillus subtilis*[J]. Biotechnology letters, 2010, 32(12): 1921-1924.
- [11] EI-Nezami H, Polychroaki N, Salminen S, et al. Binding Rather Than Metabolism May Explain the Interaction of Two Food-Grade *Lactobacillus* Strains with Zearalenone and Its Derivative α ? - Zearalenol[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(7): 3545-3549.
- [12] Zinedine A, Soriano J M, Molto J C, et al. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin[J]. Food and chemical toxicology, 2007, 45(1): 1-18.
- [13] 刘玉霞. 玉米赤霉烯酮降解菌的筛选、鉴定及脱毒条件研究[D]. 广州:华南理工大学, 2011.
- [14] Tinyiro S E, Yao W, Sun X, et al. Scavenging of zearalenone by *Bacillus* strains in vitro[J]. Res J Microbiol, 2011, 6(3): 304-309.
- [15] Tinyiro S E, Wokadala C, Xu D, et al. Adsorption and degradation of zearalenone by *Bacillus* strains[J]. Folia Microbiol, 2011, 56(4): 321-327.