

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250114002

引用格式: 杨勇, 于继光, 沈文凤, 等. 拮抗黄曲霉的伯克霍尔德菌的筛选、鉴定及应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(9): 240–247.

YANG Y, YU JG, SHEN WF, *et al.* Screening, identification and application of *Burkholderia* antagonizing *Aspergillus flavus* [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(9): 240–247. (in Chinese with English abstract).

拮抗黄曲霉的伯克霍尔德菌的筛选、鉴定及应用

杨 勇¹, 于继光¹, 沈文凤², 于丽娜², 宋 昱², 毕 洁², 高 远²,
江 晨², 王明清^{2*}

(1. 费县农业技术推广中心, 临沂 273400; 2. 山东省花生研究所, 青岛 266100)

摘 要: **目的** 筛选一株能拮抗黄曲霉生长的菌株, 并进行菌株鉴定、应用研究和基因初步分析。**方法** 以费县花生地土壤的微生物为研究对象, 通过黄曲霉对峙试验筛选得到有效菌; 通过形态学观察和 16S rRNA 基因分析、鉴定确定有效菌种类; 黄曲霉孢子悬浮液侵染花生荚果和花生籽仁, 验证有效菌拮抗黄曲霉生长的效果; 分析菌株的基因组特征和次生代谢产物合成基因簇, 确定有效菌株的基本特性。**结果** 筛选获得能拮抗黄曲霉生长的有效菌株 G22。通过形态学特征和基因同源性分析, 鉴定菌株 G22 为伯克霍尔德菌(*Burkholderia latens*), 同源性达 99.93%, 命名为伯克霍尔德菌 G22。有效菌株的发酵液对花生荚果和花生籽仁上黄曲霉的生长有一定拮抗作用。有效菌株的基因组有 3 个染色体和 1 个质粒, 次生代谢产物合成基因簇证明有效菌株有拮抗特性。**结论** 菌株 G22 对黄曲霉生长具有良好的拮抗作用。菌株 G22 的花生应用效果研究具有重要的实践意义, 为下一步开发黄曲霉的微生物菌剂奠定了基础。

关键词: 黄曲霉; 花生; 拮抗菌; 分离鉴定; 伯克霍尔德菌

Screening, identification and application of *Burkholderia* antagonizing *Aspergillus flavus*

YANG Yong¹, YU Ji-Guang¹, SHEN Wen-Feng², YU Li-Na², SONG Yu², BI Jie²,
GAO Yuan², JIANG Chen², WANG Ming-Qing^{2*}

(1. Feixian Agricultural Technology Extension Center, Linyi 273400, China;
2. Shandong Peanut Research Institute, Qingdao 266100, China)

ABSTRACT: Objective To screen a strain that can antagonize the growth of *Aspergillus flavus* and to identify the strain, study its application and analysis its genetic preliminarily. **Methods** The microorganisms in the soil of peanut field in Feixian County were used as the research object, and the effective strains were obtained through the screening of *Aspergillus flavus* standoff test; the effective strains species were determined through morphological

收稿日期: 2025-01-14

基金项目: 山东省重点研发计划项目(2023TZXD074); 科技特派员科技服务乡村振兴典型案例(新技术新品种、新模式)推广应用项目(2022DXAL0102); 山东省农业科学院农业科技创新工程项目(CXGC2025B06); 2024 年度牟平区科技创新发展专项

第一作者: 杨勇(1973—), 男, 高级农艺师, 主要研究方向为农业技术推广。E-mail: yy7171186@163.com

*通信作者: 王明清(1981—), 男, 博士, 副研究员, 主要研究方向为食品安全。E-mail: mingqing201610@163.com

observation and 16S rRNA gene analysis and identification; the peanut pods and peanut kernels were infested with the suspension of *Aspergillus flavus* spores to validate the effective bacteria's effect of antagonizing the growth of *Aspergillus flavus*; and the genome characteristics of the bacterial strains and the clusters of genes of secondary metabolites synthesis were analyzed to determine the basic characteristics of the effective bacterial strains. The genomic characteristics of the strain and the secondary metabolite synthesis gene cluster were analyzed to determine the basic characteristics of the effective strain. **Results** Effective strain G22, which could antagonize the growth of *Aspergillus flavus*, was obtained by screening. The strain G22 was identified as *Burkholderia latens* with 99.93% homology and named *Burkholderia latens* G22 by morphological characterization and gene homology analysis. The fermentation broth of the effective strain had a certain antagonistic effect on the growth of *Aspergillus flavus* on peanut pods and peanut seed kernels. The genome of the effective strain had 3 chromosomes and 1 plasmid, and the secondary metabolite synthesis gene cluster proved that the effective strain had antagonistic properties. **Conclusion** Strain G22 has good antagonistic effect on the growth of *Aspergillus flavus*. The application effect of strain G22 in peanut has important research significance in practice, which will lay a foundation for the further development of microbial fungicides for *Aspergillus flavus*.

KEY WORDS: *Aspergillus flavus*; peanut; antagonism; isolation and identification; *Burkholderia*

0 引 言

黄曲霉(*Aspergillus flavus*)侵染花生、玉米等农作物,并产生次生代谢产物黄曲霉毒素^[1]。黄曲霉毒素有剧毒性,能致畸致癌,如果长期食用会严重威胁身体健康甚至死亡^[2-3]。据联合国粮农组织估计,全球每年超四分之一的谷物遭受黄曲霉毒素的污染,导致高达数千亿美元的损失^[4]。因此,黄曲霉和黄曲霉毒素的危害必须要引起重视,其防治工作仍然是一个亟需解决的难题。目前,粮食与食品中的黄曲霉及其毒素防治办法通常有物理、化学和生物法,物理法主要是通过控制黄曲霉菌的生长环境达到防治效果;化学法主要是通过化学防霉剂处理产品达到防治效果;生物法主要是通过生物间或者产生活性物质抑制黄曲霉达到防治效果。物理和化学法防治黄曲霉菌成本高、效率低,同时还会残留有害物质以及破坏产品的营养成分^[5],所以,生物法因其更安全被认为是最有效和最有前途的方法^[6]。

前期研究发现假单胞菌、扁座壳孢、木霉菌、乳杆菌、芽孢杆菌等多种有效拮抗黄曲霉的菌株。DEY等^[7]从花生的根际分离出一株对黄曲霉有良好防治效果的假单胞菌;潘洁茹等^[8]从柑桔园分离到一株座壳孢菌,通过分析其分生孢子、侧丝和子座形态等鉴定出是一株扁座壳孢菌,其胞外代谢产物抑菌圈直径达17 mm,能明显抑制黄曲霉菌生长;张丽芳等^[9]从山东、河南、江苏、山西等地区的玉米中筛选到7株对黄曲霉有抑制作用的木霉菌,其中一株哈茨木霉的发酵产物和蛋白提取物对黄曲霉生长有较强抑制能力,可开发为微生物制剂应用;巩海强等^[10]从玉米青贮饲料筛选出了对黄曲霉有明显抑制作用的革兰氏阳性

乳酸菌,抑菌圈直径大于3.60 cm;李俊峰等^[11]发现一株通过产生拮抗蛋白而抑制黄曲霉生长的空气芽孢杆菌;郑爱芳等^[12]从农田土壤中筛选出一株贝莱斯芽孢杆菌,除了能拮抗黄曲霉外,还能对多种微生物有抑制作用,能预防花生贮藏过程中的真菌侵染,还能防治植物微生物病害;其他研究也都分离到了枯草芽孢杆菌^[13-15]。然而目前关于伯克霍尔德氏菌拮抗黄曲霉的报道较少。本研究从费县花生地分离纯化出能抑制黄曲霉生长的伯克霍尔德氏菌,并进行了应用效果研究,初步分析了其基因组特征,并挖掘了拮抗黄曲霉的次级代谢产物,为下一步开发黄曲霉的微生物菌剂奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

有效菌株 G22 由费县花生地土壤中分离、筛选得到。黄曲霉标准菌株 3357 由山东省花生研究所保藏。在费县花生地随机取土壤样品 12 份,取样深度为 0~5 cm,于 4℃冰箱冷藏备用。

DNA 试剂盒(天根生物技术公司); Super GelRed 荧光染料(美国 Everbright Inc 公司); 琼脂粉、琼脂糖(北京索莱宝科技有限公司); LB 肉汤粉(北京陆桥技术有限公司); 马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA, 青岛海博生物技术有限公司)。

1.2 仪 器

HR30-IIA2 生物安全柜(青岛海尔生物医疗股份有限公司); IX73P+DP80 倒置荧光显微镜(日本 OLYMPUS 公司); IS-RDV1 立式恒温培养箱(德国 CRYSTAL 公司);

GI36T 高压蒸气灭菌器[致微(厦门)仪器有限公司]; S1000TM Thermal Cycler 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)仪(美国 BIO-RAD 公司); 5418 离心机(德国 Eppendorf 公司); BCE124-1CCN 电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]。

1.3 拮抗黄曲霉菌株的筛选

取费县花生地土壤样品 1 g 于 9 mL 无菌水中, 搅拌 10 min, 吸取 100 μ L 涂布于 LB 平板, 放置于培养箱中 28 $^{\circ}$ C 培养 2 d 后观察菌落的长势。标记平板上的各菌落, 继续重复纯化 5 代, 在 -80 $^{\circ}$ C 保存。将筛选出的各菌株在 LB 液体培养基 28 $^{\circ}$ C 孵育 24 h, 得到各菌株发酵液, 将各菌株发酵液分别与黄曲霉对峙培养, 观察其生长状况。

1.4 拮抗黄曲霉菌株的鉴定

1.4.1 拮抗黄曲霉菌株的形态学观察

上述筛选出的有效菌株在 LB 固体培养基 28 $^{\circ}$ C 孵育 24 h, 观察记录有效菌菌落形态特征。

1.4.2 拮抗黄曲霉菌株 G22 的 16S rRNA 基因鉴定

将菌株 G22 接种于液体 LB 中, 150 r/min 28 $^{\circ}$ C 恒温培养 24 h 得到发酵液。采用天根 DNA 试剂盒提取菌株 G22 基因组 DNA。引物为 27F、1429R^[16]。PCR 反应体系 25 μ L, Taq buffer 2.5 μ L, dNTPs 2 μ L, Taq 聚合酶 0.2 μ L, 引物 27F 及 1429R 各 1 μ L, G22 菌株基因组模板 1 μ L, ddH₂O 17.3 μ L。PCR 扩增程序 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 100 s, 循环 30 个; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应结束后, 3 μ L PCR 产物上样于 1% 琼脂糖凝胶(Super GelRed 荧光染色试剂染色), 100 V 电压电泳 30 min, 凝胶成像系统检测结果得到清晰的目的条带。PCR 产物进行回收。根据说明书将 PCR 产物连接到 TAKARA 的 pMD19-T 载体; 该反应体系 10 μ L, 其中 pMD19-T 载体 1 μ L, PCR 产物 1 μ L, 水 3 μ L, Soution I 5 μ L; 该体系在 16 $^{\circ}$ C 反应 30 min。构建的重组质粒转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 测序得到的基因序列进行线上比对分析, 通过 CLUSTALW 进行多重数据比对后, 用 MEGA X^[17] 构建 16S rRNA 基因序列的系统发生树。

1.5 菌株 G22 抑制黄曲霉生长效果的应用研究

1.5.1 菌株 G22 抑制花生荚果黄曲霉生长效果

挑选完好无损的同品种花生荚果^[18], 花生荚果表面用 1% 次氯酸钠溶液消毒, 无菌水冲洗 3 次, 无菌条件下于三角瓶中接种 4×10^6 CFU/mL 黄曲霉孢子悬浮液 0.4 mL 及菌株 G22 发酵液 0.4 mL。接种后于 28 $^{\circ}$ C 孵育 7 d, 观察比较花生荚果的长菌情况。对照组用无菌水代替菌株 G22 发酵液, 每个平行重复 3 次。

1.5.2 菌株 G22 抑制花生籽仁黄曲霉生长效果

用 70% 酒精对花生籽仁消毒后无菌水冲洗 3 次(20 min

内完成整个过程)。无菌培养皿放入花生籽仁 8 粒, 接种 4×10^6 CFU/mL 黄曲霉孢子悬液 0.4 mL 及菌株 G22 发酵液 0.4 mL。接种后于 28 $^{\circ}$ C 孵育 7 d, 观察比较花生籽仁的长菌情况。对照组用无菌水代替菌株 G22 发酵液, 每个平行重复 3 次。

1.6 拮抗黄曲霉的菌株 G22 基因组分析

前期研究发现很多生防菌通过次级代谢产物抑制真菌的生长^[19], 本研究通过细菌基因组学分析, 研究该菌的次级代谢产物的基因。根据细菌 DNA 提取试剂盒说明书进行有效菌株 G22 基因组的 DNA 提取。纯化的菌株 G22 基因组 DNA 进行定量, 高质量的 DNA 被用来后面的建库测序。使用 PacBio Sequel IIe 和 illumina 测序仪(NovaSeq6000)进行菌株 G22 全基因组测序。生物信息学采用 PacBio Sequel IIe、Illumina 测序平台上生成的数据进行分析。此过程中所有的分析皆在 <http://cloud.majorbio.com>(上海美吉生物云平台)上进行。利用 Prodigal v2.6.3^[20]对菌株 G22 基因组中的编码序列进行预测, 质粒基因采用 GeneMarkS^[21]软件预测, tRNAscan-SE v2.0^[22]进行 tRNA 预测, Barrnap v0.9 (<https://github.com/tseemann/barrnap>)进行 rRNA 预测。采用 Diamond、BLASTP、HMMER 等序列比对工具, 从 Pfam、NR、CAZY、Swiss-Prot、GO、KEGG、COG 等数据库中对预测到的编码序列进行功能注释, 通过 antiSMASH v5.1.2 预测菌株 G22 次级代谢产物合成基因簇。

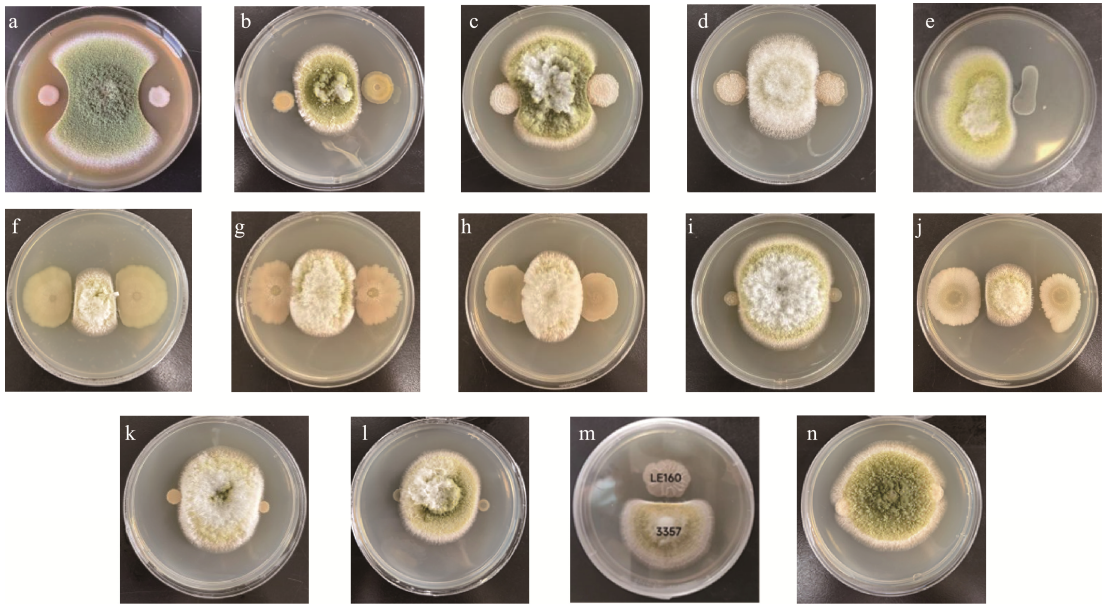
2 结果与分析

2.1 拮抗黄曲霉菌株的筛选与鉴定

本研究筛选到 102 株细菌, 将分离得到的菌株分别与黄曲霉菌进行对峙实验, 得到能拮抗黄曲霉的菌株 12 株, 分别为菌株 G6、G10、G12、G14、G22、G40、G63、G67、G82、G86、G95、G100。对峙结果如图 1 所示, 其中菌株 G22 对峙效果最明显, 菌株 LE160 和菌株 G44 分别为阳性对照和阴性对照。菌株的菌落呈圆形乳黄色半透明状(图 2), 直径为 1~2 mm。菌种分类的重要指标之一就是 16S rRNA 序列的同源性。将该序列在 ezbiocloud 数据库中比对后发现, 有效菌株 G22 与 *Burkholderia latens* R-5630(T)亲缘关系最近, 同源性达 99.93%, 属于伯克霍尔德菌(*Burkholderia latens*), 命名为伯克霍尔德菌 G22。选取相近的 17 个菌, 将其同源序列构建进化树(图 3)。

2.2 菌株 G22 抑制黄曲霉生长效果的应用

黄曲霉和菌株 G22 发酵液接种到花生荚果后的生长情况表现出明显的不同, 如图 4A 所示。对照组的花生荚果均有明显的黄曲霉生长, 接种菌株 G22 实验组的花生荚



注: a. 菌株 G22; b. 菌株 G12; c. 菌株 G40; d. 菌株 G10; e. 菌株 G100; f. 菌株 G67; g. 菌株 G63; h. 菌株 G86; i. 菌株 G6; j. 菌株 G95; k. 菌株 G14; l. 菌株 G82; m. 菌株 LE160, 阳性对照, 有效菌株拮抗黄曲霉效果图^[16]; n. 菌株 G44, 阴性对照。

图 1 黄曲霉与部分菌株在 PDA 上共同培养的菌落形态

Fig.1 Colony morphology of *Aspergillus flavus* co-cultivated with part of strains showing on PDA



图 2 菌株 G22 在 LB 肉汤上的菌落形态
Fig.2 Colony morphology of strain G22 on LB broth

壳未见明显的黄曲霉生长。说明菌株 G22 发酵液对黄曲霉生长有抑制效果, 菌株 G22 能有效拮抗黄曲霉的生长。

为进一步验证菌株 G22 在花生籽仁中对黄曲霉菌的抑制作用, 人工接种两种菌株后的生长情况如图 4B 所示, 对照组中黄曲霉生长粒数和黄曲霉覆盖率都比实验组多; 实验组只有 3 粒花生籽仁被侵染, 并且覆盖率较小。由此可见, 菌株 G22 发酵液对黄曲霉菌生长有抑制作用。

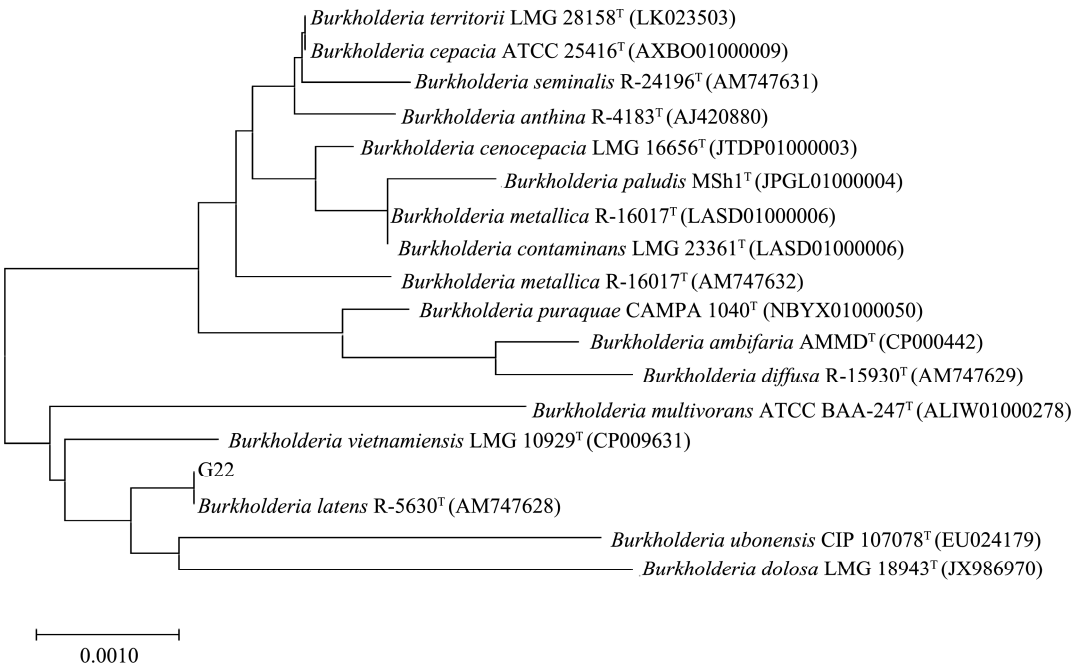
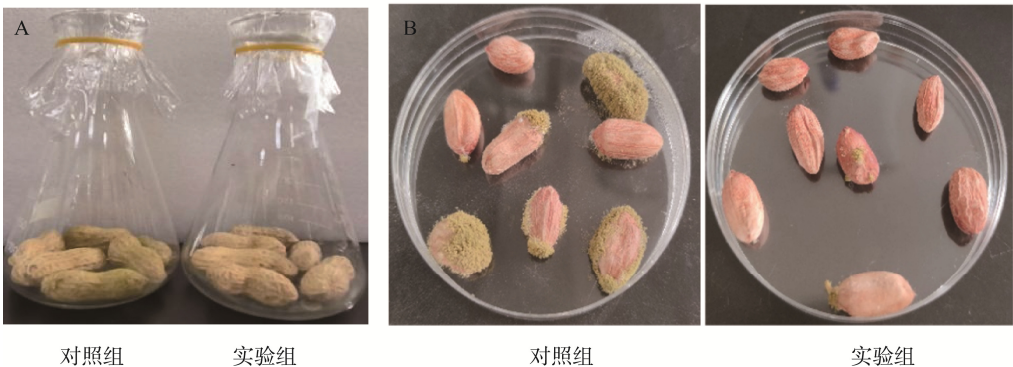


图 3 菌株 G22 基于 16S rRNA 序列比较的系统进化树
Fig.3 Phylogenetic tree of strain G22 based on 16S rRNA sequence comparisons



注: A: 菌株 G22 抑制花生荚果的黄曲霉生长效果图; B: 菌株 G22 抑制花生籽仁的黄曲霉生长效果图。

图 4 菌株 G22 抑制花生黄曲霉生长的情况

Fig.4 Demonstration of strain G22 inhibiting the growth of *Aspergillus flavus* on peanuts

2.3 菌株 G22 的基因组特征及次生代谢产物生物合成基因簇的挖掘

本研究中的有效菌 G22 经 DNA 焦磷酸测序总共产生了 94839 个读数, 相当于 162.7 倍的基因组覆盖率, 鸟嘌呤胞嘧啶(guanine cytosine, GC)含量为 67.03%。有效菌 G22 基因组由 3 条分别为 3245674、2254594、1184400 bp 的环

状染色体和 1 条 173826 bp 的质粒组成(图 5), GenBank 登录号分别为 CP185919、CP185920、CP185921、CP185922, 总计 6.86 Mbp。1 号染色体、2 号染色体和 3 号染色体分别编码了 3189、2293 和 1127 个预测开放阅读框, 质粒中则有 179 个开放阅读框。1 号染色体上有 2706 个已知开放阅读框, 338 个假定开放阅读框, 145 个未知开放阅读框, 60 个 tRNA,

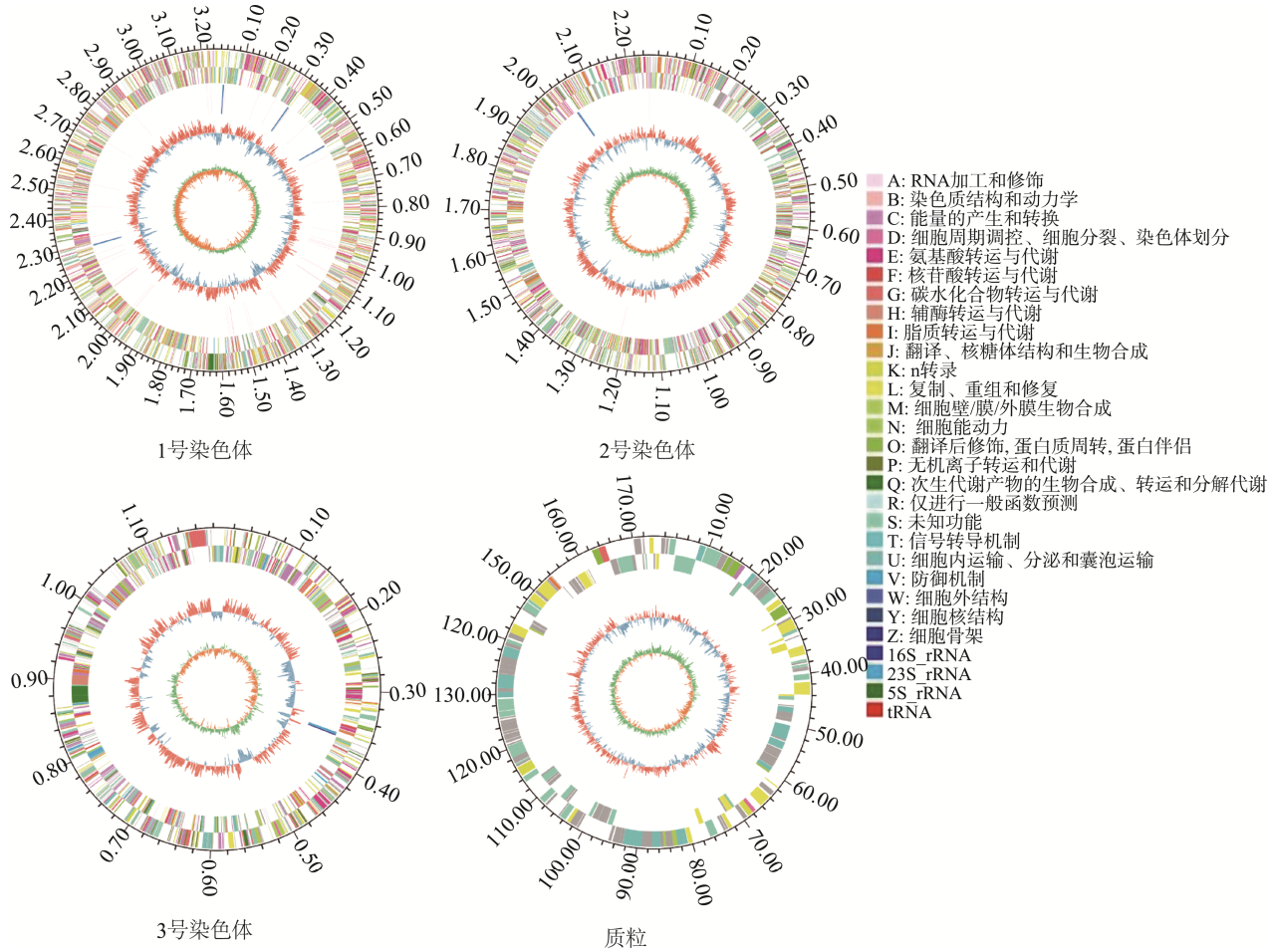


图 5 菌株 G22 圆形基因组的特定特征

Fig.5 Specific features of Circular genome of strain G22

12 个 rRNA 操作子, 13 个基因岛。2 号染色体上有 1746 个已知开放阅读框、381 个假定开放阅读框、166 个未知开放阅读框、4 个 tRNA、3 个 rRNA 操作子、2 个基因岛。3 号染色体上有 918 个已知开放阅读框、118 个假定开放阅读框、91 个未知开放阅读框、2 个 tRNA、3 个 rRNA 操作子、6 个基因岛。在质粒中, 发现了 105 个已知开放阅读框、68 个假定开放阅读框、6 个未知开放阅读框、0 个 tRNA、0 个 rRNA 操作子、1 个基因岛。

用蛋白质的直系同源簇功能注释创建了圆形基因组图谱。图谱的最外圈是基因组的大小标识; 第 2、3 圈分别是+链和-链上预测的蛋白质编码基因, 其中不同的颜色代表了不同的直系同源簇功能分类; 第 4 圈, tRNA 和 rRNA; 圈 5 为 GC 含量, 向外的红色部分表示该区域 GC 的含量比全基因组平均 GC 含量高, 向内的蓝色部分表示该区域 GC 含量全基因组平均 GC 含量低; 图谱的最内圈为 GC-Skew 值, 具体算法为 $G-C/G+C$, 可以辅助判断前导链和后滞链, 一般前导链 GC skew>0, 后滞链 GC skew<0, 也可辅助判断复制起点(累计偏移最小值)与终点(累计偏移最大值)。

利用 anti-SMASH 预测了菌株 G22 基因组中的次生代谢物生物合成基因簇^[23]。总共鉴定出 12 个这样的簇, 包括 2 个非核糖体合成酶、2 个萜烯类、2 个芳基多烯类、1 个假定蛋白、1 个糖苷水解酶家族 68 蛋白、1 个磷酸酯、1 个硬脂内酯、1 个细菌素和 UTP-葡萄糖-1-磷酸核苷酸基转移酶 GalU, 如表 1 所示。这些基因簇由核心生物合成基因、转运相关基因、调控基因、附加生物合成基因和其他基因组成。其中, 基因簇 11 与火氏伯克霍尔德菌(*Burkholderia pyrrocinia*) Lyc2 的麝香草因 A 生物合成基因簇的氨基酸相似度为 94%。基因簇 1 与洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*) 89 的鸟苷生物合成基因簇有 93% 的氨基酸相似性。基因簇 7 与双向伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia ambifaria*) IOP40-10 的头孢菌素 A 生物合成基因簇有 62% 的氨基酸相似性。基因簇 12 与弗氏阿里弧菌(*Aliivibrio fischeri*) ES11 的 APE Vf 生物合成基因簇的氨基酸相似度为 35%。基因簇 3 与费氏阿里弧菌(*Aliivibrio fischeri*) ES114 的 APE Vf 生物合成基因簇有 10% 的氨基酸相似性。基因簇 6 与病毒性链霉菌(*Streptomyces viridochromogenes*) Tü494 中的膦菊酯三肽生物合成基因簇有 6% 的氨基酸相似性。

表 1 菌株 G22 次生代谢产物生物合成基因簇
Table 1 Secondary metabolite biosynthetic gene clusters in strain G22

基因簇	类型	开始	结束	相似簇	相似性/%	MIBiG 序列
基因簇 1	非核糖体合成酶	1608791	1663560	鸟苷	93	BGC0001721 ^a
基因簇 2	萜烯	1976091	1996925	-	-	-
基因簇 3	芳基多烯	2829253	2870522	APE Vf	10	BGC0000837 ^b
基因簇 4	假定蛋白	260355	276839	-	-	-
基因簇 5	糖苷水解酶家族 68 蛋白	742594	762939	-	-	-
基因簇 6	磷酸酯	904827	946513	膦菊酯三肽	6	BGC0000406 ^c
基因簇 7	硬脂内酯	1504395	1525007	头孢菌素 A	62	BGC0001897 ^d
基因簇 8	萜烯	1741712	1765811	-	-	-
基因簇 9	细菌素	72239	83055	-	-	-
基因簇 10	单位: UTP-葡萄糖-1-磷酸核苷酸基转移酶 GalU	535180	578449	-	-	-
基因簇 11	非核糖体合成酶	849707	935136	麝香草因 A	94	BGC0001711 ^e
基因簇 12	芳基多烯	1000668	1045532	APE Vf	35	BGC0000837 ^f

注: ^a 为 *Burkholderia cepacian* 89 最相似基因簇的鉴定号; ^b 为 *Aliivibrio fischeri* ES114 最相似基因簇的鉴定号; ^c 为 *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 最相似基因簇的鉴定号; ^d 为 *Burkholderia ambifaria* IOP40-10 最相似基因簇的鉴定号; ^e 为 *Burkholderia pyrrocinia* Lyc2 最相似基因簇的鉴定号; ^f 为 *Aliivibrio fischeri* ES11 最相似基因簇的鉴定号。

3 讨论与结论

花生含有的营养物质丰富, 在食用油和休闲食品方面占有重要的地位^[24-25]。但花生等农作物易受黄曲霉污染, 每年有大量花生在收获或贮藏过程中被侵染, 损失严重^[26]。因此, 寻找能有效拮抗黄曲霉的微生物意义重大。从筛选自

身能拮抗黄曲霉的花生品种^[27-28]到筛选能拮抗黄曲霉生长的微生物^[29-30], 研究学者已对花生受黄曲霉污染问题做过很多研究, 据报道, 不同的微生物及其代谢产物能有效抑制黄曲霉生长。徐杨玉等^[31]发现绿色木霉的发酵液对黄曲霉菌有抑制作用, 大田试验发现其发酵液能抑制土壤中黄曲霉菌的生长。杜立武等^[32]从玉米中分离出一株解淀粉

芽孢杆菌,对黄曲霉菌丝的生长有抑制作用。宫安东^[33]等分离了吡咯伯克霍尔德菌,能通过产生的挥发性物质二甲基二硫有效抑制黄曲霉生长。本研究中筛选到一株伯克霍尔德氏菌对拮抗黄曲霉生长的效果明显,并且进行了应用研究。研究表明伯克霍尔德氏菌 G22 发酵液作用在花生荚果和花生籽仁上都有明显的抑制黄曲霉生长的作用。

伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia*),具有丰富的代谢多样性和较强的适应能力^[34],能抑制植物病菌生长,被开发为生物防治剂^[35-36]。伯克霍尔德氏菌基因组比较大,通常位于细菌前 5%,平均约为 7.5 Mb。大部分伯克霍尔德氏菌的种属有 2 条染色体、0~6 个质粒^[37]。本研究中的菌株 G22 有 3 个染色体和 1 个质粒,表明该菌和其他伯克霍尔德氏菌有着明显的不同。

随着基因组测序技术的发展,很多种伯克霍尔德氏菌的基因组序列已经公布于数据库,研究表明,伯克霍尔德氏菌能产生复杂的次级代谢产物,包括抗生素类、非核苷酸多肽类等天然活性物质^[38],其中产生的硝吡咯菌素、吩嗪、苯基吡咯和 Cepaciamide A 等次生代谢物具有抑菌活性,能破坏细胞生成能量或抑制细胞代谢物合成等^[39]。DELOS 等^[40]研究的伯克霍尔德氏菌 *anthina XXVI* 能有效抑制芒果炭疽鼻病原炭疽杆菌(*Colletotrichum gloeosporioides*),这可能是由于包括异羟胺酸盐类铁载体的次生代谢物产生的作用。本研究中的有效菌 G22 基因组中含有抑制真菌的环肽 *occidiofungin* 生物合成基因簇同源的基因簇,有 94% 的相似性;同时,与伯克霍尔德氏菌活性抗菌肽的合成关系密切的非核糖体合成酶在有效菌 G22 的基因组中也被预测到,由此说明有效菌 G22 有拮抗特性^[41]。

综上所述,菌株 G22 具有显著的拮抗黄曲霉生长的特征,经鉴定是一株伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia latens*),初步分析了其基因组特征,并挖掘了拮抗黄曲霉的次级代谢产物,为下一步开发黄曲霉的微生物菌剂奠定基础。

参考文献

- [1] 刘配莲, 张刚, 陈焱, 等. 食品与饲料中黄曲霉毒素去除技术的研究进展[J]. 中国油脂, 2021, 46(10): 92-97.
LIU PL, ZHANG G, CHEN Y, *et al.* Progress on detoxification technology of aflatoxin in food and feed [J]. China Oils and Fats, 2021, 46(10): 92-97.
- [2] 吴佳遥, 李磊, 游海平, 等. 黄曲霉毒素的危害及植物精油的抑制作用进展[J]. 天津农业科学, 2019, 25(7): 61-64.
WU JY, LI L, YOU HP, *et al.* Hazards of aflatoxin and inhibitory effects of plant essential oil on aflatoxin [J]. Tianjin Agricultural Science, 2019, 25(7): 61-64.
- [3] 董文亚, 陈晨, 赵秀兰, 等. 山东省市售花生及其制品中黄曲霉毒素 B₁ 污染状况与膳食暴露风险评估[J]. 中国油脂, 2023, 48(7): 67-72.
DONG WY, CHEN C, ZHAO XL, *et al.* Contamination status and dietary exposure assessment of aflatoxin B₁ in peanut and its products sold in Shandong Province [J]. China Oils and Fats, 2023, 48(7): 67-72.
- [4] JALLOW A, XIE HL, TANG XQ, *et al.* Worldwide aflatoxin contamination of agricultural products and foods: From occurrence to control [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2021, 20(3): 2332-2381.
- [5] 王昌禄, 刘彤, 李王强, 等. 微生物对黄曲霉毒素的抑制机制研究进展[J]. 食品科学技术学报, 2021, 39(1): 27-36.
WANG CL, LIU T, LI WQ, *et al.* Research progress on inhibition mechanism of aflatoxins by microorganisms [J]. Journal of Food Science and Technology, 2021, 39(1): 27-36.
- [6] 金黎明, 王晓彤, 宫小明, 等. 拮抗黄曲霉枯草芽孢杆菌 21-1-2 发酵条件的优化[J]. 中国酿造, 2020, 39(3): 47-51.
JIN LM, WANG ST, GONG XM, *et al.* Optimization of fermentation conditions of *Bacillus subtilis* 21-1-2 against *Aspergillus flavus* [J]. China Brew, 2020, 39(3): 47-51.
- [7] DEY R, PAL KK, BHATT DM, *et al.* Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth promoting rhizobacteria [J]. Microbiological Research, 2004, 159(4): 371-394.
- [8] 潘洁茹, 林萍, 叶海梅, 等. 一株扁座壳孢的分离及其胞外代谢产物对黄曲霉的抑制效果研究[J]. 中国农学通报, 2011, 27(24): 282-285.
PAN JR, LIN P, YE HM, *et al.* Isolation of an aschersonia placeta strain and the inhibition of its extracellular metabolites on *Aspergillus flavus* [J]. China Agricultural Science Bulletin, 2011, 27(24): 282-285.
- [9] 张丽芳, 许旖旎, 曹阳, 等. 哈茨木霉菌 HNA12 在防控玉米黄曲霉毒素污染中的应用[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(12): 2688-2693.
ZHANG LF, XU YN, CAO Y, *et al.* *Trichoderma harzianum* HNA12 and its application in controlling aflatoxin contamination in maize [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2022, 41(12): 2688-2693.
- [10] 巩海强, 柴继宽, 陈三冬, 等. 抑制黄曲霉乳酸菌的筛选与鉴定[J]. 草地学报, 2023, 31(2): 587-595.
GONG HQ, CHAI JK, CHEN SD, *et al.* The screening and identification of lactic acid bacteria against *Aspergillus flavus* [J]. Acta Agrestia Sinica, 2023, 31(2): 587-595.
- [11] 李俊峰, 滕丽丽, 段效辉, 等. 一株黄曲霉拮抗菌的筛选、鉴定及特性研究[J]. 核农学报, 2019, 33(6): 1181-1189.
LI JF, TENG LL, DUAN XH, *et al.* Screening, identification and characterization of antagonistic bacteria against *Aspergillus flavus* [J]. Journal of Nuclear Agricultural Science, 2019, 33(6): 1181-1189.
- [12] 郑爱芳, 何欢, 高晔, 等. 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[J]. 中国油脂, 2024, 49(2): 56-62.
ZHENG AIF, HE H, GAO Y, *et al.* Screening of biocontrol bacteria against peanut postharvest *Aspergillus flavus* contamination and its prevention effect [J]. China Oils and Fats, 2024, 49(2): 56-62.
- [13] XIA XH, ZHANG Y, LI MY, *et al.* Isolation and characterization of a *Bacillus subtilis* strain with aflatoxin B₁ biodegradation capability [J]. Food Control, 2017, 75(5): 92-98.
- [14] PETCHKONGKAEW A, TAILLANDIER P, GASALUCK P, *et al.* Isolation of *Bacillus* spp. from Thai fermented soybean (Thua-nao): screening for aflatoxin B₁ and ochratoxin A detoxification [J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 104(5): 1495-1502.
- [15] AFSHARMANESH H, AHMADZADEHB M, JAVAN-NIKKHAHB M, *et al.* Improvement in biocontrol activity of *Bacillus subtilis* UTB₁ against *Aspergillus flavus* using gamma-irradiation [J]. Crop Protection, 2014, 60: 83-92.
- [16] 王明清, 沈文凤, 穆树旗, 等. 一株降解黄曲霉毒素 B₁、拮抗黄曲霉的菌株鉴定及应用研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(18): 231-238.
WANG MQ, SHEN WF, MU SQ, *et al.* Identification and application of a

- strain that degrades aflatoxin B₁ and antagonizes *Aspergillus flavus* [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(18): 231–238.
- [17] KUMAR S, STECHER G, LI M, *et al.* MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms [J]. Molecular Biology & Evolution, 2018, 35(6): 1547–1549.
- [18] 邱西克, 康彦平, 郭建斌, 等. 花生荚壳抗黄曲霉菌感染的鉴定方法研究及抗种质发掘[J]. 中国油料作物学报, 2019, 41(1): 109–114.
- QIU XK, KANG YP, GUO JB, *et al.* Method for screening resistance of peanut shell to *Aspergillus flavus* infection and identification of resistant genotypes [J]. Chinese Journal Oil Crop Science, 2019, 41(1): 109–114.
- [19] 张立新, 谢关林, 罗远婵. 洋葱伯克氏菌在农业上应用利弊探讨[J]. 中国农业科学, 2006, 39(6): 1166–1172.
- ZHANG LX, XIE GL, LUO YC. Discussion on advantages and disadvantages of *Burkholderia cepacia* complex in agricultural utilization [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2006, 39(6): 1166–1172.
- [20] HYATT D, CHEN GL, LOCASCIO PF, *et al.* Prodigal: Prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification[J]. BMC bioinformatics, 2010, 11(1): 1–11
- [21] BESEMER J, BORODOVSKY M. GeneMark: Web software for gene finding in prokaryotes, eukaryotes and viruses [J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33(Web Server): 451–454.
- [22] CHAN PP, LOWE TM. tRNAscan-SE: Searching for tRNA genes in genomic sequences [J]. Methods of Molecular Biology, 2019, 1962: 1–14.
- [23] BLIN K, MEDEMA MH, KAZEMPOUR D, *et al.* AntiSMASH 2.0—a versatile platform for genome mining of secondary metabolite producers [J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(W1): W204–12.
- [24] TOOMER OT. Nutritional chemistry of the peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. Critical Reviews in Food ence & Nutrition, 2018, 58(17): 3042–3053.
- [25] BUROW MD, SIMPSON CE, STARR JL, *et al.* Transmission genetics of chromatin from a synthetic amphidiploid to cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). broadening the gene pool of a monophyletic polyploid species [J]. Genetics, 2001, 159(2): 823–837.
- [26] 王允, 刘冬梅, 尹海燕, 等. 花生应答黄曲霉菌侵染的代谢组学分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15 (14): 249–256.
- WANG Y, LIU DM, YIN HY, *et al.* Metabolomics analysis of peanut response to *Aspergillus flavus* infection [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(14): 249–256.
- [27] 沈文凤, 王明清, 于丽娜, 等. 抗黄曲霉侵染与产毒的花生品种筛选[J]. 花生学报, 2024, 53(2): 77–82, 90.
- SHEN WF, WANG MQ, YU LN, *et al.* Screening of peanut varieties resistant to *Aspergillus flavus* infection and toxicity [J]. Journal of Peanut Science, 2024, 53(2): 77–82, 90.
- [28] 蒋艺飞. 花生黄曲霉侵染抗性和产毒抗性的 QTL 分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2021.
- JIANG YF. QTL analysis of resistance to *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin production in peanut [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2021.
- [29] 张学雯. 高效黄曲霉拮抗菌的筛选、抑菌机理、发酵工艺条件及应用研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2019.
- ZHANG XW. Screening of antifungal bacteria against *Aspergillus flavus*, antifungal mechanism, fermentation technological conditions and application of *Aspergillus flavus* [D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2019.
- [30] 张婉. 黄曲霉毒素 B₁ 降解菌的筛选及降解机制研究[D]. 长春: 吉林大学, 2023.
- ZHANG W. Screening and degradation mechanism of aflatoxin B₁ degrading bacteria [D]. Changchun: Jilin University, 2023.
- [31] 徐杨玉, 刘付香, 洪彦彬, 等. 绿色木霉对花生黄曲霉毒素污染的防治 [J]. 热带生物学报, 2019, 10(4): 367–371.
- XV YY, LIU FX, HONG YB, *et al.* Prevention and control of aflatoxin contamination in peanut by *Trichoderma* [J]. Journal of Tropical Biology, 2019, 10(4): 367–371.
- [32] 杜立武, 高素艳, 杜瑞煊, 等. 玉米黄曲霉毒素污染拮抗菌的筛选鉴定及控制效果[J]. 安徽农业科学, 2019, 47(20): 7–9, 14.
- DU LW, GAO SY, DU RH, *et al.* Screening, identification and control effects of aflatoxin-contaminated antagonistic bacteria in corn [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2019, 47(20): 7–9, 14.
- [33] 宫安东, 董飞燕, 吴楠楠, 等. 吡咯伯克霍尔德菌 WY6-5 产二甲基二硫对储藏期花生黄曲霉及毒素的抑制作用[J]. 中国农业科学, 2019, 52(17): 2972–2982.
- GONG AND, DONG FY, WU NN, *et al.* Inhibitory effect of dimethyl disulfide from *Burkholderia pyrrocinia* WY6-5 on *Aspergillus flavus* and aflatoxins in peanuts during storage period [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2019, 52(17): 2972–2982.
- [34] TANG Y, LEI P, ZHANG CY, *et al.* Isolation and identification of *Burkholderia* sp. Z1 and analysis of its antifungal components [J]. Life Science Research, 2020, 24(6): 484–493, 498.
- [35] 张珂飞, 钟永嘉, 孙丽莉, 等. 植物有益伯克霍尔德氏菌的研究进展及其在农业中的应用[J]. 微生物学报, 2021, 61(8): 2205–2218.
- ZHANG KF, ZHONG YJ, SUN LL, *et al.* Plant-associated beneficial *Burkholderia* [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(8): 2205–2218.
- [36] SANTOS AV, DILLON RJ, DILLON VM, *et al.* Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 239(2): 319–323.
- [37] 唐滢, 雷平, 张翠央, 等. 抑真菌伯克霍尔德氏菌 Z1 的分离鉴定及其抑菌物质分析[J]. 生命科学研究, 2020, 24(6): 484–493, 498.
- TANG Y, LEI P, ZHANG CY, *et al.* Isolation and identification of *Burkholderia* sp. Z1 and analysis of its antifungal components [J]. Life Science Research, 2020, 24(6): 484–493, 498.
- [38] ROQUIGNY R, NOVINSKAK A, ARSENEAULT T, *et al.* Transcriptome alteration in phytophthora infestans in response to phenazine-1-carboxylic acid production by *Pseudomonas fluorescens* strain LBUM223 [J]. BMC Genomics, 2018, 19(1): 474.
- [39] 敖武, 曾庆桂, 李希茜, 等. 1 株拮抗真菌的生防细菌 Xj11 的分离与鉴定[J]. 微生物学杂志, 2013, 33(3): 45–48.
- AO W, ZENG QG, LI XQ, *et al.* Isolation and identification of an antifungal biocontrol bacterium Strain Xj11 [J]. Journal of Microbiology, 2013, 33(3): 45–48.
- [40] DELOS SV, BARRERA-GALICIA GC, MIRANDA-SALCEDO MA, *et al.* *Burkholderia cepacia* XXVI siderophore with biocontrol capacity against *Colletotrichum gloeosporioides* [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28: 2615–2623.
- [41] 张慧, 周于聪, 梁言, 等. 木霉菌抗菌肽 peptaibols 合成调控机制研究进展[J]. 菌物学报, 2021, 40(8): 1905–1917.
- ZHANG H, ZHOU YC, LIANG Y, *et al.* Research progress of the biosynthesis and regulation of the antibiotic peptaibols in *Trichoderma* [J]. Mycosystema, 2021, 40(8): 1905–1917.

(责任编辑: 韩晓红 于梦娇)