

呕吐毒素降解微生物的筛选及应用

窦 勇¹, 胡佩红², 姚妙爱¹, 闫怀中¹, 周玉东¹

(1. 江苏财经职业技术学院 粮食与食品药品学院, 江苏 淮安 223003; 2. 淮安正昌饲料有限公司, 江苏 淮安 223003)

摘 要:为分离筛选可高效降解呕吐毒素(Deoxynivalenol, DON)的细菌,以期在粮食 DON 生物降解中应用。采用 DON 为唯一碳源的无机盐培养基作为富集驯化培养基,从鸡肠、鱼肠及土壤样品中富集培养可降解 DON 的混合菌,并逐一分离单菌进行 DON 降解能力检测,获得降解效果最佳菌株。结果表明:JC-5 菌株在无机盐培养基中 DON 降解效果显著高于其他菌株,12 h、24 h、36 h 内的降解率依次为 56.56%、91.12%、96.97%;将 JC-5 添加到 DON 污染的面粉中,其在 12 h、24 h、36 h 内对 DON 的降解率依次为 50.32%、84.84% 和 90.66%。经形态学、生理生化特征、分子生物学鉴定,该菌株为江都丛毛单胞菌(*Comamonas jiangduensis*)。与现有 DON 降解菌相比,该菌株具有降解效率高、降解效果好,可有效降解面粉中 DON 的优点。可为进一步开发粮食中霉菌毒素的高效降解途径研究奠定基础。

关键词:降解;呕吐毒素;丛毛单胞菌;筛选;鉴定

中图分类号:TS201.3

文献标识码:A

文章编号:2096-5877(2021)04-0047-06

Screening and Application of One Deoxynivalenol in Grain Degradation Strain

DOU Yong¹, HU Peihong², YAO Miaoai¹, LYU Huaizhong¹, ZHOU Yudong¹

(1. Department of Grain and Food & Drug, Jiangsu Vocational College of Finance & Economics, Huai'an 223003; 2. Huai'an Zhengchang feed Co., Ltd., Huai'an 223003, China)

Abstract: The study aimed to investigate the ability of some bacteria strains to degrade the deoxynivalenol (DON) in order to facilitate the application of such strain in the biodegradation process of DON in grain. The screening approach to identify the best performing strain was done using DON as the only source of carbon added to inorganic salt medium for enrichment and domestication. The bacterial mixed strains were natural flora isolated and enriched from chicken and fish intestines, as well as from soil samples. The best performing bacterial strain was determined by measuring the DON degradation ability of individual isolates. The results showed that DON degradability by the strain JC-5 was significantly higher than that of other strains in inorganic salt medium. The degradation rates were 56.56 %, 91.12 % and 96.97 % in 12 h, 24 h and 36 h, respectively. Furthermore, when the JC-5 strain was added to the grain contaminated with DON, the toxin in the grain can also be degraded obviously. The degradation rates were 50.32 %, 84.84% and 90.66% in 12 h, 24 h and 36 h, respectively. Based on phenotypic, physiological and biochemical properties and genotypic determination, the bacterium was identified as *Comamonas jiangduensis*. Compared with the existing DON degradation bacteria, this bacterium demonstrated significantly high degradation efficiency, particularly when applied in grain. Therefore, it lays a foundation for further development of efficient degradation pathway of mycotoxin in grain.

Key words: Degradation; Deoxynivalenol; *Comamonas*; Screening; Identification

呕吐毒素(Deoxynivalenol, 简称 DON), 又称脱氧雪腐镰刀菌烯醇, 学名为 3,7,15-三羟基-12,13-环氧单端孢霉-9-烯-8-酮, 是污染小麦、玉米等

谷物类霉菌-禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)和黄色镰刀菌(*Fusarium culmorum*)等丝状真菌的次级代谢产物^[1]。DON 对人、畜均具有高度危害性,会引起人和动物腹痛、腹泻、呕吐、肠胃炎等疾病^[2-4],其毒性与 DON 分子上 C₁₂/C₁₃ 上的环氧基团及 C₃-OH 有关^[5]。研究表明:粮食及饲料中 DON 含量超过 1 000 μg/kg 时会对人和动物健康产生危害,我国农业农村部 2011 年对动物饲料中

收稿日期:2020-05-27

基金项目:江苏省苏北科技专项(SZ-HA2019011);江苏省政策引导类计划项目(BZ2019034)

作者简介:窦 勇(1979-),男,副教授,博士,主要从事食品安全及检测方面研究。

DON 的限量标准做了明确规定,其值也不应超过 $1\ 000\ \mu\text{g}/\text{kg}$ ^[6-7]。

目前,国内外关于 DON 的脱毒方法主要有物理法、化学法及生物降解法。物理法的脱毒效果不理想;化学法虽具有较好的脱毒效果,但存在粮食饲料自身营养同时损失;生物降解法通过筛选自然界中的微生物,在温和条件下降解毒素,相比理化方法更加高效、安全^[8-9]。近年来,国内外科研工作者在 DON 毒素的生物降解方面取得一定的研究进展,但仍然存在 DON 的降解效率不高、降解时间长、不易推广应用等缺陷。丁轲等^[10]从 55 株分离菌中筛选得到一株高效降解 DON 的蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)B.JG05,其降解率最高可达 80.61%,对饲料中的 DON,60 h 后可降解 82.68%。徐剑宏等^[11]用高产毒禾谷镰刀菌(*F. graminearum*)F-25 接种灭菌的小麦籽粒,培养后获得 DON 毒素,再以 DON 毒素为唯一碳源进行 DON 毒素降解菌的驯化富集培养,得到能够降解 DON 毒素的菌株 DDS-1;该菌在最适条件下 48 h 后可降解 95% 的 DON,如把 DDS-1 添加到小麦饲料中,48 h 后饲料中的 DON 毒素降解率仅有 75.47%。D.Pan 等^[12]分离小麦籽实内生菌作为小麦禾谷镰刀菌(*F. graminearum*)及降解 DON 的生物防护剂,获得 4 株抑制禾谷镰刀菌生长及 DON 的合成的菌株,其中巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)BM₁可减少小麦赤霉病的发生率 93%,所有菌株对 DON 均有明显的降解能力,可降低 50%~90% 的 DON。Michihiro Ito 等^[13]采用原位植物四步富集培养法筛选出一株降解 DON 的马氏菌属(*Marmoricola* sp.)放线菌 MIM116,该菌株培养液中添加 0.01% 的 Tween80,具有促进菌种生长和 DON 降解的作用,可使小麦天然样品中 DON 由 $3\ \text{mg}/\text{kg}$ 降低至 $1\ \text{mg}/\text{kg}$ 。现有文献报道粮食中 DON 的降解方法普遍存在的不足之处有两个方面:一是降解时间长,二是降解过程中影响粮食自身的营养成分平衡,因此难以在生产中进行推广应用。以 DON 为唯一碳源,向无机盐培养基中添加微量金属元素和维生素,有效提高 DON 降解菌富集效果。本研究从鸡肠道中分离出一株可高效降解粮食中 DON 的细菌,为进一步开发粮食中霉菌毒素的生物降解途径奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

样品:玉米地土壤(简写:YMDT)、小麦地土

壤(简写:XMDT)、猪场土壤(简写:ZCT)、鸡场土壤(简写:JCT)、鸡肠(简写:JC),草鱼肠(CYC)于 $4\ ^\circ\text{C}$ 保存,备用。

无机盐富集培养基^[14]: Na_2HPO_4 1.6 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, NaNO_3 0.5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.025 g,蒸馏水定容至 1 L,于 $115\ ^\circ\text{C}$ 灭菌 20 min;使用前加入 2 mL 无菌微量金属元素溶液和 1 mL 无菌维生素溶液,配方如下:

微量金属元素溶液组成: $\text{FeCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g, $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.190 g, $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, ZnCl_2 0.07 g, H_3BO_3 0.062 g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.036 g, $\text{NiCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.024 g, $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.017 g, $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g,蒸馏水定容至 1 L,用前使用 $0.22\ \mu\text{m}$ 无菌滤膜过滤除菌。

维生素溶液组成:生物素 2 mg,叶酸 2 mg,维生素 B₁ 5 mg,维生素 B₂ 5 mg,维生素 B₆ 10 mg,维生素 B₁₂ 50 mg,烟酸 5 mg,泛酸钙 5 mg,对氨基苯甲酸酯 5 mg,硫代乳酸 5 mg,蒸馏水定容至 1 L,用前使用 $0.22\ \mu\text{m}$ 无菌滤膜过滤除菌。

LB 培养基:酵母提取物 5 g,胰蛋白胨 10 g, NaCl 10 g,琼脂粉 15 g,用 5 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0,去离子水定容至 1 L, $121\ ^\circ\text{C}$ 灭菌 20 min。

DON 标准品:购自青岛普瑞邦生物科技有限公司,纯度 >99.9%。

小麦面粉:江苏新丰面粉有限公司提供。

1.2 试验仪器

DSX-280A 型手提式灭菌器,上海申安医疗器械有限公司;LHS-150SC 恒温恒湿培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;安捷伦 1260 II 高效液相色谱仪(open lab 2.0 工作站),美国安捷伦公司;Techne FPROG05Y Progene PCR 仪,德国 Thermal 公司;Biofuge pico 离心机,德国 Thermo 公司;ESJ182-4 电子天平,天津博达宏力科技发展有限公司;TS-92 型双层恒温摇床,太仓市强乐试验设备厂。

1.3 试验方法

1.3.1 降解 DON 菌株的初筛^[11,15-16]

称取 25 g 混合均匀土壤样品于 225 mL 无菌生理盐水中,振荡混匀。按 10% 接种量将样品接种于 DON 终浓度为 $20\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的无机盐富集培养基中,120 r/min, $30\ ^\circ\text{C}$ 振荡培养 7 d。吸取 $100\ \mu\text{L}$ 培养 7 d 的培养液于 DON 终浓度为 $40\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的新鲜无机盐富集培养基中,同等条件下培养 7 d;再吸取培养 14 d 的培养液于 DON 终浓度为 $60\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的新鲜无机盐富集培养基中,同等条件下再培养 7 d。

取培养 21 d 后的培养液,4 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,沉淀用无菌无机盐富集培养基洗涤、离心 3 次,再用无机富集盐培养基复溶至原有体积。取 100 μ L 复溶菌悬液,接种于 DON 终浓度为 20 μ g/mL 的无机盐富集培养基中,120 r/min,30 $^{\circ}$ C 振荡培养,24 h 后取样,样品液用流动相稀释 20 倍,经直径 13 mm 孔径 0.45 μ m 的有机相针式过滤器过滤后,进入 HPLC 系统测定 DON 含量,考察 DON 降解效果。试验设置阳性对照和阴性对照,阳性对照为接种 100 μ L 无机盐培养基,阴性对照为不含 DON 的同体积无机盐培养基。每个样品 3 个重复,整个实验重复 3 次。

1.3.2 降解 DON 菌株复筛

对初筛试验中降解效果最好的样品培养液进行复筛。取培养液 100 μ L,涂布于 DON 终浓度为 20 μ g/mL 的固体无机盐富集培养基上,静置培养 24 h,挑取单菌落,连续划线接种于 LB 平板上,获得纯种培养物,用无菌生理盐水洗出菌苔,平板活菌计数,制备浓度为 1×10^7 CFU/mL 的菌悬液。按 10% 接种量接种于终浓度为 20 μ g/mL 的无机盐培养基中,120 r/min,30 $^{\circ}$ C 下摇瓶培养,24 h 后取样测定 DON 含量,方法同 1.3.1,选取降解率最高的菌株作为复筛目的菌种。

1.3.3 目的菌株对 DON 的降解效果

选取对 DON 具有显著降解效果的菌种进行降解效果试验,分别取复筛具有降解效果的浓度为 1×10^7 CFU/mL 的菌悬液,按 10% 接种量接种于终浓度为 20 μ g/mL 的无机盐液体培养基中,120 r/min,30 $^{\circ}$ C 下摇瓶培养,分别于 6、12、24、36、48 h 取样测定 DON 含量,计算降解率,比较复筛目的菌种的降解效果,选择对 DON 降解效果最佳的菌种为最终目的菌种。

1.3.4 DON 含量的检测^[15-16]

HPLC 法测定 DON 含量,按下式计算 DON 降解率。色谱柱为安捷伦 ZorbaxSB-C18 柱,规格为 4.6 mm $\times$ 150 mm,5 μ m;色谱条件为:HPLC 检测条件:DAD 检测器,柱温 35 $^{\circ}$ C,进样量 50 μ L,流动相:20% 甲醇;流速:0.8 mL/min;检测波长:218 nm。

$$\text{DON 降解率} = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100\%$$

式中: A_1 为对照组 DON 含量; A_2 为处理组 DON 含量。

DON 标准曲线的绘制:配制 DON 母液,浓度为 1 000 μ g/mL,用流动相梯度稀释至 12.5、6.25、

3、1.5、0.75、0.375 μ g/mL 的工作液,进样量 50 μ L,重复测定 3 次取平均值。以 DON 浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制 DON 标准曲线。

1.3.5 菌株的鉴定

1.3.5.1 形态鉴定:将目的菌株在 LB 平板上分区划线,30 $^{\circ}$ C 培养至长出单菌落,观察其在 LB 培养基表面的菌落形态。

1.3.5.2 16S rRNA 鉴定^[17]:用 Omega 细菌基因组 DNA 抽提试剂盒,提取菌株的总 DNA 用细菌 16S rDNA 扩增引物 27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCT-CAG-3' 和 1492R:5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' 扩增 16S rDNA 片段,按下列组分配制 PCR 检测试剂(40 μ L 反应体系,细菌 16S 通用引物):Master Mix(2 $\times$) 20.0 μ L;上游引物 FP 1.0 μ L,下游引物 RP 1.0 μ L,dd H₂O 13 μ L;向每个 PCR 反应管中加入 35 μ L 上述反应混合液,再加入 5 μ L 分离纯化的 DNA 进行 PCR 检测。阳性对照用大肠杆菌 DNA 作为模板,阴性对照用去离子纯水为模板。PCR 循环条件为:94 $^{\circ}$ C 5 min $\rightarrow$ 30 $\times$ (94 $^{\circ}$ C 45 s $\rightarrow$ 55 $^{\circ}$ C 45 s $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 1 min 30 s) $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 10 min。在 1% 琼脂糖凝胶上将三个待检样品、阳性对照和阴性对照的 16S PCR 扩增产物、100 bp DNA Ladder Marker 各取 5 μ L 加到点样孔,接通电源进行电泳,电泳结束后在紫外灯下观察结果,判断 PCR 扩增是否成功。将上述获得的 PCR 扩增产物及细菌 16S 通用引物(27F)交上海生物工程有限公司进行测序。在 GenBank 库中进行 BLAST 比对,选取同源性较高的菌株采用 MEGA 7.0 软件进行分析,建立进化树。

1.3.6 JC-5 降解面粉中 DON 毒素

向供试面粉中添加无菌水溶解的 DON 标准品,使其终浓度为 20 mg/kg,混合均匀。试验设置无菌水组和 JC-5 培养液组两个处理组,每个处理 3 个重复,分别取 50 g 面粉样品添加 50 mL 的无菌水和含浓度为 10^8 CFU/mL 的 JC-5 培养液,于 30 $^{\circ}$ C 培养箱培养 12 h 后,按 Clifford 等^[18]的方法提取样品中 DON 毒素,测定 DON 毒素的含量。

1.3.7 数据处理

以上数据重复测定 3 次取平均值,采用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析,同时进行方差同质性检验。

2 结果与分析

2.1 DON 标准曲线及其标准品高效液相色谱图

图 1 为 HPLC-DAD 测定不同浓度 DON 标准品

所得的标准曲线,由该曲线得到峰面积与DON浓度之间的关系为: $y=20.116x+0.7005$,线性关系系数 $R^2=0.9999$,说明DON标准品浓度与DAD检测的峰面积呈高度线性关系。图2是DON标准品浓度为 $20\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的色谱图,可见在1.3.4色谱条件下DON标准品的出峰时间为 5.975 min ,因此,本研究检测样品中DON含量时,出峰时间为 6 min 左右的物质可认定为DON。

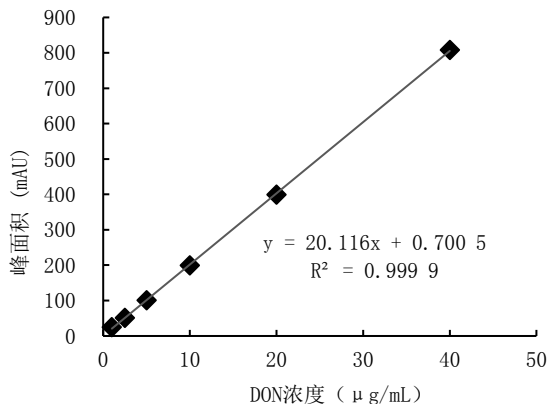


图1 DON标准曲线

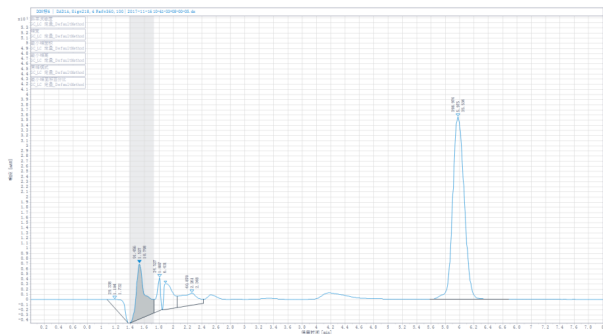
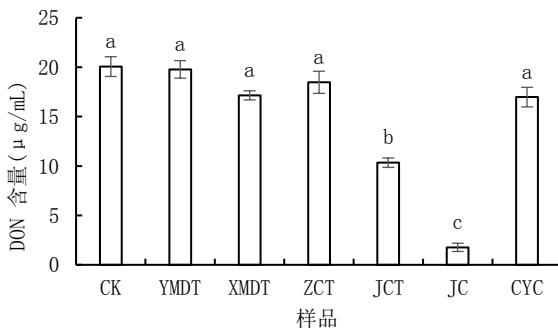


图2 DON标准品高效液相色谱图

2.2 DON降解菌初筛

图3为接种不同样品混合菌液对DON的降解效果。可见,玉米地土壤、小麦地土壤、草鱼肠、猪场土壤样品组的DON含量与对照组无明显减少,而鸡场土壤和鸡肠样品的DON含量显著降低。鸡场土壤样品和鸡肠样品DON含量分别降



注:图中不同字母代表差异显著, $P<0.05$,下同
图3 不同样品混合菌对DON的降解效果

低至 $10.34\text{ }\mu\text{g/mL}$ 和 $1.77\text{ }\mu\text{g/mL}$,降解率分别为48.4%和91.18%。说明鸡肠和鸡场土中含有DON降解菌,为筛选出高效降解DON菌种,以混合菌降解效果最好的鸡肠样品作为复筛对象。

2.3 DON降解菌复筛

从鸡肠道中分离的8株单菌,编号为JC-1~JC-8,考察单一菌种对DON的降解效果,按10%接种量接种到DON终浓度为 $20\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的无机盐培养基中,培养24 h,测定DON的残留量,结果如图4所示,菌株JC-1、JC-2、JC-4、JC-7、JC-8组与对照组相比,DON含量无显著降低,而单菌株JC-3、JC-5、JC-6组DON显著下降,其降解率依次为38.51%、42.89%、91.89%,其中以JC-5组降解率为8株单菌种最高,24 h降解91.89%。由此可见,该菌种具有高效降解DON能力,故选择此菌种作为目的菌种。

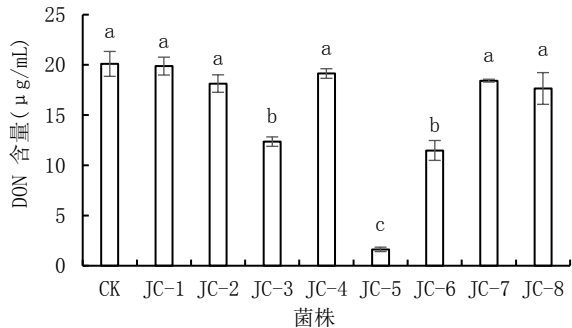


图4 不同单菌株对DON的降解效果

2.4 目的菌株对DON的降解效果

2.4.1 3株菌不同时间对DON的降解效果

从鸡肠中分离出3株单菌落,研究不同时间对DON的降解效果。图5显示,JC-3、JC-5、JC-6 3株菌在培养6 h后,JC-3和JC-6组DON含量未发生显著下降,说明这两株菌在6 h内未能降解DON,而JC-5组DON含量降低至 $14.36\text{ }\mu\text{g/mL}$,已降解28.38%,可见菌种JC-5在培养6 h内已开始利用DON。在培养12 h后,3株菌对DON均显现

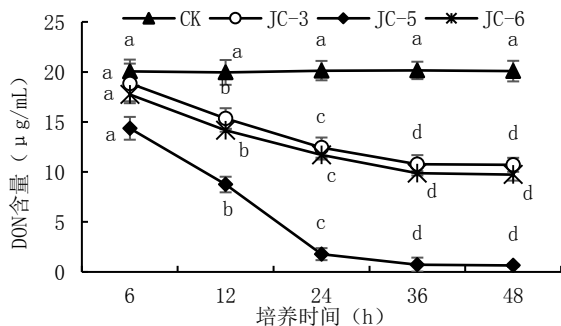


图5 不同培养时间单菌株对DON的降解效果

出降解效果,降解率依次为 23.49%、56.56%、29.38%。24 h 后降解效果更加显著,3 株菌降解效率依次升高为 38.00%、91.12%、41.70%。36 h 后三组 DON 含量无明显降低,说明这 3 株菌 36 h 后基本不再继续降解。由此可见,JC-3、JC-5、JC-6 在 36 h 对 DON 降解率达到最高值,JC-3 和 JC-6 达到 45.64% 和 51.47%,JC-5 组 DON 含量到 48 h 后降低至 0.65 $\mu\text{g/mL}$,降解率高达 96.76%。

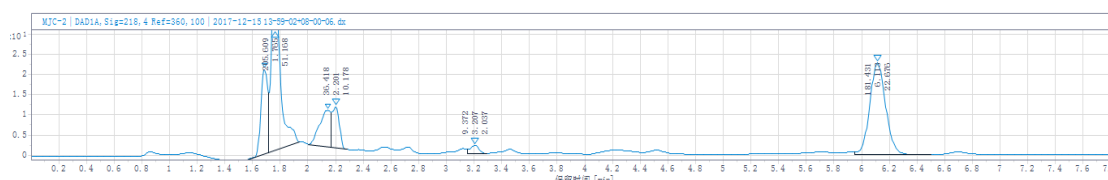


图6 DON降解前色谱图

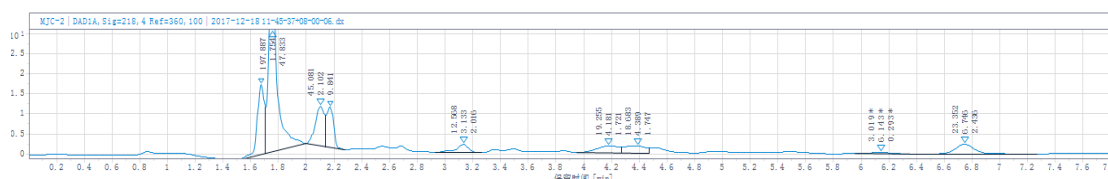


图7 DON降解后色谱图

2.5 目的降解菌的鉴定

2.5.1 DON降解菌形态学特征

图8为DON降解菌株JC-5在LB培养基中进行分离的单菌落形态,特征为:菌落呈乳白色,边缘整齐,圆形,不透明,表面圆润光滑,质地均匀,易挑取。图9为该菌经革兰氏染色在显微镜下的菌体形态,该菌为革兰氏阴性菌,形态呈短杆状,无芽孢。



图8 JC-5菌株在LB平板菌落形态

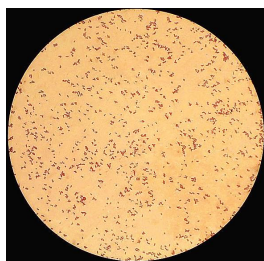


图9 JC-5菌株在光学显微镜下细胞形态(100×10)

2.5.2 分子生物学鉴定

图10显示,采用1.3.5.2方法提取JC-5菌株的

2.4.2 目的菌株对DON降解前后色谱图对比

图6、图7是目的菌株JC-5对DON降解前和培养48 h后的HPLC图。图6显示,在6.113 min出现DON峰,峰面积为181.431 mAU,在6.143 min DON峰已很小,峰面积只有3.019 mAU。在该峰右侧,即6.746 min处出现新峰,峰面积为23.352 mAU,图7显示,培养前在此出峰时间处未出现物质峰,可推断该物质可能是DON降解产物之一。



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

图10 菌株JC-5的16S rDNA片段PCR扩增结果

DNA并进行PCR扩增,通过1%琼脂糖凝胶电泳发现,产物在约1 500 bp处出现一条特征条带,说明DNA提取成功,可将纯化后的PCR产物进行测序,并在GenBank库中进行BLAST比对,建立进化树如图11所示。经比对发现,该菌株与丛毛单胞菌属(*Comamonas*)具有较高的同源性,与*Comamonas jiangduensis*处于同一主分支,因此,该菌株JC-5鉴定为江都丛毛单胞菌。

2.6 JC-5对面粉中DON的降解效果

各处理组样品在30 $^{\circ}\text{C}$ 下进行恒温培养,分别于6、12、24、36 h提取样品中DON并检测其含量,结果如图12所示,在36 h内,对照组样品中DON含量基本不变,说明DON没有被降解;而处理组样品中DON的含量明显减少,在6 h内可降解

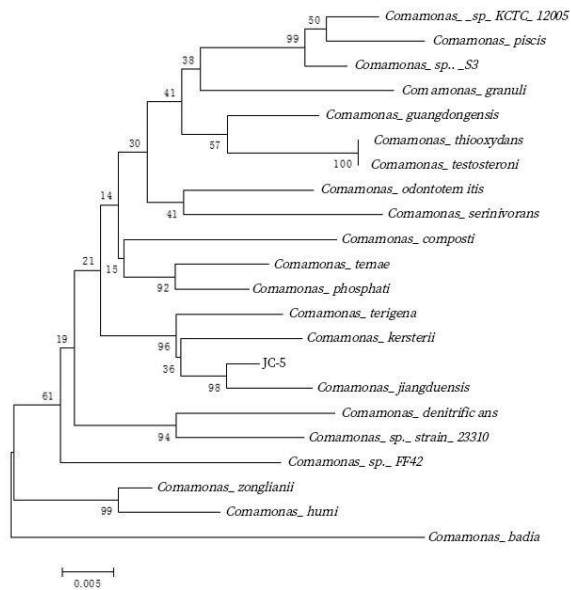


图 11 JC-5 菌株的系统进化树

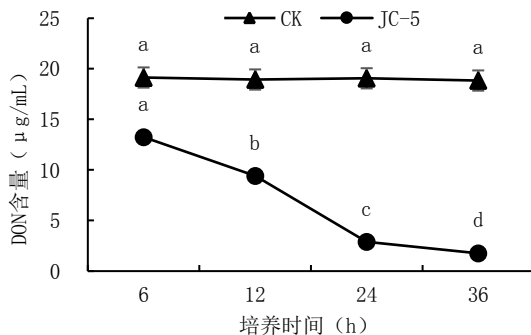


图 12 JC-5 菌对面粉中 DON 的降解

31.00% 的 DON, 在 12 h 内降解率提高到 50.32%, 24 h 和 36 h 后达到 84.84% 和 90.66%, 可以看出, JC-5 菌对面粉中 DON 降解效果显著, 在 12 h 内可降解 50% 以上的 DON, 而 36 h 后可降解 90% 以上。

3 讨论与结论

以 DON 为唯一碳源的无机盐富集培养基, 从鸡肠道分离得到降解 DON 的单菌落, 并进行 DON 降解效果测定, 获得一株降解效果最佳的菌株, 经鉴定为江都丛毛单胞菌。该菌株在 36 h 内可将无机盐富集培养基中 DON 降解 97.76%。本研究采用的无机盐富集培养基与现有文献报道^[9,11-12,19]的无机盐富集培养基相比, 补充了维生素和微量元素, 研究发现, 该培养基更有利于 DON 降解菌的富集。本研究采用现有文献报道^[6,9-10,19]的无机盐培养基尚未能成功富集 DON 降解菌, 这可能与富集培养基营养成分及所筛选微生物的种类不同相关。本研究所采用的无机盐培养基可作为 DON 乃至玉米赤霉烯酮、黄曲霉毒素等其他霉菌

毒素降解菌的富集培养基, 筛选出的菌株江都丛毛单胞菌可高效降解 DON, 其降解率明显高于现有文献报道菌种降解率^[2-4,19-21], 本研究为进一步开发粮食中霉菌毒素的高效降解途径打下基础。

参考文献:

- [1] 汪 洋, 张小溪, 张 晓. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇生物脱毒的研究进展[J]. 中国粮油学报, 2015, 30(7): 128-134.
- [2] Marcin B, Edyta K W, Agnieszka W, et al. Co-occurrence of nivalenol, deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside in beer samples[J]. Food Control, 2018, 92: 319-324.
- [3] Xenian A P, Sonia G S, Sonia M, et al. Fate of zearalenone, deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside during malting process[J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 99: 540-546.
- [4] Wang Gang, Wang Yanxia, Ji Fang, et al. Biodegradation of deoxynivalenol and its derivatives by *Devosia insulae* A16[J]. Food Chemistry, 2019, 276: 436-442.
- [5] Petr K. Biological detoxification of the mycotoxin deoxynivalenol and its use in genetically engineered crops and feed additives[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2011, 91: 491-504.
- [6] 李晓凤, 刘思利, 谭景耀, 等. 生物降解呕吐毒素的肠杆菌筛选与鉴定[J]. 现代食品科技, 2017, 33(6): 125-132.
- [7] 李 刚, 杨粉团, 曹庆军, 等. 玉米等主要作物真菌毒素、限量标准与调控技术[J]. 东北农业科学, 2017, 42(6): 49-52.
- [8] Bretz M, Beyer M, Cramer B, et al. Thermal degradation of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(17): 6445-6451.
- [9] Morgavi D P, Boudra H, Jouany J P, et al. Prevention of patulin toxicity on rumen microbial fermentation by SH-containing reducing agents[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(23): 6906-6910.
- [10] 丁 轲, 余祖华, 刘赛宝, 等. 一株降解呕吐毒素蜡芽孢杆菌的筛选与鉴定[J]. 食品科学, 2016, 37(5): 18-21.
- [11] 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.
- [12] D Pan, A Mionetto, S Tiscornia, et al. Endophytic bacteria from wheat grain as biocontrol agents of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol production in wheat[J]. Mycotoxin Res, 2015, 31: 137-143.
- [13] Michihiro Ito, Kuo Sato, Motoo Koitabashi, et al. A novel actinomycete derived from wheat heads degrades deoxynivalenol in the grain of wheat and barley affected by *Fusarium* head blight [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 96: 1059-1070.
- [14] Yoko Ikunaga, Ikuo Sato, Stephanie Grond, et al. *Nocardioide* sp. strain WSN05-2, isolated from a wheat field, degrades deoxynivalenol, producing the novel intermediate 3-epi-deoxynivalenol[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2011, 89: 419-427.
- [15] 程 亮, 伍松陵, 沈 晗, 等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇降解菌的筛选与鉴定[J]. 粮油食品科技, 2013(5): 95-97.
- [16] 吴 娱, 王开萍, 唐正江, 等. 米曲霉 *Aspergillus oryzae* As-W. 6 对脱氧雪腐镰刀菌烯醇的降解效果[J]. 食品科学, 2016, 37(17): 185-189.

(下转第 95 页)

率的结论一致。 GA_3 对果实花色苷含量影响效果不显著,低浓度的CPPU对花色苷具有促进作用,王世平等^[20]研究发现用不同浓度的 GA_3 与CPPU混合处理后作用‘藤稔’葡萄后花色苷含量显著高于对照,可能由于CPPU作用果实,也可能是二者结合后对果实花色苷含量产生促进效果,与本试验结论相似。

3.3 GA₃与CPPU对蓝莓果实种子数量的影响

无核培养在浆果的研究中已经越来越成为一种趋势,本研究发现,单独使用 GA_3 作用效果大于CPPU的作用效果,并且浓度越高,作用效果越明显, A_4 处理种子数量较CK降低了42.0%。史文婷^[16]在‘阳光玫瑰’葡萄中得出 GA_3 对葡萄无核的作用优于CPPU的作用效果,与本试验结论一致。

4 结 论

综上,在初花期和盛花期后 15 d 将长势较好的结果枝单独浸蘸处理 GA_3 与 CPPU, GA_3 可以促进花期提前,提高坐果率,增加果实糖含量,促进果实无核化。CPPU 可显著增加果实可滴定酸、维生素 C 和花色苷含量。最适宜蓝莓生长的外源 GA_3 浓度为 75 mg/L, CPPU 浓度为 10 mg/L,在此浓度下蓝莓生长结果综合质量最佳。

参考文献:

- [1] Kader F, Rövel B, Giardin M, et al. Fractionation and identification of the phenolic compounds of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) [J]. Food Chemistry, 1996, 55(1): 35-40.
- [2] 吴 林. 中国蓝莓 35 年: 科学研究与产业发展 [J]. 吉林农业大学学报, 2016, 38(1): 1-11.
- [3] 吴 林. 我国蓝莓栽培生理研究进展 [J]. 吉林农业大学学报, 2013, 35(4): 379-383.
- [4] 李丽敏, 吴 林. 中国蓝莓产业发展研究 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2011: 28-30.
- [5] 王雪松, 马文汉, 徐德冰, 等. 云南丽江 6 个蓝莓品种物候

期和果实品质研究[J]. 东北农业科学, 2016, 41(6): 100-103.

- [6] 惠生华,丁明海,秦兰香,等.4个北高丛蓝莓品种在山东日照的表现[J].中国果树,2011(6):62-64.
- [7] 陈曦,赵晨辉,卢明艳,等.吉林省浆果资源及加工利用[J].吉林农业科学,2014,39(4):71-74.
- [8] 王贵元.不同浓度6-BA和GA₃处理对豆梨实生苗生长的影响[J].吉林农业科学,2015,40(4):87-89.
- [9] 高金山,边庆华,张永忠,等.细胞分裂素CPPU的研究进展[J].农药,2006(3):151-154.
- [10] 安迪.赤霉素对兔眼蓝莓生长发育的影响研究[D].杭州:浙江农林大学,2018.
- [11] 张治安,陈展宇.植物生理学实验技术[M].长春:吉林大学出版社,2008:47-65.
- [12] 杨磊,贾佳,祖元刚.蓝莓总花色苷匀浆的提取条件优化及抗氧化活性[J].食品科学,2009,30(20):27-33.
- [13] 唐丁,温腾建,卢龙,等.赤霉素处理对峰后葡萄开花期的影响及其分子机理[J].中国农业大学学报,2015(6):92-98.
- [14] Kalt W, Joseph J A, Shukitt-Hale B. Blueberries and human health: a review of current research[J]. Am. Pomol. Soc, 2007, 61:151-160.
- [15] Williams L E, Ayars J E. Water use of Thompson seedless grapevines as affected by the application of gibberellic acid(GA₃) and trunk girdling practices to increase berry size[J]. Agric. For. Meteorol, 2005,129:85-94.
- [16] 史文婷. GA₃和CPPU对‘阳光玫瑰’葡萄果实无核化及品质的影响[D].银川:宁夏大学,2017.
- [17] 张贇珍,刘焕.赤霉素对‘摩尔多瓦’葡萄花序长短及果粒大小的影响[J].中国园艺文摘,2015,31(11):61-64.
- [18] 陶建敏,庄智敏,章镇. GA₃对诱导巨峰葡萄产生无核及果实发育的影响[J].中外葡萄与葡萄酒,2005(2):15-18.
- [19] 陈少珍,蒋慧萍,吴代东,等.植物生长调节剂对野生毛葡萄保花保果及其果实品质的影响[J].西南农业学报,2016,29(6):1420-1424.
- [20] 王世平,董秋洪,杨天仪.生长调节剂对藤稔果粒膨大及其品质的影响[J].上海交通大学学报(农业科学版),2004,22(1):37-42.

(责任编辑:刘洪霞)

(上接第 52 页)

- [17] 许超,曲勤凤,顾文佳,等.新型可降解高效氯氰菊酯微生物菌株的筛选、鉴定及条件优化[J].东北农业科学,2016,41(2):70-73.
- [18] Clifford L J, Jia Q, Pestka J J. An improved method for the purification of the trichothecene deoxynivalenol (vomitoxin) from *Fusarium graminearum* culture[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(2): 521-523.
- [19] 李亚菲,余祖华,刘赛宝,等.一株降解呕吐毒素的青霉菌

的分离与鉴定[J]. 饲料工业, 2015, 36(15): 42-45.

- [20] Arrua A, Andrea A, Moura M A, et al. Deoxynivalenol screening in wheat derived products in Gran Asunción, Paraguay[J]. Journal of Food Safety, 2019, 39(1): 3857–3863.
- [21] 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 and Contaminants, 2002, 19(4): 379–386.

(责任编辑:王 昱)