

李荣杰, 齐博康, 原现军. 兼具抑菌脱毒特性的功能乳酸菌的筛选及特性分析[J]. 山西农业科学, 2025, 53(6): 79-86.

LI R J, QI B K, YUAN X J. Screening and characterization analysis of lactic acid bacteria with both antibacterial and detoxification properties[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2025, 53(6): 79-86.

doi:10.26942/j.cnki.issn.1002-2481.2025.06.10

兼具抑菌脱毒特性的功能乳酸菌的筛选及特性分析

李荣杰¹, 齐博康², 原现军²

(1. 常州市动物疫病预防控制中心, 江苏 常州 213000; 2. 南京农业大学 草业学院, 江苏 南京 210095)

摘要:青贮饲料霉菌毒素污染时有发生, 而乳酸菌作为一类广泛存在于自然环境中的益生菌, 不仅在青贮发酵过程中起主导作用, 而且能产生多种抑菌物质(如有机酸、细菌素、蛋白类化合物等)以及通过吸附或生物降解等方式降低霉菌毒素含量。为了挖掘兼具抑菌和脱毒活性的功能乳酸菌, 以产毒黄曲霉菌和禾谷镰孢菌为指示菌, 以玉米赤霉烯酮(Zearalenone, ZEN)和脱氧雪腐镰孢菌烯醇(Deoxynivalenol, DON)为底物, 优选获得了4株兼具高效抑菌脱毒特性的功能乳酸菌, 经鉴定分别为植物乳植杆菌LP10、LP64、LP71和发酵黏液乳杆菌LF92; 并对乳酸菌在不同pH、温度、酶处理下的抑菌活性及对ZEN和DON的脱毒效果进行了检测。结果表明, 随pH值升高, 4株乳酸菌的发酵上清液对黄曲霉菌和禾谷镰孢菌抑菌活性均降低; 经80、100℃处理后, 各菌株上清液对黄曲霉菌的抑制效果降低, 而LP71、LF92上清液经高温处理后对禾谷镰孢菌的抑制效果增强。蛋白酶处理结果表现出菌株特异性, 仅LP71上清液经各蛋白酶处理后对禾谷镰孢菌的抑制效果与对照无差异。脱毒处理结果表明, LP64对ZEN和DON的脱毒率最高, 分别为46.9%、82.9%, 且脱毒机制主要为吸附作用, 可作为青贮饲料生物防控的候选菌株。

关键词:乳酸菌; 玉米赤霉烯酮; 脱氧雪腐镰孢菌烯醇; 抑菌; 脱毒

中图分类号: S852.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2481(2025)06-0079-08

Screening and Characterization Analysis of Lactic Acid Bacteria with Both Antibacterial and Detoxification Properties

LI Rongjie¹, QI Bokang², YUAN Xianjun²

(1. The Animal Disease Prevention and Control Center of Changzhou, Changzhou 213000, China;

2. College of Agro-Grassland Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Mycotoxin contamination in silage becomes a common occurrence. Lactic acid bacteria, which is a type of probiotic widely presenting in the natural environment, not only play dominant roles in silage fermentation but also produce diverse antimicrobial substances(e.g., organic acids, bacteriocins, and proteinaceous compounds) and reduce mycotoxin levels via adsorption or biodegradation. To isolate functional lactic acid bacteria with both antibacterial and detoxifying activities, in this study, four functional lactic acid bacteria with efficient antimicrobial and detoxification activities were selected using *Aspergillus flavus* and *Fusarium graminearum* as indicator fungi and zearalenone(ZEN) and deoxynivalenol(DON) as substrates. These strains were identified as *Lactiplantibacillus plantarum* LP10, *L. plantarum* LP64, *L. plantarum* LP71, and *Limosilactobacillus fermentum* LF92, respectively. The antibacterial activity of the lactic acid bacteria was evaluated under different pH levels, temperatures, and enzyme treatments, and their detoxification effects on ZEN and DON were analyzed. The results indicated that with an increase in pH, the antifungal activity of fermentation supernatants from the four lactic acid bacteria(LAB) strains against *A. flavus* and *F. graminearum* gradually decreased. After heat treatment at 80℃ and 100℃, the inhibitory effect of the respective fermentation supernatants of each LAB strain on *A. flavus* was significantly reduced, whereas the inhibitory effects of the supernatants of strains LP71 and LF92 against *F. graminearum* were enhanced following high-

收稿日期: 2025-07-24

基金项目: 常州市农业科技创新与示范推广项目(KCSF(2023)03)

作者简介: 李荣杰, 高级畜牧兽医师, 主要从事动物疫病预防控制研究, E-mail: 119420436@qq.com

通信作者: 原现军, 教授, 主要从事饲草调制加工与贮藏、饲草霉菌毒素污染防控研究, E-mail: yuanxianjun@njau.edu.cn

temperature treatment. The strains exhibited specificity in response to different protease treatments: only the inhibitory effect of LP71 supernatant against *F. graminearum* showed no significant difference from that of the control after treatment with various proteases. Furthermore, the detoxification results indicated that LP64 exhibited the highest removal rates for ZEN and DON, at 46.9% and 82.9%, respectively. The primary mechanism of detoxification was identified as adsorption. Consequently, LP64 could be used as a candidate strain for the biological control of fungi and mycotoxin detoxification in silage.

Keywords: lactic acid bacteria; zearalenone; deoxynivalenol; antibacterial; detoxification

霉菌及其产生的毒素污染是威胁饲料安全与动物生产的重要因素,其中,黄曲霉(*A. flavus*)和禾谷镰孢菌(*F. graminearum*)作为全世界范围内常见的植源性丝状真菌,不仅可侵染玉米、小麦等农作物导致产量下降,还能产生黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮(Zearalenone, ZEN)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇(Deoxynivalenol, DON)等多种霉菌毒素。这些毒素具有较强的致癌性和致畸性,可通过污染青贮饲料进入动物生产链,导致畜禽生长性能降低、繁殖障碍,甚至死亡,同时也可通过食物链危及人类健康,进而对农业经济和公共卫生安全构成严重威胁。近年来, DON 和 ZEN 在世界范围内的污染尤为严重。WHITLOW 等^[1]研究发现,在美国检测的 461 个玉米青贮样品中, ZEN 的平均浓度为 525 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 检出率为 30%。对荷兰 2002—2004 年生产的 140 份玉米青贮饲料进行检测,发现 ZEN 的检出率为 49%, 平均浓度为 174 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[2]。KEESE 等^[3]研究发现, DON 会导致泌乳奶牛乳脂率降低。DÄNICKE 等^[4]向奶牛饲喂受 DON 和 ZEN 污染的小麦,结果表明,瘤胃氨浓度显著增加,十二指肠微生物蛋白流量减少。鉴于霉菌毒素污染广泛且危害严重,急需探索有效的控制方法以降低其对青贮饲料及动物健康的不利影响。

生物脱毒方法包括利用微生物细胞壁吸附霉菌毒素和利用微生物代谢产物或分泌酶降解霉菌毒素 2 种。虽然微生物降解霉菌毒素的技术尚处于起步阶段,但与物理、化学降解技术相比,微生物降解反应条件温和,不会导致二次污染和营养损害,并具有快速高效、低毒、强特异性等特点。CHLEBICZ 等^[5]研究了 6 株酿酒酵母对不同毒素的体外脱毒效果,结果表明,其对伏马毒素 B1、B2 混合物脱除效果最显著,脱毒率可达 67%~74%。CHO 等^[6]从被污染谷物中分离出 1 株可以降解 ZEN 的枯草芽孢杆菌亚种,发现该菌株在液体培养基中与 ZEN 共培养 24 h 后, ZEN 降解率可达 99%;该菌株在固体培养基中与 ZEN 共培养 48 h 后, ZEN 降解率可达 95%。HARKAI 等^[7]通过 SOS 显

色试验及基于酵母的生物发光检测法从 124 株链霉菌(*Streptomyces*)中筛选出 2 株可有效消除 ZEN 雌激素效应的链霉菌,这 2 株菌对 ZEN 的降解率可达 100%。但对青贮饲料而言,芽孢杆菌、霉菌、酵母菌等均是青贮发酵的不良微生物,不宜用于青贮饲料的霉菌毒素脱毒,而乳酸菌作为青贮发酵的主导菌群可以成为青贮饲料霉菌毒素生物脱毒的首选菌。

乳酸菌能通过产酸降低环境 pH 值,进而抑制腐败菌繁殖,同时,部分菌株还可分泌细菌素等抑菌物质,抑制霉菌繁殖。近年来研究发现,植物乳植杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)^[8]、罗伊士乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*)^[9]等乳酸菌菌株在体外试验中表现出对霉菌具有较强拮抗活性及降解霉菌毒素的能力,其作用机制可能与代谢产物的抑菌效应、菌体表面吸附、酶促降解毒素等有关。因此,筛选具有抑菌脱毒功能的微生物制剂,并通过生物干预手段改善青贮发酵品质、控制霉菌毒素污染,已成为当前青贮饲料研究的热点方向。然而,不同菌株的抑菌谱和脱毒效率存在显著差异,且实验室条件下的抑菌脱毒特性与实际青贮环境中的应用效果往往存在差距,需结合具体菌株和应用场景开展系统研究。

基于前期研究发现,植物乳植杆菌 LP10、LP64、LP71 及发酵黏液乳杆菌 LF92 具有潜在的抑菌脱毒活性^[10],本研究拟通过体外试验明确上述菌株对 *A. flavus* 和 *F. graminearum* 的抑菌效果及稳定性(耐酸、耐热、耐酶特性),并探究其对 ZEN 和 DON 的降解能力,旨在为筛选可用于青贮的高效生物制剂和构建安全可控的青贮发酵体系提供理论依据和实践参考。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验菌株 指示菌株 *A. flavus* NRRL3357 和 *F. graminearum* PH-1 均购自中国工业微生物菌种保藏管理中心。植物乳植杆菌 LP10(*L. plan-*

tarum LP10)、LP64(*L. plantarum* LP64)、LP71(*L. plantarum* LP71)和发酵黏液乳杆菌 LF92(*Limosilactobacillus fermentum* LF92)筛选自全国不同地区发生霉变或遭受霉菌毒素污染的青贮玉米中,这些菌株加入到含20%(V/V)甘油的MRS(de Man, rogosa and sharp)肉汤中,并置于-80℃冷冻保存。

1.1.2 培养基及试剂 MRS培养基和马铃薯葡萄糖琼脂培养基(Potato dextrose agar, PDA)均购自上海盛思生化科技有限公司;胰蛋白酶、胃蛋白酶均购自北京索莱宝试剂有限公司;蛋白酶K购自伊势久生物有限公司;过氧化氢酶购自天津市化学试剂有限公司。AgraQuant®霉菌毒素酶联免疫检测试剂盒购自荷兰Koninklijke DSM公司。

磷酸缓冲液(Phosphatic buffer solution, PBS)配方为NaCl 8.0 g, KH₂PO₄ 0.2 g, Na₂HPO₄·12H₂O 2.9 g, KCl 0.2 g。

1.2 试验菌株抑菌特性测定

1.2.1 霉菌孢子悬浮液制备 将*A. flavus*和*F. graminearum*接种于PDA琼脂培养基,恒温30℃孵育7 d后,在培养基表面加入1 mL无菌水,并用无菌毛刷将菌丝刮下,紫外线照射2 min,置于30℃恒温培养箱中继续培养12 h,可形成分生孢子。利用孢子洗脱液(0.1% Tween-80(V/V))洗脱孢子,并制备成浓度为 1.0×10^6 cfu/mL的霉菌孢子悬液。

1.2.2 菌株发酵上清液制备 从-80℃超低温冰箱取出试验菌株,按2%(V/V)比例接种于MRS肉汤培养基,置于37℃恒温箱厌氧培养24 h,再将菌液在4℃条件下,8 000 r/min离心10 min,获取发酵上清液。

1.2.3 双层牛津杯抑菌试验 将121℃高压灭菌后的2%(m/V)琼脂倒于培养皿,待培养基冷却凝固后将灭菌后的牛津杯置于其表面;取霉菌孢子悬液,与灭菌后冷却至40~50℃的PDA琼脂培养基混合均匀,倒入琼脂培养基表面,待培养基凝固后取出牛津杯;将200 μL的菌株发酵上清液加入牛津杯孔内,37℃恒温培养,每隔6 h观察结果一次,共观察8次,并采用十字交叉法测量抑菌圈大小。

1.2.4 酸处理试验 使用2 mol/L的NaOH和HCl,将菌株发酵上清液pH值分别调至3.0、5.0、7.0,进一步采用双层牛津杯法比较不同pH值处理

的发酵上清液对*A. flavus*和*F. graminearum*的抑菌效果,以未调pH值的菌株发酵上清液为对照。

1.2.5 热处理试验 将菌株发酵上清液分别在60、80、100℃下处理2 h,待冷却至室温后采用双层牛津杯法比较不同温度处理的发酵上清液对*A. flavus*和*F. graminearum*的抑菌效果,以未进行热处理的菌株发酵上清液为对照。

1.2.6 蛋白酶及过氧化氢酶处理 分别将菌株上清液的pH值调至胰蛋白酶(250 U/mg)、胃蛋白酶(250 U/mg)、蛋白酶K(40 U/mg)和过氧化氢酶(40 U/mg)的最适pH值,然后添加相应蛋白酶或过氧化氢酶,37℃温育2 h;再置于100℃沸水中5 min对各种酶进行失活处理。随后将各菌株上清液的pH值调整至原始值,采用双层牛津杯法比较不同酶处理的发酵上清液对*A. flavus*和*F. graminearum*的抑菌效果,以未添加蛋白酶和过氧化氢酶的菌株上清液为对照。

1.3 试验菌株脱毒特性测定

1.3.1 菌株发酵液、上清液和菌体沉淀的制备 菌株发酵液的制备:从-80℃超低温冰箱取出乳酸菌菌株,以2%(V/V)比例接种于MRS肉汤培养基中,在37℃恒温培养箱厌氧培养48 h。发酵上清液和菌体沉淀的制备:取5 g的菌株发酵液在4℃,8 000 r/min离心15 min,上清部分即为发酵上清液;菌体沉淀用磷酸缓冲液(pH=7.4)洗涤2次,4℃,8 000 r/min离心15 min,用相同体积的磷酸缓冲液溶解即为菌体沉淀。

1.3.2 菌株脱毒试验 取900 μL菌株发酵液、发酵上清液、菌体沉淀,分别与ZEN(0.4 μg/mL)和DON(2 μg/mL)混合均匀后置于无菌离心管内,以相同体积的MRS肉汤培养基为空白对照。将ZEN反应体系置于37℃恒温培养箱中培养72 h,将DON反应体系置于30℃培养箱中培养96 h,反应结束后用AgraQuant®霉菌毒素酶联免疫检测试剂盒测定溶液中霉菌毒素含量,计算霉菌毒素降解率。

1.4 统计分析

采用SAS 9.10的一般线性模型(General linear model, GLM),根据完全随机设计分析乳酸菌的2种霉菌的抑菌活性(Y_{ijk})。

$$Y_{ijk} = \mu + I_i + T_j + (I \times T)_{ij} + e_{ijk} \quad (1)$$

式中, Y_{ijk} 为因变量, μ 为所有处理抑菌圈直径的平均值, I_i 为乳酸菌的固定效应($i=5$), T_j 为

处理的固定效应($j=3$ 或 4), $(I \times T)_{ij}$ 为乳酸菌和不同处理的交互作用, e_{ijk} 为残差。

采用 Tukey's 法对各处理间均值进行多重比较, 当 $P < 0.05$ 时, 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌对黄曲霉菌和禾谷镰孢菌的抑菌特性分析

2.1.1 不同 pH 处理对乳酸菌抑菌活性的影响 不同 pH 处理对乳酸菌抑制禾谷镰孢菌和黄曲霉菌活性的影响如表 1 所示。

表 1 不同 pH 处理对乳酸菌抑制禾谷镰孢菌和黄曲霉菌活性的影响

Tab.1 Effect of treatments of pH on the antifungal activity of LAB strains against *F. graminearum* and

A. flavus mm

霉菌 Fungi	处理 Treatment	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter			
		LP10	LP64	LP71	LF92
禾谷镰孢菌 <i>F. graminearum</i>	对照	14.9Bc	19.6Aa	18.2Bb	15.4Bc
	pH=3.0	16.6Ab	21.3Aa	21.2Aa	22.6Aa
	pH=5.0	14.6Ba	9.15Bc	11.5Cb	11.8Cb
	pH=7.0	3.57Cc	3.60Cbc	4.73Da	4.17Dab
黄曲霉菌 <i>A. flavus</i>	对照	8.27Bc	15.3Aa	14.6Aab	13.5Bb
	pH=3.0	9.73Ad	16.3Ab	13.2Ac	18.6Aa
	pH=5.0	7.13Cb	7.33Bb	4.93Bc	10.4Ca
	pH=7.0	4.53D	6.27B	4.83B	5.82D

注: 同列数据后不同大写字母表示同一菌株不同处理间差异显著 ($P < 0.05$); 同行数据后不同小写字母表示同一处理不同菌株间差异显著 ($P < 0.05$)。下表同。

Note: Different capital letters in the same column of data indicated the significant difference among the different treatments of the same strain ($P < 0.05$); Different lowercase letters in the same column of data indicated the significant differences among the different strains in the same treatment ($P < 0.05$). The same as below.

从表 1 可以看出, 不同 pH 处理下, 不同乳酸菌在对黄曲霉菌的抑制作用存在交互效应。在对照组中, 菌株 LP64 对 *F. graminearum* 和 *A. flavus* 的抑菌圈直径均高于其他菌株, 显示出最高的抑菌活性。但在 pH 值为 3.0 时, 菌株 LF92 对 *A. flavus* 抑制效果最好, 显著高于菌株 LP64 ($P < 0.05$), 对 *F. graminearum* 抑制效果也高于菌株 LP64。在 pH 值为 5.0 时, 菌株 LF92 对 *A. flavus* 抑菌圈直径也显著大于其他菌株 ($P < 0.05$); 菌株 LP10 对 *F.*

graminearum 抑制效果也显著高于其他菌株 ($P < 0.05$)。上清液 pH 值调整为 7.0 时, 各菌株对 *A. flavus* 抑菌圈直径间无显著差异, 菌株 LP71 对 *F. graminearum* 的抑菌效果最佳。

与对照组相比, 菌株 LP10、LF92 在 pH 值为 3.0 时, 对 *F. graminearum* 和 *A. flavus* 的抑菌圈直径都有显著增加 ($P < 0.05$), 且为所有 pH 处理组中抑菌效果最好的。但当上清液 pH 值调整到 5.0 和 7.0 时, 4 株乳酸菌对 *F. graminearum* 和 *A. flavus* 的抑菌圈直径逐渐缩小。

2.1.2 不同温度处理对乳酸菌抑菌活性的影响 由表 2 可知, 不同温度处理下, 不同乳酸菌对 *F. graminearum* 抑菌活性存在差异。在 60、80、100 °C 温度条件下, 菌株 LP64、LP71 对 *F. graminearum* 抑菌直径均显著大于 LP10 和 LF92 ($P < 0.05$)。与对照组相比, 随着处理温度的上升, 各菌株对 *A. flavus* 抑菌效果呈现逐渐降低的趋势。在 80 °C 处理后, 菌株 LF92 对 *A. flavus* 形成的抑菌圈直径显著大于菌株 LP10、LP64、LP71 所形成的抑菌圈直径 ($P < 0.05$)。而在 60、100 °C 处理后, 菌株 LP64、LP71、LF92 的抑菌效果均显著高于 LP10 ($P < 0.05$)。

表 2 不同温度处理对乳酸菌抑制禾谷镰孢菌和黄曲霉菌活性的影响

Tab.2 Effect of treatments of temperature on the antifungal activity of LAB strains against

F. graminearum and *A. flavus* mm

霉菌 Fungi	处理 Treatment	抑菌圈直径/mm Inhibition zone diameter			
		LP10	LP64	LP71	LF92
禾谷镰孢菌 <i>F. graminearum</i>	对照	14.9c	19.6Ba	18.2Bb	15.4Bc
	60 °C	16.1c	21.4Ab	22.3Aa	17.0Ac
	80 °C	15.8b	20.9ABa	21.5Aa	16.9Ab
	100 °C	16.0c	20.5ABb	22.1Aa	16.7Ac
黄曲霉菌 <i>A. flavus</i>	对照	8.27Ac	15.3Aa	14.6Aab	13.5Ab
	60 °C	5.50Bb	13.1Aa	13.5Aa	12.5Aa
	80 °C	4.30Bd	7.89Bc	9.74Bb	12.6Aa
	100 °C	4.30Bb	8.27Ba	9.62Ba	9.00Ba

2.1.3 不同酶处理对乳酸菌抑菌活性的影响 由表 3 可知, 不同酶处理下, 不同乳酸菌对 *F. graminearum* 和 *A. flavus* 的抑制活性存在差异。在对 *F. graminearum* 的抑制效果上, LP64 和 LF92 在被胰蛋白酶、胃蛋白酶、蛋白酶 K 和过氧化氢酶处理后抑菌活性均显著降低 ($P < 0.05$); 菌株 LP10 被

胰蛋白酶处理后,抑菌活性显著降低($P<0.05$);各种酶处理后,菌株 LP71 对 *F. graminearum* 抑菌效果没有差异。在对 *A. flavus* 抑制效果上,胃蛋白酶和蛋白酶 K 处理后,LP10 和 LP64 的抑菌活性

显著降低($P<0.05$),而 LP71 和 LF92 抑菌活性没有变化。胰蛋白酶处理后,LP71 和 LF92 的抑菌活性也显著降低($P<0.05$),表明 4 株乳酸菌上清液中均存在蛋白酶类抑菌活性物质。

表 3 不同酶处理对乳酸菌抑制禾谷镰孢菌和黄曲霉菌活性的影响

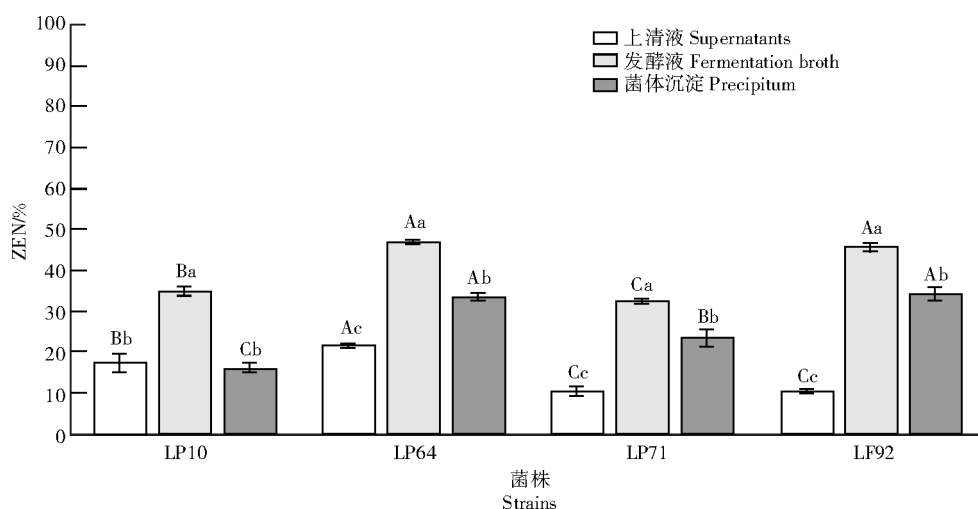
Tab.3 Effect of treatments of enzymes on the antifungal activity of LAB strains against *F. graminearum* and *A. flavus*

霉菌 Fungi	处理 Treatment	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter mm			
		LP10	LP64	LP71	LF92
禾谷镰孢菌 <i>F. graminearum</i>	对照 Control	14.7Bd	19.6Aa	18.2b	18.4Ac
	胰蛋白酶 Trypsase	4.6Cd	18.5Ca	17.2b	15.6Bc
	胃蛋白酶 Pepsase	14.0Bc	19.2Ba	19.2a	15.3Bb
	蛋白酶 K Proteinase K	14.4Bc	16.3Db	17.4a	14.4Cc
	过氧化氢酶 Catalase	15.2Ab	17.9Cab	18.2a	17.1Bb
黄曲霉菌 <i>A. flavus</i>	对照 Control	8.3Ac	15.3Aa	14.6Aab	13.5ABb
	胰蛋白酶 Trypsase	8.2Ac	13.3Bba	13.9Ba	11.9Bb
	胃蛋白酶 Pepsase	4.3Cc	12.6Cb	14.5Aa	13.9ABab
	蛋白酶 K Proteinase K	7.6Bc	13.1Bb	14.8Aa	14.1Aab
	过氧化氢酶 Catalase	8.3Ac	15.2Aa	13.4Bb	13.7ABb

2.2 乳酸菌对 ZEN 和 DON 的脱毒特性分析

2.2.1 乳酸菌不同组分对 ZEN 的脱毒效果 从图 1 可以看出,4 株乳酸菌的上清液、发酵液和菌体沉淀对 ZEN 脱毒率存在差异。对比 4 株乳酸菌的发酵液组分对 ZEN 的脱毒率,LP64 和 LF92 发酵

液对 ZEN 的脱毒效果较好,分别为 46.9% 和 45.6%。菌株 LP64、LP71、LF92 的上清液对 ZEN 的脱毒率均显著低于其菌体沉淀($P<0.05$),而 LP10 的上清液和菌体沉淀对 ZEN 的脱毒效果相似。



同一组分不同大写字母表示不同菌种间差异显著($P<0.05$);同一菌种不同小写字母表示不同组分间差异显著($P<0.05$)。下图同

Different capital letters of the same component indicated significant differences among different strains($P<0.05$); Different lowercase letters of the same strain indicated significant differences among different components of the same strain($P<0.05$). The same as the figure below

图 1 乳酸菌不同组分对 ZEN 的脱毒效果

Fig.1 The detoxification effect of the different components of 4 LAB strains on ZEN

2.2.2 乳酸菌不同组分对 DON 的脱毒效果分析 由图 2 可知,4 株乳酸菌的不同组分对 DON 脱毒效果存在差异。对比 4 株乳酸菌的发酵液组分对 DON 的脱毒率发现,LP64 发酵液的脱毒效果

最好,为 82.9%;菌株 LP64、LF92 的菌体沉淀对 DON 的脱毒率均显著高于上清液($P<0.05$),菌株 LP10、LP71 的上清液脱毒率均显著高于菌体沉淀($P<0.05$)。

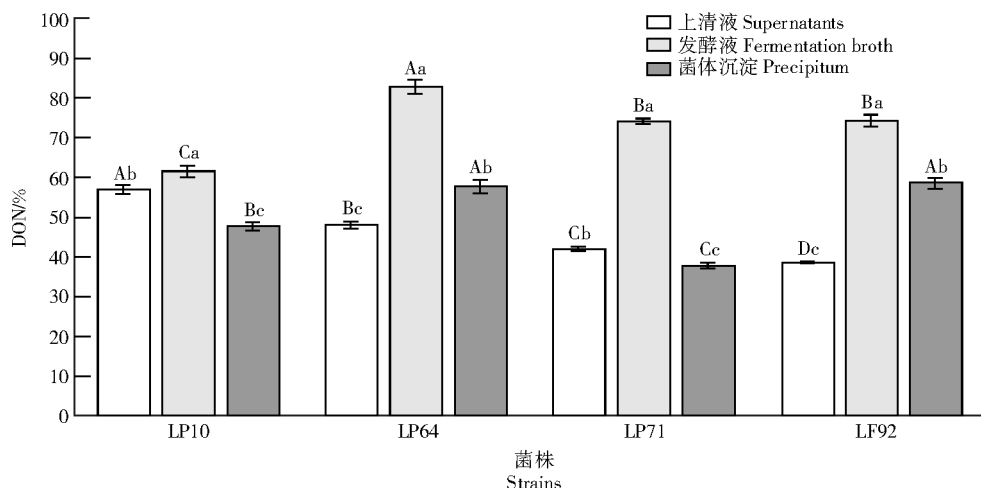


图 2 乳酸菌不同组分对 DON 的脱毒效果

Fig.2 The detoxification effect of the different components of 4 LAB strains on DON

3 结论与讨论

霉菌侵染会引起青贮饲料营养损失、霉菌毒素污染等一系列问题,对动物和人类健康造成严重的威胁。乳酸菌作为天然生物抗菌防腐剂,可产生多种代谢产物包括有机酸、苯基乳酸、蛋白质、环肽、细菌素等,可以抑制霉菌的生长^[11]。乳酸菌对抗病原微生物侵染的机制主要有降低环境酸碱度、代谢相关抗菌化合物(如细菌素)、竞争营养成分、产生有机酸、刺激免疫调节机制等^[12]。有机酸主要是通过将 pH 值降低到真菌生长范围以外^[13],进而抑制真菌生长。同时,有机酸还可通过破坏膜结构、降低细胞内 pH 值、抑制转运蛋白活性和阻碍代谢功能来发挥抗真菌活性^[14]。当环境 pH 值低于等电点时,有机酸主要以未解离的形式存在,这是发挥其抑菌作用的主要形式,在这种形式下有机酸可穿透真菌细胞壁从而发挥抑菌作用^[15]。DOGI 等^[16]研究发现,植物乳杆菌 RC009 在 pH 值小于 4.0 时,能有效抑制禾谷镰孢菌(*Fusarium graminearum*)生长,在 pH 值为 6.0 时,无抑制效果。因此,为剖析 4 株乳酸菌抑菌效果是否源于有机酸和其低 pH 值环境,本研究将乳酸菌发酵上清液的 pH 值调节为 3.0、5.0、7.0。研究发现,随着发酵上清液 pH 值升高,4 株乳酸菌对 *A. flavus*

和 *F. graminearum* 的抑菌效果均有所下降,表明发酵产生有机酸及其诱导的低 pH 值环境可能是发挥其抑菌效果的主要原因。但当中和发酵有机酸时(pH 值调节至 7.0),4 种功能菌均仍具有抑菌活性,表明可能还含有其他机制或途径协同抑菌。

乳酸菌所具备的抑菌活性在一定程度上受环境温度的变化而发生改变。对发酵上清液进行 60、80、100 °C 处理后,发现随着温度的上升,4 种乳酸菌对 *A. flavus* 的抑菌效果均显著下降,但加热处理并未影响各菌株对 *F. graminearum* 的抑菌效果,表明 4 株乳酸菌发酵液中对 *A. flavus* 的抑菌物质存在热不稳定性。ALBANO 等^[17]将植物乳植杆菌(*L. plantarum*)发酵上清液在不同温度条件下处理 60 min,发现经过 100 °C 处理后,其对大肠杆菌(*Escherichia coli*)的抑菌活性显著降低,表明其抑菌物质在高温条件下失活或变性。短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)无细胞上清液经 121 °C 处理 15 min 后,其抗菌效果未产生显著影响,表明抗菌物质的热敏性受菌株和结构不同而存在差异^[18]。

乳酸菌发酵产物中发挥主要抑菌作用的物质可能是蛋白质、多肽等^[19],本研究对 4 株乳酸菌上清液进行不同蛋白酶酶解处理后,发现经胃蛋白酶处理的 LP64 对 *A. flavus* 和 *F. graminearum* 抑菌

活性显著降低,表明蛋白质是其抑菌主要活性物质。在蛋白酶K处理后,乳酸菌LP10对*A. flavus*抑制效果、LF92对*F. graminearum*抑制效果、LP64对*A. flavus*和*F. graminearum*抑制效果均显著降低,表明乳酸菌可能通过产生丝氨酸或类丝氨酸物质来抑制*F. graminearum*的增殖^[20]。

除直接抑制霉菌生长外,乳酸菌的脱毒特性是降低青贮毒素风险的另一核心功能,二者共同构成了乳酸菌防控霉菌污染的双重防线。微生物降低霉菌毒素含量主要通过细胞壁吸附、生物转化和化学降解^[21]。吸附作用是指微生物细胞壁上的某些特定结构通过与霉菌毒素发生非共价键相互作用(主要是范德华力),这种作用有助于减少霉菌毒素在畜禽胃肠道中的吸收,从而减轻其对家畜的潜在毒性。降解作用是微生物在代谢过程中通过改变霉菌毒素的化学结构或将霉菌毒素转化为毒性较低或无毒的物质^[22],从而有效消除其对畜禽健康的潜在威胁。为了探究试验菌株对ZEN和DON的脱毒特性,本研究制备了试验菌株的发酵液、上清液和菌体沉淀等组分液,并将其与毒素反应,结果表明,各菌株的上清液和菌体沉淀均可有效去除ZEN和DON。菌株LP64、LP71、LF92的上清液脱毒率均显著低于其菌体沉淀,表明乳酸菌LP64、LP71、LF92主要通过吸附作用发挥对ZEN的脱毒作用。CHEN等^[23]基于酯酶的活性特性,筛选出3株可对ZEN脱毒的植物乳杆菌(*L. plantarum*)菌株,进一步研究表明,这3株植物乳酸菌首先通过吸附机制将ZEN紧密结合到其细胞壁上,之后利用自身分泌的酯酶对吸附在细胞壁上的ZEN进行降解,从而有效减少其毒性。菌株LP64、LF92的菌体沉淀对DON的脱毒率显著高于上清液,而菌株LP10、LP71的上清液脱毒率显著高于菌体沉淀,说明菌株LP64、LF92主要通过细胞壁吸附来对DON进行脱毒,而菌株LP10、LP71主要通过生物降解来对DON进行脱毒。菌株LP64作为脱毒效果最好的菌株,生物降解效果也高于菌株LP71、LF92。本研究系统探究了4株乳酸菌对*A. flavus*和*F. graminearum*的抑菌活性及其对ZEN和DON的脱毒效果,结果表明,4株乳酸菌在酸性条件(pH值为3.0)下对*A. flavus*和*F. graminearum*抑菌活性最强,这表明酸性物质为其主要抑菌成分;高温仅降低对*A. flavus*的抑制效果。蛋白酶处理结果表明,蛋白质类物质在菌

株抑制方面发挥重要作用。菌株通过吸附或生物降解作用去除ZEN和DON,其中,植物乳杆菌LP64脱毒率最高,可作为青贮饲料生物防控的候选菌株。

参考文献:

- [1] WHITLOW L W, HAGLER W M. Mycotoxins in dairy cattle: occurrence, toxicity, prevention and treatment[J]. Proceedings of Southwest Nutrition Conference, 2005; 124-138.
- [2] DRIEHUIS F, SPANJER M C, SCHOLTEN J M, et al. Occurrence of mycotoxins in maize, grass and wheat silage for dairy cattle in the Netherlands[J]. Food Additives & Contaminants: Part B, Surveillance, 2008, 1(1): 41-50.
- [3] KEESE C, MEYER U, REHAGE J, et al. On the effects of the concentrate proportion of dairy cow rations in the presence and absence of a *Fusarium* toxin-contaminated *Triticale* on cow performance[J]. Archives of Animal Nutrition, 2008, 62(3): 241-262.
- [4] DÄNICKE S, MATTHÄUS K, LEBZIEN P, et al. Effects of *Fusarium* toxin-contaminated wheat grain on nutrient turnover, microbial protein synthesis and metabolism of deoxynivalenol and zearalenone in the rumen of dairy cows[J]. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2005, 89(9/10): 303-315.
- [5] CHLEBICZ A, ŚLIŻEWSKA K. *In vitro* detoxification of aflatoxin B₁, deoxynivalenol, fumonisins, T-2 toxin and zearalenone by probiotic bacteria from genus *Lactobacillus* and *Saccharomyces cerevisiae* yeast[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2020, 12(1): 289-301.
- [6] 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.
- [7] HARKAI P, SZABÓ I, CSERHÁTI M, et al. Biodegradation of aflatoxin-B₁ and Zearalenone by *Streptomyces* sp. collection [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2016, 108: 48-56.
- [8] AHMAD RATHER I, SEO B J, REJISH KUMAR V J, et al. Isolation and characterization of a proteinaceous antifungal compound from *Lactobacillus plantarum* YML007 and its application as a food preservative[J]. Letters in Applied Microbiology, 2013, 57(1): 69-76.
- [9] VIMONT A, FERNANDEZ B, AHMED G, et al. Quantitative antifungal activity of reuterin against food isolates of yeasts and moulds and its potential application in yogurt[J]. International Journal of Food Microbiology, 2019, 289: 182-188.
- [10] 王文博. 抑菌脱毒功能菌的筛选及其对全株玉米青贮饲料的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2023.
WANG W B. Screening of antifungal and detoxification function bacterial and its effect on whole-plant corn silage[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2023.
- [11] 高雅, 司波雨, 范欣瑶, 等. 益生菌、菊粉及其复合制剂(合生元)对动物机体作用的研究进展[J/OL]. 饲料研究, 2025: 1-7. (2025-08-28). <https://link.net/doi/10.13557/j.cnki.issn1002->

- 2813.2025.16.027.
- GAO Y, SI B Y, FAN X Y, et al. Research progress on the effects of probiotics, inulin and their compound preparations (synbiotics) on animal body[J/OL]. Feed Research, 2025: 1-7. (2025-08-28). <https://link.cnki.net/doi/10.13557/j.cnki.issn1002-2813.2025.16.027>.
- [12] KOSGEY J C, JIA L N, FANG Y, et al. Probiotics as antifungal agents: Experimental confirmation and future prospects[J]. Journal of Microbiological Methods, 2019, 162: 28-37.
- [13] 李伟华, 张妙琴, 卫丹, 等. 乳酸杆菌联合氟康唑治疗复发性霉菌性阴道炎患者的疗效[J]. 中国药物应用与监测, 2025, 22(3): 462-465.
- LI W H, ZHANG M Q, WEI D, et al. Efficacy of *Lactobacillus* combined with fluconazole in treatment of patients with recurrent mycosis vaginitis[J]. Chinese Journal of Drug Application and Monitoring, 2025, 22(3): 462-465.
- [14] 吴健平, 罗莎莎, 陈学文, 等. 基于 LC-MS/MS 的代谢组学解析益生菌发酵棕榈粕的营养特性[J]. 饲料工业, 2025, 46(15): 151-159.
- WU J P, LUO S S, CHEN X W, et al. Metabolomic analysis of nutritional characteristics of probiotic-fermented palm kernel meal based on LC-MS/MS[J]. Feed Industry, 2025, 46(15): 151-159.
- [15] 林佳欣, 孙红男, 张苗, 等. 淀粉质食品货架期的影响因素及保鲜技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(18): 135-144.
- LIN J X, SUN H N, ZHANG M, et al. Research progress on influencing factors of shelf life and preservation technology of starch-based foods[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(18): 135-144.
- [16] DOGI C A, FOCESATO A, ARMANDO R, et al. Selection of lactic acid bacteria to promote an efficient silage fermentation capable of inhibiting the activity of *Aspergillus parasiticus* and *Fusarium graminearum* and mycotoxin production [J]. Journal of Applied Microbiology, 2013, 114(6): 1650-1660.
- [17] ALBANO H, TODOROV S D, VAN REENEN C A, et al. Characterization of two bacteriocins produced by *Pediococcus acidilactici* isolated from "Alheira", a fermented sausage traditionally produced in Portugal[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 116(2): 239-247.
- [18] CROWLEY S, MAHONY J, VAN SINDEREN D. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives[J]. Trends in Food Science & Technology, 2013, 33(2): 93-109.
- [19] CLEUSIX V, LACROIX C, VOLLENWEIDER S, et al. Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria[J]. BMC Microbiology, 2007, 7: 101.
- [20] 何金童. 地衣芽孢杆菌对玉米青贮发酵品质、有氧稳定性及黄曲霉毒素抑制作用的研究[D]. 宁夏: 宁夏大学, 2024.
- HE J T. The research of the fermentation quality, aerobic stability and aflatoxin inhibition of corn silage by *Bacillus licheniformis*[D]. Ningxia: Ningxia University, 2024.
- [21] 周杰. 饲料中霉菌毒素对育肥猪免疫功能的影响[J]. 畜牧业环境, 2025(13): 61-62.
- ZHOU J. Effect of mycotoxin in feed on immune function of finishing pigs[J]. Animal Industry and Environment, 2025(13): 61-62.
- [22] 葛昆陇, 余福泽, 李坤, 等. 玉米赤霉烯酮对猪毒性作用及其脱毒方法研究进展[J]. 饲料研究, 2025, 48(10): 152-155.
- GE K L, SHE F Z, LI K, et al. Research progress on toxic effects of zearalenone on pigs and its detoxification methods[J]. Feed Research, 2025, 48(10): 152-155.
- [23] CHEN L, LI J F, DONG Z H, et al. Effects of applying oil-extracted microalgae on the fermentation quality, feed-nutritive value and aerobic stability of ensiled sweet sorghum [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2018, 98(12): 4462-4470.