DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20260123004
引用格式: 丁立军, 沈文凤, 于丽娜, 等. 拮抗黄曲霉菌株的筛选及应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(13): 41–49.
Ding Lijun, Shen Wenfeng, Yu Lina, et al. Screening and application of antagonistic strains against *Aspergillus flavus* [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(13): 41–49. (in Chinese with English abstract).

拮抗黄曲霉菌株的筛选及应用

丁立军[1], 沈文凤[2], 于丽娜[2], 宋 昱[2], 毕 洁[2], 高 远[2], 江 晨[2],
王鲁慧[2], 王明清[2*]

(1. 费县农业农村局, 临沂 273400; 2. 山东省花生研究所, 青岛 266100)

摘 要: 目的 筛选一株有效拮抗黄曲霉生长的菌株。**方法** 利用平板划线法、黄曲霉对峙培养法筛选出有效菌; 通过形态学观察、*16S rRNA* 基因分析, 确定有效菌的种属; 通过黄曲霉侵染玉米及花生籽仁的实验, 验证有效菌抑制黄曲霉生长的效果; 通过转录组测序技术, 将有效菌株 G10 发酵液与黄曲霉共培养不同的时间, 确定有效菌株与黄曲霉之间的相互作用机制。**结果** 筛选得到有效抑制黄曲霉生长的菌株 G10, 经鉴定有效菌株 G10 与 *Burkholderia stagnalis* 的 *16S rRNA* 基因相似度达 99.93%, 属于伯克霍尔德菌, 命名为 *Burkholderia stagnalis* G10。侵染玉米及花生籽仁应用实验验证菌株 G10 对拮抗黄曲霉有显著作用。转录组测序发现, 菌株 G10 与黄曲霉共培养 24 h 的差异表达基因数为 3341 个, 其中 1830 个基因表达上调, 1511 个基因表达下调; 共培养 48 h 的差异表达基因数为 5334 个, 其中 2429 个基因表达上调, 2905 个基因表达下调。富集分析发现, 代谢过程、细胞过程、细胞结构组件、催化复合物等重要基因本体(gene ontology, GO)条目和碳代谢、氨基酸生物合成、核糖体生成过程、蛋白质加工过程等重要京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路。**结论** 筛选得到的有效菌 G10 能有效拮抗黄曲霉的生长, 为深入研究细菌与黄曲霉的互作机制及生防菌的应用提供了参考。

关键词: 黄曲霉; 拮抗菌; 分离鉴定

中图分类号: Q939.92 **文献识别码:** A **文章编号:** 2095–0381(2026)13–0041–9

Screening and application of antagonistic strains against *Aspergillus flavus*

DING Li-Jun[1], SHEN Wen-Feng[2], YU Li-Na[2], SONG Yu[2], BI Jie[2], GAO Yuan[2],
JIANG Chen[2], WANG Lu-Hui[2], WANG Ming-Qing[2*]

(1. *Feixian Agriculture and Rural Affairs Bureau*, *Linyi* 273400, *China*; 2. *Shandong Peanut Research Institute*, *Qingdao* 266100, *China*)

ABSTRACT: Objective To select a strain that effectively inhibits the growth of *Aspergillus flavus*. **Methods**

收稿日期: 2026-01-23
基金项目: 山东省农业科学院农业科技创新工程项目(CXGC2026B08); 山东省重点研发计划项目(2023TZXD074); 山东省自然科学基金项目(ZR2025QC181); 泰山学者工程资助项目(tsqnz20250761); 2024 年度牟平区科技创新发展专项计划项目; 青岛市科技惠民示范专项-现代农业项目(26-1-5-xdny-22-nsh); 烟台市高端人才引育“双百计划”经费资助项目
第一作者: 丁立军(1975—), 男, 高级农艺师, 主要研究方向为农业技术推广。E-mail: 610643177@qq.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

Effective strains were screened using the streak plate method and the confrontation culture method of *Aspergillus flavus*. The species of the effective strain was determined through morphological observation and *16S rRNA* gene analysis. The effect of the effective strain in inhibiting the growth of *Aspergillus flavus* was verified through experiments of *Aspergillus flavus* infecting corn and peanut kernels. By using transcriptome sequencing technology, the fermentation broth of the effective strain G10 was co-cultured with *Aspergillus flavus* for different periods of time, in order to determine the interaction mechanism between the effective strain and *Aspergillus flavus.* **Results** The strain G10 that inhibited the growth of *Aspergillus flavus* was selected. It was identified that the effective strain G10 had a 99.93% similarity in the *16S rRNA* gene with *Burkholderia stagnalis*. It belonged to the *Burkholderia stagnalis* and was named *Burkholderia stagnalis* G10. The application experiments on infecting corn and peanut kernels had verified that strain G10 had a significant antagonistic effect against *Aspergillus flavus*. Transcriptome sequencing revealed that the number of differentially expressed genes in strain G10 when co-cultured with *Aspergillus flavus* for 24 hours was 3341, among which 1830 genes showed up-regulation and 1511 genes showed down-regulation. The number of differentially expressed genes when co-cultured for 48 hours was 5334, among which 2429 genes showed up-regulation and 2905 genes showed down-regulation. Enrichment analysis revealed important gene ontology (GO) entries such as metabolic process, cell process, cell structure components, catalytic complex, *etc*., and important Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathways such as carbon metabolism, amino acid biosynthesis, ribosome generation process, protein processing process, *etc*. **Conclusion** The selected effective strain G10 can effectively inhibit the growth of *Aspergillus flavus*, providing a reference for further research on the interaction mechanism between bacteria and *Aspergillus flavus* and the application of biocontrol bacteria.

KEY WORDS: *Aspergillus flavus*; antagonistic bacteria; isolation and identification

0 引 言

黄曲霉(*Aspergillus flavus*)属于半知菌类, 在土壤、空气、发霉的粮食、坚果中分布广泛。黄曲霉代谢产生次级代谢产物黄曲霉毒素, 黄曲霉毒素被世界卫生组织划定为I类致癌物。黄曲霉毒素危害人的肝脏组织, 可致肝癌甚至死亡[1−2]。据统计, 全球每年约有 25%农作物受到黄曲霉污染, 主要涉及花生、玉米等粮油作物, 不仅造成巨大的经济损失, 更严重威胁食品安全和公众健康。黄曲霉对农作物的危害可以发生在其生长的各个环节, 对花生的侵染常见于茎苗、荚果和种子。目前, 食品、粮食中的黄曲霉防治主要有物理、化学、生物法[3−4]。生物防治法相比于物理、化学防治法更绿色、安全, 更受青睐[4], 已成为国内外研究的热点方向。

近年来, 关于拮抗黄曲霉菌株的筛选研究取得了显著进展[5]。目前报道的拮抗菌株主要来源于以下几类: (1)细菌类拮抗菌: 芽孢杆菌属(*Bacillus*)[6]是研究最为广泛的拮抗细菌类群。研究表明, 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)[7]、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)和贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)[8]等可通过产生脂肽类抗生素(如伊枯草菌素、表面活性素)、竞争营养与生态位、诱导植物系统抗性等多种机制抑制黄曲霉生长。伯克霍尔德菌能拮抗黄曲霉的生长[9]。此外, 假单胞菌属(*Pseudomonas*)、乳酸菌等也展现出良好的拮抗潜力。(2)真菌类拮抗菌: 木霉菌(*Trichoderma*)作为经典的生防真菌, 可通过重寄生、抗生作用和竞争作用有效抑制黄曲霉。哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)、绿色木霉(*Trichoderma viride*)等菌株已被证实能够显著降低黄曲霉毒素的产生。此外, 部分非产毒黄曲霉菌株通过竞争排斥机制, 在田间应用中表现出良好的生物防控效果。(3)放线菌类拮抗菌: 链霉菌属(*Streptomyces*)能够产生丰富的次级代谢产物, 对黄曲霉具有较强的抑制活性。其产生的抗真菌物质包括聚酮类、肽类等化合物, 作用机制多样。在应用研究方面, 拮抗菌株已被探索用于采后保鲜、饲料添加剂、土壤改良及田间生物防治等领域。部分拮抗菌制剂已进入商业化应用阶段, 如美国登记的 afla-guard®(非产毒黄曲霉菌株)在花生田间的应用效果显著[10]。

尽管拮抗黄曲霉的研究已取得一定成果, 但仍存在不足: 现有研究多集中于少数已知属种, 对特殊环境(如极端环境、海洋、发酵食品等)中微生物资源的挖掘不足, 缺乏系统性的菌株筛选与评价体系[11−12]; 多数研究停留在抑菌效果的表观评价层面, 对拮抗菌株抑制黄曲霉生长及产

毒的分子机制、代谢途径及关键功能基因的研究相对薄弱, 限制了拮抗菌的定向改良和高效利用[13]。鉴于此, 本研究从花生根系土壤中系统分离筛选拮抗黄曲霉的菌株, 结合形态学、*16S rRNA* 测序方法进行精准鉴定, 进行了实验室黄曲霉侵染玉米和花生籽仁应用实验; 根据黄曲霉与菌株 G10 共培养不同时间的转录组学分析得到了重要的基因本体(gene ontology, GO)条目和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路, 为深入研究细菌拮抗黄曲霉的相互作用机制提供了参考。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

花生: 花育 9107, 由山东省花生研究所提供; 玉米: 鲁单 510, 青岛批发市场购买。菌株: 黄曲霉 3357 菌株, 由中山大学贺竹梅教授惠赠。土壤样品: 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。

LB 肉汤(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); 琼脂粉、琼脂糖(北京索莱宝科技有限公司); Super GelRed 荧光染料(美国 Everbright Inc 公司); DNA 试剂盒(天根生物有限公司); NaClO 试剂(质量浓度 43 g/L, 山东利尔康医疗科技有限公司)。

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); IS-RDV1 培养箱(德国 CRYSTAL 公司); GI36T 高压灭菌锅[致微(厦门)仪器有限公司]; DW-86L386 立式超低温保存箱(青岛海尔特种电器有限公司); 5418 型离心机(德国 Eppendorf 公司); S1000TM Thermal Cycler 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)仪(美国 BIO-RAD 公司)。

1.3　拮抗黄曲霉菌株的筛选

将土壤样品用 10 倍、100 倍、1000 倍的无菌水梯度稀释后涂布于 LB 固体培养基, 选取能挑选单菌落的平板进行后续纯化实验[14]。将纯化后的菌株与活化后的黄曲霉对峙培养, 28 ℃避光培养 5~7 d, 根据对峙结果, 选取对峙效果明显的菌株进行下一步实验。

1.4　拮抗黄曲霉菌株的鉴定

1.4.1　菌株的形态学特征

将筛选出的有效菌株接种到 LB 平板划线, 28 ℃培养, 每天记录菌落形态。

1.4.2　菌株的 *16S rRNA* 基因鉴定

采用 DNA 试剂盒进行菌株 G10 基因组的 DNA 提取[15]。*16S rRNA* 基因通用引物为 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 反应体系 25 μL, Taq 缓冲液 2.5 μL, 脱氧核糖核苷三磷酸 2 μL, Taq 聚合酶 0.2 μL, 引物 27F 1 μL, 1492R 1 μL, G10 菌株基因组模板 1 μL, 双蒸水 17.3 μL。PCR 扩增程序 95 ℃预变性 10 min; 95 ℃变性 40 s, 55 ℃退火 40 s, 72 ℃延伸 100 s, 30 个循环; 72 ℃延伸 10 min。反应结束后, 3 μL 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 后经凝胶成像系统检测结果, 得到清晰的目的条带后进行回收, 连接到 pMD19-T 载体, 测序得到的基因序列提交 Ezbiocloud 数据库进行在线比对分析, 选取相近的同源序列进行 ClustalW 分析, 然后用 MEGA-X v10.1.7 软件构建系统进化树[16]。

1.5　抑制黄曲霉生长效果的应用研究

1.5.1　抑制带壳花生的黄曲霉生长效果

挑选完好的花育 9107 带壳花生, 用 1% NaClO 溶液消毒后接种 3×10^6 cfu/mL 黄曲霉孢子悬浮液 0.6 mL、0.8 mL 及菌株 G10 发酵液 0.4、0.6、0.8 mL。28 ℃恒温避光培养, 观察记录荚果长菌情况[17–18]。统计方法同前期花生侵染研究方法[19]。每组实验设置 3 个重复, 相应量的无菌水为空白对照。

1.5.2　抑制花生籽仁的黄曲霉生长效果

花生籽仁用 70%酒精进行消毒, 20 min 内用无菌水冲洗 3 遍。无菌培养皿中放入花生籽仁 12 粒, 接种 3×10^6 cfu/mL 黄曲霉孢子悬菌液 0.4 mL 及菌株 G10 发酵液 0.4、0.6、0.8 mL。28 ℃恒温避光培养, 观察记录花生籽仁生长情况。每组实验设置 3 个重复, 相应量的无菌水为空白对照。

1.5.3　抑制玉米的黄曲霉生长效果

用 1% NaClO 溶液对玉米粒进行消毒, 然后用无菌水冲洗 3 遍。无菌培养皿中放入 10 粒玉米粒, 接种 3×10^6 cfu/mL 的黄曲霉孢子悬菌液 0.2 mL 及菌株 G10 发酵液 0.1、0.2、0.3 mL。28 ℃恒温培养箱避光培养, 观察玉米粒的生长情况。每组实验设置 3 个重复, 相应量的无菌水为空白对照。

1.6　转录组测序

为探究有效菌 G10 对黄曲霉生长的响应变化, 本研究设 3 个处理, 分别为对照组(G1)、处理组 1 (G2)、处理组 2 (G4)。每个处理设置 3 个重复, 共 9 个样品。对照组(G1)设置黄曲霉 28 ℃避光单独培养 24 h, 处理组 1 (G2)黄曲霉与有效菌 G10 混合培养 24 h, 处理组 2 (G4)黄曲霉与有效菌 G10 混合培养 48 h。将发酵液在 10000 r/min 条件下 4 ℃离心 3 min。液氮速冻 10 min 后于–80 ℃冰箱保存。以上样品委托百迈客公司进行转录组检测。

1.7　数据处理

每组实验重复 3 次, 试验数据采用 Microsoft Excel 2019 软件进行统计、制图; 采用 SPSS 18.0 软件进行数据差异性分析, 以 $P<0.05$ 作为差异显著性判断标准。

2　结果与分析

2.1　拮抗黄曲霉菌的筛选与鉴定

从费县土壤中筛选的菌株 98 株, 分别与黄曲霉对峙培养,

得到有效拮抗黄曲霉菌株, 其中 G10 对峙效果明显(图 1)。菌株 G10 在 LB 平板上 28 ℃培养 48 h 的菌落形态为圆形、乳黄色、半透明状(图 2), 菌落的直径为 1~2 mm, 符合伯克霍尔德菌属的形态特征[14]。将菌株 G10 的 *16S rRNA* 基因序列在 ezbiocloud 数据库中比, 结果显示其与 *Burkholderia stagnalis* LMG-28156^T 亲缘关系最近, 同源性达 99.93%, 属伯克霍尔德菌, 命名为伯克霍尔德菌 G10。利用软件 MEGA X v10.1.7 将其同源序列构建进化树(图 3)。

2.2 菌株 G10 抑制黄曲霉生长效果的应用研究

带壳花生接种有效菌 G10 和黄曲霉发酵液的生长状况如图 4A 所示。右侧对照组有 4 个黄曲霉覆盖率超过 80%, 2 个黄曲霉覆盖率超过 60%; 左侧实验组有 1 个黄曲霉覆盖率超过 70%, 2 个黄曲霉覆盖率超过 30%, 3 个黄曲霉覆盖率超过 20%, 右侧对照组明显比左侧接种菌株 G10 发酵液的实验组带壳花生的生长覆盖率大, 由此表明菌株 G10 发酵液对黄曲霉菌产生抑制效果, 能拮抗于带壳花生生长的黄曲霉。同样接种两种菌株发酵液后, 验证菌株 G10 发酵液在花生籽仁中对黄曲霉的抑制作用, 其生长情况如图 4B, 右侧对照组有 4 粒黄曲霉覆盖率超过 80%, 2 粒黄曲霉覆盖率超过 60%, 2 粒黄曲霉覆盖率超过 20%; 左侧实验组有 3 粒黄曲霉覆盖率超过 30%, 2 粒黄曲霉覆盖率超过 20%, 实验组中生长黄曲霉的粒数比对照组少, 且实验组黄曲霉覆盖率比对照组小, 表明 G10 发酵液对黄曲霉表现出抑制效果, 对花生籽仁黄曲霉生长有拮抗效果。这与已报道的菌株 G22 研究结果一致[14]。

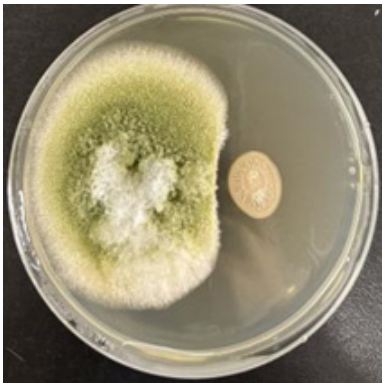


图 1 黄曲霉与菌株 G10 在 PDA 上共同培养的菌落形态
Fig.1 Colony morphology of *Aspergillus flavus* co-cultivated with strain G10 showing on PDA



图 2 菌株 G10 在 LB 平板的菌落形态
Fig.2 Colony morphology of strain G10 on LB plates

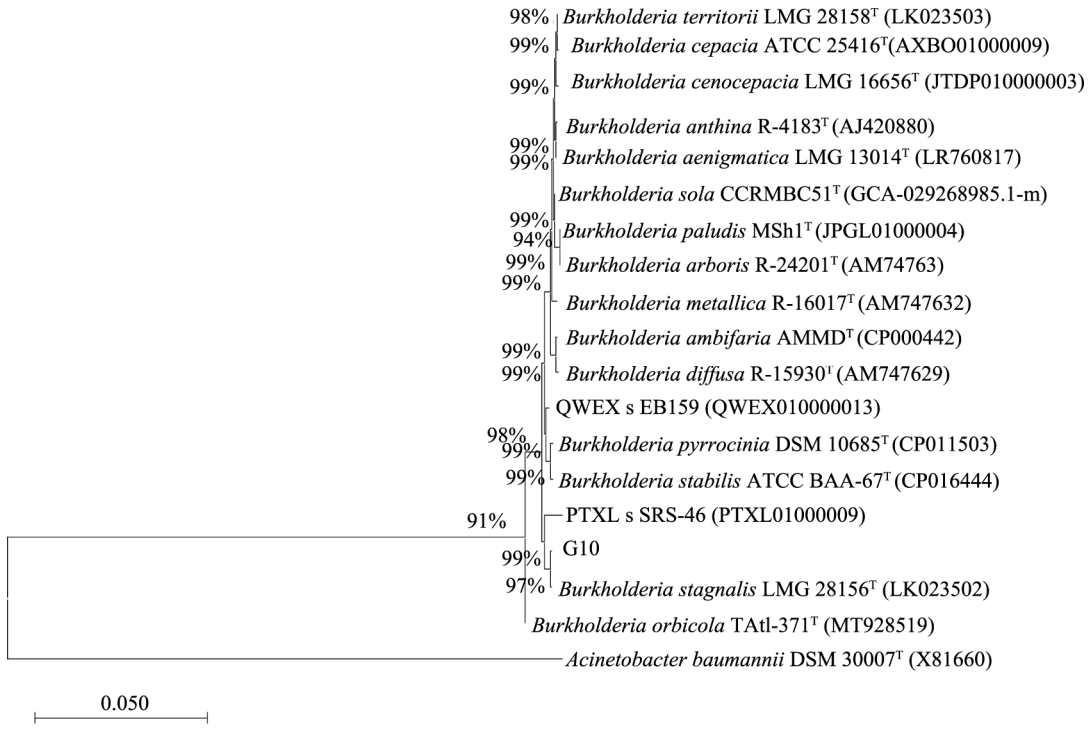
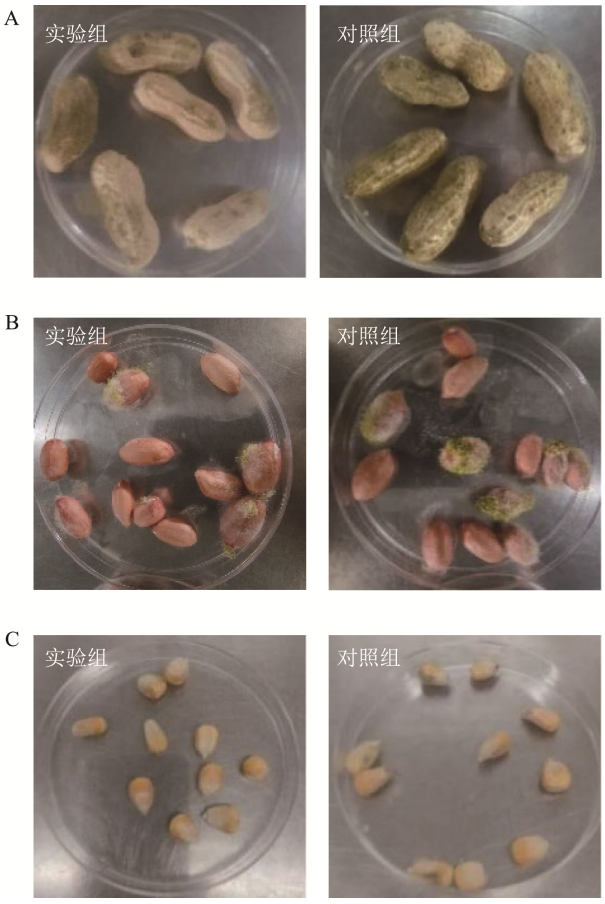


图 3 菌株 G10 系统进化树
Fig.3 Phylogenetic tree of strain G10

图 4C 为玉米粒在接种两种菌发酵液后的生长情况。由图 4C 可以看出, 右侧对照组有 2 粒黄曲霉覆盖率超过 40%, 2 粒黄曲霉覆盖率超过 20%; 左侧实验组仅有 1 粒黄曲霉覆盖率超过 20%, 实验组中黄曲霉生长的玉米粒数比对照组少, 且实验组黄曲霉覆盖率比对照组小, 说明菌株 G10 发酵液对玉米粒黄曲霉生长有拮抗效果。



注:　A.花生; B.花生籽仁; C.玉米粒。

图 4　菌株 G10 抑制黄曲霉生长效果

Fig.4　Inhibitory effects of strain G10 on the growth of *Aspergillus flavus*

2.3　黄曲霉响应菌株 G10 的转录组分析

2.3.1　测序控制分析及参考基因组比对

经质量控制, 总共得到 94.87 Gb 清洗数据, 各样品中的 Q30 碱基百分比皆大于 94.92%。所有样本的鸟嘌呤、胞嘧啶含量均在 52.52%~52.74%之间。各样品的测序片段与参考基因的比对率范围为 88.68%~94.50%。

2.3.2　差异表达基因分析

根据样本中的数值将基因进行差异表达筛选, 对有生物学重复的差异组使用软件 DESeq2[20]进行分析; 对没有生物学重复的差异组用软件 edgeR v4[21]进行分析。差异基因筛选的阈值为: P<0.05, |log2 倍数变化|≥1。差异表达基因统计结果如表 1 所示。与对照组相比, 有效菌 G10 与黄曲霉共培养 24 h 差异表达基因数为 3341 个, 其中 1830 个基因表达上调, 1511 个基因表达下调; 有效菌 G10 与黄曲霉共培养 48 h 差异表达基因数为 5334 个, 其中 2429 个基因表达上调, 2905 个基因表达下调。两种菌共培养 24 h 与共培养 48 h 相比较, 差异表达基因数为 4549 个, 其中 2105 个基因表达上调, 2444 个基因表达下调。由此可见, 两个处理组中都包含大量的差异表达基因。

表 1　差异表达基因数目统计

Table 1　Statistics of the number of differentially expressed genes

差异表达基因集名称	差异表达基因数目	上调基因数目	下调基因数目
G1 *vs* G2	3341	1830	1511
G1 *vs* G4	5334	2429	2905
G2 *vs* G4	4549	2105	2444

将不同的比较组合差异基因采用韦恩图进行展示(图 5), G1、G2、G4 共有 984 个基因集是重叠的, G1、G2 共有 2090 个基因集是重叠的, G2、G4 共有 810 个基因集是共有的, G1、G4 共有 1137 个基因集是重叠的。G1 中有 1123 个基因集是特有的, G2 中有 665 个基因集是特有的, G4 中有 410 个基因集是特有的。

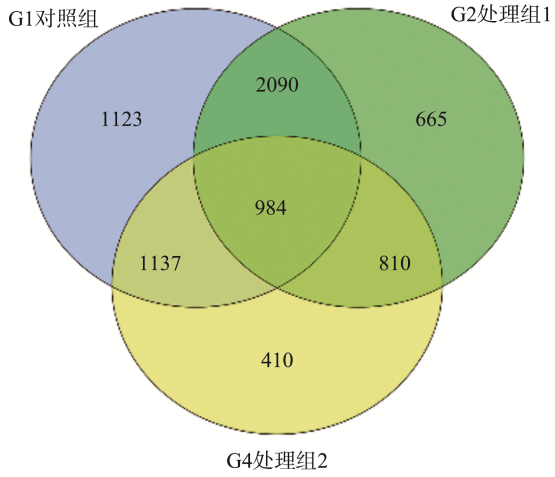


图 5　差异基因集韦恩图

Fig.5　Venn diagram of differential gene sets

将筛选出的差异表达基因进行层次聚类分析, 由图 6 可以看出, G1 *vs* G2、G1 *vs* G4、G2 *vs* G4 差异表达基因都得到明显聚类, 表明重复样本的表达模式有一致性, 有效菌 G10 与黄曲霉共培养 24 h 和 48 h 后基因表达都发生了明显变化。

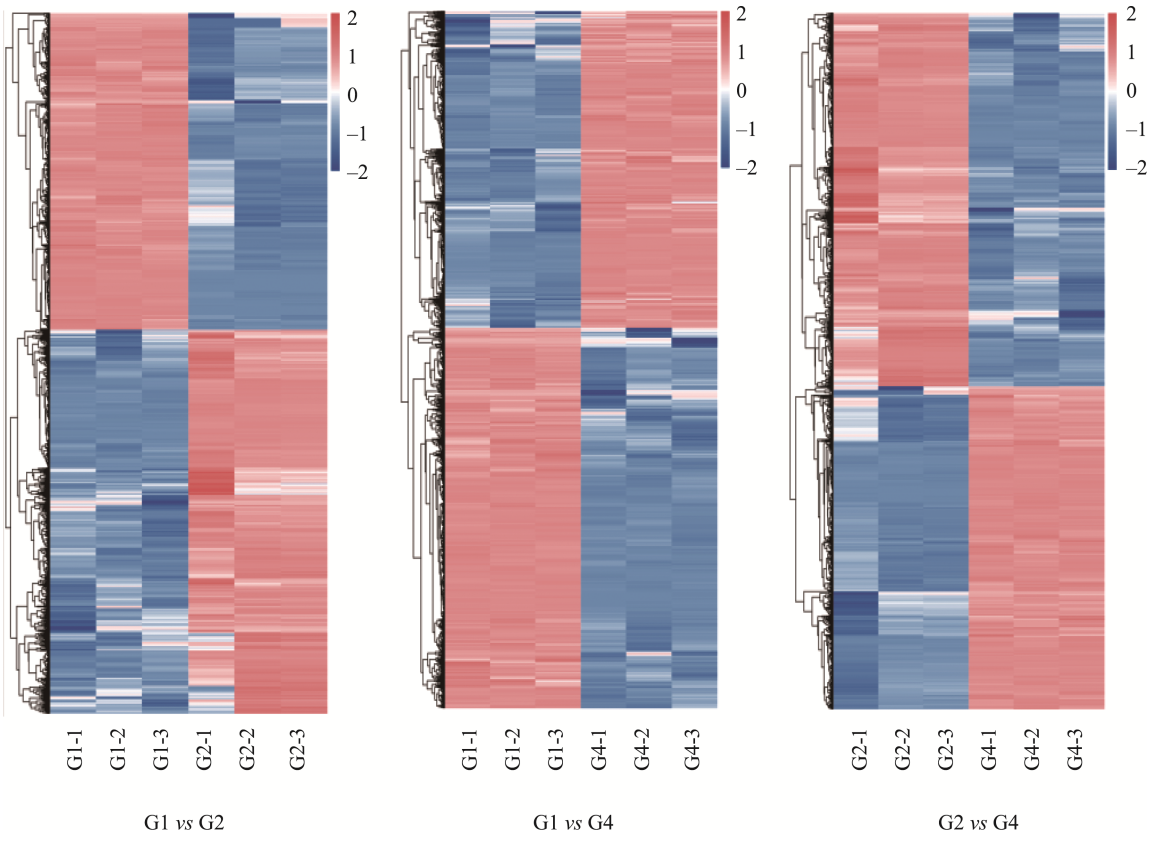


图 6 差异表达基因聚类图

Fig.6 Clustering diagram of differentially expressed genes

2.3.3 差异基因富集分析

黄曲霉对有效菌 G10 生长的响应变化，通过基因注释的结果对差异表达基因进行数据库功能注释，基因数量统计如表 2。

(1) GO 富集分析

将 G10 发酵液拮抗黄曲霉的过程中的差异表达基因进行 GO 功能分析。如图 7，将对比组的差异基因分为 3 大类，即生物学过程、分子功能和细胞组分。G10 发酵液与黄曲霉共同生长 24 h 后有 2401 个基因被注释到，生长 48 h 后有 3846 个基因被注释到：在生物学过程中，主要集中于代谢过程、定位、细胞过程、刺激反应、生物调节，细胞组分主要集中于细胞解剖实体、细胞内、含蛋白质复合物，分子功能主要集中于催化活性、结合。

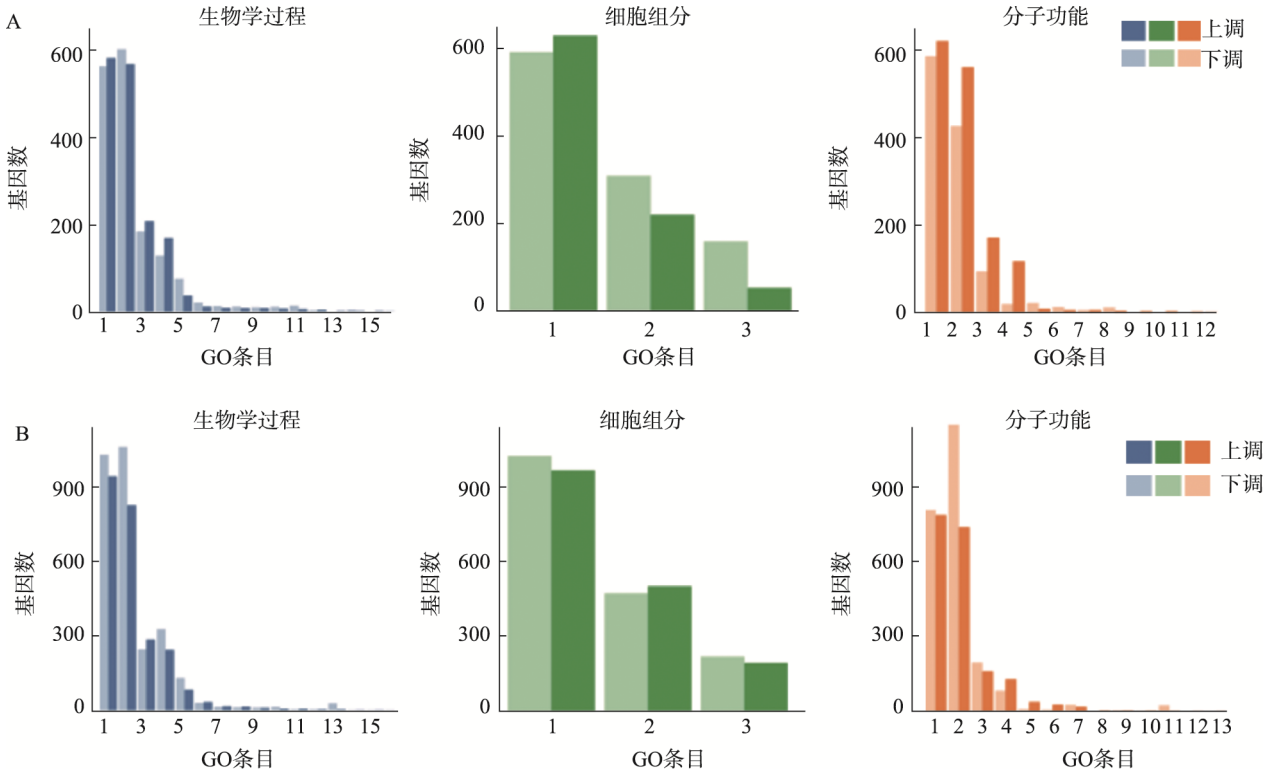
(2) KEGG 富集分析

KEGG 分析表明(图 8)，G10 发酵液与黄曲霉共培养 24 h 后富集差异表达基因显著(P<0.05)注释到 14 条通路，分别为碳代谢通路、氨基酸生物合成通路、谷胱甘肽代谢通路、苯丙氨酸代谢通路、糖酵解通路、蛋白酶体通路、2-氧代羧酸代谢通路、错配修复通路、半胱氨酸和蛋氨酸代谢通路、β-丙氨酸代谢通路、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解通路、半乳糖代谢通路、DNA 复制通路。G10 发酵液与黄曲霉共培养 48 h 后富集到差异表达基因显著(P<0.05)注释到 7 条通路，分别为蛋白酶体通路、DNA 复制通路、RNA 聚合酶通路、核糖体生物合成通路、内质网中的蛋白质加工通路、错配修复通路、同源重组通路。这可能是因为随着菌株 G10 对黄曲霉的作用，黄曲霉的部分通路逐渐适应菌株 G10 的拮抗作用，表现出差异表达基因显著通路变少。

表 2 注释的差异表达基因数量

Table 2 Number of differentially expressed genes noted in the annotations

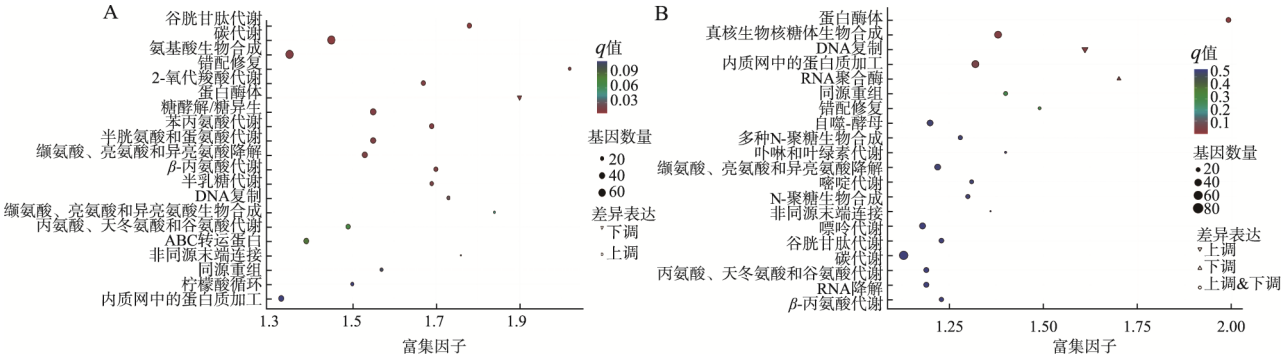
差异表达基因集名称	注释基因数	COG	GO	KEGG	KOG	NR	Pfam	Swissprot	eggNOG
G1 *vs* G2	3176	1498	2401	1998	1491	3176	2551	1845	2478
G1 *vs* G4	5082	2192	3846	3244	2450	5082	4052	2960	3958
G2 *vs* G4	4365	1935	3380	2893	2189	4365	3582	2635	3484



注: A. G1 *vs* G2。生物学过程: 1. 代谢过程; 2. 细胞过程; 3. 定位; 4. 生物调节; 5. 刺激反应; 6. 信号传导; 7. 解毒作用; 8. 繁殖; 9. 多生物过程; 10. 繁殖过程; 11. 发育过程; 12. 生物体间相互作用; 13. 生物黏附; 14. 生长; 15. 生物之间的种内相互作用; 16. 多细胞生物过程。细胞组分: 1. 细胞解剖实体; 2. 细胞内; 3. 含蛋白质复合物。分子功能: 1. 催化活性; 2. 结合; 3. 转运活性; 4. 转录调节活性; 5. 分子功能调节; 6. 抗氧化活性; 7. 翻译调节活性; 8. 结构分子活性; 9. 分子转导活性; 10. 分子载体活性; 11. 小分子传感器活性; 12. 营养库活性。B. G1 *vs* G4。生物学过程: 1. 细胞过程; 2. 代谢过程; 3. 生物调节; 4. 定位; 5. 刺激反应; 6. 信号传导; 7. 繁殖; 8. 繁殖过程; 9. 多生物过程; 10. 发育过程; 11. 生长; 12. 生物体间相互作用; 13. 解毒作用; 14. 生物黏附; 15. 生物之间的种内相互作用; 16. 多细胞生物过程。细胞组分: 1. 细胞解剖实体; 2. 细胞内; 3. 含蛋白质复合物。分子功能: 1. 结合; 2. 催化活性; 3. 转运活性; 4. 转录调节活性; 5. 结构分子活性; 6. 翻译调节活性; 7. 分子功能调节因子; 8. 分子载体活性; 9. 小分子传感器活性; 10. 分子转导活性; 11. 抗氧化活性; 12. 蛋白质折叠伴侣; 13. 营养库活性。

图 7　差异表达基因 GO 功能分析

Fig.7　GO functional analysis of differentially expressed genes



注: A. G1 *vs* G2; B. G1 *vs* G4。

图 8　差异表达基因 KEGG 富集散点图

Fig.8　Scatter plot of KEGG enrichment of differentially expressed genes

3　讨论与结论

本研究筛选到一株能抑制黄曲霉生长的菌株 G10, 并在花生和玉米中进行了应用, 发现其可抑制黄曲霉的生长。前期报道菌株 G22[14]、菌株 LE160[17]能抑制黄曲霉的生长, 能抑制花生中黄曲霉的侵染。本研究筛选到的菌株

G10 丰富了拮抗黄曲霉的菌株资源。

目前，黄曲霉的生物防治方法主要有次级代谢产物、拮抗微生物和生物竞争法[22]，生物竞争机制是不产毒菌株竞争产毒菌株的必需营养及感染位点，起到减少黄曲霉污染的目的。在自然界中，微生物之间的竞争机制比合作机制更为常见[23]。不同物种之间的激烈竞争可以让优势物种淘汰劣势物种[24]。但是，协同共存的竞争物种之间也可以通过稳定机制来适应竞争，达到竞争者之间的平衡或抑制状态[25]。它们可通过多种方式克服竞争，包括快速生长、生成孢子、应激恢复等。真菌和细菌的共培养与它们单独生长表现不同，共培养能够增强微生物的存活性、持久性和产生天然产物[26]，因此，“共培养”这一概念被提出以模拟自然环境。微生物共培养已被证明是提高微生物生物防治能力的有效途径[27]。然而，共培养微生物的相互作用机制，特别是细菌和真菌间的作用机制很少被研究。本研究通过将筛选到的有效菌株 G10 与黄曲霉在液体培养基中共培养，使它们充分作用，以其黄曲霉单独培养 24 h 为对照组，共培养 24 h、48 h 为实验组，通过不同时间相互作用后分析差异表达基因，寻找两者拮抗的作用机理。

转录组学测序技术能快速全面获得某一物种在某一状态所转录的 mRNA 序列信息，能够从整体基因水平，揭示生物学过程的分子机制[28]。本研究中有效菌株 G10 与黄曲霉随着培养时间的延长，差异表达基因的特异性响应数量逐渐增加，24 h 时 GO 功能富集到 2401 个条目，到 48 h 时为 3846 个条目；24 h 时 KEGG 功能富集到 1998 条通路，到 48 h 时为 3244 条通路。这与黄迪等[29]研究的雷尔氏菌与异形根孢囊霉菌共培养，菌根化桉树根中特异响应差异表达基因数随时间的延长逐渐增加的结果一致。这可能是随着时间的延长，黄曲霉受菌株 G10 的拮抗作用加强，更多的通路发生应激反应。GO 功能注释分析发现，有效菌与黄曲霉共培养使黄曲霉差异表达基因上调表达的基因主要有生物学过程的代谢过程和分子功能的催化活性；KEGG 分析表明，G10 发酵液与黄曲霉共培养 24 h 后富集差异表达基因显著(P<0.05)注释到 4 个大类的代谢通路，分别是环境信息处理过程、细胞过程、遗传信息处理过程、代谢过程，差异表达基因下调表达的基因有蛋白酶体、DNA 复制、错配修复、核苷酸修复、碱基切除修复等，差异表达基因上调表达的基因有苯基丙氨酸、丙氨酸、糖酵解等代谢过程。这表明有效菌作用黄曲霉后，可能使黄曲霉的新陈代谢因为细胞修复需要高能量而减缓[30–31]，同时，可能使黄曲霉的蛋白质错误修复能力减弱，所以菌株 G10 使黄曲霉生长受限。

伯克霍尔德菌是一种广泛存在于土壤、植物、人体中的一类菌，菌属复杂，涵盖了具有植物促生、生物防治、生物修复等有益功能的菌株，同时也包含若干对人类健康具有潜在威胁的致病菌。其中洋葱伯克霍尔德菌复合群在临床中最常见，是囊性纤维化患者和免疫功能低下人群的重要条件致病菌，可引发肺炎、败血症等严重感染。因此，在将伯克霍尔德菌应用于食品及农产品生防领域之前，其安全性评价是不可或缺的关键环节。前期研究发现，伯克霍尔德菌的脂肽类代谢产物在抑制病原菌生长中发挥重要作用[14]。基于此，本研究下一步拟对菌株 G10 的脂肽等活性代谢产物，进行分离纯化与结构鉴定，并探索其在生防中的应用潜力。采用代谢产物替代活菌制剂的策略，有望在一定程度上规避直接使用菌株可能带来的生物安全风险。然而，需要特别指出的是，本研究目前尚未对菌株 G10 开展系统的安全性评估，包括溶血实验、细胞毒性实验及全基因组毒力基因筛查等关键指标均待后续补充。菌株 G10 是否携带已知毒力因子、是否对哺乳动物细胞具有毒性、其代谢产物是否完全无安全隐患等问题，目前尚无实验数据支撑。这是本研究目前存在的重要局限性，也是后续研究将优先解决的核心问题。未来工作将建立涵盖表型检测与基因组学分析的综合安全性评价体系，在确保菌株及其代谢产物对非靶标生物安全无害的前提下，进一步开展田间应用及产业化探索。

综上所述，本研究从费县土壤中筛选得到有抑制黄曲霉生长效果的有效菌株 G10，综合 *16S rRNA* 基因分析结果与形态学特征，鉴定有效菌株 G10 与 *Burkholderia stagnalis* 相似度达 99.93%，属于伯克霍尔德菌；通过黄曲霉侵染玉米及花生实验室应用实验，验证菌株 G10 能有效拮抗黄曲霉；最后基于转录组测序技术从基因表达层面发现，有效菌株 G10 发酵液能影响黄曲霉代谢过程、细胞过程、细胞结构组件、催化复合物等重要 GO 条目和碳代谢、氨基酸生物合成、核糖体生成过程、蛋白质加工过程等重要 KEGG 通路。这为下一步继续深入研究细菌与黄曲霉的互作分子机制及生防菌的应用提供了参考。

参考文献

[1] 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 Jiayao, Li Lei, You Haiping, et al. Hazards of aflatoxin and inhibitory effects of plant essential oil on aflatoxin Tianjin agricultural [J]. Tianjin Agricultural Sciences, 2019, 25(7): 61–64.

[2] 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 B_1 污染状况与膳食暴露风险评估[J]. 中国油脂, 2023, 48(7): 67–72.
Dong Wenya, Chen Chen, Zhao Xiulan, et al. Contamination status and dietary exposure assessment of aflatoxin B_1 in peanut and its products sold in Shandong Province [J]. China Oils and Fats, 2023, 48(7): 67–72.

[3] Samuel M S, Mohanraj K, Chandrasekar N, et al. Synthesis of recyclable GO/$Cu_3(BTC)_2$/Fe_3O_4 hybrid nanocomposites with enhanced photocatalytic degradation of aflatoxin B_1 [J]. Chemosphere, 2022, 291: 132684.

[4] 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 Canglu, Liu Tong, Li Wangqiang, et al. Research progress on inhibiyion mechanism of aflatoxins by microorganisms [J]. Journal of Food Science and Technology, 2021, 39(1): 27–36.

[5] 张建梅，李国军，谷巍. 生物脱霉剂对黄曲霉毒素 B_1 的作用研究[J]. 中国饲料, 2009(2): 78.
Zang Jianmei, Li Guojin, Gu Wei. Study on the effect of biological

detoxifying agents on aflatoxin B_1 [J]. China Feed, 2009(2): 78.

[6] 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 Junfeng, Teng Lili, Duan Xiaohui, et al. Screening, identification and characterization of antagonistic bacteria against *Aspergillus flavus* [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2019, 33(6): 1181–1189.

[7] Xia Xiaoshuang, Zhang Ye, Li Mingyan, et al. Isolation and characterization of a *Bacillus subtilis* strain with aflatoxin B_1 biodegradation capability [J]. Food Control, 2017, 75(5): 92–98.

[8] 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 Aifang, He Huan, Gao Ye, *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.

[9] 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 Andong, Dong Feiyan, Wu Nannan, 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

[10] Chang P K, Hua S S T. Nonaflatoxigenic *Aspergillus flavus* TX9-8 competitively prevents aflatoxin accumulation by *A. flavus* isolates of large and small sclerotial morphotypes [J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 114(3): 275–279.

[11] 秦香, 李成伟, 汪浩, 等. 抗黄曲霉的海洋微生物的筛选与鉴定[J]. 轻工科技, 2019, 35(7): 4–5.
Qin Xiang, Li Chengwei, Wang Hao, et al. Screening and identification of marine microorganisms resistant to *Aspergillus flavus* [J]. Light Industry Science and Technology, 2019, 35(7): 4–5.

[12] 金黎明, 权春善, 赵晶, 等.一株拮抗黄曲霉的海洋微生物的筛选与鉴定[J]. 大连民族大学学报, 2019, 21(1): 29–32.
Jin Linming, Quan Chunshan, Zhao Jing, et al. Screening and identification of a marine microorganism against *Aspergillus flavus* [J]. Journal of Dalian Minzu University, 2019, 21(1): 29–32.

[13] 杜瑞焕, 高素艳, 张谊, 等. 花生黄曲霉毒素污染拮抗菌 B25-5 的筛选、鉴定及控制效果[J]. 中国粮油学报, 2018, 33(8): 64–68.
Du Ruihuan, Gao Suyan, Zhang Yi, et al. Screening, identification and control effect of aflatoxin antagonistic bacteria B25-5 in peanut [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2018, 33(8): 64–68.

[14] 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 Yong, Yu Jiguang, Shen Wenfeng, et al. Identification and application of a strain that degrades aflatoxin B_1 and antagonizes *Aspergillus flavus* [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(9): 240–247.

[15] 王明清, 龚魁杰, 于丽娜, 等. 降解呕吐毒素微生物的筛选鉴定及其应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(9): 3449–3454.
Wang Mingqing, Gong Kuijie, Yu Lina, et al. Screening, identification and application of microorganism for degrading deoxynivalenol [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(9): 3449–3454.

[16] Kumar S, Stecher G, Li M, et al. Mega X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms [J]. Molecular Biology and Evolution, 2018, 35(6): 1547–1549.

[17] 王明清, 沈文凤, 穆树旗, 等. 一株降解黄曲霉毒素 B_1、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 Mingqing, Shen Wenfeng, Mu Shuqi, et al. Identification and application of a strain that degrades aflatoxin B_1 and antagonizes *Aspergillus flavus* [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(18): 231–238.

[18] 邱西克, 康彦平, 郭建斌, 等. 花生荚壳抗黄曲霉菌侵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 Xike, Kang Yanping, Guo Jianbin, et al. Method for screening resistance of peanut shell to *Aspergillus flavus* infection and identification of resistant genotypes [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2019, 41(1): 109–114.

[19] 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 Wenfeng, Wang Mingqing, Yu Lina, *et al*. Screening of peanut varieties resistant to *Aspergillus flavus* infection and toxicity [J]. Journal of Peanut Science, 2024, 53(2): 77–82, 90.

[20] Love M, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 [J]. Genome Biology, 2014, 15(12): 550.

[21] Smyth G K. EdgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data [J]. Bioinformatics, 2010, 26(1): 139.

[22] 闫培生, 曹立新, 王凯, 等. 真菌毒素生物防治研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2008, 10(6): 6–19.
Yan Peisheng, Cao Lixin, Wang Kai, et al. Research progress on biological control of mycotoxin contamination [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2008, 10(6): 6–19.

[23] Foster K, Bell T. Competition, not cooperation, dominates interactions among culturable microbial species [J]. Current Biology, 2012, 22(19): 1845–1850.

[24] Barber J N, Sezmis A L, Woods L C, et al. The evolution of coexistence from competition in experimental co-cultures of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Nature Publishing Group, 2021(3), 15: 746–761.

[25] Lankau, Richard A. Rapid evolutionary change and the coexistence of species [J]. Annual Review of Ecology Evolution & Systematics, 2011, 42(1): 335–354.

[26] Pierce E C, Morin M, Little J C, et al. Bacterial-fungal interactions revealed by genome-wide analysis of bacterial mutant fitness [J]. Nature Microbiology, 2021, 6(1): 1-16.

[27] Li Qingyu, Lin Wei, Zhang Xifen, et al. Transcriptomics integrated with metabolomics reveal the competitive relationship between co-cultured *Trichoderma asperellum* HG1 and *Bacillus subtilis* Tpb55 [J]. Microbiological Research, 2024: 280. DOI: 10.1016/j.micres.2023.127598.

[28] Kelleher P, Murphy J, Mahony J, et al. Identification of DNA base modifications by means of pacific biosciences RS sequencing technology [J]. Methods in Molecular biology, 2018, 1681: 127-137. DOI:10.1007/978-1-4939-7343-9_10.

[29] 黄迪, 毛健辉, 王正木, 等. 丛枝菌根真菌响应桉树茄科雷尔氏菌侵染进程基因的筛选与鉴定[J]. 微生物学通报, 2023, 50(2): 815–831.
Huang Di, Mao Jianhui, Wang Zhengmu, et al. Screening and identification of AMF genes in *Eucalyptus grandis* during the infection course of *Ralstonia solanacearum* [J]. Microbiology China, 2023, 50(2): 815–831.

[30] 石鸿辉. 解淀粉芽孢杆菌对玉米中黄曲霉毒素 B_1 的降解效果及其作用机制研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2024: 80–95.
Shi Honghui, Degradation effect and mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* on aflatoxin B_1 in maize [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2024.

[31] Zhang Mou, Gao Xi, Hao Kaiqiang, et al. Transcriptome analysis of *Verticillium lecanii* based on RNA-Seq technology [J]. Journal of Biosafety, 2017, 26(3): 236-243.

(责任编辑: 韩晓红　曹岱琳)