

研究报告

一株扩展青霉拮抗菌的分离、鉴定及抑菌活性物质

付瑞敏^{1,2} 于烽¹ 常慧萍² 张红² 陈五岭^{1*}

(1. 西北大学生命科学学院 陕西 西安 710069)

(2. 河南教育学院生命科学系 河南 郑州 450046)

摘要:【目的】筛选有效抑制扩展青霉(*Penicillium expansum*)的拮抗菌,并鉴定其所产抑菌物质的主要种类及相对含量。【方法】从苹果表面分离到拮抗扩展青霉的菌株 BA-16,经形态学、生理生化及 16S rRNA 基因序列分析对该菌进行鉴定;根据已知脂肽类抗生素合成相关基因序列设计 3 对特异性引物对菌株 BA-16 进行检测,对 PCR 产物克隆、测序和 BLAST 分析,采用酸沉淀法从菌株发酵液中制备出抑菌物质粗提液,对活性粗提物进行 HPLC 和 MALDI-TOF-MS 分析。

【结果】经鉴定,BA-16 被鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*),所得 PCR 产物经测序和 BLAST 分析,证实 BA-16 带有 *sfp* 和 *fenB* 基因。HPLC 和 MS 结果显示菌株发酵液中含有 Fengycin 和 Surfactin 两种脂肽类产物,Fengycin 是拮抗扩展青霉的主要因素。【结论】本研究对于苹果采后青霉病的生物防治具有良好的应用开发前景。

关键词: 扩展青霉,解淀粉芽孢杆菌,丰原素,伊枯草菌素,表面活性素

Isolation, identification and characterization of an antagonistic bacterium against *Penicillium expansum*

FU Rui-Min^{1,2} YU Feng¹ CHANG Hui-Ping² ZHANG Hong² CHEN Wu-Ling^{1*}

(1. College of Life Science, Northwest University, Xi'an, Shaanxi 710069, China)

(2. Population and Life Department, Henan Institute of Education, Zhengzhou, Henan 450046, China)

Abstract: [Objective] In order to obtain an antagonistic strain which can effectively inhibit the growth of *Penicillium expansum* and to identify the antifungal substances produced by this strain. [Methods] The antagonistic strain BA-16 that could inhibit *Penicillium expansum* growth was isolated from apple surface and then identified through phenotypic, physiological, biochemical and phylogenetic (16S

Foundation item: Agricultural Science and Technology Achievements Transformation Fund Project (No. 2012GB2G000451); Science and Technology Plan Project in Henan Province (No. 132102310253); Key Research Project of Colleges and Universities in Henan Province (No. 15B180002); Science and Technology Innovation Project in Shaanxi Province (No. 2009ZKC04-16); Youth Scientific Research Projects in Henan Institute of Education (No. 20100103); Projects of Foundation and Cutting-edge Technology in Henan Province (No. 152300410092)

*Corresponding author: Tel: 86-29-88303700; E-mail: angelaminmin@163.com

Received: September 04, 2015; Accepted: December 16, 2015; Published online (www.cnki.net): December 16, 2015

基金项目: 农业部科技成果与转化项目(No. 2012GB2G000451); 河南省科技计划项目(No. 132102310253); 河南省高等学校重点科研项目(No. 15B180002); 陕西省重大科技创新项目(No. 2009ZKC04-16); 河南教育学院青年科研课题项目(No. 20100103); 河南省基础与前沿技术研究(No. 152300410092)

*通讯作者: Tel: 86-29-88303700; E-mail: angelaminmin@163.com

收稿日期: 2015-09-04; 接受日期: 2015-12-16; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-12-16

rRNA gene) analyses. Three primers were designed on the basis of the relevant genes and PCR was done. After the PCR product was purified and sequenced, the obtained sequences were analyzed by BLAST. The crude anti-fungal extracts were prepared by using acidic precipitation method and the active antagonistic substances were purified and identified by HPLC and MALDI-TOF-MS analysis. **[Results]** The strain BA-16 was identified as *Bacillus amyloliquefaciens*. PCR detection and BLAST analysis revealed that strain BA-16 expressed the *sfp* and *fenB* genes. The HPLC and MS analysis results demonstrated that the fermentation broth of the strain contained fengycin and surfactin. Moreover, fengycin played an important role in inhibiting *Penicillium expansum*. **[Conclusion]** The strain BA-16 will be a potential biological control agent against blue mold decay in apples.

Keywords: *Penicillium expansum*, *Bacillus amyloliquefaciens*, Fengycin, Iturin, Surfactin

随着人们环保意识的不断增强,生物农药越来越多应用于植物病害的防治。其中,芽孢杆菌以其对环境的高度耐受性和具有产生各种多肽类、脂肽类和细菌素等抑菌性物质的特点成为当前生物农药的研究热点。解淀粉芽孢杆菌次生代谢产物有抗菌性脂肽、蛋白或多肽等,不仅可抑制多种植物病原性真菌,而且可促进植物生长和诱导植物抗病性。特别是一些由非核糖体多肽合成酶途径合成的脂肽,主要包括 IturinA、Fengycin 和 SURFACTIN^[1]等,由于其两亲分子的结构特点和非特异性的作用模式使其能够广泛作用于多种病原菌,因此作为新一代抗生素受到关注^[2-3]。如何将这些活性物质分离纯化并制成新型、高效的生物农药,是当前研究的工作重点。

近年来,随着基因组测序工作的全面推进,枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌等菌株的基因组已测序完成,为利用 PCR 技术快速检测同类菌株的抗生素合成基因创造了条件。由扩展青霉(*Penicillium expansum*)^[4]感染苹果所致的青霉病是苹果采摘后导致果实腐烂的重要病害之一,针对该病原菌,本实验室从苹果表面分离出一株可有效抑制苹果青霉病的生防菌 BA-16,结合该菌株的形态、生理生化和分子系统发育等特征对其进行鉴定。为确定该菌株所产的脂肽类型及含量,先利用 NCBI 上已知的脂肽抗生素(Surfactin inturinA fengycin)合成基因(*sfp*, *fenB*, *ituD*)设计引物,以菌株 BA-16 的基因组 DNA 为模板,采用 PCR 技术进行脂肽抗生素合成酶的相关基因检测,然后利用脂肽提取方法制备

出粗提物,并采用 HPLC 和 MALDI-TOF-MS 对粗提物中的脂肽进行纯化和鉴定,以确定脂肽类型,本研究为认识解淀粉芽孢杆菌所产的脂肽类抗生素及其应用于苹果采后的生物防治提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、供试苹果和培养基: 致病菌扩展青霉(*Penicillium expansum*)由陕西省微生物研究所惠赠;供试苹果为红富士(Red Fuji),由陕西洛川县渭北苹果种植园惠赠。YEB 培养基和 PDA 培养基配方参见文献[5];摇瓶发酵培养基配方参见文献[6]。

1.1.2 主要试剂和仪器: Fengycin 和 Surfactin 标准品购于 Sigma 公司;乙腈、三氟乙酸、甲醇等皆为色谱纯,购自 Sigma 公司。Agilent 1100series 高效液相色谱系统购自美国安捷伦公司;液相色谱-电喷雾质谱仪(LC-ESI MS)由 Waters Alliance2690 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司)和 TSQ Quantum Discovery 三级四极杆质谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)组成。

1.2 细菌的分离、筛选

从感染青霉病苹果的表面分离菌株。用无菌水清洗苹果健康部位,将所得液体经 10^{-1} – 10^{-6} 的梯度稀释,将 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 梯度稀释液分别涂布在 YEB 平板上,37 °C 培养 24 h。挑取各平板上的菌株分别进行纯化得到单克隆,将其分别编号以做进一步研究。

以扩展青霉为指示菌,用平板对峙法^[7]对分离菌株进行拮抗能力的筛选。病原菌接种于 PDA 平板中央,待测菌株接种于离指示菌 2.5 cm 处,28 °C 培养 48 h 观察其生长状况,测量抑菌带宽度,实验均重复 3 次,挑取抑菌条带宽的菌株至 YEB 平板上,保存备用。

将初筛所得菌株接种于发酵培养基中,37 °C、150 r/min 振荡培养 72 h。参照 Pathak 等的方法^[8]制备菌株无细胞发酵液,取所制的发酵液 200 μL 接入牛津杯中,采用牛津杯法^[9]检测菌株无细胞发酵液拮抗扩展青霉的能力。28 °C 培养 24 h 后测量抑菌圈直径,挑选直径最大的菌株做进一步研究。整个实验以无菌水作为对照,实验均重复 3 次。

1.3 菌株的形态学与生理生化鉴定

将复筛所选菌株经染色、光学显微镜观察菌体个体及群体形态,生理生化反应参照《微生物学实验指导》^[10-11]。

1.4 16S rRNA 基因序列分析

使用上海生工有限公司的细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒提取所筛菌株的基因组 DNA,以其为模板,参考文献^[12]进行 16S rRNA 基因的 PCR 扩增,扩增引物见表 1。PCR 反应体系(25 μL):50 mg/L 模板 1 μL,10 μmol/L 上下游引物各 0.5 μL,*Pfu* PCR MasterMix 12.5 μL,双蒸水 10.5 μL。反应条件:94 °C 3 min;94 °C 1 min,55 °C 1 min,72 °C 2 min,

30 个循环;72 °C 10 min。目的片段经 Sanprep 柱式 PCR 试剂盒(上海生工生物工程有限公司)纯化后,提交至上海生工进行序列测定。用 BLAST 程序将所得序列结果与 GenBank 相关菌种的 16S rRNA 基因序列进行比对分析,利用 MEGA 4.1 构建系统发育树^[13]。

1.5 脂肽类抗生素合成酶相关基因的克隆

1.5.1 引物设计:以菌株的基因组 DNA 为模板进行 PCR,扩增引物见表 1,PCR 反应体系(25 μL):50 mg/L 模板 1 μL,10 μmol/L 上下游引物各 0.5 μL,*Pfu* PCR MasterMix 12.5 μL,双蒸水 10.5 μL。反应条件如下:

扩增 *sfp* 的条件:94 °C 5 min;94 °C 1 min,48 °C 30 s,72 °C 1 min,30 个循环;72 °C 10 min。

扩增 *fenB* 的条件:94 °C 5 min;94 °C 1 min,55 °C 30 s,72 °C 2 min,30 个循环;72 °C 10 min。

扩增 *ItuD* 的条件:94 °C 5 min;94 °C 1 min,58 °C 30 s,72 °C 2 min,30 个循环;72 °C 10 min。

所得 PCR 目的条带经 Sanprep 柱式 PCR 试剂盒(上海生工生物工程有限公司)纯化。

1.5.2 克隆测序:将 PCR 产物回收连接到克隆载体 pGM-T 上,转化 *E. coli* J108,蓝白斑筛选挑取阳性克隆,将之提交至上海生工测序。

1.5.3 序列分析:所得序列提交至 NCBI 并采用 BLAST 与 GenBank 的数据进行同源性分析。

1.6 菌株 BA-16 代谢产物粗提液制备

将培养 24 h 的菌株发酵液于常温下 8 000 r/min 离心 20 min,弃沉淀,将所得上清液置于无菌锥形瓶中,用浓度为 7 mol/L 的 HCl 将其 pH 调整至 2.0,无菌条件下分装至 10 mL 的无菌离心管中(每管 10 mL),4 °C 过夜,10 000 r/min 离心 20 min,取沉淀,在沉淀中加入 0.5 mL 的中性甲醇溶液,以此方法操作 2 次,将所得萃取液合并,并将其浓缩至 5 倍浓度,经 0.2 μm 滤膜过滤后即为粗提液。

1.7 脂肽类抗生素的分离、纯化和鉴定

1.7.1 HPLC 分离纯化脂肽类抗生素:采用的

表 1 用于扩增 16S rRNA、*sfp*、*ItuD*、*fenB* 基因的引物

Table 1 Primers for amplification of 16S rRNA, *sfp*, *ItuD* and *fenB* gene

基因 Gene	引物序列 Primers sequence (5'→3')	长度 Size (bp)
16S rRNA	AGAGTTTGATCATGGCTCAG CTACGGTTACCTTGTACGAC	1 468
<i>sfp</i>	ATGAAGTTTACGGAATTTA TTATAAAAGCTCTTCGTACG	675
<i>fenB</i>	CTATAGTTTGTTGACGGCTC CAGCACTGGTTCTTGTGCGCA	1 400
<i>ItuD</i>	ATGACAATCTTGCCTTTTTA TATTTTAAAATCCGCAATT	1 203

表2 高效液相色谱洗脱条件
Table 2 The eluting solution of HPLC

时间 Time (min)	表面活性素 Surfactin			丰原素 Fengycin		
	乙腈 (0.1%三氟乙酸) Acetonitrile (0.1% TFA)	水 (0.1%三氟乙酸) Water (0.1% TFA)	流速 Flow rate (mL/min)	乙腈(0.1%三氟乙酸) Acetonitrile (0.1% TFA)	水 (0.1%三氟乙酸) Water (0.1% TFA)	流速 Flow rate (mL/min)
0	20	80	0.8	60	40	1
5	50	50	0.8	60	40	1
15	65	35	0.8	90	10	1
25	65	35	0.8	90	10	1

HPLC 分析系统为 Agilent HPLC 1200series, 色谱柱为 ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈; 检测波长为 280 nm, 柱温为 30 °C, 进样量 10 μL, 采用等梯度洗脱进行样品分析, 洗脱条件如表 2 所示。

1.7.2 抗菌性脂肽拮抗扩展青霉活性检测: 扩展青霉转接至 PDA 平板上, 30 °C 培养 3 d, 用规格为 6 mm 的打孔器在病原菌菌丝上打孔, 得到直径为 6 mm 的菌饼, 将其接种于 PDA 平板中央, 距菌饼 3 cm 处放置牛津杯, 牛津杯中加入 10 μL 经 HPLC 分离纯化得到的抗菌脂肽, 以中性甲醇为对照, 30 °C 培养 5 d, 观察抑菌圈形成情况。

1.7.3 MALD-TOF-MS 鉴定: 质谱鉴定所用质谱仪为 Voyager DE-STR MALDI TOF/TOF 串联飞行时间质谱, 采用正离子模式, 扫描范围 100–2 000 *m/z*, 毛细管电压为 3.5 kV, 离子源加速电压为 20 kV, 激光波长 337 nm, 激光频率 200 Hz。

2 结果与分析

2.1 扩展青霉拮抗菌株的分离和筛选

经过初筛从苹果表面分离获得 18 株菌, 其中酵母 4 株, 细菌 14 株。通过平板对峙实验, 筛选出可拮抗扩展青霉的 6 株。采用牛津杯法检测 6 株菌的无细胞发酵液抗扩展青霉活性, 结果如表 3 所示。结果表明: 6 株菌的菌株细胞和无细胞发酵液拮抗扩展青霉的效果表现出了显著的差异。其中, BA-16 的拮抗效果最强, 因此将其挑选出来做后续研究。

2.2 扩展青霉拮抗菌株的形态学与生理生化鉴定

菌株 BA-16 经革兰氏染色阳性, 显微镜镜检为杆菌, 有芽孢, 有荚膜, 具有运动性。该菌株在 LB 平板上形成乳白色菌落。菌落边缘不整齐, 干燥不透明, 中间有突起。生理生化结果见表 4。

表3 扩展青霉拮抗菌筛选结果
Table 3 The screening results of antagonistic strains against *Penicillium expansum*

菌株 Strain	抑菌带宽 Width of inhibition band (mm)	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone (mm)
BA-3	4.196±0.025	3.338±0.026
BA-6	4.980±0.035	4.013±0.028
BA-8	5.980±0.016	4.580±0.023
BA-12	6.650±0.033	5.380±0.024
BA-17	6.880±0.003	5.560±0.002
BA-16	7.050±0.016	5.880±0.036

表4 菌株 BA-16 的生理生化特性
Table 4 Physiological and biochemical characteristic of strain BA-16

项目 Items	结果 Results	项目 Items	结果 Results
Anaerobic growth	+	2% NaCl	+
Gelatin hydrolysis	+	7% NaCl	-
Amylohydrolysis	+	30 °C	+
Citrate utilization	-	50 °C	-
Tyrosine reaction	-	D-glucose	+
V-P test	+	Maltose	+
Indole test	+	Mannitol	+

Note: +: Positive; -: Negative.

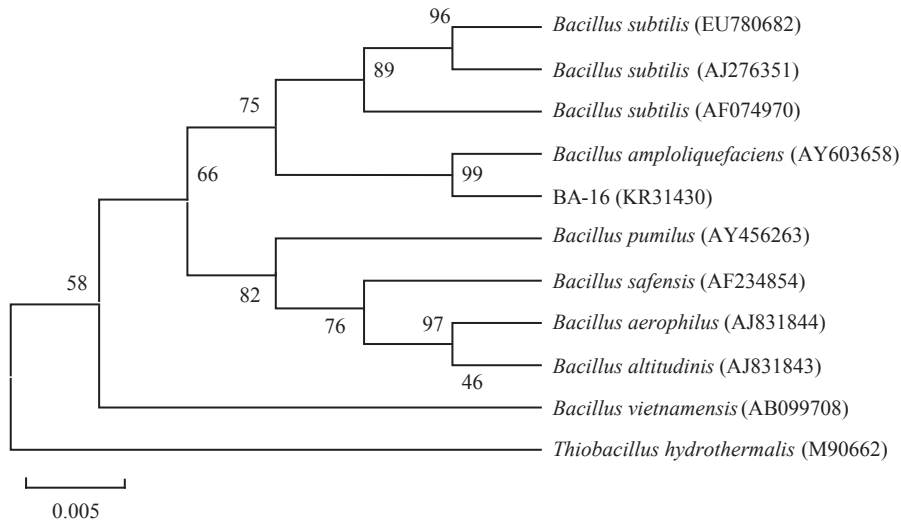


图1 菌株 BA-16 16SrRNA 基因序列发育进化树

Figure 1 Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences of isolated strain BA-16

注: 参与比对的序列的 GenBank 登录号列于括号中, 分支处标注有自展值, 标尺所示长度为 0.005 核苷酸置换率。

Note: The GenBank accession number of aligned sequences are shown in the brackets. The bootstrap value are shown at the node. Bar 0.005 means the nucleotide substitution rate of 0.005.

结合菌株 BA-16 的形态、染色及生理生化特征, 将该菌株初步鉴定为 *Bacillus* sp.。

2.3 16S rRNA 基因序列分析

提取菌株 BA-16 的总 DNA 进行 PCR 扩增, 凝胶电泳回收扩增序列, 得到一段 1 468 bp 长度的 16S rRNA 基因, 所获序列提交至 GenBank (登录号 KR31430)。将其同 GenBank 中相近种属进行 BLAST, 对 BLAST 结果进行分析, 通过 MEGA 4.1 软件构建系统发育树(图 1)。发现菌株 BA-16 与 *Bacillus amyloliquefaciens* AY603658 的相似性达到 99%, 综合形态学特征及生理生化鉴定结果, BA-16 被鉴定为 *Bacillus amyloliquefaciens*。

2.4 脂肽类抗生素合成相关基因序列分析

以所筛菌株 BA-16 的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 发现可得到两条大约为 675 bp 和 1 400 bp 的目的条带(图 2), 初步确认为 *sfp* 基因和 *fenB* 基因, 将 PCR 产物纯化测序后提交至 NCBI 进行相关序列的 BLAST 同源性分析, 结果显示与 GenBank 公布的相关基因相似性高达 99%, 可确定菌株 BA-16 具

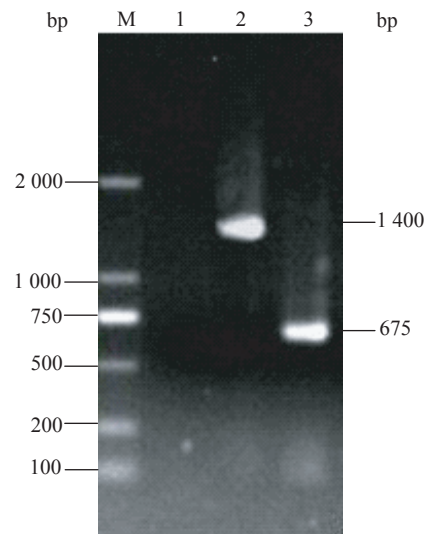


图2 脂肽类相关基因的 PCR 检测

Figure 2 PCR detection of lipopeptide related genes

注: M: DNA Marker; 1: *ItuD* 基因; 2: *fenB* 基因; 3: *sfp* 基因。

Note: M: DNA marker (Sangong) in base pairs of DL2000; 1: *ItuD* gene; 2: *fenB* gene; 3: *sfp* gene.

有 *sfp* 和 *fenB* 基因,因此推测该菌株可产生 Fengycin 和 Surfactin 两种脂肽类抗生素。

2.5 HPLC 分析

粗提液经 HPLC 分离纯化后,所得片段如图 3、4 所示,发现 Surfactin 标样在保留时间 13.683、15.776、17.741 和 21.363 min 处出现了特征峰(图 3A)。同一洗脱条件下,所测样品其 Surfactin 特征峰出现在 13.690 min 和 17.781 min (图 3B),保留时间在标准峰附近,推测是 Surfactin 的同系物; Fengycin 标样在保留时间 20.717 min, 33.665 min 和 41.260 min 处出现了特征峰(图 4A); 同一洗脱

条件下,所测样品其 Fengycin 的特征峰出现在 20.767 min 和 40.880 min (图 4B),这些峰也在标准峰附近,说明粗提液中也含有 Fengycin。

2.6 HPLC 分离纯化蛋白抗扩展青霉效果评价

将 HPLC 纯化得到的 Surfactin 和 Fengycin 分别采用牛津杯方法^[9]检测其对扩展青霉的抑制效果,所得结果如表 5 所示, Fengycin 对扩展青霉展现了明显的抑菌效果,与之相反的是, Surfactin 对扩展青霉几乎无抑制作用,推测在解淀粉芽孢杆菌抑制扩展青霉的过程中起主要作用的是脂肽类蛋白 Fengycin。

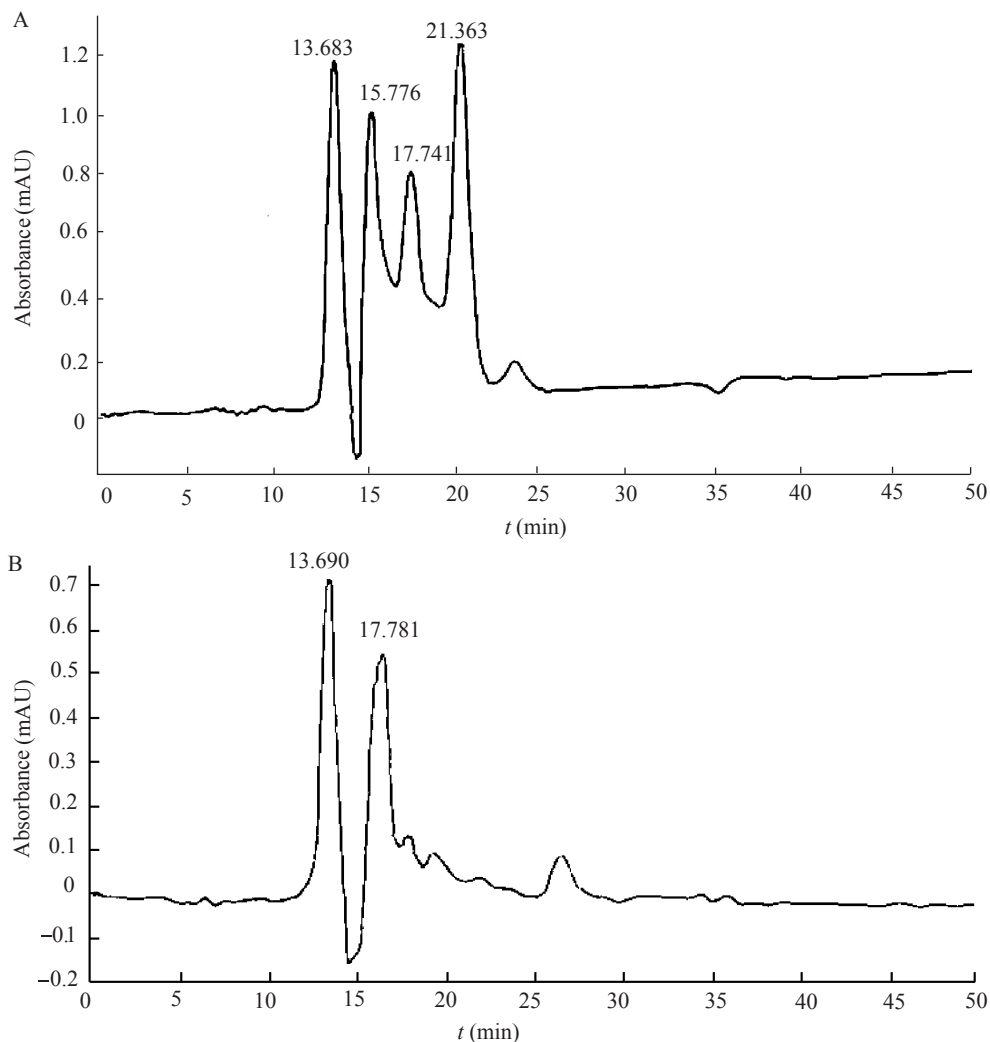


图 3 Surfactin 标准品(A)和供试样本 Surfactin (B)的 HPLC 色谱图温度-活力曲线图
 Figure 3 HPLC spectra of standard surfactin (A) and test sample surfactin (B)

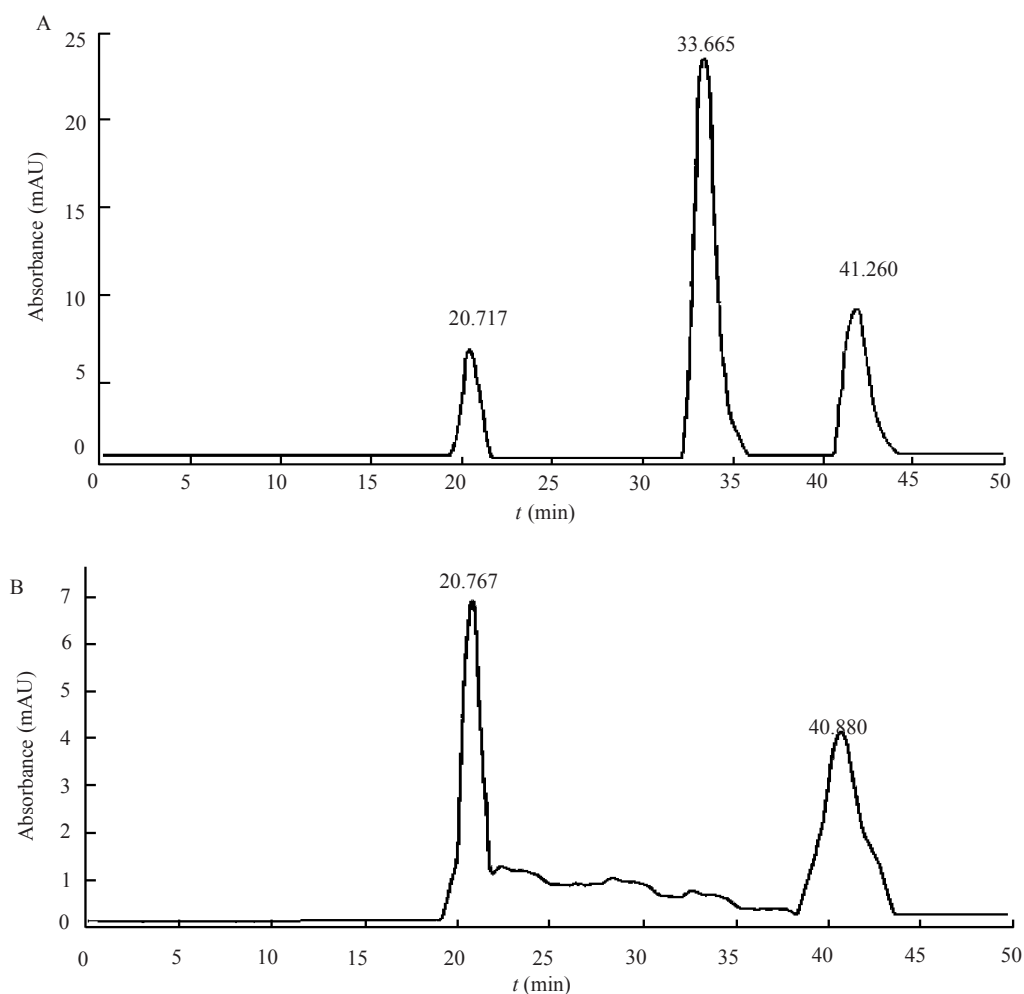


图4 Fengycin 标准品(A)和供试样本 Fengycin (B)的 HPLC 色谱
Figure 4 HPLC spectra of standard Fengycin (A) and test sample Fengycin (B)

表5 菌株 BA-16 脂肽蛋白抗扩展青霉效果
Table 5 Antagonistic effect of fractions from BA-16 against *Penicillium expansum*

组别 Group	抑菌圈直径 Inhibition zone (mm)	
	表面活性素 Surfactin	丰原素 Fengycin
Treatment group	0.10±0.12	4.68±0.08
Control group	0	0

2.7 MALD-TOF-MS 鉴定

经飞行时间质谱检测分析, 获得了粗提液中各脂肽产物同系物的分子量, 所得结果如表 6 所示。质谱图显示出 2 个系列的离子峰(图 5), 图 5A 显示了 Surfactin 家族同系物, 其 $[M+H]^+$ 、 $[M+Na]^+$ 和 $[M+K]^+$ 离子如表 6 所示, 所得 Surfactin 分别为 C13-Surfactin 和 C15-Surfactin, 且第 7 位氨基酸为 Leu; 图 5B 显示了 Fengycin 家族同系物, 其 $[M+H]^+$ 和

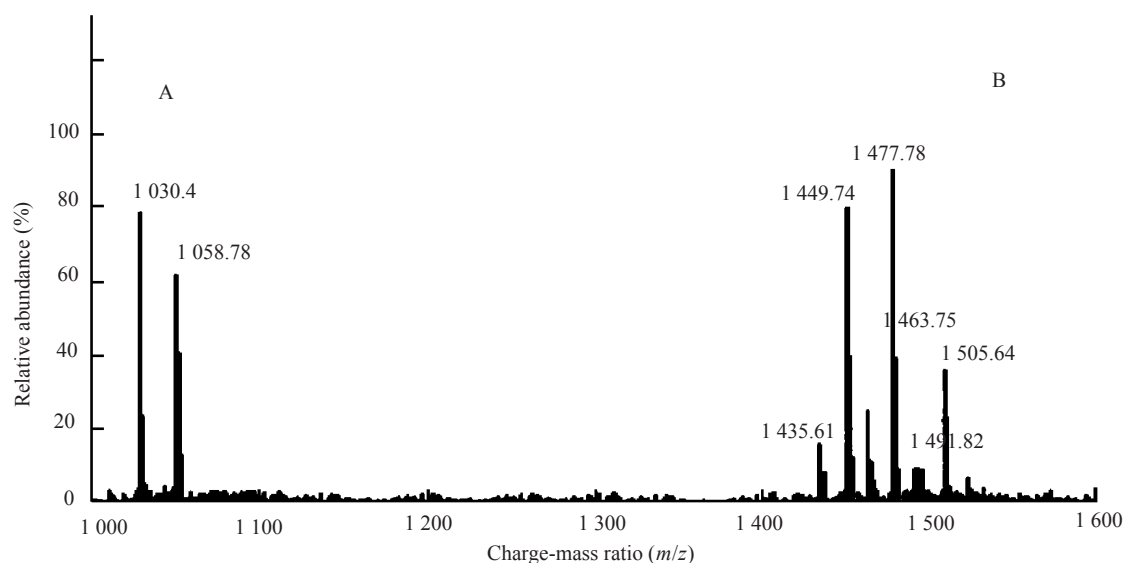


图5 拮抗菌株 BA-16 发酵液中抗菌脂肽的质谱图

Figure 5 MS spectra of lipopeptides of BA-16

表6 拮抗菌株 BA-16 发酵液中抗菌脂肽的质谱分析结果

Table 6 Mass spectrometric analysis of antifungal compounds from the cell-free supernatants of BA-16

片段 Fraction	实测荷质比 Experimental charge-mass ratio (m/z)	理论荷质比 Theoretical charge-mass ratio (m/z)	强度 Intensity (%)	结构判断 Structure assignment
Surfactin	1 030.54	1 030.40	32	C13-Surfactin, [M+Na] ⁺
	1 058.78	1 058.88	36	C15-Surfactin, [M+Na] ⁺
	1 435.61	1 435.58	28	C14-FengycinA, [M+Na] ⁺
Fengycin	1 449.74	1 449.74	74	C15-FengycinA, [M+Na] ⁺
	1 463.75	1 463.78	50	C16-FengycinA, [M+H] ⁺
	1 477.78	1 477.82	56	C17-FengycinA, [M+H] ⁺
	1 491.82	1 491.83	58	C16-FengycinB, [M+H] ⁺
	1 505.64	1 505.65	40	C17-FengycinB, [M+H] ⁺

[M+Na]⁺和[M+K]⁺离子如表6所示, 所得Fengycin分别为C14-FengycinA、C15-FengycinA、C16-FengycinA和C17-FengycinA, 这些Fengycin其第6位氨基酸为丙氨酸, C16-FengycinB和C17-FengycinB这些Fengycin其第6位氨基酸为缬氨酸。结合PCR检测结果、HPLC和质谱检测, 所得发酵液抗菌性脂肽提取物中含有Fengycin和Surfactin。

3 讨论

由于传统农药的广泛应用, 不仅污染环境和损害人类身体健康, 而且还容易使许多病原菌产生抗药性。抗菌脂肽作为生物农药, 不仅没有二次污染, 其非特异性的抗菌机制也可避免病菌抗药性的产生, 在植物的病害防治中展现了巨大优势^[14-16]。

本研究筛选出可有效拮抗扩展青霉的菌株BA-16, 该菌株被鉴定为解淀粉芽孢杆菌。在此基

础上进行了抗菌物质的分离、鉴定和抑菌机制的初步探讨。以分子生物学技术为辅助手段, 首先通过基因检测推测拮抗菌代谢产物中可能存在的活性物质; 然后利用 HPLC 技术对其进行分离、纯化和抑菌性能的初步鉴定; 最后通过质谱检测获得了脂肽类产物的精确分子量。综合分析基因检测、HPLC 和质谱鉴定的结果^[17-18], 发现扩展青霉拮抗菌 BA-16 可代谢产生 Surfactin 和 Fengycin 两类脂肽类抗生素, 这与关于解淀粉芽孢杆菌可以产生脂肽类抗生素的多数报道相符^[19]。

通过对比 Surfactin 和 Fengycin 两类脂肽类抗生素对扩展青霉的抑制效果, 发现抑制扩展青霉活性的脂肽主要是 Fengycin。Fengycin 是由一条 β -羟基脂肪酸链和一个 10 肽所形成的内酯环, 它可作用于丝状真菌的磷脂双分子层, 改变其细胞膜的通透性, 从而显著抑制其活性^[19-21]。虽然当前鲜有针对 Fengycin 的抗菌机制研究, 但根据报道, IturinA 与 Fengycin 同属于脂肽类抗生素, 其抑菌活性主要源于其肽环氨基酸以及脂肪酸碳链的变化, 例如通过结合到病菌细胞膜上, 从而改变后者的通透性; 或者通过肽环上的极性氨基酸嵌合到病菌核酸分子上从而影响后者的正常表达等^[22-24]。由于 Fengycin 与 IturinA 在结构上具有很大的相似性, 因此上述有关 IturinA 的抑菌机制为探讨 Fengycin 的抗菌原理提供了参考依据^[24]。根据 Fengycin 6 号位置氨基酸的不同将其分为 FengycinA 和 FengycinB 两种类型, 本研究中通过质谱检测分析发现菌株 BA-16 可代谢产生多种 Fengycin 同系物, 其类型涵盖 A、B 两种类型。此外, HPLC 纯化物质抑菌试验结果表明, Surfactin 对扩展青霉的抑制效果不明显, Fengycin 可能是菌株 BA-16 拮抗扩展青霉的主要物质, 这有待于进一步的实验研究。

参 考 文 献

- [1] Kim PI, Ryu J, Kim YH, et al. Production of biosurfactant lipopeptides Iturin A, fengycin and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 20(1): 138-145
- [2] Ongena M, Jourdan E, Adam A, et al. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants[J]. Environmental microbiology, 2007, 9(4): 1084-1090
- [3] Romero D, de Vicente A, Rakotoaly RH, et al. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2007, 20(4): 430-440
- [4] Waewthongrak W, Pisuchpen S, Leelasuphakul W. Effect of *Bacillus subtilis* and chitosan applications on green mold (*Penicillium digitatum* Sacc.) decay in citrus fruit[J]. Postharvest Biology and Technology, 2015, 99: 44-49
- [5] Afsharmanesh H, Ahmadzadeh M, Javan-Nikkhah M, et al. Improvement in biocontrol activity of *Bacillus subtilis* UTB1 against *Aspergillus flavus* using gamma-irradiation[J]. Crop Protection, 2014, 60: 83-92
- [6] Wang Y, Lu ZX, Bie XM, et al. Separation and extraction of antimicrobial lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2 with macroporous resin[J]. European Food Research and Technology, 2010, 231(2): 189-196
- [7] Bonaterra A, Badosa E, Cabrefiga J, et al. Prospects and limitations of microbial pesticides for control of bacterial and fungal pomefruit tree diseases[J]. Trees, 2012, 26(1): 215-226
- [8] Pathak KV, Keharia H, Gupta K, et al. Lipopeptides from the banyan endophyte, *Bacillus subtilis* K1: mass spectrometric characterization of a library of fengycins[J]. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2012, 23(10): 1716-1728
- [9] Han XY, Chen ZH, Luo DQ, et al. Study on antimicrobial activity and stability of bioactive metabolite produced by tpb55 strain fermentation[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(27): 260-264 (in Chinese)
韩欣宇, 陈志厚, 罗定棋, 等. Tpb55菌株发酵液中活性代谢产物的抑菌作用及稳定性测定[J]. 中国农学通报, 2012, 28(27): 260-264
- [10] Wei W, Li SY, Wang MJ, et al. Probiotic lactic acid bacteria to fluoroquinolones sensitivity detection method[J]. Food Science and Technology, 2013, 38(3): 22-26 (in Chinese)
韦婉, 李少英, 王梦姣, 等. 益生乳酸菌对氟喹诺酮类药物的敏感性检测方法的研究[J]. 食品科技, 2013, 38(3): 22-26
- [11] Huang WF, Zhang S. Microbiology Experiment Instruction[M]. Guangzhou: Ji'nan University Press, 2013: 122-124 (in Chinese)
黄文芳, 张松. 微生物学实验指导[M]. 广州: 暨南大学出版社, 2003: 122-124
- [12] Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, et al. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2008, 14(10): 908-934
- [13] Du ML, Fu RM, Gu YN, et al. Isolation, identification and breeding of petroleum-degrading bacteria in oilfield produced water by UV-plasma complex mutagenesis[J]. Microbiology China, 2015, 42(6): 1001-1009 (in Chinese)
杜茂林, 付瑞敏, 谷亚楠, 等. 油田采出水石油降解菌分离、鉴定及高通量选育复合诱变菌株[J]. 微生物学通报, 2015, 42(6): 1001-1009
- [14] Caldeira AT, Arteiro JMS, Coelho AV, et al. Combined use of LC-ESI-MS and antifungal tests for rapid identification of bioactive lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CCMI 1051[J]. Process Biochemistry, 2011, 46(9): 1738-1746
- [15] Zhou XH, Lu ZX, LüFX, et al. Antagonistic action of *Bacillus subtilis* strain fmbj on the postharvest pathogen *Rhizopus stolonifer*[J]. Journal of Food Science, 2011, 76(5): M254-M259
- [16] Yáñez-Mendizábal V, Usall J, Viñas I, et al. Potential of a new strain of *Bacillus subtilis* CPA-8 to control the major postharvest diseases of fruit[J]. Biocontrol Science and Technology, 2011, 21(4): 409-426
- [17] Chen H, Chen ZJ, Zhang YJ, et al. Identification of Antifungal

- Peptides from *Bacillus subtilis* BS-918[J]. Analytical Letters, 2014, 47(18): 2891-2899
- [18] Yu SM, Oh BT, Lee YH. Biocontrol of green and blue molds in postharvest satsuma mandarin using *Bacillus amyloliquefaciens* JBC36[J]. Biocontrol Science and Technology, 2012, 22(10): 1181-1197
- [19] Tanaka K, Ishihara A, Nakajima H. Isolation of anteiso-C17, iso-C17, iso-C16, and iso-C15 Bacillomycin D from *Bacillus amyloliquefaciens* SD-32 and Their Antifungal Activities against Plant Pathogens[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(7): 1469-1476
- [20] Deng Y, Lu ZX, Lu FX, et al. Study on an antimicrobial protein produced by *Paenibacillus polymyxa* JSa-9 isolated from soil[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 27(8): 1803-1807
- [21] Zamani-Zadeh M, Soleimani-Zad S, Sheikh-Zeinoddin M, et al. Integration of *Lactobacillus plantarum* A7 with thyme and cumin essential oils as a potential biocontrol tool for gray mold rot on strawberry fruit[J]. Postharvest Biology and Technology, 2014, 92: 149-156
- [22] Pandya U, Saraf M. *In vitro* evaluation of PGPR strains for their biocontrol potential against fungal pathogens[M]//Kharwar RN, Upadhyay RS, Dubey NK, et al. Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security. India: Springer, 2014.: 293-305
- [23] Guilhabert-Goya M, Margolis JS. Synergistic combinations of polyene fungicides and non-ribosomal peptides and related methods of use: US, 8623813 [P]. 2014-07-01
- [24] Lee GW, Ko JA, Oh BT, et al. Biological control of postharvest diseases of apples, peaches and nectarines by *Bacillus subtilis* S16 isolated from halophytes rhizosphere[J]. Biocontrol Science and Technology, 2012, 22(3): 351-361

2016 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(2-1)

序号	会议名称	主办/协办单位	时间	人数	地点	联系方式
1	鼠疫菌生态与遗传研讨会	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	3 月	100	北京	
2	2016 年全国微生物毒素与急危重症学术会议	中国微生物学会微生物毒素专业委员会	4 月	400	上海	陈德昌 13901674318
3	生物过程优化与放大研讨会	中国微生物学会生化工程模型化与控制专业委员会	4 月	260	湖北宜昌	尤舸浩 13908607687
4	第四届全国食用昆虫与微生物转化废弃物及高效利用研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	5 月 13-15 日	120	湖北武汉	吴悦 027-87287254
5	第二届噬菌体学术研讨会	中国微生物学会医学微生物学与免疫学专业委员会	5 月	150	湖北武汉	童贻刚 133611272813
6	第二届合成微生物学与生物制造学术研讨会	中国微生物学会分子微生物学与生物工程专业委员会	6 月	200	浙江杭州	李永泉 13735591622
7	第七届传染病基础与技术论坛	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	6 月	400	待定	吕相征 lvxz@cma.org.cn
8	酿造食品的营养化学学术研讨会	中国微生物学会酿造分会	6 月	120	浙江杭州	张秀梅 13503213265
9	第十届全国海洋生物技术与创新药物学术讨论会	中国微生物学会海洋微生物学专业委员会	8 月	250	江苏南京	王梁华 13386271017
10	工业企业微生物安全控制技术与实践研讨会	中国微生物学会工业微生物学专业委员会	8 月	200	北京	010-53218310
11	第八届全国微生物资源学术暨国家微生物资源平台运行服务研讨会	中国微生物学会微生物资源专业委员会	8 月 22-25 日	400	内蒙古 呼和浩特	阮志勇 13001101231
12	第二届真菌感染与宿主免疫学术研讨会	中国微生物学会真菌学专业委员会	9 月	200	浙江宁波	李祥 13811495603