

彭雯杰, 詹伊婧, 雷 鹏, 等. 阿斯青霉菌 XK-12 产铁载体特性及其抑菌活性[J]. 江苏农业学报, 2022, 38(1): 73-80.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2022.01.008

阿斯青霉菌 XK-12 产铁载体特性及其抑菌活性

彭雯杰, 詹伊婧, 雷 鹏, 孙 涛, 钱家熠, 徐 虹

(南京工业大学食品与轻工学院, 江苏 南京 211816)

摘要: 对从健康草莓根际中分离出一株阿斯青霉菌 XK-12(*Penicilium asturianum*), 进行了产铁载体的定性和定量分析, 鉴定其所产铁载体为羟肟酸型铁载体。并对 XK-12 产铁载体发酵条件进行了优化, 利用其发酵液测定了铁载体对病原菌的抑制效果。结果表明, 阿斯青霉菌 XK-12 产铁载体的最佳发酵条件为: 3.0% NH_4Cl 为氮源, 2.0% 葡萄糖为碳源, 添加 0.10% L-鸟氨酸盐酸盐, 培养基中不含 Fe^{3+} , 初始 pH 6.0, 温度 28 $^{\circ}\text{C}$, 250 ml 培养瓶装液量为 70 ml, 发酵周期为 168 h; 在此条件下, XK-12 产铁载体最高能达到 0.173 mg/ml。在添加 20% (体积分数) XK-12 铁载体发酵液条件下, XK-12 铁载体发酵液对草莓根腐病原菌葡萄座腔菌(*Neofusicoccum kwambonambiense* XKD-1)的抑制率达到了 100%。

关键词: 阿斯青霉; 铁载体; 发酵优化; 拮抗作用

中图分类号: S482.2⁺92

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2022)01-0073-08

Characteristics of siderophores production by *Penicilium asturianum* XK-12 and its effect on antibacterial activity

PENG Wen-jie, ZHAN Yi-jing, LEI Peng, SUN Tao, QIAN Jia-yi, XU Hong

(College of Food Science and Light Industry, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China)

Abstract: The qualitative and quantitative analyses of siderophores production were carried out on *Penicilium asturianum* XK-12 isolated from healthy strawberry rhizosphere. The siderophores produced by XK-12 were identified as hydroxamic acid-type siderophores, and the conditions for producing siderophores were optimized. Finally, the fermentation broth of XK-12 was used to determine the inhibitory effect of siderophores on a pathogen. The results showed that the best fermentation conditions for siderophores production by XK-12 were as follows: 3.0% NH_4Cl was used as nitrogen source, 2.0% glucose was used as carbon source, 0.10% of L-ornithine hydrochloride was added, there was no Fe^{3+} in the medium, the initial pH was 6.0, the temperature was 28 $^{\circ}\text{C}$, the liquid volume in 250 ml flask was 70 ml, and the fermentation period was 168 h. Under these conditions, 0.173 mg/ml siderophores could be obtained. Under the condition of adding 20% (volume fraction) XK-12 fermentation broth, the inhibition rate of fermentation broth on strawberry root rot pathogen *Neofusicoccum kwambonambiense* was 100%.

Key words: *Penicilium asturianum*; siderophore; fermentation optimization; antagonism

铁(Fe)是一种重要的植物营养元素,大多数细胞的代谢过程中都有它的参与,在植物生长过程中

发挥着重要作用,主要参与了植物的呼吸作用、光合作用、氮固定以及 DNA 合成等^[1]。铁在地壳中的含量丰富,在所有元素中处于第 4 位,在多数土壤中铁的含量非常丰富,但大部分铁都以水解后形成的 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 形式存在,而植物无法直接吸收和利用这些铁^[2-3]。大部分的细菌和真菌都可以分泌铁载体,微生物铁载体对 Fe^{3+} 具有极高亲和力,能协助植物

收稿日期:2021-04-28

基金项目:江苏省重点研发计划(现代农业)项目(BE2019390)

作者简介:彭雯杰(1996-),女,湖北宜昌人,硕士,主要从事农业微生物研究。(E-mail) pwj@njtech.edu.cn

通讯作者:徐 虹, (E-mail) xuh@njtech.edu.cn

从土壤环境中获取并利用铁,为植物的生长提供有力保障^[4]。铁载体结构多样,按特征基团来分可以大致分为 4 种类型^[5]。细菌铁载体的结构多样,但真菌铁载体大多为异羟肟酸型,它们大多拥有相似的生物合成途径,且真菌异羟肟酸型铁载体是以 N^{δ} -酰基- N^{δ} -羟基-鸟氨酸为基本单位组成的^[6]。这些真菌和细菌能够通过分泌铁载体来螯合土壤中的铁元素,形成 Fe-铁载体螯合物来供给自身生长,还可以与植物病原菌竞争生存必要的铁元素来抑制病原菌的生长^[7-9]。目前国内外对铁载体的应用研究主要集中在农业、渔业、重金属修复、核燃料后处理、纸浆漂白、生物传感等方面^[10-13]。

本试验以前期从健康草莓根际中筛选得到的一株产铁载体的植物生防真菌阿斯青霉菌 XK-12 为试验菌株,对所产铁载体类型进行鉴定,对其产铁载体的培养条件进行优化,最后用优化后的除菌发酵液考察对病原菌的拮抗效果,为植物病害防治产品的研发提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 分离自草莓健康植株根际的阿斯青霉菌 (*Penicillium asturianum*) XK-12 以及草莓根腐病原菌葡萄座腔菌 (*Neofusicoccum kwambonambiense* XKD-1) 均保存于南京工业大学材料化工国家重点实验室。

1.1.2 培养基的配制 发酵培养基: NH_4Cl 0.250 0 g, 蔗糖 25.000 0 g, 柠檬酸 1.000 0 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.125 0 g, KH_2PO_4 0.075 0 g, MgSO_4 0.080 0 g, CaCl_2 0.002 0 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.590 5 g, pH 6.8, 1 000 ml 水, 115 °C 灭菌 20 min。配制铬天青 (CAS) 检测液^[14]。将配好的 CAS 检测液转入试剂瓶并用锡纸包裹, 121 °C 灭菌 15 min, 避光保存。配制产铁载体琼脂培养基, 灭菌后待培养基温度降至 60 °C 以下, 吸取已灭菌的 CAS 检测液以 5% 的比例缓慢加入到产铁载体培养基中, 轻轻晃匀, 避免产生气泡, 再倒平板, 待冷却凝固后使用。

1.1.3 主要试剂 L -鸟氨酸盐酸盐, Acros 公司产品; L -天冬氨酸, 上海源叶生物公司产品; L -谷氨酸, 上海源叶生物公司产品; 氯化铁, 上海麦克林生化科技有限公司产品; 高氯酸, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司产品; 甲磺酸去铁胺, 上海源叶生物公司产

品; 铬天青 S, Sigma 公司产品。

1.1.4 主要仪器 紫外可见分光光度计, 上海棱光技术有限公司产品; 立式压力蒸汽灭菌锅, 上海申安医疗器械厂产品; 精密 pH 计, 上海雷磁仪器厂产品; 隔水式恒温培养箱, 上海善治仪器设备有限公司产品; 标准型净化工作台, 苏州净化设备厂产品; 回转恒温摇床, 上海第一自动化设备公司产品。

1.2 菌株产铁载体的定性分析

CAS 法^[15]确定 XK-12 是否能产铁载体。

1.3 菌株产铁载体的定量分析

通过 Arnow's 法^[16]、高氯酸铁分光光度法^[17]、分光光度法^[18]对铁载体的类型进行初步判断并定量分析。

1.3.1 甲磺酸去铁胺标准曲线制作 配制 5 mmol/L FeCl_3 -0.1 mol/L HClO_4 (pH 2) 溶液: 称取 0.811 g FeCl_3 于 1 L 去离子水中溶解, 加入 8.58 ml HClO_4 , 调 pH 为 2, 避光保存。取 0.5 ml 阿斯青霉菌 XK-12 除菌发酵液 (过 0.22 μm 膜) 与 2.5 ml 5 mmol/L FeCl_3 -0.1 mol/L HClO_4 (pH 2) 溶液混合, 静置显色 30 min, 以发酵培养基为空白对照, 进行全波长扫描, 确定最大吸收波长 (OD_{\max})。称取 1.0 mg 甲磺酸去铁胺 (Deferoxamine) 标准品, 溶于 1.0 ml 去离子水中, 将其稀释成 7 个质量浓度梯度 (0 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.10 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.50 mg/ml, 0.75 mg/ml, 1.00 mg/ml)。取各质量浓度甲磺酸去铁胺标准品 0.5 ml, 加入 2.5 ml 5 mmol/L FeCl_3 -0.1 mol/L HClO_4 (pH 2) 溶液, 测定其 OD_{\max} 下的 OD 值, 以标准品的质量浓度为横坐标, 以 OD 值为纵坐标, 绘制铁载体标准曲线。

1.3.2 铁载体含量测定 取 0.5 ml 阿斯青霉菌 XK-12 除菌发酵液与 2.5 ml 5 mmol/L FeCl_3 -0.1 mol/L HClO_4 (pH 2) 溶液混合, 测定其 OD_{\max} 下的 OD 值, 根据方法 1.3.1 中的标准曲线计算阿斯青霉菌 XK-12 铁载体产量。

1.4 孢子悬液的制备

将 PDA 液体培养的阿斯青霉菌 XK-12 涂布到 PDA 平板, 并在 28 °C 下培养 5 d, 待阿斯青霉菌菌丝铺满整个平板并生出大量绿色孢子, 吸取适量无菌水加入平板, 用接种环刮下孢子, 使其充分混匀。将平板上的孢子液转移至 50 ml 离心管中, 稀释至 1×10^7 CFU/ml。

1.5 培养基成分对铁载体产量的影响

在产铁载体培养基中,接种 2% 的孢子悬液,将氯化铵、磷酸二氢铵、硫酸铵、乙酸铵、草酸铵分别作为氮源,以 *D*-果糖、葡萄糖、*D*-麦芽糖、蔗糖、乳糖分别作为碳源,在培养温度 30 ℃、转速为 200 r/min 的条件下培养 5 d 后,用方法 1.3.2 计算铁载体产量,分析比较采用不同碳、氮源对阿斯青霉菌 XK-12 产铁载体的影响,并在确定最佳碳、氮源后设置 9 组质量分数梯度(1%~9%),在培养温度 30 ℃、转速为 200 r/min 的条件下培养 5 d 后确定最佳碳、氮源质量分数。向产铁载体发酵培养基中加入 Fe^{3+} ,使培养基中 Fe^{3+} 终浓度分别为 0 $\mu\text{mol/L}$ 、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 、1.5 $\mu\text{mol/L}$ 、2.0 $\mu\text{mol/L}$,培养 5 d 后,测定铁载体产量,确定培养基中 Fe^{3+} 浓度对 XK-12 铁载体产量的影响。将产铁载体发酵培养基灭菌后,加入经 0.22 μm 滤膜过滤后的不同氨基酸,T1 组培养基中不添加氨基酸(对照),T2 组培养基中加入 0.10% *L*-鸟氨酸盐酸盐,T3 组培养基中加入 0.10% *L*-天冬氨酸,T4 组培养基中加入 0.10% *L*-谷氨酸,T5 组培养基中加入 0.05% *L*-鸟氨酸盐酸盐与 0.05% *L*-谷氨酸,T6 组培养基中加入 0.05% *L*-天冬氨酸与 0.05% *L*-谷氨酸混合物,在培养温度 30 ℃、转速为 200 r/min 的条件下培养 5 d 后,确定不同氨基酸对铁载体产量的影响。

1.6 培养条件对铁载体产量的影响

使用方法 1.5 中确定碳、氮源后的培养基,在 20 ℃、25 ℃、28 ℃、30 ℃、35 ℃ 温度下培养,在转速为 200 r/min 的条件下培养 5 d 后,通过方法 1.3.2 测定铁载体产量,并确定最佳培养温度。使用碳、氮源优化后的培养基,分别调节初始 pH 为 5、6、7、8、9,在培养温度 30 ℃、转速为 200 r/min 的条件下培养 5 d 后,通过方法 1.3.2 测定铁载体产量来确定培养基最佳初始 pH。使用碳、氮源优化后的培养基,分别以不同装液量(30 ml、50 ml、70 ml、90 ml、110 ml)在 250 ml 的三角瓶中培养,在培养温度 30 ℃、转速为 200 r/min 的条件下以方法 1.3.2 测定铁载体产量。

1.7 不同条件下铁载体产量的时间曲线测定

使用优化后的培养基成分及培养条件,设置 3 组试验,第 1 组加入为 0.10% 的鸟氨酸盐酸盐,第 2 组加入 Fe^{3+} 使其终浓度为 2.0 $\mu\text{mol/L}$,第 3 组两者都不加(对照)。使用方法 1.3.2,每 24 h 测定一次各组铁载体产量,并绘制其在不同条件下铁载体产量的时间

曲线,确定阿斯青霉菌 XK-12 产铁载体的最佳时间。

1.8 阿斯青霉菌 XK-12 铁载体发酵液对病原菌生长的影响

将以上试验中得出的最佳发酵培养基和发酵条件综合起来进行阿斯青霉菌发酵,发酵液经 0.22 μm 滤膜除菌,将发酵液分别按终浓度 0、5%、10%、15%、20% (体积分数) 的比例添加到灭菌后的 PDA 培养基中混匀并倒平板。培养基凝固后,用直径 8 mm 的打孔器将病原菌平板打孔并倒置接种到含铁载体的 PDA 平板中央,置于 28 ℃ 培养箱培养 2 d 后,采用十字交叉法测量病原菌菌落直径,并计算各平板病原菌的抑制率^[7]。

1.9 数据分析

试验数据利用 SPSS Statistics 软件进行方差分析($P < 0.05$),计算所有均值的标准差。

2 结果与分析

2.1 阿斯青霉菌 XK-12 产铁载体种类

取阿斯青霉菌 XK-12 发酵液,过膜除菌后吸取 50 μl 加入到打孔器打孔的 CAS 检测平板上,置于暗处反应 30 min 后平板出现橙红色反应圈(图 1),说明 XK-12 菌株能产铁载体。

在高氯酸铁试验中,由 XK-12 制备的铁载体溶液颜色能够立即发生变化呈红色,并在 495 nm 处出现吸收峰,说明该菌能够产生异羟肟酸型铁载体,因此阿斯青霉 XK-12 所产的铁载体为异羟肟酸型铁载体。

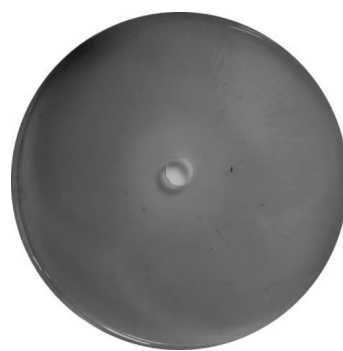


图1 CAS 平板

Fig.1 CAS detection medium

2.2 阿斯青霉菌 XK-12 铁载体标准曲线

通过全波长扫描,确定 XK-12 菌株所产铁载体的最大光吸收值在 495 nm 处,因此,我们在最大吸光值处制作相应的标准曲线(图 2),依照此标准曲线可以计算出菌株产铁载体的量。

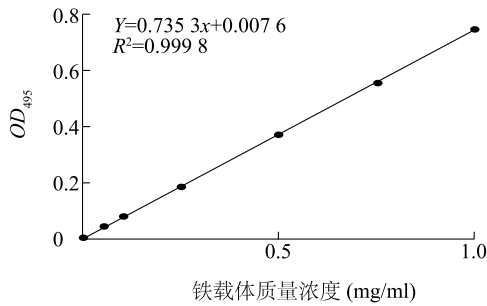
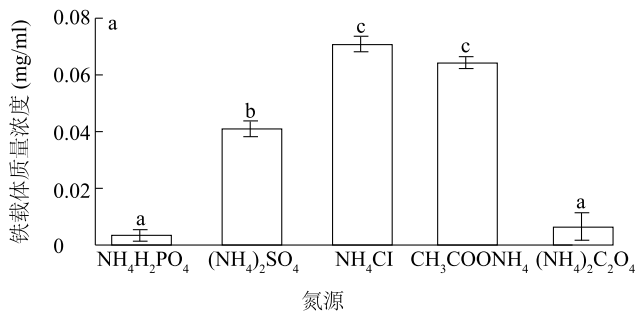


图2 阿斯青霉菌 XK-12 铁载体标准曲线

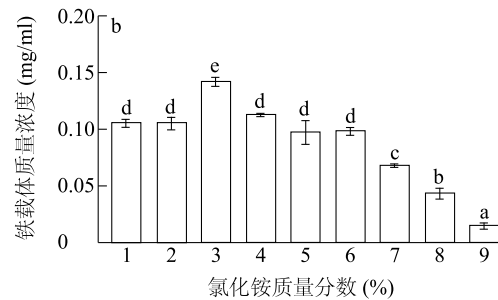
Fig.2 Standard curve of *Penicillium asturianum* XK-12 siderophore



不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。

图3 不同氮源及质量分数对 XK-12 铁载体产量的影响

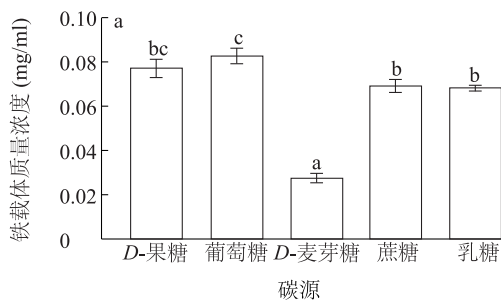
Fig.3 Effects of different nitrogen sources and concentrations on the yield of XK-12 siderophore



2.3.2 不同碳源及其质量分数对铁载体产量的影响

由图 4 可知,XK-12 铁载体产量在不同碳源下有显著差异,*D*-麦芽糖作为碳源时铁载体产量最低,葡萄糖作为碳源时铁载体产量最高。通过研究葡萄糖质

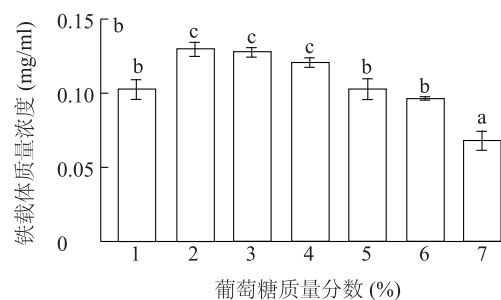
量分数对铁载体产量的影响发现,随着葡萄糖质量分数的增加,铁载体产量先上升后下降,当葡萄糖的质量分数为 2.0%时,阿斯青霉菌 XK-12 的铁载体产量最高,达到 0.134 mg/ml。



不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。

图4 不同碳源及质量分数对 XK-12 铁载体产量的影响

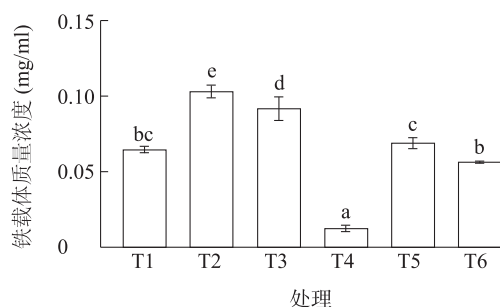
Fig.4 Effects of different carbon sources and concentrations on the yield of XK-12 siderophore



2.3.3 不同氨基酸对铁载体产量的影响 由图 5 可知,与对照相比,当培养基中添加 0.10%的 *L*-鸟氨酸盐酸盐时,阿斯青霉菌 XK-12 菌株的铁载体产量明显提高,产物质量浓度最高达到 0.106 mg/ml;当培养基中加入 0.10%的 *L*-天冬氨酸时,XK-12 菌

株的铁载体产量也有明显提高,产物质量浓度达到 0.097 mg/ml;培养基中单独添加 *L*-谷氨酸时 XK-12 铁载体产量最低;加 *L*-鸟氨酸盐酸盐和 *L*-谷氨酸的混合物时,铁载体产量与对照相比无显著差异;添加 *L*-天冬氨酸和 *L*-谷氨酸的混合物时,铁载体产量与

对照相比也无显著差异。

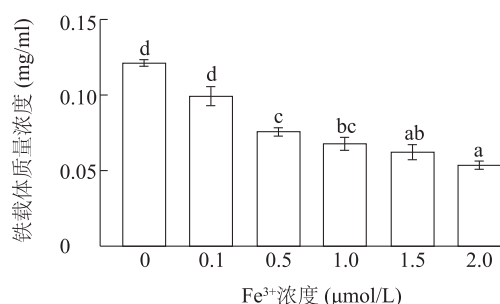


T1:不添加氨基酸(对照);T2:0.10% L-鸟氨酸盐酸盐;T3:0.10% L-天冬氨酸;T4:0.10% L-谷氨酸;T5:0.05% L-鸟氨酸盐酸盐+0.05% L-谷氨酸;T6:0.05% L-天冬氨酸+0.05% L-谷氨酸。不同小写字母表示在0.05水平上差异显著。

图5 不同氨基酸对XK-12铁载体产量的影响

Fig.5 Effects of amino acids on the yield of XK-12 siderophore

2.3.4 不同铁离子浓度对铁载体产量的影响 由图6可知, Fe^{3+} 浓度能对XK-12铁载体的产量产生显著影响,在完全不添加 Fe^{3+} 的培养基中,XK-12产铁载体产量最高,能达到0.122 mg/ml。随着铁浓度的增加,XK-12菌株产铁载体产量逐渐减少,这也反映了XK-12在低铁条件下产铁载体的特性。



不同小写字母表示在0.05水平上差异显著。

图6 不同 Fe^{3+} 浓度对XK-12铁载体产量的影响

Fig.6 Effects of different Fe^{3+} concentrations on the yield of XK-12 siderophore

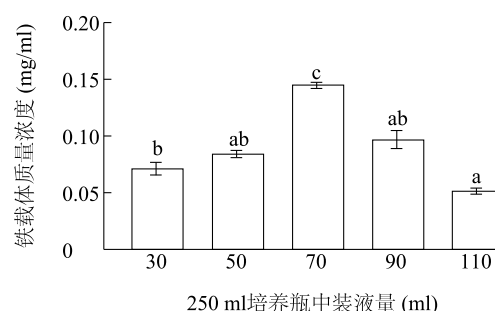
2.4 装液量对阿斯青霉菌 XK-12 产铁载体的影响

由图7可知,装液量与XK-12菌株液态发酵铁载体产量关系密切。随着装液量的逐渐增加,铁载体产量先升高,在装液量为70 ml时达到最高后下降。XK-12铁载体产量最高为0.145 mg/ml。

2.5 初始 pH 对阿斯青霉菌 XK-12 产铁载体的影响

由图8可知,XK-12铁载体的分泌随着培养基

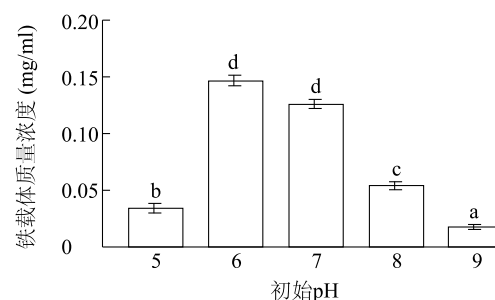
初始 pH 的增大呈现先增加后减少的趋势。XK-12菌株在发酵培养基初始 pH 为5时铁载体产量较低,pH 为6时,XK-12菌株产铁载体量最大,达到0.147 mg/ml,之后阿斯青霉菌 XK-12 产铁载体能力随着 pH 的增大逐渐降低,当初始 pH 为9时,铁载体的产量最低。



不同小写字母表示在0.05水平上差异显著。

图7 装液量对XK-12产铁载体的影响

Fig.7 Effects of the liquid volume on XK-12 siderophore



不同小写字母表示在0.05水平上差异显著。

图8 初始 pH 对XK-12产铁载体的影响

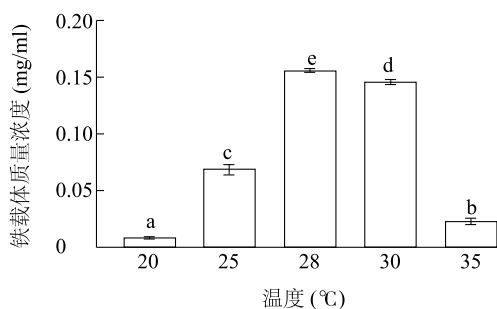
Fig.8 Effects of initial pH on XK-12 siderophore

2.6 培养温度对阿斯青霉菌 XK-12 产铁载体的影响

由图9可知,阿斯青霉菌 XK-12 在20~35℃培养均可产铁载体;在20~28℃,随着培养温度的升高,铁载体产量逐渐提高,当培养温度为28℃时,XK-12铁载体产量最高,为0.156 mg/ml;28~35℃,随着温度升高铁载体产量显著下降。说明温度在XK-12铁载体分泌中有重要影响,在真菌的最适生长温度范围(25~30℃)内,铁载体产量较高,培养温度为28℃时最利于XK-12产铁载体。

2.7 不同条件下阿斯青霉菌 XK-12 铁载体产量的时间曲线

由图10可知,在3种不同条件下,在培养168 h



不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。

图 9 温度对 XK-12 铁载体产量的影响

Fig.9 Effects of temperature on the yield of XK-12 siderophore

时阿斯青霉菌 XK-12 铁载体产量最高。添加 *L*-鸟氨酸盐酸盐能大大提高 XK-12 产铁载体产量,能达到 0.173 mg/ml;而添加 Fe^{3+} 则明显降低了铁载体的产量,仅为 0.063 mg/ml。与对照相比,添加 *L*-鸟氨酸盐酸盐能使 XK-12 铁载体产量提高 49.2%,而添加 Fe^{3+} 使铁载体产量下降了 45.2%,进一步证明了培养基成分中 Fe^{3+} 和 *L*-鸟氨酸盐酸盐是影响 XK-12 产铁载体的重要因素,与文献[23]的结论相同。

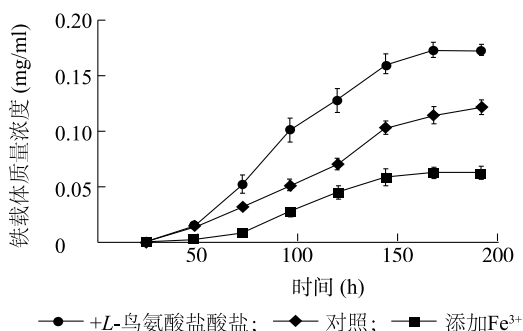


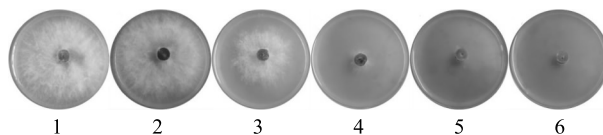
图 10 3 种条件下 XK-12 铁载体产量的时间曲线

Fig.10 Time curve of XK-12 siderophore production under three conditions

2.8 阿斯青霉菌 XK-12 铁载体发酵液对致病菌生长的影响

由图 11 可以看出,阿斯青霉菌 XK-12 铁载体发酵滤液对草莓根腐病原菌 *Neofusicoccum kwambonambiense* XKD-1 具有较强的抑制作用,添加 5%、10%、15%、20% 铁载体发酵液的 PDA 平板对 XKD-1 病原菌的抑制率分别为 36.96%±0.01%、99.42%±0.12%、100%、100%,15%、20% 铁载体发酵液添加量与 5% 添加量和 10% 添加量之间差异显著。随着

发酵液添加量的增加,XK-12 铁载体发酵液对病原菌 XKD-1 抑制率增大。在添加 10% 加 Fe^{3+} XL-12 铁载体发酵液时,病原菌生长不受抑制,说明对病原菌 XKD-1 的抑制效果是 XK-12 铁载体在起作用。



1:对照;2:添加 10% 加 Fe^{3+} XL-12 铁载体发酵液;3:添加 5% XL-12 铁载体发酵液;4:添加 10% XL-12 铁载体发酵液;5:添加 15% XL-12 铁载体发酵液;6:添加 20% XL-12 铁载体发酵液。

图 11 不同浓度阿斯青霉菌 XK-12 铁载体发酵液对草莓根腐病原菌 XKD-1 的抑制效果

Fig.11 The inhibitory effect of different concentrations of *Penicillium asturianum* XK-12 siderophore fermentation broth on *Neofusicoccum kwambonambiense* XKD-1

3 结论与讨论

本试验对阿斯青霉菌 XK-12 产铁载体进行了研究,鉴定 XK-12 所产铁载体为异羟肟酸型铁载体。对影响 XK-12 铁载体分泌的几个影响因子进行了研究,发现碳、氮源种类及质量分数、初始 pH、温度、装液量、发酵时间对其铁载体产量有显著影响,且在低铁胁迫下 XK-12 能产生更多的铁载体,这种现象可能是微生物为了获得足够的铁营养来为自身的生长营造有利环境,被迫启动铁载体转运系统,产生更多的铁载体来竞争自然界中的铁元素^[19-20]。在本试验中,添加 0.10% 的 *L*-鸟氨酸盐酸盐能显著提高 XK-12 铁载体的产量,*L*-鸟氨酸盐酸盐是真菌合成异羟肟酸型铁载体第 1 步的原料^[21],因此,*L*-鸟氨酸盐酸盐对 XK-12 菌株的铁载体生产可能有重要的作用。Wang 等^[22]对海洋酵母 HN6.2 产铁载体进行研究,发现在培养基中添加 Fe^{3+} 抑制了编码鸟氨酸 N_5 -加氧酶的羟化酶基因的表达,而在添加鸟氨酸的培养基中培养的酵母细胞中羟化酶基因的表达增强。汪少林在对真菌铁载体发酵条件的研究中发现固体发酵培养相较于液体发酵培养,粗提物的产出更高,几种真菌中 FECH-031 产量最高,为 32 mg/g,FECH-050 产量最低,为 12 mg/g^[23]。Wang 等^[22]在对海洋普鲁兰类酵母 (*Aureobasidium pullulans*) HN6.2 产铁载体的培养基优化

中,发现在培养基中添加鸟氨酸能显著提高铁载体的产量,同时添加 Fe^{3+} 后明显抑制了铁载体的产量,在优化后的最佳培养条件下,菌株最大铁载体产量能达到 1.1 mg/ml。

从抑菌试验的结果可以看出,对照平板和 10% 加 Fe^{3+} XK-12 铁载体发酵液平板上病原菌 XKD-1 生长情况几乎一致,说明整合足量铁后的铁载体失去了螯合平板中铁离子的能力,病原菌生长所需的铁元素未被夺去,可以正常生长。添加不同含量 XK-12 铁载体发酵液的 PDA 平板对草莓根腐病原菌 *Neofusicoccum kwambonambiense* XKD-1 有较强的抑制作用,且随着发酵液用量的增大,抑制作用更明显。由于微生物之间存在营养竞争^[24-25],生防微生物可以通过分泌具有螯合能力大于病原菌铁载体的铁载体来竞争土壤中微生物生长必需的铁元素,从而达到抑制病原菌生长的目的。张科立^[26]从香蕉根际分离出内生菌劳尔氏菌(*Ralstonia* sp.),发现该菌株产铁载体能力强,通过平板对峙试验对其抗病活性进行了评价,测得该菌对病原镰刀菌的抑制率为 73.2%。沈冰冰^[27]在小麦和玉米种植地土壤中筛选出一株产铁载体真菌 YZ9,在平板拮抗试验中,发现对玉米大斑病病原菌(*Exserohilum taricum*)和玉米茎腐病病原菌(*Fusarium graminearum*)的抑制率分别为 64% 和 79%。赵荣艳等^[8]从根际分离出一株产铁载体真菌黄蓝状菌 z-15(*Talaromyces flavu*),在体外试验中,对蒜薹炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、水稻恶苗病菌(*Fusarium moniliforme*)、小麦根腐病菌(*Bipolaris sorokiniana*) 3 种病原菌均有一定拮抗效果,抑制率均超过 20%,其发酵液对小麦根腐病菌的生长抑制效果较为显著,最高抑制率达 50.9%,并能有效抑制 3 种病原菌孢子萌发率,分别为 100.0%、98.3% 和 81.2%。从根际分离到一株铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) FP6,其铁载体对立枯丝核菌(*Rhizoctonia Solani*)和胶孢炭疽菌(*Colletotrichum Gloeosporioides*)作用明显,但对胶孢子菌(*C. gloeosporioides*)无明显抑制^[8,28]。由此可见,铁载体可以用于病原菌的防治,阿斯青霉菌 XK-12 在抗病促生长方面有着较大的应用潜力。

参考文献:

[1] HELL R, STEPHAN U W. Iron uptake, trafficking and homeosta-

sis in plants [J]. *Planta*, 2003, 216(4): 541-551.

- [2] 刘艳萍,滕松山,赵 蕾. 高产嗜铁素恶臭假单胞菌 A3 菌株的鉴定及其对黄瓜的促生作用[J]. *植物营养与肥料学报*, 2011, 17(6): 1507-1514.
- [3] 贾 凯,郭长虹. 高等植物体内铁运输机制研究进展[J]. *基因组学与应用生物学*, 2010, 29(6): 1152-1158.
- [4] HAAS D, DÉFAGO G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(4): 307-319.
- [5] KHAN A, SINGH P, SRIVASTAVA A. Synthesis, nature and utility of universal iron chelator-Siderophore; A review [J]. *Microbiological Research*, 2018, 212: 103-111.
- [6] HIDER R C. Siderophore mediated absorption of iron [J]. *Structure And Bonding*, 1984, 58: 25-87.
- [7] 孔维亮,周 敏,吴小芹. 水拉恩氏菌 JZ-GX1 产嗜铁素特性及其对林木病原菌的拮抗作用[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(12): 3278-3285.
- [8] 赵荣艳,翟凤艳. 嗜铁真菌 z-15 对几种病原菌的抑制作用[J]. *贵州农业科学*, 2014, 42(10): 127-129.
- [9] SASIREKHA B, SRIVIDYA S. Siderophore production by *Pseudomonas aeruginosa* FP6, a biocontrol strain for *Rhizoctonia solani* and *Colletotrichum gloeosporioides* causing diseases in chilli [J]. *Agriculture and Natural Resources*, 2016, 50(4): 250-256.
- [10] SCHALK I J, HANNAUER M, BRAUD A. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance [J]. *Environ Microbiol*, 2011, 13(11): 2844-2854.
- [11] DAHLHEIMER S R, NEAL C R, FEIN J B. Potential mobilization of platinum-group elements by siderophores in surface environments [J]. *Environ Sci Technol*, 2007, 41(3): 870-875.
- [12] AHMED E, HOLMSTROM S J. Siderophores in environmental research: roles and applications [J]. *Microb Biotechnol*, 2014, 7(3): 196-208.
- [13] 曾加会,李元媛,阮迪申,等. 植物根际促生菌及丛枝菌根真菌协助植物修复重金属污染土壤的机制[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(5): 1214-1221.
- [14] 刘 群. 缺铁胁迫下棘孢木霉菌及其嗜铁素对植物的促生机制研究 [D]. 济南: 山东师范大学, 2017.
- [15] NEILANDS J B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores [J]. *Analytical Biochemistry*, 1987, 160(1): 47-56.
- [16] ARNOW L E. Colorimetric determination of the components of 3, 4-dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixtures.[J]. *Biological Chemistry*, 1937, 118(2): 531-537.
- [17] LEONG S A, NEILANDS J B. Siderophore production by phytopathogenic microbial species [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1982, 218(2): 351-359.
- [18] SHENKER M, OLIVER I, HEBNANN M, et al. Utilization by tomatoes of iron mediated by a siderophore produced by *Rhizopus arrhizus* [J]. *Journal of Plant Nutrition*, 1992, 15(10): 2173-2182.
- [19] NEILANDS J B. Siderophores: structure and function of microbial

- iron transport compounds [J]. Journal of Biological Chemistry, 1995, 270(45): 26723-26726.
- [20] 张茜茜,朱慧明,杨肖静,等. 枯草芽孢杆菌 MB8 儿茶酚型铁载体的合成与结构分析[J]. 西南农业学报, 2019, 32(6): 1259-1266.
- [21] HAAS H. Molecular genetics of fungal siderophore biosynthesis and uptake: the role of siderophores in iron uptake and storage [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 62(4): 316-330.
- [22] WANG W, CHI Z, LIU G, et al. Chemical and biological characterization of siderophore produced by the marine-derived *Aureobasidium pullulans* HN6.2 and its antibacterial activity [J]. Biometals, 2009, 22(6): 965-972.
- [23] 汪少林. 产铁载体活性真菌筛选及铁载体化合物对微生物群落结构影响初步探究[D]. 昆明: 云南大学, 2017.
- [24] 邓琳梅,杨 蕾,张俊星,等. 云南省不同森林土壤中三七促生拮抗细菌的分离筛选[J]. 南方农业学报, 2020, 51(1): 115-122.
- [25] 刘 琴,徐 健,祁建杭,等. 娄彻氏链霉菌 SR-1102 对番茄枯萎病的防效及根际微生物的影响[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(5): 1133-1138.
- [26] 张科立. 香蕉嗜铁内生细菌 BEB3 的分离鉴定及其生防机理初探[D]. 海口: 海南大学, 2010.
- [27] 沈冰冰. 玉米茎腐病和大斑病生防菌的筛选及其促生作用的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2019.
- [28] SASIREKHA B, SRIVIDYA S. Siderophore production by *Pseudomonas aeruginosa* FP6, a biocontrol strain for *Rhizoctonia solani* and *Colletotrichum gloeosporioides* causing diseases in chilli [J]. Agriculture and Natural Resources, 2016, 50(4): 250-256.

(责任编辑:张震林)