

纳豆菌脂肽对分离于对虾养殖环境中产 T-2 毒素镰孢菌抑制效应的研究

刘唤明¹, 王雅玲^{1*}, 孙力军^{1*}, 徐德峰¹, 施琦¹, 廖建萌², 励建荣^{3,4}

(1. 广东海洋大学食品科技学院, 广东省水产品加工与安全重点实验室,

广东普通高等学校水产品深加工重点实验室, 广东 湛江 524088;

2. 湛江市质量计量监督检测所, 广东 湛江 524022;

3. 浙江工商大学食品科学与生物工程学院, 浙江 杭州 310035;

4. 渤海大学辽宁省食品安全重点实验室, 辽宁 锦州 121013)

摘要: 为了探明纳豆菌脂肽对对虾养殖环境中的产 T-2 毒素镰孢菌分离株的控制效应, 实验采用扫描电镜观察了镰孢菌孢子超微结构、普通显微镜观察了菌丝形态、荧光显微镜观察了菌丝通透性。结果显示, 脂肽浓度为 1 mg/mL 时, 脂肽对镰孢菌孢子萌发的抑制率达 78.8%, 镰孢菌培养到第 3 天的生物量为不加脂肽对照的 24.5%。扫描电镜观察结果表明, 1 mg/mL 的脂肽可以使镰孢菌的孢子呈念珠状; 普通显微镜观察结果显示, 1 mg/mL 脂肽处理能使菌丝隔膜消失; 荧光显微镜观察结果表明, 脂肽能增加镰孢菌菌丝细胞膜的通透性。

关键词: 镰孢菌; 纳豆菌; 脂肽; 抑菌

中图分类号: S 943

文献标志码: A

镰孢菌属为半知菌亚门, 丝孢纲, 是一类数量大、种类繁多, 适应世界各地环境的霉菌, 兼寄生或腐生生活, 是真菌中较大的一属。寄生于对虾上的镰孢菌, 1966 年首次在日本冈山水产实验所养殖的日本对虾 (*Litopenaeus japonicus*) 上发现^[1], 以后随着世界养虾业的迅速发展, 已在白对虾 (*Penaeus setiferus*), 凡纳滨对虾 (*Penaeus vannamei*), 加州对虾 (*Penaeus californiensis*) 等多种对虾上发现, 成为继对虾链壶菌病、离壶菌病和海壶菌病后危害最大的真菌性疾病^[2]。孙颖峰等^[3]研究表明, 对虾养殖环境存在一定浓度的镰孢菌, 对对虾养殖存在潜在危险, 因此研究控制对虾养殖环境中的镰孢菌的无公害制剂十分必要。

脂肽是枯草芽孢杆菌^[4]、淀粉液化芽孢杆菌^[5]、苏云金芽孢杆菌^[6]等分泌的一类由亲水性环状短肽头部和长链疏水性脂肪酸尾巴组成的双亲性化合物, 主要由 surfactin、iturin、fengycin 三大

类组成。脂肽具有强抗真菌活性, 目前已经运用于许多真菌的防治^[7-9]。本研究组前期的研究已从纳豆中分离筛选出了一株纳豆芽孢菌杆菌 NT-6 菌株, 该菌可以产生 surfactin、iturin、fengycin 三类脂肽类物质^[10-11]。

镰孢菌的很多种类可以产生真菌毒素, 人畜食用被污染的食物后会造成食物中毒甚至死亡。单端孢霉烯毒素是镰孢菌产生的最重要、数量最多的毒素, T-2 毒素是单端孢霉烯毒素中最重要的一种。目前还没有对虾养殖环境中的镰孢菌能产生 T-2 毒素的研究报道。本研究组前期的研究已从对虾养殖环境中筛选出了梨孢镰孢菌、串珠镰孢菌等镰孢菌^[3]。本实验在此基础上进一步筛选出能产生 T-2 毒素的镰孢菌, 并研究纳豆菌脂肽对其的抑菌效应及抑菌机理, 以期纳豆菌脂肽用来控制对虾养殖环境中的产 T-2 毒素镰孢菌提供基础。

收稿日期: 2012-08-14 修回日期: 2012-12-17

资助项目: 国家自然科学基金项目 (31171634; 30972287); “十二五”国家支撑计划项目 (2012BAD29B06); 湛江市科技计划项目 (2011D02)

通信作者: 王雅玲, E-mail: wangylchina@163.com; 孙力军, E-mail: sunlcamt@126.com

1 材料与方 法

1.1 菌株

纳豆菌 NT-6(*Bacillus subtilis* Natto), 广东海洋大学食品科技学院海洋有害微生物及毒素绿色控制研究室保存, 经生理生化 16S rDNA 鉴定 (GenBank 登录号为 JN180628)。

镰孢菌 Fw1102-1、Fs1101-3、Fs1101-7、Ff2101-1、Ff3102-4 均广东海洋大学食品科技学院海洋有害微生物及毒素绿色控制研究室保存, 分离于对虾养殖环境^[3]。

1.2 培养基

镰孢菌产毒培养基 (GYN): NH₄H₂PO₄ 1 g, KCl 0.2 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g, 葡萄糖 10 g, 酵母膏 5 g, CuSO₄ · 5H₂O 0.005 g, ZnSO₄ · 7H₂O 0.01 g, H₂O 1000 mL

绿豆培养基: 取绿豆 50 g、加蒸馏水 1 L 煮沸 10 min, 过滤后取滤液定容至 1 L, 121 °C 灭菌 20 min。

LB 液体培养基 (%): 牛肉膏 0.5; 蛋白胨 1; NaCl 0.5; pH 7.2。

改良 Landy 培养基的组成为 (/L): 葡萄糖 10.0 g, 谷氨酸钠 5.0 g, MgSO₄ 0.5 g, KCl 0.78 g, KH₂PO₄ 1.0 g, FeSO₄ 0.05 mg, CuSO₄ 0.16 mg, MnSO₄ 5.0 mg。

1.3 产 T-2 毒素镰孢菌的筛选

将实验室保藏的镰孢菌 Fw1102-1、Fs1101-3、Fs1101-7、Ff2101-1、Ff3102-4 分别接到 GYN 培养基中, 8 ~ 25 °C 间隔 12 h 变温、前期光照后期黑暗、前期振荡后期静止的培养条件下培养 28 d。取 10 mL 培养液, 加入 10 mL 乙酸乙酯振荡 10 min (NTS-4000A), 4 000 r/min 离心 5 min (TDL-5-A), 取上清液, 重复提取 3 次。合并上清液, 60 °C N₂ 吹干 (N-EVAP111) 后用 1 mL 甲醇 + 5 mmol 乙酸铵溶液 (3 + 7; V + V) + 0.1% 甲酸定容, 超声 5 min, 旋涡 30 s (VTX-3000L), 过 0.22 μm 滤膜。LC-MS/MS 检测 T-2 毒素。

LC-MS/MS 仪器条件: 色谱柱为 Hypersil GOLD (150 mm × 2.1 mm, 5 μm); 流动相: A 为甲醇 B 为 5 mmol/L 乙酸铵溶液 (0.1% 甲酸); 进样量为 10 μL; 针头到瓶底距离为 1.0 mm; 进样速度为 10.0 μL/s; 淋洗体积为 1 500 μL; 冲洗体积为 1 500 μL; 淋洗速度为 100.00 μL/s。

质谱扫描模式: ESI (+); 喷雾器电压为 4 500 V; 鞘气压力为 25 au; 辅助气压为 5 au; 毛细管温度为 270 °C; 碰撞压为 1.5 mTorr。

1.4 纳豆菌脂肽的制备

取斜面保存的 *Bacillus natto* NT-6 菌株, 接种于 LB 液体培养基中, 于 37 °C、150 r/min 条件下, 恒温摇床振荡培养 24 h 作为种子液。按照 5% 接种量接种于改良的 Landy 培养基, 于 33 °C、180 r/min 培养 38 h。5 000 r/min 离心 15 min 除去菌体, 上清液调 pH 至 2.0, 低温过夜, 5 000 r/min 离心 15 min 取沉淀用甲醇溶解, 调节 pH 至 7.0, 于磁力搅拌器上低温搅拌 5 h, 10 000 r/min 离心 20 min 后得到的上清液即为含脂肽的甲醇溶液, 然后利用低温冷冻干燥除去甲醇。

1.5 镰孢菌孢子悬液的制备

将镰孢菌 Fw1102-1 接种于绿豆培养基中进行产孢, 于 30 °C、120 r/min 的培养条件下培养 2 d。培养液经双层纱布过滤, 8 000 × g 离心除掉上清, 用 0.01% 吐温 - 20 溶液悬浮孢子, 并用血球计数板检测孢子悬浮液浓度备用。

1.6 脂肽对孢子萌发的影响

采用凹玻片法测定脂肽对孢子萌发的抑制作用, 用无菌水将脂肽配制成 2、1、0.2 mg/mL。取 40 μL 孢子悬浮液 (10⁵ cfu/mL) 和等体积不同浓度的脂肽加到凹玻片上, 混匀, 使脂肽最终浓度为 1、0.5、0.1 mg/mL。以加入等体积的无菌水和孢子悬浮液的凹玻片为对照。将凹玻片放在灭菌纱布保湿的洁净培养皿中, 28 °C 培养, 10 h 后检查孢子萌发情况。每个处理检测 3 个视野, 每个视野检测 50 个孢子, 计算孢子萌发抑制率。

孢子萌发率 (%) = (孢子萌发总数 / 观察孢子总数) × 100;

孢子萌发抑制率 (%) = (对照萌发率 - 处理萌发率) / 对照萌发率 × 100。

1.7 脂肽对镰孢菌生长的影响

将脂肽溶于 PDA 培养基, 使其终浓度分别为 1、0.5、0.1、0.01 mg/mL。分别加 200 μL 含有不同浓度脂肽的 PDA 培养基到 96 孔板中, 以 200 μL 不加脂肽的 PDA 培养基为对照, 每个孔接入 10 μL 镰孢菌孢子悬浮液 (10⁶ cfu/mL)。28 °C 培养 3 d, 每隔 24 h 于 630 nm 处测量吸光度值。

1.8 脂肽对镰孢菌孢子超微结构的影响

向镰孢菌孢子悬浮液 (10⁶ cfu/mL) 中加入脂

肽使其终浓度分别为 1 和 0.5 mg/mL, 对照组加入无菌水, 于 37 °C 作用 3 h。离心收集孢子, 用 2.5% 戊二醛固定 2 h 后涂片, 临界点干燥, 干燥后的标本放入高真空蒸发器中, 喷金镀膜, 扫描电镜下观察, 拍照。SEM XL-30 型扫描电子显微镜 (PHILIPS, 美国)。

1.9 脂肽对镰孢菌菌丝形态的影响

将镰孢菌 Fw1102-1 接种于 PDA 液体培养基, 于 30 °C 培养 20 h。取培养液 6 000 × g 离心 10 min, 收集菌丝, 无菌水洗涤 3 次后重新用无菌水悬浮, 得到菌丝悬浮液。加入脂肽, 使其终浓度为 1 mg/mL, 对照组不加入脂肽, 于 30 °C 中作用 4 h, 显微镜下镜检。

1.10 脂肽对菌丝通透性的影响

向镰孢菌 Fw1102-1 菌丝悬浮液加入脂肽, 使其终浓度分别为 1 和 0.5 mg/mL, 对照组加入无菌水, 于 37 °C 作用 3 h, 离心收集菌丝, 无菌水洗涤 3

次后通过 PI 染色后在荧光显微镜下进行观察。对照菌丝用无菌水悬浮处理。PI (Sigma, 美国) 的配制参照厂家说明书。荧光显微镜: Olympus fluorescence microscope BX-60 (Olympus, Japan); 激发光波长 450 ~ 490 nm; 发射光波长 520 nm。

2 结果与分析

2.1 产 T-2 毒素镰孢菌的筛选

镰孢菌 Fw1102-1 发酵产物 LC-MS/MS 的图谱在保留时间 5.46 min 处有一明显吸收峰, 与 T-2 毒素标准品图谱对比, 可以判断镰孢菌 Fw1102-1 能产生 T-2 毒素 (图 1)。

2.2 脂肽对孢子萌发的影响

随着脂肽浓度的升高, 孢子萌发率降低, 脂肽对镰孢菌孢子的萌发抑制作用增强 (表 1)。当脂肽浓度为 1 mg/mL 时, 脂肽对孢子萌发的抑制率达 78.8%。

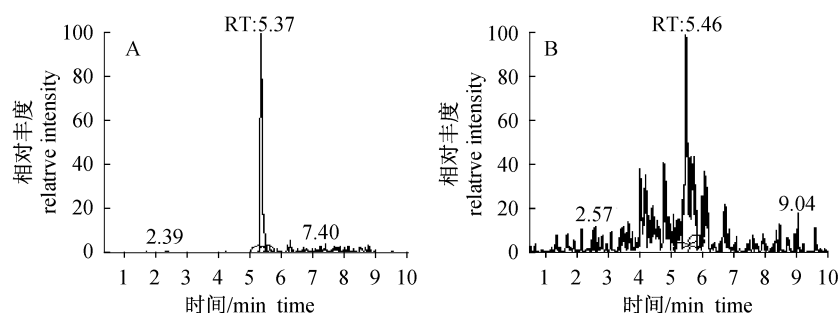


图 1 T-2 毒素检测的 LC-MS/MS 的图谱

A. T-2 毒素标准品 LC-MS/MS 的图谱; B. 镰孢菌 Fw1102-1 发酵产物 LC-MS/MS 的图谱。

Fig. 1 LC-MS/MS map of T-2 toxin detection

A. LC-MS/MS map of T-2 toxin standard; B. LC-MS/MS map of fermentation products produced by *Fusarium* Fw1102-1.

表 1 脂肽对镰孢菌孢子萌发的影响

Tab. 1 Effect of lipopeptides on spores of *Fusarium* germination

脂肽浓度/(mg/mL) concentration of lipopeptides	孢子萌发率/% ratio of spores germination	孢子萌发抑制率/% inhibition ratio of spores germination
0	50	0
1	10.6	78.8
0.5	17.2	65.6
0.1	27.3	45.5

2.4 脂肽对镰孢菌生长的影响

当加入的脂肽浓度为 1 mg/mL 时, 镰孢菌的生长受到明显的抑制, 培养到第 3 天的生物量为不加脂肽对照的 24.5% (图 2)。随着脂肽浓度的

降低, 其对镰孢菌生长的抑制逐渐减弱; 当脂肽浓度降到 0.01 mg/mL 时, 加入脂肽的镰孢菌的生长速度反而超过对照组镰孢菌的生长速度, 这可能是脂肽粗提物中含有某些能促进镰孢菌生长的杂质。

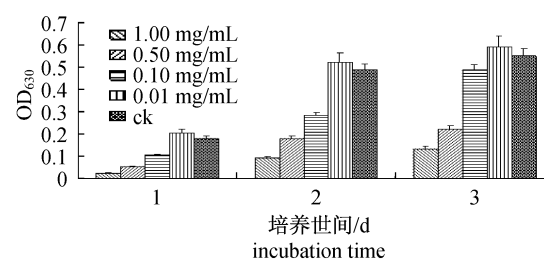


图 2 脂肽对镰孢菌生长的影响

Fig. 2 Effect of lipopeptides on the growth of *Fusarium*

2.5 脂肽对镰孢菌的孢子超微结构的影响

由扫描电镜图(图 3)结果可知,对照组的镰孢菌孢子表面光滑(图 3-a);0.5 mg/mL 的脂肽

处理的孢子中央有一缢痕(图 3-b),经 1 mg/mL 脂肽处理的孢子成念珠状(图 3-c)。

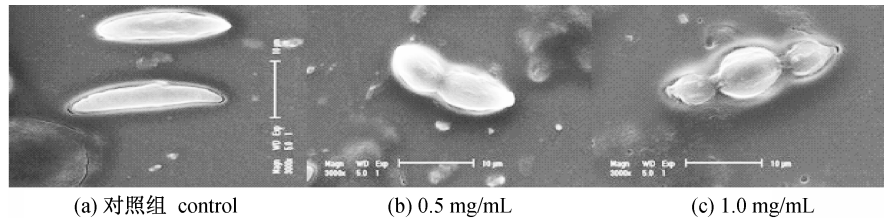


图 3 扫描电镜观察脂肽对镰孢菌孢子形态结构的影响

Fig. 3 Effect of lipopeptides on morphology of *Fusarium* spores by SEM

2.6 脂肽对镰孢菌菌丝形态的影响

由图 4 结果可知,与对照菌丝相比,在脂肽处

理 4 h 后,细胞内菌丝隔膜消失,且出现了很多较大的囊泡。

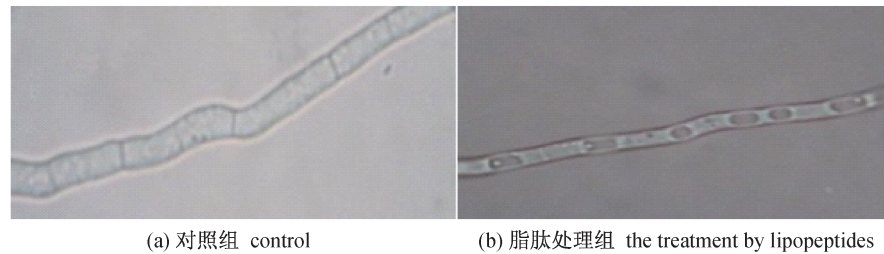


图 4 脂肽对镰孢菌菌丝形态的影响

Fig. 4 Effect of lipopeptides on the hypha morphology of *Fusarium*

2.7 脂肽对菌丝细胞膜通透性的影响

PI 与核酸结合后在 450 ~ 490 nm 绿光照射下会发射波长 520 nm 左右的红色荧光,但是 PI 本身不能透过细胞膜。所以,当在荧光显微镜下观察到细胞在 PI 的染色下呈红色时,则意味着该细胞膜的透性发生了改变。如图 5 所示,经过浓

度为 0.5 mg/mL 脂肽处理的菌丝部分被染成了红色,经过浓度为 1 mg/mL 抗菌肽处理的菌丝大部分都被染成红色,而对照只有很少一部分被染色。这说明脂肽能够破坏镰孢菌 Fw1102-1 菌丝膜的通过性,且浓度越高,破坏能力越强。

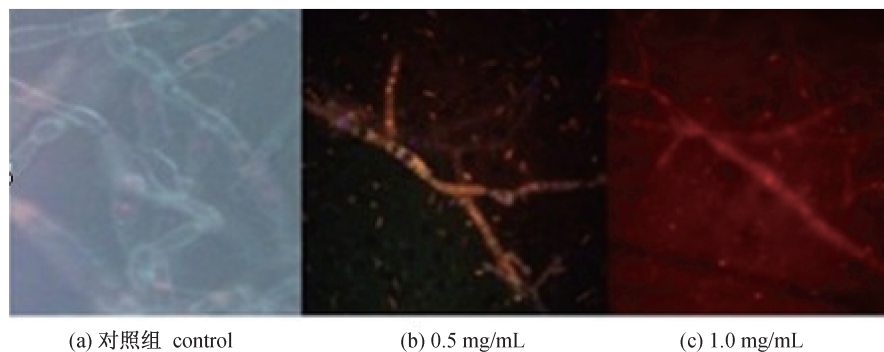


图 5 脂肽处理过的菌丝被 PI 染色后的荧光显微图

Fig. 5 Fluorescence microscopy of lipopeptides-treated *Fusarium* mycelia by PI staining

3 结论与讨论

战文斌^[12]等首次报道从越冬期中国对虾病虾

上分离鉴定出了腐皮镰孢菌、尖孢镰孢菌、三线镰孢菌和禾谷镰孢菌,但没有进一步研究这些镰孢菌能否产生 T-2 毒素。本研究首次筛选出了对虾养

殖环境中的产 T-2 毒素的镰孢菌。对虾养殖环境中的产 T-2 毒素的镰孢菌浸染对虾后很有可能会在对虾体内产生 T-2 毒素,类似的情况 Brewster 等^[13]报道过。因此与不产毒素的镰孢菌相比,产 T-2 毒素的镰孢菌对对虾养殖的危害性可能会更大。抑菌实验结果表明,纳豆菌脂肽浓度为 1 mg/mL 时,脂肽对分离于对虾养殖环境中的产生 T-2 毒素的镰孢菌的孢子萌发和生长均有明显的抑制作用,这为脂肽用来控制对虾养殖环境中的产生 T-2 毒素的镰孢菌提供了基础。

有研究表明,霉菌受脂肽中 surfactin、fengycin 和 iturin 等活性组分的协同抑制^[14-16],而本实验中纳豆菌脂肽含有 surfactin、fengycin 和 iturin 这 3 种组分,故本研究中纳豆菌脂肽对镰孢菌的抑制作用是 surfactin、fengycin 和 iturin 这 3 种组分协同作用的结果。在本研究中,通过 PI 染色结果表明纳豆菌脂肽可以破坏镰孢菌的菌丝的细胞膜,并与膜物质结合,导致真菌菌丝细胞膜穿孔^[17-18]。

参考文献:

- [1] 石川介雄. 养殖ウエルマエビのカビ感染に因る腮の黒変について[J]. 鱼病研究, 1968, 3(1): 34-38.
- [2] 俞开康, 战文斌, 周丽, 等. 我国沿海养殖对虾的疾病及研究现状[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2000, 39(suppl): 1-5.
- [3] 孙颖峰, 王雅玲, 万莉玲, 等. 芽孢杆菌抗菌肽对对虾养殖环境中镰孢菌的抑菌效应[J]. 广东农业科学, 2011(18): 95-97.
- [4] Cho S J, Lee S K, Cha B J, et al. Detection and characterization of the Gloeosporium gloeosporioides growth inhibitory compound iturinA from *Bacillus subtilis* strain KS03 [J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 223(1): 47-51.
- [5] Sun L J, Lu Z X, Bie X M, et al. Isolation and characterization of a co-producer of fengycins and surfactins, endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2, from *Scutellaria baicalensis georgi* [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2006, 22(12): 1259-1266.
- [6] 郭丽清. 苏云金芽孢杆菌中脂肽类抗生素 iturins 的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2010.
- [7] Touré Y, Ongena M, Jacques P, et al. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple [J]. Journal of Applied Microbiology, 2004, 96(5): 1151-1160.
- [8] Zhang T, Shi Z Q, Hu L B, et al. Antifungal compounds from *Bacillus subtilis* B-FS06 inhibiting the growth of *Aspergillus favus* [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(6): 783-788.
- [9] Hu L B, Shi Z Q, Zhang T, et al. Fengycin antibiotics isolated from B-FS01 culture inhibit the growth of *Fusarium moniliforme* Sheldon ATCC38932 [J]. FEMS Microbiology Letters, 2007, 272(1): 91-98.
- [10] 王东, 孙力军, 王雅玲, 等. 纳豆菌抗菌肽 APNT-6 对凡纳滨对虾的低温保鲜效果[J]. 水产学报, 2012, 36(7): 1133-1139.
- [11] 孙力军, 王雅玲, 刘唤明, 等. 一种新型抗菌肽 APNT-6 的溶血性和急性毒性评价[J]. 水产学报, 2012, 36(6): 974-978.
- [12] 战文斌, 俞开康, 孟庆显. 中国对虾镰刀菌病原体研究[J]. 青岛海洋大学学报, 1993, 23(2): 91-100.
- [13] Brewster T C, Grant D W. Excretion of Aflatoxin by Frogs After Implantation with *Aspergillus flavus* [J]. The Journal of Infectious Diseases, 1972, 125(1): 66-68.
- [14] Maget-Dana R, Thimon L, Peypoux F, et al. Surfactin/Iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A [J]. Biochimie, 1992, 74(12): 1047-1051.
- [15] Ongena M, Jourdan E, Adam A, et al. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus* as elicitors of induced systemic resistance in plants [J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(4): 1084-1090.
- [16] Romero D, de Vicente A, Rakotoaly R H, 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.
- [17] Maget-Dana R, Peypoux F. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties [J]. Toxicology, 1994, 87(1-3): 151-174.
- [18] 胡梁斌, 周威, 章挺, 等. 抗菌肽 Fengycins 抑制串珠镰刀菌的初步机制[J]. 微生物学通报, 2010, 37(2): 251-255.

**Study on inhibitory effect of lipopeptides from
Bacillus Natto on *Fusarium* isolated from
shrimp culture environment producing T-2 toxin**

LIU Huanming¹, WANG Yaling^{1*}, SUN Lijun^{1*}, XU Defeng¹,
SHI Qi¹, LIAO Jianmeng², LI Jianrong^{3,4}

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Product Processing and Safety,
Key Laboratory of Advanced Processing of Aquatic Products of Guangdong Higher Education Institution,
College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;
2. Zhanjiang Institute of Supervision & Test on Quality & Measure, Guangdong 524022, China;
3. College of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310035, China;
4. Liaoning Key Laboratory of Food Safety, Bohai University, Jinzhou 121013, China)

Abstract: In order to control *Fusarium* isolated from shrimp culture environment producing T-2 toxin, the inhibitory effect and antibacterial mechanism of lipopeptides from *Bacillus natto* on *Fusarium* was studied in the article. The inhibitory effect was studied through the influence of lipopeptides on the germination and growth of *Fusarium* spores; and the observation of the ultrastructure of the spores, the mycelium morphology and the mycelium permeability was performed through electron microscope, ordinary microscope and fluorescence microscope respectively to study the antibacterial mechanism. When the concentration of lipopeptides was 1 mg/mL, the inhibition rate on the germination of *Fusarium* spores reached 78.8%, and the cultivation biomass of *Fusarium* was 24.5% of the control group without lipopeptides on the third day. Under the condition of the same concentration, the microscopic observation under scanning electron microscope revealed that the spores of *Fusarium* presented moniliform state under the influence of lipopeptides; ordinary microscope revealed that the mycelia became nonseptate after the treatment of lipopeptides; and fluorescence microscope revealed that lipopeptides could increase the membrane permeability of the *Fusarium* mycelium.

Key words: *Fusarium*; *Bacillus natto*; lipopeptide; antibacterial mechanism

Corresponding author: WANG Yaling. E-mail: wangylchina@163.com;

SUN Lijun. E-mail: suncamt@126.com