

doi:10.3969/j.issn.2095-6002.2019.05.008

文章编号:2095-6002(2019)05-0064-08

引用格式:王志芳,李贞景,杨明冠,等. *Streptomyces alboflavus* 抗真菌物质对串珠镰刀菌的抑制机理研究[J]. 食品科学技术学报, 2019, 37(5): 64-71.



WANG Zhifang, LI Zhenjing, YANG Mingguan, et al. Inhibition mechanism of *Streptomyces alboflavus* antifungal substance against *Fusarium moniliforme*[J]. Journal of Food Science and Technology, 2019, 37(5): 64-71.

Streptomyces alboflavus 抗真菌物质对串珠镰刀菌的抑制机理研究

王志芳^{1,2}, 李贞景², 杨明冠², 路来风², 王昌禄^{2,*}, 李政³,
张健飞³, 巩继贤³

(1. 天津工业大学 分析测试中心, 天津 300387;

2. 天津科技大学 食品工程与生物技术学院/食品营养与安全教育部重点实验室, 天津 300457;

3. 天津工业大学 纺织科学与工程学院, 天津 300387)

摘要:研究了 *Streptomyces alboflavus* 产生的抗真菌物质对串珠镰刀菌的抑菌机理。通过 pH 纸层析和捷克八溶剂纸层析实验对抗菌物质进行定性分析;利用荧光显微镜和扫描电子显微镜观察抗菌物质对串珠镰刀菌细胞膜和细胞壁的破坏作用;通过细胞膜和细胞壁主要组分对抑菌物质的拮抗效果,探索抑菌物质的作用靶点;用高效液相色谱法检测抑菌物质对串珠镰刀菌细胞膜中麦角甾醇的抑制作用。极性实验显示,该物质呈中性,捷克八溶剂纸层析表明,该物质属于非水溶性 I 型抗生素;光学显微镜观察,抑菌物质对串珠镰刀菌孢子萌发有抑制作用,同时使菌丝畸形,顶端、中部出现膨大泡囊,呈“念珠状”;经 PI 染色后荧光显微镜观察,抗菌物质作用后的菌丝细胞膜通透性改变,进一步通过扫描电子显微镜观察,发现泡囊状菌丝表面凹凸不平,并残留有碎片;抑菌物质对细胞壁和细胞膜的组分拮抗作用和高效液相色谱方法检测显示,抑菌物质影响细胞膜中麦角甾醇的合成。研究结果表明, *Streptomyces alboflavus* 产生的抗真菌物质发挥抑菌作用时,影响串珠镰刀菌细胞膜中麦角甾醇的合成。本研究可为抑菌物质的鉴定和拮抗菌的应用提供理论参考。

关键词: 白黄链霉菌;串珠镰刀菌;抑菌物质;抑菌活性;抑菌机理

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

镰刀菌是世界性分布的一类真菌,可侵染达 100 余种植物,引起植物的根腐、茎腐、花腐和穗腐等多种病害^[1-2]。镰刀菌侵染寄主植物维管束系统,破坏植物的输导组织维管束,并产生毒素,造成作物萎蔫死亡,属于生产上最难防治的重要病害之一。镰刀菌在世界范围内造成许多毁灭性的植物病

害,如串珠镰刀菌(*Fusarium moniliforme*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)造成香蕉萎蔫病,禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)造成颈腐病等^[3-5]。串珠镰刀菌还会污染玉米、高粱、小麦、棉花及某些饲料等,为非专性、非宿主特异性病原菌,其水溶性代谢产物伏马菌素(fumonisin),还可以引起动物各种

收稿日期: 2018-11-15

基金项目: 天津市科技计划重点项目(16YFZCNC00700);国家自然科学基金资助项目(31701668);天津市自然科学基金资助项目(17JCQNJC14300)。

第一作者: 王志芳,女,讲师,博士,主要从事生物技术及微生物资源的开发与利用方面的研究。

*通信作者: 王昌禄,男,教授,博士生导师,主要从事食品生物技术方面的研究。

疾病,如马脑白质软化症、猪肺水肿或大鼠肝癌^[6-7]。采用生物防治手段对有害霉菌及其毒素进行防控,对环境污染小,符合农业可持续发展战略方向,受到国内外科学家关注。

链霉菌是重要的生防菌株,利用链霉菌产生的次级代谢物开发抑菌剂具有天然、安全、抑菌效果好等特点,被广泛用于农业及医药领域^[8-10]。随着现代生物技术的发展,研究者在极端环境微生物、新菌种筛选、新物质分离等方面取得了一定的成果。链霉菌具有产生多种次级代谢物的能力,对寻找具有新颖化学结构及开发新作用机理的抗菌药物生物活性资源具有重要意义^[11-14]。

Streptomyces alboflavus 是从土壤中筛选到的一株拮抗菌,保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC No. 4666),16S rDNA在NCBI注册登录号为JX915780,鉴定为白黄链霉菌。对峙培养法研究发现,该菌对黄曲霉(*Aspergillus flavus*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)、赭曲霉(*Aspergillus ochraceus*)、纯绿青霉(*Penicillium verrucosum*)、串珠镰刀菌、尖孢镰刀菌、茄腐镰刀菌(*Fusarium solani*)等常见重要植物病原菌具有广谱拮抗作用,尤其对串珠镰刀菌的抑制效果最好,且还会产生挥发性抑菌物质^[15-16]。为进一步研究 *Streptomyces alboflavus* 产生的生物活性物质,本研究对其产生的胞内抗菌物质进行定性分析,并研究其活性物质对串珠镰刀菌的抑菌机理,希望为利用链霉菌开展镰刀菌的生物防治技术研究提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和培养基

拮抗菌株:拮抗链霉菌菌株 *Streptomyces alboflavus*,本实验室自天津市宝坻区饲料厂储粮仓周围的土壤中筛选分离获得并保藏。供试菌株:串珠镰刀菌(*Fusarium moniliforme*),由天津市畜牧兽医研究所提供。

供试培养基:高氏一号液体培养基,用于 *Streptomyces alboflavus* 发酵液的培养;PDA培养基,用于指示菌串珠镰刀菌的培养及拮抗活性的测定。

1)高氏一号合成培养基配方:可溶性淀粉,20.0 g; NaCl,0.5 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.01 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.5 g;

KNO_3 ,1 g; K_2HPO_4 ,0.5 g;琼脂,20 g;自来水,1 000 mL;调节 pH 值 7.2~7.4。

2)高氏一号液体培养基配方:可溶性淀粉,20.0 g;黄豆粉,10.0 g; KNO_3 ,1.0 g; K_2HPO_4 ,0.5 g; NaCl,0.5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.5 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.01 g;自来水,1 000.0 mL;pH 值 7.2~7.4。

3)PDA培养基配方:称取去皮马铃薯 200.0 g,切成小块,加入1 000.0 mL水,煮沸 30 min,用双层纱布滤成清液。加水至 1 000.0 mL,然后加入 20.0 g 葡萄糖至完全溶解,pH 值自然。

4)查氏培养基配方: NaNO_3 ,3.0 g; K_2HPO_4 ,1.0 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.5 g; KCl,0.5 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.01 g;蔗糖,30.0 g;蒸馏水,1 000 mL;pH 值自然。

1.1.2 原料和试剂

黄豆粉,食品级,天津市售黄豆粉;硫酸亚铁、硫酸镁,化学纯,天津市化学试剂一厂;可溶性淀粉、氯化钠、硝酸钾,分析纯,天津市北方天医化学试剂厂;胆固醇(质量比 94%)、麦角甾醇(质量比大于 75%),Sigma-aldrich 公司;葡聚糖(质量比大于 97%),百特纯大分子科技有限公司;壳聚糖(质量比大于 85%),湖北圣天宇公司;硅胶 G、硅胶 H,青岛海洋化工厂;葡聚糖凝胶 LH-20,Pharmacia 公司。

1.2 仪器和设备

LS-B50L型立式压力蒸汽灭菌锅,上海华线医用核子仪器有限公司;KCL2000型恒温恒湿培养箱,日本 Eyela 东京理化公司;AG22331型高速离心机,德国 Eppendorf 公司;CX41型生物显微镜、BX-60型荧光显微镜,Olympus 公司;SU-1510型扫描电子显微镜,Hiachi 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 *Streptomyces alboflavus* 的发酵培养

将 *Streptomyces alboflavus* 菌株划线于高氏一号固体培养基斜面上进行活化,28℃恒温培养箱中培养 5~6 d,制备 1×10^6 CFU/mL 孢子悬液,按体积分数 10% 添加量加入到液体发酵培养基中,28℃,180 r/min 摇床培养 6 d。

1.3.2 *Streptomyces alboflavus* 中抑菌活性物质的分离纯化

用 8 层纱布过滤发酵液,得到链霉菌菌丝体。甲醇浸提菌丝体,将浸提液减压浓缩,粗提物经萃取、硅胶吸附柱层析、葡聚糖凝胶 LH-20 柱层析分离纯化,得到脂溶性抑菌组分。

1.3.3 抑菌活性物质检测方法

采用牛津杯法测定抑菌物质的生物活性。将串珠镰刀菌的孢子悬浮液接种于 PDA 培养基中,然后放置 3 个牛津杯,将活性物质加入一个牛津杯,其余两个作为空白对照组,培养 3 d。

1.3.4 抑菌活性物质 pH 纸层析

以新华一号层析纸为固定相,用 pH 值为 2.2 ~ 8.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液及 pH 值 9 ~ 10 的甘氨酸-氢氧化钠溶液分别处理各滤纸条,晾干后备用。在每个 pH 值的滤纸条上一端标记起点,取抑菌物质 20 μ L 进行点样,晾干后分别在水饱和的正丁醇、水饱和的乙酸乙酯、体积分数 50% 的乙醇中展层,用生物学显迹法测迁移率 Rf 值,具体方法见参考文献[17]。

1.3.5 抑菌活性物质 Doskochilova 溶剂纸层析

溶剂系统: I. 水饱和的正丁醇; II. 水饱和的正丁醇,内含质量比 2% 的对甲苯磺酸; III. V(正丁醇): V(乙酸): V(水)为 2:1:1; IV. 水饱和的正丁醇,内含质量比 2% 的六氢吡啶; V. 正丁醇饱和的 0.5 mol/L、pH 值为 7 的磷酸缓冲液; VI. 正丁醇饱和的水,内含质量比 2% 的对甲苯磺酸; VII. V(苯): V(甲醇)为 4:1,滤纸先用磷酸缓冲液处理后晾干; VIII. V(甲醇): V(水)为 3:1,水内含质量比 3% 的 NaCl,滤纸先用质量比 5% 的 Na_2SO_4 处理后晾干。用生物学显迹法测迁移率 Rf 值,具体方法见参考文献[17]。

1.4 抑菌物质对菌丝形态影响的观察

1.4.1 光学显微镜观察

采用牛津杯法检测抑菌物质的抑菌活性,挑取由抑菌物质作用产生的透明圈的边际菌丝,光学显微镜观察。挑取未受到抑制作用的菌丝作为对照。

1.4.2 荧光显微镜观察

将 1×10^6 CFU/mL 的串珠镰刀菌孢子悬浮液接种于察氏液体培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$,180 r/min 条件下培养 48 h。将串珠镰刀菌的培养液以转速为 4 000 r/min,离心 10 min,弃上清液,用抑菌物质溶液轻轻悬浮菌丝 15 min,去离子水清洗后,用碘化丙啶(PI)染色后,在荧光显微镜下进行观察。对照组菌丝用体积比为 50% 甲醇(配制抑菌物质的溶液)处理。激发光波长 450 ~ 490 nm,发射光波长 520 nm。

1.4.3 扫描电子显微镜观察

采用牛津杯法检测抑菌物质的抑菌活性,并用双面刀片从抑菌物质作用产生的透明圈的边际取样(3 ~ 5 mm^3),2.5% 戊二醛固定 2 h,磷酸缓冲液清

洗,酒精梯度脱水(体积分数为 50%、70%、80%、90%、100% 乙醇各 20 min),干燥,离子镀膜法镀膜,扫描电镜观察、照相。以未受到抑制作用的菌丝作为对照。

1.5 抑菌物质对菌丝细胞壁和细胞膜组成物质影响的检测

1.5.1 抑菌物质对细胞壁和细胞膜组成物质的拮抗作用测试

参考文献[18]进行,配制含有不同浓度的胶状几丁质、壳聚糖、 β -1,3 葡聚糖的培养基,其终质量浓度分别为 0.5、1.0、2.0、10.0 mg/mL,灭菌备用。卵磷脂、麦角甾醇、胆固醇分别配成质量浓度 1 mg/mL 母液,过滤除菌后,加入培养基中,使其终质量浓度分别为 0.5、1.0、2.0、10.0、50.0 $\mu\text{g/mL}$ 。通过牛津杯法检测加入的物质是否对抑菌物质的抑菌活性产生拮抗作用。

1.5.2 抑菌物质对菌丝细胞膜中麦角甾醇合成的检测

1.5.2.1 菌株培养及难皂化脂的提取^[19-20]

将抑菌物质加入到 PDB 培养液中,终质量浓度为 10.21 $\mu\text{g/mL}$,同时接入串珠镰刀菌孢子悬浮液。以不加抑菌物质作为空白对照组,培养 3 d 后,分别离心收集菌体,PBS 洗涤两次至上清液无色,去上清液。精确称取菌体 2.5 g,置于 250 mL 回流瓶中,加碱醇溶液(20% NaOH 与 95% 乙醇体积比为 5:3)32 mL,在 90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中皂化 1.5 h。再加 95% 乙醇 4 mL 继续皂化 1 h,冷却后加 20 mL 石油醚(沸程 30 ~ 60 $^{\circ}\text{C}$),充分振荡 20 min,静置 2 h。提取 2 次,取上层液,用 10 mL 蒸馏水洗 1 次,取 1 mL 定容至 10 mL,备用。

1.5.2.2 麦角甾醇 HPLC 检测^[21]

色谱条件为:流动相 V(甲醇): V(水)为 98:2;柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,检测波长 280 nm,流速 1.0 mL/min,灵敏度 0.01 AUFS,进样量 10 μL 。

配制麦角甾醇标准品质量浓度分别为 0.062 5、0.125 0、0.250 0、0.500 0、1.000 0 mg/mL,制作标准曲线,并对样品进行检测。

2 结果与分析

2.1 活性物质的抑菌作用分析

Streptomyces albobiflavus 中活性物质对串珠镰刀菌的抑制作用见图 1。由图 1 可知,加入活性物质的牛津杯周围产生透明的抑菌圈,活性物质显示出

很强的抑菌作用,在透明圈内没有串珠镰刀菌生长。

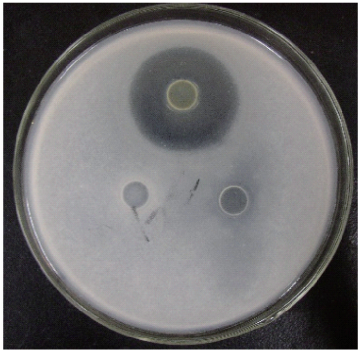


图 1 抑菌物质对串珠镰刀菌的抑制作用
Fig. 1 Inhibit action of active antifungal substance against *Fusarium moniliforme*

2.2 pH 纸层析结果

抑菌物质 pH 纸层析结果见图 2(层析体系为 50% 乙醇)。由图 2 可以看出,该物质呈现中性抗生素的特征,不论 pH 值有何变化,Rf 值几乎不变。

以不同 pH 值缓冲液处理的层析纸为固定相,用合适的溶剂系统为移动相,对不同类型的抗生素进行层析,pH 纸层析的 Rf 值有一定变化规律。可将抗生素分为酸性抗生素、碱性抗生素、中性抗生素和两性抗生素。

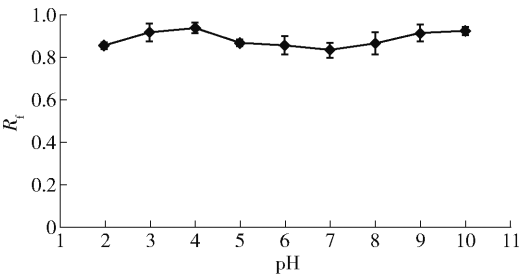
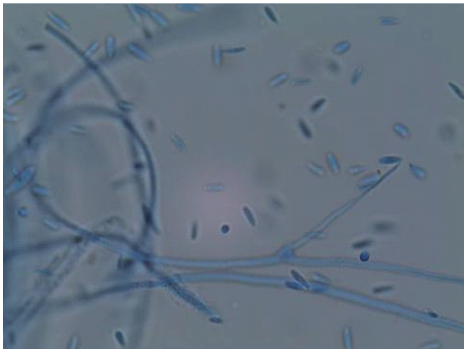


图 2 抑菌物质的 pH 纸层析结果
Fig. 2 Results of paper chromatography of pH system



(a) 正常菌丝及孢子(60×)



(b) 受抑制菌丝及孢子(60×)

图 4 抑菌物质对菌丝形态影响的光学显微镜观察结果

Fig. 4 Effects of antifungal substance on morphological of *Fusarium moniliforme* by optical microscope

2.3 捷克八溶剂纸层析结果

抑菌物质捷克八纸层析结果见图 3。由图 3 可知,活性物质在溶剂系统 5 和 6 中移动极小,而在其他溶剂系统中均移动较大,成为倒船帆形。与捷克学者提出的 6 类标准图谱比较,所得的活性物质的抗生素类别与非水溶性 I 型抗生素层析图谱相似,推断该活性物质为非水溶性 I 型抗生素。

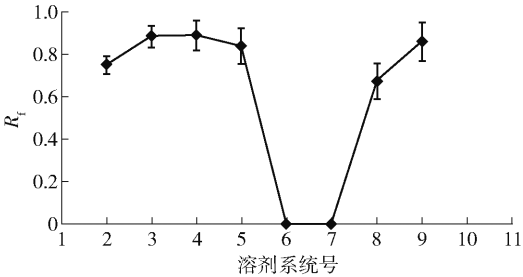


图 3 抑菌物质在捷克八溶剂系统的纸层析结果
Fig. 3 Results of paper chromatography of Daskochilova system

2.4 抑菌物质对菌丝形态的影响

2.4.1 光学显微镜观察结果

用光学显微镜观察抑菌物质对菌丝体形态的影响,结果如图 4。由图 4 可知,空白对照组,菌丝形态结构完整、表面光滑,菌丝体圆润饱满、分布均匀,表现出良好的生长状态;抑菌物质作用 48 h 后的串珠镰刀菌菌丝生长畸形,变得粗细不均,尤其菌丝末端有膨大现象,整个菌丝上有“念珠状”空泡出现,并可见不完整菌丝,原生质体外泄。实验结果表明,抑菌物质可能会通过使菌丝末端膨大阻碍菌丝继续生长。

2.4.2 荧光显微镜观察结果

经 PI 染色后的空白对照组和抑菌物质处理组菌丝,在荧光显微镜下观察结果如图 5。图 5 中,抑菌物质处理 15 min 后,多数菌丝的细胞核被染成了

红色,而空白对照组菌丝没有被染色,推测抑菌物可能破坏串珠镰刀菌菌丝细胞膜的结构,导致膜通透

性改变,干扰了菌体正常生理代谢的功能,从而起到对串珠镰刀菌的抑制作用。

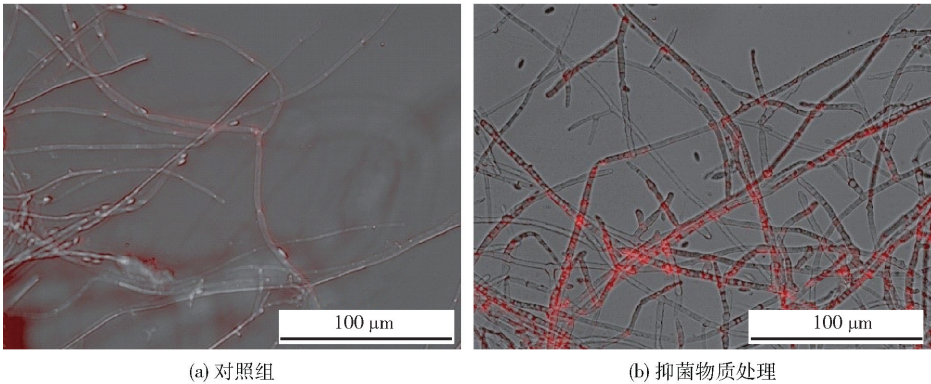


图5 抑菌物质对菌丝通透性影响的荧光显微镜观察结果

Fig. 5 Effects of antifungal substance on cell membrane of *Fusarium moniliforme* by fluorescence microscope

2.4.3 扫描电子显微镜观察结果

采用扫描电子显微镜 (SEM) 观察抑菌物质对串珠镰刀菌的抑制作用,结果见图 6。图 6 中,空白对照组菌丝生长繁茂,菌丝细长、均匀;活性物质处理组,大多数菌丝体变形、孢子萌发出畸形的菌芽,

出现较大的囊泡。泡囊状菌丝表面凹凸不平,并残留有碎片,推测活性物质可能会抑制孢子的萌发,破坏串珠镰刀菌菌体的完整性,进而产生抑菌或杀菌作用。

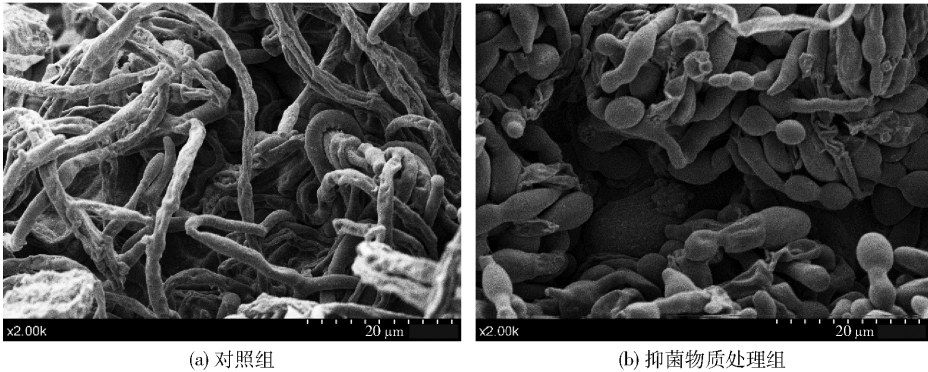


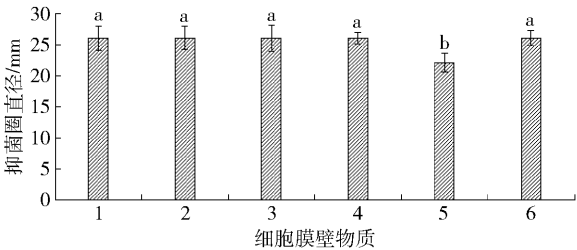
图6 抑菌物质对菌丝形态影响的 SEM 观察结果

Fig. 6 Effects of antifungal substance on morphological of *Fusarium moniliforme* by scanning electron microscope

2.5 抑菌物质对菌丝细胞壁和细胞膜组成物质的影响

2.5.1 抑菌物质对细胞壁和细胞膜组成物质的拮抗效果

抑菌物质对细胞壁物质和细胞膜组成物质的拮抗作用见图 7。图 7 中,含有胶状几丁质、壳聚糖、 β -1,3 葡聚糖、卵磷脂和胆固醇的培养皿中活性组分的抑菌作用没有变化;而含有麦角甾醇的平板中,抑菌物质的抑菌圈直径减小,并随着麦角甾醇浓度的增加,拮抗效果加强,提示抑菌物质对串珠镰刀菌的作用靶点可能与细胞膜中麦角甾醇有关。



1~6 分别表示:胶状几丁质、壳聚糖、 β -1,3 葡聚糖、卵磷脂、麦角甾醇、胆固醇;不同小写字母表示经 Duncan 新复极差法检验,在 $P < 0.05$ 水平差异显著。

图7 细胞膜壁物质对抑菌物质的拮抗效果

Fig. 7 Antagonism of components of cell membrane and cell wall to antifungal substance

2.5.2 抑菌物质对菌丝细胞膜中麦角甾醇合成的影响

2.5.2.1 麦角甾醇的标准曲线分析

对不同质量浓度的麦角甾醇标准品分别进行 HPLC 分析。以麦角甾醇的质量浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标制作标准曲线。结果表明,麦角甾醇质量浓度为 0.062 5 ~ 1.000 0 mg/mL 时,标准曲线的线性良好,回归方程为 $Y = 6\,378.8X + 87.864$, $R^2 = 0.999\,9$ 。

2.5.2.2 串珠镰刀菌菌体细胞膜中麦角甾醇的检测结果

以标准品的保留时间和峰面积值分别作为定性、定量依据。结果表明,正常菌丝的细胞膜中麦角甾醇质量浓度为 124.00 ng/mL,而用抑菌物质处理菌丝的细胞膜中麦角甾醇的质量浓度为 0.81 ng/mL,表明抑菌物质处理后的串珠镰刀菌菌丝细胞膜中麦角甾醇的生物合成减小。

3 结 论

本实验结果表明,*Streptomyces albobiflavus* 产生的抗菌物质对串珠镰刀菌菌丝生长和孢子萌发都有很强的抑制作用。抗菌物质浓度高时,能造成菌丝生长畸形、短粗,膨大形成“念珠状”,菌丝不能向前生长,从而使其受到抑制;此外,抗菌物质处理后的病原菌菌丝尖端形成膨胀泡而破裂,引起原生质外泄,造成溶菌现象。荧光显微镜观察发现,活性物质还可能对串珠镰刀菌的菌体细胞膜造成损伤,导致大分子的 PI 染料进入细胞内与细胞核 DNA 结合生成红色荧光物,而正常组菌丝中未见红色荧光物。通过检测细胞壁物质和细胞膜组成物质与抑菌物质对串珠镰刀菌抑菌效果的拮抗作用的影响,发现培养基含有麦角甾醇的平皿中,抑菌物质的抑菌圈直径减小;进一步用 HPLC 法检测了经过抑菌物质处理的菌丝和空白对照组菌丝中难皂化脂类提取物中麦角甾醇的含量,结果表明,受抑菌物质作用的菌丝细胞膜中麦角甾醇的生物合成减少。

链霉菌是重要的天然抗生素来源菌群,自从抗生素问世以来,各国学者对抗生素如何作用于微生物和作用的具体靶标位点等抑菌机理进行了很多研究。结果表明,抗生素能通过作用于微生物细胞膜、细胞壁、蛋白质合成系统,抑制核酸或核苷酸的合成等多种方式产生抑菌效果;而有一些抗菌物质会通

过几种抑制方式同时作用于病原菌,达到抑菌作用。*Streptomyces albobiflavus* 产生的抗菌物质对指示菌蛋白质合成系统、核酸或核苷酸的合成等其他作用方式值得进一步探究。随着分子生物学技术在抑菌机理方面的应用,也有报道发现一些新的特异性作用靶点和专化性靶标酶^[22-23]。研究抑菌物质的抑菌机理及新的抑菌作用方式对探寻新型防霉保鲜剂具有重要意义。

参考文献:

- [1] DE MENEZES H D, TONANI L, BACHMANN L, et al. Photodynamic treatment with phenothiazinium photosensitizers kills both ungerminated and germinated microconidia of the pathogenic fungi *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium solani*[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2016, 164: 1-12.
- [2] DE SENNA A, LATHROP A. Antifungal screening of bioprotective isolates against botrytis cinerea, *Fusarium pallidoroseum* and *Fusarium moniliforme*[J]. Fermentation, 2017, 53(3): 1-11.
- [3] OLDENBURG E, HÖPPNER F, ELLNER F, et al. Fusarium diseases of maize associated with mycotoxin contamination of agricultural products intended to be used for food and feed[J]. Mycotoxin Research, 2017, 33(3): 167-182.
- [4] MASCHIETTO V, COLOMBI C, PIRONA R, et al. QTL mapping and candidate genes for resistance to *Fusarium ear rot* and fumonisin contamination in maize[J]. BMC Plant Biology, 2017, 20(17): 2-21.
- [5] SARAVANAKUMAR K, Li Y, YU C, et al. Effect of *Trichoderma harzianum* on maize rhizosphere microbiome and biocontrol of *Fusarium Stalk rot*[J]. Scientific Reports, 2017(17): 1-13.
- [6] LOGRIECO A, MULEÈ G, MORETTI A, et al. Toxicogenic fusarium, species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe[J]. European Journal of Plant Pathology, 2002, 108(7): 597-609.
- [7] WANG X, WU Q H, WAN D, et al. Fumonisin; oxidative stress-mediated toxicity and metabolism *in vivo* and *in vitro*[J]. Archives of Toxicology, 2016, 90(1): 81-101.
- [8] ZHAO S H, DU C M, TIAN C Y. Suppression of *Fusarium oxysporum* and induced resistance of plants involved in the biocontrol of cucumber fusarium wilt by *Streptomyces bikiniensis* HD-087[J]. World Journal of Microbiolo-

- gy and Biotechnology, 2012, 28(9):2919–2927.
- [9] CHENG J, PARK S B, KIM S H, et al. Suppressing activity of staurosporine from *Streptomyces* sp. MJM4426 against rice bacterial blight disease [J]. Journal of Applied Microbiology, 2016, 120(4):975–985.
- [10] 李威, 肖熙鸥, 李可, 等. 茄子青枯病拮抗放线菌 XL-6 的筛选、鉴定及发酵条件优化 [J]. 微生物学通报, 2018, 45(2):357–367.
- LI W, XIAO X O, LI K, et al. Screening, identification and fermentation optimization of an antagonistic actinomycete strain XL-6 against *Ralstonia solanacearum* [J]. Microbiology China, 2018, 45(2):357–367.
- [11] SONG Y X, HHUANG H B, CHEN Y C, et al. Cytotoxic and antibacterial marfuraquinocins from the deep south china sea-derived *Streptomyces niveus* SCSIO 3406 [J]. Journal of Natural Products, 2013, 76(12):2263–2268.
- [12] CHENG J, PARK S B, KIM S H, et al. Suppressing activity of staurosporine from *Streptomyces* sp. MJM 4426 against rice bacterial blight disease [J]. Journal of Applied Microbiology, 2016, 120(4):975–985.
- [13] 庄令. 深海链霉菌拮抗香蕉枯萎病菌活性菌株的筛选及鉴定 [J]. 贵州农业科学, 2017, 45(12):59–63.
- ZHUANG L. Screening and identification of deep-sea streptomyces with than antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* [J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2017, 45(12):59–63.
- [14] 吴志明, 钟敏, 鹿承建, 等. 新型农抗 N2 粗提物对水稻纹枯病菌细胞膜和抗氧化功能的影响 [J]. 核农学报, 2018, 32(4):700–707.
- WU Z M, ZHONG M, LU C J, et al. Effects of the crude extract from *Streptomyces* sp. N2 on cell membrane and antioxidant function of *Rhizoctonia solani* [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2018, 32(4):700–707.
- [15] WANG C L, WANG Z F, QIAO X, et al. Antifungal activity of volatile organic compounds from *Streptomyces alboblavus* TD-1 [J]. FEMS Microbiology Letters, 2013, 341(1):45–51.
- [16] 李贞景, 张春慧, 路来风, 等. 白黄链霉菌 TD-1 菌株挥发性有机物对灰霉孢菌的抑制作用 [J]. 食品科学技术学报, 2016, 34(3):46–52.
- LI Z J, ZHANG C H, LU L F, et al. Inhibitory effect of volatile organic components from *Streptomyces alboblavus* TD-1 against *Botrytis cinerea* [J]. Journal of Food Science and Technology, 2016, 34(3):46–52.
- [17] 周德庆. 微生物实验手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 337–344.
- ZHOU D Q. Handbook of microbiology experiment [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1986: 337–344.
- [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.
- HU L B, ZHOU W, ZHANG T, et al. Mechanism of inhibition to *Fusarium moniliforme* by antimicrobial peptide Fengycins [J]. Microbiology China, 2010, 37(2):251–255.
- [19] RYDER N S. Inhibition of squalene epoxidase and sterol side-chain methylation by allylamines [J]. Biochemical Society Transactions, 1990, 18(1):45.
- [20] 曹永兵, 姜远英, 殷明, 等. 特苳康唑对真菌麦角甾醇生物合成的影响 [J]. 中国药理学杂志, 2000, 35(4):237–239.
- CAO Y B, JIANG Y Y, YIN M, et al. Effect of terbiaminazole a new antifungal agent on ergosterol biosynthesis in fungi [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2000, 35(4):237–239.
- [21] CHEN D Q, AN J M, FENG Y L, et al. Cloud-point extraction combined with liquid chromatography for the determination of ergosterol, a natural product with diuretic activity, in rat plasma, urine, and faeces [J/OL]. Journal of Analytical Methods in Chemistry [2018-11-15]. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/479056>.
- [22] 李艳波, 史怀. 利用代谢组学方法分析生防菌抑菌机理模式的初步建立 [J]. 热带作物学报, 2017, 38(1):155–159.
- LI Y B, SHI H. Establishment of a analysis method for antifungal modes of biocontrol strains on cucumber fusarium wilt by metabonomics [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2017, 38(1):155–159.
- [23] 张宇, 姜宁, 张爱忠. 抗菌肽抑菌机理及其研究方法 [J]. 现代畜牧兽医, 2018(1):52–57.
- ZHANG Y, JIANG N, ZHANG A Z. Bacteriostatic mechanism and research methods of antibacterial peptides [J]. Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2018(1):52–57.

Inhibition Mechanism of *Streptomyces alboblavus* Antifungal Substance Against *Fusarium moniliforme*

WANG Zhifang^{1,2}, LI Zhenjing², YANG Mingguan², LU Laifeng², WANG Changlu^{2,*},
LI Zheng³, ZHANG Jianfei³, GONG Jixian³

(1. Center of Analytical and Testing, Tianjin Polytechnic University, Tianjin 300387, China;

2. College of Food Engineering and Biological Technology/Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China;

3. School of Textile Science and Engineering, Tianjin Polytechnic University, Tianjin 300387, China)

Abstract: The inhibition mechanism of antifungal substance generated by *Streptomyces alboblavus* against *Fusarium moniliforme* was investigated. The antifungal substance was qualitatively analyzed by pH paper and Daskochilova system chromatography. The destructive effects of antifungal substance on cell membrane and cell wall of *Fusarium moniliforme* were observed by fluorescence microscopy and scanning electron microscopy. The antagonistic effects of main components of cell membrane and wall on antifungal substance were explored. Furthermore, the inhibitory effect of antifungal substance on ergosterol in cell membrane of *Fusarium moniliforme* was detected by HPLC. The antifungal substance was neutral and non-water-soluble type I antibiotics by polarity test and Daskochilova system paper chromatography. Optical microscope was used to observe the inhibition of germination of *Fusarium moniliforme* spores, the mycelia were distortion, deformation and swelling when treated with the antifungal substance, and the fluorescence microscope revealed that the permeability of mycelial cell membrane was changed. Moreover, the results from scanning electron microscope showed that the surface of vesicular mycelia was uneven and fragments remained. The antagonism of antifungal substance effect on components of cell wall and cell membrane and the detection by HPLC showed that the synthesis of ergosterol in the cell membrane was affected by antifungal substance. The synthesis of ergosterol in the cell membrane of *Fusarium moniliforme* was affected by the antifungal substance produced by *Streptomyces alboblavus*. This study laid a theoretical foundation on the identification of antifungal substance and the application of antagonistic bacteria.

Keywords: *Streptomyces alboblavus*; *Fusarium moniliforme*; antifungal substance; antifunga activity; antifungal mechanism

(责任编辑:叶红波)