铁载体产生菌筛选、鉴定及防治 *Botryosphaeria dothidea*

黎循航[1,2]，张言周[1]，李韵雅[1]，孙 萌[1]，管政兵[1]，蔡宇杰[1]，廖祥儒[*1]

（1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122；2. 江西农业大学 生物科学与工程学院，江西 南昌 330045）

摘要： 葡萄座腔菌属（*Botryosphaeria* spp.）真菌在全球范围广泛引起多种果树发生溃疡病和流胶病等病症，严重制约种植业的健康发展。作者从蜂蜜中分离出产儿茶酚型铁载体的 H47 菌株和产异羟肟酸型铁载体的 H114 菌株，经 16S rRNA 基因分析和生理生化鉴定，两菌株均为解淀粉芽孢杆菌。菌株用 MM9 培养基发酵，上清液经有机溶剂萃取、真空干燥获得铁载体的粗品。铁载体粗品对 *B. dothidea* Ces. & De Not ACCC 38026 进行平板抑菌实验，结果表明：H47 和 H114 菌株产生的不同类型铁载体粗品对葡萄座腔菌均有抑菌作用，毒力回归方程分别为 y=1.432x+0.578 和 y=1.744x+0.063。由此可见，H47 菌株和 H114 菌株有成为生物防治剂的潜力。

关键词： 葡萄座腔菌；铁载体；抑菌活性；解淀粉芽孢杆菌

中图分类号：Q 819　**文章编号：**1673-1689(2019)03-0144-08　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.03.021

Isolation and Characterization of Siderophore Producing Bacteria for Biocontrol *Botryosphaeria dothidea*

LI Xunhang[1,2]，*ZHANG Yanzhou*[1]，*LI Yunya*[1]，*SUN Meng*[1]，*GUAN Zhengbing*[1]，*CAI Yujie*[1]，*LIAO Xiangru*[*1]

（1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. The Bioscience and Engineering College, Jiangxi Agriculture University, Nanchang 330045, China）

Abstract: *Botryosphaeria* spp. are important pathogens on a variety of fruit trees causing cankers and gummosis on almond trunks, and resulting in a significant decline in the health development of the planting industry. The strain H47 (producing catechol-type siderophore) and the strain H114 (producing hydroxamate-type siderophore) were isolated from the honey. The two strains identified as *Bacillus amyloliquefaciens* by 16S rRNA gene analysis and physiology biochemistry experiment. The strains were cultured with the MM9 medium, and the cell-free supernatants were extracted by organic solvent. The organic phases collected as partially purified siderophore were dried in a

收稿日期： 2016-03-04

基金项目： 江苏省产学研前瞻项目（BY2014023-28）；江西省青年科学基金项目（20122BAB214027）；无锡农业科技支撑项目（CLE01N1310）。

作者简介： 黎循航（1978—），男，博士，讲师，主要从事微生物次级代谢产物方面的研究。E-mail：li_xunh@126.com

*** 通信作者：** 廖祥儒（1964—），男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail：13771104596@163.com

引用本文： 黎循航，张言周，李韵雅，等. 铁载体产生菌筛选、鉴定及防治 *Botryosphaeria dothidea*[J]. 食品与生物技术学报，2019，38(03)：144-151.

vacuum oven. The partially purified siderophore was inoculated along with the *B. dothidea* Ces. & De Not ACCC 38026 and the inhibition of the mycelial growth was test by vernier caliper. The results indicated that both catechol-type and hydroxamate-type siderophores had antifungal activity to pathogen, toxicity regression equations were $y=1.432x+0.578$ and $y=1.744x+0.063$, respectively. Thus these honey isolates had the potential as the bio-control agents, which were useful to inhibit the growth of *B. dothidea*.

Keywords: *Botryosphaeria dothidea*, siderophore, antifungal activity, *Bacillus amyloliquefaciens*

葡萄座腔菌属(*Botryosphaeria* spp.)真菌能通过修枝、嫁接等破坏植物表皮的方式潜伏性侵染植物,可造成枝干溃疡流胶,引起植株茎杆的形成层和韧皮部收缩,阻断树液循环,导致树势消弱甚至死亡[1]。*Botryosphaeria* spp.可在桃树、葡萄树、梨树等多种一年生植物和多年生植物寄主上引发溃疡病、枯梢病、流胶病、轮纹病等病害,严重威胁种植业的健康发展[2-3]。目前国内常用多菌灵、甲基硫菌灵、丙环唑等杀真菌剂防治葡萄座腔菌属引起的病害,使用初期能取得一定的防治效果。但随着药物使用时间的增加,病原菌抗药性逐步增强,防治效果严重削弱[4]。加之化学杀菌剂高毒性、高残留引发的食品安全问题,促使人们寻找一种更加安全环保的替代方法防治葡萄座腔菌造成的病害。在各种生物防治方法中,有关具有拮抗作用芽孢杆菌的研究备受关注[5]。

芽孢杆菌属中的许多种对环境有益,可作为生物杀虫剂和生物杀菌剂防治植物病害[6]。芽孢杆菌拥有多种机制拮抗土壤中的病原真菌,产生铁载体是其中之一[7]。铁载体是细菌或真菌在限制性铁离子条件下产生的一类对铁离子具有特异性亲和力的低相对分子质量(400 000~1 000 000)的螯合剂,与铁离子的结合常数范围为 10^{12}~10^{52}[8],能够有效的降低环境中生物可利用铁离子的浓度,抑制根际微生物的生长。铁载体已经在医药、植物病害防治和植物生态修复等领域得到应用[9-11]。

蜂蜜具有高渗透性、低水活度、高酸性等不利于微生物的生长的特征。蜂蜜中微生物的来源主要与蜜蜂接触的花粉、植物、蜂房及蜜蜂肠道微生物相关。研究表明,从蜂蜜分离出的微生物中芽孢杆菌占主导地位[12],且其中大部分芽孢杆菌展现出广谱抗菌活性,其抗菌活性物质在植物病害防治、食品防腐及临床治疗等方面具有应用价值[13-14],因此蜂蜜可作为一种新的资源用于筛选抗菌物质产生菌。由于铁载体防治葡萄座腔菌的研究鲜为报道,故本研究的目标为:分类鉴定从未加工蜂蜜中分离筛选的细菌;考察各个菌株产生铁载体的能力;测定铁载体对葡萄座腔菌的抑制效果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 蜂蜜 采用产于广西扶绥地区未经加工的原蜜。

1.1.2 病原真菌 *B. dothidea* Ces. & De Not ACCC 38026(简写为:*B. dothidea*):保存于江南大学工业生物技术教育部重点实验室。

1.1.3 培养基 DWA 培养基(组分 g/L)[15]:酵母膏 5.0,酪蛋白胨 2.0,甘油 1.0,葡萄糖 20.0,蔗糖 400.0,琼脂 16.0。

TSB(组分 g/L)[16]:胰蛋白胨 17.0,大豆蛋白胨 3.0,葡萄糖 2.5,NaCl 5.0,K_2HPO_4 0.3;pH 7.1~7.5。

MM9 培养基(组分 g/L)[17]:KH_2PO_4 0.3,NaCl 0.5,NH_4Cl 1.0,NaOH 6.0,PIPES 30.24。高压蒸汽灭菌后加入已分别灭菌的 30 mL 10 g/dL 去铁酪蛋白氨基酸(用 3% 8-羟基喹啉三氯甲烷溶液去除铁离子),果糖 2.0 g/L,1 mol/L $MgCl_2$ 1 mL,100 mmol/L $CaCl_2$。

PDA(组分 g/L)培养基:马铃薯 200,葡萄糖 20,琼脂 20;pH 自然。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种分离筛选 取 25 g 蜂蜜与 30%的葡萄糖溶液以 1:9 比例混合,匀浆器高速混匀 2 min,细胞悬液涂布在 DWA 培养基平板上,25 ℃培养 120 h。

1.2.2 菌种 16S rRNA 基因分析 依据文献 [18]方法提取 DNA,使用通用引物 Fd1(5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′)和 Rd1 (5′-AAGGAGGTGAT

CCAGCC-3′)扩增各菌株的 16S rRNA 基因序列,生工生物工程(上海)股份有限公司测序。基因序列提交 NCBI 数据库,并在线 BLAST 以检索最为匹配的序列,使用 MEGA 4 构建系统发育树和分子进化分析[14]。同时,菌株 16S rRNA 基因序列与 http://www.ezbiocloud.net 网站的典型菌株比对,鉴定其具有最高同源性的典型菌株。

1.2.3 CAS 检测 按照文献[19]方法,采用铬天青 S(CAS)琼脂扩散法筛选产生铁载体的菌株。取 10 μL 在 TSB 培养基中培养至对数生长期的待测菌株菌悬液点接在 CAS 琼脂平板上。菌株铁载体产量水平用菌落形成的橙色圈直径和菌落直径的比值(HC)表示。

1.2.4 铁载体类型鉴别 将分离纯化的菌株接种到种子培养基(MM9),30 ℃、200 r/min 摇瓶发酵 12 h,按 1%的接种体积分数转接到发酵培养基(MM9),30 ℃、200 r/min 摇瓶发酵 24 h。发酵液 10 000 r/min、4 ℃离心 20 min,上清液用 0.22 μm 滤膜过滤除菌备用。

Arnow 反应:取 1 mL 发酵上清液溶液,加入 1 mL、0.5 mol/L HCl,1 mL 钼酸盐(10 g 亚硝酸钠和 10 g 钼酸钠溶解于 100 mL 蒸馏水)和 1 mL、1 mol/L NaOH 溶液,混匀后静置 1 h 以上(待混合溶液颜色稳定),测 OD_{510} 吸光度值,以 2,3-二羟基苯甲酸为标品换算铁载体浓度。

Csáky 反应:取 1 mL 发酵上清液或铁载体溶液,加 1 mL、3 mol/L H_2SO_4 沸水浴 6 h。加入 3 mL 醋酸钠溶液,0.5 mL 碘溶液,1 mL 对氨基苯磺酸溶液。3~5 min 后,加入 1 mL 亚砷酸盐溶液。加入 1 mL α-萘胺溶液,补水至 10 mL,静置 20~30 min,测OD_{526} 吸光度值,以盐酸羟胺为标准品换算铁载体浓度[17]。

1.2.5 对植物病原菌 *B. dothidea* 的抑菌效果

1)平板扩散法:将 *B. dothidea* 菌块接种在 PDA 平板上,27 ℃避光培养 15 d,用无菌水洗下孢子。孢子悬液与未凝固的 PDA 培养基在 45 ℃混匀,孢子数维持在 $10^{5\text{-}6}$ 个/L,倒平板。凝固后用打孔器打孔,分别加入 20 μL 不同菌株发酵获得无菌上清液,27 ℃避光培养 5 d,测量抑菌圈的直径。菌株铁载体发酵液抑菌效果用抑菌圈直径和孔直径的比值(HC)表示。

2)铁载体粗提物对 *B. dothidea* 的抑菌效果:按照文献[17]采用有机溶剂(儿茶酚型铁载体使用乙酸乙酯,异羟肟酸型使用苯甲醇)法萃取铁载体。发酵上清液用 20%的有机溶剂萃取 3 次,合并有机溶剂萃取液,用真空旋转蒸发器浓缩至 10 mL 左右,转至真空干燥箱中除去有机溶剂,获得铁载体粗提物。

配置含不同质量浓度(0.4、0.8、1.6、3.2、6.4 g/L)铁载体粗提物的 PDA 平板,接种 *B. dothidea* 菌块(d=9 mm)置于 PDA 平板中央,27 ℃避光培养 5 d。测量不同铁载体浓度处理平板上病原菌菌落生长直径(mm),以不含铁载体的平板为对照,按公式(1)计算不同浓度铁载体对 *B. dothidea* 的抑制率。

$$\text{菌丝体生长抑制率}=\frac{\text{对照平板菌丝生长直径}-\text{处理平板菌丝生长直径}}{\text{对照平板菌丝生长直径}}\times 100\%$$

将菌丝生长抑制率依据生物几率换算表换算成几率值作为依变量,铁载体质量浓度的对数为自变量,使用 IBM SPSS Statistics 19 软件拟合并建立毒力回归方程,并从中获得 EC_{50} 和 EC_{90} 的质量浓度。试验每一处理均重复 3 次。

1.2.6 菌株的生理生化鉴定 菌株生理生化实验依据《伯杰氏细菌鉴定手册》[20],碳源的利用使用 API 50 CH 碳水化合物试验条鉴定(bioMérieux, Inc.)[21]。

2 结果与讨论

2.1 菌种分离及系统进化树的构建

蜂蜜为富含果糖(38.4%)、葡萄糖(30.3%)和蔗糖(1.3%)的高糖物质,pH 值平均约为 3.6,不利于绝大多数微生物的繁殖。研究发现,从未污染的蜂蜜检出的微生物中以芽孢杆菌为主[22]。本研究使用 DWA 培养基从蜂蜜中分离纯化出 20 株菌株,利用光学显微镜检测及革兰氏染色法和芽孢染色法初步鉴定,该 20 株分离菌株均为革兰氏阳性芽孢杆菌。提取扩增各菌株的 16S rRNA 基因并测序,基因序列通过与标准菌株的序列比对,表明分离自蜂蜜的 20 株微生物分别与 *Bacillus cereus*、*Bacillus siamensis*、*Bacillus tequilensis* 和 *Bacillus methylotrophicus* 4 种模式菌株具有极高的相似度,见表 1。其中 H88 菌株与标准菌株的相似度较低,为 92%。

为进一步分析菌株的进化地位,采用 MEGA 4.0.2 软件,使用邻接法(Neighbor-Joining method)对基因序列聚类分析和系统进化树构建,结果见图1。

表 1　20 株蜜源分离菌株同源性分析

Table 1　Homologous analysis of 20 isolated strains

菌株号	序列号	同源性最高模式菌	相似度/%
H21	KF863821	*B. cereus* ATCC 14579T	99
H88	KF863877	*B. siamensis* KCTC 13613T	92
H93	KF863882		99
H98	KF863886		99
H107	KF863889		99
H122	KF863899		99
H47	KF863845		99
H28	KF863828		99
H125	KF863902		99
H68	KF863863	*B. methylotrophicus* CBMB205T	99
H77	KF863868		99
H92	KF863881		99
H94	KF863883		98
H97	KF863885		99
H113	KF863892		99
H114	KF863893		99
H115	KF863894		99
H118	KF863897		99
H123	KF863900		99
H124	KF863901		99

H21 菌株与 *B. cereus* 同簇，归属于蜡样芽孢杆菌。H28、H123 和 H125 与 *Bacillus subtilis* subsp 168 同簇，归属于枯草芽孢杆菌。而包括 H47 在内的其余菌株可能更接近解淀粉芽孢杆菌、甲基营养型芽孢杆菌或暹罗芽孢杆菌，需后续生理生化方法鉴定。

研究发现，除 *B. cereus* 为毒素产生菌外，其它蜂蜜分离株由于能产生抗生素、细菌素和抗真菌物质，在农业和医疗保健上得到一定规模的应用。如从蜂蜜中分离出的 *B. subtilis*[23]和 *B. amyloliquefaciens*[24]能够有效的抑制造成蜜蜂幼虫疫情发生的病原菌 *Paenibacillus larvae* 和 *Ascosphaera apis* 的生长。

2.2　铁载体产生菌初筛

铁载体的测定方法多样，可依据铁载体的化学性质，铁载体的功能和生物法分别测定。CAS 琼脂平板检测法[19]是利用铁载体对铁的亲和能力高于铬天青 S，使染料的颜色从蓝色变成橙色，因而成为最为广泛的用于铁载体产生菌的鉴定方法。图 2(a)中 20 个菌株分别点接在 CAS 琼脂平板上，菌落生长过程中的铁载体渗入琼脂培养基，竞争性螯合铁离子，使染料脱色，形成橙黄色透明圈。图 2(b)中 HC 值为变色圈直径与菌落直径的比值，HC 值的大小间接反应菌落铁载体产量的高低。20 个菌株中变色圈 HC 值高于 1.5 的共有 12 株，其中编号为 H47、H98、H114 和 H124 的 4 个菌株的 HC 值高于 2.5，表明这 4 个菌株铁载体产生量可能最大。

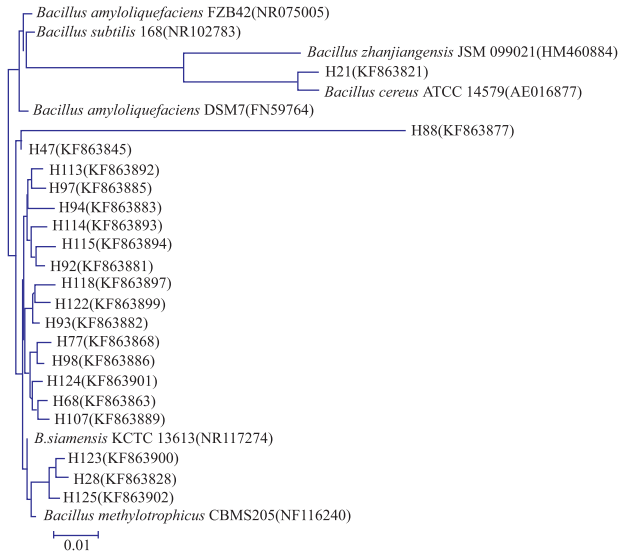


图 1　分离自蜂蜜的 20 株菌株 16S rRNA 基因系统发育树

Fig. 1　Phylogenetic tree of the 20 isolated strains by MEGA4.0.2

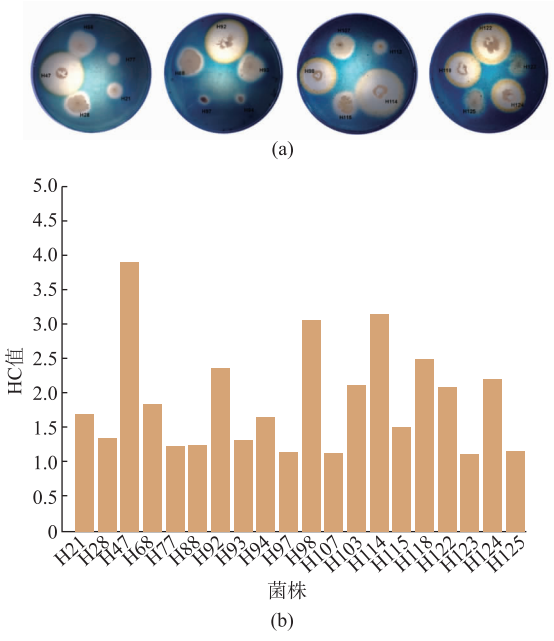


图 2　20 株分离菌株产铁载体形成变色圈及变色圈 HC 值

Fig. 2　Color-changing ring on CAS agar plate formed by 20 isolated strains and HC values

2.3 铁载体类型鉴别

铁载体的类型及产量通过化学法测定。Csáky反应用于异羟肟酸型铁载体检测,Arnow反应用于儿茶酚型铁载体检测。采用MM9培养基分别对H47、H98、H114和H124 4株菌株液体深层发酵,发酵上清液采用Csáky反应和Arnow反应测定不同铁载体浓度,结果见表2。H47菌株Arnow反应呈阳性,Csáky反应呈阴性,表明H47菌株所产铁载体含有儿茶酚型供体基团。H114菌株Csáky反应呈阳性,Arnow反应呈阴性,表明H114菌株所产铁载体含有异羟肟酸型供体基团。H98和H124菌株Csáky反应和Arnow反应均呈阳性,表明这两个菌株产生了同时含有儿茶酚型和异羟肟酸型供体基团的混合型铁载体。

微生物铁载体的产量受环境中铁离子浓度影响,高浓度的铁离子会抑制铁载体的产生。研究铁载体产量的培养基通常严格限制铁离子的浓度,从表3可以看出,蜂蜜分离的4株菌株的铁载体产量显著高于相同培养基发酵的*Xylella fastidosa*菌株[25]的产量。

表2 菌株产铁载体分类

Table 2 Siderophore-type classification

菌号	铁载体类型	
	异羟肟酸型等效浓度/(μmol/L)	儿茶酚型等效浓度/(μmol/L)
H47	0	106
H98	50	25
H114	91	0
H124	48	20

表3 不同微生物菌株铁载体产量

Table 3 Siderophore production by diverse microorganism

菌株	异羟肟酸型等效浓度/(μmol/L)	儿茶酚型等效浓度/(μmol/L)	其它类型等效浓度/(μmol/L)	培养基	参考文献
Pseudomonas aeruginosa JAS-25	130	–	–	King B	[26]
Aeromonas salmonicida	0-107	44-193	–	TSB	[27]
Methylobacterium extorquens	26	–	–	MM9	[25]
Xylella fastidosa	–	–	15	MM9	[25]

2.4 铁载体抑制病原菌作用

2.4.1 发酵液对病原菌的抑制效果 铁载体能够捕获植物根际周围的铁离子,使铁离子浓度低至*Fusarium oxysporum*,*Pythium ultimum*等植物病原菌生长所需,从而抑制作物枯萎病和根腐病的发生[28-29]。由于铁载体对*B. dothidea*抑制效果的研究鲜有报道,作者尝试利用菌株铁载体发酵液考察其对*B. dothidea*的拮抗作用。将*B. dothidea*的孢子悬液和PDA液体培养基在45 ℃混匀,倒平板,凝固后打孔,分别加入H47、H98、H114和H124菌株过滤除菌的发酵液,避光培养。图3(a)表明4个分离菌株的发酵液对*B. dothidea*的生长均具有拮抗作用,图3(b)说明铁载体的浓度与拮抗效果正相关。拮抗效果的出现可能与铁载体的竞争性的与病原菌生长所需的铁离子结合,抑制病原菌孢子的萌发相关[30]。

2.4.2 铁载体粗提物对病原菌的抑菌效果 为探究铁载体对*B. dothidea*的抑菌效果,分别选取H47菌株产生的儿茶酚型铁载体和H114菌株产生异羟肟酸型铁载体进行抑菌研究。不同类型铁载体对

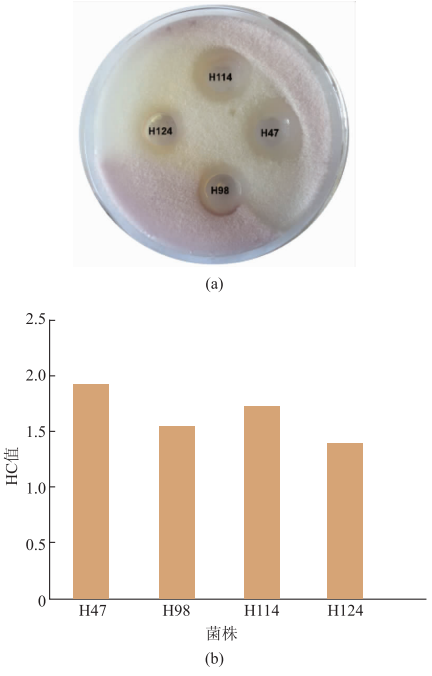


图3 4株分离菌株对葡萄座腔菌的抑制效果及HC值

Fig. 3 Inhibitory effects of four isolated strains to *B. dothidea* and HC values

B. dothidea 菌丝生长的抑制率见表 4。儿茶酚型铁载体对 *B. dothidea* 的毒力方程 $y=1.432x+0.578$,EC_{50} 和 EC_{90} 分别为 0.395 g/L 和 3.099 g/L,异羟肟酸型铁载体对 *B. dothidea* 的毒力方程 $y=1.744x+0.063$,EC_{50} 和 EC_{90} 分别为 0.921 g/L 和 5.001 g/L。类似研究表明,1 mg/mL 铁载体能抑制 *Rhizoctonia solani* 菌落的生长,且能溶解菌丝体[31]。植物病原菌的抑制机理可能主要是铁载体竞争结合铁离子而抑制霉菌孢子的萌发和早期萌发管的生长[32]。

依据抑制作用,推测 H47 菌株产生的儿茶酚型铁载体和 H114 菌株产生异羟肟酸型铁载体均能有效抑制 *B. dothidea* 的生长,且儿茶酚型铁载体的抑制效果优于异羟肟酸型铁载体。由此可见,H47 菌株和 H114 菌株具有成为生物防治剂用于葡萄座腔菌病害防治的可能性。

表 4 H47 和 H114 菌株产铁载体对 *B. dothidea* 抑制作用

Table 4 Inhibitory effects of siderophore produced by strain H47 and H114 to *B. dothidea*

菌株编号	相对抑制率/%					毒力回归方程	R^2
	0.4 g/L	0.8 g/L	1.6 g/L	3.2 g/L	6.4 g/L		
H47	51.3	66.4	80.3	89.5	96.7	$y=1.432x+0.578$	0.953
H114	25.3	46.8	67.1	82.5	92.5	$y=1.744x+0.063$	0.983

2.5 菌体生理生化鉴定

为明确 H47 和 H114 菌株的分类信息,生理生化实验被用于鉴定菌株,结果见表 5。H47 和 H114 菌株生理生化特性非常相似,根据《伯杰氏细菌鉴定手册》并结合 API 50CH 碳水化合物试验条测试,表明 H47 和 H114 菌株属于解淀粉芽孢杆菌。

表 5 H47 和 H114 菌株生理生化

Table 5 Morphological and biochemical characterization of strain H47 and H114

项目	结果	
	H47	H114
形态	杆状	杆状
色素	乳白色	乳白色
芽孢	+	+
厌氧	−	−
运动性	+	+
革兰氏染色	+	+
明胶液化	+	+
硝酸盐还原	+	+
过氧化氢酶	+	+
氧化酶活性	+	+
H_2S 产生	−	−
V-P 反应	+	+
生长温度/℃	15~45	15~40

符号:+,阳性;−,阴性。

3 结 语

作者从蜂蜜中分离出 20 株菌株,分别与 *B. cereus* ATCC 14579T、*B. siamensis* KCTC 13613T、*B. tequilensis* KCTC 13622T 和 *B. methylotrophicus* CBMB205T 4 种典型菌株具有最高的同源性。采用 CAS 检测法表明,20 菌株中 H47、H98、H114 和 H124 4 个菌株菌产铁载体,且 HC 值均高于 2.5。Csáky 反应和 Arnow 反应结果表明,H47 菌株所产铁载体为儿茶酚型(106 μmol/L),H114 菌株所产铁载体为异羟肟酸型(91 μmol/L),H98 和 H124 菌株所产铁载体为混合型(75 μmol/L 和 68 μmol/L)。4 种菌株铁载体发酵液对 *B. dothidea* Ces. & De Not ACCC 38026 均有抑制效果。H47 菌株和 H114 菌株为解淀粉芽孢杆菌,其铁载体粗提物对 *B. dothidea* Ces. & De Not ACCC 38026 的毒力回归方程分别为 $y=1.432x+0.578$,(EC_{50} 和 EC_{90} 分别为 0.395 g/L 和 3.099 g/L)和 $y=1.744x+0.063$ (EC_{50} 和 EC_{90} 分别为 0.921 g/L 和 5.001 g/L)。所以可以推测儿茶酚型铁载体和异羟肟酸型铁载体对葡萄座腔菌的孢子萌发及菌丝体的生长抑制效果,H47 和 H114 菌株具有发展成为生物防治剂的潜力。

参考文献:

[1] SILVA K S,HOJO R T N,BOMFIM M P,et al. Antagonistic in vitro activity of *Trichoderma* spp. isolates to the fungi *Phytophthora citrophthora*[J]. **Semina-Ciencias Agrarias**,2008,29(4):749-753.

[2] PITT W,HUANG R,STEEL C,et al. Identification,distribution and current taxonomy of *Botryosphaeriaceae* species associated

with grapevine decline in new south wales and south australia[J]. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, 2010, 16(1): 258-271.

[3] INDERBITZIN P, BOSTOCK R M, TROUILLAS F P, et al. A six locus phylogeny reveals high species diversity in Botryosphaeriaceae from California almond[J]. **Mycologia**, 2010, 102(6): 1350-1368.

[4] ZHANG Shuyan, ZHANG Jingnan, SUN Peiqi, et al. Laboratory toxicity of 8-hydroxy quinolinone to *Botryosphaeria dothidea* from almond[J]. **Journal of Hebei Agricultural Sciences**, 2009, 13(10): 21-22. (in Chinese)

[5] DEMOZ B T, KORSTEN L. *Bacillus subtilis* attachment, colonization, and survival on avocado flowers and its mode of action on stem-end rot pathogens[J]. **Biological Control**, 2006, 37(1): 68-74.

[6] FRAVEL D R. Commercialization and implementation of biocontrol[J]. **Annual Review of Phytopathology**, 2005, 43: 337-359.

[7] TORRES M J, BRANDAN C P, PETROSELLI G, et al. Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp subtilis and *B. amyloliquefaciens* against *Macrophomina phaseolina*: SEM study of fungal changes and UV-MALDI-TOF MS analysis of their bioactive compounds[J]. **Microbiological Research**, 2016, 182: 31-39.

[8] RAYMOND K N, DERTZ E A. Iron Transport in Bacteria[M]. Washington DC: ASM Press, 2004: 3-17.

[9] MILLER M J, ZHU H, XU Y, et al. Utilization of microbial iron assimilation processes for the development of new antibiotics and inspiration for the design of new anticancer agents[J]. **Biometals**, 2009, 22(1): 61-75.

[10] LAMB A L. Breaking a pathogen's iron will: Inhibiting siderophore production as an antimicrobial strategy[J]. **Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics**, 2015, 1854(8): 1054-1070.

[11] ULLAH A, MUSHTAQ H, ALI H, et al. Diazotrophs-assisted phytoremediation of heavy metals: a novel approach[J]. **Environmental Science and Pollution Research**, 2015, 22(4): 2505-2514.

[12] SINACORI M, FRANCESCA N, ALFONZO A, et al. Cultivable microorganisms associated with honeys of different geographical and botanical origin[J]. **Food microbiology**, 2014, 38: 284-294.

[13] LEE H, CHUREY J J, WOROBO R W. Antimicrobial activity of bacterial isolates from different floral sources of honey[J]. **Int J Food Microbiol**, 2008, 126(1-2): 240-244.

[14] ZHAO X, ZHOU Z J, HAN Y, et al. Isolation and identification of antifungal peptides from *Bacillus* BH072, a novel bacterium isolated from honey[J]. **Microbiological Research**, 2013, 168(9): 598-606.

[15] JUSTE A, KRAUSE M, LIEVENS B, et al. Protective effect of hop β-acids on microbial degradation of thick juice during storage [J]. **Journal of Applied Microbiology**, 2008, 104(1): 51-59.

[16] HUANG Baowei, ZHANG Hongmei, LIU Xuelu, et al. Different patterns of biofilm formation and effect of sub-MIC disinfectant on biofilm formation of foodbore pathogens[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2011, 30(5): 757-760. (in Chinese)

[17] PAYNE S M. Detection, isolation, and characterization of siderophores[J]. **Methods in Enzymology**, 1994, 235: 329-344.

[18] HAN Huili, CAI Yujie, GUAN Zhengbing, et al. Screening and identification and study on antimicrobial activity of bacterial isolates from honey[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2013, 32(2): 148-154. (in Chinese)

[19] SCHWYN B, NEILANDS J B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores [J]. **Analytical Biochemistry**, 1987, 160(1): 47-56.

[20] BROWN J H. Bergey's manual of determinative bacteriology[J]. **American Journal of Public Health and the Nations Health**, 1939, 29(4): 404-405.

[21] CHOI S M, PARK M H, JUNG T S, et al. Characterization of *Bacillus mojavensis* KJS-3 for industrial applications [J]. **Arch Pharm Res**, 2011, 34(2): 289-298.

[22] SNOWDON J A, CLIVER D O. Microorganisms in honey[J]. **Int J Food Microbiol**, 1996, 31(1-3): 1-26.

[23] SABATE D C, CARRILLO L, AUDISIO M C. Inhibition of Paenibacillus larvae and *Ascosphaera apis* by *Bacillus subtilis* isolated from honeybee gut and honey samples[J]. **Research in Microbiology**, 2009, 160(3): 193-199.

[24] BENITEZ L B, VELHO R V, DA MOTTA A d S, et al. Antimicrobial factor from *Bacillus amyloliquefaciens* inhibits *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood[J]. **Arch Microbiol**, 2012, 194(3): 177-185.

[25] SILVA-STENICO M E, PACHECO F T H, RODRIGUES J L M, et al. Growth and siderophore production of *Xylella fastidiosa* under iron-limited conditions[J]. **Microbiological Research**, 2005, 160(4): 429-436.

[26] SULOCHANA M B, JAYACHANDRA S Y, KUMAR S K A, et al. Antifungal attributes of siderophore produced by the

Pseudomonas aeruginosa JAS-25[J]. **Journal of Basic Microbiology**,2014,54(5):418-424.

[27] FERNANDEZ A I G,FERNANDEZ A F,PEREZ M J,et al. Siderophore production by *Aeromonas salmonicida* subsp. salmonicida. lack of strain specificity[J]. **Diseases of Aquatic Organisms**,1998,33(2):87-92.

[28] WELLER D M. Pseudomonas biocontrol agents of soilborne pathogens:looking back over 30 years[J]. **Phytopathology**,2007,97(2):250-256.

[29] SAHU G,SINDHU S. Disease control and plant growth promotion of green gram by siderophore producing pseudomonas sp[J]. **Research Journal of Microbiology**,2011,6(10):735-749.

[30] SCHER F M,BAKER R. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to Fusarium wilt pathogens[J]. **Phytopathology**,1982,72(12):1567-1573.

[31] SIDDIQUI I A,SHAUKAT S S. Combination of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pochonia chlamydosporia* for control of root-infecting fungi in tomato[J]. **Journal of Phytopathology**,2003,151(4):215-222.

科　技　信　息

加拿大批准在非标准化食品中使用焦磷酸钾

2019 年 3 月 5 日,加拿大卫生部发布 NOM/ADM-0128 号文件,修订允许使用的食品添加剂列表,批准在非标准化食品中使用食品添加剂焦磷酸钾(Potassium Pyrophosphate, tetrabasic)。

经过评估,加拿大卫生部认为焦磷酸钾作为食品添加剂是安全的,允许焦磷酸钾在非标准化食品中用作乳化剂、胶凝剂、稳定剂、增稠剂、pH 调节剂、酸反应材料和水校正剂和螯合剂。

该规定自发布之日起生效。

[信息来源]食品伙伴网. 加拿大批准在非标准化食品中使用焦磷酸钾 [EB/OL]. (2019-3-7). http://news.foodmate.net/2019/03/509140.html