



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102492629 B

(45) 授权公告日 2013. 05. 22

(21) 申请号 201110410918. X

A01P 3/00(2006. 01)

(22) 申请日 2011. 12. 09

C12R 1/80(2006. 01)

(83) 生物保藏信息

审查员 安玉苹

CCTCC NO :M2011414 2011. 11. 24

(73) 专利权人 广东省微生物研究所

地址 510070 广东省广州市先烈中路 100 号

(72) 发明人 李浩华 章卫民 王磊 陈玉婵

(74) 专利代理机构 广州科粤专利商标代理有限公司 44001

代理人 刘明星

(51) Int. Cl.

C12N 1/14(2006. 01)

A61K 36/06(2006. 01)

A61P 31/04(2006. 01)

A01N 63/04(2006. 01)

权利要求书1页 说明书7页
序列表1页

(54) 发明名称

一种海洋真菌汤姆青霉及其提取物和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种海洋真菌汤姆青霉及其提取物和应用。海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 于 2011 年 11 月 24 日保藏于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC), 地址: 中国武汉市武汉大学, 其保藏编号为 CCTCC NO :M2011414。其发酵提取物对金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 具有抑制效果, 同时, 该发酵提取物对植物病原真菌链格孢 (*Alternaria alternata*)、胶孢炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 和柱枝双孢霉 (*Cylindrocleftidium scoparium*) 也具有拮抗作用。因此, 本发明的实现, 为研究与开发新的抗菌药物、生物农药提供了候选药物, 为开发利用海洋真菌来源的天然活性物质提供了科学依据。

1. 一种海洋真菌汤姆青霉(*Penicillium thomii*)FS77,其保藏编号为 CCTCC NO:M 2011414。

2. 一种海洋真菌汤姆青霉(*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物,其特征在于,以权利要求 1 所述的海洋真菌汤姆青霉(*Penicillium thomii*)FS77 作为发酵菌株,液体发酵获得发酵培养物,分离菌丝体和发酵液,取发酵液用乙酸乙酯萃取,萃取液经浓缩后即得海洋真菌汤姆青霉(*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物。

3. 根据权利要求 2 所述的海洋真菌汤姆青霉(*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物,其特征在于,所述的液体发酵是将海洋真菌汤姆青霉(*Penicillium thomii*)FS77 菌接种到改良 PDA 液体培养基中,120r/min,26℃培养 7d,获得海洋真菌汤姆青霉(*Penicillium thomii*)FS77 发酵培养物,所述改良 PDA 培养基是在每升 PDA 培养基中加入 KH_2PO_4 3g、 MgSO_4 0.75g、维生素 B_1 10mg 和粗海盐 30g。

4. 权利要求 2 所述的海洋真菌汤姆青霉(*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物在制备抗枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)或绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)药物中的应用。

5. 一种抗枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)或绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)药物,其特征在于,该抗枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)或绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)药物包含权利要求 2 所述的海洋真菌汤姆青霉(*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物作为活性成分。

6. 权利要求 2 所述的海洋真菌汤姆青霉(*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物在制备抗链格孢(*Alternaria alternata*)或胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)或柱枝双孢霉(*Cylindrocladium scoparium*)的药物中的应用。

7. 一种抗链格孢(*Alternaria alternata*)或胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)或柱枝双孢霉(*Cylindrocladium scoparium*)的药物,其特征在于,该抗链格孢(*Alternaria alternata*)或胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)或柱枝双孢霉(*Cylindrocladium scoparium*)的药物包含权利要求 2 所述的海洋真菌汤姆青霉(*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物作为活性成分。

一种海洋真菌汤姆青霉及其提取物和应用

技术领域：

[0001] 本发明属于生物医药技术领域，具体涉及一种海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77，以及从该菌株的液体培养发酵液中制备的发酵提取物，和该提取物在制备抗细菌、生物农药中的应用。

背景技术：

[0002] 陆生微生物长期以来一直是医药和农药上的重要资源，但近年来随着陆地资源的不断开发，筛选新的微生物资源、寻找新的活性代谢产物难度越来越大，且抗药性问题日益严重，使得新药的开发面临严峻挑战。海洋约占地球表面积的 71%，蕴含丰富的微生物资源，特殊的海洋环境（低温、高压、高盐、高寒、寡营养等）及海洋物种间的生态作用，赋予海洋微生物产生不同于陆地微生物的特殊产物，包括抗菌、抗植物病原菌、抗肿瘤、抗病毒等活性物质。海洋真菌是海洋微生物的重要组成部分，这类真菌种类多，分布广，因此，从海洋真菌的次生代谢产物中寻找有别于陆栖微生物的生理活性物质进而开发成药物，对于新的抗菌药物和新型生物农药开发具有十分重要意义，是当前微生物药物研发的一个重要方向。

发明内容：

[0003] 本发明的第一目的是提供一种海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77，该菌株于 2011 年 11 月 24 日保藏于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC)，地址：中国武汉市武汉大学，其保藏编号为 CCTCC NO :M 2011414。

[0004] 本发明的海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 是从南海 (106° 30.295' E, 10° 0.941' N)1675m 深处的海泥中分离、纯化得到。其分离纯化方法为：将海泥样品用含 30%粗海盐的无菌水稀释到 10%，27℃振荡 20min，取 0.1mL 均匀涂布在改良 PDA 固体培养基中，26 ~ 28℃恒温箱培养，待菌落长出后，挑取菌落划线纯化。所述改良 PDA 固体培养基是在每升 PDA 培养基中加入 KH_2PO_4 3g、 MgSO_4 0.75g、维生素 B_1 10mg、粗海盐 30g，琼脂 20g，余量为水。

[0005] 通过形态学研究，并根据《真菌鉴定手册》（魏景超，1979），该菌株鉴定为汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)，命名为汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77，于 2011 年 11 月 24 日保藏于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC)，地址：中国武汉市武汉大学，其保藏编号为 CCTCCNO :M 2011414。

[0006] 其形态特征如下：在改良 PDA 固体培养基上菌落灰绿色，边缘白色，表面具辐射状沟纹，产孢区颜色为青灰色。帚状枝单轮生，分生孢子梗生自基质或气生菌丝；瓶梗梭形或瓶形， $7-10 \times 2-2.5 \mu\text{m}$ ；分生孢子链状排列，椭圆形， $3.0-3.5 \times 2-2.5 \mu\text{m}$ 。

[0007] 按照常规方法提取该菌株的 DNA，并利用真菌的 ITS 区的通用引物扩增其 ITS 区，其 ITS 区的碱基序列如下 SEQ IDNO.1 所示，提交至 GeneBank，其基因登录号为：JQ034359。通过在 GenBank 中进行 blast 检索，与其相似度最高的两条序列均为汤姆青霉

(*Penicillium thomii*), 相似度达 99.4%, 因此, 也确定该菌株属于汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)。

[0008] 本发明的第二个目的是提供一种具有抗菌作用的海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物, 其特征在于, 以海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 作为发酵菌株, 液体发酵获得发酵培养物, 分离菌丝体和发酵液, 取发酵液用乙酸乙酯萃取, 萃取液经浓缩后即得海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物。

[0009] 所述的液体发酵, 优选是将海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 菌接种到改良 PDA 液体培养基中, 120r/min, 26℃ 培养 7d, 获得海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 发酵培养物, 所述改良 PDA 培养基是在每升 PDA 培养基中加入 KH_2PO_4 3g、 MgSO_4 0.75g、维生素 B_1 10mg 和粗海盐 30g。

[0010] 本发明通过实验发现, 本发明的海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物在 500 μg 片滤纸浓度下, 对枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的抑菌圈直径分别为 9.6mm、4.6mm、4.6mm。选择 25mg/mL, 12.5mg/mL, 6.25mg/mL, 3.125mg/mL, 1.5625mg/mL, 0.7812mg/mL, 0.3906mg/mL 7 个浓度下进行最低抑菌浓度 (MIC 值) 试验, 确定该发酵提取物对枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的 MIC 值分别为 1.56mg/mL、6.25mg/mL、6.25mg/mL。由此可见, 本发明海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 的提取物具有抗菌活性, 可用来制备抗菌药物。

[0011] 因此本发明的第三个目的是提供海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物在制备抗菌药物中的应用。

[0012] 所述的抗菌药物优选为抗枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 或绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 药物。

[0013] 本发明的第四个目的是提供一种抗菌药物, 其特征在于, 该抗菌药物包含海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物作为活性成分。

[0014] 本发明通过实验发现, 本发明的海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物在 50mg/mL 浓度下, 对链格孢 (*Alternaria alternata*) 的抑制率为 50 ~ 60%、对胶孢炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 的抑制率为 50 ~ 60%、对柱枝双孢霉 (*Cylindrocladium scoparium*) 的抑制率为 20 ~ 30%。选择 25mg/mL, 12.5mg/mL, 6.25mg/mL, 3.125mg/mL, 1.5625mg/mL, 0.7812mg/mL, 0.3906mg/mL 7 个浓度下进行抗菌最低浓度 (MIC 值) 试验, 确定海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物对链格孢 (*Alternaria alternata*)、胶孢炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 和柱枝双孢霉 (*Cylindrocladium scoparium*) 的 MIC 值分别为 3.12mg/mL、3.12mg/mL、6.25mg/mL。结果表明本发明的海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物对植物病原菌具有拮抗作用, 可用来制备生物农药。

[0015] 本发明的第五个目的是提供海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物在制备生物农药中的应用。

[0016] 所述的生物农药优选为抗链格孢 (*Alternaria alternata*) 或胶孢炭疽菌

(*Colletotrichum gloeosporioides*) 或柱枝双孢霉 (*Cylindrocladium scoparium*) 的药物。

[0017] 本发明的第六个目的是提供一种生物农药,其特征在於,该生物农药包含海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物作为活性成分。

[0018] 本发明的海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物具有抗菌活性和抗植物病原真菌活性,表明该提取物具有良好的应用开发前景,因此本发明为研究与开发新的抗菌药物、生物农药提供了候选药物,为开发利用海洋真菌来源的天然活性物质提供了科学依据。

[0019] 本发明的汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 于 2011 年 11 月 24 日保藏于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC),地址:中国武汉市武汉大学,其保藏编号为 CCTCC NO:M 2011414。

具体实施方式:

[0020] 以下通过具体实施例来对本发明进一步说明,但并非限制本发明。

[0021] 实施例 1:海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 的分离和鉴定

[0022] 海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 是从南海 (106° 30.295' E, 10° 0.941' N)1675m 深处的海泥中分离、纯化得到。其分离纯化方法为:将海泥样品用含 30%粗海盐的无菌水稀释到 10%,27℃振荡 20min,取 0.1mL 均匀涂布在改良 PDA 固体培养基中,26 ~ 28℃恒温箱培养,待菌落长出后,挑取菌落划线纯化得到一株菌株。所述改良 PDA 固体培养基是在每升 PDA 培养基中加入 KH_2PO_4 3g、 MgSO_4 0.75g、维生素 B₁10mg、粗海盐 30g,琼脂 20g,余量为水。

[0023] 通过形态学研究,并根据《真菌鉴定手册》(魏景超,1979),该菌株鉴定为汤姆青霉 (*Penicillium thomii*),命名为汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77,于 2011 年 11 月 24 日保藏于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC),地址:中国武汉市武汉大学,其保藏编号为 CCTCCNO:M 2011414。

[0024] 其形态特征如下:在改良 PDA 培养基上菌落灰绿色,边缘白色,表面具辐射状沟纹,产孢区颜色为青灰色。帚状枝单轮生,分生孢子梗生自基质或气生菌丝;瓶梗梭形或瓶形,7-10×2-2.5 μm;分生孢子链状排列,椭圆形,3.0-3.5×2-2.5 μm。

[0025] 按照常规方法提取该菌株的 DNA,并利用真菌的 ITS 区的通用引物扩增其 ITS 区,其 ITS 区的碱基序列如下 SEQ IDNO.1 所示,提交至 GeneBank,其基因登录号为:JQ034359。通过在 GenBank 中进行 blast 检索,与其相似度最高的两条序列均为汤姆青霉 (*Penicillium thomii*),相似度达 99.4%,因此,也确定该菌株为汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)。

[0026] 实施例 2:海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物的制备

[0027] 将海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 菌接种到改良 PDA 液体培养基中,120r/min,26℃培养 7d,获得海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 的液体培养物。将海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 的液体培养物过滤,使菌丝体和发酵液分离,发酵液用等体积乙酸乙酯萃取 3 次,合并萃取液,萃取液再经减压浓缩得即得到棕色膏状的提取物,即为海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物。

[0028] 所述的改良 PDA 液体培养基通过以下方法获得：用 500mL 蒸馏水煮 200g 马铃薯 20min，过滤得汁，再加入葡萄糖 20g、 KH_2PO_4 3g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 0.75\text{g}$ 、维生素 B_1 10mg、粗海盐 30g，用水补足至 1L，灭菌制得。

[0029] 实施例 3：海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物的抗细菌活性

[0030] 一、

[0031] 采用滤纸片法测定海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物对枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的抑制作用。

[0032] 将实施例 2 得到的海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物用 DMSO 溶解，并稀释至 50mg/mL 浓度。

[0033] 将液体发酵获得的上述待测细菌菌液用生理盐水分别稀释至 10^6 CFU/mL 的浓度，吸取浓度为 10^6 CFU/mL 的细菌菌液 200 μL 均匀涂布于含有 LB 培养基平板中，贴上直径为 4mm 的滤纸片，分别在滤纸片上滴加浓度为 50mg/mL 的海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物稀释液 10 μL ，以 DMSO 代替该提取物稀释液作空白对照，以 20 μg /mL 浓度的硫酸卡那霉素代替该提取物稀释液作阳性对照，每个处理做 3 皿重复。37℃ 恒温箱中培养 24 ~ 48h，然后测量抑菌圈直径，以抑菌圈直径大小来评价抗菌活性。实验结果如表 1 所示：

[0034] 表 1：海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物的抗细菌作用

[0035]

样品	抑菌圈直径 (mm)		
	枯草芽孢杆菌	金黄色葡萄球菌	绿脓杆菌
空白对照	0	0	0
海洋真菌汤姆青霉 (<i>Penicillium thomii</i>) FS77 发酵提取物	9.6	4.6	4.6
阳性对照	13	6.0	1.0

[0036] 二、

[0037] 采用连续稀释法测定海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物对金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的最低抑菌浓度 (MIC 值)。

[0038] 将海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物按试管二倍稀释法，用 LB 液体培养基将海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物分别稀释至 25mg/mL, 12.5mg/mL, 6.25mg/mL, 3.125mg/mL, 1.5625mg/mL, 0.7812mg/mL, 0.3906mg/mL。吸取不同浓度的该发酵提取物稀释液 1mL 于试管中，再分别加入 1mL 菌液，使菌液浓度为 $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL，以 LB 液体培养基代替该发酵提取物稀释液为空白对照，置于 37℃ 恒温箱培养 24 ~ 48h 后，于含 LB 培养基平皿上划线，再继续培养 24 ~ 48h，观察生长情况，每个处理做 3 管重复。以试管澄清，划线培养不长菌的浓度为最低抑菌浓度 (MIC 值)。实验结果

如表 2 所示：

[0039] 表 2 :海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物对细菌的最低抑制浓度 (MIC 值)

[0040]

供试菌株	空白对照	FS77发酵提取物浓度 (mg/mL)							MIC值 mg/mL
		25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.7812	0.3906	
枯草芽孢杆菌	+	-	-	-	-	-	+	+	1.56
金黄色葡萄球菌	+	-	-	-	+	+	+	+	6.25
绿脓杆菌	+	-	-	-	+	+	+	+	6.25

[0041] 注：“+”表示有菌生长，“-”表示无菌生长

[0042] 由表 1 和表 2 可以看出,本发明的海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物在 500 μg/片滤纸浓度下,对枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的抑菌圈直径分别为 9.6mm、4.6mm、4.6mm。选择 25mg/mL, 12.5mg/mL, 6.25mg/mL, 3.125mg/mL, 1.5625mg/mL, 0.7812mg/mL, 0.3906mg/mL 7 个浓度下进行最低抑菌浓度 (MIC 值) 试验,确定该发酵提取物对枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的 MIC 值分别为 1.56mg/mL、6.25mg/mL、6.25mg/mL。由此可见,本发明的海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物具有抗细菌活性,可用来制备抗细菌药物。

[0043] 实施例 4 :海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物的抗真菌活性

[0044] 一、

[0045] 采用生长速率法测定海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物对链格孢 (*Alternaria alternata*)、胶孢炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 和柱枝双孢霉 (*Cylindrocladium scoparium*) 的抑制作用。

[0046] 将实施例 2 的海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物用 DMSO 溶解,并稀释至 50mg/mL 浓度。

[0047] 分别取 50mg/mL 的发酵提取物稀释液 0.1mL 均匀涂布到含 PDA 固体培养基的培养皿中,在平皿中央分别接入直径为 4mm 的链格孢 (*Alternaria alternata*)、胶孢炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 和柱枝双孢霉 (*Cylindrocladium scoparium*) 的菌饼,每处理重复 3 皿,以 DMSO 代替发酵提取物稀释液作空白对照。置于 28℃ 恒温培养箱培养 72 ~ 96h,记录菌饼生长直径,计算抑制率。

[0048] 抑制率 (%) = (空白对照平均纯生长量 - 处理平均纯生长量) / 空白对照平均纯生长量 × 100%,其中纯生长量 (mm) = 菌饼生长直径 - 4。实验结果如表 3 所示：

[0049] 表 3 :海洋直菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物对直菌的抑制率 (%)

[0050]

样品	抑制率 (%)		
	链格孢	胶孢炭疽菌	柱枝双孢霉
海洋真菌汤姆青霉 (<i>Penicillium thomii</i>)	57.9	53	21.9
FS77发酵提取物			

[0051] 二、

[0052] 采用连续稀释法测定海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物对链格孢 (*Alternaria alternata*)、胶孢炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 和柱枝双孢霉 (*Cylindrocladium scoparium*) 的最低抑制浓度 (MIC 值)。

[0053] 将海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物按试管二倍稀释法, 用 PDA 液体培养基将发酵提取物分别稀释至 25mg/mL, 12.5mg/mL, 6.25mg/mL, 3.125mg/mL, 1.5625mg/mL, 0.7812mg/mL, 0.3906mg/mL 浓度。吸取不同浓度的发酵提取物稀释液 1mL 于试管中, 再分别加入 1mL 菌液, 使孢子含量达 $10^6 \sim 10^7$ 个/mL, 以 PDA 液体培养基代替该发酵提取物稀释液为空白对照, 置于 28℃ 恒温箱培养 72 ~ 96h 后, 于含 PDA 培养基平皿上划线, 再继续培养 72 ~ 96h, 观察生长情况, 每个处理做 3 管重复。以试管澄清, 划线培养不长菌的浓度为最低抑菌浓度 (MIC 值)。实验结果如表 4 所示:

[0054] 表 4: 海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物对植物病原真菌的最低抑制浓度 (MIC 值)

[0055]

测试菌株	空白对照	FS77提取物浓度 (mg/mL)							MIC值 mg/mL
		25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.7812	0.3906	
链格孢	+	-	-	-	-	+	+	+	3.12
胶孢炭疽菌	+	-	-	-	-	+	+	+	3.12
柱枝双孢霉	+	-	-	-	+	+	+	+	6.25

[0056] 注: “+”表示有菌生长, “-”表示无菌生长

[0057] 由表 3 和表 4 可以看出, 本发明的海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物在 50mg/mL 浓度下, 对链格孢 (*Alternaria alternata*) 的抑制率为 50 ~ 60%、对胶孢炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 的抑制率为 50 ~ 60%、对柱枝双孢霉 (*Cylindrocladium scoparium*) 的抑制率为 20 ~ 30%。选择 25mg/mL, 12.5mg/mL, 6.25mg/mL, 3.125mg/mL, 1.5625mg/mL, 0.7812mg/mL, 0.3906mg/mL 7 个浓度下进行抗菌最低浓度 (MIC 值) 试验, 确定海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物对链格孢 (*Alternaria alternata*)、胶孢炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 和柱枝双孢霉 (*Cylindrocladium scoparium*) 的 MIC 值分别为 3.12mg/mL、3.12mg/mL、6.25mg/mL。结果表明本发明的海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物对植物病原菌具有拮抗作用, 可用来制备生物农药。

[0058] 综上所述, 本发明的海洋真菌汤姆青霉 (*Penicillium thomii*)FS77 发酵提取物对

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 具有抑制效果,同时,该发酵提取物对植物病原真菌链格孢 (*Alternaria alternata.*)、胶孢炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 和柱枝双孢霉 (*Cylindrocladium scoparium*) 也具有拮抗作用。因此,本发明的实现,为研究与开发新的抗菌药物、生物农药提供了候选药物,为开发利用海洋真菌来源的天然活性物质提供了科学依据。

[0001]

序列表

<110>广东省微生物研究所

<120>一种海洋真菌汤姆青霉及其提取物和应用

<160>1

<210>1

<211>541

<212>DNA

<213>汤姆青霉 (*Penicillium thomii*) FS77

<400>1

TTCCGTAGGT GAACCTGCGG AAGGATCATT ACTGAGTGAG GGCCCTCTGG GTCCAACCTC 60

CCACCCGTGT TTATTGTACC TTGTTGCTTC GGTGCGCCCG CCTCACGGCC GCCGGGGGGC 120

TTCTGCCCC GGGTCCGCGC GCACCGGAGA CACTATTGAA CTCTGTCTGA AGATTGCAGT 180

CTGAGCATAA ACTAAATAAG TAAAACTTT CAACAACGGA TCTCTTGGTT CCGGCATCGA 240

TGAAGAACGC AGCGAAATGC GATAACTAAT GTGAATTGCA GAATTCAGTG AATCATCGAG 300

TCTTTGAACG CACATTGCGC CCCCTGGTAT TCCGGGGGGC ATGCCTGTCC GAGCGTCATT 360

GCTGCCCTCA AGCACGGCTT GTGTGTTGGG CTCCGTCCCC CCGGGGACGG GTCCGAAAGG 420

CAGCGGCGGC ACCGAGTCCG GTCCTCGAGC GTATGGGGCT TTGTCACCCG CTCTGTAGGC 480

CCGGCCGGCG CCAGCCGACA ACCAATCATC CTTTTCAGGT GACCTCGATC AGTAGGATGC 540

C

541