

文章编号: 1674-5566(2025)01-0111-12

DOI: 10.12024/jsou.20240904647

野生型天然 *rhlC* 基因缺失菌株铜绿假单胞菌 A39-1 的鼠李糖脂产物结构与合成路径解析

罗惠芳^{1,2,3,4}, 戚建华^{1,2,3,4}, 童文涛^{1,2,3,4}, 王瑞^{1,2,3,4}, 吕天翊^{1,2,3,4}, 宋增福^{1,2,3,4}

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306; 3. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 4. 中国-东盟海水养殖技术“一带一路”联合实验室, 上海 201306)

摘要: 为了探究铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) A39-1 菌株以不同碳源发酵所得鼠李糖脂抑菌活性及结构组成, 解析铜绿假单胞菌 A39-1 鼠李糖脂生物合成路径。利用牛津杯法检测鼠李糖脂对常见病原菌的抑菌活性, 采用液相色谱-质谱联用技术 (LC-MS) 检测与分析鼠李糖脂样品的同系物组成, 通过第二代测序技术 (Illumina HiSeq) 和第三代单分子测序技术 (PacBio) 测定和组装铜绿假单胞菌 A39-1 的全基因组序列, 注释分析鼠李糖脂合成相关基因。结果显示, 菌株 A39-1 以甘油、葡萄糖、葵花籽油、菜籽油和调和油作为唯一碳源发酵生产的鼠李糖脂具有抑菌活性; LC-MS 检测为 4 种单糖单脂 (Rha-C_{8:2}、Rha-C_{9:2}、Rha-C_{11:2} 和 Rha-C₁₀) 和 4 种单糖双脂 (Rha-C_{6:1}-C_{6:1}、Rha-C_{12:1}-C_{12:1}、Rha-C₁₂-C₁₄ 和 Rha-C_{14:2}-C_{14:2}), Rha-C_{11:2} 为主要结构; 基因组预测到 *algC*、*rmlA*、*rmlB*、*rmlC*、*rmlD*、*rhlA*、*rhlB* 相关鼠李糖脂合成基因, 缺失编码合成双鼠李糖脂的鼠李糖基转移酶 II 基因 *rhlC*。研究表明, 铜绿假单胞菌 A39-1 为野生型天然 *rhlC* 基因缺失株, 以不同碳源发酵均能专一性产生单鼠李糖脂, 且该单鼠李糖脂具有抑菌活性。本研究探索单鼠李糖脂抑菌活性, 解析其组成结构及生物合成路径, 为开发水生动物疾病新型绿色防控药物提供新思路。

关键词: 铜绿假单胞菌 A39-1; 鼠李糖脂; 抑菌活性; 液相色谱-质谱联用技术; 全基因组测序分析

中图分类号: S 917.1 **文献标志码:** A

水产养殖是我国养殖业的支柱产业之一, 集约化养殖模式有效提升了水产品产量, 但同时也带来了病害多发、产品品质下降和水体负担加重等问题^[1]。抗生素在治疗与预防水生动物疾病方面使用普遍, 但抗生素的不合理使用极易导致养殖水环境污染和水产品药物残留等问题, 引发多重耐药风险, 影响水产养殖可持续性健康发展。因此, 寻找安全高效且环境友好的抗菌药物成为新的研究热点。

生物表面活性剂是植物或微生物通过自身代谢分泌的两亲性分子, 同时具有亲水和疏水基团, 有乳化、低毒、稳定性高、易降解和生物相容性好等特点。根据亲水基团的差异, 生物表面活性剂可以划分为磷脂类、糖脂类、脂肽类、脂肪酸

类、多糖-蛋白复合物等^[2]。在糖脂类生物表面活性剂中, 鼠李糖脂因具有高表面活性、无毒易降解、金属螯合、广谱抗菌等特性而被广泛应用于环境污染修复、农业生产、石油工业、生物制药及化妆品生产等领域^[3-6]。

已发现多种细菌都能产生鼠李糖脂, 如伯克氏菌属 (*Burkholderia*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、肠杆菌属 (*Enterobacte*)、希瓦氏菌属 (*Shewanella*)、四联球菌属 (*Tetragenococcus*) 等, 部分真菌也能产生鼠李糖脂^[7]。目前, 铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 是鼠李糖脂的主要生产菌, 模式菌株铜绿假单胞菌 PAO1 的全基因组测序于 2000 年完成^[8]。铜绿假单胞菌能够利用甘油、葡萄糖等

收稿日期: 2024-09-29 修回日期: 2024-12-18

基金项目: 上海市协同创新中心基金项目 (ZF1206); 国家重点研发计划 (2022YFE0203900)

作者简介: 罗惠芳 (2001—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产动物微生物学。E-mail: hfangLuo@163.com

通信作者: 宋增福, E-mail: zfsong@shou.edu.cn

版权所有 © 《上海海洋大学学报》编辑部 (CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

亲水性碳源以及油脂、烷烃、原油等疏水性碳源发酵产生鼠李糖脂,其中甘油被认为是高产鼠李糖脂的优势碳源^[9],葡萄糖则是鼠李糖脂合成的直接底物^[10]。目前,已有诸多关于利用废油脂、含糖废弃物、废塑料等废弃碳资源生产鼠李糖脂的研究报道,多聚焦于资源再利用和鼠李糖脂产量提升,而缺乏所产鼠李糖脂组分的报道^[11-12]。鼠李糖脂由一类同系物组成,如单糖单脂(Rha-Cn)、单糖双脂(Rha-Cn-Cm)、双糖单脂(Rha2-Cn)、双糖双脂(Rha2-Cn-Cm)等。据报道,鼠李糖脂同系物的组成及分布不同会影响乳化和抗菌性能^[13]。而菌种、碳源种类、培养条件和分离方法,都可能导致鼠李糖脂成分的多样性^[14]。现有技术中,主要采用比色法、色谱法与质谱联用技术对鼠李糖脂进行定性定量检测。数据显示,已鉴定出超过60种鼠李糖脂同源物和同系物^[15]。研究^[16-17]表明双鼠李糖脂具有更好的细胞相容性和生物降解速率,单鼠李糖脂具有更优的表面活性和抑菌性能,有巨大的研究价值和开发为水产新型抗菌制剂的潜力。

本课题组前期从餐厨油污土壤中分离得到鼠李糖脂产生菌株,鉴定并命名为铜绿假单胞菌A39-1。本文以铜绿假单胞菌A39-1为发酵菌株,探究其发酵不同碳源所得鼠李糖脂的抑菌活性,通过液相色谱-质谱联用技术检测鼠李糖脂结构组成,并通过全基因组测序分析其合成鼠李糖脂所涉及的功能基因、关键酶及调控机制,为后续鼠李糖脂应用开发提供科学数据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

铜绿假单胞菌A39-1为本课题组前期从餐厨油污土壤中分离筛选,经鉴定后将菌株保存于-80℃超低温冰箱。金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, Sa)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, Vp)、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*, Vh)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*, Pf)和产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*, Cp)均由上海海洋大学国家水生动物病原库提供。

1.2 主要试剂及仪器

LB液体培养基:蛋白胨10g,酵母膏5g,

NaCl 10g,加蒸馏水定容至1L,调节pH为7.0,固体培养基中添加琼脂粉20g,121℃灭菌20min。

发酵培养基:甘油/葡萄糖/葵花籽油/菜籽油/大豆油/调和油/煤油 20g, NaNO₃ 6g, KH₂PO₄ 0.7g, Na₂HPO₄·12H₂O 0.9g, CaCl₂·2H₂O 0.1g, MgSO₄·7H₂O 0.4g, 微量元素溶液2mL[FeSO₄·7H₂O 2g/L, MnSO₄·H₂O 1.5g/L, (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 0.75g/L],加蒸馏水定容至1L,调节pH为7.0,121℃灭菌20min。

MIR-553型电热恒温培养箱, SANYO; ZQLY-180型振荡培养箱,上海知楚仪器有限公司; Centrifuge 5430R型高速冷冻离心机, Eppendorf; MSQ PLUS/U3000型液相色谱-质谱联用仪, Thermo Fisher。

1.3 方法

1.3.1 菌株活化

在LB液体培养基中加入铜绿假单胞菌A39-1的甘油保藏液(体积分数为1%),于37℃、180r/min下培养18h,对其进行活化。将5种病原菌分别接种于LB液体培养基中(体积分数为1%),于30℃、180r/min培养20h。

1.3.2 鼠李糖脂的发酵与提取

制备并高压灭菌以甘油、葡萄糖、葵花籽油、菜籽油、大豆油、调和油、煤油为唯一碳源的发酵培养基。将活化好的菌液分别接种至含不同碳源的发酵培养基中,接种体积分数为2%,37℃、180r/min连续发酵培养144h,每种碳源设置3组平行。

将菌液于室温、4000r/min下离心20min去除菌体,上清液经0.45μm滤膜过滤。用6mol/L盐酸调节上清液pH至2.0,于4℃冰箱中静置4h。上清液与等体积萃取剂[V(氯仿):V(甲醇)=2:1]振荡混匀,于分液漏斗中静置12h,取下层有机相,置于70℃恒温水浴锅中挥发,出现棕黄色固体后于60℃条件下干燥得到粗品,经研磨粉碎得到鼠李糖脂精制样品^[18],用适量碳酸氢钠溶液(pH=8.3)溶解,即得到鼠李糖脂溶液。

1.3.3 鼠李糖脂平板抑菌实验

取200μL浓度为10⁶CFU/mL的金黄色葡萄球菌、副溶血弧菌、哈维氏弧菌、荧光假单胞菌、产气荚膜梭菌菌液分别均匀涂抹于LB固体培养基上;用无菌镊子在每个平板上放8个牛津杯,分别吸取100μL以不同碳源发酵生产的鼠李糖脂

溶液加入到各牛津杯中,对照组加等量的碳酸氢钠溶液,于 30 °C 下培养 24 h 后,观察抑菌圈形成情况,每组实验设置 3 个平行。

1.3.4 鼠李糖脂和抗生素对病原菌最小抑菌浓度(MIC)对比

采用倍比稀释法,设置鼠李糖脂终浓度为 1 000、500、250、125、62.50、31.25、15.63、7.80、3.91、1.95 mg/L,于 24 孔板分别检测其对金黄色葡萄球菌、副溶血弧菌、哈维氏弧菌、荧光假单胞菌、产气荚膜梭菌的最小抑菌浓度(Minimal inhibit concentration, MIC)。同时设置阳性对照与阴性对照,于 30 °C 下培养 24 h 后进行观察并记录,每个实验设置 3 组平行。

将 4 种抗生素(恩拉霉素、硫酸黏菌素、土霉素钙、速达肥)溶于无菌水经 0.22 μm 滤膜除菌后,以上述方法检测其对病原菌的 MIC。

1.3.5 液相色谱-质谱联用分析(LC-MS)

参考 DÉZIEL 等^[19]的方法,以乙腈水溶液溶解鼠李糖脂标准品与样品,采用 Thermo Fisher MSQ PLUS/U3000 型液相色谱-质谱联用仪检测,色谱柱型号为 Acclaim™ 120 C1,实验条件及洗脱条件见表 1。

表 1 LC-MS 检测条件
Tab. 1 LC-MS detection conditions

条件 Condition	项目 Content	参数 Parameter
实验条件 Experiment condition	柱温	25 °C
	检测模式	负离子模式
	检测波长	254 nm
	采集范围	100~1 000 m/z
洗脱条件 Elution requirement	95%超纯水	1 min
	5%~90%乙腈	12 min
	5%乙腈	8 min

1.3.6 铜绿假单胞菌 A39-1 全基因组测序分析

按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取铜绿假单胞菌 A39-1 基因组 DNA,通过琼脂糖电泳和核酸蛋白测定仪检测基因组的纯度、浓度及完整性,将检验合格的 DNA 样品送至上海派森诺生物科技有限公司,通过 Illumina 测序平台和 PacBio 平台进行全基因组测序和拼接组装,对铜

绿假单胞菌 A39-1 的全基因组序列进行生物信息学分析,重点预测鼠李糖脂合成及调控基因。

2 结果

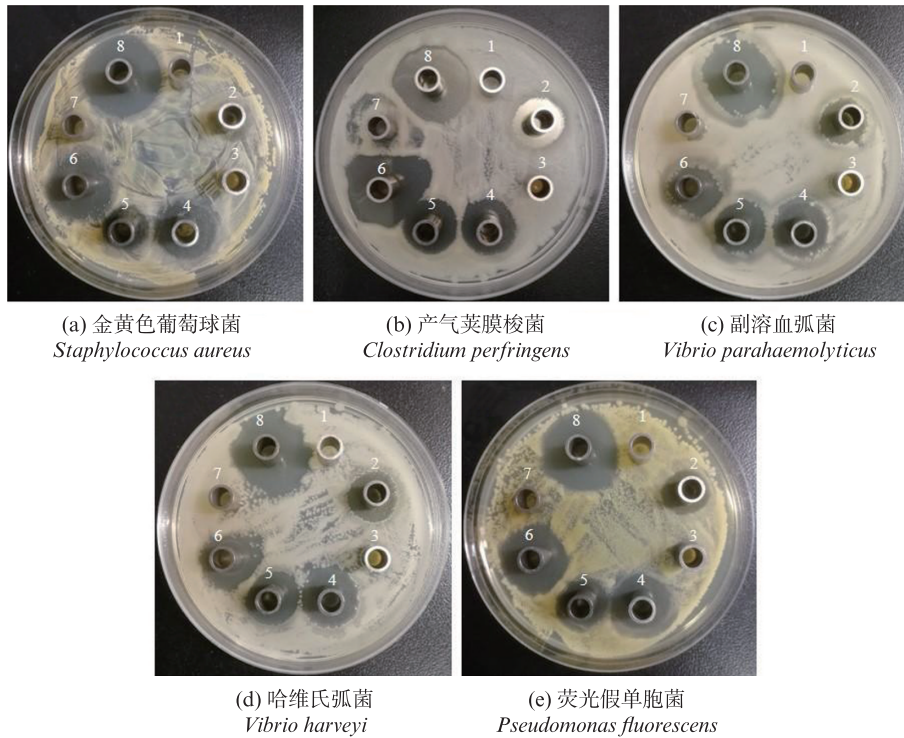
2.1 菌株 A39-1 发酵不同碳源生产的鼠李糖脂对病原菌抑菌活性

采用牛津杯法检测铜绿假单胞菌 A39-1 分别以 7 种碳源发酵生产的鼠李糖脂对 5 种病原菌的抑菌活性(图 1)。菌株 A39-1 在以甘油、葡萄糖、葵花籽油和菜籽油作为发酵碳源时,其生产的鼠李糖脂对金黄色葡萄球菌、副溶血弧菌、哈维氏弧菌、荧光假单胞菌、产气荚膜梭菌都具有抑制效果;当以调和油为发酵碳源时,其生产的鼠李糖脂对除金黄色葡萄球菌外的其他 4 种病原菌具有抑制效果;而以煤油和大豆油为发酵碳源时,其生产的鼠李糖脂对 5 种病原菌均没有抑制效果。根据本实验结果,菌株 A39-1 在以甘油作为唯一碳源发酵生产的鼠李糖脂对 5 种病原菌的抑制效果优于以其他碳源发酵生产的鼠李糖脂。

2.2 最小抑菌浓度(MIC)测定

试验测定铜绿假单胞菌 A39-1 以甘油发酵的鼠李糖脂对 5 种病原菌的 MIC,并与常见的 4 种抗生素药物(恩拉霉素、硫酸黏菌素、土霉素钙、速达肥)进行对比。鼠李糖脂对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 15.63 mg/L;对产气荚膜梭菌的 MIC 为 3.91 mg/L;对副溶血弧菌、哈维氏弧菌和荧光假单胞菌的 MIC 为 7.80 mg/L(表 2)。

在实验测定范围内,恩拉霉素对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 31.25 mg/L;对产气荚膜梭菌的 MIC 为 62.50 mg/L;对副溶血弧菌和哈维氏弧菌的 MIC 为 250 mg/L(表 3)。硫酸黏菌素对产气荚膜梭菌的 MIC 为 62.50 mg/L(表 4)。土霉素钙对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 15.63 mg/L;对产气荚膜梭菌的 MIC 为 7.80 mg/L;对荧光假单胞菌的 MIC 为 3.91 mg/L(表 5)。速达肥对金黄色葡萄球菌、哈维氏弧菌和荧光假单胞菌的 MIC 为 1.95 mg/L;对产气荚膜梭菌和副溶血弧菌的 MIC 为 3.91 mg/L(表 6)。



1. 碳酸氢钠溶液; 2. 调和油; 3. 大豆油; 4. 菜籽油; 5. 葵花籽油; 6. 葡萄糖; 7. 煤油; 8. 甘油。
 1. Sodium bicarbonate solution; 2. Blend oil; 3. Soybean oil; 4. Canola oil; 5. Sunflower oil; 6. Glucose; 7. Kerosene; 8. Glycerinum.

图1 菌株 A39-1 发酵不同碳源生产的鼠李糖脂对病原菌的抑制作用

Fig. 1 Inhibitory effect of rhamnolipid produced by *P. aeruginosa* A39-1 with different carbon sources on pathogenic bacteria

表2 鼠李糖脂对5种病原菌最小抑菌浓度
 Tab. 2 MIC of rhamnolipid on five pathogens

菌株 Strain	鼠李糖脂浓度 Rhamnolipid concentration/(mg/L)											
	1 000	500	250	125	62.50	31.25	15.63	7.80	3.91	1.95	0	CON
Sa	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
Cp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Vp	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Vh	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Pf	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-

注：“+”表示培养基出现浑浊，有目标菌株生长；“-”表示培养基澄清，无目标菌株生长。

Notes: “+” indicates that the medium is turbid and the target strain is growing; “-” indicates that the medium is clear and the target strain is not increasing.

表3 恩拉霉素对5种病原菌最小抑菌浓度
 Tab. 3 MIC of enramycin on five pathogens

菌株 Strain	恩拉霉素含量 Enramycin concentration/(mg/L)											
	1 000	500	250	125	62.50	31.25	15.63	7.80	3.91	1.95	0	CON
Sa	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
Cp	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
Vp	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Vh	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Pf	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

注：“+”表示培养基出现浑浊，有目标菌株生长；“-”表示培养基澄清，无目标菌株生长。

Notes: “+” indicates that the medium is turbid and the target strain is growing; “-” indicates that the medium is clear and the target strain is not increasing.

表 4 硫酸黏菌素对 5 种病原菌最小抑菌浓度
Tab. 4 MIC of colistin sulfate on five pathogens

菌株 Strain	硫酸黏菌素含量 Colistin sulfate concentration/(mg/L)											
	1 000	500	250	125	62.50	31.25	15.63	7.80	3.91	1.95	0	CON
Sa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Cp	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
Vp	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Vh	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Pf	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

注:“+”表示培养基出现浑浊,有目标菌株生长;“-”表示培养基澄清,无目标菌株生长。

Notes: “+” indicates that the medium is turbid and the target strain is growing; “-” indicates that the medium is clear and the target strain is not increasing.

表 5 土霉素钙对 5 种病原菌最小抑菌浓度
Tab. 5 MIC of oxytetracycline calcium on five pathogens

菌株 Strain	土霉素钙含量 Oxytetracycline calcium concentration/(mg/L)											
	1 000	500	250	125	62.50	31.25	15.63	7.80	3.91	1.95	0	CON
Sa	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
Cp	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Vp	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Vh	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Pf	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-

注:“+”表示培养基出现浑浊,有目标菌株生长;“-”表示培养基澄清,无目标菌株生长。

Notes: “+” indicates that the medium is turbid and the target strain is growing; “-” indicates that the medium is clear and the target strain is not increasing.

表 6 速达肥对 5 种病原菌最小抑菌浓度
Tab. 6 MIC of Stafac on five pathogens

菌株 Strain	速达肥含量 Stafac concentration/(mg/L)											
	1 000	500	250	125	62.50	31.25	15.63	7.80	3.91	1.95	0	CON
Sa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Cp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Vp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Vh	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Pf	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

注:“+”表示培养基出现浑浊,有目标菌株生长;“-”表示培养基澄清,无目标菌株生长。

Notes: “+” indicates that the medium is turbid and the target strain is growing; “-” indicates that the medium is clear and the target strain is not increasing.

2.3 液相色谱-质谱分析(LC-MS)

利用液相色谱串联质谱法对铜绿假单胞菌 A39-1 分别以甘油、葡萄糖和葵花籽油为唯一碳源发酵生产的鼠李糖脂进行检测。由色谱图可以看出,在同一色谱条件下,3 种鼠李糖脂的色谱主峰出峰时间一致(图 2),但同一出峰时间质谱图却不相同(图 3),即鼠李糖脂同系物结构不同。

按照糖环与脂肪酸链的构成比例,鼠李糖脂可划分为单糖双脂、双糖单脂、双糖双脂和单糖单脂四种结构。根据各质谱图中离子的质荷比、

元素组成计算及现有文献研究^[15,20],确定了 3 种鼠李糖脂样品中的同系物组分及结构(表 7)。铜绿假单胞菌 A39-1 以甘油发酵生产的鼠李糖脂中共检测到 8 种同系物,其中包括 4 种单糖单脂(Rha-C_{8:2}、Rha-C_{9:2}、Rha-C_{11:2}、Rha-C₁₀)和 4 种单糖双脂(Rha-C_{6:1}-C_{6:1}、Rha-C_{12:1}-C_{12:1}、Rha-C₁₂-C₁₄、Rha-C_{14:2}-C_{14:2}),Rha-C_{11:2}为主要结构;在以葡萄糖发酵生产的鼠李糖脂中共检测到 5 种同系物,包括 3 种单糖单脂(Rha-C_{9:2}、Rha-C₁₀、Rha-C_{12:1})和 2 种单糖双脂(Rha-C₁₀-C_{10:2}、Rha-C₁₂-C₁₄),Rha-C₁₀为主要结构;在以葵花籽油发酵生

产的鼠李糖脂中检测到 8 种同系物,其中包括 5 种单糖单脂(Rha-C_{7:1}、Rha-C_{11:2}、Rha-C_{12:1}、Rha-C_{14:2}、Rha-C_{16:1})和 3 种单糖双脂(Rha-C₆-C₆、Rha-C₈-C₈、Rha-C_{8:1}-C_{10:1}),Rha-C_{7:1}为主要结构。

2.4 铜绿假单胞菌 A39-1 全基因组结构

铜绿假单胞菌 A39-1 基因组序列总长为 6 374 121 bp,染色体 GC 含量为 66.61%,编码 66 个 tRNA 和 16 个 rRNA。共预测到 5 824 个开放阅读框(Open reading frames, ORFs),所占碱基数

量为 5 469 138 bp。铜绿假单胞菌 A39-1 基因组的染色体信息已上传至 GenBank 数据库,登录号为 CP068238。

2.5 毒力因子(VFDB)分析

铜绿假单胞菌 A39-1 基因组在 VFDB (Virulence factors of pathogenic bacteria, VFDB) 数据库注释到 210 个与黏附作用、抗菌活性、抗吞噬作用、铁摄取、蛋白酶、群体感应及分泌系统相关的毒力基因(表 8)。

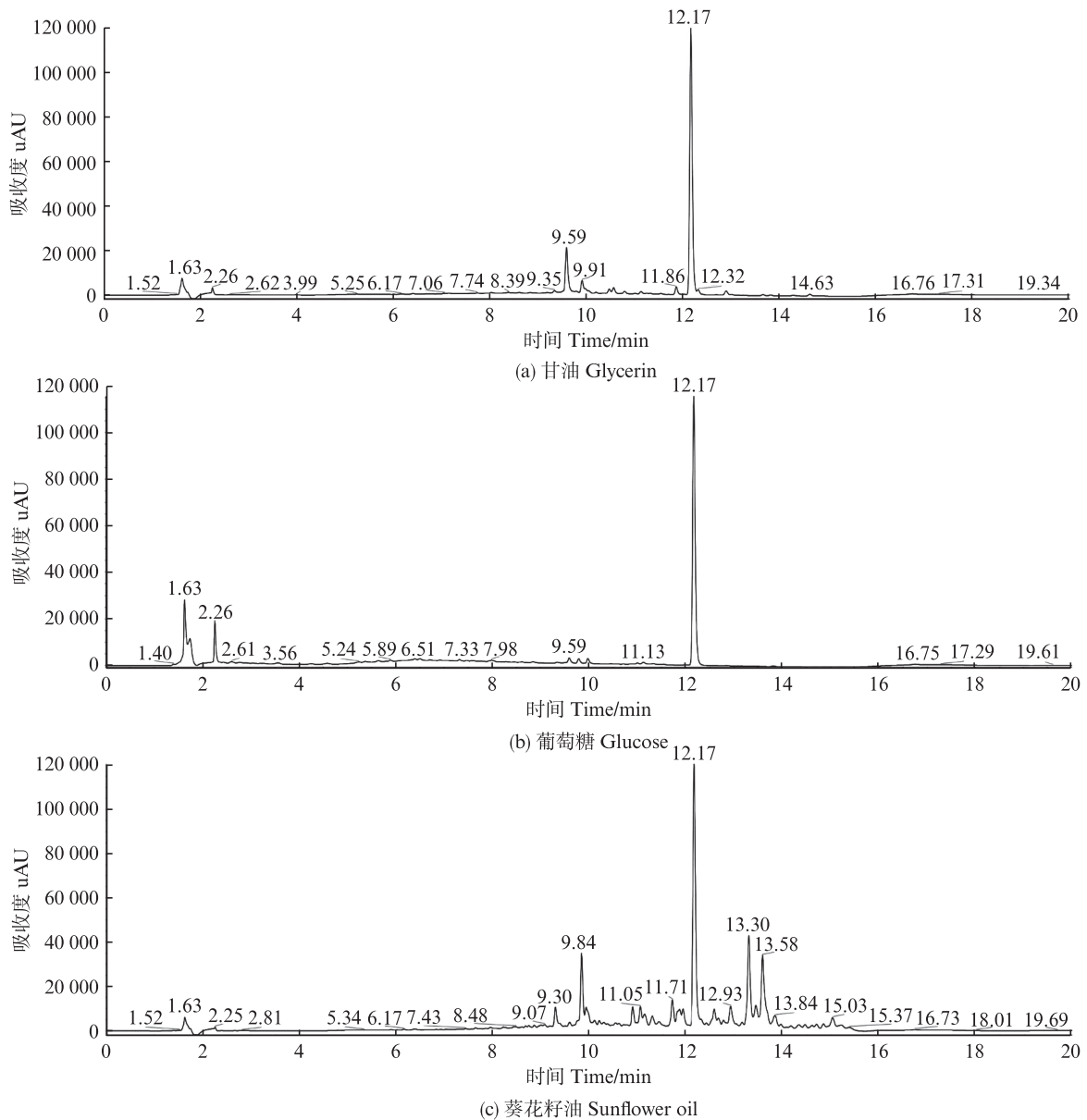


图 2 菌株 A39-1 分别发酵 3 种碳源所产鼠李糖脂的液相色谱图

Fig. 2 Liquid chromatography figure of rhamnolipid produced by *P. aeruginosa* A39-1 from three carbon sources

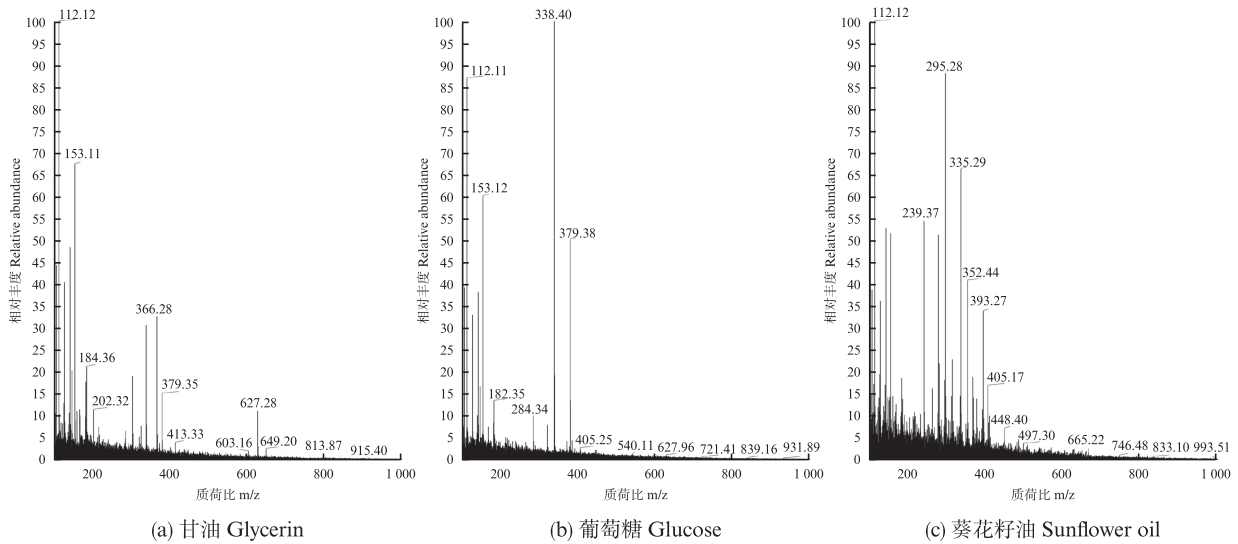


图3 菌株 A39-1 分别发酵 3 种碳源所产鼠李糖脂的质谱图

Fig. 3 Mass spectra of rhamnolipids produced by *P. aeruginosa* A39-1 from three carbon sources

表 7 菌株 A39-1 分别发酵 3 种碳源所产鼠李糖脂的组成及相对含量

Tab. 7 Composition and relative content of rhamnolipids produced by *P. aeruginosa* A39-1 from three carbon sources respectively

类型 Type	同系物 Homolog	分子式 Formula	M M	金属离子 Metal ion	m/z m/z	相对丰度 Relative abundance/%	
甘油	Rha-C _{8:2}	C ₁₄ H ₂₈ O ₇	302	[M+H] ⁺	303	25.69	
	单糖单脂 Glycerin Rha-Cn	Rha-C _{9:2}	C ₁₅ H ₂₄ O ₇	316	[M+Na] ⁺	339	35.03
		Rha-C _{11:2}	C ₁₇ H ₂₈ O ₇	347	[M+Na] ⁺	366	44.42
		Rha-C ₁₀	C ₁₆ H ₃₀ O ₇	333	[M+2Na] ⁺	379	17.75
		Rha-C _{6:1} -C _{6:1}	C ₁₈ H ₃₀ O ₉	390	[M+Na] ⁺	413	5.42
	单糖双脂 Glycerin Rha-Cn-Cm	Rha-C _{12:1} -C _{12:1}	C ₃₀ H ₅₄ O ₉	558	[M-H+2Na] ⁺	603	3.09
		Rha-C ₁₂ -C ₁₄	C ₃₂ H ₆₀ O ₉	588	[M+K] ⁺	627	15.04
Rha-C _{14:2} -C _{14:2}		C ₃₄ H ₆₄ O ₉	616	[M+K] ⁺	649	4.51	
葡萄糖	Rha-C _{9:2}	C ₁₅ H ₂₄ O ₇	316	[M+Na] ⁺	339	17.69	
	单糖单脂 Glucose Rha-Cn	Rha-C ₁₀	C ₁₆ H ₃₀ O ₇	333	[M+2Na] ⁺	379	42.17
		Rha-C _{12:1}	C ₁₈ H ₃₂ O ₇	360	[M-H+2Na] ⁺	405	6.31
	单糖双脂 Glucose Rha-Cn-Cm	Rha-C ₁₀ -C _{10:2}	C ₂₆ H ₄₄ O ₉	501	[M+K] ⁺	540	4.57
		Rha-C ₁₂ -C ₁₄	C ₃₂ H ₆₀ O ₉	588	[M+K] ⁺	627	3.26
葵花籽油	Rha-C _{7:1}	C ₁₃ H ₂₂ O ₇	290	[M+Na] ⁺	313	20.72	
	单糖单脂 Sunflower oil Rha-Cn				[M-H+2Na] ⁺	335	51.70
		Rha-C _{11:2}	C ₁₇ H ₂₈ O ₇	347	[M+Na] ⁺	366	21.06
		Rha-C _{12:1}	C ₁₈ H ₃₂ O ₇	360	[M-H+2Na] ⁺	405	16.94
		Rha-C _{14:2}	C ₂₀ H ₃₄ O ₇	386	[M+Na] ⁺	409	9.57
	Rha-C _{16:1}	C ₂₂ H ₃₈ O ₇	414	[M-H+2Na] ⁺	459	4.92	
	单糖双脂 Sunflower oil Rha-Cn-Cm	Rha-C ₆ -C ₆	C ₁₈ H ₃₂ O ₉	392	[M+H] ⁺	393	36.25
Rha-C ₈ -C ₈		C ₂₂ H ₃₈ O ₉	447	[M+H] ⁺	448	6.37	
Rha-C _{8:1} -C _{10:1}		C ₂₄ H ₄₂ O ₉	474	[M+Na] ⁺	497	3.58	

表 8 菌株 A39-1 基因组 VFDB 分析结果统计
Tab. 8 VFDB analysis results from statistics of *P. aeruginosa* A39-1 genome

类别 Content	相关基因 Gene	毒力因子 VFDB
黏附 Adhesive	<i>flgN, flgM, flgL, flgK, flgJ, flgI, flgH, flgG, flgF, flgE, flgD, flgC, flgB, motA, motB, motC, motD, fliA, fliR, fliQ, fliP, fliO, fliN, fliL, fliM, fliK, fliJ, fliI, fliG, fliF, fliE, fliS, fleN, fleR, fleS, fleQ, flhA, flhB, flhF</i> <i>Wzz, waaA, waaC, waaF, waaG, waaP</i>	鞭毛 脂多糖
	<i>pilM, pilN, pilO, pilP, pilV, pilT, pilF, pilB, pilC, pilW, pilX, pilE, pilQ, pilY1, pilY2, fimT, fimU, chpA, chpC, chpD, chpE, tapU, tapT, pilG, pilH, pilI, pilJ, pilK, pilS, pilR, pilU</i>	IV 型菌毛
抗菌活性 Anti-microbial	<i>PhzS, phzG1, phzF1, phzE1, phzD1, phzC1, phzB1, phzA1, phzM</i>	吩嗪生物合成
抗吞噬作用 Antiphagocytosis	<i>mucA, mucB, mucC, mucD, mucE, mucP, algA, algF, algJ, algI, algL, algX, algG, algE, algK, alg44, alg8, algD, algU, algW, algR, algQ, algZ, algC, algB</i>	藻酸盐
铁摄取 Ion acquisition	<i>pchA, pchB, pchC, pchD, pchE, pchF, pchG, pchH, pchI, pchR, fptA, pvdS, pvdL, pvdH, pvdE, pvdF, pvdO, pvdN, pvdM, pvdP, pvdA, pvdQ</i>	铁蛋白
蛋白酶 Protease	<i>aprA</i> <i>lasA, lasB</i>	碱性蛋白酶 弹性蛋白酶
群体感应 Quorum sensing	<i>lasI, rhII</i>	调节因子
分泌系统 Secretory system	<i>tagQ, tagR, tagS, tagT, icmF1/tssM1, dotU1, hsiJ1, fha1, hsiA1, hsiB1/vipA, hsiC1/vipB, hcp1, hsiE1, hsiF1, hsiG1, hsiH1, clpV1, vgrG1a, vgrG1b, gspE, lspE, tse1, tse2, tse3, vipB/mglB,</i>	IV 和 VI 细菌分泌系统

2.6 鼠李糖脂合成及调控基因预测

铜绿假单胞菌合成鼠李糖脂的过程是由不同基因相互协调完成的生理过程,而不是一个简单的催化反应。根据报道,结合基因组注释到的鼠李糖脂相关合成基因,预测菌株 A39-1 合成鼠李糖脂的路径(图 4)。在铜绿假单胞菌 A39-1 基因组中能预测到 *algC*、*rmlA*、*rmlB*、*rmlC* 和 *rmlD* 基因,葡萄糖-6-磷酸在这些基因编码形成的酶系的作用下转化为 dTDP-L-鼠李糖;鼠李糖基转移酶系 I 中的 RhlA (rhamnosyltransferase subunit A)负责将酰基载体蛋白转化为 β -羟基烷酰基- β -羟基烷酸 (HAAs);随后, RhlB (Rhamnosyltransferase subunit B)将一分子的 dTDP-L-鼠李糖连接到一分子的 HAAs 上,形成单鼠李糖脂。通常,单鼠李糖脂由鼠李糖基转移酶 II (Rhamnosyltransferase subunit C, RhlC)催化合成双鼠李糖脂。但在菌株 A39-1 的基因组中并没有预测到编码该酶的 *rhlC* 基因,因此其不能合成双鼠李糖脂。此外,在铜绿假单胞菌 A39-1 基因组中有常见的参与鼠李糖脂合成过程的转录调节因子 *MvfR* 以及作为反应调节器的 *AlgR*、*RpoN*、*RpoS*、*PhoB*、*DksA* 等。所以,铜绿假单胞菌 A39-1 为 *rhlC* 基因缺陷株,能够专一性的产生单鼠李糖脂。

3 讨论

在水产养殖“减量用药”“减抗替抗”的发展背景下,开发新型绿色、安全有效的抗菌制剂具有重要的现实意义。本研究发现菌株 A39-1 所产单鼠李糖脂对金黄色葡萄球菌、副溶血弧菌、哈维氏弧菌、荧光假单胞菌、产气荚膜梭菌具有抑菌活性,其中以甘油作为唯一碳源发酵所得鼠李糖脂的抑菌活性最佳。恩拉霉素、硫酸黏菌素、土霉素钙及速达肥均为养殖中预防动物疾病与促生长的常用抗生素。恩拉霉素可抑制细菌细胞壁的合成,对革兰氏阳性菌有较强抑制作用,如鸡源产气荚膜梭菌^[21]。硫酸黏菌素为多肽类抗生素,对革兰氏阴性菌有较强抑制作用,如大肠杆菌、变形杆菌等^[22]。土霉素钙为四环素类抗生素,对包括葡萄球菌、产气荚膜梭菌在内的多种革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌有效^[23]。速达肥的主要成分为维吉尼霉素,主要抗金黄色葡萄球菌等革兰氏阳性菌,可促进水产养殖动物生长和提高免疫防御能力^[24]。以该四种抗生素为阳性对照,测定鼠李糖脂最小抑菌浓度,发现其 MIC 低于 4 种抗生素,表明鼠李糖脂具有良好抑菌性能。早在 1996 年,STANGHELLINI 等^[25]就发现铜绿假单胞菌产生的鼠李糖脂可以高效裂

解瓜果腐霉(*Pythium aphanidermatum*)和辣椒疫霉(*Phytophthora capsici*)的游动孢子,在生物防控方面极具研究价值。关于鼠李糖脂的抗真菌活性陆续多有报道,鼠李糖脂被证实可以有效抑制葡萄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)^[26]、甘蔗镰孢菌(*Fusarium sacchari*)^[27]和大豆的疫霉菌(*Phytophthora sojae*)^[28]。此外,刘韵怡等^[29]发现鼠李糖脂对寄生水霉的菌丝生长和孢子萌发具有良好的抑制效果,为水生动物水霉病防控的提供新思路。ABALOS等^[30]检测发现从铜绿假单胞菌中提取的鼠李糖脂混合物对包括弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)、黏质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)在内的近20种细菌具有优良的抑制活性。ALEKSI等^[31]发现赖氨酸芽孢杆菌属BV152.1(*Lysinibacillus* sp. BV152.1)生产的双鼠李糖脂具有较强的抗生物被膜、抗菌和细胞毒性作用,当鼠李糖脂浓度大于62 μg/mL时,其对金黄色葡萄球菌的生长具有抑制作用。鼠李糖脂的广谱抗菌特性和优良抗菌效果表明其具备代替抗生素、成为新型绿色安全抗菌制剂的潜在可能。

自然发酵条件下,鼠李糖脂是由同系物分子组成的混合物。全基因组分析发现菌株A39-1基因组中含有合成鼠李糖脂所必须的相关基因,如 *algC*、*rmlABCD*、*fabB/F*、*fabG*、*fabA/Z*、*fabI/V*、*fadD*、*fadA*、*fadB*、*fadE*、*rhlA*、*rhlB* 以及相关群体感应调控基因,但并没有预测到编码鼠李糖基转移酶RhlC的 *rhlC* 基因,为天然 *rhlC* 基因缺失株,以不同碳源发酵均产生单鼠李糖脂。SOOD等^[32]从土壤中分离得到 *rhlC* 基因缺失的铜绿假单胞菌CR1,该菌株同样只产生单鼠李糖脂,并且该菌株基因组中缺乏典型的毒力基因。ZHAO等^[33]将铜绿假单胞菌SG的 *rhlC* 基因进行敲除,构建了基因敲除菌株SGΔ*rhlC*,使得菌株产单鼠李糖脂的能力得到提升。NICOLÒ等^[34]发现菌株在以含长链脂肪酸的碳源发酵时,合成双鼠李糖脂的关键基因 *rhlC* 会延迟表达,因此产生更多的单鼠李糖脂;而当以甘油或葡萄糖为碳源发酵时,产物中双鼠李糖脂含量较多,表明碳源种类可能影响合成鼠李糖脂的相关基因的表达。但是在本试验条件下,当以甘油为碳源发酵时,产生的主要是单鼠李糖脂,进一步说明A39-1菌株是一个合成双鼠李糖脂过程受阻的菌株。

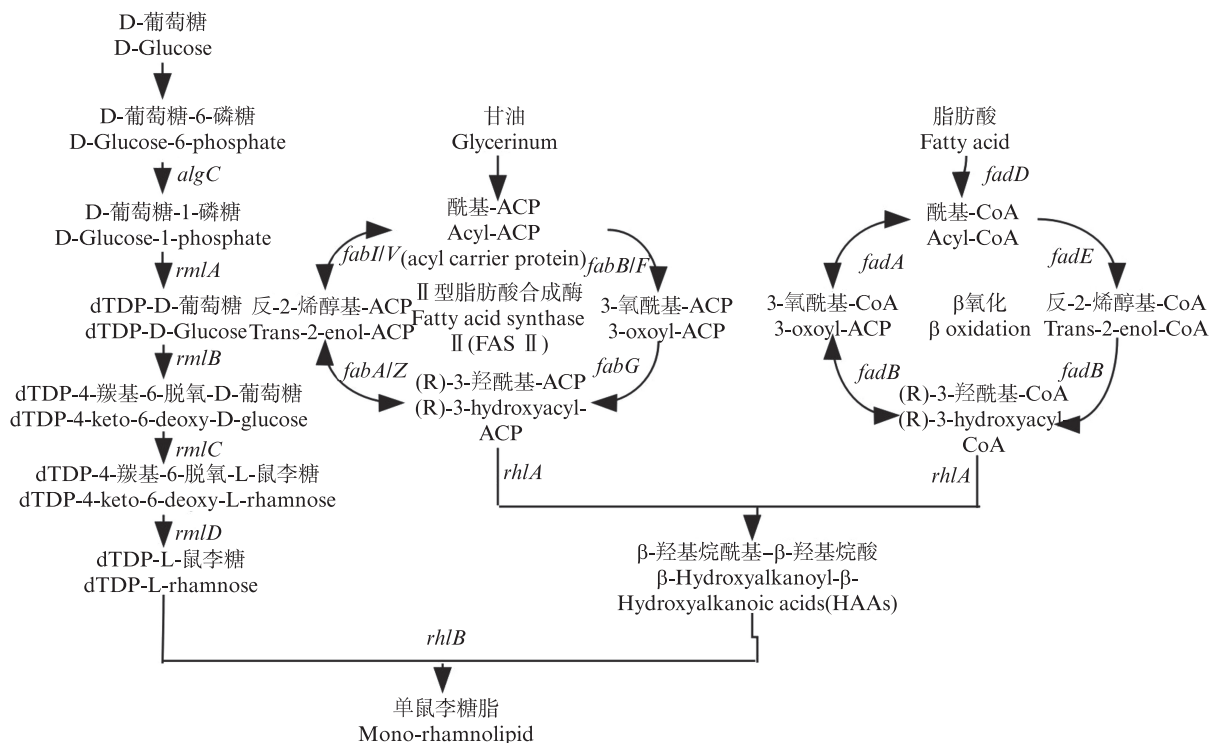


图4 铜绿假单胞菌 A39-1 中鼠李糖脂的合成途径预测

Fig. 4 Synthetic pathway prediction of rhamnolipid in *P. aeruginosa* A39-1

铜绿假单胞菌作为鼠李糖脂的常规生产菌,其基因组学已被广泛研究,但是不同亚种的铜绿假单胞菌毒力因子方面存在一定的差异。铜绿假单胞菌 A39-1 基因组中共预测到 210 个毒力因子,其中含有编码鞭毛生物合成蛋白的 *fliA*、*fliF*、*fliG* 等基因,这些基因对于细菌的定殖具有至关重要的作用。TSOU 等^[35]发现 *fliA* 能够使霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 表达量上升,抑制转录调节因子 HapR 的表达;ANNIE 等^[36]发现艰难梭菌 (*Clostridioides difficile*) *liC* 基因失活后,其细胞培养上清液中毒性增强;FENG 等^[37]认为 *fliC* 基因是荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) GcM5-1 的关键致病因子。此外,在菌株 A39-1 基因组中还包括 III、IV 和 VI 型分泌系统,其在细菌的定植和致病方面具有重要作用^[38-39]。VI 型分泌系统是革兰氏阴性菌重要的毒力因子^[40],菌株 A39-1 基因组预测到 VI 型分泌系统所必须的蛋白质合成基因 *vipA* 和 *vipB*,说明铜绿假单胞菌 A39-1 可能具有一定的致病性。若作为鼠李糖脂大规模生产菌株,铜绿假单胞菌 A39-1 的致病力与安全性还有待进一步研究与评估。

铜绿假单胞菌 A39-1 为野生型天然 *rhIC* 基因缺陷菌株,其所产单鼠李糖脂具有与抗生素相当甚至更优的抑菌效果,表明鼠李糖脂有望开发为新型安全高效的水产抗菌制剂,为水生动物疾病防控提供新思路。同时对铜绿假单胞菌 A39-1 的鼠李糖脂合成路径解析及毒力因子分析,为鼠李糖脂的生产规范及以基因工程技术构建单鼠李糖脂生产安全菌株提供理论基础。

作者声明本文无利益冲突

参考文献:

- [1] HARIKRISHNAN R, BALASUNDARAM C, HEO M S. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish [J]. *Aquaculture*, 2011, 317(1/4): 1-15.
- [2] BACCILE N. Are microbial biosurfactants actually only surfactants? [J]. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2023, 68: 101747.
- [3] GUZMÁN E, ORTEGA F, RUBIO R G. Exploring the world of rhamnolipids: a critical review of their production, interfacial properties, and potential application [J]. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2024, 69: 101780.
- [4] ONAIZI S A. Statistical analyses of the effect of rhamnolipid biosurfactant addition on the enzymatic removal of Bisphenol A from wastewater [J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2021, 32: 101929.
- [5] MASSARA H, MULLIGAN C N, HADJINICOLAOU J. Effect of rhamnolipids on chromium-contaminated kaolinite [J]. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 2007, 16(1): 1-14.
- [6] NDLOVU T, RAUTENBACH M, VOSLOO J A, et al. Characterisation and antimicrobial activity of biosurfactant extracts produced by *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a wastewater treatment plant [J]. *AMB Express*, 2017, 7(1): 108.
- [7] SEGHAL KIRAN G, THAJUDDIN N, HEMA T A, et al. Optimization and characterization of rhamnolipid biosurfactant from sponge associated marine fungi *Aspergillus* sp. MSF1 [J]. *Desalination and Water Treatment*, 2010, 24(1/3): 257-265.
- [8] STOVER C K, PHAM X Q, ERWIN A L, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen [J]. *Nature*, 2000, 406(6799): 959-964.
- [9] DOBLER L, VILELA L F, ALMEIDA R V, et al. Rhamnolipids in perspective: gene regulatory pathways, metabolic engineering, production and technological forecasting [J]. *New Biotechnology*, 2016, 33(1): 123-135.
- [10] PANG A P, WANG Y, ZHANG T, et al. Highly efficient production of rhamnolipid in *P. putida* using a novel *sacB*-based system and mixed carbon source [J]. *Bioresource Technology*, 2024, 394: 130220.
- [11] NITSCHKE M, COSTA S G V A O, HADDAD R, et al. Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI [J]. *Biotechnology Progress*, 2005, 21(5): 1562-1566.
- [12] BENINCASA M, ACCORSINI F R. *Pseudomonas aeruginosa* LBI production as an integrated process using the wastes from sunflower-oil refining as a substrate [J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(9): 3843-3849.
- [13] DAS P, YANG X P, MA L Z. Analysis of biosurfactants from industrially viable *Pseudomonas* strain isolated from crude oil suggests how rhamnolipids congeners affect emulsification property and antimicrobial activity [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 696.
- [14] ZHAO F, SHI R J, MA F, et al. Oxygen effects on rhamnolipids production by *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1): 39.
- [15] ABDEL-MAWGOUD A M, LÉPINE F, DÉZIEL E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*,

- 2010, 86(5): 1323-1336.
- [16] ZHAO F, WANG B X, YUAN M L, et al. Comparative study on antimicrobial activity of mono-rhamnolipid and di-rhamnolipid and exploration of cost-effective antimicrobial agents for agricultural applications [J]. *Microbial Cell Factories*, 2022, 21: 221.
- [17] ROCHA V A L, DE CASTILHO L V A, DE CASTRO R P V, et al. Comparison of mono-rhamnolipids and di-rhamnolipids on microbial enhanced oil recovery (MEOR) applications [J]. *Biotechnology Progress*, 2020, 36(4): e2981.
- [18] INVALLY K, SANCHETI A, JU L K. A new approach for downstream purification of rhamnolipid biosurfactants [J]. *Food and Bioproducts Processing*, 2019, 114: 122-131.
- [19] DÉZIEL E, LÉPINE F, DENNIE D, et al. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1999, 1440(2/3): 244-252.
- [20] HABA E, ABALOS A, JÁUREGUI O, et al. Use of liquid chromatography-mass spectroscopy for studying the composition and properties of rhamnolipids produced by different strains of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Journal of Surfactants and Detergents*, 2003, 6(2): 155-161.
- [21] BELOTE B L, TUJIMOTO-SILVA A, HÜMMELGEN P H, et al. Histological parameters to evaluate intestinal health on broilers challenged with *Eimeria* and *Clostridium perfringens* with or without enramycin as growth promoter [J]. *Poultry Science*, 2018, 97(7): 2287-2294.
- [22] KOEN N, VAN BREDA S V, LOOTS D T. Elucidating the antimicrobial mechanisms of colistin sulfate on *Mycobacterium tuberculosis* using metabolomics [J]. *Tuberculosis*, 2018, 111: 14-19.
- [23] 张浩, 罗义, 周启星. 四环素类抗生素生态毒性研究进展[J]. *农业环境科学学报*, 2008(2): 407-413.
ZHANG H, LUO Y, ZHAO Q X. Research advancement of eco-toxicity of tetracycline antibiotics [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2008(2): 407-413.
- [24] TS Ahmad, AJ Matty. The effect of feeding antibiotics on growth and body composition of carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Aquaculture*, 1989, 77(2): 211-220.
- [25] STANGHELLINI M E, MILLER R M. Biosurfactants: their identity and potential efficacy in the biological control of zoospore plant pathogens [J]. *Plant Disease*, 1997, 81(1): 4-12.
- [26] VARNIER A L, SANCHEZ L, VATSA P, et al. Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine [J]. *Plant, Cell & Environment*, 2009, 32(2): 178-193.
- [27] GOSWAMI D, HANDIQUE P J, DEKA S. Rhamnolipid biosurfactant against *Fusarium sacchari*—the causal organism of pokkah boeng disease of sugarcane [J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2014, 54(6): 548-557.
- [28] SOLTANI DASHTBOZORG S, MIAO S D, JU L K. Rhamnolipids as environmentally friendly biopesticide against plant pathogen *Phytophthora sojae* [J]. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 2016, 35(1): 169-173.
- [29] 刘韵怡, 戚建华, 王年, 等. 生物表面活性剂鼠李糖脂对寄生水霉的体外抑制作用[J]. *大连海洋大学学报*, 2022, 37(1): 95-103.
- LIU Y Y, QI J H, WANG N, et al. Inhibitory effect of biosurfactant rhamnolipid on *Saprolegnia parasitica* in vitro [J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2022, 37(1): 95-103.
- [30] ABALOS A, PINAZO A, INFANTE M R, et al. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes [J]. *Langmuir*, 2001, 17(5): 1367-1371.
- [31] ALEKSIC I, PETKOVIC M, JOVANOVIC M, et al. Anti-biofilm properties of bacterial di-rhamnolipids and their semi-synthetic amide derivatives [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2454.
- [32] SOOD U, SINGH D N, HIRA P, et al. Rapid and solitary production of mono-rhamnolipid biosurfactant and biofilm inhibiting pyocyanin by a taxonomic outlier *Pseudomonas aeruginosa* strain CR1 [J]. *Journal of Biotechnology*, 2020, 307: 98-106.
- [33] ZHAO F, YUAN M L, LEI L Y, et al. Enhanced production of mono-rhamnolipid in *Pseudomonas aeruginosa* and application potential in agriculture and petroleum industry [J]. *Bioresource Technology*, 2021, 323: 124605.
- [34] NICOLÒ M S, CAMBRIA M G, IMPALLOMENI G, et al. Carbon source effects on the mono/di-rhamnolipid ratio produced by *Pseudomonas aeruginosa* L05, a new human respiratory isolate [J]. *New Biotechnology*, 2017, 39: 36-41.
- [35] TSOU A M, FREY E M, HSIAO A, et al. Coordinated regulation of virulence by quorum sensing and motility pathways during the initial stages of *Vibrio cholerae* infection [J]. *Communicative & Integrative Biology*, 2008, 1(1): 42-44.
- [36] AUBRY A, HUSSACK G, CHEN W X, et al. Modulation of toxin production by the flagellar regulon in *Clostridium difficile* [J]. *Infection and Immunity*, 2012, 80(10): 3521-3532.
- [37] FENG K, LI R G, CHEN Y N, et al. Sequencing and

- analysis of the *Pseudomonas fluorescens* GeM5-1A genome: a pathogen living in the surface coat of *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. PLOS One, 2015, 10 (10): e0141515.
- [38] ALFANO J R, CHARKOWSKI A O, DENG W L, et al. The *Pseudomonas syringae* Hrp pathogenicity island has a tripartite mosaic structure composed of a cluster of type III secretion genes bounded by exchangeable effector and conserved effector loci that contribute to parasitic fitness and pathogenicity in plants [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, 97 (9) : 4856-4861.
- [39] PRESTON G M, BERTRAND N, RAINEY P B. Type III secretion in plant growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* SBW25 [J]. Molecular Microbiology, 2001, 41(5): 999-1014.
- [40] BRÖMS J E, ISHIKAWA T, WAI S N, et al. A functional VipA-VipB interaction is required for the type VI secretion system activity of *Vibrio cholerae* O1 strain A1552 [J]. BMC Microbiology, 2013, 13(1): 96.

Structure and synthetic pathway analysis of rhamnolipid products from wild-type natural *rhIC* gene deletion strain *Pseudomonas aeruginosa* A39-1

LUO Huifang^{1,2,3,4}, QI Jianhua^{1,2,3,4}, TONG Wentao^{1,2,3,4}, WANG Rui^{1,2,3,4}, LYU Tianyi^{1,2,3,4}, SONG Zengfu^{1,2,3,4}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Key Laboratory of Exploration and Utilisation of Aquatic Genetic Resources Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 4. China-ASEAN Belt and Road Joint Laboratory on Mariculture Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: To explore the antibacterial activity and structural composition of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* A39-1 fermentation with various carbon sources, as well as to analyze the rhamnolipid biosynthesis process, the inhibitory activity of rhamnolipids against pathogens was determined using the Oxford cup assay, the congener composition of rhamnolipid samples was detected and analysed using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), and the whole genome sequence was determined and assembled using Illumina Hiseq and PacBio. Genome sequence annotated and analysed rhamnolipid synthesis-related genes. Rhamnolipids produced by strain A39-1 by fermentation with glycerol, glucose, sunflower oil, rapeseed oil and blended oil as the sole carbon source had antibacterial activity; LC-MS detection of rhamnolipids obtained by glycerol fermentation as four monosaccharide monolipids (Rha-C_{8:2}, Rha-C_{9:2}, Rha-C_{11:2}, Rha-C₁₀) and four monosaccharide bilipids (Rha-C_{6:1}-C_{6:1}, Rha-C_{12:1}-C_{12:1}, Rha-C₁₂-C₁₄, Rha-C_{14:2}-C_{14:2}), Rha-C_{11:2} is the primary structure; The genome was anticipated to have genes for rhamnolipid synthesis related to *algC*, *rmlA*, *rmlB*, *rmlC*, *rmlD*, *rhIA*, *rhIB*, as well as the absence of gene *rhIC* encoding rhamnosyltransferase II synthesizes bi-rhamnolipids. *Pseudomonas aeruginosa* A39-1, a wild-type strain with a natural *rhIC* gene deletion, produced mono-rhamnolipids exclusively by fermentation with different carbon sources, and the mono-rhamnolipids had antibacterial activity. This study explores the antibacterial activity of mono-rhamnolipids, analyzes composition and biosynthesis pathways, and provides new ideas for the development of new green prevention and control medicines for aquatic animal diseases.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa* A39-1; rhamnolipid; antibacterial; liquid chromatography-mass spectrometry; whole genome sequencing analysis