

柳志强, 李乔曼, 徐爽, 等. 催吐萝芙木内生菌 *Bacillus subtilis* LYM3 的抑菌活性产物[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(1) : 67-72.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.01.011

催吐萝芙木内生菌 *Bacillus subtilis* LYM3 的抑菌活性产物

柳志强, 李乔曼, 徐爽, 吴曼莉, 张楠, 李晓宇
(海南大学环境与植物保护学院, 海南 海口 570228)

摘要: 为了研究分离自催吐萝芙木的内生细菌 *Bacillus subtilis* LYM3 的抑菌谱及其产生的抑菌活性产物, 利用对峙生长法测试了菌株 LYM3 对 10 种植物病原真菌的拮抗活性, 利用 Sephadex LH-20 凝胶柱对其产生的抑菌活性产物进行了分离, 并利用 LCMS-IT-TOF 进行了初步鉴定。结果显示: 菌株 LYM3 对 10 种植物病原真菌均有较强的拮抗作用, 抑制率均在 60% 以上, 其中对香蕉炭疽病菌的抑菌活性最强, 抑制率为 83.5%; LYM3 产生的抑菌物质主要为胞外产物, 具有较好的热稳定性, 在 pH 6~12 活性稳定; 经分离发酵液获得 3 种抑菌活性组分 A、B 和 C, 经初步鉴定推测 A 属于伊枯草菌素, B 和 C 属于表面活性素。可见, 菌株 LYM3 具有广谱抗菌性, 其产生的抑菌活性产物主要为脂肽类物质。

关键词: 催吐萝芙木; 内生细菌; 枯草芽孢杆菌; 抗菌脂肽

中图分类号: S432.4⁺2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)01-0067-06

Antifungal activity products of an endophyte *Bacillus subtilis* LYM3 from *Rauwolfia vomitoria* Afzel

LIU Zhi-qiang, LI Qiao-man, XU Shuang, WU Man-li, ZHANG Nan, LI Xiao-yu
(College of Environment and Plant Protection, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: In order to study the inhibition spectrum and antifungal products of an endophyte *Bacillus subtilis* LYM3 from *Rauwolfia vomitoria* Afzel, the antagonistic activity of strain LYM3 to 10 kinds of plant pathogenic fungi was tested using confrontation growth method, and the antifungal products were purified using Sephadex LH-20 and identified by LCMS-IT-TOF. The results showed that strain LYM3 had obvious antagonistic activity to 10 kinds of plant pathogenic fungi, and the inhibition rates were all above 60%. Among them, strain LYM3 had the highest antagonistic activity to *Collectotrichum musae* with the inhibition rate of 83.5%. The antifungal products produced by strain LYM3 were mainly extracellular products, which had better thermal stability, being stable in pH 6-12. Three fractions A, B and C with antifungal activity were obtained from fermentation broth of LYM3. After preliminary analysis, it was speculated that A belonged to iturin, B and C belonged to surfactin. Strain LYM3 had broad-spectrum inhibition activity, and its antifungal products were mainly lipopeptides.

Key words: *Rauwolfia vomitoria* Afzel; endophytic bacteria; *Bacillus subtilis*; antimicrobial lipopeptides

收稿日期: 2016-03-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(31160377)

作者简介: 柳志强(1980-), 男, 河北邯郸人, 博士, 副教授, 主要从事植物病害生物防治研究。(E-mail) liuzhiqiang80@126.com

通讯作者: 李晓宇, (E-mail) hdlxiaoyu@126.com

催吐萝芙木(*Rauwolfia vomitoria* Afzel)为夹竹桃科萝芙木属常绿小乔木, 原产西非利比里亚, 中国有 12 个种, 主要分布于海南、台湾、云南、广东、广西和贵州南部^[1-2]。催吐萝芙木具有清热解毒、清肝

火、理气止痛、杀虫止痒等药用功效。目前国内外关于催吐萝芙木的研究主要集中于其生长规律及化学药理成分^[3-4],对其内生菌及其次生代谢产物的研究涉及较少。

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是一类分布广泛的好氧性革兰氏阳性杆状细菌。枯草芽孢杆菌对多种植物病原菌具有抑制作用,抑菌谱宽,在生物防治中起着重要作用^[5-10]。枯草芽孢杆菌能够产生2大类抗菌物质:一是核糖体合成的抗菌蛋白和抗菌肽;二是非核糖体合成的脂肽类化合物,主要包括表面活性素(Surfactin)、伊枯草菌素(Iturin)和芬芥素(Fengycin)3大类^[11-12]。研究发现表面活性素具有抑制细菌、真菌、病毒和支原体等作用,芬芥素对丝状真菌有强烈的抑制作用,伊枯草菌素主要抑制真菌生长^[13]。本实验室前期从催吐萝芙木中分离并鉴定了一株枯草芽孢杆菌LYM3,对香蕉炭疽菌具有较强的拮抗作用^[14]。本研究对菌株LYM3的抑菌谱进行测定,并以香蕉炭疽菌作为靶标菌,对其产生的抑菌活性物质进行分离及初步鉴定。

1 材料与方法

1.1 菌株

B. subtilis LYM3从催吐萝芙木中经组织表面消毒分离获得^[14]。

病原真菌苹果轮纹病菌(*Physalospora piricola* Nose)、芒果蒂腐病菌(*Botryodiplodia theobromae* Pat)、水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)、黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *Cucumerinum* owen)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum* Schw)、香蕉炭疽病菌(*Colletotrichum musae*)、橡胶棒孢霉病菌(*Corynespora cassiicola*)、芒果炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides* Penz)、香蕉枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*)、橡胶炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*),由海南大学环境与植物保护学院提供。

1.2 培养基

LB培养基:酵母粉5g,胰蛋白胨10g,NaCl10g,蒸馏水1L。PDA培养基:葡萄糖20g,琼脂20g,马铃薯200g,蒸馏水1L。发酵培养基:可溶性淀粉20g,胰蛋白胨10g,酵母粉8g,NaCl10g,蒸馏水1L,初始pH6.0^[14]。

1.3 *B. subtilis* LYM3 抑菌谱的测定

在PDA平板中央分别接种一块直径为5mm的病原真菌菌饼,菌丝面朝下,距菌饼2cm处划线接种菌株LYM3,以未接种LYM3的平板为对照。28℃倒置培养,待对照病原菌菌落长满平板时调查并记录试验数据,每处理3次重复。测定LYM3的拮抗活性,计算抑制率,菌落生长抑制率=(对照菌落直径-处理菌落直径)/对照菌落直径×100%。

1.4 菌株LYM3发酵上清液的制备及活性检测

配置香蕉炭疽菌的孢子悬浮液(浓度约为 1×10^7 CFU/ml),混入PDA平板中,制备带菌平板。菌株LYM3经活化后接种于发酵培养基中,28℃、180 r/min培养60h,5000 r/min离心10min得到发酵上清液。利用0.22 μm滤膜过滤除菌,吸取100 μl上清液加入带菌平板上的管碟中,测试其对香蕉炭疽菌的抑菌活性。

1.5 温度和pH值对LYM3发酵上清液抑菌活性的影响试验

将LYM3发酵上清液置于40℃、60℃、80℃、100℃和120℃保温30min,以4℃发酵上清液作空白对照,按照方法1.4测定其对香蕉炭疽菌的抑菌活性。利用1 mol/L HCl溶液或1 mol/L NaOH,将发酵上清液pH值调至2、4、6、8、10、12,按照方法1.4测定其对香蕉炭疽菌的抑菌活性。

1.6 LYM3发酵上清液酸沉淀浸提溶剂的选择

取LYM3发酵上清液,用1 mol/L HCl调节pH值为4,4℃过夜,12000 r/min离心15min收集沉淀。沉淀干燥后加入等体积的不同有机溶剂(甲醇、乙醇、丙酮、石油醚、乙腈)浸提,12000 r/min离心15min收集上清液,重复浸提3次,收集浸提液。以发酵上清液作为对照组,管碟法(方法1.4)检测浸提液的抑菌活性,计算相对活性,相对活性=(试验组抑菌圈直径/对照组抑菌圈直径)×100%。

1.7 LYM3 抑菌物质的分离及初步分析

菌株LYM3活化后接种于LB培养液中,28℃振荡培养24h。以1%接种量接种至发酵培养基中,28℃振荡培养60h。5000 r/min离心10min,取上清液,用1 mol/L HCl调节pH值为4,4℃过夜,12000 r/min离心10min,收集沉淀。干燥后利用甲醇浸提3遍,收集甲醇浸提液,浓缩后获得LYM3发酵上清液粗提物。粗提物用Sephadex LH-20(GE)凝胶柱进行分离,利用管碟法(方法1.4)检

测各分离组分的活性,并用 LCMS-IT-TOF 液质联用仪(日本岛津公司产品)对活性组分进行分析。

2 结果与分析

2.1 *B. subtilis* LYM3 的抑菌谱

利用对峙生长法测定了 *B. subtilis* LYM3 对 10 种植物病原真菌的拮抗活性(表 1)。由表 1 可以看出,菌株 LYM3 对 10 种病原真菌均有较强的拮抗作用,抑制率在 60% 以上。其中对黄瓜枯萎病菌的抑制率最低,为 64.7%;对炭疽病菌的抑制效果较为明显,例如对橡胶炭疽病菌的抑制率为 76.3%,对芒果炭疽病菌的抑制率为 78.8%,对香蕉炭疽病菌的抑制率最大,达到 83.5%。

表 1 菌株 LYM3 对 10 种植物病原真菌的抑制率

Table 1 Inhibition rates of LYM3 to 10 kinds of pathogenic fungi

病原菌	抑制率(%)	病原菌	抑制率(%)
苹果轮纹病菌 <i>P.piricola</i>	76.5±1.6	黄瓜枯萎病菌 <i>F.oxysporum</i>	64.7±1.4
芒果蒂腐病菌 <i>B.atheobromae</i>	74.1±2.6	橡胶棒孢霉病菌 <i>C.cassicola</i>	81.2±2.1
橡胶炭疽病菌 <i>C.gloeosporioides</i>	76.3±1.2	芒果炭疽病菌 <i>C.gloeosporioides</i>	78.8±1.5
小麦赤霉病菌 <i>F.graminearum</i>	81.2±2.5	香蕉枯萎病菌 <i>F.oxysporum</i>	69.4±3.0
香蕉炭疽病菌 <i>C.musae</i>	83.5±1.5	水稻纹枯病菌 <i>R.solani</i>	71.8±2.5

制备香蕉炭疽病菌的带菌平板,利用管碟法测定 LYM3 发酵上清液及菌体破碎液的抑菌活性。结果(图 1)表明,LYM3 发酵上清液对香蕉炭疽病菌有明显的抑制作用,而菌体破碎液在香蕉炭疽病菌平板上没有形成透明圈,说明 LYM3 产生的抑菌物质主要为胞外产物。

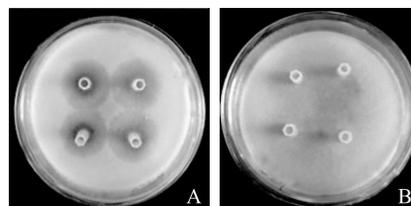


图 1 LYM3 发酵上清液(A)和菌体破碎液(B)的抑菌活性
Fig.1 Antifungal activity of the supernatant (A) and cell disruption (B) from LYM3

2.2 温度和 pH 值对 LYM3 发酵上清液抑菌活性的影响

通过管碟法测定 LYM3 发酵上清液中抑菌物质的温度稳定性。结果(图 2)显示,40 °C 30 min 处理的上清液抑菌活性较大,抑菌圈的平均直径为 23 mm,与对照组(抑菌圈的平均直径为 22 mm)差异不显著;随着温度的增加,LYM3 发酵上清液依然具有明显的抑菌活性,抑菌圈直径稳定在 17~19 mm。可以看出,菌株 LYM3 产生的抑菌物质具有较好的热稳定性。

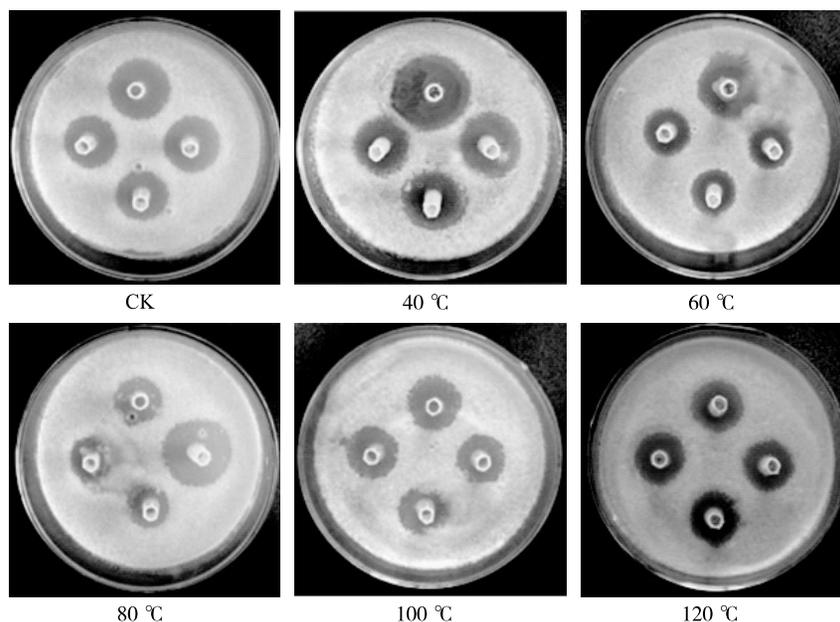


图 2 不同温度对 LYM3 发酵上清液抑菌活性的影响

Fig.2 Influence of different temperatures on antifungal activity of LYM3 supernatant

将LYM3发酵上清pH值调至不同数值,测定其抑菌活性(图3)。当 $\text{pH} \leq 4$ 时,发酵上清液形成沉淀,除去沉淀的上清液无抑菌活性,说明酸性条件可以将LYM3发酵上清液中的抑菌物质沉淀。在 $\text{pH} = 8$ 时抑菌圈直径最大,为25 mm,之后随碱性加强抑菌圈直径下降,当 $\text{pH} = 12$ 时,发酵上清液依然具有一定的抑菌活性,抑菌圈直径为15 mm。

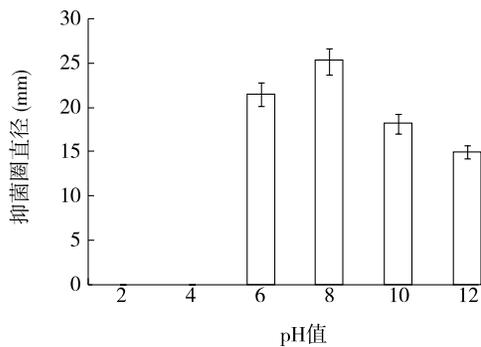


图3 不同pH值对LYM3发酵上清液抑菌活性的影响

Fig.3 Influence of different pH values on antifungal activity of LYM3 supernatant

2.3 不同有机溶剂浸提的LYM3酸沉淀物的抑菌活性

pH值试验结果表明,LYM3抑菌物质在酸性条件下($\text{pH} \leq 4$)可以沉淀。分别利用甲醇、乙醇、丙酮、乙腈和石油醚5种溶剂对LYM3酸沉淀物进行浸提,利用管碟法测定浸提液活性。由图4可以看

出,甲醇浸提沉淀回收效果较好,相对活性可达98.5%,而乙醇浸提沉淀,抑菌物质损失较大,相对活性仅为53.3%。

2.4 LYM3抑菌物质的分离及初步分析

根据LYM3抑菌物质的热稳定性及其能在酸性条件下沉淀的特性,初步判断抑菌物质可能为脂肽类物质^[15]。利用发酵培养基对LYM3进行大量发酵,共获得发酵液80 L。发酵液经离心去菌体,酸沉淀,甲醇浸提后,利用Sephadex L-20葡聚糖凝胶柱进行分离,用管碟法测定各组分对香蕉炭疽病菌的抑菌活性,初步分离获得3种具有抑菌活性的组分,记为A、B、C。由图5可以看出,3种组分中A的抑菌活性最大,抑菌圈直径达到38.6 mm,组分B的抑菌活性次之,组分C的抑菌活性较小,抑菌圈直径为12.9 mm。

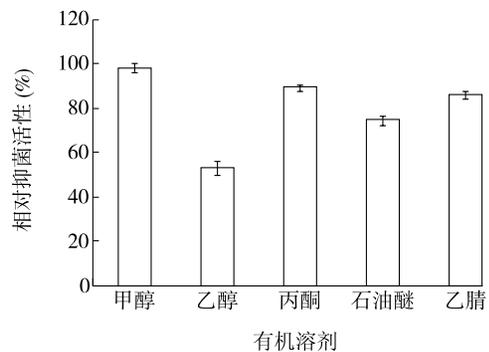


图4 不同溶剂浸提对LYM3酸沉淀物抑菌活性的影响

Fig.4 Influence of different extracting solvents on antifungal activity of acid precipitation from LYM3

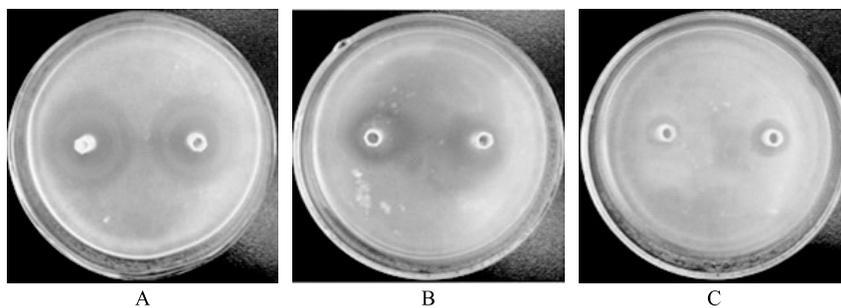


图5 LYM3抑菌活性组分A、B和C对香蕉炭疽病菌的抑制效果

Fig.5 Inhibition effect of the fractions A, B and C with antifungal activity from LYM3 on *Collectotrichum musae*

用LCMS-IT-TOF质谱仪对3种组分进行检测,检测波长205 nm,洗脱剂为80%乙腈和20%磷酸缓冲液,温度30℃,3种组分的质谱图见图6。组分A

中检测到质荷比(m/z)为1058.6的离子峰,与文献^[16]报道的 C_{15} IturinB的准分子离子峰 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的 m/z 相吻合,推测A为伊枯草菌素 C_{15} IturinB;组分

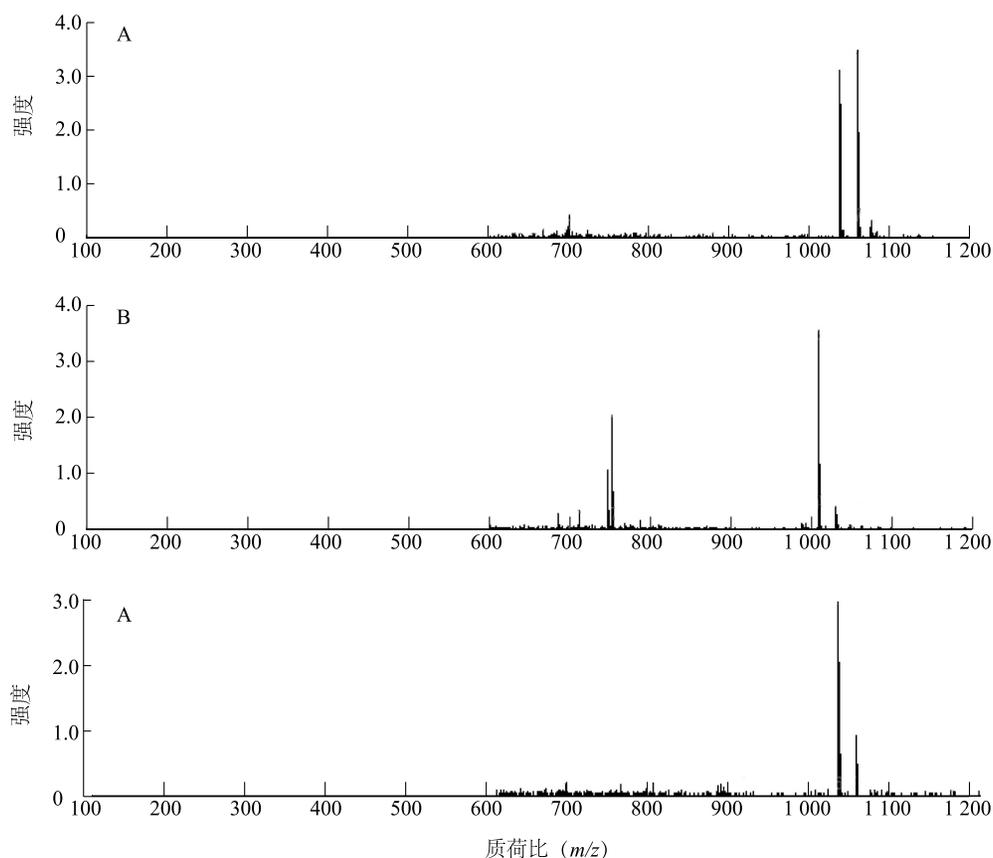


图 6 LYM3 抑菌活性组分 A、B 和 C 的质谱图

Fig.6 Massspectrum of the fractions A, B and C with antifungal activity from LYM3

B 中检测到 m/z 为 1 008. 6 的离子峰, 与文献 [16] 报道的 C_{13} SurfactinA 和 C_{14} SurfactinB 的 $[M+H]^+$ 的 m/z 相吻合, 右侧 m/z 为 1 030. 6 的离子峰为 $[M+Na]^+$ 的形式, 推测 B 为表面活性素类脂肽; 组分 C 中检测到 m/z 为 1 022. 6 的离子峰, 与文献 [16] 报道的 C_{14} SurfactinA、 C_{15} SurfactinB 和 C_{14} SurfactinC 的 $[M+H]^+$ 的 m/z 相吻合, 右侧 m/z 为 1 044. 6 的离子峰为 $[M+Na]^+$ 的形式, 推测 C 为表面活性素类脂肽。

3 讨论

本研究中分离自催吐萝芙木的内生细菌 *B. Subtilis*LYM3, 对香蕉炭疽病菌的抑制率为 83. 5%, 对其他 9 种病原真菌的抑制率均在 60% 以上, 具有广谱的抗菌性。目前已发现多种香蕉炭疽病菌的拮抗细菌, 例如董凤英在香蕉叶片、花和果实中分离获得的 8 种细菌对香蕉炭疽病菌的抑制率在 63. 35% 至 75. 1% 之间^[17]; 李敏等在龙眼果皮中分离的拮抗细菌 AP-01 对香蕉炭疽病菌的皿内抑制率为

64. 19%^[18]; 分离自阴香的内生细菌 *B. cereus* YX6 对香蕉炭疽病菌的皿内拮抗活性达 53%^[19]。

枯草芽孢杆菌产生的抗菌脂肽种类较多, 结构也比较复杂, 即使具有相同基本结构的脂肽化合物也会存在多种同系物或结构类似物, 为抗菌脂肽的分离及鉴定造成了很大的麻烦^[20]。目前已从枯草芽孢杆菌中分离到多种针对植物病原真菌的抗菌脂肽。杨琦瑶等发现枯草芽孢杆菌 B006 发酵液的甲醇提取物对黄瓜枯萎病菌和辣椒疫霉病菌具有较强的抑制作用, HPLC-ESI-MS 分析结果显示抗菌物质可能为 Surfactin 和 Fengycin^[21]。枯草芽孢杆菌 CS16 对多株植物病原真菌具有明显的抑制作用, 对病原细菌的抑菌作用相对较弱, 利用反相硅胶柱、Sephadex LH-20 凝胶柱和正相硅胶柱分离纯化获得较纯的抑菌物质, 经薄层层析和 HPLC 定性分析, 初步认定其胞外抑菌物质中含有 Iturin A^[22]。姬婧媛等以小麦全蚀病菌作为靶标菌, 采用酸沉淀、快速蛋白质液相色谱 (FPLC) 和质谱技术对枯草芽孢杆

菌 E1R-j 的抗真菌活性物质进行了分离鉴定,发现其起主要抑菌作用的成分为 Fengycins^[23]。本研究从枯草芽孢杆菌 LYM3 的发酵液中初步分离到 3 种抗香蕉炭疽病菌的活性成分,经 LCMS-IT-TOF 分析,发现它们分属于 Iturin 和 Surfactin 两类。

参考文献:

- [1] 曹福祥,徐庆军,王永南,等. 萝芙木属植物的物种和分布[J]. 中南林业科技大学学报,2007,27(6):154-158.
- [2] 管志斌,张忠廉,张丽霞. 不同处理对催吐萝芙木种子萌发的影响[J]. 中药材,2011,34(6):856-858.
- [3] 王文俊,张薇,李莲芳,等. 催吐萝芙木幼苗生长对温水及外源激素浸种的响应[J]. 中药材,2015,38(6):1135-1138.
- [4] 龙绛雪,蒋太煜. 云南萝芙木中利血平含量测定方法的建立[J]. 西部林业科学,2014,43(1):110-114.
- [5] 唐文,梁艳琼,许沛冬,等. 枯草芽孢杆菌 Czkl 诱导橡胶树抗病性相关防御酶系研究[J]. 南方农业学报,2016,47(4):576-582.
- [6] 李伟,胡江春,王书锦. 海洋细菌 3512A 对黄瓜枯萎病的防治及促进植株生长的效应[J]. 沈阳农业大学学报,2008,39(2):182-185.
- [7] 乔俊卿,陈志谊,梁雪杰,等. 枯草芽孢杆菌 Bs916 在番茄根部的定殖[J]. 江苏农业学报,2015,31(6):1278-1283.
- [8] ABRIQUEL H, FRANZ CMAP, OMAR N B, et al. Diversity and applications of *Bacillus bacteriocins* [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2011, 35(1): 201-232.
- [9] 陈忠杰,胡燕. 枯草芽孢杆菌对板栗采后黑斑病的抑制效果[J]. 江苏农业科学,2015,43(1):256-258.
- [10] 孙冰冰,杨秀荣,郝永娟,等. 响应面法优化生防枯草芽孢杆菌 B579 固相发酵工艺[J]. 山东农业科学,2016,48(5):62-66.
- [11] STEIN T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions [J]. Molecular Microbiology, 2005, 56(4): 845-857.
- [12] FALARDEAU J, WISE C, NOVITSKY L, et al. Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* lipopeptides on plant pathogens [J]. J Chem Ecol, 2013, 39(7): 869-878.
- [13] 李宝庆,鹿秀云,郭庆港,等. 枯草芽孢杆菌 BAB-1 产脂肽类及挥发性物质的分离和鉴定[J]. 中国农业科学,2010,43(17):3547-3554.
- [14] 李乔曼,吴亚腾,柳志强,等. 催吐萝芙木内生细菌 LYM3 的分离鉴定及产抗菌活性物质的发酵条件优化[J]. 广东农业科学,2015,42(5):53-57.
- [15] 邓建良,刘红彦,刘玉霞,等. 解淀粉芽孢杆菌 YN-1 抑制植物病原真菌活性物质鉴定[J]. 植物病理学报,2010,40(2):202-209.
- [16] 鲁小城. 一株枯草芽孢杆菌抗植物病原真菌活性物质的研究[D]. 杭州:浙江大学,2006.
- [17] 董凤英. 香蕉采后病害拮抗菌筛选及作用方式研究[D]. 海口:华南热带农业大学,2002.
- [18] 李敏,胡美姣,高兆银,等. 5 株拮抗菌抑菌能力及其对香蕉采后病害的防治效果[J]. 浙江农业科学,2010,1(1):130-132.
- [19] 柳志强,郑媛,吴亚腾,等. 阴香内生细菌 YX6 的鉴定及对香蕉炭疽病的防效[J]. 西南农业学报,2014,27(6):2402-2404.
- [20] 吕应年,杨世忠,牟伯中. 脂肽的分离纯化与结构研究[J]. 微生物学通报,2005,32(1):67-73.
- [21] 杨琦瑶,索雅丽,郭荣君,等. 枯草芽孢杆菌 B006 对黄瓜枯萎病菌和辣椒疫霉病菌的抑制作用及其抗菌组分分析[J]. 中国生物防治学报,2012,28(2):235-242.
- [22] 李占飞,林陈强,张慧,等. 枯草芽孢杆菌 CS16 抑菌活性与胞外产物成分分析[J]. 热带作物学报,2013,34(6):1155-1160.
- [23] 姬婧媛,杨洁,高小宁,等. 植物内生枯草芽孢杆菌 E1R-j 脂肽类化合物的分离鉴定及抑菌作用[J]. 农药学报,2015,17(2):172-178.

(责任编辑:张震林)