

刘邲洲, 陈夕军, 尹小乐, 等. 23 株芽胞杆菌及其脂肽类化合物抑菌活性比较[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(3): 533-542.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2017.03.008

23 株芽胞杆菌及其脂肽类化合物抑菌活性比较

刘邲洲¹, 陈夕军², 尹小乐¹, 梁雪杰¹, 乔俊卿¹, 刘永锋¹

(1. 江苏省农业科学院植物保护研究所, 江苏 南京 210014; 2. 扬州大学园艺与植保学院, 江苏 扬州 225009)

摘要: 为了比较 9 个种 23 株芽胞杆菌及其脂肽类化合物抑菌活性差异, 本研究以选择性培养基检测各菌株胞外酶分泌物, 采用酸沉淀法提取各菌株脂肽类化合物, 用对峙生长法分别测定芽胞杆菌及其脂肽类化合物的抑菌活性, 高效液相色谱串联质谱(LC-MS)进行脂肽类化合物种类分析。结果表明: 23 株芽胞杆菌均能产生蛋白酶, 枯草芽胞杆菌 PTS-394 等 9 个菌株抑菌能力显著, 对尖孢镰刀菌、立枯丝核菌、胶孢炭疽病菌和油菜菌核病菌的抑菌带宽分别为 33.4~42.0 mm、34.6~58.2 mm、34.6~40.0 mm 和 30.1~39.2 mm。枯草芽胞杆菌 JND 等 6 个菌株的脂肽类粗提物抑菌作用显著, 对尖孢镰刀菌和立枯丝核菌的抑菌带宽分别为 26.2~39.4 mm 和 30.5~34.2 mm。LC-MS 检测到有抑菌作用的 15 株芽胞杆菌的脂肽类化合物种类包括表面活性素家族、伊枯草素家族和泛素家族。

关键词: 芽胞杆菌; 胞外酶; 脂肽类化合物; 抑菌活性

中图分类号: S482.2⁺92 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)03-0533-10

Comparative analysis of the antagonistic activities of 23 *Bacillus* spp. strains and their lipopeptide compounds

LIU You-zhou¹, CHEN Xi-jun², YIN Xiao-le¹, LIANG Xue-jie¹, QIAO Jun-qing¹, LIU Yong-feng¹

(1. Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: *Bacillus* spp. is a kind of biological bacteria effectively preventing and controlling the occurrence and damage of many plant diseases. To evaluate the antagonistic activities of 23 *Bacillus* strains and their lipopeptide compounds, the selective medium were used to detect the extracellular enzymes produced by 23 strains. The lipopeptide compounds was extracted by acid precipitation method and analyzed by LC-MS. All 23 *Bacillus* strains produced proteases, and *Brevibacillus laterosporu* ZR4-5 and *B. atrophaeus* YL3 produced chitinases besides. Nine *Bacillus* strains including *B. subtilis* PTS-394 showed strong and steady antagonistic activities against *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia sclerotiorum*, with the widths of inhibition band of 33.4–42.0 mm, 34.6–58.2 mm, 34.6–40.0 mm and 30.1–39.2 mm, respectively. The lipopeptide compounds produced by 6 *Bacillus* strains including *B. subtilis* JND could inhibit the mycelia growth of *F. oxysporum* and *R. solani*, with the width of inhibition band of 26.2–39.4 mm and 30.5–34.2 mm, respectively. Surfactins, iturins and fengycins were detected in the lipopeptide compounds of 15 *Bacillus* strains by LC-MS analysis.

Key words: *Bacillus* spp.; extracellular enzyme; lipopeptide compound; antagonistic activity

收稿日期: 2016-11-21

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(15)1037]

作者简介: 刘邲洲(1975-), 女, 江苏高邮人, 博士, 研究员, 从事园艺作

物病害生物防治研究。(E-mail)shitouren88888@163.com

通讯作者: 刘永锋, (E-mail)liuyf@jaas.ac.cn

芽胞杆菌(*Bacillus* spp.) 是重要的生物防治资

源,因其能够产生芽胞应对高温、干旱、紫外线等不利条件,是目前生防细菌中研究较多的一类,用于生物防治的芽胞杆菌种类主要有枯草芽胞杆菌(*B. subtilis*)、解淀粉芽胞杆菌(*B. amyloliquefaciens*)、多粘芽胞杆菌(*B. polymyxa*)、蜡质芽胞杆菌(*B. cereus*)、巨大芽胞杆菌(*B. megaterium*)、短小芽胞杆菌(*B. pumilus*)等^[1-3]。

生防芽胞杆菌产生的抑菌物质种类较多,包括脂肽类抗生素、细菌素、细胞壁降解酶类、嗜铁素和其他抗菌蛋白及挥发性抗菌物质^[4-5]。芽胞细菌产生的细胞壁水解酶主要有蛋白酶、几丁质酶、纤维素酶等。几丁质和纤维素是大多数病原真菌细胞壁的主要成分,能被几丁质酶和纤维素酶降低,使得菌丝裂解死亡,因此产生几丁质酶和纤维素酶的微生物在生物防治中具有重要作用^[6]。嗜铁素是一类低分子量化合物,微生物中大多数细菌和真菌都能产生,它可以特异地螯合周围铁离子,使病原菌得不到足够的铁营养,生长发育受到抑制^[7]。近年来的研究表明:嗜铁素还能够影响生物膜形成能力^[8]、群体感应系统^[9]等。脂肽类抗生素是芽胞杆菌通过非核糖体合成途径产生的抑菌物质,分为3个类群:表面活性素类群、伊枯草素类群和泛革素类群^[10]。一般认为,由芽胞杆菌产生的表面活性素无直接抗真菌能力,但是可以加强伊枯草菌素的抗真菌能力。表面活性素还能在植物的根部形成一层生物膜,该膜能保护植物根部免受病原菌的入侵^[11]。伊枯草素家族成员包括 Iturin A、Iturin B、Iturin C、Iturin D、Iturin E,杆菌霉素 Bacillomycin D、Bacillomycin F、Bacillomycin L 以及抗霉枯草菌素 Mycosubtilin,具有一定的溶血活性,对酵母菌和真菌有很强的抑菌活性^[12]。泛革素对多种植物病原真菌具有较强的拮抗活性,而对酵母、细菌的抑菌活性及溶血活性较弱^[13]。

在以往报道中,大多选取1个或少数几个芽胞杆菌研究其脂肽类化合物的抑菌活性。本文挑选了实验室保存并鉴定的9个种23株芽胞杆菌菌株,测试其对供试细菌和病原真菌的抑制作用,比较各菌株胞外酶分泌情况,研究23株芽胞杆菌产生的脂肽类化合物种类与其抑制真菌活性的关系,为今后利用芽胞杆菌及其脂肽类抑菌物质,开发新型生物农药提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试芽胞杆菌9个种23株,包括枯草芽胞杆菌 PTS-394、JND 和 Bs168,解淀粉芽胞杆菌 B. F5-1 和 FZB42,多粘芽胞杆菌 N1-9、N3-4 和 ZF8-1,蜡质芽胞杆菌 N15-2、N24-2 和 F1-2,侧孢短芽胞杆菌(*Brevibacillus laterosporus*) N26-1、N106-2 和 ZR4-5,巨大芽胞杆菌 NF106-1 和 G329,短小芽胞杆菌 N103-1、ZR3-2 和 ZR8-4,炭疽芽胞杆菌(*B. anthracis*) F4-2、N74-1 和 BF1-3,萎缩芽胞杆菌(*B. atrophaeus*) YL3,均由本试验室保存并提供。病原细菌:欧文氏菌(*Erwinia amylovora*)和黄单胞菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola*)由本实验室保存并提供。病原真菌:尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、胶孢炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)由本实验室保存并提供。

马铃薯葡萄糖琼脂(Potato dextrose agar, PDA)培养基:马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂粉20 g、蒸馏水1 000 ml; LB(Luria-Bertani)培养基:胰蛋白胨10 g、酵母粉5 g、NaCl 10 g、蒸馏水1 000 ml;蛋白酶检测培养基:脱脂奶粉100 g、琼脂20 g、蒸馏水1 000 ml;几丁质酶检测培养基:胶状几丁质15.00 g、MgSO₄·7H₂O 0.50 g、FeSO₄·7H₂O 0.01 g、K₂HPO₄ 0.70 g、KH₂PO₄ 0.30 g、琼脂20.00 g、蒸馏水1 000 ml;纤维素酶检测培养基:蛋白胨10 g、酵母粉10 g、羧甲基纤维素钠10 g、NaCl 5 g、KH₂PO₄ 1 g、琼脂20 g、蒸馏水1 000 ml;嗜铁素检测培养基:CAS 60.50 mg、FeCl₃·6H₂O 0.27 g、HDTMA 72.90 mg、琼脂20.00 g、蒸馏水1 000 ml;Landy培养基:葡萄糖20.0 g、L-谷氨酸5.0 g、MgSO₄ 0.5 g、KCl 0.5 g、KH₂PO₄ 1.0 g、Fe₂SO₄·6H₂O 1.5×10⁻⁴ g、MnSO₄·H₂O 5.0×10⁻³ g、CuSO₄·5H₂O 1.6×10⁻⁴ g、蒸馏水1 000 ml。

试剂和仪器:试剂均为国产分析纯。Agilent 1290 Infinity 液相色谱仪(安捷伦科技有限公司生产),三重四极杆—线性离子阱复合质谱仪 QTRAP 6500(美国应用生物系统公司生产),高速冷冻离心机 AvantiTM-J25I(美国 Beckman 公司生产)。

1.2 试验方法

1.2.1 芽胞杆菌对供试菌株的拮抗性能测定 将

23株芽胞杆菌菌株和2种病原细菌的菌苔分别接种于5 ml LB培养基中,28℃、150 r/min摇培24 h,用无菌水稀释至菌含量为 10^8 CFU/ml备用。

采用对峙生长法^[14]测定各芽胞杆菌菌株对供试病原真菌的抑制作用。4种病原真菌分别在PDA培养基、28℃培养3~5 d,沿菌落边缘以6 mm灭菌打孔器打出菌饼。将各病原真菌菌饼置于空白9 cm PDA平板上(距离平板边缘3 cm),平板另一侧等距离点接5 μ l芽胞杆菌菌液,28℃恒温培养,设清水对照,每个处理重复3次。待对照处理菌落长满平板时用刻度尺测量各处理菌丝生长直径,其中尖孢镰刀菌、立枯丝核菌、胶孢炭疽病菌、油菜菌核病菌长满9 cm PDA平板所需要的培养时间分别为5 d、2 d、6 d和7 d。抑菌带宽(mm)=90-病原真菌菌丝生长直径。

采用Liu等^[15]的方法测定各芽胞杆菌菌株对供试病原细菌的抑制作用。吸取23株芽胞杆菌菌液5 μ l点接在LB平板中心,28℃培养24 h后用2种供试病原细菌的稀释菌液瞬间喷雾1 ml,28℃过夜培养,用刻度尺测量平板上抑菌圈的直径。设清水对照,每个处理重复3次。

1.2.2 芽胞杆菌胞外酶等分泌物检测 在蛋白酶、几丁质酶、纤维素酶和嗜铁素检测平板中心分别点接5 μ l 23株芽胞杆菌菌液,28℃培养2~7 d,观察蛋白酶、几丁质酶、纤维素酶检测平板有无透明圈产生,嗜铁素检测平板有无黄色晕圈产生,每个处理重复3次。

1.2.3 脂肽类化合物的粗提和抑菌作用 芽胞杆菌脂肽类化合物的提取采用酸沉淀法^[16],首先将各菌株活化后分别接种于50 ml的Landy培养基中,28℃、150 r/min培养48 h后将发酵液于4℃、10 000 r/min离心15 min,上清液I用6 mol/L HCl调pH值至2.0,4℃下沉淀12 h,10 000 r/min离心20 min,弃上清液II,收集沉淀物,将得到的沉淀物加入2 ml甲醇(分析纯)后用1 mol/L NaOH调节pH至7.0,获得23株芽胞杆菌脂肽类化合物的粗提物,放入-20℃冰箱备用。

采用对峙生长法^[14]测定脂肽类粗提物对尖孢镰刀菌和立枯丝核菌2种病原真菌的抑制作用。将2种病原真菌分别在PDA培养基上28℃培养3~5 d,沿菌落边缘以6 mm灭菌打孔器打出菌饼,置于空白PDA平板中央,菌饼四周呈十字架型等距离点

接20 μ l甲醇、20 μ l上清液II、20 μ l脂肽类粗提物和50 μ l脂肽类粗提物4个处理,重复3次。28℃恒温培养2~3 d后测量各处理菌丝生长直径,抑菌带宽计算同方法1.2.1。

1.2.4 脂肽类化合物抗菌活性物质质谱分析 将脂肽类化合物的粗提物采用饱和A-氰基-4-羟基桂皮酸,0.1%三氟乙酸,乙腈和水(体积比3:1)溶液稀释1 000倍后,通过注射器直接进样。采用高效液相色谱串联质谱仪QTRAP 6500(LC-MS)测定化合物的分子量,电喷雾条件:毛细管电压32 V、喷雾电压20 kV、毛细管温度320℃。检测方式:正离子。在形成的质谱图中横坐标表示离子的质合比(m/z),对于单电荷的脂肽类化合物来说,离子的质合比即为脂肽类化合物的质量,单位为Da。纵坐标为离子流的强度,单位为Cps。质谱图中各离子峰的质合比值和强度决定其分子结构,芽胞杆菌主要脂肽类化合物特征离子峰及其对应的质合比值参考罗楚平^[9]的方法,根据脂肽类化合物的特征峰确定各物质。

1.3 数据分析

采用Excel 2010和DPS 7.05软件进行统计分析,采用Duncan's新复极差法在 $P<0.05$ 水平进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 芽胞杆菌对病原细菌和真菌的抑制作用

23株芽胞杆菌对供试病原细菌和真菌表现出不同的抑制作用(表1、图1)。多粘芽胞杆菌N1-9和蜡质芽胞杆菌N15-2对病原细菌——欧文氏菌和黄单胞菌皆具有显著的抑制作用,可形成明显的抑菌圈,但对供试的4种病原真菌无明显抑制作用。巨大芽胞杆菌G329对欧文氏菌和黄单胞菌无明显抑制作用。3株炭疽芽胞杆菌(F4-2、N74-1和BF1-3)对病原细菌——欧文氏菌、黄单胞菌、尖孢镰刀菌和立枯丝核菌有抑制作用,但对胶孢炭疽菌和油菜菌核病菌几乎没有抑制作用。枯草芽胞杆菌PTS-394和JND、解淀粉芽胞杆菌F5-1和FZB42、多粘芽胞杆菌N3-4和ZF8-1、短小芽胞杆菌ZR3-2和ZR8-4、萎缩芽胞杆菌YL3这9株芽胞杆菌对供试的4种病原真菌有显著的抑制作用,对尖孢镰刀菌、立枯丝核菌、胶孢炭疽病菌和油菜菌核病菌4种病原真菌的抑菌带宽分别为33.4~42.0 mm、34.6~

58.2 mm、34.6~40.0 mm 和 30.1~39.2 mm,其中多粘芽胞杆菌 N3-4、短小芽胞杆菌 ZR3-2 和萎缩芽胞杆菌 YL3 拮抗能力综合性状较好,对供试的欧文氏菌和黄单胞菌也具有显著的抑制作用,抑菌圈直径分别为 36.5~75.5 mm 和 33.8~65.9 mm。

试验结果显示:23 株芽胞杆菌的抑菌能力取决于菌株个体,不具有种的共性。同一种的芽胞杆菌抑菌能力存在很大差异,如枯草芽胞杆菌 PTS-394 和 JND 综合抑菌能力显著,但菌株 Bs168 抑菌能力

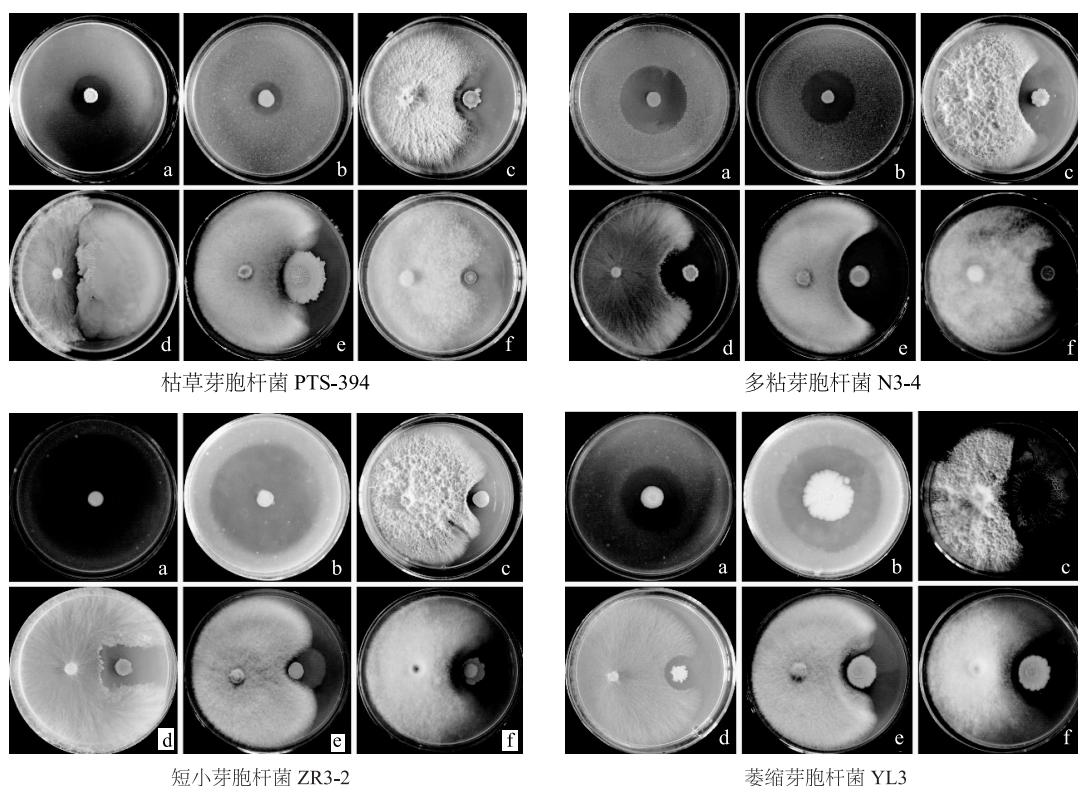
较弱。多粘芽胞杆菌 N1-9 只对病原细菌有抑菌能力,对病原真菌无抑制能力,而同一种的 N3-4 和 ZF8-1 对供试的 4 种病原真菌有显著的抑制作用。短小芽胞杆菌 ZR3-2 和 ZR8-4 对 4 种病原真菌抑制作用显著,对 2 种病原细菌抑制作用差异较大,菌株 ZR3-2 在供试的 23 株芽胞杆菌中对 2 种病原细菌抑制能力最强,菌株 ZR8-4 对 2 种病原细菌几乎没有抑菌作用,同一种的菌株 N103-1 对 4 种病原真菌抑制能力较差。

表 1 芽胞杆菌对供试病原细菌和真菌的抑制作用

Table 1 Inhibitions of four *Bacillus* strains against the tested bacteria and fungi

菌株		抑菌圈直径 (mm)		抑菌带宽 (mm)			
		欧文氏菌	黄单胞菌	尖孢镰刀菌	立枯丝核菌	胶孢炭疽病菌	油菜菌核病菌
枯草芽胞杆菌	PTS-394	27.5 ±1.3b	22.0 ±1.2c	36.1 ±3.4a	58.2 ±3.5a	38.7 ±2.5a	33.3 ±2.4a
	JND	26.2 ±2.1b	18.4 ±2.1c	35.6 ±3.9a	35.3 ±2.1b	35.1 ±2.1a	33.8 ±2.6a
	Bs168	20.1 ±1.1b	17.5 ±2.6c	18.8 ±1.2c	24.3 ±1.8bc	12.9 ±0.5b	6.8 ±1.0c
解淀粉芽胞杆菌	F5-1	20.5 ±0.4b	18.3 ±3.7c	34.7 ±1.9a	35.3 ±2.6b	37.9 ±3.5a	34.6 ±1.8a
	FZB42	21.8 ±1.2b	22.3 ±1.1c	35.1 ±0.8a	35.7 ±2.7b	36.2 ±2.8a	35.0 ±1.6a
多粘芽胞杆菌	N1-9	35.3 ±2.0ab	33.5 ±1.6b	—	—	—	—
	N3-4	41.0 ±2.1ab	33.8 ±1.4b	37.3 ±1.3a	41.0 ±2.1ab	40.0 ±3.2a	30.1 ±2.3a
	ZF8-1	20.3 ±0.5b	18.1 ±0.8c	39.2 ±1.3a	40.2 ±2.9ab	39.9 ±2.4a	38.0 ±3.4a
蜡质芽胞杆菌	N15-2	55.0 ±1.6ab	61.4 ±3.1a	—	—	—	—
	N24-2	40.7 ±1.8ab	44.0 ±3.2b	—	27.1 ±1.0b	31.9 ±3.0a	37.3 ±2.6a
	F1-2	—	24.5 ±2.1c	29.3 ±1.5b	32.7 ±1.1b	—	12.0 ±1.2c
侧孢短芽胞杆菌	N26-1	39.7 ±2.3ab	39.5 ±2.9b	34.0 ±2.8a	—	36.8 ±2.1a	32.2 ±2.6a
	N106-2	26.4 ±2.1b	34.1 ±1.2b	26.7 ±2.2b	34.1 ±2.6b	29.7 ±1.5a	26.4 ±2.1b
	ZR4-5	34.8 ±1.7ab	34.1 ±1.7b	9.6 ±1.3c	33.0 ±0.9b	31.7 ±2.3a	30.0 ±2.9a
巨大芽胞杆菌	NF106-1	—	27.3 ±2.3c	20.1 ±1.4b	16.3 ±1.2c	18.0 ±1.1b	14.8 ±1.3c
	G329	—	—	18.5 ±1.6c	19.2 ±1.4c	14.0 ±0.6b	9.8 ±1.0c
短小芽胞杆菌	N103-1	46.3 ±2.6ab	32.7 ±2.8b	27.2 ±2.5b	31.7 ±2.5b	—	20.6 ±1.6b
	ZR3-2	75.5 ±3.5a	65.9 ±3.6a	33.4 ±1.7a	41.2 ±3.7ab	34.6 ±1.9a	34.8 ±2.5a
	ZR8-4	—	28.3 ±1.0c	33.4 ±2.4a	35.4 ±2.6b	37.5 ±2.7a	37.6 ±2.5a
炭疽芽胞杆菌	F4-2	20.1 ±1.2b	33.1 ±2.1b	28.2 ±1.9b	32.4 ±1.8b	—	8.6 ±0.7c
	N74-1	31.2 ±2.7b	34.7 ±2.4b	24.6 ±1.3b	31.0 ±1.0b	—	—
	BF1-3	25.2 ±1.0b	31.5 ±2.3b	15.5 ±1.1c	33.3 ±1.6b	—	—
萎缩芽胞杆菌	YL3	36.5 ±1.9ab	55.7 ±3.5a	42.0 ±2.7a	34.6 ±1.5b	36.4 ±2.5a	39.2 ±2.3a

同一列不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。



a: 欧文氏菌; b: 黄单胞菌; c: 尖孢镰刀菌; d: 立枯丝核菌; e: 胶孢炭疽病菌; f: 油菜菌核病菌。

图 1 4 株芽胞杆菌菌株对供试病原细菌和真菌的抑菌作用

Fig.1 Inhibitions of four *Bacillus* strains against the tested bacteria and fungi

2.2 芽胞杆菌胞外酶分泌物的检测

由表 2 可知, 23 株芽胞杆菌均能分泌蛋白酶, 在检测平板上形成透明圈, 其中枯草芽胞杆菌 Bs168、多粘芽胞杆菌 N1-9、蜡质芽胞杆菌 N15-2 和炭疽芽胞杆菌 BF1-3 这 4 个菌株只能分泌蛋白酶, 能分泌 2 种胞外酶分泌物的菌株有 7 个, 占 30.43%; 分泌 3 种胞外酶分泌物的菌株有 12 个, 占 52.17%; 无供试菌株能同时分泌蛋白酶、几丁质酶、纤维素酶和嗜铁素 4 种物质。

供试菌株中只有侧孢短芽胞杆菌 ZR4-5 和萎缩芽胞杆菌 YL3 能分泌几丁质酶, 降解培养基中的几丁质, 作为唯一碳源用于菌落生长 (表 2)。有 14 株芽胞杆菌能分泌嗜铁素, 在检测培养基上形成黄色晕圈, 有 15 株芽胞杆菌能分泌纤维素酶。

2.3 芽胞杆菌脂肽类粗提物的抑菌作用

23 株供试菌株中有 15 株芽胞杆菌的脂肽类粗提物对尖孢镰刀菌和立枯丝核菌菌丝生长均有抑菌

作用, 枯草芽胞杆菌 Bs168、多粘芽胞杆菌 N1-9、3 个蜡质芽胞杆菌 N15-2、N24-2 和 F1-2、3 个炭疽芽胞杆菌 F4-2、N74-1 和 BF1-3 的脂肽类粗提物对尖孢镰刀菌和立枯丝核菌无抑制作用。6 个芽胞杆菌菌株 JND、F5-1、FZB42、G329、ZR8-4 和 YL3 的脂肽类粗提物抑菌作用明显 (图 2、图 3)。

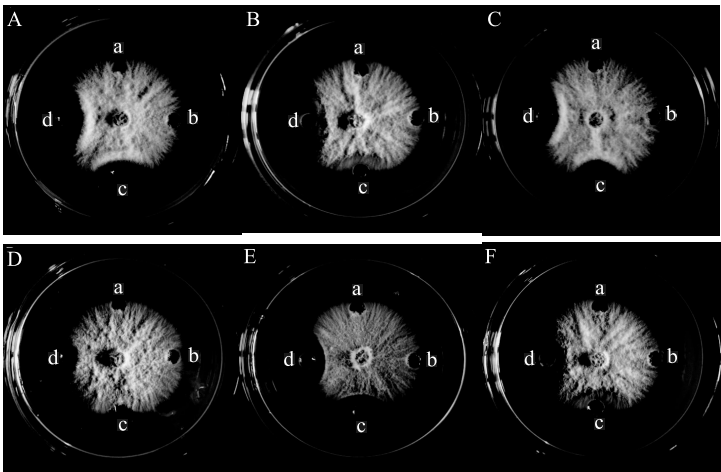
酸沉淀后的上清液 II 处理与甲醇对照处理均没有抑菌作用 (图 2a 和图 2b, 图 3a 和图 3b), 试验结果表明酸沉淀法可以有效地将脂肽类化合物收集在目的沉淀物中。芽胞杆菌 JND、F5-1、FZB42、G329、ZR8-4 和 YL3 的脂肽类粗提物 20 μ l 处理和 50 μ l 处理均具有一定的抑菌作用, 但随着处理剂量的增加抑菌作用显著 (图 2c 和图 2d, 图 3c 和图 3d)。各菌株的脂肽类粗提物 50 μ l 处理后能形成明显的抑菌带, 对尖孢镰刀菌的抑菌带宽为 26.2~39.4 mm, 对立枯丝核菌的抑菌带宽为 30.5~34.2 mm (图 2d 和图 3d)。

表 2 芽胞杆菌分泌胞外酶的检测结果

Table 2 Detection of extracellular enzymes produced by 23 *Bacillus* strains

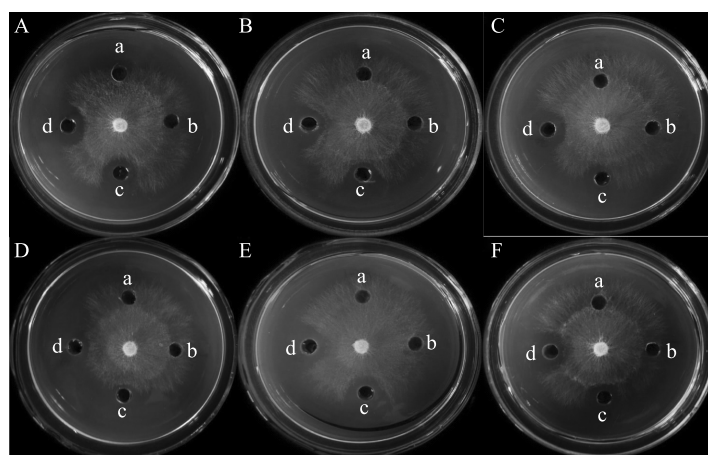
菌株		蛋白酶	几丁质酶	嗜铁素	纤维素酶
枯草芽胞杆菌	PTS-394	+	-	+	-
	JND	+	-	+	+
	Bs168	+	-	-	-
解淀粉芽胞杆菌	F5-1	+	-	+	+
	FZB42	+	-	+	+
多粘芽胞杆菌	N1-9	-	-	-	-
	N3-4	+	-	+	+
	ZF8-1	+	-	-	+
蜡质芽胞杆菌	N15-2	+	-	-	-
	N24-2	+	-	+	+
	F1-2	+	-	+	+
侧孢短芽胞杆菌	N26-1	+	-	+	+
	N106-2	+	-	-	+
	ZR4-5	+	+	-	+
巨大芽胞杆菌	NF106-1	+	-	+	-
	G329	+	-	+	-
短小芽胞杆菌	N103-1	+	-	+	+
	ZR3-2	+	-	+	+
	ZR8-4	+	-	-	+
炭疽芽胞杆菌	F4-2	+	-	+	+
	N74-1	+	-	-	+
	BF1-3	+	-	-	-
萎缩芽胞杆菌	YL3	+	+	+	-

+: 菌株能分泌胞外酶;-: 菌株不能分泌胞外酶。



A: 枯草芽胞杆菌 JND;B: 解淀粉芽胞杆菌 F5-1;C:解淀粉芽胞杆菌 FZB42;D:巨大芽胞杆菌 G329;E: 短小芽胞杆菌 ZR8-4;F: 萎缩芽胞杆菌 YL3。a:甲醇对照; b:上清液 II;c:脂肽类粗提物 20 μl; d:脂肽类粗提物 50 μl。

图 2 芽胞杆菌脂肽类粗提物对尖孢镰刀菌菌丝生长的抑制效果
Fig.2 Inhibition of lipopeptide compounds produced by *Bacillus* strains against *F. oxysporum*



A: 枯草芽胞杆菌 JND, B: 解淀粉芽胞杆菌 F5-1, C: 解淀粉芽胞杆菌 FZB42, D: 巨大芽胞杆菌 G329, E: 短小芽胞杆菌 ZR8-4, F: 萎缩芽胞杆菌 YL3。a: 甲醇对照; b: 上清液 II; c: 脂肽类粗提物 20 μ l; d: 脂肽类粗提物 50 μ l。

图3 芽胞杆菌脂肽类粗提物对立枯丝核菌菌丝生长的抑制效果

Fig.3 Inhibition of lipopeptide compounds produced by *Bacillus* strains against *Rhizoctonia solani*

2.4 芽胞杆菌脂肽类化合物的质谱分析

将对尖孢镰刀菌和立枯丝核菌菌丝生长均有抑菌作用的 15 株芽胞杆菌的脂肽类粗提物进行高效液相色谱串联质谱分析,结果表明,15 株芽胞杆菌的脂肽类化合物种类包括表面活性素家簇、伊枯草素家簇和泛革素家簇(表 3)。15 株芽胞杆菌的脂肽类粗提物全部检测到表面活性素的离子峰,质合比值 $m/z = 1\ 008.6$ Da、 $1\ 022.7$ Da 和 $1\ 036.7$ Da,相差 14.0 Da,为脂肪酸链相差 1 个亚甲基($-\text{CH}_2$)的同系物。在 10 株芽胞杆菌脂肽类化合物中检测到泛革素的离子峰,质合比值 $m/z = 1\ 449.8$ Da、 $1\ 463.9$ Da、 $1\ 477.9$ Da、 $1\ 491.9$ Da 和 $1\ 505.9$ Da,相差 14.0 Da,为脂肪酸链相差 1 个亚甲基($-\text{CH}_2$)的同系物。在 9 株芽胞杆菌脂肽类化合物中检测到杆菌霉素 D 的离子峰,质合比值 $m/z = 1\ 031.6$ Da、 $1\ 045.6$ Da 和 $1\ 059.6$ Da,相差 14.0 Da,为脂肪酸链相差 1 个亚甲基($-\text{CH}_2$)的同系物。在 5 株芽胞杆菌脂肽类化合物中检测到 Iturins 家簇,质合比值 $m/z = 1\ 043.6$ Da、 $1\ 057.6$ Da、 $1\ 071.6$ Da 和 $1\ 085.6$ Da,与其对应的脂肽类抗生素可能为杆菌霉素 F、伊枯草素 A 或者抗霉枯草菌素,在 4 株芽胞杆菌脂肽类化合物中检测到杆菌霉素 L 的离子峰,质合比值 $m/z = 1\ 021.5$ Da、 $1\ 035.5$ Da 和 $1\ 049.5$ Da,相差 14.0 Da,为脂肪酸链相差 1 个亚甲基($-\text{CH}_2$)的同系物。

菌株 JND、F5-1、FZB42、G329、ZR8-4 和 YL3

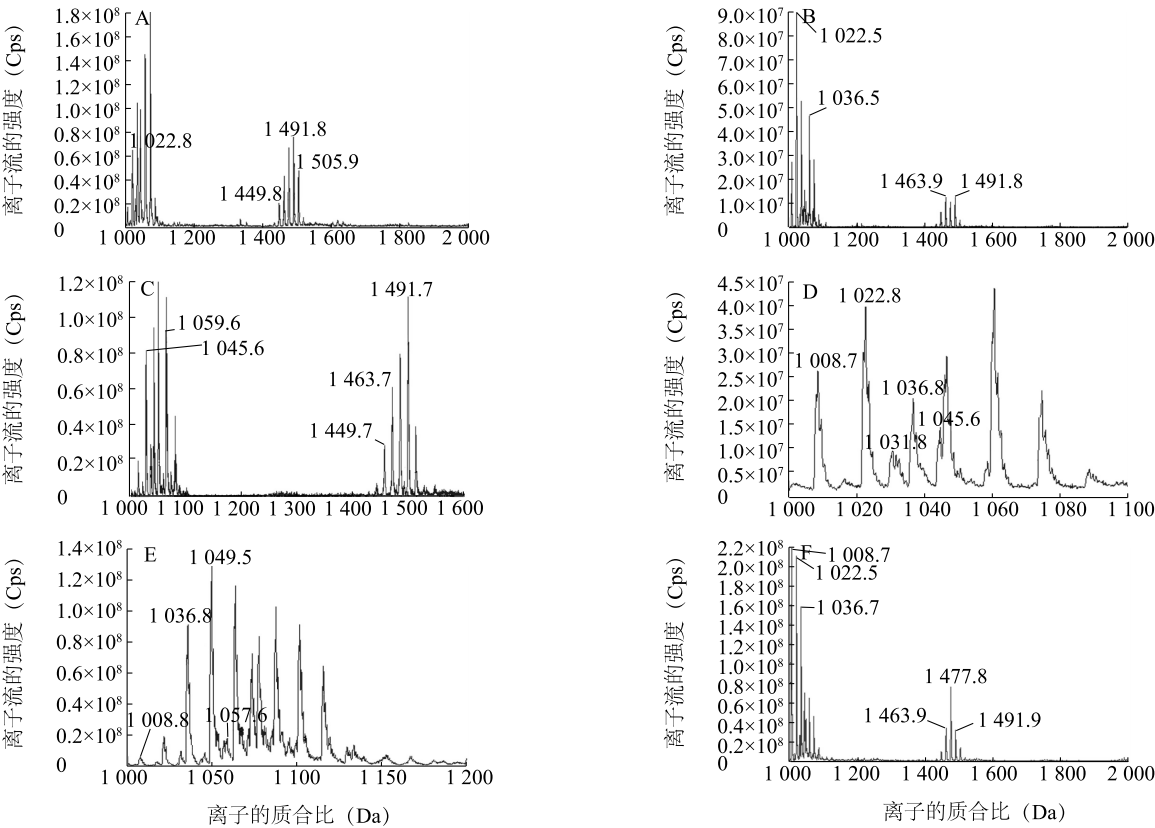
脂肽类粗提物抑菌作用明显,其产生的脂肽类抗生素的分子量一般在 1 000~2 000(图 4)。枯草芽胞杆菌 JND 分泌的脂肽类化合物有 4 种,其中表面活性素离子峰最高强度约为 1.05×10^8 Cps,泛革素离子峰最高强度为 7.61×10^7 Cps,杆菌霉素 D 离子峰最高强度为 7.02×10^7 Cps,杆菌霉素 L 离子峰最高强度为 5.62×10^7 Cps。解淀粉芽胞杆菌 F5-1 分泌的脂肽类化合物有 3 种,表面活性素离子峰最高强度约为 9.44×10^7 Cps,泛革素离子峰最高强度为 1.43×10^7 Cps,杆菌霉素 L 离子峰最高强度为 1.11×10^7 Cps,其他伊枯草素产量非常低,虽然能检测到,强度不足 1.00×10^7 Cps。解淀粉芽胞杆菌 FZB42 分泌的脂肽类化合物有 3 种,泛革素的产量最高,对应的离子峰最高强度 1.12×10^8 Cps,表面活性素离子峰最高强度约为 9.52×10^7 Cps,杆菌霉素 D 离子峰最高强度为 9.22×10^7 Cps。巨大芽胞杆菌 G329 能分泌表面活性素和杆菌霉素 D 2 种脂肽类化合物,离子峰最高强度分别为 4.02×10^7 Cps 和 1.42×10^7 Cps。短小芽胞杆菌 ZR8-4 分泌的脂肽类化合物中杆菌霉素 L 的产量最高,对应的离子峰最高强度为 1.28×10^8 Cps,表面活性素离子峰最高强度约为 9.01×10^7 Cps,杆菌霉素 D 和其他伊枯草素的产量较低。萎缩芽胞杆菌 YL3 分泌的表面活性素的产量最高,对应的离子峰最高强度为 2.22×10^8 Cps,泛革素对应的离子峰最高强度为 7.13×10^7 Cps。

表 3 芽胞杆菌分泌的脂肽类化合物种类的质谱分析

Table 3 LC-MS analysis of the kinds of lipopeptide compounds produced by *Bacillus* strains

菌 株	表面活性素	泛革素	伊枯草素		
			杆菌霉素	杆菌霉素 F、 伊枯草素 A 或 抗霉枯草菌素	杆菌霉素 L
枯草芽胞杆菌	PTS-394	+	+	-	-
	JND	+	+	-	+
解淀粉芽胞杆菌	F5-1	+	-	+	+
	FZB42	+	+	-	-
多粘芽胞杆菌	N3-4	+	+	-	-
	ZF8-1	+	+	-	-
侧孢短芽胞杆菌	N26-1	+	-	-	-
	N106-2	+	-	-	-
	ZR4-5	+	-	-	-
巨大芽胞杆菌	NF106-1	+	+	+	+
	G329	+	+	-	-
短小芽胞杆菌	N103-1	+	-	+	-
	ZR3-2	+	+	+	-
	ZR8-4	+	+	+	+
萎缩芽胞杆菌	YL3	+	-	-	-

+: 菌株能分泌脂肽类化合物; -: 菌株不能分泌脂肽类化合物。



A: 枯草芽胞杆菌 JND; B: 解淀粉芽胞杆菌 F5-1; C: 解淀粉芽胞杆菌 FZB42; D: 巨大芽胞杆菌 G329; E: 短小芽胞杆菌 ZR8-4; F: 萎缩芽胞杆菌 YL3。

图 4 6 个芽胞杆菌分泌的脂肽类化合物质谱图

Fig.4 LC-MS analysis of lipopeptide compounds produced by 6 *Bacillus* strains

3 讨论

具有抑菌作用的细胞壁降解酶(蛋白酶、几丁质酶、纤维素酶等)和嗜铁素等分泌物在细菌中广泛存在,一般选择优良生防细菌时被作为重要的筛选指标^[17]。本研究中枯草芽胞杆菌 Bs168、多粘芽胞杆菌 N1-9、蜡质芽胞杆菌 N15-2 和炭疽芽胞杆菌 BF1-3 这4个菌株只能分泌1种胞外酶,对峙生长试验结果显示这4个菌株的抑菌能力均不明显。枯草芽胞杆菌 PTS-394 等9个菌株对供试的4种病原真菌有显著的抑制作用,其中6个菌株能产生3种胞外酶分泌物,3个菌株能产生2种胞外酶分泌物。表明芽胞杆菌产生的胞外酶分泌物与菌株的抑菌能力存在相关性,与前人报道一致^[18]。

脂肽类化合物是芽胞杆菌产生的一类具有较强抑菌活性的抗生素,其种类和抑菌作用各异。张荣胜等^[19]研究发现解淀粉芽胞杆菌 Lx-11 的脂肽类化合物中含有表面活性素、泛革素和杆菌霉素 D,其中表面活性素对水稻细菌性条斑病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*)具有显著的抑制作用。Koumoutsi 等^[20]发现解淀粉芽胞杆菌 FZB42 菌株能同时分泌表面活性素、泛革素和杆菌霉素 D,其中杆菌霉素 D 在抑制真菌病害中发挥主要作用。罗楚平等^[21]发现枯草芽胞杆菌 Bs916 分泌的杆菌霉素 L 具有较高的抗真菌活性。Yanez-Mendizabal 等^[22]研究发现枯草芽胞杆菌 CPA-8 菌株产生泛革素、伊枯草素 A 和表面活性素等多种脂肽类抗生素,其中泛革素发挥主要抑菌作用。向亚萍^[13]比较了未鉴定种属的55个芽胞杆菌的抑菌活性与其产脂肽类抗生素的相关性,结果表明,脂肽类化合物分布非常集中,50个菌株能分泌表面活性素和杆菌霉素 D,只有2个菌株检测到杆菌霉素 L,1个菌株检测到泛革素。本研究中7个种15株芽胞杆菌分泌的脂肽类化合物有明显的室内抑菌作用,其中15个菌株全都能检测到表面活性素,有10个菌株检测到泛革素,9个菌株检测到杆菌霉素 D,5个菌株检测到伊枯草素,还有4个菌株检测到杆菌霉素 L,脂肽类化合物分布比较广泛,不同种的芽胞杆菌的脂肽类化合物种类不同,即使同一种的芽胞杆菌的脂肽类化合物种类也不尽相同。

王培培等^[23]报道了枯草芽胞杆菌 NCD-2 群体感应调控因子 ComA 定点突变后,突变菌株胞外蛋

白酶和纤维素酶的合成能力、对番茄灰霉菌(*Botrytis cinerea*)的抑菌活性、脂肽类化合物的合成量和生物膜的形成能力均明显下降,该结果与前人研究一致^[24]。ComP-ComA 是细菌中普遍存在的双因子调控系统,是否对不同种的芽胞杆菌胞外酶合成、抑菌活性和脂肽类化合物产量均有类似影响,还有待进一步深入研究。目前蜡质芽胞杆菌和炭疽芽胞杆菌分泌脂肽类化合物未见相关报道,本研究参试的9个种23株芽胞杆菌中3个蜡质芽胞杆菌和3个炭疽芽胞杆菌的脂肽类粗提物对尖孢镰刀菌和立枯丝核菌无抑制作用,质谱分析亦未检测到脂肽类化合物,当然还有待这2个种更多的菌株来验证。

参考文献:

- [1] 王 琴,高 青,繆卫国,等. 3种生防细菌2种药剂剂型对芒果炭疽病菌的拮抗作用初探[J]. 广东农业科学, 2014, 41(11):82-88.
- [2] 闫洪雪,李 丽,刘 露,等. 一株蜡样芽胞杆菌 B-21 的发酵优化[J]. 山东农业科学, 2016, 48(3):62-65.
- [3] 孙崇思,陈晓敏,束长龙,等. 对大丽轮枝菌具有拮抗作用的萎缩芽胞杆菌的分离和鉴定[J]. 植物保护, 2014, 40(1):30-37.
- [4] 余贤美,郑服丛,林 超,等. 土壤产嗜铁素拮抗细菌 CAS15 的分离鉴定[J]. 植物保护学报, 2009, 36(2):129-135.
- [5] 石 磊,郭庆港,李宝庆,等. 作物病害高效生防菌株的定向快速筛选及其种类鉴定[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(24):12068-12071.
- [6] 程玲娟. 深绿木霉对牧草促生作用及其作用机制研究[D]. 兰州:甘肃农业大学, 2008.
- [7] TAKESHI N, TAKURO O, OSAMU A. Efficacy of a bacterial siderophore, pyoverdine, to supply iron to *Solanum lycopersicum* plants[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2013, 115:686-690.
- [8] MORTEN R, LOUISE D H, MICHAEL G, et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: community structure, antimicrobial tolerance and immune response[J]. Journal of Molecular Biology, 2015, 427(23):3628-3645.
- [9] ALEJANDRO M D, NATALIA R, CLAUDIA I Q. Biosurfactant produced by marine bacteria interacts with diffusible pyoverdine produced by *Pseudomonas aeruginosa* [J]. New Biotechnology, 2014, 31:S180.
- [10] 罗楚平. 枯草芽胞杆菌 Bs916 产罗克霉素、表面活性素、杆菌霉素和泛革素的结构鉴定、合成途径及生物学功能[D]. 南京:南京农业大学, 2014.
- [11] DELEU M, LORENT J, LINS L, et al. Effects of surfactin on membrane models displaying lipid phase separation[J]. Biochimica Biophysica Acta-Biomembranes, 2013, 1828(2):801-815.

- [12] ZHAO P C, QUAN C S, JIN L M, et al. Sequence characterization and computational analysis of the non-ribosomal peptide synthetases controlling biosynthesis of lipopeptides, fengycins and bacillomycin D, from *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426[J]. Biotechnology Letters, 2013, 35(12): 2155-2163.
- [13] 向亚萍. 芽胞杆菌脂肽类抗生素多样性与罗克霉素合成酶启动子关键调控因子的初步研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2016.
- [14] 方中达. 植病研究方法[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2007.
- [15] LIU Y Z, LU S E, SONYA M B, et al. Sec G is required for antibiotic activities of *Pseudomonas* sp. YL23 against *Erwinia amylovora* and *Dickeya chrysanthemi*[J]. Journal of Basic Microbiology, 2015, 55(5): 617-624.
- [16] LUO C P, ZHOU H F, WANG X Y, et al. Nonribosomal peptide synthase gene clusters for lipopeptide biosynthesis in *Bacillus subtilis* 916 and their phenotypic functions[J]. Applied Environmental and Microbiology, 2015, 81(1): 422-431.
- [17] 杨婷婷. 利用相关细菌防治番茄青枯病的策略研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2009.
- [18] 孔庆科, 丁爱云. 内生细菌作为生防因子的研究进展[J]. 山东农业大学学报, 2001, 32(2): 256-260.
- [19] 张荣胜, 王晓宇, 罗楚平, 等. 解淀粉芽胞杆菌 Lx-11 产脂肽类物质鉴定及表面活性素对水稻细菌性条斑病的防治作用[J]. 中国农业科学, 2013, 46(10): 2014-2021.
- [20] KOUMOUTSI A, CHEN X H, HENNE A, et al. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(4): 1084-1096.
- [21] 罗楚平, 刘卹洲, 吴荷芳, 等. 脂肽类化合物 bacillomycin L 抗真菌活性及其对水稻病害的防治[J]. 中国生物防治学报, 2011, 27(1): 76-81.
- [22] YANEZ-MENDIZABAL V, ZERIOUH H, VIÑASI, et al. Biological control of peach brown rot by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides[J]. European Journal of Plant Pathology, 2012, 132(4): 1-11.
- [23] 王培培, 郭庆港, 李社增, 等. 群体感应调控因子 ComA 对枯草芽胞杆菌 NCD-2 抑菌物质产生和生物膜形成的影响[J]. 植物保护学报, 2016, 43(2): 193-200.
- [24] DENG X D, TIAN Y X, NIU Q H, et al. The ComP-ComA quorum system is essential for Trojan horse like pathogenesis in *Bacillus nematocida*[J]. PLoS ONE, 2013, 8(10): e76920.

(责任编辑: 陈海霞)