

枯草芽胞杆菌M29产抑菌物质培养条件的优化及抑菌物质组成初探

季冠宁^{1,2}, 汪志鹏¹, 焦加国¹, 胡锋¹, 李辉信^{1,2*}

(1. 南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095; 2. 江苏省有机固体废物资源化协同创新中心, 南京 210095)

摘要: 前期研究发现枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* M29 对黄瓜枯萎病具有较好的防治效果, 然而其抑菌物质组成和抑菌机制尚不清楚。本文首先确定了菌株 M29 产抑菌物质的抑菌效果最强时的培养条件, 进一步结合热处理、酶处理、基因检测和质谱检测初步分析此抑菌物质的组成。结果表明, 以 Landy 培养基为基础、初始 pH 为 7、培养温度在 30 °C、培养 36~48 h 时, 菌株 M29 产生的抑菌物质的抑菌效果最好。菌株 M29 抑菌物质粗提液的抑菌活性具有热稳定性和酶稳定性。此外, 在菌株 M29 的基因组 DNA 中扩增出合成 fengycin 的调控基因 *fenB*, 结合质谱检测到 Fengycin B 的分子量, 推测菌株 M29 分泌物中可能存在脂肽抗生素 Fengycin B。因此, 枯草芽胞杆菌 M29 可能通过分泌脂肽抗生素来抑制病原菌生长, 通过优化培养条件可以显著提高该菌的抑菌能力, 本研究不仅有助于更深入地理解菌株 M29 的抑菌机制, 同时也将为该菌在未来的实际应用提供理论指导。

关键词: 枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* M29; 培养条件; 抑菌物质; 脂肽化合物

中图分类号: S476 文献标志码: A 文章编号: 1005-9261(2019)06-0930-10

Optimization of Culture Conditions for Antifungal Substances Produced by *Bacillus subtilis* M29 and Preliminary Study on the Composition of Antifungal Substances

Ji Guanning^{1,2}, Wang Zhipeng¹, Jiao Jiaguo¹, Hu Feng¹, Li Huixin^{1,2*}

(1. College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Jiangsu Collaborative Innovation Center for Solid Organic Waste Utilization, Nanjing 210095, China)

Abstract: Our previous work found that *Bacillus subtilis* M29 has a good control effect on cucumber Fusarium wilt. However, the composition and mechanism of its antifungal substances are still unclear. Here, we will screen the optimal culture conditions of this strain, and determine the composition of antifungal substances produced by the strain. We determined the culture conditions based on the antifungal effect of the substances, optimal conditions (e.g., temperature and pH) were selected when the stain displayed the strongest antifungal effect. Then, we analyzed the composition of antifungal substances using heat treatment, enzyme treatment, gene detection and mass spectrometry. The results showed that the antifungal effect of the antifungal substances produced by strain M29 was strongest when Landy-based medium was used with an initial pH of 7, a culture temperature of 30 °C and a culture time of 36—48 h. The crude extract of the antimicrobial substance still had antifungal activity after heat treatment and enzyme treatment. In addition, we amplified the synthetic gene *fenB* of fengycin from the genome DNA of strain M29 and detected the molecular weight of fengycin B by mass spectrometry. Therefore, we speculate that the lipopeptide antibiotic fengycin B may be present in

收稿日期: 2019-03-26

基金项目: 国家重点研发计划 (2016YFD0300908); 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (201503121); 农业部引进国际先进农业科学技术计划 (2015-Z42)

作者简介: 季冠宁, 硕士研究生, E-mail: 2016103021@njau.edu.cn; *通信作者, 博士, 教授, E-mail: huixinli@njau.edu.cn。

DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2019.06.021

the secretions of strain M29. We concluded that *Bacillus subtilis* M29 may inhibit the growth of pathogenic fungal by secreting lipopeptide antibiotics, and the antifungal ability can be significantly improved by optimizing the culture conditions. This study will not only contribute to a better understanding of the antimicrobial mechanism of the strain, but also provide theoretical guidance for the practical application of this strain in the future.

Key words: *Bacillus subtilis* M29; culture conditions; antifungal substances; lipopeptide compounds

长期以来, 植物病虫害一直是制约农业生产的最严重的问题之一。当前化学防治因其立竿见影的效果而被广泛使用, 但是长期使用化学防治则会带来一系列的问题, 如环境污染、生态平衡破坏等^[1]。近年来, 以微生物为媒介的生物防治作为一种对人类和环境更友好的防治手段受到了人们广泛的关注^[2]。其中, 由于枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* 对环境具有较强的耐受力, 以及在生防上高效、低毒和广谱的特点, 同时也是一种广泛存在于自然界中的细菌, 因此是理想的生防菌筛选对象^[3-5]。枯草芽胞杆菌作为重要的一类生防细菌, 其抑菌机制值得进一步探讨。

枯草芽胞杆菌主要通过竞争作用、诱导植物系统抗性和拮抗作用保护植物免受病原菌的侵扰^[6]。有研究表明, 枯草芽胞杆菌 SQR9 可以通过在植物的根际、体表和土壤中优先定殖, 占据有利的空间位置, 并形成生物膜, 进而抵御病原菌的侵入^[7]。枯草芽胞杆菌也能通过诱发植物自身产生抗病机制来增加植物的抗病能力^[8], 如枯草芽胞杆菌 PTS-394 可以诱导番茄植株对灰霉病的系统抗性^[9]。此外, 拮抗作用在枯草芽胞杆菌抵御病原菌侵害植物时也起着非常重要的作用^[10]。枯草芽胞杆菌可以分泌一些抗菌物质来抑制病原菌的生长^[11]。如枯草芽胞杆菌分泌的脂肽类抗生素可以抑制和杀死多种病原微生物^[12], 也可以分泌一些细菌素、细胞壁降解酶以及其他的一些抗菌蛋白^[13]。

近年来, 人们对枯草芽胞杆菌的生防效果和抑菌机理有较多的研究。虽然对其产生的抑菌物质也有一定的研究, 但是究竟是产生的哪种物质对病原菌有较强的抑制作用尚不明确。为了实现拮抗菌最大的抑菌潜能, 需明确特定菌株产抑菌物质的最适生长条件, 以及其对应的抑菌物质组成。本课题组前期从蚓粪中分离鉴定出一株对黄瓜枯萎病菌等多种病原菌有较好防治效果的枯草芽胞杆菌 M29 (GenBank 登录号 KU870670), 然而其不同培养条件下的抑菌能力以及抑菌机制尚不清楚^[14]。本研究以该菌为研究对象, 从筛选抑菌效果最大化时的培养条件, 以及此条件下代谢产物组成方面入手, 初步探讨该菌的生防机制, 以便为其更合理有效的生物防治应用提供理论指导。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株

枯草芽胞杆菌 M29 由本实验室分离自南京市江浦汤泉农场的蚯蚓粪中; 黄瓜枯萎病病原菌尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* 黄瓜专化型由南京农业大学植物保护学院杀菌剂生物学实验室提供。

1.2 供试培养基

LB 培养基: 胰蛋白胨 10.0 g, 酵母粉 5.0 g, NaCl 10.0 g, 蒸馏水 1.0 L, pH 7.0~7.2。NA 培养基: 葡萄糖 10 g, 蛋白胨 5 g, 牛肉膏 3 g, 酵母粉 0.5 g, 蒸馏水 1.0 L, pH 7.0。KMB 培养基: 甘油 10 mL, 蛋白胨 20 g, KH₂PO₄ 1.5 g, MgSO₄·7H₂O 1.5 g, 蒸馏水 1.0 L, pH 7.0。Landy 培养基: 葡萄糖 20.0 g, L-谷氨酸 5.0 g, KH₂PO₄ 1.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, KCl 0.5 g, 酵母粉 1.0 g, MnSO₄ 5.0 mg, CuSO₄·5H₂O 0.16 mg, FeSO₄·7H₂O 0.15 mg, L-苯丙氨酸 2.0 mg, 蒸馏水 1.0 L, pH 7.0~7.2。PDA 培养基: 葡萄糖 20.0 g, 琼脂 15.0 g, 马铃薯粉 6.0 g, 蒸馏水 1.0 L, 自然 pH。

1.3 抑菌物质粗提液的制备

从平板上挑取枯草芽胞杆菌 M29 的单菌落接种于 100 mL 的 LB 液体培养基中, 30 °C、180 r/min 培养 24 h 得到种子液。按 1% 的接种量将种子液接入到各供试培养基中, 30 °C、180 r/min 培养 48 h 后, 12000 r/min 离心 20 min, 收集上清液, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 将无菌过滤液置于 4 °C 冰箱保存、备用。

1.4 抑菌活性的测定方法

采用牛津杯定量扩散法测试抑菌粗提液对指示菌黄瓜枯萎病菌的抑菌活性。通过测定菌丝生长过程中抑菌带宽的大小来衡量抑菌物质粗提液对黄瓜枯萎病菌尖孢镰刀菌的抑菌活性。在平板中央放置一块直径为 5 mm 的病原菌菌饼，以距菌饼 20 mm 处 3 个不同方向各放置牛津杯，分别往其中加入 100 μL 的抑菌粗提液。培养皿放置培养箱中 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5 d，观察记录抑菌带宽的大小。

1.5 不同培养条件对菌株 M29 的生长及产抑菌物质能力的影响

1.5.1 不同培养基对菌株 M29 产抑菌物质能力的影响 以 1% 的接种量将菌株 M29 的种子液接种到装有 100 mL 的 LB/NA/KMB/Landy 的液体培养基（装于 250 mL 三角瓶）中，30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 48 h。粗提液的提取和拮抗效果的检测方法同 1.3 和 1.4。

1.5.2 不同培养时间对菌株 M29 的生长及产抑菌物质能力的影响 以 1% 的接种量将 M29 种子液接种到 100 mL 的产抑菌物质能力最强的培养基（装于 250 mL 三角瓶）中，30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 12、24、36、48、60、72、84 h，测定细菌生长的 OD₆₀₀ 值。粗提液的提取和拮抗效果的检测方法同 1.3 和 1.4。

1.5.3 不同培养温度对菌株 M29 的生长及产抑菌物质能力的影响 以 1% 的接种量将 M29 的种子液接种到 100 mL 的产抑菌物质能力最强的培养基（装于 250 mL 三角瓶）中，分别置于 20、25、30、35 和 40 $^{\circ}\text{C}$ ，180 r/min 培养 48 h，测定细菌生长的 OD₆₀₀ 值。粗提液的提取和拮抗效果的检测方法同 1.3 和 1.4。

1.5.4 不同初始 pH 对菌株 M29 的生长及产抑菌物质能力的影响 以 1% 的接种量将 M29 种子液接种到初始 pH 分别为 5、6、7、8 的 100 mL 的产抑菌物质能力最强的培养基（装于 250 mL 三角瓶）中，30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 48 h，测定细菌生长的 OD₆₀₀ 值。粗提液的提取和拮抗效果的检测方法同 1.3 和 1.4。

1.6 抑菌物质的热稳定性检测

取 6 只刻度试管，每只试管加 3 mL 的抗菌粗提液（pH 7.0），分别于 20、40、60、80 和 100 $^{\circ}\text{C}$ 下处理 1 h。冷却后，若液体有挥发，则补加无菌水至 3 mL，然后采用牛津杯法检测其抑菌活性（参照 1.4）。

1.7 不同酶处理对抑菌物质活性的影响

分别选取胰蛋白酶和胃蛋白酶对粗提液进行处理。胰蛋白酶液和胃蛋白酶液浓度分别为 50、100、150、200 和 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；分别以不加酶液的处理与加入缓冲液的酶液（胰蛋白酶的缓冲液为 Tris-HCl，配胃蛋白酶的缓冲液为 KCl-HCl）为双对照，采用牛津杯法检测其抑菌活性（参照 1.4）。

1.8 菌株 M29 抗生素合成相关基因检测

枯草芽胞杆菌菌株间的抗生素合成基因序列相似度较高，本研究所用引物（表 1）根据文献[15]报道获得。*fenB*、*ituA* 基因引物在金斯瑞生物科技公司（南京）合成，目的片段大小分别为 767 和 885 bp。PCR 反应体系为：10 \times *Taq* buffer 2.5 μL ，Mg²⁺ (25 mmol/L) 2.5 μL ，dNTP (2.5 mmol/L) 2 μL ，5'端引物 (25 pmol/L) 1 μL ，3'端引物 (25 pmol $\mu\text{L}/\text{L}$) 1 μL ，模板 DNA 1 μL ，*Taq* 聚合酶 (5 U) 0.3 μL ，H₂O 14.7 μL ，总体积 25 μL 。PCR 反应条件：95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min；95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min，52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min 30 s，30 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物切胶回收后，连接到载体 pMD18-T 上，转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞，挑取阳性克隆测序。测序由金斯瑞生物科技公司（南京）完成，DNA 测序后的产物序列利用 NCBI 数据库的 Blast 程序进行同源检索，与 GenBank 数据进行比对分析。

表 1 调控合成脂肽抗生素相关基因设计引物

Table 1 Primers used in regulating the synthesis of related lipopeptide antibiotic genes

引物名称 Primer name	引物大小 Size (bp)	片段大小 Amplicon size (bp)	引物序列 Sequence (5'-3')
fenBF	20	767	TACCAATCGCAATGTCGTGT
fenBR	20		CTTCGATTCTAACAGCCGC
ituAF	20	885	TGCCAGACAGTATGAGGCAG
ituAR	20		CATGCCGTATCCACTGTGAC

1.9 脂肽抗菌粗提液的制备和抑菌活性检测

抗菌物质的提取采用酸沉淀法，即在上述无菌滤液中加入 6 mol/L HCl 调节 pH 2.0，4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。于

8000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀, pH 2.0 水洗数次, 沉淀干燥后加入甲醇抽提 2 次, 合并抽提液, 旋转蒸发得到沉淀, 用少量甲醇回溶所得沉淀即为抗菌物质的脂肽粗提液。抗菌粗提液于 4 °C 保存备用。在病原菌的菌饼左右各 20 mm 处放置 2 个牛津杯, 往其中一只牛津杯中加入 30 μ L 脂肽粗提液, 另一只牛津杯中加入 30 μ L 甲醇作为对照, 重复 3 次。放在 30 °C 恒温培养箱培养 5 d。

1.10 基质协助激光解吸附离子化-飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 的检测

为了准确了解菌株产生的脂肽类抗生素种类, 对其进行基质协助激光解吸附离子化-飞行时间质谱分析。使用 337 nm 氮激光源解吸附和电离, 采用 α -氰-4-羟肉桂酸 (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) 为基质, 1 μ L 样品与等体积的基质混匀, 置于仪器离子源进行测定。质量扫描范围为 1000~2000 Da, 具体方法参照文献[16]。

1.11 数据统计与分析

试验数据采用 Excel 2016 和 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 邓肯氏新复极差法分析不同处理间差异显著性。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对菌株 M29 产抑菌物质能力的影响

菌株 M29 抑菌物质的粗提液对黄瓜枯萎病原菌具有较好的抑菌效果 (表 2, 图 1), 且在 Landy 培养基中产生抑菌物质的能力最强, 平均抑菌带宽为 9.13 mm (包含孔的半径 3.0 mm)。

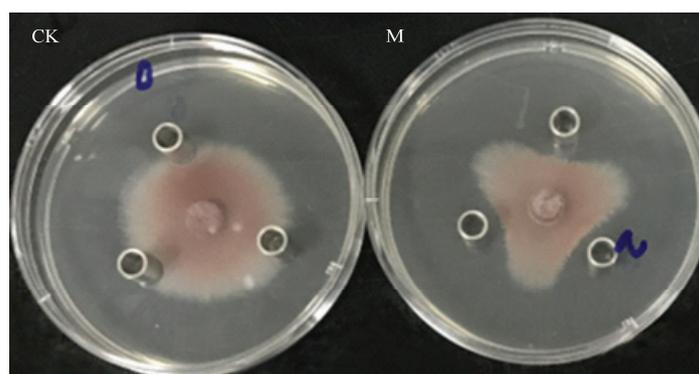
表 2 不同培养基对菌株 M29 产抑菌物质能力的影响

Table 2 Effects of different mediums on antifungal ability of antifungal substances by strain M29

培养基 Medium	抑菌带宽 Width of inhibition zone (mm)
Landy	9.13 \pm 0.25 a
KMB	8.79 \pm 0.14 a
LB	7.75 \pm 0.45 b
NA	7.04 \pm 0.19 b

注: 数据为平均值 \pm 标准误, 不同小写字母表示 0.05 水平上差异显著。

Note: Data were presented as mean \pm SE, data with different lowercase letters indicated significant difference at 0.05 level.



CK: 无抑菌物质粗提液空白对照 (Landy 培养基) Control with crude extract without antifungal substances (Landy medium); M: 添加抑菌物质粗提液处理 (Landy 培养基) Treatment with crude extract with added antifungal substances (Landy medium)

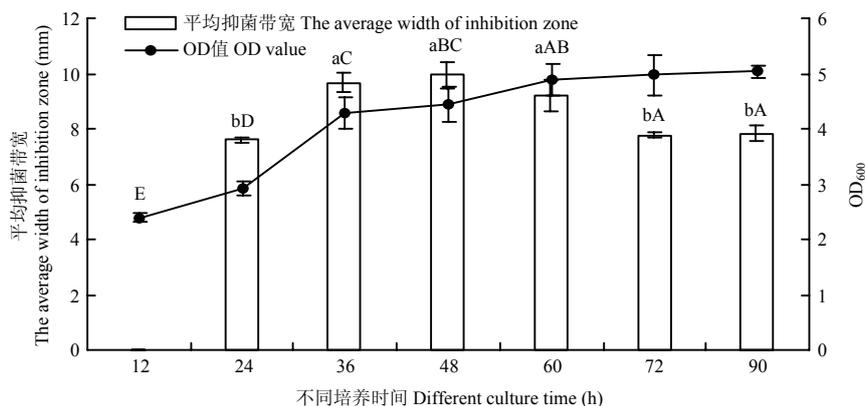
图 1 抑菌粗提液对黄瓜枯萎病原菌的拮抗效果

Fig. 1 Antagonistic effects of crude extract on *Fusarium* wilt in cucumber

2.2 不同培养条件对菌株 M29 的生长及产抑菌物质能力的影响

2.2.1 不同培养时间对菌株 M29 的生长及产抑菌物质能力的影响 随着培养时间的增加, 菌株 M29 抑菌能力呈现先增加后减少的趋势; 当培养 36~60 h 时, 抑菌能力显著高于其他培养时间; 当培养时间为 48 h

时, 抑菌带宽最大, 为 9.94 mm。同时, 不同培养时间对菌株 M29 生长有显著的影响 ($P < 0.05$), 随着培养时间的增加, 菌株 M29 的 OD_{600} 值呈现先增长后稳定的趋势 (图 2)。



注: 图上不同小写字母表示抑菌带宽在 0.05 水平差异显著; 不同大写字母表示 OD 值在 0.05 水平差异显著, 下同。

Note: Different lowercase letters indicated that the average width of the zone of inhibition were significant different between culture times at the 0.05 level; Different uppercase letters indicated that the OD value were significant different between culture times at the 0.05 level, and the letters have the same meaning for the figures below.

图 2 培养时间对菌株 M29 生长及产抑菌物质能力的影响

Fig. 2 Effects of culture time on the growth of strain M29 and antifungal ability of antifungal substances

2.2.2 不同培养温度对菌株 M29 的生长及产抑菌物质能力的影响 当培养温度为 30 °C 时, 菌株 M29 产生的抑菌物质的抑菌能力最强, 其抑菌带宽为 10.44 mm, 显著高于其他培养温度的平均抑菌带宽。同时, 不同培养温度对菌株 M29 生长有显著的影响 ($P < 0.05$), 当培养温度在 30 °C 时, 细菌的 OD_{600} 值最大, 即菌株 M29 生长最好 (图 3)。

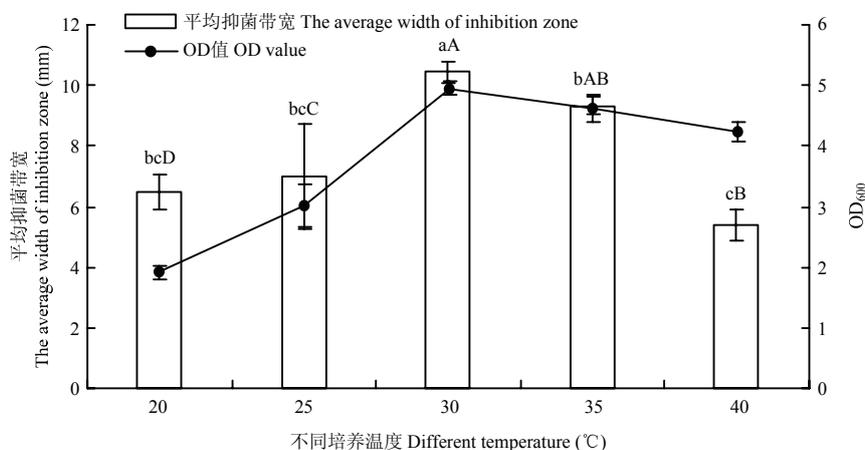


图 3 培养温度对菌株 M29 生长及产抑菌物质能力的影响

Fig. 3 Effects of culture temperatures on the growth of strain M29 and antifungal ability of antifungal substances

2.2.3 不同初始 pH 对菌株 M29 的生长及产抑菌物质能力的影响 当初始 pH 为 5 时, 细菌可以生长, 但无抑菌效果; 当初始 pH 为 6、7、8 时, 菌株 M29 抑菌效果无显著差异。初始 pH 为 8 时, 菌株 M29 的生长较快, 显著高于初始 pH 为 6 (图 4)。

2.3 抑菌物质的热稳定性

处理温度为 40 °C 时, 抑菌粗提液的抑菌能力最大, 其抑菌带宽为 9.3 mm, 显著高于 20 °C; 当处理温度达到 80 和 100 °C 时, 抗菌物质的抑菌活性显著下降; 在 100 °C 下的抑菌带宽为 6.5 mm, 表明抗菌物质具有一定的热稳定性 (图 5)。

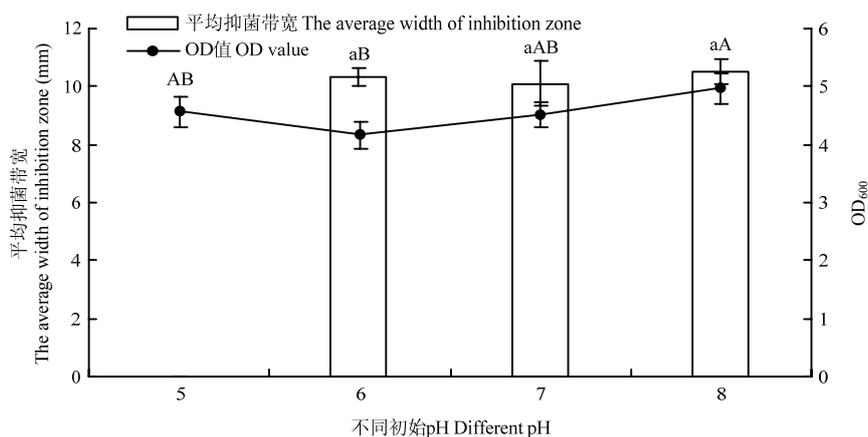


图 4 初始 pH 对菌株 M29 生长及产抑菌物质能力的影响

Fig. 4 Effects of initial pH on the growth of strain M29 and antifungal ability of antifungal substances

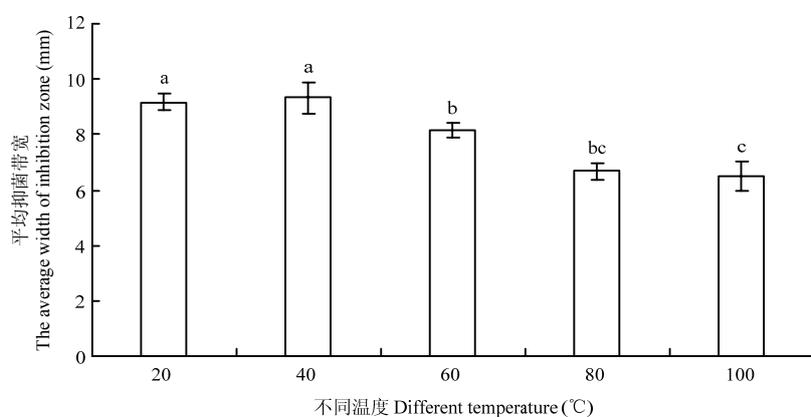


图 5 不同温度对菌株 M29 产抑菌物质稳定性的影响

Fig. 5 Effects of different temperatures on the stability of strain M29 antifungal substances

2.4 不同酶处理对抑菌物质活性的影响

经胃蛋白酶和胰蛋白酶分别处理的抑菌物质，抑菌效果与对照相比无显著差异，且各不同浓度处理间抑菌效果也无显著差异 ($P>0.05$) (图 6)。

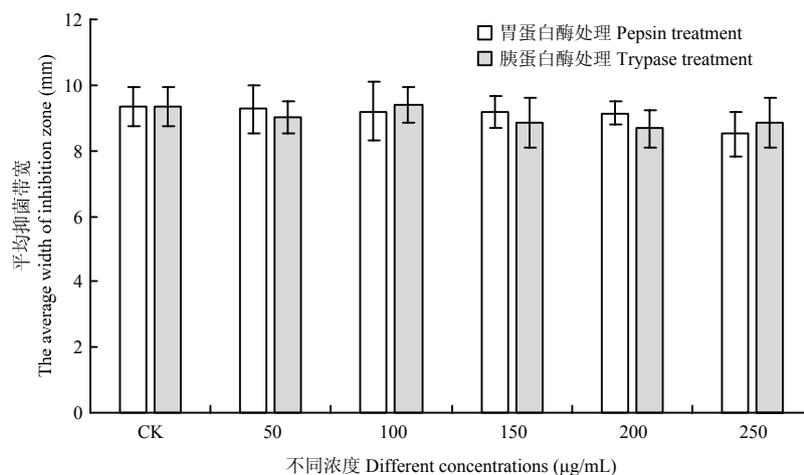
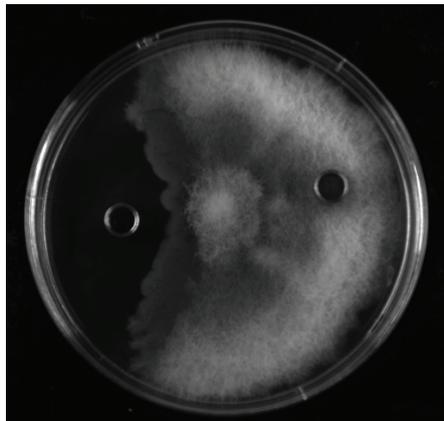


图 6 不同酶处理对菌株 M29 产抑菌物质稳定性的影响

Fig. 6 Effects of different enzymes on the stability of strain M29 antifungal substances

2.5 菌株 M29 脂肽粗提物的抑菌效果

脂肽粗提物对黄瓜枯萎病病原菌有明显的抑菌效果，菌丝的生长受到明显的抑制，同时抑菌带宽达到了 10.16 mm（图 7）。



注：左边放置的为脂肽粗提物，右边为甲醇。

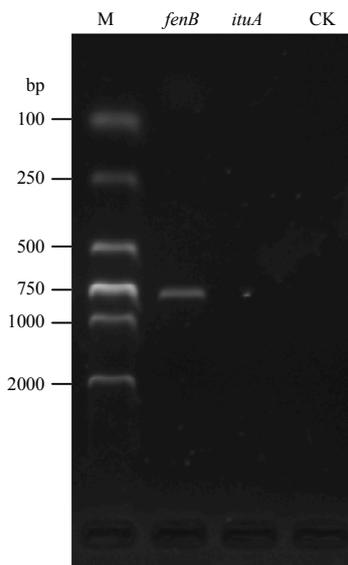
Note: The crude extract of lipopeptide is on the left, and methanol is on the right.

图 7 菌株 M29 脂肽粗提物对黄瓜枯萎病病原菌的抑菌效果

Fig. 7 The inhibition effect of strain M29 crude extract of lipopeptide on *Fusarium* wilt in cucumber

2.6 菌株 M29 的合成脂肽抗生素相关基因检测

利用两对引物对菌株 M29 基因组的 DNA 进行 PCR 扩增结果显示，扩增得到一条 750 bp 片段，为合成 fengycin 的调控基因 *fenB*，而未扩增得到合成 itruin A 的调控基因 *ituA*（图 8）。



M: DNA marker DL2000; CK: ddH₂O

图 8 菌株 M29 脂肽抗生素合成基因 *fenB* 和 *ituA* 的 PCR 扩增

Fig. 8 PCR amplification of lipopeptide antibiotic synthesis genes *fenB* and *ituA* from strain M29

2.7 基质协助激光解吸附离子化-飞行时间质谱的检测

在图中的 A 区域的质子加合峰中，质荷比 $m/z=1029$ 、 1043 、 1057 和 1071 ，相差 14 Da，为脂肪酸链相差 1 个亚甲基（-CH₂-）的同系物，这与文献[17]报道的脂肽抗生素 Iturin A 的质子化峰 $[M+H]^+$ 的分子量一致；在图中 B 区域的峰值中 $m/z=1477$ 、 1491 和 1505 ，相差 14 Da，为脂肪酸链相差 1 个亚甲基（-CH₂-）的同系物，这与文献[18]中报道的脂肽抗生素 Fengycin B 的质子化峰分子量相一致（图 9）。

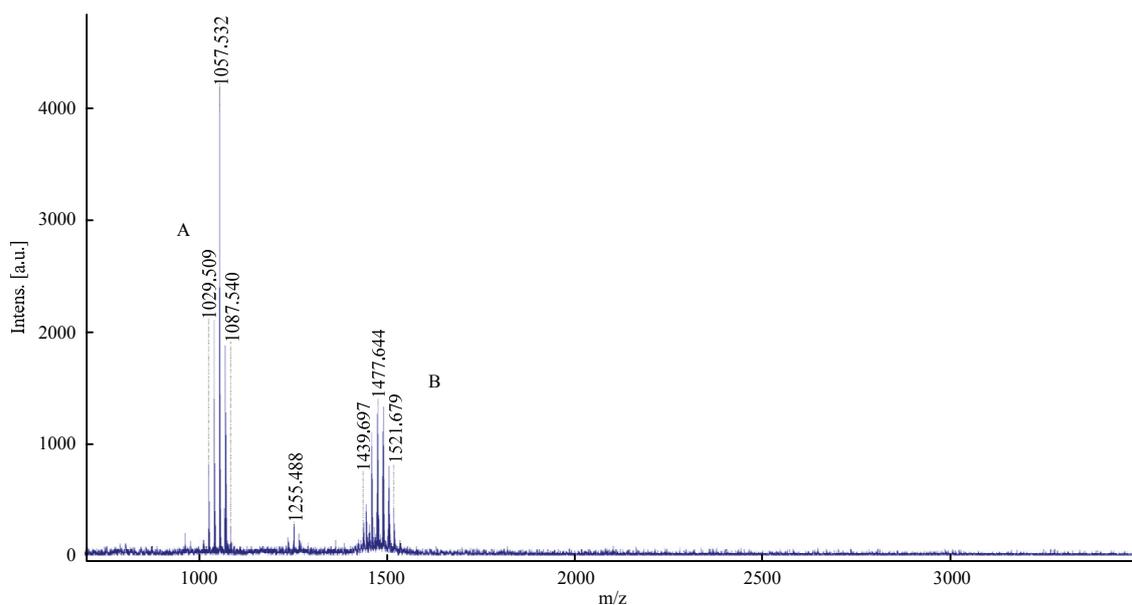


图 9 脂肽粗体物的 MALDI-TOF-MS 的分析

Fig. 9 Composition of the crude lipopeptide based on MALDI-TOF-MS

3 讨论

本试验结果显示,随着时间的增加,菌株 M29 产抑菌物质的能力呈现先增大后减小的趋势,但是细菌的生长则呈现先增加后稳定的趋势,说明抑菌物质的抑菌能力在细菌生长的对数后期以及培养的稳定期产生较强,但是随着培养时间的继续延长,菌株 M29 产生的抑菌物质的抑菌能力呈现降低的趋势,这可能是由于培养后期原来培养基中的营养成分不足,导致细菌以抑菌物质为营养成分进行生长,这与孙力军等^[19]研究结果相似。不同温度下菌株 M29 的生长状况和产抑菌物质的能力有显著差异,在 30 °C 时生长量最大、抑菌能力最强,其抑菌能力与菌株的生长量成正比,这说明当培养条件利于菌株 M29 的生长时,其抑菌物质的抑菌能力更强。孙沙沙等^[20]在研究枯草芽胞杆菌 CG24 对烟草野火病的抑菌活性时,发现其培养温度在 32 °C 可以产生更多的抑菌物质。初始 pH 试验结果表明,当初始 pH 为 5 时,菌株无抑菌效果,在 pH 6~8 时,菌株 M29 抑菌能力并无显著的差异。张雯等^[21]则发现当培养温度在 38 °C、初始 pH 8.2 时,枯草芽胞杆菌 BS08 能够产生较多的抑菌物质。由此说明,不同的培养温度和初始 pH 对枯草芽胞杆菌合成抗菌物质有一定的影响。因此,选择在 Landy 培养基下,初始 pH 为 7,培养 48 h,培养温度为 30 °C 条件下,获得的抑菌粗提物作进一步的研究。

枯草芽胞杆菌可以产生多种抗菌物,主要是一些脂肽类抗菌物、抗菌蛋白和一些抗菌肽等^[22,23]。本研究的结果发现,在 100 °C 下处理 1 h,抑菌物质仍有拮抗活性,说明该抑菌物质具有热稳定性。这与邹秋霞等^[24]和王祺等^[25]的研究结果有一定的相似之处。而且将获得的抑菌粗提物经过胃蛋白酶和胰蛋白酶的处理后,抑菌效果没有发生显著性变化,说明该抑菌物质对蛋白酶稳定。已有研究报道,枯草芽胞杆菌产生的脂肽类抗菌物质不仅对热稳定,而且对蛋白酶也具有稳定性^[26,27],这与本试验的研究结果类似。通过脂肽类抗菌物质粗提物的分离提取和对峙试验发现,脂肽类粗提物具有较好的拮抗作用,因此我们推测该抑菌物质可能为一类脂肽抗生素。

随着 Arima 等^[28]在 1968 年首次从枯草芽胞杆菌株发现脂肽类表面活性剂之后,不断有新的脂肽类抗生素被发现,目前已报道的枯草芽胞杆菌产生的脂肽抗生素主要包括三大类群:表面活性素类(surfactins)、伊枯草菌素类(iturins)和芬芥素类(fengycins)^[29]。同时在探索脂肽化合物的方法上,也有不断的改进。随着现代分子生物学的发展,曹云等^[15]利用 PCR 和 LC-MS 相结合的技术从解淀粉芽胞杆菌 SQR9 中的发酵液中发现了多种脂肽抗生素。因此,我们使用脂肽类抗生素相关基因的特异性引物对菌株 M29 基因组

DNA 进行 PCR 扩增,发现该菌基因组中存在脂肽类抗生素 Fengycin 的合成相关基因 *fenB*,结合 MALDI-TOF-MS 发现粗提物中含有与 Fengycin B 分子量相一致的成分。因此,推测菌株 M29 可以产生 Fengycin B 类的脂肽抗生素。Cawoy 等^[30]研究发现多数枯草芽胞杆菌均可分泌 Fengycin 这一类抑菌物质。Fan 等^[31]研究发现枯草芽胞杆菌 9407 产生的 Fengycin 对苹果环腐病具有极强的抑制作用。虽然有研究发现枯草芽胞杆菌产生的 Iturin A 对植物病原菌也有强烈的抑制作用^[32,33],从 MALDI-TOF-MS 的结果上也发现了与脂肽类抗生素 Iturin A 分子量相一致的物质,但由于未拥有菌株 M29 的基因组序列,多以同源序列设计的引物,未能扩增出其调控合成的基因片段,所以菌株 M29 是否存在这一脂肽类物质,还需要通过分离纯化等化学手段进一步验证。

通过现代分子生物学手段和 MALDI-TOF-MS 相结合的手段,辅助相关文献报道可以快速鉴定菌株所产生脂肽抗生素的类别,但是我们只能大致推断出菌株可以分泌哪些脂肽抗生素,而不能确定是何种抗生素起了主要作用,因此接下来还要对抑菌物质进行分离纯化,同时结合基因敲除等分子生物学技术,确定起主要作用的抗菌物质和相关调控基因。

参 考 文 献

- [1] 叶晶晶,曹宁宁,吴建梅,等.生防芽胞杆菌的应用研究进展[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2014,42(8):185-190.
- [2] Calvo H, Marco P, Blanco D, et al. Potential of a new strain of *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 as a biocontrol agent of postharvest fruit diseases[J]. Food Microbiology, 2017, 63:101-110.
- [3] 马佳,李颖,胡栋,等.芽胞杆菌生物防治作用机理与应用研究进展[J].中国生物防治学报,2018,34(4):639-648.
- [4] 张洁,汤蒙蒙,夏明聪,等.枯草芽胞杆菌 YB-05 与申嗪霉素复配防治小麦茎基腐病[J].中国生物防治学报,2018,34(6):866-872.
- [5] Shafi J, Tian H, Ji M. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review[J]. Biotechnology and Biotechnological Equipment, 2017, 31(3): 446-459.
- [6] Hill D S, Stein J I, Torkewitz N R, et al. Cloning of genes involved in the synthesis of pyrrolnitrin from pseudomonas-fluorescens and role of pyrrolnitrin synthesis in biological-control of plant-disease[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60(1): 78-85.
- [7] 凡肖,束长龙,关雄,等.细菌生物被膜在生物防治中的作用[J].中国生物防治学报,2018,34(5):791-801.
- [8] 陈志谊,刘永峰,刘邮洲,等.植物病害生防芽胞杆菌研究进展[J].江苏农业学报,2012,28(5):999-1006.
- [9] 乔俊卿,张心宁,梁雪杰,等.枯草芽胞杆菌 PTS-394 诱导番茄对灰霉病的系统抗性[J].中国生物防治学报,2017,33(2):219-225.
- [10] Shan H, Zhao M, Chen D, et al. Biocontrol of rice blast by the phenaminomethylacetic acid producer of *Bacillus methylotrophicus* strain BC79[J]. Crop Protection, 2013, 44: 29-37.
- [11] Liu Y, Cheng Z, Ng T B, et al. Bacisubin, an antifungal protein with ribonuclease and hemagglutinating activities from *Bacillus subtilis* strain B-916[J]. Peptides, 2007, 28: 553-559.
- [12] 别小妹,吕凤霞,陆兆新,等.*Bacillus subtilis* fmbJ 脂肽类抗菌物质的分离和鉴定[J].生物工程学报,2006(4):644-649.
- [13] 张晓云,郭庆港,鹿秀云,等.枯草芽胞杆菌 NCD-2 菌株抑菌蛋白的分离及鉴定[J].植物病理学报,2018,48(3):395-401.
- [14] Mu J, Li X, Jiao J, et al. Biocontrol potential of vermicompost through antifungal volatiles produced by indigenous bacteria[J]. Biological Control, 2017, 112: 49-54.
- [15] Cao Y, Xu Z, Ling N, et al. Isolation and identification of lipopeptides produced by *B. subtilis* SQR 9 for suppressing Fusarium wilt of cucumber[J]. Scientia Horticulturae, 2012, 135(1): 32-39.
- [16] 向亚萍,陈志谊,罗楚平,等.芽胞杆菌的抑菌活性与其产脂肽类抗生素的相关性[J].中国农业科学,2015,48(20):4064-4076.
- [17] Ye Y F, Li Q Q, Fu G, et al. Identification of antifungal substance (Iturin A2) produced by *Bacillus subtilis* B47 and its effect on southern corn leaf blight[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2012, 11(1): 90-99.
- [18] Wang J, Liu J, Wang X, et al. Application of electrospray ionization mass spectrometry in rapid typing of fengycin homologues produced by *Bacillus subtilis*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2010, 39(1): 98-102.
- [19] 孙力军,陆兆新,孙德坤.*Bacillus amyloliquefaciens* ES-2 液体发酵抗菌脂肽培养基及其主要影响因子筛选[J].食品工业科技,2008(5):60-63.
- [20] 孙沙沙,夏振远,吴德喜.枯草芽胞杆菌 CG24 发酵条件优化[J].云南农业大学学报(自然科学版),2013,28(1):36-43.
- [21] 张雯,卞丹,沈燕秋,等.枯草芽胞杆菌抑菌活性物质鉴定、抑菌特性及发酵条件优化[J].中国食品学报,2017,17(12):105-115.

- [22] Moyne A L, Cleveland T E, Tuzun S. Molecular characterization and analysis of the operon encoding the antifungal lipopeptide bacillomycin D[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 234(1): 43-49.
- [23] 刘颖, 徐庆, 陈章良. 抗真菌肽 LP-1 的分离纯化及特性分析[J]. *微生物学报*, 1999, 23(5): 441-447.
- [24] 邹秋霞, 任佐华, 高诗涵, 等. 枯草芽胞杆菌 YN145 分离鉴定及抑菌活性[J]. *中国生物防治报*, 2017, 33(3): 421-426.
- [25] 王祺, 张一名, 赵君, 等. 枯草芽胞杆菌 S-16 抑菌活性物质的理化性质及培养条件的研究[J]. *中国生物防治学报*, 2015, 31(3): 439-444.
- [26] Ohno A, Ano T, Shoda M. Effect of temperature change and aeration on the production of antifungal peptide antibiotic iturin by *Bacillus subtilis* NB22 in liquid cultivation[J]. *Journal of Fermentations and Bioengineering*, 1993, 75(6): 463-465.
- [27] Akpa E, Jacques P, Fuchs R, *et al.* Influence of the culture conditions on lipopeptide production by *Bacillus subtilis*[C]//Symposium of Biotechnology for Fuels & Chemicals, 2000.
- [28] Arima K, Kakinuma A, Tamura G. Surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 1968, 31(3): 488-494.
- [29] 邓建良, 刘红彦, 王鹏涛, 等. 生防芽胞杆菌脂肽抗生素研究进展[J]. *植物保护*, 2010, 36(3): 20-25.
- [30] Cawoy H, Debois D, Franzil L, *et al.* Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*[J]. *Microbial Biotechnology*, 2015, 8(2): 281-295.
- [31] Fan H, Ru J, Zhang Y, *et al.* Fengycin produced by *Bacillus subtilis* 9407 plays a major role in the biocontrol of apple ring rot disease[J]. *Microbiological Research*, 2017, 199: 89-97.
- [32] Zohora U S, Ano T, Rahman M S. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* K1 by iturin A producer *Bacillus subtilis* RB14 seed treatment in tomato plants[J]. *Advances in Microbiology*, 2016, 6(6): 424.
- [33] Mnif I, Grau-Campistany A, Coronel-León J, *et al.* Purification and identification of *Bacillus subtilis* SPB1 lipopeptide biosurfactant exhibiting antifungal activity against *Rhizoctonia bataticola* and *Rhizoctonia solani*[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(7): 6690-6699.