

# 锰消除镰刀菌酸对枯草芽胞杆菌R31生物被膜形成的抑制

周海琪<sup>1,2</sup>, 程萍<sup>1</sup>, 宫庆友<sup>2</sup>, 喻国辉<sup>1,2\*</sup>, 温书恒<sup>3</sup>

(1. 仲恺农业工程学院, 广州 510225; 2. 珠海市现代农业发展中心, 珠海 519075; 3. 广东植物龙生物技术股份有限公司, 珠海 519075)

**摘要:** 为了揭示芽胞杆菌类生防因子和镰刀菌病害的互作方式, 对镰刀菌酸抑制枯草芽胞杆菌生物被膜形成及其消除开展了研究。首先利用 24 孔细胞培养板建立了镰刀菌酸抑制枯草芽胞杆菌 R31 生物被膜形成的生物测定体系, 并筛选出抑制 R31 生物被膜形成所需的最低镰刀菌酸浓度。测定了在该镰刀菌酸浓度处理下的 R31 生长曲线, 并利用显微镜观察了镰刀菌酸处理和对照在振荡培养和静置培养下的菌体形态。然后测定了不同浓度  $\text{MnSO}_4$  添加消除镰刀菌酸抑制 R31 生物被膜形成的效果, 并用高效液相色谱测定了各处理镰刀菌酸的残留量。结果显示, 以 24 孔细胞培养板为培养容器, 以 BGM1 为培养基的生物测定系统中, 显著抑制 R31 生物被膜形成的最低镰刀菌酸用量为  $9 \mu\text{g/mL}$ ; 该浓度的镰刀菌酸抑制了静置培养的 R31 菌体形成网状结构和漂浮在液面, 并抑制了振荡培养的 R31 早期菌体增殖。但共培养体系中添加  $\text{MnSO}_4$  可以恢复 R31 的生物被膜形成, 其中  $200 \mu\text{g/mL}$  的硫酸锰不仅能消除毒素抑制, 还可显著促进 R31 的生物被膜形成。镰刀菌酸可能通过影响 R31 基质产生细胞的分化而抑制其生物被膜形成, 硫酸锰可以作为钝化剂缓解镰刀菌酸对 R31 生物被膜形成的抑制。

**关键词:** 枯草芽胞杆菌; 生物被膜形成; 镰刀菌酸; 抑制; 消除

中图分类号: S476 文献标识码: A 文章编号: 1005-9261(2019)04-0613-09

## Elimination of the Inhibition of Fusaric Acid on the Biofilm Formation of *Bacillus subtilis* R31 by Manganese

ZHOU Haiqi<sup>1,2</sup>, CHENG Ping<sup>1</sup>, GONG Qingyou<sup>2</sup>, YU Guohui<sup>1,2\*</sup>, WEN Shuheng<sup>3</sup>

(1. Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China; 2. Zhuhai Modern Agriculture Development Center, Zhuhai 519075, China; 3. Guangdong Geolong Biotechnology Co., Ltd, Zhuhai 519075, China)

**Abstract:** In order to reveal the interaction mechanisms between *Bacillus* biocontrol agents and plant pathogen *Fusarium*, the inhibition of fusaric acid (FA) from *Fusarium* on the biofilm formation of *Bacillus subtilis* strain R31, and the elimination of the inhibition were investigated. Firstly, a bioassay system was established to test the inhibition of FA on the biofilm formation of *B. subtilis* R31 by 24-well cell culture plate, and the lowest concentration of FA on the biofilm formation of R31 was screened out. The growth curve of *B. subtilis* R31 was tested in the presence of the minimum concentration of FA, and the cells of R31 with or without the FA treatment under shaking or static cultivation were observed by microscopy. Then, different concentrations of  $\text{MnSO}_4$  were added into the co-cultural system to eliminate the inhibition of FA on the biofilm formation of R31, and the residue of FA in each treatment was determined by HPLC. The results showed that in this bioassay system,  $9 \mu\text{g/mL}$  of FA could drastically inhibit the biofilm formation of R31 by inhibiting its reticular structure formation of R31 cells and reducing the cells floating on the liquid surface in static culture.  $9 \mu\text{g/mL}$  of FA can also inhibit the growth of early-stage R31 in shaking culture. Adding  $\text{MnSO}_4$  into the co-culture system, however, can restore the biofilm formation of R31. More specially,  $200 \mu\text{g/mL}$  of  $\text{MnSO}_4$  can not only eliminate the inhibition of FA on the biofilm

收稿日期: 2019-01-15

基金项目: 省级农业科技创新及推广项目 (2018LM1008); 广东省公益研究与能力建设专项 (2014A020208015)

作者简介: 周海琪, 硕士研究生, E-mail: 1483381134@qq.com; \*通信作者, 博士, 研究员, E-mail: ygh76411@163.com。

DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2019.04.019

formation of R31, but also significantly promote its formation. FA may inhibit the biofilm formation of R31 by affecting the differentiation of matrix-producing cells of R31, and  $\text{MnSO}_4$  can be used as a passivating agent to alleviate the inhibition of FA on the biofilm formation of R31.

**Key words:** *Bacillus subtilis*; biofilm formation; fusaric acid; inhibition; elimination

镰刀菌 *Fusarium* spp. 是一类重要的植物病原真菌, 危害多种水果和粮食作物如香蕉、小麦和玉米<sup>[1]</sup>。枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* R31 对镰刀菌属病原真菌具备广谱拮抗活性<sup>[2]</sup>, 并在大田中对尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* 引起的香蕉枯萎病表现出防治效果<sup>[3,4]</sup>, 可以广泛用于镰刀菌引起的作物病害生物防治。其防治机理与 R31 具有生物被膜形成 (biofilm formation) 能力并可以在作物根际稳定定殖和调节作物根际微生物群落结构有关<sup>[4-6]</sup>。

枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* 的生物被膜形成能力与其在植物根际定殖和对土传病害的防治效果之间存在相关性<sup>[7,8]</sup>, 其生物被膜的形成和根际定殖受到植物根系分泌苹果酸<sup>[9]</sup>和根系多糖的促进<sup>[10]</sup>, 并受到植物免疫反应产物的抑制<sup>[11,12]</sup>。根际土壤中的微生物或代谢产物也可能促进或抑制枯草芽胞杆菌的生物被膜形成<sup>[13]</sup>, 如植物病原菌黄色镰刀菌 *F. culmorum* 共培养时可以促进枯草芽胞杆菌生物被膜形成<sup>[14]</sup>, 土壤链霉菌产生的井冈霉素 A 在不同浓度下可以促进或抑制枯草芽胞杆菌 R31 生物被膜的形成<sup>[15]</sup>。但镰刀菌产生的毒素对枯草芽胞杆菌生物被膜形成的影响报道较少。

镰刀菌酸 (Fusaric acid, FA), 5-丁基吡啶-2-羧酸,  $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_2$ , 分子量 179, 熔点 98~100 °C, 是植物病原镰刀菌产生的次级代谢产物<sup>[16]</sup>, 是一种非专业化性真菌毒素<sup>[17]</sup>, 对植物和哺乳动物表现出广谱的毒性<sup>[18]</sup>, 也是香蕉枯萎病病原菌的主要致病因子<sup>[19,20]</sup>, 其产量与镰刀菌菌株的致病性之间存在正相关<sup>[21]</sup>。镰刀菌酸的毒性主要表现在 2 个方面: 一是镰刀菌酸通过体内氧化脱氢过程代谢成 3-n-丁基吡啶毒害细胞; 二是镰刀菌酸螯合了细胞中各种酶的铁、铜、锰等金属离子, 破坏了原生质体与原生质膜的蛋白质结构<sup>[16]</sup>, 使细胞破裂死亡。为了缓解或消除镰刀菌酸的毒性, 一些金属离子如  $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  等<sup>[22,23]</sup>或具备镰刀菌酸代谢能力的微生物如荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens*<sup>[24]</sup>被用来钝化镰刀菌酸, 并对香蕉枯萎病表现出一定的防治效果。本课题组早期研究发现, 香蕉枯萎病产生的粗毒素对芽胞杆菌的生长具有抑制作用, 并引起芽胞杆菌早衰<sup>[25]</sup>。在大田利用 R31 开展香蕉枯萎病防效试验时发现, 香蕉枯萎病初始发病率高的地块, R31 的防效会降低, 猜测可能是因为该类型地块中镰刀菌及其产生的毒素含量较高, 对 R31 的生物被膜形成和定殖产生了负面影响。

为了弄清镰刀菌酸对枯草芽胞杆菌 R31 生长和生物被膜形成的影响, 以及  $\text{Mn}^{2+}$  作为钝化剂对这种影响的钝化效果, 设计了一套生物测定体系, 确定了镰刀菌酸抑制枯草芽胞杆菌生物被膜形成的最低浓度, 并观察了该抑制浓度条件下 R31 的生长和生物被膜形成过程。由于  $\text{Mn}^{2+}$  不仅可以被用作毒素钝化剂, 还具有促进枯草芽胞杆菌生长和生物被膜形成的能力<sup>[26,27]</sup>, 因此在镰刀菌酸和 R31 的共培养体系中添加  $\text{MnSO}_4$ 。本研究为揭示芽胞杆菌类生防菌和镰刀菌病原菌毒素的互作提供了新的素材, 并为采用增效剂提高枯草芽胞杆菌 R31 的枯萎病防治效果提供了理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株和培养基

枯草芽胞杆菌 R31<sup>[2]</sup>, 由珠海市现代农业发展中心提供。试验使用 LB 培养基和 BGM1 培养基<sup>[28]</sup>。

### 1.2 供试试剂

镰刀菌酸购自东京化成工业株式会社。

### 1.3 镰刀菌酸抑制枯草芽胞杆菌生物被膜形成的生物测定体系

1.3.1 不同浓度镰刀菌酸对不同起始浓度 R31 生物被膜形成的影响 R31 种子液准备和菌体收集按照文献 [4] 方法操作, 最后得到的菌悬液浓度为  $1.76 \times 10^{10}$  cfu/mL。用 BGM1 培养基稀释收获的初始菌液, 使 R31 的终浓度分别为  $2.0 \times 10^7$ 、 $2.0 \times 10^8$  和  $2.0 \times 10^9$  cfu/mL, 备用。

向 24 孔细胞培养板中加入 BGM1 培养基和镰刀菌酸 (母液浓度 900  $\mu\text{g/mL}$ ), 使镰刀菌酸的终浓度

分别为 1、3、5、7、9、11 和 13  $\mu\text{g/mL}$ , 各镰刀菌酸处理浓度均设置对照, 并在对照中加入等体积无菌水。在不同的细胞培养板中分别加入 10  $\mu\text{L}$   $2.0 \times 10^7$ 、 $2.0 \times 10^8$  和  $2.0 \times 10^9$  cfu/mL 的 R31 稀释液, 使 2 mL 的培养体系中 R31 菌体起始浓度分别为  $1.0 \times 10^5$ 、 $1.0 \times 10^6$  和  $1.0 \times 10^7$  cfu/mL。R31 起始浓度为  $1.0 \times 10^8$  cfu/mL 的体系则加入 11  $\mu\text{L}$  浓度为  $1.76 \times 10^{10}$  cfu/mL 的初始菌液。每种处理 3 个重复, 将培养板置于 37  $^\circ\text{C}$  静置恒温培养, 分别在 24、48 和 72 h 观察并拍照记录薄皮形成情况。确定镰刀菌酸在 9  $\mu\text{g/mL}$ , R31 起始浓度为  $1.0 \times 10^6$  cfu/mL, 培养 24 h 时可以观察到明显的生物被膜形成抑制效果。每个处理重复 3 次。

**1.3.2 镰刀菌酸抑制 R31 生物被膜形成的浓度测定** 将 R31 LB 发酵液用 BGM1 稀释 1000 倍, 在装有 BGM1 和 FA 的培养孔中加入 2  $\mu\text{L}$  稀释液, 三者总体积为 2 mL, R31 的菌体终浓度约为  $1.0 \times 10^6$  cfu/mL, 镰刀菌酸的终浓度分别为 1、3、5、7、9、11 和 13  $\mu\text{g/mL}$ , 对照组不添加镰刀菌酸, 于 37  $^\circ\text{C}$  静置培养 24 h, 观察生物被膜形成情况并用结晶紫染色法定量测定生物被膜厚度<sup>[29]</sup>。每个处理重复 3 次。

#### 1.4 镰刀菌酸影响 R31 生长和生物被膜形成

**1.4.1 镰刀菌酸对 R31 在 BGM1 中静置生长的影响观察** 处理方法同 1.3.2, 镰刀菌酸浓度设定为 9  $\mu\text{g/mL}$ , 分别在 4、8、12、16、20 和 24 h 取不同处理菌液 10  $\mu\text{L}$  制片, 结晶紫染色后镜检拍照。

**1.4.2 镰刀菌酸对 R31 在 BGM1 中振荡生长的影响** R31 活化方法同 1.3.1, 从 5 mL 种子液中按 1% 的量分别加入 5 mL BGM1 和 BGM1+9  $\mu\text{g/mL}$  镰刀菌酸 (FA) 液体培养基中, 于 37  $^\circ\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养, 分别在 0、2、4、6、8、10、12、14、16 和 20 h 测定 600 nm 处 OD 值, 并以培养时间为横坐标作图, 获得 R31 的生长曲线。每个处理重复 3 次。分别在 4、6、8、10 和 12 h 取不同处理菌液 10  $\mu\text{L}$  制片镜检拍照。

#### 1.5 硫酸锰钝化镰刀菌酸恢复 R31 生物被膜

**1.5.1 不同浓度硫酸锰钝化镰刀菌酸恢复 R31 生物被膜形成的试验方法** 在事先加好 BGM1 液体培养基、FA 母液和  $\text{MnSO}_4$  母液的培养孔中加入 R31 种子液 2  $\mu\text{L}$ , 使终体积为 2 mL, 镰刀菌酸终浓度为 9  $\mu\text{g/mL}$ ,  $\text{MnSO}_4$  母液浓度为 100 mg/mL。设置了终浓度分别为 40、80、120、160 和 200  $\mu\text{g/mL}$  的  $\text{MnSO}_4$  钝化处理组以及 3 种对照组, 分别为 BGM1 培养 R31、9  $\mu\text{g/mL}$  镰刀菌酸处理 R31 和 120  $\mu\text{g/mL}$  硫酸锰处理 R31, 37  $^\circ\text{C}$  静置培养 24 h, 观察、记录并定量测定 R31 生物被膜形成情况, 测定方法同 1.3.2。每个处理重复 3 次。

**1.5.2 钝化后培养液中剩余镰刀菌酸含量的 HPLC 测定** 样品制备: 培养体系同 1.5.1, 设置 2 个对照, 分别为 9  $\mu\text{g/mL}$  镰刀菌酸+BGM1 和 R31+BGM1+9  $\mu\text{g/mL}$  镰刀菌酸, 处理组 3 个, 分别为  $\text{MnSO}_4$  终浓度为 80、160 和 200  $\mu\text{g/mL}$ 。37  $^\circ\text{C}$  静置培养 24 h, 分别收集 5 个处理培养液 20 mL, 4  $^\circ\text{C}$ 、5000 r/min 离心 10 min 去除菌体, 加入等体积乙酸乙酯抽提 12 h, 吸取上层有机相 16 mL, 真空离心蒸发浓缩, 浓缩物用 8 mL 色谱纯甲醇溶解, 然后用 0.22  $\mu\text{m}$  有机滤膜过滤。

FA 标准品 (40  $\mu\text{g/mL}$ ) 配制: 精密称取 0.0020 g 溶于色谱纯甲醇 50 mL, 0.22  $\mu\text{m}$  有机滤膜过滤。

样品中 FA 含量的 HPLC 测定<sup>[23]</sup>: 色谱柱 260 nm $\times$ 4.6 mm, 填料直径 5  $\mu\text{m}$ , 柱温 50  $^\circ\text{C}$ , 流动相为色谱纯甲醇/0.43%磷酸 (68/32), 流速 0.7 mL/min, 进样量 10  $\mu\text{L}$ , 波长 270 nm。

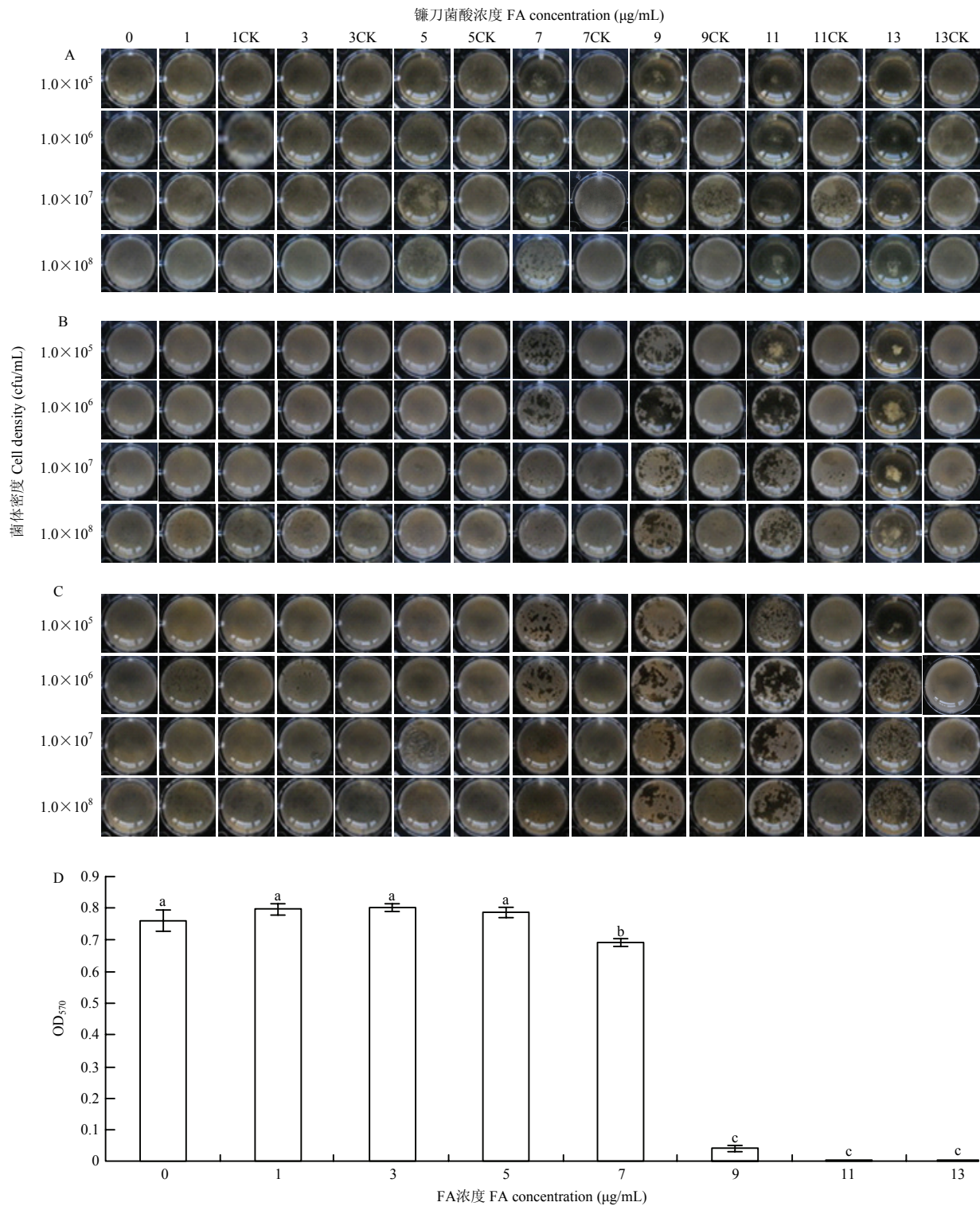
#### 1.6 数据统计与分析

文中数据采用 DPS<sup>[30]</sup> 软件开展方差分析和邓肯新复极差多重比较及正交试验的设计与分析, 利用 Excel 2003 软件作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 镰刀菌酸抑制枯草芽胞杆菌生物被膜形成的生物测定体系

**2.1.1 不同浓度镰刀菌酸对不同初始浓度 R31 生物被膜形成的影响** 镰刀菌酸可以抑制枯草芽胞杆菌 R31 生物被膜形成 (图 1A、B、C), 抑制程度与镰刀菌酸的浓度和 R31 的初始浓度相关。R31 的初始浓度低, 受抑制明显, 镰刀菌酸浓度高, 抑制效果明显。7  $\mu\text{g/mL}$  FA 抑制了低浓度 ( $1.0 \times 10^5$ 、 $1.0 \times 10^6$ 、 $1.0 \times 10^7$  cfu/mL) R31 在 24 h 内形成薄皮, 但高浓度 ( $1.0 \times 10^8$  cfu/mL) R31 在 7  $\mu\text{g/mL}$  FA 作用下能形成薄皮, 所有对照均可在 24 h 内形成较完整薄皮。9  $\mu\text{g/mL}$  FA 抑制了所有起始浓度的 R31 在 24 h 内形成薄皮。培养到 48 h (图 1B), 浓度在 9  $\mu\text{g/mL}$  及以上的 FA 仍然明显影响所有起始浓度的 R31 薄皮的形成。培养到 72 h (图 1C),



注: A、24 h, B、48 h, C、72 h, 除设置不加镰刀菌酸对照外, 每个镰刀菌酸处理浓度还设置与该浓度所加体积相等的无菌水。D、不同浓度镰刀菌酸对起始浓度为  $1.0 \times 10^6 \text{cfu/mL}$  的 R31 生物被膜形成影响的定量测定, 图中数据表示平均数  $\pm$  标准差, 图上不同的小写字母表示方差分析和多重比较差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Note: A 24 h, B 48 h, C 72 h. In addition to the control without FA, there were different controls set for different FA treatments by adding sterile water. D Quantitative determination of the effect of fusaric acid at different concentration on the biofilm formation of R31 with an initial concentration of  $1.0 \times 10^6 \text{cfu/mL}$ , data were mean  $\pm$  SD, different letters indicated significant difference by ANOVA and multiple comparisons at 0.05 level.

图 1 镰刀菌酸对枯草芽胞杆菌 R31 生物被膜形成的影响

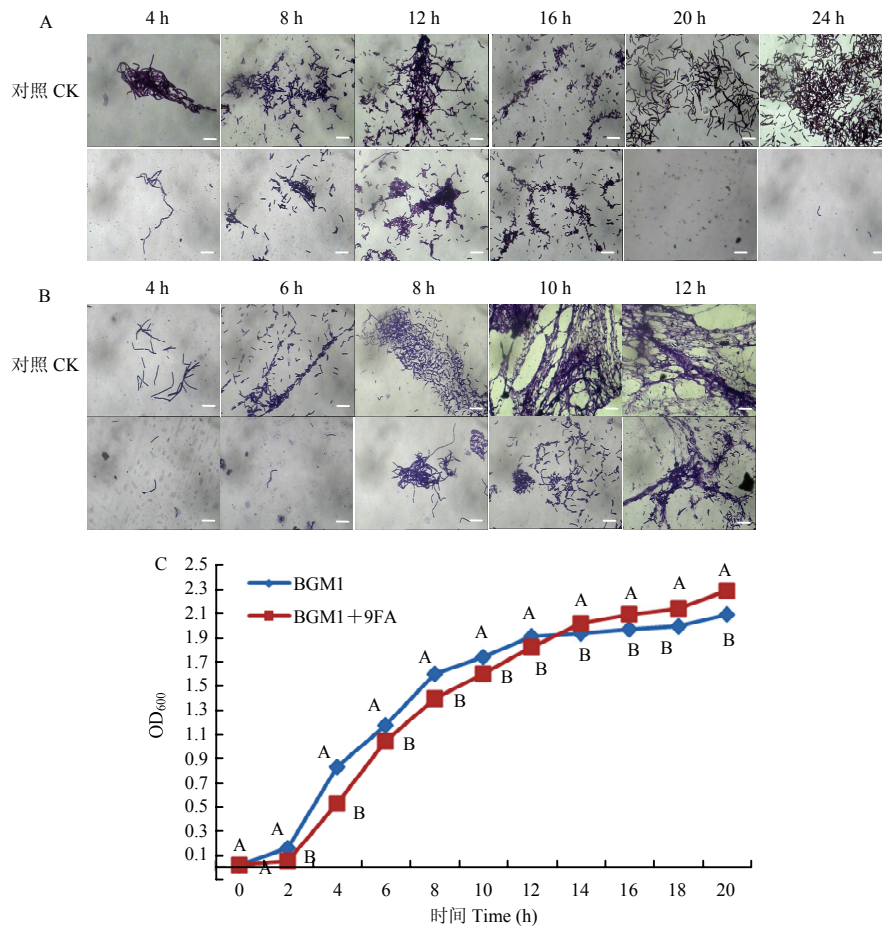
Fig. 1 Influence of FA on the biofilm formation of *B. subtilis* R31

9  $\mu\text{g/mL}$  FA 对 R31 生物被膜形成的抑制减轻, 但处理形成的薄皮仍然与对照存在差别, 说明 9  $\mu\text{g/mL}$  的 FA 可以抑制 R31 生物被膜的形成。

2.1.2 镰刀菌酸抑制 R31 生物被膜形成的最低浓度确定 按照优化的生物测定条件开展定量检测, 发现培养 24 h 时, 9  $\mu\text{g/mL}$  FA 明显抑制了 R31 生物被膜的形成, 菌体生物被膜的形成与对照差异显著 (图 1D)。

## 2.2 镰刀菌酸影响 R31 生长和生物被膜形成

2.2.1 镰刀菌酸对 R31 在 BGM1 生物被膜形成过程中的影响 显微镜观察结果如图 2A 所示, 静置培养条件下 R31 在 BGM1 培养基中以非游离 (聚团、结网) 的形式生长, 与文献报道的枯草芽胞杆菌生物被膜形成过程完全一致<sup>[31]</sup>。在该培养基中培养至 4 h 时, 菌体逐渐以长链状形式聚集生长; 8~16 h 时菌体量不断增加, 同时多呈短杆状聚集结构; 20 h 开始出现薄皮, 24 h 即可观察到致密完整的薄皮; 24 h 上清液中菌体均以长链状连接聚集。而 R31 在含有 9  $\mu\text{g/mL}$  FA 的 BGM1 培养基中虽也是以非游离的形式生长, 但菌体密度明显比对照要低; 4 h 出现长链状连接, 8 h 以后基本上保持短杆状形态, 逐渐聚集; 但到 20 h 时培养液上清中菌体极少, 与对照相比, 24 h 的培养液上清中仅观察到单个菌体, 与对照有显著差别, 大部分菌体沉淀到管底。从上述生长过程的观察来看, FA 可能影响了 R31 基质产生细胞的量, 使得产生胞外



注: A, 镰刀菌酸对 R31 在 BGM1 中静置培养时生长过程的影响; B, 镰刀菌酸对 R31 在 BGM1 中振荡培养时生长过程的影响; C, R31 在 BGM1 和 BGM1 + 9  $\mu\text{g/mL}$  镰刀菌酸培养基中的生长曲线, 不同大写字母表示方差分析多重比较差异极显著 ( $P < 0.01$ ); 图中标尺=10  $\mu\text{m}$ 。

Note: A, influence of FA on the growth of R31 in BGM1 at stilling culture; B, influence of FA on the growth of R31 in BGM1 at shaking culture; C, growth curve of *B. subtilis* R31 on BGM1 and BGM1 + 9  $\mu\text{g/mL}$  FA medium, different capital letters means significant difference by ANOVA and multiple comparisons at 0.01 level; scale bar=10  $\mu\text{m}$ .

图 2 枯草芽胞杆菌 R31 在含 9  $\mu\text{g/mL}$  镰刀菌 BGM1 培养基中的生长曲线和生长过程观察

Fig. 2 The growth curve and process of *B. subtilis* R31 on BGM1 + 9  $\mu\text{g/mL}$  FA medium

基质的细胞数量较少, 不能够形成更多的胞外多糖和蛋白质, 从而不能使细胞之间有效地粘附并形成细胞束, 最后直接影响了细胞团的形成和漂浮。

**2.2.2 R31 在不同培养基 (BGM1、BGM1+9  $\mu\text{g/mL}$  FA) 中生长曲线的测定** 振荡培养条件下 R31 在 BGM1 培养基中以非游离 (聚团、结网) 的形式生长 (图 2B)。R31 在 BGM1 培养基中培养到 4 h 时长链状菌体密度不断增加的同时以长、短链状连接聚集; 8~12 h 菌体密度增加更明显, 聚集成网状结构。振荡培养条件下 R31 在 BGM1+9  $\mu\text{g/mL}$  FA 中培养至 12 h 的每个时间段菌体密度明显比对照低, 与生长曲线 (图 2C) 的结果吻合。

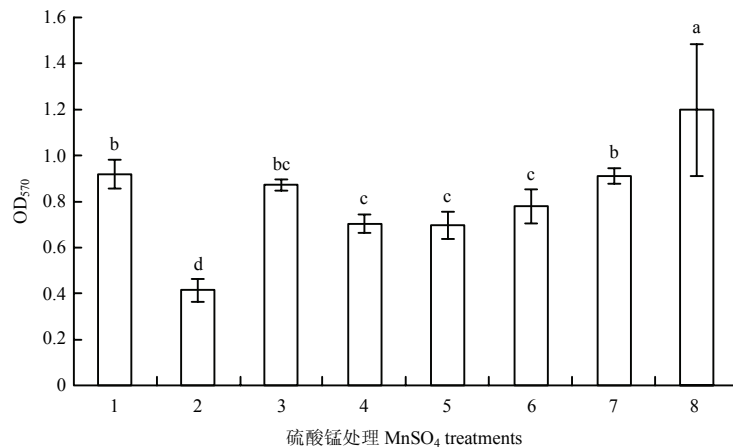
在振荡培养条件下, 9  $\mu\text{g/mL}$  的 FA 显著抑制了 R31 的对数生长期的增殖, 但显著促进了稳定期的菌体增殖 (图 2C)。从 2 h 开始到 12 h, 对照的 OD 值均显著高于镰刀菌酸处理, 而从 14 h 开始, 镰刀菌酸处理的 OD 值显著高于对照 (2C)。R31 在 BGM1 中培养 2 h, OD<sub>600</sub> 为 0.149, 随后其 OD 值随着时间而增大, 并进入对数生长期, 培养至 12 h 时, 其 OD 达到 1.912, 此后菌体生长进入稳定期。而 R31 在 BGM1+9  $\mu\text{g/mL}$  FA 中以同样的条件培养, 2 h 时 OD 值尚无明显升高, 但随后进入对数生长期, 培养至 14 h 时, 其 OD<sub>600</sub> 达到 2.017, 此后菌体生长进入稳定期。

从振荡培养条件下的 R31 生长方式观察结果来看, FA 影响了振荡培养条件下 R31 的细胞分化过程。在 BGM1 中, R31 主要以生物被膜形成的方式生长, 而添加 FA 后, 生物被膜方式生长的细胞量减少, 但随着时间的推移, FA 的抑制作用被克服, R31 最终仍然能够恢复正常的生长。

结合静置培养和振荡培养条件下 R31 的生长方式观察结果推断, FA 可能通过影响 R31 细胞群体中基质产生细胞的数量来抑制生物被膜形成。

### 2.3 硫酸锰钝化镰刀菌酸恢复 R31 生物被膜形成能力

**2.3.1 不同浓度硫酸锰钝化镰刀菌酸恢复 R31 生物被膜形成的结果**  $\text{MnSO}_4$  对 R31 生物被膜的形成没有抑制作用 (图 3), 以 9  $\mu\text{g/mL}$  FA 处理作为对照, 通过添加不同浓度  $\text{MnSO}_4$ , 发现 200  $\mu\text{g/mL}$   $\text{MnSO}_4$  能钝化镰刀菌酸并完整恢复 R31 的生物被膜形成; 200  $\mu\text{g/mL}$   $\text{MnSO}_4$  钝化 9  $\mu\text{g/mL}$  FA 使 R31 生物被膜形成能力恢复后的生物被膜总量超过对照; 小于 200  $\mu\text{g/mL}$   $\text{MnSO}_4$  处理的钝化效果不明显 (图 3)。



注: 1, CK; 2, 9  $\mu\text{g/mL}$  镰刀菌酸; 3, 120  $\mu\text{g/mL}$  硫酸锰; 4, 40  $\mu\text{g/mL}$  硫酸锰+9  $\mu\text{g/mL}$  镰刀菌酸; 5, 80  $\mu\text{g/mL}$  硫酸锰+9  $\mu\text{g/mL}$  镰刀菌酸; 6, 120  $\mu\text{g/mL}$  硫酸锰+9  $\mu\text{g/mL}$  镰刀菌酸; 7, 160  $\mu\text{g/mL}$  硫酸锰+9  $\mu\text{g/mL}$  镰刀菌酸; 8, 200  $\mu\text{g/mL}$  硫酸锰+9  $\mu\text{g/mL}$  镰刀菌酸。

Note: 1, CK; 2, 9  $\mu\text{g/mL}$  FA; 3, 120  $\mu\text{g/mL}$   $\text{MnSO}_4$ ; 4, 40  $\mu\text{g/mL}$   $\text{MnSO}_4$ +9  $\mu\text{g/mL}$  FA; 5, 80  $\mu\text{g/mL}$   $\text{MnSO}_4$ +9  $\mu\text{g/mL}$  FA; 6, 120  $\mu\text{g/mL}$   $\text{MnSO}_4$ +9  $\mu\text{g/mL}$  FA; 7, 160  $\mu\text{g/mL}$   $\text{MnSO}_4$ +9  $\mu\text{g/mL}$  FA; 8, 200  $\mu\text{g/mL}$   $\text{MnSO}_4$ +9  $\mu\text{g/mL}$  FA

图 3 不同浓度硫酸锰钝化 9  $\mu\text{g/mL}$  镰刀菌酸促进枯草芽胞杆菌 R31 生物被膜形成的测定结果

Fig. 3 Results of the passivation of manganese sulfate on 9  $\mu\text{g/mL}$  FA at different concentrations and their promotion on the biofilm formation of *B. subtilis* R31

**2.3.2 硫酸锰钝化镰刀菌酸促进 R31 对镰刀菌酸的代谢** 加入 R31 后, 9  $\mu\text{g/mL}$  的 FA 降低至 1.2  $\mu\text{g/mL}$ , 说明 R31 在生长的过程中能代谢一部分 FA; 在 R31+9  $\mu\text{g/mL}$  FA 基础上加入 80、160、200  $\mu\text{g/mL}$   $\text{MnSO}_4$ , 4 h 后检测不到 FA (表 1)。

表 1 不同处理剩余体系中 FA 含量  
Table 1 FA content in residual systems under different treatments

| 处理方式 Treatments   | 剩余 FA 含量 Residual FA contents ( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|---|--|
| BGM1+9 $\mu\text{g/mL}$ FA  | 8.84   |
| BGM1+9 $\mu\text{g/mL}$ FA+R31                                      | 1.2  |
| BGM1+9 $\mu\text{g/mL}$ FA+R31+80 $\mu\text{g/mL}$ $\text{MnSO}_4$  | 0  |
| BGM1+9 $\mu\text{g/mL}$ FA+R31+160 $\mu\text{g/mL}$ $\text{MnSO}_4$ | 0  |
| BGM1+9 $\mu\text{g/mL}$ FA+R31+200 $\mu\text{g/mL}$ $\text{MnSO}_4$ | 0  |

### 3 讨论

镰刀菌酸对枯草芽胞杆菌 R31 生物被膜形成的抑制具有浓度效应, 7  $\mu\text{g/mL}$  的镰刀菌酸即可以影响 R31 的生物被膜形成, 随着镰刀菌酸浓度的增加, 对 R31 生物被膜形成的抑制作用越来越明显。R31 的菌体起始浓度也影响了生物被膜的形成, 起始浓度为  $1.0 \times 10^5$ 、 $1.0 \times 10^6$  和  $1.0 \times 10^7$  cfu/mL 的 R31 在 7  $\mu\text{g/mL}$  的镰刀菌酸存在下, 24 h 时不能形成生物被膜, 但起始浓度为  $1.0 \times 10^8$  cfu/mL 的 R31 受影响较小, 可在 24 h 形成不完整的生物被膜, 随着培养时间的延长, 到 72 h 时, 除起始浓度为  $1.0 \times 10^5$  cfu/mL 的 R31 处理和对照还有明显差异外, 其他起始浓度的处理已和对照无明显差异了。这和过氧化氢对 R31 的生物被膜形成影响的规律类似<sup>[4]</sup>。枯草芽胞杆菌 R31 起始浓度越大, 越容易达到形成生物被膜所需要的细胞群体密度, 形成生物被膜越快, 受镰刀菌酸的影响越小。

枯草芽胞杆菌在生长和生物被膜形成过程中会出现细胞分化, 一部分细胞为游离的运动性细胞, 一部分为固定生长的基质产生细胞, 一部分则分化为感受态形成细胞, 另外一部分又分化为芽胞形成细胞<sup>[31]</sup>, 这个过程受到 Spo0A 和 DegU 这两个全局性主调控因子磷酸化水平的变化控制<sup>[29,32]</sup>, 而细胞以链状结构生长并逐步形成细胞束和细胞团并最终形成薄皮是枯草芽胞杆菌生物被膜形成的特征之一<sup>[33]</sup>。BGM1 是本实验室筛选出来的一个促进枯草芽胞杆菌生物被膜形成的培养基<sup>[28]</sup>, 通过对不同培养条件 (BGM1、BGM1+9  $\mu\text{g/mL}$  FA) 下 R31 生物被膜形成过程的观察, 发现 R31 在 BGM1 液体培养基表面能够形成完整薄皮, 此时薄皮中的菌体处于非运动型的长链状聚集交联结构中; 而在 BGM1 中加入 9  $\mu\text{g/mL}$  FA 后不能形成薄皮, 在 BGM1 液体培养基表面菌体稀少, 24 h 后菌体仍然呈单体形式。对 (BGM1、BGM1+9  $\mu\text{g/mL}$  LFA) 中 R31 的生长曲线测定发现, FA 抑制 R31 菌体的对数生长, 但促进了稳定期的 R31 的生长。结合对枯草芽胞杆菌细胞分化<sup>[31]</sup>和生物被膜形成过程观察<sup>[32]</sup>, 推断镰刀菌可能通过抑制基质产生细胞的形成抑制枯草芽胞杆菌 R31 生物被膜的形成。但 FA 究竟通过何种信号途径来实现这个过程, 还需要进一步的研究。

值得注意的是, 镰刀菌酸使香蕉表现出枯萎症状的浓度在 130  $\mu\text{g/mL}$  以上<sup>[20]</sup>, 而本课题组测定盆栽试验中发病香蕉种苗根系中镰刀菌酸的含量, 发病植株根系中镰刀菌酸的含量达到 314.7  $\mu\text{g/g}$  (未发表数据), 而完全抑制 R31 生物被膜形成的镰刀菌酸浓度仅为 9~13  $\mu\text{g/mL}$ 。很显然 R31 在发病的香蕉园的防效受到影响与发病香蕉园的病原菌浓度及其产生的毒素浓度过高有很大的关系。因此, 在镰刀菌病害发生严重的地块使用 R31, 必须考虑毒素的钝化以及如何促进 R31 的生物被膜形成。

文献报道 Mn 离子具有钝化镰刀菌酸的功能<sup>[22]</sup>, 其同时还是枯草芽胞杆菌生长和生物被膜形成所必需的微量元素<sup>[34-37]</sup>, 在枯草芽胞杆菌的生活史中发挥重要的作用<sup>[38]</sup>, 已知 Mn 离子添加到枯草芽胞杆菌的培养基中, 可以促进枯草芽胞杆菌芽胞形成<sup>[27]</sup>和抗逆<sup>[39]</sup>相关基因的转录。本研究显示, 将硫酸锰添加到含有镰刀菌酸的培养基中, 表现出恢复 R31 生物被膜形成的特点, 当硫酸锰的浓度添加到 200  $\mu\text{g/mL}$  时, 不仅可以钝化毒素的影响, 还可以促进 R31 的生物被膜形成。由于 Mn 离子还是植物重要的抗病酶 Mn-SOD 的辅基, 参与植物对超氧阴离子自由基的清除, 因此 Mn 离子具有协助 R31 在发病地块防控镰刀菌病害的潜力。但 Mn 离子过量使用后容易造成对作物的伤害, 其作为枯草芽胞杆菌 R31 的增效剂还需要进一步验证。

## 参 考 文 献

- [1] 陈楠, 潘晓静, 姚远, 等. 东北地区玉米茎腐病镰孢菌 EF1 区基因序列分析鉴定[J]. 玉米科学, 2015, 23(4): 143-148.
- [2] 喻国辉, 程萍, 王燕翎, 等. 一株香蕉枯萎病生防芽胞杆菌的鉴定、生物学特性和抗菌谱研究[J]. 中国农学通报, 2010, 26(12): 216-220.
- [3] 黎永坚, 程萍, 喻国辉, 等. 枯草芽胞杆菌 R31 和 TR21 菌株防治香蕉枯萎病田间药效试验[J]. 广东农业科学, 2012, 39(23): 70-72.
- [4] 陈川雁, 王燕, 喻国辉, 等. 枯草芽胞杆菌 R31 影响巴西蕉根系活性氧产生及对枯萎病的防治效果[J]. 中国生物防治学报, 2017, 33(2): 226-233.
- [5] 李荣, 程萍, 喻国辉, 等. 枯草芽胞杆菌 R31 在香芽蕉根部的定殖能力测定[J]. 广东农业科学, 2012, 38(24): 59-61.
- [6] 赵志国, 李一平, 喻国辉, 等. 枯草芽胞杆菌 R31 施用对中粉 1 号粉蕉根际微生物的影响[J]. 广东农业科学, 2014(17): 83-87, 105.
- [7] Bais H P, Fall R, Vivanco J M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production[J]. *Plant Physiology*, 2004, 134(1): 307-319.
- [8] 郭庆港, 吴园园, 李社增, 等. *ywb* 基因对枯草芽胞杆菌 NCD-2 菌株生物膜形成和根际定殖能力的影响[J]. 植物保护学报, 2013, 40(1): 45-50.
- [9] Rudrappa T, Czymmek K J, Pare P W, et al. Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria[J]. *Plant Physiology*, 2008, 148(3): 1547-1556.
- [10] Beauregard P B, Chai Y, Vlamakis H, et al. *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(17): 1621-1630.
- [11] Rudrappa T, Quinn W J, Stanley-Wall N R, et al. *Arabidopsis thaliana* root surface chemistry regulates in planta biofilm formation of *Bacillus subtilis*[J]. *Plant Signal and Behavior*, 2007, 2(5): 349-350.
- [12] Rudrappa T, Quinn W J, Stanley-Wall N R, et al. A degradation product of the salicylic acid pathway triggers oxidative stress resulting in down-regulation of *Bacillus subtilis* biofilm formation on *Arabidopsis thaliana* roots[J]. *Planta*, 2007, 226(2): 283-297.
- [13] Stefanic P, Kraigher B, Lyons N A, et al. Kin discrimination between sympatric *Bacillus subtilis* isolates[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(45): 14042-14047.
- [14] Khezri M, Jouzani G S, Ahmadzadeh M. *Fusarium culmorum* affects expression of biofilm formation key genes in *Bacillus subtilis*[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2016, 47(1): 47-54.
- [15] 樊胜南, 陈川雁, 喻国辉, 等. 井冈霉素 A 对枯草芽胞杆菌 R31 生长和生物被膜形成的影响[J]. 广东农业科学, 2018, 45(9): 96-102.
- [16] 姚艳平. 枯萎病菌镰刀菌酸的产生和钝化及生物活性测定的研究[D]. 太原: 山西农业大学, 2002.
- [17] 刘开军, 罗少波, 王亚琴, 等. 镰刀菌毒素对植物形态和结构的影响[J]. 中国农学通报, 2010, 26(4): 53-56.
- [18] Wang H, Ng T B. Pharmacological activities of fusaric acid (5-butylpicolinic acid)[J]. *Life Sciences*, 1999, 65(9): 849-856.
- [19] 李梅婷, 严琰, 张绍升. 香蕉枯萎病菌及其粗毒素对香蕉的致病性比较[J]. 热带作物学报, 2010, 31(3): 446-452.
- [20] 许文耀, 兀旭辉, 林成辉. 香蕉枯萎病菌粗毒素的毒性及其模型[J]. 热带作物学报, 2004, 25(4): 25-29.
- [21] 曹永军, 程萍, 喻国辉, 等. 香蕉枯萎病菌菌株致病力分化及其原因研究[J]. 热带作物学报, 2011, 32(8): 1532-1536.
- [22] 漆艳香, 张欣, 蒲金基, 等. 10 种化合物对香蕉枯萎病菌的抑菌作用及对毒素钝化的效果[J]. 果树学报, 2007, 25(1): 78-82.
- [23] 姬华伟, 郑青松, 董鲜, 等. 铜、锌元素对香蕉枯萎病的防治效果与机理[J]. 园艺学报, 2012, 39(6): 1064-1072.
- [24] Thangavelu R, Palaniswami A, Ramakrishnan G, et al. Involvement of fusaric acid detoxification by *Pseudomonas fluorescens* strain Pf10 in the biological control of *Fusarium* wilt of banana caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*[J]. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 2001, 108(5): 433-445.
- [25] 黎永坚, 杨紫红, 陈远凤, 等. 香蕉枯萎病菌粗毒素对地衣芽胞杆菌生长和培养液上清蛋白组成的影响[J]. 微生物学通报, 2009, 36(12): 1826-1831.
- [26] Shemesh M, Chai Y. A combination of glycerol and manganese promotes biofilm formation in *Bacillus subtilis* via histidine kinase KinD signaling[J]. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(12): 2747-2754.
- [27] Mhatre E, Gallegos-Monterrosa R, Kuipers O P, et al. The impact of manganese on biofilm development of *Bacillus subtilis*[J]. *Microbiology*, 2016, 162(8): 1468-1478.
- [28] 李一平, 沈汉国, 喻国辉, 等. 一种芽胞杆菌生物被膜形成缺陷培养基的研究[J]. 广东农业科学, 2016, 43(9): 98-104.
- [29] Hamon M A, Lazazzera B A. The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*[J]. *Molecular Microbiology*, 2001, 42(5): 1199-1209.
- [30] 唐启义. DPS<sup>®</sup>数据处理系统: 实验设计、统计分析及数据挖掘(第 2 版)[M]. 北京: 科学出版社, 2010.
- [31] Lopez D, Vlamakis H, Kotler R. Generation of multiple cell types in *Bacillus subtilis*[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2009, 33(1): 152-163.



- [32] Murray E J, Kiley T B, Stanley-Wall N R. A pivotal role for the response regulator DegU in controlling multicellular behavior[J]. *Microbiology*, 2009, 155(1): 1-8.
- [33] Kobayashi K, Iwano M. BslA(YuaB) forms a hydrophobic layer on the surface of *Bacillus subtilis* biofilms[J]. *Molecular Microbiology*, 2012, 85(1): 51-66.
- [34] Eisenstadt E, Fisher S, Der C L, *et al.* Manganese transport in *Bacillus subtilis* W23 during growth and sporulation[J]. *Journal of Bacteriology*, 1973, 113(3): 1363-1372.
- [35] Fisher S, Buxbaum L, Toth K, *et al.* Regulation of manganese accumulation and exchange in *Bacillus subtilis* W23[J]. *Journal of Bacteriology*, 1973, 113(3): 1373-1380.
- [36] Oh Y K, Freese E. Manganese requirement of phosphoglycerate phosphomutase and its consequences for growth and sporulation of *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1976, 127(2): 739-746.
- [37] Akrigg A. Purification and properties of a manganese-stimulated deoxyribonuclease produced during sporulation of *Bacillus subtilis*[J]. *The Biochemical Journal*, 1978, 172(1): 69-76.
- [38] Vasantha N, Freese E. The role of manganese in growth and sporulation of *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of General Microbiology*, 1979, 112(2): 329-336.
- [39] Guedon E, Moore C M, Que Q, *et al.* The global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to manganese involves the MntR, Fur, TnrA and  $\sigma$ B regulons[J]. *Molecular Microbiology*, 2003, 49(6): 1477-1491.