

内生解淀粉芽孢杆菌 BEB17 脂肽类和聚酮类化合物的抑菌活性分析

桑建伟^{1,2}, 杨扬², 陈奕鹏², 蔡吉苗², 陆翠梅², 黄贵修^{2*}

(¹海南大学热带农林学院,海口 570228;²中国热带农业科学院环境与植物保护研究所/农业部热带作物有害生物综合治理重点实验室/海南省热带农业有害生物监测与控制重点实验室,海口,571101)

摘要: BEB17 是本实验室从健康香蕉植株根部中分离得到的一株具有较强抑制真菌活性的内生解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)。在本研究中,我们通过 PCR 检测多个脂肽类和聚酮类化合物的合成相关基因,并结合基质协助激光解吸附离子化-飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 和液相色谱-质谱联用 (LC-MS) 分析,发现该菌株能产生表面活性素 Surfactin、泛革素 Fengycin 和伊枯草菌素 Iturin 三类脂肽类化合物以及 Bacillibactin、Difficidin 和 Bacillaene 三类聚酮类化合物。通过比较两种发酵培养基 (M9 和 Landy 培养基) 和两种提取方法 (酸沉淀法和大孔树脂抽提法),结果发现酸沉淀法提取较为高效, Landy 培养基更易于 BEB17 脂肽类和聚酮类化合物的发酵。活性检测表明,两种提取方法提取的粗提物对香蕉枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4, Foc4) 都具有较好的抑制作用,其中大孔树脂抽提法提取的物质抑制效果最好,当其浓度为 $300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时抑制率可达 80.75%,说明该方法制备的粗提物的活性物质含量相对较高。进一步研究表明,该提取物能引起 Foc4 菌丝膨大和畸形,并抑制其孢子萌发。分析表明,该提取物对 Foc4 细胞膜具有破坏作用。

关键词: 内生解淀粉芽孢杆菌; 脂肽类化合物; 聚酮类化合物; 抑菌活性

Antibacterial activity analysis of lipopeptide and polyketide compounds produced by endophytic bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* BEB17

SANG Jian-wei^{1,2}, YANG Yang², CHEN Yi-peng², CAI Ji-miao², LU Cui-mei², HUANG Gui-xiu^{2*} (¹Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou 570228, China; ²China Environment and Plant Protection Institute, CATAS/Key Laboratory of Integrated Pest Management on Tropical Crops, Ministry of Agriculture/Hainan Key Laboratory for Monitoring and Control of Tropical Agricultural Pests, Haikou 571101, China)

Abstract: The strain BEB17 is an endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the roots of healthy banana plants in our laboratory, which can produce volatile gases with inhibitory activity against many pathogenic fungi. In this study, we found this strain contained the genes encoding the synthesis of multiple lipopeptide and polyketide compounds via PCR amplification. In agreement, this strain did produce several known bioactive compounds, including Surfactin, Sufengycin, Iturin, Bacillibactin, Difficidin and Bacillaene, identified by using MALDI-TOF-MS and LC-MS. By comparing the two fermentation medium (M9 and Landy medium) and two extraction methods (acid precipitation and macroporous resin extraction), we show that the acid precipitation method is more efficient, and Landy medium is more prone for fermentation of lipopeptide and polyketide by the strain BEB17. The activity tests showed that the crude extracts from two extraction methods

收稿日期: 2017-11-13; 修回日期: 2017-12-08; 网络出版时间: 2017-12-11

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2184.S.20171211.0852.001.html>

基金项目: 国家重点研发计划子课题 (2017YFD0202104); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (NO.2016hzsLJ020); 农业部现代农业人才支撑计划项目 (0316001)

通讯作者: 黄贵修, 博士, 研究员, 主要从事热带植物病理学研究; E-mail: hgxiu@vip.163.com

第一作者: 桑建伟, 硕士, 研究方向为热带内源微生物收集评价与利用; E-mail: 859422121@qq.com。

described above had a good inhibitory effect on banana fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4, Foc4). Furthermore, the crude extracts from macroporous resin extraction method display the best inhibitory effect compared to other treatments. When the concentration is $300 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, the inhibition rate can reach 80.75%. This shows that this method of crude extract prepared by the active substance content is relatively higher. The further research shows that it can cause the mycelium of Foc4 swelling and deformity, and inhibit its spore germination. In addition, the Foc4 cell membrane were damaged by trypan blue staining.

Key words: Endophytic *Bacillus amyloliquefaciens*; lipopeptide; polyketide; antibacterial activity

中图分类号: S432.1

文献标识码: A

文章编号: 0412-0914(2018)03-0402-11

植物内生细菌(endophytic bacteria)是指能够定殖在植物细胞间隙或细胞内,并与寄主植物建立和谐联合关系的一类微生物。然而植物体内存在一类有益植物内生细菌,能够有效防治植物病害、促进寄主植物生长、提高其对环境的适应性、产生多种抑菌物质和诱导其系统抗性等,从而提高寄主植物的抗病性^[1]。其中内生解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)因其生长速度快、营养需求简单、具有较好的抗逆性、易于在植物体表面定殖与繁殖、抑菌谱广、对环境无污染等优点被作为重要的微生物资源广泛应用于植物病害的防治,备受植物病害生物防治研究者的关注^[2]。

解淀粉芽孢杆菌属于芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.),与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)亲缘性很高,具有广谱抑菌活性,可以产生多种抑菌物质。其主要包括抑菌蛋白、脂肽类物质和聚酮化合物等,一般通过2种途径:分别在非核糖体肽合成酶(NRPS)和聚酮合酶(PKS)的组织下合成的。其中,通过非核糖体途径合成的脂肽类物质主要包括表面活性素 Surfactin、伊枯草菌素 Iturin 和泛革素 Fengycin 三类^[3];通过在聚酮合酶组织下合成的聚酮类化合物主要包括 macrolactin、bacillaene 和 difficidin 等^[4],这些产物在防治植物病害中起着重要作用^[5]。如 Koumoutsi 等^[6]和 Chen 等^[7]研究发现解淀粉芽孢杆菌 FZB42 产生的脂肽类物质可抑制病原真菌的生长;产生的聚酮化合物对由欧文氏菌(*Erwinia amylovora*)引起的梨火疫病具有防治效果。Zhao 等^[8]研究发现泛革素能够抑制真菌的生长,但对尖孢镰刀菌的形态和细胞结构没有显著影响。Zhao 等^[9]研究认为 *B. subtilis* SG6 产生的泛革素和表面活性素对禾谷镰刀菌的生长具有抑制作用。

BEB17 是从健康香蕉植株根部分离得到的一株内生解淀粉芽孢杆菌,前期研究发现,该菌株具有

较强的广谱抑菌活性,其产生的多种挥发性抑菌物质,能抑制尖孢镰刀菌 Foc4 的菌丝生长和孢子萌发(另文发表)。本研究通过提取分析菌株 BEB17 的脂肽类和聚酮类化合物,并进一步探究其对 Foc4 的抑菌作用,从而解析菌株 BEB17 的抑菌机制,为香蕉枯萎病生防制剂的研发提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 供试菌株 内生解淀粉芽孢杆菌 BEB17、香蕉枯萎病菌尖孢镰刀菌古巴专化型 4 号生理小种(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4)菌株 Foc4 均由中国热带农业科学院环境与植物保护研究所提供。

1.1.2 培养基和试剂 LB 和 PDA 培养基参照文献[10]的配制,分别用于细菌和真菌的培养;Landy 培养基^[11]和 M9 培养基^[12]用于内生细菌 BEB17 脂肽类和聚酮类化合物的发酵收集。引物(见表1)均由华大基因股份有限公司合成;PCR 扩增反应所需 Taq 酶、dNTP 等试剂购于 TAKARA 公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 仪器设备 Bio-Rad T100 型 PCR 仪;Fire Read 型凝胶成像仪;Labconco 4.5L 型真空冷冻干燥机;热电 LYNX6000 型高速冷冻离心机;Agilent 1100 高效液相色谱仪和 Agilent 6410 三重串联四级杆质谱仪;基质协助激光解吸离子化-飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)。

1.2 实验方法

1.2.1 内生细菌 BEB17 脂肽类和聚酮类化合物合成相关基因的检测 参照 Alvarez 和 Arguelles-Arias 等的方法^[13,14]设计 *bmyA*、*fenA*、*ituC*、*srfAA*、*beaS*、*bacA*、*dfnA* 和 *dhbA* 这八对脂肽类和聚酮类

Table 1 The genes and primer sequences used in the study

Lipopeptides and polyketides	Gene	Primer	Sequence (5'-3')	PCR program
BacillomycinD	<i>bmyA</i>	BmyA-F	AAAGCGGCTCAAGAAGCGAAACCC	94°C 10 min; 94°C 45 s, 62°C 45 s, 72°C 2 min, 34 cycles; 72°C 10 min
		BmyA-R	CGATTCAGCTCATCGACCAGGTAGGC	
Fengycin	<i>fenA</i>	FenA-F	AAGAGATTCAGTAAGTGGCCATCCAG	94°C 10 min; 94°C 45 s, 62°C 45 s, 72°C 2 min, 34 cycles; 72°C 10 min
		FenA-R	CGCCCTTTGGGAAGAGGTGC	
Iturin	<i>ituC</i>	ItuC-F	AGGATCCAAGCGTGCCTTTTACGGGAAA	94°C 10 min; 94°C 45 s, 60°C 45 s, 72°C 2 min, 34 cycles; 72°C 10 min
		ItuC-R	AAAAAGCTTAATGACGCCAGCTTTCTCTT	
Surfactin	<i>srfA</i>	SrfAA-F	AAAGGATCCAGCCGAAGGGTGTTCATGGT	94°C 10 min; 94°C 45 s, 60°C 45 s, 72°C 2 min, 34 cycles; 72°C 10 min
		SrfAA-R	AAAAAGCTTGTTTTTCTCAAAGAACCAGCG	
Bacilysin	<i>bacA</i>	BacA-F	GTGAAGGCCGTACTTTTGTCTGGC	94°C 10 min; 94°C 45 s, 62°C 45 s, 72°C 2 min, 34 cycles; 72°C 10 min
		Bac-R	GGGGGGAAATACAGCTTCAGGGC	
Bacillaene	<i>beaS</i>	BeaS-F	CGAAAAGCTCTTCGACCGCCGTC	94°C 10 min; 94°C 45 s, 66°C 45 s, 72°C 2 min, 34 cycles; 72°C 10 min
		BeaS-R	CTCTCGTGCCGTCGGAATATCCGC	
Difficidin	<i>dfnA</i>	DfnA-F	GGTGCGGCATGAAGATTTGAGATCACCG	94°C 10 min; 94°C 45 s, 65°C 45 s, 72°C 2 min, 34 cycles; 72°C 10 min
		DfnA-R	GGAGAGCACTTCAATCCGACGTTGACC	
Bacillibactin	<i>dhbA</i>	DhbA-F	CGCTAAAGTAGCGCCCATCAACGC	94°C 10 min; 94°C 45 s, 66°C 45 s, 72°C 2 min, 34 cycles; 72°C 10 min
		DhbA-R	CCGCGATGGAGCGGGATTATCCG	

化合物合成相关基因的特异性引物(引物序列和反应程序见表1)对内生细菌 BEB17 的基因组 DNA 进行扩增,电泳检测 BEB17 基因组中相关脂肽类和聚酮类化合物合成基因。

1.2.2 内生细菌 BEB17 脂肽类和聚酮类粗提物的提取 分别采用酸沉淀法和大孔树脂抽提法提取 BEB17 发酵液中的脂肽类和聚酮类化合物。①参考 Yang 等的酸沉淀法^[15]:使用 200 mL M9 和 Landy 培养基发酵拮抗内生细菌 BEB17, 30°C, 180 r·min⁻¹摇床培养 48 h, 8 000 r·min⁻¹离心收集上清。发酵液上清用 6 mol·L⁻¹ HCl 调 pH 至 2.0, 4°C 过夜离心收集沉淀;向沉淀中加入 $\frac{1}{20}$ 体积的甲醇,调 pH 至 7.0,充分溶解后离心取上清;真空冷冻干燥机冷冻干燥抽提物,称重后用甲醇溶液溶解制成 10 mg·mL⁻¹粗提物母液备用。②参考 Feng 的大孔树脂抽提法^[16]:使用 200 mL M9 和 Landy 培养基发酵内生细菌 BEB17, 30°C, 180 r·min⁻¹摇床培养 48 h, 8 000 r·min⁻¹离心收集上清。向发酵液上清加入 10 mL 处理好的 XAD-16 大孔树脂,在磁力搅拌器上缓慢搅拌过夜,滤纸过滤液体。使用纯水洗涤树脂 2 次后,再用无水甲醇洗脱树脂。收集的洗脱液用真空冷冻干燥机冷冻干燥,称重后用甲醇溶液溶解制成 10 mg·mL⁻¹粗提物母液备用。

1.2.3 内生细菌 BEB17 脂肽类和聚酮类化合物的种类分析 利用基质协助激光解吸附离子化-飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)和液相色谱-质谱联用(LC-MS),分析菌株 BEB17 发酵产生的脂肽类和聚酮类化合物的种类。MALDI-TOF-MS 具体方法参照 Ongena 等^[17],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,将提取的粗提物母液与无水甲醇 50 倍稀释混匀,置于仪器离子源进行测定。质量扫描范围为 900~2 000 Da。液相色谱条件:色谱柱为 Agilent ZORBAX Extend-C₁₈ 色谱柱(150 mm×2.1 mm, 2.7 μ m),流速为 0.3 mL·min⁻¹;流动相 A 为 0.1%甲酸乙腈-甲酸水(30:70);流动相 B 为甲醇;进样量 20 μ L;洗脱程序:0 min, 60% B; 60 min, 100% B; 65 min, 60% B。质谱条件:ESI (+/-)、干燥气温度 350°C、干燥气流速 8 L·min⁻¹、雾化气压力 30 psig、Fragmentor 175 v、Collision Energy 100 v、Skimmer 65 v、扫描方式 auto MS/MS;离子扫描范围:100~2 000 m·z⁻¹^[18]。

1.2.4 内生细菌 BEB17 脂肽类和聚酮类粗提物对 Foc4 菌丝生长的抑制作用 尖孢镰刀菌 Foc4 经平板活化后,在 PDA 平板上 28°C 培养 3 d,用打孔

器在菌落边缘打取直径 5 mm 的菌饼备用。向溶化后的 50 mL PDA 中分别加入梯度稀释后的粗提物并使其终浓度分别为 10、50、100、200、300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 将其倒入培养皿(90 mm)中制成带毒平板, 冷却平板后接种 Foc4 菌饼, 以无毒 PDA 平板接种 Foc4 菌饼作为空白对照, 以只加无水甲醇作为溶剂对照, 重复 3 次。7 d 后观察病原菌生长情况, 并采用十字交叉法测定其菌落直径并依据以下公式计算抑制率: 抑制率(%) = (对照菌落直径 - 处理菌落直径) / (对照菌落直径 - 菌饼直径) $\times 100$ 。

1.2.5 内生细菌 BEB17 脂肽类和聚酮类粗提物对 Foc4 孢子萌发的抑制作用 将 Foc4 在 PDA 液体培养基中 28°C , $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养 7 d 后用无菌滤纸过滤除去菌丝, 制成浓度为 $10^7\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的孢子悬浮液, 并将其梯度稀释成 $10^3\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 使用。带毒平板的制备方法同 1.2.3。在带毒平板上涂布 100 μL Foc4 孢子悬浮液, 以无毒 PDA 平板涂布 Foc4 孢子悬浮液作为空白对照, 以只加无水甲醇作为溶剂对照。进行 3 次重复, 28°C 培养 3 d, 统计孢子萌发数, 并依据以下公式计算孢子萌发抑菌率: 抑菌率(%) = (对照孢子萌发数 - 处理孢子萌发数) / 对照孢子萌发数 $\times 100$ 。

1.2.6 内生细菌 BEB17 脂肽类和聚酮类粗提物对 Foc4 菌丝的影响 参照 1.2.3 的方法, 使用不同浓度的带毒平板处理 Foc4 菌株 7 d 后, 挑取菌落边缘菌丝, 以未经处理的正常菌丝为空白对照, 以溶剂无水甲醇处理的菌丝为溶剂对照, 0.04% 台盼蓝染色 10 min 后, 使用显微镜观察菌丝形态及染色

情况。

2 结果与分析

2.1 内生细菌 BEB17 脂肽类和聚酮类化合物合成相关基因的检测

如图 1 所示, 以内生细菌 BEB17 和解淀粉芽孢杆菌 FZB42 的基因组 DNA 为模板, 可以扩增到 BacillomycinD 合成基因 *bmyA*、Fengycin 合成基因 *fenA*、Iturin 合成基因 *ituC*、Surfactin 合成基因 *srfA*、Bacilysin 合成基因 *bacA*、Bacillaene 合成基因 *beaS*、Difficidin 合成基因 *dfnA* 和 Bacillibactin 合成基因 *dhbA*。结果表明, 菌株 BEB17 基因组 DNA 中含有上述 8 种脂肽类和聚酮类化合物合成基因。

2.2 内生细菌 BEB17 脂肽类和聚酮类粗提物的提取

分别采用酸沉淀法和大孔树脂抽提法对使用 M9 和 Landy 培养基发酵的内生解淀粉芽孢杆菌 BEB17 发酵液进行提取脂肽类和聚酮类化合物, 通过冷冻干燥后获得其粗提物(粗提物的含量见表 2), 用甲醇溶液溶解制成 $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 粗提物母液备用。从表 2 可得出, 同种培养基发酵条件下, 采用酸沉淀法提取内生细菌 BEB17 脂肽类和聚酮类粗提物的量远多于采用大孔树脂(XAD-16)抽提法提取的量; 采用同种方法提取脂肽类和聚酮类粗提物, 使用 Landy 培养基发酵提取的量要比 M9 培养基发酵提取的多。

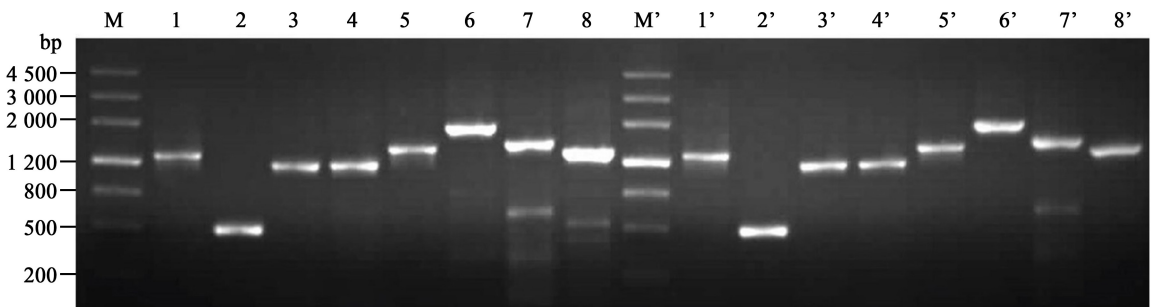


Fig. 1 The PCR detection of lipopeptide and polyketide compounds synthesis gene

M:Marker III; 1-8: *srfA*, *ituC*, *bmyA*, *bacA*, *fenA*, *dfnA*, *beaS* and *dhbA* of the strain

FZB42; 1' -8': *srfA*, *ituC*, *bmyA*, *bacA*, *fenA*, *dfnA*, *beaS* and *dhbA* of the strain BEB17.

Table 2 The amount of lipopeptide and polyketide compounds by different methods and mediums by endogenous bacteria BEB17

Endogenous bacteria	Medium	Extraction amount of acid precipitation method/mg	Extraction amount of macroporous resin extraction method/mg
BEB17	M9	92A	62C
	Landy	245B	141D

Note: Values followed by different letters mean significant at 0.01 level.

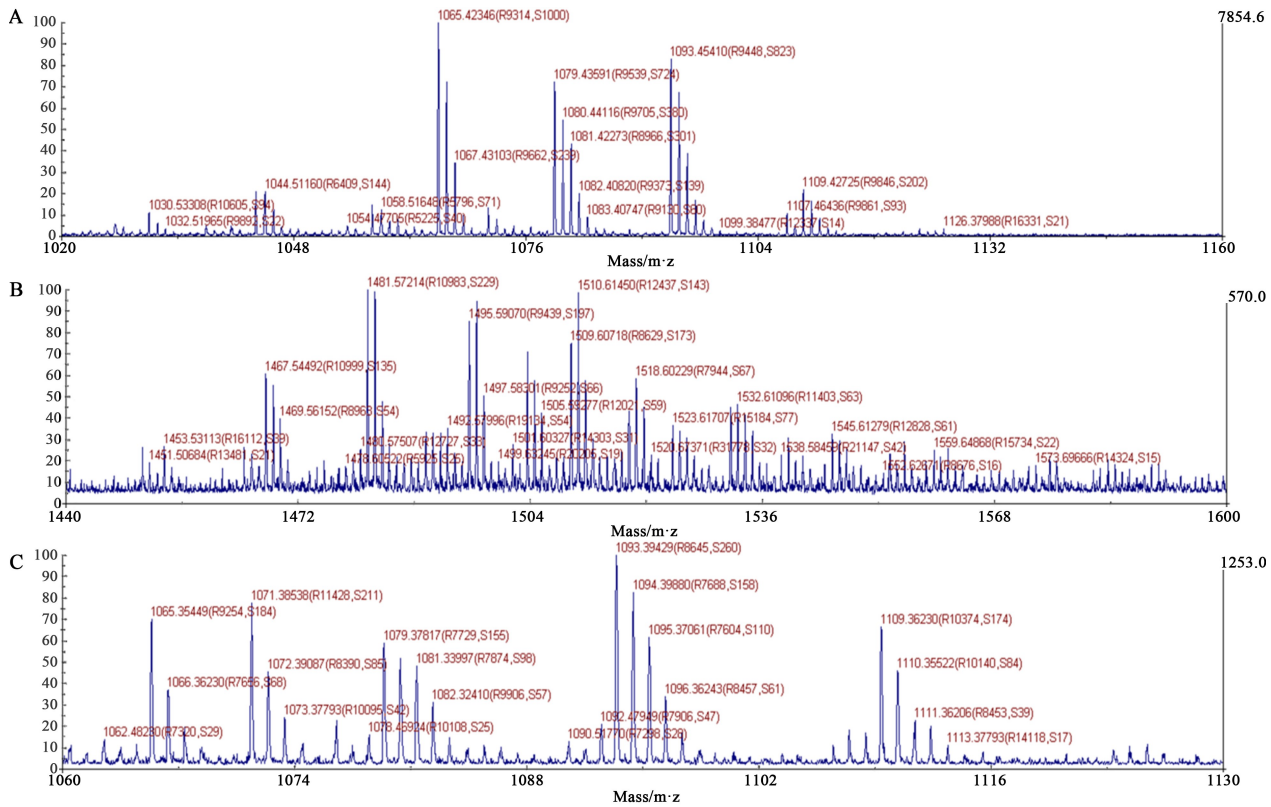


Fig. 2 MALDI-TOF-MS analysis of lipopeptide compounds by strain BEB17

A: Surfactin; B: Fengycin; C: Iturin.

2.3 内生细菌 BEB17 脂肽类和聚酮类化合物的种类分析

分别对提取的脂肽类和聚酮类物质粗提物进行 MALDI-TOF-MS 质谱分析和 LC-MS 分析(图 2 和图 3), 结果显示: 菌株 BEB17 在 m/z 值为 1 030.53、1 044.51 和 1 058.51 处有离子峰(簇)出现, 这 3 个离子峰均对应于表面活性素的质量(图 2-A); 在 m/z 值为 1 453.53、1 467.54、1 481.57、1 495.59、1 510.61、1 523.61 和 1 538.58 处有离子

峰(簇)出现, 这些离子峰均对应于泛草素的质量(图 2-B); 在 m/z 值为 1 065.35、1 070.38 和 1 079.37 处有离子峰(簇)出现, 这 3 个离子峰均对应于伊枯草菌素的质量(图 2-C)。菌株 BEB17 在 m/z 值为 881.44 处有离子峰(簇)出现, 这个离子峰对应于 Bacillibactin 的质量(图 3-A); 在 m/z 值为 583.40 处有离子峰(簇)出现, 这个离子峰对应于 Bacillaene 的质量(图 3-B) 在 m/z 值为 559.19、559.47 和 560.21 处有离子峰(簇)出现, 这 3 个离

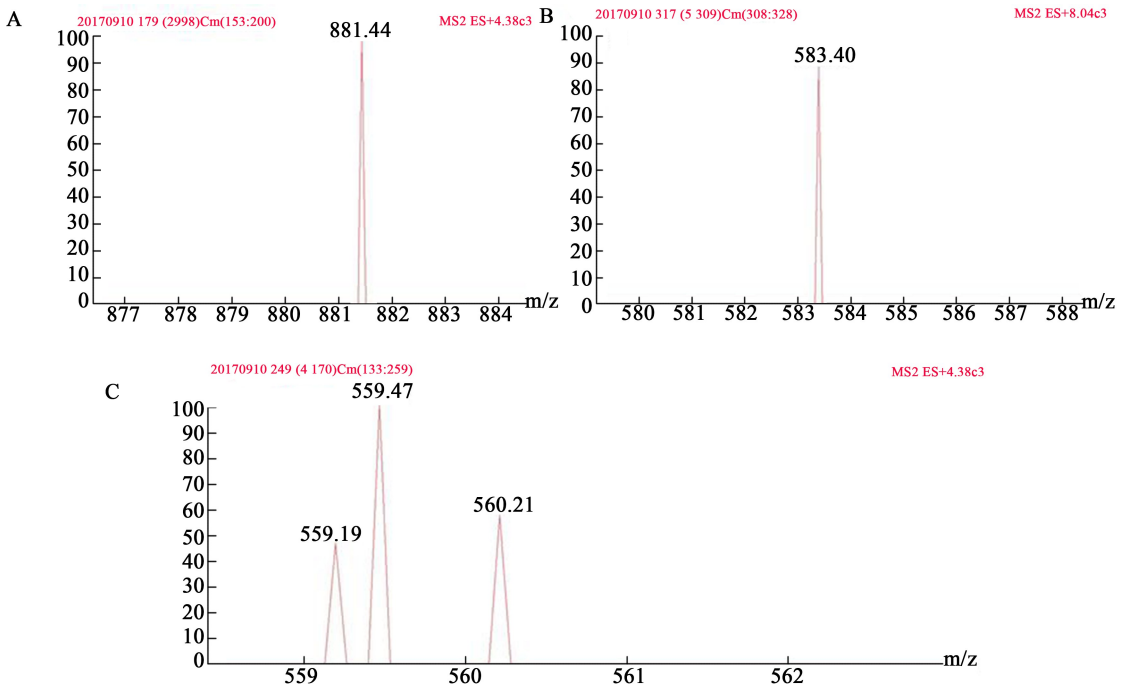


Fig. 3 LC-MS analysis of polyketide compounds by strain BEB17

A: Bacillibactin; B: Bacillaene; C: Difficidin.

子峰均对应于 Difficidin 的质量(图 3-C)。通过 MALDI-TOF-MS 质谱图和 LC-MS 质谱图分析表明,菌株 BEB17 发酵液中含有脂肽类化合物泛革素、表面活性素和伊枯草菌素以及聚酮类化合物 Bacillibactin、Bacillaene 和 Difficidin。

2.4 内生细菌 BEB17 的脂肽类和聚酮类粗提物对 Foc4 菌丝生长的抑制作用

内生解淀粉芽孢杆菌 BEB17 脂肽类和聚酮类粗提物对香蕉枯萎病原菌 Foc4 具有较强的平板抑制作用,能够显著抑制香蕉枯萎病原菌菌丝的生长(表 3 和图 4)。结果表明,使用同种培养基发酵、同一浓度条件下,采用大孔树脂抽提法提取内生细菌 BEB17 的脂肽类和聚酮类粗提物对 Foc4 的抑制效果远高于酸沉淀法;采用相同方法提取的粗提物,在同一浓度条件下,使用 Landy 培养基发酵获得的粗提物对 Foc4 的抑制效果要优于 M9 培养基。其中采用大孔树脂抽提法提取 Landy 培养基发酵 BEB17 中的粗提物对 Foc4 的抑制作用最强,采用酸沉淀法提取 M9 培养基发酵 BEB17 中的粗提物对 Foc4 的抑制效果最弱;当粗提物终浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时对 Foc4 的菌丝生长开始有抑制作用,而当粗

提物终浓度为 $300 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时几乎可完全抑制 Foc4 菌丝的生长,抑制率可达 80.75%;溶剂甲醇对 Foc4 无显著抑制作用($P>0.05$)。

2.5 内生细菌 BEB17 的脂肽类和聚酮类粗提物对 Foc4 孢子萌发的抑制作用

采用带毒平板法测定 BEB17 产生的脂肽类和聚酮类粗提物对 Foc4 孢子萌发的抑制作用。结果表明(图 5 和表 4),经 BEB17 的脂肽类和聚酮类粗提物处理后,可显著抑制 Foc4 孢子在 PDA 平板上的萌发,而空白对照(2.72×10^8)和溶剂对照(2.64×10^8)在孢子萌发数量上无显著差异($P>0.05$),说明溶剂无水甲醇对 Foc4 的孢子萌发无显著影响。在同一浓度条件下,使用同种培养基发酵,采用大孔树脂抽提法提取的粗提物对 Foc4 孢子萌发的抑制作用最强;采用同一提取方法提取粗提物,使用 Landy 培养基发酵提取的粗提物对 Foc4 孢子萌发的抑制作用最强。随着粗提物的终浓度不断升高,其对 Foc4 孢子萌发的抑制作用也在不断地加强,其中粗提物的终浓度为 $300 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,采用大孔树脂抽提法提取的粗提物可使 Foc4 的孢子不萌发。

Table 3 The inhibitory rate of different concentrations of lipopeptide and polyketide compounds extracts by BEB17 against *Foc4*

Fermentation medium and extraction method	Inhibitory rate/%				
	10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
Acid precipitation method (M9 medium)	2.45±0.61b	5.14±0.61b	12.27±0.61b	17.79±1.22c	41.72±0.61d
Acid precipitation method (Landy medium)	3.25±0.62b	6.38±1.23b	15.43±0.62b	38.89±0.62b	61.73±1.24c
XAD-16 extraction method (M9 medium)	13.50±0.61a	25.77±0.61a	40.49±3.07a	65.03±0.61a	74.23±0.01b
XAD-16 extraction method(Landy medium)	17.39±1.86a	28.57±0.62a	39.51±0.62a	67.08±0.62a	80.75±0.62a

Note: Values followed by different letters mean significant at 0.05 level.

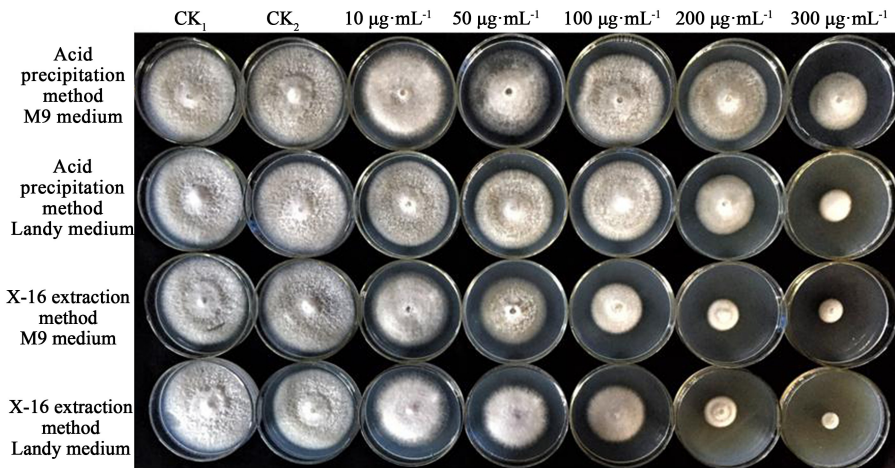


Fig. 4 The antimicrobial activity of different concentrations of lipopeptide and polyketide compounds extracts by BEB17 against *Foc4*

CK₁: Blank control (PDA); CK₂: Solvent control (PDA+ Anhydrous methanol).

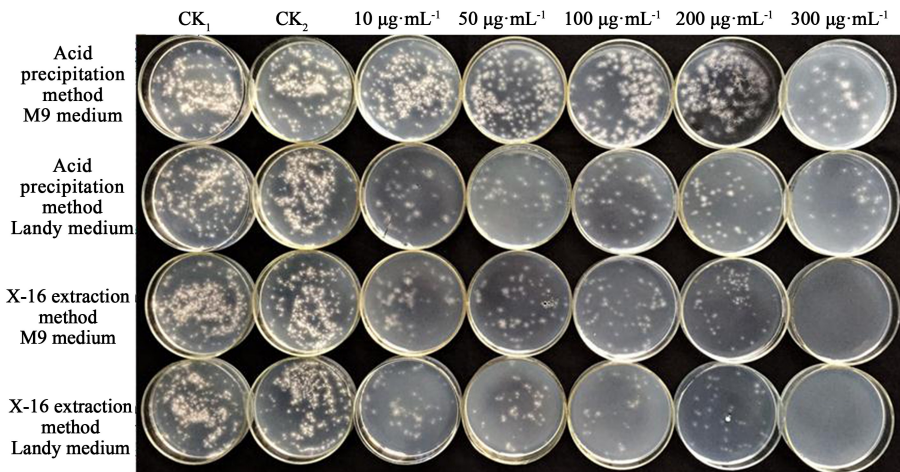


Fig. 5 The antimicrobial inhibition of different concentrations of lipopeptide and polyketide compounds extracts by BEB17 on the spore germination counts of *Foc4*

CK₁: Blank control (PDA); CK₂: Solvent control (PDA+ Anhydrous methanol).

2.5 内生细菌 BEB17 的脂肽类和聚酮类粗提物对 Foc4 菌丝的影响

尖孢镰刀菌 Foc4 菌丝经内生解淀粉芽孢杆菌 BEB17 的脂肽类和聚酮类粗提物处理后,采用台盼蓝染色法对其镜检。结果表明,经粗提物处理后 Foc4 菌丝发生扭曲,膨大和畸形,其中粗提物终浓度为 $300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时对 Foc4 的影响最大, Foc4 菌丝几乎都膨大扭曲,而相应的空白对照和溶剂对照(野生型菌丝)无显著变化(图 6)。使用同种培养基发酵、同一浓度条件下,采用大孔

树脂抽提法提取内生细菌 BEB17 的粗提物在低浓度时就可使 Foc4 的菌丝膨大扭曲;采用同一提取方法提取粗提物,在同一浓度条件下,使用 Landy 培养基发酵提取的粗提物在低浓度时就可使 Foc4 的菌丝膨大扭曲。经粗提物处理后的 Foc4 菌丝通过台盼蓝染色处理后,镜检时 Foc4 菌丝均呈现蓝色,而相应的空白对照和溶剂对照(野生型菌丝)未见被染色(图 6)。说明 BEB17 脂肽类化合物的抑菌机制可能与破坏 Foc4 细胞膜相关。

Table 4 The inhibitory rate of different concentrations of lipopeptide and polyketide compounds extracts by BEB17 on the spore germination of Foc4

Fermentation medium and extraction method	Inhibitory rate/%				
	$10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
Acid precipitation method (M9 medium)	$68.49\pm 3.58\text{d}$	$76.47\pm 2.53\text{d}$	$86.88\pm 4.61\text{d}$	$88.86\pm 1.22\text{d}$	$90.92\pm 4.51\text{c}$
Acid precipitation method (Landy medium)	$84.08\pm 1.62\text{c}$	$88.53\pm 1.23\text{c}$	$96.64\pm 2.32\text{c}$	$97.13\pm 1.57\text{c}$	$97.60\pm 1.24\text{b}$
XAD-16 extraction method (M9 medium)	$88.13\pm 2.57\text{b}$	$96.37\pm 9.54\text{b}$	$97.18\pm 1.07\text{b}$	$98.33\pm 2.23\text{b}$	$100.00\pm 0.00\text{a}$
XAD-16 extraction method(Landy medium)	$88.71\pm 1.86\text{a}$	$97.27\pm 1.37\text{a}$	$98.32\pm 2.54\text{a}$	$99.17\pm 1.26\text{a}$	$100.00\pm 0.00\text{a}$

Note: Values followed by different letters mean significant at 0.05 level.

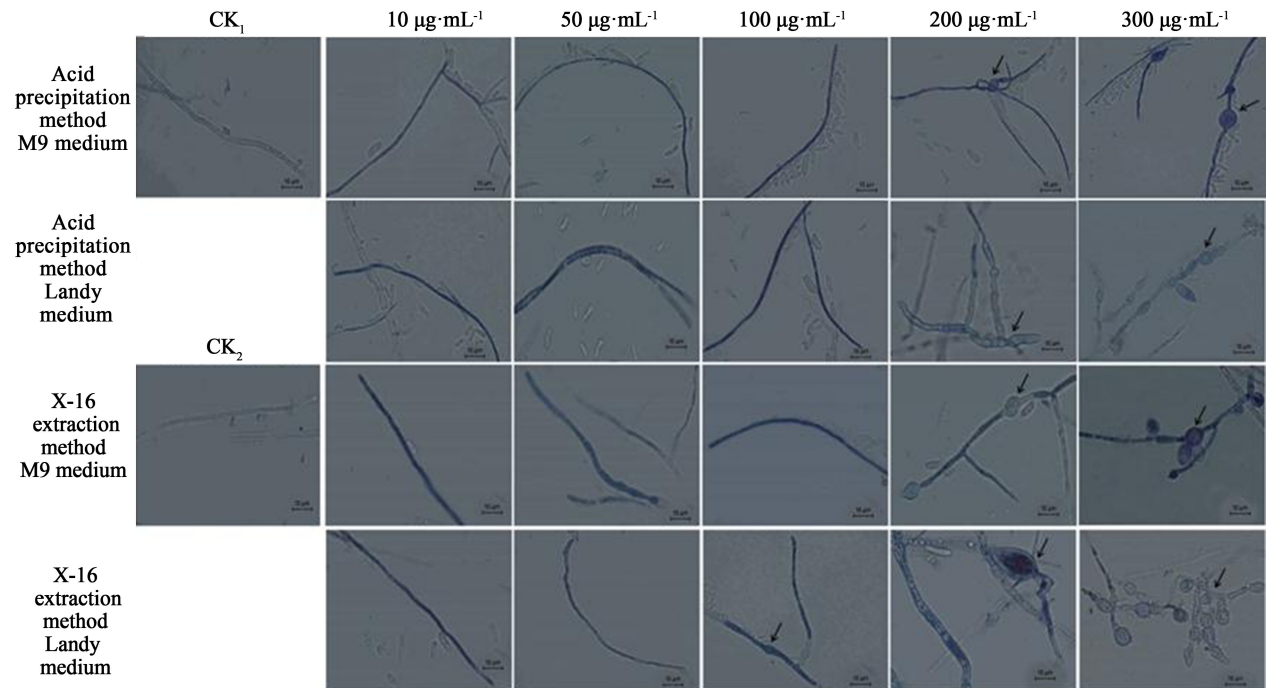


Fig. 6 The trypan blue staining after the different concentrations of lipopeptide and polyketide compounds extracts by BEB17 against Foc4

CK₁: Blank control (PDA); CK₂: Solvent control (PDA+ Anhydrous methanol).

3 结论与讨论

芽孢杆菌通过产生抗菌蛋白、脂肽类以及聚酮类物质等抑菌物质来抑制植物病原菌的生长,并且可作为根围细菌促进植物生长,因此已成为生物防治领域研究的热点之一^[19,20]。其中解淀粉芽孢杆菌主要在非核糖体肽合成酶和聚酮合酶的组织下合成的脂肽类和聚酮类物质,主要包括 Surfactin、Iturin、Fengycin、Macrolactin、Bacillaene 和 Difficidin 等^[3,4]。本研究发现解淀粉芽孢杆菌 BEB17 基因组中含有编码多种脂肽类和聚酮类化合物的相关合成基因,随后通过 MALDI-TOF-MS 和 LC-MS 分析发现菌株 BEB17 能产生 Surfactin、Fengycin 和 Iturin 三类脂肽类化合物以及 Bacillibactin、Difficidin 和 Bacillaene 三类聚酮类化合物。目前国内外对芽孢杆菌脂肽类和聚酮类物质的研究越来越广泛,多数研究者认为 Fengycin 和 Iturin 具有很强的抗真菌活性,能够对病原真菌菌丝有致畸作用并抑制孢子萌发,破坏膜结构从而导致代谢物质外泄^[21,22];而 Surfactin、Bacillibactin、Difficidin 和 Bacillaene 等具有抗细菌活性,改变细菌的表面疏水性,破坏生物膜完整性^[23-26]。由此推测菌株 BEB17 室内抑菌作用可能是由于产生了对病原真菌有强烈拮抗作用的 Fengycin 和 Iturin,并发现其可抑制 Foc4 菌丝生长和孢子萌发,这与前人的研究结果类似;而其产物与基因检测结果相比,可能是由于发酵条件的不同从而影响了 BacillomycinD 和 Bacilysin 的产生,也可能菌株 BEB17 基因组中缺乏 BacillomycinD 和 Bacilysin 的表达机制。

Xiang 等^[27]分离得到的 bacillomycin L,当其浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时对番茄枯萎病菌具有明显的抑制作用。Wang 等^[28]从枯草芽孢杆菌 Bv10 胞外抗菌物质中纯化到 iturin A2 和 iturin A4,对芝麻白绢病菌 (*Sclerotium rolfsii*) 的抑菌浓度 EC_{50} 分别为 36.79 和 $43.03 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。Luo 等^[29]发现枯草芽孢杆菌 Bs916 分泌的 bacillomycin L 能使病原真菌菌丝致畸和抑制孢子萌发,当其浓度为 $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,其对水稻纹枯病和苗瘟的防治效果分别为 71% 和 56%。在本研究中分离到的脂肽类和聚酮类粗提物浓度为 $300 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时可显著抑制 Foc4 菌丝的生长,其抑制率可达 80.75%;并能显著抑制其孢子萌发。

目前用于芽孢杆菌抑菌物质生产的培养基主要

有 Landy、LB、M9 等培养基^[30],用于其提取和分离的方法主要有酸沉淀法^[15]、大孔树脂抽提法^[16]、硫酸铵沉淀法^[31]、色谱法^[32]等。本研究中发现 Landy 培养基相较于 M9 培养基更易于 BEB17 脂肽类和聚酮类化合物的发酵;同等发酵条件下,采用大孔树脂抽提法提取粗提物的量少于酸沉淀法,但是同等浓度下其对 Foc4 的抑菌活性更强,推测可能是由于酸沉淀法通过物理沉淀方法,使得粗提物中含有大量不具抑菌活性的大分子物质,而大孔树脂抽提法通过吸附作用,更容易抽出发酵产物中的脂肽类、聚酮类的小分子化合物,相较酸沉淀法获得的粗提物其有效成分含量更高。

综上所述,本研究通过基因检测发现解淀粉芽孢杆菌 BEB17 基因组中具有编码多种脂肽类和聚酮类化合物的合成相关基因;通过两种发酵培养基和两种提取方法的比较,获得的脂肽类和聚酮类粗提物对 Foc4 菌丝生长和孢子萌发具有显著的抑制效果,并进一步分析了粗提物中脂肽类和聚酮类化合物的组分。通过以上研究,为菌株 BEB17 未来在菌肥及生物农药研发等生防领域的应用提供理论依据,并为进一步采用基因工程的手段改良该菌株,以及为脂肽类和聚酮类化合物调控机制的研究提供了基础。

参考文献

- [1] Bae H, Roberts D P, Lim H S, *et al.* Endophytic *Trichoderma* isolates from tropical environments delay disease onset and induce resistance against *Phytophthora capsici* in hot pepper using multiple mechanisms. [J]. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 2011, 24 (3): 336-351.
- [2] Wu Y J, Lin Y F, Lin H T, *et al.* Advances in the researches of biocontrol bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* (in Chinese) [J]. *Packaging and Food Machinery* (包装与食品机械), 2012, 30(6): 49-52.
- [3] Chen X H, Vater J, Piel J, *et al.* Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 [J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(11): 4024.
- [4] Arguellesarias A, Ongena M, Halimi B, *et al.* *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of

- plant pathogens.[J]. *Microbial Cell Factories*, 2009, 8(1):1-12.
- [5] Strieker M, Tanović A, Marahiel M A. Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics.[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2010, 20(2):234-240.
- [6] Koumoutsis A, Chen X H, Henne A, *et al.* Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in strain FZB42[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2013, 29(12):177-184.
- [7] Chen X H, Scholz R, Borriss M, *et al.* Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease[J]. *Journal of Biotechnology*, 2009, 140(1-2):38-44.
- [8] Zhao P, Quan C, Wang Y, *et al.* *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 as a potential biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae* [J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2014, 54(5):448.
- [9] Zhao Y, Selvaraj J N, Xing F, *et al.* Antagonistic action of *Bacillus subtilis* strain SG6 on *Fusarium graminearum*[J]. *Plos One*, 2014, 9(3):e92486.
- [10] Fang Z D. Research method for plant pathology (2nd Ed.) (in Chinese) [M]. Beijing: China Agriculture Press (北京: 中国农业出版社), 1998: 63.
- [11] Wei Y H, Chu I M. Enhancement of surfactin production in iron-enriched media by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 - Isolation, characterization, and its inhibition of fibrin clot formation[J]. *Enzyme & Microbial Technology*, 1998(8):724-728.
- [12] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual* (2nd ed) [M]. New York: Cold Spring Harbor, 1989.
- [13] Arguelles-Arias A, Ongena M, Halimi B, *et al.* *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. [J]. *Microbial Cell Factories*, 2009, 8(1):1-12.
- [14] Alvarez F, Castro M, Príncipe A, *et al.* The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP218 and ARP23 capable of producing the cyclic lipopeptide-surfactin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2012, 112(1):159-174.
- [15] Yang R X, Ji J H, Wang Z H, *et al.* Isolation, identification and inhibitory activity of lipopeptides of endophytic bacteria from the root of *Paeonia suffruticosa* (in Chinese) [J]. *Microbiology China (微生物学通报)*, 2015, 42(6):1081-1088.
- [16] Feng D X. Research on isolation and purification of antimicrobial peptides (in Chinese) [J]. *Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine (现代畜牧兽医)*, 2015(11):9-16.
- [17] Ongena M, Jacques P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol[J]. *Trends in Microbiology*, 2008, 16(3):115.
- [18] Yang M, Cui Y, Wu W. Content determination of mexiletine hydrochloride tablets by HPLC-MS/MS (in Chinese) [J]. *China Pharmaceuticals (中国药业)*, 2017, 26(2):35-37.
- [19] Chen X H, Koumoutsis A, Scholz R, *et al.* Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. [J]. *Nature Biotechnology*, 2007, 25(9):1007-1014.
- [20] Wang Y, Wang J, Quan C, *et al.* Purification and antifungal characterization of an antifungal substance from *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. *China Biotechnology*, 2007, 27(12):41-45.
- [21] Maget-Dana R, Peypoux F. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physico-chemical properties.[J]. *Toxicology*, 1994, 87(1-3):151.
- [22] Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions[J]. *Molecular Microbiology*, 2005, 56(4):845-857.
- [23] 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.
- [24] Deleu M, Lorent J, Lins L, *et al.* Effects of surfactin

- on membrane models displaying lipid phase separation [J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2013, 1828(2): 801-815.
- [25] Zhang J, Ren P F, Tian L, *et al.* Identification of a anti-MDRB compound from the marine-derived *Bacillus* sp. B-9987 (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Marine Drugs (中国海洋药物)*, 2016, 35(5):45-49.
- [26] Wu L, Wu H, Chen L, *et al.* Difficidin and bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 have antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* rice pathogens [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5:12975.
- [27] Xiang Y P, Zhou H F, Liu Y F, *et al.* Isolation and identification of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus amyloliquefaciens* B1619 and the inhibition of the lipopeptide antibiotics to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* (in Chinese) [J]. *Scientia Agricultura Sinica (中国农业科学)*, 2016, 49(15):2935-2944.
- [28] Wang Y. Purification and characterization of antimicrobial substances produced by *Bacillus subtilis* strain Bv10 (in Chinese) [D]. Nanning: Guangxi University (南宁:广西大学), 2013.
- [29] Luo C P, Liu Y Z, Wu H F, *et al.* Antifungal activity and rice disease biocontrol performance of lipopeptide antibiotic bacillomycin L (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Biological Control (中国生物防治学报)*, 2011, 27(1):76-81.
- [30] Landy M, Rosenman S B, Warren G H. An antibiotic from *Bacillus subtilis* active against pathogenic fungi [J]. *Journal of Bacteriology*, 1947, 54(4):24.
- [31] Ran J J, Xu J H, Hu X D, *et al.* Identification of a *Bacillus* strain producing lipopeptide and cloning of genes related to lipopeptide (in Chinese) [J]. *Food Science (食品科学)*, 2016, 37(17):127-132.
- [32] Rao Y K, Lin H Y, Wu W S, *et al.* Evaluation of HPLC and MEKC methods for the analysis of lipopeptide antibiotic iturin A produced by *Bacillus amyloliquefaciens* [J]. *International Journal of Applied Science & Engineering*, 2008, 6(2):85-96.

责任编辑:曾晓葳