

# 枯草芽孢杆菌 JA 脂肽类及挥发性物质抑菌效应的研究

陈 华 郑之明\* 余增亮

(中国科学院离子束生物工程学重点实验室 合肥 230031)

**摘要:** 枯草芽孢杆菌 JA 产生的脂肽类抗生素对植物病原真菌有广谱抗性。将发酵液经过酸沉淀、甲醇抽提以及反相高效液相色谱等步骤, 分离得到脂肽类抗生素的纯品。经 IC<sub>50</sub> 实验和抗菌谱测定, 考察了脂肽类抗生素对多种植物病原菌的作用, 确定了脂肽类抗生素的抗菌谱。深入研究表明, 枯草芽孢杆菌 JA 还产生未知成分的挥发性抑菌物质, 能够抑制灰霉病菌孢子的萌发和菌丝的生长。脂肽类抗生素和挥发性抑菌物质的协同作用, 有助于提高枯草芽孢杆菌的生物防治效果。

**关键词:** 枯草芽孢杆菌, 脂肽类抗生素, 挥发性抑菌物质

## Antagonistic Properties of Lipopeptides and Volatiles Produced by *Bacillus subtilis* JA

CHEN Hua ZHENG Zhi-Ming\* YU Zeng-Liang

(Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031)

**Abstract:** Lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* JA antagonized a broad spectrum of fungal pathogens. Crude lipopeptides were extracted with methanol from the precipitate which was obtained by adding 6 mol/L HCl to the cell-free culture broth. The crude extract was run on Diamonsil C<sub>18</sub> column (5 μm, 250 mm×4.6 mm) in reverse phase HPLC system to purify the lipopeptides. Inhibitory ability and IC<sub>50</sub> values of lipopeptides towards various microorganisms were determined by agar diffusion method. The results showed lipopeptides exhibited strong inhibitory activity against some important plant pathogenic fungi, including *R. solani* and *F. oxysporum*. The ability of *B. subtilis* JA to antagonize against the growth of the post-harvest pathogen—*B. cinerea* was tested *in vitro*. Spore germination of *B. cinerea* was strongly inhibited in the presence of JA cell suspension. Furthermore, *B. subtilis* JA can produce antifungal volatiles which strongly inhibited the spore germination and mycelial growth of *B. cinerea*. As a biocontrol agent, the synergic effect of lipopeptides and volatiles may play a major role in controlling the pathogens by *B. subtilis* JA.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*, Lipopeptides, Antifungal Volatiles

通常,生防微生物产生的水溶性抗生素是其在土壤中抑制病原菌生长的重要原因之一,而枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是土壤中一类重要的微生物,大量文献报道*B. subtilis*在防治植物根部、叶部、花部和枝干病害中均有应用。非核糖体合成的脂肽类抗生素是*B. subtilis*合成的主要抑菌物质,主要由三个家族组成,即:iturin、surfactin和fengycin<sup>[1-3]</sup>。Iturin由7个 $\alpha$ -氨基酸(A<sub>1</sub>-A<sub>7</sub>)和一个特殊的 $\beta$ -氨基脂肪酸( $\beta$ AA)形成环状结构;Surfactin是一种高效的生物表面活性剂,由一个七肽和一个 $\beta$ -羟基脂肪酸形成环状结构;Fengycin由10个氨基酸和一个 $\beta$ -羟基脂肪酸组成,其中3-Tyr和10-Ile通过内酯键形成环状结构<sup>[4]</sup>。脂肽类抗生素抗菌作用的原理是其对细胞膜结构特性的影响,通过改变细胞膜通透性抑制病原菌的生长<sup>[5-6]</sup>。

但是脂肽类的抗生素在生物防治中的应用也存在着局限性,如药效慢、药效不够稳定等,而多种防治因子的结合、相互促进、相互补充是生物防治的发展方向<sup>[7]</sup>。国外研究发现一些微生物能够产生挥发性小分子抑菌物质,如Fernando报道细菌产生的挥发性物质在防治*Sclerotinia sclerotiorum*中具有潜在的应用价值<sup>[8]</sup>;Ezra报道植物内生菌*Muscodora albus*能够产生具有广谱抗菌作用的挥发性小分子化合物<sup>[9]</sup>。而国内对细菌产生的挥发性抑菌物质的研究还未见报道。

*B. subtilis* JA是本实验室分离的一株植物病害生防菌,本文对JA的抑菌机制进行了研究,证明JA产生的脂肽类抗生素和挥发性物质都具有抑菌作用,这就提高了JA作为生防微生物开发的潜力。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

拮抗菌:枯草芽孢杆菌(*B. subtilis* JA)为本实验室自行分离;植物病原菌:水稻纹枯病(*Rhizoctonia solani*)、小麦赤霉病(*Fusarium graminearum*)、西瓜枯萎病(*Fusarium oxysporum*)、畸雌腐霉(*Pythium irregulare*)等由安徽农业大学惠赠;灰葡萄孢霉(*Botrytis cinerea*)购于中国林业菌种保藏中心(CFCC),保藏编号:6883。

### 1.2 脂肽类抗生素粗提物的制备

**1.2.1 培养基:**种子培养基(g/L):甘油10,蛋白胨20, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.5, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5, pH 7.0。发酵培养基(g/L):葡萄糖10,蛋白胨10,酵母粉5, NaCl 5,

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.5, pH 7.0。

**1.2.2 粗提物的制备:**接种一环JA菌体于30 mL种子培养基中,30℃、200 r/min培养12 h;再以10%的接种量接种于50 mL发酵培养基中,30℃、200 r/min摇床培养60 h。将发酵液在20℃、10000 ×g离心20 min去菌体,上清液用6 mol/L HCl调pH至2.0,在4℃冰箱中放置过夜。离心收集沉淀,烘干后用甲醇抽提。将抽提液减压蒸干,并用蒸馏水溶解,冷冻干燥后得粗提物。

### 1.3 反相HPLC分离纯化

用梯度洗脱分离脂肽类抗生素,色谱柱为Diamonsil, 5  $\mu$ m, 250 mm×4.6 mm C<sub>18</sub>柱,流动相A为含0.1%TFA的乙腈,B为含0.1%TFA的超纯水;检测波长214 nm;流速1 mL/min。将粗提物(溶于pH 7.6的Tris缓冲液)过柱,历经梯度洗脱的过程是60 min内A:B由30:70~80:20,在A液浓度达到50%左右收集目标产物。

### 1.4 脂肽类抗生素体外抗菌作用的测定

将收集到的脂肽样品做抗菌谱实验和IC<sub>50</sub>测定,细菌采用试管二倍稀释法<sup>[10]</sup>;真菌采用的方法参考文献<sup>[11]</sup>。

### 1.5 *B. subtilis* JA对*B. cinerea*的抑制作用

**1.5.1 JA菌体悬浮液对孢子萌发的影响:**方法参考文献[12],在150 mm×15 mm试管中加入5 mL PDB培养基,然后加入100  $\mu$ L *B. cinerea*孢子悬浮液( $5 \times 10^6$  spores/mL),再加入100  $\mu$ L不同浓度的JA菌体悬浮液(分别为 $5 \times 10^6$  cfu/mL、 $5 \times 10^7$  cfu/mL、 $5 \times 10^8$  cfu/mL),以加入100  $\mu$ L无菌水作为对照。将试管倾斜45°,25℃、100 r/min培养12 h,显微镜下观测孢子的萌发率。

**1.5.2 挥发性物质对孢子萌发的抑制:**在中间带有隔板的90 mm培养皿(图4)中进行挥发性物质抑菌实验,方法参考文献[13]。在一隔间中加入5 mL PDA培养基,凝固后涂布100  $\mu$ L浓度为 $5 \times 10^5$  spores/mL的*B. cinerea*孢子悬浮液;另一隔间中加入5 mL LB培养基,凝固后涂布100  $\mu$ L浓度为 $10^8$  cfu/mL的JA菌悬液(或划线接种),以加入100  $\mu$ L无菌水作为对照。培养皿外用封口膜(Parafilm)封住,隔断皿内外空气的流通。25℃培养12 h后在显微镜下观测孢子的萌发率。

**1.5.3 挥发性物质对*B. cinerea*菌丝生长的抑制:**将*B. cinerea*接种于PDA培养基中25℃培养10 d,用打孔器接种6 mm(直径)菌块于上述培养皿的

PDA 培养基上, 用同样的方法测定挥发性物质对菌丝生长的抑制作用。

## 2 结果

### 2.1 脂肽类抗生素的纯化

将粗提取物过反相 HPLC, 历经梯度洗脱, 在保留时间为 20 min~45 min 之间收集目标产物(图 1), 冷冻干燥后得到的白色粉末即为脂肽类抗生素的纯品。

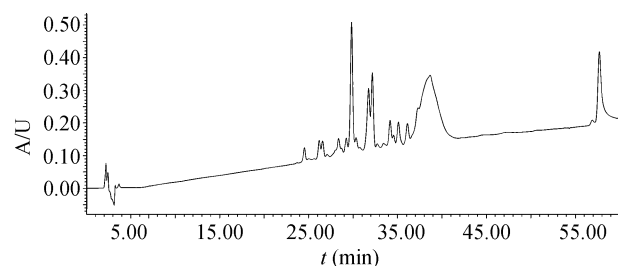


图 1 脂肽类抗生素在反相 HPLC 上的分离  
Fig. 1 Purification of lipopeptides in RP-HPLC

### 2.2 脂肽类抗生素体外抗菌作用的测定

体外抗菌作用的测定结果表明, 脂肽类抗生素对丝状真菌有强烈的抑制作用, 尤其对 *R. solani* 的抑制效果最明显, 同时对 *B. cinerea* 和 *F. oxysporum* 也有很好的抑制作用, 而对细菌基本没有抑制作用(表 1)。

表 1 脂肽类抗生素的抗菌谱及对多种病原菌的 IC <sub>50</sub>			
Table 1 Values of IC <sub>50</sub> towards various microorganisms by lipopeptides <i>in vitro</i>			
Strains	IC <sub>50</sub> (μg/mL)	Strains	IC <sub>50</sub> (μg/mL)
<i>B. cinerea</i>	7.5 ± 0.5	<i>F. oxysporum</i>	5.0 ± 1.8
<i>R. solani</i>	1.6 ± 0.7	<i>A. flavus</i>	—
<i>F. graminearum</i>	30 ± 16	<i>S. clerotiorum</i>	—
<i>P. irregulare</i>	500 ± 57	<i>C. capsici</i>	—
<i>A. niger</i>	50 ± 24	<i>P. syringae</i>	—
<i>C. fulvum</i>	40 ± 12	<i>E. coli</i>	—

“—”: 无抑制作用 “-”: Non-inhibition

### 2.3 *B. subtilis* JA 对 *B. cinerea* 的抑制作用

**2.3.1 JA 菌体对孢子萌发的影响:** 图 2 表明, 随着 JA 浓度的增大, *B. cinerea* 孢子的萌发率明显降低。当加入的 JA 菌悬液浓度为  $5 \times 10^6$  cfu/mL、 $5 \times 10^7$  cfu/mL 和  $5 \times 10^8$  cfu/mL 时, *B. cinerea* 孢子的萌发率分别为 71.5%、54.4% 和 32.7%, 而对照实验孢子的萌发率为 96.6%, 说明 JA 活菌体能明显抑制 *B. cinerea* 孢子的萌发。

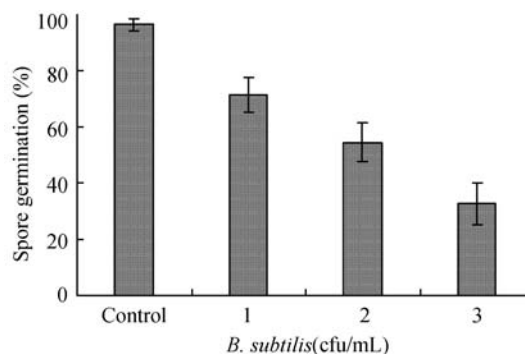


图 2 不同浓度的 *B. subtilis* JA 菌体悬浮液对 *B. cinerea* 孢子萌发的影响

Fig. 2 Effect of *B. subtilis* JA cell suspension on spore germination of *B. cinerea* in potato dextrose broth

注: Control、1、2、3 表示加入的 JA 菌体浓度分别为 0 cfu/mL,  $5 \times 10^6$  cfu/mL,  $5 \times 10^7$  cfu/mL 和  $5 \times 10^8$  cfu/mL。

Note: Control、1、2 and 3 represents cell suspension of JA were 0 cfu/mL,  $5 \times 10^6$  cfu/mL,  $5 \times 10^7$  cfu/mL, and  $5 \times 10^8$  cfu/mL, respectively.

**2.3.2 挥发性物质对孢子萌发的影响:** 图 3 表明, 在挥发性物质的作用下, *B. cinerea* 孢子的萌发率仅为 43%, 而对照实验中孢子的萌发率为 90%, 说明挥发性物质能够明显抑制 *B. cinerea* 孢子的萌发。

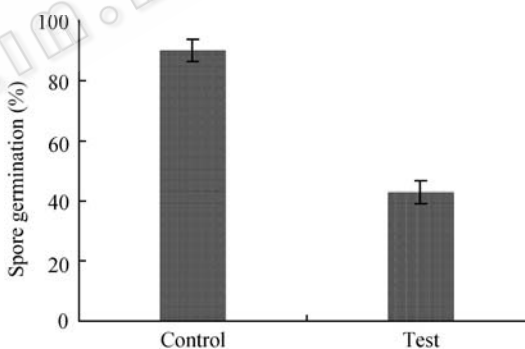


图 3 JA 产生的挥发性物质对 *B. cinerea* 孢子萌发的影响  
Fig. 3 Effect of volatiles from *B. subtilis* JA on spore germination of *B. cinerea* in divided Petri dish

**2.3.3 挥发性物质对菌丝生长的抑制:** 图 4 表明,

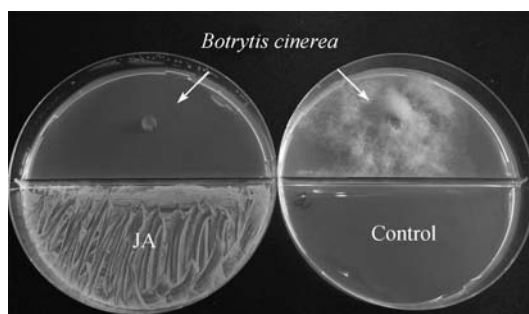


图 4 *B. subtilis* JA 产生的挥发性物质对 *B. cinerea* 菌丝生长的影响

Fig. 4 Effect of volatiles from *B. subtilis* JA on mycelial growth of *B. cinerea* in divided Petri dish

在挥发性物质存在条件下菌丝几乎没有生长, 而对照培养皿中菌丝生长正常, 说明挥发性物质对 *B. cinerea* 菌丝的生长有强烈的抑制作用。

### 3 讨论

本文利用酸沉淀、甲醇抽提和反相 HPLC 的方法将 *B. subtilis* JA 发酵液中的脂肽类抗生素分离出来, 抗菌谱测定表明, JA 产生的脂肽类抗生素对丝状真菌有很好的抑制作用, 而对细菌几乎没有抑制作用。根据文献<sup>[14]</sup>报道, 脂肽类家族 fengycin 和 iturin 对丝状真菌有强烈的抑制作用, 而 surfactin 对一些细菌具有拮抗作用。所以推测 JA 产生的脂肽类抗生素主要为 fengycin 和 iturin, 而 surfactin 的含量相对较少。IC<sub>50</sub> 实验表明, 脂肽类抗生素对多种植物病原菌有很好的抑制效果, 而且对 *B. cinerea* 也有很强的抑制作用。*B. cinerea* 是引起水果霉变的重要病原菌<sup>[12]</sup>, 因此脂肽类抗生素不但可以用于植物病害的生物防治, 还可以防治果实贮藏过程中的霉变。

*B. subtilis* JA 的菌悬液和 *B. cinerea* 孢子悬浮液的共培养实验表明, JA 菌体能够抑制 *B. cinerea* 孢子的萌发, 而此时在试管中并未检测到脂肽。在显微镜下观察到 JA 菌体黏附到 *B. cinerea* 孢子的表面, 将孢子包围, 菌体浓度越大黏附现象越严重。推测这种现象可能是 JA 活菌体抑制 *B. cinerea* 孢子萌发的重要原因, 对此现象还需进行深入的研究。

根据 Fernando 等报道, 细菌产生的挥发性抑菌物质包括醛类、醇类、酮类和硫化物<sup>[8]</sup>; Kai 等报道不同种类的细菌能产生 1~30 种挥发性化合物, 而且大多数化合物是特有的<sup>[13]</sup>。一般测定挥发性化合物的方法是气质联用(GC/MS)法, 然而很多化合物由于不存在于已知数据库中而很难被测定<sup>[13]</sup>。根据分隔平板实验, 证明 *B. subtilis* JA 产生的挥发性物质能够抑制 *B. cinerea* 孢子的萌发和菌丝的生长, 还需进一步的研究以确定挥发性抑菌物质的成分是否含有新的化合物。

### 参 考 文 献

[1] Peypoux F, Guimand M, Michel G, *et al.* Structure of iturin A, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*, 1978, **17**(19): 3992–3996.

- [2] Peypoux F, Bonmatin J M, Wallach J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, **51**(5): 553–563.
- [3] Vanittanakom N, Loeffler W, Koch U, *et al.* Fengycin-a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F29-3. *J Antibiot*, 1986, **39**(7): 888–901.
- [4] Wang J, Liu J, Wang XQ, *et al.* Application of electrospray ionization mass spectrometry in rapid typing of fengycin homologues produced by *Bacillus subtilis*. *Lett Appl Microbiol*, 2004, **39**(1): 98–102.
- [5] Deleu M, Paquot M, Nylander T. Fengycin interaction with lipid monolayers at the air-aqueous interface implications for the effect of fengycin on biological membranes. *J Colloid Interface Sci*, 2005, **283**(2): 358–365.
- [6] Heerklotz H, Seelig J. Detergent-like action of the antibiotic peptide surfactin on lipid membranes. *Biophys J*, 2001, **81**(3): 1547–1554.
- [7] Compant S, Duffy B, Nowak J, *et al.* Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(9): 4951–4959.
- [8] Fernandoa D, Ramarathnam R, Krishnamoorthy A S, *et al.* Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biol Biochem*, 2005, **37**(5): 955–964.
- [9] Ezra D, Hess WM, Strobel GA. New endophytic isolates of *Muscodor albus*, a volatile-antibiotic-producing fungus. *Microbiology*, 2004, **150**(12): 4023–4031.
- [10] 蒋细良, 谢德龄, 倪楚芳, 等. 中生菌素的抗生作用. *植物病理学报*, 1997, **27** (2): 133–138.
- [11] Wang H, Ng T B. Eryngin, a novel antifungal peptide from fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Peptides*, 2004, **25**(1): 1–5.
- [12] Spadaro D, Rossana V, Serenella P, *et al.* Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. *Postharvest Biol Technol*, 2002, **24**(2): 123–134.
- [13] Kai M, Effmert U, Berg G, *et al.* Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Arch Microbiol*, 2007, **187**(5): 1–360.
- [14] Touré Y, Ongena M, Jacques P, *et al.* Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *J Appl Microbiol*, 2004, **96**(5): 1151–1160.