



Cd 胁迫下枯草芽孢杆菌 B12 产表面活性素及其对生物被膜形成和 Cd 去除的影响

张亚见 何琳燕* 曾仟 盛下放

南京农业大学生命科学学院 农业农村部农业环境微生物重点实验室 江苏 南京 210095

摘要:【背景】枯草芽孢杆菌可通过群集的方式形成生物被膜,而生物被膜在去除重金属方面发挥着重要作用。【目的】探究枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) B12 缓解 Cd (CdSO_4)胁迫的机制。【方法】考察 Cd 胁迫对 B12 生物被膜形成的影响,用酸沉淀法、反相高效液相色谱和液质联用分析(LC-MS)对有无 Cd 胁迫条件下菌株 B12 分泌的脂肽化合物进行提取、纯化和主要成分鉴定,并探究该主要成分对枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) B12、苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*) Mr40、解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*) P29 生物被膜形成和吸附 Cd 的影响。【结果】在含 Cd 浓度为 0–1.0 mg/L 的 Mmsg 培养基中, *B. subtilis* B12 生物被膜干重显著增加。Cd 胁迫促进菌株 B12 分泌脂肽化合物,其中表面活性素(Surfactin)含量增加。在含 Cd 浓度为 0.5 mg/L 的 Mmsg 培养基中添加 Surfactin 后,菌株 B12、Mr40、P29 生物被膜干重比未添加时显著增加 84.1%–126.9%,浮游细胞数量显著下降 46.9%–55.3%,3 株菌株对 Cd 去除率显著增加 23.0%–36.1%,浮游细胞吸附 Cd 比例显著下降,生物被膜吸附 Cd 比例显著增加了 46.8%–68.1%。【结论】Cd 胁迫下菌株 B12 通过分泌更多的 Surfactin 来调控自身以及其他菌株生物被膜的形成来吸附更多的 Cd,从而缓解 Cd 胁迫。

关键词: Cd, 枯草芽孢杆菌, 生物被膜, 表面活性素

Surfactin production by *Bacillus subtilis* B12 under Cd stress and its effect on biofilm formation and Cd removal

ZHANG Yajian HE Linyan* ZENG Qian SHENG Xiafang

Key Laboratory of Agricultural and Environmental Microbiology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China

Abstract: [Background] *Bacillus subtilis* can form biofilm by clustering, and biofilm plays an important role in the removal of heavy metals. [Objective] The purpose of this study was to examine the interactions of *Bacillus subtilis* B12 biofilm and lipopeptide compounds and cadmium removal, investigating the mechanism of *B. subtilis* B12 in alleviating Cd (CdSO_4) stress. [Methods] Firstly, the effect of Cd stress on the formation of strain B12 biofilm was investigated. The lipopeptide compounds secreted by B12 strain under Cd stress were extracted, purified and identified by acid precipitation, reversed-phase high

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (41977199, 41471273); Social Development Project of Jiangsu Province (BE2016744)

*Corresponding author: Tel: 86-25-84396484; E-mail: helyan0794@njau.edu.cn

Received: 29-09-2020; Accepted: 03-11-2020; Published online: 26-01-2021

基金项目: 国家自然科学基金(41977199, 41471273); 江苏省社会发展项目(BE2016744)

*通信作者: Tel: 025-84396484; E-mail: helyan0794@njau.edu.cn

收稿日期: 2020-09-29; 接受日期: 2020-11-03; 网络首发日期: 2021-01-26

performance liquid chromatography (RP-HPLC) and liquid mass spectrometry (LC-MS). The effects of this major component on the biofilm formation and Cd adsorption of *B. subtilis* B12, *Sinorhizobium meliloti* Mr40 and *B. amyloliquefaciens* P29 were investigated. [Results] When 0–1.0 mg/L CdSO₄ was applied in Mmsg media, the dry weight of *B. subtilis* B12 biofilms increased significantly. Cd stress promoted the secretion of lipid peptide compounds by strain B12, and the content of surfactin was increased. In the Mmsg media with 0.5 mg/L Cd concentration, biofilms dry weight of strains B12, Mr40, P29 were increased by 84.1% to 126.9% significantly when the strains were exposed to surfactin compared to control medium, whereas the planktonic cells counts were reduced significantly from 46.9% to 55.3%. Meanwhile, Cd removal rate of three strains were significantly increased by 23.0%–36.1%, biosorption capacities of Cd onto the strains biofilms significantly increased by 46.8% to 68.1%. [Conclusion] These findings suggest that *B. subtilis* B12 under exposure to Cd could trigger the effect of stronger surfactin and biofilm formation, and subsequent increased Cd absorption of the biofilms, thereby protecting them from Cd stress.

Keywords: Cd, *Bacillus subtilis*, biofilm, surfactin

随着工业化进程的加快,世界经济快速发展,环境污染、生态破坏等问题日益严峻,严重影响人类健康和社会可持续发展,其中重金属污染对环境的危害尤为严重^[1-2]。众多的修复技术中,微生物固定技术因环保经济而被广泛应用^[3]。芽孢杆菌是一种广泛分布于不同环境中的革兰氏阳性细菌,产生内生芽孢,耐热抗逆性强,在土壤和植物表面普遍存在。大部分芽孢杆菌对动植物无害,对环境友好,其产生的生物被膜具有很强的吸附重金属的能力^[4-5]。侯文洁研究报道,苜蓿中华根瘤菌的生物被膜中胞外聚合物(Extracellular Polymeric Substance, EPS)通过离子交换的形式可以有效吸附去除溶液中的铜离子^[6]。

芽孢杆菌在含有高浓度重金属的土壤和水中存活与生物被膜的形成密切相关^[7]。生物被膜是由菌体自身分泌的EPS包裹细菌聚合而成的聚集体^[8],主要由多糖、蛋白质、核酸以及细胞等组成^[9]。有文献报道,生物被膜可以通过吸附作用来固定重金属,主要包括细胞吸附和EPS吸附,其中以EPS吸附为主^[10]。研究报道EPS对重金属的吸附机制主要包括离子交换、静电吸附、络合以及微量沉淀等过程^[11]。EPS的多糖和蛋白质中胺、巯基、磷酸二酯等使生物被膜整体呈现负电荷,与带正电的金属离子可以发生相互作用^[12]。研究表明,芽孢

杆菌形成生物被膜后可增强自身的抗逆性^[13]。由此可见,生物被膜在芽孢杆菌适应不良环境中发挥着重要的作用。

枯草芽孢杆菌产生的脂肽化合物主要包括表面活性素(Surfactin)、伊枯草菌素(Iturin)、泛革素(Fengycin)、杆菌溶素(Bacilysin) 4个家族^[14-16],均属于细菌非核糖体合成的脂肽类化合物,是由亲水的肽链(7–10个氨基酸组成的肽链)和亲油的脂肪酸链(β -羟基脂肪酸链或 β -胺基脂肪酸链)两部分组成的,其中脂肪酸链上的羟基或胺基与肽链氨基酸上的羧基结合形成内酯键或酰胺键,使肽链闭合形成环状脂肽^[17-18]。文献报道枯草芽孢杆菌分泌的脂肽化合物可以促进自身生物被膜的形成;Surfactin、Iturin家族中的Bacillomycin D、Iturin都可促进芽孢杆菌自身生物被膜的形成^[19-23]。但枯草芽孢杆菌分泌的脂肽化合物对其他细菌生物被膜的影响还未见报道,重金属胁迫条件下细菌生物被膜与脂肽化合物之间是否存在相互作用?这种相互作用能否有助于提高枯草芽孢杆菌的抗逆性?这些问题尚无明确答案。

本研究通过探究Cd胁迫下枯草芽孢杆菌能否通过分泌脂肽化合物来调控自身生物被膜以及其他菌株生物被膜的形成而缓解Cd胁迫,以期阐明枯草芽孢杆菌吸附Cd的机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株: 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) B12、苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*) Mr40、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) P29 为本实验室分离并保存。

LB 培养基(g/L): 蛋白粉 10.0, 酵母粉 5.0, 氯化钠 10.0, 琼脂粉 20.0 (固体培养基中加入), pH 7.0。

Mmsg 培养基: 磷酸二氢钾缓冲液(5 mmol/L, pH 7.0), 氯化镁溶液(2 mmol/L), 硫酸素溶液(2 mmol/L), 氯化钙溶液(700 mmol/L), MOPs 溶液(100 mmol/L, pH 7.0), 氯化锰溶液(50 mmol/L), 氯化铁溶液(50 mmol/L), 氯化锌溶液(1 mmol/L), 苯丙氨酸溶液(50 mg/mL), 色氨酸溶液(50 mg/mL), 谷氨酸溶液(0.5%), 甘油(0.5%)。

Landy 培养基(g/L): 葡萄糖 20.0, L-谷氨酸 5.0, MgSO₄·7H₂O 0.5, KCl 0.5, KH₂PO₄ 1.0, FeSO₄·6H₂O 5.0, MnSO₄ 10.0, CuSO₄·5H₂O 0.2, 酵母粉 1.0, 苯丙氨酸 2.0, pH 7.0。

主要试剂和仪器: 表面活性素, Wako Pure Chemicals 公司。制备型液相仪、超高效液相仪-质谱检测器、高效液相色谱仪, Agilent Technologies 公司; 高速冷冻离心机, Beckman 公司; 原子吸收光谱仪, Perkin Elmer®公司。

1.2 Cd 胁迫下 B12 生物被膜干重、多糖含量、蛋白含量的测定

生物被膜提取方法参考周华飞等^[23]并做适当改进, 详细方法如下: 挑取平板上的单菌落于 LB 液体培养基中, 30 °C、200 r/min 培养 16–18 h 至对数生长期后期, 即为活化的菌株。按 2% 的接种量将菌液接种到 2 mL Mmsg 培养基中, Cd(CdSO₄) 的浓度为 0、0.1、0.5、1.0、2.0 mg/L, 每个处理设置 3 个重复; 30 °C, 静置培养 72 h, 用枪头轻轻挑取菌液表层的生物被膜于 10 mL 离心管中, 去离子水清洗 3 次, 冷冻干燥至恒重后称取生物被

膜干重; 将干燥生物被膜移入离心管中, 向离心管中依次加入 5 mL 去离子水、2 mL 的 2 mol/L NaOH、0.25 mL 的 0.85% NaCl, 4 °C、150 r/min 振荡 3 h 后 4 °C、6 000 r/min 离心 20 min; 上清液过 0.45 μm 滤膜, 将滤液置于透析袋中, 4 °C 透析 24 h, 换水 5 次; 保留液置于 10 mL 离心管中, 4 °C 保存备用。多糖含量测定采用苯酚-硫酸法^[24], 蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝法^[25]。

1.3 菌株 B12 产脂肽化合物的提取

目前, 提取枯草芽孢杆菌脂肽化合物的培养基有 LB 和 Landy 这 2 种, 其中 Landy 使用频率最高, 所以本文采用 Landy 培养基作为提取脂肽化合物的发酵液。脂肽化合物的提取参考高圣凤等^[26]的酸沉淀法并做适当改进, 详细方法如下: 将活化好的 B12 菌液以 5% 的接种量接种到 1 L Landy 培养液中, 添加 Cd(CdSO₄) 至终浓度为 0.5 mg/L, 对照不添加 Cd; 27 °C、160 r/min 培养 3 d, 将发酵液于 4 °C、8 000 r/min 条件下离心 15 min, 弃去沉淀, 用 HCl 调节上清液 pH 至 2.0, 于 4 °C 沉淀过夜后 8 000 r/min 离心 10 min 收集沉淀, 沉淀风干后加入适量甲醇至全部溶解后进行抽提, 4 °C 搅拌约 5 h 至充分溶解后调节 pH 至 7.0, 8 000 r/min 离心 20 min, 将上清液置于通风橱中, 挥发干燥便可得到脂肽化合物的提取物; 将提取物溶于 5 mL 去离子水中, 调 pH 至 7.0, 冷冻干燥至粉末, 反复冻融 3 次后配制成 5.0 mg/mL 的母液, 然后用无菌的 0.22 μm 滤膜过滤到无菌离心管中, 即可得到 B12 无菌的脂肽化合物粗提物。无 Cd 条件下提取的脂肽化合物暂命名为 LP, Cd 浓度为 0.5 mg/L 条件下提取的脂肽化合物暂命名为 LPc。

1.4 粗提的脂肽化合物对 B12 生物被膜的影响

菌株 B12 的活化方式同 1.2。将活化菌株按 2% 的接种量接种到 Mmsg 培养基中。LP 与 LPc 浓度设置为 0、0.125、0.5、2.0 mg/L, 同时设置终浓度为 2.0 mg/L 的吐温-80 和甘油作为对照, 每个处理设置 3 个重复, 30 °C 恒温箱培养 72 h; 生物被膜

干重、多糖含量、蛋白含量的测定方法同 1.2。

1.5 粗提脂肽化合物的分离纯化

采用反向 C18 分离纯化柱的 RP-HPLC (9.4 mm×150 mm)进行脂肽化合物的分离纯化;将提取的脂肽化合物溶于甲醇中,用 0.22 μm 滤器过滤后于 4 °C 冰箱中保存备用。分离纯化条件为:检测波长 210 nm,流速 0.84 mL/min,流动相 A 为乙腈,流动相 B 为 0.1%乙酸,洗脱条件为 0–9 min,流动相 A (60%–93%)+流动相 B (40%–7%); 9–20 min, 93%流动相 A+7%流动相 B;洗脱时间为 20 min^[21]。将分离纯化得到的组分置于通风橱中,至甲醇挥发完全,再将各组分进行冷冻干燥,收集粉末,4 °C 保存备用。

1.6 纯化组分对生物被膜的影响

用无菌去离子水溶解冷冻干燥的各个组分,配成浓度为 5.0 mg/mL 的母液,用无菌的 0.22 μm 滤器过滤母液。按 2%接种量将活化的菌株 B12 接种到含有 0.5 mg/L 各组分的 Mmsgg 培养基中,以不加脂肽化合物的处理为对照,每个处理设置 3 个重复,30 °C 恒温培养 72 h。生物被膜干重、多糖含量、蛋白含量的测定方法同 1.2。

1.7 有效组分的质谱分析

采用 LC-MS 进行有效组分的分子量分析,电喷雾针的工作环境为 4.5 kV,毛细管温度为 300 °C。流动相 A 为乙腈,流动相 B 为 0.1%冰醋酸,A 和 B 的比例为 70:30,流量为 0.3 mL/min,时间为 35 min。质谱分析采用电喷雾离子化正离子模式^[21]。

1.8 Surfactin 对细菌固定 Cd 的效果研究

为了观察 Mmsgg 培养基中枯草芽孢杆菌 B12 是否产 Surfactin,将菌株 B12 按照 2%的接种量接种到 Mmsgg 培养基中,30 °C 培养 72 h 后 12 000 r/min 离心 15 min 取上清液,用 0.22 μm 的滤器过滤上清液。用 HPLC 对上清液进行分析。条件如下:检测条件:紫外检测,进样量 20 μL,柱温 35 °C,检测波长 210 nm,流速 0.84 mL/min,检测时间 25 min。溶剂:流动相 A 为纯水+0.1%三氟乙酸,

流动相 B 为乙腈+0.1%三氟乙酸。梯度变化条件:0–9 min, A: 40%–7%, B: 60%–93%; 9–20 min, A: 7%–7%, B: 93%–93%。菌株 B12、P29、Mr40 的活化方式同 1.2。按 2%接种量将菌株 B12、P29、Mr40 接种到含有 0.5 mg/L Cd 的 Mmsgg 培养基中,添加 Surfactin 至终浓度为 0.5 mg/L,以不加 Surfactin 的处理为对照,每个处理设置 3 个重复,30 °C 恒温培养 72 h。生物被膜干重的测定方法同 1.2。浮游细胞数量测定采用稀释涂布平板法^[27],具体操作如下:将取完生物被膜的剩余培养液转入无菌的离心管中,涡旋仪混匀后进行梯度稀释并涂布于 LB 固体培养基上,30 °C 恒温培养 18 h 后进行菌落计数。生物被膜中 Cd 含量的测定参考葛占标等的微波消解法^[9]并做适当改进,具体操作如下:称取 0.1 g 干燥生物被膜于消煮器中,并加入 2 mL 消解液(体积分数为 4:1 的 HNO₃ 和 HClO₄)和 8 mL 去离子水,消煮后的溶液用去离子水定容到 25 mL,经 0.45 μm 的滤器过滤后用原子吸收光谱仪(Atomic Absorption Spectroscopy, AAS)进行 Cd 含量的测定;移出生物被膜的 Mmsgg 培养基经 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min,取上清液于 10 mL 离心管中,加入 HNO₃ 使溶液的硝酸浓度为 3%,用 AAS 测定 Cd 含量,该含量为溶液中剩余 Cd 含量。Cd 去除率、生物被膜吸附 Cd 比例、浮游细胞吸附 Cd 比例计算公式如下:

$$\text{Cd 去除率(Removal Rate of Cd)} = (\text{原溶液中 Cd 含量} - \text{溶液中剩余 Cd 含量}) / \text{原溶液中 Cd 含量} \times 100\%$$

$$\text{生物被膜吸附 Cd 比例(Biofilm Fixed Cd Ratio)} = (\text{生物被膜中 Cd 总量} / \text{细菌去除 Cd 总量}) \times 100\%$$

$$\text{浮游细胞吸附 Cd 比例(The Floating Cells Fix Cd Ratio)} = 100\% - \text{生物被膜吸附 Cd 比例}(\%)$$

2 结果与分析

2.1 Cd 胁迫促进菌株 B12 生物被膜的形成

由表 1 可知,一定浓度范围的 Cd 胁迫可显著

表 1 Cd 胁迫对菌株 B12 生物被膜形成的影响
Table 1 Effects of Cd stress on strain B12 biofilm formation

Cd 浓度 Cd concentration (mg/L)	干重 Dry weight (mg)	蛋白含量 Protein content (μ g)	多糖含量 Polysaccharide content (μ g)
0.0	6.63 \pm 0.76c	51.17 \pm 3.15c	3.64 \pm 0.56c
0.1	11.27 \pm 0.76a	60.06 \pm 2.79b	4.16 \pm 0.17c
0.5	11.20 \pm 0.36a	76.17 \pm 3.00a	7.38 \pm 0.79b
1.0	9.6 \pm 0.61b	76.30 \pm 4.32a	8.72 \pm 0.88a
2.0	6.80 \pm 0.70c	57.16 \pm 4.00bc	3.29 \pm 0.31c

注: 同列数据后不同小写字母表示不同处理间有显著差异 ($P < 0.05$), 下同

Note: Different lowercase letters after data in the same column indicate significant differences between different treatments ($P < 0.05$). The same below

增加菌株 B12 的生物被膜干重、多糖含量、蛋白含量。与无 Cd 对照相比, 4 个 Cd 浓度梯度下菌株 B12 的生物被膜干重分别增加了 70.0%、68.9%、21.8%、15.5%; 蛋白含量分别增加了 17.4%、48.6%、49.1%、11.7%; Cd 浓度在 0.5–1.0 mg/L 时, 与 CK 相比多糖含量显著增加, 但 0.1 mg/L 与 2.0 mg/L 的 Cd 浓度对 B12 生物被膜中多糖含量无显著影响。由此可见, 适当浓度 Cd 胁迫可以促进多糖含量和蛋白含量增加, 从而促进生物被膜的形成; 但当 Cd 浓度过低或过高时, 菌株 B12 的生物被膜干重及其蛋白、多糖含量与 CK 之间无显著差异, 说明 Cd 胁迫程度对生物被膜的形成有重要影响。

2.2 粗提的脂肽化合物促进菌株 B12 生物被膜的形成

为了研究脂肽化合物对生物被膜的影响是否具有特异性, 选取具有表面活性素性质的吐温-80 以及具有脂类性质的甘油作为对照。由表 2 可知, 浓度为 2.0 mg/L 的吐温-80 和甘油与 CK 相比, 对菌株 B12 的生物被膜干重、多糖和蛋白含量无显著影响, 说明脂肽化合物对生物被膜的促进作用存在特异性。

3 个浓度梯度的 LP 与 LPc 可显著促进 B12 生物被膜干重、多糖含量、蛋白含量的增加。0.125、0.5、2.0 mg/L 的 LP 分别使生物被膜干重显著增加了 29.5%、50.5%、54.4%, 后 2 个浓度对生物被膜

干重的影响无显著差异, 但显著高于 0.125 mg/L 的 LP; 0.125、0.5、2.0 mg/L 的 LPc 分别使生物被膜干重显著增加了 32.1%、116.5%、106.6%, 后 2 个浓度对生物被膜干重的影响无显著差异, 但显著高于 0.125 mg/L 的 LPc。由此可见, 2 种脂肽化合物都可以促进菌株 B12 生物被膜的形成, 而且有 Cd 比无 Cd 条件下提取的脂肽化合物对生物被膜的促进效果更好。

生物被膜主要由多糖和蛋白质组成, 为了进一步研究脂肽化合物对生物被膜组分的影响, 对生物被膜中多糖含量和蛋白含量进行了测定。由表 2 可知, LP 和 LPc 处理组与 CK 相比, 均可促进菌株 B12 生物被膜中多糖含量和蛋白含量的提高。3 个浓度梯度下, LPc 与 LP 处理组相比, 蛋白含量分别提高了 5.9%、13.0%、22.0%; 多糖含量分别提高了 24.62%、23.08%、21.03%; 而且 LPc 浓度为 0.50 mg/L 条件下, 菌株 B12 生物被膜中多糖含量和蛋白含量最高。该数据表明, LPc 中可能存在某种影响, 这种影响使 LPc 造成菌株 B12 生物被膜中多糖含量和蛋白含量显著高于 LP 处理组。

表 2 脂肽化合物对菌株 B12 生物被膜特性的影响
Table 2 Effects of lipid peptide compounds on the properties of B12 biofilm

添加物及浓度 Additives and concentration (mg/L)	干重 Dry weight (mg)	蛋白质含量 Protein content (μ g)	多糖含量 Polysaccharide content (μ g)
CK	7.47 \pm 0.93d	45.93 \pm 6.62e	5.85 \pm 0.50e
Tween-80 2.0	6.63 \pm 0.85d	42.47 \pm 2.57e	5.36 \pm 0.40e
Glycerol 2.0	7.77 \pm 0.91d	48.52 \pm 2.04e	5.56 \pm 0.40e
LP 0.125	9.67 \pm 0.99c	66.30 \pm 9.45d	8.37 \pm 0.45d
LP 0.5	11.20 \pm 1.08b	91.73 \pm 5.86b	11.41 \pm 0.60b
LP 2.0	11.3 \pm 1.21b	89.94 \pm 4.24b	10.23 \pm 0.51c
LPc 0.125	9.87 \pm 0.95c	69.01 \pm 8.90c	9.81 \pm 0.59c
LPc 0.5	16.17 \pm 0.32a	97.72 \pm 7.42a	12.76 \pm 0.35a
LPc 2.0	15.43 \pm 0.67a	100.06 \pm 9.2a	11.46 \pm 0.52b

注: CK: 空白对照; LP: 无 Cd 条件下提取的脂肽化合物; LPc: Cd 浓度为 0.5 mg/L 条件下提取的脂肽化合物

Note: CK: Blank control; LP: A lipid peptide compound extracted without Cd. LPc: Lipopeptide compounds extracted with Cd concentration of 0.5 mg/L

2.3 脂肽化合物的分离纯化

图 1A 为无 Cd 条件下提取的脂肽化合物液相图, 简记为 LP 图; 图 1B 为 0.5 mg/L 的 Cd 浓度条件下提取的脂肽化合物液相图, 简记为 LPc 图。LP 与 LPc 中有 5 个相同的峰, 说明 Cd 胁迫下, 菌株 B12 的主要脂肽化合物种类与对照相同; 其中前 3 个峰大小相近, 说明 Cd 浓度为 0.5 mg/L 的胁迫对前 3 种脂肽化合物的量无显著影响; LPc 的后 2 个峰比 LP 中高, 说明 Cd 胁迫可以促进菌株 B12 分泌更多的后 2 种脂肽化合物。由此发现 Cd 胁迫主要影响了菌株 B12 分泌的某些种类脂肽化合物的浓度变化。

2.4 纯化组分对菌株 B12 生物被膜的影响

由图 2A 可以看出, 与 CK 相比, 组分 3、4、5 使菌株 B12 生物被膜的褶皱度增加。由图 2B、2C 可知, 组分 3、4 可显著增加菌株 B12 生物被膜中多糖含量和蛋白含量。外源添加组分 3 后, 生物被膜的多糖和蛋白含量分别增加了 64.3% 和 93.8%; 外源添加组分 4 后生物被膜多糖和蛋白含量分别增加了 87.0% 和 127.3%。由于有 Cd 胁迫和无 Cd 胁迫下组分 3 的峰高无显著差异, 组分 4 较组分 3 对生物被膜的影响更显著, 所以选取组分 4

进行物质鉴定。

2.5 有效组分的鉴定

图 3A 为组分 4 的液相图, 图 3B 为出峰时间为 19.88 min 时对应峰的质谱图。目前, 脂肽化合物主要有 4 大家族, 分别为 Surfactin 家族、Iturin 家族、Fengycin 家族、Bacilysin 家族。Surfactin 的分子式为 $C_{53}H_{93}N_7O_{13}$, Iturin 的分子式为 $C_{66}H_{103}N_{17}O_{16}$, Fengycin 的分子式为 $C_{72}H_{110}N_{12}O_{20}$, Bacilysin 的分子式为 $C_{12}H_{18}N_2O_5$ 。输入各分子式后算出质量核比(m/z), 结果发现 $C_{53}H_{93}N_7O_{13}$ 的 m/z 的值为 1 036.69, 输入 1 036.69 后出现了如图 3A 所示的液相图, 由此可知组分 4 中含有 Surfactin; 该液相图中 19.88 min 的峰相对丰度最高, 所以组分 4 中主要物质为 19.88 min 处的物质, 对 19.88 min 处峰进行质谱分析发现该处物质的主要 m/z 为 1 036.69。由此可以判断组分 4 主要物质为分子量为 $C_{53}H_{93}N_7O_{13}$ 的 Surfactin。相关文献报道, HPLC 出峰时间在 17.4–19.9 min 之间, 分子量(m/z)为 1 036.69 的脂肽类型为 C15 Surfactin A 或 C16 Surfactin B 或 C15 Surfactin C^[28], 进一步验证了本实验的结果; 此外, 该液相图中还有 2 个小峰处的物质未分析出分子式, 该处的物质有待进一步分析。

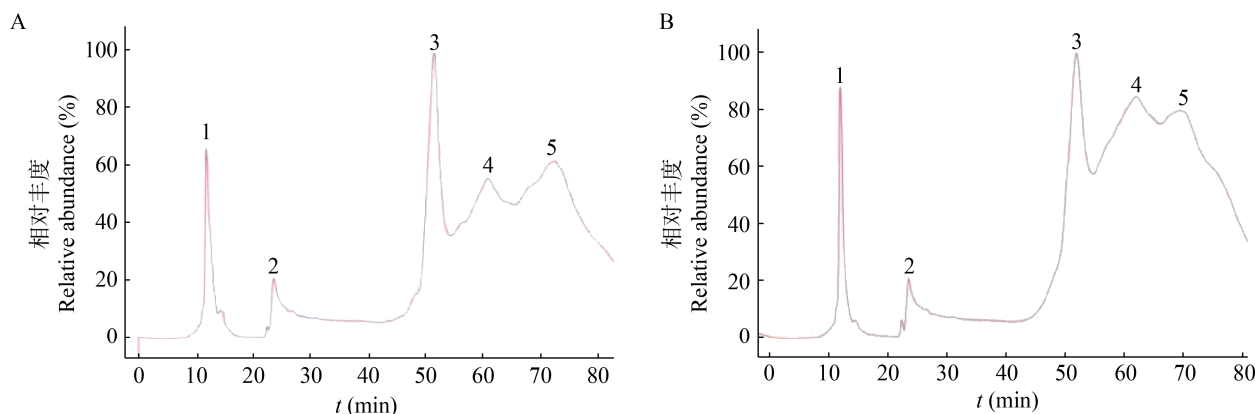


图 1 LP (A)和 LPc (B)的液相图

Figure 1 The liquid phase diagram of LP (A) and LPc (B)

注: 1、2、3、4、5 为 LP 图与 LPc 图中 5 个相同的峰

Note: 1, 2, 3, 4 and 5 are the five same peaks in LP graph and LPc graph

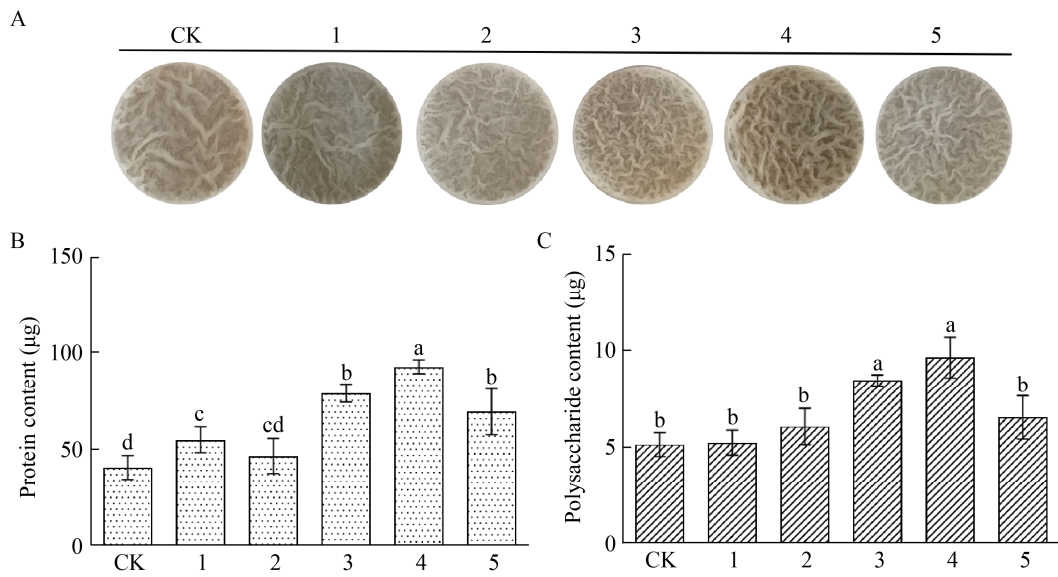


图 2 5 个组分对菌株 B12 生物被膜形貌(A)以及蛋白含量(B)和多糖含量(C)的影响

Figure 2 Effects of the five components on the morphology (A), the protein content (B) and the polysaccharide content (C) of strain B12 biofilm

注: 图 B、C 中不同小写字母表示不同处理间有显著差异($P < 0.05$)。下同

Note: Different lowercase letters in Figure B and C indicate significant differences between different treatments ($P < 0.05$). The same below

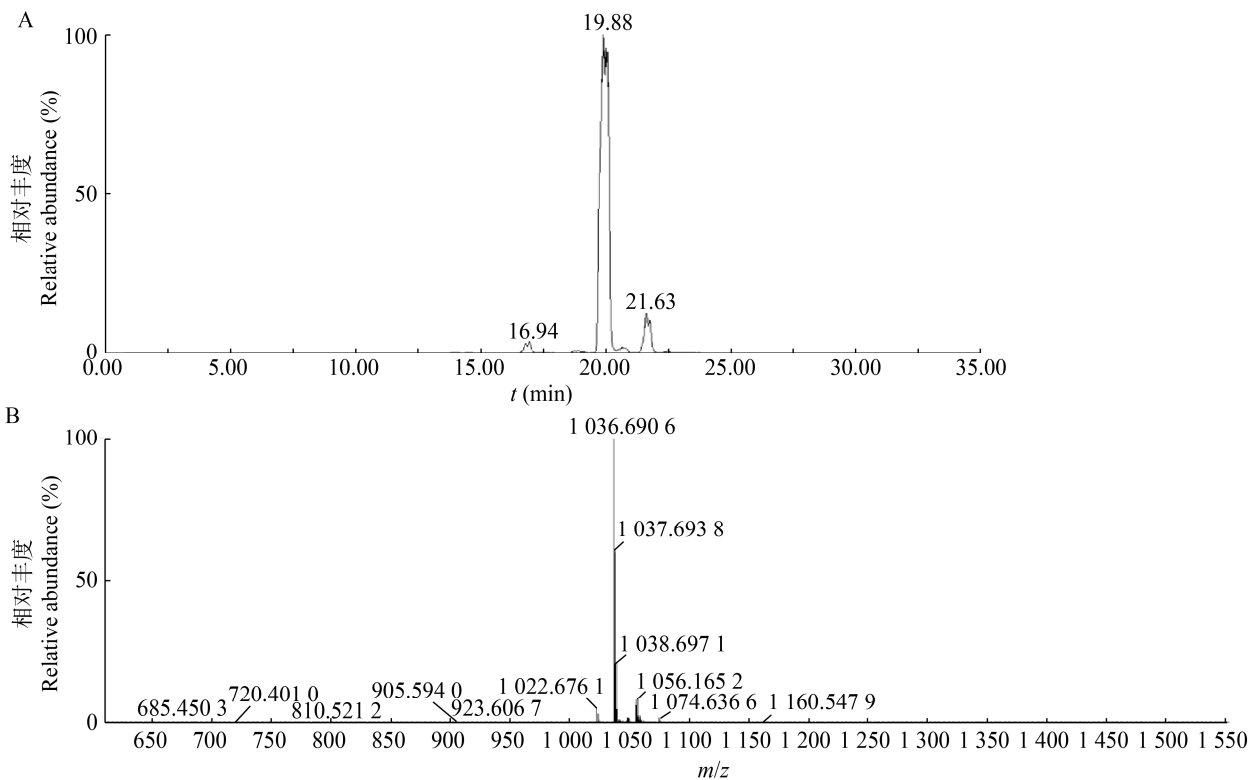


图 3 HPLC-MS 法对有效组分的鉴定

Figure 3 Identification of active components by HPLC-MS

Note: A: HPLC diagram; B: MS diagram

2.6 Surfactin 对细菌生物被膜特性的影响

相关文献报道 Surfactin 的出峰时间为 8–12 min, 而且峰形为“M”形^[29]。由图 4 的液相图可知, Mmsg 培养基中菌株 B12 也可以产 Surfactin。由图 5A、5B 可知, Surfactin 可显著提高菌株 B12 生物被膜的干重, 但菌株 B12 浮游细胞数量与 CK 相比却降低了 46.9%。这可能是因为 Surfactin 可促进菌株 B12 的群集, 导致生物被膜形成增加, 而浮游细胞数量减少。由图 5C–5E 可知, 外源添加 Surfactin 后, 与 CK 相比, 菌株 B12 Cd 的去除率增加了 36.1%, 其中生物被膜 Cd 吸附比例增加了 46.8%, 而浮游细胞吸附 Cd 的比例却下降了 52.7%。可见, 外源添加 Surfactin 后, 更多的 Cd 被菌株 B12 生物被膜吸附。上述结果表明, Surfactin 可通过促进菌株 B12 的群集来促进生物被膜的形成, 利用生物被膜吸附更多的 Cd 来缓解 Cd 对自身的胁迫。

分析图 5A 可知, 与 CK 相比, 外源添加 Surfactin 后, 不同属的苜蓿中华根瘤菌 Mr40 以及同属不同种的解淀粉芽孢杆菌 P29 生物被膜干重分别增加了 126.9%和 84.1%。可见, Surfactin 对其他产膜细菌生物被膜也有促进作用。菌株 Mr40 与 P29 的浮游细胞数量以及 Cd 吸附比例与 CK 相比都显著下降, 但生物被膜 Cd 的吸附比例分别增加了 47.3%和 68.1%。该结果表明, Surfactin 不仅可以调控枯草芽孢杆菌 B12 生物被膜的形成, 对其他细菌生物被膜的形成也有促进作用。

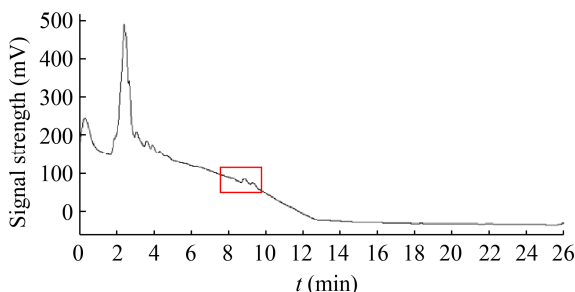


图 4 Mmsg 培养基中枯草芽孢杆菌 B12 分泌的 Surfactin 液相图

Figure 4 Liquid phase diagram of surfactin secreted by *Bacillus subtilis* B12 in Mmsg medium

3 讨论与结论

生物被膜在细菌抵抗重金属胁迫过程中发挥着至关重要的作用。研究表明, 微生物形成生物被膜是一种克服环境压力的策略, 如营养物质耗竭、氧自由基、重金属的存在等^[30]。生物被膜中大量的胞外多糖、胞外蛋白等物质带有大量阴离子, 作为一个离子交换器可以有效阻止毒性分子物质, 如重金属离子的渗透, 从而使生物被膜中的细胞远离重金属的毒害^[31]。本研究中 Cd 浓度为 0.1–1.0 mg/L 时, 与 CK 相比, 菌株 B12 生物被膜干重显著增加了 21.8%–70.0%。由此可见, Cd 胁迫作为一种环境压力可以促进 B12 生物被膜的形成, 枯草芽孢杆菌生物被膜可以通过离子交换的形式吸附 Cd, 此外菌株 B12 生物被膜形成的网格状结构还能有效屏蔽 Cd 的渗透, 减少 Cd 进入细胞, 从而缓解 Cd 对细胞的毒害。这可能是菌株 B12 缓解 Cd 胁迫的机制之一。

有文献报道, 枯草芽孢杆菌 Surfactin 的产量与诱导自身产生系统性抗性之间具有强烈的正相关性^[32]。Cd 为一种有毒的重金属, 菌株 B12 受到 Cd 胁迫时, 为了增强自身的系统性抗性, 菌株 B12 可能分泌更多的 Surfactin。此外, 相关文献报道了 PhoR/PhoP 双组分系统是枯草芽孢杆菌中普遍存在的一种调控系统, 可影响 Surfactin 的合成^[32]。相关研究发现, 在低磷环境下, 位于细胞被膜上的组氨酸蛋白激酶 PhoR 自磷酸化后将自身获取的磷酸基团转移到位于细胞质中的调控因子 PhoP 上, 磷酸化的调控因子 PhoP 通过与下游调控 Surfactin 合成基因的启动子区域相结合, 进而调控 Surfactin 的表达。相类似地, 菌株 B12 也可能通过 PhoR/PhoP 双组分系统来调控 Surfactin 的分泌, 但该推测还需探究 PhoR/PhoP 的基因表达和磷酸化水平来进一步验证。

Cd 胁迫促进了菌株 B12 生物被膜的形成以及 Surfactin 的分泌。同时, 本研究还发现 Surfactin 也可以促进生物被膜形成。目前, 枯草芽孢杆菌生

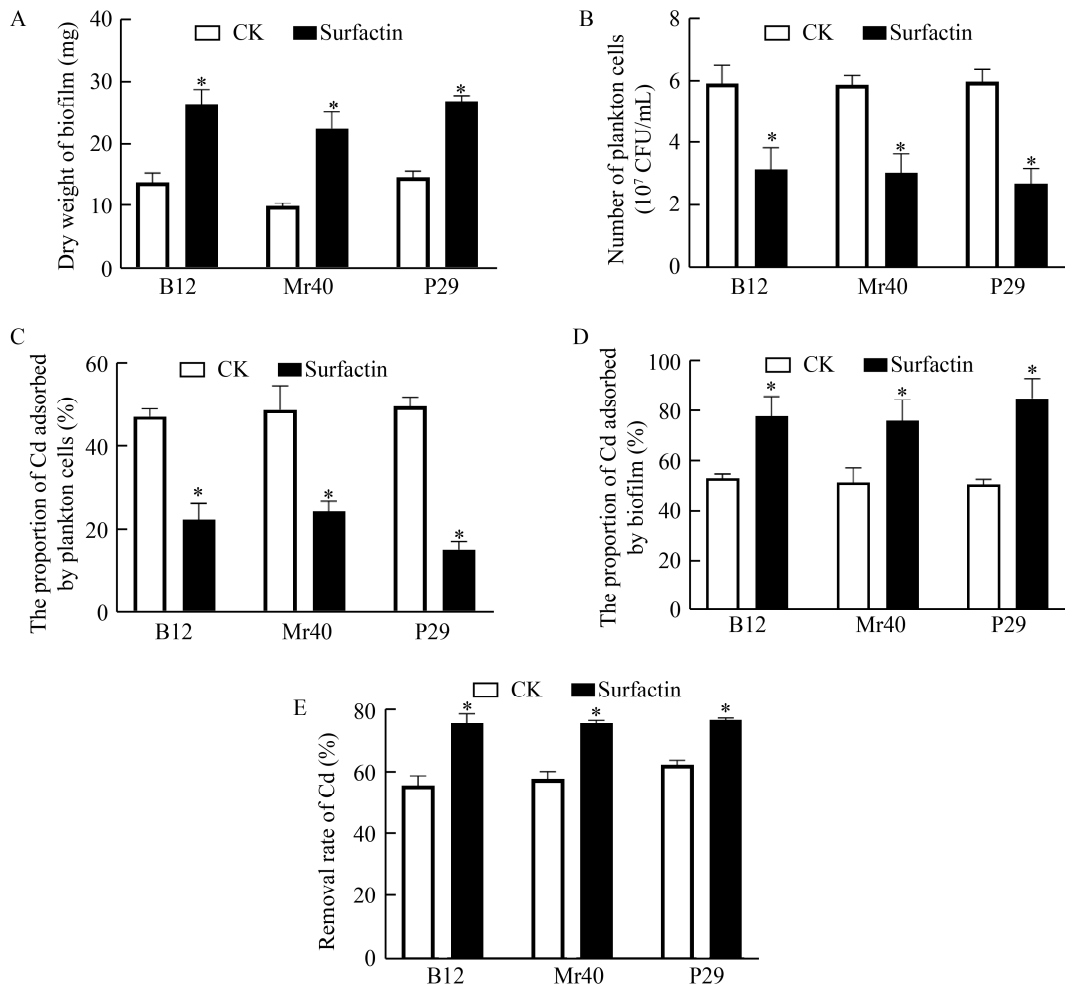


图 5 Surfactin 对生物被膜干重(A)、浮游细胞数量(B)、浮游细胞吸附 Cd 比例(C)、生物被膜吸附 Cd 比例(D)、Cd 去除率(E)的影响

Figure 5 Effects of surfactin on biofilm dry weight (A), number of plankton cells (B), Cd adsorption proportion of plankton cells (C), Cd adsorption proportion of biofilm (D) and Cd removal rate (E)

注: *: 与 CK 相比, 在 0.05 水平有显著差异($P < 0.05$)

Note: *: There is a significant difference at the 0.05 level ($P < 0.05$) compared to CK

物被膜形成的主要调控网络包括 Spo0A 下游的 SinR/SinI、AbrA/AbrB、SinR/SlrR/SlrA 和独立于 Spo0A 途径的 YwcC、DegU/DegS 等途径^[33]。Spo0A 的磷酸化可使生物被膜基质基因得到表达, 而 Spo0A 的磷酸化(Spo0A-P)水平是由组氨酸激酶 KinABCD 感受外界环境信号的变化来调控的^[34]。基因簇 *epsA-O* 和 *tapA-sipW-tasA* 是生物被膜基质形成所必需的基因^[35]。研究报道 Surfactin 在生物被膜形成过程中起着信号分子的作用, Surfactin

可使枯草芽孢杆菌细胞被膜表面发生钾泄漏, 钾泄漏可以激活组氨酸激酶 KinC 的活性, 而组氨酸激酶 KinC 又控制了基质产生所必需的 *epsA-O* 和 *tapA-sipW-tasA* 基因的表达^[36-37]。本研究中, 外源添加 Surfactin 后, *B. subtilis* B12、*S. meliloti* Mr40、*B. amyloliquefaciens* P29 的生物被膜干重显著增加, 说明 Surfactin 不仅可以调控枯草芽孢杆菌的生物被膜形成, 对其他菌株的生物被膜形成也有调控作用。调控的机制可能是 Surfactin 引起细菌细

胞被膜钾泄漏,进而激活组氨酸激酶,活化的组氨酸激酶通过调控 *epsA-O* 和 *tapA-sipW-tasA* 来调控生物被膜形成。

本研究发现 Surfactin 可以促进菌株 B12、Mr40、P29 生物被膜形成,减少浮游细胞数量,使菌株能更好地去除溶液中的 Cd。Surfactin 作为一种表面活性剂,与细菌的运动以及定殖有密切关系。研究报道,枯草芽孢杆菌 Surfactin 缺失突变株游动性以及生物和非生物表面的扩散性显著下降^[38-39]。本研究中,Cd 胁迫下溶液中菌株 B12 浮游细胞数量显著下降,可能是因为 Surfactin 分泌量增加促进了溶液中细菌向生物被膜中游动;此外,Surfactin 作为一种表面活性素,可能降低了液面的表面张力,使细菌形成的生物被膜在液面处更好地扩散,从而使生物被膜更好地吸附在试管壁上,增加生物被膜的结实度。

综上所述,Cd 胁迫可以促进菌株 B12 分泌更多 Surfactin,Surfactin 不仅可以促进自身生物被膜的形成,还可以促进不同属的苜蓿中华根瘤菌 Mr40 以及同属不同种的解淀粉芽孢杆菌 P29 生物被膜的形成,这 3 株菌生物被膜增多后可以吸附更多的 Cd,从而缓解 Cd 胁迫。

REFERENCES

- [1] Wang YJ, Wu TL, Zhou DM, Chen HM. Advances in soil heavy metal pollution evaluation based on bibliometrics analysis[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2017, 36(12): 2365-2378 (in Chinese)
王玉军,吴同亮,周东美,陈怀满. 农田土壤重金属污染评价研究进展[J]. 农业环境科学学报, 2017, 36(12): 2365-2378
- [2] Chen YP, Liang DL, Liu ZH, Wang CL, Zhen ZL, Yan ZR. Analysis of present situation and control of heavy metal pollution in vegetable greenhouse soils[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2018, 37(1): 9-17 (in Chinese)
陈玉鹏,梁东丽,刘中华,王春玲,甄志磊,闫昭如. 大棚蔬菜土壤重金属污染及其控制的研究进展与展望[J]. 农业环境科学学报, 2018, 37(1): 9-17
- [3] Xia M, Wan HP, Cao XH, Sun QY, Zhou SL. Methods for repairing contaminated soil by using microbial technology[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2020, 48(14): 13-15,19 (in Chinese)
夏明,万何平,曹新华,孙齐英,周世力. 利用微生物技术修复污染土壤的方法[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(14): 13-15,19
- [4] Zhu ML, Wang YH, Dai Y, Wu XQ, Ye JR. Effects of different culture conditions on the biofilm formation of *Bacillus pumilus* HR10[J]. Current Microbiology, 2020, 77(8): 1405-1411
- [5] Chug R, Gour VS, Mathur S, Kothari SL. Optimization of Extracellular Polymeric Substances production using *Azotobacter beijreickii* and *Bacillus subtilis* and its application in chromium (VI) removal[J]. Bioresource Technology, 2016, 214: 604-608
- [6] Hou WJ. Research of biosorption of copper by extracellular polymeric substances of *S. meliloti*[D]. Yangling: Doctoral Dissertation of Northwest A & F University, 2015 (in Chinese)
侯文洁. 苜蓿中华根瘤菌胞外聚合物吸附铜机制研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文, 2015
- [7] Chen Y, Yan F, Chai YR, Liu HX, Kolter R, Losick R, Guo JH. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation[J]. Environmental Microbiology, 2013, 15(3): 848-864
- [8] Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life[J]. Nature Reviews Microbiology, 2016, 14(9): 563-575
- [9] Ge ZB, Yin TT, Zhou QQ, Zhang J, Sheng XF, He LY. Reduced cadmium and lead uptake by leafy vegetables and soil remediation in the presence of the biofilm-producing *Bacillus* strains[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2020, 43(1): 80-88 (in Chinese)
葛占标,殷涂童,周倩倩,张静,盛下放,何琳燕. 产生物膜芽孢杆菌阻控叶菜吸收镉、铅及其修复菜地土壤的作用[J]. 南京农业大学学报, 2020, 43(1): 80-88
- [10] Camacho-Chab JC, Castañeda-Chávez MDR, Chan-Bacab MJ, Aguila-Ramírez RN, Galaviz-Villa I, Bartolo-Pérez P, Lango-Reynoso F, Tabasco-Novelo C, Gaylarde C, Ortega-Morales BO. Biosorption of cadmium by non-toxic extracellular polymeric substances (EPS) synthesized by bacteria from marine intertidal biofilms[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2018, 15(2): E314
- [11] Pal A, Paul AK. Microbial extracellular polymeric substances: Central elements in heavy metal bioremediation[J]. Indian Journal of Microbiology, 2008, 48(1): 49-64
- [12] De Philippis R, Colica G, Micheletti E. Exopolysaccharide-producing cyanobacteria in heavy metal removal from water: molecular basis and practical applicability of the biosorption process[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 92(4): 697-708
- [13] Teitzel GM, Parsek MR. Heavy metal resistance of biofilm

- and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(4): 2313-2320
- [14] Wu YQ, Wang YY, Wang C, Sha MY. Inhibitory effect of lipopeptide crude extract produced by *Bacillus subtilis* WL2 on *Phytophthora infestans* and its isolation and identification[J]. Journal of Hebei University (Natural Science Edition), 2018, 38(6): 632-639 (in Chinese)
吴艳清, 王游游, 王畅, 沙梦莹. 枯草芽孢杆菌 WL2 脂肽粗提物对致病疫霉的抑制作用及其分离鉴定[J]. 河北大学学报: 自然科学版, 2018, 38(6): 632-639
- [15] Peypoux F, Guinand M, Michel G, Delcambe L, Das BC, Lederer E. Structure of iturine A, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*[J]. Biochemistry, 1978, 17(19): 3992-3996
- [16] Gao XW, Yao SY, Pham H, Vater J, Wang JS. Purification and identification of surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis* B2 strain[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2003, 43(5): 647-652 (in Chinese)
高学文, 姚仕义, PhamH, Vater J, 王金生. 枯草芽孢杆菌 B2 菌株产生的表面活性素变异体的纯化和鉴定[J]. 微生物学报, 2003, 43(5): 647-652
- [17] Perfumo A, Banat IM, Marchant R. Going green and cold: biosurfactants from low-temperature environments to biotechnology applications[J]. Trends in Biotechnology, 2018, 36(3): 277-289
- [18] Akpa E, Jacques P, Wathélet B, Paquot M, Fuchs R, Budzikiewicz H, Thonart P. Influence of culture conditions on lipopeptide production by *Bacillus subtilis*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2001, 91/92/93(1/2/3/4/5/6/7/8/9): 551-561
- [19] Bais HP, Fall R, Vivanco JM. 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
- [20] Xu ZH, Shao JH, Li B, Yan X, Shen QR, Zhang RF. Contribution of bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to antifungal activity and biofilm formation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(3): 808-815
- [21] Kinsella K, Schulthess CP, Morris TF, Stuart JD. Rapid quantification of *Bacillus subtilis* antibiotics in the rhizosphere[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2009, 41(2): 374-379
- [22] Kinsinger RF, Shirk MC, Fall R. Rapid surface motility in *Bacillus subtilis* is dependent on extracellular surfactin and potassium ion[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(18): 5627-5631
- [23] Zhou HF, Yang HF, Yao KB, Zhuang YQ, Shu ZL, Chen ZY. FlhZ regulated the biofilm formation of *Bacillus subtilis* Bs916 and its biocontrol efficacy on rice sheath blight[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2020, 53(1): 55-64 (in Chinese)
周华飞, 杨红福, 姚克兵, 庄义庆, 束兆林, 陈志谊. FlhZ 调控枯草芽孢杆菌 Bs916 生物膜形成及其对水稻纹枯病的防治效果[J]. 中国农业科学, 2020, 53(1): 55-64
- [24] Yang Q, Gu WC, Zhou N, Zhang LS, Yang DQ. Comparison of phenol-sulfuric acid and anthrone-sulfuric acid methods for determination of polysaccharide in *Lycopus lucidus* tilrcz. var. *hirtus* regel[J]. Food Science and Technology, 2020, 45(1): 343-350 (in Chinese)
杨勤, 谷文超, 周浓, 张兰胜, 杨德全. 苯酚-硫酸法与蒽酮-硫酸法测定地参多糖的比较研究[J]. 食品科技, 2020, 45(1): 343-350
- [25] Shen YY, Qin XX, Teng QM, Sun YJ, Zhang DN, Zhou LW, Xu GP. Determination of protein content in *Eleocharis dulcis* polysaccharides[J]. Studies of Trace Elements and Health, 2019, 36(6): 50-52 (in Chinese)
沈育伊, 覃香香, 滕秋梅, 孙英杰, 张德楠, 周龙武, 徐广平. 荸荠多糖中蛋白含量的测定[J]. 微量元素与健康研究, 2019, 36(6): 50-52
- [26] Gao SF, Wang F, Liu AQ, Gou YF, Sun SW, Wang Z, Meng QQ. Identification and field application of the lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* VD18R19 against black pepper mosaic disease[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2019, 39(10): 89-94 (in Chinese)
高圣凤, 王锋, 刘爱勤, 苟亚峰, 孙世伟, 王政, 孟倩倩. *Bacillus subtilis* VD18R19 脂肽类产物鉴定及其对胡椒花叶病的田间生防效果[J]. 热带农业科学, 2019, 39(10): 89-94
- [27] Gong JH, Wang J. A brief introduction to the method of counting live bacteria by dilution coating plate method[J]. Biology Teaching, 2018, 43(2): 70-71 (in Chinese)
龚军辉, 王晶. 稀释涂布平板法计数活菌的方法简介[J]. 生物学教学, 2018, 43(2): 70-71
- [28] Zhuang GH, Song T, Lu JR, Wang XY, Zhang Q, Jiang GT, Qin AJ. Screening of *Bacillus subtilis* with lipopeptide compounds against *E. coli* and purification and separation of compounds[J]. China Poultry, 2019, 41(13): 20-25 (in Chinese)
庄国宏, 宋涛, 陆金荣, 王效禹, 张琪, 江国托, 秦爱建. 产抗大肠杆菌脂肽化合物枯草芽孢杆菌筛选及脂肽化合物的分离纯化[J]. 中国家禽, 2019, 41(13): 20-25
- [29] Liu HX. The modification of COM domain in lipopeptide plipastatin synthase and the synthesis of novel lipopeptides[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2017 (in Chinese)
刘洪霞. 脂肽 Plipastatin 合成酶 COM 结构域的修饰及新型脂肽的合成[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2017
- [30] Karatan E, Watnick P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2009, 73(2):

- 310-347
- [31] Li Z, Zhang HL, Fan SL, Yang Y, Li Y, Qu YY. Interactions between metals and environmental microbes[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2020, 26(4): 836-843 (in Chinese)
李政, 张珩琳, 范书伶, 杨颖, 李严, 曲媛媛. 金属元素与环境微生物的互作关系研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2020, 26(4): 836-843
- [32] Dong LH, Guo QG, Wang PP, Li SZ, Lu XY, Zhang XY, Zhao WS, Ma P. The effect of PhoR/PhoP two-component regulatory system on surfactin production in *Bacillus subtilis* NCD-2[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2018, 48(1): 119-127 (in Chinese)
董丽红, 郭庆港, 王培培, 李社增, 鹿秀云, 张晓云, 赵卫松, 马平. PhoR/PhoP 双组份对枯草芽胞杆菌 NCD-2 菌株中 surfactin 合成的影响[J]. 植物病理学报, 2018, 48(1): 119-127
- [33] Vlamakis H, Chai YR, Beaugard P, Losick R, Kolter R. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way[J]. Nature Reviews Microbiology, 2013, 11(3): 157-168
- [34] Jiang M, Shao W, Perego M, Hoch JA. Multiple histidine kinases regulate entry into stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis*[J]. Molecular Microbiology, 2000, 38(3): 535-542
- [35] Fujita M, González-Pastor JE, Losick R. High- and low-threshold genes in the Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(4): 1357-1368
- [36] López D, Vlamakis H, Losick R, Kolter R. Cannibalism enhances biofilm development in *Bacillus subtilis*[J]. Molecular Microbiology, 2009, 74(3): 609-618
- [37] López D, Fischbach MA, Chu F, Losick R, Kolter R. Structurally diverse natural products that cause potassium leakage trigger multicellularity in *Bacillus subtilis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(1): 280-285
- [38] Kearns DB, Chu F, Rudner R, Losick R. Genes governing swarming in *Bacillus subtilis* and evidence for a phase variation mechanism controlling surface motility[J]. Molecular Microbiology, 2004, 52(2): 357-369
- [39] Angelini TE, Roper M, Kolter R, Weitz DA, Brenner MP. *Bacillus subtilis* spreads by surfing on waves of surfactant[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(43): 18109-18113