

产表面活性素和伊枯草菌素 A 菌株的筛选及其脂肽类产物的特性

朱震 罗毅 张鹏 杨兴明 冉炜* 沈其荣

(南京农业大学 资源与环境科学学院江苏省固体有机废弃物资源化高技术研究重点实验室 江苏 南京 210095)

摘要: 采用血琼脂平板法, 从菜园土壤中分离到 8 株代谢表面活性剂的菌株, 比较各菌株的排油性、抑菌性, 根据合成脂肽类物质表面活性素(Surfactin)和伊枯草菌素 A (Iturin A)必需的 *sfp*、*ituD* 和 *lpa-14* 基因设计引物, 结合 PCR 的方法筛选到一株具广谱抗菌性且含有 *sfp*、*ituD* 和 *lpa-14* 3 个关键基因的细菌 XZ-173。经过生理生化试验测定和 16S rDNA 序列系统发育学分析, 将其鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。通过红外光谱(FT-IR)分析该菌株代谢产物, 初步鉴定为脂肽类物质, 并对照高效液相色谱(HPLC)与标准品比对结果, 确定含有 Surfactin 和 Iturin A 组分。该菌株产生的脂肽粗品能使纯水的表面张力降低至 26.6 mN/m, 临界胶束浓度(CMC)为 500 mg/L, 具有很好的乳化性能, 对立枯丝核菌和青枯菌表现出很好的拮抗活性。因此, 产脂肽细菌 XZ-173 是一株应用前景广阔的功能菌。

关键词: 芽孢杆菌, 脂肽, 表面活性素, 伊枯草菌素 A, 植物病原菌

Screening a surfactin and iturin A producing strain and characterization of its lipopeptide products

ZHU Zhen LUO Yi ZHANG Peng YANG Xing-Ming RAN Wei* SHEN Qi-Rong

(College of Resources and Environmental Sciences, Jiangsu Key Laboratory for Solid Organic Waste Utilization, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: After preliminarily isolated from soil of vegetable gardens by using blood-agar method, eight strains were further examined by oil-spreading test and inhibitory test. Primers were designed according to genes (*sfp*, *ituD*, *lpa-14*) related to surfactin and iturinA synthesis, and one bacterial strain XZ-173 with a broad spectrum of phytopathogens was screened out by PCR of the *sfp*, *ituD*, *lpa-14* gene. Based on the physiological and biochemical properties and 16S rDNA sequence analysis, it was identified as *Bacillus amyloliquefaciens*. The FT-IR and HPLC results indicated that the biosurfactant produced by

strain XZ-173 was lipopeptides that contained surfactin and iturin A. The prepared crude lipopeptides reduced the surface tension of water to 26.6 mN/m with a critical micelle concentration (CMC) of 500 mg/L and showed stable emulsification capability and strong inhibition against *Rhizoctonia solani* and *Ralstonia solanacearum*. Lipopeptide-producing stain XZ-173 had potential to be used in biological control of soil-borne plant diseases.

Keywords: *Bacillus* spp., Lipopeptide, Surfactin, IturinA, Phytopathogen

芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)具有复杂的生理学性质多样性和底物多样性,能够产生高耐性芽孢和各种抑菌物质如多肽类和脂肽类及细菌素类抗生素,是其能够生存于各种生境的重要原因^[1]。由非核糖体途径合成的脂肽类化合物是最常见的一类,主要包括 Surfactins、Iturins 和 Fengycins 3 个家族^[2-4]。由于脂肽类物质为亲油亲水的两亲分子,对其它细菌为非特定作用模式,因此不会产生抗药性细菌,可作为新一代抗生素,已经成为当今研究开发的热点^[5]。Surfactin 是已知最有效的生物表面活性剂之一,可显著降低水的表面张力(从 72 mN/m 降低到 27 mN/m),抑制细菌、病毒、真菌、支原体的生长^[6],具有优异的乳化和起泡特性,在医药和食品行业有较高的应用价值^[7-8]; Iturin 家族中以 Iturin A 抗真菌活性最强,与常用的化学农药杀菌性能相似^[9],可开发出有潜力并且环境安全的生物源农药^[10-11]。而 Fengycin 对丝状真菌具有较强的抑制作用^[12]。有报道显示, Surfactin 与 Iturin A 共同作用能够显著增强抑真菌活性^[13]。然而,脂肽及产脂肽细菌在农作物土传病害控制领域的应用仍较少,加强相关基础研究十分重要。

脂肽类表面活性剂产生菌的筛选过去主要是根据菌株在血琼脂平板上产生溶血圈的特点进行分离的,但该方法存在较多局限性^[14]。本研究结合多种筛选方法,以获得产脂肽的目标菌株:(1) 通过血平板初筛,排油活性和抗菌性比较等方法从土壤中分离到一组产脂肽菌株;(2) 根据 Surfactin 代谢过程中的 *sfp* 基因(脂肽生物合成必需的第 2 个基因,编码的 SFP 酶属于 4' 磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶超家族),以及对 Iturin A 形成起重要作用的 *ituD* 基因(编码丙二酰辅酶 A 转酰酶,调控 Iturin A 的产量)和 *lpa-14* 基因(编码 4'磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶,调节 Iturin

A 模板酶复合物的形成)设计引物,对筛选到的菌株进一步进行相关基因检测,并结合 FT-IR 和 HPLC 分析其代谢产物,确定脂肽类物质类型;(3) 对其产生的脂肽类物质粗提物的乳化性能、表面活性和抑制常见农作物病原菌生长的特性进行了相应的研究,为认识产脂肽菌株在农业领域的应用潜力和开发利用该菌株及相关微生物资源提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土壤: 用于分离拮抗菌的土壤为菜园土壤,采自江苏省宜兴市陆平村。

1.1.2 供试病原菌: 试验所用香蕉枯萎病病原菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, FOC)、棉花黄萎病病原菌 (*Verticillium dahliae*, Vd)、黄瓜立枯病病原菌 (*Rhizoctonia solani*, Rhs)、烟草黑胫病病原菌 (*Phytophthora parasitica*, Php) 和番茄青枯病病原菌 (*Ralstonia solanacearum*, Rs) 全部由江苏省固体有机废弃物资源化高技术重点实验室提供。

1.1.3 培养基(g/L): PDA: 马铃薯 200, 葡萄糖 20, 琼脂 2%; LB: 蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 10, pH 7.0; NA: 葡萄糖 10, 蛋白胨 5, 牛肉膏 3, pH 7.0-7.2; Landy: 葡萄糖 20, L-谷氨酸钠 5, KH₂SO₄ 1, MgSO₄ 0.5, KCl 0.5, 酵母粉 1, L-苯丙氨酸 2×10⁻³, MnSO₄ 5×10⁻³, CuSO₄ 0.16×10⁻³, FeSO₄ 0.15×10⁻³, pH 7.0。血琼脂平板购自上海科玛嘉生物技术有限公司。固体培养基为相应液体培养基添加 2% (W/V) 琼脂制得。

1.1.4 标准品: Surfactin 和 Iturin A 标准品购自 Sigma 公司。

1.2 菌株的筛选和鉴定

1.2.1 血平板初筛: 取采集到的番茄根际土壤 10 g

放入 90 mL 无菌水中, 振荡混匀, 80 °C 水浴 20 min, 冷却至室温, 稀释成 10^{-5} 、 10^{-6} 梯度后涂布于血琼脂平板, 放入 37 °C 培养箱中培养 1–2 d, 选取产生明显溶血圈的菌株划线于固体 LB 培养基上, 37 °C 培养 1 d, 保存备用。

1.2.2 发酵上清液的制备: 将初筛得到的菌株接种于 LB 液体培养基中, 30 °C、170 r/min 摇床培养 48 h, 10 000 r/min 离心 15 min 去除菌体, 发酵上清液过 0.22 μ m 孔径滤膜除菌, 4 °C 保存。

1.2.3 排油活性检测: 取一直径 9 cm 培养皿, 加入无菌水, 再加入 0.1 mL 液体石蜡使之在水面形成油膜, 然后在油膜中心加入 0.01 mL 发酵上清液, 中心油膜会被挤向四周形成一个圆圈, 圈的大小与表面活性剂的含量呈正比, 每个处理重复 3 次。

1.2.4 抗病原菌活性的测定: 用直径 5 mm 的打孔器切取病原真菌菌饼(立枯丝核菌取菌核)置于 PDA 平板中央, 在四周用灭菌牙签点接所试菌株, 平板于 28 °C 培养箱中培养 2–5 d, 观察菌株对不同病原

真菌的抑菌效果, 测量抑菌带大小。菌株对青枯菌的抑菌效果采取在固体 NA 培养基上点接功能菌(30 °C 先培养 12–16 h), 然后喷洒 10^6 – 10^7 CFU/mL 的青枯菌菌悬液, 30 °C 培养箱内放置 1–2 d, 测量抑菌圈大小, 比较各菌株的拮抗性能差异。

1.2.5 *sfp*、*ituD* 和 *lpa-14* 基因的 PCR 扩增及测序^[15–16]: 使用柱式 DNA 提取试剂盒(北京天恩泽基因科技有限公司)提取各功能菌株总 DNA, 扩增引物序列见表 1。PCR 采用 25 μ L 体系, 以菌株 DNA 基因组为模板, 反应条件: 扩增 *sfp* 为: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 48 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min; 检测 *ituD* 和 *lpa-14* 为: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 58 °C 30 s, 72 °C 1.5 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。目的片段经试剂盒(Axyprep DNA Gel Extraction Kit, Axygen Biosciences)纯化后连接到 PMD19-T-vector (TaKaRa)上, 转化 *E. coli* DH5 α , 随机挑选阳性克隆, 提取质粒并酶切验证, 序列测定由南京金斯瑞生物科技有限公司完成。

表 1 用于扩增 *sfp*、*ituD*、*lpa-14* 基因的引物
Table 1 Primers for amplification of *sfp*, *ituD* and *lpa-14*

基因 Gene	引物序列 Primer sequences (5'→3')	目的片段大小 PCR products size (bp)
<i>sfp</i>	ATGAAGTTTACGGAATTTA	675
	TTATAAAAAGCTCTTCGTACG	
<i>ituD</i>	ATGAACAATCTTGCCTTTTAA	1 203
	TTATTTTAAAATCCGCAATT	
<i>lpa-14</i>	GAAAATTTACGGAGTATATATG GACCGC	675
	TTATAACAGCTCTTCATACGTTTTCATCTC	

1.2.6 菌株的鉴定: 生理生化性质测定方法参见文献[18], 扩增引物采用 16S rDNA 通用引物(16s-f: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 16s-r: 5'-GGT TACCTTGTACGACTT-3') (由南京金斯瑞生物科技有限公司合成)。PCR 采用 25 μ L 反应体系, 以菌株 DNA 为模板进行扩增, 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物采用试剂盒(Axyprep DNA Gel Extraction Kit, Axygen Biosciences)纯化后, 连接到 PMD19-T-vector(TaKaRa)上, 转化 *E. coli* DH5 α , 挑选阳性克隆, 提取质粒经酶切验证后, 交由南京

金斯瑞生物科技有限公司完成测序工作。测序结果在 RDP 数据库中进行比对, 选取同源性较高的序列采用 MEGA 3.1 软件分析菌株同源性, 邻近法构建菌株系统发育树。

1.3 脂肽粗品定性分析

1.3.1 样品提取与 FT-IR 分析: 将菌株 XZ-173 接种于发酵培养基 Landy 中, 30 °C、170 r/min 摇床培养 2 d, 取一定量发酵液, 10 000 r/min 离心 15 min 去除菌体, 上清液用 6 mol/L HCl 调节 pH 至 2.0, 出现白色絮状沉淀, 4 °C 静置过夜, 再以 10 000 r/min 离心 20 min 收集沉淀; 用 pH 2.0 的 HCl 洗涤 3 次,

将沉淀溶于无菌水中, 用 NaOH 调 pH 至 7.0, 冷冻干燥得表面活性剂粗品^[17]。将表面活性剂粗品用 KBr 压片, 采用 ThermoFisher IS10 红外光谱仪分析样品组成。

1.3.2 HPLC 定性分析: HPLC 分析系统为 Agilent HPLC 1200 series, 色谱柱为 ZORBAX Eclipse XDB-C18 Analytical Column (5 μ m, 4.6 mm \times 250 nm); 检测波长为 280 nm, 柱温为 30 $^{\circ}$ C; 采用等梯度洗脱进行样品分析, 所用流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为 0.1% 三氟乙酸(V/V), 流动相比例: Surfactin 分析为 A:B=70:30 (V/V); Iturin A 分析为 A:B=40:60 (V/V); 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 10 μ L。

1.4 脂肽表面活性剂粗品性质的研究

1.4.1 粗脂肽溶液的制备: 准确称取 20 mg 脂肽粗品溶于 20 mL 无菌水中, 混匀, 稀释不同梯度, 制成 1 000、500、200、100、50 和 20 mg/L 的粗脂肽溶液。

1.4.2 粗脂肽乳化性能测定: 方法参照文献[19–20], 取 1 个刻度试管, 加入 2 mL 煤油和 2 mL 脂肽粗品溶液, 振荡混匀 2 min, 静置 24 h, 测量乳化层高度与溶液总高度, 每个处理重复 3 次, 依下式计算乳化指数:

乳化指数(EI_{24})=乳化层高度/溶液总高度 \times 100%。

乳化液放置 96 h, 每隔 24 h 测量乳化指数, 依下式比较不同浓度粗脂肽溶液的乳化稳定性:

乳化稳定性(Stability)= EI_t/EI_0 \times 100%。

EI_0 为静置 0 h 溶液的乳化指数, EI_t 为溶液静置 t h 的乳化指数。

1.4.3 脂肽粗品排油性能和表面张力的测定: 粗脂肽排油能力的测定方法参照 1.2.3; 表面张力的测定采用环法, 仪器为 ZL-2 型自动界面张力仪(山东淄博博山同业分析仪器厂), 每个样品重复测 3 次。

1.4.4 脂肽粗品抑菌活性的测定: 将粗脂肽溶液过 0.22 μ m 滤膜除菌, 制得无菌溶液。采用牛津杯扩散法测量不同浓度粗脂肽溶液的抑菌圈大小。每个处理重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离、筛选

番茄根际土壤经过血平板初筛, 分离到溶血效果明显的 8 株菌株, 通过排油和抑菌试验比较各菌株产表面活性剂和抑菌物质的能力, 从表 2 结果可知, 菌株 Z-25 具有较强的排油活性, 却无抑菌性; 菌株 Z-62、Z-72、Z-92、Z-101、XZ-173 排油活性虽不如 Z-25, 但对所试植物病原菌均有较好的抑菌效果, 其中以 Z-62 和 XZ-173 抑菌性最好, 综合菌株产表面活性剂和抑菌物质能力考虑, 挑取菌株 Z-25、Z-62、XZ-173 做后续试验。

2.2 *sfp*、*ituD* 和 *lpa-14* 基因扩增

分别以初筛细菌基因组 DNA 为模板, 经 PCR 扩增, 发现只有菌株 XZ-173 能够同时扩增出大小

表 2 菌株的排油能力和对常见作物病原菌的抑制效果比较
Table 2 Comparison of oil-spread capability and inhibition against common plant pathogens among screened bacterial strains

菌株 Strain	排油圈直径 Diameter of oil-spread zone (mm)	抑菌带(圈)大小 Inhibition zone (mm)				
		青枯病菌 <i>RS</i>	立枯病菌 <i>Rhs</i>	枯萎病菌 <i>FOC</i>	黄萎病菌 <i>Vd</i>	黑胫病菌 <i>Php</i>
Z-25	35.67 \pm 1.15a	—	—	—	—	—
Z-62	15.67 \pm 0.58f	—	9.11 \pm 0.13a	6.14 \pm 0.26a	5.73 \pm 0.15b	5.07 \pm 0.12a
Z-71	19.67 \pm 0.58e	—	5.17 \pm 0.06d	2.47 \pm 0.15e	1.87 \pm 0.21e	—
Z-72	24.33 \pm 0.58c	9.13 \pm 0.21b	4.33 \pm 0.29e	5.57 \pm 0.06b	3.27 \pm 0.06c	2.03 \pm 0.06e
Z-91	16.67 \pm 1.15f	—	5.88 \pm 0.10c	4.73 \pm 0.15d	—	3.03 \pm 0.12d
Z-92	22.33 \pm 1.53d	5.77 \pm 0.15d	6.17 \pm 0.15c	5.27 \pm 0.12c	3.36 \pm 0.21c	3.53 \pm 0.12c
Z-101	21.67 \pm 1.53d	7.27 \pm 0.06c	5.22 \pm 0.08d	5.23 \pm 0.12c	3.03 \pm 0.15d	4.17 \pm 0.06b
XZ-173	29.67 \pm 0.58b	16.53 \pm 0.25a	7.38 \pm 0.20b	6.07 \pm 0.15a	7.97 \pm 0.12a	4.93 \pm 0.17a

Note: —: No antagonism. Means followed by the same letter within a column are not significantly different ($P < 0.05$). The same below.

约为 675、1 203 和 675 bp 的特异性条带(图 1), 电泳检测与阳性对照菌株(FZB42)结果一致, 初步确认为 *sfp*、*ituD* 和 *lpa-14* 基因。PCR 产物纯化后连接到克隆载体测序, 所得序列与 BLAST 公布的 *sfp*、*ituD* 和 *lpa-14* 基因同源性高达 99% 以上, 确定 XZ-173 具有 *sfp*、*ituD* 和 *lpa-14* 3 个基因。

2.3 菌株 XZ-173 的生理生化和系统发育学分析

菌株 XZ-173 革兰氏染色阳性, 细胞为杆状, 过氧化氢酶阳性、淀粉水解阳性、V.P.反应阴性、甲基红试验阳性、明胶水解阳性、硝酸盐还原阳性、吲哚试验阴性, 能利用柠檬酸盐、酒石酸盐, 能产氨, 发酵葡萄糖产酸产气, 发酵木糖、L-阿拉伯糖、甘露糖、蔗糖、果糖只产酸。

将 XZ-173 的 16S rDNA 序列提交至 RDP 数据库中进行比对分析, 选取同源性较高的 20 条 16S rDNA 序列构建系统发育树(图 2)。结果表明, 菌株 XZ-173 与 *B. amyloliquefaciens* 标准菌株 CR-502 (GenBank 登录号 AY603658)同源性最高(98.5%), 再结合生理生化特性, 初步判定菌株 XZ-173 为解淀粉芽孢杆菌。

2.4 脂肽的定性分析

菌株 XZ-173 的表面活性剂粗品产率为 1.1 g/L, 取适量样品进行 FT-IR 分析, 结果如图 3 所示, 在 IR

图谱上, $3\,411.37\text{ cm}^{-1}$ 是由分子链间氢键引起的 NH 伸缩谱带, $1\,649.76\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,551.66\text{ cm}^{-1}$ 分别为酰胺谱带 I 和 II, 这些特征吸收表明样品中含有肽链。谱图上 $2\,960\text{--}2\,860\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,455\text{--}1\,380\text{ cm}^{-1}$ 两处吸收是脂肪酸链的 C-H 伸缩振动, $1\,236.02\text{ cm}^{-1}$ 为内酯的特征吸收, 表明样品含有脂肪酸分子, 从而证明该样品为脂肽类物质。

对提取的脂肽样品经 CH_3OH 萃取后经 HPLC 与标准品进行比对。由图 4A 可见, Surfactin 标准品在保留时间 3.065、3.529、4.098 min 出现特征峰(经 LC-MS 确定), 而脂肽样品在保留时间 3.129、3.484 min 两处出现了吸收峰(图 4B), 这 2 个峰位于标准峰附近, 推测可能是 Surfactin 的同系物, 故样品含有 Surfactin。比较图 5A 和图 5B 可知, Iturin A 标准品的特征峰在保留时间 3.260、6.665、8.809、9.266 min 出现, 脂肽样品在保留时间 3.252、6.666、8.731、9.344 min 也各有 4 个峰, 这些峰均在标准峰附近, 因此样品同样含有 Iturin A。采用 HPLC 对脂肽粗品中 Surfactin 和 Iturin A 的含量进行测定, 测得 XZ-173 的 Surfactin 和 Iturin A 的产量分别为 158.90 和 75.09 mg/L, 其 Surfactin 产量高于 *B. subtilis* ATCC 21332 (109.50 mg/L)^[15], 在已报道的文献中是较高的。

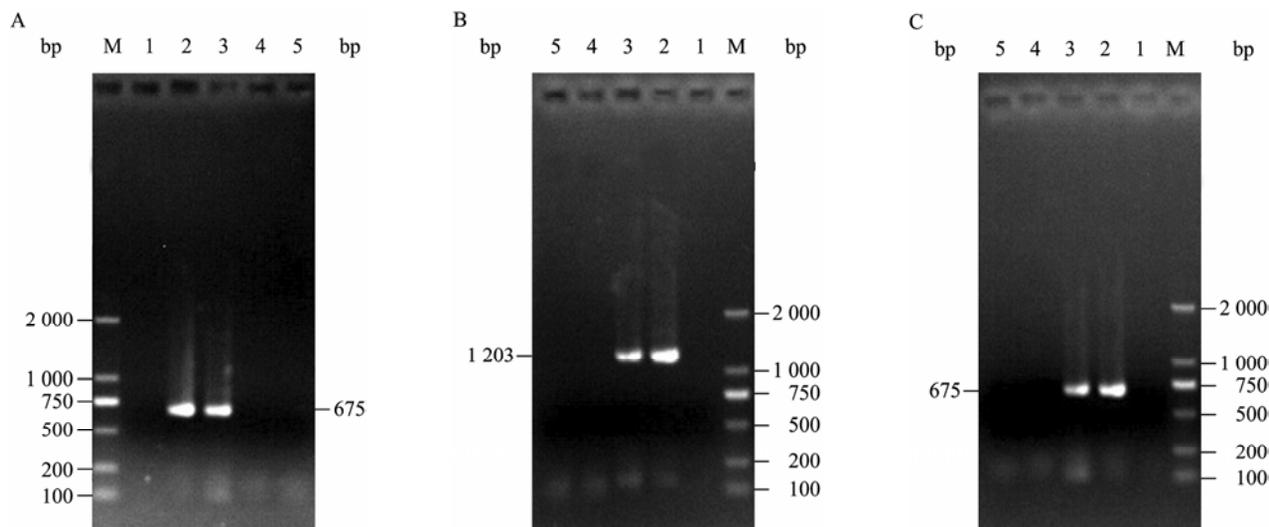


图 1 *sfp* (A)、*ituD* (B)和 *lpa-14* (C)基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR product profiles of *sfp* (A), *ituD* (B) and *lpa-14* (C) gene

Note: M: Molecular weight marker (DL2000); 1: Distilled water; 2: XZ-173; 3: FZB42; 4: Z-25; 5: Z-62.

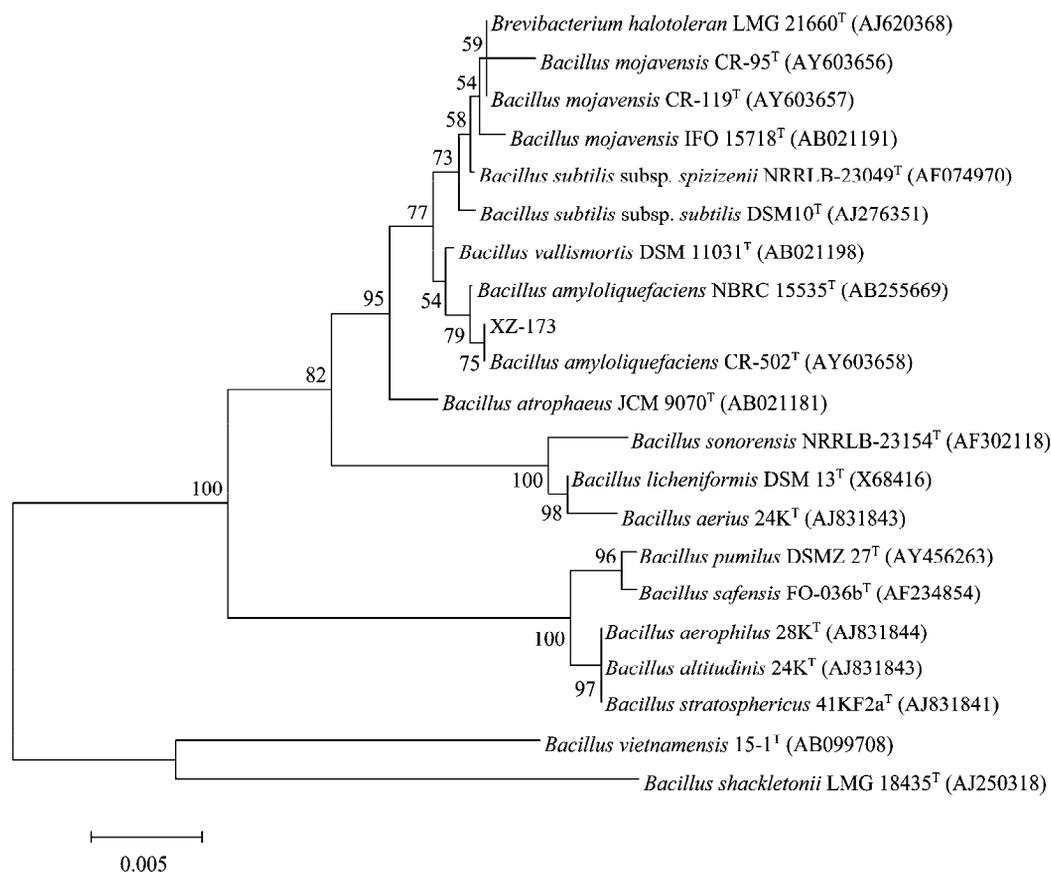


图 2 基于菌株 XZ-173 16S rDNA 序列建立的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree constructed by 16S rDNA sequence of strain XZ-173

Note: Bootstrap values(%) from 1 000 replicates are as shown. The scale bar represents 0.005 nucleotide substitutions per position. Numbers in brackets are GenBank accession numbers for the 16S rDNA gene sequence of the type strains.

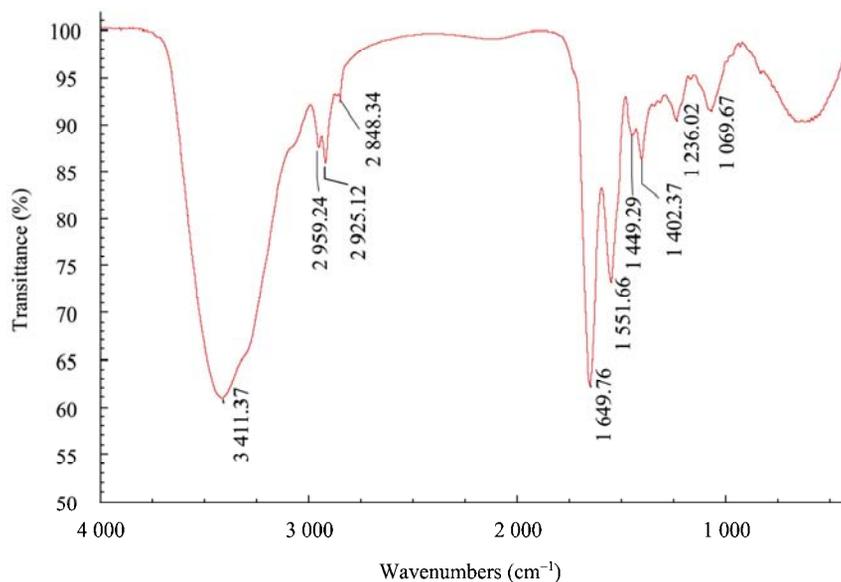


图 3 菌株 XZ-173 产生的脂肽物质的红外吸收光谱图

Fig. 3 IR graph of crude lipopeptide from strain XZ-173

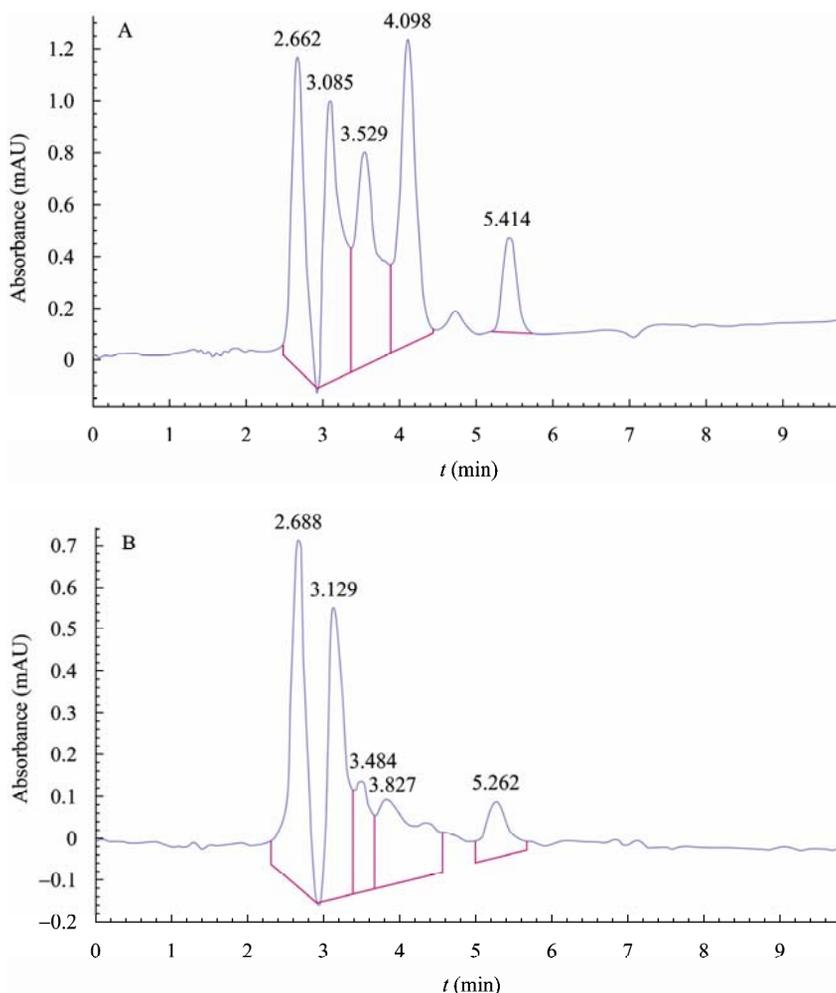


图4 Surfactin 标准品(A)和 Surfactin 粗品(B)液相色谱图
Fig. 4 HPLC spectra of standard surfactin (A) and crude surfactin (B)

2.5 脂肽粗品的表面活性特征

将粗脂肽溶液稀释成不同浓度,分别与煤油振荡混匀,静置,测得乳化指数(图6)和乳化液稳定性(图7)。粗脂肽溶液浓度越高,乳化能力越强(图6)。粗脂肽浓度在高于500 mg/L时, EI_{24} 达70%以上,表现出良好的乳化性能,但是乳化能力随着溶液浓度的增加变化不显著;在浓度低于500 mg/L时, EI_{24} 随着粗脂肽浓度的降低下降明显,且浓度低于50 mg/L的粗脂肽溶液已经没有任何乳化能力。根据图7结果可知,乳化液放置96 h,不同浓度粗脂肽溶液的乳化稳定性均有一定程度的下降,在浓度高于500 mg/L时,稳定性仅下降10%左右,乳化稳定性能较好;粗脂肽浓度越低,乳化液稳定性越差,随着静置时间

的增加,降低也越显著。由此可见,粗脂肽溶液具有一定的乳化活性,需做进一步的提纯研究。

溶液排油圈大小与表面张力值呈负相关。由图8可知,随着粗脂肽浓度的降低,溶液的排油能力逐渐减弱,相应的表面张力值逐渐增加,当浓度达到500 mg/L以上时,表面张力值降至26.6 mN/m后基本保持不变;当浓度低于20 mg/L时,粗脂肽溶液排油圈直径(10.7 mm)与对照(10 mm)差异不显著,表面张力值为66.5 mN/m,几乎没有表面活性。经计算所提取的脂肽类表面活性剂粗品CMC值约为500 mg/L,比一般的化学表面活性剂的CMC值(SDS 2 120 mg/L和吐温 20 600 mg/L^[21])要低,显示出脂肽作为生物表面活性剂的优越性能。

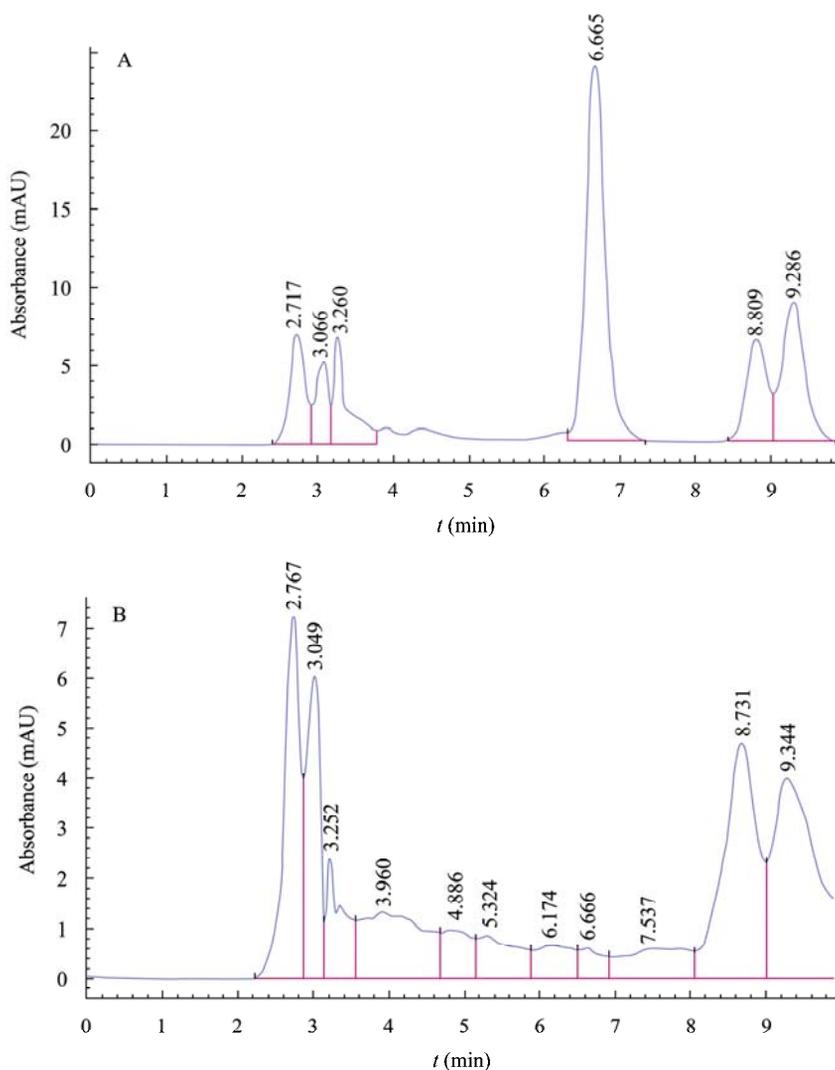


图 5 Iturin A 标准品(A)和 Iturin A 粗品(B)液相色谱图
 Fig. 5 HPLC spectra of standard iturin A (A) and crude iturin A (B)

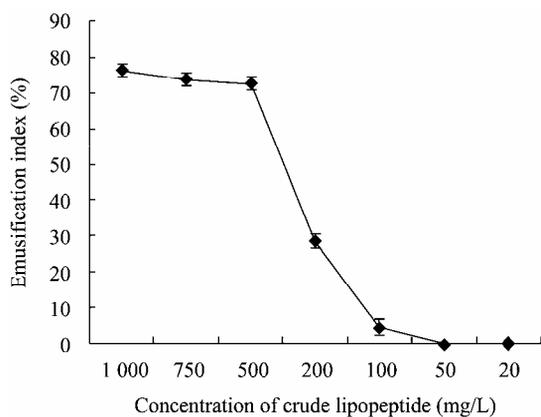


图 6 不同浓度粗脂肽溶液的乳化指数
 Fig. 6 Emulsification index of crude lipopeptide at different concentrations

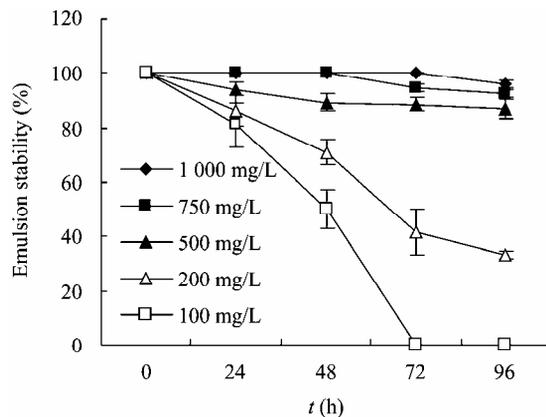


图 7 不同浓度粗脂肽溶液的乳化稳定性
 Fig. 7 Emulsion stability of crude lipopeptide at different concentrations

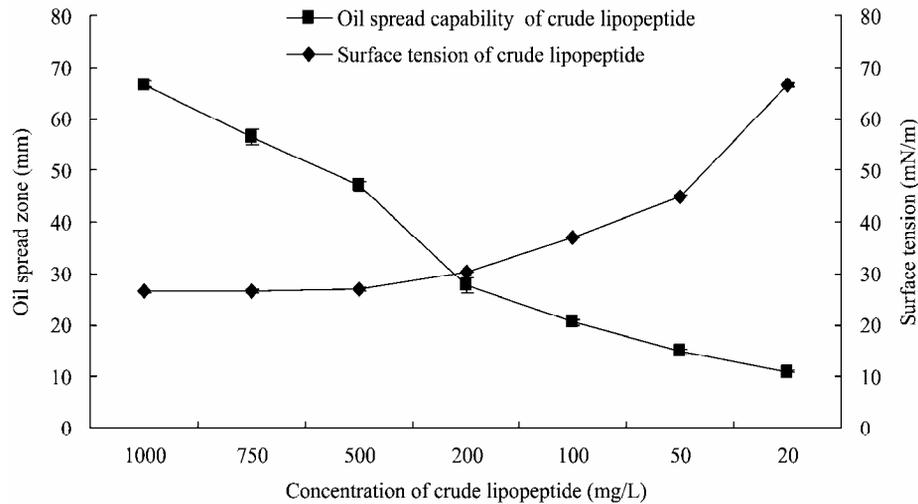


图 8 不同浓度粗脂肽溶液的排油性能和表面张力比较

Fig. 8 Oil spread capability and surface tension of crude lipopeptide at different concentrations

2.6 脂肽粗品的抑菌特征

由于菌株对青枯菌和立枯丝核菌拮抗效果明显,故选取这两种病原菌作为指示菌,研究了不同浓度粗脂肽溶液的抑菌活性(表 3)。高浓度的粗脂肽溶液(1 000 mg/L)对立枯丝核菌和青枯菌都表现出明显的抑制效果,抑菌圈直径分别为 16.27 mm 和 14.43 mm。随着浓度的降低,拮抗活性逐渐减弱,在 200 mg/L 时粗脂肽对立枯丝核菌已经没有抑菌活性,但对青枯菌仍具有一定的抑菌作用,说明所提取的脂肽类物质对细菌病害的防治效果要好于真菌,具有一定的开发潜力,对其中的抑菌组分需做更深入的分离研究。

表 3 不同浓度粗脂肽溶液的抑菌活性

Table 3 The antibiotic ability of crude lipopeptide at different concentrations

浓度 Concentration (mg/L)	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone (mm)	
	立枯病菌 <i>Rhs</i>	青枯病菌 <i>Rs</i>
1 000	16.27±0.15a	14.43±0.31a
750	11.20±0.26b	12.97±0.32b
500	6.47±0.15c	10.17±0.21c
200	—	7.37±0.15d
100	—	—

3 讨论

本研究通过采用溶血圈、排油圈、抑菌性试验与 PCR 相结合的方法,从宏观表面活性,抗真菌性和微观分子基因的角度筛选产脂肽类物质 Surfactin 和 IturinA 菌株,弥补了单纯用溶血圈进行菌株筛选的不足;利用红外光谱(FT-IR)高效液相色谱(HPLC)鉴定产物,建立了较为完整的筛选体系。并对脂肽类产物粗提物的表面活性和抗菌特性进行了研究,为产脂肽菌株 *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 的应用提供了理论基础。

植物病原真菌和细菌是引起植物病害,造成农业损失的主要原因之一,利用微生物来控制植物病害已经成为一种有效的防治措施,很多功能细菌和真菌作为生防产品相继被开发出来^[22-23]。田间应用研究证实,芽孢杆菌生防菌剂在稳定性、与化学农药相容性和防效方面,明显优于非芽孢类细菌和真菌,是一种理想的生防微生物^[24]。大量研究表明,脂肽类表面活性剂在芽孢杆菌的生物防治过程中起着重要的作用,它们主要作用于病原菌细胞膜的磷脂双分子层,改变细胞膜通透性和功能性,从而抑制病原微生物的生长^[25]。另外,与一般化学表面活性剂相比,脂肽类表面活性剂除具有降低表面张力、

稳定乳化液和增加泡沫等作用外, 还具备热稳定、无毒、生物降解性和更强的表面、界面活性等优点, 在农业和工业上都有广阔的应用前景^[26-27]。菌株 XZ-173 能够同时产生 Surfactin 和 Iturin A, 抗菌谱较广, 且对根结线虫有很好的抑制作用^[28], 是一株具有较大开发潜力的功能菌。

本文中菌株 XZ-173 产生的粗脂肽是一种混合物, 该脂肽粗品表现出了优良的乳化性能、表面活性和抑菌性, 其有效组分需要进一步分离纯化。根据 HPLC 含量测定结果可知, 菌株 XZ-173 的脂肽产率较高, 对于其产生脂肽的生理学特征、发酵条件和工艺的优化尚需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Abriouel H, Franz CMAP, Ben Omar N, et al. Diversity and applications of *Bacillus bacteriocins*[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2011, 35(1): 201-232.
- [2] Thimon L, Peypoux F, Wallach J, et al. Effect of the lipopeptide antibiotic, iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells[J]. FEMS Microbiology Letters, 1995, 128(2): 101-106.
- [3] Deleu M, Paquot M, Nylander T. Effect of fengycin, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, on model biomembranes[J]. Biophysical Journal, 2008, 94(7): 2667-2679.
- [4] 侯红漫, 靳艳, 金美芳, 等. 环脂肽类生物表面活性剂结构、功能及生物合成[J]. 微生物学通报, 2006, 33(5): 122-128.
- [5] Christofi N, Ivshina IB. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation[J]. Journal of Applied Microbiology, 2002, 93(6): 915-929.
- [6] Kracht M, Rokos H, Ozel M, et al. Antiviral and hemolytic activities of surfactin isoforms and their methyl ester derivatives[J]. The Journal of Antibiotics, 1999, 52(7): 613-619.
- [7] Mulligan CN. Environmental applications for biosurfactants[J]. Environmental Pollution, 2005, 133(2): 183-198.
- [8] Seyflová G, Svobodová J. Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications[J]. Central European Journal of Medicine, 2008, 3(2): 123-133.
- [9] Phae CG, Shoda M. Expression of the suppressive effect of *Bacillus subtilis* on phytopathogens in inoculated composts[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1990, 70(6): 409-414.
- [10] Yu GY, Sinclair JB, Hartman GL, et al. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2002, 34(7): 955-963.
- [11] Phae CG, Shoda M, Nobuhiro K, et al. Biological control of crown and root rot and bacterial wilt of tomato by *Bacillus subtilis* NB22[J]. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 1992, 58(3): 329-339.
- [12] Wei YH, Wang LC, Chen WC, et al. Production and characterization of Fengycin by indigenous *Bacillus subtilis* F29-3 originating from a potato farm[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2010, 11(11): 4526-4538.
- [13] Desai JD, Banat IM. Microbial production of surfactants and their commercial potential[J]. Microbiology and Molecular Biology Review, 1997, 61(1): 47-64.
- [14] Mulligan CN, Cooper DG, Neufeld RJ. Selection of microbes producing biosurfactants in media without hydrocarbons[J]. Journal of Fermentation Technology, 1984, 62(4): 311-314.
- [15] Hsieh FC, Li MC, Lin TC, et al. Rapid detection and characterization of surfactin-producing *Bacillus subtilis* and closely related species based on PCR[J]. Current Microbiology, 2004, 49(3): 186-191.
- [16] Heish FC, Lin TC, Meng M, et al. Comparing methods for identifying *Bacillus* strains capable of producing the antifungal lipopeptide iturin A[J]. Current Microbiology, 2008, 56(1): 1-5.
- [17] Mukherjee S, Das P, Sen R. Rapid quantification of a microbial surfactant by a simple turbidometric method[J]. Journal of Microbiological Methods, 2009, 76(1): 38-42.
- [18] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [19] Batista SB, Mounteer AH, Amorim FR, et al. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites[J]. Bioresource Technology, 2006, 97(6): 868-875.
- [20] Das M, Das SK, Mukherjee RK. Surface active properties of the culture filtrates of a *Micrococcus* species grown on n-alkenes and sugars[J]. Bioresource Technology, 1998, 63(3): 231-235.
- [21] Finnerty WR. Biosurfactants in environmental biotechnology[J]. Current Opinion in Biotechnology, 1994, 5(3): 291-295.
- [22] Grover M, Nain L, Singh SB, et al. Molecular and biochemical approaches for characterization of antifungal trait of a potent biocontrol agent *Bacillus subtilis* RP24[J]. Current Microbiology, 2010, 60(2): 99-106.
- [23] Asaka O, Shoda M. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(11):

- 4081-4085.
- [24] 陈中义, 张杰, 黄大防. 植物病害生防芽胞杆菌抗菌机制与遗传改良研究[J]. 植物病理学报, 2003, 33(2): 97-103.
- [25] Etchegaray A, Bueno CC, de Melo IS, et al. Effect of a highly concentrated lipopeptide extract of *Bacillus subtilis* on fungal and bacterial cells[J]. Archives of Microbiology, 2008, 190(6): 611-622.
- [25] Banat IM, Makkar RS, Cameotra SS. Potential commercial applications of microbial surfactants[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2000, 53(5): 495-508.
- [26] Hiraoka H, Asaka O, Ano T, et al. Characterization of *Bacillus subtilis* RB14, coproducer of peptide antibiotics iturin A and surfactin[J]. Journal of General Applied Microbiology, 1992, 38(6): 635-640.
- [27] 朱震, 陈芳, 肖同建, 等. 拮抗菌生物有机肥对番茄根结线虫的防治作用[J]. 应用生态学报, 2011, 22(4): 1033-1038.

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、病毒学、酶工程、发酵工程、代谢工程等领域的最新研究成果, 产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究和改革等。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、名课讲堂、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿、征稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿, 图与文字编好页码、图号后合成一个文件上传。凡不符合(投稿须知)要求的文稿, 本部恕不受理。

3 写作要求

来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

3.1 篇幅

以 A4 纸 5 号字计算, 综述、教学和方法类文章最好在 6 页以内, 研究报告 4-8 页(以上均包括图表)。

3.2 图表

文中的图表须清晰简明, 文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm (占半栏), 大图的宽度应小于 17 cm (通栏)。

3.3 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“et al”, 作者姓前、名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名可以缩写, 但必须标准, 不加缩写点, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

- 期刊: [1] 刘杰, 成子强, 史宣玲. SARS 冠状病毒 *nsp14* 基因的克隆和表达[J]. 微生物学通报, 2007, 34(2): 1-3.
- [2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, et al. Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase[J]. J Biol Chem, 2001, 276(39): 36514-36519.
- 图书: [3] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物实验教程[M]. 北京: 北京大学出版社, 2000: 4.
- [4] 董志扬, 张树政, 方宣钧, 等. 海藻的生物合成及抗逆机理//华路等. 核农学进展[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 115-120.

(下转 p.1517)