



## 研究报告

## 贝莱斯芽胞杆菌 HN-Q-8 菌株发酵液稳定性测定及抑菌活性成分分析

赵雅<sup>1</sup> 张岱<sup>\*1</sup> 杨志辉<sup>1</sup> 朱杰华<sup>\*1</sup> 赵冬梅<sup>1</sup> 薛雪<sup>2</sup><sup>1</sup> 河北农业大学植物保护学院 河北 保定 071000<sup>2</sup> 新加坡利农私人有限公司 北京 100026

**摘要:** 【背景】贝莱斯芽胞杆菌(*Bacillus velezensis*) HN-Q-8 菌株是本实验室前期获得的能有效拮抗立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)的生防细菌。【目的】明确贝莱斯芽胞杆菌 HN-Q-8 菌株的抑菌活性物质。【方法】采用菌丝生长速率法检测其发酵液对 5 种马铃薯病原菌的拮抗能力以及稳定性, 利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术对 HN-Q-8 菌株活性物质进行鉴定。【结果】HN-Q-8 菌株对立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、尖镰孢菌(*Fusarium oxysporum*)、茄链格孢(*Alternaria solani*)和致病疫霉(*Phytophthora infestans*)具有良好的抑菌活性, 抑菌率可达 50%–90%。发酵液分别经紫外照射 35 min、自然光照射 10 h 以及 100 °C 高温处理后, 相对抑菌率分别为 74%、92%和 98%; 发酵液的抑菌活性不受胰蛋白酶和蛋白酶 K 的影响; 但不耐强酸、强碱, 其适宜 pH 为 4.0–10.0, 表明 HN-Q-8 菌株活性物质具有良好的稳定性。活性成分能使立枯丝核菌菌丝形态畸形扭曲, 从而抑制立枯丝核菌的生长, 经鉴定活性物质为丰原素(fengycin)和表面活性素(surfactin)。【结论】贝莱斯芽胞杆菌 HN-Q-8 菌株发酵液具有较好的稳定性和较强的抑菌活性, 具有良好的开发价值和应用前景。

**关键词:** 贝莱斯芽胞杆菌, 发酵液, 抑菌活性, 稳定性, 活性成分

Determination of the stability of fermentation broth and analysis of active components of *Bacillus velezensis* HN-Q-8ZHAO Ya<sup>1</sup> ZHANG Dai<sup>\*1</sup> YANG Zhi-Hui<sup>1</sup> ZHU Jie-Hua<sup>\*1</sup> ZHAO Dong-Mei<sup>1</sup> XUE Xue<sup>2</sup><sup>1</sup> College of Plant Protection, Hebei Agricultural University, Baoding, Hebei 071000, China<sup>2</sup> Singapore AGROLEX Private Limited Beijing Representative Office, Beijing 100026, China

**Abstract:** [Background] *Bacillus velezensis* HN-Q-8 has biocontrol effect on *Rhizoctonia solani* effectively. [Objective] Identify the inhibition substances produced by *Bacillus velezensis* HN-Q-8. [Methods] Both effects of strain HN-Q-8 on five pathogens of strain potato and stability of fermentation

**Foundation items:** National Key Research and Development Program of China (2018YFD0200800); Earmarked Fund for Modern Agro-industry Technology Research System (CARS-09-P18); Earmarked Fund for Modern Agro-industry Technology Research System in Hebei Province (HBCT2018080205)

**\*Corresponding authors:** E-mail: ZHANG Dai: adaiadai.1987@163.com; ZHU Jie-Hua: zhujiehua356@126.com

**Received:** 12-06-2019; **Accepted:** 03-09-2019; **Published online:** 10-10-2019

**基金项目:** 国家重点研发计划(2018YFD0200800); 国家现代农业马铃薯产业体系建设专项(CARS-09-P18); 河北省薯类产业技术体系创新团队专项基金(HBCT2018080205)

**\*通信作者:** E-mail: 张岱: adaiadai.1987@163.com; 朱杰华: zhujiehua356@126.com

**收稿日期:** 2019-06-12; **接受日期:** 2019-09-03; **网络首发日期:** 2019-10-10

broth were detected though the growth rate method. Active substances of HN-Q-8 were identified using matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). **[Results]** The fermentation broth of strain HN-Q-8 exhibited strong inhibitory activity against *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* and *Phytophthora infestans*, with the inhibition rates ranging from 50% to 90%. The inhibition rates of fermentation broth retained 74% after 35 min exposure to UV, and 92% after a 10 hour exposure to natural light, respectively. The fermentation broth retained 98% antifungal activity after thermal treatment at 100 °C. In addition, the antifungal activity of fermentation broth was not affected by trypsin and protease K. However, the fermentation broth could not endure both extreme acid and alkali treatments, and the suitable pH ranged from 4.0 to 10.0. The methanol extract from strain HN-Q-8 had significant inhibition effect on *Rhizoctonia solani*, with the two main active substances in it including fengycin and surfactin. **[Conclusion]** The fermentation broth of strain HN-Q-8 exhibited stability and strong antifungal activity, and has promising prospects for its further study, development and application.

**Keywords:** *Bacillus velezensis*, Fermentation broth, Antifungal activity, Stability, Active components

芽胞杆菌(*Bacillus* spp.)是农业生产中应用较多的一种生防菌,作为微生态环境的优势种群,具有繁殖力强,理化性质稳定,广泛的抑菌谱,以及促进植物生长,修复农化污染环境等特点,能够满足农药减量控害增效以及绿色农业可持续发展的要求<sup>[1]</sup>,目前中国已自主开发出多种生防菌剂<sup>[2]</sup>。

目前应用于生物防治研究中芽胞杆菌的种类主要有枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)<sup>[3]</sup>、苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*)<sup>[4]</sup>、短小芽胞杆菌(*Bacillus pumilus*)<sup>[5]</sup>和解淀粉芽胞杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)<sup>[6]</sup>。枯草芽胞杆菌和苏云金芽胞杆菌等多个芽胞杆菌种的基因组测序已完成,其基因组差异较大。对生防芽胞杆菌的研究已不再局限于菌株的分离筛选,而是通过研究芽胞杆菌与病原菌互作,探索生防机制。芽胞杆菌能够产生次生代谢产物,主要包括脂肽类抗生素和抗菌蛋白两类拮抗因子,通过溶解病原体的细胞壁或细胞膜,干扰其蛋白合成、能量代谢和细胞分裂等作用,从而抑制病原菌菌丝生长和孢子萌发<sup>[7]</sup>。莫哈韦芽胞杆菌(*Bacillus mojaviensis*)能够合成蛋白酶和脂肽类物质抑制大丽花轮枝孢和黑白轮枝菌(*Verticillium dahliae* Kleb.)的孢子萌发<sup>[8]</sup>。贝莱斯芽胞杆菌 S6 产生的抗菌蛋白能够拮抗茄链格孢(*Alternaria solani*),使其菌丝发生扭曲、畸形、肿大,抑制其孢子萌发<sup>[9]</sup>。但是,生防芽胞杆菌产生的活性物质易受到温度、光照和 pH 等因素影响,

导致稳定性下降。苏云金芽胞杆菌 Bt185 发酵上清液在 50 °C 以上高温处理后抑菌活性开始下降<sup>[10]</sup>;解淀粉芽胞杆菌 HZM9 菌株发酵液经光照处理 12 h 后抑菌活性减弱<sup>[11]</sup>;枯草芽胞杆菌 a1 产生的抗真菌活性物质在 pH>8.0 时,其活性降低<sup>[12]</sup>。

贝莱斯芽胞杆菌 HN-Q-8 菌株是本实验室从黑痣病病害发生严重的马铃薯连作地块根际土壤中分离得到<sup>[13]</sup>。通过对贝莱斯芽胞杆菌 HN-Q-8 菌株发酵液稳定性、抑菌活性物质等方面进行探究,为进一步阐释抑菌机制奠定基础,为开发生物菌剂提供技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

贝莱斯芽胞杆菌 HN-Q-8 由本实验室分离保存。供试马铃薯病原菌 5 种:立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、茄链格孢(*Alternaria solani*)、茄病镰孢(*Fusarium sambucinum*)、尖镰孢菌(*Fusarium oxysporum*)和致病疫霉(*Phytophthora infestans*),均由本实验室分离保存。立枯丝核菌 ZB4 菌株作为 HN-Q-8 抑菌稳定性测定的主要靶标菌。

#### 1.1.2 培养基

LB 培养基(g/L):酵母膏 5.0,氯化钠 10.0,蛋白胨 10.0, pH 7.0-7.2;黑麦培养基(g/L):黑麦 60.0,琼脂 10.0-15.0,蔗糖 20.0;PDA (potato

dextrose agar)固体培养基(g/L): 马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂 20.0。所有培养基均在  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min 备用。

### 1.1.3 主要试剂和仪器

酵母膏、蛋白胨、琼脂, 北京奥博星生物技术有限公司; 甲醇、氯化钠、蔗糖、葡萄糖, 国产分析纯。

恒温振荡器, 上海右一仪器有限公司; 高速离心机, 赛默飞世尔科技有限公司; 恒温培养箱, 宁波江南仪器厂; 三重串联四级杆质谱仪, 安捷伦科技股份有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 HN-Q-8 菌株发酵液制备

将 HN-Q-8 菌株接种于 LB 液体培养基,  $37^\circ\text{C}$ 、200 r/min 培养 24 h, 取 100  $\mu\text{L}$  接种到 100 mL LB 液体培养基继续培养 48 h。HN-Q-8 菌株发酵液于 9 500 r/min 离心 25 min, 取上清液备用。

### 1.2.2 对 5 种马铃薯病原菌的拮抗作用

HN-Q-8 菌株发酵液与各培养基按 1:9 体积比充分混合, 制成含 HN-Q-8 菌株无菌发酵液的培养基, 以无菌水做空白对照。在平板中心分别接入 5 种供试病原菌(茄病镰孢、立枯丝核菌、茄链格孢、致病疫霉、尖镰孢菌)菌饼(5 mm), 每个处理重复 3 次。将致病疫霉置于  $18^\circ\text{C}$  培养, 其余 4 种供试病原菌置于  $25^\circ\text{C}$  培养, 待对照组菌落长满培养皿时, 测量对照组和处理组菌落的生长直径, 计算 HN-Q-8 菌株发酵液的抑菌率。抑菌率=(对照组菌落生长直径-处理组菌落生长直径)/(对照组菌落生长直径-菌饼直径) $\times 100\%$ 。

### 1.2.3 HN-Q-8 菌株活性成分的稳定性

紫外光稳定性: 将 HN-Q-8 菌株发酵液置于距离 30 W 紫外灯 30 cm 处, 分别照射 5、10、15、25、35 min, 以未经紫外线处理的 HN-Q-8 菌株发酵液为对照, 以未经紫外处理的无菌水为空白对照, 置于  $25^\circ\text{C}$  条件下培养 4 d, 每个处理重复 3 次。以立枯丝核菌 ZB4 为指示菌, 计算 HN-Q-8 菌株发酵液的相对抑菌率。相对抑菌率=(空白对照

菌落生长直径-处理菌落生长直径)/(空白对照菌落生长直径-未处理菌落生长直径) $\times 100\%$ 。

自然光稳定性: 将 HN-Q-8 菌株发酵液置于 4 000 lx 的光照箱中央, 分别照射 2、4、6、8、10、12 h 后, 以未经自然光处理的 HN-Q-8 菌株发酵液为对照, 以未经自然光处理的无菌水为空白对照, 置于  $25^\circ\text{C}$  条件下培养 4 d。每个处理重复 3 次。以立枯丝核菌 ZB4 为指示菌, 计算 HN-Q-8 菌株发酵液的相对抑菌率。相对抑菌率=(空白对照菌落生长直径-处理菌落生长直径)/(空白对照菌落生长直径-未处理菌落生长直径) $\times 100\%$ 。

蛋白酶稳定性: 将 HN-Q-8 菌株发酵液分别加入蛋白酶 K 和胰蛋白酶, 酶的终浓度为 5  $\mu\text{g/mL}$ ,  $37^\circ\text{C}$  处理 2 h, 制成含药培养基, 以未处理的发酵液为对照, 以未经蛋白酶处理的无菌水为空白对照, 置于  $25^\circ\text{C}$  条件下培养 4 d。每个处理重复 3 次。以立枯丝核菌 ZB4 为指示菌, 计算 HN-Q-8 菌株发酵液的相对抑菌率。相对抑菌率=(空白对照菌落生长直径-处理菌落生长直径)/(空白对照菌落生长直径-未处理菌落生长直径) $\times 100\%$ 。

热稳定性: 将 HN-Q-8 菌株发酵液分别在 30、40、50、60、70、80、90、100 和  $121^\circ\text{C}$  条件下处理 30 min, 待温度冷却后, 以未经温度处理的发酵液为对照, 以未经温度处理的无菌水为空白对照,  $25^\circ\text{C}$  条件下培养 4 d。每个处理重复 3 次。以立枯丝核菌 ZB4 为指示菌, 测定不同温度处理下 HN-Q-8 菌株发酵液的相对抑菌率。相对抑菌率=(空白对照菌落生长直径-处理菌落生长直径)/(空白对照菌落生长直径-未处理菌落生长直径) $\times 100\%$ 。

酸碱稳定性: 将 HN-Q-8 菌株发酵液用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 分别调整 pH 值为 2、4、6、8、10、12, 静置 24 h 后, 调至 pH 值为 7.5 (初始 pH), 以未经酸碱处理的发酵液为对照, 以未经酸碱处理的无菌水为空白对照,  $25^\circ\text{C}$  条件下培养 4 d。每处理重复 3 次。以立枯丝核菌 ZB4 为指示菌, 计算 HN-Q-8 菌株发酵液的相对抑菌率。相对抑菌

率=(空白对照菌落生长直径-处理菌落生长直径)/(空白对照菌落生长直径-未处理菌落生长直径)×100%。

#### 1.2.4 活性成分对菌丝生长的影响

挑取 1.2.2 中 HN-Q-8 菌株发酵液抑菌圈边缘的立枯丝核菌 ZB4 的菌丝,在光学显微镜下观察其菌丝形态<sup>[14]</sup>,对照为正常生长的立枯丝核菌 ZB4 的边缘菌丝,分析 HN-Q-8 菌株发酵液对立枯丝核菌 ZB4 菌丝的影响。

#### 1.2.5 HN-Q-8 菌株甲醇粗提物的抑菌活性

采用酸沉淀法提取活性物质<sup>[15]</sup>。将发酵液于 4℃、8 000 r/min 离心 20 min,收集上清液,用 6 mol/L 的 HCl 调节 pH 至 2.0,4℃ 过夜。4℃、8 000 r/min 离心 20 min 收集沉淀,用甲醇反复抽提,过滤干燥,配成浓度为 1 mg/mL 的甲醇溶液。采用平板对峙培养法,取立枯丝核菌 ZB4 菌饼于 PDA 平板中央,将 50 μL 的甲醇提取物和甲醇分别接种于距离平板中央 25 mm 处。以只接立枯丝核菌 ZB4 的平板为对照,25℃ 培养 4 d。每处理重复 3 次。

#### 1.2.6 HN-Q-8 菌株活性成分鉴定

采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)鉴定甲醇粗提物的成分。方法参考文献[16],确定仪器真空度为 10<sup>-7</sup>-mbar 或无,开始样品分析时先进行分子量校正,使用 337 nm 氮激光源解吸附和电离,采用 α-氰-4-羟肉桂酸为基质,取 1 μL 样品与等体积的基质混匀,置于仪器离子源进行测定。质量扫描范围为 1 000–2 000 Da。

#### 1.3 数据分析

应用 SPSS 19.0 软件对数据进行方差分析,采用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 HN-Q-8 菌株对 5 种马铃薯病原菌的拮抗作用

HN-Q-8 菌株发酵液对立枯丝核菌、尖镰孢

菌、茄链格孢和致病疫霉均有较强的拮抗作用,培养 4–7 d 后均出现明显的抑菌圈(图 1),对抑菌直径测定计算后,抑菌率可达 49%–89%。对茄病镰孢抑菌效果一般,抑菌率仅为 24% (表 1)。

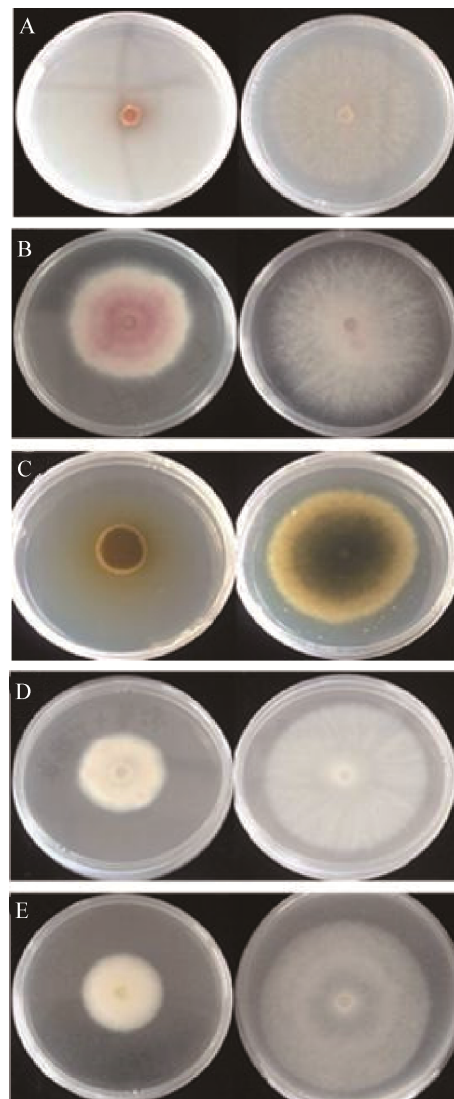


图 1 贝莱斯芽胞杆菌 HN-Q-8 菌株发酵液对 5 种马铃薯病原菌的抑菌作用

Figure 1 Inhibitory effects of fermentation broth of *B. velezensis* HN-Q-8 on five pathogens of potato

注: A: 立枯丝核菌; B: 茄病镰孢; C: 茄链格孢; D: 尖镰孢菌; E: 致病疫霉。左: 处理后生长的病原菌; 右: 正常生长的病原菌。

Note: A: *Rhizoctonia solani*; B: *Fusarium sambucinum*; C: *Fusarium oxysporum*; D: *Alternaria solani*; E: *Phytophthora infestans*. Left: Treated growth pathogens; Right: Normal growth pathogens.

表 1 贝莱斯芽胞杆菌 HN-Q-8 菌株发酵液对 5 种马铃薯病原菌的拮抗作用

Table 1 The antagonistic effects of *B. velezensis* HN-Q-8 on five pathogens of potato

病原菌	抑菌直径	抑菌率
Pathogens	Inhibitory diameter (cm)	Inhibiting rate (%)
立枯丝核菌	5.56±0.50a	89.68±0.79a
<i>Rhizoctonia solani</i>		
茄病镰孢	1.58±0.92e	24.17±1.42d
<i>Fusarium</i>		
<i>sambucinum</i>		
茄链格孢	3.85±0.17d	72.85±0.32b
<i>Alternaria solani</i>		
尖镰孢菌	3.10±0.83c	50.78±1.38c
<i>Fusarium oxysporum</i>		
致病疫霉	2.73±0.36b	49.82±0.91c
<i>Phytophthora infestans</i>		

注：表中数据为平均数±标准差。不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在  $P<0.05$  水平差异显著。

Note: Data are mean±SD. Different letters on the bars indicate significant difference at  $P<0.05$  level by Duncan's new multiple range test.

2.2 HN-Q-8 菌株发酵液的稳定性

2.2.1 紫外光稳定性

从图 2A 可以看出，HN-Q-8 菌株发酵液经 5–10 min 的紫外照射，其抑菌活性没有明显变化，紫外照射 35 min 后抑菌活性略有降低，但其相对抑菌率仍达到 74%，表明 HN-Q-8 菌株发酵液在紫外照射下仍具有较强的抑菌作用，HN-Q-8 菌株发酵液具有较好的紫外稳定性。

2.2.2 自然光稳定性

经不同时间段自然光照射，HN-Q-8 菌株发酵液抑菌活性发生一定变化(图 2B)。自然光照射 2–10 h，HN-Q-8 菌株发酵液的抑菌活性较强，相对抑菌率均在 90%以上；照射 8 h 时，相对抑菌率高达 100%；自然光照射 12 h，相对抑菌率降低，为 69%。说明 HN-Q-8 菌株发酵液具有较好的自然光稳定性。

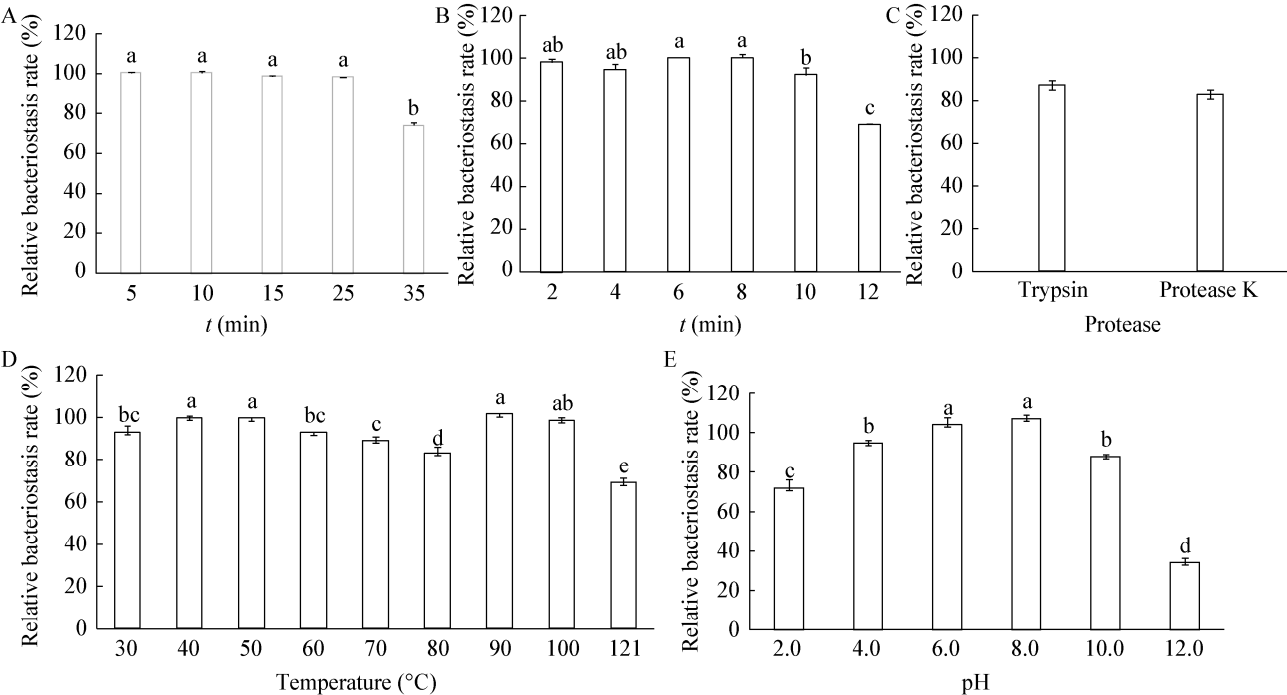


图 2 不同条件下贝莱斯芽胞杆菌 HN-Q-8 菌株发酵液的抑菌稳定性

Figure 2 Antifungal stability of *B. velezensis* HN-Q-8 fermentation broth under different conditions

注：A：紫外光；B：日光灯；C：蛋白酶种类；D：温度；E：酸碱度。图中数据为平均数±标准差。不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在  $P<0.05$  水平差异显著。

Note: A: Ultraviolet light; B: Lamp light; C: Protease types; D: Temperature; E: Acidity and alkakinity. Data are mean±SD. Different letters on the bars indicate significant difference at  $P<0.05$  level by Duncan's new multiple range test.



### 2.2.3 蛋白酶稳定性

HN-Q-8 发酵液经蛋白酶 K 和胰蛋白酶处理后, 抑菌活性较对照无显著差异(图 2C)。表明 HN-Q-8 发酵液对两种供试的蛋白酶不敏感。

### 2.2.4 热稳定性

由图 2D 可知, 在 30–100 °C 处理 30 min 后发酵液的相对抑菌率保持在 80% 以上。加热至 100 °C, 相对抑菌率仍然达到 98%。121 °C 高温灭菌处理 30 min 后, 其相对抑菌率降到了 69%。说明发酵液中的抑菌活性物质对高温有较强的耐受性, 30–100 °C 具有良好的热稳定性。

### 2.2.5 酸碱稳定性

如图 2E 所示, pH 8.0 时, 相对抑菌率最大为 107%。但在强酸和强碱处理下抑菌活性均呈下降趋势, 即 pH 2.0 时, 抑菌活性下降, 相对抑菌率为 72%; pH 为 12.0 时, 抑菌活性明显下降, 相对抑菌率最低, 为 34%。表明该抑菌活性物质不耐强酸、强碱, 适宜 pH 为 4.0–10.0。

## 2.3 HN-Q-8 菌株活性成分对菌丝形态的影响

对照组病原真菌菌丝生长正常(图 3A), 形态均

匀(图 3B); 而处理组病菌真菌菌丝受到 HN-Q-8 菌株活性成分的抑制, 菌丝生长不均匀(图 3C), 形态畸形扭曲, 顶端弯曲(图 3D)。说明 HN-Q-8 菌株发酵液中含有活性物质能使病原真菌菌丝表型形态畸形, 从而抑制立枯丝核菌 ZB4 的生长, 达到拮抗立枯丝核菌的效果。

## 2.4 甲醇粗提物的抑菌活性

HN-Q-8 菌株甲醇粗提取物可以明显抑制马铃薯黑痣病菌的生长, 溶剂甲醇对马铃薯黑痣病菌的生长无抑制作用(图 4), 说明 HN-Q-8 菌株甲醇粗提物中含有活性成分, 对马铃薯黑痣病菌 ZB4 有抑制作用。

## 2.5 HN-Q-8 菌株活性物质鉴定

将 HN-Q-8 菌株甲醇提取物的活性物质进行 MALDI-TOF-MS 测定。如图 5 所示, 发现其质谱峰峰值  $m/z$  为 1 058.700 00 和 1 477.900 00, 为表面活性素钠离子加合峰和丰原素质子加合峰。说明 HN-Q-8 菌株甲醇提取物的活性物质中含有表面活性素(suractin)和丰原素(fengycin)两种脂肽类化合物。

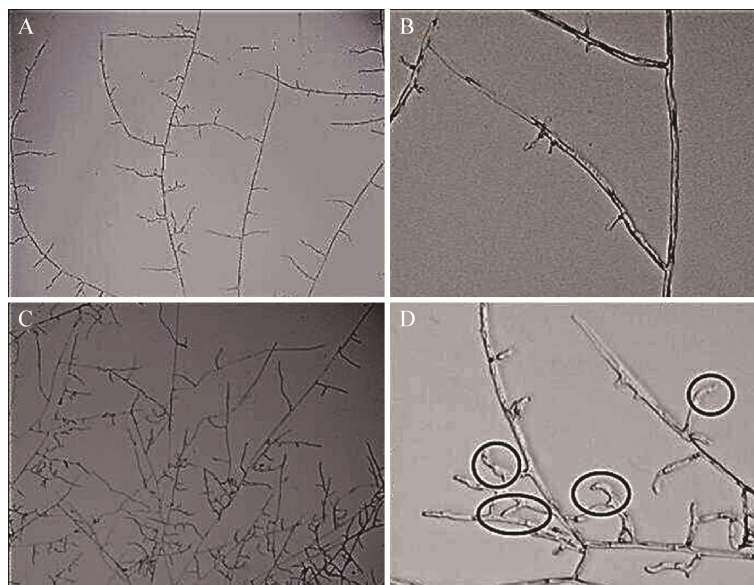


图 3 贝莱斯芽胞杆菌 HN-Q-8 发酵液对立枯丝核菌菌丝的影响

Figure 3 Effect of *B. velezensis* HN-Q-8 fermentation broth on hyphae of *Rhizoctonia solani*

注: A–B: 40 倍和 200 倍镜下正常生长的菌丝; C–D: 40 倍和 200 倍镜下 HN-Q-8 发酵液作用后的菌丝。

Note: A–B: Normal mycelium under 40- and 200-fold microscopic observation; C–D: Treated mycelium under 40- and 200-fold microscopic observation.

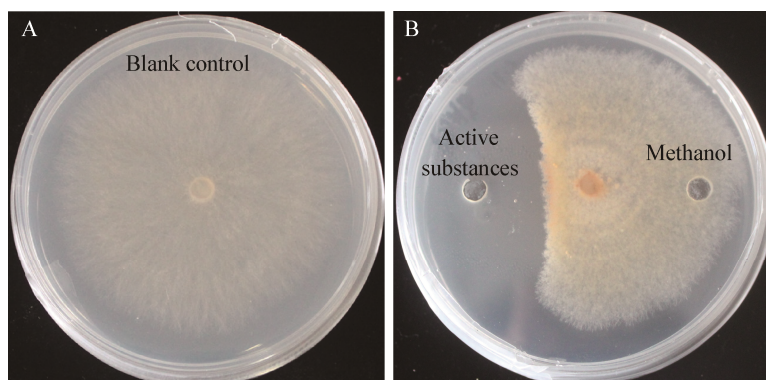


图4 贝莱斯芽胞杆菌 HN-Q-8 菌株甲醇粗提物对立枯丝核菌的抑菌作用

Figure 4 Antifungal effect of methanol extract of *B. velezensis* HN-Q-8 on *Rhizoctonia solani*

注: A: 正常生长的立枯丝核菌; B: 被抑菌活性物质作用后的立枯丝核菌。

Note: A: Untreated control *Rhizoctonia solani*; B: *Rhizoctonia solani* after co-culture with HN-Q-8 active substances.

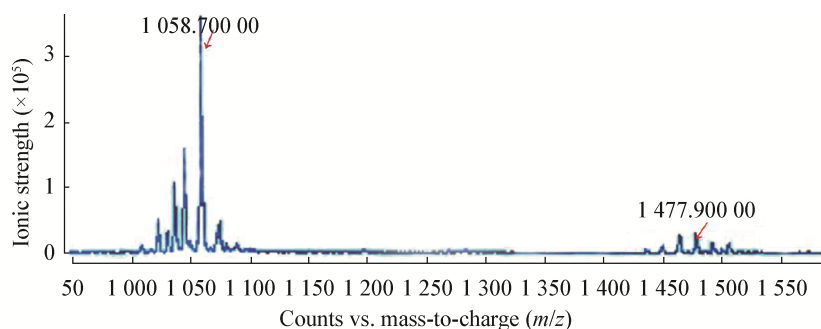


图5 贝莱斯芽胞杆菌 HN-Q-8 菌株甲醇提取物活性物质的 MALDI-TOF-MS 分析

Figure 5 MALDI-TOF-MS analysis of antifungal active substances in methanol extract of *B. velezensis* HN-Q-8

### 3 讨论与结论

本研究中 HN-Q-8 菌株发酵液经温度、紫外光、自然光、pH 等不同条件处理后,其抑菌活性不同,说明芽胞杆菌活性物质稳定性易受到外界条件的影响。这与前人研究结果相一致,吴艳清等<sup>[17]</sup>研究发现芽胞杆菌 YQ5 在经 100 °C 高温处理 30 min 抑菌率下降到 52.9%;王琦等<sup>[18]</sup>研究发现海洋解淀粉芽胞杆菌 GM-1 在光照 16 h 后抑菌活性明显下降;李颖等<sup>[19]</sup>研究发现枯草芽胞杆菌 SH-1 产生的活性物质不耐强酸强碱。此外,不同芽胞杆菌菌株发酵液的稳定性不同。胡忠亮等研究发现,解淀粉芽胞杆菌 HZM9 菌株发酵液 121 °C 处理 30 min 后抑菌活性下降到 28.94%<sup>[11]</sup>,而本研究中 HN-Q-8 发酵液在 121 °C 处理 30 min 后其相对

抑菌率仍然为 69%;海洋多粘类芽胞杆菌 L1-9 发酵液经紫外线照射 5 min 中后抑菌活性明显下降<sup>[20]</sup>,而本研究中 HN-Q-8 发酵液在紫外照射 35 min 后相对抑菌率仍达到 74%。说明本实验室筛选得到的菌株具有较强的耐热和耐紫外的能力。HN-Q-8 菌株发酵液稳定性良好,适用于田间条件下储存及应用,具有一定的开发前景。

芽胞杆菌代谢产生的脂肽类抗生素具有广谱抗真菌活性,是芽胞杆菌发挥生防作用的主要因子<sup>[21]</sup>。根据结构不同,可将其分为丰原素家族(fengycins)、伊枯草菌素家族(bacillomycins)和表面活性素家族(surfactins)<sup>[22]</sup>。这些物质能够导致病原菌菌丝生长畸形、顶端膨大,以及抑制病原菌的孢子萌发<sup>[23]</sup>。向亚萍等<sup>[24]</sup>发现解淀粉芽胞杆菌

B1619 菌株能产生 Bacillomycin L、Fengycin 和 Surfactin 三种脂肽类化合物, 抑制尖镰孢菌菌丝的生长。解淀粉芽胞杆菌 C06 能产生 Bacillomycin 和 Fengycin, 抑制果产核盘菌孢子萌发和菌丝生长<sup>[25]</sup>。本研究中贝莱斯芽胞杆菌 HN-Q-8 菌株发酵液主要活性物质为 Fengycin 和 Surfactin 两种脂肽类化合物, 对立枯丝核菌菌丝有致畸作用, 与上述结果相似。另外, 3 种脂肽类抗生素对不同病原菌群体拮抗能力存在差异。表面活性素具有抗病毒、抗支原体和抗细菌的活性<sup>[26]</sup>。与表面活性素相比, 伊枯草菌素和丰原素具有更强的抗真菌能力<sup>[27]</sup>和一定程度的抗细菌能力。但是, 3 种脂肽类抗生素在抑菌过程中会表现出协同增效作用<sup>[28]</sup>。因此, 本研究中 HN-Q-8 菌株产生的两种活性物质, 在抑制立枯丝核菌过程中的具体作用方式还有待进一步研究。

本研究采用 MALDI-TOF-MS 方法, 对 HN-Q-8 菌株活性成分进行了分析鉴定。MALDI-TOF-MS 方法通过脉冲激光将待测样品离子化, 产生的离子在加速电压作用下分离, 不同质荷比的离子飞行速度不同, 根据不同飞行时间对物质进行鉴定<sup>[29]</sup>。MALDI-TOF-MS 方法有准确性高、灵敏度高、检测范围宽及操作方便等特点<sup>[30]</sup>; 并且分析时间短, 有较强的抗干扰性, 而且样品用量少, 一般只需要毫克级的质量。样品不必做精细纯化, 前处理过程简单易操作, 待测组分中含有一些杂质也不会影响检测准确性<sup>[31]</sup>。本研究只通过盐酸沉淀和甲醇萃取等少量纯化步骤, 最大限度地保留活性成分, 使实验结果更加准确。高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)只能通过保留时间来推测物质成分<sup>[32]</sup>, 检测准确性低。

总之, HN-Q-8 菌株发酵液具有很强的抑菌活性和稳定性, 能产生脂肽类化合物 Fengycin 和 Surfactin 抑制立枯丝核菌的生长。在马铃薯黑痣病的防治中有很好的应用前景, 为开发新型生物农药提供了理论基础。

## REFERENCES

- [1] Wei DD, Miao WG, Sun QQ, et al. Analysis of the active components of *Bacillus amyloliquefaciens* HAB-2 against *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. Journal of Fruit Science, 2018, 35(10): 1253-1261 (in Chinese)  
韦丹丹, 缪卫国, 孙茜茜, 等. 解淀粉芽胞杆菌 HAB-2 抑制芒果炭疽菌的活性成分分析[J]. 果树学报, 2018, 35(10): 1253-1261
- [2] Zhao BX, Pan FR, Wang W, et al. Effects of biological agent on promoting mahaleb growth and rhizospheric bacterial community[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2018, 49(3): 286-292 (in Chinese)  
赵柏霞, 潘凤荣, 王薇, 等. 生物菌剂对樱桃的促生效应及根际细菌群落的影响[J]. 沈阳农业大学学报, 2018, 49(3): 286-292
- [3] Bi QY, Han XY, Ma ZQ, et al. Inhibitory effects of *Bacillus subtilis* HMB-20428 interacted with chemical fungicides and decrement of chemical fungicides on oomycete pathogen *Plasmopara viticola*[J]. Journal of Plant Protection, 2018, 45(6): 1396-1404 (in Chinese)  
毕秋艳, 韩秀英, 马志强, 等. 枯草芽胞杆菌 HMB-20428 与化学杀菌剂互作对葡萄霜霉病菌抑制作用和替代部分化学药剂减量用药应用[J]. 植物保护学报, 2018, 45(6): 1396-1404
- [4] Konecka E, Czarniewska E, Kaznowski A, et al. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystals and thymol mixtures[J]. Industrial Crops and Products, 2018, 117: 272-277
- [5] Fulbright SP, Chisholm S, Reardon KF. Growth inhibition of *Nannochloropsis* species by *Bacillus pumilus*[J]. Algal Research, 2016, 20: 70-76
- [6] Pei SL, Liu D, Liu HQ, et al. Study on screening, identification and detection of antibiotic activity of endophytic bacteria from wild jujube[J]. Journal of Plant Protection, 2018, 45(4): 871-877 (in Chinese)  
裴淑兰, 刘东, 刘慧芹, 等. 野生酸枣内生细菌筛选、鉴定及其抑菌活性测定[J]. 植物保护学报, 2018, 45(4): 871-877
- [7] Tjalsma H, Antelmann H, Jongbloed JDH, et al. Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the "secrets" of the secretome[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2004, 68(2): 207-233
- [8] Li QS, Xie ZM, Liu Z, et al. Screening and identification of antagonistic bacterium H14 against *Verticillium dahliae* Kleb. and its antagonistic mechanisms[J]. Journal of Plant Protection, 2018, 45(6): 1204-1211 (in Chinese)  
李全胜, 谢宗铭, 刘政, 等. 棉花黄萎病拮抗细菌 H14 的筛选鉴定及其拮抗机理分析[J]. 植物保护学报, 2018, 45(6): 1204-1211
- [9] Yang SQ, Zhang F, Ma GL. Purification and inhibitive mechanism of antagonist substances from *Bacillus velezensis* S6 strain[J]. Agrochemicals, 2017, 56(9):



- 645-648,660 (in Chinese)  
杨胜清, 张帆, 马贵龙. 贝莱斯芽孢杆菌 S6 拮抗物质分离纯化及抑菌机理[J]. 农药, 2017, 56(9): 645-648,660
- [10] Jia SY, Hao ZB, Chen SY, et al. Study on *Bacillus thuringiensis* fermentation supernatant antimicrobial spectrum and stability[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2018, 37(6): 661-665 (in Chinese)  
贾淑颖, 郝再彬, 陈圣怡, 等. 苏云金芽孢杆菌发酵上清液抑菌谱及稳定性[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(6): 661-665
- [11] Hu ZL, Zheng CY, Tian XY, et al. Determination of the inhibitory spectrum and stability of culture filtrate from *Bacillus amyloliquefaciens* HZM9[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 2017, 41(3): 65-70 (in Chinese)  
胡忠亮, 郑催云, 田兴一, 等. 解淀粉芽孢杆菌 HZM9 菌株发酵液的抑菌谱及稳定性测定[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2017, 41(3): 65-70
- [12] Zhong XP, Xiong ZQ, Chen XL. Study on the stability of antifungal active substances produced by *Bacillus subtilis* a1[J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2011(4): 878-881 (in Chinese)  
钟啸萍, 熊智强, 陈小龙. 枯草芽孢杆菌 a1 所产抗真菌活性物质的稳定性研究[J]. 浙江农业科学, 2011(4): 878-881
- [13] Zhu MM, Zhang D, Zhao DM, et al. Screening and identification of antagonistic *Bacillus* against potato black scurf[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2018, 46(14): 97-101 (in Chinese)  
朱明明, 张岱, 赵冬梅, 等. 马铃薯黑痣病生防芽孢杆菌的筛选与鉴定[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(14): 97-101
- [14] Guan XM, Meng PP, Liu X, et al. Isolation and identification of antagonistic strains against black scurf of potato and conditions for their growth[J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2015, 33(3): 90-95 (in Chinese)  
关小敏, 孟品品, 刘星, 等. 马铃薯黑痣病生防菌的筛选和鉴定及其生长条件的研究[J]. 干旱地区农业研究, 2015, 33(3): 90-95
- [15] Wang JL, Yang JK, Feng ZG, et al. Isolation and stability analysis of lipopeptides compound produced by *Bacillus subtilis* strain SYL-6[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2015(23): 114-115,117 (in Chinese)  
王继良, 杨金库, 冯争光, 等. 枯草芽孢杆菌 SYL-6 脂肽类化合物的分离与稳定性分析[J]. 现代农业科技, 2015(23): 114-115,117
- [16] Koumoutsis A, Chen XH, Henne A, et al. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(4): 1084-1096
- [17] Wu YQ, Wang YY, Jiang JZ, et al. Inhibition effect of antagonistic bacteria YQ5 against *Phytophthora infestans* and its stability[J]. China Plant Protection, 2018, 38(10): 5-12 (in Chinese)  
吴艳清, 王游游, 蒋继志, 等. 拮抗菌 YQ5 对致病疫霉的抑制作用及其抑菌稳定性研究[J]. 中国植保导刊, 2018, 38(10): 5-12
- [18] Wang Q, Wang JJ, Gu CX, et al. The studies on the stability of the antibacterial activity of two marine bacteria strains against *Candida albicans*[J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2016, 23(3): 226-230 (in Chinese)  
王琦, 汪晶晶, 顾春霞, 等. 两株抗菌海洋细菌对白色念珠菌的抗菌作用稳定性研究[J]. 药物生物技术, 2016, 23(3): 226-230
- [19] Li Y, Jin X, Sha HT, et al. Optimization of fermentation conditions of *Bacillus subtilis* SH-1 and stability of antimicrobial substances[J]. Food Science and Technology, 2016, 41(9): 25-29 (in Chinese)  
李颖, 金鑫, 沙海天, 等. 枯草芽孢杆菌 SH-1 发酵条件优化及抑菌活性物质稳定性研究[J]. 食品科技, 2016, 41(9): 25-29
- [20] Ma GZ, Fu HR, Wang SF, et al. Antimicrobial spectrum and stability determination for marine *Paenibacillus polymyxa* strain L<sub>1</sub>-9[J]. Marine Science Bulletin, 2013, 32(3): 316-320 (in Chinese)  
马桂珍, 付泓润, 王淑芳, 等. 海洋多粘类芽孢杆菌 L<sub>1</sub>-9 菌株发酵液抗菌谱及稳定性测定[J]. 海洋通报, 2013, 32(3): 316-320
- [21] Yang LR, Quan X, Xue BG, et al. Isolation and identification of *Bacillus subtilis* strain YB-05 and its antifungal substances showing antagonism against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*[J]. Biological Control, 2015, 85: 52-58
- [22] Pramudito TE, Agustina D, Nguyen TKN, et al. A novel variant of narrow-spectrum antifungal bacterial lipopeptides that strongly inhibit *Ganoderma boninense*[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2018, 10(1): 110-117
- [23] Chen L, Shi H, Heng JY, et al. Antimicrobial, plant growth-promoting and genomic properties of the peanut endophyte *Bacillus velezensis* LDO2[J]. Microbiological Research, 2019, 218: 41-48
- [24] Xiang YP, Zhou HF, Liu YF, 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*[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2016, 49(15): 2932-2944 (in Chinese)  
向亚萍, 周华飞, 刘永峰, 等. 解淀粉芽孢杆菌 B1619 脂肽类抗生素的分离鉴定及其对番茄枯萎病菌的抑制作用[J]. 中国农业科学, 2016, 49(15): 2932-2944
- [25] Liu J, Zhou T, He D, et al. Functions of lipopeptides bacillomycin D and fengycin in antagonism of *Bacillus amyloliquefaciens* C06 towards *Monilinia fructicola*[J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2011, 20(1): 43-52

- [26] Gordillo MA, Maldonado MC. Purification of peptides from *Bacillus strains* with biological activity[J]. *Chromatography and its Applications*, 2012, 11: 201-225
- [27] Guo QG, Dong WX, Li SZ, et al. Fengycin produced by *Bacillus subtilis* NCD-2 plays a major role in biocontrol of cotton seedling damping-off disease[J]. *Microbiological Research*, 2014, 169(7/8): 533-540
- [28] Ma J, Li Y, Hu D, et al. Progress on mechanism and applications of *Bacillus* as a biocontrol microbe[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2018, 34(4): 639-648 (in Chinese)  
马佳, 李颖, 胡栋, 等. 芽胞杆菌生物防治作用机理与应用研究进展[J]. *中国生物防治学报*, 2018, 34(4): 639-648
- [29] Sun C. Applications of matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in study of macromolecules[J]. *Modern Scientific Instruments*, 2011(4): 109-111 (in Chinese)  
孙畅. 基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱在高分子研究中的应用[J]. *现代科学仪器*, 2011(4): 109-111
- [30] Wang SS, Wang YJ, Zhang J, et al. Using MALDI-TOF MS coupled with a high-mass detector to directly analyze intact proteins in thyroid tissues[J]. *Science China Chemistry*, 2018, 61(7): 871-878
- [31] Vater J, Gao XW, Hitzeroth G, et al. "Whole cell"-matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry, an emerging technique for efficient screening of biocombinatorial libraries of natural compounds-present state of research[J]. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 2003, 6(6): 557-567
- [32] Zhao Y, Xu YD, Hou ML, et al. The separation of lipopeptides from endophytic strain YY1 in maize using high-speed counter-current chromatography[J]. *Journal of Plant Protection*, 2018, 45(6): 1425-1426 (in Chinese)  
赵莹, 徐雅迪, 候美玲, 等. 高速逆流色谱法分离玉米内生菌 YY1 菌株脂肽类抗菌物质[J]. *植物保护学报*, 2018, 45(6): 1425-1426

## 征 稿 简 则

### 1 刊物简介与刊登内容

《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, 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。本刊为月刊, 中文核心期刊, 中国科技核心期刊, CSCD 核心期刊, 曾获国家优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 并在新闻出版署设立的“中国期刊方阵”中被列为“双效”期刊。从 2012 年至今, 本刊以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一而蝉联“百种中国杰出学术期刊奖”, 并入选 300 种“中国精品科技期刊”, 成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

本刊刊登内容包括: 工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物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、专栏等。

### 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“投稿须知”。

### 3 写作要求

3.1 来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

3.2 英文摘要写作注意事项: (1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者所得; (2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; (3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; (4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再投稿; (5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA、ATP 等; (6) 在英文摘要中不要使用中文字体标点符号。

3.3 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如“基因”“表达”等。

3.4 脚注(正文首页下方):

Foundation items:

\*Corresponding author: Tel: 86-; E-mail:

Received: 01-01-20xx; Accepted: 01-03-20xx; Published online: 31-03-20xx

基金项目: 基金项目(编号)

\*通信作者: Tel: ; E-mail:

收稿日期: 20xx-01-01; 接受日期: 20xx-03-01; 网络首发日期: 20xx-03-31

(下转 p.648)