



研究报告

贝莱斯芽孢杆菌 RJW-5-5 的分离鉴定及细菌素、抗菌肽基因簇挖掘

任建雯¹ 罗云艳¹ 冯印印¹ 韩猛² 安航¹ 崔传斌² 张家韬² 李斌³ 杨洋³
安德荣^{*1}

1 西北农林科技大学植物保护学院 陕西 杨凌 712100

2 陕西省烟草公司 陕西 汉中 723000

3 四川省烟草公司 四川 广元 628017

摘要:【背景】化学防治污染日益严重,作物抗性、农药残留、病害再生现象越来越普遍,因此筛选新型生防菌株及研究其抗菌物质已成为热点。【目的】筛选出一株对禾旋孢腔菌等植物病原菌具有生防功能的贝莱斯芽孢杆菌,挖掘其调控合成细菌素、抗菌肽(RiPPs)的基因簇。【方法】通过分离筛选、对峙培养等方法筛选出菌株,通过全细胞脂肪酸和 Biolog 分析法以及分子生物学方法进行菌株鉴定。利用 Illumina NovaSeq 6000 平台进行全基因组序列测定,通过 BAGEL4 挖掘潜在的细菌素、RiPPs 基因簇及潜在的作用机制。【结果】菌株 RJW-5-5 对禾旋孢腔菌的抑制效果最好,抑制率可达 78.4%,对疫霉菌、菊池链格孢等病原菌均有较好的抑制作用,利用 NCBI 网站的 BLAST 功能对所测的 16S rRNA 基因和 *rpoB* 基因序列进行同源性分析,鉴定菌株 RJW-5-5 为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)。BAGEL4 分析菌株 RJW-5-5 全基因组序列含有合成 Lasso_peptide、Cerecidin、Sactipeptides 以及 Propionicin_SM1 的基因簇,其中 Propionicin_SM1 为首次在芽孢杆菌属中发现,能够合成双功能蛋白 TrpGD、二硫还原酶、2-氧戊二酸脱氢酶 E1 组分等。【结论】菌株 RJW-5-5 能够抑制多种农作物病害,具有多种羊毛硫抗生素、套索肽、细菌素等抗菌肽基因簇,具有广阔的发展前景及应用潜力。

关键词: 贝莱斯芽孢杆菌, 全基因组, 羊毛硫抗生素, RiPPs, 生物防治

Foundation items: Key Technology Project of China National Tobacco Corporation in Sichuan Province (SCYC202009); China National Tobacco Corporation Shaanxi Branch Research and Development Project (2019610700270095)

***Corresponding author:** E-mail: anderong323@163.com

Received: 11-05-2020; **Accepted:** 23-06-2020; **Published online:** 30-09-2020

基金项目: 中国烟草总公司四川省公司重点科技项目(SCYC202009); 中国烟草总公司陕西省公司研发项目(2019610700270095)

***通信作者:** E-mail: anderong323@163.com

收稿日期: 2020-05-11; **接受日期:** 2020-06-23; **网络首发日期:** 2020-09-30

Isolation and identification of *Bacillus velezensis* RJW-5-5 and gene cluster mining of bacteriocin and RiPPs

REN Jianwen¹ LUO Yunyan¹ FENG Yinyin¹ HAN Meng² AN Hang¹ CUI Chuanbin²
ZHANG Jiatao² LI Bin³ YANG Yang³ AN Derong^{*1}

¹ College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China

² Shaanxi Tobacco Company, Hanzhong, Shaanxi 723000, China

³ Sichuan Tobacco Company, Guangyuan, Sichuan 628017, China

Abstract: [Background] Chemical control pollution is becoming more and more serious, “3R” problems are becoming more and more common. Therefore, screening new biocontrol strains and studying their antibacterial substances have become a hot spot. [Objective] To screen a strain of *Bacillus velezensis* that has biocontrol function against phytopathogenic bacteria such as *Cochliobolus atrovirens*, and excavate its gene clusters that regulate the synthesis of bacteriocins and RiPPs (antibacterial peptides synthesized by ribosome pathway). [Methods] Strains were screened by methods such as separation and screening, confrontation culture, etc., and strain identification was performed by whole cell fatty acid, Biolog analysis and molecular biology methods. The Illumina NovaSeq 6000 platform was used to determine the whole genome sequence, and the potential bacteriocins, RiPPs gene clusters and potential mechanisms of action were explored through BAGEL4. [Results] Strain RJW-5-5 had the best inhibitory effect on *Cochliobolus atrovirens*, and the inhibition rate reached 78.4%. Strain RJW-5-5 was identified as *Bacillus velezensis*. [Conclusion] Strain RJW-5-5 can inhibit various crop diseases, has a variety of lantibiotic, lasso peptide, bacteriocin and other antibacterial peptide gene clusters, with broad development prospects and application potential.

Keywords: *Bacillus velezensis*, whole genome, lantibiotic, RiPPs, biological control

近年来,芽孢杆菌在农作物病虫害防治方面起了重要作用,随着对芽孢杆菌的研究越来越深入,不同种类芽孢杆菌也逐渐被分离鉴定出来。2005年,Ruiz-García等从西班牙Vélez河的咸水样品中分离出菌株CR-502T,并通过DNA杂交证实其为新菌株,将其命名为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)^[1],贝莱斯芽孢杆菌菌体呈杆状,属于革兰氏阳性菌(G⁺),大小约1.5 μm,一般为单个或成对排列,有时也呈短链排列;芽孢呈椭圆状,位于非肿胀胞囊的中间或末端^[2],贝莱斯芽孢杆菌普遍存在于自然界中,如植物组织^[3]、土壤^[4]、河水^[1]、海洋^[5]等。

细菌素是一些细菌在代谢过程中合成的具有抑菌活性的多肽类物质,是一种微生物源性天然防腐剂^[6]。细菌素具有安全无毒、抑菌活性强及作用条件温和的特点,越来越受到青睐并有逐渐取代化学防腐剂的趋势,如丙酸杆菌素在芽菜防腐

保鲜中的作用^[7]。根据前人研究结果,贝莱斯芽孢杆菌的抗菌物质主要为脂肽类抗生素和聚酮类抗生素^[8]。聚酮类化合物是由微生物、植物等产生的一大类天然产物,这类物质具有活性,对多种植物病原菌都具有拮抗活性,能够增强植物自身抵抗力^[9]。芽孢杆菌核糖体途径合成的抗菌肽主要包括3类:小RiPPs^[10]、未经修饰的细菌素和大分子抗菌蛋白。RiPPs包括所有在生物合成过程中经酶修饰而形成的特殊氨基酸或结构的多肽(例如:羊毛硫氨酸,脱水氨基酸残基,糖基化结构,环状结构,拉锁结构,头尾相接结构),这些特殊的结构通常与其生物活性有紧密联系^[11]。小RiPPs主要包括羊毛硫抗菌肽(Lanthipeptides)、Sactipeptide、头尾环化肽、含线性唑的肽(Linear Azole-Containing Peptides, LAPs)、硫肽(Thiopeptides)、Glycocins、套索肽(Lasso Peptides)^[12];未经修饰的细菌素包括Pediocin类似肽以及Cereins等未修饰

的肽；大分子抗菌蛋白包括具有抗菌活性的大分子蛋白(分子量大于 10 kD)，这些蛋白的基因簇通常包含免疫基因和结构基因^[13]。

本研究测定了菌株 RJW-5-5 对疫霉菌、菊池链格孢等多种植物病原菌的防治效果，对发挥生防细菌应有的潜力具有重要意义。通过全细胞脂肪酸和 Biolog 分析法以及分子生物学方法对该菌株进行了鉴定，为菌株鉴定方法提供了更多参考。通过第二代测序技术对菌株 RJW-5-5 进行了全基因组测序，并通过 BAGEL4 挖掘了其潜在的功能基因簇，其中 Propionicin_SM1 为首次在芽孢杆菌属中发现，为日后贝莱斯芽孢杆菌的抑菌物质研究提供更多的参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器及培养基

酵母、蛋白胨、琼脂、NaCl (分析纯)和葡萄糖，北京索莱宝科技有限公司；DNA 提取试剂盒，生工生物工程(上海)股份有限公司。电子分析天平，上海越磁电子科技有限公司；PCR 仪，Bio-Rad 公司。

培养基：LB 培养基、PDA 培养基^[14]、PDB 培养基(PDA 培养基不加琼脂)。

1.1.2 供试土壤

从陕西秦岭原始森林、渭河、太白山森林公园、水杉根际、东沙河桥下以及杨凌农药研究所等地采用五点采样法采集土样，共计 95 份。

表 1 试验所用病原菌真菌及其寄主

Table 1 Pathogenic fungi and their hosts used in the experiment

菌株 Strain	寄主 Host
辣椒疫霉病菌 <i>Phytophthora capsici</i>	辣椒 <i>Capsicum annuum</i> L.
梨黑斑病菌 <i>Alternaria kikuchiana</i> Tanaka	梨 <i>Pyrus</i> spp.
马铃薯早疫病菌 <i>Alternaria solani</i>	马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i> L.
棉花枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	棉花 <i>Gossypium</i> spp.
西瓜炭疽病菌 <i>Colletotrichum orbiculare</i>	西瓜 <i>Citrullus lanatus</i> (Thunb.) Matsum. et Nakai
烟草赤星病菌 <i>Alteraria alternata</i>	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i> L.
苹果炭疽病菌 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	苹果 <i>Malus domestica</i>
玉米大斑病菌 <i>Setosphaeria turcica</i>	玉米 <i>Zea mays</i> Linn.
玉米茎基腐病菌 <i>Pythium aphanidermatum</i>	玉米 <i>Zea mays</i> Linn.

1.1.3 病原菌样品

小麦根腐病病原菌及其他作物病原菌由本实验室分离，保存在 30% 甘油中。

1.2 菌株分离

采用稀释涂布法^[15]，分别准确称取每份待测土壤样品 10 g，按照 10 倍比连续稀释制成 10⁻¹–10⁻⁹ 一系列土壤悬浮液。静置后，每支试管各取 0.1 mL 稀释上清液，用涂布器在 LB 培养基上均匀涂抹，晾干后倒置于 30 °C 培养箱中培养 3–4 d。观察菌落生长情况，根据平板上长出的菌落的形态、颜色等特征挑取不同的细菌单菌落进行划线纯化，直至平板新长出的菌落为单一菌落。挑取单一菌落在 LB 斜面上进行划线，在培养箱中培养后保存于 4 °C 冰箱。

1.3 拮抗小麦根腐病菌的筛选

采用对峙培养法筛选^[16]，以小麦根腐病菌为指示菌，用 5 mm 的灭菌打孔器打取已活化好的指示菌菌饼，先将菌饼接在新鲜的 PDA 平板中央作指示菌，再将待测菌点接在离菌饼 2.5 cm 处(4处)，以仅接菌饼的平板为对照。放入 28 °C 恒温培养箱倒置培养 5 d，测量抑菌带并筛选出抑菌带较宽的菌株，编号为 RJW-5-5。

1.4 菌株 RJW-5-5 抑菌广谱性测定

采用对峙培养法测定^[17]生防菌 RJW-5-5 对不同病原菌(表 1)的抑制作用，在 PDA 培养基平板中央用打孔器接种 6 mm 的病原菌菌块，在其四周分别接种生防菌，以不加生防菌的平板为阴性对

照, 放置于 28 °C 黑暗培养 4–6 d, 待对照板病原菌长满皿, 观察实验组病原菌菌落形态变化, 使用十字交叉法测量菌落直径, 计算菌丝生长抑制率, 试验重复 3 次。

1.5 拮抗菌的分类鉴定

1.5.1 形态鉴定

先将 RJW-5-5 菌株在 LB 平板上进行活化, 然后转接于 100 mL 液体 LB 培养液中, 35 °C、150 r/min 恒温振荡培养 24 h 制作菌悬液, 再将菌悬液稀释后涂布于 LB 平板, 35 °C 下培养 12 h 后进行革兰氏染色, 36 h 后进行芽孢染色, 72 h 后记录菌落的形态、颜色、质地、菌落大小等特征, 并进行扫描电镜观察。

1.5.2 生理生化鉴定

参照《常见细菌系统鉴定手册》^[18]、《伯杰细菌鉴定手册》(第 9 版)^[19]和《芽孢杆菌属》^[20]的方法, 通过微生物脂肪酸快速鉴定系统(Microbial Fatty Acid Rapid Identification System, MIDI)检测菌株 RJW-5-5 的脂肪酸组成, 以及 Biolog GENIII 生理生化检测等进行鉴定。

1.5.3 分子生物学鉴定

采用基因组 DNA 提取试剂盒提取 RJW-5-5 的基因组 DNA, 用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-GTTTGATCMTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3'), 以及细菌 *rpoB* 基因通用引物 *rpoB*-F (5'-ATCGAAACGCCTGAA GGTCCAAACAT-3') 和 *rpoB*-R (5'-ACACCCTTG TTACCGTGACGACC-3')进行 PCR 扩增, PCR 反应体系及条件参照文献[21]。PCR 产物纯化后, 送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序分析。利用 NCBI 网站的 BLAST 功能对所测的 16S rRNA 基因和 *rpoB* 基因序列进行同源性分析, 确定亲缘关系, 最后使用 MEGA 7.0 软件的 Neighbor-Joining 法构建系统发育树。

1.6 菌株 RJW-5-5 全基因组序列的测定

提取菌株 RJW-5-5 的基因组 DNA, 通过 Illumina NovaSeq 6000 平台进行全基因组序列测

序, 测序模式为双端(Paired-End)测序, 测序读长为 2×150 bp。

1.7 全基因组序列分析及功能基因挖掘

使用在线软件 BAGEL 4 对菌株 RJW-5-5 全基因组中潜在的经核糖体途径合成和翻译后修饰的多肽(RiPPs)的合成基因簇进行挖掘。

2 结果与分析

2.1 生防菌株的筛选

以小麦根腐病菌为指示菌, 对分离出的几种拮抗菌进行筛选, 筛选出对小麦根腐病菌抑菌带最宽的菌株 RJW-5-5, 如图 1 所示, 测定此菌株的抑菌谱如图 2 所示, RJW-5-5 对梨黑斑病菌、玉米大斑病菌、烟草赤星病菌、马铃薯早疫病病菌、西瓜炭疽病菌以及棉花枯萎病菌都有较好的抑制作用。

2.2 RJW-5-5 的鉴定

菌株 RJW-5-5 革兰氏染色呈阳性且形成芽孢, 细胞呈短杆状, 单个或成对, 很少成链状(图 3A), 扫描电镜图(图 3B)中菌株 RJW-5-5 呈杆状, 大小在 1.1–1.3 μm 之间; 在 LB 培养基上, 细菌呈乳白色, 菌落粗糙且边缘稍有不规则(图 3C、3D)。以上形态和革兰氏染色、电镜特征与芽孢杆菌属(*Bacillus*)的形态特征类似。

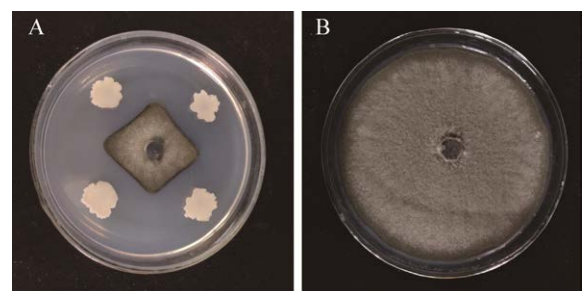


图 1 菌株 RJW-5-5 对小麦根腐病菌的抑制作用

Figure 1 Inhibitory effect of strain RJW-5-5 on wheat root rot

注: A: 菌株 RJW-5-5 菌液与病原菌的对峙作用; B: 空白对照
Note: A: Antagonistic effect of strain RJW-5-5 on the pathogen; B: Blank control

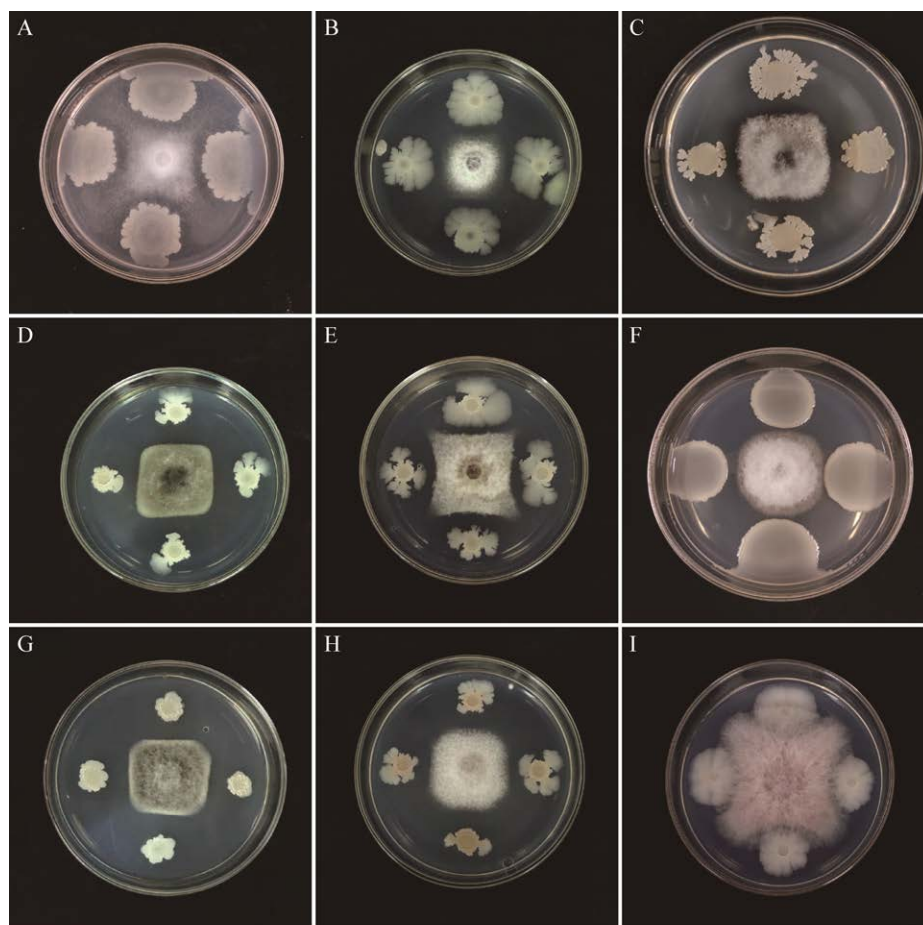


图2 菌株 RJW-5-5 的抑菌谱

Figure 2 Antibacterial spectrum of strain RJW-5-5

注: A: 辣椒疫霉病菌; B: 棉花枯萎病菌; C: 梨黑斑病菌; D: 马铃薯早疫病菌; E: 西瓜炭疽病菌; F: 苹果炭疽病菌; G: 烟草赤星病菌; H: 玉米大斑病菌; I: 玉米茎基腐病菌

Note: A: *P. capsici*; B: *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*; C: *A. kikuchiana* Tanaka; D: *A. solani*; E: *C. orbiculare*; F: *C. gloeosporioides*; G: *A. alternata*; H: *S. turcica*; I: *P. aphanidermatum*

通过微生物脂肪酸鉴定系统检测菌株 RJW-5-5 的脂肪酸组成, 可知待测菌株的主要脂肪酸为 C15:0 anteiso、C15:0 iso、C17:0 anteiso 和 C17:0 iso, 其含量分别为 44.49%、20.40%、11.36% 和 6.67%, 具体脂肪酸的结果见表 2。Biolog GENIII 生理生化检测结果(表 3)显示阳性反应有蔗糖、pH 6.0、pH 5.0、1% NaCl、4% NaCl、8% NaCl、D-果糖、1% 乳酸钠、D-山梨醇、D-果糖-6-PO₄、利福霉素 SV、盐酸胍、四唑蓝、L-乳酸、L-羟基丁二酸、氯化锂、亚碲酸钾、吐温-40、氨曲南和丁酸钠; 弱阳性反应有葡聚糖、龙胆二糖、D-蜜

三糖、葡萄糖醛酰胺、柠檬酸和甲酸, 符合芽孢杆菌(*Bacillus*)的主要细胞脂肪酸特征和生化代谢特征。

用细菌 16S rRNA 基因 27F 和 1492R 通用引物测定 16S rRNA 基因序列, 获得 1 390 bp 的基因片段, 登录号为 MT605580, 为了明确菌株 RJW-5-5 的分类地位, 将 RJW-5-5 的 16S rRNA 基因序列在 NCBI 中进行 BLAST 分析, 发现其与 *B. velezensis* (AY603658)、*B. siamensis* (AJVF01000043) 及 *B. subtilis* subsp. *subtilis* (ABQL01000001) 等菌株 16S rRNA 基因的一致性可达到 99% 以上(图 4A)。系统

发育树结果显示, RJW-5-5 与 *B. siamensis*、*B. amyloliquefaciens* 以及 *B. velezensis* 分支较近, 但支持率较低, 用细菌 *rpoB* 基因通用引物, 测定 *rpoB* 保守基因序列为 1 183 bp 的基因片段, 与已知 *B. velezensis* 模式种 NRRL B-41580^T 相似性为 98.54%, 其序列与系统发育分析参见图 4B, 可见菌株 RJW-5-5 与 *B. velezensis* NRRL B-41580^T 以 95% 的支持率聚成同一分支。

2.3 全基因组序列的测定

菌株 RJW-5-5 全基因组大小为 4 034 335 bp,

测序深度为 541.0×, 覆盖率为 92.04%, GC 含量为 47.32%, 菌株 RJW-5-5 的全基因组序列已提交至 NCBI (登录号 SRR11267609), 菌株 RJW-5-5 测序碱基 *Q* 值都大于 30, 测序结果较为可信。

2.4 BAGEL4 分析结果

通过在线软件 BAGEL4 挖掘菌株 RJW-5-5 可能产生的细菌素或 RiPPs, 结果注释到 RJW-5-5 的代谢产物中潜在的热点区域(Areas of Interest, AOI)有 6 个, 4 种产物分别为 Lasso_peptide、Cerecidin、Sactipeptides 以及 Propionacin_SM1 (表 4)。

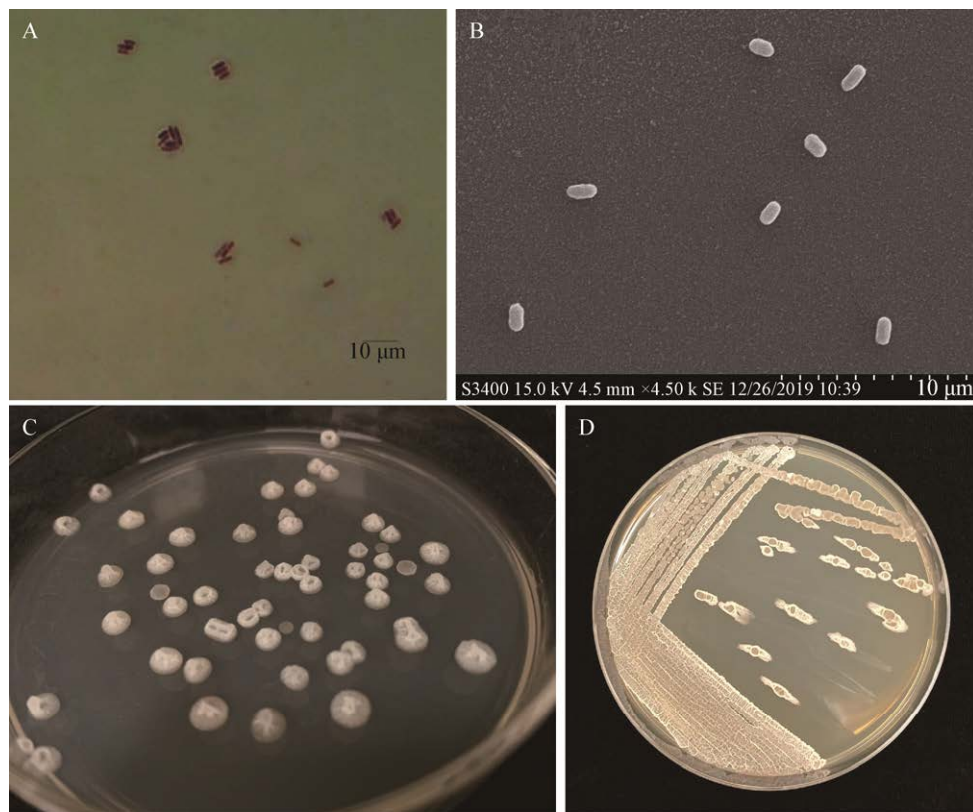


图 3 菌株 RJW-5-5 形态特征

Figure 3 Morphological characteristics of strain RJW-5-5

注: A: 革兰氏染色菌体形态, LB 培养基 30 °C 培养 24 h, 标尺=10 μm; B: RJW-5-5 扫描电镜图; C 和 D: LB 培养基 30 °C 培养 24 h 菌落形态

Note: A: Morphology of Gram staining bacteria, cultured in LB medium at 30 °C for 24 h, scale=10 μm; B: RJW-5-5 scanning electron microscopy; C and D: Colony morphology was cultured in LB medium at 30 °C for 24 h

表 2 菌株 RJW-5-5 的脂肪酸种类

Table 2 The fatty acid species of strain RJW-5-5

脂肪酸种类 Types of fatty acids	含量 Content (%)
C12:0	0.20
C13:0 iso	0.17
C13:0 anteiso	0.15
C14:0 iso	1.86
C14:0	0.66
C15:0 iso	20.40
C15:0 anteiso	44.49
C16:1 ω7c alcohol	0.22
C16:0 iso	4.97
C16:1 ω11c	0.74
C16:0	5.94
C15:0 iso 3OH	0.14
C15:0 2OH	0.28
C17:1 iso ω10c	0.57
C17:0 iso	6.67
C17:0 anteiso	11.36
C17:0	0.15
C18:0	0.32
C17:0 2OH	0.19

注：16:1ω7c 和 17:1 iso ω10c 是指 2 种磷脂脂肪酸，脂肪酸常用的命名格式为：X:YωZ(c/t)，其中，X 是总碳数，后面跟一个冒号，Y 表示双键数；ω 表示甲基末端；Z 是距离甲基端的距离；c 表示顺式，t 表示反式；iso 和 anteiso 分别表示支链的反异构和异构

Note: 16:1ω7c and 17:1 iso ω10c refer to two phospholipid fatty acids. The commonly used naming format for fatty acids is: X:YωZ(c/t), where X is the total carbon number, followed by a colon, and Y represents double number of bonds; ω represents the methyl end; Z is the distance from the methyl end; c represents the cis form, t represents the trans form; iso and anteiso represent the branched anti-isomerism and isomerism respectively

表 3 菌株 RJW-5-5 的生理生化特征

Table 3 Physiological and biochemical characteristics of strain RJW-5-5

生理生化指标 Physiological and biochemical indicators	结果 Result	生理生化指标 Physiological and biochemical indicators	结果 Result
葡聚糖 Dextrin	W	柠檬酸 Citric acid	W
龙胆二糖 Gentiobiose	W	L-羟基丁二酸 L-malic acid	+
蔗糖 Sucrose	+	氯化锂 Lithium chloride	+
D-蜜三糖 D-raffinose	W	亚碲酸钾 Potassium tellurite	+
D-果糖 D-fructose	+	吐温-40 Tween 40	+
1%乳酸钠 1% sodium lactate	+	甲酸 Formic acid	W
D-山梨醇 D-sorbitol	+	氨曲南 Aztreonam	+
D-果糖-6-PO ₄ D-fructose-6-PO ₄	+	丁酸钠 Sodium butyrate	+
利福霉素 SV Rifamycin SV	+	1% NaCl	+
盐酸胍 Guanidine HCl	+	4% NaCl	+
葡萄糖醛胺 Glucuronamide	W	8% NaCl	+
四唑蓝 Tetrazolium blue	+	pH 6.0	+
L-乳酸 L-lactic acid	+	pH 5.0	+

注：+：阳性；-：阴性；W：弱阳性

Note: +: Positive reaction; -: Negative reaction; W: Weakly positive reaction

2.4.1 Lasso_peptide 基因簇

注释到的 Lasso_peptide 生物合成基因簇的具体信息如图 5 所示。Lasso_peptide 基因簇共有 20 个 ORF，启动子在 orf00003–orf00004 之间，orf00003 基因片段在吸收磷方面具有重要调控作用，orf00004 调控合成三功能核苷酸磷酸酯酶 YfkN 蛋白，AOI_01:ABC 基因在 Contig25 的第 6 676–8 454 碱基之间，编码合成异质囊分化 ATP 结合蛋白 HepA。结构保守的 ABC 转运蛋白是套索肽合成的核心蛋白，分别编码前体肽 A、半胱氨酸蛋白酶 B 和 ATP 依赖性内酰胺合成酶 C 的基因。ABC 转运蛋白能使套索肽具有增强宿主免疫力的功能，因此，含有 ABC 转运蛋白的套索肽通常具有抗菌活性^[22]，AOI_01:LasC 调控天冬酰胺合成酶的合成。

2.4.2 Cerecidin 基因簇

Cerecidin 属于羊毛硫抗菌肽类，注释到的 Cerecidin 生物合成基因簇的具体信息如图 6 所示。预测结果中，共有 2 个 AOI 片段可以编码合成 Cerecidin，启动子位于 Protease 之前，其中，Contig000003:LanT 调控羊毛硫菌酸转运蛋白系统，Contig000003:LanM 调控合成羊毛硫抗生素修饰酶，核心肽 Contig000003:174.1: Cerecidin 及 Contig000016:173.1:Cerecidin 调节 LE-DUF、LE-LAC481、LE-MER+2PEP、L_biotic_typeA、acteriocin_IIC、Mersacidin 和 Cerecidin 的表达。

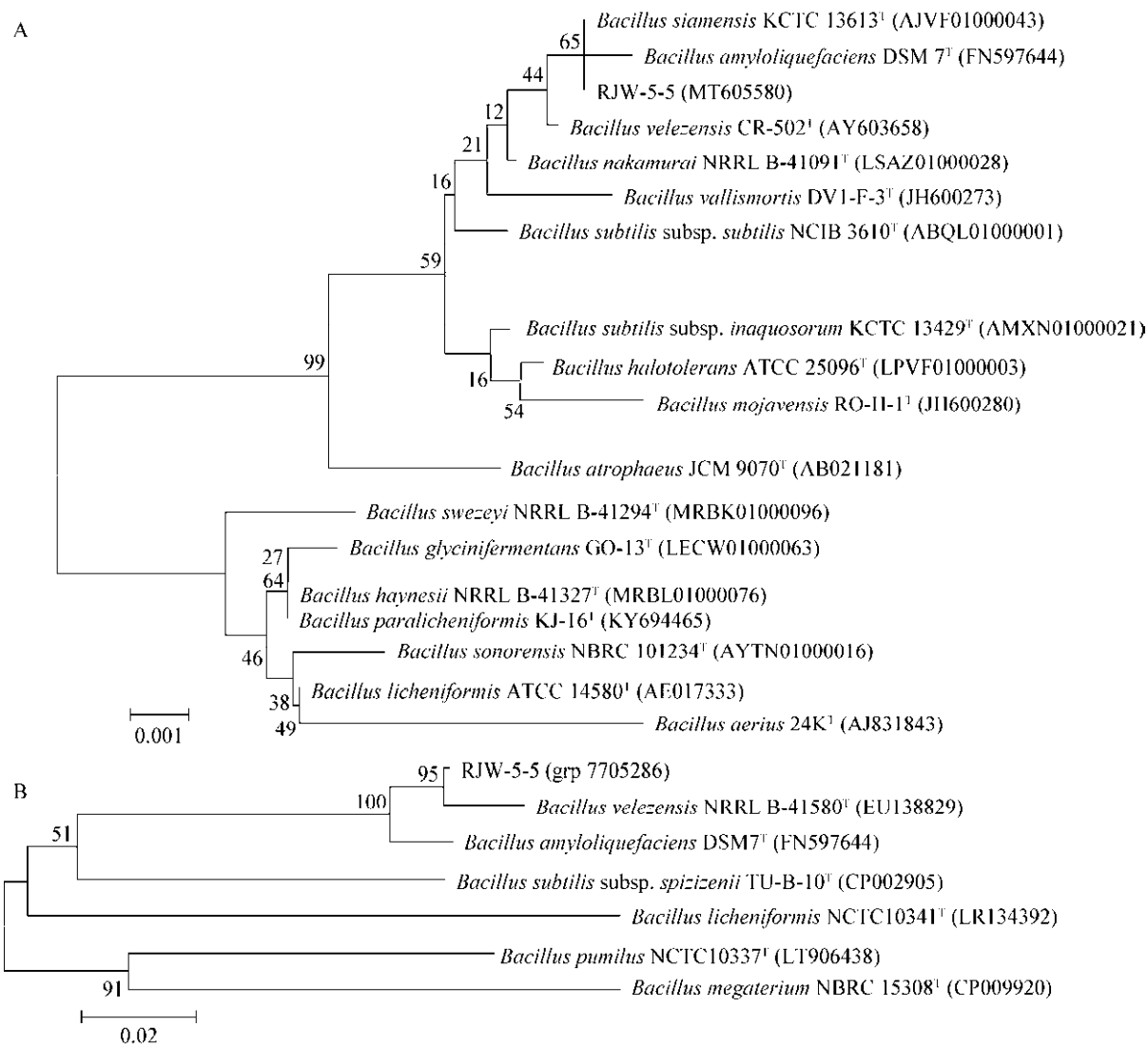


图 4 基于 16S rRNA (A)以及 *rpoB* (B)基因序列由 MEGA 构建的菌株 RJW-5-5 邻接法系统发育树
Figure 4 Phylogenetic tree of strain RJW-5-5 constructed by MEGA based on 16S rRNA (A) and *rpoB* (B) gene sequence

注: 括号中序号为 GenBank 登录号; 进化树节点上的数据为 Bootstrap 值; 标尺 0.001 和 0.02 代表序列间分歧度
Note: The serial number in parenthesis is the GenBank login number; The data on the node of the evolutionary tree is Bootstrap value; Ruler 0.001 and 0.02 represents the degree of divergence between sequences

表 4 菌株 RJW-5-5 细菌素或 RiPPs 的预测结果
Table 4 Prediction results of strain RJW-5-5 bacteriocin or RiPPs

AOI	Gene-start	Gene-end	Class
gnl-BIOEASY-contig000025.21.AOI-01	25 289	45 289	Lasso_peptide
gnl-BIOEASY-contig000016.27.AOI-01	119 723	132 246	174.1; Cerecidin
gnl-BIOEASY-contig000004.41.AOI-01	294 419	314 419	Sactipeptides
gnl-BIOEASY-contig000003.43.AOI-01	338 561	348 896	172.1; Cerecidin
gnl-BIOEASY-contig000009.44.AOI-01	189 274	216 388	186.2; Propionicin_SM1
gnl-BIOEASY-contig000022.46.AOI-01	15 638	35 638	Sactipeptides

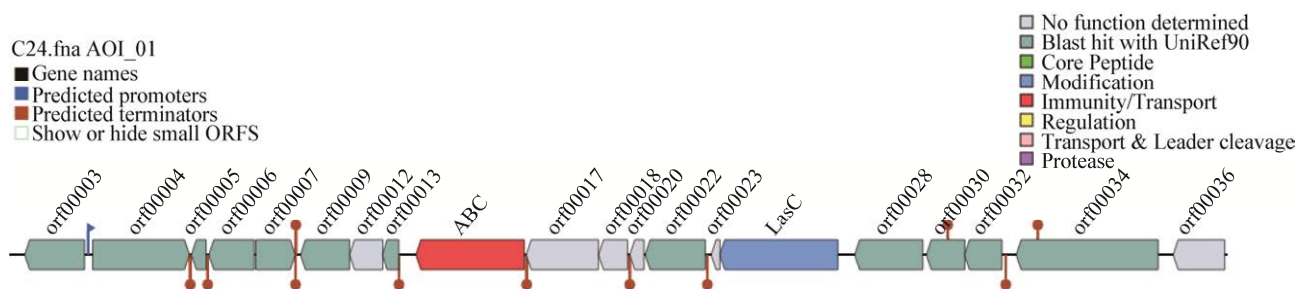
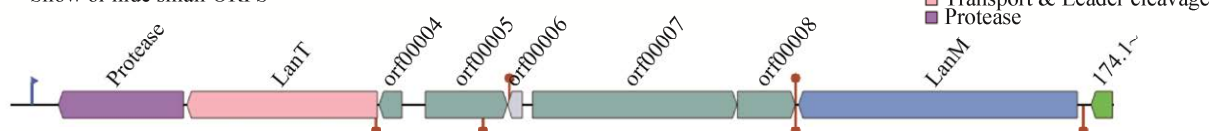


图 5 贝莱斯芽孢杆菌 RJW-5-5 中推定的 Lasso_peptide 基因簇

Figure 5 Presumed Lasso_peptide gene cluster in *B. velezensis* RJW-5-5

A C24.fna AOI_01

■ Gene names
■ Predicted promoters
■ Predicted terminators
□ Show or hide small ORFS



B

C24.fna AOI_01

■ Gene names
■ Predicted promoters
■ Predicted terminators
□ Show or hide small ORFS

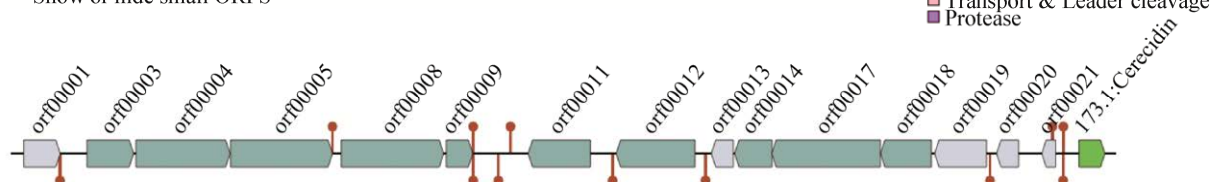


图 6 贝莱斯芽孢杆菌 RJW-5-5 中推定的 Cerecidin 基因簇

Figure 6 Putative cerecidin gene cluster in *B. velezensis* RJW-5-5

Note: A: 174.1: Cerecidin; B: 172.1: Cerecidin

2.4.3 Sactipeptides 基因簇

注释到的 Sactipeptide 基因簇具体信息如图 7 所示, 两段 Sactipeptides 基因簇 AOI 共有 40 个开放阅读框, 其中预测启动子在 Contig000022.46. AOI_01:orf00001–orf00002 之间, 根据 UniRef90 对比结果, Contig000004.41.AOI_01:orf00008 位点调控合成铁硫团簇载体蛋白。Sactipeptide 肽是一类具有半胱氨酸巯基与受体氨基的 α -碳原子连接的分子内硫醚键的多肽, 其以自由基 S-腺苷甲硫氨酸

(S-Adenosyl Methionine, SAM)酶对前导肽进行依赖性方式催化形成^[23], 这个独特的连接键与含有硫的氨基酸残基连到 β -碳键完全不同^[24]。

2.4.4 Propionicin_SM1 基因簇

Propionicin_SM1 属于一种新型细菌素, 是 Miescher 等^[25]从瑞士生牛奶分离的丙酸杆菌无细胞上清液中纯化的, 注释到的 Propionicin_SM1 生物合成基因簇的具体信息如图 8 所示, 基因簇的注释信息详见表 5。

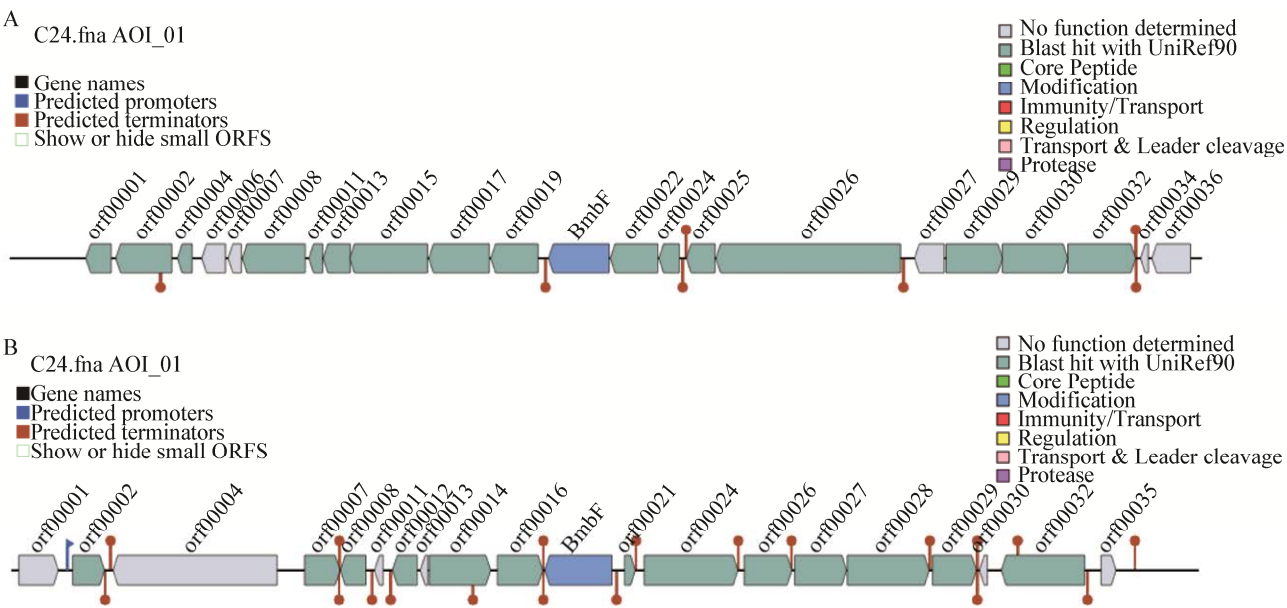


图 7 贝莱斯芽孢杆菌 RJW-5-5 中推定的 Sactipeptides 基因簇
Figure 7 The putative Sactipeptides gene cluster in *B. velezensis* RJW-5-5

注: A: Contig000004 基因簇片段; B: Contig000022 基因簇片段
Note: A: Contig000004 gene cluster fragment; B: Contig000022 gene cluster fragment

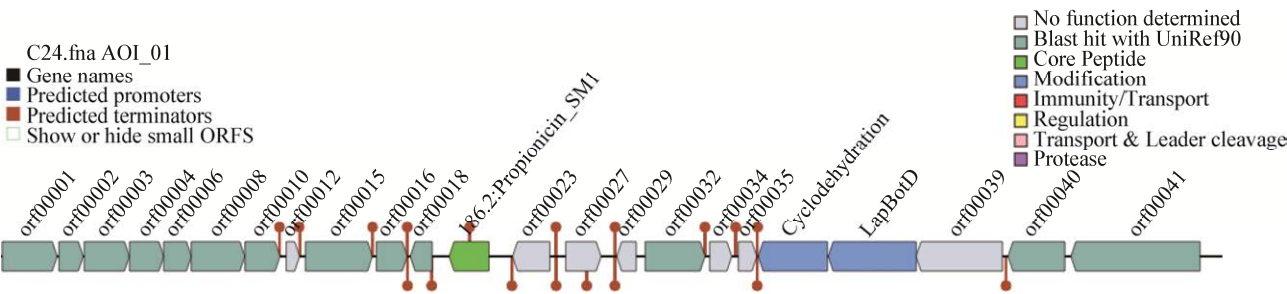


图 8 贝莱斯芽孢杆菌 RJW-5-5 中推定的 Propionicin_SM1 基因簇
Figure 8 The putative Propionicin_SM1 gene cluster in *B. velezensis* RJW-5-5

3 讨论与结论

近年来, 化学农药的危害越来越被关注, 随着进一步倡导“绿色、生态、健康、文明”发展, 中国越来越重视化学药剂给环境带来的巨大负面影响。由于长期以及不合理地使用化学农药, 我国乃至世界已经出现了严重的“3R”问题(Resistance, Recurrence, Residue)。基于绿色防控^[26]的基本条件, 本实验分离筛选出一株生防菌株 RJW-5-5, 其对梨黑斑病菌、玉米大斑病菌、烟草赤星病菌、马铃薯早疫病菌、西瓜炭疽病菌以及棉花枯萎病

菌等都有较好的抑制作用, 可为作物病害的防治提供一定的理论依据。

随着对抗生素生物合成过程的了解和基因组序列的积累, 基因组挖掘的时代即将来临。尤其是近年来, 通过对物种的全基因组挖掘, 发现了大量已知或未知的芽孢杆菌抗生素基因簇, 甚至包括被广泛研究的放线菌, 其中许多放线菌被发现可产生羊毛硫抗生素^[27]。此外, 在某些不被认为是产生抗生素的类蜡样芽孢杆菌基因组中, 一些隐藏的抗生素基因簇也很多^[28]。本研究在贝莱

表 5 Propionicin_SM1 基因簇的注释信息
Table 5 Annotated information for the Propionicin_SM1 gene cluster

蛋白编码 Protein ID	基因起始 Gene_start	基因终点 Gene_end	链 Strand	功能 Function
Contig000009.44.AOI_01:orf00001	28	1 245	+	Anthranilate synthase component 1
Contig000009.44.AOI_01:orf00002	1 284	1 829	+	Bifunctional protein TrpGD
Contig000009.44.AOI_01:orf00003	1 850	2 851	+	Anthranilate phosphoribosyltransferase
Contig000009.44.AOI_01:orf00004	2 853	3 614	+	Indole-3-glycerol phosphate synthase
Contig000009.44.AOI_01:orf00006	3 611	4 225	+	N-(5'-phosphoribosyl)anthranilate isomerase
Contig000009.44.AOI_01:orf00008	4 222	5 415	+	Tryptophan synthase beta chain
Contig000009.44.AOI_01:orf00010	5 419	6 195	+	Tryptophan synthase alpha chain
Contig000009.44.AOI_01:orf00012	6 333	6 629	+	—
Contig000009.44.AOI_01:orf00015	6 758	8 245	+	L-lactate permease
Contig000009.44.AOI_01:orf00016	8 336	9 019	+	Uncharacterized protein YukJ
Contig000009.44.AOI_01:orf00018	9 087	9 572	—	SPBc2 prophage-derived disulfide bond formation protein A n=5 RepID=BDBA_BACSU
Contig000009.44.AOI_01:186.2; Propionicin_SM1	9 949	10 830	—	186.2; Propionicin_SM1
Contig000009.44.AOI_01:orf00023	11 354	12 187	—	—
Contig000009.44.AOI_01:orf00027	12 537	13 322	+	—
Contig000009.44.AOI_01:orf00029	13 669	14 100	—	—
Contig000009.44.AOI_01:orf00032	14 298	15 632	+	Coenzyme A disulfide reductase
Contig000009.44.AOI_01:orf00034	15 733	16 224	+	—
Contig000009.44.AOI_01:orf00035	16 369	16 779	+	—
Contig000009.44.AOI_01:Cyclodehydration	16 810	18 351	—	Putative nitroreductase MJ1384
Contig000009.44.AOI_01:LapBotD	18 368	20 317	—	Uncharacterized protein in tfuA 3' region
Contig000009.44.AOI_01:orf00039	20 314	22 233	—	—
Contig000009.44.AOI_01:orf00040	22 358	23 617	—	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex
Contig000009.44.AOI_01:orf00041	23 751	26 618	—	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component

斯芽孢杆菌 RJW-5-5 中共检测到 4 种功能基因簇，分别为 Lasso_peptide、Cerecidin、Sactipeptides 以及 Propionicin_SM1。其中，Cerecidin 属于 II 类羊毛硫抗菌肽，常为环状结构，II 类羊毛硫抗菌肽通过单一的双功能羊毛硫氨酸修饰酶，LanM 进行修饰^[29]。Lasso_peptide 以及 Sactipeptides 都属于 RiPPs，该类型的 Lasso_peptide 在 1991 年首次被发现^[30]。Lasso_peptide 的结构特征是具有 N-末端大内酰胺环，其被 C-末端尾部穿过，产生独特的套索结构，即所谓的套索结^[31]。套索结由甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸或半胱氨酸的 N-末端 α-氨基与天

冬氨酸或谷氨酸的羧酸侧链之间的异肽键形成^[32]。已经发现的 Lasso_peptide 通过对酶的抑制作用显示抗菌活性^[33]，本次挖掘出的 Lasso_peptide 与其功能相似，也具有 ABC 转运蛋白。本研究发现的 Propionicin_SM1 基因簇为首次在芽孢杆菌中发现，属于丙酸杆菌素，这是细菌素的一种，能够合成双功能蛋白 TrpGD、二硫还原酶、2-氧戊二酸脱氢酶 E1 组分等。前人研究得知 Propionicin_SM1 的抑菌活性较强，100 °C 加热 10 min、30 °C 保持 2 周后活性依旧稳定，在 4 °C 冰箱中可冷藏保存 6 个月，耐酸碱值为 pH 3.0–9.0^[25]。

其对詹氏丙酸杆菌和真菌的杀菌效果明显,可抑制多种食源性致病菌,如致病性大肠杆菌、铜绿假单胞菌、副溶血性弧菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌和一株棒状杆菌^[34],对其他詹氏丙酸杆菌的杀菌效果微弱,是第一个可以应用于遗传学方面研究的细菌素^[23],在食物防腐方面研究较多,对大部分革兰氏阴性菌和部分阳性菌都有一定的抑制作用。这为以后芽孢杆菌量产 Propionin_SM1 提供了理论依据,这些羊毛硫抗生素及其他 RiPPs 在贝莱斯芽孢杆菌中的合成机制和生物学活性有待进行深入的研究。

REFERENCES

- [1] Ruiz-García C, Béjar V, Martínez-Checa F, Llamas I, Quesada E. *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the River Vélez in Málaga, Southern Spain[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55(1): 191-195
- [2] Cai GL, Zhang F, Ouyang YX, Zhao CS, Peng XH, Jiang AM. Research progress on *Bacillus velezensis*[J]. Northern Horticulture, 2018, 42(12): 162-167 (in Chinese)
蔡高磊, 张凡, 欧阳友香, 赵昌松, 彭宣和, 江爱明. 贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)研究进展[J]. 北方园艺, 2018, 42(12): 161-167
- [3] Gao ZF, Zhang BJ, Liu HP, Han JC, Zhang YJ. Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*[J]. Biological Control, 2017, 105: 27-39
- [4] Sun PP, Cui JC, Jia XH, Wang WH. Complete genome analysis of *Bacillus velezensis* L-1 and its inhibitory effect on pear gray and blue mold[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, 58(9): 1637-1646 (in Chinese)
孙平平, 崔建潮, 贾晓辉, 王文辉. 贝莱斯芽孢杆菌 L-1 对梨灰霉和青霉菌的抑制作用评价及全基因组分析[J]. 微生物学报, 2018, 58(9): 1637-1646
- [5] Yang K, Zheng KB, Huang XH, Yuan J, Chen J. Identification and antifungal activity of marine *Bacillus velezensis* strain TCS001[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2018, 20(3): 333-339 (in Chinese)
杨可, 郑柯斌, 黄晓慧, 袁静, 陈杰. 海洋生境贝莱斯芽孢杆菌 TCS001 的鉴定及抑真菌活性[J]. 农药学报, 2018, 20(3): 333-339
- [6] Gao P, Han JZ, Lu ZX, Lü FX, Zhao HZ, Zhang C, Bie XM. Isolation and identification of lactic acid bacterial strain with broad-spectrum antibacterial activity and extraction and purification of bacteriocin produced by it[J]. Food Science, 2016, 37(11): 160-166 (in Chinese)
高鹏, 韩金志, 陆兆新, 吕凤霞, 赵海珍, 张充, 别小妹. 广谱抗菌乳酸菌的分离鉴定及细菌素的提取和纯化[J]. 食品科学, 2016, 37(11): 160-166
- [7] Luo X, Fu L, Hao TY, Fang LY. Evaluation of antibacterial effects of propionibacterium bacteriocin on mung bean sprouts and its application in preservation[J]. Industrial Microbiology, 2018, 48(1): 37-42 (in Chinese)
罗欣, 傅亮, 郝天瑶, 方良月. 丙酸杆菌素抑菌效果评价及在芽菜保鲜中的应用[J]. 工业微生物, 2018, 48(1): 37-42
- [8] Tao YM, Pan HJ, Huang J, Xi X, Li P, Lu ZJ. Research and application of a novel bio-control microbial factor *Bacillus velezensis*[J]. China Plant Protection, 2019, 39(9): 26-33 (in Chinese)
陶永梅, 潘洪吉, 黄健, 席昕, 李鹏, 卢志军. 新型生防微生物因子贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)的研究与应用[J]. 中国植保导刊, 2019, 39(9): 26-33
- [9] Chowdhury SP, Hartmann A, Gao XW, Borriss R. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42: a review[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 780
- [10] Arnison PG, Bibb MJ, Bierbaum G, Bowers AA, Bugni TS, Bulaj G, Camarero JA, Campopiano DJ, Challis GL, Clardy J. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature[J]. Natural product reports, 2013, 30(1): 108-160
- [11] Alvarez-Sieiro P, Montalbán-López M, Mu DD, Kuipers OP. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(7): 2939-2951
- [12] Zhao X. Identification and characterization of antimicrobial compounds produced by *Bacillus* sp. BH072[D]. Tianjin: Doctoral Dissertation of Tianjin University, 2017 (in Chinese)
赵鑫. 芽孢杆菌 BH072 抗菌因子的鉴定及其抗菌活性的研究[D]. 天津: 天津大学博士学位论文, 2017
- [13] Wang GS. Antimicrobial Peptides: Discovery, Design, and Novel Therapeutic Strategies[M]. Wallingford: CABI Publishing, 2010
- [14] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2002
- [15] Quan X, Xue BG, Yang LR, Sun H, Yan HX. Identification of biocontrol strain YB-81 and its biocontrol efficacy against tomato gray mold[J]. Plant Protection, 2010, 36(5): 57-60 (in Chinese)
全鑫, 薛保国, 杨丽荣, 孙虎, 闫海霞. 生防菌株 YB-81 的鉴定及其对番茄灰霉病的防效[J]. 植物保护, 2010, 36(5): 57-60
- [16] Feng SL, Wang RY, Lin KC, Zhang YM, Du LX, Fan XH, Cao WP. Identification of strain Bs-208 and its inhibition against plant pathogenic fungi[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2003, 19(4): 171-174 (in Chinese)
冯书亮, 王容燕, 林开春, 张用梅, 杜立新, 范秀华, 曹伟

- 平. 拮抗细菌 Bs-208 菌株鉴定及对几种植物病原菌的抑菌测定[J]. 中国生物防治, 2003, 19(4): 171-174
- [17] Lee KJ, Kamala-Kannan S, Sub HS, Seong CK, Lee GW. Biological control of *Phytophthora* blight in red pepper (*Capsicum annuum* L.) using *Bacillus subtilis*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(7): 1139-1145
- [18] Dong XZ, Cai MY. Identification Manual of Common Bacterial System[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese)
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] Buchanan RE, Gibbons NE. Bergey's Manual of Determinative bacteriology[M]. 9th ed. Beijing: Science Press, 1984
- [20] Kloepper JW, Schroth MN, Miller TD. Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield[J]. Phytopathology, 1980, 70(11): 1078-1082
- [21] Shi YY, Zhao P, Song SW, Xiong MZ, Mo CB, Zhong NQ. Isolation and characterization of the antagonistic bacterium YN-2-2 against potato common scab[J]. Microbiology China, 2020, 47(8): 2425-2435 (in Chinese)
石莹莹, 赵盼, 宋双伟, 熊桐梓, 莫乘宝, 仲乃琴. 马铃薯疮痂病拮抗菌 YN-2-2 的分离与鉴定[J]. 微生物学通报, 2020, 47(8): 2425-2435
- [22] Tietz JI, Schwalen CJ, Patel PS, Maxson T, Blair PM, Tai HC, Zakai UI, Mitchell DA. A new genome-mining tool redefines the lasso peptide biosynthetic landscape[J]. Nature Chemical Biology, 2017, 13(5): 470-478
- [23] Azevedo AC, Bento CBP, Ruiz JC, Queiroz MV, Mantovani HC. Distribution and genetic diversity of bacteriocin gene clusters in rumen microbial genomes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(20): 7290-7304
- [24] Yang X, Van Der Donk WA. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: new insights into the role of leader and core peptides during biosynthesis[J]. Chemistry, 2013, 19(24): 7662-7677
- [25] Miescher S, Stierli MP, Teuber M, Meile L. Propionicin SM1, a bacteriocin from *Propionibacterium jensenii* DF1: isolation and characterization of the protein and its gene[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2000, 23(2): 174-184
- [26] Yang PY, Xiong YK, Yin Z, Shan XN. Progress and prospects on field demonstrations of green pest control technologies[J]. China Plant Protection, 2010, 30(4): 37-38 (in Chinese)
杨普云, 熊延坤, 尹哲, 单绪南. 绿色防控技术示范工作进展与展望[J]. 中国植保导刊, 2010, 30(4): 37-38
- [27] Foulston LC, Bibb MJ. Microbisporicin gene cluster reveals unusual features of lantibiotic biosynthesis in actinomycetes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(30): 13461-13466
- [28] Marsh AJ, O'Sullivan O, Ross RP, Cotter PD, Hill C. *In silico* analysis highlights the frequency and diversity of type 1 lantibiotic gene clusters in genome sequenced bacteria[J]. BMC Genomics, 2010, 11(1): 679
- [29] Begley M, Cotter PD, Hill C, Ross RP. Identification of a novel two-peptide lantibiotic, lichenicidin, following rational genome mining for LanM proteins[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(17): 5451-5460
- [30] Weber W, Fischli W, Hochuli E, Kupfer E, Weibel EK. Anantin: a peptide antagonist of the atrial natriuretic factor (ANF). I. Producing organism, fermentation, isolation and biological activity[J]. The Journal of Antibiotics, 1991, 44(2): 164-171
- [31] Hegemann JD, Zimmermann M, Xie XL, Marahiel MA. Lasso peptides: an intriguing class of bacterial natural products[J]. Accounts of Chemical Research, 2015, 48(7): 1909-1919
- [32] Velázquez JE, Van Der Donk WA. Genome mining for ribosomally synthesized natural products[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2011, 15(1): 11-21
- [33] Delgado MA, Rintoul MR, Farías RN, Salomón RA. *Escherichia coli* RNA polymerase is the target of the cyclopeptide antibiotic microcin J25[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(15): 4543-4550
- [34] Mohamed SE, Tahoun MK. The expression of propionicin plg-1 gene (plg-1) by lactic starters[J]. Journal of Dairy research, 2015, 82(2): 209-214