

1 株广谱拮抗植物病原真菌的芽孢杆菌 HNA3 的鉴定及其活性成分分析

徐菱菱 王 丽 陈龙男 谢福莉 李友国

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 采用形态观察、16S rDNA 序列和部分特异基因排列分析鉴定从植物根际土壤中分离的 1 株根际细菌 HNA3; 采用平板对峙试验和抑菌率计算方法测定其对供试植物病原真菌的拮抗谱和拮抗能力; 通过摇瓶发酵和酸沉淀方法研究相关抗菌活性物质的产生条件及其分离方法; 采用表面活性检测和有关功能编码基因的序列分析初步鉴定抗菌活性物质成分的性质。结果表明: HNA3 菌株为 1 种解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens*; BPY(牛肉膏蛋白胨酵母粉)培养基是适合 HNA3 生长和产生相关抗菌活性物质的适宜培养基; 活性物质存在于发酵除菌液中, 可通过酸沉淀方法分离获得。活性物质具有较高的稳定性和抗逆性, 属于脂肽类物质。本研究结果表明 HNA3 具有较广谱的拮抗植物病原真菌的能力, 具备研发成为一种表面喷施型微生物杀菌剂的特性和应用前景。

关键词 芽孢杆菌 HNA3; 植物病原真菌; 抗菌活性; 稳定性; 脂肽

中图分类号 Q 939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)03-0021-07

植物病原体引起的病害时常发生, 导致农林作物的产量与质量下降, 造成很大的经济损失。在近代, 在农业生产过程使用化学农药起到了较好的防治病害的作用, 但化学农药的使用引起了病原物的抗性, 且长期使用造成了环境污染, 对人类的健康与生存造成了不小的危害, 因此需要寻找新的、无污染的、更有效的微生物农药来抑制植物病害的发生。病原体侵染会使植物根际有益微生物产生诱导防卫反应, 诱导系统抗性(ISR)就是其中一种防卫机制, 它是由植物根际促生微生物(PGPR)诱导植物产生的对植物病原微生物的抗性反应^[1]; PGPR 能够通过产生抗病原微生物的代谢产物来拮抗病原菌侵入植物, 因而可以从植物根际中寻找具有拮抗植物病原菌能力的微生物。芽孢杆菌因能以抗逆休眠体——芽孢存在而具有很高的存活能力, 它们的繁殖能力强, 在自然界中广泛存在; 常见于根际土壤及根际中, 可纯化培养。许多试验表明芽孢杆菌具有抗植物病原真菌^[2-3]和促进植物生长的作用^[4], 芽孢杆菌能产多种胞外抗菌物质。

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室生

物固氮课题组从植物根际土壤中分离到 1 株芽孢杆菌 HNA3, 具有广谱拮抗植物病原真菌的能力。本研究对该菌的分类地位、发酵条件、活性物质性质、分离、稳定性及抗逆性等进行系统的研究, 以期为进一步优化其发酵生产工艺和条件, 将其研发成为一种植物表面喷施型的农用微生物杀菌剂奠定工作基础。

1 材料与amp;方法

1.1 试验菌株

根际细菌 HNA3 由笔者所在实验室筛选分离所得。

供试植物病原真菌包括: 拟盘菌(*Pyrenopeziza medicaginis*), 核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*), 纹枯菌(*Pellicularia sasakii*), 稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*), 棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*), 尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*), 小麦赤霉菌(*Gibberella zeae*), 草莓灰霉病菌(*Botrytis cinerea*), 甜瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*), 玉米小斑病原菌

收稿日期: 2012-05-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(J1103510)、湖北省科技攻关项目(2007AA201C28)和华中农业大学大学生科技创新基金项目(SRF)

徐菱菱, 硕士研究生, 研究方向: 根际微生物应用技术。E-mail: 309208356@163.com

通讯作者: 李友国, 博士, 教授。研究方向: 生物固氮。E-mail: youguoli@mail.hzau.edu.cn

(*Bipolaris maydis*), 苹果轮纹病病原菌 (*Botryosphaeria berengeriana* f. sp. *piricola*), 甘蔗凤梨病病原菌 (*Thielabiosis paradoxa*), 叶枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani* Kühn), 柿子黄萎病病原菌 (*Verticillium dahliae*)。转化所用感受态细胞为 *E. coli* DH5 α 。

1.2 培养基

试验中用到 LB、NB、BPY(牛肉膏蛋白胨酵母粉)、完全、基本等 5 种液体培养基。细菌培养采用 LB 固体培养基。植物病原真菌培养采用马铃薯固体培养基。

1.3 抑菌谱测定和抑制率计算

1) 平皿对峙法。LB 平皿中心接种供试真菌菌块, 于距平皿中心 2.5 cm 处对称放置 4 张直径 6 mm 的小滤纸片, 每张纸片上滴加 5 μ L HNA3, 重复 2 个平皿; 对照为 LB 琼脂平皿只接真菌^[5-6]。28 $^{\circ}$ C 培养待观察。待对照组真菌长满平板或长至纸片时取出平皿, 测量真菌直径^[7-8], 计算抑制率^[9-10]。

2) 平皿扩散法。于马铃薯平皿中心接种供试真菌菌块, 在距平皿中心 2.5 cm 处对称打直径 9 mm 的 4 个孔, 每个孔中加 100 μ L HNA3 发酵过滤除菌液, 重复 2 个平皿; 对照为马铃薯琼脂平皿上接真菌菌块, 孔中加 100 μ L 无菌水。28 $^{\circ}$ C 培养待观察。待对照组真菌长满平皿时取出试验平板, 测量真菌直径^[5-6], 计算抑制率^[9-10]。

1.4 16S rDNA 分析

以 HNA3 总 DNA 为模板, 采用 16S rDNA 通用引物 27F/1492R 进行 PCR 扩增, 得到 PCR 扩增产物, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳得到目的条带, 采用 DNA 凝胶回收试剂盒纯化目的条带, 然后进行 TA 克隆、转化后送交金思特生物科技有限公司测序, 测序结果于 NCBI 数据库中 Blast 比对分析。

1.5 部分特异基因 PCR 扩增

以 HNA3 总 DNA 为模板, 分别用 YyaO_F/TetB_R 和 YyaR_{F_L}/TetB_R 两对引物 PCR 扩增。引物序列为 YyaO_F: 5'-GGAAC CAGTC CACAG GGTG TGG-3'; YyaR_{F_L}: 5'-AAGGA GAATC ATTTA TGCGG TC-3'; TetB_R: 5'-CCATA TAGAG CTGTT CCAAT GGAGA AG-3'^[11-12]。

PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 30 个循环; 再 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min, 16 $^{\circ}$ C 降温 5 min。PCR 扩增产物

电泳回收后进行 TA 克隆、转化和测序, 测序结果经 Blast 比对分析。

1.6 HNA3 发酵条件的优化

1) 培养基优化。接种 HNA3 于 100 mL LB、NB、BPY、完全、基本等 5 种液体培养基中, 置于 28 $^{\circ}$ C、180 r/min 摇床培养 4 d 后, 重复 3 次, 测发酵液 $D_{600\text{nm}}$ 值, 观测其菌体生长情况, 同时发酵液离心, 上清过滤、除菌, 用平皿扩散法做抑制纹枯菌试验, 依据菌体生长量与抑菌能力确定最适培养基。

2) pH 值优化。调节 BPY 液体培养基 pH 2.0~10.0 (梯度为 1.0), 接种 HNA3 后置于 28 $^{\circ}$ C、180 r/min 摇床培养 4 d, 重复 3 次, 按本文“1.6”中 1) 的方法确定适宜 HNA3 生长的 pH 值。

3) 培养时间优化。接种 HNA3 于 100 mL BPY 培养基中, 置于 28 $^{\circ}$ C、180 r/min 摇床培养, 每隔 8 h 取 1 次样, 按本文“1.6”中 1) 的方法确定合适的培养时间。

1.7 抗菌活性物质的稳定性

将 HNA3 单菌落接至 BPY 培养基中, 28 $^{\circ}$ C、180 r/min 摇床培养 4 d 后, 9 500 r/min、15 min 离心得上清液, 经孔径 0.22 μ m 的滤膜过滤除菌得到发酵除菌液, 以纹枯菌作为指示菌进行抗植物病原真菌活性物质的稳定性分析。

1) 传代对抗菌活性物质的影响。从斜面划线接种 HNA3 至 LB 平板上作为 HNA3 第 1 代, 置于 28 $^{\circ}$ C 培养箱中培养, 第 2 天从 HNA3 第 1 代平板上挑取单菌落划线接至新的 LB 平板上, 依次接菌直至第 11 代, 后分别挑取 HNA3 第 1 代和第 11 代的单菌落至 100 mL BPY 液体培养基中于 28 $^{\circ}$ C、180 r/min 摇床培养 4 d, 重复 3 次, 得到发酵除菌液用平皿扩散法做抑菌试验: 第 1 代发酵除菌液样品的抑菌活性作为对照, 定为 100%, 第 11 代发酵除菌液样品抑菌活性为其与对照抑菌活性的比值的百分数。

2) 温度对抗菌物质活性的影响。分装 500 μ L 发酵除菌液于 1.5 mL 离心管中, 30~100 $^{\circ}$ C (梯度为 10 $^{\circ}$ C) 中分别保持 1 h 及于 121 $^{\circ}$ C 30 min 和 -20 $^{\circ}$ C 48 h 后, 重复 3 次, 处理完成后用平皿扩散法做抑菌试验: 不经过任何处理的发酵除菌液样品抑菌活性作为对照, 定为 100%, 处理样品抑菌活性为其与对照抑菌活性的比值的百分数, 下同。

3) 蛋白酶 K 对抗菌物质活性的影响。分装 500 μ L 发酵除菌液于 1.5 mL 离心管中, 加入质量浓度

1 mg/mL 的蛋白酶 K, 于 37 °C 水浴中保持 3 h, 后于 80 °C 水浴保持 30 min 使蛋白酶 K 变性而终止其作用, 重复 3 次。处理完成后用平皿扩散法做抑菌试验。

4) pH 值对抗菌物质活性的影响。分装 500 μ L 发酵除菌液于 1.5 mL 离心管中, 调节 pH 5.0~11.0 (梯度为 1.0), 室温放置 24 h, 重复 3 次, 用平皿扩散法做抑菌试验。

5) 有机溶剂对抗菌物质活性的影响。分装 500 μ L 发酵除菌液于 1.5 mL 离心管中, 分别加 500 μ L 乙醚、乳酸、异戊醇、正丁醇、乙酸、乙酸乙酯、二甲苯、三氯甲烷、异丙醇、丙三醇、乙二醇、乙醇、甲醇颠倒混合, 室温放置 5 h, 重复 3 次, 离心浓缩至 500 μ L 以下, 处理完成后用平皿扩散法做抑菌试验。

6) 紫外线照射对抗菌物质活性的影响。装 10 mL 发酵除菌液至灭菌的培养皿中, 于无菌操作台的紫外灯下直接照射 2、4、6、8、10、12 h, 重复 3 次, 处理完成后用平皿扩散法做抑菌试验。

1.8 生物表面活性的检测

1) 液滴坍塌试验。于封口膜 (parafilm 石蜡封口膜) 上轻轻滴加 20 μ L 蒸馏水、发酵除菌液、发酵除菌液酸沉淀后离心的上清液、发酵除菌液酸沉淀后离心的沉淀 pH 8.0 磷酸缓冲液的溶解液, 重复 3 次, 观察所加液滴形态 (坍塌或是保持球形)。

2) 排油试验。注入 40 mL 蒸馏水于直径为 8.5 cm 的干净培养皿中, 分别滴加 4 mL 液体石蜡, 待水面上油膜分布均匀稳定后, 于油膜中心分别滴加 1 mL 蒸馏水、发酵除菌液、发酵除菌液酸沉淀后离心的上清液、发酵除菌液酸沉淀后离心的沉淀 pH 8.0 磷酸缓冲液的溶解液, 重复 3 次, 观察是否出现油膜排向四周的现象^[13]。

1.9 芽孢杆菌 HNA3 脂肽类合成的功能基因分析

根据 NCBI 上登录的 3 种主要脂肽类型 (surfactin, iturin, fengycin)^[14] 的合成酶基因 *srfA*^[15]、*ituA*^[16] 和 *fenB*^[17] 序列设计引物, 以芽孢杆菌 HNA3 总 DNA 为模板, PCR 扩增脂肽合成的部分基因片段, 测序比对后推测 HNA3 遗传学上能生产的抗植物病原真菌的脂肽类型。引物序列为 *srfA*_F: 5'-CTGCT CGCCG CCTAT TTGTA-3', *srfA*_R: 5'-TGGTG AGTTT CCCAG TATCC C-3' (目的片段: 418 bp); *ituA*_F: 5'-CATTC GTCGA GGTGG GACA-3', *ituA*_R: 5'-TCGGG CAAGT

TCGTA GCG-3' (目的片段: 545 bp); *fenB*_F: 5'-TCGGG TTGAC CGTAT GCC-3', *fenB*_R: 5'-CCT-GA AATCG GCGGG AAG-3' (目的片段: 408 bp)。

2 结果与分析

2.1 HNA3 拮抗植物病原真菌的抑菌谱

采用平皿对峙法于 LB 培养基平板上检测 HNA3 菌株抑菌谱, 发现其对所有供试植物病原真菌的生长具有抑制作用。进一步研究发现, HNA3 摇瓶发酵后的除菌液也具有抑制植物病原真菌生长的能力, 在马铃薯培养基上用平皿扩散法测得除菌液的抑菌谱和抑制能力结果 (表 1) 显示, 发酵除菌液具有抑菌活性, 表明 HNA3 所产的抗菌活性物质可分泌到胞外。

表 1 HNA3 菌株及其发酵除菌液的抑菌谱和抑制能力

Table 1 Antifungal spectrum and inhibition ability of HNA3 strain and its culture filtrate

供试病原真菌 Pathogenic fungi strains tested	活菌抑菌率/% Inhibition rate	发酵滤液抑菌率/% Inhibition rate of culture filtrate
尖孢镰刀菌 <i>F. oxysporum</i>	44.58	14.41
核盘菌 <i>S. sclerotiorum</i>	81.25	52.35
甘蔗凤梨病病原菌 <i>T. paradoxa</i>	62.13	65.88
苹果轮纹病病原菌 <i>B. berengeriana</i> f. sp. <i>piricola</i>	61.76	55.00
玉米小斑病病原菌 <i>B. maydis</i>	62.68	59.41
甜瓜枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	56.25	21.76
小麦赤霉菌 <i>G. zeae</i>	45.63	55.59
棉花枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	61.86	12.65
稻瘟病菌 <i>M. grisea</i>	62.50	34.33
纹枯菌 <i>P. sasakii</i>	53.87	48.82
柿子黄萎病病原菌 <i>V. dahliae</i>	51.56	14.70
叶枯丝核菌 <i>R. solani</i> Kühn	38.13	24.41
草莓灰霉病菌 <i>B. cinerea</i>	34.21	27.65
拟盘菌 <i>P. medicaginis</i>	46.30	17.65

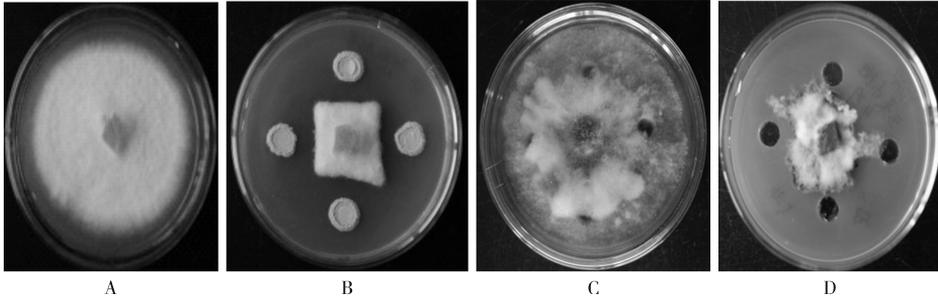
2.2 HNA3 菌株的种属鉴定

1) 个体形态和菌落特征。HNA3 在 LB 平板上生长的幼龄单菌落颜色半透明、湿润、隆起、边缘完整、形态圆形, 培养后期单菌落颜色乳白、干燥、褶皱、边缘完整。光学显微镜下观察 HNA3 细菌个体呈杆状, 成对或链状排列。芽孢染色观察显示, 芽孢内生且其呈椭圆形。

2) 16S rDNA 分析。以 HNA3 总 DNA 为模板, 采用 16S rDNA 通用引物 27F/1492R 进行 PCR

扩增,克隆、测序得到 1 509 bp 的 16S rDNA 序列 (GenBank 登录号:HM030988),经 Blast 比对分析,其与解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* 和枯草

芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 的同源性极高,如与 *B. amyloliquefaciens* PEBA0801 和 *B. subtilis* X-01 的同源性均达到 99%。



A: 无菌水对照 ddH₂O control; B: HNA3 菌体对甜瓜枯萎病菌的抑制作用 HNA3 bacteria's antagonistic capacity toward *F. oxysporum* f. sp. *melonis* on the plate; C: 无菌水对照 ddH₂O control; D: HNA3 发酵除菌液对玉米小斑病病原菌的抑制作用 HNA3 culture filtrate's antagonistic capacity toward *B. maydis* on the plate.

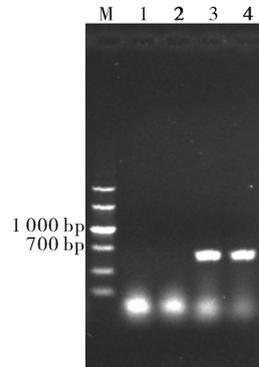
图 1 HNA3 菌体及其发酵除菌液的抑菌试验

Fig. 1 Antifungal bioactivity tests of HNA3 bacteria and its culture filtrate

3)部分特异性基因序列排列分析。*B. amyloliquefaciens* 是从 *B. subtilis* 中分离出来的,二者具有极高的同源性。在 *B. subtilis* 中,基因 *yyaO* 邻近 *tetB-tetL* 上游,*tetB-tetL* 下游 2 003 bp 处是基因 *yyaR*,而 *yyaR* 在 *B. amyloliquefaciens* 中邻近 *tetB-tetL* 上游。以此为基础设计 2 个引物对 YyaO_F/TetB_R 和 YyaR_FL/TetB_R 分别扩增 HNA3 总 DNA,电泳结果显示以 YyaO_F/TetB_R 为引物的 PCR 扩增无任何条带,而以 YyaR_FL/TetB_R 为引物的 PCR 扩增得到 600 bp 左右的条带(图 2)。其测序结果 Blast 分析表明,与之同源性较高的是 *B. amyloliquefaciens* UCM B-5113(同源性为 94%)和 *B. amyloliquefaciens* UCM B-5044(同源性为 93%),说明 HNA3 菌株属于 *B. amyloliquefaciens*。

2.3 芽孢杆菌 HNA3 发酵条件的优化

1)培养基的优化。通过测定 $D_{600\text{ nm}}$ 观察 HNA3 在 5 种液体培养基的生长情况,菌体生长量由大到小依次为完全培养基、LB 培养基、BPY 培养基、NB 培养基、基本培养基。而抑菌试验显示所产抗真菌物质抑菌能力由大到小依次为 BPY 培养基、完全培养基、LB 培养基、NB 培养基、基本培养基。综合此两项结果,说明采用 BPY 液体培养基,既有利于菌体生长(培养 48 h 时其活菌数量为 $25.0 \times 10^8/\text{mL}$),又利于抗真菌活性物质产生。



M: 1 kb marker; 1,2: 利用引物 YyaO_F/TetB_R 的 PCR 扩增产物 PCR amplification with primers of YyaO_F/TetB_R; 3,4: 利用引物 YyaR_FL/TetB_R 的扩增产物 PCR amplification with primers of YyaR_FL/TetB_R.

图 2 *tetB-tetL* 上下游功能基因的 PCR 扩增检测
Fig. 2 PCR detection of the function genes located in the upstream and downstream of *tetB-tetL*

2)pH 值的优化。调节 BPY 培养基的 pH 值至 5.0~9.0, HNA3 菌体生长和抑菌活性没有差别。而 HNA3 在 pH 2.0~4.0 及 pH 10.0 的 BPY 培养基中菌体没有生长,将此时的培养基液体涂布于 LB 平板上培养后可观察到有 HNA3 菌落生长,说明 HNA3 在此 pH 值下没有死亡,同时检测到 HNA3 在 pH 2.0~4.0 及 pH 10.0 培养基中培养的除菌液没有抑菌活性。表明培养基 pH 5.0~9.0 适合 HNA3 菌体生长(培养 48 h 时其活菌数量为 $25.0 \times 10^8/\text{mL}$)和代谢产生抗真菌活性物质。

3) 培养时间的优化。摇瓶培养 8 h HNA3 菌体有生长但无抑菌活性, 培养 16 h 菌体量继续增加且开始有抑菌活性, 之后, 随着培养时间增加其菌体量和发酵除菌液抑菌能力慢慢升高, 48 h 时其菌体生长量(活菌数达 25.0×10^8 /mL) 和抑菌能力达到最大值, 且趋于稳定。

2.4 抗菌活性物质的稳定性

1) 传代、温度、蛋白酶 K 和紫外线对 HNA3 除菌液抗菌活性的影响。HNA3 连续传代 11 次后其发酵除菌液对纹枯菌的抑制能力没有变化, 说明其产抗真菌活性物质能力具有遗传稳定性, 合成抗菌成分的功能基因不易丢失。90 °C 以内水浴中保持 1 h 其抑菌能力无变化; 于 100 °C 水浴中保持 1 h 其抑菌能力下降, 降至 90% 左右; 121 °C 30 min 活性下降更多, 降至 70% 左右。蛋白酶 K 处理发酵除菌液后, 对指示真菌的抑菌活性没有变化, 说明 HNA3 所产抗真菌主要活性成分不是蛋白质类物质。同时发现, 发酵除菌液在照射紫外线 12 h 之后抑菌活性没有变化, 表明 HNA3 所产抗真菌活性物质有很强的抗紫外线能力, 显示其能在阳光直射环境下使用。

2) pH 值对抗菌物质活性的影响。发酵除菌液在 pH 5.0~9.0 抑菌活性没有变化。调节 pH 值至 5.0 时发酵除菌液出现沉淀, 离心后沉淀有抗菌活性而上清无活性, 酸沉淀保持抑菌活性说明其抗菌成分的生物化学结构在加酸形成沉淀分离出来的过程中没有发生变化, 其功能结构未被破坏, 因而可用该方法分离 HNA3 发酵所产抗真菌活性物质。调节发酵除菌液 pH 值至 10.0 以上时, 其对真菌的抑菌能力消失了, 说明强碱对 HNA3 所产的抗菌活性物质有影响, 可能改变了该物质的生物化学结构而使其丧失抗真菌功能, 不能应用于高碱土壤中生长的植物上防治植物真菌病害。

3) 有机溶剂对抗菌物质活性的影响。发酵除菌液 1:1 混合各有机溶剂后, 加入乙醚和乳酸后出现沉淀, 沉淀有抑菌活性但抑菌活性明显下降; 加入异戊醇、正丁醇、乙酸乙酯、二甲苯和三氯甲烷之后出现分层, 一层为无色, 另一层为发酵液颜色, 分别吸取上下 2 层进行离心浓缩后发现无色层液体很快消失, 表明该层应为有机溶剂; 而另一层具发酵液颜色的液体除加有异戊醇和正丁醇的没有抑菌能力之外, 其他 3 种有机溶剂处理后还保留有 85% 以上的活性, 说明这几种有机溶剂对抗真菌活性物质有影

响且抗真菌活性物质疏水性较弱; 加入其他有机溶剂时, 发酵除菌液与之互溶, 除加入乙二醇抑菌活性降低至 70% 左右、加入甲醇其抑菌活性无变化外, 其他处理抑菌活性只稍有下降, 降至 90% 左右。

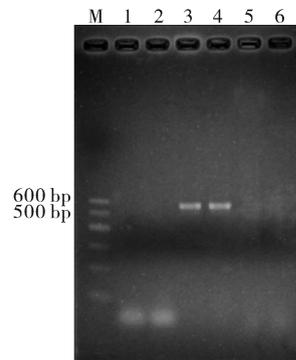
2.5 生物表面活性的检测结果

1) 液滴坍塌试验。蒸馏水和 HNA3 发酵除菌液加酸出现沉淀后离心得到的上清滴加在封口膜上, 这 2 种液滴保持球形; 而 HNA3 发酵除菌液及 HNA3 发酵除菌液加酸出现沉淀后离心得到的沉淀经 pH 8.0 磷酸缓冲液溶解后的液体滴加到封口膜上液滴均未保持球形, 而是发生坍塌, 说明 HNA3 发酵代谢产生了具有表面活性的化合物, 且很可能是具有抗植物病原真菌活性的脂肽类成分。

2) 排油试验。蒸馏水和 HNA3 发酵除菌液加酸出现沉淀后离心得到的上清加到油膜中央, 没有油膜往四周推挤现象, 而发酵除菌液及酸沉淀经 pH 8.0 磷酸缓冲液溶解后液体加到油膜中央, 油膜很快自滴加处开始往四周推挤, 进一步说明 HNA3 发酵代谢产生了具有表面活性的脂肽类物质。

2.6 HNA3 脂肽类合成功能基因的序列分析

分别设计引物以 PCR 扩增 HNA3 总 DNA, 电泳结果显示: 只有以 *ituA_F/ituA_R* 为引物的扩增获得了目的条带; 以 *srfA_F/srfA_R* 和 *fenB_F/fenB_R* 为引物扩增没有得到目的条带(图 3)。将获得的目的条带进行克隆、测序及 Blast 比对, 结果



M: 100 bp ladder marker; 1, 2: 利用引物 *srfA_F/srfA_R* 对目标基因 *srfA* 的 PCR 扩增 PCR amplification for the target gene *srfA* with primers of *srfA_F/srfA_R*; 3, 4: 利用引物 *ituA_F/ituA_R* 对目标基因 *ituA* 的 PCR 扩增 PCR amplification for the target gene *ituA* with primers of *ituA_F/ituA_R*; 5, 6: 利用引物 *fenB_F/fenB_R* 对目标基因 *fenB* 的 PCR 扩增 PCR amplification for the target gene *fenB* with primers of *fenB_F/fenB_R*.

图 3 脂肽类合成功能基因的 PCR 检测

Fig. 3 PCR detection of the function genes for lipopeptide biosynthesis

显示:与其具有同源性的都是 Iturin 合成相关基因,说明 HNA3 基因组上存在着 Iturin 合成有关的操纵元。

3 讨论

本研究对从植物根际土壤中筛选获得的、能抑制植物病原真菌的拮抗细菌菌株 HNA3 进行了菌种鉴定,通过培养与形态观察将 HNA3 归类为芽孢杆菌。通过 16S rDNA 扩增和序列分析,进一步归类其为枯草芽孢杆菌或解淀粉芽孢杆菌。为了精确鉴定 HNA3,再根据这 2 种细菌共有的 *tetB-tetL* 基因上下游序列排序分析,参考已有文献的引物序列以及 NCBI 上相关基因序列设计了适宜引物,PCR 扩增 HNA3 总 DNA,经序列分析,鉴定其为解淀粉芽孢杆菌。

HNA3 发酵条件优化结果显示 BPY 液体培养基(pH 7.0)适合 HNA3 生长和产生相关抗菌活性成分,为进一步优化发酵条件及生产工艺奠定了基础。芽孢杆菌 HNA3 的发酵除菌液对供试植物病原真菌的生长具有抑制作用,表明它能生产胞外抗菌活性成分。将发酵除菌液调至 pH 5.0 时出现具有抗菌活性的沉淀(上清无抑菌活性),沉淀经磷酸缓冲液或甲醇溶解的溶液还具有抑菌活性,表明可用酸沉淀法分离抗菌成分,且该抗菌成分可再溶解,因而可应用酸沉淀法分离 HNA3 生产的抗菌活性物质,以利于进行下一步分离纯化。试验结果还显示 HNA3 产抗菌物质的能力具有遗传稳定性;抗菌物质耐热、耐紫外线,可应用在日晒高温条件下;对 pH 值、有机溶剂、不同浓度的供试金属离子和非金属离子有不同程度的耐受性,可作为其实际应用的参考条件。本研究中酸沉淀提取含 Iturin 成分的抗菌物质方法与陈华等^[18]加酸调节 pH 2.0 轻微搅动或过夜才能得到含有 Iturin A 沉淀的方法不同之处在于:加酸调节 HNA3 发酵滤液至 pH 5.0 时能即刻得到拮抗植物病原真菌的沉淀,说明 HNA3 的拮抗成分更容易分离,具有较好的应用前景。HNA3 作为易存活、易繁殖、易培养、易贮藏、能形成抗逆性内生芽孢的芽孢杆菌,应用何种方式提高 HNA3 作为 PGPR 生防植物真菌病害的效率是值得进一步研究的课题。

参 考 文 献

- [1] CHINNASAMY G. A proteomics perspective on biocontrol and plant defense mechanism[M]//SIDDQUI Z A. PGPR: biocontrol and biofertilization. Berlin: Springer Netherlands, 2005:233-255.
- [2] CAVAGLIERI L, ORLANDO J, RODRIGUEZ M I, et al. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level[J]. Research in Microbiology, 2005, 156:748-754.
- [3] 高玲玲, 陈小龙, 蒋涛, 等. 具有拮抗作用的水稻内生固氮菌的分离与鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2012, 31(5):553-557.
- [4] IDRISSE E E, MAKAREWICZ O, FAROUK A, et al. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect[J]. Microbiology, 2002, 148:2097-2109.
- [5] 姬生宝, 范晋勇, 元英进. 藤黄灰链霉菌-H103 发酵液中抗真菌活性成分的分离纯化[J]. 微生物学通报, 2005, 32(3):77-81.
- [6] 王艳艳, 刘常宏, 陈欣, 等. 海岸盐沼湿地细菌抗真菌活性研究[J]. 植物生理科学, 2006, 22(12):56-59.
- [7] 高克祥, 刘晓光, 郭润芳, 等. 木霉菌对杨树树皮溃疡病菌拮抗作用的研究[J]. 林业科学, 2001, 37(5):82-86.
- [8] 刘海龙, 李春杰, 许艳丽. 生防细菌的抑菌谱和对大豆根腐病的防治[J]. 大豆通报, 2008(1):10-16.
- [9] MONTEALEGRE J R, REYES R, PEREZ L M, et al. Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2003, 6(2):115-127.
- [10] SWAIN M R, RAY R C. Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus subtilis* isolated from cowdung microflora[J]. Microbiological Research, 2009, 164:121-130.
- [11] VA O N, DIXELIUS C, MEIJER J, et al. Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis* [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 48:249-259.
- [12] 权春善, 王军华, 徐洪涛, 等. 一株抗真菌解淀粉芽孢杆菌的分离鉴定及其发酵条件的初步研究 [J]. 微生物学报, 2006, 46(1):7-12.
- [13] 傅时波, 李尔扬. 生物表面活性剂检测方法的研究[J]. 江苏工业学院学报, 2007, 19(2):23-25.
- [14] MERO D, DE-VICENTE A, RAKOTOALY R H, et al. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca* [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2007, 20(4):430-440.
- [15] ANO M M, MAGNUSON R, MYERS A, et al. *srfA* is an operon required for surfactin production, competence development, and efficient sporulation in *Bacillus subtilis* [J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(5):1770-1778.

- [16] SUGE K, AKIYAMA T, SHODA M. Cloning, sequencing, and characterization of the Iturin A operon[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(21): 6265-6273.
- [17] CHEN C H, CHANG L K, CHANG Y S, et al. Transposon mutagenesis and cloning of the genes encoding the enzymes of fengycin biosynthesis in *Bacillus subtilis* [J]. *Molecular and General Genetics*, 1995, 248: 121-125.
- [18] 陈华, 袁成凌, 蔡克周, 等. 枯草芽孢杆菌 JA 产生的脂肽类抗生素-iturinA 的纯化及电喷雾质谱鉴定[J]. *微生物学报*, 2008, 48(1): 116-120.

Identification of *Bacillus* strain HNA3 and its bioactive compounds with a broad spectrum of antifungal activity

XU Ling-ling WANG Li CHEN Long-nan XIE Fu-li LI You-guo

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract This study aims to identify a *Bacillus* strain HNA3 isolated from the rhizosphere soil and characterize its broad antagonistic capacity towards various plant pathogenic fungi, and to optimize the conditions for the fermentation and the bioactive component separation, therefore, to establish a solid basis for developing the HNA3 strain into a promising bioactive agent with a broad spectrum of antifungal activity. In the present work, the classification status of the HNA3 was identified through morphological observation, 16S rDNA sequence and the order of species-unique genes arrangement analysis. The spectrum and capacity of the HNA3's antifungal activity was identified by the plate dual-culture antagonistic experiment and the antimicrobial inhibition rate, respectively. The flask shaking fermentation and acid precipitation method were used to determine the optimal conditions for the HNA3's antimicrobial compound production and separation. By using the methods of surface activity examination and the analysis on the arrangement of candidate function genes and sequences, the basic properties of the bioactive antimicrobial compound were determined. The results showed that the HNA3 was identified as *Bacillus amyloliquefaciens*, and the BPY was the appropriate medium for HNA3's culture growth, as well as for the production of bioactive antifungal compound. It was also found that the bioactive antifungal compound existed in the HNA3's culture filtrates and it could be separated through acid precipitation. Furthermore, the bioactive compound could be ascribed to the category of lipopeptide and possessed the properties of high stability and stress resistance. In conclusion, the strain HNA3 demonstrates a broad spectrum of antifungal activity, and indicates a promising application prospective by developing it into a type of spraying, agricultural microbial fungicides in the future.

Key words *Bacillus* strain HNA3; plant pathogenic fungi; antifungal activity; stability; lipopeptide

(责任编辑: 张志钰)