

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2022.01.008

Bacillus velezensis SWUJ1 拮抗物质 分离纯化及抑菌机理研究

欧婷, 金必堃, 高海英, 王若琳,
张雨阳, 左伟东, 谢洁

西南大学蚕桑纺织与生物质科学学院/家蚕基因组生物学国家重点实验室, 重庆 400715

摘要: 为探究具潜在生物防治作用的贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis* SWUJ1)菌株的抑菌机理, 通过全基因组测序, 寻找该菌潜在的抑菌物质合成基因簇, 推测可能合成的抑菌活性产物; 并通过检测拮抗菌株发酵滤液热稳定性, 初步判断抑菌物质类型, 进而结合酸沉淀法和液质联用(LC-MS)和高效液相色谱(HPLC)等方法, 对菌株发酵液抑菌活性物质进行分离纯化和鉴定, 并测定抑菌组分的最低抑菌浓度(MIC), 观察其对病原菌生长的影响. 全基因组分析结果显示: *B. velezensis* SWUJ1 具有13个次级代谢产物合成基因簇, 以非核糖体肽合成酶途径合成的脂肽类抗生素为主; 拮抗菌活性发酵滤液具有较好的热稳定性. LC-MS分析结果显示: 其活性发酵液提取物中含有脂肽类化合物表面活性素、丰原素和伊枯草菌素; 经硅胶柱层析、HPLC和凝胶柱层析, 获得一单峰组分, 其MIC为200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 该组分可使病原菌丝扭曲、畸形、肿大.

关键词: 贝莱斯芽孢杆菌; 拮抗物质; 分离; 纯化; 抑菌机理

中图分类号: Q939.92; S432.4

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2022)01-0075-13

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Purification and Research of Inhibitory Mechanism of Antagonist Substances from *Bacillus velezensis* SWUJ1 Strain

OU Ting, JIN Bikun, GAO Haiying, WANG Ruolin,
ZHANG Yuyang, ZUO Weidong, XIE Jie

School of Sericulture, Textile and Biomass Science, Southwest University/

State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Chongqing 400715, China

Abstract: To explore the potential antagonistic mechanism of *Bacillus velezensis* SWUJ1, genome sequencing was conducted to analyze the gene clusters for synthesis of antagonistic substances. Possible types of

收稿日期: 2021-07-04

基金项目: 重庆市自然科学基金面上项目(cstc2019jcyj-msxmX0396); 国家自然科学基金面上项目(31870518).

作者简介: 欧婷, 博士研究生, 主要从事微生物多样性研究.

通信作者: 谢洁, 教授, 博士研究生导师.

antagonistic substances were determined by analyzing the thermal stability of *B. velezensis* SWUJ1 fermentation supernatant. The antagonistic substances from the *B. velezensis* SWUJ1 fermentation supernatant were isolated, purified and identified. The minimum inhibitory concentration (MIC) of antagonistic substance was determined, and its effect on growth of pathogen was investigated. The genome analysis of *B. velezensis* SWUJ1 revealed 13 gene clusters for synthesis of secondary metabolites, such as lipopeptide antibiotics synthesized through nonribosomal peptide synthetase pathway. The thermal stability analysis indicated that fermentation supernatant of *B. velezensis* SWUJ1 has excellent heat stability. LC-MS analysis showed that the *B. velezensis* SWUJ1 fermentation supernatant contained lipopeptides, such as surfactin, fengycin and iturin. The antimicrobial substance V 21 with MIC of 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was isolated through silica gel column chromatography, HPLC, and gel column chromatography. V 21 could make the pathogenic hyphae twisted, deformed, and swollen.

Key words: *Bacillus velezensis*; antagonistic substance; isolation; purification; inhibitory mechanism

目前,植物病害主要通过化学农药进行防控,该方法虽然耗时短、见效快,但存在易导致环境污染、使植物病原菌产生抗药性等问题^[1-2]。因此,开发对环境绿色安全且能持久有效地防治植物病害的生物防控方法具有重要意义。其中,益生微生物制剂就是化学杀菌剂的良好替代品^[3]。自 1921 年 Hartely 首次利用拮抗真菌防治 *Pythium debaryanum* 引起的猝倒病以来,部分益生真菌、放线菌和细菌等微生物被广泛应用于生物防治^[4-5]。芽孢杆菌是土壤和植物相关微生物的优势种群,具有较好的抑制植物病原菌的能力,对环境无毒害作用,且其芽孢抗逆性强,被广泛用于植物病害生物防治^[6]。其中,贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)是 2005 年才被报道的一种新型生防菌种^[7]。2016 年 Dunlap 等^[8]通过比较基因组学和 *in silico* DNA-DNA 杂交手段,将甲基营养型芽孢杆菌(*B. methylotrophicus*)、解淀粉芽孢杆菌植物亚种(*B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*)和稻生芽孢杆菌(*B. oryzicola*)归类为贝莱斯芽孢杆菌。研究表明贝莱斯芽孢杆菌是极具应用潜力的生防细菌,Liu 等^[9]分离出的 *B. velezensis* D4 可以抑制苹果树腐烂病病原菌黑腐皮壳菌(*Valsa mali*)的生长,分离自番茄根际土壤的 *B. velezensis* Y6 菌株对植物病原菌尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)孢子萌发表现出较强的抑制作用^[10]。

芽孢杆菌的抑菌机制主要包括拮抗作用、竞争作用和诱导植物抗性等^[11]。拮抗作用是指微生物产生拮抗物质直接抑制或杀死另一种微生物。芽孢杆菌可产生脂肽类化合物、聚酮类化合物和抗菌蛋白等拮抗物质抑制病原菌生长^[12]。其中,脂肽类化合物由非核糖体肽合成酶(nonribosomal peptide synthetase, NRPS)途径合成,而聚酮类化合物则是由聚酮合酶(polyketide synthase, PKS)途径合成^[12]。脂肽类化合物主要包括 3 个家族:表面活性素(Surfactin)、丰原素(Fengycin)和伊枯草菌素(Iturin),这类化合物具有很强的抗菌活性^[13-14],其主要作用于病原菌细胞膜或细胞壁^[15-17]。李生樟等^[18]研究报告 *B. velezensis* 504 菌株基因组含有编码脂肽类和聚酮糖类抑菌化合物的基因簇,并能够特异性拮抗黄单胞菌;Jin 等^[19]报道了 *B. velezensis* S3-1 菌株可产生属于丰原素、伊枯草素和表面活性素家族的 13 种脂肽类抗生素,且能抑制植物病原菌 *Botrytis cinerea* 生长。

本研究以植物炭疽病菌 *Colletotrichum* sp. 为靶标菌,对一株具有广谱抑菌活性的拮抗 *B. velezensis* SWUJ1^[20]进行全基因组测序,并对其抑菌物质进行分离纯化,初步探究其抑菌机理,为该菌进一步开发成生防制剂奠定前期研究基础。

1 材料和方法

1.1 供试材料与培养基

供试植物炭疽病菌 *Colletotrichum* sp. 和拮抗菌株 *B. velezensis* SWUJ1 为本实验室收集保存^[20].

PDA 培养基(g/L): 土豆 200.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂 15.0~20.0; PDB 培养基(g/L): 土豆 200.0, 葡萄糖 20.0; LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, NaCl 10.0, 琼脂 15.0~20.0; 改良 PDB 培养基和 Landy 培养基分别参考文献[20]和文献[21]配制.

1.2 菌株活化及抑菌效果检测

植物炭疽病菌 *Colletotrichum* sp. 和拮抗细菌 *B. velezensis* SWUJ1 活化的具体方法为: 取甘油保种的真菌菌饼和细菌菌液分别接种至新鲜的 PDA 和 LB 培养基上进行活化, 真菌于 25 °C 培养 7 d, 细菌于 28 °C 培养 1 d. 采用平板对峙法^[22]检测抑菌活性: 将 *B. velezensis* SWUJ1 新鲜培养物接种于 PDB 培养基, 28 °C 摇床 180 r/min 振荡培养 24 h, 获得菌悬液; 用直径为 5 mm 的打孔器在长满新鲜植物炭疽病菌 *Colletotrichum* sp. 菌丝的 PDA 平板边缘取菌饼, 接种至新的 PDA 平板中央, 同时在距离病原菌边缘 30 mm 的对称处划线接种新鲜拮抗细菌, 以仅培养病原菌的 PDA 平板为对照, 各设 3 个重复, 25 °C 培养 9 d 后测量病原菌的菌落直径, 计算抑菌率. 用灭菌牙签挑取培养 9 d 对照组病原菌正常生长菌丝, 以及处理组处于抑菌带边缘的病原菌菌丝制片, 在光学显微镜下观察病原菌菌丝形态. 菌落直径和抑菌率的计算公式为:

$$\text{菌落直径(mm)} = \text{测量菌落直径(mm)} - \text{菌饼直径(mm)}$$

$$\text{抑菌率} = \frac{\text{对照组菌落直径(mm)} - \text{测试组菌落直径(mm)}}{\text{对照组菌落直径(mm)}} \times 100\%$$

1.3 拮抗菌株 *B. velezensis* SWUJ1 全基因组测序

1.3.1 拮抗菌株基因组 DNA 的提取

挑取新鲜 *B. velezensis* SWUJ1 单菌落接于 LB 液体培养基, 37 °C 摇床培养 16 h, 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 参照 Qiagen 试剂盒的方法进行基因组 DNA 的提取. 样品纯度 ($A_{260/280}$ 处于 1.8~2.0 之间)、质量浓度 (>100 ng/ μ L) 检测合格后, 送至武汉未来组生物科技有限公司进行全基因组测序.

1.3.2 基因组 DNA 测序与组装

利用 Oxford Nanopore Technology 测序仪 GridION 对 DNA 进行单分子测序, 建库完后将一定浓度和体积的 DNA 文库加入到流通池中, 并将其转移到 GridION 测序仪进行实时单分子测序, 获得原始数据, 并对质控后的数据进行基因组组装、矫正及优化.

1.3.3 基因预测与功能注释

编码基因用 prodial 进行预测, 保留完整的编码序列(CDS). 提取基因组编码蛋白后, 用 Interproscan 进行注释, 提取 GO 数据库的注释信息; 用 blastp 比对编码蛋白到 KEGG 数据库, 保留比对覆盖度大于 30% 的最好结果作为注释结果; 用 rpsblast 比对编码蛋白到 COG 数据库进行注释. 采用在线预测软件 antiSMASH 5.0.0(<https://antismash.secondarymetabolites.org/#!/start>)对菌株 SWUJ1 次级代谢产物合成基因簇进行预测分析, 寻找潜在的抑菌代谢产物合成基因簇.

1.4 拮抗菌株 *B. velezensis* SWUJ1 发酵滤液热稳定性检测

将新鲜 *B. velezensis* SWUJ1 菌株接种于 LB 液体培养基, 28 °C、180 r/min 振荡培养 16 h, 获得新鲜

种子液。将 SWUJ1 菌株种子液按 1% 的接种量接种至改良 PDB 培养基, 于 25 °C 及 180 r/min 条件下培养 4 d, 将菌悬液在 8 000 r/min 条件下离心 20 min, 弃菌体沉淀, 取上清过 0.22 μm 滤膜, 得到无菌发酵滤液; 分别用 40, 60, 80, 100 °C 金属浴热处理发酵滤液 30 min, 冷却至室温, 以未做热处理的发酵滤液为对照, 检测各组滤液的抑菌活性; 采用抑菌圈法^[23]检测发酵液抑菌活性: 用直径为 5 mm 的打孔器在长满新鲜植物炭疽病菌 *Colletotrichum* sp. 菌丝的 PDA 平板边缘处取菌饼, 接种至新的 PDA 平板中央。25 °C 培养 2 d 后, 在试验平板上距病原菌边缘 15 mm 处, 用直径为 5 mm 的无菌打孔器打孔, 往孔中注入 80 μL 无菌发酵滤液。每个处理设置 3 个重复, 25 °C 培养 2 d 后, 测量抑菌带大小。

1.5 拮抗菌株 *B. velezensis* SWUJ1 发酵液粗提物的制备

1.5.1 菌株活性发酵上清液的制备

基于拮抗菌株的全基因组分析和发酵滤液的热稳定性, 推测该菌活性产物可能为脂肽类抗生素, 故选用芽孢杆菌产脂肽常用的 Landy 培养基作为发酵培养基, 利用发酵罐进行菌株体外扩大培养, 具体发酵条件为: 50 L 发酵罐, 装量 31 L, 接种量为 10%, 25 °C, pH 值为 7.0, 300 r/min 搅拌培养 3 d 后, 8 000 r/min 离心 20 min, 取发酵上清液备用。

1.5.2 活性物质的粗提

采用酸沉淀法^[24]提取活性发酵液中的抑菌物质, 具体方法为: 用 6 mol/L 浓 HCl 将 1.5.1 制备的发酵上清液的 pH 值调至 2.0, 4 °C 静置沉淀 12 h; 4 °C, 8 000 r/min 离心 20 min 收集沉淀, 待沉淀自然干燥后加适量甲醇溶解; 多次抽滤至滤液无活性, 合并滤液, 旋转蒸发浓缩粗提物。

1.5.3 抑菌活性的检测

采用纸片抑菌圈法^[23]检测发酵液粗提物对炭疽病菌的抑菌活性, 具体方法为: 将新鲜病原菌菌饼接种在 PDA 平板中央, 并在距离菌饼中心 20 mm 处放置无菌滤纸片, 在滤纸片上加入 20 μL 发酵液粗提物, 以滴加等量甲醇为空白对照, 22 °C 培养 5 d, 观察是否形成抑菌带, 以此判断发酵液粗提物的抑菌活性。

1.6 拮抗菌株 *B. velezensis* SWUJ1 发酵液脂肽类抑菌物质的分离鉴定

对获得的发酵液粗提物进行 LC-MS 分析, 具体方法参考文献^[25]: LC-MS 分析使用 Agilent 1290 Infinity Ultra Performance Liquid Chromatography 与 Agilent 6545 UHD and Accurate-Mass Q-TOF 质谱联用仪。色谱柱型号为 Waters XSelect[®] HSS T3 柱 (2.5 μm, 100 mm × 2.1 mm); 流动相: A 为水溶液 (0.1% 甲酸), B 为乙腈 (0.1% 甲酸); 流速设置为 0.35 mL/min, 柱温为 40 °C。进样量: 正离子模式 1 μL, 负离子模式 2 μL。优化的色谱梯度: 0~2 min, 5% B; 2~10 min, 5%~95% B; 10~15 min, 95% B。运行时间设为 5 min, 用于平衡系统。质谱使用正离子模式结合负离子模式, 优化的参数如下: 毛细管电压为 3.5 kV; 干燥气流为 10 L/min; 气体温度为 325 °C; 喷雾器压强为 1 363.9 kPa; 碎裂电压为 120 V; 取样锥电压为 45 V。质谱的采集范围 50~3 000 m/z , 数据系统分析使用 Agilent Masshunter Qualitative Analysis B. 08.00 software (Agilent Technologies, USA)。

1.7 拮抗菌株 *B. velezensis* SWUJ1 发酵液小分子抑菌物质的分离纯化

采用 C18 反相柱层析对发酵粗提物进行分离, 以 20%, 40%, 60%, 80% 的甲醇进行梯度洗脱, 流速为 20 mL/min, 分别收集各梯度洗脱液, 浓缩后用纸片抑菌圈法检测各分离组分对炭疽病菌的抑菌活性。用直径为 0.22 μm 的滤膜对活性较好的组分进行过滤, 利用汉邦高效液相色谱仪, 以 YMC-Pack ODS-A 液相色谱柱 (C18 柱) 进一步分离纯化抑菌活性组分。以水为流动相 A, 乙腈为流动相 B, 按表 1 方法进行分离

纯化, 浓缩后用纸片抑菌圈法检测各分离组分对炭疽病菌的抑菌活性. 利用 Sephadex LH-20 凝胶层析对活性较好的组分进行分离, 洗脱剂为甲醇, 每 5 mL 收集一个组分, 各组分通过薄层色谱(TLC)点板合并, 以炭疽病菌为指示菌, 采用 96 孔板法测定各合并组分的抑菌活性, 具体方法为: 在 96 孔板的小孔内各自加入 100 μL PDB 培养基. 对照组中加入 10 μL 甲醇, 处理组中加入 10 μL 分离组分, 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d, 观察炭疽病菌生长情况.

表 1 高效液相色谱设置方法

时间/min	流速/(mL \cdot min $^{-1}$)	流动相 A/%	流动相 B/%
0	8	80	20
20	8	0	100
30	8	0	100

1.8 活性物质最低抑制质量浓度的测定及其对病原菌菌丝形态的影响

取 5 mg 分离获得的单峰物质溶于 1 mL 的甲醇溶液, 配制成 5 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的抑菌溶液. 在 96 孔板中分别加入抑菌溶液, 待其风干后, 加入 100 μL PDB 培养基, 每孔样品质量浓度依次为 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 每孔加入大小均一的 *Colletotrichum* sp. 菌块, 以甲醇及 PDA 块为对照, 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d, 观察真菌的生长情况, 确定真菌完全被抑制时的最低抑菌浓度(MIC), 实验平行重复 3 次, 并在光学显微镜下观察活性化合物对病原菌菌丝形态的影响.

2 结果和分析

2.1 *B. velezensis* SWUJ1 菌株的抑菌效果

平板对峙实验结果显示, *B. velezensis* SWUJ1 对供试炭疽病菌生长具有较好的抑制作用(图 1a), 其抑菌率可达 58.90%, 而对照组病原菌菌丝长满整个平板(图 1b). 对不同组真菌菌丝进行显微观察, 结果表明 *B. velezensis* SWUJ1 处理组的炭疽病菌部分菌丝扭曲、畸形、肿大, 且内容物聚集(图 1c), 而对照组真菌菌丝无色透明、细长、光滑匀整(图 1d), 说明 *B. velezensis* SWUJ1 菌株对病原菌菌丝有明显的破坏作用.

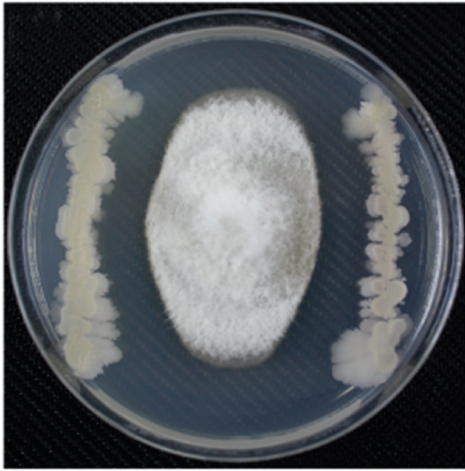
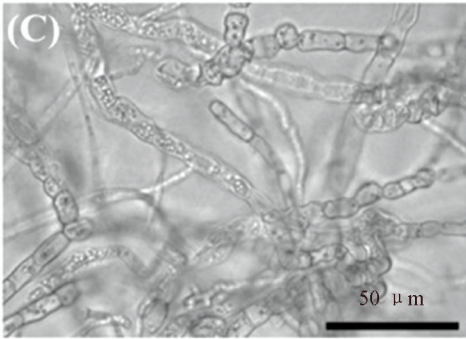
2.2 拮抗菌株 *B. velezensis* SWUJ1 全基因组分析

2.2.1 *B. velezensis* SWUJ1 全基因组组装

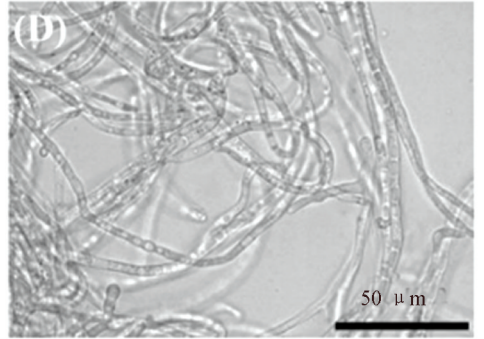
B. velezensis SWUJ1 菌株全基因组测序结果表明, 该菌染色体全长为 3, 926, 914 bp, 基因组 GC 含量为 46.53%, 共得到 3 732 个完整的 CDS, 占整个基因组序列的 88.62%. 非编码 RNA 中包含 27 个 rRNA 和 86 个 tRNA, 分别占整个基因组序列的 1.05% 和 0.17%(图 2), 且该菌中未发现质粒. 将该菌的基因组测序结果提交 GenBank, 登录号为 CP077672.

2.2.2 基因预测与功能注释

对 *B. velezensis* SWUJ1 菌株编码基因在 GO 数据库进行功能注释分析(图 3a), 结果表明在分子功能中参与催化、结合、运输活性相关的基因占比较大; 生物学过程中参与代谢过程、细胞过程和单组织过程类别的基因较多; 细胞组分中参与细胞、细胞膜、细胞部位、细胞膜部位的基因比例较大, 表明 *B. velezensis* SWUJ1 的基因多集中在酶催化、代谢以及细胞分化等过程. 将 CDS 与 COG 数据库比对分析, 结果表明 *B. velezensis* SWUJ1 菌株基因组中编码氨基酸转运和代谢蛋白、转录蛋白和碳水化合物转运代谢蛋白的比例较大(图 3b). 对 *B. velezensis* SWUJ1 的基因组编码蛋白进行 KEGG 功能分类统计, 结果表

a. 病原菌 *Colletotrichum* sp. 和 *B. velezensis* SWUJ1 共培养b. 病原菌 *Colletotrichum* sp. 对照

c. 共培养菌丝镜检

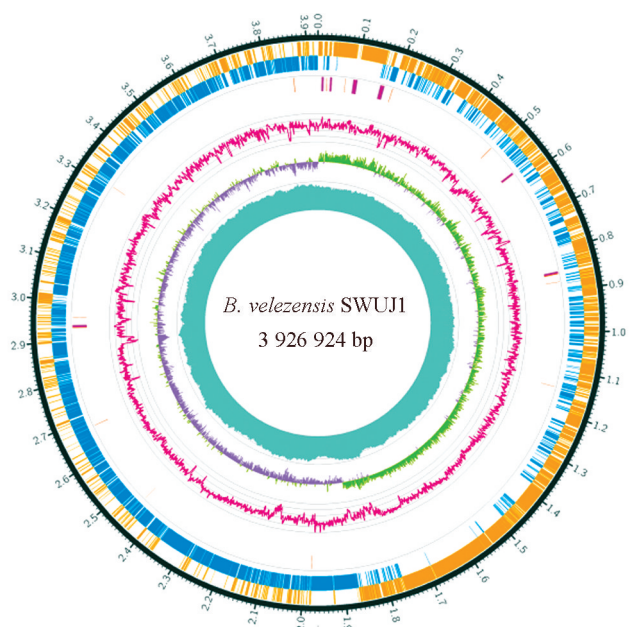


d. 对照菌丝镜检

图 1 *B. velezensis* SWUJ1 菌株对病原菌的抑制作用 (25 °C 下培养 9 d)

明该菌参与代谢功能的基因占比最多, 其中编码碳水化合物转运与代谢基因的数目占比达 22.86% (图 3c).

基因功能注释结果显示, *B. velezensis* SWUJ1 基因组中含有属于 NRPS 途径的表面活性素、丰原素、溶杆菌素和嗜铁素 4 类抑菌物质合成相关基因, 以及由 PKS-NRPS 途径催化的伊枯草菌素 (Iturin) 和聚酮类化合物 Bacillaene 合成相关基因 (表 2). 其中 *comA* 可激活由 *srfAA*, *srfAB*, *srfAC* 构成的操纵子, 从而调控表面活性素的合成^[26]; *fenC*, *fenD*, *fenE*, *fenA* 和 *fenB* 为编码丰原素合成酶的基因^[27]; *bacA*, *bacG*, *bacF* 的编码蛋白是成熟溶杆菌素形成的关键酶^[28]; 编码双模块非核糖体肽合成酶的基因 *dhbF* 参与嗜铁素的合成^[29]. 与表面活



由外到内依次为: 圈 1 为基因组大小, 圈 2 为编码基因正义链, 圈 3 为编码基因负义链, 圈 4 为非编码 RNA, 圈 5 为 GC 比, 圈 6 为 GC-skew, 圈 7 为测序深度.

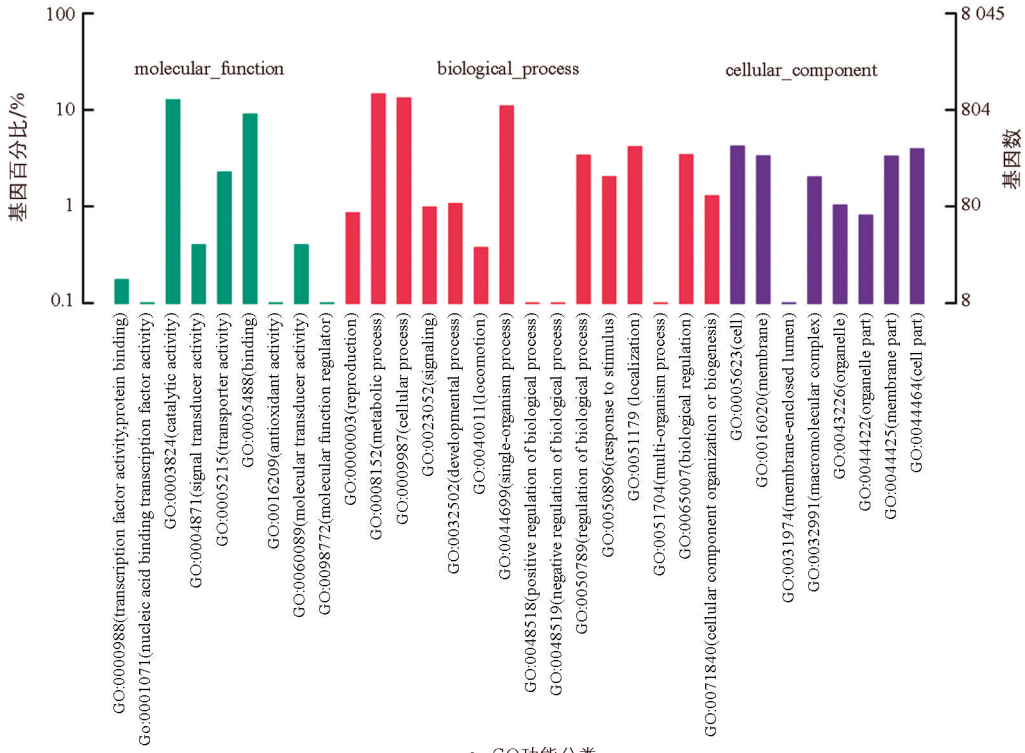
图 2 *B. velezensis* SWUJ1 菌株基因组圈图

性素、丰原素不同, 伊枯草菌素由 PKS-NRPS 杂化复合物合成, *ituA*, *ituB* 和 *ituC* 是其操纵子的 3 个开放阅读框^[30]; 聚酮类化合物 Bacillaene 也是杂化 PKS-NRPS 的自然产物, *pksJ*, *pksL* 和 *pksM* 等参与了 Bacillaene 的生物合成^[31].

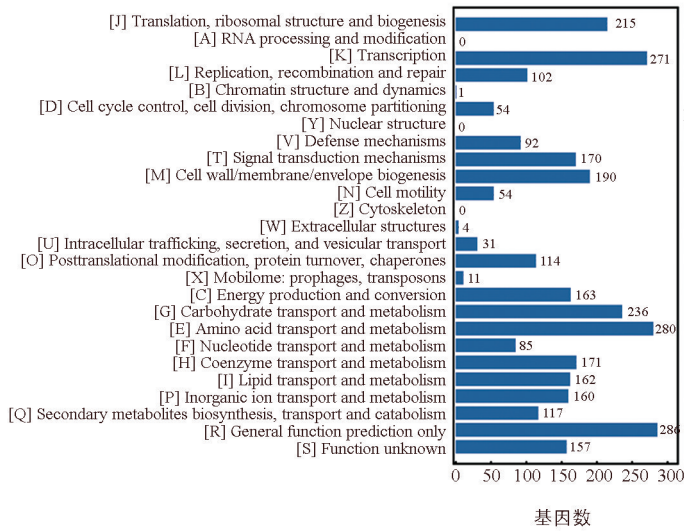
表 2 *B. velezensis* SWUJ1 菌株抑菌相关基因统计

基因	基因位置	蛋白*	功能描述
<i>surfAA</i>	336050—346804	Surfactin family lipopeptide synthetase A	Surfactin biosynthesis
<i>surfAB</i>	346826—357586	Surfactin family lipopeptide synthetase B	Surfactin biosynthesis
<i>surfAC</i>	357621—361457	Surfactin family lipopeptide synthetase C	Surfactin biosynthesis
<i>surfAD</i>	361477—362208	External thioesterase TEII	Surfactin biosynthesis
<i>fenB</i>	1936738—1940541	Fengycin family lipopeptide synthetase E	Fengycin biosynthesis
<i>fenA</i>	1940561—1951342	Fengycin family lipopeptide synthetase D	Fengycin biosynthesis
<i>fenE</i>	1951368—1959017	Fengycin family lipopeptide synthetase C	Fengycin biosynthesis
<i>fenD</i>	1959033—1966730	Fengycin family lipopeptide synthetase B	Fengycin biosynthesis
<i>fenC</i>	1966756—1974414	Fengycin family lipopeptide synthetase A	Fengycin biosynthesis
<i>comA</i>	3013468—3014112	Competent response regulator ComA	Regulator of Surfactin production
<i>comP</i>	3014193—3016544	Sensor histidine kinase ComP	Regulator of Surfactin production
<i>comX</i>	3016522—3016692	Competence protein ComX	Regulator of Surfactin production
<i>comQ</i>	3016689—3017597	Competence protein ComQ	Regulator of Surfactin production
<i>ituC</i>	1876593—1884452	Iturin family lipopeptide synthetase C	Iturin biosynthesis
<i>ituB</i>	1884536—1900627	Iturin family lipopeptide synthetase B	Iturin biosynthesis
<i>ituA</i>	1900672—1912620	Iturin family lipopeptide synthetase A	Iturin biosynthesis
<i>bacA</i>	3616428—3617042	Prephenate decarboxylase	Bacilysin biosynthesis
<i>bacG</i>	3610327—3611127	Bacilysin biosynthesis oxidoreductase BacG	Bacilysin biosynthesis
<i>bacF</i>	3611144—3612343	Bacilysin biosynthesis transaminase BacF	Bacilysin biosynthesis
<i>dhbF</i>	3040244—3047371	Nonribosomal peptide synthetase DhbF	Bacillibactin biosynthesis
<i>pksD</i>	1693483—1694457	Bacillaene synthase trans-acting acyltransferase	Bacillaene biosynthesis
<i>pksC</i>	1692477—1693346	Polyketide biosynthesis malonyl-CoA-[acyl-carrier-protein] transacylase	Bacillaene biosynthesis
<i>pksE</i>	1383024—1385330	Trans-AT polyketide synthase, acyltransferase and oxidoreductase domains	Bacillaene biosynthesis
<i>acpK</i>	1694459—1696699	Polyketide biosynthesis acyl carrier protein	Bacillaene biosynthesis
<i>pksG</i>	1696765—1697013	Polyketide biosynthesis 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase-like enzyme PksG	Bacillaene biosynthesis
<i>pksH</i>	1697065—1698327	Polyketide biosynthesis enoyl-CoA hydratase PksH	Bacillaene biosynthesis
<i>pksI</i>	1698324—1699097	Polyketide biosynthesis enoyl-CoA hydratase PksI	Bacillaene biosynthesis
<i>pksJ</i>	1699107—1699856	Polyketide biosynthesis enoyl-CoA hydratase PksJ	Bacillaene biosynthesis
<i>pksL</i>	1699896—1714850	Polyketide synthase PksL	Bacillaene biosynthesis
<i>pksM</i>	1714852—1728258	Polyketide synthase PksM	Bacillaene biosynthesis
<i>pksN</i>	1728276—1738814	Polyketide synthase PksN	Bacillaene biosynthesis
<i>pksR</i>	1738804—1755105	Polyketide synthase PksR	Bacillaene biosynthesis
	1755119—1762576	Polyketide synthase PksR	Bacillaene biosynthesis

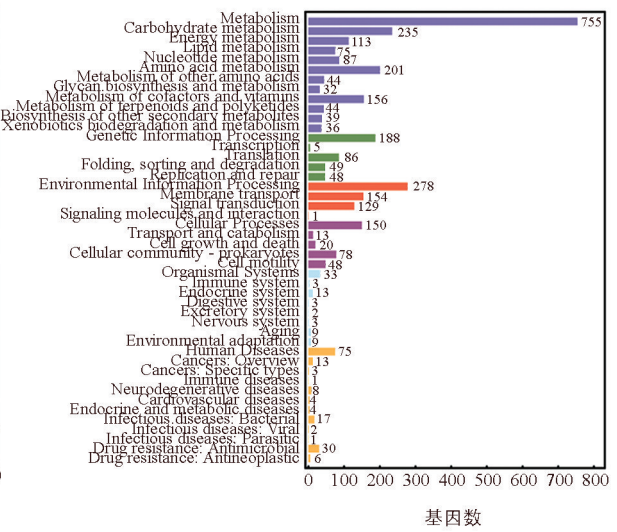
注: * 表示该注释信息来自 KEGG 数据库.



a. GO功能分类



b. COG功能分类



c. KEGG功能分类

图 3 B. velezensis SWUJ1 菌株基因组编码蛋白的功能分类

2.2.3 次级代谢基因簇分析

通过 antiSMASH 5.0.0 软件在线预测 *B. velezensis* SWUJ1 菌株的次级代谢产物, 结果显示该菌基因组中存在 13 个次级代谢产物合成基因簇. 其中, 除萜烯(Terpene)、第 3 类聚酮类化合物(T3PKS)、细菌素(Bacteriocin)和 Cluster 11 代谢物类型未知外, 其余 8 个基因簇均可以合成芽孢杆菌中常见且具抑菌活性的次级代谢产物: Cluster 1, 表面活性素合成基因簇; Cluster 2, 丁酰苷菌素合成基因簇; Cluster 4, 大环内酯合成基因簇; Cluster 5, Bacillaene 合成基因簇; Cluster 6, 丰原素合成基因簇; Cluster 10, Difficidin 合成基因簇; Cluster 12, 铁载体合成基因簇; Cluster 13, 溶杆菌素合成基因簇. Cluster 1, Cluster 6, Cluster 11 和 Cluster 12 基因簇均通过非核糖体途径合成相应的次级代谢产物(表 3).

表 3 *B. velezensis* SWUJ1 菌株次级代谢产物的预测

基因簇 ^a	类型 ^b	基因簇位置 ^c	次级代谢物 ^d	功能 ^e	相似度 ^f
1	NRPS	316165—381233	Surfactin	Anti-virus, anti-mycoplasma, anti-tumour	78%
2	PKS-like	919655—960899	Butirosin	Anti-bacterial	7%
3	Terpene	1046514—1063672	—	—	—
4	TransAT-PKS	1363072—1449448	Macrolactin	Anti-fungal, anti-bacterial, anti-virus, anti-tumor	100%
5	TransAT-PKS	1672950—1782555	Bacillaene	Anti-fungal, anti-bacterial	100%
6	NRPS	1858055—1991039	Fengycin	Anti-fungal	100%
7	Terpene	2018280—2040163	—	—	—
8	Bacteriocin	2086013—2096131	—	—	—
9	T3PKS	2114271—2155371	—	—	—
10	TransAT-PKS-like	2270927—2377106	Difficidin	—	100%
11	NRPS	2861512—2916408	—	—	—
12	NRPS	3020244—3072036	Bacillibactin	Accumulate and take up iron ions	100%
13	Other	3593534—3634952	Bacilysin	Anti-bacterial and <i>Candida albicans</i>	100%

注: a 为 antiSMASH5.0.0 注释的次级代谢物合成基因簇; b 为基因簇类型; c 为菌株基因组中基因簇的位置; d 为基于基因簇可能产生的次级代谢物; e 为基因簇合成代谢物的生物活性功能; f 为与已知基因簇的相似度。“—”表示未知。

2.3 拮抗菌株 *B. velezensis* SWUJ1 发酵滤液热稳定性

B. velezensis SWUJ1 菌株发酵滤液经不同温度热处理后, 对病原菌的抑菌活性与未经热处理的对照相比差异无统计学意义, 其中 40 °C 热处理 30 min 后抑菌能力无明显变化, 60, 80, 100 °C 热处理 30 min 后抑菌能力略有下降(图 4) ($p > 0.05$), 表明发酵上清液中的活性物质具有较好的热稳定性, 有利于后续 *B. velezensis* SWUJ1 菌株生防制剂的制备和应用。综合 *B. velezensis* SWUJ1 菌株全基因组分析及活性发酵液的热稳定性结果, 初步判断抑菌物质可能为脂肽类物质或小分子活性物质, 有利于后续活性物质分离纯化的研究。

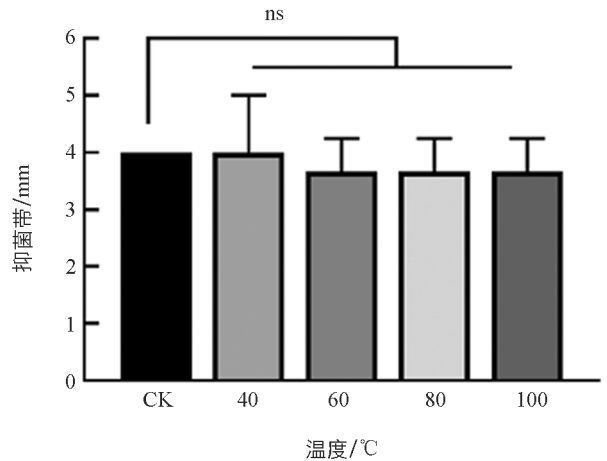


图 4 温度对 *B. velezensis* SWUJ1 菌株发酵滤液抑菌活性物质的影响

2.4 拮抗菌株 *B. velezensis* SWUJ1 发酵液脂肽类抑菌物质的分离鉴定结果

对 *B. velezensis* SWUJ1 菌株发酵液粗提物进行 LC-MS 分析, 结果显示该菌株抑菌活性物的粗提物在 m/z 值为 1 008.68 和 1 022.70 处有离子峰(簇)出现, 这 2 个离子峰的相对分子质量依次相差 14(脂肪酸链结构“—CH₂—”), 分别对应于表面活性素(C₁₂—C₁₅)的相对分子质量(图 5a); 在 m/z 值为 1 447.77, 1 461.78, 1 475.80 和 1 489.81 处有 4 离子峰(簇)出现, 分别对应丰原素(C₁₄—C₁₈)的相对分子质量(图 5b); 在 m/z 值为 1 006.64, 1 020.65, 1 034.67 和 1 048.69 处有 4 离子峰(簇)出现, 分别对应伊枯草菌素(C₁₂—C₁₇)的相对分子质量(图 5c)。通过比较离子响应强度发现, 抑菌活性物中的丰原素含量较少, 表面活性素和伊枯草菌素相对较多。以上结果表明, 菌株 *B. velezensis* SWUJ1 可能通过产生脂肽类化合物表面活性素、丰原素和伊枯草菌素抑制病原菌生长。

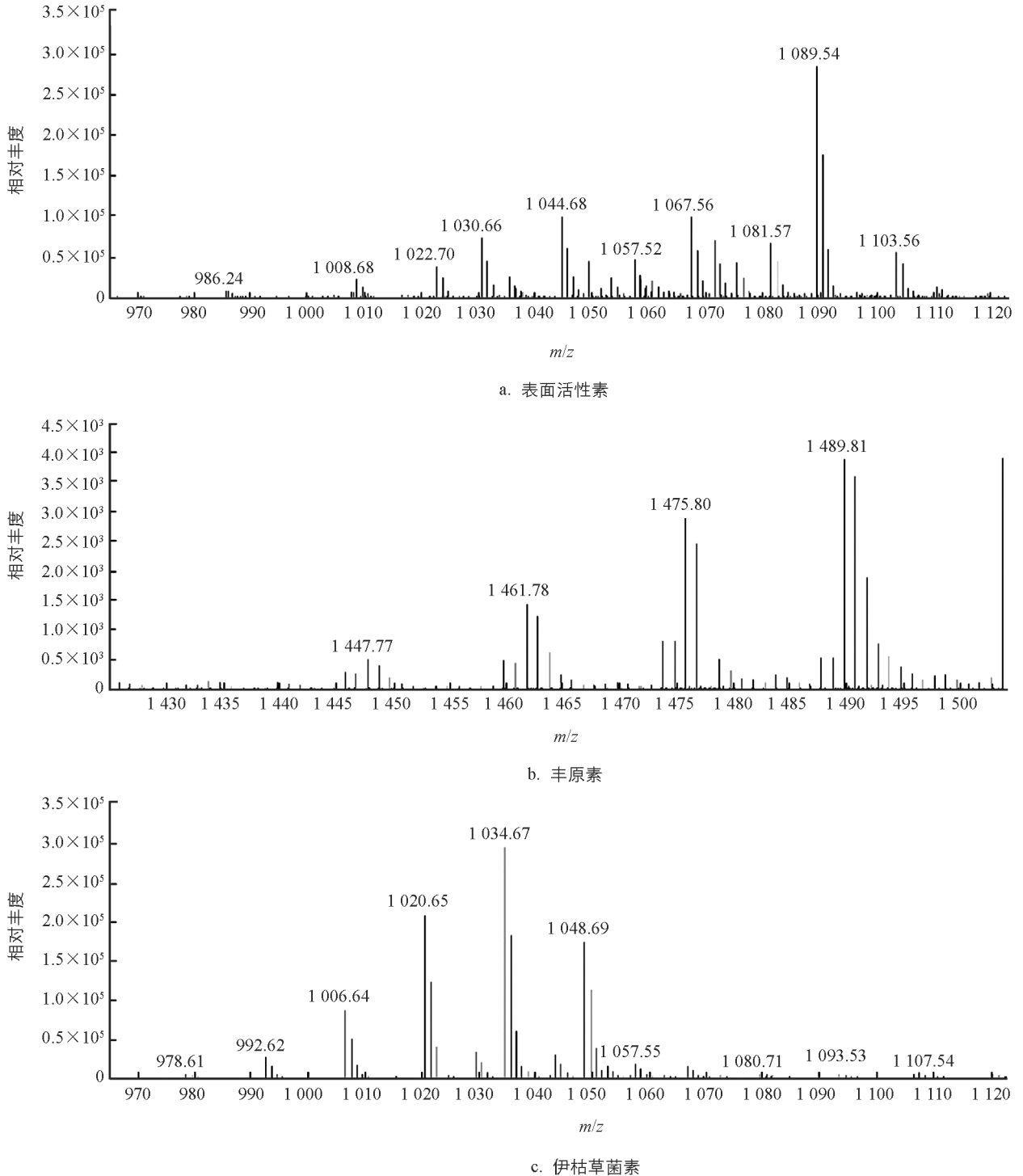
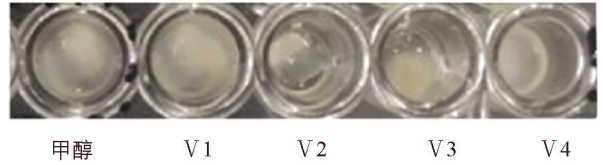
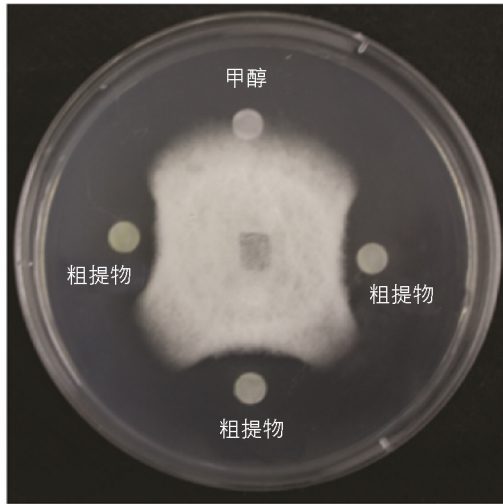


图 5 *B. velezensis* SWUJ1 菌株活性发酵液粗提物的 LC-MS 分析

2.5 拮抗菌株 *B. velezensis* SWUJ1 发酵液小分子抑菌物质的分离纯化结果

通过纸片抑菌圈法检测菌株发酵液粗提物的抑菌活性, 结果表明菌株发酵液粗提物具有较好的抑菌活性(图 6a). 对发酵粗提物进行中压反相柱层析, 其中 20% 甲醇洗脱组分具有良好抑菌活性, 进而利用 HPLC 对该组分进行分离纯化, 共收集获得 8 个组分(I-VIII), 其中 4 个组分有抑菌活性(II-V). 利用 Sephadex LH-20 凝胶层析对活性最强的 V 组分(保留时间为 20.5 min)进一步分离纯化, 获得 V1-V4 等 4 个组分. 利用 96 孔板对各组分的抑菌活性进行检测, 结果表明 V2 组分有明显抑菌效果(图 6b).

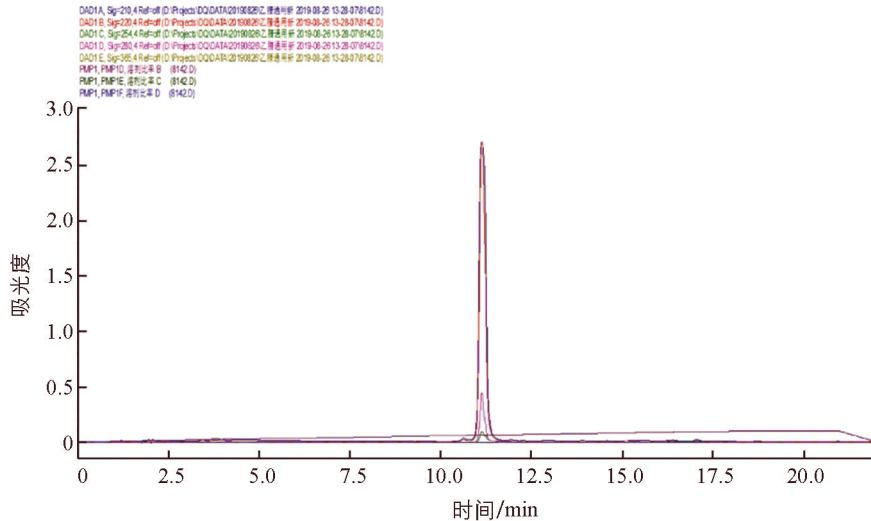


a. 甲醇和发酵液粗提物加入量均为 20 μ L, 22 $^{\circ}$ C 培养 5 d

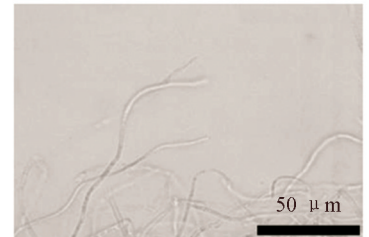
b. 甲醇和 V1-V4 组分加入量均为 10 μ L, 25 $^{\circ}$ C 培养 3 d

图 6 *B. velezensis* SWUJ1 菌株发酵液粗提物及凝胶层析各组分抑菌活性检测

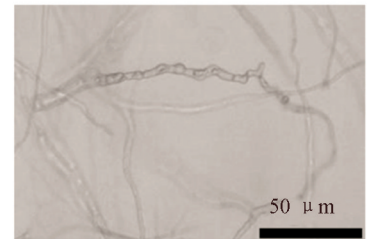
利用 HPLC 对 V2 组分进一步制纯, 得到单峰物质, 命名为 V21(图 7a)。干燥后为黄色粉末, 将其配置成初始质量浓度为 5 000 μ g/mL 的溶液, 梯度稀释后检测其对病原菌的抑制作用, 结果表明 V21 组分有明显的抑菌作用(图 7b), 且其最低抑菌质量浓度(MIC)为 200 μ g/mL; 镜检结果表明, 与未加 V21 的病原菌丝相比, 质量浓度为 150 μ g/mL 的 V21 组分可使病原菌的部分菌丝扭曲、畸化和膨大(图 7c)。



a. 高效液相色谱图



对照组



V21 组分处理组



b. MIC 检测

CK1: 甲醇, CK2: PDA 块, a-j: 组分 V21, 质量浓度依次为 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50 μ g/mL。

图 7 组分 V21 的抑菌活性检测

3 小结与讨论

分离自土壤环境中的 *B. velezensis* SWUJ1 菌株对香樟炭疽病菌具有较好的抑制作用, 且通过对培养基成分和发酵条件进行优化, 显著提升了 *B. velezensis* SWUJ1 的抑菌活性^[20], 但有关该菌株的抑菌活性物质及抑菌机制尚不清楚。本研究对 *B. velezensis* SWUJ1 菌株进行了全基因组测序, 并对抑菌活性物质

进行分离纯化,以期初步探究该菌的抑菌机制.结果表明 *B. velezensis* SWUJ1 菌株具有合成表面活性素、丰原素、Bacillaene 和 Bacilysin 等抗菌物质的相关基因簇,通过 LC-MS 分析进一步发现该菌发酵液中存在表面活性素、丰原素和伊枯草菌素 3 种脂肽类抑菌物质,并获得了一个具有较好抑菌活性的 V 21 组分,其最小抑菌浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.徐杨等^[32]从海洋枯草芽孢杆菌 3512A 获得的脂肽类抗菌化合物在氘代试剂中溶解性差,未能获得理想的二维核磁共振数据,利用电喷雾飞行时间质谱解析也未能获得氨基酸裂解顺序,表明获得的抗菌化合物可能是新型脂肽类成分.本研究获得的 V 21 组分在氘代试剂中溶解性亦不佳,仅由一维核磁共振氢谱、碳谱图谱分析尚不能得到其确切结构,经微谱数据比对,可能是 Bacillopeptins 或 Bacillomycin D 等脂肽类物质,其结构需进一步确定.黄承敏等^[33]研究表明芽孢杆菌 HN-7 菌株发酵上清液经 121 $^{\circ}\text{C}$ 处理 20 min 后仍具有很强的抑菌活性.本研究中 *B. velezensis* SWUJ1 菌株的抑菌活性发酵滤液亦具有较好的热稳定性,其在 100 $^{\circ}\text{C}$ 处理后抑菌活性无显著变化,说明 *B. velezensis* 的活性滤液具有较高的热稳定性,这将有利于其在田间施用.

B. velezensis 是一种十分具有生物防治潜力的优势菌种.刘雪娇等^[34]在 *B. velezensis* 3A3-15 脂肽类抗生素的粗提物中发现了表面活性素(C_{14} — C_{15}),该菌产生的抑菌物质可使尖孢镰刀菌菌丝发生膨大、弯曲、缠绕等畸化现象.迟惠荣等^[35]利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱在 *B. velezensis* V4 中检测到了表面活性素和伊枯草菌素等抑菌物质.Li 等^[36]发现 *B. velezensis* 1B-23 不仅可以产生表面活性素、伊枯草菌素,也可产生大环内酯、环二肽等抑菌物质抑制多种病原菌.后续研究将在本文研究基础上,进一步挖掘其生防相关基因,展开关键遗传调控元件及表达系统的研究,深入探究该菌拮抗病原真菌的抑制机理.

参考文献:

- [1] 黄慧婧,罗坤.芽孢杆菌与杀菌剂复配防治植物病害的研究进展[J].微生物学通报,2021,48(3):938-947.
- [2] 李巧玲,杨毅,肖忠,等.木香根腐病生防细菌的筛选与鉴定[J].西南大学学报(自然科学版),2020,42(9):71-76.
- [3] MORALES-CEDEÑO L R, OROZCO-MOSQUEDA M D C, LOEZA-LARA P D, et al. Plant Growth-Promoting Bacterial Endophytes as Biocontrol Agents of Pre- and Post-Harvest Diseases: Fundamentals, Methods of Application and Future Perspectives [J]. Microbiological Research, 2021, 242: 126612-1-126612-12.
- [4] 黄曦,许兰兰,黄荣韶,等.枯草芽孢杆菌在抑制植物病原菌中的研究进展[J].生物技术通报,2010(1):24-29.
- [5] 徐耀波,谢洁,潘国庆,等.1株抑制铜绿微囊藻生长的放线菌的分离鉴定[J].西南大学学报(自然科学版),2015,37(10):57-61.
- [6] KIM S Y, LEE S Y, WEON H Y, et al. Complete Genome Sequence of *Bacillus Velezensis* M75, a Biocontrol Agent Against Fungal Plant Pathogens, Isolated from Cotton Waste [J]. Journal of Biotechnology, 2017, 241: 112-115.
- [7] RUIZ-GARCÍA C, BÉJAR V, MARTÍNEZ-CHECA F, et al. *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(pt 1): 191-195.
- [8] DUNLAP C A, KIM S J, KWON S W, et al. *Bacillus Velezensis* is not a Later Heterotypic Synonym of *Bacillus Amyloliquefaciens*; *Bacillus Methylophilus*, *Bacillus Amyloliquefaciens* Subsp. *plantarum* and ‘*Bacillus Oryzicola*’ are Later Heterotypic Synonyms of *Bacillus Velezensis* Based on Phylogenomics [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(3): 1212-1217.
- [9] LIU R H, LI J Y, ZHANG F R, et al. Biocontrol Activity of *Bacillus Velezensis* D4 Against Apple Valsa Canker [J]. Biological Control, 2021, 163: 104760-1-104760-10.
- [10] CAO Y, PI H, CHANDRANGSU P, et al. Antagonism of Two Plant-Growth Promoting *Bacillus Velezensis* Isolates Against *Ralstonia Solanacearum* and *Fusarium Oxysporum* [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 4360-1-4360-14.
- [11] CHEN K, TIAN Z H, HE H, et al. *Bacillus* Species as Potential Biocontrol Agents Against Citrus Diseases [J]. Biological Control, 2020, 151: 104419-1-104419-9.
- [12] 桑建伟,杨扬,陈奕鹏,等.内生解淀粉芽孢杆菌 BEB17 脂肽类和聚酮类化合物的抑菌活性分析[J].植物病理学报,2018,48(3):402-412.
- [13] INÈS M, DHOUBA G. Lipopeptide Surfactants: Production, Recovery and Pore Forming Capacity [J]. Peptides, 2015, 71: 100-112.

- [14] FUJITA S, YOKOTA K. Disease Suppression by the Cyclic Lipopeptides Iturina and Surfactin from *Bacillus* SPP. Against *Fusarium* Wilt of Lettuce [J]. *Journal of General Plant Pathology*, 2019, 85(1): 44-48.
- [15] 罗楚平. 枯草芽胞杆菌 Bs916 产罗克霉素、表面活性素、杆菌霉素和泛革素的结构鉴定、合成途径及生物学功能 [D]. 南京: 南京农业大学, 2014.
- [16] GRABOVA A Y, DRAGOVOZ I V, ZELENKA L B, et al. Antifungal Activity and Gene Expression of Lipopeptide Antibiotics in Strains of Genus *Bacillus* [J]. *Biopolymers and Cell*, 2016, 32(1): 41-48.
- [17] 付雯, 高永祥, 张晓勇. 伊枯草菌素研究进展 [J]. *安徽农学通报*, 2014, 20(24): 23-26.
- [18] 李生樟, 陈颖, 杨瑞环, 等. 一株拮抗黄单胞菌的贝莱斯芽孢杆菌的分离和鉴定 [J]. *微生物学报*, 2019, 59(10): 1969-1983.
- [19] JIN Q, JIANG Q Y, ZHAO L, et al. Complete Genome Sequence of *Bacillus Velezensis* S3-1, a Potential Biological Pesticide with Plant Pathogen Inhibiting and Plant Promoting Capabilities [J]. *Journal of Biotechnology*, 2017, 259: 199-203.
- [20] 欧婷, 江鸿森, 任慧爽, 等. 一株香樟炭疽病拮抗菌的鉴定及其发酵条件优化 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2019, 41(7): 43-52.
- [21] MOTTA DOS SANTOS L F, COUTTE F, RAVALLEC R, et al. An Improvement of Surfactin Production by *B. Subtilis* BBG131 Using Design of Experiments in Microbioreactors and Continuous Process in Bubbleless Membrane Bioreactor [J]. *Bioresource Technology*, 2016, 218: 944-952.
- [22] 谢颖, 刘炜炜, 刘安巧, 等. 一株 *Thuidium cymbifolium* 内生细菌的鉴定及其抑制真菌活性研究 [J]. *化学与生物工程*, 2020, 37(12): 17-21.
- [23] 谭才邓, 朱美娟, 杜淑霞, 等. 抑菌试验中抑菌圈法的比较研究 [J]. *食品工业*, 2016, 37(11): 122-125.
- [24] LUO C, LIU X, ZHOU H, et al. Nonribosomal Peptide Synthase Gene Clusters for Lipopeptide Biosynthesis in *Bacillus Subtilis* 916 and Their Phenotypic Functions [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(1): 422-431.
- [25] 王若琳, 徐伟芳, 王飞, 等. 桑树内生拮抗菌的分离鉴定及其对桑断枝烂叶病的生防初探 [J]. *微生物学报*, 2019, 59(11): 2130-2143.
- [26] ZHU Z W, ZHANG B Y, CAI Q H, et al. A Critical Review on the Environmental Application of Lipopeptide Micelles [J]. *Bioresource Technology*, 2021, 339: 125602-1-125602-12.
- [27] 金清, 肖明. 新型抗菌肽——表面活性素、伊枯草菌素和丰原素 [J]. *微生物与感染*, 2018, 13(1): 56-64.
- [28] ÖZCENGİZ G, ÖĞÜLÜR İ. Biochemistry, Genetics and Regulation of Bacilysin Biosynthesis and Its Significance more than an Antibiotic [J]. *New Biotechnology*, 2015, 32(6): 612-619.
- [29] RONNEBAUM T A, LAMB A L. Nonribosomal Peptides for Iron Acquisition: Pyochelin Biosynthesis as a Case Study [J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2018, 53: 1-11.
- [30] ONGENA M, JACQUES P. *Bacillus* Lipopeptides: Versatile Weapons for Plant Disease Biocontrol [J]. *Trends in Microbiology*, 2008, 16(3): 115-125.
- [31] VARGAS-BAUTISTA C, RAHLWES K, STRAIGHT P. Bacterial Competition Reveals Differential Regulation of the Pks Genes by *Bacillus Subtilis* [J]. *J Bacteriol*, 2014, 196(4): 717-728.
- [32] 徐杨, 王楠, 李伟, 等. 海洋枯草芽孢杆菌 3512A 抗真菌脂肽的分离纯化及结构特性鉴定 [J]. *中国生物防治*, 2009, 25(4): 328-333.
- [33] 黄承敏, 王蓉蓉, 肖茜, 等. 一株具有抗菌活性芽孢杆菌 HN-7 的分离及抗菌活性研究 [J]. *中国酿造*, 2018, 37(7): 31-34.
- [34] 刘雪娇, 李红亚, 李术娜, 等. 贝莱斯芽孢杆菌 3A3-15 生防和促生机制 [J]. *河北大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(3): 302-310.
- [35] 迟惠荣, 张亚惠, 曾欣, 等. 多花黄精内生贝莱斯芽孢杆菌的分离鉴定及其抗菌与促生作用分析 [J]. *植物保护*, 2019, 45(4): 122-131.
- [36] LI M S M, PICCOLI D A, MCDOWELL T, et al. Evaluating the Biocontrol Potential of Canadian Strain *Bacillus Velezensis* 1B-23 via Its Surfactin Production at Various pHs and Temperatures [J]. *BMC Biotechnology*, 2021, 21(1): 31-1-31-12.