

贝莱斯芽胞杆菌 ZF145 抑菌物质提取方法比较及成分鉴定



曾先锋¹ 覃诗扬^{1,2} 谢学文¹ 石延霞¹ 柴阿丽¹ 李宝聚^{1*} 李磊^{1*}

(1. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 蔬菜生物育种全国重点实验室, 北京 100081;

2. 天津农学院园艺园林学院, 天津 300384)

摘要: 为明确贝莱斯芽胞杆菌 *Bacillus velezensis* 菌株 ZF145 中可有效抑制黄瓜角斑病病原菌扁桃假单胞菌流注致病变种 *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans* 的主要物质, 采用冻干法、酸沉法、絮凝法、萃取法和铵沉法提取菌株 ZF145 发酵液中的抑菌物质, 通过室内盆栽试验验证粗提物对黄瓜角斑病的防治效果, 综合比较不同方法的提取效果, 并通过高效液相色谱-质谱 (high performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS) 联用技术鉴定粗提物中的抑菌物质。结果表明, 絮凝法最适用于贝莱斯芽胞杆菌菌株 ZF145 发酵上清液中抑菌物质的提取, 通过絮凝法提取的粗提物对扁桃假单胞菌流注致病变种的抑菌圈直径达到 19.50 mm, 对黄瓜角斑病的盆栽防治效果为 42.85%, 且粗提物中的主要抑菌物质为 C₁₃~C₁₆ 的 surfactin 同系物, 浓度和纯度均为最高, 分别为 2.77 g/L 和 69.28%。表明本研究优化的絮凝法可用于芽胞杆菌发酵液中抑菌物质的提取。

关键词: 贝莱斯芽胞杆菌; 黄瓜角斑病; 絮凝法; 防治效果; 抑菌物质

Comparison of the extraction method and identification of antimicrobial substances from *Bacillus velezensis* strain ZF145

Zeng Xianfeng¹ Qin Shiyang^{1,2} Xie Xuewen¹ Shi Yanxia¹ Chai Ali¹ Li Baoju^{1*} Li Lei^{1*}

(1. State Key Laboratory of Vegetable Biobreeding, Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 2. College of Horticulture and Landscape Architecture,

Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China)

Abstract: In order to identify the substances with the main antibacterial effect in *Bacillus velezensis* strain ZF145, the effects of different extraction methods were comprehensively evaluated, and the bacteriostatic substances in the fermentation broth of *B. velezensis* strain ZF145 were extracted with lyophilization, acid precipitation, flocculation, extraction and ammonium precipitation, which verified the efficacy of crude extract on cucumber angular leaf spot, and identified the bacteriostatic substances in crude extract with high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS). The results showed that the flocculation method was the most suitable for the extraction of bacteriostatic substances in the supernatant of *B. velezensis* strain ZF145 fermentation broth, the inhibition diameter of *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans* by the crude extract prepared by the flocculation method reached 19.50 mm, the pot control effect on cucumber angular leaf spot was 42.85%, and the main bacteriostatic substance in the crude extract of flocculation was C₁₃~C₁₆ surfactin, and the concentration and-

基金项目: 国家重点研发计划(2023YFD1401200), 中国农业科学院科技创新工程项目(CAAS-ASTIP-IVFCAAS), 农业农村部园艺作物生物学与种质创制重点实验室项目(IVF2023), 蔬菜生物育种全国重点实验室开放课题

* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: lilei01@caas.cn, libaojuivf@163.com

收稿日期: 2023-06-26

purity were the highest, reached 2.77 g/L and 69.28%. The flocculation method optimized in this study could be used for the extraction of bacteriostatic substances from bacillus fermentation broth.

Key words: *Bacillus velezensis*; cucumber angular leaf spot; flocculation method; biocontrol effect; bacteriostatic substance

黄瓜角斑病是由扁桃假单胞流泪致病变种 *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans* 侵染引起的一种细菌性病害,该病在苗期和成株期均可发生,苗期主要危害子叶,成株期主要危害叶片、叶柄以及卷须,发生严重时还可危害茎蔓和果实,严重影响黄瓜产量(苑宝洁等,2022)。目前,黄瓜角斑病的防治主要依靠中生菌素、春雷霉素等药剂以及芽胞杆菌类生物农药,长期使用单一化学药剂容易造成病菌抗药性增强。芽胞杆菌类生物农药主要通过产生抑菌物质抑制病菌的生长来起到预防作用。本课题组前期筛选获得1株对黄瓜角斑病有较好防治效果的贝莱斯芽胞杆菌 ZF145,进一步明确其产生的抑菌物质种类,评估其是否具备开发为微生物药剂的潜力。

贝莱斯芽胞杆菌 *Bacillus velezensis* 主要通过非核糖体肽合成酶和聚酮合成酶产生一系列生物活性次级代谢产物,如 surfactin、bacillomycin-D、fengycin 以及 bacillibactin 等。Chen et al.(2009)通过对解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens* 菌株 FZB42 的基因组进行分析,得出约有 10% 的基因专门用于脂肽和聚酮类抗菌分子等生物活性分子的合成。Wu et al.(2015)研究发现解淀粉芽胞杆菌菌株 FZB42 通过 difficidin 和 bacillysin 发挥生物防治活性,能很好地控制由稻黄单胞菌 *Xanthomonas oryzae* 的 2 个致病变种水稻白叶枯病菌 *X. oryzae* pv. *oryzae* 和条斑病菌 *X. oryzae* pv. *oryzicola* 引起的白叶枯病和条斑病。

对于芽胞杆菌产生的不同抑菌物质,其提取方法也不同。目前,抑菌物质提取方法主要有硫酸铵盐析法(兰宝锋等,2022)、有机溶剂萃取法(王皓楠等,2016)以及酸沉淀法(乔欣蕾等,2021)等。兰宝锋等(2022)比较了硫酸铵盐析法、酸沉淀法、甲醇抽提法和乙酸乙酯萃取法提取抑菌物质的效果,结果显示硫酸铵盐析法最适用于解淀粉芽胞杆菌菌株 A13 中抑菌物质的提取。王皓楠等(2016)比较了有机试剂萃取法、酸沉淀法和硫酸铵沉淀法,结果显示萃取法最适合解淀粉芽胞杆菌菌株 HAB-6 中抑菌物质的提取。Zhang et al.(2014)研究结果表明,采用以磷酸氢二钠和氯化钙作为絮凝剂的絮凝法可以将脂肽类抑菌物质 surfactin 富集在沉淀中。本研究通过不同方法提取贝莱斯芽胞杆菌菌株 ZF145 发酵

上清液中的抑菌物质,利用杯碟法测试不同粗提物在不同浓度下对扁桃假单胞流泪致病变种的抑制效果,通过盆栽试验验证粗提物对黄瓜角斑病的生防效果,利用高效液相色谱-质谱(high performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS)联用技术鉴定抑菌活性组分中的主要抑菌物质,以期揭示贝莱斯芽胞杆菌菌株 ZF145 的生防机理提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株和植物:贝莱斯芽胞杆菌菌株 ZF145(苑宝洁等,2022)和扁桃假单胞流泪致病变种菌株 NM002(Chai et al., 2020),均由中国农业科学院蔬菜花卉研究所蔬菜病害综合防治课题组筛选、鉴定并保存。黄瓜品种为中农 6 号,种子购自中蔬种业科技(北京)有限公司,在日光温室自然条件下生长至 2 叶 1 心期供试。

供试培养基:LB(Luria-Bertani)液体培养基成分为胰蛋白胨 10 g、酵母提取物 5 g、NaCl 10 g、蒸馏水 1 L, pH 为 7.2±0.1; LB 液体培养基中添加 15 g 琼脂可制备得到 LB 固体培养基;营养肉汤(nutrient broth, NB)培养基成分为蛋白胨 10 g、牛肉粉 3 g、NaCl 5 g、蒸馏水 1 L, pH 为 7.2±0.1; NB 培养基中添加 20 g 琼脂可制备得到营养琼脂(nutrient agar, NA)培养基;改良 MS(minimal salt)培养基成分为葡萄糖 20 g、胰蛋白胨 5 g、Na₂HPO₄ 2.8 mg、KH₂PO₄ 1 g、(NH₄)₂SO₄ 0.5 g、MgCl₂ 53 mg、EDTA-2Na 0.5 mg、FeSO₄·7H₂O 0.2 mg、ZnSO₄·7H₂O 0.01 mg、MnCl₂·4H₂O 0.003 mg、H₃BO₃ 0.03 mg、CoCl₂·6H₂O 0.02 mg、NiCl₂·6H₂O 0.002 mg、Na₂MoO₄·2H₂O 0.003 mg、CuCl₂·2H₂O 0.001 mg, 蒸馏水 1 L, pH 为 7.2±0.1。

药剂、试剂和仪器:3% 中生菌素(zhongsheng-mycin)可湿性粉剂,江西正邦作物保护股份有限公司。surfactin 标准品,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;其他试剂均为国产分析纯和色谱纯。FE28-Standard pH 计,梅特勒-托利多(中国)公司;1200LC 高效液相色谱仪、Agilent 6470 三重四极杆液质联用系统,美国安捷伦公司;Sigma 1-16 台式高速离心

机,德国Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 贝莱斯芽胞杆菌ZF145粗提物的提取方法

取-80℃甘油保藏的贝莱斯芽胞杆菌菌株ZF145置于37℃水浴器中,待菌液呈半融状态时用接种环蘸取菌悬液于LB固体平板上划线培养,37℃培养12~16 h。挑取单菌落接种至50 mL LB液体培养基中,于37℃、200 r/min条件下振荡培养12 h,即获得培养液。按体积比1%接种至100 mL改良MS培养基中,于37℃、180 r/min条件下振荡培养36 h,即获得发酵液,再于4℃、8 000 r/min条件下离心10 min,去除菌体沉淀,收集上清液用于提取菌株ZF145中的抑菌物质。

冻干法:取200 mL发酵上清液,预冻后置于冷冻干燥机中,待其形成冻干粉后取出,加入200 mL甲醇在磁力搅拌器上抽提6 h(李方舟,2020),再于4℃、8 000 r/min条件下离心10 min,去除沉淀获得上清液。通过37℃旋转蒸发仪将甲醇溶液蒸发后,使用20 mL甲醇复溶,再过0.22 μm无菌滤膜,用氮气吹干,称重后加入5 mL甲醇溶解所有物质,计算初始浓度,过0.22 μm无菌滤膜,于-40℃储存备用。

铵沉法:取200 mL发酵上清液,将112.2 g硫酸铵缓慢加入其中,使硫酸铵饱和度为80%(兰宝锋等,2022),在25℃下充分溶解后,转移至10℃冷库搅拌过夜,使用0.22 μm无菌滤膜进行抽滤,将滤纸放入50 mL离心管中,分批次加入甲醇振荡抽提,直至甲醇溶液无色,加入总量不超过200 mL。通过37℃旋转蒸发仪将甲醇溶液蒸发,后续试验步骤同冻干法。

酸沉淀法:取200 mL发酵上清液置于烧杯中,用浓盐酸将pH调至2.0(刘安等,2019),于4℃放置过夜。以8 000 r/min离心10 min,去除上清液,向沉淀中加入甲醇进行抽提,直至甲醇无色,加入总量不超过200 mL。通过37℃旋转蒸发仪将甲醇溶液蒸发,后续试验步骤同冻干法。

萃取法:将200 mL发酵上清液置于分液漏斗中,按乙酸乙酯与发酵上清液体积比为3:1进行萃取(王皓楠等,2016),室温放置过夜,倒出有机相并于37℃旋转蒸发仪中蒸发有机溶剂,后续试验步骤同冻干法。

絮凝法:将200 mL发酵上清液置于烧杯中,加入Na₂HPO₄ 5 g搅拌至完全溶解,再加入CaCl₂ 3 g搅拌至完全溶解(Zhang et al., 2014),调节pH至6.4,室温放置过夜,以8 000 r/min离心10 min,收集沉

淀,使用少量异丙醇将沉淀洗出,倒入250 mL烧杯中,加入100 mL异丙醇,在磁力搅拌器上于37℃、300 r/min条件下搅拌2 h,再以8 000 r/min离心10 min,去除沉淀,将上清液通过37℃旋转蒸发仪蒸发有机试剂,后续试验步骤同冻干法。

1.2.2 贝莱斯芽胞杆菌ZF145粗提物抑菌效果的测定

使用甲醇分别将1.2.1不同方法提取的抑菌粗提物浓度梯度稀释至4 000、2 000、1 000和500 mg/L,并保留1组原始浓度粗提物。将保存的扁桃假单胞流泪致病变种菌株NM002在NA平板上划线培养,于28℃暗培养24 h后,用接种环蘸取适量菌体接种到50 mL NB培养基中,于28℃、180 r/min条件下振荡培养24 h,制成菌悬液。取12 mL菌悬液加入到200 mL 50℃的NA培养基中,轻微混匀,倒入90 mm塑料培养皿中,制得混合平板。使用杯碟法测定各粗提物对菌株NM002的抑制效果,取1个牛津杯放在混合平板上,往牛津杯中加入100 μL粗提物样品,盖上皿盖放入4℃冰箱中静置3 h,取出后于28℃暗培养24 h,测量抑菌圈直径(黄伟等,2022),评价各粗提物的抑菌效果。每个浓度处理重复3次。

1.2.3 贝莱斯芽胞杆菌ZF145抑菌物质的鉴定

采用HPLC-MS联用技术对1.2.1不同方法提取的贝莱斯芽胞杆菌ZF145粗提物中的抑菌物质进行鉴定。HPLC检测时样品上机浓度均为4 000 mg/L,使用1 000、2 000、3 000和4 000 mg/L的surfactin标准品建立标准曲线。流动相选择含0.1%甲酸的水(流动相A)和甲醇(流动相B),0~2 min,90%流动相A+10%流动相B;2~20 min,流动相A梯度递减+流动相B梯度递增;20~28 min,100%流动相B;28.5~35.0 min,90%流动相A+10%流动相B。超声脱气处理15 min后备用。选用反相C₁₈色谱柱(长250 mm×直径4.6 mm,填充物粒径5 μm),柱温为25℃,紫外检测器VWD1检测波长为210 nm,流速为1 mL/min,样品进样量为10 μL。在样品进样前,HPLC仪以预处理过的流动相运行35 min,平衡C₁₈色谱柱并减小基线噪音。待基线稳定在±10 mAU时开始进样分析(Biniarz & Łukaszewicz, 2017)。使用三重四极杆液质联用系统对HPLC仪洗脱峰进行分析,采用电喷雾离子源正离子模式检测,操作电压为3 500 V,操作温度为300℃,流速为1 mL/min,质量扫描范围为40~2 500 m/z。利用碰撞诱导解离技术获得化合物的典型碎片离子,碰撞池中碰撞气体为氮气。通过比对文献数据及目标物质分子量来判断物质种类。

1.2.4 贝莱斯芽胞杆菌 ZF145 粗提物防治效果的测定

将 1.2.1 不同方法提取的贝莱斯芽胞杆菌 ZF145 粗提物均稀释至 4 000 mg/L 备用。将扁桃假单胞流泪致病变种菌株 NM002 接种至 NB 培养基中,于 28 ℃、180 r/min 条件下摇培 24 h,即获得菌悬液,用水稀释至浓度为 1×10^8 CFU/mL,备用。采用喷雾法等量均匀地将制备的菌悬液喷施在 2 叶 1 心期黄瓜幼苗叶片表面,每株喷施 10 mL。于温度 28 ℃、相对湿度 75% 条件下保湿培养 24 h,再采用喷雾法均匀地将 4 000 mg/L 粗提物稀释液喷施在黄瓜幼苗叶片表面,每株喷施 10 mL,以喷施等量蒸馏水为病原菌对照,以喷施等量 3% 中生菌素可湿性粉剂 1 000 倍液为药剂对照,每个处理重复 3 次,每个重复为 8 株黄瓜幼苗。保湿培养 7~14 d 后,待病原菌对照完全发病后,调查发病情况并确定病级,并计算病情指数和防治效果。黄瓜角斑病病级分类标准:0 级,不发病;1 级,0% < 病斑面积占叶片面积的比例 ≤ 5%;3 级,5% < 病斑面积占叶片面积的比例 ≤ 25%;5 级,25% < 病斑面积占叶片面积的比例 ≤ 50%;7 级,50% < 病斑面积占叶片面积的比例 ≤ 75%;9 级,75% < 病斑面积占叶片面积的比例 ≤ 100% (Chai et al., 2020)。病情指数 = $\Sigma(\text{各级病叶数} \times \text{病级数}) / (\text{调查总叶数} \times 9) \times 100$; 防治效果 = $(\text{空白对照病情指数} - \text{处理病情指数}) / \text{空白对照病情指数} \times 100\%$ 。

1.3 数据分析

采用 Excel 2016 软件对试验数据进行处理,利

用 SPSS 21.0 软件对试验数据进行统计分析,应用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 不同方法提取的贝莱斯芽胞杆菌 ZF145 粗提物

采用冻干法、酸沉法、絮凝法、萃取法、铵沉法从 200 mL 贝莱斯芽胞杆菌菌株 ZF145 发酵上清液中提取到的粗提物的初始浓度分别为 443 120、25 200、88 460、70 840 和 37 260 mg/L,其中冻干法提取的粗提物浓度最高。

2.2 贝莱斯芽胞杆菌菌株 ZF145 粗提物的抑菌效果

不同提取方法提取的粗提物均对扁桃假单胞流泪致病变种菌株 NM002 有抑制作用(表 1),其中采用冻干法提取的粗提物的抑菌效果最佳,抑菌圈直径达到 29.50 mm,其次为萃取法提取的粗提物,抑菌圈直径为 23.00 mm,酸沉法、絮凝法和铵沉法提取的粗提物的抑菌圈直径分别为 20.67、19.50 和 19.67 mm(表 1)。

将 5 种方法提取的贝莱斯芽胞杆菌菌株 ZF145 粗提物分别稀释至 4 000、2 000、1 000 和 500 mg/L,在最高浓度 4 000 mg/L 处理下,酸沉法提取的粗提物对扁桃假单胞流泪致病变种菌株 NM002 的抑制效果最好,抑菌圈直径达 20.00 mm,其次为絮凝法提取的粗提物,抑菌圈直径为 18.17 mm,冻干法、萃取法和铵沉法提取的粗提物的抑菌圈直径分别为 11.67、14.33 和 14.00 mm(表 1)。

表 1 贝莱斯芽胞杆菌菌株 ZF145 不同浓度粗提物对扁桃假单胞流泪致病变种菌株 NM002 的抑菌圈直径

Table 1 Diameter of the inhibition circle of *Bacillus velezensis* ZF145 crude extract with different concentrations on *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans* NM002

提取方法 Extraction method	抑菌圈直径 Diameter of the inhibition circle/mm				
	初始浓度 Initial concentration	4 000 mg/L	2 000 mg/L	1 000 mg/L	500 mg/L
冻干法 Lyophilization	29.50±1.87 a	11.67±0.57 b	8.50±0.54 c	9.00±0.00 c	7.67±0.51 d
酸沉法 Acid precipitation	20.67±0.82 bc	20.00±0.63 a	16.00±0.00 a	15.00±0.89 a	12.83±0.75 b
絮凝法 Flocculation	19.50±0.84 c	18.17±1.83 a	17.17±2.56 a	13.33±1.86 ab	11.17±0.98 c
萃取法 Ethyl acetate extraction	23.00±2.37 b	14.33±1.63 b	16.67±0.52 a	14.00±1.10 b	15.67±1.51 a
铵沉法 Ammonium sulfate precipitate	19.67±1.60 c	14.00±0.00 b	11.17±0.75 b	8.17±0.41 c	8.17±0.41 d

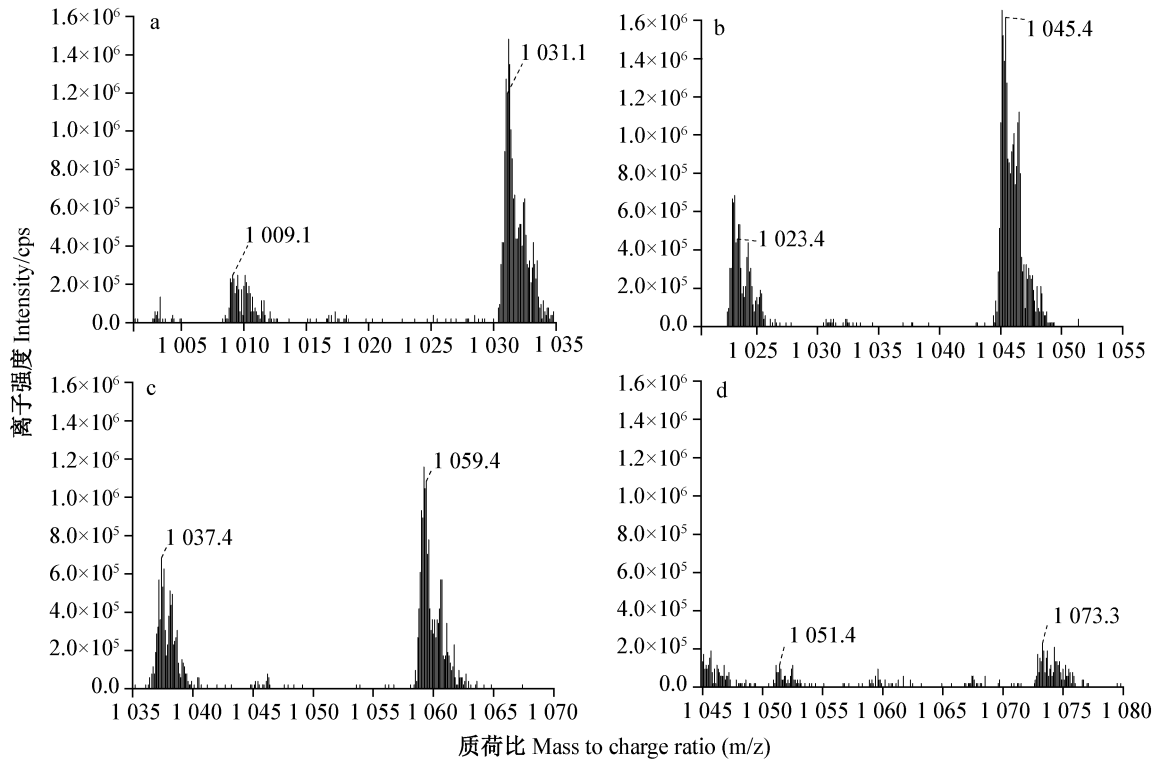
表中数据为平均数±标准差。同列不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验差异显著 ($P < 0.05$)。Data are mean±SD. Different lowercase letters in the same column indicate significant difference by Duncan's new multiple range test ($P < 0.05$).

2.3 贝莱斯芽胞杆菌 ZF145 抑菌活性组分鉴定结果

HPLC-MS 分析结果显示,主要信号峰出现在 22.80、23.02、23.20 和 23.54 min,对这 4 个信号峰进行质谱分析, $[M+H]^+$ 质荷比分别为 1 009.1、1 023.4、1 037.4 和 1 051.4, $[M+Na]^+$ 质荷比分别为 1 031.1、

1 045.4、1 059.4 和 1 073.3(图 1)。4 种物质之间的分子量均相差 14 Da,与 CH_2 的分子量大小一致,说明相差一个亚甲基。与 C_{13} ~ C_{16} 的 surfactin 同系物的 $[M+H]^+$ 、 $[M+Na]^+$ 质荷比吻合,由此判断贝莱斯芽胞杆菌菌株 ZF145 的抑菌活性组分中存在 C_{13} ~ C_{16} 的

surfactin同系物。



a: C_{13} surfactin; b: C_{14} surfactin; c: C_{15} surfactin; d: C_{16} surfactin.

图1 贝莱斯芽胞杆菌菌株ZF145中抑菌活性组分的一级质谱图

Fig. 1 Primary mass spectrometry of the bacteriostatic active components of *Bacillus velezensis* ZF145

2.4 菌株ZF145粗提物中surfactin的纯度

surfactin标准样品有3种同系物,分别为 C_{13} surfactin、 C_{14} surfactin和 C_{15} surfactin,因此在保留时间22~24 min区间共有3个吸收峰(图2),通过HPLC积分结果,建立surfactin的标准曲线为 $y=63.89x-8.34$ ($R^2=0.996$)。经计算,絮凝法提取的粗提物中surfactin的浓度及纯度均最高,分别为2.77 g/L和69.28%;其次为酸沉法提取的粗提物,surfactin浓度为2.56 g/L,纯度为63.91%;萃取法提取的粗提物中surfactin的浓度为1.87 g/L,纯度为46.76%;冻干法提取的粗提物中surfactin的浓度为1.56 g/L,纯度为39.01%;而铵沉法提取的粗提物中surfactin的浓度为1.24 g/L,纯度为30.96%(表2)。

2.5 贝莱斯芽胞杆菌菌株ZF145粗提物的生防效果

通过5种方法提取的贝莱斯芽胞杆菌菌株ZF145粗提物对黄瓜角斑病均有一定的防治效果,其中通过酸沉法提取的4 000 mg/L粗提物对黄瓜角斑病的防治效果最好,为47.86%;其次为絮凝法提取的4 000 mg/L粗提物,防治效果为42.85%;3%中生菌素可湿性粉剂1 000倍液对黄瓜角斑病的防治效果为35.93%;而通过冻干法、萃取法和铵沉法提

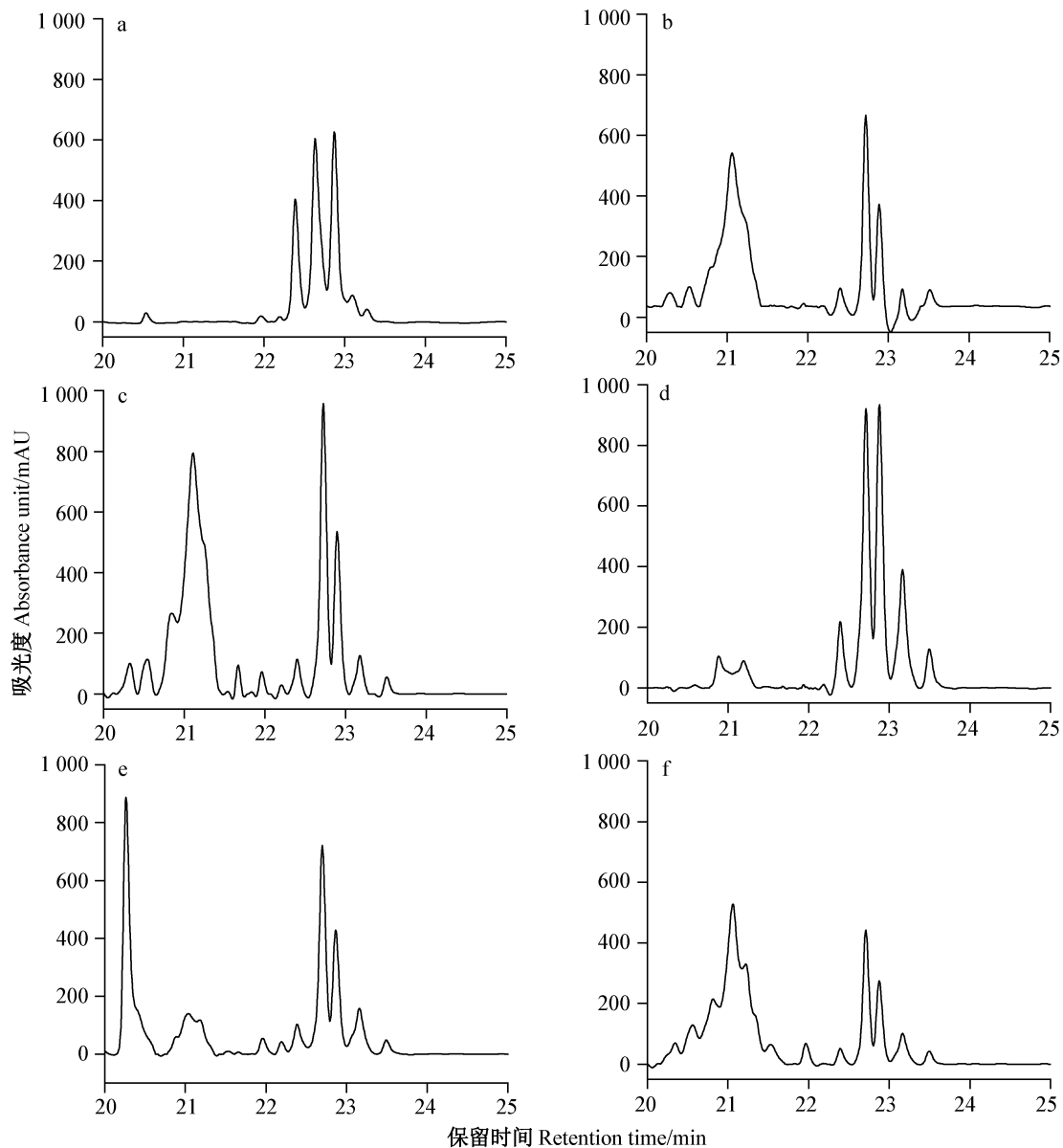
取的4 000 mg/L粗提物对黄瓜角斑病的防治效果很低,分别为24.62%、33.09%和11.86%(表3)。

3 讨论

芽胞杆菌通过产生抑菌物质来抑制病原菌生长是其最主要的生防机理之一,芽胞杆菌能产生多种抑菌物质,包括脂肽类、多肽类和抑菌蛋白类。针对不同的抑菌物质可采用不同的提取方法。酸沉法作为目前芽胞杆菌抑菌物质最常用的提取方法之一,不分各物质的等电点,而是通过降低所有蛋白质及脂肽类物质的溶解度来获得发酵液中几乎所有种类的抑菌物质。但由于许多发酵培养基配方中会存在缓冲离子对,如磷酸氢根和磷酸二氢根,要将发酵液pH调节至2.0,需要加入大量盐酸,生产成本低,且废液处理困难(乔欣蕾等,2021)。铵沉法会破坏发酵液中具有二级结构的蛋白质,使蛋白质及其他物质絮凝沉淀(兰宝锋等,2022)。萃取法多采用有机溶剂对发酵液(体积比2:1或3:1)中抑菌物质进行萃取,在蒸发结晶或者旋转蒸发过程中过多的有机相会耗费大量的能源,优点是有机相可以重复使用(王皓楠等,2016)。絮凝法主要利用脂肽类物质碱

溶酸沉、脂溶性以及磷酸钙冷析热解的特性提取发酵液中的抑菌物质。磷酸氢二钠和氯化钙反应会形成磷酸钙,在操作过程中先加入磷酸氢二钠至完全溶解,随后加入氯化钙,在氯化钙加入的过程中会逐渐生成磷酸钙,该生成过程中会包裹和吸附发酵液中的物质(Zhang et al., 2014)。在实际生产中,絮凝法已经被用于提取发酵残渣中的吩嗪-1-羧酸。从生产实际分析,絮凝法大幅度减少了处理体积,从液体处理转化到固体处理,极大程度上减轻了提取工艺对储罐的需求,并且更加节约能源。本研究结果

表明,5种提取方法均可从贝莱斯芽胞杆菌 ZF145 发酵液中提取抑菌物质,其中絮凝法提取获得的粗体物中 surfactin 的纯度最高,酸沉法次之,铵沉法最低;另外酸沉法与絮凝法提取获得的粗提物的生防效果无显著差异。相同浓度下酸沉法提取的粗提物样品对黄瓜角斑病的防治效果为 47.86%,絮凝法提取获得的粗提物对黄瓜角斑病的防治效果达到 42.85%,而铵沉法提取获得的粗提物对黄瓜角斑病的防治效果仅为 11.86%。后续研究中可改进酸沉法及絮凝法,以提高抑菌物质的提取率。



a: 2 500 mg/L surfactin 标准品; b~f: 分别为冻干法、酸沉法、絮凝法、萃取法和铵沉法提取的 4 000 mg/L 粗提物。a: 2 500 mg/L surfactin standard; b~f: 4 000 mg/L crude extracts obtained by using lyophilized, acid precipitation, flocculation, extraction and ammonium, respectively.

图2 不同方法提取的贝莱斯芽胞杆菌菌株 ZF145 粗提物的高效液相色谱图

Fig. 2 HPLC characterization of *Bacillus velezensis* ZF145 crude extract at different methods

表2 不同方法提取的贝莱斯芽胞杆菌菌株 ZF145 粗提取物中 surfactin 浓度和纯度

Table 2 Comparison of surfactin content and purity of *Bacillus velezensis* ZF145 crude extracts prepared by different extraction methods

提取方法 Extraction method	浓度 Concentration/(g/L)	纯度 Purity/%
冻干法 Lyophilization	1.56±0.32 bc	39.01±8.02 bc
酸沉法 Acid precipitation	2.56±0.28 a	63.91±7.09 a
絮凝法 Flocculation	2.77±0.18 a	69.28±4.43 a
萃取法 Ethyl acetate extraction	1.87±0.30 b	46.76±7.50 b
铵沉法 Ammonium sulfate precipitate	1.24±0.16 c	30.96±3.88 c

表中数据为平均数±标准差。同列不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验差异显著 ($P<0.05$)。Data are mean±SD. Different lowercase letters in the same column indicate significant difference by Duncan's new multiple range test ($P<0.05$).

表3 不同方法提取的贝莱斯芽胞杆菌菌株 ZF145 粗提取物对黄瓜角斑病的防治效果

Table 3 Effect of crude extracts prepared by different methods of *Bacillus velezensis* strain ZF145 on cucumber angular leaf spot disease

处理 Treatment	使用浓度 Applied concentration	病情指数 Disease index	防治效果 Control effect/%
冻干法粗提取物 Crude extract prepared by lyophilization	4 000 mg/L	43.03±2.04 bc	24.62±3.58 c
酸沉法粗提取物 Crude extract prepared by acid precipitation	4 000 mg/L	29.76±1.74 d	47.86±3.05 a
絮凝法粗提取物 Crude extract prepared by flocculation	4 000 mg/L	32.62±0.57 d	42.85±0.99 ab
萃取法粗提取物 Crude extract prepared by ethyl acetate extraction	4 000 mg/L	38.20±3.47 cd	33.09±6.08 bc
铵沉法粗提取物 Crude extract prepared by ammonium sulfate precipitate	4 000 mg/L	50.31±2.48 ab	11.86±4.35 d
3% 中生菌素可湿性粉剂 3% zhongshengmycin WP	1 000×	36.57±4.58 cd	35.93±8.03 bc
病原菌对照 Pathogen control	—	57.08±7.34 a	

表中数据为平均数±标准差。同列不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验差异显著 ($P<0.05$)。Data are mean±SD. Different lowercase letters in the same column indicate significant difference by Duncan's new multiple range test ($P<0.05$).

HPLC-MS 分析技术已经广泛用于芽胞杆菌抑菌物质的分析鉴定,通过 HPLC-MS、MS/MS 等分析技术可以发掘芽胞杆菌代谢产物中更多的具有抑菌活性或诱导植物抗性能力的新型活性物质。本研究通过 HPLC-MS 分析发现贝莱斯芽胞杆菌菌株 ZF145 产生的抑菌物质主要为 C₁₃~C₁₆ surfactin 同系物。Sarwar et al. (2018) 研究结果表明枯草芽胞杆菌 *B. subtilis* 菌株 NH-100 及 surfactin A 制剂对由念珠藻 *Nostoc punctiforme* 引起的水稻恶苗病表现出显著的拮抗活性。Jin et al. (2020) 从贝莱斯芽胞杆菌菌株 HN-2 中获得了水稻白叶枯病菌有拮抗作用的物质,经鉴定为 C₁₅ surfactin A。surfactin 因其多样的生物活性不断被开发为具有不同功能的制剂,包括抗菌剂 (Heerklotz & Seelig, 2007)、抗真菌剂 (Zanotto et al., 2019)、抗病毒剂 (Kracht et al., 1999)、防癌剂 (Zanotto et al., 2019)、抗支原体剂 (Shaligram & Singhal, 2010)、抗致病菌黏附剂 (Zeraiik & Nitschke, 2010) 和植物防御诱导子 (Jourdan et al., 2009)。surfactin 主要作用于细菌的细胞壁,使

细胞壁出现穿孔,导致细胞死亡,如可以增加痤疮丙酸杆菌 *Propionibacterium acnes* 细胞壁的渗透性,使碱性磷酸酶渗入细胞外环境 (Shan et al., 2021)。另一方面, surfactin 可以成功防止金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 黏附及其表面生物膜形成 (Liu et al., 2019)。

本研究通过活体生测方式验证了不同提取方法获得的粗提取物对黄瓜角斑病的防治效果,其中酸沉法和絮凝法提取获得的样品中 surfactin 含量较高,同时对黄瓜角斑病的防治效果也较好,说明 surfactin 的浓度与生防效果呈正相关关系,这表明芽胞杆菌产生的 surfactin 对病原菌的抑制作用是防治黄瓜角斑病的主要机理之一。

参 考 文 献 (References)

- Biniarz P, Łukaszewicz M. 2017. Direct quantification of lipopeptide biosurfactants in biological samples via HPLC and UPLC-MS requires sample modification with an organic solvent. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(11): 4747–4759
- Chai AL, Yuan LF, Li L, Shi YX, Xie XW, Wang Q, Li BJ. 2020. Aero-

- sol transmission of *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans* in greenhouses. *Science of the Total Environment*, 748: 141433
- Chen XH, Koumoutsis A, Scholz R, Schneider K, Vater J, Süßmuth R, Piel J, Borriss R. 2009. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *Journal of Biotechnology*, 140(1/2): 27–37
- Heerklotz H, Seelig J. 2007. Leakage and lysis of lipid membranes induced by the lipopeptide surfactin. *European Biophysics Journal*, 36(4): 305–314
- Huang W, Zhang LJ, Qin XZ, Wang N, Wang W. 2022. Preliminary analysis of stability and antimicrobial substances in fermentation broth of *Bacillus velezensis* JK19. *Chinese Journal of Biological Control*, 38(1): 73–80 (in Chinese) [黄伟, 张丽娟, 秦新政, 王宁, 王玮. 2022. 贝莱斯芽胞杆菌 JK19 发酵液稳定性及抑菌物质初步分析. *中国生物防治学报*, 38(1): 73–80]
- Jin PF, Wang Y, Tan Z, Liu WB, Miao WG. 2020. Antibacterial activity and rice-induced resistance, mediated by C₁₅ surfactin A, in controlling rice disease caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 169: 104669
- Jourdan E, Henry G, Duby F, Dommes J, Barthélemy JP, Thonart P, Ongena M. 2009. Insights into the defense-related events occurring in plant cells following perception of surfactin-type lipopeptide from *Bacillus subtilis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(4): 456–468
- Kracht M, Rokos H, Özel M, Kowall M, Pauli G, Vater J. 1999. Antiviral and hemolytic activities of surfactin isoforms and their methyl ester derivatives. *Journal of Antibiotics*, 52(7): 613–619
- Lan BF, Wang R, He S, Zhou LQ, Meng JZ. 2022. Optimization and analysis of crude extraction of bacteriostatic substances from *Bacillus amyloliquefaciens*. *China Brewing*, 41(6): 195–199 (in Chinese) [兰宝锋, 王睿, 何双, 周礼芹, 蒙健宗. 2022. 解淀粉芽胞杆菌抑菌物质粗提取的优化及分析. *中国酿造*, 41(6): 195–199]
- Li FZ. 2020. Study on genome sequencing and antimicrobial metabolites produced by endophytic bacterium *Bacillus velezensis* FZ06 isolated from leaves of *Camellia assamica*. Master thesis. Guangzhou: South China University of Technology (in Chinese) [李方舟. 2020. 普洱茶叶片内生细菌 *Bacillus velezensis* FZ06 的基因组测序及抗菌活性代谢产物研究. 硕士学位论文. 广州: 华南理工大学]
- Liu A, Zhao H, Zhang CZ. 2019. Analysis and extraction optimization of bacteriostatic substances from *Bacillus velezensis*. *China Brewing*, 38(12): 63–68 (in Chinese) [刘安, 赵华, 张朝正. 2019. 贝莱斯芽胞杆菌抑菌物质的分析及提取优化. *中国酿造*, 38(12): 63–68]
- Liu J, Li W, Zhu XY, Zhao HZ, Lu YJ, Zhang C, Lu ZX. 2019. Surfactin effectively inhibits *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm formation on surfaces. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(11): 4565–4574
- Qiao XL, Fan XR, Huo XY, Zhang XC, Xiao JW, Zhang DD. 2021. Analysis of antifungal substances produced by *Bacillus subtilis* isolate against *Fusarium oxysporum*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 29(10): 1999–2007 (in Chinese) [乔欣蕾, 凡雪蕊, 霍晓毅, 张学超, 肖嘉文, 张冬冬. 2021. 枯草芽胞杆菌拮抗尖孢镰刀菌的抑菌物质分析. *农业生物技术学报*, 29(10): 1999–2007]
- Sarwar A, Hassan MN, Imran M, Iqbal M, Majeed S, Brader G, Sessitsch A, Hafeez FY. 2018. Biocontrol activity of surfactin A purified from *Bacillus* NH-100 and NH-217 against rice bakanae disease. *Microbiological Research*, 209: 1–13
- Shaligram NS, Singhal RS. 2010. Surfactin: a review on biosynthesis, fermentation, purification and applications. *Food Technology and Biotechnology*, 48(2): 119–134
- Shan MY, Meng FQ, Zhou LB, Lu FX, Bie XM, Zhao HZ, Lu ZX. 2021. Surfactin inhibits the growth of *Propionibacterium acnes* by destroying the cell wall and membrane. *Letters in Applied Microbiology*, 73(6): 684–693
- Wang HN, Jin PF, Liu WB, Lin CH, Miao WG, Zheng FC. 2016. Characterization of the active substances of *Bacillus amyloliquefaciens* HAB-6. *Journal of Plant Protection*, 43(3): 452–458 (in Chinese) [王皓楠, 靳鹏飞, 刘文波, 林春花, 缪卫国, 郑服丛. 2016. 解淀粉芽胞杆菌 HAB-6 抑菌活性成分的分析. *植物保护学报*, 43(3): 452–458]
- Wu LM, Wu HJ, Qiao JQ, Gao XW, Borriss R. 2015. Novel routes for improving biocontrol activity of *Bacillus* based bioinoculants. *Frontiers in Microbiology*, 6: 1395
- Yuan BJ, Li L, Zhang HJ, Shi YX, Chai AL, Xie XW, Li BJ. 2022. Screening of antagonistic bacteria against bacterial angular leaf spot of cucumber and its control effect. *Chinese Journal of Biological Control*, 38(2): 421–427 (in Chinese) [苑宝洁, 李磊, 张红杰, 石延霞, 柴阿丽, 谢学文, 李宝聚. 2022. 黄瓜细菌性角斑病拮抗细菌的筛选及其防治效果. *中国生物防治学报*, 38(2): 421–427]
- Zanotto AW, Valério A, de Andrade CJ, Pastore GM. 2019. New sustainable alternatives to reduce the production costs for surfactin 50 years after the discovery. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(21): 8647–8656
- Zeraik AE, Nitschke M. 2010. Biosurfactants as agents to reduce adhesion of pathogenic bacteria to polystyrene surfaces: effect of temperature and hydrophobicity. *Current Microbiology*, 61(6): 554–559
- Zhang DL, Wang YF, Lu YJ, Zhang C, Lu ZX. 2014. An efficient method for separation of surfactin from *Bacillus amyloliquefaciens* fmb50 broth by flocculation. *Process Biochemistry*, 49(7): 1182–1188

(责任编辑:李美娟)