

• 海洋生物技术 •

基于 *PKS* 和 *NRPS* 基因的海洋来源抗病原菌活性菌株筛选及其代谢产物活性分析

张丽影, 刘骏锋, 董极靓, 金黎明, 许永斌, 郑维, 权春善

大连民族大学 生命科学学院 生物技术与资源利用教育部重点实验室, 辽宁 大连 116600

张丽影, 刘骏锋, 董极靓, 金黎明, 许永斌, 郑维, 权春善. 基于 *PKS* 和 *NRPS* 基因的海洋来源抗病原菌活性菌株筛选及其代谢产物活性分析. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4520-4535.

ZHANG LY, LIU JF, DONG JL, JIN LM, XU YB, ZHENG W, QUAN CS. Screening of marine resistant strain based on *PKS* and *NRPS* genes and the activity of its metabolites. Chin J Biotech, 2022, 38(12): 4520-4535.

摘 要: 基于聚酮合成酶基因 (polyketide synthases gene, *PKS*) 和非核糖体多肽合成酶基因 (non ribosomal polypeptide synthase gene, *NRPS*), 本研究从 77 株分离于北冰洋海泥的菌株中筛选出 1 株具有较高抗病原菌活性的菌株并对其进行了菌种鉴定。通过优化培养基组成和发酵条件提高了该菌株活性代谢产物的产量, 并利用高分辨率质谱 (high resolution mass spectrometry, HRMS)、核磁氢谱 (^1H nuclear magnetic hydrogen, ^1H NMR) 和碳谱 (^{13}C NMR) 对其主要代谢产物进行了结构鉴定。测定了该菌株主要代谢产物的抗菌谱及代谢产物对黄瓜枯萎病的影响。研究表明, 该菌株为贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*), 其对植物具有一定的促生作用。当发酵条件为麦芽糖 5 g/L、胰蛋白胨 10 g/L、氯化钠 10 g/L、温度 30 °C、转速 150 r/min、发酵时间 60 h 时, 该菌株代谢产物的抑菌圈直径由 (16.23±0.42) mm 提高至 (24.42±0.57) mm。菌株代谢产物含有大环内酯类化合物 macrolactin A, 其对多种病原细菌和真菌具有明显拮抗作用。黄瓜幼苗实验表明, 该菌株代谢产物对黄瓜枯萎病具有防护作用, 其作为生防菌剂具有一定的开发应用潜力。

关键词: 海洋拮抗菌; 贝莱斯芽孢杆菌; 代谢产物; 黄瓜枯萎病

Received: March 22, 2022; Accepted: May 10, 2022; Published online: May 19, 2022

Supported by: Key Laboratory Project of Liaoning Provincial Department of Education (LS2010049)

Corresponding author: QUAN Chunshan. E-mail: mikyeken@dlnu.edu.cn

基金项目: 辽宁省教育厅重点实验室项目 (LS2010049)

Screening of marine resistant strain based on *PKS* and *NRPS* genes and the activity of its metabolites

ZHANG Liying, LIU Junfeng, DONG Jiliang, JIN Liming, XU Yongbin, ZHENG Wei, QUAN Chunshan

Key Laboratory of Biotechnology and Bioresources Utilization (Ministry of Education), College of Life Science, Dalian Minzu University, Dalian 116600, Liaoning, China

Abstract: Based on polyketide syntheses gene (*PKS*) and non-ribosomal peptide synthetases gene (*NRPS*), one strain with high anti-pathogenic activity was screened from 77 strains isolated from Arctic marine sediments and identified. By optimizing the composition of culture medium and fermentation conditions, the production of this strain's active metabolites was improved and the main metabolites were identified by HRMS, ^1H NMR and ^{13}C NMR. The antibacterial spectrum of the main metabolites and the effect of the metabolites on cucumber Fusarium wilt were also determined. The results showed that the strain was *Bacillus velezensis* and it showed growth promoting effect on plants. When the strain was cultured in 5 g/L maltose, 10 g/L tryptone, 10 g/L sodium chloride, at 30 °C, 150 r/min for 60 h, the diameter of the inhibition zone increased from (16.23±0.42) to (24.42±0.57) mm. The metabolites of this strain mainly contain macrolide compound macrolactin A, which has antagonistic effect on a variety of pathogenic bacteria and fungi. Cucumber seedling experiments showed that the metabolites of this strain had a protective effect on cucumber Fusarium wilt, and showed a good potential for development and application as a biocontrol agent.

Keywords: marine antagonists; *Bacillus velezensis*; metabolites; cucumber Fusarium wilt

抗生素的大量使用和滥用增加了抗生素耐药菌株的产生, 超级细菌的出现给医药、农药行业均提出了新的挑战, 急需开发新型环保的抗生素以应对日益增多的超级病原菌问题^[1]。近年来, 从陆地微生物中重复分离的代谢产物越来越多, 而处于海洋的微生物因生长环境特殊, 往往产生不同于陆生微生物的化学结构新颖、代谢机制特殊、生物活性独特的代谢产物, 因此成为新药开发的研究热点^[2-5]。

在微生物的代谢过程中, 聚酮合成途径 (polyketide synthase, *PKS*) 和非核糖体合成途径 (non-ribosomal peptide synthesis, *NRPS*) 是其合成次级代谢产物的主要途径, 通过这两种

途径微生物产生了大量的、具有生物活性的天然产物^[6-7]。因此, 基于 *PKS* 和 *NRPS* 基因簇进行 *PKS*-*NRPS* 分析的次级代谢产物发掘, 对发现新的天然活性物质具有重要意义, 目前 I 型 *PKS* 和 *NRPS* 基因常作为菌株产生新颖结构天然活性化合物的指示^[8-10]。

本研究以实验室保存的 77 株海洋微生物为研究对象, 通过 I 型 *PKS* 和 *NRPS* 基因的简并引物对其进行初筛, 并利用多种病原菌进行复筛, 最终得到 1 株对多种病原菌均有良好拮抗效果的 64 号菌株。经鉴定该菌为贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*)。随后研究了该菌株的促生作用, 并对其发酵条件进行优化以提高

拮抗代谢产物产量。利用 HRMS、 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 对 *B. velezensis* 主要代谢产物进行了结构鉴定, 并对其抗菌活性进行了分析。此外, 通过黄瓜幼苗实验验证了该菌株代谢产物对黄瓜枯萎病的影响, 为该菌株在生防领域的应用研发提供了理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料和仪器

77 株海洋微生物由本实验室从北冰洋海泥样品中筛选所得并保藏。屎肠球菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、伤寒沙门氏菌均为本实验室自存。胰蛋白胨、酵母粉、琼脂粉、MRS 培养基和 $2\times\text{SanTaq}$ PCR Master Mix、DNA Marker DL2000 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 乙二胺四乙酸钠、冰乙酸、解有机磷培养基、解无机磷培养基、解钾培养基、固氮培养基、ADF 培养基购自青岛海博生物; 其余试剂均为分析纯。所用引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

海水 LB 液体培养基 (1 L): 胰蛋白胨 10.0 g, 酵母粉 5.0 g, 氯化钠 10.0 g, 1 L 海水 (取自大连市金普新区渤海), 沉积后用 $0.2\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤 ($121\ ^\circ\text{C}$ 湿热灭菌 15 min)。

主要仪器与设备: XevoG2-XS 高分辨率质

谱仪 (Waters), 1260 高效液相色谱仪 (Agilent), Mercury Plus 400 型核磁共振仪 (Varian)。

1.2 利用 I 型 *PKS* 和 *NRPS* 基因简并引物初筛菌株

对本实验室分离保藏的海洋菌进行活化, 用划线法在海水 LB 固体培养基上划出单菌落, 随后进行菌落 PCR 检测。利用针对 *NRPS* 和 I 型 *PKS* 基因的简并引物 (表 1) 初筛菌株^[11]。模板 DNA 的获取: 从单个菌落中蘸取菌体并在 $10\ \mu\text{L}$ 无菌水中稀释, $100\ ^\circ\text{C}$ 煮沸 10 min, 取上清液备用。PCR 反应体系 ($25\ \mu\text{L}$): $1.0\ \mu\text{L}$ $0.4\ \mu\text{mol/L}$ Primer F, $1.0\ \mu\text{L}$ $0.4\ \mu\text{mol/L}$ Primer R, $1.0\ \mu\text{L}$ $10\ \text{ng/L}$ 模板 DNA, $12.5\ \mu\text{L}$ $2\times\text{Taq}$ PCR Master Mix, $9.5\ \mu\text{L}$ 无菌水。PCR 反应条件为: $95\ ^\circ\text{C}$ 预变性 5 min; $94\ ^\circ\text{C}$ 变性 30 s, $57\ ^\circ\text{C}$ 退火 30 s, $72\ ^\circ\text{C}$ 延伸 90 s, 共循环 35 次; $72\ ^\circ\text{C}$ 终延伸 10 min, $4\ ^\circ\text{C}$ 保存。通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检验反应产物, 上样量为 $10\ \mu\text{L}$, 使用 DL 2000 marker 作为参考。电泳电压为 90 V。

1.3 拮抗菌株的筛选

将初筛获得的菌株接种到 100 mL 海水 LB 液体培养基中, $37\ ^\circ\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 3 d, 发酵液在 8 000 r/min 条件下离心 10 min, 取上清, 旋蒸浓缩, 得到 1 mL 浓缩的粗发酵

表 1 I 型 *PKS* 和 *NRPS* 筛选基因的引物序列

Table 1 Primers designed for type I *PKS* and *NRPS* screening genes

No.	Primer	Sequence (5'→3')	Product size (bp)	Gene
1	GCF	GCSATGGAYCCSCARCRCGSVT	700–800	<i>PKS</i>
	GCR	GTSCCSGTSCRTGSSCYTCSAC		
2	KSDPOOF	MGNRGARGARGCNNWNSMNATGGAYCCNCARCANMG	700–800	
	KSHGTGr	GGRTCNCNARNSWNGTNCNGTNCRTG		
3	MTF	GCNGGYGGYGCENTAYGTNCC	700–800	
	MTR	CCNCGDATYTTNACYTG		
4	1F	GCSTACSYSATSTACACSTCSGG	1 000–1 400	<i>NRPS</i>
	1R	SASGTCVCCSGTSCGGTAS		

液^[12]。采用双层平板牛津杯法测定抑菌活性。将 10 mL LB 固体培养基倒入平板使其凝固,凝固后在距平板中心 2 cm 处呈中心对称状放置 4 个牛津杯(直径 0.8 cm)。分别将屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)的培养液以 0.1%的接种量加入 LB 培养基(屎肠球菌培养基为 MRS 肉汤培养基)中混匀,倒入上述放置好牛津杯的底层平板上,待凝固后拔出牛津杯,将药液注入牛津杯留下的孔洞中,观察是否有抑菌圈产生。每孔加入 100 μ L 粗发酵液,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h,测量抑菌圈直径。

1.4 拮抗菌株鉴定

将筛选出的菌株培养 24 h,提取其 DNA。用通用引物对菌株进行 16S rRNA 基因扩增,PCR 反应体系 25 μ L: 2.5 μ L 10 \times PCR Buffer, 4.0 μ L dNTPs (each 10 mmol/L), 0.5 μ L Taq Plus DNA Polymerase (5 U/ μ L), 2.0 μ L 50 mmol/L MgSO₄, 1.0 μ L Primer F (10 μ mol/L), 1.0 μ L Primer R (10 μ mol/L), 1.0 μ L 模板 DNA, 13.0 μ L 无菌水。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 57 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 共循环 35 次; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存^[13-14]。

1.5 *B. velezensis* L64 的促生作用测定

解磷和解钾作:挑取少量活化 *B. velezensis* L64 菌体分别接种到解无机磷、解有机磷和解钾固体培养基平板上,37 $^{\circ}$ C 培养 5-7 d,观察菌落周围是否有透明圈出现。

固氮作用:挑取少量活化 *B. velezensis* L64 菌体接种到无氮培养基平板上,37 $^{\circ}$ C 培养 5-7 d,观察菌株在该检测培养基上能否生长。以不具有固氮作用的大肠杆菌为阴性对照。

产 ACC 脱氨酶活性:挑取少量活化 *B. velezensis* L64 菌体接种到 ADF 固体培养基平板上,37 $^{\circ}$ C 培养 7 d,观察菌株是否生长。若能生长,将菌株转接于 ADF 固体培养基上。如若生长,则继续转接至 3 代。以不能产生 ACC 脱氨酶的大肠杆菌为阴性对照。

1.6 *B. velezensis* L64 发酵条件的优化

将活化后的 *B. velezensis* L64 菌体以 1%的接种量接入 500 mL 基础培养基中,30 $^{\circ}$ C、150 r/min 发酵 72 h。第 60 h 添加 Diaion HP20 (2 g/100 mL) 和 Amberlite XAD-16 (2 g/100 mL) 树脂^[15]。将发酵液于 4 $^{\circ}$ C、6 000 r/min 离心 10 min。发酵液离心后弃上清,收集菌体和树脂,用 500 mL 甲醇对沉淀的菌体和树脂进行抽提,振荡 30 min 后离心收集上清液,重复多次直至树脂恢复至白色,过滤除去树脂,然后对甲醇上清液进行旋蒸,蒸干后的样品用甲醇溶至 1 g/mL。采用双层平板牛津杯法,以伤寒沙门氏菌为指示菌检测 *B. velezensis* L64 代谢产物的抑菌效果。

1.6.1 培养基组成优化

保持其他发酵条件不变,在基础发酵培养基中分别添加 0.5%的酵母粉、牛肉膏、麦芽糖、葡萄糖和蔗糖,考察不同碳源对 *B. velezensis* L64 代谢产物的影响;在上述实验确定碳源的基础上分别添加 1%的胰蛋白胨、氯化铵、硫酸铵、乙酸铵和柠檬酸铵,考察不同氮源对代谢产物的影响;在上述实验基础上,更换无机盐成分,分别添加 1%的氯化钠、氯化钾、氯化钙、无水硫酸镁和硫酸亚铁,考察无机盐对代谢产物的影响。

以单因素实验结果为基础,通过正交实验进一步确定 *B. velezensis* L64 最优培养基组成,考察因素为麦芽糖、胰蛋白胨和氯化钠,因素与水平表见表 2。

表 2 培养基组成 $L_9(3^3)$ 正交实验因素和水平
Table 2 $L_9(3^3)$ orthogonal experimental factors and levels

Levels	Maltose (A, g/L)	Tryptone (B, g/L)	NaCl (C, g/L)
1	5	5	5
2	10	10	10
3	15	15	15

1.6.2 发酵条件优化

以优化后的培养基对 *B. velezensis* L64 进行发酵培养, 发酵时间分别为 12、24、36、48、60、72 和 84 h; 确定最优发酵时间后, 改变发酵培养温度, 分别为 20 °C、25 °C、28 °C、30 °C、35 °C、37 °C 和 40 °C, 以确定最佳培养温度; 最后改变发酵时的转速, 分别为 120、150、180、200 和 220 r/min, 以确定最佳培养转速。

以单因素实验结果为基础, 通过正交实验进一步确定 *B. velezensis* L64 最优培养条件, 考察因素为发酵时间、发酵温度和培养箱转速, 因素与水平见表 3。

1.7 *B. velezensis* L64 代谢产物的分离与鉴定

将 *B. velezensis* L64 的代谢产物用甲醇浸泡, 超声 30 min 后静置 12 h。12 000 r/min 离心后取上清液进行高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 检测 (色谱柱: Kromasil 公司 ODS 反相柱, 4.6 mm×250 mm, 5 μm)。检测波长为 254 nm, 乙腈和水为流动相, 进行梯度洗脱 (0–20 min: 10%–80%乙腈, 20.01–30 min: 80%–100%乙腈,

表 3 发酵条件 $L_9(3^3)$ 正交实验因素和水平
Table 2 $L_9(3^3)$ orthogonal experimental factors and levels

Levels	Fermentation time (A, h)	Fermentation temperature (B, °C)	Rotation speed (r/min)
1	48	30	120
2	60	35	150
3	72	37	180

30.01–40 min: 100%乙腈), 流速 1.0 mL/min, 柱温 25 °C。HRMS 检测分子量, ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 鉴定结构。

1.8 Macrolactin A 抑菌谱的测定

采用双层平板牛津杯法测定了从 *B. velezensis* L64 菌株代谢产物中提取的 macrolactin A 对细菌的抑菌谱, 方法同 1.3。采用平板对峙法测定其对真菌的抑菌谱。将实验室保藏的真菌病原菌接种于 PDB 培养基, 置于 30 °C 恒温培养箱中, 活化 3 d 后备用。将 10 mL PDB 固体培养基倒入平板, 待其凝固后在平板中心放置 1 个牛津杯 (直径 0.8 cm)。随后继续倒入 10 mL PDB 固体培养基作为第二层平板。用直径 1 cm 的打孔器打出 4 个圆形菌饼, 在距离平板中心 2 cm 处呈中心对称状放置 4 个菌饼。拔出牛津杯, 将 100 μL 1 mg/mL macrolactin A 注入孔洞中, 30 °C 培养 3 d 观察并记录抑菌圈大小。

1.9 *B. velezensis* L64 代谢产物对黄瓜幼苗感染枯萎病的影响

将活化的黄瓜枯萎病病原菌尖镰孢菌接种于装有 20 mL PDA 液体培养基中, 30 °C、180 r/min 培养 120 h, 备用。选择长势一致、健康的三叶一心黄瓜幼苗移植到装有灭菌营养土的花盆中, 每盆移植两株幼苗。栽种时, 根部距土壤表面 5 cm, 在实验过程中每隔 12 h 用 10 mL 无菌水灌溉一次。24 h 后进行盆栽划伤实验^[16]。取 4 组样品分别为 (a) 先接种 1 mL 尖镰孢菌, 2 h 后接种 1 mL *B. velezensis* L64 代谢产物; (b) 接种 1 mL *B. velezensis* L64 代谢产物, 2 h 后接种 1 mL 尖镰孢菌; (c) 为空白样品; (d) 接种 1 mL 尖镰孢菌。在距土壤表面 3 cm 的位置, 划出 1 个长 3 mm、宽 3 mm、深 3 mm 的伤口; 将花盆置于室温, 避免阳光直射, 观察并记录发病情况。

2 结果与分析

2.1 基于 *NRPS* 和 I 型 *PKS* 基因的菌株初筛结果

将实验室保存的 77 株海洋菌按 1-77 进行编号并进行划线分离, 其中 16、17、43、44 和 61 这 5 株菌株在培养基上无法生长, 其余 72 株均得到单菌落。将得到的单菌落用 50% 的甘油进行菌种保藏, 以备后续菌落 PCR 实验。

以 72 株海洋来源细菌的基因组 DNA 为模板, 利用 I 型 *PKS* 和 *NRPS* 基因的简并引物进行菌落 PCR 扩增, 产物经 1.0% 琼脂糖电泳检测。Primer 1、Primer 2 和 Primer 3 为依据 I 型 *PKS* 的 KS 结构域设计的简并引物, 目的片段大小应为 700-800 bp; Primer 4 为依据 *NRPS* 的腺苷化结构域 (adenylation, A) 设计的简并引物, 目的片段大小应为 1 000-1 400 bp。检测结果表明, 只有 16 株菌株可以同时扩增出与 4 对简并引物扩增产物预期大小相近的 DNA 片段, 分别为 12、14、25、26、31、36、38、

40、45、56、64、68、69、70、73、77 号菌株。有 5 株菌株不能扩增出任何与预期值相近的 DNA 片段, 推测它们不能编码这两种基因, 其余菌株仅能扩增出部分 DNA 片段。因此, 基于以上结果初步筛选这 16 株菌株进行进一步的拮抗筛选。

2.2 拮抗菌株的筛选与鉴定

将初筛得到的 16 株菌株进行拮抗活性检测, 选用病原菌分别为屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、大肠埃希 (*Escherichia coli*) 和伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhi*)。检测结果表明 (表 4), 64 和 68 号菌株对 4 种病原菌均存在抑制活性; 25、26、77 号菌株可以拮抗 3 种病原菌, 但均不能对屎肠球菌产生抑制作用; 12、31、36、38 和 69 号菌株只对大肠埃希菌具有抑菌活性。由于 64 号菌株对 4 种病原菌的抑菌作用均优于 68 号, 其对伤寒沙门氏菌的抑菌圈达 (16.23±0.42) mm, 抑菌效果最好, 因此后续实验详细针对 64 号菌株展开。

表 4 16 株海洋菌对 4 种病原菌的拮抗活性检测结果

Table 4 Antagonism test of 16 bacteria against four microbial pathogens

Bacterial No.	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhi</i>
12	-	-	13.64±0.31	-
14	-	-	-	-
25	-	11.82±0.68	14.37±0.56	14.33±0.25
26	-	10.39±0.76	15.43±0.29	15.68±0.27
31	-	-	10.75±0.58	-
36	-	-	10.47±0.23	-
38	-	-	10.22±0.35	-
40	-	-	-	-
45	-	-	10.85±0.39	-
56	-	-	15.84±0.27	9.85±0.55
64	16.02±0.35	15.66±0.37	15.42±0.74	16.23±0.42
68	15.85±0.48	15.64±0.49	14.85±0.15	16.16±0.57
69	-	-	11.64±0.34	-
70	-	-	-	-
73	-	-	-	12.38±0.19
77	-	15.68±0.18	14.87±0.38	12.98±0.58

“-”: no antimicrobial activity.

将 64 号菌株在基础培养基上培养 24 h 后, 观察菌落形貌, 发现其菌落呈乳白色, 不透明, 边缘存在褶皱, 向中间皱缩凸起, 挑开菌落后有粘液状分泌物。从菌落形态初步判定其符合芽孢杆菌属形态 (图 1)。将 64 号菌株的 16S rRNA 基因序列放入 NCBI 核酸序列数据库中进行 BLAST, 确认序列后使用 ClustaW 进行比对, 发现其与 *B. velezensis* 的同源性达到 99% 以上。依据比对结果, 采用邻接 (neighbor-joining, NJ) 法, 利用 MEGA 构建系统发育树, 如图 2 所示。基于以上结果, 鉴定 64 号菌为 *B. velezensis*, 随后将其命名为 *B. velezensis* L64。

2.3 *B. velezensis* L64 菌株的促生作用

B. velezensis L64 在解无机磷、解有机磷固

体培养基平板上, 均能出现晕圈, 但在解无机磷的培养基上晕圈更大, 说明其具有解磷作用且解无机磷能力优于解有机磷能力 (图 3A、3B)^[17]。*B. velezensis* L64 在解钾培养基平板上能出现晕圈, 说明其有解钾作用 (图 3C), 而在无氮培养基平板上不能生长, 说明该菌株无固氮作用。

B. velezensis L64 在 ACC 作为唯一氮源的 ADF 固体培养基平板上生长良好, 连续转接 3 代后仍能正常生长 (图 3D-F)。说明该菌株能够产生 ACC 脱氨酶, 将菌体产生的 ACC 分解为 α -丁酮酸和氨, 被菌株利用以满足其生长。阴性对照大肠杆菌在 ADF 培养基上未能生长。

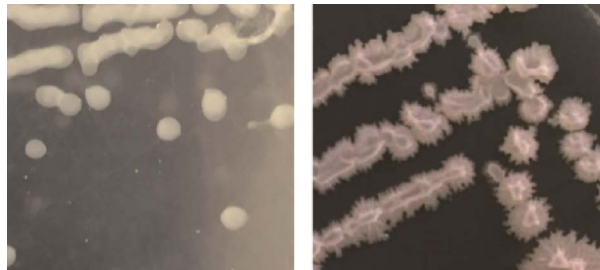


图 1 64 号菌株菌落形态

Figure 1 Colony morphology of strain 64.

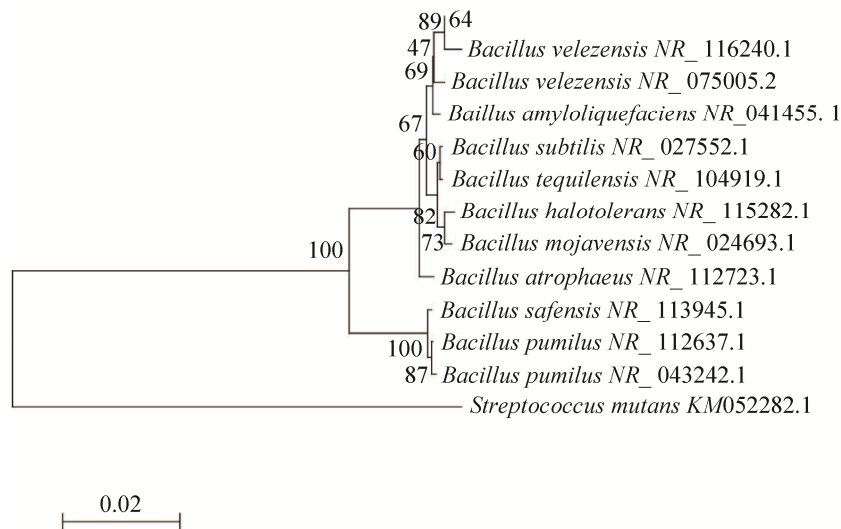


图 2 64 号菌株在系统发育树中的位置

Figure 2 Position of strain 64 in a 16S rRNA gene sequences based phylogenetic tree.

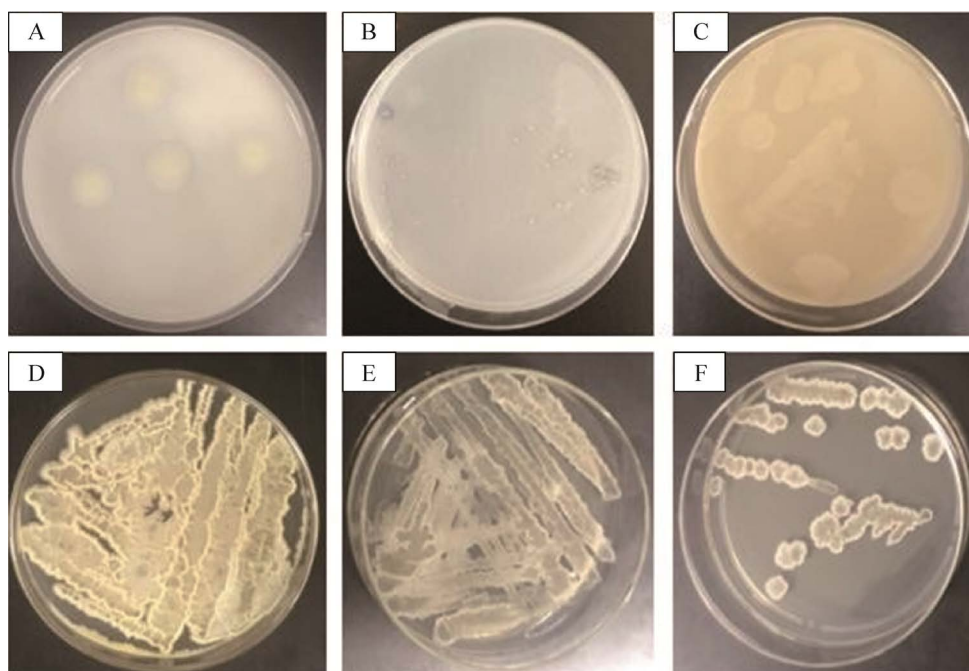


图3 *B. velezensis* L64 在不同培养基上的生长状态 A: 无机磷培养基; B: 有机磷培养基; C: 解钾培养基; D: 第一代 ADF 培养基; E: 第二代 ADF 培养基; F: 第三代 ADF 培养基

Figure 3 Growth status of *B. velezensis* L64 on different media. (A) Inorganic phosphorus medium. (B) Organophosphorus medium. (C) Potassium dissolving medium. (D) First generation ADF medium. (E) Second generation ADF medium. (F) Third generation ADF medium.

2.4 培养基组成的优化

2.4.1 单因素优化结果

在基础培养基中分别添加不同碳源、氮源和无机盐,考察其对 *B. velezensis* L64 发酵产物抑菌活性的影响,结果如图4所示。抑菌圈直径随着3种成分的改变而发生明显变化。以牛肉膏作为碳源时,抑菌圈直径仅为 (16.72 ± 0.46) mm,抑菌效果不佳;而使用麦芽糖为碳源时抑菌圈直径可达 (21.11 ± 0.63) mm,比基础培养基提高了 3.13 mm (图4A),因此初步确定培养基的最佳碳源为麦芽糖。固定碳源为麦芽糖,在培养基中分别添加不同氮源 (图4B),当氮源为胰蛋白胨时抑菌圈直径可达 (21.38 ± 0.88) mm,为氯化铵和硫酸铵时抑菌圈直径分别为 (11.72 ± 0.45) mm、 (10.14 ± 0.58) mm,抑菌效果均低于胰蛋白胨。使用乙酸铵和柠檬酸铵

时的发酵液基本无抑菌作用,分析原因可能 *B. velezensis* L64 不能利用这两种成分来产生抑菌物质。以上述最佳碳源和氮源为基础,更换无机盐成分为氯化钠、氯化钾、氯化钙、无水硫酸镁、硫酸亚铁,考察其对发酵产物抗菌活性的影响 (图4C)。当氯化钠作为无机盐时抑菌圈直径为 (21.85 ± 0.52) mm,高于其他无机盐时的抑菌效果,因此初步确定最佳的无机盐成分为氯化钠。

2.4.2 正交试验优化

以单因素优化得到的结果为基础,通过正交试验进一步确定 *B. velezensis* L64 的最佳发酵培养基组成, $L_9 (3^3)$ 设计及结果如表5所示。最优组合为在 1 L 海水中添加麦芽糖 5 g,胰蛋白胨 10 g,氯化钠 10 g。其中氮源对优化结果的影响要大于碳源,无机盐种类影响最小。

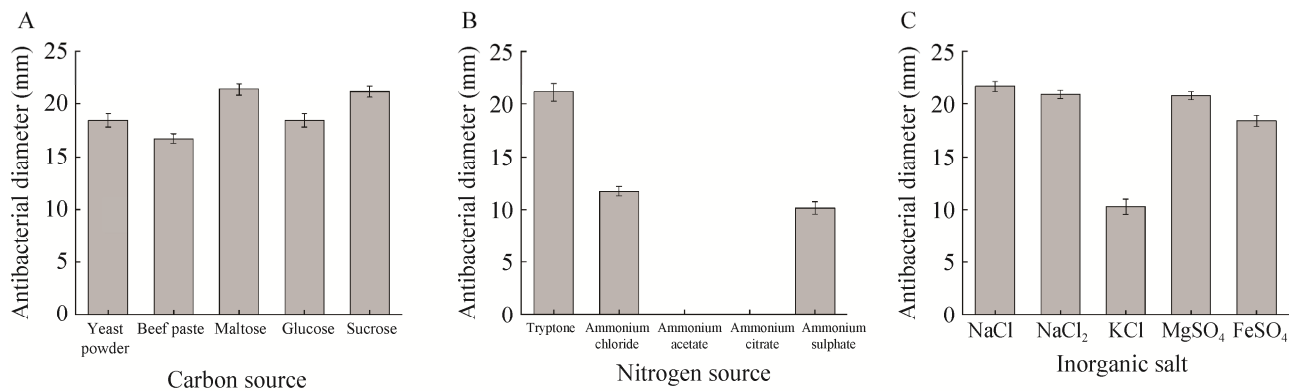


图4 培养基组成单因素优化结果

Figure 4 Single factor optimization of medium composition.

表5 培养基组成正交试验设计及结果

Table 5 Orthogonal experimental design for optimization of medium composition

No.	A	B	C	Antibacterial diameter (mm)
1	1	1	1	19.97±0.85
2	1	2	2	22.14±0.26
3	1	3	3	17.08±0.23
4	2	1	2	19.45±0.96
5	2	2	3	18.97±0.86
6	2	3	1	17.95±0.75
7	3	1	3	19.07±1.68
8	3	2	1	18.03±0.52
9	3	3	2	16.18±0.35
K1	59.19	58.49	55.95	
K2	56.37	59.14	57.78	
K3	53.29	51.21	55.12	
k1	19.72	19.49	18.65	
k2	18.79	19.71	19.25	
k3	17.76	17.07	18.37	
R	1.02	2.64	0.88	
Order		B>A>C		
Optimal level	A1	B2	C2	
Optimal combination	A1B2C2			

2.5 发酵条件的优化

2.5.1 单因素优化

考察了发酵时间、发酵温度和转速对 *B. velezensis* L64 代谢产物抑菌活性的影响, 结果如图 5 所示。

B. velezensis L64 产生的次级代谢产物在

12–84 h 内随时间的增加, 抑菌圈直径先增大后减小, 48 h 时, 抑菌圈直径达到最大值 (23.68±0.54) mm (图 5A), 因此最佳培养时间确定为 48 h。取 *B. velezensis* L64 在不同温度下以 180 r/min 分别培养 48 h。结果显示 (图 5B), 发酵温度为 20 °C 时, 不出现抑菌圈, 这可能是

由于温度过低, *B. velezensis* L64 不能产生活性代谢产物所致; 温度为 37 °C 时, 抑菌圈直径最大为 (23.62±0.43) mm, 因此初步确定最佳培养温度为 37 °C。以上述实验结果为基础, 将菌体分别置于不同转速, 37 °C 下培养 48 h。结果显示 (图 5C), 随着转速的升高, 抑菌圈直径先增大后减小, 当转速为 180 r/min 时抑菌圈直径

最大, 达到 (23.86±0.47) mm, 因此初步确定最佳的转速为 180 r/min。

2.5.2 正交优化

以单因素优化得到的发酵时间、发酵温度以及转速的结果作为基础, 通过正交实验进一步确定 *B. velezensis* L64 的最佳发酵条件。L₉ (3³) 设计及结果如表 6 所示, 最优组合为发

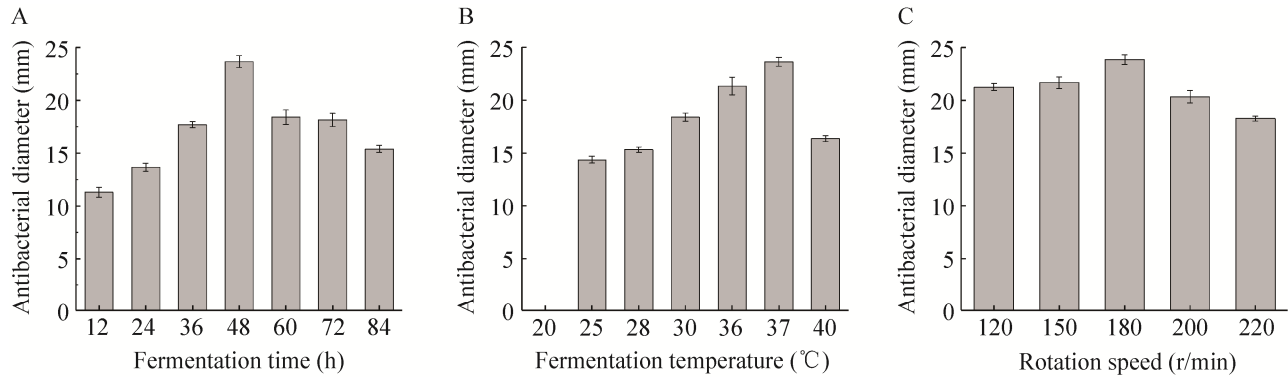


图 5 发酵条件单因素优化结果

Figure 5 Single factor optimization of fermentation conditions.

表 6 发酵条件正交实验设计及结果

Table 6 Orthogonal experimental design for optimization of fermentation conditions

No.	A	B	C	Antibacterial diameter (mm)
1	1	1	1	21.94±0.53
2	1	2	2	21.69±0.49
3	1	3	3	19.60±0.82
4	2	1	2	24.42±0.37
5	2	2	3	23.35±0.46
6	2	3	1	22.36±0.39
7	3	1	3	21.03±0.77
8	3	2	1	20.47±0.14
9	3	3	2	20.60±0.45
K1	63.23	67.39	64.77	
K2	70.13	65.50	66.70	
K3	62.09	62.56	63.98	
k1	21.07	22.46	21.59	
k2	23.37	21.83	22.23	
k3	20.69	20.85	21.32	
R	2.67	1.60	0.90	
Order		A>B>C		
Optimal level	A2	B1	C2	
Optimal combination		A2B1C2		

酵温度 30 ℃, 转速 150 r/min, 发酵时间 60 h。其中发酵时间对于发酵条件的影响最大, 其次为发酵温度, 转速影响最小。

2.6 *B. velezensis* L64 菌株代谢产物的鉴定

通过培养基条件和发酵条件的优化, *B. velezensis* L64 菌株代谢产物的抑菌活性明显提高 (图 6), 抑菌圈直径达到 (24.42 ± 0.57) mm, 较优化之前提高了 8.19 mm。

对 *B. velezensis* L64 代谢产物的粗提液进行 HPLC 检测, 结果如图 7A 所示, 在 32.6 min 出现了一个含量较高的单峰, 将其收集并进行高分辨率质谱 (high resolution mass spectrometry,

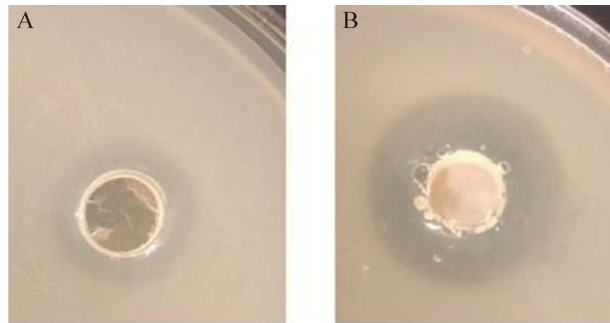


图 6 *B. velezensis* L64 菌株优化前后代谢产物抑菌活性 A: 优化前; B: 优化后

Figure 6 Antibacterial activity of metabolites of *B. velezensis* L64 strain before (A) and after (B) optimization.

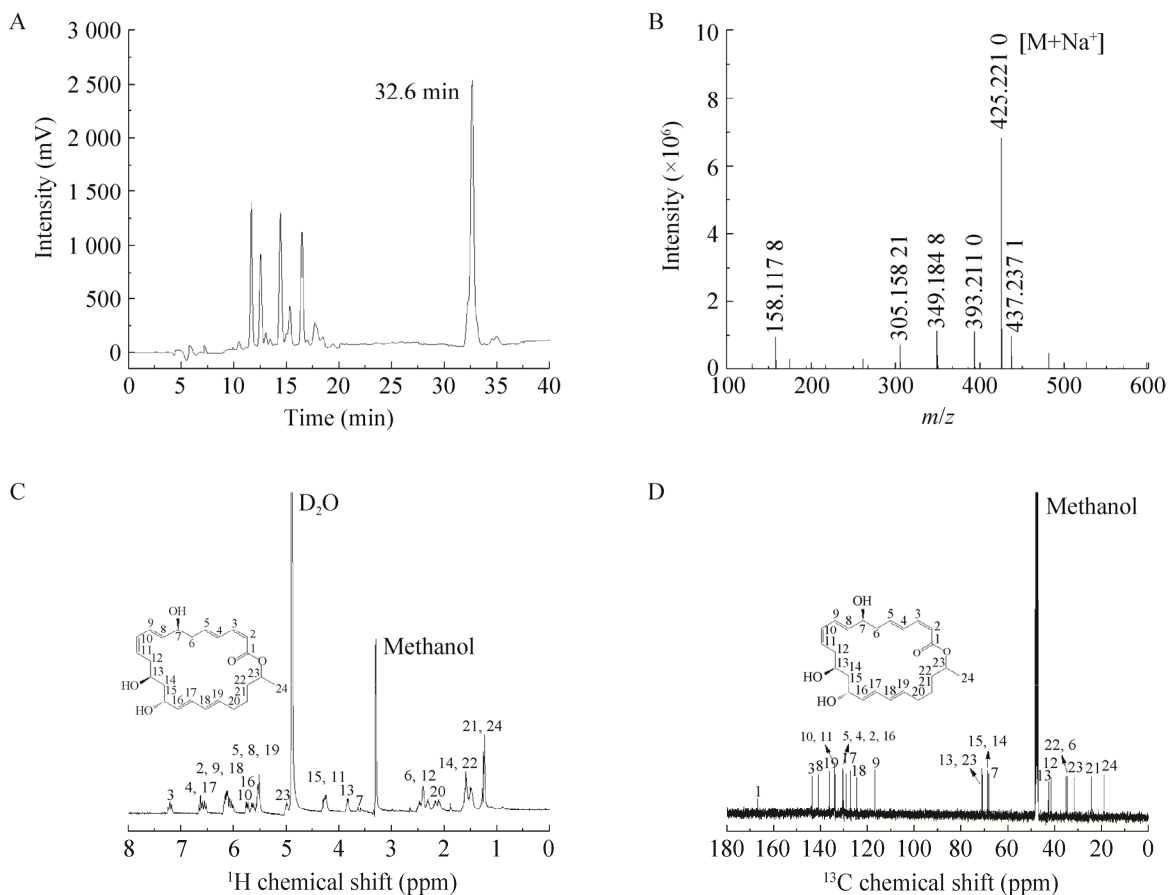


图 7 *B. velezensis* L64 代谢产物的鉴定 A: 液相谱图; B: 质谱图; C: ^1H NMR 谱图; D: ^{13}C NMR 谱图 (核磁溶剂为 D_2O)

Figure 7 Identification of *B. velezensis* L64 metabolite. (A) Liquid phase spectrum. (B) Mass spectrogram. (C) ^1H NMR spectrum. (D) ^{13}C NMR spectrum (NMR solvent: D_2O).

HRMS) 检测。根据检测结果推测该化合物的分子式为 $C_{24}H_{34}O_5$, 图 7B 中 425.221 0 处的峰归属于 $[M+Na]^+$ 的分子离子峰, 与推测结果相符。从该化合物分子式中的 C、H 原子个数比推断, 该分子的不饱和度为 8, 分子中双键和环的总数为 8, 初步判断其为聚酮类化合物 macrolactin A。从图 7C 的 1H NMR 谱图中可见, 谱图中共出现 14 组谱峰, 其化学位移及谱峰面积与 macrolactin A 分子中各氢原子所处的化学环境及数量吻合。因核磁所用溶剂为 D_2O , macrolactin A 中 3 个羟基中的氢原子属于活泼氢, 易于和 D_2O 发生氢氧交换, 因此在谱图中没有出现这 3 个氢的谱峰。从图 7D 的 ^{13}C NMR 谱图中可见, 共出现 24 个谱峰, 与 macrolactin A 中的 24 个碳原子完全对应, 其中, 羰基碳 (1 号) 的谱峰出现在 168.01 ppm, 6 个 $C=C$ 双键中的 12 个碳, 集中出现在 110–150 ppm 之间, 甲基碳 (24 号) 出现在 20.13 ppm。各谱峰具体信息详见表 7, 其数值与文献值吻合^[18]。综合上述结果可以确定该化合物即为 macrolactin A。

2.7 Macrolactin A 抑菌谱的测定

随后, 我们考察了从 *B. velezensis* L64 菌株代谢产物中提取的 macrolactin A 对 8 种病原细菌 (1–8) 和 16 种病原真菌 (9–24 号) 的抑菌活性, 结果列于表 8。从中可见, macrolactin A 对真菌的抑菌活性稍优于细菌。在细菌中, 对伤寒沙门氏菌的抑菌活性最大, 而对铜绿假单胞菌无抑制作用。在真菌中, 对导致黄瓜枯萎病的尖孢镰刀菌的抑菌活性最大, 抑菌圈直径达到 (33.59 ± 0.48) mm, 其次为玉米弯孢菌和新月弯孢菌, 对冻土毛霉菌的抑制作用相对较小, 抑菌圈仅为 (15.36 ± 0.42) mm。以上结果表明, *B. velezensis* L64 的主要代谢产物 macrolactin A 对植物病原菌表现出较好的抑菌活性, 其在生物农药方面具有较大应用潜力。

表 7 Macrolactin A (D_2O) 核磁氢谱 (400 MHz) 和碳谱 (150 MHz) 数据

Table 7 1H NMR (400 MHz) and ^{13}C NMR (150 MHz) data of macrolactin A (D_2O)

No.	δ_H , mult (J in Hz)		δ_C
1	-		168.01
2	6.16	m	117.99
3	6.62	d (11.6)	145.04
4	7.22	dd (15.1, 11.2)	131.43
5	5.54	dt	142.26
6	eq	2.31 dt (13.3, 7.0)	36.10
	ax	2.19 m	
7	3.61	m	69.17
8	5.54	m	131.74
9	6.05	dd (15.2, 10.4)	125.93
10	5.64	dt (14.6, 7.0)	130.27
11	4.30	t (6.6)	128.38
12	eq	2.48 dq (13.4, 6.7, 5.6)	42.89
	ax	2.41 h (7.8)	
13	3.84	p (5.9, 5.4)	72.34
14	eq	1.62 m	43.90
	ax	1.53 m	
15	4.25	m	69.77
16	5.57	dd (15.1, 5.8)	137.57
17	6.11	d (11.0)	135.26
18	6.56	dd (15.2, 11.0)	131.19
19	5.54	m	135.16
20	eq	2.10 dd (14.4, 7.1)	32.80
	ax	2.03 q (6.9, 6.5)	
21	eq	1.31 d (17.4)	25.65
	ax	1.16 dt	
22	eq	1.59 m	36.51
	ax	1.49 dd (8.9, 6.4)	
23	5.00	dt (13.6, 6.8)	72.21
24	1.25	t (6.3)	20.13

2.8 *B. velezensis* L64 菌株代谢产物对黄瓜幼苗感染枯萎病的影响

通过黄瓜幼苗盆栽根部划伤试验进一步考察 *B. velezensis* L64 代谢产物对黄瓜幼苗感染枯萎病的影响 (图 8)。实验组 (A)、(B)、(C) 和 (D) 分别为: (A) 先接种 1 mL 尖孢镰刀菌菌液,

表8 Macrolactin A 对不同细菌和真菌的抑菌活性
Table 8 Antimicrobial activity of macroactin A against different bacteria and fungi

No.	Bacteria and fungi	Antibacterial diameter (mm)
1	<i>Salmonella typhi</i>	24.23±0.26
2	<i>Escherichia coli</i>	22.32±0.29
3	<i>Staphylococcus aureus</i>	23.59±0.34
4	<i>Enterococcus faecium</i>	18.53±0.28
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	—
6	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	12.24±0.34
7	<i>Acinetobacter baumannii</i>	14.68±0.37
8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	18.59±0.31
9	<i>Curvularia lunata</i>	32.14±0.32
10	<i>Rhizoctonia solani</i>	22.31±0.84
11	<i>Alternaria spinosa</i>	27.82±0.68
12	<i>Exserohilum turcicum</i> (Pass.) Leonard et Suggs	28.47±0.36
13	<i>Curvularia lunata</i>	32.75±0.62
14	<i>Fusarium graminearum</i>	29.25±0.31
15	<i>Rhizoctonia cerealis</i>	27.69±0.84
16	<i>Trichomonas discoides</i>	25.38±0.58
17	<i>Fusarium moniliforme</i>	25.45±0.36
18	<i>Fusarium oxysporum</i>	33.59±0.48
19	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	21.83±0.27
20	<i>Trichoderma permafrost</i>	15.36±0.42
21	Pear blossom blight	23.26±0.41
22	<i>Rhizopus oryzae</i>	19.34±0.28
23	<i>Aspergillus niger</i>	29.57±0.52
24	<i>Pseudostomatosis solanacearum</i>	24.59±0.95

—: no antimicrobial activity.

2 h 后接种 1 mL *B. velezensis* L64 代谢产物; (B) 接种 1 mL *B. velezensis* L64 代谢产物, 2 h 后接种 1 mL 尖镰孢菌菌液; (C) 为空白样品; (D) 接种 1 mL 尖镰孢菌。接种 120 h 后观察各组黄瓜幼苗发现, (A)、(B) 组幼苗的形态明显优于 (D) 组, 形态更为挺拔, 叶片和根茎部斑点更少, 且 (A) 组幼苗较 (B) 组更为健康, 说明 *B. velezensis* L64 的代谢产物对黄瓜枯萎病的防治作用大于保护作用^[17]。此外, 经代谢产物处理的黄瓜幼苗 (A)、(B) 组形态优于未接种病菌的空白组 (C), 说明 *B. velezensis* L64 代谢产物对黄瓜幼苗的生长具有一定的促进作用。

3 讨论

本研究基于 *PKS* 和 *NRPS* 基因, 从 77 株海洋菌中筛选出 1 株具有较高抗病原菌活性的菌株, 通过对其形态特征与 16S rRNA 基因序列分析, 鉴定并将其命名为 *B. velezensis* L64。该菌株在解无机磷、解有机磷和解钾培养基平板上均能出现晕圈, 说明其具有解磷和解钾作用。土壤中存在多种矿物元素, 但对植物来说大多数都无法直接吸收利用, 大量矿物元素的累积导致土壤结构遭到破坏, 进而影响植物的生长发育。*B. velezensis* L64 既能溶解有机磷又能溶解无机磷, 可以最大程度地利用土壤中的磷元素, 有效避免磷在土壤中的沉积^[19]。此外, 解

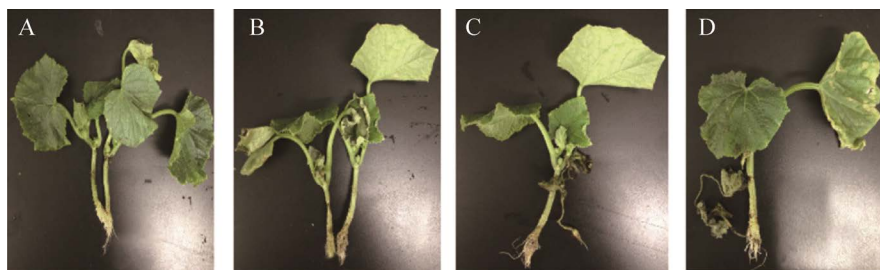


图8 120 h 后黄瓜幼苗形态

Figure 8 Morphology of potted plant scratch experiment after 120 h.

钾作用说明该菌株能够对土壤中的云母、长石等含钾矿物进行分解,从而抑制或减少病原微生物的繁殖机会^[20]。

B. velezensis L64 在无氮培养基平板上不能生长,而在 1-氨基环丙烷基-1-羧酸 (ACC) 作为唯一氮源的 ADF 固体培养基平板上生长良好,且连续转接 3 代后仍能正常生长,说明该菌株能够产生 ACC 脱氨酶,将 ACC 分解为 α -丁酮酸和氨,被菌株利用以满足生长。ACC 是乙烯合成的前体物质,生防菌能够产生 ACC 脱氨酶水解 ACC,从而有效降低植物体内乙烯的产生,增强植物的抗逆能力,促进植物的生长发育^[21-22]。实验结果表明 *B. velezensis* L64 菌株对植物生长具有一定的促进作用。

为了提高 *B. velezensis* L64 菌株活性代谢产物的产量,本研究通过单因素试验与正交实验结合对菌株的最佳培养基和培养条件进行了优化。最终确定最适发酵条件为:麦芽糖 5 g/L,胰蛋白胨 10 g/L,氯化钠 10 g/L;温度 30 °C,转速 150 r/min,发酵时间 60 h。优化后,*B. velezensis* L64 代谢产物的抑菌圈直径由优化前的 (16.23±0.42) mm 提高到 (24.42±0.57) mm。经 HRMS、¹H NMR 和 ¹³C NMR 分析,*B. velezensis* L64 菌株的代谢产物含有聚酮类化合物 macrolactin A。Macrolactin 是一类由生物体通过 PKS 基因簇逐级缩合产生的聚酮化合物,迄今为止已发现近 30 种衍生物^[23]。1989 年,Gustafson 研究小组首次从一株未分类的深海细菌中分离得到 macrolactin A^[24],随后在放线菌、芽孢杆菌、链霉菌等菌株中先后发现了该化合物的存在^[25-27]。Macrolactin A 具有抗菌、抗病毒和抗肿瘤活性,其抗菌谱较宽,对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、耐万古霉素肠球菌、根瘤农杆菌等细菌,灰曲霉、立枯丝核菌、白色念珠菌、尖孢炭疽菌、茶拟盘多毛孢菌和胶孢炭

疽菌等真菌表现出抑制活性^[28-30]。本研究考察了 macrolactin A 对多种病原细菌和真菌的抑菌活性,结果表明该化合物对真菌的抑制能力优于细菌,尤其对导致黄瓜枯萎病的尖孢镰刀菌表现出最强的抑菌活性。

枯萎病是黄瓜最为严重的病害之一,每年都会造成黄瓜大幅减产甚至绝收。目前针对黄瓜枯萎病的防治主要以化学农药为主,但化学农药的过量使用不仅危害人类健康,还易导致环境污染,甚至产生耐药性等问题^[31],因此,急需高效生物农药替代化学农药以解决此类问题。*B. velezensis* L64 菌株的代谢产物 macrolactin A 对导致黄瓜枯萎病的尖孢镰刀菌表现出较强活性,同时该菌株具有解磷、解钾以及促进植物生长的作用,因此我们通过黄瓜幼苗盆栽根部划伤试验进一步考察了 *B. velezensis* L64 代谢产物对黄瓜枯萎病的影响。结果表明,*B. velezensis* L64 的代谢产物对黄光枯萎病具有防护作用,未来可以作为新型生防菌剂的潜在候选者。

REFERENCES

- [1] Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8(4): 260-271.
- [2] 朱玉莹. 海洋微生物及其天然产物在两种肝癌诱因防治中的功能发掘及作用机理研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2017.
Zhu YY. Function and mechanism exploring of marine microorganisms and their natural products in prevention and treatment of two hepatoma carcinogenic factors[D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2017 (in Chinese).
- [3] 柏凤月, 倪孟祥. 海洋微生物来源的抗菌活性物质研究进展. *化学与生物工程*, 2016, 33(5): 15-19, 25.
Bai FY, Ni MX. Research progress on antimicrobial bioactive substances from marine microorganisms. *Chem Bioeng*, 2016, 33(5): 15-19, 25 (in Chinese).
- [4] 曾维才, 石碧. 天然产物抗氧化活性的常见评价方法. *化工进展*, 2013, 32(6): 1205-1213, 1247.

- Zeng WC, Shi B. Common methods of antioxidant activity evaluation for natural products: a review. *Chem Ind Eng Prog*, 2013, 32(6): 1205-1213, 1247 (in Chinese).
- [5] 付兵, 王美, 刘建阳, 等. 海洋来源杂色曲霉次级代谢产物及其抗植物病原细菌活性. *中国农业科学*, 2020, 53(19): 3964-3974.
- Fu B, Wang M, Liu JY, et al. Secondary metabolites from a marine-derived fungus *Aspergillus versicolor* and their anti-phytopathogenic bacterial activity. *Sci Agric Sin*, 2020, 53(19): 3964-3974 (in Chinese).
- [6] Kurasawa K, Kuwahara S, Enomoto M. Synthesis of bacilosarcins B and C. *Tetrahedron Lett*, 2016, 57(45): 4997-4999.
- [7] Itoh J, Omoto S, Nishizawa N, et al. Chemical structures of amicoumacins produced by *Bacillus pumilus*. *Agric Biol Chem*, 1982, 46(11): 2659-2665.
- [8] Li YX, Xu Y, Liu LL, et al. Five new amicoumacins isolated from a marine-derived bacterium *Bacillus subtilis*. *Mar Drugs*, 2012, 10(12): 319-328.
- [9] Chakraborty K, Thilakan B, Raola VK. Polyketide family of novel antibacterial 7-O-methyl-5'-hydroxy-3'-heptenoate-macrolactin from seaweed-associated *Bacillus subtilis* MTCC 10403. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(50): 12194-12208.
- [10] Jiang SM, Sun W, Chen MJ, et al. Diversity of culturable actinobacteria isolated from marine sponge *Haliclona* sp.. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2007, 92(4): 405-416.
- [11] Chakraborty K, Thilakan B, Raola VK. Polyketide family of novel antibacterial 7-O-methyl-5'-hydroxy-3'-heptenoate-macrolactin from seaweed-associated *Bacillus subtilis* MTCC 10403. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(50): 12194-12208.
- [12] 布坎南(R.E.Buchanan)等编, 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组译. 伯杰细菌鉴定手册. 8版. 北京: 科学出版社, 1984.
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th edition. Beijing: Science Press, 1984 (in Chinese).
- [13] Brennan CA, Garrett WS. *Fusobacterium nucleatum*-symbiont, opportunist and oncobacterium. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17(3): 156-166.
- [14] 彭云, 李舒馨, 俞泽, 等. 一株海洋放线菌的鉴定及其促生作用机理. *微生物学通报*, 2020, 47(11): 3515-3526.
- Peng Y, Li SX, Yu Z, et al. Identification and growth promoting effect of a marine actinomycete. *Microbiol China*, 2020, 47(11): 3515-3526 (in Chinese).
- [15] 王硕, 孟庆丽, 武天娇, 等. 抗金葡菌深海真菌的分离鉴定及抑菌谱研究. *生物技术*, 2015, 25(2): 169-172.
- Wang S, Meng QL, Wu TJ, et al. Isolation, identification and antimicrobial spectrum of deep-sea fungi against *Staphylococcus aureus*. *Biotechnology*, 2015, 25(2): 169-172 (in Chinese).
- [16] 张春秋, 马光恕, 廉华, 等. 木霉对黄瓜幼苗生理特性及枯萎病防治效果的影响. *植物保护*, 2018, 44(5): 238-246.
- Zhang CQ, Ma GS, Lian H, et al. Effect of *Trichoderma* on physiological characteristics of cucumber seedlings and control effect against Fusarium wilt. *Plant Prot*, 2018, 44(5): 238-246 (in Chinese).
- [17] 祁超, 寸海春, 何鹏飞, 等. 生防菌 YN201490 在黄瓜植株体内的定殖能力及防病机制的初步研究. *云南大学学报(自然科学版)*, 2019, 41(1): 172-180.
- Qi C, Cun HC, He PF, et al. Colonization ability in cucumber plant and biocontrol mechanism of *Bacillus subtilis* YN201490. *J Yunnan Univ (Nat Sci Ed)*, 2019, 41(1): 172-180 (in Chinese).
- [18] Han JS, Cheng JH, Yoon TM, et al. Biological control agent of common scab disease by antagonistic strain *Bacillus* sp. Sunhua. *J Appl Microbiol*, 2005, 99(1): 213-221.
- [19] Gamalero E, Berta G, Massa N, et al. Interactions between *Pseudomonas putida* UW4 and *Gigaspora rosea* BEG9 and their consequences for the growth of cucumber under salt-stress conditions. *J Appl Microbiol*, 2010, 108(1): 236-245.
- [20] Glick BR. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol Res*, 2014, 169(1): 30-39.
- [21] 祝久香. 黄瓜枯萎病拮抗细菌的筛选、发酵及生防机理研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2019.
- Zhu JX. Screening and fermentation of antagonistic bacteria against Fusarium wilt of cucumber and its biocontrol mechanism studying[D]. Changsha: Central South University of Forestry & Technology, 2019 (in Chinese).
- [22] 周贝贝. 植物根际促生菌的筛选及其在草莓上的应用研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2018.
- Zhou BB. Screening of plant growth-promoting rhizobacteria and its application in strawberry[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [23] Ortiz A, Sansinenea E. Macrolactin antibiotics:

- amazing natural products. *Mini Rev Med Chem*, 2020, 20(7): 584-600.
- [24] Gustafson K, Roman M, Fenical W. The macrolactins, a novel class of antiviral and cytotoxic macrolides from a deep-sea marine bacterium. *J Am Chem Soc*, 1989, 111(19): 7519-7524.
- [25] Seung-Je L, Cho JY, Cho JI, et al. Isolation and characterization of antimicrobial substance macrolactin A produced from *Bacillus amyloliquefaciens* CHO104 isolated from soil. *J Microbiol Biotechnol*, 2004, 14(3): 525-531.
- [26] Ho KH, Gon KW, Ja RI, et al. Neuronal cell protection activity of macrolactin A produced by *Actinomadura* sp.. *J Microbiol Biotechnol*, 1997, 7(6): 429-434.
- [27] 杨桥, 韩文菊, 张文俊, 等. 产 Macrolactin A 抗生素海洋解淀粉芽孢杆菌的鉴定及发酵条件优化. *药物生物技术*, 2009, 16(4): 311-315, 346.
- Yang Q, Han WJ, Zhang WJ, et al. Identification of a macrolactin A antibiotic-producing marine *Bacillus amylo* JY-863 strain and optimization of its fermentation conditions. *Pharm Biotechnol*, 2009, 16(4): 311-315, 346 (in Chinese).
- [28] Chen L, Wang XH, Liu YP. Contribution of macrolactin in *Bacillus velezensis* CLA178 to the antagonistic activities against *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Arch Microbiol*, 2021, 203(4): 1743-1752.
- [29] Tareq FS, Kim JH, Lee MA, et al. Antimicrobial gageomacrolactins characterized from the fermentation of the marine-derived bacterium *Bacillus subtilis* under optimum growth conditions. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(14): 3428-3434.
- [30] Li W, Tang XX, Yan X, et al. A new macrolactin antibiotic from deep sea-derived bacteria *Bacillus subtilis* B5. *Nat Prod Res*, 2016, 30(24): 2777-2782.
- [31] 李军营, 赵琦琪, 杨超. 云南省烟植地青枯菌 RS-22 的分离及其拮抗菌的筛选和鉴定. *微生物学通报*, 2021, 48(4): 1071-1079.
- Li JY, Zhao QQ, Yang C. Isolation and identification of *Ralstonia solanacearum*-22 and its antagonistic bacteria in tobacco plantations of Yunnan province. *Microbiol China*, 2021, 48(4): 1071-1079 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)