

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (9) :1133 – 1143; 4 September 2015
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi:10.13343/j.cnki.wsxb.20150152

解淀粉芽胞杆菌 BaX030 的分离鉴定及抗菌功能

何浩, 朱颖龄, 迟立庆, 赵子昭, 王婷, 左明星, 张通, 周逢娟, 夏立秋, 丁学知*

湖南师范大学生命科学院, 微生物分子生物学国家重点实验室培育基地, 湖南 长沙 410081

摘要: 【目的】芽胞杆菌是微生物活性物的重要来源, 从全国各地采集的 72 份土壤样品中分离出 339 株芽胞杆菌, 研究各菌株抑菌活性, 分离纯化抑菌活性物, 为丰富芽胞杆菌菌种资源和微生物次级代谢物的挖掘奠定实际应用基础。【方法】采用水浴加热和稀释平板涂布等方法从河南花生地采集的土壤中筛选得到一株具有很强抑菌活性的芽胞杆菌, 结合形态观察、生理生化特征和 16S rRNA 基因序列同源性比对分析, 对该菌株进行鉴定。丙酮沉淀、葡聚糖凝胶柱层析、 C_{18} 反相柱层析得到 *Bacillus amyloliquefaciens* X030 抑菌活性物, LC-MS/MS 鉴定其分子量。利用滤纸片扩散法和平板对峙培养法测定抑菌谱及拮抗性。【结果】筛选分离得到一株解淀粉芽胞杆菌, 归类并命名为解淀粉芽胞杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* X030。BaX030 对金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、白色念珠菌 (*Candida albicans*)、酵母菌 (*Saccharomycetes*) 有较强抑制效果, 对水稻稻瘟病菌 (*Pyriculariaoryzae*)、辣椒尖胞炭疽病菌 (*Chili pointed cell anthrax*)、枇杷炭疽病菌 (*Gloeosporium eriobotryae spg*)、烟草黑胫病菌 (*Phytophthora parasitica*) 有良好拮抗活性。初步确定 BaX030 产生的抑菌活性物为多肽类化合物。【结论】分离得到的 *B. amyloliquefaciens* X030 产生了一个对病原细菌具有较强抑制作用的多肽, 同时该菌株在拮抗植物病原真菌方面也有明显的效果。

关键词: 解淀粉芽胞杆菌, 抑菌, 分离纯化, 多肽

中图分类号: Q939 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 09-1133-11

微生物代谢产物中蕴藏大量潜在的药物资源^[1-3]、食品资源^[4]与生物能源^[5-6], 其中关于抑菌和杀虫方面的微生物新药物研究成果显著, 开发出了一批微生物食品防腐剂^[7]和微生物新农药^[8]。芽胞杆菌是微生物库中活性产物来源最丰富、最重要的菌种之一, 生长周期短, 繁殖速度非常快, 在生长繁殖过程中产生种类繁多的代谢产物。目前, 国内外在芽胞杆菌研究方面进展较快, 筛选出多种具

有抑菌活性的芽胞杆菌, 并通过分离纯化发酵产物得到了一些蛋白类、肽类及生物小分子类物质, 如枯草芽胞杆菌产生抗菌肽 AFP1、AFP2 和 AFP3^[9]; 多粘类芽胞杆菌能产生肽类、蛋白质类、核苷类、吡嗪类和酚类等多种抗菌物质^[10]。芽胞杆菌产生的非蛋白类抑菌活性物在高温、强酸、强碱的环境中活性较稳定, 因此对芽胞杆菌非蛋白类活性物的研究具有重要的理论意义和实际应用前景。

基金项目: 国家自然科学基金 (31370116); 国家“863 计划” (2011AA10A203); 湖南省高校创新平台开放基金项目 (13CY002, 10CY013); 湖南省生物发育工程及新产品研发协同创新中心项目 (20134486); 国家级大学生创新训练项目 (201410542009)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-731-88872298; E-mail: dingxuezhi@hunnu.edu.cn

作者简介: 何浩 (1989 -), 男, 硕士研究生, 主要从事芽胞杆菌代谢活性物的分离纯化与功能研究。E-mail: 787400602@qq.com

收稿日期: 2015-04-01; **修回日期:** 2015-06-29

解淀粉芽胞杆菌在自然界中分布广泛,易分离培养,对人畜无毒无害,不污染环境。具有丰富的自身代谢产物,产生多种抗菌活性物,如抗真菌蛋白^[11]、表面活性素^[12-13]、伊枯草菌素^[14]、几丁质酶^[15]、蛋白酶等,其大多数肽类活性物具有热稳定性、对紫外照射和蛋白酶处理不敏感,耐酸耐碱性等特性。已有研究表明解淀粉芽胞杆菌对植物病原真菌^[16-17]和食物腐败菌致病菌^[18]有很好的抑制效果。目前,越来越多解淀粉芽胞杆菌被应用到动植物病虫害的防治中。

本研究采用水浴加热和稀释平板涂布等方法从土壤中分离得到一株解淀粉芽胞杆菌,结合形态观察、生理生化特征和16S rRNA基因序列同源性分析对该菌进行分类鉴定;探索抑菌谱,分离鉴定抑菌活性物,为解淀粉芽胞杆菌抑菌机理研究与生物防治应用奠定重要基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 土样和目的菌株:通过多点取样法从河南花生地中采集土样,筛选得到解淀粉芽胞杆菌 BaX030。

1.1.2 供试菌株:产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)、枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、酵母菌(*Saccharomyces*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、水稻稻瘟病菌(*Pyricularia oryzae*)本实验室保藏。辣椒尖胞炭疽病菌(*Chili pointed cell anthrax*)、枇杷炭疽病菌(*Gloeosporium eriobotryae speg*)、黄瓜疫霉病菌(*Cucumber phytophthora bacteria*)、烟草黑胫病菌(*Phytophthora parasitica*)、油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)湖南农业大学植物病理学实验室惠赠。

1.1.3 培养基:LB培养基^[19]、PDA培养基^[20]。

1.2 菌株分离

参照 Grundmann 等^[21]菌株分离方法进行。

1.3 菌株鉴定

1.3.1 形态观察:菌株 BaX030 接种到 LB 平板上,30 ℃ 培养 48 h,观察菌落形态,并接种到 LB 液体培

养基中,30 ℃、180 r/min,培养 48 h,在培养过程中观察色素产生和菌体的生长。从固体平板上挑单菌落,进行革兰氏染色并观察细菌形态;收集 12 h 和 48 h 菌体,双蒸水洗 10 次,戊二醛固定后在扫描电镜下观察菌体形态和芽胞。

1.3.2 生理生化特征观察:参照《常见细菌系统鉴定手册》^[22]方法进行。

1.3.3 16S rRNA 基因扩增测序与构建系统发育树:以实验室已有 16S rRNA 基因通用引物,对各分离菌株进行菌落 PCR 扩增 16S rDNA,16S_F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 16S_R: 5'-ACGGCTACCTGTACGACTT-3' 扩增总体积 100 μL,94 ℃ 4 min,94 ℃ 0.5 min,52 ℃ 0.5 min,72 ℃ 1.5 min,进行 30 个循环,72 ℃ 10 min。PCR 产物进行回收(用北京百泰克生物技术有限公司多功能 DNA 纯化回收试剂盒),pMD18-T 载体连接,上海英骏生物技术有限公司完成测序。从 EzTaxon-e 数据库中获取与分离菌株亲源关系较近的模式菌株 16S rRNA 基因,结合在 GenBank 中经 BLAST 获取到的菌株 16S rRNA 基因,运用 MEGA 4.1 的 Kimura-2-Parameter 模型,采用邻接法(N-J)构建系统发育树(Replications = 1000,Bootstrap 值取百分比)。

1.4 生物活性测定

1.4.1 抑制病原细菌:滤纸片法检测 BaX030 对产气肠杆菌、枯草芽胞杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌、酵母菌、鼠伤寒沙门氏菌和绿脓杆菌的抑菌效果。BaX030 48 h 发酵上清液(8000 × g 离心 30 min,过 0.22 μm 滤膜处理)分别经温度梯度 40、60、80、100 ℃ 处理 1 h,121 ℃ 处理 30 min 后各取 5 μL 用于抑菌试验。pH 梯度 1、3、5、7、9、10、13 处理 1 h 后调 pH 至中性,各取 5 μL 用于抑菌试验。蛋白酶 K 和胰蛋白酶分别处理 1 h 后各取 5 μL 用于抑菌试验。48 h 发酵上清液经体积排阻色谱层析和 C₁₈ 反相高效液相色谱纯化后收集各组分进行抑菌试验。用游标卡尺检测抑菌效果:抑菌圈半径(mm) = 抑菌圈半径(mm) - 滤纸片半径(mm)。

1.4.2 拮抗植物病原真菌:采用平板对峙培养法,在 PDA 平板中心位置接种直径为 6 mm 的植物病原真菌菌落(水稻稻瘟病菌菌丝、辣椒尖胞炭疽病菌菌丝、枇杷炭疽病菌菌丝、黄瓜疫霉病菌菌丝、水稻纹枯病菌菌丝、油菜菌核病菌菌丝和烟草黑胫病菌菌丝),距离中心两侧各 2 cm 处加 5 μL 菌液,28 ℃

倒置培养 5–10 d, 与对照组比较观察病原真菌生长效果。对峙培养 10 d 后, 相差显微镜观察病原真菌菌丝和孢子与 BaX030 之间的相互作用。

1.4.3 抑菌活性物的分离与鉴定: 丙酮沉淀 BaX030 48 h 发酵上清液 (发酵上清液与丙酮按 1:4 的体积混合均匀后 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置过夜), 取上清, 冻干 (冷冻干燥浓缩仪), 双蒸水溶解, 蛋白质纯化仪 (葡聚糖凝胶柱 Superdex 200) 分离 (流动相: 水, 流速: 0.5 mL/min , 上样量: 1 mL , 时间: 80 min), 安捷伦 1290 超高效液相色谱 (ZORBAX SB-C₁₈ $4.6\text{ mm} \times 150\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$) 纯化 (流动相: 水和甲醇, 流速: 1 mL/min , 上样量: $20\text{ }\mu\text{L}$, 时间: 14 min), 对活性组分进行 LC-MS/MS 鉴定 (表 1)。

2 结果和分析

2.1 菌株鉴定

2.1.1 形态特征: 分离得到一个革兰氏染色呈阳性的菌株 BaX030。LB 液体培养基中培养 12 h, 菌液呈菊红色。LB 平板上, 菌落圆形扁平, 边缘整齐, 干燥, 易挑起, 后期呈白色。相差显微镜观察 (图 1-A,

图 1-B), 该菌体为杆状产芽胞细菌; 扫描电镜观察 (图 1-C, 图 1-D), 细菌大小约为 $1.00\text{ }\mu\text{m} \times 2.00\text{ }\mu\text{m}$, 培养 12 h 菌体呈短杆状, 培养 24 h 菌体呈长杆状伴随有芽胞的产生。

表 1. 抑菌活性组分 UHPLC (超高效液相色谱) 梯度洗脱程序

Table 1. UHPLC gradient elution procedure of the antimicrobial active component

<i>t</i> /min	<i>c</i> (H ₂ O) /%	<i>c</i> (methanol) /%
0	95	5
4	50	50
7	20	80
10	0	100
12	0	100
13	95	5
14	95	5

2.1.2 生理生化特征: 分离的菌株符合解淀粉芽胞杆菌的生理生化基本特征, 不利用刚果红和蔗糖, 不降解酪素, 能水解淀粉、过氧化氢和吐温 80, 能使明胶液化, 能还原硝酸盐, 吲哚和甲基红试验

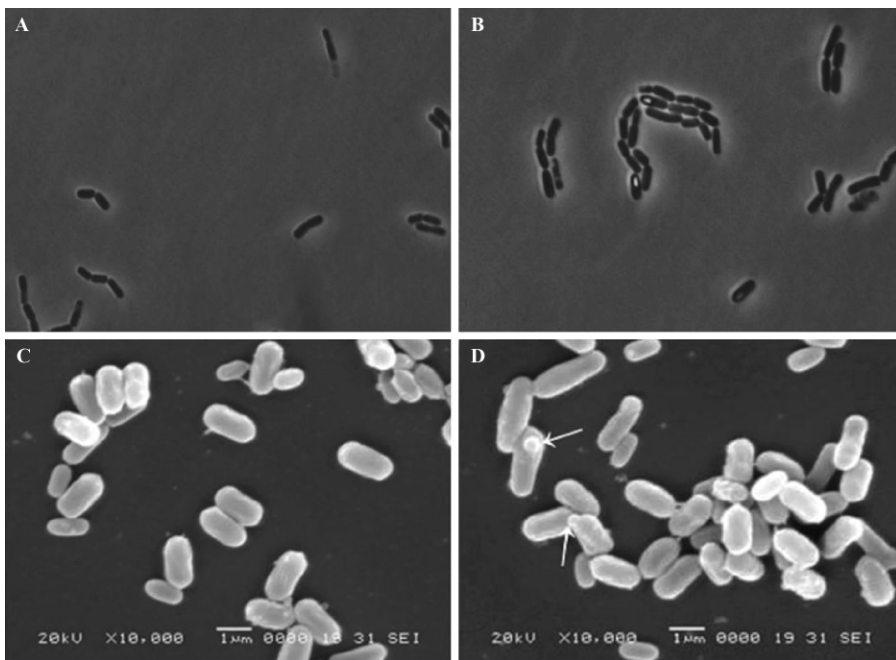


图 1. BaX030 菌株形态观察

Figure 1. The morphology of BaX030 strain. A: The scanning phase contrast microscope that BaX030 strain were cultured 12 hours; B: The scanning phase contrast microscope that BaX030 strain were cultured 24 hours; C: The scanning electron microscopy that BaX030 strain were cultured 12 hours; D: The scanning electron microscopy that BaX030 strain were cultured 24 hours.

呈阴性, V-P 试验和柠檬酸盐试验呈阳性, 糖发酵试验(葡萄糖)产气不产酸, 糖发酵试验(乳糖)不产气不产酸。

2.1.3 系统发育树的构建: 分离菌株 BaX030 16S rRNA 基因序列长度为 1513 bp, NCBI 上经 BLAST 分析发现该菌株属于芽胞杆菌属, 分别与 *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 (CP006890.1)、*Bacillus amyloliquefaciens* UCMB5033 (HG328253.1)、*Bacillus amyloliquefaciens* BCRC 17038 (DQ993675.1)、*Bacillus amyloliquefaciens* FZB42

(CP000560.1)、*Bacillus amyloliquefaciens* CC178 (CP006845.1)、*Bacillus amyloliquefaciens* UCMB5113 (HG328254.1)、*Bacillus amyloliquefaciens* M7J (AB735985.1) 等的相似性最高, 均为 99%, 利用 MRGA 4.1 的 Kimura-2-Parameter 模型, 运用邻接法 (NJ) 构建系统发育树, 如图 2 所示。根据 BLAST 所得结果推测该菌株属于 *Bacillus amyloliquefaciens* 亚种, 命名为 *Bacillus amyloliquefaciens* X030。该菌株 16S rRNA 基因序列在 GenBank 上获得的登录号为: KM191359.1。

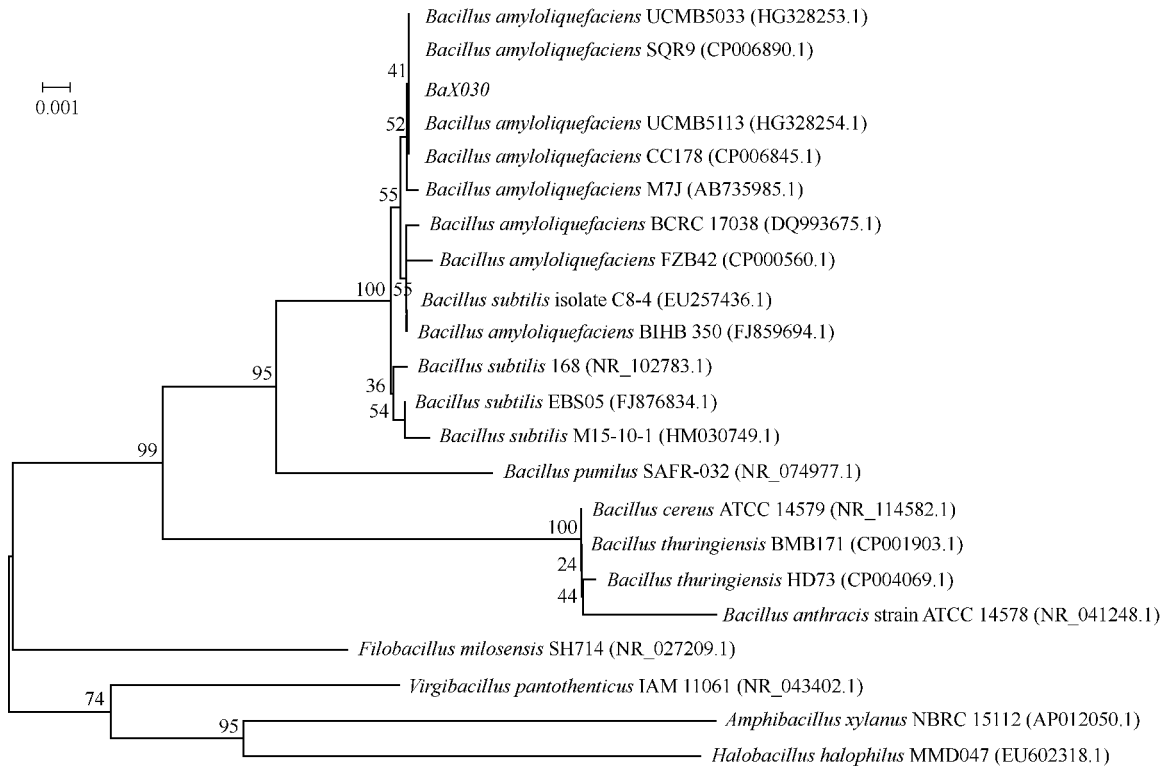


图 2. 根据 16S rRNA 基因序列构建系统发育进化树

Figure 2. The phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences. The numbers on branches indicate bootstrap values. The tree rooted was constructed by Kimura-2-Parameter model and N-J method with bootstrap values calculated from 1000 resampling. The numbers at each node that indicate the percentage of bootstrap supporting. The numbers in the brackets followed each bacterial name are 16S rDNA sequence accession numbers in GenBank.

2.2 生物活性测定

2.2.1 抑制细菌生长活性: 抑菌结果表明(表 2) 菌株 BaX030 48 h 发酵上清液对金黄色葡萄球菌、白色念珠菌、酵母菌有抑制效果, 其抑菌活性随温度的升高整体改变较大, 低于 80 °C 时保持较高活性, 高于 80 °C 时, 活性几乎呈线性

降低; pH 中性条件下抑菌活性最好, 强酸环境中活性保持较好, 碱性环境中活性逐步降低; 蛋白酶 K 与胰蛋白酶处理后活性丧失明显, 抑菌圈半径都小于 4.5000 mm。对产气肠杆菌、枯草芽胞杆菌、鼠伤寒沙门氏菌和绿脓杆菌无抑菌活性。

表 2. 抑制细菌生长的抑菌圈半径 (mm)
Table 2. The semidiameter of inhibition zone (mm)

T/°C	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Saccharomycetes</i>
25	6.0221 ± 0.05274	5.3302 ± 0.07090	1.7269 ± 0.03254
40	4.6803 ± 0.07406	5.0413 ± 0.03319	2.3214 ± 0.01453
60	4.8812 ± 0.01535	4.5403 ± 0.05607	1.8403 ± 0.08034
80	4.6105 ± 0.08613	3.2042 ± 0.01679	1.8455 ± 0.02219
100	3.3833 ± 0.04392	3.0958 ± 0.02568	1.6405 ± 0.09010
121	2.5840 ± 0.06205	2.5873 ± 0.04343	0.5753 ± 0.01524
pH			
1	5.1298 ± 0.08396	4.3408 ± 0.03836	1.0697 ± 0.09421
3	5.8805 ± 0.03613	5.2451 ± 0.04035	1.2375 ± 0.09268
5	5.0074 ± 0.08236	3.7825 ± 0.07651	0.5488 ± 0.05587
7	5.3125 ± 0.07094	5.5305 ± 0.01092	2.3108 ± 0.03026
9	4.3547 ± 0.02956	3.8453 ± 0.09834	1.6659 ± 0.06988
11	3.1608 ± 0.09416	1.9414 ± 0.08913	0.2203 ± 0.05526

Means and standard deviation in the column according to SPSS.

2.2.2 拮抗植物病原真菌：由水稻稻瘟病菌、辣椒尖胞炭疽病菌、枇杷炭疽病菌与烟草黑胫病菌在平

板上的生长情况可知，菌株 BaX030 对以上 4 种植物病原真菌都具有较好的拮抗作用（图 3），培养

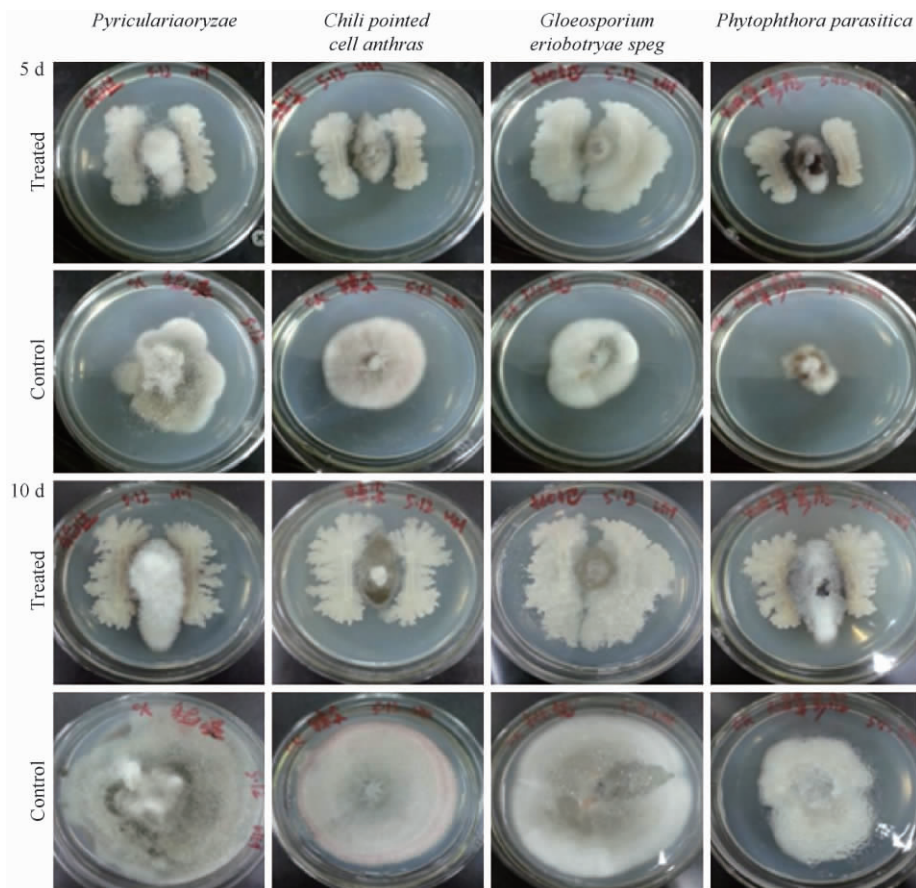


图 3. BaX030 菌株对植物病原菌的拮抗作用

Figure 3. The antagonistic action of strain BaX030 against phytopathogen. Representative photographs showed BaX030 and *Pyriculariaoryzae*, *Chili pointed cell anthrax*, *gloeosporium eriobotryae spg*, *phytophthora parasitica* confrontation cultured 5 days and 10 days of each phytopathogen growth situation. The results showed that the strain has a very significant effect on *Chili pointed cell anthrax* and *gloeosporium eriobotryae spg*.

5 d, 对照组植物病原真菌形成直径约 35 mm 的圆形菌落, 实验组植物病原真菌生长受到抑制; 培养 10 d, 对照组植物病原真菌长满整个平皿, 实验组 BaX030 在辣椒尖胞炭疽病菌与枇杷炭疽病菌周围形成环状包围圈, 在水稻稻瘟病菌与烟草黑胫病菌两侧抑制作用也非常明显。BaX030 对黄瓜疫霉病菌、水稻纹枯病菌、油菜菌核病菌无明显的拮抗作用。

相差显微镜下观察水稻稻瘟病菌、辣椒尖胞炭疽病菌、枇杷炭疽病菌、烟草黑胫病菌分别与

BaX030 之间的相互作用, 结果显示: 辣椒尖胞炭疽病菌对照组中孢子形态正常(图 4-A), 受 BaX030 拮抗后, 4 d 部分孢子颜色变深(图 4-C), 6 d 孢子颜色变深、内含物减少(图 4-D); 8 d 孢子出现不同程度的破裂(图 4-E-1), 内含物在孢子外大量出现(图 4-E-2); 10 d 辣椒尖胞炭疽病菌与 BaX030 菌体接触, 接触部位细菌将孢子包围且孢子大小与形态发生明显变化, 孢子数量也显著减少(图 4-F)。水稻稻瘟病菌、枇杷炭疽病菌、烟草黑胫病菌产生的分生孢子与 BaX030 相互作用不明显。

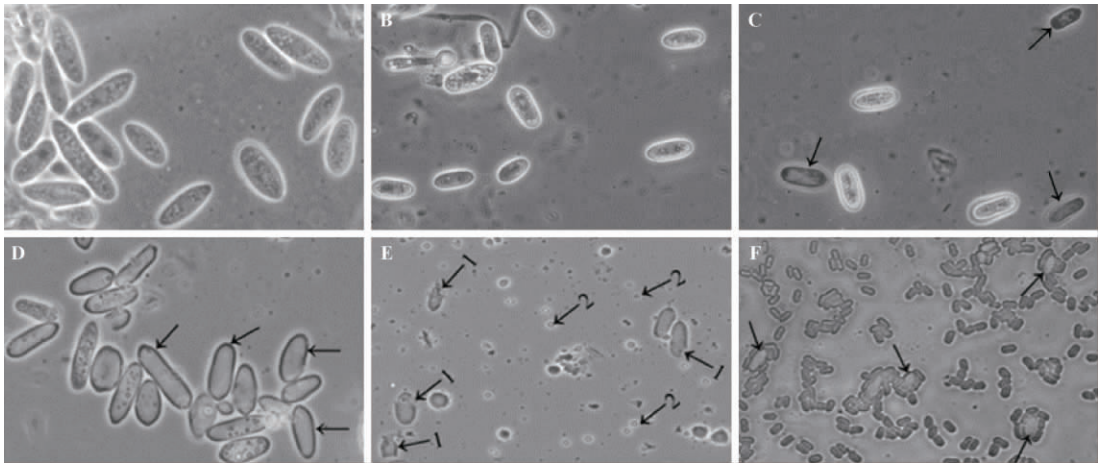


图 4. BaX030 菌株对辣椒尖胞炭疽病菌孢子的影响

Figure 4. The inhibitory effect of strain BaX030 against *Chili pointed cell anthrax* spores. A: The spore morphology of *Bacillus amyloliquefaciens* without antagonistic action (1000 ×); B: The spore morphology of *Bacillus amyloliquefaciens* cultured 2 d with antagonistic action (1000 ×); C: The spore morphology of *Bacillus amyloliquefaciens* cultured 4 d with antagonistic action (1000 ×); D: The spore morphology of *Bacillus amyloliquefaciens* cultured 6 d with antagonistic action (1000 ×); E: The spore morphology of *Bacillus amyloliquefaciens* cultured 8 d with antagonistic action (1000 ×); F: The spore morphology of *Bacillus amyloliquefaciens* cultured 10 d with antagonistic action (1000 ×).

2.3 抑菌活性物的分离与鉴定

丙酮沉淀 BaX030 代谢产物获得抗菌活性粗提物, 经葡聚糖凝胶柱层析得到 A1、A2、A3、A4 四个洗脱峰(图 5), 分别对金黄色葡萄球菌和白色念珠菌进行抑菌实验, 结果显示, 洗脱峰 A2 有较强抑菌活性; 收集洗脱峰 A2, 利用 C₁₈ 反相柱进一步纯化, 得到抗菌活性组分 B2(图 6); LC-MS/MS 分析结果显示, 抗菌活性物 B2 纯度较高, 其检测时间为 2.18 min, 分子量大小 182.09 Da, 二级质谱主要片段分子量大小为 103.36、119.16、136.09、147.16、165.06 Da 等(图 7)。

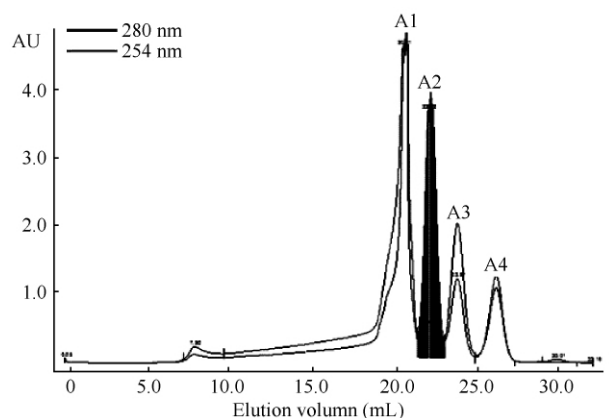


图 5. BaX030 发酵上清液葡聚糖凝胶分离

Figure 5. The antibacterial activity of strain BaX030 fermentation supernatant with purification each component.

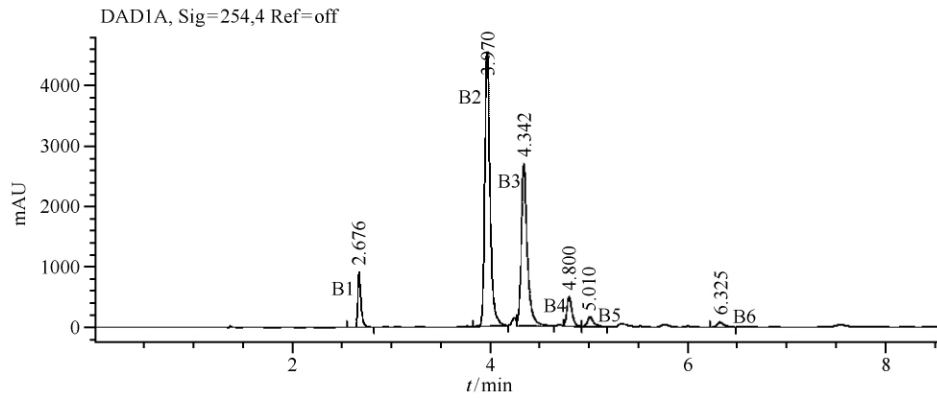


图 6. 超高效液相色谱分离纯化活性组分

Figure 6. The purity of the active component by high performance liquid chromatography.

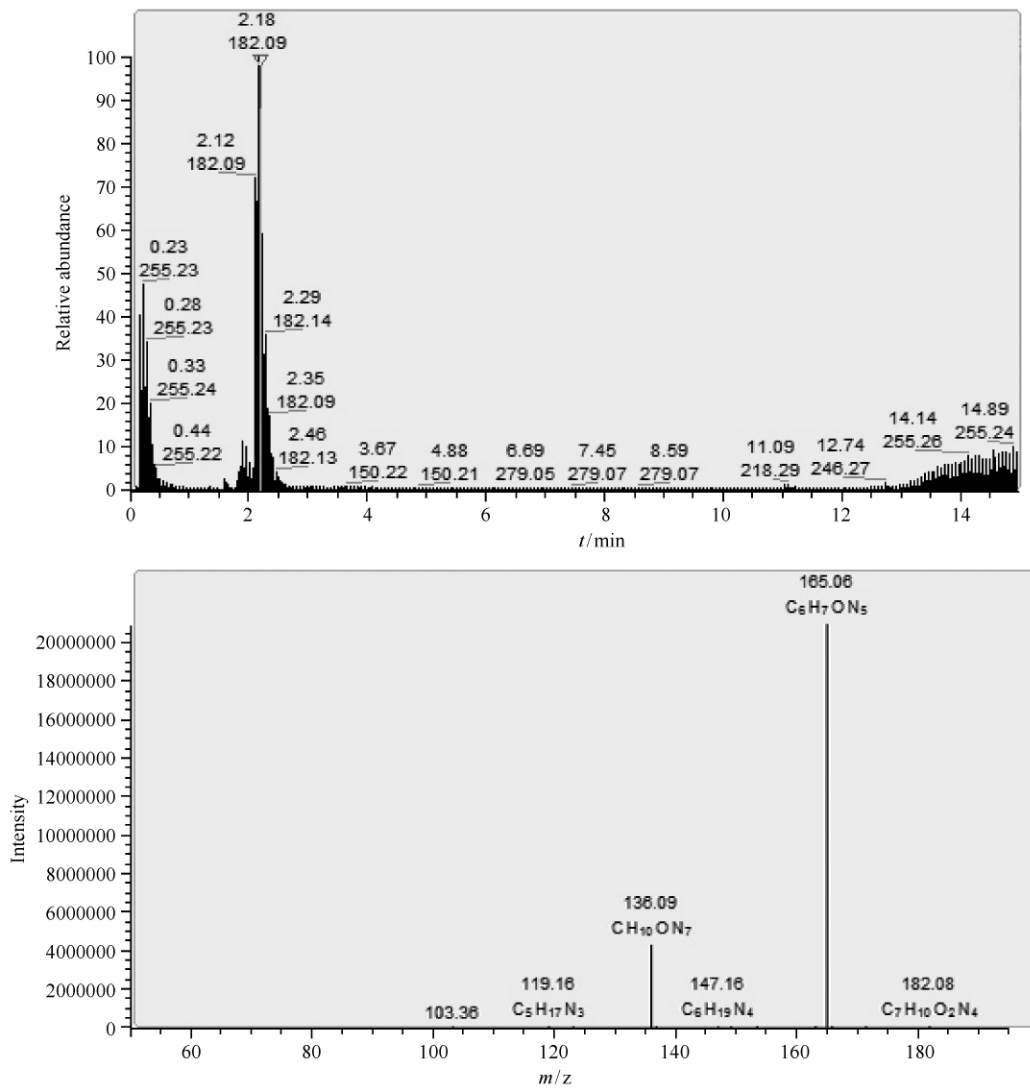


图 7. 抗菌组分 B2 的质谱鉴定

Figure 7. The identification of components B2.

3 讨论

解淀粉芽胞杆菌作为重要的生防细菌,其活性范围非常广,然而,大部分亚种抑菌谱较窄,单个菌株不能同时对病原性真菌、致病性细菌和线虫有活性,如解淀粉芽胞杆菌 WH1、SQR9^[23]、PPCB004^[24] 等对植物病原真菌有较强抑制活性,解淀粉芽胞杆菌 RC-2^[25] 与 MET0908^[26] 对炭疽病菌拮抗效果明显,解淀粉芽胞杆菌 R3 对大肠杆菌所有菌群有抑制作用^[27],解淀粉芽胞杆菌 Es-2 能抑制虾仁腐败希瓦菌的生长^[28]。本研究从 339 株芽胞杆菌中筛选出一株抑菌活性最强的解淀粉芽胞杆菌,该菌株经 16S rRNA 基因同源比对分析,结合生理生化特征鉴定等确定为一株解淀粉芽胞杆菌新菌株,命名为 *Bacillus amyloliquefaciens* X030。BaX030 菌株抑菌谱广,对金黄色葡萄球菌、白色念珠菌、酵母菌有抑制作用,对水稻稻瘟病菌、辣椒尖胞炭疽病菌、枇杷炭疽病菌、烟草黑胫病菌拮抗效果明显,具有潜在的应用前景。BaX030 与植物病原真菌对峙培养过程中发现,BaX030 对辣椒尖胞炭疽病菌孢子产生了明显抑制作用,随着培养时间推移,孢子出现变黑,内含物释放和裂解等现象。当前关于生防菌植物病虫害防治的机制研究较少,对植物病原真菌孢子的作用机制研究未见报道,本研究发现的这一独特现象为进一步研究生防菌对植物病原菌作用机理提供了新方向。

目前,色谱技术已被大量应用于细菌代谢产物的分离,如^[29] Pradip Kumar Singh 等利用液相色谱分离芽胞杆菌细菌素,Manns DC^[30] 等运用色谱技术获得苏云金芽胞杆菌 SF361 菌株抗真菌蛋白 YvgO。代谢产物常用色谱分离方法为离子交换色谱层析-C₁₈反相色谱层析-葡聚糖凝胶色谱层析。本研究分离方法与常用分离方法在色谱利用顺序上有所调整,先采用葡聚糖凝胶色谱(Superdex 200)层析初步分离发酵上清液,去除发酵上清液中的大分子;再经 C₁₈反相色谱(ZORBAX SB-C₁₈ 4.6 mm × 150 mm, 5 μm)层析将物质按极性强弱分开,得到极性较强的活性组分 B2。LC-MS/MS 鉴定显示,B2

为纯度较高的活性物,分子量 182.09 Da。对于上述抑菌活性物分离方法的建立和分子量的确定,为后续大量制备活性物质,进一步解析活性物分子结构奠定了基础。

BaX030 抑菌研究表明,产生的抑菌活性物对高温、强碱和蛋白酶敏感,对强酸不敏感,这与朱晓飞等研究的解淀粉芽胞杆菌 YB-3 产生的多肽类抗菌物质理化性质相似^[31];抗菌活性物大小为 182.09 Da,与解淀粉芽胞杆菌 Q-426 产生的环二肽类化合物分子量相近^[32]。因此,推测 BaX030 产生的抗菌活性物可能是一种多肽。该活性物的大批量分离纯化及抑制机理有待后续进一步研究。

参考文献

- [1] Bhattacharyya S, Gupta P, Banerjee G, Jain A, Singh M. Inhibition of biofilm formation and lipase in *Candida albicans* by culture filtrate of *Staphylococcus epidermidis* in vitro. *International Journal of Applied Basic Medical Research*, 2014, 4 (1): 27-30.
- [2] Chinembiri TN, du Plessis LH, Gerber M, Hamman JH, du Plessis J. Review of natural compounds for potential skin cancer treatment. *Molecules*, 2014, 19 (8): 11679-11721.
- [3] Roh C, Kang C. Production of anti-cancer agent using microbial biotransformation. *Molecules*, 2014, 19 (10): 16684-16692.
- [4] Rodrigo Otávio Miranda, Gabriel Gama Neto, Rosangela de Freitas, Antônio Fernandes de Carvalho, Luís Augusto Nero. Enumeration of bifidobacteria using Petrifilm™ AC in pure cultures and in a fermented milk manufactured with a commercial culture of *Streptococcus thermophilus*. *Food Microbiology*, 2011, 28 (8): 1509-1513.
- [5] Solli L, Håvelsrud OE, Horn SJ, Rike AG. A metagenomic study of the microbial communities in four parallel biogas reactors. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7 (1): 146.
- [6] Dong Y, Sanford RA, Locke RA 2nd, Cann IK, Mackie RI, Fouke BW. Fe-oxide grain coatings support bacterial Fe-reducing metabolisms in 1.7 - 2.0 km-deep subsurface quartz arenite sandstone reservoirs of the Illinois Basin (USA). *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 511.
- [7] Jagannath A, Kumar M, Raju PS, Batra HV. Nisin based

- stabilization of novel fruit and vegetable functional juices containing bacterial cellulose at ambient temperature. *Journal of Food Science and Technology*, 2014, 51 (6) : 1218-1222.
- [8] Ding XZ, Luo ZH, Xia LQ, Gao BD, Sun YJ, Fu ZJ, Liu F, Hu SB, Mo XT, Zhang YM. Cloning and expression of the cryIAc-tchiB fusion gene from *Bacillus thuringiensis* and tobacco and its insecticidal synergistic effect. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47 (6) : 1002-1008. (in Chinese)
- 丁学知, 罗朝晖, 夏立秋, 高必达, 孙运军, 付祖姣, 刘飞, 胡胜标, 莫湘涛, 张友明. 苏云金芽胞杆菌 cryIAc 与烟草几丁质酶 tchiB 双价基因克隆表达及其杀虫增效作用研究. *微生物学报*, 2007, 47 (6) : 1002-1008.
- [9] Lv SJ, Fang HH, Liu J, Wang ML. The Study of antagonism of *Bacillus subtilis* JA-206 against dermatophytes. *Acta Laser Biology Sinica*, 2007, 16 (5) : 636-639. (in Chinese)
- 吕树娟, 方海红, 刘静, 王明丽. 枯草芽胞杆菌 JA-206 对皮肤癣菌抑制作用的研究. *激光生物学报*, 2007, 16 (5) : 636-639.
- [10] Zhang HY, Jin Y, Li J, Chen LY, Cui BA. Determination of antibiotic and cellulose enzyme activity of *Bacillus*. *Chinese Journal of Microecology*, 2009, 21 (9) : 801-803. (in Chinese)
- 张红英, 金钺, 李娟, 陈丽颖, 崔保安. 芽胞杆菌抗菌活性和纤维素酶活性的测定. *中国微生态学杂志*, 2009, 21 (9) : 801-803.
- [11] Kim PI, Bai H, Bai D, Chae H, Chung S, Kim Y, Park R, Chi YT. Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, 97 (5) : 942-949.
- [12] Mikkola R, Andersson MA, Grigoriev P, Teplova VV, Saris NE, Rainey FA, Salkinoja-Salonen MS. *Bacillus amyloliquefaciens* strains isolated from moisture-damaged buildings produced surfactin and a substance toxic to mammalian cells. *Archives of Microbiology*, 2004, 181 (4) : 314-323.
- [13] Souto GI, Correa OS, Montecchia MS, Kerber NL, Pucheu NL, Bachur M, García AF. Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, 97 (6) : 1247-1256.
- [14] Hiradate S, Yoshida S, Sugie H, Yada H, Fujii Y. Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2. *Phytochemistry*, 2002, 61 (6) : 693-698.
- [15] Wang SL, Hsiao WJ, Chang WT. Purification and characterization of an antimicrobial chitinase extracellularly produced by *Monascus purpureus* CCRC31499 in a shrimp and crab shell powder medium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50 (8) : 2249-2255.
- [16] Arrebola E, Jacobs R, Korsten L. Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 108 (2) : 386-395.
- [17] Luo XY, Zeng XJ, Xiao YH, Luo M, Yang XY, Pei Y. Overexpression of antimicrobial peptide genes and a chitinase gene in transgenic tobacco enhances resistance to *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* and *Alternaria alternata*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2005, 35 (3) : 249-255. (in Chinese)
- 罗小英, 曾雪嘉, 肖月华, 罗明, 杨星勇, 裴炎. 抗菌肽和几丁质酶基因提高烟草对黑胫病菌和赤星病菌的抗性研究. *植物病理学报*, 2005, 35 (3) : 249-255.
- [18] Liu ChJ, Quan CS, Fan SD, Wang JH. Properties of an antimicrobial substance from lactobacillus paraplantarum and application of the fermented solution on pork preservation. *Food Research and Development*, 2009, 30 (8) : 152-155. (in Chinese)
- 刘长建, 权春善, 范圣第, 王军华. 类植物乳杆菌抑菌物质的性质及其在猪肉保鲜中的作用. *食品研究与开发*, 2009, 30 (8) : 152-155.
- [19] Grundmann F, Dill V, Dowling A, Thanwisai A, Bode E, Chantratita N, Ffrench-Constant R, Bode HB. Identification and isolation of insecticidal oxazoles from *Pseudomonas* spp.. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 2012, 8 : 749-752.
- [20] Yang QX, Xie YS, Zhang H, Li XM. Isolation, identification and antagonism on microorganisms and cancer cells by active endophytes from *Rehmannia glutinosa* libosch. *Microbiology China*, 2010, 37 (10) : 1467-1474. (in Chinese)

- 杨清香, 谢永生, 张昊, 李学梅. 怀地黄活性内生菌的分离鉴定及抗菌抗肿瘤活性. 微生物学通报, 2010, 37 (10) : 1467-1474.
- [21] Wang F, Grundmann S, Schmid M, Dörfler U, Roherer S, Charles Munch J, Hartmann A, Jiang X, Schroll R. Isolation and characterization of 1, 2, 4-trichlorobenzene mineralizing *Bordetella* sp. and its bioremediation potential in soil. *Chemosphere*, 2007, 67 (5) : 896-902.
- [22] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 1999: 320-418.
- [23] Li B, Li Q, Xu Z, Zhang N, Shen Q, Zhang R. Responses of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to different soilborne fungal pathogens through the alteration of antifungal compounds production. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5:1-10.
- [24] Arrebola E, Jacobs R, Korsten L. Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 108 (2) : 386-395.
- [25] Hiradate S, Yoshida S, Sugie H, Yada H, Fujii Y. Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2. *Phytochemistry*, 2002, 61 (6) : 693-698.
- [26] Kim PI, Chung KC. Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 234 (1) : 177-183.
- [27] Chi Z, Rong YJ, Li Y, Tang MJ, Chi ZM. Biosurfactins production by *Bacillus amyloliquefaciens* R3 and their antibacterial activity against multi-drug resistant pathogenic *E. coli*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2014, 38 (5) : 853-861.
- [28] Liu H, Sun L, Wang Y, Lei X, Xu D. Modeling antimicrobial activity of lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2 against *Shewanella putrefaciens* in shrimp meat using a response surface method. *Journal of Food Protection*, 2012, 75 (10) :1855-1868.
- [29] Singh PK, Chittipurna, Ashish, Sharma V, Patil PB, Korpole S. Identification, purification and characterization of laterosporulin, a novel bacteriocin produced by *Brevibacillus* sp. strain GI-9. *PLoS One*, 2012, 7 (3) :e31498.
- [30] Manns DC, Churey JJ, Worobo RW. Functional assignment of YvgO, a novel set of purified and chemically characterized proteinaceous antifungal variants produced by *Bacillus thuringiensis* SF361. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78 (8) :2543-2552.
- [31] Zhu XF, Zhang XX, Niu YC, Hu YS, Yan YC, Wang HS. Isolation and identification of a *Bacillus amyloliquefaciens* YB-3 against *Rhizoctonia solani*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51 (8) : 1128-1133. (in Chinese)
朱晓飞, 张晓霞, 牛永春, 胡元森, 闫艳春, 王海胜. 一株抗水稻纹枯病菌的解淀粉芽孢杆菌分离与鉴定. 微生物学报, 2011, 51 (8) : 1128-1133.
- [32] 王建华, 权春善, 王雪, 赵朋超, 范圣第. 解淀粉芽孢杆菌 Q-426 中天然环二肽的发现及其性质的初步研究. 第六届全国化学工程与生物化工年会论文集, 2010.

Screening and antibacterial function of *Bacillus amyloliquefaciens* X030

Hao He, Yingling Zhu, Liqing Chi, Zizhao Zhao, Ting Wang, Mingxing Zuo, Tong Zhang, Fengjuan Zhou, Liqiu Xia, Xuezhi Ding*

State Key Laboratory Breeding Base of Microbial Molecular Biology, College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan Province, China

Abstract: [Objective] We isolated 339 bacillus strains from 72 soil samples all over the country, then purified their antimicrobial compounds and studied the antibacterial activity, to enrich bacillus resources and explore their second metabolites. [Methods] A bacillus strain with strong antibacterial activity was selected by dilution plate and water bath heating from a soil sample from a peanut plantation in Henan Province; this strain was identified according to morphological observation, physiological and biochemical characteristics, and consequences of 16S rRNA homologous analysis. Antibacterial compound from the identified strain, *Bacillus amyloliquefaciens* X030, was separated and purified by acetone precipitation, Sephadex chromatography, C₁₈ reverse phase column chromatography. Its molecular weight was analyzed by LC-MS/MS. The antibacterial activity was characterized by disc diffusion and plate two-way cultivation.

[Results] *Bacillus amyloliquefaciens* was isolated that not only has antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Candida albican* and *Saccharomycetes*; but also against *Pyriculariaoryzae*, *Chili pointed cell anthrax*, *Gloeosporium eriotryae speg* and *Phytophthora parasitica*. The compound was confirmed as polypeptide. [Conclusion] *Bacillus amyloliquefaciens* X030 can produce a polypeptide that inhibits pathogenic bacteria and plant pathogenic fungi.

Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens*, antibacterial, purification, polypeptide

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31370116), by the National High Technology Research and Development program (863) of China (2011AA10A203), by the Key Project of Hunan Provincial Education Department (13CY002, 10CY013), by the Cooperative Innovation Center of Engineering and New Products for Developmental Biology of Hunan Province (20134486) and by Training Plan to Innovation and Enterprise of National University Students (201410542009)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-731-88872298; E-mail: dingxuezhi@hunnu.edu.cn

Received: 1 April 2015/Revised: 29 June 2015