



海南大学  
HAINAN UNIVERSITY



# 芽孢杆菌HAB-2活性成分分离鉴定与抑菌机理研究



靳鹏飞

[jinpengfei@hainanu.edu.cn](mailto:jinpengfei@hainanu.edu.cn)



化学农药是保障粮食生产的重要农业物资，每年能挽回大量的农作物损失。但大量化学农药的使用，引起了众多的环境、农产品质量安全以及大量的抗药性强的病原菌株等一系列的社会和环境问题，农药是一把双刃剑，它在保障人类获得丰厚农产品的同时，也给环境和生态带来了严重的污染与危害(卜元卿等，2014)。

随着人们认识的进步，在安全、环保、绿色农药的理念指引下，催生了绿色环保的生物农药的研发进程。生物防治是目前最有效最环保清洁的病害的治理方式之一，人们逐渐接受了利用生物与生物之间相互作用的方式作为防治病虫害的方法（Pierre, 2000; Wagner, 1999）。**因此绿色农药生物防治值得深入研究。**





生防菌的类型繁多，目前主要应用的有细菌、真菌和放线菌等，其中生防细菌主要是由**芽孢杆菌属** (*Bacillus spp.*)和假单胞菌属 (*Pseudomonas spp.*) 的一些亚种组成(秦刚等, 2012)。

在美国，3 株枯草芽孢杆菌(**GBO3、MBI600、QST713**)和1株解淀粉芽孢杆菌(**FZB24**)获得环保局(EPA)商品化或有限商品化生产应用许可。

德国将解淀粉芽孢杆菌菌株**FZB42**用于微生物肥料，将解淀粉芽孢杆菌菌株**CECT 5940**作为饲料添加剂。

日本，东京技术研究所利用**枯草芽孢杆菌RB14**和**NB22**防治**番茄病害**。



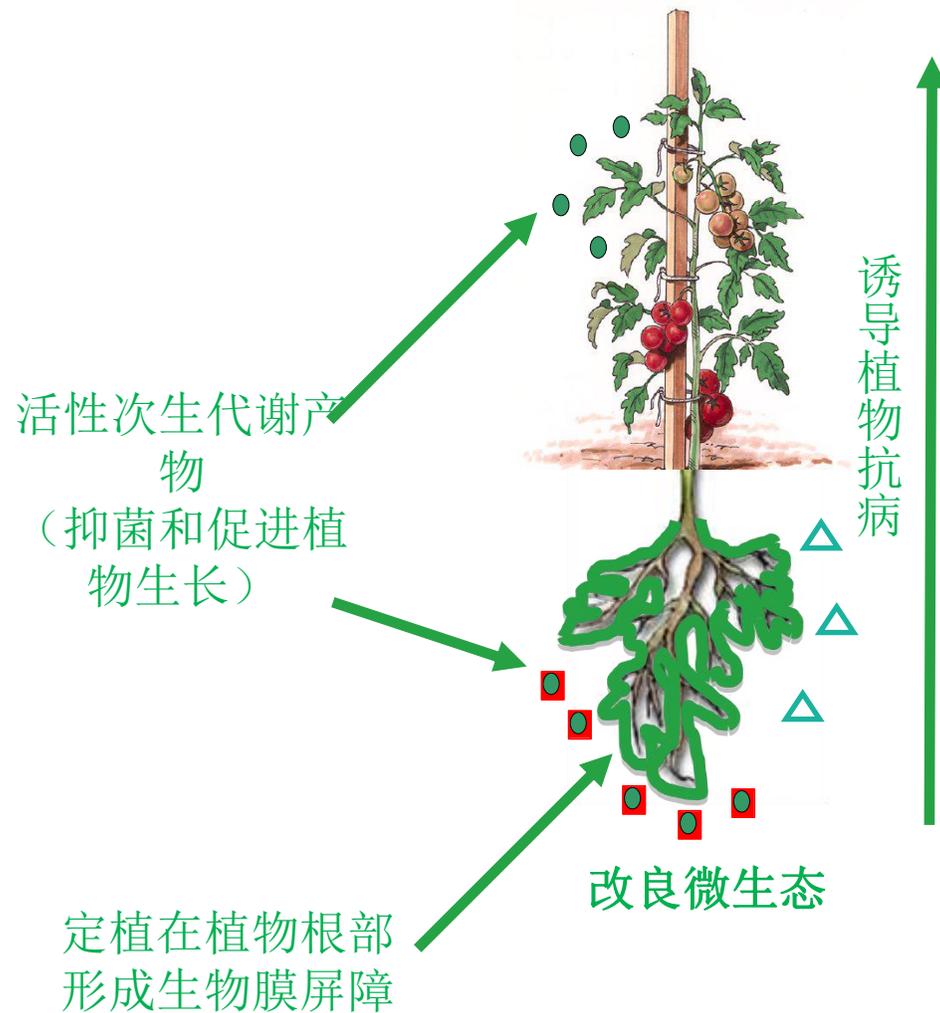
**中国商品化芽孢杆菌菌株：**  
江苏省农业科学院植物保护研究所：**枯草芽孢杆菌菌株Bs-916**；  
南京农业大学：**枯草芽孢杆菌菌株B3**(麦丰宁)；  
云南农业大学和中国农业大学：**枯草芽孢杆菌可湿性粉剂(百抗)**；  
陕西加伦多作物科学有限公司：**解淀粉芽孢杆菌微生物杀菌剂**；

澳大利亚利用**枯草芽孢杆菌A-13**防治麦类和胡萝卜**立枯病**以及其他土传病害。

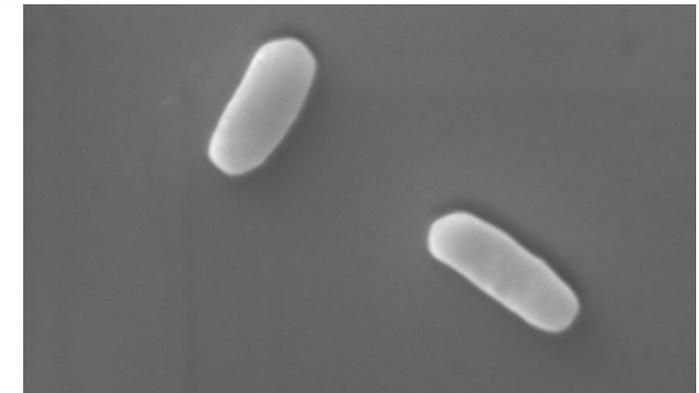


# 生防芽孢杆菌

芽孢杆菌是一类好氧或兼性好氧、棒杆状且能形成内生芽孢的革兰氏阳性细菌，广泛存在于自然界中。芽孢杆菌可以产生大量有生物活性的次生代谢产物(抑菌、抗病毒和促进植物生长)，并且能与植物形成良好的互作关系，易于在植物根围土壤、根部以及地上部的叶片或茎等组织中定殖，在一定程度上防控植物病害。



芽孢杆菌生防机理

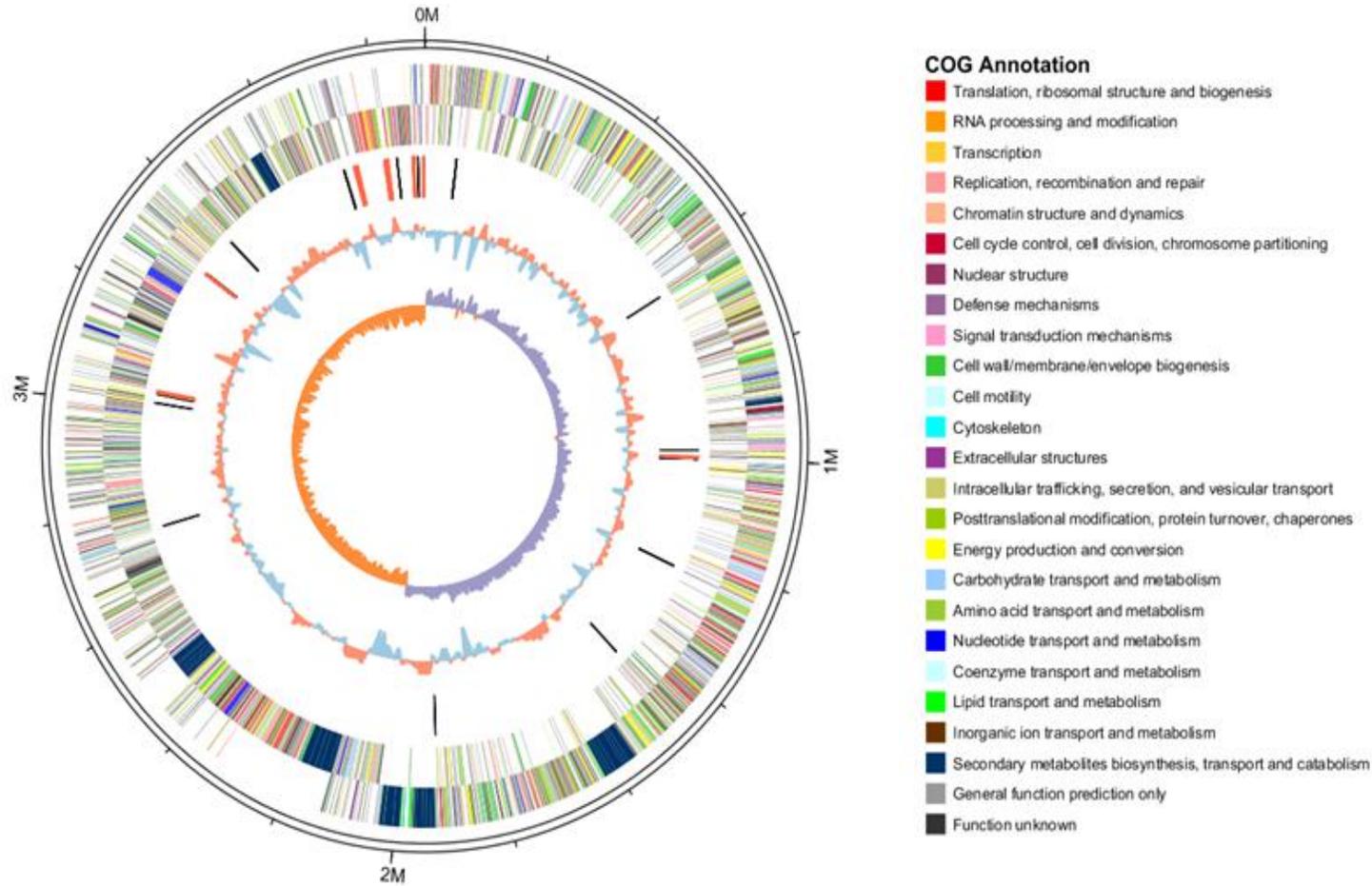


# 芽孢杆菌模式菌株基因组 *Bacillus* model strains and genome



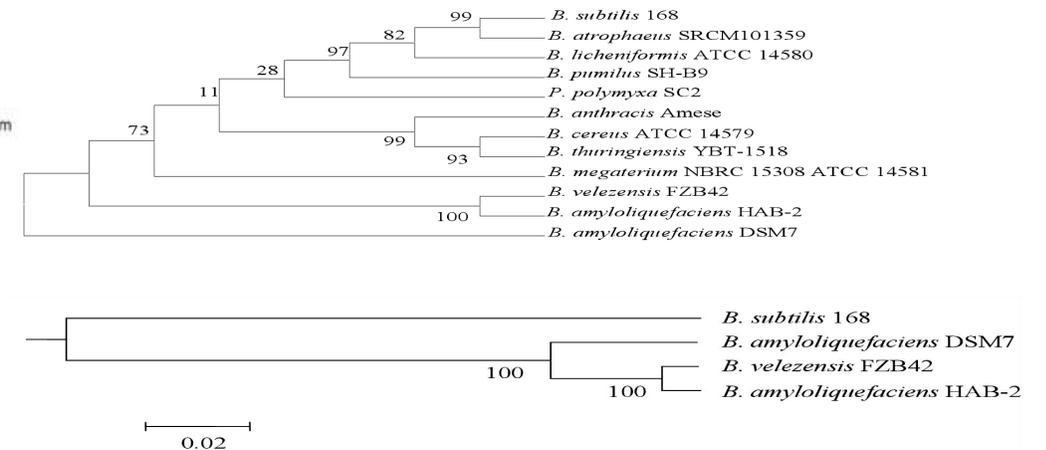
由NCBI查询可知，目前完成全基因组测序并注释的芽孢杆菌主要集中在**枯草芽孢杆菌**（70个）、**蜡状芽孢杆菌**（47个）和**解淀粉芽孢杆菌**（23个）；其余为**多粘芽孢杆菌**（11个）、**巨大芽孢杆菌**（6个）、**地衣芽孢杆菌**（13个）；且主要集中在近10年内，由此可知目前芽孢杆菌的研究热点基于全基因组数据，已处于分子水平和机理研究的层面当中。

# 芽孢杆菌模式菌株基因组 *Bacillus* model strains and genome



**Fig. 1.** Circular representation of the HAB-2 genome. Genome circular representation can fully display the characteristics of the genome. From outer to inner circle: 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> circle mean positive chain gene and negative chain gene, all genes in colour code according to their functions by COG annotation. 3<sup>rd</sup> circle means ncRNA (black indicates tRNA, red indicates rRNA). 4<sup>th</sup> circle means GC content (red indicates greater than average value, blue indicates less than average value). 5<sup>th</sup> circle means GC skew ( $GC\ Skew = (G-C)/(G+C)$ ); purple indicates greater than 0, and orange indicates less than 0).

2018年6月，我们对HAB-2菌株进行了基因组测序，在测序和组装后，组装了143,574个片段，总共1,350,725,830个碱基对。我们获得了大约3,894,648bp（3.89M）的基因组大小，GC含量为46.64%，共预测了3,929个蛋白质编码基因，其中最大基因为16,302 bp，最小基因为114 bp。此外，在基因组中预测了86种tRNA和9种16s-23s-5s核糖体RNA操纵子。同时，我们把HAB-2菌株与模式菌株FZB42菌株进行了基因组层面的差异比较。

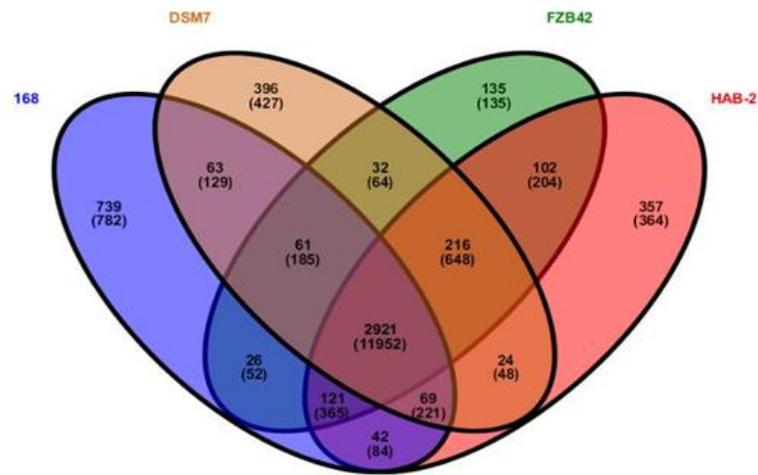


**Fig. 5. A:** Phylogenetic tree drawn from the 16S rRNA of *B. amyloliquefaciens* HAB-2, *B. subtilis* 168, *B. atrophaeus* SRCM101359, *B. licheniformis* ATCC 14580, *B. pumilus* SH-B9, *P. polymyxa* SC2, *B. anthracis* Amese, *B. cereus* ATCC 14579, *B. thuringiensis* YBT-1518, *B. megaterium* NBRC 15308 ATCC 14581, *B. velezensis* FZB42, *B. amyloliquefaciens* DSM7. **B:** Phylogenetic tree drawn from the core genomes of HAB-2, DSM7, FZB42 and 168. Bootstrap values are indicated in % of repetitions.

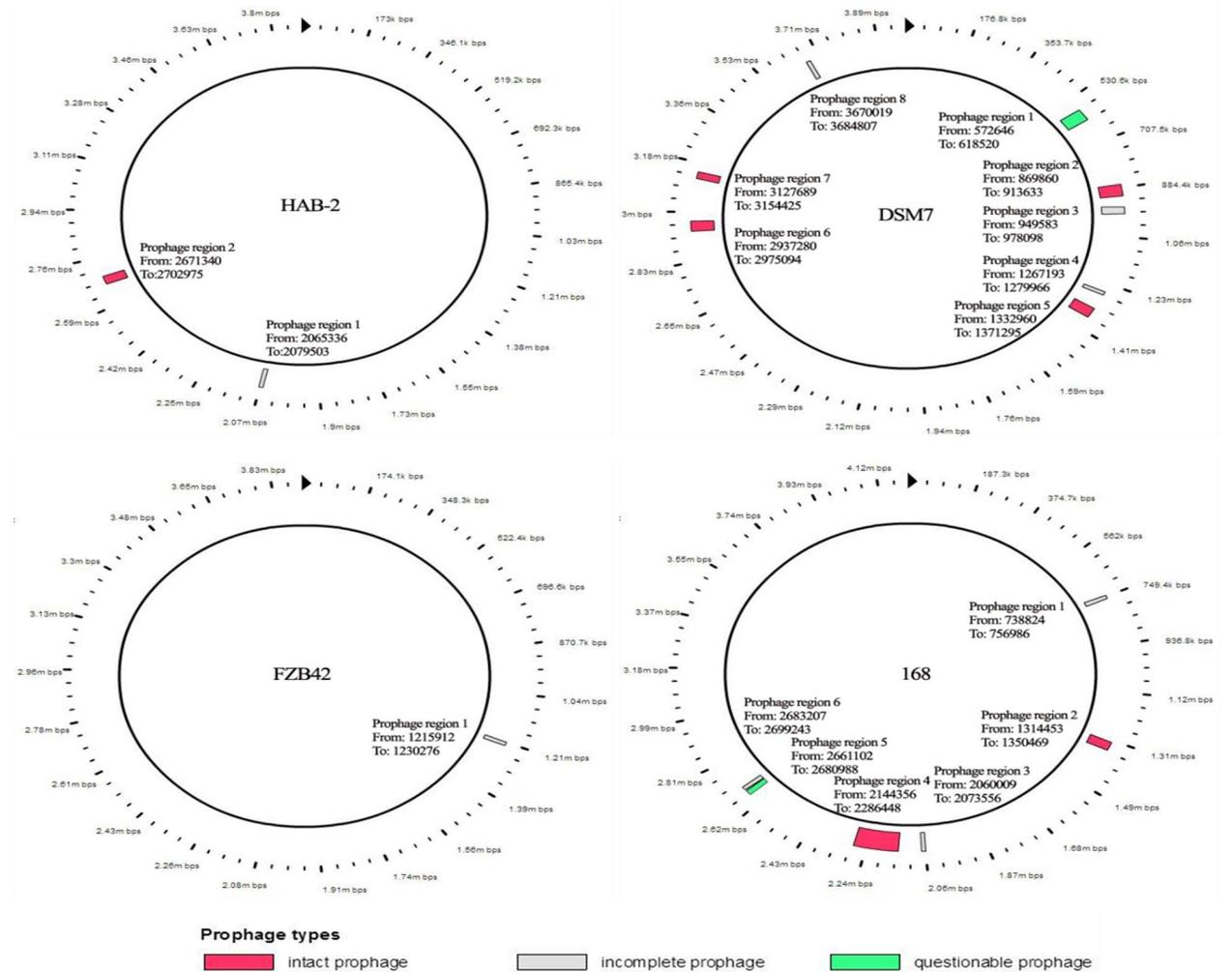
# 芽孢杆菌模式菌株基因组 *Bacillus* model strains and genome

Table1 Genomic features of the *B.amyloliquefaciens* HAB-2 genome and comparison with genomes of other *Bacillus* spp

|                                  | <i>B. amyloliquefaciens</i><br>HAB-2 | <i>B. amyloliquefaciens</i><br>DSM7 | <i>B. velezensis</i><br>FZB42 | <i>B. subtilis</i><br>168 |
|----------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| Genome size (bp)                 | 3,894,648                            | 3,980,199                           | 3,918,589                     | 4,214,630                 |
| G+C content (mol%)               | 46.6                                 | 46.8                                | 46.4                          | 43.5                      |
| Protein-coding sequences         | 3,930                                | 3,923                               | 3,693                         | 4,106                     |
| Average CDS size (bp)            | 880                                  | 880                                 | 933                           | 895                       |
| Percent of coding region         | 88.8                                 | 86.7                                | 88.0                          | 87.2                      |
| Ribosomal RNA operons            | 9                                    | 10                                  | 10                            | 10                        |
| Number of tRNAs                  | 86                                   | 94                                  | 89                            | 86                        |
| Phage-associated genes           | 58                                   | 273                                 | 25                            | 324                       |
| Transposase genes of IS elements | 2                                    | 10                                  | 9                             | 0                         |



**Fig. 3.** The Venn diagram was drawn to analyze the distribution of orthologous gene families in the genomes of *B. amyloliquefaciens* HAB-2, *B. amyloliquefaciens* DSM7, *B. velezensis* FZB42, and *B. subtilis* 168. This analysis exploits all CDS of the genomes and is not restricted to the core genome. The number above each part represents the number of gene families, while the number below represents the number of genes.



**Fig. 2.** Prophage of the *B.amyloliquefaciens* HAB-2 and comparison with other *Bacillus* spp. All prophage regions in different colours code according to completeness, a prediction of whether the region contains a intact or incomplete prophage. If the region's total score is less than 70, it is marked as incomplete (gray); if between 70 to 90, it is marked as questionable (green); if greater than 90, it is marked as intact (red).

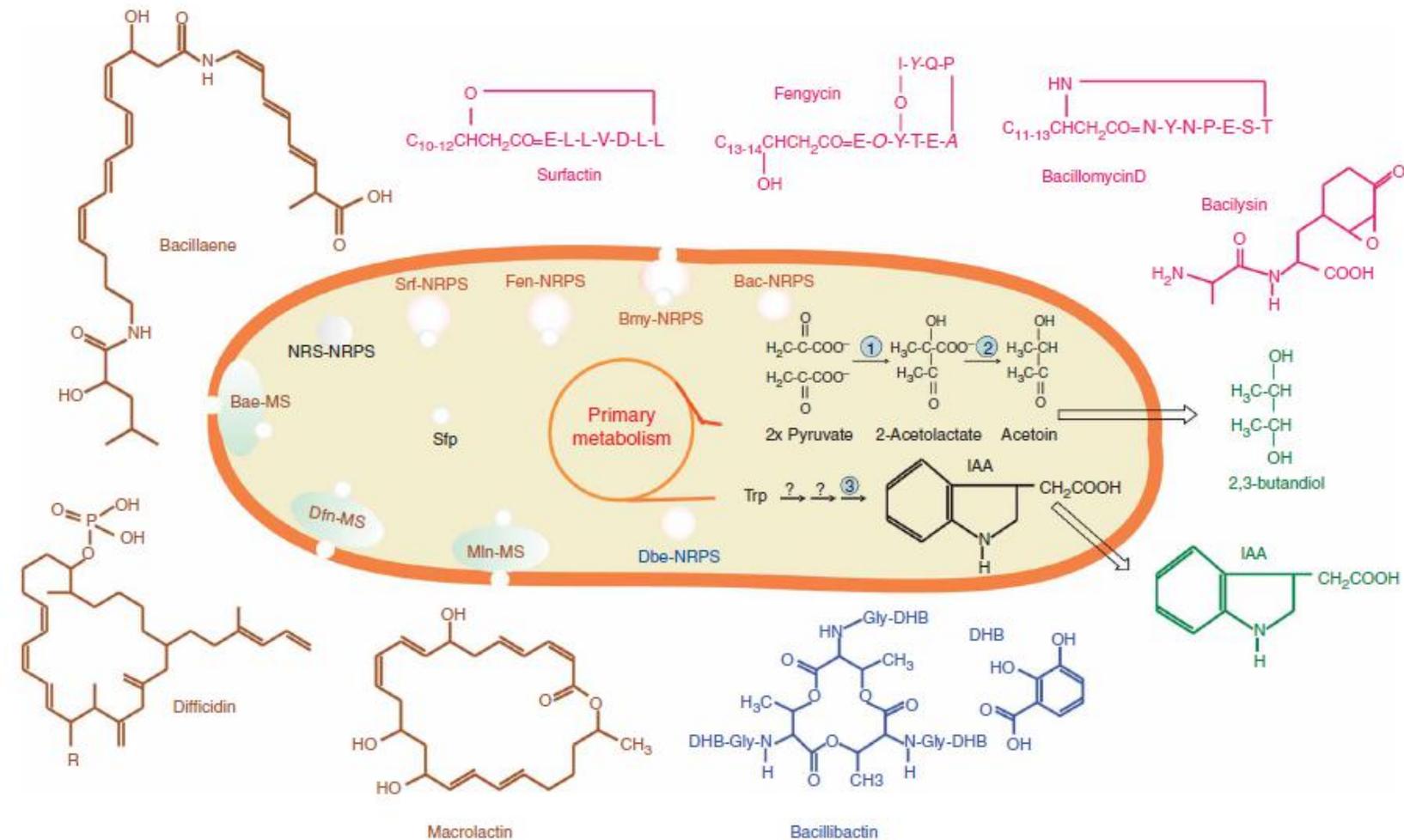
# 芽孢杆菌模式菌株基因组 *Bacillus* model strains and genome

**Table 2 Gene clusters involved in synthesis of antifungal and antibacterial acting secondary metabolites found in *B. amyloliquefaciens* HAB-2 genomes.**

| Compound      | HAB-2   |         | Type             | Size(kb) | DSM7T | FZB42 | 168 |
|---------------|---------|---------|------------------|----------|-------|-------|-----|
|               | from    | to      |                  |          |       |       |     |
| Mersacidin    | 119197  | 163215  | lantipeptide     | 44.0     | 95    | 98    | 81  |
| Bacilysin     | 314409  | 355827  | other            | 41.4     | 94    | 98    | 81  |
| Bacillibactin | 855296  | 922092  | bacteriocin-nrps | 66.8     | 94    | 98    | 79  |
| Difficidin    | 1541606 | 1642045 | transatpks       | 100.4    | 94    | 98    | 81  |
| Unknown       | 1757680 | 1798771 | t3pks            | 41.1     | 94    | 98    | 79  |
| Unknown       | 1862496 | 1884379 | terpene          | 21.9     | 94    | 99    | 82  |
| Fengycin      | 1909679 | 2047504 | transatpks-nrps  | 137.8    | 92    | 98    | 80  |
| Bacillaene    | 2109637 | 2212296 | transatpks-nrps  | 102.6    | 93    | 98    | 79  |
| Macrolactin   | 2440918 | 2526808 | transatpks       | 85.9     | 95    | 98    | 85  |
| Unknown       | 2825278 | 2846018 | terpene          | 20.7     | 93    | 99    | 78  |
| Unknown       | 2928806 | 2970050 | otherks          | 41.2     | 94    | 99    | 76  |
| Unknown       | 3201340 | 3242548 | ladderane        | 41.2     | 95    | 99    | 82  |
| Surfactin     | 3519488 | 3584895 | nrps             | 65.4     | 93    | 98    | 76  |

**lantipeptide:** Lanthipeptide cluster; **other:** Cluster containing a secondary metabolite-related protein that does not fit into any other category; **bacteriocin:** Bacteriocin or other unspecified ribosomally synthesised and post-translationally modified peptide product (RiPP) cluster; **transatpks:** Trans-AT PKS cluster; **t3pks:** Type III PKS cluster; **terpene:** Terpene cluster; **otherks:** Other types of PKS cluster; **ladderane:** Ladderane cluster; **nrps:** Nonribosomal peptide synthetase cluster.

根据我们对HAB-2测序结果分析，我们比较并列举了一部分功能基因簇的大小和相似度以及代谢途径，发现HAB-2菌株中有许多与模式菌株FZB42相似的基因簇序列，相似度可以达到98-99%，与另一个模式菌株DSM7T的相似度就没有那么高了，相似度在92-95%，这可能是同一个种的种间差异没有那么大，而与另一个种的枯草芽孢杆菌168菌株的相似度就比较低了，相似度在79-85%。这些我们比较的这些基因簇都是与**抑菌、抑藻和抗病毒等与表型相关的基因簇**，这也与目前我们的实验结果相吻合。



芽胞杆菌次生代谢产物主要通过**两种途径**产生。：

- (1)**核糖体途径**，该途径为常规的蛋白质核糖体合成过程，合成聚酮化合物；
- (2)**非核糖体途径**，由非核糖体多肽合成酶（NRPS）通过“多载体硫模板机制”的方式进行合成，产生**环状表面活性素（Surfactin）、伊枯草素（Iturin）和泛革素（Fengycin）、罗克霉素（Locillomycin）**等酯肽类抗生素。

（Chen *et al.*, 2008; Strieker *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2017）

**Secondary metabolites with biocontrol and plant growth-promoting activities (Chen *et al.*, 2008)**

# 脂肽类物质合成与调控关键基因

# The key genes about antibiotic synthesis and regulation (Chen *et al.*, 2008)

Table 2 NRPS and PKS gene clusters involved in synthesis of secondary metabolites in *B. amyloliquefaciens* FZB42 and *B. subtilis* 168<sup>a</sup>

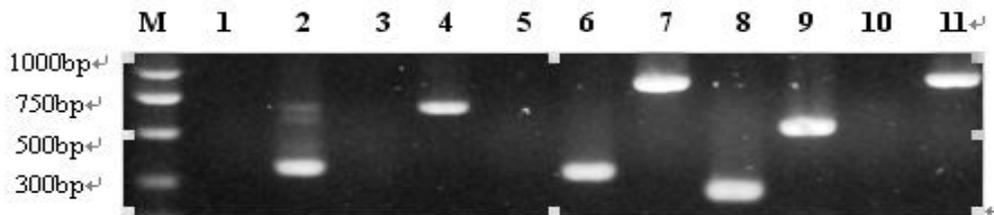
| Compound             | Enzyme   | FZB42   | Size (kb) | Dependent on <sup>b</sup> | <i>B. subtilis</i> 168                           | Identity % |
|----------------------|----------|---|-----------|---------------------------|--|------------|
| Surfactin            | NRPS     | <i>srfABCD, aat, 334, ycx, CycxD, sfp, yczE</i> | 32.0      | Sfp                       | <i>srfAA, AB, AC, AD, ycxA, ycxB, ycxC, ycxD</i> | 73–83      |
| BacillomycinD        | NRPS/PKS | <i>bmyCBAD</i>                                  | 39.7      | Sfp, YczE                 | Not present                                      | 0          |
| Fengycin             | NRPS     | <i>fenABCDE</i>                                 | 38.2      | Sfp                       | <i>PpsABCDE</i>                                  | 60–65      |
| Putative peptide     | NRPS     | <i>nrsABCDEF</i>                                | 15.0      | Unknown                   | Not present                                      | 0          |
| Bacillibactin        | NRPS     | <i>dhbABCDEF</i>                                | 12.8      | Sfp                       | <i>DhbABCDEF</i>                                 | 60–80      |
| Bacilysin/anticapsin | NRPS     | <i>bacABCDE, ywfG</i>                           | 6.9       | –                         | <i>YwfBCDEFG</i>                                 | 84–93      |
| Macrolactin          | PKS      | <i>mlnABCDEFGH</i>                              | 53.9      | Sfp, YczE                 | Not present                                      | 0          |
| Bacillaene           | PKS/NRPS | <i>baeBCDE, acpK, baeGHIJLMNRS</i>              | 74.3      | Sfp, YczE                 | <i>pksBCDE, acpK, pksGHIJLMNRS</i>               | 52–83      |
| Difficidin           | PKS      | <i>dfnAYXBCDEFGHIJKLM</i>                       | 71.1      | Sfp, YczE                 | Not present                                      | 0          |

<sup>a</sup>Note that lipopeptides and polyketides are not expressed in *B. subtilis* 168 due to a mutation of the phosphopantetheinyl transferase Sfp. <sup>b</sup>Dependence of product synthesis on Sfp and the membrane-spanning protein YczE was tested in mutants deficient in synthesis of Sfp (CH3) and YczE (CH4) by bioautography, MALDI-TOF mass spectrometry and HPLC-ESI mass spectrometry (see Methods).

根据2007年Rainer Borriss在Nature Biotechnology上报道的*sfp*基因在合成**Surfactin**、**BacillomycinD**、**Fengycin**、**Bacillibactin**、**Macrolactin**、**Bacillaene**和**Difficidin**等脂肽类物质上都有不可缺少的作用(Xiao Hua Chen *et al.*, 2008)。

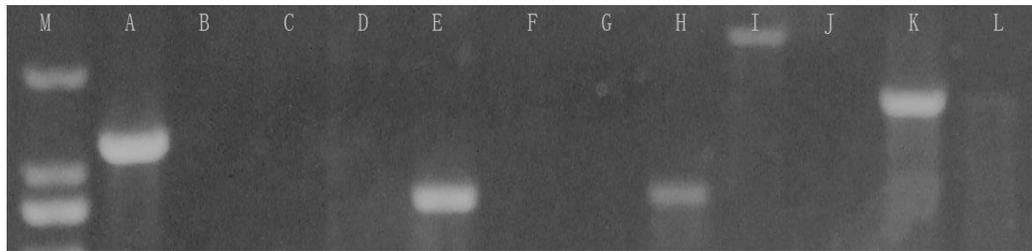
*sfp*基因编码**4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶**（4'-phosphopantetheinyl transferase）(Lambalot *et al.*, 1996)，是**芽孢杆菌非核糖体途径合成脂肽类化合物的关键基因**（Tsuge *et al.*, 1996）。该酶使无活性的合成酶从脱辅基蛋白转化成有活性的全酶形式。模式菌株*B. subtilis* 168虽然含有完整的脂肽类合成酶基因簇，但由于合成脂肽物质的非核糖体途径中所需的*sfp*基因，长期传代有一个碱基突变，因此不能合成任何抗菌物质（Nakano *et al.*, 1992；Tsuge *et al.*, 1996，李响等，2015）。

# 本课题组的研究 The key genes about antibiotic synthesis and regulation



M:2000DNA marker 1:*ituC* 2:*srfAB* 3:*sboA* 4:*ituD* 5:*qk* 6:*fenD*  
7:*bamC* 8:*yndj* 9:*ituB* 10:*fenB* 11:*ituA*基因片段

HAB-2菌株基因组上含有脂肽类物质 **surfactin**、**fengycin**、**iturin**、**bacillomycin**的合成基因，能产生脂肽类物质。

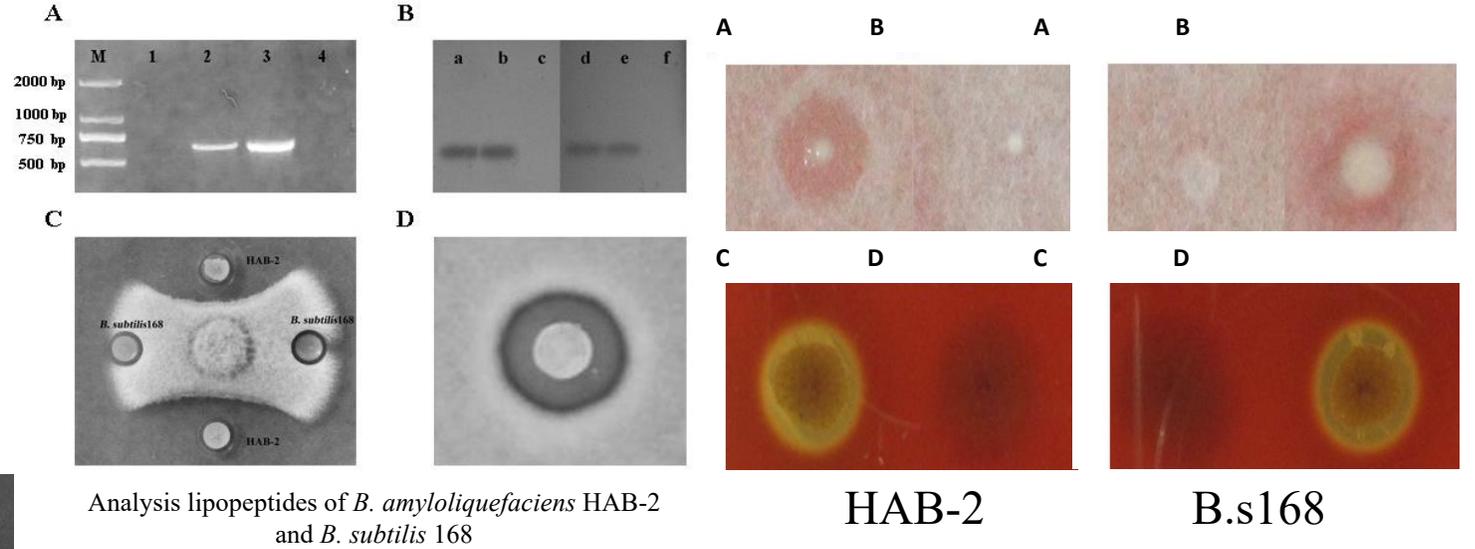


M:2000Marker A:HAB-2-*ituA* B: *B. subtilis* 168-*ituA* C: HAB-2-*ituD* D: *B. subtilis* 168-*ituD* E: HAB-2-*lpa14* F: *B. subtilis* 168-*lpa14* G: HAB-2-*sfp* H: *B. subtilis* 168-*sfp* I: HAB-2-*mycB* J: *B. subtilis* 168-*mycB* K: HAB-2-*fenB* L: *B. subtilis* 168-*fenB*

HAB-2菌株中基因组中含有*ituA*基因（1100bp）、*lpa*基因（675bp）、*mycB*基因（2024bp）、*fenB*基因（1400bp）等调节基因。



**Fig. 6.** The gene cluster that directs surfactin. The above is the gene cluster of *B. amyloliquefaciens* HAB-2. The following is the gene cluster of the model strain *B. velezensis* FZB42. Red box and arrow mark the location of the key gene *sfp* and *lpaH2*.



Analysis lipopeptides of *B. amyloliquefaciens* HAB-2 and *B. subtilis* 168

HAB-2

B.s168

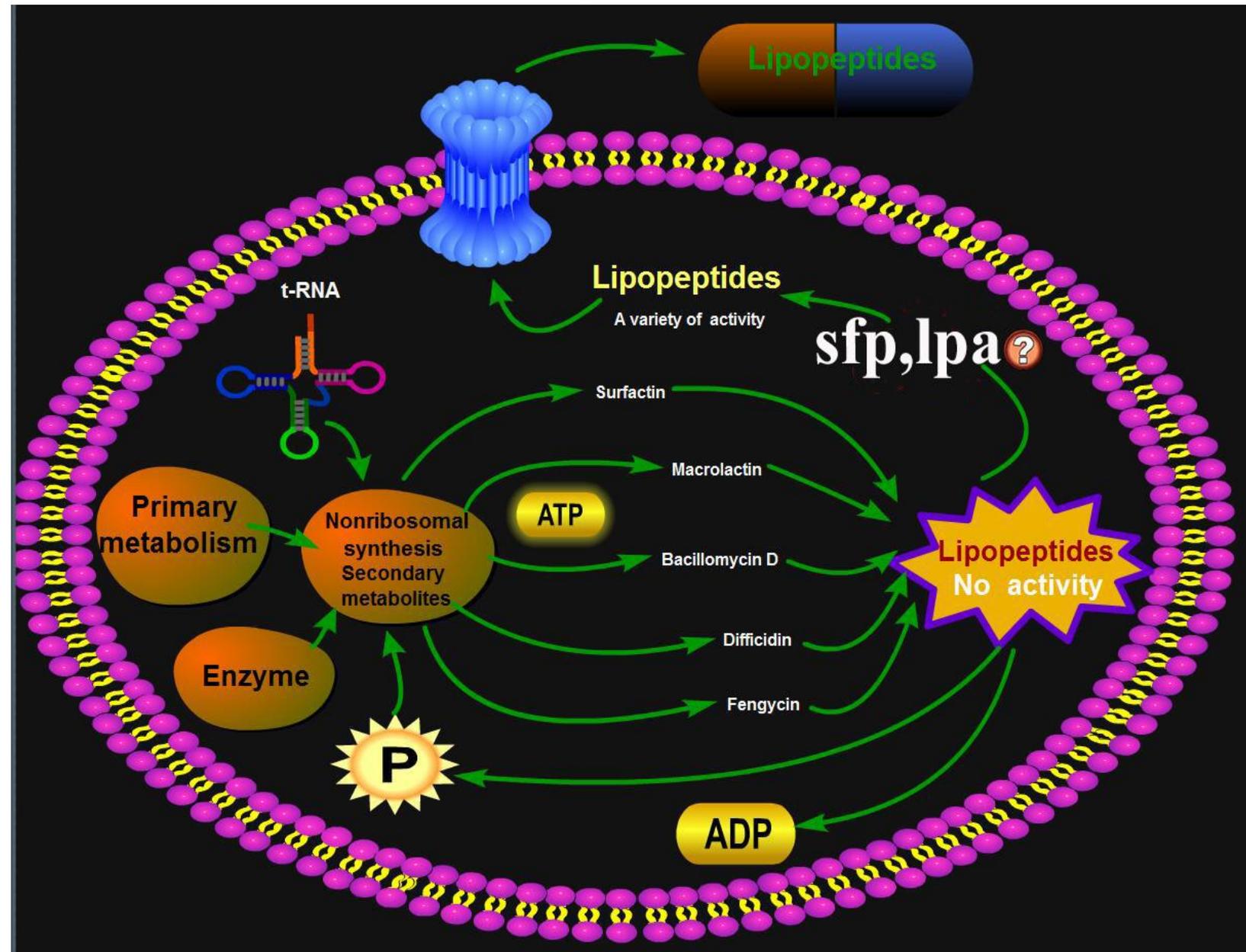
模式菌株 *B. subtilis* 168仅含有*sfp*基因，但*sfp*基因由于长期传代导致一个碱基错配，因此不能产生任何脂肽类物质。然而HAB-2菌株基因组中同样也没有*sfp*基因，但是经过飞行时间质谱和分离技术发现了HAB-2菌株代谢产生脂肽类物质，并且具有抑菌活性。采用基因敲除的手段，对关键基因*lpaH2*进行敲除，发现*lpaH2*基因在脂肽类物质合成中起到关键性的作用。

# 脂肽类物质合成与调控关键基因

# The key genes about antibiotic synthesis and regulation

lpa基因也编码4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶, 调节Iturin A模板酶复合物的形成, 该基因也可以调控合成与sfp基因类似的磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶。(Tsuge *et al.*, 2001)

Jin等发现存在lpa基因, 可在模式菌株*B. subtilis* 168中代替sfp作为重要合成酶基因, 是调控脂肽类物质的关键基因。(Jin *et al.*, 2017)



The lipopeptides pathways



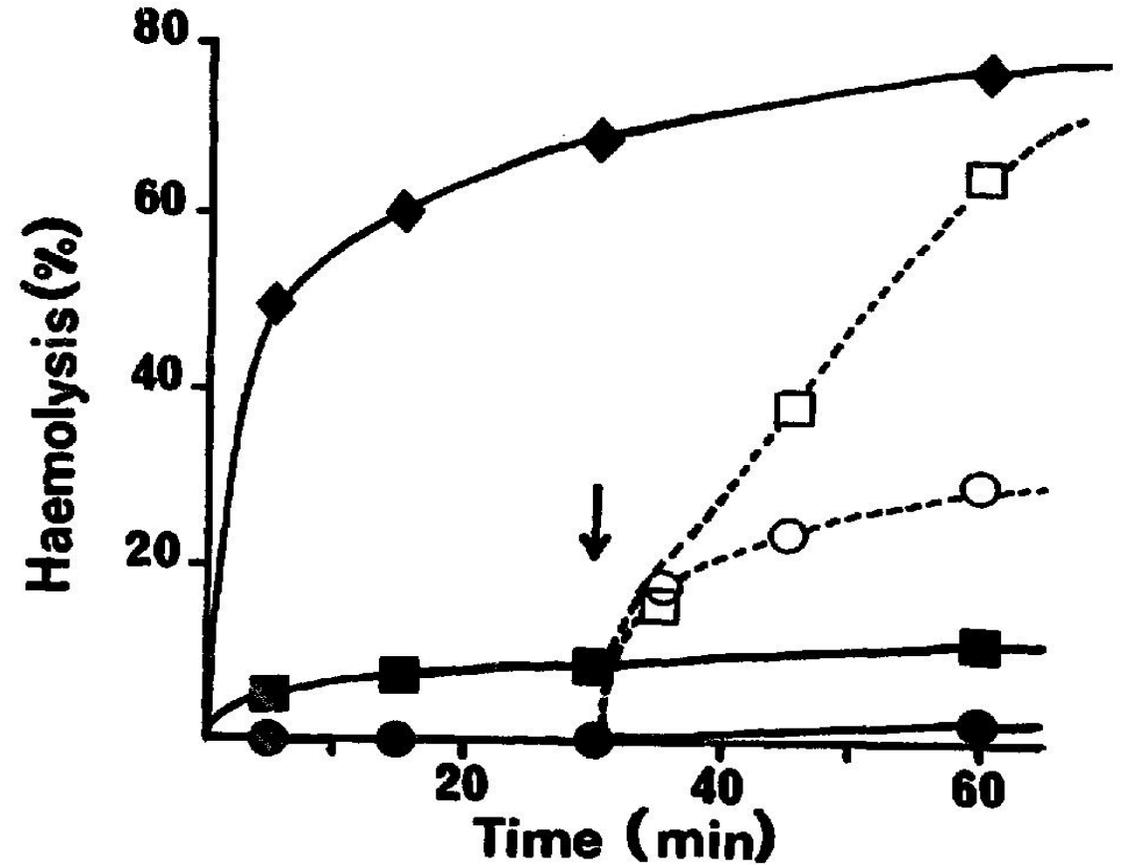




# 协同机制 Synergistic mechanism

Maget Dana等(1992)发现在IturinA中适当添加没有活性浓度的surfactin可以增强IturinA的溶血活性（右图），这种作用是IturinA和surfactin两者相互协同作用的效果。

研究表明，**表面活性素与伊枯草素**，**表明活性素与泛革素**，**伊枯草素与泛革素**，相互之间均具有一定的**协同作用**，能够增强后者的抑菌活动。



Haemolysis of human erythrocytes by the lipopeptides.

■ iturin A ( $2 \times 10^{-5}$  M); ● surfactin ( $2 \times 10^{-5}$  M);  
◆ surfactin/iturin A mixture 1: 1 ( $4 \times 10^{-5}$  M); □ sequential addition of iturin A ( $2 \times 10^{-5}$  M) then surfactin ( $2 \times 10^{-5}$  M) after a time lag of 30 min; ○ sequential addition of surfactin ( $2 \times 10^{-5}$  M) then iturin A ( $2 \times 10^{-5}$  M) after a time lag of 30 min. The arrow indicates the addition of the second lipopeptide.

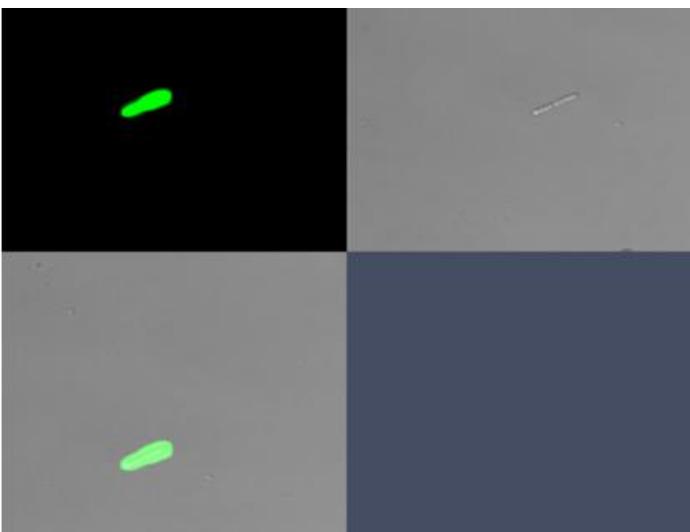
# 芽孢杆菌的应用 Application of *Bacillus*

## 定殖与促生作用

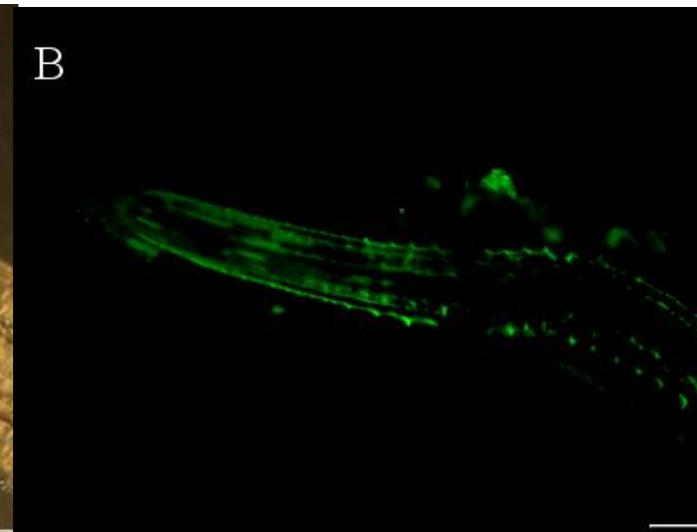
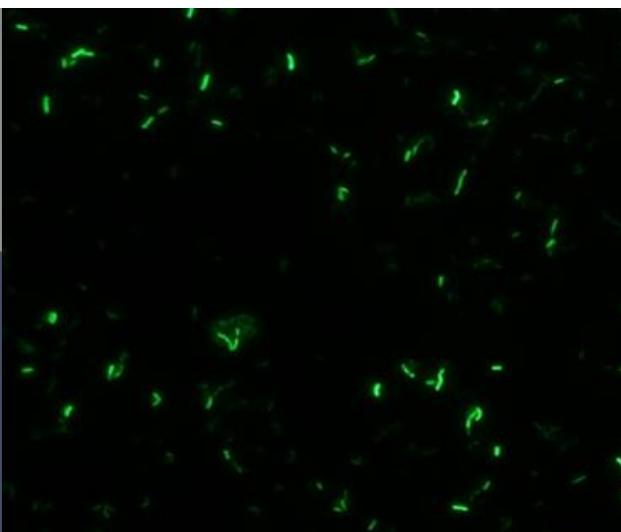


21 d

A: 无菌水 B: HAB-2发酵液 (CFU=5×10<sup>8</sup>) C: HAB-2发酵上清液



激光共聚焦显微镜下的标记HAB-2菌株



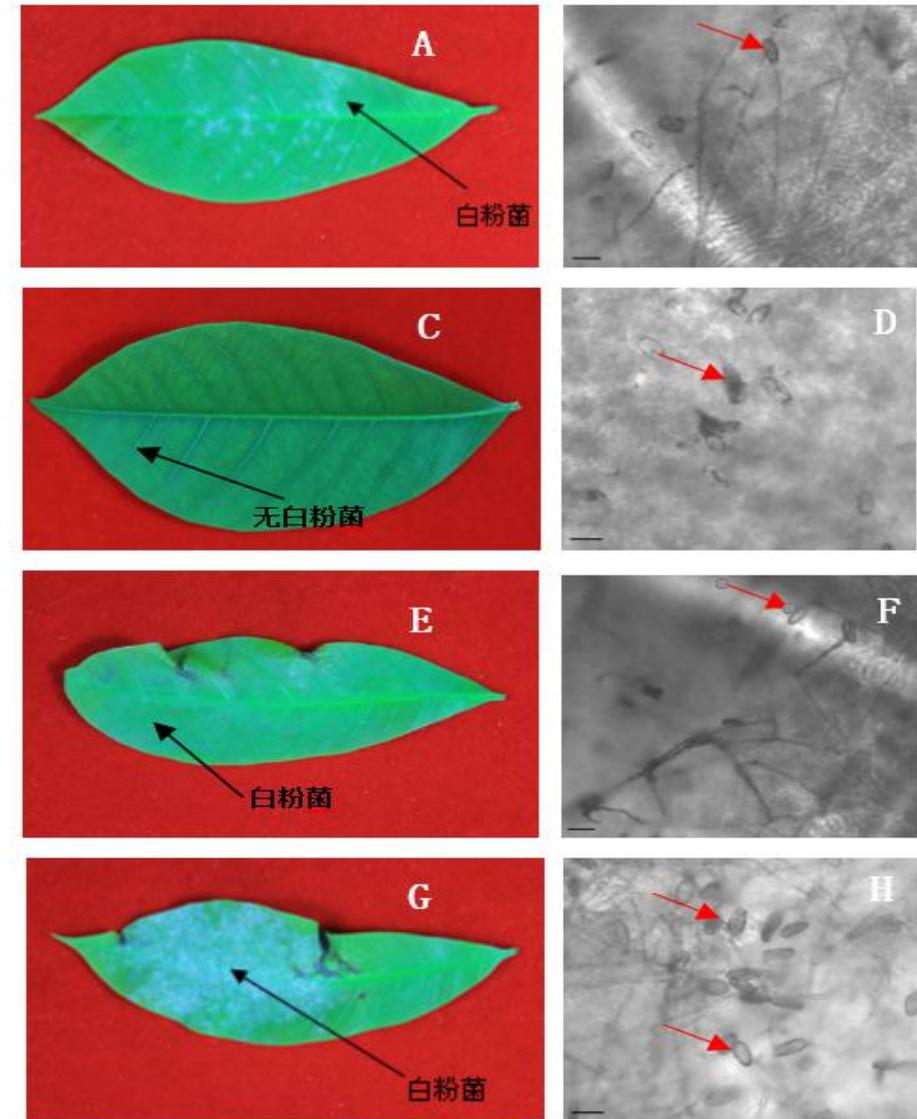
荧光显微镜下的标记HAB-2菌株定殖烟草根系

A: HAB-2发酵液 (CFU=5×10<sup>8</sup>, 白光) B: HAB-2发酵液 (CFU=5×10<sup>8</sup>, 荧光)

# 芽孢杆菌的应用 Application of *Bacillus*



A: HAB-2杀菌剂成品 B: 对照苦瓜 C: 施用HAB-2杀菌剂的苦瓜  
HAB-2生物杀菌剂使用于苦瓜

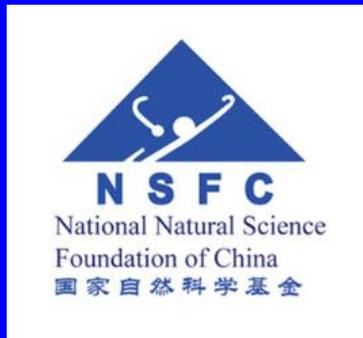


A. B: 正丁醇提取物处理; C-D: 杆菌霉素DC处理;  
E-F: 三唑酮处理; G-H: CK处理;  
(标尺: 图B、D、F、H=20  $\mu\text{m}$ )  
HAB-2菌株提取物对橡胶树白粉病防治试验

感谢



1



7



海南省科学技术厅  
HAINANSHENG KEXUEJISHUTING

2



国家天然橡胶产业体系项目 (CARS-34-GW8)

1

14件专利申请，已获7件专利

Thank you for your attention!

欢迎来海南大学植物保护学院学术交流与指导!