

# 解淀粉芽孢杆菌研究进展

贺海滨<sup>1</sup> 苏峻冬<sup>2</sup> 滕凯<sup>3</sup> 朱三荣<sup>3</sup> 赵誉强<sup>2</sup> 唐前君<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>衡南县扶贫开发项目事务中心,湖南衡南 421100;

<sup>2</sup>湖南农业大学植物保护学院,湖南长沙 410128;

<sup>3</sup>湖南省烟草公司湘西州公司,湖南吉首 416000)

**摘要** 本文了解淀粉芽孢杆菌的研发应用概况,综述了解淀粉芽孢杆菌的生物防治作用机制研究进展,具体包括产生抗菌物质、溶菌作用、诱导抗性以及在空间和营养物质上的竞争等方面内容,以期了解淀粉芽孢杆菌的应用提供参考。

**关键词** 解淀粉芽孢杆菌;生物防治;抑菌机制

中图分类号 S477+.1 文献标识码 A

文章编号 1007-5739(2021)02-0101-04

DOI:10.3969/j.issn.1007-5739.2021.02.043

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



## Research Progress on *Bacillus amyloliquefaciens*

HE Haibin<sup>1</sup> SU Jundong<sup>2</sup> TENG Kai<sup>3</sup> ZHU Sanrong<sup>3</sup> ZHAO Yuqiang<sup>2</sup> TANG Qianjun<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> Hengnan County Poverty Alleviation and Development Project Affairs Center, Hengnan Hunan 421100; <sup>2</sup> College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha Hunan 410128; <sup>3</sup> Xiangxi Branch of Hunan Tobacco Company, Jishou Hunan 416000)

**Abstract** This paper introduced the research, development and application of *Bacillus amyloliquefaciens*, summarized the research progress of the biological control mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens*, including the production of antibacterial substances, bacteriolysis, inducible resistance, competition in space and nutrients, etc., in order to provide reference for the application of *Bacillus amyloliquefaciens*.

**Keywords** *Bacillus amyloliquefaciens*; biological control; antibacterial mechanism

化学防治是防治病虫害的有效措施,然而随着农药残留量增加、病虫害抗药性提高、害虫再猖獗等问题的出现,生物防治这一领域再度受到重视。随着解淀粉芽孢杆菌被确立为独立的种以及对其进行全基因组测序,人们对芽孢杆菌有了更多的了解。解淀粉芽孢杆菌是一类植物根际促生细菌(PGPR),PGPR菌株在作物保护、促进植物生长和改良土壤等方面发挥着重要作用<sup>[1]</sup>。PGPR菌株对根的形态有积极影响,可以增加根部表面积,从而促进植物根部吸收营养物质,使植物生长更加旺盛。研究发现,解淀粉芽孢杆菌具有抑菌谱广、防治效益高等特点。长期以来,研究人员对解淀粉芽孢杆菌不断开展研究,并陆续取得成果。

现详细介绍如下,以期了解淀粉芽孢杆菌的开发应用提供参考。

## 1 解淀粉芽孢杆菌的研发应用概况

### 1.1 研发概况

早从20世纪开始,研究者们就开始对解淀粉芽孢杆菌分泌的抑菌物质进行了分离、纯化、鉴定、克隆和功能等方面的研究。

2014年,Bankura等<sup>[2]</sup>通过甲醇提取结合电喷雾电离质谱(LC-ESI-MS/MS)对*B. amyloliquefaciens*-6B分泌的环脂肽类抗真菌物质进行鉴定和测序,分析出26种类表面活性素。

2016年,陈欣怡<sup>[3]</sup>首次发现iturinA和Fengucin对解淀粉芽孢杆菌生物膜形成初期的影响较后期显著,首次证明伊枯草素家族的iturinA显著影响解淀粉芽孢杆菌的运动性<sup>[3]</sup>。

2017年,Jamal等<sup>[4]</sup>利用HPLC结合核磁共振技术首次从*B. amyloliquefacien*、发酵产物中分离鉴定出具有较强杀线虫效果的二环肽(Pro-Leu)。薛松<sup>[5]</sup>通过试验筛选出菌株X5和BQA2,发现其对青枯菌有较好的

**基金项目** 中国烟草总公司湖南省公司科技专项“湖南烟区主要病毒病防控关键技术研究”(17-20Aa02);湖南省烟草公司湘西州公司科技项目“抗烟草普通花叶病毒病生物复合剂的研究与应用”(YC16015)。

**作者简介** 贺海滨(1980—),男,湖南衡阳人,农艺师。研究方向:植物病害生物防治。

\* 通信作者

**收稿日期** 2020-08-18

拮抗效果;通过采用 16S rDNA 基因鉴定以及生理生化试验鉴定 X5 和 BQA2 为解淀粉芽孢杆菌,然后对解淀粉芽孢杆菌菌株 X5 和 B4A2 做 GFP 转化标记;使用氮肥、磷肥、钾肥、复合肥和标记菌株混合处理番茄苗,发现它们对 X5-GFP 和 BQA2-GFP 在番茄根部的定殖起促进作用。赵鑫<sup>[6]</sup>从蜂蜜中分离鉴定了解淀粉芽孢杆菌菌株 BH072,其产生 TasA 和 iturinA 等抗真菌物质并且产生大分子蛋白鞭毛蛋白,产量优化结果显示,BH072 菌株的 iturinA 产量高于其他芽孢杆菌。苏翠珠<sup>[7]</sup>突破以往只对单一菌株或者同属菌株分析的局限,将 2 种细菌结合在一起分析,研究了橘黄假单胞菌芽孢 JD37 和解淀粉芽孢杆菌 53-1,发现两者之间无拮抗作用;然后通过试验找出 YPG 培养基和 36 h 的联合发酵条件;最后以土壤中番茄灰霉病菌菌丝数量为指标判断出其联合发酵具有较好的防治土传病害的效果。段静<sup>[8]</sup>采用壳聚糖选择性培养基筛选到一株能够利用壳聚糖维持生长的解淀粉芽孢杆菌 HZ-1510;并且对表达了该株细菌的壳聚糖酶进行酶活力研究,明确了该壳聚糖酶的最适反应条件。王淋敏<sup>[9]</sup>证明了贝莱斯芽孢杆菌的发酵液对豌豆、胡豆和玉米起促生作用,同时证明了促生物质对林木种子罗汉和合欢也起促生作用。

2018 年,潘虹余等<sup>[10]</sup>对 *B. amyoliquefaciens* 突变菌株的研究为抑菌物质相关菌株的选育提供了新方法;用 *B. amyoliquefaciens* B15 菌株的发酵液对灰霉病菌进行处理,观察到灰霉菌发生染色质收缩、细胞核破裂和细胞凋亡等现象,通过试验解释了抑菌物质对病原菌的作用机理。张臻<sup>[11]</sup>通过研究发现,解淀粉芽孢杆菌 HZ-25 在室内以及田间对小麦茎基腐病和赤霉病均具有较好的防治效果,在防治小麦赤霉病中施用多菌灵会使小麦产生抗药性,为开发出替代多菌灵等农药提供了材料。王慧<sup>[12]</sup>通过研究和优化,已较好地解决了解淀粉芽孢杆菌 K11 菌株质粒稳定性差的难题,建立了不同强度 PamyQ-SPaprE 突变体为高效表达元件以解淀粉芽孢杆菌突变株 K7-6 为宿主菌的解淀粉芽孢杆菌高效表达体系,为以后更加深入研究解淀粉芽孢杆菌高效分泌表达机制奠定了基础。孙亚芳<sup>[13]</sup>研究表明,解淀粉芽孢杆菌 B4 和枯草芽孢杆菌 B6 均属于安全无毒级别,且解淀粉芽孢杆菌 B4 悬浊液对水晶梨、苹果、番茄采后起到抑制病害发生的作用。枇杷自然腐败试验证明,B4 和 B6 的发酵液均能显著降低高温下枇杷的自然腐败,延长贮藏期,为食物保鲜提供了研究基础。邓旗<sup>[14]</sup>运用比较基因组学分析不同种属的芽孢杆菌基因组差异,发现基因组间的亲缘关系和

共线性情况会影响菌株的 Surfactin 合成能力;合成酶基因发生的非同义突变会改变对氨基酸的特异性选择,造成 surfactin 组分的差异;目前会产生 surfactin 的主要有解淀粉芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和贝莱斯芽孢杆菌。

2019 年,刘云鹏<sup>[15]</sup>发现了根系分泌的 D-半乳糖是受诱导的;另外,还发现了不同激发子在诱导植物抗性基因表达方面是相对特异性的。康星星<sup>[16]</sup>利用绿色荧光蛋白标记菌株 Bv-GFP,发现该菌能够实现一次接种全株分布和防病的特点;通过 qRT-PCR 分析,证明在小麦植株内贝莱斯芽孢杆菌 CC09 能够转录抗菌物质 iturin A 合成酶基因,这可能说明 iturin A 在介导内生贝莱斯芽孢杆菌 CC09 菌株的防病过程和机制中发挥重要作用。芽孢杆菌对鱼类无毒无害,并且芽孢杆菌有很强的存活能力,芽孢杆菌产生的抗菌物质对水产病原菌有很好的拮抗作用<sup>[17]</sup>,因而被作为益生菌引入水产养殖中。

## 1.2 应用状况

解淀粉芽孢杆菌可用于防治大豆、番茄、小麦等农作物病虫害,在农业、工业、医疗食品等多领域应用广泛,具有重要的科研价值。早在 20 世纪,芽孢杆菌已运用于工业生产中,利用其生产高纯度、高活性的蛋白酶和淀粉酶。国内外将芽孢杆菌应用于食品领域的研究还不多。刘亚萍<sup>[18]</sup>对解淀粉芽孢杆菌 CGMCC 1.936 进行单菌落分离优化,优化后,解淀粉芽孢杆菌 CGMCC 1.936 对大肠杆菌的抑菌效果明显上升,抑菌活性先后提高了 123.62%。由此,其初步可作为食品保鲜剂应用。田间药效试验研究表明,解淀粉芽孢杆菌对小麦黄花叶病有较好的预防效果,且对小麦有一定的促生作用<sup>[19]</sup>。侯宝宏等<sup>[20]</sup>研制了防治苹果树腐烂病的解淀粉芽孢杆菌 TS-1203 涂抹剂和可湿性粉剂,其中涂抹剂剂型的防治效果更好。薛松<sup>[5]</sup>研究表明,解淀粉芽孢杆菌 X5、BQA2 有较强的定殖能力,对番茄植株和根部起促生作用。

美国有 1 株解淀粉芽孢杆菌(*B. amyoliquefaciens*) 和 3 株枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*) 获得了 EPA 商品化生产许可并且已经广泛应用。Bio Yield 是 Gunstafson 公司用解淀粉芽孢杆菌 FZB42 与枯草芽孢杆菌 GB122 共同制成的新型杀菌剂,主要应用于水果或蔬菜霜霉病、灰霉病和白粉病的防治。

解淀粉芽孢杆菌 GHt-q6 对番茄灰霉病菌和叶霉病菌的抑菌效果较好,且能在植株体内定殖。许敏<sup>[21]</sup>利用解淀粉芽孢杆菌 GHt-q6 制成乳悬剂和可湿性粉剂,为植物病害防治提供了安全有效的生物防治药剂,为

番茄病害防治提供了保障。解淀粉芽孢杆菌 LXY 6-2 的发酵液可用于防治辣椒根腐病,虽然与化学药剂相比防治效果略低,但其安全环保且防效持久,可以作为传统化学药剂的替代品<sup>[21]</sup>。

芽孢杆菌可以抑制有害藻类的生长和繁殖。例如,解淀粉芽孢杆菌 FZB42 对铜绿微囊藻的抑藻效果最好,主要通过分泌胞外物质的间接方式起到抑藻作用<sup>[23]</sup>。刘亚萍<sup>[18]</sup>在香蕉保鲜试验中使用解淀粉芽孢杆菌 CGMCC 1.936 抗菌活性物质纯品和保鲜膜的复合处理,在短时间内可以有效延缓香蕉腐烂,使香蕉保持良好的品质。刘冬<sup>[24]</sup>从健康大豆土壤中分离得到 1 株对大豆疫病具有良好防治效果的菌株 JDF3,该菌株对大豆疫病具有良好的防治效果。

## 2 解淀粉芽孢杆菌的生物防治作用机制

### 2.1 产生抗菌物质

在 *B. amyoiiguesfaciens* 发酵物中有越来越多能够抑制致病菌生长的物质被发现并分离出来。按分子量大小将其主要分为两大类,即大分子抑菌蛋白类和小分子抑菌肽类。抑菌肽类如 Surfactin (表面活性素)、Fengucin (丰原素)、Iturin (伊枯草素)等是目前研究的热点<sup>[25]</sup>。姚佳明<sup>[23]</sup>利用高通量筛选方法,获得解淀粉芽孢杆菌 B815-1,分离纯化其上清液中的抑菌物质,得到 2 种抑菌活性成分,其中一种是分子量为 639.75 Da 的新型抗菌肽。通过抑菌谱探究发现, Surfactin 与六肽对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌均有抑菌作用<sup>[25]</sup>。解淀粉芽孢杆菌 PG 12 是理化性质稳定的脂肽类抗生素,该菌是抑制苹果轮纹病菌菌丝和孢子的主要抗菌物质<sup>[3]</sup>。

夏京津<sup>[26]</sup>通过扫描电镜显示,解淀粉芽孢杆菌产生的脂肽作用于嗜水气单胞菌后,其菌体表面出现塌陷和孔洞,变得粗糙,说明脂肽的杀菌作用可能与细胞膜相互作用有关。杨洋<sup>[27]</sup>研究发现:解淀粉芽孢杆菌 FZB42 对禾谷镰孢菌有较强的抑制作用;通过试验证明, bacillomycin D 是 FZB42 中的主要抑菌物质, bacillomycin D 对防治禾谷镰孢菌有显著效果。解淀粉芽孢杆菌 SYBC H47 能够产生脂肽类和酶等物质,对桃树流胶病具有较好的防治作用<sup>[28]</sup>。王培松<sup>[29]</sup>从杠果树的茎叶组织中分离鉴定得到解淀粉芽孢杆菌 MG-3,该菌株通过分泌抗菌蛋白来抑制果蔬病害;试验表明,抗菌蛋白很可能是丝氨酸蛋白酶<sup>[29]</sup>。

### 2.2 溶菌作用

王培松<sup>[29]</sup>进行了枇杷焦腐病抑制效果的研究,结果表明,抗菌蛋白可以降解病原真菌的菌丝,抑制病原菌分生孢子的萌发。该抗菌蛋白能够抑制枇杷焦腐

病菌、荔枝焦腐病菌、橄榄焦腐病菌等多种果蔬病害病原菌,有良好的广谱性<sup>[29]</sup>。

大量试验证实,脂肽类和聚酮类等次级代谢产物是生防菌芽孢杆菌防病的主要活性物质。湖南农业大学植物病理实验室的前期研究也证实,贝莱斯芽孢杆菌菌株 Bv 的基因组中有 8.2% 的基因负责编码脂肽类和聚酮类化合物。代谢产物抗菌试验表明,这些物质对病原真菌的生长和繁殖有抑制作用,导致菌丝顶端膨大或菌丝溶解。

### 2.3 诱导抗性

芽孢杆菌的防病作用机制主要涉及苯丙氨酸解氨酶(PAL)、多酚氧化酶(PPO)、过氧化酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)等一系列酶类活性变化,通过组织木质化、产生植保素、增强细胞机械强度,共同作用,抵抗病毒、细菌和真菌,从而提高宿主的抗病性<sup>[18]</sup>。此外,还有一些其他抗生素类物质,本文重点研究了寡肽类抗生素 bacilysin,采用色谱技术对抗真菌化合物进行分离纯化,得到产物 bacilysin。反应动力学研究发现, bacilysin 与靶酶之间的相互作用是一个线性混合型抑制反应, bacilysin 能够直接与靶酶发生作用,抑制其转氨酶活性<sup>[30]</sup>。薛松<sup>[5]</sup>发现,解淀粉芽孢杆菌单独或与青枯菌混合处理后番茄苗叶片的 SOD、POD、PAL、PPO、CAT 的防御酶活性都有很大提高,并且混合处理组的酶活性要高于单独处理组。这表明解淀粉芽孢杆菌 X5-GFP 和 BQA2-GFP 能够诱导番茄苗产生抗性。解淀粉芽孢杆菌 Ba13 可通过激活番茄系统抗性相关基因表达及相关酶活性来提高番茄对黄化曲叶病毒病的防御能力<sup>[31]</sup>。赵鑫<sup>[6]</sup>从蜂蜜样品分离的解淀粉芽孢杆菌 BH072 显示出对霉菌的抗真菌活性。吴黎明<sup>[23]</sup>报道了环二肽有诱导植物产生抗性的潜力,可进行深入研究。

### 2.4 在空间和营养物质上的竞争

贝莱斯芽孢杆菌被确定为解淀粉芽孢杆菌的后期异型体。内生贝莱斯芽孢杆菌 CC09 不仅能够在小麦根部中定殖,而且能够迁移至小麦的茎叶器官,起到一定的防病作用<sup>[16]</sup>。解淀粉芽孢杆菌 B4 能在枇杷果的表面迅速增殖,占据部分位点,通过与其菌丝相互缠绕,分泌特定的抗生素,或影响菌核形成,从而抑制霉菌菌丝生长<sup>[13]</sup>。

## 3 结语

目前,国内抗菌物质研究主要集中在目标菌株的筛选,以及抗菌成分的分离、纯化、鉴定、表征和作用机理上。芽孢杆菌产生的抗菌物质虽然很多,但单一抗菌成分的收率低,纯化工艺复杂,难以满足农业、工

业、食品等行业对抗菌物质日益增长的需求。因此,寻找合适的方法同时提高抗菌物质的产量和使用效率是重要的研究方向。基因组探测研究结果提供了许多新抗菌物质基因簇的信息,其是否为真正有效的抗菌物质,还需进一步研究试验。

#### 4 参考文献

- [1] 王贝贝.景天根际促生菌的筛选、基因组测序及培养基优化[D].泰安:山东农业大学,2018.
- [2] BANKURA K, MAITY D, MOLLICK M M R, et al. Identification and characterization of novel surfactins produced by fungal antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* 6B[J]. *Biotechnology & Applied Biochemistry*, 2014, 61(3): 349-356.
- [3] 陈欣怡.苹果轮纹病生防解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)PG12 主要生防机制研究[D].北京:中国农业大学,2016.
- [4] JAMAL Q, CHO J Y, MOON J H, et al. Identification for the first time of cyclo(D-Pro-L-Leu) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* Y1 as a nematocide for control of meloidogyne incognita[J]. *Molecules*, 2017, 22(11): 1-16.
- [5] 薛松.解淀粉芽孢杆菌在番茄上的定殖及拮抗青枯病的研究[D].海口:海南大学,2017.
- [6] 赵鑫.芽孢杆菌 BH072 抗菌因子的鉴定及其抗菌活性的研究[D].天津:天津大学,2017.
- [7] 苏翠珠.两株具有生防功能的根际细菌全基因组分析及联合应用[D].上海:上海师范大学,2017.
- [8] 段静.解淀粉芽孢杆菌 HZ-1510 壳聚糖酶基因的克隆、重组表达及其活性研究[D].武汉:华中农业大学,2017.
- [9] 王淋敏.贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)促生作用的研究[D].雅安:四川农业大学,2017.
- [10] 潘虹余,金玮望,张晓蒙,等.解淀粉芽孢杆菌 B15 抑菌物质对葡萄灰霉病灰葡萄孢的抑菌机理[J]. *微生物学报*, 2018, 58(7): 1245-1254.
- [11] 张臻.两株生防菌对小麦赤霉病和茎基腐病防治效果的评价[D].武汉:华中农业大学,2018.
- [12] 王慧.解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* K11 高效表达体系的建立及其高效表达元件的优化[D].北京:中国农业科学院,2018.
- [13] 孙亚芳.拮抗芽孢杆菌在枇杷采后保鲜中的应用及抑菌机制初探[D].杭州:浙江大学,2018.
- [14] 邓旗.贝莱斯芽孢杆菌 CMT-6 的 surfactin 合成基因表征及其响应溶氧的调控通路研究[D].湛江:广东海洋大学,2018.
- [15] 刘云鹏.根际促生解淀粉芽孢杆菌根际定殖和诱导植物系统抗性的机理研究[D].北京:中国农业科学院,2019.
- [16] 康星星.贝莱斯芽孢杆菌 CC09 防治小麦全蚀病菌侵染的机制[D].南京:南京大学,2019.
- [17] WANG A, WANG A, RAN C, et al. Use of probiotics in aquaculture of China—a review of the past decade[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 86: 734-755.
- [18] 刘亚萍.解淀粉芽孢杆菌抑菌活性物质提取、鉴定及在香蕉保鲜中的应用[D].泰安:山东农业大学,2019.
- [19] 曹晶晶.解淀粉芽孢杆菌对小麦黄花叶病的生物防治研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2015.
- [20] 侯宝宏.解淀粉芽孢杆菌 TS-1203 抑菌活性物质分析及制剂研制[D].兰州:甘肃农业大学,2016.
- [21] 许敏.解淀粉芽孢杆菌 GHt-q6 生防菌剂的研制和应用[D].晋中:山西农业大学,2017.
- [22] 李晓宇.解淀粉芽孢杆菌 LXY-6-2 筛选、鉴定、诱变与发酵条件优化及其对辣椒根腐病的生物防治研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2018.
- [23] 吴黎明.解淀粉芽孢杆菌 FZB42 生防功能及环二肽激发子功能研究[D].南京:南京农业大学,2016.
- [24] 刘冬.解淀粉芽孢杆菌与枯草芽孢杆菌对大豆疫病的生防作用及其机理研究[D].合肥:安徽农业大学,2019.
- [25] 姚佳明.解淀粉芽孢杆菌抑菌活性成分鉴定及机理研究[D].无锡:江南大学,2019.
- [26] 夏京津.解淀粉芽孢杆菌 HE 活性成分分析及安全性评价[D].武汉:华中农业大学,2019.
- [27] 杨洋.解淀粉芽孢杆菌 FZB42 抗菌脂肽 bacillomycin D 对禾谷镰孢菌拮抗机制的研究[D].南京:南京农业大学,2017.
- [28] 黎循航.桃流胶病拮抗微生物筛选及发酵产抗菌脂肽研究[D].无锡:江南大学,2016.
- [29] 王培松.解淀粉芽孢杆菌 MG-3 抗菌蛋白的纯化与性质研究[D].福州:福州大学,2018.
- [30] 王涛.抗真菌化合物 bacilysin 的制备、抑菌机制研究及结构改造的探索[D].杭州:浙江大学,2016.
- [31] 娄义.芽孢杆菌对番茄促生及防治番茄黄化曲叶病毒病机理研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2018.