

# 枯草芽孢杆菌 fmb60 菌株非核糖体肽类化合物对铜绿微囊藻生长的抑制作用

杨杰<sup>1,3</sup>, 王自山<sup>1,3</sup>, 柴金龙<sup>1,3</sup>, 陈扬<sup>1,3</sup>, 卢静<sup>1,3</sup>, 房耀维<sup>1,3</sup>, 王淑军<sup>1,3</sup>, 陆兆新<sup>2</sup>

1 江苏海洋大学 江苏省海洋生物资源与环境重点实验室, 江苏 连云港 222005

2 南京农业大学 食品科技学院, 江苏 南京 210095

3 江苏省海洋资源开发研究院, 江苏 连云港 222005

杨杰, 王自山, 柴金龙, 等. 枯草芽孢杆菌 fmb60 菌株非核糖体肽类化合物对铜绿微囊藻生长的抑制作用. 生物工程学报, 2021, 37(2): 625-634.

Yang J, Wang ZS, Chai JL, et al. Inhibition of *Microcystis aeruginosa* by *Bacillus subtilis* fmb60 non-ribosome peptide metabolites. Chin J Biotech, 2021, 37(2): 625-634.

**摘要:** 铜绿微囊藻是一种分布广泛的水华微藻, 可对人类健康和生态环境造成严重危害, 而枯草芽孢杆菌作为一种生防微生物可通过非核糖体肽合成酶合成多种生物活性物质。因此, 枯草芽孢杆菌 fmb60 非核糖体肽 (Non-ribosomal peptide, NRP) 类产物对铜绿微囊藻生长抑制作用的研究在水华治理方面具有重要的意义。利用基因组挖掘技术从枯草芽孢杆菌 fmb60 中分离鉴定出 bacillibactin、表面活性素 (Surfactin) 和芬芥素 (Fengycin) 3 种 NRP 类产物, 进而通过添加不同浓度的 NRP 类产物研究其对铜绿微囊藻生长的影响, 结果显示其对铜绿微囊藻 4 d 的半效应浓度值  $EC_{50.4d}$  为 26.5 mg/L, 且随着样品浓度的增加, 枯草芽孢杆菌 fmb60 的 NRP 类产物对铜绿微囊藻的抑制作用增强。当向其分别加入 50 mg/L 的样品时, 培养 4 d 的铜绿微囊藻  $F_v/F_m$ 、 $F_v/F_o$ 、Yield 参数分别比对照组降低了 2.8%、1.7%、2.0%。表明枯草芽孢杆菌 fmb60 NRP 类产物能够显著抑制铜绿微囊藻的光合作用强度及代谢合成, 从而为枯草芽孢杆菌抑藻剂的开发奠定理论基础。

**关键词:** 枯草芽孢杆菌, 非核糖体肽类产物, 铜绿微囊藻, 生长抑制

**Received:** June 25, 2020; **Accepted:** November 17, 2020

**Supported by:** China Postdoctoral Science Foundation (No. 2019M661767), Jiangsu Planned Projects for Postdoctoral Research Funds (No. 2019K015), Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions, Open-end Funds of Jiangsu Institute of Marine Resources (No. JSIMR201906), Jiangsu Ocean University Talent Introduction Research Project (No. KQ17028).

**Corresponding author:** Zhaoxin Lu. Tel/Fax: +86-25-84396583; E-mail: fmb@njau.edu.cn

中国博士后科学基金 (No. 2019M661767), 江苏省博士后科研资助计划 (No. 2019K015), 江苏高校优势学科建设工程资助项目, 江苏省海洋资源开发研究院开放课题 (No. JSIMR201906), 江苏海洋大学人才引进科研启动项目 (No. KQ17028) 资助。

网络出版时间: 2020-12-10

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20201209.1114.001.html>

## Inhibition of *Microcystis aeruginosa* by *Bacillus subtilis* fmb60 non-ribosome peptide metabolites

Jie Yang<sup>1,3</sup>, Zishan Wang<sup>1,3</sup>, Jinlong Chai<sup>1,3</sup>, Yang Chen<sup>1,3</sup>, Jing Lu<sup>1,3</sup>, Yaowei Fang<sup>1,3</sup>, Shujun Wang<sup>1,3</sup>, and Zhaoxin Lu<sup>2</sup>

1 Jiangsu Key Laboratory of Marine Bioresources and Environment, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, Jiangsu, China

2 College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

3 Jiangsu Marine Resources Development Research Institute, Lianyungang 222000, Jiangsu, China

**Abstract:** *Microcystis aeruginosa*, a type of algal bloom microalgae, is widely distributed in water, causing serious deteriorated effects on humans and the ecological environment. As a biocontrol microorganism, *Bacillus subtilis* can synthesize various bioactive substances through non-ribosomal peptide synthetase, to inhibit the growth of *M. aeruginosa*. Thus, it is imperative to investigate the non-ribosomal peptide (NRP) metabolites of *B. subtilis* fmb60. Three NRP metabolites from *B. subtilis* fmb60 including bacillibactin, surfactin and fengycin were extracted and identified by genome mining technology. The growth inhibition of *M. aeruginosa* was studied by adding various concentrations of NRP metabolites. The half-effect concentration value ( $EC_{50,4d}$ ) of *M. aeruginosa* was 26.5 mg/L after incubation for 4 days. With the increasing concentration, the inhibitory effects of NRP metabolites of *B. subtilis* fmb60 on *M. aeruginosa* was enhanced significantly. Compared with the control group, with the addition of 50 mg/L NRP metabolites to the *M. aeruginosa*, the content of Fv/Fm, Fv/Fo and Yield parameter after cultured for 4 days were decreased by 2.8%, 1.7% and 2.0%, respectively. Those findings indicate that the NRP metabolites of *B. subtilis* fmb60 can significantly inhibit the photosynthesis and metabolism of *M. aeruginosa*, which provides a theoretical foundation for the development of biological algae inhibitor of *B. subtilis*.

**Keywords:** *Bacillus subtilis* fmb60, NRP metabolites, *Microcystis aeruginosa*, growth inhibition

随着现代工业与农业生产的快速发展,大量含有氮、磷元素的废水直接排入水体,引起浮游植物的迅速增长,导致水体富营养化,从而破坏了水体生态系统的平衡。此外养殖业、捕捞业和运输业的过度发展,一定程度上破坏了水体的自然生态环境以及自净能力,促使水华现象频繁发生。铜绿微囊藻是造成水华现象的主要蓝藻之一,其在代谢过程中能够产生具有强烈肝毒性的微囊藻毒素,可通过污染水产品 and 饮用水危害人类的健康,给人类社会和自然界带来了巨大的影响<sup>[1]</sup>。目前化学法和物理法广泛应用于铜绿微囊藻的治理,然而人工合成产物的添加对环境产生了不利的影响,同时对其他水生生物也有不良作用<sup>[2-4]</sup>。因此,开发环境友好型的抑藻剂越来越受到人们的关注。微生物通过营养竞争、分泌活性物质等方面来实现对藻类的生长抑制,同时微生物具有分布广泛、种类丰富及环境友好等特点,在铜绿

微囊藻防治方面表现出巨大潜力<sup>[5-7]</sup>。

枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 是一种属于革兰氏阳性菌的生物安全菌株,广泛存在于自然界中,有着强大的分泌表达系统。非核糖体肽(Non-ribosomal peptide, NRP)类产物是枯草芽孢杆菌在代谢过程中产生的一类重要的生物活性物质,具有广泛的抗菌、抗肿瘤、表面活性,在农业、工业和生物防治方面具有重要的应用前景<sup>[8]</sup>。本课题组前期从植物堆肥中筛选得到一株枯草芽孢杆菌 fmb60,对多种细菌和真菌具有良好的抑制活性。antiSMASH 预测表明其基因组中包含 3 个非核糖体肽合成酶(Non-ribosomal peptide synthetase, NRPS)基因簇,分析发现其分别和 surfactin (srf)、fengycin (fen) 以及 bacillibactin (dhh) 合成酶高度同源,同源性分别达到了 78%、100% 和 92%。表明枯草芽孢杆菌 fmb60 具备合成多种 NRP 类产物的潜力<sup>[9]</sup>。本实验主要通过研究枯草芽孢杆菌

fmb60 代谢过程中的 NRP 类化合物对铜绿微囊藻的生长抑制的影响,为枯草芽孢杆菌代谢产物在抑藻剂的开发方面奠定理论和应用基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

*B. subtilis* fmb60 保藏于本实验室;铜绿微囊藻 *M. aeruginosa* 购自中国科学院淡水藻种库 FACHB-905;色谱试剂购自美国天地公司;分析试剂购自上海国药集团有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 *B. subtilis* fmb60 的发酵

挑取一环 *B. subtilis* fmb60 菌种接种于装有 100 mL BPY 培养基的 250 mL 三角瓶中,37 °C、180 r/min 活化 16–18 h,以 3% 的接种量接种于装有 100 mL Landy 培养基的 250 mL 三角瓶中,37 °C、180 r/min 培养 36 h,获得 *B. subtilis* fmb60 发酵液。

#### 1.2.2 *B. subtilis* fmb60 NRPS 基因簇代谢产物的分离与鉴定

将获得的 *B. subtilis* fmb60 发酵液在常温条件下 8 000×g 离心 20 min 除去菌体,收集发酵上清液,将获得的上清液用 6 mol/L 的 HCl 调节其 pH 至 2.0,静置过夜后 8 000×g 离心 20 min 收集沉淀,按每 1 L 酸沉溶液所得的沉淀加入 50 mL 甲醇进行溶解提取,获得 *B. subtilis* fmb60 NRP 类产物。

根据 antiSMASH 预测结果,将通过上述方法获得粗提物采用 HPLC-MS/MS 鉴定相应产物,条件如下所示。(1) HPLC 部分: Eclipse Plus C18 色谱柱 (Φ2.1 mm×150 mm, 3.5 μm);进样量: 5 μL;柱温: 35 °C;检测波长: 210 和 280 nm;流速: 0.25 mL/min;检测时间: 40 min;流动相: A 相为超纯水,B 相为乙腈;0–40 min,A 相:90%–10%。(2) 电喷雾质谱 (ESI-MS) 部分:操作电压为 4.5 kV,操作温度为 300 °C,操作压力为 2 MPa,

检测方式:正离子模式。

#### 1.2.3 铜绿微囊藻的培养和生长曲线测定

将铜绿微囊藻转入三角烧瓶内,放置在多段编程恒温光照培养箱中培养,光照强度设置为 2 000 lx,光暗比设置为 12 h:12 h,控制温度为 (25±1) °C。首先将藻种培养 20–30 d,活化藻种;然后取 10 mL 接种于 50 mL 锥形瓶内扩大培养,每天摇瓶 2–3 次。通过血球计数板计数,绘制铜绿微囊藻生长曲线。

#### 1.2.4 *B. subtilis* fmb60 NRP 类产物对铜绿微囊藻生长抑制的测定

生长抑制的测定在 250 mL 的三角瓶中进行,每一个三角瓶中的藻液总体积为 100 mL。确定藻种的初始密度  $X$  个/mL,根据上述结果设定实验组藻密度为  $2.4\times 10^7$  个/mL,需要的藻种体积  $Y$  (mL),取  $Y$  (mL) 藻种加入到 250 mL 三角瓶中,再加入 (100– $Y$ ) mL 培养基使三角瓶中的总体积为 100 mL。使用 BG-11 培养基溶解实验所用药品,并分别按照所需的浓度梯度进行稀释,配制样品终浓度为 20、30、40、50 mg/L 共 4 个浓度。未加样品处理的藻种为对照组。每组样品浓度都设置 3 个平行,每组平行实验都测定 3 个在入射光波长 680 nm 处的吸光度数据。将每个药品浓度组所测得的共 9 个吸光度数据取平均值,利用吸光值和藻密度之间的线性关系计算得到不同药品浓度组的藻种密度。加入藻种体积计算公式: $Y=2.4\times 10^7\times 100/X$ 。

为了进一步观察 *B. subtilis* fmb60 NRP 类产物对铜绿微囊藻细胞形态的影响,将经过终浓度为 50 mg/L 的样品处理 24 h 的铜绿微囊藻细胞在 5 000 r/min 离心 10 min,收集细胞,用磷酸氢钠缓冲液 (50 mmol/L, pH 7.2) 洗涤 2 次,然后将获得的细胞预先用 2.5% 戊二醛固定。最后利用透射电镜观察 NRP 类产物对铜绿微囊藻细胞形态的影响。

### 1.2.5 测定指标和分析方法

采用分光光度法测定添加样品培养后的铜绿微囊藻的叶绿素 a 的含量<sup>[10]</sup>。准确量取 10 mL 藻液于 15 mL 离心管中, 5 000 r/min 离心 10 min, 离心后弃上清液, 藻细胞加入 5 mL 无水乙醇并摇匀, 置于 4 °C 的冰箱避光处理 24 h, 5 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液为待测样品。

使用紫外分光光度计测定待测液体于 632 nm、649 nm、665 nm、696 nm 处的吸光度。

叶绿素 a 的含量:  $CA=0.0604 \times A_{632} - 4.5224 \times A_{649} + 13.2969 \times A_{665} - 1.7453 \times A_{696}$ 。

利用浮游植物分类荧光仪 (PHYTO-PAM) 对待测藻液的各个叶绿素荧光参数进行测定。打开 FluorPen 软件, 先放置 1 mL 待测藻液 (每次测定体积应统一) 在比色皿中暗适应 15 min, 启动仪器测定初始荧光产量  $F_0$ , 饱和脉冲后测定最大荧光产量  $F_m$ 、LC, 以此计算出最大光能转化效率  $F_v/F_m$ 、潜在活性  $F_v/F_0$ 、实际光量子产量

Yield、rETRmax、 $I_k$  值。

试验数据为 3 次重复实验的平均值, 表示为  $\bar{x} \pm s$ 。数据处理和图表绘制采用 Origin 9.0 软件。

## 2 结果与分析

### 2.1 *B. subtilis* fmb60 NRP 类产物的分离与鉴定

根据 antiSMASH 预测分析结果, 利用 HPLC 和 HPLC-MS/MS 技术对 bacillibactin、surfactin 与 fengycin 进行分离、鉴定。利用 HPLC-MS 分析图 1A 中样品液相峰发现, 样品中含有质荷比  $[M+H]^+$  为 882.9  $m/z$  和 1 435.6  $m/z$ 、1 449.8  $m/z$ 、1 463.9  $m/z$ 、1 477.9  $m/z$ 、1 491.8  $m/z$ 、1 505.9  $m/z$  以及 994.2  $m/z$ 、1 008.8  $m/z$ 、1 002.4  $m/z$ 、1 036.4  $m/z$ 、1 050.5  $m/z$  的 3 组质谱峰。进一步 MS/MS 分析 (图 1B), 比对 bacillibactin、surfactin 和 fengycin 3 种抗菌脂肽的相关研究<sup>[11-13]</sup>, 确认了 3 种化合物的结构。同时与实验室保存的 3 种化合物标准品分别对比, 测得样品的含量为 95%。

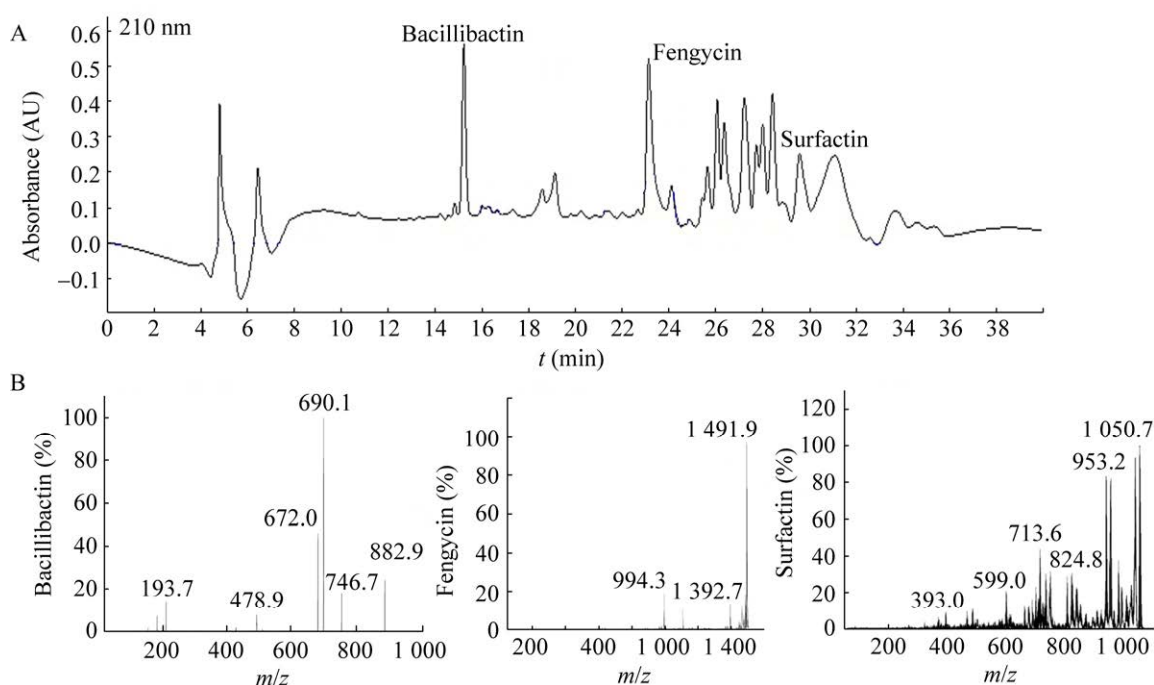


图 1 *B. subtilis* fmb60 NRP 类产物的分析与鉴定 (A: *B. subtilis* fmb60 NRP 类化合物 HPLC 图谱; B: Bacillibactin、fengycin 和 surfactin 二级质谱图)

Fig. 1 Analysis and identification of *B. subtilis* fmb60 NRP metabolites. (A) HPLC. (B) MS/MS spectra of bacillibactin, fengycin and surfactin.

## 2.2 铜绿微囊藻生长曲线测定

测定铜绿微囊藻的培养过程中藻密度的变化,结果表明接种 4 d 后铜绿微囊藻的生长进入对数期,藻种生长速度达到最大值,繁殖速度快,藻细胞数量呈指数递增。通过显微镜观察发现,接种 10–14 d 时藻种个体形态和生理特性稳定,藻种处于最佳状态。因此,确定在铜绿微囊藻接种的 12 d 为活性测试实验的最适时期。

## 2.3 *B. subtilis* fmb60 NRP 类产物对铜绿微囊藻生长抑制的影响

通过细胞计数可以直观地反映铜绿微囊藻的生长状况。由图 2 可以看出 *B. subtilis* fmb60 NRP 类产物对铜绿微囊藻具有明显的抑制效果,且随着样品浓度的增加而增强,培养 4 d 时,不同浓度的样品对铜绿微囊藻的抑制率分别为 37.7%、54.5%、64.1% 和 70.8%。*B. subtilis* fmb60 NRP 类产物对铜绿微囊藻 4 d 的半效应浓度值  $EC_{50,4d}$  为 26.5 mg/L,且随着时间的增加,其对铜绿微囊藻的生长抑制效果先迅速增加而后趋势变缓。

利用透射电镜观察铜绿微囊藻细胞形态的变化,结果见图 3,可以看出未经样品处理的铜绿微囊藻细胞形态饱满,呈规则的球形,且细胞表面完好;而经过 *B. subtilis* fmb60 NRP 类产物处理的铜绿微囊藻细胞表面破裂,细胞形态呈扁平状,胞内物质外泄。说明样品会破坏细胞的形态,从而对铜绿微囊藻的生长起到抑制作用。因此,推

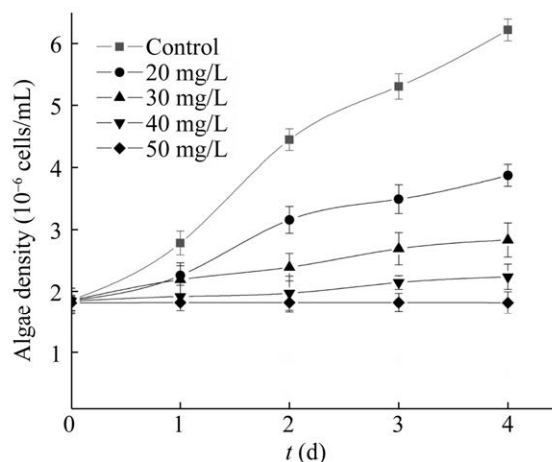


图 2 不同浓度的样品对铜绿微囊藻密度的影响  
Fig. 2 The effects of different concentrations of drugs on the density of *M. aeruginosa*.

测 *B. subtilis* fmb60 NRP 类产物主要作用于细胞表面,在其表面形成孔洞,从而使得细胞内容物泄漏,造成细胞死亡。研究表明 fengycin 和 surfactin 主要作用于细胞壁,在细胞表面形成孔洞,同时抑制细胞膜的合成,从而使细胞快速去极化,造成细胞死亡<sup>[14]</sup>。然而,由于作用机制的不同, fengycin 主要抑制真核微生物的细胞膜的合成, surfactin 主要作用于细菌细胞膜<sup>[15]</sup>。

## 2.4 *B. subtilis* fmb60 NRP 类产物对铜绿微囊藻叶绿素 a 含量的影响

铜绿微囊藻细胞内的叶绿素 a 主要位于光合系统 II 的核心复合体上,能够吸收能量传递到反

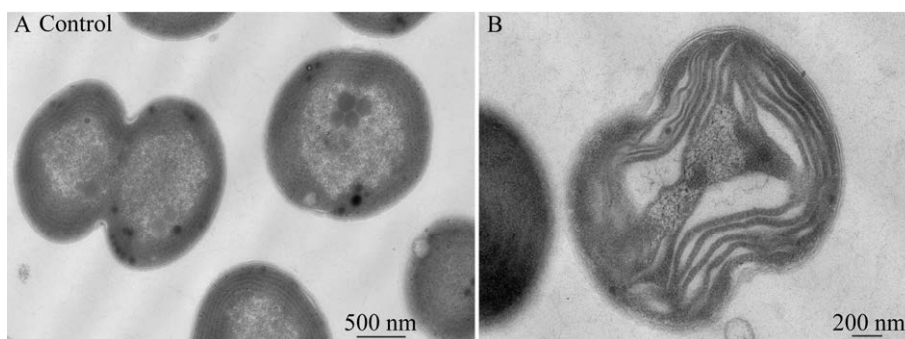


图 3 *B. subtilis* fmb60 NRP 类产物对铜绿微囊藻细胞形态的影响

Fig. 3 The effect of *B. subtilis* fmb60 NRP metabolites on the cell morphology of *M. aeruginosa*. (A) Control. (B) *M. aeruginosa* cell morphology after adding 50 mg/L drugs.

应中心从而进行光化学反应<sup>[16]</sup>。当藻细胞受到环境胁迫，其生理过程就会受到影响，将直接或间接地影响到叶绿素 a 含量。因此，叶绿素 a 的含量变化是藻类受到胁迫的生理反应指标。由图 4 可知，经过 *B. subtilis* fmb60 NRP 类产物处理后的铜绿微囊藻细胞中叶绿素 a 的含量显著低于对照组，表明其光化学反应受到了抑制。当样品浓度为 30 mg/mL 时，铜绿微囊藻细胞叶绿素 a 含量为对照组的 66.7%，而随着样品浓度继续增加，铜绿微囊藻细胞叶绿素 a 的含量无显著变化。此外，在相同样品浓度下，不同处理时间对铜绿微囊藻细胞中叶绿素 a 的含量无显著影响。

## 2.5 *B. subtilis* fmb60 NRP 类产物对铜绿微囊藻荧光特性的影响结果

Fv/Fm 指的是 PS II 的最大光化学量子产量，是对光系统 II 光化学反应可能达到的最大产量的评估，一旦当藻种受到外界环境条件胁迫，该值就会降低，其是研究外界环境胁迫等因素对光合作用产生的影响的重要指标<sup>[17]</sup>。由图 5A 可知，随着样品浓度的增加，铜绿微囊藻的 Fv/Fm 值降低，这表明其受到的抑制程度增强。特别是培养第 4 天时，50 mg/L 样品处理组的铜绿微囊藻的 Fv/Fm 仅为对照组的 2.8%。

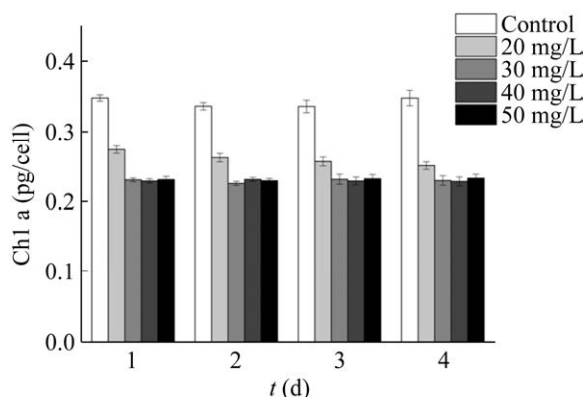


图 4 不同浓度的样品对铜绿微囊藻叶绿素 a 含量的影响

Fig. 4 The effects of different concentrations of drugs on the chlorophyll a content in *M. aeruginosa*.

Fv/Fo 反映了光反应中心 PS II 的潜在活性，当受到环境条件胁迫时，其值下降，是用于判断光合作用是否受到抑制的指标之一<sup>[17]</sup>。图 5B 结果表明从 1 d 开始，铜绿微囊藻的 Fv/Fo 值出现显著下降，随着时间的延长，下降趋势明显。当培养到 4 d 时，50 mg/L 样品处理组铜绿微囊藻的 Fv/Fo 值仅为对照的 1.7%。且随着样品浓度的增加，铜绿微囊藻的 Fv/Fo 值降低，表明样品对铜绿微囊藻的光合作用产生抑制作用。

$\alpha$  值反映藻细胞对光能的利用效率<sup>[18]</sup>。由图 5C 可知，对照组的  $\alpha$  值一直维持在 0.14–0.15 之间，而实验组的  $\alpha$  值随着样品浓度的增加呈现不断下降的趋势，说明样品处理组的铜绿微囊藻对光能的利用效率不断降低。尤其是在加入 50 mg/L 的药品后，实验第 2 天时铜绿微囊藻的  $\alpha$  值已接近 0，实验后期也维持了显著的抑制效果。

Yield 指在光合作用中每吸收 1 个光子，所固定 CO<sub>2</sub> 分子数或者释放 O<sub>2</sub> 的分子数，可以用来指示代谢合成强度<sup>[18]</sup>。由图 5D 可知，随着样品浓度的增加，铜绿微囊藻的 Yield 受到的抑制程度不断增强。培养 3 d 时，加入 50 mg/L 样品处理组铜绿微囊藻的 Yield 值下降为对照组的 2.0%。结果表明，加入样品后，铜绿微囊藻的光反应中心受抑制的程度越来越严重，代谢合成受到的阻碍程度越来越高。

rETR<sub>max</sub> 是指最大相对电子传递速率，反映了植物对光能的利用效率，是光合活性的重要指标，可以指示藻类的生长潜能。由图 5E 可知，随着样品浓度的增加，铜绿微囊藻的 rETR<sub>max</sub> 逐渐下降，对光能的利用效率逐渐减弱。当加入 50 mg/L 的样品培养 2 d 时，铜绿微囊藻的 rETR<sub>max</sub> 值下降至 0，且在测定的时间内保持不变，说明样品对铜绿微囊藻的光合活性抑制作用是持续的，藻细胞的光合系统 II 遭受到了不可恢复的破坏。

I<sub>k</sub> 是半饱和光照强度，反映了藻类对强光耐受能力的强弱<sup>[18]</sup>。由图 5F 可以看出，随着样品

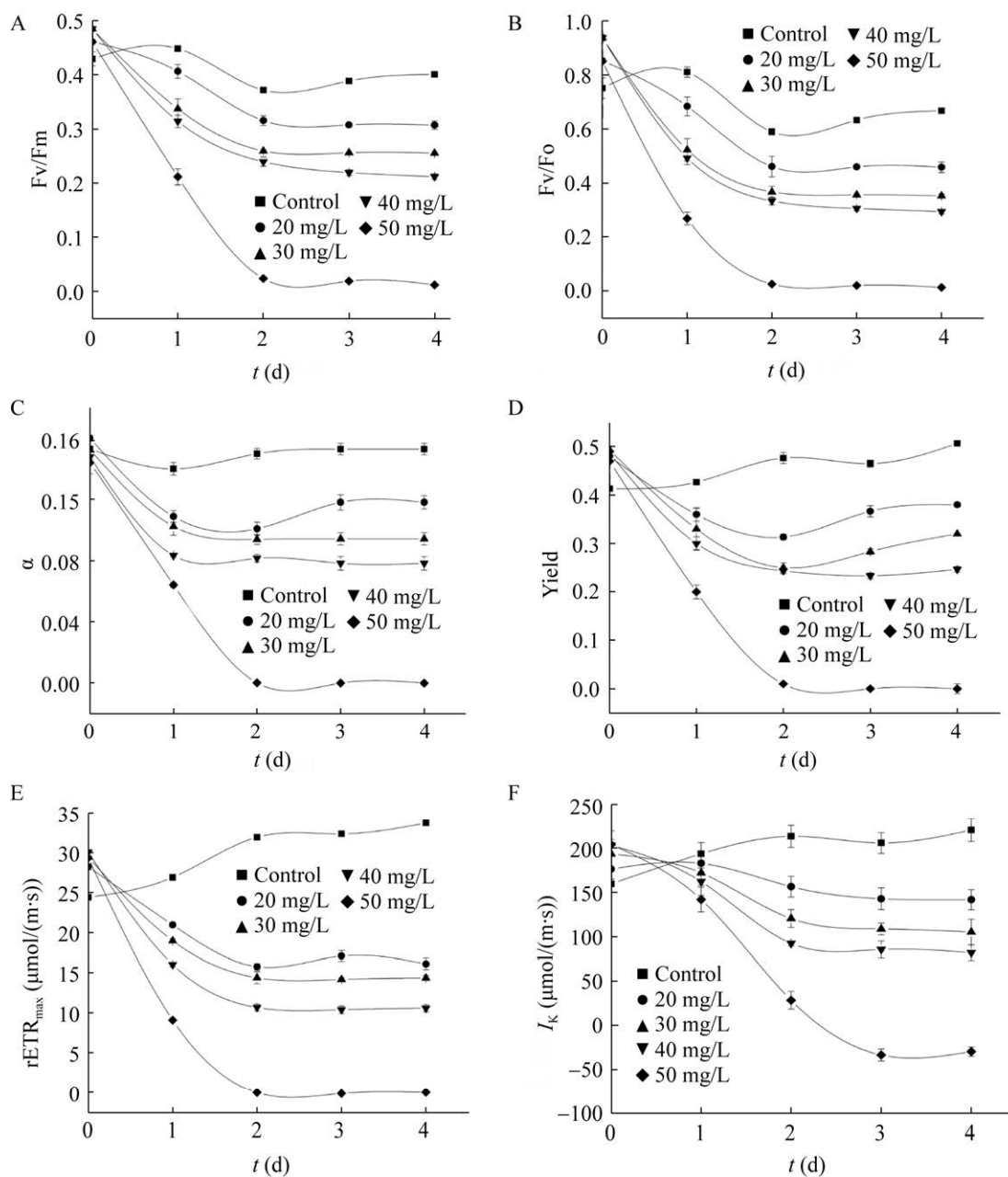


图 5 不同浓度的样品对铜绿微囊藻荧光特性的影响 (A: 不同浓度的样品对铜绿微囊藻最大光量子产量  $F_v/F_m$  的影响; B: 不同浓度的样品对铜绿微囊藻潜在活性的影响; C: 不同浓度的样品对铜绿微囊藻  $\alpha$  值的影响; D: 不同浓度的样品对铜绿微囊藻实际光量子产量的影响; E: 不同浓度的样品对铜绿微囊藻  $rETR_{max}$  的影响; F: 不同浓度的样品对铜绿微囊藻  $I_k$  的影响)

Fig. 5 Effects of different concentrations of samples on the fluorescence characteristics of *M. aeruginosa*. (A) The effects of different concentrations of drugs on the maximum light quantum yield  $F_v/F_m$  of *M. aeruginosa*. (B) The effects different concentrations of drugs on the potential activity of *M. aeruginosa*. (C) The effects different concentrations of drugs on  $\alpha$  of *M. aeruginosa*. (D) The effects of different concentrations of drugs on the actual quantum production of *M. aeruginosa*. (E) The effects of different concentrations of drugs on the  $rETR_{max}$  of *M. aeruginosa*. (F) The effects of different concentrations of drugs on the  $I_k$  of *M. aeruginosa*.

浓度的增加,铜绿微囊藻的  $I_k$  值不断降低,和  $rETR_{max}$  的变化规律一致,加入 50 mg/L 的样品培养 2 d 时,铜绿微囊藻的  $rETR_{max}$  值下降至对照组的 13.2%,培养至 3 d 时,铜绿微囊藻的  $rETR_{max}$  值下降至 0 以下,说明藻类生长潜能受到抑制伴随而来的是对强光耐受能力的减弱。

### 3 讨论

铜绿微囊藻是引起水华的一种主要藻类,铜绿微囊藻在代谢过程中能够产生微囊藻毒素,引起水生生态系统的失衡,同时威胁人类健康<sup>[19]</sup>。因此,研究铜绿微囊藻的防治具有重要的意义。生物法对有害藻类的抑制是水华防治的有效手段之一。*B. subtilis* 作为一种公认安全 (GRAS) 的细菌,广泛存在于自然界中,对环境友好,同时 *B. subtilis* 在代谢过程中可以产生多种活性物质,其中 NRP 类产物是目前研究最为广泛的产物,在农业、工业和生物防治等方面具有重要的应用价值<sup>[20-21]</sup>。

微生物对有害藻类的抑制作用主要体现在对其细胞形态、光合作用系统的影响。本研究通过测定 *B. subtilis* fmb60 NRP 类产物 surfactin、fengycin 和 bacillibactin 对于铜绿微囊藻生长的抑制、细胞形态的变化、光合作用系统的影响,发现 *B. subtilis* fmb60 NRP 类产物对铜绿微囊藻的抑制效果明显,抑制程度高,且随着样品浓度的增加,对铜绿微囊藻的抑制作用不断增强。

目前对 *B. subtilis* 抑制藻类的机制研究较少,有报道指出 *B. subtilis* 可通过代谢过程中产生活性物质间接的抑制铜绿微囊藻的生长<sup>[22-23]</sup>。此外,芽孢杆菌的无菌滤液可破坏藻细胞膜的完整性,从而抑制藻的生长<sup>[24]</sup>。本研究结果进一步表明 *B. subtilis* fmb60 在代谢过程中产生的 surfactin、fengycin 和 bacillibactin 能够破坏铜绿微囊藻的细胞结构,从而抑制其生长,这与前人研究结果一致。然而其作用机制尚不清楚,surfactin

和 fengycin 是 *B. subtilis* 通过 NRPS 途径产生的脂肽类物质,surfactin 具有很强的表面活性,对多种细菌具有良好的抑菌活性<sup>[25]</sup>。Fengycin 对多种丝状真菌具有良好的抑制作用,而对细菌却无明显的活性,然而研究表明 surfactin 可以增强 fengycin 对真菌的抑制效果<sup>[26]</sup>。Surfactin 和 fengycin 对微生物抑制作用主要是作用于微生物细胞膜,抑制其合成而造成细胞凋亡。Bacillibactin 是 *B. subtilis* 通过 B 型 NRPS 途径产生的一种儿茶素类嗜铁素,通过竞争生物生长必需的铁离子抑制植物病害菌的生长<sup>[27]</sup>。因此,推测 *B. subtilis* fmb60 中 surfactin、fengycin 和 bacillibactin 可协同作用于铜绿微囊藻细胞膜,在细胞表面形成孔洞,使藻细胞损伤和破裂,导致细胞内物质流失和细胞凋亡。

光合作用是藻类细胞生长繁殖的基础,藻细胞光合作用系统受到抑制,必将影响藻类的生长。本研究发现,在 surfactin、fengycin 和 bacillibactin 作用下,铜绿微囊藻细胞中叶绿素 a、最大光化学量子产量 Fv/Fm、光反应中心 PS II 的潜在活性 Fv/Fo、 $\alpha$  值、实际光量子产量 Yield、最大相对电子传递速率  $rETR_{max}$  值以及半饱和光照强度  $I_k$  都显著下降,说明铜绿微囊藻细胞无法进行正常的光合作用,阻碍了铜绿微囊藻的光合电子链传递,从而引起铜绿微囊藻对光能的利用效率以及潜在最大光合速率均受到抑制,导致 PS II 的光合能量传递受阻,同时降低了铜绿微囊藻对强光的耐受能力<sup>[16,28]</sup>。

综上所述,本研究表明 *B. subtilis* NRP 类产物对有害藻类有显著的抑制效果,可为微生物控藻对水华治理奠定理论基础,具有一定的开发潜力。

### REFERENCES

- [1] Zhang CC, Massey IY, Liu Y, et al. Identification and characterization of a novel indigenous algicidal bacterium *Chryseobacterium* species against *Microcystis aeruginosa*. J Toxicol Environ Health A,



- 2019, 82(15): 845-853.
- [2] Shu YL, Yan T, Fang M, et al. Effects of electron beam irradiation on proteins and exopolysaccharide production and changes in *Microcystis aeruginosa*. *Int J Radiat Biol*, 2020, 96(5): 689-696.
- [3] Diaz D, Church J, Young M, et al. Silica-quaternary ammonium "Fixed-Quat" nanofilm coated fiberglass mesh for water disinfection and harmful algal blooms control. *J Environ Sci*, 2019, 82: 213-224.
- [4] 郑宁宁, 孙丽, 丁宁, 等. 有害微藻抑藻细菌多样性及抑藻机制研究进展. *微生物学通报*, 2019, 46(5): 1204-1219.
- Zheng NN, Sun L, Ding N, et al. Diversity of algicidal bacteria associated with harmful microalgae and the algicidal mechanisms. *Chin J Microbiol*, 2019, 46(5): 1204-1219 (in Chinese).
- [5] Wu LM, Wu HJ, Chen LN, et al. Bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 has specific bactericidal activity against harmful algal bloom species. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(24): 7512-7520.
- [6] Shi RJ, Huang HH, Zhan HQ, et al. Algicidal activity against *Skeletonema costatum* by marine bacteria isolated from a high frequency harmful algal blooms area in southern Chinese coast. *World J Microb Biot*, 2013, 29(1): 153-162.
- [7] Lu YP, Wang J, Zhang XQ, et al. Inhibition of the growth of *Cyanobacteria* during the recruitment stage in Lake Taihu. *Environ Sci Pollu Res*, 2016, 23(6): 5830-5838.
- [8] Kaspar F, Neubauer P, Gimpel M. Bioactive secondary metabolites from *Bacillus subtilis*: a comprehensive review. *J Nat Prod*, 2019, 82(7): 2038-2053.
- [9] 杨杰. 枯草杆菌 fmb60 的 NRPS 和 I 型 PKS 基因簇代谢产物发掘及其生物活性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2017.
- Yang J. Genomics-driven discovery of NRPS and Type I PKS metabolites from *Bacillus subtilis* fmb60 and their bioactivity[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [10] Ritchie RJ. Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls *a*, *b*, *c*, and *d* and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. *Photosynthetica*, 2008, 46(1): 115-126.
- [11] Sen R. Surfactin: biosynthesis, genetics and potential applications//Sen R. *Biosurfactants*. New York, NY: Springer, 2010: 316-323.
- [12] Luo CP, Liu XH, Zhou X, et al. Unusual biosynthesis and structure of locillomycins from *Bacillus subtilis* 916. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(19): 6601-6609.
- [13] Raza W, Wu HS, Shah MAA, et al. A catechol type siderophore, bacillibactin: biosynthesis, regulation and transport in *Bacillus subtilis*. *J Basic Microbiol*, 2008, 48(2), doi: 10.1002/jobm.200800097.
- [14] Sur S, Romo TD, Grossfield A. Selectivity and mechanism of fengycin, an antimicrobial lipopeptide from molecular dynamics. *J Phys Chem B*, 2018, 122(8): 2219-2226.
- [15] Sur S, Grossfield A, Romo TD. Insights into the mechanism of fengycin, an antimicrobial lipopeptide using multiscale simulations. *Biophys J*, 2016, 110(3): 76a.
- [16] 谭啸, 戴凯文, 段志鹏, 等. 萘对铜绿微囊藻和聚球藻生长及叶绿素荧光影响的比较. *河海大学学报(自然科学版)*, 2018, 46(2): 115-121.
- Tan X, Dai KW, Duan ZP, et al. Comparison of the effects of naphthalene on the growth and chlorophyll fluorescence of *Microcystis aeruginosa* and *Synechococcus* sp.. *J Hohai Univ (Nat Sci)*, 2016, 46(2): 115-121 (in Chinese).
- [17] 于燕. 多功能溶藻链霉菌的分离及其对铜绿微囊藻溶藻特性的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2019.
- Yu Y. Isolation and characterization of a multifunctional algicidal *Streptomyces* sp. strain against *Microcystis aeruginosa*[D]. Chongqing: Southwest University, 2019 (in Chinese).
- [18] 朱俊英, 刘碧云, 王静, 等. 穗花狐尾藻化感作用对铜绿微囊藻光合效率的影响. *环境科学*, 2011, 32(10): 2904-2908.
- Zhu JY, Liu BY, Wang J, et al. Allelopathic influence of *Myriophyllum spicatum* on the photosynthetic efficiency of *Microcystis aeruginosa*. *Environ Sci*, 2011, 32(10): 2904-2908 (in Chinese).
- [19] Hettiarachchi IU, Sethunga S, Manage PM. Contamination status of algae toxins *Microcystins* in some selected water bodies in Sri

- Lanka/Proceedings of International Forestry and Environment Symposium. Sri Lanka: University of Sri Jayewardenepura, 2014.
- [20] 许艳婷, 宋瑞雪, 田聪琦, 等. 抑藻菌株 *Bacillus* sp. hsn 03 分离鉴定及其对铜绿微囊藻的抑制效果与特征. 微生物学通报, 2018, 45(12): 2592-2602.
- Xu YT, Song RX, Tian CQ, et al. Isolation and identification of *Bacillus* sp. hsn03 with algicidal activity on *Microcystis aeruginosa*. Microbiol China, 2018, 45(12): 2592-2602 (in Chinese).
- [21] Yang J, Zhu XY, Cao MM, et al. Genomics-inspired discovery of three antibacterial active metabolites, aurantinins B, C, and D from compost-associated *Bacillus subtilis* fmb60. J Agric Food Chem, 2016, 64(46): 8811-8820.
- [22] 程新, 李昆太, 黄林. 一株枯草芽孢杆菌的生长特性及抑藻效果研究. 生物技术通报, 2017, 33(7): 120-125.
- Cheng X, Li KT, Huang L. Research on growth characteristics and algicidal effects of *Bacillus subtilis*. Biotechnol Bull, 2017, 33(7): 120-125 (in Chinese).
- [23] 张睿, 王广军, 李志斐, 等. 枯草芽孢杆菌对铜绿微囊藻抑制效果的研究. 中国环境科学, 2015, 35(6): 1814-1821.
- Zhang R, Wang GJ, Li ZF, et al. Inhibition of *Microcystis aeruginosa* by *Bacillus subtilis*. China Environ Sci, 2015, 35(6): 1814-1821 (in Chinese).
- [24] 李蕾. 溶藻细菌的分离鉴定及其胞外活性物质对球形棕囊藻的溶藻特性研究[D]. 广州: 暨南大学, 2012.
- Li Q. Isolation and identification of algicidal bacteria and characteristics study of algicidal bacteria on *Phaeocystis globosa*[D]. Guangzhou: Master's Thesis of Jinan University, 2012 (in Chinese).
- [25] Abdelli F, Jardak M, Elloumi J, et al. Antibacterial, anti-adherent and cytotoxic activities of surfactin(s) from a lipolytic strain *Bacillus safensis* F4. Biodegradation, 2019, 30(4): 287-300.
- [26] Li Y, Héloir MC, Zhang X, et al. Surfactin and fengycin contribute to the protection of a *Bacillus subtilis* strain against grape downy mildew by both direct effect and defence stimulation. Mol Plant Pathol, 2019, 20(8): 1037-1050.
- [27] Raza W, Hussain Q, Shen QR. Production, regulation and transportation of bacillibactin in *Bacillus subtilis*. J Chem Soc Pakistan, 2012, 34(4): 996-1002.
- [28] Zhang HJ, Lv JL, Peng Y, et al. Cell death in a harmful algal bloom causing species *Alexandrium tamarense* upon an algicidal bacterium induction. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 98(18): 7949-7958.

(本文责编 郝丽芳)