

吡咯伯克霍尔德氏菌JK-SH007产嗜铁素的相关基因克隆及条件优化

陈艳彬¹, 韩燕燕¹, 王斐¹, 叶建仁², 任嘉红^{1*}

(1. 长治学院生物科学与技术系, 长治 046011; 2. 南京林业大学林学院, 南京 210037)

摘要: 为了明确吡咯伯克霍尔德氏菌 *Burkholderia pyrrocinia* JK-SH007 是否产嗜铁素, 揭示其生防机制, 本文通过 CAS 检测该菌株产嗜铁素的能力, 并对其嗜铁素合成相关基因 *cepR* 进行克隆及序列分析, 同时采用单因素试验及响应面法对菌株 JK-SH007 产嗜铁素条件进行优化。结果表明, 菌株 JK-SH007 具有明显的产嗜铁素能力, 其嗜铁素合成相关基因 *cepR* 大小为 720 bp, 与 *B. pyrrocinia* (EU034001) 的亲缘关系最近, 同源性为 99%, 两者序列相似性为 97%, 13 个位点出现 SNP; 另外菌株 JK-SH007 *cepR* 基因编码的氨基酸序列有 3 个氨基酸发生了替换, 两者一致性为 97%。该菌产嗜铁素最优培养时间是 15 h、pH 8、转速 200 r/min、最佳碳源和氮源分别是甘油和氯化铵; PB 试验筛选出影响该菌株产嗜铁素的关键性因素分别是 pH、加碳量、加氮量; CCD 试验结果显示, pH 和加氮量的交互作用较明显; 最终采用 Design-Expert 软件分析出菌株 JK-SH007 产嗜铁素最佳方案为碳源加入量 15.00 g/L、氮源加入量 10.50 g/L、温度 30 °C、pH 7.36, 优化后菌株产嗜铁素能力由 18.59 提升到 37.86, 响应面优化产嗜铁素条件的效果是显著的, 嗜铁素产量得到明显提高。

关键词: 吡咯伯克霍尔德氏菌; 嗜铁素; *cepR* 基因

中图分类号: S476 文献标识码: A 文章编号: 1005-9261(2019)04-0630-12

Cloning and Conditions Optimization of the Siderophore Producing Gene for *Burkholderia pyrrocinia* JK-SH007

CHEN Yanbin¹, HAN Yanyan¹, WANG Fei¹, YE Jianren², REN Jiahong^{1*}

(1. Department of Biological Science and Technology, Changzhi College, Changzhi 046011, China; 2. College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: Siderophore plays an important role in the plant growth promotion and plant disease control. The effective biocontrol strain *Burkholderia pyrrocinia* JK-SH007 was isolated from the poplar stem. In order to determine whether JK-SH007 strain can produce siderophore and reveal its biocontrol mechanism, the ability of the strain to produce siderophore was detected by CAS detection, the *cepR* gene of JK-SH007 was cloned and the sequence was analyzed. On the basis of single factor experiment, response surface method (RSM) was used to optimize the siderophore production conditions of JK-SH007 strain. The results showed that JK-SH007 strain has the capacity to produce siderophore, and the *cepR* gene size of JK-SH007 was 720 bp. The strain was most closely related to *B. pyrrocinia* (EU034001), with 99% homology, 97% the sequence similarity was and SNP at 13 sites. Compared with the *cepR* gene of *B. pyrrocinia* (EU034001), three amino acids encoded by *cepR* gene of JK-SH007 were found to be replaced and the consistency was 97%. The experiment of siderophore production showed that the optimal culture time for siderophore producing was 15 h, the pH value of the medium was 8, and

收稿日期: 2018-11-29

基金项目: 国家自然科学基金 (31470645); 山西省 1331 重点学科建设项目 (1331KSC); 山西省重点学科建设 (FSKSC)

作者简介: 陈艳彬, 硕士, 高级实验师, E-mail: yanbin_happy@163.com; *通信作者, 博士, 教授, E-mail: renjiahong@163.com。

DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2019.04.001

the rotating speed was 200 r/min. The optimal carbon and nitrogen sources were glycerin and ammonium chloride. According to PB (Plackett-Burman) experiment, the key factors influencing siderophore producing were pH, carbon and nitrogen. CCD (short for Central Composite Design) experiment showed that the interaction between pH and nitrogen addition was obvious. The optimal solution of siderophore producing for JK-SH007 by Design-Expert was as follows: carbon source at 15.00 g/L, nitrogen source at 10.50 g/L, the culture temperature at 30 °C and the medium starting pH value of 7.36. After optimization, the siderophore production capacity of JK-SH007 increased from 18.59 to 37.86. The culture conditions obtained by RSM were effective and reliable, and the yield of siderophore improved significantly.

Key words: *Burkholderia pyrrocinia*; siderophore; *cepR* gene

嗜铁素(siderophore)也叫铁载体,是指由微生物在低铁条件下合成的一类小分子量(1~2 kDa)能特异地螯合 Fe^{3+} 的螯合因子^[1-3]。绝大多数细菌和真菌都能通过非核糖途径合成分泌一种或几种嗜铁素,它的产生是地球上微生物适应地壳高氧低铁环境的结果^[4]。大量研究表明,嗜铁素在植物病害防治和促进植物生长方面均起着重要的作用^[5-9]。几乎所有的好氧细菌和真菌均有产嗜铁素的相关基因,能够在铁胁迫条件下诱导产生相应的合成及吸收系统^[10]。

据报道,洋葱伯克霍尔德氏菌菌群 *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) 的不少菌株具有生物防治、促进植物生长、生物修复等功能,在植物病害防治中发挥了重要作用^[11,12]。*cepIR* 系统是首先在椰毒伯克霍尔德氏菌 *B. cenocepacia* 中被证实的细菌群体感应(quorum sensing, QS)系统之一,该系统包括 *cepI* 和 *cepR* 两种蛋白,其中 *cepR* 蛋白是 *cepR* 基因转录产生,其与信号分子结合后激活或抑制目的基因转录的蛋白,在洋葱伯克氏菌的 QS 中发挥着重要作用^[13-16]。另据研究报道,*cepR* 基因与细菌产生嗜铁素相关,如洋葱伯克氏菌的 *cepR* 突变株与野生菌株相比,嗜铁素的合成大量增加,抑制病原菌的能力增强^[13]。

本课题组前期从杨树体干分离获得一株杨树溃疡病高效生防菌吡咯伯克霍尔德氏菌 *Burkholderia pyrrocinia* JK-SH007,该菌株隶属于 Bcc 的基因型 IX,具有内生性,对金黄壳囊孢、拟茎点霉、七叶树壳梭孢 3 种杨树溃疡病病原真菌具有强烈的抑制作用^[17],对杨树溃疡病具有一定防治效果,温室防治效果为 82.8%~90.2%,野外防治效果可达 40.5%,而且对杨树具有明显的促生长作用^[18,19]。为验证该菌株是否具有产嗜铁素能力和产嗜铁素相关的 *cepR* 基因,本文采用 CAS 法检测菌株 JK-SH007 产嗜铁素的能力,并采用 PCR 方法对该菌株产嗜铁素合成相关基因 *cepR* 进行同源克隆并构建系统发育树,与其同源性最高菌株的核酸序列和氨基酸序列进行比对分析,确定菌株 JK-SH007 的 *cepR* 基因与产生嗜铁素相关;同时,对该菌株产嗜铁素的条件进行了优化,探索其产嗜铁素的最佳条件。这对提高生防菌株吡咯伯克霍尔德氏菌 JK-SH007 的效价,进一步研究伯克霍尔德氏菌合成嗜铁素的机制奠定了基础,也为研制高效生防菌剂提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

吡咯伯克霍尔德氏菌 JK-SH007 是由本实验室分离所得,保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC 编号 M0209028,保藏日期为 2009 年 2 月 18 日)。

1.2 培养基

LB 液体培养基、CAS 检测平板^[20]和 MKB 培养基^[21]。

1.3 吡咯伯克霍尔德氏菌 JK-SH007 产嗜铁素能力检测

采用 Schwyn 和 Neilands^[22]的研究方法进行嗜铁素检测,将-80 °C 冰箱保存的吡咯伯克霍尔德氏菌 JK-SH007 划线培养后挑取单菌落,接种于 LB 液体培养基中,30 °C、180 r/min 过夜摇培后,将菌液点到 CAS 检测平板上,30 °C 培养 72 h,观察菌落周围颜色变化。

1.4 吡咯伯克霍尔德氏菌 JK-SH007 相关基因(*cepR* 基因)的 PCR 扩增

采用 CTAB 法提取菌株 JK-SH007 基因组 DNA,根据 NCBI 已经公布的吡咯伯克霍尔德氏菌

(EU034001)的产嗜铁素相关基因 *cepR* 的序列设计扩增一对同源克隆引物(*cepR*-F: 5'-TCAGGGTGCCTCGATGAG-3', *cepR*-R: 5'-CGGGATCCGAGAAAGAATGGAAGTGC-3'), 利用该引物扩增菌株 JK-SH007 中 *cepR* 基因。扩增条件为 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 1 min, 60 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min 50 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。将 PCR 产物进行 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。然后将切胶回收的目的基因分别与载体 pMD19-T 连接, 连接产物转入大肠杆菌 JM109 感受态细胞中进行培养, 挑取白色单菌落进行 PCR 检测, 将检测结果呈阳性的克隆菌株送华大基因公司进行测序, 并将测序结果在 NCBI 上进行比对, 运用 BioEdit 和 MEGA6.0 软件构建系统发育树。

1.5 吡咯伯克霍尔德氏菌 JK-SH007 产嗜铁素工艺优化

1.5.1 单因素优化试验 控制其他条件一致, 分别改变单因素培养基的 pH 为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0; 转速为 140、160、180、200、220 r/min; 菌液的培养时间分别为 6、9、12、15、18、21、24 h; MKB 培养基中主要提供碳源的物质甘油分别用酵母、葡萄糖、果糖、蔗糖代替; MKB 培养基中主要提供氮源的物质酸水解酪素分别用氯化铵、硫酸铵、蛋白胨、尿素代替; 测定不同条件下菌株产嗜铁素的能力。

1.5.2 PB (Plackett-Burman) 试验及 CCD (central composite design) 试验 选取影响菌株 JK-SH007 产嗜铁素能力的 7 个因素(pH、转速、接菌量、加氮量、时间、加碳量、培养液的量), 采用 PB 设计方案进行关键因子的筛选。采用 CCD 法对由 PB 试验筛选出的关键因素进行试验设计, 同时固定其他非关键因素。以 PB 试验、CCD 试验确定的最佳产嗜铁素能力试验, 进行菌株产嗜铁素能力试验, 验证优化方案, 若产嗜铁素能力与模型相符, 即可以确定菌株 JK-SH007 产嗜铁素能力的最优条件。

1.5.3 产嗜铁素相对含量的测定 采用 CAS^[20]检测法, 将在 LB 培养基中活化的菌株, 取 500 μL 菌液加入 50 mL MKB^[20]培养基中, 30 °C、180 r/min 培养 24 h。参照文献[23]报道的方法, 取培养到一定时期的菌液, 测定其 OD₆₀₀, 并将菌液在 10 °C、10000 r/min 离心 15 min, 取上清液微孔滤膜过滤, 滤后的上清用 ddH₂O 进行倍比稀释, 取 100 μL 稀释后的上清与 100 μL CAS 定量检测液混合(As), MKB 培养基进行相同的操作(Ar), 无菌 ddH₂O 作为空白, 室温下反应 1 h 后, 分别记录样品(As)与对照(Ar) OD₆₃₀ 的值, 用如下公式计算嗜铁素产量: 嗜铁素单位(%) = 100 × (Ar - As) / Ar; 细菌产嗜铁素能力一般用嗜铁素单位数与细菌 OD₆₀₀ 的比值来表示。

2 结果与分析

2.1 吡咯伯克霍尔德氏菌 JK-SH007 的产嗜铁素能力

采用 CAS 蓝色检测平板对细菌嗜铁素进行检测, 由于平板中含有铬天青、溴化十六烷基三甲铵和铁离子组成的复合物呈现蓝色, 当平板中的铁离子被微生物分泌的嗜铁素夺走时, 便会形成黄色晕圈, 从而证明菌株具有产生嗜铁素的能力^[22]。将活化后的吡咯伯克霍尔德氏菌 JK-SH007 菌液点接在 CAS 平板上, 30 °C 下培养 72 h 后可明显看到黄色晕圈(图 1), 由此说明菌株 JK-SH007 能够产生与铁离子有高亲和力的物质——嗜铁素。

2.2 吡咯伯克霍尔德氏菌 JK-SH007 *cepR* 基因 PCR 扩增结果

设计同源克隆引物对菌株 JK-SH007 基因组中产嗜铁素相关基因 *cepR* 进行 PCR 扩增, 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳。通过切胶回收, 将该片段与载体 PMD19-T 连接后转入大肠杆菌 JM109 进行测序, 测序结果表明该基因的大小为 720 bp, 与预期片段大小一致(图 2)。

2.3 系统发育树的构建与序列分析

将菌株 JK-SH007 的 *cepR* 基因序列在 NCBI 上进行 Blast 比对, 根据 Genbank 结果, 运用 BioEdit 和 MEGA 软件采用邻接法构建系统发育树结果表明与吡咯伯克霍尔德氏菌(EU034001)的亲缘关系最近, 同源率为 99% (图 3)。将目的基因克隆得到的序列与吡咯伯克霍尔德氏菌(EU034001)的 *cepR* 基因进行序列比对, 两者相似性为 97%, 并且分别在第 240、244、291、296、301、381、426、429、549、561、585、622、626 共 13 个位点出现 SNP (图 4), 进一步对克隆序列 *cepR* 与吡咯伯克霍尔德氏菌(EU034001)的 *cepR* 基因所推导的编码氨基酸序列比对发现, 其在第 82、99、208 位共有 3 个氨基酸发

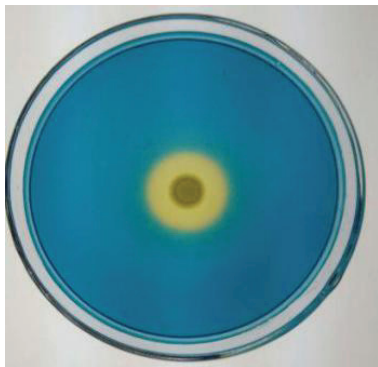
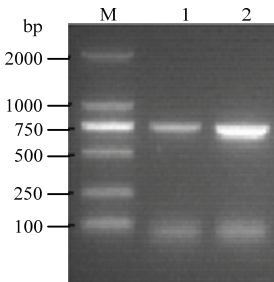


图 1 吡咯伯克霍尔德氏菌 JK-SH007 CAS 平板检测结果

Fig. 1 Results of *B. pyrrocinia* JK-SH007 strain CAS test plate



M: 2000 DL DNA Marker; 1, 2: 均为扩增的目的片段 *cepR* genes

图 2 吡咯伯克霍尔德氏菌 JK-SH007 *cepR* 基因 PCR 扩增电泳图

Fig. 2 The electrophoresis map of *cepR* gene of *B. pyrrocinia* JK-SH007 PCR ramplification results

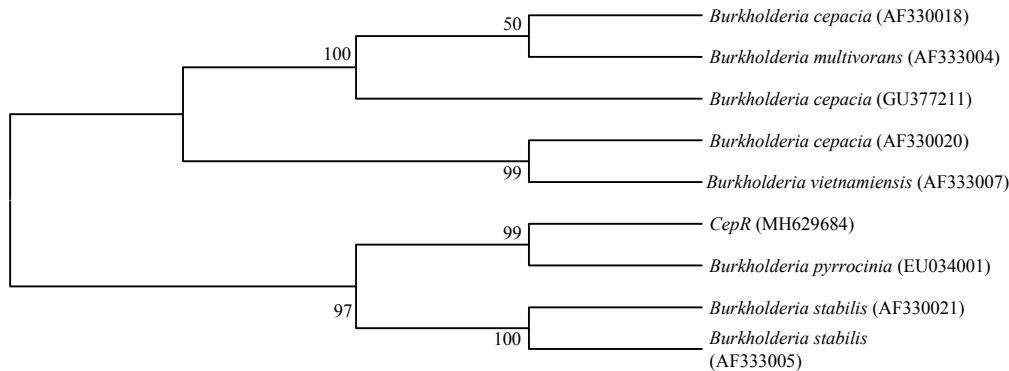


图 3 基于 *cepR* 基因序列构建的吡咯伯克霍尔德氏菌 JK-SH007 系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic trees of *B. pyrrocinia* JK-SH007 constructed based on *cepR* sequences



图 4 吡咯伯克霍尔德氏菌 JK-SH007 与 EU034001 的 *cepR* 基因核酸序列比对

Fig. 4 Comparison of the *cepR* gene nucleic acid sequences of *B. pyrrocinia* JK-SH007 and EU034001

生了替换，两者一致性为 97%（图 5）。这说明菌株 JK-SH007 具有与合成嗜铁素相关的 *cepR* 基因，这也暗示该菌株具有产嗜铁素能力，与前期的 CAS 平板结果一致。

2.4 产嗜铁素条件的优化

菌株 JK-SH007 的产嗜铁素条件的单因子试验表明，最佳产嗜铁素条件为 pH 8、转速 200 r/min、培养 15 h、碳源甘油、氮源氯化铵（图 6~10）。

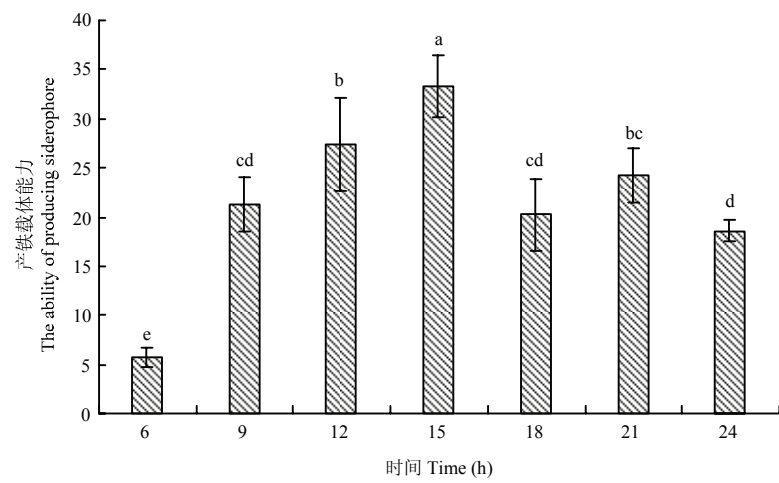


图 8 不同培养时间对产嗜铁素能力的影响

Fig. 8 Effects of different culture time on siderophore content

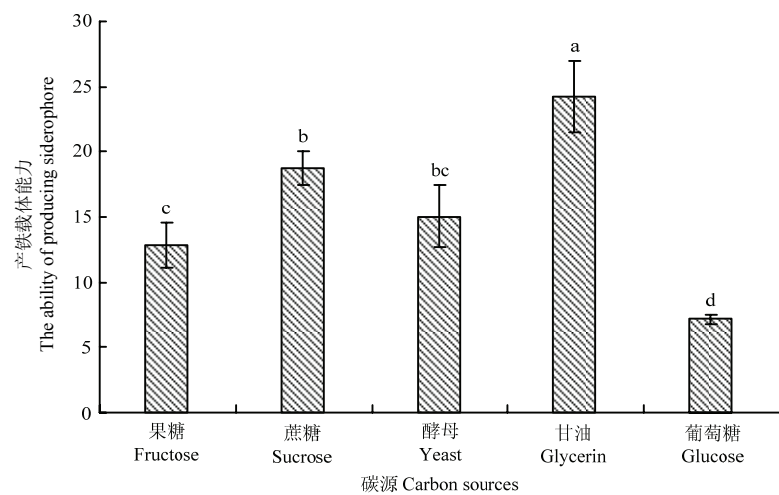


图 9 不同的碳源对产嗜铁素能力的影响

Fig. 9 Effects of different carbon source on siderophore content

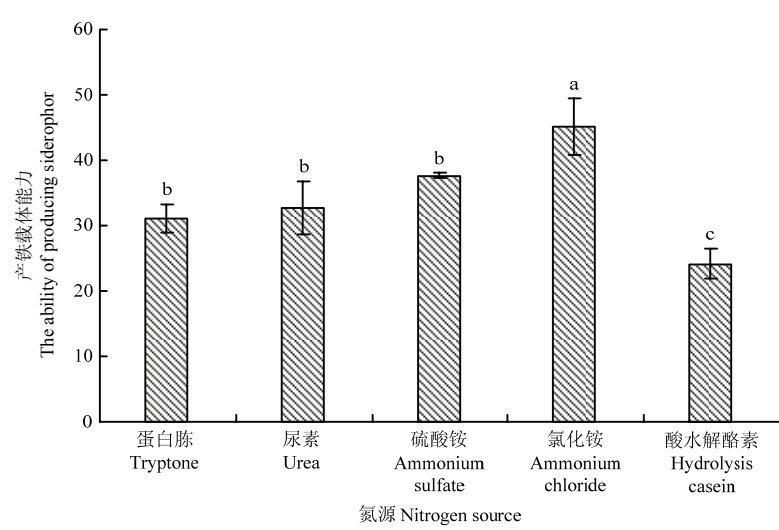


图 10 不同的氮源对产嗜铁素能力影响

Fig. 10 Effects of different nitrogen sources on siderophore content

2)。整个分析中 Prob (p) >F 值为 0.0094, 表明试验得出的回归方程达到了显著水平, 即该模型在被研究整个回归区域拟合较好。决定系数 $R^2=0.7443$, 表明相关性较好; 调整系数 (校正决定系数) $Adj R^2 = 0.6483$, 变化系数 C.V.% =32.60%, 精密度为 8.34, 大于 1.0 视为合理, 因此, 本试验即为合理。

表 1 Plackett-Burman 试验设计结果
Table 1 Plackett-Burman experiment design results

序号	Number	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11	能力	Ability
1	9	220	5	1	9	5	75	-1	1	1	-1	-1	42.46	
2	5	220	5	1	21	15	75	-1	-1	-1	1	1	24.20	
3	5	140	5	1	21	15	50	1	1	1	-1	-1	45.84	
4	5	220	1	5	21	5	75	1	1	-1	-1	-1	12.31	
5	9	140	5	5	21	5	50	-1	1	-1	1	1	13.62	
6	9	140	1	1	21	5	75	1	-1	1	1	1	40.41	
7	5	140	1	5	9	15	75	-1	1	1	1	1	31.53	
8	9	220	1	1	9	15	50	1	1	-1	1	1	80.48	
9	5	220	5	5	9	5	50	1	-1	1	1	1	10.84	
10	9	140	5	5	9	15	75	1	-1	-1	-1	-1	43.01	
11	5	140	1	1	9	5	50	-1	-1	-1	-1	-1	33.96	
12	9	220	1	5	21	15	50	-1	-1	1	-1	-1	39.62	

注: 在本次 PB 试验中共有 11 个因素, 前 7 个因素为试验因素, X1: pH; X2: 转速 (r/min); X3: 接菌量 (%); X4: 加氮量 (%); X5: 时间 (h); X6: 加碳量 (g); X7: 培养液的量 (mL); 后 4 个为虚拟因素, 每一个因素只存在两个水平, 一个高水平, 一个低水平, 按照试验设计的组合进行。

Note: There are 11 factors in this PB experiment, the first seven factors are experimental factors. X1: pH; X2: Speed (r/min); X3: Inoculation amount of bacteria (%); X4: Add nitrogen (%); X5: Time (h); X6: Add carbon (g); X7: The amount of culture fluid (mL); The last four are virtual factors, there are only two levels of each factor, the high and low level, The experiment was carried out according to the combination of experimental design.

表 2 PB 试验结果分析
Table 2 PB experimental results

因素	效应值	平方和	贡献值	回归系数	重要性
Factor	Stdized effects	Sum of squares	Contribution value (%)	Regression estimate	Importance
截距 Intercept				34.86	
X ₁	16.81	848.06	21.00	8.41	是
X ₂	0.26	0.21	5.148E-003	0.13	否
X ₃	-9.72	283.24	7.01	-4.86	否
X ₄	-19.41	1130.24	27.97	-9.70	是
X ₅	-11.04	365.64	9.05	-5.52	否
X ₆	18.52	1028.97	25.47	9.26	是
X ₇	-5.07	77.01	1.91	-2.53	否
X ₈	7.91	187.70	4.65	3.95	否
X ₉	5.69	97.24	2.41	2.85	否
X ₁₀	0.51	0.79	0.020	0.26	否
X ₁₁	-2.68	21.55	0.53	-1.34	否

注: 在本次 CCD 试验中共有 3 个因素, 分别是 pH、加碳量(g/L)和加氮量(g/L), 按照试验设计的组合进行。

Note: There are 3 factors in this CCD experiment, pH, the amount of carbon added (g/L) and nitrogen added (g/L), the experiment was carried out according to the combination of experimental design.

2.6 显著性因素组合试验及响应面优化培养条件

将 PB 试验筛选出的 3 个显著性因子进行组合设计, 测定实际产嗜铁素能力 (表 3)。软件分析结果

如表 4 所示，该模型 $P<0.0001$ ，差异极显著，模型的失拟项 ($P=0.5710>0.05$)，无显著性差异，说明所选模型的拟合程度好，能较好的拟合本试验结果。调整系数 $R^2=0.8827$ ，变化系数 $C.V.\%=6.75\%$ ，精密度为 12.83，只需要大于 1.0 即可视为合理，说明该 CCD 的设计可靠，能较好地应用于菌株产生嗜铁素

表 3 CCD 试验设计结果（实际值）
Table 3 CCD experimental results (actual value)

序号 Number	pH	加碳量 Carbon source amount (g)	加氮量 Nitrogen source amount (%)	能力 Ability
1	7.00	15.00	10.00	35.23
2	8.00	13.00	12.00	33.12
3	8.00	13.00	8.00	32.32
4	7.00	15.00	10.00	40.97
5	8.00	17.00	8.00	32.11
6	7.00	15.00	6.64	28.98
7	6.00	17.00	12.00	31.49
8	7.00	15.00	13.36	32.78
9	7.00	15.00	10.00	41.47
10	7.00	18.36	10.00	31.08
11	6.00	17.00	8.00	19.26
12	7.00	15.00	10.00	40.64
13	6.00	13.00	12.00	31.70
14	7.00	15.00	10.00	37.79
15	6.00	13.00	8.00	16.95
16	7.00	11.64	10.00	30.28
17	5.32	15.00	10.00	23.10
18	7.00	15.00	10.00	39.06
19	8.68	15.00	10.00	33.15
20	8.00	17.00	12.00	32.70

表 4 CCD 试验设计的方差分析结果
Table 4 Analysis of variance analysis of CCD experiment design

方差来源 Sources of variance	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 Value	Prob. (P) >F
模型 Model	770.90	9	85.66	16.50	<0.0001
A-PH	166.97	1	166.97	32.17	0.0002
B-加碳量(Carbon source amount)	0.58	1	0.58	0.11	0.7450
C-加氮量(Nitrogen source amount)	88.48	1	88.48	17.05	0.0020
AB	0.93	1	0.93	0.18	0.6808
AC	81.86	1	81.86	15.77	0.0026
BC	0.93	1	0.93	0.18	0.6808
A ²	235.81	1	235.92	45.43	<0.0001
B ²	142.25	1	142.25	27.41	0.0004
C ²	135.92	1	135.92	26.19	0.0005
残差 Residual	51.90	10	5.19		
失拟项 Lack of fit	23.77	5	4.75	0.85	0.5710
纯误差 Pure error	28.13	5	5.63		
总离差 Cor total	822.80	19			

能力的理论预测。一次项 A 因子 ($P=0.0002$) 和 C 因子 ($P=0.0020$) 对响应值产嗜铁素能力影响达极显著水平, 一次项 B ($P=0.7450$) 对响应值产嗜铁素能力影响不显著; 交互项 AC ($P=0.0026$) 对菌株产嗜铁素能力的影响较显著, 交互项 AB ($P=0.6808$) 和 BC ($P=0.6808$) 对菌株产嗜铁素能力的影响不显著; 平方项 A^2 ($P<0.0001$)、 B^2 ($P=0.0004$)、 C^2 ($P=0.0005$) 对菌株产嗜铁素能力的影响极其显著。A、B、C 3 个因素对菌株产嗜铁素能力的影响大小依次为: $A>C>B$, 3 个因素并非简单的线性关系。经修正不显著项后, 多元回归拟合模型的二次多项式方程为: $Y=38.42+3.50A+2.55C-3.20AC-3.77A^2-2.87B^2-2.81C^2$ 。

通过等高面图直观的观察交互作用是否显著, 若等高线为椭圆形则表明交互作用显著, 非椭圆表明交互作用不显著。加碳量和 pH (图 11)、加氮量和加碳量 (图 12)、加氮量和 pH (图 13) 对菌株产嗜铁素的能力交互影响的等高面图和三维曲面图可看出, pH 和加氮量这两个因素之间有着较明显相互影响, 与前面数据所得结果一致。

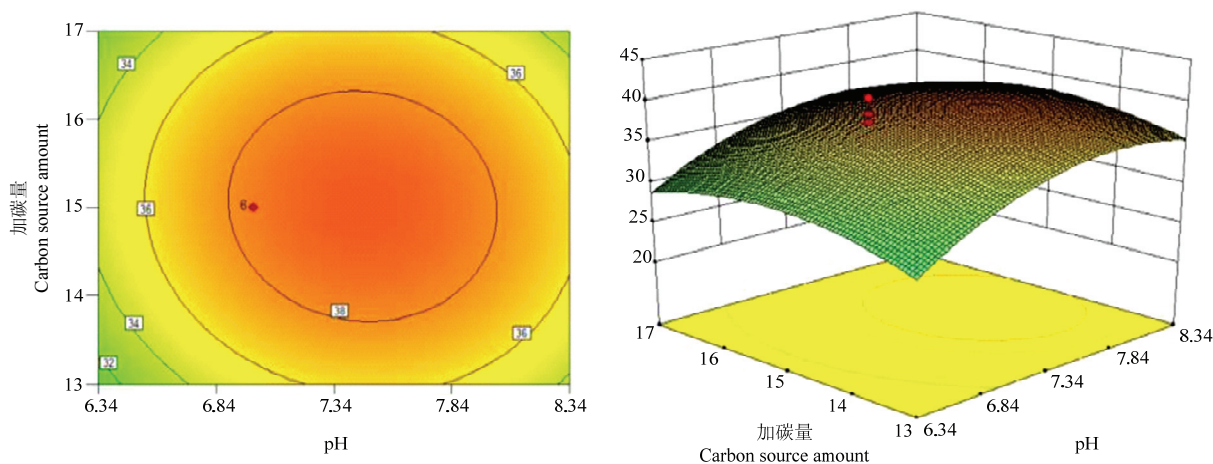


图 11 加碳量和 pH 对菌株产嗜铁素能力交互影响的等高面图和三维曲面图

Fig. 11 Surface and contour plots of mutual effect for carbon source amount and pH on siderophore content

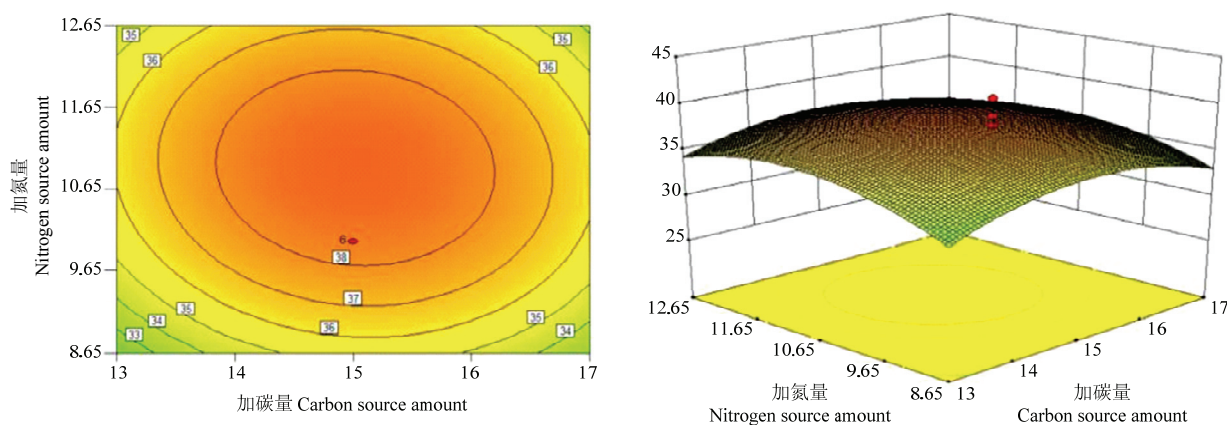


图 12 加氮量和加碳量对菌株产嗜铁素能力交互影响的等高面图和三维曲面图

Fig. 12 Surface and contour plots of mutual effect for nitrogen source amount and carbon source amount on siderophore content

2.7 最优培养条件的验证

由 Design Expert 软件设计的菌株产嗜铁素能力的最优条件为: 控制其他条件保持一致, 在 MKB 培养基基础上碳源 15.00 g/L、氮源 10.50 g/L、温度控制在 30 °C、培养基的 pH 为 7.36。优化后菌株产嗜铁素能力由 18.59 上升为 37.86, 表明该条件可以使菌株产嗜铁素能力上升。

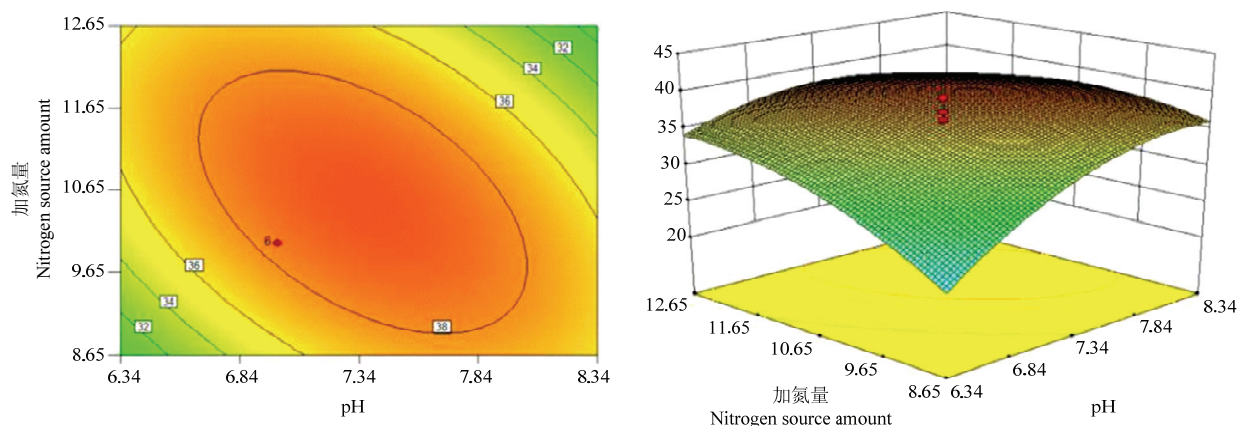


图 13 加氮量和 pH 对菌株产嗜铁素能力交互影响的等高面图和三维曲面图

Fig. 13 Surface and contour plots of mutual effect for nitrogen source amount and pH on siderophore content

3 讨论

微生物中大多数细菌和真菌都能产生一种或几种特殊物质，而分泌嗜铁素是其控制真菌病害的一种主要机制^[24]，嗜铁素在农业生产、病虫害防治等生防方面发挥着重要作用。Arora 等^[25]从药用植物中分离到的 2 个根瘤菌菌株能够分泌嗜铁素，有效抑制了花生芽腐病的发生。Ben 等^[26]研究发现 2 株假单胞杆菌通过分泌嗜铁素竞争 Fe^{3+} ，有效持久地抑制了康乃馨镰刀菌枯萎病的发生。冉隆贤等^[27]对 3 个假单胞杆菌菌株及嗜铁素缺失突变体防治桉树灰霉病进行了研究，结果表明假单胞杆菌的嗜铁素是控制桉树灰霉病的重要因子。总之，嗜铁素作为一种重要的生物活性物质，对其研究具有重要的理论和实践意义。

本试验以吡咯伯克霍尔德氏菌 JK-SH007 为研究对象，首先采用 CAS 法检测到该菌株可以产生嗜铁素，在此基础上对该菌株嗜铁素合成相关基因 *cepR* 进行克隆，并对其序列进行分析，结果表明 *cepR* 基因全长 720 bp，与咯伯克霍尔德氏菌 EU0340010 的 *cepR* 基因具有高度的同源性，相似性达 99%，两者序列相似性为 97%，13 个位点出现 SNP；另外，菌株 JK-SH007 *cepR* 基因编码的氨基酸序列有 3 个氨基酸发生了替换，两者一致性为 97%。CepR 系统作为洋葱伯克霍尔德氏菌的主要的 QS 系统，主要调节控制嗜铁素、脂肪酶、蛋白酶和 C6-HSL 和 C8-HSL 等信号分子的产生^[13,28,29]。杨岑等^[30]采用 PCR 方法克隆了洋葱伯克霍尔德氏菌 CAS19 嗜铁素合成相关基因 *cepR*，并对 *cepR* 基因编码蛋白的结构和功能进行生物信息学分析和预测。在后续研究中也对菌株 JK-SH007 的嗜铁素合成机制通过 CEISP/CAS9 基因敲除技术进行验证，并进一步对菌株 JK-SH007 的其他拮抗基因进行分析，以获得更多菌株生防相关基因功能的信息。

本研究在单因素试验基础上采用 PB 和 CCD 试验对菌株 JK-SH007 产嗜铁素条件进行了工艺优化，单因素优化试验中分别探究了培养条件和优化培养基成分，培养条件考察 pH 值、转速、培养时间 3 个因素，优化培养基成分主要是找寻最佳碳源和氮源。杨岑等^[31]检测到吡咯伯克霍尔德氏菌 CAS19 在 320 nm 处有嗜铁素特异吸收峰，并且在单因素试验中得到最佳碳源是蔗糖。本试验是在 630 nm 下检测嗜铁素含量，并且得到的最佳碳源是甘油。这可能是由于种的不同，另外两者产生的嗜铁素种类也可能有所差别。PB 试验设计中，共有 pH、培养时间、培养液的加入量、加碳量、加氮量、转速、接菌量 7 个重要因子参与筛选，进行了 12 组试验，最终确定关键性因素是 pH 值、加碳量和加氮量。对关键性因子进行 CCD 试验组合设计，根据 Design-expert 给出的方案进行试验操作，观察单个关键性因素和各个关键性因素间的交互作用对菌株产嗜铁素能力的影响，试验数据显示 pH 值和加氮量对菌株产嗜铁素能力的影响比较大，交互影响显著。工艺优化结果表明，菌株 JK-SH007 产嗜铁素最佳条件为 MKB 培养基基础上碳源 15.00 g/L、氮源 10.50 g/L、温度控制在 30 °C、培养基的 pH 为 7.36，优化后菌株产嗜铁素能力由 18.59 提升为 37.86。

开展对吡咯伯克霍尔德氏菌 JK-SH007 产嗜铁素能力的测定、*cepR* 基因克隆以及产嗜铁素条件的优化，将有利于提高菌株 JK-SH007 生防菌的效价，提高防效，同时为进一步系统地研究伯克霍尔德氏菌合成嗜

铁素的机制和基因工程改造奠定基础,为高效生防菌剂的研制和合理使用提供理论依据和技术支持。洋葱伯克霍尔德氏菌菌群(Bcc)是广泛存在于水、人体和土壤中的革兰氏阴性菌,该类菌的不少菌株在离体条件下能够产生4种嗜铁素:水杨酸(salicylic acid)、绿脓菌螯铁蛋白(pyochelin)、鸟菌素(ornibactins)和洋葱伯克菌素(cepabactin)^[32]。本次试验由于时间和条件的限制,关于吡咯伯克霍尔德氏菌JK-SH007产生的嗜铁素具体种类还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Tan W Z, Verma V k, Jeong K J, *et al.* Molecular characterization of vulnibactin biosynthesis in *Vibrio vulnificus* indicates the existence of an alternative siderophore[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5(1): 1-11.
- [2] Kim S M, Park J H, Lee H S, *et al.* LuxR homologue SmcR is essential for *Vibrio vulnificus* pathogenesis and biofilm detachment, and its expression is induced by host cells[J]. *Infection and Immunity*, 2013, 81(10): 3721-3730.
- [3] Ledala N, Pearson S L, Wilkinson B J, *et al.* Molecular characterization of the fur protein of *Listeria monocytogenes*[J]. *Microbiology*, 2007, 153(4): 1103-1111.
- [4] Guerinot M L. Microbial iron transport[J]. *Annual Review of Microbiology*, 1994, 48: 743-772.
- [5] Saha M, Sarkar S, Sarkar B, *et al.* Microbial siderophores and their potential applications: a review[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(5): 3984-3999.
- [6] Sullivan T S, Ramkissoon S, Garrison V H, *et al.* Siderophore production of African dust microorganisms over Trinidad and Tobago[J]. *Aerobiologia*, 2012, 28(3): 391-401.
- [7] Gamalero E, Glick B R. *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Nutrient Managemen*[M]. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011, 17-46.
- [8] Rungin S, Indananda C, Suttiviriya P, *et al.* Plant growth enhancing effects by a siderophore-producing endophytic streptomycete isolated from a Thai jasmine rice plant (*Oryza sativa* L. cv. KDML105)[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2012, 102(3): 463-472.
- [9] Yadav S, Kaushik R, Saxena A K, *et al.* Diversity and phylogeny of plant growth-promoting bacilli from moderately acidic soil[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2011, 51(1): 98.
- [10] 李俊峰. 有益菌菌株铁载体的研究和铁吸收调节蛋白(Fur)基因的克隆和表达[D]. 青岛: 中海洋大学, 2005.
- [11] Parra-Cota F I, Pena-Cabiales J J, de los Santos-Villalobos S, *et al.* *Burkholderia ambifaria* and *B. caribensis* promote growth and increase yield in grain amaranth (*Amaranthus cruentus* and *A. hypochondriacus*) by improving plant nitrogen uptake[J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(2): e88094.
- [12] Singh R K, Malik N, Singh S. Improved nutrient use efficiency increases plant growth of rice with the use of IAA-overproducing strains of endophytic *Burkholderia cepacia* strain RRE25[J]. *Microbial Ecology*, 2013, 66(2): 375-384.
- [13] Lewenza S, Sokol P A. Regulation of ornibactin biosynthesis and N-acyl-L-homoserine lactone production by CepR in *Burkholderia cepacia*[J]. *Bacteriology*, 2001, 183(7): 2212-2218.
- [14] Pappas K M, Weingart C L, Winans S C. Chemical communication in proteobacteria: biochemical and structural studies of signal synthases and receptors required for intercellular signaling[J]. *Molecular Microbiology*, 2004, 53(3): 755-769.
- [15] Huber B, Feldmann F, Kothe M, *et al.* Identification of a novel virulence factor in *Burkholderia cenocepacia* H111 required for efficient slow killing of *Caenorhabditis elegans*[J]. *Infection and Immunity*, 2004, 72 (12): 7220-7230.
- [16] Weingart C L, White C E, Liu S, *et al.* Direct binding of the quorum sensing regulator CepR of *Burkholderia cenocepacia* to two target promoters *in vitro*[J]. *Molecular Microbiology*, 2005, 57(2): 452-467.
- [17] 任嘉红, 吴小芹, 刘辉, 等. 吡咯伯克霍尔德氏菌 JK-SH007 抗菌蛋白的分离纯化[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(6): 872-880.
- [18] 任嘉红, 李浩, 刘辉, 等. 吡咯伯克霍尔德氏菌 JK-SH007 对杨树根际微生物数量及功能多样性的影响[J]. *林业科学*, 2016, 52(5): 126-133.
- [19] 任嘉红, 班虎栋, 叶建仁, 等. 吡咯伯克霍尔德氏菌 JK-SH007 的发酵条件及其对杨树溃疡病的防治效果[J]. *中国生物防治*, 2010, 26(3): 300-306.
- [20] 陈佳亮. 烟草根际促生菌 Sm-1 的分离及其外泌铁载体的纯化与鉴定[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2017.
- [21] 杨常娥, 鲁艳莉, 倪捍成, 等. 创伤弧菌产铁载体菌株的筛选及其诱导条件的响应面优化[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(3): 159-165.
- [22] Schwyn B, Neilands J B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores[J]. *Analytical Biochemistry*, 1987, 160(1): 47-56.
- [23] Machuca A, Milagres A M F. Use of CAS-agar plate modified to study the effect of different variables on the siderophore production by *Aspergillus*[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2003, 36(3): 177-181.

- [24] 梁建根, 郝中娜, 王连平, 等. 嗜铁素功能研究概述[J]. 中国农学通, 2011, 27(5): 284-287.
- [25] Arora N K, Kang S C, Maheshwari D K. Isolation of siderophore-producing strains of *Rhizobium meliloti* and their biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* that causes charcoal rot of groundnut [J]. Current Science, 2001, 81(6): 673-677.
- [26] Ben J D, Jan W M, Peter A H M, *et al.* Siderophore-mediated competition for iron and induced resistance in the suppression of *Fusarium* wilt of carnation by fluorescent *Pseudomonas* spp.[J]. Netherlands Journal of Plant Pathology, 1993, 99: 277-289.
- [27] Ran L, Xiang M, Zhou B, *et al.* Siderophores are the main determinants of fluorescent *Pseudomonas* in suppression of grey mould in *Eucalyptus urophylla*[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2005, 35(1): 6-12.
- [28] Lewenza S, Conway B, Greenberg E P, *et al.* Quorum sensing in *Burkholderia cepacia* identification of the luxRI homologs *cepRI*[J]. Bacteriology, 1999, 181(3): 748-756.
- [29] Lutter E, Lewenza S, Dennis J J, *et al.* Distribution of quorum-sensing genes in the *Burkholderia cepacia* complex[J]. Infection and Immunity, 2001, 69(7): 4661-4666.
- [30] 杨琴, 余贤美, 贺春萍, 等. 洋葱伯克霍尔德氏菌 CAS19 嗜铁素合成相关基因 *cepR* 的克隆及生物信息分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(2): 245-251.
- [31] 杨琴, 余贤美, 贺春萍, 等. 洋葱伯克霍尔德氏菌 CAS19 产嗜铁素条件的研究[J]. 热带作物学报, 2010, 31(2): 265-269.
- [32] Parke J L, Gurian-Scherman D. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains[J]. Annual Review of Phytopathology, 2001, 39: 225-258.