

解淀粉芽孢杆菌抑菌活性初步研究

杨帆,李新民,刘春来,王爽,夏吉星,王克勤,刘兴龙

(黑龙江省农业科学院 植物保护研究所,黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:为了进一步分离纯化抑菌蛋白和脂肽类物质,促进拮抗菌的开发和利用,选取2株对多种植物病原真菌具有良好拮抗作用的解淀粉芽孢杆菌,利用硫酸铵沉淀法粗提2株菌株的抑菌蛋白,酸沉淀法粗提脂肽类抑菌物质,分别测定粗提物对多种植物病原真菌的抑制效果。初步检测2株菌株是否具有产纤维素酶、蛋白酶和嗜铁素活性。结果表明:BQD1菌株20%~30%的蛋白粗提液对玉米大斑病菌拮抗作用最强,抑菌直径达31.48 mm。TY菌株30%~40%的蛋白粗提液对玉米大斑病菌抑菌直径最高达34.20 mm。2株菌株脂肽类粗提液对靶标病原菌株的拮抗作用均高于其发酵液,且均可产生纤维素酶、蛋白酶和嗜铁素。

关键词:解淀粉芽孢杆菌;抑菌活性物;植物病原真菌

中图分类号:Q939.99 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2015)09-0055-05 **DOI:**10.11942/j.issn1002-2767.2015.09.0055

解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)的寄生环境复杂,具有较强的抗逆性,在自身生长过程中可产生一系列低分子量抗生素以及抗菌蛋白或多肽等活性物质^[1],这些活性物质对多种植物病原真菌的生长具有不同程度的抑制作用,并且可作为根围细菌促进植物生长^[2],已广泛应用于多种重要真菌病害的生物防治。生防拮抗菌有些菌株可产生几丁质酶、蛋白酶、纤维素酶等^[3-5],这些酶在一定程度上可有效降解高等真菌

细胞壁成分,从而抑制植物病原菌生长。铁是所有活细胞多种酶系统的一个必须成分,生防拮抗菌中有些菌株可产生嗜铁素,通过铁竞争机制,使病原菌由于缺乏铁而不能正常繁殖,进而达到控制病害的目的。

黑龙江省农业科学院生防室前期以4种土传病害病原菌为诱导菌株,采用土壤颗粒撒布法,从不同生态区农田土壤样本中分离得到55株拮抗细菌菌株^[6]。本研究从中选取拮抗作用较好的生防菌,采用琼脂孔扩散法检测其抗菌蛋白及脂肽类粗提物对多种重要植物真菌病害的拮抗作用。初步检测目标生防菌是否具有产酶特性,是否产生嗜铁素,以确保生防菌的多功能性。为进一步分离纯化抑菌蛋白和脂肽类物质,开发、应用拮抗菌提供理论依据。

收稿日期:2015-04-30
基金项目:国家高技术研究发展计划(863计划)资助项目(2011AA10A205);黑龙江省农业科技创新工程资助项目(2014QN009)
第一作者简介:杨帆(1982-),女,辽宁省盘锦市人,博士,助理研究员,从事生物防治研究。
通讯作者:李新民(1963-),男,硕士,研究员,从事生物防治研究。E-mail:xinmin63@163.com。

Analysis on the Current Situation of Mulching Film Residue in Qinghai Province

LI Yue-mei

(Soil and Fertilizer Institute, Qinghai Academy of Agricultural and Forestry Science, Xining, Qinghai 810016)

Abstract: Twelve monitoring sites with strong regional representation were selected as the monitoring object. The investigation was carried out to know the current situation of mulching film residue in most agricultural areas of Qinghai province. The results showed that the amounts of mulching film residue were varied from 0.90 to 7.05 kg·hm⁻², and the rate of mulching film residue was 3.25% averagely. The planting pattern, the time with mulching film and the crops were major impact factors. The highest mulching film residue obtained by open-field vegetables planting pattern, reached up to 3.73 kg·hm⁻². The more longer the years of the film coated, the more greater the residual rate. Xunhua line pepper got the highest rate of the film residue among the rest of different types of crops. The conclusion could be reached that the harmful of mulching film residue in Qinghai province was less serious obviously in comparison with other regions.

Keywords: Qinghai province; mulching film; residue; investigation

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试拮抗菌株及病原真菌 解淀粉芽孢杆菌 BQD1、TY 由黑龙江省农业科学院植物保护研究所生防室分离、筛选、鉴定和保存。供试植物病原菌玉米大斑病菌 (*Setosphaeria turcica*)、番茄灰霉病 (*Botrytis cinerea*)、水稻纹枯病菌 (*Rhizoctonia solani*)、水稻稻瘟病菌 (*Piricularia grisea*) 由黑龙江省农业科学院植物保护研究所植物免疫室提供。

1.1.2 供试培养基 ① NA 培养基用于拮抗菌的培养。② 马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基用于病原真菌的培养与拮抗活性测定。③ 纤维素酶检测培养基^[4]: 蛋白胨 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、酵母粉 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、梭甲基纤维素钠 (CMC) $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、NaCl $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 KH_2PO_4 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、琼脂 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，蒸馏水定容至 $1\,000\text{ mL}$ ，pH 7.0。④ 蛋白酶检测培养基^[5]: A 液: 脱脂奶粉 40 g 定容至 200 mL ; B 液: 琼脂 20 g 定容至 200 mL ; C 液: $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 600 mL 。A 液、B 液和 C 液分别灭菌后混匀制备平板。⑤ 嗜铁素检测培养基^[7]: A 液 (铬天青 CAS 染液): 含 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CAS, $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 十六烷基三甲基溴化胺 (HDTMA)。B 液: $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液 (pH 6.8)。称取 2 g 蔗糖、 3 g 酸水解酪素、 CaCl_2 溶液 1 mL 、 MgSO_4 溶液 20 mL 、 20 g 琼脂，去离子水 500 mL ，在约 60°C 时缓慢加入 A 液 50 mL 和 B 液 5 mL ，定容至 $1\,000\text{ mL}$ (配制嗜铁素检测培养基溶液均用去离子水)。

以上培养基均在 121°C 下灭菌 20 min 。

1.2 方法

1.2.1 抗菌蛋白的粗提及活性测定 蛋白粗提采用硫酸铵沉淀法。供试拮抗菌株接种于金氏培养液中， 28°C 、 $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ，发酵 72 h 后 4°C $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min ，收集上清液，上清液经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤，取 8 等份 20 mL 上清液，分别加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至饱和度为 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、100% (缓慢加入，使其溶解)， 4°C 沉淀过夜后 4°C $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 min ，收集沉淀，沉淀用 20 mL PB 液复溶，透析得到不同饱和度蛋白粗提液^[8]。

活性测定采用琼脂孔扩散法。将制备好的病原菌平板用直径 5 mm 打孔器每板均匀分布 3 点打孔，孔内加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 待测液，以无菌的金氏培养液为对照，每处理重复 3 次。置 28°C 培养，待

对照菌落长满培养皿时，采用十字交叉法测量抑菌圈直径，评价抑菌效果。

1.2.2 脂肽类物质的粗提及活性测定 利用酸沉淀和甲醇抽提进行菌株代谢产物脂肽类物的粗提^[9]，略有改动。 100 mL 发酵液在 4°C 、 $8\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min ，收集上清液，上清液中加入 $6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 调 pH 至 2.0， 4°C 静置过夜。 4°C 、 $8\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min ，收集沉淀。沉淀加入 2 mL 甲醇，用 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 调节 pH 至 7.0，用甲醇分两次抽提，每次 4 mL 甲醇，合并甲醇抽提物，经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤，滤液用 $6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 调 pH 至 2.0， 4°C 过夜。 $8\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心收集沉淀，加入适量甲醇得到 $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 脂肽提取液，放入 4°C 冰箱密封保存。

活性测定采用琼脂孔扩散法，同 1.2.1。

1.2.3 酶活测定 ① 纤维素酶。 $20\text{ }\mu\text{L}$ 待测拮抗菌液点样于纤维素酶检测平板中央，每处理重复 4 次。 28°C 恒温培养 5 d 。平板加入适量 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 刚果红溶液，染色 1 h ，弃去染液，加入适量 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 溶液，洗涤 1 h 。

根据菌落周围是否形成透明圈确定拮抗菌株是否具有纤维素酶活性。十字交叉法，分别测量透明圈直径 (R1) 和菌落直径 (R2)，以 R1/R2 比值确定拮抗菌株产纤维素酶活性强弱。

② 蛋白酶。 $20\text{ }\mu\text{L}$ 待测拮抗菌液点样于蛋白酶检测平板中央，每处理重复 4 次。 28°C 恒温培养 5 d 后，分别测量透明圈直径 (R1) 和菌落直径 (R2)，以 R1/R2 比值确定拮抗菌株产蛋白酶活性强弱。

③ 嗜铁素。 $50\text{ }\mu\text{L}$ 待测拮抗菌液点样于嗜铁素检测平板中央，每处理重复 4 次。 28°C 恒温培养 7 d 。产生嗜铁素的菌株可在培养基上出现橘黄色晕圈，分别测量晕圈直径 (R1) 和菌落直径 (R2)，以 R1/R2 比值确定拮抗菌株产嗜铁素强弱。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌株抗菌蛋白粗提物活性

分别对 BQD1 和 TY 菌株 72 h 发酵液，利用不同梯度硫酸铵饱和度沉淀的粗蛋白抑菌作用研究结果表明 (表 1、表 2、图 1)，BQD1 菌株在 20%~30% 硫酸铵饱和度下沉淀的粗蛋白对玉米大斑病菌和水稻纹枯病菌的抑菌圈直径分别为 31.48 和 11.28 mm ，与发酵滤液抑菌圈直径 32.83 和 12.83 mm 相近，且差异不显著 (见表 1)。而 TY 菌株在 30%~40% 硫酸铵饱和度下沉淀的

表 1 BQD1 菌株抗菌蛋白粗提液对植物病原菌菌丝生长的影响

Table 1 Effect of antifungal proteins produced by Strain BQD1 on hyphal growth of plant pathogens

处理 Treatments	抑菌圈直径±标准误/mm Diameters of inhibition zone±SE		
	玉米大斑病	番茄灰霉病	水稻纹枯病
	<i>Setosphaeria turcica</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
发酵滤液	32.83±4.54 a	22.27±1.40 a	12.83±2.17 a
0~20%	26.70±1.06 bc	12.57±2.01 c	9.50±0.87 b
20%~30%	31.48±4.97 ab	13.38±1.33 c	11.28±1.44 ab
30%~40%	30.73±4.10 abc	15.78±0.91 b	10.73±1.04 ab
40%~50%	28.48±3.07 abc	13.27±0.98 c	10.03±1.72 b
50%~60%	29.55±3.60 abc	11.83±0.88 cd	10.10±1.05 b
60%~70%	29.27±3.25 abc	12.35±1.26 c	9.60±1.28 b
70%~80%	25.03±2.21 c	12.10±1.46 cd	9.20±1.10 b
80%~100%	25.97±4.29 bc	10.65±0.84 d	9.53±0.81 b

同列数值后不同小写字母表示经 Duncan 氏分析,在 $P<0.05$ 水平下差异显著。下同。
Different lowercases after numerical mean significant difference at 0.05 level by Duncan's analysis. The same below.

粗蛋白对玉米大斑病菌和水稻纹枯病菌的抑菌圈直径分别为 34.20 和 13.53 mm,在各饱和度下表现出较高的抑菌效果(见表 2)。在 30%~40% 硫酸铵饱和度下沉淀的粗蛋白,2 株菌株对番茄灰霉病菌表现出较好的抑菌作用。

表 2 TY 菌株抗菌蛋白粗提液对植物病原菌菌丝生长的影响

Table 2 Effect of antifungal proteins produced by strain TY on hyphal growth of plant pathogens

处理 Treatments	抑菌圈直径±标准误/mm Diameters of inhibition zone±SE		
	玉米大斑病	番茄灰霉病	水稻纹枯病
	<i>Setosphaeria turcica</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
发酵滤液	35.82±0.90 a	14.55±0.76 bc	14.55±0.76 ab
0~20%	28.35±0.64 e	9.87±0.36 d	13.42±0.84 bcd
20%~30%	32.95±1.11 bc	19.25±4.52 a	13.97±1.03 abc
30%~40%	34.20±1.93 b	17.13±0.87 ab	13.53±1.58 bcd
40%~50%	32.98±1.12 bc	17.08±1.71 ab	12.95±0.45 cd
50%~60%	31.13±0.90 d	18.70±0.53 a	12.58±1.30 cd
60%~70%	31.82±1.51 cd	18.00±2.11 a	13.08±1.56 bcd
70%~80%	27.88±0.42 e	13.07±1.38 c	13.15±0.75 bcd
80%~100%	27.45±1.12 e	13.05±2.53 c	12.27±1.19 d

2.2 拮抗菌脂肽类粗提物活性

研究结果表明(表 3、图 2),BQD1 和 TY 菌

株脂肽提取物对玉米大斑病菌、水稻纹枯病菌和水稻稻瘟病菌均具有很好的抑制作用。本研究脂肽类物粗体液对病原菌抑菌活性强于菌株的发酵液,同设定提取的脂肽物粗体液的终浓度(10 mg·mL⁻¹)有关。

表 3 拮抗菌株脂肽类物对植物病原菌菌丝生长的影响

Table 3 Effect of lipopeptides products produced by antagonistic bacteria on hyphal growth of plant pathogens

菌株 Strains		抑菌圈直径±标准误/mm Diameters of inhibition zone±SE		
		玉米大斑病 <i>Setosphaeria</i>	水稻纹枯病 <i>Rhizoctonia</i>	水稻稻瘟病 <i>Pyricularia</i>
		<i>turcica</i>	<i>solani</i>	<i>grisea</i>
BQD1	发酵滤液	34.80±0.75	11.4±1.20	32.46±2.32
	脂肽类粗提物	37.70±0.61	21.14±1.32	36.55±3.49
TY	发酵滤液	32.78±0.69	10.03±1.26	15.06±0.90
	脂肽类粗提物	35.78±1.56	17.48±1.24	34.17±2.61

2.3 拮抗菌株酶活

对 2 株解淀粉芽孢杆菌分泌纤维素酶、蛋白酶和嗜铁素检测结果表明(见表 4),2 株解淀粉芽孢杆菌均可产生纤维素酶(5 d)、蛋白酶(5 d)和嗜铁素(7 d),且菌株间无显著差异。菌株分泌蛋白酶较多,培养 5 d,水解圈直径均大于 40 mm。菌株产嗜铁素较少,培养 7 d,桔黄色的透明晕圈直径均大于 8 mm。

表 4 拮抗细菌产酶和产嗜铁素活性

Table 4 Enzyme and siderophore production of antagonistic bacteria

菌株 Stains	纤维素酶 Cellulase			蛋白酶 Protease			嗜铁素 Siderophore		
	透明圈直径 R ₁ /mm	菌落直径 R ₂ /mm	R ₁ /R ₂	透明圈直径 R ₁ /mm	菌落直径 R ₂ /mm	R ₁ /R ₂	透明圈直径 R ₁ /mm	菌落直径 R ₂ /mm	R ₁ /R ₂ Ratio
	Diameter of transparent cycles	Diameter of colonies		Diameter of transparent cycles	Diameter of colonies		Diameter of transparent cycles	Diameter of colony	
TY	34.80±3.11	17.03±3.15	1.75±0.32	44.17±0.76	13.77±0.23	3.21±0.05	9.17±0.76	7.75±0.25	1.18±0.08
BQD1	38.57±2.69	19.68±1.78	1.97±0.26	40.25±7.17	16.92±1.51	2.47±0.50	8.33±0.58	7.67±0.29	1.09±0.06

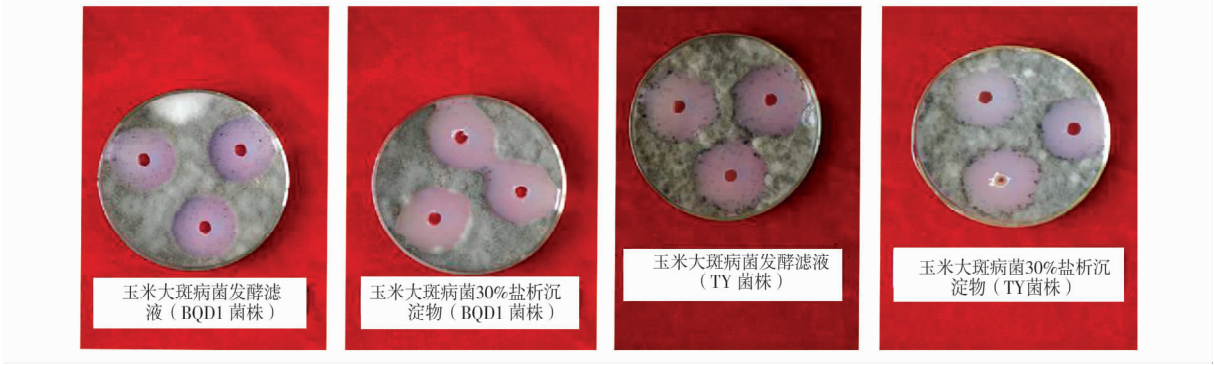


图 1 拮抗菌株盐析蛋白粗提物对玉米大斑病菌抑菌活性

Fig. 1 Bacteriostasis activity of antifungal proteins crude extracts from antagonistic bacteria against *Setosphaeria turcica*

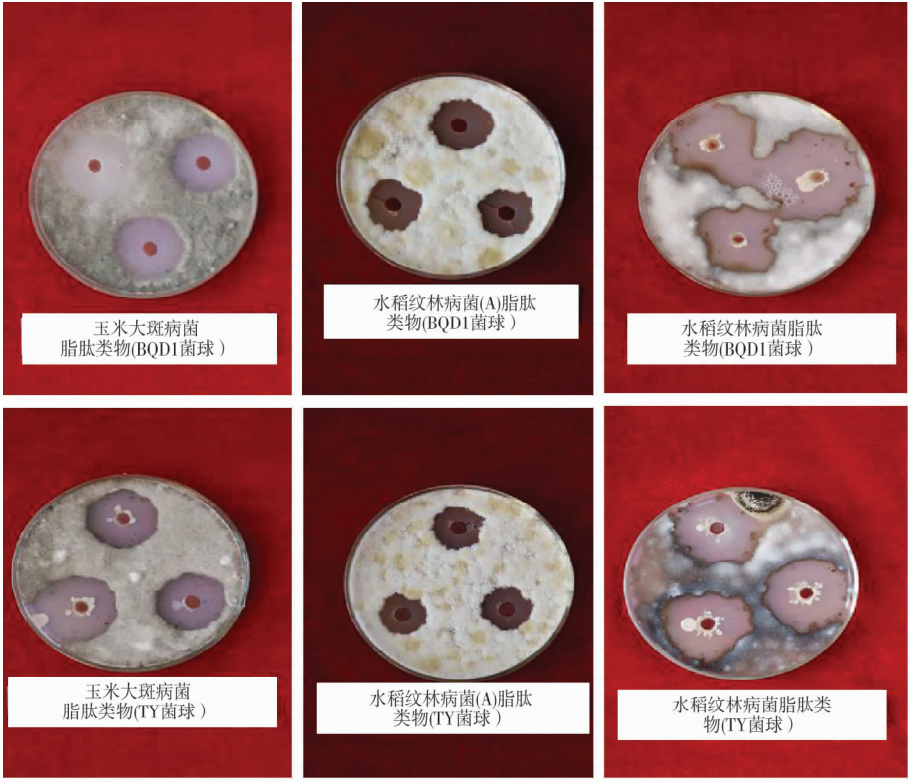


图 2 拮抗菌株脂肽类物对三种病菌抑菌活性

Fig. 2 Bacteriostasis activity of lipopeptides products produced by antagonistic bacteria

3 结论

本研究结果表明,解淀粉芽孢杆菌 BQD1、TY 通过硫酸铵盐析沉淀得到的不同饱和度的抑菌蛋白粗提液对玉米大斑病菌、番茄灰霉病菌和水稻纹枯病菌均有不同程度的抑制作用,其中对玉米大斑病菌的抑制作用最强,能明显抑制菌丝的生长。BQD1、TY 通过酸沉淀得到的脂肽类粗提液对玉米大斑病菌、水稻稻瘟病菌和水稻纹枯病菌均有很好的抑菌效果,其中对玉米大斑病菌的抑制效果最明显。由此可见,2 株拮抗菌产生的一系列活性物质可抑制病菌菌丝的生长,从而达到拮抗作用。本研究仅对解淀粉芽孢杆菌的蛋白及脂肽类物质进行了粗提,其活性物质有待进一步检测分析。

拮抗菌分泌的多种酶可破坏病原菌丝的细胞壁,使受抑制的病原菌丝无法完成菌丝生长、孢子萌发等代谢过程^[10],从而达到拮抗作用。在解淀粉芽孢杆菌 BQD1、TY 酶活检测中,2 株拮抗菌均可分泌纤维素酶、蛋白酶和嗜铁素,且菌株间无显著差异。

参考文献:

- [1] Chen X H, Koumoutsis A, Scholz R, et al. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-

promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42[J]. *Nature Biotechnology*, 2007, 25: 1007-1014.

- [2] 邓建良, 刘红彦, 刘玉霞, 等. 解淀粉芽孢杆菌 YN-1 抑制植物病原真菌活性物质鉴定[J]. *植物病理学报*, 2010, 40(2): 202-209.
- [3] 石磊, 杜锦锦, 郭庆港, 等. 具分泌几丁质酶活性的生防细菌的筛选鉴定及其几丁质酶基因的克隆和表达[J]. *植物病理学报*, 2013, 43(2): 149-156.
- [4] 高凤菊, 陈惠, 吴琦, 等. 产纤维素酶芽孢杆菌 C-36 的分离筛选及其鉴定[J]. *四川农业大学学报*, 2006, 24(2): 175-177, 213.
- [5] Saurabh Saran, Jasmine Isar, Rajendra Kumar Saxena. A modified method for the detection of microbial proteases on agar plate using tannic acid[J]. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2007, 70: 697-699.
- [6] 刘春来, 李新民, 王爽, 等. 土壤拮抗细菌的分离与抗植物病原真菌活性初步研究[J]. *黑龙江农业科学*, 2015(7): 56-61.
- [7] 赵翔, 谢志雄, 陈绍兴, 等. 适合高产铁载体细菌筛选、检测体系的改进与探析[J]. *微生物学通报*, 2006, 33(6): 95-98.
- [8] 黎波, 魏学军, 李亚宁, 等. 解淀粉芽孢杆菌 x-278 菌株抗菌蛋白初步分析[J]. *河南农业科学*, 2013, 42(7): 68-71, 83.
- [9] 钱常娣. 枯草芽孢杆菌 BAB-1 脂肽类物质的分离鉴定及性质分析[D]. 河北: 河北农业大学, 2010.
- [10] 王晓辉, 王贵鹏, 张庆芳, 等. 一株抗灰霉病解淀粉芽孢杆菌的筛选鉴定及抑菌蛋白的分离[J]. *吉林农业科学*, 2015, 40(1): 64-67.

Study on Antifungal Substance Produced by *Bacillus amyloliquefaciens*

YANG Fan, LI Xin-min, LIU Chun-lai, WANG Shuang, XIA Ji-xing, WANG Ke-qin, LIU Xing-long

(Plant Protection Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: In order to isolate and purify the antifungal proteins and lipopeptides products, and promote the development and utilization of antagonistic bacteria, two strains of *Bacillus amyloliquefaciens* which showed obvious antifungal activity against plant pathogens were selected. Antifungal proteins of two strains were preliminarily separated, using the methods of ammonium sulfate precipitation, and tested on plant pathogens. Antifungal activity of lipopeptides products which extracted with methanol from hydrochloric acid precipitate were tested plant pathogens. Two strains were also tested whether could produce cellulose, protease and siderophore. The results showed that the strongest antifungal proteins inhibition activity of strain BQD1 was under the ammonium sulfate condition of 20%~30%, its diameter of inhibition zone to *Setosphaeria turcica* was 31.48 mm. Antifungal proteins inhibition activity of strain TY was under the ammonium sulfate condition of 30%~40%, its diameter of inhibition zone to *Setosphaeria turcica* was 34.20 mm. Lipopeptides products of two strains had stronger antagonism effect on target plant pathogens than its fermentation, two strains could both produce cellulose, protease and siderophore.

Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens*; antifungal substance; plant pathogens

(本文作者还有邵天玉、徐充, 单位同第一作者)