

生防菌代谢物质种类及其研究进展

陈雪丽

(黑龙江省农业科学院 土壤肥料与环境资源研究所/黑龙江省土壤环境与植物营养重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:从目前用于植物病害生物防治的生防菌代谢物质种类方面,综述了生防菌代谢物质活性成分的国内外研究进展,代谢物质活性成分主要包括抗菌肽、抗生素及其次生代谢产物和一些酶类等。

关键词:生防菌;代谢物质;抗菌肽

中图分类号:S476

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2010)10-0011-05

植物病害给农业生产带来巨大的经济损失,传统的选育抗病品种、施用化学农药、轮作等耕作措施在植物病害的防治过程中发挥着重要作用。然而,国内外大量研究表明,大量化学农药的频繁使用,易使许多病虫草产生抗药性,施用不当还易引起环境污染和农药残留。利用环境中一些拮抗微生物对病原菌的拮抗作用、营养和空间竞争、重寄生作用以及微生物诱导植物产生系统抗病性等来防治植物病害是植物病害生物防治的一个重要的组成部分^[1-2]。而大多生防菌能产生抗菌物质,抗菌物质可以在植物体外直接杀死或抑制病原菌,如果能分离出抗菌物质的编码基因,并应用到抗病育种中是很有意义的。

1 生防菌种类

据报道,目前细菌、真菌和放线菌在生物防治中均有应用。其中细菌主要有芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)、假单胞杆菌(*Pseudomonas* spp.)、土壤放射杆菌(*Agrobacterium radiobacter*)以及其它一些细菌^[3]。真菌用于病害生物防治的主要是木霉菌,1932年,Weindling^[4]发现在培养条件下木素木霉菌(*Trichoderma lignorum*)可以寄生于许多土传真菌,在土壤中增加其含量能够防治某些

致病真菌,木霉菌由此引起人们的重视。目前用于生物防治研究的木霉菌有8种,即哈茨木霉菌(*T. harzianum*)、绿色木霉菌(*T. viride*)、康氏木霉菌(*T. koningii*)、钩状木霉菌(*T. hamatum*)、长枝木霉菌(*T. longibrachiatum*)、绿粘帚霉(*Glocladium virens*)、多孢木霉(*T. polysporum*)和棘孢木霉(*T. asperellum*)对多种植物病原菌表现拮抗活性^[5-6]。用于植物病害生物防治的放线菌主要是链霉菌属的不同种,如刺泡吸水链霉菌北京变种^[7](*Streptomyces hygrospinosus* var. *beijingensis*)、玫瑰皮黄链霉素菌淡色变种^[8](*S. roscoelucacurvar. palliclus*)、诺尔斯链霉菌西昌变种^[9](*S. noursei* var. *xichangensis*)等多种链霉菌,对小麦白粉病、小麦赤霉病、水稻纹枯病等病原菌具有较好的防治效果。

2 生防菌代谢物质种类及研究进展

2.1 微生物抗菌肽

抗菌肽又称抗微生物肽(Anti-microbial peptides,简称ABP)或肽抗生素(peptide antibiotics)是基因编码的肽类抗菌分子^[10],它们广泛分布于整个生物界,是脊椎动物、无脊椎动物和植物的先天免疫关键因子^[11]。抗菌肽和常规的抗生素不同,抗生素是通过一系列酶合成的产物,而抗菌肽则是某个特定基因编码的产物。能产生抗菌肽的生防菌主要是生防细菌。

2.1.1 微生物抗菌肽的作用机制 几乎所有抗菌肽都是阳离子型,大多具有两亲性 α -螺旋和 β -折叠结构。抗菌肽的功能与结构有着密切的关

收稿日期:2010-05-27

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划资助项目(2007BAD87B03;2007BAD87B01-3);农业部资助项目(WX-Z-07-06);2008年黑龙江省农业科技创新工程青年基金资助项目

作者简介:陈雪丽(1980-),女,黑龙江省依安县人,硕士,助理研究员,从事土壤微生物研究。E-mail: xuelichen99@163.com。

系,从目前的研究结果来看,一般认为抗菌肽杀菌机理主要是作用于细胞膜,破坏其完整性并形成离子通道,造成细胞内容物溢出胞外而死亡^[12]。

关于通道形成的具体过程有几种假说^[13],认为通道的形成分为 3 个步骤:

(1)抗菌肽分子通过正负电荷间的静电作用吸附到膜表面;

(2)抗菌肽分子中的疏水位插入到细胞膜中;

(3)抗菌肽分子的两性结构分子 α -螺旋插入膜中,从而改变膜的构象,多个抗菌肽分子共同作用形成离子通道。

Fik 等认为抗菌肽作用于细胞膜时,N-端的两亲螺旋结合在膜表面,只有 C-端的疏水螺旋插入膜中,进而形成通道。

Clague 等认为抗菌肽通过作用于膜蛋白,引起蛋白质凝聚失活,细胞膜变性而形成离子通道。

抗菌肽通过物理作用造成细胞膜的穿孔,这样就不需要一些特殊的受体。因此微生物要产生对抗菌肽的耐受性,只能通过改变其膜的结构,而这一点是很难做到的。大多数抗菌肽是由无特点的氨基酸序列组成,缺少一个独特的可被蛋白水解酶识别的抗原决定基,因此微生物要破坏抗菌肽也十分不易。研究表明,有些因素可以显著抑制抗菌肽的生物活性。动植物细胞膜中的胆固醇能稳定脂质双层,还可以与抗菌肽相互作用,降低其活性^[14-17]。同时其作用效力与机体内的盐浓度有关, α 和 β 防御素在盐浓度达到 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时就会迅速失去作用^[18]。其中,细菌素是最常见的一类抗菌肽,它能特异性杀死竞争菌,而对宿主自身无害,这是由于转录后的修饰作用或宿主有特殊的免疫机制。

2.1.2 微生物抗菌肽的研究现状 芽孢杆菌是一类重要的生防细菌,其分泌的抗菌肽对多种病原真菌有较好的抑制效果,因此成为近年来生物防治研究中的热点。钟娟等^[19]从新疆棉株上分离得到 1 株细菌 ZK,经形态性状和生理生化鉴定,确定该菌属于芽孢杆菌属(*Bacillus* spp.),其代谢产物是一种抗病原真菌的肽类物质——捷安

肽素。以此株菌作为出发菌株,进行紫外线、微波和亚硝基胍诱变,获得高产突变株 Mv 28,在摇瓶试验中,该变异株产捷安肽素活性比出发菌株提高 31.6%。杜红方^[20]通过拮抗试验筛选出对棉花枯萎病菌具有拮抗作用的芽孢杆菌 LC105 菌株,并从其发酵液中分离纯化出单一组分的抗棉花黄萎病的蛋白质。刘晓妹^[21]自菜园土中分离得到对茄子菌核菌、番茄灰霉菌、小麦纹枯病菌等 5 种病菌有强烈抑制作用的芽孢杆菌 B1 和 B2。从发酵液中分离提纯到分子量分别为 103.5、127.5 kDa 的抗菌蛋白。齐爱勇^[22]对番茄灰霉生防菌 B21 进行分子鉴定及抗菌蛋白分离纯化,得知 B21 为枯草芽孢杆菌,抗菌蛋白分离纯化后确定蛋白质分子量为 43 kDa。赵涛^[23]从枯草芽孢杆菌 A3-2 菌株发酵液中分离纯化出分子量为 3.49 kDa 的小分子量多肽,研究表明该抗菌肽对黄瓜枯萎病菌、板栗干腐病菌、苹果轮纹病菌、棉花立枯病菌等多种病原菌菌丝及分生孢子具有强烈抑制作用。胡明^[24]对拮抗细菌 BDT-25 的抗菌蛋白分离提纯获得纯蛋白,经 SDS-PAGE 电泳检测,其分子量为 2 kDa 左右。刘静等^[25]对枯草芽孢杆菌 JA 分泌物中具有抑菌作用的物质进行分离纯化,获得 3 种对水稻纹枯病菌和小麦赤霉病菌均有抑菌作用的抗菌肽,通过 MALDI-TOF 质谱法测得其分子量分别为 1.46、1.47 和 1.49 kDa,并对其氨基酸组成进行分析。Elizabeth^[26]从 *Bacillus cereus* 代谢物中分离得到分子量为 2.7 kDa 的抗菌蛋白,并通过 Western 杂交整合到大肠杆菌中。王光华等^[27]自大豆根际分离得到 1 株对大豆根腐病^[28]、黄瓜和番茄枯萎病^[29]的生防菌 *Peanibacillus polymyxa* BRF-1,对其进行鉴定和生物学特性研究,从代谢产物中纯化得到分子量为 35.4 kDa 的具有抑菌活性的抗菌肽^[30]。吴建胜等^[31]对从水稻的菊欧氏菌(*Erwinia chrysanthemi*)中分离提取的一种抗菌物质细菌素 Echcin,研究表明,细菌素 Echcin 对 5 个属植物病原细菌、辣椒疫霉、苎麻疫霉、番茄早疫等病原真菌具有很强的抑制作用。

2.2 抗生素类

2.2.1 微生物产生抗生素的种类 1942 年, Wakesman 将由微生物产生的能够以低浓度抑制其它微生物生长的物质称为抗生素。据报道,木霉能产生挥发性或不挥发性的抗菌素类物质,如木霉菌素(trichodemin)、胶霉毒素(gliotoxin)、绿木霉素(viridin)、抗菌肽(antibiotic peptide)等^[32-33]。木霉菌能产生抗真菌代谢产物,一个菌株可产生多种抗生素,如哈茨木霉可产生 12 种,康氏木霉菌可产生 9 种,绿色木霉菌可产生 10 种,这些抗生素的化学性质各不相同,包括戊酮、辛酮、萜类、多肽和氨基酸衍生物等。在木霉菌与病原菌对峙培养中出现抑菌圈,说明在代谢过程中产生了某些抗生物质。

2.2.2 微生物产生抗生素的研究现状 谭周进等^[34]报道了假单胞杆菌可以产生吩嗪(phenazines)类、2,4-二乙酰藤黄酚(2,4-diacetyl-phloroglucinol, DAPG 或 PhI)、硝吡咯菌素(Pyvrdnitrin, Prn)、藤黄绿脓菌素(Pyoluteorin, Plt)、假单胞菌素(Pseudobactin)、环庚三烯酚酮(Tropiline)等多种对小麦全蚀病菌、黄瓜枯萎病菌、棉花猝倒病菌等多种病原菌具有有效抑制作用的抗生素。

近年来,研究表明放线菌代谢产物中的活性成分性质不尽相同,其中一部分为水溶性抗生素,一部分为脂溶性抗生素。如放线菌 D2-4^[35]产生的代谢产物经分离纯化是一种弱碱性水溶性抗生素,对番茄灰霉病等蔬菜及经济作物的某些真菌病害有很好的防治效果。而编号为 24 的放线菌,产生的代谢产物对烟草赤星病菌、马铃薯干腐病菌、玉米大斑病菌等 8 种病原菌菌丝生长或孢子萌发均有较强的抑制作用,其抑菌活性成分主要为水溶性物质^[36]。刺孢吸水链霉菌北京变种(即农抗 120 产生菌)发酵代谢产物中具有活性的成份是一类脂溶性物质,对水稻纹枯病等几种作物病原真菌在平皿抑菌测定中有很高活性^[7]。

2.3 酶

2.3.1 微生物代谢酶的种类 许多病原真菌细

胞壁都含有几丁质和 β -1,3 葡聚糖。很多生防菌就通过代谢几丁质酶、 β -1,3 葡聚糖酶来破坏病原真菌的细胞壁而具有抗病防病作用。目前研究较多的微生物代谢酶类包括几丁质酶、 β -1,3 葡聚糖酶、蛋白酶、纤维素酶类等。

2.3.2 微生物代谢酶的研究现状 木霉产生各种细胞壁溶解酶是其重要的拮抗机制。在抗生和菌寄生中可产生几丁质酶、 β -1,3 葡聚糖酶、蛋白酶、纤维素酶和木聚糖酶来分解植物病原真菌的细胞壁或分泌葡萄糖苷酶等胞外酶来降解病原菌产生的毒素^[37]。研究表明,短芽孢杆菌(*Bacillus brevis*)、地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)和枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)能产生具有分解几丁质和壳聚糖能力的几丁质酶^[38],并对水稻、油菜、黄瓜和小麦等作物的多种病原真菌具有较好的抑制作用^[39]。据报道,最早发现具有几丁质酶活性的芽孢杆菌是 *B. chitinourous*, 目前涉及 *B. subtilis*、*B. coagulans*、*B. megaterium*、*B. licheniformis*、*B. thuringiensis*、*B. cereus*、*B. circulans*、*B. stercorophilus*、*B. pabuli* 等很多芽孢杆菌种群^[40]。

2.4 其它类代谢物质

研究表明,荧光假单胞杆菌(*Pseudomonas fluorescens*)的转化株能产生大量的含氮氧化物,这种含氮氧化物能够增强 *Pseudomonads* 的生防效果,诱导植株系统抗病性(ISR)的产生^[41]。生物表面活性剂(biosurfactant)是最近发现的一类具有生防作用的拮抗物质。荧光假单胞杆菌的某些菌株产生的生物表面活性剂,降低了病原菌孢子的表面张力,在细胞膜内外膨压的作用下,使孢子细胞破裂而死亡。Souza^[42]对荧光假单胞杆菌 *P. fluorescens* SS101 的研究表明,将浓度为 25~50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的提纯生物表面活性剂在离体条件下,观察对腐霉菌游动孢子的作用。结果表明,游动孢子在 30 s 内活动受到明显抑制,60 s 后孢子细胞膜破裂,孢子消失。盆栽生物测试也证明,SS101 菌株对由 *Phytophthora* 和 *Pythium* 引起的花卉和蔬菜病害有很好的防治效果。

3 展望

大量研究表明,微生物很容易通过基因突变对传统的抗生素产生耐受性,然而,其通过基因突变的方式来产生对抗菌肽的耐受性几乎是不可能的。因为其抗菌机制是不同的:抗生素一般是通过抑制细菌的细胞壁、蛋白质或 DNA 等的合成来发挥作用,这种作用需要一些特殊受体;而抗菌肽一般是通过物理作用造成细胞膜的穿孔,这样就不需要一些特殊的受体。微生物要产生对抗菌肽的耐受性有两大难点^[12]:

(1)抗菌肽的作用目标是细菌的细胞膜,因此微生物要避免被抗菌肽攻击,就必须改变其膜的结构,然而这一点是很难做到的。

(2)大多数的抗菌肽是由无特点的氨基酸序列组成,缺少一个独特的可被蛋白水解酶识别的抗原决定基,因此微生物要破坏抗菌肽也十分不易。

因此,微生物抗菌肽作为一类抗菌能力强、抗菌谱广、种类多、可供选择范围广、靶标菌株不易产生抗性突变的功能多肽有着广阔的应用前景。

然而,仅仅依靠微生物发酵代谢物来生产微生物杀菌剂、杀虫剂、除草剂和增效剂等有很大的局限性。如何在成本较低条件下,将微生物代谢产物产业化、批量生产,或通过其它废弃原料生产加工成具有微生物拮抗能力的酶类或抗生素类物质,且活性稳定,进而推广应用是目前生物农药和增效剂的发展方向。

参考文献:

- [1] Cook Y, Reuveni M. Occurrence of metalaxyl-resistance isolates of *Phytophthora infestans* in potato fields in Israel[J]. Phytopathology, 1983, 73: 925-927.
- [2] Cook R J. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens[J]. Ann. Rev. Phytopathol., 1993, 31: 53-80.
- [3] 王光华, Jos M Raaijmakers. 生防细菌产生的拮抗物质及其在生物防治中的作用[J]. 应用生态学报, 2004, 15(6): 1100-1104.
- [4] Weidling R. Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma hamatum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi[J]. Phytopathology, 1932, 22: 837-845.
- [5] Bhuyan S A. Antagonistic effect of *T. viride*, *T. harzianum* and *Aspergillus terreus* on *Rhizoctonia solani* causing sheath blight of rice[J]. J. Agricultural Science Society of North East India, 1994, 7(1): 125-128.
- [6] 周晓丽, 苗青, 范海延. 应用木霉菌防治蔬菜病害的研究进展[J]. 辽宁农业科学, 2005(3): 57-59.
- [7] 王学士, 任清水, 全赞华, 等. 农用抗生素 120 有效成分的研究[J]. 生物防治通报, 1994, 10(3): 131-134.
- [8] 金同铭, 宋家祥, 李香玲, 等. 抗小麦赤霉病抗生素 861-A 的提取、纯化及理化性质[J]. 微生物学报, 1989, 29(4): 317-319.
- [9] 向固西, 胡厚芝, 陈家任, 等. 一种新的农用抗生素—宁南霉素[J]. 微生物学报, 1995, 35(5): 368-374.
- [10] Zhang L, Falla T, Wu M, et al. Determinants of Recombinant Production of Antimicrobial Cationic Peptides and Creation of Peptide Variants in Bacteria[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998, 247(3): 674-680.
- [11] Boman H G. Peptide Antibiotics and Their Role in Innate Immunity[J]. Annu Rev Immunol, 1995, 13: 61-92.
- [12] 李聪, 燕安, 俞利凤, 等. 抗菌肽的研究进展[J]. 细胞生物学杂志, 2004, 26(2): 125-128.
- [13] 李香春, 李鸿军. 天然肽类食品防腐剂的研究动态[J]. 肉类工业, 2002, 25(4): 44-46.
- [14] Matsuzakik. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defence? Magainin and tachyplesins as archetypes[J]. Biochim Biophys Acta, 1999, 1462: 1-10.
- [15] Fernandez L S, Huisun K, Ellen C, et al. Antibacterial agents based on the cyclic D, L- α -peptide architecture[J]. Nature, 2001, 412: 452-455.
- [16] Yang L, Weiss T M, Lehrer R I, et al. Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin[J]. Biophys J, 2000, 79: 2002-2009.
- [17] Shai Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides[J]. Biochim Biophys Acta, 1999, 1462: 55-70.
- [18] James P, Tam Y N, Yang J L. Correlations of cationic charges with salt sensitivity and microbial specificity of cystine-stabilized β -strand antimicrobial peptides[J]. J Biol Chem., 2002, 277: 50450-50456.
- [19] 钟娟, 周金燕, 谭红. 抗真菌多肽—捷安肽素高产菌的选育[J]. 应用与环境生物学报, 2004, 10(10): 104-107.
- [20] 杜红方. 棉花黄萎病拮抗细菌的筛选与抗菌蛋白的分离纯化[D]. 保定: 河北大学, 2003.

- [21] 刘晓妹. 芽孢杆菌 B1、B2 抗菌物质产生条件、理化性质、抗菌机理及其防病研究 [D]. 兰州:甘肃农业大学,2001.
- [22] 齐爱勇. 番茄灰霉生防菌 B21 的分子鉴定及其抗菌蛋白的分离纯化 [D]. 保定:河北农业大学,2004.
- [23] 赵涛. 枯草芽孢杆菌 A3-2 菌株的分离鉴定及其抗菌蛋白的分离纯化与性质研究 [D]. 泰安:山东农业大学,2002.
- [24] 胡明. 棉花黄萎病抗菌蛋白的分离纯化及其部分性质的研究 [D]. 保定:河北大学,2004.
- [25] 刘静,王军,姚建铭,等. 枯草芽孢杆菌 JA 抗菌物质特性的研究及抗菌肽的分离纯化 [J]. 微生物学报,2004,44(4):511-514.
- [26] Elizabeth A, Stohlocelyn L, Milner J H. Zwittermicin A biosynthetic cluster [J]. Gene, 1999, 237:403-411.
- [27] 王光华,金剑,徐美娜,等. 生防细菌 BRF-1 和 BRF-2 鉴定及生物学特征 [J]. 中国生物防治,2007,23(1):49-54.
- [28] 王光华,周克琴,金剑,等. 生防微生物 BRF-1 对大豆根腐病的拮抗作用 [J]. 大豆科学,2004,23(3):188-191.
- [29] 陈雪丽,王光华,金剑,等. 多粘类芽孢杆菌 BRF-1 和枯草芽孢杆菌 BRF-2 对黄瓜和番茄枯萎病的防治效果 [J]. 中国生态农业学报,2008,16(2):446-450.
- [30] 陈雪丽,郝再斌,王光华,等. 多粘类芽孢杆菌 BRF-1 抗菌蛋白的分离纯化 [J]. 中国生物防治,2007,23(2):156-159.
- [31] 吴建胜,梁晶丹,王金生. 细菌素 Echin 防治作物真菌病害、细菌病害的研究 [J]. 植物病理学报,1999,29(2):104-109.
- [32] Baek J M, Howell C R, Kenerley C M. The role of extracellular chitinase from *Trichoderma virens* Gv29_8 in the biocontrol of *Rhizoctonia solani* [J]. Current Genetics, 1999,35(1):41-43.
- [33] Bertagnolli B L, Daly S, Sincilir J B. Antimycotic compounds from the plant pathogen *Rhizoctonia solani* and its antagonist *Trichoderma harzianum* [J]. Phytopathology, 1998,88:131-135.
- [34] 谭周进,肖启明. 假单孢菌产生的抗生素 [J]. 世界科技研究与进展,2003,25(2):54-57.
- [35] 韩斯琴,徐梅,白震,等. D2-4 放线菌抗真菌病害活性成分研究 [J]. 微生物学杂志,2004,24(1):8-10.
- [36] 田小卫,龙建友,白红进,等. 一株放线菌次生代谢产物抗菌活性的初步研究 [J]. 植物保护,2004,30(2):51-54.
- [37] Thrane C, Tronsmo A, Jensen D E. Endo- β -1,3 glucanase and cellular from *Trichoderma harzianum*: Purification and Partial characterization, induction of biological activity against plant pathogenic *Pythium* spp. [J]. European J Plant Pathology, 1997,103:3331-3344.
- [38] 顾真荣,马承铸,韩长安. 产几丁质酶芽孢杆菌的筛选鉴定和酶活力测定 [J]. 上海农业学报,2001,17(3):92-96.
- [39] 顾真荣,马承铸,韩长安. 产几丁质酶芽孢杆菌对病原真菌的抑菌作用 [J]. 上海农业学报,2001,17(4):88-92.
- [40] Martin D F, Priest F C, Todd C, et al. Distribution of beta-gluconases within the genus *Bacillus* [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1980,40(6):1136-1138.
- [41] Wang Y Q, Yang Q, Tosa T. Nitric oxide-overproducing transformants of *Pseudomonas fluorescens* with enhanced biocontrol of tomato bacterial wilt [J]. J Gen Plant Pathol, 2005,71:33-38.
- [42] Souza J T. Distribution, diversity, and activity of antibiotic producing *Pseudomonas* spp. [D]. Wageningen, The Netherlands: Wageningen University, 2002.

Metabolite Species Produced by Biocontrol Strains and Its Resent Advances

CHEN Xue-li

(Soil Fertility and Environmental Resources Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Soil Environment and Plant Nutrition of Heilongjiang Province, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: This paper summarized the research progress of active ingredients metabolized by biocontrol strains in the respect of metabolites species which has been utilized in plant diseases biocontrol. The active ingredients mainly include anti-peptides, antibiotics and its secondary metabolites and some kinds of enzyme.

Key words: biocontrol strains; metabolites; peptide