微生物学通报
Microbiology
tongbao@im.ac.cn

JUN 20, 2008, 35(6): 903~908
© 2008 by Institute of Microbiology, CAS

研究报告

解淀粉芽孢杆菌 NK10.BAhjaWT 抑真菌作用的研究

郝建安　曹志辉　赵凤梅　高卫华　徐海津　白艳玲　张秀明　乔明强*

(南开大学生命科学学院分子生物学研究所　天津　300071)

摘　要: 芽孢杆菌属以多产抗菌素闻名。通过筛选几十株不同来源的芽孢杆菌，获得 1 株具有强抑真菌活性的芽孢杆菌。经过 16S rDNA 检测与 Biolog 分析，确定此株菌为解淀粉芽孢杆菌。本实验对摇瓶发酵的条件进行了优化，经过对发酵上清液硫酸铵盐析、透析、真空冷冻干燥获得粗提蛋白。并对粗蛋白的热稳定性、pH 稳定性、抗蛋白酶水解能力、离子稳定性以及抑真菌谱进行了研究，最后使用扫描电镜对抑真菌机制进行了探索。

关键词: 解淀粉芽孢杆菌，抑真菌蛋白，稳定性，抑真菌谱

Exploring the Antifungal Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NK10.BAhjaWT

HAO Jian-An　CAO Zhi-Hui　ZHAO Feng-Mei　GAO Wei-Hua　XU Hai-Jin
BAI Yan-Ling　ZHANG Xiu-Ming　QIAO Ming-Qiang*

(*Institute for Molecular Biology*, *College of Life Science*, *NanKai University*, *Tianjin* 300071)

Abstract: *Bacillus* are well known antibiotic producers. In this study, dozens of *Bacillus* strains from different sources were screened. Among them, a strain with strong antifungal activity was found. With 16S rDNA test and Biolog assay, this strain was identified to be *Bacillus amyloliquefaciens*. The fermentation conditions were optimized in small conical flasks. After ammonium sulfate salting out, dialysis, freezing vacuum dehydration, the crude protein extracts were obtained. The thermal stability, pH stability, protease stability, ion stability and antifungal spectrum of this protein were studied further. Scanning electronic microscope was also used to explore the antifungal mechanism.

Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens,* Antifungal protein, Stability, Antifungal spectrum

真菌几乎无处不在，它无时无刻不在影响我们的生活。真菌可引发多种人类和动植物病害，如人牛皮癣、兔霉菌病、水稻纹枯病和番茄早疫病等。寻找抑真菌物质，对于保卫人类的健康和减少动、植物病害造成的经济损失，都具有非常重要的意义。

目前市场上常用的抑真菌制剂，都为化学制剂，虽然疗效确切，但存在副作用，而且生产的成本较

基金项目：天津市应用基础研究计划重点项目(No. 033605011)
*通讯作者：Tel: 022-23503340; ✉: mingqiangqiao@yahoo.com.cn
收稿日期：2007-10-19; 接受日期: 2008-02-19

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

高，严重的还会造成化学成分的残留，污染环境。因此，寻找副作用小、不污染环境、来源于生物的抑真菌制剂是非常有意义的。

目前已经从动物，植物和细菌中分离出如凝集素、植物防卫素、几丁质酶、葡聚糖酶、伊枯草菌素等多种抑真菌蛋白。在众多产抑真菌蛋白的生物中，芽孢杆菌非常有代表性。目前报道的具有抑真菌活性的芽孢杆菌就有枯草芽孢杆菌[1]、地衣芽孢杆菌[2]、短小芽孢杆菌[3]和解淀粉芽孢杆菌[4,5]等。由于芽孢杆菌易于发酵，且会将抑真菌蛋白分泌到胞外，抑真菌蛋白又具有性质稳定，水溶性等优点，便于应用为生物制剂。

本实验以实验室自主分离的 1 株解淀粉芽孢杆菌为研究对象，对抑真菌粗蛋白的获得，稳定性和抑菌谱进行了研究，同时对抑制真菌的作用机制进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 菌种

解淀粉芽孢杆菌 NK10.BAhjaWT(*Bacillus amyloliquefaciens* NK10.BAhjaWT)为本实验室保存；茄病镰刀菌(*Fusarium solani*)、水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani* Ktihn)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)以及黑痘病菌(葡萄痂圆孢 *Sphaceloma ampelina* de Bary)均为天津市植保所惠赠，人絮状表皮癣菌(*Epidermophyton floccosum*)为天津市长征医院惠赠。

1.2 培养基

LB 培养基：胰蛋白(Oxoid 公司)10 g/L，酵母抽提物(Oxoid 公司)5 g/L, NaCl 10 g/L 琼脂 1.5% (*W*/*V*, 固体培养基)；调至 pH 7.0。

PSA 培养基：土豆 200 g/L，蔗糖 20 g/L，琼脂 1.7% (*W*/*V*, 固体培养基)。

沙氏培养基：蛋白胨 10 g/L，葡萄糖 40 g/L，琼脂 1.5% (*W*/*V*, 固体培养基)。

1.3 酶和试剂

蛋白酶 K 购自宝生物工程(大连)有限公司，化学试剂(分析纯)购自天津大学化学试剂厂。

1.4 仪器

Eppendorf 离心机 5810R，真空冷冻干燥机 CHRiST ALPHA1-4 与扫描电镜(Scanning Electronic Microscope, SEM)FEI Quanta 200 均为南开大学生物实验中心公用仪器。

1.5 芽孢杆菌的抑真菌活性检测

牛津杯检测法(用于植物病原真菌检测)：真菌孢子悬液(使用含 0.5% NaCl，15%甘油，1%吐温 20 的溶液清洗真菌斜面获得) 200 μL 均匀涂布于固体 PSA 平板表面，30℃培养 3 h，4℃培养 1 h，成为检测平板。检测时在平板放置牛津杯，每杯中点 280 μL 芽孢杆菌发酵上清液(液体 LB，30℃，180 r/min，培养 24 h 后 4℃，12000 r/min，20 min)或粗蛋白溶液，30℃温箱培养 2 d 后，观察抑菌圈大小。滤纸片检测法(用于人病原真菌检测)：直径 0.5 cm 的圆形滤纸片在粗蛋白溶液中浸泡直至不能再吸收为止，放置沙氏培养基表面，并在四周接种真菌块，30℃温箱培养 2 d 后，观察真菌生长状态。

1.6 菌种鉴定

筛选得到的芽孢杆菌通过 16S rDNA[6]和Biolog 检测[7]进行菌种鉴定。16S rDNA检测用引物forward primer 5′-ATGGATCCGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′, reverse primer 5′-TATCTGCAGTGGTGTGACGGGCGGTGT-3′。将获得的 16S rDNA序列在GenBank中对比，获得鉴定结果。将过夜培养的液体菌悬液滴在载玻片表面，加盖玻片后用定性滤纸吸干边缘，在 1000 倍显微镜下观察细胞形态。

1.7 抑真菌活性曲线的测定

将新转接的芽孢杆菌单菌落接入 200 mL 液体 LB 培养基，30℃，180 r/min 振荡培养，每隔 6 h 取 1 mL培养基，记录OD_{600}光吸收值后 4℃，12000 r/min 离心 10 min获得上清液，进行抑真菌活性检测。

1.8 抑真菌粗提蛋白的获得

将新转接的芽孢杆菌单菌落接入液体LB培养基，30℃ 180 r/min 振荡培养 2 d 后 4℃ 12000 r/min 离心 10 min 获得上清液。0℃ 60%硫酸铵沉淀 3 h，4℃ 12000 r/min 离心 10 min 沉淀溶于 1 mmol/L Tris-HCl pH7.4 获得粗提蛋白溶液。3 kD 透析袋于 0℃ 1 mmol/L Tris-HCl pH7.4 溶液中透析 6 h，所得溶液真空冷冻干燥 48 h 即获得粗提蛋白粉末。粗提蛋白溶液的 SDS-PAGE 以及考马斯亮蓝染色法依据《蛋白质技术手册》。

1.9 解淀粉芽孢杆菌 NK10.BAhjaWT 抑真菌谱

使用茄病镰刀菌、水稻纹枯病菌、黑曲霉、黑痘病菌以及人絮状表皮癣菌进行抑真菌检测，构建抑真菌谱。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

1.10 抑真菌蛋白的稳定性

在不同温度(–20℃、30℃、60℃、75℃、100℃和 121℃)处理蛋白粗提物溶液 15 min后观测抑真菌效果; 加 6 mol/L HCl或NaOH固体颗粒调节蛋白粗提物溶液pH值(至 3、4.5、7、9.5 和 11)后观测抑真菌效果; 使用蛋白酶K (50 μg/mL) 37℃处理蛋白粗提物溶液 30 min后观测抑真菌效果; 在蛋白粗提物溶液中加入 1 mmol/L Fe^{2+}, Zn^{2+}后观测抑真菌效果。

1.11 抑真菌作用的扫描电镜分析

使用粗提蛋白对茄病镰刀菌(*Fusarium solani*)进行抑真菌实验, 选取牛津杯抑真菌圈内(无菌丝生长), 外(菌丝生长良好)以及内外结合部处的固体培养基进行处理, 然后进行扫描电镜分析。

2 结果

2.1 抑真菌芽孢杆菌的筛选

使用抑真菌检测的方法, 在培养真菌平板 2 d后会看到在牛津杯附近不生长菌丝, 形成抑菌圈, 抑菌圈的直径约 2 cm, 对照组 60%饱和度的硫酸铵和粗提蛋白沉淀后的上清液都没有抑真菌活性(见图 1)。

2.2 菌种鉴定

经序列扩增、基因克隆、测序, 获得 16S rDNA 序列。将此序列在 GenBank 中对比, 确定分离出的菌属于芽孢杆菌属, 且与枯草芽孢杆菌 BCRC 17366, AU30, MO2, BZ15 等都有 99%的相似性, GenBank 注册号 DQ658169。

经过 Biolog 系统鉴定生理生化反应, 实验用菌与解淀粉芽孢杆菌有 0.66 的相似性。菌种 Biolog 鉴定结果见表 1。

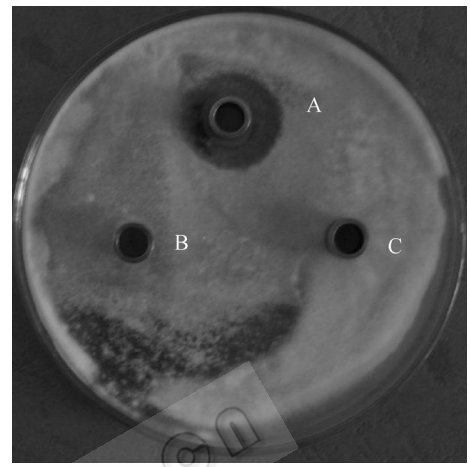

图 1 解淀粉芽孢杆菌 NK10.BAhjaWT 对茄病镰刀菌生长的抑制作用

Fig. 1 Antifugal activity toward *Fusarium solani* of *Bacillus amyloliquefaciens*NK10.BAhjaWT

注: A: 粗提蛋白溶液; B: 60%饱和度硫酸铵溶液; C: 粗提蛋白沉淀后的上清液

Note: A: Crude protein extract; B: 60% saturated solution of ammonium sulfate; C: Supernatant

表 1 Biolog 鉴定

Table 1 Biolog identification

No.	Species	Similarity	Distance	Type
1	*Bacillus amyloliquefaciens* B	0.66	4.73	GP-ROD SB
2	*Bacillus subtilis* B	0.02	5.85	GP-ROD SB
3	*Bacillus amyloliquefaciens* A	0.00	7.65	GP-ROD SB
4	*Bacillus subtilis* C	0.00	8.34	GP-ROD SB
5	*Bacillus licheniformis*	0.00	9.18	GP-ROD SB

注: Similarity: 菌株与标准菌株的相似度; Distance: 菌株与标准菌株的距离; Type GP-ROD SB: 进行 Biolog 检测所用的板子型号是革兰氏阳性细菌杆状芽孢杆菌

Note: Similarity: The most important determinant of species; Distance: The distance between the tested strain and the model strain; Type GP-ROD SB: The Biolog plate we used in test is gram-positive *Bacillus*' type

在 1000 倍显微镜下观察发现, 该菌细胞呈杆状(见图 2)。

经过 16S rDNA 与 Biolog 鉴定以及菌株的形态学观察最终确定此菌株为解淀粉芽孢杆菌。命名为解淀粉芽孢杆菌 NK10.BAhjaWT(*Bacillus amyloliquefaciens* NK10.BAhjaWT)。

2.3 解淀粉芽孢杆菌 NK10.BAhjaWT 的抑真菌曲线

解淀粉芽孢杆菌NK10.BAhjaWT培养 30 h以后, OD_{600}值开始下降, 菌株生长进入衰亡期, 而抑菌圈直径大小相对稳定。48 h以后, 抑菌圈直径开始逐渐变小, 为使抑真菌蛋白达到最佳产量, 摇瓶发酵最好控制在 30 h至 48 h之间(见图 3)。

2.4 粗提蛋白的 SDS-PAGE

粗提蛋白的 SDS-PAGE 电泳图中有多条清晰的蛋白质条带, 显示粗提蛋白是含有多种蛋白的混合物, 还有待于近一步分离纯化才能得到抑真菌纯蛋

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn
http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn

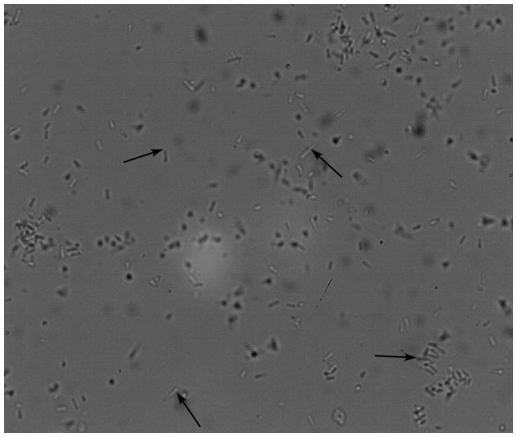

图 2 解淀粉芽孢杆菌 NK10.BAhjaWT 的细胞学形态(在 10×100 倍显微镜下)

Fig. 2 Morphological test of *Bacillus amyloliquefaciens* NK10.BAhjaWT(under micrsoscope 1000 times)

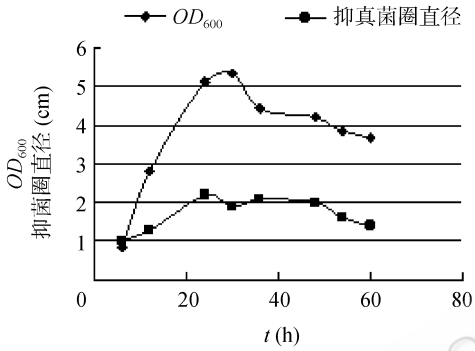

图 3 解淀粉芽孢杆菌 NK10.BAhjaWT 针对茄病镰刀菌的抑真菌活性曲线

Fig. 3 Antifungal activity curve toward *Fusarium solani* of *Bacillus amyloliquefaciens* NK10.BahjaWT

白(见图 4)。

2.5 抑真菌谱

粗提蛋白能够抑制茄病镰刀菌、水稻纹枯病菌、黑曲霉、黑痘病菌以及人絮状表皮癣菌的生长(见图 5)。

2.6 抑真菌粗提蛋白的稳定性

抑真菌粗提蛋白具有很好的热稳定性，在−20℃~100℃范围内都保持了抑真菌活性，只在 1×10^5 Pa(高压灭菌)处理后失去活性。抑真菌粗提蛋白在pH 4.5~11 的范围内保持了抑真菌活性，仅在极酸的条件下(pH 3)失去活性。在蛋白质溶液中加入 1 mmol/L Fe^{2+}和Zn^{2+}也不影响蛋白的抑真菌活性。蛋白酶K处理后粗提蛋白也保持了抑真菌活性。

2.7 抑真菌机制的扫描电镜分析

在电镜观察中发现，在抑真菌粗提蛋白的作用下，真菌菌丝生长受到抑制，出现 3 种情况：菌丝生长畸形(图 6B)；菌体细胞壁被溶解，脱落(图 6C)；菌体穿孔(图 6D)。

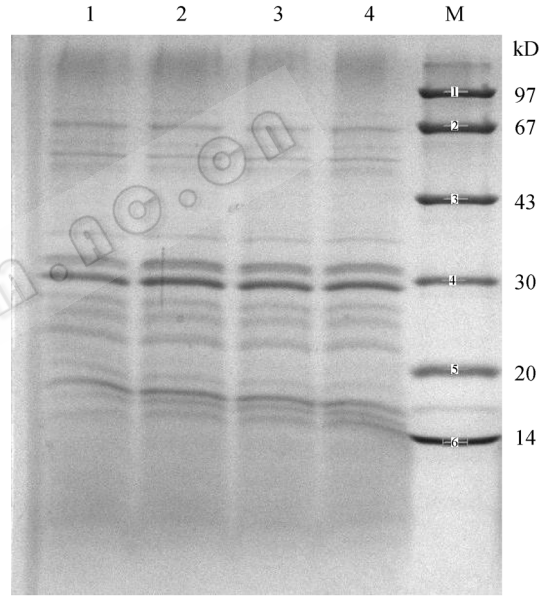

图 4 粗提蛋白的 SDS-PAGE

Fig. 4 SDS-PAGE of crude protein extract

注：1-4：粗提蛋白溶液; M：蛋白质 marker

Note: 1-4: Crude protein extract; M: Protein marker

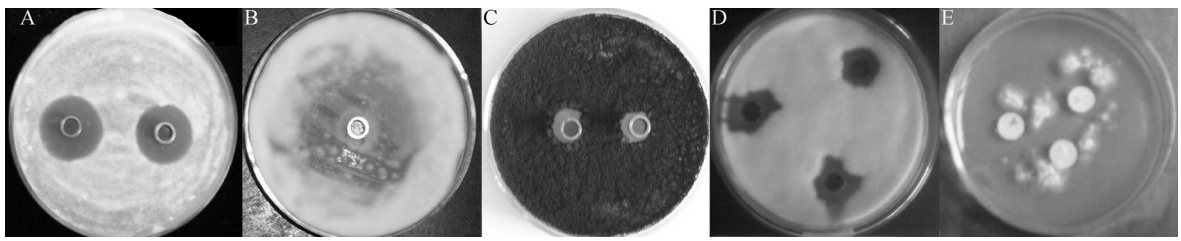

图 5 解淀粉芽孢杆菌 NK10.BAhjaWT 的抑真菌谱

Fig. 5 Antifungal spectrum *of Bacillus amyloliquefaciens* NK10.BAhjaWT

注：A：对茄病镰刀菌的抑制; B：对水稻纹枯病菌的抑制; C：对黑曲霉的抑制; D：对黑痘病菌的抑制; E：对人絮状毛癣菌的抑制(菌丝未能长过滤纸片)

Note: A: Inhibit *Fusarium solani*; B: Inhibit *Rhizoctonia solani* Ktihn; C: Inhibit *Aspergillus niger*; D: Inhibit *Sphaceloma ampelina de Bary*; E: Inhibit *Epidermophyton floccosum*

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

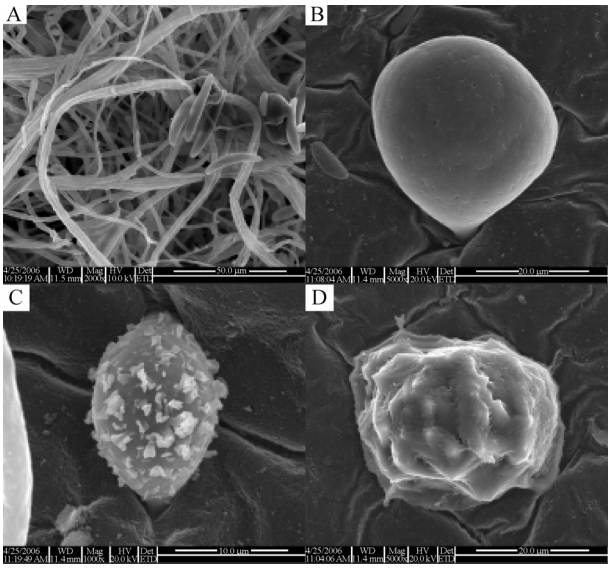

图 6　粗提蛋白对茄病镰刀菌抑制作用的扫描电镜分析
Fig. 6　SEM analysis of crude protein extract antifungal activity toward *Fusarium solani*
注：A: 正常生长菌丝(×2000); B: 菌丝生长畸形(×5000); C: 菌体细胞壁被溶解, 脱落(×10000); D: 菌体穿孔(×5000)
Note: A: Normal mycelium (×2000); B: Mycelium deformed (×5000); C: Cell wall dissolved, shedded (×10000); D: Cell wall perforated (×5000)

3　讨论

16S rRNA大小在1500 bp左右, 是进行分类研究的理想材料[8]。根据GenBank中存在的芽孢杆菌属多个 16S rDNA序列设计了本实验的一对引物。16S rDNA分析表明本实验室分离的菌株属于芽孢杆菌属, Biolog检测显示菌株NK10.BAhjaWT与解淀粉芽孢杆菌的相似性为 0.66(相似性越接近 1.0 越可信[9]), 细胞形态学观察发现细菌呈杆状, 综合这几点结果确定本实验菌株为解淀粉芽孢杆菌。最早发现的来源于芽孢杆菌的抑真菌物质是伊枯草菌素(Iturin)[10], 其后又从枯草芽孢杆菌中分离到一系列伊枯草菌素, 命名为伊枯草菌素A、D、E等, 形成了伊枯草菌素家族[11,12]。从芽孢杆菌中分离出的抑真菌物质多为类似伊枯草菌素的小肽[4,6], 分子量均在 1 kD左右。近来发现的大分子蛋白多为酶类, 如几丁质酶和葡聚糖酶[13,14]。本实验通过透析除去了小于 3 kD的蛋白, 推测抑真菌蛋白的分子量大于　3 kD。芽孢杆菌抑真菌蛋白是在细菌生长进入平稳期一段时间后逐渐达到最大产量, 这可能与抑真菌蛋白产量的积累需要一定时间有关。对照实验表明, 粗提蛋白制备过程中使用的硫酸铵以及硫酸铵沉淀后的上清液都无抑真菌活性, 说明所使用的硫酸铵沉淀法可以将此种抑真菌蛋白完全沉淀下来。实验还使用超声波破碎的方法将培养后的细胞沉淀打碎, 同样溶于 1 mmol/L Tris-HCL pH7.4 的缓冲液中, 此溶液没有抑真菌活性。证明抑真菌蛋白是被分泌到细胞外。该蛋白具有良好的稳定性, 离子的存在不仅不影响活性反而可能增大抑菌活性, 实验中增大离子浓度确实观察到了这一现象(数据未列出)。近年来显微镜照相技术以及形态学观察[15,16] 逐渐被用来研究芽孢杆菌的抑真菌机制, 本实验首次将高分辨率扫描电镜应用于抑真菌机制的研究, 发现抑真菌作用是在孢子萌发阶段使真菌新生菌丝畸形, 细胞壁溶解脱落, 甚至穿孔。综上所述, 此抑真菌粗蛋白易生产, 性质稳定, 抑制真菌萌发, 抗真菌谱广, 非常适合作为一种新的抑真菌试剂开发应用。

致谢： 感谢宋存江教授、陶健博士和杨超硕士在 Biolog 检测中给予的帮助。感谢天津市植保所提供了真菌指示菌株, 感谢天津市林果所协助做了部分抑真菌实验。感谢天津市长征医院协助进行了人皮肤真菌抑菌试验。

参 考 文 献

[1] Toure´ Y, Ongena M, Jacques P, *et al.* Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, **96**: 1151–1160.

[2] Patel VJ, Tendulkar SR, Chattoo BB. Bioprocess development for the production of an antifungal molecule by *Bacillus licheniformis* BC98. *Journal of Bioscience and Bioengineering,* 2004, **98**(4): 231–235.

[3] Bottone EJ, Peluso RW. Production by *Bacillus pumilus* (MSH) of an antifungal compound that is active against *Mucoraceae* and *Aspergillus* species: preliminary report. *Journal of Medical Microbiology,* 2003, **52**: 69–74.

[4] Yoshida S, Hiradate S, Tsukamoto T, *et al.* Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. *Biological Control,* 2001, **91(**2): 181–187.

[5] 权春善, 王军华, 徐洪涛, 等. 一株抑真菌解淀粉芽孢杆菌的分离鉴定及其发酵条件的初步研究. 微生物学报, 2006, **46**(1): 7–12.

[6] Gong M, Wang JD, Zhang J, *et al.* Study of the antifungal ability of *Bacillus subtilis* strain PY-1 *in vitro* and identification of its antifungal substance (Iturin A). *Acta Bio-*

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn
http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn

chim Biophys Sin, 2006, **38**: 233–240.

[7] Mafham JP, Boddy L, Randerson PF. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilization profiles a critique. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, **42**: 1–14.

[8] Wisotzkey JD, Jr PJ, Fox GE, *et al*. Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov International. *Journal of Systematic Bacteriology*, **42**: 263–269.

[9] 李金霞, 程 池, 姚 粟, 等. Biolog 微生物自动分析系统——酵母菌鉴定操作规程的研究. 食品与发酵工业, 2006, **32**(7): 50–53.

[10] Delcambel L. Studies on constitution of iturin. *C R Seances Soc Biol Fil,* 1952, **146**(21-22): 1808–1812.

[11] Besson F, Peypoux F, Michel G, *et al*. Characterization of iturin A in antibiotics from various strains of *Bacillus subtilis*. *J Antibiot (Tokyo)*, 1976, **29**(10): 1043–1049.

[12] Besson F, Michel G. Isolation and characterization of new iturins: iturin D and iturin E. *J Antibiot* (*Tokyo*), 1987, **40**(4): 437–442.

[13] Kim PI, Chung KiChul. Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. *FEMS Microbiology Letters,* 2004, **234**: 177–183.

[14] Wang SL, Shih IL, Liang TW, *et al*. Purification and characterization of two antifungal chitinases extracellularly produced by *Bacillus amyloliquefaciens* V656 in a shrimp and crab shell powder medium. *J Agric Food Chem,* 2002, **50**: 2241–2248.

[15] Liu YF, Chen ZhY, Ng TB, *et al*. Bacisubin, an antifungal protein with ribonuclease and hemagglutinating activities from *Bacillus subtilis* strain B-916. *Peptides*, 2006, **28**(3): 553–559.

[16] 侯 珲, 朱建兰. 枯草芽孢杆菌对番茄茎基腐病菌和葡萄灰霉病菌的抑制作用研究. 甘肃农业大学学报, 2003, **38**(1): 51–56.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一，主要反映国内外微生物学各分支学科研究最新成果和进展，其内容要求新颖丰富，观点明确，论述恰当，最好包含作者自己的工作内容和见解。因此，作者在动笔之前必须明确选题，一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面，在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势。即掌握其内在的精髓，深入到专题研究的本质，论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望，提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外，作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法，辅以注释，客观而有少量评述，使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是：在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文，引用文献数量不限。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn