

棉花枯萎、黄萎病拮抗芽孢杆菌的抗菌蛋白特性

齐东梅 梁启美 惠明 牛天贵*

(中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083)

摘要: 从土贝母和腊肠等中药和发酵食品中筛选出对棉花枯萎、黄萎病菌有广谱拮抗作用的芽孢杆菌 29 株, 其中有 12 株菌产抗菌蛋白。有 5 株抑菌活性较强: H110、H184、H216、B316 和 B382。经初步鉴定, H110 和 H184 为枯草芽孢杆菌, H216、B316 和 B382 为地衣芽孢杆菌。5 株菌的蛋白粗提液对热稳定, 对蛋白酶 K、胰蛋白酶均不敏感, 但 H184、H216 的蛋白粗提液对胃蛋白酶部分敏感。

关键词: 芽孢杆菌, 抗菌蛋白, 棉花枯萎病, 棉花黄萎病

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 04-0042-05

Characteristics of Antagonistic Proteins from *Bacillus* Against Cotton Fusarium Wilt and Verticillium Wilt

QI Dong-Mei LIANG Qi-Mei HUI Ming NIU Tian-Gui*

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083)

Abstract: Twenty-nine antagonistic *Bacillus* strains, isolated from some Chinese traditional medicine and fermented food, inhibit the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Vasinfestum* and *Verticillium dahliae* Kleb. And twelve of them are able to produce antagonistic proteins. Among the twelve strains, five (H110, H184, H216, B316 and B382) showed higher antibacterial activity. Furthermore, H110 and H184 were identified as *Bacillus subtilis*, and H216, B316 and B382 as *Bacillus licheniformis* based on physiological and biochemistry experiments. The antagonistic proteins of five strains were all thermostable, resistant to proteinase K and trypsin, while H184 and H216 partially sensitive to pepsin.

Key words: *Bacillus*, Antagonistic protein, *Fusarium oxysporum* f. sp. *Vasinfestum*, *Verticillium dahliae* Kleb.

棉花枯萎病 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *Vasinfestum*) 和黄萎病 (*Verticillium dahliae* Kleb.) 是棉花生产上危害最为严重的两种世界性病害^[1]。采用常规方法选育抗病品种, 受物种间限制, 而且存在选育周期长、抗性单一的缺点; 利用综合农业措施和化学药剂防治, 又易污染环境、破坏生态平衡。因此, 从微生物工程和植物基因工程的角度出发, 筛选出对植物病原菌有很强拮抗作用的微生物, 并通过植物基因工程技术将抗性基因导入植物细胞培育出抗病品种, 是防治棉花枯萎和黄萎病的一条有效途径。

芽孢杆菌是一类需氧或兼性厌氧、G⁺ (目前也发现有 G⁻ 的), 在一定条件下能产生抗逆性内生孢子的化能异养菌^[2]。其抗菌谱广泛, 对多种病原真菌、细菌均有较强的抑制作用。已有文章报道, 芽孢杆菌对马铃薯环腐病菌^[3]、梨灰霉病^[4]、油菜菌核病^[5]、水稻白叶枯病菌^[6]和小麦赤霉病菌^[7]等多种植物病原菌具有潜在的生防利用价值。它通过产生多种抗生素, 包括脂肽类、肽类、磷脂类、多烯类化合物、氨基酸类、核酸类和类噬菌体颗粒等, 起到抑制多种植物及人类病原菌的作用^[8]。尤其是肽类和

* 通讯作者

收稿日期: 2004-09-20, 修回日期: 2004-11-04

脂肽类物质的发现,为抗病害基因工程提供了新的生物资源和抗菌基因,是一种具有极大应用潜力的微生物类群。

因此,本研究定位于芽孢杆菌,试图从芽孢杆菌中筛选出抑制棉花枯萎病菌和黄萎病菌的拮抗菌株。本文报道了从529株芽孢杆菌中,筛选出分泌高活性抗菌蛋白、对棉花枯萎病和黄萎病的3种致病型均有较强拮抗作用的芽孢杆菌5株,研究了其胞外抗菌蛋白的部分特性,并对该5株芽孢杆菌进行了初步鉴定。

1 材料与方法

1.1 供试菌种

1.1.1 芽孢杆菌菌株:529株芽孢杆菌由本实验室提供,自中药和发酵食品中分离。

1.1.2 指示菌:供试指示菌棉花枯萎病菌 Ag226 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *Vasinfec-tum*) 和棉花黄萎病菌 (*Verticillium dahliae* Kleb.) 的3种致病型 V991、V43、V3-10,由中国农业科学院郭三堆教授提供。

1.2 培养基

LB 培养基^[9],用于培养芽孢杆菌。PDA 培养基^[9],用于培养病原真菌和测定抑菌活性。

1.3 拮抗芽孢杆菌的初筛

将固体培养基上培养好的病原菌用无菌水配制成孢子悬浮液 ($2 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$ CFU/mL),置4℃冰箱保存。

异步培养法:点种法接种芽孢杆菌于PDA平板上,于37℃培养18~24h,然后将平板倒扣于盛一薄层氯仿的培养皿盖熏蒸30min,以便杀死菌体并令其固定在平板表面。移去培养皿盖,让平板里的残余氯仿彻底挥发40min。取1mL病原菌孢子悬浮液,轻摇令其均匀布满平板,晾干后,于24℃培养3~14d。具有抑制棉花病原真菌活性的菌株周围产生透明抑菌圈。观察抑菌圈的有无和大小,初步筛选出对4株病原菌均有拮抗作用的菌株。

1.4 拮抗芽孢杆菌蛋白粗提液的制备

初筛所得拮抗芽孢杆菌于LB培养液中,37℃振荡培养24h,4℃10,000r/min离心10min,上清液中加入固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至60%饱和度,4℃下沉淀18~20h,10,000r/min离心20min,沉淀用1/25体积5mmol/L的磷酸缓冲液(pH7.0)悬浮。

1.5 拮抗芽孢杆菌粗蛋白提取液抑菌活性的测定

平板扩散法:取400 μL 病原菌孢子悬浮液于PDA平板上,涂布均匀后晾干,放置灭过菌的牛津杯,并分别加入拮抗芽孢杆菌的蛋白粗提液50 μL ,每个试样重复3次,同时以磷酸缓冲液做对照。4℃下静置,待牛津杯中蛋白粗提液渗入培养基后取下牛津杯,于24℃培养3~14d,观察抑菌结果,并测量抑菌圈直径。根据抑菌圈大小,筛选出拮抗蛋白活性较强的菌株。

1.6 芽孢杆菌蛋白粗提液稳定性测定

1.6.1 对温度的稳定性:将蛋白粗提液分别在60、80℃下处理30min,在100℃和120℃下处理20min,以未处理的样品为对照,采用牛津杯法检测其抑菌活性。

1.6.2 对蛋白酶的稳定性:蛋白粗提液分别用胰蛋白酶、蛋白酶K、胃蛋白酶在37℃下处理90min,酶反应浓度为1mg/mL,以不用酶处理的蛋白粗提液作对照,采用牛津

杯法测其抑菌活性。

1.7 拮抗芽孢杆菌的鉴定

生理生化特征测定参照文献 [9] 的方法进行。并与《常见细菌系统鉴定手册》^[10] 中相应模式菌株进行比较。

2 结果

2.1 拮抗棉花枯萎、黄萎病菌芽孢杆菌的筛选

观察异步培养法所得结果，发现 529 株芽孢杆菌中，有 29 株菌为广谱拮抗菌，对 4 株病原菌均有拮抗作用。根据其蛋白粗提液是否具有抑菌活性，将 29 株芽孢杆菌分为两类。类 I 为产抗菌蛋白的芽孢杆菌，有 12 株菌。根据蛋白粗提液的抑菌圈大小，从 12 株菌中筛选出具有较强抑菌活性的菌株 5 株，编号为 H110、H184、H216、B316、B382。它们对四株棉花病原菌的抑菌效果见表 1。类 II 包含 17 株菌，其蛋白粗提液无抑菌活性。

表 1 5 株芽孢杆菌对棉花枯萎、黄萎病菌的抑制作用

拮抗芽孢杆菌	来源	病原菌和菌株			
		棉花枯萎病菌	棉花黄萎病菌	棉花黄萎病菌	棉花黄萎病菌
		Ag226	V991	V43	V3-10
H110	白豆蔻	++	+++	+++	+++
H184	土贝母	+++	+++	++	++
H216	葶苈子	++	+++	++	++
B316	四川蜡肠	++	++	++	++
B382	福州奶豆	++	++	++	+

注: +++ D1/D2 ≥ 2, ++ 2 > D1/D2 ≥ 1.5, + 1.5 > D1/D2 ≥ 1, D1 抑菌圈带宽, D2 菌落半径

2.2 拮抗芽孢杆菌对棉花枯萎和黄萎病菌的拮抗作用

采用异步培养法筛选到的 5 株菌具有较强的抑菌活性，如图 1 所示。在棉花黄萎病菌 V991 和枯萎病菌 Ag226 平板上，H110、H184、H216、B316、B382 的菌落周围均出现大而清晰的抑菌圈。表明，这 5 株芽孢杆菌均能通过分泌拮抗棉花枯萎和黄萎病原菌的物质而起到抑制棉花病原真菌的作用。

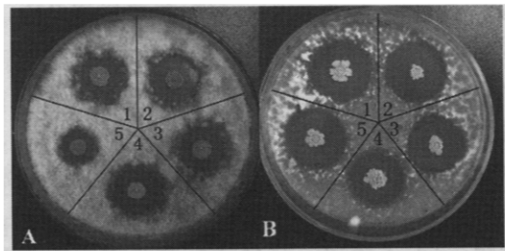


图 1 5 株芽孢杆菌对棉花枯萎和黄萎病菌的拮抗作用

A 枯萎 Ag226, B 黄萎 V991

1 H110, 2 H184, 3 H216, 4 B316, 5 B382, 6 Control

2.3 拮抗芽孢杆菌蛋白粗提液对棉花枯萎和黄萎病菌的拮抗作用

采用盐析法提取 5 株芽孢杆菌发酵液中的蛋白质，用牛津杯法测定蛋白粗提液对棉花枯萎和黄萎病原菌的拮抗作用，H110、H184、H216、B316 和 B382 的蛋白粗提液对棉花枯萎 Ag226 和黄萎病菌 V991、V43、V3-10 均有较强的拮抗作用。如图 2 所示，

5 株菌的蛋白粗提液对 3 株棉花黄萎病菌的拮抗作用要强于对棉花枯萎病菌的拮抗作用, 且以 H110 和 H216 蛋白粗提液的抑菌活性最强。

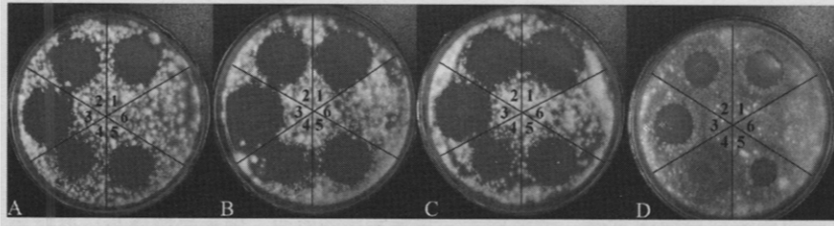


图 2 5 株芽孢杆菌蛋白粗提液对棉花枯萎、黄萎病菌的抑菌活性

A 黄萎 V991, B 黄萎 V43, C 黄萎 V3-10, D 枯萎 Ag226

1 H110, 2 H184, 3 H216, 4 B316, 5 B382, 6 Control

2.4 蛋白粗提液对温度和蛋白酶的稳定性

2.4.1 对温度的稳定性: 对 5 株芽孢杆菌的蛋白粗提液 60℃、80℃ 处理 30min, 100℃、120℃ 处理 20min 后, 测其抑菌活性, 结果表明, 5 株菌的蛋白粗提液经 60℃、80℃ 处理后, 抑菌活性与对照相比无显著差异, 100℃ 处理 20min, H110、H184、H216、B316、B382 的抑菌活性分别下降了 10%、18%、21%、35% 和 12%。120℃ 处理 20min, 5 株芽孢杆菌蛋白粗提液的抑菌活性均全部丧失。

2.4.2 对蛋白酶的稳定性: 用不同蛋白酶处理 5 株芽孢杆菌的蛋白粗提液, 测其抑菌活性, 发现, 5 株菌的蛋白粗提液对蛋白酶 K、胰蛋白酶均不敏感。H184、H216 对胃蛋白酶部分敏感, 抑菌圈直径比对照减小约 3%。

2.5 拮抗芽孢杆菌的初步鉴定

对 5 株拮抗芽孢杆菌进行了部分生理生化反应特征的测定, 将其与模式菌株比较, 具体见表 2。参照《常见细菌系统鉴定手册》^[10], 初步鉴定 H110、H184 为枯草芽孢杆菌, H216、B316 和 B382 为地衣芽孢杆菌。

表 2 5 株芽孢杆菌与模式菌株的特征比较

特征	枯草芽孢杆菌 ^m	H110	H184	地衣芽孢杆菌 ^m	H216	B316	B382
革兰氏染色	+	+	+	+	+	+	+
细胞杆状	+	+	+	+	+	+	+
芽孢圆形	-	-	-	-	-	-	-
孢囊膨大	-	-	d	-	d	-	-
厌氧生长	-	-	-	+	+	+	+
过氧化氢酶	+	+	+	+	+	+	+
氧化酶	+	+	+	ND	d	+	+
明胶水解	+	-	+	+	+	+	+
淀粉水解	+	+	+	+	+	+	+
酪素水解	+	+	+	+	+	+	+
酪氨酸水解	-	-	-	-	-	-	-
卵磷脂水解	-	-	-	-	-	d	d
2% NaCl	+	+	+	+	+	+	+
5% NaCl	+	+	+	+	+	+	+

续表 2

7% NaCl	+	+	+	+	-	+	-
10% NaCl	ND	-	-	ND	-	-	-
10℃	d	-	-	-	-	-	-
55℃	-	-	-	+	+	+	+
65℃	-	-	-	-	-	-	-
D-葡萄糖	+	+	+	+	+	+	+
蔗糖	+	+	+	ND	+	+	+
海藻糖	+	+	+	ND	+	+	+
D-木糖	+	+	+	+	+	+	+
纤维二糖	+	+	+	ND	+	+	+
丙酸盐利用	-	-	-	+	+	+	+
V. P. 实验	+	+	+	+	+	+	+

注: + ≥90% 菌株为阳性, - ≥90% 菌株为阴性, d 11% ~ 89% 菌株为阳性, ND 未测定

3 讨论

芽孢杆菌 (*Bacillus* spp.) 是自然界广泛存在的一类细菌, 可以产生杆菌肽、环脂、氨基酸类、核酸类、类噬菌体颗粒等多种抗菌物质, 在植物病害生物防治中被广泛应用。本试验表明, 从中药和食品中筛选出的对棉花枯萎和黄萎病菌具有广谱抑菌作用的 29 株芽孢杆菌中, 有 12 株菌的蛋白粗提液有抑菌活性, 证明这些菌产抗菌蛋白。其余 17 株菌的蛋白粗提液无抑菌活性, 原因可能是所产抑菌物质为非蛋白类物质, 或性质不稳定而在处理过程中失活, 或是蛋白浓度过低未表现出来, 也可能其拮抗作用是因营养竞争造成的。5 株拮抗芽孢杆菌中以 H110 抗菌效果最佳, 且经数次传代培养后抗菌活性稳定, 需进一步研究其抗菌蛋白。

试验表明: H110、H184、H216、B316、B382 菌株产芽孢, 好氧或兼性厌氧, 菌体杆状, 属于芽孢杆菌属。根据 5 株菌的生理生化特征, 查阅参考文献 [10] 中的芽孢杆菌分类检索表, 初步判断 H110 和 H184 为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), H216、B316 和 B382 为地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)。除了 H184 和 H216 菌株的孢囊略有膨大, H316 和 382 的卵磷脂水解特征为弱阳性, 5 株菌与模式菌株的其他特征均相同。因此认为孢囊膨大和卵磷脂水解酶阳性不影响将 H184 隶属于枯草芽孢杆菌种、H216、B316 和 B382 隶属于地衣芽孢杆菌种的分类地位。

参 考 文 献

- [1] 石磊岩. 棉花学报, 1996, 8 (6): 292 ~ 294.
- [2] 韩延平. 微生物学免疫学进展, 2001, 29 (4): 73 ~ 78.
- [3] 田宏先, 崔林, 孙振, 等. 山西农业科学, 2001, 29 (2): 43 ~ 45.
- [4] Mari M, Guizzardi M, Pratella G C. Biological Control, 1996, 7: 30 ~ 37.
- [5] 廖晓兰, 罗宽. 湖南农业大学学报, 2000, 26 (4): 296 ~ 298.
- [6] 林东, 徐庆, 刘忆舟, 等. 农业生物技术学报, 2001, 9 (1): 77 ~ 80.
- [7] 余桂容, 张敏, 叶华智. 四川农业大学学报, 1998, 16 (3): 314 ~ 318.
- [8] Tamehiro N, Okamoto Y, Okamoto S, et al. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46: 315 ~ 320.
- [9] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验. 北京: 科学出版社, 2002.
- [10] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.