

研究报告

拮抗菌 BS-98 分泌抗菌蛋白的条件及其发酵液特性

胡 剑* 林心怡 张九一 王树荣 王岳五

(南开大学生命科学学院微生物系, 天津 300071)

摘要 由本室分离得到一株强烈抑制芦笋茎枯病等植物病原真菌的拮抗菌 BS-98 菌株 (*Bacillus subtilis*)。用环柱法检测该菌株的抗菌活性表明, 该菌株除抑制芦笋茎枯病菌 *Phoma asparagi* Sacc 外, 对小麦赤霉病菌 (*Fusarium graminearum*), 棉花枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*), 棉花黄萎病菌 (*Verticillium albo-atrum*), 黄瓜灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*), 立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) 等植物病原真菌以及黄瓜角斑病菌 (*Pseudomonas syringae* PV. *lachrymans*) 等植物病原细菌均表现出很强的拮抗作用。选用 BPY 液体培养基 (起始 pH8.0), 30℃ 振荡培养 48h 后, 可用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀法从发酵液中分离出较多抑制病原真菌生长的蛋白。该发酵液中所含抗菌物在常温下对碱稳定, 在酸性环境中具有良好的热稳定性。

关键词 拮抗菌, 抗菌蛋白, 芦笋茎枯病菌

芦笋茎枯病是芦笋作物的一种毁灭性病害, 目前在美国、巴西、日本、朝鲜等国以及我国大陆十几个省市和台湾均有发生^[1~3], 一般减产 30%~50%, 严重者枯死无收, 已成为阻碍我国芦笋生产发展的重要因素。我国对芦笋茎枯病的研究较晚, 报道很少, 特别是对芦笋茎枯病的生物防治及抗菌蛋白方面的研究, 国内外尚无报道。筛选抑制芦笋茎枯病菌的拮抗菌, 研究其产抗菌蛋白的条件及特性, 以进一步作为拮抗物制剂用于田间防治芦笋茎枯病或纯化抗菌活性蛋白, 克隆抗病基因; 并将其导入植株中以获得抗病植株, 将是防治此病的一条有效途径。本文报道了从本室分离得到一株对芦笋茎枯病菌及其它植物病原真菌和细菌有强烈抑制作用的枯草芽孢杆菌 BS-98, 研究了不同培养条件对该菌株产抗菌蛋白及活性的影响, 对发酵液中抗菌蛋白的稳定性也做了初步探讨。

1 材料和方法

1.1 供试指示菌及培养基

指示菌见表 1, 由南开大学元素所生测室

提供。供试培养基^[4]: PDA、BPY 培养基分别用于病原真菌及细菌固体培养; BS-98 菌株最适液体培养基从 NA、KMB、YT、LB、YSP、BPY 等培养基中筛选。

1.2 抗菌蛋白粗提取

拮抗菌枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) BS-98 接种于 BPY 培养基 (pH8.0) 中, 30℃ 振荡培养 (120r/min) 48h 后, 9000r/min 离心 20min 去菌体, 加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 于上清液至饱和度为 70%, 4℃ 静置过夜, 8500r/min 离心 30min 收集沉淀, 溶于少量的 20mmol/L NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲液 (pH6.5), 置透析袋 (截留分子量 8000u) 中, 用同缓冲液透析去盐即得到抗菌蛋白粗提液。蛋白质浓度测定参照文献[5]。

1.3 抗菌活性测定

指示菌悬液的制备参照文献[6]。

环柱测定法^[7]: 在 PDA 或 BPY 平板上分别加入 0.1ml 病原真菌或细菌悬液涂布, 制成

* 现在中国农业大学生物学院, 邮编 100094

1995-10-04 收稿

待测平板,再将灭菌钢圈分别置于平板上,取100 μ l 抗菌物溶液注入钢圈内。病原真菌在28 $^{\circ}$ C下培养4d,细菌置30 $^{\circ}$ C培养24h,检测抑菌圈大小。

1.4 拮抗菌 BS-98 发酵液特性

将最适发酵条件下得到的发酵液过滤去菌,调节 pH 值使其分别为 2、4、10、12,每一 pH 值分别作热处理:30 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、80 $^{\circ}$ C、100 $^{\circ}$ C 处理 30min,1 $\times 10^5$ Pa 下 121 $^{\circ}$ C 处理 20min,冷却后以芦笋茎枯病菌作指示菌检测抑菌活性,以未经处理的培养滤液作对照。

2 结果与讨论

2.1 拮抗菌 BS-98 的筛选及其抑菌谱

以芦笋茎枯病菌等 5 属 6 株植物病原真菌作指示菌,分别检测分离到的 17 株枯草杆菌的抑菌活性,其中 5 株显示出清晰的抑菌圈(6 株指示真菌至少有 1 株被抑制生长),在此 5 株中尚有 1 株对所有 6 种病原真菌都有显著的抑制作用,将其命名为 BS-98。此外以植物病原细菌作指示菌进行检测,发现 BS-98 也有较强的抑菌作用。BS-98 抑菌谱见表 1。由表 1 可见,BS-98 菌株对芦笋茎枯病菌及小麦赤霉病菌等表现出很强的抑菌活性。

表 1 拮抗菌 BS-98 的抑菌谱

指示菌*	抑菌圈直径(mm)
芦笋茎枯病菌	38
小麦赤霉病菌	30
棉花枯萎病菌	25
棉花黄萎病菌	20
灰霉菌	24
立枯丝核菌	18
黄瓜角斑病菌	12

* 除黄瓜角斑病菌为细菌外,其余为真菌

2.2 培养条件对 BS-98 菌株产抗菌蛋白及其活性的影响

2.2.1 培养时间的影响:将 BS-98 菌株接种于 BPY 培养基(pH7.0)中,30 $^{\circ}$ C 振荡培养(120r/min),于不同时间取 50ml 发酵液测其

吸光度(OD₆₁₀)、粗蛋白含量及其抑制芦笋茎枯病菌的活性,重复 2 次(以下均相同)。结果表明(图 1)培养至 48h 三者均达最高值,以后随培养时间延长而下降,抑菌活性的下降尤为显著。

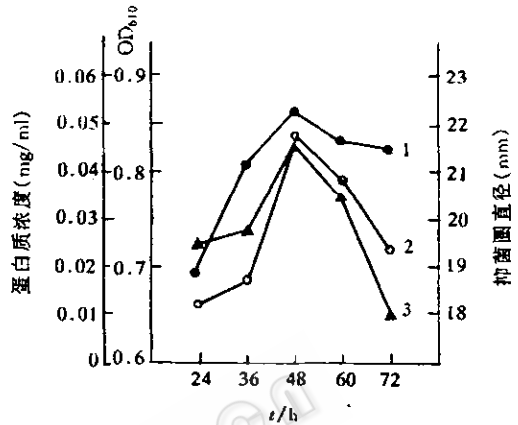


图 1 培养时间对产抗菌蛋白及活性的影响

1. 蛋白质, 2. OD 值, 3. 抑菌圈

2.2.2 培养基种类的影响:选用不同成分的液体培养基(pH7.0),接种后 30 $^{\circ}$ C 振荡培养 48h,测 OD₆₁₀、粗蛋白含量及其抑菌活性,结果表明(图 2),BPY 培养基最适合 BS-98 菌株的生长要求,可产较多抗菌物质且拮抗性相对较高。

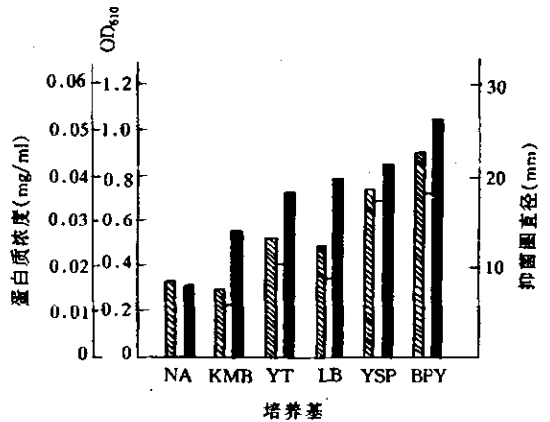


图 2 不同种类培养基对抗菌蛋白及活性的影响

图示:黑:抑菌圈直径;白:OD;斜线:蛋白质浓度

2.2.3 起始 pH 值的影响:调节 BPY 培养基的起始 pH 值分别为 5、6、7、8、9,接种后 30 $^{\circ}$ C 振荡培养 48h,测菌液的 OD₆₁₀、粗蛋白含量及抑菌活性。结果表明(图 3),在 pH8.0 时,OD₆₁₀

最低粗蛋白浓度较低但抑菌活性表现最强,说明在此 pH 值下,不利菌体生长,但促使其产生较多的抗菌活性物质,在粗蛋白中相对含量较高,表现出的抑菌活性最强。

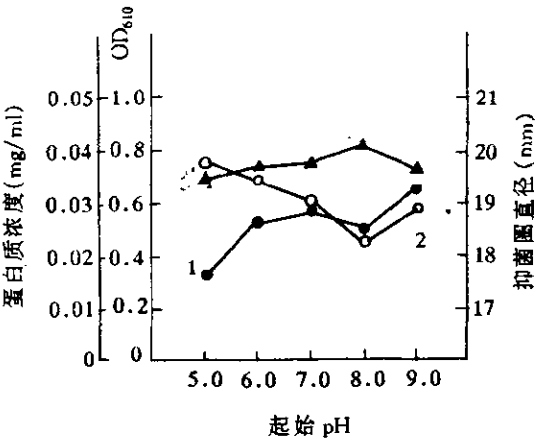


图 3 培养基起始 pH 对产抗菌蛋白及活性的影响

1. 蛋白质; 2. QD 值; 3. 抑菌圈

2.2.4 通气量的影响: 分别在 500ml 三角瓶中装入 BPY 培养基 (pH8.0) 30、50、100、200ml, 接种后于 30℃ 振荡培养 48h, 结果表明 (图 4): 50ml 装液量的菌液 OD₆₁₀ 及抑菌活性最高, 随装液量增加二者呈下降趋势, 说明 BS-98 菌株为好氧菌。

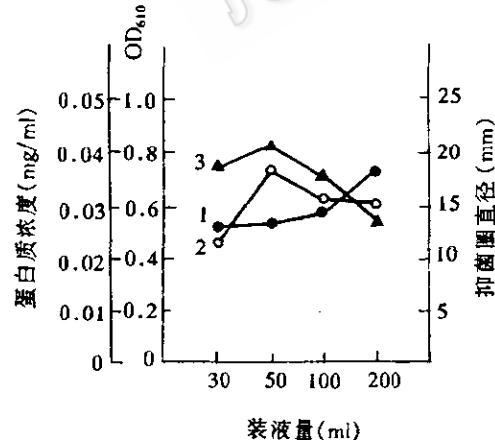


图 4 通气量对产抗菌蛋白及活性的影响

1. 蛋白质; 2. OD 值; 3. 抑菌圈

以上结果表明: 选用 BPY 培养基, 起始 pH8.0, 装液量 50ml / 500ml 三角瓶, 30℃ 振荡培养 48h, 可获得较多的抗菌活性物质。

2.3 (NH₄)₂SO₄ 饱和度对提取抗菌蛋白量及活性的影响

BS-98 发酵液去菌体上清液中先加入 30% 饱和度的 (NH₄)₂SO₄, 4℃ 静置过夜后收集沉淀, 溶于少量磷酸缓冲液中, 稀释至一定蛋白浓度检测抑菌活性。上清调整 (NH₄)₂SO₄ 饱和度至 40%, 同上制备得到 30%~40% 的盐析蛋白, 依此类推, 分别制备出 40%~50%、50%~60%、60%~70%、70%~80%、80%~90% 盐析蛋白溶液, 稀释至相同的蛋白浓度, 检测其对芦笋茎枯病菌的抑菌活性, 结果见表 2。

表 2 (NH₄)₂SO₄ 分级盐析对提取抗菌活性物质的影响

(NH ₄) ₂ SO ₄ 分级盐析 饱和度 (%)	30	30~40	40~50	50~60	60~70	70~80	80~90
抑菌圈 (mm)	18	22	28	18	25	20	0

由表 2 可见, 在 70% 以上饱和度条件下, 抑菌性不再加强, 说明 70% 饱和度时抗菌活性物质已基本沉淀完全。在 30% 饱和度以下, 抑菌活性较小, 说明沉淀出的大量蛋白多为杂蛋白, 出于提纯的考虑由此可确定出级盐析的两个饱和度为 30% 及 70%。即先在发酵上清液中加入 30% 饱和度 (NH₄)₂SO₄ 4℃ 过夜, 离心去沉淀, 上清中补加 (NH₄)₂SO₄ 至 70% 饱和度 4℃ 过夜可沉淀出大部分的抗菌蛋白。

2.4 拮抗菌 BS-98 发酵液特性

2.4.1 上清液稀释液的抑菌活性: 将最适发酵条件下得到的发酵液离心过滤除菌, 将无菌滤液分别稀释 2、5、7.5、10、25 倍后分别检测其抑菌活性, 结果见表 3。

去菌滤液与原发酵液进行比较, 培养滤液的抑菌活性降低, 其原因是拮抗菌自身的存在不停地代谢后产生大量抗菌活性物质, 抗菌物质浓度高, 显示出较强的抑菌活性。培养滤液稀释至 2~7.5 倍后抑菌活性基本上没有变化。

2.4.2 发酵滤液的稳定性: 在常温条件下

表3 BS-98 菌株去菌滤液及其稀释液抑菌活性比较

指示菌	发酵液	抑菌圈(mm)					
		不同稀释倍数的去菌滤液					
		0	2	5	7.5	10	25
芦笋茎枯病菌	38	28	26	26	24	19	8
小麦赤霉病菌	30	21	21	20	18	12	8
棉花枯萎病菌	25	8	8	8	8	0	0
棉花黄萎病菌	20	15	15	14	14	8	0
灰霉菌	24	18	18	18	17	12	0
立枯丝核菌	18	10	10	8	6	0	0
黄瓜角斑病菌	12	8	8	0	0	0	0

表4 不同处理条件下的相对抑菌活性

热处理 (℃)	相对抑菌活性(%)					
	pH 值					
	2.0	4.0	8.5	10	12	8.5(对照)
30	46.9	65.7	100	93.8	75.1	100
60	42.1	60.5	100	84.2	81.5	100
80	40	55	100	85	0	100
100	66.7	75	86.1	0	0	100
121	69.5	72.6	75.2	0	0	100

(注: BS-98 菌株培养 48h 后培养滤液 pH 值为 8.5)

(30℃), 存在于碱性环境中的抗菌物质活性较高即对碱稳定, 而随着温度的升高其碱稳定性下降, 在酸性条件下相对抑菌活性增强。培养滤液于 pH4.0 与 pH8.5 时分别于 121℃ 处理后, 相对抑菌活性相当(表 4), 显示出该抗菌物质在酸性环境中具有良好的热稳定性, 这一特性值得进一步探讨。由于拈抗菌 BS-98 培养滤液在常温下于 pH 较宽范围内保持大部分抑菌活性, 酸性条件下具有良好的热稳定性及活性, 因此将其施用于田间防治植物病害具有很

好的开拓前景。

近年来国外关于枯草芽孢杆菌对植物病原真菌的抑制作用及防治试验报道较多^[8~12], 国内也报道了对白菜软腐病, 小麦赤霉病^[13]具有抑制作用的菌株。本文首次报道了对芦笋茎枯病菌、小麦赤霉病菌以及棉花枯萎病菌、棉花黄萎病菌等病原真菌及黄瓜角斑病菌具有强烈抑制作用的拈抗菌株 BS-98。BS-98 菌株具有生长快, 产抗菌物质组份多, 抗菌能力强, 抗菌谱广等优点, 显示了良好的应用前景。

参 考 文 献

[1] Choi K K. Korean Jour of Plant Protection, 1981, 20(2): 83~86.
[2] Reifschneider F J B, Lopes C A. FAO Plant Protection Bulletin, 1982, 30(3~4): 157.
[3] Lui T ME, Hwang J S. Plant Protection Bulletin, 1988, 30(1): 24~30.
[4] 中国微生物菌种保藏委员会编著: 中国菌种目录, 北京: 轻工业出版社, 1983, 404~422.
[5] Bradford M M. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248~254.
[6] Phae C G, Shoda M, Kubota H. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1990, 69(1): 1~7.
[7] 方中达. 植病研究方法, 北京: 农业出版社, 1982, 231.
[8] Gregory G F, Schreiber L R, Ichada J. Phytopathology, 1984, 74: 804~805.
[9] Azad H R, Davis J R, Schnathorst W C, et al. Phytopathology, 1985, 75: 1301.
[10] Hall T J, Schreiber L R, Curtleben. Plant Dis, 1986, 70: 521~524.
[11] Ferreira J H S, Matthee F N, Thomas A C. Phytopathology, 1991, 81(3): 283~287.
[12] Hiraoka H, Ano T, shoda M. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1992, 74(5): 323~326.
[13] 王雅平, 刘伊强, 潘乃巍等. 植物学报, 1993, 35(3): 222~228.

(下转第 335 页)

THE CULTURAL CONDITIONS OF ANTIFUNGAL PROTEIN PRODUCING STRAIN BS-98 AND PROPERTIES OF ITS CULTURE BROTH

Hu Jian Lin Xinyi Zhang Jiuyi Wang Shurong Wang Yuewu

(Nankai University, Department of Microbiology, Tianjin 300071)

Abstract An antagonistic strain, *Bacillus subtilis* BS-98 strongly against plant fungal pathogens such as *Phoma asparagi* Sacc. was isolated from our laboratory. The inhibitory spectrum showed that the protein had a strong inhibiting activity against the pathogens of *Phoma asparagi*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *Verticillium albo-atrum*, *Botrytis cinerea* Pers., *Rhizoctonia solani*, *Pseudomonas syringae* PV. *lachrymans*. The optimal culture conditions of BS-98 strain were as following: RPY medium, initial pH8.0, temperature 30℃ and cultivation time 48 hours. The antifungal substance of BS-98 cultural filtrate was thermostable under low pH value.

Key words Antagonistic bacterium, Antifungal protein, *Phoma asparagi* Sacc.