

富贵竹黑腐病拮抗菌 H5 的抑菌机制及相关特性研究

陈 曼 李 赤 邱逸斯 王建余 于 莉*

(广东海洋大学农学院 湛江 524088)

摘 要: 从湛江红树植物-红海榄筛选出 1 株对引起富贵竹病害黑曲霉菌(*Aspergillus niger*)有良好抑制作用的菌株编号为 H5, 初步鉴定为地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)。该菌株采用平板对峙、生长速率法及管碟法对黑曲霉均表现良好的抑制作用, 发酵原液对菌丝生长和孢子萌发的抑制率分别为 91.9%和 100%, 抑菌带内菌丝扭曲畸形、表面产生大量囊状突起。其无菌滤液对酸碱、热稳定性较好, 经 55%硫酸铵沉淀后经 121℃处理 25 min 仍能保持大部分活性, 初步推测该物质为一种耐热的蛋白。

关键词: 地衣芽孢杆菌, 红树林细菌, 抑菌特性

Antagonistic Mechanisms and Related Properties of Strain H5 Against Black-rot Disease of *Dracaena sanderiana*

CHEN Man LI Chi QIU Yi-Si WANG Jian-Yu YU Li*

(College of Agriculture, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088)

Abstract: A strain no. H5 isolated from *Rhizophora stylosa* Griff in Zhanjiang had a good antagonistic activity against *Aspergillus niger*, pathogen of *Dracaena Sanderiana* black-rot disease. It was identified as *Bacillus licheniformis*. Dual culture, mycelium growth rate and inhibitory zones were used to test the effect. Strong inhibition was shown against *A. niger*. Inhibitory ratios of H5 germ-free fermented filtrate on mycelium growth and conidial germination were 91.9% and 100% respectively. In addition, mycelia on the edge of antagonistic band became abnormal and over-branching. Meanwhile, a lot of vesicles appeared on the surface. When treated with heat, acid and alkali, the filtration of H5 was always with stable activity. Precipitate in 55% saturated ammonium sulfate dissolved in phosphate buffer solution maintained most of the activity after high pressure steam sterilization for 25 minutes. It was preliminarily considered as a kind of heat resistant protein.

Keywords: *Bacillus licheniformis*, Mangrove bacteria, Antagonistic mechanism

富贵竹黑腐病(Black-rot disease)是富贵竹采后 烂, 严重影响富贵竹竹条的加工和出口质量。目前
加工最主要病害之一, 该病主要造成富贵竹竹条腐 在加工和出口运输途中主要使用化学杀菌剂来控制

病害,其效果并不理想,整批退货的情况时有发生。湛江有着丰富的红树林资源,红树林是介于陆地和海洋之间的特殊生态系统,存在着微生物的多样性^[1],近年很多学者开始从极端环境中筛选拮抗微生物,并从海洋微生物的代谢产物中发现多种活性物质^[1-3],应用于医药、工业和农业等领域。本文从红树林植物分离微生物筛选对黑曲霉(*Aspergillus niger* V. Tiegh)具有抑制作用的微生物。富贵竹黑腐病有关生物防治的研究至今在国内外还未见报道。笔者从湛江沿海红树林植物分离筛选具有抑制作用的菌株,其目的是寻找新的拮抗菌株或抗菌活性物质。本文主要报道强拮抗菌株 H5 抑菌机理及相关特性。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及培养基

H5 菌株从红树林植物——红海榄(*Rhizophora stylosa* Griff)根部分离得到,经 BiologTM 和 16S rDNA 测序鉴定为地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)(文章待发表)。指示菌为 *Aspergillus niger* 从富贵竹上分离纯化得到,并保存在本实验室。

细菌的培养使用改造的 NA^[4]或 NB 培养基,拮抗菌筛选培养基为:PDA+5 g/L 蛋白胨+1 g/L 酵母膏。

1.2 拮抗菌株 H5 的活性测定

对峙培养法:28 对峙培养 3 d,测量抑菌带宽度。

生长速率法:取菌株 H5 发酵原液、稀释 10、20、40 倍液各 2 mL 与 10 mL PDA 混合倒平板,培养 3 d,测量菌落直径^[5]。

管碟法^[6]测定:每个牛津杯加入 200 μ L 无菌滤液,60 h 测量抑菌圈径。

1.3 拮抗菌株 H5 的抑菌机制及相关特性

1.3.1 无菌滤液对菌丝生长和孢子萌发的抑制作用:28 恒温对峙培养 3 d,显微观察指示菌形态;将无菌滤液原液、稀释 20、40、60 倍液与黑曲霉孢子悬浮液等体积混合,测定孢子萌发率及抑制率,镜检孢子萌发情况。

1.3.2 无菌滤液对温度及酸碱的稳定性测定^[7]:无菌滤液放入 40、60、80、100 水浴和 1×10^5 Pa 高压灭菌各处理 30 min,冷却至室温;用 HCl 和 NaOH 将无菌滤液的 pH 值分别调至 3~10,静置调回原 pH 值,以不做处理的无菌滤液作对照,每处理 3

个重复,采用杯碟法检测各处理抑菌活性。

1.3.3 无菌滤液对硫酸铵的稳定性测定^[8]:无菌滤液中加入硫酸铵固体粉末至饱和度 55%,置 4 冰箱过夜,次日离心分别收集沉淀和上清,沉淀物用 pH 值 7.0 的磷酸盐缓冲液溶解,分别测定沉淀和上清的抑菌活性,以磷酸盐缓冲液为对照。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌株 H5 的活性测定

采用平板对峙法、生长速率法和抑菌圈法都显示 H5 菌株对黑曲霉病菌有明显的抑制作用。对峙平板实验中,抑菌带宽度达 10.1 mm,拮抗菌菌落边缘伴随有白色条带产生;管碟法测定实验中,在牛津杯周围产生的抑菌圈清晰明显,平均直径达 24 mm。

生长速率法显示不同稀释倍数的发酵液(原液、10 倍液、20 倍液、40 倍液)对黑曲霉菌丝生长具有明显的抑制作用,抑制率分别为 91.9% aA、88.2% bA、71.8% cB、62.4% dC,几个不同处理之间抑菌率存在显著差异,总的趋势是发酵液浓度与抑菌率成正比。

2.2 拮抗菌株 H5 的抑菌机制及相关特性

2.2.1 对菌丝生长的抑菌作用:显微观察对峙培养抑菌带的黑曲霉菌丝原生质浓缩,菌丝分支多而杂乱,菌丝肿胀表面产生大量颗粒状突出物,菌丝顶端膨大形成泡囊;而对照菌丝均匀、生长旺盛,可见拮抗菌 H5 对黑曲霉菌丝有明显的破坏作用。

2.2.2 H5 无菌滤液对孢子萌发的影响:实验结果表明:H5 菌株无菌滤液对黑曲霉孢子萌发具有显著的抑制作用,无菌滤液浓度越高,孢子萌发率越低,当稀释倍数达 40 倍时,对孢子萌发抑制率仍在 50% 以上,且萌发的孢子芽管长度明显短于对照,无法正常伸长,4 个不同处理之间存在极显著差异见表 1。

2.2.3 无菌滤液对热的稳定性测定:菌株 H5 的无菌滤液经不同温度处理结果(表 2)显示,对照抑菌圈直径为 21.0 mm,无菌滤液在 40、60 处理 30 min 后,抑菌活性没有明显变化,80、100、121 处理后抑菌活性有所降低,是对照抑制率的 42.9%。方差分析显示不同温度处理之间差异不显著,表明此抑菌物质对热具有较好的稳定性。

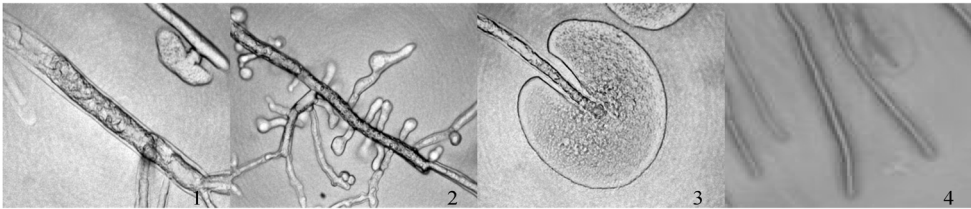


图 1 对峙培养黑曲霉菌丝变化情况

Fig. 1 Hypha changes of *Aspergillus niger* by dual cultural assay

1-3: 抑菌带内异常菌丝; 4: 正常菌丝
1-3: Abnormal hyphae in the inhibition band; 4. Normal hyphae

表 1 拮抗菌无菌滤液对黑曲霉(<i>Aspergillus niger</i>) 孢子萌发的抑制作用		
Table 1 Inhibition of H5 germfree fermented filtrate on conidiophores germination of <i>Aspergillus niger</i>		
处理 Treatment	孢子萌发率 Germination rate(%)	孢子萌发抑制率 Inhibition rate(%)
原液(Fermentation production)	0	100 a [*] A ^{**}
10 倍稀释液(10 times dilute treatment)	17.1	82.9bB
20 倍稀释液(20 times dilute treatment)	21.1	78.9cC
40 倍稀释液(40 times dilute treatment)	36.2	63.8dD
对照(CK)	100	—

^{*}在 0.05 水平上差异显著, ^{**}在 0.01 水平上差异显著

2.2.4 无菌滤液对 pH 值的稳定性测定：菌株 H5 的无菌滤液经不同 pH 处理结果(表 2)，对照 pH7 抑菌圈直径为 23 mm，方差分析表明，pH3 与 pH7(对照)相比达显著水平，其余处理均与对照差异不显著，在中性、碱性条件抑菌活性强于酸性条件，菌株产生的抑菌物质对酸、碱均具有较好的稳定性。

表 2 无菌滤液对热及酸碱的稳定性			
Table 2 Stability of H5 germfree fermented filtrate after treated with heat, acid and alkali respectively			
温度处理 Temperature (℃)	抑菌圈直径 Diameter of inhi- bition zone(mm)	pH 处理 pH	抑菌圈直径 Diameter of inhi- bition zone(mm)
30 (CK)	21.0a	3	13c
40	20.3a	4	18.3bc
60	18.5ab	5	15bc
80	18.1ab	6	21.3a
100	15.0ab	7(CK)	23a
121	12.6b	8	22.5a
—	—	9	20ab
—	—	10	21.7a

2.2.5 无菌滤液对硫酸铵的稳定性测定：菌株 H5 的无菌滤液经硫酸铵处理后，沉淀经磷酸盐缓冲液溶解后有较强的抑菌活性，抑菌圈直径达 23 mm，对照及上清均无抑菌活性，说明饱和度 55%的硫酸铵能沉淀大部分抑菌物质，推测菌株 H5 产生的抑菌物质可能是蛋白类物质，并且抗菌物质经 1 × 10⁵ Pa 高压灭菌后抑菌圈直径达 20 mm，能保持约 87%的抑菌活性，可以根据此特性，将无菌滤液经高温高压处理除去无抑菌活性的杂蛋白，从而达到对活性蛋白提纯的目的。

3 讨论

地衣芽孢杆菌通过产生抗菌素来破坏病原菌，从而抑制病原菌的生长，同一菌种的不同菌株可以产生不同抗菌素^[9]。Johnson 等 1945 年发现地衣芽孢杆菌能够产生肽类物质，并命名为杆菌肽(Bacitracin)，杆菌肽具有强烈的抑菌作用，强烈抑制 G⁺，对部分 G⁻有作用^[10]。此后，许多学者对地衣芽孢杆菌进行研究，Yoon Kim^[11]从大豆的发酵物中分离到的一株地衣芽孢杆菌 B65-1 的抑菌活性物质为苯乙酸。刘莹^[12]从土壤中筛选出的一株地衣芽孢杆菌，其滤液对真菌的灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)等植物病原菌均有较强的抑制作用。目前从红树林植物分离到地衣芽孢杆菌对富贵竹黑腐病进行防治的研究至今未见报道。本研究得出如下结论：

- (1) 拮抗菌 H5 对黑曲霉病菌菌丝生长和孢子萌发具有明显的抑制作用，该菌株无菌滤液可以显著降低孢子萌发率，抑制芽管伸长。推测拮抗菌的抑菌机理为分泌抑菌物质直接破坏病原菌菌丝和孢子，且该菌株无菌滤液对热和酸碱均具有较好的稳定性，研究结果与刘莹的研究类似^[11]。
- (2) 无菌滤液经硫酸铵沉淀后，对照及上清均

无抑菌活性, 沉淀经磷酸盐缓冲液溶解后有较强的抑菌活性, 抑菌圈清晰明显推断抑菌活性物质为蛋白类物质。Batrakov 等从地衣芽孢杆菌 603 菌株获得一种新型肽脂, 对多变棒杆菌(*Corynebacterium variabilis*)有很强的抑制作用^[13]; Martirani 等从地衣芽孢杆菌 490/5 的培养液中分离得到一种细菌素, 对 *Bacillus* 相近的种有拮抗作用, 对链霉蛋白酶 E 和蛋白酶 K 敏感^[14]。这些抑菌成分与实验菌株 H5 所产生的蛋白类物质是否为同种物质, 有待进一步实验验证。

参 考 文 献

- [1] 陈 华, 洪 葵, 庄 令, 等. 海南红树微生物生态分布及细胞毒活性评价. 热带作物学报, 2006, 27(1): 60–62.
- [2] 吴雄宇, 李曼玲, 胡谷平, 等. 南海红树林内生真菌 2508 代谢物研究. 中山大学学报, 2002, 40(3): 34–36.
- [3] 朱 峰, 林永成. 两株南海红树林内生真菌混合发酵产生新生物碱 marinamide 和其甲酯. 科学通报, 2006, 51(7): 792–795.
- [4] 方中达. 植病研究方法. 第三版. 北京: 中国农业出版社, 1998, p.182.
- [5] 马 平, 李社增, 陈新华, 等. 利用拮抗菌防治棉铃疫病. 中国生物防治, 1998, 14(2): 65–67.
- [6] 范秀容, 沈 萍. 微生物学实验. 北京: 人民教育出版社, 1981, pp.53–62.
- [7] 赖 翼, 刘成君, 李 晖, 等. 青稞散黑穗病拮抗 LN2176 的分离鉴定发酵条件及发酵产物的研究. 植物保护, 2005, 31(3): 32.
- [8] 汪家政, 范 明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2000, pp.65–67.
- [9] Johnson BAH, Meleney FL. A new antibiotic produced by a member of the Bacitracin *B.subtilis* group. *Science*, 1995, 376–377.
- [10] 李 华. 地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)对番茄灰霉病、辣椒炭疽病生物防治研究. 四川农业大学硕士论文, 2005.
- [11] Yoon Kim, Jeong-Yong Cho, Ju-Hee Kuk, *et al.* Identification and Antimicrobial Activity of Phenylacetic Acid Produced by *Bcillus licheniformis* Isolated from Fermented Soybean, Chungkook-Jang. *Current Microbiology*, 48(2004), 312–317.
- [12] 刘 莹, 杨翔华, 张 全, 等. 拮抗菌株的筛选及其发酵液的抑菌活性. 西北农业学报, 2006, 15(5): 202–205.
- [13] Batrakov Stanislav G, Rodionova Tatiana A, Esipov Stanislav E. A novel lipopeptide, an inhibitor of bacterial adhesion, from the thermophilic and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* strain 603. *Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2003, 1634(3): 107–115.
- [14] Martirani L, Varcamonti M, Naclerio G, *et al.* Purification and partial characterization of bacillocin490, a novel bacteriocin produced by a thermophilic strain of *Bacillus lichenniformis*. *Microb Cell Fact*, 2002, 1: 1–5.

稿件书写规范

论文中阿拉伯数字的使用

凡是可以使用阿拉伯数字且很得体的地方均应使用阿拉伯数字。世纪、年代、年、月、日、时刻必须使用阿拉伯数字, 年份必须用全称。对科技期刊来说, 凡处在计量单位和计数单位前面的数字, 包括 9 以下的各位数字, 除个别特例外, 均应使用阿拉伯数字。不是表示科学计量和有统计意义数字的一位数可以用汉字, 例如: 一本教材, 两种商品等。