

枯草芽孢杆菌 BS2 对葡萄灰霉病菌抑菌 机制的初步探索

李永刚* 郭晓慧

(东北农业大学农学院 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 对葡萄灰霉病菌的生防枯草芽孢杆菌 BS2 菌液成分及胞外蛋白的抑菌机制进行了初步研究, BS2 对葡萄灰霉病菌具有较好的拮抗作用, 其菌液成分和胞外蛋白经 20°C–120°C 处理后, 抑菌效果存在差异。BS2 的菌液成分及胞外蛋白对灰霉病菌的产孢、萌发和菌丝的生长等方面均具有较好的抑制作用, 且对灰霉病菌菌丝的原生质有囊泡和颗粒化现象。由此分析, BS2 抑菌活性物质是多种成分共同作用的结果, 抑菌物质中含有对温度敏感的高分子蛋白质, 且抑菌机制也是从多方面共同起作用。

关键词: 葡萄灰霉病菌, 枯草芽孢杆菌, 菌液成分, 胞外蛋白, 抑菌机制

Preliminary Exploration for Inhibitory Mechanism of *Bacillus subtilis* Strain BS2 to *Botrytis Cinerea*

LI Yong-Gang* GUO Xiao-Hui

(Agricultural College, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

Abstract: The *Bacillus subtilis* strain 2 (BS2) was measured to antagonistic mechanism by using face to face culturing. The antagonistic effect of BS2 to *Botrytis cinerea* was obvious. Growth inhibition rate had significant difference between bacteria culture fluid and extracellular proteins at various temperatures (20°C–120°C). But the activity effect of extracellular proteins of BS2 was sensitive to temperature. Bacteria culture fluid and extracellular proteins produced from BS2 had a good antibacterial effect on *B. cinerea* mycelial growth, spores bearing and germination. And Treated with bacteria culture fluid and extracellular proteins produced from BS2, protoplast from the hyphae became abnormal. Overall, this study indicates that the BS2 active substance is composed of various components and has multiple antagonistic mechanism.

Keywords: *Botrytis cinerea*, *Bacillus subtilis*, Bacteria culture fluid, Extracellular proteins, Inhibitory mechanism

葡萄灰霉病是葡萄生产中危害最大的病害之一, 其病原菌是灰葡萄孢(*Botrytis cinerea* Pers.), 该

病不仅发生在田间, 更是产后贮藏过程中的毁灭性病害。虽然有高效杀菌剂和先进的贮藏技术, 但每

年因灰霉病造成的葡萄产后损失最高可达 50%，一般损失也在 20%–30%，并且严重影响葡萄的品质^[1]。

目前，世界葡萄栽培面积已经超过 1×10^7 hm²，年产量近 6×10^7 吨，占世界水果总产量的 20%，仅次于柑橘，居世界第 2 位^[2]。葡萄采后病害会导致巨大经济损失，低温保存后葡萄灰霉病为主要病害之一，当前国内外主要还是化学防腐，而其中最多的是 SO₂ 和硫化物，但这种方法不仅对葡萄品质和色泽有很大影响，而且对人们的正常生活及环境也造成一定危害。因此，迫切需要寻找一种有效而无害的防治方法^[3–5]。以有效微生物取代化学杀菌剂用于果蔬采后病害的防治已显示出巨大的应用前景，并成为一个新的研究热点。

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)用于防治植物病原真菌在国内有不少研究，在国外已登记为生物杀菌剂^[6]。本课题组经过多年筛选获得葡萄灰霉病菌的生防菌 1 株，经鉴定后为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)，并测定其对葡萄灰霉病菌的抑菌机制，为下一步葡萄生防菌保鲜剂的研究奠定良好基础。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株

枯草芽孢杆菌 BS2 (*Bacillus subtilis*)和葡萄灰霉病菌(*Botrytis cinerea* Pers.)，本课题组分离并鉴定。

1.2 枯草芽孢杆菌 BS2 对葡萄灰霉病菌的拮抗作用测定

BS2 在营养肉汁琼脂(Nutrient agar, NA)上 30℃ 活化 48 h 后划平行线接种在距 PDA 平板中心 3 cm 处，然后在此 PDA 平板的中央接种经过扩繁的葡萄灰霉病菌菌碟(直径 0.7 cm)，3 次重复，放入恒温箱中 26℃ 培养 72 h 后测量植物病原菌菌丝生长的最长半径与最短半径、拮抗带宽，计算其比值。

1.3 枯草芽孢杆菌 BS2 菌液成分对灰霉病菌的作用机制

1.3.1 BS2 菌液滤液的制备及胞外蛋白的提取：将 BS2 接种于 KB 液体培养基中，振荡培养过夜作为种子液，按 1%接种量转接于金氏 B (King's B medium, KB)液体培养基中(装液量 100 mL/300 mL 三角瓶)，30℃ 170 r/min 培养 48 h，然后用细菌滤器过滤后，备用。

胞外蛋白参照李永刚等提取方法，采用

(NH₄)₂SO₄ 分级沉淀法提取 75%饱和度的沉淀蛋白，用于抑菌活性检测^[7–9]。

1.3.2 BS2 菌液成分及胞外蛋白经不同温度处理对灰霉菌菌丝生长的影响：菌液的无菌滤液及胞外蛋白经 20℃、60℃、80℃、100℃ 和 121℃ 分别处理 20 min 后，取滤液加入定量的 PDA 培养基中使浓度达到 5%，充分混匀，倒 15 mL 于灭菌的培养皿中，待培养基冷却后在平板中央接种 0.7 cm 的灰霉病菌菌碟，以无菌 KB 培养基处理为空白对照，每处理 3 次重复，25℃ 培养 72 h 后测定灰霉病菌菌落的直径，计算抑菌率。

1.3.3 BS2 菌液成分及胞外蛋白对灰霉菌分生孢子萌发的影响：葡萄灰霉病菌在 PDA 培养基上培养 4 d，即可产生大量分生孢子，用无菌水稀释成菌悬液，每个视野 50 个孢子(10 倍放大)，BS2 菌液成分滤液及胞外蛋白按 5%的浓度加入 2 mL 灰霉病孢子悬浮液中，以加相同量的不含菌培养基为空白对照，每处理 3 次重复，观察 BS2 无菌滤液及胞外蛋白对孢子萌发的影响。

1.3.4 BS2 菌液成分及胞外蛋白对灰霉菌分生孢子产生的影响：葡萄灰霉病菌在 PDA 培养基上培养 48 h 活化，然后到菌碟接种于 PDA 培养基中央，待菌落直径达 4 cm 时，将周围培养基挖出，然后将 3%不同浓度的培养滤液 20 mL 淹没真菌菌落 20 min，倾去培养滤液，以无菌水处理为对照，每处理 3 次重复，置于 25℃ 下培养 5 d 至孢子产生，每平板用 10 mL 无菌水将孢子洗下，经 4 层纱布过滤，得孢子悬浮液，用血球计数板在显微镜下计数，计算抑制率。

1.3.5 BS2 菌液成分及胞外蛋白对葡萄灰霉病菌菌丝形态影响：灰霉病菌菌碟准备如 1.2 所示，移接菌碟 5 片于 5%浓度的次生代谢滤液及胞外蛋白中培养，以没加入细菌液的 KB 培养液处理菌丝块作为对照，培养后 24 h 在光学显微镜观察病原菌菌丝形态和结构的变化。

2 结果与分析

2.1 BS2 对灰霉菌拮抗作用测定

采用菌丝生长速率法，测定 BS2 对灰霉菌菌丝生长的菌落最长半径/最短半径 2.00，拮抗带宽为 1.83。由数据看出，BS2 对灰霉病菌生长的抑制效果较好，一般认为拮抗最长半径比最短半径达到 2 为

抑菌效果优良菌株, BS2 对灰霉病菌有较好的拮抗作用。

2.2 BS2 菌液成分及胞外蛋白经不同温度处理对灰霉菌菌丝生长的影响

取 BS2 菌液的无菌滤液和胞外蛋白, 以不同温度处理后以加入定量培养基中浓度达 5%, 同样利用菌丝生长速率法测定, 结果见表 1。

由表 1 可以看出, 培养 2 d 芽孢杆菌 BS2 的滤液经不同温度处理后, 5% 浓度处理在 20°C 和 121°C 之间抑菌效果虽然有所下降, 但并无显著差异, 温度对菌液成分影响小; 胞外蛋白 5% 浓度处理在 20°C 和 121°C, 抑菌效果有显著差异, 说明温度对抑菌蛋白有很大影响。总之, BS2 抑菌活性物质中含有抑菌蛋白, 同时也含有其他抑菌活性物质, 且总体抑菌效果受温度影响不大, 抑菌蛋白在拮抗活性物质中不是起主要抑菌作用。

2.3 枯草芽孢杆菌 BS2 菌液成分及胞外蛋白对灰霉菌分生孢子萌发的影响

在 2 mL 细胞培养板中, 加入滤液至灰霉菌孢子

悬浮液中使滤液浓度为 5%, 以加相同量的不含菌培养基为空白对照, 待对照孢子萌发率在 60%, 调查萌发情况, 结果见表 2。

由表 2 可以看出, 细菌滤液处理后抑制灰霉菌菌分生孢子的萌发率仅为 7.5%, 而对照处理萌发率为 60.2%; 胞外蛋白处理过的孢子萌发率只有 1.67%。由此说明, 芽孢杆菌 BS2 的菌液成分及胞外蛋白对灰霉菌分生孢子具有较好抑制萌发的作用, 在田间防治病害过程中可能会对灰霉菌孢子的萌发侵入具有较好的抑制作用, 有待于进一步试验验证。

2.4 BS2 菌液成分及胞外蛋白对灰霉菌分生孢子产生的影响

将 PDA 培养基中生长至 4 cm 的菌块分别加入 5%、10% 浓度的细菌培养滤液 20 mL, 浸没菌落 10 min 后倾去液体, 每个处理 3 次重复, 以无菌水为对照, 5 d 后计算其孢子萌发率, 调查结果见表 3。

从表 3 可知, 5% 和 10% 浓度的培养滤液及胞外蛋白均对灰霉菌分生孢子的产生有显著性抑制, 并

表 1 5% BS2 菌液成分及胞外蛋白经不同温度处理对灰霉菌菌丝生长的影响

Table 1 Effect on *B. cinerea* mycelium growth by bacteria culture fluid and extracellular proteins produced from BS2

不同温度 Different temperatures (°C)	菌液成分 Bacteria culture fluid				胞外蛋白 Extracellular proteins							
	菌落直径 Colony diameters (cm)			抑制率 Inhibitory rate (%)	显著水平 Significance level		菌落直径 Colony diameters (cm)			抑制率 Inhibitory rate (%)	显著水平 Significance level	
	1	2	3		0.05	0.1	1	2	3		0.05	0.1
20	2.58	2.80	2.42	35.00	a	A	1.68	1.55	2.32	57.79	a	A
60	3.32	2.55	2.20	32.75	a	A	2.00	1.70	2.00	56.65	a	A
80	2.38	3.20	2.42	33.33	a	A	1.58	2.02	2.52	53.46	a	A
100	2.30	2.75	2.84	34.25	a	A	2.95	2.58	3.25	33.23	b	B
121	2.88	3.25	2.90	24.75	a	A	2.92	3.12	2.98	31.41	b	B
CK	3.98	4.12	3.92		b	B	4.38	3.95	4.82		c	C

表 2 枯草芽孢杆菌 BS2 菌液成分对灰霉菌分生孢子萌发的影响

Table 2 Effect on germination of *B. cinerea* by bacteria culture fluid and extracellular proteins produced from BS2

处理 Treatments	调查数 Surveyed number	萌发数 Germinative number	重复 Repeats			总数(个) Sum	萌发率 Germinative rate (%)
			1	2	3		
菌液成分 Metabolic product	处理 Treatments	调查数 Surveyed number	120	98	100	318	7.5
	萌发数 Germinative number	3	19	2	24		
	调查数 Surveyed number	148	67	44	259	60.2	
	萌发数 Germinative number	86	38	32	156		
胞外蛋白 Extracellular proteins	处理 Treatments	调查数 Surveyed number	100	100	100	300	1.67
	萌发数 Germinative number	0	4	1	5		
	调查数 Surveyed number	100	100	100	300	86.33	
	萌发数 Germinative number	92	85	82	259		

表3 枯草芽孢杆菌 BS2 菌液成分对灰霉菌分生孢子产生的影响
Table 3 Effect on *B. cinerea* spores bearing by bacteria culture fluid and extracellular proteins produced from BS2

处理 Treatments	菌液成分 Bacteria culture fluid						胞外蛋白 Extracellular proteins					
	浓度 (10 ⁶ 个/mL) Concentration			平均值 (10 ⁶ 个/mL) Average	显著水平 Significance level		浓度(10 ⁶ 个/mL) Concentration			平均值 (10 ⁶ 个/mL) Average	显著水平 Significance level	
	1	2	3		0.05	0.1	1	2	3		0.05	0.1
5%	0.17	0.067	0.067	0.10	a	A	0.40	0.13	0.53	0.35	a	A
10%	0.03	0.10	0.10	0.08	a	A	0.26	0.40	0.13	0.26	a	A
CK	0.73	0.67	0.47	0.62	b	B	1.87	1.47	1.07	1.47	b	B

且随浓度的递增,抑制效果也逐渐加强。说明 BS2 的菌液成分和胞外蛋白可较好地抑制灰霉菌的产孢,从而在实际田间生产过程中可能会对灰霉菌再次侵染起作用,有待于进一步试验验证。

2.5 BS2 菌液成分及胞外蛋白对菌丝形态的影响

葡萄灰霉菌菌丝移接于 5%浓度的培养滤液的 KB 培养液中,培养 24 h,在光学显微镜观察病原菌菌丝形态的变化,结果如图 1、2 所示。

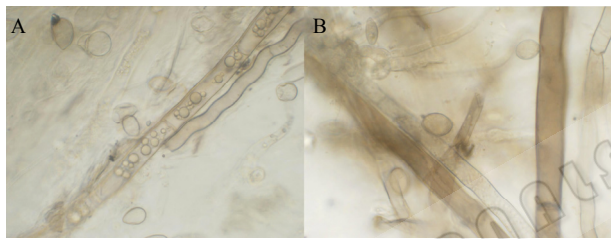


图1 BS2 菌液成分处理葡萄灰霉菌菌丝的形态
Fig. 1 Effect on *B. cinerea* mycelium morphology by bacteria culture fluid produced from BS2
Note: A: Treatment; B: Control.

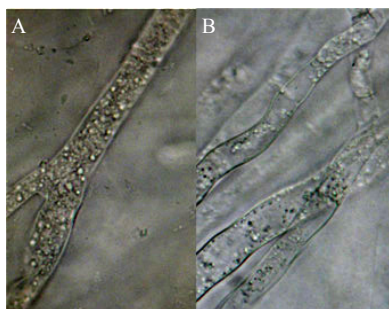


图2 BS2 胞外蛋白处理葡萄灰霉菌菌丝的形态
Fig. 2 Effect on *B. cinerea* mycelium morphology by extracellular proteins produced from BS2
Note: A: Treatment; B: Control.

由图 1 和图 2 可以看出,BS2 的菌液成分及胞外蛋白对葡萄灰霉菌菌丝的形态均有影响,与对照相比菌液成分造成菌丝原生质囊泡化,而胞外蛋白则造成菌丝的原生质颗粒化,影响到菌丝的正常生

长,菌液成分与胞外蛋白对菌丝形态影响不同可能与菌液内活性物质浓度与胞外蛋白浓度不同有关。

3 讨论

(1) 枯草芽孢杆菌 BS2 对葡萄灰霉病具有抑制菌丝生长、孢子产生、孢子萌发及菌丝发育异常等作用,表明拮抗菌 BS2 对灰霉菌菌感染循环的各个环节共同作用,有效抑制了灰霉菌的生长、繁殖和再侵染等环节,更具有较好的开发前景。

(2) BS2 的菌液成分及胞外蛋白造成菌丝原生质囊泡化和颗粒化可能与 BS2 所产生的抑菌活性物质造成细胞膜透性改变导致原生质渗漏存在一定关系,因为枯草芽孢杆菌产生的抗菌物质主要通过溶解细胞壁或细胞膜,造成原生质泄漏使菌丝断裂或畸形,同时抑制孢子的萌发^[10]。细菌几丁质酶抑制真菌分生孢子萌发,使之膨大形成空泡,也会引发芽管致畸,其中外切酶比内切酶更有效,因此,BS2 产生的抑菌蛋白成分中更可能含有几丁质酶蛋白^[11]。

(3) BS2 菌分泌的抗菌物质主要有两大成分,即低分子量抗菌素和高分子量抗菌蛋白质^[9]。BS2 菌液成分在高温处理后不影响其对葡萄灰霉菌的抑制效果,但所提取的拮抗蛋白对 80°C 以上高温敏感,说明 BS2 对葡萄灰霉菌的抑菌活性物质为多种活性物质,其中拮抗蛋白起到部分抑菌作用^[12-13],且可能为高分子量抗菌蛋白。

(4) 由于菌液成分提取时 BS2 只培养了 48 h,因此菌液成分中活性物质浓度较低。另外,试验证明该菌株培养 120 h 菌液成分浓度才达最高,而胞外蛋白则是采用硫酸铵沉淀法,蛋白浓度较高,造成菌液成分与胞外蛋白抑菌效果无可比性,这是影响本文中菌液成分及胞外蛋白抑菌效果不理想的主要原因。

通过对 BS2 抑菌机制的初步研究,为该菌株进

一步应用于葡萄灰霉病的防控奠定了良好的基础。

参 考 文 献

- [1] 陈宇飞. 葡萄果实抗灰霉病研究. 东北农业大学硕士论文, 2006.
- [2] 秦丹, 石雪晖, 胡亚平, 等. 葡萄采后贮藏保鲜研究进展. 保鲜与加工, 2006, 6(1): 9-12.
- [3] 张华云, 王善广, 高海燕, 等. 葡萄 SO₂ 伤害与影响因素研究. 保鲜与加工, 2002(5): 17-19.
- [4] 孔秋莲, 胡文玉, 修德仁, 等. 葡萄贮藏中 SO₂ 伤害与活性氧代谢的关系. 沈阳农业大学学报, 2000, 32(6): 449-451.
- [5] 孔秋莲, 倍德仁, 胡文玉, 等. SO₂ 伤害与葡萄汁液含酸量、pH 值、缓冲容量的关系. 保鲜与加工, 2001(3): 13-15.
- [6] 顾真荣, 吴畏, 高新华, 等. 枯草芽孢杆菌 G3 菌株的抗菌物质及其特性. 植物病理学报, 2004, 34(2): 166-172.
- [7] 李永刚, 宋兴舜, 马凤鸣, 等. 水稻稻瘟病拮抗菌 L1 鉴定及抑菌特性的初步研究. 微生物学通报, 2008, 35(6): 898-902.
- [8] 何青芳, 陈卫良, 马志超. 枯草芽孢杆菌 A30 菌株产生的拮抗肽的分离纯化与理化性质研究. 中国水稻科学, 2002, 16(4): 361-365.
- [9] 刘永峰, 陈志谊, 张杰, 等. 枯草芽孢杆菌 B-916 胞外抗菌蛋白质的性质. 江苏农业学报, 2005, 21(4): 288-293.
- [10] 程洪斌, 刘晓桥, 陈红漫. 枯草芽孢杆菌防治植物真菌病害研究进展. 上海农业学报, 2006, 22(1): 109-112.
- [11] Zhang Z, Yuen GY, Sarath G, *et al.* Chitinases from the plant disease biocontrol agent, *Stenotrophomonas maltophilia* C3. *Phytopathology*, 2001, 91(2): 204-211.
- [12] 林东, 徐庆, 刘忆舟, 等. 枯草芽孢杆菌 SO113 分泌蛋白的抑菌作用及抗菌蛋白的分离纯化. 农业生物技术学报, 2001, 9(1): 77-80.
- [13] 刘静, 王军, 姚建铭, 等. 枯草芽孢杆菌 JA 抗菌物特性的研究及抗菌肽的分离纯化. 微生物学报, 2004, 44(4): 511-514.

稿件书写规范

论文中计量单位的表示方法

为执行国务院发布的《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》的规定, 计量单位和单位符号按国家技术监督局发布的《量和单位》GB3100-3102-93 执行。单位符号均用英文小写(正体), 不允许随便对单位符号进行修饰。现将本刊常用计量单位和符号介绍如下, 希望作者参照执行。

时间: 日用 d; 小时用 h; 分钟用 min; 秒用 s 等表示。

溶液浓度: 用 mol/L, 不用 M (克分子浓度) 和 N (当量浓度) 等非许用单位表示。

旋转速度: 用 r/min, 不用 rpm。

蒸汽压力: 用 Pa 或 kPa、MPa 表示。

光密度: 用 OD (斜体) 表示。

生物大分子的分子量: 蛋白质用 D 或 kD, 核酸用 bp 或 kb 表示。

图表中数值的物理量和单位: 物理量符号采用斜体, 单位用正体并用括号括起, 例如: t (h) (表示时间, 单位是小时)。带数值的计量单位: 计量单位不能省略, 跟数字之间加一空格(%除外), 例如: 20 cm × 0.3 cm, 不能写成 20 × 0.3 cm; 3 °C-5 °C 不可写成 3-5 °C; 3%-6% 不可写成 3-6% 等。