

拮抗菌 SB1 的鉴定及其抗菌物质的分析

连玲丽^{1,3} 谢荔岩^{1,2} 郑璐平^{1,2} 林奇英^{1,2*}

(1. 福建农林大学植物病毒研究所 福建 福州 350002)

(2. 生物农药与化学生物学教育部重点实验室 福建 福州 350002)

(3. 福建农林大学生命科学学院 福建 福州 350002)

摘要: 对番茄根系菌株 SB1 的抗菌活性进行测定, 结果表明该菌株对多种植物病原真菌、细菌具有明显的抑制作用, 表现出广谱抗菌活性。通过菌体形态、生理生化反应及 16S rDNA 序列分析, 鉴定菌株 SB1 为枯草芽孢杆菌内生亚种。以青枯雷尔氏菌为指示菌, 测定了菌株 SB1 抗菌物质的理化性质及组成。结果表明, 其抗菌物质表现出良好的热稳定性、水溶性和醇溶性, 且对紫外线照射和蛋白酶 K 处理不敏感。高效液相色谱分析结果进一步显示菌株 SB1 的抗菌物质中含有抗菌肽 Surfactin。

关键词: 拮抗菌, 枯草芽孢杆菌, 抗菌物质, 青枯雷尔氏菌

Identification of Antagonistic Bacterium SB1 and Analysis on Its Antibacterial Substance

LIAN Ling-Li^{1,3} XIE Li-Yan^{1,2} ZHENG Lu-Ping^{1,2} LIN Qi-Ying^{1,2*}

(1. Institute of Plant Virology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

(2. Key Laboratory of Biopesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Fuzhou, Fujian 350002, China)

(3. College of Life Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract: A bacterial strain SB1, isolated from tomato roots, was tested for its antimicrobial activities. Results indicated that strain SB1 showed strong inhibitory activities against various plant pathogenic fungi and pathogenic bacteria, exhibiting wide antimicrobial spectrum. Strain SB1 was identified as *Bacillus subtilis* subsp. *endophyticus* based on its morphological, physiological characteristics and 16S rDNA sequence. In addition, properties of antibacterial substances of strain SB1 were examined using *Ralstonia solanacearum* as an indicator. The results showed that antibacterial substances were heat-stable, water-soluble, alcohol-soluble, and resistant to ultraviolet radiation and protease K. High performance liquid chromatography (HPLC) results further suggested that one of the antibacterial substances was surfactin.

Keywords: Antagonistic bacteria, *Bacillus subtilis*, Antibacterial compounds, *Ralstonia solanacearum*

芽孢杆菌是一类在土壤和植物根际广泛分布的有益微生物, 在植物病害的生防控制中起重要作用, 同时这类细菌具有良好的抗逆性和耐热性, 对人畜

无害, 不污染环境, 因而备受植病生防研究者的青睐。目前, 已商品化生产的菌株包括 FZB24、GBO3、MBI600 和 QST713 等, 它们被广泛用于镰

刀枯萎病、立枯病和曲霉病等多种植物病害的防治^[1]。研究表明,芽孢杆菌可通过拮抗活性、定殖竞争和诱导抗性等多种方式防治病害^[2],其中,拮抗作用是生防菌株通过产生抑菌物质,影响病菌生长,甚至杀死病菌的现象。迄今已发现这类细菌可分泌蛋白质类、脂肪肽类及细菌素等抗菌物质多达几十种^[2],这些物质的产生与菌株的防病效果密切相关^[3-4]。

本研究从番茄根系分离到一株对细菌性青枯病有较好防治效果的菌株 SB1,通过常规生理生化及 16S rDNA 序列分析对该菌株进行了鉴定,并对其分泌的抗菌物质的理化性质及组成进行了研究。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及病原物

供试拮抗菌 SB1 和供试病原物(表 1)均由本实验室分离保存。

1.2 培养基

肉汁胨培养基(NA)和马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)分别用于病原细菌和真菌的固体培养,相应的培养液用于两类病原物的液体培养,PDA 及其对应的液体培养基(PDB)用于拮抗菌 SB1 培养。

1.3 菌株 SB1 的抗菌活性测定

将菌株 SB1 接种于 PDB 培养基发酵培养 48 h 后,于 12000 r/min 离心 10 min,制得发酵上清液。

对病原细菌抑制作用的测定:将 300 μ L 病菌新鲜培养物(浓度为 10^8 CFU/mL)涂布于 NA 平板,在标记点打孔后,加入 50 μ L 拮抗菌发酵上清液,于 28°C 培养 48 h 后测量抑菌圈大小。

对病原真菌抑制作用的测定:在 PDA 平板中间打孔,加入 50 μ L 拮抗菌发酵上清液,于距离平板中央 3 cm 处接种病菌菌丝圆片,在 28°C 培养 24-48 h 后测量抑菌圈大小。

采用半叶法^[5]测定拮抗菌发酵上清液对 TMV 病毒的体外抑制活性。以上 3 种活性测定试验均以灭菌培养液处理为对照。

1.4 菌株 SB1 的鉴定

1.4.1 常规鉴定:参照文献[6-7]的方法对菌株进行形态和生理生化鉴定,包括革兰氏染色、接触酶、淀粉水解、厌氧生长等指标。

1.4.2 16S rDNA 序列分析:采用细菌 16S rDNA 的

通用引物(P1: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', P2: 5'-ACGGGCGGTGTGTACAAG-3')扩增菌株 SB1 的 16S rDNA 序列。PCR 反应体系为:2.0 μ L 细菌 DNA, 0.5 μ L *Taq* DNA 聚合酶, 1.0 μ L dNTPs (每份 2.5 mmol/L), 2.5 μ L 10 \times PCR 缓冲液, 1.5 μ L 25 mmol/L $MgCl_2$, 1.0 μ L 引物(10 μ mol/L), 补充水至总体积为 25 μ L。反应条件为:94°C 5 min; 94°C 50 s, 55°C 50 s, 72°C 2 min, 循环 30 次; 72°C 10 min。PCR 产物经 UltraClean™ 15 DNA 纯化试剂盒回收后,与克隆载体 pMD18-T 连接,转化入大肠杆菌 DH5 α ,获得的阳性克隆送至上海基康生物技术有限公司进行序列测定。采用 ClustalX 软件进行序列比对,MEGA 软件的 Neighbour-joining 方法进行系统进化分析。

1.5 菌株 SB1 产抗菌物质的培养基条件优化

选择 PDB、NB、LB、BPY 和 KMB 5 种培养基,分别接种菌株 SB1 后,于 30°C、180 r/min 振荡培养,每隔 12 h 取样 1 次,以青枯雷尔氏菌为病原指示菌测定抗菌活性。

1.6 菌株 SB1 的抗菌物质的理化性质分析

以青枯雷尔氏菌为病原指示菌,测定菌株 SB1 的抗菌物质对高温、高压、紫外线、蛋白酶及酸碱条件的耐受性,同时测定抗菌物质在不同溶剂中的溶解性。

1.6.1 高温高压对抗菌物质的影响:取等量拮抗菌发酵上清液,分别于 60°C、80°C、100°C 处理 30 min 和 1×10^5 Pa 处理 20 min 后,12000 r/min 离心 10 min 去除变性物质,然后各取 50 μ L 上清液,依照 1.3 的方法测定其抗菌活性。以 25°C 的发酵上清液为阳性对照,灭菌培养基为阴性对照。

1.6.2 紫外线和蛋白酶 K 处理对抗菌物质的影响:取适量发酵上清液于 40 W 紫外灯下(距离约 10 cm),照射处理 4 h 后,测定其抗菌活性;再取 1 mL 发酵上清液加入蛋白酶 K (终浓度为 100 mg/L),37°C 温育 3 h 后,检测抗菌活性,分别以未处理发酵上清液和蛋白酶 K 为阳性对照和阴性对照。

1.6.3 酸碱度对抗菌物质的影响:取适量发酵上清液,分为 11 份,分别用稀酸或稀碱调节酸碱度为 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12,处理后的发酵液于 12000 r/min 离心 10 min,沉淀物用磷酸缓冲液(pH 7.2)重悬溶解,上清液移入新管,并调 pH 值至

中性, 分别测定各处理沉淀及上清部分的抗菌活性, 以培养基和磷酸缓冲液的酸碱处理液为阴性对照。

1.6.4 不同溶剂对抗菌物质的溶解性及抗菌活性的影响: 取等量发酵上清液的冻干粉, 分别用水、甲醇、乙醇、丙酮、氯仿、乙醚和石油醚等溶剂溶解, 反复萃取数次后, 12000 r/min 离心 10 min, 将上清液移至新管备用, 沉淀物用磷酸缓冲液(pH 7.2)重悬溶解, 分别测定各处理沉淀重悬液和上清液的抗菌活性, 以相应的溶剂及磷酸缓冲液为阴性对照。

1.7 抗菌物质的提取及组成分析

将菌株 SB1 接种于 PDB 培养液中, 于 30°C 发酵培养 60 h 后, 12000 r/min 离心 20 min, 收集上清液。以 2 mol/L HCl 调节 pH 至 2.0, 搅拌 2 h 后, 12000 r/min 离心 20 min, 收集沉淀。以甲醇抽提 3 次, 旋转蒸发浓缩抽提液, 随后过硅胶柱 600 mm × 50 mm 层析, 以甲醇/氯仿梯度洗脱, 收集活性部分, 制得抗菌粗提物。采用岛津 10A 液相色谱仪分析抗菌粗提物, 色谱条件为: ODS 柱 4.6 mm × 150 mm, 流动相为甲醇:乙酸(1%) = 60:40, 流速 1.0 mL/min, 20 μL 进样量, 210 nm 检测。

2 结果与分析

2.1 菌株 SB1 的拮抗活性

结果显示(表 1), 菌株 SB1 对供试的 20 种病原

物均有不同程度的抑制作用。其中, 对青枯雷尔氏菌、大肠杆菌等革兰氏阴性菌的拮抗作用较强, 而对巨大芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌等革兰氏阳性菌的抑制效果相对较弱; 同时, 该菌株对黄瓜枯萎病菌、黄瓜灰霉、辣椒疫霉等真菌的抑制活性较强, 抑菌圈直径分别达 25.3 mm、28.3 mm 和 21.6 mm。另外, 拮抗菌还对 TMV 表现出较高的钝化活性。由此可见, 菌株 SB1 具有广谱的抗植物病原微生物的活性。

2.2 菌株 SB1 的鉴定

形态观察和生理生化测定结果表明, 菌株 SB1 为革兰氏阳性菌, 菌体呈杆状, 产芽孢, 兼性厌氧, 7% NaCl 和 pH 5.7 生长, 接触酶和 V. P 反应呈阳性, 能以阿拉伯糖、木糖和甘露醇代替葡萄糖产酸, 淀粉水解反应和硝酸还原反应呈阳性, 参照文献[6]的芽孢杆菌特征表, 鉴定菌株 SB1 为枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)。

比较菌株 SB1 和 GenBank 数据库中已登录芽孢杆菌的 16S rDNA 序列, 结果表明, 菌株 SB1 (DQ463427)与枯草芽孢杆菌(AB232386)的同源性最高, 达 99.7%; 系统进化树分析(图 1)进一步显示, 菌株 SB1 和 *B. subtilis* (AB232386)及 *B. subtilis* subsp. *endophyticus* (AF399911)归于同一分支, 说明菌株 SB1 为枯草芽孢杆菌的内生亚种。

表 1 菌株 SB1 的拮抗活性
Table 1 Antimicrobial activities of strain SB1

| 病原细菌 Pathogenic bacteria | 抑菌圈 Inhibition zone (mm) | 病原真菌 Pathogenic fungi | 抑菌圈 Inhibition zone (mm) |
|---|-----------------------------|---|-----------------------------|
| <i>Ralstonia solanacearum</i> | 20.5 ± 0.7 | <i>Alternaria brassicae</i> var. <i>phaseoli</i> | 15.0 ± 0.4 |
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> | 10.8 ± 1.2 | <i>Pyricularia oryzae</i> | 16.3 ± 0.6 |
| <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> | 19.8 ± 0.7 | <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i> | 25.3 ± 1.1 |
| <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> | 20.4 ± 0.6 | <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> | 17.0 ± 0.7 |
| <i>Escherichia coli</i> | 23.5 ± 0.9 | <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> | 17.9 ± 0.5 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 5.7 ± 0.5 | <i>Pythium aphanidermatum</i> | 10.5 ± 1.3 |
| <i>B. megaterium</i> | 7.9 ± 0.4 | <i>Phytophthora capsici</i> Leonian | 21.6 ± 0.6 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 8.0 ± 1.1 | <i>Colletotrichum musae</i> | 11.4 ± 1.1 |
| | | <i>Botrytis cinerea</i> | 28.3 ± 0.7 |
| 病毒 Virus | 抑制率 Inhibition rate (%) | <i>Bipolaris maydis</i> | 18.7 ± 0.3 |
| Tobacco mosaic virus | 89.3 | <i>Rhizoctonia solani</i> | 17.3 ± 0.9 |

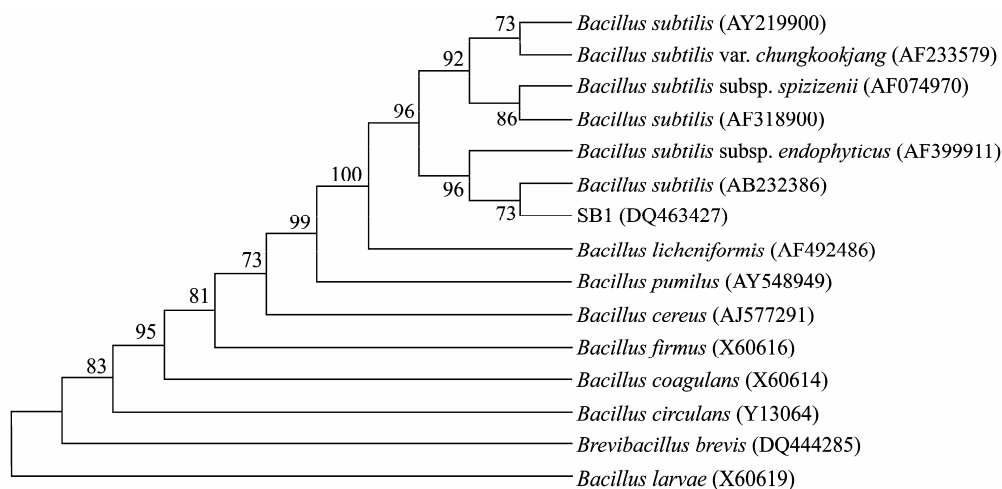


图1 拮抗菌株 SB1 与其他芽孢杆菌的系统进化树图

Fig. 1 Phylogenetic tree of antagonistic strain SB1 and other strains of *Bacillus* spp.

Note: The bootstrap values presented at corresponding branches were determined from 1000 replications, those with values of < 50% are not indicated. The numbers in the brackets represent Genbank accession numbers.

2.3 菌株 SB1 产抗菌物质的培养基条件优化

结果显示(图2), 菌株 SB1 在不同培养基条件下均能产生抗菌物质, 但各处理的抗菌物质分泌量存在较大差别, 以 PDB、KMB 和 BPY 培养物的抗菌活性较强, 且持续时间较长, 而 LB 和 NB 培养物的抑菌活性仅出现在发酵培养的 36–72 h。比较 PDB 和 KMB 培养物, PDB 培养物活性高峰(60 h)的出现明显早于 KMB 培养物(108 h), 由此选取 PDB 培养基振荡培养 60 h 为菌株 SB1 产抗菌物质的最适条件。

2.4 菌株 SB1 抗菌物质的理化性质

经不同温度处理后, 菌株 SB1 发酵上清液的抗菌活性发生变化。其中, 60°C 和 80°C 处理 30 min 对发酵上清液的活性影响不大; 而 100°C 处理

30 min 和 1×10^5 Pa 处理 20 min 后, 发酵上清液的活性分别为常温对照的 83.71%和 73.53%, 说明抗菌物质具有较好的热稳定性, 对高压环境也有一定的耐受性。

经蛋白酶 K 处理的发酵上清液的抗菌活性(21.8 mm)与阳性对照的活性(22.5 mm)相当; 而经紫外线处理 4 h 的发酵上清液的抗菌活性也未出现下降, 可见抗菌物质对蛋白酶 K 和紫外线不敏感。

经酸碱处理的发酵上清液中出现絮状沉淀, 抗菌活性也受到较大的影响。由图 3 可见, 抗菌物质在中性及弱碱性条件下(pH 7–9)处于溶解状态, 且活性较好; 在强碱性条件下(pH > 10)易被破坏而失去活性; 在强酸性条件下(pH < 4)形成沉淀物, 且沉淀物重新溶解后仍有很强的活性, 说明抗菌物质在

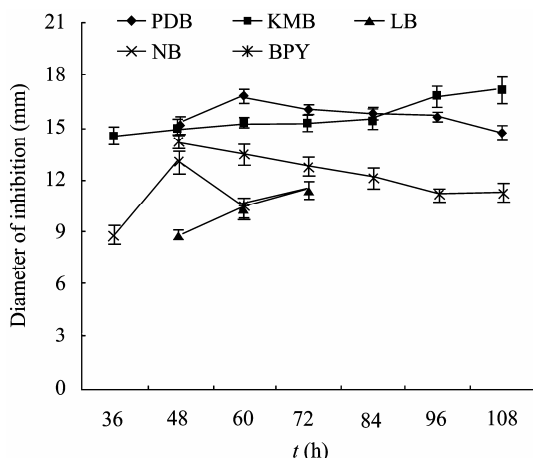


图2 菌株 SB1 在不同培养基条件下的抗菌活性

Fig. 2 Antibacterial activities of strain SB1 in different media

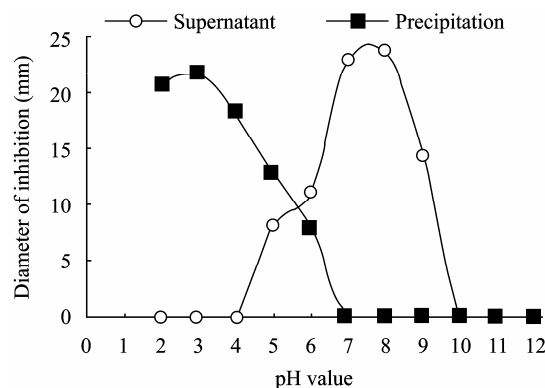


图3 pH 值对菌株 SB1 抗菌活性的影响

Fig. 3 Effects of pH value on the antibacterial activities of strain SB1

酸性条件下不稳定,易形成可逆沉淀物。

抗菌物质的溶解性试验结果显示(图4),抗菌物质在水中的溶解性最好,同时易溶于甲醇、乙醇和丙酮,微溶于氯仿和乙醚,不溶于石油醚,说明抗菌物质具有较好的水溶性和醇溶性。

2.5 抗菌物质的初步鉴定

比较菌株 SB1 抗菌粗提物和抗菌肽 Surfactin 标准品的 HPLC 谱图,结果显示,标准品中检测到两个峰,其保留时间分别为 7.569 min 和 8.453 min (图 5A 箭头所示);而抗菌粗提物的谱图中也出现 2 个相近的峰,保留时间分别为 7.585 min 和 8.431 min (图 5B 箭头所示),说明菌株 SB1 的抗菌物质中含有 Surfactin 成分。

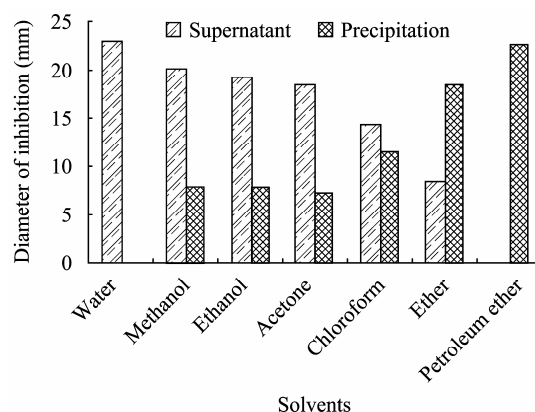


图4 菌株 SB1 抗菌物质在不同溶剂中的溶解性

Fig. 4 Solubility of antibacterial substance of strain SB1 in different solvents

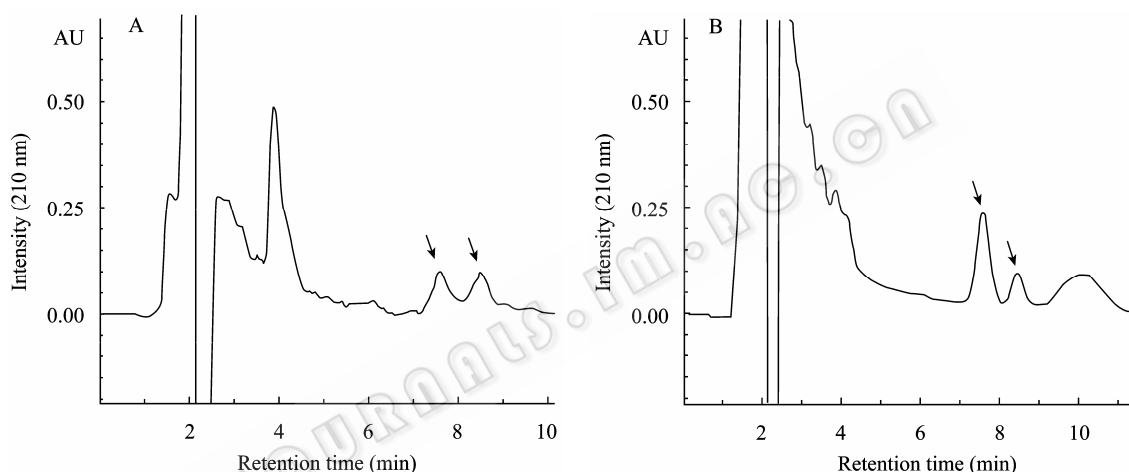


图5 Surfactin 标准样品(A)和菌株 SB1 抗菌物质(B)的 HPLC 层析图谱

Fig. 5 HPLC chromatogram of standard surfactin (A) and active compounds of strain SB1 (B)

3 讨论

枯草芽孢杆菌是一类能产生多种抗菌物质、具有广谱抗菌活性和极强的抗逆能力的杆状细菌。目前已从不同来源的菌株中分离到多肽类、脂肽类、细菌素和蛋白质等多种类型的抗菌物质,这些抗菌物质大多对病原真菌表现出强烈的拮抗活性,如刘永锋等^[8]分离的枯草芽孢杆菌菌株 B-916 产生一种对水稻纹枯病菌有抑制活性的蛋白质;邱思鑫^[9]分离的辣椒内生芽孢杆菌 TB2 菌株产生的蛋白类物质对辣椒炭疽病和西瓜枯萎病都有强烈的抑制作用;此外,包括表面活性素(Surfactin)、伊枯草菌素和芬枯草菌素等在内的脂肪肽也对病原真菌有抑制作用^[10]。相比而言,靶向植物病原细菌的抗菌物质分

离和鉴定的研究则鲜见报道^[11]。本研究以植物致病细菌青枯雷尔氏菌为靶标分析枯草芽孢杆菌内生亚种 SB1 菌株的抗菌活性,结果表明,该菌株分泌的抗菌物质具有较强的耐热性、醇溶性、对蛋白酶处理不敏感等特性,这与枯草芽孢杆菌分泌的脂肪肽类物质的性质^[12]较为相符。

脂肽是枯草芽孢杆菌产生的一类主要抗菌物质,包括表面活性素、芬枯草菌素和伊枯草菌素 3 个家族成员。其中,芬枯草菌素和伊枯草菌素对真菌有强烈的拮抗作用^[12],而表面活性素具有抗菌、抗肿瘤、抗病毒活性及表面活性等多种生物功能^[12]。在本研究中,我们首先采用分子杂交技术检测到菌株 SB1 含有表面活性素和伊枯草菌素基因^[13],HPLC 分析进一步从菌株 SB1 的抗菌粗提物





中检测到 2 个与表面活性素具有相近保留时间的同系物,说明该菌株的广谱抗细菌、抗病毒活性与其分泌的表面活性素密不可分,而该菌株对多种真菌的强烈抑制作用是仅取决于表面活性素,还是表面活性素与伊枯草菌素协同作用的结果,还有待进一步的试验分析来加以阐明。

参 考 文 献

- [1] Office of Pesticide Program: biopesticide. 2001. <http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides>.
- [2] 陈中义, 张杰, 黄大昉. 植物病害生防芽孢杆菌抗菌机制与遗传改良研究. 植物病理学报, 2003, **33**(2): 97-103.
- [3] Bais HP, Fall R, Vivanco JM. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiology*, 2004, **134**(1): 307-319.
- [4] Leclère V, Béchet M, Adam A, et al. Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(8): 4577-4584.
- [5] 李红霞, 康绍兰, 李兴红, 等. 植物源抗病毒制剂 VA 对烟草花叶病毒(TMV)体外钝化作用的初步研究. 河北农业大学学报, 2000, **23**(4): 67-70.
- [6] 蔡妙英, 刘聿太, 战立克. 芽孢杆菌属. 北京: 农业出版社, 1983.
- [7] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [8] 刘永锋, 高渊, 黄建华, 等. 拮抗细菌 B-916 及其分泌物对几种植物病原菌的毒力分析. 中国生物防治, 2002, **18**(1): 45-46.
- [9] 邱思鑫. 防病促生植物内生芽孢杆菌. 福建农林大学博士学位论文, 2004.
- [10] 李晶, 杨谦. 生防枯草芽孢杆菌的研究进展. 安徽农业科学, 2008, **36**(1): 106-111, 132.
- [11] 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.
- [12] Katz E, Demain AL. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriological reviews*, 1977, **41**(2): 449-474.
- [13] 连玲丽, 谢荔岩, 林奇英, 等. 芽孢杆菌三种抗菌素基因的杂交检测. 激光生物学报, 2008, **17**(1): 81-85.

征订启事

2010 年中科院微生物所期刊联合编辑部联合征订全面启动!

| | |
|---|---|
|  | 《微生物学报》月刊(每月 4 日出版), 单价 55.00 元, 全年定价 660 元。刊号: ISSN 0001-6209; CODEN WSHPA8。国内邮发代号: 2-504; 国外邮发代号: BM67。 |
|  | 《生物工程学报》月刊(每月 25 日出版), 单价 65.00 元, 全年定价 780 元。刊号: ISSN 1000-3061; CODEN SGXUED。国内邮发代号: 82-13; 国外邮发代号: BM5608。 |
|  | 《微生物学通报》月刊(每月 20 日出版), 单价 48.00 元, 年价 576 元。刊号: ISSN 0253-2654; CODEN WSWPDI。国内邮发代号: 2-817; 国外邮发代号: BM413。 |
|  | 《菌物学报》双月刊(单月 15 日出版), 单价 80 元, 全年定价 480 元。刊号: ISSN 1672-6472; CODEN JXUUAЕ。国内邮发代号: 2-499; 国外邮发代号: Q723。 |
| 订阅 | 欢迎广大读者直接与本刊发行部联系订购, 我们将按期免费为您邮寄。 |
| | 汇款地址: (100101)北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中科院微生物所 B401 |
| | 收信人: 《 》编辑部; 电话: 010-64807521; E-mail: bjb@im.ac.cn |
| | 请在附言处注明“订刊费”及所订期刊名称、年代、卷、期和数量。 |