

研究报告



南极沉积物来源抗菌细菌的筛选及抑菌物质的鉴定

罗曼 万婧惊 黄仕新 唐旭 徐长安*

自然资源部第三海洋研究所 福建 厦门 361005

摘要:【背景】科学研究表明,由于南极环境条件特殊,微生物资源丰富,有望筛选出功效显著的抗菌微生物。【目的】以黄瓜枯萎病致病菌木贼镰刀菌(*Fusarium equiseti*)为指示菌,从南极沉积物中分离筛选具有拮抗作用的细菌菌株并对其抑菌物质进行初步鉴定。【方法】应用平板对峙法和琼脂扩散法分别对样品和发酵液进行初筛和复筛,筛选出对 *F. equiseti* 抑菌效果最强的菌株,基于形态学、生理生化、分子生物学分析,对该菌株进行鉴定。之后,对目标菌株发酵上清中的抑菌物质进行抑菌谱研究,并对其抑菌成分进行温度和 pH 的稳定检测,通过硫酸铵沉淀的方法初步鉴定发酵液中的抑菌物质。【结果】从南极沉积物样品中共分离纯化出 62 株细菌,有 5 株具有较好的抑菌效果,其中抑菌效果最强的菌株鉴定为枯草芽孢杆菌斯氏亚种(*Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*),命名为 JYM35。抑菌谱检测结果显示,菌株 JYM35 对丝瓜枯萎病致病菌层生镰刀菌(*Fusarium proliferatum*)和辣椒枯萎病致病菌 *F. equiseti* 具有较强的抑菌效果,对长豆褐腐病致病菌斧霉属(*Choanephora*)有较明显的拮抗作用,对水产致病菌副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)和溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)也有一定的拮抗作用。菌株 JYM35 发酵上清中所含的抑菌物质热稳定性强且耐碱不耐酸,硫酸铵沉淀后可初步确定其抑菌物质隶属蛋白类。【结论】菌株 JYM35 是一株产蛋白类活性物质的广谱型抑菌菌株,对枯萎病致病菌的拮抗作用最强。因此具有较好的开发利用价值。

关键词: 南极沉积物, 木贼镰刀菌, 筛选, 抑菌谱, 抑菌物质

Screening of antimicrobial bacteria from Antarctic sediments and identification of antagonistic substance

LUO Man WAN Jing-Liang HUANG Shi-Xin TANG Xu XU Chang-An*

Third Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, Xiamen, Fujian 361005, China

Abstract: [Background] Scientific research shows that due to the special environmental conditions in Antarctica and the abundance of microbial resources, it is expected to screen out highly effective

Foundation items: Xiamen Marine Economy Innovation Development Demonstration Project (16CZY009SF05, 16CZP017SF06); Marine Economy Development Subsidy Fund Project of Fujian Province (FJHJF-L-2018-5); Fundamental Scientific Research Business Project of the Third Institute of Oceanography, MNR (Marine Division 2017027); Yantai Marine Economy Innovation Development Demonstration Project (YHCX-SW-L-201703)

*Corresponding author: Tel: 86-592-2195527; E-mail: xuchangan@tio.org.cn

Received: 09-10-2019; Accepted: 30-12-2019; Published online: 06-01-2020

基金项目: 厦门市海洋经济创新发展示范项目(16CZY009SF05, 16CZP017SF06); 福建省海洋经济发展补助资金项目(FJHJF-L-2018-5); 自然资源部第三海洋研究所基本科研业务费项目(海三科 2017027); 烟台市海洋经济创新发展示范项目(YHCX-SW-L-201703)

*通信作者: Tel: 0592-2195527; E-mail: xuchangan@tio.org.cn

收稿日期: 2019-10-09; 接受日期: 2019-12-30; 网络首发日期: 2020-01-06

antimicrobial microorganisms. **[Objective]** To isolate and screen out antimicrobial strain from Antarctic sediments and to make preliminary identification of antibacterial substance, by using the pathogen of cucumber fusarium wilt named *F. equiseti* as indicator fungus. **[Methods]** The plate-based confrontation method was used to screen the strain from sediment samples and fermentation broth, with the strongest antimicrobial effect on *Fusarium equiseti*. Based on morphological, physiological, biochemical, molecular biology analysis, the strain was identified. Then the antimicrobial spectrum of antimicrobial substance in the fermentation broth was studied, and the stability of the antimicrobial component was detected under different temperatures and pH conditions, and the antimicrobial substance in fermentation broth was identified by the method of ammonium sulfate precipitation. **[Results]** A total of 62 bacteria were isolated from the Antarctic sediment samples, and 5 were with better antiseptic effects, of which the most effective strain was identified as *Bacillus subspedestion* (*Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*) and named JYM35. The result of antimicrobial spectrum showed that JYM35 is of strong antagonistic effect on the pathogen of towel gourd fusarium wilt named *F. proliferatum* and pathogen of pepper fusarium wilt named *Fusarium equiseti*, and has antagonistic effect on brown rot of long-bean named *Choanephora*, and also has certain antimicrobial effect on aquatic pathogen named *Vibrio parahaemolyticus* and *V. alginolyticus* as well. The antagonistic substance contained in the fermentation broth of JYM35 has the characteristic of high thermal stability, and it is resistant to alkali but not to acid. Through ammonium sulfate precipitation, it can be preliminarily determined that the antagonistic substance belongs to proteins. **[Conclusion]** Strain JYM35 is a broad-spectrum antimicrobial strain that produces protein-like active substance and has the strongest antagonistic effect against fusarium wilt.

Keywords: Antarctic sediment, *Fusarium equiseti*, Screening, Antibacterial spectrum, Antagonistic substance

植物病害是影响我国农业发展的一大重要因素,农作物因各种病害原因减产给我国的经济造成了重大损失^[1]。导致植物病害的原因有很多,目前可大致分为两大类:非侵染性因素和侵染性因素,侵染性因素是造成植物病害的主要方面,包括细菌、真菌、病毒、线虫、寄生性植物及其他病原物在内的病源都属于侵染性因素^[2]。其中,由镰刀菌引起的枯萎病是瓜果蔬菜的常见病害^[3]。染病植株若不及时防治,病害则将会迅速蔓延,造成植物的枯萎死亡,从而影响品质和产量。目前,化学防治在枯萎病治理中占主导地位,但由于化学农药的长期使用,不仅使很多病害植株产生了抗药性,还让化学农药通过食物链进入了人体,危害人体健康^[4]。因此,开发利用绿色有机的病害防治方法成为了一个崭新的目标,在这一契机下,生物防治手段成功登上了研究舞台。其中微生物防治手段在生物防治中脱颖而出,其使用安全,不产生抗药性。在我国,利用微生物防治病害已取得很好的成果^[5]。

由于极地环境独特的地理和气候等条件,使得极地微生物的代谢调控机制及生理生化特征也具有一定的独特性^[6-8]。因此南北极区域被认为是新型生物活性物质和先导化合物菌株的种源地,是有重要意义的潜在微生物资源库^[9-12]。董宁^[13]对南极格罗夫山地区的微生物进行研究,分离获得了具有产胞外酶活性的抗菌菌株。贺瑞含等^[14]从北极土壤中分离得到了金黄色葡萄球菌和鲍氏不动杆菌的拮抗细菌。近年来的研究结果均表明,从极地微生物中可分离到具有良好生物活性的菌株,显示了极地微生物资源巨大的开发应用潜力。其中在细菌的抗菌效果研究中,枯草芽孢杆菌显示出其独特的优势,它分布广,抗菌性能好,为后续的实际应用奠定了较好的理论研究基础,已有大量文献报道过枯草芽孢杆菌的抗真菌性能,于杰等^[15]从香蕉根部土壤分离出了一株对香蕉枯萎病具有抑制作用的枯草芽孢杆菌。牛焕杰等^[16]从枯草芽孢杆菌中分离的抗菌蛋白对苹果树腐烂病菌丝有较好的抑制作用。本实验以南极沉积物为研究对象,筛选出了一株对

黄瓜枯萎病致病菌木贼镰刀菌有拮抗作用的细菌并鉴定为枯草芽孢杆菌斯氏亚种, 其抑菌谱的研究结果显示目标菌株对枯萎病具有较好的抑制作用, 对目标菌株的抑菌物质进行了理化性质的研究并初步鉴定其抗菌物质隶属蛋白类, 为后续的分纯化奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

筛选目标菌株的样品取自南极, 无菌条件下送回本实验室 4 °C 保存。

1.1.2 指示菌

木贼镰刀菌(*Fusarium equiseti*)、层生镰刀菌(*Fusarium proliferatum*)、笄霉属(*Choanephora*)、灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)和沙门氏菌(*Salmonella*)由本实验室保藏。迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)和溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)由厦门大学生物实验室提供。

1.1.3 培养基

2216E 培养基(g/L): 蛋白胨 5.0, 酵母膏 1.0, 磷酸高铁 0.1, 过滤陈海水 1.0, 固体培养基另加琼脂 18.0, pH 7.6;

PDA 培养基(g/L): BD Difco 品牌, pH 7.2;

PDB 培养基(g/L): BD Difco 品牌, pH 7.2;

LB 培养基(g/L): 固体培养基中加入琼脂粉 18.0, pH 7.0。

以上培养基 1×10^5 Pa 灭菌 30 min 备用。

1.1.4 主要试剂和仪器

DNA Marker, 北京宝日医生物技术有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 上海赛百盛基因技术有限公司。生化培养箱, 宁波莱福科技有限公司; 全温大容量振荡器, 太仓实验设备厂; Veriti 96 Thermal cycler PCR 仪, 应用生物系统公司; 徕卡显微镜 DM750, 徕卡仪器有限公司; 抑菌圈测量仪, 杭州迅数科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离纯化

在无菌条件下, 将适量样品放入装有 50 mL 无菌过滤海水的锥形瓶中, 20 °C、180 r/min 振荡培养 30 min。将样品进行梯度稀释至 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} , 各取 50 μ L 均匀涂布于 2216E 固体培养基上, 20 °C 培养箱倒置培养 3 d。挑取形态不同的菌落在 2216E 固体培养基上划线分离纯化 3 次, 纯化后的菌株保藏于磁珠管。

1.2.2 筛选

(1) 拮抗菌株的初筛

将黄瓜枯萎病致病菌木贼镰刀菌接于 PDB 培养基中, 于 28 °C、180 r/min 摇床培养 3 d, 取 50 μ L 均匀涂布于 PDA 培养基, 28 °C 培养箱中培养 4 d, 得指示菌平板。将从 1.2.1 中分离纯化得到的细菌菌株接种于 2216E 液体培养基, 20 °C、180 r/min 摇床培养 24 h, 获得细菌培养液。取出上述指示菌平板用 $\Phi 6$ mm 的打孔器打孔得指示菌菌饼, 将菌饼放于 PDA 平板中央, 菌饼周围用打孔器打孔, 孔中加入 50 μ L 待测细菌培养液, 28 °C 培养 3–4 d, 观察是否有抑菌效果。

(2) 拮抗菌株的复筛

利用琼脂扩散法^[17]进行抑菌效果复筛。将初筛得到的具有抑菌效果的细菌接入 50 mL 2216E 液体培养基中发酵培养 3 d, 菌株发酵液于 12 000 r/min 离心 10 min 后取上清过 0.22 μ m 无菌滤膜备用。将指示菌培养液按 0.1% 的比例接入冷却至 50 °C 左右的 PDA 培养基中, 倒平板。待平板凝固后用 $\Phi 6$ mm 的打孔器打孔, 孔中加入上述待测菌株发酵液样品, 以加入无菌培养基的孔作为空白对照, 平板置于 28 °C 恒温箱中培养 3–5 d, 观察抑菌效果。每组实验 3 次重复。

1.2.3 菌株的鉴定

(1) 形态学与生理生化鉴定

目标菌株在 2216E 固体培养基上 20 °C 培养 48 h 后, 观察菌落形态。根据《伯杰氏细菌学鉴定手册》^[18]和《常见细菌系统鉴定手册》进行生理生

化鉴定^[19]。

(2) 16S rRNA 基因的分子生物学鉴定

目标菌株基因 DNA 利用细菌基因组 DNA 试剂盒提取。以 16S rRNA 基因的通用引物进行 PCR 扩增, 引物为 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTACCTTGTAGGACTT-3')。PCR 反应体系 (50 μ L): 2 \times Taq PCR Mater Mix 25 μ L, 27F (10 μ mol/L) 2 μ L, 1492R (10 μ mol/L) 2 μ L, Template DNA 2 μ L, ddH₂O 19 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行序列测定, 测序结果在 NCBI 上通过 BLAST 进行序列同源性比对, 确定目标菌株的分类地位。利用 MEGA 7 软件制作菌株系统发育树。

1.2.4 抑菌谱的测定

按照 1.2.2 中的琼脂扩散方法测定目标菌株对丝瓜枯萎病致病菌层生镰刀菌、辣椒枯萎病致病菌木贼镰刀菌、长豆褐腐病致病菌笋霉属和灰霉病致病菌灰葡萄孢菌 4 株病原真菌的抑菌效果。将苏云金芽孢杆菌、沙门氏菌、迟缓爱德华氏菌、副溶血弧菌和溶藻弧菌 5 株细菌指示菌培养液按 0.1% 的比例接入冷却至 50 $^{\circ}$ C 左右的 LB 培养基中, 倒平板。待平板凝固后用 Φ 6 mm 的打孔器打孔, 孔中加入按 1.2.2 中复筛的方法处理过的目标菌株发酵液样品, 以加入无菌培养基的孔作为空白对照, 平板置于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中培养 24 h, 观察抑菌效果。每组实验 3 次重复。

1.2.5 抑菌物质的稳定性分析

将菌株 JYM35 接种于 LB 培养基中 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 发酵培养 3 d, 发酵液 4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 10 min, 得菌株发酵上清液。

(1) 温度对抑菌物质活性的影响

取发酵上清液 3 份, 分别置于 60、80、100 $^{\circ}$ C 处理 1 h, 按照 1.2.2 中的琼脂扩散法测定各处理发酵液的抑菌活性, 以原发酵液作为对照。

(2) pH 值对抑菌物质活性的影响

取发酵上清液 7 份, 调节 pH 为 1.0、3.0、5.0、7.0、9.0、11.0、13.0, 按照 1.2.2 中的琼脂扩散法测定处理发酵液的抑菌活性, 以原发酵液作为对照。

1.2.6 抑菌物质的初步鉴定

1.2.5 中得到的发酵上清液于冰上边搅拌边加入硫酸铵固体, 使饱和度达到 60%, 4 $^{\circ}$ C 静置过夜。上述液体 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 10 min, 分别收集离心液和沉淀, 沉淀用纯水复溶后加入到处理好的 3 000 Da 的透析袋中, 于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中进行透析除盐, 透析时间为 24 h, 每 2–4 h 换液一次。所得透析液与离心液、发酵上清液一同按照 1.2.2 中的琼脂扩散法测定抑菌活性。

2 结果与讨论

2.1 菌株分离、纯化及筛选结果

以南极沙土沉积物为样品, 分离纯化出 62 株细菌, 通过初筛和复筛, 确定有 5 株细菌的胞外产物具有较好的抑菌效果, 抑菌效果见表 1。表 1 中结果显示, 菌株 JYM35 对黄瓜枯萎病致病菌木贼镰刀菌的抑菌效果明显强于其余 4 株细菌的抑菌效

表 1 菌株发酵液对指示菌的抑菌效果

Table 1 Bacteriostatic effect of fermentation broth on indicator bacteria

菌株编号 Strain No.	抑菌效果 Antibacterial effect
JYM30	++
JYM31	++
JYM35	+++
JYM48	++
JYM50	++

注: 打孔器直径为 6 mm, 抑菌圈>6 mm 认为有抑菌活性。+: 有抗菌效果, 抑菌圈在 6–10 mm 之间; ++: 抑菌圈在 10–15 mm 之间; +++: 抑菌圈在 15 mm 以上。

Note: The diameter of the perforator is 6 mm, and the bacteriostatic zone>6 mm is considered to have bacteriostatic activity. +: Antibacterial effect, and the inhibition zone is between 6–10 mm. ++: The inhibition zone is between 10–15 mm. +++: The inhibition zone is above 15 mm.

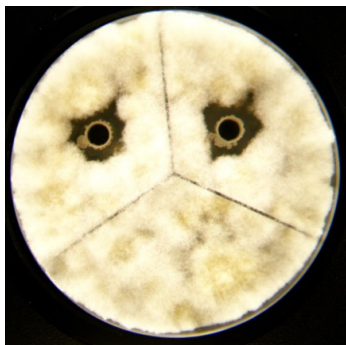


图 1 菌株 JYM35 的抑菌效果图
Figure 1 Antibacterial effect of strain JYM35

果, 其抑菌效果如图 1 所示。因此, 选取 JYM35 作为后续实验的菌株。

2.2 菌株的鉴定

2.2.1 形态与生理生化鉴定结果

菌株 JYM35 在 2216E 平板上 20 °C 培养 48 h 后呈乳白色、圆形、湿润且微隆起的菌落。目标菌株革兰氏染色结果为阳性。菌株 JYM35 的生理生化鉴定结果如表 2 所示。

表 2 菌株 JYM35 的生理生化鉴定结果
Table 2 Physiological and biochemical identification results of strain JYM35

项目	结果
Items	Result
革兰氏染色 Gram staining	+
接触酶实验 Catalase test	+
淀粉水解实验 Starch hydrolysis test	+
V-P 实验 V-P test	-
甲基红实验 Methyl red test	-
柠檬酸盐利用实验 Citrate utilization test	-
硝酸盐还原实验 Nitrate reduction test	-
吲哚实验 Indole test	-

注: +: 阳性; -: 阴性。
Note: +: Positive; -: Negative.

2.2.2 16S rRNA 基因的分子生物学鉴定结果

通过在 NCBI 上对菌株 JYM35 测序结果的同源性比对及构建的系统发育树分析, 菌株 JYM35 被鉴定为枯草芽孢杆菌斯氏亚种(*Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*), 菌株的 GenBank 登录号为 MN511799。系统发育树如图 2 所示。

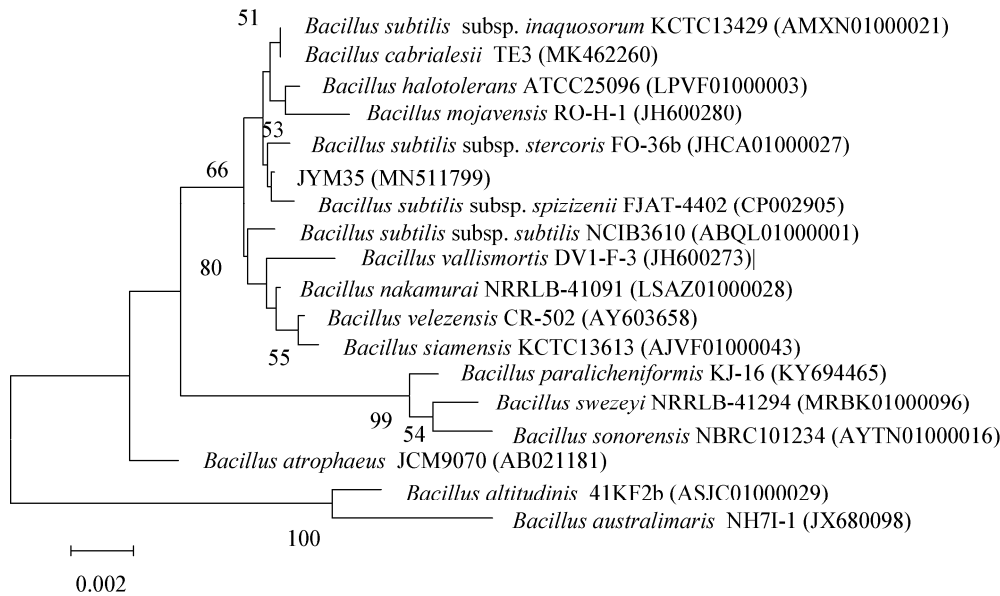


图 2 菌株 JYM35 的系统发育树
Figure 2 Phylogenetic tree of strain JYM35

注: 括号中序号代表菌株序列号; 分支点上的数字代表可信度, 数值越大, 可信度越强; 标尺代表遗传距离, 标尺越短代表亲缘关系越近。
Note: The serial number in brackets represents the serial number of the strain; The number on the branch point represents the credibility, the larger is more credible; The ruler represents genetic distance, and the shorter shows the more closely related.

2.3 抑菌谱测定结果

抑菌谱测定结果如表 3 所示。菌株 JYM35 对丝瓜枯萎病致病菌层生镰刀菌和辣椒枯萎病致病菌木贼镰刀菌抑菌效果明显, 对长豆褐腐病致病菌斧霉属抑菌效果较为明显, 对水产致病菌副溶血弧菌和溶藻弧菌有抑菌活性。说明菌株 JYM35 是一株广谱型抑菌菌株, 并对枯萎病致病菌有较强的抑制作用。到目前为止, 研究者^[20-22]对极地微生物抗菌功能的研究均以病原细菌作为指示菌, 针对植物病原真菌抗菌功能筛选的研究较少, 因此本实验的菌株 JYM35 具有一定的研究价值。

2.4 抑菌物质的稳定性检测结果

2.4.1 温度对抑菌物质活性的影响

菌株 JYM35 发酵上清液于 60、80、100 °C 处理 1 h 后, 指示菌平板每孔加样 50 μ L, 各处理样品的抑菌活性结果如图 3 所示, 由图 3 可知菌株 JYM35 的抑菌物质在 100 °C 条件下处理 1 h 后基本失去活性, 在 60 °C 和 80 °C 条件下处理 1 h 后与原发酵液对比活性基本未受影响, 说明此抑菌物质的热稳定性较好。

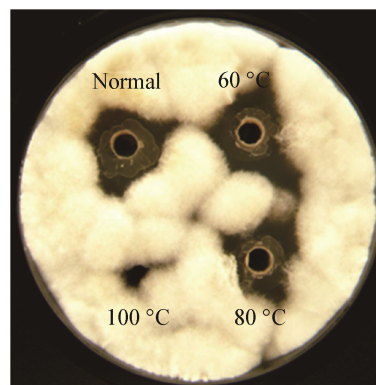


图 3 温度对抑菌物质活性的影响

Figure 3 Effect of temperature on the activity of antagonistic substance

注: Normal: 未处理的发酵液的抑菌效果; 60、80、100 °C 分别代表发酵液在 60、80、100 °C 下处理 1 h 的抑菌效果。

Note: Normal: The antibacterial effect of the untreated fermentation broth. 60, 80, and 100 °C represent the antibacterial effect of the fermentation broth treated at 60, 80, and 100 °C for 1 h.

2.4.2 pH 值对抑菌物质活性的影响

菌株 JYM35 发酵上清液 pH 值为 8.28, 将发酵上清 pH 值调为 1.0、3.0、5.0、7.0、9.0、11.0、13.0 后进行抑菌活性检测, 指示菌平板每孔加样 50 μ L, 各梯度处理发酵液的抑菌活性结果如图 4 所示, 由图 4 可知, 在 $\text{pH} \leq 7.0$ 时, 随着 pH 值的降低, 菌株 JYM35 的抑菌物质活性逐渐下降, pH 值为 1.0 时抑菌物质失去活性; 在 $\text{pH} > 7.0$ 时, 其活性基本未受影响, 因此可初步判断此抑菌物质耐碱不耐酸。

2.5 抑菌物质的初步鉴定结果

菌株 JYM35 的发酵液经离心、盐析和透析后分别得到发酵上清液、盐析离心液和透析液, 3 种溶液的 pH 值分别为 8.28、7.89 和 6.33, 以木贼镰刀菌为指示菌进行抑菌活性测定, 平板加样顺序由左上角开始顺时针为发酵上清液、盐析离心液和透析液, 每孔加样 20 μ L, 抑菌效果如图 5 所示, 由图 5 可知透析液存在明显的抑菌效果, 因此可以初步判断菌株 JYM35 的抑菌物质隶属蛋白类。其中盐析离心液也呈现出一定的抑菌效果, 因为硫酸铵饱和度为 60% 时无法沉淀发酵液中的所有蛋白, 因此残留蛋白仍具有一定的抑菌活性。

表 3 菌株 JYM35 的抑菌谱检测结果

Table 3 Bacteriostatic spectrum assay results of strain JYM35

指示菌菌种	抑菌效果
Indicator strain	Antibacterial effect
斧霉属 <i>Choanephora</i>	++
木贼镰刀菌 <i>Fusarium equiseti</i>	+++
层生镰刀菌 <i>Fusarium proliferatum</i>	+++
灰葡萄孢菌 <i>Botrytis cinerea</i>	—
迟缓爱德华氏菌 <i>Edwardsiella tarda</i>	—
苏云金芽孢杆菌 <i>Bacillus thuringiensis</i>	—
副溶血弧菌 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	+
溶藻弧菌 <i>Vibrio alginolyticus</i>	+
沙门氏菌 <i>Salmonella</i>	—

注: 打孔器直径为 6 mm, 抑菌圈 > 6 mm 认为有抑菌活性。+: 有抗菌效果, 抑菌圈在 6–10 mm 之间; ++: 抑菌圈在 10–15 mm 之间; +++: 抑菌圈在 15 mm 以上。

Note: The diameter of the punch is 6 mm, and the bacteriostatic zone > 6 mm is considered to have bacteriostatic activity, +: Antibacterial effect, and the inhibition zone is between 6–10 mm. ++: The inhibition zone is between 10–15 mm. +++: The inhibition zone is above 15 mm.

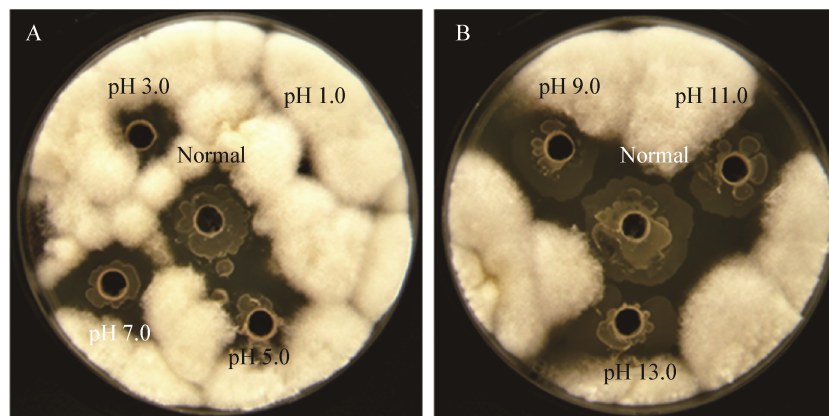


图 4 pH 值对抑菌物质活性的影响

Figure 4 Effect of pH on the activity of antagonistic substance

注: A: $\text{pH} \leq 7.0$; B: $\text{pH} > 7.0$. Normal: 未处理的发酵液抑菌效果; pH 1.0、3.0、5.0、7.0、9.0、11.0、13.0 分别代表发酵液在不同 pH 值下处理后的抑菌效果.

Note: A: $\text{pH} \leq 7.0$; B: $\text{pH} > 7.0$. Normal: The antibacterial effect of the untreated fermentation broth. pH 1.0, 3.0, 5.0, 7.0, 9.0, 11.0, and 13.0 respectively represent the antibacterial effect of the fermentation broth after treatment at different pH values.

3 结论

本实验以黄瓜枯萎病致病菌木贼镰刀菌为指示菌, 从南极沉积物样品中进行拮抗细菌的筛选, 共分离出 62 株细菌, 其中有 5 株细菌的胞外产物显示出了较好的抑菌活性, 抑菌效果最好的菌株

JYM35 经形态学、生理生化 and 系统发育树分析鉴定为枯草芽孢杆菌斯氏亚种(*Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*)。对菌株 JYM35 进行了抑菌谱的检测, 结果显示其对丝瓜枯萎病致病菌层生镰刀菌和辣椒枯萎病致病菌木贼镰刀菌具有明显拮抗作用, 对长豆褐腐病致病菌笄霉属有一定的拮抗作用, 对水产致病菌副溶血弧菌和溶藻弧菌也有抑菌效果。菌株 JYM35 的发酵上清中所含抑菌物质热稳定性强且耐碱不耐酸, 硫酸铵沉淀透析后可初步确定其抑菌物质为蛋白类。因此菌株 JYM35 是一株特异性拮抗枯萎病且产活性蛋白的广谱型抑菌菌株, 具有一定的研究价值。

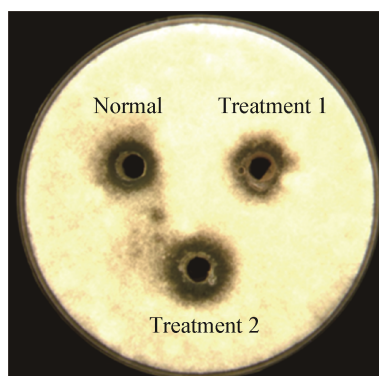


图 5 JYM35 发酵上清液、盐析上清液、盐析沉淀透析液的抑菌活性

Figure 5 The inhibitory activity of JYM35 fermentation supernatant, salting out supernatant and salting out precipitated dialysate

注: Normal: JYM35 发酵上清液的抑菌效果; Treatment 1: 盐析后离心上清液的抑菌效果; Treatment 2: 盐析后沉淀透析液的抑菌效果.

Note: Normal: The antibacterial effect of JYM35 fermentation supernatant; Treatment 1: The antibacterial effect of centrifugal supernatant after salting out; Treatment 2: The antibacterial effect of precipitated dialysate after salting out.

REFERENCES

- [1] Ren YL, Niu ZH, Liu LY, et al. Preliminary study on bacteriostasis of artemisia essential oil to several plant pathogens[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2019, 25(16): 85-88,142 (in Chinese)
任艳利, 牛之函, 刘琳玉, 等. 椒蒿精油对几种植物病原菌的抑制作用研究[J]. 安徽农学通报, 2019, 25(16): 85-88,142
- [2] Yin H, Zhao JP, Liang P. Symptoms and types of plant diseases[J]. Modern Horticulture, 2013(4): 73 (in Chinese)
尹红, 赵金盘, 梁平. 植物病害的症状及类型[J]. 现代园艺, 2013(4): 73
- [3] Dong JP, Qi XH, Xu Q, et al. Segregation and identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* and analysis of cucumber varieties' resistance difference[J]. Molecular

- Plant Breeding, 2017, 15(9): 3648-3653 (in Chinese)
董京萍, 齐晓花, 徐强, 等. 黄瓜枯萎病菌分离鉴定及品种抗性差异分析[J]. 分子植物育种, 2017, 15(9): 3648-3653
- [4] Guo R. Extension, application and developmental strategies of biopesticides in China[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2011, 27(1): 124-127 (in Chinese)
郭荣. 我国生物农药的推广应用现状及发展策略[J]. 中国生物防治学报, 2011, 27(1): 124-127
- [5] Pérez-García A, Romero D, de Vicente A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2011, 22(2): 187-193
- [6] Wilson ZE, Brimble MA. Molecules derived from the extremes of life[J]. Natural Product Reports, 2009, 26(1): 44-71
- [7] Ghiglione JF, Galand PE, Pommier T, et al. Pole-to-pole biogeography of surface and deep marine bacterial communities[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(43): 17633-17638
- [8] Zeng YX, Chen B, Zou Y, et al. Polar microorganisms, a potential source for new natural medicines-A review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(5): 695-700 (in Chinese)
曾胤新, 陈波, 邹扬, 等. 极地微生物——新天然药物的潜在来源[J]. 微生物学报, 2008, 48(5): 695-700
- [9] Onofri S, Zucconi L, Tosi S. Continental Antarctic Fungi[M]. München, Germany: IHW-Verlag, 2007
- [10] Brunati M, Rojas JL, Sponga F, et al. Diversity and pharmaceutical screening of fungi from benthic mats of Antarctic lakes[J]. Marine Genomics, 2009, 2(1): 43-50
- [11] Chen HW, Gao AG. Progress on investigation and research of polar microbiology in China[J]. Chinese Journal of Polar Research, 2005, 17(4): 299-307 (in Chinese)
陈皓文, 高爱国. 中国极地微生物学调查研究进展[J]. 极地研究, 2005, 17(4): 299-307
- [12] Zhang BT, Miao JL, Li GY, et al. Research advances in the study of active substances from polar microorganism[J]. Marine Sciences, 2004, 28(2): 58-63 (in Chinese)
张波涛, 缪锦来, 李光友, 等. 极地微生物活性物质研究进展[J]. 海洋科学, 2004, 28(2): 58-63
- [13] Dong N. Microbial diversity, extracellular enzyme activity and antimicrobial activity of culturable bacteria of soil from Grove Mountains, East Antarctica[D]. Qingdao: Master's Thesis of Ocean University of China, 2014 (in Chinese)
董宁. 东南极格罗夫山土壤微生物多样性及其可培养细菌的产酶和抗菌活性筛选[D]. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 2014
- [14] He RH, Du ZJ, Yu Y, et al. Isolation of antibacterial and culturable bacteria from Arctic tundra soils[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2019, 59(6): 1050-1062 (in Chinese)
贺瑞含, 杜宗军, 俞勇, 等. 北极苔原土壤中可培养细菌的分离及其抗菌活性测定[J]. 微生物学报, 2019, 59(6): 1050-1062
- [15] Yu J, Zhang RY, Tan ZQ, et al. Studies on antifungal activity and purification of antifungal substance from *Bacillus subtilis* B25 strain[J]. Genomics and Applied Biology, 2016, 35(3): 629-634 (in Chinese)
于杰, 张荣意, 谭志琼, 等. 枯草芽孢杆菌 B25 抗真菌作用及抗菌蛋白的分离纯化[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(3): 629-634
- [16] Niu HJ, Li H, Wang NN, et al. Isolation and purification of antifungal protein from *Bacillus subtilis* E1R-j against *Valsa mali*[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2016, 44(9): 135-142 (in Chinese)
牛焕杰, 李辉, 王娜娜, 等. 苹果树腐烂病菌拮抗枯草芽孢杆菌 E1R-j 抗菌蛋白的分离纯化[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2016, 44(9): 135-142
- [17] Zhang GZ, Chen LH, Yang TY, et al. Optimization of agar diffusion bioassay for nisin[J]. Food Science, 2007, 28(3): 175-178 (in Chinese)
张国只, 陈林海, 杨天佑, 等. 琼脂扩散法测定乳链菌肽效价的优化[J]. 食品科学, 2007, 28(3): 175-178
- [18] Buchanan RE. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. Translation Group of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, trans. 8th ed. Beijing: Science Press, 1984 (in Chinese)
布坎南 RE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组, 译. 8版. 北京: 科学出版社, 1984
- [19] Dong XZ, Cai MY. Manual of Determinate Bacteriology[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese)
东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001
- [20] Yuan LY, Wang YL, Ning XB, et al. Screening and phylogenetic analysis of antibacterial strains isolated from *Antarctic krill*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(5): 179-184, 370 (in Chinese)
袁兰云, 王亚璐, 宁喜斌, 等. 南极磷虾中产抗菌活性物质菌株的筛选及系统发育分析[J]. 食品工业科技, 2017, 38(5): 179-184, 370
- [21] Fu SB, Yan S, Xin Q, et al. Study on the antimicrobial activity of endophytic fungi from lichens of Ny-Alesund, Arctic[J]. Journal of Zunyi Medical University, 2016, 39(5): 474-477 (in Chinese)
付少彬, 闫松, 辛庆, 等. 北极新奥尔松地区地衣内生真菌的抑菌活性[J]. 遵义医学院学报, 2016, 39(5): 474-477
- [22] Li H, Lin XZ, He PQ, et al. Screening and phylogenetic analysis of antibacterial strains isolated from Antarctic[J]. Microbiology China, 2011, 38(2): 264-269 (in Chinese)
李贺, 林学政, 何培青, 等. 南极抗细菌活性菌株的筛选及系统发育分析[J]. 微生物学通报, 2011, 38(2): 264-269