

• 研究简报 •

枯草芽孢杆菌 Bs-916的抑菌活性及其抑菌物质初探

刘永锋^{1,2,3}, 陈志谊¹, 周明国^{* 2}, 张杰³,
宋福平³, 刘邲洲¹, 罗楚平¹

(1. 江苏省农业科学研究院 植物保护研究所, 南京 210014 2. 南京农业大学 植物保护学院, 南京 210095
3 中国农业科学院 植物保护研究所 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100094)

摘要: 为了揭示从土壤中分离出的拮抗菌—枯草芽孢杆菌 Bs-916的抑菌作用和抑菌机理, 采用管碟法、平板涂抹法及孢子盟发法测定了 Bs-916及其代谢液对水稻纹枯病菌、蚕豆枯萎病菌等8种病原菌的抑菌活性, 结果表明其对供试的大多数病原菌均具有较强的抑菌活性, 如 Bs-916及其代谢液对水稻纹枯病菌的抑制率分别为 95.4% 和 70.7%, 对水稻稻曲病菌的抑制率均为 100%。为了探索 Bs-916胞外物质的种类及特性, 分别采用丙酮沉淀、PEG 沉淀、等电点沉淀和超微浓缩等方法从 Bs-916代谢液中获得了沉淀物或截留物, 它们均具有抑菌活性。沉淀物经蛋白酶 K 处理后, 活性减弱, 说明 Bs-916胞外抗菌物质具有蛋白质的性质。

关键词: 枯草芽孢杆菌; Bs-916 代谢液; 抗菌物质; 抑菌活性

中图分类号: S482.292

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2007)01-0092-04

Analysis on the Antifungal Activity of *Bacillus subtilis* Strain Bs-916 and Its Extract

LIU Yong-feng^{1,2,3}, CHEN Zhi-yi¹, ZHOU Ming-guo^{* 2}, ZHANG Jie³,
SONG Fu-ping³, LIU You-zhou¹, LUO Chu-ping¹

(1. Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Science, Nanjing 210014 China;

2 College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

3 State Key Laboratory for Biology of Plant Disease and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China)

Abstract *Bacillus subtilis* strain Bs-916 which was isolated from rice field soil was used in controlling rice sheath blight and rice false smut. Bs-916 and its extract exhibited high antifungal (antibacterial) activity toward *Rhizoctonia solani*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium oxysporum*, *Picularia grisea*, *Ustilaginoidea virens*, *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* and *Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola*. Inhibition rate of Bs-916 and its extract were 95.4% and 70.7% toward *R. solani*, 100% and 100% toward *U. virens*, respectively. The extract of Bs-916 was deposited by acetone, PEG 6000, ammonium sulfate and different pH value; the extract were also drawn by Ultra-4 centrifugal devices and the above

收稿日期: 2006-05-25 修回日期: 2006-09-01.

作者简介: 刘永锋 (1973-), 男, 甘肃平凉人, 在职博士研究生, 副研究员, 从事植物病害生物防治研究工作; * 通讯作者: 周明国, 教授, 博士生导师, 主要从事杀菌剂毒理学及植物病原菌抗药性分子机制研究工作. 联系电话: 025-84395641; E-mail: mgzhou@njau.edu.cn

基金项目: 江苏省自然科学基金项目 (BK 2005108); 国家农业科技跨越计划专项资金项目 (2003-18); 植物病虫害生物学国家重点实验室开放基金项目 (PD2).

distilled substances showed high antifungal activity toward *Rhizoctonia solani*. The antifungal activity of the extract was decreased when it was treated with protease K. The results implied that an antifungal protein existed in the extract of B_s-916.

Key words *Bacillus subtilis* B_s-916 extract antifungal substance antifungal activity

利用枯草芽孢杆菌防治植物病害是目前植物病害生物防治的研究热点^[1~10]。枯草芽孢杆菌代谢系统发达,胞外抗菌物质丰富,从其中分离和纯化抗菌物质,克隆与抗病物质相关基因的研究为植物病害的生物防治和高效外源抗病基因的克隆提供了新的研究思路^[6~10]。枯草芽孢杆菌 B_s-916 是从土壤中分离获得的对水稻纹枯病菌具有较好拮抗作用的菌株,近几年在大面积防治水稻纹枯病中取得了比较理想的效果^[8]。为了揭示其抑菌作用和抑菌物质,笔者研究了 B_s-916 对几种植物病原菌的抑菌活性及其毒力效果,初步探索了 B_s-916 胞外抗菌物质的种类及其特性。

1 材料和方法

1.1 供试材料

生防菌株: 枯草芽孢杆菌 B_s-916 (*Bacillus subtilis*)。

病原菌: 水稻纹枯病菌 *Rhizoctonia solani*; 水稻恶苗病菌 *Fusarium moniliforme* Sheld、蚕豆枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* Schlecht f *fabae* Yu et Fang、西瓜枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* (Schl) f sp *nieveum* (E. F. Smith) Snyder et Hansen、水稻稻瘟病菌 *Piricularia grisea* 水稻稻曲病菌 *Ustilago indica* virens、水稻白叶枯病菌 *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* (Ishiyama) Zoo 和水稻细菌性条斑病菌

Xanthomonas oryzae pv *oryzicola* Dawson 均由江苏省农科院植保所保存。

蛋白酶 K 由 Merck 公司生产。超微浓缩离心管 (Ultra-4 centrifugal devices Millipore 生产)。葡萄糖、酵母膏、胰蛋白胨由北京奥博星生物技术有限责任公司生产。试剂均为分析纯。

1.2 B_s-916 培养液及其代谢液的制备

将 B_s-916 移入 400 mL YPG (内含葡萄糖 5 g 酵母膏 5 g 胰蛋白胨 5 g) 培养液中,在 28℃ 下振荡 (150 r/min) 培养 48 h 得到 B_s-916 培养液 (菌含量为 1×10^9 cfu/mL), 取其 200 mL 用细菌过滤器滤掉菌体得 B_s-916 代谢液。

1.3 对不同病原菌的毒力测定

分别测定原液、原液稀释 100 倍和 500 倍的 B_s-916 及其代谢液对不同病原菌的毒力。采用管碟法^[11]测定其对水稻纹枯病菌、水稻恶苗病菌、西瓜枯萎病菌、蚕豆枯萎病菌的毒力,按 (1) 式计算其抑制率。用平板涂抹法结合管碟法测定其对水稻白叶枯病菌、细菌性条斑病菌、稻曲病菌的毒力,即在相应的培养基平板上涂抹上述菌液 (稻曲病菌为孢子液),再用管碟法测定 B_s-916 对病原菌的毒力,按 (2) 式计算其抑制率。采用孢子萌发抑制法^[11]测定其对稻瘟病菌的毒力,每处理重复 3 次。按 (3) 式计算其抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = (\text{对照菌落直径} - \text{处理后菌落直径}) / (\text{对照菌落直径} - 8 \text{ mm}) \times 100 \quad (1)$$

$$\text{抑制率}(\%) = (\text{处理后抑菌圈直径} - \text{杯碟直径}) / (\text{对照菌落直径} - \text{杯碟直径}) \times 100 \quad (2)$$

$$\text{抑制率}(\%) = (\text{对照孢子萌发数} - \text{处理孢子萌发数}) / \text{对照孢子萌发数} \times 100 \quad (3)$$

1.4 B_s-916 胞外物质的提取及抑菌活性测定

采用不同方法分别获得 B_s-916 胞外物质,用文献 [11, 12] 方法测定其对水稻纹枯病菌的抑菌活性。

1.4.1 丙酮沉淀法 取 B_s-916 代谢液 10 mL, 按照体积比为 1:5 的比例加入 -20℃ 的丙酮 20 mL, 并在 -20℃ 下放置 10 min, 10 000 r/min 下离心 10 min, 弃上清液, 沉淀风干后用 2 倍体积的 0.067 mol/L 的磷酸缓冲液 (pH 6.95 下同) 溶解。

测定其抑菌活性。

1.4.2 聚乙二醇 (PEG 6000) 沉淀法 取 B_s-916 代谢液 50 mL, 加入 75 mL 质量分数为 50% 的 PEG 6000 搅拌 30~60 min 直至 PEG 完全溶解, 10 000 r/min 下离心 10 min, 弃上清液, 沉淀用 2 倍体积的 0.067 mol/L 的磷酸缓冲液 (pH 6.95) 溶解后测定其抑菌活性。

1.4.3 硫酸铵沉淀法 取 B_s-916 代谢液 100 mL, 加入硫酸铵使溶液达到饱和, 4℃ 下过夜, 于

10 000 r/min 下离心 20 min 后得沉淀物, 沉淀用上述磷酸缓冲液溶解, 透析 48 h 后取袋内物质, 测定其抑菌活性。

1.4.4 超微浓缩提取 将 1.4.3 节得到的 Bs-916 胞外抗菌物质利用超微浓缩离心管浓缩, 截留相对分子质量为 10 kDa 的物质, 浓缩后分别测定离心后的滤液和截留物的抑菌活性。

1.4.5 不同 pH 值沉淀 取 1.4.3 节得到的 Bs-916 胞外抗菌物质 10 mL, 滴加 0.2 mol/L 的盐酸, 出现沉淀后摇匀, 直至沉淀不再溶解为止。在 10 000 r/min 下离心 20 min, 测定上清液的 pH 值, 沉淀用 0.067 mol/L 的磷酸缓冲液缓慢溶解, 即得该 pH 值时 Bs-916 的胞外蛋白质; 上清液中滴加 0.2 mol/L 的盐酸, 同法获取不同 pH 值下的蛋白质, 直至加入酸后不再有蛋白质沉淀析出为止。同法将 0.2 mol/L 的氢氧化钠加入到上清液中, 分别获取碱性条件下的沉淀物质。分别测定所得各物质对水稻纹枯病菌的抑菌活性。

1.4.6 蛋白酶 K 对胞外抗菌物质抑菌活性的影

响 取 1.4.3 节得到的 Bs-916 胞外抗菌物质 100 μ L 与浓度为 1 mg/mL 的蛋白酶 K 等量混合, 在恒温 37℃ 下反应 30 min。测定蛋白酶处理后的胞外抗菌物质对水稻纹枯病菌的毒力。

2 结果与分析

2.1 Bs-916 培养液及其代谢液对不同病原菌的毒力

结果 (表 1) 表明: Bs-916 培养液在原液、1:100 和 1:500 倍稀释液对供试的病原菌表现出不同的抑制作用。对大多数供试病原菌的抑制率随稀释倍数的增加而减弱; 但对稻曲病菌和白叶枯病菌, 在不同的稀释浓度下, 抑制率均为 100%。

各浓度的 Bs-916 代谢液对水稻稻曲病菌的抑制率均为 100%; 对水稻纹枯病菌和水稻稻瘟病菌的抑制率随稀释倍数的增加而降低; 对水稻恶苗病菌、蚕豆镰刀病菌、西瓜枯萎病菌、水稻白叶枯病菌和细菌性条斑病菌无抑制作用。

Table 1 Inhibition effect of Bs-916 and its extract toward different pathogens at different concentration

Pathogens	Inhibition rate of Bs-916			Inhibition rate of Bs-916's extract (%)		
	1:0	1:100	1:500	1:0	1:100	1:500
R. solani	95.4	88.9	88.1	23.5	21.7	19.9
F. moniliforme	87.6	87.4	87.2	0	0	0
F. oxysporum f. fabae	74.0	69.6	70.0	0	0	0
F. oxysporum f. niveum	49.7	43.2	40.7	0	0	0
P. grisea	100	74.0	42.3	49.5	48.7	44.9
U. virens	100	100	100	100	100	100
X. campestris pv. oryzae	100	100	100	0	0	0
X. campestris pv. oryzaicola	100	60.2	34.8	0	0	0

2.2 不同方法获得的 Bs-916 胞外物质对水稻纹枯病菌的抑菌活性

用丙酮、PEG6000 和硫酸铵沉淀所得的 Bs-916 胞外物质对水稻纹枯病菌均有一定的抑菌活性。经超微浓缩后的截留液有抑菌活性, 而滤液无活性, 说明对水稻纹枯病菌具有抑菌活性的物质的相对分子质量不小于 10 kDa。不同等电点沉淀获得的沉淀物质对水稻纹枯病菌都有抑菌活性 (见图 1)。经过碱沉淀未获得沉淀物, 说明枯草芽孢杆菌胞外具有抑菌活性的物质为酸性物质。

2.3 蛋白酶 K 对胞外抗菌物质抑菌活性的影响

结果见图 2 经蛋白酶 K 处理后, Bs-916 胞外物质的抑菌活性下降, 说明 Bs-916 胞外抗菌物质具有蛋白质的特点。

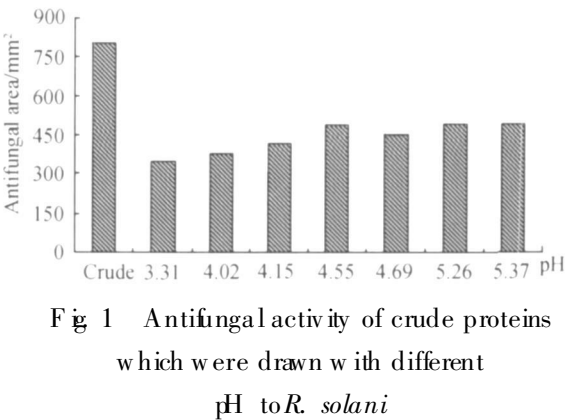


Fig 1 Antifungal activity of crude proteins which were drawn with different pH to R. solani

3 讨论

目前有关枯草芽孢杆菌防治植物病害的机理

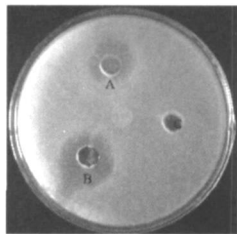


Fig. 2 Influence of protease K on the inhibition activity of B-916 antifungal substance (to *R. solani*)

A: B-916 antifungal substance [drawn with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] + protease K; B: B-916 antifungal substance [drawn with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$]; C: control

或机制的研究报道不多。已有的研究结果表明, B-916具有耐高温, 对酸碱适应度宽, 对盐敏感性不强的特点^[2]。本研究结果表明, B-916具有广谱抑菌的特性, 其胞外抗菌物质可被硫酸铵、丙酮、PEG6000和酸沉淀, 超微浓缩显示其相对分子质量大于 10 kDa 蛋白酶 K 对 B-916 抗菌物质的抑菌活性有影响。这些特点显示 B-916 胞外抗菌物质具有蛋白质性质, 说明 B-916 可分泌产生胞外抗菌蛋白质。本研究为进一步分离和纯化 B-916 胞外抗菌蛋白质奠定了基础。

参考文献:

- [1] SHODA M. Bacterial Control of Plant Diseases [J]. J Biosci Bieng, 2000, 89: 515-521.
- [2] HE Ying-chun(何迎春), GAO Bi-da(高必达). 立枯丝核菌的生物防治 [J]. Chin J Biol Control (中国生物防治), 2000, 16(1): 31-34.
- [3] BASIH P, FALL R, M VIVANCO J. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against Infection of Arabidopsis Roots by *Pseudomonas syringae* is Facilitated by Biofilm Formation and Surfactin Production [J]. Plant Physiology, 2004, 134(1): 307-320.
- [4] BHARATHI R, VIVEKANANTHAN R, HARISH S, et al. Rhizobacteria - Based Bioformulations for the Management of Fruit Rot Infection in Chillies [J]. Crop Protection, 2004, 23: 835-843.
- [5] VIVEKANANTHAN R, RAVIM, SARAVANAKUMAR D, et al. Microbially Induced Defence Related Proteins against Postharvest Anthracnose Infection in Mango [J]. Crop Protection, 2004, 23: 1061-1067.
- [6] TALSMAN H, ANTELMANN H, DING BLOED J D H, et al. Proteomics of Protein Secretion by *Bacillus subtilis*: Separating the "Secrets" of the Secretome [J]. Microbiology and Molecular Biology Review, 2004, 68: 207-233.
- [7] TORSTEN S. *Bacillus subtilis* Antibiotics Structures Syntheses and Specific Functions [J]. Mol Microbiol, 2005, 56(4): 845-857.
- [8] CHEN Zhi-yi(陈志谊), XU Zhi-gang(许志刚), LU Fan(陆凡), et al. 拮抗细菌 B-916 培养液对水稻纹枯病菌的抗生活性及其抗菌物质的研究 [J]. Jiangsu J Agric Sci (江苏农业学报), 2000, 16(3): 148-152.
- [9] SIM e-nu(司美茹), XUE Quan-hong(薛泉宏), YU Bo(余博), et al. 36 株生防菌对辣椒疫病等 4 种病原真菌的拮抗作用研究 [J]. J Northwest Sci Tech Univ Agric and For Nat Sci Ed (西北农林科技大学学报: 自然科学版), 2005, 33(1): 49-54.
- [10] SHEN Jing-yu(沈锦玉), YIN Wen-lin(尹文林), CAO Zheng(曹铮), et al. 枯草芽孢杆菌 B115 抗菌蛋白的分离纯化及部分性质 [J]. Acta Hydrobiologica Sinica (水生生物学报), 2005(6): 589-684.
- [11] CHEN Nian-chun(陈年春). The Bioassay Technology for Pesticides (农药生物测定技术) [M]. Beijing(北京): China Agricultural University Press(农业大学出版社), 1991: 149-160.
- [12] WANG Jia-zheng(汪家政), FAN Ming(范明). Handbook of Technology to Protein (蛋白质技术手册) [M]. Beijing(北京): Science Press(科学出版社), 2002: 77-99.

(Ed. JIN SH)