

解淀粉芽孢杆菌 IMAUB1034 抗真菌活性物质的初步研究

宗志友, 王海宽, 肖瑞峰, 闫艳华

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 对解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) IMAUB1034 活性物质的理化性质和盆栽实验中对甜瓜疫霉菌引起的病害的防治效果进行研究. 结果显示, 解淀粉芽孢杆菌发酵液对由甜瓜疫霉菌引起的病害具有一定防病效果, 病情指数为 40.22, 生防效果达到 35.9%. 另外, 其发酵液还能抑制甜瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum*)、灰葡萄孢霉菌 (*Botrytis cinerea*)、番茄早疫病菌 (*Alternaria solani*)、甜瓜疫霉菌 (*Phytophthora drechsleri* Tucker)、苹果炭疽病菌 (*Glomerella cingulate*) 的生长. 无菌上清液中的活性物质能耐高温、耐酸碱, 在 pH 2~10 仍然能检测到很高的抑菌活性. 但经过酶处理后抑菌活性降低程度不同.

关键词: 解淀粉芽孢杆菌; 甜瓜疫霉菌; 抗真菌活性; 生物防治

中图分类号: Q93

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2012)01-0005-04

Preliminary Research on Antifungal Bioactive Substance of *Bacillus amyloliquefaciens* IMAUB1034

ZONG Zhiyou, WANG Haikuan, XIAO Ruifeng, YAN Yanhua

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology,
Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The characteristics of bioactive substance and biocontrol effect of *Bacillus amyloliquefaciens* IMAUB1034 were studied. The results showed that the fermentation broth of *B. amyloliquefaciens* IMAUB1034 can reduce the incidence of the disease. The disease index was 40.22 and the biocontrol effect was 35.9%. Besides, its fermentation broth can inhibit the growth of *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani*, *Phytophthora drechsleri* Tucker, and *Glomerella cingulate*. The bioactive substance can survive heat stable and the antifungal activity was still obvious in pH 2-10. When processed by protease, the antifungal activity was reduced inordinately.

Key words: *Bacillus amyloliquefaciens*; *Phytophthora drechsleri* Tucker; antifungal activity; biocontrol

植物真菌病害是造成农业生产损失的一个重要原因^[1-2]. 甜瓜疫病是农业生产中的主要灾害性病害^[3], 其病原菌能严重侵蚀作物的叶片和果实, 减产幅度达 40%~60%, 重者绝收, 极大地影响了农业的生产^[4]. 长期以来, 化学制剂如苯并咪唑等在防治植物真菌病, 降低农业生产损失中发挥了重要作用, 在很长一段时期内得到了人们的认可^[5]. 但是研究^[6]发现, 长期频繁的使用化学制剂很容易使病原菌产生抗药性, 同时会有药物残留在植物上对人和动物的健康造成危害. 因此, 选择一种无害的适合可持续发展农

业的防治植物真菌病害的新方法迫在眉睫.

目前人们越来越多的把工作重心转向了利用生物方法防治植物真菌病害. Chen 等^[7]利用枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) B579 在防治黄瓜枯萎病中取得了良好的效果. 管珺等^[8]研究了蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) CMCC63305 的生物防治能力, 结果发现蜡样芽孢杆菌 CMCC63305 代谢液对小麦纹枯病有很好的抑制效果, 对蔬菜灰霉病的抑制率也很高.

解淀粉芽孢杆菌 IMAUB1034^[9]是首次从中国内

收稿日期: 2011-07-07; 修回日期: 2011-10-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20876116; 30900961); 天津市科技计划项目 (10ZCKFNC01600)

作者简介: 宗志友 (1985—), 男, 河北人, 硕士研究生; 通信作者: 王海宽, 副教授, 博士, haikuanwangcn@yahoo.com.cn.

蒙古天然酸粥(naturally fermented congee)中分离出来,其能在极端酸性条件下生长.本文对其性质进行研究后发现,其无菌上清液还能抑制疫霉菌的生长,在盆栽实验中能有效降低甜瓜疫霉病的发生,为解淀粉芽孢杆菌在生物防治植物真菌病害方面的应用提供依据.

1 材料与方法

1.1 菌种来源

解淀粉芽孢杆菌 IMAUB1034 菌株,由内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室提供.

指示菌:甜瓜疫霉菌(*Phytophthora drechsleri* Tucker)、灰葡萄孢霉菌(*Botrytis cinerea*)、番茄早疫病菌(*Alternaria solani*)、甜瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)、苹果炭疽病菌(*Glomerella cingulate*)来源于天津市植物保护研究所.

1.2 培养基

种子培养基(g/L):蛋白胨 10,酵母浸出汁 5, NaCl 10.

发酵培养基:同上.

上述培养基均在 121 °C 灭菌 20 min.

1.3 培养方法

种子培养:接种解淀粉芽孢杆菌 IMAUB1034 于装有 30 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中,在 37 °C、180 r/min 培养 24 h.

发酵培养:取 2%的种子液接种于装有 100 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中,在 37 °C、180 r/min 培养 42 h.

1.4 抑菌活性测定方法

以甜瓜疫霉菌为指示菌,马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA 培养基)作为指示菌的培养基.将发酵好的解淀粉芽孢杆菌菌液经 4 °C、8 000 r/min 离心 20 min 后弃掉沉淀.上清液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,取其 1 mL 与 20 mL 的 PDA 培养基混匀,倒入直径均为 90 mm 的平板中.等培养基凝固后将直径为 5 mm 的霉菌菌块打入 PDA 平板中央.将平板放于 28 °C 恒温箱中培养 4~6 d.将没有混入发酵液的 PDA 平板作空白对照.每个处理 3 次重复,观察抑菌圈直径(d , mm),取平均值.按下式计算抑菌率.

$$\text{抑菌率} = (d_{\text{空白}} - d_{\text{抑菌圈}}) / (d_{\text{空白}} - d_{\text{霉菌菌块}}) \times 100\%$$

1.5 生长时间与抑菌率关系曲线的绘制

将解淀粉芽孢杆菌种子液分别转接到多个装有

30 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中,37 °C、180 r/min 条件下摇瓶培养,每隔 2 h 取出 1 个三角瓶,在 600 nm 下测定吸光度,并用 1.4 所述方法以甜瓜疫霉菌为指示菌测定其抑菌活性.以培养时间为横坐标,以吸光度和抑菌率为纵坐标绘制曲线.

1.6 抗菌谱的确定

采用 1.4 所述方法,测定解淀粉芽孢杆菌无菌上清液的抗菌谱.指示菌采用同样会引发植物真菌病害的霉菌属真菌,例如灰葡萄孢霉菌、甜瓜疫霉菌、甜瓜枯萎病菌、番茄早疫病菌、苹果炭疽病菌.

1.7 性质实验

1.7.1 加热对活性物质抑菌活性的影响

将无菌上清液分别在 40、60、80、100 °C 水浴 60 min,121 °C 处理 20 min 后,用 1.4 所述方法测定其抑菌活性,以未处理的无菌上清液为空白对照.

1.7.2 酶处理对活性物质抑菌活性的影响

无菌上清液 pH 为 7.0,分别加入胰蛋白酶、中性蛋白酶和蛋白酶 K 于 37 °C 水浴处理无菌上清液 2 h,煮沸灭活 3 min 终止酶反应,用 1.4 所述方法测定其抑菌活性,以未处理的无菌上清液为对照.

1.7.3 pH 对活性物质抑菌活性的影响

将原始 pH 为 7.0 的无菌上清液,用 1 mol/L 的 NaOH 和 HCl 分别调至 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0.用 1.4 所述方法测定其抑菌活性.

1.8 盆栽实验

实验用甜椒苗为 5~6 叶,将解淀粉芽孢杆菌无菌上清液浇灌甜椒根部,每株 10 mL.对照灌清水,24 h 后伤根接种甜瓜疫霉菌每株 5 mL,菌液中孢子囊个数为 10^4 mL^{-1} .接种后将植株置于 25 °C 左右,保持植株根部湿润的环境.接种后 5~8 d 调查全部植株的病情并计算病情指数和防治效果^[10].每处理 30 株,重复 2 次.其病情分级标准见表 1.

$$\text{病情指数} = \frac{\sum(\text{病叶数} \times \text{相对级数}) \times 100}{\text{调查总叶数} \times 3}$$

$$\text{防治效果} = \frac{\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数}}{\text{对照病情指数}} \times 100\%$$

表 1 病情分级标准

Tab.1 Standards of disease grades

分级	病情特征
0 级	无病斑
1 级	茎基部病斑水浸状,稍褐变;叶片轻度萎蔫
2 级	全部叶片萎蔫,根及茎部分褐变
3 级	叶片枯死,茎基部大部分褐变或枯死

2 结果与讨论

2.1 生长时间与抑菌率的关系

生长时间与抑菌率关系曲线如图 1 所示. 解淀粉芽孢杆菌在 10 h 左右进入对数期, 当 24 h 左右时对数期结束, 进入稳定期. 同时抑菌率随着时间成线性增加, 当在稳定期 35 h 左右时其无菌上清液的抑菌活性达到最大值为 78%. 在 42 h 稳定期基本结束进入衰亡期, 抑菌率也逐步下降.

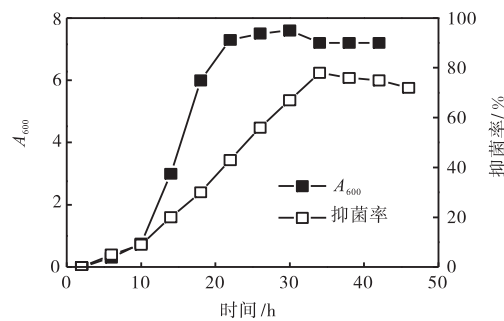


图 1 解淀粉芽孢杆菌 IMAUB1034 抑菌率与其生长时间的关系
Fig.1 Relation of bacteriostatis ratio of *B. amyloliquefaciens* IMAUB1034 and its growth time

2.2 抗菌谱的测定

抗植物致病真菌谱的测定结果见表 2. 解淀粉芽孢杆菌无菌上清液对甜瓜疫霉病菌的抑制效果最好, 达到 78.3%, 对甜瓜枯萎病菌、番茄早疫病菌、苹果炭疽病菌和灰葡萄孢霉菌也具有很高的抑菌活性. 这说明解淀粉芽孢杆菌的抑菌活性物质具有很广的抗菌谱, 能抑制多种植物致病真菌.

表 2 解淀粉芽孢杆菌 IMAUB1034 抗植物致病真菌谱的测定结果

Tab.2 Results of anti-plant pathogenic fungal spectrum of *B. amyloliquefaciens* IMAUB1034

植物致病真菌	抑菌率/%
甜瓜疫霉病菌	78.3 ± 1.5
甜瓜枯萎病菌	76.3 ± 2.5
灰葡萄孢霉菌	66.9 ± 1.6
苹果炭疽病菌	71.0 ± 1.6
番茄早疫病菌	73.6 ± 1.2

2.3 抑菌活性物质的性质

2.3.1 温度对活性物质抑菌活性的影响

经过不同温度处理的实验结果(图 2)发现, 活性物质在 80 ℃ 处理 60 min 后抑菌活性为 65%; 100 ℃ 处理 60 min 后抑菌活性为 54%. 这表明活性物质在高温下仍能保持较高的抑菌活性.

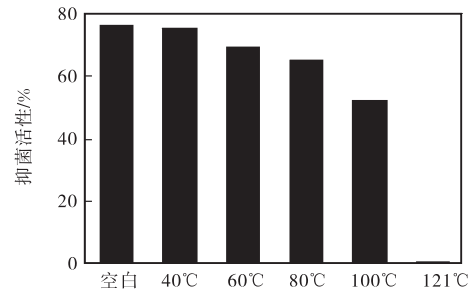


图 2 温度对解淀粉芽孢杆菌 IMAUB1034 抑菌活性的影响
Fig.2 Effect of the temperature on the antifungal activity of *B. amyloliquefaciens* IMAUB1034

2.3.2 酶处理对活性物质抑菌活性的影响

经过酶处理实验的结果(图 3)发现, 活性物质经蛋白酶 K、胰蛋白酶处理后, 活性降低很多, 但是中性蛋白酶处理后抑菌活性损失很少. 这表明无菌上清液中除了可能含有一定的蛋白类抑菌物质外还可能含有其他类的抑菌活性物质, 这有待进一步的研究.

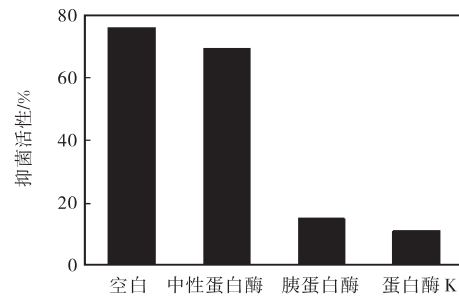


图 3 蛋白酶对解淀粉芽孢杆菌 IMAUB1034 抑菌活性的影响
Fig.3 Effect of protease on the antifungal activity of *B. amyloliquefaciens* IMAUB1034

2.3.3 酸碱对活性物质抑菌活性的影响

经不同 pH 处理活性物质的实验结果(图 4)显示, 活性物质在 pH 2 ~ 12 时仍具有很高的抑菌活性, 在 pH 6.5 ~ 8.0 抑菌活性最高. 这表明无菌上清液中的活性物质耐酸碱, 能适应极端环境.

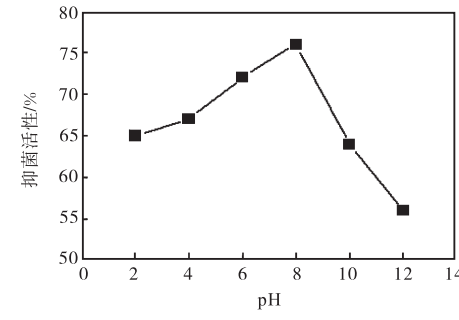


图 4 pH 对解淀粉芽孢杆菌 IMAUB1034 抑菌活性的影响
Fig.4 Effect of pH on the antifungal activity of *B. amyloliquefaciens* IMAUB1034

2.4 盆栽实验

盆栽实验结果见表 3。由表 3 可以看出,在甜椒疫霉病的生物防治中,用解淀粉芽孢杆菌 IMAUB1034 无菌上清液浇灌甜椒根部的病情指数为 40.22,病株率为 82.24%,防治效果为 35.9%。清水对照的病情指数为 62.75,病株率为 93.88%。可见解淀粉芽孢杆菌 IMAUB1034 无菌上清液对甜椒疫霉病具有一定的抑制作用。

表 3 解淀粉芽孢杆菌 IMAUB1034 对甜瓜疫霉病的防治效果

Tab.3 Biocontrol effect of *B. amyloliquefaciens* IMAUB 1034 against the disease caused by *Phytophthora drechsleri* Tucker

处理	病情指数	病株率/%	防治效果/%
解淀粉芽孢杆菌菌液	40.22	82.24	35.90
清水对照	62.75	93.88	

3 结 论

(1)解淀粉芽孢杆菌 IMAUB1034 无菌上清液具有较强的抑菌活性,其抑菌活性随着培养时间的延长成线性增加,在 35~42 h 时抑菌活性达到最大值,这为解淀粉芽孢杆菌培养时间的确定提供了依据。

(2)解淀粉芽孢杆菌 IMAUB1034 无菌上清液能抑制 5 种植物致病霉菌,具有很广的抗菌谱,能够防治多种植物真菌病害。

(3)解淀粉芽孢杆菌 IMAUB1034 无菌上清液中的活性物质能耐高温、耐酸碱,在 pH 2~10 环境下也发挥其生物防病功能。同时在酶处理活性物质的实验中发现,当经蛋白酶 K、胰蛋白酶处理后,抑菌活性降低很多,这说明活性物质多为蛋白类物质。

(4)盆栽实验证明,解淀粉芽孢杆菌 IMAUB1034 无菌上清液对甜椒疫霉病的防治效果达到 35.90%,具有一定的抑制植物真菌病害的作用。

参考文献:

[1] 王英国,王军华,权春善,等. 解淀粉芽孢杆菌抗菌活

性物质的分离纯化及抑菌活性研究[J]. 中国生物工程杂志,2007,27(12):41-45.

[2] 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[J]. 上海农业学报,2006,22(1):109-112.

[3] 马绍国,王惠军,朱建祥,等. 甜椒疫病、根腐病综合防治技术及病毒病致病因素研究初报[J]. 宁夏农林科技,2003(2):7-10.

[4] 方宇,程玲娟,李成印,等. 棚室甜椒疫病发生与综合防治技术[J]. 安徽农学通报,2010,16(8):116-117.

[5] Yang Liping, Xie Jiatao, Jiang Daohong, et al. Antifungal substances produced by *Penicillium oxalicum* strain PY-1-potential antibiotics against plant pathogenic fungi[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008,24(7):909-915.

[6] Baysal O, Caliskan M, Yesilova O. An inhibitory effect of a new *Bacillus subtilis* strain (EU07) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2008,73(1/2/3):25-32.

[7] Chen Fang, Wang Min, Zheng Yu, et al. Quantitative changes of plant defense enzymes and phytohormone in biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt by *Bacillus subtilis* B579[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010,26(4):675-684.

[8] 管珺,杨文革,王瑞荣,等. 蜡样芽孢杆菌 cmcc63305 的促生·抑菌及杀虫作用研究[J]. 安徽农业科学, 2010,38(1):228-230.

[9] Wang Yanyan, Zhang Heping, Zhang Lei, et al. In vitro assessment of probiotic properties of *Bacillus* isolated from naturally fermented congee from Inner Mongolia of China[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010,26(8):1369-1377.

[10] Li Wei, Hu Jiangchun, Wang Shujin. Growth-promotion and biocontrol of cucumber *fusarium* wilt by marine *Bacillus subtilis* 3512A[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2008,39(2):182-185.

责任编辑: 郎婧