

一株抗真菌的解淀粉芽孢杆菌的鉴定及其抗菌性研究

陈成, 崔堂兵, 于平儒

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

摘要: 本实验室从广州地区土壤中分离得到一株产抗真菌物质的菌株 HN06。经检测其对黑曲霉(*Aspergillus niger*)、稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)、水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)和苦瓜枯萎病菌(*Cucurbit wilt*)均有良好的抑制作用。经生理生化实验及 16S rDNA 同源性序列分析, 鉴定该菌株为解淀粉芽孢杆菌。并对其产生的抗真菌物质的部分性质进行了研究。

关键词: 抗真菌; 解淀粉芽孢杆菌; 鉴定

文章编号: 1673-9078(2011)1-36-39

Identification of an Anti-fungal Strain of *Amyloliqefaciens Bacillus* and the Properties of the Antifungal Substance

CHEN Cheng, CUI Tang-bing, YU Ping-ru

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: A bacterial strain HN06 with anti-fungal effect was isolated from the soil in Guangzhou. This strain showed high inhibitory effects on *Aspergillus niger*, *Magnaporthe oryzae*, *Rhizoctonia solani* and *Cucurbit wilt*. It was identified as *Bacillus amyloliqefaciens* by physiological-biochemical properties and phylogenetic analysis of 16S rDNA sequence. And the properties of the antifungal substance produced by HN06 were also studied.

Key words: anti-fungal; *amyloliqefaciens bacillus*; identification

据联合国粮农组织(FAO)统计, 每年因植物遭受病害造成的平均减产量为总产量的 10%~15%^[1], 而植物病害主要是由真菌引起的。目前抑制真菌对植物病害的方法主要化学农药。但是由于其对人类健康的危害、环境的污染和植物病原菌抗性的产生等问题, 使得寻找广谱、高效、低毒的生物农药成为必然。自 1945 年 Johnson 等^[2]报道枯草芽孢杆菌产生抗菌物质后, 各种微生物产生的抗菌物质便引起了广泛关注。芽孢杆菌是自然界中广泛存在的一种非致病性细菌, 能产生多种抗菌物质, 其中大部分是多肽, 主要抑制革兰氏阳性菌; 有些还能抑制革兰氏阴性菌、霉菌和酵母^[3]。解淀粉芽孢杆菌是一种与枯草芽孢杆菌亲缘性很高的细菌, 在近年来的报道中其自身的生长过程中可以产生一系列的代谢产物, 据报道这些代谢产物具有抑制真菌和细菌的活性^[4]。

拮抗细菌 HN06 是本实验室从土壤中分离获得, 对多种植物病原真菌有较强的抑制作用, 有良好的应用前景。本研究通过生理生化特征和 16S rDNA 序列

分析, 对该菌株进行鉴定。并对 HN06 产生的抗真菌物质的特性进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 菌种

指示菌为黑曲霉(*Aspergillus niger*)、稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)、水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)、冬瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)和苦瓜枯萎病菌(*Cucurbit wilt*), 均为本实验室保藏。拮抗菌 HN06 由本实验室分离及保藏。

1.2 培养基

NYD 培养基: 牛肉浸膏 8.0 g/L, 酵母膏 5.0 g/L, 葡萄糖 1.0 g/L, 调至 pH 7.0。

PDA 培养基: 新鲜马铃薯 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 琼脂粉 20 g/L, 调至 pH 7.0。

LB 培养基: 蛋白胨 10 g/L、酵母粉 5 g/L、NaCl 10 g/L、琼脂 2%, 调至 pH 7.0。

1.3 HN06 抗菌物质抗菌谱的测定

抗真菌物质的获得: 将 HN06 菌株适量接种于 NYD 液体培养基, 在温度 30 °C、摇床转速 180 r/min 的条件下培养 48 h。然后在温度 4 °C、转速 5000 r/min

收稿日期: 2010-08-13

基金项目: 广东省科技攻关资助项目(2009B020310006)

作者简介: 陈成(1985-), 男, 硕士研究生, 主要从事酶工程的研究

的条件下离心 20 min。取离心上清液，用 0.22 μm 的滤器过滤后，取滤液进行抗真菌实验。

指示菌悬液的制备：分别取水稻纹枯病等致病菌一环，接入 5 mL 无菌水中，振荡 12 h，制成菌悬液。

抗真菌活性的测定：采用牛津杯检测法。将指示菌悬液 100 μL 均匀涂布于固体 PDA 平板表面，待培养基表面干后放入灭菌的牛津杯，向杯中分别加入 100 μL 待测样品，然后将培养皿于 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 3 d 后，观察抑菌圈的有无并测量其直径大小^[6]。

1.4 菌株生理生化特性分析

观察菌落的形态、大小、边缘、表面、凹凸度、透明度；革兰氏染色及芽孢染色观察菌株形态。具体方法参照《常见细菌系统鉴定手册》^[6]。

1.5 16S rRNA 基因序列分析

以细菌基因组 DNA 为模板，选择细菌 16S rRNA 基因特异性引物 P16sF1: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AGA ACG AAC GCT-3' (与 16S rRNA 5' 端匹配), P16sB1: 5'-TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT CAC CCC-3' (与 16S rRNA 3' 端匹配)。可以扩增出 16S rRNA 的序列 (约 1.5 kb)。委托华大基因公司测序。测序完成后，将得到的序列在 NCBI 上进行 BLAST，选取几株具有代表性的菌株，采用 clustal 软件和 MAGA 软件的进行多序列同源性分析，并构建系统进化树^[7]。

1.6 抗真菌物质的性质研究

1.6.1 温度对抗真菌物质抑菌活性的影响

按照 1.3 中的方法获得抗真菌物质，取 3 mL 于具塞试管中，分别置于 20 $^{\circ}\text{C}$ 、40 $^{\circ}\text{C}$ 、60 $^{\circ}\text{C}$ 、90 $^{\circ}\text{C}$ 和 100 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴中，保温 30 min。冷却后进行抗真菌效果实验。

1.6.2 pH 对抗真菌物质抑菌活性的影响

按照 1.3 中的方法获得抗真菌物质，取 3 mL 于具塞试管中，分别调 pH 到 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0 条件下处理 5 h。然后再依次调 pH 至 7.0，用无菌水定容至 4 mL，进行抗真菌效果实验。

2 结果与讨论

2.1 抗菌谱的测定

由表 1 可以看出，HN06 产生的抗菌物质除了对冬瓜枯萎病菌没有抑菌作用外，对黑曲霉、稻瘟病菌、水稻纹枯病菌具有很强的抑菌作用，对苦瓜枯萎病菌也有一定的抑菌作用。

表 1 HN06 菌株的抗菌谱

Table 1 Antimicrobial spectrum of strain HN06

病原菌 Pathogens	抑菌圈直径/mm
黑曲霉(<i>Aspergillus niger</i>)	25
稻瘟病菌(<i>Magnaporthe oryzae</i>)	27
水稻纹枯病菌(<i>Rhizoctonia solani</i>)	20
冬瓜枯萎病菌(<i>Fusarium oxysporum</i>)	0
苦瓜枯萎病菌(<i>Cucurbit wilt</i>)	10

2.2 形态特征及染色结果

拮抗菌 HN06 革兰氏染色呈阳性，长杆状，产芽孢，有荚膜，稀疏周生鞭毛。在 LB 平板上培养 24 h 后，形成的单菌落类似圆形，边缘不规则，有隆起，表面褶皱，不透明，干燥，菌落呈浅黄色；液体培养静止时有菌膜形成。显微镜下油镜观察，细胞呈杆状，革兰氏染色阳性，产芽孢，芽孢呈椭圆形，有运动性。



图 1 拮抗菌 HN06 菌落形态

Fig.1 Colony morphology antagonistic of HN06



图 2 拮抗菌 HN06 芽孢染色形态

Fig.2 Spore stain morphology of HN06

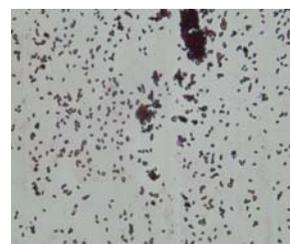


图 3 拮抗菌 HN06 革兰氏染色形态

Fig.3 Gram stain morphology of HN06

2.3 生理生化特征测定结果

主要生理生化特征见表 2。由表 2 可知，HN06 菌株的接触酶、酪氨酸水解、厌氧生长、明胶水解、淀粉水解、V-P 反应和硝酸盐还原均为阳性；酪氨酸水

解、苯丙氨酸脱氨酶、吲哚产生、柠檬酸盐利用均为阴性；可利用 D-葡萄糖、D-甘露醇、麦芽糖、蔗糖。经观察可知，HN06 菌株在 pH 5.6 条件下生长；5% NaCl 下不生长；在 50 °C 下不生长。结合 HN06 菌株的形态特征及染色结果，参照参考文献^[6]，判断 HN06 为芽孢杆菌或类芽孢杆菌属。

表 2 拮抗菌 HN06 的生理生化特征

Table 2 Characteristics of strain HN06

检测项目	特征	检测项目	特征
接触酶	+	硝酸盐还原	+
厌氧生长	+	苯丙氨酸脱氨酶	-
D-葡萄糖	+	柠檬酸盐利用	-
D-甘露醇	+	V-P 反应	+
麦芽糖	+	生长 pH5.6	+
蔗糖	+	2% NaCl	+
酪朊水解	+	5% NaCl	-
明胶水解	+	生长温度: 5 °C	-
淀粉水解	+	生长温度: 30 °C	+
酪氨酸水解	-	生长温度: 50 °C	-

2.4 HN06 的 16S rDNA 序列分析

经 1%琼脂糖凝胶电泳，凝胶成像系统下显示的图像如图 4，引物扩增出的序列长度约为 1.5 kb 左右，符合常规的 16S rDNA 序列长度。测序结果表明，扩增的 16S rDNA 序列全长 1453 bp。

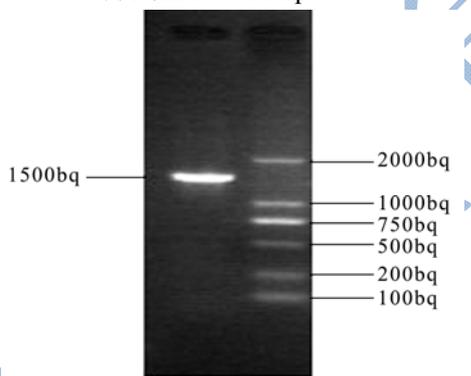


图 4 HN06 的 16S rDNA 电泳结果

Fig.4 16S rDNA PCR amplified spectrum of strain HN06

测序结果为：

AGCTCTGTACCTTCGGCGGCTGGCTCCATAAAGGT
TACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGT
GACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATCACCG
CGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCAC
GCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAAGTGAACAG
ATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGTTTCGCTGCCCTT
TGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAA
GGGCGATGATGATTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGT

TTGTCACCGGCAGTACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGC
TGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTT
AACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGC
ACCACCTGTACTCTGCCCCGAAGGGGACGTCCTATCT
CTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGTTCT
TCGCGTTGCTTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGT
GCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGA
CCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCA
GACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCAT
CGTTTACGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCG
CTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCA
GAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTCTCCACATCTCTAC
GCATTCACCGCTACACGTGGAATTCACCTCTCTCTTCT
GCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTT
GAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTG
CGAGCCCTTACGCCCAATAATTCGGACAACGCTTGCC
ACCTACGTATTACCGCGGTGCTGGCACGTAGTTAGCCGT
GGCTTCTGGTTAGTACCGTCAAGGTGCGGCCCTATTG
AACGGCACTTGTCTTCCCTAACACAGAGCTTACGAT
CCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAG
ACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCC
GTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGA
TCACCCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTCGCTTGGTGA
GCCGTTACCTACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCAT
CTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTCTGAACCA
TGCGGTTACAGACAACCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCC
GGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGTTACCCACGTGTTA
CTCACCCGTCGCGCTAACATCAGGGAGCAAGCTCCCA
TCTGTCCGCTCGACTGCATGTATAGCGATTTAGCACGG

上述碱基序列在 NCBI 数据库上 Blast，构建的系统进化树如图 5。

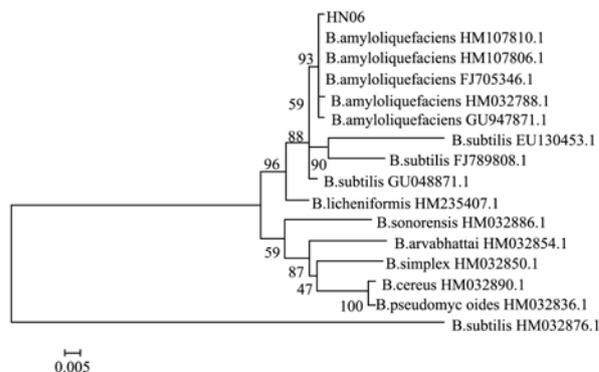


图 5 菌株 HN06 系统发育进化树

Fig.5 phylogenetic tree based on16S rDNA sequence of Bacillus

由图 5 可看出，HN06 菌株的遗传进化距离与芽孢杆菌属最近，它与解淀粉芽孢杆菌（*Bacillus*

amyloliquefaciens) 同处于一个最小的分支, 与已知菌株 *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 的同源性达到 99%。综合 HN06 菌株的形态特征和 16S rDNA 序列分析, 鉴定 HN06 菌株为解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)。

2.5 抗菌物质的性质

2.5.1 温度对抗菌物质活性的影响

抗真菌物质在 40 °C 以下处理 30 min 仍保持原有的抑菌活性, 当温度提高至 60 °C 以上时, 其失去抑菌活性。可见温度较低时, 抗菌物质的活性较高, 而温度过高则影响抗菌物质的活性, 结果见图 6。

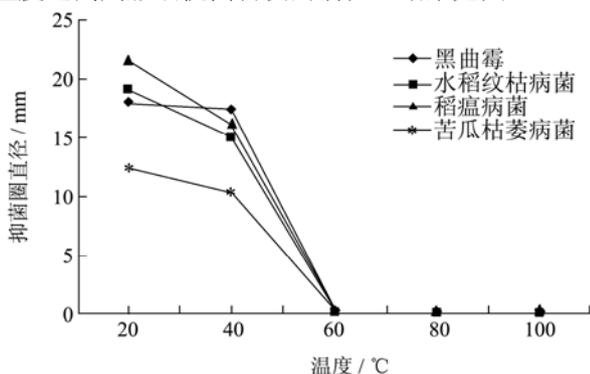


图 6 温度对抗菌物质活性的影响

Fig.6 Effect of temperature on the antifungal substances

2.5.2 pH 对抗菌物质活性的影响

pH 值对抗真菌物质稳定性的影响见图 7, 在酸性条件下抗菌物质容易失活, pH 低于 4 时, 完全失去了抑菌活性, 而在中性及碱性 (pH 在 6~10 范围) 条件下抑菌活性高, 当 pH 在 7~8 范围内, 抑菌活性最高。

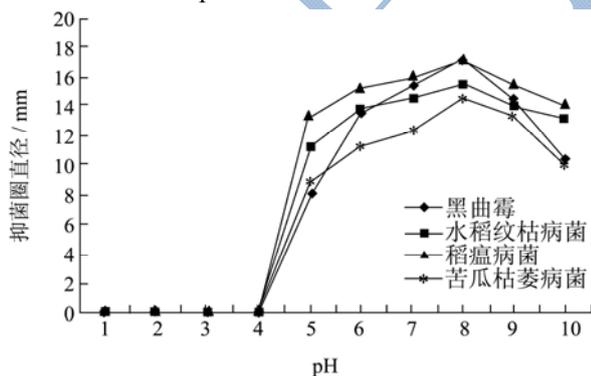


图 7 pH 对抗菌物质活性的影响

Fig.7 Effect of pH on the antifungal substances

3 结论

芽孢杆菌繁殖能力强, 有利于工业化生产, 对人畜无害, 不污染环境。芽孢杆菌产生的抗菌活性物质大多为低分子抗生素以及蛋白或多肽类化合物。对抗

真菌活性物质的研究以枯草芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、多黏性芽孢杆菌居多, 近年来对解淀粉芽孢杆菌研究逐渐增多, 其产抗真菌物质主要有抗真菌蛋白^[8]、伊枯草菌素、几丁质酶^[9]等。

基于细菌的生理生化特征和 16S rDNA 序列分析建立的系统进化树, 基本确定了 HN06 为解淀粉芽孢杆菌。微生物之间的拮抗现象早已被认识和广泛应用, 从自然界寻找和筛选新的抗菌物质是微生物研究的重要内容。通过对其产生的抗真菌物质性质研究发现, 该菌株产生的抗真菌活性物质在 pH 5~10 的范围内都有活性, 在 pH 7~8 的范围内活性最高, 在温度 40 °C 以下有较好的抗菌活性。因此, 有望将 HN06 菌株产生的抗菌物质开发成生物农药, 在农业生产上具有良好的应用前景。

参考文献

- [1] 刘志俊,段渝峰.生物农药新概念新发展[J].农药科学与管理,2003,24(7):28-32
- [2] Maget Dana R, Peypoux F Iturins. A special class of pore forming lip peptides: biological and hysicochemical properties [J]. Toxicology, 1994, 87: 151-174
- [3] 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[J].微生物学报,2004,44(4):511-513
- [4] 权春善,王军华,徐洪涛,等.一株抗真菌解淀粉芽孢杆菌的分离鉴定及其发酵条件的初步研究[J].微生物学报,2006, 46(1):7-12
- [5] 崔堂兵,刘煜平,郭勇,等.枯草芽孢杆菌培养生产农用抗真菌素初步研究[J].广东农业科学,2007,1:51-54
- [6] 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
- [7] Quan C S, Liu Q, Tian W J, et al. Biodegradation of an endocrine-disrupting chemical, di-2-ethylhexyl phthalate, by *Bacillus subtilis* No.66 [J]. Appl Microbio Biotech, 2005, 66: 701-710
- [8] Kim P I, Chung K C. Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908 [J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 234(1): 177-183
- [9] Wang S L, Shih I L, Liang T W, et al. Purification and characterization of two antifungal chitinases extracellularly produced by *Bacillus amyloliquefaciens* V656 in a shrimp and crab shell powder medium [J]. J Agric Food Chem, 2002, 50(8): 2241-2248