

菌株 BS-3 的鉴定及其真菌抑制活性的初步研究

胡云广, 柴海云, 崔堂兵

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

摘要: 从土壤中分离得到一株对多种植物病原真菌具有抑制作用的菌株, 将其命名为 BS-3。该菌株对水稻纹枯病、稻瘟病、苦瓜枯萎病等病原真菌均有较强抑制作用。通过对菌株 BS-3 的 16S rDNA 的序列测定和同源性比对, 发现它与 *Bacillus licheniformis*、*Bacillus subtilis*、*Bacillus amyloliquefaciens* 等的 16S rDNA 有高达 100% 的同源性, 结合形态和生理生化鉴定指标, 将其鉴定为地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis*。选用受其抑制作用较明显的水稻纹枯病病原真菌瓜亡革菌 (*Thanatephorus cucumeris*) 作为指示菌, 牛津杯法检测 BS-3 菌株发酵产物的抑菌活性。结果表明 BS-3 菌株的发酵上清液滤液、硫酸铵处理离心沉淀对水稻纹枯病菌有较强抑菌活性。此外, 该抗真菌物质具有较强热稳定性。

关键词: 菌种鉴定; 水稻纹枯病; 抑真菌活性

文章编号: 1673-9078(2012)2-147-151

Identification of the Strain BS-3 and Preliminary Study on the Characterization of the Antifungal Substance

HU Yun-guang, CHAI Hai-yun, CUI Tang-bing

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

Abstract: A strain of inhibition to many kinds of plant pathogenic fungi, named BS-3, was isolated from soils. The strain had quite strong fungistatic activities on plant pathogenic fungi such as rice sheath blight, rice blast. It had 100% homologous to *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* by 16S rDNA sequences BLAST analysis plus the results of morphological and biochemical parameters. It was confirmed as a strain of *Bacillus licheniformis*. Using rice sheath blight fungus *Thanatephorus cucumeris* as the indicator bacteria, inhibition zone method was chosen to detect antifungal activity of fermentation product belong to the strain BS-3. The results showed that the fermentation liquor after the treatment of centrifuging and 50% saturated ammonium sulfate had quite strong fungistatic activities. In addition, the antifungal substances had strong thermostability.

Key words: strain identification; rice sheath blight; antifungal activity

地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 是一种土壤常见细菌, 革兰氏阳性, 嗜热。该菌最适生长温度大约为 50 ℃, 并且能在更高的温度下存活。该菌能产多种蛋白酶, 酶分泌的最适温度为 37 ℃。它是芽孢杆菌中最具应用潜力的菌种之一, 被广泛应用于医药、农药、食品、饲料加工、环境污染治理等各个行业^[1]。它也是常用工业微生物生产菌种, 在纸浆发酵、高温淀粉酶生产、蛋白酶生产和氨基酸生产等领域发挥重要作用^[2]。该菌可促使机体产生抗菌活性物质、杀灭致病菌, 并具有独特的生物夺氧作用机制, 能抑制致病菌的生长繁殖, 调整菌群失调, 因此作为“整肠生”的主要成分而被广泛使用。由于地衣芽孢杆菌具有广泛且重要的应用价值, 因此值得深入研究。

目前对地衣芽孢杆菌的研究主要集中在饲料加工

及医药应用等方面, 而对植物病害防治等方面的研究还较欠缺。本实验分离到的地衣芽孢芽孢 BS-3 对多种植物病原真菌有较强生长抑制作用, 经检验, 其对水稻纹枯病、稻瘟病、苦瓜枯萎病、黑曲霉等真菌能起到有效的生长抑制。本实验就选用受其抑制作用较为明显、对水稻危害严重的水稻纹枯病作为指示菌检测其真菌抑制活性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

BS-03 菌株分离自广州大学城华南理工大学附近土壤; 水稻纹枯病病原菌瓜亡革菌 (*Thanatephorus cucumeris*) 为省农科院水稻研究所保存。

1.2 菌株鉴定

本实验鉴定过程严格参照《伯杰细菌鉴定手册》(第九版)^[3]、《常见细菌系统鉴定手册》^[4]、《分子克

收稿日期: 2011-11-08

作者简介: 胡云广 (1986-), 男, 硕士研究生, 研究方向为发酵工程

隆实验指南》(第三版)^[5]等对该菌株的形态特性、群体特征、生理生化特征以及 16S rDNA 序列分析结果对其进行鉴定。

其中 16S rDNA 测序过程中 PCR 反应体系、PCR 反应程序等如表 1 所示^[6]：

表 1 PCR 反应体系 (50 μ L)

Table 1 PCR reaction system (50 μ L)

成分	终浓度	实际用量
浓缩反应缓冲液(10 \times buffer)	1 \times 工作浓度	5 μ L
dNTP 混合物(10 mmol)	各 0.2 mol/L	1 μ L
Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)	0.5-1.0 U/50 μ L	0.5 μ L
氯化镁(MgCl ₂)(25 mmol)	1.5 mmol/L	5 μ L
上游引物(10 pmol/ μ L)	1 μ mol/L	1 μ L
下游引物(10 pmol/ μ L)	1 μ mol/L	1 μ L
模板	102~105 拷贝/50 μ L	1 μ L
无菌水	将反应体积补足至 50 μ L	35.5 μ L

反应引物分别为 F27 (5'-AGAGTTTGATCCTG GCTCAG-3') 及 R1522 (5'-AAGGAGGTGATCCA GCCGA-3')。PCR 反应程序：94 $^{\circ}$ C 变性 5 min 后进入循环：94 $^{\circ}$ C 1 min \rightarrow 56 $^{\circ}$ C 1 min \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 2 min，共 30 个循环，最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min^[5]。然后将扩增产物送上海英骏生物技术有限公司进行测序，最后将测得的碱基序列与通过 Genbank 数据库搜索到的同源序列，用 ClustalX 进行序列比对，然后用 Phylipwy 3.65 软件进行系统发育分析^[2,6]。

1.3 培养基和发酵条件

马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA) 和马铃薯葡萄糖培养液 (PD) 分别用于水稻纹枯病原菌的培养^[7]。发酵培养基成分和发酵条件为：葡萄糖 15.0 g/L、大豆蛋白胨 5.0 g/L、KCl 0.5 g/L、MgSO₄ 0.7 g/L、吐温~80 1.0 g/L、初始 pH 7.5、接种量 7.5%、摇床转速 200 r/min、发酵温度 28 $^{\circ}$ C。

1.4 BS-3 号菌发酵液处理与抑菌活性测定

BS-3 菌株发酵液经 6000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 20 min，上清液用微孔滤膜过滤 (滤膜孔径 0.45 μ m)，滤液即为发酵上清液滤液^[6]。将该滤液用 50%饱和度硫酸铵沉淀，过夜，6000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 20 min，沉淀溶于 0.02 mol/L pH 6.8 磷酸盐缓冲溶液中，该沉淀溶解液即为硫酸铵处理离心沉淀，上清液即为硫酸铵处理离心上清液。用改进的牛津杯法^[8,9]分别测定发酵上清液滤液、硫酸铵处理后离心沉淀和上清液的抑菌活性。其中改进的抑菌圈法方法如下：用含 15%甘油和 0.5% NaCl 的吐温-60 缓冲液冲洗长满水稻纹枯病菌孢子的 PDA 平板，制成孢子悬液后分装成 5 mL 每份于-20 $^{\circ}$ C 保存。PDA 平板中加入 200 μ L 水稻纹枯病孢子悬液，

涂布均匀后倒置于 30 $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养孵化孢子 3~5 h 后取出，将已灭菌的牛津杯等间隔置于接种有真菌孢子的 PDA 平板上，然后分别将发酵上清液滤液、硫酸铵处理后离心沉淀和上清液 200 μ L 加入牛津杯中，30 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 2~3 d 后观察抑菌圈大小。

1.5 抗菌物质热稳定性实验

分别测定不同处理温度和处理时间对硫酸铵处理离心沉淀热稳定性的影响。

处理温度热稳定性实验方法：将抗真菌物质分别经 50 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、70 $^{\circ}$ C、80 $^{\circ}$ C 和 90 $^{\circ}$ C 处理 30 min，使用牛津杯法测定处理后抗菌物质的抑菌活性，以未经处理的抗真菌物质为对照 (CK)，将对照的抑菌率定为 100%。

处理时间热稳定性实验方法：将抗真菌物质置于 70 $^{\circ}$ C 水浴锅中分别处理 2、4、6、8 h，然后测定处理产物的抑菌活性，以未经处理的抗真菌物质为对照 (CK)，同样将对照的相对抑菌率定为 100%^[10,11]。

2 结果与分析

2.1 BS-3 的生物学特性及生理生化特征

BS-3 菌株菌落表面干燥皱缩，不透明，中间向上隆起，菌落边缘乳白色，不整齐，呈锯齿状 (见图 1)。其液体培养基表面形成膜。革兰氏染色呈紫色 (见图 2)，杆状，有芽孢 (见图 3)，菌体单个或成对排列。



图 1 BS-3 菌株菌落形态

Fig.1 Colonial morphology of BS-3



图 2 BS-3 菌株革兰氏染色图 (1000 \times)

Fig.2 Gram stain figure of BS-3

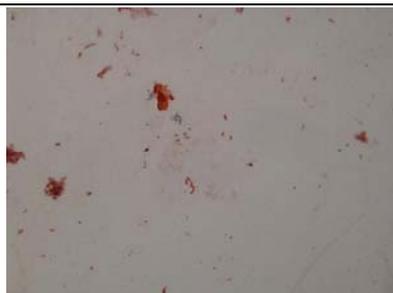


图3 BS-3 菌株芽孢染色图 (1000×)

Fig.3 Spore staining figure of BS-3

随后, 通过菌种鉴定生理生化实验对 BS-3 菌株依次进行属和种的鉴定, 实验结果分别见表 2 和表 3。

表 2 BS-3 菌株生理生化特性(属)

Table 2 Physio-biochemical characteristics of BS-3 (Generic)

生理生化特征	测定结果
革兰氏染色	G+
接触酶实验	+
氧化酶实验	-
厌氧生长试验	-
V-P 试验	+
硝酸盐还原试验	+

注: “+”阳性反应; “-”阴性反应

根据以上形态特征观察结果及部分生理生化实验结果(表 2), 查《常见细菌系统鉴定手册》可知, 菌种属于芽孢杆菌属 (*Bacillus sp.*)。根据此类菌的生理生化特性继续做生理生化试验以鉴定到种。

根据表 3 形态特征进行观察及生理生化试验结果, 查《伯杰细菌鉴定手册》及《常见细菌系统鉴定手册》可知, 菌种 BS-3 与地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 最相似。

2.2 BS-3 菌株的 16S rDNA 同源性比对

根据 ClustalX 序列比对结果, BS-3 菌株与 *Bacillus Subtilis*、*Bacillus amyloliquefaciens*、*Bacillus licheniformis*、*Bacillus mucilaginosus*、*Bacillus velezensis*、*Bacillus polyfermenticus*、*Bacillus vallismortis* 具最高同源性达 100%。

2.3 系统发育分析

对 BS-3 菌株及与它同源性最高的芽孢杆菌的 16S rDNA 全序列进行遗传距离计算(BS-3 菌株 16S rDNA 在 Genbank 中 Accession No. JN867130), 并根据遗传距离得到系统发育树(图 4), 可见与 BS-3 菌株在进化上距离相近的菌株很多, 他们分别是 *Bacillus subtilis*、*Bacillus amyloliquefaciens*、*Bacillus velezensis*、*Bacillus mucilaginosus*、*Bacillus licheniformis*、*Bacillus vallismortis*、*Bacillus polyfermenticus*, 因此可以判定 BS-3 菌株属于芽孢杆菌属 *Bacillus sp.*。

2.4 抑菌活性测定

在涂布有水稻纹枯病原真菌孢子的 PDA 平板上等间隔立 3 个牛津杯, 牛津杯内分别加入 200 μL 地衣芽孢杆菌 BS-3 菌株的发酵上清液滤液、硫酸铵处理后离心沉淀和上清液进行抑真菌实验, 结果表明地衣芽孢杆菌 BS-3 菌株的发酵上清液滤液、硫酸铵处理后离心沉淀具有较强抑真菌功能^[12,13], 抑菌圈平均直径分别为 30.5 mm 和 24.6 mm, 而硫酸铵处理后离心上清液未观察到有抑菌圈, 实验结果见图 5。由此说明, 50%饱和度硫酸铵能使抗真菌物质几乎完全沉淀。

表 3 BS-3 菌株生理生化特性(种)

Table 3 Physio-biochemical characteristics of BS-3(Specific)

生理生化特征	测定结果
淀粉水解实验	+
明胶液化实验	+
糖、醇类发酵试验:	
D-葡萄糖	+
L-阿拉伯糖	+
D-甘露醇	+
D-木糖	+
葡萄糖产气	-
运动性	+
苯丙氨酸脱氨酶试验	
	-
耐盐性试验:	
2%NaCl	+
5%NaCl	+
7%NaCl	-
10%NaCl	-
柠檬酸盐利用	+
生长 PH 值试验:	
pH 6.8 营养肉汤	+
pH 5.7 营养肉汤	+
卵磷脂酶试验	-
吲哚试验	-
生长温度:	
30 °C	+
40 °C	+
50 °C	+
60 °C	-
酪素水解试验	+
酪氨酸水解试验	-
丙酸盐利用试验	+

注: “+”阳性反应; “-”阴性反应

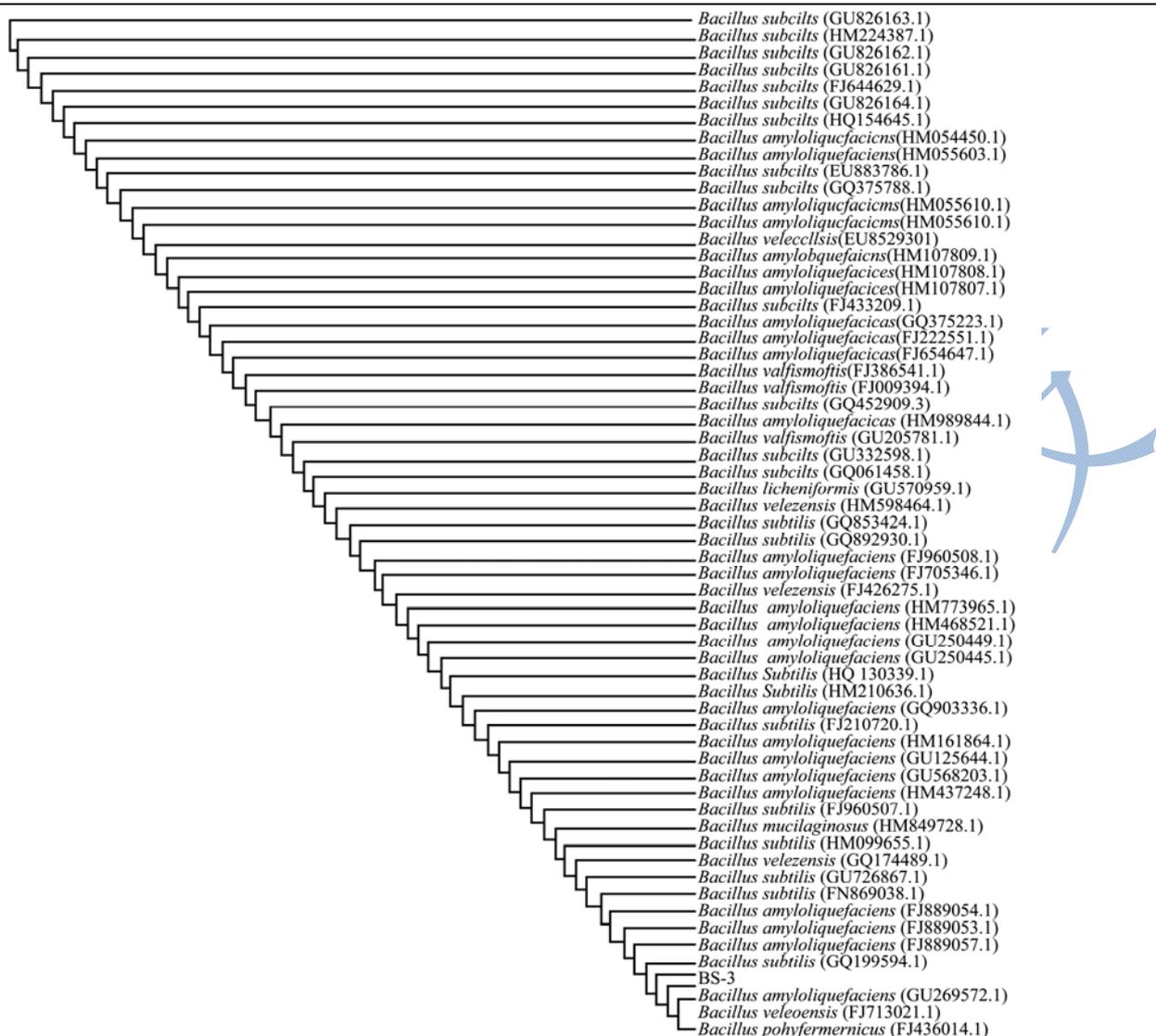


图4 BS-3 菌株的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree of BS-3

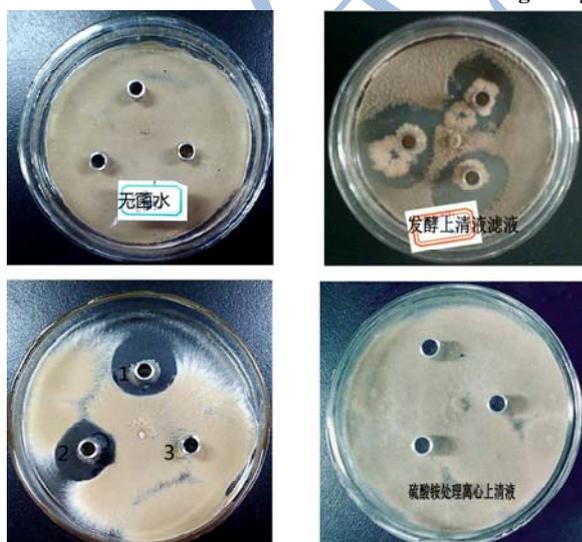


图5 抑真菌活性实验结果

Fig.5 The results of antifungal activity

注: 1, 2 为硫酸铵处理后离心沉淀; 3 为无菌水。

2.5 抑真菌物质热稳定性

分别测定温度以及热处理时间对 BS-3 菌株抗真菌物质热稳定性的影响, 使用牛津杯法进行抑菌活性的测定, 结果如表 4、表 5 所示。

表 4 温度对抗真菌物质热稳定性的影响

Table 4 The influence of temperature to the thermostability of the antifungal substance

处理温度/℃	抑菌圈直径/mm	相对抑菌率/%
50	24.4	98.8
60	24.1	97.6
70	24.0	97.2
80	20.4	82.6
90	16.5	66.8
CK	24.7	100

由表 4 可知, BS-3 菌株抗真菌物质在 50 ℃、60 ℃ 和 70 ℃ 加热 30 min 后, 其相对抑菌率均在 95% 以上;

在 80 °C 加热 30 min 后, 其相对抑菌率稍有降低; 当加热温度升高到 90 °C 时, 其相对抑菌率降至 66.8%。如表 5 所示, 在 70 °C 水浴中分别处理 2、4、6、8 h 后, 发酵液中的抗菌物质的抗菌活性均有所下降, 但是随着处理时间的不断增加, 其抗菌活性没有显著变化。综上所述, 可以看出该抗真菌物质热稳定性较好, 对高温具有较强耐受性。

表 5 处理时间对抗真菌物质热稳定性的影响

Table 5 The influence of treatment time to the thermostability of the antifungal substance

处理时间/h	抑菌圈直径/mm	相对抑菌率/%
2	16.4	66.4
4	16.1	65.2
6	15.8	64.0
8	16.0	64.8
CK	24.7	100

3 讨论

目前对地衣芽孢杆菌的研究还甚少, 尤其是对具有抑菌活性的发酵产物的研究, 因此研究其抑菌产物意义重大。通过形态学观察, 生理生化特性和 16S rDNA 序列的分析得出该革兰氏阳性杆状细菌 BS-3 为地衣芽孢杆菌。该菌发酵产物有较强的抑菌活性, 且具有较强热稳定性, 因此可以作为良好的生防菌。但该抗真菌物质的性质还不能确定, 因此尚需进一步的实验对其进行分离纯化, 以获得该物质的结构特征及生理生化特性。

参考文献

- [1] Kim Y O, Cho J Y, Kuk J H, et al. Identification and antimicrobial activity of phenylacetic acid produced by *Bacillus licheniformis* isolated from fermented soybean [J]. *Microbiology*, 2004, 48(1): 312-317
- [2] 马凯, 刘光全, 程池. 地衣芽孢杆菌 16S rRNA 基因的 TD-PCR 扩增及系统发育分析[J]. *微生物学通报*, 2007, 34(4): 709-711
- [3] 布坎南 R.E., 吉本斯 N.E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1994
- [4] 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
- [5] Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory press, 2001
- [6] 潘园园, 陈雯莉, 黄巧云. 一株抗重金属铜镉细菌的分离、鉴定及其 16S rDNA 的序列分析[J]. *微生物学通报*, 2005, 32(3): 68-72
- [7] 唐丽娟, 纪兆林, 徐敬友, 等. 地衣芽孢杆菌 W10 对灰葡萄孢的抑制作用及其抗菌物质[J]. *中国生物防治*, 2005, 21(3): 203-205
- [8] 赵凤梅. 地衣芽孢杆菌抑真菌作用及相关基因的研究[D]. 南开大学硕士学位论文, 2004
- [9] Antonio Gdlvez, Mercedes Maqueda, Manuel Martlnez-Bueno, et al. Isolation and physico-chemical characterization of an antifungal and antibacterial peptide produced by *Bacillus licheniformis* A12 [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1993, 39: 438-442
- [10] 赵丽华. 枯草芽孢杆菌拮抗菌株 B29 活性物质形成条件研究及其抗菌蛋白的分离纯化[D]. 黑龙江大学, 2007
- [11] 何青芳, 陈卫良, 马志超. 枯草芽孢杆菌 A30 菌株产生的拮抗肽的分离纯化与理化性质研究[J]. *中国水稻科学*, 2002, 16(4): 361-365
- [12] 李应琼, 崔堂兵, 许喜林, 等. 枯草芽孢杆菌 BS-06 抗真菌物质的特性研究[J]. *现代食品科技*, 2009, 25(4): 382-384
- [13] 陈成, 崔堂兵, 于平儒. 一株抗真菌的解淀粉芽孢杆菌的鉴定及其抗菌性研究[J]. *现代食品科技*, 2011, 27(1): 36-39