

文章编号: 1674-7054(2013)01-0036-09

橡胶树枯草芽孢杆菌 Czk1 抑菌 活性物质的理化性质

樊兰艳¹, 贺春萍^{2,3,4}, 梁艳琼^{2,3,4}, 郑肖兰^{2,3,4}, 吴伟怀^{2,3,4}, 李锐^{2,3,4}, 郑服丛¹

(1. 海南大学 环境与植物保护学院, 海南 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院 环境与植物保护研究所/海南省热带作物病虫害生物防治工程技术研究中心, 海南 儋州 571737; 3. 农业部热带作物有害生物综合治理重点实验室, 海南 儋州 571737; 4. 海南省热带农业有害生物监测与控制重点实验室, 海南 儋州 571737)

摘要: 采用杯碟法和生长速率法, 对橡胶树枯草芽孢杆菌菌株 Czk1 发酵液中活性物质进行了初步定位。结果表明: 活性物质属于胞外分泌型代谢产物, 存在于发酵上清液中。理化性质的研究表明, 其抗菌物质表现出耐高温、不耐强酸碱, 对紫外线和蛋白酶 K 不敏感, 以及对 5 种常见的金属离子溶液、有机溶剂具有不敏感的特性; 采用酸沉淀后甲醇抽提的方法可提取该活性物质。Czk1 培养条件的单因子实验结果表明, YPD 培养基作为该菌株的发酵液培养基, 初始 pH 值为 7.0, 以 7% 接种量接种, 摇床培养 (28 ℃, 180 r · min⁻¹) 3 d, Czk1 表现出对病原菌最佳的拮抗活性。

关键词: 枯草芽孢杆菌; Czk1; 活性物质; 生物学性质; 橡胶树

中图分类号: S 476; S 435.76

文献标志码: A

橡胶是全球重要的工业原料和战略物资, 橡胶树病害是阻碍天然橡胶产业顺利发展的重要因素。炭疽病及根病是我国橡胶树的重要病害, 目前防治这两类病害的方法主要是化学防治, 由此造成的环境污染、农药残留以及抗药性等诸多问题已引起人们的广泛关注。枯草芽孢杆菌是一种广泛存在且重要的生防细菌, 具有极易分离和培养、生长速度快、营养简单、产生多种抗菌素和酶等优点。目前, 利用枯草芽孢杆菌防治植物病害已成为研究热点, 但利用其防治橡胶树病害的研究未见报道, 对橡胶树病害进行生物防治方面的研究仍处于起步阶段。枯草芽孢杆菌 Czk1 是从橡胶树木质部分离到的 1 株细菌, 前期实验结果^[1]表明, 该菌株对橡胶树红根病 *Ganoderma pseudoferreum* (Wakef.) Over. etsteinm、褐根病 *Phellinus noxius* Corner、紫根病 *Helicobasidium compactum* Boed、白根病 *Rigidoprus lignosus* (Klotzsch) Imaz、臭根病 *Sphaerostilbe repens* Berk. et. Br. 以及橡胶树炭疽病 *Colletotrichum gloeosporioides* 等病原菌具有良好的抑制作用, 具有较好的开发前景, 尤其是微生物农药的潜力, 其抑菌成分的定位和提取对进一步研究至关重要。为此, 笔者对菌株 Czk1 活性成分产生部位进行分析, 测定菌株 Czk1 的抑菌物质对温度、紫外线、酸碱性和有机溶剂等耐受性, 且通过单因子实验筛选出具有最佳拮抗活性的培养基, 进一步研究接种量、培养时间及其培养基初始 pH 值对活性的影响, 旨在为抑菌物质的分离纯化以及后续的开发应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 病原指示菌橡胶树红根病菌 *Ganoderma pseudoferreum* (Wakef.) Over. etsteinm 菌株 GP-010、褐根病菌 *Phellinus noxius* Corner 菌株 Pn-006、紫根病菌 *Helicobasidium compactum* Boed 菌株 Hr-001、

收稿日期: 2012-12-22

基金项目: 国家天然橡胶产业技术体系病虫害防控专家岗位项目 (nycytx-34-GW2-4-3, CARS-34-GW8), 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2012hysJ021), 海南大学“211 工程”建设项目

作者简介: 樊兰艳 (1986-), 女, 壮族, 广西来宾人, 海南大学环境与植物保护学院 2010 级硕士研究生。

通信作者: 郑服丛 (1956-), 男, 教授, E-mail: zhengfucong126@.com

臭根病菌 *Sphaerostilbe repens* Berk. et. Br. 菌株 Sr-001、白根病菌 *Rigidoprus lignosus* (Klotzsch) Imaz 菌株 RL-001 和橡胶树炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 菌株 RC178, 生防菌枯草芽孢杆菌 Czk1 (分离自橡胶树木质部) 均由中国热带农业科学院环境与植物保护研究所分离、鉴定并保存。

1.1.2 培养基 1) LB 培养基: 胰蛋白胨 10 g, 酵母浸出粉 5 g, NaCl 10 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH7.0~7.2; 2) 发酵液培养基^[1]: $w=2\%$ 的葡萄糖, $\mu=1\%$ 的氮源酵母浸出物 + 胰蛋白胨 + 氯化铵 (2:2:1), $\mu=0.3\%$ 的无机盐磷酸氢二钠 + $w=0.1\%$ 的磷酸二氢钠, pH7.5; 3) PDB 培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 固体加琼脂 15 g, 水 1 000 mL, pH7.0。4) BPY 培养基: 牛肉浸出粉 5 g, 蛋白胨 5 g, 酵母膏 5 g, NaCl 5 g, 葡萄糖 5 g, 水 1 000 mL, pH7.0~7.2。5) YPD 培养基 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): $w=1\%$ 的酵母膏, $\mu=2\%$ 的蛋白胨, $\mu=2\%$ 的葡萄糖, pH7.0~7.2。6) NB 培养基: 蛋白胨 10 g, 牛肉粉 3 g, NaCl 5 g, 水 1 000 mL, pH7.0~7.2。7) KMB 培养基: 蛋白胨 20 g, MgCl_2 1.4 g, K_2SO_4 10 g, 甘油 10 mL, 加水至 1 L, pH7.0~7.2。8) Landy 培养基: 葡萄糖 20 g, L-谷氨酸 5 g, MgSO_4 0.5 g, KCl 0.5 g, KH_2PO_4 1 g, L-苯丙氨酸 2.0 mg, MnSO_4 5.0 mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.16 mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15 mg。所有培养基均在 0.1 MPa, 121℃ 下灭菌 30 min。

1.2 方法

1.2.1 枯草芽孢杆菌 Czk1 发酵液中活性物质的初步定位 采用杯碟法和生长速率法, 以橡胶树 5 种根病病原菌和橡胶树炭疽病病原菌为指示菌, 测定发酵上清液以及菌体破碎液的活性。具体做法如下: 将菌株 Czk1 活化后, 挑取单菌落置于 LB 液体培养基中摇床培养 (28℃, $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 12 h, 按照 5% 的接种量接种到发酵液培养基中摇床培养 (28℃, $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 72 h, 离心 (4℃, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 15 min, 得到发酵上清液和菌体沉淀。发酵上清液经 0.22 μm 细菌过滤器过滤后置于 4℃ 冰箱备用; 菌体部分^[2]用 $w=0.85\%$ 的 NaCl 溶液洗涤 2 次, 置于 -20℃ 冰箱过夜, 解冻后用 5 倍体积的 $w=0.85\%$ 的 NaCl 溶液悬浮, 置于冰上, 用超声破碎仪对细胞进行间隔破碎, 条件参考文献 [3], 即: 20 kHz, 450 W, 破碎 2 min, 停 2 min, 共破碎 30 min。然后离心 (4℃, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 15 min, 取上清液, 过 0.22 μm 细菌过滤器得到菌体破碎液。

1) 杯碟法: 制备好 PDA 平板, 在平板中间接种病原菌, 在距病原菌 2 cm 处分别放置 2 或 4 个牛津杯。杯碟中各加入 100 μL 上述处理液, 以无菌水为对照。病原菌置于 28℃ 恒温箱中培养, 待菌落长至一定程度, 观察病原菌有无抑菌带产生。试验设置 5 次重复。

2) 生长速率法: 将 PDA 培养基制成含毒培养介质, 每 100 mL 的 PDA 培养基中分别加入 2 mL 上述处理液, 混匀后倒于 5 个平板, 以无菌水为对照, 发酵上清液和菌体破碎液为处理。病原菌置于 28℃ 恒温箱中培养, 待菌落长至培养皿 2/3 以上, 十字交叉法测量菌落直径。

抑制率 = (对照菌落直径 - 处理菌落直径) / 对照菌落直径 $\times 100\%$ 。

1.2.2 Czk1 发酵上清液对温度、pH 值、紫外线和蛋白酶 K 的耐受性测定 以橡胶树红根病菌 *Ganoderma pseudoferreum* (Wakef.) Over. etsteinm 菌株 GP-010 为指示菌, 测定菌株 Czk1 发酵上清液对温度、pH 值、紫外线和蛋白酶 K 的耐受性。在 PDA 平板中间接种橡胶树红根病病原菌, 在距病原菌 2 cm 处分别对称放置 2 个牛津杯。杯碟中各加入 100 μL 上述处理液, 以无菌水和原液为对照。病原菌置于 28℃ 恒温箱中培养, 待菌落长至一定程度, 记录抑菌带产生情况, 并测量菌落直径 (mm)。

抑制率 = (对照菌落直径 - 处理菌落直径) / 对照菌落直径 $\times 100\%$ 。

1) Czk1 发酵上清液对温度的敏感性 将发酵上清液过细菌过滤器后, 各取 2 mL 于 40、60、80、100℃ 的水浴锅中水浴处理 1 h, 121℃ 高温灭菌 30 min, 以无菌水和未处理的上清液 (27℃) 为对照, 测定对橡胶树红根病菌的抑制活性。

2) Czk1 发酵上清液对 pH 敏感性 取发酵上清液分别用 1 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCl 溶液或 1 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液调节 pH 值为 2~12, 将其离心 (4℃, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 15 min) 后取上清液, 用 0.22 μm 细菌过滤器过滤后置于 4℃ 冰箱中备用。

3) Czk1 发酵上清液对紫外线敏感性 将上清液过细菌过滤器后, 打开盖子置于超净工作台 20 W 紫外灯下距离灯管 10 cm 处连续照射 4 h 后取出, 检测对橡胶树红根病菌的活性。

4) Czk1 发酵上清液对蛋白酶 K 敏感性 蛋白酶 K 的配置方法参考《分子克隆实验指南》第 3 版^[4],

将蛋白酶 K 配置成质量浓度为 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的母液,分装,置于 -20°C 冰箱中保存,备用。使用时,取 $50 \mu\text{L}$ 体积母液加入 1 mL 的无菌滤液中,使其反应成质量浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,反应体系在 37°C 水浴锅中温育 1 h 后取出,备用。以橡胶树红根病菌 *Ganoderma pseudoferreum* (Wakef.) Over. etsteinm 菌株 GP-010 检测各处理液的活性。

1.2.3 Czk1 发酵上清液对有机溶剂的敏感性测定 各取 1 mL 发酵上清液,分别加入等体积的甲醇、乙醇、丙酮和乙腈 4 种有机溶剂,混匀,室温放置 30 min 备用。以原液、加入等体积有机溶剂的无菌水为对照,以橡胶树炭疽病菌为指示菌测定活性。取 $100 \mu\text{L}$ 菌液浓度为 $10^6 \sim 10^8 / \text{mL}$ 炭疽病菌孢子悬浮液均匀涂布于 PDA 平板上,待晾干后在平板距中心 2 cm 处放置牛津杯,杯碟中加入 $100 \mu\text{L}$ 各处理液,测量抑菌圈直径 (mm)。

1.2.4 Czk1 发酵上清液对金属离子的敏感性测定 配置常见的金属离子 Cu^{2+} , Fe^{3+} , Na^+ , Mn^{2+} , Mg^{2+} 溶液,使其浓度均为 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,使用时,取 1 mL 发酵液加入 $100 \mu\text{L}$ 各金属离子溶液,以无菌水为对照,RC-478 为指示菌,方法同 1.2.3。测量各处理抑菌圈直径 (mm)。

1.2.5 Czk1 发酵上清液酸沉淀后的活性检测 将发酵液离心后,上清液加入浓盐酸调节 pH 至 4.0,出现絮状沉淀物,然后置于 4°C 冰箱过夜后将其离心 (4°C , $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 15 min) 得到沉淀和上清液。将沉淀冷冻干燥后加入适量甲醇萃取,得到甲醇提取物。以甲醇和无菌水为对照,甲醇提取物和上清液为处理,以橡胶树炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* RC-478 病原菌为指示菌,方法同 1.2.3。

1.3 不同培养基、接种量、培养时间以及培养基不同 pH 值对拮抗活性的影响测定 根据单因子实验设计,以 LB 为菌株 Czk1 的种子培养基,按照 5% 接种量接种到发酵液培养基^[1],在 PDB, BPY, YPD, NB, KMB, Landy 培养基中摇床培养 3 d 后,分别从各培养基中取样,测量各培养基对橡胶树炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 菌株 RC-478 抑菌圈直径,得到对病原菌有最佳抑制作用的发酵培养基。

按照 1%, 3%, 5%, 7%, 9% 的接种量接种到上述筛选出对病原菌抑制效果最佳的培养基中,得到发酵最佳接种量。同时均按照 5% 的接种量接种到筛选出的发酵培养基中,振荡培养 28°C , $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 分别培养 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 d 取样,测定不同发酵时间对病原菌的抑制作用。

将筛选出对病原菌有最佳抑制作用的培养基,调节其初始 pH 值在 3 ~ 11 范围,均按照 5% 的接种量培养 3 d 后,测量发酵培养基的不同初始 pH 值对病原菌的抑制作用。

2 结果与分析

2.1 枯草芽孢杆菌 Czk1 发酵液中活性成分产生部位 菌株 Czk1 经发酵后,只有发酵上清液对橡胶树 5 种根病菌和炭疽病菌菌丝有明显的抑制作用。菌丝生长受阻导致菌落周围出现抑菌带,形态有变异,初期呈方形生长,后逐渐趋向于十字形菌落生长(图 1 Pn-006)。而菌体经破碎后得到的破碎液对菌落生长没有明显的抑制作用,与对照组一样,无抑菌带出现(见图 1)。

结合表 1 结果表明,发酵上清液对橡胶树 6 种病原真菌菌落生长产生不同程度的抑制作用,其中,对橡胶树臭根病原菌抑制作用最明显,抑制率达到了 63.1%;表 1 结果同样也显示了菌体经破碎后的破碎液对病原菌没有抑制作用。根据这两种实验结果可以推测,菌株 Czk1 产生的活性物质来自于胞外分泌,存在于发酵液上清液中,后续将对发酵上清液作进一步研究。

2.2 发酵上清液热稳定性 发酵液经不同温度处理后,均能在一定程度上抑制菌落的生长,出现明显的抑菌带(见图 2), 100°C 和 121°C 的高温处理抑菌带依然存在,说明发酵液具有一定的耐高温特性。结合表 2 的数据统计分析,随着温度的升高,发酵上清液对病原菌的抑制率并没有下降, 60°C 处理的发酵上清液对病原菌的抑制效果最好,与其他温度处理的结果差异达极显著。除此之外,其余各温度处理的发酵液间抑制效果差异不显著。这可能与橡胶树红根病原菌本身的生长特性有一定关系,试验过程发现,在 PDA 平板上,该病原菌极易吸收培养基中的水分,一旦被抑制,菌落生长容易出现不同程度的皱褶和不均匀生长,可能会导致菌落直径测量时存在一定的误差。但实验结果表明发酵上清液具有耐高温的特性。

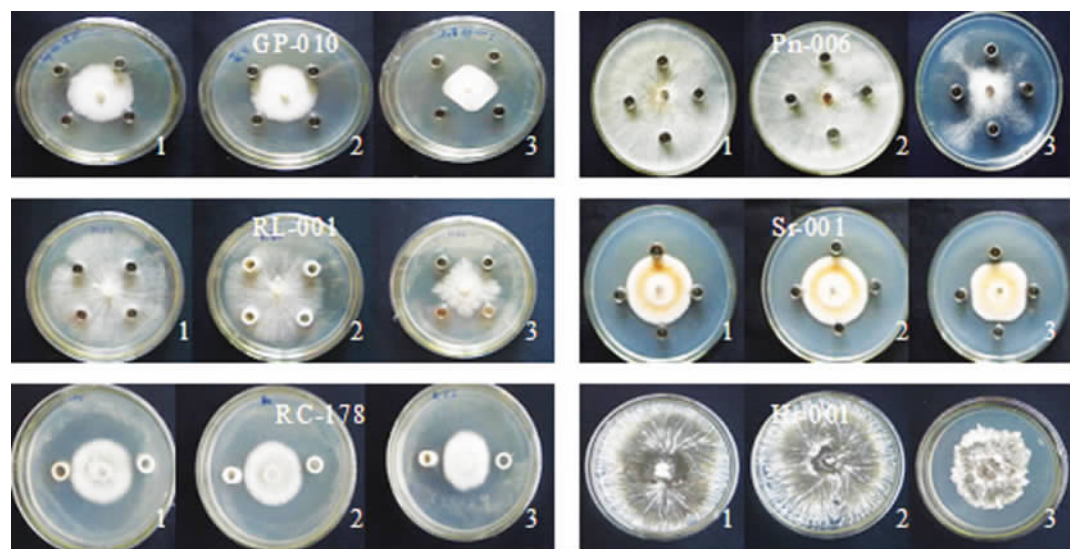


图 1 不同处理对橡胶树 5 种根病病菌和炭疽病菌的抑制效果
图中 1 2 3 分别代表无菌水(CK) 、菌体破碎液和发酵上清液. 其中 Hr-001 为生长速率法测定

Fig. 1 The inhibitory effects of different treatments on pathogens of 5 root diseases and *Colletotrichum gloeosporioides* from rubber trees

1. Aseptic water (CK) ; 2. The disrupted cell suspension of the strain;
3. The supernatant. Hr-001 is measured by growth rate method

表 1 不同处理对橡胶树 5 种根病菌及炭疽病菌的抑制率
Tab. 1 The inhibition rate of different treatments on pathogens of the 5 root diseases and *Colletotrichum gloeosporioides* from rubber trees

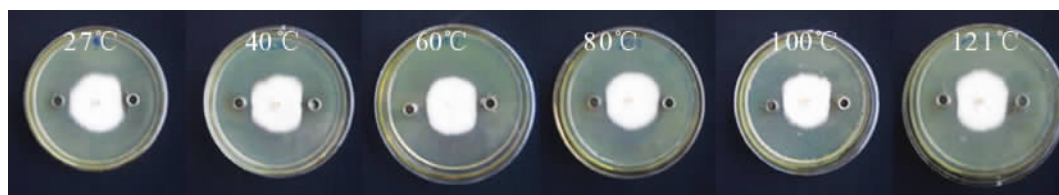
病原菌 Pathogens	上清液抑制率/% The inhibition rate of suspension	菌体破碎液抑制率/% The inhibition rate of disrupted cell suspension
橡胶树红根病菌 GP-010 <i>G. pseudoferreum</i> GP-010	53.5	—
橡胶树褐根病菌 Pn-006 <i>P. noxius</i> Pn-006	57.8	—
橡胶树白根病菌 RL-001 <i>R. lignosus</i> RL-001	28.5	—
橡胶树臭根病菌 Sr-001 <i>S. repens</i> Sr-001	63.1	—
橡胶树紫根病菌 Hr-001 <i>H. compactum</i> Hr-001	37.5	—
橡胶树炭疽病菌 RC-178 <i>C. gloeosporioides</i> RC-178	22.0	—

注: —表示无抑制作用,下同
Note: — shows no inhibitory effect , similarly hereinafter

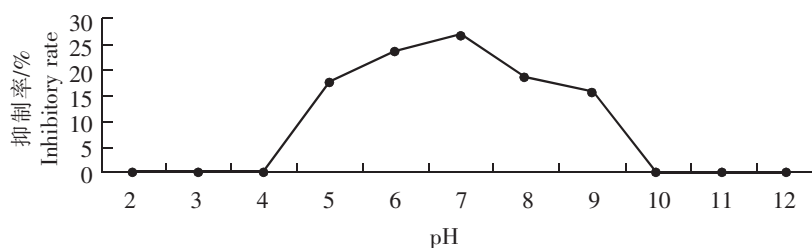
表2 不同温度处理的发酵上清液对橡胶树红根病菌菌株 GP-010 的抑制率

Tab.2 The inhibition rate of the supernatants under different temperatures on pathogen GP-010 of rubber red root disease

温度处理/℃ Treatment	抑制率/% Inhibition rate			
	I	II	III	平均抑菌率/% Average inhibition rate
27	11.8	14.7	11.8	13.3 b
40	17.6	11.8	11.8	14.7 b
60	26.5	32.3	26.5	29.4 a
80	20.6	14.7	11.8	15.7 b
100	14.7	23.5	20.6	19.6 b
121	14.7	17.6	14.7	16.2 b

注: 平均抑制百分率后标注不同字母表示处理间差异显著性($P < 0.05$), 下同Note: Different letters following the average inhibition rate indicate significant of difference ($P < 0.05$) between treatments , similarly hereinafter图2 不同温度处理的 Czk1 发酵上清液对 *G. pseudoferreum* GP-010 的生长抑制情况Fig.2 The growth inhibition of *G. pseudoferreum* GP-010 by the fermentation culture supernatants of the strain Czk1 under different temperatures

2.3 pH 耐受性 经酸碱处理的发酵上清液, 抑菌活性随着酸碱强度的变化而变化(见图3)。强碱性条件下($\text{pH} \geq 10$) 活性完全消失; 强酸性($\text{pH} \leq 4$) 条件下出现沉淀物, 上清液的活性消失, 对病原菌无抑制作用。pH 值在 5 ~ 9 范围内均呈现不同程度的活性, 在中性条件($\text{pH} = 7$) 时活性最佳, 对病原菌的抑制率达 26.5%。因此, 发酵上清液应避免在强酸和强碱环境下使用和贮存。

图3 不同 pH 值的发酵上清液对 *G. pseudoferreum* GP-010 的抑制率Fig.3 The inhibition rate of the fermentation culture supernatants in different pH values on the *G. pseudoferreum* GP-010

2.4 对蛋白酶 K 和紫外线敏感性 从表3和表4可看出, 发酵上清液对蛋白酶 K 和紫外线不敏感, 与原液相比较差异不显著($P < 0.05$), 用蛋白酶 K 和紫外线照射处理的发酵上清液, 与原液对病原菌的抑制率差异不显著($P < 0.05$)。

2.5 有机溶剂和金属离子稳定性 发酵上清液经过 4 种有机溶剂处理后, 均显示出不同程度的活性(见图4)。其中, 在乙醇中抑菌圈直径最大(除原液外), 达到 20.5 mm, 与原液差异不显著($P < 0.05$); 其次是丙酮和乙腈, 抑菌圈直径均为 19.5 mm。在甲醇中 Czk1 发酵上清液失去了部分活性, 抑菌圈直径为 17.3 mm。总体来说, 在这 4 种有机溶剂当中, 发酵上清液均保留较好活性, 具有一定的稳定性。

表 3 蛋白酶 K 处理后的发酵上清液对病原菌 GP-010 的抑制率

Tab. 3 The inhibition rate of the fermentation broth treated with proteinase K on the pathogen GP-010

处理 Treatment	抑制率/% Inhibition rate			
	I	II	III	平均抑菌率/% Average inhibition rate
蛋白酶 K Proteinase K	10	5	12.5	12.5a
原液 Supernatant	15	12.5	15	13.8a

表 4 紫外线照射处理的发酵上清液对病原菌 GP-010 的抑制率

Tab. 4 The inhibition rate of the fermentation broth treated with UV irradiation on the pathogen GP-010

处理 Treatment	抑制率/% Inhibition rate			
	I	II	III	平均抑菌率/% Average inhibition rate
紫外照射 4 h UV irradiation for 4 h	8.8	8.8	11.8	9.80a
原液 Supernatant	11.8	8.8	8.9	9.83a

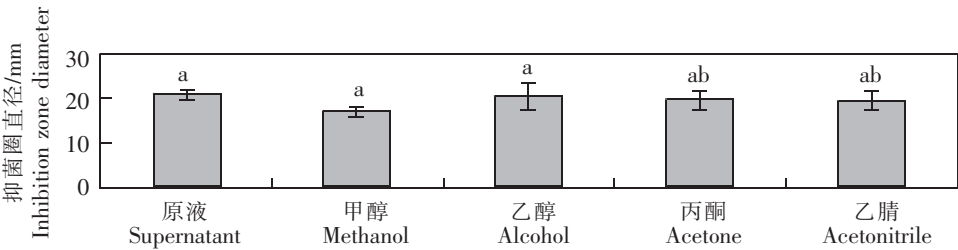


图 4 不同溶剂处理的发酵上清液对菌株 Czk1 抗菌活性的影响

Fig. 4 The effect of different solvents on the antimicrobial activity of the strain Czk1

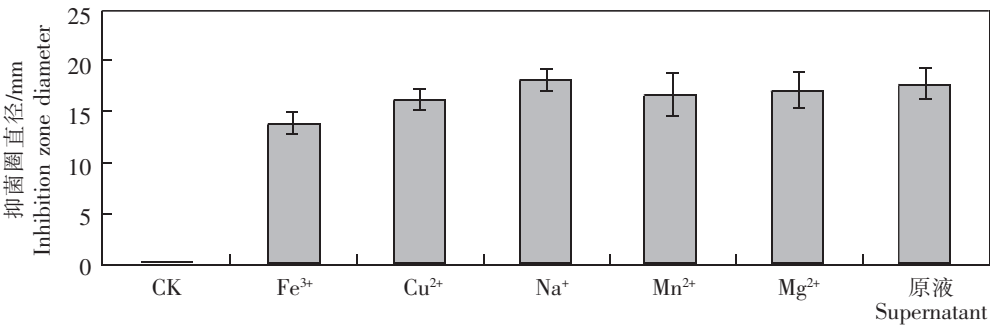


图 5 不同金属离子处理的发酵液对橡胶树炭疽病病菌 RC-178 的抑制效果

Fig. 5 The inhibition of the fermentation broth treated with different metal ions on the pathogen RC-178 of *Colletotrichum gloeosporioides* from rubber tree

由图 5 可看出 ,发酵上清液经过不同金属离子溶液处理后 ,仍具有较好的抑制效果。在 Na^+ 溶液中抑菌圈直径最大 ,平均抑菌圈直径为 18 mm; 其次是原液 $> \text{Mg}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Fe}^{3+}$ 。结果表明 ,发酵上清液对这 5 种金属离子稳定。

2.6 酸沉淀甲醇萃取 发酵上清液经过酸处理后出现絮状沉淀物 ,沉淀物冷冻干燥用甲醇萃取后具有活性 ,出现明显的抑菌圈 ,而酸沉淀后的上清液和纯甲醇对橡胶树炭疽病病原菌 *C. gloeosporioides* RC-178

的生长没有抑制作用(见图6)。

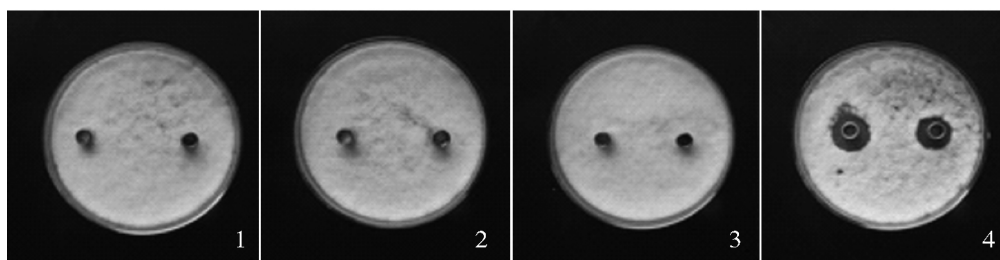


图6 菌株 Czk1 在酸沉淀甲醇萃取下的抗菌活性

1. 对照; 2. 甲醇; 3. 酸沉淀后的上清液; 4. 甲醇提取物

Fig. 6 The antimicrobial activity of the strain Czk1 after acid precipitation and methanol extraction

1. Control; 2. Methanol; 3. Supernatant of acid precipitation; 4. Methanol extraction

2.7 不同培养基、接种量、培养时间以及培养基不同 pH 值对拮抗活性的影响

2.7.1 不同培养基对拮抗活性的影响 由图7可见,只有在 Landy, YPD, BPY 以及发酵液培养基中出现了抑菌圈,抑菌圈平均直径分别为 12, 17, 15, 13 mm。在 PDB, NB 和 KMB 培养基中没有明显的抑菌圈产生。其中,适宜产拮抗物质的培养基顺序为: YPD > BPY > 发酵液培养基 > Landy。因此,将选择 YPD 培养基作为菌株 Czk1 的发酵液培养基。

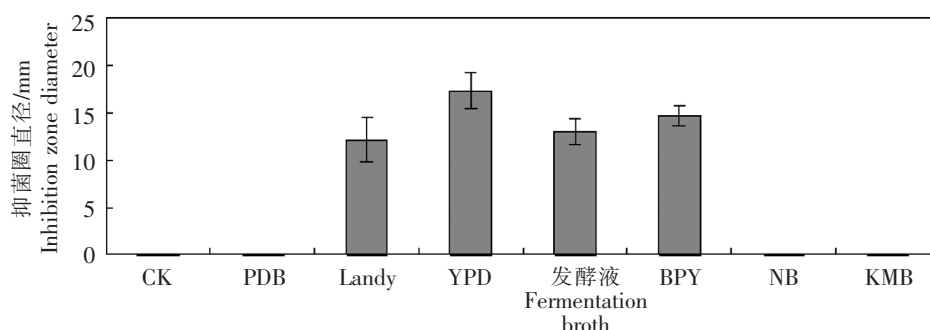


图7 不同培养基对菌株 Czk1 拮抗活性的影响

Fig. 7 The effect of different media on the antagonistic activity of the strain Czk1

2.7.2 不同接种量对拮抗活性的影响 由图8可看出,7%的接种量显示了最好的拮抗活性,抑菌圈平均直径为 19.6 mm,与其他处理间的差异达到极显著。其次是3%和5%的接种量,抑菌圈平均直径分别为 8.4, 8.7,对拮抗活性的影响差异不显著。过多或过少的接种量对菌株拮抗活性的影响较大,接种量过小,菌体生长缓慢,增加能量的消耗,延长发酵周期,不利于微生物次级代谢产物的合成。接种量过大,发酵周期初始浓度过大,导致营养物质消耗过多,也不利于产生拮抗物质。

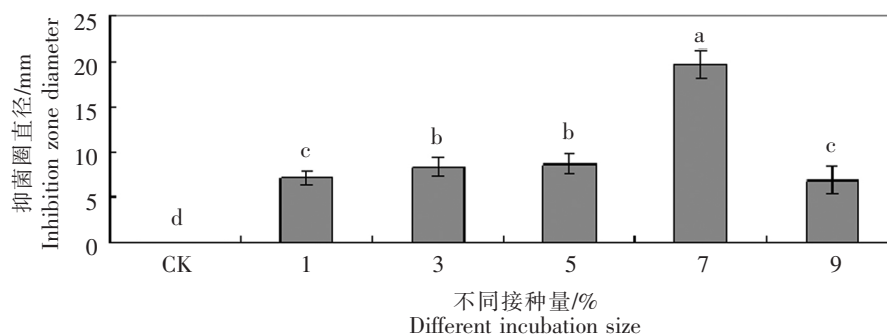


图8 不同接种量对拮抗活性的影响

Fig. 8 The effect of different inoculum sizes on the antagonistic activity of the strain Czk1

2.7.3 不同培养时间对拮抗活性的影响 由图9可知,随着发酵时间的变化,拮抗活性也发生显著的变

化。在培养 1~3 d 内,随着时间的延长,菌量的不断增大拮抗活性随之增大,在第 3 天达到最大值,随后,菌体进入生长后期,菌种衰老营养不足也不利于产生拮抗作用,拮抗活性随着发酵时间变长而减弱。第 7 天,活性消失。

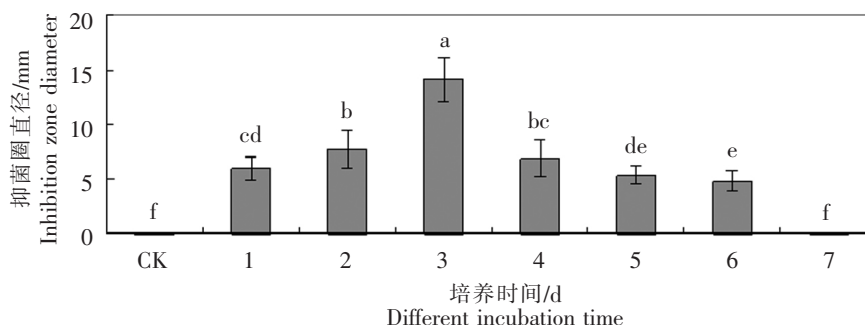


图 9 不同培养时间对拮抗活性的影响

Fig. 9 The effect of different incubation time on the antagonistic activity of the strain Czk1

2.7.4 培养基不同 pH 值对拮抗活性的影响 发酵过程中培养基 pH 值是影响微生物生长的一个重要参数,初始 pH 值对发酵体系的 pH 值影响较大。控制 YPD 不同的初始 pH 值对拮抗活性的影响结果如图 10 所示,在中性条件下拮抗活性最大,由于过酸($\text{pH} < 4$)和过碱($\text{pH} > 10$)的条件下不利于微生物生长,因此,过酸和过碱的条件下拮抗作用消失。

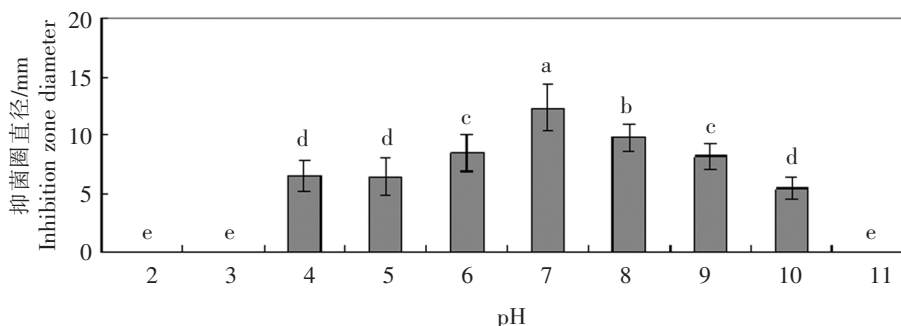


图 10 培养基初始 pH 值对拮抗活性的影响

Fig. 10 The effect of initial medium pH value on the antagonistic activity of the strain Czk1

通过对培养条件的单因子实验,初步确定菌株 Czk1 对病原菌最佳拮抗活性的条件是:选择 YPD 作为菌株的发酵液培养基,初始 pH 值为 7.0,以 7% 接种量接种,摇床培养($28\text{ }^{\circ}\text{C}$, $180\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 3 d。

3 讨论

枯草芽孢杆菌分泌拮抗物质是该菌防病促生的一个重要机制,主要有核糖体合成途径的大分子蛋白质和非核糖体合成途径的小分子肽脂类抗生素。这些抗菌物质大多对病原真菌表现出强烈的拮抗活性,如陈夕军等^[5]报道分离到的枯草芽孢杆菌分泌的蛋白 G87 对水稻稻瘟病有强烈的抑制作用;陈力等^[6]报道菌株 CQBS03 产生的蛋白质物质对柑橘溃疡病有良好的防治效果;此外,表面活性素、伊枯草菌素和芬枯草菌素等在内的脂肪肽对病原真菌也有抑制作用^[7]。本研究结果表明,枯草芽孢杆菌 Czk1 菌株分泌的抗菌物质对橡胶树 5 种根病以及炭疽病病菌具有较好的抑制作用,该抗菌物质具有耐高温、不耐强酸碱、对紫外线和对蛋白酶 K 稳定以及对常见的 4 种有机溶剂稳定的特性。其产生活性物质的粗提物可通过酸沉淀甲醇萃取的方法获得,这与枯草芽孢杆菌分泌的脂肽类物质的性质较相似^[8-9]。研究发现,用浓盐酸调节 pH 至 4 时,发酵上清液失去了活性,说明活性物质在 pH 为 4 时基本能沉淀下来,且选择 YPG 作为发酵液培养基,初始 pH 值在中性的条件下以 7% 的接种量,摇床培养($28\text{ }^{\circ}\text{C}$, $180\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 3 d 能表现出最佳的拮抗活性。多数文献^[10-11]报道将 pH 调节到 2 才能完全沉淀活性物质,选择 Landy 是提取脂

肽类抗生素的最佳培养基。由此可以推测,同一类菌其来源不同,可能存在某些差异,也可能是培养条件不相同所致。调节发酵液 pH 为 4 时能将活性物质基本沉淀下来,这对于工业上大规模生产抗菌活性物质节约盐酸的用量非常重要。

脂肽是枯草芽孢杆菌产生的一类主要抗菌物质,包括表面活性素、芬枯草菌素和伊枯草菌素 3 个家庭成员。脂肽类抗生素具有低毒并且在自然环境中容易降解的特性,在工业、农业、医学上具有较广阔的应用前景^[12-14]。本研究首次对橡胶树内生细菌的抗菌活性物质进行了分析和探讨,以橡胶树根部常见的 5 种根病病菌和橡胶树叶片上主要病害炭疽病病原菌为指示菌,室内平板拮抗实验表明,该菌株抗菌活性物质对指示菌具有良好的抑制效果。根据研究结果,下一步将展开对枯草芽孢杆菌 Czk1 产生的脂肽类抗菌物质进行深入研究。Czk1 是一株极具开发潜力的生防菌株,而利用枯草芽孢杆菌防治橡胶树根病和炭疽病的研究还未见报道。现今报道的抗菌物质大多只是针对单一物质进行研究,两大类物质(蛋白质和脂肽)是否同时存在共同发挥拮抗作用的系统研究鲜有报道。对枯草芽孢杆菌 Czk1 是否也能产生抗菌蛋白,与脂肽类抗生素协同使用能够更好地防治橡胶树病害,还有待进一步深入研究。本研究结果可为枯草芽孢杆菌抗菌物质的分离纯化、抗菌机理的研究以及开发利用生防菌剂防治橡胶树病害提供理论依据。

参考文献:

- [1] 赵璐璐, 贺春萍, 钱飞燕, 等. 橡胶树内生拮抗细菌菌株 Czk1 发酵条件优化[J]. 热带作物学报, 2011, 32(5): 926-931.
- [2] 梁建根, 吴吉安, 竺利红, 等. 生防菌 BH-2 发酵液中抑菌成分的定位及提取研究[J]. 中国农学通报, 2007, 23(11): 324-327.
- [3] 程小东, 李梅香, 杜樟樟, 等. 超声波作用时间对地衣芽孢杆菌存活率的影响[J]. 济宁医学院学报, 2003, 26(1): 40-41.
- [4] SAMBROO J, RUSSELL D W. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚基, 等译. 北京: 科学出版社, 2002.
- [5] 陈夕军, 李娟, 孙启利, 等. 水稻内生枯草芽孢杆菌 G87 抗菌蛋白的分离纯化及理化特性[J]. 微生物学报, 2010, 50(10): 1353-1357.
- [6] 陈力, 王中康, 黄冠军, 等. 柑橘溃疡病生防菌株 CQBS03 的鉴定及其培养特性研究[J]. 中国农业科学, 2008, 41(8): 2537-2545.
- [7] 陈中义, 张杰, 黄大防. 植物病害生防芽孢杆菌抗菌机制与遗传改良研究[J]. 植物病理学报, 2003, 33(2): 97-103.
- [8] KATZ E, DEMAINE A L. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions[J]. Bacteriological reviews, 1977, 41(2): 449-474.
- [9] 连玲丽, 谢荔岩, 郝璐平, 等. 拮抗菌 SB1 的鉴定及其抗菌物质的分析[J]. 微生物学通报, 2010, 37(7): 986-991.
- [10] 高学文, 姚仕义, HUONG pham, 等. 基因工程菌枯草芽孢杆菌 GEB3 产生的肽脂类抗生素及其生物活性研究[J]. 中国农业科学, 2003, 36(12): 1496-1501.
- [11] 赵秀香, 赵柏霞, 冯镛, 等. 枯草芽孢杆菌 SN-02 抑菌物质的分离、纯化及结构测定[J]. 植物保护学报, 2008, 35(4): 322-326.
- [12] 王大威, 刘永建, 林忠平, 等. 一株产生脂肽的枯草芽孢杆菌的分离鉴定及脂肽对原油的作用[J]. 微生物学报, 2008, 48(3): 304-311.
- [13] HENRY G, DELEU M, JOURDAN E, et al. The bacterial lipopeptide surfactin targets the lipid fraction of the plant plasma membrane to trigger immune-related defence responses[J]. Cellular Microbiology, 2011, 13(11): 1824-1837.
- [14] COBB A, ROBERTS LK, PALUCKA AK, et al. Development of a HIV-1 lipopeptide antigen pulsed therapeutic dendritic cell vaccine[J]. Journal of Immunological Methods, 2011, 365: 27-37.

(下转第 55 页)

Effect of Aqueous Extracts of 3 Plants (*Ipomoea cairica* , *Ipomoea triloba* and *Ipomoea digitata*) on Seed Germination and Seedling Growth of Radish , Cabbage , Mustard and Asparagus Lettuce

SONG Xin^{1,2} , SHEN Yide² , HUANG Qiaoqiao² , LI Xiaoxia² , FAN Zhiwei²

(1 College of Environment and plant Protection , Hainan University , Haikou 570228 , China; 2 Environment and Plant Protection Institute , CATAS/ Key Laboratory for Integrated Pest Management of Tropical Crops , Ministry of Agriculture/ Hainan Key Laboratory for Monitoring and Control of Tropical Agricultural Pests/ Hainan Engineering Research Center for Biological Control of Tropical Crops Diseases and Insect Pests , Haikou 571101 , China)

Abstract: Using the petri dishes filter paper method , leaves of 3 plants (*Ipomoea cairica* , *Ipomoea triloba* and *Ipomoea digitata* Linn) were extracted with water and used to treat four vegetables (radish , cabbage , mustard and asparagus lettuce) to observe their seed germination and their seedling growth. The results showed that the leaf aqueous extract of *I. cairica* significantly inhibited seed germination and seedling growth of the four vegetables , and that the inhibition increased with concentration of the aqueous extract. At the low concentration (0.1 g • mL⁻¹) the aqueous extract of *I. cairica* inhibited 81.3% , 80.1% , 74.2% and 64.8% of the root growth of cabbage , asparagus lettuce , mustard and radish , respectively , while at higher concentration (0.5 g • mL⁻¹) it stopped the seedling growth of all the vegetables tested. The aqueous extracts of the native plant *I. digitata* and the weak invader *I. triloba* promoted seed growth of the vegetables at the low concentration , and gave a slight inhibition to the seed growth at the high concentration. The aqueous extract of *I. digitata* at the high concentration inhibited the root growth of the cabbage , asparagus lettuce , mustard and radish by 47.7% , 59.3% , 43.6% and 22.8% , respectively , and that of *I. triloba* inhibited the four vegetables by 78.7% , 75% , 49.6% and 25.1% , respectively. The results suggest that the strong invader *I. cairica* has a higher allelopathic effect than the weak invader *I. digitata* and the native plant *I. triloba*.

Key words: *Ipomoea cairica*; *Ipomoea digitata*; *Ipomoea triloba*; active role; aqueous extract

(上接第 44 页)

Characteristics of the Antimicrobial Active Component of *Bacillus subtilis* Strain Czk1

FAN Lanyan¹ , HE Chunping^{2,3,4} , LIANG Yanqiong^{2,3,4} , ZHENG Xiaolan^{2,3,4} ,
WU Weihuai^{2,3,4} , LI Rui^{2,3,4} , ZHENG Fucong¹

(1. College of Environment and Plant Protection , Hainan University , Danzhou 571737 , China; 2. Environment and Plant Protection Institute , CATAS/ Hainan Engineering Research Center for Biological Control of Tropical Crops Diseases and Insect Pests , Danzhou 571737 , China; 3. Key Laboratory of Integrated Pest Management on Tropical Crops , Ministry of Agriculture , Danzhou 571737 , China; 4. Hainan Key Laboratory for Monitoring and Control of Tropical Agricultural Pests , Danzhou 571737 , China)

Abstract: Cup-plate methods and plate growth rate method were used to determine antimicrobial substances of strain Czk1 of *Bacillus subtilis* in the fermentation broth. The results indicated that the active component of this strain were extracellular metabolites and existed in the supernatant. Physicochemical analysis showed this antimicrobial component was not tolerant to high temperature and high and low acidity , and not sensitive to ultraviolet radiation , protease K , 5 common metal ions and organic solvent. This component could be extracted by acid precipitation and methanol extraction. Single factor experiment showed this strain had the highest pathogen antagonistic activity when shake cultured at 28 °C and 180 r • min⁻¹ for 3 d on YPD medium inoculated at the rate of 7% and the initial pH7.

Key words: *Bacillus subtilis*; active substance; biological characteristics; rubber tree