

大丽轮枝菌拮抗细菌的分离与抗菌物质鉴定

袁洪水¹, 杜红方², 李 佳¹, 张爱莲², 张元亮², 朱宝成¹

(1. 河北农业大学生命科学学院, 保定 071001; 2. 河北大学生命科学学院, 保定 071002)

摘要:从黄萎病发病棉田未发病棉株根际土样中分离芽孢杆菌, 利用对峙培养法对大丽轮枝菌进行平板拮抗实验, 筛选出 6 株对大丽轮枝菌有拮抗作用的芽孢杆菌, 其中 3 株菌发酵代谢产物具有抗菌活性。S4-3 菌株发酵液滤液经 100℃、30 min 热处理丧失抗菌活性, 发酵液氯仿抽提物不具有抗菌活性, 发酵液硫酸铵沉淀物有抑菌活性, 但经蛋白酶处理后活性丧失, 认为 S4-3 菌株抑菌活性物质是蛋白质。而菌株 S4-5 发酵液经 100℃ 热处理后还有较高的抗菌活性, 发酵液氯仿抽提物也具有抗菌活性, 但硫酸铵沉淀物对病原菌无抑制作用; S5-6 菌株发酵液滤液经 100℃ 热处理丧失抗菌活性, 硫酸铵沉淀物也不具有抗菌活性, 而发酵液氯仿抽提物有抗菌活性, 因此认为 S4-5 和 S5-6 菌株产生的抑菌物质不是蛋白质类。

关键词:棉花黄萎病; 拮抗细菌; 分离; 抗菌物; 鉴定

中图分类号: S435.621 文献标识码: A

文章编号: 1002-7807(2008)06-0442-05

Screening of Antagonistic Bacterium Strains against *Verticillium dahliae* and Identification of the Antifungal Substance

YUAN Hong-shui¹, DU Hong-fang², LI Jia¹, ZHANG Ai-lian², ZHANG Yuan-liang², ZHU Bao-cheng^{1*}

(1. College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China; 2. College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002, China)

Abstract: Thirty spore-forming bacterium strains were isolated from several samples of soil in cotton field. Antagonistic tests of all these strains against *Verticillium dahliae* were carried out on PDA medium by pairing culture method. The results showed that there were six strains which had antagonistic activity against *Verticillium dahliae* and of the six strains, there were three strains whose metabolite had the antagonistic activity. After treated with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractional precipitation, the liquid fermentation production of S4-3 strain showed antagonistic activity against *Verticillium dahliae*. And the antagonistic activity was lost after treated with heat(100℃, 30 min) and CHCl_3 . It is suggested that the antifungal substance of the S4-3 strain should be protein. The antagonistic activity of liquid fermentation production of the S4-5 strain remained relatively high after treated with heat (100℃, 30 min), and the chloroform extracts of liquid fermentation production of the S4-5 strain showed the antagonistic activity too. But after treated with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractional precipitation, the liquid fermentation production of strain S4-5 did not show the antagonistic activity to *Verticillium dahliae*. The antagonistic activity of liquid fermentation production of the S5-6 strain was lost after treated with heat (100℃, 30 min), but the chloroform extracts of liquid fermentation production of the S5-6 strain still had the antagonistic activity. In addition, after treated with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractional precipitation, the S5-6 strain did not show the antagonistic activity, either. All these results indicated that the antifun-

gal substance of S4-5 strain and S5-6 strain must not be protein.

Key words: Cotton *Verticillium* wilt; antagonistic bacterium; screening; antifungal substance; identification

棉花黄萎病(*Verticillium* wilt)是由土壤中大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae* Kleb.)感染棉株而形成的病害,严重影响棉花产量和品质,是棉花生产的最重要病害之一,有棉花的“癌症”之称。近几年来,我国棉花黄萎病发生十分严重,呈逐年上升趋势,目前发病面积达到全国棉田面积的一半以上^[1-2]。为了控制棉花黄萎病的发生和蔓延,国内外的专家先后进行了化学药剂、育种、轮作栽培等多种防治研究,而利用微生物之间的拮抗关系,筛选黄萎病致病菌——大丽轮枝菌的拮抗细菌用于生物防治,被认为是最具有发展潜力的有效防治方法之一^[3]。

芽孢杆菌是自然界广泛存在的一类细菌,通过产生肽类、磷脂类、多烯类、氨基酸类、核酸类和类噬菌体颗粒等物质,对多种病原菌和细菌的生长起抑制作用,具有较广的抗菌谱^[4]。尤其是肽类和脂肽类物质的发现,为抗病基因工程提供了新的生物资源和抗菌基因,是一种具有极大应用潜力的微生物类群。通过对棉花导入抗菌基因、对棉株施用肽类抗菌剂或者培育根际微生物中有益芽孢杆菌种群拮抗病原菌、降低其致病能力,都能达到降低发病率的目的^[3-4]。因此,芽孢杆菌具有较高的潜在生防利用价值。本研究从发病棉田未发病棉株下土壤中分离出大丽轮枝菌拮抗芽孢杆菌,并进行了抑菌活性测定及抗菌物质的提取和鉴定,为芽孢杆菌生防制剂的开发利用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 病原菌

大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae* Kleb.) V-190 菌株,河北农业大学制药工程实验室保存。

1.2 土样

采自河北省、北京市、内蒙古自治区、新疆维吾尔自治区等地黄萎病发病棉田未发病棉株根际地表以下 10~15 cm 处,保存于无菌纸袋中,自然风干。

1.3 培养基

NA 培养基^[5]:用于芽孢杆菌分离和培养。

NB 培养基^[5]:用于芽孢杆菌液体培养。

PDA 培养基^[5]:用于大丽轮枝菌培养。

1.4 实验方法

1.4.1 拮抗细菌的分离。将各土样于无菌水中充分振荡分散,静置 10 min 后取上清液加热至 80℃,保持 10 min,梯度稀释至 $10^{-3} \sim 10^{-5}$,各取 0.1 mL 涂布于 NA 培养基平板上,倒置,28℃ 恒温培养箱中培养 7 d,挑取不同形态的单菌落转接到 NA 试管斜面上,同时记录菌落形态并涂片做革兰氏染色和芽孢染色,对产芽孢菌 28℃ 培养 72~120 h,4℃ 冰箱保存。

1.4.2 拮抗细菌的筛选。将大丽轮枝菌接种于 PDA 斜面,25℃ 培养 7~10 d,加入灭菌去离子水 5 mL,用接种环轻轻刮下孢子,转入灭菌后的已放置玻璃珠的三角瓶中,振荡,用无菌脱脂棉过滤除去菌丝体,将孢子液稀释制成约含 1×10^7 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 孢子的悬浮液,取 5 mL 孢子悬液,加入到 45℃ 左右的 100 mL PDA 培养基中,摇匀,倒入灭菌平皿($\phi 15$ mm)内,每皿 50 mL,凝固后于 25℃ 恒温培养 24 h,即为含病原菌的琼脂平板。

将分离菌株点涂在病原菌平板上,每个菌株点涂 3 个点,每点涂布直径 5 mm,于 25℃ 培养 5~7 d,观察分离菌株对大丽轮枝菌的生长抑制情况,测定抑菌圈直径。

1.4.3 拮抗菌胞外代谢产物的抗菌活性检测和性质测定。采用管碟法^[5],首先制备含大丽轮枝菌病原菌平板,将其于 25℃ 恒温培育 2 h,在平板上均匀放置牛津杯,用于拮抗细菌代谢产物抗菌活性的测定。

将具有拮抗作用的菌株转接至 NA 斜面,活化 72 h 后,接种于装有 50 mL NB 培养基的 250 mL 三角瓶中,30℃、180 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 旋转摇床培养 60 h。将培养液于 4℃、4000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液分别进行如下处理^[6-7]:① 用 0.2 μm 微孔滤膜过滤;② 将①处理后的部分液体 100℃ 水浴 30 min;③ 将①处理后的部分液体加等体积氯仿后充分振摇 60 min,待静置分层后取上层液相;④ 上清液加硫酸铵至 80% 饱和度,4℃ 静置过夜,4℃、8000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 收集沉淀,并用 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.5 的磷酸缓冲液溶解,用相同的缓冲液透析(8000 D) 2 d,用 1%

BaCl₂ 检验透析效果,透析完全后冷冻干燥,用时加 Tris-HCl 缓冲液溶解,制成 3 g · L⁻¹ 抗菌蛋白溶液,0.2 μm 滤膜过滤;⑤ 将④获得的冻干物用 pH 7.2 Tris-HCl 缓冲液溶解,制成 6 g · L⁻¹ 抗菌蛋白溶液,分别加入等体积浓度为 1 g · L⁻¹ 的胃蛋白酶、胰蛋白酶、蛋白酶 K,摇匀,使酶终浓度为 0.5 g · L⁻¹,抗菌物浓度为 3 g · L⁻¹,在 37℃ 下处理 2 h,0.2 μm 滤膜过滤。以上 5 种处理各取 200 μL 加入到病原菌平板的牛津杯内,于 25℃ 培养 3~5 d,观察抑制大丽轮枝菌的生长情况,并测定抑菌圈直径。

2 结果与分析

2.1 拮抗细菌的分离

平板分离菌培养 7 d,根据菌落形态、革兰氏

染色和芽孢染色结果,从土壤中共分离到 30 个杆状产芽孢、革兰氏染色阳性细菌菌株,其菌落特征见表 1。

2.2 拮抗细菌菌株的筛选

对分离出的芽孢杆菌在含大丽轮枝菌的平板上进行对峙拮抗筛选,其中,抑菌圈直径大于 18 mm 的 6 株,其中菌株 S4-5 抑菌圈直径为 21.6 mm,对大丽轮枝菌 V-190 菌株的生长具有很强的抑制作用,各菌株的抑菌效果见表 2。

2.3 拮抗菌株发酵产物的抗菌活性测定

通过管碟法测定,加入 S4-3、S4-5 和 S5-6 菌株的发酵培养上清液的牛津杯周围出现透明抑菌圈,抑菌圈平均直径分别为 (17.3 ± 2.87) mm、(16.7 ± 2.49) mm、(18.7 ± 1.70) mm,说明这些拮抗菌株产生了抗菌物质并分泌到发酵液中。

表 1 土壤中分离的芽孢杆菌的菌落特征

Table 1 Characteristics of the bacteria colonies isolated from soil

菌株	菌落特征	菌落直径/mm
S1-1	菌落中间凹陷,表面较干燥,边缘整齐,乳白色	9
S1-2	同心圆状突起,近圆形,干燥,白色	5
S2-1	菌落成同心圆状,较规整,圆形,微黄色	3
S2-2	菌落中心有一突起,边缘整齐,圆形,微黄色	5
S2-3	菌落中心有一突起,边缘整齐,圆形,乳白色	7
S2-4	表面皱褶较多,中心颜色较深,乳白渐微黄色	10
S2-5	表面皱褶突起较大,边缘不规整,乳白色	13
S3-1	表面有皱褶,干燥,边缘不整齐,扩散状,乳白色	10
S3-2	菌落表面有突起,微黄色,粘稠状	2
S3-3	表面有微皱褶,边缘整齐,圆形,较湿润,乳白色	6
S3-4	有深浅不同的沟,边缘不整齐,较湿润,乳白色	4
S3-5	成辐射状,边缘不整齐,较湿润,乳白色	2.3
S3-6	边缘不整齐,较湿润,桔黄色	5
S4-1	边缘较整齐,圆形,表面的皱褶,乳白色	6
S4-2	边缘较整齐,近圆形,表面的皱褶,干燥,乳白色	7
S4-3	菌落成同心圆状,乳白色	4
S4-4	菌落较小,乳白色	2
S4-5	中心凹陷,颜色较深,近圆形	4
S4-6	菌落成花瓣状,干燥,有突起,乳白色	8
S5-1	有皱褶,表面干燥,扩散状,乳白色	10
S5-2	菌落成同心圆状,乳白色	12
S5-3	菌落较厚,近圆形,乳白色,中心突起	2
S5-4	表面的微皱褶,近圆形,微黄色	4
S5-5	中心有皱褶,由中心向外缘辐射状,湿润,乳白色	2
S5-6	中心有皱褶突起,不规整,较湿润,乳白色	2.2
S5-7	中心有皱褶突起,不规整,有细小的沟,边缘较浅	8
S6-1	边缘不整齐,成树状,有皱褶,微黄色	12
S6-2	中心高高的突起,成辐射状,干燥,白色	10
S7-1	同心圆状突起,干燥,白色,边缘整齐	15
S8-1	不规整,干燥,有细小的突起,微黄色	13

表 2 对大丽轮枝菌有较强拮抗作用的细菌菌株
Table 2 Antagonistic strains with the higher antifungal activity against *Verticillium dahliae*

菌株	抑菌圈平均直径/mm
S2-2	21.4±1.0
S2-4	20.0±3.0
S2-5	21.4±1.6
S4-3	19.2±3.4
S4-5	21.6±2.2
S5-6	18.6±2.1

2.4 发酵液滤液热处理后抗菌活性测定

通过管碟法测定,发酵液滤液热处理后,菌株 S4-5 的代谢产物仍具有抗菌活性,其抑菌圈平均直径为(13.0±0.96)mm,而菌株 S4-3、S4-6 抗菌活性丧失。表明菌株 S4-5 所产抗菌物质能够耐受 100℃、30 min 热处理,而菌株 S4-3、S4-6 所产抗菌物质不耐热。

2.5 发酵液滤液氯仿抽提物抗菌活性测定

通过管碟法测定,S4-5、S5-6 菌株发酵液滤液氯仿抽提物在含大丽轮枝菌的平板上出现抑菌圈,抑菌圈平均直径分别为(10.5±0.30)mm、(9.72±1.14)mm,而菌株 S4-3 无菌滤液氯仿抽提物无抗菌性。从而说明 S4-5、S5-6 菌株发酵液中的抗菌物质为脂溶性物质。

2.6 拮抗细菌硫酸铵沉淀物的抗菌活性测定

通过管碟法拮抗实验结果表明,菌株 S4-3 发酵液的硫酸铵沉淀物对病原菌具有抗菌作用,抑菌圈平均直径为(9.3±1.50)mm,而菌株 S4-5、S5-6 的硫酸铵沉淀物对病原菌无抑制作用。说明菌株 S4-3 发酵液中的抗菌物质是蛋白质,而菌株 S4-5 和 S5-6 发酵液中的抗菌物质不是蛋白质,其抗菌物质性质有待进一步研究。

2.7 拮抗细菌硫酸铵沉淀物对蛋白酶的稳定性

菌株 S4-5、S5-6 的硫酸铵沉淀物对病原菌无抑制作用未做此研究,S4-3 菌株发酵液硫酸铵沉淀物经三种蛋白酶处理后抑菌活性完全丧失,进一步证实 S4-3 菌株发酵液中的抗菌物质是蛋白质。

3 讨论

棉花黄萎病为土传病害,危害严重,用化学杀菌剂防治防效甚微。为了减轻化学药剂对环境和人体健康的影响,学者们开始广泛寻找安全、有效的生物防治方法。拮抗芽孢杆菌对不良环境有较

强的抵抗能力,在土壤中容易繁殖形成优势菌群,利用其所具有的拮抗作用抑制病原菌的生长繁殖,研究开发生防剂具有重要意义^[8-10]。从棉花黄萎病发病区的非发病植株下土壤中分离拮抗菌,目的性强,获得目的菌的机会大。本研究初步筛选 30 个菌株即得到对大丽轮枝菌有拮抗作用的细菌菌株 6 株,其中菌株 S4-3、S4-5 和 S5-6 发酵液滤液具有抗菌活性,说明其产生了胞外抗菌活性物质。菌株 S4-3 发酵液的硫酸铵沉淀物具有抑菌活性,但经蛋白酶处理、发酵液滤液经热 100℃、30 min 处理后均失去抑菌活性,说明其抑菌活性物质是蛋白质;菌株 S4-5 和 S5-6 抑菌物质可被氯仿抽提,且仍具有抑菌活性,说明其抑菌活性物质是非蛋白质类物质。

本研究所分离三株拮抗菌均有作为生防菌应用于防治棉花黄萎病的价值,尤其是 S4-3 菌株所产蛋白质可为构建转基因抗病棉花提供基因基础,为植物黄萎病的生物防治提供了新的微生物资源,但其拮抗机制及其产生的抗菌物质有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 石磊岩. 中国棉花枯、黄萎病病原菌研究[J]. 棉花学报, 1996,8(6): 292-294.
SHI Lei-yan. Studies on the pathogen of *Fusarium vasinfectum* and *Verticillium dahliae* of cotton[J]. Cotton Science, 1996, 8(6): 292-294.
- [2] 马存, 简桂良, 孙文姬. 我国棉花抗黄萎病育种现状、问题及对策[J]. 中国农业科学, 1997,30(2): 58-64.
MA Cun, Jian Gui-liang, Sun Wen-ji. Current status, problem and countermeasure on resistance Breeding to *Verticillium* wilt of cotton in china[J]. Scientia Agricultura Sinica, 1997,30(2): 58-64.
- [3] LI She-zeng, Lu Xiu-yun, Ma Ping, et al. Biological control of *Verticillium* wilt of cotton caused by *Verticillium dahliae* with antagonistic bacteria[J]. Shandong Science, 2005,18(3): 98-106.
- [4] TAMEHIRO N, Okamoto Y, Okamoto S, et al. Bacilysocin, a novel phospholipid antibiotil produced by *Bacillus subtilis* 168[J], Antimicrob Agents Chemotherapy, 2002,46(2):315- 320.
- [5] 沈萍, 范秀荣, 李广武. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999.
SHEN Ping, Fan Xiu-rong, Li Guang-wu. Microbio-

- logical experiment technology[M]. Beijing: Higher Education Press, 1999.
- [6] 周艳芬, 杜红方, 袁洪水, 等. 棉花黄萎病拮抗蛋白的分离与纯化[J]. 棉花学报, 2007, 19(2): 98-101.
ZHOU Yan-fen, Du Hong-fang, Yuan Hong-shui, et al. Isolation and purification of antifungal protein from *Paenibacillus* to *Verticillium dahliae* [J]. Cotton Science, 2007, 19(2): 98-101.
- [7] 齐东梅, 梁启美, 惠明, 等. 棉花枯萎、黄萎病拮抗芽孢杆菌的抗菌蛋白特性[J]. 微生物学通报, 2005, 32(4): 42-46.
QI Dong-mei, Liang Qi-mei, Hui Ming, et al. Characteristics of antagonistic proteins from *Bacillus* against cotton *Fusarium* wilt and *Verticillium* wilt [J]. Microbiology, 2005, 32(4): 42-46.
- [8] 鹿秀云, 李社增, 马平, 等. 棉花黄萎病生防细菌 NCD-2 抑菌物质提取研究[J]. 山东科学, 2005, 18(3): 22-25.
LU Xiu-yun, Li She-zeng, Ma Ping, et al. Evaluation of biocontrol potential of a bacterial strain NCD-2 against cotton *Verticillium* wilt in field trials [J]. Shandong Science, 2005, 18(3): 22-25.
- [9] 梁启美, 齐东梅, 贾洁, 等. 棉花黄、枯萎病拮抗菌的筛选及抗菌蛋白 B-(110)-a 的初步测定[J]. 植物保护学报, 2005, 31(5): 25-28.
LIANG Qi-mei, Qi Dong-mei, Jia Jie, et al. Isolation of antagonistic *Bacillus* and purification of antifungal protein B-(110)-a [J]. Journal of Plant Protection, 2005, 31(5): 25-28.
- [10] 耿川东, 谢伟军, 龚慕慕, 等. 抗棉花黄萎病菌的抗菌蛋白质研究[J]. 江苏农业学报, 1997, 13(4): 206-210.
GENG Chuan-dong, Xie Wei-jun, Gong Zhen-zhen, et al. A study on proteins resistant to cotton *Verticillium* wilt pathogen [J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 1997, 13(4): 206-210.
- [11] 孙瑀, 马平, 朱宝成, 等. 棉花黄萎菌拮抗菌 BDT-25 的鉴定及抗菌蛋白产生条件研究[J]. 华北农学报, 2006, 21(6): 119-123
SUN Yao, Ma Ping, Zhu Bao-cheng, et al. Identification and production condition of the antifungal protein from antagonistic *bacterium* BDT-25 against *Verticillium dahliae* [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2006, 21(6): 119-123.
- [12] 袁洪水, 马平, 李术娜, 等. 棉花黄萎病拮抗细菌的筛选与抗菌物分析[J]. 棉花学报, 2007, 19(6): 436-439.
YUAN Hong-shui, Ma Ping, Li Shu-na, et al. Screening of antagonistic bacteria against *Verticillium dahliae* and characteristic analyses of antagonistic substance [J]. Cotton Science, 2007, 19(6): 436-439.