枯草芽孢杆菌 G8 抗菌蛋白的理化性质和抑菌作用

翟茹环 尚玉珂 刘 峰 张修国 慕 卫*

(山东农业大学植物保护学院,泰安 271018)

摘要: 分离得到一株对黄瓜菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary 有拮抗作用的枯草芽孢杆菌 G8,其无菌发酵液经硫酸铵沉淀得广谱抗菌粗蛋白。为明确枯草芽孢杆菌 G8 的理化性质,研究了温度、pH 变化、UV 照射、有机溶剂、蛋白酶和保存时间对抗菌蛋白稳定性的影响。结果表明:此粗蛋白耐酸,在 pH 值 1~10 范围内均有抑菌活性,将其 pH 值调为 1.0 作用 16 h 后保持原有活性的 69.2%;对温度有较高的稳定性,抗菌蛋白经 100 ℃处理 60 min 保持原有活性的 80.8%;对蛋白酶 K 和有机溶剂不敏感;抗菌粗蛋白抑菌活性持久,在常温下 120 天保持原有活性的 71.54%。初步研究了抗菌粗蛋白对黄瓜菌核病菌的抑制作用。结果显示,病菌菌丝消融、原生质渗漏、菌丝细胞泡囊化,并抑制病菌菌核萌发。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 拮抗细菌; 抗菌蛋白; 抑菌作用; 黄瓜菌核病菌

Characteristics and inhibitory action of antifungal protein produced by *Bacillus subtilis* strain G8

Zhai Ruhuan Shang Yuke Liu Feng Zhang Xiuguo Mu Wei*

(College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong Province, China)

Abstract: A *Bacillus subtilis* strain G8 which possesses antagonistic abilities to *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary was isolated. The crude antifungal protein obtained by ammonium sulfate precipitation had broad inhibition spectrum. To gain valuable information for further purification, structure determination and exploitation of the antifungal protein, the effects of heat, pH, UV, organic solvents, proteinase and preservation time on inhibiting activity of antifungal protein were studied. The result showed that it was stable in various pH and temperature and resistant to proteinase K and organic solvents. The antifungal protein is active in the range of pH 1-10, even be adjusted at pH 1.0 for 16 hours, the inhibition rate on *S. sclerotiorum* was retained 69.2%. The antifungal activity was retained 80.8% after at 100 ℃ for 60 min. The antifungal activity could lasting for long time at normal temperature and was retained 71.54% after preserving for 120 d. Preliminary study on the action mechanism of the antifungal protein demonstrated that it could break down the hyphae and leak the protoplasm, turn the hyphal cells into bigger sacs and inhibit germination of *Sclerotium sclerotiorum*.

Key words: *Bacillus subtilis*; antagonistic bacteria; antifungal protein; inhibitory action; *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary

---

基金项目:国家科技支撑计划项目(2006BAD17B07)

作者简介: 翟茹环,女,1981 年生,硕士研究生,主要从事生物防治研究,email: xiaoru515@163.com

*通讯作者(Author for correspondence), email: muwei@sdau.edu.cn, Tel: 0538-8242611

收稿日期:2007-06-29

由 *Sclerotinia sclerotiorum*(Lib.)de Bary 引起的黄瓜菌核病近年来在我国北方保护地黄瓜栽培中发生和危害日益严重,造成严重经济损失。目前尚无高抗性品种和特效药剂问世,致使该病的防治成为一个难题。近年来利用拮抗微生物对植物病害进行生物防治逐渐受到人们重视,尤其是枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 的应用。目前人们已从枯草芽孢杆菌的不同菌株中发现了 60 多种抗菌物质,这些抗菌物质对小麦全蚀病菌[1]、棉花枯萎病菌[2]、棉花立枯病菌[3]、烟草青枯病菌[4]、小麦纹枯病菌[5]、水稻纹枯病菌[6]、棉花炭疽病菌[7]等具有强烈的抑制作用,但关于黄瓜菌核病菌抗菌物质的研究国内未见报道。枯草芽孢杆菌 G8 是针对黄瓜菌核病菌筛选的拮抗菌,其产生的抗菌物质对黄瓜菌核病菌抑菌活性高且具有广谱抗性。本研究对抗菌物质的理化性质和抗菌谱进行了系统分析,以期为进一步研究作用机制、分析抗菌蛋白结构和开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株:拮抗菌株为枯草芽孢杆菌 G8 *Bacillus subtilis*(GenBank 序列号:EF491625),本实验室分离;指示菌株为黄瓜菌核病菌 *S. sclerotiorum*,本实验室保存。供试培养基:培养用 LB 培养液;拮抗用 PDA 培养基。仪器:THZ - 82 型空气浴摇床,江苏太仓;CR22 型高速冷冻离心机,日本日立;紫外分光光度计,日本岛津。

1.2 方法

1.2.1 G8 培养时间和抗菌活性的关系

用灭菌牙签挑取一个 G8 单菌落斑接种到 15 mL 试管中(装液量为 30%,下同),置 37 ℃ 180 r/min 振荡培养 16 h。按 5% 接种量接种于 250 mL 发酵瓶中,空白对照接种无菌水,同样条件下培养。每隔 4 h 取 4 mL 培养液两份,一份紫外分光光度计测定 OD_{600}吸收值,另一份在 10 000 r/min 离心 25 min,上清平板打孔法测定活性。以培养时间为横坐标,发酵液的 OD_{600}吸收值和除菌发酵液的抑菌率为纵坐标作图,分析 G8 的培养时间与抗菌物质抑菌活性的关系。

1.2.2 除菌发酵液的制备

将培养约 36 h(OD_{600}为 2.818,浓度为 4.2×10^7 cfu/mL)的发酵液经 4 ℃ 10 000 r/min 离心 25 min,上清液即除菌发酵液。

1.2.3 抗菌蛋白的提取方法

除菌发酵液中加固体硫酸铵至 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80% 和 90% 饱和度,置 4 ℃ 下过夜,高速冷冻离心机在 4 ℃下 10 000 r/min 离心 20 min。每 100 mL 培养液所得沉淀用 2 mL 浓度为 20 mmoL/L Tris · HCl(pH7.5)缓冲液悬浮。置截留分子量为 8.0 kD 透析袋中于 4 ℃ 透析 20 h,用同缓冲液脱盐,PEG6000 浓缩后得抗菌粗蛋白。平板打孔法测定活性,每孔加 60 μL,比较各饱和度沉淀粗蛋白的抑菌活性。

1.2.4 抗菌粗蛋白特性

热稳定性:将抗菌粗蛋白分别在 50 ℃ 处理 60 min、80 ℃ 处理 30 min 和 60 min、100 ℃ 处理 30 min 和 60 min。平板打孔法测定活性,每孔加 60 μL,以未处理的粗蛋白作对照,设抑菌率为 100%(下同)。

pH 稳定性:将抗菌粗蛋白用乳酸和氢氧化钠分别调至 pH 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0、13.0、14.0,置 4 ℃ 过夜,用乳酸和氢氧化钠将各 pH 值调回中性后检测活性。

对有机溶剂的敏感性:在抗菌粗蛋白中分别加入等体积的乙醚、乙酸乙酯、石油醚、三氯甲烷、丙酮和甲醇,充分混匀 30 min 后,热水浴(约 50 ℃)去除有机溶剂后检测活性。

紫外照射稳定性:抗菌粗蛋白在 20 W 紫外灯下距离 10 cm 分别照射 0、2、4、6、8、10、12 h 后检测活性。

蛋白酶 K 稳定性:将抗菌粗蛋白用蛋白酶 K 在 50 ℃ 下处理 60 min(酶反应浓度为 1 mg/mL)后测定活性。

抗菌蛋白储存时间与拮抗活性:将抗菌粗蛋白分别在常温和 4 ℃ 冰箱保存 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130 天后检测活性。

1.2.5 抗菌粗蛋白的抑菌活性

抗菌谱测定:用平板对峙法分别测定抗菌蛋白对黄瓜菌核病菌、棉花枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *vesinfectum*、黄瓜蔓枯病菌 *Mycosphaerella melonis*、棉花立枯病菌 *Rhizoctonia solani*、烟草黑胫病菌 *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*、棉花红腐病菌 *Fusarium moniliforme* var. *intermedium*、棉花黑斑病菌 *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*、番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea*、小麦纹枯病菌 *Rhizoctonia cerealis*、棉花炭疽病菌 *Colletotrichum gossypii* Southw、西洋参立枯根腐病菌 *Phytophthora cactorum*、大蒜灰霉病菌

Botrytis cinerea 和番茄早疫病菌 *Alternaria solani* Sorauе 的拮抗作用。

对黄瓜菌核病菌丝生长的影响:在 PDA 平板上将病原菌菌饼(直径 4 mm)接种于平板中央,28 ℃培养箱中培养 24 h 后,在新长成的菌丝周围打孔(4 mm),将待测的抗菌粗蛋白注入孔内,每孔 60 μL,28 ℃下培养 2 天,观察抑菌状况,镜检观察被抑制菌丝形态变化。

对菌核萌发的影响:选取大小一致的菌核,在 G8 抗菌粗蛋白中浸泡 10 s 后接种在 PDA 平板上,每平板接种 4 个菌核,接种三皿。以未处理的菌核为对照,培养 72 h 后观察菌核萌发情况。

2 结果与分析

2.1 生防菌培养时间和拮抗物质产生的关系

结果显示,在初始的 16 h 内菌体呈典型的对数增长。16 h 后,菌体生长随时间逐渐增加,在 20 h 时达到高峰,20 h 后菌体生长进入衰退期。其除菌发酵液抑菌活性随着菌体的增长而增加,但存在一定的滞后性,在菌体量达到高峰 16 h 后即培养 36 h 的除菌发酵液抑菌活性达到高峰,其后抑菌活性没有随时间的延长出现明显变化(图 1)。培养时间在 20 ~ 84 h 产生的拮抗物质均抑制菌核的产生。由此可见抗菌物质较稳定,对培养时间要求不严格。

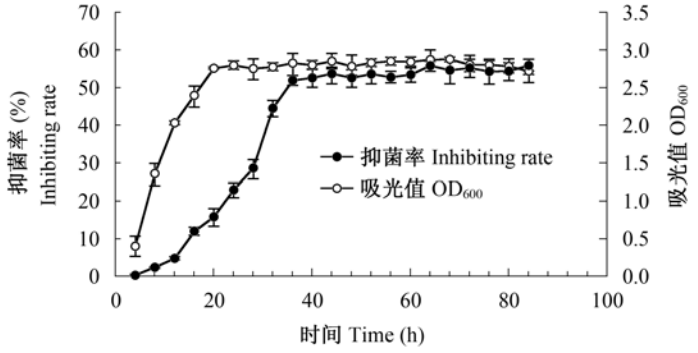

图 1 培养时间对 G8 抗菌蛋白抑菌活性和菌体生长的影响

Fig. 1 Effect of different culturing time on inhibiting activity and the growth of G8

2.2 抗菌蛋白沉淀最适硫酸铵饱和度的确定

结果显示,硫酸铵饱和度达到 40% 时抑菌圈直径为 24 mm,40% ~90% 抑菌活性没有显著提高(图 2)。故为减少无活性蛋白的含量选用 40% 硫酸铵饱和度沉淀抗菌蛋白。

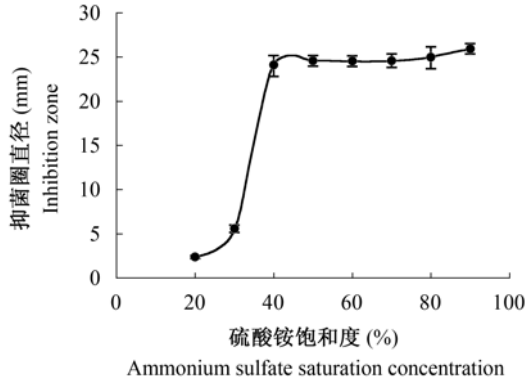

图 2 不同硫酸铵饱和度沉淀抗菌蛋白抑菌活性

Fig. 2 Effect of different saturations of $(NH_4)_2SO_4$ on inhibiting activity of antifungal protein

2.3 抗菌蛋白的性质

2.3.1 热稳定性:抗菌蛋白经 50 ℃处理 60 min、80 ℃处理 30 min 和 60 min 后其抑菌活性与对照相比没有变化。经 100 ℃处理 30 min 和 60 min 后抑菌率分别为原有的 90.9% 和 80.8%。由此可见抗菌蛋白对热不敏感。

2.3.2 对 pH 稳定性:将 pH 调为 1 作用 16 h 后活性为对照的 69.2%,pH 为 6 ~ 7 时抑菌活性无变化,pH 值在 8 以后,抑菌活性随着 pH 值的增大而降低,在 pH 为 10 时抑菌活性降为对照的 21.2%。说明抗菌蛋白对酸不敏感、不耐碱。

2.3.3 对有机溶剂的敏感性:经乙醚、乙酸乙酯、石油醚、三氯甲烷、丙酮和甲醇处理后对抗菌蛋白的拮抗活性略有影响,抑菌率分别为对照的81.2%、74.51%、77.45%、87.25%、79.41% 和 88.0%,说明抗菌蛋白对有机溶剂不敏感。

2.3.4 对紫外线的稳定性:随着紫外光照射时间的增长,抗菌蛋白的抑菌活性缓慢降低,紫外光照射 10 h 后抑菌活性为对照的 56.5%。说明抗菌蛋白耐紫外光。

2.3.5 对蛋白酶的稳定性:抗菌蛋白经蛋白酶 K 处理 60 min 后抗菌活性为对照的 84.6%,说明抗菌粗蛋白对蛋白酶 K 不敏感。

2.3.6 抗菌蛋白粗提液储存时间与拮抗活性:结果显示,抗菌蛋白经常温和 4 ℃储存 120 天后活性分别为对照的 71.54% 和 72.28%,表明温度对抗菌蛋白活性无影响(图 3)。

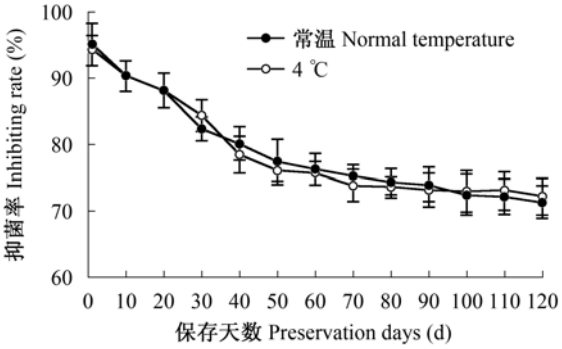

图 3 常温和 4 ℃保存时间对抗菌蛋白抑菌活性的影响

Fig. 3 Effect of preserving time in normal temperature or 4 ℃ on inhibiting activity of antifungal protein

2.4 抗菌蛋白抑菌活性

2.4.1 抗菌粗蛋白抑菌谱:结果显示,抗菌蛋白具有广谱抗性,对供试的 13 种病原真菌均有抑制作用,对黄瓜菌核病菌和番茄灰霉病菌抑制作用尤其明显(表 1)。

表 1 抗菌蛋白抗菌谱测定结果

Table 1 Inhibition spectrum of antifungal protein

病原菌 Pathogenic fungus	抑菌率 Inhibiting rate	病原菌 Pathogenic fungus	抑菌率 Inhibiting rate
棉花枯萎病菌 *F. oxysporum*	+	番茄灰霉病菌 *B. cinerea*	+++
黄瓜蔓枯病菌 *M. melonis*	++	小麦纹枯病菌 *R. cerealis*	−
棉花立枯病菌 *R. solani*	+	棉花炭疽病菌 *C. gossypii*	++
黄瓜菌核病菌 *S. sclerotiorum*	+++	西洋参立枯根腐病菌 *P. cactorum*	++
烟草黑胫病菌 *P. parasitica* var. *nicotianae*	−	大蒜灰霉病菌 *B. cinerea*	++
番茄早疫病菌 *A. solani*	++	棉花红腐病菌 *F. moniliforme* var. *intermedium*	++
棉花黑斑病菌 *X. campestris* pv. *malvacearum*	+		

注:+++:抑制率 80% ~100%;++:抑制率 60% ~80%;+:抑制率 40% ~60%;−:抑制率 <40%。Note: +++: inhibiting rate 80% −100%; ++: inhibiting rate 60% −80%; +: inhibiting rate 40% −60%; −: inhibiting rate <40%.

2.4.2 对黄瓜菌核病菌的抑制作用:镜检发现被拮抗菌丝有消融现象,造成原生质体凝集渗漏,空壳较多,菌丝体粗细不等、扭曲变形(图 4)。

2.4.3 抗菌蛋白对黄瓜菌核病菌菌核萌发的影响:培养 72 h 后,处理的 12 个菌核均未萌发,对照全部萌发,表明 G8 抗菌蛋白可以抑制黄瓜菌核病菌菌核的萌发。

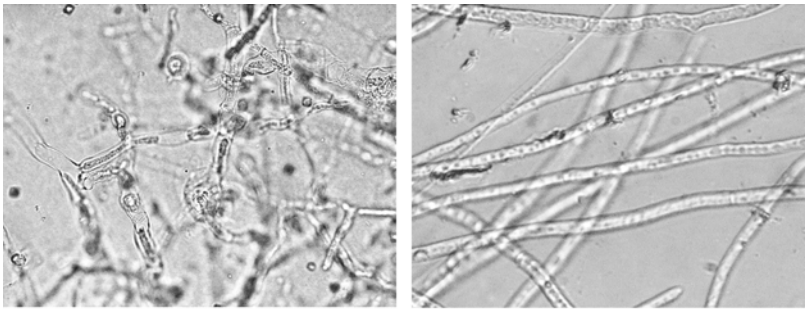

图 4 抗菌蛋白对黄瓜菌核病菌丝形态的影响

Fig. 4 Effect of antifungal protein of G8 on *S. sclerotiorum* mycelium

注:A 为抗菌蛋白处理的黄瓜菌核病菌丝形态;B 为对照处理的黄瓜菌核病菌丝形态。Note: A indicate mycelia of *S. sclerotiorum*; B indicate mycelia of *S. sclerotiorum* treated with antifungal protein.

3 讨论

从生防菌培养时间和拮抗物质产生的关系看，拮抗菌培养 20 h 后菌体生长进入衰退期，除菌发酵液在培养 36 h 后抗菌活性达到顶峰且抑菌活性没有随菌体生长衰退而下降。补充试验得知摇床培养 13 天的除菌发酵液抑菌活性依然保持较高水平，说明抗菌活性物质具有较高的稳定性。

G8 发酵液盐析沉淀蛋白后的上清液不存在抗菌活性且沉淀物对蛋白酶 K 敏感，由此推断其抗菌物质主要为蛋白或肽类物质。目前国内报道的耐热抗菌蛋白很多[8-9]，但耐酸的抗菌蛋白报道较少[10]，多为在 pH 4 ~ 12 时保持拮抗活性[11-13]。G8 产生的抗菌蛋白对酸稳定、对温度不敏感、耐紫外线和对有机溶剂敏感性差等，这些性质说明抗菌蛋白能适应特殊而复杂的环境，有良好的应用前景。

枯草芽孢杆菌产生的抗菌物质在防治植物病害中起着重要作用，并已从不同来源的菌株中分离到杆菌蛋白、大环脂和环脂蛋白、类似噬菌体颗粒及蛋白质等几十种不同的抗菌物质[10, 14-20]。在已报道的枯草芽孢杆菌抗真菌物质中，多数抑菌活性不强，抗菌谱窄，不能同时抑制多种丝状真菌。本实验室分离的拮抗细菌 G8 产生的抗菌物质属于广谱抗真菌蛋白，对已测定的 13 种真菌均有抑制作用，对黄瓜菌核病菌和番茄灰霉病菌的抑制作用尤为明显。

有研究表明枯草芽孢杆菌还可产生挥发性的抑菌物质。这些抗菌物质或抑制菌丝生长或抑制孢子萌发或二者兼具，对病菌产生有效的抑制作用。枯草芽孢杆菌 PRSS[21] 等菌株产生的挥发性代谢物质几乎可完全抑制 *Penicillium* spp. 、*Aspergillus chracens* 及 *R. solani* 等病菌菌丝的生长和孢子及毒素的形成。生产实践中主要通过改变土壤或特定空间（如包装容器）的气体组成而抑制病菌生长。由于试验条件所限，不能完全捕捉到 G8 产生的挥发性抗菌物质，活性测定其对不同真菌抑制率在 60% 左右，并可抑制菌核萌发。关于 G8 抗菌蛋白与挥发性抗菌物质的特性和作用机制还需进一步研究。

参 考 文 献（References）

1 张颖，王刚，王云帆，等. 枯草芽孢杆菌 B_{2-47} 对小麦全蚀病的防治及其病原的抑制作用. 河南大学学报（自然科学版），2006，36(1)：79 - 81

2 朱薇玲，缪礼鸿，刘晓红，等. 芽孢杆菌 B15 对棉花枯萎病菌的拮抗性能. 武汉工业学院学报，2006，25(3)：8 - 10

3 纪春艳，王纯利，罗明. 新疆棉花立枯病根际拮抗细菌的筛选. 西北农林科技大学学报（自然科学版），2007，35(5)：97 - 101

4 易有金，刘如石，尹华群，等. 烟草青枯病拮抗内生细菌的分离、鉴定及其田间防效. 应用生态学报，2007，18(3)：554 - 558

5 王刚，张彭湃，陈红卫，等. 枯草芽孢杆菌 B1-41 对小麦纹枯病菌的抑制作用. 微生物学杂志，2006，26(4)：20 - 22

6 顾真荣，魏春妹，马承铸. 枯草芽孢杆菌 G3 菌株抑制立枯丝核菌菌核形成的影响因子分析. 中国生物防治，2005，21(1)：33 - 36

7 王春霞，王道本，周启. 棉花根际促生菌筛选菌株的分类鉴定. 华中农大学报，1997，16 (1)：29 - 32

8 刘伊强，王雅平，潘乃穗，等. 拮抗菌 TG26 的鉴定及其抗菌蛋白 BI 的纯化和部分特性. 植物学报，1994，36(3)：197 - 203

9 谌晓曦，陈卫良，李德葆. 357 细菌及其拮抗物质对植物病原真菌的抑制. 微生物学报，2003，30(3)：67 - 71

10 谢栋，彭憬，王津红，等. 枯草芽孢杆菌抗菌蛋白 X98Ⅲ的纯化与性质. 微生物学报，1998，38(1)：13 - 19

11 沈锦玉，尹文林，曹铮，等. 枯草芽孢杆菌 B115 抗菌蛋白的分离纯化及部分性质. 水生生物学报，2005，29(6)：689 - 693

12 彭好文，黎起秦，蒙姣荣，等. 芽孢杆菌 B11 拮抗蛋白性质及其对西瓜枯萎病菌的作用机理. 植物保护，2003，29(5)：22 - 25

13 童有仁，马志超，陈为良，等. 枯草芽孢杆菌 B034 拮抗蛋白的分离纯化及特性分析. 微生物学报，1999，39(4)：339 - 343

14 刘进元，李忠，潘乃穗，等. 抗菌蛋白 LCⅢ的分离纯化及其部分特性. 生物工程学报，1992，8(3)：266 - 270

15 刘颖，徐庆，陈章良. 抗真菌肽 LP-1 的分离纯化及特性分析. 微生物学报，1999，39(5)：441 - 447

16 Landy M，Warren G H，Roseman S B，et al. Bacillomycin，anantibiotic from *Bacillus subtilis* active against pathogenic fungi. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine，1948，67：539 - 541

17 Peypoux F，Bonmatin J M，Wallach J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. Applied Microbiology Biotechnology，1999，51(5)：553 - 563

18 Vanittanakom N，Loeffler W，Koch U，et al. Fengycin- a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. Journal of Antibiotic，1986，39(7)：888 - 901

19 Maget-Dana R，Peypoux F. Iturins，a special class of pore-forming lipopeptides：Biological and physicochemical properties. Toxicology，1994，87(1/3)：151 - 174

20 刘永锋，陈志谊，周明国，等. 枯草芽孢杆菌 Bs-916 的抑菌活性及其抑菌物质初探. 农药学学报，2007，9(1)：92 - 95

21 杨佐忠. 枯草芽孢杆菌 PRS5 抗生作用的初步研究. 西南林学院学报，1992，12(2)：167 - 173