

枯草芽孢杆菌 B-903 菌株抗菌物质的研究

孔建 王文夕 赵白鸽 程红梅 申效诚 张桂芬

(河南省农业科学院植物保护研究所, 郑州 450002)

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) B-903 菌株系从郑州苹果园中分离得到, 其代谢产生的抗菌物质对多种植物病原真菌有强抑制作用。试验结果表明, 将 B-903 菌株摇床培养 24 小时, 细菌数量以对数增长达最大值; 培养 41 小时, 抗菌物质开始检出, 此时培养液 pH 值由 6.5 变为 7.5, 以后随细菌数量减少和 pH 值的回降, 抗菌物质逐渐积累, 于培养 112 小时达最高值。作者认为该物质是细菌衰亡过程中产生的代谢产物。培养过程中的供氧条件影响细菌数量的增长和抗菌物质积累。B-903 抗菌物质为水溶性物质, 常温下, 酸、碱条件不破坏该物质活性, 酸性环境中, 该物质具热稳定性。

关键词 枯草芽孢杆菌; 抗菌物质; 生物防治

目前, 植物病害主要依赖化学杀菌剂防治, 因而导致了环境污染和病菌抗药性产生等问题。农用抗生素在植物病害生物防治上的研究和应用已日益引起人们的重视, 但现有农用抗生素的产生菌多为放线菌和真菌, 拮抗性细菌由于培养方便, 生产周期短, 作为新的抗生素来源, 近年来颇受关注。作者于郑州苹果园中分离到一株编号为 B-903 的细菌, 对多种植物病原真菌具强拮抗作用, 经鉴定为枯草芽孢杆菌。为了解其抗菌物质的产生过程及特性, 进行了如下研究。

材 料 和 方 法

(一) 材料

B-903 菌株于 4℃ 下砂管保存, 试验前取出以 NYDA 培养基(牛肉膏 8g, 酵母浸膏 5g, 葡萄糖 10g, 琼脂 17—20g, 蒸馏水 1000ml) 于 30℃ 下斜面培养 24 小时。液体培养时将上述成份中除去琼脂。测试病原真菌采用 PDA 培养基(马铃薯 20g, 葡萄糖 10g, 琼脂 20g, 蒸馏水 1000ml) 斜面保存, 测试前转接入相同成份的平板培养基上培养。细菌抑制剂为分别配制的浓度为 100 单位/ml 的青霉素 G 钾盐和硫酸链霉素溶液。

(二) 方法

1. B-903 菌株培养滤液的制备: 将斜面培养的 B-903 菌株以 3ml 无菌水冲下, 接入 50ml 培养液中, 于 30℃ 下摇床振荡(120r/min) 培养 24 小时, 制成含细菌数量 (CFU) 10^8 /ml 的种子液。再将其以 1:20 的比例接种于 150ml 培养液中, 根据试验要求在上述条件下培养 72—144 小时后取出, 离心 (3000r/min) 15 分钟, 取上清液待用。

2. 抗菌物质活性测定: 根据试验内容, 将培养滤液加入细菌抑制剂或于 120℃ 下高温灭菌 20 分钟。用打孔器从平板培养的待测菌上取直径 5mm 的菌丝块, 移至 PDA 平

板培养基上,中心位置放一标准杯碟,杯碟中加满培养滤液,杯碟距测试菌接种点 20mm,于 28℃ 下培养。对照以无菌水或不含 B-903 抗菌物质的培养液测试,待对照中的测试菌长满平皿后,测量各处理抑菌圈。抗菌活性以抑菌圈直径大小表示。

3. 供氧条件对抗菌物质活性的影响:将 B-903 菌株于摇床振荡或静置(每日手摇 2 次以破坏表面菌膜)条件下液体培养 72 或 140 小时,制成培养滤液,以芝麻蚀脉镰孢菌测试活性;同时另将 B-903 菌株接入培养液后,分别取 20、40、80、160ml 装入 250ml 三角瓶中,振荡培养 72 小时后用同法测试培养滤液中的抗菌物质活性,并将离心获得的菌体烘干称重,以检查不同供氧条件对 B-903 细菌培养及其抗菌物质的影响。

4. 抗菌物质的产生过程研究:将 B-903 菌株液体振荡培养,定时取出部分培养液,检查 pH 值,细菌数量和培养滤液的抗菌活性,以查明抗菌物质的产生时间及其积累过程。

5. 抗菌物质的理化性质测定:将 B-903 菌株液体振荡培养 110 小时,制成培养滤液,各取 20ml,分别调节成不同的 pH 值,高温(120℃)处理后测定抗菌活性,以检验抗菌物质的稳定性。为进一步了解抗菌物质的特性,用浓盐酸将 500ml 培养滤液 pH 值调节至 2—3,使培养滤液产生沉淀,然后经离心(3000r/min)取上清液待测。将沉淀物取出烘干(50℃),用索式提取法以乙醚提取 6 小时,将乙醚提取液和不溶物分别取出,待乙醚提取液自然挥发干后,留下脂溶物,用 2ml 乙酸乙酯溶解后待测。将乙醚提取后的不溶物以 8ml 0.1mol/L 的 NaOH 溶液溶解后,在 4℃ 条件下超速离心(30000r/min) 10 分钟,取上清液待测,超速离心后的沉淀物仍以 0.1mol/L NaOH 溶液溶解后待测。上述各溶液均以芝麻蚀脉镰孢菌测试其抗菌活性。

结 果

(一) 抗菌物质的抑菌作用

将振荡培养的 B-903 菌株培养滤液经高温杀菌后,作抑菌测试,证明该滤液中确有抗菌物质存在。试验指出,该物质对供试的 13 种植物病原真菌均有明显抑制作用(表 1),将培养滤液稀释 40 倍后,用芝麻蚀脉镰孢菌测试,抑菌圈直径仍达 10.67—14.40mm。盆栽试验结果表明,培养滤液稀释 5—20 倍,浸泡棉种 24 小时,可降低棉苗炭疽病害发病率 62—85%,死苗率降低 41.48—45.83%。说明该抗菌物质不仅在平皿测试时有抑菌作用,而且可以通过植物体控制病害的发生和蔓延(另文发表)。

(二) 供氧条件对细菌生长和抗菌物质活性的影响

枯草芽孢杆菌是好气性细菌,供氧条件影响该菌的生长和抗菌物质的产量。试验结果表明,以摇床振荡培养,其培养滤液抑菌活性显著高于静置培养(表 2)。进一步试验指出,在恒定容积的容器中,培养液的装入量直接与供氧量有关。在 250ml 的三角瓶中,分别装入 20、40、80、160ml 的培养液,经 72 小时振荡培养后,各处理的菌体干重依次为 17.6×10^{-3} 、 14.35×10^{-3} 、 14.30×10^{-3} 、 10.2×10^{-3} g; 抑菌圈直径分别为 16.38、16.11、15.80、14.20mm。供氧量与菌体数量和抗菌物质活性呈正相关。

(三) 抗菌物质的产生与积累

由图 1 看出: B-903 菌株在液体培养过程中,初始的 24 小时内,细菌数量(CFU)呈

表 1 B-903 菌株抗菌物质的抑菌谱

Table 1 Antifungal spectrum of antibiotic substance obtained from culture of B-903 strain

植物病原真菌 Plant pathogeny fungi	抑菌圈直径 Inhibition zone (mm)	植物病原真菌 Plant pathogeny fungi	抑菌圈直径 Inhibition zone (mm)
球座尾孢 <i>Cercospora personata</i>	34	串珠镰刀菌 <i>F. moniliforme</i>	26.5
番茄早疫病菌 <i>Alternaria solani</i>	26.6	芝麻蚀脉镰孢 <i>F. vasinfectum</i> var. <i>sesami</i>	22.1
棉刺盘孢 <i>Colletotrichum gossypii</i>	25.5	黄瓜枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	18.8
苹果黑腐皮壳 <i>Valsa mali</i>	19.4	棉花枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	19.5
梨生囊孢壳 <i>Physalospora piricola</i>	17.5	姜枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>zingiberi</i>	18.8
尖镰孢 <i>Fusarium oxysporum</i>	17.8	西瓜枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	17.6

表 2 不同培养条件下 B-903 菌株培养滤液活性比较

Table 2 The antifungu activity to *F. vasinfectum* var. *sesami* of cultural filtrate at the condition of rotary shaker or motionless

处 理 Treatment	摇 床 Rotary shaker		静 置 Motionless	
	72h	140h	72h	140h
抑菌圈直径 Inhibition zone (mm)	16.67	18.67	18.78	14.78
差异显著性* Difference significance	b	a	c	c

* 表中字母不同者为差异显著

Any two value not marked by the same letter are significantly different in Duncan's method at $P = 0.05$.

典型的对数增长并达最大值, 培养 88 小时后细菌进入衰亡期; 培养液 pH 值在细菌数量达高峰后, 突然上升至 7.5, 此时(培养 41 小时)抗菌活性开始检出, 随抗菌物质的积累, pH 值逐渐转回酸性, 并稳定在 5.5 左右, 抗菌物质活性于培养 112 小时达最大值。根据三种曲线分析, 可把 pH 值由酸变碱的过程看作抗菌物质产生的信号, 该物质很可能是细菌衰亡期中释放出的代谢产物。

(四) 抗菌物质的理化特性

B-903 菌株培养滤液在酸性条件下, 经高温处理 20 分钟, 抗菌物质活性无衰减, 与未经高温处理的培养滤液无显著差异。但在中性或碱性环境中, 经高温处理抗菌活性全部丧失。说明该物质在酸性条件下具热稳定性。在中性和碱性环境中, 该物质虽无热稳定性, 但以细菌抑制剂排除活菌干扰后测试, 抗菌活性与在酸性环境下测试效果无差异, 证明该抗菌物质在碱性条件下也是稳定的。在进一步试验中以强酸条件 (pH2) 使抗菌物质沉淀, 并以 NaOH 溶液溶解该沉淀物, 使溶液 pH 值达 9—10, 抗菌物质仍保持相同活性,

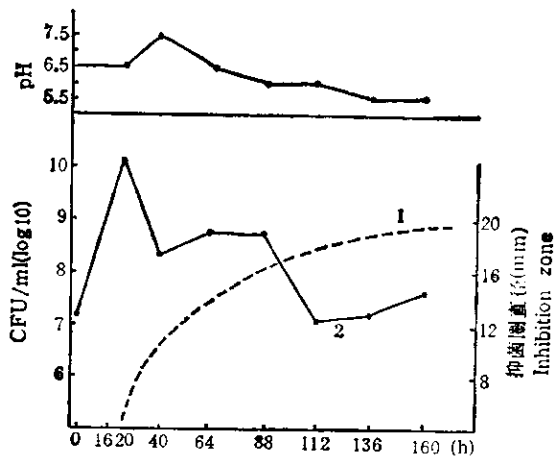


图1 B-903 菌株培养滤液的抑菌活性、培养时间和 pH 值的关系

Fig. 1 The relationship amongst antifungu activity of cultural filtrate of B-903 strain, it's pH value and it's cultural time

1. 抑菌圈直径 Inhibition zone 2. 菌落形成单位/ml CFU/ml

表3 不同 pH 下不同处理 B-903 菌株培养液的抑菌活性

Table 3 The antifungu activity of B-903 strain cultural filtrate autoclaved or not in different pH value

处 理 Treatment	高温灭菌 Autoclaved (121°C, 20min)		滤液中加入细菌抑制剂 Add penicillin and streptomycin into filtrate		蒸馏水中加入细菌 抑制剂 Add penicillin and streptomycin into water
	pH6	pH7 or 7.5	pH6	pH7.5	
抑菌圈直径 Inhibition zone (mm)	18.29	0	18.43	17.43	0
差异显著性* Difference significance	a	b	a	a	b

* 字母不同者为差异显著

Any two value not marked by the same letter are significantly different in Duncan's method at $P = 0.05$.

表明较强的酸、碱条件不改变该物质抗菌性能。但长期将该物质保存在酸、碱条件下对活性有何影响尚待研究。

以 HCl 使 B-903 菌株培养滤液产生沉淀后, 其上清液无抑菌活性, 而沉淀物质以 0.1mol/L NaOH 溶液溶解后, 抗菌活性明显, 表明抗菌物质存在于沉淀物中。将该粗提物(沉淀物)以乙醚提取后, 其脂溶物无抗菌活性, 将粗提物的碱性溶液经冷冻超速离心后, 上清液具抗菌活性, 沉渣则无抗菌性能, 说明该抗菌物质属于水溶性物质。

讨 论

近年来, 国外关于枯草芽孢杆菌对植物病原真菌的抑制作用及防治试验已有较多报道^[4,5]。国内也报道了对白菜软腐病^[1]、小麦赤霉病具抑制作用的菌株^[2]。从现有报道看, 各地菌株在抑菌谱上有较大差异, 一般只对 1 种或几种病原菌有效, B-903 菌株属于广谱

性的拮抗细菌,尤其对多种镰刀菌引起的土传病害有抑制作用,显示了良好的潜在应用前景。

关于枯草芽孢杆菌的抗菌物质结构,国外报道为多肽类^[6],国内尚无确定的结果。B-903 菌株的抗菌物质与其相比,在理化性质上有许多相似之处,如热稳定性、酸沉淀等,但国内外报道的这类物质主要造成病菌菌丝畸形,抑制孢子萌发等,而 B-903 菌株抗菌物质的主要抑菌机理是破坏病菌细胞壁,造成细胞溶解和消融^[5]。这种差异的根源和 B-903 菌株抗菌物质的结构等尚待进一步研究。另外,酸性环境可保护抗菌物质免遭高温破坏,这种保护机制值得探讨。

参 考 文 献

- [1] 王金生等: 南京农业大学学报, 12(4): 59—62, 1989。
- [2] 王雅平等: 生物防治通报, 8(2): 54—57, 1992。
- [3] 孔 建等: 生物防治通报, 8(2): 91—92, 1992。
- [4] Baker, C. J. et al.: *Plant Disease*, 69:770—772, 1985.
- [5] Guedner, C. R. et al.: *J. Agri. Food Chem.*, 36:336—370, 1988.
- [6] Mckeen, C. D. et al.: *Phytopathology*, 76:136—139, 1986.

STUDY ON CHARACTERISTIC OF ANTIFUNGU SUBSTANCE FROM *BACILLUS SUBTILIS* B-903 STRAIN

Kong Jian Wang Wenxi Zhao Baige Cheng Hongmei
Shen Xiaocheng Zhang Guifen

(Institute of Plant Protection, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002)

Antagonistic substance which is strong antagonistic to various plant pathology fungi can be produced by *Bacillus subtilis* B-903 strain separated from apple orchard of Zhengzhou. The experiment showed: cultured on rotary shaker for 24 hours, the CFU of this bacteria reached the largest value in log increasing at this time, pH changed from acid to alkline and got 7.5 at 41 hours, the antifungu activity of cultural filtrate could be detected simultaneously. As the decrease of CFU and decline of pH, antifungu activity increased gradually and reached the highest at 112 hours, this antifungu substances was thought as the metabolites produced in the die process of B-903. This substances is water dissoluble and stable in acid condition when autoclaved at 121°C for 20 minutes, but the antifungu activity disappear when autoclaved in neutral and alkline conditions at 121°C for 20 minutes. In room temperature condition, these substance is stable in neutral and alkline situation.

Key words *Bacillus subtilis*; Antifungu substances; Biological control