

文章编号: 1003-8701(2015)01-0064-04

# 一株抗灰霉病解淀粉芽孢杆菌的筛选鉴定 及抑菌蛋白的分离

王晓辉, 王贵鹏, 张庆芳, 迟乃玉\*, 石淑钰

(大连大学辽宁省海洋微生物工程技术研究中心, 辽宁 大连 116622)

**摘要:**【目的】为研究一株筛选自大黑山林间土壤下的生防细菌,以形态学、16S rDNA 进行鉴定。同时对其抑菌蛋白进行分离。【方法】采用对峙平板法进行初筛、复筛,用抑菌圈法测定抑菌效果,并镜检菌丝效果。通过形态学观察,生理生化及 16S rDNA 基因序列分析研究其分类。以 Sephacryl S-200 分离抑菌蛋白。【结果】生防细菌 K1 对灰霉病具有稳定的抑菌效果,抑菌直径达到 45 mm;16S rDNA 鉴定为解淀粉芽孢杆菌。无菌发酵液通过 Sephacryl S-200 分离得到一种抗菌蛋白。SDS-PAGE 显示其分子量为 55kDa。【结论】筛选出一株生防解淀粉芽孢杆菌 K1,分离得到一种分子量为 55kDa 的抗菌蛋白。

**关键词:**解淀粉芽孢杆菌;灰霉菌;抑菌作用;生理生化;Sephacryl S-200

中图分类号:S482.2

文献标识码:A

DOI:10.16423/j.cnki.1003-8701.2015.01.015

## Isolation, identification of an anti-*Botrytis cinerea* *Bacillus amyloliquefaciens* and Separation of Antimicrobial Protein

WANG Xiao-hui, WANG Gui-peng, ZHANG Qing-fang, CHI Nai-yu\*, SHI Shu-yu

(Liaoning Center of Marine Microbial Engineering and Technology, Dalian University, Dalian 116622, China)

**Abstract:** [Objective] In order to study the bio-control bacteria screened from forest soil in Dahei Mountain. Bacteria were identified by morphological, 16S rDNA, and its antimicrobial protein was separated. [Method] The plate-confrontation method and antibacterial circle method were used for preliminary screening and antimicrobial testing in vitro, respectively. The taxonomic identification of strain K1 was studied by analyzing its morphology characteristics, physiological and biochemical characteristics, and 16S rDNA gene sequence. Protein was separated by Sephacryl S-200. [Results] K1 had a stable inhibitory effect against *Botrytis cinerea*. Inhibition zone diameter was 45mm. From the taxonomic identification result, this bacterium was identified as *Bacillus amyloliquefaciens*. An antimicrobial protein was isolated by Sephacryl S-200. And SDS-PAGE results showed that molecular weight of protein was about 55 kDa. [Conclusion] A bio-control *Bacillus amyloliquefaciens* K1 was screened. An antibacterial protein with 55kDa was isolated.

**Keywords:** *Bacillus amyloliquefaciens*; *Botrytis cinerea*; Inhibition effect; Physiological and chemical property; Sephacryl S-200

灰霉病广泛存在于番茄、草莓、黄瓜等农作物中,其由灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea* Pers.) 感染所致。灰霉病孢子在 7~15℃便可以萌发,从寄主伤口、衰老器官、枯死组织或表皮上侵入从而引发病变<sup>[1]</sup>。极易使农作物在贮藏和运输中染病,并

造成严重的损失。防治灰霉病的主要方法是传统的喷洒化学农药<sup>[2]</sup>。但是这种方法不仅带来环境污染,同时也威胁着人类健康。随着化学农药的使用,病原菌抗药性不断增加,使防效降低。与传统的化学农药相比,生物农药具有成本低,无污染,无残留,不产生抗药性等优点。目前关于生防菌株的研究主要包括生防真菌和生防细菌<sup>[3]</sup>。生防真菌中木霉菌可以寄生于多种植物病原真菌,具有广谱的抑菌效果<sup>[4]</sup>。生防细菌主要包括芽孢杆菌、土壤放射杆菌、假单胞杆菌等。芽孢杆菌

收稿日期:2014-07-12

基金项目:863 计划子课题(2007AA01306)

作者简介:王晓辉(1981-),女,讲师,博士,从事海洋低温酶制剂研究。

通讯作者:迟乃玉,男,博士,教授,E-mail: Cny7566@126.com

属中的解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)抑菌广谱性强,对炭疽病(*Anthraxnose*)<sup>[5]</sup>、灰霉病(*Botrytis cinerea*)<sup>[6]</sup>、青霉病(*Penicillium italicum*)<sup>[7]</sup>、柑桔绿霉菌(*Penicillium digitatum*)<sup>[3]</sup>等都有抑制作用。解淀粉芽孢杆菌大多分离自根系附近土壤,在自然界分布广,易于分离,且可产生植酸酶、几丁质酶、葡聚糖酶、蛋白酶、淀粉酶、凝乳酶等多种抗菌蛋白<sup>[1,8-9]</sup>和伊枯草菌素、丰原素等多种脂肽类抗生素<sup>[9-12]</sup>,因此在生物防治中有广阔的应用前景。

本实验室筛选鉴定出一株解淀粉芽孢杆菌,抑菌实验,对峙平板法,菌丝镜检等证明其抑菌效果较好。并对其抗菌蛋白分离,得到一分子量为55 kDa的抑菌蛋白。对孢子萌发,菌丝生长均有较好的抑制效果。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

菌株筛选自大连市开发区大黑山,林间地下10~20 cm处的土壤中。

### 1.2 菌株及培养基

灰霉菌株(*Botrytis cinerea*)。

初筛培养基:牛肉膏0.3 g;蛋白胨1 g;NaCl 0.5 g;pH 7.0;ddH<sub>2</sub>O 100 mL。

种子培养基:酵母膏0.3 g;蛋白胨1 g;NaCl 0.5 g;pH 7.0;ddH<sub>2</sub>O 100 mL。

PDA培养基:马铃薯20 g;葡萄糖2 g;水100 mL;pH自然。

### 1.3 菌株的筛选和鉴定

#### 1.3.1 菌株的初筛

将1 g土壤加入100 mL蒸馏水中,制备悬浊液,分别稀释获得浓度为10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup>、10<sup>-8</sup>(W/V)的样品溶液,分别移取0.1 mL涂布于固体初筛培养基平板上,30℃培养24 h。

#### 1.3.2 菌株的复筛

以对峙平板法复筛<sup>[13]</sup>,从上述初筛平板上挑取形态不同的菌落在灰霉菌琼脂块两侧划线,以两侧不划线的作为对照组,培养96 h测其抑菌率。

抑菌率(%)=[(对照组灰霉菌直径-处理灰霉菌直径)/对照组灰霉菌直径]×100%

#### 1.3.3 抑菌效果的验证

抑菌实验,用打孔器在PDA培养基上打孔,然后将灰霉菌孢子悬液均匀涂布到培养基上(避开洞口),最后将所筛菌发酵液滴加到洞口(注意避免

溢出洞口),27℃培养96 h,测其抑菌直径。

抑菌直径=(最大抑菌直径+最小抑菌直径)/2

将抑菌圈边沿受抑制的菌丝和正常菌丝以孔雀石绿染色后镜检。

#### 1.3.4 形态学特性

将有抑菌效果的菌株接种于固体初筛培养基平板中,27℃培养,观察单菌落的形状、大小、颜色等形态特征。采用革兰氏染色法,观察菌体形状、革兰氏染色反应。

#### 1.3.5 生理生化鉴定

参照《伯杰氏细菌手册》第8版相关内容,菌株对应生理生化进行验证<sup>[14]</sup>。

#### 1.3.6 菌株的分子生物学鉴定

采用酚氯仿抽提法提取菌株的DNA。以16SrDNA引物进行PCR扩增。Forward primer P<sub>1</sub>(5'-CAGAGTTTGATCCTGGT-3'); Reverse primer P<sub>2</sub>(5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')进行PCR扩增<sup>[15]</sup>。扩增反应体系 Ex Taq (5U/μL) 0.25μL, Buffer 5.0μL, dNTP mixture 5.0μL, Forward primer 0.5μL, Reverse primer 0.5μL, 补加 ddH<sub>2</sub>O 到 50 μL。扩增程序为:94℃预变性5 min;94℃变性1 min,55℃复性1 min,72℃延伸1.5 min,30个循环;72℃延伸5 min。PCR产物测序,与NCBI进行BLAST比对,并以MEGA5软件进行系统发育树的构建。

### 1.4 拮抗物的分离

将K1接种于种子培养基中,27℃培养24 h后以1%的接种量接种于PDA培养基中培养48 h后待用。

先将Sephacryl S-200(Φ1.6 cm×50 cm)以pH 7.4的PBS缓冲液平衡,将发酵液6000 r/min离心除菌体后上样3 mL,以相同的缓冲液洗脱,以蛋白检测仪(OD<sub>280</sub>)记录洗脱液蛋白含量,收集吸收峰处的蛋白,以透过分子量3 kDa的透析膜4℃过夜透析除盐。将所得蛋白溶液以孢子萌发抑制率实验和抑菌圈实验检测蛋白抑菌效果。抑菌圈实验采用孟加拉红土豆培养基,防止杂菌干扰。将所得透析蛋白冷冻干燥浓缩,并以电泳检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 筛选结果

自落叶下土壤中筛选出一株灰霉菌拮抗菌,命名为K1。菌落为圆形,白色,表面初始光泽,几天后变为褶皱,边缘翘起,中间凹陷。菌落粘稠且菌株生长旺盛,易凝聚成菌斑。平板中可获得

直径为 15 mm 的大菌落,如图 1(A)。通过革兰氏染色验证为革兰氏阳性,菌体呈现椭圆形,两端紫色,中间较透明。如图 1(B)(10×100oil)。

### 2.2 抑菌效果验证

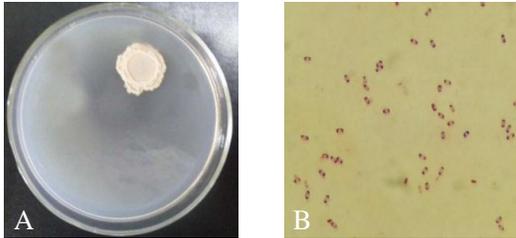


图 1 K1 形态学观察

#### 2.2.1 抑菌效果的平板验证

通过对峙平板法检验 K1 的抑菌效果,结果如图 2(A 为对照组, B 为实验组)。其抑菌率为 57%。抑菌实验得到抑菌直径为 43 mm,如图 2(C)。

#### 2.2.2 抑菌效果的镜检

镜检结果如图 3,正常菌丝(B)粗壮,孢子浓密,有明显的孢子束。受抑制的菌丝(A)出现弯曲、褶皱、断裂、畸形等现象,且没有孢子囊和孢子束。因细胞膜通透性的增加,细胞质基质外流,使菌丝明显变细,并影响染色效果。

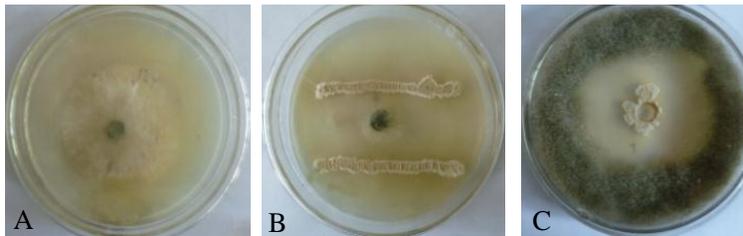


图 2 K1 对灰霉菌的抑菌效果

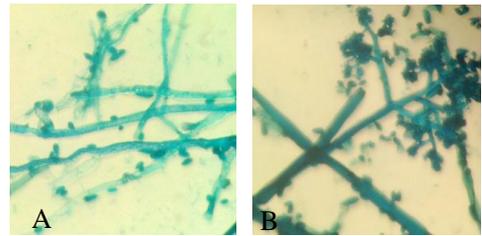


图 3 K1 对灰霉菌丝的作用效果

### 2.3 菌株鉴定

#### 2.3.1 生理生化结果

K1 的部分生理生化特征见表 1。

表 1 K1 的生理生化特征

特征	K1	特征	K1
葡萄糖产酸	+	明胶液化	-
淀粉酶	+	过氧化氢酶	+
厌氧生长	-	甲基红	-
Tween 80	-	V-P	-
脲酶	+	蔗糖醇解	+

注:+:阳性;-:阴性

#### 2.3.2 16S rDNA 序列分析

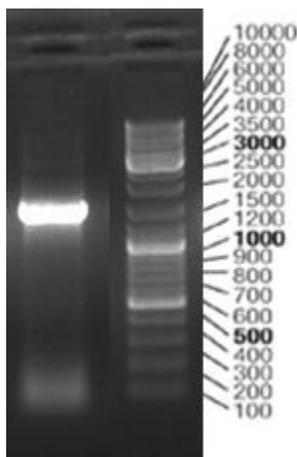


图 4 K1 的 16S rDNA PCR 扩增电泳分析结果

经 1% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统下显示的图像如图 4。测序结果表明,扩增的 16S rDNA 序列全长 1442 bp。16S rDNA 鉴定结果为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefacien*),系统发育树结果见图 5。K1 与解淀粉芽孢杆菌亲缘最近。

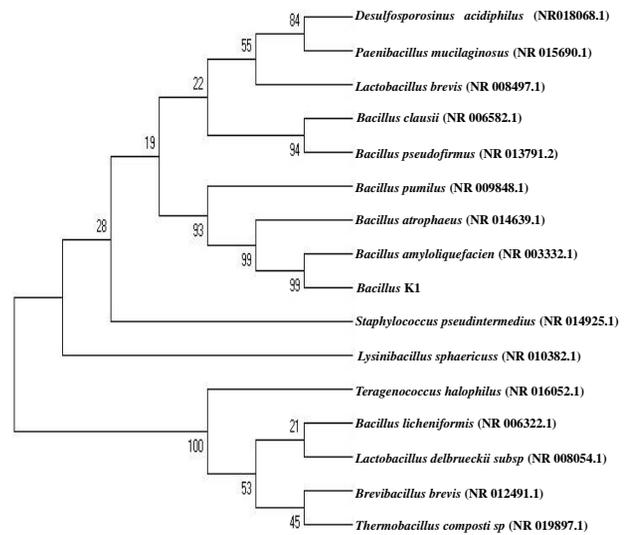


图 5 菌株 K1 系统发育进化树

### 2.4 拮抗物的分离

#### 2.4.1 Sephacryl S-200 柱分离

通过 Sephacryl S-200 的分离结果及与对应蛋白吸收峰的孢子萌发抑制率如图 6。从图 6 可以得出,蛋白主要集中在 100 ~ 250 min 之间。出现 3 个峰,按出峰顺序命名为 A 峰、B 峰、C 峰,通过

孢子萌发抑制率实验证明C峰的孢子萌发抑制率最高。以A、B、C三个吸收峰处的蛋白溶液做抑菌实验, C峰处所得到蛋白有抑菌效果。A、B峰处无抑菌效果。说明C峰处为有抑菌活性的蛋白。并通过SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳检测蛋白的分子量。12% SDS-PAGE蛋白电泳结果如图7, C峰的蛋白分子量为55kDa左右。

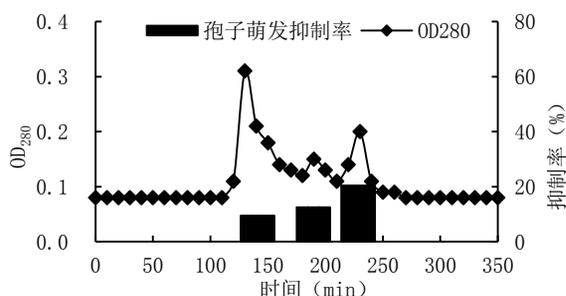


图6 Sephacryl S-200凝胶柱层析洗脱结果

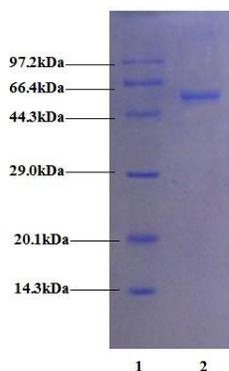


图7 SDS-PAGE电泳结果

注:1:Marker; 2:C峰

### 3 结论与讨论

本实验室从大连大黑山林间土壤中筛选出一株灰霉病拮抗菌。通过形态学、16S rDNA 鉴定该菌株为解淀粉芽孢杆菌。经对峙平板法, 抑菌圈法, 菌丝镜检证明其有良好的抑菌效果。根据结果推测: 解淀粉芽孢杆菌可分泌多种抑菌物质, 破坏灰霉菌菌丝的细胞壁, 改变细胞膜通透性, 细胞质基质外流。使受抑制的灰霉菌菌丝无法完成菌丝生长、孢子萌发等代谢过程, 最终死亡。

芽孢杆菌作为生防细菌的重要组成部分, 早已得到广泛的重视。已报道的解淀粉芽孢杆菌代谢拮抗物质主要有: 几丁质酶、 $\beta$ 1-3葡聚糖酶、纤维素酶、蛋白酶、氢氰酸、嗜铁素等。嗜铁素主要结合铁离子, 使灰霉菌缺铁而死亡。蛋白酶、几丁质酶等主要是裂解灰霉菌细胞壁。从而抑制菌丝的发育。解淀粉芽孢杆菌代谢产生的抑菌物质

较多, 抑菌效果是多种抑菌物质协同作用的结果。

解淀粉芽孢杆菌抑菌机理复杂, 其详尽的抑菌机理需经进一步研究得到。但因解淀粉芽孢杆菌有良好的抑菌效果, 国外已经进行了半商业化的实验, 有的拮抗菌已经制成商品投放市场<sup>[16-17]</sup>, 其在生物防治领域有广阔的应用前景。

#### 参考文献:

- [1] 陆继臣, 迟乃玉, 张庆芳. 格氏沙雷菌 CNY-04 对灰霉病菌作用机制及抑菌物质理化性质研究[J]. 植物保护, 2013, 39(3): 73-77.
- [2] Wedge D E, Smith B J, Quebedeaux J P, et al. Fungicide management strategies for control of strawberry fruit rot diseases in Louisiana and Mississippi[J]. Crop Protection, 2007, 26(9): 1449-1458.
- [3] Elad Y, Kohl J, Fokkema N J. Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic bacteria and fungi[J]. European Journal of Plant Pathology, 1994, 100(5): 315-336.
- [4] 屈海泳, 罗曼, 蒋立科. T90-1 木霉菌的筛选和对草莓灰霉病菌作用机制的研究[J]. 微生物学报, 2004, 44(2): 244-247.
- [5] 罗萍, 区建发, 杨炜钊, 等. 香蕉炭疽菌拮抗生防菌株的筛选及鉴定[J]. 现代食品科技, 2011, 27(3): 275-278.
- [6] 王奕文, 胡文兵, 许玲. 甜瓜果实表面生防芽孢杆菌的类群与鉴别[J]. 植物病理学报, 2008, 38(3): 317-324.
- [7] Sun L J, Lu Z X, Bie X M, et al. Isolation and characterization of a co-producer of fengycins and surfactins, endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2 from *Scutellaria baicalensis* Georgi[J]. World Journal of Microbiology Biotechnology, 2006(12): 1259-1266.
- [8] 吴慧玲, 刘伟成, 董丹, 等. 一株生防细菌的分离鉴定及其抑菌活性物质的分析[J]. 中国农学通报, 2012, 28(33): 107-111.
- [9] Thomas D W, Ito T. The revised structure of the peptide antibiotic esperin, established by mass spectrometry[J]. Tetrahedron, 1969, 25(9): 1985-1990.
- [10] Vanittanakom N, Loeffler W, Koch U, et al. Fengycin-A novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3[J]. J Antibiotics, 1986, 39(7): 888-901.
- [11] Maget Dana R, Peypoux F. Iturins, a special class of pore forming lipopeptides: biological and physicochemical properties[J]. Toxicology, 1994(87): 151-174.
- [12] 邓建良, 刘红彦, 刘玉霞, 等. 解淀粉芽孢杆菌 YN-1 抑制植物病原真菌活性物质鉴定[J]. 植物病理学报, 2010, 40(2): 202-209.
- [13] 方中达. 植物研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997: 249-253.
- [14] 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.
- [15] Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study [J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(2): 697-703.
- [16] Sharma R R, Singh D, Singh R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review[J]. Biological Control, 2009, 50(3): 205-221.
- [17] 洪鹏, 安国栋, 胡美英, 等. 解淀粉芽孢杆菌防治果蔬采后病害研究进展[J]. 中国农学通报, 2013, 29(12): 168-173.