

文章编号: 1000-5692(2007)01-0091-05

生防菌 ZJY-1 抑菌作用的初步研究

张 昕¹, 张立钦¹, 马良进¹, 林海萍¹, 毛胜凤¹, 张炳欣²

(1. 浙江林学院 林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300; 2. 浙江大学 农业与生物技术学院, 浙江 杭州 310029)

摘要: 通过测定发酵上清液和细胞破碎液对供试黄瓜枯萎病菌 *Fusarium oxysporium* f. *cucumerinum* 菌丝生长和分生孢子萌发的抑制作用, 初步研究了植物病原生防细菌 ZJY-1 *Brevibacillus brevis* 的拮抗活性。结果表明, 该菌株主要通过分泌到胞外的次生代谢产物抑制病原菌的生长。与对照和细胞破碎液处理相比, 病原菌菌丝在含有发酵上清液的培养基上生长明显受到抑制; 由发酵上清液制备的拮抗粗提物显著抑制病原孢子的萌发和芽管的伸长, 抑制率分别为 96.0% 和 82.0%。图 3 表 2 参 16

关键词: 微生物学; 生防细菌; 生物防治; 抑菌作用; 植物病害; 次生代谢产物

中图分类号: S476; Q935 **文献标识码:** A

植物病原菌引起各类农作物病害, 给农林业生产造成极大的经济损失^[1]。长期以来, 人们主要依赖化学方法减轻病害的发生程度^[2]。近年来, 一种新的植物病害防治方法——生物防治, 越来越引起重视^[3-9], 而其中能够产生内生孢子, 具有广泛环境适应性的芽孢杆菌属 *Bacillus* 已成为研究热点^[7-9]。许多结果表明芽孢杆菌能显著降低病害的发生程度^[10,11], 有些种还具有促进植物生长的潜力, 有广阔的开发应用前景^[12]。作者以 1 株分离自黄瓜 *Cucumis sativus* 根围、对多种病原菌具有明显抑制作用的芽孢杆菌为出发菌, 对其抑菌机理作了初步研究, 为防菌剂型的研制和实际施用提供了理论依据。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株

生防菌 ZJY-1 *Brevibacillus brevis* 分离自黄瓜根围, 由浙江大学鉴定, 经验证对多种病原菌生长有抑制作用; 供试病原菌为黄瓜枯萎病菌 *Fusarium oxysporium* f. *cucumerinum*, 由浙江大学农业与生物技术学院生物所实验室鉴定并保存。

1.2 培养基

细菌发酵基础培养基为金氏 B 培养基(KMB); 病原菌生长培养基为马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA); 查氏培养基用于病原真菌产孢。

1.3 菌株的拮抗机制研究

1.3.1 种子液的制备 用灭菌牙签在 KMB 平板上挑取新鲜生长的单个菌落, 置于含 30 mL KMB 培养

收稿日期: 2006-03-13; 修回日期: 2006-05-24

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目(30230250)

作者简介: 张昕, 博士, 从事植物病理学与微生物生态学研究。E-mail: zhangxins@126.com

液的50 mL三角瓶中, 28 °C 200 r·min⁻¹的摇床中培养24 h后, 吸取1.5 mL, 按照1%比例接种在含有150 mL的250 mL三角摇瓶中, 28 °C 200 r·min⁻¹的摇床中培养24 h, 制成种子液。

1.3.2 发酵上清液对尖孢镰刀菌菌落生长的抑制作用 将新鲜的种子液以1%的比例(1.5 mL)接种到含150 mL KMB培养液的250 mL的三角瓶中, 30 °C下200 r·min⁻¹的摇床中培养。在培养24, 48, 72, 96和120 h时, 分别取培养液做拮抗测定。方法如下: 培养液1.2万 r·min⁻¹离心10 min, 去菌体, 上清经细菌过滤器过滤制成无菌滤液。取1 mL无菌滤液和14 mL即将冷却的PDA培养基倒入无菌培养皿, 迅速混匀, 以无菌水代替无菌滤液为对照, 均设3个重复, 待凝固后在培养皿的中央接入直径为6 mm病原菌菌块, 置于28 °C的生化培养箱中培养。当对照的病原菌长至培养皿边缘时, 用十字交叉法测定处理组的镰刀菌菌块直径, 并且计算出抑制率。公式如下: 抑制率(%)=[(对照组菌落直径-处理组菌落直径)/对照组菌落直径]×100%。

1.3.3 细胞破碎液对尖孢镰刀菌菌落生长的抑制作用测定 将方法1.3.2中各时段1.2万 r·min⁻¹离心后的菌体用20 mmol·L⁻¹的Tri·Cl (pH 7.5)缓冲液悬浮, 经超声波破碎细胞后, 用细菌过滤器过滤。无菌的细胞破碎液按上述相同方法作抗菌作用测定。

1.3.4 菌株生长曲线与代谢产物形成的关系 在24, 48, 72, 96和120 h时, 分别取培养液稀释后测量其光密度(600 nm)值, 明确菌株的生长与代谢产物形成的关系。

1.3.5 拮抗粗提液的制备 将新鲜的菌株种子液以1%的比例(1.5 mL)接种到含150 mL KMB培养液的250 mL摇瓶中, 30 °C下220 r·min⁻¹的摇床中培养到代谢产物提取的最佳时间。1.2万 r·min⁻¹离心10 min去菌体, 经细菌过滤器过滤得到无菌滤液, 加入固体硫酸铵(边搅拌边加), 制成45%~80%各饱和梯度, 用方法1.3.2验证代谢产物盐析的最佳饱和度。无菌滤液经最佳饱和度盐析后, 4 °C下静置过夜。8 000 r·min⁻¹下离心20 min后, 用1 mL 0.1 mmol·L⁻¹的Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ (pH 6.6)的缓冲液溶解沉淀得到的样品即拮抗粗提液。拮抗粗提液对病原菌的抗菌作用方法同方法1.3.2。

1.3.6 拮抗粗提液对尖孢镰刀菌孢子萌发的影响 病原菌孢子悬液的制备及孢子萌发的抑制实验参照程亮等方法进行^[13]。

1.3.7 拮抗粗提液对尖孢镰刀菌菌丝生长的影响 用拮抗粗提物淋喷平面培养病菌菌落26 °C培养后, 与经缓冲液淋喷的对照平面同时定期镜检。

2 结果与分析

2.1 菌株ZJY-1发酵上清液对尖孢镰刀菌菌落生长的影响

ZJY-1的上清液对病原菌生长有明显的拮抗作用(图1)。在无菌上清液处理的PDA平板上的病原菌菌落直径明显小于无菌水处理的对照, 生长受到显著抑制。

2.2 菌株ZJY-1细胞破碎液对尖孢镰刀菌菌落生长的影响

ZJY-1的细胞破碎液与缓冲液以及无菌水的对照相比对病原菌的生长几乎没有影响(图1), 可见菌株主要靠分泌到胞外的次生代谢产物对病原菌发挥抑菌作用。

2.3 菌株ZJY-1生长曲线与代谢产物形成的关系

由图2可知, 随着细菌的生长, 抗菌代谢产物对*Fusarium oxysporum* f. *cucumerinum*的抑制率逐渐增加, 并在细菌生长量达到最高峰(72 h)12 h后达到最大值。由此可知细菌抗菌物质的积累与细菌的生长同步, 但高峰期的出现滞后曲线的稳定期12 h, 即细菌发酵96 h后抗菌物质产量达

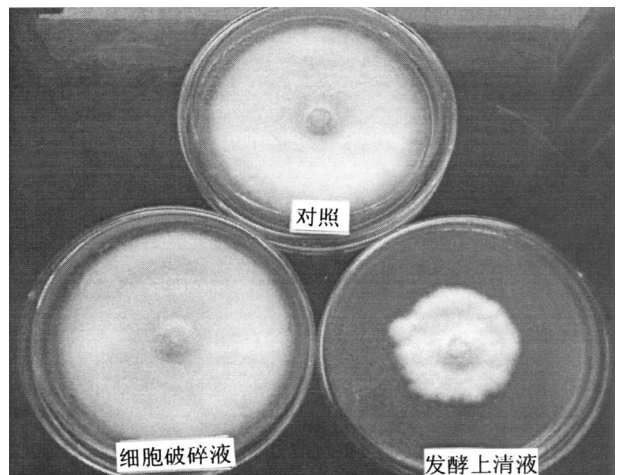


图1 细菌抗菌物质对病原真菌的抑制作用

Figure 1 Effects of antagonistic metabolites on the pathogens

到最大。

2.4 代谢产物盐析最佳饱和度的确定

由表 1 可知, 随着硫酸铵饱和度的逐渐增加, 上清液的抑菌作用呈逐渐降低的趋势, 而沉淀的抑菌作用逐渐增强, 当饱和度为 75% 时抑菌效果达到最大。

2.5 拮抗粗提物对病原菌孢子萌发的抑制

结果表明, 拮抗菌的代谢粗提物对 *Fusarium oxysporium* f. *cucumerinum* 的分生孢子萌发率及芽管的伸长均有显著的抑制作用, 对孢子萌发的抑制效果为 96.0%, 对芽管生长的抑制效果为 82.0% (表 2 图 3)。

表 1 不同 (NH₄)₂SO₄ 饱和度下代谢产物的抑制率

Table 1 Inhibitive value of metabolites against *Fusarium oxysporium* f. *cucumerinum* under different (NH₄)₂SO₄ saturation

饱和度/%	抑制率/%	
	上清	沉淀
45	34.6	39.7
50	31.8	41.4
55	29.6	45.3
60	25.5	49.1
65	16.3	53.2
70	10.7	62.5
75	1.5	67.8
80	0	67.1

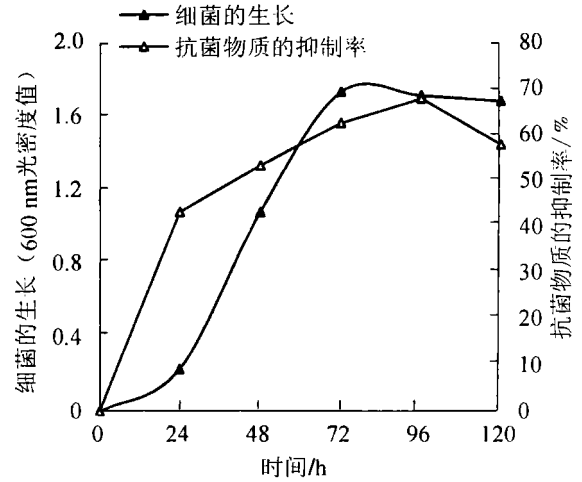


图 2 菌株生长曲线与抗菌代谢产物形成的关系
Figure 2 Relationship between growth curve and production of antagonistic metabolites of strain ZJY-1

表 2 抗菌粗提液对 *Fusarium oxysporium* f. *cucumerinum* 分生孢子萌发和芽管生长的抑制作用

Table 2 Inhibition effect of antagonistic metabolites on germination and tube growth of conidia of *Fusarium oxysporium* f. *cucumerinum*

处理项	平均萌发率/%	抑制效果/%	显著性	平均芽管长/ μ m	抑制效果/%	显著性
对照	100		a	229		a
抗菌粗提液	4	96.0	b	41	82.0	b

说明: ①在凹玻片上培养 9 h 所得结果。②萌发率的抑制效果(%)=[(对照平均萌发率-粗提液平均萌发率)/对照平均萌发率] × 100%; 芽管生长的抑制效果(%)=[(对照平均芽管长-粗提液平均芽管长)/对照平均芽管长] × 100%。

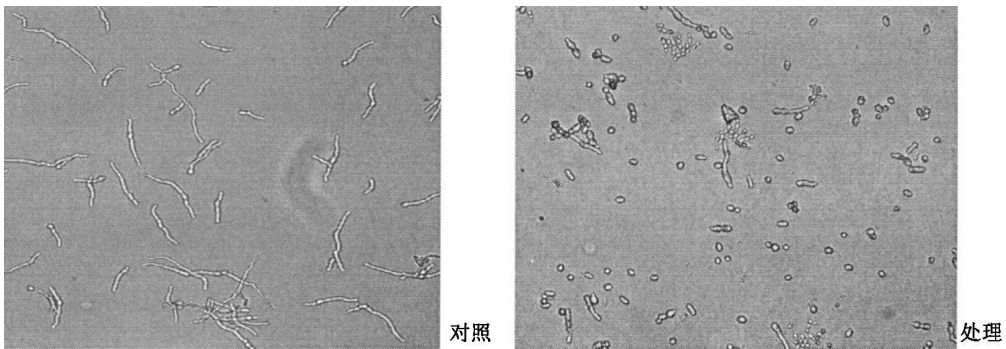


图 3 抗菌粗提液对 *Fusarium oxysporium* f. *cucumerinum* 分生孢子萌发的抑制作用

Figure 3 Inhibition effect of antagonistic metabolites on germination and tube growth of conidia of *Fusarium oxysporium* f. *cucumerinum*

2.6 拮抗粗提物对病原菌菌丝的影响

经拮抗粗提物喷淋 5 d 后, 与对照相比, 菌丝变得细弱, 枯萎, 褶皱, 并有变形。

3 结论与讨论

拮抗机制的研究发现, 菌株 ZJY-1 主要通过产生分泌到胞外, 能够抑制菌丝正常生长和分生孢子萌发的抗菌代谢产物达到抑制病原菌的目的。无菌的发酵上清液使菌丝变得细弱、枯萎、褶皱, 并有变形; 病原菌的孢子悬液经该上清液处理后其萌发率及芽管的生长均受到显著的抑制。菌体细胞经超声波破碎后未发现具有抑菌作用, 可见抗菌物质分泌在胞外。 *Brevibacillus brevis* 因为对多种植物病害具有显著的防治作用, 目前在欧洲国家已有成功的应用。Edwards 等^[4]的研究证实, 该菌株产生的一种短杆菌肽 S 参与了对病原菌的拮抗抑制。另有报道, *Brevibacillus brevis* 还能够分泌有抑菌作用的短杆菌肽 D 和短杆菌酪肽, 因此, 笔者研究的菌株产生的具体抗菌物质还有待进一步探索。

尽管当前人们主要着眼于将活菌制剂引入环境, 发挥生态效应, 但施用具有显著生态功能的微生物次生代谢产物也不失为良策, 目前已有很多成功的应用实例^[15, 16]。笔者对 ZJY-1 分泌的抑菌代谢产物的体外测定表明, 该物质对热、蛋白酶 K 和紫外线等极端稳定, 具有进一步开发利用的潜力。

参考文献:

- [1] 王光亮, 于金友, 石玉萍, 等. 植物病害生物防治研究进展[J]. 山东农业科学, 2004 (4): 75-76.
- [2] 彭好文, 黎起秦, 林纬. 生物防治研究及其应用概况[J]. 广西农业生物科学, 2004, 23 (2): 170-175.
- [3] 葛红莲, 赵红六, 郭坚华. 植物土传病害微生物农药的研究开发进展[J]. 安徽农业科学, 2004, 32 (1): 153-155.
- [4] 王占武, 李晓芝, 张翠绵, 等. 防病促生功能性微生物的筛选及应用研究[J]. 河北农业科学, 2004, 8 (2): 28-31.
- [5] 唐裕芳, 张妙玲, 冯波, 等. 茶多酚的抑菌活性研究[J]. 浙江林学院学报, 2005, 22 (5): 553-557.
- [6] 杨艳红, 陈玉惠, 朱云峰, 等. 西南地区茶类柱锈重寄生菌的分离与鉴定[J]. 浙江林学院学报, 2005, 22 (4): 414-419.
- [7] 李晶, 孙宇峰, 张淑梅, 等. 枯草芽孢杆菌水剂防治黄瓜枯萎病田间防效研究[J]. 生物技术, 2004, 14 (5): 77-78.
- [8] 彭好文, 黎起秦, 段承杰, 等. 拮抗细菌 B11 的鉴定及其分泌的拮抗蛋白抗菌谱[J]. 中国生物防治, 2004, 20 (1): 74-76.
- [9] 黄海婵, 裘娟萍. 枯草芽孢杆菌防治植物病害的研究进展[J]. 浙江农业科学, 2005 (3): 213-215.
- [10] SILVERIRA E B D, MARIANO R, MIEHEREFF S J, et al. Antagonism of *Bacillus* spp. Against *Pseudomonas solanacearum* and effect on tomato seedling growth[J]. *Fitopatol Bras*, 1995, 20 (4): 605-612.
- [11] 董晓平, 祝福杰. 应用枯草芽孢杆菌防治黄瓜枯萎病试验[J]. 北方园艺, 2005 (3): 58.
- [12] 王雅平, 刘伊强, 潘乃燧, 等. 枯草芽孢杆菌 TG26 防病增产效应的研究[J]. 生物防治通报, 1993, 9 (2): 63-65.
- [13] 程亮, 肖爱萍, 游春平. 拮抗菌对香蕉枯萎病菌的抑菌作用初步研究[J]. 仲恺农业技术学院学报, 2005, 18 (1): 9-13.
- [14] EDWARDS S G, Seddon B. Mode of antagonism of *Brevibacillus brevis* against *Botrytis cinerea* in vitro[J]. *J Appl Microbiol*, 2001, 91: 652-659.
- [15] 郭道森, 赵博光, 高蓉. 利用愈伤组织验证细菌分离物 B619 与松材线虫病的关系[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2001, 25 (5): 71-74.
- [16] 石延霞, 李宝聚, 杨秀芬, 等. 0.25% 帕克素水剂防治番茄晚疫病的药效试验[J]. 中国蔬菜, 2004 (6): 31-32.

Antagonistic activity of biocontrol bacterium ZJY-1 *Brevibacillus brevis*

ZHANG Xin¹, ZHANG Li-qin¹, MA Liang-jin¹, LIN Hai-ping¹, MAO Sheng-feng¹, ZHANG Bing-xin²

(1. School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. Faculty of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, Zhejiang, China)

Abstract: Preliminary study on antagonistic activity of biocontrol bacterium *Brevibacillus brevis* ZJY-1 was made by

analyzing the inhibitory effect of cellular extraction and cell-free supernatant to mycelium growth and conidial spore germination of *Fusarium oxysporum* f. *cucumerinum*. The results showed that the growth of *Fusarium oxysporum* f. *cucumerinum* was inhibited mainly by metabolites excreted outside by the strain. In medium contained with cell-free supernatant, Mycelium growth of *Fusarium oxysporum* f. *cucumerinum* was obviously affected compared with that cultured in check and cellular extraction-contained medium. The metabolites derived from supernatant could evidently inhibit germination and tube growth of conidia, the inhibit rate was up to 96.0% and 82.0% respectively. [Ch, 3 fig, 2 tab, 16 ref.]

Key words: microbiology; biocontrol bacteria; biocontrol; antagonistic activity; plant disease; metabolites

2005 年浙江省“大学学报类”期刊影响因子

刊名	影响因子	被引频次
浙江林学院学报	0.851	659
浙江大学学报: 医学版	0.734	501
浙江大学学报: 理学版	0.688	171
浙江大学学报: 工学版	0.543	674
浙江大学学报: 人文社会科学版	0.483	455
浙江大学学报: 农业与生命科学版	0.466	1 088
浙江科技学院学报	0.433	109
浙江师范大学学报: 自然科学版	0.341	184
杭州师范学院学报: 社会科学版	0.302	209
浙江工业大学学报	0.292	262
浙江海洋学院学报: 自然科学版	0.280	284
浙江理工大学学报	0.240	143
浙江中医药大学学报	0.236	754
浙江师范大学学报: 社会科学版	0.215	245
中共浙江省委党校学报	0.214	130
温州医学院学报	0.211	302
浙江树人大学学报	0.203	100
杭州电子科技大学学报	0.188	147
宁波大学学报: 理工版	0.170	183
中国计量学院学报	0.160	74
宁波大学学报: 人文科学版	0.151	144
温州大学学报	0.149	59
宁波工程学院学报	0.133	91
浙江教育学院学报	0.133	46
浙江海洋学院学报: 人文科学版	0.131	41
浙江万里学院学报	0.129	121
绍兴文理学院学报	0.121	230
嘉兴学院学报	0.116	115
宁波大学学报: 教育科学版	0.109	165
湖州师范学院学报	0.098	112
杭州师范学院学报	0.092	112
丽水学院学报	0.077	86
浙江水利水电专科学校学报	0.059	40
公安学刊——浙江公安高等专科学校学报	0.057	43
浙江工商大学学报	—	84
台州学院学报	—	35
浙江传媒学院学报	—	12

数据来源: 中国科技信息研究所, 万方数据股份有限公司. 2006 年版中国期刊引证报告(扩刊版). 北京: 科学技术文献出版社, 2006.