

拮抗菌株 TJB-8 的鉴定及抑菌物质分析

田爱霞

(甘肃省靖远县职业中等专业学校, 甘肃 白银 730600)

摘要: 菌株 TJB-8 是从杨树 *Populus* 根部土壤中分离获得的一株对杨树腐烂病菌 *Cytospora chrysosperma* 具有明显抑菌效果的细菌。基于形态学特征、生理生化特性和 16S rDNA 序列分析鉴定了 TJB-8 的分类地位, 并分别采用菌丝生长速率法和二分皿法分析了其抑菌活性物质, 为菌株 TJB-8 的实际开发利用提供理论基础。研究结果显示: 菌株 TJB-8 的无菌滤液有效抑制了杨树腐烂病菌菌丝生长, 抑制率达到 97.42%(72 h), 并使生长的菌丝产生畸形膨大; TJB-8 的无菌滤液还能明显抑制胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides*, 细极链格孢菌 *Alternaria tenuissima*, 尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum*, 禾谷镰刀菌 *F. graminearum* 和立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani* 的生长; 菌株 TJB-8 经鉴定为蜡样芽孢杆菌 *Bacillus cereus*, 并发现其能产生 β -1,3-葡聚糖酶和蛋白酶; 此外, 其产生的蛋白类物质、脂肽类物质及挥发性气体均表现出较强的抑菌活性, 对杨树腐烂病菌的抑制率分别达到 100%(72 h), 100%(72 h)和 76.08%(48 h)。蜡样芽孢杆菌 TJB-8 是一株抑菌活性强、抑菌谱广且能产生多种抑菌活性物质的拮抗细菌, 作为一种生物杀菌剂具有较高的工业开发和田间应用的前景。图 5 表 4 参 27

关键词: 森林保护学; 蜡样芽孢杆菌; 抑菌活性; 抑菌蛋白; 脂肽; 挥发性气体

中图分类号: S763.1

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2017)06-1071-08

Antagonistic strain of TJB-8 and its antifungal substances

TIAN Aixia

(Jingyuan Vocational Secondary Specialized School of Gansu, Baiyin 730600, Gansu, China)

Abstract: Strain TJB-8 has been isolated from the root soil of poplar and has exhibited a strong inhibitory effect against *Cytospora chrysosperma*, a predominant fungus causing poplar canker. In order to provide technical guidance for further exploitation and utilization of TJB-8, the species of TJB-8 and its antifungal substances were investigated in this study. The strain TJB-8 was identified based on morphological and physiological characteristics, as well as a phylogenetic analysis of partial 16S rDNA sequence; the antifungal substances of TJB-8 were analyzed by colony diameter assay and two-compartment plate method. Results revealed that sterile culture filtrates of TJB-8 had a strong antifungal activity against *C. chrysosperma* with an inhibitory rate of 97.42% (over 72 h). The hyphae of *C. chrysosperma* at the edge of the colony exhibited swelling after being treated with a sterile culture filtrate. Also, this sterile culture filtrate effectively inhibited the hyphae growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria tenuissima*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium graminearum*, and *Rhizoctonia solani*. Strain TJB-8 was identified as *Bacillus cereus* and produced β -1,3-glucanase and protease. Moreover, TJB-8 produced high antifungal activities against *C. chrysosperma* with crude proteins (100% in 72 h), lipopeptides (100% in 72 h), and volatiles (76.08% in 48 h). Thus, *B. cereus* TJB-8 was an antagonistic bacterium with strong antifungal activity, a wide inhibitory spectrum, and varied antifungal substances, having a broad prospect of industrial development and field application as a biological fungicide. [Ch, 5 fig. 4 tab. 27 ref.]

Key words: forest protection; *Bacillus cereus*; antifungal activity; antifungal proteins; lipopeptides; volatiles

人们越来越意识到使用化学农药的弊端,并开始积极寻求其他防治手段来替代或减少化学农药的使用。生物防治因其高效,对环境、生态及人类健康安全,无毒等优点得到了广泛重视和关注,并成为了目前植物病害防治的热点。目前,很多有益微生物及其代谢产物被成功应用于植物病害的生物防治中,包括真菌、细菌、放线菌、酵母等。在这些生防微生物中,芽孢杆菌属 *Bacillus* 是近年来生物防治研究的一个重点方向^[1]。芽孢杆菌广泛分布于自然界各种不同环境中,包括土壤、水体、植物体表面及体内等。其生长速度快、营养需求简单、抗逆性强、易于在植物体表面定殖与繁殖、抑菌谱广、对人畜无害、不污染环境,且制剂生产的工艺简单、制剂稳定、储存时间长、施用方便,不仅符合人们对环境和健康的需求,而且为农林业的可持续发展提供了保障^[1-2]。大量的研究表明:芽孢杆菌防治植物病害的作用方式多种多样,主要有拮抗作用、竞争作用、溶菌作用、诱导抗性和促进植物生长等^[1]。拮抗作用是芽孢杆菌通过产生抑菌活性物质,抑制或杀死病原菌的现象,是芽孢杆菌最主要的作用方式,也是目前研究较为深入广泛的一种抑菌机制^[3]。芽孢杆菌主要通过 2 种途径产生抑菌活性物质,分别是核糖体途径和非核糖体途径。核糖体合成的抑菌物质主要有活性蛋白类、酶类、细菌素等,如鞭毛蛋白、枯草菌素、葡聚糖酶、纤维素酶和几丁质酶等;非核糖体途径合成的抑菌物质主要有脂肽类、多肽类物质、挥发性抑菌物质等,如表面活性素(surfactins),伊枯草菌素(iturins),丰原素(fengycins),醇类,聚酮类,酚类,大环内酯类等^[1-5]。菌株 TJB-8 是从杨树 *Populus* 根部土壤中分离得到的一株对杨树腐烂病菌 *Cytospora chrysosperma* 具有明显抑菌活性的拮抗细菌。本研究测定了菌株 TJB-8 无菌滤液的抑菌活性,鉴定了菌株,并初步分析了其抑菌活性物质。研究结果为该菌株的进一步工业开发和田间应用提供理论基础和科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

供试拮抗菌株 TJB-8 均由甘肃省靖远县职业中等专业学校生物学实验室分离并保存,供试病原真菌均由中国林业微生物保藏中心提供。

1.2 供试培养基

拮抗菌株的培养和斜面保存均采用 Luria-Bertani(LB)固体培养基;拮抗菌株种子液制备采用 LB 液体培养基;拮抗菌株的发酵培养采用发酵培养基[葡萄糖 22.64 g,蛋白胨 11.93 g,大豆粉 5.00 g,磷酸二氢钾(KH_2PO_4) 1.00 g,硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.50 g,氯化铵(NH_4Cl) 3.00 g,磷酸氢二钠(Na_2HPO_4) 1.00 g,酵母浸粉 1.86 g,蒸馏水定容至 1 000 mL, pH 7.0~7.2]^[6];病原真菌的培养和抑菌活性的检测均采用马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)。

1.3 拮抗菌株 TJB-8 抑菌活性的探究

1.3.1 TJB-8 无菌滤液的制备 挑取活化后的 TJB-8 单菌落,接种至盛有 100 mL LB 液体培养基的 250 mL 三角瓶中,于 28 ℃, 200 r·min⁻¹ 的条件下振荡培养 24 h 得到 TJB-8 种子液。按 1% 的接种量将种子液接入装有 100 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中,于 28 ℃, 200 r·min⁻¹ 条件下振荡培养 4 d。4 ℃, 10 000 g 的条件下离心 30 min 后收集上清液,再用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,得到无菌滤液^[7]。

1.3.2 TJB-8 无菌滤液对杨树腐烂病菌及其他 5 种病原真菌的抑制活性 抑菌活性的测定采用菌丝生长速率法^[8]。将无菌滤液以体积比 1:10 的比例与加热冷却至 40~50 ℃ 的 PDA 混合,倒平板,在不同的平板中央分别接入直径 6 mm 的病原真菌菌饼,28 ℃ 倒置培养,隔 12 h 测量病原真菌菌落直径,直至对照组菌落直径长至培养皿直径的 3/4 以上为止。以不加无菌滤液的平板作为对照,设重复 3 个·处理⁻¹,采用十字交叉法测量病原菌菌落直径,计算抑菌率。抑菌率=[(对照组菌落扩展直径-处理组菌落扩展直径)/对照组菌落扩展直径]×100%。其中:菌落扩展直径=菌落总直径-菌饼直径。

1.3.3 TJB-8 无菌滤液对杨树腐烂病菌菌丝形态的影响 分别挑取 1.3.2 中对照组和处理组中杨树腐烂病菌的边缘菌丝观察 TJB-8 无菌滤液对杨树腐烂病菌菌丝形态的影响。

1.4 拮抗菌株的鉴定

1.4.1 形态及生理生化指标测定 参照文献[9-10]的方法对菌株的形态和生理生化特征进行测定,包括革兰氏染色、接触酶、淀粉水解、厌氧生长、明胶液化等指标。

1.4.2 16S rDNA 基因序列测定和比对分析 采用菌落聚合酶链式反应(PCR)法扩增 16S rDNA^[11]：挑取单菌落至装有200.0 μL 无菌去离子水的离心(EP)管中，100 ℃煮沸 10 min 后，10 000 g，2 min 离心取上清液，即为菌株的基因组 DNA。以提取的菌株基因组 DNA 为模板，利用引物 63f：5'-CAGGCCTAA-CACATGCAAGTC-3'，1387r：5'-GGGCGGWTGTACAAGGC-3'^[12]，进行 PCR 扩增。扩增体系为 20 μL，含有 10×*Taq*E 缓冲液 2.0 μL，dNTP 1.6 μL，引物 63f 和 1387r 各 1.0 μL，DNA *Taq* 聚合酶 0.1 μL，DNA 模板 1.0 μL，双蒸水补足至 20.0 μL。扩增条件：94 ℃ 4.0 min；94 ℃ 1.0 min，55 ℃ 1.0 min，72 ℃ 1.5 min，35 个循环；72 ℃ 10.0 min。引物合成和测序由英潍捷基(上海)贸易有限公司完成。采用 BLAST 方法在 GenBank 数据库中进行相似性搜索和同源性比较，采用 ClustalX 1.8 进行序列匹配分析，通过 MEGA 5.0 软件，采用 Neighbor-Joining 法构建系统发育，用 Bootstrap(重复抽样 1 000 次)分析评估树的稳定性。

1.5 拮抗菌株 TJB-8 抑菌物质的初步分析

1.5.1 TJB-8 产真菌细胞壁裂解酶特性测定 5 种不同真菌细胞壁裂解酶包括 β-1,3-葡聚糖酶、纤维素酶、酯酶、蛋白酶和几丁质酶的检测分别采用文献[9, 13–15]中的方法。

1.5.2 蛋白类抑菌物质提取及抑菌活性测定 按照 1.3.1 中的方法获得 TJB-8 的无菌滤液，逐渐加入硫酸铵至 70%的饱和度，振荡混匀，于 4 ℃静置过夜。在 4 ℃，10 000 g 的条件下离心 30 min 后收集沉淀，将沉淀溶于少量蒸馏水中，再置于透析袋(8 000~14 000 D)中透析脱盐，透析后收集透析袋中的蛋白提取物溶液，调节其 pH 至中性，并将其最终体积调整为原始无菌滤液体积的一半。最后再用 0.22 μm 微孔滤膜过滤，得到无菌蛋白提取物溶液，并置于 4 ℃冰箱保存^[7]。利用菌丝生长速率法测定蛋白提取物溶液对杨树腐烂病菌的抑菌活性。

1.5.3 脂肽类抑菌物质提取及抑菌活性测定 按照 1.3.1 中的方法获得 TJB-8 的无菌滤液，用 6.0 mol·L⁻¹ 的盐酸调节无菌培养滤液的 pH 值至 pH 2.0，于 4 ℃静置过夜。在 4 ℃，10 000 g 的条件下离心 30 min 后收集沉淀，用甲醇萃取 3 次，合并萃取液，然后在旋转蒸发仪中减压蒸干得到脂肽类提取物^[15]。用蒸馏水将脂肽类提取物溶解至最终体积为原无菌滤液体积的一半，再用 0.22 μm 微孔滤膜过滤，得到无菌脂肽类提取物溶液，4 ℃保存备用^[7]。利用菌丝生长速率法测定脂肽类提取物溶液对杨树腐烂病菌的抑菌活性。

1.5.4 挥发性气体抑菌活性测定 采用二分皿法测定挥发性气体对杨树腐烂病菌的抑菌活性^[8]。隔 12 h 测量病原菌菌落直径，直至对照组菌落直径长至培养皿半径的 3/4 以上为止。计算抑菌率，重复 3 次·处理⁻¹。

1.6 数据统计及分析

采用 Excel 2010 和 SPSS 20.0 软件对实验数据进行统计分析，对不同处理组间的差异进行单因素方差分析，应用 Duncan 法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌株 TJB-8 无菌滤液对杨树腐烂病菌及其他 5 种病原真菌的抑菌活性

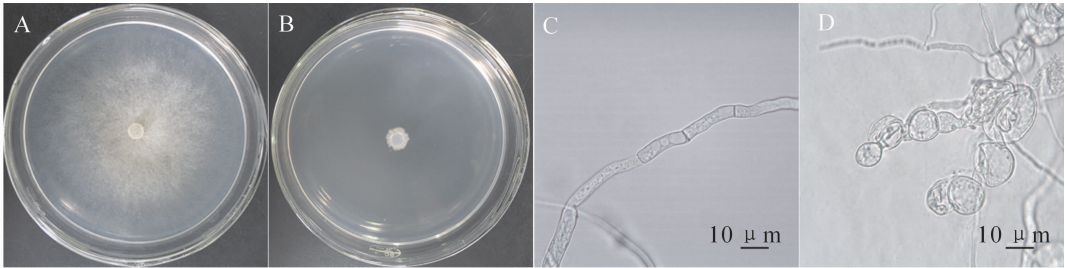
菌株 TJB-8 无菌滤液对杨树腐烂病菌具有明显的抑菌活性，培养 12 h 时，能有效地抑制杨树腐烂病菌菌丝生长；随着培养时间的延长，处理组的菌丝开始生长，至 48 h 后，处理组的菌丝停止生长。培养 72 h 后，抑制率达到 97.42%(图 1A，图 1B，表 1)。无菌滤液对其他 5 种病原真菌也均有较好的抑菌活性。抑菌活性显示 TJB-8 无菌滤液对杨树腐烂病菌，细极链格孢菌 *Alternaria tenuissima*，立枯丝核

表 1 拮抗菌株 TJB-8 无菌滤液对杨树腐烂病菌的抑菌活性
Table 1 Antifungal activity of sterile culture filtrate of strain TJB-8 against *Cytospora chrysosperma*

培养时间/h	菌落扩展直径/mm		抑制率/%
	处理组	对照组	
12	0 ± 0	14.83 ± 0.29	100 ± 0 a
24	1.00 ± 0	33.67 ± 0.58	97.03 ± 0 b
36	1.60 ± 0.36	53.33 ± 1.15	97.00 ± 0.68 b
48	2.17 ± 0.76	72.17 ± 0.76	97.00 ± 1.06 b
60	2.17 ± 0.76	84.00 ± 0	97.42 ± 0.91 b
72	2.17 ± 0.76	84.00 ± 0	97.42 ± 0.91 b

说明：表中数据为平均数±标准差。同列数据后无相同小写字母的表示差异显著($P<0.05$)。

菌 *Rhizoctonia solani* 的抑菌活性最高, 抑制率分别达到 97.42%, 96.65%和 95.45%; 对禾谷镰刀菌 *Fusarium graminearum* 的抑菌活性次之, 抑菌率达到 64.11%; 对胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 和尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* 的抑菌活性最低, 但抑制率也分别达到 58.40%和 57.73%(表 2)。此外, 通过观察杨树腐烂病菌对照组和处理组菌落边缘的菌丝发现, 杨树腐烂病菌菌丝经过 TJB-8 无菌滤液作用后会产生局部膨大的畸形(图 1D), 而对照组的菌丝生长正常、形态均匀(图 1C)。



A. 对照组生长正常的杨树腐烂病菌(72 h); B. 处理组被无菌滤液抑制的杨树腐烂病菌(72 h); C. 对照组生长正常形态均匀的菌丝; D. 处理组被无菌滤液抑制后局部膨大的畸形菌丝

图 1 拮抗菌株 TJB-8 无菌滤液对杨树腐烂病菌菌丝生长及形态的影响

Figure 1 Effect of sterile culture filtrate of strain TJB-8 on the growth and morphology of fungal hyphae

表 2 拮抗菌株 TJB-8 无菌滤液的抑菌谱

Table 2 Antifungal spectrum of sterile culture filtrate of strain TJB-8

病原真菌	抑制率/%	病原真菌	抑制率/%
杨树腐烂病菌 <i>Cytospora chrysosperma</i>	97.42 ± 0.91 a	尖孢镰刀菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	57.73 ± 2.36 c
胶孢炭疽菌 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	58.40 ± 1.26 c	禾谷镰刀菌 <i>Fusarium graminearum</i>	64.11 ± 2.87 b
细极链格孢菌 <i>Alternaria tenuissima</i>	96.65 ± 0.83 a	立枯丝核菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	95.45 ± 1.10 a

2.2 拮抗菌株 TJB-8 的鉴定

2.2.1 形态和生理生化特征 菌株 TJB-8 为革兰氏阳性菌, 杆状, 菌体大小为(0.8~1.1) μm × (2.1~3.0) μm, 有鞭毛, 产芽孢, 兼性厌氧型。在 LB 培养基平板上菌落呈灰白色, 不透明, 表面光滑干燥, 形状不规则近圆形, 中部隆起, 不产色素。依据菌株的生理生化特征(表 3), 并利用统计学方法将拮抗菌株 TJB-8 和芽孢杆菌属内各个种的形态和生理生化特征进行聚类分析, 鉴定菌株 TJB-8 与蜡样芽孢杆菌 *Bacillus cereus* 最为相近。

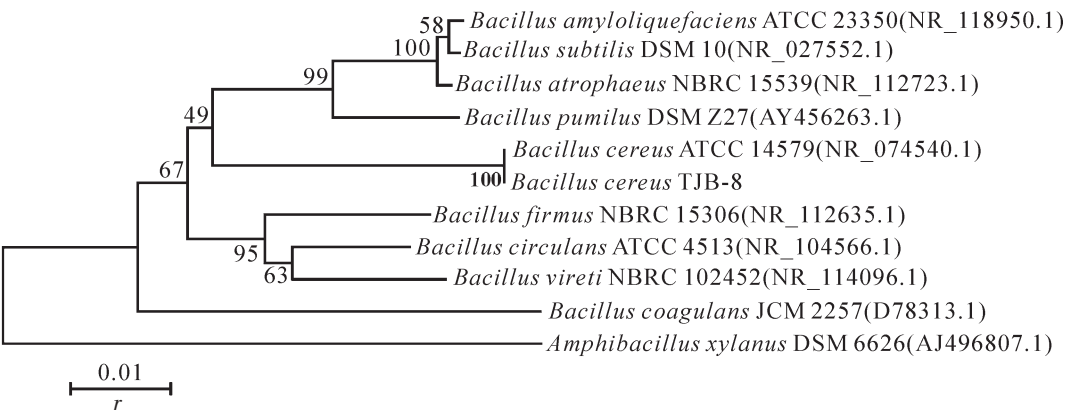
表 3 菌株 TJB-8 生理生化特性

Table 3 Physiological and biochemical characteristics of strain TJB-8

测定指标	菌株特性		测定指标	菌株特性		测定指标	菌株特性	
	蜡样芽孢杆菌	TJB-8		蜡样芽孢杆菌	TJB-8		蜡样芽孢杆菌	TJB-8
接触酶	+	+	硝酸盐还原	+	+	葡萄糖产酸	+	+
厌氧生长	+	+	明胶液化	+	+	D-木糖产酸	-	-
V-P 测定	+	+	吡啶产生	+	-	L-阿拉伯糖产酸	-	-
氧化酶	+	+	苯丙氨酸脱氨酶	-	-	甘露醇产酸	-	-
柠檬酸盐利用	+	+	淀粉水解	+	+	生长 pH 5.7	+	+
卵磷脂酶水解	+	+						

说明: + 表示阳性或生长; - 表示阴性或不生长。蜡样芽孢杆菌生理生化特性参见参考文献[9]。

2.2.2 16S rDNA 序列测定及分析 菌株 TJB-8 的 16S rDNA PCR 扩增得到一段大小约为 1.3 kb 的基因片段, 回收测序后, 测定的片段大小为 1 258 bp, 提交到 GenBank, 序列号为 KX886805。用 ClustalX 和 MEGA 软件进行分析, Neibour-Joining 法构建系统发育树(图 2)。该菌株与模式菌株 *Bacillus cereus* ATCC 14579 相似度达 100%。综合菌株 TJB-8 的形态学特征、生理生化特性及 16S rDNA 序列分析的结果, 最终将菌株 TJB-8 鉴定为蜡样芽孢杆菌。



括号中的序号为序列在GenBank中的登录号

图 2 菌株 TJB-8 16S rDNA 序列的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of strain TJB-8

2.3 拮抗菌株 TJB-8 产真菌细胞壁裂解酶特性

真菌细胞壁裂解酶特性的检测结果显示，只有 β -1, 3-葡聚糖酶(图 3A)和蛋白酶(图 3B)的检测平板中菌体周围产生明显透明圈，而其他裂解酶检测平板中菌体周围未见透明圈或晕圈出现，表明 TJB-8 能产生 β -1,3-葡聚糖酶和蛋白酶，而不能产生几丁质酶、纤维素酶和脂酶。

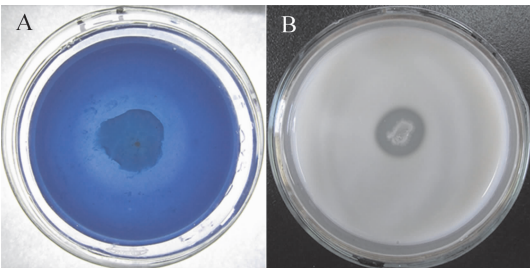


图 3 菌株 TJB-8 产生 β -1,3-葡聚糖酶(A)和蛋白酶(B)

Figure 3 Production of β -1, 3-glucanase (A) and protease (B) by strain TJB-8

2.4 拮抗菌株 TJB-8 蛋白类和脂肽类提取物的抑菌活性

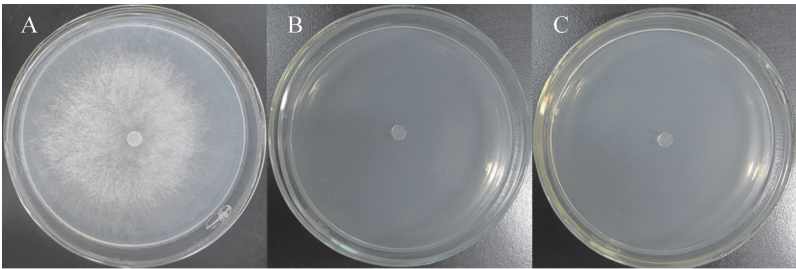
TJB-8 蛋白类和脂肽类提取物的抑菌活性检测结果表明：TJB-8 的蛋白类和脂肽类提取物均具有较强的抑菌活性(图 4)。蛋白类和脂肽类提取物都能完全抑制杨树腐烂病菌菌丝生长，且抑菌活性稳定，培养 72 h 后依然保持 100%的抑制率(表 4)。

2.5 拮抗菌株 TJB-8 挥发性气体的抑菌活性

TJB-8 挥发性气体的抑菌活性检测发现，TJB-8 的挥发性气体对杨树腐烂病菌具有很好的抑菌活性，

表 4 菌株 TJB-8 不同抑菌物质的抑菌活性

Table 4 Antifungal activities of different antifungal substances produced by strain TJB-8 against <i>Cytospora chrysosperma</i>							
t/h	抑制率/%			t/h	抑制率/%		
	蛋白类提取物	脂肽类提取物	挥发性气体		蛋白类提取物	脂肽类提取物	挥发性气体
12	100 ± 0 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a	48	100 ± 0 a	100 ± 0 a	76.08 ± 0.83 b
24	100 ± 0 a	100 ± 0 a	78.26 ± 1.88 b	60	100 ± 0 a	100 ± 0 a	
36	100 ± 0 a	100 ± 0 a	77.02 ± 1.08 b	72	100 ± 0 a	100 ± 0 a	



A. 在无添加的PDA上生长的杨树腐烂病菌(72 h); B. 被蛋白类提取物抑制的杨树腐烂病菌(72 h); C. 被脂肽类提取物抑制的杨树腐烂病菌(72 h)

图 4 菌株 TJB-8 蛋白类和脂肽类提取物的抑菌活性

Figure 4 Antifungal activities of crude proteins and lipopeptides produced by strain TJB-8

能有效地抑制杨树腐烂病菌菌丝的生长(图 5)。挥发性气体的抑菌活性随着培养时间的延长而逐渐降低,但依然保持较高的抑菌率,培养 48 h 后其抑制率仍然达到 76.08%(表 4)。

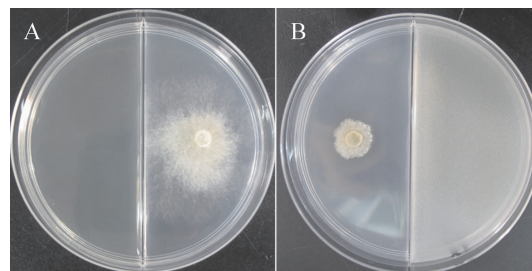
3 讨论

蜡样芽孢杆菌广泛存在于自然界土壤中,和其他种类的生防芽孢杆菌一样都具有抑菌活性强、抑菌谱广的优点。蜡样芽孢杆菌能抑制包括镰刀菌属 *Fusarium*, 葡萄孢属 *Botrytis*, 腐霉属 *Pythium*, 梨孢属 *Piricularia*, 丝核菌属 *Rhizoctonia*, 假单胞菌属 *Pseudomonas* 等植物病原菌^[16-19]。本研究发现菌株 TJB-8 具有较强的拮抗活性和较广的抑菌谱,其无菌滤液在 PDA 平板上能有效地抑制杨树腐烂病菌的生长,抑制率达到 97.42%(72 h),且能使生长的杨树腐烂病菌菌丝产生畸形膨大;同时 TJB-8 的无菌滤液还能有效抑制其他多种植物病原真菌菌丝生长,包括胶孢炭疽菌、细极链格孢菌、尖孢镰刀菌、禾谷镰刀菌和立枯丝核。通过结合菌株的形态学特征、生理生化特征和 16S rDNA 序列分析最终将 TJB-8 鉴定为蜡样芽孢杆菌。

通过产生抑菌活性物质来抑制或杀死病原菌是蜡样芽孢杆菌和其他种类芽孢杆菌表现出较强抑菌活性及较广抑菌谱的重要原因之一^[3]。通过核糖体途径和非核糖体途径合成的蛋白类和脂肽类抑菌物质是蜡样芽孢杆菌产生的主要抑菌活性物质^[3-4]。蛋白类物质主要有蛋白酶类物质和其他蛋白类物质。蛋白酶类物质常见的主要有几丁质酶、纤维素酶、蛋白酶、脂肪酶和葡聚糖酶等。这些真菌细胞壁裂解酶的作用机制主要是通过裂解病原菌细胞壁,导致病原菌细胞破裂死亡,从而抑制或杀死病原菌^[20]。大部分的生防芽孢杆菌都能产生 1 种或多种细胞壁裂解酶。CHANG 等^[16]发现生防蜡样芽孢杆菌 *Bacillus cereus* QQ308 能产生多种抗真菌裂解酶,包括几丁质酶和蛋白酶。HUANG 等^[21]报道蜡样芽孢杆菌 28-9 能产生一种有效抑制百合灰霉病菌 *Botrytis elliptica* 孢子萌发的几丁质酶。本研究发现蜡样芽孢杆菌 TJB-8 能产生 β -1,3-葡聚糖酶和蛋白酶,这可能是 TJB-8 无菌滤液能使杨树腐烂病菌的菌丝产生畸形的重要原因之一。蜡样芽孢杆菌还能通过核糖体途径产生其他类型的蛋白类抑菌物质。郝变青等^[22]研究发现蜡样芽孢杆菌 BC98-1 不仅能产生几丁质酶,还能产生能有效抑制黄瓜枯萎病菌尖孢镰刀菌的菌丝生长和孢子萌发的抑菌蛋白。本研究从 TJB-8 无菌滤液中提取蛋白类物质并测定其抑菌活性发现,其蛋白类提取物具有很强的抑菌活性,能 100%抑制杨树腐烂病菌的生长。除了蛋白类抑菌物质,蜡样芽孢杆菌通过非核糖体途径还能产生多种类型的多肽类抑菌物质。SRIRAM 等^[23]报道蜡样芽孢杆菌 NK1 能产生具有抑菌活性的脂肽类物质。SILO-SUH 等^[24]首次从蜡样芽孢杆菌 UW85 中分离到了线形多肽类抑菌物质 zwittermicin A,能有效抑制苜蓿疫霉根腐病菌 *Phytophthora medicaginis* 的菌丝生长和孢子萌发。本研究发现 TJB-8 的脂肽类提取物也具有抑菌活性,有效抑制了杨树腐烂病菌的生长,抑制率达到 100%。

挥发性气体也是芽孢杆菌产生的重要抑菌活性物质之一,这些具有抑菌活性的挥发性气体主要包括醇类、醛类、酸类、脂类和酮类等化合物^[5, 25]。很多蜡样芽孢杆菌也被报道能产生挥发性抑菌气体。HUANG 等^[26]研究发现蜡样芽孢杆菌 C1L 产生的挥发性气体能有效抑制灰霉病菌 *Botrytis cinerea* 感染烟草 *Nicotiana tabacum* 叶片,最后鉴定发现其挥发性气体中主要的抑菌物质是二甲基二硫(DMDS)。KAI 等^[27]报道蜡样芽孢杆菌的挥发性气体能抑制病原真菌菌丝生长和孢子萌发,并影响菌丝的形态。本研究的结果表明:菌株 TJB-8 的挥发性气体能很好的抑制杨树腐烂病菌的生长,抑制率达到 76.08%。

蜡样芽孢杆菌 TJB-8 抑菌活性强、抑菌谱广且能产生多种类型的抑菌活性物质,显示出了较高的研究和应用价值。目前,对于蜡样芽孢杆菌 TJB-8 的不同类型的抑菌活性物质的具体种类及结构还不清楚,需要后期进一步的纯化与鉴定,在田间的实际应用效果也需要开展后续的验证。



A. 未被挥发性气体作用的杨树腐烂病菌(48 h); B. 被挥发性气体抑制的杨树腐烂病菌(48 h)

图 5 菌株 TJB-8 挥发性气体的抑菌活性

Figure 5 Antifungal activity of volatiles produced by strain TJB-8

4 参考文献

- [1] 齐爱勇, 赵绪生, 刘大群. 芽孢杆菌生物防治植物病害研究现状[J]. 中国农学通报, 2011, **27**(12): 277 – 280.
QI Aiyong, ZHAO Xusheng, LIU Daqun. Research of biological control in plant diseases by *Bacillus* spp. [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2011, **27**(12): 277 – 280.
- [2] 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.
HUANG Haichan, QIU Juanping. Research progress of control in plant diseases by *Bacillus subtilis* [J]. *J Zhejiang Agr Sci*, 2005(3): 213 – 215.
- [3] REN Jianjun, SHI Guanglu, WANG Xiaoqin, *et al.* Identification and characterization of a novel *Bacillus subtilis* strain with potent antifungal activity of a flagellin-like protein [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2013, **29**: 2343 – 2352.
- [4] CAWOY H, DEBOIS D, FRANZIL L, *et al.* Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* [J]. *Microb biotechnol*, 2015, **8**(2): 281 – 295.
- [5] CHAVES-LOPEZ C, SERIO A, GIANOTTI A, *et al.* Diversity of food-borne *Bacillus volatile* compounds and influence on fungal growth [J]. *J Appl Microbiol*, 2015, **119**(2): 487 – 499.
- [6] HUANG Huayi, YU Dimei, TIAN Chengming, *et al.* Optimization of medium to improve the antifungal activity of *Bacillus atrophaeus* XW2 using response surface methodology [J]. *J Pure Appl Microbiol*, 2015, **9**(3): 1783 – 1792.
- [7] HUANG Huayi, WU Ziqiang, TIAN Chengming, *et al.* Identification and characterization of the endophytic bacterium *Bacillus atrophaeus* XW2, antagonistic towards *Colletotrichum gloeosporioides* [J]. *Ann Microbiol*, 2014, **65**(3): 1361 – 1371.
- [8] 孙妍, 于地美, 黄华毅, 等. 黄栌枯萎病菌抑菌细菌的分离与鉴定[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2015, **39**(6): 17 – 23.
SUN Yan, YU Dimei, HUANG Huayi, *et al.* Isolation and identification of antagonistic bacterium against smoke tree wilt fungus *Verticillium dahliae* [J]. *J Nanjing For Univ Nat Sci Ed*, 2015, **39**(6): 17 – 23.
- [9] 东秀株, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [10] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986.
- [11] 何红, 邱思鑫, 蔡学清, 等. 辣椒内生细菌 BS-1 和 BS-2 在植物体内的定殖及鉴定[J]. 微生物学报, 2004, **44**(1): 13 – 18.
HE Hong, QIU Sixin, CAI Xueqing, *et al.* Colonization in plants and identification of endophytic bacteria BS-1 and BS-2 from *Capsicum annuum* [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2004, **44**(1): 13 – 18.
- [12] MARCHESI J R, SATO T, WEIGHTMAN A J, *et al.* Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**(2): 795 – 799.
- [13] 高小宁, 涂璇, 黄丽丽, 等. 产 β -1,3-葡聚糖酶植物内生放线菌的筛选及抑菌活性研究[J]. 微生物学通报, 2009, **36**(8): 1189 – 1194.
GAO Xiaoning, TU Xuan, HUANG Lili, *et al.* The screen of plant endophytic actinomycetes producing β -1,3-glucanase and antifungal activity of β -1,3-glucanase [J]. *Microbiology*, 2009, **36**(8): 1189 – 1194.
- [14] ESSGHAIER B, FARDEAU M L, CAVOL J L, *et al.* Biological control of grey mould in strawberry fruits by halophilic bacteria [J]. *J Appl Microbiol*, 2009, **106**(3): 833 – 846.
- [15] REN Jiahong, LI Hao, WANG Yanfang, *et al.* Biocontrol potential of an endophytic *Bacillus pumilus* JK-SX001 against poplar canker [J]. *Biol Control*, 2013, **67**(3): 421 – 430.
- [16] CHANG W T, CHEN Y C, JAO C L. Antifungal activity and enhancement of plant growth by *Bacillus cereus* grown on shellfish chitin wastes [J]. *Bioresour Technol*, 2007, **98**(6), 1224 – 1230.
- [17] 唐容容, 杨文革, 胡永红, 等. 蜡样芽孢杆菌 CGMCC4348 菌株防治番茄灰霉病的效果及机理研究[J]. 湖北农业科学, 2013, **52**(8): 1817 – 1820.
TANG Rongrong, YANG Wenge, HU Yonghong, *et al.* Control effect and mechanism of strain *Bacillus cereus* CGM-CC4348 to *Botrytis cinerea* [J]. *J Hubei Agric Sci*, 2013, **52**(8): 1817 – 1820.
- [18] 张美英, 王林, 张德纯, 等. 一株蜡样芽孢杆菌 16S rDNA 分子鉴定及其发酵液抑菌谱的测定[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 2014, **35**(6): 1 – 5.
ZHANG Meiyong, WANG Lin, ZHANG Dechun, *et al.* Identification of a *Bacillus cereus* via 16S rDNA molecular and

- determination of antibacterial spectrum from ITS fermentation broth [J]. *J Inner Mongolia Agric Univ Nat Sci Ed*, 2014, **35**(6): 1 – 5.
- [19] 郑广荣, 梁樱凡, 杜倩, 等. 一株产酸蜡状芽胞杆菌的筛选及其抑菌特性研究[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2013, **50**(6): 1379 – 1384.
- ZHENG Guangrong, LIANG Yingfan, DU Qian, *et al*. Screening of acid-producing *Bacillus cereus* and study on its antimicrobial properties [J]. *J Sichuan Univ Nat Sci Ed*, 2013, **50**(6): 1379 – 1384.
- [20] TSENG S C, LIU S Y, YANG H H, *et al*. Proteomic study of biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* ETS 323 in response to *Rhizoctonia solani* [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, **56**(16): 6914 – 6922.
- [21] HUANG C J, WANG T K, CHUNG S C, *et al*. Identification of an antifungal chitinase from a potential biocontrol agent, *Bacillus cereus* 28-9 [J]. *BMB Rep*, 2005, **38**(1): 82 – 88.
- [22] 郝变青, 马利平, 乔雄梧, 等. 芽胞杆菌 BC98-1 拮抗蛋白性质及其对黄瓜枯萎病菌的抑菌作用[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2004, **22**(增刊): 91 – 94.
- HAO Bianqing, MA Liping, QIAO Xiongwu, *et al*. Properties of antagonistic protein of *Bacillus cereus* 98-I and its inhibition activity against *Fusarium oxysporum* on cucumber [J]. *J Shihezi Univ Nat Sci*, 2004, **22**(suppl): 91 – 94.
- [23] SRIRAM M I, KALISHWARALAL K, DEEPAK V, *et al*. Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant produced by heavy metal tolerant strain *Bacillus cereus* NK1 [J]. *Colloid Surfa B Bioint*, 2011, **85**(2): 174 – 181.
- [24] SILO-SUH L A, LETHBRIDGE B J, RAFFEL S J, *et al*. Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**(6): 2023 – 2030.
- [25] ANDO H, KURATA A, KISHIMOTO N. Antimicrobial properties and mechanism of volatile isoamyl acetate, a main flavour component of Japanese sake (Ginjo-shu) [J]. *J Appl Microbiol*, 2015, **118**(4): 873 – 880.
- [26] HUANG C J, TSAY J F, CHANG S Y, *et al*. Dimethyl disulfide is an induced systemic resistance elicitor produced by *Bacillus cereus* C1L [J]. *Pest Manage Sci*, 2012, **68**(9): 1306 – 1310.
- [27] KAI M, HAUSTEIN M, MOLINA F, *et al*. Bacterial volatiles and their action potential [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, **81**(6): 1001 – 1012.