

解淀粉芽孢杆菌 X-278 菌株抗菌 蛋白初步分析

黎 波, 魏学军, 李亚宁, 孟庆芳, 张 汀, 刘大群, 赤国彤*

(河北农业大学 植物保护学院, 河北省植物病虫害生物防治工程技术研究中心,
国家北方山区农业工程技术研究中心, 河北 保定 071001)

摘要: 为研究解淀粉芽孢杆菌 X-278 菌株所产抗菌蛋白的性质, 通过饱和硫酸铵沉淀法提取 X-278 菌株蛋白粗提液, 并对蛋白粗提液进行蛋白酶稳定性试验和热稳定性试验。结果表明, 当硫酸铵饱和度为 50% 时, 沉淀得到的 X-278 菌株蛋白粗提液对棉花黄萎病菌的抑菌作用最强, 抑菌圈直径达 18.9 mm。蛋白粗提液对蛋白酶 K 敏感性最差, 对胰蛋白酶最敏感; 蛋白粗提液经 40 °C 处理后抑菌活性最高, 而 121 °C 处理后抑菌活性最低, 抑菌圈直径为 13.6 mm, 为对照(常温处理)的 72%。以上结果表明, X-278 菌株粗蛋白的部分抗菌成分属于耐热物质, 并且抗菌成分间存在性质上的差异。

关键词: 解淀粉芽孢杆菌; 抗菌蛋白; 大丽轮枝菌; 棉花黄萎病

中图分类号: S435.621 S476 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2013)07-0068-05

Primary Analysis of Antifungal Proteins Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* X-278 against *Verticillium dahliae*

LI Bo, WEI Xue-jun, LI Ya-ning, MENG Qing-fang, ZHANG Ting,
LIU Da-qun, CHI Guo-tong*

(Hebei Provincial Biological Control Center of Plant Diseases and Plant Pests, National Engineering
Research Center for Agriculture in Northern Mountainous Areas, College of Plant Protection,
Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China)

Abstract: In order to study the characteristics of antifungal proteins isolated from *Bacillus amyloliquefaciens* X-278, crude proteins were extracted via precipitation of the cell culture of strain X-278 with ammonium sulphate, and the protease stability and thermal stability were determined. The result showed that the crude proteins of strain X-278 had strongest control effect on cotton *Verticillium* wilt using ammonium sulphate at 50% saturation, with the inhibition zone diameter of 18.9 mm. The crude protein extracts were relatively insensitive to proteinase K, but more sensitive to trypsin. The activity of the antifungal substrates was investigated under different temperatures, and the result showed that the antifungal activity at 40 °C was the highest, while it decreased most at 121 °C and showed significant difference from the control. However, the crude protein extracts still retained 72% of the antifungal activity compared to the control and the diameter of inhibition zone was 13.6 mm after heat treatment for 30 min under 121 °C. The results above indicated that part of the antifungal extracts of *Bacillus amyloliquefaciens* X-278 were heat-resistant substance and the antifungal extracts were several substrates with different traits.

收稿日期: 2012-12-10

基金项目: 国家 863 计划项目(2011AA10A205); 国家自然科学基金项目(31171894); 河北省自然科学基金项目(C2011204114)

作者简介: 黎 波(1987-), 男, 河北邯郸人, 在读硕士研究生, 研究方向: 天然产物农药。E-mail: liboer870923@126.com

* 通讯作者: 赤国彤(1957-), 男, 河北安新人, 研究员, 硕士生导师, 主要从事农药加工方面的研究。

E-mail: chiguotong@126.com

Key words: *Bacillus amyloliquefaciens*; antifungal protein; *Verticillium dahliae*; cotton *Verticillium* wilt

解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 在生长过程中可产生一系列代谢产物^[1], 包括低分子抗菌脂肽^[2]以及抗菌蛋白^[3]或多肽等活性物质^[4-5], 这些代谢产物能够抑制多种植物病原真菌和细菌^[6], 且对人畜无毒, 对环境亲和友好, 另外病菌对其也不易产生抗性^[7-8], 解淀粉芽孢杆菌代谢产物的诸多优点使其受到广泛关注。对这些活性物质的分离和纯化, 使其作为高效的微生物农药新品种投向市场, 已成为相关研究的热点。

解淀粉芽孢杆菌 X-278 是河北农业大学植物保护学院生防室从辛集市棉田健康棉株上分离筛选得到的一株有效防治棉花黄萎病的生防细菌^[9], 其通过产生抗菌蛋白抑制大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae* Kleb)。本研究探索该菌株产生抗菌蛋白的最佳条件, 并分析抗菌蛋白的理化性质, 为进一步对抗菌蛋白的纯化和应用提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

棉花黄萎病病原菌大丽轮枝菌由河北农业大学植物保护学院生防室提供; 解淀粉芽孢杆菌 X-278 菌株为河北农业大学植物保护学院生防室从辛集市棉田健康棉株分离筛选而得。

1.2 X-278 菌株无菌滤液的制备

将 X-278 菌株在 NA 培养基上划线培养 24 h, 取单菌落接种于 BPY 液体培养基, 28 ℃、160 r/min 条件下摇床培养 48 h。对培养液离心 (12 000 r/min, 3 min), 上清液经细菌过滤器 ($\varphi=0.22\ \mu\text{m}$) 过滤后得无菌体培养液。

1.3 X-278 菌株抑菌活性的测定

采用牛津杯检测法。吸取 1 mL 大丽轮枝菌孢子悬浮液 ($1.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^8\ \text{cfu/mL}$) 加入到 PDA 培养基中, 混合均匀后, 倒平板, 放于 28 ℃培养箱内过夜。每个平板上均匀放置 3 个牛津杯, 每个杯内注入 50 μL 无菌滤液, 28 ℃培养 2 d, 测量抑菌圈直径。

1.4 培养条件对 X-278 菌株发酵液抑菌活性影响测定

1.4.1 培养基 将 X-278 菌株分别接种于 NA、NB、LB、BPY 培养液中, 28 ℃、160 r/min 条件下摇床培养 48 h, 然后测定无菌体培养液对大丽轮枝菌的抑菌活性。

1.4.2 pH 值 将 X-278 菌株接种于初始 pH 值分别为 4、5、6、7、8、9、10 的 BPY 液体培养基中, 28 ℃、160 r/min 条件下摇床培养 48 h, 然后测定无菌体培养液对大丽轮枝菌的抑菌活性, 以自然 pH 值的 BPY 液体培养基培养获得的无菌体培养液作为对照。

1.5 X-278 菌株抗菌蛋白粗提液的提取和性质分析

1.5.1 X-278 菌株蛋白粗提液制备及抑菌活性测定 将 X-278 菌株接种于 BPY 液体培养基中, 28 ℃、160 r/min 条件下振荡培养 48 h。该培养液经离心 (12 000 r/min, 3 min) 去除沉淀, 细菌过滤器 ($\varphi=0.22\ \mu\text{m}$) 过滤后, 在上清液中加入硫酸铵分别至 40%、50%、60%、70%、80% 饱和度, 4 ℃沉淀过夜, 离心 (12 000 r/min, 20 min) 收集沉淀物, 用少量磷酸缓冲液 (pH 值 7.2) 进行溶解, 4 ℃透析除盐 (透析袋截流分子量为 14 000 Da)。透析液用细菌过滤器 ($\varphi=0.22\ \mu\text{m}$) 过滤除去杂质后即得蛋白粗提液, 对该粗提液进行抑菌活性测定。

1.5.2 X-278 菌株蛋白粗提液稳定性测定

1.5.2.1 对蛋白酶的稳定性 将蛋白粗提液分别用蛋白酶 K、胰蛋白酶和链酶蛋白酶处理, 每种酶质量浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$, 37 ℃处理 1 h。对处理后的样品溶液测定抑菌活性, 以未经蛋白酶处理的 X-278 菌株蛋白粗提液为对照, 重复 3 次。

1.5.2.2 热稳定性 X-278 菌株蛋白粗提液经 40、60、80、100、121 ℃各处理 30 min 后, 测定抑菌活性, 以常温保存的 X-278 菌株蛋白粗提液为对照, 重复 3 次。

1.5.3 X-278 菌株蛋白粗提液对棉花黄萎病菌菌丝形态的影响 将大丽轮枝菌的菌悬液接于 PDA 培养基内, 倒平板, 平板上均匀放置 3 个牛津杯, 每个牛津杯内注入 50 μL 蛋白粗提液, 放于培养箱培养 24 h, 在显微镜下观察受抑制菌丝的形态变化。

2 结果与分析

2.1 X-278 菌株无菌滤液对棉花黄萎病菌的抑制作用

X-278 菌株无菌滤液对棉花黄萎病菌的抑制活性测定结果显示, 无菌滤液周围出现大而清晰的抑菌圈 (图 1), 说明 X-278 菌株培养液中含有对棉花黄萎病菌表现强抑制作用的物质, 该物质属于 X-278 菌株的胞外分泌物质。

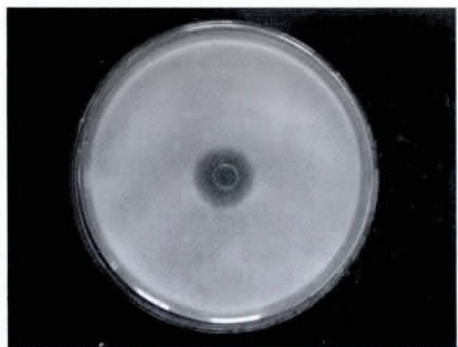
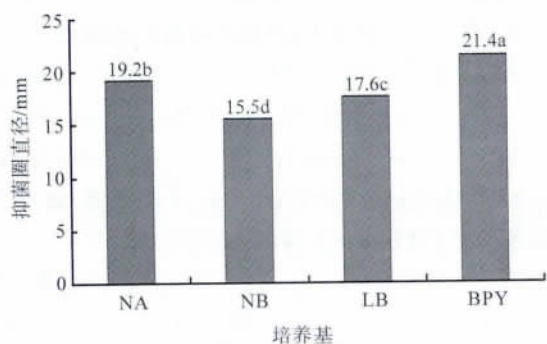


图 1 X-278 菌株无菌滤液对棉花黄萎病菌的抑制作用

2.2 培养条件对 X-278 菌株培养液抑菌活性的影响

2.2.1 培养基 试验结果表明,采用不同的培养基对菌株 X-278 进行培养,培养液的抑菌圈大小不同。其中用 BPY 培养基培养时,X-278 菌株的无菌滤液抑菌作用最强,抑菌圈直径达到 21.4 mm,显著大于其他 3 种培养基培养时的抑菌圈直径(图 2)。说明 BPY 培养基最适宜 X-278 菌株产生胞外抗菌物质。



不同小写字母表示在 $P=0.05$ 水平差异显著,下同

图 2 培养基对 X-278 菌株培养液抑菌活性的影响

2.2.2 pH 值 试验结果表明,BPY 培养基初始 pH 值为 5 时,X-278 菌株培养液的抑菌作用最强,抑菌圈直径达到 32.8 mm,显著大于其他 pH 值培养基培养时的抑菌圈直径(图 3)。因此,培养基初始 pH 值为 5 是 X-278 菌株产生胞外抗菌物质的最适 pH 值。

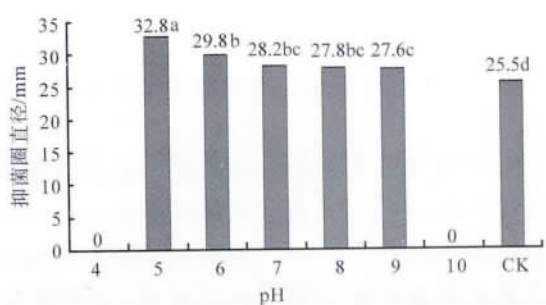


图 3 BPY 培养基初始 pH 值对 X-278 菌株培养液抑菌活性的影响

2.3 X-278 菌株蛋白粗提液对棉花黄萎病菌的抑制作用

提取 X-278 菌株培养液的蛋白类物质测定其抑菌活性,发现蛋白粗提液周围出现大而清晰的抑菌圈(图 4),说明经硫酸铵盐析提取的蛋白粗提液对棉花黄萎病菌有明显的抑菌作用。



图 4 X-278 菌株蛋白粗提液对棉花黄萎病菌的抑制作用

2.4 不同饱和度硫酸铵对 X-278 菌株蛋白粗提液抑菌效果的影响

采用不同饱和度的硫酸铵对 X-278 菌株的无菌培养液进行沉淀,抑菌活性测定结果表明,经 40%~80%饱和度硫酸铵沉淀得到的蛋白粗提液均有抑菌活性,其中硫酸铵饱和度为 50%时,其沉淀的蛋白粗提液抑菌作用最大,抑菌圈直径达 18.9 mm,与其他处理差异达到显著水平(表 1)。

表 1 不同饱和度硫酸铵沉淀对 X-278 菌株蛋白粗提液抑菌效果的影响

项目	硫酸铵饱和度/%				
	40	50	60	70	80
抑菌圈直径/mm	14.9c	18.9a	15.7b	15.0c	13.4d

2.5 X-278 菌株抗菌粗蛋白对蛋白酶的稳定性

X-278 菌株粗蛋白提取液用不同的蛋白酶在 37℃下处理 1 h 后,对其进行抑菌活性检测,结果如图 5 所示。经蛋白酶 K、链酶蛋白酶和胰蛋白酶处理后,X-278 菌株粗蛋白提取液的抑菌活性为未经

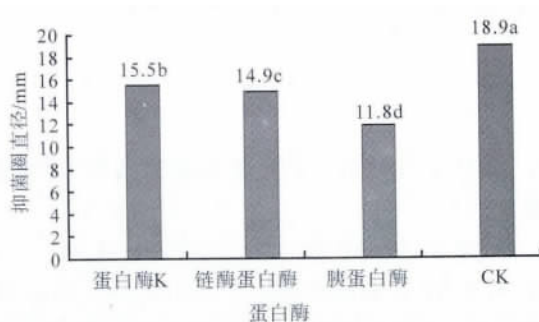


图 5 不同蛋白酶对 X-278 菌株粗提蛋白抑菌活性的影响

处理提取液抑菌活性的 82%、79% 和 62%，各处理间差异显著，说明 X-278 菌株抗菌粗蛋白提取液中抗菌物质为混合成分，其对蛋白酶 K 敏感性最差，对胰蛋白酶最敏感。

2.6 X-278 菌株抗菌粗蛋白对热的稳定性

X-278 菌株粗蛋白提取液经 40、60、80、100、121℃ 分别处理 30 min 后，其抗菌活性随着处理温度的升高而降低，40℃ 处理的粗蛋白抑菌活性最高，抑菌圈直径为 17.6 mm，与其他处理间差异达显著水平；121℃ 处理的粗蛋白抑菌活性最低，抑菌圈直径为 13.6 mm，表明经 121℃ 处理后的粗蛋白仍有部分抗菌活性，为对照的 72% (图 6)。以上结果表明，X-278 菌株粗蛋白中抗菌物质可能是混合成分，且部分抗菌成分属于耐热物质。

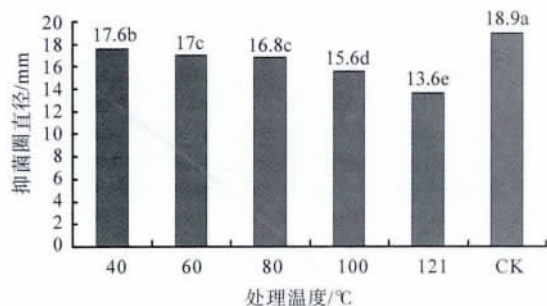
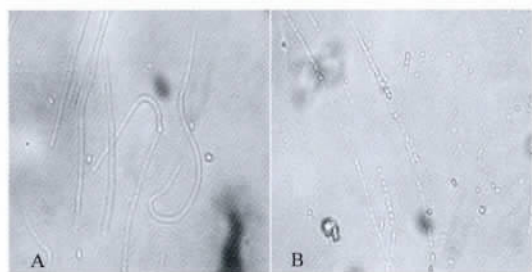


图 6 不同温度对 X-278 菌株粗提蛋白抗菌活性的影响

2.7 X-278 菌株蛋白粗提液对棉花黄萎病菌菌丝形态的影响

显微镜下观察发现，未经 X-278 菌株蛋白粗提液处理的菌丝光滑、透明，且粗细一致 (图 7A)。经 X-278 菌株蛋白粗提液处理 24 h 后，菌丝出现断裂，变细，开始消融，成“念珠”状 (图 7B)。



A. 正常菌丝; B. 经蛋白粗提液处理的菌丝

图 7 X-278 菌株粗提蛋白对大丽轮枝菌菌丝形态的影响

3 讨论

自 1945 年 Johnson 等^[10]报道枯草芽孢杆菌产生抗菌物质后，芽孢杆菌产生的抗菌物质便引起了广泛关注。芽孢杆菌内生芽孢，繁殖力强，具有很强的抗逆能力和抑制植物病原真菌、细菌和线虫的作

用^[11-12]，其抗菌物质主要包括低分子抗生素^[13]、抗菌蛋白^[14]和一系列挥发性抗菌物质^[15-16]。

目前对解淀粉芽孢杆菌抗菌物质的研究报道很多，如张宝俊等^[17]研究的 LP-5 菌株抗菌蛋白对蛋白酶 K 和胰蛋白酶不敏感，121℃ 处理 30 min 后活性完全丧失；孟利强等^[7]研究的 TF28 菌株抗菌粗蛋白对蛋白酶 K 部分敏感，100℃ 处理 30 min 后活性部分丧失；袁洪水等^[18]研究的 BDT-25 菌株抗菌蛋白对蛋白酶 K 和胰蛋白酶均敏感，经 40℃ 处理 20 min 后保留部分抗菌活性，60℃ 以上处理抗菌活性完全丧失；王军华等^[19]研究的 Q-12 菌株抗菌蛋白对蛋白酶 K 不敏感，121℃ 处理 15 min 后仍保留 80% 的抑菌活性。本研究表明，解淀粉芽孢杆菌 X-278 蛋白粗提液经 121℃ 处理 30 min 后，仍对棉花黄萎病菌表现出很强的抑制作用，并且粗提液对蛋白酶处理部分敏感，这与张宝俊等^[17]研究的抗菌蛋白有一定的差别，与袁洪水等^[18]研究的抗菌蛋白不同，与孟利强等^[7]、王军华等^[19]研究的抗菌蛋白有一定的相似性。

解淀粉芽孢杆菌 X-278 对棉花黄萎病菌有很强的抑制作用，采用 50% 饱和度的硫酸铵提取的蛋白粗提液，对棉花黄萎病菌仍有一定的抑菌作用，因此推测，菌株 X-278 的蛋白粗提取液中存在蛋白类抗菌物质，同时还存在肽类抗菌物质。这些抑菌物质需要进一步分离纯化，为克隆抗病基因、构建基因工程菌株以及开发和应用 X-278 菌株奠定基础。

参考文献:

- [1] 车晓曦, 李校堃. 解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 的研究进展[J]. 北京农业, 2010(3): 7-10.
- [2] 李德全, 陈志谊, 聂亚锋, 生防菌 Bs-916 及高效突变菌株抗菌物质及其对水稻抗性诱导作用的研究[J]. 植物病理学报, 2008, 38(2): 192-198.
- [3] 童有仁, 马志超, 陈卫良, 等. 枯草芽孢杆菌 B034 拮抗蛋白的分离纯化及特性分析[J]. 微生物学报, 1999, 39(4): 339-343.
- [4] 刘新涛, 刘玉霞, 邓建良, 等. 解淀粉芽孢杆菌 YN-1 发酵条件的优化[J]. 河南农业科学, 2009(10): 102-104.
- [5] Chen X H, Koumoutsis A, Scholz R. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42[J]. Nature Biotechnology, 2007, 25: 1007-1014.
- [6] 王英国, 王军华, 权春善, 等. 解淀粉芽孢杆菌抗菌活性物质的分离纯化及抑菌活性研究[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(12): 41-45.

(下转第 83 页)

- [4] 胡飞,孔垂华. 胜红蓟化感作用研究 I: 水溶物的化感作用及其化感物质分离鉴定[J]. 应用生态学报, 1997, 8(3): 304-308.
- [5] 于兴军,于丹,马克平. 不同生境条件下紫茎泽兰化感作用的变化与入侵力关系的研究[J]. 植物生态学报, 2004, 28(6): 773-780.
- [6] Callaway R M, Aschehoug E T. Invasive plants versus their new and old neighbors: A mechanism for exotic invasion[J]. Science, 2000, 290: 521-523.
- [7] 刘全儒. 中国菊科植物一新归化属——黄菊属[J]. 植物分类学报, 2005, 4(2): 178-180.
- [8] 李香菊,张米茹,李咏军,等. 黄顶菊水提取液对植物种子发芽及胚根伸长的化感作用研究[J]. 杂草科学, 2007(4): 15-19.
- [9] 刘佳,谭万忠. 外来入侵植物黄顶菊的研究现状与展望[J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2010, 32(增刊): 49-53.
- [10] 唐秀丽,谭万忠,付卫东,等. 外来入侵杂草黄顶菊的发生特性与综合控制技术[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2010, 36(6): 694-699.
- [11] 皇甫超河,陈冬青,杨殿林. 外来入侵植物黄顶菊与四种牧草间化感互作[J]. 草业学报, 2010, 19(4): 22-32.
- [12] 王辉,郭玉华,张燕之,等. 旱稻与水稻主要品质性状的比较研究[J]. 辽宁农业科学, 2004(1): 5-7.
- [13] 王化琪,康定明. 旱稻发展战略与低碳可持续农业[C]//发展低碳农业 应对气候变化——低碳农业研讨会论文集. 北京: 中国农业出版社, 2010: 232-236.
- [14] 张风娟,徐兴友,郭艾英,等. 3种入侵植物叶片挥发物对旱稻幼苗根的影响[J]. 生态学报, 2011, 31(19): 5832-5838.
- [15] 曾建军,杨丽英,孙敏. 剑叶金鸡菊化感作用对白菜种子萌发和幼苗生长的影响[J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2009, 31(6): 88-91.
- [16] 刘长坤,邓洪平,尹灿,等. 土荆芥植株化感作用对5种农作物种子萌发和幼苗生长的影响[J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2010, 35(3): 152-155.

~~~~~

(上接第 71 页)

- [7] 孟利强,李晶,张淑梅,等. 解淀粉芽孢杆菌 TF28 抗菌粗蛋白的初步研究[J]. 中国林副特产, 2011(5): 10-13.
- [8] 张少飞,李敏,邢志国,等. 产抑菌物质 SDLH 菌株的鉴定及发酵产物稳定性研究[J]. 生物技术, 2009, 19(5): 56-61.
- [9] 陈英化,李爱霞,冯丽娜,等. 棉花黄萎病内生拮抗细菌 L-4-2 的鉴定及定殖[J]. 西北农业学报, 2012, 21(2): 68-71.
- [10] Johnson F H, Campbell D H. The retardation of protein denaturation by hydrostatic pressure[J]. Journal of Cell Comp Physiol, 1945, 26: 43-46.
- [11] 李术娜,马平,胡明,等. 棉花黄萎病拮抗细菌筛选与 B-101 菌株抗菌蛋白分离[J]. 植物病理学报, 2008, 38(4): 445-448.
- [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] Tamehiro N, Okamoto Y, Okamoto S, et al. Bacilysin, a novel phospholipids antibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168[J]. Antimicrob Agents Chemoth, 2002, 46: 315-320.
- [14] Marx F. Small basic antifungal proteins secreted from filamentous ascomycetes: a comparative study regarding expression, structure, function and potential application[J]. Apply Microbiol Biotechnol, 2004, 65: 133-142.
- [15] 李宝庆,鹿秀云,郭庆港,等. 枯草芽孢杆菌 BAB-1 产脂肽类及挥发性物质的分离和鉴定[J]. 中国农业科学, 2010, 43(17): 3547-3554.
- [16] 孟立花,李社增,郭庆港,等. 枯草芽孢杆菌 NCD-2 菌株抗菌蛋白初步分析[J]. 华北农学报, 2008, 23(1): 189-193.
- [17] 张宝俊,张家榕,韩巨才,等. 内生解淀粉芽孢杆菌 LP-5 抗菌蛋白的分离纯化及特性[J]. 植物保护学报, 2010, 37(2): 143-147.
- [18] 袁洪水,马平,李术娜,等. 棉花黄萎病拮抗细菌的筛选与抗菌物分析[J]. 棉花学报, 2007, 19(6): 436-439.
- [19] 王军华,权春善,徐洪涛,等. 解淀粉芽孢杆菌 Q-12 抗真菌特性的研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(6): 47-50.