

生防菌 HY-19 的鉴定及其抑菌物质研究

路兆军, 苗杰, 刘瑞珍, 马旭升, 赵莹, 王淑惠, 李保进* (烟台市森林资源监测保护服务中心, 山东烟台 264000)

摘要 [目的]明确 HY-19 的抑菌物质特性及其分类地位。[方法]以苹果褐斑病等为靶标采用平板对峙法分析其拮抗谱,对 HY-19 进行形态观察、生理生化测定和分子鉴定及其抑菌物质特性研究。[结果]菌株 HY-19 拮抗活性强且抑菌谱广,综合形态、生理生化及系统发育树分析,确定 HY-19 为短短芽孢杆菌(*Brevibacillus brevis*)。HY-19 无菌滤液对病原指示菌有拮抗活性,且酸碱稳定性、蛋白酶、抗紫外辐射表现良好。HY-19 含有丰原素等 4 种抑菌代谢产物合成基因,表明该菌株可能产生抗菌肽类物质,从而达到抑菌效果。[结论]该研究为苹果病原真菌的生防制剂开发与利用提供科学依据。

关键词 短短芽孢杆菌;生物防治;苹果病原真菌;抑菌物质

中图分类号 S432.9 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)08-0090-04

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2022.08.024



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on Identification of Biocontrol Strain HY-19 and Its Antibacterial Substances

LU Zhao-jun, MIAO Jie, LIU Rui-zhen et al (Yantai Forest Resources Monitoring and Protection Service Center, Yantai, Shandong 264000)

Abstract [Objective] In order to confirm the taxonomic position of HY-19 and its antibacterial substance characteristics. [Method] The inhibitory spectrum of HY-19 targeting to apple pathogenic fungi such as Apple Marssonina Leaf Blotch was analyzed by flat-stand method, then the morphological observation, physiological and biochemical determination, molecular identification and antibacterial properties of HY-19 were studied. [Result] The results showed that HY-19 had strong antagonistic activity and broad spectrum of inhibition. HY-19 was identified as *Bacillus brevis* through morphological, physiological and biochemical and phylogenetic tree analysis. The fermentation filtrate of HY-19 had antagonistic activity against pathogen indicator which showed good acid-base stability, proteolysis-resistant and UV-resistant. HY-19 contains four kinds of antimicrobial metabolite genes such as fengycin which suggested that the strain may produce antimicrobial peptides to achieve antibacterial effect. [Conclusion] This study will lay a foundation for the development and utilization of biocontrol agents against apple pathogenic fungi.

Key words *Bacillus brevis*; Biocontrol; Apple pathogenic fungi; Antibacterial substances

芽孢杆菌因其分布广泛、对人畜和环境安全、抗逆性高、抑菌谱广、生产成本相对较低等优点被开发成为杀菌剂用于植物病害的生物防治^[1]。拮抗芽孢杆菌产生的抑菌物质能够有效抑制植物病原真菌或细菌的生长,从而达到防病和促生的效果^[2]。如 Chandel 等^[3]研究发现,该菌可防治由尖孢镰孢菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)引起的番茄枯萎病;Bapat 等^[4]研究表明,该菌可产生孢外拮抗物质来抑制豌豆枯萎病原菌的孢子萌发、菌丝生长;杨廷雅等^[5]研究发现,菌株 HAB-5 产生的 14.4 kDa 肽对橡胶炭疽病(*Colletotrichum gloeosporioides*)、香蕉枯萎病(*Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*, FOC)、香蕉炭疽病(*Colletotrichum musae*)等多种病原菌均有拮抗活性;菌株 MH1 对棉花枯萎病(*Rhizoctonia solani* Kuhn)有明显的拮抗作用^[6];菌株 MHQ1 产生的抗菌物质正丁醇对桃杨炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、香石竹疫霉(*P. hytophthora nicotianae*)等多种植物病原真菌有拮抗作用^[7]。

苹果斑点落叶病、褐斑病等在我国山东、陕西等苹果主产区发生普遍且危害严重,是我国苹果生产上的主要病害^[8-9]。病情大流行时,果树叶片在 8—9 月即大量提前脱落,严重削弱树势,影响果树的正常生长发育及来年苹果的产量与质量^[10]。

HY-19 为从苹果根际土壤中分离得到的 1 株细菌,对苹果斑点落叶病菌(*Alternaria alternata* Kiessl)、苹果褐斑病菌(*Marssonina coronaria* Davis)、苹果轮斑病菌(*Alternaria mali* Roberts)等多种苹果重要病害具有明显的拮抗作用。笔者以苹果褐斑病菌等为靶标采用平板对峙法分析其拮抗谱,综合形态观察、生理生化测定和分子鉴定明确其分类地位,通过无菌滤液稳定性检测及抑菌代谢产物合成基因分析,初步推测抑菌物质为酯肽类抗生素,为苹果病原真菌生防制剂的开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株 HY-19 分离自健康苹果植株根际土壤,烟台市林业科学研究所实验室保存。

1.2 病原指示菌 苹果斑点落叶病菌、苹果褐斑病菌、苹果圆斑病菌、苹果轮斑病菌由烟台市森林资源监测保护服务中心实验室保存,苹果轮纹病菌(*Phylospora piricola* Nose.)、苹果炭疽病菌[*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc.]由烟台市农业科学研究院提供。

1.3 培养基 马铃薯胡萝卜培养基(PCDA)^[11]用于病原菌的培养、保存;牛肉膏蛋白胨液体培养基(NB)用于细菌液体发酵、培养;牛肉膏蛋白胨琼脂培养基(NA)用于细菌培养、保存。

1.4 菌株 HY-19 拮抗谱测定 采用平板对峙法^[12]测定菌株 HY-19 对病原菌的抑菌活性。采用菌丝生长速率法^[13]测定并计算菌株 HY-19 无菌滤液对病原菌的抑制率;用灭菌牙签将菌株 HY-19 接种到 NB 培养基上,30 ℃、200 r/min 振

基金项目 烟台市科技计划项目(2019MSGY114)。

作者简介 路兆军(1986—),男,河南安阳人,工程师,硕士,从事林业有害生物防治研究。*通信作者,正高级工程师,硕士,从事林木遗传研究。

收稿日期 2021-08-09

荡培养 48 h, 菌液 4 ℃, 6 000 r/min 离心 20 min, 取上清液用 0.22 μm 微孔滤器过滤除菌后 4 ℃ 保存备用。将病原菌接至滤液浓度为 10% 的 PCDA 平板中心, 以不含滤液的 PCDA 平板为对照。计算各处理病原菌菌落直径及各拮抗菌株对病原菌的抑制率。抑制率 = (对照组直径 - 试验组直径) / (对照组直径) × 100%。

1.5 菌株 HY-19 的鉴定

1.5.1 形态与生理生化特征鉴定。按照《常见细菌系统鉴定手册》^[14]和《伯杰氏细菌鉴定手册》^[15]的方法对 HY-19 进行形态鉴定及生理生化特征测定。

1.5.2 16S rDNA 基因序列分析。采用细菌 16S rDNA 扩增通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') 对 HY-19 进行 PCR 扩增, 由生工生物工程(上海)股份有限公司完成 DNA 提取及测序工作。测序结果与 NCBI 数据库进行 Blast 核酸序列比对, 利用 MEGA 5.0 软件采用邻接法 (Neighbor-Joining) 构建系统发育树。

1.6 菌株 HY-19 无菌滤液稳定性检测

1.6.1 酸碱稳定性测定。对无菌滤液进行 pH 梯度处理, pH 分别为 3、4、5、6、7、8、9、10, 室温处理 3 h 后, 将各滤液调至 pH = 7。以苹果斑点落叶病菌为病原指示菌, 采用生长速率法分析抑菌物质的酸碱稳定性。

1.6.2 蛋白酶对抑菌物质的影响。分别将蛋白酶 K、胰蛋白酶、胃蛋白酶加入无菌滤液中配制成 2 mg/mL 溶液, 37 ℃ 水浴 2 h。以未经酶处理的滤液为对照, 以苹果斑点落叶病菌

为病原指示菌, 采用生长速率法分析蛋白酶对抑菌物质的影响。

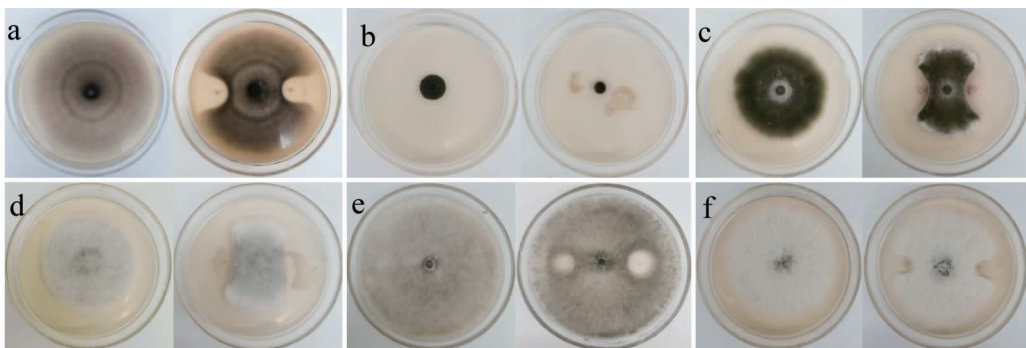
1.6.3 紫外辐射对抑菌物质的影响。将无菌滤液置于紫外灯下分别照射 0、2、4、6、8、10、12、24 h, 以苹果斑点落叶病菌为病原指示菌, 采用生长速率法研究紫外辐射对抑菌物质的影响。

1.7 菌株 HY-19 抑菌代谢产物合成基因检测 以菌株 HY-19 总 DNA 为模板, 以细胞壁组分糖醛酸磷壁酸质合成基因为对照, 用相应引物^[16] 分别对丰原素 (Fengycin)、杆菌溶素 (Bacilysin)、表面活性素 (Surfactin)、伊枯草菌素 (Iturin) 合成相关基因部分片段进行 PCR 扩增, 检测菌株 HY-19 是否含有相应的抑菌代谢产物合成基因。

1.8 数据处理 利用 SPSS 22.0 软件进行数据统计分析, 采用 Duncan's 新复极差法进行多重比较及显著性分析 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 菌株 HY-19 拮抗谱测定 菌株 HY-19 对不同病原菌具有不同程度的拮抗活性 (图 1), 其中对苹果斑点落叶病菌、苹果圆斑病菌、苹果轮斑病菌的抑菌带宽度分别为 2.62、2.41、1.15 cm, 对苹果轮纹病菌、苹果炭疽病菌、苹果褐斑病菌的抑菌带宽度分别为 0.94、0.77、0.52 cm。菌丝生长速率法测定结果表明, 菌株 HY-19 发酵滤液对苹果褐斑病菌、苹果斑点落叶病菌抑制率较高, 分别为 60.35%、58.62%, 对苹果圆斑病菌、苹果轮斑病菌、苹果轮纹病菌的抑制率次之, 对苹果炭疽病菌的抑制率最低, 仅 10.21%。



注: a. 苹果斑点落叶病菌; b. 苹果褐斑病菌; c. 苹果圆斑病菌; d. 苹果轮斑病菌; e. 苹果轮纹病菌; f. 苹果炭疽病菌

Note: a. *Alternaria alternaria* kiessl; b. *Marssonina coronaria* Davis; c. *Phyllosticta solitaria*; d. *Alternaria mali* Roberts; e. *Physalospora piricola* Nose.; f. *Colletotrichum gloeosporioides*

图 1 HY-19 对苹果病原菌的拮抗活性测定

Fig. 1 The inhibition effect of HY-19 against apple pathogens

2.2 拮抗菌的鉴定

2.2.1 形态特征。菌株 HY-19 在 NA 培养基上菌落近圆形, 边缘平整, 白色, 表面光滑有光泽 (图 2a); 菌体短杆状, 革兰氏阳性^[17] (图 2b)。

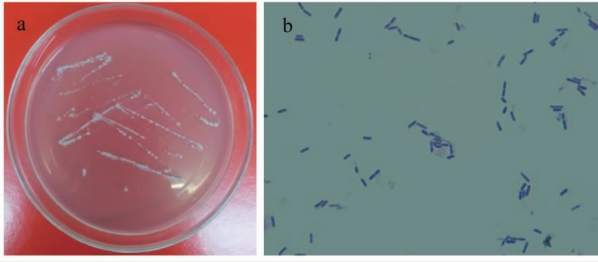
2.2.2 生理生化鉴定。该菌株为好氧菌, 其需氧性、硝酸盐还原、明胶液化等测定为阳性反应, 葡萄糖发酵、淀粉水解反应为阴性, 具体生理生化鉴定结果见表 1。

2.2.3 16S rDNA 测序分析。对菌株 HY-19 的 16S rDNA 基因片段进行 PCR 扩增, 并对 PCR 产物测序, 测序结果表明该

区段的长度为 1 444 bp, 综合比对结果显示, 菌株 HY-19 与短短芽孢杆菌 [*Brevibacillus brevis* (AY887081.2)] 的同源性最近且属同一分支 (图 3), 结合形态特征、生理生化特性及分子鉴定, 初步判断菌株 HY-19 为短短芽孢杆菌。

2.3 菌株 HY-19 无菌滤液稳定性检测

2.3.1 酸碱稳定性。由图 4 可知, 菌株 HY-19 发酵滤液在 pH 为 7~9 时抑菌活性保持在 40%~58%, 在 pH 为 7 时抑菌活性最强, 达 58%, 在 pH 为 3 和 10 的强酸碱环境中也可保持 20% 以上的活性。这说明其耐酸碱稳定性较高, 但在中性



注:a.HY-19 菌落形态;b.革兰氏染色后 HY-19 菌体形态

Note:a.Colony morphological features of HY-19;b.Cell morphology after Gram's staining of HY-19

图 2 HY-19 形态特征

Fig.2 Morphological features of HY-19

环境活性最高,在实际应用中宜保持中性环境。

表 1 菌株 HY-19 的生理生化特性

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of HY-19

序号 No.	检测项目 Test items	结果 Result
1	需氧性	+
2	硝酸盐还原	+
3	明胶液化	+
4	葡萄糖发酵	-
5	淀粉水解	-
6	2%NaCl	+
7	5%NaCl	-
8	4℃生长	+

注:“+”表示阳性;“-”表示阴性

Note:“+”means positive;“-”means negative

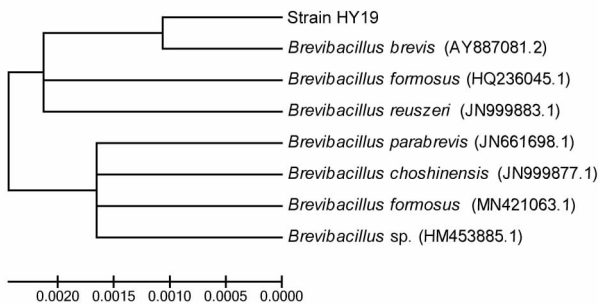


图 3 菌株 HY-19 与相关菌株的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of HY-19 and related strains

2.3.2 蛋白酶对抑菌物质的影响。分别用蛋白酶 K、胰蛋白酶、胃蛋白酶处理 HY-19 发酵滤液后,与 CK 相比,其抑菌活性略有下降,但差异不显著($P < 0.05$),说明 HY-19 发酵滤液中可能不含或仅含少量蛋白类抑菌活性物质(图 5)。

2.3.3 紫外辐射对抑菌物质的影响。HY-19 发酵滤液经紫外线处理后,对苹果斑点落叶病菌的抑制效果略有下降,但差异不显著($P < 0.05$),且抑菌率均在 54%以上,说明紫外线对 HY-19 发酵滤液抑菌活性无显著影响(图 6)。

2.4 菌株 HY-19 抑菌代谢产物合成基因检测 为了验证 HY-19 是否含有抑菌代谢产物合成基因,提取菌株全基因组后扩增丰原素、杆菌溶素、表面活性素、伊枯草菌素合成基因目的片段,结果表明(图 7),4 种脂肽类抗生素目的片段均能

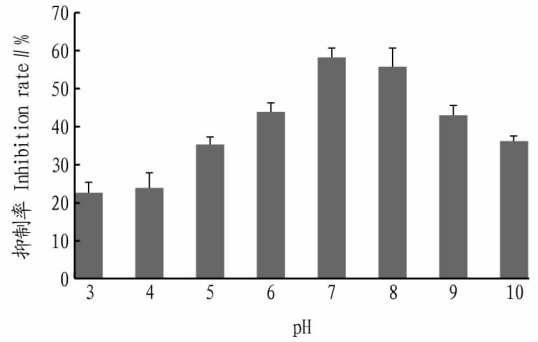


图 4 pH 对 HY-19 发酵滤液抑菌活性的影响

Fig.4 Effect of pH on the antimicrobial activity of HY-19 axenic fermentation broth

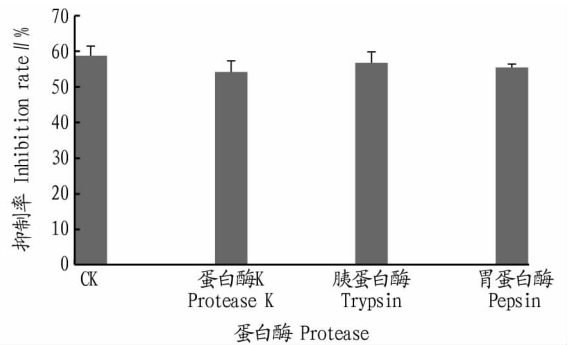


图 5 蛋白酶对 HY-19 发酵滤液抑菌活性的影响

Fig.5 Effect of proteases on the antimicrobial activity of HY-19 axenic fermentation broth

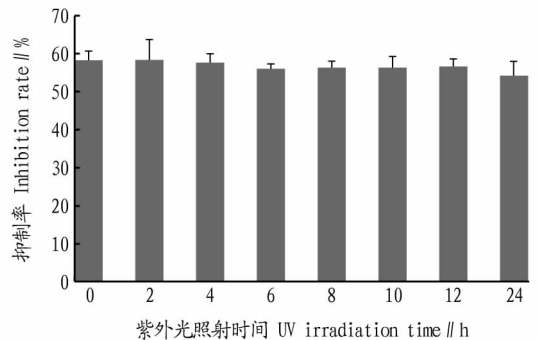


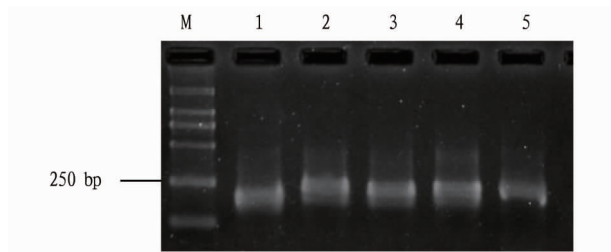
图 6 紫外线对 HY-19 发酵滤液抑菌活性的影响

Fig.6 Effect of UV on the antimicrobial activity of HY-19 axenic fermentation broth

扩增成功,证明 HY-19 含有相应抑菌代谢产物的基因,具备产生相应抑菌代谢产物的能力,这些脂肽类抑菌代谢产物可能是 HY-19 发挥抑菌活性的关键因素。

3 结论与讨论

该研究以苹果褐斑病菌、苹果斑点落叶病菌为靶标,从苹果植株根际土壤分离纯化得到的菌株中筛选到 1 株拮抗菌株 HY-19。该菌株对 6 种苹果病原菌具有不同程度的拮抗活性,对苹果褐斑病菌、苹果斑点落叶病菌抑制率较高,分别为 60.35%、58.62%。通过形态观察、生理生化测定及分子生物学鉴定,初步判定 HY-19 为短短芽孢杆菌(*Bacillus brevis*)。HY-19 无菌滤液对苹果斑点落叶病菌拮抗活性的酸碱稳定性、蛋白酶、抗紫外辐射表现良好。HY-19 含有丰原



注: M. DNA Marker; 1~5: 细胞壁组分糖酞磷酸酯、丰原素、杆菌溶素、表面活性素、伊枯草菌素合成相关基因

Note: M. DNA Marker; 1~5. The PCR products of genes related to biosynthesis of teichuronic acid, fengycin, bacilysin, surfactin, iturin, respectively

图 7 菌株 HY-19 抑菌代谢产物合成基因检测

Fig.7 PCR amplification of antibiotic biosynthetic gene fragments in HY-19

素等 4 种抑菌代谢产物合成基因, 推测 HY-19 发酵产生的脂肽类抗生素是其具有拮抗活性的主要原因。

短短芽孢杆菌为革兰氏阳性菌、严格好氧, 可产生抗逆性内生孢子, 广泛分布于土壤、淤泥、岩石等环境中^[18], 其产生的代谢产物包括多种类型, 其中一些物质有明显的抑菌作用^[19]。这些抑菌物质主要包括由核糖体合成的抗菌蛋白、细菌素, 由非核糖体合成的酯肽类物质或其他活性物质^[20]。其中酯肽类物质具有高效、稳定、广谱、安全无毒、无污染等特性, 在农业、环保等多个领域有广泛的应用前景^[21]。魏新燕等^[22]研究发现, 甲基营养性芽孢杆菌 BH21 的脂肽粗提物对灰霉菌菌丝生长抑制率可达 73.9%。刘萍等^[23]研究表明, 解淀粉芽孢杆菌产生的伊枯草菌素 *Bacillomycin D* 对金黄色葡萄球菌的生长具有显著抑制作用。董伟欣等^[24]证实丰原素在枯草芽孢杆菌 NCD-2 对灰霉病菌的抑制作用中发挥主要功能。

目前苹果生产中对常见真菌性病害以化学防治为主, 施药频次高, 对环境及果品影响较大^[25], 因此, 开发高效、广谱、稳定的微生物杀菌剂具有重要的现实意义。目前国内鲜见短短芽孢杆菌防治苹果早期落叶病的相关报道, 该研究筛选出的 HY-19 对 2 种苹果主要病害的拮抗活性较高, 具有一定的开发和应用价值。

参考文献

[1] 陈志谊. 芽孢杆菌类生物杀菌剂的研发与应用[J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(5): 723-732.

- [2] FALARDEAU J, WISE C, NOVITSKY L, et al. Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* lipopeptides on plant pathogens[J]. Journal of chemical ecology, 2013, 39(7): 869-878.
- [3] CHANDEL S, ALLAN E J, WOODWARD S. Biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* on tomato by *Brevibacillus brevis* [J]. Journal of phytopathology, 2010, 158(7/8): 470-478.
- [4] BAPAT S, SHAH A K. Biological control of fusarial wilt of pigeon pea by *Bacillus brevis* [J]. Canadian journal of microbiology, 2000, 46(2): 125-132.
- [5] 杨廷雅, 孙亮, 周婷婷, 等. 短短芽孢杆菌 *Brevibacillus brevis* HAB-5 主要抑菌活性成分的分析及其特性研究[J]. 中国生物防治学报, 2014, 30(2): 222-231.
- [6] 杜志兵, 杜秉海, 姚良同, 等. 两株棉花立枯病拮抗菌 MH1 和 MH25 的筛选与鉴定[J]. 微生物学通报, 2008, 35(2): 204-208.
- [7] 邱孙全, 杨红, 赵春安, 等. 一株内生短短芽孢杆菌的鉴定及其抗菌活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(S1): 30-33.
- [8] 寿园园, 李春敏, 赵永波, 等. 苹果早期落叶病的发生防治及相关研究进展[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(20): 9519-9521.
- [9] 孔宝华, 阮应珍, 曹克强, 等. 云南昭通苹果早期落叶病流行动态[J]. 植物保护, 2010, 36(6): 117-120, 131.
- [10] 何劲, 雷帮星, 宋贞富, 等. DEB-2 菌株对贵州苹果早期落叶病病原的毒力效应[J]. 西南农业学报, 2014, 27(2): 652-657.
- [11] 赵华. 苹果褐斑病病原学、组织细胞学和化学防治研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012.
- [12] 豆雅楠, 牛世全, 豆建涛, 等. 芽孢杆菌拮抗苹果树腐烂病菌的筛选、鉴定及抑菌活性初探[J]. 微生物学通报, 2018, 45(12): 2684-2694.
- [13] 王蓓, 牛世全, 达文燕, 等. 河西走廊盐碱土壤中抗立枯丝核菌的放线菌筛选[J]. 生物技术通报, 2014(1): 156-160.
- [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] HOLT J G, KRIEG N R, SNEATH P H A, et al. Bergey's manual of determinative bacteriology [M]. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.
- [16] 贾慧慧, 王超男, 魏艳敏, 等. 解淀粉芽孢杆菌 BJ-6 基因组测序与抗菌代谢产物合成基因分析[J]. 北京农学院学报, 2020, 35(3): 64-68.
- [17] 方中达. 植物研究方法[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [18] NICHOLSON W L. Roles of *Bacillus* endospores in the environment [J]. Cellular and molecular life sciences, 2002, 59(3): 410-416.
- [19] LUDWIG W, KLENK H P. Bergey's manual of systematic bacteriology [M]//BRENNER D J, KREIG N, STALEY J T, et al. Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 2 part A introductory essays. New York: Springer, 2006: 595-623.
- [20] 郭洁心, 马超, 朱洪磊, 等. 植物内生菌 G-1 菌株的鉴定及其拮抗物质的初步研究[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2020, 40(1): 59-65.
- [21] 严婉荣, 肖敏, 陈圆, 等. 解淀粉芽孢杆菌抗菌脂肽研究进展[J]. 北方园艺, 2018(7): 162-167.
- [22] 魏新燕, 黄媛媛, 黄亚丽, 等. 拮抗灰霉菌的海洋细菌甲基营养型芽孢杆菌的筛选、鉴定及其抑菌活性物质的研究[J]. 中国生物防治学报, 2017, 33(5): 667-674.
- [23] 刘萍, 王祖华, 张七, 等. 金黄色葡萄球菌拮抗菌株的筛选鉴定及其抗菌物质分析[J]. 微生物学通报, 2020, 47(5): 1544-1551.
- [24] 董伟欣, 李宝庆, 李社增, 等. 脂肽类抗生素 fengycin 在枯草芽孢杆菌 NCD-2 菌株抑制番茄灰霉病菌中的功能分析[J]. 植物病理学报, 2013, 43(4): 401-410.
- [25] 赵云福, 邱东晓, 梁晨, 等. 苹果病原真菌拮抗菌 HMQU140045 的分离与鉴定[J]. 山东农业科学, 2017, 49(12): 54-58.