

枯草芽孢杆菌 NCD-2 菌株抗菌蛋白初步分析

孟立花^{1,2},李社增²,郭庆港²,马平²,刘大群¹

(1.河北农业大学 植物保护学院,河北 保定 071000;

2.河北省农林科学院 植物保护研究所,河北省农业有害生物综合防治工程技术研究中心,河北 保定 071000)

摘要:枯草芽孢杆菌 NCD-2 菌株对棉花黄萎病原菌大丽轮枝菌具有较强的抗生作用。通过对 NCD-2 菌株培养条件的研究,结果表明在 30℃、培养液初始 pH 为 7.0 和培养时间为 2 d 条件下,利用 NB 培养基培养该菌株所得培养液抑菌活性优于其他培养基,其培养液经硫酸铵沉淀所得的蛋白粗提液经 RNA 酶处理后的抑菌活性与对照相比差异不显著,经蛋白酶 K 和胰蛋白酶处理后的抑菌活性与对照相比差异显著;蛋白粗提液经 60℃ 处理后的抑菌活性与对照相比差异不显著,经 80、100、120℃ 处理后抑菌活性与对照相比差异显著,但经 120℃ 处理 30 min 后仍有一部分抑菌活性,研究结果说明该菌株产生的抗菌物质存在性质上的差异。

关键词:枯草芽孢杆菌;抗菌蛋白;大丽轮枝菌;棉花黄萎病

中图分类号:S47 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2008)01-0189-05

Primary Analysis on the Antifungal Activity of the Protein Produced by *Bacillus subtilis* NCD-2 against *Verticillium dahliae*

MENGLi-hua^{1,2},LI She-zeng²,GUO Qing-gang²,MA Ping²,LIU Da-qun¹

(1 College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, China;

2. Institute of Plant Protection, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, IPM Centre of Hebei Province, Baoding 071000, China)

Abstract: *Bacillus subtilis* NCD-2 was isolated from cotton rhizosphere and showed significantly control effect on cotton verticillium wilt. Characteristics of the crude antifungal protein produced by strain NCD-2 was evaluated under different culture conditions. The result showed that the strain could produce more antifungal substance under the optimum condition (cultured in NB broth for 2d under 30℃ and pH 7.0). Precipitates of the fermentation of strain NCD-2 was collected by salt out with ammonium sulfate and showed strong inhibition effect against *Verticillium dahliae*. The culture of the ammonium sulfate precipitation from the crude protein extracts by RNase treatment, the antifungal activity compared with control was no significant difference, when treated with Proteinase K, Trypsin, the antifungal activity compared with the control was significantly. The activity of the antifungal substrates were investigated under different temperatures. The antifungal activity of the substrate at 60℃ was no significant difference when it compared with control, while the antifungal activity decreased at 80, 100 and 120℃ and showed significant difference compared with the control. However, the crude protein extracts still showed the antifungal activity after heat treatments for 30 min under 120℃. Results indicated that the antifungal extracts of *Bacillus subtilis* NCD-2 were several substrates with different traits.

Key words: *Bacillus subtilis*; Antifungal protein; *Verticillium dahliae*; Cotton verticillium wilt

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 是一类好氧革兰氏阳性细菌^[1],在一定条件下能产生对热、紫外线、电磁辐射及某些化学药品有很强抗性的芽孢。其抗

菌谱广泛,对多种植物病原菌具有潜在的生防利用价值^[3]。枯草芽孢杆菌可以产生多种抗菌物质,包括多肽类抗生素^[4]、抗菌蛋白^[5]和挥发性抗菌物

收稿日期:2007-12-16

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30671401);国家高技术研究发展重大项目(863)经费资助项目(2006AA10A211)

作者简介:孟立花(1980-),女,河北景县人,在读硕士,主要从事植物病害生物防治研究。

通讯作者:马平(1964-),男,江苏南京人,研究员,主要从事微生物杀菌剂的研究。

质^[6]。分离纯化利用这类抗菌物质,特别是抗菌蛋白类物质一直是相关研究的热点之一。

枯草芽孢杆菌 NCD-2 菌株是河北省农林科学院植物保护研究所植物病害生物防治实验室分离到的一株有效防治棉花黄萎病的细菌^[7],它通过产生抗菌物质达到对大丽轮枝菌的抑制作用^[8],以该菌株作为有效成分的微生物农药(10 亿/g 芽孢枯草芽孢杆菌可湿性粉剂)已完成国家农药登记。本研究通过对该菌株产生抗菌蛋白的最佳条件及抗菌蛋白特性的研究,为进一步纯化抗菌蛋白及其应用提供了科学依据。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

NCD-2 菌株和棉花黄萎病病原菌大丽轮枝菌菌株均由河北省农林科学院植物保护研究所植物病害生物防治实验室提供。

1.2 NCD-2 菌株无菌体培养液制备

NCD-2 菌株平板划线接种,30℃ 恒温培养 24 h。挑取单菌落接种于盛有 NB 培养液三角瓶中,装液量为每三角瓶(250 mL)中盛有 100 mL NB 培养液,在指定温度下,摇床振荡(180 r/min)培养一定时间。培养液离心(4 500 r/min,30 min)后,上清液经细菌过滤器($\phi = 0.22 \mu\text{m}$)过滤则得无菌体培养液。

1.3 抑菌活性测定

采用改进牛津杯法即牛津杯双层培养基法。从在 PDA 平板培养基上培养 7 d 的棉花黄萎病病原菌落边缘挑取菌丝块 3~4 块,接种于 PDB 培养液中,装液量为每三角瓶(250 mL)中盛有 100 mL PDB 培养液,25℃,摇床振荡(180 r/min)培养 4 d。无菌纱布过滤去菌丝得到分生孢子悬浮液,血球计数板计数,将分生孢子悬浮液用无菌水调整为 10^8 个/mL。倒 PDA 培养基为平板下层;在每 100 mL 改良 PDA 培养基(其中琼脂含量为 0.5%,其他成分与 PDA 相同)中加入 1 mL 棉花黄萎菌分生孢子悬浮液并混合均匀,倒平板作为上层。在每个双层平板上均匀放置 3 个无菌牛津杯。每个牛津杯内注入 100 μL 供试样品,30℃ 培养 2~3 d 后测量抑菌圈直径。

1.4 培养条件对 NCD-2 菌株发酵液抑菌活性的影响

按照下列培养条件对 NCD-2 菌株进行培养,制备无菌体培养液,并进行抑菌活性测定。

不同培养基的影响:将 NCD-2 菌株分别接种于 NB、LB、LBG、BPY、PDB 培养液中,于 30℃,摇床振荡(180 r/min)培养 2 d。

培养温度的影响:将 NCD-2 菌株分别接种在 NB 培养液,分别在 25、30 和 37℃,摇床振荡(180 r/min)培养 2 d。

不同 pH 的影响:将 NCD-2 菌株接种在初始 pH 分别为 3、5、7、9 和 11 的 NB 培养液,30℃,摇床振荡(180 r/min)培养 2 d。

培养时间的影响:将 NCD-2 菌株接种在 NB 培养液中,30℃,摇床振荡(180 r/min)培养,培养时间分别为 1、2、3、4、5 和 6 d。

1.5 NCD-2 菌株抗菌蛋白粗提液提取和性质分析

1.5.1 NCD-2 菌株蛋白粗提液制备 应用 NB 培养液,对 NCD-2 菌株进行振荡培养(30℃,180 r/min,2 d)。该培养液经离心(4 500 r/min,30 min)去除菌体,去菌体培养液加入 80% 饱和度的硫酸铵,4℃ 沉淀过夜,离心(4 500 r/min)30 min,收集沉淀物,用磷酸缓冲液(pH 7.2)进行溶解,4℃ 透析过夜(透析袋截流分子量为 14 000)。透析液用细菌过滤器($\phi = 0.22 \mu\text{m}$)过滤除去杂质后即为蛋白粗提液。并对该粗提液进行抑菌活性测定。4 次重复,以 NB 培养液作对照。

1.5.2 不同饱和度的硫酸铵盐析对抑菌效果的影响 应用 NB 培养液,对 NCD-2 菌株进行振荡培养(30℃,180 r/min,2 d)。该培养液经离心(4 500 r/min,30 min)去除菌体,去菌体上清液中先加入 30% 饱和度的硫酸铵,4℃ 沉淀过夜,收集沉淀,溶于 3 mL 磷酸缓冲液(pH 7.2)中。其上清液调整硫酸铵饱和度至 40%,同上制备得到 30%~40% 的盐析沉淀物,以此类推分别制备 40%~50%、50%~60%、60%~70%、70%~80% 和 80%~90% 的盐析沉淀物。各沉淀物经透析脱盐后进行抑菌活性测定,4 次重复,以 NB 培养液作对照。

1.5.3 NCD-2 菌株抗菌粗蛋白对 RNA 酶和蛋白酶的稳定性 将蛋白粗提液分别用蛋白酶 K、胰蛋白酶和 RNase I 处理,每种酶使用浓度 500 $\mu\text{g/mL}$,37℃ 处理 1 h。对处理后的样品溶液进行抑菌活性测定,未经蛋白酶处理的 NCD-2 菌株蛋白粗提液为对照,4 次重复。

1.5.4 热处理对 NCD-2 菌株抗菌粗蛋白活性的影响 NCD-2 菌株蛋白粗提液经 60、80、100 和 121℃ 各处理 30 min 后进行抑菌活性测定,设常温保存的 NCD-2 菌株蛋白粗提液为对照,4 次重复。

1.6 数据统计分析

本试验有关数据的统计分析采用 SAS 6.04 版本软件(SAS Institute Inc)

2 结果与分析

2.1 NCD-2 菌株无菌体培养液对棉花黄萎病原菌的抑制作用

菌株 NCD-2 的无菌培养液对棉花黄萎菌的抑制作用测定结果表明,供试样品周围出现大而清晰的抑菌圈(图 1)。该结果说明 NCD-2 菌株培养液中含有对棉花黄萎病原菌有强抑制作用的物质,属于 NCD-2 菌株的胞外分泌物质。

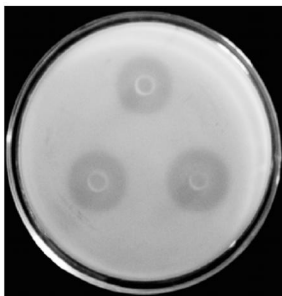


图 1 NCD-2 菌株的无菌体培养液对棉花黄萎病原菌的抑制作用

Fig.1 Inhibition activity of *Bacillus subtilis* NCD-2 filtrate against *Verticillium dahliae*

2.2 培养条件对 NCD-2 菌株培养液抑菌活性的影响

2.2.1 不同培养基的影响 采用不同的培养基对菌株 NCD-2 进行培养,试验结果表明,在应用不同培养基对 NCD-2 菌株培养时,其培养液的抑菌圈的大小不同。其中 NB 培养液作为培养基时,NCD-2 菌株培养液的抑菌作用最强,抑菌圈直径达到 19.5 mm,明显大于其他 4 种培养液的抑菌作用(图 2)。该结果说明了 NB 培养液适宜 NCD-2 菌株产生胞外抗菌物质。

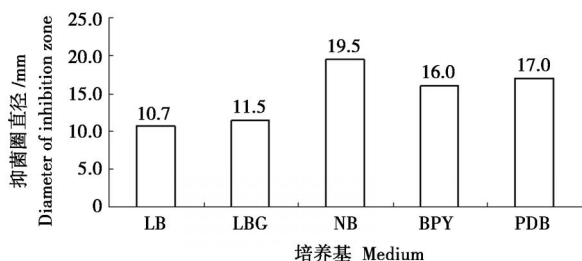


图 2 培养基对培养液抑菌活性的影响

Fig.2 Effects of different media on inhibition activity of *B. subtilis* NCD-2 filtrate against *V. dahliae*

2.2.2 不同温度的影响 在 3 种不同温度(25, 30, 37)下对 NCD-2 菌株进行培养。试验结果表明,培养温度为 30 时,其培养液的抑菌作用最强,抑菌圈直径达到 19.5 mm,明显大于其他两温度培养下培养液的抑菌作用(图 3)。该结果说明 30 培养适宜 NCD-2 菌株产生胞外抗菌物质。

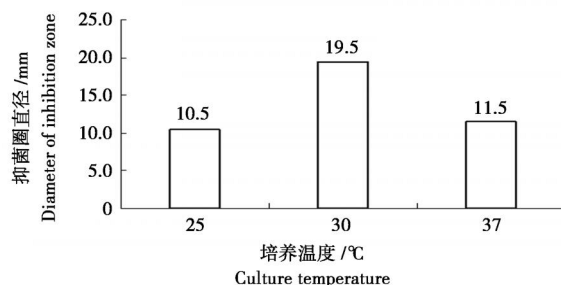


图 3 培养温度对培养液抑菌活性的影响

Fig.3 Effects of different culture temperatures on inhibition activity of *B. subtilis* NCD-2 filtrate against *V. dahliae*

2.2.3 不同 pH 的影响 使用 5 种初始 pH 值(3.0, 5.0, 7.0, 9.0, 11.0)的 NB 培养基对 NCD-2 菌株进行培养。试验结果表明培养液初始 pH 为 7.0 时,培养液的抑菌作用最强,抑菌圈直径达到 19.0 mm,明显大于其他 pH 培养液的抑菌作用(图 4)。该结果说明培养液初始 pH 为 7.0 时适宜 NCD-2 菌株产生胞外抗菌物质。

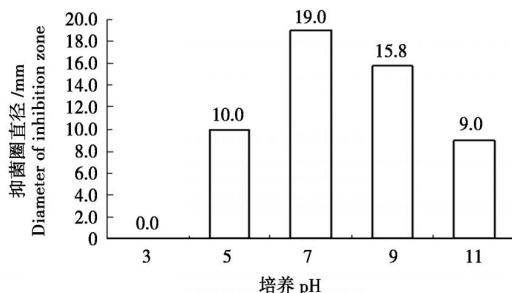


图 4 NB 培养液初始 pH 对培养液抑菌活性的影响

Fig.4 Effects of different initial pH of NB broth on inhibiting activity of *B. subtilis* NCD-2 filtrate against *V. dahliae*

2.2.4 不同培养时间的影响 试验结果表明, NCD-2 菌株经不同的培养时间(1, 2, 3, 4, 5 和 6 d)培养后,其培养液抑菌活性在培养 2 d 时抑菌圈直径达到最大,3 d 以后抑菌圈直径大小略有下降,并趋于稳定(图 5)。该结果说明培养 2 d 适宜 NCD-2 菌株产生胞外抗菌物质,过短或过长都不能达到最佳的效果。

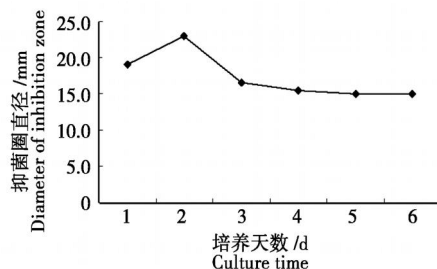


图 5 培养时间对培养液抑菌活性的影响

Fig.5 Effects of different culture time on inhibition activity of *B. subtilis* NCD-2 filtrate against *V. dahliae*

2.3 蛋白粗提液对棉花黄萎病病原菌的抑制作用

对菌株 NCD-2 的培养液进行蛋白类物质的提取和抑菌活性测定,试验结果表明,供试样品周围出现大而清晰的抑菌圈(图 6)。该结果说明经硫酸铵盐析提取的蛋白粗提液对棉花黄萎病病原菌有明显的抑菌作用。

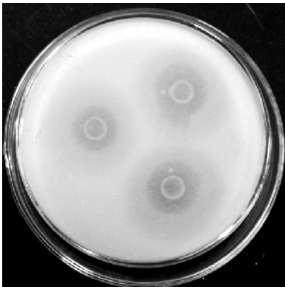


图 6 蛋白粗提液对棉花黄萎病病原菌的抑制作用

Fig. 6 Inhibition activity of antifungal protein produced by *B. subtilis* NCD-2 against *V. dahliae*

2.4 不同饱和度硫酸铵对抑菌效果的影响

采用不同饱和度的硫酸铵对菌株 NCD-2 的无菌培养液进行沉淀,试验结果表明,培养液经 30 % ~ 80 % 饱和度硫酸铵沉淀的蛋白粗提液均有抑菌活性,而硫酸铵饱和度大于 80 % 或小于 30 % 时,其沉淀的蛋白粗提液没有抑菌活性(表 1)。因此在以后的试验中采用 80 % 饱和度硫酸铵进行盐析:先在无菌体培养液中加入 30 % 饱和度的硫酸铵,4 沉淀

表 1 不同饱和度的硫酸铵沉淀对抑菌效果的影响

Tab.1 Effects of different saturation of ammonium sulfate on inhibiting activity

硫酸铵饱和度/ % Concentration of Ammonius sulfate	30	30 ~ 40	40 ~ 50	50 ~ 60	60 ~ 70	70 ~ 80	80 ~ 90
抑菌圈直径/ mm Diameter of inhibition zone	0	18.0	18.0	15.0	8.0	4.0	0

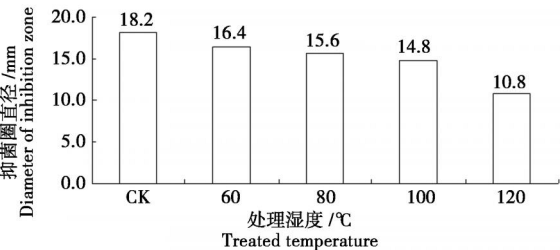


图 8 温度对 NCD-2 菌株粗提蛋白抗菌活性影响

Fig. 8 Effects of different temperatures on inhibition activity of crude antifungal protein produced by *B. subtilis* NCD-2

2.6 NCD-2 菌株抗菌粗蛋白提取液对热的稳定性

试验结果表明,NCD-2 菌株粗蛋白经 60,80,100 和 120 分别处理 30 min 后,其抗菌活性随着温度的升高而降低,经 60 处理的粗蛋白抑菌活性与对照相比差异不显著,经 80,100 处理的粗蛋白抑菌活性与对照相比差异显著,且经 120 处理后的抑菌活性与对照相比差异较显著($p = 0.05$),但仍有部

过夜,离心去沉淀,上清液中补加硫酸铵至 80 % 饱和度和,4 沉淀过夜沉淀出大部分抗菌蛋白。

2.5 NCD-2 菌株抗菌粗蛋白对蛋白酶和 RNA 酶的稳定性

试验结果表明 NCD-2 菌株粗蛋白提取液经不同的酶处理后,经 RNase I 处理后抑菌活性基本不变,经蛋白酶 K、胰蛋白酶处理后抑菌圈直径与对照相比差异显著($p = 0.05$),处理后提取液的抑菌活性分别为未经处理的提取液抑菌活性的 55 % 和 54 % (图 7)。该结果说明 NCD-2 菌株抗菌粗蛋白提取液中抗菌物质为混合成分,其中含有一部分蛋白类物质。

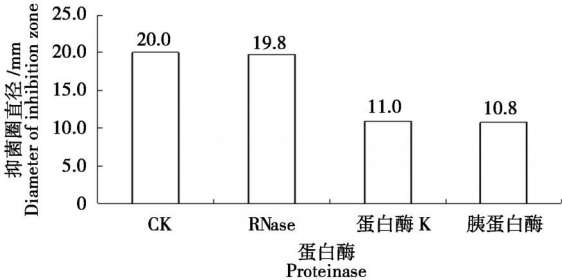


图 7 蛋白酶和 RNA 酶对 NCD-2 菌株粗提蛋白抑菌活性影响

Fig. 7 Effects of different proteinases and RNase I on inhibiting activity of crude antifungal protein produced by *B. subtilis* NCD-2

分抗菌活性,为对照的 59.4 % (图 8)。该结果说明,NCD-2 菌株粗蛋白中抗菌成分可能是一种混合成分,部分抗菌成分属于耐热物质。

3 讨论

枯草芽孢杆菌可以产生多种抗菌物质,包括肽类、蛋白类、氨基多糖类和多烯类物质,其中尤以肽类抗菌物质研究的最多。细菌培养液经硫酸铵沉淀、盐析后可以得到蛋白或多肽类物质,其中肽类抗菌物质一般表现为热稳定性和对蛋白酶不敏感性。

目前对枯草芽孢杆菌抗菌物质的研究报道很多,如谢栋等^[9]研究的枯草芽孢杆菌 BS-98 抗菌蛋白,该抗菌蛋白经蛋白酶 K 处理后部分活性丧失,经 120 处理后仍保持 54 % 的抑菌活性;启东梅等研究的芽孢杆菌抗菌蛋白,该抗菌蛋白对蛋白酶不敏感,120 热处理后活性全部丧失;汪澈等^[10]研究的枯草芽孢杆菌 B9601- γ_2 抗菌蛋白,该抗菌蛋白对

蛋白酶部分敏感,120℃ 热处理后活性全部丧失;孙瑶等研究的枯草芽孢杆菌 BDT-25 抗菌蛋白,该抗菌蛋白对蛋白酶 K 敏感,对热敏感。

本研究的枯草芽孢杆菌 NCD-2 菌株对棉花黄萎病病原菌有很强的抑制作用。其粗蛋白提取液经 121℃ 处理 30 min 后,仍表现较强的抑菌活性,并且提取液对蛋白酶表现部分敏感,这与谢栋等研究的抗菌蛋白有一定的相似性,与汪澈等研究的抗菌蛋白有一定的差别,与孙瑶等研究的抗菌蛋白不同。因此,推测菌株 NCD-2 的粗蛋白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并开展深入的研究。

参考文献:

- [1] 程洪斌,刘晓桥,陈红漫,等. 枯草芽孢杆菌防治植物真菌病害研究进展[J]. 上海农业学报,2006,22(1):109 - 112.
- [2] 陈中义,张杰,黄大昉,等. 植物病害生防芽孢杆菌抗菌机制与遗传改良研究[J]. 植物病理学报,2002,24(4):312 - 314.
- [3] 齐冬梅,梁启美,惠明,等. 棉花枯萎、黄萎病拮抗芽孢杆菌的抗菌蛋白特性[J]. 微生物学通报,2005,32(4):42 - 46.
- [4] Tamehiro N,Okamoto Y,Okamoto S, *et al*. Bacilysocin, a novel phospholipids antibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168[J]. Antimicrob Agents Chemothec,2002,46:315 - 320.
- [5] Marx F. Small basic antifungal proteins secreted from filamentous ascomycetes: a comparative study regarding expression, structure, function and potential application[J]. Appl Microbiol Biotechnol,2004,65:133 - 142.
- [6] 孙瑶,马平,朱宝成,等. 棉花黄萎菌拮抗菌 BDT-25 的鉴定及抗菌蛋白产生条件研究[J]. 华北农学报,2006,21(6):119 - 123.
- [7] 李社增,鹿秀云,马平,等. 防治棉花黄萎病的生防细菌 NCD-2 的田间效果评价及其鉴定[J]. 植物病理学报,2005,35(5):451 - 455.
- [8] 李社增,鹿秀云,马平,等. 棉花黄萎病生防细菌 NCD-2 抑菌物质提取初步研究[J]. 棉花学报,2004,16(1):62 - 63.
- [9] 谢栋,彭憬,王津红,等. 枯草芽孢杆菌抗菌蛋白 X98 的纯化与性质[J]. 微生物学报,1998,38(1):13 - 19.
- [10] 汪澈,何月秋,张永庆,等. 枯草芽孢杆菌 B9601 - Y₂ 抑菌蛋白活性及产生条件的研究[J]. 植物病理学报,2005,35(1):30 - 36.