

林志伟,肖亚静,郭春兰,等. 枯草芽孢杆菌 21 代谢物对大豆茄镰孢菌的抑菌机制[J]. 江苏农业科学,2015,43(11):175-177.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.049

枯草芽孢杆菌 21 代谢物对大豆茄镰孢菌的抑菌机制

林志伟,肖亚静,郭春兰,孙冬梅

(黑龙江八一农垦大学,黑龙江大庆 163319)

摘要:采用显微观察与电导率测定相结合的方法,研究枯草芽孢杆菌 21 代谢物对大豆茄镰孢菌的抑菌作用与抑制机理。结果表明:该菌株的无菌代谢物对茄镰孢菌菌丝生长及孢子萌发均有抑制作用,当发酵液的体积分数达到 90% 时,对病菌孢子萌发的抑制率可达 99%;显微观察可发现孢子畸形、顶端囊泡出现、芽管伸长受抑等现象;经无菌发酵液处理后,菌片的电导率改变,显示出膜透性的改变。

关键词:枯草芽孢杆菌;代谢物;茄镰孢菌;抑菌

中图分类号: S435.651 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)11-0175-03

大豆根腐病是黑龙江省东北部大豆产区发生较严重的根部病害之一,该病害发生时可影响大豆的产量和品质,一般年份减产可达 10%~30%,严重时减产可达 60%。引起大豆根腐病的病原菌有十多种,属于镰孢菌属、丝核菌属、腐霉属和疫霉属等,其中镰刀菌、丝核菌的致病力较强,引起根腐病普遍发生^[1-3]。

在根腐病的防治中以化学农药拌种为主,鉴于化学农药的生态效应,生物防治不失为一种有效的防治手段,目前已报道有多种生防制剂对该病具有防治效果^[4-12]。前期的研究证明枯草芽孢杆菌 21 具有生物防治能力,为了更好地开发该菌株在生产中的应用,本研究利用其代谢物对大豆根腐病菌茄镰孢菌进行抑菌研究。

1 材料与方法

1.1 材料

枯草芽孢杆菌 21 (*Bacillus subtilis* 21)、大豆根腐病菌茄镰孢菌 (*Fusarium solani*) 均保存于黑龙江八一农垦大学微生物与发酵实验室。

大豆品种为绥农 29,由黑龙江八一农垦大学大豆栽培组惠赠。

1.2 试验方法

1.2.1 枯草芽孢杆菌发酵液的获得 将筛选出的枯草芽孢杆菌菌株转接到配制好的牛肉膏蛋白胨斜面试管中,28℃ 活化 20 h 后,用接种环刮取 1 环菌体,接种于牛肉膏蛋白胨液体培养基中,在 28℃、160 r/min 振荡培养 20 h 左右。当菌体 $D_{620\text{ nm}}$ 达到 0.7 左右时,按照 3% 接种量接菌到灭过菌的牛肉膏蛋白胨液体培养基中,在 28℃、160 r/min 振荡培养 36 h,即为发酵好的枯草芽孢杆菌。发酵后的培养液先经离心沉淀,然后去除菌体,在无菌条件下吸取发酵上清液,用孔径大小为 0.22 μm 的微孔滤膜进行过滤除菌,获得拮抗无菌

滤液。

1.2.2 代谢物对茄镰孢菌菌丝生长的抑制 以茄镰孢菌为指示菌,将病原真菌活化,待其长满平板后,用直径为 5 mm 的打孔器打成大小一致的菌碟,用接种针挑取菌碟分别接入 PDA 平板中,28℃ 恒温培养 1 d 后,在距离菌碟 3 cm 处插入已灭菌的牛津杯,并向牛津杯内注入相同体积的处理好的无菌滤液,每组重复 3 次,置于 28℃ 恒温箱中培养 4 d 后测量抑菌圈半径。

1.2.3 不同浓度发酵液对植物病原菌孢子萌发的影响 分别向含有 0.1 mL 的 5.2×10^7 个/mL 的茄镰孢菌分生孢子悬浮液中加入 0.9、0.8、0.7、0.6、0.5 mL 枯草芽孢杆菌发酵液,并用无菌水定容使其最终体系均为 1 mL,即发酵液的体积分数分别为 90%、80%、70%、60%、50%;以未加发酵液的茄镰孢菌分生孢子悬浮液作为空白对照,充分混匀后于 28℃ 恒温暗培养,当空白对照的孢子萌发率达到 90% 以上时,调查各处理孢子萌发情况,每个载玻片观察 10 个视野,共计 300 个孢子,孢子萌发形成的芽管长度大于孢子一半时视为萌发,计算不同浓度枯草芽孢杆菌发酵液处理的孢子萌发率,对发酵液作用下孢子萌发出现的畸形情况拍照记录,相关计算公式如下:

孢子萌发率 = (萌发的孢子/300) × 100%;

抑制百分率 = (空白对照孢子萌发率 - 处理孢子萌发率)/空白对照孢子萌发率 × 100%。

1.2.4 无菌发酵液处理对茄镰孢菌电导率变化的影响 用直径为 5 mm 的打孔器在已活化好的镰刀菌菌落同心环处打取菌碟,分别培养在直径为 9 cm 的含有 20 mL 查氏培养基的培养皿中,28℃ 恒温暗培养 4 d,待用。将培养好的镰刀菌菌片用重蒸水冲洗 5 遍,真空抽滤吸干水分后,放入装有无菌发酵液的 100 mL 三角瓶中浸渍,保证菌片完全浸没在培养液中,每 2 h 取 5 个菌片,用重蒸水冲洗 5 次,保证菌片完好。将冲洗后的菌片放入有盛有 35 mL 无离子水的 50 mL 三角瓶中,即刻利用电导率仪测定电导率,之后静置 30 min,再次测定浸渍液的电导率,两者差值可以反映出所测菌体在处理时间内的细胞内容物渗出程度。以浸于清水中的菌片的电导率为对照。

收稿日期:2015-03-26

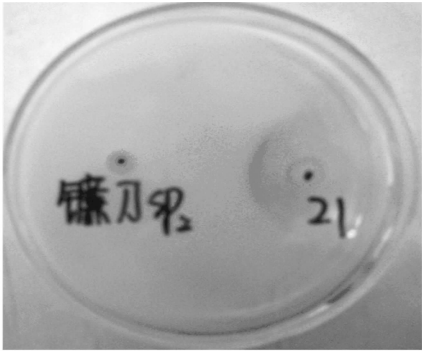
基金项目:黑龙江省教育厅产业化培育项目(编号:1254CGZH32)。

作者简介:林志伟(1970—),男,黑龙江勃利人,硕士,副教授,主要从事植物病虫害综合防治技术研究。E-mail:408160466@qq.com。

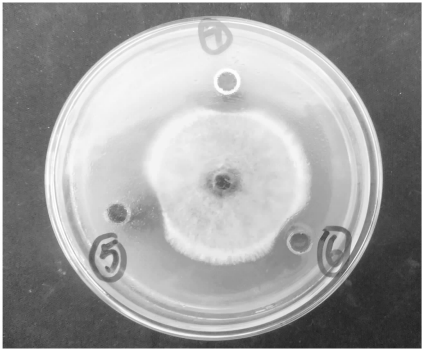
2 结果与分析

2.1 代谢物对茄镰孢菌菌丝生长的抑制

试验中证实:经对峙培养后,枯草芽孢杆菌 21 对茄镰孢菌的菌丝生长可以产生抑菌圈(图 1-a),抑菌圈直径可达 0.9 cm,因而进一步进行了该菌株代谢物的抑菌作用研究。测定结果表明:采用管碟法获得的抑菌圈直径可达 0.7 cm (图 1-b),菌丝生长抑制率为 83.4%。



a.枯草芽孢杆菌 21 对茄镰孢菌的抑制效果



b.枯草芽孢杆菌 21 代谢物对茄镰孢菌抑制效果

图1 枯草芽孢杆菌 21 及其代谢产物对茄镰孢菌的抑制

2.2 代谢物对茄镰孢菌孢子萌发的影响

枯草芽孢杆菌产生的代谢产物主要为抗菌肽类及一些蛋白类拮抗物,对病原菌的孢子萌发及菌丝生长产生抑制作用。利用无菌代谢物处理病原菌孢子,通过定时观察显微镜下孢子萌发情况发现:28℃黑暗恒温培养 8 h 后,对照(清水处理)中茄镰孢菌孢子萌发率可达到 95% 以上;而不同浓度代谢物处理茄镰孢菌的分生孢子后,对镰孢菌的孢子萌发均产生抑制作用,但不同浓度抑制程度不同,且随着发酵液浓度的增加,孢子萌发率逐渐降低,即发酵液体积分数分别为 50%、60%、70%、80%、90% 时,镰孢菌的孢子萌发率分别为 67.0%、18.0%、7.0%、3.0%、0.7%,即当发酵液的体积分数达到 90% 时,对病菌孢子萌发的抑制率可达 99% (表 1);供试不同浓度的发酵液对孢子萌发都有强烈抑制作用,在显微镜下均可观察到大量的畸变孢子及不萌发的孢子,畸变形态多样,部分孢子顶端出现囊泡,部分孢子顶端膨大变形,部分孢子萌发长出了芽管,但芽管无法进一步伸长(图 2-a);而对照组孢子可正常萌芽并形成大量光滑修长的菌丝体(图 2-b)。

2.3 枯草芽孢杆菌无菌代谢物处理茄镰孢菌后菌体电导率的变化

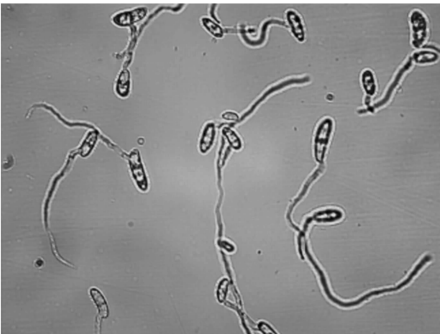
表 1 不同浓度的枯草芽孢杆菌 21 发酵液对茄镰孢菌孢子萌发的影响

代谢物浓度 (%)	萌发数 (个)	萌发率 (%)
90	2	0.7
80	9	3.0
70	21	7.0
60	54	18.0
50	201	67.0
0 (CK)	299	99.7

电导率的变化可以衡量溶液中离子强度的大小,也在一定程度上反映细胞膜透性的改变。通过对浸泡不同时间镰孢菌片电导率的测定发现:与对照相比,经无菌发酵液处理过的菌体浸渍液电导率变化趋势与对照(水)处理的电导率变化不同,发酵液处理 2~16 h 内的菌片浸渍液电导率均高于清水处理,且以处理 10 h 时电导率值最高,高出对照 186%,随后呈下降趋势;当发酵液处理 18~28 h 时,菌体浸渍液电导率值却明显低于对照,尤其是发酵液处理 20~28 h 时,电导率值相对平稳(图 3)。从结果中可看出,随着发酵液对菌体处理时间的延长,菌体的内容物外渗作用增加,当作用 16 h 后,菌体内容物几乎全部外渗;而在 18 h 后,发酵液处理的菌片电导率反而低于对照,这可能与清水处理菌片损伤程度较小有关,从清水对照处理不同时间电导率值变化较平稳也能体现这一点。



a.经枯草芽孢杆菌 21 发酵液处理后的茄镰孢菌畸变孢子



b.正常萌发的茄镰孢菌孢子

图2 枯草芽孢杆菌 21 发酵液对茄镰孢菌孢子萌发的畸变影响

3 结论与讨论

拮抗微生物在植物病害防治方面机理复杂,主要体现在空间和营养竞争、产生抗菌物质与诱导植物抗病性等方面。

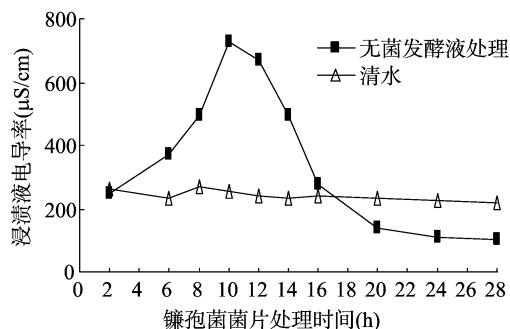


图3 枯草芽孢杆菌无菌发酵液对茄镰孢菌电导率的影响

已有大量文献报道了不同拮抗微生物的拮抗效果,其中拮抗细菌主要为芽孢杆菌,且主要的菌种为枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)、多黏芽孢杆菌(*B. polymyxa*)、地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)、短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)等,不同菌株对不同植物病原真菌表现出不同的抑制效果^[4-7,13-22]。试验选用的枯草芽孢杆菌 21 菌株对茄镰孢菌的菌丝生长表现出明显抑制作用,可作为潜在的生防菌株进一步开发与应用。

微生物的代谢产物种类多样,是有效的杀菌成分,代谢物抑菌机理的探讨也是目前生物防治研究的热点之一。利用显微观察法研究真菌、细菌或放线菌代谢物的抑菌效果时,均观察到了病原菌菌丝生长畸形或孢子萌发畸形的现象^[21]。在对枯草芽孢杆菌 21 菌株无菌滤液抑菌研究中,也同时观察到了病原菌孢子畸形、无法正常萌发的现象,这一结果的获得为该菌株的开发应用提供有力支持。

真菌的细胞壁与细胞膜是调节物质运输的重要细胞器,一旦细胞壁与膜受到损伤后会有电解质的渗漏,因而测定电解率的变化可以作为判断膜损伤的依据之一。许多研究表明,作用于细胞膜的抗菌物都能促使电导率的增高^[18,21]。本研究经处理后的病原菌菌体浸液的电导率也出现增高的现象,且与对照相比电导率增高在处理 2 h 后即有明显的表现,表明该菌株在真菌病害防治中具有重要潜力。

参考文献:

- [1] 辛惠普,马汇泉,刘静茹,等. 大豆根腐病发生与防治的初步研究[J]. 大豆科学,1987,6(3):189-196.
- [2] 韩庆新,辛惠普. 大豆根腐病主要病原菌对大豆幼苗致病性的初步研究[J]. 大豆科学,1990,9(2):157-162.
- [3] 李宝英,马淑梅. 大豆根腐病病原菌种类及抗原筛选[J]. 植物保护学报,2000,27(1):91-92.
- [4] 孙冬梅,杨 谦,宋金柱,等. 黄绿木霉菌对大豆根腐病镰刀菌的拮抗作用[J]. 中国油料作物学报,2005,27(3):58-61,105.
- [5] 张淑梅,王玉霞,赵晓宇,等. 生物拌种剂防治大豆根腐病效果和机制[J]. 大豆科学,2009,28(5):863-868,874.
- [6] 郭荣君,刘杏忠,杨怀文,等. 芽孢杆菌 BH1 防治大豆根腐病的效果及机制[J]. 中国生物防治,2003,19(4):180-184.
- [7] 温广月,许艳丽,李春杰,等. 6 株生防细菌对大豆根腐病防治效果初步评价[J]. 大豆科学,2005,24(2):121-125.
- [8] Li X Y, Yang J J, Mao Z C, et al. Enhancement of biocontrol activities

- and cyclic lipopeptides production by chemical mutagenesis of *Bacillus subtilis* XF-1, a biocontrol agent of *Plasmodiophora brassicae* and *Fusarium solani* [J]. Indian Journal of Microbiology, 2014, 54 (4): 476-479.
- [9] Gajbhiye A, Rai A R, Meshram S U, et al. Isolation, evaluation and characterization of *Bacillus subtilis* from cotton rhizospheric soil with biocontrol activity against *Fusarium oxysporum* [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2010, 26 (7): 1187-1194.
- [10] 许艳丽,张红骥,张匀华,等. 复配生防菌株防治大豆根腐病的研究[J]. 大豆科学,2008,27(2):270-274.
- [11] Zheng X Y, Sinclair J B. The effects of traits of *Bacillus megaterium* on seed and root colonization and their correlation with the suppression of *Rhizoctonia* root rot of soybean [J]. BioControl, 2000, 45 (2): 223-243.
- [12] Choudhary D K. Plant growth - promotion (PGP) activities and molecular characterization of rhizobacterial strains isolated from soybean (*Glycine max* L. Merrill) plants against charcoal rot pathogen, *Macrophomina phaseolina* [J]. Biotechnology Letters, 2011, 33 (11): 2287-2295.
- [13] Vawdrey L L, Martin T M, De Faveri J. The potential of organic and inorganic soil amendments, and a biological control agent (*Trichoderma* sp.) for the management of *Phytophthora* root rot of papaw in far northern Queensland [J]. Australasian Plant Pathology, 2002, 31 (4): 391-399.
- [14] Zhang J X, Xue A G, Morrison M J, et al. Impact of time between field application of *Bacillus subtilis* strains SB01 and SB24 and inoculation with *Sclerotinia sclerotiorum* on the suppression of *Sclerotinia* stem rot in soybean [J]. European Journal of Plant Pathology, 2011, 131 (1): 95-102.
- [15] Chen F Wang M, Zheng Y, et al. Quantitative changes of plant defense enzymes and phytohormone in biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt by *Bacillus subtilis* B579 [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 26 (4): 675-684.
- [16] 马利平,郝变青,王 静,等. 拮抗菌 B96-II 对芦笋枯萎菌的抑菌作用[J]. 应用与环境生物学报,2009,15(6):861-865.
- [17] 郭成瑾,张丽荣,沈瑞清. 土壤消毒对马铃薯连作田土壤微生物数量的影响[J]. 江苏农业科学,2014,42(10):367-369.
- [18] 赵 帅,田长彦,史应武,等. 黄瓜枯萎病生防菌 HD-087 产抗菌物质条件的优化及抑菌作用初探[J]. 微生物学通报,2013,40(5):802-811.
- [19] Zhao S, Du C M, Tian C Y. Suppression of *Fusarium oxysporum* and induced resistance of plants involved in the biocontrol of cucumber fusarium wilt by *Streptomyces bikiniensis* HD-087 [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2012, 28 (9): 2919-2927.
- [20] 高摇芬,褚建梅,李静虹,等. 植物病原真菌致病机理研究进展[J]. 江苏农业学报,2014,30(5):1174-1179.
- [21] 孙冬梅,林志伟. 黄绿木霉发酵液对水稻纹枯病菌作用的研究[J]. 植物保护,2009,35(4):83-86.
- [22] Hultberg M, Bengtsson T, Liljeroth E. Late blight on potato is suppressed by the biosurfactant - producing strain *Pseudomonas koreensis* 2.74 and its biosurfactant [J]. BioControl, 2010, 55 (4): 543-550.