

防风内生防细菌FFR3的筛选、鉴定及其抑菌物质特性研究

戚昱琦, 陈爱明, 蔡灏漾, 古扎来·达吾坎尔, 唐子恒, 王娜*

江苏科技大学生物技术学院, 江苏 镇江
Email: *biojustwn@126.com

收稿日期: 2020年11月21日; 录用日期: 2020年12月17日; 发布日期: 2020年12月29日

摘要

植物内生细菌在植物的促生、生物防治、抗逆性以及生物医药、环境保护等方面具有重要的作用。本文从中草药防风(*Saposhnikovia divaricata* (Trucz.) Schischk.)根系中筛选出1株对多种病原细菌和病原真菌具有广谱抗性的内生细菌FFR3, 并通过形态学和16SrRNA分子生物学鉴定, 在此基础上研究了FFR3对病原真菌的形态影响和抑菌物质的特性。结果表明, FFR3为类芽孢杆菌(*Paenibacillus* spp.), 对梨火疫病菌、稻黄单胞菌水稻致病变种、苏云金芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、丁香假单胞杆菌桑致病变种等多种病原细菌以及核盘菌、禾谷丝核菌、串珠镰胞菌、辣椒疫霉、灰霉菌等多种病原真菌具有明显抑制作用。FFR3产生的胞外物质破坏病原真菌细胞壁结构, 使菌丝脱水、皱缩、断裂, 环状或U型打环, 菌丝变短变细, 达到抑制病原真菌的效果。硫酸铵沉淀、乙醇醇沉、不同有机溶剂分级萃取FFR3胞外抑菌物质, 以金黄色葡萄球菌和丁香假单胞杆菌桑致病变种为指示菌, 初步判定抑菌物质为蛋白质类(或肽类)物质、生物碱或者黄酮类物质。硫酸铵沉淀的蛋白质类(或肽类)物质在低于80℃时保持良好的抑菌活性; 在蛋白酶K和胰蛋白酶处理后, 抑菌活性明显下降; 在pH 6~8即中性范围内对指示菌的抑制效果最好。类芽孢杆菌是一类重要的植物病害生物防治微生物, 在环境污染治理、食品、医药等领域均有广阔的应用前景。本研究为植物内生菌及类芽孢杆菌的进一步开发应用提供一定的基础。

关键词

植物内生细菌, 筛选, 鉴定, 抑菌活性, 抑菌物质

Screening, Identification of Endophytic Bacterium FFR3 from *Saposhnikovia divaricate* (Trucz.) Schischk. and Study on Characteristics of Its Antibacterial Substances

Yuqi Qi, Aiming Chen, Haoyang Cai, Guzalay·Dawkar, Ziheng Tang, Na Wang*

*通讯作者。

文章引用: 戚昱琦, 陈爱明, 蔡灏漾, 古扎来·达吾坎尔, 唐子恒, 王娜. 防风内生防细菌 FFR3 的筛选、鉴定及其抑菌物质特性研究[J]. 微生物前沿, 2020, 9(4): 171-184. DOI: 10.12677/amb.2020.94023

Abstract

Plant endophytic bacteria played important roles in plant growth, biological control, stress resistance, biomedicine and environmental protection. In this paper, an endophytic bacterium with broad spectrum resistance to many pathogenic bacteria and fungi, named FFR3, was isolated from the root of *Saposhnikovia divaricata* (Trucz.) Schischk. Based on the morphology and 16SrRNA molecular biology, strain FFR3 was identified. The morphological effects of strain FFR3 on pathogenic fungi and the characteristics of antibacterial substances were also studied. Results showed that strain FFR3 was identified as *Paenibacillus* spp. which had obvious antibacterial activities to a variety of pathogenic bacteria and pathogenic fungi, such as *Erwinia amylovory*, *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*, *Bacillus thuringiensis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas syringae* pv. *Mori* and *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia zae*, *Fusarium moniliforme*, *Phytophthora capsici*, *Botrytis cinerea*. The extracellular substances, produced by FFR3, destroyed the cell wall structure of pathogenic fungi, caused the mycelium to dehydrate, shrink, break, ring or u-shaped ring, and shortened and thinned the mycelium, so as to inhibit the growth of pathogenic fungi. Using *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas syringae* pv. *Mori* as indicator bacteria, the antibacterial substances, extracted by ammonium sulfate, ethanol and different organic solvents, were preliminarily determined as proteins (or peptides), alkaloids or flavonoids. The proteins (or peptides), precipitated by ammonium sulfate, showed excellent heat stability, which could remain good antibacterial activities below 80°C. After treatment with protease K and trypsin, the antibacterial activities decreased significantly. The antagonist could exert its excellent activities in the pH range from 6.0 to 8.0. *Paenibacillus* spp. was an important biological control microorganism of plant diseases, which had broad application prospects in the fields of environmental pollution control, food, medicine and so on. This study provided a basis for the further development and application of endophytic bacteria and *Paenibacillus* spp.

Keywords

Plant Endophytic Bacteria, Screening, Identification, Antibacterial Activity, Antibacterial Substances

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

植物病害是危害农业生产的自然灾害之一，阻碍农作物生长发育，引起产量降低，给农户造成巨大经济损失。化学药剂是农业生产上植物病害防控的主要方式，防治效果显著的同时，长期以来的不合理使用造成的环境污染、生物多样性破坏、病原菌抗药性增强、农产品质量下降等负面问题也日益加剧[1] [2] [3] [4]。随着人们环保意识以及食品安全意识的不断增强，生物防治受到了植物保护工作者的重视，其中

环境相容性好、高防效、作用谱广、对人畜低毒的微生物农药受到青睐[5]。

细菌、真菌、放线菌,甚至病毒和原生动物等均可作为微生物农药应用于植物病害的生物防治中[5] [6] [7] [8] [9]。但细菌具有分布广泛、种类多样、繁殖速度快、代谢活动复杂、对病原菌作用方式多样等特点,使其成为主要的微生物农药开发源。

植物内生菌(endophyte)是指那些在其生活史的一定阶段或者全部阶段生活于健康植物的各种组织和器官内部,又不引起植物明显病害的微生物,它们与植物之间存在一种复杂的微生态关系[10]。目前,内生菌泛指一切生活在植物体内的腐生、寄生和共生的真菌、细菌、放线菌等微生物[10]。内生菌具有重要的生物学和生态学价值,能够促进宿主生长,增强宿主植物抗逆境、抗病虫害作用,增加宿主植物的他感作用等[11]。植物内生菌可产生丰富多样的具有生物活性的代谢产物,在生物医药、植物病虫害防控等方面也发挥着重要的作用[12]。但植物内生细菌因与植物互利共生、抗逆性强、危害小、定殖快的优点,成为微生物农药研究的主要对象[13] [14]。

防风(*Saposhnikovia divaricata* (Trucz.) Schischk.)属于被子植物门、双子叶植物纲、伞形科、防风属植物,多年生草本。防风根部具有治疗感冒头痛、风湿痹痛、风疹瘙痒、破伤风等功效。随着临床研究的深入,根部有效成分还可以治疗风湿性关节炎、类风湿关节炎、肩关节周围炎等关节性顽疾。

本研究采用常规方法对采自云南的防风内生细菌进行分离,从根部筛选出一株对多种病原细菌和病原真菌具有光谱抗性的内生细菌,命名为 FFR3,并从微生物的培养、形态及分子生物学入手,对其进行鉴定。采用硫酸铵沉淀、乙醇醇沉、不同有机溶剂分级萃取 FFR3 胞外抑菌物质,以金黄色葡萄球菌和丁香假单胞杆菌桑致病变种为指示菌,对其抑菌物质种类进行初步分析,探讨了抑菌物质的特性,为新型微生物农药的开发提供一定的理论依据。

2. 材料与方法

2.1. 供试材料

植物材料:防风(*Saposhnikovia divaricata* (Trucz.) Schischk.),采自云南省曲靖市师宗县高良乡岭黑村老庄科。

病原真菌:核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、禾谷丝核菌(*Rhizoctonia*)、串珠镰胞菌(*Fusarium moniliforme*)、辣椒疫霉(*Phytophthora capsici*)和灰霉菌(*Botrytis cinerea*)。

病原细菌:梨火疫病菌(*Erwinia amylovory*)、稻黄单胞菌水稻致病变种(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、丁香假单胞杆菌桑致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *mori*)。

2.2. 培养基

LB 培养基:胰蛋白胨 10 g,酵母浸膏 5 g,氯化钠 10 g,琼脂 15~20 g,蒸馏水 1 L (pH 7.4)。

PDA 培养基:马铃薯 200 g,削皮,洗净切小块,加适量蒸馏水煮沸 20 min,四层纱布过滤。滤液中加入葡萄糖 20 g,琼脂 15~20 g,蒸馏水定容至 1000 mL。pH 自然。

NB 培养基:牛肉膏 3 g、蛋白胨 10 g、NaCl 5 g,蒸馏水 1000 mL (pH 7.4~7.6)。

KB 培养基:蛋白胨 20 g,甘油 10 mL, K_2HPO_4 1.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5 g,水 1000 mL (pH 7.0~7.2)。用于丁香假单胞杆菌桑致病变种的培养。

2.3. 内生细菌菌株的筛选

防风成熟根,流水洗净表面附属物,切成 3~4 cm 长小段,1%次氯酸钠溶液浸泡 2 min 后,无菌水冲

洗多次,再用75%乙醇浸泡2 min,无菌水冲洗多次。根在超净工作台中晾干表面水分,切成0.5~1 cm长小段,纵切成两半,切面贴附于PDA平板中,28℃培养3~7天。期间分离根周边生长的可挑取细菌菌落,并转接于新的PDA平板进行纯化。纯化后菌株接种于PDA培养基斜面,4℃冰箱中保存备用。其中一株命名为FFR3的菌株经初筛后用于实验。

取最后一次清洗的无菌水100 μL涂布于PDA培养基平板,培养后无菌生长,表明根表面附生菌已清除,分离菌株为防风根部内生细菌。

2.4. 内生细菌 FFR3 的鉴定

2.4.1. 电镜形态学鉴定

将FFR3接种于LB液体培养基中,37℃震荡培养24 h后(120 rpm),取250 μL菌液加入到含有3 mL LB液体培养基的六孔板中,加入细胞爬片,封口膜密封。静置4 h后,置于摇床中37℃振荡培养(30 rpm)。24 h和72 h后取出细胞爬片,经前固定、清洗、后固定、脱水、干燥、镀金等,扫描显微镜下观察菌细胞形态。

2.4.2. 分子生物学鉴定

采用细菌基因组DNA提取试剂盒(天根生物科技有限公司)提取内生菌基因组DNA,使用通用上游8F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和下游1510R(5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')引物进行PCR扩增。50 μL PCR扩增体系:10×buffer 5 μL, dNTP(10 mmol/L)1 μL,上下游引物各1 μL,细菌基因组DNA 2 μL, MgCl₂(15 mmol/L)0.5 μL, Taq酶0.5 μL, ddH₂O 39 μL。PCR反应条件:95℃预变性5 min,95℃变性30 s,60℃退火30 s,72℃延伸60 s,25个循环,最后72℃延伸5 min。PCR扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后委托南京金斯瑞生物科技有限公司完成测序工作。

菌株FFR3的16S rRNA基因在NCBI数据库中进行BLAST比对,筛选同源序列。选择同源性较高的序列,采用MEGA(version 6.06)软件包中的neighbor-joining法构建系统进化树分析系统发育地位。

2.5. 内生细菌 FFR3 的广谱抗性分析

2.5.1. 对病原细菌的抑制效应分析

采用平板涂布法分析FFR3对病原细菌的抑制效应[15]。取直径6 mm的在PDA培养基上生长24 h的FFR3小块,接种在涂有病原细菌悬液的PDA平板中(丁香假单胞杆菌桑致病变种用KB培养基,下同。),于37℃培养箱中培养3 d,分析FFR3对病原细菌的抑制效果。抑菌圈直径(mm) = 总直径 - FFR3小块直径(6 mm)。

2.5.2. 对病原真菌的抑制效应分析

采用平板对峙法分析FFR3对病原真菌的抑制效应[16]。在PDA培养基上以真菌菌块($\phi=6$ mm)为中心,距离1 cm左右的三个位置点接FFR3菌株,28℃培养箱中静置培养3 d,分析FFR3对病原真菌的抑制效果。菌株与病原真菌之间的距离表示抑制效果的强弱。

2.5.3. 对病原真菌的形态影响

取出预先浸泡在75%乙醇中的盖玻片并晾干,在2.5.2方法的基础上,成30°角斜插在真菌菌块和FFR3之间。28℃培养箱中静置培养3天后,取出盖玻片,菌丝面朝下,盖在洁净的载玻片上,光学显微镜下观察菌丝形态。

2.6. 内生细菌 FFR3 胞外抑菌物质抑菌效果检测

将菌株FFR3分别接种在LB培养基、NB培养基和PD培养基中(50 mL/150 mL),120 rpm、37℃条

件下震荡培养 3 d。培养液在 8000 rpm、4℃条件下离心 20 min，收集上清液并用 0.2 μm 无菌滤膜过滤除菌。将灭菌干燥后的滤纸片($\phi = 6$ mm)完全浸泡在上述除菌上清液中 30 min，用于分析胞外抑菌物质对病原菌的抑菌效果。

参照 2.5.1 的方法，将滤纸片取出晾至微干，贴在涂有病原细菌菌悬液的培养基平板中。37℃培养箱中培养 3 d，观察对病原细菌的抑制效果。

参照 2.5.2 的方法，取直径 6 mm 病原真菌小块贴在 PDA 培养基平板中央，以真菌菌块为中心，距离 1 cm 左右的位置贴附晾至微干的滤纸片，28℃培养箱中培养 3 d，观察对病原真菌的抑制效果。

2.7. 内生细菌 FFR3 胞外抑菌物质的初步分离

将 FFR3 接种在 LB 液体培养基中，在 120 rpm、37℃条件下震荡培养 3 d，8000 rpm、4℃条件下离心 20 min 后得到含胞外抑菌物质的上清液。

2.7.1. 蛋白质或多肽类物质的分离

分别将上清液用 20%、30%、40%、50%、60%、70%硫酸铵分级沉淀，10000 rpm 离心 20 min，弃去上清，获得蛋白质或多肽类物质沉淀。用 PBS 缓冲溶液(0.1 mol/L, pH 7.2)将沉淀悬浮，悬浮液在透析袋(截留分子质量 8000~14000 D)中透析去盐后冷冻干燥。用 PBS 缓冲液将沉淀配制成 1 mg/mL 稀释液，采用 2.6 滤纸片法测定蛋白质或肽类物质的抑菌性。

2.7.2. 多糖类物质的分离

分别将上清液用 20%和 40%的乙醇醇沉，收集沉淀获得多糖类物质。用 PBS 缓冲溶液(0.1 mol/L, pH 7.2)将沉淀配制成 1 mg/mL 稀释液，采用 2.6 滤纸片法测定多糖类物质的抑菌性。

2.7.3. 次生代谢物的分离

以等体积石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯对上清液进行分级萃取，萃取后旋转蒸发仪浓缩。甲醇溶解沉淀物配成 10 mg/mL 稀释液，以甲醇为对照，采用 2.6 滤纸片法测定次生代谢物的抑菌性。

2.8. 内生细菌 FFR3 胞外硫酸铵沉淀抑菌物质的稳定性

在得到的最佳硫酸铵沉淀条件下，以指示菌为实验对象，采用 2.6 滤纸片法检测 FFR3 胞外抑菌物质对温度、蛋白酶和酸碱(pH)的稳定性。

2.8.1. 抑菌物质的温度稳定性

将溶解于 PBS 缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.2)的等体积 1 mg/mL 抑菌物质溶液分别在 30℃、50℃、70℃、80℃、90℃、100℃水浴中处理 30 min，在 121℃的灭菌锅中灭菌 30 min，检测胞外抑菌物质对温度的稳定性。

2.8.2. 抑菌物质的蛋白酶稳定性

分别滴加 20 μL 浓度为 1 mg/mL 的蛋白酶 K 和胰蛋白酶于 2 mL PBS 缓冲液溶解的抑菌物质溶液中，颠倒混匀(轻缓)，37℃静置反应 10 min 后，以相同浓度的不做处理的溶液作为对照，检测胞外抑菌物质对蛋白酶的稳定性。

2.8.3. 抑菌物质的酸碱稳定性

用浓度为 1 mol/L 的盐酸和氢氧化钠溶液分别将 1 mg/mL 的抑菌物质的 pH 调节为 2、4、6、8、10、12，颠倒混匀(轻缓)，室温静止 5 min 后，检测抑菌物质对酸碱的稳定性。

3. 结果与分析

3.1. 内生防细菌 FFR3 的筛选

实验从防风根中共筛选出内生细菌 14 株, 经初步分析, 编号为 FFR3 的菌株对多种病原细菌和真菌有明显的抑制作用。菌株 FFR3 的菌落中间薄, 边缘厚且有褶皱, 粘稠难以分离。接种 24 h 内颜色为透明状, 之后逐渐变暗, 接近暗橘色(图 1); 革兰氏染色后, 菌细胞部分呈红色, 部分呈紫色(图 2), 属于革兰氏可变菌。



Figure 1. Colony morphology of strain FFR3

图 1. 菌株 FFR3 的菌落形态

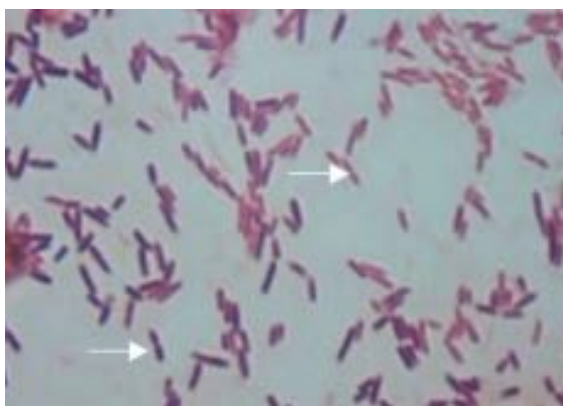


Figure 2. Gram staining of strain FFR3 (10 × 100). Left arrow: Gram-positive bacteria (G^+); Right arrow: Gram-negative bacteria (G^-)

图 2. 菌株 FFR3 的革兰氏染色(10 × 100 倍)。左箭头: 革兰氏阳性菌(G^+); 右箭头: 革兰氏阴性菌(G^-)

3.2. 内生防细菌 FFR3 的鉴定

光学显微镜和扫描电子显微镜形态分析表明, 在培养 24 h 内, FFR3 菌细胞呈杆状, 主要以无丝分裂方式繁殖, 表面多糖分泌物较多(图 3(a)和图 3(c))。培养 72 h 后, 部分菌细胞变椭圆形, 菌体一端膨大后细胞壁变薄, 随后破裂释放出芽孢; 或者向内凹陷碎裂, 芽孢随之释放(图 3(b)和图 3(d))。推测 FFR3 在不同的环境中可通过两种不同的方式繁殖, 具体繁殖方式可能受培养时间、培养基成分、湿度等影响。结合 FFR3 的 16S rRNA 序列和进化树分析(图 4), 鉴定该菌株为类芽孢杆菌(*Paenibacillus* spp.)。

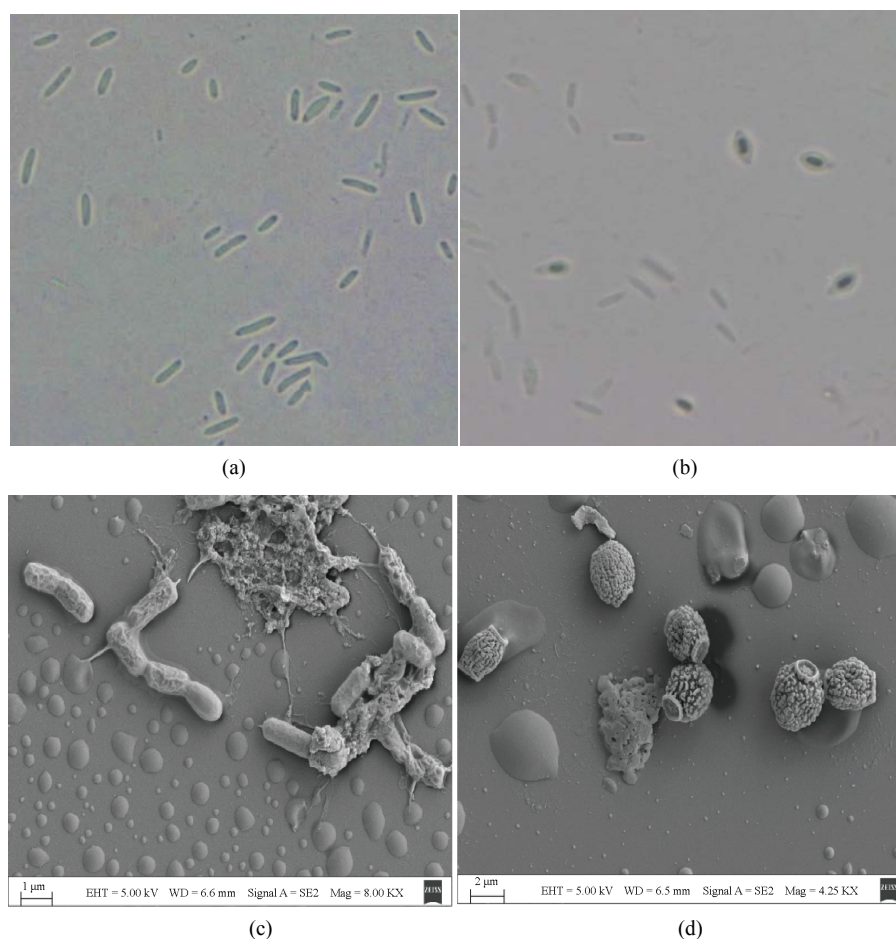


Figure 3. Morphology of strain FFR3. (a) and (b) Morphology under optical microscope (10×100); (c) and (d) Morphology under scanning electron microscope ($\times 10,000$)
图 3. 菌株 FFR3 的形态。(a)和(b) 光学显微镜形态(10×100); (c)和(d) 扫描电镜形态($\times 10,000$)

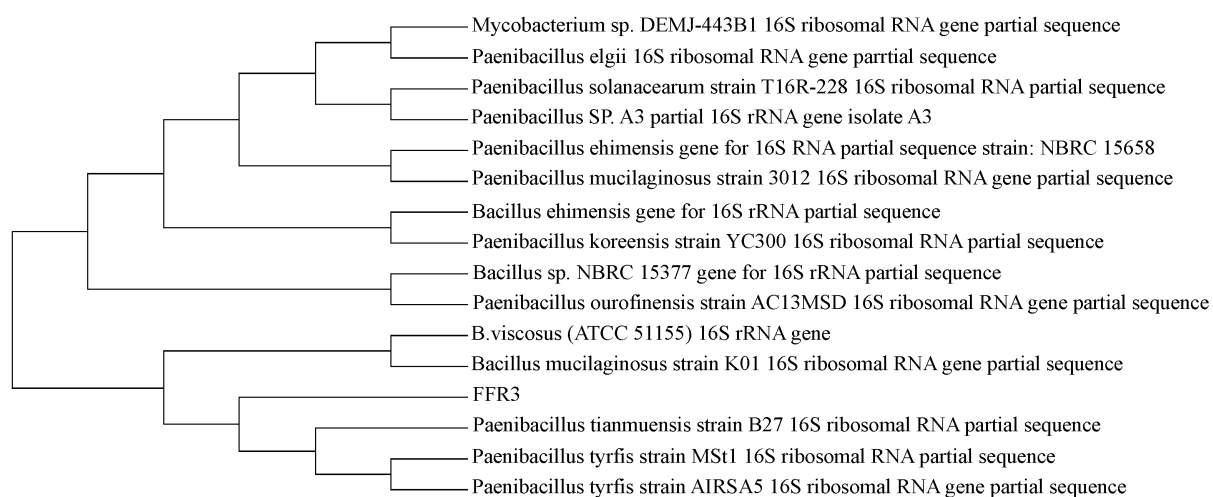


Figure 4. Phylogenetic tree of strain FFR3 based on 16S rRNA gene sequence
图 4. 依据菌株 FFR3 的 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

3.3. 内生防细菌 FFR3 的广谱抗性

3.3.1. FFR3 对病原细菌的抗性

菌株 FFR3 与病原细菌共培养 3 d 后结果如表 1 所示。抑菌圈直径越大, 抑制效果越显著。FFR3 对实验用 5 种病原细菌均具有一定的抑制效果, 其中对金黄色葡萄球菌的抑菌效果最好, 抑菌圈直径可达 24.70 ± 5.30 mm; 对丁香假单胞杆菌桑致病变种和梨火疫病菌的抑制效果相当; 对稻黄单胞菌水稻致病变种和苏云金杆菌的抑制效果较弱。FFR3 对 5 种病原细菌的抑制强度有一定的差异性, 后述实验以抑菌效果强的金黄色葡萄球菌和丁香假单胞杆菌桑致病变种为监测菌。

Table 1. Inhibitory effects of strain FFR3 on pathogenic bacteria

表 1. 菌株 FFR3 对病原细菌的抑制效果

病原细菌 Pathogenic bacteria	抑菌圈直径(mm) Diameter of bacteriostatic zone (mm)
梨火疫病菌 <i>Erwinia amylovory</i>	12.00 ± 1.32^b
稻黄单胞菌水稻致病变种 <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	8.30 ± 0.92^{bc}
苏云金芽胞杆菌 <i>Bacillus thuringiensis</i>	4.67 ± 1.76^c
丁香假单胞杆菌桑致病变种 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>mori</i>	14.07 ± 5.34^b
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	24.70 ± 5.30^a

注: 表中同列数据后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

3.3.2. FFR3 对病原真菌的抗性

共培养 3 d 后, 菌株 FFR3 对病原真菌的抑制效果如表 2 所示。菌株与病原真菌之间的抑菌距离越大, 抑菌效果越好。FFR3 对 5 种供试病原真菌均具有一定的抑制效果, 其中对核盘菌、禾谷丝核菌和辣椒疫霉的抑制效果最好, 对串珠镰胞菌和灰霉菌的抑制强度相对较弱。灰霉菌是一种广寄主性的、能够引起多种植物致病的病原真菌。截止 2013 年, 世界上尚未发现任何一种植物对灰霉菌产生抗性[17] [18]。核盘菌是危害作物和蔬菜的世界性重要病原菌, 防治主要依靠化学农药[19] [20]。综合实验可行性以及病原菌研究背景, 后续实验选择核盘菌和灰霉菌为监测菌。

Table 2. Inhibitory effects of strain FFR3 on pathogenic fungi

表 2. 菌株 FFR3 对病原真菌的抑制效果

病原真菌 Pathogenic fungi	抑菌距离(mm) Bacteriostatic distance (mm)
核盘菌 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	20.33 ± 7.09^a
禾谷丝核菌 <i>Rhizoctonia zeae</i>	13.40 ± 0.36^a
串珠镰胞菌 <i>Fusarium moniliforme</i>	5.57 ± 1.69^b
辣椒疫霉 <i>Phytophthora capsici</i>	15.03 ± 3.82^a
灰霉菌 <i>Botrytis cinerea</i>	6.33 ± 1.15^b

注: 表中同列数据后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

3.3.3. FFR3 对病原真菌菌丝体形态的影响

FFR3 对核盘菌表现出明显的抑制, 抑制边缘的菌丝颜色比正常菌丝深, 菌丝密且短(图 5(a))。核盘菌的正常菌丝表面光滑饱满(图 5(b)); 受 FFR3 影响菌丝呈脱水皱缩状态, 原生质体透明, 菌体扁平(图

5(c); 新生菌丝受 FFR3 影响后脱水, 最终被破坏脱落(图 5(d))。

FFR3 显著抑制灰霉菌的生长(图 6(a)); 正常菌丝表面光滑(图 6(b)); 受抑制菌丝皱缩断裂, 较正常菌丝变短变细(图 6(c)), 且环状或 U 型打环(图 6(d))。

3.4. 内生防细菌 FFR3 胞外抑菌物质的初步分析

3.4.1. 产抑菌物质优势培养基筛选

采用 2.6 滤纸片法筛选不同发酵培养基中 FFR3 胞外抑菌物质的抑菌强度, 以抑菌圈直径减去滤纸片 ($\phi = 6 \text{ mm}$)直径表示抑菌强度。PDA 培养基发酵产物对 2 种监测病原细菌均无抑制作用; NB 培养基发酵

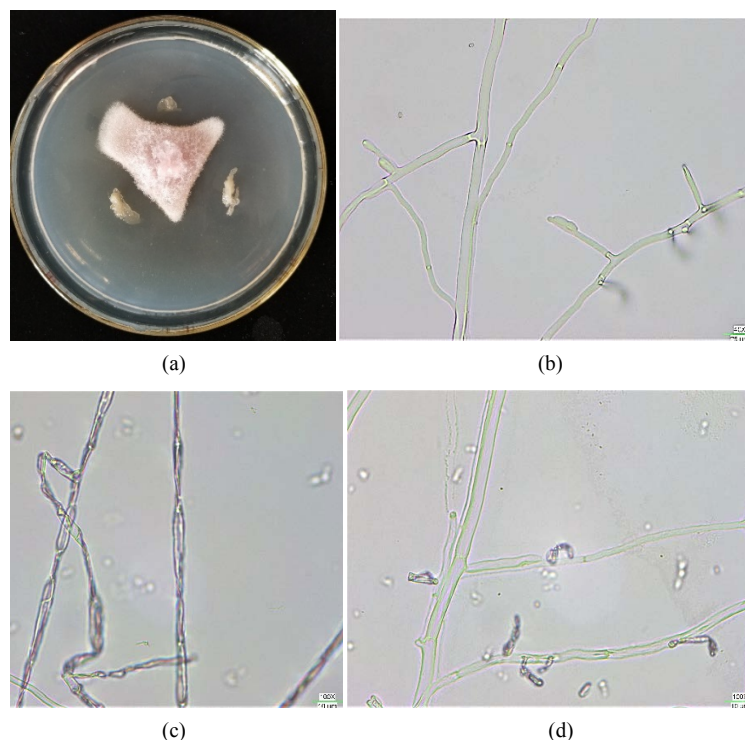
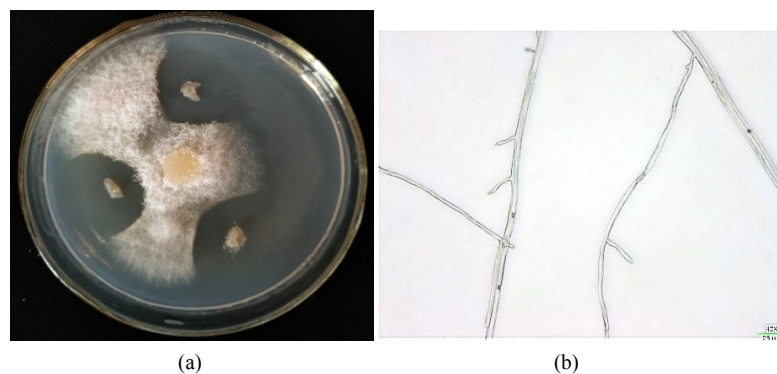


Figure 5. Effects of strain FFR3 on the morphology of *Sclerotinia sclerotiorum*. (a) Confrontation test of strain FFR3 and *Sclerotinia sclerotiorum*; (b) Normal hyphae of *Sclerotinia sclerotiorum* (10×40); (c) and (d) Confrontation hyphae of *Sclerotinia sclerotiorum* (10×40)

图 5. 菌株 FFR3 对核盘菌形态的影响。(a) FFR3 与核盘菌对峙实验; (b) 核盘菌正常菌丝(10×40); (c)和(d) 核盘菌对峙培养菌丝(10×40)



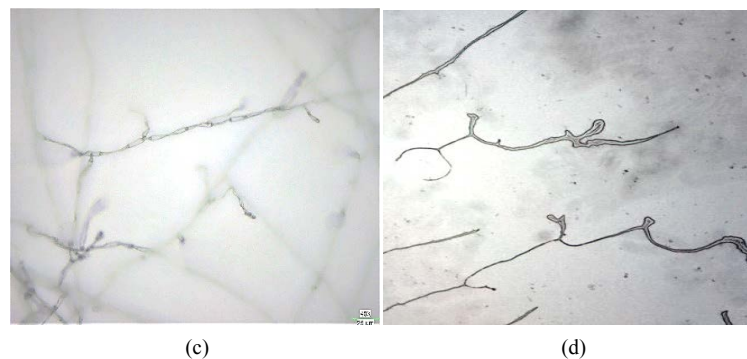


Figure 6. Effects of strain FFR3 on the morphology of *Botrytis cinerea*. (a) Confrontation test of strain FFR3 and *Botrytis cinerea*; (b) Normal hyphae of *Botrytis cinerea* (10×40); (c) and (d) Confrontation hyphae of *Botrytis cinerea* (10×40)

图 6. 菌株 FFR3 对灰霉菌形态的影响。(a) FFR3 与灰霉菌对峙实验；(b) 灰霉菌正常菌丝(10×40)；(c)和(d) 灰霉菌对峙培养菌丝(10×40)

产物对丁香假单胞杆菌无抑制作用，但对金黄色葡萄球菌抑制效果显著；LB 培养基发酵产物对 2 种监测菌均有抑制作用，且彼此间无显著差异(表 3)。此结果表明，抑菌物质可能是多种物质，不同的培养基对不同产物的产生效果不同，对不同病原细菌的抑制效果也不同。LB 培养基发酵液的抑菌谱广且抑菌强度稳定，因此采用 LB 发酵培养基进行后续实验的菌株培养发酵。

Table 3. Antibacterial effects of fermentation broth with different medium

表 3. 不同培养基发酵液抑菌效果

病原细菌 Pathogenic bacteria	LB 培养基 LB medium	PDA 培养基 PDA medium	NB 培养基 NB medium
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	4.00 ± 0.87^b mm	0.00 ± 0.00^c mm	9.00 ± 1.00^a mm
丁香假单胞杆菌桑致病变种 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>mori</i>	2.00 ± 0.46^b mm	0.00 ± 0.00^c mm	0.00 ± 0.00^c mm

注：表中数据后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

3.4.2. 盐析和醇沉法分离胞外抑菌物质

以金黄色葡萄球菌和丁香假单胞杆菌两种病原细菌为监测菌，以 LB 培养基为发酵培养基，以硫酸铵盐析和乙醇醇沉法分离 FFR3 胞外物质，采用 2.6 滤纸片法检测抑菌效果，结果如表 4 所示。多糖溶于水而不溶于乙醇，随着乙醇的加入，发酵液中的多糖产物逐步析出。20%和 40%的醇沉产物对 2 种监测菌均无抑制作用，表明多糖类物质不是抑菌物质的成分。发酵产物中加入硫酸铵，可有效降低蛋白质(或肽类)的溶解度，使蛋白质(或肽类)脱水凝聚沉淀。20%、30%和 40%硫酸铵沉淀对 2 种监测病原细菌均有较好抑制效果；50%硫酸铵沉淀仅对金黄色葡萄球菌表现抑制作用，70%硫酸铵沉淀仅对丁香假单胞杆菌表现抑制作用，且抑制效果均较弱。因此推测，FFR3 的抑菌产物可能是蛋白类(或肽类)物质，可用 20%、30%和 40%硫酸铵初步盐析分离。

3.4.3. 有机溶剂萃取胞外抑菌物质

液体中混合物各组分在不同有机溶剂中的溶解度不同，利用不同的有机溶剂可有效的萃取发酵液中的不同组分。FFR3 发酵液不同萃取相对金黄色葡萄球菌均有一定的抑制作用，其中以乙酸乙酯相和二氯甲烷相的抑制效果最强。仅乙酸乙酯相对丁香假单胞杆菌表现出一定的抑制效果，且与 LB 发酵液的效

果相当(表 5)。石油醚是一种极性小的有机溶剂,可有效萃取混合液中小极性脂溶性的化合物,如油脂、蜡、挥发油以及固醇、三萜化合物等物质;二氯甲烷的极性比石油醚略大,可溶解色素、酯类等小极性物质;而乙酸乙酯对游离生物碱、有机酸、黄酮及苷元等中等极性化合物的萃取效果较好;水可提出糖类、无机盐、氨基酸等水溶性的成分。不同监测菌对不同次级代谢产物的敏感度不同,可利用有机溶剂的萃取成分差异性筛选出最有效的代谢产物。FFR3 胞外抑菌物质主要分布在二氯甲烷相和乙酸乙酯相,推测某些生物碱或者黄酮类物质参与了 FFR3 的抑菌效应。

Table 4. Antibacterial effects of alcohol precipitation and salting-out components in FFR3 fermentation broth
表 4. FFR3 发酵液醇沉和盐析成分的抑菌效果

病原细菌 Pathogenic bacteria	PBS 对照 PBS control	醇沉 Alcohol precipitation			硫酸铵沉淀 Ammonium sulfate precipitation				
		20%	40%	20%	30%	40%	50%	60%	70%
丁香假单胞杆菌桑致病变种 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>mori</i>	-	-	-	++	++	++	-	-	+
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	++	++	++	+	-	-

注:“-”无抑制作用,“+”有抑制作用,“++”抑制作用较强。

Table 5. Antibacterial effects of antibacterial substances extracted by different organic solvents
表 5. 不同有机溶剂萃取的抑菌物质的抑菌效果

不同萃取段 Different extraction segment	病原细菌 Pathogenic bacteria	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	丁香假单胞杆菌 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>mori</i>
	LB 发酵液 LB fermentation broth		5.67 ± 4.93 ^a mm
石油醚相 Petroleum ether phase		3.33 ± 5.77 ^b mm	0.00 ± 0.00 ^b mm
二氯甲烷相 Dichloromethane phase		6.17 ± 5.39 ^a mm	0.00 ± 0.00 ^b mm
乙酸乙酯相 ethyl acetate phase		6.33 ± 5.69 ^a mm	2.50 ± 4.33 ^a mm
水相 Water phase		2.67 ± 4.62 ^b mm	0.00 ± 0.00 ^b mm
甲醇对照 Methanol control		0.00 ± 0.00 ^c mm	0.00 ± 0.00 ^b mm

注:表中同列数据后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

3.5. 内生防细菌 FFR3 蛋白类(或肽类)抑菌物质的稳定性

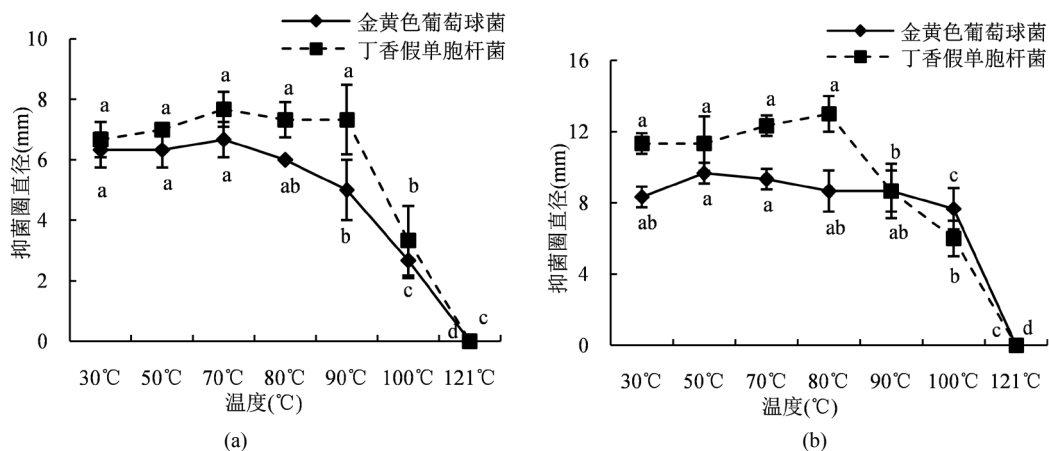
3.5.1. 对温度的稳定性

30%和 40%的硫酸铵沉淀对指示菌的抑制效果受到温度的影响。当温度低于 90℃时,30%硫酸铵沉淀的抑菌效果比较稳定;在温度达到 100℃时,沉淀的抑菌活性大幅下降;在高压蒸汽灭菌条件下,沉淀失去抑菌活性(图 7(a))。40%硫酸铵沉淀在温度低于 80℃时对丁香假单胞杆菌的抑制效果稳定保持,在温度低于 90℃时对金黄色葡萄球菌的作用效果比较稳定,而后随温度升高急剧下降,在高压蒸汽灭菌条件下,失去抑菌活性(图 7(b))。表明 FFR3 的蛋白类(或肽类)抑菌物质对温度具有良好的耐受性。

3.5.2. 对蛋白酶的稳定性

蛋白酶 K 是一种高活性蛋白酶,可有效降解生物样品中的蛋白质;胰蛋白酶属肽链内切酶,能把多

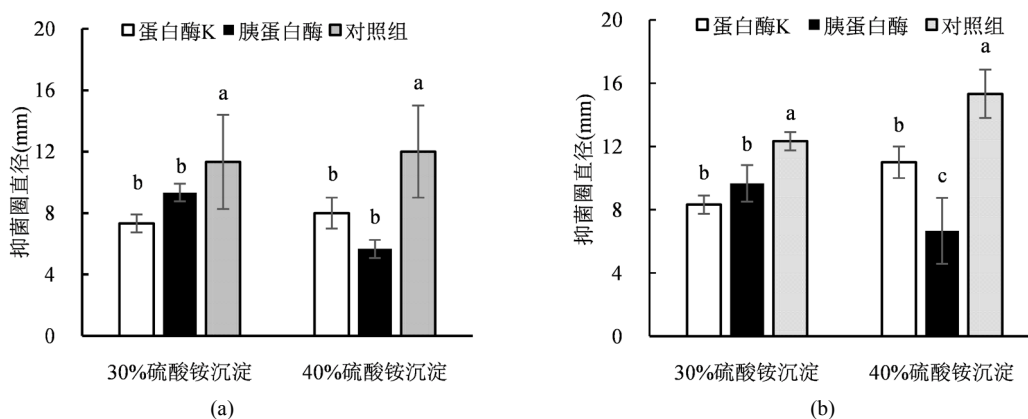
肽链中赖氨酸和精氨酸残基中的羧基侧切断, 是特异性最强的蛋白酶。经蛋白酶处理后, 30%和 40%的硫酸铵沉淀对 2 种监测菌的抑制活性均明显下降(图 8), 表明抑菌物质对蛋白酶敏感, 属于蛋白质(或肽类)物质。



注: 图中同一组数据上不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Figure 7. Effects of ammonium sulfate precipitation on antibacterial activities by different temperatures. (a) Antibacterial activity of 30% ammonium sulfate precipitation; (b) Antibacterial activity of 40% ammonium sulfate precipitation

图 7. 温度对硫酸铵沉淀抑菌活性的影响。(a) 30%硫酸铵沉淀的抑菌活性; (b) 40%硫酸铵沉淀的抑菌活性



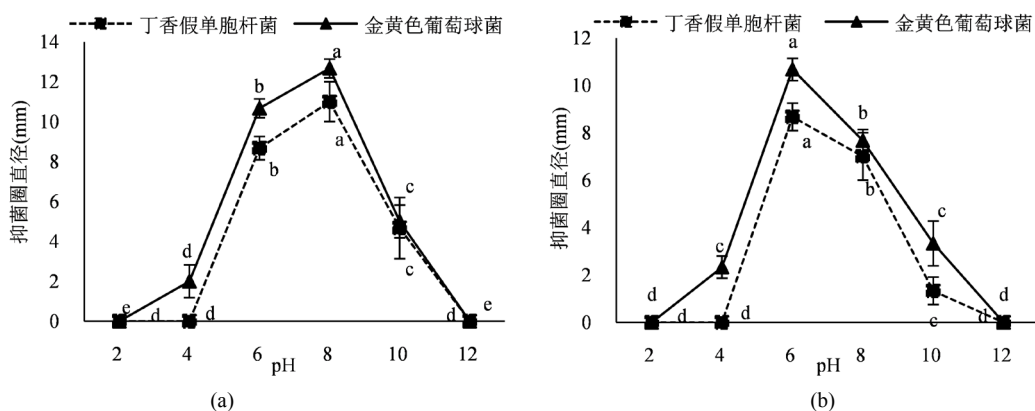
注: 图中同一组数据上不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Figure 8. Effects of ammonium sulfate precipitation on antibacterial activities by different proteases. (a) Antibacterial activity to *Pseudomonas syringae* pv. *Mori*; (b) Antibacterial activity to *Staphylococcus aureus*

图 8. 蛋白酶对硫酸铵沉淀抑菌活性的影响。(a) 对丁香假单胞杆菌的抑制活性; (b) 对金黄色葡萄球菌的抑制活性

3.5.3. 对酸碱的稳定性

30%的硫酸铵沉淀和 40%的硫酸铵沉淀的抑菌活性均受 pH 值的影响很大, 在中性条件下抑菌活性比较稳定, 在强酸性和强碱性条件下不稳定, 在 pH 值达到 10 以上或者 5 以下抑菌活性急剧下降, 说明该抑菌物质的活性 pH 范围比较广(图 9)。



注：图中同一组数据上不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Figure 9. Effects of ammonium sulfate precipitation on antibacterial activities by acid-base. (a) Antibacterial activity of 30% ammonium sulfate precipitation; (b) Antibacterial activity of 40% ammonium sulfate precipitation

图 9. 酸碱性对硫酸铵沉淀抑菌活性的影响。(a) 30%硫酸铵沉淀的抑菌活性；(b) 40%硫酸铵沉淀的抑菌活性

4. 结论

本研究从中草药防风的根中共筛选出内生细菌 14 株，其中一株命名为 FFR3 的菌株对多种病原细菌和病原真菌具有明显的抑制活性，具有光谱抗性。FFR3 属于草兰氏可变菌，接种后 24 h 内以无丝分裂繁殖方式为主，72 h 后产生内生孢子。通过形态学和分子生物学鉴定该菌株为类芽孢杆菌(*Paenibacillus* spp.)。

菌株 FFR3 可使真菌菌丝脱水皱缩进而断裂，菌丝变短变细，菌丝环状或 U 型打环，从而破坏病原真菌菌丝体，达到抑制病原真菌的效果。

通过硫酸铵沉淀、乙醇醇沉、不同有机溶剂分级萃取 LB 发酵液中的胞外抑菌物质，以金黄色葡萄球菌和丁香假单胞杆菌桑致病变种为指示菌，可初步判定抑菌物质为蛋白质(或肽类)类物质、生物碱或者黄酮类物质。

硫酸铵沉淀的蛋白质(或肽类)类物质具有良好的热稳定性，在低于 80℃ 时保持良好的抑菌活性；在蛋白酶 K 和胰蛋白酶处理后，活性明显下降；在 pH 6~8 即中性范围内对指示菌的抑制效果较高，在 pH 值达到 10 以上或者 5 以下抑菌活性急剧下降。

类芽孢杆菌分布广泛，对人畜安全和无污染，美国环保署将其列为可在商业上应用的微生物之一，2006 年也被我国农业部列为免做安全鉴定的一级菌种，是一种重要的植物病害生物防治微生物。此外，类芽孢杆菌在环境污染治理、食品、医药等领域均有广阔的应用前景[21] [22]。

基金项目

2020 年江苏科技大学大学生创新计划项目。

参考文献

- [1] 王智. 辽宁省不同地区番茄灰霉菌抗药性研究[D]: [硕士学位论文]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2016.
- [2] 李晓强, 孙跃先, 叶光祯, 等. 使用化学农药对农业生物多样性的影响[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2008, 30(S2): 365-369.
- [3] 张静静. 吉林省主要城市城郊土壤 - 蔬菜系统中有机氯农药残留及风险研究[D]: [博士学位论文]. 长春: 中国科

- 学院研究生院(东北地理与农业生态研究所), 2016.
- [4] 卜元卿, 孔源, 智勇, 等. 化学农药对环境的污染及其防控对策建议[J]. 中国农业科技导报, 2014, 16(2): 19-25.
- [5] Sturz, A.V., Christie, B.R. and Nowak, J. (2000) Bacterial Endophytes: Potential Role in Developing Sustainable Systems of Crop Production. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **19**, 1-30. <https://doi.org/10.1080/07352680091139169>
- [6] 黄丽丹, 陈玉惠. 生防菌及相关生物技术在植物病害防治中的应用[J]. 西南林学院学报, 2006, 26(1): 85-89.
- [7] Prado, S., Nay, B. and Kunz, C. (2015) *Paraconiothyrium variabile*, an Ascomycete Endophyte, Suppresses Mycotoxin Production in the Plant Pathogen *Fusarium oxysporum*. *Journal of Medical Mycology*, **25**, e96-e97. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2015.02.005>
- [8] Romeralo, C., Santamaría, O., Pando, V., et al. (2015) Fungal Endophytes Reduce Necrosis Length Produced by *Gremmeniella abietina* in *Pinus halepensis* Seedlings. *Biological Control*, **80**, 30-39. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.09.010>
- [9] Larran, S., Simón, M.R., Moreno, M.V. and Diez, J.J. (2016) Endophytes from Wheat as Biocontrol Agents against Tan Spot Disease. *Biological Control*, **92**, 17-23. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.09.002>
- [10] 赵旭, 常思静, 菁纯娥, 等. 我国植物内生菌研究进展[J]. 中国沙漠, 2010, 30(1): 87-91.
- [11] 文才艺, 吴元华, 田秀玲. 植物内生菌研究进展及其存在的问题[J]. 生态学杂志, 2004, 23(2): 86-91.
- [12] 邹文欣, 谭仁祥. 植物内生菌研究进展[J]. 植物学报, 2001, 43(9): 881-892.
- [13] Etesami, H., Alikhani, H.A. and Mirseyed, H.M. (2018) Root Bacterial Endophytes as Potential Biological Control Agents against Fungal Rice Pathogens. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, **52**, 560-581. <https://doi.org/10.1080/03235408.2018.1557884>
- [14] Sahu, P. K., Singh, S., Gupta, A., et al. (2019) Antagonistic Potential of Bacterial Endophytes and Induction of Systemic Resistance against Collar rot Pathogen *Sclerotium rolfsii* in Tomato. *Biology Control*, **137**, 104014. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104014>
- [15] Kanagasabhapathy, M., Sasaki, H., Haldar, S., et al. (2006) Antibacterial Activities of Marine Epibiotic Bacteria Isolated from Brown Algae of Japan. *Annals of Microbiology*, **56**, Article No. 167. <https://doi.org/10.1007/BF03175000>
- [16] Verma, S.K., Kingsley, K., Bergen, M., et al. (2018) Bacterial Endophytes from Rice Cut Grass (*Leersia oryzoides* L.) Increase Growth, Promote root Gravitropic Response, Stimulate Root Hair Formation, and Protect Rice Seedlings from Disease. *Plant and Soil*, **422**, 223-238. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3339-1>
- [17] 袁章虎, 张小凤, 韩秀英. 灰霉菌抗药性研究进展[J]. 河北农业大学学报, 1996(3): 107-110.
- [18] 许玲, 张晟瑜, 王奕文, 等. 灰霉菌采后致病性研究[J]. 植物病理学报, 2006, 36(1): 74-79.
- [19] 臧宪朋. 植物与核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)互作分子生物学的初步研究[D]: [硕士学位论文]. 杭州: 浙江大学, 2010.
- [20] 吴健, 周永明, 王幼平. 油菜与核盘菌互作分子机理研究进展[J]. 中国油料作物学报, 2018, 40(5): 721-729.
- [21] 鲁红学, 周焱. 类芽孢杆菌在植物病害防治和环境治理中的应用研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(30): 13244-13247.
- [22] 花榜清, 刘振民, 吴正钧, 等. 类芽孢杆菌抗菌物质的研究进展[J]. 应用化工, 2018, 47(7): 1467-1472.