

白菜软腐病拮抗菌M-14 拮抗机理 和拮抗物质的初步研究

唐蕊, 张雪辉, 石晓云, 王僧虎

(邢台学院 生物化学系, 河北 邢台 054001)

摘 要:通过室内筛选得到对白菜软腐病有较强拮抗作用的菌株 M-14, 对其拮抗机理、拮抗物质的稳定性及抗菌谱进行了初步研究。结果表明:拮抗菌 M-14 对白菜软腐病菌的拮抗作用源于代谢物质而不是菌体本身; M-14 酸碱稳定性极强, 在 pH 3~11 的范围内均表现出较强的抑菌效果; 拮抗菌 M-14 产生的拮抗物质热稳定性较强, 在 40℃ 时抑菌活性最强, 10~100℃ 范围内均表现出较强的抑菌活性; 经对 5 种供试菌的抑菌作用测试, 表现出抗菌谱广的特点。

关键词:白菜软腐病; 拮抗菌; 拮抗物质; 拮抗机理

中图分类号:S 436.341.1⁺3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)20-0038-02

白菜软腐病是由软腐欧文氏菌 (*Erwinia carotovora*) 引起的细菌性病害。近年来, 随着白菜栽培面积的不断扩大, 尤其在前期干旱、后期多雨或灌溉不当情况下, 白菜软腐病很容易在生产中大面积流行, 造成严重损失。目前, 对于白菜软腐病在农业生产上主要采用选育抗病品种和化学药剂防治相结合的方法^[1-2]。但随着人们环保意识的加强, 对食品安全的关注, 蔬菜上化学杀菌剂的使用受到了极大的限制。生物防治具有很大的发展潜力。通过抑菌圈法, 对从各种不同的生态环境下分离到的微生物菌株进行筛选, 得到对白菜软腐病菌表现出较强抑制作用的拮抗菌 M-14。现对其拮抗机理、拮抗物质的稳定性及抗菌谱进行了初步研究, 以期生物农药的开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

拮抗菌 M-14 由小麦田土壤中分离所得; 白菜软腐病菌等供试菌, 由邢台学院微生物实验室提供; LB 培养基; LB 培养液; PDA 培养基。

1.2 试验方法

1.2.1 母液的制备 将试管保存的拮抗菌 M-14 和白菜软腐病菌菌种分别转接至 LB 培养基平板上活化, 24 h 后挑取并环接于 100 mL 液体培养基中, 在 30℃, 180 r/min 条件下振荡培养 24 h, 即为母液。

1.2.2 拮抗菌 M-14 拮抗机理的研究 留部分拮抗菌 M-14 母液, 将剩余母液经无菌过滤器过滤, 得到菌体、无菌滤液。将 0.2 mL 白菜软腐病菌母液涂布于含 LB

培养基的平板上, 用直径为 5 mm 的打孔器在每个平板上打 4 个孔, 分别加入 80 μ L 的无菌水、拮抗菌 M-14 母液、菌体和无菌滤液, 3 次重复, 放于 30℃ 培养箱中培养 48 h, 观察并测量抑菌圈的大小 (改良牛津杯法)。

1.2.3 拮抗菌 M-14 的拮抗物质稳定性测试^[3] **酸碱稳定性测试:**将拮抗菌 M-14 母液经无菌过滤器过滤得无菌滤液, 吸取 5 mL 转入无菌试管, 用 1 M NaOH 或 HCl 调 pH 值分别至 3、4、5、6、7、8、9、11, 静置 30 min 后, 测试其对白菜软腐病菌的抑制作用 (方法同 1.2.2), 以无菌水调不同 pH 为对照, 每处理 3 次重复。**热稳定性测试:**将拮抗菌 M-14 母液经无菌过滤器过滤得无菌滤液, 取无菌试管各吸取 5 mL 无菌滤液, 分别在 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100℃ 下处理 60 min 后, 测试其对白菜软腐病菌的抑制作用 (方法同 1.2.2), 3 次重复。

1.2.4 拮抗菌 M-14 的拮抗物质抑菌谱测试 将金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌 3 种细菌作指示菌, 在 LB 培养液中培养 24 h, 将拮抗菌 M-14 母液经无菌过滤器过滤得无菌滤液, 采用抑菌圈法测试无菌滤液对上述各菌的抑制作用^[4]; 同时以苹果轮纹病菌、大豆菌核病菌 2 种真菌作指示菌, 在 100 mL 溶化好的 PDA 培养基中加入 5 mL 拮抗菌 M-14 的无菌滤液, 倒平板, 分别接入上述 2 种真菌的菌盘, 以加入 5 mL 无菌水的平板为对照, 3 次重复, 通过计算抑菌率表示其抑菌作用^[5]。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌 M-14 的拮抗机理

通过对拮抗菌 M-14 菌株的母液、菌体和无菌过滤液, 采用涂布平板法, 测试其对白菜软腐病菌的抑制作用。由表 1 可看出, 在无菌水对照和菌体 2 个处理中均未出现抑菌圈, 而其母液和无菌滤液则出现了明显的抑菌圈, 且抑菌圈大小差别不大, 充分说明 M-14

第一作者简介:唐蕊(1976-),女,河北秦皇岛人,硕士,副教授,现从事微生物学教学与科研工作。E-mail:xtxytr@126.com。

基金项目:河北省科技支撑计划资助项目(10220307)。

收稿日期:2011-07-26

菌株对白菜软腐病的拮抗作用源于其代谢物质而非菌体。

表 1 拮抗菌 M-14 不同处理的抑菌效果测试结果

处理	无菌水	母液	菌体	无菌滤液
抑菌圈/mm	0	24	0	25

2.2 拮抗菌 M-14 的拮抗物质稳定性测试

2.2.1 酸碱稳定性 由图 1 可看出,拮抗菌 M-14 无菌滤液在经不同 pH 处理后,尤其在 pH 3 和 pH 11 等强酸强碱条件下仍具有较高的抑菌活性,表明其抗菌物质具有极强的酸碱稳定性。

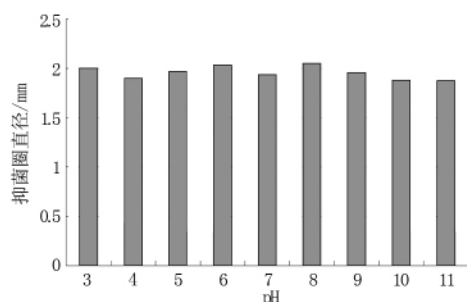


图 1 M-14 无菌滤液经不同 pH 处理后对白菜软腐病原菌的抑菌效果

2.2.2 热稳定性 由图 2 可看出,拮抗菌 M-14 无菌滤液经 40℃ 处理抑菌活性最强,30℃ 次之,但经其它温度处理后其抑菌活性仍很强,且抑菌效果差异不明显,表明其抗菌物质具有较强的热稳定性。

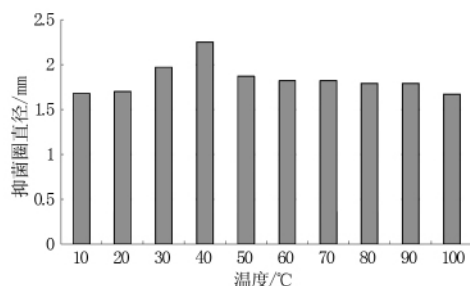


图 2 M-14 无菌滤液经不同温度处理后对白菜软腐病原菌的抑菌效果

2.3 拮抗菌 M-14 的拮抗物质抑菌谱测试

由表 2 可看出,拮抗菌 M-14 无菌滤液无论对革兰氏阴性菌大肠杆菌还是对革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌均表现出明显的抑菌活性,而且对枯草芽孢杆菌也具有相当的抑菌活性;同时对植物病原真菌大豆菌核病菌和苹果轮纹病菌均表现出一定的抑菌效果。表明拮抗菌 M-14 的拮抗物质抑菌谱广。

表 2 M-14 无菌滤液对 5 种供试菌的抑制作用

菌株	抑菌圈直径/mm	抑菌率/%
大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>)	20	—
金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)	28	—
枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus cereus</i>)	21	—
大豆菌核病菌(<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary)	—	60
苹果轮纹病菌(<i>Botryosphaeria dothidea</i> f. sp. <i>piricola</i>)	—	55

3 讨论与结论

根据拮抗作用的选择性,可将微生物间的拮抗关系分为非特异性拮抗关系和特异性拮抗关系二类。许多微生物在生命活动过程中,能产生某种抗生素,具有选择性地抑制或杀死别种微生物的作用,这是一种特异拮抗关系^[6]。而拮抗细菌拮抗作用方式主要有抗生素和溶菌作用,其作用机理包括产生抗生素、拮抗蛋白或细胞壁降解酶类等^[7]。试验中通过改良牛津杯法证实,拮抗菌 M-14 对白菜软腐菌的拮抗作用源自其产生的代谢物。经初步研究,M-14 菌株的拮抗物质具有极强的酸碱稳定性和热稳定性,且其抑菌谱广泛,具有一定的研究开发价值。当然,有关 M-14 菌株抑菌机理及抑菌活性物质的分离、鉴定,理化性质、安全性等均需进一步研究测试。另外,M-14 菌株在白菜内的定殖力、对白菜生长的影响等也需进一步研究。

参考文献

- [1] 鲁燕汶. 大白菜软腐病病原菌的分离、筛选及鉴定[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2006:5-6.
- [2] 臧威,张耀伟,孙剑秋,等. 大白菜软腐菌种群组成及优势菌致病性的研究[J]. 植物资源与环境学报,2006,15(1):26-29.
- [3] 贺小香. 大白菜软腐病菌的拮抗内生细菌的筛选及其拮抗作用的研究[D]. 长沙:湖南农业大学,2006:2-11.
- [4] 马琼. 魔芋软腐病拮抗菌的分离及抗性研究[J]. 湖北民族学院学报(自然科学版),2007,25(4):455-457.
- [5] 张雪辉,唐蕊,鹿秀云,等. 黄瓜灰霉病拮抗细菌 NZT-19-241 抗菌物质产生条件的研究[J]. 北方园艺,2009(11):92-93.
- [6] 诸葛健,李华钟. 微生物学[M]. 北京:科学出版社,2006:297-300.
- [7] 于淑池,徐亚茹. 拮抗细菌产生的活性物质及拮抗机理研究进展[J]. 承德职业学院学报,2006(1):67-69.

Primary Study on the Antibiotic Mechanism and Substance of M-14 Strain Against Chinese Cabbage Soft Rot

TANG Rui, ZHANG Xue-hui, SHI Xiao-yun, WANG Seng-hu

(Department of Biology and Chemistry, Xingtai University, Xingtai, Hebei 054001)

Abstract: M-14 strain was selected by screening against Chinese cabbage soft rot, the antibiotic mechanism, substance and antimicrobial spectrum were studied. The results showed that the antagonism of M-14 to Chinese cabbage soft rot from metabolites rather than itself bacteria, antibiotic activity was due to the producing substance of M-14 strain, it was very stable in 3~11 pH values and 10~100℃ temperatures. In addition, it could inhibit 3 bacteria and 2 fungi, so its restraint spectrum was very wide.

Key words: *Erwinia carotovora*; antagonistic bacteria; antibiotic mechanism and substance; antibiotic mechanism