

# 解淀粉芽孢杆菌 CMN1308 抗真菌特性研究

张雪花<sup>1,2</sup>, 李琳玲<sup>1</sup>, 程 华<sup>1</sup>, 艾远航<sup>1</sup>, 王 晖<sup>1</sup>, 程水源<sup>2,3</sup>

(1. 黄冈师范学院 经济林木种质改良与资源综合利用湖北省重点实验室, 湖北 黄冈 438000; 2. 长江大学 园艺园林学院, 湖北 荆州 434023; 3. 武汉轻工大学 生物与制药工程学院, 湖北 武汉 430023)

**摘 要:**以解淀粉芽孢杆菌 CMN1308 为试材, 采用平板对峙培养法, 测定 CMN1308 对葡枝根霉(*Rhizopus stolonifer*)、腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)、黑葡萄穗霉(*Stachybotrys chartarum*)、栗疫菌(*Cryphonectria parasitica*)、可可毛色二孢菌(*Lasiodiplodia theobromae*)、扩展青霉(*Penicillium expansum*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)的抑菌效果, 并进行了镜检观测及无菌滤液中抑菌成分稳定性测定, 以充分研究其抑菌效果及抗真菌特性。结果表明:拮抗菌 CMN1308 对上述 7 种供试病原菌均有较强的抑制作用, 表现出抑菌谱广的特点; 其中对扩展青霉的抑制作用最好, 抑菌圈直径可达 27.1 mm; CMN1308 对可可毛色二孢菌菌丝生长有较强的抑制作用, 且其发酵产生的抑菌物质热稳定性较好, 耐碱怕酸, 对紫外线不敏感。这为进一步探索板栗采后生防保鲜技术和微生物制剂的开发与应用提供了一定的理论与技术支持。

**关键词:**板栗; 生物防治; 抗真菌谱; 稳定性

**中图分类号:**Q 946 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)02-0117-05

板栗(*Castanea mollissima* Blume)属壳斗科栗属植物, 在我国的经济林树种中占有重要地位; 然而由于板栗含水率较高, 贮藏过程中很容易发生腐烂<sup>[1]</sup>, 造成经济损失, 严重制约了板栗产业的发展。随着人们环保意识的加强, 对食品安全的关注, 果蔬上化学杀菌剂的使用受到了极大的限制<sup>[2]</sup>。植物病害的生物防治被认为是具有发展潜力的重要防治方法, 而获得高效的拮抗菌株是植物病害生物防治的基础<sup>[3]</sup>。前期课题组对板栗病原菌的分离、鉴定及生防保鲜研究中, 从耐储板栗品种‘玫瑰红’果仁中分离筛选出了一株对板栗霉病有较强抑制效果的内生拮抗细菌(CMN1308), 经鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。

前人研究发现, 绝大多数解淀粉芽孢杆菌菌株在生长过程中可产生一系列次生代谢产物<sup>[4]</sup>, 包括抗菌蛋白、脂肽类物质或多肽等活性物质, 能够抑制多种植物病原真菌和细菌<sup>[5]</sup>, 具有广谱抑菌活性, 用其开发新型

保鲜剂, 具有无污染、不产生抗药性、有利于人体安全等优点, 有较好的发展前景, 已成为相关研究的热点<sup>[6]</sup>。现对课题组分离鉴定的板栗源解淀粉芽孢杆菌 CMN1308 的抑菌谱、抗真菌特性及拮抗物质的稳定性进行了初步探究, 以期为进一步探索板栗采后生防保鲜技术的应用和研究提供参考依据, 为微生物制剂的开发与应用提供理论基础与支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试菌种解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*) CMN1308、葡枝根霉(*Rhizopus stolonifer*)、腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)、黑葡萄穗霉(*Stachybotrys chartarum*)、栗疫菌(*Cryphonectria parasitica*)、可可毛色二孢菌(*Lasiodiplodia theobromae*)、扩展青霉(*Penicillium expansum*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*), 均由课题组于板栗中分离鉴定并保存。

### 1.2 试验方法

1.2.1 CMN1308 的抗真菌谱测定 将拮抗菌 CMN1308 置于 LB 培养基上 37℃活化 36 h。采用对峙培养法<sup>[7]</sup>进行抑菌谱的筛选。将细菌菌饼(d=6 mm)接入到 PDA 培养基距中心 25 mm 的 4 个点, 病原真菌菌饼(d=6 mm)接入培养皿中央, 以只接病原真菌的为对照, 培养 3~5 d 测量各处理的抑菌圈直径。挑取上述处理菌落边缘菌丝和正常生长菌丝镜检, 观察拮抗菌对菌丝生长的影响<sup>[8]</sup>。

1.2.2 拮抗菌发酵液、菌悬液及无菌滤液的制备 将拮抗菌平板划线接种于 LB 培养基, 37℃恒温培养 12 h。挑

**第一作者简介:**张雪花(1991-), 女, 湖北宜昌人, 硕士研究生, 研究方向为板栗采后微生物防治。E-mail: 455262713@qq.com.

**责任作者:**程水源(1965-), 男, 湖北天门人, 博士, 教授, 博士生导师, 现主要从事经济林种质资源评价与利用等研究工作。E-mail: s\_y\_cheng@sina.com.

**基金项目:**湖北省教育厅中青年基金资助项目(Q20132909); 黄冈师范学院产学研合作资助项目(2012025903); 湖北省教育厅高校产学研合作资助重点资助项目(C2010060); 湖北省自然科学基金重点资助项目(2010CBB03901)。

**收稿日期:**2015-10-13

取单菌落接种于 LB 液体培养基中,装液量为 100 mL/250 mL,37℃下 160 r/min 振荡培养 48 h,即得拮抗菌发酵液。发酵液置于离心管中在 10 000 r/min 下离心 10 min,收集菌体用无菌生理盐水洗涤 2 次制成菌悬液,离心后的上清液用 0.22  $\mu\text{m}$  的细菌过滤器过滤得无菌滤液<sup>[9]</sup>。

1.2.3 CMN1308 不同处理液的抑菌效果测定 用滤纸片法<sup>[10]</sup>测拮抗菌 CMN1308 不同组分的抑菌活性。取 200  $\mu\text{L}$  扩展青霉菌悬液于平板涂布均匀,滤纸片( $d=6\text{ mm}$ )分别放入 CMN1308 发酵液、菌悬液和无菌滤液中浸泡后置于平板上,以无菌水为对照。培养 2~3 d 后测量抑菌圈直径。

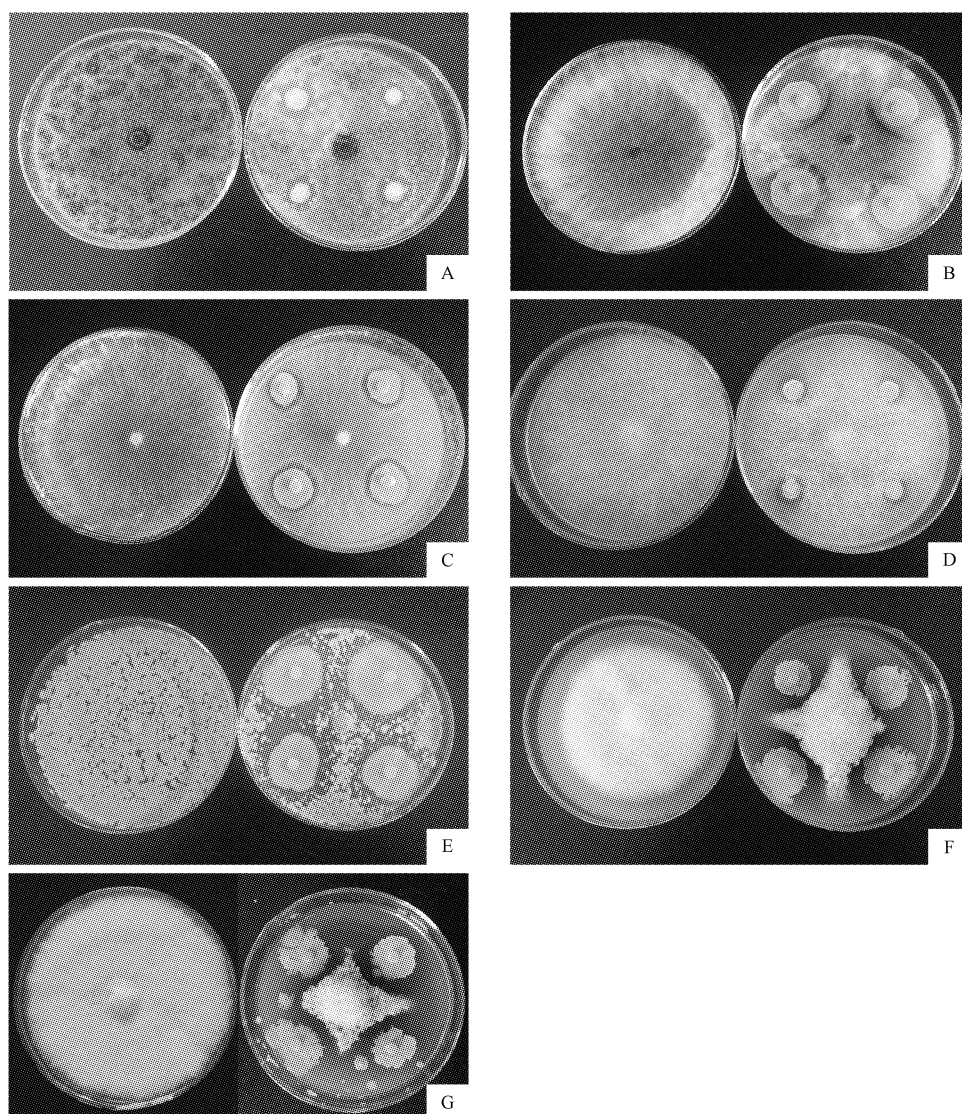
1.2.4 拮抗菌 CMN1308 的拮抗物质稳定性测试 温度处理:在不同温度(20、40、60、80、100℃)处理无菌滤液

60 min 后,用滤纸片法测试抗真菌效果<sup>[11]</sup>;酸碱处理:加 1 mol/L NaOH 或 HCl 调节无菌滤液 pH 值(2、3、4、5、6、8、9、10、11、12),静置 30 min 后测试抗真菌效果<sup>[12]</sup>;紫外线照射处理:将无菌滤液置于距离紫外灯( $30\text{ }\mu\text{W}/\text{cm}^2$ )15 cm 处分别处理 10、20、30、40、60 min 后测试抗真菌效果<sup>[13]</sup>。未经处理的无菌滤液为对照,抑菌活性定为 100%。

## 2 结果与分析

### 2.1 拮抗菌 CMN1308 对病原真菌的抑制效果

利用平板对峙培养法测试了 CMN1308 对供试病原真菌的抑菌活性,结果表明 CMN1308 菌株对 7 种病原真菌均有不同程度的抑制作用(图 1),抑菌圈平均直径均在 10~30 mm,表现出抗真菌谱广的特点。其



注:A,黑曲霉;B,可可毛色二孢菌;C,栗疫菌;D,葡枝根霉;E,扩展青霉;F,腐皮镰刀菌;G,黑葡萄穗霉。

Note:A, *Aspergillus niger*; B, *Lasiodiplodia theobromae*; C, *Cryphonectria parasitica*; D, *Rhizopus stolonifer*; E, *Penicillium expansum*; F, *Fusarium solani*; G, *Stachybotrys chartarum*.

图 1 拮抗菌 CMN1308 对病原真菌的抑制作用

Fig. 1 Antagonistic bacteria CMN1308 inhibition of pathogenic fungi



中,CMN1308 对扩展青霉的抑制作用最强,抑菌圈平均直径达到 27.1 mm(表 1)。

表 1 拮抗菌 CMN1308 对病原真菌的抑制作用

Table 1 Antagonistic bacteria CMN1308 inhibition of pathogenic fungi

菌株 Strain	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter/mm
栗疫菌( <i>Cryphonectria parasitica</i> )	17.0±1.22
可可毛色二孢菌( <i>Lasiodiplodia theobromae</i> )	18.6±1.29
葡枝根霉( <i>Rhizopus stolonifer</i> )	10.9±0.74
扩展青霉( <i>Penicillium expansum</i> )	27.1±2.16
黑曲霉( <i>Aspergillus niger</i> )	14.4±1.52
腐皮镰刀菌( <i>Fusarium solani</i> )	20.4±1.71
黑葡萄穗霉( <i>Stachybotrys chartarum</i> )	20.9±1.88

试验中发现,菌丝生长及菌落扩展受到明显抑制,出现明显的抑菌圈。且挑起可可毛色二孢菌的致病菌丝置于显微镜下观察,有明显的菌丝断裂现象(图 2),说明菌株 CMN1308 能有效抑制致病菌丝的生长。

2.2 拮抗菌 CMN1308 不同处理液的抑菌效果

由表 2 可知,拮抗菌 CMN1308 的不同处理液对扩展青霉都有较强抑制作用,发酵液的抑菌效果最好,菌悬液和无菌滤液的抑菌效果相当。说明 CMN1308 对板栗霉菌的抑制是其代谢产物与菌体的共同作用。

2.3 菌株 CMN1308 在 LB 培养基中的生长曲线

由图 3 可以看出,菌株 CMN1308 在培养 24 h 内,菌

表 2 CMN1308 不同处理液对扩展青霉的抑菌效果

Table 2 CMN1308 different treatment solution inhibitory effect on *Penicillium expansum*

处理 Treatment	无菌水(CK) Sterile water	发酵液 Fermentation liquor	菌悬液 Bacterial suspension	无菌滤液 Germfree filtrate
抑菌圈直径 Inhibition zone diameter/mm	0	17.7±0.47	11.5±0.82	11.2±0.24

2.4 CMN1308 无菌滤液稳定性测试

2.4.1 热稳定性 CMN1308 无菌滤液经 5 种不同温度处理后的抑菌效果见表 3,拮抗菌产生的拮抗物质在 40℃时抑菌活性最强,但其与对照在 0.05 水平上无显著性差异。随着温度的升高,其抑菌活性有下降的趋势。但总体上拮抗物质在 4~100℃范围内均表现较强的抑

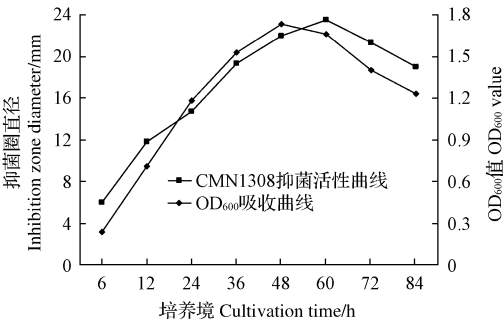
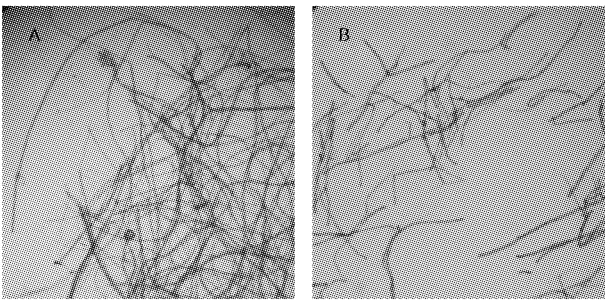


图 3 CMN1308 抑菌活性曲线和 OD<sub>600</sub> 吸收曲线

Fig. 3 Antibacterial activity curve and OD<sub>600</sub> absorption curve of CMN1308

量呈对数增长,到 48 h 左右生物产量达最大值,OD<sub>600</sub> 的吸收值出现最高峰,OD<sub>600</sub> 值为 1.730 7。而培养 60 h 的发酵液对扩展青霉有最强的抑制作用,抑菌圈直径达 23.5 mm,60 h 以后抑菌物质的抑菌活性开始下降,这说明抑菌活性物质的产生滞后于菌体的对数增长期。培养 48 h 以后虽然 CMN1308 的生长衰退,菌体逐步死亡,但是抑菌活性产物的量还是处于一个积累的过程。因此,CMN1308 菌株发酵产抑菌活性物质的最适培养时间为 48~60 h。



注:A,正常生长菌丝;B,对峙培养边缘菌丝。

Note: A, Normal growth of mycelium; B, Dual culture edge mycelium.

图 2 CMN1308 对可可毛色二孢菌菌丝生长的抑制(在 1 000 倍显微镜下)

Fig. 2 Inhibition of CMN1308 on the mycelial growth of *Lasiodiplodia theobromae* (under microscope 1 000 times)

表 3 CMN1308 无菌滤液经不同温度处理后对扩展青霉的抑菌效果

Table 3 Effect of CMN1308 sterile filtrate treated at different temperatures on inhibitory of *Penicillium expansum*

温度 Temperature/℃	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter/mm	相对抑菌率 Inhibition rate/%
4(CK)	14.8±0.24	100.0
20	14.7±0.47	99.3
40	15.0±0.41	101.4
60	13.7±0.41	92.6
80	13.5±0.47	91.2
100	12.6±0.71	85.1

菌活性,相对抑菌率均在 85%以上,说明 CMN1308 产生的抑菌物质具有较强的热稳定性。

2.4.2 酸碱稳定性 CMN1308 无菌滤液经不同 pH 处理后,其抑菌效果见表 4,拮抗菌滤液在 pH 6~8 的中性条件下抑菌效果最好,同时在 pH 9~12 的碱性条件下抑菌效果较好,说明滤液中的拮抗物质具有较好的碱稳定性。而在 pH 2~5 的酸性条件下,滤液易产生沉淀,抑菌效果差,说明拮抗菌产生的抑菌物质在酸性条件下

表4 CMN1308 无菌滤液经不同 pH 处理后  
对扩展青霉的抑菌效果

Table 4 Effect of CMN1308 sterile filtrate treated at  
different pH on inhibitory of *Penicillium expansum*

pH 值 pH value	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter/mm	相对抑菌率 Inhibition rate/%
2	6.0±0.00	33.3
3	6.0±0.00	33.3
4	6.3±0.47	35.0
5	6.7±0.47	37.2
6	18.2±0.24	101.1
7 (CK)	18.0±0.41	100.0
8	18.5±0.71	102.7
9	17.8±0.24	98.9
10	17.3±0.24	96.1
11	16.3±0.47	90.6
12	15.2±0.24	84.4

不稳定。

2.4.3 紫外线照射稳定性 由表5可以看出,无菌滤液经不同时间紫外线照射处理后,随着照射时间的延长,其抗菌活性有下降的趋势,紫外线照射 60 min 后其相对抑菌率仍为 90.8%,与对照在 0.05 水平上没有显著性差异。说明 CMN1308 产生的抑菌物质对紫外线照射不敏感。

表5 CMN1308 无菌滤液经不同时间紫外照射  
处理后对扩展青霉的抑菌效果

Table 5 Effect of CMN1308 sterile filtrate treated at different  
times of UV radiation on inhibitory of *Penicillium expansum*

紫外线处理时间 UV treatment time/min	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter/mm	相对抑菌率 Inhibition rate/%
0(CK)	18.5±0.41	100
10	17.8±0.24	96.2
20	17.3±0.47	93.5
30	17.0±0.81	91.9
40	17.2±0.24	93.0
60	16.8±0.24	90.8

### 3 讨论与结论

生物防治技术作为具有广阔应用前景的新型果蔬采后防腐手段,已逐渐成为学术热点,应用生防菌为防治果蔬采后病害开辟了新途径。据研究,生防菌防治植物病害的作用机制主要有营养和空间位点的竞争、分泌抗菌物质、寄生和诱导植物体抗性<sup>[14]</sup>。该研究主要对解淀粉芽孢杆菌 CMN1308 的抑菌谱和拮抗物质的稳定性等方面进行了初步探究,解淀粉芽孢杆菌 CMN1308 的抑菌谱较广,对多种食品腐败真菌和致病菌均有较强的抑制效果,该菌株与病原真菌竞争营养与空间,抑制病原真菌菌丝生长及菌落扩展。有研究表明,芽孢杆菌产生的孢子能抗紫外线光和热,这使得它能抵御不利的环境条件,并且能配制简单的配方用于商业目的<sup>[15]</sup>。该研

究对 CMN1308 的稳定性测试结果也表明,其抑菌成分具有较好的热稳定性,对紫外光照射不敏感。但其发酵产生的抗真菌活性物质耐碱怕酸,酸性条件下易产生沉淀,活性物质被沉淀下来,后期可以尝试用酸沉淀法初步提取该菌中的抑菌物质。研究对进一步探索 CMN1308 的抑菌机理有一定的参考价值,为探索果蔬采后生防保鲜技术和微生物制剂的开发与应用提供了一定的理论基础。

该研究主要关注其对常见的几种病原真菌的抑菌活性,而对细菌是否具有抑菌活性,还需要相关的试验验证。当然,有关 CMN1308 菌株发酵培养基的优化及抑菌活性物质的分离、纯化、鉴定,安全性等均需进一步研究测试。另外,CMN1308 菌株诱导板栗产生抗病性方面的作用机制也需进一步研究。

### 参考文献

- [1] 汪永文,张良富,王力,等. 板栗贮藏保鲜问题及解决措施[J]. 经济林研究,2009,27(3):108-114.
- [2] KEIJITSU T,ATSUSHI I,HIROMITSU N. Isolation of anteiso-C17, iso-C17, iso-C16, and iso-C15 Bacillomycin D from *Bacillus amyloliquefaciens* SD-32 and their antifungal activities against plant pathogens[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2014,62:1469-1476.
- [3] CHEN D,LIU X,LI C Y, et al. Isolation of *Bacillus amyloliquefaciens* S20 and its application in control of eggplant bacterial wilt[J]. Journal of Environmental Management,2014,137:120-127.
- [4] ROMY S,JOACHIM V,ANTO B, et al. Amylocyclin, a novel circular bacteriocin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 [J]. Journal of Bacteriology,2014,196(10):1842-1852.
- [5] 王英国,王军华,权春善,等. 解淀粉芽孢杆菌抗菌活性物质的分离纯化及抑菌活性研究[J]. 中国生物工程杂志,2007,27(12):41-45.
- [6] 黎波,魏学军,李亚宁,等. 解淀粉芽孢杆菌 X-278 抗菌蛋白初步分析[J]. 河南农业科学,2013,42(7):68-71,83.
- [7] 张艳群,来航线,韦小敏,等. 两株生防芽孢细菌筛选、鉴定及拮抗研究[J]. 微生物学通报,2014,41(2):281-289.
- [8] 陈莉,米娜瓦尔,公勤,等. 生防细菌 A178 的分子鉴定及抑菌机理的研究[J]. 中国农学通报,2009,25(22):241-244.
- [9] 杨振. 枯草芽孢杆菌对油桃采后病害的生物防治及防治机理研究[D]. 天津:天津科技大学,2009.
- [10] 臧威,何旭,孙剑秋,等. 桦木内生真菌的分离与代谢产物的抑菌活性[J]. 生态环境学报,2012,21(4):661-665.
- [11] 郝建安,曹志辉,赵凤梅,等. 解淀粉芽孢杆菌 NK10. BAhaWT 抑真菌作用的研究[J]. 微生物学通报,2008,35(6):903-908.
- [12] 布婷婷,周国英,刘君昂. 油茶内生拮抗细菌 Y13 菌株 16S rDNA 序列分析及抑菌机理研究[J]. 经济林研究,2012,30(3):11-15.
- [13] 张宝俊,张家榕,韩巨才,等. 内生解淀粉芽孢杆菌 LP-5 抗菌蛋白的分离纯化及特性[J]. 植物保护学报,2010,37(2):143-147.
- [14] 洪鹏,安国栋,胡美英,等. 解淀粉芽孢杆菌防治果蔬采后病害研究进展[J]. 中国农学通报,2013,29(12):168-173.
- [15] SEUNG H J,NARAYAN C P,DENG J X, et al. Biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 against fungal plant diseases[J]. Mycobiology,2013,41(4):234-242.

# 火龙果花中黄酮类化合物抗氧化活性研究

李国胜, 姚秋桂, 张伟敏

(海南大学 食品学院, 海南 海口 570228)

**摘要:**为了寻找安全的天然抗氧化剂,以火龙果花为研究对象,以乙醇作为提取溶剂,对火龙果花进行加热回流提取,以体外抗氧化试验为活性评价手段,测定其中的总黄酮含量,利用DPPH法、水杨酸法、邻苯三酚法、硫氰酸铁法、普鲁士蓝法从5个方面测定样品的抗氧化活性,以化学合成的脂溶性抗氧化剂TBHQ为阳性对照品。研究不同浓度下火龙果花中黄酮类化合物的抗氧化活性。结果表明:火龙果花总黄酮含量为2.62 mg/mL,黄酮类化合物对DPPH·的清除能力与特丁基对苯二酚(TBHQ)相当,清除·OH的 $IC_{50}$ 为0.57 mg/mL,清除超氧阴离子的 $IC_{50}$ 为1.41 mg/mL,抑制脂质过氧化的 $IC_{50}$ 为1.80 mg/mL,还原力相对较弱。研究表明火龙果花中黄酮类化合物具有较强的抗氧化活性,可作为天然抗氧化剂推广应用。

**关键词:**火龙果花;黄酮;抗氧化;自由基

**中图分类号:**S 667.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)02-0121-05

火龙果(*Hylocereus undatus*)属仙人掌科(Cactaceae)量天尺属(*Hylocereus*(Berger)Britt. et Rose),又称红

龙果、青龙果、仙蜜果、仙人掌果、芝麻果等,有红火龙果、白火龙果和黄火龙果3种类型,我国的火龙果种植主要分布在广东、广西、贵州、台湾、海南、福建等省份。火龙果具有很高的经济价值,是集水果、蔬菜、花卉、医药和保健于一体的热带草本植物。

火龙果5—10月开花,火龙果花硕大,因其夜晚开放固有“夜仙子”的美称,每个花季每株平均生花蕾

**第一作者简介:**李国胜(1977-),男,陕西西安人,硕士研究生,讲师,研究方向为天然产物与食品加工。E-mail:13637694043@163.com。  
**基金项目:**海南省自然科学基金资助项目(314087)。  
**收稿日期:**2015-09-28

## Characterizing a Novel Strain of *Bacillus amyloliquefaciens* CMN1308 for Potential Biological Control in Pathogenic Bacterium

ZHANG Xuehua<sup>1,2</sup>, LI Linling<sup>1</sup>, CHENG Hua<sup>1</sup>, AI Yuanhang<sup>1</sup>, WANG Hui<sup>1</sup>, CHENG Shuiyuan<sup>2,3</sup>

(1. Economic Forest Germplasm Improvement and Comprehensive Utilization of Resources of Hubei Key Laboratory, Huanggang Normal University, Huanggang, Hubei 438000; 2. College of Horticulture and Gardening, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434023; 3. College of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan, Hubei 430023)

**Abstract:** Taking *Bacillus amyloliquefaciens* CMN1308 as materials, with the method of confront culture, the antibiosis effect on *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium solani*, *Stachybotrys chartarum*, *Cryphonectria parasitica*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Penicillium expansum* and *Aspergillus niger* was studied. The results showed that CMN1308 had stronger antibiosis effect on the seven major pathogens of chestnut. Among this, CMN1308 had a best biocontrol to *P. expansum*, the inhibition zone diameter was 27.1 mm. The further study on the stability of antimicrobial components in CMN1308 showed, the growth of *P. expansum* hyphal was limited by the antimicrobial components isolated from CMN1308, which also had a good stability to hot temperature, alkali and UV, but sensitive to acid. The results suggested that antibiotic effect and inducible resistance were the major mechanism of CMN1308 on chestnut pathogenic. The finding of this study would help to optimize the practical use of CMN1308 in the biological control of chestnut or other fruit rot caused by pathogenic fungi.

**Keywords:** *C. mollissima*; biological control; antifungal spectrum; stability