

doi:10.16779/j.cnki.1003-5508.2019.04.026

枯草芽孢杆菌主要作用机制与应用研究进展

李怡洁¹, 杨佐忠^{2*}

(1. 西南大学植物保护学院, 重庆 400715; 2. 四川省退耕还林还草中心, 成都 610081)

摘要: 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 是一种应用十分广泛的益生菌, 能维持机体肠道微生态平衡, 提升机体免疫水平, 在植物病虫害生物防治、植物抗性诱导及促进生长发育等方面显示出独特作用。因其易于人工繁殖和对环境的高度友好性, 在生物保鲜、动物养殖、农作物病虫害防治和生物肥料生产领域得到广泛应用。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 作用机制; 进展

中图分类号: S7818.52; Q939.124 文献标识码: A

文章编号: 1003-5508(2019)04-0126-05

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Advances in Researches on Main Action Mechanism and Application of *Bacillus Subtilis*

LI Yi-jie¹ YANG Zuo-zhong^{2*}

(1. College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Sichuan Center for Returning Farmland to Forest and Grass, Chengdu 610081, China)

Abstract: *Bacillus subtilis* is a widely used probiotics, which can maintain the balance of intestinal micro-ecology and improve the immune level of the body, which plays a unique role in the biological control of plant diseases and the promotion of plant growth and development. It is widely used in the fields of biological preservation, animal breeding, crop disease and insect control, animal nutrition and biological fertilizer production because of its easy artificial production and high environmental friendliness. In this paper, the function of *Bacillus subtilis* was analyzed, the application of *Bacillus subtilis* in biological preservation, animal breeding, crop disease and insect control were mainly described, and the prospect of new development and application of *Bacillus subtilis* was put forward.

Key words: *Bacillus subtilis*, Action Mechanism, Progress

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 因其具有绿色无污染、无毒无害、可替代抗生素等众多优异的生物特性被广大学者及其研究人员研究, 同时也作为一种最早的益生菌类群出现在研究人员的视野里。枯草芽孢杆菌隶属于芽孢杆菌属的单细胞原核生物, 无荚膜, 周生鞭毛, 可以运动, 一般存在于菌体中

央或近似中央位置, 芽孢生长成型后对菌体体积不产生影响, 不会造成菌体膨大。其分布广泛、繁殖迅速, 并能自生成抗逆性孢子, 成型的菌落多为淡黄色或黄白色, 表面多为粗糙不光滑且不透明。枯草芽孢杆菌是中国农业部批准的应用广泛的益生菌, 它是一种可厌氧进行生长繁殖的革兰氏阳性短

收稿日期: 2019-06-17

基金项目: 中国烟草公司四川省公司科技项目 (SCYC201703)

作者简介: 李怡洁 (1998-), 女, 本科在读, 研究方向为植物保护, e-mail: 974735434@qq.com。

* 通讯作者: 杨佐忠 (1964-), 男, 教授级高工, 博士, e-mail: 105608377@qq.com。

杆菌^[1]。通过对枯草芽孢杆菌的主要作用机制与应用现状进行分析并做出展望,可为后期如何将枯草芽孢杆菌运用到生产实际中提供理论来源及思路,并为推进更加稳定、可持续的生物、农业生态发展奠定良好的基础。

1 枯草芽孢杆菌作用机制

1.1 维持肠道微生态平衡

枯草芽孢杆菌以内生孢子形态进入动物的消化道,在进入消化道后随即到达动物肠道内。由于枯草芽孢杆菌本身属于好氧菌群,在进入动物肠道后,内生孢子由休眠态转变为活跃态的过程中会消耗大量游离态氧气,进而创造一个有利于有益厌氧菌生长而不利好氧菌生长繁殖的低氧微环境^[2],与此同时,内生孢子还产生了对致病菌有明显拮抗作用的多种抗生类物质^[3],进而维持肠道微生态平衡。Guo 等^[4]通过以不同剂量的枯草芽孢杆菌去饲喂蛋鸡,实验证明乳酸杆菌和双歧杆菌等厌氧菌群显著增加,而好氧菌大肠杆菌数量显著减少;陈兵等^[5]通过研究口服了枯草芽孢杆菌后的大白鼠 1 周后粪便中厌氧菌和好氧菌落数量变化,结果显示为肠道厌氧菌群数量增多,好氧菌群数量则明显减少。

1.2 提升机体免疫水平

刘学剑^[6]提出,枯草芽孢杆菌具有一定免疫调节活性,改善免疫功能,增加 T、B 淋巴细胞的数量,增加抗病能力。张爱武等^[7]认为这是因为芽孢杆菌改善了动物体免疫器官的发育。枯草芽孢杆菌还可以通过自身产生的胞外抑菌物质与病原菌争夺附着位点,进而减少细胞免受病原菌的侵害。Inooka 等^[8]通过使用 10^7 CFU · g⁻¹ 剂量的枯草芽孢杆菌饲喂雏鸡,通过实验结果表明鸡脾脏中的 T、B 淋巴细胞数量显著增加;Ducle 等^[9]通过将枯草芽孢杆菌的表面抗原加入到小鼠体内,实验结果表明小鼠的免疫系统产生免疫球蛋白 IgG,同时使巨噬细胞中促炎细胞因子 IL-6 数量降低。

1.3 诱导抗性与促生作用

土壤中存在一类定殖于植物根际的有益微生物,我们将其称为植物根际促生菌(PGPR),它可以在减少植物病害发生的同时促进植物的生长^[10]。*B. subtilis* 是植物根际促生细菌(PGPR)的主要菌类

之一,可产生类似植物生长激素、细胞分裂素等代谢物质,促进植物快速发育,增强植株抗性从而提高抗病力,有效抵抗病原物的侵害。Ryu 等^[11]从植物根围分离出一株枯草芽孢杆菌 HK-CSM-1,经过实验证明 HK-CSM-1 对由 *Colletotrichum panacicola* 诱发的人参炭疽病有很多的拮抗效果,同时对人参接种枯草芽孢杆菌之后,其体内的 *Colletotrichum panacicola* 的数量有明显降低,这种现象与化学杀真菌剂 albesilate 杀菌效果相似。*B. subtilis* TR21 菌株能够拮抗众多病原真菌,在温室和大田栽培种植条件下,都能诱导香蕉产生抗性,较好的预防香蕉枯萎病发生。汤浩等^[12-14]等以巴西蕉为材料,运用半定量 RT-PCR 方法,以香蕉 25 S 信使基因为内标,用 TR21 菌液灌根接种处理后,检测香蕉根系 PAL、POD、PR-3 和 PR-1 四种与抗病性相关的基因表达情况。实验结果表明,经过接种处理后,这四种抗病基因的平均表达量都增加了,但 PAL 和 POD 基因的表达增幅明显高于 PR-3 和 PR-1 基因,并且 PAL 和 POD 抗病基因在接种培养了 12 h 之后的表达量达到最高。从而证明 *B. subtilis* TR21 菌株是通过系统诱导香蕉抗病性来预防枯萎病的。Walia 等^[15]从番茄根际土壤中分离了一株具有促生性能的菌株 N11,经鉴定为枯草芽孢杆菌菌株 CKT1,该菌株显示出植物生长促进活性,即溶磷、产铁载体、吡啶乙酸和氢氰酸。盆栽试验表明,该菌株可导致株高、根长和番茄幼苗的枝条和根的干物质产量显著增加。黄媛媛^[16]以枯草芽孢杆菌 SL-44 对象,研究发现在辣椒植物生长发育中,枯草芽孢杆菌 SL-44 对立枯丝核菌具有体外抑制作用,此外,SL-44 具有产嗜铁素、固氮和分泌 IAA 的能力,IAA 产量最高达到 $7.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。SL-44 具有定殖在植物根围的能力,并能够与植物发生互作。因此,SL-44 对辣椒植物具有生防和促生的作用,并可作为生物防治土传病害的潜在制剂用于促进作物的增产。

2 枯草芽孢杆菌应用情况

2.1 枯草芽孢杆菌在生物保鲜中的应用

2.1.1 果品保鲜中的应用

枯草芽孢杆菌具有抗逆能力强、易于繁殖,代谢产物丰富,抗菌谱广,对人畜高度安全等特点,加之收获后果品贮藏条件的可控性,用于果品生物防腐

(病原性腐烂)具有特殊优势。1986年, Charles L. Wilson、P. Lawrence Pusey 和李富新^[17]等用 *B. subtilis* B-3 菌株制剂处理桃、李和杏等多种成熟后的新鲜水果,有效地控制了由褐腐病致病菌 *Monilinia fructicola* 引起的腐烂病,其效果与市面上的优良杀菌剂效果相似。Vapinder 和 Deverall 两位学者^[18]用从柑桔果实上分离到的枯草芽孢杆菌抗体制剂有效地控制了由链格孢霉、地霉属、指状青霉等致病菌引起的柑桔果实腐病,防效达 60% 以上。杨佐忠^[19]用 *B. subtilis* PRS5 菌剂防治收获后柑桔果实腐烂病,获得与相关化学保鲜剂(杀菌剂)相当之效果。刘浩强,李鸿筠等^[20]研究了生物源保鲜剂枯草芽孢杆菌对锦橙采后主要病菌的毒性及对锦橙果实的贮藏保鲜效果。结果表明:枯草芽孢杆菌可湿性粉剂 2000 倍液对青霉病、绿霉病、炭疽病等总病害均有较好的防治效果,而对果实品质的影响和清水对照比较没有差异性,并且对外观色泽和口感没有负面影响。说明枯草芽孢杆菌可湿性粉剂 2 000 倍液对锦橙储藏保鲜效果较好。

2.1.2 鲜切花保鲜中的应用

以枯草芽孢杆菌制剂为材料,王澄澈等^[21]对月季、高勇^[22]等对波斯菊,朱天辉等^[23]对除虫菊等鲜切花卉进行生物保鲜试验,均可不同程度延长鲜切花的观赏期。25℃条件下,0.5%~1.0%的 *B. subtilis* PRS5 发酵制剂可有效延长月季和波斯菊鲜切花的保鲜期,浓度高于 1.0% 时会对鲜切花产生明显毒害作用。低浓度(<1%的发酵浓度)的 *B. subtilis* PRS5 制剂可明显延长除虫菊的花期(10 d)。

2.2 枯草芽孢杆菌在动物养殖中的应用

枯草芽孢杆菌菌体生长过程中,一方面通过产生的枯草菌素、短杆菌肽等活性物质,在动物消化道代谢过程中可合成多种营养素如氨基酸、多肽、促生长因子和多种维生素等,这些养分可直接被机体利用。在肠道中能够产生乙酸、丙酸和丁酸等挥发性脂肪酸,降低肠道 pH 值,抑制病原菌生长,为有益菌的增殖创造有利条件,间接抑制其它致病菌生长^[24~26]。

此外,枯草芽孢杆菌菌体自身合成 α -淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶、纤维素酶等酶类,在消化道中与动物体内的消化酶类一同发挥作用,能合成维生素 B1、B2、B6、烟酸等多种 B 族维生素,提高动物体内干扰素和巨噬细胞的活性。还可分泌其他多种酶类

如麦芽糖酶、植酸酶和纤维素酶等,有助于降解植物性饲料中某些抗营养因子,补充动物内源酶的不足,通过分泌有益活性代谢物质改善肠道形态和促进消化酶分泌来提高饲料养分的利用率,基于这些特性,枯草芽孢杆菌被广泛应用于动物养殖业^[27~30]。比如,纳豆枯草芽孢杆菌喂食牛犊后,可在其肠胃中生长,分泌各种维生素、生长激素和各种活性酶,促进牛犊肠胃黏膜细胞的分裂增殖,增强各种消化酶的活性,同时抑制肠胃中各种病菌发育,增强牛犊的抗逆性^[31]。纳豆枯草芽孢杆菌被农业农村部列为可直接饲养喂食动物的 12 种饲料级微生物添加剂之一。

枯草芽孢杆菌在动物养殖业中发挥着极其重要的作用。枯草芽孢杆菌也被运用于水产养殖上的应用领域^[1]。其作用机理是枯草芽孢杆菌被投入到水中之后,快速分裂繁殖,产生的细胞外活性酶可分解水底淤泥及水中的有机物,既可防止水域营养过剩,又能清除一部分淤泥。

2.3 枯草芽孢杆菌在农作物病虫害防治中的应用

目前,在农林病虫害多种绿色防控措施中,生物防治手段因环境友好性和可持续效果好,备受青睐。出于食品安全与环境保护需要,随着国家近年来陆续出台的化学农药减量或高毒农药限用、禁用等政策加速实施,众多农药生产厂家以枯草芽孢杆菌拮抗剂为主体的生物农药(制剂)登记产品大幅增加。

美国研发的 *B. subtilis* var. *amyloli quefaciens* FZB24,澳大利亚研发的 *B. subtilis* A213,日本研发的 *B. subtilis* RB-14 和中国研发的 *B. subtilis* B916、B908、B3、B903、XM16 等菌株^[32]相继实现产业化。胡清玉等^[33]研究发现,以枯草芽孢杆菌为主要菌群和钾肥联用可增强苹果树的树势,显著降低腐烂病病疤复发率;翟世玉等^[34]研究发现钾和枯草芽孢杆菌联用对黑腐皮菌的抑菌效果。陈中义于 2002 年还将两个含有 CryIAc 基因的穿梭表达质粒载体,导入到枯草芽孢杆菌 B916 菌株,获得了全新基因工程菌 Bs2249 和 Bs2014,这两个基因菌在防病及杀虫方面都具有良好的效果。商业化产品“百泰天赞好”的核心菌株 *B. subtilis* Y1336,不仅对水稻、小麦、蔬菜等多种农作物真菌病害有优异防效,在种群的定殖过程中,自身会分泌一定量植物生长素,刺激作物生根、分蘖、出芽等过程,从而改善植物生长状况,提高品质和产量。Zohora 等^[35]分离出的枯草芽

孢杆菌 RB14 能定殖在番茄的根表,并在番茄生长发育过程中发挥促生作用,可促进番茄种子的发芽,将其发芽率提高至 99%,同时对番茄植物猝倒病 (*Rhizoctonia solani* K1) 有明显的预防效果,可降低植物病发病率高达 80%。杨佐忠^[36] 通过不同制剂及其处理方法研究枯草芽孢杆菌对杉苗猝倒病的防效,试验表明,在两种试验环境下杉苗猝倒病均有减轻,枯草芽孢杆菌在室内灭菌和田间自然土中的防效均优于五氯硝基苯。

3 展望

枯草芽孢杆菌作为一种安全、高效、环保、功能多样的细菌,是一种具有极高研究开发潜力的微生物菌种,日益成为众多生物科技工作者关注热点。目前其已在生物农药和生物肥料领域初步实现产业化,因其代谢产物的多功能性,也在农林植物培育与保护、畜牧饲料、食品加工、环境保护等众多领域得到广泛应用。同时对枯草芽孢杆菌及其近缘种中拮抗基因的克隆及其表达调控等方面的探索及研究取得了突破性的进展,其中有的已应用于工业生产。但是,对枯草芽孢杆菌的研究还需在以下几个方面开展系统深入的研究:

(1) 与国际研究水平相比,我国在对枯草芽孢杆菌基因组和蛋白质组学方面的研究还需深入研究。

(2) 枯草芽孢杆菌益生作用的机制相对复杂,目前还不能完全阐述清楚;同时,其是否具有潜在的安全性问题还需深入的研究。

(3) 在枯草芽孢杆菌产品产业开发及应用方面暴露出很多问题,例如相关产品容易受外界环境影响、作用对象单一、有效期短、见效速度慢等缺点,还需进一步深入研究解决。

(4) 枯草芽孢杆菌在养殖业中的研究已经获取很多实验数据,但由于枯草芽孢杆菌种类繁多,发酵产物的需求不同,发酵时间存在一定差异,导致生产不稳定、成本高等问题而不能广泛应用在饲料中,因此对降低发酵成本、缩短发酵周期、稳定生产等方面还需进一步深入研究解决。

参考文献:

[1] 蔡艳,曹根凤,叶盛,等. 枯草芽孢杆菌代替抗生素在水产养殖

上的应用[J]. 山西农经,2018,19(41):75~76.

- [2] Knap I, Kehlet A B, Bennedsen M, et al. *Bacillus subtilis* (DSM17299) significantly reduces Salmonella in broilers [J]. Poultry Science,2011,90(8):1690~1694.
- [3] Li W F, Rajput I R, Xu X, et al. Effects of probiotic (*Bacillus subtilis*) on laying performance, blood biochemical properties and intestinal microflora of Shaoxing duck [J]. International Journal of Poultry Science,2011,10(8):583~589.
- [4] GUO J R, DONG X F, LIU S, et al. Effects of long-term *Bacillus subtilis* CGMCC 1.921 supplementation on performance, egg quality, and fecal and cecal microbiota of laying hens [J]. Poultry science,2017(96):1280~1289.
- [5] 陈兵,朱凤香,陈巧云,等. 纳豆芽孢杆菌分离纯化及对大白鼠肠道微生态系统的影响[J]. 浙江农业学报,2003,15(4):223~227.
- [7] 张爱武,董斌,左璐雅,等. 不同水平枯草芽孢杆菌对鹌鹑内脏器官及小肠发育的影响[J]. 经济动物学报,2010,14(2):98~101.
- [8] Inooka S, Uehara S, Kimura M. The effect of *Bacillus natto* on the T and B lymphocytes from spleens of feeding chickens [J]. Poultry Science. 1986,65(6):1217~1226.
- [9] DUC LE H, HONG H A, BARBOSA T M, et al. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use [J]. Applied and Environmental Microbiology,2004,70(4):2161~2171.
- [10] Éva Laslo, Éva György, Gyöngyvér Mara, et al. Screening of plant growth promoting rhizobacteria as potential microbial inoculants [J]. Crop Protection,2012,40:43~48.
- [11] Hojin Ryu, Hoon Park, Dong-Sang Suh, et al. Biological control of *Colletotrichum panacicola* on *Panax ginseng* by *Bacillus subtilis* HK-CSM-1 [J]. Journal of Ginseng Research,2014,38(3):215~219.
- [12] 汤浩. 广东香蕉枯萎病菌遗传多样性分析及其产几丁质酶拮抗菌的筛选 [D]. 华中农业大学,2012.
- [13] 喻国辉,周林,程萍,等. 枯草芽孢杆菌 TR21 对香蕉抗病相关基因表达的诱导作用 [J]. 中国生物防治学报,2012,28(01):152~156.
- [14] 李荣. 枯草芽孢杆菌 R31 对香蕉枯萎病生防机制研究 [D]. 华中农业大学,2012.
- [15] Walia A, Mehta P, Chauhan A, Shirkot C K. Effect of *Bacillus subtilis* strain CKT1 as inoculum on growth of tomato seedlings under net house conditions [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. India, 2014,84(1):145~155.
- [16] 黄媛媛. 枯草芽孢杆菌 SL44 对辣椒防病促生性能及作用机制研究 [D]. 石河子大学,2018.
- [17] Charles L. Wilson, P. Lawrence Pusey, 李富新. 产后植物病害生物防治的潜力 [J]. 世界农业. 1986(12):33~34.
- [18] Singh V, Deverall B J. *Bacillus subtilis* as a control agent against fungal pathogens of citrus fruit [J]. Transactions of the British Mycological Society. 1984,83(3):487~490.
- [19] 杨佐忠. 枯草芽孢杆菌 PRS5 防治收获后柑橘果腐病试验

- [J]. 云南农业大学学报. 1993,8(3): 236~237.
- [20] 刘浩强,李鸿筠,向可海,等. 生物源保鲜剂枯草芽孢杆菌对锦橙贮藏病菌敏感性和保鲜效果[J]. 食品工业科技,2015,36(04):315~319.
- [21] 王澄澈,吴敬须. 不同处理对月季切花保鲜性能的影响[J]. 园艺学报,1992,19(4):375~376.
- [22] 高勇,吴绍锦. 切花保鲜剂研究综述[J]. 园艺学报. 1989,16(2):139~145.
- [23] 朱天辉,杨佐忠. 切花生物保鲜剂的研究[J]. 四川林业科技,1999,20(1):5~7.
- [24] Knap I, Kehlet A B, Nennedsen M, et al. *Bacillus subtilis* (DSM17299) significantly reduces *Salmonella* in broilers [J]. Poultry Science,2011,90(8):1690~1694.
- [25] LaRagione R M, Woodwand M J. Competitive exclusion by *Bacillus subtilis* spores of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and *Clostridium perfringens* in young chickens [J]. Veterinary Microbiology,2003,94(3):245~256.
- [26] 朱沛霖. 枯草芽孢杆菌对雪山鸡生产性能、肠道健康和免疫机能的影响及机制[D]. 扬州大学,2017.
- [27] Fore C, A cuti G, Manuali E, et al. Effects of two different probiotics on microflora, morphology, and morphometry of gut in organic laying hens [J]. Poultry Science,2016,95(11): 2528~2535.
- [28] Abdelqader A, Al-Fatafah A, Das G. Effects of dietary *Bacillus subtilis* and inulin supplementation on performance, eggshell quality, intestinal morphology and microflora composition of laying hens in the late phase of production [J]. Animal Feed Science and Technology,2013,179:103~111.
- [29] 谢鹏,付胜勇,戴鑫,等. 饲料中添加枯草芽孢杆菌制剂对乳鸽消化道酶活性和血清生化指标的影响[J]. 饲料工业,2014,35(24):7~11.
- [30] 李卫芬,白洁,李雅丽,等. 枯草芽孢杆菌对肉鸡肉质、养分消化率及血清生化指标的影响[J]. 中国兽医学报,2014,34(10):1682~1685.
- [31] 胡东新,潘康成. 微生态制剂及其作用机理[J]. 中国饲料,2001(3):14~16.
- [32] 陈中义. 多功能质粒载体与组合 Bt 杀虫蛋白基因工程菌研究 [D]. 北京: 中国农业科学院,2002.
- [33] 胡清玉,刘力伟,刘欣,等. 木美土里生物菌肥对苹果树腐烂病的防治作用评价[J]. 中国果树,2015(04):52~55.
- [34] 翟世玉,殷辉,周建波,等. 枯草芽孢杆菌与钾联用对黑腐皮菌的抑制作用[J]. 山西农业科学,2019,47(04):660~664.
- [35] Umme Salma Zohora, Takashi Ano, Mohammad Shahedur Rahman. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* K1 by Iturin A Producer *Bacillus subtilis* RB14 Seed Treatment in Tomato Plants [J]. Advances in Microbiology,2016(6):424~431.
- [36] 杨佐忠. PRS₅ 对杉苗猝倒病的影响[J]. 森林病虫通讯,1990(04):26~28.

.....

(上接第 69 页)

- [2] 甘小洪,胡敬. 南充市城区彩叶植物资源及园林应用研究 [J]. 四川林业科技,2009,30(4):96~99.
- [3] 梁鸿霞,翟通德,陈中兰,等. 南充市区绿化植物叶片重金属元素含量及其大气污染评价[J]. 西华师范大学学报(自然科学版),2006,27(4):435~438.
- [4] 陈善波,曹雯,杨文渊,等. 四川省眉山市城市绿地植物多样性研究[J]. 安徽农业科学,2012,40(5):2815~2817.
- [5] 强方方,王瑜. 近 10 年四川省地级市区园林绿化情况研究 [J]. 四川环境,2018,37(6):160~168.
- [6] 西充县志编纂委员会. 西充县志 [M]. 重庆出版社,1993,1.
- [7] 《南充市志》编纂委员会. 南充市志 [M]. 南充: 方志出版社,2010. 2~96.
- [8] 钱长江,张华海,李茂,等. 贵阳市引种园林树种的组成及生长适应性调查[J]. 贵州农业科学,2013,41(12):184~188.
- [9] 康俊水,张淑英,邢晨明,等. 东营市区园林绿化树木生长情况调查[J]. 山东林业科技,1998:3~6.
- [10] 宋超,孙鹏,樊翠霞,等. 北京市园林绿地常用植物生长现状研究[J]. 现代农业科技,2009,20:222~236.
- [11] 唐春艳,陈果,张敏迟,等. 南充市城市园林植物主要病虫害调查及分析[J]. 西华师范大学学报(自然科学版),2017,38(2):157~157.