

# 甲基营养型芽孢杆菌对疮痂链霉菌的生防潜力

许子璇<sup>1</sup>, 吴达仁<sup>1,2</sup>, 王建宇<sup>3</sup>, 周波<sup>3</sup>, 李健<sup>1,2</sup>, 苏国成<sup>1</sup>

(1. 集美大学海洋食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021; 2. 福建省海洋功能食品工程技术研究中心, 福建 厦门 361021; 3. 山东农业大学生命科学学院, 山东 泰安 271018)

**[摘要]** 为评价甲基营养型芽孢杆菌 SJ80 与 SJ81 对马铃薯疮痂病的生防潜力, 以疮痂链霉菌为指示菌, 测试了其发酵上清液的理化稳定性, 并与咯菌腈、辛菌胺醋酸盐 2 种农药进行对比, 检测其粗提物的生物安全性和抑菌效果。采用牛津杯法抑菌试验, 以抑菌直径测试 SJ80 与 SJ81 发酵液的最佳发酵时间, 发酵上清液经不同温度、紫外照射、pH 值及蛋白酶处理后, 以抑菌率测试其稳定性, 采用 MTT 法测定粗提物体外急性细胞毒性。结果表明: 2 种发酵上清液最佳发酵时间为 3 d, 经 121 ℃ 处理 30 min 或紫外照射 24 h 后, 抑菌率均高于 90%; SJ81 在 pH=1~13 的抑菌率保持在 80% 以上, 有较好稳定性, SJ80 在 pH=1~11 的抑菌趋势与 SJ81 的相似, 在 pH=13 的抑菌率为 0, 耐碱性较弱; 发酵上清液经碱性蛋白酶与胰蛋白酶处理 2 h 后, 抑菌率均接近 100%, 对酶处理较稳定。体外急性毒性实验结果显示, SJ80、SJ81 对 LO2 细胞增殖的半数抑制量 (IC<sub>50</sub>) 分别为 239, 137 mg/L, 对 PC12 细胞的 IC<sub>50</sub> 分别为 266, 161.3 mg/L; 在农药的推荐使用量下, 咯菌腈和辛菌胺醋酸盐的抑菌率分别为 25.46%, 0%, 对应的细胞活力均低于 50%, 比发酵液毒性大且抑菌率低。可见, 2 种拮抗菌发酵上清液理化性质稳定, 比农药安全性高, 有突出的抑菌优势, 具有生防潜力。

**[关键词]** 甲基营养型芽孢杆菌; 疮痂病; 拮抗菌; 抑菌活性; 马铃薯

**[中图分类号]** S 435.32; S 476.1

## Biocontrol Potential of *Bacillus methylotrophicus* Against *Streptomyces scabies*

XU Zixuan<sup>1</sup>, WU Daren<sup>1,2</sup>, WANG Jianyu<sup>3</sup>, ZHOU Bo<sup>3</sup>, LI Jian<sup>1,2</sup>, SU Guocheng<sup>1</sup>

(1. College of Ocean Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Fujian Provincial Engineering Technology Research Center of Marine Functional Food, Xiamen 361021, China;

3. College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

**Abstract:** In order to evaluate the biocontrol potential of two *Bacillus methylotrophicus* strains SJ80 and SJ81 against potato common scab, *Streptomyces scabies* was used as an indicator bacteria to test the physicochemical stability of the fermentation supernatant. Compared with fludioxonil and octylamine acetate to detect the biological safety and antibacterial effect of the fermented crude extract. The Oxford cup method was used to test the bacteriostasis. The bacteriostatic diameter was used to test the optimal fermentation time of SJ80 and SJ81, and the bacteriostatic rate was used to value the stability of the two antagonistic bacteria fermentation broths after treatment with different temperatures, UV irradiation, pH value and protease. The MTT method was used to determine the acute cytotoxicity of crude extracts from SJ80 and SJ81 *in vitro*. The experimental results showed

**[收稿日期]** 2020-10-18

**[基金项目]** 山东省农业重大应用技术创新项目 (SD2019ZZ009)

**[作者简介]** 许子璇 (1997—), 女, 硕士生, 从事微生物学和天然产物分离纯化技术研究。通信作者: 苏国成 (1962—), 男, 教授, 从事微生物技术和食品安全研究。E-mail: amoluscin@163.com

that the best fermentation time of the two fermentation broths was 3 days, and the antibacterial rates of both were higher than 90% after treatment at 121 °C for 30 min or continuous UV irradiation for 24 h. In the pH value range of 1 ~ 13, the antibacterial rate of SJ81 remained above 80%, which was similar to that of SJ80. However, SJ80 completely lost its antibacterial activity at pH = 13, indicating that the alkali resistance of SJ80 was relatively weak. The fermentation broth was not sensitive to proteinase treatments because the antibacterial rate was close to 100% after treatment with alcalase or trypsin for 2 h. The acute cytotoxicity test *in vitro* showed that the IC<sub>50</sub> of SJ80 and SJ81 for LO2 cells were 239, 137 mg/L, and the IC<sub>50</sub> for PC12 cells were 266, 161.3 mg/L. Under the recommended dosage of pesticides, the bacteriostatic rates of fludioxonil and octylamine acetate were 25.46%, 0%, and the corresponding cell viability was less than 50%, which were more toxic than fermentation broth and had lower bacteriostatic rates. Therefore, the two antagonistic bacteria fermentation supernatants had stable physical and chemical properties, and they were safer than pesticides. Meanwhile they had outstanding antibacterial advantages, and had excellent potential for biocontrol.

**Keywords:** *Bacillus methylotrophicus*; scab; antagonistic bacteria; antibacterial activity; potato

## 0 引言

疮痂链霉菌 (*Streptomyces scabies*) 是马铃薯疮痂病的病原菌, 作为革兰氏阳性、丝状、腐生放线菌, 其菌丝尖端释放的孢子可在根际土壤、种子中传播, 并通过茎块伤口、皮孔等侵染甜菜、萝卜、马铃薯等多种植物<sup>[1]</sup>。疮痂链霉菌能够产生黑色素、灰色气生菌丝和孢子螺旋链<sup>[2]</sup>, 并随着染病马铃薯的生长发育, 链霉菌会影响其组织扩张, 导致其呈现软木状表皮坏死性病变, 最终使马铃薯表面形成凸起的硬痂<sup>[3]</sup>。染病的马铃薯在清洗过程中不易被处理干净, 这不仅会导致加工成本增加, 还严重降低其经济价值。2015 年, 我国农业部启动马铃薯主粮化战略, 为满足日益增长的粮食需求, 培育优质无病害的马铃薯是关键。马铃薯疮痂病在我国各大马铃薯产区普遍存在<sup>[4-7]</sup>, 但对其防治手段有限, 目前主要依赖化学防治手段<sup>[8]</sup>, 这种手段存在农药残留、药效低、耐药性强、土壤污染等问题<sup>[9]</sup>。因此, 近年来研究热点主要集中在生物防治, 利用土壤微生物的拮抗特性开发生防菌剂<sup>[10-12]</sup>, 可以实现土壤生态体系的改良和病害的防治, 是绿色、环保、高效的防治手段<sup>[13]</sup>。目前, 有效针对马铃薯疮痂链霉菌的生防菌研究较少, 仍未开发出可以代替化学农药且低毒、安全、高效的生防菌剂。

芽孢杆菌在植物根际土壤中广泛存在, 它可以产生具有高度抗性的内生孢子<sup>[14]</sup>, 是开发生防菌剂的重要来源。目前, 已有多种芽孢杆菌被报道, 如解淀粉芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、多粘芽孢杆菌、贝莱斯芽孢杆菌等, 它们可通过分泌抗菌代谢产物来抑制食源性病害<sup>[15-18]</sup>, 但对于土壤来源的甲基营养型芽孢杆菌 (*Bacillus methylotrophicus*) 的研究相对较少。甲基营养型芽孢杆菌是 2010 年由 Madhaiyan 等<sup>[19]</sup>在水稻根际土壤中分离报道的新菌种, 其对葡萄霜霉病<sup>[20]</sup>、葡萄灰霉病<sup>[21]</sup>、黄瓜炭疽病<sup>[22]</sup>、罗汉果斑枯病<sup>[23]</sup>、梨黑斑病<sup>[24]</sup>、西瓜枯萎病<sup>[25]</sup>等多种植物病害有抑制作用, 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等食源性致病菌也有抑菌作用<sup>[26]</sup>, 具有开发生防菌剂的潜力。

本实验探究了 2 种土壤来源的甲基营养型芽孢杆菌在不同条件下对马铃薯疮痂链霉菌的拮抗效果, 测试其发酵上清液的最佳发酵时间以及经不同温度、紫外照射、pH 值、蛋白酶处理后的稳定性, 并与市售农药进行对比, 明确其体外急性细胞毒性作用和抑菌效果, 以评估其作为生防菌剂的潜力。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 材料

病原菌: 疮痂链霉菌 (AMCC400023)<sup>[27]</sup>。拮抗菌: SJ80、SJ81 甲基营养芽孢杆菌, 山东农业大

学资源与环境微生物实验室。LO2 正常肝脏细胞, 大白鼠肾上腺髓质嗜铬瘤细胞 PC12, 集美大学食品与生物工程学院。

LB 培养基 (g/L): 胰蛋白胨 10, 氯化钠 10, 酵母粉 5, 琼脂粉 20, pH = 7.0 ~ 7.5。放线菌液体培养基, 海博生物有限公司。

1.1.2 主要试剂

噻唑兰 (MTT), 南京奥多福尼生物科技有限公司; DMEM 培养基、磷酸缓冲液 (PBS)、双抗 (PS), 美国 Hyclone 公司; 胎牛血清 (FBS), 澳洲 GEMINI 公司; 咯菌腈 (fludioxonil), 瑞士先正达作物保护有限公司; 辛菌胺醋酸盐, 山西美源化工有限公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株形态观察

将拮抗菌培养于 LB 固体培养基中, 用革兰氏染色法处理拮抗菌后, 在光学显微镜下观察菌体形态。

1.2.2 拮抗菌发酵上清液制备

挑取单菌落接种于装有 50 mL LB 液体培养基的 250 mL 三角瓶中, 37 ℃、180 r/min 振荡培养 12 h, 得到种子液。按 1% 接种量将种子液接种至装有 20 mL LB 液体培养基的 500 mL 三角瓶中, 于 37 ℃、180 r/min 恒温振荡培养 48 h。将培养好的发酵液 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 用 0.22 μm 滤膜过滤后, 4 ℃ 保存待用。

1.2.3 病原菌孢子悬浮液制备

挑取一环活化好的疮痂链霉菌, 紧密地划在高氏一号培养基上, 28 ℃ 恒温静置培养 2 ~ 3 d。吸取无菌水于平板上, 用刀片轻轻刮下表面孢子, 少量多次冲洗培养基表面孢子, 收集至 50 mL 离心管中, 4 ℃ 保存待用。

1.2.4 拮抗物质发酵时间优化

将 2 株拮抗菌连续 6 d 在同一时间接种于 LB 液体培养基中, 在 37 ℃、180 r/min 条件下恒温培养, 每隔 24 h 取一次样品, 采用牛津杯法测定抑菌直径, 每组重复 3 次。

1.2.5 拮抗菌发酵产物稳定性实验

牛津杯法抑菌试验: 在放线菌固体培养基表面涂布 200 μL 病原菌孢子悬浮液<sup>[28]</sup>, 至表面没有明显水分后, 将无菌牛津杯垂直插入培养基表面, 每孔加入 200 μL 样品, 28 ℃ 恒温静置培养 48 h 后, 测量抑菌圈直径, 计算抑菌率。计算公式为: 抑菌率/% = (1 -  $d_{\text{对照}} - d_{\text{样品}}/d_{\text{对照}}$ ) × 100, 其中,  $d$  为抑菌圈直径。

参照 Huang 等<sup>[15]</sup>的方法对发酵上清液稳定性进行实验。

1) 温度稳定性。将拮抗菌发酵上清液分别在 50, 60, 70, 80, 90, 100, 121 ℃ 条件下处理 30 min, 冷却后采用牛津杯法测定抑菌直径, 以未处理的发酵上清液为对照, 每组重复 3 次, 计算抑菌率。

2) 紫外照射稳定性。参照文献 [29], 将拮抗菌发酵上清液分别置于 15 W 紫外灯下照射 6, 12, 24 h, 通过牛津杯法测定抑菌直径, 以未处理的发酵上清液为对照, 每组重复 3 次, 计算抑菌率。

3) pH 值稳定性。将拮抗菌发酵上清液用 1 mol/L HCl 或 1 mol/L NaOH 调整 pH 值为 1 ~ 13, 静置 24 h 后调回原始 pH 值, 通过牛津杯法测定抑菌直径, 以未处理的发酵上清液为对照, 每组重复 3 次, 计算抑菌率。

4) 蛋白酶稳定性。选择 0.1, 0.5, 1.0 mg/L 的胰蛋白酶和碱性蛋白酶处理发酵上清液, 以 1:50 的比例加入发酵上清液, 37 ℃ 水浴 2 h, 90 ℃ 灭活蛋白酶, 冷却至室温后用牛津杯法测定抑菌直径, 以酶液为空白组, 以未处理的发酵上清液为对照组, 每组重复 3 次, 计算抑菌率。

1.2.6 拮抗菌粗提物细胞毒性试验

利用含体积分数 1% 双抗 (青霉素、链霉素) 和体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基,

在二氧化碳培养箱分别培养 LO2 细胞与 PC12 细胞，恒温 37 ℃，二氧化碳体积分数为 5%。

将 2 种拮抗菌发酵上清液用等体积乙酸乙酯萃取 3 次，萃取剂合并后真空浓缩，得到乙酸乙酯浸提物，用适量甲醇复溶并稀释至不同浓度，用 0.22 μm 滤膜过滤后 4 ℃ 保存待用。SJ80 样品作用的质量浓度分别为 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 mg/L；SJ81 样品作用的质量浓度分别为 25, 50, 5, 100, 125, 150, 175, 200 mg/L。以辛菌胺醋酸盐<sup>[30]</sup>和咯菌腈<sup>[8]</sup>2 种农药作为对照进行实验，按照推荐使用浓度选择辛菌胺醋酸盐 36 mg/L（稀释 500 倍）、咯菌腈 16.7 mg/L（稀释 1 500 倍）。此外，设一个高浓度组辛菌胺醋酸盐 180 mg/L（稀释 100 倍）、咯菌腈 167 mg/L（稀释 150 倍）作为参考。

参照肖宝平等<sup>[31]</sup>的 MTT 法测定体外急性细胞毒性，取对数生长期的 LO2 细胞制成均匀单细胞悬液，以 1 × 10<sup>4</sup> 个/孔铺至 96 孔板，100 μL/孔，置于培养箱培养 12 h，待细胞贴壁后，吸弃旧培养基，加入不同浓度粗提物或药品，继续培养 24 h 后，每孔换 100 μL 新培养基，并加入 15 μL 0.5 g/L 的噻唑兰，37 ℃ 孵育 4 h 后吸弃上清液，每孔加 150 μL DMSO，震荡 10 min，在 490 nm 处检测吸光度值。每个样品做 6 个平行，设定 DMSO 为空白组，甲醇为溶剂对照组。PC12 细胞实验方法同上，计算细胞活力公式如下：细胞活力/% = (A<sub>样品</sub> - A<sub>空白</sub>) / (A<sub>溶剂</sub> - A<sub>空白</sub>) × 100，其中，A 为吸光度值。

1.2.7 农药对比试验

选择 1.2.6 中质量浓度为 50, 100, 150, 200 mg/L 的 SJ80 粗提物，质量浓度为 50, 75, 100, 125 mg/L 的 SJ81 粗提物，以及 4 个浓度的农药，用牛津杯法比较抑菌活性，每组重复 3 次，计算抑菌率。

1.2.8 数据处理与分析

数据以 SPSS statistics 17.0 软件进行处理，采用单因素方差分析（ONEWAY-ANOVA）检验其相关性和显著性，P < 0.05 被认为具有统计学意义。

2 实验结果

2.1 菌落形态

将 2 株拮抗菌接种在 LB 固体培养基上，于 37 ℃ 恒温静置培养 2 d，观察菌落形态和革兰氏染色后的显微形态（1 000 倍），结果如图 1 所示。可见，2 株菌形态有明显差异，SJ80 单菌落呈圆形，边缘粗糙，中间有褶皱状圆形凸起，干燥无光泽，不透明（见图 1a）；SJ81 单菌落大，形状不规则，边缘较光滑，中间有不规则褶皱凸起，表面无光泽，干燥（见图 1c）；2 株菌在显微镜下观察均呈蓝紫色短杆状（见图 1b、图 1d），均为革兰氏阳性菌。

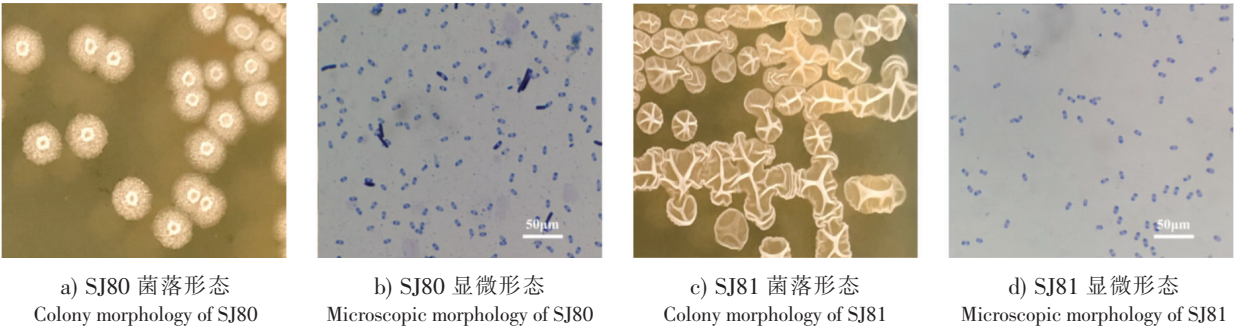


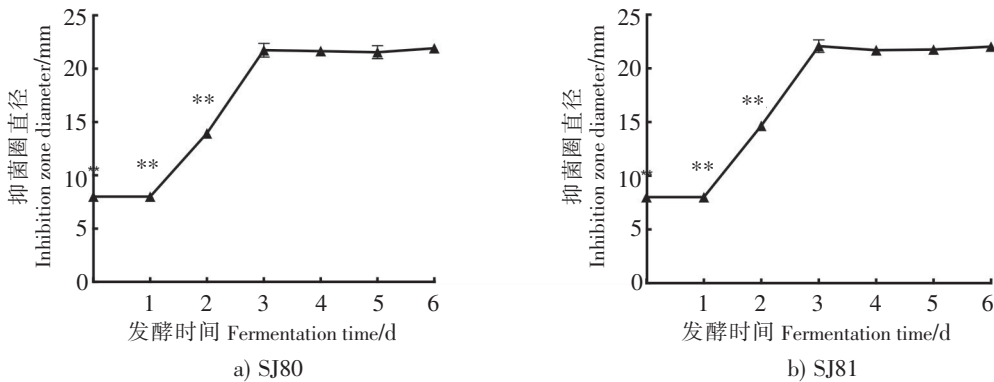
图 1 2 株拮抗菌在 LB 培养基上的菌落形态特征及革兰氏染色结果

Fig.1 Morphological characteristics on LB medium and Gram staining results of two antagonistic strains



2.2 发酵时间优化

如图2所示,在1~3 d内,2株拈抗菌随着发酵时间的增加,抑菌圈直径显著增加( $P < 0.01$ );在4~6 d内,发酵液的抑菌效果逐渐趋于平缓,不再提高。因此,2株拈抗菌活性物质在发酵3 d达到饱和,最佳发酵时间为3 d。



a) SJ80  
b) SJ81  
\*\* $P < 0.01$  是与发酵3 d比较;抑菌圈直径以 mm 表示,包括牛津杯外径(8 mm)  
\*\* $P < 0.01$  compared with 3 d fermentation;the diameter of the inhibition zone is expressed in mm,including the outer diameter of the Oxford cup(8 mm)

图2 2株拈抗菌经不同发酵时间处理的发酵液抑菌圈直径  
Fig.2 Inhibition zone diameter of two antagonistic fermentation broth at different fermentation time

2.3 温度稳定性

如图3所示,2种发酵上清液经50~121℃处理后,抑菌率均高于90%,与未经处理的对照组间没有显著性差异( $P > 0.05$ ),说明2种发酵上清液的活性物质在高温下不会失活,对温度不敏感,具有较强的耐热性。

2.4 紫外照射稳定性

如图4所示,SJ80发酵上清液经紫外照射6,12,24 h后的抑菌率分别为96.23%,98.5%,99.3%,SJ81发酵上清液的抑菌率分别为94.22%,98.64%,99.25%,2种发酵上清液抑菌活力均在90%以上。与未经处理的对照组相比,抑菌圈直径均无显著性差异( $P > 0.05$ ),表明2株拈抗菌的活性物质对紫外照射不敏感,在紫外线下较稳定。

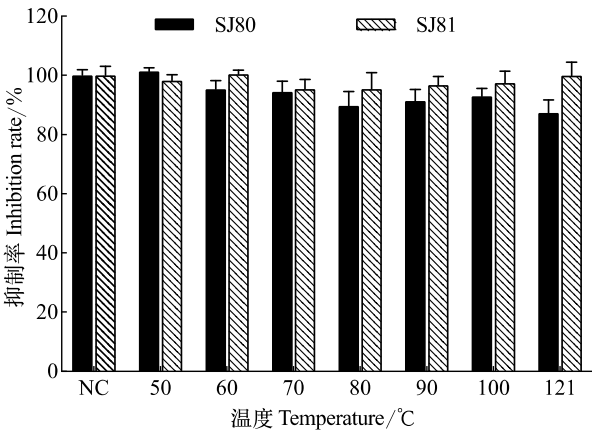


图3 2株拈抗菌发酵上清液经不同温度处理后的抑菌率  
Fig.3 Inhibition rate of two antagonistic fermentation supernatants at different temperatures

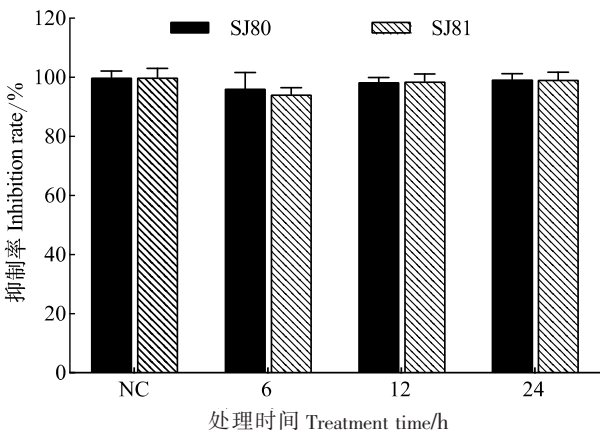


图4 2株拈抗菌发酵上清液经不同紫外照射时间后的抑菌率  
Fig.4 Inhibition rate of two antagonistic fermentation supernatants at different UV exposure time

2.5 pH 值稳定性

如图 5 所示, SJ81 发酵上清液在 pH = 1~13 时均有抑菌活性, 在 pH = 7, 9 时抑菌率达到 88%, 91%, 与未经处理的对照组无显著性差异, 其余 pH 值条件下与对照组有显著性差异 ( $P < 0.05$ ); SJ80 发酵上清液在 pH = 1~11 时均有抑菌活性, 在 pH = 13 时抑菌率为 0, 其中 pH = 9 时抑菌率高达 100%, 与对照组无显著性差异, 在其余 pH 值条件下抑菌率均小于 80%, 与对照组有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。综上可得, 2 株拮抗菌发酵上清液在弱碱条件下抑菌活性较高, 强碱或偏酸条件下抑菌活性降低。

2.6 蛋白酶稳定性

由于 2 种发酵上清液自身呈碱性, 因此选择胰蛋白酶和碱性蛋白酶进行实验, 结果见图 6。可见, 空白组的抑菌率均为 0, 排除了酶的自身作用, 2 株拮抗菌发酵上清液经不同浓度酶液处理后, 抑菌活性均高于 95%, 与对照组无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。由此可见, 胰蛋白酶与碱性蛋白酶对 2 种拮抗菌发酵上清液中活性物质无酶解作用。

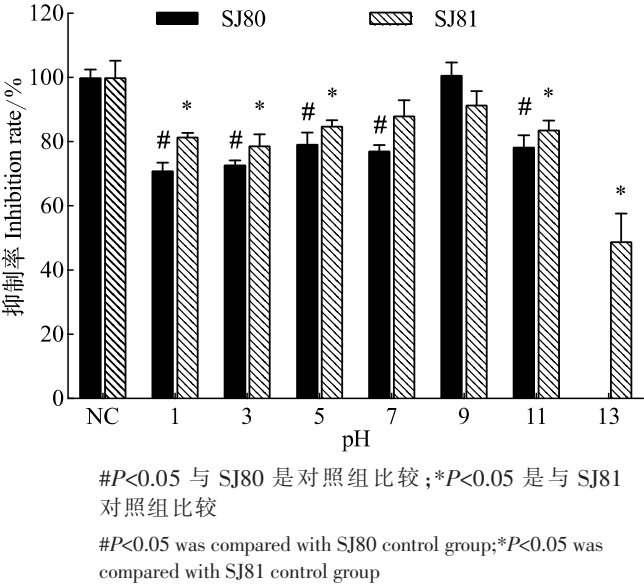


图 5 2 株拮抗菌发酵上清液经不同 pH 值处理后的抑菌率  
Fig.5 Inhibition rate of two antagonistic fermentation supernatants at different pH values

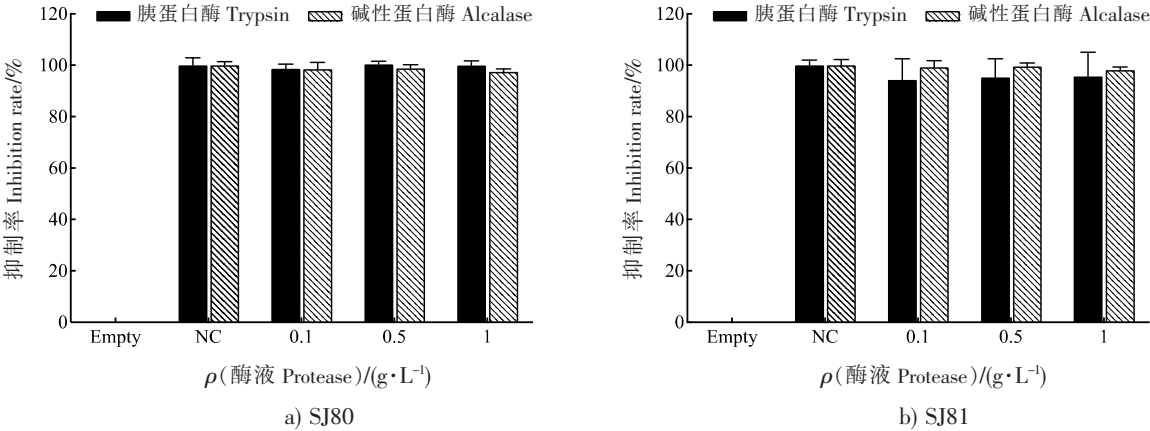


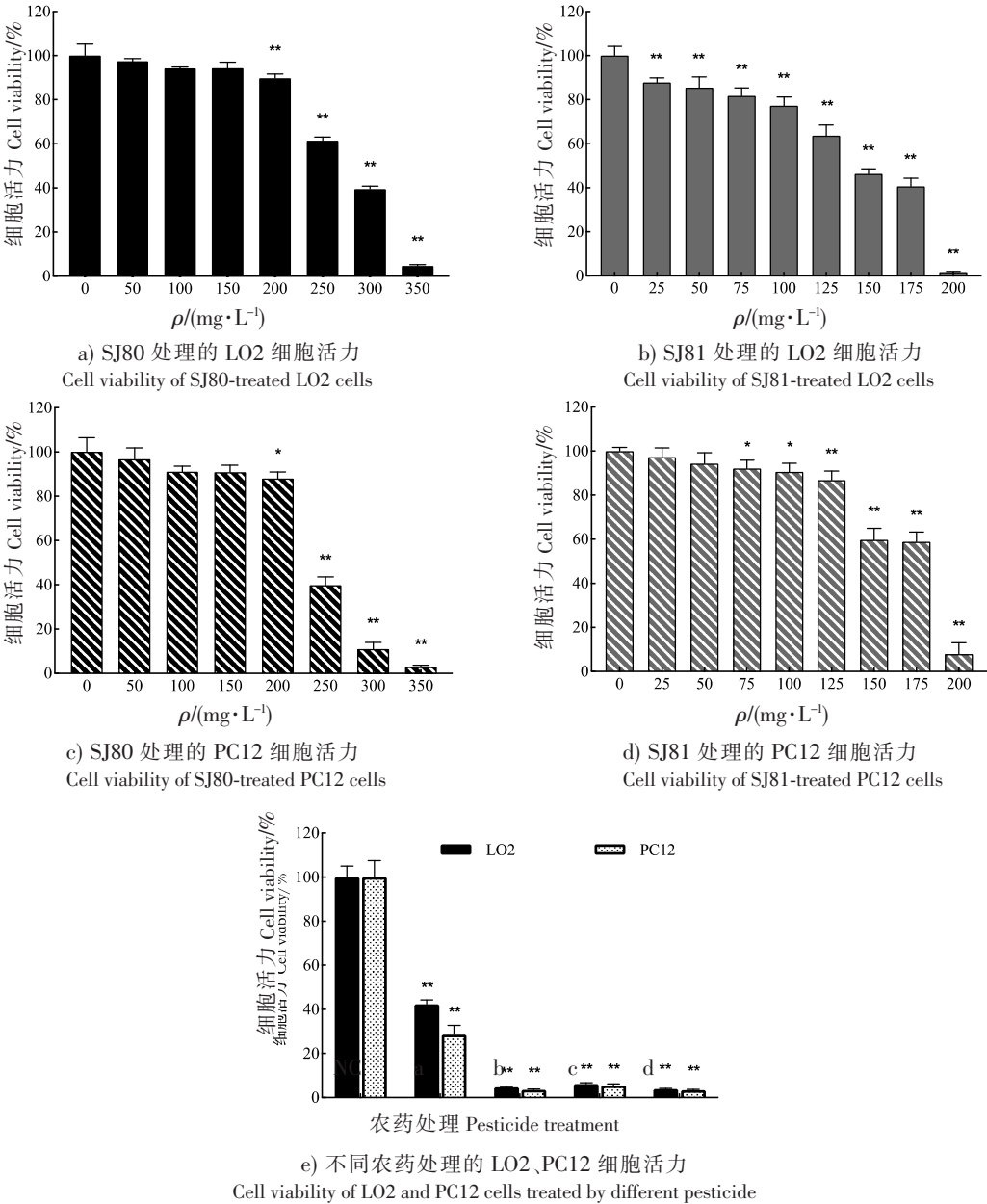
图 6 2 株拮抗菌发酵上清液经不同浓度蛋白酶处理的抑菌率

Fig.6 Inhibition rate of two antagonistic fermentation supernatants at different concentration of protease

2.7 体外急性细胞毒性试验

由于拮抗菌发酵产生大量代谢产物, 抑菌活性物质与毒素物质共同存在, 若作为生防菌剂作用于农田, 喷洒过程会在农作物上有些许残留, 有直接入口的风险, 因此, 需要通过 MTT 实验确定其体外急性细胞毒性作用。如图 7 所示, 随着样品浓度增加, LO2、PC12 细胞活力逐渐降低。对于 LO2 细胞, 样品质量浓度在 200 mg/L 时, 细胞活力达到 80% 以上, 在 300 mg/L 时, 细胞活力低于 50% (见图 7a); 样品质量浓度为 75 mg/L 时, 细胞活力在 80% 以上, 在 150 mg/L 时, 细胞活力低于 50% (见图 7b)。对于 PC12 细胞, 样品质量浓度为 200 mg/L 时, 细胞活力仍在 80% 以上, 在 250 mg/L 时, 细胞活力明显下降, 只有 39.84% (见图 7c); 样品浓度在 125 mg/L 时, 细胞活力在 80% 以上, 在 150 mg/L 和 175 mg/L 时, 细胞活力也处于较高水平, 分别达到 59.74%, 58.89%, 在 200 mg/L 时, 细胞活力才显

著降低至 7.98% (见图 7d)。对于 SJ80, LO2、PC12 2 种细胞中其  $IC_{50}$  分别为 239, 266 mg/L; 对于 SJ81, LO2、PC12 2 种细胞中其  $IC_{50}$  分别为 137, 161.3 mg/L, 因此可知 SJ81 毒性比 SJ80 强, 可能是由于 SJ81 发酵产生的毒素物质较多的缘故。4 组农药对应的细胞活力均低于 50%, 其中咯菌腈在 16.7 mg/L 时对 LO2 细胞活力为 42.32%, 对 PC12 细胞活力为 28.52%, 其余各浓度对 2 种细胞的细胞活力均在 10% 以下, 细胞几乎全部死亡, 与对照组有极显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 与 SJ80、SJ81 粗提物相比表现出较大杀伤力, 体现了拮抗菌生物防治的安全性 (见图 7e)。



**\*\* $P < 0.01$**  是与对照组比较;a—咯菌腈 16.7 mg/L;b—咯菌腈 167 mg/L;c—辛菌胺醋酸盐 36 mg/L;d—辛菌胺醋酸盐 180 mg/L

**\*\* $P < 0.01$**  was compared with the control group;a—fluronitrile 16.7 mg/L;b—fluronitrile 167 mg/L;c—octylamine acetate 36 mg/L;d—octylamine acetate 180 mg/L

图 7 不同浓度 2 株拮抗菌发酵上清液乙酸乙酯粗提物与 2 种农药对细胞活力的影响

Fig.7 Effects of ethyl acetate crude extract of two antagonistic bacteria fermentation broth and two pesticides on cell viability

## 2.8 农药对比实验

为了比较拮抗菌粗提物与农药的抑菌活性, 选择节 2.7 中细胞活力在 80% 以上的作用浓度与农药进行对比, 结果如图 8 所示。可见, 以抑菌效果最强的 167 mg/L 咯菌腈为抑菌率 100% 的对照组, 其推荐使用浓度 (16.7 mg/L) 的抑菌率为 25.46%; 辛菌胺醋酸盐在高浓度下的抑菌率为 37.46%, 在推荐使用浓度 (36 mg/L) 下的抑菌率为 0。通过线性拟合, 得到 SJ80 和 SJ81 粗提物的抑菌率方程分别为  $Y = 0.2157X + 22.75$  和  $Y = 0.1763X + 25.45$ 。SJ80 和 SJ81 粗提物在质量浓度为 16.7 mg/L 时的抑菌率分别为 26.35%, 28.39%, 均强于咯菌腈的抑菌效果, 在质量浓度为 36 mg/L 时的抑菌率分别为 30.52%, 31.8%, 均强于辛菌胺醋酸盐的抑菌效果。因此, 在推荐使用浓度下, 2 株拮抗菌的抑菌效果均强于 2 种农药, 突出了 SJ80、SJ81 拮抗菌的作用优势。

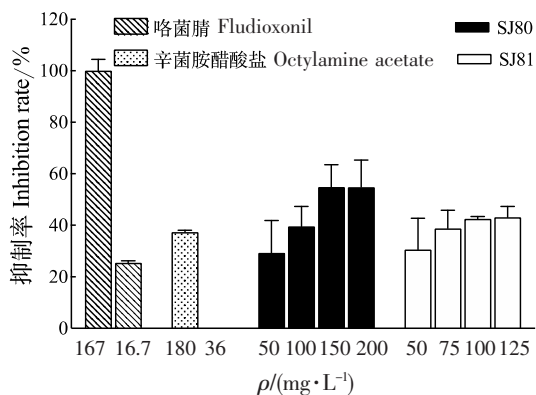


图 8 不同样品处理后的抑菌率

Fig.8 Inhibition rate of the different treatment

## 3 讨论

本研究旨在对比 2 种农药与 2 株甲基营养型芽孢杆菌对疮痂链霉菌的抑菌效果。甲基营养型芽孢杆菌与农药相比, 具有较好的抑菌效果, 且相同浓度下有较低的细胞毒性。由于农药残留, 人们长期、低剂量地摄入农药, 在体内积累的农药不仅会造成慢性损伤, 而且有一定的神经毒性与肝脏毒性。苟练等<sup>[32]</sup>发现, 低剂量与高剂量农药均可导致 PC12 细胞 DNA 损伤, 诱导细胞凋亡; 陈洁等<sup>[33]</sup>阐述了不同农药导致细胞凋亡的不同途径, 具体机制还需进一步探究。我国已经意识到农药与化肥对生态系统的严重破坏造成的粮食安全问题, 在 2015 年制定了《到 2020 年化肥使用量零增长行动方案》和《到 2020 年农药使用量零增长行动方案》<sup>[34]</sup>, 大力推进农药减量控害。

生防菌剂一般要具有强稳定性, 耐高温性、耐酸碱性、耐紫外照射都是重要指标。若作为生防菌剂代替农药施用于田间, 耐高温特性是重要的指标。2 株拮抗菌发酵上清液在 121 °C 高温处理 30 min 仍对疮痂链霉菌有 90% 以上的抑菌效果, 说明其活性物质高温下不易失活, 有很好的耐热性; 2 株菌在 24 h 紫外连续照射后仍有较强抑菌活性, 说明抑菌活性物质强光下不易被分解; 在 pH 值呈中性或弱碱性时, 2 株拮抗菌抑菌活性稳定, 在强酸性条件下仍有活性, 表明其耐酸性较强, 说明其在农田中可能对土地的酸碱性有很好的适应性; 抑菌活性物质不易被蛋白酶酶解, 是较稳定的生防菌剂。许多研究发现, 芽孢杆菌可以产生多种抑菌活性物质, 其中能够有效抑制植物病害的代谢产物有环状脂肽、聚酮化合物、杆菌素和核糖体合成的抗菌肽等几类物质; 已经鉴定得到的环状脂肽类物质主要有脂肽 (Surfactin)<sup>[35]</sup>、伊枯草素 (iturin)<sup>[36]</sup>、丰霉素 (fengycin)、多粘菌素 (polymyxin)<sup>[37]</sup>、镰刀菌素 (fusaricidin) 等, 聚酮化合物主要有巨乳素 (macrolactin)、地非西丁 (difficidin) 等, 其中脂肽的存在最广泛<sup>[38-39]</sup>。Huang 等<sup>[15]</sup>研究发现, 一些芽孢杆菌存在脂肽类抗生素的合成基因, 可分泌大量抗生素, 有广谱抑菌效果, 且发酵上清液理化性质较稳定。因此, 本文所用的 2 株甲基营养型芽孢杆菌可能也是通过产生天然抗菌物质来抑制马铃薯疮痂病的病原菌, 但具体还需进一步深入研究。

甲基营养型芽孢杆菌针对马铃薯疮痂病的研究较少, 2019 年首次报道了一株甲基营养型芽孢杆菌对内蒙古马铃薯疮痂病有抑菌效果<sup>[40]</sup>, 但未明确其有效成分和抑菌机制。本研究发现 SJ80 与 SJ81 能有效抑制马铃薯疮痂病, 体外急性细胞毒性比市售农药小, 而且具有稳定的理化性质, 有用于马铃薯疮痂病生物防治的潜力。为进一步探索其抑菌机理, 后续将对发酵上清液粗提物分离纯化、活性鉴定等进行深入研究, 为疮痂病研究提供新的方向, 也为更好地将其应用于农业生产提供理论依据。



## [ 参考文献 ]

- [1] LOCCI R. Actinomycetes as plant pathogens [J]. European Journal of Plant Pathology, 1994, 100(3/4): 179-200. DOI:10.1007/BF01876235.
- [2] KEINATH A P. Population dynamics of *Streptomyces scabies* and other actinomycetes as related to common scab of potato [J]. Phytopathology, 1989, 79(6): 681. DOI:10.1094/Phyto-79-681.
- [3] 张良, 程林润, 卞晓波, 等. 中国马铃薯疮痂病的研究与防控 [J]. 浙江农业科学, 2019, 60(10): 1778-1781.
- [4] 邢莹莹, 金光辉. 黑龙江省部分地区马铃薯疮痂病病原鉴定及主栽品种的抗性评价 [D]. 密山: 黑龙江八一农垦大学, 2015.
- [5] 吕娟娟. 甘谷县马铃薯窖藏病害的调查 [J]. 农业科技与信息, 2020(6): 52-55.
- [6] 李飞, 曹贞菊, 陈明俊, 等. 贵州省马铃薯疮痂病抗性品种初筛 [J]. 种子, 2020, 39(3): 72-75.
- [7] 李智媛. 黑龙江省马铃薯疮痂病综合防控技术 [J]. 黑龙江农业科学, 2019(9): 156-157.
- [8] 孙庚, 李志念, 颜克成, 等. 应用于马铃薯疮痂病防治药剂筛选的改良方法研究 [J]. 农药, 2020, 59(4): 303-305.
- [9] 赵玲, 滕应, 骆永明. 中国农田土壤农药污染现状和防控对策 [J]. 土壤, 2017, 49(3): 417-427.
- [10] ZACHOW C, JAHANSHAH G, DE BRUIJN I, et al. The novel lipopeptide poaeamide of the endophyte *Pseudomonas poae* RE \* 1-1-14 is involved in pathogen suppression and root colonization [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2015, 28(7): 800-810. DOI:10.1094/MPMI-12-14-0406-R.
- [11] LECOMTE C, ALABOUVETTE C, EDEL-HERMANN V, et al. Biological control of ornamental plant diseases caused by *Fusarium oxysporum*; a review [J]. Biological Control, 2016, 101: 17-30. DOI:10.1016/j.biocontrol.2016.06.004.
- [12] SEIBER J N, COATS J, DUKE S O, et al. Biopesticides: state of the art and future opportunities [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(48): 11613-11619. DOI:10.1021/jf504252n.
- [13] 冉平, 王玉娟, 李继明, 等. 生物源农药对马铃薯产量及病害防效的影响 [J]. 中国马铃薯, 2020, 34(2): 114-120.
- [14] KIM Y G, KANG H K, KWON K D, et al. Antagonistic activities of novel peptides from *Bacillus amyloliquefaciens* PT14 against *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(48): 10380-10387. DOI:10.1021/acs.jafc.5b04068.
- [15] HUANG J, WEI Z, TAN S, et al. Suppression of bacterial wilt of tomato by bioorganic fertilizer made from the antibacterial compound producing strain *Bacillus amyloliquefaciens* HR62 [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(44): 10708-10716. DOI:10.1021/jf503136a.
- [16] WU Y, ZHOU L, LU F, et al. Discovery of a novel antimicrobial lipopeptide, brevibacillin V, from *Brevibacillus laterosporus* Fmb70 and its application on the preservation of skim milk [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(45): 12452-12460. DOI:10.1021/acs.jafc.9b04113.
- [17] ROBERTS K D, AZAD M A K, WANG J, et al. Antimicrobial activity and toxicity of the major lipopeptide components of polymyxin B and colistin: last-line antibiotics against multidrug-resistant gram-negative bacteria [J]. ACS Infectious Diseases, 2015, 1(11): 568-575. DOI:10.1021/acsinfecdis.5b00085.
- [18] KANG X, ZHANG W, CAI X, et al. *Bacillus velezensis* CC09: a potential 'vaccine' for controlling wheat diseases [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2018, 31(6): 623-632. DOI:10.1094/MPMI-09-17-0227-R.
- [19] MADHAIYAN M, POONGUZHALI S, KWON S W, et al. *Bacillus methylotrophicus* sp. nov., a methanol-utilizing, plant-growth-promoting bacterium isolated from rice rhizosphere soil [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60(10): 2490-2495. DOI:10.1099/ijs.0.015487-0.
- [20] 康兴娇, 申红妙, 贾招闪, 等. 葡萄霜霉病生防菌甲基营养型芽孢杆菌 T3 的鉴定及其防治效果 [J]. 中国生物防治学报, 2016, 32(6): 775-782.
- [21] 魏新燕, 黄媛媛, 黄亚丽, 等. 甲基营养型芽孢杆菌 BH21 对葡萄灰霉病菌的拮抗作用 [J]. 中国农业科学, 2018, 51(5): 883-892.

- [22] 吕倩, 胡江春, 王楠, 等. 南海深海甲基营养型芽孢杆菌 SHB114 抗真菌脂肽活性产物的研究 [J]. 中国生物防治学报, 2014, 30(1): 113-120.
- [23] 蒋妮, 宋利沙, 蒋水元, 等. 内生甲基营养型芽孢杆菌对罗汉果斑枯病的拮抗作用 [J]. 西南农业学报, 2020, 33(1): 77-84.
- [24] 采俊香, 李月梅. 抱茎苦蕒菜内生甲基营养型芽孢杆菌 G-5 抗菌蛋白抗真菌特性研究 [J]. 中国植保导刊, 2017, 37(4): 20-26.
- [25] 殷晓敏, 吴琼, 金志强. 甲基营养型芽孢杆菌对西瓜枯萎病菌拮抗作用的研究 [J]. 热带农业科学, 2017, 37(11): 54-60.
- [26] 张可可, 席宇, 吴少雄, 等. 甲基营养型芽孢杆菌的分离鉴定及其广谱抗菌性能初步研究 [J]. 中国调味品, 2019, 44(10): 31-34, 45.
- [27] LIANG F, LIN R, YAO Y, et al. Systematic identification of pathogenic *Streptomyces* sp. AMCC400023 that causes common scab and genomic analysis of its pathogenicity island [J]. Phytopathology, 2019, 109(7): 1115-1128. DOI: 10.1094/PHYTO-07-18-0266-R.
- [28] 李玉聪, 李滨影, 油心怡, 等. 马铃薯疮痂病拮抗菌的筛选鉴定及防治效果初探 [J]. 生物技术通报, 2018, 34(10): 116-121.
- [29] 王丽波, 徐雅琴, 肖振平, 等. 南瓜籽蛋白 Pw-1 的抑菌活性和稳定性研究 [J]. 中国食品学报, 2016, 16(12): 193-197.
- [30] 徐梁, 王永星, 李勇, 等. 辛菌胺在土传病害防控领域的创新性技术开发及应用 [J]. 世界农药, 2020, 42(2): 42-44.
- [31] 肖宝平, 陈露, 曾珺, 等. 姜黄素提高 PC12 细胞的抗氧化能力 [J]. 食品科学, 2021, 42(1): 172-179.
- [32] 苟练, 廉楠, 王巧旭, 等. 有机磷及氨基甲酸酯类农药单独和联合作用对 PC<sub>12</sub> 细胞 DNA 损伤的影响 [J]. 生态毒理学报, 2017, 12(4): 202-209.
- [33] 陈洁, 张积仁. 农药致慢性细胞毒性及基因毒性机制研究进展 [J]. 生态毒理学报, 2017, 12(1): 82-88.
- [34] 张贵锋. 我国到 2020 年农药使用量零增长行动方案 [J]. 新农业, 2015(21): 31-35.
- [35] LEE S C, KIM S H, PARK I H, et al. Isolation and structural analysis of bamylocin A, novel lipopeptide from *Bacillus amyloliquefaciens* LP03 having antagonistic and crude oil-emulsifying activity [J]. Archives of Microbiology, 2007, 188(4): 307-312. DOI:10.1007/s00203-007-0250-9.
- [36] YU G Y, SINCLAIR J B, HARTMAN G L, et al. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing rhizoctonia solani [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2002, 34(7): 955-963. DOI:10.1016/S0038-0717(02)00027-5.
- [37] NIU B, VATER J, RUECKERT C, et al. Polymyxin P is the active principle in suppressing phytopathogenic *Erwinia* spp. by the biocontrol rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* M-1 [J]. BMC Microbiology, 2013, 13(1): 137. DOI: 10.1186/1471-2180-13-137.
- [38] BORRISS R. *Bacillus*, a plant-beneficial bacterium [C] //LUGTENBERG B. Principles of Plant-Microbe Interactions. Cham: Springer International Publishing, 2015: 379-391. DOI:10.1007/978-3-319-08575-3\_40.
- [39] ARGUELLES-ARIAS A, ONGENA M, HALIMI B, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens [J]. Microbial Cell Factories, 2009, 8(1): 63. DOI:10.1186/1475-2859-8-63.
- [40] 梁燕, 张笑宇. 马铃薯疮痂病生防菌筛选及其生防机制的初步研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2019.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)