

刘小玉,付登强,刘立云,等. 解淀粉芽孢杆菌 ck-05 发酵液的抑菌活性[J]. 江苏农业科学,2021,49(4):78-81.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.04.015

解淀粉芽孢杆菌 ck-05 发酵液的抑菌活性

刘小玉,付登强,刘立云,齐 兰

(中国热带农业科学院椰子研究所/海南省槟榔产业工程研究中心,海南文昌 571339)

摘要:对解淀粉芽孢杆菌 ck-05 菌株发酵液中生物活性物质的抑菌作用及稳定性进行初步研究。采用菌丝生长速率法测定菌株 ck-05 发酵液对 11 种病原菌的抑菌作用。结果表明,ck-05 菌株发酵液对供试植物病原菌均具有较强的抑菌作用,其中对香蕉枯萎病的抑制性最强,抑菌率达 82.22%。另外,以香蕉枯萎病为指示菌,测定不同条件下 ck-05 菌株发酵液的抑菌稳定性。结果表明,发酵液热稳定性较好;对酸碱性条件比较敏感,pH 值为 6~8 时具有较强的抑菌作用;紫外线和自然光照射下稳定性较好,对蛋白酶不敏感。

关键词:解淀粉芽孢杆菌 ck-05;抑菌活性;稳定性;生长速率法;香蕉枯萎病;发酵液

中图分类号:S182 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)04-0078-04

近年来,化肥的施用为作物产量的提高做出了突出贡献,但盲目过量施用化肥,造成部分地区植物土传病害日益加重^[1]。利用化学药剂防治植物病害会引起诸多副作用,生物防治逐渐成为农业生产中一种新的发展趋势。解淀粉芽孢杆菌具有广泛抗菌能力,属革兰氏阳性芽孢杆菌。有研究表明,解淀粉芽孢杆菌通过产生吡啶-3-乙酸(IAA),分泌葡聚糖酶、几丁质酶以及抗菌活性物质,达到防治植物病害的目的^[2-3]。笔者所在课题组在前期工作中获得解淀粉芽孢杆菌菌株 ck-05,为进一步将该菌株应用到实际生产中,对该菌株发酵液的抑菌活性及不同条件下的稳定性进行研究,

旨在为将该菌株开发为生物农药提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验时间及地点

试验于 2019 年在海南省文昌市文清大道 496 号椰子研究所实验室(19°33'12"N,110°47'14"E)开展。

1.2 供试菌株及培养基^[4]

解淀粉芽孢杆菌 ck-05 和 11 种病原菌(槟榔炭疽病、椰子茎腐病、菜心炭疽病、油茶炭疽病、油棕心腐病、椰子灰斑病、板栗疫病、香蕉枯萎病、油茶炭疽病、槟榔心腐病、花生果腐病)均由中国热带农业科学院椰子研究所实验室保藏。

LB(Luria-Bertani)培养基:5 g 酵母粉,10 g NaCl,10 g 蛋白胨,18~20 g 琼脂,1 L 水,pH 值为 7.0~7.2。

马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基:200 g 土豆,20 g 葡萄糖,18~20 g 琼脂,1 L 水。

发酵培养基:20 g 葡萄糖,20 g 蛋白胨,0.8 g 无

收稿日期:2020-06-09

基金项目:海南省重大科技项目(编号:ZDKJ201817-3-5);“一带一路”热带项目(编号:BARTP-06)。

作者简介:刘小玉(1986—),女,江西九江人,硕士,助理研究员,主要从事土壤微生物方面的研究。E-mail:liuxiaoyu06120210@163.com。

resistance against *Ralstonia solanacearum* is associated with modification of soil microbial community structure and activity[J]. Biological Trace Element Research,2013,152(2):275-283.

[14]Slomberg D L,Schoenfisch M H. Silica nanoparticle phytotoxicity to *Arabidopsis thaliana*[J]. Environmental Science and Technology,2012,46(18):10247-10254.

[15]中国农药信息网. 农药登记数据[DB/OL]. [2020-12-01].
http://www.chinapesticide.org.cn/hysj/index.jhtml.

[16]Zhao P Y,Cao L D,Ma D K,et al. Translocation,distribution and degradation of prochloraz-loaded mesoporous silica nanoparticles in cucumber plants[J]. Nanoscale,2018,10(4):1798-1806.

[17]沈殿晶,张铭瑞,陈小军,等. 基于介孔二氧化硅的鱼藤酮纳米颗粒的制备及其性能研究[J]. 农药学报,2020,22(6):1061-1068.

[18]Chen H Y,Lin Y S,Zhou H J,et al. Synthesis and characterization of chlorpyrifos/copper(II) Schiff base mesoporous silica with pH sensitivity for pesticide sustained release[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2016,64(43):8095-8102.

[19]Chen H Y,Huang G Z,Zhou H J,et al. Highly efficient triazolone/metal ion/polydopamine/MCM-41 sustained release system with pH sensitivity for pesticide delivery[J]. Royal Society Open Science,2018,5(7):180658.

水氯化钙, 1.3 g K_2HPO_4 , 0.2 g $MgSO_4$, 0.8 g $MnSO_4 \cdot H_2O$, pH 为值 7.0~7.2。

1.3 无菌发酵液的制备^[5]

将活化的菌株 ck-05 接入 LB 液体培养基中, 30 ℃、200 r/min 摇床培养 24 h ($D_{600\text{ nm}} > 0.8$) 为种子液。将种子液分别按体积分数 5% 接入灭好菌的发酵培养基中, 30 ℃ 发酵培养 48 h。发酵液 10 000 r/min 离心 20 min, 上清液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 得到菌株 ck-05 无菌发酵液。

1.4 ck-05 发酵液抑菌谱的测定

将 10 mL ck-05 菌株发酵液与 90 mL PDA 培养基混合均匀, 制成含菌株 ck-05 无菌发酵液的培养基平板。分别在平板中央接入 11 种不同的供试病原菌菌块(5 mm), 以 10 mL 无菌水为对照(CK)。置于 28 ℃ 的恒温培养箱中培养, 待对照组菌落长满培养皿时, 采用十字交叉法测量各处理组菌落直径, 并计算无菌滤液的抑菌率^[6-7]。

抑菌率 = (对照菌落生长直径 - 处理菌落生长直径) / 对照菌落生长直径 × 100%。

1.5 ck-05 发酵液的稳定性测定

1.5.1 热稳定性 在 40、60、80、100 ℃ 条件下, 分别将 ck-05 菌株发酵液处理 30、60、120 min 及 121 ℃ 灭菌 20 min^[8-9], 测定 ck-05 无菌发酵液对香蕉枯萎病的抑菌率, CK 为不作温度处理的发酵液。待观察并测量各处理组菌落直径, 并计算抑菌率, 计算方法同上。

1.5.2 酸碱稳定性 pH 值设为 1.0~13.0 等 13 个梯度, 用 HCl 和 NaOH 调整 ck-05 菌株无菌发酵液的 pH 值, 静置 24 h 后调回发酵液原始 pH 值(pH 值 = 7.2), 测定 ck-05 无菌发酵液对香蕉枯萎病的抑菌率^[9]。

1.5.3 紫外线稳定性 将 ck-05 菌株发酵液置于距离 30 W 紫外灯 30 cm 处, 紫外线照射时间分别设为 10、20、30、40、50、60 min 等不同处理, 测定 ck-05 无菌发酵液对香蕉枯萎病的抑菌率^[10]。

1.5.4 光照稳定性 将 ck-05 菌株无菌发酵液在自然光下照射 4、8、12、16、20、24 h, 测定 ck-05 无菌发酵液对香蕉枯萎病的抑菌率^[10-11]。

1.5.5 酶稳定性 酶的终质量浓度为 50 mg/L, 温度设为 37 ℃。用胃蛋白酶、蛋白酶 K 和胰蛋白酶处理 ck-05 菌株发酵液, 分别处理 0.5、1.0、1.5、2.0 h, 测定 ck-05 无菌发酵液对香蕉枯萎病的抑菌率, 得出蛋白酶耐受性^[10,12]。

2 结果与分析

2.1 ck-05 菌株无菌发酵液的抑菌谱测定

由表 1 可知, ck-05 菌株发酵液除对菜心炭疽病病菌的抑菌作用为 43.47% 外, 对其他 10 种供试病原菌的抑菌率均达到 50% 以上, 发酵液对香蕉枯萎病的抑制作用最强, 抑菌率达 82.22%, 其次为花生果腐病病菌和椰子茎腐病病菌, 抑菌率分别为 79.44% 和 78.89%。由此可见, ck-05 菌株发酵液抗菌范围较广。

表 1 ck-05 菌株发酵液的抑菌谱

| 病原菌名称 | 处理菌落直径 (mm) | 对照菌落直径 (mm) | 抑菌率 (%) |
|---------|----------------|----------------|--------------|
| 椰子茎腐病病菌 | 19.0 ± 1.15 | 90.00 ± 0.00 | 78.89 ± 1.28 |
| 油茶叶斑病病菌 | 27.0 ± 2.58 | 90.00 ± 0.00 | 70.00 ± 2.87 |
| 香蕉枯萎病病菌 | 16.0 ± 0.82 | 90.00 ± 0.00 | 82.22 ± 0.91 |
| 油茶炭疽病病菌 | 28.5 ± 2.52 | 63.75 ± 1.50 | 55.32 ± 3.42 |
| 槟榔炭疽病病菌 | 25.0 ± 1.15 | 90.00 ± 0.00 | 72.22 ± 1.28 |
| 椰子灰斑病病菌 | 25.0 ± 1.15 | 90.00 ± 0.00 | 72.22 ± 1.28 |
| 槟榔心腐病病菌 | 22.5 ± 2.52 | 90.00 ± 0.00 | 75.00 ± 2.80 |
| 油棕心腐病病菌 | 18.0 ± 1.63 | 90.00 ± 0.00 | 74.29 ± 2.33 |
| 板栗疫病病菌 | 37.5 ± 2.52 | 90.00 ± 0.00 | 53.16 ± 3.15 |
| 花生果腐病病菌 | 18.5 ± 1.00 | 90.00 ± 0.00 | 79.44 ± 1.11 |
| 菜心炭疽病病菌 | 34.5 ± 3.00 | 61.00 ± 1.15 | 43.47 ± 4.45 |

2.2 ck-05 菌株发酵液的热稳定性

以香蕉枯萎病病菌为指示菌, 由图 1 可知, 经过不同温度处理后, ck-05 菌株发酵液仍具有较强的抑菌作用, 热稳定性较好。40、60、80 ℃ 处理不同时间后抑菌作用无明显变化, 但温度高于 80 ℃ 处理后发酵液抑菌活性明显下降, 100 ℃ 高温处理 120 min 后发酵液抑菌率为 31.48%, 经 121 ℃ 高压蒸汽灭菌后发酵液抑菌率仅为 19.26%。当温度达到 100 ℃ 后, ck-05 菌株发酵液的抑菌率明显降低, 这可能是由于高温能够使其抑菌活性物质结构发生变化, 导致活性物质变性失活, 最终使发酵液抑菌活性下降。

2.3 ck-05 菌株发酵液的酸碱稳定性

由图 2 可知, ck-05 菌株发酵液的抑菌活性对 pH 值较敏感。pH 值为 7 时, 其发酵液抑菌活性最大, pH 值为 5 时, 抑菌率为 44.44%; pH 值为 3 时, 抑菌率为 27.41%, pH 值为 1 时, 抑菌率仅为 10.00%, 与对照组 CK 相比分别下降 34.43%、59.56%、85.25%, pH 值为 9 时, 抑菌率为 50.00%、

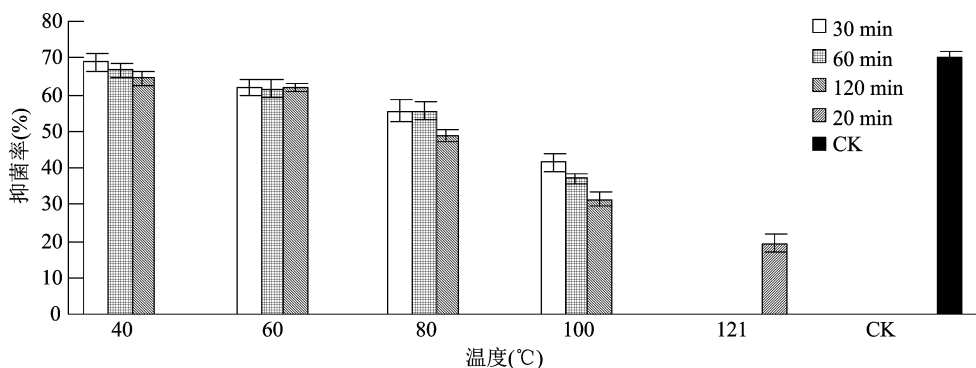


图1 ck-05 菌株发酵液的热稳定性

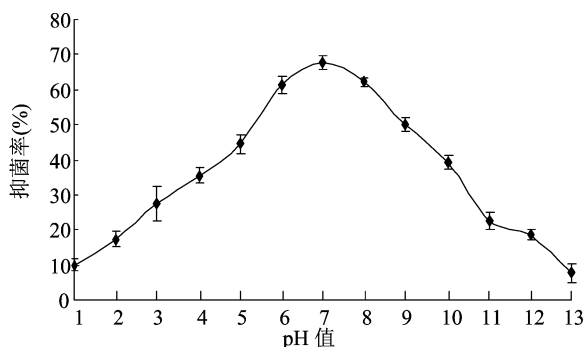


图2 ck-05 菌株发酵液的酸碱稳定性

pH 值为 11 时,抑菌率为 22.59%;pH 值为 13 时,抑菌率仅为 7.78%,与对照 CK 相比分别下降 26.23%、66.67%、88.52%。

2.4 ck-05 菌株发酵液的紫外线照射稳定性

紫外线照射稳定性是抑菌活性物质开发药品、食品防腐剂的重要指标,若紫外稳定性差将会降低药效^[13]。由图 3 可知,与对照 CK 相比,经紫外线照射 30 min 内,ck-05 菌株发酵液抑菌率下降较小;40 min 后随着紫外线照射时间不断延长,抑菌活性明显降低,但紫外线照射 60 min 时其抑菌率仍在 40% 以上。由此可知,ck-05 菌株发酵液的抑菌活性受紫外线照射的影响较小,该结果与葛平华等的报道^[8]一致。

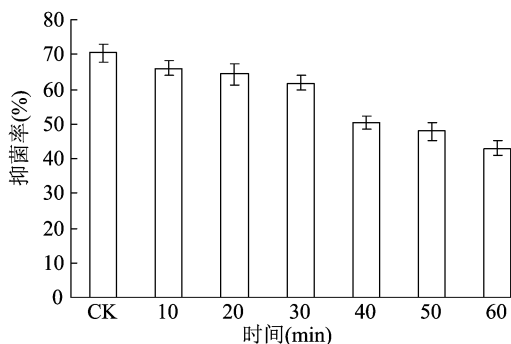


图3 ck-05 菌株发酵液的紫外线照射稳定性

2.5 ck-05 菌株发酵液的自然光照稳定性

由图 4 可知,ck-05 菌株发酵液在自然光照射 0~24 h 后,其抑菌活性均无明显变化。当持续光照 24 h 后,ck-05 菌株发酵液仍具有较强的抑菌活性,抑菌率为 64.81%,与 CK 相比,其抑菌率变化不明显,由此可见,ck-05 菌株发酵液的抑菌活性受自然光照的影响较小。

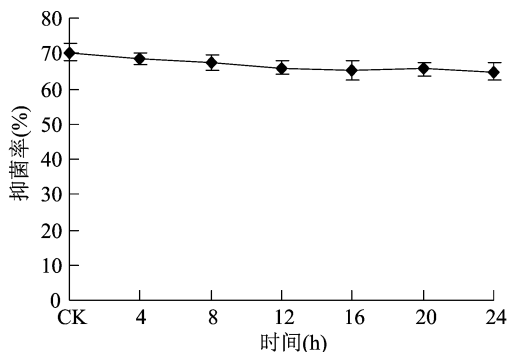


图4 ck-05 菌株发酵液的自然光照稳定性

2.6 ck-05 菌株发酵液的蛋白酶稳定性

由图 5 可知,不同蛋白酶对 ck-05 菌株发酵液的抑菌活性影响不明显,说明其发酵液的抑菌作用对 3 种供试蛋白酶均不敏感。

3 讨论与结论

李杨等研究结果表明,解淀粉芽孢杆菌 ZJ01 对苹果轮纹病病菌有较强的抑制作用^[14]。王晓辉等认为解淀粉芽孢杆菌 K1 发酵液可有效抑制灰霉病病菌的生长^[15]。Caldeira 等认为,菌株 CCM1051 能较强烈地抑制哈茨木霉及根霉生长,抑菌作用分别为 74.7%、99.8%^[16]。张宝俊等从解淀粉芽孢杆菌 LP-5 中获得 1 种对梨黑斑病病菌具有较强抑制作用的抗菌蛋白^[17]。Eva Arrebola 等研究表明,菌株 PPCB004 能有效抑制青霉属真菌的菌丝生长,其中对壳青霉菌的抑菌率达 73.3%^[18]。解淀粉芽孢杆

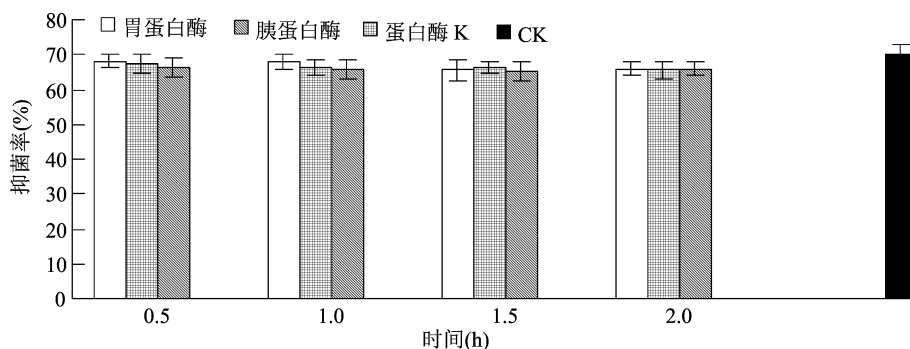


图5 ck-05 菌株发酵液的蛋白酶稳定性

菌的抑菌机制表现在不同的方面,不同的菌株其抑菌机制可能不同,但主要是产生抑菌活性物质。抑菌活性物质主要有甜蛋白、抗生素肽类物质、伊枯草菌素、芬枯草菌素、表面活性素、几丁质酶、芽孢素类和细菌素等^[19]。本研究发现,解淀粉芽孢杆菌 ck-05 发酵液对 11 种供试植物病原菌的菌丝生长均具有较强的抑制作用,尤其是对香蕉枯萎病的抑菌作用最强,抑制率达 82.22%。以香蕉枯萎病病菌为指示菌,ck-05 菌株发酵液在温度低于 80 ℃ 时具有较好的热稳定性;对酸碱性条件比较敏感, pH 值为 6~8 时具有较强的抑菌作用;紫外线和自然光照射下稳定性较好,对蛋白酶不敏感。该菌株发挥抑菌作用的具体活性物质及抑菌机制还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 李洪连,黄俊丽,袁红霞. 有机改良剂在防治植物土传病害中的应用[J]. 植物病理学报,2002,32(4):289-295.
- [2] Chen X H, Vater J, Piel J, et al. Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 [J]. Journal of bacteriology, 2006, 188 (11):4024-4036.
- [3] 李统华,冯中红,杨成德. 高寒草甸牧草内生解淀粉芽孢杆菌 216MY6 发酵工艺优化[J]. 草地学报,2019,27(2):503-509.
- [4] 张玲玲. 具有抑菌活性土壤拮抗放线菌 C3-11 菌株的筛选研究 [D]. 贵阳:贵州大学,2010.
- [5] 贾淑颖,郝再彬,陈圣怡,等. 苏云金芽孢杆菌发酵上清液抑菌谱及稳定性[J]. 食品与生物技术学报,2018,37(6):661-665.
- [6] 张丰. 毛壳菌 *Chaetomium* spp. 分离、筛选及生防机制初步研究 [D]. 泰安:山东农业大学,2013.
- [7] 赵颖. 张家口地区谷子赤霉病病情调查、病原鉴定及药剂筛选 [D]. 张家口:河北北方学院,2018.
- [8] 葛平华,马桂珍,付泓润,等. 海洋解淀粉芽孢杆菌 GM-1 菌株发酵液抗菌谱及稳定性测定[J]. 农药,2012,51(10):730-732,741.
- [9] 王琦,汪晶晶,顾春霞,等. 两株抗菌海洋细菌对白色念珠菌的抗菌作用稳定性研究[J]. 药物生物技术,2016,23(3):226-230.
- [10] 葛平华. 海洋颤藻菌的筛选及其对核盘菌抑制作用的研究 [D]. 南京:南京农业大学,2013.
- [11] 吴庆菊,曾会才,弓淑芬. 放线菌 WZ162 菌株发酵液抗香蕉枯萎病菌稳定性研究[J]. 广西农业科学,2009,40(4):366-369.
- [12] 王慧萍. 拮抗性芽孢杆菌 F53 抑制茄子黄萎病菌 *Verticillium dahliae* 的研究 [D]. 南京:南京师范大学,2005.
- [13] 房耀维,王淑军,刘姝,等. 一株海洋专性放线菌的分类鉴定及其抑菌活性[J]. 农药,2014,53(2):136-139.
- [14] 李杨,陈东玫,杨凤秋,等. 解淀粉芽孢杆菌 ZJ01 对苹果轮纹病菌抑制作用[J]. 河北果树,2019(4):4-6.
- [15] 王晓辉,王贵鹏,张庆芳,等. 一株抗灰霉病解淀粉芽孢杆菌的筛选鉴定及抑菌蛋白的分离[J]. 吉林农业科学,2015,40(1):64-67.
- [16] Caldeira A T, Feio S S, Arteiro J M S, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* CCM1051 *in vitro* activity against wood contaminant fungi[J]. Annals of Microbiology,2007,57:29-33.
- [17] 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.
- [18] Arrebola E, Sivakumar D, Korsten L. Effect of volatile compounds produced by *Bacillus* strains on postharvest decay in citrus [J]. Biological Control,2010,53(1):122-128.
- [19] Romano A, Vitullo D, di Pietro A, et al. Antifungal lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* strain B07 [J]. Journal of Natural Products,2011,74(2):145-151.