

张凤杰, 金玮璠, 张晓蒙, 等. 生防菌解淀粉芽孢杆菌 B15 发酵液抗菌谱及安全性测试[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(5): 102-106.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.05.018

# 生防菌解淀粉芽孢杆菌 B15 发酵液抗菌谱及安全性测试

张凤杰<sup>1</sup>, 金玮璠<sup>1</sup>, 张晓蒙<sup>1</sup>, 于佳俊<sup>1</sup>, 邹理<sup>2</sup>, 孙宝胜<sup>2</sup>, 闫寅卓<sup>1</sup>, 薛洁<sup>1</sup>

(1. 中国食品发酵工业研究院有限公司, 北京 100015; 2. 北京利农富民葡萄种植专业合作社, 北京 101501)

**摘要:**解淀粉芽孢杆菌 B15 是来源于酿酒葡萄表面的生防菌, 通过研究该菌株发酵液对 23 种植物病原菌的抑制效果, 并以水稻为试验对象进行安全性测试。结果表明, 生防菌解淀粉芽孢杆菌 B15 的发酵稀释液(浓度为 10 CFU/mL)对 23 种植物病原菌的抑制率均在 50% 以上, 对香菇烂筒病、苹果腐烂病、棉花炭疽病、花生褐斑病和黄瓜枯萎病 5 种病原菌的抑制率在 90% 以上, 计算可得 EC<sub>50</sub> 的范围为 0.000 ~ 11.704 个/mL, 表明解淀粉芽孢杆菌 B15 具有广谱抗菌性。通过室内田间安全测试试验, 验证了该菌株对作物的安全性, 从而为该菌株生物农药的开发与应用提供数据支持。

**关键词:**解淀粉芽孢杆菌; 植物病原菌; 抑制率; 抗菌谱; 安全性测试

**中图分类号:** TQ458; S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)05-0102-05

笔者所在实验室在前期的研究中, 从酿酒葡萄表面筛选、鉴定发现 1 株具有明显抑制霉菌效果的解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*), 将其编号为 B15, 并对其抑菌活性成分和代谢机制进行研究<sup>[1-3]</sup>。解淀粉芽孢杆菌为学界公认的植物病原真菌的生防细菌, 能够产生脂肽类抑菌物质, 并且分裂繁殖速度快、对营养条件要求简单, 因而被广泛应用于植物疫病防治和果蔬保鲜中, 是经美国食品和药物管理局 (FDA) 安全认证的菌种, 也是国内农业农村部批准的生物农药使用菌种之一<sup>[4-6]</sup>。据统计, 以芽孢杆菌为基础的产品约占细菌生物防治剂产品的一半<sup>[7]</sup>。

目前, 国内研究者分离、研究并进行初步应用的解淀粉芽孢杆菌菌株有 YN-1 (来源于郑州果园)<sup>[8]</sup>、TB-2 (来源于茄科作物内生菌)<sup>[9-10]</sup>、PEBA20 (来源于杨树内生菌)<sup>[11-12]</sup>、HN-06 (来源于土壤)<sup>[13-14]</sup> 等, 发现解淀粉芽孢杆菌能够抑制苹果炭疽病、苹果轮纹病、苹果腐烂病、芹菜菌核病、香蕉轴腐病、桃褐腐病、烟草黑胫病、辣椒疫霉、番

茄灰霉等病原菌的生长, 并且应用芽孢杆菌处理在防病稳定性与化学农药的相容性等方面具有明显优势<sup>[15]</sup>。

本研究分析来源于酿酒葡萄表面的解淀粉芽孢杆菌 B15 的抗菌谱和安全性, 旨在为将该菌株作为生防菌开发生物农药提供研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

水稻品种为明恢 86、武育粳 3 号、沈农 265。

生防菌菌株解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*) B15 来源于酿酒葡萄表皮, 贮藏于国家级酒类品质与安全国际联合研究中心。23 种植物病原见表 1, 来源于中国农业科学院植物保护研究所农业部农药化学与应用技术重点开放实验室。

### 1.2 培养基

种子液活化培养基为营养肉汤 (NB), 病原菌活化培养基为马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA)。基础发酵培养基为改良 Landy 培养基, 配方如下: 30 g/L 葡萄糖, 14 g/L 谷氨酸钠, 0.5 g/L MgSO<sub>4</sub>, 0.5 g/L KCl, 1.0 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.15 mg/L FeSO<sub>4</sub>, 5.0 mg/L MnSO<sub>4</sub>, 0.16 mg/L CuSO<sub>4</sub>, pH 值为 7.0。

### 1.3 菌株 B15 发酵液的制备

将保存于 4 ℃ 的解淀粉芽孢杆菌 B15 接种到斜面上, 于 30 ℃ 培养 48 h, 再将其接种于 NB 培养基上, 于 37 ℃、120 r/min 振荡培养 24 h 后进行活

收稿日期: 2020-06-07

基金项目: 北京市科技计划 (编号: Z191100004019018); 北京市科技新星计划 (编号: z181100006218004)。

作者简介: 张凤杰 (1986—), 女, 山东诸城人, 硕士, 工程师, 主要从事食品生物技术研究。Tel: (010) 53218288; E-mail: zhangfengjie86@126.com。

通信作者: 薛洁, 博士, 教授级高级工程师, 主要从事食品生物技术研究。Tel: (010) 53218262; E-mail: lxxuejie@126.com。

表 1 病原名称信息

序号	病害名称	对应病原的拉丁名
1	香菇烂筒病	<i>Tichoderma harzianum</i>
2	苹果腐烂病	<i>Valsa ceratosperma</i>
3	棉花炭疽病	<i>Colletotrichum gossypii</i>
4	花生褐斑	<i>Cercospora arachidicola</i>
5	黄瓜枯萎病	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cucumebrium</i>
6	辣椒疫霉病	<i>Phytophthora capsici</i>
7	棉花枯萎病	<i>Fusarium oxysporum</i>
8	棉花立枯病	<i>Rhizoctonia solani</i>
9	稻瘟病	<i>Magnaporthe grisea</i>
10	苹果斑点落叶病	<i>Alternaria alternaria</i>
11	番茄早疫病	<i>Alternaria solani</i>
12	玉米穗腐病	<i>Fusarium moniliforme</i>
13	小麦赤霉病	<i>FusaHum graminearum</i>
14	黄瓜靶斑病	<i>Corynespora cassiicola</i>
15	苹果轮纹病	<i>Botryospuaeria berengeriana</i>
16	番茄晚疫病	<i>Phytophthora infestans</i>
17	猝倒病	<i>Pythium aphanidermatum</i>
18	水稻恶苗病	<i>Sarocladium oryzae</i>
19	黄瓜灰霉病	<i>Botrytis cinerea</i>
20	油菜菌核病	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
21	芦笋茎枯病	<i>Phoma asparagi</i>
22	水稻纹枯病	<i>Thanatephorus cucumeris</i>
23	柑橘蒂腐病	<i>Diplodia natalensis</i>

化扩培,得到种子液。将种子液按 4% 的接种量接种于改良 Landy 培养基中,于 30 ℃、180 r/min 条件振荡培养 50 h,得到发酵液,然后将发酵液于 8 000 r/min 离心 15 min,取上清液。

#### 1.4 抗菌谱的室内生测方法

1.4.1 植物病原菌的活化 用打孔器在实验室保存的 23 种植物病原菌平板上取 1 块菌板,置于 PDA 平板中央,放入培养箱中于 25 ℃ 进行培养,待病原菌即将铺满平板时取出,用封口膜封好后放入 4 ℃ 冰箱中备用。

1.4.2 发酵液的稀释 经测定,“1.3”节制备的发酵液的孢子数为  $1.9 \times 10^8$  个/mL,按梯度稀释为 7 个浓度(分别为 150.0、50.0、25.0、10.0、5.0、1.0、0.5 个/mL)的稀释液试验组,分别取 100  $\mu$ L 稀释液加入 60 mL PDA 培养基中,平均倒 3 个平板,以无菌水作为对照组(即不添加解淀粉芽孢杆菌 B15 菌液的 PDA 平板),备用。

1.4.3 菌丝生长速率的测定 参照 NY/T 1156.2—2006《农药室内生物测定试验准则 杀菌剂

第 2 部分:抑制病原真菌菌丝生长试验 平皿法》,将培养好的病原菌在无菌操作条件下用直径为 7 mm 的灭菌打孔器自菌落边缘切取菌苔(约 6 mm),将菌丝面向下接种在上述平板中央,25 ℃ 恒温培养,待空白对照平板中的菌落充分生长后,用十字交叉法测量各处理的菌落直径,计算抑制率,计算公式如下:

$$\text{菌落增长直径} = \text{菌落直径平均值} - \text{菌饼直径}; \quad (1)$$

$$\text{菌丝生长抑制率} = \frac{\text{对照菌落增长直径} - \text{处理菌落增长直径}}{\text{对照菌落增长直径}} \times 100\%。 \quad (2)$$

采用回归分析法对试验数据进行分析,以各处理浓度的对数值为横坐标、以菌丝生长抑制率换算成的概率值为纵坐标,求出回归方程和有效抑制浓度(EC<sub>50</sub>、EC<sub>90</sub>)。

#### 1.5 安全性测试方法

测试试验在中国农业科学院植物保护研究所温室内进行,浇透水后均匀撒播种子,温室白天温度为 28 ℃,夜间温度为 25 ℃,培育 1 周后进行施药。

测定“1.3”节制备的发酵液孢子数,按梯度稀释为 3 个浓度(150、50、10 个/mL)的稀释液试验组,以无菌水作为空白对照组,每个设浓度 3 个处理,每个处理设 10 株。采用 Spraying System 公司生产的气力喷头 Air Atom 喷雾,喷雾压力 0.2 MPa。

施药后 7 d 通过目测法观察各处理水稻的生长情况,观察水稻是否有变色、坏死、萎蔫等药害症状,从而判断不同浓度解淀粉芽孢杆菌发酵液对水稻苗的药害情况。

药害分级标准(分 5 级): - 表示无症状; + 表示新叶上有少量药斑; ++ 表示新叶上有较多药斑,但生长基本正常; +++ 表示新叶畸形扭曲且少量脱落,或花蕾少量脱落,或幼果上有明显药斑; ++++ 表示花蕾大量脱落,甚至新梢枯死,或花蕾大量脱落,或果实严重受害致畸、脱落。

测量各处理水稻的株高、根长和鲜质量,计算不同浓度菌株 B15 发酵液喷雾对水稻生长的影响。试验中的数据采用 DPS 统计软件处理,采用 Duncan's 法比较不同处理之间水稻株高、根长和鲜质量之间的差异显著性。相关公式如下:

株高(鲜质量、根长)抑制率 = (CK 水稻的株高、鲜质量、根长 - 处理组的株高、鲜质量、根长) /

CK 水稻的株高、鲜质量、根长  $\times 100\%$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 B15 发酵液抗菌谱的测定

部分室内生物活性测定试验结果见图 1, 其中第 1 个平板中的 CK 为空白对照, 不添加解淀粉芽孢杆菌 B15 发酵液, 其余各平板为不同稀释浓度的解淀粉芽孢杆菌 B15 菌液。试验结果表明, 病原菌在 CK 平板中的长势良好, 而在添加 B15 菌液平板

中的生长受到明显抑制, 生长直径与菌液浓度成反比。

以棉花枯萎病病菌为例, 生长 5 d 时, 测定不同浓度发酵液处理组的菌落增长直径, 从而计算抑制率(表 2), 按照“浓度 - 对数值”和“抑制率 - 概率值”进行直线回归分析(图 2), 计算得出,  $EC_{50}$  为 0.086 个/mL, 95% 置信限为 0.056 ~ 0.133 个/mL,  $EC_{90}$  为 24.29 个/mL, 95% 置信限为 19.54 ~ 30.20 个/mL。

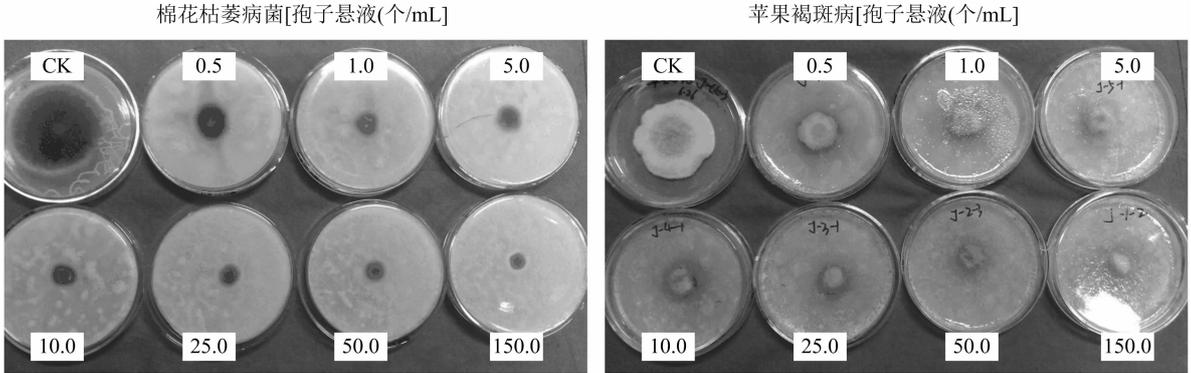


图1 棉花枯萎病菌和苹果褐斑病菌的室内生测试验

表2 解淀粉芽孢杆菌 B15 发酵液对棉花枯萎病病菌菌丝生长速率的抑制效果

药剂	浓度 (个/mL)	菌落增长直径 (mm)	菌丝生长抑制率 (%)	概率值
B15 发酵液	50.0	4.00	91.94	6.40
	25.0	4.83	90.26	6.30
	10.0	6.33	87.23	6.14
	1.0	14.33	71.10	5.56
	0.5	17.50	64.72	5.38
CK	0	49.60	—	—

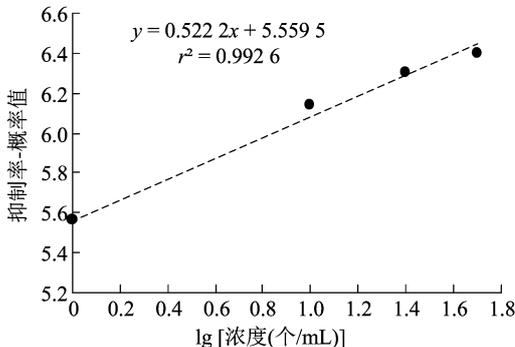


图2 解淀粉芽孢杆菌 B15 发酵液对棉花枯萎病病菌菌丝生长速率的抑制回归方程

采用“1.4”节的室内生测方法测定解淀粉芽孢杆菌 B15 发酵液的抗菌谱, 结果(表 3)表明, 该菌株

10 CFU/mL 稀释发酵液对供试 23 种植物病原真菌的抑制率达到 50% 以上, 其中对香菇烂筒病、苹果腐烂病、棉花炭疽病、花生褐斑病和黄瓜枯萎病 5 种病原真菌的抑制率在 90% 以上。由此可见, 解淀粉芽孢杆菌 B15 发酵液的抑菌范围较广。

### 2.2 安全性试验

喷雾处理后 7 d 通过目测法观察药害情况。由表 4 可以看出, 3 种水稻均生长正常, 叶色鲜绿, 无坏死斑, 叶缘无枯黄状, 且无药害产生。

测定每个水稻品种、每个处理(10 株水稻)的株高、根长和鲜质量。由表 5 可以看出, 各浓度解淀粉芽孢杆菌 B15 对明恢 86 株高的影响无论在 0.05 水平还是在 0.01 水平都没有显著差异, 而对武育粳 3 号品种水稻的影响有显著差异。

由表 6 可以看出, 各浓度的解淀粉芽孢杆菌 B15 对明恢 86、武育粳 3 号 2 个水稻品种的根长无论在 0.05 水平还是在 0.01 水平都没有显著影响。在对沈农 265 根长的影响方面, 各浓度与 CK 间在 0.01 水平上有显著差异, 而各浓度之间不具有显著差异。

由表 7 可以看出, 各浓度解淀粉芽孢杆菌 B15 对武育粳 3 号 2 个水稻品种鲜质量的影响无论在 0.05 水平还是在 0.01 水平都没有显著影响。而在对

表 3 解淀粉芽孢杆菌 B15 发酵液的抑菌谱和一致性效果

序号	病害名称	周期 (d)	抑制率 (%)	EC <sub>50</sub> (个/mL)	回归方程	r	EC <sub>50</sub> 的 95% 置信区间 (个/mL)
1	香菇烂筒	5	96.67	0.019	$y = 6.3134 + 0.7600x$	0.997	0.010 ~ 0.037
2	苹果腐烂病	6	95.82	0.127	$y = 5.7865 + 0.8763x$	0.984	0.000 ~ 0.000
3	棉花炭疽	6	94.61	0.012	$y = 6.337 + 0.6948x$	0.941	0.001 ~ 0.116
4	花生褐斑	6	90.69	0.008	$y = 5.8326 + 0.3974x$	0.972	0.001 ~ 0.061
5	黄瓜枯萎	6	90.57	0.000	$y = 6.1033 + 0.3028x$	0.949	0.000 ~ 0.007
6	辣椒疫霉	6	89.55	0.000	$y = 6.1762 + 0.2174x$	0.997	0.000 ~ 0.000
7	棉花枯萎	5	87.23	0.086	$y = 5.5565 + 0.5233x$	0.997	0.056 ~ 0.133
8	棉花立枯	5	86.41	0.000	$y = 5.8226 + 0.2335x$	0.993	0.000 ~ 0.001
9	稻瘟	6	86.27	0.002	$y = 5.7449 + 0.2823x$	0.966	0.000 ~ 0.029
10	苹果斑点落叶	5	84.94	0.000	$y = 5.8455 + 0.2305x$	0.980	0.000 ~ 0.002
11	番茄早疫	4	84.93	0.000	$y = 5.9377 + 0.0906x$	0.998	0.000 ~ 0.000
12	玉米穗腐	5	84.75	0.001	$y = 5.823 + 0.2769x$	0.975	0.000 ~ 0.008
13	小麦赤霉	4	84.64	0.001	$y = 5.7456 + 0.2471x$	0.987	0.000 ~ 0.005
14	黄瓜靶斑	4	84.00	0.003	$y = 5.7164 + 0.82756x$	0.997	0.001 ~ 0.006
15	苹果轮纹	6	83.60	0.029	$y = 5.6178 + 0.4005x$	0.983	0.007 ~ 0.121
16	番茄晚疫	5	79.32	0.007	$y = 5.5688 + 0.2625x$	0.997	0.004 ~ 0.012
17	猝倒	3	79.07	0.002	$y = 5.6236 + 0.2364x$	0.924	0.000 ~ 0.166
18	水稻恶苗	6	77.02	0.012	$y = 5.4945 + 0.2589x$	0.993	0.006 ~ 0.026
19	黄瓜灰霉	6	74.65	0.302	$y = 5.2061 + 0.3962x$	0.989	0.124 ~ 0.737
20	油菜菌核	3	69.48	0.280	$y = 5.1904 + 0.3441x$	0.972	0.125 ~ 0.628
21	芦笋茎枯	4	67.88	0.324	$y = 5.1893 + 0.3873x$	0.937	0.099 ~ 1.064
22	水稻纹枯	2	63.10	0.136	$y = 5.1918 + 0.2216x$	0.964	0.032 ~ 0.589
23	柑橘蒂腐	2	56.58	5.812	$y = 4.6407 + 0.4701x$	0.968	2.887 ~ 11.704

表 4 解淀粉芽孢杆菌 B15 发酵液对 3 种水稻的影响

解淀粉芽孢杆菌浓度 (CFU/mL)	施药后 7 d 的药害情况		
	明恢 63	武育梗 3 号	沈农 265
10	生长正常、叶色绿, 无药害	生长正常、叶色绿, 无药害	生长正常、叶色绿, 无药害
50	生长正常、叶色绿, 无药害	生长正常、叶色绿, 无药害	生长正常、叶色绿, 无药害
150	生长正常、叶色绿, 无药害	生长正常、叶色绿, 无药害	生长正常、叶色绿, 无药害

表 5 解淀粉芽孢杆菌 B15 发酵液喷雾对 3 种水稻株高的影响

浓度 (CFU/mL)	明恢 86		武育梗 3 号		沈农 265	
	平均株高 (mm)	抑制率 (%)	平均株高 (mm)	抑制率 (%)	平均株高 (mm)	抑制率 (%)
CK	216.9aA		200.2bB		262.8aA	
10	224.8aA	-3.66	242.5aA	-21.1	252.2abA	4.06
50	225.5aA	-4.00	185.5cBC	7.4	248.7abA	5.36
150	231.2aA	-6.59	181.3cC	9.5	244.2bA	7.09

注: 同列数据后标有不同小写字母、大写字母分别表示差异显著 ( $P < 0.05$ )、极显著 ( $P < 0.01$ )。下表同。

沈农 265 的水稻鲜质量方面, 50、150 CFU/mL 处理与 CK 在 0.05 水平上具有显著差异; 在 0.01 水平上, 各解淀粉芽孢杆菌 B15 浓度与 CK 及其他各浓度之间都没有显著差异。

### 3 讨论与结论

本研究以解淀粉芽孢杆菌 B15 为研究对象, 进行室内生物活性测定和安全性测定, 旨在为将该生

表 6 解淀粉芽孢杆菌 B15 发酵液喷雾对 3 种水稻根长的影响

浓度 (CFU/mL)	明恢 86		武育梗 3 号		沈农 265	
	平均根长(mm)	抑制率(%)	平均根长(mm)	抑制率(%)	平均根长(mm)	抑制率(%)
CK	193.9aA		174.0aA		199.6aA	
10	119.6aA	38.31	194.7aA	-11.9	159.2bB	20.22
50	171.4aA	11.62	157.6aA	9.4	158.5bB	20.57
150	171.6aA	11.52	154.2aA	11.3	165.5bB	17.10

表 7 解淀粉芽孢杆菌 B15 发酵液喷雾对 3 种水稻鲜质量的影响

浓度 (CFU/mL)	明恢 86		武育梗 3 号		沈农 265	
	平均鲜质量(mm)	抑制率(%)	平均鲜质量(mm)	抑制率(%)	平均鲜质量(mm)	抑制率(%)
CK	0.132abA		0.103aA		0.099bA	
10	0.135abA	-2.02	0.102aA	-2.0	0.096bA	3.02
50	0.119bA	10.10	0.096aA	3.7	0.113aA	-13.42
150	0.153aA	-15.66	0.121aA	-21.0	0.091cA	8.05

防菌株作为生物农药推广应用奠定研究基础。研究表明,解淀粉芽孢杆菌 B15 对 23 种供试植物病原菌均有抑制作用,且抑制率高,作用浓度低,同时对测试水稻植株无药害作用,安全性高。以本研究为基础,可以进行解淀粉芽孢杆菌 B15 可湿性粉剂的开发与田间应用研究。

#### 参考文献:

- [1] 龚谷迪,周广田,郭 阳,等. 脂肽 surfactin、iturin、fengycin 性质鉴定的研究与展望[J]. 中国食品添加剂,2013(3):211-215.
- [2] 朱弘元,康 健,范 昕,等. 解淀粉芽孢杆菌 B15 产脂肽的分离鉴定及抑菌机理[J]. 江苏农业科学,2016,44(5):186-189.
- [3] 潘虹余,金玮璠,张晓蒙,等. 解淀粉芽孢杆菌 B15 抑菌物质对葡萄灰霉病灰葡萄孢的抑菌机理[J]. 微生物学报,2018,58(7):1245-1254
- [4] 林 毅,陈金辉,黄志鹏. 芽孢杆菌几丁质酶及其在植物病虫害生物防治中的应用[J]. 福建农业科技,1998(增刊1):32-33.
- [5] Vitullo D, Pietro A D, Romano A, et al. Role of new bacterial surfactins in the antifungal interaction between *Bacillus amyloliquefaciens* and *Fusarium oxysporum* [J]. Plant Pathology, 2012,61(4):689-699.
- [6] Reva O N, Dixelius C, Meijer J, et al. Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus*

*amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis* [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004,48(2):249-259.

- [7] Fravel D R. Commercialization and implementation of biocontrol[J]. Annual Review of Phytopathology 2005,43:A337-359.
- [8] 邓建良. 解淀粉芽孢杆菌 YN-1 抑制植物病原真菌活性物质研究[D]. 武汉:华中农业大学,2009:1.
- [9] 邱思鑫,阮宏春,宋美仙,等. 内生解淀粉芽孢杆菌 TB2 菌株活性物质诱导辣椒果抗疫病的生化机理[J]. 热带作物学报,2010,31(10):1813-1820.
- [10] 邱思鑫,何 红,阮宏椿,等. 内生芽孢杆菌 TB2 防治辣椒疫病效果及其机理初探[J]. 植物病理学报,2004(2):173-179.
- [11] 胥丽娜. 杨树内生细菌的分离、多样性分析及解淀粉芽孢杆菌 PEBA20 的抑菌活性研究[D]. 泰安:山东农业大学,2009:16-21.
- [12] 李祥英,张英华,胥丽娜,等. 解淀粉芽孢杆菌对烟草叶片光合特性的影响[J]. 山东农业大学学报(自然科学版),2018,49(3):518-522,527.
- [13] 张峰峰,周 可,谢风行,等. 解淀粉芽孢杆菌 HN 固体菌剂发酵制备技术研究[J]. 中国饲料,2018(23):33-39.
- [14] 陈 成. 一株解淀粉芽孢杆菌产抗真菌物质的研究[D]. 广州:华南理工大学,2010:13-22.
- [15] Chen X, Scholz R, Borriss M, et al. Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease [J]. Journal of Biotechnology 2009,140(1/2):38-44.