

姜艳鹏,胡振华,张翠静,等. 枯草芽孢杆菌 J22 拮抗姜瘟阴沟肠杆菌的效果与机理研究[J]. 江苏农业科学,2023,51(2):125-134.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.02.019

# 枯草芽孢杆菌 J22 拮抗姜瘟阴沟肠杆菌的效果与机理研究

姜艳鹏,胡振华,张翠静,隋业伟,陆洪省  
(山东科技大学安全与环境工程学院,山东青岛 266590)

**摘要:**姜瘟病是影响生姜种植生产的主要障碍之一,其减产率高,危害性广。为研究枯草芽孢杆菌 J22 对姜瘟致病菌的抑制效果和机理,从山东省安丘市凌河镇生姜种植基地的发病地块选取土样,富集培养、分离出 12 株细菌,经 16S rDNA 测序及致病性试验鉴定为姜瘟致病菌,通过液体培养与平板对峙试验验证枯草芽孢杆菌 J22 对阴沟肠杆菌 -SKD 的拮抗效果,利用红外光谱、高效液相色谱和质谱研究其拮抗机理,最后通过高通量测序分析枯草芽孢杆菌 J22 对土壤细菌群落的影响。结果表明,分离菌阴沟肠杆菌 -SKD 为姜瘟致病菌,可引起生姜茎片的腐烂;枯草芽孢杆菌 J22 对阴沟肠杆菌 -SKD 在液体培养与平板对峙试验中的抑制率分别为 18.07%、42.55%;枯草芽孢杆菌 J22 发酵液经酸沉降醇提取的粗提物,经红外光谱测定为脂肽类物质,高效液相色谱和质谱鉴定其分子量在 460~1 500 u 之间,有效成分为具有抑菌活性的表面活性素;高通量分析表明,枯草芽孢杆菌 J22 对土壤中肠杆菌具有抑制作用,肠杆菌在目、科、属、种水平上的相对丰度分别降低了 10.71、10.71、10.39、10.39 百分点。本研究证明了枯草芽孢杆菌 J22 可通过分泌抑菌活性物质发挥拮抗作用,为姜瘟病的生物防治提供了一定的理论依据。

**关键词:**姜瘟病;阴沟肠杆菌;枯草芽孢杆菌;拮抗性能;抑菌作用

**中图分类号:**S436.32 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2023)02-0125-10

姜是一种普遍种植的香辛类保健蔬菜,具有广

泛的医用效果<sup>[1]</sup>和较高的经济价值<sup>[2]</sup>。但随着连年种植,种植区姜瘟病的发病率逐年升高<sup>[3]</sup>,姜瘟病的发生通常认为是由青枯劳尔氏菌<sup>[4]</sup>引起的,该病原体可以在土壤中存活很久。其发病地块一般减产 10%~20%,严重时导致绝产<sup>[5-6]</sup>,对生姜的种植生产造成了严重威胁。

在我国通常采用化学法防治姜瘟病的发生<sup>[7]</sup>,

液的抑菌谱及稳定性测定[J]. 南京林业大学学报(自然科学版),2017,41(3):65-70.

[35] Wilson C L, Wisniewski M E. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology [J]. Annual Review of Phytopathology, 1989, 27(1): 425-441.

[36] 张德锋,高艳侠,可小丽,等. 贝莱斯芽孢杆菌 LF01 基因组序列分析及其代谢产物的生防作用[J]. 水产学报,2022,46(2): 196-206.

[37] Teixeira G M, Mosela M, Nicoletto M L A, et al. Genomic insights into the antifungal activity and plant growth-promoting ability in *Bacillus velezensis* CMRP 4490 [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 11: 618415.

[38] Malanicheva I A, Kozlov D G, Efimenko T A, et al. New antibiotics produced by *Bacillus subtilis* strains [J]. Microbiology, 2014, 83(4): 352-356.

[39] Chen W C, Juang R S, Wei Y H. Applications of a lipopeptide

biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms [J]. Biochemical Engineering Journal, 2015, 103: 158-169.

[40] Tang J, He J G, Liu T T, et al. Removal of heavy metal from sludge by the combined application of a biodegradable biosurfactant and complexing agent in enhanced electrokinetic treatment [J]. Chemosphere, 2017, 189: 599-608.

[41] Hotta K, Kim C Y, Fox D T, et al. Siderophore-mediated iron acquisition in *Bacillus anthracis* and related strains [J]. Microbiology, 2010, 156(Pt 7): 1918-1925.

[42] Müller S, Strack S N, Hoefler B C, et al. Bacillaene and sporulation protect *Bacillus subtilis* from predation by *Myxococcus xanthus* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(18): 5603-5610.

[43] 左豫虎,康振生,杨传平,等.  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶活性与大豆疫霉根腐病抗性的关系[J]. 植物病理学报,2009, 39(6): 600-607.

目前广泛使用土壤熏蒸剂如甲基溴、棉隆及氯化苦进行土壤消毒,能有效控制土传病虫害,但对环境和人体健康都造成了负面影响,因此化学防治姜瘟病的方法正逐步被淘汰<sup>[8]</sup>。生物防治是化学杀菌剂的一种潜在替代方法<sup>[9-10]</sup>,筛选对姜瘟病原菌的拮抗菌株,对生姜的种植具有重要意义<sup>[11-12]</sup>。枯草芽孢杆菌被认为是应用最广泛、研究最充分的生防菌之一<sup>[13-14]</sup>,具有很强的竞争活力,如与镰刀菌竞争营养物质或分泌抗菌物质来抑制镰刀菌<sup>[15]</sup>,且对葡萄灰霉病、稻瘟病等具有良好的抑菌效果,其基因组的 4% ~ 5% 负责合成抗生素,如环脂肽(LPs)、丰霉素<sup>[16]</sup>等。

本研究于 2020 年 9 月采集山东省安丘市凌河镇生姜种植基地患病地块的土样,并进行病原菌分离,根据 16S rDNA 与致病性试验,鉴定其为阴沟肠杆菌。阴沟肠杆菌作为内生菌,在有利于细菌生存或者宿主敏感的条件下,会影响姜根茎的质量,造成其腐烂<sup>[17-18]</sup>,然而研究枯草芽孢杆菌对阴沟肠杆菌的抑制效果尚未见报道。本研究的主要目的是在实验室条件下评估枯草芽孢杆菌对阴沟肠杆菌的抑制效果,为后期生物防治提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 供试材料 试验土样采自山东省安丘市凌河镇生姜种植基地(119.07°E、36.36°N),拮抗菌枯草芽孢杆菌 J22 为笔者所在实验室之前分离得到的菌株。

1.1.2 供试培养基 致病菌筛选培养基(LB):蛋白胨 10 g,NaCl 10 g,酵母浸粉 5 g,琼脂 20 g,水补充至 1 000 mL,pH 值 7.2。蛋白酶培养基:脱脂奶粉 100 g,琼脂 15 ~ 20 g,水补充至 1 000 mL<sup>[19]</sup>。

### 1.2 试验方法

1.2.1 致病菌的分离和鉴定 取发病地块姜土样品,委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行高通量测序,扩增区域为 V3 ~ V4(细菌)<sup>[20]</sup>。配制土壤梯度浸出液,并在 LB 固体培养基上涂布培养 48 h,培养温度为 30 ℃,经多次纯化培养,共分离到 12 个菌株,对分离到的菌株进行 16S rDNA 测序,PCR 扩增引物为 27F(5' - AGAGTTTGATCCTGGCT CAG - 3')和 1492R(5' - TACGGCTACCTTGTTACG ACTT - 3')<sup>[21]</sup>。利用美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,简称

NCBI)数据库对测得的 16S rDNA 进行同源性比对,并通过 MEGA 6.0 构建系统进化树,鉴定种属<sup>[22]</sup>。

1.2.2 细菌菌株的致病性分析 姜根茎清洗后,用 0.5% 次氯酸钠消毒,再用无菌水洗净。切成 3 mm 厚的薄片,用顶端涂有致病菌菌液的牙签对薄片进行接种,未涂有菌液的薄片为对照<sup>[23-24]</sup>,30 ℃ 下静置培养,观察其致病性。

1.2.3 枯草芽孢杆菌 J22 的抑菌能力测定 (1)液体培养抑菌法:将阴沟肠杆菌和枯草芽孢杆菌 J22 分别在 LB 液体培养基中振荡培养 48 h,转速为 120 r/min,培养温度为 30 ℃,得到富集液。取 15 mL 阴沟肠杆菌和枯草芽孢杆菌 J22 富集液分别加入 270 mL LB 液体培养基中进行培养,培养条件同上,每隔 6 h 在 520 nm 处测定吸光度,单独培养阴沟肠杆菌测得的吸光度为对照。利用公式(1)计算抑菌率:抑菌率 =  $(D_{\text{对照}} - D_{\text{处理}}) / D_{\text{对照}} \times 100\%$ <sup>[25]</sup>。(2)平板培养抑菌法:分别取 10 μL 枯草芽孢杆菌 J22 与阴沟肠杆菌富集液均匀涂布在 LB 固体培养基上,30 ℃ 培养 48 h 得到菌落,再用 0.6 cm 的打孔器取阴沟肠杆菌菌饼置于 LB 固体培养基中央,同时取枯草芽孢杆菌 J22 菌饼与阴沟肠杆菌菌饼置于 LB 固体培养基两侧,每处理重复 3 皿,30 ℃ 培养 3 d,测量菌斑直径。利用公式(2)计算抑菌率:抑菌率 =  $[\text{菌落直径(CK)} - \text{菌落直径(处理)}] / [\text{菌落直径(CK)} - \text{菌丝块直径}] \times 100\%$ <sup>[26]</sup>。

1.2.4 枯草芽孢杆菌 J22 代谢物测定 蛋白酶检测:在每张 6 mm 的灭菌滤纸片上滴枯草芽孢杆菌 J22 发酵液 5 μL,放置在蛋白平板中央,每处理重复 3 皿,30 ℃ 培养,观察有无透明圈产生<sup>[27]</sup>。红外光谱测定:分别对阴沟肠杆菌、枯草芽孢杆菌及阴沟肠杆菌和枯草芽孢杆菌(阴沟 - 枯草)富集液 4 000 r/min、离心 5 min,得到沉淀物,60 ℃ 条件下烘干沉淀物 10 h,研磨成粉末并与溴化钾以质量比 1 : 100 的比例混合均匀,压片制样,采用 Nicolet 380 傅立叶红外光谱仪在 4 000 ~ 500 cm<sup>-1</sup> 下进行扫描<sup>[25]</sup>。

1.2.5 抑菌物质高效液相色谱 - 质谱联用仪(LC - MS)测定 分别对阴沟肠杆菌、枯草芽孢杆菌以及阴沟 - 枯草的共培养液 8 000 r/min 离心 15 min,收集上清液,用 HCl 调节 pH 值为 2.0,在 4 ℃ 下过夜,对处理液 8 000 r/min 离心 15 min,得到沉淀物,并用甲醇对沉淀物进行溶解,用 NaOH 将

pH 值调至 7.0 后,8 000 r/min 离心 15 min,收集上清液,在 50 ℃ 条件下对上清液旋转浓缩,用甲醇给浓缩液定容至 50 mL,采用 LC-MS 进行分析<sup>[28]</sup>。

1.2.6 高通量测序分析 在 10 g 姜瘟发病土壤中加入 20 mL 枯草芽孢杆菌 J22 培养液,30 ℃ 培养 7 d,委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行高通量分析,扩增区域为 V3~V4(细菌),对测序结果进行物种分类分析和菌群差异分析,以未加入枯草芽孢杆菌 J22 培养液的土壤样品为对照。

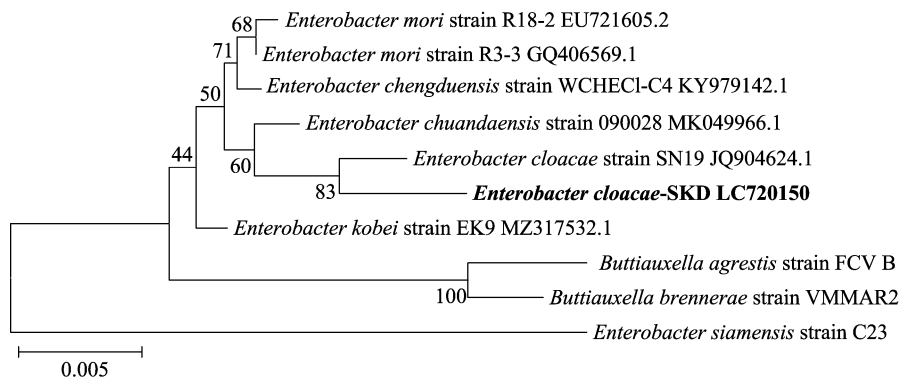
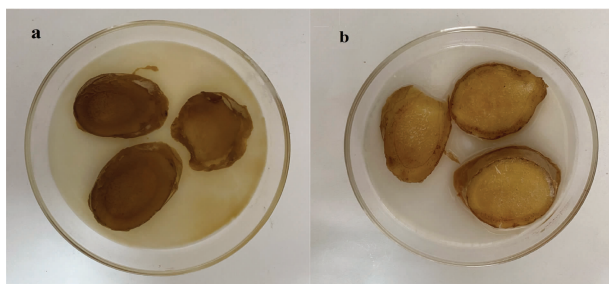


图1 基于 16S rDNA 基因序列构建的菌株阴沟肠杆菌-SKD 系统发育树

## 2.2 阴沟肠杆菌的致病性分析

涂有阴沟肠杆菌-SKD 的姜切片以及未涂菌液的切片(对照),在 30 ℃ 条件下培养 14 d,结果如图 2 所示。涂有阴沟肠杆菌-SKD 的姜片组织内部明显出现发黄、质地变软、腐烂病状(图 2-a)。以无菌水为对照的姜片上未出现变色腐烂等症状(图 2-b)。



a. 接种阴沟肠杆菌-SKD 的姜片 b. 接种无菌水的姜片  
图2 阴沟肠杆菌-SKD 的致病性试验

## 2.3 枯草芽孢杆菌的抑菌能力测定

2.3.1 液体培养的抑菌效果 对阴沟肠杆菌-SKD 单独培养液以及阴沟-SKD+枯草 J22 共培养液进行吸光度( $D_{520\text{ nm}}$ )测定,绘制生长曲线(图 3)。结果表明,阴沟肠杆菌-SKD 最大吸光度为 1.173,阴沟-SKD+枯草 J22 共培养时最大吸光度为 0.961,降低了 0.212,根据公式(1)计算得到抑菌率为 18.07%。

## 2 结果与分析

### 2.1 阴沟肠杆菌的鉴定

对分离得到的致病菌进行 16S rDNA 测序,用 NCBI 数据库对测得的序列进行同源性分析,并构建系统树(图 1)。从图 1 可以看出,分离菌株与阴沟肠杆菌 SN19 (JQ904624.1) 碱基序列相似度为 98%,暂鉴定该分离致病菌为阴沟肠杆菌-SKD (*Enterobacter cloacae*-SKD)。

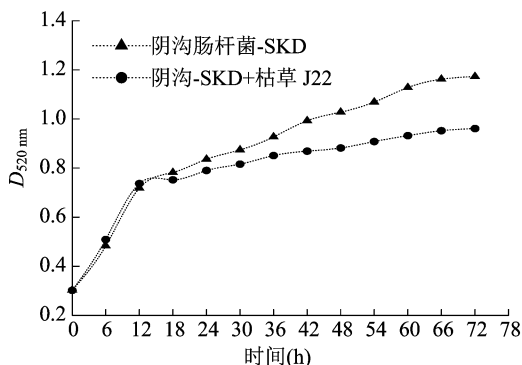


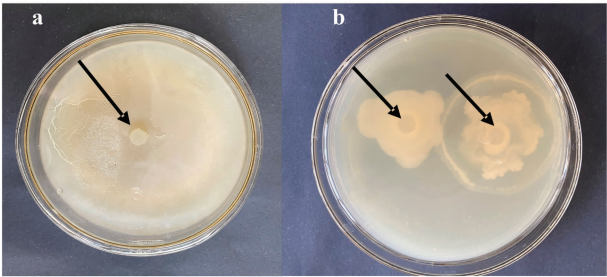
图3 枯草芽孢杆菌 J22 对阴沟肠杆菌-SKD 在液体环境下的抑制作用

2.3.2 平板对峙 在 LB 培养基中培养 3 d,阴沟肠杆菌-SKD 单独培养时的菌饼直径为 10 cm(图 4-a),共培养时菌饼直径为 6 cm(图 4-b),根据公式(2)得到 J22 对阴沟肠杆菌-SKD 的抑菌率为 42.55%。

### 2.4 枯草芽孢杆菌 J22 产酶与代谢物质的分析

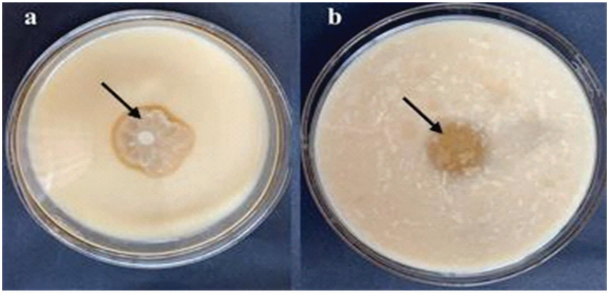
2.4.1 产酶能力分析 如图 5 所示枯草芽孢杆菌 J22 在蛋白酶平板中培养 3 d 后,平板中出现明显透明圈,表明枯草芽孢杆菌 J22 能分泌蛋白酶,可将奶粉蛋白质降解成小分子可溶性物质。

2.4.2 代谢产物的红外吸收光谱测定 对枯草芽孢杆菌 J22 富集液(a)、阴沟肠杆菌-SKD 富集液(b)、阴沟-SKD+枯草 J22 共培养液(c)进行离心,



a.单独放阴沟肠杆菌菌饼；b.左为枯草芽孢杆菌菌饼，右为阴沟肠杆菌-SKD 菌饼

图4 枯草芽孢杆菌 J22 在平板上对阴沟肠杆菌-SKD 的抑制



a.蛋白酶平板正面 b.蛋白酶平板背面

图5 枯草芽孢杆菌 J22 产蛋白酶检测

采用红外光谱测定离心后的沉淀物，测定结果如图 6 所示。(a)在  $1\,656.79\text{ cm}^{-1}$  出现吸收峰。(b)在  $1\,654.79\text{ cm}^{-1}$  出现吸收峰，其吸收峰均落在  $1\,700\sim1\,600\text{ cm}^{-1}$  范围内，为酰胺谱带 I，表明样品中含有肽键<sup>[29]</sup>。(c)的吸收峰移出现在  $1\,651.59\text{ cm}^{-1}$ ，表明共培养时分子内氢键被破坏，使峰位向低波数移动<sup>[29]</sup>。相较于 (a) 和 (b)，(c) 代表酰胺基 ( $-\text{CONH}-$ ) 的吸收峰明显增强，在  $1\,560.16\text{ cm}^{-1}$  出现明显吸收峰。(a) 在  $1\,231.51\text{ cm}^{-1}$ 、(b) 在  $1\,234.51\text{ cm}^{-1}$  出现特征吸收峰，证明样品中含有脂肽类物质<sup>[30]</sup>。从 (a) 的吸收峰  $1\,065.33\text{ cm}^{-1}$  和 (b) 的吸收峰  $1\,086.53\text{ cm}^{-1}$  移至 (c) 的吸收峰  $1\,117.37\text{ cm}^{-1}$ ，证明了 (c) 中谷氨酸/天冬氨酸的羧基侧链 ( $\text{O}-\text{H}$  伸缩) 和酰胺基的  $-\text{NH}$  键的存在<sup>[31]</sup>。从图 6 可以看出，(c) 在  $700\sim500\text{ cm}^{-1}$  处

的宽峰相比于 (a) 和 (b) 的红外光谱图发生了较明显的变化，这可能是枯草芽孢杆菌 J22 产生的脂肽物质给阴沟肠杆菌-SKD 带来了影响<sup>[31]</sup>。观察到的峰值与 Das 等报道的脂肽生物表面活性素的峰值<sup>[32-33]</sup> 相似。脂肽生物表面活性素也产生了类似的红外吸收模式，并在大致相同的波数位置被吸收<sup>[32]</sup>。

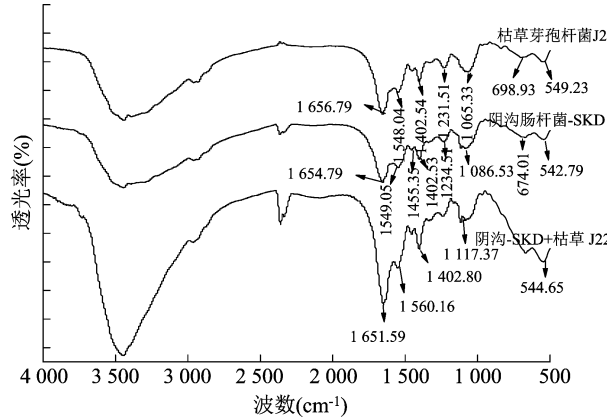


图6 红外光谱图

2.5 抑菌活性物质的 LC-MS 测定

2.5.1 枯草芽孢杆菌 J22 单独培养条件下 对培养 5 d 后的 J22 菌液进行离心，收集上清液，利用 LC-MS 对上清液中的抑菌活性物质进行测定，结果如图 7、图 8 所示。从图 7 可以看出，色谱峰主要出现在 13.39、14.32、14.91、16.77 min，结合图 8 质谱图，得到其分子质荷比 ( $m/z$ ) 分别为 1 008.658 8、1 022.673 9、1 036.689 8、1 036.690 7，根据高学文等的研究<sup>[34]</sup> 推测均为表面活性素。

2.5.2 阴沟肠杆菌-SKD 单独培养条件下 对培养 5 d 后的阴沟肠杆菌-SKD 菌液进行离心，收集上清液，利用 LC-MS 对上清液的物质进行测定，结果如图 9、图 10 所示。在 9.52 min 处峰主要分子质荷比为 946.399 5，在 10.14 min 处峰主要分子质荷比为 727.392 5，通过 Xcalibur 软件进行元素组成分

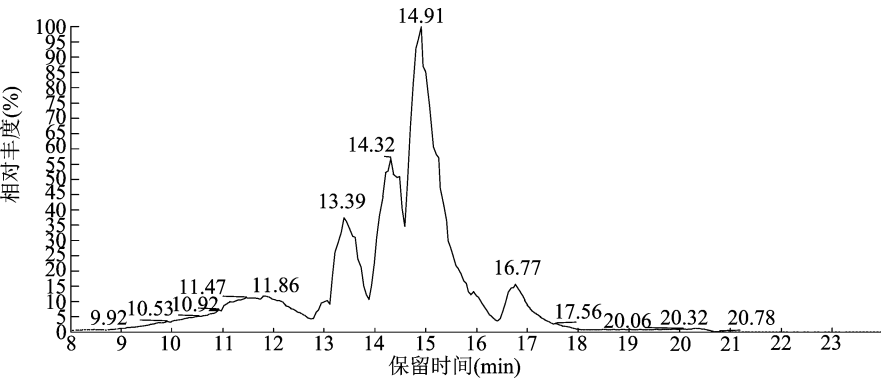


图7 枯草芽孢杆菌 J22 粗提物的 HPLC 图

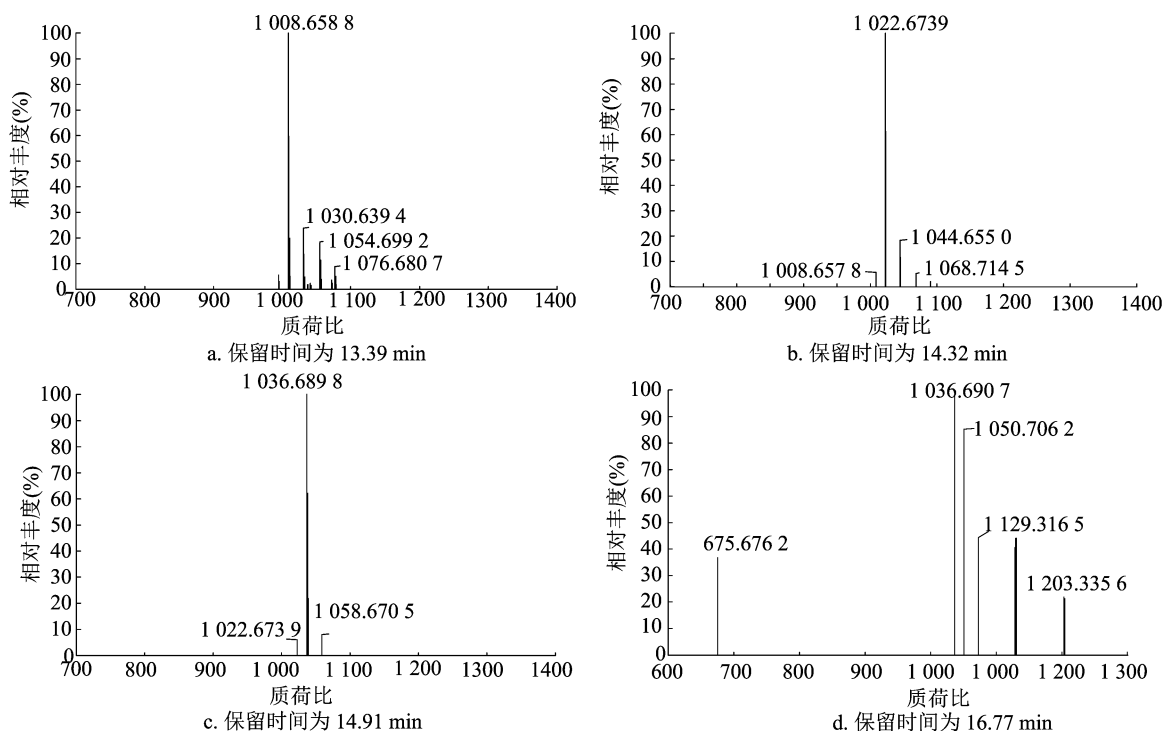


图8 枯草芽孢杆菌 J22 粗提物的脂肽质谱图

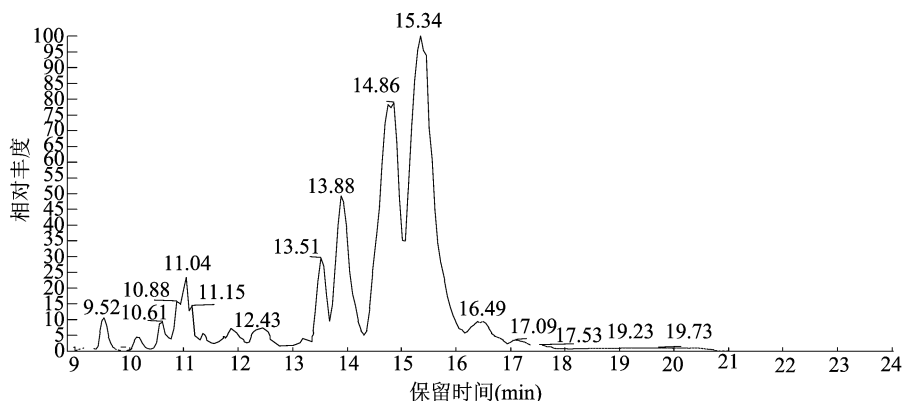


图9 阴沟肠杆菌-SKD 粗提物的 HPLC 图

析,元素组成为  $C_{27}H_{55}O_{13}N_{10}$ , 根据刘邈洲等的研究<sup>[35]</sup>推测质荷比 1 029.533 4 为杆菌霉素,质荷比 1 447.714 8 为泛革素;10.61 min 处峰主要分子质荷比为 1 036.689 8,推测其为表面活性素;11.04、12.43 min 处主要分子质荷比分别为 739.411 3、463.320 7,元素组成分别为  $C_{25}H_{59}O_{15}N_{10}$ 、 $C_{29}H_{41}O_2N_3$ ,结构有待进一步鉴定。13.51、13.88、14.86 min 处主要分子质荷比分别为 994.643 4、1 008.658 6、1 022.674 9,均为表面活性素。

2.5.3 阴沟-SKD+枯草 J22 共培养条件下 阴沟-SKD+枯草 J22 共培养 5 d 后进行离心,收集上清液,利用 LC-MS 对上清液中的抑菌活性物质进行测定,结果如图 11、图 12 所示。10.09、10.67、

11.87 min 处峰主要分子质荷比为 579.341 9、563.346 5、463.320 1,通过 Xcalibur 软件进行元素组成分析,元素组成分别为  $C_{18}H_{47}O_{11}N_{10}$ 、 $C_{28}H_{51}O_{11}N_2$ 、 $C_{29}H_{41}O_2N_3$ ,12.28 min 处峰主要分子质荷比为 463.320 5、503.313 0,元素组成分别为  $C_{29}H_{41}O_2N_3$ 、 $C_{29}H_{39}O_3N_6$ ;结构有待进一步鉴定。13.57 min 处峰主要分子质荷比为 683.543 4,元素组成为  $C_{27}H_{59}O_{10}N_{10}$ ;13.88、14.78、15.36 min 处峰主要分子质荷比为 1 008.659 4、1 022.674 5、1 036.690 4,推测其均为表面活性素。

综上所述,3 种培养条件下,均出现表面活性素的离子峰,分子质荷比值相差 14,分别为 1 008.7、1 022.7 和 1 036.7,证明这 3 种活性肽均为脂肪酸

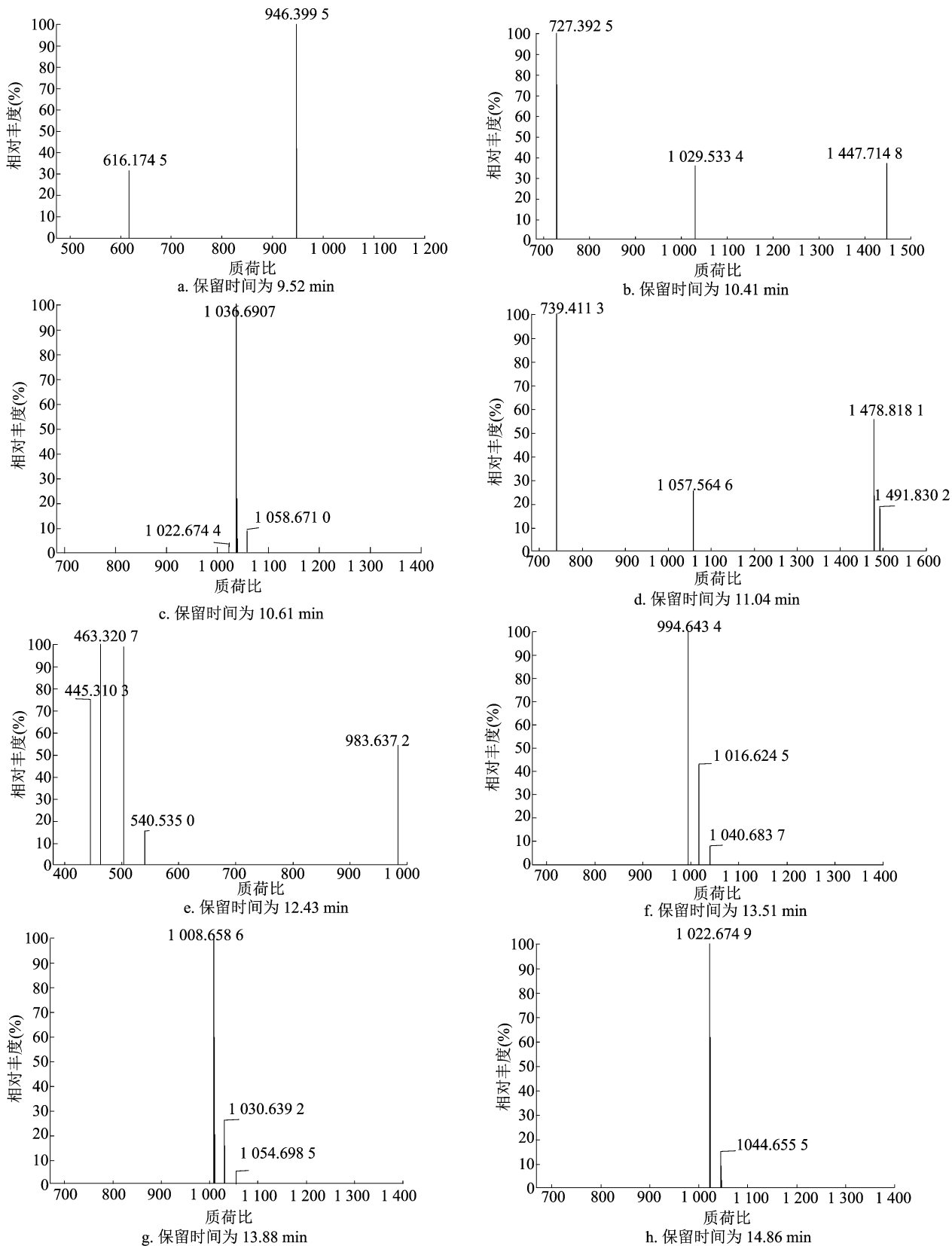


图10 阴沟肠杆菌-SKD 粗提物的脂质谱图

链同系物,且相差 1 个亚甲基( $-\text{CH}_2$ )。同时,阴沟 - SKD + 枯草 J22 共培养时产生了较多新物质,如

$\text{C}_{18}\text{H}_{47}\text{O}_{11}\text{N}_{10}$ 、 $\text{C}_{28}\text{H}_{51}\text{O}_{11}\text{N}_2$ 、 $\text{C}_{29}\text{H}_{41}\text{O}_2\text{N}_3$ 、 $\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{O}_3\text{N}_6$ 、 $\text{C}_{27}\text{H}_{59}\text{O}_{10}\text{N}_{10}$ ,具体结构有待进一步鉴定。

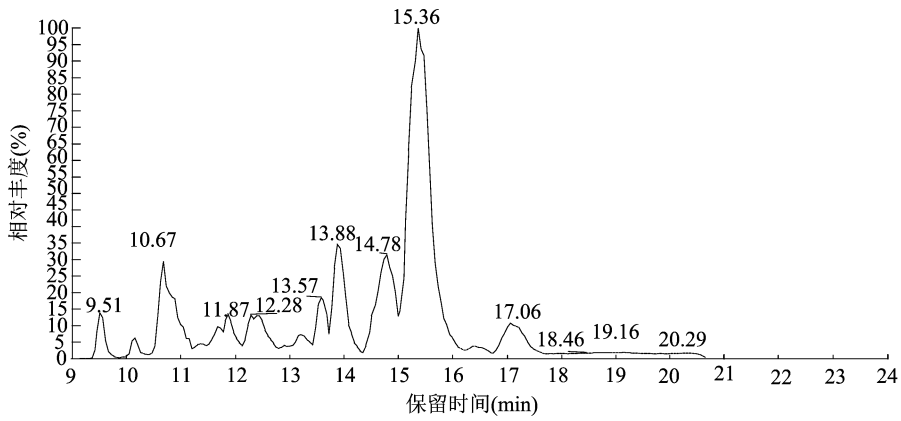


图11 阴沟肠杆菌-SKD 与枯草芽孢杆菌 J22 共培养粗提物的 HPLC 图

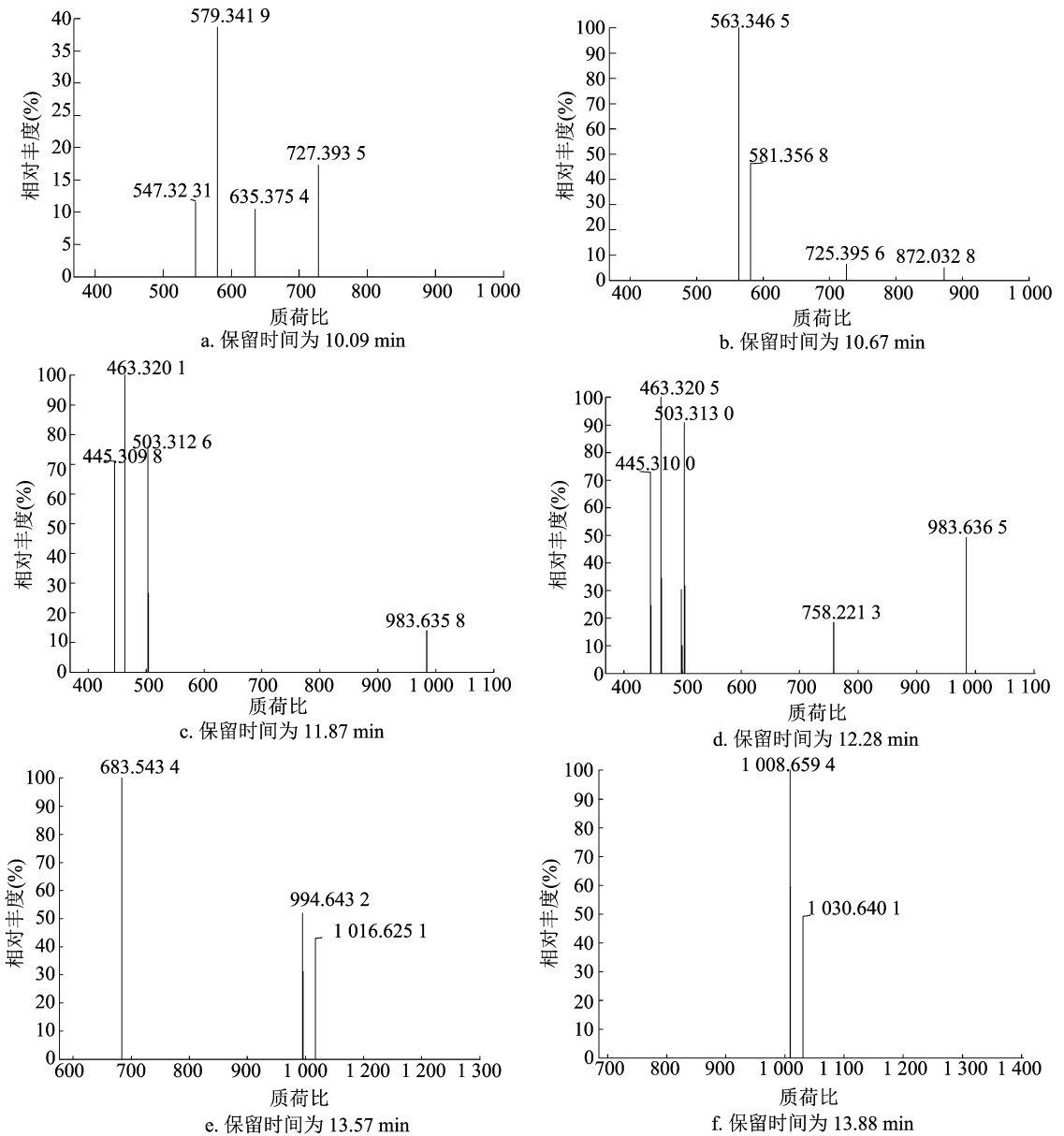


图12 阴沟肠杆菌-SKD 与枯草芽孢杆菌 J22 共培养时产生的脂肽质谱图



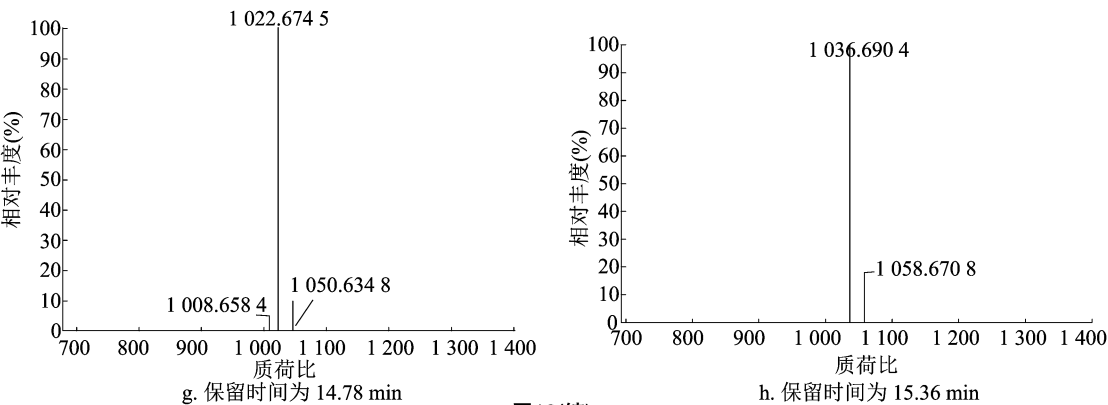


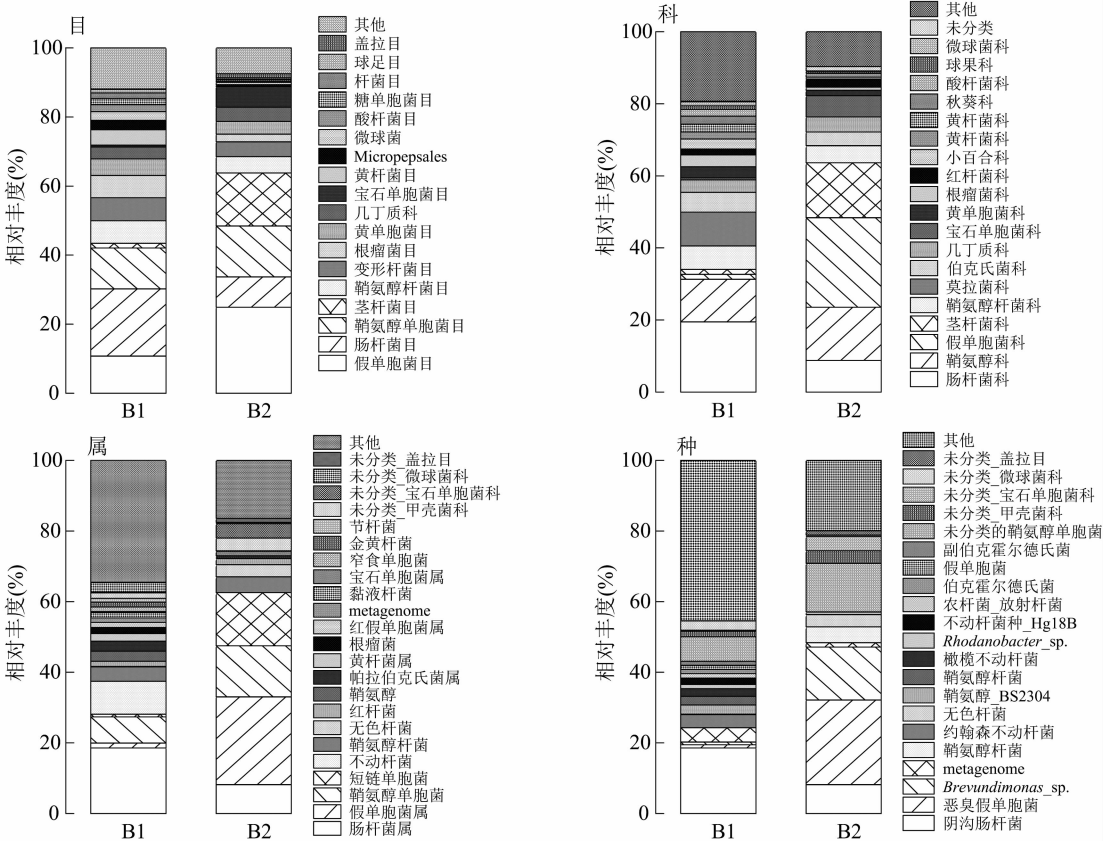
图12(续)

2.6 高通量测序分析

对加入枯草芽孢杆菌 J22 和未加入枯草芽孢杆菌 J22 的土壤分别进行高通量分析,结果如图 13 所示。加入枯草芽孢杆菌 J22 的土壤样品中,在目水平上,假单胞菌目相对丰度升高了 14.17 百分点,茎杆菌目相对丰度升高了 13.97 百分点,肠杆菌目相对丰度降低了 10.71 百分点;在科水平上,假单胞菌科相对丰度升高了 23.47 百分点,成为优势菌,茎杆菌科相对丰度升高了 13.86 百分点,肠杆菌科相对丰度减少了 10.71 百分点,莫拉菌科相对丰度减少

了 9.31 百分点;在属水平上,假单胞菌属相对丰度增加了 23.48 百分点,成为优势菌,短链单胞菌相对丰度增加了 14.28 百分点,肠杆菌属相对丰度减少 10.39 百分点,不动杆菌相对丰度减少 9.31 百分点;在种水平上,恶臭假单胞杆菌相对丰度增加了 23.06 百分点,成为优势菌,鞘氨醇杆菌相对丰度增加了 4.44 百分点,阴沟肠杆菌相对丰度减少了 10.39 百分点。

高通量分析结果表明,枯草芽孢杆菌 J22 在目、科、属、种水平上对土壤菌落结构的影响一致,其中



B1 为土样的根际细菌相对丰度, B2 为土样加 J22 后的根际细菌相对丰度

图13 土壤根际细菌丰度



假单胞菌、鞘氨醇单胞菌、茎杆菌相对丰度均变大,姜瘟病致病菌(阴沟肠杆菌-SKD)相对丰度出现明显降低,证明枯草芽孢杆菌 J22 对土壤中肠杆菌具有抑制作用,具有一定的姜瘟病防治潜力。

### 3 讨论

本研究通过对发病地块进行病原菌的分离、培养、纯化,筛选出 1 株能够使姜切片患病的菌株,根据 16S rDNA 确定姜瘟致病菌为阴沟肠杆菌-SKD。阴沟肠杆菌可在患病玉米、洋葱<sup>[36]</sup>、水稻植株等植物中分离出来<sup>[37]</sup>,同时,阴沟肠杆菌可以作为生姜内生菌,在有利于细菌生存或者宿主敏感的条件下,会影响根茎的质量,造成其腐烂<sup>[18]</sup>。目前,暂未见对由阴沟肠杆菌引起的姜瘟病进行生物防治的报道。枯草芽孢杆菌抑菌能力强,应用范围广。因此,本试验研究了枯草芽孢杆菌 J22 对阴沟肠杆菌-SKD 的抑制效果,结果表明,枯草芽孢杆菌 J22 在液体培养、平板对峙试验中均显示对阴沟肠杆菌-SKD 有一定的抑制作用,同时,蛋白酶作为抑菌物质也在本试验中通过透明圈得到证明<sup>[38]</sup>。

表面活性素是已知最有效的抑菌物质之一,可显著抑制细菌、病毒、真菌、支原体的生长<sup>[39]</sup>。本试验通过红外光谱与 LC-MS 分析枯草芽孢杆菌产生的脂肽类物质,主要分子质量在 460~1 500 u 区间,其中含量最多的为表面活性素。桑建伟等的研究结果显示,解淀粉芽孢杆菌 BEB17 也可以产生表面活性素<sup>[40]</sup>。Chen 等研究发现,解淀粉芽孢杆菌 FZB42 产生的脂肽类物质可抑制病原真菌的生长,对由欧文氏菌引起的梨火疫病具有防治效果<sup>[41]</sup>。目前国内外对表面活性素的研究越来越广泛,多数研究者认为表面活性素具有很强的抗菌活性,能够改变细菌的表面疏水性,破坏膜结构,从而导致代谢物质外泄<sup>[42]</sup>。本试验中通过傅立叶红外光谱和 LC-MS 检测到枯草芽孢杆菌粗提物中也存在表面活性素,从而从机理上证明了枯草芽孢杆菌对阴沟肠杆菌-SKD 具有抑制作用。

通过高通量测序分析土壤中的细菌群落构成,发现加入枯草芽孢杆菌后,阴沟肠杆菌在目、科、属、种的水平上均有所降低,在土壤中主要的优势菌为假单胞菌、鞘氨醇单胞菌和茎杆菌,为下一步进行田间试验提供了理论依据。

试验表明枯草芽孢杆菌对阴沟肠杆菌-SKD 有显著的抑制作用,为开发具有环境安全的生物农

药<sup>[43]</sup>以及姜瘟病防治的实际应用提供了一定的理论基础和应用前景。

### 4 结论

本试验从山东省安丘市分离纯化出姜瘟病的致病菌,经 16S rDNA 和致病性试验鉴定致病菌为阴沟肠杆菌-SKD,可作为生姜内生菌,引起姜根茎腐烂。通过液体培养和平板对峙试验,枯草芽孢杆菌 J22 对阴沟肠杆菌均有抑制效果,抑制率分别为 18.07%、42.55%,通过蛋白酶平板的透明圈验证了枯草芽孢杆菌 J22 能够分泌蛋白酶类抑菌物质。枯草芽孢杆菌 J22 发酵液经离心提取的抑菌物质,经红外光谱测定为内酯类的环状脂肽,再经酸沉降,高效液相色谱和质谱鉴定其分子质量范围为 460~1 500 u,有效成分为枯草芽孢杆菌表面活性素。高通量分析枯草芽孢杆菌 J22 对姜瘟病土壤中的细菌菌群影响,表明加入枯草芽孢杆菌后枯草芽孢杆菌对肠杆菌-SKD 在目、科、属、种水平上的相对丰度分别降低了 10.71、10.71、10.39、10.39 百分点,且前后优势菌群没有发生变化。为后续进行田间试验提供了理论依据。

### 参考文献:

- [1] Le D P, Smith M, Hudler G W, et al. *Pythium* soft rot of ginger: detection and identification of the causal pathogens, and their control [J]. *Crop Protection*, 2014, 65: 153-167.
- [2] Rai M, Ingle A P, Paralikar P, et al. Effective management of soft rot of ginger caused by *Pythium* spp. and *Fusarium* spp.: emerging role of nanotechnology [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(16): 6827-6839.
- [3] 付丽军, 周禹, 闫红波, 等. 唐山地区姜瘟病发生动态及发病因子调查[J]. *中国植保导刊*, 2020, 40(2): 43-48, 57.
- [4] 张玲玲, 周洁, 秦曼丽, 等. 生姜青枯病原菌的鉴定与 PCR 检测方法的建立[J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2021, 43(9): 10-20.
- [5] 刘润叶, 杨士凤, 陈晓梅, 等. 一株拮抗姜瘟青枯劳尔氏菌的泛菌的分离及鉴定[J]. *四川大学学报(自然科学版)*, 2007, 44(3): 683-686.
- [6] Prameela T P, Bhai R S. Bacterial wilt of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) incited by *Ralstonia pseudosolanacearum* - A review based on pathogen diversity, diagnostics and management[J]. *Journal of Plant Pathology*, 2020, 102(3): 709-719.
- [7] Yang C, Hamel C, Vujanovic V, et al. Fungicide: modes of action and possible impact on nontarget microorganisms [J]. *ISRN Ecology*, 2011, 2011: 130289.
- [8] Mao L G, Jiang H Y, Wang Q X, et al. Efficacy of soil fumigation with dazomet for controlling ginger bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) in China[J]. *Crop Protection*, 2017, 100: 111-116.

- [9] Abiodun J, Osaretin B I, Elizabeth T A, et al. Effectiveness of *Pseudomonas species* in the management of tomato early blight pathogen *Alternaria solani* [J]. African Journal of Microbiology Research, 2017, 11(23): 972–976.
- [10] Kotan R, Dikbas N, Bostan H. Biological control of post harvest disease caused by *Aspergillus flavus* on stored lemon fruits [J]. African Journal of Biotechnology, 2009, 8(2): 209–214.
- [11] 李纪潮, 杨天梅, 杨绍兵, 等. 3 种三七根腐病致病菌的抑菌植物筛选[J]. 南方农业学报, 2019, 50(10): 2205–2213.
- [12] Gupta S L, Paijwar M S, Rizvi G. Biological management of rot disease of ginger (*Zingiber officinales* Rosc.) [J]. Trends Biosci, 2013, 6(3): 302.
- [13] Parisa M, Elif T, Recep K, et al. Potential of some bacteria for biological control of postharvest citrus green mould caused by *Penicillium digitatum* [J]. Plant Protection Science, 2017, 53(3): 134–143.
- [14] 夏俊芳, 郑素慧, 翟少华, 等. 一株拮抗酿酒葡萄灰霉病的枯草芽孢杆菌 T3 筛选、鉴定及抑菌分析[J]. 食品工业科技, 2020, 41(23): 99–105, 113.
- [15] Kloepper J W, Ryu C M, Zhang S A. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. [J]. Phytopathology, 2004, 94(11): 1259–1266.
- [16] Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses as functions [J]. Molecular Microbiology, 2005, 56(4): 845–857.
- [17] Kumar A, Prameela T P, Suseelabhai R, et al. Host specificity and genetic diversity of race 4 strains of *Ralstonia solanacearum* [J]. Plant Pathology, 2014, 63(5): 1138–1148.
- [18] Nishijima K A, Alvarez A M, Hepperly P R, et al. Association of *Enterobacter cloacae* with rhizome rot of edible ginger in Hawaii [J]. Plant Disease, 2004, 88(12): 1318–1327.
- [19] Dahler G S, Barras F, Keen N T. Cloning of genes encoding extracellular metalloproteases from *Erwinia chrysanthemi* EC16 [J]. Journal of Bacteriology, 1990, 172(10): 5803–5815.
- [20] 高杜娟, 刘兴录, 兰志斌, 等. 水稻—油菜周年耕作方式对土壤微生物的影响[J]. 中国农学通报, 2021, 37(16): 74–81.
- [21] 张起畅, 张文飞, 殷浩能, 等. 宏基因组测序分析东寨港红树林淤泥和水体微生物的多样性[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(1): 116–122.
- [22] 郑科, 段盛文, 成莉凤, 等. 苕麻脱胶细菌菌株的筛选、分类鉴定与多样性分析[J]. 中国麻业科学, 2018, 40(5): 201–207.
- [23] Moreira S I, Dutra D D C, Rodrigues A C, et al. Fungi and bacteria associated with post-harvest rot of ginger rhizomes in Espírito Santo, Brazil [J]. Tropical Plant Pathology, 2013, 38(3): 218–226.
- [24] Liu J, Zhao Z C, Wang C X. First report of rhizome rot on ginger (*Zingiber officinale*) caused by *Enterobacter cloacae* in Shandong Province, China [J]. Plant Disease, 2021, 105(1): 210.
- [25] 张雯, 卞丹, 沈燕秋, 等. 枯草芽孢杆菌抑菌活性物质鉴定、抑菌特性及发酵条件优化[J]. 中国食品学报, 2017, 17(12): 105–115.
- [26] 张维端, 郭秀春, 李钦, 等. 杜仲叶和果实中内生真菌的分离及抑菌活性[J]. 中草药, 2016, 47(16): 2921–2926.
- [27] 刘卹洲, 陈志谊, 梁雪杰, 等. 番茄枯萎病和青枯病拮抗细菌的筛选、评价与鉴定[J]. 中国生物防治学报, 2012, 28(1): 101–108.
- [28] 李彦林, 张蔚, 李晓玉, 等. 产 Surfactin 芽孢杆菌的筛选及特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(13): 31–37.
- [29] 陈翔, 曾朝玮, 申瑾, 等. 中温结合乙醇处理对枯草芽孢杆菌芽孢皮层裂解酶活性及结构的影响[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(23): 37–42.
- [30] 朱震, 罗毅, 张鹏, 等. 产表面活性素和伊枯草菌素 A 菌株的筛选及其脂肽类产物的特性[J]. 微生物学通报, 2011, 38(10): 1488–1498.
- [31] Nawel J, Noomen H, Angeles M, et al. Isolation and characterization of kurstakin and surfactin isoforms produced by *Enterobacter cloacae* C3 strain [J]. Journal of Mass Spectrometry, 2019, 54(1): 7–18.
- [32] Das P, Mukherjee S, Sen R. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 104(6): 1675–1684.
- [33] Jemil N, Ayed H B, Manresa A, et al. Antioxidant properties, antimicrobial and anti-adhesive activities of DCS<sub>1</sub> lipopeptides from *Bacillus methylophilus* DCS<sub>1</sub> [J]. BMC Microbiology, 2017, 17(1): 144.
- [34] 高学文, 姚仕义, Huong Pham, 等. 基因工程菌枯草芽孢杆菌 GEB3 产生的脂肽类抗生素及其生物活性研究[J]. 中国农业科学, 2003, 36(12): 1496–1501.
- [35] 刘卹洲, 陈夕军, 尹小乐, 等. 23 株芽孢杆菌及其脂肽类化合物抑菌活性比较[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(3): 533–542.
- [36] Schroeder B K, du Toit L J, Schwartz H F. First report of *Enterobacter cloacae* causing onion bulb rot in the Columbia Basin of Washington state [J]. Plant Disease, 2009, 93(3): 323.
- [37] Hardoim P R, Nazir R, Sessitsch A, et al. The new species *Enterobacter oryzophilus* sp. nov. and *Enterobacter oryzendophyticus* sp. nov. are key inhabitants of the endosphere of rice [J]. BMC Microbiology, 2013, 13: 164.
- [38] Dinesh R, Anandaraj M, Kumar A, et al. Isolation, characterization, and evaluation of multi-trait plant growth promoting rhizobacteria for their growth promoting and disease suppressing effects on ginger [J]. Microbiological Research, 2015, 173: 34–43.
- [39] 沈玉江, 雷亚峰, 刘健, 等. 产表面活性素枯草芽孢杆菌 YHI 的培养基优化研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2020, 32(5): 69–76, 128.
- [40] 桑建伟, 杨扬, 陈奕鹏, 等. 内生解淀粉芽孢杆菌 BEB17 脂肽类和聚酮类化合物的抑菌活性分析[J]. 植物病理学报, 2018, 48(3): 402–412.
- [41] Chen X H, Scholz R, Borris 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.
- [42] 罗楚平, 张婧, 季冬淳, 等. 表面活性素、杆菌霉素 L、罗克霉素和泛草素 4 种脂肽类抗生素高效制备方法及其生物学活性[J]. 西南农业学报, 2018, 31(11): 2307–2314.
- [43] 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.