

蜡样芽孢杆菌 0-9 对小麦根腐病菌的抑菌作用研究

黄秋斌, 韩兴旺, 刘凤英* (河南大学生命科学学院, 河南开封 475004)

摘要 采用平板对峙法, 研究 0-9 菌株对引起小麦根腐病的致病菌尖孢镰刀菌的抑菌作用, 抑菌率为 50%, 该菌株发酵代谢产物对小麦根腐病菌的抑菌作用达 83%; 0-9 菌株代谢产物处理尖孢镰刀菌的分生孢子后, 其萌发率降低 61.2%; 发酵代谢物质在高温和长时间紫外线照射下仍具有约 80% 的抑菌活性, 且代谢产物的有效抑菌活性可以长达 14 d。同时采用平板对峙法研究 0-9 菌株对 5 株植物病原真菌的抑菌作用, 结果表明 0-9 菌株也具有广泛的抑菌效果。

关键词 蜡样芽孢杆菌 0-9; 代谢产物; 小麦尖孢镰刀菌; 抑菌活性

中图分类号 S435.121.4⁺7 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2020)12-0135-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.12.037

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Study on the Bacteriostatic Effect of *Bacillus cereus* 0-9 on Root Rot of Wheat

HUANG Qiu-bin, HAN Xing-wang, LIU Feng-ying (School of Life Science, Henan University, Kaifeng, Henan 475004)

Abstract The bacteriostatic effect of strain 0-9 on *Fusarium oxysporum*, which caused wheat root rot, was studied by plate confrontation method. The bacteriostatic rate of *Fusarium oxysporum* was 50%. The bacteriostatic effect of fermentation metabolites on *Fusarium oxysporum* was 83%. After the conidia of *Fusarium oxysporum* was treated with metabolites of strain 0-9, the germination rate decreased by 61.2%, and the fermentation metabolites still had about 80% bacteriostatic activity under high temperature and long time ultraviolet irradiation, and the effective bacteriostatic activity of metabolites could be as long as 14 days. At the same time, the bacteriostatic effect of strain 0-9 on 5 strains of plant pathogenic fungi in laboratory was studied by plate confrontation method. The results showed that strain 0-9 also had a wide range of bacteriostatic effects.

Key words *Bacillus cereus* 0-9; Metabolites; *Fusarium oxysporum*; Activity

小麦根腐病是比较普遍的一种小麦病害, 在东北、华北和西北地区发生比较严重, 能够严重影响小麦的产量和品质, 是由多种病原菌入侵小麦根部所造成, 主要致病菌以麦根腐平脐蠕孢菌(*Bipolaris sorokiniana*)和尖孢镰刀菌属(*Fusarium oxysporum*)为主。目前常用的防治手段有物理方法、种子化学药物包衣及生物方法^[1-2]。物理防治手段主要采用农作物轮作的方法, 防治效果有限, 受环境条件影响较大, 而化学防治手段则是通过化学药物三唑类杀菌剂与小麦种子拌种来防治, 但长时间使用杀菌剂会造成环境污染, 诱导病菌抗性增强, 破坏生态平衡^[3]。生物防治方法则是利用环境微生物和提取物来进行防治, 具有有效、安全和持久的特点, 近年来备受关注。目前常用的生物防治微生物主要有内生细菌、内生真菌、放线菌等多种菌群^[4-6], 其中芽孢杆菌属抗逆能力强, 繁殖速度快, 对生长要求简单, 可以产生细菌素、酶类、活性物质、脂肽等抗菌物质, 在自然界中广泛存在于植物内, 是一种理想的生防微生物, 但目前对小麦根腐病防治的微生物研究很少^[7-10]。蜡样芽孢杆菌 0-9(*Bacillus cereus*)是从小麦根部中分离得到的内生细菌, 具有很好的抑菌作用^[11], 笔者研究 0-9 菌株对小麦根腐病菌尖孢镰刀菌活性的影响及其发酵代谢物质的稳定性, 为探索该菌株的抑菌机制以及开发应用生防制剂提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料 蜡样芽孢杆菌 0-9 由河南大学资源分离与微生物实验室分离保存, 保存于-80℃。小麦禾谷丝核菌

(*Rhizoctonia zeae*)、绿豆立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、玉米弯孢霉叶斑病(*Curvularia lunata* Boedijn)、西瓜炭疽病菌(*Colletotrichum lagenarium*)、尖孢镰菌黄瓜专化型(*Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum*)、小麦尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*) 6 种真菌均由河南大学资源遗传与分离实验室提供, 保存于 4℃。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株的活化。 0-9 菌株活化: 取甘油管保藏菌, 在固体 LB 培养基(1% 蛋白胨, 0.5% 酵母粉, 1% NaCl, 121℃ 灭菌 20 min)上划线活化, 挑取新鲜单菌落接入 100 mL 液体 LB 培养基中, 30℃、200 r/min 条件下振荡培养 18 h, 4℃ 条件下保存备用。

植物病原真菌的活化: 取病原真菌试管斜面, 用接种针挑取真菌菌丝放置于 PDA 培养基(马铃薯 200 g, 葡萄糖 10 g, 琼脂粉 15 g, 1 000 mL ddH₂O, 115℃ 灭菌 20 min)上, 于 25℃ 培养箱繁殖培养 7 d, 4℃ 条件下保存备用。

1.2.2 蜡样芽孢杆菌 0-9 菌株对植物病原菌菌丝生长的测定。 将活化后的 0-9 单菌落转接于 100 mL LB 液体培养基内, 30℃、200 r/min 振荡培养 18 h, 后 12 000 r/min 离心收集菌体, 并用无菌水悬浮菌体, 4℃ 保存备用; 在 PDA 培养基平板上距中心位置接种直径为 8 mm 的病原菌菌饼, 后在平板周围距离该菌饼 2.5 cm 的位置加入 5 μL 0-9 细菌菌悬液, 以 5 μL 无菌水作为对照, 后放置于 25℃ 培养, 培养 6 d 后观察结果, 采用十字交叉法测量病原菌直径, 对照病原菌直径记为 A, 处理病原菌直径记为 B, 计算抑菌率:

$$\text{抑菌率} = [(A - B) / A] \times 100\%$$

1.2.3 蜡样芽孢杆菌 0-9 菌株代谢产物对小麦尖孢镰刀菌活性测定。 将活化后的 0-9 单菌落转接于 100 mL PDA 液体

基金项目 河南省高等学校重点科研项目(16A180021)。
作者简介 黄秋斌(1988—), 男, 河南周口人, 初级实验师, 硕士, 从事微生物遗传资源与应用研究。* 通信作者, 讲师, 博士, 硕士生导师, 从事微生物资源与应用研究。
收稿日期 2019-11-09; **修回日期** 2019-12-24

培养基中,30 ℃、200 r/min 振荡培养 24 h,后在 12 000 r/min 离心收集上清,用 0.22 μm 的滤头过滤除菌,配制不同浓度(10⁻¹倍、10⁻²倍)的混合液,后与冷却至 45 ℃的 100 mL 固体 PDA 培养基混合倒平板,待冷却后在平板中心接种直径 8 mm 的病原菌菌饼,以 PDA 培养基为对照,放置于 25 ℃培养,6 d 后观察小麦尖孢镰刀菌在平板上的生长情况。

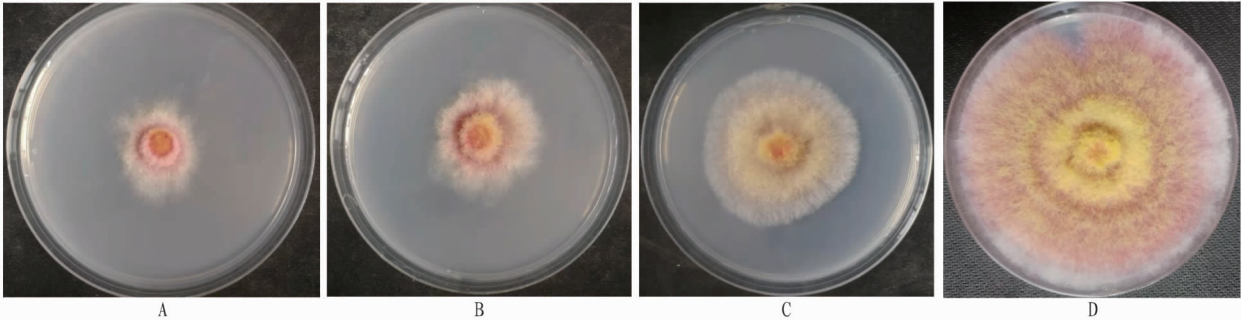
1.2.4 蜡样芽孢杆菌 0-9 代谢产物对孢子萌发的测定。小麦尖孢镰刀菌在 PDA 平板培养 14 d 后,加入 10 mL 无菌水洗脱孢子,用 8 层纱布过滤除去菌丝碎片,3 000 r/min 慢速离心,清洗 2 次后获得孢子悬液,然后将不同梯度的代谢产物和孢子悬液等比例混合,放到凹玻片中,置于 25 ℃培养箱中黑暗条件下培养 24 h,40×显微镜下观察并统计孢子萌发数,计算孢子的萌发率。

1.2.5 蜡样芽孢杆菌 0-9 代谢产物稳定性的测定。

(1)热稳定性。将过滤后代谢产物分别在 40、60、80、100 和 121 ℃处理 10 min,后与 100 mL 固体 PDA 培养基混合倒平板,待冷却后在平板中心接种直径 8 mm 的病原菌菌饼,以 PDA 培养基作为对照,放置于 25 ℃培养,培养 6 d 后采用十字交叉法测量病原真菌直径,计算抑菌率。

(2)紫外线稳定性。取过滤后 0-9 菌株代谢产物放置在超净台内紫外线(功率 21 W,距离 70 cm)照射处理,处理时间为 0、10、20、30 和 60 min,处理完毕后与 100 mL 固体 PDA 培养基混合倒平板,待冷却后在平板中心接种直径 8 mm 的病原菌菌饼,以 PDA 培养基作为对照,放置于 25 ℃培养,培养 6 d 后采用十字交叉法测量病原真菌直径,计算抑菌率。

(3)代谢产物的有效时间。把过滤后 0-9 菌株代谢产物在 25 ℃条件下分别放置 1、3、7 和 14 d,后与 100 mL 固体 PDA 培养基混合倒平板,待冷却后在平板中心接种直径 8 mm 的病原菌菌饼,以 PDA 培养基作为对照,放置于 25 ℃培养,培养 6 d 后采用十字交叉法测量病原真菌直径,计算抑菌率。



注:A 为代谢产物原液,B 为稀释 10 倍代谢产物,C 为稀释 100 倍代谢产物,D 为 CK 对照
Node: A.metabolite raw liquid;B.10-fold dilution of metabolites;C.100-fold dilution of metabolites;D.CK

图 2 0-9 菌株代谢产物对小麦尖孢镰刀菌的抑制作用

Fig.2 Inhibitory effect of metabolites of strain 0-9 on *Fusarium oxysporum*

2.4 0-9 菌株代谢产物的稳定性

2.4.1 温度的耐受性。从图 3 可以看出,0-9 菌株代谢产物经过不同温度处理后还表现出对小麦根腐病一定的抑菌活性,其中 30 和 40 ℃处理后抑菌活性无明显变化,抑制率达 84%;100 和 121 ℃高温处理后抑菌活性有所下降,但下降趋

2 结果与分析

2.1 蜡样芽孢杆菌 0-9 对小麦尖孢镰刀菌的抑菌作用 从图 1 可以看出,采用平板对峙法培养后,蜡样芽孢杆菌 0-9 菌株对小麦尖孢镰刀菌具有很好的抑制作用,其抑制率可达 50%,差异性比较明显。



图 1 0-9 菌株对小麦尖孢镰刀菌的抑制作用

Fig.1 Inhibitory effect of strain 0-9 on *Fusarium oxysporum*

2.2 0-9 菌株代谢产物对小麦尖孢镰刀菌活性的影响 从图 2 可以看出,平板经过 25 ℃培养 5 d 后,0-9 菌株代谢产物对小麦尖孢镰刀菌的活性具有很高的抑制率,可达 85%;稀释 100 倍后对病原真菌小麦尖孢镰刀菌仍具有一定的抑制性,可达 62%,说明 0-9 代谢产物对小麦尖孢镰刀菌具有很强的抑制活性。

2.3 0-9 菌株代谢产物对分生孢子萌发的影响 经过代谢产物处理后的孢子萌发率为 22.5%,而不经处理的孢子萌发率为 83.7%,且 100 倍、10 倍稀释的代谢产物处理后孢子萌发率分别为 45.2%、36.7%,比对照组低,说明 0-9 菌株产生的代谢产物能够影响分生孢子的萌发。

势不明显,抑制率达 76%,说明该代谢产物对小麦根腐病的抑菌活性受温度的影响很小,对温度具有很好的耐受性。

2.4.2 紫外线的耐受性。通过对 0-9 菌株代谢产物进行不同时间的紫外线处理后测定抑菌活性,结果见图 4。从图 4 可以看出,没有紫外线处理的,其抑菌活性为 83%,经过紫外

线处理 10、20、30、60 min 后,抑制率可达 81%,抑菌活性无明显变化,说明该代谢产物对紫外线不敏感,其对小麦根腐病的抑制性比较稳定。

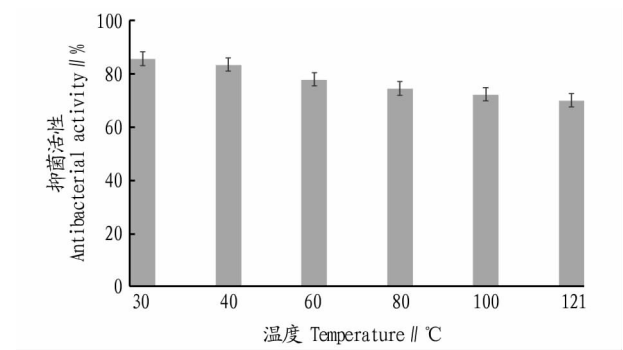


图 3 温度对 0-9 菌株代谢产物抑菌活性的影响
Fig.3 Effect of temperature on bacteriostatic activity of metabolites of 0-9

2.4.3 有效时间的稳定性。0-9 菌株代谢产物放置 4 ℃ 冰箱 1、3、7、14 d 后测定抑菌活性,结果见图 5。从图 5 可以看出,代谢产物放置一段时间后,抑菌活性和对照组相比无明显变化,抑制率仍可达 80%~82%,说明 0-9 菌株代谢物质不随着放置时间的变化而变化,对小麦根腐病的抑菌活性稳定性较好。

2.5 0-9 菌株代谢产物对 5 种植物病原真菌的抑制作用 从图 6 可以看出,蜡样芽孢杆菌 0-9 对 5 种真菌均有一定的抑制作用,其中对西瓜炭疽病菌抑制较为明显,抑制率为 60%;其次是对尖孢镰刀菌黄瓜转化型和玉米弯孢霉叶斑病 2 种真菌的抑制,其抑制率分别为 26.7%和 25.0%;对小麦禾谷丝

核菌和绿豆立枯丝核菌的抑制效果较低,其抑制率分别为 16.7%和 18.0%。

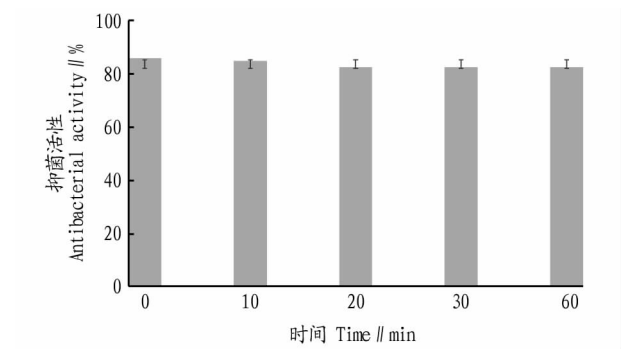


图 4 紫外线对 0-9 菌株代谢产物抑菌活性的影响
Fig.4 Effect of ultraviolet light on bacteriostatic activity of metabolites of 0-9

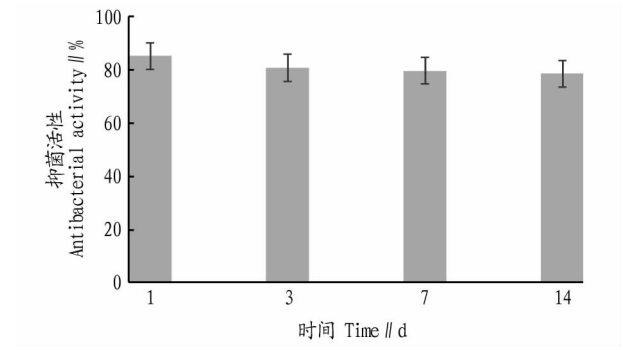
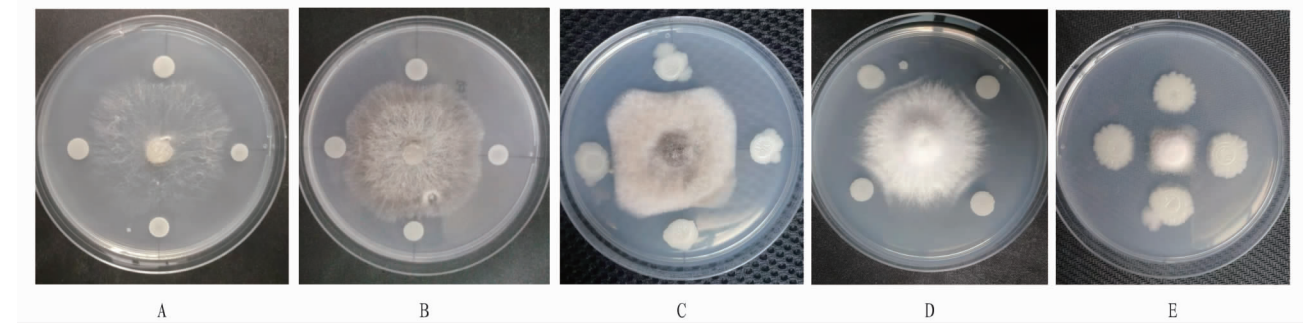


图 5 0-9 菌株代谢产物稳定性对抑菌活性的影响
Fig.5 Effect of stability of metabolites of 0-9 on bacteriostatic activity



注:A.小麦禾谷丝核菌; B.绿豆立枯丝核菌; C.玉米弯孢霉叶斑病;D.尖孢镰刀菌黄瓜专化型; E.西瓜炭疽病菌
Note: A.Wheat Rhizoctonia zeae; B.Rhizoctonia solani; C.Curvularia lunata Boedijn; D.Fusarium oxysporum f.sp cucumerinum; E.Collectotrichum lagenarium

图 6 蜡样芽孢杆菌 0-9 菌株对 5 种真菌的抑制作用
Fig.6 Inhibitory effect of Bacillus cereus 0-9 on five plant pathogens

3 结论与讨论

目前,生防菌的研究还停留在实验室阶段,在实验室条件下具有很好的抑菌活性,而在大田条件下,受到温度、紫外线、酸碱度等环境变化,生防菌及其代谢产物则不能很好地适应环境而发挥抑菌作用^[12-13],该研究中蜡样芽孢杆菌 0-9 (*Bacillus cereus*)是从小麦根部分离得到的内生细菌,通过平板对峙试验发现对引起小麦根腐病的病原真菌小麦尖孢镰刀菌均有一定的抑制作用,其抑制率可达 50%,为此研究 0-9 菌株及其代谢产物对小麦根腐病的抑制作用机制。通过

对0-9 代谢产物进行分析发现其对小麦尖孢镰刀菌抑制作用较为明显,可达 83%,说明 0-9 菌株能够产生较强的次生代谢产物,且该代谢产物能够抑制分生孢子的萌发,使菌丝局部膨大,不规则,生长缓慢异常。此外,发酵产生的代谢产物能够保持很强的稳定性,在高温、紫外线等条件下也能够发挥对病原真菌的抑制作用,且 0-9 菌株对小麦禾谷丝核菌、绿豆立枯丝核菌、玉米弯孢霉叶斑病、西瓜炭疽病菌、尖孢镰刀菌黄瓜专化型 5 种真菌具有广泛的抑制作用,为该菌株应用于大田环境提供理论基础。目前 0-9 菌株代谢产物中

发挥抑制作用的具体物质是哪种还不是很明确,下一步工作需要研究该物质的具体成分以及提取条件的优化,从而为该菌株作为生防制剂防治小麦根腐病的应用开发提供条件。

参考文献

- [1] 张德珍,李鹏昌,陈晓霞,等.山东省小麦根腐病病原菌的分离鉴定[J].植物保护学报,2016,43(2):233-240.
- [2] 刘正坪,王立新,李荣禧,等.小麦根腐病菌鉴定及其生物学特性测定[J].华北农学报,2002,17(2):44-48.
- [3] 张博,刘苹,张悦丽,等.几种生物制剂对小麦根腐病菌的毒力[J].麦类作物学报,2018,38(3):366-371.
- [4] 石晶盈,陈维信,刘爱媛.植物内生菌及其防治植物病害的研究进展[J].生态学报,2006,26(7):2395-2401.
- [5] 方珍娟,张晓霞,马立安.植物内生菌研究进展[J].长江大学学报(自科版),2018,15(10):41-45.
- [6] 文文艺,吴元华,田秀玲.植物内生菌研究进展及其存在的问题[J].生

态学杂志,2004,23(2):86-91.

- [7] 李晶,杨谦.生防枯草芽孢杆菌的研究进展[J].安徽农业科学,2008,36(1):106-111,132.
- [8] 刘文波,秦春秀,熊燕红,等.解淀粉芽孢杆菌 HAB-7 对 18 株植物病原真菌的抑制作用[J].热带农业科学,2017,37(2):53-57,66.
- [9] 黄华毅,王佳琳,马荣,等.枯草芽孢杆菌 STO-12 抑菌活性及其抑菌物质分析[J].浙江农业学报,2017,29(1):81-88.
- [10] 杨晓燕,王钰鑫,叶伟伟,等.枯草芽孢杆菌对几种植物病原真菌的抑菌活性[J].工业微生物,2018,48(6):32-38.
- [11] 黄秋斌,许玉彬,童琰,王刚,等.*pseP* 基因对蜡样芽孢杆菌 0-9 菌株生物薄膜形成和防治小麦纹枯病的影响[J].植物保护学报,2014,41(2):236-241.
- [12] 谭云峰,田志来.我国微生物杀虫剂的研究应用及展望[J].吉林农业科学,2005,30(3):62-65.
- [13] 冯书亮,王容燕,曹伟平,等.苏云金杆菌与其他芽孢杆菌在土壤中消长动态的关系[J].农业环境科学学报,2005,24(5):877-880.

(上接第 127 页)

转型升级,在目前发展的现状下,融入康养旅游模式,在传统单一的乡村旅游中创新融合“康养+田园”“康养+体育”“康养+文化”“康养+养生”的发展模式,丰富旅客多样化体验,实现可持续发展。

参考文献

- [1] 孙九霞.中国旅游发展笔谈——乡村旅游与乡村文化复兴[J].旅游学刊,2019,34(6):1.
- [2] KROUT J A.Seasonal migration of the elderly[J].The gerontologist,1983,23(3):295-299.
- [3] SKELLEY B D.Retiree-attraction policies:Challenges for local government in rural regions[J].Public administration and management,2004,9(3):212-223.
- [4] GUSTAFSON P.Tourism and seasonal retirement migration[J].Annals of tourism research,2002,29(4):899-918.
- [5] STARÁ J,PETERSON C.Understanding the concept of wellness for the future of the tourism industry:A literature review[J].Journal of tourism and services,2017,14(1):18-29.

- [6] 陈纯.国内外康养旅游研究综述[J].攀枝花学院学报,2019,36(4):43-47.
- [7] 杨振之.中国旅游发展笔谈——旅游与健康、养生[J].旅游学刊,2016,31(11):1.
- [8] 任宣羽.康养旅游:内涵解析与发展路径[J].旅游学刊,2016,31(11):1-4.
- [9] 谢晓红,郭倩,吴玉鸣.我国区域性特色小镇康养旅游模式探究[J].生态经济,2018,34(9):150-154.
- [10] 凌常荣,周曦.康养旅游发展与后发地区乡村振兴研究:以广西“东巴凤”地区为例[J].经济论坛,2018(3):73-77.
- [11] 刘新,邓云芳.田园康养的精准脱贫——湖南省武陵山片区乡村旅游与康养产业的创新融合研究[J].黑龙江生态工程职业学院学报,2018,31(2):29-31.
- [12] 韩秋,王欢欢,沈山.我国康养产业发展的实践路径[J].旅游纵览,2019(6):110-112.
- [13] 易慧玲,李志刚.产业融合视角下康养旅游发展模式及路径探析[J].广西师范学院学报(哲学社会科学版),2019,40(5):126-131.
- [14] 天津市统计局,国家统计局天津调查队.天津统计年鉴 2018[M].北京:中国统计出版社,2018.
- [15] 于沐仔,王庆生.基于田园综合体视角的旅游精准扶贫对策研究:以山东省沂南县朱家林为例[J].中国商论,2017(34):45-48.