

枯草芽胞杆菌Y13挥发性物质的分析及抑菌活性

冯福山^{1,2}, 刘君昂^{1,2}, 胡廉成^{1,2}, 文瑞芝^{1,2}, 周国英^{1,2*}

(1. 中南林业科技大学, 长沙 410004; 2. 南方人工林病虫害防控国家林业局重点实验室/森林有害生物防控湖南省重点实验室/经济林培育与保护教育部重点实验室, 长沙 410004)

摘要: 枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* Y13 是一株高效广谱的生防菌, 对油茶主要病害具有较好的生防效果, 试验表明其发酵产生的挥发性物质对油茶炭疽病菌有较好的抑制作用。对菌株 Y13 产生的挥发性物质进行定性定量分析, 并测定其抑菌活性, 为油茶病害无公害防治及药剂开发提供理论依据。采用顶空固相微萃取技术 (HS-SPME) 和气相色谱-质谱联用仪 (GC-MS) 收集并分析 Y13 挥发性物质成分, 购买相应挥发性物质纯品, 采用双皿倒扣法测定其抑菌活性。Y13 挥发性物质对 10 种植物病原真菌抑菌率在 19.2%~83.9%, 其中挥发性物质对果生炭疽菌 *Colletotrichum fructicola* 的抑菌活性最强, 抑菌率达到 83.9%; 检测其中 10 种挥发性化合物纯品对果生炭疽菌的抑菌活性发现, 除了正十八烷外, 其他 9 种挥发性化合物纯品均具有不同程度的抑菌活性; 筛选出的 4 种高效抑菌挥发性化合物纯品对 7 种常见的油茶病原真菌的抑菌活性检测结果表明, 4 种挥发性化合物纯品 (10 μ L/平板) 对 7 种常见的油茶病原真菌均具有较好的抑菌活性, 抑菌活性壬醛 > 苯甲醛 > 3-甲基-4-苯基吡啶 > 苯丙噻唑。Y13 挥发性物质对油茶主要病害病原菌有很好的抑制作用, 具有一定的研究意义和良好的开发价值。

关键词: 枯草芽胞杆菌; 挥发性物质; GC-MS; 抑菌活性

中图分类号: S476 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-9261(2019)04-0597-08

Analysis of Volatile Compounds from *Bacillus subtilis* Y13 and Its Antimicrobial Activity

FENG Fushan^{1,2}, LIU Junang^{1,2}, HU Liancheng^{1,2}, WEN Ruizhi^{1,2}, ZHOU Guoying^{1,2*}

(1. Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China; 2. Key Laboratory of National Forestry and Grassland Administration on Control of Artificial Forest Diseases and Pests in South China/Hunan Provincial Key Laboratory for Control of Forest Diseases and Pests/Key Laboratory for Non-wood Forest Cultivation and Conservation of Ministry of Education, Changsha 410004, China)

Abstract: *Bacillus subtilis* Y13 is a high-efficiency and broad-spectrum biocontrol strain. It has excellent biocontrol effect on the main diseases of *Camellia oleifera*. Experiments showed that the volatile substances produced by fermentation had a good inhibitory effect on anthracnose of *Camellia oleifera*. Volatile substances produced by strain Y13 were analyzed qualitatively and quantitatively, and their bacteriostatic activities were determined, which provided a theoretical basis for pollution-free control of *Camellia oleifera* diseases and pesticide development. Headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) were used to collect and analyze the volatile components of Y13, purchasing pure volatile substances, and measuring its antifungus activity. The antifungus rate of Y13 volatiles to 10 plant pathogenic fungi was 19.2%–83.9%, among which volatile substances had the strongest antifungus activity against *C. fructicola*, and the inhibition rate reached 83.9%. The antifungus activity of 10 volatile compounds against *C. fructicola* was detected. Except octadecane, the other 9 volatile compounds had different degrees of antifungus activity. The four highly effective antifungus volatile

收稿日期: 2019-03-07

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFD0600103-3)

作者简介: 冯福山, 硕士研究生, E-mail: 865426731@qq.com; *通信作者, 博士, 教授, E-mail: 522375325@qq.com。

DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2019.04.017

compounds were selected. The antifungus activity of pure products against 7 common *Camellia oleifera* fungi showed that the four volatile compounds (10 μ L/plate) had good antifungus activity and antifungus activity against 7 common *Camellia oleifera* fungi. The antifungus activity were ranked as Nonanal>Benzaldehyde>3-methyl-4-phenylpyrazole>Benzothiazole. Y13 volatile substances have a good inhibitory effect on the pathogens of *Camellia oleifera*, and have certain research significance and good development value.

Key words: *Bacillus subtilis*; volatile compounds; GC-MS; inhibition activity

油茶 *Camellia oleifera*, 属山茶科 *Theaceae* 山茶属 *Camellia* L.常绿小乔木或灌木, 是我国特有的一种珍贵的木本油料植物^[1]。目前, 油茶在我国多个省份均有种植, 产值大, 对我国农村经济以及精准扶贫项目具有良好的推动作用。炭疽病是为害严重、造成损失较大的病害^[2], 其主要致病菌为果生炭疽菌 *Colletotrichum fructicola*^[3], 该病原菌分布广泛, 对环境的适应能力强, 为害严重。据统计, 油茶炭疽病造成我国油茶林年均损失高达 90 亿元^[4,5]。因此, 深入研究油茶炭疽病的防治措施, 对提高油茶的产量及品质有重要意义。

生物防治能有效防治植物病害, 还能减少使用化学药剂所带来的弊端^[6], 在植物病害的防治上起着越来越重要的作用^[7]。在农业、工业和制药方面, 微生物抗菌性物质都有应用潜力。在农业生产方面, 微生物抗菌性物质作为生物防治剂来控制植物病原, 可以减少化学杀菌剂使用, 对环境无害^[8]。近年来, 人们对微生物源挥发性物质的研究日益增多, 不仅因为释放挥发性物质的微生物种类超出人们现有的认识, 而且这些微生物挥发性物质成分复杂、功能多样, 但是有关其产生的挥发性物质对病原菌的抑制作用相关研究鲜有报道。芽胞杆菌种群庞大, 分布广泛; 易于定殖与繁殖、抑菌谱广、对人畜无害, 是一种绿色安全的生防微生物^[9]; 其生长速度快、营养需求简单、能产生大量抗逆性强且休眠期长的芽胞, 这些特点使其明显优于其他生防微生物, 是一种理想的生防微生物^[10]。本文研究油茶内生拮抗菌枯草芽胞杆菌 Y13 的挥发性物质, 研究其组成成分、抑菌活性等, 为进一步研究机理奠定基础。

拮抗菌 Y13 是本课题组从健康油茶叶片中筛选、分离出对油茶炭疽病有强烈抑制作用的油茶内生细菌, 经生理生化分析及 16S rDNA 鉴定为枯草芽胞杆菌^[11]。本研究主要对枯草芽胞杆菌 Y13 的挥发性气体对多种植物病原真菌的抑菌活性进行测定, 采用顶空固相微萃取技术 (Headspace solid-phase microextraction, HS-SPME) 收集枯草芽胞杆菌 Y13 的挥发性气体, 并利用气相色谱-质谱联用仪 (GC-MS) 对挥发性气体的组分进行分析, 从市场上购买鉴定出的挥发性气体化合物的纯品并分别测定这些挥发性化合物纯品的抑菌活性, 筛选出具有高效抑菌活性的挥发性气体组分, 为枯草芽胞杆菌 Y13 的挥发性气体的开发利用和无公害药剂的研发提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株

供试拮抗菌: 枯草芽胞杆菌 Y13 由本课题组从健康油茶叶片分离、筛选、鉴定获得。

供试病原菌: 果生炭疽菌 *Colletotrichum fructicola*、暹罗炭疽菌 *Colletotrichum siamense*、胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides*、山茶炭疽菌 *Colletotrichum camelliae*、君子兰炭疽菌 *Colletotrichum cliviae*、链格孢菌 *Alternaria alternata*、拟盘多毛孢菌 *Pestalotiopsis microspora*、天门冬拟茎点霉 *Phomopsis asparagi*、新月弯孢霉 *Curvularia lunata*、粉红单端孢菌 *Trichotecium roseum* 等均由中南林业科技大学经济林培育与保护教育部重点实验室森林微生物菌种保藏中心分离、鉴定并保存。

1.2 供试培养基

马铃薯葡萄糖琼脂 (potato dextrose agar, PDA) 培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 18 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 自然。

LB (Luria-Bertani) 液体培养基: 胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 10 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.0~7.2。

牛肉膏蛋白胨固体 (Nutrient broth, NB) 培养基: 蛋白胨 10 g, 牛肉膏 5 g, NaCl 5g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.0~7.2。

Y13 最佳产气抑菌培养基: 葡萄糖 17.59 g, 酵母膏 11.56 g, 磷酸二氢钾 1.44 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.62。

以上供试培养基配制后均通过蒸汽高压 (121 °C, 处理 20 min) 方法灭菌。

1.3 主要试剂及仪器

95%壬醛 (Nonanal, TCI 试剂)、98% 2-壬酮 (2-Nonanone, TCI 试剂)、98% 2-庚酮 (2-Heptanone, TCI 试剂)、95%苯甲醛 (Benzaldehyde, S-A 试剂)、98% 3-甲基-4-苯基吡唑 (3-methyl-4-phenylpyrazole, Alfa 试剂)、98% 3,5-二叔丁基苯酚 (3,5-ditertbutylphenol, MATRIX 试剂)、99%邻苯二甲酸二丁酯 (Dibutyl phthalate, Alfa 试剂)、97%过氧化二碳酸二酯 (2-Diethylhexyl peroxydicarbonate, TCI 试剂)、97%苯丙噻唑 (Benzothiazole, ark pharm 试剂)、85%正十八烷 (Octadecane, TCI 试剂), 其他试剂均为国产分析纯。7890A-5975C 气相色谱-质谱联用仪 (美国 Agilent)、5-7330 型固相微萃取装置 (美国 Supelco 公司)、50 μm /30 μm 二乙烯苯/碳分子筛/聚二甲基硅氧烷微萃取头 (美国 Supelco 公司)、HP-5 石英毛细管色谱柱等。

1.4 Y13 产挥发性物质抑菌谱的测定

以 10 种常见的植物病原真菌为指示菌, 测定枯草芽胞杆菌 Y13 挥发性气体的抑菌活性。抑菌活性的检测采用双皿倒扣法^[12]并做一定的改进。具体方法为: 将拮抗菌 Y13 接在 LB 液体培养基上, 在 28 °C、180 r/min 振荡培养 24 h, 制成种子液, 再将 Y13 种子液接入 LB 发酵培养基, 发酵培养 2 d 后, 以 1:20 (v/v) 的比例与加热冷却至 45~50 °C 的 NB 固体培养基混合均匀并倾倒入平板, 对照组为不添加 Y13 菌液的 NB 固体培养基平板; 再制备 PDA 培养基平板, 并将供试病原菌用 PDA 培养基, 培养 7 d 后, 用打孔器切取菌落边缘的新鲜菌饼 (直径 6 mm) 分别接种至平板中央; 最后将接种了病原真菌的 PDA 平板倒扣到不同处理的 NB 固体培养基平板上, 用双层封口膜将两个培养皿封住, 于 28 °C 恒温培养箱中培养, 接种病原真菌的 PDA 平板在上, 4 d 后测量病原真菌菌落直径 (mm), 每个处理设 3 次重复。病原真菌菌落直径采用十字交叉法进行测量并计算抑菌率, 抑菌率 (%) = (对照组菌落直径 - 处理组菌落直径) / (对照组菌落直径 - 菌饼直径) \times 100。

1.5 Y13 产挥发性物质收集及 GC-MS 分析

1.5.1 顶空固相微萃取 (HS-SPME) 收集挥发性气体 将制备好的 Y13 菌液 (1.0×10^9 cfu/mL) 以 1:20 (v/v) 的比例与加热冷却至 45 °C~50 °C 的 NB 液体培养基混合, 然后用移液枪吸取 5 mL 混合完 Y13 菌液的 NB 液体培养基于 20 mL 顶空进样瓶中, 对照组为顶空进样瓶中添加 5 mL 不混合 Y13 菌液的 NB 液体培养基, 将顶空瓶置于 28 °C、140 r/min 恒温摇床中培养 3 d 后收集 Y13 的挥发性气体。挥发性气体的收集采用顶空固相微萃取技术, 对挥发性气体进行手动萃取并配置 50 μm /30 μm 的二乙烯苯/碳分子筛/聚二甲基硅氧烷微萃取头 (DVB/CAR/PDMS, 灰色)。将顶空进样瓶置于 40 °C, 恒温装置中平衡 1 h 以上, 且将萃取纤维头在气相色谱的进样口中活化 10 min, 活化温度为 230 °C, 然后将萃取纤维头插入顶空进样瓶中萃取 20 min, 吸附完成后, 迅速取出萃取纤维头插入气相色谱-质谱联用仪 (GC-MS) 进样口解析 2 min, 然后进行 GC-MS 分析。

1.5.2 挥发性化合物的定性和定量分析 气相色谱条件: 采用 HP-5 石英毛细管色谱柱 (30.0 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm), 进样口温度 230 °C, 载气为高纯度氦气 (>99.999%), 色谱柱初始温度 50 °C, 保持 2 min, 柱流量 1 mL/min, 分流进样, 分流比为 10:1, 以 6 °C/min 升温速率至 180 °C, 保持 1 min, 在以 10 °C/min 升温速率至 250 °C, 保持 3 min。质谱条件: 电子轰击离子源 (EI), 离子源温度为 230 °C, GC-MS 接口温度 230 °C, 四极杆温度 150 °C, 电子能量 70 eV, 质量扫描范围为 30~450 m/z。GC-MS 所得质谱图经 NIST2011 质谱数据库检索, 结合每个峰的质谱数据和化合物的标准图谱特征, 对其进行定性分析, 利用色谱峰面积归一法测得各组分的相对百分比来表示单个化合物的质量分数。

1.6 挥发性化合物纯品抑菌活性的检测

从市面上购买 GC-MS 分析鉴定出的 10 种枯草芽胞杆菌 Y13 挥发性化合物的纯品 (表 1), 并分别

检测其抑菌活性,以果生炭疽菌作为指示菌进行检测。检测方法具体为:制备 PDA 培养基平板并在平板中央接入新鲜的果生炭疽菌菌饼(直径 6 mm),再分别在培养皿的皿盖中央放置无菌干燥的滤纸片(直径 6 mm),用移液枪分别往滤纸片上滴加不同体积的挥发物化合物纯品,然后将培养皿用双层封口膜封住,于 28 °C 恒温培养箱中倒置培养,每个纯品均设 5、10、15 和 20 μL 用量,以滤纸片上滴加无菌水为对照,待对照组病原真菌菌落直径长至超过培养皿直径的 3/4 时,测量病原真菌的菌落直径(mm),每个处理设 3 次重复。病原真菌菌落直径的测量采用十字交叉法,计算抑菌率。

表 1 市购的 10 种 Y13 挥发性化合物纯品
Table 1 10 kinds of pure Y13 volatile compounds purchased from market

序号 Number	化合物 Compound	纯度 Purity
1	壬醛 Nonanal	95%
2	2-壬酮 2-Nonanone	98%
3	2-庚酮 2-Heptanone	98%
4	苯甲醛 Benzaldehyde	95%
5	3-甲基-4-苯基吡唑 3-methyl-4-phenylpyrazole	98%
6	3,5-二叔丁基苯酚 3,5-di-tert-butylphenol	98%
7	邻苯二甲酸二丁酯 Dibutyl phthalate	99%
8	正十八烷 Octadecane	85%
9	过氧化二碳酸二酯 Di (2-ethylhexyl)	97%
10	苯丙噻唑 Benzothiazole	97%

1.7 4 种高效抑菌挥发性化合物纯品对 7 种常见油茶病原真菌的抑菌活性检测

以 7 种常见油茶病原真菌为指示菌,测定筛选出的 4 种高效抑菌挥发性化合物(苯甲醛、壬醛、3-甲基-4-苯基吡唑、苯丙噻唑)对它们的抑菌活性。抑菌活性的测定采用 1.6 中的方法,滤纸片中的施药量为 10 μL ,以滤纸片上滴加无菌水为对照,待对照组病原真菌菌落直径长至超过培养皿直径的 3/4 时,测量病原真菌的菌落直径(mm),此后用新的无菌培养皿盖替换原来放置有滴有挥发性抑菌化合物纯品的滤纸片的皿盖,并继续观察 3 d,观察被抑制的病原真菌的生长有无恢复,每个处理设 3 次重复。

1.8 数据统计与分析

采用 Excel 2010 (Microsoft, USA) 和 SPSS 20.0 (IBM, USA) 软件对试验数据进行统计和分析,并应用 Duncan 氏法对不同处理组间的差异进行单因素方差分析 ($P \leq 0.05$),所有数据为平均值 \pm 标准差。

2 结果与分析

2.1 Y13 产挥发性物质的抑菌谱

枯草芽胞杆菌 Y13 的挥发性物质对 10 种病原真菌均有不同程度的抑菌活性,其抑菌率在 19.2%~83.9%。其中挥发性气体对果生炭疽菌的抑菌活性最强,抑菌率达到 83.9%,对天门冬拟茎点菌具有最低的抑菌效果,抑菌率为 19.2% (表 2)。

2.2 Y13 产挥发性物质的定性定量分析

采用顶空固相微萃取技术收集枯草芽胞杆菌 Y13 的挥发性气体,并利用气相色谱-质谱联用仪 (GC-MS) 分析气体成分,共发现 13 种明显不同的典型峰,经 NIST05 质谱数据库检索,共检测出 13 种不同的挥发性化合物,包括醇类、酚类、醛类、酯类、酮类、烯炔类、烷烃类等,这 13 种挥发性化合物总含量占挥发物质总量的 53.52%。其中邻苯二甲酸二丁酯是 13 种挥发性化合物中含量最高的组分,相对含量为 12.81%;其次是十六甲基-1,15-二羟基八硅氧烷,相对含量为 9.82%;最低的为 3-甲基-4-苯基吡唑,相对含量为 1.61%。在这 13 种挥发性化合物中,醇类仅有 1 种,相对含量为 2.63%;醛类有 2 种,相对含量为 7.41%;酮类有 2 种,相对含量为 3.83%;酯类有 2 种,相对含量为 15.45%;烯炔类有 1 种,相对含量为 5.00%;烷烃类有 2 种,相对含量为 11.43% (表 3)。

表 2 枯草芽胞杆菌 Y13 挥发性物质对多种植物病原真菌的抑菌活性测定

Table 2 Inhibition activities of volatiles produced by *B. subtilis* Y13 against various fungal phytopathogens

植物病原真菌 Fungi	培养时间 Incubation time (d)	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone (mm)	抑菌率 Inhibition rate (%)
果生炭疽菌 <i>Colletotrichum fructicola</i>	4	9.0±0.2	83.9±1.2
暹罗炭疽菌 <i>Colletotrichum siamense</i>	4	16.0±0.5	65.7±0.8
胶孢炭疽菌 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	4	15.0±0.4	63.8±1.5
山茶炭疽菌 <i>Colletotrichum camelliae</i>	4	14.0±0.3	54.3±3.2
君子兰炭疽菌 <i>Colletotrichum cliviae</i>	4	18.0±0.6	61.2±3.0
链格孢菌 <i>Alternaria alternate</i>	5	18.0±0.3	59.8±2.1
拟盘多毛孢菌 <i>Pestalotiopsis microspora</i>	7	19.0±0.3	42.1±0.7
天门冬拟茎点菌 <i>Phomopsis asparagi</i>	4	38.0±0.6	19.2±2.6
新月弯孢霉 <i>Curvularia lunata</i>	5	21.0±0.3	38.2±1.8
粉红单端孢菌 <i>Trichotecium roseum</i>	7	13.0±0.5	70.4±2.9

表 3 枯草芽胞杆菌 Y13 产挥发性物质的 GC-MS 鉴定结果

Table 3 GC-MS identification results of volatile substances produced by *B. subtilis* Y13

保留时间 Retention time (min)	化合物名称 Name of compound	分子式 Molecular formula	相对含量 Relative content (%)
3.93	乙醇 Ethanol	C ₂ H ₆ O	2.63
4.01	壬醛 Nonanal	C ₉ H ₁₈ O	3.33
5.28	2-壬酮 2-Nonanone	C ₉ H ₁₈ O	1.88
18.08	2-庚酮 2-Heptanone	C ₇ H ₁₄ O	1.95
30.75	苯甲醛 Benzaldehyde	C ₇ H ₆ O	4.08
31.33	3-甲基-4-苯基吡唑 3-methyl-4-phenylpyrazole	C ₁₀ H ₁₀ N ₂	1.61
33.64	3,5-二叔丁基苯酚 3,5-di-tert-butylphenol	C ₁₄ H ₂₂ O	2.62
44.78	邻苯二甲酸二丁酯 Dibutyl phthalate	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	12.81
46.69	新植二烯 Neophytadiene	C ₂₀ H ₃₈	5.00
46.87	过氧化二碳酸二(2-乙基己基)酯 Di (2-ethylhexyl) peroxydicarbonate	C ₁₈ H ₃₄ O ₆	2.64
50.05	正十八烷 Octadecane	C ₁₈ H ₃₈	1.61
50.26	十六甲基-1,15-二羟基八硅氧烷 Hexadecyl-1,15-dihydroxyocta siloxane	C ₁₆ H ₃₅ O ₉ Si ₈	9.82
52.33	苯丙噻唑 Benzothiazole	C ₇ H ₅ NS	3.54

2.3 10 种挥发性物质纯品的抑菌活性

当培养皿(直径 9 cm)中的施药剂量为 5 μL 时, 壬醛、苯甲醛均能完全抑制果生炭疽菌的生长, 10 种挥发性化合物纯品的抑菌率为壬醛(100%) = 苯甲醛(100%) > 3-甲基-4-苯基吡唑(94.2%) > 苯丙噻唑(89.6%) > 3,5-二叔丁基苯酚(72.4%) > 2-壬酮(69.7%) > 2-庚酮(65.4%) > 邻苯二甲酸二丁酯(48.9%) > 过氧化二碳酸二酯(40.3%) > 正十八烷(0%)。随着施药剂量的增加, 挥发性化合物纯品的抑菌活性逐渐增加, 当施药剂量为 20 μL 时, 壬醛、苯甲醛、3-甲基-4-苯基吡唑、苯丙噻唑 4 种纯品均能抑制完全果生炭疽菌的生长, 10 种挥发性化合物纯品的抑菌率为壬醛(100%) = 苯甲醛(100%) > 3-甲基-4-苯基吡唑(100%) > 苯丙噻唑(100%) > 3,5-二叔丁基苯酚(85.5%) > 2-庚酮(75.6%) > 2-壬酮(74.1%) > 过氧化二碳酸二酯(49.1%) > 邻苯二甲酸二丁酯(48.8%) > 正十八烷(0%)。随着施药浓度的上升, 壬醛、2-庚酮、苯甲醛、3-甲基-4-苯基吡唑、3,5-二叔丁基苯酚、苯丙噻唑、过氧化二碳酸二酯等 7 种挥发性化合物纯品的抑菌活性均呈现逐渐上升趋势; 邻苯二甲酸二丁酯在施药浓度为 20 μL 时,

抑菌率有所下降。对比 9 种具有抑菌活性的挥发性化合物纯品的抑菌活性发现, 壬醛、苯甲醛、3-甲基-4-苯基吡唑和苯丙噻唑的抑菌活性较强, 施药剂量为 10 μL 时, 这 4 种挥发性化合物纯品对果生炭疽菌的抑菌率均达到 90% 以上, 另外几种挥发性化合物纯品的抑菌率均低于 75% (表 4)。所以进一步探究筛选出的壬醛、苯甲醛、3-甲基-4-苯基吡唑和苯丙噻唑 4 种挥发性化合物纯品的抑菌活性。

表 4 不同浓度的 10 种挥发性化合物纯品对果生炭疽菌的抑菌活性分析

Table 4 Inhibition activities of different concentrations of 10 pure volatile compounds against *C. fruticola*

挥发物纯品用量 Dosage (μL)	抑菌率 Inhibition rate (%)									
	正十八烷	过氧化二碳 酸二酯	邻苯二甲酸 二丁酯	2-庚酮	2-壬酮	3,5-二叔丁 基苯酚	苯丙 噻唑	3-甲基-4-苯 基吡唑	苯甲醛	壬醛
5	0.00	40.3 \pm 0.5 d	48.9 \pm 0.4 c	65.4 \pm 0.5d	69.8 \pm 0.7 c	72.4 \pm 0.7 d	89.6 \pm 0.7 d	94.2 \pm 0.1 d	100.0 \pm 0.0 a	100.0 \pm 0.0 a
10	0.00	44.5 \pm 0.7 c	50.7 \pm 0.5 b	67.9 \pm 0.4 c	71.9 \pm 0.4 b	74.7 \pm 0.5 c	94.5 \pm 0.70 c	95.8 \pm 0.6 c	100.0 \pm 0.0 a	100.0 \pm 0.0 a
15	0.00	46.7 \pm 0.8 b	52.8 \pm 0.5 a	73.1 \pm 0.5 b	73.8 \pm 0.9 a	79.9 \pm 0.2 b	97.2 \pm 0.4 b	98.4 \pm 0.1 b	100.0 \pm 0.0 a	100.0 \pm 0.0 a
20	0.00	48.8 \pm 0.2 a	49.1 \pm 1.1 c	75.6 \pm 0.2 a	74.1 \pm 1.3 a	85.5 \pm 0.6 a	100.0 \pm 0.0 a	100.0 \pm 0.0 a	100.0 \pm 0.0 a	100.0 \pm 0.0 a

注: 同列中不同小写字母表示差异显著性 ($P < 0.05$)

Note: Date followed by different letters in the same column were significantly different at 0.05 level.

2.4 筛选出的 4 种高效抑菌挥发性化合物纯品对油茶常见病原真菌的抑制活性

4 种挥发性化合物纯品 (10 μL /平板) 对 7 种常见的油茶病原真菌均具有较好的抑菌活性, 壬醛是本研究中筛选出的 4 种高效抑菌挥发性化合物纯品中抑菌活性最强、效果最显著的, 能完全抑制 7 种油茶病原菌的生长; 苯甲醛能完全抑制果生炭疽菌、胶孢炭疽菌、山茶炭疽菌的生长, 对暹罗炭疽菌、君子兰炭疽菌、链格孢菌、拟盘多毛孢菌的抑制活性均在 90% 以上; 3-甲基-4-苯基吡唑能完全抑制果生炭疽菌、君子兰炭疽菌的生长, 对拟盘多毛孢的抑菌活性最低, 抑菌率为 57.2%; 苯丙噻唑对果生炭疽菌、胶孢炭疽菌、山茶炭疽菌、暹罗炭疽菌、君子兰炭疽的抑制率均在 90% 以上, 对拟盘多毛孢菌的抑菌活性最低, 抑菌率为 53.1%。此外, 用新的无菌培养皿盖替换原来放置有滴有挥发性化合物纯品的滤纸片的皿盖, 并连续观察 3 d 后, 发现被壬醛完全抑制的 7 种油茶病原真菌的生长均没有变化, 未见到植物病原真菌有新的菌丝生长 (表 5)。

表 5 筛选出的 4 种挥发性化合物纯品 (10 μL /平板) 对多种油茶病原真菌的抑菌活性

Table 5 Inhibition activity of selected pure volatile compounds (10 μL /plate) against several pathogenic fungi from *C. oleifera*

植物病原真菌 Fungi	培养时间 Incubation time (d)	抑菌率 Inhibition rate (%)			
		壬醛 $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{O}$	苯甲醛 $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}$	3-甲基-4-苯基吡唑 $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_2$	苯丙噻唑 $\text{C}_7\text{H}_5\text{NS}$
果生炭疽菌 <i>C. fruticola</i>	4	100 \pm 0.00 a	100.00 \pm 0.00 a	100.00 \pm 0.00 a	90.30 \pm 0.20 d
暹罗炭疽菌 <i>C. siamense</i>	4	100 \pm 0.00 a	94.80 \pm 0.40 d	97.60 \pm 0.80 b	100.00 \pm 0.00 a
胶孢炭疽菌 <i>C. gloeosporioides</i>	4	100 \pm 0.00 a	95.67 \pm 0.06 c	90.40 \pm 0.60 c	91.30 \pm 0.60 c
山茶炭疽菌 <i>C. camelliae</i>	4	100 \pm 0.00 a	96.40 \pm 0.20 b	91.20 \pm 1.00 c	93.80 \pm 0.40 b
君子兰炭疽菌 <i>C. cliviae</i>	4	100 \pm 0.00 a	91.70 \pm 0.40 f	100.00 \pm 0.00 a	90.30 \pm 0.20 d
链格孢菌 <i>A. alternate</i>	5	100 \pm 0.00 a	90.20 \pm 0.40 g	78.60 \pm 0.50 d	68.0 \pm 0.60 e
拟盘多毛孢菌 <i>P. microspora</i>	7	100 \pm 0.00 a	93.53 \pm 0.25 e	57.20 \pm 0.40 e	53.10 \pm 0.20 f

注: 同列中不同小写字母表示差异显著性 ($P < 0.05$)

Note: Date followed by different letters in the same column are significantly different at 0.05 level.

3 讨论

微生物产生的抑菌挥发性物质具有抑菌高效、可生物降解、在植物表面不残留等特点, 因此利用挥发性气体防治植物病害被认为是比传统的化学防治更环保更有效的植物病害防治手段之一^[13]。本研究中, 枯草芽孢杆菌 Y13 挥发性物质显示出了较好的抑菌活性和抑菌广谱性, 它不仅能够有效抑制多种病原真菌的生

长, 还能抑制多种病原真菌产生色素。Liu 等^[14]报道芽胞杆菌 BL02、BSH-4 和 ZB13 的挥发性气体均能有效地抑制核芸苔链格孢 *Alternaria brassicae*、菊池尾孢 *Cercospora kikuchii*、大丽轮枝菌 *Verticillium dahliae* 的菌丝生长; Chaves-López 等^[15]研究表明解淀粉芽胞杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* M49 的挥发性气体能抑制尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* 的色素形成。目前, 芽胞杆菌挥发性气体对植物病原真菌色素形成的抑制作用机制尚不清楚, 有研究表明芽胞杆菌的挥发性气体并非是抑制色素的产生, 而是抑制了色素产生的速率。芽胞杆菌挥发性气体对病原真菌色素形成的影响的具体机制还有待进一步深入研究。

通过采用气相色谱-质谱技术, 不同种类的挥发性化合物已经从芽胞杆菌的挥发性气体中鉴定出来, 其中抑菌活性检测发现不同种类的挥发性化合物对病原真菌的抑菌效果差异显著。Maruzzella^[16]研究结果表明挥发性气体的抑菌活性大小排序为有机酸>醛>醇>醚>酮>酯>内酯。Andersen 等^[17]报道脂肪族醛和酮比醇对链格孢菌 *A. lternata* 的芽管形成的抑制作用更强。本研究中, 4 种筛选出的挥发性物质化合物纯品(壬醛、为苯甲醛、3-甲基-4-苯基吡唑、苯丙噻唑)的抑菌活性的大小排序和前人的研究结果一致, 通过检测 10 μL/平板施药量时 4 种挥发性化合物对 7 种常见的油茶病原真菌的抑菌活性发现, 4 种挥发性化合物的抑菌活性为壬醛>苯甲醛>3-甲基-4-苯基吡唑>苯丙噻唑。其中施药量为 10 μL 时, 壬醛能完全抑制 7 种常见的油茶病原真菌的生长, 说明在利用生物防治来控制油茶病害的过程中, 壬醛等 4 种挥发性物质具有一定的开发意义和良好的应用前景。

在农业方面, 微生物的挥发性物质作为生物防治制剂来控制植物病原, 可以减少化学杀菌剂使用, 是更无害环境的病害管理策略。第一, 细菌产生的挥发性物质具有防治土传病害的潜力^[18]。Minerdi 等^[19]从土壤中分离的野生型镰刀菌 WT MSA35 和其伴生细菌释放的挥发性物质可以抑制致病菌 *F. oxysporum* 的生长。第二, 微生物挥发性物质与植物之间也存在互作, 微生物挥发性物质对植物有益的作用之一是诱导植物的防卫反应以抵抗病原菌的侵入。Ryu 等^[20]研究发现, 将拟南芥暴露在枯草芽胞杆菌 GB03 和解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens* IN937a 产生的挥发性物质中, 能够诱导拟南芥乙烯介导的抗病途径, 降低由胡萝卜软腐欧氏杆菌 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 引起的腐烂病。第三, 微生物挥发性物质在果蔬采收后的储存与运输方面也体现了应用, 目前, 关于利用微生物挥发性物质的熏蒸也主要集中在这个领域^[21]。微生物熏蒸不需要释放挥发性物质的微生物与植物产品直接接触; 抗菌挥发性物质在密封环境中很容易扩散至整个环境; 抗菌挥发性物质不会在植物产品表面留下残留物。本研究已明确检测出枯草芽胞杆菌 Y13 挥发性化合物的组成成分, 并利用多种病原真菌测定筛选出了效果最好的组分, 但如何将实验室内取得的良好效果转移到实际生产中, 依然面临很多的挑战。

参 考 文 献

- [1] 庄瑞林. 中国油茶(第2版)[M]. 北京: 中国林业出版社, 2008.
- [2] 刘君昂, 潘华平, 伍南, 等. 油茶主要病害空间分布格局规律的研究[J]. 中国森林病虫, 2010, 29(5): 7-10.
- [3] 李河, 周国英, 徐建平, 等. 一种油茶新炭疽病原的多基因系统发育分析鉴定[J]. 植物保护学报, 2014, 41(5): 602-607.
- [4] 袁嗣令, 张能唐, 翁月霞, 等. 油茶炭疽病的研究[J]. 植物保护学报, 1963, 2(3): 253-262.
- [5] 齐苗, 李曼曼. 油茶炭疽病防治研究进展[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(3): 13-14.
- [6] Steel C C. Catalase activity and sensitivity to the fungicides, iprodione and fludioxonil in *Botrytis cinerea*[J]. Letters in Applied Microbiology, 1996, 22(5): 335-338.
- [7] Naing K W, Anees M, Kim S J, et al. Characterization of antifungal activity of *Paenibacillus ehimensis* KWN38 against soilborne phytopathogenic fungi belonging to various taxonomic groups[J]. Annals of Microbiology, 2014, 64(1): 55-63.
- [8] 张清华, 黄丽丽, 连鑫坤, 等. 微生物源挥发性物质及其生物防治作用研究进展[J]. 生态学杂志, 2017, 36(7): 2036-2044.
- [9] 沈萍. 微生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [10] Elliott M L, Jardin E A D, Batson Jr W E, et al. Viability and stability of biological control agents on cotton and snap bean seeds[J]. Pest Management Science, 2001, 57(8): 695-706.
- [11] 布婷婷, 周国英, 刘君昂, 等. 油茶内生拮抗细菌 Y13 菌株 16S rDNA 序列分析及抑菌机理研究[J]. 经济林研究, 2012, 30(3): 11-15.
- [12] 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.
- [13] Mercier J, Smilanick J L. Control of green mold and sour rot of stored lemon by biofumigation with *Muscodoralbus*[J]. *Biological Control*, 2005, 32(3): 401-407.
- [14] Liu W W, Wei M U, Zhu B Y, *et al.* Antagonistic activities of volatiles from four strains of *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* spp. against soil-borne plant pathogens[J]. *Agricultural Sciences in China*, 2008, 7(9): 1104-1114.
- [15] Chaves-López C, Serio A, Gianotti A, *et al.* Diversity of food-borne *Bacillus* volatile compounds and influence on fungal growth[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2015, 119(2): 487-499.
- [16] Maruzzella J C. Antimicrobial substances from ferns[J]. *Nature*, 1961, 191(4787): 518.
- [17] Andersen R A, Hamilton-Kemp T R, Hildebrand D F, *et al.* Structure-antifungal activity relationships among volatile C6 and C9 aliphatic aldehydes, ketones, and alcohols[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994, 42(7): 1563-1568.
- [18] Kai M, Hausteim M, Molina F, *et al.* Bacterial volatiles and their action potential[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 81(6): 1001-1012.
- [19] Minerdi D, Bossi S, Gullino M L, *et al.* Volatile organic compounds: a potential direct long-distance mechanism for antagonistic action of *Fusarium oxysporum* strain MSA 35[J]. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(4): 844-854.
- [20] Ryu C M, Farag M A, Hu C H, *et al.* Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2004, 134(3): 1017-1026.
- [21] Gomes A A M, Queiroz M V, Pereira O L. Mycofumigation for the biological control of post-harvest diseases in fruits and vegetables: a review[J]. *Austin Journal of Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 2: 1051.