



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20140124

解淀粉芽孢杆菌 BI₂ 产抑菌物质的新型种衣剂的研制

王亚军¹, 李 昆¹, 王德培^{1,2}

(1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457; 2. 工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津 300457)

摘要: 将解淀粉芽孢杆菌 BI₂ 发酵所产抑菌物质作为新型种衣剂的有效成分与研制的复合型成膜剂溶液混合, 制成可抑制黄曲霉孢子萌发的花生种子包衣。结果表明, 选用 4% 聚乙烯醇(PVA)与 1.5% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)以体积比 5 : 1 混合作为种子包衣最佳成膜剂配方, 经过包衣后对花生种子的发芽势和发芽率没有显著影响。含有抑菌物质的发酵液冻干粉的 pH 稳定性和热稳定性均较好。发酵液冻干粉抑制黄曲霉孢子萌发的最小质量浓度为 1.92 mg/mL。在与花生种子混合时, 发酵液冻干粉在成膜剂中的含量达到 4 mg/mL 时, 黄曲霉完全被抑制。

关键词: 解淀粉芽孢杆菌 BI₂; 花生种子; 种衣剂; 发芽势; 发芽率

中图分类号: Q939.92 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-6510(2015)04-0030-05

A Novel Seed Coating Formula with Antifungal Substances Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* BI₂

WANG Yajun¹, LI Kun¹, WANG Depei^{1,2}

(1. College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;
2. Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin 300457, China)

Abstract: The antifungal substances produced from *Bacillus amyloliquefaciens* BI₂ were for the first time used as active ingredients in seed coating. The fermented broth containing antifungal substances was ultrafiltered and freeze-dried to form lyophilized powder, and then mixed with composite film-forming agent solution. Finally, peanut seeds were coated with this kind of seed coating containing antifungal substances. The results showed that the best volume ratio of 4% polyvinyl alcohol(PVA) to 1.5% sodium carboxymethyl cellulose(CMC-Na) was 5 : 1, which is the best film former recipe in seed coating, and it has no significant effect on seed germination potential and germination rate. The pH stability and thermal stability of the lyophilized powder of the fermented broth containing antifungal substances are good. The MIC of the powder to inhibit *Aspergillus flavus* spore germination is 1.92 mg/mL. When the content of that powder in the film former reaches 4 mg/mL, *A. flavus* was completely inhibited.

Key words: *Bacillus amyloliquefaciens* BI₂; peanut seeds; seed coating; germination potential; germination rate

目前对种子进行包衣处理是使种子免受黄曲霉等有害菌侵害的有效手段。迄今为止广泛使用的种衣剂大部分是化学农药类种衣剂, 该种衣剂在防治有害菌的同时会有环境污染、病害菌抗药性增加、种子本身残留农药成分等负面影响。生物种衣剂是利用拮抗微生物的代谢产物或拮抗微生物本身加工制成的种子包衣剂, 它是将拮抗微生物或拮抗物质、成膜剂、助剂经特定工艺加工制成的, 可直接包裹在种子

表面, 形成具有一定通透性的膜结构^[1-2]。生物种衣剂因其生物防治功能和零污染成为具有较好发展前景的一类种衣剂^[3]。解淀粉芽孢杆菌 BI₂ 是本实验室从秸秆饲料中分离出的一株拮抗菌, 其所产生的两种次级代谢产物对黄曲霉具有较强的抑制作用, 其中抑菌物质 A(已鉴定是表面活性素)对黄曲霉菌丝生长有显著抑制作用, 抑菌物质 B(待鉴定)对黄曲霉孢子萌发具有较强抑制作用^[4]。另外, 其抑菌物质对玉米小

收稿日期: 2014-09-24; 修回日期: 2015-01-26

基金项目: 天津市科技支撑计划资助项目(12ZCZDNC01600)

作者简介: 王亚军(1990—), 男, 河南商丘人, 硕士研究生; 通信作者: 王德培, 教授, wangdp@tust.edu.cn.

斑病菌、小麦纹枯病菌、水稻纹枯病菌等 20 多种重要的植物病原性菌也具有较强的抑制作用^[5]。本研究探索 BI₂ 除菌发酵液冻干粉与研发出的成膜剂混合后作为一种新型种衣剂的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

解淀粉芽孢杆菌 BI₂ (*Bacillus amyloliquefaciens* BI₂) 由本实验室自秸秆饲料中分离得到, 中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏, 保藏号: CGMCC No. 3413; 黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 由天津科技大学生化工程研究室保存; 花生种子购自天津市康佳益农农作物种植专业合作社; 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na)、海藻酸钠、壳聚糖购自上海紫一试剂厂; 聚乙烯醇 (PVA)、乙酸、次氯酸钠购自天津市化学试剂厂; 两性霉素 B 和制霉菌素购自上海生工生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 成膜剂配方的筛选

分别配制质量分数 1.5% 的羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 溶液、1.5% 海藻酸钠溶液、1.5% 壳聚糖溶液、4% 聚乙烯醇 (PVA) 溶液。同时配制复合型成膜剂溶液, 选择 4% 聚乙烯醇与 1.5% 羧甲基纤维素钠分别以体积比 3:1、4:1、5:1、6:1 的比例混合。根据其成膜性、透水性、水溶性和溶胀性等指标^[6], 筛选出最佳成膜剂。每个处理组 3 个重复。

(1) 成膜性测定: 将等体积 (1 mL) 的各成膜剂溶液于干净载玻片上流动成膜, 置于 30 °C 下晾干。成膜性等级: I 级: 能够均匀成膜, 载玻片在水中浸泡 30 min 后, 膜能从载玻片上完整刮下, 表示成膜性好; II 级: 能够均匀成膜, 载玻片在水中浸泡 30 min 后, 膜不能从载玻片上完整刮下, 表示成膜性中等; III 级: 不能均匀成膜, 表示成膜性差。

(2) 透水性测定: 将等体积 (1 mL) 的各成膜剂溶液涂布于圆形滤纸的表面并干燥。取干净的培养皿盖称质量, 将已干燥的滤纸折叠并放在培养皿盖上, 有成膜剂的一面朝下, 吸取 10 mL 蒸馏水放在滤纸片内, 3 h 后称取培养皿盖的质量, 计算涂抹不同成膜剂的滤纸片渗下水的质量。

(3) 溶胀性测定: 将等体积 (1 mL) 的各成膜剂溶液于干净载玻片上流动成膜, 干燥后取下称质量, 然后浸入水中, 6 h 后取出并用滤纸吸去表面的水, 再次称质量, 按照式 (1) 计算溶胀率, 其中 m 为膜湿质

量; m_0 表示膜干质量。

$$\text{溶胀率} = \frac{m - m_0}{m_0} \times 100\% \quad (1)$$

(4) 水溶性测定: 将等体积 (1 mL) 的各成膜剂溶液于干净载玻片上流动成膜, 干燥后浸入水中, 20 h 后计算载玻片上膜溶解的面积, 并计算溶解面积的百分比。

1.2.2 成膜剂溶液的配制及除菌发酵液冻干粉的特性

发酵液经加热离心除菌后连续过 30 000、10 000、5 000 超滤膜后再过 400~600 纳滤膜, 均取透过液, 经冷冻干燥得到冻干粉。成膜剂按最佳配方进行配制, 实验组加入不同质量的冻干粉, 制成含抑菌物质的种子包衣后, 包衣种子, 对照组不加抑菌物质。每个处理组 3 个重复。

(1) 发酵液冻干粉的 pH 稳定性: 将发酵液冻干粉溶于水, 使其质量浓度为 100 mg/mL, pH 分别用 HCl 和 NaOH 调至 5、6、8、10、12, 处理 12 h 后调回原 pH 8.5, 牛津杯法^[7]测定各组的抑菌活性。未经处理的发酵液为对照, 置于 30 °C 培养 36 h, 用交叉法测量抑菌圈直径。

(2) 发酵液冻干粉的热稳定性: 将发酵液冻干粉溶于水, 使其质量浓度为 100 mg/mL, 分别在 50、60、70、80、90、100 °C 处理 30 min, 121 °C 处理 20 min, 牛津杯法测定各组的抑菌活性。未经处理的发酵液为对照, 置于 30 °C 培养 36 h, 用交叉法测量抑菌圈直径。

1.2.3 除菌发酵液冻干粉的最小抑菌质量浓度

除菌发酵液冻干粉的最小抑菌浓度采用 96 孔板法^[8]测定。用生理盐水将 PDA 斜面上的黄曲霉孢子洗下。在孔中加入 $4 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 的孢子悬液 100 μL , 然后在孔中分别加入不同质量浓度的除菌发酵液冻干粉溶液各 100 μL , 使其终质量浓度为 0.38~19.15 mg/mL; 阴性对照为 100 μL 无菌水, 阳性对照为 50 $\mu\text{g/mL}$ 两性霉素 B, 每个处理组设 3 个平行。将 96 孔板置于 30 °C 培养 48 h 后, 用酶标仪测定孔板透光率, 孔板透光率没有变化且孔中无可见黄曲霉孢子萌发的浓度视为最小抑菌质量浓度。

1.2.4 种子包衣方法

称取形状规则、饱满的花生种子 15 g, 用 1% 次氯酸钠消毒, 并用无菌水洗涤晾干置于 250 mL 三角瓶中, 吸取成膜剂溶液 3 mL, 注入三角瓶中并不断摇动, 用玻璃棒搅拌种子防止种子粘连, 放置 30 min, 使其在种子表面固化成膜^[9]。

1.2.5 包衣种子萌发试验

将包衣后花生种子在 40 °C 左右的温水中浸泡 2~4 h, 取出后放入干净培养皿中, 用 6 层纱布盖好, 置于 25 °C 培养, 使其萌发, 每天喷淋等量温水 2 次, 保持花生种子湿润, 每个处理 3 个重复, 每个重复 50 粒种子. 以同浓度成膜剂包衣的种子和未包衣种子为对照. 发芽势和发芽率按照式 (2)、(3) 计算.

$$\text{发芽势} = \frac{48 \text{ h内发芽种子的粒数}}{\text{供试种子的粒数}} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{发芽率} = \frac{72 \text{ h内发芽种子的粒数}}{\text{供试种子的粒数}} \times 100\% \quad (3)$$

1.2.6 种子包衣的抗黄曲霉效果

按照 1.2.4 方法, 在各个三角瓶中分别加入含有不同含量抑菌物质的成膜剂溶液 3 mL, 使除菌发酵液冻干粉的质量分数分别为 1、2、3、4、5 mg/mL, 10 mg/mL 的制霉菌素与成膜剂混合后涂布的种子为阳性对照, 未加抑菌物质包衣后种子和未包衣种子为空白对照, 再分别在各个三角瓶中加入 $2 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 黄曲霉孢子 200 μL , 后向各三角瓶中喷洒 10 mL PDA 液体培养基, 充分摇动三角瓶使黄曲霉孢子分散均匀, 30 °C 培养, 观察黄曲霉生长情况^[10].

1.2.7 数据统计分析

采用 SPSS 19.0 中的方差分析程序 (ANOVA) 分析各实验部分的差异, 在图中以不同字母表示不同处理组之间具有显著差异 ($P < 0.05$).

2 结果与分析

2.1 最佳成膜剂的筛选

实验表明羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 和海藻酸钠成膜性较差; 聚乙烯醇 (PVA) 溶胀性较差; 壳聚糖具有较好的成膜性、耐水性, 但透水性、溶胀性较差. 将聚乙烯醇与羧甲基纤维素钠以一定比例混合后, 其溶胀性提高, 因此本研究将聚乙烯醇与羧甲基纤维素钠以不同比例混合, 与其他待试成膜剂一起测定其各种性能指标. 成膜剂的配方: A 为 4% PVA 溶液, B 为 1.5% 壳聚糖溶液, C、D、E、F 分别为 4% PVA 与 1.5% CMC-Na 以体积比 3:1、4:1、5:1、6:1 的混合溶液. 在图中以不同字母表示不同处理组之间具有显著差异 ($P < 0.05$).

图 1 为成膜剂的透水性测定结果. 从图 1 中可以看出, 配方 E 和配方 F 的透水性相差不大, 但透水性比其他各组效果明显提高.

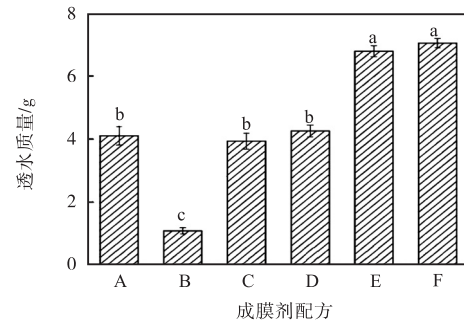


图 1 成膜剂的透水性测定结果

Fig. 1 Water permeability of the film former

图 2 为成膜剂的溶胀性测定结果. 从图 2 中可以看出: 配方 A 和配方 B 的溶胀率不大, 其中配方 B 的溶胀率最低, 为 70.82%. 复合型成膜剂的溶胀率均较高, 其中配方 C、D、E 的溶胀率分别为 188.08%、180.22% 和 175.91%.

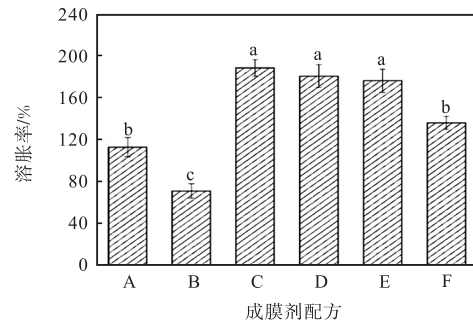


图 2 成膜剂的溶胀率测定结果

Fig. 2 Swelling ratio of the film former

图 3 为成膜剂的水溶性测定结果. 从图 3 中可以看出: 配方 A 和配方 B 的耐水性非常好. 复合型成膜剂配方 C 和配方 D 的耐水性较差; 配方 E 和配方 F 的耐水性较好.

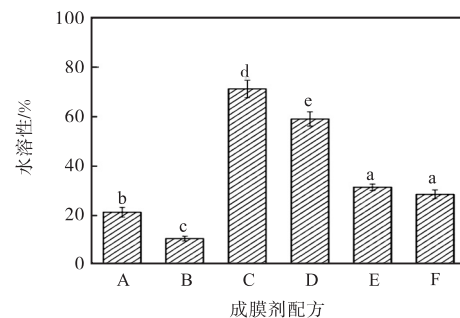


图 3 成膜剂的水溶性测定结果

Fig. 3 Water solubility of the film former

从成膜剂的成膜性、透水性、溶胀性和水溶性综合考虑, 配方 E (4% 聚乙烯醇与 1.5% 羧甲基纤维素钠以体积比 5:1 混合配制成的成膜剂) 综合性能优于其他成膜剂配方, 因此选择其作为种子包衣的最佳

成膜剂配方.

2.2 除菌发酵液冻干粉的特性

除菌发酵液冻干粉的 pH 稳定性和热稳定性如图 4 和图 5 所示. 从图 4 中可以看出除菌发酵液冻干粉在酸性条件下不稳定, 在 pH 为 6~12 条件下比较稳定.

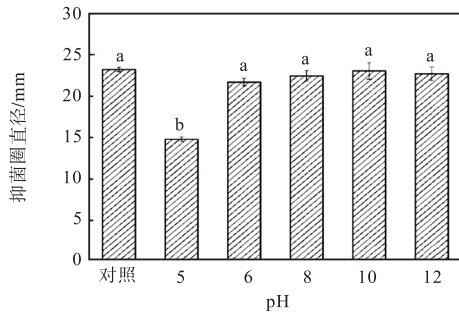


图 4 发酵液冻干粉的 pH 稳定性

Fig. 4 The pH stability of the lyophilized powder of the fermented broth

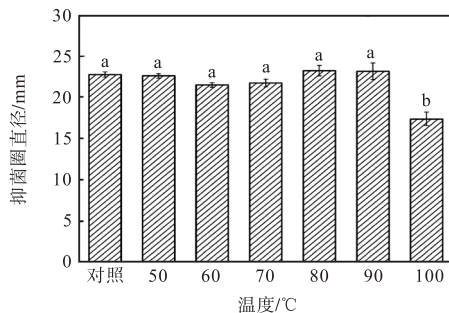


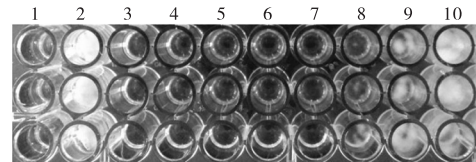
图 5 发酵液冻干粉的热稳定性

Fig. 5 The thermal stability of the lyophilized powder of the fermented broth

从图 5 中可以看出除菌发酵液冻干粉在 50~90 °C 处理 30 min, 抑菌活性保持不变; 在 100 °C 处理 30 min, 抑菌活性下降 24.4%; 说明其具有较强的热稳定性.

2.3 除菌发酵液冻干粉最小抑菌浓度

发酵液冻干粉最小抑菌浓度实验结果如图 6 所示. 当发酵液冻干粉质量浓度低于 1.92 mg/mL 时, 透光率下降, 可看到黄曲霉的生长, 且随着除菌发酵液冻干粉浓度的降低, 黄曲霉的生长逐渐旺盛; 当除菌发酵液冻干粉质量浓度高于 1.92 mg/mL 时, 无黄曲霉孢子萌发. 因此, 除菌发酵液冻干粉对黄曲霉的最小抑菌质量浓度为 1.92 mg/mL.



1. 阳性对照; 2. 阴性对照; 3—10. 除菌发酵液冻干粉质量浓度依次为 19.15、9.58、6.38、3.83、1.92、0.96、0.63、0.38 mg/mL

图 6 发酵液冻干粉的最小抑菌浓度

Fig. 6 MIC of the lyophilized powder of the fermented broth

2.4 包衣对种子萌发的影响

不同处理方法对种子萌发的影响见表 1. 从表 1 可以看出, 经种子包衣后, 花生种子在发芽势和发芽率指标方面, 与对照组间无显著差异, 说明经此成膜剂包衣后不会影响种子的发芽势和发芽率.

表 1 不同处理方法对种子萌发的影响

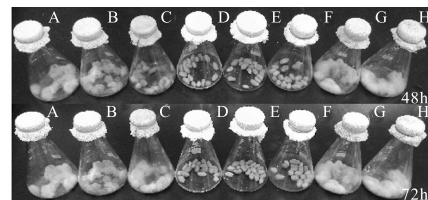
Tab. 1 The effect of the different treatment on seed germination

处理方法	发芽势/%					发芽率/%				
	I	II	III	平均	SD	I	II	III	平均	SD
冻干粉	80	82	80	80.7 ^a	1.1	98	94	96	96.0 ^b	2.0
空白包衣	84	88	82	84.7 ^a	3.1	88	92	96	92.0 ^b	4.0
未包衣	86	92	82	86.7 ^a	5.0	94	92	96	94.0 ^b	2.0

注: 平均值后注有相同字母说明处理组间无显著差异 ($P > 0.05$).

2.5 种子包衣的抗黄曲霉效果

种子包衣的抗黄曲霉效果如图 7 所示. 从图 7 中可见: 黄曲霉在没有任何抑菌物质存在时生长旺盛 (图 7 G、H); 在有较低质量浓度抑菌物质存在时, 黄曲霉生长受到一定抑制; 随着除菌发酵液冻干粉在成膜剂溶液中质量浓度的增加, 黄曲霉的生长量逐渐减少, 当除菌发酵液冻干粉质量浓度达到 4 mg/mL (图 7 D) 时, 没有黄曲霉生长, 与制霉菌素溶液包衣种子的抑菌效果相近.



A—E. 加入的成膜剂溶液中除菌发酵液冻干粉的含量分别为 1、2、3、4、5 mg/mL; F. 10 mg/mL 的制霉菌素溶液包衣后种子; G. 为未加抑菌物质的包衣后种子; H. 未包衣种子

图 7 种子包衣抑制黄曲霉的效果

Fig. 7 The inhibitory effect of seed coating on *Aspergillus flavus*

3 讨 论

芽孢杆菌 BI₂ 是一株广谱拮抗菌株, 能够抑制 20 多种植物病原菌^[12], 本研究期望利用芽孢杆菌 BI₂ 发酵液中具有高效抑菌能力的抑菌物质, 旨在开发一种新型环保生物种衣剂, 实现防止种子霉变的目的. 与化学农药种衣剂相比, 微生物种衣剂尤其是在其次级代谢产物作为有效成分时, 对包衣后的成膜性等要求很高^[13]. 经过成膜剂配方的配制实验, 最终选择 4% 聚乙烯醇与 1.5% 羧甲基纤维素钠以体积比 5 : 1 混合配制成的成膜剂作为种子包衣的最佳成膜剂配方, 以此比例混合配制成的成膜剂, 综合性能优于其他成膜剂配方, 并且对包衣后花生种子的发芽势和发芽率没有显著影响. 含有抑菌物质的发酵液冻干粉 pH 稳定性、热稳定性均较好, 可适用于种子包衣中. 在抑制黄曲霉孢子萌发方面, 抑制黄曲霉孢子萌发的最小质量浓度为 1.92 mg/mL. 在抑制花生种子表面的黄曲霉时, 随着发酵液冻干粉质量浓度的增加, 黄曲霉的生长量逐渐减少, 成膜剂中最小发酵液冻干粉的含量只有 4 mg/mL.

目前用芽孢杆菌菌剂包衣种子防治植物病害菌方面的报道仍较少, 一种新型环保生物种衣剂需要考虑多方面的因素, 比如杀菌效能、对人体的危害性、残留量等. 吴继星等^[14]以苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*)为活性成分研制出一种生物种衣剂, 不仅能防治大豆孢囊线虫病且能促进大豆生长. 李春等^[15]利用根瘤菌、固氮菌等有益微生物作为活性成分, 研制出一种能防治棉花苗期病害、促进棉花生长及增强棉花在盐胁迫下生长能力的多功能生物种衣剂.

本研究中芽孢杆菌种衣剂的活性成分自菌体发酵产生, 与化学农药类种衣剂相比具有易于生产、成本低、环保无毒等优点. 本研究研制的新型种衣剂为菌株和生防制剂的进一步研究和发展提供了优良的资源, 有望在种子及生防领域得到应用.

参考文献:

- [1] Ziani K, Ursúa B, Maté J I. Application of bioactive coatings based on chitosan for artichoke seed protection[J]. *Crop Protection*, 2010, 29(8): 853-859.
- [2] Hirano S, Yamamoto T, Hayashi M, et al. Chitinase activity in seeds coated with chitosan derivatives[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1990, 54(10): 2719-2720.
- [3] 张琦, 徐宁彤, 曲琪环. 生物复合型种衣剂对香谷苗期生理指标的影响[J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(30): 16746-16747, 16750.
- [4] 王德培, 李可乐, 王亚军, 等. 解淀粉芽孢杆菌 BI₂ 抗真菌活性物质的分离纯化及特性分析[J]. *食品工业科技*, 2013(11): 78-81.
- [5] 孟慧. 芽孢杆菌 BI₂ 的鉴定及其抑制黄曲霉特性的研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2011.
- [6] 杨桦. 种衣剂在林木种子上应用及壳聚糖作为种衣剂抗性添加剂的研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2008.
- [7] 刘冬梅, 李理, 杨晓泉, 等. 用牛津杯法测定益生菌的抑菌活力[J]. *食品研究与开发*, 2006, 27(3): 110-111.
- [8] 胡小平, 万喆, 李若瑜. 应用 CLSI M38-A2 方案测定须癣毛癣菌对抗真菌药物敏感性[J]. *中国真菌学杂志*, 2011, 6(3): 149-153.
- [9] 董丽萍, 浦恩堂, 吴毅歆, 等. 解淀粉芽孢杆菌 B9601-Y2 复方油菜种衣剂的研制[J]. *云南大学学报: 自然科学版*, 2013, 35(4): 558-564.
- [10] Zhang Ting, Shi Zhiqi, Hu Liangbin, et al. Antifungal compounds from *Bacillus subtilis* B-FS06 inhibiting the growth of *Aspergillus flavus*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 24(6): 783-788.
- [11] 肖琴. 新型环保型棉花种衣剂的研制与应用研究[D]. 武汉: 武汉理工大学, 2008.
- [12] 王德培, 孟慧, 管叙龙, 等. 解淀粉芽孢杆菌 BI₂ 的鉴定及其对黄曲霉的抑制作用[J]. *天津科技大学学报*, 2010, 25(6): 5-9.
- [13] 姚丽霞, 武占省, 李春. 一种复合型成膜剂的成膜性能测定及其对生防菌抑菌活性的影响[J]. *农药学学报*, 2009, 11(3): 381-387.
- [14] 吴继星, 陈在佶, 曹春霞, 等. 苏云金杆菌悬浮种衣剂: 中国, 1849890A[P]. 2006-04-06.
- [15] 李春, 姚丽霞, 陶晶, 等. 一种多功能生物种衣剂及制备方法: 中国, 101444227A[P]. 2009-01-09.

责任编辑: 郎婧