一株高地芽胞杆菌 D30202 的抑草活性及作用机制初探

张秀雨， 李伟佳， 沈 硕*

（青海大学，青海省农林科学院，青藏高原生物技术教育部重点实验室，西宁 810016）

摘要 为开发新型微生物除草剂，通过萌发袋法对嗜盐高地芽胞杆菌 *Bacillus altitudinis* 菌株 D30202 抑制杂草种子萌发和幼苗生长的活性进行测定。通过盆栽茎叶喷雾法对不同有机溶剂萃取物的杀草谱和作物安全性进行测定和评价，并以自生油菜 *Brassica napus* L. 为供试杂草对活性菌株的抑草机理进行初探。结果表明，嗜盐高地芽胞杆菌菌株 D30202 发酵液的正丁醇萃取物对十字花科杂草自生油菜的除草活性最为显著，同时对青稞 *Hordeum vulgare* var. *coeleste*、小麦 *Triticum aestivum* L. 表现出较高的安全性。而经正丁醇萃取物处理的自生油菜，其丙二醛（MDA）含量及抗氧化酶（SOD、POD、CAT）活性呈持续下降趋势，表明该菌株的抑草作用机理可能是通过影响光合作用等代谢过程实现的。综上所述，高地芽胞杆菌 D30202 可开发为禾本科作物田十字花科杂草的生物除草剂。

关键词 嗜盐菌； 杀草谱； 作物安全性； 抑草机理； 微生物除草剂

中图分类号： S476 **文献标识码：** A **DOI：** 10.16688/j.zwbh.2021382

Preliminary study on the herbicidal activity and mechanism of *Bacillus altitudinis* D30202

ZHANG Xiuyu， LI Weijia， SHEN Shuo*

（*Qinghai University*, *Qinghai Academy of Agriculture and Forestry Sciences*, *Key Laboratory of Qinghai Tibet Plateau Biotechnology*, *Ministry of Education*, *Xining* 810016, *China*）

Abstract In order to develop a new type of microbial herbicide, the germination bag method was used to determine the inhibition activity of *Bacillus altitudinis* D30202 on weed seed germination and seedling growth. The herbicidal spectrum and crop safety of different organic solvent extracts were determined and evaluated by stem and leaf spray method in pot experiment. Volunteer rape (*Brassica napus* L.) was used as the test weed to explore the herbicidal mechanism of active strains. The results showed that *n*-butanol extracts of the fermentation broth of D30202 had the most significant herbicidal activity against cruciferous weed volunteer rape and showed high safety against highland barley (*Hordeum vulgare* var. *coeleste*) and wheat (*Triticum aestivum* L.). However, the content of malondialdehyde (MDA) and the activities of antioxidant enzymes (SOD, POD, CAT) in volunteer rape treated with *n*-butanol extract showed a continuous downward trend, indicating that the strain may inhibit the weed by affecting the metabolic processes such as photosynthesis. In summary, *B. altitudinis* D30202 can be developed as a biological herbicide for cruciferous weeds in gramineous crop fields.

Key words halophilic bacteria； herbicidal spectrum； crop safety； herbicide mechanism； microbial herbicide

农田杂草，以其极强的生命力及适应性侵占农田并危害农作物生长发育。仅青海省农田草害受害面积就达 32.6 万 hm^2，每年由草害造成的粮油减产量达 8000 万 kg[1]。据调查，青海省农田杂草共 35 科 61 属 182 种，除野燕麦等禾本科优势杂草外，前茬自生油菜也泛滥成灾[2]。为了控制农田杂草，化

收稿日期： 2021-07-07 **修订日期：** 2021-09-15
基金项目： 青海省科技厅国际合作专项（2021-HZ-804）；国家自然科学基金（31360445）；青海省“高端创新人才千人计划”（20180703）；国家现代农业产业技术体系（CARS-10）
* 通信作者 E-mail：fjfzss@126.com

学除草一直都是最为有效的措施。但是化学除草剂的长期使用会带来农药残留及生态位破坏等危害，即便是剂量低于推荐施用浓度(RFAC)也会严重影响生态群落的功能组成，这对于生态农业的可持续发展非常不利[3]。面对化学除草剂带来的诸多生态风险，愈发严格的农药监管要求有创新的保护性农田杂草管理投入农业生产[4]。

与化学除草剂相比，微生物源除草剂具有资源丰富，不易使杂草产生抗性，对非靶标生物相对安全，经济效益可观，环境相容性好等特点[5]。研究表明，许多微生物的代谢产物会对植物的生长产生影响，比如造成植物叶片、根茎以及组织发生病变，引起疾病；抑制或者促进一些植物种子的萌发及植物幼苗的生长[6]。因此，微生物农药的研究与开发成为当今农药研究与开发的一个重要方向。

目前为止，仅从杂草中分离出的抑草生防菌株就有近 100 种，但实际应用的微生物资源十分有限[7]。全球现注册有 20 余种不同类型的生物除草剂产品，如 MBI-005、StumpOut、Biochon、Camperico、Blufosinate 和 Myco-TechPaste[8]。在中国只有鲁保 1 号等极少数生物除草剂被注册并大面积使用。微生物除草剂可分为活体微生物除草剂和微生物代谢产物除草剂，其中多数除草剂的作用机理尚不明确[9]。本研究以前期课题组筛选出的一种高地芽胞杆菌 *Bacillus altitudinis* D30202 为材料，对该菌的抑草活性及多种酶活指标进行了测定，并确定了该菌株的杀草谱和作物安全性，初步探索了其抑草作用机制。研究结果能够为后续微生物源除草剂的研究与开发提供新的活性微生物资源，从而为杂草生物防控开辟新途径。研究发现的活性萃取物部分为进一步开发除草活性天然产物及其先导化合物奠定理论基础。活性萃取物抑草作用机理的初探可为后续生防除草作用机理的研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试菌株：高地芽胞杆菌 *Bacillus altitudinis* D30202(GenBank 登录号：MN104583)由本课题组成员自青海察尔汗盐湖湖泥样品中分离纯化得到，并进行鉴定[10]。该菌株保存于青海大学农林科学院生物技术研究所实验室 4℃冰箱。

供试杂草种子：野燕麦 *Avena fatua* L.、自生油菜 *Brassica napus* L.、猪殃殃 *Galium spurium* L.、藜 *Chenopodium album* L. 和密花香薷 *Elsholtzia densa* Benth. 由青海大学农林科学院生物技术研究所提供。

供试作物：小麦 *Triticum aestivum* L.‘青春 38’、青稞 *Hordeum vulgare* var. *coeleste*‘昆仑 14 号’、藜麦 *Chenopodium quinoa* Willd. ‘青白藜 1 号’、蚕豆 *Vicia faba* L.‘青蚕 14 号’和玉米 *Zea mays* L.‘纪元 8 号’由青海大学农林科学院作物栽培研究所提供。

ATCC213 改良培养基[11]：$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 10 g，$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.2 g，KCl 5 g，蛋白胨 2.5 g，酵母膏 10 g，NaCl 30 g，琼脂粉 16 g(液体培养基不加琼脂粉)，加蒸馏水至 1 000 mL，pH 7.2～7.4。

1.2 试验方法

1.2.1 高地芽胞杆菌 D30202 有机溶剂萃取物的制备

将保存在 4℃冰箱中的菌株 D30202 接种于 ATCC213 改良固体培养基平板上，于 37℃培养箱中培养 48 h 使其活化。将活化好的菌株 D30202 转入装瓶量为 800 mL 的 ATCC213 改良液体培养基中，于 37℃恒温摇瓶柜中，以 180 r/min 振荡培养7 d。收获菌株发酵液，发酵液经抽滤后，装入 3 000 mL 的梨形漏斗中用等量的乙酸乙酯或正丁醇萃取 3 遍，萃取后的溶液经旋转蒸发仪减压浓缩得到乙酸乙酯和正丁醇萃取物。萃取物经吐温-80 预溶，再将其分别配制成浓度为 5、10、20 mg/mL 和 50 mg/mL 的萃取物溶液，备用。

1.2.2 高地芽胞杆菌 D30202 萃取物抑草活性测定

挑选饱满、无损伤的野燕麦和自生油菜种子，用 5%次氯酸钠溶液置于磁力搅拌器中搅拌 10 min，再用无菌水搅拌冲洗 3 次，将种子用吸水纸吸干后，放置于生长箱(28℃，L∥D＝12 h∥12 h)中。催芽 48 h 后，挑选露白一致的供试种子放入铺有双层无菌滤纸的玻璃培养皿中(d＝9 cm)，每皿 16 粒供试杂草种子。采用平皿法测定萃取物溶液的抑草活性，共设置 5 个处理并进行 3 次重复。每个处理分别加入不同浓度的萃取物溶液 5 mL，以 0.2% (m/V，下同)吐温-80 水溶液作为空白对照，即将空白对照视为萃取物浓度为 0 的处理。将培养皿放置于人工气候箱(25℃，L∥D=12 h∥12 h)中培养，培养期间补充种子及幼苗生长所需水分[12]。7 d 后测定杂

草种子的根长、芽长并计算抑制率。

根长抑制率=(对照根长－处理根长)/对照根长×100%;

芽长抑制率=(对照芽长－处理芽长)/对照芽长×100%。

1.2.3 正丁醇萃取物抑制杂草活性的盆栽试验

喷剂配制:称取菌株 D30202 正丁醇萃取物,用 0.2%吐温-80 水溶液稀释成 10、20、40 mg/mL。以 0.2%吐温-80 水溶液为空白对照,每剂量 3 次重复,每盆(d=12 cm)施药量 15 mL。

供试植物栽培:将试验土壤装至花盆 4/5 处,从顶部浇水使土壤完全润湿。将预处理的供试作物和杂草种子均匀撒播于土壤表面,根据种子大小覆土 0.5～2.0 cm,播种后移入可控日光温室(25℃,L//D=12 h//12 h)进行常规培养。待植株出苗后进行间苗定株(5 株/盆),并在植株 3～4 叶期进行茎叶喷雾处理。药剂喷施从低浓度到高浓度进行,手持压力喷壶距植株顶端 8～10 cm 并与叶面角呈 45°进行喷施。

1.2.4 杀草谱测定

室内杀草谱测定参照中华人民共和国农业行业标准(NY/T 1155.8-2007)农药室内生物测定试验准则除草剂 第 8 部分:作物的安全性试验 茎叶喷雾法,根据选取杂草的受害症状和严重程度,评价药剂的除草活性[13]。杂草初始定株密度一致(140 株/m^2),杂草的栽培流程及药剂配制、喷施详见 1.2.3。室内杀草谱生物测定采用上述行业标准 5.1.2.1 目测法评价药剂的除草活性。采用施药后靶标杂草的面积相当于空白对照区该杂草面积的比例进行分级。1 级:全部死亡;2 级:相当于空白对照区杂草面积的 0～2.5%;3 级:相当于空白对照区杂草面积的 2.6%～5%;4 级:相当于空白对照区杂草面积的 5.1%～10%;5 级:相当于空白对照区杂草面积的 10.1%～15%;6 级:相当于空白对照区杂草面积的 15.1%～25%;7 级:相当于空白对照区杂草面积的 25.1%～35%;8 级:相当于空白对照区杂草面积的 35.1%～67.5%;9 级:相当于空白对照区杂草面积的 67.6%～100%。

1.2.5 作物安全性评价

室内作物安全性评价依据 1.2.4 及上述行业标准执行。供试植物在茎叶喷雾法处理后,分别在处理后的 1、3、5、7、9 d 和 14 d 定期观察作物和杂草的生长状态,目测法进行颜色变化(黄化、白化、变紫等)、形态变化(新叶畸形、扭曲等)和生长变化(脱水、枯萎、矮、簇生等)等主要药害症状的记录,并根据表 1 的药害分级标准进行分级。

表 1　药害分级标准[14]

Table 1　The phytotoxicity classification standard

药害级别 Phytotoxicity grade	代号 Code	药害程度及特征 Phytotoxicity degree and characteristics
0	－	植株生长正常与空白对照株无异
1	＋	20%以内叶尖灼伤,或叶片出现斑点
2	＋＋	20%～49%植株叶片发生药害斑点
3	＋＋＋	50%～69%植株叶片发生药害斑点或 10%植株枯萎
4	＋＋＋＋	70%～90%植株叶片发生枯萎或有 20%植株死亡

1.2.6 菌株 D30202 正丁醇萃取物溶液处理后自生油菜生理生化指标的测定

药剂喷施及采样:在温室用花盆培育自生油菜至三叶期,用手持喷壶将浓度为 40 mg/mL 的菌株 D30202 正丁醇萃取物溶液均匀喷洒到自生油菜叶片上,以 0.2%吐温-80 水溶液作对照,每处理重复 3 次,每盆施药量为 15 mL,连续喷施 8 d,每天对不同处理的叶片进行采样。

丙二醛(MDA)含量(μmol/g)测定:采用过氧化脂质硫代巴比妥酸法[15]。

超氧化物歧化酶(SOD)活性测定:采用氮蓝四唑(NBT)光化还原法[16]。

过氧化氢酶(CAT)活性测定:采用紫外吸收法[15]。

过氧化物酶(POD)活性测定:采用愈创木酚比色法[16]。

1.2.7 数据分析

数据采用 IBM SPSS Statistics 25.0 软件进行统计分析,应用 Duncan 氏新复极差法进行各处理间的差异显著性分析(P<0.05),数据以平均值±标准差表示。

2 结果与分析

2.1 高地芽胞杆菌 D30202 发酵液萃取物抑草活性

2.1.1 高地芽胞杆菌 D30202 发酵液萃取物对野燕麦根长和芽长的抑制活性

由表 2 可知，正丁醇萃取物溶液对野燕麦根长的抑制率随着浓度的升高而增加，当浓度为 10 mg/mL 时，该萃取物溶液对野燕麦的根长表现出较强的抑制活性，抑制率为 60.97%。乙酸乙酯萃取物浓度为 50 mg/mL 时对野燕麦根长表现出较强抑制性，抑制率达 68.72%。正丁醇萃取物和乙酸乙酯萃取物在低浓度 5 mg/mL 时对野燕麦芽长均具有促进作用，在 50 mg/mL 对芽长均具有中度抑制活性。

表 2 菌株 D30202 发酵液萃取物对野燕麦根长和芽长抑制活性[1)]

Table 2 Inhibition on wild oat root and sprout by fermentation extract of strain D30202

浓度/mg·mL^{-1} Concentration	正丁醇萃取物 N-butanol extracts				乙酸乙酯萃取物 Ethyl acetate extracts			
	根长/cm RL	根长抑制率/% RLIR	芽长/cm SL	芽长抑制率/% SLIR	根长/cm RL	根长抑制率/% RLIR	芽长/cm SL	芽长抑制率/% SLIR
0	(8.25±0.38)a	—	(7.03±0.51)ab	—	(8.25±0.38)a	—	(7.03±0.51)a	—
5	(5.97±0.72)b	27.63	(8.29±1.17)a	−17.9	(7.72±1.01)a	11.88	(7.12±0.66)a	−1.28
10	(3.22±0.46)c	60.97	(6.13±0.74)b	12.80	(7.52±0.16)a	8.58	(4.85±1.10)b	31.01
20	(1.24±0.18)d	84.97	(3.72±0.65)c	47.08	(4.46±0.34)b	45.94	(3.51±0.29)c	50.07
50	(1.07±0.42)d	87.03	(2.12±0.20)d	69.84	(2.58±0.29)c	68.72	(2.35±0.14)c	66.57

1) 表中数据为平均值±标准差。同列不同字母间表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。RL：根长；RLIR：根长抑制率；SL：芽长；SLIR：芽长抑制率。下同。
The data in the table are the mean±standard deviation. Different letters in the same column indicate significant differences at 0.05 level by Duncan's new multiple range method. RL: Root length; RLIR: Root length inhibition rate; SL: Sprout length; SLIR: Sprout length inhibition rate. The same applies below.

2.1.2 高地芽胞杆菌 D30202 发酵液萃取物对自生油菜根长和芽长的抑制活性

由表 3 可知，当正丁醇萃取物溶液浓度在 5 mg/mL 时，便对自生油菜根长表现出较强的抑制活性，抑制率达 81.64%；在 10 mg/mL 以上时对自生油菜的芽长、根长均表现出明显的抑制活性，抑制率可达 80.14%～100%。乙酸乙酯萃取物溶液在 20 mg/mL 以上对自生油菜的根长和芽长表现出较强抑制活性。

通过对比，发酵液的正丁醇萃取物溶液在浓度仅为 5 mg/mL 时，便对自生油菜表现出强抑制作用，在 50 mg/mL 时完全抑制了自生油菜种子萌发。因此，在后续试验应选择抑草活性较高的正丁醇萃取物进行。

表 3 菌株 D30202 发酵液萃取物对自生油菜根长和芽长的抑制活性

Table 3 Inhibition on volunteer oilseed rape root and sprout by fermentation extract of strain D30202

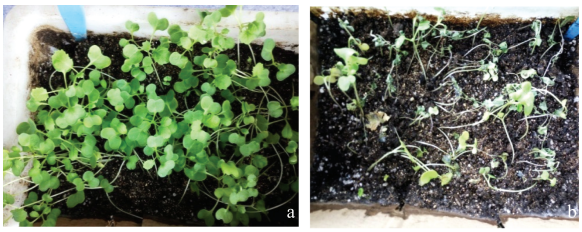
浓度/mg·mL^{-1} Concentration	正丁醇萃取物 N-butanol extracts				乙酸乙酯萃取物 Ethyl acetate extracts			
	根长/cm RL	根长抑制率/% RLIR	芽长/cm SL	芽长抑制率/% SLIR	根长/cm RL	根长抑制率/% RLIR	芽长/cm SL	芽长抑制率/% SLIR
0	(8.61±0.63)a	—	(2.77±0.42)a	—	(8.61±0.63)a	—	(2.77±0.42)a	—
5	(1.58±0.94)b	81.64	(1.34±0.38)b	51.26	(8.14±1.63)a	5.45	(1.93±0.17)b	30.32
10	(0.56±0.28)b	95.50	(0.55±1.08)c	80.14	(5.36±0.83)b	37.74	(1.51±0.25)b	45.49
20	(0)c	100	(0.26±0.12)c	90.61	(2.66±1.21)c	69.11	(0.85±0.14)c	69.31
50	(0)c	100	(0)d	100	(1.93±0.90)c	77.58	(0.91±0.04)c	67.51

2.2 菌株 D30202 正丁醇萃取物的杀草谱

野燕麦、自生油菜、猪殃殃、藜和密花香薷经浓度为 10、20 mg/mL 和 40 mg/mL 的正丁醇萃取物溶液处理 7 d 后结果显示，浓度为 40 mg/mL 的正丁醇萃取物溶液对自生油菜、野燕麦、藜和密花香薷均有不同程度的防效，对十字花科的杂草自生油菜

防效最为显著(图 1)。在浓度为 10 mg/mL 和 20 mg/mL 时,正丁醇萃取物溶液对藜、密花香薷和自生油菜的防效随浓度降低,对猪殃殃和野燕麦防效甚微(表 4)。

3 种不同浓度的正丁醇萃取物溶液对目标杂草处理 7 d 后,40 mg/mL 正丁醇萃取物溶液对茜草科猪殃殃以外的供试杂草均造成了不同程度的药害症状。其中,十字花科自生油菜受害症状最为严重,植株全部死亡;藜科藜、唇形科密花香薷和禾本科野燕麦的受害症状较轻。



a: 自生油菜对照; b: 喷施40 mg/mL正丁醇萃取物的自生油菜
a: Volunteer rape control; b: Volunteer rape sprayed with 40 mg/mL *n*-butanol extracts

图 1　40 mg/mL 菌株 D30202 正丁醇萃取物对杂草自生油菜的影响(7 d)

Fig. 1　Effect of *n*-butanol extracts of strain D30202 at 40 mg/mL on volunteer oilseed rape (7 d)

2.3　作物安全性评价

在 10、20 mg/mL 和 40 mg/mL 正丁醇萃取物溶液处理下,玉米'纪元 8 号'、藜麦'青白藜 1 号'、青稞'昆仑 14 号'、小麦'青春 38'和蚕豆'青蚕 14 号'的药害程度均随正丁醇萃取物溶液浓度的升高而加重。在 40 mg/mL 正丁醇萃取物溶液处理下,玉米叶片药害症状明显,表现为叶片失水,干枯萎蔫,叶片卷曲,并伴随叶片白化,植株矮化;藜麦叶片干枯萎蔫凋零,随之茎秆出现萎蔫、倒伏,植株死亡;青稞叶片失绿,卷曲,尖端干枯,白化;小麦叶片尖端干枯,白化;蚕豆仅出现零星药害斑点,随着时间的推移,症状消失。在 10 mg/mL 和 20 mg/mL 正丁醇萃取物溶液处理下,玉米叶片出现病斑,叶面卷曲变黑;藜麦叶片干枯,茎秆萎缩;青稞和小麦的药害症状不明显,仅表现为叶片零星白化斑点或尖端白化;蚕豆未显现明显药害症状(表 5)。

表 4　不同浓度菌株 D30202 正丁醇萃取物处理后各杂草发生等级

Table 4　Occurence level of weeds after treated by *n*-butanol extracts with different concentrations of strain D30202

供试杂草 The tested weed	杂草发生等级 Occurence level of weeds		
	10 mg/mL	20 mg/mL	40 mg/mL
自生油菜 *Brassica napus*	6	4	1
野燕麦 *Avena fatua*	9	8	8
藜 *Chenopodium album*	9	8	5
密花香薷 *Elsholtzia densa*	9	9	5
猪殃殃 *Galium spurium*	9	9	9

表 5　不同浓度菌株 D30202 正丁醇萃取物对不同作物的安全性评价

Table 5　Safety evaluation of *n*-butanol extracts of strain D30202 with different concentrations on different crops

作物 Crop	药害等级 Phytotoxicity grade				症状 Symptom
	0	10	20	40	
玉米 *Zea mays*	−	+	++	+++	10 mg/mL 处理叶面出现斑点,干枯。20 mg/mL 处理叶面卷曲变黑
藜麦 *Chenopodium quinoa*	−	++	++	++++	10 mg/mL 和 20 mg/mL 处理叶片干枯,茎秆萎蔫
青稞 *Hordeum vulgare*	−	−	−	+	10 mg/mL 和 20 mg/mL 处理叶片出现零星白化斑点
小麦 *Triticum aestivum*	−	+	+	++	10 mg/mL 和 20 mg/mL 处理叶尖白化,变枯
蚕豆 *Vicia faba*	−	−	−	+	10 mg/mL 和 20 mg/mL 处理安全,无影响

上述结果表明,40 mg/mL 正丁醇萃取物溶液对主要农作物玉米和藜麦药害显著,对小麦和青稞药害较弱,对蚕豆安全,说明该浓度以下的正丁醇萃取物溶液适宜于蚕豆田间防除十字花科杂草。在 10 mg/mL 和 20 mg/mL 下,正丁醇萃取物溶液对青稞和蚕豆安全,对玉米、小麦和藜麦仍有一定药害;对目标杂草野燕麦、藜和密花香薷防效较弱,对自生油菜防效较为显著。

2.4　供试杂草自生油菜生理生化指标变化的测定

三叶期自生油菜在喷施菌株 D30202 正丁醇萃取物溶液后的 8 d 内,其叶片相关生理生化指标变化情况如下(图 2)。

经菌株 D30202 正丁醇萃取物处理过的自生油菜,其叶片丙二醛(MDA)含量明显高于对照组样品。经正丁醇萃取物处理的样品在 1～3 d 丙二醛含量急剧上升,3 d 以后丙二醛含量开始下降,但其整体水平

一直高于对照组。而对照组样品的丙二醛(MDA)含量保持相对平稳,基本没有大幅波动(图 2a)。

菌株 D30202 正丁醇萃取物使自生油菜一系列抗氧化酶活性呈持续下降趋势。与对照样品相比较,处理过的自生油菜 CAT 活性呈现先上升后下降的趋势;第 2 天为活性变化转折点,此时 CAT 活性值最高。对照组 CAT 活性维持在 2 000～2 500 U/(min· g)水平内上下浮动(图 2b)。在 SOD 活性的观测试验中,对照组 SOD 活性在 1～8 d 内基本保持平稳,仅在第 7 天有些许波动。与对照样品相比较,在 1～3 d 内两组处理的 SOD 活性均保持平稳趋势;3 d 以后菌株 D30202 正丁醇萃取物处理过的自生油菜 SOD 活性呈现剧烈下降的趋势(图 2c)。菌株 D30202 正丁醇萃取物处理过的自生油菜 POD 活性随时间变化呈现出负相关的下降趋势,在 1～3 d 内处理组 POD 活性高于对照组。在 3 d 以后,对照组样品 POD 活性呈相对上升趋势,处理组 POD 活性呈直线下降趋势(图 2d)。

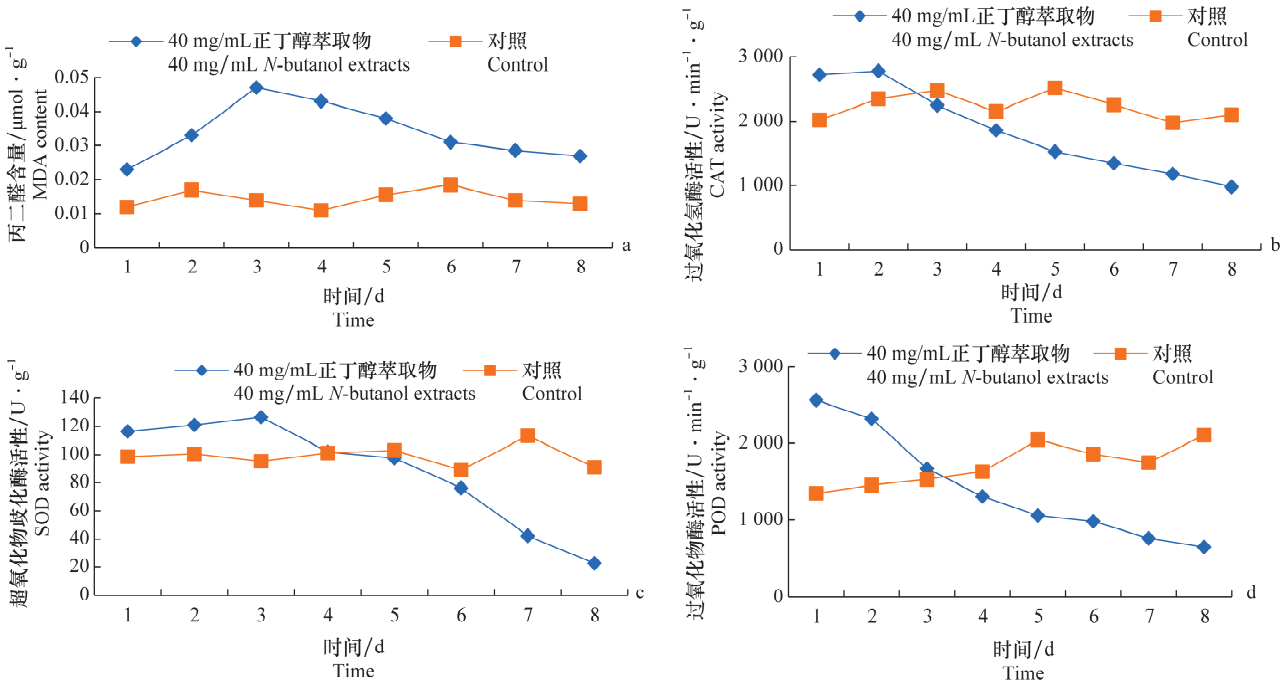


图 2　菌株 D30202 正丁醇萃取物溶液处理后的自生油菜生理生化指标变化

Fig. 2　Changes of physiological and biochemical indexes of volunteer rape treated with *n*-butanol extract of strain D30202

3　结论与讨论

芽胞杆菌 *Bacillus* spp. 是自然界广泛分布的生防细菌,因具有庞大的种群,较强的繁殖力,稳定的理化性质,以及广泛的抑菌谱,在科研和生产中应用较多[17]。研究组最初通过种子萌发袋法从 87 株中度嗜盐菌中筛选出具有抑草活性的菌株 D30202,通过 16S rRNA/ITS 基因序列比较分析,发现菌株 D30202 的 ITS 与已知菌株 *Bacillus altitudinis*(ASJC01000029)的一致性达 100%。结合菌株 D30202 形态及理化特征,最终确定了菌株 D30202 为高地芽胞杆菌 *Bacillus altitudinis*[18]。虽然用于生防的芽胞杆菌资源丰富,但处于高寒生境中的高地芽胞杆菌的研究和开发还相对较少。高寒嗜盐的高地芽胞杆菌 D30202 作为特种生防菌具有良好的开发前景。

作物安全性评价和杀草谱的测定是新除草剂开发阶段必不可少的一步。本研究采用温室盆栽试验对菌株 D30202 正丁醇萃取物溶液的杀草谱及其对作物的安全性进行了测定及评价。根据朱友理等[19]不同药剂浓度对作物安全性不同的研究,结合 Smith[20]的田间除草理论:根据作物对不同浓度药剂的敏感性以及不同浓度药剂的除草活性来选择药剂的适宜浓度用于田间除草的理论,菌株 D30202 正丁醇相萃取物具有开发为禾本科作物田间防除十字花科杂草除草剂的潜力。这也与张风文等[21]的研究结论相呼应。为明确新化合物作为新型除草剂在农田应用的可行性,需测定新化合物的杀草谱以

及对作物的安全性。

当前研究的除草剂作用机理都是通过打乱或破坏植物的正常代谢过程而引起杂草死亡，诸如：抑制光合作用、抑制生命活动必需物质的合成、干扰激素平衡、抑制细胞的发育和破坏膜完整性等[22-23]。本研究选取丙二醛（MDA）及一系列抗氧化酶（SOD、POD、CAT）作为观测供试杂草的代谢指标。植物受到逆境胁迫时，细胞中会积累渗透调节物质并提高抗氧化酶类活性，而渗透调节物质 MDA 同时也是膜脂过氧化的最终产物，其含量多少象征着植物细胞膜遭受逆境的伤害程度和抗逆性的强弱[24-25]。

从试验结果得知，在菌株 D30202 正丁醇萃取物溶液处理 2 d 后，无论是 MDA 含量，还是抗氧化酶（SOD、POD、CAT）活性都发生了显著变化。MDA 含量始终高于对照样品，表明杂草受到了胁迫。而抗氧化酶（SOD、POD、CAT）活性均出现显著下降，这可能是胁迫超过了机体所能承受的极限，引起了酶活性的下降或破坏，导致膜脂质过氧化作用加剧，植物体的正常代谢被破坏，生长受到抑制。其中观测到的对照组样品抗氧化酶活性波动及 POD 活性的略微上升，除去试验允许的随机误差外，可能是三叶期杂草对氧浓度调节和组织老化的体现。

试验结果中抗氧化酶活性的变化与李磊等、洪法水等[26-27]关于胁迫对植物抗氧化酶活性影响的研究结果一致。胁迫使过氧化物大量积累，而供试植物的抗氧化酶系统对氧化损伤的缓解效果不断减弱。氧自由基的积累加速了叶绿体分解和膜脂过氧化加剧，最终导致植物质膜结构和生理功能的破坏。调节系统的紊乱不仅影响了光合作用，还影响了机体的正常生物合成。王云生等[28]的研究指出 MDA 含量的升高还影响光合电子传递，从而抑制光合作用，使植株死亡。张利霞等[29]通过模拟试验证实了夏枯草抗氧化酶活性和光合参数对逆境胁迫的响应。此次试验只选择了丙二醛、抗氧化酶等指标进行测定，仅初步探明除草机理与光合作用和生物合成有关。而在测试萃取物抑草活性的环节选取了两种极性不同的有机溶剂进行对比，乙酸乙酯萃取物和正丁醇萃取物的抑草效果存在着浓度差，这可能是因为极性不同的溶剂萃取到的活性成分不同导致的，后续应深度优化萃取条件以确定最优抑草组分。关于代谢物中活性化合物具体通过什么途径和模式起作用，以及其作用位点是什么还需对活性化合物进一步分离表征。

参考文献

[1] 辛存岳. 2006 年青海农田主要草害发生趋势预测及防御[J]. 青海农林科技，2006(1)：14－16.

[2] 涂鹤龄，辛存岳，陈照礼，等. 青海农田草害调查研究[J]. 青海农林科技，1988(1)：4－20.

[3] QI Yue，LI Junsheng，GUAN Xiao，et al. Effects of herbicides on non-target plant species diversity and the community composition of fallow fields in northern China [J/OL]. Scientific Reports，2020，10(1)：9967. DOI：10.1038/s41598-020-67025-2.

[4] KUDSK P，MATHIASSEN S K. Pesticide regulation in the European Union and the glyphosate controversy [J]. Weed Science，2020，68(3)：214－222.

[5] 李海涛. 寄生疫霉菌作为微生物除草剂防除麦瓶草潜力的研究[D]. 泰安：山东农业大学，2005.

[6] 魏文君. 三种药用植物中萜类成分及其生物活性的研究[D]. 兰州：兰州大学，2019.

[7] 王禹博，纪明山，谷祖敏，等. 生物除草剂的开发、研究进展与未来发展思路[J]. 农药，2019，58(2)：86－88.

[8] 强胜，陈世国. 生物除草剂研发现状及其面临的机遇与挑战[J]. 杂草科学，2011，29(1)：1－6.

[9] 陈燕芳，丁伟，丁吉林，等. 天然产物除草剂研究进展[J]. 杂草科学，2007(2)：1－6.

[10] 沈硕. 青藏高原察尔汗盐湖地区可培养中度嗜盐菌的群落结构与多样性[J]. 微生物学报，2017，57(4)：490－499.

[11] 王钱福. 嗜盐菌的分离及其多相分类学研究[D]. 兰州：兰州大学，2007.

[12] 李玮，沈硕，郭青云. 3 株来源于青稞白酒糟醅的生防菌株鉴定及其生物活性[J]. 中国生物防治学报，2016，32(4)：544－552.

[13] 农业农村部农药检定所. 农药室内生物测定试验准则 除草剂 第 8 部分：作物的安全性试验 茎叶喷雾法：NY/T 1155.8-2007 [S]. 北京：中国农业出版社，2007.

[14] 刘欢，慕平，许维诚，等. 10 种除草剂对裸燕麦田杂草的药效、燕麦产量及安全性影响[J]. 草原与草坪，2015，35(2)：1－8.

[15] 刘萍，李明军，丁义峰. 植物生理学实验[M]. 北京：科学出版社，2016.

[16] 郑炳松. 现代植物生理生化研究技术[M]. 北京：气象出版社，2006.

[17] 马佳，李颖，胡栋，等. 芽胞杆菌生物防治作用机理与应用研究进展[J]. 中国生物防治学报，2018，34(4)：639－648.

[18] 李伟佳，沈硕，陈妙妙. 嗜盐抑草活性菌株的筛选及鉴定[J]. 青海大学学报，2019，37(6)：11－19.

[19] 朱友理，何东兵，曹书培，等. 不同浸种剂和浓度对 5 个水稻品种发芽率和幼苗生长的安全性研究[J]. 江苏农业科学，2019，47(7)：87－91.

[20] SMITH M A K. Comparing weed and crop seedling response to pre-emergence pendimethalin application in *Corchorus olitorius* and *Abelmoschus esculentus* [J]. Crop Protection，2006，25(12)：1221－1226.

（下转 211 页）

[7] 吕昂，王成，汤亚芳，等. 兰花茎腐病拮抗菌 HJ-5 的筛选和生防潜力评估[J]. 河南农业科学，2021，50(8)：85－93.

[8] 周德庆. 微生物学实验教程[M]. 2 版. 北京:高等教育出版社，2002.

[9] JEFFREY D，WISOTZKEY P，JURTSHUK J R，et al. Comparative sequence analyses on the 16s rDNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*，*Bacillus acidoterrestris*，and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus，*Alicyclobacillus* gen. nov [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology，1992，42(2)：263－269.

[10] DUCA M T L，SATOMIB M，AGATAC N，et al. *GyrB* as a phylogenetic discriminator for members of the *Bacillus anthracis-cereus-thuringiensis* group [J]. Journal of Microbiological Methods，2004，56(3)：383－394.

[11] 于飞进，陈卫良. 培养条件对 *Bacillus cereus* 357 生长及产生拮抗物质的影响[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版)，2006(4)：396－400.

[12] RUIZ-GARCiA C，BEJAR V，MARTiNEZ-CHECA F，et al. *Bacillus velezensis* sp. nov. a surfactant-producing bacterium isolated from the river Velez in Malaga，southern Spain [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology，2005，55(1)：191－195.

[13] 刘晓艳，闵勇，黄大野，等. 死亡谷芽胞杆菌研究进展[J]. 生物资源，2018，40(1)：8－12.

[14] 梁丽琼，黄少莉，邵杭，等. 水稻基腐病菌拮抗菌解淀粉芽孢杆菌 E3 菌株的鉴定及抑菌活性[J]. 华南农业大学学报，2021，42(4)：51－62.

[15] PAJIN I，VLAJKOV V，FROHME M，et al. Pepper bacterial spot control by *Bacillus velezensis*：bioprocess solution [J/OL]. Microorganisms，2020，8(10)：1463. DOI：10.3390/microorganisms8101463.

[16] 李生樟，陈颖，杨瑞环，等. 一株拮抗黄单胞菌的贝莱斯芽孢杆菌的分离和鉴定[J]. 微生物学报，2019，59(10)：1969－1983.

[17] 崔双，陈昌龙，冯佳豪，等. 魔芋软腐病致病菌 *Pectobacterium aroidearum* 的特征及贝莱斯芽孢杆菌的生防效果[J]. 中国蔬菜，2021(3)：83－93.

[18] XU Yang，WANG Lulu，LIANG Wenxing，et al. Biocontrol potential of endophytic *Bacillus velezensis* strain QSE-21 against postharvest grey mould of fruit [J]. Biological Control，2021，161(2)：1－12.

[19] 张晓勇，李树江，严凯，等. 杧果采后炭疽病生防菌株筛选及其培养特性研究[J]. 园艺学报，2021，48(11)：2171－2184.

[20] XU Shuai，XIE Xuewen，ZHAO Yurong，et al. Whole-genome analysis of *Bacillus velezensis* ZF2，a biocontrol agent that protects *Cucumis sativus* against corynespora leaf spot diseases [J/OL]. 3 Biotech，2020，10(4)：186. DOI：10.1007/s13205-020-2165-y.

[21] 陶永梅，潘洪吉，黄健，等. 新型生防微生物因子贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)的研究与应用[J]. 中国植保导刊，2019，39(9)：26－33.

[22] JANG S J，KIM Y J，PARK J M，et al. Analysis of microflora in Gochujang，Korean traditional fermented food [J]. Food Science & Biotechnology，2011，20(5)：1435－1440.

[23] MENG Qingxiao，JIANG Helen，HAO Jianjun. Effects of *Bacillus velezensis* strain BAC03 in promoting plant growth [J]. Biological Control，2016，98：18－26.

[24] 龚庆伟. 芽孢杆菌抗菌脂肽的分离纯化及 Bacillomycin D 抑制黄曲霉作用的研究[D]. 南京:南京农业大学，2012.

[25] ARREBOLA E，JACOBS R，KORSTEN L. Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens [J]. Journal of Applied Microbiology，2010，108(2)：386－395.

[26] LIMA W G，PARREIRA A G，NASCIMENTO L A，et al. Absence of antibacterial，anti-candida，and anti-dengue activities of a surfactin isolated from *Bacillus subtilis* [J]. Journal of Pharmaceutical Negative Results，2018，9(1)：27－32.

(责任编辑：杨明丽)

(上接 203 页)

[21] 张风文，金涛，王恒智，等. 新化合物环吡氟草酮对小麦田杂草的杀草谱与安全性评价[C] //第十三届全国杂草科学大会论文摘要集 . 2017.

[22] 王恒亮，吴仁海，职倩倩，等. 除草剂作用机制研究进展[J]. 河南农业科学，2013，42(12)：11－15.

[23] 陈世国，强胜. 生物除草剂研究与开发的现状及未来的发展趋势[J]. 中国生物防治学报，2015，31(5)：770－779.

[24] 孙欧文，杨倩倩，章毅，等. 四个绣球品种对高温干旱复合胁迫的生理响应机制[J]. 植物生理学报，2019，55(10)：1531－1544.

[25] 张伟珍，古丽君，段廷玉，等. AM 真菌提高植物抗逆性的机制[J]. 草业科学，2018，35(3)：491－507.

[26] 李磊，罗浚凤，谭琳山，等. 锌胁迫对桉树巯基物质含量及抗氧化酶活性的影响[J]. 基因组学与应用生物学，2020，39(2)：213－218.

[27] 洪法水，张帆. 玉米幼苗萎蔫过程中某些理化性质变化的研究[J]. 西北植物学报，1999，19(1)：74－78.

[28] 王云生，陆徐忠，孙明娜，等. Physiological research on the difference of bentazon tolerance in wild type rice and sensitive lethal mutants [J]. 作物学报，2008，34(9)：1615－1622.

[29] 张利霞，郝国宝，常青山，等. 模拟酸雨胁迫对夏枯草抗氧化酶活性和光合参数的影响[J]. 中国草地学报，2020，42(4)：56－61.

(责任编辑：杨明丽)