

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2019.07.007

# 一株香樟炭疽病拮抗菌的鉴定 及其发酵条件优化<sup>①</sup>

欧 婷<sup>1</sup>, 江鸿森<sup>1</sup>, 任慧爽<sup>2</sup>, 王 飞<sup>1</sup>,  
徐伟芳<sup>1</sup>, 王若琳<sup>1</sup>, 谢 洁<sup>1</sup>

1. 西南大学 生物技术学院/家蚕基因组生物学国家重点实验室, 重庆 400715;
2. 重庆市风景园林科学研究院, 重庆 401329

**摘要:** 为寻获香樟炭疽病生物防治的优良菌种资源, 通过形态学观察、生理生化检测和基于 16S rDNA 系统发育分析, 对一株香樟炭疽病拮抗菌 SWUJ1 进行了菌种鉴定; 通过单因素试验优化该菌株产生抑菌活性物质的发酵条件, 并采用抑菌圈法检测其发酵液抑菌活性; 进而利用菌丝生长速率法测定该菌株的抑菌谱。菌种鉴定结果表明 SWUJ1 为革兰氏阳性杆状菌株、产芽孢, 在 LB 固体培养基上菌落呈圆形、边缘整齐光滑、湿润、呈乳白色黏稠状, 过氧化氢酶呈阳性且具运动性; 基于 16S rDNA 序列的系统发育分析结果显示该菌株与登录号为 NR116240 的甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*)的亲缘关系最近, 且处于系统发育树的同一分枝, 故将 SWUJ1 菌株鉴定为甲基营养型芽孢杆菌, 命名为 *B. methylotrophicus* SWUJ1; 发酵条件优化结果表明该菌株产抑菌活性物质的最佳氮源为酵母粉, 碳源为乳糖, 无机盐离子为  $MgSO_4$ , 初始 pH 值为 5.0, 培养温度为 25 °C, 接种量为 1.0%, 发酵时间为 96 h, 优化后拮抗细菌 *B. methylotrophicus* SWUJ1 等量发酵上清液对香樟炭疽病菌的拮抗作用显著提高, 且其发酵上清液对核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)及旋孢腔菌(*Cochiobolus sativus*)等 10 余种常见植物病原菌具不同程度的抑制作用。研究结果表明, *B. methylotrophicus* SWUJ1 菌株可作为开发香樟炭疽病生防制剂的候选菌株。

**关键词:** 香樟炭疽病; 拮抗菌; 鉴定; 发酵优化

中图分类号: S182

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2019)07-0043-10

香樟(*Cinamomum camphora* (L) Prest)为樟科、樟属亚热带常绿阔叶乔木<sup>[1]</sup>。由于具有生长快、枝叶茂密、常绿且冠形美观, 以及能避臭、驱虫、吸毒气、隔噪音等特点, 香樟被广泛应用于城市园林绿化<sup>[2-3]</sup>。随着香樟种植面积的扩大, 香樟病害问题也越来越引起人们的重视。其中, 香樟炭疽病是由盘长孢状刺盘孢(*Colletotrichum gloeosporioides*)引起的主要真菌病害<sup>[4]</sup>, 该病害在全国各地发病率极高, 发病叶片呈现褐色病斑, 且常伴随不规则形状的黑色小粒点<sup>[4-5]</sup>。此外, 炭疽病菌也能使香樟茎干枯死, 影响其正常生长, 给绿化建设带来极大的损失。目前, 生产上防控香樟炭疽病以化学农药防治为主, 另辅以合理修剪, 树粮间作等农艺防控手段<sup>[6]</sup>。然而, 农艺法耗时费力, 且防效甚微; 化学法主要是通过多菌灵、红日强力杀菌

① 收稿日期: 2018-07-31

基金项目: 国家自然科学基金项目(31601678); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(XDJK2018D020); 重庆市城市管理委员会科技计划项目(园科学 2016 第 08 号)。

作者简介: 欧 婷(1994-), 女, 硕士研究生, 主要从事微生物次生代谢产物研究。

通信作者: 谢 洁, 教授, 硕士研究生导师。

剂、碘加酮杀菌剂等对香樟进行喷雾防治<sup>[7]</sup>, 尽管此法短期内防治效果较好, 但易导致农药残留、病原菌产生耐药性、造成环境污染等一系列弊端. 近年来, 随着人们对环境问题的日益重视, 使用安全有效的微生物菌剂<sup>[8-10]</sup>防治炭疽病已逐步成为一种极具潜力的生物防控手段, 而利用此法进行香樟炭疽病防治的报道整体较少. 因此, 寻获能够有效抑制香樟炭疽病菌生长的微生物菌种资源对于绿色防控香樟炭疽病具有重要意义.

土壤微生物(soil microorganism)是生活在土壤中的细菌、真菌、放线菌及藻类等的总称<sup>[11]</sup>. 土壤有益微生物种类丰富, 因其具有促进宿主植物生长<sup>[12]</sup>、增加宿主植物抗病虫害能力<sup>[13-14]</sup>等功能, 被广泛应用于植物病虫害生物防治<sup>[15-17]</sup>. 近年来, 有关利用土壤有益微生物防治植物炭疽菌的研究报道表明: 土壤中存在大量能够抑制植物病原菌生长的拮抗菌群, 这些菌群是开发植物病原微生物生防制剂的重要菌种来源<sup>[18-20]</sup>. 张晖等从香蕉根际土壤中分离获得几株对荔枝炭疽病菌与香蕉炭疽病菌均具明显抑菌作用的芽孢杆菌分离株<sup>[18]</sup>; 喇文军等从农田土壤分离筛选出的枯草芽孢杆菌 C-D6 对香蕉炭疽病原菌拮抗效果显著<sup>[19]</sup>; 祝福元等从土壤中分离获得的两株芽孢杆菌菌株 19E2、13A1 对菜心炭疽病菌具有强烈抑制作用<sup>[20]</sup>. 然而, 有关利用土壤有益微生物防治香樟炭疽病的研究报道较少.

本研究对一株来自根际土壤的香樟炭疽病菌拮抗细菌进行菌种鉴定, 优化该菌株产生抑菌活性物质的发酵条件, 并测试其抑菌谱, 以期利用土壤有益微生物进行香樟炭疽病的防治奠定基础.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 供试菌株

拮抗细菌 SWUJ1 菌株(来自根际土壤)及香樟炭疽病菌(*C. gloeosporioides*)SC 菌株由重庆市风景园林科学研究院提供.

#### 1.1.2 供试抗菌谱病原菌

桑椹核地杖菌(*Scleromitrua shiraiana*) SXSG-5、核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*) PZ-2、茎点霉(*Phoma exigua*) GXH1、锈腐病菌(*Ilyonectria radiciala*) SXZW10、鞭毛藻丛赤壳菌(*Nectria haematococca*) SXZW6 为本实验室分离保存. 腐霉菌(*Pythium ultimum*) SWU3、灰霉菌(*Botrytis cinerea*) SWU5、西瓜炭疽菌(*Colletrichum lagenarium*) SWU8、榆梢枯长喙霉(*Ceratocystis ulmi*) SWU10、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*) SWU22、旋孢腔菌(*Cochiobolus sativus*) SWU25、链格孢菌(*Alternaria alternata*) SWU26、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*) SWU27 为本实验室收集保存.

#### 1.1.3 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、马铃薯葡萄糖培养基(PDB)、LB 琼脂培养基: 均参照文献<sup>[20]</sup>配制; 使用 PDB 培养基作为氮源基础培养基; 碳源基础培养基: 马铃薯 200.0 g 煮沸 20 min 过滤取滤液, 加入最佳氮源(根据氮源优化结果选择)10.0 g, 蒸馏水定容至 1 000 mL, pH 值自然; 无机盐基础培养基: 马铃薯 200.0 g 煮沸 20 min 过滤取滤液, 加入最佳氮源(酵母粉)10.0 g, 最佳碳源(乳糖)20.0 g, 蒸馏水定容至 1 000 mL, pH 值自然. 将上述培养基在 121 °C 的高压条件下灭菌 20 min 后备用.

#### 1.1.4 主要试剂与仪器

基因组提取试剂盒(PrepMan Ultra Sample Preparation Regant)购自美国 ABI 公司; DNA marker、Taq 酶、dNTP、PCR Buffer、Mg<sup>2+</sup> 购自宝生物工程生工(大连)有限公司; PCR 引物购自生工(上海)生物有限公司; 生化鉴定试剂盒购自广东环凯生物科技有限公司; 其他试剂均为国产分析纯. 电泳仪、水浴锅均购自北京六一仪器厂, PCR 仪购自美国 ABI 公司.

## 1.2 方法

### 1.2.1 抑菌活性检测方法

采用平板对峙法<sup>[21]</sup>检测抑菌活性: 将目标拮抗菌新鲜培养物接种于 PDB 培养基, 在 28 °C 温度下, 摇

床转速为 180 r/min, 振荡培养 24 h, 获得菌悬液; 活性检测时, 用规格为 5 mm 的打孔器在长满新鲜炭疽病菌菌丝的 PDA 平板边缘处打取菌饼, 接种至新的 PDA 平板中央, 并在距菌饼中心 30 mm 对称处用菌悬液划一条直线, 以不加拮抗菌菌悬液的 PDA 平板为对照, 22 °C 恒温培养一周, 观察抑菌带大小, 以此判断拮抗细菌抑菌活性。

### 1.2.2 拮抗细菌鉴定的方法

#### 1.2.2.1 菌体培养特征、形态观察及生理生化特征测定

目标菌株培养特征、形态观察以及运动性、淀粉水解、明胶液化、硝酸盐还原等生理生化特性测试实验, 均参照文献[22-24]的方法进行。

#### 1.2.2.2 菌体分子生物学鉴定和系统发育分析

将 SWUJ1 菌株接种至 LB 液体培养基振荡培养 12~18 h 后, 提取菌株基因组, 并以其为模板, 采用引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' 进行 16S rDNA 扩增。PCR 反应条件为: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 60 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。扩增产物送往生工(上海)生物有限公司测序, 将获得的基因序列拼接后在 NCBI(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行同源性比较分析, 下载同源性较高的菌种序列信息, 用 ClustalX 2.0 程序进行多重序列比对, 利用 MEGA 6.0 软件邻接法(Neighbor-joining method)进行 1 000 次步长计算, 构建系统发育树<sup>[25]</sup>。

#### 1.2.3 拮抗菌株发酵条件优化

采用抑菌圈法<sup>[26]</sup>检测培养基成分(碳源、氮源和无机盐)及发酵条件(温度、pH 值、接种量以及发酵时间)对 SWUJ1 菌株产生抑菌活性物质的影响。具体方法为: 将 SWUJ1 菌株纯培养物接种至液体培养基恒温振荡培养后, 收集发酵液, 以 10 000 r/min 的转速离心 30 min, 取上清液过 0.22 μm 滤膜制备无菌发酵上清液。进而在新鲜 PDA 平板中央接种炭疽病菌 SC 菌株菌饼, 并在距离菌饼中心 30 mm 处用 8 mm 直径的打孔器打孔, 孔内加入 200 μL 拮抗细菌无菌发酵上清液, 于 25 °C 温度下培养 1 周, 测量菌丝边缘至琼脂孔的距离, 以此数值表示抑菌带宽度, 判断拮抗细菌相应发酵条件下的抑菌活性大小。

##### 1.2.3.1 培养基成分优化

(1) 氮源优化: 在其他条件不变的情况下, 在氮源基础培养基(PDB 培养基)中分别加入 1% 的蛋白胨、酵母粉、牛肉膏、胰蛋白胨、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>、NaNO<sub>3</sub> 作为氮源, 以氮源基础培养基为对照, 取目标菌株种子液加入发酵培养基中(接种量 1%), 于 28 °C、摇床转速为 180 r/min 的条件下振荡培养 96 h, 每个处理设置 3 次重复。

(2) 碳源优化: 在其他条件不变的情况下, 在碳源基础培养基中分别加入 2% 的葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、可溶性淀粉和苹果酸作为碳源, 以碳源基础培养基为对照, 取目标菌株种子液加入发酵培养基中(接种量 1%), 于 28 °C、转速为摇床转速为 180 r/min 的条件下振荡培养 96 h, 每个处理设置 3 次重复。

(3) 无机盐优化: 在其他条件不变的情况下, 在无机盐基础培养基中分别加入 0.05%, 0.10%, 0.15% 共 3 个质量分数梯度的 KCl, MnSO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaCl, FeSO<sub>4</sub> 和 MgSO<sub>4</sub>, 以无机盐基础培养基为对照, 取目标菌株种子液加入发酵培养基中(接种量 1%), 于 28 °C、摇床转速为 180 r/min 的条件下振荡培养 96 h, 每个处理设置 3 次重复。

##### 1.2.3.2 培养条件优化

基于已经优化的发酵培养基组分, 检测 SWUJ1 菌株在不同培养条件下获得发酵液的抑菌效果, 每种条件设置 3 个重复。

(1) 温度: 设置 20, 25, 28, 30, 32, 35, 37 和 40 °C 共 8 个温度, 其他条件一致, 接种后于 180 r/min 条件下培养 3 d, 检测抑菌效果, 确定最适温度;

(2) 起始 pH 值: 设置 3.0, 4.0, 4.5, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 和 9.0 共 8 个起始 pH 值, 其他条件一致, 接种后于 28 °C、摇床转速为 180 r/min 的条件下培养 3 d, 检测抑菌效果, 确定最适起始 pH 值;

(3) 发酵时间: 设置 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144 h 共 8 个发酵时间, 其他培养条件一致, 于 28 °C、摇床转速为 180 r/min 的条件下培养后, 检测抑菌效果, 确定最适发酵时间;

(4) 接种量: 设置 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8% 和 9% 共 9 个接种量, 其他培养条件一致, 于 28 °C、摇床转速为 180 r/min 的条件下培养 3 d, 检测抑菌效果, 确定最适接种量。

#### 1.2.4 拮抗菌株抑菌谱的检测方法

将拮抗菌株 SWUJ1 接种于优化后的发酵培养基, 按 1.2.3 中的方法制备无菌上清发酵液, 用菌丝生长速率法<sup>[27]</sup>检测其对核盘菌 PZ-2、旋孢腔菌 SWU25 等 10 余种植物病原菌的抑菌效果。根据病原菌生长速度, 腐霉病菌 SWU3 及尖孢镰刀菌 SWU27 在培养 1 d 时测量抑菌率, 桑椹核地仗菌 SXSG-5、锈腐病菌 SXZW10、茎点霉 GXH1 及西瓜炭疽菌 SWU8 在培养 8 d 时测量抑菌率, 其余病原真菌在培养 3 d 时测量抑菌率。具体方法为: 将 PDA 培养基高压灭菌后冷却至 50 °C 左右, 以 1% 的比例混入拮抗菌株 SWUJ1 无菌发酵上清液制备检测平板, 以未加发酵滤液的 PDA 平板作为对照, 接入直径为 5 mm 的病原菌菌饼后, 置于 25 °C 培养箱中培养, 每个处理组 3 个重复。实验结束后, 用十字交叉法测量病原菌菌落直径, 并计算抑菌率<sup>[28]</sup>:

$$\text{菌落直径(mm)} = \text{测量菌落直径(mm)} - \text{菌饼直径(mm)}$$

$$\text{抑菌率} = \frac{\text{对照组菌落直径(mm)} - \text{测试组菌落直径(mm)}}{\text{对照组菌落直径(mm)}} \times 100\%$$

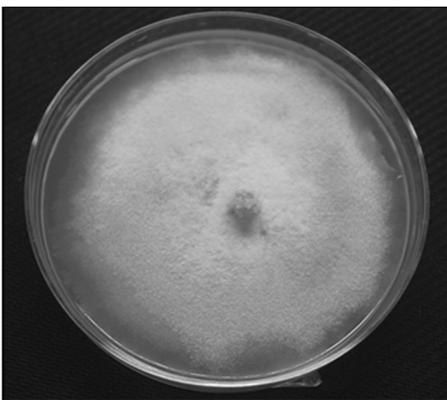
### 1.3 数据分析

实验数据用 Office excel 2010 处理, 使用 SPASS 17.0 软件进行单因素方差统计分析, 结果以“平均值 ± 标准误差”表示。

## 2 结果和分析

### 2.1 拮抗菌菌体的抑菌活性检测结果

抑菌测试结果表明, SWUJ1 菌体对炭疽病菌 SC 菌株具有较强的抑制活性。香樟炭疽病菌 SC 菌株在对照 PDA 培养基上生长迅速, 1 周后长满整个平板(图 1(a)), 而炭疽病菌 SC 菌株与 SWUJ1 菌株在 PDA 培养基上对峙培养时, 出现明显的抑菌带(图 1(b))。



(a) 炭疽病菌 SC 菌株在 PDA 培养基上的生长情况



(b) 炭疽病菌 SC 菌株与 SWUJ1 菌株在 PDA 培养基上的对峙生长情况

图 1 拮抗菌 SWUJ 菌株对炭疽病菌 SC 菌株的生长抑制作用(7 d)

### 2.2 拮抗菌株 SWUJ1 的鉴定

#### 2.2.1 形态学鉴定

将拮抗菌 SWUJ1 菌株接种至 LB 固体培养基, 28 °C 恒温培养 24 h, 观察到菌落呈圆形、边缘整齐光滑、湿润、呈乳白色黏稠状(图 2(a))。SWUJ1 菌株革兰氏染色与芽孢染色结果表明, 该菌体为革兰氏阳性杆状菌株, 且能产芽孢(图 2(b)、图 2(c))。

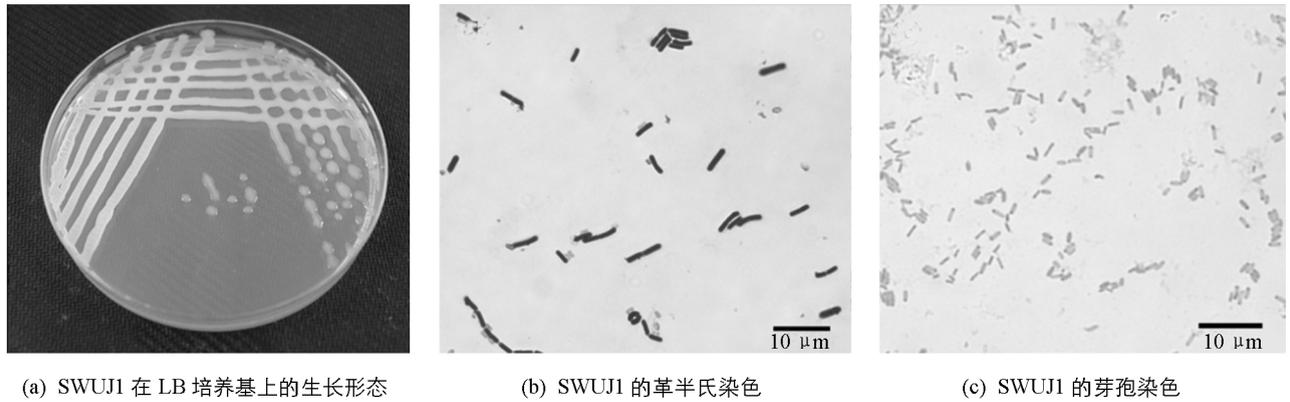


图 2 SWUJ1 菌株的形态学特征

### 2.2.2 生理生化实验

生理生化实验结果表明, SWUJ1 菌株能够还原硝酸盐、液化明胶、水解淀粉、过氧化氢酶检测呈阳性; 能够利用枸橼盐酸, 在半固体琼脂培养基中能扩散生长, 表明其具有运动性(表 1)。这些特性与芽孢杆菌属菌株的生理生化特性一致, 综合对 SWUJ1 菌株的形态学观察及生理特性分析, 判断其为芽孢杆菌属菌株。

表 1 SWUJ1 菌株的生理生化特征

测试项目	结果	测试项目	结果
葡萄糖产气	-	木糖	-
蛋白胨水	-	明胶	+
硝酸盐还原	+	西蒙氏枸橼盐酸	+
淀粉	+	葡萄糖磷酸盐	-
过氧化氢酶	+	半固体琼脂	+
甘露糖	-	阿拉伯糖	-

注: “+”表示阳性; “-”表示阴性。

### 2.2.3 SWUJ1 菌株 16S rDNA 序列测定及系统发育分析

将 SWUJ1 菌株 16S rDNA 扩增产物送至生工(上海)有限公司测序, 得到长度为 1 454 bp 的片段, 提交该序列相关信息至 GenBank, 获得登录号 MH613286, 将该序列与 GenBank 中序列进行在线比对, 结果显示其与多株 *Bacillus methylotrophicus* 菌株 16S rDNA 序列的同源性高达 99%。基于 16S rDNA 系统发育分析结果显示, SWUJ1 菌株登录号为 NR116240 的甲基营养型芽孢杆菌的亲缘关系最近, 处于系统发育树的同一分枝(图 3)。

结合 SWUJ1 菌株的形态学观察、生理生化反应特征、16S rDNA 序列的系统发育分析结果, 鉴定 SWUJ1 菌株为甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*), 命名为 *B. methylotrophicus* SWUJ1。

## 2.3 SWUJ1 菌株的发酵条件优化

### 2.3.1 培养基成分的优化

通过单因素试验检测不同碳源、氮源以及无机盐对拮抗菌株产抑菌活性物质的影响。结果表明, 在选用的 7 种氮源培养基上生长的 SWUJ1 菌株均可产生抑菌活性物质。其中以酵母粉为氮源时, 该菌发酵液的抑菌活性最大, 抑菌带宽度为 11.97 mm, 比对照组提高了 60.99%, 其次是  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、牛肉膏、蛋白胨、 $\text{NaNO}_3$ 、胰蛋白胨(图 4(a)), 故酵母粉为最佳氮源; 在选用的 6 种碳源培养基上生长的 SWUJ1 菌株, 除苹果酸外, 其余均可产生抑菌活性物质。其中以乳糖为碳源时, 该菌发酵液的抑菌活性最大, 抑菌带宽度为 12.26 mm, 比对照组提高了 45.45%, 其次是可溶性淀粉、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖(图 4(b)), 故乳糖为最佳碳源; 在选用的 7 种无机盐中, 采用质量分数为 0.10% 的  $\text{MgSO}_4$  最有利于 SWUJ1 菌

株产生抑菌活性物质, 抑菌带宽度可高达 15.17 mm(图 4(c)).

综上所述, 优化后的培养基配方为: 马铃薯 200.0 g 煮沸 20 min 过滤取滤液, 加入酵母粉 10.0 g, 乳糖 20.0 g,  $MgSO_4$  1.0 g, 蒸馏水定容至 1 000 mL.

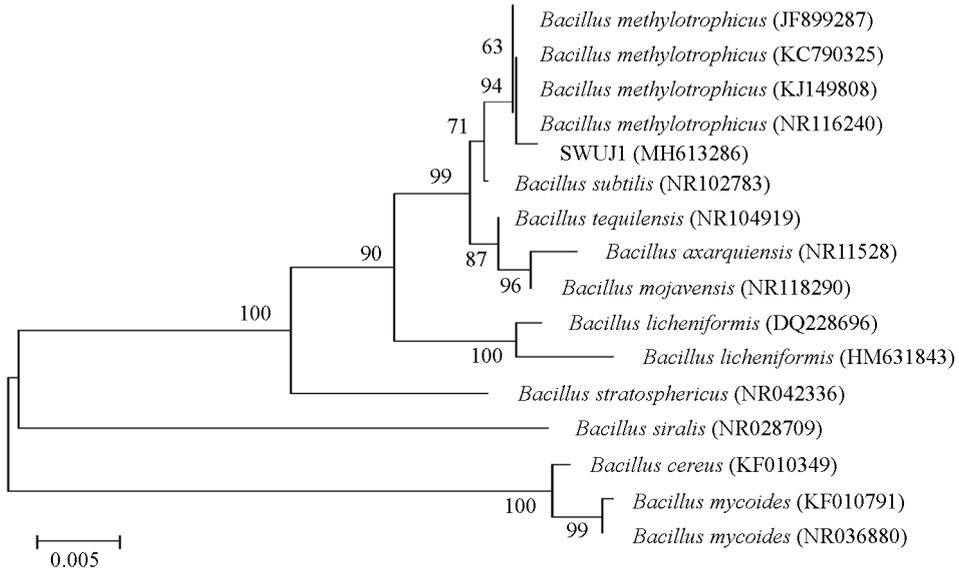
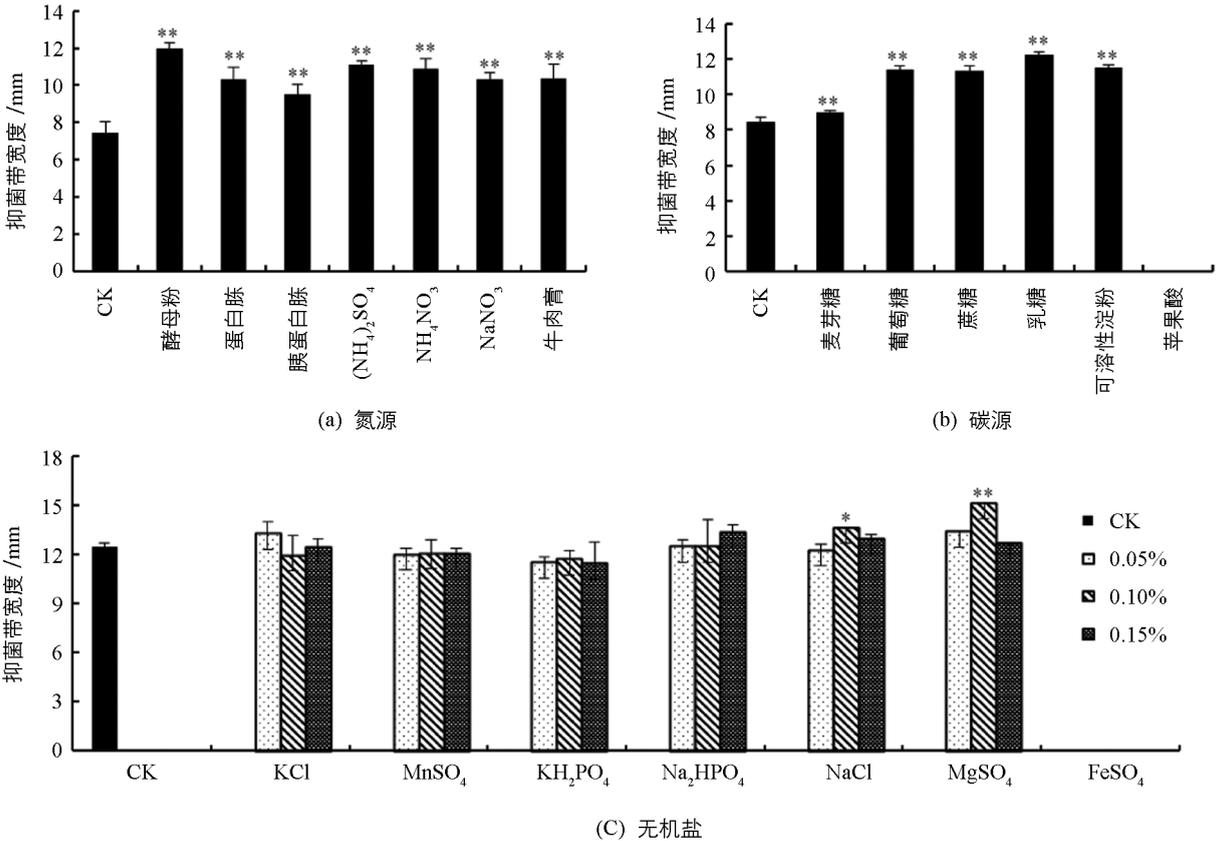


图 3 SWUJ1 菌株基于 16S rDNA 的系统发育树



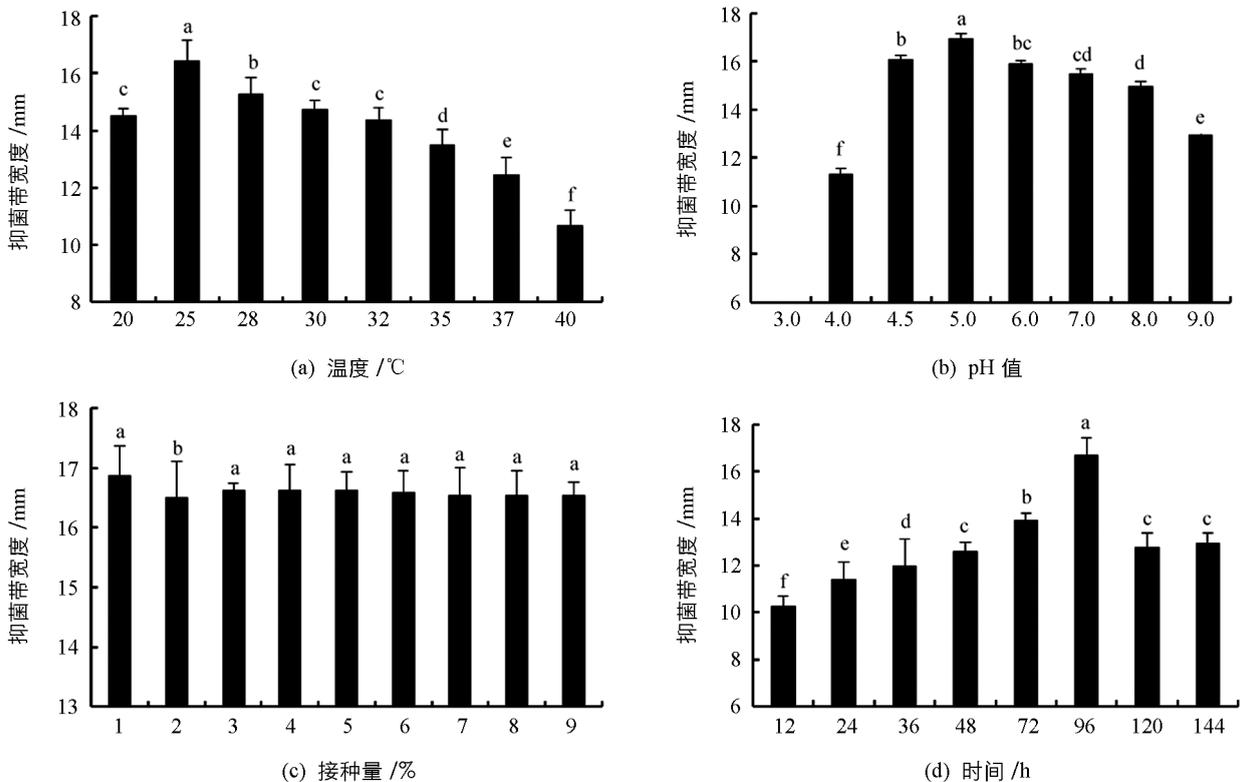
“\*”表示与 CK 相比差异具有统计学意义( $p < 0.05$ ), “\*\*”表示与 CK 相比差异极具有统计学意义( $p < 0.01$ ).

图 4 不同碳源、氮源和无机盐对 *B. methylotrophicus* SWUJ1 发酵液抑菌活性的影响

### 2.3.2 培养条件的优化

在确定培养基成分优化结果的基础上, 对 SWUJ1 菌株发酵条件进行单因素优化试验. 结果表明:

与其他培养温度相比, SWUJ1 菌株在 25 °C 培养条件下, 发酵液抑菌活性最大, 其抑菌带宽度可达 16.43 mm(图 5(a)); pH 值过高或过低, 均会显著降低发酵液的抑菌活性, 初始 pH 值为 5.0 时抑菌活性最强(图 5(b)), 其抑菌带宽度可达 16.93 mm; 而种子液接种量对菌株发酵液抑菌活性影响不大, 种子液接种量为 1% 时, 发酵上清液抑菌活性略强(图 5(c)); 同时, 不同发酵时间对菌株产抑菌活性物质的影响显著, 随着培养时间延长, 发酵液抑菌活性逐渐增加, 待到菌株培养至 96 h 时, 其抑菌活性最强, 抑菌带宽度可达 16.73 mm(图 5(d)), 随后, 培养时间过长抑菌活性呈现下降趋势. 综上所述可知, 拮抗菌株 SWUJ1 的最适培养温度为 25 °C, 最适初始 pH 值为 5.0, 最适初始接种量为 1%, 最适培养时间为 96 h.



柱上不同小写字母表示差异具有统计学意义( $p < 0.05$ ).

图 5 不同培养条件对 *B. methylophilus* SWUJ1 发酵液抑菌活性的影响

利用优化后的培养基配方和发酵条件培养 SWUJ1 菌株, 进行优化结果的验证. 结果表明, 优化后 SWUJ1 菌株等量发酵上清液的抑菌带宽度( $16.64 \pm 0.09$ ) mm 显著大于 PDB 培养基发酵上清液的抑菌带宽度( $7.435 \pm 0.09$ ) mm, 抑菌效果提高了 123.81%, 优化后的发酵培养基组成与发酵条件有利于抑菌活性物质的生成(图 6).

#### 2.4 拮抗菌株 SWUJ1 抑菌谱检测

抑菌谱测试结果表明, SWUJ1 菌株对多种植物病原菌具有较强的抑制作用, 尤其对桑椹核地仗菌 SXSG-5、核盘菌 PZ-2 和旋孢腔菌 SWU25 的抑菌效果最为显著, 抑菌率分别高达 100%, 100% 和 94.89%(表 2). 因此, SWUJ1 菌株有望开发成为植物真菌病害的生防菌株.

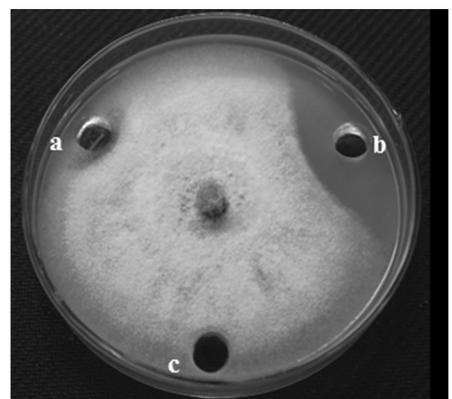


图 6 优化前后 SWUJ1 无菌发酵上清液对炭疽病菌 SC 的抑制效果

表 2 SWUJ1 菌株发酵滤液对多种病原真菌的抑制作用

病原菌	抑菌率/%	病原菌	抑菌率/%
<i>Pythium ultimum</i> SWU3 a	12.83±0.09	<i>Cochiobolus sativus</i> SWU25	94.89±0.05
<i>Fusarium oxysporum</i> SWU27 a	17.82±0.29	<i>Nectria haematococca</i> SXZW6	31.13±0.07
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> PZ-2	100.00±0.00	<i>Scleromitrua shiraiana</i> SXSG-5b	100.00±0.00
<i>Botrytis cinerea</i> SWU5	75.17±0.05	<i>Ilyonectria radicolica</i> SXZW10 b	69.56±0.33
<i>Ceratocystis ulmi</i> SWU10	75.99±0.04	<i>Phoma exigua</i> GXH1 b	64.22±0.59
<i>Rhizoctonia solani</i> SWU22	13.52±0.08	<i>Colletrichum lagenarium</i> SWU8 b	79.86±0.07
<i>Alternaria alternata</i> SWU26	12.74±0.15		

注: 根据病原菌生长速度的不同, 大多数病原菌在接种 3 d 时测量抑菌率(a. 接种后 1 d 测量; b. 接种后 8 d 测量).

### 3 讨 论

本研究对一株来自根际土壤的香樟炭疽病菌拮抗细菌 SWUJ1 菌株进行菌种鉴定, 并对其抑菌活性物质进行发酵条件的优化, 结果表明其优化后的无菌发酵液对香樟炭疽病病原菌的抑菌率提高了 123.81%. 根据该菌株形态特征、生理生化检测结果及基于 16S rDNA 的系统发育分析将其鉴定为甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*), 且 SWUJ1 菌株对核地仗菌 SXSG-5、核盘菌 PZ-2 及旋孢腔菌 SWU25 等植物病原菌亦表现出较强的抑菌活性, 表明该菌株具有较宽的抑菌谱.

芽孢杆菌是一类好氧或兼性厌氧、能形成抗逆性内生芽孢的杆状细菌, 广泛分布于土壤、水体及植物体等多种生态环境中<sup>[29-32]</sup>. 大多数芽孢杆菌可通过生成抑菌活性物质<sup>[33]</sup>, 竞争性排阻<sup>[34]</sup>, 诱导宿主植物产生抗病性及忍耐性<sup>[35]</sup>等多种机理抑制植物病原菌的生长, 从而提高宿主植物的抗病性能. 甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*)作为芽孢杆菌属的重要种群, 广泛分布于土壤环境中, 并发挥着潜在的生防作用. 常征等从三七园土壤中分离的甲基营养型芽孢杆菌 YS(r)-1 对三七腐霉菌具有较强的抑制作用<sup>[36]</sup>; 孙卓等从森林土壤中筛选获得的甲基营养型芽孢杆菌 SZ-2 可用于人参锈腐病的防治<sup>[37]</sup>; 尹向田等从葡萄种植园中分离出的甲基营养型芽孢杆菌 GSBM05 对葡萄白腐病菌等 10 余种植物病原菌有抑菌效果<sup>[38]</sup>. 本研究中的甲基营养型芽孢杆菌 SWUJ1 菌株亦展现出对香樟炭疽病菌的生物防治潜能.

抑菌活性物质的生成是生防菌株发挥防病功能的重要机制之一, 而活性物质的生成效率不仅与菌株自身遗传特性相关, 亦受菌株培养条件影响. 为提高 SWUJ1 菌株抑菌活性物质的产量, 本研究对其发酵条件进行优化, 优化后的培养基成分和培养条件能够显著提高 SWUJ1 菌株等量发酵液的抑菌活性, 为香樟炭疽病防治提供了新的菌种资源. 后续研究将进一步分离纯化 *B. methylotrophicus* SWUJ1 菌株发酵液中的主要抑菌活性物质, 探究其对香樟炭疽菌具有抑制作用的相关机制及其在室外的防治效果, 为在生产中利用该菌株进行香樟炭疽病的生物防治奠定坚实的研究基础.

### 参考文献:

- [1] 王丽贞. 芳香樟炭疽病的研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2007.
- [2] 许东新, 杨学军, 唐东芹, 等. 上海外环线带森林结构的优化模式 [J]. 东北林业大学学报, 2002, 30(3): 118-122.
- [3] 秦 霞. 香樟的功用及主要栽培技术 [J]. 中国林副特产, 2001(3): 18.
- [4] 葛建明, 张 伟, 管丽琴, 等. 香樟炭疽病菌生物学特性及其植物源农药的筛选 [J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2005, 23(4): 401-405, 442.
- [5] 何思瑶, 吴道军, 任慧爽, 等. 5 种杀菌剂对香樟炭疽病菌的室内药效试验 [J]. 绿色科技, 2017(13): 21-23.
- [6] 彭 琼, 卢宗荣, 何传统, 等. 恩施市城区樟树主要病虫害的研究 [J]. 湖北林业科技, 2014, 43(2): 35-37.
- [7] 杨彦辉, 龙珠平. 樟树炭疽病防治措施初探 [J]. 湖南林业科技, 2007, 34(5): 81-82.
- [8] 单体江, 冯 皓, 艾彩霞, 等. 樟树病害及其防治研究综述 [J]. 湖南林业科技, 2014, 41(4): 75-77, 85.
- [9] 任建国, 黄思良, 晏卫红, 等. 拮抗微生物防治芒果炭疽病研究 [J]. 西南农业学报, 2002, 15(4): 82-85.
- [10] 唐玉清, 殷允广. 微生物功能菌生物防治葡萄炭疽病试验报告 [J]. 新疆农业科技, 2015(3): 41-42.

- [11] SANTHANAM R, BALDWIN I T, GROTEN K. In Wild Tobacco, *Nicotiana Attenuata*, Variation Among Bacterial Communities of Isogenic Plants is Mainly Shaped by the Local Soil Microbiota Independently of the Plants' Capacity to Produce Jasmonic Acid [J]. *Communicative & Integrative Biology*, 2015, 8(2): e1017160-1-e1017160-5.
- [12] PANKE-BUISSÉ K, POOLE A C, GOODRICH J K, et al. Selection on Soil Microbiomes Reveals Reproducible Impacts on Plant Function [J]. *The ISME Journal*, 2015, 9(4): 980-989.
- [13] SANGUIN H, SARNIGUET A, GAZENGEL K, et al. Rhizosphere Bacterial Communities Associated with Disease Suppressiveness Stages of Take-All Decline in Wheat Monoculture [J]. *New Phytologist*, 2009, 184(3): 694-707.
- [14] EDWARDS J, JOHNSON C, SANTOS-MEDELLÍN C, et al. Structure, Variation, and Assembly of the Root-Associated Microbiomes of Rice [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015, 112(8): E911-E920.
- [15] MENDES R, KRUIJT M, DE BRUIJN I, et al. Deciphering the Rhizosphere Microbiome for Disease-Suppressive Bacteria [J]. *Science*, 2011, 332(6033): 1097-1100.
- [16] SANTOYO G, DEL CARMEN OROZCO-MOSQUEDA M, GOVINDAPPA M. Mechanisms of Biocontrol and Plant Growth-Promoting Activity in Soil Bacterial Species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: A Review [J]. *Biocontrol Science and Technology*, 2012, 22(8): 855-872.
- [17] YANG H W, LI J, XIAO Y H, et al. An Integrated Insight into the Relationship Between Soil Microbial Community and Tobacco Bacterial Wilt Disease [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2179-2190.
- [18] 张 晖, 宋圆圆, 吕 顺, 等. 香蕉根际促生菌的抑菌活性及对作物生长的促进作用 [J]. *华南农业大学学报*, 2015, 36(3): 65-70.
- [19] 喇文军, 贾书娟, 吴小丽, 等. 抑制辣椒炭疽菌的生防芽孢杆菌菌株筛选和鉴定 [J]. *深圳职业技术学院学报*, 2016, 15(3): 48-52.
- [20] 祝福元, 吴小丽, 吕风青, 等. 菜心炭疽病菌拮抗细菌的筛选及鉴定 [J]. *微生物学通报*, 2009, 36(9): 1350-1355.
- [21] 孙 卓, 杨利民. 人参灰霉病拮抗细菌的筛选及鉴定 [J]. *植物保护学报*, 2016, 43(6): 935-942.
- [22] 周德庆. 微生物学教程 [M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 2002: 356-357.
- [23] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [24] 沈 萍. 微生物学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [25] WEISBURG G, BARNS M, PELLETIER A, et al. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study [J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(2): 697-703.
- [26] 谢 洁, 夏 天, 林立鹏, 等. 一株桑树内生拮抗菌的分离鉴定 [J]. *蚕业科学*, 2009, 35(1): 121-125.
- [27] 方中达. 植病研究方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [28] 王 军, 何大敏, 陈廷智, 等. 大蒜与3种药用作物对烟草炭疽病菌的抑菌效果 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2018, 40(2): 1-7.
- [29] 吕 倩, 胡江春, 王 楠, 等. 南海深海甲基营养型芽孢杆菌 SHB114 抗真菌脂肽活性产物的研究 [J]. *中国生物防治学报*, 2014, 30(1): 113-120.
- [30] 魏新燕, 黄媛媛, 黄亚丽, 等. 甲基营养型芽孢杆菌 BH21 对葡萄灰霉病菌的拮抗作用 [J]. *中国农业科学*, 2018, 51(5): 883-892.
- [31] 康林玉, 刘周斌, 欧立军, 等. 土壤微生物促进作物生长发育研究进展 [J]. *湖南农业科学*, 2017(3): 113-116.
- [32] 任慧爽, 徐伟芳, 王爱印, 等. 桑树内生细菌多样性及内生拮抗活性菌群的研究 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2017, 39(1): 36-45.
- [33] STEIN T. *Bacillus subtilis* Antibiotics: Structures, Syntheses and Specific Functions [J]. *Molecular Microbiology*, 2005, 56(4): 845-857.
- [34] PÉREZ-GARCÍA A, ROMERO D, DE VICENTE A. Plant Protection and Growth Stimulation by Microorganisms: Biotechnological Applications of Bacilli in Agriculture [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2011, 22(2): 187-193.
- [35] GOND S K, BERGEN M S, TORRES M S, et al. Endophytic *Bacillus* spp. Produce Antifungal Lipopeptides and Induce Host Defence Gene Expression in Maize [J]. *Microbiological Research*, 2015, 172: 79-87.
- [36] 常 征, 王 蓉, 李洪潮, 等. 菌株 YS(r)-19 分离鉴定及对三七根腐病菌的抑菌活性 [J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(6): 92-95.

[37] 孙 卓, 杨利民. 人参锈腐病拮抗细菌的筛选鉴定 [J]. 中国农业大学学报, 2016, 21(2): 73-81.

[38] 尹向田, 苏 玲, 吴新颖, 等. 芽孢杆菌 GSBM05 对葡萄白腐病菌的抑菌活性及其鉴定 [J]. 中国农学通报, 2018, 34(1): 134-141.

## Identification of an Antagonistic Bacterium Against Camphor Anthracnose and Optimization of Fermentation Conditions for It

OU Ting<sup>1</sup>, JIANG Hong-sen<sup>1</sup>, REN Hui-shuang<sup>2</sup>,  
WANG Fei<sup>1</sup>, XU Wei-fang<sup>1</sup>, WANG Ruo-lin<sup>1</sup>, XIE Jie<sup>1</sup>

1. School of Biotechnology, Southwest University/ State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Chongqing 400715, China;

2. Chongqing Landscape and Gardening Research Institute, Chongqing 401329, China

**Abstract:** In order to prepare strain resources for the biological control of camphor anthracnose, an antagonistic bacterium SWUJ1 against camphor anthracnose was identified by morphological features, physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA phylogenetic analysis. Further, the fermentation conditions and medium composition were optimized through a single-factor experiment, and the antimicrobial activity of the cell-free fermentation supernatant was determined with the inhibition zone method. Moreover, the antimicrobial spectrum of the cell-free fermentation supernatant was assayed with the method of mycelia growth rate. The results of identification showed that SWUJ1 was Gram-positive, rod-shaped and able to form spores. The colony of SWUJ1 was round, neat, smooth, moist, milky white and viscous on the LB solid medium. Its catalase and motility were positive. Based on 16S rDNA phylogenetic analysis, SWUJ1 was close to *Bacillus methylotrophicus* and in the same minimal clade with *B. methylotrophicus* (accession number: NR116240). Therefore, strain SWUJ1 was identified as a strain of *B. methylotrophicus*, and named *B. methylotrophicus* SWUJ1. The results of fermentation optimization showed that optimal nitrogen source for the antibacterial substances of strain SWUJ1 was yeast powder, the carbon source was lactose, and the inorganic ion was MgSO<sub>4</sub> and the optimal culture conditions were inoculation size of 1.0% for 94 h at 25 °C with an initial pH of 5.0. Equal fermentation supernatant of the antagonistic bacterium *B. methylotrophicus* SWUJ1 significantly improved its antagonistic activity against camphor anthracnose via fermentation optimization and showed antagonistic activity in different degrees against more than 10 plant pathogens such as *Sclerotinia sclerotiorum* and *Cochiobolus sativus*. The above results indicated that *B. methylotrophicus* SWUJ1 could be a candidate strain for future biological control of camphor anthracnose.

**Key words:** camphor anthracnose; antagonistic bacterium; identification; fermentation optimization

