

一株抗荔枝病原菌的枯草芽孢杆菌的分离鉴定及其发酵条件的初步研究*

Identification and Fermentation Conditions of a *Bacillus subtilis* with Antagonistic Ability against Litchi Pathogenic Fungi

黄曦², 张荣灿⁴, 庄军莲⁴, 黄荣韶³, 黄庶识^{1**}

HUANG Xi², ZHANG Rong-can⁴, ZHUANG Jun-lian⁴, HUANG Rong-shao³, HUANG Shu-shi¹

(1. 广西科学院生物物理实验室, 广西南宁 530007; 2. 广西药用植物园, 广西南宁 530023; 3. 广西大学农学院, 广西南宁 530004; 4. 广西科学院海洋环境监测中心, 广西南宁 530007)

(1. Biophysics Laboratory, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 2. Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning, Guangxi, 530023, China; 3. Agriculture Academy of Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China; 4. Marine Environment Monitoring Center, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China)

摘要: 对从健康果树际土壤中分离得到的一株有较强的抑制荔枝病原菌活性的菌株(ON-6)进行鉴定, 以荔枝霜疫霉和荔枝炭疽菌作为指示菌, 对该菌株的拮抗能力进行测定, 并对其发酵条件进行初步研究。结果表明, 菌株ON-6 鉴定为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 其无菌发酵液对荔枝霜疫霉菌、炭疽菌有明显抑制作用, 抑制率分别为 92.3% 和 70.3%, 其产拮抗物质的最佳培养条件为: 碳源为葡萄糖、氮源为牛肉膏和蛋白胨、温度为 32~34℃、初始 pH 值为 7.0~7.5、培养时间为 7d、装液量为 25ml/250ml。

关键词: 枯草芽孢杆菌 荔枝病原菌 分离鉴定 发酵条件

中图法分类号: Q815 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2011)04-0396-06

Abstract: A spore-producing bacilli strain ON-6, which was obtained from health litchi fruit tree rhizosphere soil, was identified to be *Bacillus subtilis* after routine microbial and 16S rDNA molecular biology detection. Strain ON-6 had high inhibitory rate to mycelial growth of *Penorophythora litchi* Chen ex ko et al and *Colletrichum gloeosporioides* Penz, and the ratio were around 92.3% and 70.3%, respectively. The suitable culture conditions for strain ON-6 producing antifungal substances were glucose as the carbon source, beef extract and peptone as nitrogen source, the temperature between 32℃ and 34℃, the initial pH value ranged from 7.0 to 7.5, the optimal load of 250ml flask containing 25ml medium, and the culture time of 7d.

Key words: *Bacillus subtilis*, Litchi pathogens fungi, isolation and identification, fermentation condition

我国荔枝采收后的主要贮运病害是由荔枝霜疫霉菌 (*Penorophythora litchi* Chen ex ko) 引起的霜

疫霉病、由白地霉 (*Geotrichum cadidum* Link) 引起的酸腐病、由炭疽菌 (*Colletrichum gloeosporioides* Penz) 引起的炭疽病^[1]。荔枝霜疫霉病主要危害荔枝的花和果实。花期发病, 造成大量的花干枯; 幼果期发病, 造成落果; 成熟期发病, 导致果实腐烂^[2]。炭疽病可以危害荔枝的叶、梢、花穗和果实。荔枝在幼果期遭受炭疽菌侵染可能不立即表现症状, 病菌潜伏在果皮中, 到荔枝采收后在贮运期间才表现症状^[3]。

收稿日期: 2011-01-07

作者简介: 黄曦 (1981-), 女, 研究实习员, 主要从事药用植物及应用微生物研究工作。

* 国家自然科学基金项目 (30860010); 广西自然科学基金项目 (桂科回 0832006) 资助。

** 通讯作者: hshushi@gxas.cn; hshushi@yahoo.com.cn.

目前,荔枝采收后,运用得比较多的保鲜、防病方法是冷藏、气调贮藏,化学药剂、物理处理等或几种方法的结合。长期使用化学药剂处理荔枝果实,会引起病菌的抗性和环境的污染,甚至危害人类的健康。因此寻求安全、无毒、高效的防治荔枝采收后腐烂的技术,对于促进荔枝产业的健康发展尤为重要。筛选有拮抗作用的有益微生物,并从中提取相关抗菌化学物质,用于抑制或灭杀使水果致病的病原微生物,以延缓果实有机物的水解,达到延长果实贮藏期和保鲜的目的,是20世纪80年代以来生物防治研究的热点,也是解决荔枝采收后烂果问题的一种有效和安全的方法。

本研究对从健康荔枝果树根际土壤中筛选出的一株芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)进行鉴定,以荔枝霜疫霉菌和荔枝炭疽菌作为指示菌,对该芽孢杆菌菌株的拮抗能力进行测定,并对其发酵条件进行初步研究,为以抗菌活性物质为主要成分的微生物杀菌剂的研制和应用提供理论依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

菌株 ON-6 (按实验室编号),筛选于荔枝果树根际土壤,现为实验室保存。

荔枝霜疫霉菌株和荔枝炭疽菌株由华南农业大学环资学院提供。

1.1.2 培养基

NB 培养基:牛肉膏 3.0g、蛋白胨 10.0g、NaCl 5.0g、葡萄糖 1.0g、水 1000ml, pH 值 7.4。

NA 培养基:牛肉膏 3.0g、蛋白胨 10.0g、NaCl 5.0g、葡萄糖 1.0g、琼脂粉 15.0g、水 1000ml, pH 值 7.4。

PDA 培养基:马铃薯 200.0g、葡萄糖 20.0g、琼脂粉 15.0g、水 1000ml, pH 值 7.0~7.2。

1.2 菌株 ON-6 无菌发酵液对荔枝病原真菌的拮抗能力的测定

将筛选的拮抗细菌活化后接种于 NB 培养基, 180r/min、30℃ 振荡培养 7d, 4℃、9000r/m 离心 15min, 去除菌体, 用 0.22μm 滤膜抽滤, 滤液即为拮抗菌无菌发酵液。

将 1ml 无菌发酵液加入 9ml NA 培养基中, 混匀后制成平板, 取直径 6mm 的荔枝病原菌菌块(28℃、已用 PDA 平板培养 4d) 菌面朝下置于平板上, 28℃ 培养 48h, 用十字交叉法测定病原菌菌落直径。同时以 NB 作对照。每处理设三次重复计算抑菌率。抑

制率=(对照真菌生长面积-拮抗作用后真菌生长面积)/对照真菌生长面积×100%。

1.3 菌株的鉴定

菌体形态、培养特征的观察及生理生化指标的测定参考文献[4,5]中的检测方法及检索表要求依序检测及鉴定。

16S rDNA 基因序列的测定及进化树的构建: 采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(TIANGEN 公司生产)提取细菌基因组 DNA, 以基因组 DNA 为模板, 采用细菌通用引物进行 PCR 扩增。引物序列:

16SP: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';

16SF: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'。

PCR 反应体系: 10×Buffer 2.5μl、2.5mmol/L dNTP 2μl、16SP(10μmol/L) 1μl、16SF(10μmol/L) 1μl、模板 DNA 2μl、Taq 聚合酶 0.5μl、双蒸水 162μl。

PCR 反应条件: ①94℃ 预变性 4min; ②94℃ 变性 1min; ③53℃ 退火 1min; ④68℃ 延伸 1.5min; ⑤40 个循环; ⑥68℃ 延伸 10min。

PCR 扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶进行电泳分离。PCR 产物纯化与序列测定在北京三博志远生物技术有限责任公司进行。将所测得序列与 GenBank 数据库中已有的细菌 16S rDNA 序列进行相似性比较分析。以相似性为基础利用 ClustalXV2.0、MEGA4.1 软件进行序列比较、系统发育分析以及进化树构建。

1.4 菌株 ON-6 产拮抗物质条件的研究

设置影响菌株 ON-6 产生抑菌活性物质的不同的碳源、氮源、温度、时间、初始 pH 值、通气量等培养条件进行培养。培养结束后, 测定不同处理发酵液的 OD_{625} 值, 并按 1.2 的方法, 以荔枝炭疽菌为目标菌测定无菌发酵液的抑菌活性, 计算抑制率。

1.4.1 不同碳源对菌体生长及抑菌活性的影响

初始培养基为: 蛋白胨 10.0g、NaCl 5.0g、水 1000ml, pH 值 7.0。在初始培养基中分别加入不同的唯一碳源: 葡萄糖、蔗糖、果糖、麦芽糖、可溶性淀粉、马铃薯淀粉、玉米粉、乳糖, 浓度均为 1.0% (m/V), 每个处理设三个重复, 30℃、180r/min 振荡培养 120h, 测定菌体生物量和抑制率。

1.4.2 不同氮源对菌体生长及抑菌活性的影响

在最佳碳源的培养基中分别加入不同的唯一氮源: 牛肉膏、酵母膏, 浓度均为 0.1% (m/V); 蛋白胨、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NaNO_3 、 NH_4Cl , 浓度均为 1.0% (m/V), 每个处理设三个重复, 30℃、180r/min 培养 120h, 测定菌体生物量和抑制率。

1.4.3 不同温度对菌株生长及抑菌活性的影响

将菌株 ON-6 接入 NB 培养基中,在不同的温度:10℃、15℃、20℃、25℃、28℃、30℃、32℃、34℃、37℃、40℃、45℃ 和 50℃ 条件下,180r/min 培养 120h,每个处理设三个重复,测定菌体生物量和抑制率。

1.4.4 不同初始 pH 值对菌体生长及抑菌活性的影响

将菌株 ON-6 分别接入 pH 值为 4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.5 和 10.0 的 NB 培养基中,每个处理设三个重复,180r/min 培养 120h,测定菌体生物量和抑制率。

1.4.5 不同培养时间对菌体生长及抑菌活性的影响

将菌株 ON-6 接种于 NB 液体培养基中,30℃、180r/min 分别培养 1d、2d、3d、4d、5d、6d、7d、8d、9d、10d、11d、12d,每个处理设三个重复,测定菌体生物量和抑制率。

1.4.6 不同通气量对菌体生长及抑菌活性的影响

将菌株 ON-6 分别接种于含 25ml、50ml、75ml、100ml、125ml NB 培养基的 250ml 三角瓶中,30℃、180r/min 培养 120h,每个处理设三个重复,测定菌体生物量和抑制率。

2 结果与分析

2.1 菌株 ON-6 无菌发酵液对荔枝病原真菌的抑制作用

菌株 ON-6 对荔枝霜疫霉菌的抑制效果最好,菌丝生长抑制率达到 92% 以上;对荔枝炭疽菌菌丝生长抑制率为 70.3%(表 1)。

表 1 菌株 ON-6 无菌发酵液对荔枝霜疫霉菌和炭疽菌菌丝生长的影响

Table 1 Inhibition effects of bacteria zymotic fluid on the mycelia growth of *P. litchii* and *C. gloeosporioides*

病原真菌 Disease fungus	对照组 直径菌饼 Diameter of CK(cm)	处理组 直径菌饼 Diameter of treatment group(cm)	菌丝生长 抑制率 Inhibition rate(%)
荔枝霜疫霉菌 <i>P. litchii</i>	4.6	1.4	92.3
荔枝炭疽菌 <i>C. gloeosporioides</i>	5.8	3.2	70.3

2.2 菌株 ON-6 的鉴定

2.2.1 生理生化特性

将菌株 ON-6 的生理生化特征与《伯杰氏细菌鉴定手册》中的相关内容进行对比,发现其特性与枯草芽孢杆菌最为接近(表 2)。

2.2.2 16S rDNA 序列分析

以菌株 ON-6 的基因组 DNA 为模板,PCR 扩增得到菌株 ON-6 的 16S rDNA 片段,大小约 1500bp。回收该片段并进行测序,发现序列长度为 1422bp(图 1)。将菌株 ON-6 的 16S rDNA 序列与 GenBank 中表 2 菌株的生理生化特征

Table 2 Physiological and biochemical characters of strain ON-6

实验项目 Characters	菌株 ON-6 Strain ON-6	枯草芽 孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	实验项目 Characters	菌株 ON-6 Strain ON-6	枯草芽 孢杆菌 <i>B. subtilis</i>
明胶液化 Gelation liq- uefaction	+	+	甲基红试验 M. R. test	-	-
淀粉水解 Starch hydrolysis	+	+	50℃ 生长 Growth at 50 ℃	+	+
接触酶 Contacted enzyme	+	+	硝酸盐还原 Hydrogen ni- tride reduction	+	+
氧化酶 Oxidase	+	+	葡萄糖 Glucose	+	+
最高耐盐性 Saline resistance	7%	7%	果糖 Fructose	+	+
V-P 测定 V-P test	+	+	蔗糖 Sucrose	+	+

GTCGAGCGGAAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGC
GGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTA
AGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGG
ATGGTTGTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGG
CTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAG
CTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGC
GTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACT
GAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGG
GAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACG
CCGCGTGAGTGATGAAGGTTTCGGATCGTAAAGCTCTG
TTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGC
ACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTA
CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTTAGGTGGCAAGCGT
TGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTT
TCTTAAGTCTGATGTGAAGCCCGGCTCAACCGGGG
AGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAG
GAGAGTGGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
GATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGG
TCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCG
AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGCTAAACGA
TGAGTGCTAAGTGTAGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCT
GCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGG
TCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG
CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATCGAAGCAACG
CGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCC
TAGAGATAGGACGTCCCTTCGGGGGCGAGGTGACAGG
TGGTGATGTTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTG
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGATCTTAGTT
GCCAGATTGAGTTGGGCACTTAAAGGTGACTGCGGGT
GACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATC
ATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGG
ACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCA
ATCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCA
ACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGTATGTAATCGCGGA
TCAGCATGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACA
CACCGCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCGGAA
GTCGGTGAGGTAACCTTTATGAGCCAGCCCGCGAAGGG
AGCA

图 1 菌株 ON-6 的 16S rDNA 基因序列

Fig. 1 16S rDNA sequence of strain ON-6

的序列比较,确定菌株 ON-6 与枯草芽孢杆菌的同源性为 100%。以相似性为基础,另外选取 14 株细菌以及 3 株实验室分离出的芽孢杆菌(OR-1、OR-2、OR-3)构建系统发育进化树。结果发现,菌株 ON-6 与枯草芽孢杆菌 EU883786、GQ861458 位于进化树的同一分支上(图 2),说明菌株 ON-6 与枯草芽孢杆菌 EU883786、GQ861458 的同源关系最近。依据《伯杰氏细菌鉴定手册》,菌株 ON-6 在形态特征和生理特征上与枯草芽孢杆菌相似,再根据 16S rDNA 基因序列比对结果和构建的系统进化树,将菌株 ON-6 鉴定为枯草芽孢杆菌。

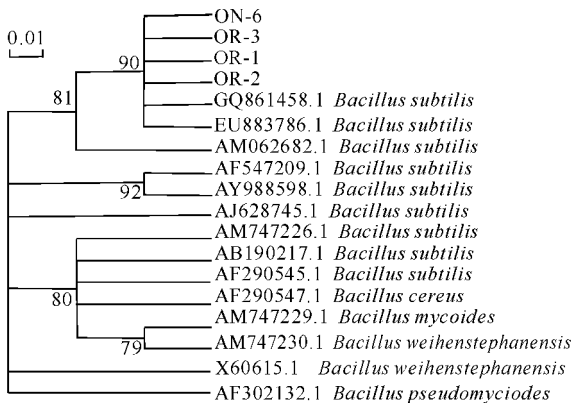


图 2 依据 16S rDNA 基因序列构建的菌株 ON-6 的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain ON-6 based on 16S rDNA gene sequence

2.3 菌株 ON-6 产拮抗物质条件的研究

菌株 ON-6 对荔枝病原真菌霜疫霉菌和炭疽菌菌丝生长有较强的抑制作用。推测菌株 ON-6 主要是通过分泌拮抗物质来抑制荔枝病原菌菌丝的生长。在此基础上,对菌株 ON-6 进行不同培养条件的研究,以期获得该菌株产生抑菌活性物的最适条件。

2.3.1 不同碳源对菌体生长及抑菌活性的影响

菌株 ON-6 能利用葡萄糖、蔗糖、果糖、麦芽糖、可溶性淀粉、马铃薯淀粉、玉米粉、乳糖等作为碳源。以乳糖为碳源时,菌体生长最旺盛,但是产生的抗菌活性物质的活性并不是最高的;以可溶性淀粉、马铃薯淀粉、玉米粉或乳糖为碳源时,产生的抗菌活性物质的活性相对于菌体量来说较低;而以麦芽糖作为碳源时,菌体量最高,产生的抗菌活性物质的活性也最高,以葡萄糖的次之(图 3)。考虑到以后工业化生产的成本,选择葡萄糖作为碳源。

2.3.2 不同氮源对菌体生长及抑菌活性的影响

以牛肉膏、酵母膏和蛋白胨等有机物作为氮源时,菌体生长旺盛,其中以蛋白胨作为氮源时的菌体量最高,其抑菌物质的活性也最高。而相对于有机氮

源,无机氮源并不利于菌株的生长。以无机氮源培养时,菌体生长速度缓慢、菌体量较低,虽然产生的抑菌物质的活性相对于菌体量来说较高,但都低于有机碳源的。因而不选择无机化合物作为氮源。可选用牛肉膏和蛋白胨的组合作为该菌株的氮源(图 4)。

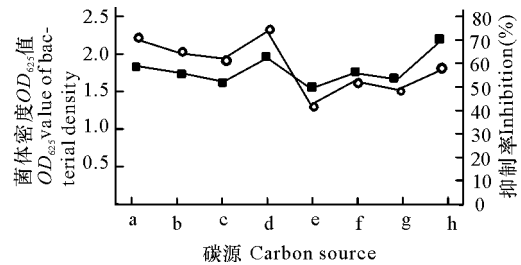


图 3 不同碳源对菌株 ON-6 拮抗物质活性的影响

Fig. 3 Effects of different carbon source on inhibiting activity of antimicrobial substances of strain ON-6 against pathogen

a. 葡萄糖, b. 蔗糖, c. 果糖, d. 麦芽糖, e. 可溶性淀粉, f. 马铃薯淀粉, g. 玉米粉, h. 乳糖。 a. Glucose, b. Sucrose, c. Fructose, d. Maltose, e. Soluble starch, f. Potato starch, g. Corn powder, h. Lactose.

■: OD₆₂₅, ○: 抑制率。 ■: OD₆₂₅, ○: Inhibition.

2.3.3 不同温度对菌体生长及抑菌活性的影响

菌株 ON-6 在 10~50℃ 内均能生长,并且都能产生活性物质;在 22~32℃ 内,随着温度的升高菌株的菌体量不断增大,所产的活性物质的抑菌活性也不断增大;当温度升高到 32℃ 时,菌体量达到最大值,其后随着温度的升高菌株生长量逐渐下降。但在 34℃ 时,菌株所产的活性物质的抑菌活性才达到最大值,超过 34℃ 后所产的拮抗物质的抑菌活性才随着温度的升高呈下降趋势(图 5)。这说明,菌株生长量与其产生抗菌物质的活性有一定关系,但不一定呈正相关。

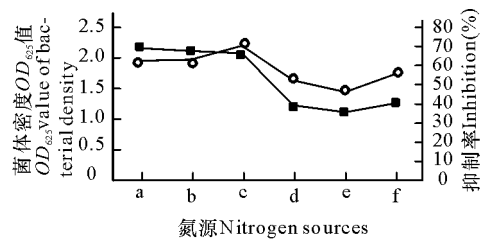


图 4 不同氮源对菌株 ON-6 拮抗物质活性的影响

Fig. 4 Effects of different nitrogen source on inhibiting activity of antimicrobial substances of strain ON-6 against pathogen

a. 牛肉膏, b. 酵母膏, c. 蛋白胨, d. (NH₄)₂SO₄, e. NaNO₃, f. NH₄Cl。 a. Beef extract, b. Yeast extract, c. Peptone, d. (NH₄)₂SO₄, e. NaNO₃, f. NH₄Cl.

■: OD₆₂₅, ○: 抑制率。 ■: OD₆₂₅, ○: Inhibition.

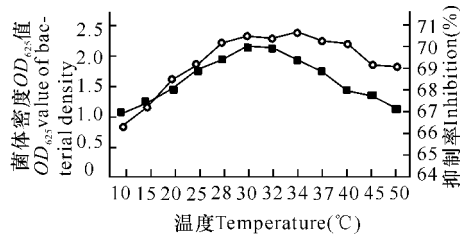


图 5 不同温度对菌株 ON-6 拮抗物质活性的影响

Fig. 5 Effects of temperature on inhibiting activity of antimicrobial substances of strain ON-6 against pathogen

—■—: OD_{625} , —○—: 抑制率。—■—: OD_{625} , —○—: Inhibition.

2.3.4 不同起始 pH 值对菌体生长及抑菌活性的影响

培养基不同的起始 pH 值对菌株 ON-6 的生长和活性物质的产生有一定的影响。当 pH 值为 4.5~9.0 时,菌株能够正常生长;当 pH 值为 6.0~7.0 时,菌体量随着 pH 值的升高而增大,菌株产生的活性物质的活性也呈相同趋势;当 pH 值 7.0 时菌体量达到最大值,之后菌体量随着 pH 值的升高而减小。菌株在 pH 值 6.5~8.5 内产生的活性物质的活性趋于稳定,之后活性随着 pH 值的升高而降低(图 6)。因此最适合菌株 ON-6 产生拮抗物质的 pH 值为 6.5~8.5。

2.3.5 不同培养时间对菌体生长及抑菌活性的影响

菌株 ON-6 在培养液中,30°C 恒温振荡培养,在 1~7d 内,菌体量和拮抗物质的活性随培养天数的增加而增大,拮抗物质的活性在第 6d 达到最大值,菌体量在第 7d 达到最大值。当培养天数超过 7d 以后,菌体量和所产的拮抗物质的抑菌活性均趋于稳定(图 7)。

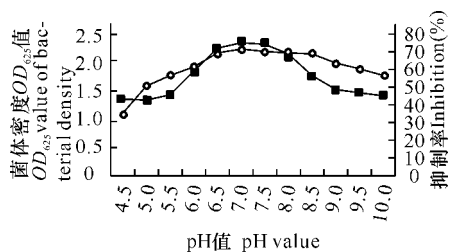


图 6 不同 pH 值对菌株 ON-6 拮抗物质活性的影响

Fig. 6 Effects of pH value on inhibiting activity of antimicrobial substances of strain ON-6 against pathogen

—■—: OD_{625} , —○—: 抑制率。—■—: OD_{625} , —○—: Inhibition.

2.3.6 不同通气量对菌体生长及抑菌活性的影响

菌株 ON-6 在 NB 培养基不同装液量的三角瓶中的生长及拮抗物质抑菌活性测定结果表明,菌株的生长量及其产生的拮抗物质的活性,随装液量的增加

而降低,即装液量越少,通气量越大,菌株生长越好,菌量越大,拮抗物质的活性越高(图 8)。这说明菌株为好气菌,培养时通气条件对菌株生长和抗菌物质的产生有较大的影响,通气条件越好,对菌株生长及其抗菌物质的分泌越有利。

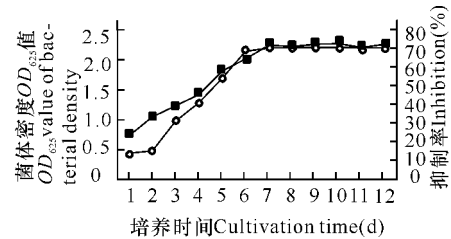


图 7 不同培养时间对菌株 ON-6 拮抗物质活性的影响

Fig. 7 Effects of culture times on inhibiting activity of antimicrobial substances of strain ON-6 against pathogen

—■—: OD_{625} , —○—: 抑制率。—■—: OD_{625} , —○—: Inhibition.

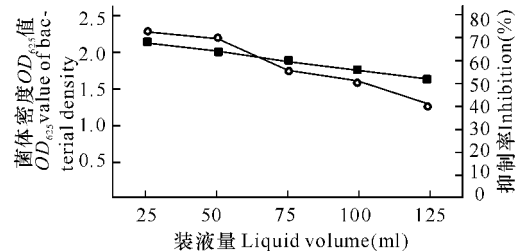


图 8 不同通气量对菌株 ON-6 拮抗物质活性的影响

Fig. 8 Effects of liquid volume on inhibiting activity of antimicrobial substances of strain ON-6 against pathogen

—■—: OD_{625} , —○—: 抑制率。—■—: OD_{625} , —○—: Inhibition.

3 讨论

本研究中菌株 ON-6 是从荔枝果树根际土壤中筛选得到的一株生防细菌。其无菌发酵液对荔枝病原真菌的抑制实验表明,该生防菌对荔枝霜疫霉菌、炭疽菌具有较强的拮抗作用。说明菌株 ON-6 的代谢产物具有明显的抑制荔枝病原菌菌丝生长的作用,其生防机制主要是分泌拮抗物质。根据对菌株的形态学、生理生化试验结果,初步断定菌株 ON-6 为枯草芽孢杆菌。通过将其 16S rDNA 序列与 GenBank 中的序列比较,确定菌株 ON-6 与枯草芽孢杆菌的同源性为 100%。目前,基于 16S rDNA 序列分析来进行细菌的鉴定是国际上通用的技术。一般认为,若 16S rDNA 序列同源性大于 98%,便可以认为是同种;若同源性大于 93%~95%,便可以认为是同属^[6]。根据这一结论,将菌株 ON-6 鉴定为枯草芽孢杆菌。

枯草芽孢杆菌是一种嗜温性好氧或兼性厌氧的革兰氏阳性杆状细菌,其营养细胞受营养缺乏或者代

谢产物积累,或者温度变化等外部环境因子的触发,在细胞内形成能够对辐射、热、干燥、极端 pH 值、静水压和一些有毒化学物质等有很强抵抗能力的内生孢子^[7,8]。枯草芽孢杆菌能抑制范围很广的植物病原菌,对包括植物根部、枝干、叶、花和收获后的果品在内的多种植物真菌和细菌性病害具有拮抗作用。枯草芽孢杆菌能够拮抗超过 30 种的植物病原菌^[9]。枯草芽孢杆菌在自然界中分布广泛,对人畜无毒无害,不污染环境,容易分离培养,具有广谱抗菌活性和极强的抗逆能力,能产生肽类、脂肽类、多烯类、氨基酸类等多种抗菌素和酶^[10],是目前生物防治和水果保鲜中研究得最多的一种有益微生物。

通过对枯草芽孢杆菌 ON-6 菌株发酵条件的研究,得出该菌株产拮抗物质的最佳条件为:碳源为葡萄糖、氮源为牛肉膏和蛋白胨、温度为 32~34℃、初始 pH 值为 7.0~7.5、培养时间为 7d、装液量为 25ml/250ml。

培养条件对拮抗菌生长量及抗菌物质的活性有较大影响^[11~15]。本文着重考察了菌体生长量与抗菌物质的产生之间的相关性。结果表明,菌株生长量与其产生的抗菌物质的活性有一定关系,但不一定呈正相关。说明虽然抗菌物质的产生是以菌体生长为前提的,但产生抗菌物质的培养条件会有所不同。因此,鉴于本研究中筛选出的枯草芽孢杆菌 ON-6 菌株对荔枝病原菌有较强的拮抗作用,具有良好的理论研究价值和前景。在今后的研究中,可以对该菌株的发酵培养基进行进一步优化试验,为以后规模化生产进行有益的探索。

参考文献:

- [1] 王继栋,朱西儒,孙谷畴.荔枝采后病害与赭曲霉的应用[J].中国果树,2001(6):42-44.
- [2] 蔡永春.荔枝霜疫霉病发生规律及防治技术的试验研究[J].湖北植保,2008(2):43-43.
- [3] 刘爱媛,陈维信,李欣允.荔枝炭疽病菌生物学特性的研究[J].植物病理学报,2003,33(4):313-316.
- [4] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001:59-63.
- [5] 布坎南,吉本斯.伯杰细菌鉴定手册[M].中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组,译.第8版.北京:科学出版社,1984.
- [6] Fry N K, Warwick S, Saunders N A, et al. The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family Legionellaceae[J]. Journal of General Microbiology, 1991, 137: 215-222.
- [7] Nicholson W L, Munakata N, Horneck G, et al. Resistance of bacterial endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2000, 64: 548.
- [8] Setlow P J. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals[J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 101: 514.
- [9] Moyne A L, Cleveland T E, Tuzun S. Molecular characterization and analysis of the operon encoding the antifungal lipopeptide bacillomycin D[J]. FEMS Microbiology Letter, 2004, 234: 43-49.
- [10] Ahimou F, Jacques P, Deleu M. Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 27: 749-754.
- [11] 张学君,刘焕利,潘小玫,等.小麦纹枯病生防菌株 B3 产生抗菌物质条件的研究[J].南京农业大学学报,1995,18(1):26-30.
- [12] 胡剑,林心怡,张九一,等.拮抗菌 BS-98 分泌抗菌蛋白的条件及其发酵液特性[J].微生物学报,1996,23(6):323-335.
- [13] 童蕴慧,纪兆林,徐敬友,等.灰葡萄孢拮抗细菌的种类鉴定及生长条件研究[J].扬州大学学报:农业与生命科学版,2002,23(2):37-70.
- [14] 李俊,纪明山,刘浩强,等.番茄灰霉病拮抗细菌抗菌物质产生条件的研究[J].沈阳农业大学学报,2004,35(2):105-108.
- [15] 肖爱萍,游春平,陈金明,等.稻瘟病拮抗细菌发酵配方与培养条件的研究[J].江西农业大学学报,2004,26(4):499-50.

(责任编辑:陈小玲)