

张 蕾,蒋继志,于永昂.拮抗细菌 TD-12 菌株发酵条件的优化及鉴定[J].江苏农业科学,2016,44(2):143-146.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.02.041

拮抗细菌 TD-12 菌株发酵条件的优化及鉴定

张 蕾¹,蒋继志²,于永昂³

(1. 河南科技学院生命科技学院,河南新乡 453003; 2. 河北大学生命科学学院,河北保定 071002;
3. 西北农林科技大学农学院,陕西杨凌 712100)

摘要:TD-12 菌株是前期分离筛选得到的在防治马铃薯晚疫病中很有潜力的内生细菌。为加快对该菌株的深入研究和利用,本试验利用滤纸片法对其部分发酵条件进行了初步优化,结果表明,该菌株在 37 ℃、150 r/min、初始 pH 值 7.0、培养 30 h 得到的菌液抑菌效果最佳,抑菌率达到了 93.12%,抑菌率比优化前提高了 7.86%。并通过对该菌株的形态和培养特征观察、生理生化特性以及 16 S rDNA 序列分析,对该菌株进行了初步鉴定,该菌株为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。试验结果为深入研究该菌株的抑菌性能及开发利用提供了基础资料。

关键词:致病疫霉;TD-12 菌株菌液;鉴定;发酵条件

中图分类号:S435.32 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)02-0143-04

马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)是茄科茄属的一年生草本块茎植物,在粮食作物中位居第四,是唯一的粮菜兼用型作物。由致病疫霉[*Phytophthora infestans* (Mont) de Bary]引起的马铃薯晚疫病是引起马铃薯产量损失最严重的一种病害。由于化学农药的长期大量使用及病菌 A2 交配型的出现,致使高致病性、高抗药性菌株不断出现,造成近几年晚疫病在马铃薯和番茄上大流行,引起了国际社会的极大关注^[1]。生产中主要依靠选用抗病品种、农业栽培措施、化学农药来控制该病的发生^[2],而生物防治因其与环境友好、维持生态平衡、有利于人类健康等优点,受到越来越多研究者的关注和重视。前人已从多种类型的土壤中筛选得到了一些有明显抑制致病疫霉生长或诱导马铃薯增强抗病性的真菌^[3]、细菌^[4-5]和放线菌^[6],并对他们产生的拮抗物质^[3]、抑菌机理^[7]、诱导抗病作用^[4-5,8]等进行了研究。但利用茄科植物内生菌抑制致病疫霉的报道还比较少。我们在前期研究中筛选出了一些对致病疫霉菌丝生长具有显著抑制作用的菌株,如分离自马铃薯

块茎的 TD-12 菌株在初期试验中对致病疫霉菌丝生长表现了强烈的抑制作用,在马铃薯离体组织上也展示出了良好的防病作用,其活体对病菌生长的抑制率达到了 92.24%,在马铃薯块茎切片和离体叶片上对晚疫病的防效分别达到了 91.00%、76.23%以上^[9]。但在后期的重复试验研究中,发现该菌株的抑菌率有所下降,抑菌率仅为 85.26%。为稳定和进一步提高 TD-12 菌株对致病疫霉的抑制作用,对其部分发酵条件进行了初步优化,并对该菌株的分类地位进行了鉴定,以期为今后开发田间有效控制马铃薯晚疫病高效稳定的生物农药提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

拮抗细菌 TD-12 菌株(分离于马铃薯块茎中),致病疫霉菌株[*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary]Z182,本研究室保存菌株。

1.2 TD-12 菌株发酵条件优化

1.2.1 种子液的制备 用灭菌竹签挑取牛肉膏蛋白胨平板上的 TD-12 菌株的新鲜培养菌落,接种到含有 50 mL LB 液体培养基中,37 ℃、150 r/min 振荡培养 24 h 后,按照 1% 的比例吸取 1 mL 到 100 mL 的 LB 液体培养基中,37 ℃、150 r/min 振荡培养 24 h 后即种子液。

1.2.2 发酵温度的确定 取 TD-12 菌株种子液 1 mL 接种

is a hallmark of partial resistance to rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*[J]. BMC Plant Biology,2010,10(3):1-17.

[14]高峰,李国英,王钦英.水杨酸诱导棉花耐黄萎病的效应[J].新疆农业科学,2004,41(5):333-336.

[15]Baldwin I T,Zhang Z P,Diab N,et al. Quantification corrections and manipulations of wound-induced changes in jasmonic acid and nicotine in *Nicotiana sylvestris*[J]. Planta,1997,201(4):397-404.

[16]Durner J,Shah J,Klessig D F. Salicylic acid and disease resistance in plants[J]. Trends Plant Science,1997,2(7):266-274.

收稿日期:2015-01-27

基金项目:河北省自然科学基金(编号:C2011201003)。

作者简介:张 蕾(1987—),女,河南新乡人,硕士,助理实验师,从事植物分子生物学研究。E-mail:zhanglei07025@163.com。

通信作者:蒋继志,教授,博士生导师,从事植物病害生物防治及生物活性物质研发。E-mail:jizhijiang909@163.com。

[9]田国忠,李怀方,裘维蕃.植物激素与植物病害的相互作用[J].植物生理学通讯,1999,35(3):177-184.

[10]石磊岩,孙文姬.棉花抗黄萎病苗期鉴定方法[J].植物保护,1987,13(1):42.

[11]陆 雯,潘璐琪,王雪艳.水杨酸及茉莉酸介导植物抗病性的研究进展[J].贵州农业科学,2013,41(10):40-43.

[12]Alvarez M E. Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease[J]. Springer Netherlands,2000,44(3):185-198.

[13]Vergne E,Grand X,Ballini E,et al. Preformed expression of defense

到装有 100 mL LB 液体培养基的 250 mL 三角瓶中,分别在 22、25、28、31、34、37、40 ℃ 条件下振荡(150 r/min)培养 24 h,采用滤纸片法^[10],测定对致病疫霉生长的抑制作用,参照李丽艳等方法^[5]计算抑菌率。

1.2.3 发酵培养中转速的确定 将 TD-12 菌株 1 mL 的种子液接种到 100 mL LB 液体培养基中,按照上述试验中已确定的最适培养温度,分别在 50、100、150、200、250 r/min 等不同转速下振荡培养 24 h,所得菌液抑菌效果的测定方法同“1.2.2”节。

1.2.4 培养时间的确定 取 TD-12 菌株种子液 1 mL 接种到装有 100 mL LB 液体培养基的 250 mL 三角瓶中,按照上述试验中已确定的最适培养温度和转速,分别取在第 12、18、24、30、36、42、48 h 的菌液进行抑菌试验,所得菌液抑菌效果的测定方法同“1.2.2”节。

1.2.5 初始 pH 值的确定 用 NaOH 和 HCl 将 LB 液体培养基调制成 pH 值分别为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0 的培养基,然后将 1 mL TD-12 菌株的种子液接种到 100 mL 上述培养基中,按照上述试验中所确定的最佳发酵温度、转速以及时间进行发酵培养,所得菌液抑菌效果的测定方法同“1.2.2”节。

以上各项试验条件每组处理重复 3 次,所得试验结果用 SPSS 软件进行统计分析。

1.3 菌株分类地位的确定

1.3.1 菌株培养特性及菌体形态观察及其染色 观察 TD-12 菌株在 LB 固体培养基上的生长状况及菌落特征,在光学显微镜下观察菌株菌体的形态,并参照文献^[11]进行革兰氏染色和芽孢染色。

1.3.2 生理生化特征 参照常见细菌系统鉴定手册的方法^[12],对 TD-12 菌株分别进行了接触酶反应、明胶水解、淀粉水解、V-P 测定、硝酸盐还原、酪氨酸水解、苯丙氨酸脱氨酶、吡嗪产生、柠檬酸利用以及葡萄糖、D-甘露醇、麦芽糖、蔗糖的利用试验。

1.3.3 16S rDNA 基因序列测定及分析 采用 SDS 法提取菌株 TD-12 总 DNA,采用细菌 16S rDNA 扩增通用引物扩增 TD-12 菌株的基因组 DNA,通用引物设计,Primer1:5'-AGAGTTTGATCATGCTCAG-3',Primer2:5'-TAGGGTTACCTTGTTACGACTT-3'。委托华大基因测序,将所得测序结果通过 Blast 软件与 GenBank 核酸数据库进行对比,选取具有代表性的菌株,采用 Mega4.1 软件包中的 Phylogeny 进行系统发育树的构建^[13]。

2 结果与分析

2.1 发酵培养温度

取 TD-12 菌株种子液 1 mL 接种到装有 100 mL LB 液体培养基的 250 mL 三角瓶中,分别在 22、25、28、31、34、37、40 ℃ 条件下振荡(150 r/min)培养 24 h,结果表明,培养温度对 TD-12 菌液抑菌率的影响比较明显(图 1),随培养温度升高,抑菌率呈先上升后下降的趋势,在培养温度为 22 ℃ 时抑菌率只有 42.59%,随着培养温度的升高,抑菌率逐渐升高,在培养温度为 37 ℃ 时抑菌率最高,为 90.25%,而在培养温度为 40 ℃ 时抑菌率显著下降。分析表明,温度 37 ℃ 所得

抑菌率与其他处理之间差异显著。表明 TD-12 菌株的最佳培养温度为 37 ℃,以下试验培养温度均选用 37 ℃。

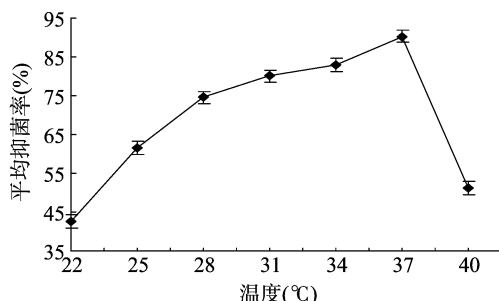


图1 培养温度对菌液抑菌活性的影响

2.2 振荡培养中的转速

振荡培养中的转速对 TD-12 菌液抑菌率的影响见图 2。在转速为 50 r/min 条件下,所得菌液的抑菌率仅为 20%,与静置培养条件下的抑菌率无明显差异;当转速在 100~200 r/min 范围内时,所得菌液均表现出很强的抑制作用,抑菌率都在 70% 以上,其中以 150~200 r/min 条件下所得菌液的抑菌率较高,均在 80% 以上。在转速为 150 r/min 时抑菌率最高,为 90.52%,在转速为 250 r/min 时,抑菌率明显下降,为 60%。分析表明,转速 150 r/min 所得抑菌率与转速 50、100、200、250 r/min 之间差异极显著,表明 150 r/min 是最适条件。

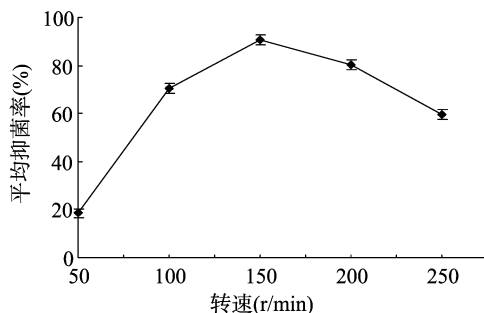


图2 不同转速对菌液抑菌活性的影响

2.3 发酵培养时间

培养时间对抑菌活性的影响结果见图 3。该菌株在培养时间为 12 h 时抑菌率最低,只有 70%,随着培养时间的增加,抑菌率逐渐增加,在培养时间为 30 h 时抑菌率最高,为 92%,之后抑菌率随着培养时间的增加而有所下降。分析表明,培养时间为 30 h 所得抑菌率与培养 12、18、24、36、42、48 h 处理间差异显著。因此,该菌株的最佳发酵时间为 30 h。

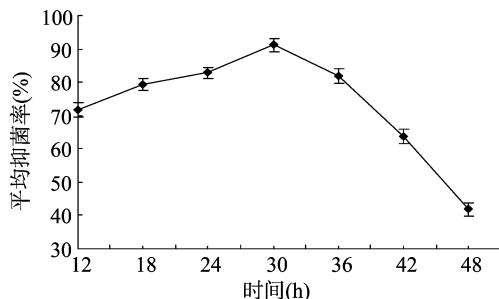


图3 培养时间对菌液抑菌活性的影响

2.4 培养基初始 pH 值

从图 4 可以看出,在初始 pH 值为 4 时,抑菌率最低,只

有 41%; 在初始 pH 值为 6~9 时, 抑菌率基本稳定在 90%, 其中 pH 值为 7 时, 抑菌率最高, 为 93.12%; pH 值超过 9 后, 抑菌率急剧下降, 当 pH 值为 10、11 时, 抑菌率分别为 74%、58%。分析表明, 初始 pH 值为 7 时所得抑菌率与其他处理差异显著, 由此确定 pH 值 7 为最适的初始 pH 值。

综合上述所有优化条件, 优化后的结果见图 5。优化后 TD-12 菌株菌液对致病疫霉的抑菌率达到了 93.12%, 比优化前 85.26% 提高了 9.22%, 表明 TD-12 菌株有进一步应用潜能。



图5 TD-12 菌株发酵条件优化前后菌液对致病疫霉的抑菌作用比较

2.5 菌株分类地位的确定

2.5.1 培养特性、形态特征及染色结果 拮抗菌 TD-12 在 LB 培养基上培养呈黄色不透明菌落, 表面粗糙, 菌落边缘不规则(图 6)。显微镜下油镜观察细胞呈杆状, 革兰氏染色呈阳性, 产芽孢, 芽孢呈椭圆形, 有运动性。



图6 菌株 TD-12 在 LB 培养基上的菌落形态

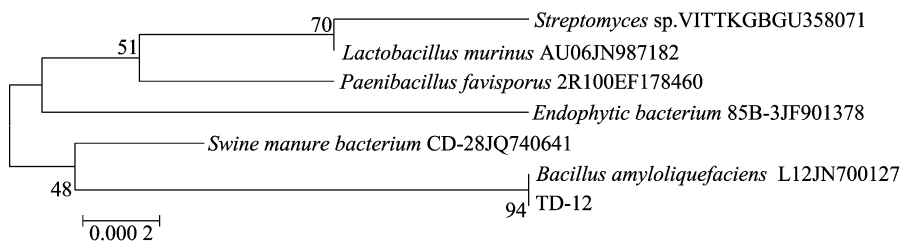


图7 TD-12 与不同属间的系统发育树

3 讨论

微生物在不同生长发育阶段和不同培养条件下产生活性物质的种类和数量均不相同, 有时培养条件即使只发生微小的变化, 活性物质产生也会受到明显的影响。因此, 确定菌株的最佳发酵条件对于获得大量高活性物质至关重要。李双东等从番茄中分离得到内生枯草芽孢杆菌 EB-28, EB-28 无菌体培养液对致病疫霉游动孢子释放的抑制率达 91.26%, 但对菌体生长没有抑制作用, EB-28 菌悬液对马铃薯晚疫病在离体叶片和盆栽植株上的防病效果分别为 55.68% 和

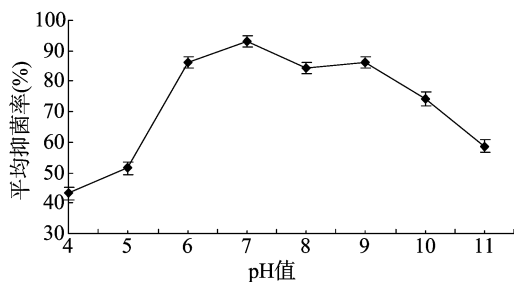


图4 初始 pH 值对菌液抑菌活性的影响

2.5.2 生理生化特征 TD-12 菌株的接触酶反应有气泡产生, 明胶水解、淀粉水解、V-P 反应和硝酸盐还原均为阳性; 酪氨酸水解、苯丙氨酸脱氢酶、吲哚产生、柠檬酸利用均为阴性; 可利用葡萄糖、D-甘露醇、麦芽糖和蔗糖。综合 TD-12 菌落特征、培养特性、形态观察和染色结果, 参照东秀珠等的方法^[12], 初步推测 TD-12 菌株可能为芽孢杆菌或类芽孢杆菌属细菌。

2.5.3 拮抗菌 TD-12 菌株的 16S rDNA 序列分析 经 PCR 扩增后得到 TD-12 菌株 16S rDNA 的 PCR 产物为单一条带, 测序结果表明, TD-12 菌株 16S rDNA 的序列长度为 1 432 bp。将该序列在 GeneBank/NCBI 中进行序列比对, 结果表明, TD-12 菌株与解淀粉芽孢杆菌在同一个分支上, 同源率为 94% (图 7、图 8), 表明 TD-12 菌株与解淀粉芽孢杆菌亲缘关系最近。结合上述形态特征、染色结果和生理生化特性, 可以初步确定 TD-12 菌株为解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)。

74.22%^[14]。Daayf 等筛选得到的芽孢杆菌 *B. subtilis* B1、J1、B3 对致病疫霉的抑菌率分别达到 81%、79%、76%^[15]。姜军坡等从健康的牛粪便中筛选出 1 株解淀粉芽孢杆菌 BN-9, 发现其对大肠杆菌有较强的抑制作用^[16]。Sutyak 等从益生菌乳制品中分离得到 1 株解淀粉芽孢杆菌, 其细胞无菌上清液可以对单核细胞增生李斯特菌、链球菌属及肠道加德菌产生抑制作用, 但对肠道乳酸菌不产生作用^[17]。此外, 于靛等对解淀粉芽孢杆菌 T1 进行了发酵培养基和培养条件进行优化, 优化后的培养液中解淀粉芽孢杆菌 T1 的活菌数明显增多, 由 1.4×10^9 CFU/mL 增至 3.5×10^9 CFU/mL^[18]。郭尧等

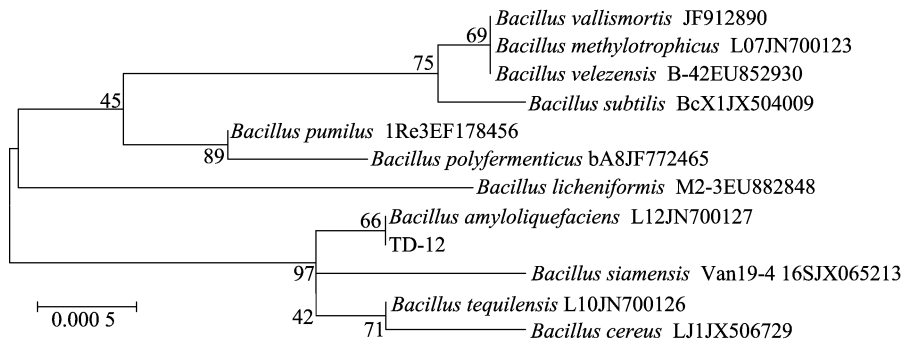


图8 TD-12 菌株与其近似种的系统发育树

用滤纸片法以单因子试验对致病疫霉拮抗放线菌 sy11 发酵条件优化,结果表明,优化后抑菌率达到了 90%,比优化前提高了约 10%^[19]。吴真真等对致病疫霉拮抗细菌 SR13-2 进行发酵条件优化,优化后比优化前抑菌率提高了约 10%,并且发现该菌株具有较强的耐热性和耐酸碱性的^[20]。

本研究对分离自马铃薯块茎的 TD-12 菌株菌液抑制致病疫霉菌丝生长的部分发酵条件进行了优化,明确了该菌株的最适发酵条件为:将 1 mL 种子液接种到初始 pH 值 7 的 100 mL LB 液体培养基中,在 37 °C 条件下以 150 r/min 的转速振荡培养 30 h,在此条件下,所得菌液对致病疫霉菌丝生长的抑制率可达 93.12% 优化后比优化前抑菌率提高了 9.22%。该菌株在抑制致病疫霉方面有较大的应用潜力。此外,明确拮抗菌的种类及其分类地位,对开发生物制剂且应用于农业生产具有重要的指导意义。本试验中通过菌体形态、培养特性、菌落特征观察以及生理生化特性的 16S rDNA 序列分析,将菌株 TD-12 鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。有报道表明,解淀粉芽孢杆菌种内的许多菌株对人畜安全,已被越来越多地应用于饲料添加剂和饲用微生态制剂^[13]。与此同时,该细菌种内的另外一些菌株展示出了抑制许多植物病原菌的巨大潜力,分离自土壤的 1 株解淀粉芽孢杆菌 HN06,对黑曲霉(*Aspergillus niger*)、稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)、水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)、苦瓜枯萎病菌(*cucurbit wilt*)均有良好的抑制作用^[21]。上述研究进一步证实,解淀粉芽孢杆菌在植物病害防治方面有广阔的应用潜力。

参考文献:

- [1] 黄英菊,蒋继志,冯丽娜,等. 致病疫霉拮抗细菌研究进展[J]. 中国植保导刊,2013,33(8):18-22.
- [2] Cooke L R, Schepers H, Hermansen A, et al. Epidemiology and integrated control of potato late blight in Europe[J]. Potato Research, 2011, 54(2):183-222.
- [3] El-Hasan E, Walker F, Schone J, et al. Detection of viridifungin A and other antifungal metabolites excreted by *Trichoderma harzianum* active against different plant pathogens[J]. European Journal of Plant Pathology, 2009, 124(3):457-470.
- [4] An Y J, Kang S C, Ki-Deok K K, et al. Enhanced defense responses of tomato plants against late blight pathogen *Phytophthora infestans* by pre-inoculation with rhizobacteria[J]. Crop Protection, 2010, 29(12):1406-1412.
- [5] Li L Y, Jiang J Z, Guo W. Screening of antagonistic bacteria against *Phytophthora infestans* and its inhibition effect[J]. Plant Diseases and Pests, 2011, 2(3):49-51, 55.
- [6] 刘月,蒋继志,郭俊亭,等. 致病疫霉拮抗放线菌的筛选及抑菌作用初步研究[J]. 河北农业大学学报, 2012, 35(3):82-85.
- [7] 蒋继志,郭俊亭,李丽艳. 致病疫霉拮抗真菌研究进展[J]. 河北大学学报:自然科学版, 2012, 32(1):105-112.
- [8] 蒋继志,孙琳琳,郭会婧,等. 几种微生物提取物诱导马铃薯抗晚疫病及机理的初步研究[J]. 植物病理学报, 2010, 40(2):173-179.
- [9] 蒋继志,张蕾,刘璇,等. 致病疫霉拮抗内生细菌的筛选及离体防病作用[J]. 河北农业大学学报, 2013, 36(2):75-79.
- [10] Rodriguez H, Rico S, Diaz M, et al. Two-component systems in *Streptomyces*: key regulators of antibiotic complex pathways[J]. Microbial Cell Factories, 2013, 12:127-136.
- [11] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1986:65-70.
- [12] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社, 2001:353-356.
- [13] 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.
- [14] 李双东,曹克强. 枯草芽孢杆菌 EB228 对马铃薯晚疫病菌的抑菌作用及防病效果[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(24):11376-11378.
- [15] Daayf F, Adam L, Fernando W D. Comparative screening of bacteria for biological control of potato late blight (strain US-8), using *in vitro*, detached-leaves, and whole-plant testing systems[J]. Calif J Plant Pathol, 2003, 25(3):276-284.
- [16] 姜军坡,范会兰,王伟,等. 牛源肠道益生菌芽孢杆菌 BN-9 菌株的分离鉴定[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(1):142-146.
- [17] Sutyak K, Wirawan R E, Aroutcheva A A, et al. Isolation of the *Bacillus subtilis* antimicrobial peptide subtilisin from the dairy product-derived *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 104(4):1067-1074.
- [18] 于靓,程德勇,熊儒先,等. 解淀粉芽孢杆菌 T1 增殖培养基配方及培养条件优化[J]. 湖北农业科学, 2014, 53(15):3621-3624.
- [19] 郭尧,李丽,蒋继志,等. 致病疫霉拮抗放线菌 Sy11 发酵条件的优化[J]. 河北农业大学学报, 2014, 37(2):71-75.
- [20] 吴真真,蒋继志,汪洁,等. 致病疫霉拮抗细菌 SR13-2 菌液稳定性研究[J]. 中国植保导刊, 2013, 33(8):9-12, 8.
- [21] 陈成,崔堂兵,于平儒. 一株抗真菌的解淀粉芽孢杆菌的鉴定及其抗菌性研究[J]. 现代食品科技, 2011, 27(1):36-39.