

李静泉,高 坤,许继飞,等. 土壤芽孢杆菌 NDD-1 及其拮抗菌短小芽孢杆菌 NDY-10 的分离、鉴定和抑菌特性[J]. 江苏农业科学,2017,45(15):91-95.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.15.023

土壤芽孢杆菌 NDD-1 及其拮抗菌短小芽孢杆菌 NDY-10 的分离、鉴定和抑菌特性

李静泉¹,高 坤¹,许继飞¹,张志磊²,赵 吉¹

(1. 内蒙古大学环境与资源学院/内蒙古自治区环境污染控制与废物资源化重点实验室,内蒙古呼和浩特 010021;

2. 包头市机动车排气检测管理中心,内蒙古包头 014060)

摘要:从内蒙古大唐国际托总托发电有限责任公司储煤区土壤样品中筛选到 1 株拮抗菌株 NDY-10 及被其抑制的菌株 NDD-1。通过菌落形态和显微镜观察,结合 16S rRNA、*gyrB* 基因比对分析对菌株进行鉴定;采用牛津杯法对菌株 NDY-10 进行抑菌谱试验;通过紫外线照射、不同温度、不同 pH 值等处理对菌株 NDY-10 发酵上清液对菌株 NDD-1 的抑菌活性及稳定性进行研究。结果表明,经鉴定,菌株 NDY-10、NDD-1 分别为短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)、土壤芽孢杆菌(*Solibacillus* sp.)。短小芽孢杆菌 NDY-10 对土壤芽孢杆菌 NDD-1、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的抑制作用依次减弱,而对枯草芽孢杆菌、酵母菌、青霉菌没有抑制作用;短小芽孢杆菌 NDY-10 发酵上清液抑菌活性受热处理影响较大,受紫外线照射处理影响较小,在 pH 值为 5~9 范围内保持较高的稳定性。首次报道了短小芽孢杆菌对土壤芽孢杆菌的抑菌作用。

关键词:短小芽孢杆菌;土壤芽孢杆菌;分离;鉴定;抑菌;特性

中图分类号:Q93-331 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)15-0091-05

由于短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)在植物病害防治^[1-3]、微生物制剂^[4-5]、水环境保护^[6-8]等方面具有巨大的应用潜力,因此近年来逐渐成为研究热点。已有研究表明,短小芽孢杆菌对多种病原性微生物具有抑菌作用。郑敏筛选出 1 株短小芽孢杆菌,在平板试验中对芒果炭疽病原菌的抑

制率为 88.87%,在活体试验中该菌株的抑菌率高于 80%,可有效降低芒果自然腐烂^[9]。胡晓璐等以水稻稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)为试验菌株,发现短小芽孢杆菌 DX01 对水稻稻瘟病菌孢子萌发的抑制率为 36%^[10]。Ghasemi 等从伊朗高盐环境中筛选出 1 株短小芽孢杆菌,发现它可分泌 2 种几丁质酶(ChiS、ChiL),可抑制多种植物病原菌^[11]。于婷等对分离出的短小芽孢杆菌 BSH-4 菌株及其抗菌蛋白进行抑菌谱研究,发现它对 8 种常见蔬菜病原真菌具有抑制作用,其中对黄瓜蔓枯病菌、番茄早疫病病菌和黄瓜立枯病菌具有较高的抑菌活性^[12]。彭虹旻对筛选出具有抑菌活性的短小芽孢杆菌 4D-14 进行研究,确定其分泌的抗菌物质为小肽类,受蛋白酶影响不大,具有较高的热稳定性^[13]。颜爱勤等的研究表明,短小芽孢杆菌 JK-SX001 菌株产

收稿日期:2016-03-28

基金项目:内蒙古自治区自然科学基金(编号:2014BS0309);内蒙古自治区重大基础研究开放课题(编号:30500-515330304);内蒙古大学高层次人才科研启动项目(编号:30105-135102)。

作者简介:李静泉(1983—),男,河北邯郸人,博士,讲师,主要从事环境微生物方面的研究。E-mail:ljq198327@163.com。

通信作者:赵 吉,博士,教授,博士生导师,主要从事环境微生物、微生物生态方面的研究。E-mail:ndzj@imu.edu.cn。

[12]张书泰,杨秋明,陈 钦,等. 福建南平不同植烟土壤微生物数量与养分状况分析[J]. 中国农学通报,2014,30(31):76-81.

[13]梁颂捷,林 毅,朱其清,等. 福建植烟土壤 pH 值与土壤有效养分的相关性[J]. 中国烟草科学,2001,22(1):25-27.

[14]陈朝阳,吴 平,陈星峰,等. 南平市植烟土壤氮、磷、钾养分状况与演变趋势[J]. 中国农学通报,2011,27(25):68-76.

[15]李 玥,赖勇林,王 军,等. 不同养分缺乏对烤烟根系形态及营养生长的影响[J]. 中国烟草科学,2015,36(2):60-65.

[16]徐 洁,罗华元,常寿荣,等. 烟草根际土壤微生物区系分析及其相关性研究[J]. 西南农业学报,2011,24(6):2279-2284.

[17]谭 军,王昌军,孟贵星,等. 恩施植烟土壤理化性状对烟草青枯病发生影响的初步分析[J]. 中国烟草科学,2012,33(6):93-96.

[18]施河丽,向必坤,彭五星,等. 调节植烟土壤酸度防控烤烟青枯

病[J]. 中国烟草学报,2015,21(6):50-53.

[19]何 凯,石纹豪,李振轮. 生物有机肥防治植物土传病害研究进展[J]. 河南农业科学,2014,43(6):1-5.

[20]徐文静,靳晓东,杨秋生. 植物根际微生物的影响因素研究进展[J]. 河南农业科学,2014,43(5):6-12.

[21]王丽丽,石俊雄,袁赛飞,等. 微生物有机肥结合土壤改良剂防治烟草青枯病[J]. 土壤学报,2013,50(1):150-156.

[22]陈巧玲,胡 江,汪汉成,等. 生物有机肥对盆栽烟草根际青枯病原菌和短小芽孢杆菌数量的影响[J]. 南京农业大学学报,2012,35(1):75-79.

[23]殷金玉,王 岩,郭夏丽,等. 延边地区植烟土壤微生物根际效应分析[J]. 中国烟草学报,2011,17(6):60-65.

[24]罗 明,文启凯. 不同用量的氮磷无机肥对棉田土壤微生物区系及活性的影响[J]. 土壤通报,2000,31(2):67-69.

生的非蛋白抗菌物质造成病原菌菌丝顶端畸形,形成膨胀,强烈抑制病原真菌菌丝生长,同时通过抑制病原菌孢子产生芽管来抑制分生孢子的萌发^[14]。Aunpad 等从短小芽孢杆菌中首次分离到 pumilicin 4 细菌素,对耐万古霉素肠球菌(VRE)和一些革兰氏阳性细菌有显著的抑制作用,经鉴定这种细菌素属于多肽类物质^[15]。但有关短小芽孢杆菌对芽孢杆菌属及其近缘属菌株的抑菌作用却未见报道。本研究分离得到 1 株拮抗菌株——短小芽孢杆菌 NDY-10(*B. pumilus* NDY-10)及被它抑制的土壤芽孢杆菌 NDD-1 菌株(*Solibacillus* sp. strain NDD-1),扩大了短小芽孢杆菌抑菌作用的范围,并研究了短小芽孢杆菌 NDY-10 的抑菌谱及该菌株对土壤芽孢杆菌 NDD-1 菌株的抑菌活性。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 土壤样品 土壤样品,采自内蒙古大唐国际托克托发电有限责任公司的煤炭储藏区。

1.1.2 主要试剂 牛肉浸膏、葡萄糖、细菌学蛋白胨、酵母提取物、NaCl、MgSO₄·7H₂O、KH₂PO₄、琼脂粉,均为化学纯。

1.1.3 培养基 牛肉膏蛋白胨液体培养基:0.5%牛肉浸膏,1.0%细菌学蛋白胨,1.0% NaCl,用 3 mol/L NaOH 调节 pH 值至 7.2,121℃高压灭菌 30 min。

牛肉膏蛋白胨固体培养基:每 100 mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基中加入 1.5 g 琼脂粉配制而成。

水琼脂培养基:蒸馏水加琼脂粉至终浓度为 1.5%,121℃高压灭菌 30 min。

马丁式培养基:1.00%葡萄糖,0.50%蛋白胨,0.10% KH₂PO₄,0.05% MgSO₄·7H₂O,1.50%琼脂粉,121℃高压灭菌 30 min。

1.1.4 主要设备 PowerCycler SL 96 Gradient 型 PCR 仪,购自 Analytik Jena AG; GBOX 型凝胶成像仪,购自 Gene Company Limited; UV-2600A 型紫外-可见分光光度计,购自尤尼柯(上海)仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株的分离、鉴定 采用稀释平板涂布法从土壤样品中分离菌种。向 150 mL 无菌三角瓶中加入 45 mL 灭菌水和适量已灭菌小玻璃球,称取 5 g 土壤样品加入三角瓶中,制成土壤悬液,于 30℃摇床振荡 2 h。用移液器吸取 1 mL 土壤悬液于无菌试管中,加入 9 mL 无菌水,混匀后从中吸取 1 mL 加入第 2 个无菌试管中并加入 9 mL 无菌水,以此类推制成 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 6 个稀释梯度的土壤悬液。分别吸取 200 μL 10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 3 个稀释梯度的土壤悬液均匀涂布在牛肉膏蛋白胨琼脂培养基上,于 28℃培养箱中倒置培养 3 d。在分离菌株资源过程中发现有拮抗菌及被抑制菌存在,分别挑取、纯化,并验证其抑菌效果,将拮抗菌命名为 NDY-10,将被抑制菌命名为 NDD-1,进行菌株鉴定。对菌株进行划线培养,观察菌落形态,并对菌株分别进行革兰氏染色和芽孢染色,显微镜下观察染色结果。

采用天根生化科技(北京)有限公司的细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株基因组 DNA,对菌株的 16S rRNA 基因和 *gyrB* 基因^[16-18] 分别进行 PCR 扩增、测序、构建系统发育

树。16S rRNA 基因 PCR 扩增所用引物为 27F、1492R,引物序列:27F,5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';1492R,5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'。16S rRNA 基因 PCR 扩增程序:94℃5 min;94℃30 s,55℃30 s,72℃80 s,循环 26 次;72℃10 min。*gyrB* 基因 PCR 扩增所用引物为 UP-1、UP-2S^[13],引物序列:UP-1,5'-GAAGTCATCATGACCGTTCT-GCAYGCNGGNGGNAARTTYGA-3';UP-2S,5'-AGCAGG-GTACGGATGTGCGAGCCRTCACRTCNGCRTCNGTCAT-3'。*gyrB* 基因 PCR 扩增程序:94℃5 min;94℃40 s,60℃40 s,72℃2 min,循环 30 次;72℃10 min。

基因测序结果在 NCBI 上通过 BLAST 进行序列比对分析,利用 MEGA 4.1 软件构建菌株的系统进化树。

1.2.2 短小芽孢杆菌 NDY-10 抑菌谱测定 为了检测 NDY-10 菌株的抑菌谱,除 NDD-1 菌株外再选择 2 种革兰氏阳性菌(枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌)、1 种革兰氏阴性菌(大肠杆菌)及 2 种真菌(青霉菌、酵母菌)进行 NDY-10 菌株的抑菌谱试验。供试菌株及来源信息见表 1。

表 1 供试菌株及来源

试验菌株	来源
土壤芽孢杆菌 NDD-1(<i>Solibacillus</i> sp. strain NDD-1)	本试验分离所得
枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>)	笔者实验室保存
大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>)	笔者实验室保存
金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)	笔者实验室保存
酵母菌(<i>Saccharomyces</i>)	笔者实验室保存
青霉菌(<i>Penicillium</i> sp.)	笔者实验室保存

使用牛津杯法检测 NDY-10 菌株的发酵液对 6 种供试菌株的抑菌作用。先在培养皿中倒入 10 mL 左右的水琼脂培养基,待其冷却后,对供试菌株作下述处理:对于细菌供试菌株,将装有 50 mL 牛肉膏蛋白胨琼脂培养基的三角瓶灭菌后,待其降至 60℃左右时加入 1 mL 供试细菌菌株菌液,轻轻转动使菌液均匀分布在培养基中,在水琼脂平皿中倒入 10 mL 左右已加入菌液的牛肉膏蛋白胨琼脂培养基;真菌供试菌株接入马丁式培养基中作相同处理。待培养基凝固,在平皿中等间距放入 3 个牛津杯,轻轻加压使牛津杯固定在培养基上,每个牛津杯中加入 100 μL NDY-10 菌株发酵液。细菌在 37℃的恒温培养箱中培养 7 d,真菌在 28℃恒温培养箱中培养 7 d。

1.2.3 短小芽孢杆菌 NDY-10 的抑菌活性及其稳定性测定 NDY-10 菌株在 220 r/min、37℃摇床中培养 2 d,12 000 r/min 离心 15 min,收集上清液。无菌条件下,对发酵上清液作如下处理。80℃处理:上清液在 80℃水浴锅中水浴 1 h;121℃处理:上清液在灭菌锅中 121℃条件下处理 30 min;将上清液用 3 mol/L HCl、NaOH 分别调节 pH 值为 3、5、9、11,处理 1 h,分别记为 pH₃、pH₅、pH₉、pH₁₁ 处理组;紫外处理:将上清液在超净工作台于紫外线照射下处理 1 h;对照:不作任何处理。

然后将高温处理过的发酵上清液降至室温,将不同酸碱度处理过的发酵上清液 pH 值调为 7.8。

分别取上述处理过的和未处理的发酵上清液各 6 mL 于试管中,向每支试管中加入 3 mL NDD-1 菌株菌液;同时设

置空白对照组,其处理方法为 6 mL 牛肉膏蛋白胨培养基与 3 mL NDD-1 菌株菌液混合。在 37 ℃、220 r/min 摇床中发酵培养 6 h,测定培养前、培养后菌液的 $D_{600\text{ nm}}$ 。每个处理 3 次重复, $D_{600\text{ nm}}$ 取平均值。

抑菌率计算公式:

$$r = (1 - \frac{B_1 - B_0}{A_1 - A_0}) \times 100\%$$

式中: r 为抑菌率; A 为空白对照组(添加牛肉膏蛋白胨培养基)菌液的 $D_{600\text{ nm}}$; A_0 为 0 h 时菌液的 $D_{600\text{ nm}}$; A_1 为 6 h 时菌液的 $D_{600\text{ nm}}$; B 为处理组(添加 NDY-10 发酵上清液)菌液的 $D_{600\text{ nm}}$; B_0 为 0 h 时菌液的 $D_{600\text{ nm}}$; B_1 为 6 h 时菌液的 $D_{600\text{ nm}}$ 。

相对抑菌活性计算公式:

$$a = \frac{r_2}{r_1} \times 100\%$$

式中: a 为相对抑菌活性,%; r_2 为经过处理的发酵上清液的抑菌率,%; r_1 为未经处理的发酵上清液的抑菌率,%。

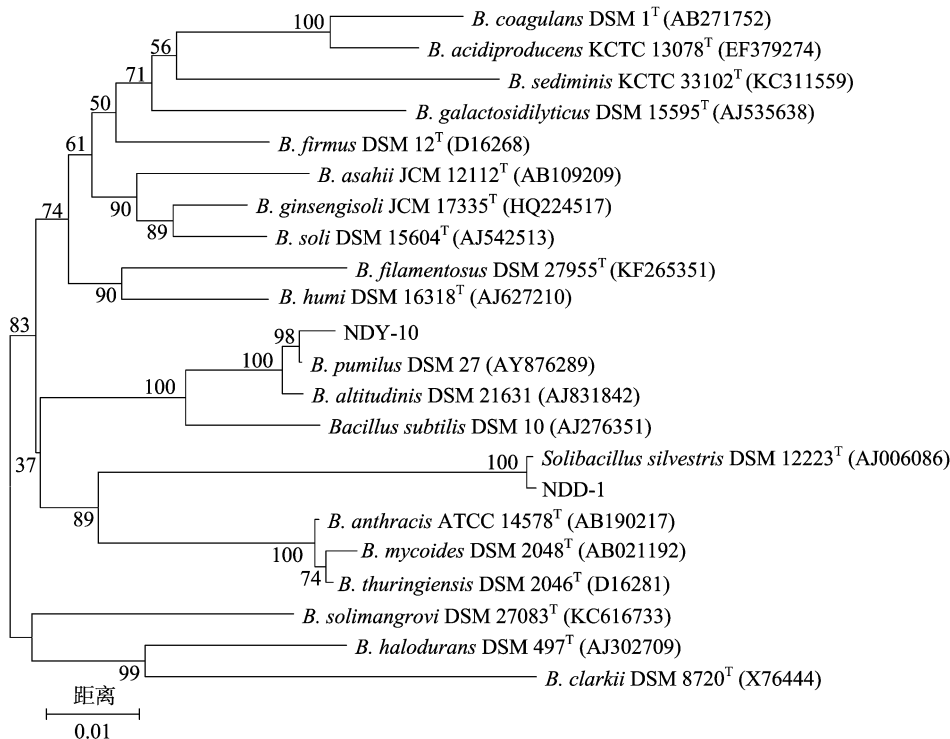
2 结果与分析

2.1 菌株鉴定

拈抗菌株 NDY-10 为革兰氏阳性菌,菌落外圈呈现半透明状态,中间乳白色,形状不规则,菌落扁平,边缘不整齐,表面湿润、光滑,有黏性;在显微镜下观察菌体呈细杆状,比较长,多数单独存在,少部分成链排列,芽孢为近端生。将菌株 NDY-10 的 16S rRNA、*gyrB* 基因序列进行 BLAST 比对分析,发现菌株 NDY-10 的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 数据库

中短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)的 16S rRNA 基因序列相似性最高,最大相似度达 99%。菌株 NDY-10 的 *gyrB* 基因序列与 *B. pumilus* HTC38 的 *gyrB* 基因序列相似度为 99% (覆盖率 87%),与 *B. pumilus* LLTC93 的 *gyrB* 基因序列相似度为 98% (覆盖率 86%),与 *B. pumilus* NJ-V2 的 *gyrB* 基因序列相似度为 91% (覆盖率 97%),与 *B. pumilus* SH-B9 的 *gyrB* 基因序列相似度为 90% (覆盖率 99%)。因此,将菌株 NDY-10 鉴定为短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)。*B. pumilus* NDY-10 的 16S rRNA 基因序列的 GenBank 登录号为 KT036668,其 *gyrB* 基因序列的 GenBank 登录号为 KT036670。菌株 NDY-10 的 16S rRNA、*gyrB* 基因序列系统发育树分别如图 1、图 2 所示,聚类结果与 BLAST 比对分析结果一致。

被抑制菌株 NDD-1 为革兰氏阳性菌,菌落呈半透明状态,淡黄色,圆形,菌落饱满凸起,边缘整齐,表面湿润、光滑,有黏性,在显微镜下观察菌体呈短杆状,多数单独存在,少部分成链排列,芽孢为端生,芽孢呈圆形,而芽孢杆菌属菌株的芽孢呈椭圆形,这是土壤芽孢杆菌属(*Solibacillus*)菌株区别于芽孢杆菌属(*Bacillus*)菌株的一个重要特征^[19]。将菌株 NDD-1 的 16S rRNA 基因序列和 *gyrB* 基因序列进行 BLAST 比对分析,发现菌株 NDD-1 的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 数据库中的 *Solibacillus*、*Bacillus* 中部分菌株的 16S rRNA 基因序列的相似度均达到 99%。菌株 NDD-1 的 *gyrB* 基因序列与土壤森林芽孢杆菌(*S. silvestris*) StLB046 的 *gyrB* 基因序列相似度为 92% (覆盖率 99%),与 *S. silvestris* DSM 12223 的 *gyrB* 基因序列相似度为 91% (覆盖率 99%),与 *B.*



Bacillus subtilis—枯草芽孢杆菌; *B. coagulans*—凝结芽孢杆菌; *B. acidiproducens*—产酸芽孢杆菌; *B. sediminis*—沉积物芽孢杆菌; *B. galactosidilyticus*—解半乳糖苷芽孢杆菌; *B. firmus*—坚强芽孢杆菌; *B. asahii*—朝日芽孢杆菌; *B. ginsengisoli*—人参地芽孢杆菌; *B. soli*—土壤芽孢杆菌; *B. filamentosus*—丝状芽孢杆菌; *B. humi*—土地芽孢杆菌; *B. pumilus*—短小芽孢杆菌; *B. altitudinis*—高地芽孢杆菌; *B. anthracis*—炭疽芽孢杆菌; *B. mycoides*—蕈状芽孢杆菌; *B. thuringiensis*—苏云金芽孢杆菌; *B. solimangrovi*—红树林土壤芽孢杆菌; *B. halodurans*—耐盐芽孢杆菌; *Solibacillus silvestris*—森林土壤芽孢杆菌

图1 菌株 NDY-10、NDD-1 的 16S rRNA 基因序列系统发育树

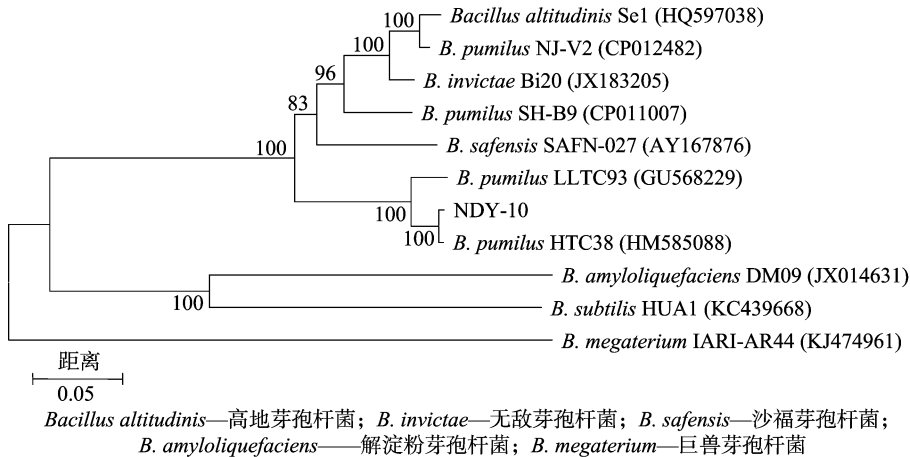
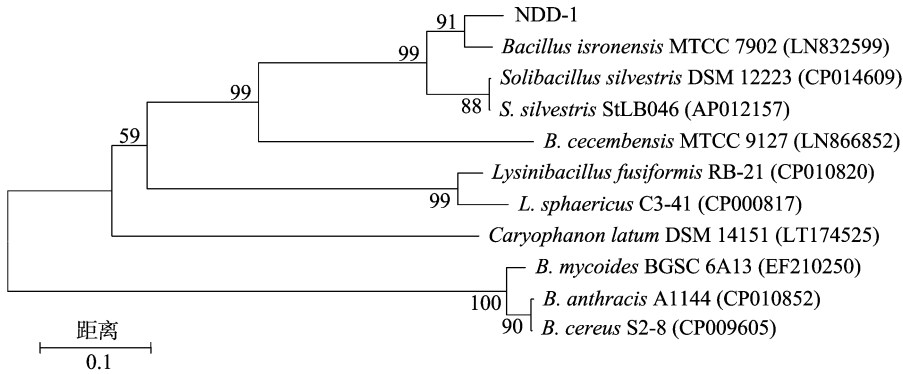


图2 菌株 NDY-10 的 *gyrB* 基因序列系统发育树

isronensis MTCC 7902 的 *gyrB* 基因序列相似度为 96% (覆盖率 67%)。因此, 将菌株 NDD - 1 鉴定为土壤芽孢杆菌 (*Solibacillus* sp. strain)^[19-20]。*Solibacillus* sp. strain NDD - 1 的 16S rRNA 基因序列的 GenBank 登录号为 KT036669, 其

gyrB 基因序列的 GenBank 登录号为 KT036671。菌株 NDD - 1 的 16S rRNA、*gyrB* 基因序列系统发育树分别如图 1、图 3 所示, 聚类结果与 Blast 比对分析结果一致。



Bacillus isronensis—印空研芽孢杆菌; *B. cecembensis*—科研中心芽孢杆菌; *Lysinibacillus fusiformis*—纺锤形赖氨酸芽孢杆菌; *L. sphaericus*—球形赖氨酸芽孢杆菌; *Caryophanon latum*—阔显核菌; *B. mycoides*—蕈状芽孢杆菌; *B. anthracis*—炭疽芽孢杆菌; *B. cereus*—蜡样芽孢杆菌

图3 菌株 NDD-1 的 *gyrB* 基因序列系统发育树

2.2 短小芽孢杆菌 NDY - 10 的抑菌谱

通过牛津杯法检测 NDY - 10 菌株对 6 株供试菌株的抑菌效果, 由表 2 可知, 菌株 NDY - 10 对 NDD - 1 的抑制作用最强, 对大肠杆菌的抑制作用较强, 对金黄色葡萄球菌的抑制作用较弱, 而对枯草芽孢杆菌、酵母菌、青霉菌则没有抑制作用。

表 2 短小芽孢杆菌 NDY - 10 的抑菌谱测定结果

供试菌株	抑制作用
土壤芽孢杆菌 NDD - 1	+++
枯草芽孢杆菌	-
大肠杆菌	++
金黄色葡萄球菌	+
酵母菌	-
青霉菌	-

注: “+”表示有抑制作用, 其数量与抑制作用成正比; “-”表示没有抑制作用。

2.3 短小芽孢杆菌 NDY - 10 的抑菌活性及其稳定性

由表 3 可知, 对照组对 NDD - 1 菌株的抑制率为 78.2%。对 NDY - 10 菌株的发酵上清液作不同处理后, 其发酵上清液

表 3 短小芽孢杆菌 NDY - 10 发酵上清液对土壤芽孢杆菌 NDD - 1 的抑菌活性

试验组	抑菌率 (%)	相对抑菌活性 (%)
对照	78.2	100.00
80 ℃ 处理	37.2	47.57
121 ℃ 处理	23.7	30.31
pH ₃ 处理	30.9	39.51
pH ₅ 处理	69.3	88.62
pH ₉ 处理	72.5	92.71
pH ₁₁ 处理	41.3	52.81
紫外线处理	66.4	84.91

表现出不同的抑菌活性。

高温处理后, NDY - 10 菌株发酵上清液对 NDD - 1 菌株的抑菌率下降。80 ℃ 处理后其抑菌率下降至 37.2%, 相对抑菌活性为 47.57%; 而 121 ℃ 处理后其抑菌率下降至 23.7%, 相对抑菌活性为 30.31%。表明热处理对 NDY - 10 菌株发酵上清液的抑菌活性有明显的影响。

在 pH 值分别为 3、5、9、11 的处理条件下, NDY - 10 菌株

发酵上清液对 NDD - 1 菌株的抑菌率分别为 30.9%、69.3%、72.5%、41.3%，相对抑菌活性分别为 39.51%、88.62%、92.71%、52.81%。可见在 pH 值为 5~9 的处理范围内，其发酵上清液的抑菌活性保持较高的稳定性，抑菌率高于 69%，相对抑菌活性高于 88%。

紫外线处理后 NDY - 10 菌株发酵上清液对 NDD - 1 菌株的抑菌率为 66.4%，相对抑菌活性为 84.91%，可见紫外照射对 NDY - 10 菌株发酵上清液的抑菌活性影响较小。

3 讨论与结论

本研究从内蒙古大唐国际托克托发电有限责任公司储煤区土壤中分离、筛选到 1 株拮抗菌株 NDY - 10 及被其抑制的菌株 NDD - 1，经鉴定，两者分别为短小芽孢杆菌、土壤芽孢杆菌。在已报道的抑菌性短小芽孢杆菌中，如 *B. pumilus* DX01^[10]、*B. pumilus* SG2^[11]、*B. pumilus* BSH - 4^[12]、*B. pumilus* 4D - 14^[13]、*B. pumilus* JK - SX001^[14]、*B. pumilus* WAPB4^[15] 等均未见有关短小芽孢杆菌对芽孢杆菌属及其近缘属菌株的抑菌作用的报道。*B. pumilus* NDY - 10 对 *S. sp.* strain NDD - 1 的抑制作用扩大了短小芽孢杆菌抑菌作用的范围。同时通过抑菌谱试验发现，*B. pumilus* NDY - 10 虽然对 *S. sp.* strain NDD - 1 具有非常强的抑制作用，但对枯草芽孢杆菌却无抑制作用，说明 *B. pumilus* NDY - 10 对芽孢杆菌属及其近缘属菌株的抑制作用具有选择性，其选择抑制的机制有待进一步研究。

对 *B. pumilus* NDY - 10 发酵上清液的抑菌活性及稳定性进行研究，结果显示，其发酵上清液的 pH 值为 7.8 时，抑菌率为 78.2%；抑菌活性受热处理的影响较大，80℃ 处理后其抑菌率下降至 37.2%，121℃ 处理后，其发酵液的抑菌率下降至 23.7%；抑菌活性受紫外线处理的影响较小，紫外线处理 1 h 后，其发酵上清液的抑菌率为 66.4%；在 pH 值为 5~9 的范围内其发酵上清液保持较高的抑菌活性，抑菌率高于 69%。

参考文献：

- [1] 邱德文. 我国植物病害生物防治的现状与发展策略[J]. 植物保护, 2010, 36(4): 15 - 18.
- [2] 李凯, 袁鹤. 植物病害生物防治概述[J]. 山西农业科学, 2012, 40(7): 807 - 810.
- [3] 沈新迁, 胡晓璐, 刘通, 等. GFP 标记的短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) 转座突变株的构建初探[J]. 上海交通大学学报 (农业科学版), 2012, 30(4): 15 - 20.
- [4] Telang S, Patel P, Sarangdhar V, et al. Isolation and cloning of the endoglucanase gene from *Bacillus pumilus* and its expression in *Deinococcus radiodurans*[J]. Biotech, 2014, 4(1): 57 - 65.
- [5] Tangahu B V, Abdullah S R S, Basri H, et al. Biosorption of lead

- (Pb) by three *Bacillus* species (*Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus* and *Bacillus subtilis*) isolated from *Scirpus grossus*[M]// From Sources to Solution. Singapore: Springer, 2014.
- [6] Guan Z B, Song C M, Zhang N, et al. Overexpression, characterization, and dye - decolorizing ability of a thermostable, pH - stable, and organic solvent - tolerant laccase from *Bacillus pumilus* W3[J]. Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic, 2014, 101(1/2): 1 - 6.
- [7] 慕娟, 问清江, 党永, 等. 短小芽孢杆菌产碱性木聚糖酶发酵条件的研究[J]. 微生物学杂志, 2012, 32(2): 73 - 78.
- [8] 问清江, 慕娟, 党永, 等. 紫外诱变选育高产碱性木聚糖酶优良短小芽孢杆菌[J]. 陕西农业科学, 2014, 60(12): 1 - 6.
- [9] 郑敏. 芒果炭疽病挥发性抑菌物质产生菌的筛选及拮抗机理研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2013: 35 - 40.
- [10] 胡晓璐, 陈云鹏, 沈新迁, 等. 短小芽孢杆菌 DX01 菌株 Tn5 转座突变株的抑菌活性筛选体系的建立[J]. 植物保护学报, 2012, 39(5): 406 - 410.
- [11] Ghasemi S, Ahmadian G, Sadeghi M, et al. First report of a bifunctional chitinase/lysozyme produced by *Bacillus pumilus* SG2[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2011, 48(3): 225 - 231.
- [12] 于婷, 尚玉珂, 李艳芳, 等. 短小芽孢杆菌 BSH - 4 抗菌物质的提取及其特性[J]. 植物保护学报, 2009, 36(1): 65 - 69.
- [13] 彭虹施. 短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus* 4D - 14) 的分离与分子鉴定、抑菌性及微生态制剂应用研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013: 81 - 83.
- [14] 颜爱勤, 吴小芹, 叶建仁, 等. 短小芽孢杆菌 JK - SX001 非蛋白抗菌物质研究[J]. 南京林业大学学报, 2012, 36(3): 13 - 16.
- [15] Aunpad R, Na - Bangchang K. Pumilicin 4, a novel bacteriocin with anti - MRSA and anti - VRE activity produced by newly isolated bacteria *Bacillus pumilus* strain WAPB4[J]. Current Microbiology, 2007, 55(4): 308 - 313.
- [16] Yamamoto S, Harayama S. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with Universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(3): 1104 - 1109.
- [17] 郝云婕, 韩素贞. *gyrB* 基因在细菌系统发育分析中的应用[J]. 生物技术通报, 2008(2): 39 - 41.
- [18] 曹凤明, 杨小红, 马鸣超, 等. 枯草芽孢杆菌近缘种群鉴定方法研究进展[J]. 微生物学通报, 2014, 41(5): 968 - 974.
- [19] Krishnamurthi S, Chakrabarti T, Stackebrandt E. Re - examination of the taxonomic position of *Bacillus silvestris* Rheims et al. 1999 and proposal to transfer it to *Solibacillus* gen. nov. as *Solibacillus silvestris* comb. Nov. [J]. International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology, 2009, 59(5): 1054.
- [20] 刘波, 王阶平, 陶天申, 等. 芽孢杆菌属及其近缘属种名目录[J]. 福建农业学报, 2015, 30(1): 38 - 59.