

尹福强,刘 铭,蔡艺梅. 烟草黑胫病拮抗细菌的筛选及其发酵条件优化[J]. 江苏农业科学,2017,45(15):96-98.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.15.024

烟草黑胫病拮抗细菌的筛选及其发酵条件优化

尹福强,刘 铭,蔡艺梅

(西昌学院农业科学学院,四川西昌 615013)

摘要:为获得对烟草黑胫病有较强生防效果的拮抗细菌,从四川省凉山州5个县(市)烟草种植田地采集10份土壤样品,通过稀释平板法分离得到112株细菌。采用平板对峙法获得39株对烟草黑胫病病原菌(*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*)拮抗效果较好的细菌。选取拮抗效果最好的GC-38菌株进行进一步研究,结果显示,菌株GC-38对烟草黑胫病菌抑制率为81.81%,经鉴定菌株GC-38为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。优化后得到其最佳发酵条件:碳源为葡萄糖,氮源为蛋白胨,pH值为9.0,温度在30~35℃范围内。可见,GC-38菌株对烟草黑胫病有明显的拮抗作用,是具有较大开发潜能的生防菌株。

关键词:烟草黑胫病;拮抗细菌;抑菌率;发酵条件;生物防治

中图分类号: S435.72 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)15-0096-03

烟草是我国重要的经济作物之一,近年来,烟草黑胫病逐渐成为仅次于烟草病毒病的第二大烟草病害,每年造成的经济损失平均均为1亿元^[1-2]。烟草黑胫病是由烟草疫霉(*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*)引发的经土壤传播的真菌性病害,主要发生在烟草成株阶段,在苗床期发生较少,烟草黑胫病常年发病率为10%~15%,严重时发病率高于80%,甚至绝收,给烟草生产带来严重的威胁。

对烟草黑胫病的防治,目前主要集中在化学防治方面^[3]。但化学防治可造成环境污染,且容易产生抗药性^[4]。相对于化学防治而言,生物防治具有成本低、有效期长、不污染环境、对人畜安全、病害不易产生抗性、可减少化学农药用料、节约能源等优点。本研究从烟草根际土壤中分离筛选出有益细菌,筛选拮抗效果较好的菌株,然后对其进行鉴定,研究其生长曲线及发酵条件,为更好地利用该菌株奠定基础,同时为黑胫病的生物防治提供资源。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌种 烟草疫霉(*P. parasitica* var. *nicotianae*),由西昌学院植物保护实验室提供。

1.1.2 供试土壤样品 采自四川省凉山州会理县、普格县、盐源县、冕宁县、西昌市5个县(市)烟草黑胫病发病严重的健康烟草植株的根际土壤。

1.1.3 供试培养基 PDA培养基、燕麦培养基、NA液体培养基,培养基配方均参照《微生物及其应用》^[5]。

1.2 试验方法

1.2.1 拮抗细菌的分离 采用稀释平板法分离拮抗细菌。

在健康烟草植株的根际采集土壤样品,采用5点法取样,每点取20g土壤样品,每块烟田中共取100g土壤样品。5个县(市)的取样点共取10份土壤样品,分别将每份土壤样品充分混匀后称取10g装入10个三角瓶中,并加入适量提前灭菌的玻璃珠和90mL无菌水,将三角瓶振荡20min,静置5min后取其上清液。最后用无菌水将上清液稀释成浓度为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 悬浮液,本试验取用 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 悬浮液,在超净工作台上用三角玻璃棒将上清液均匀涂抹于NA平板上,28℃恒温培养1~2d。待菌落长出后,将单菌落逐个挑出转接于试管中,进行纯化培养并编号。

1.2.2 拮抗细菌的筛选 以烟草黑胫病病原菌作为病原菌,采用对峙划线法测定拮抗细菌对病原菌的拮抗作用,用直径为5mm的打孔器打取病原菌菌饼,接种于PDA平板中心,用接种环挑取供试拮抗细菌于距平板中央约3cm处划1条贯穿培养皿的菌线,以接种病原菌菌饼不接拮抗菌的PDA平板作为对照,在28℃恒温培养,产生抑菌效果后,用游标卡尺测量菌落半径,计算抑菌率。

抑菌率 = (对照组病原菌菌落半径 - 处理组病原菌菌落半径) / 对照组病原菌菌落半径 × 100%。

选出对病原菌有拮抗效果的菌株,再以相同的方法进行复筛,每个菌株3次重复,从中选出拮抗效果最好的1株菌株,用于发酵条件的优化试验。

1.2.3 拮抗细菌的鉴定 采用划线培养法将筛选出的拮抗效果最好的细菌菌株接种至NA平板上,35℃倒置培养1~2d,通过细菌的形态特征及生理生化特征进行初步鉴定。鉴定方法参考《伯杰氏细菌鉴定手册》^[6]和《常见细菌系统鉴定手册》^[7]。

1.2.4 拮抗细菌菌株种子液制备 从筛选出的拮抗效果最好的细菌菌株斜面上挑取1环培养物接种于50mLNA液体培养基中,于35℃、140r/min振荡培养12h得到拮抗细菌种子液。

1.2.5 生长曲线的测定 将细菌菌株种子液以4mL的接种

收稿日期:2017-02-15

基金项目:四川省教育厅自然科学重点项目(编号:15ZA0243、13ZA044)。

作者简介:尹福强(1977—),男,四川广安人,博士,副教授,主要从事烟草栽培研究。E-mail:765504017@qq.com。

量接入 250 mL 的 NA 液体培养基中,35 ℃、140 r/min 振荡培养,分别于 0、3、6、9、12、15、18、21、24、27、30、33、36、39、42、45、48 h 取出 2 mL 培养液测其 $D_{600\text{nm}}$,绘制生长曲线。

1.2.6 发酵条件优化 NA 培养基中分别含有蛋白胨和葡萄糖,为使发酵条件得到优化可以在其他培养基配方不变的基础上,分别用其他可用氮源、碳源将蛋白胨、葡萄糖换掉。本试验能够使用的氮源有硝酸铵、硝酸钾、氯化铵和硝酸钠,可使用的碳源有蔗糖、可溶性淀粉、乳糖和麦芽糖。通过对氮源、碳源的更换分别制成了不同氮源、碳源的培养基。改变温度、pH 值,以 4 mL 的接种量将种子液接入到 250 mL 不同培养基中,140 r/min 振荡培养,测其 $D_{600\text{nm}}$,得到拮抗细菌的最

适发酵条件。

2 结果与分析

2.1 烟草黑胥病根际拮抗细菌的筛选

用稀释平板法分离并得到了 112 株细菌,采用平板划线对峙法分别接种病原菌和细菌。首先取 5 mm 病原菌菌饼接种于 PDA 平板中央,再用划线法在距平板中心约 3 cm 处将细菌接种于平板上,28 ℃ 倒置培养 6 d 后观察抑菌效果,计算抑菌率。由表 1 可知,有抑菌作用的菌株共 39 株,占 34.82%,这 39 株拮抗菌对病原菌的平均抑制率为 64.57%,拮抗效果最好的菌株是 GC-38,其抑菌率高达 81.81%。

表 1 39 株烟草黑胥病拮抗细菌的抑菌率

菌株编号	菌落半径 (mm)	抑菌率 (%)	菌株编号	菌落半径 (mm)	抑菌率 (%)	菌株编号	菌落半径 (mm)	抑菌率 (%)
CK	37.3	—	GC-37	8.3	77.75	GC-78	13.4	64.08
GC-1	16.7	55.23	GC-38	6.8	81.81	GC-83	20.2	45.84
GC-2	15.3	58.98	GC-39	13.6	63.54	GC-84	12.9	65.42
GC-3	9.2	75.34	GC-40	15.3	58.98	GC-89	8.9	76.14
GC-5	10.6	71.58	GC-45	17.6	52.82	GC-90	9.1	75.60
GC-8	18.5	50.40	GC-47	11.4	69.44	GC-95	21.1	43.43
GC-9	10.1	72.92	GC-48	15.6	58.18	GC-98	15.9	57.37
GC-13	12.3	67.02	GC-49	7.1	80.97	GC-100	12.4	66.76
GC-18	9.8	73.73	GC-50	15.2	59.25	GC-102	17.8	52.28
GC-19	9.1	75.60	GC-51	12.6	66.22	GC-105	20.3	45.58
GC-23	10.5	71.85	GC-62	12.5	66.49	GC-106	16.1	56.84
GC-24	14.2	61.93	GC-64	20.3	45.58	GC-108	9.9	73.46
GC-28	8.3	77.75	GC-65	11.8	68.36			
GC-29	11.3	69.71	GC-69	13.4	64.08			

2.2 菌株 GC-38 的鉴定

GC-38 菌株在 NA 培养基上菌落为乳白色至淡黄色,菌落直径 2~3 mm,圆形,周围不规则,表面不光滑,有皱纹。显微镜下观察,菌体呈杆状,直或接近直,(0.3~2.2) $\mu\text{m} \times$ (1.2~7.0) μm ,多数运动,鞭毛典型侧生。由表 2 可知,GC-38 菌株的革兰氏染色、葡萄糖、蔗糖、氧化酶、接触酶、淀粉水解、硝酸盐还原、甲基红、伏-普反应(V-P)、明胶液化和柠檬酸盐试验结果均为阳性,而吲哚、乙醇氧化、乙酸试验结果均为阴性。菌株 GC-38 的形态及生理生化特性与解淀粉芽孢杆菌最为接近,经鉴定,GC-38 为解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)。

表 2 菌株 GC-38 生理生化特征测定结果

测试项目	结果	测试项目	结果
革兰氏染色	+	吲哚	-
葡萄糖	+	甲基红	+
蔗糖	+	V-P	+
氧化酶	+	明胶液化	+
接触酶	+	柠檬酸盐	+
淀粉水解	+	乙醇氧化	-
硝酸盐还原	+	乙酸	-

注:“+”表示阳性,“-”表示阴性。

2.3 生长曲线的绘制

由图 1 可知,GC-38 菌株的生长曲线基本呈“S”形,0~12 h 其生长较为平缓,为延迟期;12~33 h 菌株生长相对于

0~12 h 要快很多,为对数生长期;在 33~42 h 菌株基本停止生长,为稳定期;42 h 后菌株不再生长甚至出现死亡的现象,此时为衰亡期。该菌株在对数生长期生长迅速,代谢比较强,生命力强,最适合用作种子液,因此,选取 12 h 时的发酵液作为种子液。

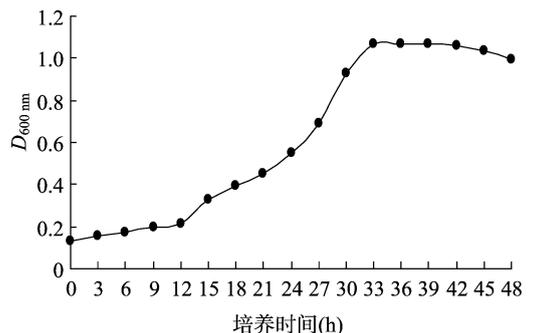


图 1 GC-38 菌株的生长曲线

2.4 GC-38 菌株发酵培养基的优化

2.4.1 pH 值对 GC-38 菌株生长的影响 将 GC-38 菌株的种子液按 4 mL 的接种量分别接种于初始 pH 值分别为 6、7、8、9、10、11、12,装液量为 250 mL 的发酵培养基中,于 140 r/min、35 ℃ 恒温振荡培养 20 h,测定其 $D_{600\text{nm}}$ 。由图 2 可知,pH 值为 9 时,GC-38 菌株的 $D_{600\text{nm}}$ 最高,即菌株生长量较大。因此,GC-38 菌株发酵的最适 pH 值为 9。

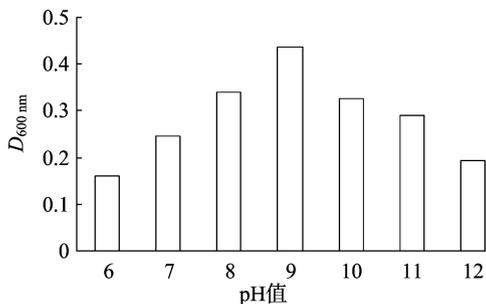


图2 pH 值对 GC-38 菌株生长的影响

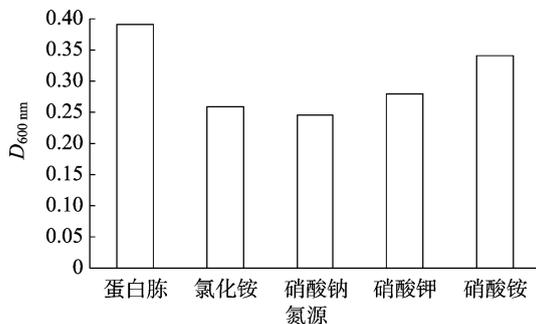


图5 不同氮源对菌株 GC-38 生长的影响

2.4.2 温度对 GC-38 菌株生长的影响 将 GC-38 菌株的种子液按 4 mL 的接种量接种到 250 mL、pH 值为 9 的基础培养基中,分别在 15、20、25、30、35、40、45 °C 条件下,140 r/min 振荡培养 20 h,测定其 $D_{600\text{ nm}}$ 。由图 3 可知,温度为 30~35 °C 时,GC-38 菌株的生长量较大,因此,最适温度范围为 30~35 °C。

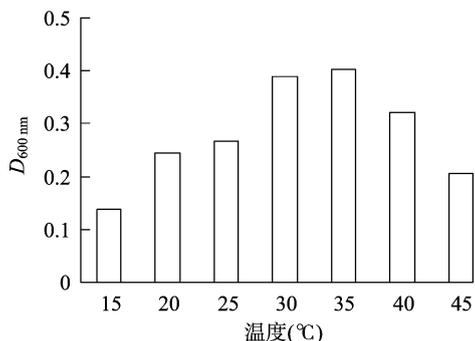


图3 温度对菌株 GC-38 生长影响

2.4.3 碳源筛选 将 GC-38 菌株的种子液按 4 mL 的接种量接种到 250 mL、pH 值为 9 的碳源培养基中,140 r/min、35 °C 恒温振荡培养 20 h,稀释 20 倍测定其 $D_{600\text{ nm}}$ 。由图 4 可知,以葡萄糖为碳源对 GC-38 菌株生长量的作用最大,因此,确定最适碳源为葡萄糖。

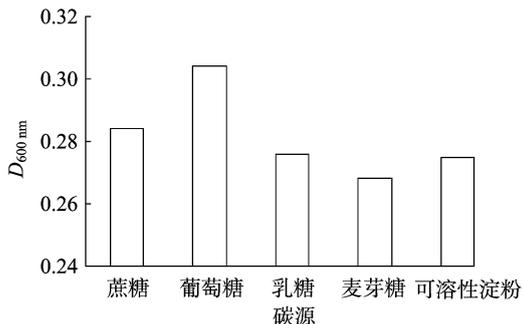


图4 不同碳源对菌株 GC-38 生长的影响

2.4.4 氮源筛选 将 GC-38 菌株的种子液按 4 mL 的接种量,接种到 250 mL、pH 值为 9 的氮源培养基中,140 r/min、35 °C 恒温振荡培养 20 h,测定其 $D_{600\text{ nm}}$ 。由图 5 可知,蛋白胨为氮源时菌株的 $D_{600\text{ nm}}$ 最高,即菌株生长量最大,因此,确定最适氮源为蛋白胨。

3 讨论

20 世纪 90 年代以来,越来越多的人开始关注生物防治,

用于生物防治的微生物有很多,主要包括真菌、细菌、放线菌、病毒等。易龙等从烟草病株提取出对烟草赤星病菌有明显抑制作用的拮抗内生细菌 *Ttb162*^[8]。刘鑫海等从甜瓜表面分离得到的假单胞菌对甜瓜枯萎病的生防效果较好^[9]。唐圣华等从烟草根际土壤中分离得到的一株枯草芽孢杆菌对烟草赤星病有较好的防效^[10]。

近年来,芽孢杆菌用于病害防治的研究较多,某些芽孢杆菌不仅能防病而且在防病的同时还能促进作物的生长,使作物的产量得到显著的增加^[11-12]。朱晓飞等从土壤中筛选出的解淀粉芽孢杆菌对水稻纹枯病的抑制率高于 70%^[13]。本研究筛选的 GC-38 解淀粉芽孢杆菌对烟草黑胫病具有较好的抑菌活性,这在此前还未见报道,但解淀粉芽孢杆菌对烟草黑胫病病原菌的抑制机理及大田防治效果还有待进一步研究。

参考文献:

[1] 孔凡玉,朱贤朝. 我国烟草侵染性病害发生趋势原因及防治对策[J]. 中国烟草科学,1995(1):31-34.
 [2] 陈瑞泰,朱贤朝. 全国 16 个主产烟省(区)烟草侵染性病害调研报告[J]. 中国烟草科学,1997,18(4):1-7.
 [3] 李勇,朱晓伟,张定志. 几种药剂防治烟草黑胫病田间试验[J]. 植物医生,2012(1):35-37.
 [4] 袁宗胜,张广民,刘延荣,等. 烟草黑胫病菌对甲霜灵的敏感性测定[J]. 中国烟草科学,2001,22(4):9-12.
 [5] 秦春娥,别运清. 微生物及其应用[M]. 武汉:湖北科学技术出版社,2008.
 [6] 布坎南 R E,吉本斯 N E. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 8 版.北京:科学出版社,1984.
 [7] 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.
 [8] 易龙,肖崇刚,马冠华,等. 防治烟草赤星病有益内生细菌的筛选及抑菌作用[J]. 微生物学报,2004,44(1):19-22.
 [9] 刘鑫海,王祺,周洪友. 甜瓜采后病害生防细菌的鉴定及生理生化特性测定[J]. 华北农学报,2008,23(3):185-189.
 [10] 唐圣华,万秀清,郭兆奎,等. 烟草赤星病拮抗生防菌 BS06-1 的筛选[J]. 安徽农业科学,2008,36(35):15564-15565.
 [11] 陈中义,张杰,黄大防. 植物病害生防芽孢杆菌抗菌机制与遗传改良研究[J]. 植物病理学报,2003,33(2):97-103.
 [12] 范瑛阁,李莎,赵静,等. 枯草芽孢杆菌 H1 和 H2 对黄瓜的促生作用[J]. 江苏农业科学,2015,43(7):158-161.
 [13] 朱晓飞,张晓霞,牛永春,等. 一株抗水稻纹枯病菌的解淀粉芽孢杆菌分离与鉴定[J]. 微生物学报,2011,51(8):1128-1133.