

# 苹果轮纹病拮抗细菌 R8 发酵条件的初步研究

杨 华<sup>1,2</sup>, 纪明山<sup>1</sup>, 张广仁<sup>2</sup>

(1. 沈阳农业大学, 辽宁 沈阳 110160 2 辽宁省果树科学研究所, 辽宁 营口 115009)

中图分类号: S 436.611.1<sup>+</sup>9 文献标识码: A 文章编号: 1001—0009(2007)12—0219—02

苹果轮纹病 (*Macrophoma kawatsukai*) 主要为害果实、枝干, 也能为害叶片。该病在我国各苹果产区均有发生, 在以苹果生产为支柱产业的辽宁和山东两省发生尤其严重。重病树枝干上病斑累累, 树势衰弱, 甚至造成枝干枯死; 果实受害后腐烂, 病果率 30% 以上, 贮藏 1 个月后病果率可以达到 50% 以上, 严重影响产量和质量。生产上一直应用多菌灵来防治, 防治倍数由最初的 800 ~ 1 000 倍提高到现在 500 倍左右, 病菌对多菌灵已经产生了明显的抗性。赵白鸽和辛玉成等筛选出对轮纹病有抑制作用的拮抗菌, 但对拮抗菌的发酵条件研究不多。国外在生物防治轮纹病的方面报道也较少。

拮抗细菌 (*Bacillus sp.*) R8 从土壤中分离得到, 室内平板对峙测定结果表明对苹果轮纹病有较强的抑制作用, 抑菌带宽度达到 10 mm 以上。试验将筛选出的拮抗细菌 R8 的发酵条件进行优化, 得到最佳发酵培养基配方, 同时确定最佳发酵条件, 从而为进一步的中试放大及大规模生产提供必要的前提。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株

拮抗细菌 (*Bacillus sp.*) R8 从土壤中分离得到, 苹果轮纹病菌从病果上分离得到。

### 1.2 培养基

真菌培养基 PDA: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL; 细菌培养基 NA: 牛肉浸膏 3 g, 蛋白胨 10 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL; 原始发酵培养基 NB: 蛋白胨 10 g, 牛肉浸膏 10 g, NaCl 5 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.3; 供试培养基 NB; YSP (酵母浸膏 5 g, 蔗糖 20 g, 蛋白胨 10 g); NYBD (牛肉浸膏 8 g, 酵母浸膏

第一作者简介: 杨华 (1974-), 女, 辽宁营口人, 助理研究员, 在读硕士, 主要从事果树病害生物防治研究, 中国植物保护学会会员。  
E-mail: yanghua007@yahoo.com.cn.  
通讯作者: 纪明山。  
收稿日期: 2007—06—28

[3] Algam S A, Xie G L. Comprative performance of Bacillus spp. in growth promotion and suppression of tomato baxterial wilt caused by Ralstonia solanacearum soad[J]. Journal of Zhe jiang University( Agric. & life sci.), 2004, 30(6): 603-610.  
[4] 唐丽娟, 纪兆林, 徐敬友, 等. 地衣芽孢杆菌 W10 对灰葡萄的抑制作

用及其抗菌物质[J]. 2005 21(3): 203-205.  
[5] 陈年春. 农药生物测定技术[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1991: 168.  
[6] 陈中义, 张杰, 黄大昉. 植物病害生防芽孢杆菌机制与遗传改良研究[J]. 植物病理学报 2003 33(2): 97-100.

## Preliminary Study of Fermental Condition of *Bacillus sp.* Antagonistic to *Phytophthora capsici*

XIAO Shu-qin, XUE Chun-sheng, ZHOU Xue, CAO Yuan-yin

(Plant Immunity Institute, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161, China)

**Abstract:** The fermental condition influence on the inhibitory effect of *Bacillus sp.* BS18 antagonistic to *Phytophthora capsici* was studied. Through culture condition and orthogonal tests, we obtained an optimal medium composition: beef extract 2%, tryptone 2%, maltose 1%, NaCl 0.1%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3%; when the strain was cultured with conditions as following: initial pH 7.0~7.5, inoculation level 2%, 130 r/min shake revolutions with 30 mL medium in 250 mL flask. Culture temperature was 30℃ and culture time was 48 hours. The diameter of inhibition zone reached 2.85 cm.

**Key words:** *Bacillus sp.* BS18; Fermental condition; Inhibition; *Phytophthora capsici*

5g, 葡萄糖 10 g); CM 培养基(蛋白胨 10 g, 牛肉浸膏 3 g, pH 7.2~7.4); LB(胰蛋白胨 10 g, 酵母浸膏 5 g, NaCl 10 g pH 7.4)。

1.3 培养方法

1.3.1 菌种活化 将斜面保存的 R8 在 NA 平板上活化, 24 h 后挑取一环接入 20 mL NB 液体培养基中, 28℃, 130 r·min<sup>-1</sup> 培养 24 h, 制成浓度为 108 cfu·mL<sup>-1</sup> 的种子液。

1.3.2 基础培养基的选择 将种子液以 1:20 的比例接种于 100 mL 不同供试液体培养基中, 28℃, 130 r·min<sup>-1</sup> 培养 24 h、48 h 和 72 h 后分别进行菌体产生量的测定, 以确定基础培养基。

1.3.3 培养条件的优化 采用正交试验设计, 测定 pH、温度、装液量、初始接菌量和发酵时间 5 个因素在 4 个水平上对拮抗菌菌体产生量的影响

1.4 拮抗菌菌体产生量的测定

采用 UV2000 分光光度计测定发酵培养液在 600 nm 处的吸光值, 并且设不接菌培养液为对照。根据吸光值大小, 确定拮抗菌生长量及其营养要求和最佳发酵配方。

2 结果与分析

2.1 基础培养基的确定

试验结果见图 1。在供试的 5 种培养基中, 由于培养基各自成分的不同, 拮抗生防菌株 R8 发酵后, 菌体产生量也不同。其中在 YSP 培养基中菌体产生量最多, CM 培养基中菌体产生量最少, 说明 R8 细菌菌株在 YSP 培养基中能较好生长, 因此选择 YSP 为基础培养基。

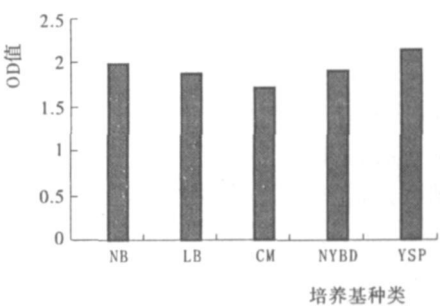


图 1 不同培养条件对拮抗菌菌体产生量的影响

2.2 不同培养条件对拮抗菌菌体产生量的影响

表 1 不同培养条件对拮抗菌菌体产生量的影响								
试验号	温度/℃	pH	通气量	初始接菌量/%	发酵时间/h	OD 值	5%显著性	1%显著性
1	22	4.0	40	0.5	24	0.058	j	H
2	22	5.5	80	5.0	48	2.251	ab	A
3	22	7.0	120	15.0	72	2.002	de	CD
4	22	8.5	160	30.0	96	2.009	d	CD
5	25	4.0	80	15.0	96	0.111	j	H
6	25	5.5	40	0.5	72	2.111	e	BC
7	25	7.0	160	0.5	48	1.883	f	DE
8	25	8.5	120	5.0	24	1.523	h	F
9	28	4.0	120	30.0	48	0.322	j	G
10	28	5.5	120	15.0	24	1.887	f	DE
11	28	7.0	40	5.0	96	2.267	a	A
12	28	8.5	80	0.5	72	2.155	bc	AB
13	31	4.0	160	5.0	72	0.034	j	H
14	31	5.5	120	0.5	96	1.902	ef	DE
15	31	7.0	80	30.0	24	1.765	g	E
16	31	8.5	40	15.0	48	1.941	def	D

注 相同字母表示在 P=0.05 或 P=0.01 水平上差异不显著。

试验结果见表 1。可以看出, 当 R8 在温度为 28℃, pH 为 7.0, 在 250 mL 三角瓶中装 40 mL 液体培养基, 接种量为 5%(v/v), 培养时间 96 h 时, 菌体生长量最大。

3 结论与讨论

利用拮抗菌生物防治植物病害是当今植病界十分活跃的研究领域之一, 并已显示出良好的应用前景。在利用拮抗菌进行生物防治的过程中, 获得尽可能多的产量对工业化生产是十分重要的, 对拮抗菌菌株及发

酵条件的初步研究为发酵工艺的研究打下良好的基础, 对将来的工业化生产提供重要参考。

试验研究结果表明, 在含酵母浸膏 5 g, 蔗糖 20 g, 蛋白胨 10 g 的 1000 mL YSP 液体培养基中, 菌体生长量最大; 当温度为 28℃, pH 为 7.0, 通气量和接种量小, 发酵培养 96 h 时, 菌体生长量最大。因此可以推断该菌株为一种好氧菌, 适宜的培养液接近中性, 所以在生产上要注意发酵培养液的 pH 值和通气量。