

# 抗草莓灰霉病的芽孢杆菌 CM3 的分离与筛选

黄 静, 赵 佳, 陈 哲, 梁 宏

(山西省农业科学院 生物技术研究中心, 山西 太原 030031)

**摘 要:**以发病草莓根际土壤为分离对象,采用平板稀释法及平板对峙法,分离并鉴定抗草莓灰霉病的病原菌。结果表明:从土壤中分离到 1 株对草莓灰霉病具有明显抑菌作用的细菌,通过形态、生理生化特性分析以及 16S rDNA 序列同源性比较,鉴定该菌株为解淀粉芽孢杆菌,命名为 CM3。菌株 CM3 的发酵产物对温度、酸碱度和紫外线均不敏感,储存多天后仍能保持抑菌活性。

**关键词:**草莓灰霉病;解淀粉芽孢杆菌;抑菌能力;发酵产物

**中图分类号:**S 668.403.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)11-0113-04

灰霉病是由半知菌亚门葡萄孢属的灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)侵染所引起的一种普遍性植物病害,是危害设施蔬菜、瓜果和花卉生产和储藏的重要病害之一,严重影响瓜果蔬菜的产量和品质,给设施农业造成巨大的经济损失<sup>[1]</sup>。灰霉病侵染的宿主比较广泛,大多数寄主属于双子叶植物,例如草莓。草莓灰霉病是导致温室草莓产量和质量降低的主要因素之一。连续多年在室内种植,极易引起病原病害的逐年积累,导致灰霉病的危害程度不断加重,造成草莓的产量下降和品质降低<sup>[2]</sup>。目前,防治温室内草莓灰霉病主要以化学手段为主,包括硫磺、多菌灵和百菌清等。化学药剂的使用势必会产生农药残留的问题,威胁人类的健康,同时由于长期喷洒农药会造成灰霉病原菌产生抗性,这样一来化学防治的优势就会下降。

因此,研究开发环保绿色的微生物制剂来防治草莓灰霉病已成为当前研究的热点。已有研究表明一些真菌和细菌能够有效防治草莓灰霉病,如酵母菌<sup>[3]</sup>、木霉菌<sup>[4]</sup>和芽孢杆菌<sup>[5]</sup>等芽孢杆菌属中的解淀粉芽孢杆菌的抑菌谱广,抑菌效果好,对多种植物病原真菌都有抑菌效果<sup>[6]</sup>。现从感病草莓根际土壤中筛选鉴定出 1 株解淀粉芽孢杆菌,采用平板稀释法和对峙平板法等进行抑菌效果试验。此外,对菌株的发酵上清液进行了性质

分析,发现其发酵产物性质稳定,极适合作为微生物制剂进行开发应用。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试拮抗菌分离自发病草莓植株根际采集的土壤样品,共计 600 份。供试草莓灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)由山西省农业科学院农产品质量安全与检测研究所提供,经柯赫氏法则证明为草莓灰霉病病原菌。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 土壤样品中菌株的分离和纯化** 采用平板稀释法。将 1 g 土壤加入 100 mL 蒸馏水中,制备土壤悬浊液,分别稀释获得浓度为  $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$  (W/V) 的样品溶液,分别移取 0.1 mL 样品溶液涂布于固体初筛培养基平板上,30 °C 培养 24 h。根据菌落的大小、形状、质地、颜色、光泽、透明度等培养特征,挑取不同形态的单菌落于 PDA 平板上划线纯化。30 °C 培养 48 h,4 °C 冰箱保存备用,作为待测原始菌株。

**1.2.2 草莓灰霉菌拮抗菌的筛选** 初筛采用平板对峙法。用灭菌的牙签挑取纯化好的菌种点接在距平皿中心 3 cm 处的 4 个角点上,30 °C 培养 1~2 d。用打孔器取活化的病原菌菌饼置于 PDA 平板中央,22 °C 培养 3~5 d 后测量抑菌半径。每处理设 3 次重复,以只接种病原菌的平板作对照,观察病原菌的生长状态,选出对病原菌生长有抑制作用,且被抑病原菌丝边缘平齐、拮抗作用持久的菌株。复筛:进入复筛的菌株,采用双层平板牛津杯法测定其发酵滤液的抑菌活性。在平皿上先铺一层素琼脂,根据需要放置好牛津杯。将菌悬液(稀释后的病原菌发酵液)倒入恒温约 50 °C 的灭菌 PDA 培养基(含有 0.8% 的琼脂)中,混匀后铺

**第一作者简介:**黄静(1965-),女,本科,助理研究员,现主要从事拮抗菌抑菌物质开发等研究工作。E-mail:362948115@qq.com.

**责任作者:**梁宏(1964-),男,本科,副研究员,研究方向为微生物学。E-mail:yankunchen2015@163.com.

**基金项目:**山西省农业科学院科技攻关资助项目(YGG1414);山西省科技自主创新能力提升资助项目(2015zzcx-22)。

**收稿日期:**2015-12-16

板。待完全冷却后将牛津杯取出,制成含有病原菌的 PDA 平板。将拮抗菌株的发酵滤液加入小孔内,以 PDA 培养基作为对照,培养 2 d 后,用十字交叉法测量抑菌圈直径。

1.2.3 拮抗菌的鉴定 形态特征观察:拮抗菌株的形态特征分析参照《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[7]</sup>。16S rDNA 序列分析:提取菌株的基因组总 DNA。16S rDNA 的克隆采用细菌的通用引物 27F(AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG) 和 1492R(GGT TAC CTT GTT ACG ACT T) 进行 PCR 扩增。扩增产物送至上海生工测序,测序后获得的 16S rDNA 序列在 NCBI 网站用 Blast 进行序列比对分析。

### 1.3 项目测定

发酵滤液抑菌活性的测定:采用双层平板牛津杯法,测量抑菌圈直径并记录试验结果。

储存时间对抑菌活性的影响:将发酵滤液于 4℃ 下分别储存 1、2、3、4、5 d,以新鲜滤液为对照,测定抑菌活性。

温度对抑菌活性的影响:将发酵滤液分别置于 30~100℃(间隔为 10℃),保温 60 min,在室温下平衡 5 min 后,以未经温度处理的发酵滤液作为对照,测定抑菌活性。

pH 对抑菌活性的影响:将发酵滤液分别用 1 mol·L<sup>-1</sup> HCl 或 0.5 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 调节 pH 至 3、4、5、6、7、8、9、10,处理 1 h 后,再将 pH 调至 7.0(初始发酵滤液 pH 7.0),以未经处理的发酵滤液为对照,测定抑菌活性。

紫外线对抑菌活性的影响:将 4 mL 发酵滤液置于无菌培养皿中,经 30 W 的紫外灯照射 4 h 后放置于黑暗 15 min,以未经处理的发酵滤液作为对照,检测紫外线处理前后发酵滤液的抑菌活性。

## 2 结果与分析

### 2.1 拮抗菌的分离与筛选

从榆次、清徐的草莓种植大棚中采集回来的土壤样品中共分离得到 79 株细菌菌株。通过平板对峙法的初筛以及双层平板牛津杯法的复筛,最终选定 1 株拮抗效果明显且作用稳定的菌株(图 1),命名为 CM3。

### 2.2 拮抗菌 CM3 的鉴定结果

2.2.1 形态特征观察 菌株 CM3(图 1)在 PDA 培养基上呈白色不透明菌落,中央突起有隆起,菌落边缘不规则;菌体革兰氏染色阳性,直杆状,可形成芽孢。

2.2.2 生理生化试验 由表 1 可知,与《伯杰氏细菌鉴定手册》及《常见细菌系统鉴定手册》描述的解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)的生理生化特征基本相同,初步鉴定为解淀粉芽孢杆菌。

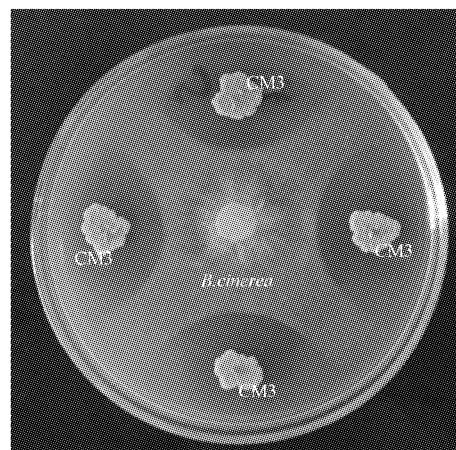


图 1 菌株 CM3 对草莓灰霉病的抑制作用

Fig. 1 Inhibitory activity of strain CM3 on *Botrytis cinerea*

表 1 解淀粉芽孢杆菌 CM3 的生理生化鉴定结果

Table 1 Physiological-biochemical testing and identification of the strain CM3

鉴定特征 Characteristic	菌株 CM3 Strain CM3	解淀粉芽孢杆菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
革兰氏染色 Gram stain	+	+
硝酸盐 Nitrate	+	+
淀粉水解 Amylum hydrolysis	+	+
氧化酶 Oxidase	-	-
接触酶 Catalase	+	+
芽孢染色 Gemma stain	+	+
形状 Shape	杆状	杆状
VP 测定 VP test	+	+

2.2.3 16S rDNA 序列测定及系统进化分析 以菌株 CM3 的总 DNA 为模板,PCR 扩增出一条约 1.5 kb DNA 片段。菌株 CM3 的 16S rDNA 片段测序结果表明,该片段全长为 1 512 bp。将测定的序列用 Blast 软件与 GenBank 中已知的 16S rDNA 进行同源性比较,通过比对发现菌株 CM3 与 *Bacillus amyloliquefaciens*(登录号:CP004065.1、CP006890.1、CP007165.1 和 HQ407277.1)的同源性均为 99%。结合形态学和生理生化特征指标,确定菌株 CM3 为解淀粉芽孢杆菌。

### 2.3 拮抗菌 CM3 发酵滤液的理化性质研究

2.3.1 储存时间的影响 菌株 CM3 的发酵滤液在 4℃ 下,放置 1、2、3、4、5 d 后,测定其抑菌效果。由图 2 可知,随着放置时间的增加,发酵滤液的抑菌圈直径显现缓慢减少的趋势。放置时间在 4 d 之内,发酵滤液的抑菌能力与对照相比没有显著减弱,均保持在对照组的 95%,而从放置 5 d 开始,其抑菌能力下降到对照的 90% 以下。结果表明,菌株 CM3 的发酵滤液性质比较稳定,存放 4 d 后还能保持良好的抑菌效果,大大增加了其作为微生物制剂开发的可能性。

2.3.2 对热的稳定性 菌株 CM3 的发酵滤液在不同温度下处理 30 min 后,测定的抑菌活性。由图 3 可知,随

着温度的逐步升高,发酵滤液对于草莓灰霉病原菌的抑菌能力呈现缓慢下降趋势。在 30~100 ℃,发酵滤液的抑菌能力受温度的影响较弱,与对照相比并没有显著性差异,均保持为对照的 90% 以上,而且不同温度之间的抑菌能力也没有显著差异。表明菌株 CM3 产生的发酵滤液对温度较为稳定,说明菌株 CM3 发酵产生的抑菌物质中蛋白质成分很少,大多数成分可能是较为稳定的脂肽类物质或者聚酮类物质<sup>[8-10]</sup>。

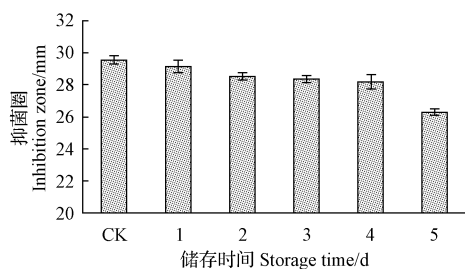


图2 储存时间对菌株 CM3 发酵滤液抑菌活性的影响

Fig. 2 Effect of storage time on antagonistic activities of CM3

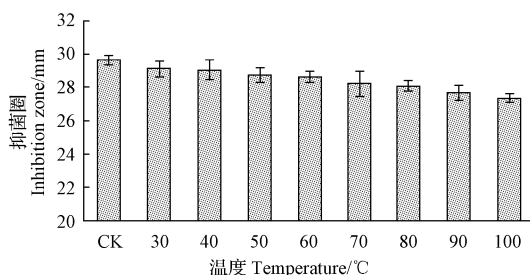


图3 温度对菌株 CM3 发酵滤液抑菌活性的影响

Fig. 3 Effect of temperature on antagonistic activities of CM3

2.3.3 对酸碱的稳定性 菌株 CM3 的发酵滤液在室温下经过不同 pH 处理后,其抑菌圈直径见图 4, pH 7 时,菌株 CM3 的发酵滤液对草莓灰霉病菌的抑菌活性最强。因为菌株 CM3 发酵滤液的初始 pH 为 7,所以在 pH 7 条件下处理 30 min 并没有对其抑菌活性造成影响。在 pH 6 和 pH 8 处理后,抑菌圈大小仅仅下降到了 pH 7 的 97%,说明在此 pH 范围内,发酵滤液的活性受 pH 的影响很小。当 pH 为 3~5 或 9~10 时,发酵滤液的活性发生下降,但是并没有显著性差异;即便是在 pH 3 和 pH 10 的条件下,抑菌圈的大小也仅仅降低到 pH 7 的 77.8%,仍保留着较好的抑菌活性。结果表明,菌株 CM3 的发酵滤液对酸碱具有比较高的耐性,进一步说明了发酵液中的抑菌成分可能多是脂肽类物质或者聚酮类物质<sup>[11]</sup>。

2.3.4 对紫外线的稳定性 菌株 CM3 的发酵滤液经紫外灯(功率:20 W;强度:60  $\mu\text{W} \cdot \text{cm}^{-2}$ )照射 4 h 后,其抑菌活性略有下降,降低为未处理菌株的 97.0%(图 5),可以说菌株 CM3 发酵滤液对紫外线不敏感。

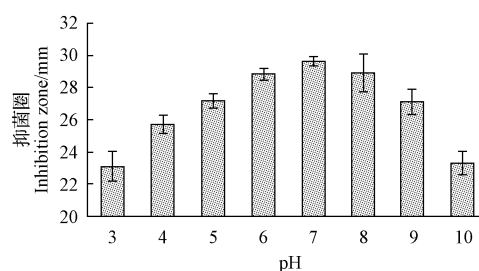


图4 pH 对菌株 CM3 发酵滤液抑菌活性的影响

Fig. 4 Effect of pH treatments on antagonistic activities of CM3

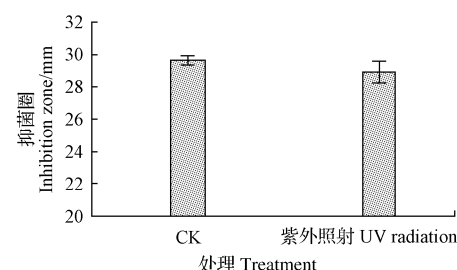


图5 紫外照射对菌株 CM3 的发酵滤液抑菌活性的影响

Fig. 5 Effect of UV radiation on antagonistic activity of CM3

### 3 讨论

灰霉病是影响草莓生产和储藏的主要病害之一,是由灰葡萄孢菌侵染所造成的。灰葡萄孢菌能以菌丝、分生孢子及菌核多种感染模式侵染植物,寄主范围十分广泛。该病原菌在侵染过程中通过信号转导途径调控与致病相关的基因和蛋白表达,产生毒素,分泌胞外水解酶,共同协同作用完成致病过程<sup>[12]</sup>。

长期以来,对于草莓灰霉病的防治主要以化学防治为主,但化学防治带来了诸多问题,环境的污染、农药的残留,食品的安全性问题等。同时,由于长期使用同种类型的杀菌剂势必会导致病原菌产生一定的抗药性。解决这一问题的主要途径就是寻找出能够抑制病原菌生长且对环境友好的新型环保型生物杀菌剂。至今,人们已经研究了许多可以抑制植物病原菌生长的真菌和细菌,例如酵母菌<sup>[13-14]</sup>、木霉菌<sup>[15-16]</sup>、枯草芽孢杆菌<sup>[17]</sup>、解淀粉芽孢杆菌<sup>[18]</sup>等,其中部分拮抗菌被开发成生物制剂用来进行病害防治的研究。

该试验从草莓灰霉病病株的根际土壤中筛选到了 1 株抑制草莓灰霉病效果明显的细菌,通过生理生化试验以及分子生物学水平的鉴定,认为该拮抗菌株为解淀粉芽孢杆菌,将其命名为 CM3。试验表明,菌株 CM3 以发酵液存在能够产生抑制灰霉病菌生长的拮抗成分;对其发酵液进行研究发现,发酵液中的拮抗物质对温度、酸碱度较稳定,对紫外线不敏感,并且在存放多天后还能够保持一定的抑菌能力,说明菌株 CM3 发酵产生的



抑菌成分有稳定的性能及较强的环境适应性,这些性质有利于菌株 CM3 被开发成微生物制剂,用来进行草莓灰霉病的生物防治<sup>[19-21]</sup>。

虽然,微生物制剂以抑菌谱范围广,对环境安全等特点已经受到了人们的重视,但由于其存在防治效果低,容易受环境条件的影响等劣势,在植物病害防治中并不能够完全替代化学杀菌剂的作用<sup>[22]</sup>。所以,不仅要加强开发抑菌效果好的微生物制剂,还要努力研究如何将微生物制剂与化学方法有效的结合起来<sup>[23]</sup>,利用二者的协同增效作用来产生 1+1>2 的防治效果,既提高了微生物制剂的防治效果,又减少化学农药的使用量,而且交替用药又能够避免灰霉病菌对药剂产生抗性,保证了良好的防治效果,可以认为,药剂协同增效防治将成为综合治理温室草莓灰霉病最具潜力的研究热点。

### 参考文献

- [1] ZHANG H Y, YANG Q Y, LIN H T, et al. Phytic acid enhances biocontrol efficacy of *Rhodotorula mucilaginosa* against postharvest gray mold spoilage and natural spoilage of strawberries[J]. LWT-Food Science and Technology, 2013, 52: 110-115.
- [2] HUANG R, CHE H J, ZHANG J, et al. Evaluation of *Sporidiobolus parvoseus* strain YCXT3 as biocontrol agent of *Botrytis cinerea* on post-harvest strawberry fruits[J]. Biological Control, 2012, 62: 53-63.
- [3] 黄蓉. 防治草莓灰霉病酵母菌株筛选及防病机制研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2011.
- [4] 马华升, 廖益民, 阮松林, 等. 绿色木霉菌株 HZ0501 对草莓灰霉病的防效研究[J]. 杭州农业与科技, 2010(1): 27-28.
- [5] WANG P P, GUO Q G, MA Y N, et al. DegQ regulates the production of fengycins and biofilm formation of the biocontrol agent *Bacillus subtilis* NCD-2[J]. Microbiological Research, 2015, 178: 42-50.
- [6] 陈哲, 黄静, 赵佳, 等. 解淀粉芽孢杆菌拮抗成分的研究进展[J]. 生物技术通报, 2015, 31(6): 37-41.
- [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] XU Z H, SHAO J H, LI B, et al. Contribution of bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to antifungal activity and biofilm formation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(3): 808-815.
- [9] ARREBOLA E, JACOBS R, KORSTEN L. Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 108: 386-395.
- [10] MANZOOOR S, NIAZI A, BEJAI S, et al. Genome sequence of a plant-Associated bacterium, *Bacillus amyloliquefaciens* strain UCMB5036 [J]. Genome Announcements, 2013, 1(2): e0011113.
- [11] LEE S, KIM S, PARK I, et al. Isolation and structural analysis of bamylocin A, novel lipopeptide from *Bacillus amyloliquefaciens* LP03 having antagonistic and crude oil-emulsifying activity[J]. Arch Microbiol, 2007, 188: 307-312.
- [12] 赵红霞, 苟萍. 灰葡萄孢菌致病机理研究进展[J]. 生物技术, 2014, 24(1): 100-103.
- [13] 李若晨. 间型假丝酵母 C410 防治番茄灰霉病的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.
- [14] 黄蓉, 杨龙, 张静, 等. 出芽短梗霉菌株 YW1 防治储藏期草莓灰霉病的研究[J]. 中国生物防治学报, 2013, 29(4): 531-537.
- [15] 黄亚丽, 王淑霞, 杜晓哲, 等. 一株具有诱导抗性木霉菌株的筛选及其对黄瓜灰霉病诱导抗性的初步研究[J]. 植物保护, 2013, 39(1): 38-43.
- [16] 陈娟, 王承芳, 黄杰峰, 等. 木霉菌制剂防治草莓苗期炭疽病效果研究[J]. 现代农业科技, 2015(7): 115-119.
- [17] 刘刚, 杨雪, 梅雪然, 等. 枯草芽孢杆菌 Loq18 抗菌蛋白的分离纯化及其对灰葡萄孢的抑制活性[J]. 四川师范大学学报(自然科学版), 2015, 38(1): 119-125.
- [18] 王晓辉, 王贵鹏, 张庆芳, 等. 一株抗灰霉病解淀粉芽孢杆菌的筛选鉴定及抑菌蛋白的分离[J]. 吉林农业科学, 2015, 40(1): 64-67.
- [19] 卜春亚, 孙晔, 张天蔚, 等. 一株草莓根腐尖孢镰刀菌拮抗内生细菌的分离鉴定及抑菌特性[J]. 应用与环境生物学报, 2014, 20(2): 300-304.
- [20] 陈召亮, 张辉, 张娜娜, 等. 拮抗菌 RY3 抗菌粗蛋白理化性质及其对柑橘绿霉病菌的抑菌活性[J]. 食品与机械, 2013, 29(6): 187-190.
- [21] 徐长安, 毛勇. 海洋生境枯草芽孢杆菌 LHB02 抗菌蛋白的分离纯化及部分特性分析[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2011, 50(5): 922-927.
- [22] 武雯, 成玮, 张顾旭, 等. 草莓灰霉病田间防治试验研究[J]. 上海农业科技, 2015(2): 132-133.
- [23] 申光辉, 薛泉宏, 陈秦, 等. 硅酸钾与密旋链霉菌 Act12 菌剂配施对连作草莓生长、果实产量及品质的影响[J]. 中国生态农业学报, 2012, 20(3): 315-321.

## Isolation and Identification of *Bacillus amyloliquefaciens* CM3 Against Strawberry Gray Mold

HUANG Jing, ZHAO Jia, CHEN Zhe, LIANG Hong

(Biotechnology Research Center, Shanxi Academy of Agriculture Science, Taiyuan, Shanxi 030031)

**Abstract:** Taking rhizosphere soil of pathogenetic strawberry as isolation object, using plate dilution and confrontation methods, the bacteria against strawberry gray mold was isolated and identified. The results showed that a new bacteria stain, named CM3, with high antifungal activity against *Botrytis cinerea* was isolated. According to its morphological, physiological and biochemical characteristics as well as 16S rRNA sequences, CM3 was identified as *Bacillus amyloliquefaciens*. The fermentation products of strain CM3 was not sensitive to the change of temperature, pH and the UV irradiation, and still could maintain the high antifungal activity after a few days. *Bacillus amyloliquefaciens* CM3 was an excellent biocontrol agent for strawberry gray mold.

**Keywords:** strawberry gray mold; *Bacillus amyloliquefaciens*; antibacterial ability; fermentation products