

DOI:10.11937/bfyy.201703030

一株黄瓜枯萎病拮抗菌的鉴定及 发酵培养基的优化

杜 宾

(太原学院 园艺系,山西 太原 030012)

摘 要:采用形态观察和生理生化特性检测方法,结合 16S rRNA 基因序列分析,将一株黄瓜枯萎病拮抗菌株 KC24 鉴定为类芽孢杆菌,并对其进行了抑菌谱测试。结果表明:KC24 能拮抗多种植物病原菌,具有广谱抗菌活性,利用响应面法对其产芽孢发酵培养基进行了优化,优化后的发酵液中芽孢数量达 13.5×10^8 cfu \cdot mL⁻¹,比优化前提高了 107.7%。最优产孢培养基配方为玉米粉 20 g,豆粕 5 g, KNO₃ 2.0 g, KH₂PO₄ 2.59 g, NaCl 1.0 g, (NH₄)₂SO₄ 2.04 g, FeSO₄ 0.009 1 g, MgSO₄ \cdot 7H₂O 1 g, H₂O 1 L, pH 7.0。

关键词:黄瓜枯萎病;类芽孢杆菌;响应面;芽孢

中图分类号:S 436.421.1⁺3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)03-0132-06

黄瓜枯萎病又被称为萎蔫病,是一种发病最为广泛的土传性真菌病害,其病原菌为黄瓜专化型尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)^[1-2]。黄瓜枯萎病在我国各地均有发生,发病率一般为 15%~25%,严重时达 60%~70%,有的甚至全田枯萎死亡,是黄瓜病害中的癌症^[3-5]。随着我国黄瓜种植面积的不断增加,黄瓜枯萎病的危害日益严重,已制约黄瓜产业化发展。

利用含拮抗功能微生物的生物农药进行生物防治,其高效、无毒、无污染,环保优势明显^[6]。卢彩鸽等^[7]从 172 个细菌菌株中筛选到一株对甘蓝枯萎病有较强抑制作用的拮抗菌株,鉴定为解淀粉芽孢杆菌。王小慧等^[8]筛选到一株能拮抗西瓜枯萎病菌的类芽孢杆菌 Cy5,并将其与已腐熟的有机肥制成生物有机肥,西瓜枯萎病防治率达 75%。拮抗微生物表现出了良好的应用前景。

太原学院植物保护实验室经过多年试验,分离筛选到一株对黄瓜枯萎病菌具有显著抑制活性的拮抗菌 KC24,并对其鉴定及抑菌谱检测。在功能微生物工业化生产过程中,发酵液中的有效活菌量是评判产品质量的最重要指标^[9]。芽孢是芽孢杆菌

内生的一种抗逆休眠体,芽孢不新陈代谢,对高温、高压、高盐等各种逆境的抵抗力增强,方便运输与储存;且菌体存活时间长,使发酵产品的保质期显著增加^[10-11]。为了工业化应用拮抗功能菌 KC24,该研究对其产芽孢发酵培养基进行了优化,旨在为 KC24 发酵工艺的改进提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种菌株 KC24 由太原学院植物保护实验室分离保存。供试病原菌:黄瓜枯萎病菌、甜瓜枯萎病菌、西瓜枯萎病菌、番茄灰霉病菌与辣椒炭疽病菌由中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心提供。

1.1.2 培养基与试剂盒 NA 培养基、PDA 培养基配方见参考文献^[12],产孢发酵初始培养基:玉米粉 20 g,豆粕 5 g, KNO₃ 2.0 g, KH₂PO₄ 2.0 g, NaCl 1.0 g, (NH₄)₂SO₄ 1.5 g, FeSO₄ 0.005 g, MgSO₄ \cdot 7H₂O 1 g, H₂O 1 L, pH 7.0。细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自上海生工生物工程有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株 KC24 的鉴定 显微镜下对菌株 KC24 进行形态观察。生理生化检测参照文献^[13]进行。菌株 KC24 的 16S rRNA 基因序列测定与分析:用基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株 KC24 的基因组 DNA,利用通用引物 24f 5'-AGAGTTTGTACCTG-

作者简介:杜宾(1980-),男,山西太原人,硕士,讲师,研究方向为植物保护。E-mail:weiapple001@126.com.

收稿日期:2016-09-26

GCTCAG - 3' 与 1492r 5' - TACGGYTACCTTGT-TACGACTT - 3' 扩增基因组 DNA 的 16S rDNA 基因片段^[14-16]。PCR 反应采用 25 μ L 体系:10 \times 缓冲液 2.5 μ L; 2 μ L (25 mmol \cdot L⁻¹) MgCl₂; 4 μ L (1.25 mmol \cdot L⁻¹) dNTP; 2 μ L (100 μ mol \cdot L⁻¹) 引物; 0.4 μ L (5U \cdot μ L⁻¹) Taq 酶; DNA 模板 1 μ L (0.05~1.00 μ g \cdot μ L⁻¹); 去离子水 13.1 μ L。PCR 扩增条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min; 50 $^{\circ}$ C 退火 1 min; 72 $^{\circ}$ C 延伸 4 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min^[17-18]。16S rDNA 基因序列由上海生工生物工程有限公司进行测序。将测定得到的 16S rDNA 的序列与 NCBI 数据库中的相关序列进行比对分析。

1.2.2 菌株 KC24 的抑菌谱测定 选择黄瓜枯萎病菌、甜瓜枯萎病菌、西瓜枯萎病菌、番茄灰霉病菌与辣椒炭疽病菌作为指示病原菌, 利用平板对峙培养法检测菌株 KC24 的植物病原菌抑制能力。具体方法: 将保藏的植物病原菌进行活化并转接到 PDA 培养基平板上, 用灭菌打孔器(直径 5 mm)在病原菌菌

落边缘打孔, 菌片转接至新的 PDA 培养基平板中央, 30 $^{\circ}$ C 静置培养 24 h, 将菌株 KC24 点接在距离病菌片 20 mm 处, 4 次重复。30 $^{\circ}$ C 静置培养 48 h, 观察拮抗效果, 计算抑菌率^[19]。抑菌率(%)=(对照病原菌直径-对峙拮抗菌的病原菌直径)/对照病原菌直径 \times 100。

1.2.3 产孢发酵培养基的优化 发酵条件为 pH 7.0, 接种量 3%, 30 $^{\circ}$ C 培养 48 h。利用 Plackett-Burman 设计法, 选择培养基的 11 个成分(3 个空项估计试验误差), 15 组试验筛选影响芽孢产量的重要因子, 每个成分取高低 2 个水平(表 1), 以提高芽孢产量为目标对解淀粉芽孢杆菌 KC24 进行发酵培养基的优化^[10, 20-21]。根据试验结果, 安排重要因素浓度爬坡试验, 其它培养基成分按初始发酵培养基的浓度配比, 发酵完成后测定发酵液中的芽孢数量, 并最终确定重要因素浓度范围。通过 Box-Behnken 设计法, 利用 SAS 软件对 3 个重要因素设计 3 因素 3 水平共 15 个试验点的响应面分析(表 2)。

表 1 Plackett-Burman 试验设计因子与水平

Table 1 Factors and levels design of Plackett-Burman experiment		g \cdot L ⁻¹	
编号 Code	因子 Factor	水平 Level	
		-1	1
A	玉米粉	20	25
B	豆粕	5.00	6.25
C	空项	—	—
D	KNO ₃	2.0	2.5
E	KH ₂ PO ₄	2.0	2.5
F	空项	—	—
G	(NH ₄) ₂ SO ₄	1.5	1.9
H	NaCl	1.00	1.25
I	空项	—	—
J	FeSO ₄	0.005	0.007
K	MgSO ₄ \cdot 7H ₂ O	1.00	1.25

表 2 响应面分析的因素及水平

Table 2 Factors and levels of response surface analysis				
g \cdot L ⁻¹				
编号 Code	因素 Factor	水平 Level		
		-1	0	1
X1	(NH ₄) ₂ SO ₄	1.9	2.0	2.1
X2	FeSO ₄	0.008	0.009	0.010
X3	KH ₂ PO ₄	2.45	2.55	2.65

1.2.4 验证试验 在最优发酵条件下进行 3 次重复发酵试验, 测定发酵液中芽孢数量, 验证可靠性。芽孢数量检测: 发酵液样品于 80 $^{\circ}$ C 水浴 15 min, 然后取 1 mL 发酵液梯度稀释平板菌落计数, 计算发酵液中芽孢数量。

2 结果与分析

2.1 菌株 KC24 的形态及生理生化特性

菌株 KC24 革兰氏染色呈阳性, 菌体在显微镜下为杆状, 有鞭毛, 具有运动性, 好氧生长, 可形成内生芽孢, 在 NA 培养基上呈橘红色不透明菌落, 表面褶皱, 边缘不规则。对菌株 KC24 进行各项生理生化指标的检测(表 3)。

2.2 菌株 KC24 16S rRNA 序列测序与分析

经测序分析, 菌株 KC24 的 16S rRNA 的序列长度为 1 480 bp。将序列提交 GenBank 数据库, 获得序列号 KU230011。经过与相关基因序列比对, 菌株 KC24 与类芽孢杆菌的相似性达到 99%, 再将形态特

征与生理生化特性综合评价,将菌株 KC24 鉴定为类芽孢杆菌。

2.3 菌株 KC24 的抑菌谱测定

菌株 KC24 对植物病原菌抑制能力如图 1、表 4 所示,类芽孢杆菌 KC24 对黄瓜枯萎病菌、甜瓜枯萎病菌、西瓜枯萎病菌、番茄灰霉病菌与辣椒炭疽病菌均具有抑制作用,说明类芽孢杆菌 KC24 具有广谱抗菌性能。

表 3

菌株 KC24 生理生化特性

Table 3 Physiological and biochemical characteristics of strain KC24

特性 Characteristic	结果 Result	特性 Characteristic	结果 Result
革兰氏染色 Gram staining	+	孢子膨胀反应 Swelling spore	—
甲基红试验 Methyl red test	—	牛奶凝固反应 Milk solidification	+
需氧生长 Aerobic growth	+	牛奶胨化反应 Milk peptonization	+
厌氧生长 Anaerobic growth	—	淀粉水解反应 Starch hydrolysis	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	过氧化氢酶反应 Catalase	+
柠檬酸反应 Utilization of citrate	+	鸟氨酸反应 Ornithine decarboxyase	—
VP 试验 Voges-proskauer test	+	丙酮反应 Dihydroxyacetone	+
D-葡萄糖反应 D-glucose	+	吡啉反应 Indole production	—
D-木糖反应 D-xylose	+	蛋黄试验 Egg yolk test	—
D-甘露醇反应 D-mannitol	+	硫化氢试验 H ₂ S production	—
L-阿拉伯糖 L-arabinose	+	pH	5~9
乳糖反应 Lactose	+	生长温度范围 Growth temperature range/℃	15~55
葡萄糖产气反应 Gas from glucose	+	最适温度 Optimum temperature/℃	31
氧化酶反应 Oxidase	+	NaCl 耐受 Tolerance to NaCl/%	<10

注: + 表示反应结果呈阳性, — 表示反应结果呈阴性。

Note: + show positive response, — show negative response.

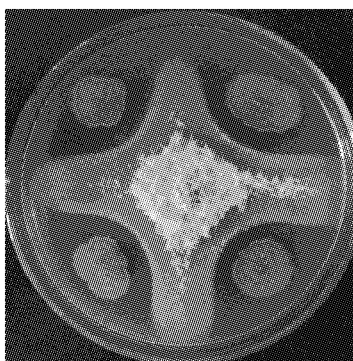


图 1 菌株 KC24 拮抗黄瓜枯萎病菌

Fig. 1 Strain KC24 against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*

表 4 菌株 KC24 的抑菌谱检测结果

Table 4 Results of antimicrobial spectrum of the strain KC24

病原菌 Pathogen	抑菌率 Inhibition rate/%
黄瓜枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	63.47±0.21
甜瓜枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>muskmelon</i>	48.25±0.19
西瓜枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	54.36±0.34
番茄灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i>	40.88±0.32
辣椒炭疽病菌 <i>Colletotrichum capsici</i>	47.54±0.36

2.4 Plackett-Burman 试验结果分析

测定培养基不同配比情况下发酵后的芽孢数量(表 5),利用 SAS 软件分析获得各因素水平及效应评价(表 6)。结果表明,各因素对发酵液中芽孢数量影响显著,排名前 3 位的依次是: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 > \text{FeSO}_4 > \text{KH}_2\text{PO}_4$,由此确定这 3 个因素为重要因素,进行下一步最陡爬坡路径试验。

2.5 爬坡试验结果

因素水平及效应评价说明, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 FeSO_4 和 KH_2PO_4 均为正效应因子,浓度设计应逐渐增大。为确定 3 种重要因素的最适浓度范围,进行爬坡路径试验(表 7)。结果表明,随着 3 种因子浓度的增加,发酵液中的芽孢数量呈现先升高而后下降的变化趋势。当发酵液浓度达到最大值 $12.9 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,3 种因素的浓度分别为: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 FeSO_4 $0.009 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 KH_2PO_4 $2.55 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,由此确

表 5 Plackett-Burman 试验设计与结果

Table 5 Plackett-Burman experimental design

试验点 Site	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	芽孢数量 Spore number / ($\times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$)
1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	7.3
2	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	7.0
3	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	9.1
4	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	5.4
5	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	5.6
6	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	7.7
7	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	6.5
8	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	7.9
9	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	8.2
10	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	8.8
11	1	1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	8.2
12	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	8.7

表 6 Plackett-Burman 各因素
水平的效应评价

Table 6 Effect analysis for factors and levels of
Plackett-Burman experiment

编号 Code	因素 Factor	误差 t	标准差 $Pr> t $	重要性排列 Arrange of importance
A	玉米粉	-0.974	0.498 6	7
B	豆粕	-1.310	0.351 3	6
D	KNO ₃	0.542	0.650 7	8
E	KH ₂ PO ₄	2.375	0.053 5	3
G	(NH ₄) ₂ SO ₄	6.989	0.004 0	1
H	NaCl	1.653	0.198 3	5
J	FeSO ₄	4.487	0.032 4	2
K	MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.056	0.116 8	4

表 7 最陡爬坡路径结果

Table 7 Results the steepest uphill path

编号 Code	(NH ₄) ₂ SO ₄ /(g·L ⁻¹)	FeSO ₄ /(g·L ⁻¹)	KH ₂ PO ₄ /(g·L ⁻¹)	芽孢数量 Spore number/(×10 ⁸ cfu·mL ⁻¹)
1	1.7	0.006	2.25	9.2
2	1.8	0.007	2.35	9.9
3	1.9	0.008	2.45	11.3
4	2.0	0.009	2.55	12.9
5	2.1	0.010	2.65	11.8

定最大响应值范围,并以这 3 个浓度值为中心点进行响应面分析。

2.6 响应面试验分析结果

根据 Box-Behnken 的 15 组试验数据(表 8)与回归分析结果(表 9)进行响应面分析,拟合的二次回归方程为 $Y_1 = -160.606 + 52.313.4X_1 + 46.513.3X_2 +$

$82.574.8X_3 - 4.632.185X_1^2 - 44.686.5X_2^2 - 60.853.7X_3^2 -$
 $535.688X_1X_2 - 3.807.86X_1X_3 + 7.558.829X_2X_3,$
 $R^2 = 0.988.6,$ 回归模型 P 值为 0.000 说明模型显著,失拟 P 值为 0.868,说明失拟不显著,模型没有失拟现象。根据回归方程做出不同因子的响应曲面图,由图 2 可知,响应曲面图存在最大值,对回归方程求偏导可得 3 种重要因素的最优值:(NH₄)₂SO₄ 2.04 g·L⁻¹, FeSO₄ 0.009 1 g·L⁻¹, KH₂PO₄ 2.59 g·L⁻¹, 预测的最大芽孢数为 13.4×10^8 cfu·mL⁻¹。以最优配比培养基,进行了 3 次重复试验,平均芽孢数量为 $(13.5 \pm 0.15) \times 10^8$ cfu·mL⁻¹,与预测值接近,证明了模型的有效性。

表 8 Box-Behnken 设计及结果

Table 8 Desgin and result of Box-Behnken

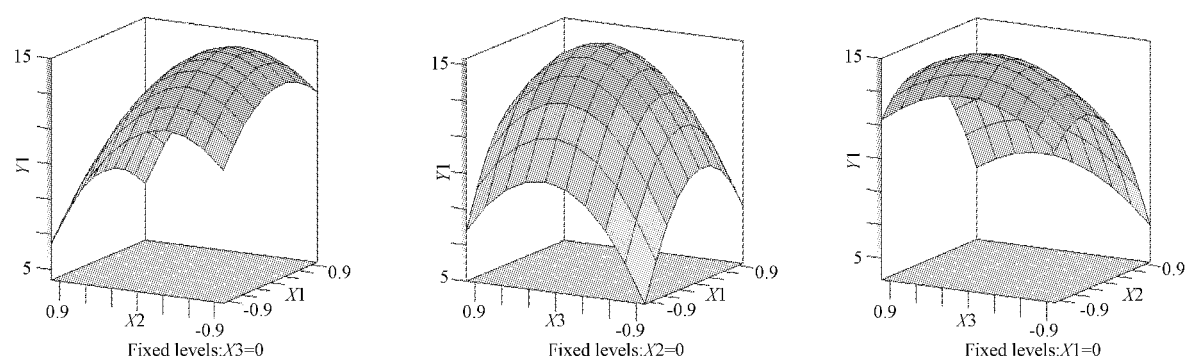
编号 Code	X1	X2	X3	芽孢数量 Spore number/(×10 ⁸ cfu·mL ⁻¹)
1	-1	-1	0	8.6
2	-1	0	-1	7.4
3	-1	0	1	11.7
4	-1	1	0	10.4
5	0	-1	-1	7.1
6	0	-1	1	9.9
7	0	1	-1	9.1
8	0	1	1	9.5
9	1	-1	0	7.0
10	1	0	-1	6.2
11	1	0	1	6.6
12	1	1	0	7.9
13	0	0	0	13.3
14	0	0	0	13.8
15	0	0	0	13.5

表 9 Box-Behnken 设计回归分析

Table 9 Regression analysis of Box-Behnken desgin

来源 Source	自由度 df	偏差平方和 Seq. SS	调整后的偏差平方和 Adj. SS	调整后的平均偏差平方和 Adj. MS	F 分布 F	可信度 P
回归模型 Regression model	9	169.685	169.685	18.579 3	50.30	0.000
线性 Linear	3	21.174	21.174	6.951 7	19.04	0.004
X1	1	5.235	5.235	5.230 4	13.98	0.012
X2	1	0.928	0.928	0.925 1	2.45	0.183
X3	1	15.462	15.462	15.462 8	40.02	0.002
平方 Square	3	144.235	144.235	48.004 6	128.14	0.000
X1×X1	1	63.366	78.692	78.692 0	210.38	0.000
X2×X2	1	22.943	21.056	21.056 4	78.17	0.000
X3×X3	1	58.169	58.169	58.168 5	152.66	0.000
交互作用 Interaction	3	4.488	4.488	1.588 2	4.27	0.061
X1×X2	1	0.067	0.067	0.067 5	0.22	0.479
X1×X3	1	3.460	3.460	3.460 1	9.73	0.025
X2×X3	1	0.926	0.926	0.926 8	2.25	0.158
残差误差 Residual error	5	0.156 3	0.156 3	0.312 6		
拟失 Lose	3	0.416	0.416	0.135 5	0.18	0.868
纯误差 Pure error	2	1.359	1.359	0.709 7		
合计 Combine	14	173.846				

$R^2 = 0.988.6$



注: X1. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; X2. FeSO_4 ; X3. KH_2PO_4 . Y1. 芽孢数量($\times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$)。
Note: X1. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; X2. FeSO_4 ; X3. KH_2PO_4 . Y1. Spore number($\times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$).

图2 3种重要因素的响应面分析

Fig. 2 Response surface analysis of three important factors

经试验优化后得到菌株 KC24 的产孢发酵培养基配方为玉米粉 20 g, 豆粕 5 g, KNO_3 2.0 g, KH_2PO_4 2.59 g, NaCl 1.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.04 g, FeSO_4 0.009 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g, H_2O 1 L, pH 7.0。

3 讨论与结论

芽孢杆菌在自然界广泛存在,能够内生芽孢,抗逆性好,繁殖能力强,且属于非致病菌,对环境零污染,非常适合开展规模化的工业生产。芽孢杆菌产生的抗菌活性物质大多为非核糖体合成的小分子多肽类抗菌物质,其热稳定性好,耐受蛋白酶的水解,在植物保护尤其是生物农药领域有非常好的应用前景^[22]。课题组经过多年试验分离筛选到的芽孢杆菌 KC24 属于广谱性拮抗菌,能够抑制多种植物病原菌,尤其对黄瓜枯萎病菌有强烈的拮抗作用(抑菌率 63.47%),经鉴定为类芽孢杆菌(*Paenibacillus jamilae*)。通过对类芽孢杆菌 KC24 的生理生化特性检测发现,该菌株在 pH 5~9,温度 15~55 $^{\circ}\text{C}$ 内均能生长,对环境要求不严苛,有利于存储运输,推广应用潜力巨大。

发酵培养基的优化是功能微生物实现工业化、规模化应用的必要环节。Plackett-Burman 设计配合响应面分析法能够从众多影响因素中筛选出最重要的几种因素,并能进一步对这些因素进行优化,且试验次数少、周期短,还能预测最优产量,在功能微生物发酵领域应用广泛。梁昌聪等^[23]利用响应面法优化了解淀粉芽孢杆菌 C101 的培养基,优化后发酵液中的芽孢数量达 14.69×10^8 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。李康乐等^[24]对响应面法优化泰乐菌素发酵培养基进行了研究,发现对泰乐菌素效价影响较大的 3 个重要因素分别为鱼粉、黄豆饼粉、油,响应面法优化后在鱼粉

10.46 g $\cdot \text{L}^{-1}$ 、黄豆饼粉 14.69 g $\cdot \text{L}^{-1}$ 、油 58 g $\cdot \text{L}^{-1}$ 的最优培养基下,泰乐菌素的产量可达 14 915 U $\cdot \text{mL}^{-1}$,比优化前提高了 15%,实测值与响应面预测值接近。这些结果均表明,响应面分析法是一种科学、合理的优化分析方法。

在功能微生物工业化生产过程中,发酵液中的有效活菌量是评判产品质量的最重要指标。但是有效活菌量会随着功能微生物菌剂保存时间的增长而降低,进而影响使用效果。保质期短是制约功能微生物制剂规模化应用的瓶颈。芽孢是芽孢杆菌内生的一种抗逆休眠体,芽孢不新陈代谢,对高温、高压、高盐等各种逆境的抵抗力增强,方便运输与储存;且菌体存活时间长,使发酵产品的保质期显著增加。该试验中,在经优化后的培养基配比下,类芽孢杆菌 KC24 的芽孢数量达 $13.5 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$,比优化前提高了 107.7%。为芽孢杆菌 KC24 的工业化应用奠定了基础。

该研究对一株黄瓜枯萎病拮抗菌 KC24 进行了鉴定,通过形态观察和生理生化特性检测,再结合 16S rRNA 基因序列分析,确定菌株 KC24 为类芽孢杆菌;并对其进行了抑菌谱测试,结果表明 KC24 能拮抗多种植物病原菌,具有广谱抗菌活性。利用响应面法对其产孢发酵培养基进行了优化,优化后的发酵液中芽孢数量达 $13.5 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$,比优化前提高了 107.7%。最优产孢培养基配方为玉米粉 20 g,豆粕 5 g, KNO_3 2.0 g, KH_2PO_4 2.59 g, NaCl 1.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.04 g, FeSO_4 0.009 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g, H_2O 1 L, pH 7.0。

参考文献

[1] 韦巧婕,郑新艳,邓开英,等. 黄瓜枯萎病拮抗菌的筛选鉴定及

其生物防效[J]. 南京农业大学学报, 2013, 36(1): 40-46.

[2] 郭晋云, 胡晓峰, 李勇, 等. 黄瓜枯萎病对黄瓜光合和水分生理特性的影响[J]. 南京农业大学学报, 2011, 34(1): 79-80.

[3] OMAR I, ONEILL T M, ROSSALL S. Biological control of *Fusarium* crown and root rot of tomato with antagonistic bacteria and integrated control when combined with the fungicide carbendazim[J]. Plant Pathology, 2006, 55: 92-99.

[4] CHUNG S, KONG H, BUYER J S, et al. Isolation and partial characterization of *Bacillus subtilis* ME488 for suppression of soilborne pathogens of cucumber and pepper[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 80: 115-123.

[5] PERSSON L. Abiotic characteristics of soils suppressive to *Aphanomyces* root rot[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2000, 32: 1141-1150.

[6] 肖爱萍, 游春平, 梁关平, 等. 香蕉枯萎病拮抗菌的筛选及其作用机制研究[J]. 植物保护, 2006, 32(4): 53-56.

[7] 卢彩鸽, 张殿朋, 刘伟成, 等. 一株甘蓝枯萎病拮抗细菌的筛选鉴定及其抑菌活性测定[J]. 华北农学报, 2014, 29(1): 195-202.

[8] 王小慧, 张国漪, 李蕊, 等. 拮抗菌强化的生物有机肥对西瓜枯萎病的防治作用[J]. 植物营养与肥料学报, 2013, 19(1): 223-231.

[9] 权春善, 王军华, 徐洪涛, 等. 一株抗真菌解淀粉芽孢杆菌的分离鉴定及其发酵条件的初步研究[J]. 微生物学报, 2006, 46(1): 7-12.

[10] 张荣胜, 梁雪杰, 刘永锋, 等. 解淀粉芽孢杆菌 Lx-11 生物发酵工艺优化[J]. 中国生物防治学报, 2013, 29(2): 254-262.

[11] TANYILDIZI M S, ELIBOL M, OZER D. Optimization of growth medium for the production of α -amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* using response surface methodology[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2006(4): 618-622.

[12] 沈萍, 范秀荣, 李广武. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 69-82.

社, 1999: 69-82.

[13] 权春善, 王军华, 徐洪涛, 等. 一株抗真菌解淀粉芽孢杆菌的分离鉴定及其发酵条件的初步研究[J]. 微生物学报, 2006, 46(1): 7-12.

[14] WILSON K H, BLITCHINGTON R B, GREENE R C. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1990, 28(9): 1942-1946.

[15] 程凯, 江欢欢, 沈标, 等. 棉花黄萎病拮抗菌的筛选及其生物防治效果[J]. 植物营养与肥料学报, 2011, 17(16): 166-173.

[16] 江欢欢, 程凯, 杨兴明, 等. 辣椒青枯病拮抗菌的筛选及其生物防治效应[J]. 土壤学报, 2010, 47(6): 1225-1231.

[17] 梅新兰, 赵青云, 谭石勇, 等. 辣椒疫病拮抗菌株筛选、鉴定及其防效[J]. 应用生态学报, 2010, 21(10): 2652-2658.

[18] 张慧, 杨兴明, 冉炜, 等. 土传棉花黄萎病拮抗菌的筛选及其生物效应[J]. 土壤学报, 2008, 45(6): 1095-1101.

[19] 孙燕霞, 张瑞清, 张伟, 等. 一株黄瓜枯萎病拮抗菌的筛选和鉴定[J]. 生物技术, 2009, 19(6): 22-25.

[20] 陆继臣, 迟乃玉, 窦少华, 等. 响应面法优化灰霉病生防菌 CNY-04 培养条件[J]. 微生物学通报, 2013(40): 1414-1422.

[21] CAI M H, ZHOU X S, SUN X Q, et al. Statistical optimization of medium composition for aspergillide A production by marine-derived fungus *Aspergillus glaucus* [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2009, 36(3): 381-389.

[22] 孙力军, 陆兆新, 孙德坤. *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2 液体发酵抗菌脂肽培养基及其主要影响因子筛选[J]. 食品工业科技, 2008, 29(5): 60-63.

[23] 梁昌聪, 郭立佳, 刘磊, 等. 响应面法优化解淀粉芽孢杆菌 C101 发酵培养基[J]. 生物技术通报, 2014(8): 169-174.

[24] 李康乐, 张萍, 石彦鹏, 等. 利用响应面法优化泰乐菌素发酵培养基[J]. 中国兽药杂志, 2014, 48(1): 20-25.

Identification of Antagonistic Strain Against Cucumber *Fusarium* Wilt and Optimization of Its Fermentation Medium

DU Bin

(Department of Horticulture, Taiyuan College, Taiyuan, Shanxi 030012)

Abstract: Based on the morphological, physiological and 16S rRNA sequence characteristics, a bacterial strain was identified as *Paenibacillus*, named KC24. Bacteriostatic spectrum of KC24 was detected. The results showed that KC24 could confront a variety of plant pathogens, it had a broad-spectrum antimicrobial activity. The fermentation medium components for spore production of KC24 was optimized by response surface methodology. The optimized number of spores in the fermented liquid was 13.5×10^8 cfu \cdot mL⁻¹, increased more than 107.7%. The optimal fermentation conditions were corn flour 20 g, soybean meal 5 g, KNO₃ 2.0 g, KH₂PO₄ 2.59 g, NaCl 1.0 g, (NH₄)₂SO₄ 2.04 g, FeSO₄ 0.009 1 g, MgSO₄ \cdot 7H₂O 1 g, H₂O 1 L, pH 7.0.

Keywords: cucumber *Fusarium* wilt; *Paenibacillus*; response surface methodology; spore