

一株死谷芽孢杆菌的分离、鉴定及抗病促生效果初探

林 英¹, 司春灿², 赵青松¹, 杜道林², 李萍萍^{1,3}

(1. 江苏大学 农业工程研究院, 现代农业装备与技术省部共建教育部重点实验室, 江苏省重点实验室, 江苏 镇江 212013;

2. 江苏大学 环境学院, 江苏 镇江 212013; 3. 南京林业大学 森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037)

摘 要:为了寻求新的生物防治菌种资源,以醋糟基质为试验材料,采用稀释涂布平板法从醋糟中分离出对立枯丝核菌具有明显抑制作用的拮抗菌,采用平板对峙法研究其对病原菌的广谱抑制效果,将菌体特征与 16S rDNA 序列分析及生理生化指标相结合,对拮抗菌进行初步鉴定,确定其分类地位,采用温室盆栽试验对分离的拮抗菌进行抗病促生效果初探。结果表明:从醋糟中分离到了 1 株对立枯丝核菌具有明显拮抗作用的菌株 CZ,且菌株 CZ 具有广谱的抑菌效果,对西瓜枯萎病、香瓜枯萎病、黄瓜枯萎病、水稻恶苗病、小麦赤霉病、苹果炭疽病原菌都具有较强的拮抗作用。根据菌体特征、16S rDNA 序列分析及生理生化指标的结果,初步鉴定该菌为死谷芽孢杆菌(*Bacillus vallismortis* CZ)。温室盆栽试验表明菌株 CZ 对由立枯丝核菌引起的黄瓜立枯病具有显著的抑制效果,与对照组相比,接种菌株 CZ 后,黄瓜小苗的病情指数降低了 18.3%。由此可见,菌株 *Bacillus vallismortis* CZ 具有开发成生防试剂的潜力。

关键词:醋糟;拮抗菌;分离;抗病;促生

中图分类号:S 476 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)13-0088-05

生物防治具有对环境和人畜安全、不易产生抗药性、处理费用低廉等优点,已广泛应用于各种农林病虫害的防治^[1-3]。在生物防治过程中,分离和筛选防效好、活性稳定、环境适应性强的生防菌株是保证生物防治效果的前提^[4]。因而寻求新的、高效的可替代化学试剂的生物生防资源,对农业的可持续性发展具有重要的意义。

堆肥是多个微生物群体共同作用,通过高温发酵从而实现有机物矿质化、腐殖化和无害化变成腐熟肥料的过程。在堆肥过程中会产生各种营养类型的微生物群落,通过这些丰富的微生物资源库,使得从中寻找可用作生物农药或者生物肥料的菌种成为可能^[5-6]。

醋糟是制醋行业中产生的糟渣,通过堆制发酵,醋糟已被开发成无土栽培基质和生物肥料,广泛用于育苗和栽培中,并投入了商品化生产^[7-9]。该研究试图采用

稀释涂布平板法,从醋糟中分离出对立枯丝核菌具有明显抑制作用的拮抗菌,并结合菌体特征、16S rDNA 序列分析及生理生化指标,对拮抗菌进行初步鉴定,确定其分类地位。同时在温室盆栽条件下对分离的拮抗菌进行抗病促生效果初探,旨在为生物防治提供菌种资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试醋糟由江苏恒顺集团提供,为新鲜醋糟在自然条件下堆制发酵而成。供试致病菌菌株由江苏大学环境学院杜道林教授提供。试验中选用的黄瓜品种为天津农业科学院科技服务公司选育的“津研 4 号”。

马铃薯葡萄糖培养基(PDA),Luria-Bertani 培养基(LB),PCR Buffer, dNTP, *Taq* 酶(东胜),BCL 卡(梅里埃)。超净台(苏州净化),摇床(金坛富华),PCR 仪(Eppendorf),扫描电镜(日立 S4800)。

1.2 试验方法

1.2.1 拮抗菌的分离及广谱性验证 利用改进的稀释涂布平板法^[10],将分离纯化培养好的单菌落接种于含有 50 mL LB 液体培养基的三角瓶中,30℃、200 r/min 摇至对数期。采用经典的平板对峙法^[11],对目标细菌进行拮抗能力评估。为进一步验证分离的菌株是否具有广谱抑菌效果,选取了如表 1 所示的另外 6 种常见的植物病

第一作者简介:林英(1985-),女,博士研究生,研究方向为设施园艺工程与技术。E-mail:jslning@163.com.

责任作者:李萍萍(1956-),女,教授,博士生导师,现主要从事设施农业与农业生态工程等工作。E-mail:lipingping@uj.s.edu.cn.

基金项目:国家星火计划资助项目(2010GA69001);江苏省研究生创新计划资助项目(CXZZ11_0583)。

收稿日期:2014-03-13

原真菌进行进一步的抑菌试验。

1.2.2 拮抗菌的鉴定 将分离的菌株在 LB 培养基上培养 48 h 后观察菌落形态特征。采用结晶紫进行革兰氏染色^[12],孔雀绿染色法进行芽孢染色^[13],并利用扫描电镜观察菌体形态及大小。扫描电子显微镜(SEM)样品的制备参照 Deng 等^[14]的方法略作调整、固定:取液体培养基中的菌体 1 mL,8 000 r/min 离心 3~5 min,弃上清,并用磷酸缓冲液 PBS (pH 7.2)清洗 3 次,倒入 2.5% 戊二醛固定液于 4℃ 过夜后,用 PBS (pH 7.2)缓冲液清洗 3 次。脱水:依次用 30%、50%、70%、85%、90% 的乙醇溶液梯度脱水处理,各浓度均处理 15 min。再用 100% 的乙醇处理 2 次,每次 15 min。干燥:吸取混匀的细菌-醋酸戊脂悬浮液滴在盖玻片上,将滴有菌液的盖玻片分别于-20、-70℃ 的冰箱冷冻 12 h 后,置于冷冻干燥机内真空干燥。扫描:将干燥后的样品放在真空镀膜机内镀金 15 min 后取出在扫描电镜中进行观察。

1.2.3 16S rDNA 序列分析 以液体 LB 培养基上摇好的菌液作为模板,选择细菌 16S rDNA 扩增的常用引物对 F27: 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3' 和 1492R: 5'-CCGTCGAATTCCTTTGAGTTT-3',扩增菌株的 16S rDNA 片段。25 μ L PCR 反应体系为 10 \times PCR Buffer 含 (Mg^{2+}) 5 μ L, dNTP (10 mM) 1 μ L, 上下游引物 (10 pM) 各 1 μ L, Taq 酶 (5 U/ μ L) 0.5 μ L, DNA 模板 1 μ L, 无菌水 15.5 μ L。PCR 运行程序:预变性 94℃, 10 min;变性 94℃, 45 s;退火 56℃, 40 s;延伸 72℃, 40 s;共 35 个循环;总延伸 72℃, 7 min。将扩增的 16S rDNA 产物割胶回收纯化后送上海生工生物工程技术服务有限公司测序,所得序列通过 NCBI 数据库进行 Blast 比对,采用 MEGA 4.1 软件的邻接法 (Neighbor-Joining, NJ)对分离的拮抗菌株进行序列分析并构建系统发育树^[15]。

1.2.4 拮抗菌的生理生化特性观察 拮抗菌生理生化指标的测定,采用配套的 BCL 鉴定卡,在法国生物梅里埃公司的 Vitek 2 Compact 微生物自动分析仪上进行,方法参照 Vitek 2 及鉴定卡说明书。14 h 后获得生理生化反应结果和菌种鉴定结果。

1.2.5 盆栽试验 盆栽试验在江苏大学日光温室内进行。设 3 个处理:I拮抗菌 CZ;II立枯丝核菌;III拮抗菌 CZ+立枯丝核菌;以不做任何处理为对照(CK)。每处理 3 次重复,每次重复为 10 株小苗。将“津研 4 号”的黄瓜种子表面消毒后,于穴盘中育苗。待穴盘出苗长至 4 片真叶时,将小苗移栽至内径为 16 cm,高为 20 cm 的装有 300 g 土壤的聚乙烯塑料盆中。移栽小苗 1 周后,在需要接种小苗的盆中于小苗的根部浇灌 30 mL 浓度为 1×10^7 CFU/mL 的菌液,以保证接种时土壤中拮抗菌的浓度为 1×10^6 CFU/g 土。接种拮抗菌约 2 周后,在

需要接种致病菌的小苗根部,参照 Fuchs^[16]的方法按 0.1% (w/w)的比例,接种 0.3 g 由小麦扩繁的立枯丝核菌。接种致病菌后,调查植株发病情况,待对照组 60% 的小苗出现发病症状后,结束试验。根据发病程度将病情指数分为 5 级,0 级:无症状,健康植株;1 级:小于 10% 的茎基出现病斑;2 级:11%~50% 的茎基出现病斑;3 级:51%~100% 的茎基出现病斑,4 级:植株死亡^[17]。病情指数 = \sum (各级病株数 \times 对应的病级值) / (调查总株数 \times 最高级病级值) \times 100。

1.3 数据分析

采用 SAS 9.1 统计软件中的 ANOVA 过程进行 Duncan 多重比较检验组间差异显著性。数据表示为平均数 \pm 标准差 (mean \pm SE)。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌的分离及广谱性验证

通过平板对峙法对分离到的细菌进行筛选,得到一株对立枯丝核菌具有明显拮抗活性的菌株,将其命名为 CZ。对菌株 CZ 的抗菌谱进行测定,结果如表 1 所示,菌株 CZ 对立枯丝核菌、西瓜枯萎病、水稻恶苗病、苹果炭疽病原菌都具有非常强的抑制效果,且菌株 CZ 对西瓜枯萎病、黄瓜枯萎病、小麦赤霉病原真菌表现出了较好的抑制作用。由此可见菌株 CZ 在离体平板试验条件下对植物病原菌具有广谱的抑菌效果。

表 1 拮抗菌 CZ 对 7 种植物病原菌的抑制效果

Table 1 The effect of antagonistic bacteria strain CZ against seven fungal pathogens

致病菌 Fungus	抑制程度 Degree of inhibition
立枯丝核菌 (<i>Rhizoctonia solani</i>)	++++
西瓜枯萎病 (<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>)	+++
西瓜枯萎病 (<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Melonis</i>)	++++
黄瓜枯萎病 (<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>)	+++
水稻恶苗病 (<i>Gibberella fujikuroi</i> (Sawada) Wollenw)	++++
小麦赤霉病 (<i>Fusarium graminearum</i>)	+++
苹果炭疽病 (<i>Glomerella cingulata</i>)	++++

注:—无抑菌效果;+较弱的抑菌效果,在靠近细菌的边缘真菌的生长停止;++中等抑菌效果,抑菌圈直径 <2 mm;+++较强的抑制效果,抑菌圈直径为 2~5 mm;++++非常强的抑制效果,抑菌圈直径 >5 mm。

Note:—, no inhibition zone; +, weak inhibition, growth of the fungus was stopped at the bacterial-streak; ++, moderate inhibition with inhibition zone <2 mm; +++, strong inhibition with inhibition zone 2~5 mm; +++++, very strong inhibition with inhibition zone >5 mm.

2.2 拮抗菌的鉴定

2.2.1 形态特征 供试菌株 CZ 在 LB 平板培养基上 30℃ 培养 48 h 后,菌落呈淡黄色、圆形、有褶皱。培养 4 d 后菌落表面有较多粘性絮状物质生成,革兰氏呈阳性,产芽孢,芽孢椭圆形,中生或近中。扫描电镜观察菌体为杆状,端圆,长 2.0~2.2 μ m,宽 0.6~0.8 μ m,无鞭毛 (图 1)。

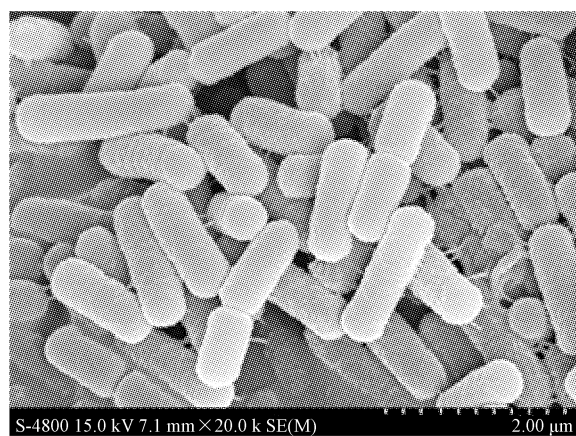


图1 拮抗菌 CZ 的扫描电镜图
Fig.1 Scanning electron micrographs of antagonistic bacteria strain CZ

2.2.2 16S rDNA 序列分析 菌株 CZ 经 16S rDNA PCR 扩增,得到了 1 条约 1 500 bp 的目的条带,将目的片段割胶回收测序后得到大小为 1 488 bp 的 DNA 序列。将序列与 NCBI 数据库 Blast 进行同源性比较,序列登入号为 KF578076,比对结果显示菌株 CZ 与其比对的芽孢杆菌属同源,相似度都在 99% 以上,因而将该菌株归属为芽孢杆菌属。采用 MEGA 4.1 软件构建系统进化树,由图 2 可知,菌株 CZ 与已知菌 *Bacillus mojavensis* (NR024693) 的亲缘关系最近,在同一分支上。

2.2.3 生理生化特性 通过形态学和 16S rDNA 序列分析,可以明确确定菌株 CZ 为芽孢杆菌属。根据这一鉴定结果,采用适于芽孢杆菌鉴定的 BCL 卡在法国生物梅里埃 Vitek 2 Compact 生理生化鉴定仪上对菌株 CZ 的分类地位做进一步的确定。菌株 CZ 的生理生化特性结果见表 2。通过自动检索数据库比较鉴定表明,菌株 CZ 为谷芽孢杆菌(*Bacillus vallismortis*),其概率百分比达 95%。因此结合形态特征、16S rDNA 序列及生理生化特征分析,初步确定拮抗菌 CZ 为死谷芽孢杆菌(*Bacillus vallismortis* CZ)。

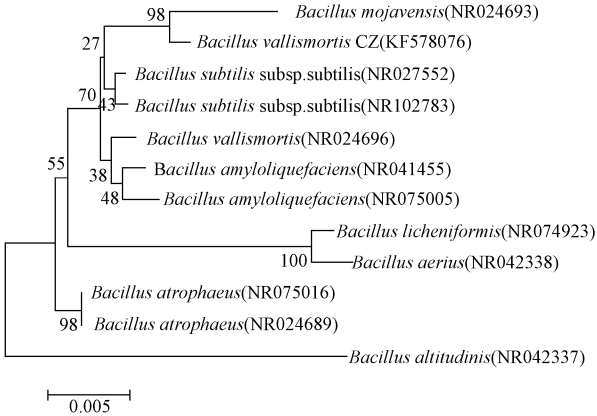


图2 菌株 CZ 基于 16S rDNA 序列的系统进化树
Fig.2 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA gene sequence of strain CZ

表 2 拮抗菌 CZ 的生理生化特性

Physiological and biochemical characters of strain CZ					
鉴别特征	结果	鉴别特征	结果	鉴别特征	结果
Characteristics	Results	Characteristics	Results	Characteristics	Results
β-木糖苷酶(BXYL)	+	肌醇(INO)	+	L-鼠李糖(IRHA)	+
β-半乳糖苷酶(BGAL)	+	糖原(GLYG)	—	腐胺同化(PSCNa)	—
α-甘露糖苷酶(AMAN)	—	菊粉(INU)	+	丙酮酸盐(PVATE)	+
α-半乳糖苷酶(AGAL)	+	古老糖(PLE)	+	七叶苷水解(ESC)	+
β-甘露糖苷酶(BMAN)	+	ELLM (ELLMAN)	+	红四氮唑(TTZ)	(+)
L-赖氨酸胺酶(LysA)	—	环糊精(CDEX)	—	磷酸胆碱(PHC)	—
L-脯氨酸胺酶(ProA)	—	麦芽三糖(MTE)	—	D-松三糖(dMLZ)	—
亮氨酸胺酶(LeuA)	+	D-核糖(dRIB)	+	α-葡萄糖苷酶(AGLU)	+
丙氨酸胺酶(AlaA)	—	D-半乳糖(dGAL)	—	甘氨酸胺酶(GlyA)	+
酪氨酸胺酶(TyrA)	+	D-葡萄糖(dGLU)	+	对竹桃霉素耐药(OLD)	—
甲基-D-木糖苷(MdX)	—	D-甘露糖(dMAN)	+	D-甘露糖(dMNE)	+
β-葡萄糖苷酶(BGLU)	+	D-塔格糖(dTAG)	—	对多粘菌素 B 耐药(POLYB_R)	—
对卡那霉素耐药(KAN)	—	D-海藻糖(dTRE)	+	丙氨酸-苯丙氨酸-脯氨酸胺酶(APPA)	—
L-吡咯烷酮芳胺酶(PyrA)	+	L-天冬氨酸胺酶(AspA)	—	甲基-α-D-吡喃葡萄糖苷酸(MdG)	+
N-乙酰-D-氨基葡萄糖(NAG)	—	在 6.5% NaCl 中生长(NaCl 6.5%)	+		
β-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(BNAG)	(—)	苯丙氨酸胺酶(PheA)	+		

注:—阴性;+阳性;(—)弱阴性,反应稍低于阈值;(+)弱阳性,反应稍高于阈值。
Note:—negative;+positive;(—) weak negative, reaction is slightly lower than the threshold value; (+) weakly positive, reaction is slightly higher than the threshold of the reaction.

2.3 盆栽试验

由表 3 可知,醋糟中分离的拮抗菌 CZ 在温室条件下对由立枯丝核菌引发的黄瓜立枯病有一定的防治效

果。从病情指数上来看,接种菌株 CZ 的黄瓜植株的病情指数为 42.7%,明显低于没有接种菌株 CZ 只接种立枯丝核的对照试验组(61.0%),病情指数降低了 18.3 个

百分点。从生物量来看,在不论是否接种立枯丝核菌的情况下,处理Ⅲ和Ⅳ组黄瓜小苗的苗高、地上部分干重和

地下部分干重与对照组之间均无显著差异。由此可见,拮抗菌 CZ 对黄瓜小苗没有明显的促生作用。

表 3 温室条件下拮抗菌 CZ 对黄瓜立枯病的生防及促生效果

Table 3 Effect of strain CZ on biological control of damping-off disease and on growth of cucumber

处理 Treatments	病情指数 Diseases index/%	苗高 Height/cm	地上部分干重 Shoot dry weight/g	根的干重 Root weight/g
CK	—	43.5±1.5a	1.9±0.10a	0.188±0.02a
拮抗菌 CZ	—	46.1±0.5a	2.0±0.04a	0.197±0.02a
Ⅱ立枯丝核	61.0±3.5a	38.2±1.6b	1.6±0.03b	0.149±0.03b
Ⅲ拮抗菌 CZ+立枯丝核	42.7±1.8b	41.9±1.8ab	1.7±0.03b	0.153±0.01b

注:表中数据为平均值±标准误,不同的小写字母表示经 Duncan's 氏新复极差法检验差异显著($P<0.05$)。

Note: Data are mean±SE, different lowercase letters represent significant difference ($P<0.05$) between the treatments (one-way ANOVA, $P<0.05$) according to Duncan's multiple range tests.

3 讨论与结论

生物防治是植物病虫害综合治理的重要手段,对实现农业的可持续发展具有重大意义,而分离与筛选高效生防微生物则是实现生物防治的前提。国内外关于生防菌的分离多见于土壤、植物体表和植物体内,而近几年从腐熟的堆肥中分离出拮抗菌的报道屡见不鲜。如权春善等^[18]从堆肥中分离到了 1 株具有广谱拮抗效应的解淀粉芽孢杆菌;Cuesta 等^[6]从橄榄油厂废弃物堆肥中分离到了 12 株对植物病原菌具有强烈抑制效果的放线菌;Pugliese 等^[5]从城市污泥和生活垃圾堆肥中共分离到 28 株拮抗菌。该试验采用稀释涂布平板法从醋糟中分离到了 1 株对立枯丝核菌具有明显拮抗作用的菌株 CZ。体外平板试验表明该菌株具有广谱的抑菌效果。根据菌体特征、16S rDNA 序列分析及生理生化指标,初步鉴定该菌为死谷芽孢杆(*Bacillus vallismortis* CZ)。

芽孢杆菌由于具有可产生多种抗菌物质、抗逆性强,对环境适应性强等优点,是生防微生物的重要组成部分。研究表明,许多芽孢杆菌不仅具有防病作用,而且有促生作用,能够促进植物的生长^[19-21]。但在该试验中,分离的拮抗菌 CZ 对黄瓜没有明显的促生长作用。

植物病害的微生物防治是一个极其复杂的过程,不仅涉及到拮抗菌、病原菌和植物三者之间的相互作用,而且还和土著性微生物区系、大型微生物区系(线虫、原生动物等)和植物栽培基质(土壤、蛭石等)有关^[22-23]。许多筛选的拮抗菌在体外平皿试验中对病原菌表现出了明显的拮抗效果,但在植物活体和田间实际应用时却不能达到理想的防病效果^[24-26]。在该试验中,拮抗菌 CZ 不仅在室内平板试验上对包括立枯丝核菌在内的其它病原真菌表现了广谱的抑菌效果,而且在温室盆栽试验条件下,对由立枯丝核引发的黄瓜立枯病也具有较好的控制效果。由此可见,拮抗菌 CZ 具有很好的作为生防菌的潜力。由于实际的大田环境相对于温室条件而言要复杂和多变得多,拮抗菌(*Bacillus vallismortis* CZ)在

实际大田应用中是否也能具有理想的广谱的防病效果还有待于进一步研究。

(致谢:镇江疾病控制中心的徐岚女士为该试验使用 Vitek 2 Compact 微生物自动分析仪提供了大量帮助,在此表示衷心的感谢!)

参考文献

- [1] Claude A, Chantal O, Quirico M, et al. Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*[J]. New Phytologist, 2009, 184(3): 529-544.
- [2] 周秀华,崔磊,武杰,等. 三种拮抗菌对苗木立枯病原菌的影响[J]. 北方园艺, 2011(24): 167-169.
- [3] Federico G R, Maria M R, Marcela F, et al. Biological control by *Trichoderma* species of *Fusarium solani* causing peanut brown root rot under field conditions[J]. Crop Protection, 2007, 26(4): 549-555.
- [4] 谢永丽,徐志伟,马莉贞,等. 青海北山林场桦树根围芽孢杆菌分子鉴定及其拮抗活性分析[J]. 植物保护学报, 2012, 39(3): 246-252.
- [5] Pugliese M, Liu B P, Gullino M L, et al. Selection of antagonists from compost to control soil-borne pathogens[J]. Journal of Plant Diseases and Protection, 2008, 115(5): 220.
- [6] Cuesta G, García-de-la-Fuente R, Abad M, et al. Isolation and identification of actinomycetes from a compost-amended soil with potential as biocontrol agents[J]. Journal of Environmental Management, 2012, 95: 280-284.
- [7] 赵青松,李萍萍,郑洪倩,等. 灌水量对有机基质栽培黄瓜生长及氮素利用的影响[J]. 农业工程学报, 2012, 28(12): 117-121.
- [8] Zhao Q S, Li P P, Sun D M. Effects of inoculating thermophiles and *Rhizopus* on composting process of vinegar residue and their nutrients status[J]. Advanced Materials Research, 2012, 518, 68-72.
- [9] Chen L, Yang X, Raza W, et al. Solid-state fermentation of agro-industrial wastes to produce bioorganic fertilizer for the biocontrol of *Fusarium* wilt of cucumber in continuously cropped soil[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(4): 3900-3910.
- [10] Lin Y, Du D, Si C, et al. Potential biocontrol *Bacillus* sp. strains isolated by an improved method from vinegar waste compost exhibit antibiosis against fungal pathogens and promote growth of cucumbers[J]. Biological Control, 2014, 71: 7-15.
- [11] Anith K N, Radhakrishnan N V, Manomohandas T P. Screening of antagonistic bacteria for biological control of nursery wilt of black pepper (*Piper nigrum*) [J]. Microbiological Research, 2003, 158(2): 91-97.
- [12] 李振国,骆永明,腾应. 土壤与环境微生物研究方法[M]. 北京: 科学出版社, 2008.
- [13] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.

- [14] Deng H, Han Y, Liu Y, et al. Identification of a newly isolated erythritol-producing yeast and cloning of its erythritol reductase genes[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2012, 39 (11): 1663-1672.
- [15] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4. 0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [16] Fuchs J G. Interactions between beneficial and harmful microorganisms: from the composting process to compost application[M]//Microbes at Work. Springer Berlin Heidelberg, 2010: 213-229.
- [17] Chandanie W A, Kubota M, Hyakumachi M. Interactions between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and plant growth-promoting fungi and their significance for enhancing plant growth and suppressing damping-off of cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. Applied Soil Ecology, 2009, 41(3): 336-341.
- [18] 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, 4(6): 7-12.
- [19] Chen F, Wang M, Zheng Y. Quantitative changes of plant defense enzymes and phytohormone in biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt by *Bacillus subtilis* B579[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 26(4): 675-684.
- [20] Zhou K, Yamagishi M, Osaki M. *Paenibacillus* BRF-1 has biocontrol ability against *Phialophora gregata* disease and promotes soybean growth [J]. Soil Science and Plant Nutrition, 2008, 54(6): 870-875.
- [21] Guo J H, Qi H Y, Guo Y H, et al. Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria[J]. Biological Control, 2004, 29(1): 66-72.
- [22] Lemessa F, Zeller W. Screening rhizobacteria for biological control of *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia [J]. Biological Control, 2007, 42 (3): 336-344.
- [23] Lugtenberg B, Kamilova F. Plant-growth-promoting rhizobacteria[J]. Annual Review of Microbiology, 2009, 63: 541-556.
- [24] Ran L X, Liu C Y, Wu G J, et al. Suppression of bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. in China [J]. Biological Control, 2005, 32(1): 111-120.
- [25] Simonetti E, Carmona M A, Scandiani M M, et al. Evaluation of indigenous bacterial strains for biocontrol of the frog-eye leaf spot of soya bean caused by *Cercospora sojina* [J]. Letters in Applied Microbiology, 2012, 55 (2): 170-173.
- [26] Dal Bello G, Monaco C, Rollan M C, et al. Biocontrol of postharvest grey mould on tomato by yeasts [J]. Journal of Phytopathology, 2008, 156 (5): 257-263.

Isolation and Identification of A *Bacillus vallismortis* CZ and Primary Testing Its Disease-suppressive and Growth-promoting Capacities

LIN Ying¹, SI Chun-can², ZHAO Qing-song¹, DU Dao-lin², LI Ping-ping^{1,3}

(1. Key Laboratory of Modern Agricultural Equipment and Technology, Ministry of Education and Jiangsu Province, Institute of Agricultural Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013; 2. School of Environment, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013; 3. College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing, Jiangsu 210037)

Abstract: In order to seek new biocontrol agents, taking the vinegar residue substrate as the test materials, bacteria isolated from the vinegar residue substrate with inhibitory activities toward *R. Solani* using the dilution plate method, their broad antifungal inhibitory activity were tested using the dual plate assay, combining with morphological characteristics, 16S rDNA sequence and physiological and biochemical characteristics to identify and determine its taxonomic status, its antagonistic potential against disease and plant growth promotion under greenhouse were further evaluated. The results showed that strain CZ isolated from the vinegar residue substrate exhibited broad-spectrum antagonism towards the tested fungi, including *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *Melonis*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenw, *Fusarium graminearum*, *Glomerella cingulate*. According to the morphological, phylogenetic analysis of the 16S rDNA sequence and physiological characteristics, strain CZ was identified as *Bacillus vallismortis*. Strain CZ also was found to be effective in controlling damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani* under greenhouse conditions, inoculated with strain CZ led the percent disease index reductions in 18.3%. Together all, strain CZ has great potential as a biocontrol agent.

Key words: vinegar waste; antagonistic bacterial; isolated; disease-suppressive; growth-promoting