

芽孢杆菌 BU108 的分离鉴定及对马铃薯疮痂病的防治

宋 焱, 向君亮, 申永瑞, 王佳琦, 刘 权, 殷奎德

(黑龙江八一农垦大学 生命科学技术学院, 黑龙江 大庆 163319)

摘要: 为改善马铃薯 *Solanum tuberosum* 疮痂病日益加重的情况, 以疮痂链霉菌 *Streptomyces scabies* 为指示菌筛选拮抗菌, 优化菌株的发酵条件, 检测菌株对马铃薯疮痂病的抑制情况。首先, 利用稀释涂布法、平板划线法和抑菌圈法分离筛选到了 1 株对疮痂链霉菌具有抑制作用的拮抗菌株, 通过形态学观察和 16S rDNA 序列比对鉴定为芽孢杆菌 *Bacillus*, 并命名为 BU108。随后, 采用单因素多水平试验设计方法, 对该菌株培养条件进行了优化, 确定最适培养条件为: 碳源为葡萄糖, 氮源为酵母浸粉, 碳氮比为 1:2, 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)为 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)为 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 氯化钠(NaCl)为 $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 培养温度为 $28 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 8, 培养时间为 22 h。最后, 通过盆栽实验检验了芽孢杆菌 BU108 对马铃薯疮痂病的实际抑制效果, 结果显示: BU108 施用浓度为 $1 \times 10^{10} \text{ cfu} \cdot \text{m}^{-2}$ 时效果最好, 抑制率为 91.6%, 差异达极显著水平($P < 0.01$)。图 9 表 3 参 20

关键词: 植物病理学; 马铃薯疮痂病; 芽孢杆菌; 优化; 生物防治

中图分类号: Q945.8; S532

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2018)04-0757-08

Screening and identification of *Bacillus* strain BU108 and bio-control effects on potato scab

SONG Ye, XIANG Junliang, SHEN Yongrui, WANG Jiaqi, LIU Quan, YIN Kuide

(College of Life Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, Heilongjiang, China)

Abstract: To improve bio-controls on potato scab, the scab *Streptomyces scabies* was used as an indicator bacteria for screening of antagonistic bacterial strains, for optimization of fermentation conditions, and inhibition of potato scab. First, an outstanding strain (BU108) was obtained and identified as *Bacillus* by morphological observation and subsequent 16S rDNA sequencing. Then the culture conditions of BU108 were optimized for best inhibition by a single factor and a multi-level experimental design, Repeat five times at each level. Finally, the inhibiting effect of BU108 on potato scab was detected through a pot experiment. Results of the optimal culture conditions were as follows: glucose as carbon source, yeast extract as nitrogen source, C/N ratio of 1:2, $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$, $28 \text{ }^\circ\text{C}$ culture temperature, pH 8, and 22 h culture time. The pot experiment showed that a better effect was obtained with an application concentration of $1 \times 10^{10} \text{ cfu} \cdot \text{m}^{-2}$. The inhibition rate reached 91.6% with marked differences ($P < 0.01$). This result not only provided material for a biological control of potato scab, but also helped accumulate experience for applying BU108 in actual production. [Ch, 9 fig. 3 tab. 20 ref.]

Key words: plant pathology; potato scab; *Bacillus*; optimization; biological control

马铃薯 *Solanum tuberosum* 是中国主要的粮食作物, 黑龙江省的马铃薯种植面积一直居于前列, 但

收稿日期: 2017-07-26; 修回日期: 2017-09-19

基金项目: 黑龙江八一农垦大学研究生创新基金资助项目(YJSCX2017-Y67); 大庆市指导性科技计划项目(Zd-2017-60)

作者简介: 宋焱, 从事生物化学与分子生物学研究。E-mail: 635702583@qq.com。通信作者: 殷奎德, 教授, 博士生导师, 从事植物与微生物互作研究。E-mail: yinkuide@163.com

近年来由疮痂链霉菌 *Streptomyces scabies* 引起的马铃薯疮痂病日益严重, 直接影响马铃薯的品质, 造成了较大的经济损失^[1]。马铃薯疮痂病首先会在马铃薯表面产生褐色的点状斑块, 随着马铃薯的生长, 点状斑块会随之扩大形成褐色圆形或不规则形的大斑块, 感染后期斑块处细胞木栓化, 致马铃薯表面形成凹陷或凸起的疮痂状粗糙硬斑块, 严重影响马铃薯的外观品质和经济价值^[2]。长期以来, 马铃薯疮痂病的防治大多采用化学农药的方法, 虽然短期内防治效果显著, 但长期使用不仅污染环境和危害人类健康, 还会造成土壤中的菌群失调, 使得病原菌缺乏有效抑制而导致病害发生更加严重^[3]。生物防治是马铃薯疮痂病防治的一个热点和趋势, 该方法利用微生物及其分泌物来抑制病害的发生, 不会对环境造成污染, 是一种友好型的病害防治方法。目前, 已报道了多种能够对马铃薯疮痂病具有防治效果的拮抗菌株, 其中以芽孢杆菌 *Bacillus* 占多数, 抑制效果也更加显著^[4-5]。但是在前人利用芽孢杆菌作为生防菌防治植物病害的研究中, 却发现有些生防菌株会出现异地防治效果不理想的情况, 究其原因可能与菌株在土壤中的定殖能力以及受土壤中土著微生物的抑制有关^[6-11]。生防菌株施用到土壤中, 会面临生存环境的改变, 抑菌物的分泌量可能会受到影响, 进而影响生防菌株的抑菌效果。此外, 不同地区土壤的菌群结构也存在差异, 导致一个地区的生防菌株在另一个地区施用可能会由于不适应新的微生物菌群结构及生态环境, 同样发挥不了理想的生物防治效果^[12]。鉴于此, 本研究从黑龙江省当地马铃薯疮痂病发病土壤中筛选鉴定适宜本地生态环境及土壤菌群结构的拮抗菌, 对菌株的培养条件进行优化, 通过盆栽实验检验菌株的实际防治效果, 旨在为该菌应用到马铃薯疮痂病的生物防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 指示菌 病原菌疮痂链霉菌由本实验室保存提供。

1.1.2 样品 土样采自黑龙江省克山县马铃薯发病地块; 马铃薯品种为‘大西洋’ *Solanum tuberosum* ‘Atlantic’。

1.1.3 培养基 YME 固体培养基: 麦芽糖 10.0 g·L⁻¹, 酵母提取物 4.0 g·L⁻¹, 葡萄糖 4.0 g·L⁻¹, 琼脂 20.0 g·L⁻¹, pH 7.2; LB 固体培养基: 氯化钠(NaCl) 10.0 g·L⁻¹, 蛋白胨 10.0 g·L⁻¹, 酵母浸粉 5.0 g·L⁻¹, 琼脂 20.0 g·L⁻¹, pH 7.5; 发酵条件优化基础培养基^[13]: 葡萄糖 10.0 g·L⁻¹, 蛋白胨 10.0 g·L⁻¹, 氯化钠 10.0 g·L⁻¹, 磷酸二氢钾(KH₂PO₄) 1.5 g·L⁻¹, 硫酸镁(MgSO₄·7H₂O) 1.5 g·L⁻¹。

1.2 生防菌株的分离鉴定

1.2.1 菌株的筛选 采集有伤病的马铃薯周围的土壤带回实验室, 土壤加水匀浆并倍比稀释至 10⁻⁶, 把 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ 倍的土壤稀释液涂布。在平板上挑取单个菌落纯化培养, 保存分离到的单个菌株, 在涂有链霉菌的平板上做抑菌实验。

1.2.2 菌株的鉴定 形态观察: 显微镜观察单菌的颜色、形状、状态。分子生物学鉴定: 基于 16S rDNA 序列分析的生防菌株种属鉴定。50.0 μL 聚合酶链式反应(PCR)反应体系: 2.0 μL 细菌基因组 DNA, 4.0 μL 10 mmol·L⁻¹ 16S 引物 27f: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 1492R: 5'-TACCTTGTTAC-GACTT-3', 1.2 μL 10 μmol·L⁻¹ 三磷酸碱基脱氧核苷酸(dNTPs), 4.0 μL 50 mmol·L⁻¹ 氯化镁(MgCl₂), 5.0 μL 10×PCR 缓冲液, 0.3 μL DNA 聚合酶。PCR 扩增条件: 95℃预变性 3 min; 95℃变性 30 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 90 s, 40 个循环, 4℃无限循环。反应结果经 8 g·L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳进行条带检测, 纯化后样品送交上海生工完成测序。所获得的碱基序列在美国生物技术信息中心(NCBI)数据库中进行 Blast 同源性对比, 利用 MEGA 5 软件进行多序列比对并构建系统发育树。

1.3 发酵条件的优化

1.3.1 发酵方法及抑菌粗提液的制备 根据种子培养基的营养条件, 分别更换不同质量浓度和种类的碳源、氮源及不同比例的无机盐离子和碳氮比(C/N)加入装有 50 mL 发酵液培养基的 100 mL 的三角瓶中, 改变培养菌株的发酵条件(培养温度、pH 值、培养时间等), 将活化好的菌株接种到发酵液培养基中, 37℃, 160 r·min⁻¹ 恒温振荡培养 24 h 后。菌液离心 4 min, 12 000 r·min⁻¹, 菌液上清使用 0.22 μm 滤膜过滤后采用管碟法进行抑菌实验。

1.3.2 抑菌活性的测定 抑菌活性的测定采用管碟法, 把培养好的病原菌用涂布棒涂匀在已制作好的平

板，在平板上放牛津杯加入抑菌物粗提液。抑菌活性通过测量抑菌圈的半径，计算平均值比较大小进行确定。

1.3.3 适宜碳源的确定 根据培养基的营养条件，采用单因素多水平试验设计方法，分别加入 10.0 g·L⁻¹ 的葡萄糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖作为不同的碳源，其他因素同种子液培养基，重复 5 次·水平⁻¹，采用管碟法测定抑菌活性确定适宜碳源的种类。

1.3.4 适宜氮源的确定 在适宜碳源试验结果基础上，根据培养基的营养条件，设计氮源单因素多水平试验，分别加入 10.0 g·L⁻¹ 的蛋白胨、胰蛋白胨、大豆蛋白胨、酵母浸粉、牛肉粉作为不同的氮源，其他因素不变，重复 5 次·水平⁻¹，采用管碟法测定抑菌活性确定适宜的氮源种类。

1.3.5 适宜 C/N 的确定 在适宜碳、氮源试验结果基础上，根据培养基的营养条件，设计 C/N 单因素多水平试验，选取 C/N 分别为 1:1，1:2，1:3，1:4，1:5 进行发酵试验，其他因素不变，重复 5 次·水平⁻¹，采用管碟法测定的抑菌活性确定适宜的 C/N。

1.3.6 无机离子正交试验 在适宜碳、氮源及 C/N 试验结果基础上，根据培养基的营养条件，选择培养基中的 KH₂PO₄，MgSO₄·7H₂O，NaCl 为正交试验因素，设计 3 水平 3 因素试验(表 1)，设置空白项为对照(ck₁)。分别将不同水平的 KH₂PO₄，MgSO₄·7H₂O，NaCl 加入发酵培养基中，培养基 pH 值调至 pH 7.0，其他因素不变，重复 5 次·水平⁻¹，采用管碟法测定抑菌物活性确定适宜的无机离子。

表 1 无机离子实验因素质量浓度表

Table 1 Level of orthogonal experimental factors of inorganic ions

水平	KH ₂ PO ₄ /(g·L ⁻¹)	MgSO ₄ ·7H ₂ O/(g·L ⁻¹)	NaCl/(g·L ⁻¹)
1	0.5	0.5	5.0
2	1.0	1.0	10.0
3	1.5	1.5	15.0

1.3.7 最适 pH 值 在适宜碳，氮源，C/N，无机离子正交试验结果基础上，根据培养基的营养条件，设计初始最适 pH 值单因素多水平试验，分别调节初始 pH 值为 pH 5，pH 6，pH 7，pH 8，pH 9，重复 5 次·水平⁻¹，采用管碟法测定抑菌活性确定适宜的 pH 值。

1.3.8 最适温度 在适宜碳，氮源，C/N 及 pH 值，无机离子正交试验结果基础上，根据培养基的营养条件，设计培养温度单因素多水平试验，分别调节初始温度为 22，28，32，37，44 ℃，重复 5 次·水平⁻¹，采用管碟法测定抑菌活性确定最适温度。

1.3.9 培养时间 在上述最佳培养条件确定基础上，根据培养基的营养条件，设计培养时间单因素多水平试验，分别设置 8，10，12，14，16，18，20，22，24，26，28 和 30 h 的培养时间，重复 3 次·水平⁻¹，采用管碟法测定的抑菌活性确定适宜的培养时间。

1.4 菌株 BU108 对马铃薯疮痂病的防效盆栽实验

实验在黑龙江八一农垦大学大庆市重点实验室中进行，采用盆栽实验，实验用盆钵为 28 cm × 20 cm 的聚乙烯塑料盆，钵装风干土为 3 kg·盆⁻¹，装入马铃薯疮痂病发病土壤。选取健康的有芽马铃薯，用清水冲洗干净，切成三角块，在盆钵土壤中植入 2 块有芽马铃薯，芽尖向上。同时制备发酵培养基，接种 BU108 生防菌。设置 3 组处理，重复 6 次·处理⁻¹，分别为对照(ck₂)，低浓度 BU108(1×10⁸ cfu·m⁻²)和高浓度 BU108(1×10¹⁰ cfu·m⁻²)。各个处理中菌液最终施用量为 100 mL，在栽种时加入菌液，之后不再添加，栽种前浇水 1 000 mL。根据马铃薯生长情况定量加水，待马铃薯成熟后，进行病斑数的统计与分析。

2 结果与分析

2.1 土壤中菌株的分离筛选和鉴定

从有病害马铃薯根际土壤中分离得到 200 余株菌株，命名按 BU1，BU2，BU3 等依次排列，对所有得到的菌株进行抑菌实验。结果显示：BU108 与其他菌株相比抑菌圈半径最大，抑菌效果最为明显(图 1)。BU108 菌落形态白色不透明，边缘不整齐、干燥、中间有星状皱起；在液体培养基中色暗、皱褶、完整的膜、轻度混浊，可知 BU108 对疮痂链霉菌有抑菌效果。在 16S rDNA 序列分析的基础上进行 NCBI 序列比对，找到与目的菌株相似度最为接近的碱基序列。应用 MEGA5 软件对这些碱基序列进行分析，构建系统进化树。从图 2 可以看出：BU108 属于芽孢杆菌属，但与目前鉴定到的芽孢杆菌种之间存在不同，与 *Bacillus* sp.(KT583425.1)亲缘关系最近。

2.2 培养条件的优化

2.2.1 适宜碳源的选择 分别用葡萄糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖代替培养基中的葡萄糖。结果显示：抑菌实验的半径平均值分别为 11, 7.6, 7.8 和 8.2 mm。由图 3 可知：当葡萄糖作为碳源时，抑菌效果最为明显。由方差分析可知：组内间的差异较小，而且葡萄糖与其他的碳源有极显著差异($P<0.01$)，因此确定葡萄糖为最佳碳源。

2.2.2 适宜氮源的选择 在最佳碳源确定的基础上，分别用胰蛋白胨、蛋白胨、大豆蛋白、牛肉粉、酵母浸粉代替培养基中的蛋白胨。结果(图 4)显示：抑菌实验的半径平均值分别为 6.8, 6.6, 6.4, 7.2 和 8.6 mm。当酵母浸粉作为氮源时，抑菌效果最为明显。由方差分析可知：酵母浸粉与其他的氮源有极显著差异($P<0.01$)，因此确定酵母浸粉为最佳氮源。

2.2.3 适宜 C/N 的选择 碳源和氮源之间的比例对微生物的生长和代谢同样重要。在最佳碳、氮源确定的基础上，设置 C/N 为 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5。结果显示(图 5)：抑菌圈的半径平均值分别 9.0, 12.5, 7.3, 7.8 和 7.0 mm。当 C/N 为 1:2 时抑菌效果最为明显，与方差分析组内间的差异较小，与其他组间有极显著差异($P<0.01$)，因此确定最佳 C/N 为 1:2。

2.2.4 适宜的无机离子 在最佳碳源、氮源和 C/N 确定的基础上改变无机离子的浓度，并检测无机离子



图 1 BU108 抑制疮痂链霉菌
Figure 1 Inhibition of BU108 against *Streptomyces scabies*

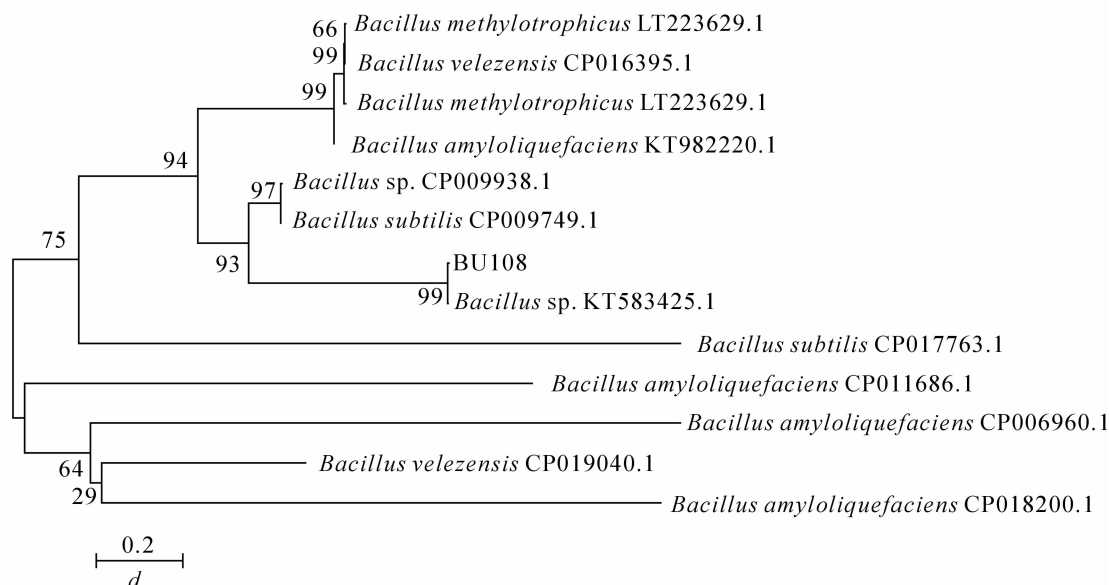


图 2 BU108 的 16S rDNA 序列系统进化树

Figure 2 Phylogenetic tree of BU108 16S rDNA

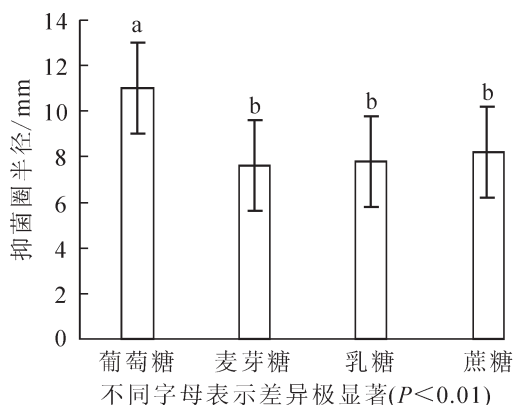


图 3 碳源对芽孢杆菌 BU108 抑菌活性的影响

Figure 3 Effect of carbon source on the activity of *Bacillus* BU108

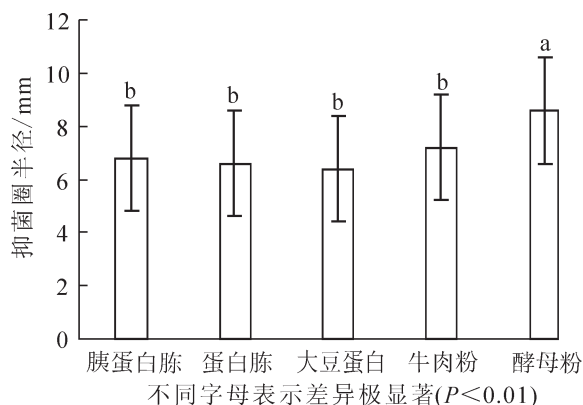


图 4 氮源对芽孢杆菌 BU108 抑菌活性的影响

Figure 4 Effect of nitrogen source on the activity of *Bacillus* BU108

对抑菌活性影响。由表 2 可知：NaCl 对抑菌效果影响最大，极差 R 大小依次为 $\text{NaCl} > \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} > \text{KH}_2\text{PO}_4 > \text{ck}$ 。由表 3 可知：NaCl 对抑菌物的产生影响最大，影响最小的为 KH_2PO_4 。可见，NaCl 质量浓度为 $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对菌株的抑菌效果最佳。

2.2.5 最适 pH 值 在最佳碳源、氮源和 C/N 及无机离子比例确定的基础上，改变培养基 pH 为 5, 6, 7, 8, 9。结果(图 6)显示：抑菌圈的半径平均值分别为 9.0, 9.6, 9.8, 12.4 和 8.4 mm。当 pH 为 8 时，抑菌效果最为明显，由方差分析可知各个组内间的差异较小而且 pH 为 8 时与其他组有极显著差异($P < 0.01$)，因此确定 pH 8 是最佳 pH 值。

2.2.6 培养温度 在最佳碳源、氮源、C/N 和无机离子比例及 pH 确定的基础上，设置培养温度为 22, 28, 32, 37, 44 $^{\circ}\text{C}$ 。结果(图 7)显示：抑菌圈的半径平均值分别为 9.0, 12.6, 9.0, 8.2 和 7.0 mm。芽孢杆菌 BU108 在 22, 32, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下生长良好，在 44 $^{\circ}\text{C}$ 下生长一般，28 $^{\circ}\text{C}$ 下生长情况最佳。由方差分析可知：培养温度为 28 $^{\circ}\text{C}$ 时组内间的差异较小，与其他组相比具有极显著差异($P < 0.01$)，因此 28 $^{\circ}\text{C}$ 为最佳培养温度。

2.2.7 培养时间 培养时间过长营养物质消耗殆尽不利于菌株的生长，时间过短微生物代谢物质的分泌量不足影响菌株的抑菌效果。在最佳碳源、氮源、C/N、无机离子比例和 pH 值及培养温度确定的基础上，设置培养时间为 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 和 30 h。结果显示(图 8)：抑菌实验的半径平均值分别 5.2, 5.2, 6.7, 7.2, 7.7, 8.3, 8.7, 11.7, 9.0, 7.7, 7.0 和 6.3 mm。22 h 时抑菌半

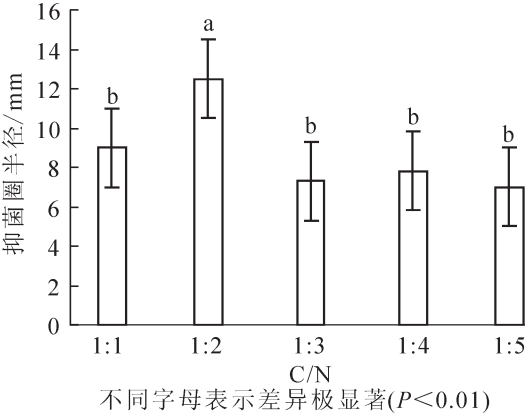


图 5 C/N 对芽孢杆菌 BU108 抑菌活性的影响
Figure 5 Effect of C/N on the antagonistic activity of *Bacillus* BU108

表 2 无机离子对抑菌活性影响的正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal tests on the effect of inorganic ions on the yield of antimicrobial agents					
试验号	KH_2PO_4	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	NaCl	空白项(ck ₁)	抑菌圈半径/mm
1	1	1	1	1	15.2
2	1	2	2	2	8.7
3	1	3	3	3	7.2
4	2	1	2	3	10.3
5	2	2	3	1	7.2
6	2	3	1	2	12.8
7	3	1	3	2	7.5
8	3	2	1	3	13.6
9	3	3	2	1	6.8
K_1	31.1	33	41.6	29.2	
K_2	30.3	29.5	25.8	29.0	
K_3	27.9	26.8	21.9	31.1	
R	3.2	6.2	19.7	2.1	

说明：1, 2, 3 表示相对应的水平； K_1 代表每组水平 1 的抑菌圈半径之和， K_2 和 K_3 同理。 R 代表极差，对照组(空白项)的 1, 2, 3 不代表水平，只代表正交表里的检验项

表 3 无机离子对抑菌活性影响的方差分析

Table 3 Variance analysis of the effect of inorganic ions on antibacterial activity					
因素	偏差平方和	自由度	均方	F	$F_{\alpha=0.05}$
KH_2PO_4	1.85	2	0.93	2.06	19
MgSO_4	6.44	2	3.22	7.16	
NaCl	72.55	2	36.28	80.62	
空白项	0.90	2	0.45		

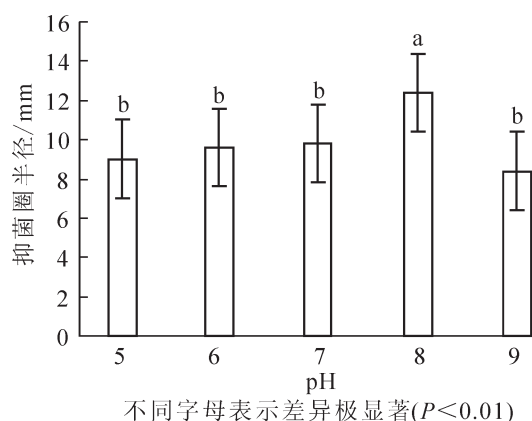


图6 pH对芽孢杆菌BU108抑菌活性的影响

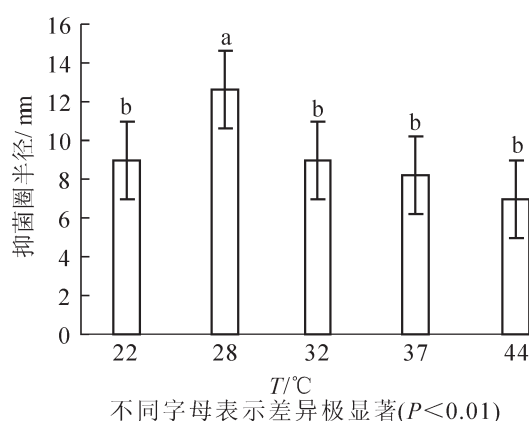
Figure 6 pH effect on the antibacterial activity of *Bacillus* BU108

图7 培养温度对芽孢杆菌BU108抑菌活性的影响

Figure 7 Effect of culture temperature on the antibacterial activity of *Bacillus* BU108

径最大, 抑菌效果最好。由方差分析可知: 组内间的差异较小, 与其他组相比具有极显著差异 ($P < 0.01$), 因此最适培养时间为 22 h。

2.3 菌株 BU108 对疮痂病的防治效果

对 3 组处理的盆栽实验的病斑数进行统计(图 9): 对照组的病斑数平均值为 12.0, 高浓度 BU108 组的病斑数平均值为 1.0, 低浓度 BU108 组的病斑数平均值为 8.3。由方差分析可知: 高浓度 BU108 组与其他组别间有极显著差异, 抑制率为 91.6%。低浓度 BU108 组与对照之间有极显著差异 ($P < 0.01$), 抑制率为 30.8%。表明芽孢杆菌 BU108 能够抑制马铃薯疮痂病的发生, 且浓度越高, 抑制效果越好。

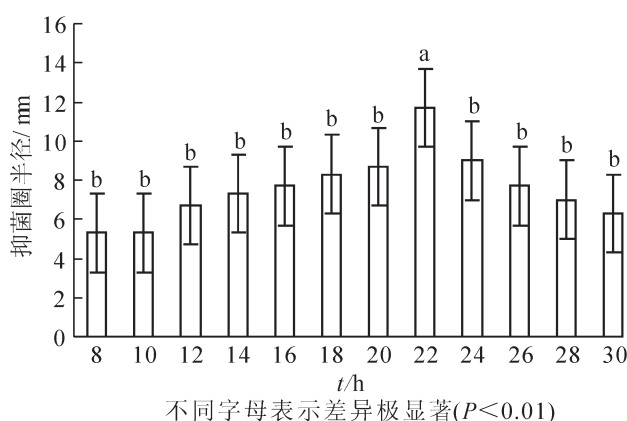


图8 培养时间对芽孢杆菌BU108抑菌活性的影响

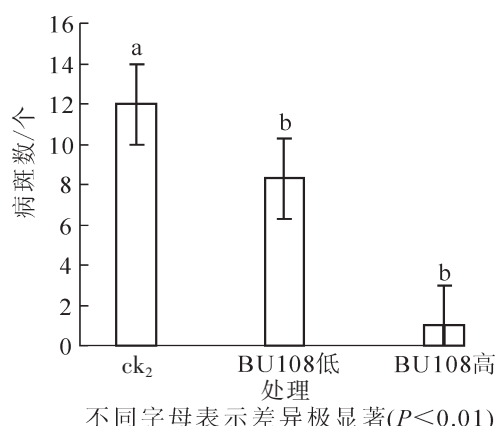
Figure 8 Effect of culture time on the antibacterial activity of *Bacillus* BU108

图9 芽孢杆菌BU108对马铃薯疮痂病的影响

Figure 9 Effect of *Bacillus* BU108 on potato scab

3 结论与讨论

本研究通过平板涂布法、平板划线法分离单菌, 利用本实验室提供的病原菌筛选拮抗菌, 对 200 余株菌株做抑菌实验, 测量抑菌圈的半径, 发现菌株 BU108 抑菌圈半径最大, 抑菌效果最为明显。通过形态学观察和菌株的进化树分析, 初步确定 BU108 属于芽孢杆菌。因 BU108 与目前已知的芽孢杆菌序列之间存在较大不同, 无法归类到具体的种。

通过摇瓶发酵对芽孢杆菌 BU108 抑菌活性物质的培养条件进行了研究, BU108 的最佳培养条件: 碳源为葡萄糖, 氮源为酵母浸粉, C/N 为 1:2, 无机离子 KH_2PO_4 为 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 为 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NaCl 为 $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 8, 培养时间为 22 h, 培养温度为 28°C 。有些生防菌的最佳碳源为葡萄糖、氮源为大豆饼粉^[14-15], 最佳的 pH 偏酸性^[16], 而 BU108 的最佳碳源为葡萄糖、氮源为酵母浸粉, 在偏碱性条件下生长良好并且抑菌效果最佳。证明其培养条件的不同对芽孢杆菌 BU108 菌株抑菌物的产生有很大

影响。无机离子质量浓度对 BU108 菌株抑菌物的产生也有很大影响, 在本研究中无机离子质量浓度最小时, 抑菌效果最好。由此可见, 生防菌株不同其培养条件相差很大, 每个菌株都有其相应的营养要求和培养方式。

本研究采用盆栽实验检验了菌株 BU108 对马铃薯疮痂病的抑制效果。实验设置了不同浓度的生防菌发酵液处理土壤, 发现抑菌效果与发酵菌液的浓度之间存在正相关, 发酵液浓度高的处理组其抑菌效果也高。原因可能是低浓度的发酵液菌数少则抑菌物分泌量也相对较少, 抑制率也低。本研究确定了 BU108 在土壤中具有抑制疮痂病发病的效果, 可以作为生物防治的候选。本次盆栽试验为了保证马铃薯发病, 盆栽土壤采用马铃薯疮痂病发病土壤, 马铃薯发病和生防菌抑菌效果表现良好, 但是在实际应用中面对复杂的土壤微生物, 能否取得理想效果还有待检验。

在前人利用芽孢杆菌防治植物病害的研究中, 芽孢杆菌多与其他微生物或药剂共同使用^[17-20]。在今后的实际应用中也可以尝试与其他生防菌组合使用, 增强对马铃薯疮痂病的抑制效果。

4 参考文献

- [1] 郝智勇. 马铃薯种薯疮痂病成因及防治措施[J]. 黑龙江农业科学, 2017(1): 158 – 159.
HAO Zhiyong. Formation factors and prevention measures of potato scab [J]. *Heilongjiang Agric Sci*, 2017(1): 158 – 159.
- [2] 李洪浩, 丁凡, 余韩开宗, 等. 马铃薯疮痂病的发生及防治措施[J]. 四川农业科技, 2017(2): 25 – 26.
LI Honghao, DING Fan, YU-HAN Kaizong, *et al.* Occurrence and control measures of potato scab [J]. *Sichuan Agric Sci Technol*, 2017(2): 25 – 26.
- [3] CAAMAÑO-ANTELO S, FERNÁNDEZ-NO I C, BÖHME K, *et al.* Genetic discrimination of food borne pathogenic and spoilage *Bacillus* spp. based on three housekeeping genes [J]. *Food Microbiol*, 2015, **46**: 288 – 298.
- [4] 朱玥妍, 刘姣, 杜春梅. 芽孢杆菌生物防治植物病害研究进展[J]. 安徽农业科学, 2012, **40**(34): 16635 – 16638.
ZHU Yueyan, LIU Jiao, DU Chunmei. Research progress of biological control in plant diseases by *Bacillus* spp. [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2012, **40**(34): 16635 – 16638.
- [5] 齐爱勇, 赵绪生, 刘大群. 芽孢杆菌生物防治植物病害研究现状[J]. 中国农学通报, 2011, **27**(12): 277 – 280.
QI Aiyong, ZHAO Xusheng, LIU Daqun. Research of biological control in plant disease by *Bacillus* spp. [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2011, **27**(12): 277 – 280.
- [6] 郭凤柳, 张海颖, 李勇, 等. 马铃薯疮痂病拮抗菌株 B1 的鉴定及防效测定[J]. 江苏农业科学, 2013, **41**(5): 90 – 93.
GUO Fengliu, ZHANG Haiying, LI Yong, *et al.* The identification and determination of antibacterial effect against potato scab of antagonistic strain B1 [J]. *Jiangsu Agric Sci*, 2013, **41**(5): 90 – 93.
- [7] 李勇. 马铃薯疮痂病菌拮抗菌的鉴定及抑菌药剂室内筛选[D]. 保定: 河北农业大学, 2012.
LI Yong. *Identification of Antagonistic Bacterium and Screening of Bactericides Against Potato Common Scab Pathogens* [D]. Baoding: Agricultural University of Hebei, 2012.
- [8] 李美丽. 枯草芽孢杆菌 B2 发酵工艺初探及其田间定殖和促生防病效果研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2008.
LI Meili. *Preliminary Study on Fermentation Technology of Bacillus subtilis B2 and Its Effects on Colonization and Growth Promoting in the Field* [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2008.
- [9] 张建平, 哈斯, 林团荣, 等. 不同杀菌剂对马铃薯疮痂病的防效试验[J]. 中国马铃薯, 2013, **27**(2): 83 – 86.
ZHANG Jianping, HA Si, LIN Tuanrong, *et al.* Control efficacy of various fungicides on potato common scab [J]. *Chin Potato J*, 2013, **27**(2): 83 – 86.
- [10] 朱茂山, 赵奎华, 刘长远, 等. 枯草芽孢杆菌 B18 菌株对黄瓜枯萎病菌抑菌作用研究[J]. 辽宁农业科学, 2003(3): 39.
ZHU Maoshan, ZHAO Kuihua, LIU Changyuan, *et al.* Study on the bacteriostasis of *Bacillus subtilis* B18 to cucumber fusarium wilt [J]. *Liaoning Agric Sci*, 2003(3): 39.
- [11] 叶晶晶, 曹宁宁, 吴建梅, 等. 生防芽孢杆菌的应用研究进展[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),

- 2014, **42**(8): 185 – 190.
- YE Jingjing, CAO Ningning, WU Jianmei, *et al.* Research progress on application of biocontrol *Bacillus* [J]. *J Northwest A&F Univ Nat Sci Ed*, 2014, **42**(8): 185 – 190.
- [12] 陈志谊, 刘永峰, 刘卹洲, 等. 植物病害生防芽孢杆菌研究进展[J]. 江苏农业学报, 2012, **28**(5): 999 – 1006.
- CHEN Zhiyi, LIU Yongfeng, LIU Youzhou, *et al.* Research progress in biocontrol of *Bacillus* spp. against plant diseases [J]. *Jiangsu J Agric Sci*, 2012, **28**(5): 999 – 1006.
- [13] 马晓丹, 张红星, 钟思琼, 等. 枯草芽孢杆菌 C3 产抗菌物质发酵培养基的优化[J]. 中国酿造, 2012, **31**(5): 10 – 14.
- MA Xiaodan, ZHANG Hongxing, ZHONG Siqiong, *et al.* Optimization of fermentation medium for antimicrobial substances from *Bacillus subtilis* C3 [J]. *Chin Brew*, 2012, **31**(5): 10 – 14.
- [14] 宋卡魏, 王星云, 张荣意. 培养条件对枯草芽孢杆菌 B68 芽孢产量的影响[J]. 中国生物防治, 2007, **23**(3): 255 – 259.
- SONG Kawei, WANG Xingyun, ZHANG Rongyi. Culture conditions affecting spore production of *Bacillus subtilis* B68 [J]. *Chin J Biol Control*, 2007, **23**(3): 255 – 259.
- [15] 郝林华, 孙丕喜, 姜振波, 等. 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)液体发酵条件[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2006, **24**(4): 380 – 385.
- HAO Linhua, SUN Peixi, JIANG Zhenbo, *et al.* Liquid fermentation conditions of *Bacillus subtilis* [J]. *J Shanghai Jiaotong Univ Agric Sci*, 2006, **24**(4): 380 – 385.
- [16] YOUNIS M A M, HEZAYEN F F, NOUR-ELDEIN M A, *et al.* Optimization of cultivation medium and growth conditions for *Bacillus subtilis* KO strain isolated from sugar cane molasses [J]. *Ame-Eur J Agric Environ Sci*, 2010, **7**(1): 31 – 37.
- [17] 时新瑞, 范书华, 邵广忠, 等. 利用新型土壤颗粒剂防控马铃薯疮痂病[J]. 中国马铃薯, 2015, **29**(6): 362 – 364.
- SHI Xinrui, FAN Shuhua, SHAO Guangzhong, *et al.* Prevention of potato scab using new soil granules [J]. *Chin Potato J*, 2015, **29**(6): 362 – 364.
- [18] 孙静, 金光辉, 刘喜才. 不同药剂及施用方式对马铃薯疮痂病的防效[J]. 中国马铃薯, 2015, **29**(2): 107 – 111.
- SUN Jing, JIN Guanghui, LIU Xicai. Control effect of different fungicides and application methods on potato common scab disease [J]. *Chin Potato J*, 2015, **29**(2): 107 – 111.
- [19] 张露, 艾玉廷, 马健, 等. 不同比例氟啶胺对马铃薯块茎疮痂病防治效果[J]. 中国马铃薯, 2013, **27**(3): 175 – 178.
- ZHANG Lu, AI Yuting, MA Jian, *et al.* Control efficacy of various leaves of fluazinam on potato tuber common scab [J]. *Chin Potato J*, 2013, **27**(3): 175 – 178.
- [20] 陈志谊. 芽孢杆菌类生物杀菌剂的研发与应用[J]. 中国生物防治学报, 2015, **31**(5): 723 – 732.
- CHEN Zhiyi. Research and application of bio-fungicide with *Bacillus* spp. [J]. *Chin J Biol Control*, 2015, **31**(5): 723 – 732.