

王欣悦, 杨思葭, 王晴, 等. 一株枯草芽孢杆菌的鉴定和抑菌作用研究[J]. 黑龙江农业科学, 2020(3):21-26.

一株枯草芽孢杆菌的鉴定和抑菌作用研究

王欣悦¹, 杨思葭¹, 王晴¹, 文雪¹, 王文中¹, 马超¹, 郑树生², 王彦杰¹

(1. 黑龙江八一农垦大学 生命科学技术学院/寒区环境微生物与农业废弃物资源化利用重点实验室, 黑龙江 大庆 163319; 2. 黑龙江八一农垦大学 实验设备管理中心, 黑龙江 大庆 163319)

摘要:为明确一株具有生防作用的细菌种类及对几种病原真菌的抑制作用,通过 16SrDNA 序列分析对菌株进行鉴定,采用平板对峙法研究其发酵液、无菌培养滤液和细胞破碎液的抑菌活性,设计不同温度处理、设置不同 pH 环境和不同 pH 处理来探究该菌的抑菌效能。结果表明:供试菌株为枯草芽孢杆菌,命名为 KC-1,该菌株的发酵液对禾谷镰刀菌、镰孢菌、玉米链格孢、稻梨孢、尖孢镰刀菌均有显著的抑制作用,对镰孢菌的抑制率最高,可达 74.39%;抑菌活性物质不耐热,在 100℃处理 30 min 后,发酵液对病原真菌无明显抑制作用;细胞破碎后仍然具有抑菌作用,KC-1 菌体破碎液稀释 1.0×10^4 倍及 pH5~10 的条件下仍具有稳定的抑菌活性。KC-1 菌具有高效、广谱的抑菌活性,对病原真菌的拮抗作用效果明显,有一定的应用价值。

关键词:枯草芽孢杆菌;对峙培养;抑菌活性;抑菌谱

真菌病害是危害农作物的一种重大自然灾害。禾谷镰刀菌引发的小麦茎基腐病是一种小麦根部病害,严重威胁小麦生产安全,该病菌产生的毒素还会造成粮食污染^[1-4]。尖孢镰刀菌是一种世界性分布的土传病原真菌,可以侵染 120 多种不同的植物物种,其中包括番茄、香蕉、棉花和苜蓿等^[5-6],可以引起建兰萎蔫至死亡及香蕉枯萎病的发生^[7]。在生产上对这些疾病的防治主要是使用化学杀菌剂多菌灵,但由于该药剂作用位点单一,长期使用已使病原菌产生一定的抗药性。

生物防治技术具备安全、有效、环保无污染等特性,使其成为农业生产方向新趋势。由于生物防治技术是一门新兴的技术产业,在研发应用上并不成熟,因此还需进一步研究拓展。生防细菌的筛选及应用是生物防治技术研究的热点之一,国内外对其研究已有多年。芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)作为重要的生物防治资源,是目前生防细菌中研究较多的一类^[8]。毕秋艳等^[9]研究发现枯草芽孢杆菌 HMB-20428 与化学杀菌剂啞菌酯及硅氧烷化合物互作对葡萄霜霉病菌(*Plasmopara*

viticola)的抑制作用明显。王丽花等^[10]研究发现枯草芽孢杆菌 Y1336 不同稀释倍数代谢产物对月季白粉病均具有防效作用,效果随稀释倍数升高而降低。宗英等^[11]研究发现贝莱斯芽孢杆菌 JS25R 可高效抑制禾谷镰刀菌的菌丝生长,在温室条件下其发酵液能有效降低小麦赤霉病的发病率、发病程度和病情指数。迄今所研究的芽孢杆菌大多是与化学药剂互作而达到防效作用,或筛选的细菌仅对单一或部分病原菌具有抑制效果,不具备抗菌广谱性。目前,对芽孢杆菌的研究还处于试验阶段,对剂型的深入研究较少,在将其破碎研究其内容物方面、及不同环境条件方面的研究较少。本试验选取了 5 种不同科属的病原菌,测试供试细菌对病原菌的抑制作用,分析供试细菌发酵液、细菌细胞破碎液以及在不同温度和 pH 条件下对病原菌的抑制作用,避免了单一方面研究的局限性,为生防细菌在生物防治领域发挥作用提供新的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试细菌由黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院微生物实验室提供。

供试病原菌为禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)、镰孢菌(*Fusarium* spp.)、玉米链格孢(Maize *Alternaria tenuis* Nees)、稻梨孢(*Piricularia oryzae*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*),由黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院

收稿日期:2019-11-30

基金项目:黑龙江八一农垦大学创新创业项目(201910223008);黑龙江省大学生创新创业训练计划项目(201910223008)。

第一作者:王欣悦(1997-),女,在读学士,专业方向为农用微生物菌剂研究。E-mail:359162096@qq.com。

通信作者:王彦杰(1972-),男,博士,教授,博导,从事农业废弃物资源化研究。E-mail:wangyanjie1972@163.com。

发酵实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 供试细菌的扩大培养 无菌条件下,将所得生防细菌用接种环挑出部分菌体,在营养琼脂培养基上划线纯化,经镜检确定是芽孢杆菌纯种,从中选取纯净的单菌落转接于营养琼脂斜面上,37℃培养1~2 d。配制牛肉膏蛋白胨培养基500 mL,分装至5个三角瓶(250 mL)灭菌备用。挑取营养琼脂斜面上的单菌落接入液体培养基中,恒温摇床37℃,180 r·min⁻¹振荡培养24 h。

1.2.2 细菌发酵上清液的制备 细菌发酵液:无菌条件下,从保存平皿上用接种环挑出单菌落,在营养琼脂培养基上划线纯化,经镜检确定是芽孢杆菌纯种,从中选取纯净的单菌落转接于营养琼脂斜面上,37℃培养1~2 d。挑取营养琼脂斜面上的单菌落接入液体培养基中,恒温摇床37℃,180 r·min⁻¹振荡培养24 h^[12]。

细菌无菌培养滤液:已制备好的细菌发酵液经多次纯化后得到较纯净的菌液,过滤得到上清液。

1.2.3 细菌细胞破碎方法 将制备好的细菌发酵液经多次纯化得到较纯净的菌液,6 000 r·min⁻¹离心,用无菌水清洗再离心的菌体,重悬后利用超声波破碎机破碎菌体,得到细菌细胞破碎液。4个三角瓶(50 mL)中分别加入9 mL无菌水,用移液器从原液中吸取1 mL加入50 mL三角瓶混匀,再从中吸取1 mL加入第二个三角瓶,依次梯度稀释。将细菌上清液和破碎液原液按比例配制成 1.0×10^{-1} 、 1.0×10^{-2} 、 1.0×10^{-3} 、 1.0×10^{-4} 四个浓度梯度。

1.2.4 供试细菌16S rDNA的扩增及序列分析 基因组DNA提取按SK8255(细菌)试剂盒操作。

采用常规方法,提取菌株基因组DNA作为模板,扩增选用的引物序列。根据相关基因设计得到27F(AGTTTGATCMTGGCTCAG)和1492R(GGTTACCTTGTTACGACTT)。根据设计引物的退火温度和扩增片段大小设计PCR反应程序。反应体系:Template(基因组DNA $20 \sim 50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) $0.5 \mu\text{L}$ 、 $10 \times \text{Buffer}(\text{with Mg}^{2+})$ $2.5 \mu\text{L}$ 、dNTP(各 $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) $1 \mu\text{L}$ 、酶 $0.2 \mu\text{L}$ 、F($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) $0.5 \mu\text{L}$ 、R($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) $0.5 \mu\text{L}$ 、加双蒸水至 $25 \mu\text{L}$ 。PCR反应结束,用1%琼脂糖凝胶电泳检测。

PCR产物由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。所测得的基因序列在NCBI上利用BLAST进行同源性比较。根据序列比对结果,通过MEGA5.0软件neighbor joining法构建系统进化树。

1.2.5 细菌发酵液对病原真菌生长的影响 将保存的5种农作物病原真菌转接到PDA培养基上进行活化,27℃培养,待菌丝长满平板后,采用平板对峙法,在PDA平板中央,接种一块直径为5 mm病原菌菌饼,距菌饼3 cm处,接入生防细菌发酵液,27℃培养6 d,测量细菌与不同病原真菌之间的抑菌圈半径^[12],计算出抑菌率。

抑菌率(%)=(对照半径-抑菌半径)/对照半径 $\times 100$

1.2.6 细菌细胞无菌培养滤液和破碎液对病原真菌生长的影响 在PDA培养基中接入若干直径为5 mm的病原菌菌饼,距菌饼3 cm处,接入不同浓度梯度细菌细胞无菌培养滤液、破碎液原液及稀释液,27℃环境下培养5~6 d,测量其抑菌半径^[12]。

1.2.7 不同温度处理的细菌发酵液对病原真菌生长的影响 在无菌超净台上,将制备好的发酵液分装入2 mL的EP管中,分别置于40、50、60、70、80、90和100℃的恒温水浴锅中水浴处理30 min,37℃为对照组。30 min水浴后取出并置于超净台待用。以镰孢菌(*Fusarium* spp.)作为指示菌,活化后在PDA培养基中接入若干直径为5 mm的菌饼,接入不同温度处理的细菌发酵液,进行对峙试验,方法参照郭春兰^[12]方法略加修改。

1.2.8 不同pH条件的细菌发酵液对病原真菌生长的影响 配制 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的NaOH溶液和 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的H₂SO₄溶液备用。配制pH正常的PDA培养基,用配制好的NaOH溶液和H₂SO₄溶液分别调pH至4、5、6、7、8、9和10,灭菌。以镰孢菌(*Fusarium* spp.)作为指示菌,活化后用5 mm打孔器打成若干菌饼,分别用接种针接入不同pH条件的PDA培养基,接入细菌发酵液进行对峙试验。5~6 d后测定其抑菌率。

1.2.9 经不同pH处理后细菌发酵液与几种病原真菌对峙培养 将制备好的细菌发酵液分装至7个50 mL的三角瓶中,每个10 mL,使用配制好的NaOH溶液和H₂SO₄溶液将发酵液的pH分别调至4、5、6、7、8、9和10,处理30 min。以镰孢

菌(*Fusarium* spp.)作为指示菌,活化后用 5 mm 打孔器打成若干菌饼,用接种针接入 PDA 培养基(pH 自然),接入不同 pH 处理的细菌发酵液进行对峙实验。5~6 d 后测定其抑菌率。

1.2.10 数据分析 利用 SPSS 22.0 软件对试验数据进行单因素方差分析,应用最小显著差数(LSD)法检验差异显著性。

2 结果与分析

2.1 KC-1 菌 16S rDNA 序列分析

利用通用引物扩增出的 16S rDNA 序列大小约为 1 469 bp(图 1)。

由图 2 可知,将所得序列在 NCBI 中经 Blastn 初步比对,其与枯草芽孢杆菌相似度较高,在发育树中所得序列与枯草芽孢杆菌聚为一簇,同源性高达 99.59%,鉴定为枯草芽孢杆菌,命名为 KC-1。经 NCBI 提交序列,序列登录号为 MK910865。

2.2 KC-1 菌发酵液与几种病原真菌对峙培养

采用菌丝生长抑制法,测定 KC-1 菌拮抗 5 种病原真菌对峙平板抑菌率。KC-1 菌对 5 种农作

物病原真菌菌丝的生长均具有明显的抑制作用(图 3),抑制效果明显(图 4)。平均抑制率为 64.24%,对禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)、镰孢菌(*Fusarium* spp.)、玉米链格孢(Maize 职 *Alternaria tenuis* Nees)、稻梨孢(*Piricularia oryzae*)和尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)的抑制率分别为 60.90%、74.39%、64.10%、65.63%和 61.18%。

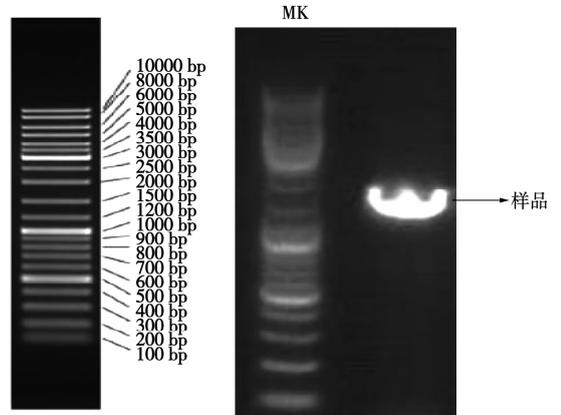


图 1 KC-1 菌电泳结果

Fig. 1 The electrophoresis results of KC-1 bacteria

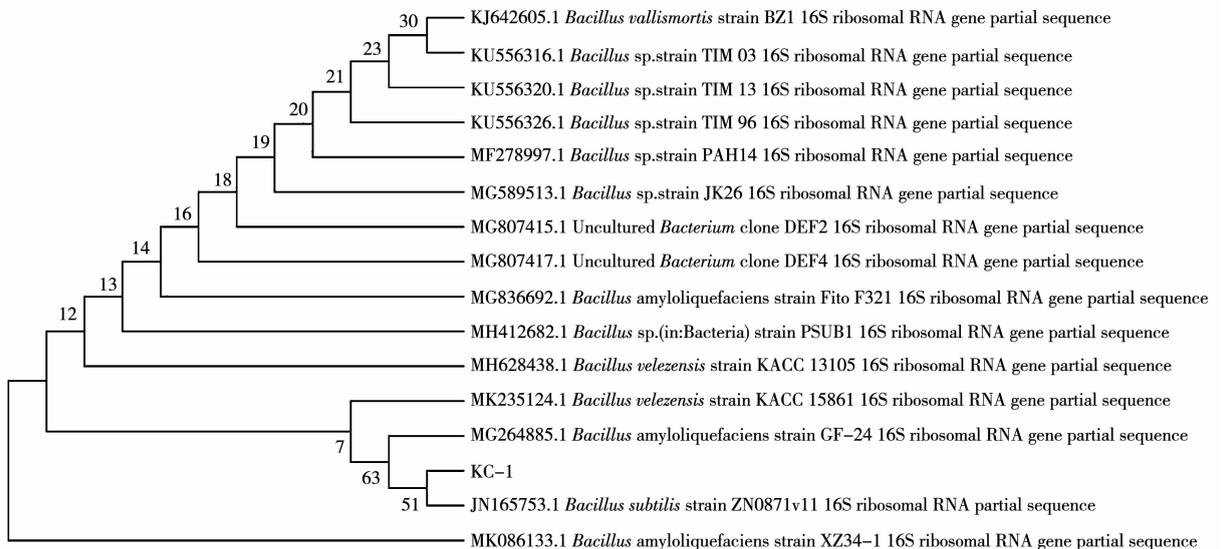


图 2 KC-1 的 16S rRNA 系统发育树

Fig. 2 16S rRNA phylogenetic tree of KC-1 bacteria

2.3 KC-1 菌细胞无菌培养滤液和破碎液对病原真菌生长的影响

稀释 KC-1 菌破碎细胞无菌培养滤液和破碎液,作用于病原真菌。由表 1 可知,KC-1 菌的无菌培养滤液对病原真菌无抑制作用;KC-1 菌细胞破碎后仍然具有抑菌作用,且与破碎前抑菌率相

比无明显差异。抑菌作用随稀释浓度梯度的增加而减弱。

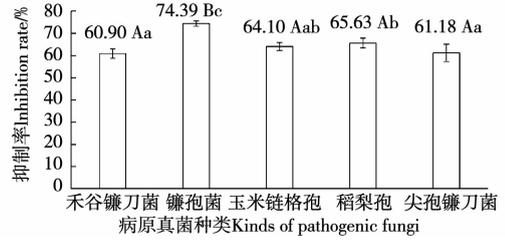
2.4 不同温度处理的 KC-1 菌发酵液与几种病原真菌对峙培养

由图 5 可知,KC-1 菌发酵液经 40、50 和 60 ℃ 处理,抑菌效果减弱,与对照 37 ℃ 差异极显著;经

70 和 80 °C 处理, 抑菌率明显下降, 对镰孢菌的抑制率低于 60%; 经 90 °C 温度处理, 抑菌率明显下降, 对镰孢菌的抑制率低于 50%; 经 100 °C 处理, 发酵液对病原真菌几乎无抑菌效果。

2.5 在不同 pH 条件下 KC-1 菌发酵液与病原真菌对峙培养

由图 6 可知, 培养基 pH 为 4 时, KC-1 菌和指示菌均未生长; pH 为 7 时抑菌效果最明显, 对镰孢菌的抑制率为 60.12%; pH 高于 7 或低于 7 时, 抑菌效果明显下降; pH 为 4 时 KC-1 菌几乎无活性; pH 为 10 时 KC-1 菌的活性较 pH 为 9 时又明显下降, 活性很低。

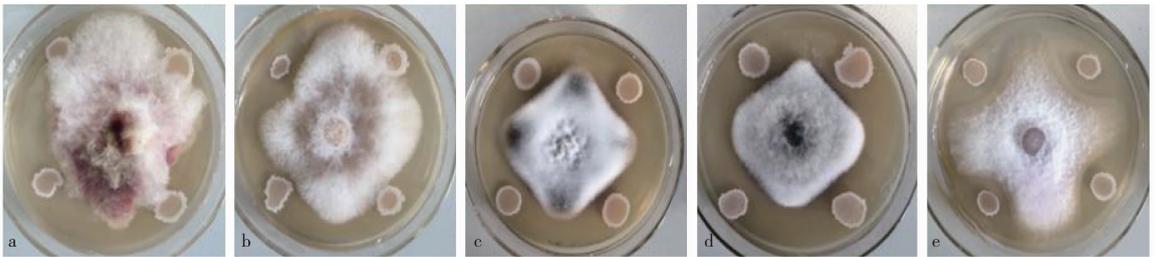


不同大小写字母表示差异达显著 ($P \leq 0.05$) 或极显著 ($P \leq 0.01$) (下同)。

The different capital and lower case letters indicate significant difference ($P \leq 0.05$) or extremely significant difference ($P \leq 0.01$) (the same below).

图 3 KC-1 菌发酵液对 5 种病原真菌的抑制率

Fig. 3 The inhibition rate of KC-1 bacteria fermentation broth to five kinds of pathogenic fungi



a: 禾谷镰刀菌; b: 镰孢菌; c: 玉米链格孢; d: 稻梨孢; e: 尖孢镰刀菌

a: *Fusarium graminearum*; b: *Fusarium* spp.; c: *Maize Alternaria tenuis* Nees; d: *Piricularia oryzae*; e: *Fusarium oxysporum*

图 4 KC-1 菌发酵液对 5 种病原真菌抑制作用的图示

Fig. 4 The diagrams of the inhibition rate of KC-1 bacteria fermentation broth to five kinds of pathogenic fungi

表 1 不同浓度梯度 KC-1 菌细胞破碎液对 5 种病原真菌抑制率

Table 1 The inhibition ratio of different concentration gradient of KC-1 bacteria cell fragmentation broth to five kinds of pathogenic fungi

浓度梯度 Concentration gradient	抑制率 Inhibition rate/%				
	禾谷镰刀菌 <i>Fusarium graminearum</i>	镰孢菌 <i>Fusarium</i> spp.	玉米链格孢 <i>Maize Alternaria tenuis</i> Nees	稻梨孢 <i>Piricularia oryzae</i>	尖孢镰刀菌 <i>Fusarium oxysporum</i>
原液	64.88 Aa	65.24 Aa	58.22 Ba	58.55 Ba	59.59 Ba
10 倍	62.50 Aab	59.45 ABb	57.89 ABa	59.87 ABa	55.81 Bab
10 ² 倍	59.82 Abc	56.71 Abc	55.59 Aa	54.93 Aa	57.56 Aa
10 ³ 倍	58.63 Abc	57.32 Abc	44.74 Db	54.61 ABa	51.74 BCb
10 ⁴ 倍	55.95 Ac	54.27 ABc	43.42 Cb	55.92 Aa	51.16 ABb

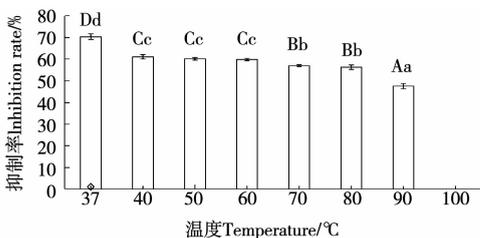


图 5 不同温度处理 KC-1 菌发酵液对镰孢菌的抑制率

Fig. 5 The inhibition rate of different temperature treatments of KC-1 bacteria fermentation broth to *Fusarium* spp.

2.6 不同 pH 处理后的 KC-1 菌发酵液与病原真菌对峙培养

由图 7 可知, 发酵液经不同 pH 处理后, 抑菌率变化明显 ($P \geq 0.05$)。发酵液 pH 调至 4 时, 处理后对镰孢菌并无抑制作用; 处理 pH 为 5 和 6 时, 抑菌率趋于 pH 自然时的结果; 处理 pH 为 7 和 8 时, 抑菌率明显下降, 对镰孢菌的抑制率低于 65%; 当处理 pH 为 9 和 10 时, 抑菌率再次下降了一个梯度, 但仍然具有抑制作用。

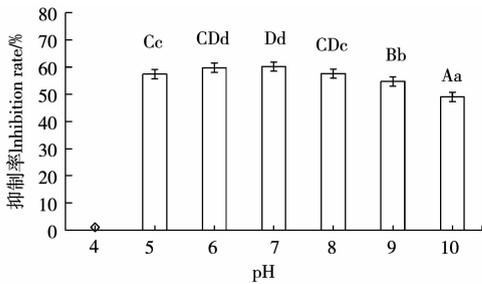


图6 KC-1菌在不同pH条件对镰孢菌的抑制率

Fig. 6 The inhibition rate of different pH conditions of KC-1 bacteria to *Fusarium* spp.

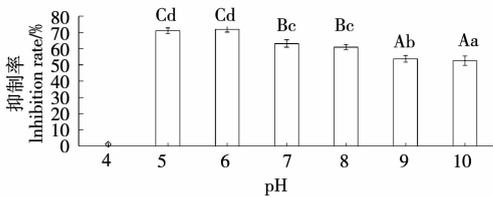


图7 KC-1菌发酵液经不同pH处理后对病原菌的抑制率

Fig. 7 The inhibition rate of different pH treatments of KC-1 bacteria fermentation broth to pathogenic fungi

3 讨论

研究发现,枯草芽孢杆菌对禾谷镰刀菌、番茄早疫病菌^[13]、辣椒疫霉病菌^[13]、小麦全蚀病菌^[14]和小麦茎基腐病菌等多种植物病原菌具有拮抗作用。大多数的拮抗细菌由感染病菌的植株上筛选,或直接从种植农作物的土壤中筛选得到。宗英等^[11]从感染赤霉病的麦穗上通过平板对峙法筛选得到贝莱斯芽孢杆菌 JS25R 进行研究,发现其发酵液对禾谷镰刀菌 J07 有很好的抑制作用。黄华毅等^[15]从枣树根土壤中分离到拮抗细菌 STO-12,通过平板对峙法和菌丝生长速率法,发现该菌株及其无菌培养滤液对枣缩果病菌、杨树炭疽病菌和杨树腐烂病菌均具有很好的抑菌活性。杨晓燕等^[16]通过枯草芽孢杆菌菌液对几种植物病原菌的菌丝抑制试验、菌丝形态影响试验以及分生孢子萌发抑制试验,发现其对6种病原真菌的菌丝形态、菌丝生长、产孢和分生孢子萌发都有明显的破坏或抑制作用。Chenniappan 等^[17]研究分离的157株根瘤菌对7种根瘤菌的拮抗能力,结果表明16株根瘤菌对7种根瘤菌均表现出一致的拮抗活性;大多数 PGPR,尤其是铜绿假单胞菌 MML2424 和枯草杆菌 MML2490,具有良好的商品化前景,可用于植物促生和姜黄根腐病的防治。本试验中枯草芽孢杆菌 KC-1 由病原菌培养平板中筛选得到,研究发现其发酵液及其细

胞破碎液能有效抑制禾谷镰刀菌、镰孢菌、玉米链格孢、稻梨孢和尖孢镰刀菌菌丝生长,减少农作物被病原菌侵害的几率。KC-1 发酵液对5种病原菌的平均抑制率高达60%以上,其中对镰孢菌的抑制率最高,达74.39%,KC-1 菌细胞破碎液在稀释倍数达10 000倍时仍具有较高的活性,表明该菌在生物防治方面具有较高的应用价值。本试验研究发现 KC-1 菌的无菌培养滤液并无抑菌能力,证明该菌的菌体和细胞破碎物是具有抑菌作用的,对 KC-1 菌抑菌物质的研究应从菌体着手。

陈晓萌等^[14]对枯草芽孢杆菌 MG-4 的分泌物研究发现 MG-4 分泌的抑菌物质在中性及酸性条件稳定,对碱敏感。在 pH2~7 时 CFS(发酵无菌上清液)相对活性为 98.8%~100.0%,从 pH8~12,相对活性由 98.8% 迅速降至 2.1%。本研究发现枯草芽孢杆菌 KC-1 对禾谷镰刀菌等5种病原真菌均有明显拮抗作用,具有抑菌广谱性。研究过程中发现枯草芽孢杆菌 KC-1 发酵液在中性及碱性环境中能够具有较好的抑菌能力,对酸性敏感。在环境 pH 为 5 到 10 时 KC-1 菌发酵液的抑菌活性在 50%~60% 波动,抑菌能力稳定。而在热稳定性方面,与对照相比,处理温度越高,KC-1 菌发酵液抑菌能力越弱,这与陈晓萌等^[14]的研究结果相似。然而发酵液在 100℃ 处理 30 min 后几乎丧失抑菌能力,对比之前的研究结果,KC-1 菌所含有的抑菌物质并不耐热,由此可推测该菌抑菌物质可能为抗菌蛋白。

4 结论

枯草芽孢杆菌作为重要的生防微生物,具有较强的竞争生存能力,能够同病原菌竞争植物周围的营养、生存空间并分泌抗菌物质抑制病原菌生长,同时激发植物防御系统抵抗病原菌入侵。枯草芽孢杆菌菌剂与化学药剂的复配施用可减少化学农药的污染,提高农作物病害的防效作用,具有广阔的开发前景。

本试验经过对 KC-1 菌株和发酵液抑菌作用的研究,证明 KC-1 菌的抑菌能力,为枯草芽孢杆菌的应用提供更丰富的材料。且本试验以温度和 pH 两个方面对 KC-1 菌发酵液抑菌能力进行试验研究,为以后 KC-1 菌抑菌作用条件的优化提供参考。KC-1 菌对病原真菌具有拮抗作用且效果明显,是一株具有开发潜力的枯草芽孢杆菌,可以对其抑菌成分进行试验分析、对其分离提纯进行更深入研究。

参考文献:

- [1] 张洁, 汤蒙蒙, 夏明聪, 等. 枯草芽胞杆菌 YB-05 与申嗪霉素复配防治小麦茎基腐病[J]. 中国生物防治学报, 2018, 34(6): 866-872.
- [2] del Blanco I, Froberg R, Stack R, et al. Detection of QTL linked to *Fusarium* head blight resistance in Sumai 3-derived North Dakota bread wheat lines[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 106(6): 1027-1031.
- [3] 郭炜, 李雪萍, 漆永红, 等. 西北地区冬小麦茎基腐病原假禾谷镰刀菌的鉴定及种质资源抗性筛选[J]. 甘肃农业大学学报, 2018, 53(6): 164-170.
- [4] 钱恒伟, 迟梦宇, 赵颖, 等. 禾谷镰刀菌 CYP51A 基因对五种三唑类杀菌剂敏感性的影响[J]. 植物保护学报, 2018, 45(6): 1381-1388.
- [5] 刘香萍, 敬雪敏, 闫红秀, 等. 尖孢镰刀菌的分离鉴定及不同苜蓿品种芽期抗病性[J]. 植物保护, 2019(4): 229-235.
- [6] 徐志周, 王明元, 杜锦鹏, 等. 一株香蕉枯萎病拮抗菌 HQB-1 的分离鉴定及其发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2019, 46(7): 1611-1618.
- [7] 姚锦爱, 张鸿, 黄鹏, 等. 建兰茎腐病原菌尖孢镰刀菌 F-02 的绿色荧光蛋白基因标记[J]. 福建农业学报, 2019, 34(1): 70-75.
- [8] 刘卹洲, 陈夕军, 尹小乐, 等. 23 株芽胞杆菌及其脂肽类化合物抑菌活性比较[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(3): 533-542.
- [9] 毕秋艳, 韩秀英, 马志强, 等. 枯草芽胞杆菌 HMB-20428 与化学杀菌剂互作对葡萄霜霉病菌抑制作用和替代部分化学药剂减量用药应用[J]. 植物保护学报, 2018, 45(6): 1396-1404.
- [10] 王丽花, 杨秀梅, 谭程仁, 等. 枯草芽胞杆菌 Y1336 对月季白粉病防效及土壤元素含量的影响[J]. 西南农业学报, 2018, 31(12): 2569-2574.
- [11] 宗英, 赵月菊, 刘阳, 等. 一株贝莱斯芽胞杆菌抑制禾谷镰刀菌的研究[J]. 核农学报, 2018, 32(2): 310-317.
- [12] 郭春兰. 枯草芽胞杆菌 21 的分离及其抑菌能力研究. 微生物资源的开发与利用[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2014.
- [13] 谢梓语, 郭恩辉, 孙雨波, 等. 枯草芽胞杆菌 B1409 对番茄和辣椒的防病促生作用[J]. 植物保护学报, 2018, 45(3): 520-527.
- [14] 陈晓萌, 王亚杰, 李佳, 等. 枯草芽胞杆菌 MG-4 抑制小麦全蚀病菌物质及其性质分析[J]. 植物保护学报, 2018, 45(3): 511-519.
- [15] 黄华毅, 王佳琳, 马荣, 等. 枯草芽胞杆菌 STO-12 抑菌活性及其抑菌物质分析[J]. 浙江农业学报, 2017, 29(1): 81-88.
- [16] 杨晓燕, 王钰鑫, 叶伟伟, 等. 枯草芽胞杆菌对几种植物病原真菌的抑菌活性[J]. 工业微生物, 2018, 48(6): 32-38.
- [17] Chenniappan C, Narayanasamy M, Daniel G M, et al. Bio-control efficiency of native plant growth promoting rhizobacteria against rhizome rot disease of turmeric[J]. Biological Control, 2019, 129: 55-64.

Identification of *Bacillus subtilis* and the Inhibitory Effect on Pathogenic Fungi

WANG Xin-yue¹, YANG Si-jia¹, WANG Qing¹, WEN Xue¹, WANG Wen-zhong¹, MA Chao¹, ZHENG Shu-sheng², WANG Yan-jie¹

(1. Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Environmental Microbiology and Recycling of Argo-waste in Cold Region, College of Life Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China; 2. Experimental Equipment Management Center of Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

Abstract: In order to determine the bacterial species with the biological control effect and the inhibitory effect on several kinds of pathogenic fungi, the bacterial strain was identified by the 16SrDNA sequence analysis, and the fermentation broth, aseptic culture filtrate and cell fragmentation solution was studied by the plate confrontation method. Different temperature treatment, different pH environment and different pH treatment were designed to explore the antibacterial efficacy of the bacteria. The results showed that the tested strains was identified as *Bacillus subtilis*, named KC-1, the KC-1 fermentation broth has a significant inhibitory effect on *Fusarium graminearum*, *Fusarium* spp., Maize *Alternaria tenuis* Nees, *Piricularia oryzae* and *Fusarium oxysporum*, and the inhibition ratio of *Fusarium* spp. was as high as 74.39%; The antibacterial active substances were not thermolabile, the fermentation broth had no obvious inhibitory effect on pathogenic fungi after the treatment at 100 °C for 30 minutes; it still had antibacterial effect after cell being fragmented, the KC-1 bacteria fragmentation solution still had a stable antibacterial activity after being diluted 10⁴ times and at a pH level of 5-10. The KC-1 bacteria with the high efficiency and the broad-spectrum antibacterial activity has obvious antagonistic effect on pathogenic fungi and considerable applied value.

Keywords: *Bacillus subtilis*; confrontation training; antibacterial activity; antimicrobial spectrum