

研究报告

香蕉炭疽菌拮抗菌 HSL3-29 的分离鉴定及防治效果

潘洁明^{1,2}, 玉焯¹, 陈韦唯¹, 贝永建^{1,2}, 辛桂瑜^{1,2}, 蒋媛媛¹, 刘瑶¹, 牙彩娜¹, 赖洁玲^{*1,2}

1 玉林师范学院生物与制药学院, 广西 玉林 537000

2 广西高校亚热带生物资源保护与利用重点实验室, 广西 玉林 537000

潘洁明, 玉焯, 陈韦唯, 贝永建, 辛桂瑜, 蒋媛媛, 刘瑶, 牙彩娜, 赖洁玲. 香蕉炭疽菌拮抗菌 HSL3-29 的分离鉴定及防治效果[J]. 微生物学通报, 2024, 51(3): 898-909.

PAN Jieming, YU Ye, CHEN Weiwei, BEI Yongjian, XIN Guiyu, JIANG Yuanyuan, LIU Yao, YA Caina, LAI Jieling. Isolation, identification, and biocontrol effect of a bacterial strain HSL3-29 against *Colletotrichum musae*[J]. Microbiology China, 2024, 51(3): 898-909.

摘要: 【背景】香蕉炭疽病是由香蕉炭疽菌(*Colletotrichum musae*)侵染引起的真菌性病害, 严重制约香蕉产业的发展。【目的】从广西壮族自治区红树林土样中筛选出对香蕉炭疽病有拮抗效果的生防细菌, 并评价发酵液的防治效果。【方法】采用平板稀释法分离菌株, 以 *Colletotrichum musae* 为指示菌, 利用平板对峙法筛选具有拮抗效果的菌株; 通过形态特征、生理生化特征及 16S rRNA 基因序列分析确定其分类地位; 采用单因素控制法研究其生物学特性; 对峙生长法评价其生物活性; 离体法测定其发酵液的防效。【结果】筛选获得一株对香蕉炭疽菌具有较强拮抗效果的菌株 HSL3-29, 其皿内抑制活性为 81.83%, 并且对其他 6 种病原真菌具有不同程度的抑制作用, 抗菌谱较广。根据该菌的形态特征、生理生化特征及 16S rRNA 基因序列分析, 初步鉴定菌株 HSL3-29 为 *Bacillus amyloliquefaciens*。该菌株的对数生长期为 4–24 h; 对氨基青霉素和万古霉素敏感; 具有显著的高温能力, 并且在高盐的环境中仍能存活。发酵液对香蕉炭疽病的防控效果为 39.4%。【结论】分离筛选到一株对香蕉炭疽菌有拮抗活性的细菌, 为进一步开发香蕉炭疽病的生防菌剂提供了菌种资源。**关键词:** 分离鉴定; 香蕉炭疽病; 生物活性; 生物学特征; 生物防效

资助项目: 广西高校中青年教师基础能力提升项目(2021KY0582); 玉林师范学院大学生创新创业训练计划(S202210606124); 玉林师范学院高层次人才科研启动基金(G2019ZK49)

This work was supported by the Basic Ability Improvement Project of Young and Middle-aged Teachers in Guangxi Universities (2021KY0582), the Innovation and Entrepreneurship Training Program for Undergraduates of Yulin Normal University (S202210606124), and the Scientific Research Foundation of Yulin Normal University (G2019ZK49).

*Corresponding author. E-mail: jllai_01@163.com

Received: 2023-09-18; Accepted: 2023-11-02; Published online: 2023-12-12

Isolation, identification, and biocontrol effect of a bacterial strain HSL3-29 against *Colletotrichum musae*

PAN Jieming^{1,2}, YU Ye¹, CHEN Weiwei¹, BEI Yongjian^{1,2}, XIN Guiyu^{1,2}, JIANG Yuanyuan¹, LIU Yao¹, YA Caina¹, LAI Jieling^{*1,2}

1 College of Biology & Pharmacy, Yulin Normal University, Yulin 537000, Guangxi, China

2 Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Bio-resources, Education Department of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Yulin 537000, Guangxi, China

Abstract: [Background] Banana anthracnose is a fungal disease caused by *Colletotrichum musae*, which seriously restricts the development of the banana industry. [Objective] To screen the biocontrol bacteria against *Colletotrichum musae* from mangrove soil samples in Guangxi Zhuang Autonomous Region, and evaluate the biocontrol effect of the fermentation broth. [Methods] The biocontrol bacteria were isolated by dilution plate method, and a plate confrontation experiment was conducted to screen out the strains with antagonistic effects on *C. musae*. The bacterial strain was identified based on morphological characteristics, physiological and biochemical properties, and 16S rRNA sequencing results. The biological characteristics of the strain screened out were studied by single factor experiments. The antagonistic activity was evaluated based on the mycelial growth rate. The biocontrol effect of the fermentation broth was examined with detached banana. [Results] A strain HSL3-29 was isolated from mangrove soil. It had a strong antagonistic effect against *C. musae*, with the inhibition rate of 81.83%. HSL3-29 had a broad antimicrobial spectrum, with inhibitory effects on other six plant pathogenic fungal species. HSL3-29 was identified as *Bacillus amyloliquefaciens*. The strain entered the logarithmic growth stage during 4–24 h. It was sensitive to ampicillin and vancomycin, had tolerance to high temperatures, and could survive in high salt environments. The fermentation broth of the strain showed the biocontrol effect up to 39.4% on the banana fruits infected with anthracnose. [Conclusion] A strain of *B. amyloliquefaciens* with strong antagonism to *C. musae* was isolated, which provided strain resources for the development of biocontrol agents for banana anthracnose. **Keywords:** isolation and identification; banana anthracnose; biological activity; biological characteristic; biological control

香蕉炭疽病是由香蕉炭疽菌(*Colletotrichum musae*)侵染引起的真菌性病害,严重影响香蕉的田间生长和采后运输及销售^[1]。该病侵染香蕉果实后果皮会出现黑褐色斑点,随之扩大连成黑色斑块,最终导致果实腐烂^[2]。该病还会影响香蕉叶、苞片、花器等部位^[3],严重影响果实的生长发育。目前针对香蕉炭疽菌的防治手段主要以化学防治为主,该方法一方面容易使病

原菌产生抗性,另一方面易造成环境污染^[4-8],威胁人类健康。因此,探索高效防治香蕉炭疽病的方法对香蕉产业具有重要意义。

利用生物防治的方法防治植物病害具有无环境污染、不易产生抗性等优点,深受研究者的青睐。前人研究显示,生防微生物对植物病原菌具有有效的防治效果,包括芽孢杆菌、酵母菌和链霉菌等,其中芽孢杆菌应用广泛,如芽孢

杆菌对番茄匍柄霉叶斑病^[9]、黄芪根腐病^[10]、辣椒根腐病^[11]和西瓜枯萎病^[12]等真菌病害防治效果显著。

本研究以广西壮族自治区红树林来源的土壤为试验样品,分离筛选对香蕉炭疽菌具有抑制效果的芽孢杆菌,结合形态特征、生理生化特征及 16S rRNA 基因序列分析等方法鉴定筛选的菌株,并评价发酵液的防效,以期为香蕉炭疽病的生物防控提供菌种资源,并为活性代谢产物的分离提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 样品

土样采自广西壮族自治区北海市银海区福成镇红树林(21°46'N, 109°31'E),取深度 10–20 cm 处的土壤,自然风干后装入无菌密封袋备用。

香蕉炭疽菌(*Colletotrichum musae*)、柑橘炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、水稻稻瘟病菌(*Pyricularia oryzae*)、香蕉枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* *racel*)和芒果拟盘多毛孢菌(*Mango pestalotiopsis*)由中国热带农业科学院热带生物技术研究提供;细极链格孢菌(*Alternaria tenuissima*)和哈锐炭疽菌(*Colletotrichum horii*)由本课题组保存。

1.2 主要试剂和仪器

细菌 DNA 提取试剂盒, Omega 公司。立式自动压力蒸汽灭菌器,致微(厦门)仪器有限公司;超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;光学显微镜,广州市明美光电技术有限公司;生化培养箱,韶关市泰宏医疗器械有限公司。

1.3 供试培养基

LB 培养基、LA 培养基、马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、牛肉膏蛋白胨培养基及生理生化所用培养基配方参考文献[13];肉汁胨培养基(broth peptone agar medium, BPA)配方参考文

献[14];葡萄糖酵母牛肉膏培养基(ager yeast dextrose medium, AYDA)配方参考文献[15];牛肉蛋白胨酵母培养基(beef peptone yeast medium, BPY)配方参考文献[16]。

1.4 拮抗菌株的分离纯化

采用梯度稀释法^[13]分离芽孢杆菌。取 10 g 土样添加到 90 mL 无菌水中,28 °C、180 r/min 摇床振荡 20 min,静置后取上清液 80 °C 恒温水浴 30 min,然后取 1 mL 加入盛有 9 mL 无菌水的试管中振荡混匀,分别稀释成 10⁻⁴、10⁻⁵和 10⁻⁶这 3 个梯度。每个梯度吸取 200 μL 均匀涂布于牛肉膏蛋白胨培养基上,每个处理 3 次重复,正置 1 h 后于 37 °C 倒置培养 48 h,挑选不同类型的菌落纯化保存。

以香蕉炭疽菌为供试病原菌,采用平板对峙法对分离到的菌株进行活性筛选,即先在 PDA 平板中心接入直径为 6 mm 的香蕉炭疽菌,再于供试病原真菌两侧 2.5 cm 处接入经分离纯化获得的待测拮抗菌菌株,每个处理 3 次重复,以只接有供试病原菌的 PDA 平板为空白对照组,采用十字交叉法测量病原菌直径,并根据公式(1)计算抑菌率^[17]。

抑菌率(%) =

$$\frac{\text{对照组病原菌直径} - \text{处理组病原菌直径}}{\text{对照组病原菌直径}} \times 100 \quad (1)$$

1.5 菌株的鉴定

将筛选得到的目标菌株分别接种于 BPA、AYDA、BPY、LB 和牛肉膏蛋白胨培养基,37 °C 倒置培养 1 d 后观察菌株的形态,并进行革兰氏染色。参考《常见细菌系统鉴定手册》^[18],利用微量生化鉴定管对菌株进行生理生化鉴定。

采用细菌 DNA 提取试剂盒提取目标菌株的 DNA。以 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3')为引物^[19]扩增 16S rRNA 基因序列。PCR

反应体系(25 μL): $2\times\text{Taq Mix}$ 12.5 μL , 正、反向引物(5 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL , 模板 DNA (10 mmol/L) 1 μL , ddH₂O 9.5 μL 。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 扩增产物由广州艾基生物有限公司测序, 然后提交所测序列至 GenBank, 并在 NCBI 数据库中比对分析, 利用 MEGA 7.0 以 neighbor-joining 法构建系统发育树。

1.6 抗菌谱的测定

利用平板对峙法测定拮抗菌对不同供试病原菌的抑制作用, 方法同 1.4。

1.7 菌株的生物学特性测定

1.7.1 药敏试验

采用纸片扩散法^[13]测定拮抗菌对不同抗生素的敏感性。

1.7.2 菌株的耐盐能力测定

拮抗菌耐盐能力的测定参考贾丽艳等^[20]的方法略作修改。挑取拮抗菌单菌落接种于 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 12 h 得到拮抗菌菌悬液。以 1% (体积分数)的接种量将拮抗菌菌悬液接种至 NaCl 终浓度为 0%、5%、10%、15%和 20%的 LB 培养基中, 每个浓度设置 3 个重复组, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 24 h 后取菌液于波长 600 nm 处测定吸光度。

1.7.3 菌株的高温耐受能力测定

拮抗菌高温耐受能力的测定参考贾丽艳等^[20]的方法略作修改。取适量拮抗菌菌悬液置于不同试管中, 将试管分别置于 85、90、95 和 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中温育 10 min, 将试管取出后室温放置至冷却, 再以 1% (体积分数)的接种量将处理后的菌悬液接种于新鲜的 LB 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 24 h 后取样于波长 600 nm 处测定吸光度。每个温度设置 3 个重复组, 以不作温度处理的菌悬液作为对照。

1.7.4 菌株的生长曲线测定

拮抗菌生长曲线的测定参考袁蕊等^[21]的方法略作修改。将拮抗菌接种于 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养过夜, 再以 1% (体积分数)的接种量接种至新鲜的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养, 每隔 4 h 取样检测 OD_{600} 值, 每个处理设置 3 次重复, 以 OD_{600} 值为纵坐标, 时间为横坐标, 绘制菌株生长曲线。

1.8 菌株发酵液对香蕉炭疽病的防效

菌株发酵液参考李晓宇^[11]的方法发酵获得。取大小均一的健康香蕉, 设置 3 个处理组: LB 培养基处理组(阴性对照组)、1 mg/mL 多菌灵处理组(阳性对照组)、无菌发酵液处理组, 每个处理组设置 3 个重复。首先对香蕉消毒, 然后用针头在表面制造伤口, 分别取 20 μL LB 培养基、无菌发酵液和 1 mg/mL 多菌灵涂抹在香蕉表面, 待其干燥后, 将直径 5 mm 的香蕉炭疽菌菌饼接种在伤口处, 将处理后的香蕉置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 气候培养箱中保湿培养, 记录发病情况。并根据公式(2)和公式(3)计算病情指数和防治效果^[22], 病斑分级标准参考文献^[23]。

病情指数(%)=[\sum (病级斑点数 \times 该病级值)]/(接种点数 \times 最高级值) \times 100 (2)

病情防治效果(%)=[(对照组病情指数-处理组病情指数)]/对照组病情指数 \times 100 (3)

2 结果与分析

2.1 菌株的分离筛选结果

从红树林土壤中分离筛选到 13 株对香蕉炭疽菌具有拮抗作用的菌株, 分离率为 68.42%, 其中菌株 HSL3-29 对香蕉炭疽菌拮抗效果最佳, 对峙培养 5 d 后抑菌率达到 81.83% (图 1)。

2.2 菌株 HSL3-29 的鉴定结果

2.2.1 形态特征

菌株 HSL3-29 在牛肉膏蛋白胨培养基上生

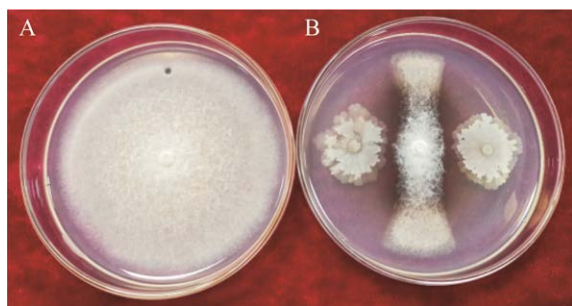


图1 菌株 HSL3-29 对香蕉炭疽菌的抑制作用 A: 香蕉炭疽菌对照. B: 菌株 HSL3-29 与 *Colletotrichum musae* 的平板对峙

Figure 1 Inhibitory of strain HSL3-29 against *Colletotrichum musae*. A: The control of *Colletotrichum musae*. B: Inhibition of strain HSL3-29 against *Colletotrichum musae*.

长 1 d 后菌落呈米白色, 边缘整齐, 表面轻度隆起(图 2A)。在其他培养基, 如 BPY 培养基、BPA 培养基、AYDA 培养和 LA 培养基上生长时菌落形态各异。在 BPA 培养基中菌落有晕圈(图 2B), 在 AYDA 培养基中菌落乳白色、菌落扁平不透明(图 2C), 在 BPY 培养基中菌落乳白色、扁平不透明(图 2D), 在 LA 培养基中菌落米黄色、边缘整齐(图 2E)。菌株 HSL3-29 经革兰氏染色后油镜(100×)观察, 其菌体呈紫色, 杆状, 两端钝圆, 反应结果为阳性(图 3)。

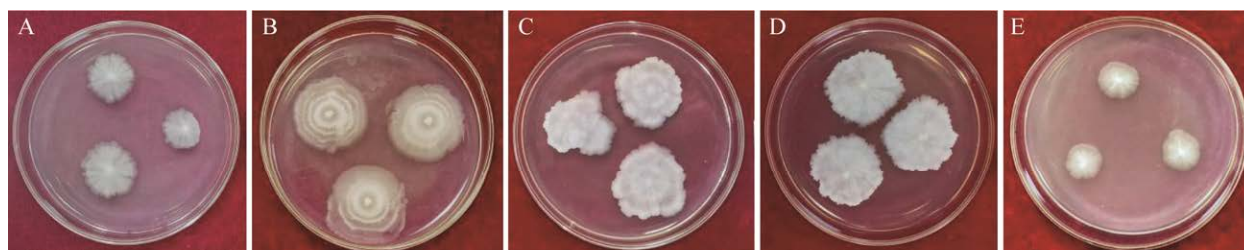


图2 菌株 HSL3-29 在不同种培养基上生长的形态特征 A: 牛肉膏蛋白胨培养基. B: BPA 培养基. C: AYDA 培养基. D: BPY 培养基. E: LA 培养基

Figure 2 Morphological characteristics of strain HSL3-29 grown on different species of media. A: Beef extract peptone medium. B: BPA medium. C: AYDA medium. D: BPY medium. E: LA medium.

2.2.2 生理生化鉴定

生理生化试验结果表明, 菌株 HSL3-29 能利用葡萄糖发酵产酸, 不能利用乳糖产酸, 能利用柠檬酸盐, 能水解淀粉, 能胨化牛奶, 产吲哚, 不产硫化氢, VP 试验和 MR 试验为阴性(表 1)。

2.2.3 分子生物学鉴定

通过 PCR 扩增获得菌株 HSL3-29 的 16S rRNA 基因序列(1 418 bp), GenBank 登录号为 OP550422。利用 NCBI 数据库进行 BLAST 比对并构建系统发育树(图 4), BLAST 分析结果显示菌株 HSL3-29 与 *Bacillus amyloliquefaciens* 相似性达 99%, 系统发育树显示菌株 HSL3-29 与 *Bacillus amyloliquefaciens* strain MPF15 (MT487666)聚类在同一个分支上。因此, 综合菌株形态特征、生理生化特征及 16S rRNA 基因序列分析, 将菌株 HSL3-29 鉴定为 *Bacillus amyloliquefaciens*。

2.3 菌株 HSL3-39 的抗菌谱测定结果

抗菌谱测定结果表明, 菌株 HSL3-29 对 6 种不同植物病原真菌表现出不同的拮抗作用, 其中对芒果拟盘多毛孢菌抑菌效果最弱, 仅为 18.17%; 对水稻稻瘟病菌的抑菌率最高, 达到 83.61%, 对香蕉炭疽菌抑菌率为 81.83%, 仅次

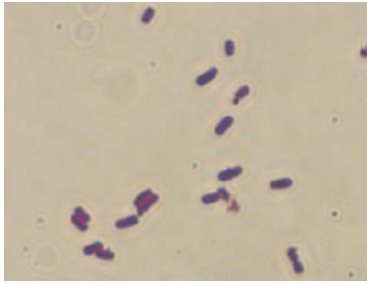


图 3 菌株 HSL3-29 的革兰氏染色
Figure 3 Gram staining of strain HSL3-29.

于水稻稻瘟病菌。试验结果表明菌株 HSL3-29 对多种植物病原真菌均有较好的抑制作用(图 5)。

2.4 菌株 HSL3-29 的生物学特征

2.4.1 药敏试验结果

药敏试验结果表明菌株 HSL3-29 对 7 种抗生素表现出不同的敏感性, 其中对氨苄青霉素、万古霉素敏感, 对链霉素、卡那霉素和红霉素表现为中度敏感, 对四环素和氯霉素表现出耐药性(表 2)。

表 1 菌株 HSL3-29 的生理生化特征

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain HSL3-29

项目 Items	结果 Results
发酵葡萄糖产酸 Glucose fermentation test	+
发酵乳糖产酸 Lactose fermentation test	-
吲哚试验 Indole test	+
牛奶凝固豚化试验 Milk coagulation test	+
柠檬酸盐试验 Citrate test	+
淀粉水解试验 Starch hydrolysis test	+
H ₂ S 试验 Hydrogen sulfide test	-
VP 试验 VP test	-
MR 试验 MR test	-

+: 阳性; -: 阴性

+: Positive; -: Negative.

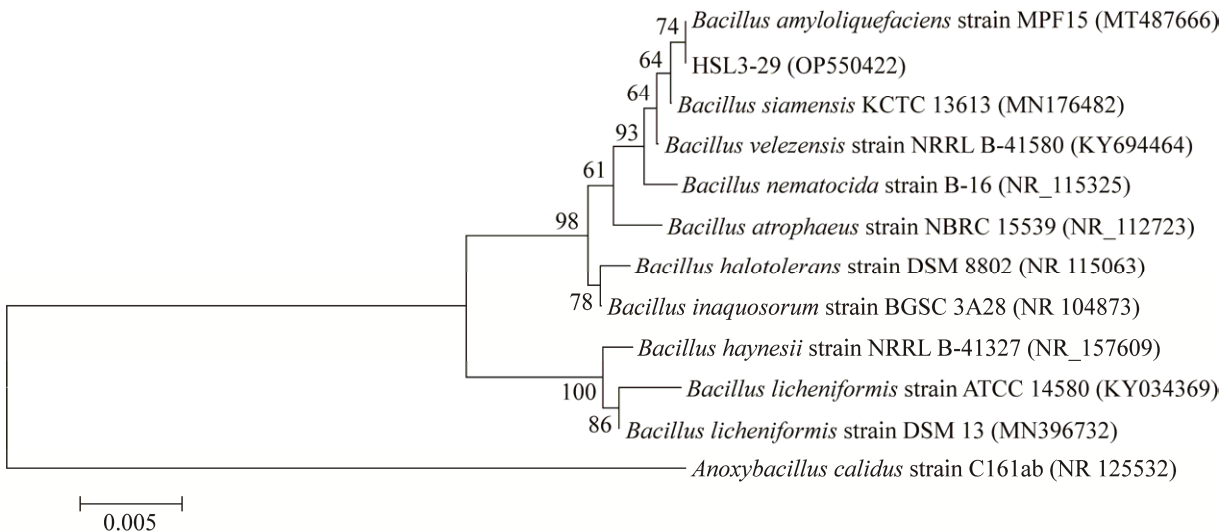


图 4 菌株 HSL3-29 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 分支处数值表示 bootstrap 值; 括号内数值为 GenBank 登录号; 标尺 0.005 代表序列的进化差异

Figure 4 Phylogenetic tree of strain HSL3-29 based on 16S rRNA gene sequence. Numbers at branch nodes present bootstrap value; Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; The scale bar 0.005 represents sequence variance.

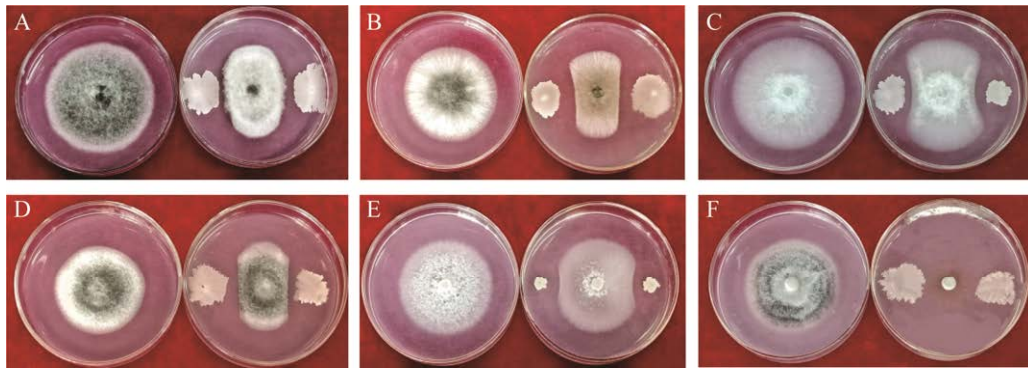


图5 菌株 HSL3-29 对不同植物病原真菌的抑菌作用 A: 细极链格孢菌. B: 哈锐炭疽菌. C: 香蕉枯萎病菌. D: 柑橘炭疽菌. E: 芒果拟盘多毛孢菌. F: 水稻稻瘟病菌

Figure 5 The antibacterial effect of strain HSL3-29 on different plant pathogenic fungi. A: *Alternaria tenuissima*. B: *Colletotrichum horii*. C: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race1, FOC1. D: *Colletotrichum gloeosporioides*. E: *Mango pestalotiopsis*. F: *Pyricularia oryzae*.

2.4.2 菌株 HSL3-29 耐盐能力的测定

盐耐受试验结果表明在 NaCl 终浓度为 0 和 5% 的 LB 培养基中, 该菌株均能较好地生长, 其 OD_{600} 值分别为 1.32 ± 0.15 和 1.28 ± 0.11 , 生长量无显著差异。在 NaCl 终浓度高于 10% 时, 菌株的生长受到抑制, 表明菌株 HSL3-29 对盐有一定的耐受能力(图 6)。

表 2 菌株 HSL3-29 的耐药性

Table 2 Drug resistance of strain HSL3-29

抗菌药物名称 Antimicrobial agents	抑菌圈直径 Inhibition diameter (mm)	敏感程度 Susceptibility
氨苄青霉素 Ampicillin	32.73 ± 1.20	S
万古霉素 Vancomycin	20.63 ± 0.03	S
红霉素 Erythromycin	18.06 ± 0.37	I
链霉素 Streptomycin	17.27 ± 0.55	I
卡那霉素 Kanamycin	17.10 ± 0.31	I
四环素 Tetracycline	12.98 ± 1.07	R
氯霉素 Chloramphenicol	0	R

S: 敏感; I: 中度敏感; R: 耐药

S: Sensitive; I: Intermediary; R: Drug resistance.

2.4.3 菌株 HSL3-29 的高温耐受试验

高温耐受试验结果表明菌株 HSL3-29 经 85–100 °C 高温处理后, 均生长良好, 100 °C 处理后的 OD_{600} 值为 1.37 ± 0.02 , 对照 37 °C 处理的 OD_{600} 为 1.48 ± 0.01 (图 7), 表明该菌对高温具有耐受性。

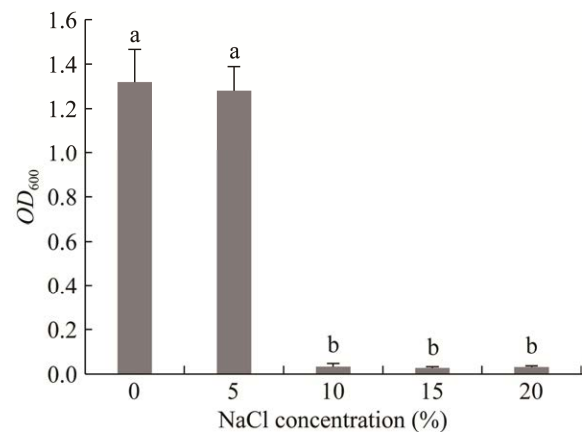


图6 菌株 HSL3-29 对不同 NaCl 浓度的敏感程度 不同小写字母表示各处理间差异显著性 ($P < 0.05$)

Figure 6 Sensitivity of strain HSL3-29 to different concentrations of NaCl. Different lowercase letters indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$).

2.4.4 菌株 HSL3-29 生长曲线的测定

生长曲线测定结果表明, 菌株 HSL3-29 在 0-4 h 生长速度较慢, 处于延滞期; 4 h 后生长迅速, OD_{600} 值呈对数增加, 进入对数生长期; 在 24-28 h 生长变缓, 逐步进入稳定期; 28 h 后菌株生长量下降, 进入衰亡期(图 8)。

2.4.5 菌株 HSL3-29 发酵液对香蕉炭疽病的防效

香蕉果实防效试验结果表明, 香蕉接种病原菌后, 对照组的病情指数为 97.8%, 发酵液处理组的病情指数为 59.26%, 多菌灵处理组的

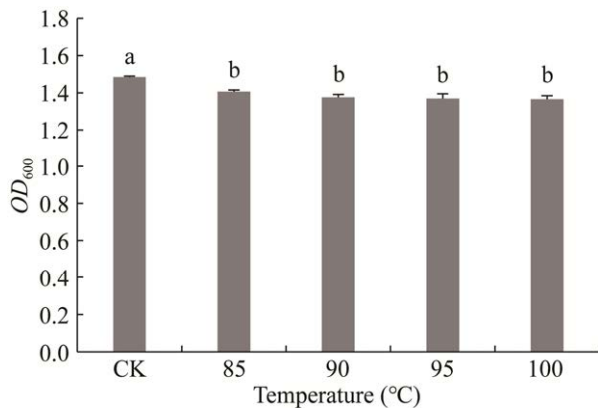


图 7 菌株 HSL3-29 对不同温度的敏感程度 不同小写字母表示各处理间差异显著性($P<0.05$)

Figure 7 Sensitivity of strain HSL3-29 to different temperatures. Different lowercase letters indicate significant differences between treatments ($P<0.05$).

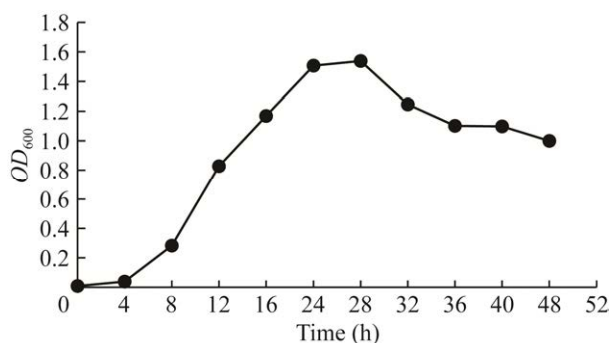


图 8 菌株 HSL3-29 的生长曲线

Figure 8 Growth curve of strain HSL3-29.

病情指数为 30.56%, 发酵液处理的香蕉病斑直径明显小于对照的病斑直径, 其防治效果为 39.4%, 多菌灵处理组的防治效果为 68.75%, 数据表明发酵液的防效约为多菌灵的 60% (图 9)。

3 讨论与结论

生防微生物在植物病害防治上应用广泛, 与人类的生活密切相关。其中芽孢杆菌是应用较为广泛的生防微生物之一, 其分泌的抗菌物



图 9 菌株发酵液对香蕉果实炭疽病的防效 A: LB 培养基. B: 多菌灵药液. C: 发酵液. D: 不同处理的防治效果

Figure 9 The biocontrol effect of fermentation broth against anthracnose on the banana fruits. A: LB medium. B: Carbendazim solution. C: Fermentation broth. D: Prevention and control effect of different treatments.

质能有效抑制病原菌，在生物防治中的应用潜力巨大。目前，国内外已有很多有关芽孢杆菌防治植物真菌病害的研究报道，如芽孢杆菌对番茄早疫病、灰葡萄孢菌^[24]、草莓炭疽病^[25]、百香果叶片枯萎病^[26]、马铃薯早疫病^[27]、小麦叶片白粉病^[28]和烟草黑胫病^[29]均具有不同程度的抑制和防治效果。由此可见，芽孢杆菌对真菌病害的防治具有巨大的潜力。与前人研究结果一致，本试验分离得到的芽孢杆菌 HSL3-29 对香蕉炭疽菌具有较强抑制效果，抑菌率达 81.83%。防效试验显示该菌发酵液对香蕉炭疽病病斑有抑制作用，但效果不佳，仅达 39.4%，推测发酵条件未达到最佳状态，导致发酵液中有效代谢产物的浓度较低。

菌株的抗生素抗性是临床疗效及安全用药的指标。本研究发现菌株 HSL3-29 对氨基青霉素较为敏感，对四环素表现出耐药性，这与 Jiang 等^[30]研究结果一致。菌株 HSL3-29 对万古霉素较为敏感，与刘晓燕等^[31]对 WH1 研究结果一致。但两者对卡那霉素的敏感性存在差异，菌株 WH1 对卡那霉素表现出较高的敏感性，而本研究中的菌株 HSL3-29 对卡那霉素只表现为中度敏感。推测菌株 HSL3-29 与菌株 WH1 具有不同的代谢产物。

研究微生物的生长曲线在生产实践中具有重要意义^[32]。本研究发现菌株 HSL3-29 与龚发源^[33]研究的枯草杆菌 J1220 的生长状况相似，在培养 4-24 h 时菌株生长状态较为活跃，但菌株 HSL3-29 在培养 28 h 后就快速进入衰亡期，而菌株 J1220 仍处于稳定期。本研究中，生长曲线测定所用的培养基为 LB 培养基，龚发源^[33]研究所用的培养基为营养肉汤培养基，分析原因可能是培养基碳氮源有所差异，LB 培养基提供的营养不足以维系菌株 HSL3-29 继续生存，出现了自溶现象，从而进入衰亡期。

生防菌株的抗逆性是开发理想微生物制剂的前提，要求其在苛刻的环境能够存活和繁殖^[34]。目前，关于生防菌株的抗逆性已有不少相关报道，如芽孢杆菌 WH1^[31]、BLCC1-1 和 BLCC1-2^[35]具有耐高温特性，芽孢杆菌 JY24 对肠胃环境具有耐受性^[36]，芽孢杆菌 W03 和 D17 具有较强的抗紫外线能力和耐酸碱能力^[37]，本研究的菌株 HSL3-29 经 100 °C 处理后存活率高，具有耐高温特性，这与前人的研究结果一致。芽孢杆菌的抗逆性研究为研制生物制剂提供了一定的理论基础，有利于加快芽孢杆菌产业化发展。

REFERENCES

- [1] 张月凤, 辜柳霜, 柳志强, 李晓宇. 生防放线菌 CY-14 的鉴定及其发酵液对香蕉炭疽病的防治效果[J]. 农药学报, 2018, 20(5): 634-642.
ZHANG YF, GU LS, LIU ZQ, LI XY. Identification of a biocontrol actinomycete strain CY-14 and the effect of its fermentation broth on *Colletotrichum musae*[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2018, 20(5): 634-642 (in Chinese).
- [2] 鲁长海. 香蕉炭疽病的浸染途径、发病机理与防治措施[J]. 广东化工, 2016, 43(8): 99-100, 87.
LU CH. The disseminated way, pathogenesis and prevention measures of anthracnose in bananas[J]. Guangdong Chemical Industry, 2016, 43(8): 99-100, 87 (in Chinese).
- [3] 古瑞琼. 香蕉炭疽菌和镰刀菌潜伏侵染初步研究[J]. 热带作物研究, 1986(4): 63-67.
GU RQ. Preliminary studies on latent infestation of banana by anthracnose and fusarium[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 1986(4): 63-67 (in Chinese).
- [4] 江茂生, 许文耀. 艾蒿提取物对 13 种植物病原菌的抑制作用[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2007, 36(4): 352-356.
JIANG MS, XU WY. Inhibition activities of the extract from the plant of *Artemisia argyi* against 13 kinds of phytopathogenic fungi[J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2007, 36(4): 352-356 (in Chinese).
- [5] 雷照鸣, 梁艳琼, 贺春萍, 郑服丛. 20%咪鲜胺水乳剂防治香蕉炭疽病效果评价[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(11): 4830-4831.

- LEI ZM, LIANG YQ, HE CP, ZHENG FC. Evaluation on 20% prochloraz emulsion water on controlling banana anthracnos[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2013, 41(11): 4830-4831 (in Chinese).
- [6] 邓才明, 谭元花, 杨太源, 王彬. 咪鲜胺水乳剂对模拟长途汽车运输香蕉炭疽病防治药效试验[J]. 云南农业, 2016(5): 48-50.
- DENG CM, TAN YH, YANG TY, WANG B. Efficacy test of prochloraz emulsion in water against banana anthracnose transported by simulated long-distance bus[J]. Yunnan Agriculture, 2016(5): 48-50 (in Chinese).
- [7] 梁财, 陈颖, 李昌恒, 宋祥民, 谢昌平, 朱朝华, 孙然锋. 山芝麻提取物对 10 种植物病原真菌的抑菌活性初探[J]. 广西植物, 2020, 40(5): 715-726.
- LIANG C, CHEN Y, LI CH, SONG XM, XIE CP, ZHU CH, SUN RF. Antifungal activity of extracts of *Helicteres ngustifolia* against ten plant pathogenic fungi[J]. Guihaia, 2020, 40(5): 715-726 (in Chinese).
- [8] ZHU XY, LIN HZ, SI ZW, XIA YH, CHEN WX, LI XP. Benzothiadiazole-mediated induced resistance to *Colletotrichum musae* and delayed ripening of harvested banana fruit[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(7): 1494-1502.
- [9] 李新宇, 李磊, 陈利达, 石延霞, 柴阿丽, 谢学文, 李宝聚. 番茄柄霉叶斑病拮抗细菌的筛选与鉴定[J]. 园艺学报, 2020, 47(4): 741-748.
- LI XY, LI L, CHEN LD, SHI YX, CHAI AL, XIE XW, LI BJ. Screening and identification of antagonistic bacteria against gray leaf spot of tomato caused by *Stemphylium solani*[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2020, 47(4): 741-748 (in Chinese).
- [10] 赵晓霞, 牛世全, 文娜, 苏锋锋. 黄芪根腐病生防芽孢杆菌的筛选鉴定与盆栽防效试验[J]. 生物技术通报, 2019, 35(9): 107-111.
- ZHAO XX, NIU SQ, WEN N, SU FF. Screening and identification of biocontrol *Bacillus* sp. against *Astragalus* root rot and its pot experiment[J]. Biotechnology Bulletin, 2019, 35(9): 107-111 (in Chinese).
- [11] 李晓宇. 解淀粉芽孢杆菌 LXY-6-2 筛选、鉴定、诱变与发酵条件优化及其对辣椒根腐病的生物防治研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2018.
- LI XY. Screening, identification, mutation and optimization of fermentation conditions of *Bacillus Amylolique faciens* LXY-6-2 and its biocontrol effects against *Fusarium solani*[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2018 (in Chinese).
- [12] 孙正祥, 龙欣钰, 孟祥佳, 曹帅, 毛国庆, 周焱. 枯草芽孢杆菌 YZU-S149 的分离鉴定及对西瓜枯萎病的生防作用[J]. 长江大学学报(自然科学版), 2021, 18(4): 114-120.
- SUN ZX, LONG XY, MENG XJ, CAO S, MAO GQ, ZHOU Y. Isolation and identification of *Bacillus subtilis* YZU-S149 and its biocontrol effect on watermelon *Fusarium* wilt[J]. Journal of Yangtze University (Natural Science Edition), 2021, 18(4): 114-120 (in Chinese).
- [13] 蔡信之, 黄君红. 微生物学实验[M]. 4 版. 北京: 科学出版社, 2019.
- CAI XZ, HUANG JH. Microbiological Experiment[M]. 4th ed. Beijing: Science Press, 2019 (in Chinese).
- [14] 方中达. 植病研究方法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- FANG ZD. Research Methods of Plant Diseases[M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 1998 (in Chinese).
- [15] 陈莉, 缪卫国, 刘海洋, 努尔孜亚. 短短芽孢杆菌 A57 对棉花主要病原真菌的拮抗机理[J]. 西北农业学报, 2008, 17(4): 149-155.
- CHEN L, MIAO WG, LIU HY, NU EZY. Antagonistic mechanism of *Brevibacillus brevis* A57 against cotton mainly pathogenic fungus[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2008, 17(4): 149-155 (in Chinese).
- [16] 孙力军, 陆兆新, 别小妹, 吕凤霞, 方传记. 培养基对解淀粉芽孢杆菌 ES-2 菌株产抗菌脂肽的影响[J]. 中国农业科学, 2008, 41(10): 3389-3398.
- SUN LJ, LU ZX, BIE XM, LU FX, FANG CJ. Influence of medium on antimicrobial lipopeptide production by *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2008, 41(10): 3389-3398 (in Chinese).
- [17] 何明川, 曾舒泉, 王志江, 詹菽国, 柯昌磊, 李微杰, 张忠, 吴国星, 谢永辉. 一株烟草疫霉拮抗菌 MC4-2 的鉴定、发酵条件优化及防效测定[J]. 微生物学通报, 2021, 48(12): 4636-4648.
- HE MC, ZENG SQ, WANG ZJ, ZHAN YG, KE CL, LI WJ, ZHANG Z, WU GX, XIE YH. Identification, fermentation condition optimization and control effect of an antagonistic strain MC4-2 against *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*[J]. Microbiology China, 2021, 48(12): 4636-4648 (in Chinese).
- [18] 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.
- DONG XZ, CAI MY. Handbook of Identification of

- Common Bacterial Systems[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese).
- [19] 于杰. 一株抗 MRSA 放线菌的鉴定及其抗菌活性物质的初步分析[D]. 海口: 海南大学硕士学位论文, 2016.
- YU J. Identification of an anti-MRSA actinomycetes and preliminary analysis of antibacterial metabolite[D]. Haikou: Master's Thesis of Hainan University, 2016 (in Chinese).
- [20] 贾丽艳, 高娟娟, 荆旭, 田宇敏, 郭晋田, 郝林. 产细菌素益生菌——枯草芽孢杆菌 HJD.A32 生物学特性研究[J]. 中国食品学报, 2020, 20(5): 66-73.
- JIA LY, GAO JJ, JING X, TIAN YM, GUO JT, HAO L. The research on biological characteristics of *Bacillus subtilis* HJD.A32 which produced bacteriocine[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(5): 66-73 (in Chinese).
- [21] 袁蕊, 王学江, 李峰. 一株枯草芽孢杆菌的分离鉴定及其发酵条件优化[J]. 化学与生物工程, 2019, 36(7): 35-38.
- YUAN R, WANG XJ, LI F. Isolation and identification of *Bacillus subtilis* and its fermentation condition optimization[J]. Chemistry & Bioengineering, 2019, 36(7): 35-38 (in Chinese).
- [22] HIMAMAN W, THAMCHAIPENET A, PATHOMAREE W, DUANGMAL K. Actinomycetes from *Eucalyptus* and their biological activities for controlling *Eucalyptus* leaf and shoot blight[J]. Microbiological Research, 2016, 188/189: 42-52.
- [23] SUBRAMANI R, AALBERSBERG W. Marine actinomycetes: an ongoing source of novel bioactive metabolites[J]. Microbiological Research, 2012, 167(10): 571-580.
- [24] TODOROVA S, KOZHUHAROVA L. Characteristics and antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* strains isolated from soil[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 26(7): 1207-1216.
- [25] 李娟, 宋洁, 姜路路, 冯新雨, 刘畅, 单洪宇. 草莓炭疽病拮抗芽孢杆菌 TJX-012 的筛选与鉴定[J]. 辽东学院学报(自然科学版), 2015, 22(1): 23-26, 47.
- LI J, SONG J, JIANG LL, FENG XY, LIU C, SHAN HY. Screening and identification of antagonistic *Bacillus* DTJ-012 on strawberry anthracnose[J]. Journal of Liaodong University (Natural Science Edition), 2015, 22(1): 23-26, 47 (in Chinese).
- [26] CHEN YH, LEE PC, HUANG TP. Biological control of collar rot on passion fruits via induction of apoptosis in the collar rot pathogen by *Bacillus subtilis*[J]. Phytopathology®, 2021, 111(4): 627-638.
- [27] 王怡凡, 刘巍, 朱其立, 孙敏, 李延锋, 朱建强. 马铃薯早疫病拮抗细菌 WK-1 的筛选鉴定及其生物学特性分析[J]. 西南农业学报, 2022, 35(4): 855-863.
- WANG YF, LIU W, ZHU QL, SUN M, LI YF, ZHU JQ. Screening and identification of potato early blight antagonistic bacteria WK-1 and analysis of its biological characteristics[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2022, 35(4): 855-863 (in Chinese).
- [28] XIE DS, CAI XW, YANG CP, XIE LJ, QIN GW, ZHANG M, HUANG Y, GONG GS, CHANG XL, CHEN HB. Studies on the control effect of *Bacillus subtilis* on wheat powdery mildew[J]. Pest Management Science, 2021, 77(10): 4375-4382.
- [29] 濮永瑜, 包玲凤, 何翔, 刘芮, 张庆, 施竹凤, 何永宏, 杨佩文. 烟草青枯病和黑胫病拮抗细菌的筛选、鉴定及防效研究[J]. 中国农学通报, 2022, 38(7): 116-123.
- PU YY, BAO LF, HE X, LIU R, ZHANG Q, SHI ZF, HE YH, YANG PW. Screening, identification and control efficacy of antagonistic bacteria against *Ralstonia solanacearum* and *Phytophthora parasitica*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2022, 38(7): 116-123 (in Chinese).
- [30] JIANG FY, HUANG H, YANG N, FENG HM, LI Y, HAN BB. Isolation, identification, and biological control *in vitro* of tail rot pathogen strain from *Hippocampus kuda*[J]. PLoS One, 2020, 15(4): e0232162.
- [31] 刘晓燕, 王玲玲, 栾会妮, 郑伟, 侯仕营, 刘振华, 张世浩. 一株枯草芽孢杆菌的分离鉴定、生物学特性及其对水质净化的作用[J]. 微生物学通报, 2021, 48(2): 449-461.
- LIU XY, WANG LL, LUAN HN, ZHENG W, HOU SY, LIU ZH, ZHANG SH. Isolation and identification of a *Bacillus subtilis* strain for water purification[J]. Microbiology China, 2021, 48(2): 449-461 (in Chinese).
- [32] 梁念, 朱道辰, 孙建中. 一株枯草芽孢杆菌 Y1 的生长条件优化[J]. 饲料研究, 2020, 43(8): 63-68.
- LIANG N, ZHU DC, SUN JZ. Optimization of a *Bacillus subtilis* strain Y1 growth conditions[J]. Feed Research, 2020, 43(8): 63-68 (in Chinese).
- [33] 龚发源. 饲用益生枯草芽孢杆菌的食品安全性评价研究[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2016.
- GONG FY. Study on food safety evaluation of feed probiotic *Bacillus subtilis*[D]. Wuhan: Master's Thesis

- of Huazhong Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [34] 孔建, 赵白鸽, 王文夕, 王同贵. 枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* (Cohen) B-903 菌株抗菌物质对植物病原真菌的抑制作用[J]. 植物病理学报, 1995, 25(1): 69-72.
- KONG J, ZHAO BG, WANG WX, WANG T. On the inhibitory action of *Bacillus subtilis* (Cohen) B-903 strain's antifungal substance on plant pathogenic fungi[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1995, 25(1): 69-72 (in Chinese).
- [35] 刘秀侠, 徐海燕, 辛国芹, 李金敏, 赵影, 孙学森, 谷巍. 11 株枯草芽孢杆菌益生特性研究[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(8): 2333-2341.
- LIU XX, XU HY, XIN GQ, LI JM, ZHAO Y, SUN XS, GU W. Study on probiotic characteristics of eleven *Bacillus subtilis* strains[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2017, 44(8): 2333-2341 (in Chinese).
- [36] 孔利华, 高书锋, 雷平, 王升平, 周映华, 龚平, 曾发姣, 缪东, 周小玲, 曾奥, 舒燕, 邬理洋, 刘惠知. 产 β -葡萄糖醛酸苷酶菌株胃肠道耐受性与酶学特性研究[J]. 家畜生态学报, 2020, 41(9): 59-64, 96.
- KONG LH, GAO SF, LEI P, WANG SP, ZHOU YH, GONG P, ZENG FJ, MIAO D, ZHOU XL, ZENG A, SHU Y, WU LY, LIU HZ. Gastrointestinal tolerance and enzymatic characteristics of a strain producing β -glucuronidase[J]. Acta Ecologiae Animalis Domastici, 2020, 41(9): 59-64, 96 (in Chinese).
- [37] 李娜, 刘锦霞, 杜文静, 李晶, 丁品, 张建军, 武建荣. 生防枯草芽孢杆菌高效抗逆菌株选育及其对一品红灰霉病的防控效果[J]. 北方园艺, 2014, (23): 101-105.
- LI N, LIU JX, DU WJ, LI J, DING P, ZHANG JJ, WU JR. Mutagenesis of *Bacillus subtilis* with high toxicity and strong resilience, and its effect of control of *Botrytis cinerea* of 'Poinsettia'[J]. Northern Horticulture, 2014, (23): 101-105 (in Chinese).