

Isolation of *Bacillus subtilis* with Broad-Spectrum Antagonism against Plant Pathogens and Its Spore Formation

Ge Zhang, Yangzhuoyue Jin, Yukun Cui, Jiyan Pang, Ruiyan Zhu

School of Environmental and Chemical Engineering, Yanshan University, Qinhuangdao Hebei
Email: zhuruiyan_22@126.com

Received: Jan. 12th, 2019; accepted: Jan. 27th, 2019; published: Feb. 3rd, 2019

Abstract

A *Bacillus* strain, isolated from soil of Songyuan (Daxinganling Forest) with antagonism against plant pathogen from pear tree with black spot disease, was identified by morphology, physiology & biochemistry as well as 16 srDNA and designated as *Bacillus subtilis* Z58. Furthermore, *B. subtilis* Z58 was confirmed to possess broad-spectrum antagonism against 17 kinds of plant pathogens. Then, parameters for spore formation were designed by both single factors and orthogonal experiment and the results showed the optimal parameters were: fermentation broth: adsorbent of 4:1 (v/m), cell amounts of 6×10^9 /g and temperature of 32°C. Spore proportion kept above 98% from 15 d to 90 d after adsorbing to corncob powder. Thus, *B. subtilis* Z58 was expected to develop as a biocontrol agent.

Keywords

Bacillus subtilis, Identification, Broad-Spectrum Antagonism, Spore Formation, Adsorption

广谱性拮抗植物病原菌枯草芽孢杆菌的分离鉴定及芽孢形成条件的研究

张戈, 金阳卓越, 崔玉坤, 庞霖岩, 朱瑞艳

燕山大学环境与化学工程学院, 河北 秦皇岛
Email: zhuruiyan_22@126.com

收稿日期: 2019年1月12日; 录用日期: 2019年1月27日; 发布日期: 2019年2月3日

摘要

从大兴安岭松苑原始森林林区分离得到的一株对梨黑斑病菌具有拮抗作用的芽孢杆菌, 经形态学、生理生化和分子生物学鉴定为枯草芽孢杆菌, 命名为*Bacillus subtilis* Z58; 平板对峙实验结果表明*B. subtilis*

Z58对17种植物病原菌均具有拮抗作用；单因素和正交设计得出*B. subtilis* Z58生成芽孢的最适条件为：发酵液体积：吸附材料质量为4:1，菌体量 6×10^9 /g和温度为32℃，且该菌株芽孢形成率在15 d达到98%以上，到90 d时基本无营养体存在，该菌株有望开发成农用生防微生物菌剂。

关键词

枯草芽孢杆菌，鉴定，广谱拮抗性，芽孢形成，吸附

Copyright © 2019 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*, *B. subtilis*)是一种优良的植物病原菌拮抗微生物，*B. subtilis*可通过位点和营养竞争、拮抗物质产生、溶菌作用、诱导抗性及其引发根际促生菌的诱导抗性等拮抗植物病原菌[1] [2] [3]，同时 *B. subtilis* 也是典型的植物生长促生菌(PGPR)，可为植物提供其生长过程中所需要的重要物质而避免使用化学品[4] [5]；同时 *B. subtilis* 生长速度快、营养要求简单、其芽孢抗逆性强，十分有利于工业过程的生产、剂型加工、产品保存及在环境中的存活和定殖，芽孢也为微生物对抗各种极端环境提供了生理保障，作为商品具有更长的货架期，也是该种属微生物广泛应用于农业生产的重要原因[6]。细菌芽孢的形成是营养体细胞转化成休眠体的过程[7]，国内外研究及调节机制最深入的为 *B. subtilis*。芽孢形成过程受诸多条件的控制，比如营养缺乏、高浓度矿物元素、pH、温度、水分、高细胞密度和辐射等多种因素都可引发营养体细胞的分化并形成芽孢[8]，同时，芽孢的形成受多种调控因子如 Spo0A、 σ^H 、 σ^F 、 σ^E 和 σ^G 等的调控[9] [10]，从而启动下游相关基因的表达调控，下游基因表达后，细胞开始一系列形态变化最终完成芽孢的形成。然而，不同的微生物形成芽孢的机制并不相同，对特定的微生物而言，需要探索其合适的条件控制其芽孢的形成。本文作者从黑龙江大兴安岭林区土壤中分离得到一株具有广谱拮抗植物病原菌的芽孢菌，对其进行了分类鉴定并建立了该菌的进化树；同时研究了该菌株对 17 种植物病原菌的抑制率；在研究其形成芽孢时发现在发酵过程中并不能形成芽孢，因此研究了该菌吸附到固体基质上形成芽孢的条件，为该菌在农业生产中的开发应用奠定基础。

2. 材料与方法

2.1. 培养基

LB 液体培养基：酵母浸膏粉 5 g/L，蛋白胨 10 g/L，NaCl 10 g/L，pH 自然，121℃灭菌 20 min；固体 LB 培养基中加入琼脂 25 g/L。

PDA 培养基：马铃薯浸粉 6 g/L，葡萄糖 20 g/L，琼脂 20 g/L，pH5.6 ± 0.2 (购自海博生物技术有限公司，生产编号 HB0233)，121℃灭菌 20 min。

2.2. 试验方法

2.2.1. 芽孢杆菌的分离纯化

从大兴安岭松苑原始森林林区采集土壤样品并用无菌取样袋带回。称取土样 1 g 并加入到 50 ml 无菌水中(无菌水中加入直径为 20 mm 玻璃珠 20 粒) 180 rpm 振荡 20 min。将振荡后的样品静置，5 min 后将上清转移

至 2 ml 灭菌离心管中,将离心管置于 75℃ 水浴中热激处理 10 min,将热激后的溶液逐级梯度稀释到 10^{-1} ~ 10^{-7} ,取 100 μ l 涂布于 LB 固体平板培养上,37℃ 培养 3~4 d 至单菌落直径达到 2~3 mm。选取每个平板上生长 50~100 个单菌落的稀释梯度的平板,用牙签挑取单菌落,三段划线纯化菌落。将纯化后的菌落点接种于已接种梨黑斑病菌的 LB 固体培养基上,选择对梨黑斑病菌具有较强拮抗作用的菌株,对其进行菌株鉴定。

2.2.2. 芽孢杆菌对植物病原菌的拮抗

用灭菌的打孔器取病原菌菌块并置于 LB 固体培养基上,将芽孢杆菌置于 LB 固体培养基上植物病原菌菌块的两侧,距离病原菌菌块约 10 mm,将培养皿置于 28℃ 培养箱中正置培养 5~6 天,测定植物病原菌菌苔直径大小,并计算芽孢杆菌对植物病原菌的抑菌能力大小,对照植物病原菌菌苔直径为 D_1 ,拮抗平板上与芽孢杆菌平行位置的植物病原菌直径为 D_2 ,则抑菌率大小为 $\frac{D_1 - D_2}{D_1}$ 。

2.2.3. 芽孢杆菌的鉴定

显微形态鉴定:芽孢杆菌的显微形态通过革兰氏染色并通过光学显微镜观察获得。

生理生化鉴定:生理生化鉴定方法按照微生物实验指导书中常规方法进行。

分子生物学鉴定:挑取对梨黑斑病菌具有显著拮抗作用的菌落接种于 LB 液体培养基中,37℃、180 rpm 震荡培养 20 h,1.5 ml 菌液于 10,000 g 离心 2 min 并收集菌体,按照 Tiangen 细菌 DNA 提取试剂盒方法提取芽孢杆菌总 DNA,并利用 27F 和 1492R 通用引物进行 PCR 扩增 16srDNA,扩增后使用琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果,并将条带正确的 PCR 产物送至北京三博致远进行测序,利用测序后的序列建立该菌株的系统进化树。

2.2.4. 芽孢杆菌芽孢形成工艺优化

将 LB 培养基中发酵得到的芽孢杆菌菌液,10,000 g 离心 10 min,并重悬于一定体积的 LB 培养基中,得到不同浓缩倍数的芽孢杆菌菌悬液。将菌悬液与一定质量的灭菌玉米芯粉(60 目)混合均匀后保存于三角瓶中,瓶口覆盖透气膜,定期进行芽孢形成的检测。对芽孢杆菌芽孢形成率影响因素首先设计温度、发酵液体积:载体质量与吸附菌体量单因素实验,在单因素结果基础上进行芽孢形成条件的正交设计,得出最佳条件;同时定期检测保存三个月的芽孢情况。

3. 结果与讨论

3.1. 拮抗梨黑斑病菌芽孢杆菌菌株的分离和鉴定

分离纯化的芽孢杆菌对梨黑斑病的拮抗如图 1,表明该芽孢菌对梨黑斑病具有显著的抑制效果。

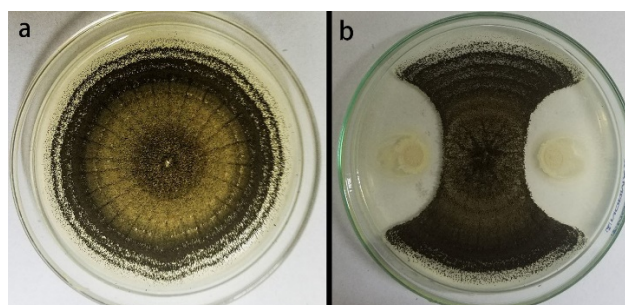


Figure 1. Antagonism against plant pathogen from pear tree with black spot disease by the isolate, a plant pathogen from pear tree with black spot disease, b *Bacillus*-plant pathogen

图 1. 芽孢杆菌对梨黑斑病菌的拮抗, a 梨黑斑病菌, b 芽孢杆菌-梨黑斑病菌平板对峙

然后对芽孢杆菌进行鉴定，菌落的形态：该菌株在 LB 固体培养基上培养至直径 2~3 mm 时的菌落形态为：圆形、凸起、表面光滑湿润、边缘整齐、菌落半透明，乳白色。染色后利用光学显微镜观察该菌株呈现革兰氏阳性、杆状、能产生芽孢，营养体大小为 $(0.6 - 1.0) \times 1.2 - 2.5 \mu\text{m}$ ；根据《伯杰氏细菌手册》对菌株进行生理生化鉴定(表 1)，初步判断该菌株属于芽孢杆菌属。

Table 1. Characterization (physiology & biochemistry) of the isolate
表 1. 菌株的生理生化特性

特征	菌株	特征	菌株
芽孢染色	+	色素	-
葡萄糖	+	精氨酸水解酶	+
淀粉	+	亚硝酸盐	-
蔗糖	+	硫化氢	-

提取芽孢杆菌的总 DNA，并扩增其 16 srDNA，将测序正确的序列利用邻接法制作芽孢杆菌系统进化树(图 2)，结果表明该分离的菌株与 *B. subtilis* CS10 同源率为 100%，因此将该菌株归类为枯草芽孢杆菌，命名为 *B. subtilis* Z58。

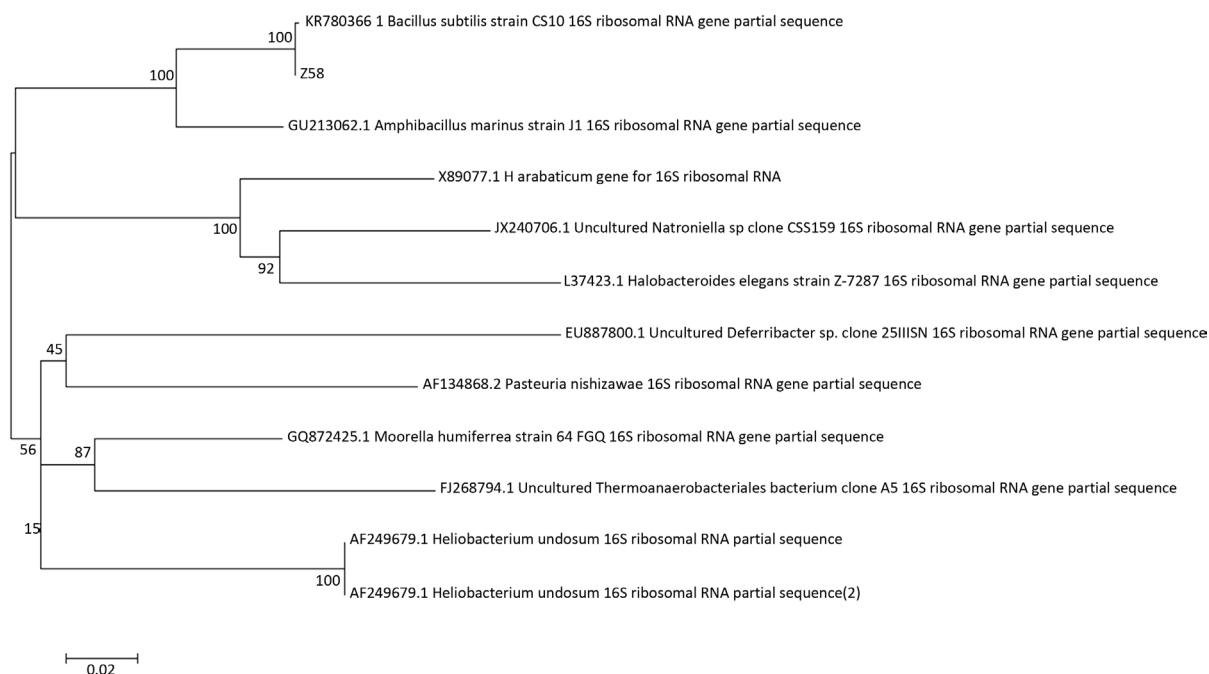


Figure 2. Phylogenetic tree of *B. subtilis* Z58

图 2. *B. subtilis* Z58 的系统进化树

3.2. *B. subtilis* Z58 对植物病原菌的拮抗

为了解 *B. subtilis* Z58 对植物病原菌拮抗是否具有广谱性，研究了 *B. subtilis* Z58 对 17 种植物病原菌的抑制效果(图 3)，结果表明 *B. subtilis* Z58 对茶叶白星病菌抑制率最高，可达到 84.9%，对番茄叶霉抑制率最低(50%)，对 11 种植物病原菌的抑制率达到 70%以上，因此表明 *B. subtilis* Z58 的植物病原菌拮抗具有广谱性，有望将其开发成一种生物防治微生物菌剂。

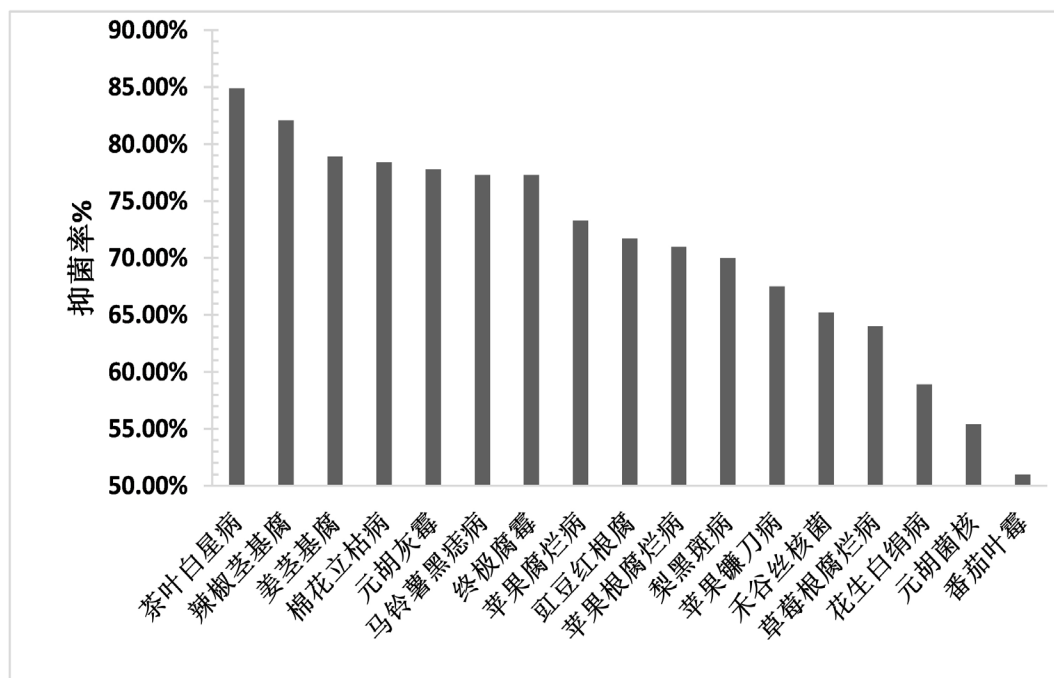


Figure 3. Inhibition to 17 kinds of plant pathogens by *B. subtilis* Z58
图 3. *B. subtilis* Z58 对 17 种植物病原菌抑制率

3.3. *B. subtilis* Z58 的芽孢形成研究

3.3.1. 温度对 *B. subtilis* Z58 芽孢形成的影响

由于 *B. subtilis* Z58 在设计为数种产孢培养基中都不产孢，因此设计将 *B. subtilis* Z58 发酵液浓缩后吸附到玉米芯粉载体上以期促使其芽孢生成。首先研究了不同温度条件对 *B. subtilis* Z58 芽孢形成的影响，当吸附于载体后，于室温保存基本无芽孢生成，当温度分别提升至 32℃ 和 40℃ 时，有芽孢生成(图 4)，结果表明室温、32℃ 和 40℃ 时的芽孢形成率分别达到 5.7%、43.9% 和 71.0%，结果显示温度低于 32℃ 或室温影响 *B. subtilis* Z58 的芽孢形成。

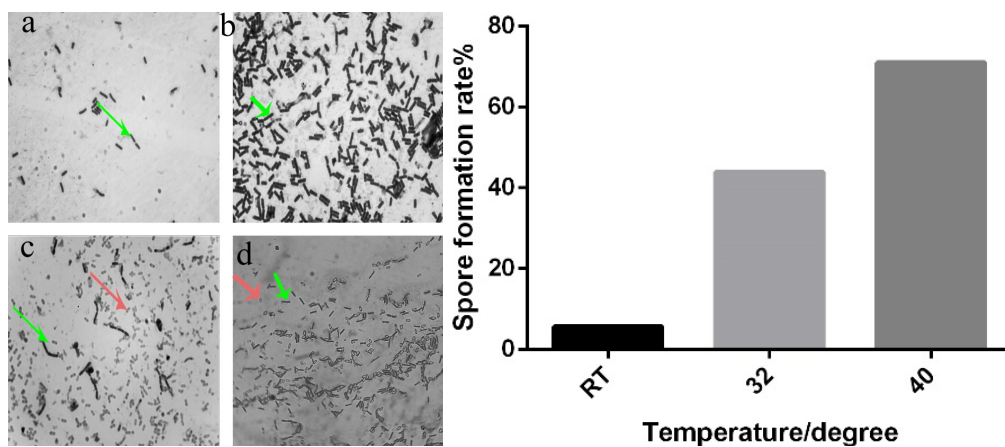


Figure 4. Spore formation of *B. subtilis* Z58 after adsorbing on corncob with different temperatures. a control, b Room temperature, c 40℃. Red arrow indicated spore and green indicated vegetable cells

图 4. 吸附于玉米芯粉载体上在不同温度条件下保存 48 h 的芽孢形成情况。a 对照(未吸附时，发酵液)，b 室温，c 32℃，d 40℃。红色箭头：芽孢，绿色箭头：营养体

3.3.2. 发酵液体积吸附材料质量之比对 *B. subtilis* Z58 芽孢形成的影响

由于温度对 *B. subtilis* Z58 芽孢形成影响显著,且单因素实验中 40℃ 条件下芽孢形成率最高,因此选择 40℃ 作为水分含量对 *B. subtilis* Z58 芽孢形成影响的基础温度。将 8 ml 发酵液离心并倾倒掉相应的上清,剩余体积悬浮细胞保证起始的菌数一致,结果表明发酵液体积:吸附材料质量为 4:1 时芽孢形成率最高可达到 83.3% (图 5)。

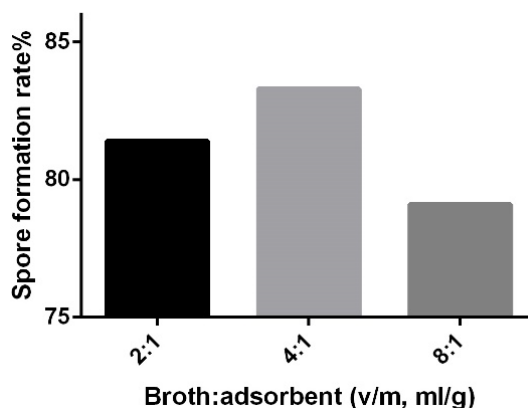


Figure 5. Effect of broth volume: adsorbent on spore formation

图 5. 发酵液体积与吸附材料质量之比对 *B. subtilis* Z58 芽孢生成的影响

3.3.3. 起始菌体数量对 *B. subtilis* Z58 芽孢形成的影响

根据温度、发酵液体积与吸附材料质量之比对 *B. subtilis* Z58 芽孢形成的影响结果,在研究菌体数量对 *B. subtilis* Z58 芽孢形成的影响时设定温度和发酵液体积:吸附材料质量分别为 40℃ 和 4:1,结果表明吸附在载体的 *B. subtilis* Z58 起始菌数为 6×10^9 /g 时, *B. subtilis* Z58 芽孢形成率最高,可达到 77.1%,随着吸附菌数的增加芽孢形成逐渐降低,但是芽孢形成都在 70% 以上,差异不明显(图 6)。

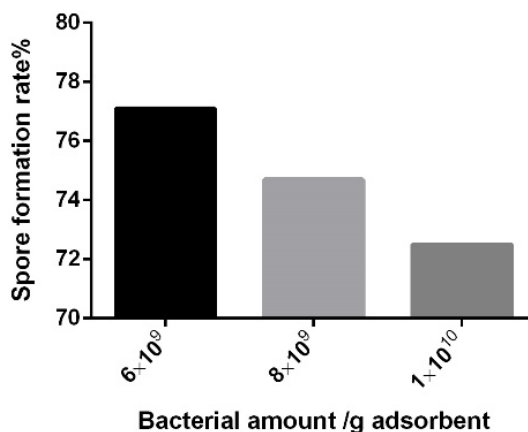


Figure 6. Effect of initial cell numbers of *B. subtilis* Z58 on spore formation

图 6. *B. subtilis* Z58 活菌数对其芽孢生成率的影响

3.3.4. 温度、发酵液体积:吸附材料质量和菌体量的正交实验

根据单因素实验结果分别将其进行正交设计,确定的正交因素水平表为(表 2)。

Table 2. Orthogonal factor levels for spore formation of *B. subtilis* Z58**表 2.** *B. subtilis* Z58 芽孢形成正交因素水平表

水平	因素 A (发酵液体积:吸附材料质量)	因素 B (菌体数量/g)	因素 C (温度/°C)
1	2:1	6×10^9	RT
2	4:1	8×10^9	32
3	8:1	1×10^{10}	40

Table 3. Results of orthogonal experiment and visual analysis**表 3.** L9(3³)正交实验结果与直观分析表

因素	发酵液体积:吸附材料质量	菌体量	温度	芽孢形成率%
1	1	1	1	38.2
2	1	2	2	61.1
3	1	3	3	38.7
4	2	1	2	81.8
5	2	2	3	63.6
6	2	3	1	2.3
7	3	1	3	59.9
8	3	2	1	2.8
9	3	3	2	84.8
K ₁	0.460	0.600	0.144	
K ₂	0.492	0.425	0.759	
K ₃	0.492	0.419	0.541	
R	0.032	0.181	0.615	

正交实验结果的极差分析表明影响 *B. subtilis* Z58 芽孢形成的主次影响因素为：温度>菌体量>水分；根据分析结果综合未来在应用过程中的可行性，则对于 *B. subtilis* Z58 吸附固形物材料芽孢形成的最佳条件为：A2B1C2，即发酵液体积：吸附材料质量为 4:1，菌体量 6×10^9 /g 和温度为 32°C (表 3)。

3.3.5. 保存时间对 *B. subtilis* Z58 芽孢形成的影响

按照正交实验最佳条件，*B. subtilis* Z58 发酵液与玉米芯粉混合后保存，分别记录 15 d，60 d 和 90 d 的芽孢率(图 7)，结果表明从 15 d 到 3 个月芽孢率基本没有发生变化，一直维持在 98%以上，表明 *B. subtilis* Z58 吸附于固体基质促进芽孢生成是可行的芽孢生成途径，同时也能稳定维持芽孢率达到微生物菌剂行业标准的货架期。

4. 结论

本文筛选得到的一株芽孢杆菌经形态学、生理生化和分子生物学鉴定为枯草芽孢杆菌，并命名为 *B. subtilis* Z58，该菌株对 17 种植物病原菌均具有拮抗作用，对茶叶白星病病菌的抑制率可达到 87.5%；通过单因素和正交设计得到该菌株吸附于玉米芯粉载体促进孢子生成的最佳条件为：发酵液体积：吸附材

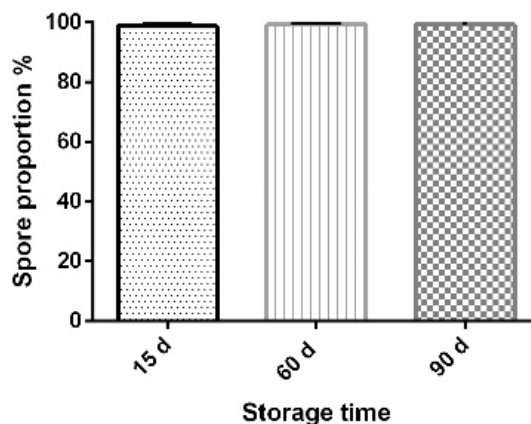


Figure 7. Spore formation of *B. subtilis* Z58 after adsorbing on corncob with different storage time. Date shown in Figure was mean \pm SD and all data were from triplicates

图 7. 15~90 天 *B. subtilis* Z58 的芽孢率情况, 图中数据为平均值 \pm SD, 为三次重复试验数据

料质量为 4:1, 初始菌体量 6×10^9 /g 和温度为 32℃, 该菌株生成芽孢后, 3 个月内芽孢率基本不发生变化, 维持在芽孢率 98% 以上, 该菌株有望开发成为广谱性的植物病原菌拮抗菌剂。

基金项目

感谢河北省生物农业技术工程技术研究中心提供本文所使用的植物病原菌菌株。

参考文献

- [1] Koumoutsis, A., *et al.* (2004) Structural and Functional Characterization of Gene Clusters Directing Nonribosomal Synthesis of Bioactive Cyclic Lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* Strain FZB42. *Journal of Bacteriology*, **186**, 1084-1096. <https://doi.org/10.1128/JB.186.4.1084-1096.2004>
- [2] Xu, Z., *et al.* (2013) Contribution of Bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to Antifungal Activity and Biofilm Formation. *Applied and Environmental Microbiology*, **79**, 808-815. <https://doi.org/10.1128/AEM.02645-12>
- [3] Peypoux, F., Bonmatin, J.M. and Wallach, J. (1999) Recent Trends in the Biochemistry of Surfactin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **51**, 553-563. <https://doi.org/10.1007/s002530051432>
- [4] Berg, G. (2009) Plant-Microbe Interactions Promoting Plant Growth and Health: Perspectives for Controlled Use of Microorganisms in Agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **84**, 11-18. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2092-7>
- [5] Perez-Garcia, A., Romero, D. and Vicente, A. (2011) Plant Protection and Growth Stimulation by Microorganisms: Biotechnological Applications of *Bacilli* in Agriculture. *Current Opinion in Biotechnology*, **22**, 187-193. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.12.003>
- [6] Ongena, M. and Jacques, P. (2008) *Bacillus lipopeptides*: Versatile Weapons for Plant Disease Biocontrol. *Trends in Microbiology*, **16**, 115-125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
- [7] Gribomont, A.C. and Stragier, A. (1996) Idiopathic Epimacular Membrane and Vitreo-Macular Traction Syndrome: Vitrectomy Functional Results. *Bulletin De La Societe Belge Dophthalmologie*, **262**, 123-126.
- [8] Sella, S.R., Vandenberghe, L.P. and Soccol, C.R. (2014) Life Cycle and Spore Resistance of Spore-Forming *Bacillus atrophaeus*. *Microbiological Research*, **169**, 931-939. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.05.001>
- [9] Burbulys, D., Trach, K.A. and Hoch, J.A. (1991) Initiation of Sporulation in *B. subtilis* Is Controlled by a Multicomponent Phosphorelay. *Cell*, **64**, 545-552. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90238-T](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90238-T)
- [10] Molle, V., *et al.* (2003) The Spo0A Regulon of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, **50**, 1683-1701.

知网检索的两种方式：

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2327-0810，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：amb@hanspub.org