

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

权春善¹, 王军华², 徐洪涛², 范圣第¹

(¹ 大连民族学院生命科学院生物工程研究中心 大连 116600)

(² 大连理工大学环境与生命学院生物科学与工程系 大连 116024)

摘 要 :从堆肥中分离到一株对植物病原菌尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)具有强烈抗菌活性并具有较广抗菌谱的细菌 Q-12 菌株。通过形态观察、生理生化实验、16S rDNA 同源性序列分析以及部分特异性基因序列分析,鉴定该菌为解淀粉芽孢杆菌。该菌的最适培养基组成为:葡萄糖 5g/L, NH₄Cl 1g/L, 牛肉膏 0.8g/L, 氯化镁 5g/L。最适培养温度为 33℃, 最适培养 pH 为 6.0, 最适培养时间为 40h。

关键词 :解淀粉芽孢杆菌, 枯草芽孢杆菌, 鉴定, 抑菌活性

中图分类号 :Q93 **文献标识码** :A **文章编号** :0001-6209(2006)01-0007-06

据联合国粮农组织(FAO)统计,每年因遭受植物病害引起的减产平均损失为总产量的 10%~15%^[1],其中 80% 以上的植物病害是由真菌引起的^[2]。目前真菌防治主要以化学农药为主,而化学农药引起的环境污染已经对人类健康造成潜在的威胁。并且大多数引起植物病害的病原菌寄生于土壤中,一般化学农药难以从根本上控制其危害^[3],亟待有新的、高效的微生物农药新品种或新剂型投放市场,以满足该领域的需求。堆肥中含有大量的植物病原菌拮抗菌,而且这些菌适应环境的能力较强,因而从中寻找可用作生物农药或者生物肥料的菌种成为可能。

本文从堆肥中分离到一株对尖孢镰刀菌具有强烈抗性的菌株,经鉴定该菌为解淀粉芽孢杆菌。该菌株营养要求较简单,环境适应能力强,有望用作生物农药或生物肥料,具有很高的开发应用前景。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 :Q-12 菌株在本研究中筛选分离得到。用于筛选实验的植物病原菌尖孢镰刀菌 1(*Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae* O-27), 尖孢镰刀菌 2(*F. oxysporum* f. sp. *Ladicea-lycopersici* O-34), 立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani* Kühn O-28)由日本广岛大学生物生产学部太田钦幸教授惠赠。用于测定抑菌谱的其它菌种由广岛大学工学部菌种保藏中心提供。

1.1.2 培养基 :分离筛选用培养基为马铃薯固体培

养基(PDA),其组成为:每升含马铃薯 200g,葡萄糖 20g,琼脂 15g, pH 自然。Q-12 菌的基础培养基为 BPY 培养基,其组成为:每升含葡萄糖 5g,蛋白胨 1g,牛肉膏 5g,酵母粉 5g,氯化钠 5g, pH 7.0。

1.1.3 主要试剂和仪器 :DNA 凝胶回收纯化试剂盒(Ver 2.0),PCR 反应的各种试剂均购自大连 TaKaRa 公司,DNA 提取用试剂盒购自 BIO-RAD,API 试剂盒(50 CHB/20 E)和 API 培养基(50 CHB/E)购自 bioMérieux,蛋白胨、牛肉膏、NaCl、葡萄糖、阿拉伯糖等购自上海生物工程技术服务有限公司。光学显微镜(OLYMPUS BH-2)。

1.2 菌种的分离纯化

从大连地区收集了 200 份堆肥样品,分别称取 0.5g 样品悬浮在 4.5mL 生理盐水中,剧烈振荡。将 20mL PDA 培养基均匀地注入一个直径为 9cm 的平皿中,待培养基凝固,在其正中间放置一片圆形滤纸片(Paper disk),然后把 20μL 上述土壤样品悬浮液滴入圆形滤纸片中。接着在距平皿中心 2.5cm 处对称地接上病原菌,将平板置于 28℃ 培养 3~7 d 并观察抑菌圈的形成。挑选出有明显抑菌圈的平板,将生长在圆形滤纸片周围的菌落用划线法接种到营养琼脂平板上。纯菌通过反复划线接种并培养单菌落而获得。

1.3 菌的鉴定

1.3.1 形态观察与染色 :在光学显微镜下观察个体形态并测量菌体大小,参照文献[4]进行 Gram 染色、芽孢染色。

基金项目:辽宁省自然科学基金项目(2040949)

作者简介:权春善(1973-),女,黑龙江人,副教授,主要从事微生物学及分子生物学研究。Tel:36-411-87532756; Fax:36-411-87644496;

E-mail: mikyeken@dlmu.edu.cn

收稿日期:2005-05-25;接受日期:2005-08-06;修回日期:2005-08-07

1.3.2 API 试剂条法对 Q-12 菌株鉴定 :将培养 24h 的菌体用无菌生理盐水洗两次后 ,加入 API 50 CHB/E 培养基(或 0.85%生理盐水 混匀 ,然后将混有菌体的 API 50 CHB/E 培养基(或 0.85%生理盐水)分别加入相应试剂盒各孔内 ,37℃静置培养 48h ,观察试剂盒各孔颜色的变化。

1.3.3 Q-12 菌的 16S rDNA PCR 扩增和序列测定 :16S rDNA的扩增反应参考文献 [5],得到的 PCR 产物用 DNA 凝胶回收纯化试剂盒(Ver 2.0)纯化并委托大连宝生物工程有限公司测序。将所得 1545bp 序列 (DDBJ 登录号 AB199317)与 MicroSeq Microbial Identification System software V.1.4.1 中核酸数据进行同源性分析 ,并构建系统发育树。

1.3.4 Q-12 菌与枯草芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌部分特异性基因序列分析 :从中国普通微生物菌种保藏中心购得模式菌枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* AS 1.1159)和解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens* AS 1.1131) ,采用 CTAB 法^[6]提取上述 3 种菌的染色体 DNA ,并将其作为 PCR 反应的模板 DNA。采用常规 PCR 反应的方法 ,所用的引物为 YyaO_ F/TetB_ R 和 YyaR_ F/TetB_ R 两对引物 ,引物序列分别为 :YyaO_ F 5'-GGAACCACTCCACAGGTTGTGG-3' ;YyaR_ F ,5'-CGATTGAGTGGGCRAAGGAGAATCATTTWTGYGGT -3' ; TetB_ R ,5'-CCATATAGAGCTGTTCCAATGCAGAAG -3'。PCR 反应条件为 :94℃变性 1min ,94℃变性 1min、52℃引物复性 1min、72℃延伸 1min ,30 个循环 ,最后 72℃延伸 7min。所得 PCR 产物用 2.0%琼脂糖凝胶电泳在标准条件下进行检测。

1.4 最适发酵条件的研究

1.4.1 最适培养基组成的确定 :保持基础培养基其它成分和浓度不变 ,依次改变培养基的碳源、氮源和金属离子的种类 ,接种 Q-12 菌 ,于 30℃、200r/min 摇床培养 3d ,离心收集上清液 ,测 OD_{660} 和抑菌活性。

1.4.2 最适 pH 值、培养温度的确定 :调节培养基的 pH 值为 2.0~9.0 ,并向不同 pH 值的培养基中接种 Q-12 菌 ,于 30℃、200r/min 摇床培养 3d ,离心收集上清液 ,测 660nm 下的吸光度和抑菌活性。单一地改变培养温度 ,并以同样的方法确定最适培养温度。

1.4.3 培养时间对 Q-12 菌生长及其抑菌活性的影响 :按已确定的最适培养基组成和浓度配制培养基 ,调 pH 至最适值。按上述方法接种 Q-12 菌 ,于最适培养温度下进行培养。每隔 4h 测定菌体量(OD_{660})和抑菌活性。

1.5 活性的测定方法

采用牛津杯定量扩散法测试发酵液对指示菌 *F. oxysporum* 等的抑菌活性。

2 结果

2.1 菌种的分离与筛选

从堆肥样品中筛选出了 10 株对 *R. solani* kühn O-28 , *F. oxysporum* f. sp. spinaciae O-27 和 *F. oxysporum* f. sp. *ladicis-lycopersici* O-34 形成较明显抑菌圈的菌株 ,其中 Q-12 菌株不仅对 *F. oxysporum* f. sp. *spinaciae* O-27 和 *F. oxysporum* f. sp. *ladicis-lycopersici* O-34 有很高的抑菌活性 ,并对 *R. solani* kühn O-28 也有较高的抑菌活性。因此 ,Q-12 菌株被选用于进一步的研究工作。Q-12 菌产生的抗菌物质对多种霉菌均有抗性 ,但只对部分细菌和酵母菌具有抑菌活性 ,见表 1 所示。

表 1 Q-12 菌的抑菌谱

Table 1 Antimicrobial spectrum of strain Q-12	
Test microorganism	Width of inhibition zone/mm
<i>Rhizoctonia solani</i> kühn O-28	25
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>spinaciae</i> O-27	27
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ladicis-lycopersici</i> O-34	26
<i>Rosellinia necatrix</i>	15
<i>Aspergillus flavus</i> Link Fries fgbbosos	18
<i>Aspergillus flavus</i> Link Fries var <i>aryzae</i>	16
<i>Aspergillus niger</i> var. <i>Tie shem</i>	18
<i>Mucor hiemolis</i> Wehmer fihiemalis	8
<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom	10
<i>Rhizopus oryzae</i> Went & Prinsen Geerings	7
<i>Candida albicans</i> (Robin) Berkfont	15
<i>Cryptococcus meoformens</i> (San felice) Vaillenism	0
<i>Pichia membranace</i> faciens Hansen	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Meyer ex Hansen	0
<i>Escherichia coli</i>	0
<i>Bacillus subtilis</i>	0
<i>Salmonella</i> sp.	13

2.2 Q-12 菌株的分类鉴定

2.2.1 菌体特征及菌落特征 :菌体呈短杆状 ,染色均匀 ,具运动性 ,兼性厌氧 ,可形成内生芽孢 ,芽孢囊膨大 ,呈椭圆形 ,游离芽孢表面着色弱 ,Gram 染色阳性。在 LB 培养基上呈白色不透明菌落 ,表面粗糙 ,菌落边缘不规则 ,在多种培养基上均不产色素。

2.2.2 API 生化试验条法 :API 生化试验条法对 Q-12 菌的鉴定结果(表 2)与反应鉴定表比对 ,并参考文献[7],可判断 Q-12 菌为枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)或解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)。

表 2 Q-12 菌的主要生理学特性

Table 2 Physiological characteristics of strain Q-12			
Biochemical assays	Result	Biochemical assays	Result
Control	+	GLYcerol	-
ERYthritol	-	D-Arabinose	+
L-Arabinose	+	Ribose	+
D-Xylose	-	L-Xylose	-
Adonitol	-	β-Methyl-D-Xyloside	-
Galactose	+	Glucose	+
Fructose	+	Mannose	-
Sorbose	-	Rhamnose	-
Dulcitol	+	Inositol	+
Mannitol	+	Sorbitol	-
α-Methyl-D-mannoside	+	α-Methyl-D-glucoside	+
N-Acetyl-Glucosamine	+	Amygdalin	+
Arbutin	+	Esculin	+
Salicin	+	Cellobiose	+
Maltose	-	Lactose	+
Melibiose	+	Sucrose	+
Trehalose	+	Inulin	-
Melezitose	+	Raffinose	+
Starch	+	Glycogen	-
Xylitol	+	Gentiobiose	+
D-Turanose	-	D-Lyxose	-
D-Tagatose	-	D-Fucose	-
L-Fucose	-	D-Arabitol	-
L-Arabitol	-	Gluconate	-
2-Keto-D-Gluconate	-	5-Keto-D-Gluconate	-

2.2.3 16S rDNA 同源性的鉴定 :Q-12 菌染色体 DNA 用 PCR 扩增出单一条带 ,PCR 产物回收纯化后 经 DNA 测序 ,序列长度为 1545bp ,在 DDBJ 中的序列登记号为 AB199317。以 16S rRNA 序列同源性为基础构建系统发育树如图 1。菌株 Q-12 与 *B. amyloliquefaciens* 位于同一分支中 ,与 *B. subtilis*

Subsp. *subtilis* 相似性为 99.48% ,与 *Brevibacterium halotolerans* 和 *B. mojavensis* 相似性为 99.29% ,与 *B. atrophaeus* 相似性为 99.16%。

2.2.4 Q-12 菌与枯草芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌部分特异性基因序列的分析 :*B. subtilis* 和 *B. amyloliquefaciens* 含有很多相同或相似的基因 ,但是通过基因比较发现 ,*B. subtilis* subsp. *subtilis* 和 *B. amyloliquefaciens* 的部分基因顺序明显不同^[8]。*B. subtilis* 和 *B. amyloliquefaciens* 均含有能够编码转运蛋白的基因 *tetB-tetL*。在 *B. subtilis* 中 ,基因 *yjaR* (功能未知)位于 *tetB-tetL* 的下游 2003bp 处 ,而基因 *yjaO* (功能未知)位于 *tetB(L)* 的上游并与之相邻 ;在 *B. amyloliquefaciens* 中 ,*yjaR* 位于 *tetB-tetL* 的上游并且与之相邻。据此设计两对引物 YyaO_ F /TetB_ R 和 YyaR_ F /TetB_ R 用于 PCR 扩增 ,其中正向引物 YyaO_ F 和 YyaR_ F 分别源自 *yjaO* 和 *yjaR* 两个基因的 3'末端 ,反向引物 TetB_ R 源自基因 *tetB* 的 5'末端^[8]。Oleg 等已经成功地利用这两对引物对多个可能为枯草芽孢杆菌或者解淀粉芽孢杆菌的菌种进行了鉴定。分别用上述两对引物对 Q-12、*B. subtilis* AS 1.1159 以及 *B. amyloliquefaciens* AS 1.1131 进行扩增 ,结果表明当以 YyaO_ F/TetB_ R 作为引物时 ,*B. subtilis* AS 1.1159 能够扩增 ,而 Q-12 和 *B. amyloliquefaciens* AS 1.1131 不能扩增 ;以 YyaR_ F /TetB_ R 作为引物时 ,*B. subtilis* AS 1.1159 不能被扩增 ,而 Q-12 和 *B. amyloliquefaciens* AS 1.113 能够扩增(图 2)。结合 16S rDNA 的鉴定结果可以确定 Q-12 菌为解淀粉芽孢杆菌。

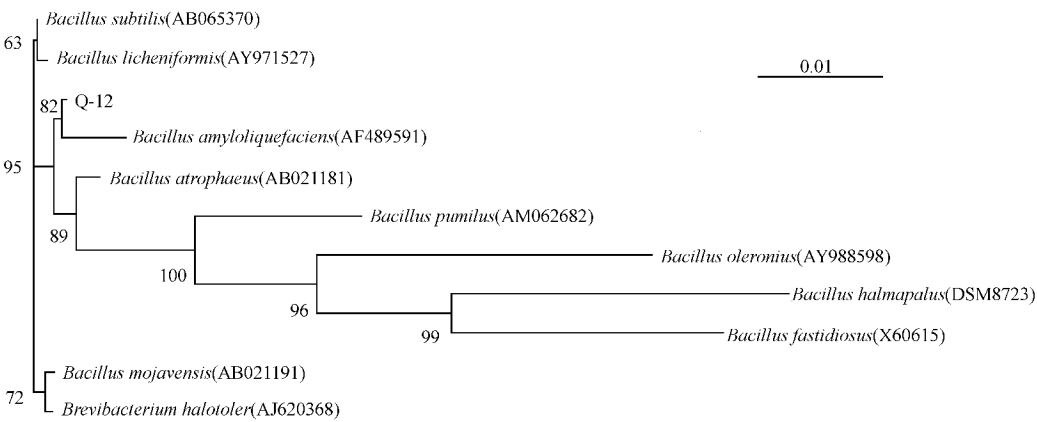


图 1 以 16S rDNA 序列为基础的 Q-12 菌系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree of the strain Q-12 based on 16S rDNA sequence
Numbers in parentheses represent the sequences 'accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar , 1 % sequence divergence.

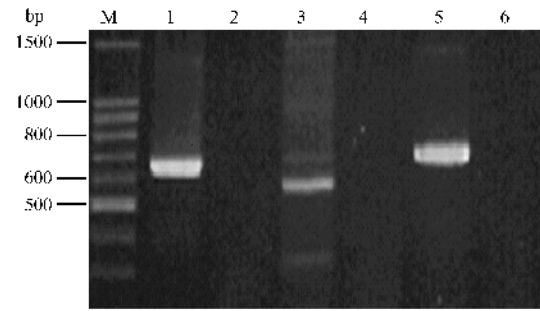


图 2 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图

Fig.2 Gel electrophoresis of the PCR product of the three strains using the primers YyaR_F /TetB_R and YyaO_F/TetB_R
M : marker 100bp ladder ; 1 and 4 : Q-12 ; 2 and 5 : *B. subtilis* AS 1.1159 ; 3 and 6 : *B. amyloliquefaciens* AS 1.1131.
1 ~ 3 : Amplification performed with the primer pair of YyaR_F /TetB_R ;
4 ~ 6 : Amplification performed with the primer pair of YyaO_F/TetB_R.

2.3 确定最适发酵条件

2.3.1 确定培养基组成 : Q-12 菌均能利用葡萄糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖、淀粉、木糖、果糖、柠檬酸钠等碳源 , 以乳糖为碳源时菌体生长最旺盛 , 但以麦芽糖作为碳源时产生的活性物质的活性最高 , 葡萄糖次之。麦芽糖市场价较高 , 考虑到以后工业化生产的成本 , 选择葡萄糖为碳源。

有机类的氮源有利于菌体的生长 , 但不利于活性物质的产生。当以 NH_4Cl 为氮源时抑菌活性最高 , 并能保证菌的正常生长 , 故选用 NH_4Cl 为氮源 (图 3)。

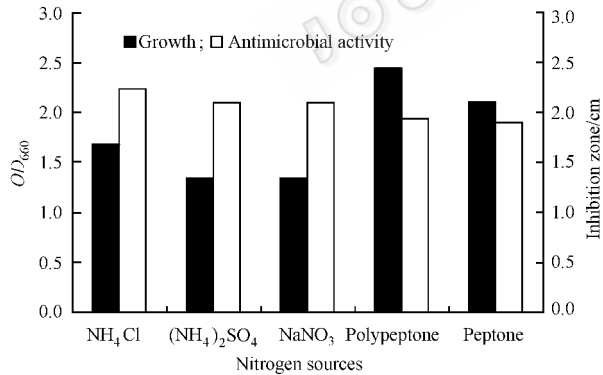


图 3 不同氮源对菌体生长及其抗菌物质产生的影响

Fig.3 Effect of nitrogen sources on the growth and antimicrobial activity of strain Q-12

以葡萄糖为碳源 , 氯化氨为氮源 , 以不同一价或二价金属离子 (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Li^{+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{+} , Na^{+} , K^{+}) 代替培养基中的 Na^{+} , 研究了不同金属离子对抑菌活性物质产生和菌体生长的影响。当培养基中加入 Mg^{2+} 时生成的菌体量最多、抑菌活性最强 , Na^{+} 次之。因此选择 MgCl_2 替代原培养基中的 NaCl 。

培养基中只加入酵母粉 , Q-12 菌能生长但不产

生抑菌活性物质 , 而当培养基中只加入牛肉膏 , Q-12 菌既能生长又能产生抑菌活性物质 , 且抑菌活性较高。牛肉膏的浓度的高低对菌体的生长几乎没有影响 , 但直接影响抑菌活性物质的生产量 , 如图 4 所示 , 牛肉膏浓度较低时抑菌活性随牛肉膏浓度的增加逐渐提高 , 当牛肉膏浓度为 0.8% 时抑菌活性达到最高值。

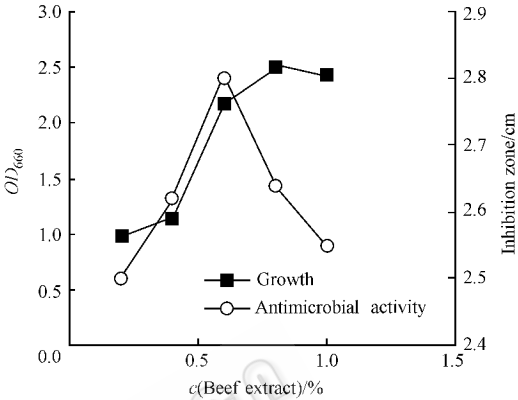


图 4 牛肉膏浓度对菌体生长及其抗菌物质产生的影响

Fig.4 Effect of concentration of beef extract on the growth and antimicrobial activity of strain Q-12

2.3.2 确定最适培养条件 : Q-12 菌对环境酸碱度有较强的适应能力 , 在 pH2.0 ~ 8.0 的范围内均能生长 , 而在 pH 5.0 ~ 8.0 范围内生长能力较强且产生较多的抗菌活性物质 , 其最适培养 pH 值为 6.0。

Q-12 菌对温度也有较强的适应能力 , 在 10.0 ~ 70.0℃ 的范围内均能生长 , 在温度 28.0 ~ 40.0℃ 范围内菌的生长量和抑菌活性基本保持不变。将数据用 Excel 作图 , 并 2 阶回归分析得出最适培养温度为 33℃。

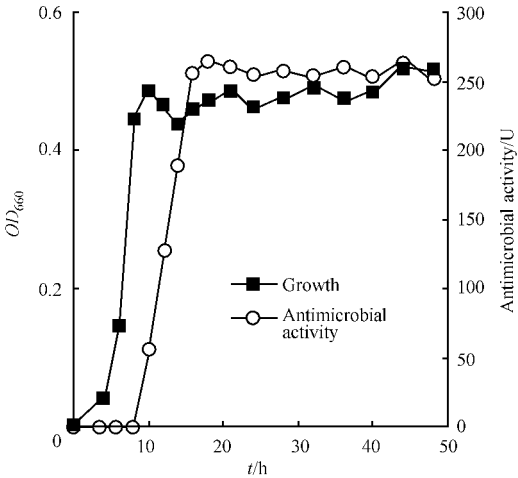


图 5 培养时间对菌体生长及其抗菌物质产生的影响

Fig.5 Effect of cultivation time on growth and antimicrobial activity of strain Q-12

在确定培养基组成、培养温度及培养基初始 pH 的基础上,测定了 Q-12 菌的最适培养时间。如图 5 所示,该菌培养 4h 开始进入对数生长期,培养 10h 进入平衡期。在培养进行 8h 时开始产生抑菌活性物质,随后随着培养时间的增加抑菌活性直线上升,在培养 16h 时抑菌活性达到最高值并进入平衡期。

3 讨论

芽孢杆菌内生芽孢,繁殖能力强,有利于工业化生产,又是自然界中广泛存在的非致病细菌,对人畜无害,不污染环境。因此自 1945 年 Johnson 等报道枯草芽孢杆菌产生抗菌物质后^[9],近半个世纪以来各国的研究工作者对它可望成为一种生物控制因素而寄予极大的兴趣和关注。芽孢杆菌产生的抗菌活性物质大多为低分子抗生素以及蛋白或多肽类化合物。芽孢杆菌产生的多肽类的抗生素主要包括 Eleines、Bacitracins 及 Gramicidins 等,具有线状或环状结构。它们分子量小,热稳定性好,含有 D-氨基酸,能耐受蛋白酶的水解作用^[10]。这些抗菌肽对许多危害严重的病原真菌都表现出很强的抑菌活性,在农牧业中有很好的应用前景;另外由于它们能够在细菌质膜上形成离子通道,破坏膜势,引起胞内物质泄漏而杀死细菌,因此一般不易产生耐药性和交叉抗性,很可能成为新药的来源^[9]。近年来对解淀粉芽孢杆菌产抗真菌活性物质的研究较多,其产的抗真菌活性物质与枯草芽孢杆菌近似,主要有抗真菌蛋白^[11]、表面活性素^[12,13]、伊枯草菌素^[14,15]、几丁质酶^[16]等。

枯草芽孢杆菌与其相近菌种具有很高的同源性。根据同源性分析,目前已从枯草芽孢杆菌中分化出 *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus mojavensis* 和 *Bacillus vallismortis* 3 个菌种,并且将枯草芽孢杆菌分为 *B. subtilis* subsp. *subtilis* 和 *B. subtilis* subsp. *spizizenii* 两个亚种。大量的实验只是将枯草芽孢杆菌及其相近菌种确定为枯草芽孢杆菌,而没有更深入的研究它们的同源性。而能够产生抗菌蛋白、胞外植酸酶以及几丁质酶的菌株大部分是特异性的,甚至可能只与某一特定菌种或者某一菌种的亚种相关,因而对枯草芽孢杆菌及其相近菌种进行精确的分类鉴定是很有必要的。

本文从堆肥中分离、筛选出对尖孢镰刀菌具有强烈抑菌活性的菌株 Q-12,通过生理生化实验以及 16S rDNA 同源性分析以及部分基因特异性序列分析,确定该菌株为解淀粉芽孢杆菌。解淀粉芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌表型相似,很容易混淆,仅从同源性上

很难精确确定它的分类地位。目前已有多种基因如 *gyrA*、*cheA* 以及 α -amylase^[8] 等已经用于枯草芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌的分类研究,但是通过单个基因对细菌分类其准确性受到了限制。解淀粉芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌同源性高,内含很多相同或相似的基因。但是经研究发现,这两个菌种某些相同或相似基因的排列顺序不同,因而可以利用这一差别通过同时鉴定多个基因来区分这两个菌种。本文利用基因 *yyaR*、*yyaO*、*tetL*、*tetB* 在解淀粉芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌中排列顺序的差异,对这两个菌进行分类鉴定,结果表明 Q-12 菌为解淀粉芽孢杆菌。

通过对 Q-12 菌的发酵条件进行初步研究,发现该菌对环境的要求不苛刻,在营养贫瘠的培养基中,很宽的温度及 pH 值范围内均能很好地生长。菌体内生孢子,有利于储存和运输,有望用作生物农药或者生物肥料。Q-12 菌的发酵液对多种植物病原菌有较强的抑制作用,并且对某些人类致病真菌也有抑制作用,有很好的应用前景。

参 考 文 献

- [1] 赵继红,李建中. 农用微生物杀菌剂研究进展. 农药, 2003, 42 (5): 6-8.
- [2] 崔星明, 吴 畏, 杨竹平. 植物抗真菌和细菌病害基因工程育种策略. 上海农业学报, 1999, 15 (2): 90-96.
- [3] 朱昌雄, 蒋细良, 姬军红, 等. 我国生物农药的研究进展及对未来发展建议. 现代化工, 2003, 23 (7): 1-4.
- [4] 周德庆. 微生物学实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1986, 65-70, 178-180.
- [5] Quan CS, Liu Q, Tian WJ, et al. Biodegradation of an endocrine-disrupting chemical, di-2-ethylhexyl phthalate, by *Bacillus subtilis* No. 66. *Appl Microbiol Biotech*, 2005, 66: 701-710.
- [6] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学技术出版社, 2001, 36-39.
- [7] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, 267-295.
- [8] Oleg NR, Christina D, Johan M, et al. Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 48: 249-259.
- [9] 谢 栋, 彭 憬, 王津红, 等. 枯草芽孢杆菌抗菌蛋白 X98III 的纯化与性质. 微生物学报, 1998, 38 (1): 13-19.
- [10] 刘 静, 王 军, 姚建铭, 等. 枯草芽孢杆菌 JA 抗菌物特性的研究及抗菌肽的分离纯化. 微生物学报, 2004, 44 (4): 511-514.
- [11] Kim PI, Chung KC. Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 234 (1): 177-183.

- [12] Mikkola R, Andersson M, Grigoriev P, *et al.* *Bacillus amyloliquefaciens* strains isolated from moisture-damaged buildings produced surfactin and a substance toxic to mammalian cells. *Archives of Microbiology*, 2004, **181**(4): 314–313.
- [13] Souto GI, Correa OS, Montecchia MS, *et al.* Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, **97**(6): 1247–1256.
- [14] Hiradate S, Yoshida S, Sugie H, *et al.* Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2. *Phytochemistry*, 2002, **61**(6): 693–698.
- [15] Yu GY, Sinclair JB, Hartman GL, *et al.* Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology & Biochemistry*, 2002, **34**: 955–963.
- [16] Wang SL, Shih IL, Liang TW, *et al.* Purification and characterization of two antifungal chitinases extracellularly produced by *Bacillus amyloliquefaciens* V656 in a shrimp and crab shell powder medium. *J Agric Food Chem*, 2002, **50**(8): 2241–2248.

Identification and characterization of a *Bacillus amyloliquefaciens* with high antifungal activity

QUAN Chun-shan^{1*}, WANG Jun-hua², XU Hong-tao², FAN Sheng-di¹

(¹ College of Life Science, Dalian Nationalities University, Dalian 116600, China)

(² School of Environmental and Biological Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: Plant disease can cause serious crop losses, and chemical control of disease is costly both to the environment and to the farmer. Some microorganism can produce the substance which has the preventing and exterminating functions to plant pathogens. These substances are valid to plant pathogens with only lower concentration, in addition the substances do not remain in soil and crops without being decomposed. If composition is performed with the microorganism, or the microorganism is mixed into compost, the functional compost having preventing and exterminating action will be made out and that can be more useful to environmental preservation.

In order to screen antifungal bacteria for use in biological control, 200 compost samples were taken from different regions in China, over 10 bacterium with clear antifungal activity were isolated from composts, among them, strain Q-12 exhibited the highest antifungal activity which was strongly inhibits the growth of many plant pathogenic fungi such as *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solan*. According to the characteristics of morphology, physiology and biochemistry tests (API 50 CHB/E system) and the comparison of 16S rDNA sequence, the strain Q-12 was similar to *B. subtilis* and *B. amyloliquefaciens*. Some specific genes *yjaR*, *yjaO* and *tetB*, which have previously been shown to be effective for resolving these closely related taxa of the *B. subtilis* group, were analysed to clarify further the classification of Q-12, and two pairs of primers *YjaR_F/TetB_R* and *YjaO_F/TetB_R* were designed. From the analysis of fingerprints obtained with the two primers, strain Q-12 and *B. amyloliquefaciens* showed identical genomic fingerprints with primers *YjaR_F/TetB_R*, indicating their closely genetic relationship, and was identified as *B. amyloliquefaciens*.

In the investigation of the culture condition, growth was carried out in a basal medium and gradually supplemented with the various ingredients to be investigated. The major ingredients being investigated included carbon sources, nitrogen sources and inorganic salts. The optimum medium and culture conditions of the strain all were studied with single factor test. The strain is easy to cultivate, and the optimal antibiotic production condition is growth in a medium (5 g/L glucose, 1 g/L NH_4Cl , 0.8 g/L beef extract, 5 g/L MgCl_2 , pH 6.0) at 33°C for 40 h.

A number of *Bacillus* strains have proven safe over many years as a nonpathogenic species and are consumed in ton quantities in several human food preparations. Strains of *Bacillus* have several advantages over other biocontrol bacteria in that they are often soil isolates capable of sporulation, easy to cultivate and store, and some strains have been shown to increase yields of various crops.

Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus subtilis*; Identification; Antifungal activity