

柑桔溃疡病生防细菌 Bt8 的研究

谭小艳¹, 黄思良^{1,2*}, 任建国², 晏卫红², 岑贞陆²

(¹广西大学农学院 南宁 530005) (²广西农业科学院微生物研究室 南宁 530007)

摘 要 柑桔溃疡病是中国柑桔的重要病害。从南宁柑桔园土壤中分离到 1 株对柑桔溃疡病菌具有强抑制力的细菌 Bt8。根据 Bt8 菌株的形态、16S rDNA 序列分析以及生理生化特性, 将其鉴定为鲍氏不动杆菌。Bt8 菌株的抑菌效果受温度、pH 及培养基等环境因素的影响。在温室条件下将该细菌悬浮液喷施到柑桔叶片上, 获得了 55.2% 的病斑抑制效果。研究结果揭示了鲍氏不动杆菌在柑桔溃疡病田间防治上的潜能。

关键词 生物防治, 16S rDNA, 柑桔溃疡病, 鲍氏不动杆菌

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)02-0292-05

由地毯草黄单胞杆菌柑桔致病变种 [*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Hasse) Vauterin] 引起的柑桔溃疡病是柑桔的重要病害, 为国内外植物检疫对象^[1]。该病在易受台风影响的沿海地区发生尤为严重, 是沿海地区发展柑桔(特别是橙类)生产的难题。目前, 防治柑桔溃疡病主要采用以农业防治为基础, 化学防治为主导的综合措施^[2]。以化学防治为主导的综合防治体系难以避免化学农药对环境及农产品的残留污染及病原菌抗药性的产生。如何在柑桔溃疡病的综合防治体系中导入生物防治技术, 减少对化学农药的依赖程度, 是柑桔溃疡病防治领域的重要研究方向。获取对柑桔溃疡病菌有拮抗作用的微生物资源是进行柑桔溃疡病生物防治工作的基础。玻器内测定, 已知对柑桔溃疡病菌有拮抗作用的微生物有枯草芽孢杆菌 [*Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn 1872, 174], 草生欧氏杆菌 [*Erwinia herbicola* (Lohnis) Dye 1964, 268], 荧光假单胞菌 [*Pseudomonas fluorescens* Migula 1895, 29] 和丁香假单胞杆菌 [*Pseudomonas syringae* van Hall 1902, 141] 以及腐生的 *Xanthomonas* sp.^[3,4]。周吉奎等^[5]报道了 K-2 与 K-8 两种细菌在温室和大田防治试验中对柑桔溃疡病表现出良好的防治效果, 但未阐明这两种细菌的分类地位。目前, 对柑桔溃疡病菌拮抗微生物资源仍知之甚少。近年, 作者从柑桔园土壤中分离到一种新的对柑桔溃疡病菌有较强拮抗作用的细菌, 并对该菌的分类及生物学特性等进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株和培养基: 柑桔溃疡病菌 [*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Hasse) Vauterin = *X. campestris* pv. *citri* Dye = *X. citri* (Hasse) Dowson] 由广西农业科学院微生物研究室分离纯化鉴定并保存。培养基采用 NA 培养基: 蛋白胨 5g, 酵母浸膏 1g, 牛肉膏 3g, 琼脂粉 10g, 蔗糖 10g, 水 1000mL, pH 7.0 ~ 7.2。

1.1.2 主要试剂: 引物由上海 Sangon 公司合成, Pfu DNA Polymerase 购自宝生物工程大连有限公司, PCR 产物纯化试剂盒购自上海中科开瑞生物芯片科技股份有限公司, 生化试剂购自武汉生命技术有限公司。

1.2 Bt8 菌株的分离

2003 年 7 月, 从广西南宁青秀山柑桔园采集土壤, 称取土壤 10g, 放入 90mL 有玻璃珠的无菌水三角瓶中, 200r/min 20min 摇匀, 制成 10^{-2} 土壤悬浮液, 然后稀释成 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} , 从 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 悬浮液中, 用接种环沾取悬浮液, 在平板培养基上划线, 在 28℃ 与 30℃ 下倒置培养 24h 后观察, 如有单菌落, 挑到斜面上, 连续观察 7d^[6]。

1.3 Bt8 菌株的抑菌活性测定

用抑菌圈法^[7]测定 Bt8 菌株的抑菌活性。将分离到的细菌菌株 Bt8 和柑桔溃疡病菌分别接种于 10mL 的 NA 液体培养基中, 震荡 (30℃, 170r/min) 培养 24h, 将其配成浓度约 1×10^8 cfu/mL 的待测菌液。测定时先倒一薄层水琼脂于培养皿内, 中间放一牛

基金项目: 广西科技攻关项目(桂科攻 0322003B)

* 通讯作者。Tel 86-771-3244914, E-mail: silianguang@126.com

作者简介: 谭小艳(1978 -), 女, 陕西临潼人, 硕士研究生, 主要从事植物病害生物防治的研究, 现在枣庄学院生物系工作。E-mail: tomhaha168@tom.com

收稿日期: 2005-06-20, 接受日期: 2005-12-07, 修回日期: 2006-01-05

津杯,待融化的 300mL NA 培养基冷却到 50℃左右,加入 3mL 溃疡病菌悬浮液,混匀,倒入培养皿中,每皿约 20mL,冷却后,取出牛津杯,孔中注入 0.1mL 的 Bt8 细菌悬浮液,以 NA 液体培养基为对照,每一处理 3 个重复,于 30℃培养 48h,观察抑菌情况,测量抑菌圈直径^[7]。

1.4 温度对抑菌活性的影响

用抑菌圈法^[7]测定温度对 Bt8 菌株抑菌活性的影响。将接种的 NA 平板培养基分别放于 18℃、21℃、24℃、27℃、30℃、33℃、36℃、39℃培养 48h 后测量抑菌圈直径,每一处理 3 个重复。

1.5 pH 值对抑菌活性的影响

将 NA 液体培养基灭菌后用 pH 计调至 3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0。将拮抗菌 Bt8 接入不同的 pH 值培养液中,震荡(30℃,170r/min)培养 18h,用 1.3 节的抑菌圈法做拮抗试验,48h 后测量抑菌圈直径,每一处理 3 个重复。

1.6 培养基对抑菌活性的影响

将拮抗菌 Bt8 分别接种在豆芽汁(10%新鲜黄豆芽汁 200mL,葡萄糖 50g,水 800mL,pH7.2~7.4)、胡萝卜(新鲜胡萝卜 200g,水 1000mL)、PDA(马铃薯 200g,蔗糖 20g,水 1000mL)、玉米粉(玉米粉 30g,水 1000mL)、NA、LB(胰蛋白胨 10g,氯化钠 10g,酵母提取物 5g,双蒸水 1000mL,pH 7.0)液体培养基中,震荡(30℃,170r/min)培养 24h,用 1.3 节的抑菌圈法作拮抗实验,48h 后测量抑菌圈直径,每一处理 3 个重复。

1.7 Bt8 菌株抑菌力的稳定性

将 Bt8 菌株在 NA 斜面培养基上每隔 15d 移植 1 次,30℃培养 24h 后于 4℃冰箱保存,连续反复移植培养 8 次,按 1.3 节的方法测定每次移植前 Bt8 菌株的抑菌力,每次检测设 3 个重复。

1.8 Bt8 菌株的分子生物学鉴定

用稀释涂布法将 Bt8 菌株接种在 NA 平板上,30℃培养过夜,采用细菌单菌落直接 PCR 扩增法,制备细菌 DNA,即取一单菌落溶于 10 μ L 1% SDS 溶液中,充分震荡摇匀,用 300 μ L TE(Tris-HCl)溶解获得 DNA 原液,将原液稀释 10 倍为 PCR 扩增模板^[8]。PCR 扩增采用通用引物^[11],序列为:Primer1: 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3', Primer2: 5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 反应条件:94℃ 4min,94℃ 1min,50℃ 1min,72℃ 2min,30 个循环;72℃ 10min。反应结束后,取 5 μ L 反应液进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。使用纯化试剂盒纯化 PCR 产物,委托上海鼎安生物公司对扩增产物进行测序,序

列采用双向测定。采用 BLAST 程序对扩增产物序列进行同源性比较,并用 ClustalX1.81 软件构建系统发育树。

1.9 Bt8 菌株的形态学特征和生理生化性状

形态学和生理生化性状分析按照常规细菌学方法^[9-11]进行。

1.10 Bt8 菌株的盆栽防治试验

将生防菌 Bt8 和柑桔溃疡病菌接种于 NA 液体培养基中,摇床(30℃,150r/min)培养 24h 后,配成浓度约为 1 \times 10⁸cfu/mL 的菌体悬浮液。设 3 个处理:Ⅰ同时接溃疡病菌和拮抗菌;Ⅱ先接溃疡病菌 2d 以后接拮抗菌 Bt8;Ⅲ先接拮抗菌 Bt8 2d 以后接溃疡病菌,以只接溃疡病菌为对照。选取健康的植株,在不同方位的枝条上取 4 组叶子,分别为对照、处理Ⅰ、处理Ⅱ、处理Ⅲ,每一处理 3 片叶子,挂好标签,针刺接种后于温度为 21℃~29℃、湿度为 80% 的环境中保湿 5d,对照发病后第 25d 调查发病情况,采用十字相交法测量病斑直径,按下式计算病斑抑制率:

$$\text{病斑抑制率}(\%) = \frac{\text{对照病斑总面积} - \text{处理病斑总面积}}{\text{对照病斑总面积}} \times 100$$

2 结果

2.1 Bt8 菌株的抑菌活性

对 Bt8 菌株的抑菌活性进行测定结果表明,该菌株对柑桔溃疡病菌生长有很强的抑制作用,其抑菌圈直径可高达 55mm~60mm(图 1)。

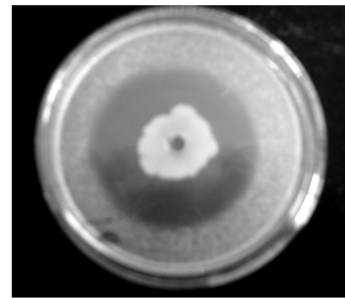


图 1 Bt8 菌株对柑桔溃疡病菌生长的抑制

Fig.1 Growth of *X. axonopodis* pv. *citri* inhibited by Bt8 strain

2.2 温度、pH 值和培养基对 Bt8 菌株抑菌活性的影响

2.2.1 温度与 pH 值对 Bt8 菌株抑菌活性的影响: 温度对 Bt8 菌株抑菌活性有显著的影响,在 18℃~30℃抑菌圈直径差异不大,但在 33℃时抑菌圈直径达到最大。表现最大与最小抑菌圈直径的温度与最大 OD 值及最小 OD 值的温度相一致,在所测定的温度范围内,抑菌圈直径及反映菌体生长量的 OD 值均与温度的高低基本呈正相关(表 1)。pH 值对 Bt8 菌株抑菌活性的影响:当 pH 为 10.0 时 Bt8 菌株抑菌圈直径达到最大(51.22mm),而 pH 10.0 的 OD

值相对较低(1.14)。最高 OD 值的 pH 为 6.5。该结果显示 Bt8 菌株抑菌活性最强的 pH 与菌体最适生长的 pH 处于异位状态(表 1)。

表 1 温度与 pH 对 Bt8 菌株抑菌活性的影响

Table 1 Effect of temperatures and pHs on inhibiting activities of Bt8 strain

Treatment	OD ₆₅₀	Diameter of inhibition zone/mm
Temperature(°C)		
18	1.31	14.97 b
21	1.32	17.83 b
24	1.33	17.33 b
27	1.32	18.50 b
30	1.39	20.86 b
33	1.52	39.67 a
pH		
4.5	0.08	25.53 e
5.0	1.17	27.93 de
5.5	1.19	25.49 e
6.0	1.19	28.47 cde
6.5	1.36	25.54 e
7.0	1.13	28.27 de
7.5	1.30	36.76 b
8.0	1.27	32.75 bede
8.5	1.07	33.64 bcd
9.0	1.23	29.03 cde
9.5	1.06	33.37 bcd
10.0	1.14	51.22 a
10.5	1.11	35.64 bc
11.0	1.11	0.00 f

The lowercases represent the significance level of difference at 1%. Statistic analysis was carried out separately for temperatures and pHs.

2.2.2 培养基对 Bt8 菌株抑菌活性的影响:不同培养基对 Bt8 菌株抑菌活性有一定的影响:豆芽汁培养基培养的 Bt8 菌株抑菌圈直径最大(38.77mm);在 LB 中的抑菌圈直径最小(20.48mm),且与其它处理区相比在 1% 水平上差异极显著。OD 值的高低与抑菌圈直径大小呈正相关,即表现最大与最小抑菌圈直径的培养基分别与最大 OD 值及最小 OD 值的培养基相一致(表 2)。

表 2 培养基对 Bt8 菌株抑菌活性的影响

Table 2 Effect of media on inhibiting activities of Bt8 strain

Medium	OD ₆₅₀	Diameter of inhibition zone/mm
Bean seedling juice	1.34	38.77 a
Maize powder	1.24	35.12 a
Carrot juice	1.24	34.50 a
NA	1.23	33.35 a
Potato juice	1.22	32.14 a
LB	1.00	20.48 b

The lowercases represent the significance level of difference at 1%.

2.3 Bt8 菌株抑菌力的稳定性

对生防菌 Bt8 抑菌力的稳定性监测结果表明,连续移植 8 次,抑菌圈平均直径 31.17mm,各移植次数的抑菌圈直径有一定差异(表 3)。移植前抑菌圈直径最大(39.5mm),显著大于所有移植次数的抑菌圈直径。移植 1 次后,抑菌圈直径围绕平均值上下波动,变化规律不明显。没有观察到抑菌力消失的现象。该结果显示,与移植前相比,Bt8 菌株抑菌力略下降后基本趋于稳定。

表 3 生防菌株 Bt8 连续 8 次移植的抑菌力监测

Table 3 Monitoring of inhibiting activities of Bt8 strain against *X. axonopodis* pv. *citri*

Transfer time	Diameter of inhibition zone/mm
0	39.50 a
1	32.14 b
2	28.90 cd
3	27.48 d
4	31.30 bc
5	33.35 b
6	32.00 b
7	28.80 cd
8	27.03 d

The lowercases represent the significance level of difference at 1%.

2.4 Bt8 菌株 16S rDNA 序列测定与分析

PCR 扩增结果,获得了 Bt8 菌株 16S rDNA 的约 1.5kb 扩增片段。对 PCR 产物测序结果,共测得 Bt8 菌株 16S rDNA 全序列由 1443 个碱基构成,已在 GenBank 登录(登录号:AY847284)。对 16S rDNA 序列进行比较发现,Bt8 菌株与不动杆菌属 *Acinetobacter* 有 99% 的同源性。系统发育分析结果表明,该菌株与不动杆菌属 *Acinetobacter* 形成一个类群(图 2)。

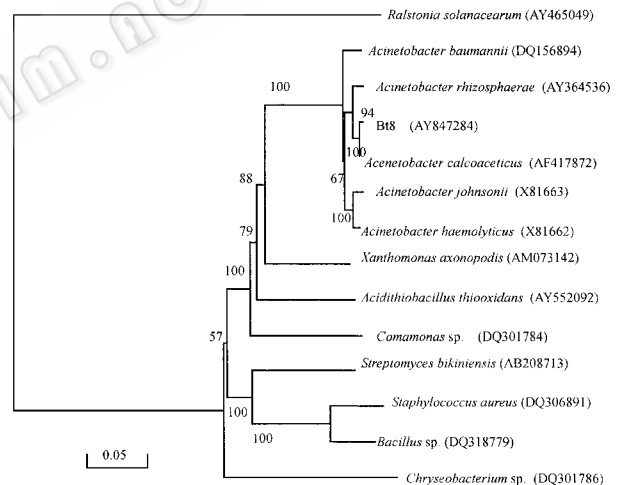


图 2 基于 16S rDNA 序列同源性的 Bt8 菌株系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence homology of Bt8 strain. The numbers in parentheses represent the sequence accession number in GenBank. The numbers in each branch points denote the percentages supported by bootstrap. Bar, 5% sequence divergence.

2.5 Bt8 菌株的形态学与生物学特征

生防菌 Bt8 菌体呈球形或椭圆至短杆状,0.9 ~ 1.5 μ m 静止时期呈球状,常成对,也可呈不同长度的链状,无芽孢,无鞭毛,革兰氏染色阴性,生长温度 11 ~ 44 $^{\circ}$ C,最适 33 $^{\circ}$ C,生长 pH 4.0 ~ 11.0,最适 pH 7.0 和 9.0。在 NA 平板上,菌落白色,直径 2mm 左右,圆形,表面低凸,光滑,培养 24h 菌落边缘整齐,48h 后缺刻(图 3),不透明,无粘性,没有可溶性色素产生,有恶臭气味。

2.6 Bt8 菌株生理生化特征

Bt8 菌株能够利用的化合物有麦芽糖、乙醇、L-

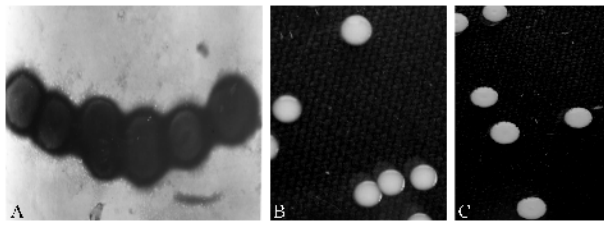


图3 生防菌株 Bt8 菌体及菌落形态

Fig.3 Morphological characteristics of Bt8 strain. A. Cell chain ;B. 24-hour-old colonies ;C. 48-hour-old colonies.

赖氨酸、DL-丙氨酸、L-缬氨酸、L-组氨酸、L-酪氨酸、L-亮氨酸、DL-苹果酸钙。能够以硝酸铵、硫酸铵、磷酸氢二铵为氮源(表4)。不产生荧光色素,能在2%的NaCl中生长。生理生化反应阳性的是:吲哚试验、过氧化氢酶、油脂水解、柠檬酸盐的利用、葡萄糖产酸、葡萄糖氧化、吐温80、硝酸盐还原;生理生化反应阴性的是:氧化酶、淀粉水解、甲基红(M.R.)、乙酰甲基甲醇(V-P)、亚硝酸盐还原、硫化氢、3-酮基乳糖测定、明胶液化、反硝化(表5)。

表4 生防菌株 Bt8 对不同化合物的利用

Table 4 Utilization of different compounds by Bt8 strain

Compound	Utilization	Compound	Utilization
L-rhamnose	-	DL-alanine	+
L-aspartic acid	-	L-valine	+
α-lactose	-	L-histidine	+
α-Keto-glutaric acid	-	L-tyrosine	+
Succinic acid	-	L-leucine	+
Tartaric acid	-	DL-calcium malate	+
Sodium benzoate	-	Ammonium nitrate	+
Amino acetic acid	-	Ammonium sulfate	+
Maltose	+	Diammonium hydrogen phosphate	+
Ethanol	+	Ammonium chloride	+
L-lysine	+	Thymine	-

“+”和“-”represent positive and negative reactions, respectively.

表5 生防菌株 Bt8 的生理生化反应

Table 5 Physiological and biochemical reactions of Bt8 strain

Item tested	Reaction	Item tested	Reaction
Catalase reaction	+	Nitrite reduction	-
Oil fat hydrolysis	+	Denitrification	-
Sodium citrate	+	Gelatin liquefaction	-
D-glucose	+	Fluorescence dye	-
D-glucose	+	Egg yolk agar	-
Nitrate reduction	+	Sulfureted hydrogen	-
Indole	+	Growth in 2% NaCl	+
Tween 80	+	Growth in 5% NaCl	-
Oxidase	-	Growth at 43°C	+
Starch hydrolysis	-	Growth at 44°C	+
Methyl red	-	Growth at 45°C	-
Voges-Proskauer	-		

“+”和“-”represent positive and negative reactions, respectively.

2.7 盆栽防治试验效果

Bt8 菌株不同的处理对柑桔溃疡病的抑制效果有一定差异,处理 I 的病斑抑制率最小(24.5%),处

理 II 居中(31.3%),处理 III 最高(52.2%)。通过多次试验,处理 III 的病斑抑制率均为最高且稳定(数据未示)。

3 讨论

pH 值对 Bt8 菌株的抑制活性的影响与温度或培养基的影响机制不一样。表现最大与最小抑制菌圈直径的温度分别与最大 OD 值及最小 OD 值的温度相一致(表1)。同样,表现最大与最小抑菌圈直径的培养基分别与最大 OD 值及最小 OD 值的培养基相一致(表3)。因此,温度及培养基对 Bt8 菌株的抑菌活性的影响主要是通过影响该菌株的生长量来实现的。表现最大 OD 值的 pH 为 6.5,而表现最大抑菌圈直径的 pH 却为 10.0(表2),该结果表明,表现最强抑菌活性的 pH(10.0)不是 Bt8 菌株的最适生长 pH, pH 对该菌株抑菌活性的影响不唯一依赖菌体的生物量。pH 影响 Bt8 菌株的抑菌活性的机理值得进一步研究。本研究结果对优化 Bt8 菌株的培养条件,发挥其最佳抑菌活性具有指导意义。

采用分子生物学方法,能够快速鉴定细菌,但由于菌株间的遗传距离较近,只能准确地鉴定到属,至于种的鉴定,还必需考虑菌株的形态及生理生化特征。经 16S rDNA 序列对比和系统发育分析, Bt8 菌株虽与乙酸钙不动杆菌 *Acinetobacter calcoaceticus* Bouvet et Grimont 也有 99% 的同源性,但生理生化特性测试结果表明, Bt8 菌株与乙酸钙不动杆菌有两点不相同: 1) Bt8 菌株可以在 41°C 与 44°C 环境中生长(表5),而乙酸钙不动杆菌不能在 41°C 环境中生长^[9, 12-14]; 2) Bt8 菌株能利用苹果酸钙(表4),而乙酸钙不动杆菌不能利用该化合物^[9, 12-14]。由于 Bt8 菌株与具有 99% 同源性的鲍氏不动杆菌 *Acinetobacter baumannii* Bouvet et Grimont 的生理生化特征^[9, 11-13]相一致,因此作者将 Bt8 菌株鉴定为鲍氏不动杆菌。引起人类、动物疾病的鲍氏不动杆菌的菌株在医学及兽医学领域报道较多^[14-24]。该菌有的菌株可以降解除草剂敌草隆^[25]。Sarma 等^[26]从被油污染的土壤中分离到能降解石油的鲍氏不动杆菌,并确认种内多样性的存在。本研究首次发现鲍氏不动杆菌对柑桔溃疡病菌有拮抗作用(图1),这一研究结果进一步丰富了人们对该菌生物学多样性的认识。

由生理特征可知, Bt8 菌株有较广的生长温度和 pH 值,能够抵抗外界的不良环境,在合适的环境中,该菌生长迅速,平皿中测试对柑桔溃疡病菌有很强的拮抗作用,其最适生长温度和柑桔溃疡病菌的最适侵染温度吻合。盆栽防治效果良好而稳定。因此, Bt8 作为柑桔溃疡病的生防菌具有很大的开发潜力。今后,对抗菌活性成分的纯化、鉴定、利用及其调控基因的克隆与利用值得深入研究。

参 考 文 献

- [1] 赖传雅. 农业植物病理学(华南本). 北京: 科学出版社, 2003, 9.
- [2] 覃可尊. 综合防治溃疡病效果显著. 中国南方果树, 1997, 26(1): 19.
- [3] 黄凤莲. 柑桔溃疡病的生物防治前景探讨. 湖南农业科学, 2001, 4: 47.
- [4] Civerolo EL. 世界柑桔溃疡病及其病原菌的研究现状和进展. 植物检疫, 1986, 115: 120.
- [5] 周吉奎, 罗宽, 肖启明. 柑桔溃疡病生物防治研究. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2001, 27(4): 303-305.
- [6] 沈萍, 范秀容, 李广斌. 微生物实验. 高等教育出版社, 1999.
- [7] 方中达. 植病研究法. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [8] 戴欣. 海洋细菌的分子鉴定分类. 中山大学学报(自然科学版), 2000, 1: 67-68.
- [9] 东秀珠, 蔡妙英等. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [10] 中国科学院微生物研究所细菌分类组编. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社, 1978.
- [11] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物学实验教程. 北京: 北京大学出版社, 1999.
- [12] 蔡妙英, 卢运玉, 赵玉峰. 细菌名称(第二版). 北京: 科学出版社, 1996, 5.
- [13] Buchana RE, Gibbons NE. 伯杰细菌鉴定手册(第八版). 北京: 科学出版社, 1984, 12.
- [14] Francey T, Gaschen F, Nicolet J, et al. The role of *Acinetobacter baumannii* as a nosocomial pathogen for dogs and cats in a intensive care unit. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2000, 14(2): 177-183.
- [15] Hofmann AC, Gerber H, Nicolet J. Prospective study of risk factors for wound infections in surgically treated horses. *Revista de Medicina Veterinaria Buenos Aires*, 1999, 80(6): 509-514.
- [16] Palabaykoglul I, Tulunay M, Unal N. Colonization of airways and nosocomial pneumonia. *Turkish Journal of Infection*, 2000, 14(1): 41-45.
- [17] Mah MW, Memish ZA, Cunningham G, et al. Outbreak of *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit associated with tracheostomy. *American Journal of Infection Control*, 2000, 29(5): 248-288.
- [18] Ugur A, Yilmaz L, Sahin N, et al. Microflora on the skin of European eel (*Anguilla anguilla* L., 1758) sampled from Creek Yuvarlakay, Turkey. *Israeli Journal of Aquaculture Bannmidjeh*, 2003, 54(2): 89-94.
- [19] Oncw O, Keskin O, Acar HV, et al. Hospital-acquired infections following the 1999 Marmara earthquake. *Journal of Hospital Infection*, 2002, 57(4): 723-728.
- [20] Rahal JJ, Urban C, Segal MS. Nosocomial antibiotic resistance in multiple gram-negative species: experience at one hospital with squeezing the resistance ball on multiple sites. *Clinical Infectious Diseases*, 2002, 34(4): 499-503.
- [21] Scola BL, Raoult D. *Acinetobacter baumannii* in human body louse. *Emerging Infectious Diseases*, 2004, 10(9): 1671-1673.
- [22] Macedo JLS de, Rosa SC, Castro C. Sepsis in burned patients. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2003, 36(6): 647-652.
- [23] Montero A, Ariza J, Coroella X. Antibiotic combinations for serious infections caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a mouse pneumonia model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2004, 54(6): 1085-1019.
- [24] Scott PT, Petersen K, Fishbain J, et al. *Acinetobacter baumannii* infections among patients at military medical facilities treating injured U. S. service members, 2002-2004. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2004, 53(45): 1063-1066.
- [25] Roque MR de A, Melo IS de. Isolation and characterization of bacteria degrading the herbicide diuron. *Scientia Agricola* 2000, 57(4): 723-728.
- [26] Samã PM, Dhruva B, Krishnan S, et al. Assessment of intra-species diversity among strains of *Acinetobacter baumannii* isolated from sites contaminated with petroleum hydrocarbons. *Canadian Journal of Microbiology*, 2004, 50(6): 405-414.

Study on a bacterial strain Bt8 for biocontrol against citrus bacterial canker

TAN Xiao-yan¹, HUANG Si-liang^{1,2*}, REN Jian-guo², YAN Wei-hong², CEN Zhen-lu²⁽¹⁾ College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530005, China⁽²⁾ Laboratory of Microbiology, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China

Abstract: Citrus bacterial canker is an important disease of Citrus species in China. The disease severely occurs especially in the coastal area. Integrated control system has been used for the control of the disease, in which chemotherapy plays an important role at present. The chemotherapy-dominant control system brought many problems to the environment, such as chemical residues in the products and induction of resistance to fungicides by the pathogen. To solve these problems, an intensive study on biocontrol of citrus bacterial canker is needed. Isolations and characterizations of biocontrol agents are the basis for biocontrol of the disease. A bacterial strain Bt8 with strong inhibiting ability against *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Hasse) Vauterin, was isolated from citrus orchard soil in Nanning, China. The isolated bacterial strain was identified and characterized as *Acinetobacter baumannii* Bouvet et Grimont on the base of its morphology and 16S rDNA sequence analysis as well as physiological and biochemical characters. The inhibiting activity of the bacterium suspension against the pathogen was significantly influenced by environmental factors, such as temperatures, pHs and media. At temperatures of 18°C to 33°C, both the inhibiting activity of the bacterium suspension and the biomass of the bacterium increased with the increases of temperatures, suggesting that the influence of temperature on inhibiting activity of the bacterium suspension was in dependence on the bacterial biomass. In NA liquid medium of pH 10, the bacterium suspension showed the highest inhibiting activity against *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, which was not in dependence on biomass of the bacterium. The bacterium suspension provided 55.2% inhibition against bacterial canker under greenhouse conditions. The results showed that *Acinetobacter baumannii* has potential as biocontrol agent against bacterial canker disease. *Acinetobacter baumannii* was reported as the pathogens infecting human and animals. The present study enriched the understanding on biological diversity in *Acinetobacter baumannii* to sciences. This is the first report on the isolation of *Acinetobacter baumannii* with strong inhibiting ability against plant pathogen.

Keywords: Biocontrol; 16S rDNA; Citrus bacterial canker; *Acinetobacter baumannii*

Foundation item: The Project for Science and Technology Department of Guangxi (0322003B)

* Corresponding author. Tel: 86-771-3244914; E-mail: silianghuang@126.com

Received 20 June 2005/Accepted 7 December 2005/Revised 5 January 2006