

生姜青枯病生防菌株 NX 7 的鉴定、抗菌活性物质分析及发酵条件优化

李乃成¹, 郭洪参², 陈小川¹, 杜淑琦¹, 张苗苗¹, 张 燕¹

(1. 潍坊理工学院现代农业与环境学院 山东潍坊 261000; 2. 安丘市农业农村局 山东安丘 262100)

摘要: 青枯病是生姜栽培产业最为严重的土传病害之一, 传统化学防治存在防效差、环境污染等诸多弊端。为制定生姜青枯病生防措施, 本研究于生姜根际分离获得 1 株对青枯病菌拮抗效果较好的菌株 NX 7, 经形态学观察、生理生化特性测定并结合分子生物学鉴定明确其分类地位, 通过液质联用技术(LC-MS)对其抑菌产物进行初步分析, 并采用琼脂扩散法, 结合单因素试验及正交试验确定其最适发酵培养基组分、发酵条件, 分析优化后菌株抑菌效果。结果表明, 菌株 NX 7 鉴定为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*), 抑菌圈直径为 1.15 cm, 其发酵液内含有 Minocycline、Lankacidin C 及 Rifaximin 等 3 种聚酮类代谢产物, 其中 Rifaximin 抑菌活性最强, EC_{50} 为 $287.66 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。单因素试验及正交试验结果显示, 菌株 NX 7 最适培养基组分为蛋白胨 $11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、牛肉浸粉 $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 及硫酸锌 $11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 最适发酵条件为培养基初始 pH 6、培养温度为 25°C 、转速为 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。优化后菌株 NX 7 抑菌圈直径较常规处理提高 93.48%。综上所述, 菌株 NX 7 对生姜青枯病菌具有较强的抑菌效果, 经发酵培养基及发酵条件优化后可增强其抑菌能力。菌株 NX 7 具有开发成生姜青枯病生防菌剂的潜力。

关键词: 生姜; 青枯病; 贝莱斯芽孢杆菌; 发酵条件; 正交试验; 聚酮类代谢产物

中图分类号: S632.5

文献标志码: A

文章编号: 1673-2871(2026)08-192-11

Identification, optimization of fermentation conditions and analysis of antibacterial substances of biocontrol strain NX 7 against *Ralstonia solanacearum*

Li Naicheng¹, Guo Hongshen², Chen Xiaochuan¹, Du Shuqi¹, Zhang Miaomiao¹, Zhang Yan¹

(1. College of Modern Agriculture and Environment, Weifang Institute of Technology, Weifang 261000, Shandong, China; 2. Anqiu County Bureau of Agriculture and Rural Areas, Anqiu 262100, Shandong, China)

Abstract: Bacterial wilt of ginger caused by *Ralstonia solanacearum*, is the destructive pathogen of ginger throughout the entire growth cycle. Traditional chemical control methods have many drawbacks such as poor efficacy and environmental pollution. Thus, it is urgent to establish an environmentally friendly and highly efficient biological control system. To investigate the resistance potency of plant growth-promoting rhizobacteria in ginger to *R. solanacearum*, one strain, marked as NX 7, was isolated from ginger rhizosphere soil and exhibited potent antagonistic effects against *R. solanacearum*. Morphological observations, physiological and biochemical examination, and molecular biological identification were deployed to classify the antagonist strain. The antibacterial activity of NX 7 strains was quantified through agar diffusion method. Single-factor experiments and orthogonal tests were subsequently conducted to optimize the fermentation medium components and fermentation conditions. The strain NX 7 was identified as *Bacillus velezensis* based on the multiple methodology. It formed an inhibition zone of 1.15 cm in diameter and produced Minocycline, Lankacidin C and Rifaximin in fermentation broth. Meanwhile, the Rifaximin exhibited the strongest inhibition effect on the pathogen and EC_{50} is $287.66 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. The results of single factor and orthogonal experiments showed optimal growth medium for strain NX 7 was contained peptone ($11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), beef extract desiccant ($7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), and zinc sulfate ($11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). The best fermentation conditions were determined as initial pH of 6.0, temperature of 25°C , rotation speed of $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$. The diameter of inhibition zone of the optimized strain NX7 against *R. solanacearum* increased to 3.56 cm, which was 93.48% larger than fer-

收稿日期: 2026-01-19; 修回日期: 2026-04-16

基金项目: 山东省自然科学基金(ZR2023QC326)

作者简介: 李乃成, 男, 副教授, 研究方向为植物生理生态学。E-mail: nc.li@wfit.edu.cn

通信作者: 张 燕, 女, 讲师, 研究方向为植物保护。E-mail: yan.zhang.nh@wfit.edu.cn

mentation medium conditions. In summary, the strain NX 7 exhibited a strong antagonist activity against *R. solanacearum*. Optimized medium and fermentation conditions enhanced the antibacterial activity of NX 7 strain, which demonstrated its potential as a biocontrol agent.

Key words: Ginger; Bacterial wilt; *Bacillus velezensis*; Fermentation condition; Orthogonal test; Polyketide metabolite

生姜(*Zingiber officinale* Roscoe)隶属于姜科姜属,是我国重要的药食两用作物之一,在世界范围内广泛种植^[1-2]。生姜富含挥发油、姜辣素、氨基酸等活性物质,具有解表散寒,温中止呕等功效^[3]。作为世界上生姜种植面积最大、生产总量最高、出口最多的国家,我国生姜栽培历史已有两千多年。然而随着国内外市场需求的激增,生姜重茬种植屡见不鲜。由于生姜无性繁殖的特性,重茬种植方式极易产生病虫害,给生姜产量及品质造成负面影响^[4]。其中,由青枯劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)引发的青枯病被认为是生姜生产中最严重的一种土传病害。该病害破坏性极大,发病植株发育迟缓,整叶失绿、黄化,严重时可导致整株枯死,严重威胁着我国生姜产业的健康发展^[5-6]。目前,国内对于生姜青枯病的防治依然以化学防治为主,但化学农药的长期滥用极易诱导病原菌产生抗药性,同时也会产生食品污染、土壤环境污染等潜在问题^[7]。鉴于此,环境友好型的青枯病生物防控凭借绿色环保、成本低廉等优势逐渐受到广大学者的关注^[8]。

为实现生姜青枯病的有效生物防控,研究者以生姜青枯病菌为靶标,采用多种方式分离、鉴定了大量具备抗病活性的拮抗菌株,诸如贝莱斯芽孢杆菌^[2]、枝孢瓶霉^[7]、木霉^[9]、枯草芽孢杆菌^[10]等生防菌株均被报道具备广泛的抑菌活性。在诸多生防菌株中,芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)以其环境友好、安全无毒等优点成为应用最广泛的生防菌种资源之一。研究表明,贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*)不仅可对生姜青枯病、哈密瓜果斑病等细菌性病害产生显著抑制效果^[2,11],对大枣炭疽病、苹果树腐烂病、菜豆腐烂病等真菌性病害也有较好的防控效应^[12-14]。芽孢杆菌可定殖于作物根系,通过阻遏细菌分裂生长、真菌孢子萌发等方式直接对病菌产生抑制效果,亦可通过诱导作物抗性基因上调表达及分泌胞外抗菌代谢产物等间接发挥生防功能^[12-13]。然而,在诸多抑菌机制中,胞外抗菌代谢物则被认为是芽孢杆菌最为重要的生防机制之一^[15]。

芽孢杆菌的抗菌产物主要包括抗菌脂肽、聚酮及蛋白类化合物^[16-17]。这些代谢物可破坏病菌细胞壁及细胞膜结构的完整性,引起细胞内容物泄露;

或者显著抑制病菌内荚膜多糖等代谢产物的合成以阻碍病菌的生长发育^[18-19]。有研究认为,芽孢杆菌的生防效率与其代谢产物的合成能力显著相关,而培养基营养组成、pH、温度等发酵条件均对生防菌的抑菌活性产生显著影响^[20]。不同菌株的最佳发酵条件存在差异,且培养基营养成分及发酵条件的差异亦会对生防菌的活菌数及活性产物种类造成显著影响。例如,枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) YC 25 的最佳发酵温度为 30 °C,芽孢产量为 1.42×10^{10} CFU · mL⁻¹,其对烟草黑胫病菌的防效达 77.88%^[21]。而枯草芽孢杆菌 YN 145 的最佳发酵温度为 28 °C,其发酵条件优化后单位体积中的菌体对稻瘟病菌的抑菌率较优化前提升 12.5%^[22]。目前关于利用生姜根际芽孢杆菌进行青枯病防控的研究较少,且针对芽孢杆菌的活性产物分析、培养基及发酵条件优化的系统研究亦尚显匮乏。

基于此,本研究从生姜青枯病生物防控角度出发,自生姜根际筛选获得 1 株具备生防潜能的芽孢杆菌 NX 7,通过形态学结合分子生物学对该菌株进行鉴定,分析菌株活性产物类型,采用单因素结合正交试验设计,探索菌株的最佳发酵条件,以期合理、高效利用拮抗菌,为后期研制高效防控生姜青枯病的生防制剂提供菌株资源和理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及培养基

本研究中芽孢杆菌菌株 NX 7 由潍坊理工学院植物保护实验室在 2024 年 7 月分离于潍坊安丘市生姜栽培区。生姜青枯病病菌青枯劳尔氏菌 SJ 17 由中国科学院南京土壤研究所李建刚研究员惠赠。本试验于 2025 年 4 月在潍坊理工学院植物保护实验室内进行。

本研究中培养基信息如下。青枯病病菌培养基(TTC):蛋白胨 5.0 g,酵母浸粉 0.2 g,牛肉浸粉 5.0 g,葡萄糖 5.0 g,七水硫酸镁 1.5 g,去离子水 1.0 L, pH 7.0, 2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑(TTC) 100 μL,固体培养基内加入琼脂粉 20 g。营养肉汤培养基(NB):蛋白胨 10.0 g,牛肉浸粉 5.0 g,氯化钠 5.0 g,去离子水 1.0 L, pH 7.0,固体培养基(NA)内加入琼脂粉 20.0 g。发酵培养基:葡萄糖 5.0 g,酵

母浸粉 5.0 g, 氯化钠 5.0 g, 去离子水 1.0 L, pH 7.0。所有培养基均 121 °C 灭菌 30 min 241.33 kPa, 备用。

1.2 菌株 NX 7 的拮抗活性分析及鉴定

1.2.1 菌株 NX 7 拮抗活性分析 将青枯病病菌 SJ 17 接种于 NB 培养基中, 30 °C、180 r·min⁻¹ 培养 24 h, 调节 OD₆₀₀ 至 0.8 备用; 菌株 NX 7 接种于 NB 培养基中, 28 °C、180 r·min⁻¹ 培养 48 h 后备用。菌株 NX 7 拮抗活性分析采用琼脂平板扩散法于 TTC 平板上进行^[2]。将营养肉汤固体培养基(NA)加热至溶解状态, 待温度降低至 45 °C 左右, 以 1:200 的比例接入 SJ 17 菌液制备成混菌平板。待培养基凝固后, 于培养皿中央采用无菌打孔器(直径 6 mm)打孔, 孔内注入 100 μL 菌株 NX7 菌液, 每个处理重复 5 次, 每次处理设置 3 个平板。在 28 °C 条件下培养 72 h 后, 以十字交叉法测量抑菌圈直径。

1.2.2 菌株 NX 7 的形态学观察及生理生化特性测定 取活化后的菌株 NX 7, 采用平板划线法^[11]接种于 NA 培养基上, 30 °C 恒温培养箱中培养 48 h, 观察菌株单菌落的形态、颜色、大小、凹凸度、透明度等, 并进行革兰氏染色观察, 分析菌体的形态特征。参照《常见细菌系统鉴定手册》^[23]进行菌株生理生化特性测定, 主要开展菌株对不同碳源(乳糖、葡萄糖、甘露醇、蔗糖)利用情况、明胶液化、V-P 反应(Voges-Proskauer reaction)等试验。

1.2.3 分子生物学鉴定 采用宝日医生物技术有限公司的细菌基因组 DNA 提取试剂盒(TaKaRa, 9763)提取菌株 NX 7 基因组 DNA, 采用细菌 16 S rDNA 通用引物 27 F/1492 R 进行 PCR 扩增, 产物直接进行双向测序^[24]。产物测序分析由生工生物工程(上海)股份有限公司完成, 测序结果通过 Gen-Bank 数据库进行 BLAST 同源比对分析。采用 MEGA 6.0 软件包以最大似然法^[25]进行系统发育树构建。

1.2.4 菌株 NX 7 无菌上清液拮抗活性分析 将活化的菌株 NX 7 接种到 NB 培养基中, 28 °C、180 r·min⁻¹ 恒温振荡培养 48 h, 将培养液于 12 000 r·min⁻¹ 进行离心 20 min 后收集上清液。上清液经 0.22 μm 滤膜过滤, 滤液即为拮抗菌株 NX 7 的无菌上清液。采用琼脂平板扩散法^[2]测定菌株 NX 7 无菌上清液的拮抗活性。

1.3 菌株 NX 7 活性产物分析

将菌株 NX 7 接种于 NB 培养基内, 28 °C、180 r·min⁻¹ 培养 7 d 后得到菌株发酵液。发酵液于

8000 r·min⁻¹ 条件下离心 10 min 取上清液, 加入 3 倍体积的无水甲醇充分提取产物。提取完成后, 14 000 r·min⁻¹ 条件下离心 10 min, 收集上清液经 0.22 μm 滤膜过滤后采用琼脂平板扩散法^[2]验证拮抗活性。活性验证完成后, 采用液相色谱-质谱联用(LC-MS)技术分析菌株 NX 7 发酵液中的活性产物。液相色谱条件为: 色谱柱为沃特世 ACQUITY UPLC HSS T 3 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 柱温 40 °C, 上样量 4 μL, 流速 0.4 mL·min⁻¹; 流动相 A 为 0.1% 甲酸水, 流动相 B 为 0.1% 甲酸乙腈; 洗脱程序为: 0 min, 5% B; 2.5 min, 10% B; 14 min, 40% B; 24 min, 95% B; 30 min, 5% B。质谱条件为: ESI (+/-)、雾化气压 413.7 kPa、辅助气压 413.7 kPa、气帘气压 241.33 kPa、温度 550 °C、喷雾电压 5500 V (正离子模式)或-4500 V (负离子模式)、轰击能量 30 eV、采集范围 50~1200 m/z。

根据菌株 NX 7 发酵液中分析所得的脂肽类及聚酮类产物, 采用琼脂扩散法^[2]测定对应商用产品的抑菌活性。针对 NX 7 发酵液内的抑菌活性物质采用罗飞等^[26]的方法分析其半数致死有效浓度(EC₅₀)。以含有活性产物的 NA 平板为分析载体, 活性产物浓度(ρ , 后同)梯度均设置为 50、100、200、400、600、800 及 1000 μg·mL⁻¹, 以不添加药剂的 NA 平板为对照。采用平板菌落计数法^[3]测定活性产物的抑菌率。

$$I/\% = \frac{N_c - N_r}{N_c} \times 100。$$

其中, I 为抑菌率, N_c 为对照组菌落数量, N_r 为处理组菌落数量。

1.4 菌株 NX 7 发酵培养基组分优化

1.4.1 碳源组分优化 分别采用可溶性淀粉、葡萄糖、麦芽糖、蔗糖及牛肉浸粉等质量替代发酵培养基内原有碳源, 其他养分保持不变。将菌株 NX 7 于 28 °C、180 r·min⁻¹ 条件下培养 48 h, 采用琼脂平板扩散法^[2]测定各处理中菌株 NX 7 发酵液的拮抗活性, 以确定最适碳源。

1.4.2 氮源组分优化 分别采用酵母浸粉、蛋白胨、甘氨酸、硝酸钾及硫酸铵等质量替代发酵培养基内原有氮源, 其他养分保持不变。试验方法同 1.4.1, 以确定最适氮源。

1.4.3 无机盐组分优化 分别采用氯化钠、硫酸镁、硫酸锌、磷酸二氢钠及氯化钾等质量替代发酵培养基内原有无机盐, 其他养分保持不变。试验方法同 1.4.1, 以确定最适无机盐。

1.4.4 培养基各组分最佳浓度的单因素试验 基于前期培养基组分优化结果,开展各组分最佳浓度的单因素试验。在保持培养基内其余2种养分不变的情况下,分别加入不同浓度梯度的(3.0、5.0、7.0、9.0、11.0 g·L⁻¹)的最佳碳源、氮源及无机盐以替代发酵培养基内原有的对应组分。采用琼脂平板扩散法^[2]测定各处理菌株NX 7发酵液的拮抗活性,初步确认各组分的最适浓度。

1.4.5 培养基组分正交试验 基于培养基各组分单因素试验研究结果,以最佳碳源、氮源及无机盐为研究对象,设计3因素3水平正交试验,分析各组分的最适配比。

1.5 菌株NX 7发酵条件优化

1.5.1 优化培养基初始pH、培养温度及转速的单因素研究 基于优化发酵培养基的配方,针对培养基初始pH、培养温度及培养转速进行单因素试验,以初步确定最适发酵条件。其中初始pH设置为5.0、5.5、6.0、6.5、7.0及7.5;温度梯度设置为20、25、30、35及40℃;培养转速设置为120、150、180、210及240 r·min⁻¹。

1.5.2 优化培养基初始pH、培养温度及转速的正交试验 根据初始pH、培养温度及转速的单因素试验结果,设计3因素3水平正交试验,以确定上述因素的最适组合。

1.6 优化培养基及发酵条件对菌株NX 7拮抗活性的影响

将活化后的NX 7分别接入普通发酵培养基及优化后的发酵培养基,分别在pH 7.0、180 r·min⁻¹、28℃条件及优化后培养条件下培养48 h。每个处理重复6次。培养结束后,采用琼脂平板扩散法^[2]测定菌株NX 7发酵液对青枯病病菌SJ 17的拮抗活性。

1.7 统计分析

采用Excel 2021进行数据统计,采用SPSS 22.0进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)及独立T检验(T-test),采用OriginPro 2024软件包制图。

2 结果与分析

2.1 菌株NX 7拮抗活性及鉴定

2.1.1 菌株NX 7的拮抗活性 菌株NX 7经过48 h摇瓶培养后,通过琼脂平板扩散法研究表明菌株NX 7对生姜青枯病病菌SJ 17产生了明显的抑制效应,抑菌圈直径达1.15 cm(图1)。同时,菌株NX 7无菌上清液亦可对生姜青枯病病菌SJ 17产

生较好抑制效果,抑菌圈直径达0.92 cm。

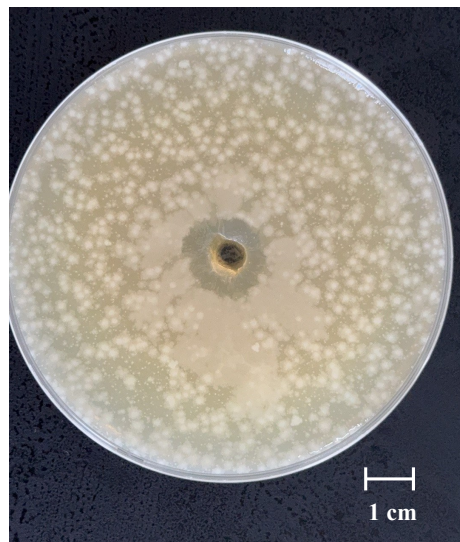


图1 菌株NX 7对生姜青枯病病菌SJ 17的抑菌效应

Fig. 1 Inhibition effect of strain NX 7 against *R. solanacearum*

2.1.2 菌株NX 7的形态特征及生理生化特性 菌株NX 7于NA平板内培养48 h后,单菌落形态如图2所示。菌株NX 7菌落呈乳白色,半透明,形状不规则,黏性大,易挑起。表面粗糙且有明显皱褶,革兰氏染色为阳性。

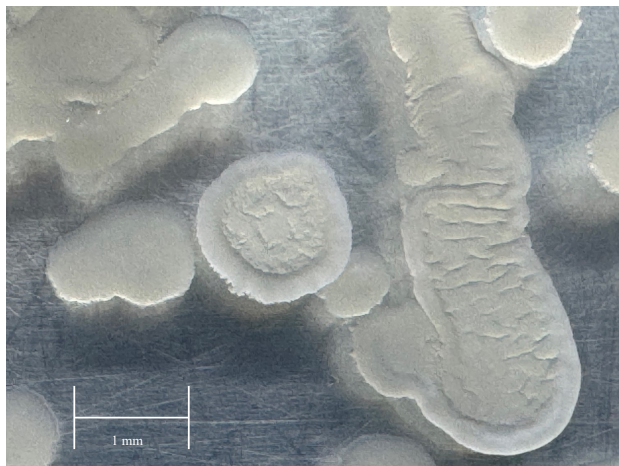


图2 菌株NX 7的菌落形态

Fig. 2 Morphological characteristics of strain NX 7

由表1可知,菌株NX 7为兼性需氧菌,过氧化氢试验、V-P试验及产吲哚试验均为阳性,可水解明胶、淀粉,能够利用乳糖、葡萄糖、甘露醇及蔗糖等碳源。综上所述,菌株NX 7的生理生化特性与贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)类似。

2.1.3 菌株NX 7的分子生物学鉴定 菌株NX 7的16 S rDNA系统发育树如图3所示,菌株NX 7与芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)聚为一类,且与贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*)亲缘关系较近。结合菌落形

表 1 菌株 NX 7 的生理生化特性
Table 1 Physiological characteristics of strain NX 7

试验项目 Item	结果 Result	试验项目 Item	结果 Result
兼性需氧 Facultative aerobic	+	甲基红试验 Methyl red test	+
过氧化氢试验 Catalase test	+	10 %NaCl	+
氧化酶试验 Oxidase test	-	4 °C	-
产吲哚试验 Indole production test	+	乳糖 Lactose	+
V-P 试验 V-P test	+	葡萄糖 Glucose	+
淀粉水解 Hydrolysis of starch	+	甘露醇 Mannitol	+
明胶水解 Hydrolysis of gelatin	+	蔗糖 Sucrose	+

注：-为阴性，+为阳性。
Note：- means negative reaction；+ means positive reaction.

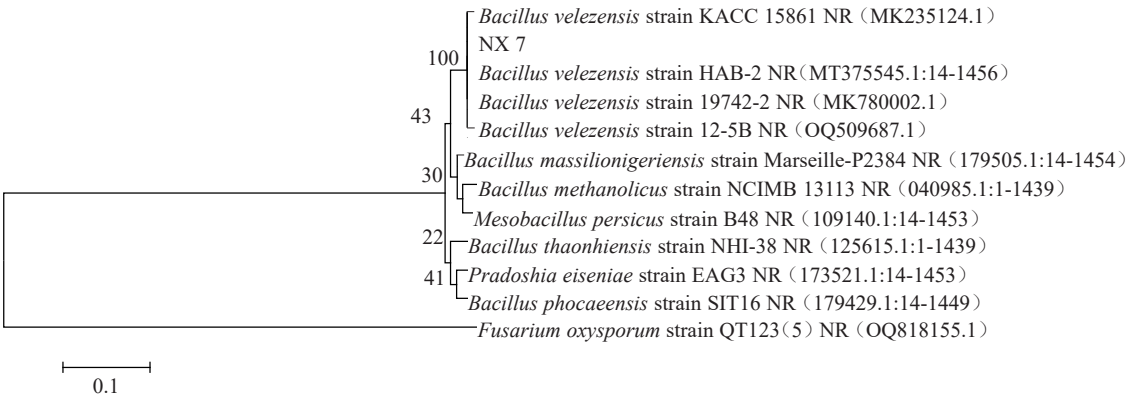


图 3 采用最大似然法构建的菌株 NX 7 的系统发育树
Fig. 3 Phylogenetic tree of strain NX 7 constructed based on maximum likelihood method

态特征、生理生化特性及系统发育分析，菌株 NX 7 被鉴定为贝莱斯芽孢杆菌。

2.2 菌株 NX 7 活性产物分析

菌株 NX 7 代谢产物 LC-MS 分析结果如图 4 所示。菌株 NX 7 代谢粗提物在正离子模式下检测到 376 个离子峰，负离子模式下检测到 208 个离子峰，其中在 m/z 值(质荷比)为 456.177 6、458.218 4、784.342 3 处的离子峰分别与数据库中的 Minocycline、Lankacidin C 及 Rifaximin 相对应。LC-MS 一级质谱棒状图结果证实(图 4)，菌株 NX 7 发酵液内含有 Minocycline、Lankacidin C 及 Rifaximin 等聚酮类代谢产物。

EC₅₀用以评估菌株 NX 7 不同活性产物的抑菌能力。由图 5 可知，各活性产物抑制率均与产物浓度呈线性相关。其中 Rifaximin 抑菌效果最佳，EC₅₀为 287.66 μg·mL⁻¹；Minocycline 次之，EC₅₀为 437.68 μg·mL⁻¹；Lankacidin C 抑菌效果较弱，EC₅₀为 451.03 μg·mL⁻¹。

2.3 菌株 NX 7 发酵培养基组分优化

2.3.1 碳源、氮源及无机盐对菌株 NX 7 拮抗活性的

影响 由图 6 可知，不同养分对菌株 NX 7 拮抗活性影响显著。以蛋白胨为氮源时菌株 NX 7 拮抗活性最佳，抑菌圈直径为 2.39 cm，显著大于其他氮源处理；以牛肉浸粉作为碳源时菌株 NX 7 抑菌活性最佳，抑菌圈直径达 2.86 cm，显著大于其他碳源处理；采用硫酸锌作为无机盐时菌株 NX 7 拮抗活性最佳，抑菌圈直径达 3.63 cm，显著大于其他无机盐处理。综上，本研究中选择蛋白胨为最佳氮源，牛肉浸粉为最佳碳源，硫酸锌为最佳无机盐以进行后续试验。

2.3.2 发酵培养基组分最佳浓度的单因素试验结果

由图 7 可知，培养基内任意养分的浓度变化均会影响菌株 NX 7 的拮抗活性。当蛋白胨、牛肉浸粉及硫酸锌浓度均为 3 g·L⁻¹时，各处理均未检测到明显抑菌活性。除硫酸锌处理外，蛋白胨、牛肉浸粉处理菌株 NX 7 拮抗活性均随培养基内养分浓度增加整体呈先升高后下降趋势。蛋白胨浓度为 7、9 及 11 g·L⁻¹时，抑菌圈直径分别为 2.11、3.22 及 3.12 cm；牛肉浸粉浓度为 7、9 及 11 g·L⁻¹时，抑菌圈直径分别为 1.80、2.65 及 2.51 cm；硫酸锌浓度

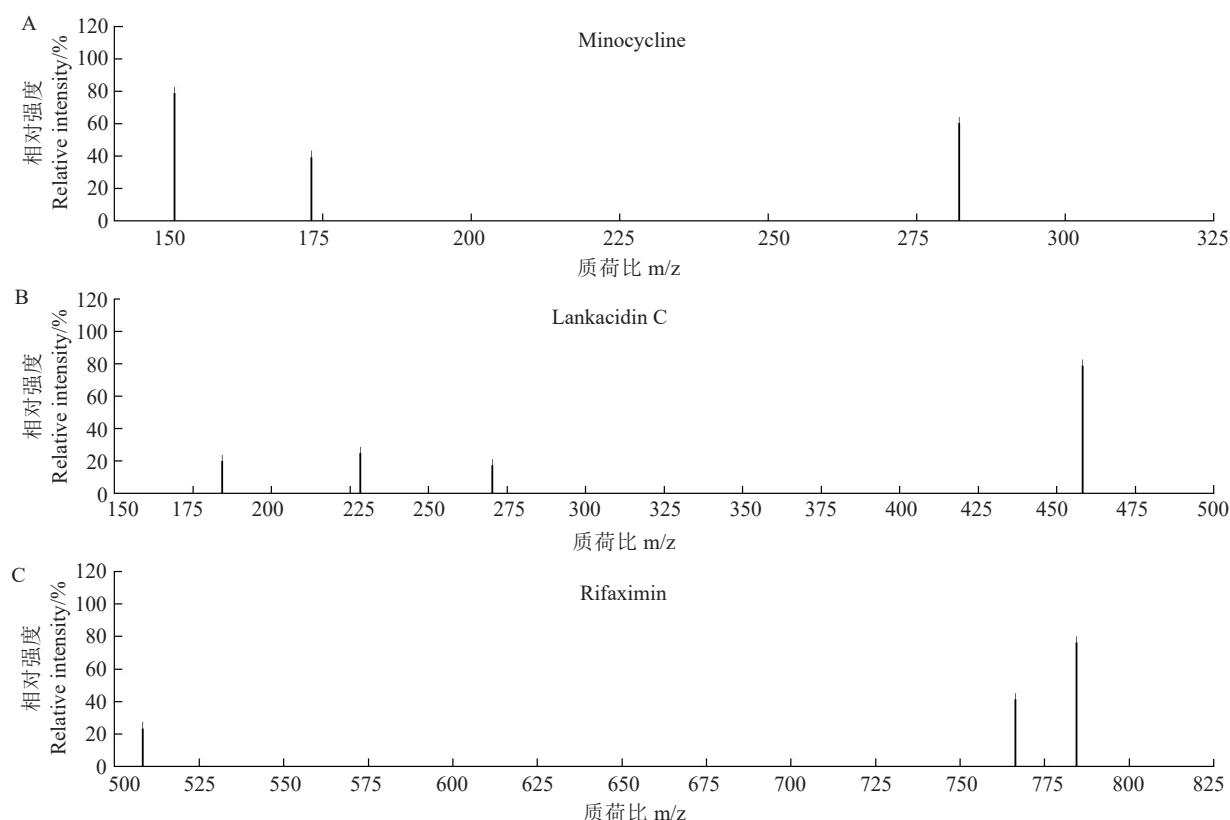


图4 菌株NX 7代谢产物的LC-MS分析

Fig. 4 LC-MS analysis of metabolites released by strain NX 7

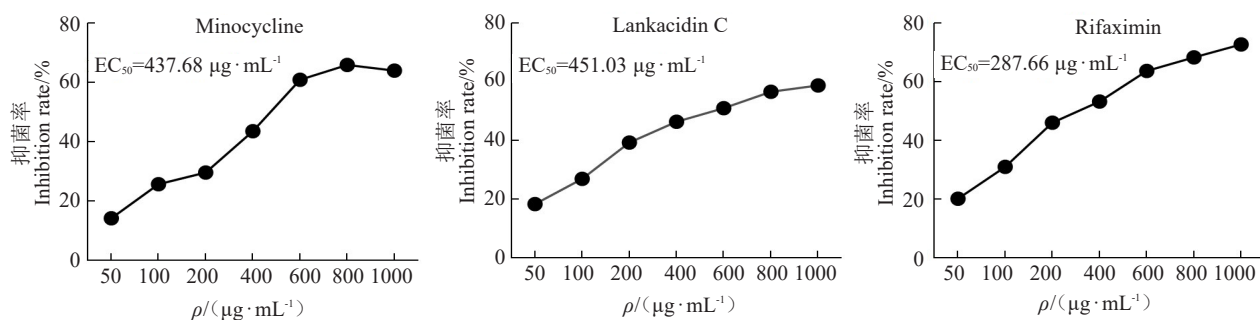


图5 菌株NX 7代谢产物的抑菌活性分析

Fig. 5 Analysis of antibacterial activity of metabolites from strain NX 7

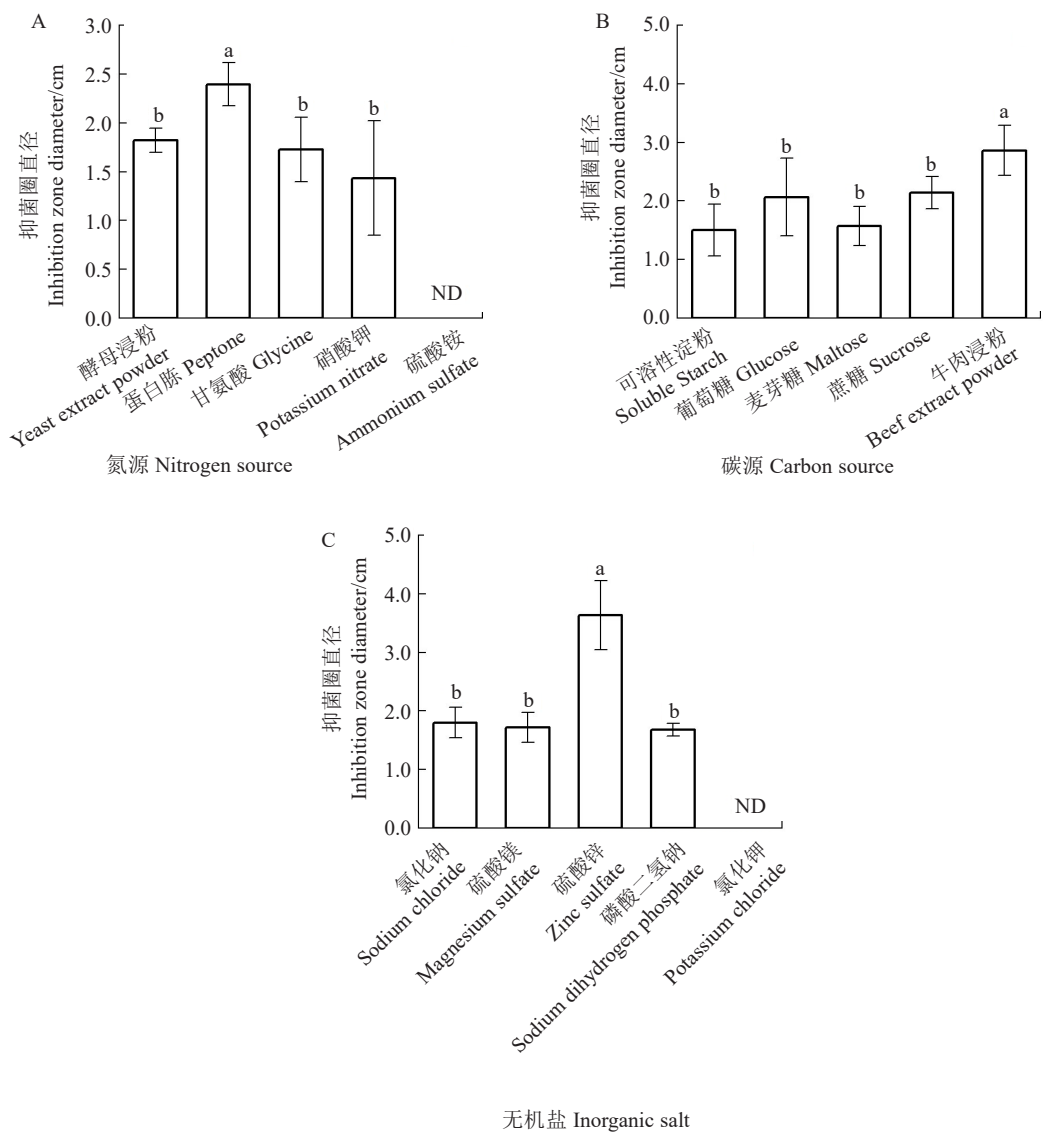
为7、9及 $11\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,抑菌圈直径分别为2.26、2.60及2.83 cm。因此,蛋白胨、牛肉浸粉及硫酸锌均选择7、9、 $11\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 3个水平进行后续正交试验。

2.3.3 菌株NX 7最适培养基组分最适配比分析 菌株NX 7发酵培养基氮源、碳源及无机盐正交试验结果见表2。3种因素 R 值由高到低依次为 $R_C>R_B>R_A$,表明硫酸锌浓度变化对菌株NX 7的拮抗活性影响最大,其次为牛肉浸粉,最后为蛋白胨,三者最优组合为 $A_3B_1C_3$ 。即菌株NX 7发酵培养基最佳养分组合为蛋白胨 $11\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、牛肉浸粉 $7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

及硫酸锌 $11\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.4 菌株NX 7发酵条件优化分析

2.4.1 不同培养基初始pH、培养温度及转速对菌株NX 7拮抗活性的影响 不同发酵条件对菌株NX 7拮抗活性的影响如图8所示。随着培养基初始pH、温度及转速升高,菌株NX 7的拮抗活性整体均呈先升高后下降趋势,pH处于5.5~6.5时,菌株NX 7拮抗活性较高,其中pH为6.0时,拮抗活性最强,抑菌圈直径为2.54 cm。当培养温度为20~30℃时,菌株NX 7拮抗活性较高,其中温度为



注:不同小写字母表示处理间在 0.05 水平差异显著。ND. 未检测到抑菌圈。下同。
Note: Different small letters indicate significant difference among different treatments at 0.05 level. ND. Non-detected. The same below.

图 6 不同营养成分对菌株 NX 7 拮抗活性的影响
Fig. 6 Effects of different nutrients on the antagonistic activity of strain NX 7

25℃时,菌株 NX 7 拮抗活性最高,抑菌圈直径为 1.87 cm,显著大于其他温度处理。转速为 150~210 r·min⁻¹时,菌株 NX 7 有较高的抑菌活性,转速为 180 r·min⁻¹时菌株 NX 7 拮抗活性最高,抑菌圈直径为 2.43 cm。因此,初始 pH 选择 5.0、5.5 及 6.0;培养温度选择 20、25 及 30℃;培养转速选择 150、180 及 210 r·min⁻¹这 3 个水平进行后续正交试验研究。

2.4.2 菌株 NX 7 最适发酵条件分析 菌株 NX 7 最适发酵条件正交试验结果如表 3 所示。3 种因素 R 值由高到低依次为 R_B>R_C>R_A,表明温度变化对菌株 NX 7 的拮抗活性影响最大,其次为转速,最后为培养基初始 pH,三者最优组合为 A₃B₂C₂。即菌株

NX 7 最适发酵条件为培养基初始 pH 为 6、培养温度为 25℃、转速为 180 r·min⁻¹。

2.5 菌株 NX 7 发酵培养基及发酵条件优化前后的平板抑菌效果分析

菌株 NX 7 发酵优化前后的平板抑菌效果如图 9 所示。常规发酵培养基及发酵条件培养的菌株 NX 7 抑菌圈直径为 1.84 cm,优化后的菌株 NX 7 抑菌圈直径达 3.56 cm,较常规处理提高 93.48%。

3 讨论与结论

芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)作为作物根系土壤内的主要微生物之一,是农业病害防控中重要的生防资

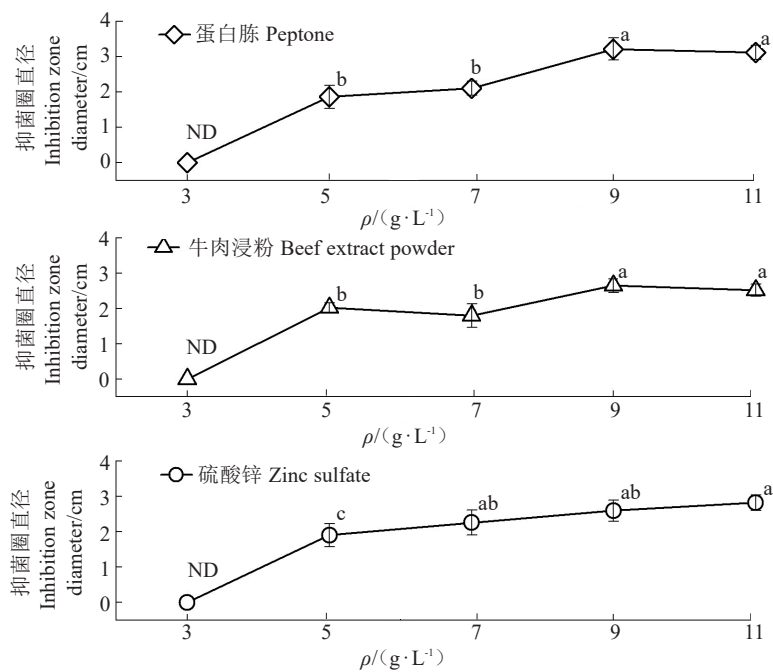


图 7 不同浓度的培养基组分对菌株 NX 7 拮抗活性的影响

Fig. 7 Effects of different concentrations of nutrients in culture mediums on the antagonistic activity of strain NX 7

表 2 氮源、碳源及无机盐正交试验结果

Table 2 Results of the orthogonal test on nitrogen source, carbon source and inorganic salt

处理 Treatment	因素 Factor A: ρ (蛋白胨) Peptone concentration/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	B: ρ (牛肉浸粉) Beef extract powder concentration/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	C: ρ (硫酸锌) Zinc sulfate concentration/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter/cm
1	7	7	7	1.52
2	7	9	11	2.06
3	7	11	9	2.13
4	9	7	9	2.10
5	9	9	11	1.86
6	9	11	7	1.94
7	11	7	9	2.47
8	11	9	7	1.61
9	11	11	11	1.92
K1	1.90	2.03	1.69	
K2	1.97	1.84	1.84	
K3	2.00	1.99	1.94	
R	0.10	0.19	0.26	

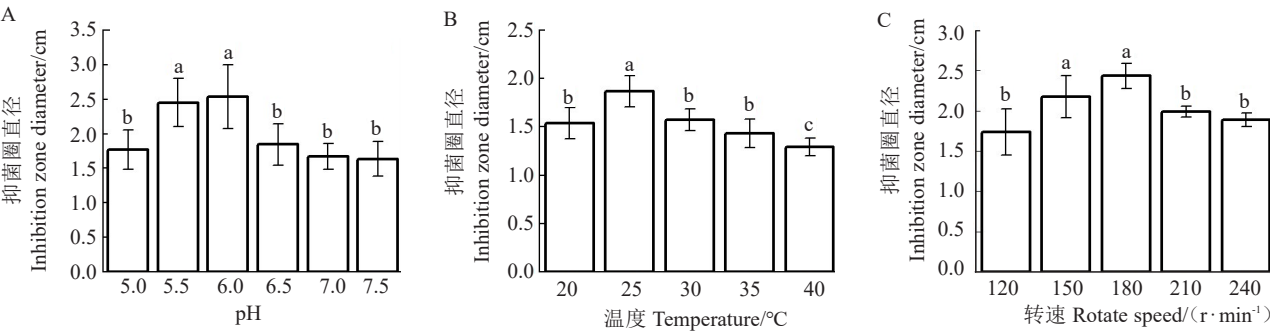
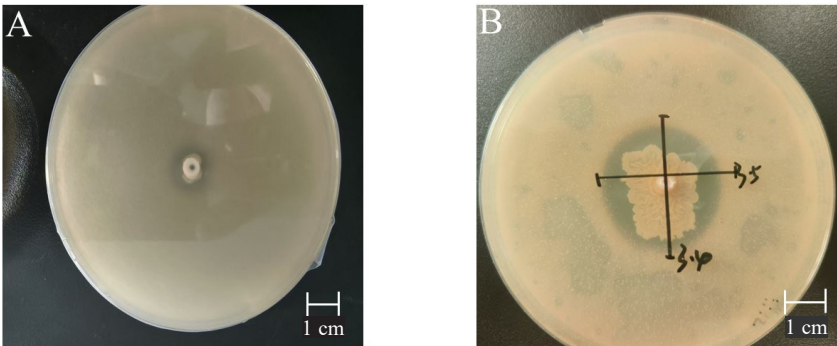


图 8 不同发酵条件对菌株 NX 7 拮抗活性的影响

Fig. 8 Effects of different nutrients on the antagonistic activity of strain NX 7

表 3 pH、温度及转速正交试验结果
Table 3 Results of the orthogonal test on pH, rotation speed and temperature

处理 Treatment	因素 Factor			抑菌圈直径 Inhibition zone diameter/cm	处理 Treatment	因素 Factor			抑菌圈直径 Inhibition zone diameter/cm
	A:pH	B:温度 Temperature/ °C	C:转速 Rotation speed/ (r·min ⁻¹)			A:pH	B:温度 Temperature/ °C	C:转速 Rotation speed/ (r·min ⁻¹)	
1	5.0	20	150	1.89	8	6.0	25	150	2.11
2	5.0	25	210	2.23	9	6.0	30	210	2.04
3	5.0	30	180	1.87	K1	2.00	1.97	1.96	
4	5.5	20	180	1.98	K2	2.05	2.21	2.21	
5	5.5	25	210	2.29	K3	2.07	1.93	2.19	
6	5.5	30	150	1.88	R	0.07	0.28	0.25	
7	6.0	20	180	2.05					



注：A. 优化前菌株 NX 7 拮抗活性；B. 优化后菌株 NX 7 拮抗活性。
Note: A. Inhibition effect of strain NX7 before optimization; B. Inhibition effect of strain NX 7 after optimization.

图 9 优化前后菌株 NX 7 发酵液的拮抗活性对比
Fig. 9 Comparison of antagonistic activity of strain NX 7 under the conditions of before and after optimization

源^[27]。芽孢杆菌抑菌范围广泛，且兼具作物促生、土壤改良等有益效果，现已广泛应用于多种作物病害的生物防控，诸如枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)及贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*)均被报道对作物青枯病有较好的防控效果^[2, 28-29]。其中，贝莱斯芽孢杆菌物种作为一类较新的芽孢杆菌，其基因组内约有 10% 基因参与了抑菌物质的合成，优于枯草芽孢杆菌等物种^[30]。已有研究表明，贝莱斯芽孢杆菌 PS 1-3 及 PS 3-2 可显著抑制黄瓜枯萎病菌菌丝的生长发育，引发菌丝畸形溶解^[31]。贝莱斯芽孢杆菌 f-20 对哈密瓜细菌性果斑病防治效果达 50.85%，究其原因则是该菌株存在可产生丰原素、表面活性素等次级代谢产物的基因簇^[11]。本研究从生姜根际土壤分离获得 1 株芽孢杆菌菌株 NX 7，对生姜青枯病菌 SJ 17 有较好的抑制效果，抑菌圈直径为 1.15 cm。通过形态鉴定、生理生化特性分析并结合分子生物学等解析技术方法鉴定菌株 NX 7 为贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*)。

贝莱斯芽孢杆菌的生防机制主要集中于以下 3 个方面：产生脂肽类或聚酮类等抑菌代谢产物；改善作物根际微环境，促进宿主生长发育；诱导宿主产生系统抗性^[32-35]。其中，抑菌物质的合成则被认为是贝莱斯芽孢杆菌最为重要的抑菌途径。自首个贝莱斯芽孢杆菌 FBZ 42 基因组注释完成后，共计挖掘 9 个抑菌物质合成相关的基因，其中 5 个编码合成非核糖体脂肽类化合物(non-ribosomal lipopeptides)，另一大类则是编码聚酮合成酶用以指导聚酮类物质的合成^[35]。有研究表明，贝莱斯芽孢杆菌 BEB 17 可以产生 bacillibactin、difficidin 及 bacillaene 等 3 种聚酮类代谢物，它们可改变细胞表面疏水性，破坏细胞膜完整结构^[36-37]。在本研究中，菌株 NX 7 发酵液内并未发现类似聚酮产物，但其发酵液内检测到 minocycline、lankacidin C 及 rifaximin 等聚酮类代谢产物。这种代谢产物种类的差异与菌株及发酵培养基的差异密切相关^[11]。已有研究表明，minocycline 及 lankacidin C 可作为广谱性抗生素，对革兰氏阴性菌抑制效果较强，可降低病菌对

宿主细胞膜结构的损伤作用^[38-39]。rifaximin 作为半合成的利福霉素的衍生物,可有效抑制细菌中依赖 DNA β -2 亚单位的 RNA 多聚酶,从而抑制 DNA 的合成,进而产生抑菌作用^[40]。因此,推测菌株 NX 7 合成的聚酮类代谢产物联合作用抑制了病菌的生长。抑菌活性测定结果显示,rifaximin 的 EC_{50} 为 $287.66 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,其抑菌活性与中生菌素相似^[41],表明该产物具备进一步开发利用的潜能。

贝莱斯芽孢杆菌抑菌产物的产量与其发酵培养基及发酵条件密切相关,相同发酵条件下不同菌株抑菌物质种类及产量亦可能存在显著差异^[42]。例如,培养温度可显著影响菌株细胞膜表面的流动性、酶促反应速率以及培养基组分的溶解度;培养基 pH 可影响菌株细胞膜带电荷状态、通透性及培养基内养分的解离;摇床转速则对培养基内溶氧含量产生影响,这些因素均可进一步影响菌株养分的吸收利用^[43]。陈丹丹等^[29]研究表明,解淀粉芽孢杆菌 M 26 最佳发酵条件为温度 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、pH 7.0、转速 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。在本次研究中,菌株 NX 7 最佳发酵温度为 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、pH 为 6.0 及转速为 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,与前人研究结果相似。贝莱斯芽孢杆菌 SN-20 在 $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、接种量 3% 的条件下发酵 32 h 后,其脂肽类代谢产物产量高达 129.3 mg ,较未优化前提高 21.85% ^[42]。在本次研究中,菌株 NX 7 通过优化培养基及发酵条件后,抑菌圈直径达到 3.56 cm ,较未优化前增大 93.48% ,表明优化后的培养基及发酵条件可明显提高菌株 NX 7 的抑菌能力。未来应考虑在实际生产中验证优化后的发酵条件,从而为菌株 NX 7 的实际应用提供理论数据。

本研究从生姜根际土壤分离获得 1 株对生姜青枯病病菌有较好抑菌效果的贝莱斯芽孢杆菌 NX 7,通过 LC-MS 分析确定 NX 7 发酵液内含有 minocycline、lankacidin C 及 rifaximin 3 种聚酮类代谢产物,其中 rifaximin 具备最佳抑菌活性。为进一步提高菌株 NX 7 的抑菌效果,本研究通过单因素试验结合正交试验确定菌株 NX 7 最适发酵培养基为蛋白胨 $11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、牛肉浸粉 $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 及硫酸锌 $11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,最适发酵条件为培养基初始 pH 为 6、培养温度为 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、转速为 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。优化后菌株 NX 7 抑菌圈直径增大 93.48% 。本研究为菌株后续的研发利用提供了理论数据。

参考文献

[1] 高伟,席克勇,尹军良,等.外源 SiNPs 对盐胁迫下生姜幼苗生长和生理特性的影响[J].西北农林科技大学学报(自然科学

版),2023,51(9):109-118.

- [2] 崔艳艳,张佳佳,俞伶俐,等.生姜青枯病菌拮抗芽孢杆菌的筛选、鉴定及发酵条件优化[J].南方农业学报,2024,55(2):468-478.
- [3] 周丽荣,熊诗洁,张玲玲,等.姜精油和柠檬醛对生姜枯萎病菌的抑菌作用及盆栽防效[J].中国生态农业学报(中英文),2024,32(1):130-140.
- [4] 周弦,刘续立,熊诗洁,等.主要气候因子对长江上游生姜种植区姜瘟病发生动态的影响[J].河南农业科学,2022,51(5):71-83.
- [5] Dang K K, Hou J F, Liu H, et al. Root exudates of ginger induced by *Ralstonia solanacearum* infection could inhibit bacterial wilt[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2023(71):1957-1969.
- [6] 杨维超,李小莉,黄皓,等.广西生姜青枯病菌的遗传多样性与致病力分化[J].中国蔬菜,2025(2):140-147.
- [7] 曾凤花,谢玲,黄皓,等.枝孢瓶霉属合成菌群对生姜青枯病的生物防治[J].南方农业学报,2025,56(2):643-654.
- [8] 白鸽,李言雨,刘彩霞,等.链霉菌对土传枯萎病和青枯病的防控效果评估及影响因子探究[J].微生物学报,2025,65(7):2874-2888.
- [9] Wang Q, Song J, Zhang J, et al. Effects of microbial agent application on the bacterial community in ginger rhizosphere soil under different planting years[J]. Frontiers in Microbiology, 2023(14):1203796.
- [10] 姜艳鹏,胡振华,张翠静,等.枯草芽孢杆菌 J 22 拮抗姜瘟阴沟肠杆菌的效果与机理研究[J].江苏农业科学,2023,51(2):125-134.
- [11] 李成江,王勇,刘玉敏,等.贝莱斯芽孢杆菌的分离鉴定及对哈密瓜细菌性果斑病的防治效果[J].应用与环境生物学报,2025,31(9):1456-1466.
- [12] Won S J, Kim C W, Moon J H, et al. Biological control of anthracnose fruit rot disease (*Colletotrichum* spp.) and fruit yield improvement of jujube (*Zizyphus jujuba* Miller var. *inermis* Rehder) using *Bacillus velezensis* CE 100[J]. Biological Control, 2023(187):105405.
- [13] 李紫英,沙帅帅,唐御忻,等.贝莱斯芽孢杆菌 SY 01 诱导苹果树抗性基因表达及其脂肽类抑菌物质分析[J].山东农业大学学报(自然科学版),2024,55(5):711-719.
- [14] Wekesa T B, Wekesa E N, Kavesu N, et al. Taxonomical, functional, and cytopathological characterization of *Bacillus* spp. from Lake Magadi, Kenya, against *Rhizoctonia solani* Kuhn in *Phaseolus vulgaris* L.[J]. Journal of Basic Microbiology, 2023, 63(11):1293-1304.
- [15] 刘博,蒲乐莹,陶科,等.紫花苜蓿根腐病生防菌的筛选、鉴定及发酵条件优化[J].南方农业学报,2022,53(8):2142-2152.
- [16] 周池,周诗晶,陶禹,等.贝莱斯芽孢杆菌 XY 40-1:全基因组特征分析及对辣椒疫病的生物防治效果评价[J].微生物学报,2024,64(12):4882-4901.
- [17] 范盈盈,戴莹莹,张媛媛,等.解淀粉芽孢杆菌脂肽提取物对番茄链格孢菌的抑菌机制研究[J].广东农业科学,2025,52(3):1-13.

- [18] Zhang S W, Zheng G Q, Xu B L, et al. Identification of the fungal pathogens of postharvest disease on peach fruits and the control mechanisms of *Bacillus subtilis* JK-14[J]. Toxins, 2019, 11(6):322.
- [19] Rong S H, Xu H, Li L H, et al. Antifungal activity of endophytic *Bacillus safensis* B 21 and its potential application as a biopesticide to control rice blast[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2020(162):69-77.
- [20] 安久春, 袁青松, 高彦平, 等. 太子参叶斑病生防菌发酵条件的优化[J]. 中药材, 2024, 47(4):826-832.
- [21] 危潇, 黎妍妍, 袁勤峰, 等. 枯草芽孢杆菌斯氏亚种 YC 25 发酵条件优化及防效测定[J]. 微生物学报, 2025, 65(7):3208-3220.
- [22] 毛思业, 周瑚, 郑昕威, 等. 枯草芽孢杆菌 YN 145 的发酵条件优化及活性物质分析[J]. 农药, 2025, 64(2):106-114.
- [23] 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.
- [24] 张燕, 徐延平, 邱佳佳, 等. 多黏类芽孢杆菌 NX 6 对感染炭疽病西瓜幼苗抗氧化酶的影响[J]. 江苏农业科学, 2024, 52(18):147-154.
- [25] 朱飞舟, 陈利玉, 陈汉春. 16S rRNA 基因序列分析法鉴定病原细菌[J]. 中南大学学报(医学版), 2013, 38(10):1035-1041.
- [26] 罗飞, 穆青, 余知和, 等. 五种药剂对烟草青枯病菌的抑制活性及碳代谢的影响[J]. 农药学报, 2023, 25(4):870-877.
- [27] 李森, 李磊, 刘世程, 等. 解淀粉芽孢杆菌 ZF 522 的分离鉴定及对生姜根腐病防治效果[J]. 中国生物防治学报, 2025, 41(3):585-592.
- [28] Yendyo S, Ramesh G C, Binayak R P. Evaluation of *Trichoderma* spp., *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* for biological control of *Ralstonia* wilt of tomato[J]. F1000 Research, 2018(6):2028.
- [29] 陈丹丹, 李圆圆, 齐素敏, 等. 一株青枯菌拮抗细菌 M 26 的筛选、鉴定及其发酵条件优化[J]. 山东农业科学, 2020, 52(9):114-118.
- [30] Khalid F, Khalid A, Fu Y C, et al. Potential of *Bacillus velezensis* as a probiotic in animal feed: A review[J]. Journal of Microbiology, 2021, 59(7):627-633.
- [31] 刘东岳, 李敏, 孙文献, 等. 拮抗尖孢镰刀菌的 PGPR 筛选与抑菌机制的初步研究[J]. 植物病理学报, 2017, 47(5):704-715.
- [32] Chowdhury S P, Hartmann A, Gao X W, et al. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42-a review[J]. Frontier of Microbiology, 2015(6):780.
- [33] Bai X F, Li Q, Zhang D, et al. *Bacillus velezensis* strain HN-Q-8 induced resistance to *Alternaria solani* and stimulated growth of potato plant [J]. Biology, 2023, 12(6):856.
- [34] He P J, Wang W J, Zhang J J, et al. Genome sequence resource of *Bacillus velezensis* strain HC-5, revealing its potential as a native biological control agent against ginger bacterial wilt[J]. PhytoFrontiers™, 2024(4):817-820.
- [35] Chen X H, Koumoutsis A, Scholz R, et al. More than anticipated - production of antibiotics and other secondary metabolites by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42[J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2009, 16(1/2):14-24.
- [36] 桑建伟, 杨扬, 陈奕鹏, 等. 内生解淀粉芽孢杆菌 BEB 17 脂肽类和聚酮类化合物的抑菌活性分析[J]. 植物病理学报, 2018, 48(3):402-412.
- [37] Bais H P, Fall R, Vivanco J M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of Arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production[J]. Plant Physiology, 2004, 134(1):307-319.
- [38] 李素平, 袁玲, 迟少艺, 等. 一种自溶性产酶溶杆菌新菌株 LE 16 对温室番茄灰霉病的抑制作用[J]. 微生物学报, 2022, 62(10):3871-3885.
- [39] Joanna W, Agnieszka K, Maria S B. Plant growth-promoting rhizobacteria: *Peribacillus frigiditolerans* 2 RO 30 and *Pseudomonas sivasensis* 2 RO45 for their effect on canola growth under controlled as well as natural conditions[J]. Frontiers in Plant Science, 2023(14):1233237.
- [40] Gillis J C, Brogden R N. Rifaximin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic potential in conditions mediated by gastrointestinal bacteria[J]. Drugs, 1995, 49(3):467-484.
- [41] 王玲, 刘二明, 周鑫钰, 等. 一株辣椒青枯病菌拮抗内生细菌的筛选鉴定与发酵条件优化[J]. 南方农业学报, 2014, 45(10):1781-1787.
- [42] 朱海云, 马瑜, 柯杨, 等. 抗猕猴桃细菌性溃疡病蜡样芽孢杆菌 MA 23 培养基及发酵条件优化[J]. 中国农学通报, 2021, 37(7):112-118.
- [43] 纪帅奇, 乌日娜, 张淘威, 等. 高产抗菌脂肽芽孢杆菌的分离鉴定筛选及发酵工艺优化[J]. 食品工业科技, 2024, 45(4):101-108.