

研究报告

## 高产铁载体棉田土壤细菌 SS05 的筛选与鉴定

林天兴<sup>1,2</sup> 唐梅<sup>1</sup> 黄明远<sup>1</sup> 管芩澜<sup>1</sup> 龚明福<sup>1,2\*</sup>

(1. 峨嵋山特色生物资源重点实验室 乐山师范学院 化学与生命科学学院 四川 乐山 614004)

(2. 乐山师范学院 现代农业研究中心 四川 乐山 614004)

**摘 要:** 【目的】研究从棉田土壤中筛选得到的高产铁载体细菌产铁载体能力、分类地位和抑菌活性。【方法】通过改良蔗糖-天冬氨酸培养基选择性筛选产铁载体细菌, 通过分光光度计法测定铁载体活性, 通过混菌法测定产铁载体细菌上清液对棉花枯萎病致病菌尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)的抑菌效果, 采用形态学、生理生化鉴定及 16S rDNA 序列系统发育分析对高产铁载体菌株进行鉴定。【结果】从棉田土壤中筛选到 162 株产铁载体细菌, 30 株产铁载体能力较强的细菌中 21 株具有较高产铁载体能力, 菌株 SS05 的铁载体活性单位达到 98.3%; 在低铁条件下, SS05 上清液对 *F. oxysporum* 具有显著的抑制作用; SS05 与莫哈韦芽孢杆菌(*Bacillus mojavenensis*)最为接近。【结论】SS05 是高产铁载体菌株, 与莫哈韦芽孢杆菌(*Bacillus mojavenensis*)最为接近, 在低铁培养条件下其上清液对 *F. oxysporum* 具有显著的抑制作用。

**关键词:** 铁载体, 棉田, 筛选, CAS 检测方法, 鉴定

## Screening and identification of a high yield siderophore-producing bacteria SS05 isolated from cotton soil

LIN Tian-Xing<sup>1,2</sup> TANG Mei<sup>1</sup> HUANG Ming-Yuan<sup>1</sup>  
GUAN Qin-Lan<sup>1</sup> GONG Ming-Fu<sup>1,2\*</sup>

(1. Key Laboratory of Special Biological Resources in Mountain Emei, School of Chemistry and Life Sciences, Leshan Normal University, Leshan, Sichuan 614004, China)

(2. Modern Agricultural Development Research Center, Leshan Normal University, Leshan, Sichuan 614004, China)

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30960010); 乐山师范学院引进人才科研启动基金项目(No. Z1160)

\*通讯作者: Tel: 86-833-2277035; 信箱: gongmingfu98@163.com

收稿日期: 2011-11-24; 接受日期: 2012-03-07

**Abstract: [Objective]** The objective of this study was to examine the production of siderophore, taxonomic position and antifungal activity of high yield siderophore-producing bacteria isolated from Xinjiang cotton field soil. **[Methods]** high yield siderophore-producing bacteria were isolated by modified sugar-aspartic acid (MSA) medium and siderophore activity was measured by spectrophotometer method. The inhibitory effect against fusarium wilt pathogens (*Fusarium oxysporum*) was measured by mixed culture method. The strain SS05 was identified according to morphological features, physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA sequences of the strain. **[Results]** There were 163 siderophore-producing bacteria strains isolated from cotton soil and 21 of 30 tested strains has high siderophore-producing capacity. The total siderophore relative content of strain SS05 was 98.3%. The supernatant of SS05 cultured with low concentrations of  $\text{Fe}^{3+}$  has significant inhibitory effect against *F. oxysporum*. Strain SS05 was identified as *Bacillus* sp. and has the closest genetic relationship with *Bacillus mojavensis*. **[Conclusion]** Strain SS05 was a high yield siderophore-producing bacterium, had the closest genetic relationship with *Bacillus mojavensis*. The supernatant of SS05 cultured with low concentrations of  $\text{Fe}^{3+}$  has significant inhibitory effect against *F. oxysporum*.

**Keywords:** Siderophores, Cotton soil, Screening, Chrome azurol sulfonate methods, Identification

铁载体(Siderophore)是生长在低铁环境中的微生物合成的一种具有高  $\text{Fe}^{3+}$  专一性的低分子量(一般大小为 500–1 000 D)铁螯合剂<sup>[1]</sup>, 微生物铁载体可以被生长在铁胁迫条件下的植物作为铁源直接利用, 还能够通过抑制病原微生物的生长而促进植物根系的抗病能力, 因此在促进植物生长<sup>[2]</sup>和生物防治中有重要的意义<sup>[3–5]</sup>。Maria L. Tortora 等<sup>[6]</sup>利用巴西固氮螺菌(*Azospirillum brasilense*)产生的儿茶酚型铁载体(Catechol type siderophores)防治由辣椒炭疽杆菌(*Colletotrichum acutatum*)引起的草莓炭疽病取得了较好的效果。

微生物铁载体通常包括儿茶酚(Catchlate)<sup>[7]</sup>、羟肟酸(Hydroxamates)<sup>[8]</sup>、羧酸型(Carboxylate-type)<sup>[9]</sup>3 种类型, 并有各自特定的检测方法。根据铁载体的一些理化特性, 现已发展了多种铁载体的检测方法, 并可以根据颜色的深浅通过比色法来定量计算铁载体的浓度<sup>[14]</sup>, 因此该法是目前通用的一种检测铁载体的方法。陈绍兴等<sup>[15]</sup>用天冬氨酸替代天冬酰胺, 将 CAS 蓝色检测液与改良蔗糖-天冬氨酸培养基(Modified sugar-aspartic acid, MSA)相结合, 得到一种改进的 MSA-CAS 检测平板, 该检测平板的检测灵敏度比通用 CAS 检测平板高。

土壤细菌能通过产生铁载体抑制病原菌<sup>[16]</sup>, 因此从棉田土壤中筛选产铁载体细菌, 对棉花枯萎病的生物防治有重要的意义。本试验采用改良 MSA 培养基选择性筛选土壤中产生铁载体的细菌, 并测定了产铁载体的能力和高产铁载体菌株在低铁条件下其上清液对棉花枯萎病的拮抗效果, 为棉花枯萎病的生物防治提供理论依据。

土壤细菌能通过产生铁载体抑制病原菌<sup>[16]</sup>, 因此从棉田土壤中筛选产铁载体细菌, 对棉花枯萎病的生物防治有重要的意义。本试验采用改良 MSA 培养基选择性筛选土壤中产生铁载体的细菌, 并测定了产铁载体的能力和高产铁载体菌株在低铁条件下其上清液对棉花枯萎病的拮抗效果, 为棉花枯萎病的生物防治提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

土壤样品于 2011 年 6 月采自新疆生产建设兵团农 1 师 1 团 16 连 333 斗 1 垄 2 房棉田和 8 连 251 斗 2 垄 2 房棉田, 均为沙壤土。16 连 333 斗

1 垄 2 房棉田种植棉花为长绒棉, 8 连 251 斗 2 垄 2 房棉田种植棉花为陆地棉。每块棉田随机取 3 个小区, 每小区采用 5 点取样法, 在田间用取样器按对角线取 0–25 cm 耕层土, 混合均匀, 按四分法取 25–30 g 土壤样品装入已灭菌的自封袋中, 带回实验室置于 4 °C 冰箱中保存备用。2011 年 6 月采集土样时从 8 连 251 斗 2 垄 2 房棉田中采集棉花枯萎病症状明显的病株, 带回实验室分离纯化并回接验证的棉花枯萎病致病菌尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum* XJFO-5)。

### 1.2 产铁载体细菌的选择性分离

通用 CAS 蓝色检测液和 MSA 液体培养基根据文献[15]配制。固体检测平板则是在 MSA 液体培养基中加入 5% 的 CAS 蓝色检测液和 2% 的琼脂凝固而成。

将土壤样品用 10 倍递减法稀释, 接种到 LB 固体平板上分离细菌, 单菌落纯化接种到新的 LB 固体平板上, 28 °C 恒温培养 24 h, 用打孔器制成直径约 8 mm 的菌饼, 置于固体检测平板上, 28 °C 倒置培养 2 d, 观察菌落周围是否产生变色圈, 数码相机照相, 在凝胶成像系统长波紫外光的照射下由仪器记录下检测平板上的荧光图像, 曝光时间由仪器自动控制, 产生变色圈的为产铁载体细菌。以 *Escherichia coli* 替代细菌样品作为阴性对照。

### 1.3 铁载体定量测定

实验方法依据文献[15]并作改进, 将细菌培养液按 1% 的量接入到 30 mL MSA 液体培养基, 28 °C、200 r/min 培养 24 h, 10 000 r/min 离心 15 min, 上清液用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤除菌, 与等体积 CAS 蓝色检测液混合均匀制成样品, 室温放置充分反应后测定各样品的  $OD_{680}$  ( $A_s$ ), 以双蒸水作为对照调零, 用相同方法测定未接菌株的各液体培养基作为上清液的吸光值作为参比值( $A_r$ ), 铁载体的浓度用铁载体活性单位 (Siderophore

unit,  $SU$ )表示,  $SU=[(A_r-A_s)/A_r]\times 100\%$  [14], 每处理重复 3 次。依据文献[14]对细菌产铁载体能力进行划分,  $A_s/A_r$  从 1.0–0 之间以 0.2 为间隔, 每减小 0.2 增加一个“+”, 一般产铁载体能力较高(+++)的细菌其  $A_s/A_r$  低于 0.5。选择产铁载体能力最强的菌株, 测定其上清液对棉花枯萎病原真菌的抑制作用。

### 1.4 高产铁载体上清液对棉花枯萎病原真菌的抑制作用

配制 MSA 液体培养基, 在接菌之前加入  $FeCl_3$ , 使培养基中  $Fe^{3+}$  的终浓度分别为: 0、10、50 和 100 μmol/L。将高产铁载体细菌培养液按 1% 的量分别接入到这些 MSA 液体培养基中, 32 °C、200 r/min 振荡培养 2 d, 10 000 r/min 离心 15 min, 经 0.22 μm 的微孔滤膜过滤除菌, 得无菌含铁载体上清液。取少量该上清液, 以不接菌的 MSA 液体培养基为对照进行全波长(200–800 nm)扫描。

取上述无菌上清液以 5% 的量加入到溶化的固体 PDA 培养基中, 混匀制成平板, 用无菌去离子水替代无菌上清液作为阴性对照组(CK1), 以  $Fe^{3+}$  终浓度为 0 培养所得 SS05 上清液及 100 μmol/L 的  $FeCl_3$  替代无菌上清液作为阳性对照组(CK2)。取直径为 8 mm 的 *F. oxysporum* 菌饼倒贴(有菌丝的一面朝下)于上述 PDA 平板中央, 25 °C 湿度为 90% 的霉菌培养箱培养, 每个处理 3 个重复, 3 d 后测定病原真菌生长直径, 并对统计结果做方差分析。

### 1.5 高产铁载体菌株的分类鉴定

高产铁载体菌株形态观察及生理生化特性测定参照文献[17]的方法进行, 基因组 DNA 提取和 16S rDNA 序列测定参照文献[18]进行, 扩增产物由上海生工生物工程技术有限公司测序, 将所测序列在 <http://www.eztaxon.org> 中作 Identify 后找到同属相似性较高的相关模式菌株<sup>[19]</sup>序列,

结合在 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)做 BLAST 后的同属相似性较高的相关菌株序列, 并选择一个外群菌株的序列, 通过 ClustalX 进行多序列比对, 系统进化矩阵根据 Kimura 模型估算, 用 MEGA 4.0 (Molecular evolutionary genetics analysis)软件采用邻接法(Neighbor-Joining)聚类分析, 构建出系统发育树<sup>[20]</sup>, 以确定该菌株分类地位。

## 2 结果与分析

### 2.1 产铁载体棉田土壤细菌的筛选

使用改良 MSA 检测平板从棉田土壤样品中选择性分离获得 162 株产铁载体的菌株, 选择其中变色圈较大的 30 株菌株(分别编号为 SS01–SS30, 部分见图 1)用于测定总的铁载体含量实验, 30 个菌株在菌落形态上存在明显的差异。

### 2.2 产铁载体棉田土壤细菌总的铁载体量测定

测定 30 株供试菌株  $OD_{680}$  值的大小, 计算铁载体活性单位和  $A_s/A_r$  值, 并根据  $A_s/A_r$  值确定各个菌株分泌铁载体能力的等级。

如表 1 所示, 30 株供试菌中,  $A_s/A_r$  介于 0.6–1.0 的有 9 株, 占供试菌的 30%, 属于产铁载

体较低的菌株;  $A_s/A_r$  介于 0–0.6 的有 21 株, 占供试菌的 70%, 属于产铁载体较高的菌株。 $A_s/A_r$  低于 0.2 的有 11 株, 占 37%, 属于高产铁载体菌株, 其中菌株 SS05 ( $A_s/A_r=0.017$ )产铁载体能力最强。可见, 棉田土壤中产铁载体能力较强的细菌所占比例较大。

### 2.3 高产铁载体菌株 SS05 上清液对棉花枯萎病原真菌的抑制作用

选 SS05 ( $A_s/A_r=0.017$ )测试其上清液对棉花枯萎病原真菌的抑制作用。结果表明 SS05 菌株上清液对棉花枯萎病菌 *F. oxysporum* 菌丝生长的抑制作用受培养基中铁离子浓度影响较大, 培养基中铁离子浓度越低, SS05 上清液对 *F. oxysporum* 菌丝生长抑制能力越强, 方差分析结果表明与对照组差异显著(表 2、图 2)。从图 2 还可以看出, SS05 在低铁浓度( $Fe^{3+}$ 浓度低于  $100\ \mu\text{mol/L}$ )条件下培养, 其上清液对棉花枯萎病菌菌丝的形态和长势也有较显著的影响, 铁离子浓度越低, 棉花枯萎病菌菌丝生长越弱、越稀疏。而 SS05 在无铁条件下培养( $Fe^{3+}$ 浓度为 0)所得上清液平板中添加外源铁离子( $Fe^{3+}$ 浓度为  $100\ \mu\text{mol/L}$ )后, 棉花枯萎病菌菌丝生长与阴性对照无明显差异(图 2), 说明铁离子本身并不抑制病菌生长。

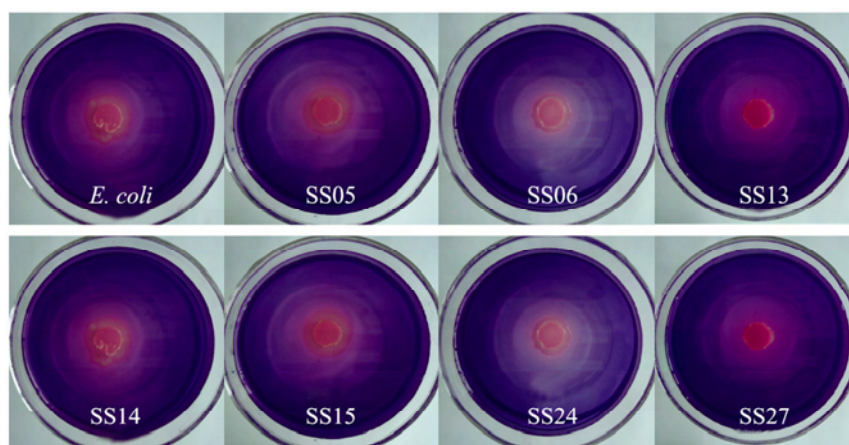


图 1 部分产铁载体菌株在 MSA 平板上的变色圈

Fig. 1 The color circle of different siderophore-Producing strains in MSA general plate

表 1 来自新疆棉田土壤细菌产铁载体能力表  
Table 1 Siderophore-producing activity of soil bacteria obtained from cotton soil in Xinjiang

菌株号 Strain number	$A_s/A_r$	产铁载体 能力等级 Siderophore activity level	菌株号 Strain number	$A_s/A_r$	产铁载体 能力等级 Siderophore activity level	菌株号 Strain number	$A_s/A_r$	产铁载体 能力等级 Siderophore activity level
SS01	0.163±0.014	+++++	SS11	0.160±0.005	+++++	SS21	0.976±0.028	+
SS02	0.293±0.023	++++	SS12	0.976±0.048	+	SS22	0.465±0.022	+++
SS03	0.276±0.015	++++	SS13	0.345±0.012	++++	SS23	0.229±0.025	++++
SS04	0.165±0.018	+++++	SS14	0.143±0.015	+++++	SS24	0.189±0.010	+++++
SS05	0.017±0.006	+++++	SS15	0.146±0.015	+++++	SS25	0.967±0.009	+
SS06	0.528±0.026	+++	SS16	0.151±0.027	+++++	SS26	0.952±0.028	+
SS07	0.128±0.009	+++++	SS17	0.196±0.021	+++++	SS27	0.254±0.026	++++
SS08	0.825±0.018	+	SS18	0.215±0.019	++++	SS28	0.984±0.042	+
SS09	0.516±0.032	+++	SS19	0.879±0.035	+	SS29	0.971±0.023	+
SS10	0.497±0.026	+++	SS20	0.176±0.006	+++++	SS30	0.972±0.018	+

表 2 不同铁离子浓度培养得到的 SS05 上清液对尖孢镰刀菌生长的影响  
Table 2 Growth inhibition of *F. oxysporum* strain caused by supernatant of SS05 cultured with different iron concentrations

铁离子浓度 Iron concentration ( $\mu\text{mol/L}$ )	0	10	50	100	CK1	CK2
菌饼直径 Diameter of coenobium (cm)	2.86±0.05aA	3.42±0.07bB	3.75±0.06cC	3.98±0.05cdCD	4.17±0.05deD	4.20±0.07eD

注: CK1 和 CK2 分别用无菌去离子水和 100  $\mu\text{mol/L}$  的  $\text{FeCl}_3$  代替无菌铁载体上清液进行处理. 小写字母完全不同表示在 5% 水平差异显著; 大写字母完全不同表示在 1% 水平差异极显著.

Note: Instead of sterile siderophore supernatant, CK1 and CK2 were respectively treated with deionized water and 100  $\mu\text{mol/L}$  of  $\text{FeCl}_3$ . Different lowercase letters indicates a significant level of 5%; Capital letters is completely different at 1% means more significant.

2.4 高产铁载体菌株 SS05 的系统发育地位

2.4.1 形态特征: 高产铁载体菌株 SS05 在 NA 培养基上 28 °C 培养 48 h 后, 菌落形态不规则, 边缘隆起, 中间凹陷, 不透明, 表面干燥, 乳白色。菌体杆状, 革兰氏阳性, 大小为 (1.3–3.5)  $\mu\text{m} \times (0.5–0.8) \mu\text{m}$ , 芽孢中生, 最适生长温度为 25 °C–30 °C。

2.4.2 生理生化特性: 高产铁载体菌株 SS05 菌

株的葡萄糖、D-甘露糖、阿拉伯糖、木糖和甘露醇产酸、硝酸盐还原、过氧化氢酶试验、淀粉水解、明胶液化、V.P 反应均为阳性; 酪蛋白水解、苯丙氨酸脱氨、厌氧生长、葡萄糖产气均为阴性。可利用葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、D-山梨醇等碳源, 不能利用乳糖、异戊醇; 能利用蛋白胨、牛肉浸膏、酵母浸膏等有机氮源, 不能利用  $\text{KNO}_3$ 、氯化铵等无机氮源。

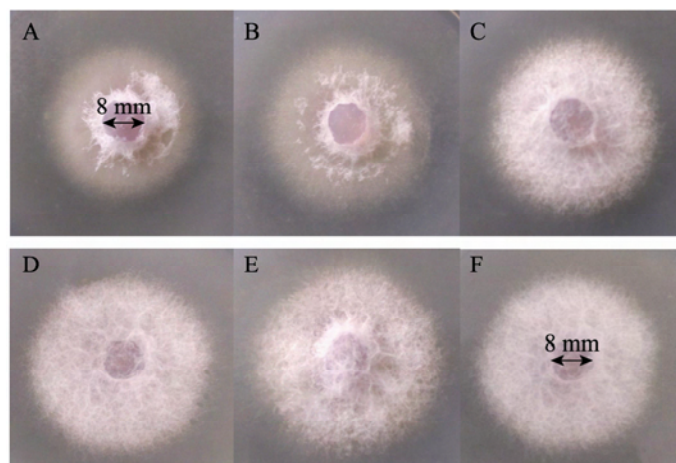


图 2 不同  $\text{Fe}^{3+}$  浓度培养得到的 SS05 上清液对棉花枯萎病原真菌的抑制效果  
Fig. 2 The inhibition effect of SS05 supernatant cultured with different concentrations of  $\text{Fe}^{3+}$  against *Fusarium oxysporum*

注: A–D:  $\text{Fe}^{3+}$  浓度分别为 0、10、50、100  $\mu\text{mol/L}$ ; E 为 CK1, 用无菌去离子水代替 SS05 上清液进行处理; F 为 CK2, 用  $\text{Fe}^{3+}$  浓度为 0 的 SS05 上清液和 100  $\mu\text{mol/L}$  的  $\text{FeCl}_3$  代替 SS05 上清液进行处理. 未开始培养时, 病原真菌菌饼的原始直径均为 8 mm.

Note: Cultured with different concentrations of  $\text{Fe}^{3+}$ ; A: 0  $\mu\text{mol/L}$ ; B: 10  $\mu\text{mol/L}$ ; C: 50  $\mu\text{mol/L}$ ; D: 100  $\mu\text{mol/L}$ . E: Negative control, respectively treated with deionized water; F: Positive control, respectively treated with SS05 supernatant cultured with 0  $\mu\text{mol/L}$  concentrations of  $\text{Fe}^{3+}$  and solution of 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{FeCl}_3$ . The original diameter of pathogenic fungus before being cultured is 8 mm.

**2.4.3 分子生物学特性:** SS05 在 GenBank 的序列登录号为 HQ123465, 与 Eztaxon 及 GenBank 中相似性较高的相关菌株的系统发育树见图 3. SS05 与莫哈韦芽孢杆菌(*Bacillus mojavensis*)同处于芽孢杆菌属(*Bacillus*)一个大的分支内, 与 *B. mojavensis* 遗传距离最为接近, 与 *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* 的模式菌株 DSM 7 相似性系数为 99.36%, 遗传距离小于 0.001。

综合该菌的形态特征、培养特征、生理生化特征和分子生物学特性, 鉴定该菌为 *S. mojavensis*。

### 3 结论与讨论

朱彭玲等<sup>[21]</sup>对分离自新疆地区棉花根际土壤的铁载体产生菌的遗传多样性进行分析, 在 BOXAIR-PCR 分析中, 68 株供试菌分为 11 个遗传群; 在 16S rRNA PCR-RFLP 分析中, 68 株供试菌分为 10 个遗传群; 代表菌株的 16S rDNA 全序列分析表明, 供试菌分属于假单胞菌属

(*Pseudomonas*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)、短状杆菌属(*Brachybacterium*)和泛菌属(*Pantoea*)。于素芳等<sup>[22]</sup>利用 CAS 检测平板从棉花根际细菌中筛选出一株铁载体产生能力较强的恶臭假单胞菌(*P. putida*)菌株。本研究通过改良 MSA 平板筛选到 21 株产铁载体能力较强的菌株, 其中 SS05 具有高产铁载体的能力( $A_s/A_r=0.017$ ), 16S rDNA 全序列分析表明该菌株为莫哈韦芽孢杆菌(*B. mojavensis*), 研究结果证实了棉田土壤中存在丰富的产铁载体细菌。

谢小军和王敬国<sup>[23]</sup>研究了不同培养基和  $\text{Al}^{3+}$  对铁载体产生的影响, 结果表明不同培养基对铁载体的产生影响较大,  $\text{Al}^{3+}$  能显著刺激铁载体的分泌, 并且能抵消一定浓度范围内的  $\text{Fe}^{3+}$  对铁载体分泌的抑制作用。Manninen 和 Mattila<sup>[24]</sup>通过在液体培养基中添加少量的  $\text{Fe}^{3+}$ , 导致假单胞菌



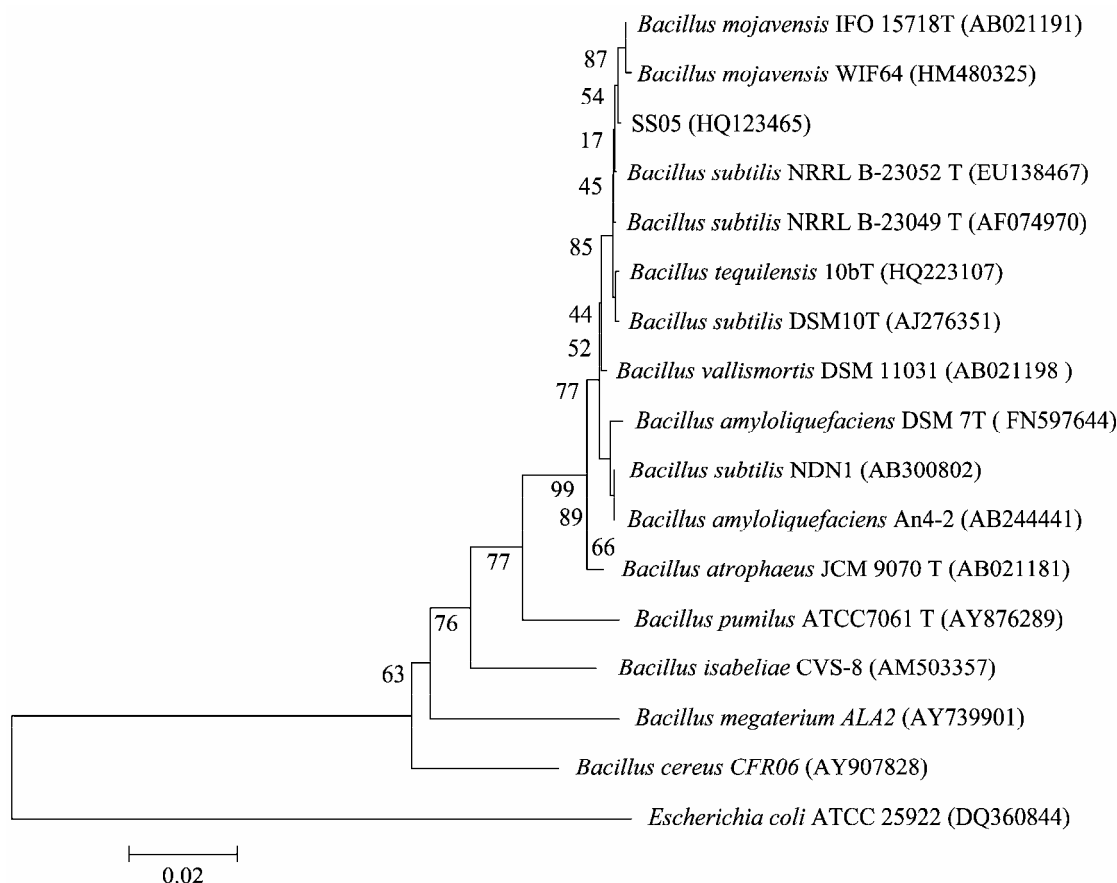


图3 利用16S rDNA序列构建的SS05系统发育进化树状图

Fig. 3 Phylogenetic dendrogram based on 16S rDNA sequences of endophytic bacteria SS05

注: 图中分支上数字表示树形可信度, 括号内为 GenBank 登录号, 黑体为试验菌株。

Note: The figures on the branches indicate the reliabilities. GenBank accession numbers are in the parenthesis. The boldfaces are tested strains. The scale bar represents 0.02 substitutions per nucleotide position.

的培养液在 400 nm 处的特异吸收值降低。陈绍兴和谢志雄<sup>[25]</sup>通过研究不同浓度的铁离子对荧光假单胞菌生长和产铁载体方面的影响表明, 适当浓度的铁离子浓度对荧光假单胞菌生长有促进作用, 而当铁离子浓度大于 1  $\mu\text{mol/L}$  时, 可以完全抑制荧光假单胞菌铁载体的产生。韩松等<sup>[26]</sup>研究表明当铁离子浓度大于 100  $\mu\text{mol/L}$  时, 产铁载体内生细菌 HS-4 的上清液仍然对棉花枯萎病菌菌丝生长有明显的抑制作用。这些研究结果均表明  $\text{Fe}^{3+}$  浓度对铁载体的产生有明显影响, 抑制铁载体产生的铁离子浓度因菌种不同而存在差

异。本研究结果表明培养基中铁离子浓度影响 SS05 对棉花枯萎病菌菌丝的生长, 培养基中铁离子浓度越低, 这种影响越强, 其原因很可能是铁离子的存在抑制了铁载体的合成或抑制了铁载体对铁的螯合作用。SS05 在  $\text{Fe}^{3+}$  浓度为 0 的条件下所得上清液平板中添加 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Fe}^{3+}$  的外源铁离子时棉花枯萎病菌菌丝生长与无 SS05 上清液处理无明显差异, 表明铁离子本身并不抑制病菌生长, 而是  $\text{Fe}^{3+}$  存在抑制了铁载体对铁的螯合作用。

仅就 16S rDNA 序列而言, 菌株 SS05 应与枯草芽孢杆菌亲缘关系更近, SS05 的 16S rDNA 序

列与枯草芽孢杆菌 3 个亚群模式菌株的相似性分别为: *B. subtilis* subsp. *spizizenii* NRRL B-23049 (AF074970) 99.855%、*B. subtilis* subsp. *inaquosorum* NRRL B-23052 (EU138467) 99.829% 和 *B. subtilis* subsp. *subtilis* DSM10 (AJ276351) 99.3%, 而与 *B. mojavensis* 的模式菌株 IFO1571 (AB3008028) 相似性为 99.36%。从形态特征、培养特征、生理生化特征来看, 菌株 SS05 更接近于 *B. mojavensis*<sup>[17,27]</sup>。细菌的鉴定不能仅根据 16S rDNA 序列相似性高低作为唯一标准, 还必须结合形态特征、培养特征及生理生化特征共同考虑, 因此我们认为把 SS05 鉴定为 *B. mojavensis* 更为恰当。

徐雪莲等<sup>[28]</sup>从海南红树林健康叶片中分离得到了一株拮抗菌株 BM-027, 对枯萎病尖镰孢菌具有明显的抑制作用, 经鉴定为 *B. mojavensis*; 李佳等<sup>[29]</sup>从棉田土壤筛选得到一株对棉花黄萎病具有拮抗作用的 *B. mojavensis* 菌株 7-47; 周鑫钰等<sup>[27]</sup>发现 *B. mojavensis* 菌株 F1 具有较强的拮抗烟草青枯雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)活性。我们发现 *B. mojavensis* SS05 菌株具有很强的产铁载体的能力, 在低铁条件下, SS05 对棉花枯萎病菌具有较强的拮抗活性, 可为棉花枯萎病的防治提供生防菌资源。

后续试验尚需对菌株 SS05 的最佳发酵条件进行优化, 研究其制剂化、田间使用方法等, 并对田间防治效果进行评价。

## 参 考 文 献

- [1] Hider R. Siderophore mediated absorption of iron[J]. Structure and Bonding, 1984, 58: 25–87.
- [2] Kloepper JW, Leong J, Teintze M, et al. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria[J]. Nature, 1980, 286(5776): 885–886.
- [3] Couillerot O, Prigent-Combaret C, Caballero-

- Mellado J, et al. *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens[J]. Letters in Applied Microbiology, 2009, 48(5): 505–512.
- [4] Chaiarn M, Chunhaleuchanon S, Lumyong S. Screening siderophore producing bacteria as potential biological control agent for fungal rice pathogens in Thailand[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009, 25(11): 1919–1928.
- [5] Sayyed RZ, Chincholkar SB. Siderophore-producing *Alcaligenes faecalis* exhibited more biocontrol potential Vis-à-Vis chemical fungicide[J]. Current Microbiology, 2009, 58(1): 47–51.
- [6] Tortora ML, Díaz-Ricci JC, Pedraza RO. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*[J]. Archives of Microbiology, 2011, 193(4): 275–286.
- [7] Arnow LE. Colorimetric determination of the components of 3, 4-dihydroxyphenylalanine tyrosine mixtures[J]. Journal of Biological Chemistry, 1937, 118: 531–537.
- [8] Csaky TZ. On the estimation of bound hydroxylamine in biological materials[J]. Acta Chemica Scandinavica, 1948, 2: 450–454.
- [9] Baakza A, Vala AK, Dava BP, et al. A comparative study of siderophore production by fungi from marine and terrestrial habitats[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2004, 311(1): 1–9.
- [10] Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores[J]. Analytical Biochemistry, 1987, 160(1): 47–56.
- [11] Pal RB, Karuna G. Siderophores and Pathogenicity of Microorganisms[J]. Journal of Bioscience and Technology, 2010, 1(3): 127–134.
- [12] Philson SB, Llinás M. Siderochromes from *Pseudomonas fluorescens* I. Isolation and characterization[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1982, 257(14): 8081–8085.
- [13] Bultreys A, Gheysen I, Wathelet B, et al.



- High-performance liquid chromatography analyses of pyoverdinin siderophores differentiate among phytopathogenic fluorescent *Pseudomonas* species[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(2): 1143–1153.
- [14] Persmark M, Expert D, Neilands JB. Isolation, characterization, and synthesis of chrysobactin, a compound with siderophore activity from *Erwinia chrysanthemi*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264(6): 3187–3193.
- [15] 陈绍兴, 赵翔, 沈萍, 等. 高灵敏假单胞菌铁载体的平板检测方法[J]. *微生物学通报*, 2006, 33(3): 122–127.
- [16] 赵翔, 陈绍兴, 谢志雄, 等. 高产铁载体荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* sp-f 的筛选鉴定及其铁载体特性研究[J]. *微生物学报*, 2006, 46(5): 691–695.
- [17] 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: 358–364.
- [18] Devereux R, Hines ME, Stahl DA. Scyeling: characterization of natural communities of sulfate-reducing bacteria by 16S rRNA sequence comparisons[J]. *Microbial Ecology*, 1996, 32(3): 283–292.
- [19] Chun J, Lee JH, Jung H, et al. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(10): 2259–2261.
- [20] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406–425.
- [21] 朱彭玲, 杜秉海, 丁延芹, 等. 新疆棉花根际土壤铁载体产生菌的遗传多样性及系统发育研究[J]. *中国农业科学*, 2009, 42(5): 1568–1574.
- [22] 于素芳, 丁延芹, 姚良同, 等. 一株棉花根际铁载体产生菌 E19 的分离鉴定[J]. *生物技术*, 2007(6): 19–21.
- [23] 谢小军, 王敬国. 一株细菌儿茶酚型铁载体分泌的影响因素研究[J]. *微生物学通报*, 2006, 33(1): 105–109.
- [24] Mannine M, Mattila-Sandholm T. Methods for the detection of *Pseudomonas* siderophores[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1994, 19(3): 223–224.
- [25] 陈绍兴, 谢志雄. 铁离子对荧光假单胞菌生长及产铁载体的影响[J]. *江苏农业科学*, 2008(4): 294–295.
- [26] 韩松, 张守村, 黄晓艳, 等. 一株产铁载体内生细菌对尖孢镰刀菌的拮抗作用[J]. *西北植物学报*, 2011, 31(5): 1039–1044.
- [27] 周鑫钰, 朱宏建, 周倩, 等. 1株烟草青枯病拮抗内生细菌的分离及鉴定[J]. *湖南农业大学学报: 自然科学版*, 2011, 37(6): 637–640, 664.
- [28] 徐雪莲, 代鹏. 2株抗枯萎病尖镰孢菌内生细菌菌株的分离及鉴定[J]. *果树学报*, 2007, 24(4): 483–486.
- [29] 李佳, 李术娜, 郭晓军, 等. 一株大丽轮枝菌拮抗细菌7-47菌株的分离与鉴定[J]. *棉花学报*, 2009, 21(2): 156–158.