

研究报告

三株酚酸降解菌的筛选与鉴定及其生物活性

廖永琴^{1,2}, 王楠^{1,2}, 申云鑫^{1,2}, 唐加菜², 施竹凤², 矣小鹏^{1,2}, 冯路遥^{2,3}, 李铭刚³, 何永宏^{*1}, 杨佩文^{*2}

1 云南农业大学植物保护学院, 云南 昆明 650000

2 云南省农业科学院农业环境资源研究所, 云南 昆明 650205

3 云南大学资源植物研究院, 云南 昆明 650091

廖永琴, 王楠, 申云鑫, 唐加菜, 施竹凤, 矣小鹏, 冯路遥, 李铭刚, 何永宏, 杨佩文. 三株酚酸降解菌的筛选与鉴定及其生物活性[J]. 微生物学通报, 2024, 51(6): 2193-2214.

LIAO Yongqin, WANG Nan, SHEN Yunxin, TANG Jiakai, SHI Zhufeng, YI Xiaopeng, FENG Luyao, LI Minggang, HE Yonghong, YANG Peiwen. Three phenolic acid-degrading bacterial strains: screening, identification, and biological activities[J]. Microbiology China, 2024, 51(6): 2193-2214.

摘要:【背景】常见作物连续种植后会导致根系分泌酚酸类自毒物质, 该类物质是引起土传病害和连作障碍频发的主要因素。【目的】探讨利用有益微生物降解作物根系分泌物苯甲酸, 缓解作物土传病害发生, 并储备有益菌种资源。【方法】通过以苯甲酸为唯一碳源的无机盐培养基筛选无量山菌株资源, 结合高效液相色谱仪测定酚酸降解菌株对苯甲酸的降解率; 利用平板对峙试验, 并基于缓解苯甲酸抑制番茄种子萌发试验及番茄幼苗促生长和对番茄枯萎病防效试验验证菌株的生物活性; 结合形态学、生理生化和 16S rRNA 基因序列对菌株进行分类学鉴定。【结果】从无量山筛选得到 4 株放线菌和 3 株细菌具有酚酸降解能力, 酚酸降解菌株在摇瓶培养 72 h 时对苯甲酸降解率分别为 100%、99.83%、99.89%、99.87%、64.91%、56.92%和 49.33%; 其中 2 株放线菌 YNK-FS0018、YNK-FS0019 和一株细菌 YNK-FB0022 能较好地利用苯甲酸。番茄种子萌发试验结果表明菌株 YNK-FS0018、YNK-FS0019 和 YNK-FB0022 均可以缓解苯甲酸对种子萌发的抑制, 促进种子萌发, 萌发率分别为 73%、73%和 97%, 并促进种子根生长, 平均根长为 13.31、13.04 和 14.56 cm; 平板对峙试验结果表明菌株 YNK-FS0018、YNK-FS0019 和 YNK-FB0022 均对病原菌有广谱抗性; 抗生素基因检测结果为菌株 YNK-FS0018、YNK-FS0019 具有 *PKSII*、*NRPS* 基因, 菌株 YNK-FB0022 具有 *fenD*、*bioA*、*yndJ*、*ysnE*、*ituC*、*sboA* 和 *srfAB* 基因; 盆栽试验结果显示菌株 YNK-FS0018 对番茄株高、地上鲜重、地上干重、根重、根长和茎粗有促生作用, 各项分别增加 53.40%、67.50%、57.50%、73.50%、77.28%和 9.40%; 菌株 YNK-FS0019 处理的株高、地上鲜重、地上干重、根重、

资助项目: 云南省科技计划重大科技专项(202202AE090010, 202202AE090015); 云南省专家基层科研工作站——杨佩文专家工作站(云人社通[2022]17 号)

This work was supported by the Major Science and Technology Project of Yunnan Province (202202AE090010, 202202AE090015) and the YANG Peiwen Expert Workstation of Yunnan Provincial Expert Grassroots Research Workstation ([2022]17).

*Corresponding authors. E-mail: HE Yonghong, heyonghong700327@163.com; YANG Peiwen, pwyang2000@126.com

Received: 2023-09-08; Accepted: 2023-10-19; Published online: 2023-12-01

根长和茎粗分别增加 23%、40.90%、14.00%、57.00%、26.30%和 16.80%; 菌株 YNK-FB0022 处理的株高、地上鲜重、地上干重、根重、根长和茎粗分别增加 24.50%、44.70%、26.40%、75.10%、98.00%和 9.00%; 3 株菌对番茄枯萎病的防效分别为 87.10%、74.18%和 80.65%; 结合形态学和分子生物学鉴定, 菌株 YNK-FS0018 为稻瘟毒素链霉菌(*Streptomyces blastmyceticus*, GenBank 登录号为 OR523286), YNK-FS0019 为白黄链霉菌(*Streptomyces alboflavus*, GenBank 登录号为 OR523289), YNK-FB0022 为耐盐芽孢杆菌(*Bacillus halotolerans*, GenBank 登录号为 OR523290); 此外, 菌株均有解有机磷、溶锌、分泌铁载体、水解淀粉酶和水解蛋白酶的能力。【结论】三株酚酸降解菌具有解有机磷、溶锌、分泌铁载体、水解淀粉酶和水解蛋白酶的能力, 对番茄幼苗株高、茎粗、根长、根重、地上部分鲜重和干重等农艺性状具有显著促进作用, 对番茄枯萎病防效较好, 可为土传病害的生物防治上提供微生物资源。

关键词: 苯甲酸; 酚酸降解菌; 促生长; 拮抗; 番茄枯萎病

Three phenolic acid-degrading bacterial strains: screening, identification, and biological activities

LIAO Yongqin^{1,2}, WANG Nan^{1,2}, SHEN Yunxin^{1,2}, TANG Jiakai², SHI Zhufeng²,
YI Xiaopeng^{1,2}, FENG Luyao^{2,3}, LI Minggang³, HE Yonghong^{*1}, YANG Peiwen^{*2}

1 College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650000, Yunnan, China

2 Agricultural Environment and Resources Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, Yunnan, China

3 Resource Plant Research Institute, Yunnan University, Kunming 650091, Yunnan, China

Abstract: [Background] Continuous planting of common crops can lead to the secretion of phenolic acid autotoxic substances in roots, which are the main factors causing soil-borne diseases and continuous cropping obstacles. **[Objective]** To mine the microorganisms capable of degrading benzoic acid secreted by crop roots, reduce the occurrence of soil-borne diseases, and reserve beneficial microbial resources. **[Methods]** We used benzoic acid as the sole carbon source in the inorganic salt medium to screen the strain resources of Wuliang Mountain and determined the degradation rate of benzoic acid by high-performance liquid chromatography. The plate confrontation test, tomato seed germination experiment, tomato seedling growth experiment, and pathogen (*Fusarium* wilt) inoculation experiment with tomato seedlings were carried out to examine the biological activities of the strains. The strains were identified based on morphological, physiological, and biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequences. **[Results]** Four strains of *Actinomycetes* and three strains of bacteria with phenolic acid-degrading ability were screened from Wuliang Mountain. After culture in shake flasks for 72 h, the strains showed the benzoic acid-degrading rate of 100%, 99.83%, 99.89%, 99.87%, 64.91%, 56.92%, and 49.33%, respectively. Two *Actinomycetes* strains (YNK-FS0018 and YNK-FS0019) and one bacterial strain (YNK-FB0022) could make good use of benzoic acid. The treatments with the three strains alleviated the inhibitory effect of benzoic acid on tomato

seed germination, with the seed germination rates of 73%, 73%, and 97%, the root length of 13.31, 13.04, and 14.56 cm, respectively. Furthermore, the three strains had broad-spectrum resistance to pathogens. YNK-FS0018 and YNK-FS0019 carried *PKSII* and *NRPS*, and YNK-FB0022 carried *fenD*, *bioA*, *yndJ*, *ysnE*, *ituC*, *sboA*, and *srfAB*. The results of pot experiments showed that strain YNK-FS0018 increased the plant height, above ground fresh weight, above ground dry weight, root weight, root length, and stem diameter by 53.40%, 67.50%, 57.50%, 73.50%, 77.28%, and 9.40%, respectively. The increases in the above indicators by YNK-FS0019 were 23.00%, 40.90%, 14.00%, 57.00%, 26.30%, and 16.80%, respectively. The increases by YNK-FB0022 were 24.50%, 44.70%, 26.40%, 75.10%, 98.00%, and 9.00%, respectively. The control effects of three strains on tomato *Fusarium* wilt were 87.10%, 74.18%, and 80.65%, respectively. YNK-FS0018, YNK-FS0019, and YNK-FB0022 were identified as *Streptomyces blastmyceticus* (GenBank accession number: OR523286), *Streptomyces alboflavus* (GenBank accession number: OR523289), and *Bacillus halotolerans* (GenBank accession number: OR523290), respectively. All the strains had the abilities of solubilizing organic phosphorus and zinc, secreting siderophores, and producing amylase and protease. **[Conclusion]** The three phenolic acid-degrading bacterial strains have the abilities of solubilizing organic phosphorus and zinc, secreting siderophores, and producing amylase and protease. They can significantly increase the plant height, stem thickness, root length, root weight, above ground fresh weight and above ground dry weight of tomato seedlings. Moreover, they demonstrate strong control effects on tomato *Fusarium* wilt, serving as the microbial resources for the biocontrol of soil-borne diseases.

Keywords: benzoic acid; phenol acid-degrading bacteria; growth promoting; antagonism; tomato *Fusarium* wilt

随着现代农业规模化、集约化、单一化的发展,连续种植模式十分普遍,造成作物生长受抑、土传病害高发、产量锐减的连作障碍频繁发生,而植物根系分泌自毒物质是导致这一现象的主要因素之一。常见经济作物和中草药植物如烟草、番茄、花生、黄连和三七等连续种植后会分泌对羟基苯甲酸、苯甲酸和阿魏酸等自毒物质,研究发现该类自毒物质的累积会导致我国南方红壤偏酸^[1],进而形成利于植物病原微生物生长的环境,因此病原微生物得到大量生长繁殖,土壤中真菌、细菌比例上升,土壤微生物区系失衡,从而加重作物土传病害的发生和传播。通过根际有益微生物的代谢过程,降低土壤中自毒物质的含量并抑制病原微

生物的生长繁殖,是缓解作物土传病害的发展历程的有效措施,对推进农业绿色可持续发展具有显著意义。

化感自毒作用与土传病害的发生具有密切的关系^[1]。近年来的研究表明,凡是容易引起自毒作用的作物一般也易引起土传病害产生而导致连作障碍^[2]。人参(*Panax ginseng*)连作自毒物质苯甲酸能够显著促进人参锈腐病菌的菌丝生长和孢子萌发,从而显著加重人参锈腐病的侵染^[3]。Hao 等^[4]研究发现西瓜根系分泌的酚酸类物质香草酸、水杨酸和对羟基苯甲酸可促进尖孢镰刀菌的孢子萌发和菌丝生长。通过对土壤中自毒物质的生物降解是农业生产上减少土传病害发生、缓解连作障碍的一个重要举

措。近年来,科研人员利用以酚酸类物质作为唯一碳源的培养基,已从自然环境中获得多种具有酚酸降解功能的细菌,在缓解土传病害发生中具有较好的实际应用价值。王洁等^[5]从香草兰根际土壤中筛到6株可降解酚酸类自毒物质的菌株,其中菌株FD-21在摇瓶培养72 h时对苯甲酸、对羟基苯甲酸和水杨酸的降解率分别为78.87%、89.50%和93.62%,并对香草兰土传枯萎病致病菌尖孢镰刀菌的抑制率为45.49%。采集连作12年地块花生根际土壤,获得7株可高效降解酚酸类自毒物质且降解底物多样的根际微生物菌株,其中B28及CA04对疫霉菌、尖孢镰刀菌和灰霉菌等常见的植物病原菌生长都有抑制能力^[6]。孙秀等^[7]在黄瓜根际土壤中也筛选到了能够降解肉桂酸的高效菌株,其中恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) 12 h内对肉桂酸的降解率达到99.35%,黑曲霉(*Aspergillus niger*) 在72 h内对肉桂酸的降解率达到99.62%。

根际有益微生物在生长代谢过程中可通过固氮、解磷、分泌铁载体和植物类激素,以及产抑菌类活性物质,为植物提供更多可利用的营养元素并有效抑制甚至杀死植物病原菌。根际有益微生物也可以利用土壤中的自毒物质,降低或消除由于自毒物质的累积对土壤或植株造成的不利影响。因此,在植物病害生物防治方面具有极大的应用价值和潜力。随着对根际有益微生物资源的挖掘,科研人员们不局限于农田,尝试从各种生境下挖掘菌株资源,国家森林公园自然保护区是特殊的地形-气候-水文特征的耦合,土壤有机质含量丰富,蕴藏丰富的具有重大经济价值的物种和种质资源,在此生境下有利于挖掘功能丰富的有益根际微生物。骆婷等^[8]于高山森林土壤中分离得到具有降解纤维素、蛋白质、淀粉、油脂和过氧化氢的多功能可培养细菌。

目前,大量对酚酸降解菌的研究仅为菌株

的分离鉴定,缺乏对酚酸降解菌多样化的生物活性研究以及应用潜力研究。基于此,本研究以常见根系分泌自毒物质苯甲酸为唯一氮源筛选无量山森林土壤中的菌株,使用高效液相色谱测定其酚酸降解率,结合酚酸降解菌缓解苯甲酸抑制种子萌发试验和酚酸降解菌促进番茄幼苗及防控番茄枯萎病试验,验证其生物活性,并测定菌株常见生物功能,以期为酚酸降解菌的开发利用提供技术支撑,并为土传病害的生物防治发展提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

土壤样品采集于云南省无量山原始森林,采用五点取样法取多年生植株附近的土壤,将五点样块的离表层土壤10–20 cm的土壤取出混合装入50 mL的离心管带回实验室进行分菌试验。

番茄枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) YNK-FP0014、玉米大斑病菌(*Exserohilum turcicum*) YNK-FP0020、香蕉枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4) (Foc4) YNK-FP0009、草果茎点霉属叶斑病菌(*Phoma matteucciicola*) YNK-FP0011,烟草炭疽病菌(*Colletotrichum micotianae*) YNK-FP0019和烟草黑胫病菌(*Phytophthora parasitica*) YNK-FP0023由云南省农业科学院农业环境资源研究所分离培养并鉴定保藏。

1.1.2 培养基

营养琼脂(NA)培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 牛肉粉 3.0, 氯化钠 5.0, 琼脂 15.0, pH 7.30±0.12, 121 °C灭菌 20 min 备用; LB 液体培养基(g/L): 酵母膏 5.0, 蛋白胨 10.0, 氯化钠 5.0, pH 7.0, 121 °C灭菌 20 min 备用; 高氏一号培养基(g/L):

可溶性淀粉 20.0, KNO_3 1.0, K_2HPO_4 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, NaCl 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, 琼脂 20.0, pH 7.20–7.40, 121 °C 灭菌 20 min 备用, 液体培养基在上述基础上减去琼脂; 苯甲酸无机盐液体培养基(g/L): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0, KH_2PO_4 0.5, NaCl 0.5, K_2HPO_4 1.5, 苯甲酸(本试验添加浓度为 0.1、0.5 和 1.0 g/L), pH 自然, 121 °C 灭菌 20 min 备用, 固体培养基在此基础上加 20.0 g/L 的琼脂粉。

解有机磷选择培养基和解无机磷选择培养基参考文献[9]配制, 金氏培养基(King broth, KB)参考文献[10]配制, 固氮选择培养基参考文献[11]配制, 溶锌选择培养基参考文献[12]配制, 酪蛋白选择培养基参考文献[13]配制, 淀粉酶选择培养基参考文献[14]配制, 铬天青 S (Chrome azurol S, CAS)培养基双层平板参考文献[15]配制。

1.1.3 主要试剂和仪器

苯甲酸、七水硫酸镁, 上海易恩化学技术有限公司; 七水硫酸亚铁, 广东光华科技股份有限公司; 硫酸铵, 上海源叶生物科技有限公司; 磷酸二氢钾, 西陇化工有限公司; 氯化钠, 范德生物科技有限公司; 琼脂糖凝胶纯化试剂, 宝生物工程(大连)有限公司。

高效液相色谱仪, 安捷伦科技有限公司; 超高速离心机, 上海龙跃仪器设备有限公司; 恒温摇床、生化培养箱, 上海智城分析仪器制造有限公司; 扫描电镜, 复纳科学仪器(上海)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 酚酸降解菌的初步筛选

称取 2.0 g 土样于 250 mL 锥形瓶中, 加入 200 mL 无菌水制备土壤悬浊液, 于 180 r/min、30 °C 培养 6 h 后静置 20 min, 取上清液进行梯度稀释, 分别吸取 200 μL 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} 稀释液涂布至以苯甲酸(0.10 g/L)为唯一氮源的无

机盐培养基上, 30 °C 培养箱中培养 3 d。待长出明显菌落后观察菌落形态, 分别挑选不同形态、颜色的单菌落于 NA 培养基和高氏 1 号培养基中于 30 °C 纯化培养, 将纯化后的单菌落接种至 NA 和高氏一号固体培养基斜面, 4 °C 冰箱保存备用。

1.2.2 酚酸降解菌的复筛

将上述以苯甲酸为唯一碳源的无机盐培养基中的苯甲酸浓度增加到 0.50 g/L 和 1.00 g/L, 取斜面保存的菌株活化后接种于高浓度酚酸培养基中, 30 °C 恒温培养箱培养 3 d 后观察生长较好的菌株(放线菌 5 d), 将生长较好的菌株接种于 NA 培养基和高氏一号固体培养基上培养保存。

1.2.3 高效液相色谱仪测定苯甲酸降解率

将筛选到的苯甲酸降解菌活化后接种于 20 mL LB 或高氏一号液体培养基中, 于 30 °C、180 r/min 培养 24 h 作为种子液。取 1 mL 种子液接入 50 mL 以苯甲酸作底物的无机盐液体培养基中, 底物浓度均为 0.10 g/L。分别取零时样品和 37 °C、180 r/min 振荡培养 4 d 后的样品, 经 0.22 μm 滤膜过滤后用 HPLC 检测底物量, 从而计算底物降解效率。高效液相的条件: 取待测发酵液加入 50 mL 离心管中, 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min, 取上清 1.00 mL 过 0.22 μm 微孔滤膜作为进样品, 色谱柱为 Agilent C18 柱 (250 mm \times 4.0 mm \times 5 μm); 柱温为 35 °C; 紫外检测波长为 230 nm; 流动相为甲醇: 0.02 mol/L, 甲醇: 乙酸铵=5:95 (体积比); 流速为 1.00 mL/min; 进样体积为 10.00 μL , 等梯度洗脱。

降解率(%)=[(零时底物量-末时底物量)/零时底物量] \times 100, 得到酚酸降解菌的底物降解谱。

1.2.4 酚酸降解菌株缓解苯甲酸影响番茄种子萌发试验

试验设置 6 个处理分别为: 1) 清水对照; 2) 1.00 g/L 的苯甲酸处理; 3) 酚酸降解菌株菌

悬液; 4) 酚酸降解菌株菌悬液稀释 10 倍处理; 5) 酚酸降解菌株菌悬液稀释 100 倍处理; 6) 酚酸降解菌株菌悬液稀释 1 000 倍处理; 以 1% 的接种量将 1.2.1 中筛选得到的菌株接种于 LB 和高氏一号液体培养基中, 在 30 °C、180 r/min 的恒温摇床培养 48 h 后, 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min, 倒掉上清液用无菌水重悬并稀释成不同浓度梯度使用。选取番茄种子为试验对象, 番茄种子浸泡于 70% 乙醇 10 min 后用无菌水清洗 3 遍完成消毒。取沉淀到水下的种子, 在水中常温浸泡 12 h 后取各组种子置于铺垫 2–3 层灭菌滤纸的 9.00 cm 透明培养皿中, 每个处理每皿 10 粒种子, 重复 3 次。处理 3、4 和 5 先用 2.00 mL 苯甲酸处理, 24 h 后用 2.00 mL 对应菌悬液处理, 后续每隔 24 h 用无菌水处理, 其他处理用 2.00 mL 所需液体处理后每隔 24 h 添加 2.00 mL 无菌水。种子萌发于 26 °C 人工气候箱, 光、暗交替时间为 16 h 和 8 h, 培养 7 d, 测定发芽率和整株长。

发芽指标测定: 以露白>1/2 种子长为标准, 发芽率(势) (%)=(发芽种子数/供试种子数)×100。

1.2.5 酚酸降解菌对番茄幼苗的促生长及对番茄枯萎病防控试验

按 1% 的接种量将 1.2.2 筛选的菌株接种于 NB 和高氏一号液体培养基中, 30 °C、180 r/min 摇床培养 48 h, 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min 后弃上清, 用无菌水重悬菌体并稀释待用。筛选长势相近的番茄幼苗移栽至直径 14.00 cm 且装有灭菌蔬菜种植基质的花盆中, 每盆 1 株。设置试验组(菌液)、对照组(病原菌接种), 每个处理 10 盆共 3 个重复, 室内常规处理 7 d 后使用菌株菌悬液进行灌根, 用玻璃棒在番茄苗根茎约 3.00 cm 处扎孔, 深约 5.00 cm, 每株 100 mL 病原菌悬液, 待病原菌定殖 3 d 后接入等量的 1.2.2 筛选的菌株菌悬液。生长期间每 3 天浇 1 次

水, 昼夜温度分别为 25 °C 和 20 °C, 光照时长 14 h、黑暗时长 10 h, 45 d 后观察记录发病情况并统计番茄植株株高、茎粗、根重及地上部鲜重和地上部干重。

各处理发病情况按照番茄枯萎病病情分级标准, 0: 无症状; 1: 1 片或两片叶子变黄; 2: 3 片或者 4 片真叶变黄叶片萎蔫下垂; 3: 5 片或 6 片真叶变黄或真叶萎蔫下垂; 4: 全株严重萎蔫以致枯死。

病情指数=(各级病株数×该病级值)/(总株数×最高级值)×100;

防效=(对照组病情指数-处理组病情指数)/对照组病情指数×100。

1.2.6 酚酸降解菌抑菌广谱性试验及抗生素合成基因检测

用接种铲挑取病原菌菌丝块置于 PDA 培养皿培养 5 d, 用打孔器在病原菌边缘打取 0.50 cm 的病原菌菌饼, 置于新的 PDA 培养皿中心, 用接种针从培养皿上挑取已活化的待测细菌和放线菌, 十字交叉在距离病原菌 2.50 cm 处接种菌株, 以只接种病原菌的培养皿为对照, 置 28 °C 培养箱培养 3–5 d。对病原菌的抑制作用采用抑制率表示。

抑菌率 (%)=[(对照菌落直径-处理菌落直径)/对照菌落直径]×100。

抗生素合成基因 PCR 检测, 合成引物序列如表 1 所示。

1.2.7 酚酸降解菌的其他生物活性

将 1.2.2 筛选得到的菌株分别点接到解有机磷选择培养基、无机磷选择培养基、固氮选择培养基、溶锌选择培养基、酪蛋白选择培养基和淀粉酶选择培养基上, 37 °C 培养 48 h, 若有透明圈生成则说明具有相应活性, 使用 CAS 双层平板检测菌株产铁载体能力, 若有色素或透明圈的产生表明菌株有分泌铁载体的能力。

表 1 抗生素基因检测引物合成表

Table 1 Synthesis of primers for antibiotic gene detection

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	产物长度 Product length (bp)	参考文献 Reference
<i>srfAB</i>	GTTCTCGCAGTCCAGCAGAAG GCCGAGCGTATCCGTACCGAG	308	[16]
<i>yndJ</i>	CAGAGCGACAGCAATCACAT TGAATTTTCGGTCCGCTTATC	212	[16]
<i>fenD</i>	CCTGCAGAAGGAGAAGTGAAG TGCTCATCGTCTTCCGTTTC	293	[16]
<i>ituC</i>	TTCACCTTTTGATCTGGCGAT CGTCCGGTACATTTTCAC	575	[16]
<i>bamC</i>	CTGGAAGAGATGCCGCTTAC AAGAGTGCCTTTCTTCGGA	957	[17]
<i>dhbC</i>	ATGTTGGATCAAAACGTTAT TCATATGTGATCCACGCCCCA	1 197	[16]
<i>sboA</i>	TCGGTTTGTAACCTTCAACTGC GTCCACTAGACAAGCGGCTC	334	[17]
<i>ysnE</i>	GGCTGTGAACCTTTGCTATG GCTGTTTCGGGTCTCTTTAT	462	[16]
<i>bioA</i>	TTCCACGGCCATTCTATAC TTTGTCCCCTTATCCTGCAC	210	[17]
<i>PKSI</i>	TSAAGTCSAACATCGGB CGCAGGTTSCSGTACCAG	1 200–1 400	[18]
<i>PKSII</i>	ACCGGCT GCACSTCSGGST ACGTAGTCSAGGTCGCASAC	700	[19]
<i>NRPS</i>	GCSTACSY SATSTACACSTCSGG SASGTCVCCSGTSCGGTAS	800	[18]

挑取单菌落接种于 LB 液体培养基中, 30 °C、180 r/min 培养 24 h, 无菌条件吸取 4 mL 发酵液于玻璃试管中, 快速与 4 mL Sackowcki's 显色剂(将 150 mL 的浓硫酸缓缓加入到 250 mL 去离子水中, 边加边搅拌, 待溶液冷却后加入 7.50 mL 0.50 mol/L FeCl₃·6H₂O 溶液)混合, 常温避光静置显色 40 min, 观察并记录颜色变化。

1.2.8 酚酸降解菌株的生理生化及分子鉴定

参照《伯杰细菌鉴定手册》^[20]和《常见细菌系统鉴定手册》^[21]中的方法对酚酸降解菌株进行形态学鉴定和生理生化特性检测。

采用 chelex-100 法提取 1.2.2 筛选的细菌 DNA^[22], 并将提取的 DNA 作为模板, 对获得的菌株进行 16S rRNA 基因序列测定。采用通用引

物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3')进行 PCR 扩增。PCR 反应体系及反应条件参照申云鑫等^[11]的方法。取 1 μL PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳, 用琼脂糖凝胶纯化试剂盒切胶回收 PCR 产物进行测序分析。16S rRNA 基因序列的测序工作由擎科生物医药科技有限生物公司完成。测序结果经 BLAST 搜索(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)后与 GenBank 数据库中相关种属的基因序列进行比较分析。选用相似性较高的模式菌株序列作为参比对象, 利用 MEGA 7.0 构建系统发育树, 并通过 bootstrap 进行 1 000 次重复测试, 分析各分离菌株的进化地位, 同时利用生理生化指标进一步鉴定。

1.2.9 数据分析

数据采用单因素方差分析、多重比较及独立样本 t 检验分析比较处理间的显著性差异。

选择 Excel 和 SPSS Statistics 20.0 软件进行数据统计分析, 采用 Origin 2021 和 GraphPad Prism 8 制图。

2 结果与分析

2.1 酚酸降解菌筛选结果

以苯甲酸为唯一氮源的培养基筛选到的酚酸降解菌株如表 2 所示, 4 株放线菌 YNK-FS0018、YNK-FS0019、YNK-FS0020 和 YNK-FS0021 随着苯甲酸浓度的增加均生长良好, 细菌 YNK-FB0022、YNK-FB0023 和 YNK-FB0024

表 2 酚酸降解菌的筛选结果

Table 2 Screening results of phenol acid degrading bacteria

菌株名称 Strain name	0.10 g/L 苯甲酸 0.10 g/L Benzoic acid	0.50 g/L 苯甲酸 0.50 g/L Benzoic acid	1.00 g/L 苯甲酸 1.00 g/L Benzoic acid
YNK-FS0018	+++	+++	++
YNK-FS0019	+++	+++	++
YNK-FS0020	+++	+++	++
YNK-FS0329	++	+	+
YNK-FS0354	+	+	-
YNK-FS0021	+++	+++	++
YNK-FS0857	+	-	-
YNK-FS0756	+	-	-
YNK-FB0022	+++	++	+
YNK-FB0023	+++	+	+
YNK-FB0024	+++	+	+
YNK-FB0521	+	-	-
YNK-FB0674	++	-	-
YNK-FB0864	+	-	-

+++、++、+和-分别表示从外观观察菌种生长较好、良好、一般和不生长

+++、++, + and - means that growth of strains as good-colony, ordinary-colony, a little colony, no colony by observation, respectively.

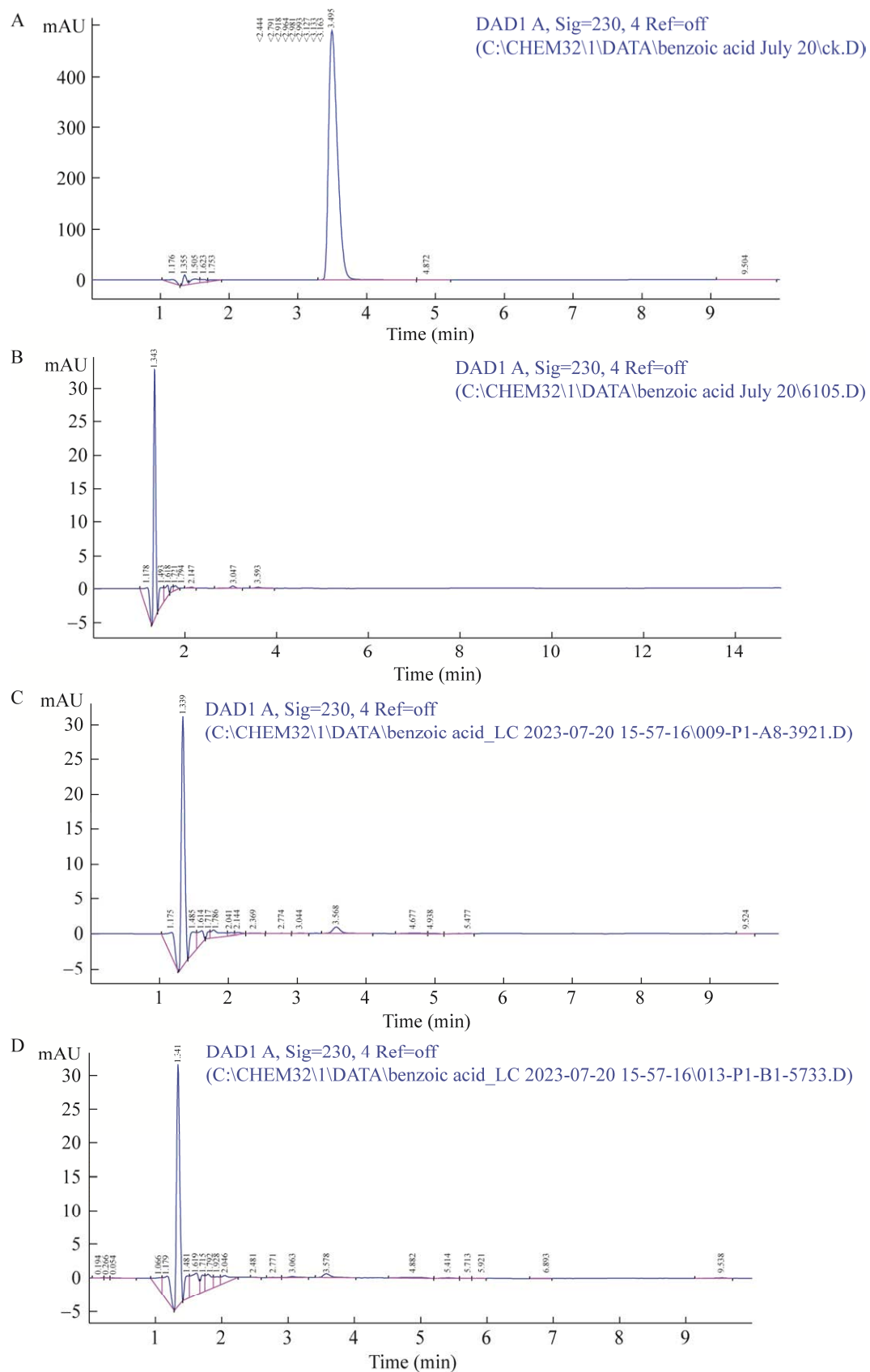
随着苯甲酸浓度的增加菌落数量有所减少, 但是能适应 1.00 g/L 的高浓度苯甲酸培养基。根据菌株是否能较好利用苯甲酸, 本试验初步筛选出 7 株具有酚酸降解能力的菌株, 分别为放线菌 YNK-FS0018、YNK-FS0019、YNK-FS0020、YNK-FS0021 和细菌 YNK-FB0022、YNK-FB0023、YNK-FB0024。

2.2 酚酸降解菌对苯甲酸降解率测定结果

将初步筛选得到的 7 株酚酸降解菌经苯甲酸无机盐液体培养基摇瓶处理 72 h 后, 通过高效液相色谱仪得到苯甲酸降解谱如图 1 所示, 根据降解率计算公式计算 7 株菌对苯甲酸的降解率(表 3), 4 株放线菌对苯甲酸的降解率达到 99% 以上, 细菌 YNK-FB0022、NK-FB0023 对苯甲酸的降解率达到 50% 以上。根据菌株对苯甲酸的降解能力选取放线菌 YNK-FS0018、YNK-FS0019 和细菌 YNK-FB0022 继续挖掘其生物活性。

2.3 酚酸降解菌缓解苯甲酸抑制番茄种子萌发试验

番茄种子在光照培养箱培养 7 d 后结果如图 2、图 3 所示, 3 株酚酸降解菌均可显著缓解苯甲酸对番茄种子萌发的抑制并促进种子生长。菌株 YNK-FB0022 的原液缓解苯甲酸的抑制作用最强, 并且与对照相比其促进种子萌发效果也显著, 种子萌发率达到 97%, 菌株 YNK-FB0022 的 1 000 倍稀释液对种子根长萌发的促进作用最强, 番茄种子根长平均长度达 13.04 cm; 菌株 YNK-FS0018 的 100 倍稀释液对苯甲酸抑制种子萌发的缓解作用最显著, 经处理番茄种子萌发率达 73%, 菌株 YNK-FS0018 的 10 倍稀释液对种子根长促进作用最强, 种子根长为 13.31 cm; 菌株 YNK-FS0019 的 100 倍稀释液对苯甲酸抑制种子萌发的缓解作用最显著, 番茄种子萌发率达 73%, 菌株 YNK-FS0019 的原液对番茄种子的根长促进作用最强, 种子平



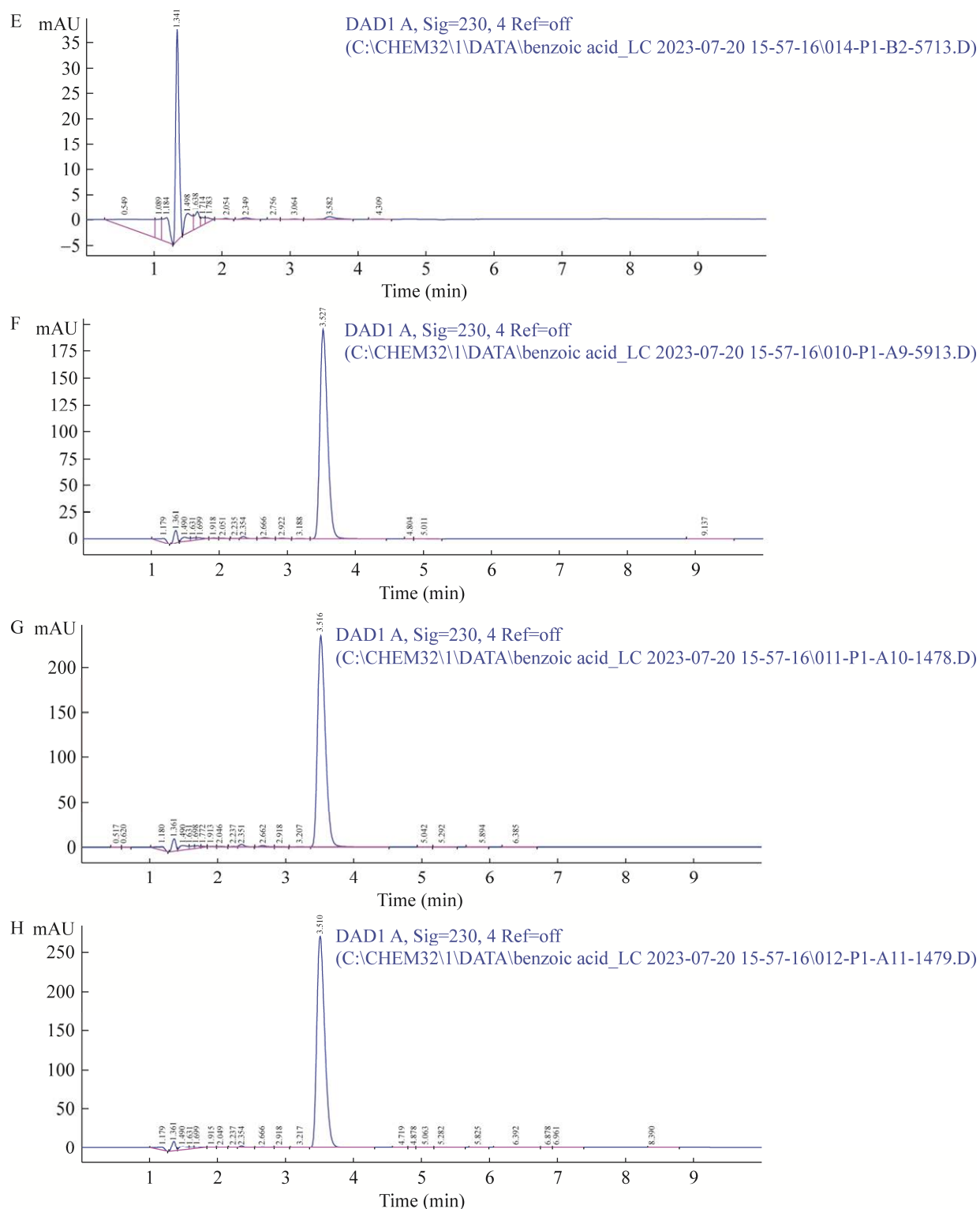


图 1 高效液相检测不同菌株对苯甲酸的降解效果

Figure 1 The degradation effect of benzoic acid by different strains was detected by HPLC. A: Control. B: YNK-FS0018. C: YNK-FS0019. D: YNK-FS0020. E: YNK-FS0021. F: YNK-FB0022. G: YNK-FB0023. H: YNK-FB0024.

表 3 酚酸降解菌对苯甲酸的降解率

Table 3 The degradation rate of benzoic acid by phenol acid degrading bacteria.

菌株名称 Name of strain	保留时间 Reserve time (min)	峰面积 Peak area	降解率 Degradation rate (%)
CK	3.49	4 335.28	—
YNK-FS0018	3.59	—	100.00
YNK-FS0019	3.56	7.36	99.83
YNK-FS0020	3.57	4.93	99.89
YNK-FS0021	3.58	5.85	99.87
YNK-FB0022	3.52	1 520.97	64.91
YNK-FB0023	3.51	1 520.97	56.92
YNK-FB0024	3.51	2 196.33	49.33

—: 峰面积为“0”和无降解率

—: A peak area of “0” and no degradation rate.

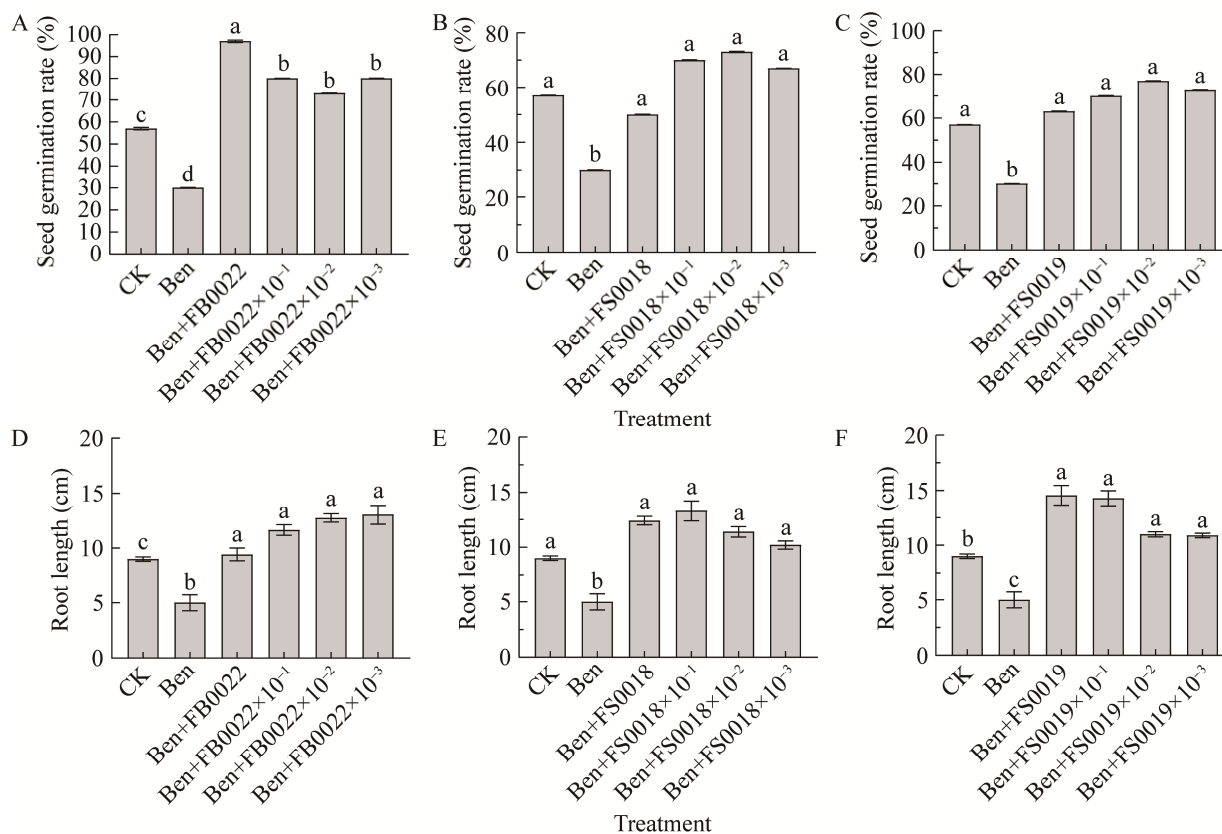


图 2 酚酸降解菌缓解苯甲酸对种子发芽的影响 A: YNK-FB0022 处理种子萌发率. B: YNK-FS0018 处理种子萌发率. C: YNK-FS0019 处理种子萌发率. D: YNK-FB0022 处理种子根长. E: YNK-FS0018 处理种子根长. F: YNK-FS0019 处理种子根长. CK: 清水对照. Ben: 苯甲酸处理. 不同小写字母表示差异显著

Figure 2 Effect of benzoic acid on seed germination mitigated by phenolic acid-degrading bacteria. A: YNK-FB0022 treated seed germination rate. B: YNK-FS0018 treated seed germination rate. C: YNK-FS0019 treated seed germination rate. D: YNK-FB0022 treated seed root length. E: YNK-FS0018 treated seed root length. F: YNK-FS0019 treated seed root length. CK: Clear water control. Ben: Benzoic acid treatment. Different lowercase letters indicate significant differences.

均根长为 14.56 cm。添加苯甲酸的种子经酚酸降解菌株处理后,与苯甲酸处理比较其种子萌发率均有显著提高,除菌株 YNK-FB0022 外,其他菌株与 CK 相比无显著差异,但在一定程度上有促进种子萌发的作用;经酚酸降解菌株处理后的种子根长与苯甲酸处理相比也均显著变长,除菌株 YNK-FS0019 处理外,其他菌株处理后种子根长与对照相比无显著差异,但平均长度均高于 CK,说明酚酸降解菌株在一定程度上促进了种

子根长生长。

2.4 酚酸降解菌的抑菌广谱性

三株酚酸降解菌对实验室保存的病原菌平板对峙结果如表 4 和图 4 所示,其中 3 株菌对草果茎点霉属叶斑病菌的拮抗最明显,抑菌率均达到 85%以上,对香蕉枯萎病菌的拮抗较弱。三株酚酸降解菌均对多种病原菌存在拮抗作用,表明菌株在作物病害生物防治方面具有极大的应用前景。

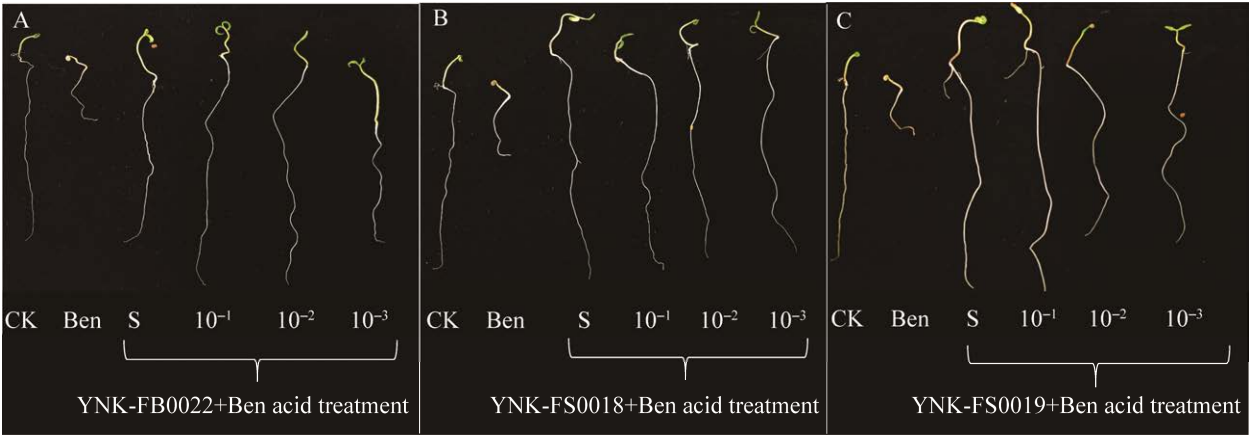


图 3 酚酸降解菌对苯甲酸抑制番茄根长的影响 A: YNK-FB0022+苯甲酸处理. B: YNK-FS0018+苯甲酸处理. C: YNK-FS0019+苯甲酸处理. S: 菌悬液原液. 10^{-1} 、 10^{-2} 和 10^{-3} : 菌悬液分别稀释 10、100 和 1 000 倍. Ben: 苯甲酸处理. CK: 无菌水处理.

Figure 3 Effect of phenol acid degrading bacteria on benzoic acid inhibiting tomato root length. A: YNK-FB0022+benzoic acid treatment. B: YNK-FS0018+benzoic acid treatment. C: YNK-FS0019+benzoic acid treatment. S: Bacterial suspension stock solution. 10^{-1} , 10^{-2} and 10^{-3} : Dilute the bacterial suspension 10, 100 and 1 000 times, respectively. Ben: Benzoic acid treatment. CK: Sterile water treatment.

表 4 酚酸降解菌对病原真菌的抑菌率

Table 4 Inhibition rate of phenolic acid-degrading bacteria to pathogenic fungi (%)

病原真菌 Pathogenic fungi	YNK-FS0018	YNK-FS0019	YNK-FB0022
番茄枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	79.52	75.42	83.65
玉米大斑病菌 <i>Exserohilum turcicum</i>	82.75	81.03	83.91
烟草炭疽病菌 <i>Colletotrichum micotianae</i>	75.34	74.23	74.36
草果茎点霉属叶斑病菌 <i>Phoma matteucciicola</i>	86.48	85.15	88.23
烟草黑胫病菌 <i>Phytophthora parasitica</i>	80.45	83.03	78.91
香蕉枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> race 4	70.47	68.21	58.45

2.5 酚酸降解菌基因组抗生素合成基因 PCR 检测

对 3 株酚酸降解菌进行 PCR 抗生素基因检测, 结果如图 5 所示, 放线菌 YNK-FS0018 和放线菌 YNK-FS0019 均具有 *PKSII*、*NRPS* 基因, 其中 YNK-FS0018 还具有 *PKSI* 基因, 表明 2 株放线菌具有合成聚酮类化合物和非核糖体肽类

化合物的活性, 具有抗菌、抗炎、免疫抑制和抗病毒等潜力; 细菌 YNK-FB0022 基因组中含有 *fenD*、*bioA*、*yndJ*、*ysnE*、*ituC*、*sboA* 和 *srfAB* 基因, 由此推断菌株 YNK-FB0022 具有合成泛草素、生物素、假定蛋白、生长素、伊枯草菌素、枯草杆菌素和表面活性素等多种抑菌促生物质的潜力。

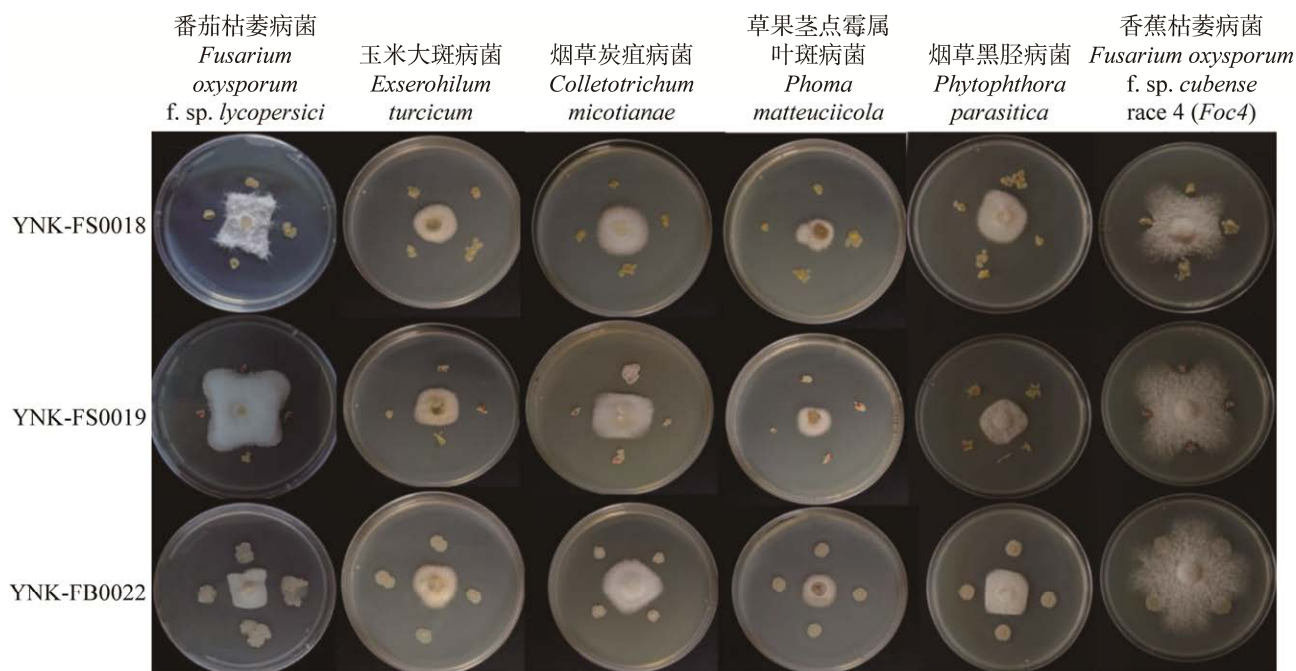


图 4 酚酸降解菌的抑菌广谱性

Figure 4 Broad-spectrum antimicrobial activity of phenolic acid-degrading bacteria.

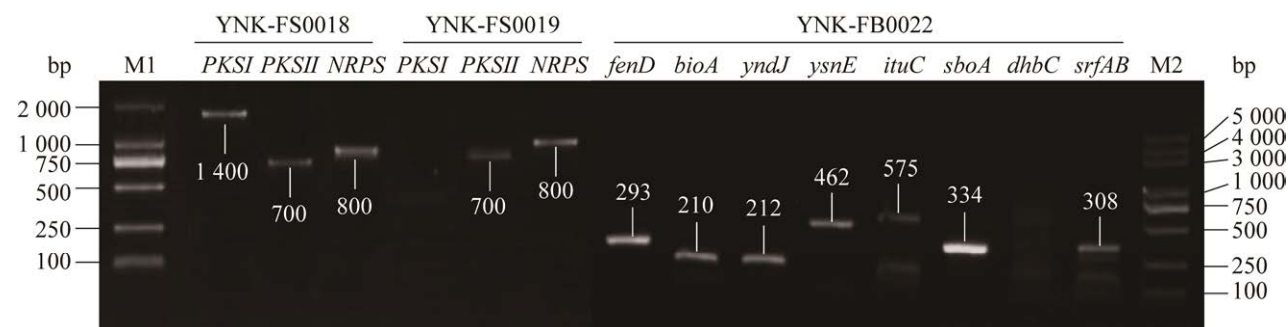


图 5 酚酸降解菌抗生素合成基因 PCR 电泳产物

Figure 5 PCR products of antibiotic synthesis genes of phenol acid degrading bacteria. M1: DL2000 DNA Marker. M2: DL5000 DNA Marker.

2.6 酚酸降解菌对番茄幼苗的促生影响及对番茄枯萎病的防效结果

基于种子萌发试验,使用培养 48 h 后 YNK-FS0018 重悬菌液的 10 倍稀释液、YNK-FS0019 重悬菌液原液和 YNK-FB0022 的 1 000 倍稀释液对番茄苗促生长试验及对番茄枯萎病的防控效果,结果如表 5、图 6 所示,接种酚酸降解菌可显著促进番茄幼苗的生长,表现为提高番茄株高、促进主根生长和增加根重及增加地上

部鲜重和干重。与对照相比,菌株 YNK-FS0018 处理的株高、地上鲜重、地上干重、根重、根长和茎粗分别增加 53.40%、67.50%、57.50%、73.50%、77.28%和 9.40%;与对照相比,菌株 YNK-FS0019 处理的株高、地上鲜重、地上干重、根重、根长和茎粗分别增加 23.00%、40.90%、14.00%、57.00%、26.30%和 16.80%;与对照相比,菌株 YNK-FB0022 处理的株高、地上鲜重、地上干重、根重、根长和茎粗分别增加 24.50%、

表 5 酚酸降解菌菌悬液对番茄幼苗生长的影响和对番茄枯萎病的防效

Table 5 Effect of suspension of phenolic acid-degrading bacteria on growth of tomato seedlings and control of tomato *Fusarium* wilt

处理 Treatment	CK	YNK-FS0018	YNK-FS0019	YNK-FB0022
株高 Height (cm)	84.23±3.43c	129.33±8.66a	103.63±4.78b	104.90±1.61b
地上部鲜重 Fresh weight of above-ground part (g)	31.93±1.78c	53.50±2.64a	44.99±1.55b	46.21±0.60b
地上部干重 Dry weight of above-ground part (g)	5.71±0.33d	9.00±0.14a	6.52±0.70c	7.22±0.15b
根重 Root weight (g)	7.07±0.12c	12.29±0.52b	11.11±0.14a	12.39±0.41a
根长 Root length (cm)	12.03±0.60d	21.33±0.67b	15.20±0.46c	22.83±1.46a
茎粗 Stem thick (cm)	5.24±0.07b	5.74±0.08ab	6.12±0.68a	5.71±0.03b
病情指数 Disease index	25.83±0.21a	3.33±0.08b	6.67±0.07b	5.00±0.13b
防效 Control effect (%)	—	87.10±0.18a	74.18±0.23b	80.65±0.29b

数据为平均值±标准差,不同小写字母表示不同菌株之间具显著差异($P<0.05$); -: 无防效

The data is the mean±standard. Different lowercase letters indicate significant differences between different strains ($P<0.05$); -: No preventive effect.

—: No preventive effect.

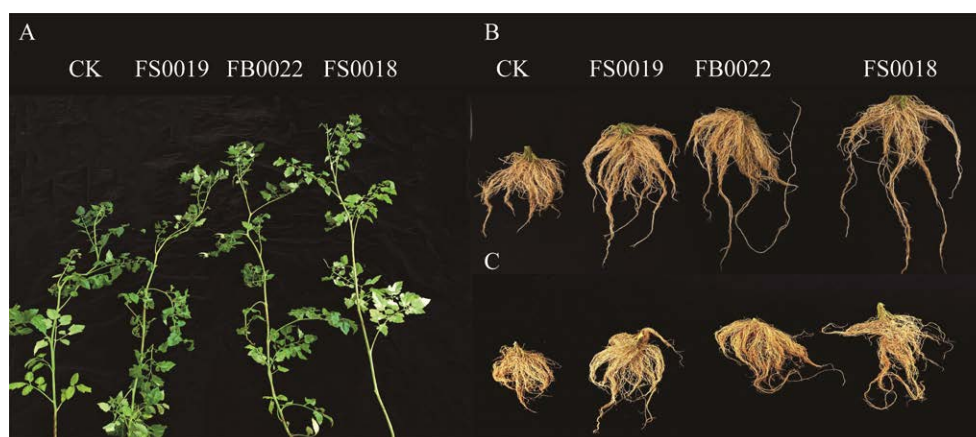


图 6 酚酸降解菌对番茄生长的影响 A: 番茄植株地上部分. B: 番茄新鲜地下部分. C: 番茄干燥地下部分

Figure 6 Effect of phenolic acid-degrading bacteria on tomato growth. A: Aboveground part of tomato plant. B: The tomatoes are fresh underground. C: Dry weight of underground part of tomato.

44.70%、26.40%、75.10%、98.00%和 9.00%；三株酚酸降解菌处理后的病情指数较 CK 均显著降低且对番茄枯萎病的防效均达到 70%以上，其中菌株 YNK-FS0018 的防效效果最好，达到 87.10%。结果表明 3 株酚酸降解菌在植物促生及病害防控上有较好的应用前景。

2.7 酚酸降解菌其他生物活性研究

三株酚酸降解菌株均具有解有机磷、溶锌、分泌铁载体、水解淀粉和水解蛋白的能力(表 6)，其中菌株 YNK-FB0022 还具有分泌生长素的作用。三株酚酸降解菌的功能较丰富，说明菌株的应用前景较好。

2.8 酚酸降解菌的生理生化鉴定

菌株 YNK-FB0022 菌落表面湿润光滑，不透明，革兰氏染色阳性，能利用麦芽糖、葡萄糖，能水解淀粉，甲基红反应为阳性，不能水解脂肪；菌株 YNK-FS0019 为革兰氏阳性细菌，菌落形态呈黄白色、有白色孢子气丝，淀粉水解、蛋白水解、柠檬酸反应、接触酶和乳糖利用等均均为阳性，甲基红反应和 VP 反应为阴性；菌株 YNK-FS0018 菌落呈淡黄白色，微凸起，是一株

革兰氏阳性菌，能水解淀粉，弱利用柠檬酸盐。

2.9 酚酸降解菌的分子鉴定结果及电镜扫描

经 NCBI BLAST 分析，菌株 YNK-FB0022 的 16S rRNA 基因序列(GenBank 登录号为 OR523290)与耐盐芽孢杆菌的相似度为 99.93%，选取 *Metabacillus galliciensis* 作为外群(GenBank 登录号为 FM162181)，利用 NJ 法构建系统发育树如图 7A 所示；菌株 YNK-FS0019 的 16S rRNA 基因序列(GenBank 登录号为 OR523289)与白黄链霉菌的相似度为 100%，选取 *Streptoalloteichus tenebrarius* 作为外群 (GenBank 登录号为 NR12665)，利用 NJ 法构建系统发育树如图 7B 所示；菌株 YNK-FS0018 的 16S rRNA 基因序列(GenBank 登录号为 OR523286)与稻瘟毒素链菌的相似度为 100%，选取 *Streptoalloteichus tenebrarius* 作为外群(GenBank 登录号为 NR12665)，利用 NJ 法构建系统发育树如图 7C 所示。

根据系统发育树结合平板菌落形态和电镜扫描结果，将菌株 YNK-FB0022 鉴定为耐盐芽孢杆菌(*Bacillus halotolerans*) (图 8A、8B)；将菌株 YNK-FS0019 鉴定为白黄链霉菌(*Streptomyces*

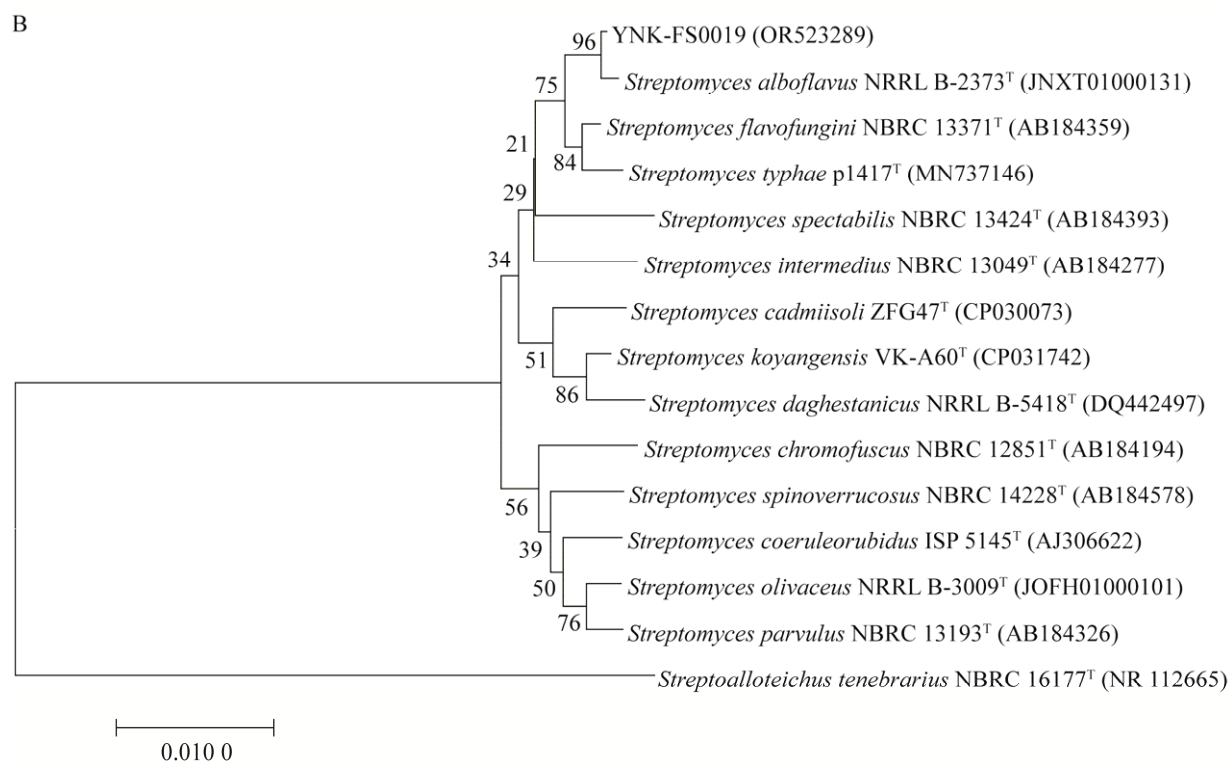
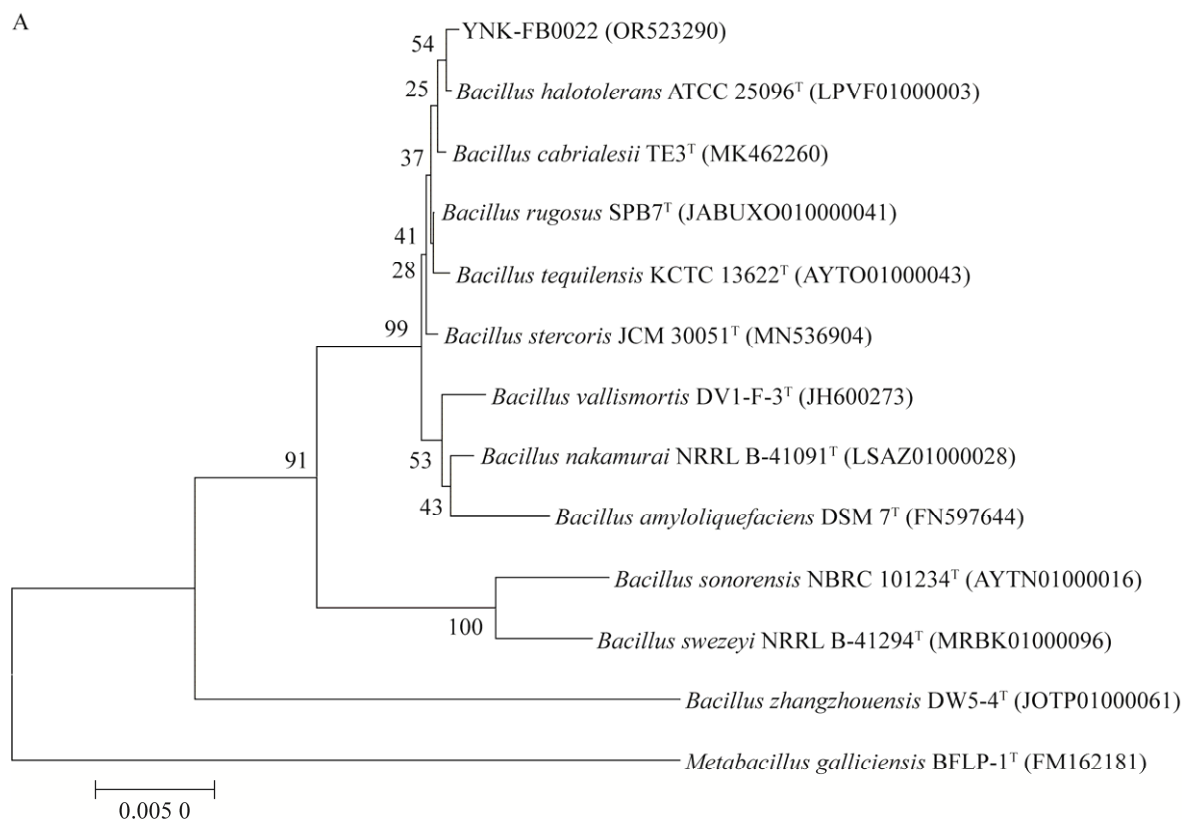
表 6 酚酸降解菌的其他生物功能

Table 6 Other biological functions of phenolic acid-degrading bacteria

功能 Function	YNK-FS0018	YNK-FS0019	YNK-FB0022
固氮 Nitrogen fixation	—	—	—
解有机磷 Organophosphorus hydrolysis	+	+	+
解无机磷 Dissolved inorganic phosphorus	—	—	—
溶锌 Soluble zinc element	+	+	+
分泌铁载体 Secretory siderophore	+	+	+
淀粉酶 Secretes amylase	+	+	+
生长素 Auxin is secreted	—	—	+
蛋白酶 Protease	+	+	+
ACC 脱氨酶 Secretes ACC deaminase	—	—	—

+: 阳性; -: 阴性

+: Positive; -: Negative.



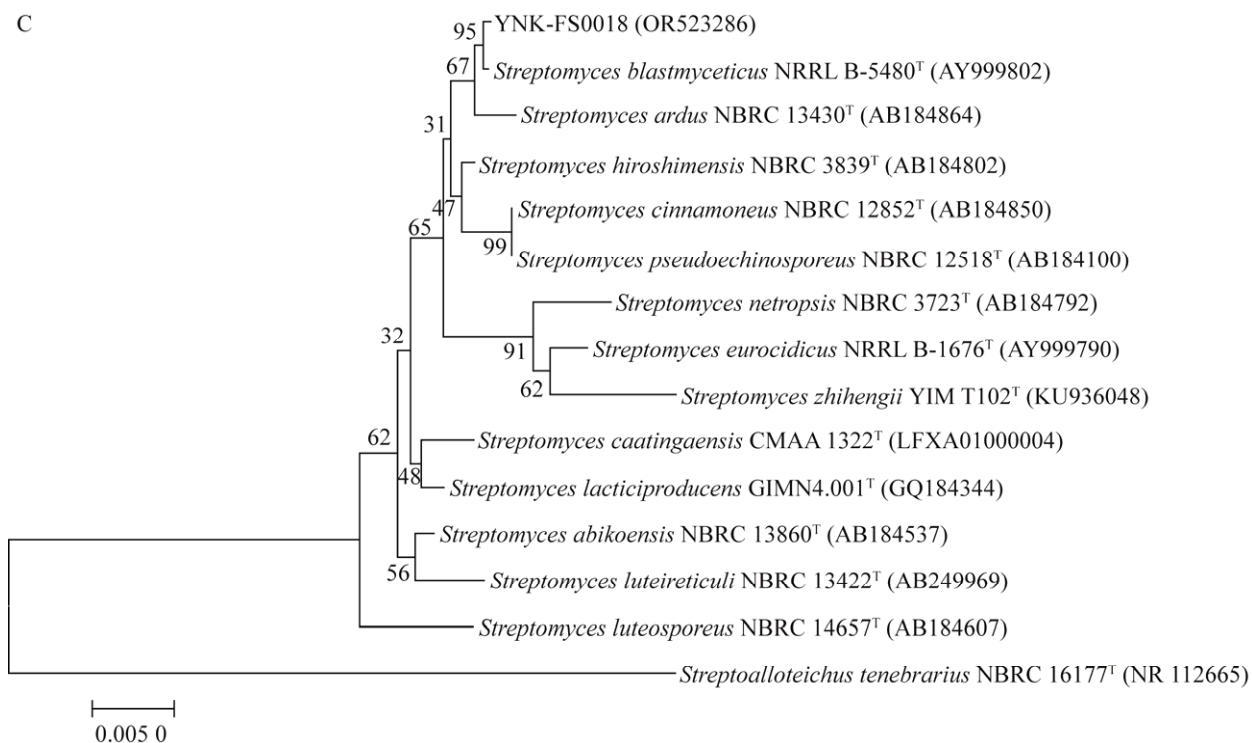


图7 酚酸降解菌基于16S rRNA基因序列构建的系统发育树 A: YNK-FB0022系统发育树. B: YNK-FS0019系统发育树. C: YNK-FS0018系统发育树. 括号内序号为菌株的GenBank登录号; 上标“T”表明为模式菌株; 分支数字表示bootstrap支持率; 标尺所示长度为0.0100和0.0050核苷酸置换率

Figure 7 Phylogenetic tree of phenolic acid-degrading bacteria based on 16S rRNA gene sequence. A: YNK-FB0022 phylogenetic tree. B: Phylogenetic tree of YNK-FS0019. C: YNK-FS0018 phylogenetic tree. The serial number in parentheses is the GenBank accession number of the strain; The superscript “T” indicates the type strain; The branch number indicates the bootstrap support rate; The length indicated by the scale is 0.0100 and 0.0050 nucleotide substitution rate.

alboflavus) (图8C、8D); 将菌株 YNK-FS0018 鉴定为稻瘟毒素链霉菌(*Streptomyces blastmyceticus*) (图8E、8F)。

3 讨论

在有限土地资源上专一化和规模化的耕种, 导致农田土壤连作障碍问题日趋严重, 成为制约现代农业可持续发展的主要障碍之一。其中植物自毒作用被认为是导致连作障碍的重要诱因之一^[23-24]。对多种连作植物根系土壤进行分析, 发现阿魏酸、对羟基苯甲酸和苯甲酸等酚酸

类物质是其根系分泌的主要自毒物质, 向土壤中添加有益微生物降解作物根系自毒物质, 能有效地防治由该类物质导致的连作障碍^[25]。根际有益微生物可通过多种途径缓解连作障碍, 与作物健康生长息息相关, 因此, 筛选获得高效的多功能根际有益微生物具有重要意义^[26-28]。

土壤中酚酸类自毒物质的浓度积累到一定量时, 即产生显著的化感作用, 对植物种子萌发及生长发育产生毒害作用。对羟基苯甲酸、香草酸和苯甲酸等是花生连作土壤中的主要酚酸类物质, 在根系土壤中累积达到一定浓度后

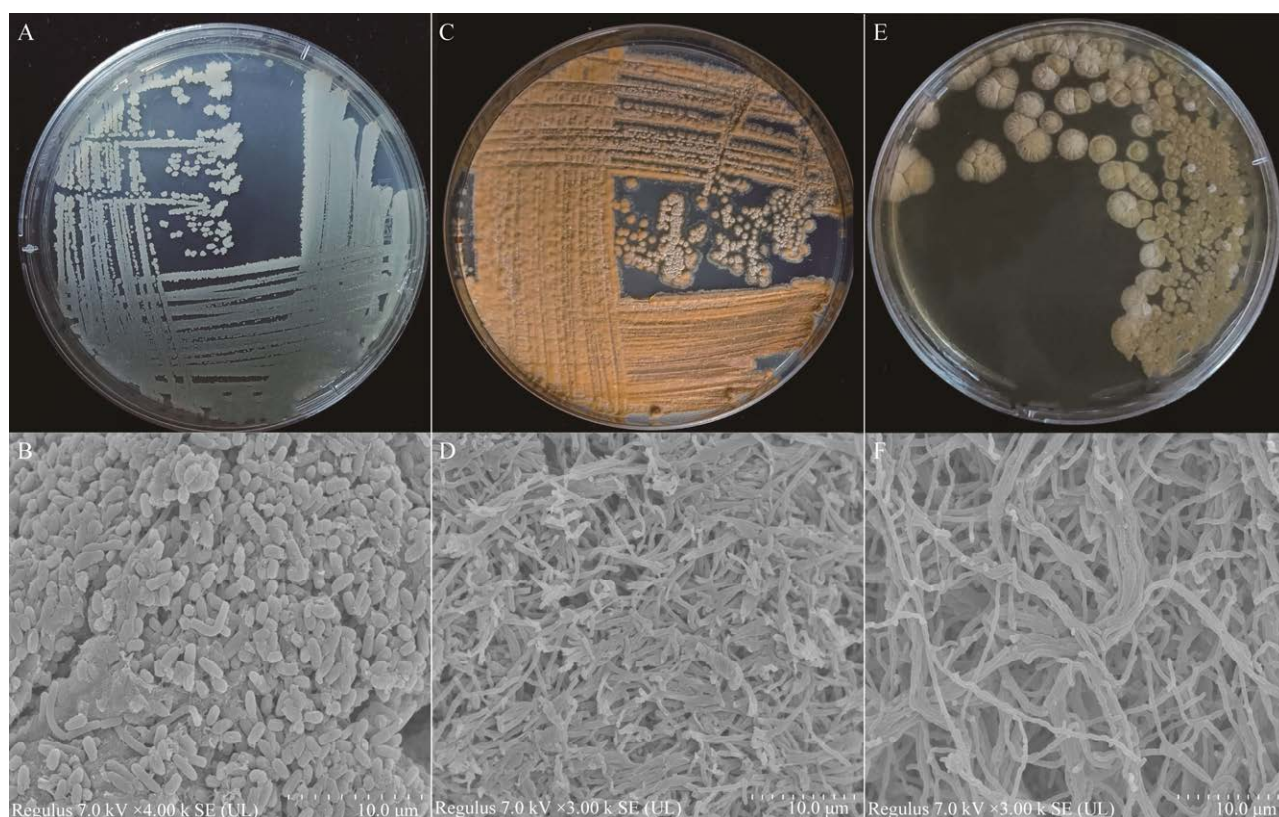


图 8 酚酸降解菌菌落形态及扫描电镜图 A 和 B: 菌株 YNK-FB0022 菌落形态图和电镜扫描图. C 和 D: 菌株 YNK-FS0019 菌落形态图和电镜扫描图. E 和 F: 菌株 YNK-FS0018 菌落形态图和电镜扫描图
Figure 8 Colony morphology and scanning electron microscopy of phenolic acid degrading bacteria. A and B: The colony morphology and electron microscope scanning of YNK-FB0022. C and D: The colony morphology and electron microscope scanning of YNK-FS0019. E and F: The colony morphology and electron microscope scanning of YNK-FS0018.

均可对花生种子的发芽和幼苗的生长产生抑制作用^[29]。可利用根际有益微生物降解自毒化感物质,减少化感作用。目前,从自然环境中获得的具有酚酸降解功能的菌株包括芽孢杆菌属(*Bacillus*)、固氮菌属(*Azotobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)和微小杆菌属(*Exiguobacterium*)等^[30-32]。孙秀等^[7]以肉桂酸为唯一碳源,分离得到一株黑曲霉(*Aspergillus niger*),其对肉桂酸具有良好的降解作用,可有效缓解肉桂酸对植株生长的抑制作用,同时可提高黄瓜植株的农艺性状。分离自苹果根际土

壤中的一株根皮苷降解菌 AMCC 300110,该菌株具有广谱的酚酸降解能力,在缓解苹果连作障碍方面具有极大的应用价值^[33]。王丹丹等^[6]从连作花生根际土壤分离得 7 株酚酸降解菌,其中菌株 *Bacillus* sp. B28 可有效缓解苯甲酸对花生种子萌发的影响。本试验从无量山森林保护区筛选分离得到 7 株具有降解苯甲酸能力的菌株,菌株 YNK-FB0022、YNK-FS0018 和 YNK-FS0019 对苯甲酸的降解率分别为 100%、99.83%和 64.91%并且均可显著缓解苯甲酸对番茄种子萌发的影响。

对我国南方红壤花生种植区土壤进行分析

研究发现, 酚酸类物质的累积可导致土壤偏酸, 土壤从细菌型逐渐向真菌型过渡的同时, 病原真菌富集, 进而造成土壤微生物区系失衡、地力衰竭, 土传病害加剧^[1]。根际有益微生物可合成多种脂肽、聚酮等活性物质, 以拮抗各种真菌和细菌, 增强自生竞争优势, 利用有益根际微生物拮抗病原菌是减少土传病害发生和传播的一项重要举措。一株贝莱斯芽孢杆菌 SH-1471 具有 *srfA*、*fenB*、*ituA*、*ituD* 和 *bymA* 等基因, 可通过合成多种脂肽类抗生素抑制真菌、细菌的生长, 并诱导生物膜的形成, 且贝莱斯芽孢杆菌 SH-1471 菌体以及无菌发酵液对番茄枯萎病菌均可起到良好的抑制效果^[34]; 濮永瑜等^[35]从发病烟株根际土壤中分离得到 2 株拮抗菌株, 全基因组分析 2 株均存在 *srfAB*、*fenD*、*ituC*、*bamC* 和 *bioA* 等合成脂肽类物质相关的基因, 能抑制烟草青枯病和黑胫病的发生; 从水稻中分离、筛选并鉴定出对稻病真菌具有拮抗性能的内生放线菌, 为米修链霉菌 (*Streptomyces misionensis*), 呈现 *PKSII* 型和 *NRPS* 基因阳性, 该菌株使稻瘟病菌菌丝出现畸形, 其无菌滤液对病菌菌丝生长的抑制率 28.06%, 是一株具生防潜力的内生放线菌, 在农业上具有实际研发价值^[36]; 本试验的酚酸降解菌株 YNK-FS0018 和 YNK-FS0019 均具有 *PKSII*、*NRPS* 基因, YNK-FB0022 具有 *fenD*、*bioA*、*yndJ*、*ysnE*、*ituC*、*sboA* 和 *srfAB* 基因, 并且对 3 株菌对病原菌具有广谱性抗性, 且盆栽试验中 3 株酚酸降解菌对番茄枯萎病的防效均分别达到 87.10%、74.18%和 80.65%。

由于自毒物质的累积而引起的连作障碍还会导致土壤理化性质恶化, 不利于作物对养分的利用, 而根际有益微生物通过多种促生机制促进植物生长。根际有益微生物首先可以通过固氮、解磷、溶锌和分泌铁载体等作用提高土壤中

养分的含量及利用率, 为植物提供更多可利用的营养元素; 其次可以通过产生植物类激素促进植物生长, 如合成植物激素吲哚乙酸^[37]。申云鑫等^[10]从健康烟草根际土壤中分离得一株高活性拟蕈状芽孢杆菌 (*Bacillus paramycoides*), 该菌株具有极强的产 IAA 活性, 分泌量为 39.88 $\mu\text{g/mL}$, 促生试验结果表明, 该菌株可显著提高番茄幼苗的根长、根重和株高等农艺性状。何建清等^[38]从西藏不同地区青稞根际土壤中分离解有机磷菌株, 菌株 10BN-11 溶磷效果较好且对增加青稞发芽率、发芽势、发芽指数、株高、根长和鲜重都有明显的促进作用。于镭污染地区的植物根际土壤分离得到 30 株耐镭细菌, 其中 2 株具有高产 IAA 活性, 以及产 1-氨基环丙烷-1-羧酸 (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) 脱氨酶和铁载体活性, 在促进作物生长的同时, 也促进植物对镭的吸收和促进土壤镭有效化^[39]。本研究发现菌株 YNK-FB0022、YNK-FS0018 和 YNK-FS0019 均具有产铁载体、溶锌和解有机磷的功能, 其中菌株 YNK-FB0022 可分泌植物激素 IAA, 并且在盆栽试验中 3 株酚酸降解菌均对番茄幼苗生长有促进作用。

本研究从无量山森林土壤中分离得到 3 株酚酸降解菌株, 对 3 株酚酸降解菌的自毒化感物质降解、植物病原菌生长抑制及促进番茄幼苗生长特性只进行了基础试验及分析, 作用机理仍需进一步研究。通过高效液相检测发现放线菌降解苯甲酸的能力强于细菌, 因此, 在筛选根际促生菌时, 应包含多个种属, 防止获得的菌株功能单一, 限制其应用范围, 其次土壤中的酚酸含量种类复杂, 如含有对羟基苯甲酸、肉桂酸、香草酸和阿魏酸等, 研究菌株对多种酚酸的降解能力, 同时也可将多个具有自毒化感物质降解、抑制植物病原菌生长及促生能力的根际促生菌配制高效多功能复合菌剂, 从而提高

根际有益微生物对连作障碍的综合治理效果。

4 结论

本试验研究于云南省无量山森林土壤中分离得到 7 株酚酸降解菌株,其中菌株 YNK-FS0018、YNK-FS0019 和 YNK-FB0022 具有解有机磷、溶锌、分泌铁载体、水解淀粉和水解蛋白的能力,对多种病原菌有广谱抑菌活性,并在盆栽试验中表现出对番茄幼苗株高、茎粗、根长、根重、地上部分鲜重和干重等农艺性状具有显著促进作用,其对番茄枯萎病防效较好,可为土传病害的生物防治提供微生物资源。

REFERENCES

- [1] 王兴祥, 张桃林, 戴传超. 连作花生土壤障碍原因及消除技术研究进展[J]. 土壤, 2010, 42(4): 505-512.
WANG XX, ZHANG TL, DAI CC. Advance in mechanism and countermeasures of peanut succession monocropping obstacles[J]. Soils, 2010, 42(4): 505-512 (in Chinese).
- [2] WU HS, RAZA W, FAN JQ, SUN YG, BAO W, SHEN QR. Cinnamic acid inhibits growth but stimulates production of pathogenesis factors by *in vitro* cultures of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(4): 1316-1321.
- [3] 李自博, 周如军, 解宇娇, 傅俊范. 人参连作根际土壤中酚酸物质对人参锈腐病菌的化感效应[J]. 应用生态学报, 2016, 27(11): 3616-3622.
LI ZB, ZHOU RJ, XIE YJ, FU JF. Allelopathic effects of phenolic compounds of ginseng root rhizosphere on *Cylindrocarpum destructans*[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2016, 27(11): 3616-3622 (in Chinese).
- [4] HAO WY, REN LX, RAN W, SHEN QR. Allelopathic effects of root exudates from watermelon and rice plants on *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*[J]. Plant and Soil, 2010, 336(1): 485-497.
- [5] 王洁, 王蓓蓓, 尚方剑, 苏兰茜, 赵少官, 洪珊, 赵青云. 香草兰酚酸类自毒物质降解菌的筛选和鉴定及其抑菌效果[J]. 热带生物学报, 2022, 13(6): 595-604.
WANG J, WANG BB, SHANG FJ, SU LX, ZHAO SG, HONG S, ZHAO QY. Screening identification and antimicrobial activity of microbial strains degrading autotoxic phenolic acids in the rhizosphere of vanilla[J]. Journal of Tropical Biology, 2022, 13(6): 595-604 (in Chinese).
- [6] 王丹丹, 孙丽, 于宏, 阎祥慧, 张成凯, 王孟亮, 陈大印, 解志红. 花生种子相关促生菌分离鉴定及功能评价[J]. 微生物学通报, 2023, 50(11): 1-13.
WANG DD, SUN L, YU H, YAN XH, ZHANG CK, WANG ML, CHEN DY, XIE ZH. Solation identification and functional characterization of plant growth-promoting bacteria from peanut seeds[J]. Microbiology China: 2023, 50(11): 1-13 (in Chinese).
- [7] 孙秀, 王秀峰, 魏珉, 王芳, 史庆华, 周波. 肉桂酸降解真菌的筛选及其降解液对黄瓜种子发芽的影响[J]. 园艺学报, 2014, 41(4): 765-772.
SUN X, WANG XF, WEI M, WANG F, SHI QH, ZHOU B. Screening and identification of cinnamic acid-degrading fungus and the effect of degradation liquid on the cucumber germination[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2014, 41(4): 765-772 (in Chinese).
- [8] 骆婷, 夏虹, 冯定胜, 高友, 王一丁. 森林土壤中多功能降解菌的分离筛选及鉴定[J]. 西南农业学报, 2018, 31(5): 1032-1040.
LUO T, XIA H, FENG DS, GAO Y, WANG YD. Isolation and identification of multi-function degradation bacteria from forest soil[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2018, 31(5): 1032-1040 (in Chinese).
- [9] 杨荣, 高婷, 李滢璟, 魏崇瑶, 高森, 马莲菊. 辣椒根际促生菌的分离筛选及抗病促生特性研究[J]. 生物技术通报, 2020, 36(5): 104-109.
YANG M, GAO T, LI YJ, WEI CY, GAO M, MA LJ. Isolation and screening of plant growth-promoting rhizobacteria in pepper and their disease-resistant growth-promoting characteristics[J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(5): 104-109 (in Chinese).
- [10] 申云鑫, 赵江源, 王楠, 李铭刚, 施竹凤, 冯路遥, 李者芬, 陈齐斌, 杨佩文. 具促生功能拟蕈状芽孢杆菌(*Bacillus paramycoides*) SH-1464 发酵条件优化及其活性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(6): 2436-2451.
SHEN YX, ZHAO JY, WANG N, LI MG, SHI ZF, FENG LY, LI ZF, CHEN QB, YANG PW. Optimization of fermentation conditions of *Bacillus paramycoides* SH-1464 with growth-promoting activity[J]. Microbiology China, 2023, 50(6): 2436-2451 (in Chinese).
- [11] 申云鑫, 施竹凤, 周旭东, 李铭刚, 张庆, 冯路遥,

- 陈齐斌, 杨佩文. 三株具生防功能芽孢杆菌的分离鉴定及其生物活性研究[J]. 生物技术通报, 2023, 39(3): 267-277.
- SHEN YX, SHI ZF, ZHOU XD, LI MG, ZHANG Q, FENG LY, CHEN QB, YANG PW. Isolation, identification and bio-activity of three *Bacillus* strains with biocontrol function[J]. Biotechnology Bulletin, 2023, 39(3): 267-277 (in Chinese).
- [12] RANI N, KAUR G, KAUR S, MUTREJA V, PANDEY N. Plant growth-promoting attributes of zinc solubilizing *Dietzia maris* isolated from polyhouse rhizospheric soil of Punjab[J]. Curr Microbiol, 2023, 80(1): 48.
- [13] 赵晓艳, 曾志驰, 穆丽丽, 邓悦, 王飞. 蛋白酶高产菌株的筛选鉴定与酶学特性研究[J]. 江西农业学报, 2016, 28(4): 32-38.
- ZHAO XY, ZENG ZC, MU LL, DENG Y, WANG F. Research on screening, identification and enzymological characteristics of strains with high yield of protease[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2016, 28(4): 32-38 (in Chinese).
- [14] 文狄, 褚丹维, 罗绍娇, 丁淑金, 蒙帮明. 土壤中产高活性淀粉酶细菌的分离与纯化[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(27): 6-9, 41.
- WEN D, CHU DW, LUO SJ, DING SJ, MENG BM. Isolation and purification of bacteria producing highly active amylase in soil[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2018, 46(27): 6-9, 41 (in Chinese).
- [15] 赵江源, 邹雪峰, 何翔, 张庆, 杨济达, 朱红业, 杨佩文, 李铭刚. 2 株分泌型铁载体真菌对番茄青枯病的防效[J]. 植物保护, 2022, 48(4): 123-130.
- ZHAO JY, ZOU XF, HE X, ZHANG Q, YANG JD, ZHU HY, YANG PW, LI MG. Control effects of two siderophore-producing fungi against tomato bacterial wilt[J]. Plant Protection, 2022, 48(4): 123-130 (in Chinese).
- [16] JOSHI R, MCSPADDEN GARDENER BB. Identification and characterization of novel genetic markers associated with biological control activities in *Bacillus subtilis*[J]. Phytopathology®, 2006, 96(2): 145-154.
- [17] MORA I, CABREFIGA J, MONTESINOS E. Antimicrobial peptide genes in *Bacillus* strains from plant environments[J]. International Microbiology: the Official Journal of the Spanish Society for Microbiology, 2011, 14(4): 213-223.
- [18] 郑文艺, 韩海燕, 崔海超, 傅岳峰, 李欣悦, 袁肖寒, 宋金凤, 顾成波. 欧洲疮痂链霉菌 F5 的鉴定及其抗菌活性[J]. 微生物学通报, 2022, 49(6): 2111-2123.
- ZHENG WY, HAN HY, CUI HC, FU YF, LI XY, YUAN XH, SONG JF, GU CB. Characterization and antipathogenic activity of *Streptomyces europaeiscabiei* F5 from the rhizosphere of pigeon pea[J]. Microbiology China, 2022, 49(6): 2111-2123 (in Chinese).
- [19] 祁鹤兴, 赵映珺, 李鹏, 高媛, 徐全智, 顾沛雯. 产 PK 和 NRP 类抗生素苦豆子内生放线菌分子筛选及抗生素类型鉴定[J]. 微生物学通报, 2016, 43(3): 583-592.
- QI HX, ZHAO YJ, LI P, GAO Y, XU QZ, GU PW. Molecular screening and identification of endophytic actinomycetes in PK and NRP-producing antibiotics and antibiotic types[J]. Microbiology China, 2016, 43(3): 583-592 (in Chinese).
- [20] BUCHANAN RE, GIBBONS NE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8 版. 中国科学院微生物研究所, 译. 北京: 科学出版社, 1984.
- BUCHANAN RE, GIBBONS NE. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. 8th ed. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, trans. Beijing: Science Press, 1984 (in Chinese).
- [21] 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.
- DONG XZ, CAI MY. Handbook of Identification of Common Bacterial Systems[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese).
- [22] WALSH PS, METZGER DA, HIGUCHI R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material[J]. BioTechniques, 1991, 10(4): 506-513.
- [23] Utkhede RS. Soil sickness, replant problem or replant disease and its integrated control[J]. Allelopathy Journal, 2006, 18(1): 23-38.
- [24] BENNETT AJ, BENDING GD, CHANDLER D, HILTON S, MILLS P. Meeting the demand for crop production: the challenge of yield decline in crops grown in short rotations[J]. Biological Reviews, 2012, 87(1): 52-71.
- [25] 王晓辉. 西瓜自毒物质阿魏酸降解放线菌筛选及其降解效果研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2011.
- WANG XH. Screening of actinomycetes degrading ferulic acid from watermelon and its degradation effect[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2011 (in Chinese).
- [26] 刘晔, 刘晓丹, 张林利, 吴越, 王国文, 汪强, 姜瑛. 花生根际多功能高效促生菌的筛选鉴定及其效应研究[J]. 生物技术通报, 2017, 33(10): 125-134.
- LIU Y, LIU XD, ZHANG LL, WU Y, WANG GW,

- WANG Q, JIANG Y. Screening, identification of multifunctional peanut root-promoting rhizobacteria and its promoting effects on peanuts (*Arachis hypogaea* L.)[J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(10): 125-134 (in Chinese).
- [27] YU RQ, KURT Z, HE F, SPAIN JC. Biodegradation of the allelopathic chemical pterostilbene by a *Sphingobium* sp. strain from the peanut rhizosphere[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2019, 85(5): e02154-e02118.
- [28] SYED S, TOLLAMADUGU NVKVP, LIAN B. *Aspergillus* and *Fusarium* control in the early stages of *Arachis hypogaea* (groundnut crop) by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) consortium[J]. Microbiological Research, 2020, 240: 126562.
- [29] LI PD, WANG XX, LI YL, WANG HW, LIANG FY, DAI CC. The contents of phenolic acids in continuous cropping peanut and their allelopathy[J]. Acta Ecologica Sinica, 2010, 30(8): 2128-2134.
- [30] WANG Y, ZHANG W, ZHANG Z, WANG W, XU S, HE X. Isolation, identification and characterization of phenolic acid-degrading bacteria from soil[J]. Journal of Applied Microbiology, 2021, 131(1): 208-220.
- [31] KHALID M, HASSANI D, BILAL M, ASAD F, HUANG DF. Influence of bio-fertilizer containing beneficial fungi and rhizospheric bacteria on health promoting compounds and antioxidant activity of *Spinacia oleracea* L.[J]. Botanical Studies, 2017, 58(1): 1-9.
- [32] WU FH, AN YQ, AN YR, WANG XJ, CHENG ZY, ZHANG Y, HOU XW, CHEN CX, WANG L, BAI JG. *Acinetobacter calcoaceticus* CSY-P13 mitigates stress of ferulic and p-hydroxybenzoic acids in cucumber by affecting antioxidant enzyme activity and soil bacterial community[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1262.
- [33] 刘淑艳, 王芳, 王建宇, 林榕珊. 根皮苷降解真菌的筛选、鉴定及降解特性研究[J]. 生物技术通报, 2017, 33(10): 143-147.
- LIU SY, WANG F, WANG JY, LIN RS. Isolation, identification and degrading properties of phlorizin-degrading fungi[J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(10): 143-147 (in Chinese).
- [34] 申云鑫, 李铭刚, 施竹凤, 赵江源, 王楠, 李者芬, 杨明英, 陈齐斌, 杨佩文. 贝莱斯芽胞杆菌 SH-1471 可湿性粉剂研制及其对番茄枯萎病的防治效果[J]. 中国生物防治学报, 2023, 39(4): 904-914.
- SHEN YX, LI MG, SHI ZF, ZHAO JY, WANG N, LI ZF, YANG MY, CHEN QB, YANG PW. Development of wettable powder of *Bacillus velezensis* SH-1471 and its control effect on tomato *Fusarium* wilt[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2023, 39(4): 904-914 (in Chinese).
- [35] 濮永瑜, 包玲凤, 何翔, 刘芮, 张庆, 施竹凤, 何永宏, 杨佩文. 烟草青枯病和黑胫病拮抗细菌的筛选、鉴定及防效研究[J]. 中国农学通报, 2022, 38(7): 116-123.
- PU YY, BAO LF, HE X, LIU R, ZHANG Q, SHI ZF, HE YH, YANG PW. Screening, identification and control efficacy of antagonistic bacteria against *Ralstonia solanacearum* and *Phytophthora parasitica*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2022, 38(7): 116-123 (in Chinese).
- [36] 王真真, 徐婷, 袁珊珊, 廖红东, 杨远柱, 曾夏冬, 李燕, 胡小淳, 柳倩. 水稻内生放线菌 OsiRt-1 的分离鉴定及对稻瘟病的防治作用[J]. 微生物学通报, 2016, 43(5): 1009-1018.
- WANG ZZ, XU T, YUAN SS, LIAO HD, YANG YZ, ZENG XD, LI Y, HU XC, LIU Q. Identification of an endophytic actinomyce OsiRt-1 isolated from rice and its effect against rice blast disease[J]. Microbiology China, 2016, 43(5): 1009-1018 (in Chinese).
- [37] RYU MH, ZHANG J, TOTH T, KHOKHANI D, GEDDES BA, MUS F, GARCIA-COSTAS A, PETERS JW, POOLE PS, ANÉ JM, VOIGT CA. Control of nitrogen fixation in bacteria that associate with cereals[J]. Nature Microbiology, 2020, 5(2): 314-330.
- [38] 何建清, 张格杰, 赵伟进, 王孝先, 卢玉君, 刘晓凤. 青根根际解有机磷细菌的筛选及对青稞种子萌发和幼苗的促生效应[J]. 高原农业, 2018(6): 601-606.
- HE JQ, ZHANG GJ, ZHAO WJ, WANG XX, LU YJ, LIU XF. Screening of organophosphorus degrading bacteria in rhizosphere of highland barley and their effects on seed germination and seedling growth of highland barley[J]. Journal of Plateau Agriculture, 2018(6): 601-606 (in Chinese).
- [39] 吴慧丽, 田薇, 纪燕玲, 姜来清, 蔡庆生. 促进镉吸收积累的植物根际促生菌的筛选及其对一年生黑麦草的影响[J]. 草业学报, 2021, 30(7): 53-61.
- WU HL, TIAN W, JI YL, LOU LQ, CAI QS. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria that promote cadmium absorption and accumulation and their effects on annual ryegrass[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2021, 30(7): 53-61 (in Chinese).