

研究报告

拮抗植物病原真菌的纤维素/木质素降解菌株的筛选及鉴定

张新杰¹, 周兴瑞¹, 孙慧颖¹, 孟亚南^{1,2}, 曾凡力^{*1,2}

1 河北农业大学生命科学学院, 河北 保定 071001

2 河北省植物生理学与病理学重点实验室, 河北 保定 071001

张新杰, 周兴瑞, 孙慧颖, 孟亚南, 曾凡力. 拮抗植物病原真菌的纤维素/木质素降解菌株的筛选及鉴定[J]. 微生物学通报, 2023, 50(1): 251-261.

ZHANG Xinjie, ZHOU Xingrui, SUN Huiying, MENG Ya'nian, ZENG Fanli. Screening and identification of cellulose/lignin-degrading strains against plant pathogenic fungi[J]. Microbiology China, 2023, 50(1): 251-261.

摘要:【背景】秸秆还田在改善土壤肥力和丰富营养等方面有重要作用,但是也存在秸秆难以快速降解利用和病原真菌病害威胁的问题。【目的】为解决还田秸秆的降解和病原真菌病害问题,从长期秸秆还田地区采集样品,从中筛选出具有降解秸秆和抑菌功能的菌株。【方法】采用稀释分离法、苯胺蓝染色法和刚果红染色法等对秸秆高效降解菌株进行筛选,通过16S rRNA基因测序及构建系统发育树进行菌株鉴定。采用对峙培养法测定筛选到的秸秆降解菌株对玉米大斑病菌(*Setosphaeria turcica*)、梨黑斑病菌(*Alternaria kikuchiana*)、马铃薯早疫病菌(*Alternaria solani*)、链格孢属真菌(*Alternaria alternata*) ACCC38230和ACCC38231等5种供试植物病原真菌的抑制作用。以玉米大斑病菌(*Setosphaeria turcica*)为后期供试植物病原真菌,测定拮抗菌株代谢产物的抑菌能力;通过观察拮抗菌株粗提液对玉米大斑病菌分生孢子萌发和菌丝生长的影响,从而测定菌株对病原真菌的抑制作用。【结果】从秸秆还田土壤中分离筛选获得3株高效降解纤维素及木质素菌株并命名为JY122、ZY133和JY215。通过形态学观察和16S rRNA基因测序鉴定上述菌株全部为芽孢杆菌属(*Bacillus*)。通过系统发育树分析结果表明,JY122与蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)相似性为99.4%,ZY133与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)相似性为100%,JY215与贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)相似性为99.1%。平板对峙实验结果显示,JY122、ZY133和JY215菌株对不同种属的植物病原真菌均有较强的抑制作用,抑制率高达43.74%–67.54%。此外,上述芽孢杆菌代谢产物具有抑菌活性及很强的热稳定性,经95℃处理后依然具有良好的抑菌效果。【结论】筛选获得的JY122、ZY133和JY215菌株具有高效降解纤维素/木质素能力,抑制多种植物病原真菌生长,代谢产物抑菌能力强且热稳定性高。这为玉米秸秆还田提供菌株资源,也为进一步解决秸

资助项目: 河北省重点研发计划(21322908D); 河北省“三三三人才工程”资助项目(C20221006)

This work was supported by the Key Research and Development Program of Hebei Province (21322908D) and the “Three-Three-Three Talent Project” Funded Project of Hebei Province (C20221006).

*Corresponding author. E-mail: shmzfl@hebau.edu.cn

Received: 2022-03-11; Accepted: 2022-07-17; Published online: 2022-08-17

秆还田难点提供了新方法和思路。

关键词：秸秆降解；植物病原真菌；芽孢杆菌；拮抗

Screening and identification of cellulose/lignin-degrading strains against plant pathogenic fungi

ZHANG Xinjie¹, ZHOU Xingrui¹, SUN Huiying¹, MENG Ya'nan^{1,2}, ZENG Fanli^{*1,2}

1 College of Life Sciences, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, Hebei, China

2 Key Laboratory of Plant Physiology and Pathology in Hebei Province, Baoding 071001, Hebei, China

Abstract: [Background] While improving soil fertility and nutrients, straw returning faces the challenge of slow straw degradation and threat of pathogenic fungi. [Objective] To screen efficient straw-degrading strains against the fungi from samples in areas with long-term straw returning. [Methods] The isolation by dilution in liquid, aniline blue staining, and Congo red staining were used to screen the efficient straw-degrading strains and the strains were identified based on 16S rRNA gene sequencing and phylogeny analysis. The inhibition of the screened straw-degrading strains on *Setostphaeria turcica*, *Alternaria kikuchiana*, *Alternaria solani*, and *Alternaria alternata* ACCC38230 and ACCC38231 was examined by the confrontation assay. Moreover, the ability of the metabolites of the antagonistic strains against *S. turcica* was determined, and the influence of the strains on conidial germination and hypha growth of *S. turcica* was detected with crude extract of antagonistic strains. [Results] Three efficient cellulose/lignin-degrading strains were screened out and named as JY122, ZY133, and JY215, which all belong to *Bacillus*. Phylogeny analysis revealed 99.4% similarity between JY122 and *Bacillus cereus*, 100% similarity between ZY133 and *Bacillus subtilis*, and 99.1% similarity between JY215 and *Bacillus velezensis*. The three had strong inhibitory effect on pathogenic fungi of different species with the inhibition rate in the range of 43.74%–67.54%. In addition, the metabolites of them showed antifungal activity and strong thermal stability, as the antifungal activity was still high after treatment at 95 °C. [Conclusion] JY122, ZY133, and JY215 show high efficiency in degrading cellulose/lignin and inhibit the growth of a variety of plant pathogenic fungi. The metabolites of the three have strong antifungal ability and high thermal stability. This study provides strain resources for returning maize straw and a method for tackling the challenges in straw returning.

Keywords: straw degradation; plant pathogenic fungi; *Bacillus*; antagonism

我国是农业大国，农作物秸秆种类繁多且产量极高。秸秆还田作为我国农业绿色发展战略之一，通过秸秆腐烂降解来提升土壤肥力和各种营养成分，改善土壤水热条件及营养条件。

此外，秸秆还田还有利于减少农业废弃物污染和秸秆焚烧带来的环境污染问题，减少化肥使用，提高经济效益，对农业可持续发展技术具有积极推动作用^[1-5]。

秸秆是重要的可再生生物质资源和工业生产原材料^[6], 其主要成分是纤维素、半纤维素和木质素。结构的复杂性造成秸秆难以被快速降解利用, 成为限制秸秆还田资源再利用的瓶颈^[7-11]。更重要的是, 秸秆携带各种植物病原真菌, 秸秆还田后病原真菌随之繁殖, 引起重要的真菌病害, 造成农作物产量和品质下降^[12-13]。解决秸秆还田问题的关键就是有效地破坏植物木质纤维素结构, 释放有价值的化学物质并且抑制病原真菌的生长。在自然条件下, 微生物在秸秆分解中起着至关重要的作用, 微生物数量及其种类会直接影响秸秆分解率的高低。与大多数以化学或物理方式对秸秆进行处理的方法相比, 利用微生物将秸秆进行还田所需条件较低并且更环保^[14-16]。目前, 生物防治是研究应用的热点。早期研究表明, 一些芽孢杆菌可以将木质素和与木质素相关的模型化合物代谢成各种低分子量化合物^[17-18]。Raj 等从造纸厂废水中筛选得到 3 株具有降解木质素能力的芽孢杆菌^[19]。Sapapporn 等^[20]从纸浆和造纸厂污泥中分离出 4 种不同的细菌菌株, 其中一株具有较高去除颜色和木质素能力并且被鉴定为芽孢杆菌。此外, 游景茂等从白术的根部筛选得到一株枯草芽孢杆菌 BZJN1, 该菌株对于白术根腐病具有良好的抑菌效果^[21]。芽孢杆菌具有超强的生存和繁殖能力, 可定殖于植物根系, 对人畜有益, 操作简单且技术成熟, 是开发和利用最广泛的生防菌类群^[22-23]。虽然芽孢杆菌的研究非常成熟, 但具有降解纤维素和木质素并且抑制植物病原真菌的芽孢杆菌尚未发现和鉴定。因此, 筛选同时具备降解纤维素和拮抗病原真菌的芽孢杆菌, 对于秸秆还田绿色农业发展具有重要意义。

本研究通过对河北省不同秸秆还田地区的土壤样品进行实验, 筛选能够高效降解纤维素/

木质素且对植物病原真菌具有拮抗作用的菌株, 并利用形态学和经典分子生物学方法对菌株进行鉴定, 同时对其代谢产物的热稳定性和抑菌效果进行分析, 以期明确其抑菌活性物质及机理提供理论基础, 为更好地解决秸秆还田带来的降解利用率低及真菌病害等问题提供有力手段和理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

植物病原真菌玉米大斑病菌(*Setostphaeria turcica*)、梨黑斑病菌(*Alternaria kikuchiana*)、马铃薯早疫病菌(*Alternaria solani*)、链格孢属真菌(*Alternaria alternata*) ACCC38230 和 ACCC38231 均由本实验室保存。

菌种分离样品于 2020 年采于河北省唐山市、沧州市、邯郸市大名县、石家庄市正定县、行唐县等市县农作物生长区土壤及田间废弃秸秆。

1.2 主要试剂和仪器

氢氧化钠、胰蛋白胨、无水乙醇、氯化钠、羧甲基纤维素钠、磷酸氢二钾、七水合硫酸镁、琼脂等, 福晨化学试剂有限公司(天津); DNA Marker, 北京博迈德基因技术有限公司; 质粒小提试剂盒 DP103、普通 DNA 产物纯化试剂盒 DP204、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 DP209, 天根生物科技有限公司(天津)。

T100 Thermal Cycler, Bio-Rad 公司; 智能生化培养箱, 宁波赛福实验仪器有限公司; 洁净工作台, 苏净安泰空气技术有限公司; 低速台式离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; 振荡培养箱, 上海旻泉仪器有限公司。

1.3 培养基

实验所用培养基按照参考文献[24-25]进行配制: PDA 培养基(g/L): 马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂 20.0, 自然 pH。LB 培养基(g/L):

胰蛋白胨 10.0, 氯化钠 10.0, 酵母浸粉 5.0。羧甲基纤维素钠(CMC-Na)培养基(g/L): 羧甲基纤维素钠 15.0, 琼脂粉 12.0, 蛋白胨 2.0, 氯化钠 1.0, 磷酸氢二钾 1.0, 酵母浸粉 1.0, 七水合硫酸镁 0.2。苯胺蓝培养基(g/L): 琼脂粉 12.0, 2% 苯胺蓝溶液 5 mL/L。1%刚果红染液: 刚果红粉末 1 g, 蒸馏水 100 mL。0.9%氯化钠溶液: 氯化钠 0.9 g, 蒸馏水 100 mL。

1.4 降解纤维素和木质素菌株分离纯化及筛选

1.4.1 菌株的分离纯化

称取 2 g 采集的样品, 加入 20 mL 无菌水, 25 °C、180 r/min 培养 20 min 后静置 30 min, 制备悬浮液。取 1 mL 上述悬浮液于 1.5 mL 离心管, 25 °C、10 000×g 离心 1 min。上清进行梯度稀释(10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5}), 涂布于 CMC-Na 培养基, 24 °C 倒置培养 2-3 d 至单克隆出现^[26]。用 LB 培养基连续划线进行纯化, 获得的菌株用 30%甘油保存于-80 °C超低温冰箱。

1.4.2 木质素降解菌的筛选

利用苯胺蓝脱色法进行木质素降解菌的筛选, 菌株通过产生漆酶等含铜的多酚氧化酶破坏苯胺蓝多酚键, 降解苯胺蓝而蓝色消失。取纯培养的单克隆菌株, 接种至 5 mL 的 LB 液体培养基, 于 25 °C、150 r/min 培养 48 h, 制备菌液。取上述 5 μL 菌液滴加至苯胺蓝培养基中, 晾干, 25 °C 倒置培养 24 h。观察苯胺蓝是否产生脱色圈^[27], 实验重复 3 次。

1.4.3 纤维素降解菌的筛选

利用刚果红染色方法进行纤维素降解菌的筛选, 刚果红可以和纤维素等多糖形成红色物质, 但是不能与水解后的纤维二糖和葡萄糖发生反应, 因此可以通过是否产生透明圈来进行纤维素降解菌株筛选。取纯培养的单克隆菌株, 接种至 5 mL 的 LB 液体培养基, 于 25 °C、150 r/min 培养 48 h, 制备菌液。取上述 5 μL 菌

液滴加至 CMC-Na 培养基中晾干, 25 °C 倒置培养 48 h 至菌落生长至适当大小。用 1%刚果红染液对上述平板染色 15 min, 弃去刚果红染液。用 0.9% NaCl 溶液对平板脱色 15 min, 弃去 NaCl 溶液^[24,26]。记录菌落生长区域及其周围是否出现明显透明圈。

1.5 拮抗菌株的筛选

将本实验供试病原菌接种至 PDA 培养基, 25 °C 倒置培养 3 d。在距离菌落边缘 1 cm 处打孔, 备用。挑取上述筛选得到的具有降解纤维素和木质素菌株的单克隆, 接种至 5 mL LB 液体培养基, 于 25 °C、150 r/min 培养 48 h, 菌液备用。取 5 μL 菌液分别加入到培养病原菌的 PDA 培养基打孔位置。24 °C 培养 3 d, 观察病原菌生长情况^[28]。

1.6 拮抗菌株对玉米大斑病菌分生孢子萌发的影响

取培养 15 d 的玉米大斑病菌, 向平皿中加入 5 mL ddH₂O, 用棉签轻轻刮取病菌分生孢子, 用两层纱布过滤, 收集孢悬液备用。将上述筛选得到的拮抗菌株制备粗提液。将玉米大斑病菌孢悬液与粗提液等体积混合, 滴加到玻璃纸进行诱导, 25 °C 培养每隔 2 h 观察孢子萌发情况^[25], 实验重复 3 次。

1.7 拮抗菌株代谢产物热稳定性及抑菌能力测定

采用硫酸铵沉淀的方法进行代谢产物产物提取^[29], 取 10 mL 菌液于 17 000×g 离心 10 min, 上清用硫酸铵过夜沉淀。然后 17 000×g 离心 10 min 收集沉淀, 沉淀用 1 mL PBS 缓冲液溶解, 各取 100 μL 进行如下处理: 95 °C 加热 15、20、25 和 30 min, 4 °C 保存备用。取等量上述不同处理的样品, 分别加入玉米大斑病菌培养基打孔的位置, 24 °C 培养 3 d, 观察病原菌生长情况。

1.8 拮抗细菌形态观察及生理生化特性分析

参照《常见细菌系统鉴定手册》^[30]对细菌菌落形态大小、菌落表面光泽度、凹凸度、菌落边缘平整性及透明度进行观察。

1.9 拮抗菌株的鉴定

挑取 LB 固体培养基上的单菌落接种至 5 mL LB 液体培养基, 25 °C、150 r/min 培养 24 h, 菌液为模板进行 PCR 验证。选择 16S rRNA 基因对菌株进行鉴定, 通用引物为 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 反应体系(50 μ L): 上、下游引物(10 μ mol/L)各 2 μ L, 模板 DNA 1 μ L, dNTP Mix (10 mmol/L) 0.5 μ L, 10 \times Long PCR Buffer 5 μ L, 0.5% BSA 1.5 μ L, *Pfu+Taq* (5 U/ μ L) 0.4 μ L, 加 ddH₂O 至 50 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 60 s, 30 个循环; 72 °C 5 min; 12 °C 10 min。PCR 扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测, PCR 产物在生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。测序结果利用 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)进行 BLAST 序列比对分析, 下载不同菌株相似度较高的序

列, 使用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 木质素降解菌的筛选结果

通过对采集的样品进行菌株分离纯化得到 99 株能够在 CMC-Na 平皿上生长的菌株。通过苯胺蓝平板脱色法进行木质素降解菌株筛选, 结果筛选到 9 株苯胺蓝脱色效果明显的菌株(图 1A), 分别为 JY122、BL219、ZY113、JY215、ZY133、ZY163、JY2234、JY1132 和 ZY123, 说明这些菌株具有降解木质素的功能。通过对脱色圈大小进行数据统计分析, 发现 JY122、BL219、JY215 和 ZY133 菌株脱色效果最好, ZY113 和 JY1132 菌株脱色效果较差(图 1B)。脱色圈越大, 降解木质素能力越强, 产生的酶越多。

2.2 纤维素降解菌的筛选结果

将分离纯化得到的 99 株菌进行纤维素降解功能筛选, 发现有 20 株可以在刚果红培养基中形成水解圈。其中 JY215、JY122 和 ZY133 菌株既可以在苯胺蓝培养基产生脱色圈, 也可以在刚果红培养基产生水解圈(图 2A)。

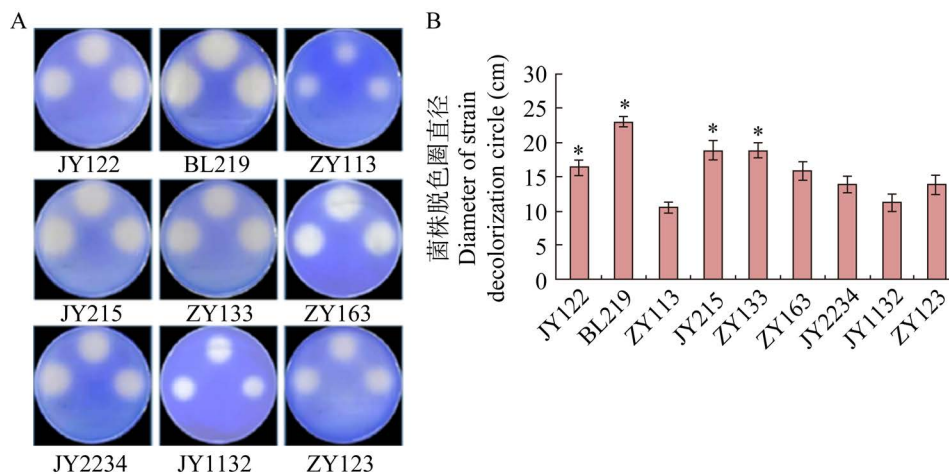


图 1 不同木质素降解菌苯胺蓝脱色圈(A)及其直径统计图(B)

Figure 1 Statistics of aniline blue decolorization circle (A) and diameter (B) of different lignin-degrading bacteria (B). *: $P < 0.05$.

通过对 JY215、JY122 和 ZY133 菌株刚果红水解圈直径和菌落直径比(D/d)进行统计分析,发现从大到小依次为 JY215、JY122、ZY133。JY215 和 JY122 菌株刚果红水解圈直径和菌落直径比(D/d)显著高于 ZY133 菌株(图 2B)。 D/d 比值越大,说明该菌产生的纤维素酶活性越高。因此,初步推测这 3 株菌具有降解纤维素和木质素的功能。

2.3 拮抗植物病原真菌的菌株筛选结果

利用平板对峙法发现菌株 JY215、JY122

和 ZY133 具有较广的抗菌谱,表现出对玉米大斑病菌、马铃薯早疫病菌、梨黑斑病菌和链格孢属真菌等 4 种植物病原真菌均有强烈的拮抗作用(图 3)。其中,对玉米大斑病菌拮抗能力最强,达到 50%左右,具有明显的抑菌效果。

2.4 拮抗菌株对玉米大斑病菌分生孢子萌发的影响

进一步探究 JY215、JY122 和 ZY133 拮抗菌株对病菌分生孢子的影响,结果如图 4 所示,

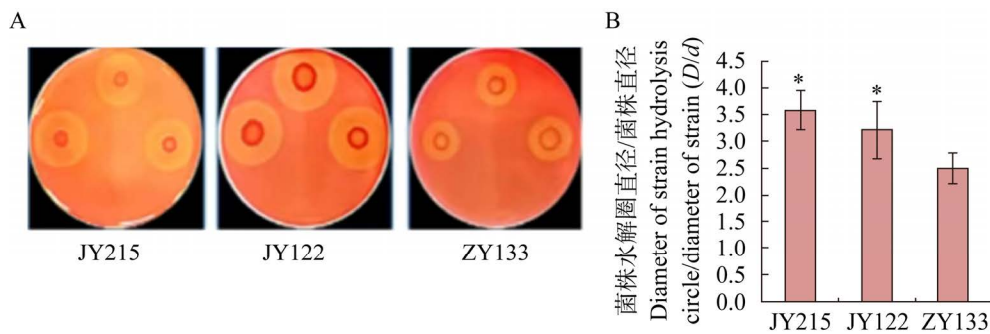


图 2 三株菌经刚果红染色后产生水解圈(A)及其直径比 D/d 统计图(B)

Figure 2 The three strains produced hydrolysis circles after staining with Congo red (A) and D/d (B). *: $P < 0.05$.

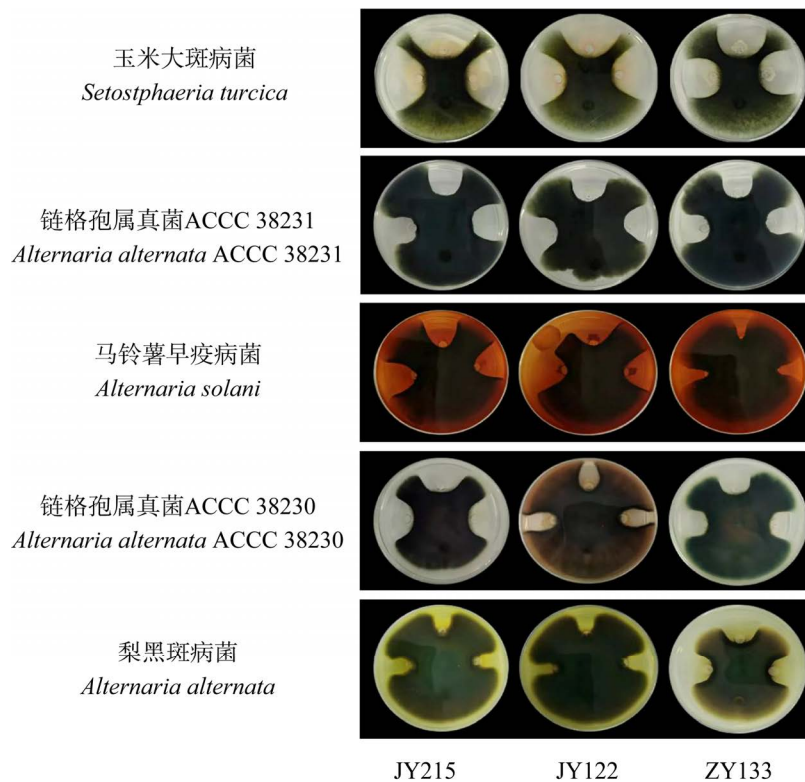


图 3 JY215、JY122 和 ZY133 对不同植物病原真菌抑制效果图

Figure 3 Antibacterial effects of JY215, JY122 and ZY133 on different phytopathogenic fungi.

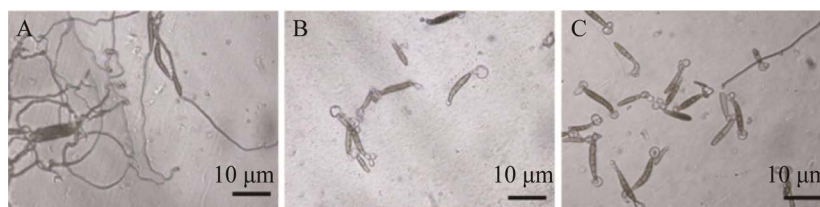


图4 JY215 (A)、JY122 (B)和 ZY133 (C)菌株抑制玉米大斑病菌分生孢子萌发

Figure 4 Strain JY215 (A), JY122 (B) and ZY133 (C) inhibited the germination of conidia of *Setostphaeria turcica*.

菌株 JY215、JY122 和 ZY133 粗提液能显著抑制玉米大斑病菌分生孢子萌发。将未处理组作为对照(图 4A), 24 °C 培养至 12 h 和 20 h, 对照组孢子已萌发, 而菌株 JY215、JY122 和 ZY133 粗提液处理组的分生孢子末端仍呈现末端膨大, 出现囊泡状结构, 未正常萌发(图 4B、4C)。

2.5 拮抗菌株代谢产物抑菌能力分析

将代谢产物 95 °C 处理 15、20、25 和 30 min, 结果显示, 经 95 °C 处理 30 min 仍然具有良好的抑菌效果(图 5)。因此, JY215、JY122 和 ZY133 拮抗菌株代谢产物具有较好的热稳定性和抑菌功能。

2.6 拮抗菌株形态特征

通过对 JY215、JY122 和 ZY133 菌株在 LB 培养基上划线培养, 进行菌落表型分析。结果显示, 在 LB 固体培养基上 JY215 和 JY122 菌

株呈现乳白色圆形, 表面光滑、湿润、黏稠, 不易挑起等特点, ZY133 菌株表面褶皱, 白色不透明, 干燥, 边缘锯齿状形成不规则圆形菌落。统计结果见表 1。通过培养发现, 这 3 株菌株生长速率较快, 温度适应性强, 在 4–50 °C 均可培养。

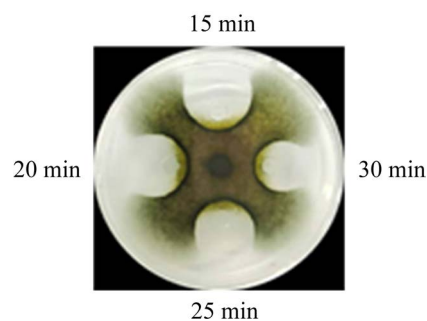


图5 ZY133 代谢产物 95 °C 处理后抑菌能力验证
Figure 5 Verification of the antibacterial ability of ZY133 metabolites treated at 95 °C.

表 1 拮抗菌株菌落形态表

Table 1 Colony morphology of antagonistic strains

| 菌株 | 颜色 | 干湿状况 | 形状 | 高度 | 透明度 | 边缘 |
|--------|-------------|--------------------|-------------------|--------|--------------|--------|
| Strain | Color | Moisture condition | Shape | Height | Transparency | Rim |
| JY215 | 乳白色 | 湿润、黏稠 | 圆形 | 凸起 | 透明 | 整齐 |
| | Milky white | Moist | Round | Convex | Transparent | Neat |
| JY122 | 乳白色 | 湿润、黏稠 | 圆形 | 凸起 | 透明 | 光滑 |
| | Milky white | Moist | Round | Convex | Transparent | Smooth |
| ZY133 | 白色 | 干燥 | 不规则圆形 | 扁平 | 不透明 | 褶皱 |
| | White | Dry | Irregularly round | Flat | Opaque | Fold |

2.7 拮抗菌株分子鉴定结果

将 3 株拮抗菌株进行 16S rRNA 基因序列鉴定,采用通用引物 27F 和 1492R 进行 PCR 扩增,条带大小在 1 500 bp 左右。通过在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>),发现 JY122 与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)部分序列相似度可达 99%, JY215 与解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)等具有较高相似度; ZY133 与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)序列相似度达 100%,与解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、特基拉芽孢杆菌(*Bacillus tequilensis*)等均具有较高的相似性。

利用 MEGA 软件构建系统发育树。结果显

示,菌株 JY122 与蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)相似性较高,菌株 ZY133 与枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)相似性较高, JY215 与贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*)相似度较高(图 6)。

3 讨论与结论

本研究首次从秸秆还田土壤中分离鉴定 3 株芽孢杆菌,三者均具有降解纤维素、木质素活性且具有抑菌活性。对玉米大斑病菌、马铃薯早疫病菌、梨黑斑病菌和链格孢属等 5 种植物病原真菌均有较好的拮抗活性。此外,代谢产物可导致玉米大斑病菌分生孢子萌发受到抑制,菌丝末端畸形、膨大等。推测这些菌株分泌物可能破坏病菌细胞壁完整性,从而造成菌丝发育受到抑制,并且这些物质具有良好的热稳

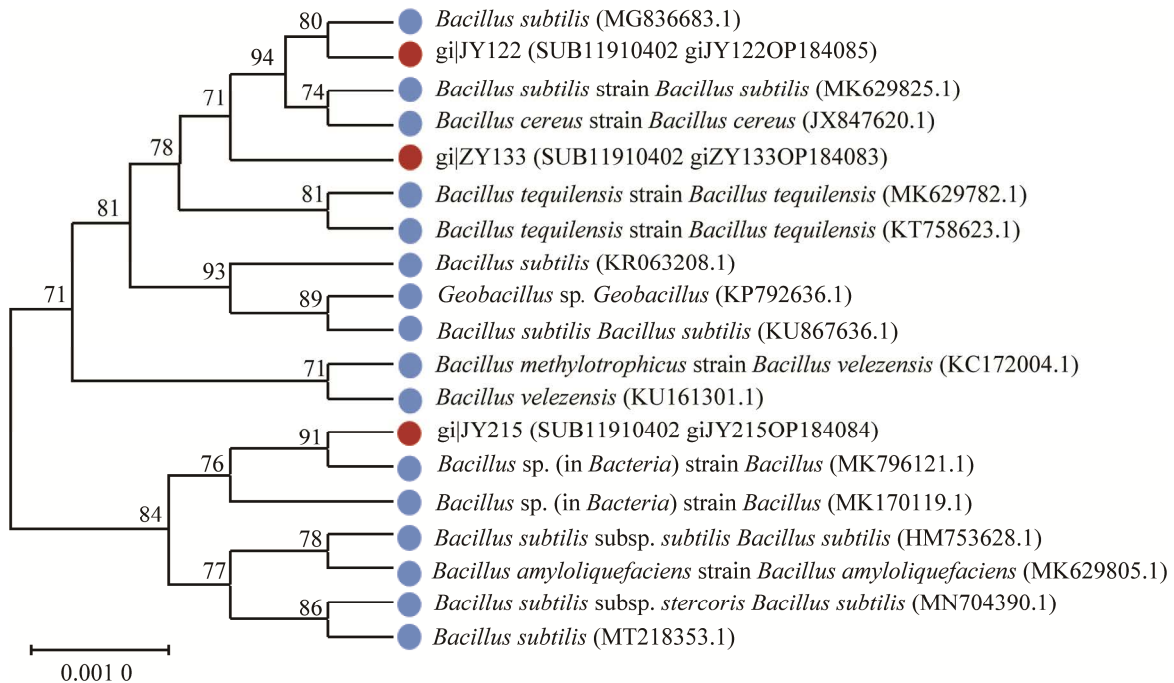


图 6 基于 16S rRNA 基因序列构建拮抗菌株 JY215、JY122 和 ZY133 的系统发育树 括号内的序号表示相应菌株在 GenBank 的登录号; 进化树的标尺和刻度表示进化距离

Figure 6 Phylogenetic tree of antagonistic strains JY215, JY122 and ZY133 based on 16S rRNA gene sequence. The sequence number in parentheses indicates the landing number of the corresponding strain in GenBank, and the scale and scale of the evolutionary tree indicate the evolutionary distance.

定性。本研究的部分内容与前人报道的基本一致。有研究表明,芽孢杆菌通过破坏真菌细胞壁而影响菌丝发育^[31]。张新杰等^[32]研究发现,菌株 L-14 对弯曲平脐蠕孢菌、禾谷镰孢菌和玉米大斑病菌等病菌均有很好的拮抗作用,产生的分泌物可抑制病菌菌丝和分生孢子的生长。刘彦策等^[33]研究发现,枯草芽孢杆菌 L10 对玉米茎腐病的禾谷镰孢菌有明显的拮抗作用,盆栽实验可以减轻茎腐病的发生程度,可作为生防菌剂。李永丽等^[34]研究发现,贝莱斯芽孢杆菌 Pm9 菌株具有可产生多种抗菌脂肽类物质的基因,以及纤维素酶和几丁质酶合成相关的基因,并且对不同的病原真菌具有良好的抑制作用。然而,本研究首次发现并鉴定三株菌同时具有降解纤维素/木质素和抑制病原真菌的能力,功能更加全面,用途也更加广泛。

秸秆还田作为我国绿色农业发展的战略之一,其难以降解和携带多种病原真菌是解决的关键问题^[35-37]。本研究从秸秆还田土壤中分离得到 JY215、JY122 和 ZY133 这 3 株芽孢杆菌,在加快秸秆降解资源再利用的同时抑制了植物病原菌的生长,使秸秆中残存病原菌对农作物的影响降低。本研究所得菌株与前人所得菌株相比可更完备地解决秸秆还田问题,其特性与优点使其更适用于秸秆还田后的耕地。取之于土,还之于土,不仅不会破坏生态环境而且还可以改善生态环境,对资源利用和生态维护具有重要意义。另外,研究还发现所得菌株的代谢产物具有较好的热稳定性。本研究对秸秆还田、防治植物病原菌病害等领域具有重要意义,为解决秸秆还田问题提供了新思路和理论基础。

REFERENCES

- [1] PALM C, BLANCO-CANQUI H, de CLERCK F, GATERE L, GRACE P. Conservation agriculture and ecosystem services: an overview[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2014, 187: 87-105.
- [2] KUANG EJ, CHI FQ, JENG AS, SU QR, ZHANG JM. A comparison of different methods of decomposing maize straw in China[J]. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science*, 2014, 63(sup2): 186-194.
- [3] 刘俊丽. 玉米秸秆还田的优势及技术探析[J]. *种子科技*, 2019, 37(8): 57-57, 61.
LIU JL. Advantages and techniques of returning corn straw to field[J]. *Seed Science & Technology*, 2019, 37(8): 57-57, 61 (in Chinese).
- [4] LI PP, HE C, LI G, DING P, LAN MM, GAO Z, JIAO YZ. Biological pretreatment of corn straw for enhancing degradation efficiency and biogas production[J]. *Bioengineered*, 2020, 11(1): 251-260.
- [5] FU SF, WANG F, YUAN XZ, YANG ZM, LUO SJ, WANG CS, GUO RB. The thermophilic (55 °C) microaerobic pretreatment of corn straw for anaerobic digestion[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 175: 203-208.
- [6] CHEN KJ, TANG JC, XU BH, LAN SL, CAO YK. Degradation enhancement of rice straw by co-culture of *Phanerochaete chrysosporium* and *Trichoderma viride*[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 19708.
- [7] CHEN XL, YU J, ZHANG ZB, LU CH. Study on structure and thermal stability properties of cellulose fibers from rice straw[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 85(1): 245-250.
- [8] 张崎峰. 玉米秸秆还田存在的问题及对策[J]. *中国西部科技*, 2014, 13(3): 73, 126.
ZHANG QF. Problems and countermeasures of straw returning[J]. *Science and Technology of West China*, 2014, 13(3): 73, 126 (in Chinese).
- [9] 李钦存. 玉米秸秆还田的负面效应及解决途径[J]. *基层农技推广*, 2014, 2(8): 44-45.
LI QC. Negative effects of returning corn straw to field and solutions[J]. *Primary Agricultural Technology Extension*, 2014, 2(8): 44-45 (in Chinese).
- [10] 石祖梁, 刘璐璐, 王飞, 李想, 常志州. 我国农作物秸秆综合利用发展模式及政策建议[J]. *中国农业科技导报*, 2016, 18(6): 16-22.
SHI ZL, LIU LL, WANG F, LI X, CHANG ZZ. Development model and policy proposal for comprehensive utilization of crop straw in China[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2016, 18(6): 16-22 (in Chinese).
- [11] YANG HS, ZHAI SL, LI YF, ZHOU JJ, HE RY, LIU J, XUE YG, MENG YL. Waterlogging reduction and wheat yield increase through long-term ditch-buried straw

- return in a rice—Wheat rotation system[J]. *Field Crops Research*, 2017, 209: 189-197.
- [12] 蔡武宁, 何艳丽, 朱坤, 王红丽. 秸秆全面禁烧后的病虫害防控[J]. *现代农业科学*, 2009, 16(3): 170-171.
CAI WN, HE YL, ZHU K, WANG HL. How to strengthen the control of diseases and pests after overall burning of straw[J]. *Modern Agricultural Sciences*, 2009, 16(3): 170-171 (in Chinese).
- [13] 马海英. 谈玉米秸秆还田与小麦病虫害防治配套技术措施[J]. *农家参谋*, 2019(13): 76.
MA HY. Discussion on supporting technical measures of corn straw returning to field and wheat pest control[J]. *The Farmers Consultant*, 2019(13): 76 (in Chinese).
- [14] 黄金枝, 胡桂萍, 俞燕芳, 杜贤明, 石旭平, 王军文. 微生物在农业废弃物堆肥应用中的研究进展[J]. *广东农业科学*, 2019, 46(1): 64-70.
HUANG JZ, HU GP, YU YF, DU XM, SHI XP, WANG JW. Research progress of microbe in agricultural waste composting[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2019, 46(1): 64-70 (in Chinese).
- [15] MA JS, ZHANG KK, HUANG M, HECTOR SB, LIU B, TONG CY, LIU Q, ZENG JR, GAO Y, XU T, LIU Y, LIU XM, ZHU YH. Involvement of Fenton chemistry in rice straw degradation by the lignocellulolytic bacterium *Pantoea ananatis* Sd-1[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9(1): 211.
- [16] WANG X, WANG XX, GENG P, YANG Q, CHEN K, LIU N, FAN YL, ZHAN XM, HAN XR. Effects of different returning method combined with decomposer on decomposition of organic components of straw and soil fertility[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 15495.
- [17] JOKELA J, PELLINEN J, SALKINOJA-SALONEN M. Initial steps in the pathway for bacterial degradation of two tetrameric lignin model compounds[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987, 53(11): 2642-2649.
- [18] KUMAR L, RATHORE V, SRIVASTAVA H. 14C-[lignin]-lignocellulose biodegradation by bacteria isolated from polluted soil[J]. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2001, 39(6): 584-589.
- [19] RAJ A, KRISHNA REDDY MM, CHANDRA R. Identification of low molecular weight aromatic compounds by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) from kraft lignin degradation by three *Bacillus* sp[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2007, 59(4): 292-296.
- [20] SAPAPPORN N, CHAIJAMRUS S, CHATDUMRONG W, TOCHAMPA W. Degradation and polymerization of black liquor lignin using *Bacillus* sp. isolated from a pulp mill[J]. *BioResources*, 2018, 14(1): 1049-1076.
- [21] 游景茂, 熊坤, 穆森, 郭杰, 郭晓亮, 段媛媛, 李娟, 曹凡, 邹宗成, 谭海. 内生细菌 BZJN1 的鉴定及对白术根腐病的生物防治研究[J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(3): 478-483.
YOU JM, XIONG K, MU S, GUO J, GUO XL, DUAN YY, LI J, CAO F, ZOU ZC, TAN H. Identification of endophytic bacteria BZJN₁ and research on biological control of root rot of *Atractylodes macrocephala*[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2018, 43(3): 478-483 (in Chinese).
- [22] 徐莹莹, 王俊河, 刘玉涛, 高盼, 王宇先, 杨慧莹, 于侃超, 葛选良, 迟莉, 樊景胜. 秸秆不同还田方式对土壤物理性状、玉米产量的影响[J]. *玉米科学*, 2018, 26(5): 78-84.
XU YY, WANG JH, LIU YT, GAO P, WANG YX, YANG HY, YU KC, GE XL, CHI L, FAN JS. Effects of different returning methods of straw on soil physical property, yield of corn[J]. *Journal of Maize Sciences*, 2018, 26(5): 78-84 (in Chinese).
- [23] 孟建宇, 陈勿力吉玛, 郭慧琴, 冯福应, 陈玉萍. 常温和低温纤维素降解菌的分离及其降解特性[J]. *农业生物技术学报*, 2021, 29(1): 73-84.
MENG JY, CHEN W, GUO HQ, FENG FY, CHEN YP. Isolation and degradation characteristics of cellulose-degradation bacteria at room and low temperature[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2021, 29(1): 73-84 (in Chinese).
- [24] 白洪志. 降解纤维素菌种筛选及纤维素降解研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学博士学位论文, 2008.
BAI HZ. Screening of cellulose degradation fungi and the study of its degradation characteristics[D]. Harbin: Doctoral Dissertation of Harbin Institute of Technology, 2008 (in Chinese).
- [25] ZENG FL, MENG YN, HAO ZM, LI P, ZHAI WB, SHEN S, CAO ZY, DONG JG. *Setosphaeria turcica* ATR turns off appressorium-mediated maize infection and triggers melanin-involved self-protection in response to genotoxic stress[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2020, 21(3): 401-414.
- [26] 李慧君. 秸秆纤维素降解菌的筛选及其利用研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2010.
LI HJ. The filtration and use of microorganism with cornstalk-fibre catabolism ability[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2010 (in Chinese).
- [27] 王华, 刘小刚, 罗华, 杨光. 木质素降解菌筛选及葡萄枝条木质素降解研究[J]. *西北农业学报*, 2009, 18(5): 302-305, 311.

- WANG H, LIU XG, LUO H, YANG G. Screening of lignin-degrading fungi and study of lignin degradation of vineyard pruning[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2009, 18(5): 302-305, 311 (in Chinese).
- [28] 黄建凤, 张发宝, 逢玉万, 黄巧义, 唐拴虎, 付弘婷, 杨苞梅. 两株香蕉枯萎病拮抗细菌的筛选及抑菌机理[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(4): 835-844.
- HUANG JF, ZHANG FB, PANG YW, HUANG QY, TANG SH, FU HT, YANG BM. Inhibition of banana *Fusarium* wilt by two biocontrol agents[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(4): 835-844 (in Chinese).
- [29] 杨帆, 李新民, 刘春来, 王爽, 夏吉星, 王克勤, 刘兴龙, 邵天玉, 徐充. 解淀粉芽孢杆菌抑菌活性初步研究[J]. *黑龙江农业科学*, 2015(9): 55-59.
- YANG F, LI XM, LIU CL, WANG S, XIA JX, WANG KQ, LIU XL, XU C. Study on antifungal substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, 2015(9): 55-59 (in Chinese).
- [30] 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).
- [31] 仇艳肖. 黄瓜灰霉病高效拮抗菌的筛选鉴定及其作用研究[D]. 石家庄: 河北师范大学硕士学位论文, 2012.
- QIU YX. Study on screening, identification and effect of efficient antagonistic bacteria against *Botrytis cinerea*[D]. Shijiazhuang: Master's Thesis of Hebei Normal University, 2012 (in Chinese).
- [32] 张新杰, 刘彦策, 钱欣雨, 肖生林, 于波, 董金皋, 郝志敏. 弯曲平脐蠕孢拮抗细菌的筛选、鉴定及拮抗作用[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(8): 2417-2424.
- ZHANG XJ, LIU YC, QIAN XY, XIAO SL, YU B, DONG JG, HAO ZM. Isolation, identification and characterization of an antagonistic bacterium against *Bipolaris papendorffii*[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(8): 2417-2424 (in Chinese).
- [33] 刘彦策, 王会敏, 钱欣雨, 李慧颖, 申坤, 郝志敏, 董金皋. 玉米内生菌 L10 的分离、鉴定及拮抗活性[J]. *植物保护学报*, 2021, 48(3): 630-637.
- LIU YC, WANG HM, QIAN XY, LI HY, SHEN S, HAO ZM, DONG JG. Isolation, identification and antagonistic activity of maize endophyte L10[J]. *Journal of Plant Protection*, 2021, 48(3): 630-637 (in Chinese).
- [34] 李永丽, 周洲, 曲良建, 尹新明. 贝莱斯芽孢杆菌 Pm9 生物防治潜力及全基因组分析[J]. *河南农业大学学报*, 2021, 55(6): 1081-1088.
- LI YL, ZHOU Z, QU LJ, YIN XM. Biological control potential and complete genome analysis of *Bacillus velezensis* Pm₉[J]. *Journal of Henan Agricultural University*, 2021, 55(6): 1081-1088 (in Chinese).
- [35] DOMAŃSKI J, MARCHUT-MIKOŁAJCZYK O, CIECIURA-WŁOCH W, PATELSKI P, DZIEKOŃSKA-KUBCZAK U, JANUSZEWICZ B, Zhang BL, DZIUGAN P. Production of methane, hydrogen and ethanol from *Secale cereale* L. straw pretreated with sulfuric acid[J]. *Molecules*, 2020, 25(4): 1013.
- [36] 侯金丽. 微生物技术在秸秆转化利用中的应用研究进展[J]. *中国西部科技*, 2015, 14(3): 72-73.
- HOU JL. Applied research progress of microbial technologies in straw conversion and utilization[J]. *Science and Technology of West China*, 2015, 14(3): 72-73 (in Chinese).
- [37] REHMAN N, de MIRANDA MIG, ROSA SML, PIMENTEL DM, NACHTIGALL SMB, BICA CID. Cellulose and nanocellulose from maize straw: an insight on the crystal properties[J]. *Journal of Polymers and the Environment*, 2014, 22(2): 252-259.