



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103361292 B

(45) 授权公告日 2015.03.25

(21) 申请号 201310317073.9

A01P 3/00(2006.01)

(22) 申请日 2013.07.25

C12R 1/085(2006.01)

(83) 生物保藏信息

审查员 王溯铭

CGMCC NO :7767 2013.06.20

(73) 专利权人 四川农业大学

地址 611130 四川省成都市温江区惠民路  
211 号

(72) 发明人 朱天辉 李姝江 邵宝林 张静

韩珊 譙天敏 郑磊 张丽娜

(74) 专利代理机构 北京众合诚成知识产权代理

有限公司 11246

代理人 龚燮英

(51) Int. Cl.

C12N 1/20(2006.01)

A01N 63/02(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54) 发明名称

蜡样芽孢杆菌 B2 菌株、液体制剂及其制作方法和在防治杂交竹白纹羽病中的应用

(57) 摘要

本发明公开了蜡样芽孢杆菌 B2 菌株、液体制剂及其制作方法和在防治杂交竹白纹羽病中的应用;该菌株已于 2013 年 6 月 20 日保藏在中国北京市朝阳区中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC),保藏编号为 CGMCC NO :7767,分类命名为蜡样芽孢杆菌 *Bacillus cereus*。未发病杂交竹用上述液体制剂 100-200 倍(体积比)稀释度沿根系幅面灌根,每株 100 毫升,每年春季施用一次,可预防白纹羽病发生。发病杂交竹按 50-100 倍(体积比)稀释度沿根系幅面灌根及附近土壤淋灌,每株 200 毫升,春、夏各一次,连续三年,可效治疗白纹羽病。

1. 蜡样芽孢杆菌 B2 菌株,保藏编号为 CGMCC NO :7767。
2. 含有权利要求 1 所述的蜡样芽孢杆菌 B2 菌株的液体制剂。
3. 根据权利要求 1 所述的 B2 菌株在防治杂交竹白纹羽病中的应用。
4. 根据权利要求 2 所述的液体制剂的制作方法,其特征在于,包括以下步骤:
  - ①一级斜面种子:常规方法制作牛肉膏蛋白胨斜面培养基,接种蜡样芽孢杆菌 B2 后在 26-28℃下培养 24-36 小时制成一级种子;
  - ②二级液体种子:营养肉质培养液经高压灭菌后,按 100mL 液体盛于 300mL 三角瓶比例装瓶,在无菌状态接种蜡样芽孢杆菌 B2 斜面种子,每瓶接种 2 支斜面种子,温度 26-28℃,初始 pH 值 6.0,120r/min 振荡培养 36h,制成蜡样芽孢杆菌 B2 液体种子;
  - ③液体发酵:营养肉质培养液经高压灭菌后,按 200mL 液体盛于 500mL 三角瓶比例装瓶,在无菌状态接种 B2 液体种子,接种量 10%体积比,温度 26-28℃,初始 pH 值 6.0,120r/min 振荡培养 72h,制成 B2 液体制剂;营养肉质培养液:牛肉膏 7.0g,蛋白胨 10g,NaCl 5g,竹根浸渍液 1000mL,竹根浸渍液:10g 竹根在 1000ml 水中煮沸 10 分钟,除去根残体,取其滤液即得。

## 蜡样芽孢杆菌 B2 菌株、液体制剂及其制作方法和在防治杂交竹白纹羽病中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及的是一株蜡样芽孢杆菌 B2 菌株、液体制剂及其制作方法和在防治杂交竹白纹羽病中的应用。

### 背景技术

[0002] 撑 × 绿杂交竹是南方重要的经济用材竹,也是四川等地引种发展的主要经济竹种之一。近年来,由褐坚壳菌 [*Rosellinia necatrix* (Hart.) Berl.] 引起的杂交竹白纹羽病导致根系腐烂、竹整株枯死,造成较大的经济损失,极大地威胁着长江中上游地区退耕还林进程和生态屏障建设。目前主要采用化学防治和营林技术,而生物防治措施研究尚未涉及。化学防治虽是一种有效的防治手段,但存在病原菌抗药性、环境与食品安全、药害等许多实际问题,一些化学杀菌剂在许多发达国家和地区已严格限制使用。而与环境友好的生物农药越来越受到人们的青睐,是未来农业可持续发展的重要组成部分。该病土传根病侵染循环不明显,发病环境相对稳定,最适宜于生物防治,该技术是生态学领域的一个应用学科分支,是基于生态平衡的原理,引进有益生物基因或基因产物,达到稳定、有效地防治靶标病(虫),生物农药是利用生物活体或者其代谢产物对有害生物进行防治的一类制剂,是生物防治的物质基础和重要手段。

### 发明内容

[0003] 本发明人在杂交竹根际中发现蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 一新菌株 B2,能有效预防和治疗杂交竹白纹羽病。

[0004] 该菌株于 2010 年 6 月 14 日分离自四川雅安市天全县杂交竹根际。经形态,生理,分子鉴定为蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*);该菌株已于 2013 年 6 月 20 日保藏在中国北京市朝阳区中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC),保藏编号为 CGMCC NO:7767,分类命名为蜡样芽孢杆菌 *Bacillus cereus*。

[0005] B2 发酵液经稀释后,对杂交竹白纹羽病菌表现出不同的防治效果,原液至 200 倍以下效果显著,特别是 50 倍以下,可基本上控制病害不发生。未发病杂交竹用上述液体制剂 100-200 倍 (体积比) 稀释度沿根系幅面灌根,每株 100 毫升,每年春季施用一次,可预防白纹羽病发生。发病杂交竹按 50-100 倍 (体积比) 稀释度沿根系幅面灌根及附近土壤淋灌,每株 200 毫升,春、夏各一次,连续三年,可效治疗白纹羽病。

### 具体实施方式

[0006] 以下结合具体实施例,对本发明进行详细说明。

[0007] (一) 蜡样芽孢杆菌 B2 菌株筛选

[0008] 1.1 供试病原菌

[0009] 供试病原菌为杂交竹白纹羽病菌 [*Rosellinia necatrix* (Hart.) Berl.]。

### [0010] 1.2 芽孢的分离和纯化

[0011] 取杂交竹根际土壤(表层 10cm 以下)装入无菌样品袋带回实验室,备用。每份样品称量 10g,转至装有 90mL 生理盐水和少量玻璃珠的三角瓶中,充分混匀后制成土壤悬浮液,放入 100℃水浴中加热 5min。冷却后,无菌条件下取 1mL 加入装有 9mL 无菌水的试管中,充分混匀得到  $10^{-2}$  的样品稀释液,按照此法依次稀释,分别获得  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  和  $10^{-6}$  的土壤稀释液,取  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  和  $10^{-6}$  的土壤稀释液各 0.1mL,分别采用稀释平板涂布法将其涂布在 LB 培养基上,倒置在 30℃恒温培养箱中,48h 后根据菌落形态特征,挑取单菌落进行平板划线,以保证菌落纯度,分别保存于斜面中,保存备用。

### [0012] 1.3 生防芽孢杆菌的初筛

[0013] 将斜面培养的产孢白纹羽病菌用无菌水洗出分生孢子,用移液枪取 1mL 加入无菌培养皿中,然后倒入 45℃左右的 PDA 培养基 15mL,充分混合均匀,冷却后制成含菌平板。采用点菌法,接种分离获得的芽孢杆菌,倒置在 30℃恒温培养箱中,24h 后观察有无抑菌圈产生进行生防芽孢杆菌的筛选,并做好记录。

[0014] 分离共获得 36 株芽孢杆菌,根据菌落形态、颜色、边缘、光学特性以及是否产生色素进行合并后,共 25 株。分别通过点菌法进行拮抗测定,筛选出杂交竹白纹羽病菌具有较强拮抗作用的菌株 4 株,占总数的 16%。抑菌圈直径达到 5mm 以上的共 3 株,其中 B2 菌株拮抗作用最强,抑菌圈直径均达到 14mm 左右;其次是 B21,抑菌圈直径均达到 8mm 左右;B2A 抑菌圈最小,仅达到 5mm。

### [0015] 1.4 发酵液活性的测定(复筛)

[0016] 上述 1.3 中筛选出抑菌活性较强的芽孢杆菌菌株,活化后分别将其接种于 LB 肉汤培养液中,30℃,120r/min 的恒温摇床中培养,培养 24h 后,作为种子液以 1:1 比例加入含有葡萄糖的 LB 肉汤培养基,30℃,120r/min 的恒温摇床中培养 48h 后取出,用牛津杯法和打孔法进行抑菌试验,检测发酵液是否有抑菌活性。

[0017] 待测生防菌株发酵后,静置,取上清液,3500r/min,离心 5min,取上清液分别采用打孔法、牛津杯法对指示病原菌进行拮抗测定。

[0018] 采用打孔法,将指示病原菌分生孢子接种在平板上,直径 5mm 打孔器打孔后,在孔中加入待测的生防菌发酵液,测得 B2A、B2-1 基本不产生抑菌圈,而 B2 菌株抑菌圈直径达到  $20\text{mm} \pm 0.6\text{mm}$ ,说明 B2 对杂交竹白纹羽病菌具有较好的抑制作用。

[0019] 采用牛津杯法对发酵液进行拮抗活性的测定,测得 B2 具有一定的拮抗活性,发酵液对病原菌的抑菌圈直径达到  $13\text{mm} \pm 0.5\text{mm}$ ,而 B2A 和 B2-1 基本看不出抑菌圈,发酵液无抑菌活性。

### [0020] 1.5 发酵滤液活性的测定

[0021] 用移液枪吸取 5mL 经过 24h 培养的种子液,加入装有 45mL 含葡萄糖的 LB 肉汤培养液的 250mL 三角瓶中,30℃,120r/min 的恒温摇床中培养,36h 后,经 3000r/min,离心 5min 后,取上清液,用 0.2  $\mu\text{m}$  细菌过滤器过滤,获得无细胞发酵滤液。取 0.1mL 病原菌稀释液涂布于平板上,采用牛津杯法、打孔法测定发酵滤液对病原菌的抑菌活性,重复 3 次,并设对照,2d 后测量抑菌圈直径。

[0022] 同时对发酵液进行 121℃,15min 高温处理,按照上述方法检测拮抗活性的有无。

[0023] 结合 1.3 和 1.4 实验结果,筛选出最佳生防芽孢杆菌进行后续试验。

[0024] B2 菌株经发酵后,取其上清液用细菌过滤器(直径 0.2  $\mu\text{m}$ ) 过滤后获得无菌发酵滤液,用打孔法和牛津杯法分别测定抑菌活性测定。结果表明, B2 菌株经发酵后获得无细胞发酵滤液对指示病原菌表现出一定的拮抗效果,打孔法和牛津杯法产生的抑菌圈带宽分别为  $4\text{mm} \pm 0.5\text{mm}$  和  $3\text{mm} \pm 0.2\text{mm}$ 。发酵滤液经过  $121^\circ\text{C}$ ,  $15\text{min}$  高温处理后仍具有拮抗活性,说明抑菌代谢产物具有耐热性。

[0025] 1.6 盆栽试验

[0026] 选取一年生盆杂交竹为实验对象, PDA 斜面白纹羽病菌分生孢子( $3 \times 10^3$ ) 接种根系一周后,用筛选出的生防菌经发酵后,取其发酵液采用灌根法分不同浓度对竹苗进行灌根处理,每盆 200mL,并以无菌水作对照,重复 3 次,统计杂交竹发病情况。

[0027] 表 1 盆栽试验 30d 后的防治效果

[0028]

处理	稀释倍数 (体积比)	发病率 (%)
B2	-	1
	50	5
	100	10
	200	15
	500	40
	1000	50
CK	-	95

[0029] B2 发酵液经稀释后,表现出不同的防治效果,原液至 200 倍以下效果显著,特别是 50 倍以下,可基本上控制病害不发生。

[0030] (二) 田间防治实例

[0031] 1、B2 液体制剂制作

[0032] ①一级斜面种子:常规方法制作牛肉膏蛋白胨斜面培养基(牛肉膏 7.0g, 蛋白胨 10g, NaCl 5g, 琼脂 17g, 水 1000mL),接种蜡样芽孢杆菌 B2 后在  $26-28^\circ\text{C}$  下培养 24-36 小时制成一级种子。

[0033] ②二级液体种子:营养肉质培养液(牛肉膏 7.0g, 蛋白胨 10g, NaCl 5g, 竹根浸渍液 1000mL)经高压灭菌后,按 100mL 液体盛于 300mL 三角瓶比例(通氧控制)装瓶,在无菌状态接种蜡样芽孢杆菌 B2 斜面种子,每瓶接种 2 支斜面种子,温度  $26-28^\circ\text{C}$ , 初始 pH 值 6.0,  $120\text{r}/\text{min}$  振荡培养 36h,制成蜡样芽孢杆菌 B2 液体种子。

[0034] ③液体发酵:营养肉质培养液(牛肉膏 7.0g, 蛋白胨 10g, NaCl 5g, 竹根浸渍液 1000mL, 竹根浸渍液:10g 竹根在 1000ml 水中煮沸 10 分钟,除去根残体,取其滤液即得)经高压灭菌后,按 200mL 液体盛于 500mL 三角瓶比例(通氧控制)装瓶,在无菌状态接种 B2 液体种子,接种量 10%(体积比),温度  $26-28^\circ\text{C}$ , 初始 pH 值 6.0,  $120\text{r}/\text{min}$  振荡培养 72h,制成

B2 液体制剂。

[0035] ④制剂保存：瓶装制剂常温保存半年或低温（4 度）1 年半不影响防治和治疗效果。

[0036] 2、田间预防与治疗

[0037] ①预防处理：未发病杂交竹用上述液体制剂 100-200 倍（体积比）稀释度沿根系幅面灌根，每株 100 毫升，每年春季施用一次，可预防白纹羽病发生。

[0038] ②防治处理：发病杂交竹按 50-100 倍（体积比）稀释度沿根系幅面灌根及附近土壤淋灌，每株 200 毫升，春、夏各一次，连续三年，可效治疗白纹羽病。

[0039] 表 2 蜡样芽孢杆菌(B. cereus) B2 预防效果：未发病杂交竹林地(1 年生)

[0040]

处理	稀释倍数	发病率 (%)
B2	—	0
	50	0
	100	0
	200	0

[0041]

	500	2
	1000	4
CK	—	19

[0042] 表 3 蜡样芽孢杆菌(B. cereus) B2 治疗效果：发病杂交竹林地(处理 1 年后)

[0043]

处理	稀释倍数	发病率 (%)	相对防治效果 (%)
B2	-	10	90
	50	15	85
	100	20	80
	200	30	70
	500	40	60
	1000	60	40
CK (自然发病)	-	100	

[0044] 应当理解的是,对本领域普通技术人员来说,可以根据上述说明加以改进或变换,而所有这些改进和变换都应属于本发明所附权利要求的保护范围。