

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 1/20

A01N 63/00



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02135876.1

[45] 授权公告日 2005 年 10 月 5 日

[11] 授权公告号 CN 1221659C

[22] 申请日 2002.12.14 [21] 申请号 02135876.1
 [71] 专利权人 山西省农业科学院植物保护研究所
 地址 030031 山西省太原市农科北路 64 号植
 保所
 [72] 发明人 乔雄梧 马利平 高 芬 郝变青
 审查员 宋智刚

[74] 专利代理机构 山西太原科卫专利事务所
 代理人 朱 源

权利要求书 1 页 说明书 6 页

[54] 发明名称 一种以蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 98-I 菌株制备微生物杀菌剂的生产方法

[57] 摘要

本发明为一种以蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 98-I 菌株制备微生物杀菌剂的生产方法, 蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 98-I 菌株广谱性好, 抑菌活性高, 且对多种植物有促生和促进种子发芽的作用, 对植物有诱导抗性作用。以该菌株制备微生物杀菌剂的生产方法, 其生产工艺流程包含斜面菌种制备、摇床菌种制备、一级菌种制备和大罐发酵, 并给出了每一工艺步骤的相关参数。该微生物杀菌剂的广谱性决定了其推广应用的广泛性和广阔性, 不仅可防蔬菜、瓜类土传病害, 而且对花卉、草坪的土传病害也有防治效果。该杀菌剂还具有促生作用。该微生物杀菌剂具有良好的经济和社会效益, 符合生态农业、可持续农业的要求。

ISSN 1008-4274

1、一种以蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 98-I 菌株制备微生物杀菌剂的生产方法, 其生产工艺流程包含斜面菌种制备、摇床菌种制备、一级菌种制备和大罐发酵, 其特征为:

——斜面菌种制备的工艺条件为: PDA 培养基, 28℃, 48 小时

——摇床菌种制备的工艺条件为: ①号培养基, 28-42℃, 摇床转速 150-200 转/分, 48 小时, ①号培养基为: 马铃薯 20%, 葡萄糖 1.5-3.0%, 氯化钠 0.2-0.5%, 磷酸二氢钾 0.1-0.6%, 其余为水

——一级菌种制备的工艺条件为: ②号培养基, 28-42℃, 发酵罐转速 150-280 转/分, 48 小时, PH 值 4-10, 通气量 1: 1, ②号培养基为: 玉米粉 0.2-0.5%, 豆粉 0.2-0.5%, 葡萄糖 3-6%, 氯化钠 0.1-0.8%, 磷酸二氢钾 0.1-0.8%, 硫酸铵 0.1-0.8%, 蛋白胨 0.1-0.8%, 硫酸镁 0.01-0.05%, 硫酸锌 0.01-0.05%, 其余为水

——大罐发酵的工艺条件为: ②号培养基, 28-42℃, 发酵罐转速 150-280 转/分, 48 小时, PH 值 4-10, 通气量 1: 1。

一种以蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 98-I 菌株制备微生物杀菌剂的生产方法

技术领域

本发明涉及一种细菌菌株，具体为一种蜡状芽孢杆菌的菌株，同时涉及以该菌株制备微生物杀菌剂的生产方法。

背景技术

蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 属于芽孢杆菌属。目前，国内外有蜡状 (质) 芽孢杆菌的不同菌株用于植物病菌、病害防治及促生作用的文献报道，国内如 B. C. sp 对稻瘟病菌的抑制，B. C. S14 对棉花病害的防治和促生作用，B. C. R2 对水稻纹枯病的防治，B. C. 752 对水稻、西瓜、玉米有促生作用和对病菌孢子有消解作用，B. C. CS51 对水仙褐斑病有拮抗作用，B. C. B₀₁₇ 能促进苹果幼苗生长，B. C 对小麦全蚀病菌和棉花枯萎病有拮抗作用等；国外如蜡状芽孢杆菌 B. C. uw85、B. C. S18、B. C. W35、B. C. 28、B. C. B₀、B. C. DGA34、B. C. MS1-9、B. C. AS4-12 等菌株主要对番茄、黄瓜猝倒病 (绵腐病) 的防治。现有的蜡状芽孢杆菌的每种菌株主要对植物的一种病害、个别对二种病害有防治作用，促生作用也是每一菌株对个别 1-2 种植物起作用，因此，其可防治的病害种类单一，促生作用所针对的植物或作物的品种单一，广谱性较差。

发明内容

本发明提供一种蜡状芽孢杆菌的菌株，并给出以该菌株制备微生物杀菌剂的生产方法。

本发明是采用如下技术方案实现的：一种蜡状芽孢杆菌的菌株，该菌株表述为蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 98-I。该菌株已在非专利文献——2001 年第 7 卷第 2 期《应用与环境生物学报》上以论文的形式公开，公众欲获得该菌株可向山西省农业科学院植物保护研究所山西省农药重点实验室申请索取，该菌株的持有者——山西省农业科学院植物保护研究所山西省农药重点实验室保证在符合法律规定的条件下，将从申请日起二十年内向公众发放该菌株。

本发明所述的蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 98-I [以下简称 B. C. 98-I] 的研究起源于“沤肥浸渍液对植物病害的防治及机理研究”。研究中发现沤肥液中存在对多种植物病原真菌有强烈拮抗作用的细菌菌株，从沤肥浸渍液、土壤、植物根际中筛选细菌菌种，总共收集到活性菌株 330 个，利用其对生产上常见的植物真菌病害如：黄瓜枯萎病、青椒枯萎病、青椒疫病、番茄枯萎病、番茄早疫病、西瓜枯萎病、一品红、仙客来枯萎病等 8 种病害进行平皿对峙拮抗菌筛选、温室防病拮抗菌筛选和大田防治效果试验，最后筛选出广谱兼有促生作用的防治蔬菜、瓜类、花卉

等土传病害的拮抗菌——B. C. 98- I。

B. C. 98- I 菌株具有如下的细菌学特性:

1、形态特性

(1) 菌落特征:

该菌可在 PDA、NA 培养基上生长, 菌落圆形, 边缘不整齐, 初期有光泽, 菌落为肉色, 培养基不变色, 略有异味。

(2) 菌体特征:

杆菌, 一般大小为 $1.0-1.2 \times 2.5-4.5$ 微米, 有芽孢, 中生到次端生, 一般不膨大, 革兰氏染色为阳性、紫色。菌体游动, 周生鞭毛。

2、生化特性:

接触酶阳性, 好氧生长, VP 阳性, VP 液中产酸为 5.6, 卵黄反应阳性, 对溶菌酶的抗性为阳性。水解淀粉, 还原硝酸盐成亚硝酸盐, 分解酪素、酪氨酸, 石蕊牛奶中产酸, 胨化。

3、生理特性

可利用葡萄糖、甘露醇产酸, 利用柠檬酸。阿拉伯糖、木糖为阴性反应。PH 为 5.7 时可生长, 7%氯化钠中生长, 生长温度 $10-45^{\circ}\text{C}$, 60°C 以上高温对之有影响。

4、抑菌活性

1%浓度 (10^8cfu/ml) 对黄瓜枯萎病菌的抑制率为 62.6%

1%浓度 (10^8cfu/ml) 对西瓜枯萎病菌的抑制率为 80.2%

1%浓度 (10^8cfu/ml) 对青椒枯萎病菌的抑制率为 82.4%

1%浓度 (10^8cfu/ml) 对番茄枯萎病菌的抑制率为 69.5%

将 B. C. 98- I 菌株主要特征指标与已知的 44 株蜡状芽孢杆菌进行对照比较 (见下表)

主要性状	44 株蜡状芽孢杆菌反应	B. C. 98-1 拮抗菌反应
1、显微形态	杆状	杆状
2、长度	$1.0-1.2 \times 3.0-5.0$ 微米	$1.0-1.2 \times 2.5-4.5$ 微米
3、芽孢有无	有芽孢	有芽孢
4、生长位置	中生一次端生	中生一次端生
5、膨大情况	一般不膨大	一般不膨大
6、革兰氏染色	+	+
7、鞭毛生长	周生鞭毛	周生鞭毛
8、生长温度	$35-45^{\circ}\text{C}$ $10-20^{\circ}\text{C}$	$35-45^{\circ}\text{C}$ $10-20^{\circ}\text{C}$
9、接触酶	+	+
10、厌氧生长	+	+

11、VP	+	+
12、VP液中产酸	4.3-5.6	5.6
13、卵黄反应	+	+
14、对溶菌酶的抗性	+	+
15、7%的氯化钠中	+	+
16、PH为5.7时	+	+
17、从葡萄糖产酸	+	+
18、淀粉水解	+	+
19、利用柠檬酸	+	+
20、还原硝酸盐成亚硝酸	+	+
21、分解酪素	+	+
22、酪氨酸	+	+
23、石蕊牛奶中	产碱，个别产酸或胨化	产酸，胨化
24、阿拉伯糖	-	-
25、木糖	-, 个别阳性	+, -
26、甘露醇产酸	-	+
27 苯丙氨酸7天脱氧	-	-

通过对照比较可以看出：B.C.98-I菌株的主要特征指标与已知蜡状芽孢杆菌菌株的基本相同，但又与已知菌株有一定区别，其主要不同点在于甘露醇产酸显阳性、其菌株的长度范围略有缩小。根据中国科学院微生物研究所细菌分类组编著的《一般细菌常见鉴定方法》一书和上述的菌学特性及对照比较结果，表明B.C.98-I菌株属于芽孢杆菌属，蜡状芽孢杆菌种，并将该菌株定名为：蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 98-I。

蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 98-I具有以下优点：

1、广谱性好。对黄瓜枯萎病、黄瓜霜霉病、青椒枯萎病、青椒疫病、番茄枯萎病、西瓜枯萎病、早熟禾枯萎病等病害有明显的防治效果。尤其在枯萎病害的防治方面有突出效果（见下表）

B.C.98-I拮抗菌的应用范围及防治效果

病害名称	平皿抑制率%	温室防治效果%	大田防治效果%
黄瓜枯萎病	71.4	80.9	86.0
青椒枯萎病	77.1	69.2	68.2
番茄枯萎病	53.6	55.9	-
西瓜枯萎病	71.3	67.5	74.4
一品红枯萎病	73.2	-	79.9

2、抑菌活性高。在接菌量为 10^8 cfu/ml 时，对黄瓜枯萎菌、青椒枯萎菌、番茄枯萎病和西瓜枯萎菌的平皿抑制率 24 小时达 60% 以上，72 小时后

达90%以上。

3、对多种植物有促生和促进种子发芽的作用。对7种植物有促生作用，发芽率增加从青椒的8.9%、黄瓜、西瓜的20%、白菜、番茄的50-80%，到对早熟禾的350%。其它拮抗菌只对个别植物有促生作用。

4、对植物有诱导抗性作用。经对西瓜、黄瓜、青椒3种植物7个抗性指标测定，其中4种酶（过氧化氢酶、苯丙氨酸转氨酶、多酚氧化酶、B-1,3葡聚糖酶）活性有不同程度的提高。

5、适应范围广。在-18℃和60℃范围内均能存活。耐一定的盐研。

6、发酵周期短。

本发明的另一个目的是给出以 B.C.98-I 菌株制备微生物杀菌剂的生产方法，使该拮抗菌的生产发酵规模化，使其在生物防治中得到大范围的应用。

以 B.C.98-I 菌株制备微生物杀菌剂的生产方法，其生产工艺流程包含斜面菌种制备、摇床菌种制备、一级菌种制备和大罐发酵，其中，斜面菌种制备的工艺条件为：PDA 培养基，28℃，48 小时；摇床菌种制备的工艺条件为：①号培养基，28-42℃，摇床转速 150-200 转/分，48 小时，①号培养基为：马铃薯 20%，葡萄糖 1.5-3.0%，氯化钠 0.2-0.5%，磷酸二氢钾 0.1-0.6%，其余为水；一级菌种制备的工艺条件为：②号培养基，28-42℃，发酵罐转速 150-280 转/分，48 小时，PH 值 4-10，通气量 1: 1，②号培养基为：玉米粉 0.2-0.5%，豆粉 0.2-0.5%，葡萄糖 3-6%，氯化钠 0.1-0.8%，磷酸二氢钾 0.1-0.8%，硫酸铵 0.1-0.8%，蛋白胨 0.1-0.8%，硫酸镁 0.01-0.05%，硫酸锌 0.01-0.05%，其余为水；大罐发酵的工艺条件为：②号培养基，28-42℃，发酵罐转速 150-280 转/分，48 小时，PH 值 4-10，通气量 1: 1。大罐发酵后得到的液体就是所需的产品——微生物杀菌剂。

该生产方法发酵周期短。发酵流程为 4 步，杀菌剂中菌株浓度大于等于 10^{10} cfu/ml，可直接应用于大田防治。

该微生物杀菌剂的广谱性决定了其推广应用的广泛性和广阔性，不仅可防蔬菜、瓜类土传病害，而且对花卉、草坪的土传病害也有防治效果。该杀菌剂还具有促生作用，所以其即是杀菌剂又是菌肥，可作为叶菜类植物的生物菌肥。该杀菌剂具有强的耐抗性和适应性，使其可在不同气候条件、不同生态条件下推广应用。具有低价高效性，具有良好的市场前景。

该微生物杀菌剂具有良好的经济和社会效益。本产品投入产出比为 1:8，每亩可挽回经济损失 80 元，如果每年推广 100 万亩，2-3 年推广 300 万亩，可获经济效益 24000 万元。该产品不仅具有明显的经济效益，而且具有十分良好的社会效益和生态效益，符合生态农业、可持续农业的要求。

具体实施方式

实施例 1

以 B.C.98-I 菌株制备微生物杀菌剂的生产方法，其生产工艺流程包

含斜面菌种制备、摇床菌种制备、一级菌种制备和大罐发酵，其中，斜面菌种制备的工艺条件为：PDA培养基，28℃，48小时；摇床菌种制备的工艺条件为：①号培养基，28℃，摇床转速150转/分，48小时，①号培养基为：马铃薯20%，葡萄糖1.5%，氯化钠0.2%，磷酸二氢钾0.1%，其余为水；一级菌种制备的工艺条件为：②号培养基，28℃，发酵罐转速150转/分，48小时。PH值4，通气量1:1，②号培养基为：玉米粉0.2%，豆粉0.2%，葡萄糖3%，氯化钠0.1%，磷酸二氢钾0.1%，硫酸铵0.1%，蛋白胨0.1%，硫酸镁0.01%，硫酸锌0.01%，其余为水，大罐发酵的工艺条件为：②号培养基，28℃，发酵罐转速150转/分，48小时。PH值4，通气量1:1。大罐发酵后得到的液体就是所需的产品——微生物杀菌剂。

本实施例的产品剂型为水剂。

产品质量标准：

- 1、浓度大于等于 10^{10} cfu/ml
- 2、对黄瓜枯萎菌的抑制中浓度为 2×10^7 cfu/ml
对西瓜枯萎菌的抑制中浓度为 1×10^7 cfu/ml
对青椒枯萎菌的抑制中浓度为 0.6×10^7 cfu/ml
对番茄枯萎菌的抑制中浓度为 2×10^7 cfu/ml

田间使用方法及浓度：

发病前一个月灌根一次，浓度为300-800倍，视前茬病情而定，每株灌溉250ml。

实施例2

以B.C.98-I菌株制备微生物杀菌剂的生产方法，其生产工艺流程包含斜面菌种制备、摇床菌种制备、一级菌种制备和大罐发酵，其中，斜面菌种制备的工艺条件为：PDA培养基，28℃，48小时；摇床菌种制备的工艺条件为：①号培养基，42℃，摇床转速200转/分，48小时，①号培养基为：马铃薯20%，葡萄糖3.0%，氯化钠0.5%，磷酸二氢钾0.6%，其余为水；一级菌种制备的工艺条件为：②号培养基，42℃，发酵罐转速280转/分，48小时，PH值10，通气量1:1，②号培养基为：玉米粉0.5%，豆粉0.5%，葡萄糖6%，氯化钠0.8%，磷酸二氢钾0.8%，硫酸铵0.8%，蛋白胨0.8%，硫酸镁0.05%，硫酸锌0.05%，其余为水，大罐发酵的工艺条件为：②号培养基，42℃，发酵罐转速280转/分，48小时。PH值10，通气量1:1。大罐发酵后得到的液体就是所需的产品——微生物杀菌剂。

实施例3

以B.C.98-I菌株制备微生物杀菌剂的生产方法，其生产工艺流程包含斜面菌种制备、摇床菌种制备、一级菌种制备和大罐发酵，其中，斜面菌种制备的工艺条件为：PDA培养基，28℃，48小时；摇床菌种制备的工艺条件为：①号培养基，35℃，摇床转速180转/分，48小时，①号培养基为：马铃薯20%，葡萄糖2.0%，氯化钠0.3%，磷酸二氢钾0.4%，其余为水；

一级菌种制备的工艺条件为：②号培养基，35℃，发酵罐转速 220 转/分，48 小时，PH 值 7，通气量 1: 1，②号培养基为：玉米粉 0.4%，豆粉 0.3%，葡萄糖 4%，氯化钠 0.5%，磷酸二氢钾 0.5%，硫酸铵 0.5%，蛋白胨 0.5%，硫酸镁 0.03%，硫酸锌 0.03%，其余为水。大罐发酵的工艺条件为：②号培养基，35℃，发酵罐转速 220 转/分，48 小时，PH 值 7，通气量 1: 1。大罐发酵后得到的液体就是所需的产品——微生物杀菌剂。