

植病生防芽孢杆菌的分离筛选与初步鉴定^①

张晓舟 徐剑宏 李顺鹏*

(南京农业大学农业部农业环境微生物工程重点开放实验室 南京 210095)

摘要 从山东和江苏采集的菜园土样中分离筛选得到4株芽孢杆菌B15、B110、B113和B122, 它们均对植物病原真菌具有较强的拮抗能力且具有广谱性。4株芽孢杆菌可以致使黄瓜枯萎病原菌菌丝生长形态异常, 出现菌丝前端膨大或变细、菌丝扭曲、分支加剧、生成大量圆珠形囊状体和原生质凝聚等异常现象。通过对4个菌株培养物形态特征的观察和一系列的生理生化实验得到其初步鉴定结果, 其中B15和B113为短链芽孢杆菌 (*Brevibacillus brevis*), B110为多粘类芽孢杆菌 (*Paenibacillus polymyxa*), B122为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。

关键词 拮抗作用; 芽孢杆菌; 筛选; 鉴定; 生物防治

中图分类号 S432.44; S476

植物真菌性病害是造成农业损失的主要原因之一^[1,2], 施用化学农药虽有一定效果, 但价格昂贵且长期使用会增加病原菌的抗性和造成环境的污染^[3]。土壤是各种微生物良好的栖息环境, 生存着许多具有相互拮抗作用的微生物^[4]。利用植株上附生的或根际土壤中的拮抗细菌或其代谢产物调控根围有害微生物的平衡以达到控病保产的目的, 是土传病害防治的重要途径^[5~7], 筛选高效和活性稳定的拮抗菌株则是保证生物防治获得成功的先决条件。芽孢杆菌 (*Bacillus* spp.) 是自然界广泛存在的一类细菌, 一些菌株可以产生杆菌肽、大环脂、环脂和类噬菌体颗粒等十几种抗菌物质, 在植物病害生物防治中被广泛应用^[8]。同时, 芽孢杆菌作为革兰氏阳性细菌, 可以形成芽孢, 细胞壁不含内毒素, 除个别种外绝大多数对人畜无毒, 因此具有很强的环境适应性和环境友好性^[9]。本研究从山东和江苏两地的菜园土样中选择性地分离和筛选具有拮抗作用的芽孢杆菌, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 供试病原真菌

黄瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum*)、黄瓜炭疽病菌 (*Colletotrichum orbiculare*)、番茄早疫病菌 (*Alternaria solani*) 和辣椒炭疽病菌 (*Colletotrichum capsoci*) 为本实验室保存; 番茄灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*) 购自中国农业科学院土壤肥料研究所; 草莓

灰霉病菌 (*Botrytis cinerea* Persoon)、茄子黄萎病菌 (*Verticillium dahliae* Kleb) 和辣椒疫霉菌 (*Phytophthora capsici* Leonian) 购自中国农业科学院蔬菜花卉研究所。

1.2 培养基

病原真菌和芽孢杆菌均采用马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA) 培养。

1.3 土样中芽孢杆菌的分离

将从山东惠民、莱阳, 江苏南京、江阴、无锡5地的菜园中植物根部采集的土样自然风干。每份土样称取10 g, 放入盛有90 ml 无菌水和玻璃珠的三角瓶中, 在摇床上剧烈振荡30 min后于80 °C的水浴中保持15 min。然后用无菌水进行梯度稀释后涂布PDA平板, 于37 °C培养箱内培养24 h左右, 挑取菌落形态差异明显的单菌落进入初筛。

1.4 具有拮抗作用的芽孢杆菌的初筛和复筛

以黄瓜枯萎病菌为指示菌, 采用PDA平板对峙生长法^[10]将进入初筛的菌株点接在距平板中央3 cm处的4个角点上, 平板中央同时移入一直径0.3 cm的黄瓜枯萎病菌的琼脂块, 置于25 °C培养箱培养3~5天, 选出对病原菌生长有抑制作用的菌株进入复筛。每个菌株4次重复, 同样的方法培养并测量抑菌圈半径 (细菌菌落中心至病原菌菌丝边缘) 的大小, 筛选出抑菌圈半径较大, 被抑病原菌丝边缘平齐且拮抗作用持久的菌株。

1.5 拮抗菌株对不同病原真菌的拮抗性能测定

^①江苏省自然科学基金 (BK2001071) 和中国科学院南京土壤研究所开放实验室基金 (2025102) 资助。

*通讯作者 (lsp@njau.edu.cn)

同样采用平板对峙生长法将不同的病原真菌接种于PDA平板, 25 °C培养14天后观察并记录抑菌圈半径的大小。

1.6 拮抗机理的初步研究

用平板对峙生长法接种黄瓜枯萎病菌和拮抗细菌, 25 °C培养14天后, 挑取抑菌圈边缘生长受抑制的病原菌丝, 用结晶紫染色液简单染色后于低倍显微镜下观察菌丝形态变化。

1.7 拮抗芽孢杆菌的初步鉴定

芽孢杆菌菌株的鉴定依照文献[11, 12]进行。

2 结果与分析

2.1 拮抗芽孢杆菌的分离筛选

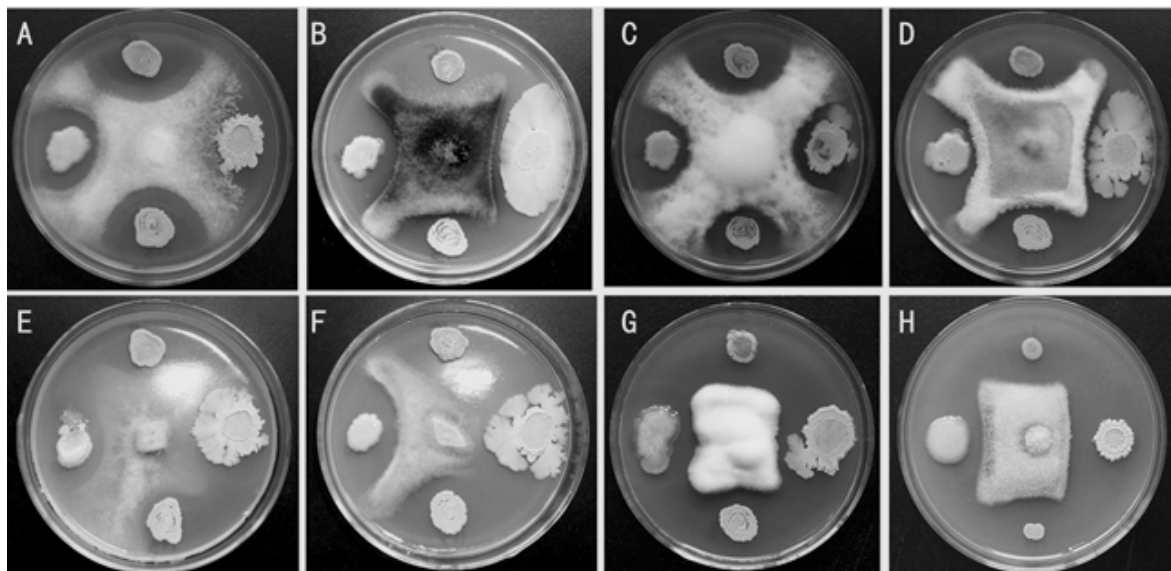
从PDA平板上选择性地挑出外观有明显差别且

长时间培养后都可以观察到芽孢形成的菌株126个, 初筛出具有一定拮抗作用的菌株22个。通过复筛, 得到4株抑菌圈半径较大且抗性持久的菌株B15、B110、B113和B122, 其平均抑菌圈半径分别为12.5 mm, 11.6 mm, 12.6 mm和13.5 mm; 其余18个菌株的抑菌圈半径均在3.3 ~ 10.0 mm之间(详细数据未列出)。

2.2 4株芽孢杆菌对不同病原真菌的拮抗性比较

采用平板对峙生长法培养之后, 4株芽孢杆菌B15、B110、B113和B122对8种病原真菌的拮抗作用见图1。

从图1可以看出, 4株芽孢杆菌均对不同的病原真菌表现出广谱的拮抗作用, 但各菌株对不同病原菌表现出的拮抗强度有所差别, 这可能是由于不同



(图1中各平板中细菌菌落依次为: 上: B15; 下: B113; 左: B110; 右: B122, 各平板接种的病原真菌依次为: A: 辣椒疫霉病菌; B: 辣椒炭疽病菌; C: 黄瓜枯萎病菌; D: 番茄早疫病病菌; E: 番茄灰霉病菌; F: 草莓灰霉病菌; G: 茄子黄萎病菌; H: 黄瓜炭疽病菌)

图 1 4株芽孢杆菌对不同病原真菌的拮抗作用

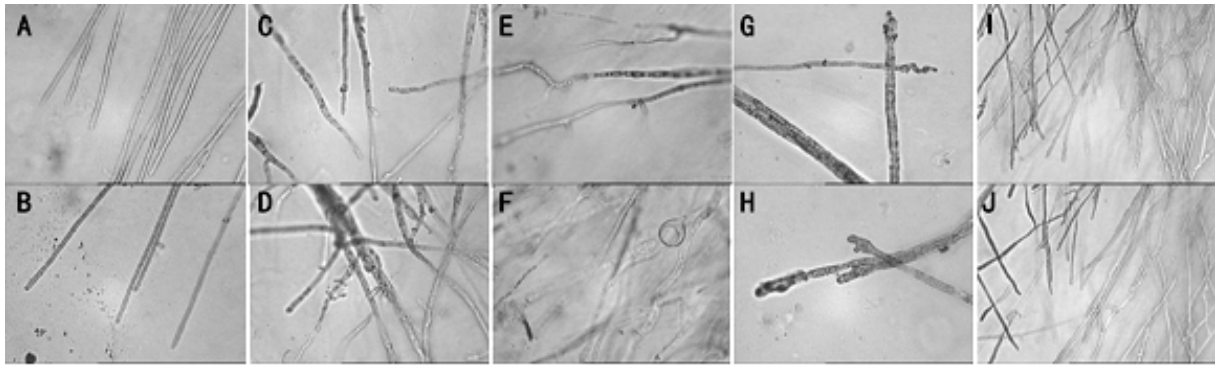
Fig. 1 Antagonistic effects of four strains of *Bacillus* spp. on different pathogenic fungi

的病原真菌的菌丝体构造等有所不同所造成的。其中, 4个菌株对番茄灰霉病菌拮抗作用最弱; 菌株B122对辣椒疫霉病菌、辣椒炭疽病菌、番茄早疫病病菌、番茄灰霉病菌及草莓灰霉病菌的抑菌作用较弱; 而菌株B15、B110和B113对绝大多数病原菌都表现出很强的拮抗作用。从拮抗菌株对病原菌的平板抑菌作用可以看出, 4个菌株向菌落周围的培养基中分泌释放某种拮抗物质, 从而明显抑制了病原菌丝的生长和发育。

2.3 拮抗作用机理的初步研究

对峙生长培养后, 黄瓜枯萎病菌丝体受不同拮抗菌株作用后的异常形态见图2。

从图2可以看出, 与对照组相比, B15处理过的病原菌丝体扭曲, 缢缩或膨大; B110处理过的菌丝顶端出现圆珠形囊状体, 菌丝体扭曲分节, 原生质凝聚; B113处理过的菌丝顶端扭曲、异常分生, 菌丝体膨大, 原生质凝聚; B122处理过的菌丝扭曲盘结, 明显变细。



(A 和 B: 正常的黄瓜枯萎病菌丝; C 和 D: 受 B15 抑制的菌丝; E 和 F: 受 B110 抑制的菌丝; G 和 H: 受 B113 抑制的菌丝; I 和 J: 受 B122 抑制的菌丝)

图 2 黄瓜枯萎病菌丝体受拮抗菌作用后的异常形态 (200×)

Fig. 2 Abnormal forms of the *Fusarium oxysporum* hypha inhibited by the *bacillus* spp. (200×)

4 个拮抗菌株对病原真菌均具有广谱拮抗作用，但是病原菌丝受拮抗菌分泌物作用后的形态变化却各不相同。菌株 B15 和 B113 处理过的病原菌丝形态变化有一定的相似性。这也表明各菌株可能是分泌了不同的抗生物质而起到抑菌效果的。

2.4 4株芽孢杆菌的初步鉴定结果

2.4.1 形态特征和培养特征 各菌株细胞个体形态观察和PDA平板培养24h后的菌落形态观察结果见表1和表2。

2.4.2 生理生化特征 4株芽孢杆菌的生理生化特征见表3。

表1 4株芽孢杆菌的形态特征和培养特征

Table 1 Morphological features and culture characters of the four *bacillus* spp. strains

菌株	革兰氏染色	形状	大小 (μm)	鞭毛 染色	运动性	菌落				可溶性 色素
						形状	表面	边缘	颜色	
B15	+	杆状	0.6×2.8	周生鞭毛	+	近圆形	粗糙	不整齐	灰黄色	无
B110	+	杆状	0.7×4.0	周生鞭毛	+	圆形	光滑	整齐	乳白色	无
B113	+	杆状	0.8×3.2	周生鞭毛	+	近圆形	粗糙	不整齐	灰黄色	无
B122	+	杆状	0.6×3.0	周生鞭毛	+	近圆形	粗糙	不整齐	黄褐色	无

表 2 4株芽孢杆菌芽孢的形态特征

Table 2 Morphological features of the spore of the four *bacillus* spp. strains

菌株	大小(μm)	孢囊形态	芽孢形状	芽孢位置
B15	1.0×2.0	膨大	椭圆形	中生或近端生
B110	1.0×2.1	膨大	卵圆形	中生或端生
B113	1.0×2.0	膨大	椭圆形	中生或端生
B122	0.8×1.2	不膨大	椭圆形或柱状	中生

表3 4株芽孢杆菌的生理生化特征

Table 3 Physiological and biochemical characters of the four *bacillus* spp. strains

菌株	明胶 液化	淀粉 水解	接触酶	氧化酶	硝酸盐 还原	厌氧 生长	V-P 反应	50℃ 生长	5% NaCl 生长	D-葡 萄糖	L-阿拉 伯糖	D-木糖	D-甘露糖
B15	+	-	+	+	NT	-	-	-	-	+	-	-	+
B110	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
B113	+	-	+	+	NT	-	-	-	-	+	-	-	+
B122	+	+	+	NT	+	-	+	-	+	+	+	+	+

注：“+”表示阳性，“-”表示阴性，“NT”表示未测定。

2.4.3 菌株的鉴定 综合上述个体形态、菌落特征观察结果及生理生化特征, 结合相关文献^[11, 12], 可以初步确定以上4个菌株的分类地位: 菌株B15和B113为短短芽孢杆菌 (*Brevibacillus brevis*), 菌株B110为多粘类芽孢杆菌 (*Paenibacillus polymyxa*), 菌株B122为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。

3 结语

本试验从分离到的 126 个芽孢杆菌菌株中筛选出的 4 个菌株不但对黄瓜枯萎病菌具有较强的抑菌作用, 而且对另外 7 种病原真菌都有着广谱的抑制作用; 这同时也说明了土壤中存在大量我们可以利用和改造的有益微生物资源。我们分离得到的菌株是来源于菜园土中的土壤微生物, 所以应该易于在土壤中定居, 其中 B15 和 B113 两个菌株形成的抑菌圈边缘清晰且作用时间持久, 是很有希望值得继续研究和开发的菌株。本研究虽然对各菌株作了一些初步试验和鉴定, 并发现它们具有作为生物农药的潜力, 但是对它们的盆栽试验效果、抑菌有效组分的分离、结构鉴定、发酵条件优化和安全性试验等方面的研究工作还有待进一步深入研究。

参考文献

- 1 Cornelissen B, Melchers LS. Strategies for control of fungal diseases with transgenic plants. *Plant Physiol.*, 1993, 101 (3): 709 ~ 712
- 2 安琼, 董元华, 王辉, 王霞, 王梅农, 郭宗祥. 苏南农田土壤有机氯农药残留规律. *土壤学报*, 2004, 41 (3): 414 ~ 419
- 3 刘颖, 徐庆, 陈章良. 抗真菌肽 LP-1 的分离纯化及特性分析. *微生物学报*, 1999, 39 (5): 441 ~ 447
- 4 吴建峰, 林先贵. 土壤微生物在促进植物生长方面的作用. *土壤*, 2003, 35 (1): 18 ~ 21
- 5 Yao Q, Qing F, Li X, Christine P. Utilization of sparingly soluble phosphate by red clover in association with *Glomus mosseae* and *Bacillus megaterium*. *Pedosphere*, 2002, 12 (2): 131 ~ 138
- 6 吴建峰, 林先贵. 我国微生物肥料研究现状及发展趋势. *土壤*, 2002, 34 (2): 68 ~ 72
- 7 孙红霞, 武琴, 郑国祥, 王振忠. EM 对茄子、黄瓜抗连作障碍和增强土壤生物活性的效果. *土壤*, 2001, 33 (5): 264 ~ 267
- 8 刘焕利, 潘小玫, 张学君, 王金生. 产抗菌蛋白芽孢杆菌的筛选及抗菌蛋白的性质. *中国生物防治*, 1995, 11 (4): 160 ~ 164
- 9 彭清忠, 张惟材, 朱厚础. 枯草杆菌表达系统的研究进展. *生物技术通讯*, 2001, 12 (3): 220 ~ 225
- 10 纪明山, 王英姿, 程根武, 李博强, 张国辉, 李艳丽, 回文广. 西瓜枯萎病拮抗菌株筛选及田间防效试验. *中国生物防治*, 2002, 18 (2): 71 ~ 74
- 11 戈登 RE, 海恩斯 WC, 帕格 CHN 著(蔡妙英等译). 芽孢杆菌属. 北京: 农业出版社, 1983, 106 ~ 108
- 12 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, 59 ~ 63

ISOLATION, SCREENING AND PRELIMINARY IDENTIFICATION OF PLANT PATHOGENIC FUNGI BIOCONTROL STRAINS OF *BACILLUS* SPP.

ZHANG Xiao-zhou XU Jian-hong LI Shun-peng

(Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, MOA, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract Four strains of *Bacillus* spp. B15, B110, B113 and B122 were isolated from garden soil samples, which were collected from Shandong and Jiangsu Provinces. Experiments show they all had strong antagonistic effects on a broad spectrum of plant pathogenic fungi. The four strains of *Bacillus* spp. could induce deformed growth of hyphae of *Fusarium oxysporum*. With their tips bulged or attenuated, the hypha grew twisty, ramulose, yielded a large number of round cystids and their protoplasm agglomerated. Through observation of their morphological features and culture characters and a series of physiological and biochemical experiments, B15 and B113 were identified as *Brevibacillus brevis*, B110 as *Paenibacillus polymyxa* and B122 as *Bacillus subtilis*.

Key words Antagonism, *Bacillus* spp., Screening, Identification, Biological control