

# 黄瓜灰霉病产芽孢拮抗细菌的分离 筛选与 L-72 菌株的鉴定

张蕊 李术娜 李朝玉 王全 李红亚 朱宝成

(河北农业大学 生命科学院 河北 保定 071001)

**摘要:**以灰葡萄孢菌为指示菌,采用平板对峙法(改良的琼脂平板扩散法),从土壤中分离筛选出产芽孢拮抗菌株 7 株。采用液体发酵法对初筛菌株进行了复筛,得到 1 株具有较高拮抗活性的菌株 L-72,对该菌株进行了形态观察和生理生化特征分析,鉴定为 *Bacillus* 属。用 PCR 法扩增其 16S rDNA,测定全序列(1 432 bp),与 GeneBank 中已知菌的 16S rDNA 序列对比,并用 Neighbor-joining 方法构建 L-72 菌株进化树,结果表明,L-72 菌株与 9 种模式菌株相似度均低于 97%。因此,确定 L-72 菌株是与芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)亲缘关系最近的 *Bacillus* 属中的一个新种。

**关键词:**灰葡萄孢菌;拮抗细菌;筛选;鉴定

中图分类号:S436.421 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2010)04-0191-05

## Isolation Screening of Spore-producing Antagonistic Bacteria Against Cucumber Gray Mold and Identification of the Strain L-72

ZHANG Rui, LI Shu-na, LI Chao-yu, WANG Quan, LI Hong-ya, ZHU Bao-cheng

(College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

**Abstract:** 7 spore-producing antagonistic bacteria strains were isolated and screened from several different regions by using *Botrytis cinerea* as the indicator bacteria through plate cultivation method(the improved agar plate diffusion method) in the experiments. A strain named L-72 with a rather higher antagonistic activity was obtained after secondary screening by liquid state fermentation. Thus the morphology characteristics, physiological and biochemical properties and 16S rDNA sequence of strain L-72 were further studied. The L-72 strain was finally identified as a kind of *Bacillus*. The similarity of the 16S rDNA sequences between L-72 strain and other standard strains were below to 97%, so it was identified that strain L-72 was a new species which has nearest genetic relationship with *Bacillus velezensis* and *Bacillus amyloliquefaciens*.

**Key words:** *Botrytis cinerea*; Antagonistic bacteria; Screening; Identification

近年来,我国黄瓜栽培面积不断扩大,而黄瓜灰霉病是黄瓜生产的常见病害。灰霉病是由半知菌亚门(Deuteromycotina)葡萄孢属(*Botrytis*)真菌侵染引起的病害<sup>[1]</sup>,病菌以菌丝或分生孢子以及菌核的形态附着在病残体上或遗留在土壤中越冬。带菌植株、病田土是该病的初侵染源,温室及露地栽培均易发生病害,直接危害植株的花器和果实,对黄瓜的产量和品质均有很大影响<sup>[2]</sup>。

病菌在相对较短的时间里会对杀菌剂产生抗性,化学农药具有高污染性,遇到天气变化时农业措

施无法实施,若实施则需要的成本较高,与此相比,生物防治体现出了许多互补优势。其能降低灰霉病菌对杀菌剂的选择压,降低黄瓜中的农药残留量,同时也降低了生产成本。因此利用生物防治抑制灰霉病是病原菌综合治理的重要措施之一。生物防治也因其低污染、低残留的特性近年来成为农作物抗病的研究重点<sup>[3]</sup>。本研究是从国内黄瓜灰霉病高发区采集的土样中,分离筛选出对灰葡萄孢菌具有较高拮抗活性的 L-72 菌株,并对其进行了菌种鉴定。

收稿日期:2010-02-09

作者简介:张蕊(1984-),女,山东鄄城人,硕士,主要从事微生物及生化药学方面的研究。

通讯作者:朱宝成(1962-),男,河北献县人,教授,博士生导师,主要从事微生物及生化药学方面的研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验菌株

病原菌:灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*),本实验室保存。

### 1.2 菌株分离及生理生化鉴定的试剂和培养基

1.2.1 筛选所用试剂 链霉素(华北制药厂)。

1.2.2 筛选用培养基 PDA 和 NA 培养基参见沈萍等<sup>[4]</sup>的《微生物学实验》。PDA 培养基用于培养灰葡萄孢菌,NA 培养基用于培养拮抗细菌。

NB 培养基为 NA 液体形式,即不向其中加琼脂。

发酵培养基(复筛培养基):蔗糖 50 g,牛肉膏 50 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g,蒸馏水 1 000 mL, pH 7.5。

1.2.3 鉴定试剂及培养基 参见东秀珠等<sup>[5]</sup>的《常见细菌系统鉴定手册》。

1.2.4 DNA 提取和 16S rDNA 基因扩增所用试剂 TE 缓冲液:10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0;1 mmol/L EDTA pH 8.0。SDS 提取缓冲液:100 mmol/L Tris-HCl pH 8.0;20 mmol/L EDTA;10% SDS;1.4 mol/L NaCl,Tris 饱和酚:氯仿(25:24),dNTP Mixture(2.5 mmol/L), $10 \times \text{ExTaq Buffer}$ ( $\text{Mg}^{2+}$  pluse)

### 1.3 试验方法

1.3.1 土样采集 用接种铲取发病黄瓜地表以下 10~15 cm 深处土样,保存于塑料袋中,记录采样时间、地点等信息。

1.3.2 土样中产芽孢细菌的富集及分离<sup>[6]</sup> 称取 1 g 土样放入装有 9 mL 无菌水的试管中,混匀后 80℃ 水浴 20 min,然后进行系列稀释,得到各种浓度的菌悬液。分别取  $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  两个稀释梯度的稀释液 0.1 mL 涂布于 NA 培养基平板,然后倒置于 37℃ 培养箱中培养 24 h。挑取不同形状的单菌落转接至 NA 培养基斜面上,37℃ 恒温培养 24 h,放置 4℃ 冰箱保存备用。所挑取的菌落同时在 NA 培养基平板上划线检查纯度。

1.3.3 拮抗细菌的初筛 向培养 10 d 的灰葡萄孢菌斜面上加入 5 mL 无菌水,用灭菌的竹签轻轻刮取孢子,将 5 mL 孢子悬液加入融化后冷却到 45℃ 左右的终浓度为 25 mg/mL 链霉素的 PDA 培养基中,混匀后倒平板。

用灭菌的竹签挑取适量活化好的斜面菌种接种于平板上。置于 25℃ 温箱培养,培养 48 h 后观察并记录抑菌圈的有无及大小。

1.3.4 拮抗菌的复筛 用灭菌的竹签挑取斜面菌种接种于发酵培养基中,30℃、180 r/min 摇床振荡

培养 48 h。发酵液进行滤膜过滤除去菌体,取上清备用。在病原菌平板上用打孔器打孔,向其中加入 75  $\mu\text{L}$  拮抗细菌菌株的发酵液上清液,置于 25℃ 培养箱培养,培养 48 h 后测量抑菌圈直径。

1.3.5 拮抗菌株 L-72 的形态观察及生理生化特性测定

1.3.5.1 个体形态特征 在 NA 培养基上 37℃、培养 24 h,取样涂片,观察其菌体形态。

1.3.5.2 菌落特征观察 将菌液系列梯度稀释的方法,在 NA 培养基上涂布,37℃ 培养 24 h 后观察菌落特征。

1.3.5.3 生理生化试验 参照东秀珠等<sup>[5]</sup>的方法对菌株 L-72 分别进行生长温度和耐热性试验、碳源利用试验、氮源利用试验、荧光色素试验、脓青素的产生试验、产糊精结晶试验、亚硝酸还原试验、反硝化试验、产氨试验、色氨酸脱氢酶试验、脂酶试验、接触酶试验、葡萄糖氧化发酵、硝酸盐还原试验、淀粉水解试验、糖、醇发酵试验、V. P. 试验(乙酰甲基甲醇试验)、柠檬酸盐的利用试验、纤维素水解试验、3-酮基乳糖试验、脲酶(尿素水解)试验、苯丙氨酸脱氢酶试验、硫化氢产气试验、牛奶分解试验、甲基红(M. R.)试验、丙二酸利用试验等生理生化试验。

1.3.6 L-72 菌株 16s rDNA 分析

1.3.6.1 基因组 DNA 的提取与纯化 参考 Kim 等和 Rainey 等<sup>[7,8]</sup>的方法提取细菌总 DNA。取对数生长期的发酵液 1.5 mL,8 000 r/min 离心收集菌体,提取基因组 DNA。

1.3.6.2 16S rDNA 的 PCR 扩增和序列测定 引物为通用引物<sup>[9]</sup>,正向引物为 27F: 5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3',反向引物为 1495R: 5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3'。分别位于 16S rDNA 的 8~27 和 1495~1514 位的碱基片段(以 *Escherichia coli* 的 16S rDNA 碱基位置为准)。

PCR 反应体系:DNA(70 ng/ $\mu\text{L}$ )模板 2  $\mu\text{L}$ ;dNTP Mixture(2.5 mmol/L) 2.5  $\mu\text{L}$ ;27F(20  $\mu\text{mol/L}$ ) 1.5  $\mu\text{L}$ ;1495F(20  $\mu\text{mol/L}$ ) 1.5  $\mu\text{L}$ ;  $10 \times \text{ExTaq Buffer}$ ( $\text{Mg}^{2+}$  pluse) 5  $\mu\text{L}$ ;ExTaq DNA 聚合酶 0.2  $\mu\text{L}$ ;补足 ddH<sub>2</sub>O 到 50  $\mu\text{L}$ 。

PCR 条件:94℃ 预变性 3 min;然后 94℃ 变性 1 min、55℃ 退火 1 min、72℃ 延伸 3 min,共 30 个循环;最后 72℃ 延伸 5 min。PCR 产物经试剂盒纯化后,送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.3.7 16S rDNA 序列分析及系统发育树绘制 将所测得的 16S rDNA 序列用 BLAST 软件与 GenBank 数据库进行相似性分析,并与 GenBank 中的相近序

列在 Clustal X( 1. 8) 程序包中进行多重序列匹配排列( Multiple alignments) 分析,最后形成一个多重序列匹配排列阵,其中形成的缺口用横杠“-”填补,用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树<sup>[10]</sup>。

2 结果与分析

2.1 土样中拮抗细菌的分离筛选

2.1.1 土样中细菌的分离 将分离出的不同特征的单菌落纯化后共得到 200 个菌株,其形态特征大

都为灰白色、少数为黄色、不透明菌落,大小不等、扁平状,表面干燥、有皱折,呈火山口状、放射状或不规则状,菌落边缘整齐。

2.1.2 土样中灰霉病菌拮抗细菌的初筛 将分离出的细菌菌株分别与灰葡萄孢菌进行生长对峙试验,本试验共从 200 个菌株中分离得到具有较强拮抗作用的菌株 7 株,分别为 1-6、L-72、7-60、12-4、3-19、8-54、Y-3,其单菌落形态特征如(表 1)。

表 1 菌落形态特征观察结果

Tab.1 Result of colonial shape characteristic observation							
菌株 Strain	形状 Shape	大小/mm Size	边缘 Edge	隆起形状 Uplift shape	透明度 Transparency	颜色 Colour	表面 Surface
1-6	不规则圆形	2	缺刻	隆起	不透明	灰白色	粗糙
L-72	圆形	3	圆整	隆起	不透明	黄白色	粗糙
7-60	不规则圆形	2	缺刻	线状隆起	不透明	灰白色	粗糙
12-4	圆形	3	圆整	不隆起	不透明	灰白色	光滑
3-19	圆形	3	圆整	四周隆起中间凹陷	半透明	白色	光滑
8-54	不规则圆形	2	圆整	中间隆起	不透明	黄白色	粗糙
Y-3	圆形	3	圆整	隆起	不透明	白色	粗糙

2.1.3 土样中灰霉病菌拮抗细菌的复筛结果 通过对初筛的 7 株菌进行复筛,其中有 4 株抑菌能力较好,它们是菌株 L-72、1-6、7-60、12-4,其抑菌圈直径均在 15 mm 以上(表 2)。土样中灰霉病菌拮抗细菌的复筛结果见图 1。结果发现,菌株 L-72 表现出较强的拮抗活性,具有进一步研究应用的价值,因此将其作为后续研究的供试菌株。

表 2 复筛抑菌试验结果

Tab.2 Result of bacteriostasis test in second screening		
菌株 Strain	抑菌圈直径/mm Bacteriostasis circle diameter	
	Parallel 1	Parallel 2
L-72	20.0	20.0
1-6	18.0	18.0
7-60	17.0	17.0
12-4	17.0	17.0
3-19	15.0	13.0
8-54	12.0	12.0
Y-3	12.0	12.0

菌体进行革兰氏染色,在油镜下观察。试验菌株经染色后在显微镜下观察多呈杆状,革兰氏染色均呈阳性,菌体长度多为 2~3 μm,芽孢呈椭圆形、稍膨大、中生或端生(图 2)。

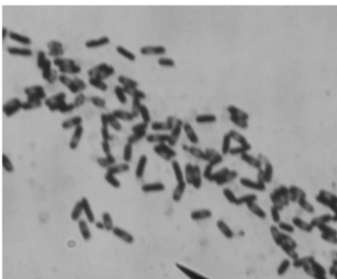


图 2 菌株革兰氏染色图片

Fig.2 Cell morphology of bacteria strains

2.2.2 菌落形态 在 NA 培养基平板上培养 24 h 的菌落形态如图 3 所示。菌落呈近圆形,边缘不整齐,不透明,表面有皱褶,中间有突起,微黄色。

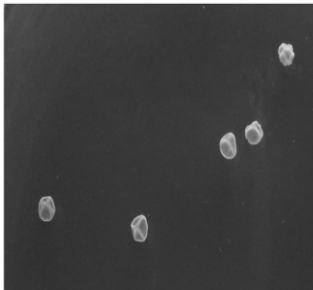


图 3 菌株在 NA 平板上生长的形态

Fig.3 Colony morphology of strains

2.2 菌株 L-72 的鉴定

2.2.1 菌体形态 在 NA 试管斜面上培养 24 h 的

2.2.3 生理生化试验结果 L-72 菌株进行上述生理生化实验,结果见表 3。

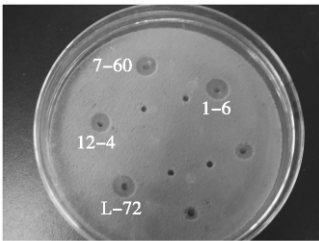


图 1 复筛时菌株的拮抗作用

Fig.1 Result of strains in second screening

综合以上拮抗菌 L-72 菌株的形态特征和生理生化特性,对照《伯杰氏细菌鉴定手册》<sup>[11]</sup>和《常见细菌系统鉴定手册》,鉴定拮抗菌 L-72 菌株属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)。

2.2.4 L-72 菌株 16S rDNA 全序列分析 测出的 L-72 菌株的 16S rDNA 序列长度为 1 432 bp,将测得的序列与数据库中已注册的 16S rDNA 序列用 BLAST 程序进行序列相似性比较分析,将 Genbank 中与 L-72 菌株相似性较高的 10 个菌株构建系统进化树,结果如图 4、图 5 和表 4 所示。供试菌株的 16S rDNA 序列与芽孢杆菌属的标准菌株同源相似度大部分在 95% 以上,同时该菌株与标准菌株 16S rDNA 序列的同源相似性均低于 97%,因此确定 L-72 菌株是与 *Bacillus velezensis*,*Bacillus amyloliquefaciens* 亲缘关系最近的芽孢杆菌属(*Bacillus*)中的一个新种。

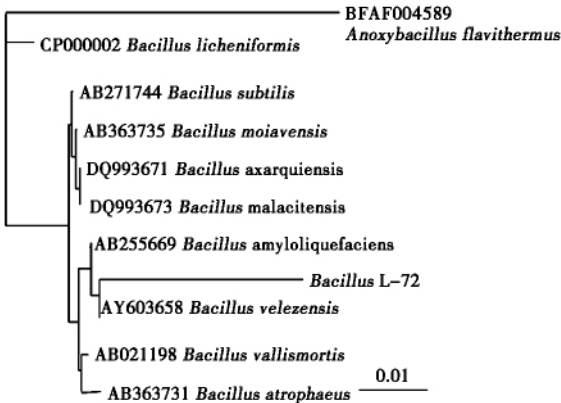


图 4 拮抗菌 L-72 菌株的 16S rDNA 序列系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of 16S rDNA sequence of antagonistic strain L-72 and related strains

表 4 拮抗菌 L-72 菌株与几种标准菌株的相似性比较

Tab. 4 Comparison of similarity between antagonistic strain L-72 and several norm stains			
序列号 Sequence number	种名 Species name	菌种号 Strain number	相似性 / % Similarity
AB255669	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	NBRC 15535	96.02
AB363731	<i>Bacillus atrophaeus</i>	NBRC 15539	95.32
DQ993671	<i>Bacillus axarquiensis</i>	LMG 22476	95.57
CP000002	<i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC 14580	93.70
DQ993673	<i>Bacillus malacitensis</i>	LMG 22477	95.57
AB363735	<i>Bacillus mojavensis</i>	NBRC 15718	95.64
AB271744	<i>Bacillus subtilis</i>	NBRC 13719	95.72
AB021198	<i>Bacillus vallismortis</i>	DSM11031	95.87
AY603658	<i>Bacillus velezensis</i>	CR-502	96.10
BFAF004589	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	DSM2641	85.33

3 结论

从土壤中分离筛选出产芽孢拮抗菌株 L-72,对该菌株进行了形态观察和生理生化特征分析。用

表 3 生理生化试验结果

Tab. 3 Result of physiological and biochemical experiments

项目 Item	试验结果 Results
生长温度和耐热性试验 (4℃)	-
生长温度和耐热性试验 (37℃)	+
生长温度和耐热性试验 (45℃)	+
生长温度和耐热性试验 (65℃)	+
碳源利用试验 (可溶性淀粉)	+
碳源利用试验 (蔗糖)	-
碳源利用试验 (麦芽糖)	-
碳源利用试验 (甘露醇)	-
氮源利用试验 (加有磷酸二氢铵)	-
氮源利用试验 (不加磷酸二氢铵)	-
氮源利用试验 (加硝酸铵)	+
氮源利用试验 (不加硝酸铵)	-
荧光色素试验	+
脓青素产生试验	-
丙二酸利用试验	-
柠檬酸盐利用试验	+
酒石酸盐利用试验	-
接触酶试验	+
葡萄糖氧化发酵试验	+
糖醇类发酵	+
甲基红试验	-
V-P 试验	-
淀粉水解试验	-
纤维素分解试验	-
产糊精结晶试验	+
3-酮基乳糖测定	-
硝酸盐还原	+
亚硝酸还原试验	+
反硝化试验	-
产氨试验	+
脲酶试验	-
苯丙氨基脱氨	-
色氨酸脱氢酶试验	-
脂酶试验	-
牛奶分解试验	产酸
硫化氢试验	-

注: +, 表示阳性; -, 表示阴性。  
Note: +, Positive; -, Negative.

PCR 法扩增其 16S rDNA,测定全序列 (1 432 bp),与 GeneBank 中已知菌的 16S rDNA 序列对比,并用 Neighbor-joining 方法构建 L-72 菌株进化树,结果表明,L-72 菌株与 9 种模式菌株相似度均低于 97%。

