

胶孢炭疽菌拮抗菌株的筛选、鉴定及 抑菌物质分析

吕纪涛¹,魏 莉²,曹晓璐³,杨继业¹,郭晓军^{1*},李潞滨³,尹艳军¹
(1. 河北农业大学 生命科学学院,河北 保定 071000; 2. 邯郸市环境监测中心站,河北 邯郸 056002;
3. 中国林业科学研究院 林业研究所 林木遗传育种国家重点实验室,北京 100091)

摘要: 为了筛选获得高效拮抗建兰炭疽病病原菌胶孢炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 的菌株,采用平板对峙法,从新疆库姆塔格沙漠土样分离的 126 株细菌中初筛获得 23 株拮抗菌株,经平板扩散法复筛得到 1 株高效拮抗菌株 N147-1-3。结合菌落菌体形态观察、16S rDNA 序列分析和生理生化试验,鉴定该菌为甲基营养型芽孢杆菌 (*Bacillus methylotrophicus*)。对拮抗菌发酵液上清测定表明,60% 的硫酸铵沉淀物具有最高的抑菌活性,经氯仿抽提后萃取相不具有拮抗活性,经高温处理和蛋白酶 K 消化后抑菌物质的拮抗作用消失,初步分析抑菌物质是蛋白类物质。
关键词: 建立炭疽病; 胶孢炭疽菌; 芽孢杆菌; 拮抗作用; 筛选; 鉴定; 抑菌物质
中图分类号: S436.8 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2015)07-0089-05

Screening, Identification and Bacteriostat Qualitative Analysis of Antagonistic Strain against *Colletotrichum gloeosporioides*

LÜ Jitao¹, WEI Li², CAO Xiaolu³, YANG Jiye¹, GUO Xiaojun^{1*}, LI Lubin³, YIN Yanjun¹
(1. College of Life Science, Agriculture University of Hebei, Baoding 071001, China;
2. Environmental Monitoring Center of Handan, Handan 056002, China;
3. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Research Institute of Forestry,
Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: Twenty-three strains were obtained by screening strains with high antagonism against *Colletotrichum gloeosporioides* by the tablet confrontation method from 126 strains, which were isolated from Xinjiang Kumtag desert samples. Strain N147-1-3 with highest antagonism was obtained by using the plate diffusion method. Combined with the morphology observation of colonies and cells, 16S rDNA sequence analysis, physiological and biochemical characteristics tests, the strain was finally identified as *Bacillus methylotrophicus*. The test results of the supernatant of the strain fermented liquid showed that the sediment by adding 60% ammonium sulfate had the highest antibacterial activity. The supernatant of the strain fermented liquid lost its antimicrobial activity after the chloroform extraction. The antagonism effect of the strain disappeared after treatments by high temperatures or proteinase K. The antibacterial substance was finally identified as protein.
Key words: cymbidium anthracnose; *Colletotrichum gloeosporioides*; *Bacillus*; antagonism; screening; identification; antibacterial substance

收稿日期:2014-12-26
基金项目:国家林业局 948 项目(2011-4-71)
作者简介:吕纪涛(1987-),男,河北邯郸人,在读硕士研究生,研究方向:环境微生物资源开发与利用。
E-mail:648564840@qq.com
* 通讯作者:郭晓军(1980-),男,河北张家口人,讲师,在读博士研究生,主要从事微生物资源开发与利用研究。
E-mail:guoxiaojun545@126.com

建兰为多年生单子叶观赏花卉,花期较长且可多次开花,其根、叶可入药^[1]。现今,建兰已是盆栽观赏兰花的主要品种之一,其规模化养殖不断扩大,但建兰炭疽病的发生越来越严重,大大影响了建兰的欣赏价值和商品价值,给建兰养殖者带来了巨大经济损失,必须加以控制^[2]。建兰炭疽病主要由胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)侵染导致^[3]。采用生物防治法防治建兰炭疽病因具有无污染、不易诱导抗药性、防效持久等优点,逐渐成为国内相关研究的热点。曹晓璐等^[4]从毛乌素沙地土壤生物结皮样品中筛选出了 1 株高效拮抗兰花炭疽病的菌株 5A5-3,该菌株被鉴定为 *Bacillus velezensis*。

目前,随着极端微生物在抗菌蛋白、抗生素、酶等活性物质方面的大量开发和应用,研究者们逐渐把目光着眼于特殊环境微生物。本研究自新疆库姆塔格沙漠土样分离菌株,从中筛选到 1 株对胶孢炭疽菌具有高拮抗活性的菌株,并对其分泌的拮抗物质进行了定性研究,以期从拮抗菌中提取抑菌物质,为建兰抗病转基因育种提供全新的基因资源。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 初筛菌株为从新疆库姆塔格沙漠中分离出的 126 株细菌,这些菌株及建兰炭疽病原菌胶孢炭疽菌均由河北农业大学制药工程实验室提供。

1.1.2 培养基与试剂 NA 和 NB 培养基参考文献[5]配制,PDA 培养基参考文献[6]配制,生理生化试验中所用培养基参照《伯杰细菌鉴定手册》^[7]和《常见细菌系统鉴定手册》^[8]配制。

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌平板的制作 制作胶孢炭疽菌平板,方法见参考文献[9]。

1.2.2 初筛 将保存的 126 株菌株采用平板对峙法接到胶孢炭疽菌平板上,每个平板接 2 株相同菌株,28 ℃ 培养 4~5 d 后观察抑菌圈产生情况。

1.2.3 复筛 将 1.2.2 中得到的具有拮抗作用的菌株接种于装有 100 mL NB 培养基的 250 mL 三角瓶中,37 ℃、180 r/min 摇床培养 48 h。发酵液 10 000 r/min 离心 5 min,上清液用 0.2 μm 微孔滤膜过滤。在病原菌平板上均匀打孔,将 60 μL 滤液注入孔内,设置 3 个平行,28 ℃ 恒温培养 4~5 d,测量抑菌圈直径,挑选出抑菌圈大且清晰透明的菌株进行鉴定^[10]。

1.2.4 拮抗菌株的鉴定

1.2.4.1 菌落形态学鉴定 采用 10 倍梯度稀释法

制备拮抗菌株的菌悬液,吸取 100 μL 适宜浓度的菌悬液涂布在 NA 培养基平板上培养 24 h,对单菌落的大小、形状、边缘、表面、透明度及颜色等进行观察。并对该菌株进行革兰氏染色和芽孢染色,显微镜下观察。

1.2.4.2 16S rDNA 序列分析 采用 CTAB 法^[11]提取菌株 DNA,PCR 扩增其 16S rDNA 序列,扩增所需引物为通用引物 27F 和 1492R,27F:5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3';1492R:5'-GGTTACCTT-GTTACGACTT-3'。将扩增产物送往北京宝锐通生物科技有限公司测序,将所得序列与 GenBank 数据库中序列进行 Blast 分析比对^[12],并构建系统发育树^[13]。

1.2.4.3 生理生化鉴定 生理生化鉴定参照《伯杰细菌鉴定手册》^[7]和《常见细菌系统鉴定手册》^[8]进行。

1.2.5 抑菌物质的初步分析

1.2.5.1 粗提液的制备 将拮抗菌发酵液 12 000 r/min 离心 5 min,上清液进行硫酸铵沉淀,4 ℃ 静置过夜,然后 4 ℃、12 000 r/min 离心 20 min,收集沉淀,将沉淀溶于 pH 值 8.0、0.2 mol/L 的磷酸缓冲液中^[14],测定抑菌活性。硫酸铵饱和度分别设为 30%、40%、50%、60%、70%。

将抑菌活性最高的硫酸铵沉淀液作为后续研究的拮抗细菌抑菌物质粗提液。

1.2.5.2 氯仿处理 在试管内加入拮抗细菌抑菌物质的粗提液 2 mL 和等量的氯仿,静置分层后取上清液。重复 2~3 次,测定抑菌圈大小。

1.2.5.3 高温处理 取 2 支试管加入拮抗细菌抑菌物质的粗提液 5 mL,分别在 100 ℃ 和 121 ℃ 下处理 15 min,测定抑菌圈大小。

1.2.5.4 蛋白酶处理 取拮抗细菌抑菌物质的粗提液 1 mL,加入 20 μL 蛋白酶 K,充分混匀,55 ℃ 水浴 1 h,测定抑菌圈大小。

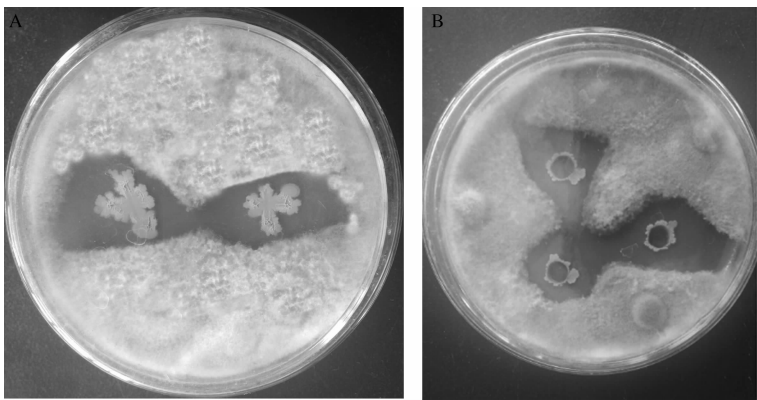
2 结果与分析

2.1 菌株的初筛结果

将 126 株菌株分别与胶孢炭疽菌进行平板对峙试验,共得到 23 株具有拮抗作用的菌株,图 1A 所示为 N147-1-3 菌株在平板对峙试验中产生了透明圈。

2.2 菌株的复筛结果

采用平板扩散法对初筛得到的 23 株菌株进行复筛,发现菌株 N147-1-3 的抑菌圈直径最大,为 20 mm,完全透明(图 1B),表明其对胶孢炭疽菌的生长具有很强的抑制作用。



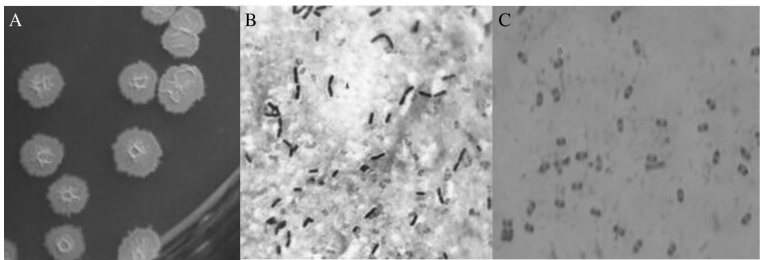
A. 初筛; B. 复筛

图 1 菌株 N147-1-3 对胶孢炭疽菌的拮抗作用

2.3 菌株的鉴定结果

2.3.1 形态观察 从图 2 可以看出,菌株 N147-1-3 的菌落呈暗白色,圆形,大小适中,湿润,边缘齿

状,内部圈状褶皱凸起,不透明;菌体为杆状、革兰氏阴性菌;芽孢椭圆,中生。



A. 菌落形态; B. 菌体形态; C. 芽孢形态

图 2 胶孢炭疽菌拮抗菌株 N147-1-3 的菌落及菌体形态

2.3.2 16S rDNA 序列分析 将菌株 N147-1-3 的 16S rDNA 序列与 GenBank 中已注册的 16S rDNA 序列用 Blast 程序进行序列相似性分析。取数据库中

及 1 株外源菌株构建系统发育树(图 3)。结果表明,菌株 N147-1-3 与菌株 *Bacillus methylotrophicus* 位于同一簇群,亲缘关系最近,其相似度为 100%。

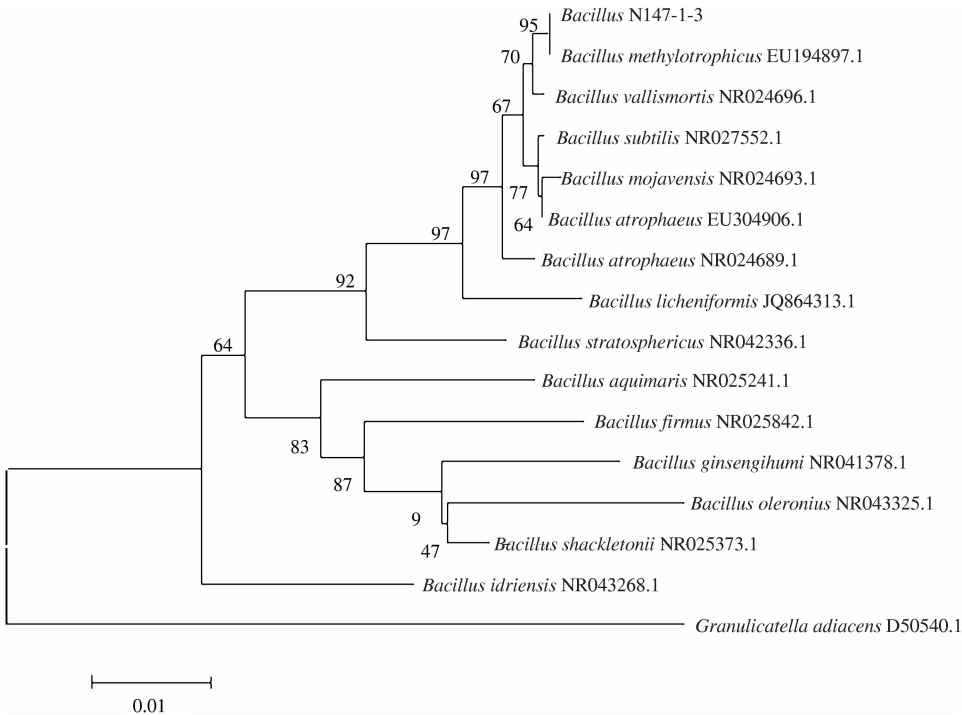


图 3 胶孢炭疽菌拮抗菌株 N147-1-3 的系统发育树

2.3.3 生理生化鉴定 菌株的生理生化试验结果见表 1。结合菌株 N147-1-3 的菌落菌体形态特征、16S rDNA 序列分析以及生理生化特性试验结果,最终将 N147-1-3 菌株鉴定为甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*)。

表 1 胶孢炭疽菌拮抗菌株 N147-1-3 的生理生化特性

试验名称	质量分数 (pH)	试验结果	试验名称	试验结果
荧光试验		-	3-酮基乳糖测定	-
丙二酸试验		-	产氨试验	+
耐盐需盐试验	2%	+	脲酶试验	+
	5%	+	色氨酸脱氨酶试验	-
	7%	+	脂酶试验	-
	10%	-	糖类发酵	+
耐 pH 试验	4	+	运动性试验	+
	5	+	明胶液化	+
	6	+	淀粉水解试验	-
	8	+	产糊精试验	+
	9	-	卵磷脂酶试验	+
	10	-	柠檬酸盐试验	+
甲基红试验		-	接触酶试验	+
苯丙氨酸脱氨酶试验		+	V-P 试验	+

注：+ 为阳性反应，- 为阴性反应。

2.4 抑菌物质的初步分析结果

2.4.1 硫酸铵逐级沉淀 发酵液经不同饱和度硫酸铵沉淀后抑菌活性不同,硫酸铵饱和度在 60% 时沉淀物的抑菌圈最大 ($P < 0.01$) (图 4), 证明饱和度 60% 的硫酸铵可使该菌株胞外抑菌物质绝大部分盐析出来,进而可以初步推断该抑菌物质是一种蛋白类物质。后续研究将 60% 硫酸铵沉淀物溶液作为粗提液。

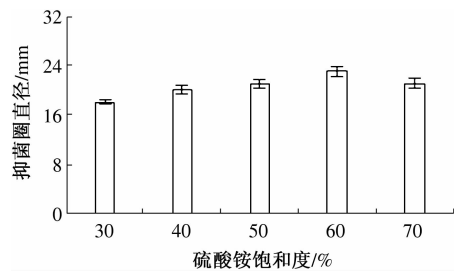


图 4 N147-1-3 菌株发酵液上清经不同饱和度和硫酸铵处理后沉淀物的抑菌活性

2.4.2 氯仿抽提处理 粗提液经氯仿 2 次抽提后,发现没有抑菌圈产生 (图 5), 说明抑菌物质对氯仿敏感。

2.4.3 高温处理 如图 6 所示,粗提液经 100 ℃ 和 121 ℃ 高温处理 15 min 后均没有抑菌圈产生,说明该抑菌活性物质对温度敏感,不耐高温。

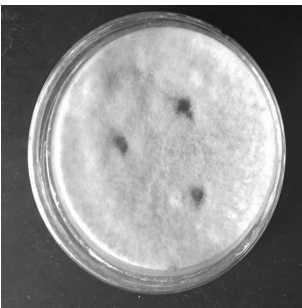
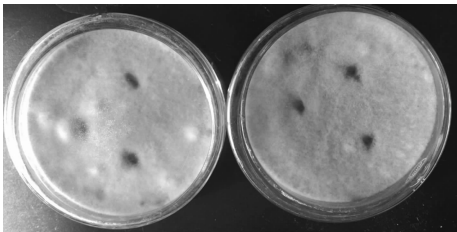


图 5 N147-1-3 菌株发酵液上清经氯仿抽提后的抑菌活性



左为 100 ℃ 处理,右为 121 ℃ 处理

图 6 N147-1-3 菌株发酵液上清经高温处理后的抑菌活性

2.4.4 蛋白酶处理 如图 7 所示,粗提液经蛋白酶 K 处理后,没有出现抑菌圈,证明蛋白酶 K 可以消化分解该抑菌活性物质。

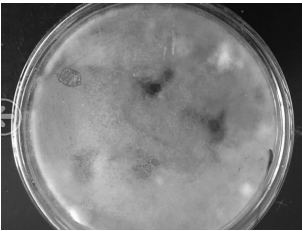


图 7 N147-1-3 菌株发酵液上清经蛋白酶 K 处理后的抑菌活性

3 结论与讨论

目前主要以化学药剂防治兰花病害,其他措施还包括加强栽培管理和选育抗病力强的新品种,关于利用拮抗微生物的生物防治研究少见报道^[15]。姚圣梅等^[16]通过研究明确了不同品种兰花感染炭疽病的程度,并对病原菌孢子的萌发做了初步探索。姚锦爱等^[3,17]分离了建兰炭疽病病原菌,对其培养条件进行了优化,并对其分生孢子的生物特性进行了研究,在病害防治方面选用的是化学药物。李景蕙等^[18]对兰花炭疽病的发生特点及综合防治进行了研究,指出高温高湿促进炭疽病的发生,防治方式为物理减除和化学防治。雷洽祥^[19]研究了兰花炭疽病的预防和防治,防治方式主要是喷药治疗。生物防治方面,曹晓璐等^[4]筛选出了 1 株高效拮抗胶

孢炭疽菌的菌株,但未对其拮抗物质的性质进行研究。

本研究从分离自新疆库姆塔格沙漠土样的 126 株菌株中,筛选得到活性最高的菌株 N147-1-3,其对病原菌的抑菌圈直径达到 20 mm,此株具有高生防活性的野生菌株为建兰炭疽病的生物防治研究以及抑菌活性物质的提取提供了基础材料。对 N147-1-3 进行菌落菌体形态观察、生理生化鉴定以及 16S rDNA 序列分析,确定该菌株为甲基营养型芽孢杆菌。通过硫酸铵逐级沉淀、氯仿抽提处理、高温处理和蛋白酶 K 消化处理对该菌株胞外抑菌物质的性质进行研究,确定该抑菌物质为蛋白类物质。近年来,对甲基营养型芽孢杆菌的相关报道逐渐增多,姜云等^[20]筛选到 1 株高拮抗人参锈腐病的甲基营养型芽孢杆菌,其抑菌活性物质为蛋白类。芽孢杆菌作为植物病害生物防治的优势种群,具有较强的抗菌防病作用,已成功用于多种植物病害的生物防治^[21-22],但是尚未发现在建兰病害防治中的应用报道。本研究筛选到的甲基营养型芽孢杆菌对建兰炭疽病原菌有很强的拮抗活性,为建兰病害的生物防治提供了新的拮抗菌资源,初步判定是蛋白类物质起作用,至于其组成成分和抑菌机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] 吴高杰,李璐,赖钟雄. 兰花试管开花研究进展[J]. 中国农学通报,2011,27(10):67-72.

[2] 姚锦爱,余德亿,陈福如,等. 建兰胶孢炭疽病 ITS 序列分析及其 PCR 快速检测[J]. 植物保护学报,2013,40(3):249-254.

[3] 姚锦爱,黄鹏,余德亿,等. 建兰胶孢炭疽菌分生孢子的生物学特性及病害防治药剂的筛选[J]. 福建农林大学学报:自然科学版,2012,41(6):585-589.

[4] 曹晓璐,刘慧娟,郭晓军,等. 兰花炭疽病拮抗菌 5A5-3 菌株的初步筛选和鉴定[J]. 林业科学研究,2013,26(5):598-602.

[5] 钱存柔,黄仪秀. 微生物学实验教程[M]. 北京:北京大学出版社,1999.

[6] 李军红,姜绍通,童洋洋. 产脂肪酶真菌的筛选及产酶条件优化[J]. 安徽农业科学,2011,39(26):15840-15842.

[7] 布坎南,吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8 版. 北京:科学出版社,1984.

[8] 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.

[9] 朱莹. 大丽轮枝菌拮抗细菌 DM-54 菌株的分离及抗菌蛋白纯化[D]. 保定:河北大学,2009.

[10] 李术娜,杜红方,袁洪水,等. 棉花黄萎病拮抗菌 LC-04 菌株的抗菌蛋白产生条件研究[J]. 棉花学报,2006,18(4):233-237.

[11] 赵辉,鲁传涛,刘红彦,等. 1 株生防芽孢杆菌的鉴定及其抑菌活性的初步研究[J]. 河南农业科学,2014,43(4):75-79.

[12] 张帆,杨丽蓉,薛保国,等. 小麦全蚀病菌拮抗菌株 FY1 的筛选和鉴定[J]. 河南农业科学,2014,43(5):88-92.

[13] Saitou N, Nei M. The neighbour-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Mol Biol Evol,1987,4:406-425.

[14] 郝晓娟,刘波,谢关林,等. 短短芽孢杆菌 JK-2 菌株抑菌物质特性的研究[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版,2007,33(5):484-489.

[15] 连彩,郭晓军,朱宝成,等. 兰花枯萎病拮抗细菌的筛选与鉴定[J]. 华北农学报,2012,27(2):222-225.

[16] 姚圣梅,姜晓明. 兰花炭疽病的初步研究[J]. 仲恺农业技术学院学报,1997,10(1):36-40.

[17] 姚锦爱,黄鹏,余德亿,等. 建兰炭疽病原菌分离、鉴定及培养条件优化[J]. 热带作物学报,2011,32(10):1940-1944.

[18] 李景蕻,张丽华. 兰花炭疽病的发生特点及综合防治[J]. 北方园艺,2013(18):108-110.

[19] 雷洽祥. 兰花炭疽病的防治[J]. 中国花卉盆景,2005(8):17.

[20] 姜云,许鹏,陈长卿,等. *Bacillus methylotrophicus* 菌株产抗菌蛋白性质及对人参锈腐病菌抑菌作用[J]. 农药,2013,52(11):835-838.

[21] Oita S, Horita M, Yanagi S O. Purification properties of a new chitin-binding antifungal CB21 from *Bacillus licheniformis*[J]. Bioscience Biotechnology & Biochemistry, 1996,60(3):481-483.

[22] 黄剑飞,李健,刘淇,等. 一株芽孢杆菌的分离、鉴定及其抗菌效果研究[J]. 安徽农业科学,2008,36(6):2321-2322,2326.