

# 蚯蚓粪中黄瓜枯萎病菌拮抗细菌的筛选及鉴定

刘 丽, 张艳菊\*

(东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030)

**摘要:**采用稀释平板法,从新鲜蚯蚓粪中分离到374株细菌。筛选出对黄瓜枯萎病菌有拮抗活性的菌株28株,其中以D2的抑菌效果最好,抑菌直径达28.28 mm,且抑菌效果稳定。利用菌体形态和菌落特征观察、生理生化试验和16S rDNA序列同源性分析,对抑菌效果良好的菌株进行分类鉴定, D2的分子生物学鉴定中,得到目的片段大小为1462 bp,并结合其形态及生理生化特征结果表明该菌株为洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cenocepacia*)。

**关键词:**蚯蚓粪; 黄瓜枯萎病菌; 拮抗细菌; 16S rDNA 鉴定

中图分类号:

文献标识码:

文章编号: 1003-8701(2016)03

## Screening and Identification of Antagonistic Bacterial Strains against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* in Earthworm Excrement

LIU li, ZHANG Yanju\*

(College of Agronomy, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** A total number of 374 bacterial strains were isolated from fresh earthworm excrement by tube dilution assay. The result of plate test showed that 28 strains had antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. According to the results of the suppression assay, strain D2 was selected as the best one. The inhibiting diameter was 28.28 mm and the inhibitory effect is stable. The mycelium shape, colony characteristic observation, a series of physiological and biochemistry experiments and determination of the sequence of 16S rRNA of the D2 had been done. Identification of molecular biology of D2 obtained the target fragment sized 1462 bp. Combined with its morphological and physiological and biochemical characteristics, the results showed that the strain was *Burkholderia cenocepacia*.

**Key words:** Earthworm excrement; Cucumber fusarium wilt disease; Antagonistic bacteria; 16S RDNA identification

黄瓜枯萎病是由尖孢镰孢菌黄瓜专化型(*Fusarium oxysporum* f.sp.*cucumerinum* Owen) 侵染引起的、具有毁灭性的真菌病害,广泛分布于世界各黄瓜产区。目前枯萎病的防治措施主要有种植抗病品种、轮作、嫁接育苗及药剂防治等。药剂防治虽是快速、有效的减轻枯萎病危害的方法,但会对作物和环境造成污染,产生农药抗性及农药残留等一系列令人担忧的问题。而且随着人们环保意识的增强和对绿色食品的认可,使药剂防治受到了很大程度的限制。因此减少化学农药的

使用,使用生物有机肥和生物农药成为减轻枯萎病危害的安全、经济、有效的途径。

蚯蚓粪是蚯蚓对其生活环境周围的有机质进行利用和降解的产物,家畜禽类的排泄物经过蚯蚓的处理,既可以有效利用生物质能源,降低环保中的投入资金,又能够显著减少废弃物里病原菌的数目<sup>[1]</sup>。更可贵的是至少含有2种以上拮抗微生物,这些大量有益微生物施入土壤后,可迅速抑制有害菌的繁殖,减轻土传病害的发生,从而达到控制病害,改善作物品质的目的。本研究的目的是从蚯蚓粪中筛选出对黄瓜枯萎病菌有较强抑菌作用的拮抗细菌,鉴定其分类地位,研究其对黄瓜枯萎病的防治效果,为扩大生产以及进一步开发有关蚯蚓粪的系列优质高效农化产品提供有力的理论依据。

收稿日期:

基金项目: 国家自然科学基金项目(31171792)

作者简介: 刘 丽(1990-),女,硕士,主要从事植物病原生物学研究。

通讯作者: 张艳菊,女,教授,博士生导师, E-mail: yanjuzhang@yahoo.com.cn

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料

#### 1.1.1 供试蚯蚓粪

新鲜蚯蚓粪来自黑龙江省双城区杏山镇顺利村。

#### 1.1.2 供试黄瓜品种

感病品系 L18, 由东北农业大学黄瓜课题组提供, 用于拮抗菌株皿内促生和盆栽防效试验。

#### 1.1.3 供试病菌

黄瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum f. sp. cucumerinum*), 由东北农业大学植物病理研究室提供。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 蚯蚓粪中拮抗细菌的分离

称取蚯蚓粪样品 10 g 倒入含 90 mL 无菌水的三角瓶中, 震荡 20 min, 得到蚯蚓粪悬浮液母液。取 1 mL 加入装有 9 mL 灭菌水三角瓶中形成  $10^{-2}$  稀释, 并依次将蚯蚓粪母液稀释  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 。取系列稀释菌液 0.2 mL 分别涂布在 NA 平板上, 置于 28℃ 恒温箱中培养 24 h, 挑取单菌落进行纯培养。

#### 1.2.2 蚯蚓粪中拮抗细菌的筛选及对植物病原真菌的抑制作用

采用平板对峙法测定<sup>[2]</sup>。在 PDA 培养基中心接种黄瓜枯萎病菌, 25℃ 恒温培养 48 h 后, 在距离菌碟 2.5 cm 处接种拮抗菌悬浮液, 每个培养皿对称点 4 个点, 重复 3 次, 以不接拮抗菌为空白对照。26℃ 培养 7 d, 测量菌落直径, 计算抑菌率。

$$\text{抑菌率} = \frac{\text{对照菌落生长直径} - \text{处理菌落生长直径}}{\text{对照菌落生长直径}} \times 100\%$$

挑取纯培养的待测细菌培养物放入装有 50 mL NB 培养液的 100 mL 三角瓶中, 置于恒温振荡培养箱中 28℃ 180 r/min 震荡培养 48 h, 并用无菌水配制成浓度为  $3 \times 10^8$  cfu/mL 的菌悬液备用。

#### 1.2.3 拮抗菌的鉴定

##### 1.2.3.1 形态鉴定

单菌落形态: 利用逐级稀释法, 将 D2 菌悬液用无菌水稀释,  $10^{-3}$  到  $10^{-7}$  依次涂在 NA 上, 28℃ 培养 2 d, 有了单菌落, 观察菌落的形态。

革兰氏染色: 1. 固定。2. 结晶紫染 1 min。3. 水冲洗。4. 加碘液染 3 min。5. 水洗, 吸去水分。6. 加 95% 酒精脱色, 20 s 后水洗, 吸去水分。7. 番红染液染 10 s 后, 用水冲掉。8. 油镜镜检。革兰氏阳性菌菌体被染成紫色, 革兰氏阴性菌被染

成红色<sup>[3]</sup>。

芽孢染色: 1. 制备菌悬液。2. 孔雀绿加热染色 20 min。3. 涂片固定。4. 水洗脱色。5. 番前红复染 3 min。6. 干燥, 油镜镜检。芽孢呈绿色, 芽孢囊及营养体呈红色<sup>[4]</sup>。

采用扫描电镜观察拮抗菌的菌体形态、测量菌体大小。

##### 1.2.3.2 生理生化特性测定

参照东秀珠等<sup>[5]</sup>、方中达<sup>[6]</sup>、钱存柔等<sup>[4]</sup>的方法进行 D2 的生理生化特性测定。

荧光产生反应: 将 D2 接种在 NA 斜面上, 28℃ 恒温培养 2 d, 挑取培养物划线接种于 King B 培养基斜面上, 置 28℃ 恒温培养 2 d 后, 在 365 nm 紫外灯下观察有无荧光产生。

把 D2 在 NB 里培养, 不加菌是空白对照, 依次放在 4℃/41℃ 水浴锅里, 培养 2 d, 观察培养液, 出现浑浊是生长的。

耐盐性试验: 配制 NaCl 含量分别为 2%、5%、7%、10% 的 NB 培养液, 接种 D2, 28℃ 150 r/min 振荡培养 2~3 d, 观察细菌的生长情况<sup>[5]</sup>。

明胶液化试验: 取斜面培养的 D2 菌苔穿刺接种于明胶高层约 2/3 深度的培养基上, 以未接种为空白对照。置于 22℃ (明胶低于 20℃ 凝固成固体, 高于 24℃ 则自行呈液化状态) 温箱中培养, 3 d、5 d、7 d 分别观察明胶是否液化及液化程度。

淀粉水解试验: 将 D2 划线接种于可溶性淀粉平板上, 28℃ 培养 2~3 d; 打开皿盖, 在平板上滴加少量碘液, 轻轻旋转, 使碘液覆盖整个平板。如果培养基变为深蓝色, 说明拮抗菌未水解淀粉, 为阴性反应, 以“-”表示; 如果菌体周围出现无色透明圈, 为阳性反应, 以“+”表示。

##### 1.2.3.3 分子鉴定

16S rDNA 序列分析: 拮抗菌基因组 DNA 采用 CTAB 法提取<sup>[7]</sup>; 以基因组 DNA 为模板, 采用细菌的 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增<sup>[8]</sup>。引物序列为: 上游引物 F: 5'-AGTTTGATCMTGGCTCAG-3', 下游引物 R: 5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3', 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

PCR 反应体系: 25 μL 总体积中包括 0.5 μL 基因组 DNA (50 ng/μL), 引物 F (10 μM)、R (10 μM) 各 0.5 μL, 2.5 μL Buffer (10×) (with Mg<sup>2+</sup>), 1 μL dNTP (2.5 mM), 0.2 μL Taq (1 U/μL), 19.8 μL ddH<sub>2</sub>O。

反应程序: 首先 94℃ 预变性 4 min; 然后 94℃ 变性 45 s, ; 55℃ 退火 45 s, ; 72℃ 延伸 1 min, ; 循环 30 次; 接着 72℃ 延伸 10 min, 最后在 4℃

下保存。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测经试剂盒纯化后,送至上海生物工程技术公司进行测序。将所测得的16S rDNA序列用Blast软件与Genbank数据库进行同源性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 黄瓜枯萎病菌拮抗细菌的筛选

本试验采用稀释平板法,分别从先后获得的两批新鲜蚯蚓粪中分离到374株细菌,编号为D1~D374。对这374株细菌进行枯萎病菌拮抗性试验,共28株细菌对黄瓜枯萎病菌具有一定的拮抗作用(表1)。

表1 黄瓜枯萎病拮抗细菌的筛选

菌株编号	抑菌直径(mm)	菌株编号	抑菌直径(mm)
D1	29.16	D123	34.66
D2	28.28	D129	39.08
D18	30.68	D136	37.52
D22	32.74	D180	35.38
D24	32.90	D209	35.06
D26	34.82	D218	31.38
D41	34.66	D243	32.94
D44	37.04	D265	34.74
D54	31.82	D272	36.28
D69	35.48	D297	35.76
D88	35.06	D312	33.44
D91	36.12	D322	31.80
D93	33.40	D349	38.42
D114	37.84	D355	37.62

### 2.2 分离菌株的拮抗力测定

采用室内对峙培养法对经分离纯化所得的菌株进行拮抗力测定,其中以D2的抑菌效果最显著,抑菌直径达28.28 mm,对黄瓜枯萎病菌抑菌率为64.0%,并且经多次重复试验,抑菌效果稳定。

### 2.3 拮抗菌的鉴定

#### 2.3.1 拮抗菌形态及染色反应

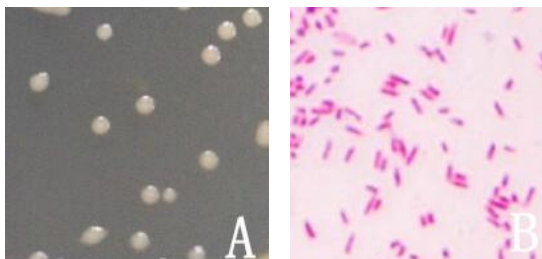


图1 菌落特征及革兰氏染色

拮抗菌在NA培养基上生长良好,单菌落形态为圆形或近圆形,扁平状,中等大小,表面光滑,不透明(图1A)。革兰氏染色反应为阴性(图1B),不产生芽孢。扫描电子显微镜下菌体呈直杆状,单极生鞭毛,0.5~1.0  $\mu\text{m}$   $\times$  1.5~4.0  $\mu\text{m}$ (图2)。

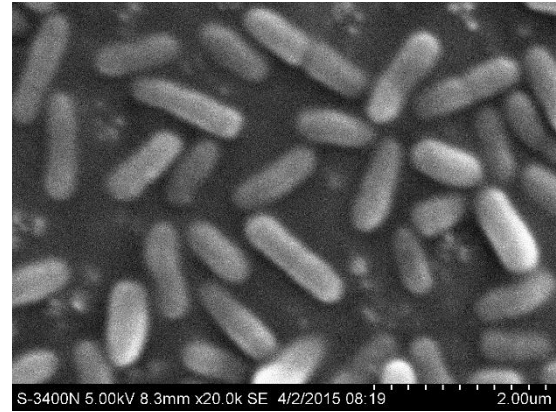


图2 拮抗细菌D2的电镜观察(20 000 $\times$ )

#### 2.3.2 生理生化特性

生理生化反应实验结果表明,拮抗细菌在荧光反应实验中结果为阴性,即不产生荧光。在4 $^{\circ}\text{C}$ 时不生长,在41 $^{\circ}\text{C}$ 时可以生长。在耐盐性实验中,拮抗菌在NaCl浓度为2%和5%时可以生长,7%和10%时不生长。明胶液化实验中,拮抗菌可以使明胶液化。淀粉水解实验中,拮抗菌不能分解淀粉(表2)。

表2 D2的生理生化特性

细菌学试验	鉴定结果
荧光反应	-
生长试验	4 $^{\circ}\text{C}$ -
	41 $^{\circ}\text{C}$ +
耐盐性试验	2% +
	5% +
	7% -
	10% -
明胶液化	+
淀粉水解试验	-

注:“+”阳性,“-”阴性。

根据《常见细菌系统鉴定手册》及《伯杰氏细菌鉴定手册》<sup>[9]</sup>综合分析菌株D2形态特征及生理生化特性,初步鉴定菌株D2属于伯克霍尔德里氏菌属(*Burkholderia*)。

#### 2.3.3 拮抗菌16S rDNA序列分析

PCR扩增片段大小为1462 bp,将扩增产物送至上海生物工程技术公司进行测序,将所得的测

序结果与 Genbank 中已报道的序列进行同源性比较,结果表明拮抗菌 D2 与 NR\_074686.1 (*Burkholderia cenocepacia* AU 1054 strain AU 1054)、CP001025.1 (*Burkholderia ambifaria* MC40-6)、CP000958.1 (*Burkholderia cenocepacia* MC0-3)、CP000458.1 (*Burkholderia cenocepacia* HI2424) 和 CP000378.1 (*Burkholderia cenocepacia* AU 1054) 的同源性均达到 99%,证明该菌株为洋葱伯克霍尔德菌 (*Burkholderia cenocepacia*) (如图 3)。

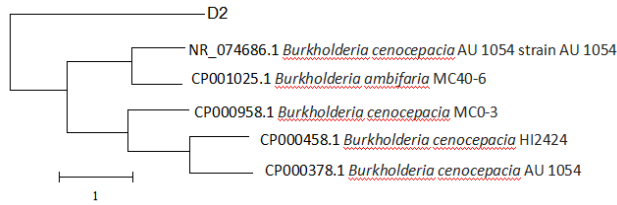


图 3 拮抗菌 D2 的 16S rDNA 系统发育树图

### 3 讨论与结论

土传病害生物防治的研究始于 20 世纪 20 年代,至今已有不少成功范例,其中最著名的当属 *Agrobacterium radiobacter* 84 菌系,它可防治由 *A. tumefaciens* 引起的桃、樱桃、葡萄等植物的根癌病,目前已在很多国家推广使用<sup>[10]</sup>。土传病害(如枯萎病)的发生是土壤有害生物和环境条件共同作用的结果<sup>[11]</sup>,土壤微生物组成及非生物因素如土壤的理化性质和营养状况等都会对病害的发生和为害产生影响。

随着科学技术的进步和人类对蚯蚓研究的深入,人们发现蚯蚓粪并不仅仅是代谢废弃物,而且在促进作物的生长、抑制病原菌的活性和改善土壤肥力等方面都具有重要作用。胡艳霞等<sup>[12]</sup>研究发现,蚯蚓对农业有机废弃物进行生物降解的产物蚯蚓粪,在一定程度上能够控制黄瓜苗期土传病害的发生,并表现出明显的促生长效应;并从新鲜蚯蚓粪中成功分离到拮抗活性强、抗菌性广的拮抗微生物。本研究通过对分离得到的 374 株细菌进行发酵液的抑菌活性测定,筛选出对黄瓜枯萎病菌有一定抑菌效果的菌株 28 个。对 28 株菌株进行单胞分离、抑菌活性测定,确定 D2 为最佳菌株,抑菌直径达 28.28 mm,抑菌效果稳定,此拮抗细菌用来防治黄瓜枯萎病的潜力是非常大的。直接在土壤中养殖蚯蚓或者添加适量蚯蚓粪,可起到防病、增肥、改良土壤、促进作物生长等作用,是符合绿色农业发展的一种方法<sup>[13]</sup>。

本研究在菌株的形态、培养性状、生理生化的

特性等传统鉴定方法的基础上,结合 16S rDNA 分子鉴定方法对 D2 菌株分类地位进行鉴定。传统鉴定结果与《常见细菌系统鉴定手册》及《伯杰细菌鉴定手册》描述的洋葱伯克霍尔德菌 (*Burkholderia cenocepacia*) 特征一致。16S rDNA 序列分析进行细菌鉴定是国际上通用的鉴定技术,一般认为 16S rDNA 序列同源性小于 98%,可以认为种不同,同源性小于 93%~95%,可以认为属不同<sup>[5]</sup>。D2 与洋葱伯克霍尔德菌 (*Burkholderia cenocepacia*) NR\_074686.1、CP001025.1、CP000958.1、CP000458.1 和 CP000378.1 的匹配率均达到 99%,认为菌株 D2 即为洋葱伯克霍尔德菌 (*Burkholderia cenocepacia*)。伯克霍尔德菌是一类广泛存在于土壤、水和植物根围的革兰氏阴性细菌,在农业领域中具有生物防治、生物降解和促进植物生长等多种功能<sup>[14]</sup>。目前国内外研究较多的伯克霍尔德菌是来自土壤、水及植物根围等农业环境中,也有从水稻、柑橘、桑树体内分离到的报道<sup>[5]</sup>。有关该拮抗细菌的田间防治效果以及生物安全性还有待于进一步的研究。

### 参考文献:

- [1] Kumar A.G., and Sekaran G., Enteric pathogen modification by anecic earthworm, *Lampito mauritii*[J]. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 2005(9): 15-17.
- [2] 苗则彦,赵奎华,刘长远. 内生细菌 B504 的鉴定及对黄瓜枯萎病的生防作用[J]. *植物保护*, 2009, 35(6): 73-77.
- [3] 沈萍,范秀荣,李广武. 微生物学实验(第三版)[M]. 北京:高等教育出版社, 2003: 28-30; 116-120.
- [4] 钱存柔,黄仪秀. 微生物学实验教程[M]. 北京:北京大学出版社, 2008: 23-33; 113-129.
- [5] 东秀珠,蔡妙英,等. 常见细菌鉴定手册(第一版)[M]. 北京:科学出版社, 2001: 364-398.
- [6] 方中达. 植物研究方法(第三版)[M]. 北京:中国农业出版社, 1998: 171-208; 212-218.
- [7] Ausubelm F, Brent R, Kingston R E. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京:科学出版社, 1998: 39.
- [8] 滕齐辉,曹慧,崔中利,等. 太湖地区典型菜地土壤微生物 16S rDNA 的 PCR-RFLP 分析[J]. *生物多样性*, 2006, 14(4): 345-351.
- [9] 驹田旦. 利用拮抗微生物防治土壤病害[M]. *农药译丛*, 1987, 9(1): 44-49.
- [10] 李长松. 拮抗性细菌生物防治植物土传病害的研究进展[J]. 1992, 8(4): 168-172.
- [11] Celetti M J, Melzer M S, Boland G J. Integrated management of angular leaf spot (*Phaeosariopsis griseola* (Sacc.) Ferr.) on snap beans in Ontario[J]. *Plant Health Progress*, 2005, doi: 10.1094/PHP-2005-1129-01-RS.
- [12] 胡艳霞,孙振钧,程文玲. 蚯蚓养殖及蚓粪对植物土传病害

- 抑制作用的研究进展 [J]. 应用生态学报, 2003, 14(2): 296-300.
- [13] 叶云峰, 付 岗, 袁高庆, 等. 植物土传病害安全防控技术 [J]. 山西农业科学, 2009, 37(7): 64-66.
- [14] 牟志美, 路国兵, 冀宪领, 等. 桑树内生拮抗细菌 *Burkholderiacepacia* LulO-1 的分离鉴定及其内生定殖 [J]. 微生物学报, 2008, 48(5): 623-630.

(责任编辑: 王 昱)