一株韭菜内生高效氯氰菊酯降解生防细菌的分离与鉴定。

任明,赵蕾*

(山东师范大学 生命科学学院,济南 250014)

摘 要: 从新鲜韭菜的根中分离到一株对多种蔬菜病原真菌有抑制作用的优势内生细菌 W7,对其拮抗机制的初步研究结果表明,胞外代谢物对病原真菌无抑制作用,而菌体经超声波破碎及有机溶剂沉淀得到的多糖粗提液可明显抑制病原菌菌丝生长。该菌还能以 100 mg/L 高效氯氰菊酯为唯一碳源生长,7 d 的降解率为51.3%,表明该菌是一株兼具农药降解特性的生防内生细菌。通过对其形态特征、生理生化及 16S rDNA 同源性序列分析,初步鉴定该菌为类芽孢杆菌(Paenibacillus spp.)。

关键词:内生细菌;拮抗;菌体多糖;高效氯氰菊酯;类芽孢杆菌

中图分类号: Q939.92

文献标识码: A

文章编号:1004-1389(2010)03-0057-05

Isolation and Identification of a Beta-cypermethrin-degrading and Biocontrol Endophytic Bacteria in Leek

REN Ming and ZHAO Lei*

(College of Life Science, Shandong Normal University, Ji'nan 250014, China)

Abstract: One dominant endophytic bacterial strain W7 was isolated from the root of fresh leek, which had a broad inhibition spectrum against several vegetable pathogenic fungi. The results of its antagonistic mechanism showed that the extracellular metabolites had no effect on pathogenic fungi, but the somatic polysaccharose which obtained from cells by ultrasonic disruption and organic solvent precipitation could inhibit the growth of mycelium. Strain W7 was also found to be capable of utilizing beta-cypermethrin as the sole source of carbon for growth, and its degradation within 7 days at initial concentration of 100 mg/L was 51.3%. The results indicated that strain W7 was a pesticide-degrading and an endophytic bacteria suitable for biocontrol. It was identified as *Paenibacillus* spp. based on morphological-physiological-biochemical properties and 16S rDNA sequence analysis.

Key words: Endophytic bacteria; Antagonism; Somatic polysaccharide; Beta-cypermethrin; *Paeniba-cillus* spp.

植物内生菌是指定殖在健康植物体内并与植物建立和谐关系的一类微生物,在长期进化的过程中,由于内生菌能够在植物体内大量繁殖和扩散,克服了其它生防菌定殖能力较差、易受环境影响且防效不稳定的缺陷,因而成为目前生防研究领域的一大热点。

然而,对于植物内生菌的研究以往大多集中

在其生防和促进作物生长方面,对于兼具农药降解特性生防内生菌的研究则鲜见报道^[1]。众所周知,在韭菜生产中,由于韭蛆的肆虐造成了化学杀虫剂的超量使用,致使韭菜中农药残留超标异常严重,百姓呼声甚高。针对这种情况,本研究以农药污染严重的韭菜植株内生细菌为筛选目标,通过考查菌株的生防及农药降解特性,获得了对拟

^{*} 收稿日期:2009-08-12 **修回日期:**2009-10-27

基金项目:"十一五"国家科技支撑计划重点项目(2006BAD17B00)。

作者简介:任 明(1984-),女,山东菏泽人,硕士研究生,专业方向为微生物资源开发与应用。E-mail: shining_1984@126.com * 通讯作者:赵 蕾(1963-),女,江苏镇江人,副教授,硕士生导师,主要从事植物病害生物防治研究。E-mail: zhaolei @ sdu. edu. cn

除虫菊酯类杀虫剂高效氯氰菊酯有降解作用、且对多种蔬菜病原真菌具有明显拮抗作用的生防优势内生细菌 W7,并进行了拮抗机制的初步研究及菌种的鉴定,这对阐明韭菜内生细菌的作用机制、防治韭菜病害、降低农药残留具有重要的理论及实践意义。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

菌株源自山东曲阜采集的完整新鲜韭菜植株。

1.2 供试病原菌

黄瓜枯萎病菌(Fusarium oxysporum f. sp. cucumerinum)、西瓜枯萎病菌(Fusarium oxysporum f. sp. niveum)由青岛农业大学植物保护学院提供;萝卜枯萎病菌(Fusarium spp.)由山东农业大学植物保护学院提供;草莓灰霉病菌(Botrytis cinerea)由山东师范大学微生物实验室分离鉴定。

1.3 培养基

牛肉膏蛋白胨培养基(NA);马铃薯蔗糖培养基(PDA);对峙培养基(改良 PDA):在 PDA 培养基中加入 3 g/L 牛肉浸膏;改良 PDB 培养基:在 PDB 培养基中加入 3 g/L 牛肉浸膏;添加农药的基础培养基: NH₄ Cl 0.5 g, MgSO₄ • 7H₂O 0.2 g, Na₂ HPO₄ • 12H₂O 0.5 g, ZnSO₄ • 7H₂O 200 μ g, KH₂PO₄ 0.5 g, CaCl₂ 0.06 g, 农药(毒死蜱或高效氯氰菊酯)100 mg, pH 7.2, 蒸馏水 1 000 mL。

1.4 主要试剂

PCR 扩增的全套试剂购自上海生物工程技术服务有限公司,16S rDNA 序列扩增引物由上海生物工程技术服务有限公司合成,毒死蜱、高效氯氰菊酯原药由山东农业大学植物保护学院提供,其余试剂均为国产分析纯。

1.5 韭菜内生细菌的分离

取健康韭菜的根部,冲洗干净后晾干,切成1cm 左右的小段,表面消毒后置灭菌研钵中,加无菌水研磨至浆状后稀释涂平板^[2]。根据菌落形态,颜色、大小等挑取不同的单菌落,纯化并保存。

1.6 内生拮抗细菌的筛选

采用平板对峙法分别测定初筛菌株对各蔬菜病原真菌的拮抗作用。取培养5d的病原菌菌丝块接种于改良PDA平板中央,28℃培养1d后,在菌落四周接初筛菌株。设无细菌处理为对照,每处理重复3次[3]。培养7d后测量病原菌菌落

直径,计算抑制率。

病原菌生长抑制率=(对照菌落直径-处理 菌落直径)/对照菌落直径×100%。

1.7 菌株 W7 抑菌机制

菌体多糖的提取^[4-6]将菌株 W7 接种于改良 PDB 培养基,37℃摇瓶培养 72 h,离心取菌体,超声波破碎后于 95℃水浴中提取 3.5 h,重复抽提 2~3次,合并上清液。加入 3 倍体积的无水乙醇,4℃静置过夜。6 000 r/min 离心 20 min 后,溶解沉淀,4℃透析过夜过细菌滤器得菌体多糖粗提液。

菌体多糖粗提液对菌丝生长的抑制作用^[7]:对菌落延伸的抑制采用平板抑制法。将病原菌接种于 PDA 平板上,28℃培养 1 d 后,在菌落周围用直径 9 mm 的打孔器打孔,加入菌体多糖粗提液,对照以等量的无菌水代替,继续培养 2~4 d,观察抑菌情况。

1.8 农药降解特性研究

将制备好的菌悬液($OD_{600}=1.0$)以 2%的接种量接种到 50 mL 含 100 mg/L 农药(高效氯氰菊酯或毒死蜱)的液体基础培养基中。分别于接种培养后的第 1、2、3、4、5、6、7 d 取样,测菌体生长量(OD_{600}),然后在发酵液中加入等体积的二氯甲烷震荡,静置 1h 取下相,测 278 nm 处的光吸收值[$^{8-9}$]。根据标准曲线得农药质量浓度,并计算降解率: $R=(C_{CK}-C)/C_{CK}\times100\%$

其中,R 为降解率;C 为接菌处理中的残存质量浓度(mg/L); C_{CK} 为对照中的农药质量浓度(mg/L)。

1.9 菌种鉴定

生理生化试验 按照《常用细菌系统鉴定手册》^[10]的方法进行常规的革兰氏染色、芽孢染色、碳源利用试验、甲基红试验(M. R)、乙酞甲醇试验(V- P)、接触酶试验等对菌株 W7 进行初步鉴定。

16S rDNA 序列扩增和序列分析 采用 Biospin Bacteria Genomic DNA Extraction Kit 获得基因组 DNA 模板。根据原核生物 16S rDNA 保守序列通用引物 F8(5'-AGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3') 和 R1492 (5'-GGTTACCTTGT-TACGACTT-3')[11] 进行 16S rDNA 的 PCR 扩增。由上海生物工程技术服务有限公司完成测序,将测定的序列在 GenBank 中用 BLAST 软件与已知的 16S rDNA 进行同源性比较。采用MEGA3.1 软件进行多序列同源性分析,并构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 韭菜内生细菌的分离

采用稀释平板法,从韭菜根的研磨液中初筛了 56 株内生细菌。以平板划线法对分离出的菌株进行纯化,结合细菌菌落形态和革兰氏染色后单个菌形态的观察,最后确定为 25 株内生细菌菌株,命名为 W1~W25。

2.2 菌株 W7 对病原真菌的抑菌作用

韭菜中的优势内生细菌 W7 对各蔬菜病原菌

均有明显的抑制作用(图 1)。菌株 W7 对各病原菌的抑菌率如表 1 所示。

2.3 菌株 W7 的抑菌机制

采用超声波破碎、有机溶剂沉淀等步骤得到菌体多糖粗提液,通过平板抑制法研究其抑菌活性。结果如图 2 所示,加菌体多糖粗提液的孔周围病原菌菌丝明显比对照周围的菌丝稀薄,且菌体延伸受抑制,但抑菌率较活菌的抑菌率低(表 1)。

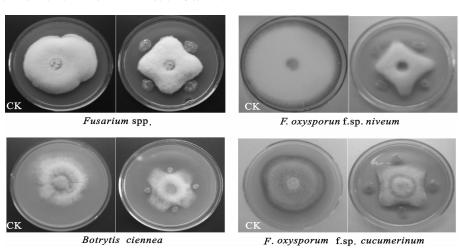


图 1 菌株 W7 对不同蔬菜病原真菌的拮抗作用

Fig. 1 Antagonistic activity of stain W7 against different vegetable pathogenic fungi

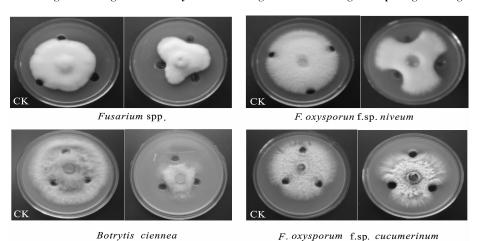


图 2 W7 菌体多糖对病原真菌的抑制作用

Fig. 2 Effects of the somatic polysaccharose of strain W7 on different pathogenic fungi 表 1 菌株 W7 及其菌体多糖对各蔬菜病原真菌的抑制率

Table 1 Inhibition rate of strain W7 and somatic polysaccharose to different vegetable pathogenic fungi

病原真菌 Phytopathogenic fungi	菌株 W7 抑制率/% Inhibition rate of strain W7	菌体多糖抑制率/% Inhibition rate of somatic polysaccharide
黄瓜枯萎病菌 F. oxysporum f. sp. cucumerinum	30.4±1.8	26.2±3.1
西瓜枯萎病菌 F. oxysporum f. sp. niveum	52.2 ± 3.4	46.0 ± 1.6
萝卜枯萎病菌 Fusarium spp.	39.2 ± 2.9	38.4 \pm 3.2
草莓灰霉病菌 Botrytis cinerea	38.2 \pm 2.0	36.5 ± 2.6

2.4 菌株 W7 对高效氯氰菊酯的降解作用

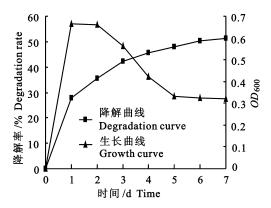
菌株 W7 在以高效氯氰菊酯为唯一碳源的基 础培养基上能够生长,最初24h降解速率最快, 达 27.7%。随着菌株生长进入稳定期和衰亡期, 农药降解曲线也趋于平缓,第7天降解率达 51.3%(图 3)。而菌株 W7 却不能在以毒死蜱为 唯一碳源的培养基上生长。

2.5 菌种鉴定

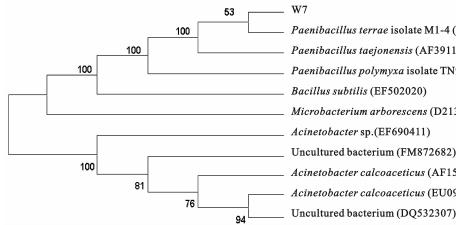
形态及生理生化特征:W7 在改良 PDA 培养 基上能形成光滑、透明、粘稠、富有弹性的菌落。 革兰氏阳性菌,接触酶、V-P试验及葡萄糖氧化发 酵呈阳性,可利用乳糖、木糖、麦芽糖产酸,水解明 胶和淀粉,能利用柠檬酸盐及还原硝酸盐和亚硝 酸盐。根据《常用细菌系统鉴定手册》[10]初步鉴 定菌株 W7 属类芽孢杆菌属(Paenibacillus)。

16S rDNA 序列扩增和序列分析: PCR 扩增 后得到约1.5kb扩增产物。测序结果表明,菌株

W7 的 16S rDNA 全序列由 1 456 个碱基构成。 将其与 GenBank 中的序列进行比较,发现菌株 W7 与类芽孢杆菌属各菌株相似度最高,同源性 达 99%,这与生理生化试验结果一致。系统发育 树如图 4 所示。



菌株 W7 生长和对高效氯氰菊酯的降解 Fig. 3 Degradation of beta-cypermethrin during growth of strain W7



Paenibacillus terrae isolate M1-4 (EF690404) Paenibacillus taejonensis (AF391124) Paenibacillus polymyxa isolate TN96 (EU362608) Bacillus subtilis (EF502020) Microbacterium arborescens (D21339) Acinetobacter sp.(EF690411) Uncultured bacterium (FM872682) Acinetobacter calcoaceticus (AF159045) Acinetobacter calcoaceticus (EU090179)

分支点的数字为分支自展支持率(%);括号中的序号为 GenBank 数据库中的登录号 Numbers at each branch points indicate the percentage supported by bootstrap(%); those in parentheses are the GenBank accession number

图 4 菌株 W7 的系统发育树

Fig. 4 The phylogenetic tree of strain W7

3 讨论

在农业生产中,大田种植的韭菜不易发生病 害,但随着韭菜保护地面积的不断扩大,韭菜灰霉 病、疫病的发生日益严重,防治主要依赖化学农 药,而未见有生防菌剂的相关研究报道。本文从 韭菜中分离到的这株对几种蔬菜病原真菌具有明 显拮抗作用的内生细菌属类芽孢杆菌属。

据文献报道,类芽孢杆菌抗菌谱广,且在植物 体内具有很强的定殖能力,既可防病,又可促生, 其拮抗机制是通过营养与位点竞争及产生抗菌蛋 白等阻止或杀灭植物病原菌[12-15]。而本研究将 在改良 PDB 培养基中培养 3 d 得到的发酵液过 滤除菌浓缩之后,发现胞外代谢物并无抑菌活性, 且菌体表面大量的粘稠状物质使菌体的除去非常 困难,若将发酵液置于超低温冰箱冻死菌体后,发 酵液却依然有抑菌活性,但抑菌作用、较菌体存在 时的低(结果未列出),因此初步分析抑菌物质可 能主要位于菌体上,而根据文献报道的方法(稍作 改进)获得的菌体多糖对几种蔬菜病原真菌具有 抑菌活性,但其抑菌作用机制有待进一步研究。

高效氯氰菊酯是拟除虫菊酯类农药的一种,

也是韭菜生产中常用杀虫剂。目前国内外关于拟除虫菊酯类农药降解菌的报道主要集中在阴沟肠杆菌(Enterobacter clocace)^[16]、假单胞菌(Pseudomonas)^[17]、地衣芽孢杆菌(Bacillus licheni formis)^[18],未见有类芽孢杆菌的报道。本文发现的这株韭菜内生类芽孢杆菌不仅具有拮抗病原真菌的能力,而且对高效氯氰菊酯具有降解作用,这对降解韭菜植株中的农药残留具有重要意义。其实际生防和农药降解作用还需通过盆栽试验进一步证实。

参考文献:

- [1] 洪永聪,辛 伟,来玉宾,等. 茶树内生防病和农药降解菌的分离[J]. 茶叶科学,2005,25(3):183-188.
- [2] 沈 萍,范秀容,李广武. 微生物学实验(第 3 版)[M]. 北京;高等教育出版社,1999;70-72.
- [3] 邢介帅,李 然,赵 蕾,等.产蛋白酶生防细菌的筛选及 其对病原真菌的拮抗作用[J].西北农业学报,2008,17 (1):106-109.
- [4] 张 燕,李轻舟,杜连祥,等. 肺炎克雷伯氏菌荚膜多糖的 提取纯化及其对细胞免疫活性的影响[J]. 生物工程学报, 2005,21(3):461-465.
- [5] Alfonso R B, Maria J V, Encarnacion M, et al. Biological Response Modifier Activity of an Exopolysaccharide from Paenibacillus jamilae CP-7[J]. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2001, 8(4):706-710.
- [6] 李平作,徐 柔,章克昌. 灵芝菌丝体胞内多糖提取工艺的 优化[J]. 无锡轻工大学学报,1999,18(4):38-41.
- [7] 邢介帅,李 然,赵 蕾,等. 生防芽孢杆菌 T2 胞外蛋白酶 的纯化及其抗真菌作用[J]. 植物病理学报,2008,38(4): 377-381.
- [8] 王兆守,林 淦,尤民生,等. 茶叶上拟除虫菊酯类农药降

- 解菌的分离及其特性[J]. 生态学报,2005,25(7):1824-1827
- [9] 谢 慧,朱鲁生,王 军,等. 真菌 WZ-3 对有机磷杀虫剂毒 死蜱的酶促降解[J]. 环境科学,2005,26(6):164-168.
- [10] 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;57-61.
- [11] Weisburg W G, Bams S M, Pelletier D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(2):697-703.
- [12] 宋永燕,李 平,郑爰萍,等. 生防细菌 LM-3 的鉴定及其 抗菌蛋白的研究[J]. 四川大学学报:自然科学版,2006, 43(5):1110-1115.
- [13] 王智文,袁士涛,何 亮. 多粘类芽孢杆菌 Cp-S316 抗真 菌活性物质的提取及其部分性质研究[J]. 农业环境科学 学报,2007,26(4):1464-1468.
- [14] Selim S, Negrael J, Govaerts C, et al. Isolation and partial characterization of antagonistic peptides produced by Paenibacillus sp. Strain B2 isolated from the Sorghum mycorrhizosphere[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71 (11):6501-6507.
- [15] 陈雪丽,郝再彬,王光华,等. 多粘类芽孢杆菌 BRF-1 抗菌蛋白的分离纯化[J]. 中国生物防治,2007,23(2):156-
- [16] 王兆守,林 淦,李秀仙,等. 拟除虫菊酯降解菌的分离、筛选及鉴定[J]. 福建农林大学学报:自然科学版,2003,32(2):176-180.
- [17] Opp E, Akhtar M H I. Dentification and characterization of a pseudomonas strain capable of metabolizing phenoxybenzoates[J]. Applicated and Environmental Microbiology, 1991, 57(5):1249-1300.
- [18] 丁海涛,李顺鹏,沈 标,等. 拟除虫菊酯类农药残留降解菌的筛选及其生理特性研究[J]. 土壤学报,2003,40(1):123-129.