

污水中西葫芦灰霉病拮抗细菌的分离与应用

唐蕊

(邢台学院 生化系 河北 邢台 054001)

摘要:从污水中分离得到 89 株细菌,筛选出对西葫芦灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)有拮抗作用的生防菌株 50 株,占分离菌株的 56.2%,其中拮抗菌株 6 株,占分离菌株的 6.7%。同时测试了拮抗菌株及其无菌培养滤液对西葫芦灰霉病菌菌落生长的作用。结果表明:拮抗菌株对西葫芦灰霉病菌菌落生长有很强的抑制作用,抑制率在 67.04%~78.51%之间,其中 XTB-37 的抑菌带高达 12.33 mm;拮抗菌株的无菌培养滤液对灰霉菌生长的抑制率在 44.94%~67.42%之间,与抑菌带的大小成正比。

关键词:拮抗细菌;西葫芦;灰葡萄孢菌;生物防治

中图分类号:S 436.429 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2007)09-0043-02

西葫芦灰霉病是由 *Botrytis cinerea* 引起的一种真菌病害,危害西葫芦的茎、叶、花及果实,以危害幼瓜为主。病菌从雌花侵入,花和幼果的蒂部初呈水浸状,逐渐软化,表面生灰色霉层,有时长出黑色菌核。损失率一般在 25%~30%,重者可达 100%,造成绝产。目前生产上主要采用化学农药防治此病,但极易产生抗药性,同时由于长期大量使用化学农药,使得高残留、污染环境等不利影响日益突出。试验旨在筛选对西葫芦灰霉病有拮抗作用的高效生物防治菌株,为生物农药的研制开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

水样(2005 年 5 月采自邢台学院附近造纸厂污水池)、植物病原菌(微生物实验室分离所得)、牛肉膏蛋白胨琼脂培养基(NA)、马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)。

1.2 试验方法

1.2.1 水样的采集 将灭菌的带玻璃塞的采集瓶完全浸没于污水池中,打开瓶塞让水缓缓流入瓶内,盛满后,将瓶塞盖好,取出采集瓶,将采集到的水样置于 4℃条件下保存备用。

1.2.2 污水中微生物的分离 取水样 10 mL 放到 250 mL 的灭菌三角瓶中,加入 90 mL 无菌水,在摇床上(室温,170 r/min)振荡 30 min,静置 2 h,取上清液 1 mL 加无菌水 9 mL,即成 10 mL 微生物悬液。将悬液梯度稀释成 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 倍稀释液,各取 200 μ L 均匀涂于 NA 培养基平板上,每个浓度 3 次重复,在 28℃恒

温培养 1~2 d,待菌落长出后,用灭菌的接种针挑取形态、大小、色泽不同的细菌单菌落,在 NA 培养基平板上划成“Z”线进行纯化,培养 2 d 后再挑取单菌落进行再纯化,最后将纯化的菌株移至试管 NA 斜面培养基上培养,编号,置于 4℃冰箱中保存待用。

1.2.3 对西葫芦灰霉菌拮抗细菌的筛选 将西葫芦灰霉菌(*Botrytis cinerea*)菌种在 PDA 培养基平板上活化 5 d,然后在菌落边缘用直径 5 mm 的打孔器打取菌龄一致的菌片,转接到另一 PDA 平板中央,在菌片四周距菌片 2 cm 处呈“品”字形画线接分离细菌,以不接细菌为对照,每处理 4 次重复,放于 25℃恒温培养,待对照菌落长满培养皿时,测量处理菌落生长量和细菌接种点至灰霉病菌菌落边缘的间距(抑菌带)确定抑菌程度,计算抑制率。以抑菌带大于 1 mm 的菌株记为有拮抗作用的菌株;抑菌带大于 5 mm 的菌株作为拮抗菌株。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{对照菌落生长量} - \text{处理菌落生长量}}{\text{对照菌落生长量}} \times 100.$$

1.2.4 拮抗细菌无菌培养滤液对西葫芦灰霉菌生长的影响 将筛选出的 6 株拮抗细菌活化后,接于 100 mL 的 NA 培养液中,放于摇床上(28℃,170 r/min)振荡培养 48 h,再在高速低温冷冻离心机(4℃,10⁴ r/min)离心 20 min,取上清液用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤,得无菌培养液。将无菌培养液按 1:20 的比例加入到 45℃左右的 PDA 培养基中,倒皿,在平板中央接活化的 5 mm 的西葫芦灰霉菌菌片,每处理 4 次重复,以 PDA 培养基为对照,待对照菌落长满培养皿时,测量处理菌落直径,计算抑制率。

2 试验结果

通过梯度稀释法共从污水中分离得到细菌 89 株,采用室内对峙培养法对其进行拮抗力测定,具有拮抗性

作者简介:唐蕊(1976-),女,河北秦皇岛市人,硕士,讲师,主要从事教学与科研工作。

收稿日期:2007-04-30

的菌株 50 株, 占分离菌株的 56.2%; 其中拮抗菌株 6 株, 占分离菌株的 6.7%。拮抗菌株的抑制率在 67.04%~78.51% 之间, 其中 XTB-37 的抑菌带高达 12.33 mm, XTB-42 的抑菌带达 11.50 mm, 其他 4 株菌的抑菌带在 5.00~9.67 mm 之间。拮抗菌株的形状特征描述如下: XTB-2—白色, 有树枝状分枝; XTB-7—浅黄色, 圆形, 边缘不整齐; XTB-15—淡黄色, 形状不规则, 花朵状; XTB-20—白色, 近圆形, 多聚花型; XTB-37—桔红色, 边缘整齐; XTB-42—白色, 圆形, 边缘整齐。

表 1 拮抗细菌对西葫芦灰霉菌的拮抗作用

处理	菌落生长量/mm	抑菌带/mm	抑制率/%	差异显著性 5%
CK	45.00	—	0.00	A
XTB-20	14.83	5.00	67.04	B
XTB-37	11.67	12.33	74.07	C
XTB-42	11.50	11.50	74.44	C
XTB-2	10.67	8.33	76.29	C
XTB-15	10.67	9.67	76.29	C
XTB-7	9.67	8.67	78.51	C

拮抗细菌无菌培养滤液对西葫芦灰霉菌拮抗性测试结果见表 2。由表 2 看出, 不同拮抗细菌无菌培养滤液对西葫芦灰霉菌均表现出了一定的抑制作用, 抑制率在 44.94%~67.42% 之间, 其中抑菌带最大的 XTB-37 的抑制率最高, 为 67.42%。

表 2 拮抗细菌无菌培养滤液对西葫芦灰霉菌的拮抗作用

处理	菌落直径/mm	抑制率/%	差异显著性 5%
CK	89.00	0.00	A
XTB-20	49.00	44.94	B
XTB-2	46.00	48.31	B
XTB-7	46.00	48.31	B
XTB-15	38.00	57.30	C
XTB-42	32.00	64.04	D
XTB-37	29.00	67.42	D

3 讨论

污水中的微生物由于其特殊的生存环境, 会产生与陆地微生物不同的活性物质。随着生物防治的深入发展, 其生物资源的开发利用将会受到世界各国的重视和青睐。试验首次从污水中分离到了 89 株细菌, 并在室内测试了它们对西葫芦灰霉病菌的抑制作用, 其中 6 株拮抗细菌均表现出了较好防治效果, 表明了污水中微生物作为新的农用抗生素资源的可能性, 为开发新型生物农药奠定了基础。但其产生的抗菌物质的理化性质、酸碱稳定性、热稳定性等均需进一步研究测试。

参考文献

[1] 田黎, 顾振芳, 陈杰, 等. 海洋细菌 B987 菌株的抑菌物质及对几种植物病原真菌的作用[J]. 植物病理学报 2003 33(1): 77-81.
[2] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社 1998.
[3] 董蕴慧. 灰葡萄孢拮抗细菌的筛选[J]. 中国生物防治 2000(3): 122-124.

Separation and Application of Anti-bacteria from Sewage Against Botrytis cinerea

TANG Rui

(Department of Biology and Chemistry, College of Xingtai, Xingtai, Hebei 054001, China)

Abstract: 89 bacteria were separated from sewage near Xingtai College. 50 bacteria that have antagonistic effect to *Botrytis cinerea* were obtained by ridding. Accounts for 56.2% which separates the bacterial strain, 6 anti-bacteria accounts for 6.7% which separates the bacterial strain. They have very strong inhibitory activity to grow on *Botrytis cinerea* colony, the suppressing rate is among 67.04%~78.5%, Restraining the fungus area is up to 12.33mm of XTB-37. Anti bacteria's aseptically filtrate have strong inhibitory activity to *Botrytis cinerea* growth, the restrain rate among 44.94%~67.4%, they lead in direct radio with restraining the fungus area.

Key words: Anti-bacteria; Vegetable marrow; *Botrytis cinerea*; Bio-control

农业 降灾减灾 措施

入夏以来,我国从南到北冰雹、大风、水涝等灾害频发,给我国农业带来巨大的经济损失。为了最大限度的降灾保收,现介绍几种农业药剂降灾保收措施。

1 冰雹、大风、水涝

粮豆、瓜菜、果树等遭受冰雹、大风、水涝等灾害,用奇农泰 10 g 加磷酸二氢钾 100 g 加尿素 50 g,加水 15 kg,在冰雹后喷施,只要生长点没有打坏,上午喷施,下午茎秆即可变硬,

3 d 即可发出新枝,10 d 即可恢复正常。奇农泰混合液可有效的抗御大风、水涝等自然灾害,使作物在大风中枝干折断最少;在水涝后只要作物没有被淹死,及时喷施奇农泰混合液,会使作物迅速恢复生机,增强抗病能力,最大限度的减少灾害造成的损失。

2 低温冷害

用奇农泰 10 g 加硫酸钾 150 g 加食盐 100 g,加水 15 kg,在冻害前喷施,会使农作物免遭冻害;在农作物发生冻害后喷施,隔天再喷施 1 次,会使遭受冻害的农作物很快恢复生机,最大限度的降低冻害造成的损失。特别是在冬春大棚、温室内使用,效果更为有效。