

DOI:10.11937/bfyy.201606021

黄瓜灰霉病菌拮抗菌 BBC-3 的 筛选、鉴定及抑菌特性

仇艳肖^{1,2}, 程辉彩¹, 周竞^{1,2}, 尹淑丽¹, 张根伟¹, 张丽萍¹

(1. 河北省科学院 生物研究所, 河北 石家庄 050081; 2. 石家庄四药有限公司, 河北 石家庄 052165)

摘要:以黄瓜根际土壤为分离对象,采用稀释平板法分离到 1 株对黄瓜灰霉病抑菌作用明显的拮抗菌 BBC-3,利用对峙培养法和平板扩散法对其抑菌特性进行鉴定。结果表明:经过形态特征、生理生化及 16S rDNA 序列分析,BBC-3 鉴定为短芽孢杆菌(*Brevibacillus brevis*);该菌具有广谱抗菌活性,对所选 14 种植物病原菌均有较强抑制作用。该菌产生的抗菌物质对高温、酸碱及光照稳定性强,对蛋白不敏感,常温及 4℃ 储存 6 个月抑菌活性大于 80%。

关键词:黄瓜灰霉病;短芽孢杆菌;筛选;鉴定;抑菌特性

中图分类号:S 436.421.1⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)06-0084-05

灰霉病由灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)侵染引起,是果蔬生产和贮藏中的重要病害。灰葡萄孢能广泛侵染蔬菜、瓜果、谷物等多种经济作物和粮食作物,造成严重

的经济损失^[1]。对于黄瓜灰霉病,若防治不当,可造成减产 30%~50%,严重时可导致减产 80%^[2-3]。目前,生产上防治黄瓜灰霉病的方法主要是喷施化学农药,虽然在短期内能起到很好的防治效果,但长期使用,不仅会造成环境污染、农药残留,危害人类健康,破坏生态平衡;而且灰霉病菌遗传变异大,适应性强,长期大量使用易使病原菌产生严重的抗药性,从而使其防治效果大大下降^[4-5]。国内外学者在抗病育种和农业措施方面也做了大量工作,但由于缺乏有效抗原和农业技术不完善,防治效果都不尽如人意。

第一作者简介:仇艳肖(1984-),女,硕士,助理研究员,研究方向为应用微生物。E-mail:412817295@qq.com.

责任作者:张丽萍(1969-),女,硕士,研究员,研究方向为应用微生物。E-mail:lizzie-69@163.com.

基金项目:河北省重点基础研究资助项目(13966503D);河北省科学院资助项目(15302)。

收稿日期:2015-12-18

[9] 朱胜萱,高宁.屋顶农场的意义及实践:以上海“天空菜园”系列为例[J].风景园林,2013(3):24-27.

[10] BAUMANN N. Ground-nesting birds on green roofs in Switzerland; preliminary observations[J]. Urban Habitats,2006(4):37-50.

[11] MARIE. 北美的屋顶绿化的市场发展趋势与案例分析[EB/OL]. <http://news.dichan.sina.com.cn/business/2010/08/18/201293.html>. 2010-08-18.

The Innovative Design and Construction of Roof Greening in Shanghai

HE Kun,ZHANG Zhiguo,BAI Lu

(School of Ecological Technology and Engineering,Shanghai Institute of Technology,Shanghai 201418)

Abstract:Roof greening is regarded as an important method to increase urban green land and improve the urban ecological environment. Based on the analysis of the problems in Shanghai roof greening,it was necessary to carry out the plan of roof greening system and to make some innovations on the designing and technology. Combining with domestic and foreign existing research results and practice,two new roof green models,the roof farm and roof biological habitat,would be introduced to the public in this paper,and meanwhile two technologies,the light-modular-container and rainwater-collection-technology in green roof,would be expounded detailed,as a result,some theoretical guidance would be expected to provide for the innovation of Shanghai roof green.

Keywords:roof green;landscape design;roof form;biological habitat

生物防治能够克服化学防治的弊端,具有无污染、无残留及安全高效等优势,受到研究者越来越多的关注。尤其是芽孢杆菌已经成为生物防治领域里一类重要微生物菌群,能够产生耐热、耐旱、抗紫外线和抗有机溶剂的内生孢子,所产芽孢可制成各种剂型,与化学农药混用后不失活,是理想的生防菌筛选对象^[6-7],因此,现以黄瓜灰霉病菌为指示菌,从土壤中筛选拮抗灰霉病菌的芽孢杆菌,以期为开发研制新型微生物制剂和防治蔬菜灰霉病奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 土样来源 采集河北、山东和长春等地的黄瓜根际土壤。

1.1.2 供试病原菌 黄瓜灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、黄瓜炭疽病菌(*Colletotrichum lagenarium*)、黄瓜霜霉病菌(*Pseudoperonospora cubensis*)、黄瓜黑星病菌(*Cladosporium cucumerinum*)、番茄早疫病菌(*Alternaria solani*)、番茄叶霉病菌(*Fulvia fulva*)、辣椒疫霉病菌(*Phytophthora capsici*)、葡萄灰霉病菌(*Botrytis cinerea* pers. ex Fr.)、梨黑斑病菌(*Alternaria alternata* (Fr.) Keissler)、苹果轮纹病菌(*Phylospora piricola*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum* Schw.)和玉米小斑病菌(*Bipolaris maydis*)均由河北省科学院生物研究所保存。

1.1.3 培养基 PB培养基、NB培养基、马铃薯培养基(PDA)及生理生化鉴定培养基配方参照《常见细菌系统鉴定手册》^[8]。

1.1.4 试剂盒和扩增引物 细菌基因组DNA提取试剂盒和琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;16S rDNA扩增引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 拮抗菌分离和筛选 用平板稀释法分离土壤样品,通过平板对峙培养法对分离到的菌株进行筛选。

1.2.2 BBC-3分类鉴定 菌体形态特征及生理生化指标检测参照《常见细菌系统鉴定手册》^[8]。细菌总DNA提取和PCR产物回收纯化采用北京天根生化科技有限公司细菌基因组DNA提取试剂盒及琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒进行;以基因组为模板进行16S rDNA片段扩增,PCR反应体系为:20 μ L 体积中包括 11.8 μ L ddH₂O, 2 μ L 10 \times buffer, 2 μ L dNTPs, 1 μ L primer 1, 1 μ L primer 2, 2 μ L DNA, 0.2 μ L Taq 酶;PCR反应条件:95 $^{\circ}$ C 4 min 变性;95 $^{\circ}$ C 1 min, 52 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 30个循环延伸;72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳,检测其纯度与大小。PCR回收产物由

北京博迈德科技发展有限公司进行测序。

1.3 项目测定

1.3.1 菌株BBC-3抗菌谱测定 采用生长速率法测定BBC-3对14种植物病原菌的抑菌活性。抑菌率(%)=(对照菌菌落直径-处理菌菌落直径)/(对照菌菌落直径-菌块直径) \times 100。

1.3.2 热稳定性 将BBC-3发酵滤液分别在60、70、80、90、100 $^{\circ}$ C下水浴30 min,自然冷却后以原始发酵上清液为对照,采用平板扩散法测定抑菌活性。

1.3.3 酸碱稳定性 将BBC-3发酵滤液分别用1 mol/L HCl、1 mol/L NaOH调节pH值2~12,同时以原始发酵滤液和各个pH值的水溶液为对照,测定抑菌活性。

1.3.4 光稳定性 将BBC-3无菌发酵滤液在光强(800 lx)的光照下照射12、24、36 h,以未经照射处理的无菌发酵滤液作为对照,检测抗菌活性。

1.3.5 蛋白酶对发酵液稳定性的影响 发酵滤液分别与胰蛋白酶、胃蛋白酶、蛋白酶K在37 $^{\circ}$ C下处理1 h,酶反应浓度均为1 mg/mL,以原始发酵滤液和各种酶本身为对照,采用平板扩散法检测抑菌活性。

1.3.6 贮存稳定性 取24份发酵滤液样品,每管分装5 mL,1份室温保存,1份4 $^{\circ}$ C冰箱保存,每隔1个月测定样品的抑菌活性,测定12个月。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌的分离和筛选

采用稀释平板法从样品中分离到36株黄瓜灰霉病菌拮抗菌。通过平板扩散法复筛选到1株高效拮抗菌BBC-3(图1),其发酵滤液抑菌圈直径达27.7 mm。在复筛过程中,随培养时间延长,菌株BBC-3对病原菌的拮抗作用几乎不变。

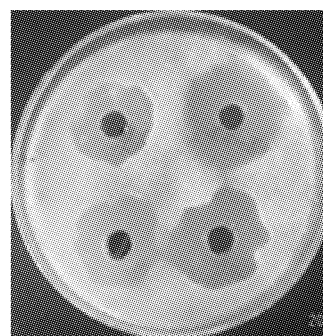


图1 BBC-3对黄瓜灰霉病菌抑制作用

Fig. 1 Inhibition of strain BBC-3 against *Botrytis cinerea*

2.2 拮抗菌的鉴定

菌株BBC-3菌落为圆形、白色、不透明,表面光滑湿润,中间隆起,边缘整齐,不产生可溶性色素。通过光学显微镜和扫描电镜观察菌体形态,BBC-3为杆菌,产芽

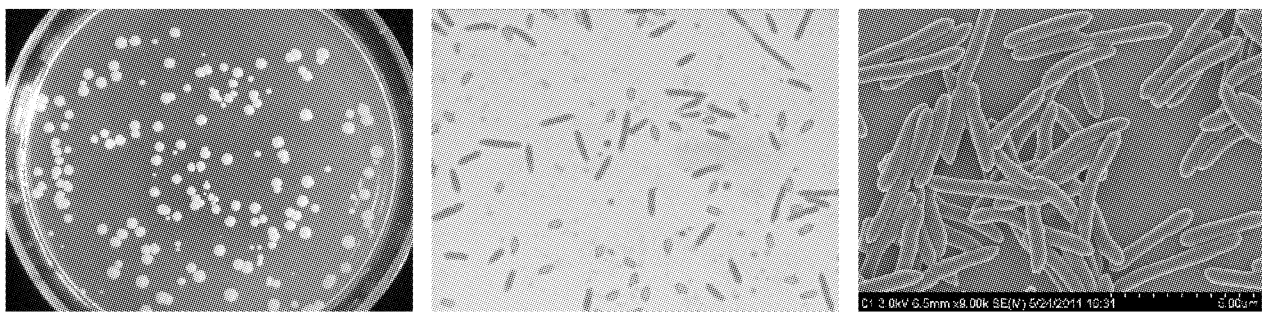


图2 菌株 BBC-3 菌落及菌体形态

Fig. 2 Colony and cell morphological characteristics of strain BBC-3

孢,芽孢中生,呈椭圆形,革兰氏染色阳性,菌体大小为(0.7~0.9) $\mu\text{m} \times (1.7 \sim 3.6) \mu\text{m}$ (图2)。

菌株 BBC-3 生理生化测定结果表明,该菌厌氧不能生长,接触酶阳性,可还原硝酸盐,利用柠檬酸盐,酪氨酸水解、明胶水解阳性,V-P、淀粉水解反应为阴性;利用葡萄糖和甘露醇产酸;不能利用阿拉伯糖和木糖产酸;在2%NaCl、15℃、pH 5.5 及 pH 9.0 条件下均能生长,不能在5%NaCl 和 50℃ 条件下生长,以上特征符合《常见细菌系统鉴定手册》中关于短短芽孢杆菌的描述,结果如表1所示。

表1 BBC-3 菌株的生理生化特征

Table 1 Physiological and biochemical features of strain BBC-3

测定项目 Tested items	BBC-3	短短芽孢杆菌 <i>Brevibacillus brevis</i>
革兰氏染色 Gram staining	+	+
厌氧生长 Anaerobic	—	—
柠檬酸利用 Christensen	+	V
V-P 反应 V-P reaction	—	—
硝酸盐还原 Nitrate deoxidization	+	V
淀粉水解 Starch hydrolysis	—	—
明胶液化 Gelatin hydrolysis	+	+
酪氨酸水解 Casein hydrolysis	+	+
接触酶 Catalase	+	+
生长 Growth 15℃	+	V
50℃	—	—
2%NaCl	+	V
5%NaCl	—	—
pH 5.5	+	V
pH 9.0	+	+
产酸 Acid production 葡萄糖 Glucose	+	+
阿拉伯糖 Arabinose	—	—
甘露醇 Mannitol	+	+
木糖 Xylose	—	—

注:+, $\geq 90\%$ 菌株为阳性;—, $\geq 90\%$ 菌株为阴性;V 表示反应可变。

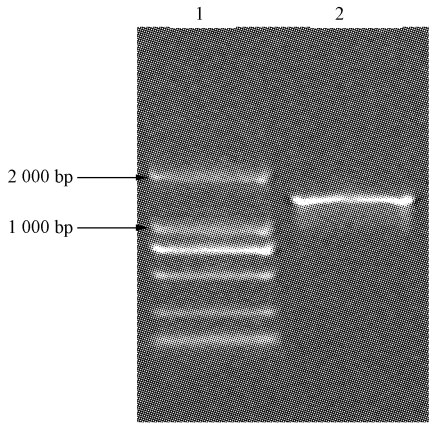
Note: +, $\geq 90\%$ of strain is positive; —, $\geq 90\%$ of strain is negative; V means response variable.

以基因组 DNA 为模板,利用细菌 16S rDNA 的通用引物对拮抗菌 BBC-3 扩增得到约 1 500 bp 的 PCR 产物,并对扩增产物进行回收纯化(图3),片段均符合常规的 16S rDNA 序列长度。

将 PCR 纯化回收产物进行测序分析,菌株 BBC-3 的 16S rDNA 序列长度为 1 412 bp。利用 MEGA 4.0 软件构建系统发育树,结果见图4,BBC-3 和 *B. brevis* 同处于一个最小的分支,其 16S rDNA 序列与 *B. brevis* H16-8 (EU812754.1) 的 16S rDNA 序列相似性达 100%。结合形态特征、生理生化测定和 16S rDNA 序列分析,将拮抗菌 BBC-3 鉴定为短短芽孢杆菌(*Brevibacillus brevis*)。

2.3 抗菌谱测定

BBC-3 对 14 株植物病原菌抑菌性检测,由表2可知,该菌具有广谱抑菌活性,其发酵滤液对 14 种病原菌均有较强的抑菌活性,抑菌率在 80% 以上。其中对黄瓜灰霉病菌、黄瓜炭疽病菌、黄瓜霜霉病菌、番茄叶霉病菌、葡萄灰霉病菌及立枯丝核菌的抑菌活性都在 95% 以上,对黄瓜灰霉病菌抑菌率最高,可达 98.3%。



注:1 为 Marker DL 2 000;2 为菌株 BBC-3 的扩增产物。

Note: 1, Marker DL 2 000; 2, amplification product of strain BBC-3.

图3 BBC-3 菌株 16S rDNA 序列 PCR 产物回收纯化

Fig. 3 The results of gel extraction of 16S rDNA

2.4 热稳定性

由图5可知,随着温度的升高,抑菌活性呈下降趋势,低于 80℃ 处理 30 min,抑菌活性变化不显著;90℃ 处理 30 min 抑菌活性下降为原来的 85%,100℃ 时抑菌率

表 2 BBC-3 发酵滤液抑菌谱测定

Table 2 Inhibition spectrum of strain BBC-3 against pathogens

病原菌 Pathogens	抑菌率 Inhibition rate/%	病原菌 Pathogens	抑菌率 Inhibition rate/%
黄瓜灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i>	98.3	辣椒疫霉病菌 <i>phytophora capsici</i>	83.7
黄瓜炭疽病菌 <i>Colletotrichum lagenarium</i>	95.8	棉花枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. vasinfectum	93.5
黄瓜霜霉病菌 <i>Pseudoperonospora cubensis</i>	95.7	梨斑斑病菌 <i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissler	88.3
黄瓜黑星病菌 <i>Cladosporium cucumerinum</i>	90.7	玉米小斑病菌 <i>Bipolaris maydis</i>	94.3
番茄叶霉病菌 <i>Fulvia fulva</i>	95.2	苹果轮纹病菌 <i>Physalospora piricola</i>	94.6
番茄早疫病菌 <i>Alternaria solani</i>	92.6	葡萄灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i> pers. ex Fr.	97.4
立枯丝核菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	95.5	小麦赤霉病菌 <i>Fusarium graminearum</i> Schw.	85.4

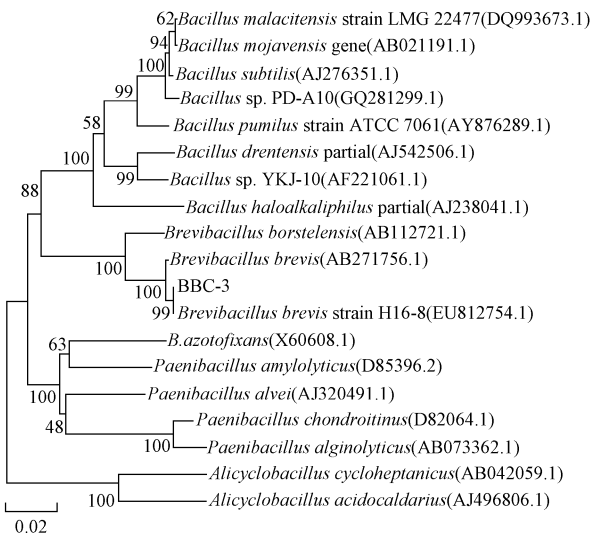


图 4 菌株 BBC-3 的 16S rDNA 的系统发育树
Fig. 4 The phylogenetic tree of 16S rDNA sequence derived from BBC-3

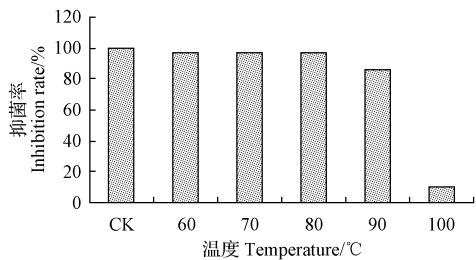


图 5 BBC-3 抑菌物质热稳定性
Fig. 5 Effect of temperature on stability of the antifungal material

急剧下降,仅为原来的 10%,说明 BBC-3 发酵滤液在 80℃ 以下具有较好的热稳定性。

2.5 酸碱稳定性

由图 6 可知,在 pH 2~12 范围内,经过酸碱处理后的发酵液对指示菌均表现出很好的抗菌活性,菌株 BBC-3 发酵液原始 pH 值约为 8.5,在强酸强碱条件下抗菌活性没有显著差异,说明菌株 BBC-3 产生的抗菌物质有很好的耐酸碱性能。

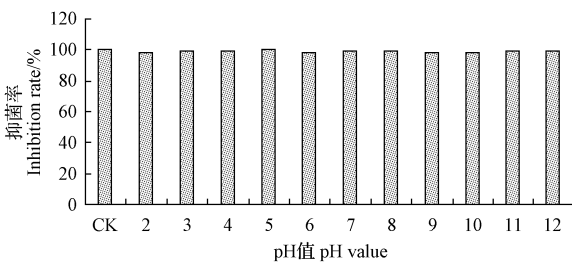


图 6 BBC-3 抑菌物质酸碱稳定性
Fig. 6 Effect of acids and bases on stability of the antifungal material

2.6 蛋白酶稳定性

由表 3 可知,发酵滤液经不同蛋白酶处理,抑菌活性与对照相比没有显著差异,说明 BBC-3 发酵滤液对胰蛋白酶、蛋白酶 K、胃蛋白酶均不敏感。

表 3 蛋白酶对 BBC-3 发酵滤液抑菌活性影响

Table 3 Effect of proteinases on activity of antifungal substance

处理 Treatment	对照 CK	蛋白酶 K Proteinase K	胰蛋白酶 Trypsin	胃蛋白酶 Pepsin
抑菌圈直径 Inhibition zone diameter/mm	25.77aA	25.70aA	25.65aA	25.80aA

注:大小写字母分别为 1% 和 5% 水平显著性分析,数值后相同字母表示差异不显著。

Note:Capital and lowercase letters represent 1% and 5% significance level analysis respectively,after the value of the same letter show no significant difference.

2.7 光稳定性

发酵滤液经强光照射后,抑菌活性没有显著变化(图 7),说明该抗菌物质具有较好的光稳定性能。

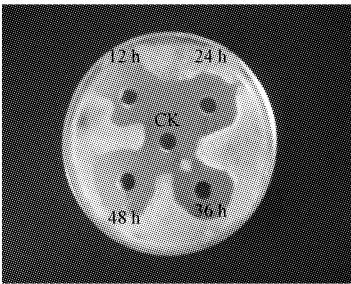


图 7 光照对发酵液抑菌活性影响
Fig. 7 Effect of light on stability of antifungal substances

2.8 贮存稳定性

分别于室温和 4℃ 贮存 BBC-3 发酵滤液,从图 8 可以看出,贮存 6 个月,抑菌活性都在 80% 以上,6 个月以后,室温贮存的发酵滤液抑菌活性下降速度显著高于 4℃ 贮存的发酵液,12 个月后 4℃ 贮存抑菌活性为 45%,而室温贮存抑菌活性仅为 25%。说明低温贮存有利于抑菌活性稳定性,但是在开发新型药物研制时需要筛选添加保护剂等助剂,以利于其长期贮存。

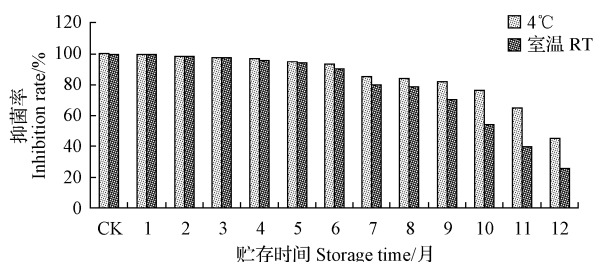


图 8 贮存时间对发酵液稳定性影响

Fig. 8 Effect of storage time on activity of antifungal substance

3 结论

从自然界寻找和筛选新的生防芽孢杆菌对生物防治具有重大意义,利用拮抗菌防治黄瓜灰霉病具有广阔的应用前景。该研究采用透明圈法,从土壤样品中分离

筛选得到 1 株对黄瓜灰霉病有强烈抑制作用的拮抗菌 BBC-3,经鉴定为短芽孢杆菌。菌株 BBC-3 的 16S rRNA 基因序列系统进化树显示,菌株 BBC-3 与 EU812754 构成一个分支,16S rRNA 序列的同源性达到 100%,其生理生化结果也与 *Brevibacillus brevis* 的主要鉴定指标相符,鉴定为 *Brevibacillus brevis*。BBC-3 的发酵液对高温、酸碱、蛋白酶及强光都有很好的稳定性,且对环境安全性好,具有良好的开发应用前景。

参考文献

- [1] ABDEL RHANI H, AFIFA M, ALLAL D. Biological control of tomato grey mould with compost water extracts, *Trichoderma* sp. and *Gliocladium* sp. [J]. *Phytopathologia Mediterranea*, 2006, 45(2): 110-116.
- [2] 禹化强. 大棚黄瓜主要病害的防治研究[J]. *中国果菜*, 2015, 35(2): 48-52.
- [3] 祁连弟. 沼液及不同药剂对大棚黄瓜灰霉病防治效果的研究[J]. *中国沼气*, 2014, 32(4): 73-75.
- [4] 丑波. 黄瓜灰霉病的发生及防治[J]. *现代农业*, 2014(9): 22.
- [5] 齐爱勇, 魏东盛, 刘大群, 等. 番茄灰霉病拮抗菌的筛选[J]. *植物保护科学*, 2006, 22(6): 311-313.
- [6] 叶晶晶, 曹宁宁, 吴建梅, 等. 生防芽孢杆菌的应用研究进展[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2014, 42(8): 185-190.
- [7] 彭研, 陈相艳, 裘纪莹, 等. 生防芽孢杆菌的研究进展[J]. *山东农业科学*, 2013, 45(7): 138-140.
- [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: 62-65.

Screening, Identification and Antifungal Activity of BBC-3 Against *Botrytis cinerea*

QIU Yanxiao^{1,2}, CHENG Huicai¹, ZHOU Jing^{1,2}, YIN Shuli¹, ZHANG Genwei¹, ZHANG Liping¹

(1. Institute of Biology, Hebei Academy of Sciences, Shijiazhuang, Hebei 050081; 2. Shijiazhuang No. 4 Pharmaceutical Co. Ltd., Shijiazhuang, Hebei 052165)

Abstract: Taking cucumber rhizosphere soil as isolation objects, using dilution-plate method, BBC-3 was screened which had strong and stable antagonistic activity against *Botrytis cinerea*. The antifungal activity was identified by using confrontation culture and agar diffusion methods. The results showed that it was identified as *Brevibacillus brevis* based on the results of morphologic characteristics, physiological and biochemical properties and phylogenetic analysis of 16S rDNA sequence and was named for BBC-3. It had better activity to 14 kinds of plant pathogens. Antifungal substance from BBC-3 had high stability against heat, acid, alkali and irradiation of glare, and it was unsensible to proteinase. The antibacterial activity was more than 80% at 4℃ for 6 months.

Keywords: *Botrytis cinerea*; *Brevibacillus brevis*; screen; identification; antifungal activity