

李梦茜,蔡永振,严茗,等.家蚕败血病病原拮抗菌的鉴定与抑菌作用[J].江苏农业科学,2016,44(5):328-329.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.05.095

家蚕败血病病原拮抗菌的鉴定与抑菌作用

李梦茜,蔡永振,严茗,陈也佳,韦小明,韦肖,欧青,张振旺

(河池学院,广西宜州 546300)

摘要:从木论喀斯特森林保护区土壤中分离获得 1 株对家蚕败血病病原具有显著拮抗作用的菌株,并研究其对家蚕败血病的抑菌效果,以期新型微生物农药的开发奠定基础。拮抗菌株的发酵产物对败血菌具有较强的拮抗作用,抑菌圈直径平均为 22.60 mm,抗菌发酵液最大稀释倍数可达 60 倍。根据菌株的形态特征、生理生化特性、16S rDNA 序列分析对其鉴定为 *Paenibacillus polymyxa*,命名为 *Paenibacillus polymyxa* HC2015。

关键词:家蚕;败血病;拮抗菌;抑菌作用

中图分类号:S884.4⁺2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)05-0328-02

细菌、真菌、病毒分别为家蚕疾病的三大病原。家蚕败血病(*Bacterial septicemia*)是很严重的细菌病害,目前主要以化学药品防治败血病。大量使用化学药品易导致环境污染并威胁人体健康,因此采用生物制品取代化学药品是大势所趋。筛选家蚕病原拮抗菌对生态蚕业的发展具有重要意义。

目前,拮抗菌研究的重要性已日益凸出,学者从土壤、水、植物体内筛选分离拮抗菌菌株,并证实其在生物防治、促进生物健康发育等多个方面具有利用价值^[1-3]。然而,生物防治主要应用于植物病害,关于动物病害防治的研究鲜见报道。笔者所在课题组从木论喀斯特森林保护区土壤中筛选出 1 株对家蚕败血病病原具有显著拮抗作用的菌株,且其抑菌谱较广,对金黄色葡萄球菌、家蚕病原菌败血菌、苏云金芽孢杆菌、黑霉菌、大肠杆菌等多种动植物病原菌均有较强的拮抗作用。本试验检测了 A-02 菌株对家蚕败血病的拮抗作用,以期新型蚕桑用微生物农药的开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

家蚕败血菌(*Bacterial septicemia*)由笔者所在实验室保存,家蚕败血病菌病原拮抗菌菌株从木论喀斯特森林保护区土壤中筛选获得。

1.2 菌悬液制备及分离培养

称取土壤 10 g,于灭菌研钵中研碎,将 100 mL 无菌水加入灭菌研钵,振荡 10~20 min,即为 10⁻¹ 的土壤悬液;静置 5~10 min,吸取上清液 1 mL,依次梯度稀释,分别配制 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸ 等不同浓度的稀释液。取 0.1 mL 悬液均匀涂布于培养皿中,待表面干燥后,于 28 ℃ 恒

温培养箱中倒置培养 4~5 d,根据菌落的大小、形状、边缘形状、表面结构、光泽、透明度、颜色等微生物菌落特征挑出单菌落并编号。

1.3 拮抗性能的检测

采用平板对峙法检测菌株拮抗,设置 3 个重复,于 28 ℃ 下培养 45 d。依据病原菌与拮抗菌之间的距离判断拮抗作用大小,保留拮抗效果优良的菌株。

采用平板扩散法检测发酵液活性,利用 PDA 液体培养基,于 28 ℃ 下培养 16~24 h,记录发酵液扩散形成抑菌圈的最大稀释倍数。筛选拮抗效果和发酵性能优良的菌株。

1.4 菌体形态特征及生理生化指标的测定

菌体形态及最适 pH 值测定、过氧化氢酶试验、甲基红试验、氧化酶试验、脲酶试验、吡啶试验测试、淀粉水解、V.P 试验及葡萄糖、蔗糖、山梨醇、木糖、甘露醇发酵试验均参照相关文献中的方法^[4]进行。

1.5 16S rDNA 序列测定及其系统进化树的构建

16S rDNA 序列 PCR 测定以通用的 27F 5'-AGACTTT-GATCCTGGCTCAG-3、1492R 5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3'为引物,以提取的总 DNA 为模板。PCR 技术扩增 16S rDNA 序列的反应程序为:94 ℃ 变性 5 min;94 ℃ 45 s,56 ℃ 45 s,72 ℃ 90 s,30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min,4 ℃ 保存。扩增出 16S rDNA 后,采用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行分离,经 DNA 胶回收试剂盒纯化后,直接邮寄至上海生工生物工程技术有限公司进行测序。将测序结果在 NCBI 上进行比对分析,并筛选出 9 株菌株 16S rDNA 的全序列,采用 ClustalW 软件构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离筛选

经拮抗性能检测筛选到 1 株对家蚕病原菌(金黄色葡萄球菌、黑霉菌、大肠杆菌)均有较强拮抗作用的菌株,编号为 A-02。该菌株对败血病菌的抑制效果较强,抑菌圈直径平均为 22.60 mm,抗菌发酵液最大稀释倍数可达到 60 倍(图 1)。由表 1 可知,A-02 菌株及其发酵液对败血病菌、苏云金杆菌的拮抗作用最强,对金黄色葡萄球菌、黑霉菌、大肠杆菌

收稿日期:2015-05-05

基金项目:广西教育厅高校科研立项项目(编号:LX2014332);河池学院校级青年课题(编号:2014QN-NO12)。

作者简介:李梦茜,硕士,讲师,主要从事微生物药物学研究。
E-mail:limengxi66@126.com。

通信作者:张振旺,硕士,助教,主要从事生物技术研究。E-mail:zhenwangzhang@126.com。

也有一定拮抗作用;发酵液稀释 40~60 倍时,对上述病原菌的拮抗作用仍明显,可见该菌株的发酵性能良好。

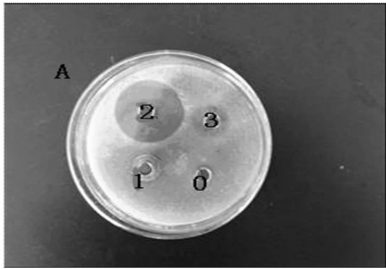


图1 A-02 菌株发酵液对败血病菌病原的拮抗性能检测

表 1 A-02 菌株及其发酵液对家蚕病原菌的拮抗作用

病原菌	菌株	菌株发酵液最大稀释倍数
败血病菌	+++++	60
苏云金杆菌	+++++	50
金黄色葡萄球菌	++++	40
黑霉菌	+	10
大肠杆菌	+++	30

注:“+”表示抑菌圈直径为 3~6 mm,“++”表示抑菌圈直径为 7~9 mm,“+++”表示抑菌圈直径为 8~12 mm,“++++”表示抑菌圈直径为 10~16 mm,“+++++”表示抑菌圈直径为 12~19 mm,“++++++”表示抑菌圈直径为 16~30 mm。

2.2 拮抗菌培养形态特征及革兰氏染色结果

A-02 菌株在 PDA 培养平板上生长的菌落特征为乳白色菌落、有光泽、菌落光滑、半透明。A-02 菌株革兰氏染色为阳性;芽孢为椭圆形,菌体形态为杆状,芽孢、细胞壁革兰氏染色均为阳性。

3 讨论

化学药物的过量使用使病原病害产生恶性抗药性,破坏生态环境,研发高效、安全的生物药物是大势所趋^[5-6]。生物药物的广泛利用须满足遗传稳定性、抗逆性 2 个必备条件,而 A-02 菌株的遗传稳定性与抗逆性满足生物药物的要求。通过 16S rDNA 的序列同源性、菌株形态特征、生理生化指标鉴定该菌株为多黏类芽孢杆菌。由于 A-02 菌株高产抗菌活性物质,是一种较好的拮抗菌,对动植物病原菌具有较强的抑制活性,起到抗病作用。本研究对于探索家蚕病原物的生物防治方法以及蚕业发展具有重要意义。

参考文献:

[1]查传勇,董法宝,杨悦,等. 洋葱伯克霍尔德氏菌 Lu10-1 产生抗菌活性物质的发酵培养基和发酵条件优化[J]. 蚕业科学,

2.3 生理生化特征

A-02 菌株为好氧菌,可于厌氧条件下生长。菌体受 pH 值影响不大,在 pH 值 5~9 区间培养抑菌效果良好(图 2)。不能利用天门冬素培养基作为氮源,可利用无机氮源。A-02 菌株过氧化氢酶试验有气泡产生,为阳性;甲基红试验为黄色,呈阴性反应;氧化酶试验为阳性;脲酶试验为阴性反应;吲哚试验为阴性反应;葡萄糖、蔗糖、山梨醇、木糖、甘露醇发酵试验反应为阳性;水解淀粉试验为阳性反应,表明该菌株可分解淀粉;该菌株可使明胶液化;V. P 试验呈红色,为阳性反应。

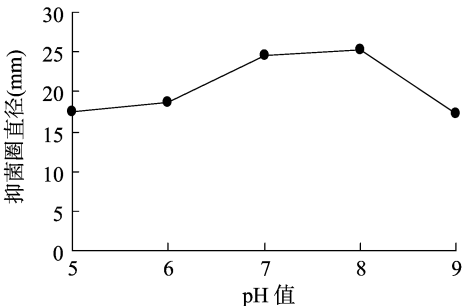


图2 pH 值对 A-02 菌株抑菌效果的影响

2.4 系统进化树的构建与分析

将测序所得 A-02 菌株的 16S rDNA 碱基序列于 NCBI 数据库 BLAST 上进行比对,选取 9 株同源性高的菌株构建系统进化树(图 3)。A-02 菌株以 100% 的同源性属于 *Paenibacillus polymyxa*。

根据形态特征和生理生化指标,鉴定该菌株属于多黏类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*),依据系统命名法将其命名为 *Paenibacillus polymyxa* HC2015。

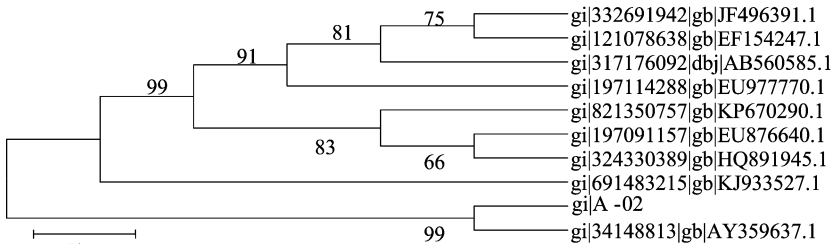


图3 A-02 菌株与相近菌株的系统进化分析

2009,35(2):229-235.

[2]Agodi A, Mahenthiralingam E, Barchitta M, et al. Burkholderia cepacia complex infection in Italian patients with cystic fibrosis: Prevalence, epidemiology, and genomovar status[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2001, 39(8):2891-2896.

[3]Parke J L, Gurian S D. Diversity of the burkholderia cepacia complex and implications for risk assessment of biological control strains[J]. Annual Review of Phytopathology, 2001, 39:225-258.

[4]布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 8 版. 北京:科学出版社,1984.

[5]张爱华,任志成,王壮,等. 不同生物源农药对西洋参主要病害的室内抑菌活性及田间防效[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(11):197-200.

[6]马丽,王开梅,李维林,等. 蒺藜提取物作为生物农药的效果[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(3):86-87.