

大豆根腐病拮抗细菌的生物学特性研究

李春杰, 刘海龙, 许艳丽

(中国科学院 东北地理与农业生态研究所 黑土区农业生态国家重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150081)

摘要:以实验室筛选出的对大豆根腐病拮抗效果较好的8株细菌(B01c、B021a、B04b、B06、B072b、B09、B131和B1)为研究对象,对其适宜生长温度、pH、氧气、渗透压、生长速度等生物学特性进行了测定。结果表明:在测试温度中,B01c、B021a、B04b和B131适宜生长温度为 $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$,B06和B09适宜生长温度为 $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$,B1在 $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ 和 $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下均生长较好。8株生防细菌在中性环境中均可较好生长;在pH为3时所有菌株均不能正常生长;除B09外,其它7株细菌在pH为11时均可生长,但较中性环境生长稍差。生防菌株B01c和B09为好氧菌;菌株B021a、B04b、B06和B1为兼性厌氧菌;B072b和B131为耐氧厌氧菌。B04b和B072b为较耐盐型菌株;B131耐盐性较差;其它菌株在正常盐浓度下均可生长。8株生防细菌的生长曲线存在一定的差异。

关键词:大豆;根腐病;生防细菌;生物学特性

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2011)05-0809-04

Biological Characteristics of Antagonistic Bacteria against Soybean Root Rot

LI Chun-jie, LIU Hai-long, XU Yan-li

(Key Laboratory of Mollisols Agroecology, Northeast Institute of Geography and Agroecology, Chinese Academy of Sciences, Harbin 150081, Heilongjiang, China)

Abstract: Eight soybean root antagonistic bacteria strains including B01c, B021a, B04b, B06, B072b, B09, B131 and B1 had been screened in precious research, and the biological characteristics of growth temperature, pH, oxygen, osmotic pressure and growth rate of those bacteria were tested in this study. As for the suitable growth temperature, B01c, B021a, B04b and B131 were $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$, B06 and B09 were $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$, B1 could grow well at both $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ and $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$. All strains could grow well at pH 7, seven strains could grow at pH 11 except B09, while pH 3 was not suitable for all of them. The growth condition of bacteria in neutral condition was better than pH 11. Among all strains, B01c and B09 were aerobes, B021a, B04b, B06 and B1 were facultative anaerobes, B072b and B131 were aerotolerant anaerobes. B04b and B072b were haloduric, B131 was weak haloduric and other strains could survive at 0.85% and 5% NaCl concentrations. The growth curves showed that 8 biocontrol bacteria had different growth properties. In general, the biological characteristics of 8 antagonistic bacteria strains were different, the research made a foundation for further application of these biocontrol bacteria.

Key words: Soybean; Root rot; Antagonistic bacteria; Biological characteristics

细菌作为自然界中分布最广泛的一类微生物,以种类多、数量大、繁殖速度快、易于人工培养等优势,受到微生物工作者越来越多的关注。很多植物根际及非根际细菌具有防病作用,有些菌株能促进植物生长,有些菌株兼具防病和促生效果^[1]。黑土区农业生态院重点实验室农田有害生物控制学科组已从大豆根内和根际土壤中分离和筛选到了8株生防细菌,它们对14种病原真菌具有抑菌作用,抑菌率为15.6%~67.5%;其中部分菌株对大豆根腐病病原菌尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)和茄腐镰刀菌(*Fusarium solani*)有较好的防效;各生防

菌株对大豆种子发芽没有抑制作用^[2]。

微生物的生长繁殖是通过与外界环境进行物质和能量交换实现的,环境条件的改变对微生物的生长造成不同程度的影响。对于生防细菌而言,了解其对环境因素的适应能力尤为重要。不同类型的生防细菌对同一环境因素的适应能力不尽相同。仅就生长温度而言,一般随温度升高细菌活性加强。但某些生防细菌是嗜温的,因此不能用于防治那些耐低温的病原菌引起的晚秋、早春的苗期病害^[3]。而某些生防细菌是耐寒、耐低温的,只有在较低的温度下才能有效的分泌具有生防作用的酶类物质,从而发挥生防作

收稿日期:2011-04-22

基金项目:国家“十一五”科技支撑计划资助项目(2006BAD21B01-15);黑龙江省“十一五”科技攻关资助项目(GA06B101-1-5)。

第一作者简介:李春杰(1976-),女,在读博士,副研究员,研究方向为大豆病虫害生物防治。E-mail:lichunjie@neigaeherb.ac.cn。

通讯作者:许艳丽(1958-),女,研究员,博士生导师,从事植物线虫病害、作物病虫害生物生态控制和土壤微生态研究。

E-mail:xyll@neigaeherb.ac.cn。

用。田间土壤的 pH 影响着生防细菌的生长以及生防细菌参与重寄生、抗生、营养竞争和产生胞外酶等活动。相关学者已对一些生防细菌的生物学特性做过研究,如桑树内生拮抗细菌^[4]、辣椒根腐病^[5]、番茄早疫、小麦赤霉、梨黑心病霉菌 X1、西瓜枯萎、梨黑心病霉菌 X2、马铃薯干腐和烟草赤星拮抗细菌^[6],但对大豆根腐病拮抗细菌的生物学特性研究鲜有报道。该试验对 8 株目标生防细菌的生长温度、pH、氧气、渗透压、生长速度等生物学特性进行了研究,确定菌株生长的最佳环境条件,为生防菌发挥其最佳防效及生防制剂的研制和应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

细菌菌株 B01c、B021a、B04b、B06、B072b、B09、B131 和 B1,由中国科学院东北地理与农业生态研究所黑土区农业生态院重点实验室农田有害生物控制学科组分离保存。

1.2 试验方法

1.2.1 生防细菌生长的适宜温度筛选 参照方中达^[7]的方法配置 NA 培养基(牛肉浸膏 3 g、蛋白胨 10 g、NaCl 5 g、琼脂 20 g 加水至 1 000 mL,pH 7.0),制备 NA 平板,使凝固后的培养基厚度为一般培养基的 1.5~2.0 倍(避免在 60℃ 温度下培养基干裂),即 90 mm 培养皿内倒入 20 mL 左右 NA 培养基。分别将生防细菌涂布平板,3 次重复,平板倒置于 4、10、30、45 和 60℃ 条件下保温 48 h,观察细菌的生长状况。最高生长温度超过 55℃ 为嗜热菌;最高生长温度不超过 20℃,可以在 ≤0℃ 的条件下生长为嗜冷菌^[8]。

1.2.2 生防细菌生长的适宜酸碱度 参照方中达^[7]的方法制备 pH 为 3、5、7、9 和 11 的 NB 培养液(牛肉浸膏 3 g、蛋白胨 10 g、NaCl 5 g 加水至 1 000 mL,用 NaOH 和 HCl 调节 pH 值)。菌悬液制备:将纯化的生防细菌 10 μL 接入 40 mL 不同 pH 值的 NB 培养液中,150 r·min⁻¹,28℃ 下振荡培养 24 h 后备用。无菌操作吸取 1 mL 生防细菌的 24 h 菌悬液接入培养瓶中,150 r·min⁻¹,28℃ 下振荡培养 24 h 后,测定培养物的 OD₆₀₀ 值。根据 OD₆₀₀ 值划分菌株生长情况,OD₆₀₀ 值 < 0.4 时认为菌株不能正常生长,OD₆₀₀ 值 > 0.4 时认为菌株可生长。

1.2.3 生防细菌生长对 O₂ 的需求 采用深层琼脂法^[3],将生防细菌制成菌悬液,将溶好的 NA 培养基装入灭菌试管中,100℃ 水浴 5~10 min,将试管取出室温静置冷却 45~50℃,做好标记,无菌操作吸取 0.1 mL 菌悬液加入相应试管中,双手快速搓动试管,

避免震荡使过多的空气混入培养基,待菌液均匀分布于培养基后,将试管置于冰浴中,使琼脂迅速凝固。28℃ 恒温箱内静置保温 48 h 后连续观察生长状况,直至 10 d 后结果清晰为止,试验重复 5 次。根据生防细菌在试管中的生长部位,判断各生防菌株对氧气的的需求及耐受能力。按照对氧气的的需求量分为 5 种类型:好氧菌只在培养基表面生长;微好氧菌在培养基中部生长;兼性厌氧菌在培养基接近表面及上部生长旺盛,中下部也有少量生长;专性厌氧菌只在培养基底部生长;耐氧厌氧菌在培养基中均匀生长。

1.2.4 生防细菌的耐盐性 制备含 0.85%、5%、10%、15% 和 25% NaCl 浓度的 NA 固体培养基平板。将生防细菌涂布平板,3 次重复。将上述平板置于 28℃ 恒温箱内,第 4 天开始观察并记录不同 NaCl 浓度平板上细菌的生长情况。菌落直径与对照相差 < 2 mm 为“++”生长良好,比对照相差 > 2 mm 且 < 4 mm 为“+”生长一般,菌落不生长为“-”。

1.2.5 生防细菌生长曲线的测定 取 20 mL 培养 24 h 的菌悬液,接种于 400 mL NB 培养基中,150 r·min⁻¹,37℃ 振荡培养。取样时间为 0~34 h,每隔 2 h 取 1 次样,以灭菌 NB 培养基为对照,测定 OD₆₀₀ 值。根据测定数值绘制生长曲线。

2 结果与分析

2.1 生防细菌生长的适宜温度

由表 1 可知,8 株生防细菌在 60℃ 和 4℃ 时均不能生长,所以均不是嗜热菌或嗜冷菌。菌株 B021a、B04b、B06、B09 和 B1 在 45℃ 条件下生长良好,其适宜生长温度偏高;各菌株在 30℃ 条件下均生长良好;在测试温度中,B01c、B021a、B04b 和 B131 的适宜生长温度是(30±1)℃;B06 和 B09 适宜生长温度是(45±1)℃;B1 在(30±1)℃ 和(45±1)℃ 下均生长良好,适应性较强。

表 1 温度对生防细菌生长的影响

Table 1 Effect of different temperature on growth of biocontrol bacteria

菌株 Strains	温度 Temperature/℃				
	4	10	30	45	60
B01c	-	++	+++	+	-
B021a	-	+	+++	++	-
B04b	-	+	+++	++	-
B06	-	+	++	+++	-
B072b	-	+	++	-	-
B09	-	+	++	+++	-
B131	-	+	+++	+	-
B1	-	++	+++	+++	-

“+++”:生长良好;“++”:生长一般;“+”:生长较差;“-”:不生长
“+++”: Good growth; “++”: Normal growth; “+”: Poor growth; “-”: No growth

2.2 生防细菌生长的适宜酸碱度

在不同的酸碱度环境下,菌株间的生长差异较大(图1)。8株生防细菌在pH为7时均生长较好,即在中性环境中均可较好生长;在pH为3时所有菌株均不能正常生长,即它们不适合强酸性环境下生长;除了菌株B09,其它7株细菌在pH为11时均可生长,但较中性环境生长差。B01c、B06和B131在pH为5和7时,OD₆₀₀值均较高,且差异不显著($P < 0.05$),推断B01c、B06和B131最适生长pH值为5~7;生防细菌B021a、B04b和B1当pH为7和9时,OD₆₀₀值均较高,且差异不显著($P < 0.05$),推断B021a、B04b和B1最适生长pH值为7~9;生防细菌B072b当pH为7时,OD₆₀₀值最高(1.231),与pH9时的OD₆₀₀值(0.733)差异显著($P < 0.05$),可推断B072b最适生长pH值为7;生防细菌B09当pH7时,OD₆₀₀值最高,其次是pH为5和9时,与前者差异不显著($P < 0.05$),推断B09最适生长pH值为5~9。因此,B01c、B06和B131在偏酸环境下较适合生长;B021a、B04b和B1适合在偏碱环境下生长;B09在稍偏酸和稍偏碱的环境均可生长;B072b对生长环境的酸碱度要求较严格,仅在中性环境中能生长良好。

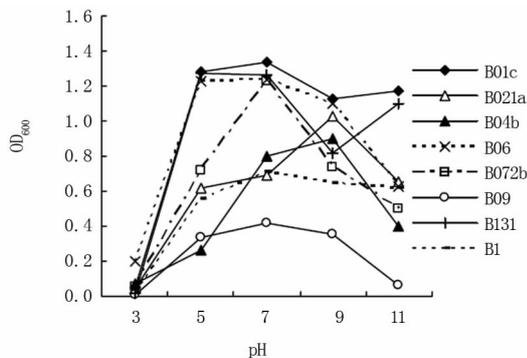


图1 pH对生防细菌生长的影响

Fig.1 Effect of pH on biocontrol bacteria growth

2.3 生防细菌生长对O₂的需求

从测试结果可以看出,各菌株对氧的需求不同,生防菌株B01c和B09只在深层琼脂培养基表面生长为好氧菌;生防菌株B021a、B04b、B06和B1在深层琼脂培养基接近表面及上部生长旺盛,中下部也有少量生长为兼性厌氧菌;生防菌株B072b和B131在深层琼脂培养基均匀生长为耐氧厌氧菌。生防细菌对氧的需求不同,可反映出不同细菌细胞内生物氧化酶系统的差别。

2.4 生防细菌生长的耐盐性

由表2可知,菌株B131对盐忍耐程度较低,在5%盐浓度下不能生长;其它7株细菌在0.85%和5%盐浓度下(正常盐浓度)均可正常生长;其中

B04b和B072b在10%盐浓度下生长较好,耐盐性较强;8株生防菌株在15%和25%盐浓度下均不能正常生长。

表2 不同NaCl浓度下生防细菌的生长情况

Table 2 Growth of biocontrol bacteria under different NaCl concentrations

菌株 Strains	NaCl 浓度 NaCl concentration/%				
	0.85	5	10	15	25
B01c	++	++	+	-	-
B021a	++	++	-	-	-
B04b	++	++	++	-	-
B06	++	++	+	-	-
B072b	++	++	++	-	-
B09	++	++	-	-	-
B131	++	-	-	-	-
B1	++	++	+	-	-

“++”:生长良好;“+”:生长一般;“-”:不生长。

“++”:Good growth;“+”:Normal growth;“-”:No growth.

2.5 生防细菌的生长曲线

如图2所示,在NB培养液中,B01c、B021a、B04b和B06菌株分别在2~18h、2~16h、2~24h和2~20h生长最快,其中分别在初始2~8h、2~10h、2~6h和2~6h内菌体量呈典型的对数增长,随后菌体量随时间逐渐增加,这一阶段即为它的指数期;分别在18~30h、16~30h、24~32h和20~30h菌体量随时间增长基本保持平衡,分别在20、18、24和28h菌体量达到最大值,这一阶段为它的稳定期;此后进入衰亡期,菌体死亡的速度超过新生的速度,菌体量减少,整个群体呈现负增长趋势。

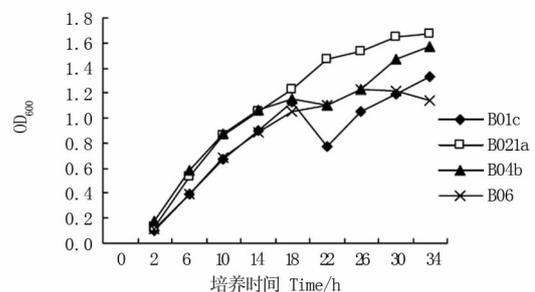


图2 生防菌株B01c、B021a、B04b和B06生长曲线

Fig.2 Growth curve of biocontrol bacteria B01c、B021a、B04b and B06

在NB培养液中,B072b、B09、B131和B1菌株分别在2~16h、2~26h、2~28h和2~18h生长最快(图3),其中分别在初始2~6h、2~8h、2~12h和2~8h内菌体量呈典型的对数增长,随后菌体量随时间逐渐增加,这一阶段即为它的指数期;分别在16~26h、26~32h、28~34h和18~28h菌体量随时间增长基本保持平衡,即处于正生长与

负生长相等的动态平衡中;分别在18、28、28和18 h菌体量达到最大值,这一阶段为它的稳定期;此后进入衰亡期,菌体死亡的速度超过新生的速度,菌体量减少,整个群体呈现负增长。

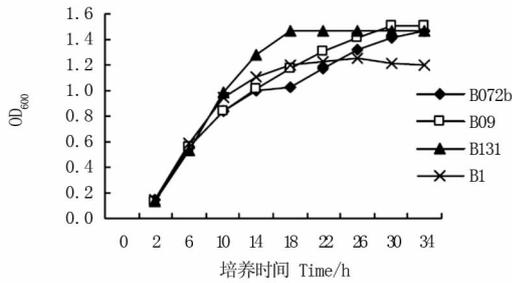


图3 生防菌株 B072b、B09、B131 和 B1 生长曲线
Fig.3 Growth curve of biocontrol bacteria B072b、B09、B131 and B1

3 讨论

生防细菌田间应用是一个复杂的过程,生防细菌受环境因子影响较大,导致生防效果不稳定。就环境条件而言,温度和湿度是影响生防细菌防治效果的2个最关键的因子^[9]。可能是因为田间的环 境因子如温度、湿度、光照等都是在不断的变化中,从而影响生防细菌的定殖和繁殖^[10]。生防细菌在实际应用中常表现出不稳定性。在小范围的试验中可能表现出很好的作用,但在田间的大面积试验中却出现很强的不稳定性,这是由于生防因子在田间的大生态系统中的行为和作用方式会发生较大变化^[11]。生防因子的稳定性,对于生防效果至关重要,抗生因子在土壤中的有效存在时间是生防因子保持稳定抑菌活性的关键。因此,接种体引入到土壤环境之前,应该首先考虑土壤的环境^[12],适宜的环境能使细菌在根系中长时间保持较高的种群密度。

从该试验结果可以看出,不同细菌或菌株的适宜生长温度不同;在不同的酸碱度下其生长状况差别较大,但8株生防细菌在中性环境中均可较好生长;它们对氧的需求也不同;各菌株对渗透压变化的适应能力也大不相同,多数在0.85%~5%的盐浓度范围均能正常生长;菌体量达到最大值的时间明显不同。明确生防细菌对环境因子如温度、pH、O₂和渗透压等适应能力及生长速度,可为选择大豆根腐病生防细菌的应用生态环境提供参考。

参考文献

- [1] 安德荣.生物制药的原理及方法—抗生素的制备[M].北京:中国科学文化出版社,2002.(An D R. Principle and method of biological pharmacy-preparation of antibiotic[M]. Beijing: China Science Culture Press,2002.)
- [2] 刘海龙,李春杰,许艳丽.生防细菌的抑菌谱和对大豆根腐病的防治[J].大豆通报,2008(1):10-13,16.(Liu H L, Li C J, Xu Y L. Antibacterial spectrum and biocontrol against soybean root rot of 8 strains bacteria[J]. Soybean Bulletin,2008(1):10-13,16.)
- [3] 沈萍,范秀容,李广武.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社,2004.(Shen P, Fan X R, Li G W. Experiment manual on microbiology[M]. Beijing: Higher Education Press,2004.)
- [4] 路国兵,李季生,牟志美,等.一株桑树内生拮抗细菌的分离鉴定及生物学特性研究[J].蚕业科学,2008;34(1):11-17.(Lu G B, Li J S, Mu Z M, et al. Isolation and identification of an antagonistic endophytic bacterium from mulberry and its biological characteristics[J]. Science of Sericulture,2008;34(1):11-17.)
- [5] 朱辉,姚良同,田方,等.辣椒根腐病拮抗细菌的筛选及其生物学特性研究[J].生物技术通报,2008(1):156-159.(Zhu H, Yao L T, Tian F, et al. Screening and study on biological characteristics of antagonistic bacteria against *Fusarium solani*[J]. Biotechnology Bulletin,2008(1):156-159.)
- [6] 杨森,孙高利,董兆麟,等.一株 *Burkholderia* 细菌的抗植物病原真菌及生物学特性的研究[J].西北大学学报(自然科学版),2008,38(5):779-782.(Yang S, Sun G L, Dong Z L, et al. Characterization and antifungal activity of an environmental *Burkholderia* spp. isolate[J]. Journal of Northwest University (Natural Science Edition),2008,38(5):779-782.)
- [7] 方中达.植病研究法[M].北京:农业出版社,1977:161-224.(Fang Z D. Research method on phytopathology[M]. Beijing: Agricultural Press,1977:161-224.)
- [8] 陈骏,连宾,王斌,等.极端环境下的微生物及其生物地球化学作用[J].地学前缘,2006,13(6):199-207.(Chen J, Lian B, Wang B, et al. The occurrence and biogeochemistry of microbes in extreme environments[J]. Earth Science Frontiers,2006,13(6):199-207.)
- [9] Guo J H, Qi H Y, Guo Y H, et al. Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria[J]. Biological Control, 2003, 24: 288-295.
- [10] Siddiqui I A, Shaikat S S. Resistance against the damping-O. fungus *Rhizoctonia Solani* systemically induced by the plant-growth-promoting rhizobacteria *Pseudomonas Aeruginosa* (IE-6S+) and *P. Fluorescens* (CHA0) [J]. Journal of Phytopathology, 2002, 150: 500-506.
- [11] Rainey P B. Adaptation of *Pseudomonas Fluorescens* to the plant rhizosphere [J]. Environmental Microbiology, 1999, 1(3):243-257.
- [12] Girlanda M, Perotto S, Moenne-Loccoz Y, et al. Impact of biocontrol *Pseudomonas Fluorescens* CHA0 and a genetically modified derivative on the diversity of culturable fungi in the cucumber rhizosphere [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(4):1851-1864.