

# 研究报告

## BIOLOG 系统鉴定黄瓜根围促生菌的初步研究\*

陈晓斌<sup>1\*\*</sup> 张炳欣<sup>1</sup> 楼兵干<sup>1</sup> M. H. Ryder<sup>3</sup> 许志刚<sup>2</sup>

(浙江大学农学院 杭州 310029)<sup>1</sup> (南京农业大学植物保护系 南京 210095)<sup>2</sup>

(CSIRO Land and Water, Glen Osmond, SA5064, Australia)<sup>3</sup>

**摘要:** 对筛选出的 8 株具有明显促生防病作用的黄瓜根围促生菌 CN11, CN31, CN45, CN116, CN129, XB120, XB5, XB41 通过 BIOLOG 法进行了分类鉴定, 分别为: 铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*), 波纹假单胞菌 (*P. corrugata*), 短芽孢杆菌 (*Bacillus brevis*), 荧光假单胞菌 B 型 (*P. fluorescens* type B), 铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*), 荧光假单胞菌 C 型 (*P. fluorescens* type C), 短芽孢杆菌 (*Bacillus brevis*) 和解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*)。鉴定结果与分离筛选的 PGPR 菌株大多集中在假单胞菌 (*Pseudomonas* spp.) 和芽孢杆菌 (*Bacillus* spp.) 两个属。

**关键词:** 黄瓜, 根围促生菌 (PGPR), BIOLOG 测试, 鉴定

**中图分类号:** S154.3, S432.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)06-0403-05

## STUDIES ON IDENTIFICATION TO PLANT GROWTH—PROMOTING RHIZOBACTERIA OF CUCUMBER USING BIOLOG ANALYSIS

CHEN Xiao-Bin<sup>1</sup> ZHANG Bing-Xin<sup>1</sup> LOU Bing-Gan<sup>1</sup> M. H. Ryder<sup>3</sup> XU Zhi-Gang<sup>2</sup>

(Agricultural College, Zhejiang University, Hangzhou 310029)<sup>1</sup>

(Department of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)<sup>2</sup>

(CSIRO Land and Water, Glen Osmond, SA5064, Australia)<sup>3</sup>

**Abstract:** BIOLOG analysis was used for the identification of 8 bacterial strains, which were isolated from cucumber rhizosphere and proved to have significant growth-promotion and disease-control effects on cucumber seedlings. The result showed that strain CN11 was identified as *Pseudomonas aeruginosa*, CN31 as *P. corrugata*, CN45 as *Bacillus brevis*, CN116 as *P. fluorescens* type B, CN129 as *P. aeruginosa*, XB120 as *P. fluorescens* type C, XB5 as *Bacillus brevis*, and XB41 as *B. amyloliquefaciens*. It agreed that most of screened PGPR belonged to *Pseudomonas* spp. and *Bacillus* spp.

**Key words:** *Cucumis sativus*, Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), BIOLOG analysis, Identification

植物根围促生菌 (Plant growth-promoting rhizobacteria, 简称 PGPR) 是指根围的一类有益细菌, 能直接或间接地对植物生长起促进作用。自 1978 年 Burr 和 Bchroth 等在马铃薯上率先报道 PGPR 以来, 对其防病促生的研究蓬勃发展,

至 1997 年, 有关 PGPR 的国际专门研讨会已举

\* 澳大利亚国际农业发展中心 (ACIAR) 资助的中澳合作项目 (No. PN9680)

国家自然科学基金资助项目 (No.30070511)

\*\* 现工作单位: 上海交通大学农学院园艺系

收稿日期: 1999-10-14, 修回日期: 2000-06-06

行了 4 届。PGPR 的微生物生态制剂已被广泛地用于植物病害的生物防治,特别是有效地用于防治小麦全蚀病、马铃薯软腐病、棉苗猝倒病、作物青枯病等多种顽固性土传病害<sup>[1~3]</sup>。从 1996 年开始,我们从黄瓜、番茄等蔬菜作物根围分离筛选到一些对蔬菜生长有明显促进作用和对不同病原引起的苗期猝倒病有效防治效果的 PGPR 菌株<sup>[4,5]</sup>,为进一步弄清这些菌株的防病促生机制及其在根围的定殖情况等生态学问题,并为研究开发利用无污染、效果好的 PGPR 生防菌剂防治蔬菜苗期病害作准备,对其分类状况作一个准确的鉴定是很有必要的。

由美国 BIOLOG 公司生产的 Microstation™ 微孔板鉴定系统(简称 BIOLOG 系统)有 4 种类型,分别用于对放线菌、酵母菌、革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌的重要生理生化反应作快速鉴定。当接种纯培养的细菌悬液时,其中一些孔中的营养物质被利用,使孔中的氧化反应指示剂四氮唑紫(Tetrazolium violet)呈现出不同程度的紫色,从而构成该种细菌的特有“代谢指纹”(Metabolic Fingerprint),经相应的仪器记录,结果输入 BIOLOG 配套软件,与标准菌种的数据库比较后,该菌株的分类地位便被确定出来<sup>[6,7]</sup>。该方法具有快速、简便、高效、准确的特点,近年来在国外广泛用于多种细菌、放线菌和酵母菌的鉴定,用于指示不同生境如水样、土壤、根围、叶围微生物群落的时空差异性等<sup>[8]</sup>。国内赵友福等采用 BIOLOG 鉴定系统来鉴定植物病原细菌<sup>[9]</sup>等。本文报道了采用 BIOLOG 系统对黄瓜 PGPR 菌株进行分类鉴定的结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株

供鉴定菌株系本实验室分离自黄瓜根围,经盆栽和田间试验证明对黄瓜植株生长有明显的促进作用,并对由多种病原引起的黄瓜苗期猝倒病有较好的防效<sup>[4,5]</sup>,菌株于含 20% 甘油的 LB 培养基中在 -20℃ 下长期保存。

### 1.2 供试菌株的革兰氏染色

按常规方法进行,确定菌株革兰氏反应阴

性或阳性后再用相应的 GN 板或 GP 板测试。

### 1.3 BIOLOG 测试

基本按 BIOLOG 测试操作程序<sup>[10]</sup>,有所修改为:①菌株首先经 KMB 平板活化,再于专用培养基 BUGM(BIOLOG Universal Growth Medium)上划线培养(30℃, 12~18h);②用棉拭小心刮取菌苔至盛有 18~20mL 预热的灭菌生理盐水的三角瓶中,涡旋振荡至均匀菌悬液,取部分菌悬液至 7230 分光光度计上比色测定浓度,调节革兰氏阴性菌(GN)的  $OD_{590}$  值为 0.25~0.30,革兰氏阳性菌(GP)的  $OD_{590}$  值为 0.16~0.26,即相当于菌悬液浓度为  $3 \times 10^8$  CFU/mL;③采用多头进液器加样,每孔 150μL,革兰氏阴性菌和阳性菌分别接种在 GN 板和 GP 板上 30℃ 恒温中培养;④分别在接种 4h 后和 24h 后目测:以 A1 孔(内无碳源)为对照,凡与该孔颜色相近者记“-”,与此孔相比有明显紫色出现者记为“+”,不能分辨者记为“±”;⑤培养 24h 后用 Bio-Rad 550 型酶标仪测读结果,滤光片波长为 590nm;⑥将④⑤结果经配套软件处理,得出菌株鉴定结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 革兰氏染色结果

供试菌株革兰氏染色结果为:革兰氏阴性(GN)的 5 株:CN11、CN31、CN116、CN129、XB120;革兰氏阳性(GP)的 3 株:CN45、XB5、XB41。

### 2.2 4h、24h 目测结果和酶标仪测读结果

目测往往不受条件限制,简便易行。30℃ 培养 4h 后, BIOLOG 板上发生生化反应的孔中出现颜色变化,尽管反应尚未完成,但“代谢指纹”已显现出来(如图 1,以菌株 XB120 为例)对有些 GN 菌株,4h 后显色结果已基本与最后结果相同,对一些特殊的菌株如肠细菌中的某些种,4h 目测常很重要,因为这些细菌培养时间过长“代谢指纹”往往不易读取(全为阳性)。

24h 后,各个孔的颜色变化已相当明显,有的孔底甚至已有色素沉淀。目测时往往需要用无菌牙签将不同孔适当搅动后以分辨颜色变化。

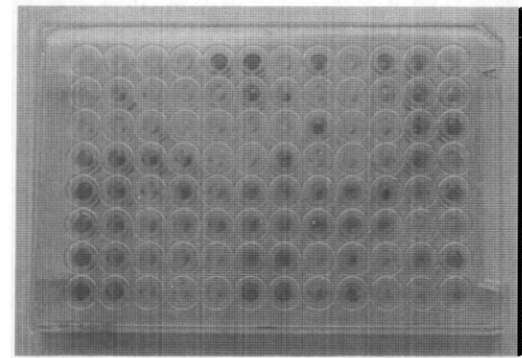


图1 XB120接种后培养4h的“代谢指纹”图谱

24h 时酶标仪测读结果,首先生成原始数据,之后与目测一样选取 A1 孔为对照(即选取

A1 孔原始数据为 Cut-off 值),每孔的阴性、阳性结果即可自动生成。

2.3 Microlog 3 计算机软件鉴定结果

将 4h、24h 目测结果,24h 机读结果比较分析后,采用“+”记 100,“-”记 0,“±”记 50 逐孔输入的方法(如表 1,以菌株 XB120 为例),也可采用原始数据逐孔输入法,经计算机与已有模式菌种资料对照,则得出菌株的最后鉴定结果见表 2、表 3。

从鉴定结果看,与各 PGPR 菌株最匹配的模式种分别为: CN11 和 CN129 属铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*); CN31 属波纹假

表1 菌株XB120 24h机读结果鉴定逐孔输入

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	<50-	<50>	<100-	<100>	<100>	0	<100.	0	<100.	<100>	0
B	0	<100>	0	<50>	<50>	<100>	0+	<50-	0	<50>	<100>	<50+
C	0	0	<100>	<50-	0	<50-	<50>	<50+	<50-	0	<100>	<100>
D	<100>	<100>	<100>	<100>	0	<50-	<100>	0	0	0	<100>	<50>
E	<100>	<100>	<50+	<100>	<100>	<100>	<100>	<100>	<100>	0	<100>	<100>
F	<100>	<100>	<50-	<100>	<100>	<100>	<100>	<100>	<100>	<100>	<50>	<50+
G	<100>	<100>	<100>	<100>	<50-	<100>	<100>	<100>	<100>	<100>	<100>	<100>
H	<100>	<100>	<50+	<50-	<50>	<100>	<100>	<100>	<100>	<100>	0	<100>

表2 菌株XB120 Microlog 3计算机软件鉴定结果\*

CLOSEST SPECIES(最相近的模式种)	SIM	DIST	AVG	MAX
=>1) PSEUDOMONAS FLUORESCENS TYPE C	0.769	3.359	0.875	4.137
2) PSEUDOMONAS AURANTIACA	0.004	5.103	0.438	2.894
3) PSEUDOMONAS PUTIDA TYPE B1	0.001	5.437	0.604	1.319
4) PSEUDOMONAS AERUGINOSA	0.001	5.439	0.797	3.456
5) PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS (FLUOR. TYPE D)	0.000	6.178	0.081	1.419
6) PSEUDOMONAS FUSCOVAGINAE	0.000	6.207	0.438	2.162
7) PSEUDOMONAS AUREOFACIENS (FLUOR. TYPE E)	0.000	7.096	0.081	2.419
8) PSEUDOMONAS PUTIDA TYPE A2	0.000	7.249	0.109	0.706
9) PSEUDOMONAS FLUORESCENS TYPE B	0.000	7.275	0.281	1.531
10) PSEUDOMONAS FLUORESCENS TYPE G	0.000	8.169	0.375	3.825
Other:	...	...	...	...

\* BIO-NUMBER: 3726-2727-1573-7543-7773-7777-7775

SPECIES IDENTIFICATION: PSEUDOMONAS FLUORESCENS TYPE C

表3 PGPR筛选菌株的鉴定结果\*

菌株	最匹配的种	相似系数	鉴定种
CN11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.859	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
CN31	<i>P. corrugata</i>	0.808	<i>P. corrugata</i>
CN45	<i>B. brevis</i>	0.597	<i>B. brevis</i>
CN116	<i>P. fluorescens</i> type B	0.667	<i>P. fluorescens</i> type B
CN129	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.522	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
XB5	<i>B. brevis</i>	0.213	不能最后确定
XB41	<i>B. amyloliquefaciens</i>	0.398	不能最后确定
XB120	<i>P. fluorescens</i> type C	0.769	<i>P. fluorescens</i> type C

\* 相似系数(SIM)大于0.50则分类地位能最后确定

单胞菌(*P. corrugata*); CN116 属荧光假单胞菌 B 型(*P. fluorescens* type B); XB120 属荧光假单胞菌 C 型(*P. fluorescens* type C); CN45 和 XB5 可能属短芽孢杆菌(*Bacillus brevis*); XB41 则与解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)有些相似。与模式种相似系数(SIM)革兰氏阴性菌均大于 0.50, 革兰氏阳性菌相似系数则只有 CN45 一个菌株大于 0.50, 其余两菌株相似系数分别为 0.213 和 0.398。

### 3 讨论

传统的细菌鉴定主要偏重于表型特征(如细菌形态学特征、培养性状差异)和一般的生理生化特性等<sup>[1]</sup>。表型特征的描述由于缺乏足够的细节资料而很难将细菌准确鉴定至种; 利用生理生化特性鉴定虽能较好地解决这一点, 但由于所测试项目甚多, 要求实验室内大量的工作, 因而相当费事费力; 而 BIOLOG 法以纯培养细菌的“代谢指纹”图谱为基础, 与计算机的数值分类和聚类分析相结合, 根据已有的菌种库资料, 获得细菌的分类鉴定, 显示了其快速、简便、测试程序标准化等优点, 能大大节省测试工作中的繁重劳动, 减少人为误差。只要菌种库资料充分, 对细菌的鉴定一般都能精确至种, 有的甚至能精确至种以下的分类阶元, 如不同生化变种、致病变种等。只是, 在目前的数据库中, 模式种的数量还较为有限, 不少待测样品有

时还不能准确鉴定到种, 而只能到相似的类群, 有待不断完善。因此对于微生物分类鉴定, 仅靠某一种系统的方法进行是远远不够的, BIOLOG 系统也不例外。若同时能结合其它方法如细胞壁脂肪酸气相色谱(GC-FAME)鉴定系统, 结果将更为可靠(目前我们实验室已进行这方面的工作)。

从鉴定的结果看, 革兰氏阴性菌株的相似系数一般均远远大于 0.50, 即能达到 BIOLOG 要求的鉴定水平, 而革兰氏阳性菌除 CN45 与模式种短芽孢杆菌 *Bacillus brevis* 相似系数能达 0.50 之外, 一般均小于 0.50, 不能达到 BIOLOG 的最终鉴定水平, 究其原因, 可能之一是革兰氏阳性菌菌苔在生理盐水中难分散, 菌悬液不均一, 要达到要求的  $OD_{590}$  值(0.16~0.20)则需要较长的振荡时间(大于 10min)和更剧烈的分散条件, 可能会影响菌株的活力, 进而影响“代谢指纹”。

分类鉴定结果显示, 分离筛选的这几株 PGPR 菌株均分别属于假单胞菌(*Pseudomonas* spp.), 或芽孢杆菌(*Bacillus* spp.), 这与分离筛选的 PGPR 菌株大多集中在这两个属并且研究报道最多是相一致的<sup>[1,2]</sup>。而且, 在这些菌株中还出现了假单胞菌或芽孢杆菌同一种细菌的不同分离物, 这说明在某一种具体的作物根围, PGPR 往往以某种细菌为主, 即 PGPR 菌种分布具特异性(随寄主植物基因型不同而有差异)。Cook

等<sup>[12]</sup>早就指出,植物生态系中的微生物与植物之间、微生物与病原物之间、以及微生物之间关系复杂,相互依存又相互制约,微生物组成和数量变化因植物的种类、部位、发育阶段和环境而变化,筛选利用生防因子要求遵循从哪里来再回到哪里去的原则。上述 PGPR 菌株分布的特异性,或许能联系到目前筛选利用的 PGPR 菌株往往普遍存在作用谱窄、推广应用时生防效果不稳定等问题,并同时也为生防菌剂的开发利用时要考虑菌株的复配混配提供一点依据。

**致谢** 本项研究得到了澳大利亚联邦科学院土地和水资源管理部研究员 Maarten Ryder 博士的帮助,美国 Kansas 州立大学植病系杨民和博士提供部分资料,在此表示感谢。

## 参 考 文 献

[1] Kloepper J W. In: The Biological Control of Plant

Disease. FFTC Book Series, No. 42. ED. J. Bay-Petersen. 1991, 142~152.

- [2] Weller D M. Ann. Rev. Phytopathol. 1988, 26:397~407.
- [3] 陈晓斌,张炳欣. 微生物学杂志, 2000, 1: 38~41.
- [4] 陈晓斌,张炳欣. 山东农业大学学报, 1999, 30(增刊): 142~149.
- [5] 陈晓斌,张炳欣,楼兵干等. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 1999, 6: 578~582.
- [6] Bochner B R. Nature, 1989, 339:157~158.
- [7] Bochner B R. ASM News. 1989, 55:536~539.
- [8] Smalia K, Wachtendorf U, Heuer H *et al.* Appl. Environ. Microbiol. 1998, 64:1220~1225.
- [9] 赵友福,魏亚东,高崇省等. 植物病理学报, 1997, 27(2): 139~144.
- [10] Instruction for use of the BIOLOG MicroPlate TM. 1993, Inc.
- [11] 许志刚. 植物病理学报, 1998, 28(2): 97~100.
- [12] Cook R J, Baker K F. St. Paul, Am. Phytopathol. Soc. 1983, 539.