

中药源芽孢杆菌抗病原真菌菌株的筛选与鉴定

周文文 敖常伟 牛天贵

(中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083)

摘要: 从 20 种中药中分离纯化得到 48 株芽孢杆菌, 其中 25 株对 10 种植物病原菌中至少一种具有拮抗作用, 7 株抗菌谱较广, 其中 1 株广谱抗菌能力极强。25 株有抗性菌株经纯化培养对其进行菌体菌落形态观察和生理生化特征鉴定, 其中 8 株芽孢杆菌被初步鉴定为枯草芽孢杆菌, 3 株被初步鉴定为蜡样芽孢杆菌, 1 株被初步鉴定为纳豆芽孢杆菌, 1 株被初步鉴定为地衣芽孢杆菌, 发现两种可能对芽孢杆菌有抑制作用的中药。

关键词: 中药, 芽孢杆菌, 拮抗作用, 鉴定

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 02-0090-05

Isolation and Identification of Antagonistic *Bacillus* from Chinese Traditional Medicine

ZHOU Wen-Wen AO Chang-Wei NIU Tian-Gui

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083)

Abstract: There were 48 strains of *bacilli* obtained from 20 Chinese traditional medicines. Twenty-five strains had antagonistic effect against at least one of ten plant pathogens. Seven strains had antibiosis to more than four pathogens and the best strain had antibiosis to nine pathogens. After physiological and biochemical experiments, eight strains of 25 antagonistic *bacilli* were proved to be *Bacillus subtilis*, three were *Bacillus cereus*, one were *Bacillus natto* and one were *Bacillus licheniformis*. At the same time, two kinds of Chinese traditional medicines, which probably had antibacterial effect, were found.

Key words: Chinese traditional medicine, *Bacillus*, Antagonism, Identification

芽孢杆菌 (*Bacillus*) 是一大群需氧或兼性厌氧、革兰氏阳性 (目前发现亦有个别革兰氏阴性的)、在一定条件下形成内生芽孢的化能异养菌, 在生产生活中的应用十分广泛。中药作为一种具有悠久历史的中国特色产品, 对于其中的芽孢杆菌的分离及鉴定工作尚未见相关文献报道, 以中药作为待分离样品具有自身的特殊性。中药中的芽孢杆菌的分离及鉴定的实验结果将为后期确定分离菌株的鉴定特征与系统发育的关系, 芽孢杆菌信息资源库的建立提供宝贵资料。

芽孢杆菌作为潜在的生防资源, 已成为近年来生防菌剂研制开发的热点。与芽孢杆菌有关的生防作用的报道涉及棉花、马铃薯、玉米、水稻、小麦等作物。目前, 对于植物某些病害的防治在抗病品种选育和利用、化学防治等方面收效甚微, 尤其是化学防治污染环境的问题难以克服的情况下, 用生防菌进行生物防治是生态农业可持续发展的一个重要方面^[1]。一些芽孢杆菌不仅具有防病作用还可促进作物增产, 刺激和协调作物生长, 抑制病害发生。

本试验从 20 种中药材中分离得到了 48 株芽孢杆菌, 将它们作为参试菌, 与对经济

通讯作者 Tel: 010-62737045, E-mail: niutianguai@163.com

收稿日期: 2005-06-02, 修回日期: 2005-07-04

作物(梨、棉花、玉米及水稻)危害较大的十种病原真菌进行了拮抗性试验,得到有拮抗作用的菌株 25 株,其中抗菌谱较广的 7 株,并针对不同病害选出了拮抗能力强的菌株以及一株抗菌谱广、抗菌特性最为优良菌株,以期为进一步研究和应用提供依据。同时对 25 株拮抗真菌菌株进行了形态及生理生化特征分析,进行了初步鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料: 48 株芽孢杆菌分离自 20 种中草药,编号如下:(1)姜半夏、(2)升麻片、(3)香蒿本、(4)生麻黄、(5)炙麻黄、(6)北豆根、(7)百茯苓、(8)建泽泻、(9)紫丹参、(10)川羌活、(11)炙紫苑、(12)炙冬花、(13)金果榄、(14)海浮石、(15)生蛤壳、(16)煅蛤壳、(17)鸡骨草、(18)冬精草、(19)马尾连、(20)百部根。

1.1.2 病原菌: 梨青霉病菌 (*Penicillium expansum*)、梨黑斑病菌 (*Alternaria alternata*) 由中国农业大学食品学院姜微波教授提供;棉花黄萎病菌 (*Verticillium dahliae* Kleb.)、棉花枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *Vasinfectum*) 由中国农业科学院郭三堆教授提供;玉米小斑病菌 (*Cochliobolus heterostrophus*)、玉米黑粉病菌 (*Ustilago maydis*)、玉米青枯病菌 (*Fusarium graminealeum*)、水稻白叶枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)、米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 和黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 由本实验室保存。

1.1.3 初步鉴定模式菌: 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megatherium*)、纳豆芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis* Var. *natto*)、蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 细菌的分离纯化及培养特征: 将中药样品 80℃ 处理 10 min,采用稀释平板法及划线法进行纯化,于 37℃ 培养 48 h,并于 24 h 及 48 h 进行革兰氏染色,观察菌体形态和菌落特征。

1.2.2 生理生化试验: 葡萄糖产气试验、糖醇发酵试验、接触酶试验、柠檬酸盐利用试验、明胶液化试验、淀粉水解试验、耐盐性和需盐性试验、石蕊牛奶试验、V-P 测定试验、Tween 80 水解试验、硝酸盐还原试验,分别参照文献 [2, 3] 方法进行。

1.2.3 拮抗试验: 参照文献 [4],采用异步培养法,将从中药中分离得到的芽孢杆菌点种于 PDA 平板,于 37℃ 培养 24 h。将平板倒扣于盛薄层氯仿的培养皿盖中熏蒸 50min,以便杀死菌体并令其固定在平板表面。打开皿盖,充分吹去残余氯仿后加制备好的一定浓度的病原真菌孢子悬液 1 mL,浸润数分钟后弃去剩余的菌液,晾干平皿。24℃ 培养 2~14 d 后,观察细菌菌落周围病原菌生长情况、有无抑菌圈,通过抑菌圈带宽与细菌菌落半径之比反映拮抗效果。

2 结果

2.1 中药中芽孢杆菌菌株分布及拮抗试验

从 20 种中药中分离得到 48 株芽孢杆菌,本次实验样品除姜半夏、煅蛤壳,其他中药中均存在一定种类数量的芽孢杆菌。菌株编号 m-n (其中 m 代表菌种来源的中药编号, n 代表第 m 种中药分离得到的菌株序号),对 48 株菌进行了如下 10 种病原菌抗菌

测试, 结果见表 1。

表 1 参试菌的拮抗试验结果

| 拮抗菌 | 玉米 小斑病 | 玉米 黑粉病 | 玉米 青枯病 | 水稻白 叶枯病 | 米曲霉 | 黑曲霉 | 棉花 枯萎病 | 棉花 黄萎病 | 梨 青霉病 | 梨 黑斑病 |
|------|-----------|-----------|-----------|------------|-----|-----|-----------|-----------|----------|----------|
| 2-3 | - | + | - | - | - | - | - | - | - | + |
| 2-4 | ++ | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 2-5 | +++ | + | - | + | - | + | ++ | + | + | - |
| 3-1 | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 3-3 | + | + | - | + | - | - | - | - | ++ | + |
| 4-2 | + | + | - | - | - | - | - | - | - | + |
| 5-1 | ++ | +++ | - | - | - | - | +++ | - | - | + |
| 8-1 | + | + | - | - | - | - | - | - | - | + |
| 9-1 | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| 9-2 | ++ | ++ | - | - | - | - | - | - | + | - |
| 10-1 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 10-2 | + | + | + | ++ | - | - | - | - | - | + |
| 10-3 | - | - | - | + | - | - | - | - | - | + |
| 10-4 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 10-5 | +++ | ++ | - | - | - | - | - | - | - | ++ |
| 12-2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| 13-1 | - | - | - | +++ | - | - | + | ++ | - | ++ |
| 15-1 | - | - | - | + | - | - | - | ++ | - | - |
| 17-2 | ++ | - | - | - | - | + | - | - | + | ++ |
| 18-1 | - | - | - | + | - | - | - | - | - | + |
| 19-1 | +++ | + | +++ | ++ | + | - | ++ | ++ | + | +++ |
| 20-1 | ++ | - | ++ | + | - | - | - | - | - | - |
| 20-2 | ++ | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 20-3 | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 20-4 | +++ | ++ | - | + | - | - | + | - | - | - |

注: +++ $D1/D2 \geq 2$, ++ $2 > D1/D2 \geq 1.5$, + $1.5 > D1/D2 \geq 1$, 其中 D1 为抑菌圈带宽, D2 为菌落半径, 表中未列无拮抗能力菌株

由表 1 可知 48 株芽孢杆菌中 25 株有拮抗植物病原菌能力。

2.2 菌落菌体形态特征

选取的模式菌及 25 株抗病原菌菌株的菌落形态和菌体形态见表 2。

表 2 参试菌菌落菌体形态试验结果

| 菌种 | 菌落形态 | | | | | | | 菌体形态 | | |
|--------|------|----|----|------|-----|----|----|------|------|-------|
| | 圆形 | 凸起 | 光滑 | 边缘整齐 | 透明度 | 色素 | 粘液 | 细胞形状 | 细胞排列 | 革兰氏反应 |
| 枯草芽孢杆菌 | + | - | + | + | - | - | + | 短杆 | 单个 | + |
| 巨大芽孢杆菌 | + | + | + | + | - | - | - | 短杆 | 单个 | + |
| 纳豆芽孢杆菌 | + | + | + | - | - | - | + | 短杆 | 单个 | + |
| 蜡样芽孢杆菌 | + | - | + | + | - | - | - | 长杆 | 单个 | + |
| 2-3 | + | + | + | + | - | - | + | 短杆 | 单个 | + |
| 2-4 | + | - | + | + | - | - | - | 短杆 | 单个 | + |
| 2-5 | + | - | + | + | - | - | - | 短杆 | 单个 | + |

续表 2

| | | | | | | | | | | |
|------|---|---|---|---|-----|---|-----|----|----|---|
| 3-1 | + | + | + | + | (+) | - | - | 短杆 | 单个 | + |
| 3-3 | + | + | + | + | - | - | - | 长杆 | 单个 | + |
| 4-2 | + | + | + | + | - | - | + | 长杆 | 单个 | + |
| 5-1 | + | - | - | + | - | - | - | 短杆 | 单个 | + |
| 8-1 | + | + | + | + | - | - | + | 短杆 | 单个 | + |
| 9-1 | + | + | + | + | - | - | + | 短杆 | 单个 | + |
| 9-2 | + | - | - | + | - | - | - | 短杆 | 成链 | + |
| 10-1 | + | + | + | + | - | - | (-) | 短杆 | 单个 | + |
| 10-2 | + | + | + | + | - | - | (-) | 短杆 | 单个 | + |
| 10-3 | + | + | + | + | + | - | + | 短杆 | 单个 | + |
| 10-4 | + | + | + | + | + | - | - | 短杆 | 单个 | + |
| 10-5 | + | - | - | + | - | - | - | 短杆 | 单个 | + |
| 12-2 | + | + | + | + | - | - | - | 短杆 | 单个 | + |
| 13-1 | + | - | - | + | (+) | - | - | 短杆 | 单个 | + |
| 15-1 | + | + | + | + | (+) | - | + | 短杆 | 单个 | + |
| 17-2 | + | + | + | + | (+) | - | - | 短杆 | 单个 | + |
| 18-1 | + | + | + | + | - | - | - | 短杆 | 单个 | + |
| 19-1 | + | - | + | + | - | - | + | 短杆 | 单个 | + |
| 20-1 | + | - | - | + | - | - | - | 短杆 | 单个 | + |
| 20-2 | + | + | - | + | - | - | - | 短杆 | 单个 | + |
| 20-3 | + | + | + | + | - | - | (-) | 短杆 | 单个 | + |
| 20-4 | + | + | + | + | - | - | - | 短杆 | 单个 | + |

注：+ 阳性，- 阴性，(+) 弱阳性，(-) 弱阴性

2.3 生理生化特性鉴定

参照文献 [2, 3] 对模式菌及分离菌株进行系列生理生化试验，将具代表性的理化特征检测结果列表 3。

表 3 参试菌的生理生化反应结果

| 菌种/性质 | I | II | | | | | III | IV | V | VI | VII | | | | VIII | | | | | IX | X | XI |
|--------|---|----|---|---|---|---|-----|----|---|----|-----|---|---|---|------|---|---|---|---|----|---|----|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | |
| 枯草芽孢杆菌 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | - | - | + | - | - | - | + | - | + |
| 巨大芽孢杆菌 | - | + | + | - | + | - | + | + | - | + | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | + |
| 纳豆芽孢杆菌 | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | - | + | - | - | - | + | - | - | - | + | - | + |
| 蜡样芽孢杆菌 | - | + | + | + | + | - | + | + | + | + | - | - | - | | | + | - | - | - | + | + | + |
| 2-3 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | - | - | + | - | - | - | + | + | + |
| 2-4 | - | + | - | + | + | - | + | + | + | - | - | + | - | - | - | + | - | - | - | + | + | + |
| 2-5 | - | + | + | + | - | + | + | + | + | + | - | + | + | + | - | + | - | - | - | + | + | + |
| 3-1 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | - | - | + | - | + | - | + | - | + |
| 3-3 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | - | - | + | - | - | - | + | - | + |
| 4-2 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | - | - | - | + | - | - | - | + | + | + |
| 5-1 | - | + | + | + | + | - | + | + | + | + | - | + | - | - | - | + | - | - | - | + | + | + |
| 8-1 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | - | - | + | - | - | - | + | + | + |
| 9-1 | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | - | + | + | - | - | + | - | + | - | + | + | + |
| 9-2 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | - | + | - | - | - | + | - | + |
| 10-1 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | - | - | + | - | - | - | + | + | + |
| 10-2 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | - | - | + | - | + | - | + | + | + |

续表 3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 10-3 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | - | - | + | - | - | + | + | + |
| 10-4 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | + |
| 10-5 | - | + | + | + | - | + | + | + | + | + | - | + | + | - | - | + | - | - | + | + | + |
| 12-2 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | - | - | + | - | - | + | + | + |
| 13-1 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | - | - | - | + | - | - | + | - | + |
| 15-1 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | - | - | + | - | - | + | + | + |
| 17-2 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | - | - | + | - | - | + | + | + |
| 18-1 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | - | - | + | + | + |
| 19-1 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | - | + | - | - | + | + | + |
| 20-1 | - | + | + | - | - | + | + | + | + | + | - | + | + | + | - | + | - | - | + | - | + |
| 20-2 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | - | - | + | - | - | + | + | + |
| 20-3 | - | + | + | + | + | + | + | + | - | + | - | - | + | - | + | - | - | - | + | + | + |
| 20-4 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | - | - | + | - | - | + | - | + |

注：Ⅰ 葡萄糖产气，Ⅱ 糖醇发酵（1 葡萄糖 2 麦芽糖 3 棉子糖 4 乳糖 5 甘露醇），Ⅲ 接触酶，Ⅳ 柠檬酸盐利用，Ⅴ 明胶液化，Ⅵ 淀粉水解，Ⅶ 耐盐性和需盐性（2%、5%、7%、10%），Ⅷ 石蕊牛奶（1 还原 2 胨化 3 产碱 4 产凝 5 酶凝），Ⅸ V-P 测定，Ⅹ 吐温 80 水解，Ⅺ 硝酸盐还原

3 结论

20 种中药样品中共分离得到 48 株芽孢杆菌。其中中药姜半夏、煅蛤壳重复多次仍无法分离得到芽孢杆菌，推测这两种样品中某些有效成分抑制芽孢杆菌的生长，煅蛤壳也可能是加工中灼烧处理致使芽孢死亡。

通过 48 株菌对 10 种植物病原菌的拮抗性试验初步确定其拮抗能力，结果表明：具有拮抗作用的芽孢杆菌 25 株，菌株 2-5、5-1、10-2、13-1、17-2、19-1、20-4 七株抗菌谱较广，并且 2-5、10-5、19-1、20-4 对玉米小斑病，5-1 对玉米黑粉病，19-1 对玉米青枯病、13-1 对水稻白叶枯病、5-1 对棉花枯萎病、19-1 对梨黑斑病表现出极强的拮抗能力，参试菌对米曲霉和黑曲霉的抑制作用相对较弱。在所有参试菌中，19-1 菌株抗菌谱最广，抗菌能力最强，有待于进行抗菌物质提取及应用的深入研究。

根据生理生化鉴定试验，结合形态观察，与模式菌对照并参照文献 [2] 对芽孢杆菌的描述，将 2-3、2-5、3-1、3-3、9-2、18-1、19-1、20-4 初步鉴定为枯草芽孢杆菌；将 2-4、5-1、20-3 初步鉴定为蜡样芽孢杆菌；将 10-5 初步鉴定为纳豆芽孢杆菌；将 13-1 初步鉴定为地衣芽孢杆菌，已分离得到的其他菌株还有待于进一步的生理生化试验和遗传特征鉴定。

参 考 文 献

[1] 冉国华. 海南大学学报, 2004, 22 (4): 365 ~ 373.
[2] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, et al. Bergey' s Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Baltimore: Williams and Williams and Wilkins, 1994.
[3] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
[4] Tagg J R, McGiven A R. Applied Microbiology, 1971, 21: 943.
[5] 韩延平, 杨瑞馥. 微生物学免疫学进展, 2001, 29 (4): 73 ~ 78.
[6] Schallmeyer M, Singh A, Ward P O. Canadian Journal of Microbiology, 2004, 50 (1): 1 ~ 17.
[7] 王春霞, 王道本, 周 启. 华中农业大学学报, 1997, 16 (1): 29 ~ 32.