

一株农药降解生防细菌的分离与鉴定

安霞 赵蕾*

(山东师范大学生命科学学院 山东 济南 250014)

摘要: 从花生根际土壤中分离到一株对多种土传植物病原真菌具有拮抗作用的生防细菌 B3, 该菌能够以 100 mg/L 高效氯氟菊酯、毒死蜱和吡虫啉为唯一碳源生长, 7 d 的降解率分别为 54.42%、57.44% 和 49.24%, 显示了该菌在植物病害生物防治和土壤生物修复方面具有潜在的开发价值。通过形态特征、生理生化及 16S rRNA 同源性序列分析, 鉴定该菌为多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)。

关键词: 多粘类芽孢杆菌, 拮抗, 农药降解, 鉴定

Isolation and Identification of a Pesticide-degrading and Biocontrol Bacterium

AN Xia ZHAO Lei*

(College of Life Sciences, Shandong Normal University, Jinan, Shandong 250014, China)

Abstract: One biocontrol *bacillus* B3 was isolated from peanut rhizosphere, which showed a broad inhibition spectrum against various soil-borne plant phytopathogenic fungi. It was also found to be capable of utilizing beta-cypermethrin, chlorpyrifos and imidacloprid as the sole source of carbon for growth. The extent of degradation of them at initial concentration of 100 mg/L was 54.42%, 57.44% and 49.24% respectively within 7 days. Strain B3 was identified as *Paenibacillus polymyxa* based on morphological, physiological-biochemical properties, and 16S rRNA sequence analysis. This study indicated that strain B3 had potential application in biological control and soil bioremediation.

Keywords: *Paenibacillus polymyxa*, Antagonism, Pesticide-degrading, Identification

半个世纪以来, 植物病虫害的防治一直依靠大量化学农药的使用, 但由此造成的病原菌和害虫的抗药性以及土壤和作物中的农药残留, 给人类健康和生态环境造成了严重的危害。而生物防治以其无毒害, 不污染环境, 不易引起抗药性等特点备受世界各国的广泛关注, 许多生防菌剂已成功地应用于农业生产中^[1,2]。与此同时, 利用微生物进行土壤修复的研究也取得了很大的进展^[3], 已有多种农药残

留降解菌剂问世。由于生产中施用的农药约 80% 直接进入土壤, 如果生防细菌能以农药作为碳源, 那么在防治作物病虫害的同时, 还能降低土壤中的农药残留, 对农业的可持续发展具有重要意义。而目前国内外对兼具生防和农药降解作用的微生物却很少研究。为此, 我们以多种土传植物病原真菌为靶标, 以 3 种常用的杀虫剂(高效氯氟菊酯、毒死蜱、吡虫啉)为筛选底物, 从植物根际土壤中分离筛选农

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划重点项目(No. 2006BAD17B00)

*通讯作者: Tel: 86-531-88177190; E-mail: zhaolei@sdu.edu.cn

收稿日期: 2009-05-23; 接受日期: 2009-07-07

药降解生防细菌, 为今后进一步开发应用于绿色农业的多功能生防菌奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病原真菌: 萝卜枯萎病菌(*Fusarium* spp.)、西瓜枯萎病菌(*F. oxysporum* f. sp. *niveum*)、棉花枯萎病菌(*F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*)、小麦纹枯病菌(*Rhizoctonia cerealis*)、小麦赤霉病菌(*F. graminearum*)、黄瓜枯萎病菌(*F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)由本实验室保存。

1.1.2 培养基: NA 培养基、改良 PDA 培养基、添加农药的基础培养基: NH_4Cl 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 200 μg , KH_2PO_4 0.5 g, CaCl_2 0.06 g, 杀虫剂(高效氯氰菊酯或毒死蜱或吡虫啉)100 mg, pH 7.2, 蒸馏水 1000 mL。

1.1.3 主要试剂: PCR 扩增的全套试剂购自上海生物工程技术服务有限公司, 16S rRNA 序列扩增引物由上海生物工程技术服务有限公司合成, 高效氯氰菊酯、毒死蜱和吡虫啉原药由山东农业大学植物保护学院提供, 其余试剂为国产分析纯。

1.2 生防细菌的分离筛选

采用稀释涂布平板法, 从花生根际土壤中分离细菌。采用异步培养法^[4]测定菌株对各种病原真菌的拮抗作用。于改良 PDA 平板中央接种直径 10 mm 的病原菌菌饼, 37℃ 培养 24 h 后在距离菌饼 2 cm 处接种分离到的细菌, 37℃ 恒温箱中培养, 同时以不接细菌为对照, 每处理重复 3 次。培养 7 d 后测量病原菌菌落直径, 计算对病原菌生长抑制率。

病原菌生长抑制率(%) = (对照菌落直径 - 处理菌落直径)/对照菌落直径 \times 100%

1.3 农药的降解作用

1.3.1 农药降解菌的筛选: 将生防细菌涂于添加农药的基础培养基平板上, 37℃ 培养, 挑选生长良好的菌落保存。

1.3.2 降解菌对农药的降解率: 在分别含 100 mg/L 杀虫剂(高效氯氰菊酯或毒死蜱或吡虫啉)的 50 mL 基础培养基中, 以 2% 的接种量($OD_{600} = 1.0$)接种生防细菌后, 37℃、150 r/min 振荡培养。分别于 24 h、48 h、72 h、96 h、120 h、144 h 和 168 h 取 2 mL 发酵液测 OD_{600} , 剩余发酵液用二氯甲烷萃取后, 用紫外分光光度计测 250 nm~350 nm 的光度值, 制作农

药降解率曲线和菌体生长曲线^[5]。

降解率(%) = (对照样品残留量 - 处理样品残留量)/对照样品残留量 \times 100%

1.4 菌种鉴定

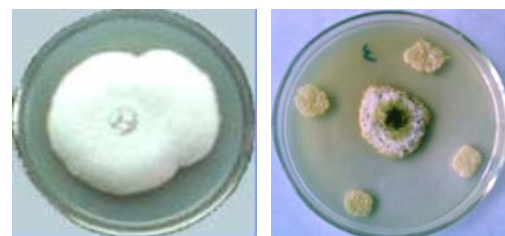
1.4.1 生理生化试验: 对筛选到的菌株进行革兰氏染色和芽孢染色, 观察菌体形态、大小、有无芽孢及着生位置。按照《常用细菌鉴定手册》^[6]方法进行生理生化试验, 如碳氮源利用试验、甲基红试验(MR)、乙酰甲醇试验(V-P)和接触酶试验等。

1.4.2 16S rRNA 序列扩增和序列分析: 采用蛋白酶/SDS 法制备总 DNA 模板, 根据原核生物 16S rRNA 保守序列通用引物 F8(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 R1492(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')^[7]进行 16S rRNA 的 PCR 扩增。扩增产物由上海生物工程技术服务有限公司测序, 将测定的序列在 GenBank 中用 Blast 软件与已知的 16S rRNA 序列进行同源性比较, 采用 Mega3.1 软件进行多序列同源性分析, 并构建系统发育树。

2 结果

2.1 拮抗细菌的分离筛选

采用平板稀释法从花生根际土样中分离到 54 株细菌, 通过抑菌谱筛选得到了对多种植物病原真菌均有明显抑制作用的菌株 B3(见图 1 及表 1)。



Fusarium spp.



F. oxysporum f. sp. *niveum*

图 1 菌株 B3 对萝卜枯萎病菌(*Fusarium* spp.)和西瓜枯萎病菌(*F. oxysporum* f. sp. *niveum*)的拮抗作用

Fig. 1 Antagonistic activity of strain B3 against *Fusarium* spp. and *F. oxysporum* f. sp. *niveum*

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

表1 菌株 B3 对不同病原真菌的抑制作用
Table 1 Inhibition of strain B3 on growth of different pathogens

病原真菌 Phytopathogenic fungi	抑菌带宽度 Width of inhibition zone (mm)	抑菌率 Inhibition rate (%)
萝卜枯萎病菌 <i>Fusarium</i> spp.	9.0 ± 0.8	81.6 ± 3.9
西瓜枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	4.3 ± 0.4	67.6 ± 2.1
棉花枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	2.3 ± 0.5	63.3 ± 2.3
小麦纹枯病菌 <i>Rhizoctonia cerealis</i>	7.2 ± 0.5	60.4 ± 3.9
小麦赤霉病菌 <i>F. graminearum</i>	2.5 ± 0.5	51.6 ± 2.9
黄瓜枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	4.0 ± 1.0	47.5 ± 4.0

2.2 菌株 B3 对 3 种杀虫剂的降解作用

菌株生长和农药降解率的关系曲线表明,在分别以 3 种杀虫剂为唯一碳源的基础培养基中,菌株生长的对数期在 0~2 d 之间,农药残留量迅速减少,与菌株生长近乎成正相关,稳定期在 2 d~3 d,随着菌株生长进入衰亡期(3 d 以后),农药残留量也趋向稳定(见图 2)。

2.3 形态和生理生化特征

菌株 B3 为革兰氏阳性菌。在 NA 平板上,菌落呈圆形或不规则形,表面光滑,琼脂平板上的培养物在水中不易分散开。内生芽孢,椭圆形,膨大不明显,

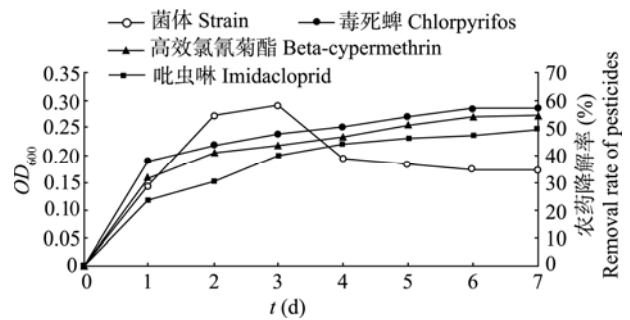


图 2 菌株 B3 生长和对农药的降解

Fig. 2 Utilization of different pesticides during growth of strain B3

居中。V-P 和 M.R 试验阳性,可水解淀粉,利用蔗糖产生果糖和葡萄糖,从果糖、乳糖、半乳糖、阿拉伯糖、麦芽糖、山梨糖、甘露醇、木糖和丙三醇产酸产气。利用柠檬酸盐,可还原硝酸盐为亚硝酸盐。

2.4 16S rRNA 的序列分析

PCR 扩增后得到约 1.5 kb 的扩增产物。将扩增产物测序,表明菌株 B3 16S rRNA 的全序列由 1459 个碱基构成,已在 GenBank 登录(Accession number: FJ940900)。通过与 GenBank 中的序列进行比较,菌株 B3 与多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)有 99% 的同源性。系统发育分析表明,菌株 B3 与类芽孢杆菌(*Paenibacillus* spp.)相似度最高(见图 3),结合生理生化试验结果,将其鉴定为多粘类芽孢杆菌(*P. polymyxa*)。

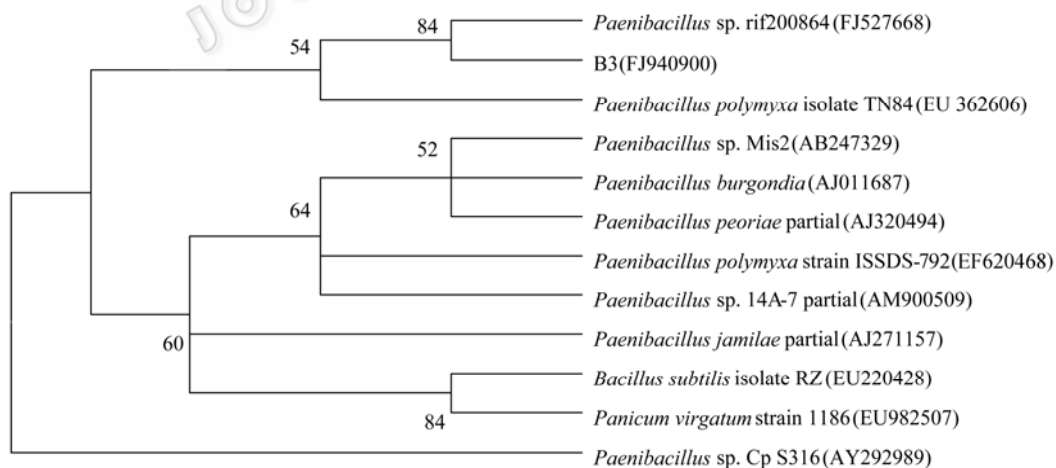


图 3 菌株 B3 的系统发育树

Fig. 3 The phylogenetic tree of strain B3

注:分支点的数字为分支自展支持率(%);括号中的序号为 GenBank 数据库中的登录号。

Note: Numbers at each branch points indicate the percentage supported by bootstrap (%); those in parentheses are the GenBank accession number.

3 讨论

类芽孢杆菌属(*Paenibacillus* spp.)是芽孢杆菌属(*Bacillus* spp.)分类上的新发展, 1994年由Ash等人^[8]将 11 个种从芽孢杆菌属中分离出来, 至今已有 23 个种。类芽孢杆菌抗菌谱广, 抗病能力强, 效果稳定, 代谢产物抗逆性强, 既可防病, 又能促进作物生长, 在农业生产中得到了广泛的应用。我们从花生根际分离到的菌株 B3, 是类芽孢杆菌属(*Paenibacillus* spp.)中的多粘类芽孢杆菌(*P. polymyxa*), 对 6 种土传植物病原真菌具有明显的拮抗作用, 这与国内外报道^[9,10]的结果一致, 而且该菌对目前常用的 3 种杀虫剂: 拟除虫菊酯类的高效氯氰菊酯、有机磷类的毒死蜱和烟碱类的吡虫啉具有降解作用, 是一株具有土壤修复功能的生防菌。

目前国内外关于农药降解菌的报道主要集中在假单胞菌属(*Pseudomonas* spp.)^[11]、芽孢杆菌属(*Bacillus* spp.)^[12]、产碱杆菌属(*Alcaligenes* spp.)^[13]和不动杆菌属(*Acinetobacter* spp.)^[14]中, 未见类芽孢杆菌属(*Paenibacillus* spp.)中有农药降解菌的报道。本实验发现, 菌株 B3 在底物浓度为 100 mg/L 时, 降解率最高(结果未列出), 培养 7 d 对高效氯氰菊酯、吡虫啉和毒死蜱的降解率分别为 54.42%、49.24%和 57.44%, 达到或超过了目前国内外的同类研究结果, 如假单胞菌(*Pseudomonas* spp.) 20 d 对 60 mg/L 氯氰菊酯的降解率为 50%左右^[11], 14 d 对 50 mg/L 吡虫啉的降解率约为 70%^[15], 粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*) 18 d 对 100 mg/L 毒死蜱的降解率为 76.22%^[13], 且未见有高效氯氰菊酯降解菌的文献报道。

上述结果表明, 菌株 B3 具有潜在的降解农药残留和防治土传作物病害的双重作用, 这是许多其它菌株无法比拟的。该菌在土壤中的实际生防及农药降解作用需进一步通过盆栽试验证实, 其生防和农药降解机制的研究也是我们目前正在开展的工作。

参 考 文 献

- [1] Baker KF. Evolving concepts of biological control of plant pathogens. *Ann Rev Phytopathol*, 1987, **25**: 67–85.
- [2] Ryu CM, Kim J, Choi O, *et al.* Improvement of biological control capacity of *Paenibacillus polymyxa* E681 by seed pelleting on sesame. *Biological Control*, 2006, **39**(3): 82–289.
- [3] Singh BK, Walker A, Morgan JA, *et al.* Effects of soil pH on the biodegradation of chlorpyrifos and isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium. *Appl Environ Microbiol*. 2003, **69**(9): 5198–5206.
- [4] 饶小莉, 沈德龙, 李俊, 等. 甘草内生细菌的分离及拮抗菌株鉴定. *微生物学通报*, 2007, **34**(4): 700–704.
- [5] 王兆守, 林淦, 尤民生, 等. 茶叶上拟除虫菊酯类农药降解菌的分离及其特性. *生态学报*, 2005, **25**(7): 1824–1827.
- [6] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, pp.370–378.
- [7] Weisburg WG, Bams SM, Pelletier DA, *et al.* 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 1991, **173**(2): 697–703.
- [8] Ash C, Priest FC, Collins MD. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli using a PCR probe test. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1994, **64**: 253–260.
- [9] 张晓舟, 徐剑宏, 李顺鹏. 植病生防芽孢杆菌的分离筛选与初步鉴定. *土壤*, 2005, **37**(1): 85–88.
- [10] Validov S, Kamilova F, Qi S, *et al.* Selection of bacteria able to control *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in stonewool substrate. *J Appl Microbiol*, 2007, **102**(2): 461–471.
- [11] Grant RJ, Daniell TJ, Betts WB. Isolation and identification of synthetic pyrethroid-degrading bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, **92**: 534–540.
- [12] Maloney SE, Maule A, Smith ARW. Purification and preliminary characterization of permethrinase from a pyrethroid-transforming strain of *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**(7): 2007–2013.
- [13] 杨丽, 赵宇华, 张炳欣, 等. 一株毒死蜱降解细菌的分离鉴定及其在土壤修复中的应用. *微生物学报*, 2005, **45**(6): 905–909.
- [14] 郑永良, 刘德立, 高强, 等. 甲胺磷农药降解菌 HS-A32 的分离鉴定及降解特性. *应用与环境生物学报*, 2006, **12**(3): 399–403.
- [15] Pandey G, Dorrian SJ, Russell RJ, *et al.* Biotransformation of the neonicotinoid insecticides imidacloprid and thiamethoxam by *Pseudomonas* sp. 1G. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, **380**(3): 710–714.