

## 研究报告

## 天山大峡谷原始森林黏细菌的分离鉴定及其抗菌活性

窦新玉, 潘雯, 董志铭, 罗明, 韩剑\*

新疆农业大学农学院 农业农村部西北荒漠绿洲农林外来入侵生物防控重点实验室(部省共建) 农林有害生物监测与安全防护重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830052

窦新玉, 潘雯, 董志铭, 罗明, 韩剑. 天山大峡谷原始森林黏细菌的分离鉴定及其抗菌活性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(9): 3952-3969.

DOU Xinyu, PAN Wen, DONG Zhiming, LUO Ming, HAN Jian. Isolation, identification, and antimicrobial activities of myxobacteria in primitive forest of Tianshan Grand Canyon[J]. Microbiology China, 2023, 50(9): 3952-3969.

**摘要:**【背景】黏细菌是一类具有多细胞群体行为特征的高等原核生物, 其对植物病原真菌和细菌的捕食特性使其在植物病害防治方面具有重要的应用潜力。【目的】探究乌鲁木齐天山大峡谷原始森林可培养黏细菌的多样性并分析其抗菌活性, 为发掘黏细菌生防菌株奠定基础。【方法】以天山大峡谷原始森林采集的土样和腐木为分离材料, 采用免粪诱导法和被捕食菌诱导法从中分离纯化黏细菌菌株, 结合形态学观察、生理生化测定和 16S rRNA 基因序列分析确定其分类地位, 并以 6 种植物病原真菌[大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)、尖孢镰刀菌萎蔫专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*)、拟轮枝链孢霉(*Fusarium verticillioides*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、黄色镰刀菌(*Fusarium culmorum*)、细极链格孢菌(*Alternaria tenuissima*)]和 1 种植物病原细菌[梨火疫病病菌(*Erwinia amylovora*)]为靶标菌, 通过平板对峙法和菌苔捕食法测定其抗菌活性。【结果】从采集的样品中分离出 70 株菌株, 经纯化后获得 36 株黏细菌纯培养物。经鉴定隶属于 4 个属, 黏球菌属(*Myxococcus*) 30 株、孢囊杆菌属(*Cystobacter*) 3 株、珊瑚球菌属(*Corallococcus*) 2 株和原囊菌属(*Archangium*) 1 株。抗菌活性分析显示, 本研究获得的 36 株黏细菌至少对 2 种植物病原真菌有抗菌活性, 表现出广谱的抗真菌活性, 初步筛选出一株菌株 NSE37-1 兼具广谱和高效抗真菌活性; 供试的 15 株黏细菌对梨火疫病病菌均具有捕食活性, 初步筛选出一株对梨火疫病病菌具有较强捕食能力的黏细菌菌株 NSE25。【结论】天山大峡谷可培养黏细菌资源比较丰富, 黏球菌属是该地区可培养

资助项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金(2021D01A97); 新疆维吾尔自治区自然科学基金重点项目(2021D01D12); 国家重点研发计划(2021YFD1400200)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2021D01A97), the Key Project of Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2021D01D12), and the National Key Research and Development Program of China (2021YFD1400200).

\*Corresponding author. E-mail: hjwjemail@163.com

Received: 2023-01-04; Accepted: 2023-03-03; Published online: 2023-04-12

黏细菌菌群中的优势菌。分离纯化出的黏细菌菌株均表现出广谱的抗植物病原菌活性, 具有进一步研究和开发的潜在价值。

**关键词:** 天山大峡谷; 原始森林; 黏细菌; 分离鉴定; 抗菌活性

## Isolation, identification, and antimicrobial activities of myxobacteria in primitive forest of Tianshan Grand Canyon

DOU Xinyu, PAN Wen, DONG Zhiming, LUO Ming, HAN Jian\*

Key Laboratory of the Pest Monitoring and Safety Control of Crops and Forests of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Key Laboratory of Prevention and Control of Invasive Alien Species in Agriculture & Forestry of the North-western Desert Oasis (Co-construction by Ministry and Province), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, Xinjiang, China

**Abstract:** **[Background]** Myxobacteria are a group of higher prokaryotes with social behavior. They are versatile predators that prey on phytopathogenic fungi and bacteria, serving as excellent candidates for biocontrol agents. **[Objective]** To explore the diversity and antimicrobial activities of culturable myxobacteria in the primitive forest of Tianshan Grand Canyon in Urumqi, and lay a foundation for the discovery of myxobacteria strains for biocontrol. **[Methods]** Culturable myxobacteria were isolated from the soil and rotting wood samples collected from the primitive forest of Tianshan Grand Canyon by the rabbit dung pellets-inducing method and prey-inducing method. The isolates were identified based morphological characteristics, physiological and biochemical properties, and the 16S rRNA gene sequences. The antimicrobial activities of the isolates were determined with 6 phytopathogenic fungal species (*Verticillium dahliae*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *Fusarium verticillioides*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium culmorum*, and *Alternaria tenuissima*) and 1 phytopathogenic bacterial species (*Erwinia amylovora*) by plate confrontation method and lawn predation method. **[Results]** Seventy potential strains were isolated from the collected samples, and 36 pure cultures of myxobacteria were obtained after purification. The 36 strains belonged to 4 genera: *Myxococcus* (30 strains), *Cystobacter* (3 strains), *Corallococcus* (2 strains), and *Archangium* (1 strain). The 36 strains of myxobacteria presented activities against at least two species of phytopathogenic fungi, exhibiting broad-spectrum antifungal activities. One strain NSE37-1 with both broad-spectrum efficient antifungal activity was screened out. Fifteen strains had predatory activity against *E. amylovora*, and one strain NSE25 with strong predatory activity was screened out. **[Conclusion]** The culturable myxobacteria are abundant in Tianshan Grand Canyon, among which *Myxococcus* is the dominant genus. The isolated and purified myxobacteria strains all exhibited broad-spectrum activities against phytopathogens, demonstrating the value for research in the future.

**Keywords:** Tianshan Grand Canyon; primitive forest; myxobacteria; isolation and identification; antimicrobial activity

植物病害是严重危害农业生产的自然灾害之一,对作物的生长发育和产量有较大的影响,据统计全球因植物病害引起的损失约占作物总产量的 20%–40%<sup>[1]</sup>,每年直接经济损失高达数千亿美元,其中大部分的病害由病原真菌所致<sup>[2]</sup>。为避免因过度依赖化学农药产生的抗药性、农药残留超标、环境污染等一系列问题。近年来,通过微生物的抑菌、免疫调控、叶际或根际微生物组调控等策略阻止病原菌的入侵已逐渐成为植物病害防治的重要手段<sup>[3–4]</sup>。目前,受到关注比较多的生防微生物主要来自于芽胞杆菌(*Bacillus*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、链霉菌(*Streptomyces*)、溶杆菌(*Lysobacter*)和木霉(*Trichoderma*)等,其主要通过产生多种抗菌物质、营养或者生态位竞争、诱导植物抗性等机制抑制病原菌的生长<sup>[5–6]</sup>。然而,受环境因子的多变性及微生物自身的适应性等影响<sup>[7]</sup>,生防微生物进入田间后会面临难以定殖、持效性差及防效不稳定等问题,致使生物菌剂的田间应用受到一定程度的限制。

黏细菌(myxobacteria)是一类具有复杂多细胞群体行为特征的革兰氏阴性细菌,可以捕食细菌、真菌和酵母等活的微生物来满足自身的营养需求<sup>[8]</sup>。黏细菌广泛地分布于包括土壤、腐木、粪便和水体等不同环境中<sup>[9]</sup>。与多数已报道的生防微生物不同,黏细菌在植物病害生物防治中具有显著的特点。黏细菌是一类通才型(generalist predator)的微生物捕食者,能够在固体表面滑行运动,通过直接攻击、狼群围捕或孤立捕食多样化的策略猎杀细胞<sup>[10]</sup>。同时黏细菌能够产生丰富且具有抗菌活性的酶类和次生代谢产物<sup>[11]</sup>。此外,黏细菌在营养匮乏或者面对逆境时会形成子实体,菌体分化成抗逆性强的黏孢子,抵抗干燥、寒冷、炎热和营养缺乏等外部不良环境,使黏细菌可以在很多极端环

境中长期生存,具备良好的稳定性和竞争力<sup>[12]</sup>。近年来的研究还发现,黏细菌具有土壤微生物群落生态调控功能<sup>[13]</sup>。黏细菌的这些特性使其被视为一类具有重要生防潜力的新型生防微生物资源。然而,目前关于黏细菌应用于植物病害防治的研究相较于其他生防微生物要少很多,原因之一是由于黏细菌作为一类难培养微生物其分离周期长、纯化困难。尽管近年来山东大学<sup>[9]</sup>、广东省微生物研究所<sup>[14]</sup>、河北大学<sup>[15]</sup>等高校推动了黏细菌的分离纯化工作,但目前所获得的黏细菌资源仍十分有限,因此获得大量的黏细菌种质资源是其被开发和利用的关键。

前人研究表明森林中的土壤和腐木是分离黏细菌、发现新黏细菌资源的最好来源<sup>[16]</sup>。例如,Yamamoto 等<sup>[17]</sup>从日本屋久岛森林土样中分离到 *Vulgatibacter incomptus* gen.nov., sp. nov.和 *Labilithrix luteola* gen. nov., sp. nov. 2 个黏细菌新属;张鲜姣等<sup>[14]</sup>从越南原始森林的土壤、腐木及树皮样品中分离到多株较难分离的蜂窝囊菌属(*Melittangium*)及软骨霉菌属(*Chondromyces*)的黏细菌菌株;王春玲<sup>[18]</sup>从鼎湖山森林土壤中分离出一株黄绿色珊瑚球菌(*Corallococcus flavoviridis*),经鉴定为珊瑚球菌属的新种。

天山大峡谷原始森林地处新疆维吾尔自治区乌鲁木齐县境内,位于天山中部的北坡和准噶尔盆地的南端(42°09′–43°28′N, 87°12′–87°50′E),三面环山,平均海拔 2 000 m,既具有北温带大陆性干旱气候特征,又具有垂直气候分布带的特点,年均气温 4–6 °C。天山大峡谷内分布有森林峡谷、高山湖泊、高山草甸和雪山冰川等不同地理环境,植物资源丰富,具有天山北坡最完整的原始雪岭云杉林。土壤类型随海拔从低到高依次为山地棕钙土、山地黑钙土、灰褐色森林土和高山草甸土,其中以腐殖质丰富的

山地灰褐色森林土为主<sup>[19]</sup>。天山大峡谷独特的地理环境、丰富的自然资源及多样的土壤类型,这些都预示着极有可能从该地区的森林土壤或腐木中发掘到功能新颖、具有重要利用价值的黏细菌资源。本研究采用兔粪诱导法和被捕食菌诱导法,从采集样品中分离纯化黏细菌菌株,结合形态学观察和 16S rRNA 基因序列分析对纯化的菌株进行分类鉴定,并对其抗菌活性进行分析,以期发掘黏细菌生防菌株奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 土壤样品的采集

2021 年 7 月从新疆维吾尔自治区乌鲁木齐天山大峡谷国家森林公园(42°09′-43°28′N, 87°12′-87°50′E, 海拔 1 846-2 360 m)采集土壤样品。根据土壤类型及地表植被不同,随机采集土壤样品 44 份,其中高山草甸土壤样品 19 份,云杉林灰褐色森林土壤样品 25 份,采集深度为表层 0-10 cm。采集腐木样品 5 份。样品采回后置于室内通风避光处自然风干,常温干燥保存。

#### 1.1.2 培养基、主要试剂和仪器

LB 液体培养基、LBS 液体培养基、VY/4 培养基、WCX 培养基、TPM 培养基和 PDA 培养基参考文献[20]配制,NA 培养基、NB 液体培养基参考文献[21]配制,MD1 培养基参考文献[14]配制。

细菌基因组 DNA 提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司。PCR 扩增仪和台式高速冷冻离心机, Eppendorf 公司;凝胶成像系统, Bio-Rad 公司;恒温培养箱, 宁波江南仪器厂;恒温振荡培养箱, 上海智城分析仪器制造公司;全自动菌落计数仪, 杭州讯数科技有限公司。

#### 1.1.3 供试菌株

梨火疫病病菌(*Erwinia amylovora*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、棉花黄萎病病菌大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)、棉花枯萎病病菌尖孢镰刀菌萎蔫专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*)、棉花红腐病病菌拟轮枝链孢霉(*Fusarium verticillioides*)、棉花立枯病病菌立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、万寿菊枯萎病病菌黄色镰刀菌(*Fusarium culmorum*)、万寿菊褐斑病菌细极链格孢菌(*Alternaria tenuissima*)均由新疆农业大学农学院微生物实验室保藏,用于黏细菌子实体的诱导及抗菌活性测定。

### 1.2 黏细菌菌株的分离

#### 1.2.1 土壤和腐木样品预处理

每份土样取大约 30 g 分别盛于 90 mm 无菌培养皿中,置于 58 °C 电烘箱中处理 30 min,待土样冷却后加入终浓度为 25 µg/mL 的放线菌酮溶液,于室温下浸泡过夜,除去土壤残液后备用。对于腐木样品,剪碎后置于无菌培养皿中,加入终浓度为 50 µg/mL 的放线菌酮溶液,浸泡 24 h,将浸泡过的样品除去残液后于 56 °C 处理 10 min,备用。

#### 1.2.2 兔粪诱导法

参考 Reichenbach<sup>[22]</sup>的方法,在无菌培养皿盛放的土样表面半包埋入 3 个无菌兔粪球,30 °C 恒温培养,5 d 后开始观察兔粪球上子实体形成情况,持续观察 15 d。

#### 1.2.3 被捕食菌诱导法

参考 Peterson<sup>[23]</sup>的方法,以大肠杆菌和梨火疫病病菌作为被捕食菌诱导黏细菌子实体的形成。将大肠杆菌和梨火疫病病菌分别接种于 NB 液体培养基中,30 °C、160 r/min 振荡培养过夜,次日将培养好的菌液 12 000 r/min 离心 1 min,得到的菌体沉淀用无菌水漂洗 3 次,最终用 100 µL 无菌水悬浮菌体沉淀作为细菌悬液。用无菌接种

环蘸取菌悬液在含放线菌酮(终浓度为 25  $\mu\text{g/mL}$ )的 WCX 培养基表面划“田”字线,晾干。取少量预处理土样或腐木样品置于 4 个方格中央,30  $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 72 h 后持续观察子实体形成情况。

### 1.2.4 黏细菌的纯化与保藏

在体式显微镜下用无菌细针尖挑取子实体转接于 VY/4 或 MD1 培养基上,30  $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养。待黏细菌扩展出新鲜菌膜后,挑取菌膜边缘继续纯化,直至无杂菌生长。刮取纯化的菌膜接种于 LB 液体培养基中,30  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养过夜。由于黏细菌不能在 LB 液体培养基中生长,其他杂菌可快速生长,因此观察 LB 培养基是否浑浊来判断黏细菌纯化情况。若培养基浑浊表明该菌株存在杂菌,需进一步采用加热纯化法(58  $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min)或冷冻纯化法(-80  $^{\circ}\text{C}$ 冷冻 36 h,反复冻融 3 次)进行纯化。刮取纯菌株菌膜悬浮于 20%的甘油中,保藏于-80  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中;或在无菌兔粪表面黏附纯化好的黏细菌,30  $^{\circ}\text{C}$ 培养 3-5 d,待黏细菌在兔粪表面形成子实体后,将兔粪转入无菌离心管,并置于装有变色硅胶的自封袋中室温干燥保藏。

## 1.3 黏细菌的鉴定

目前关于黏细菌的分类鉴定主要是通过形态学观察并结合 16S rRNA 基因及管家基因(如 *lepA*、*gryB*)的序列分析<sup>[24]</sup>,综合分析确定其分类地位。因此本研究采用子实体形态学观察、生理生化测定和 16S rRNA 基因序列分析对分离到的黏细菌进行鉴定。

### 1.3.1 形态学观察

利用体式显微镜和数码相机对菌株的子实体形态、菌落形态进行观察并拍照,并参考文献[25]和文献[26]中黏细菌的分类标准,对获得的黏细菌纯培养菌株进行初步鉴定。

### 1.3.2 生理生化测定

按照《伯杰细菌鉴定手册》<sup>[27]</sup>中对黏细菌

个别属种的生理生化特性的描述,将纯化的黏细菌菌株进行 LB 液体培养基培养、大肠杆菌利用、硝酸盐还原、明胶液化、纤维素水解、脲酶利用、吐温-80 利用、刚果红试验、淀粉水解、牛奶酪化与抗生素敏感性检测等试验。

### 1.3.3 黏细菌 16S rRNA 基因 PCR 扩增及序列分析

采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取黏细菌总 DNA。以细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACG GCTACCTTGTTACGACTT-3')扩增黏细菌 16S rRNA 基因片段<sup>[28]</sup>。PCR 反应体系及反应条件参考文献[16]。PCR 产物由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。将所得序列在 GenBank 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中进行 BLAST 检索,选取与其相似性最高的模式菌株的 16S rRNA 基因序列,利用 DNA Star 软件进行同源比较。再用 MEGA 7.0 软件以邻接法(neighbor-joining method)构建 16S rRNA 基因系统发育树。

## 1.4 黏细菌抗菌活性分析

### 1.4.1 黏细菌抗植物病原真菌活性分析

将活化好的黏细菌接种至 LBS 液体培养基中,30  $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 培养 3-4 d,12 000 r/min 离心 1 min 收集菌体,将成团的黏细菌菌体充分打散,加入无菌水重悬制备成  $OD_{600}$  为 2.0 的黏细菌菌悬液。取一小块斜面保存的大丽轮枝菌、尖孢镰刀菌萎蔫专化型、拟轮枝链孢霉、立枯丝核菌、黄色镰刀菌、细极链格孢菌接种至 PDA 培养基上,28  $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养活化后,用灭菌的刀片沿活化后的菌丝扩展边缘切取 2 mm $\times$ 2 mm 的琼脂块转接于 VY/4 平板中间,再在距菌块中心约 2 cm 处,上下左右沿直线对称接种 20  $\mu\text{L}$  黏细菌菌悬液( $OD_{600}$ =2.0)。自然晾干后,放入 28  $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养。以单独接种

上述真菌的固体平板为对照, 每组试验设 3 个重复。对峙 5 d 后利用全自动菌落计数仪拍照并测量真菌菌落面积, 计算拮抗率。

拮抗率(%)=(对照组菌落面积-处理组菌落面积)/(对照组菌落面积)×100。

#### 1.4.2 黏细菌捕食梨火疫病病菌活性测定

参考王婷<sup>[29]</sup>的方法活化梨火疫病病菌, 挑取单菌落接入 NB 液体培养基中, 30 °C、160 r/min 培养至菌液  $OD_{600}$  为 0.8, 12 000 r/min 离心 1 min, 弃上清, 菌体沉淀用无菌水漂洗 3 次, 重悬备用。将活化好的黏细菌接种至 LBS 液体培养基中, 30 °C、160 r/min 培养 3–4 d, 得到的黏细菌菌悬液 12 000 r/min 离心 1 min, 菌体沉淀用无菌水清洗 3 次, 将成团的黏细菌菌体充分打散, 最后用无菌水重悬至  $OD_{600}$  为 1.0, 备用。在 TPM 固体培养基上垂直悬空点接病原细菌菌悬液 50  $\mu$ L, 自然风干, 在病原细菌菌苔中心位置点接 3  $\mu$ L 黏细菌菌悬液, 对照组点接 3  $\mu$ L 无菌水, 待风干后置于 30 °C 恒温培养箱中培养 5 d, 并用体视显微镜每隔 24 h 观察黏细菌菌膜的运动扩散情况, 5 d 后用无菌接种环刮下菌苔并用无菌水混匀, 采用稀释涂布的方法, 每个梯度取 100  $\mu$ L 于 NA 平板涂布均匀, 平板放置 30 °C 恒温培养箱培养至单菌落长出, 统计菌落数, 计算残留活细胞数, 评估捕食活性。

## 1.5 数据分析

利用 SPSS Statistics 19.0 软件进行数据分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 黏细菌菌株的分离及纯化

利用兔粪诱导、大肠杆菌诱导及梨火疫病病菌诱导 3 种分离方法, 从 44 份土壤样品中共分离出 70 株黏细菌疑似菌株, 通过挑取子实体等纯化方法获得 36 株纯菌。其中兔粪诱导法分离出 23 株菌, 纯菌 11 株, 纯菌率为 47.83%; 大肠杆菌诱导法分离出的菌株数量最多, 但纯化过程中易被污染杂菌, 因此仅纯化出 10 株黏细菌纯培养物, 纯菌率为 34.48%; 梨火疫病病菌诱导法虽然分离出的菌株数量最少, 但纯化获得黏细菌 15 株, 纯菌率为 83.33% (表 1)。以 5 份腐木为分离材料, 尽管也诱导出了黏细菌子实体, 但由于腐木样品很容易滋生大量霉菌, 且很快就将子实体覆盖, 难以挑取, 未能纯化出黏细菌菌株。

### 2.2 黏细菌菌株的鉴定

#### 2.2.1 黏细菌菌株的形态特征

对分离出的 36 株菌进行形态观察, 根据子实体和菌落的颜色、形态特征及能否进行滑行运动, 可以分为 6 类。I: 子实体为球形, 单个分布, 颜色为桔黄色(图 1A), 菌膜呈黄色半透明

表 1 分离纯化获得的黏细菌菌株数

Table 1 The number of myxobacteria strains obtained by isolation and purification

分离方法 Methods of isolation	分离出的疑似黏细菌数 Number of the isolated strains	纯化出黏细菌数 Number of the purified strains	纯菌率 Purification rate of the strains (%)
兔粪诱导法 Rabbit dung pellets inducing method	23	11	47.83
大肠杆菌诱导法 <i>Escherichia coli</i> inducing method	29	10	34.48
梨火疫病病菌诱导法 <i>Erwinia amylovora</i> inducing method	18	15	83.33
总计 Total	70	36	51.43



同心圆扩展, 菌膜上有整齐排列的子实体(图 1B); II: 子实体圆形或椭圆形, 橘红色, 单个分布, 表面光滑, 黏液较多(图 1C), 菌膜呈同心圆扩展, 子实体分布均匀(图 1D); III: 子实体椭圆形, 乳白色, 单生, 基部紧缩(图 1E), 菌膜呈黄色薄膜状扩展, 半透明(图 1F); IV: 子实体球形或椭圆形, 橘黄色(图 1G), 在平板上聚集成团,

菌膜呈薄膜状扩展, 不易切断(图 1H); V: 子实体为卵球形, 簇生, 初期为桔黄色, 后期颜色逐渐加深变为亮褐色, 易挑取(图 1I), 菌膜呈不规则薄膜状扩展, 边缘有脊状突起(图 1J); VI: 子实体初期呈肉粉色, 随着发育颜色逐渐变深成橘红色或深褐色(图 1K), 菌膜密实, 有明显的辐射状线, 边缘呈脊状(图 1L)。

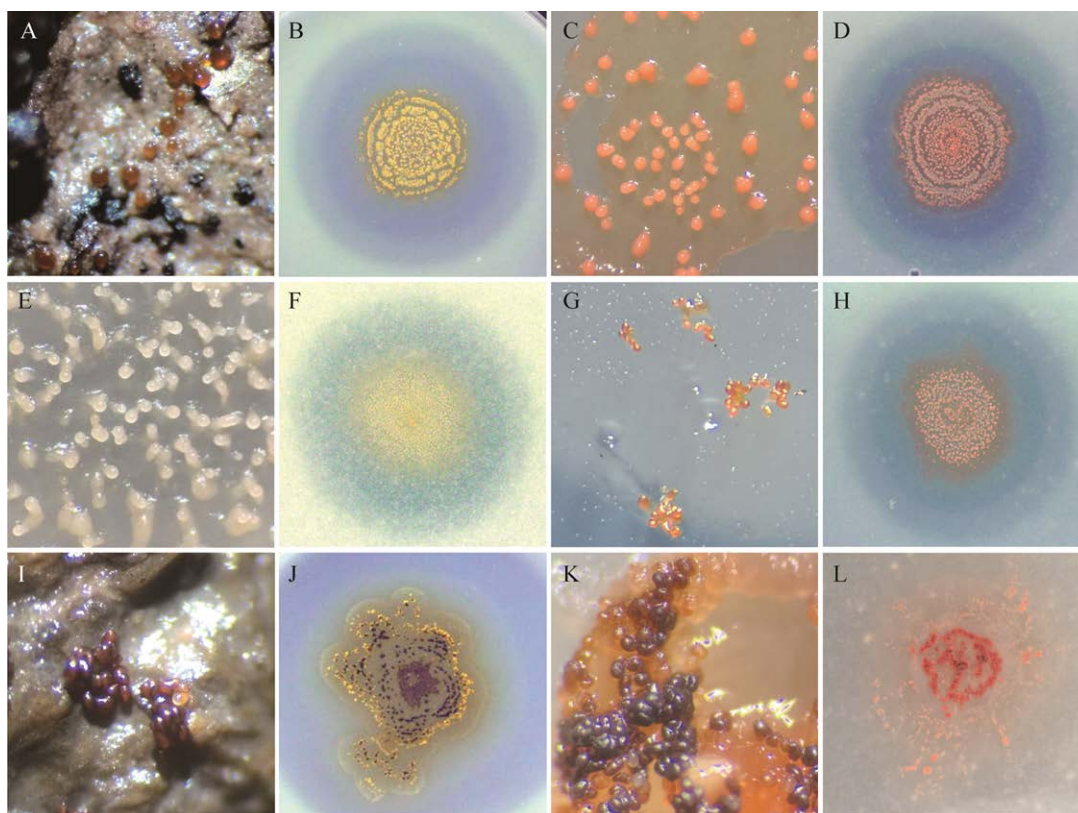


图 1 部分黏细菌子实体及菌落形态图 A: NSD9, 黏球菌(*Myxococcus*)子实体. B: NSD9, 黏球菌(*Myxococcus*)菌落. C: NST15, 黏球菌(*Myxococcus*)子实体. D: NST15, 黏球菌(*Myxococcus*)菌落. E: NST24, 黏球菌(*Myxococcus*)子实体. F: NST24, 黏球菌(*Myxococcus*)菌落. G: NST17, 珊瑚球菌(*Coralloccoccus*)子实体. H: NST17, 珊瑚球菌(*Coralloccoccus*)菌落. I: NSE37-1, 抱囊杆菌(*Cystobacter*)子实体. J: NSE37-1, 抱囊杆菌(*Cystobacter*)菌落. K: NST47, 原囊菌(*Archangium*)子实体. L: NST47, 原囊菌(*Archangium*)菌落

Figure 1 Morphological characteristics of some isolated myxobacteria strains. A: Fruiting bodies of *Myxococcus* sp. NSD9. B: Colony morphology of *Myxococcus* sp. NSD9. C: Fruiting bodies of *Myxococcus* sp. NST15. D: Colony morphology of *Myxococcus* sp. NST15. E: Fruiting bodies of *Myxococcus* sp. NST24. F: Colony morphology of *Myxococcus* sp. NST24. G: Fruiting bodies of *Coralloccoccus* sp. NST17. H: Colony morphology of *Coralloccoccus* sp. NST17. I: Fruiting bodies of *Cystobacter* sp. NSE37-1. J: Colony morphology of *Cystobacter* sp. NSE37-1. K: Fruiting bodies of *Archangium* sp. NST47. L: Colony morphology of *Archangium* sp. NST47.

## 2.2.2 黏细菌菌株的生理生化特征

对纯化的菌株进行生理生化测定,发现所有菌株均不能在 LB 液体培养基内生长,可以利用活的大肠杆菌及吐温-80,吸附刚果红,可使明胶液化、硝酸盐还原、淀粉水解,但不能降解纤维素,所有菌株的生理生化特征与《伯杰氏细菌手册》<sup>[27]</sup>中所描述的黏细菌的特征相符,结合其形态特征将这 36 株菌株初步鉴定为 4 个属,分别为黏球菌属(*Myxococcus*)、珊瑚球菌属(*Corallococcus*)、孢囊杆菌属(*Cystobacter*)和原囊菌属(*Archangium*)。

## 2.2.3 黏细菌菌株的分子鉴定

以提取的黏细菌基因组 DNA 为模板,PCR 扩增其 16S rRNA 基因片段并测序。将获得的序列提交至 GenBank,获取序列登录号分别为 OQ048326–OQ048361。将测序结果通过 BLAST 程序与在 GenBank 数据库中的已知序列进行相似性比对,并选取与其相似性最高的模式菌株 16S rRNA 基因序列进行序列比对,结果如表 2 所示。以 NSE3 为代表的 15 株菌与橙色黏球菌(*Myxococcus fulvus*)模式菌株 NBRC 100333 (AB218224)的序列相似性最高,达到 99.8%–100.0%。以 NSE1 为代表的 14 株菌株与变绿黏球菌(*Myxococcus virescens*)模式菌株 NBRC 100081 (AB218220)的序列相似性最高,达到 99.5%–99.9%。

菌株 NST24 与模式菌株 *Myxococcus eversor* AB053B (JAAIXY010000049)的序列相似性达到 99.9%。以 NST17 为代表的 2 株菌与模式菌株 *Corallococcus llansteffanensis* CA051B (MF163360)的序列相似性达到 99.6%–99.7%。以 NSD30 为代表的 3 株菌与锈色孢囊杆菌(*Cystobacter ferrugineus*)模式菌株 DSM 14716 (DQ768112)的序列相似性达到 100.0%。菌株 NST47 与紫色原囊菌(*Archangium violaceum*)模式菌株 DSM 14727 (DQ768114)的序列相似性达到 99.9%。

通过序列相似性分析发现本研究获得的 36 株黏细菌中有 30 株分布于黏球菌科(*Myxococcaceae*),6 株分布于原囊黏菌科(*Archangiaceae*)中,因此基于 16S rRNA 基因序列分别构建黏球菌科和原囊黏菌科系统发育树。基于黏球菌科不同菌株构建的系统发育树显示(图 2),本研究获得的 30 株黏球菌科黏细菌分为 2 个分支。第 I 分支属于黏球菌属(*Myxococcus*),本研究分离的大部分菌株属于这一分支。其中以菌株 NSE3 为代表的 15 株黏细菌与橙色黏球菌(*Myxococcus fulvus*)模式菌株 NBRC 100333 (AB218224)聚为一支;以菌株 NSE1 为代表的 14 株黏细菌与变绿黏球菌(*Myxococcus virescens*)模式菌株 NBRC 100081 (AB218220)聚为一支;而菌株 NST24 则与模式菌株 *Myxococcus eversor*

表 2 基于 16S rRNA 基因同源性分析对 36 株黏细菌分离物的分类鉴定结果

Table 2 Classification and identification of 36 myxobacteria isolates based on 16S rRNA gene homology analysis

代表菌株 Strain	GenBank 登录号 GenBank accession No.	亲缘关系最近的模式菌株及登录号 Closest type strain and accession No.	相似性 Similarity (%)	菌株数目 Number of the strains
NSE3	OQ048331	<i>Myxococcus fulvus</i> NBRC 100333 (AB218224)	99.8–100.0	15
NSE1	OQ048326	<i>Myxococcus virescens</i> NBRC 100081 (AB218220)	99.5–99.9	14
NST24	OQ048345	<i>Myxococcus eversor</i> AB053B (JAAIXY010000049)	99.9	1
NST17	OQ048339	<i>Corallococcus llansteffanensis</i> CA051B (MF163360)	99.6–99.7	2
NSD30	OQ048348	<i>Cystobacter ferrugineus</i> DSM 14716 (DQ768112)	100.0	3
NST47	OQ048362	<i>Archangium violaceum</i> DSM 14727 (DQ768114)	99.9	1



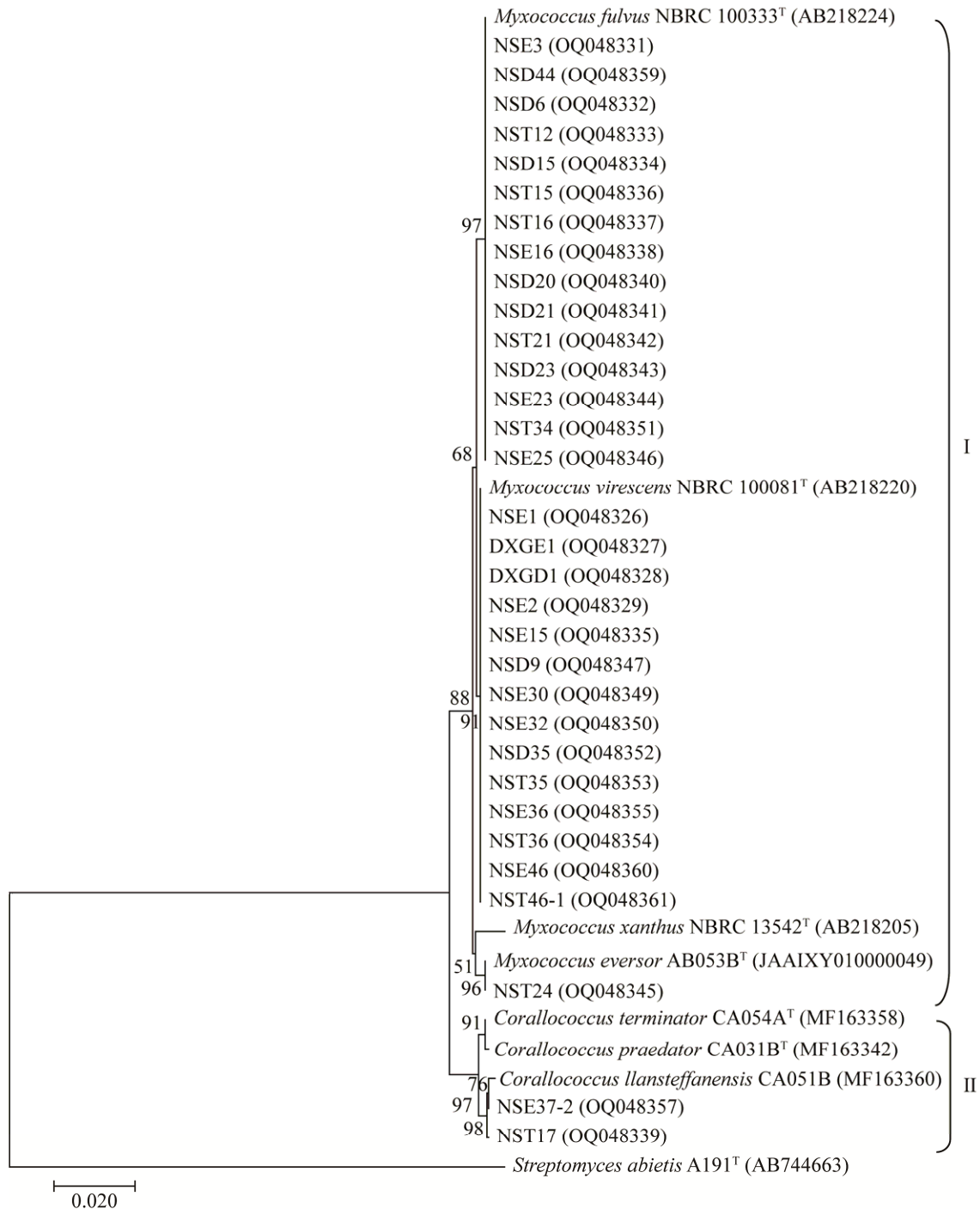


图2 基于16S rRNA基因序列构建的32株黏球菌科菌株的系统发育树 括号内为菌株16S rRNA基因序列在GenBank中的登录号；分支上的数值为1 000次bootstrap分析所得值；标尺0.020为进化距离

Figure 2 Phylogenetic tree of 32 new *Myxococcaceae* strains based on 16S rRNA gene sequences. The numbers in parentheses represent the accession numbers in the GenBank for the 16S rRNA gene sequences of those reference strains and screened strains; The value on the branch point is the value obtained by 1 000 bootstrap analysis; The scale 0.020 is the evolutionary distance.

AB053B (JAAIXY010000049)聚为一簇。第II分支属于珊瑚球菌属(*Coralloccoccus*), 菌株 NST17 和 NSE37-2 与模式菌株 *Coralloccoccus llansteffanensis* CA051B (MF163360)聚为一簇。基于原囊黏菌科不同菌株构建的系统发育树(图3)显示, 本研究获得的6株原囊黏菌科黏细菌分为2个分支, 第I分支属于原囊菌属(*Archangium*), 菌株 NST47 与紫色原囊菌(*Archangium violaceum*)模式菌株 DSM 14727 (DQ768114)聚为一簇; 第II分支属于孢囊杆菌属(*Cystobacter*), 菌株 NSD30、NSE37-1、NSE41 这3株黏细菌菌株与锈色孢囊杆菌(*Cystobacter ferrugineus*)模式菌株 DSM 14716 (DQ768112)聚为一簇。

## 2.3 黏细菌的抗菌活性

### 2.3.1 黏细菌对几种植物病原真菌的抗菌活性

以细极链格孢菌(*Alternaria tenuissima*)、黄

色镰刀菌(*Fusarium culmorum*)、尖孢镰刀菌萎蔫专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、拟轮枝链孢霉(*Fusarium verticillioides*)和大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)6种植物病原真菌为目标指示菌, 采用平板对峙法, 通过统计菌落面积对获得的36株黏细菌纯培养物的抗真菌活性进行测定。结果如表3所示, 36株黏细菌至少表现出对2种植物病原真菌具有抗菌活性, 表现出广谱的抗真菌活性, 其中有36株黏细菌对 *Alternaria tenuissima* 表现出抗菌活性, 菌株 NST47 的拮抗率最高, 达到96.77%; 有23株黏细菌对 *Fusarium culmorum* 表现出抗菌活性, 菌株 NSE37-1 的拮抗率最高, 达到91.50%; 有27株黏细菌对 *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* 表现出抗菌活性, 菌株 NSE37-1 的拮抗率最高, 达到98.97%; 有32株黏细菌

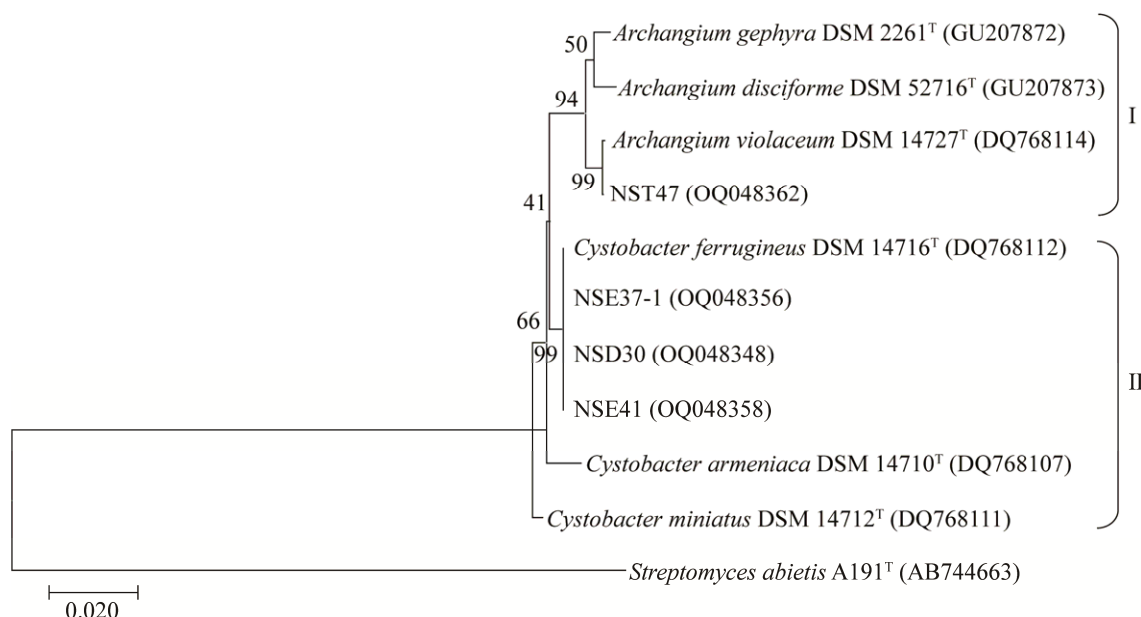


图3 基于16S rRNA基因序列构建的4株原囊黏菌科的系统发育树 括号内为菌株16S rRNA基因在GenBank中的登录号; 分支上的数值为1000次bootstrap分析所得值; 标尺0.02为进化距离

Figure 3 Phylogenetic tree of 4 new *Archangiceae* strains based on 16S rRNA gene sequence. The numbers in parentheses represent the accession numbers in the GenBank for the 16S rRNA gene sequences of those reference strains and screened strains; The value on the branch point is the value obtained by 1000 bootstrap analysis; The scale 0.02 is the evolutionary distance.

表3 黏细菌菌株对6种植物病原真菌的抗菌活性

Table 3 Antimicrobial activity of myxobacteria strains against six plant pathogenic fungi

菌株编号 Strain No.	病原菌生长拮抗率 Inhibition rate (%)					
	细极链格孢菌 <i>Alternaria tenuissima</i>	黄色镰刀菌 <i>Fusarium culmorum</i>	尖孢镰刀菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	立枯丝核菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	拟轮枝镰孢菌 <i>Fusarium verticillioides</i>	大丽轮枝菌 <i>Verticillium dahliae</i>
DXGD1	80.34±2.15g	—	75.53±1.95j	87.08±2.43fg	94.61±2.77ab	51.23±3.16r
NSD6	64.87±3.13n	43.97±1.34q	92.31±1.39cd	81.13±3.94hi	81.11±3.67m	57.14±2.03no
NSD9	79.97±3.27gh	70.60±2.18k	71.24±3.05k	82.53±3.62h	82.70±2.31l	93.67±3.57c
NSD15	85.67±1.90e	77.16±1.72g	66.77±2.98l	77.60±2.69j	91.24±2.13efg	66.90±3.19g
NSD20	58.42±2.23pq	73.00±1.40i	67.00±2.45l	80.00±4.33i	86.00±1.65i	68.98±2.67f
NSD21	92.17±2.59b	72.22±2.30ij	87.89±2.01fg	81.34±2.79hi	94.23±2.78ab	74.89±3.78e
NSD23	65.24±1.47n	—	—	—	76.86±2.74n	—
NSD30	90.12±1.62c	85.15±2.22cd	84.77±2.76h	96.64±1.56ab	86.85±2.55i	80.89±2.78d
NSD35	75.20±2.13i	83.78±3.40de	—	46.90±2.40p	90.95±1.11fg	54.82±3.22pq
NSD44	55.69±1.71r	—	—	67.36±2.71l	93.42±2.79bc	—
NSE1	88.25±2.34d	80.51±2.28f	—	81.35±3.83hi	94.36±2.99ab	65.98±3.56gh
DXGE1	80.49±2.36g	68.35±2.16lm	87.48±3.68g	89.47±2.40e	91.69±2.70def	68.76±1.53f
NSE2	82.75±1.23f	72.66±1.47i	—	60.01±2.27n	88.69±3.12h	62.76±3.97jk
NSE3	92.84±3.51b	—	90.85±2.60de	—	—	63.57±2.06ij
NSE15	57.36±2.12q	—	87.73±2.72g	94.37±1.85c	93.94±2.01bc	65.79±2.65gh
NSE16	72.89±3.3jk	63.57±2.49o	95.33±1.86b	97.38±2.45a	92.73±2.61cd	—
NSE23	55.01±2.74r	—	—	56.30±2.70o	84.21±3.07k	53.21±2.27q
NSE25	78.65±3.49h	—	—	88.73±2.41ef	—	47.10±2.31s
NSE30	74.29±2.37ij	65.57±1.88n	87.83±2.39fg	86.01±1.26g	93.45±2.28bc	66.29±1.83gh
NSE32	80.38±3.44g	—	93.44±3.15c	95.46±3.39bc	90.03±2.39g	92.55±2.15c
NSE36	70.47±2.17m	75.19±2.54h	92.81±2.78c	81.86±2.86h	90.69±2.55fg	55.70±1.99op
NSE37-1	89.62±3.69cd	91.50±2.42a	98.97±0.46a	92.06±2.10d	91.37±2.63defg	96.53±1.42b
NSE37-2	64.29±2.37n	58.69±3.68p	74.01±1.27j	70.93±2.94k	74.75±1.23o	64.84±1.92hi
NSE41	64.76±1.83n	77.01±2.23g	90.69±1.49de	65.77±2.59lm	90.73±2.73fg	98.96±0.78a
NSE46	60.02±2.98p	82.78±3.41e	98.90±0.78a	86.25±3.82g	85.63±2.19ij	59.99±3.19lm
NST12	58.68±1.47pq	—	96.01±2.70b	86.93±3.94g	90.71±3.44fg	56.68±2.49no
NST15	83.34±2.41f	85.52±1.23c	80.36±3.28i	—	92.69±3.54cde	68.87±2.83f
NST16	82.83±1.50f	—	—	87.78±2.83efg	91.81±3.60def	45.04±1.16t
NST17	73.19±3.54jk	67.25±2.82m	70.66±2.47k	59.02±3.98n	72.01±3.27p	66.98±2.84g
NST21	69.45±1.81m	69.69±3.49kl	72.01±2.26k	70.73±3.73k	74.29±3.37o	31.14±1.14u
NST24	59.29±2.86p	70.78±2.96jk	70.47±2.11k	65.02±3.14m	72.78±2.30p	—
NST34	90.38±2.90c	83.95±2.60cde	90.84±1.57de	—	91.22±2.47efg	54.19±3.22pq
NST35	72.37±2.21kl	—	89.61±1.95ef	80.00±2.21i	84.47±2.83jk	54.71±2.15pq
NST36	70.91±3.39lm	—	—	67.34±3.72l	86.93±2.99i	58.49±2.34mn
NST46	62.71±2.16o	—	81.25±2.68i	94.88±2.27c	95.54±3.51a	70.42±3.43f
NST47	96.77±1.34a	88.13±2.35b	90.86±1.03de	71.44±2.31k	71.86±2.99p	61.39±2.29kl

不同小写字母表示同列数据差异显著( $P<0.05$ ); —: 无拮抗作用Different lowercase letters in same column represent significant difference at  $P<0.05$  level among the treatments; —: No inhibition.

对 *Rhizoctonia solani* 表现出抗菌活性, 菌株 NSE16 的拮抗率最高, 达到 97.38%; 有 34 株黏细菌对 *Fusarium verticillioides* 表现出抗菌活性, 菌株 NST46 的拮抗率最高, 达到 95.54%; 有 32 株黏细菌对 *Verticillium dahliae* 表现出抗菌活性, 菌株 NSE41 的拮抗率最高, 达到 98.96%。通过上述试验结果不仅发现同一株黏细菌对不同病原真菌的抗菌活性存在差异, 而且归属于同一个种的黏细菌对同种病原真菌的捕食能力也存在差异, 如菌株 NSE23 和 NSE16 经鉴定均属于橙色黏球菌, 但这 2 个菌株对 *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* 的抗菌活性存在显著差异。

此外, 通过对 36 株黏细菌的抗菌谱和拮抗率综合分析, 发现菌株 NSE37-1 对 6 种植物病原真菌的拮抗率均在 89.62% 以上, 表现出广谱且高效的抗菌活性, 但黏细菌 NSE37-1 面对不同的病原菌表现出不同的抗菌策略。如图 4 所示, 黏细菌 NSE37-1 与 6 种植物病原真菌对峙培养过程中均能保持一定的位置, 同时都能产生大量的黏孢子, 并不受病原真菌的影响。其中菌株 NSE37-1 对 *Fusarium culmorum* 和

*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* 具有很强的捕食效果, 黏细菌沿菌丝扩散生长, 菌丝明显坍塌、稀松, 并且占据更广的生存位置和更多的繁殖营养; 对 *Rhizoctonia solani*、*Fusarium verticillioides* 和 *Verticillium dahliae* 具有很强的抑制生长作用, 同时兼具一定的捕食作用, 而对 *Alternaria tenuissima* 则仅表现出抑菌作用。

### 2.3.2 黏细菌对梨火疫病病菌的捕食能力

以梨火疫病病菌为靶标病原菌, 对梨火疫病诱导法分离获得的 15 株黏细菌的捕食能力进行初步评估。结果表明, 15 株黏细菌均能够在梨火疫病病菌菌苔表面扩散, 但不同黏细菌菌株的扩展速度不同, 培养 5 d 后刮取菌苔并稀释涂布, 计算梨火疫病病菌残留活细胞数, 发现不同黏细菌菌株的捕食能力存在差异, 梨火疫病活细胞数与对照( $2.4 \times 10^9$  CFU/mL)相比下降到  $6.5 \times 10^4$ – $6.4 \times 10^6$  CFU/mL (表 4)。其中菌株 NSE25 向外扩展捕食梨火疫病病菌的能力较强, 培养 3 d 就能覆盖大部分病原细菌菌苔, 5 d 后能够完全扩散并覆盖整个病原细菌菌苔, 并且在跨过的区域形成大量子实体, 梨火疫病病菌残留活细胞数下降至  $6.5 \times 10^4$  CFU/mL (图 5)。

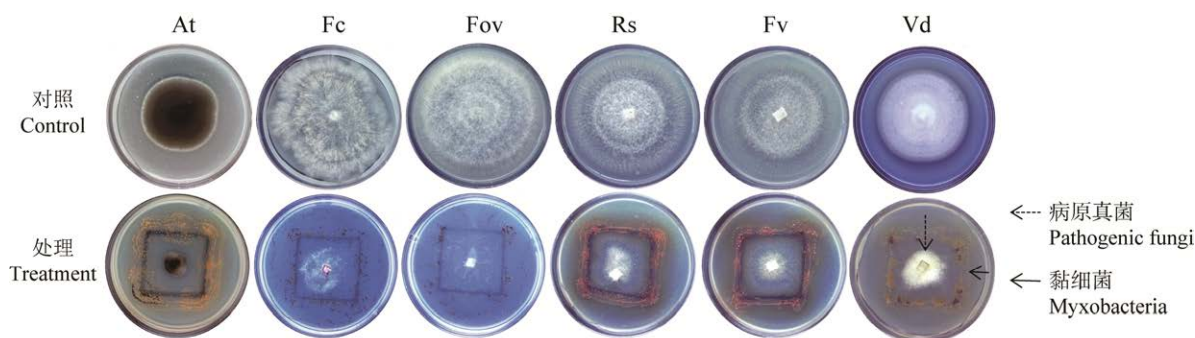


图 4 黏细菌菌株 NSE37-1 对不同病原真菌的抗菌活性分析 At: 细极链格孢菌; Fc: 黄色镰刀菌; Fov: 尖孢镰刀菌萎蔫专化型; Rs: 立枯丝核菌; Fv: 拟轮枝链孢霉; Vd: 大丽轮枝菌

Figure 4 Analysis of antimicrobial activity of myxobacteria strain NSE37-1 against different pathogenic fungi. At: *Alternaria tenuissima*; Fc: *Fusarium culmorum*; Fov: *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*; Rs: *Rhizoctonia solani*; Fv: *Fusarium verticillioides*; Vd: *Verticillium dahliae*.

表 4 黏细菌捕食梨火疫病病菌后的残留活菌数  
Table 4 The survival of *Erwinia amylovora* after preying by different myxobacteria

菌株编号	活菌数
Strains No.	The survival of <i>Erwinia amylovora</i> ( $\times 10^5$ CFU/mL)
NSE1	6.2 $\pm$ 2.1b
DXGE1	7.2 $\pm$ 3.3b
NSE2	57 $\pm$ 31b
NSE3	64 $\pm$ 19b
NSE15	7.5 $\pm$ 3.4b
NSE16	35 $\pm$ 29b
NSE23	38 $\pm$ 12b
NSE25	0.65 $\pm$ 0.16b
NSE30	5.0 $\pm$ 1.3b
NSE32	21 $\pm$ 16b
NSE36	9.1 $\pm$ 2.8b
NSE37-1	30 $\pm$ 39b
NSE37-2	53 $\pm$ 35b
NSE41	63 $\pm$ 26b
NSE46	3.1 $\pm$ 1.5b
CK	24 000 $\pm$ 12 000a

不同小写字母表示数据差异显著( $P<0.05$ )

Different lowercase letters in same column represent significant difference at  $P<0.05$  level among the treatments.

### 3 讨论与结论

#### 3.1 影响天山大峡谷原始森林可培养黏细菌多样性的因素

黏细菌偏爱于有机质丰富和中性或微碱性的土壤、朽木、树皮、食草哺乳动物的粪便以及腐烂的地衣等基质<sup>[30]</sup>。原始森林中落叶及枯

木覆盖量大, 土壤腐殖质含量高, 蕴藏着丰富的微生物资源。2018 年武志华等<sup>[31]</sup>通过变性梯度凝胶电泳(DGGE)对大兴安岭采集的 15 份土样中黏细菌资源的多样性进行分析, 结果显示 15 个土样中共鉴定到 13 个属的黏细菌, 基本覆盖了大部分已知的黏细菌种属及部分未分类的黏细菌, 表现出丰富的多样性。2019 年王春玲<sup>[18]</sup>通过高通量测序分析鼎山湖森林土壤中黏细菌的多样性, 结果同样表明森林土壤中具有丰富的黏细菌资源, 但由于黏细菌分离纯化困难, 仅从大兴安岭和鼎山湖森林样品中分别获得 2 个属 8 个种及 3 个属, 其中有 3 株为疑似黏细菌新种。新疆森林资源丰富, 主要以山地针叶林为主, 其中天山大峡谷原始森林是天山北坡最完整、具有典型代表的原始雪岭云杉林。天山大峡谷原始森林土壤腐殖质丰富, 平均海拔 2 000 m, 年平均气温为 4–6 °C, 峡谷内穿过多条河流, 形成了罕见的高山森林峡谷、高山湖泊和冰川融入一体的独特生境特征, 极有可能得到功能新颖、有重要利用价值的黏细菌资源, 但对其土壤中黏细菌的研究还未见报道。基于此, 本研究从天山大峡谷原始森林采集 44 份土样和 5 份腐木, 采用兔粪诱导法、大肠杆菌诱导法和梨火疫病病菌诱导法共分离到 70 株黏细菌, 经纯化获得 36 株黏细菌纯培养物, 隶属于 4 个属 6 个种, 获得的可培养黏细菌资源

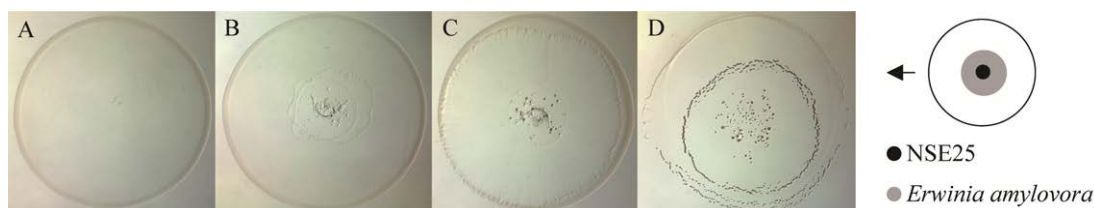


图 5 黏细菌菌株 NSE25 对梨火疫病病菌的菌苔捕食试验 A: 无菌水对照组. B: 捕食第 1 天. C: 捕食第 3 天. D: 捕食第 5 天

Figure 5 Experiments on the predation of myxobacteria strain NSE25 against *Erwinia amylovora*. A: Sterile water control group. B: Predation on day 1. C: Predation on day 3. D: Predation on day 5.



较为丰富。然而本研究获得的可培养黏细菌多样性并未达到预期, 实际上本研究在分离的过程中可以观察到许多形态各异的黏细菌子实体, 但由于天山大峡谷原始森林土壤和腐木样品中腐殖质含量丰富, 不但适合黏细菌的生长, 同样也适合其他微生物生长, 因此在挑取子实体的过程中极易被其他杂菌所污染, 虽然经过多种方法反复纯化, 但仍有大量的黏细菌无法纯化而丢失。尤其是腐木样品虽然经放线菌酮溶液浸泡了 24 h, 但仍然滋生了大量霉菌, 且很快就将子实体覆盖, 难以挑取, 未能纯化出黏细菌菌株。其次, 诱导出来的很多子实体由于缺乏合适的培养条件, 在常用的 MD1 或 VY/4 培养基上不生长, 导致许多黏细菌分离失败。例如, 本研究曾多次观察到疑似软骨霉菌属黏细菌子实体, 但经多次挑取转接均未成功培养。此外, 黏细菌具有自溶特性, 极易死亡, 分离纯化的一些黏细菌使用常规的甘油保藏法很难长时间保藏, 造成黏细菌资源丢失。但本研究发现利用无菌兔粪在无菌干燥环境中保藏黏细菌, 能够提高黏细菌的存活率和保藏期。近年来研究人员为获得更多的黏细菌资源, 不断优化黏细菌分离方法。周杨等<sup>[32]</sup>研究发现一种主要成分为大肠杆菌菌体、可溶性淀粉、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、3-吗啉丙磺酸和  $\text{VB}_{12}$  的黏细菌培养基, 可缩短黏细菌培养周期, 促进难培养黏细菌的可培养性。郭秋菊等<sup>[33]</sup>和张鲜姣等<sup>[14]</sup>发现利用助长菌与黏细菌共培养技术可促进黏细菌快速形成子实体或促使未能被培养的黏细菌形成子实体, 这为黏细菌的分离提供了新思路。蚁烁星等<sup>[34]</sup>研究发现通过在诱导培养基中添加土壤浸提液, 改变诱导菌的种类及接种方式可明显增加黏细菌的种类。

### 3.2 黏细菌抗菌活性分析

黏细菌作为一类新型微生物资源, 捕食谱

相当广泛, 其对被捕食菌的偏爱性一般体现在很大的分类单位如门和纲的层次, 有可能解决某些病原菌菌系差异大等防治难题, 具有重要的生物防治意义<sup>[35]</sup>, 因此在植物病害生物防治中的应用日益受到重视。早在 20 世纪 70 年代 Hocking 等<sup>[36]</sup>首次发现黏细菌能不同程度地捕食 *Phythium intermedium*、*Rhizoctonia solani* 和 *Fusarium oxysporum* 等不同类型的植物病原真菌。Kim 等<sup>[37]</sup>发现 *Myxococcus* sp. KYC1126 对辣椒疫霉菌丝抑制率可达 100%。在国内, 李周坤<sup>[38]</sup>发掘的黏细菌 *Coralloccoccus* sp. EGB 对水稻稻曲病菌、稻瘟病菌、黄瓜枯萎病菌、辣椒疫霉及大豆疫霉的生长均具有良好的抑制作用。任兴波等<sup>[39]</sup>从内蒙古农田土壤中分离获得致病疫霉的高效拮抗黏细菌菌株 *Myxococcus xanthus* YR-3, 其对马铃薯晚疫病致病菌菌丝生长抑制率高达 96.67%。崔中利等<sup>[40]</sup>筛选出一株对稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)等多种病原真菌具有广谱抗菌活性的原囊菌属黏细菌 *Archangium* sp. AC19。但目前针对棉花和万寿菊生产中主要病原真菌筛选广谱抗菌活性的黏细菌菌株鲜有报道。本研究以棉花和万寿菊生产中 6 种重要病原真菌为靶标菌, 对从新疆天山大峡谷中获得 36 株黏细菌纯培养物进行抗菌活性测定, 初步筛选出一株兼具广谱和高效抗菌活性的黏细菌菌株 NSE37-1, 这为进一步研究黏细菌在棉花和万寿菊真菌病害生物防治中的应用奠定了基础。

本研究通过平板对峙试验发现分离的 36 株黏细菌对多种植物病原真菌具有广谱的抗菌活性, 但同一株黏细菌对不同病原真菌的抗菌活性存在差异, 表现出一定的捕食偏好性。Li 等<sup>[41]</sup>研究发现 *Coralloccoccus* sp. EGB 分泌一种  $\beta$ -1,6-葡聚糖酶, 该酶直接参与裂解真菌细胞



壁,具有广谱的抗真菌活性,但无法捕食细胞壁缺乏 $\beta$ -1,6-葡聚糖的真菌,如粗糙脉孢菌。这表明黏细菌对不同猎物的捕食偏好性可能是由猎物菌类型不同导致。同时本研究还发现部分黏细菌在面对不同猎物时会采取不同的抗菌策略,如黏细菌菌株NSE37-1在与*Fusarium culmorum*和*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*对峙培养时会引起菌丝的明显坍塌,表现出明显的捕食作用;面对*Rhizoctonia solani*、*Fusarium verticillioides*和*Verticillium dahliae*既表现出抑菌效果又兼具捕食作用,而对*Alternaria tenuissima*则表现为强烈的抑菌效果。目前,关于黏细菌捕食作用的研究主要集中在细菌捕食方面,对真菌的捕食机制研究较少,仅涉及具有抗真菌活性的几丁质酶、 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶等细胞壁裂解酶<sup>[42-43]</sup>及抗真菌活性的次级代谢物<sup>[44]</sup>等。为何黏细菌NSE37-1针对不同的猎物菌采取不同的抗菌策略,该菌株产生哪类抗菌活性物质及其抗菌作用机理等问题都有待于今后进一步深入研究。

梨火疫病(fire blight)是由解淀粉欧文氏菌(*Erwinia amylovora*)引起的蔷薇科仁果类果树的毁灭性病害<sup>[45]</sup>。2016年在我国新疆发现以来,目前已扩散至我国的新疆和甘肃70个地区<sup>[46]</sup>,对苹果、梨等多种果树造成严重危害,但如何对梨火疫病高效安全地防控依然是世界性难题。近年来利用有益微生物在梨火疫病生物防治中的相关研究和应用方面取得了一定进展,包括*Pseudomonas fluorescens*<sup>[47]</sup>、*Erwinia herbicola*<sup>[48]</sup>、*Bacillus velezensis*<sup>[21]</sup>、*Klebsiella* sp.<sup>[49]</sup>、*Bacillus amyloliquefaciens*<sup>[50]</sup>等已被用于梨火疫病的生物防治,但关于黏细菌在梨火疫病生物防治中的研究和应用目前尚属空白。本研究为提高捕食梨火疫病菌黏细菌菌株的筛选效率,使用*Erwinia amylovora*作为被捕食菌,

从44份土样中分离纯化出15株黏细菌,纯菌率在3种方法中最高,达到83.33%。通过菌苔捕食试验发现这15株菌对梨火疫病菌均具有捕食能力,但不同黏细菌对梨火疫病的捕食能力存在差异,说明不同黏细菌具有一定的捕食偏好性。其中菌株NSE24的捕食活性最强,具有潜在的生防潜力。本研究结果不仅为进一步研究黏细菌在梨火疫病生物防治中的应用潜力奠定了基础,同时也提示,在直接面向生物防治用途的黏细菌筛选中,可以使用梨火疫病菌等对黏细菌有助长效果的植物病原菌作为被捕食菌,从样品中诱导分离高效捕食植物病原菌的黏细菌。

## REFERENCES

- [1] SAVARY S, WILLOCQUET L, PETHYBRIDGE SJ, ESKER P, McROBERTS N, NELSON A. The global burden of pathogens and pests on major food crops[J]. *Nature Ecology & Evolution*, 2019, 3(3): 430-439.
- [2] FISHER MC, HAWKINS NJ, SANGALD D, GURR SJ. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security[J]. *Science*, 2018, 360(6390): 739-742.
- [3] TRINGE SG. A layered defense against plant pathogens[J]. *Science*, 2019, 366(6465): 568-569.
- [4] CHEN T, NOMURA K, WANG XL, SOHRABI R, XU J, YAO LY, PAASCH BC, MA L, KREMER J, CHENG YT, ZHANG L, WANG N, WANG ET, XIN XF, HE SY. A plant genetic network for preventing dysbiosis in the phyllosphere[J]. *Nature*, 2020, 580(7805): 653-657.
- [5] SYED AB RAHMAN SF, SINGH E, PIETERSE CMJ, SCHENK PM. Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens[J]. *Plant Science: an International Journal of Experimental Plant Biology*, 2018, 267: 102-111.
- [6] LEGEIN M, SMETS W, VANDENHEUVEL D, EILERS T, MUYSHONDT B, PRINSEN E, SAMSON R, LEBEER S. Modes of action of microbial biocontrol in the phyllosphere[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1619.
- [7] BABALOLA OO. Beneficial bacteria of agricultural importance[J]. *Biotechnology Letters*, 2010, 32(11): 1559-1570.

- [8] KONOVALOVA A, PETTERS T, SØGAARD-ANDERSEN L. Extracellular biology of *Myxococcus xanthus*[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2010, 34(2): 89-106.
- [9] 李曙光. 黏细菌的环境分布、季节演替及其相互作用[D]. 济南: 山东大学博士学位论文, 2014.  
LI SG. Environmental distribution, seasonal succession and interaction of myxobacteria[D]. Jinan: Doctoral Dissertation of Shandong University, 2014 (in Chinese).
- [10] 李周坤, 叶现丰, 杨凡, 黄彦, 范加勤, 王辉, 崔中利. 黏细菌捕食生物学研究进展及其在农业领域的应用潜力[J]. 南京农业大学学报, 2021, 44(2): 208-216.  
LI ZK, YE XF, YANG F, HUANG Y, FAN JQ, WANG H, CUI ZL. The predation biology of myxobacteria and its application in agricultural field[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2021, 44(2): 208-216 (in Chinese).
- [11] SCHÄBERLE TF, LOHR F, SCHMITZ A, KÖNIG GM. Antibiotics from myxobacteria[J]. Natural Product Reports, 2014, 31(7): 953-972.
- [12] DAWID W. Biology and global distribution of myxobacteria in soils[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2000, 24(4): 403-427.
- [13] YE XF, LI ZK, LUO X, WANG WH, LI YK, LI R, ZHANG B, QIAO Y, ZHOU J, FAN JQ, WANG H, HUANG Y, CAO H, CUI ZL, ZHANG RF. A predatory myxobacterium controls cucumber *Fusarium* wilt by regulating the soil microbial community[J]. Microbiome, 2020, 8(1): 49.
- [14] 张鲜姣, 吕颖颖, 朱红惠. 越南原始森林粘细菌的分离与鉴定[J]. 生物技术进展, 2018, 8(2): 147-152, 189.  
ZHANG XJ, LV YY, ZHU HH. Isolation and identification of myxobacteria in virgin forest of Vietnam[J]. Current Biotechnology, 2018, 8(2): 147-152, 189 (in Chinese).
- [15] 方晓梅, 张利平. 粘细菌生态多样性的初步研究[J]. 生物多样性, 2001, 9(3): 207-213.  
FANG XM, ZHANG LP. A preliminary study on ecological diversity of myxobacteria[J]. Chinese Biodiversity, 2001, 9(3): 207-213 (in Chinese).
- [16] GARCIA RO, REICHENBACH H, RING MW, MÜLLER R. *Phaselicystis flava* gen. nov., sp. nov., an arachidonic acid-containing soil myxobacterium, and the description of *Phaselicystidaceae* fam. nov[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(Pt 6): 1524-1530.
- [17] YAMAMOTO E, MURAMATSU H, NAGAI K. *Vulgatibacter incomptus* gen. nov., sp. nov. and *Labilitrix luteola* gen. nov., sp. nov., two myxobacteria isolated from soil in Yakushima Island, and the description of *Vulgatibacteraceae* fam. nov., *Labilitrichaceae* fam. nov. and *Anaeromyxobacteraceae* fam. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64(Pt 10): 3360-3368.
- [18] 王春玲. 鼎湖山粘细菌与噬几丁质属细菌资源多样性与捕食机制[D]. 广州: 华南农业大学博士学位论文, 2019.  
WANG CL. Diversity and predation mechanism of myxobacteria and chitin-eating bacteria in Dinghushan[D]. Guangzhou: Doctoral Dissertation of South China Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [19] 赵芳芳. 天山大峡谷国家森林公园生态风险评价及开发利用管理对策[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学硕士学位论文, 2021.  
ZHAO FF. Ecological risk assessment and development and utilization management countermeasures of Tianshan Grand Canyon National Forest Park[D]. Urumqi: Master's Thesis of Xinjiang Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [20] 叶现丰. 珊瑚球菌 EGB 防控黄瓜枯萎病的生理生态学机制研究[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2019.  
YE XF. Study on physiological and ecological mechanism of coral cocci EGB in controlling cucumber *Fusarium* wilt[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [21] 吕天宇, 贺旭, 罗明, 韩剑, 包慧芳, 黄伟. 梨火疫病菌拮抗细菌 FX1 培养基及摇瓶发酵条件优化[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(6): 1553-1565.  
LÜ TY, HE X, LUO M, HAN J, BAO HF, HUANG W. Optimization of culture medium and shake flask fermentation conditions for *Bacillus velezensis* FX1 against *Erwinia amylovora*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2022, 38(6): 1553-1565 (in Chinese).
- [22] REICHENBACH H. A simple method for the purification of myxobacteria[J]. Journal of Microbiological Methods, 1983, 1(2): 77-79.
- [23] PETERSON JE. Isolation, cultivation and maintenance of the myxobacteria[J]. Methods in Microbiology, 1969, 3: 185-210.
- [24] STACKEBRANDT E, PÄUKER O, ERHARD M. Grouping myxococci (*Coralloccoccus*) strains by matrix-assisted laser desorption ionization

- time-of-flight (MALDI TOF) mass spectrometry: comparison with gene sequence phylogenies[J]. *Current Microbiology*, 2005, 50(2): 71-77.
- [25] REICHENBACH H. *Kofleria* Gen. nov.[M]//Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology. New York: Springer-Verlag, 2006: 1143-1144.
- [26] REICHENBACH H, DWORKIN M. The Myxobacteria[M]//The Prokaryotes. New York, NY: Springer New York, 1992: 3416-3487.
- [27] BUCHANAN RE, GIBBONS NE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所, 译. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984.
- BUCHANAN RE, GIBBONS NE. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, trans. 8th ed. Beijing: Science Press, 1984 (in Chinese).
- [28] BRUNEL B, GIVAUDAN A, LANOIS A, AKHURST RJ, BOEMARE N. Fast and accurate identification of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species by restriction analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(2): 574-580.
- [29] 王婷. 新型生防粘细菌 *Myxococcus* sp. BS 的分离及粘细菌对细菌性软腐病菌的捕食机理研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2018.
- WANG T. Isolation of a novel biocontrol *Myxococcus* sp. BS and the myxobacterial predation mechanism against bacterial soft rot[D]. Nanjing: Master Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [30] MOHR KI, STECHLING M, WINK J, WILHARM E, STADLER M. Comparison of myxobacterial diversity and evaluation of isolation success in two niches: Kiritimati Island and German compost[J]. *Microbiology Open*, 2016, 5(2): 268-278.
- [31] 武志华, 李娜, 马秀枝, 董晔, 郭子文, 刘惠荣. 大兴安岭地区粘细菌资源的多样性及其生物活性[J]. *微生物学通报*, 2018, 45(2): 266-283.
- WU ZH, LI N, MA XZ, DONG Y, GUO ZW, LIU HR. Diversity and bioactivities of myxobacteria in Daxing'an mountains[J]. *Microbiology China*, 2018, 45(2): 266-283 (in Chinese).
- [32] 周杨, 蚁烁星, 张鲜姣, 姚青, 朱红惠. 基于细菌共现网络的土壤粘细菌分离[J]. *生物资源*, 2020, 42(5): 531-539.
- ZHOU Y, YI SX, ZHANG XJ, YAO Q, ZHU HH. Isolation of soil myxobacteria based on bacterial co-occurrence network[J]. *Biotic Resources*, 2020, 42(5): 531-539 (in Chinese).
- [33] 郭秋菊, GARCIA R, 钱晓鸣, 沈月毛. 一株软骨霉状菌的纯化方法[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2011, 50(1): 106-110.
- GUO QJ, GARCIA R, QIAN XM, SHEN YM. The purification of *Chondromyces* sp.[J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science Edition)*, 2011, 50(1): 106-110 (in Chinese).
- [34] 蚁烁星, 周杨, 张鲜姣, 姚青, 李华平, 朱红惠. 不同分离方法对子实体形成和粘细菌分离的影响[J]. *微生物学报*, 2021, 61(4): 923-934.
- YI SX, ZHOU Y, ZHANG XJ, YAO Q, LI HP, ZHU HH. Effects of different methods on the formation of fruiting bodies and isolation of myxobacteria[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(4): 923-934 (in Chinese).
- [35] MORGAN AD, MACLEAN RC, HILLESLAND KL, VELICER GJ. Comparative analysis of *Myxococcus* predation on soil bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(20): 6920-6927.
- [36] HOCKING D, COOK FD. Myxobacteria exert partial control of damping-off and root disease in container-grown tree seedlings[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1972, 18(10): 1557-1560.
- [37] KIM ST, YUN SC. Biocontrol activity of *Myxococcus* sp. KYC 1126 against *Phytophthora* blight on hot pepper[J]. *Research in Plant Disease*, 2011, 17(2): 121-128.
- [38] 李周坤. *Corallococcus* sp. EGB 来源的糖苷水解酶的鉴定及其生物学功能研究[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2015.
- LI ZK. Identification and biological function of glycoside hydrolase from *Corallococcus* sp. EGB[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [39] 任兴波, 武志华, 崔海辰, 高向红, 冯福应, 刘惠荣. 致病疫霉拮抗菌株 YR-7 的分离鉴定及其活性物质[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(7): 1513-1523.
- REN XB, WU ZH, CUI HC, GAO XH, FENG FY, LIU HR. Isolation and identification of the strain YR-7 against *Phytophthora infestans* and study on its antibiotic substances[J]. *Microbiology China*, 2016, 43(7): 1513-1523 (in Chinese).
- [40] 崔中利, 李周坤, 王婷, 罗雪, 黄彦. 一株捕食植物病原细菌的叶柄粘球菌及其在细菌性病害生物防治中的应用: CN108559718A[P]. 2018-09-21.
- CUI ZL, LI ZK, WANG T, LUO X, HUANG Y. *Myxococcus stipitatus* preying on plant pathogenic

- bacteria and application thereof in biological control of bacterial diseases: CN108559718A[P]. 2018-09-21 (in Chinese).
- [41] LI ZK, YE XF, LIU MX, XIA CY, ZHANG L, LUO X, WANG T, CHEN Y, ZHAO YQ, QIAO Y, HUANG Y, CAO H, GU XY, FAN JQ, CUI ZL, ZHANG ZG. A novel outer membrane  $\beta$ -1,6-glucanase is deployed in the predation of fungi by myxobacteria[J]. The ISME Journal, 2019, 13(9): 2223-2235.
- [42] LI ZK. Identification of an *endo*-chitinase from *Corallococcus* sp. EGB and evaluation of its antifungal properties[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 132: 1235-1243.
- [43] ZHOU J, CHEN JH, LI ZK, YE XF, DONG WL, JIANG M, HUANG Y, CUI ZL. Enzymatic properties of a multi-specific  $\beta$ -(1,3)-glucanase from *Corallococcus* sp. EGB and its potential antifungal applications[J]. Protein Expression and Purification, 2019, 164: 105481.
- [44] GARCIA R, GEMPERLEIN K, MÜLLER R. *Minicystis rosea* gen. nov., sp. nov., a polyunsaturated fatty acid-rich and steroid-producing soil myxobacterium[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64(Pt 11): 3733-3742.
- [45] 胡白石. 梨火疫病菌的风险分析及检测技术研究[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2000.
- HU BS. Study on risk analysis and detection technology of *Erwinia amylovora*[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2000 (in Chinese).
- [46] 农业农村部办公厅. 农业农村部办公厅关于印发《全国农业植物检疫性有害生物分布行政区名录》的通知[J]. 中华人民共和国农业农村部公报, 2019(6): 40.
- Circular of the General Office of the Ministry of Agriculture. Notice of the general office of the ministry of agriculture and rural affairs on printing and distributing the catalogue of administrative districts of agricultural plant quarantine pests in China[J]. Gazette of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, 2019(6): 40 (in Chinese).
- [47] VANNESTE JL, YU J. Biological control of fire blight using *Erwinia herbicola* Eh252 and *Pseudomonas fluorescens* A506 separately or in combination[J]. Acta Horticulturae, 1996(411): 351-354.
- [48] LINDOW S. Interactions of antibiotics with *Pseudomonas fluorescens* strain A506 in the control of fire blight and frost injury to pear[J]. Phytopathology, 1996, 86(8): 841.
- [49] 徐琳赟, 古丽孜热·曼合木提, 韩剑, 蒋萍, 黄伟, 罗明. 香梨内生拮抗细菌的筛选及对梨火疫病的生防潜力[J]. 西北植物学报, 2021, 41(1): 132-141.
- XU LY, GULIZZIER M, HAN J, JIANG P, HUANG W, LUO M. Screening of endophytic antagonistic bacteria from 'kuerlexiangli' pear and their biocontrol potential against fire blight disease[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2021, 41(1): 132-141 (in Chinese).
- [50] 王俊, 高建诚, 巴音克西克, 吴莉莉. 利用蜜蜂传播生防菌防治梨火疫病[J]. 植物检疫, 2022, 36(1): 9-12.
- WANG J, GAO JC, BAYINKEXIKE, WU LL. Dispersal of biocontrol bacterium by honey bee for control of pear fire blight[J]. Plant Quarantine, 2022, 36(1): 9-12 (in Chinese).