



符堯,李静,张子安,等.一株抗大豆胞囊线虫芽孢杆菌的分离鉴定[J].黑龙江农业科学,2022(2):36-40.

一株抗大豆胞囊线虫芽孢杆菌的分离鉴定

符堯¹,李静¹,张子安¹,周园园^{1,2}

(1.黑龙江八一农垦大学农学院,黑龙江大庆163316;2.国家杂粮工程技术研究中心,黑龙江大庆163319)

摘要:为了筛选用作防治大豆胞囊线虫的微生态制剂的益生菌,从大豆根围土中分离芽孢杆菌 Ba1-7,并测定其发酵液对大豆胞囊线虫 2 龄幼虫活性的影响。结合形态学、生理生化特征及 16S rRNA 基因序列比对分析对菌株进行鉴定。结果表明:分离筛选的芽孢杆菌 Ba1-7 发酵液对大豆胞囊线虫 2 龄幼虫校正死亡率为 83.32%,经分子生物学鉴定菌株 Ba1-7 为阿氏芽孢杆菌(*Bacillus aryabhattai*)。菌株 Ba1-7 可用作防治大豆胞囊线虫的生防菌剂。

关键词:大豆胞囊线虫;芽孢杆菌;分离;鉴定

大豆胞囊线虫(SCN, *Heterodera glycines*)病是大豆生产中危害最重的病害之一,一般造成产量损失达 5%~10%。该病害在世界大豆种植区普遍发生,并且在视觉上未发现症状时就可造成大豆减产 30%^[1],严重时可能造成减产 70%以上^[2]。该病害的防治以化学防治和种植抗病品种为主,同时,生物防治也是有效的防治手段之一^[3-5]。随着社会的进步、科学的发展,粮食安全成为人们关注的焦点。化学农药减施势在必行,生物防治变得越来越迫切。因此,开发新型生物杀线剂迫在眉睫。

芽孢杆菌具有抗逆性强、分布广、繁殖快、环境友好、有显著的抗菌活性等优点,其开发和利用正引起人们的重视,有些芽孢杆菌已被广泛应用于植物病害的生物防治^[6-7],线虫的作用机制也成为近年来的研究热点^[8-10]。为了进一步发掘土壤中微生物生防资源,本研究拟从土壤中分离芽孢杆菌,并通过大豆胞囊线虫进行 2 龄幼虫致死作用测定,筛选出活性较高的菌株,采用形态学、生理生化反应及分子生物学方法进一步对菌株进行鉴定,明确菌株的分类地位,为大豆胞囊线虫病的生物防治奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 培养基 牛肉膏蛋白胨固体培养基(NA):牛肉膏 3.0 g,酵母膏 1.0 g,蛋白胨 5.0 g,葡萄糖 10.0 g,琼脂粉 20.0 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 调至 7.2,高压灭菌锅 121 ℃,灭菌 20 min。

牛肉膏蛋白胨液体培养基(NB):牛肉膏 3.0 g,酵母膏 1.0 g,蛋白胨 5.0 g,葡萄糖 10.0 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 调至 7.2,高压灭菌锅 121 ℃,灭菌 20 min。

1.1.2 大豆胞囊线虫 大豆胞囊线虫 3 号生理小种分离自黑龙江省安达市大豆胞囊线虫病土。

1.1.3 试剂 革兰氏染色液和生化管,购自杭州微生物试剂有限公司。细菌基因组 DNA 提取试剂盒,购自 TIANGEN 生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株分离 参考龚国淑等^[11]的菌株分离方法,称取 10 g 样品至含有 90 mL 无菌水的三角瓶中,150 r·min⁻¹振荡 20 min,逐级稀释到 1×10⁻¹,1×10⁻²和 1×10⁻³,置于 80 ℃水浴锅中 10~20 min,以杀死非芽孢,然后配制成 1×10⁻⁴,1×10⁻⁵和 1×10⁻⁶浓度梯度的土壤悬液,悬液不做热处理,分别吸取 100 μL 不同浓度的土壤悬液均匀涂布于 NA 平板。倒置于 30 ℃恒温箱,培养 24 h;挑取单菌落纯化、编号;固体斜面 4 ℃保存备用。

1.2.2 菌株发酵液制备 挑取经活化的单菌落接种于液体 NA 培养基,放入恒温振荡培养箱,培养条件为 30 ℃,180 r·min⁻¹培养(发酵液浓度为 1×10⁹ CFU·mL⁻¹,OD₆₀₀ 为 0.37)。培养 48 h

收稿日期:2021-11-13

基金项目:黑龙江省大学生创新创业训练计划(202010223105);大庆市指导性科技计划(zd-2021-72)。

第一作者:符堯(1999—),女,本科生,专业为植物保护。E-mail:1067603370@qq.com。

通信作者:周园园(1988—),女,博士,讲师,从事植物保护相关研究。E-mail:zhouyuanyuan6616@163.com。

后,离心 10 min(转速 8 000 r·min⁻¹),收集上清液,即得到菌株发酵液。

1.2.3 大豆胞囊线虫的制备 采用淘洗过筛法从病土中分离胞囊,在体视解剖镜下选取饱满、成熟的胞囊。用 0.5%次氯酸钠溶液消毒 3 min,然后用无菌水冲洗,放入自制孵化池中孵化,每天及时收集 2 龄零幼虫(J2),备用。

1.2.4 菌株发酵液对大豆胞囊线虫 2 龄幼虫(J2)致死作用的测定 配制经摇床发酵的浓度为 1×10⁹ CFU 的菌株发酵液原液,将约 100 条新孵化出的 J2 放入灭菌的贝氏小皿中,加入菌株发酵液,5 次重复。置于 25 ℃培养箱,以毛针刺激后僵直不动为标准。48 h 镜检计数,记录线虫的死亡率,以空白培养基为对照(CK)。

1.2.5 菌株鉴定 形态学鉴定:用划线法将细菌菌株接种在 NA 平板培养基上,28 ℃恒温培养 1~3 d,单菌落出现时观察其大小、形状、表面、边缘、透明度、菌落和培养基的颜色等。

革兰氏染色:用接种针挑取培养好的细菌菌落,在载玻片上滴一滴无菌水,将细菌菌落涂布在无菌水中,风干,在酒精灯火焰上快速通过进行固定。用结晶紫的混合液染 1 min,无菌水冲洗后吸干,滴加碘液覆盖染色 1 min,水洗,用 95%乙醇脱色 20~30 s,水洗,再用 2.5%番红液染色

3 min,同上述方法水洗,静置风干,在光学显微镜下镜检。若菌体为紫色则细菌为革兰氏阳性细菌;若菌体为红色则细菌为革兰氏阴性细菌。

生理生化鉴定:将细菌在培养基上培养一段时间后,使用芽孢杆菌生化鉴定条(青岛海博生物技术有限公司)进行各项生理生化指标测定,以及普里斯考尔(V-P)、柠檬酸盐、丙酸盐、D-木糖、L-阿拉伯糖、D-甘露醇、明胶液化、7%氯化钠生长情况、pH5.7 生长情况、硝酸盐还原和淀粉水解测定。具体试验方法如下:挑取菌落,接种于营养琼脂平板,(36±1)℃培养 24 h,接种至生化鉴定条。若试剂条中内容物为液体,采用菌悬液法接种;若内容物为固态,则采用“之”字形划线接种或穿刺接种。

菌悬液法:用接种针从牛肉膏蛋白胨固体培养基平板上挑取单个菌落至无菌生理盐水中,将悬液配制成浓度均一的细菌悬液,加入至 V-P 柠檬酸盐、明胶、7%氯化钠、pH5.7、硝酸盐还原、淀粉水解孔内,每孔加入 100 μL 菌悬液。

穿刺和划线接种:使用接种针挑取菌落垂直穿刺于丙酸盐、D 木糖、L-阿拉伯糖、D-甘露醇孔中。挑取菌落,接种于 NA 平板,36 ℃培养 24 h,接种至生化鉴定条。培养结束后,对照下表观察记录(表 1)。

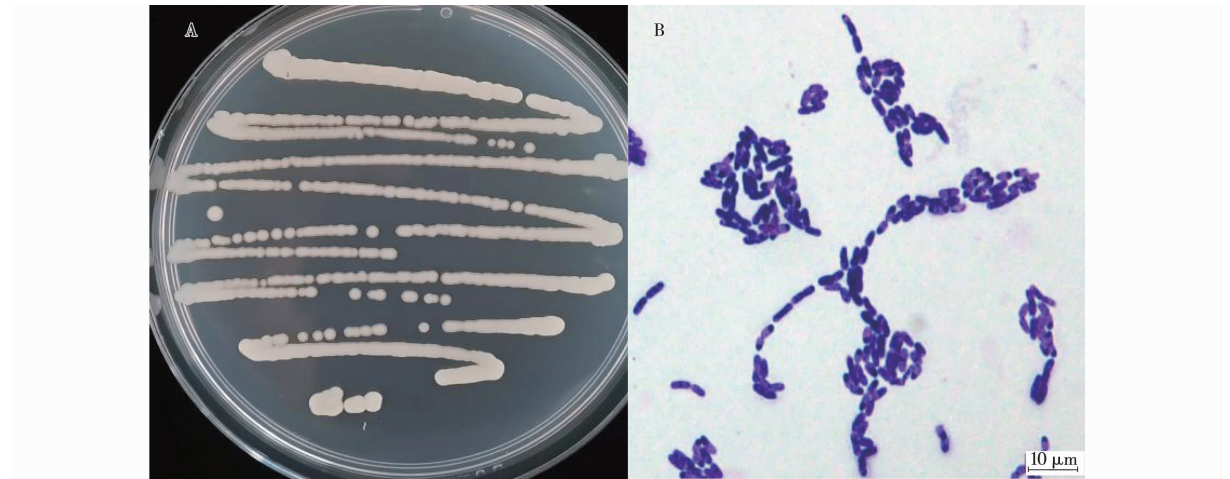
表 1 芽孢杆菌生化鉴定条结果对照表

项目	结果判断		培养时间/h	备注
	阳性	阴性		
V-P	变红	不变红	48~96	培养结束后,滴加 V-P 试剂(甲液 6 滴,乙液 2 滴),摇匀后继续培养 0.5~4.0 h,4 h 内不变色为阴性,变红为阳性
柠檬酸盐	变蓝	变黄色或不变色	48	
丙酸盐	变蓝	变黄色或不变色	48	有时需延长培养至 96 h
D-木糖	变黄	紫红色或不变色	48~96	
L-阿拉伯糖	变黄	紫红色或不变色	48~96	
D-甘露醇	变黄	紫红色或不变色	48~96	
明胶液化	液化	不液化	48~96	培养结束后,置于 4 ℃冰箱放置 20 min,若变为固态则为阴性,若仍然为液态则为阳性
7%氯化钠生长情况	浑浊	澄清或轻微浑浊	48~96	
pH5.7 生长情况	浑浊	澄清或轻微浑浊	24~48	
硝酸盐还原	滴加试剂变红,或加入试剂不变红,加入锌粒仍然不变红	滴加试剂不变红,继续加入锌粒后变红	48~96	滴加硝酸盐还原试剂甲、乙液各 2~3 滴,观察结果。若变红,则为阳性;若不变红,继续加入锌粒,加入锌粒后变红为阴性,不变红为阳性
淀粉水解	不变蓝	变蓝	48~96	培养结束后需滴加卢戈氏碘液

分子生物学鉴定:DNA 的提取按照生工生物工程(上海)股份有限公司提供的试剂盒提取细菌 DNA[天根生化科技(北京)有限公司]。

PCR 扩增:由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列为 27F(5'-AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG-3');1492R(5'-ACGGCTACCT-TGTTACGACTT-3')。扩增反应体系(25 μ L),包括 12.5 μ L Taq Master Mix,1 μ L 上、下游引物,0.5 μ L DNA 模板,10 μ L dd H₂O。PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,55 $^{\circ}$ C 复性 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s 为 1 个循环,共 30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物委托吉林省库美生物科技有限公司测序,测序结果在 NCBI 数据库上进行 BLAST 比对分析,用 Mega 7 构建系统发育树。

1.2.6 数据分析 试验数据用 Excel 2010 整理,用 SPSS 17.0 软件的 T 检验进行差异显著性分析。



A. 菌株 Ba1-7 在 NA 培养基上的菌落形态;B. 菌株 Ba1-7 的革兰氏染色结果。

图 1 菌株 Ba1-7 的形态学特征

2.2.2 菌株 Ba1-7 的生理生化特性 菌株的生理生化反应结果见表 3,菌株能够利用柠檬酸盐、D-木糖、L-阿拉伯糖、D-甘露醇,并能使淀粉水解;V-P 测定及硝酸盐还原呈阳性,能够液化明胶;不能利用丙酸盐。参考《伯杰细菌鉴定手册》^[12]和《常见细菌系统鉴定手册》^[13],根据细菌菌株的形态特征,并结合生理生化特性,初步认为生防菌 Ba1-7 为芽孢杆菌属。

2 结果与分析

2.1 菌株 Ba1-7 发酵液对大豆胞囊线虫 J2 的影响

菌株 Ba1-7 发酵液对大豆胞囊线虫 J2 活性影响测定结果表明,Ba1-7 发酵液处理大豆胞囊线虫 48 h 后,线虫平均死亡率为 88.82%,校正死亡率为 83.32%,与对照培养基差异显著(表 2)。

表 2 细菌发酵液对大豆胞囊线虫 2 龄幼虫活性的影响

菌株	平均死亡率/%	校正死亡率/%
CK	32.98±4.00 b	-
Ba1-7	88.82±3.20 a	83.32

注:不同小写字母表示 P<0.05 水平差异显著。

2.2 菌株 Ba1-7 的鉴定

2.2.1 菌株 Ba1-7 的形态学观察 对菌株 Ba1-7 的形态特征进行观察,发现菌株 Ba1-7 在 NA 培养基上生长良好。菌落较大,呈圆形或近圆形,乳白色,无光泽,不透明,表面突起,菌体杆状。对生防芽孢杆菌进行革兰氏染色观察,结果表明该菌株为革兰氏阳性(图 1)。

表 3 生防细菌生理生化鉴定结果

指标	鉴定结果	指标	鉴定结果
V-P	+	明胶液化	+
柠檬酸盐	+	7%氯化钠生长	-
丙酸盐	-	pH5.7 生长	+
D-木糖	+	硝酸盐还原	+
L-阿拉伯糖	+	淀粉水解	+
D-甘露醇	+		

2.2.3 菌株 Ba1-7 分子生物学(16S rRNA)鉴定

菌株 Ba1-7 进行克隆测序,经测序菌株 Ba1-7 的序列长度为1 418 bp,提交至 GenBank 进行比对(登录号:OL71-4327),结果与阿氏芽孢杆菌的

(*Bacillus aryabhattai*) 同源性最高,为100%。通过 MEGA 7 构建系统发育树,结果表明 Ba1-7 与 *B. aryabhattai* WN889284.1 的关系最近,可聚为一类(图 2)。

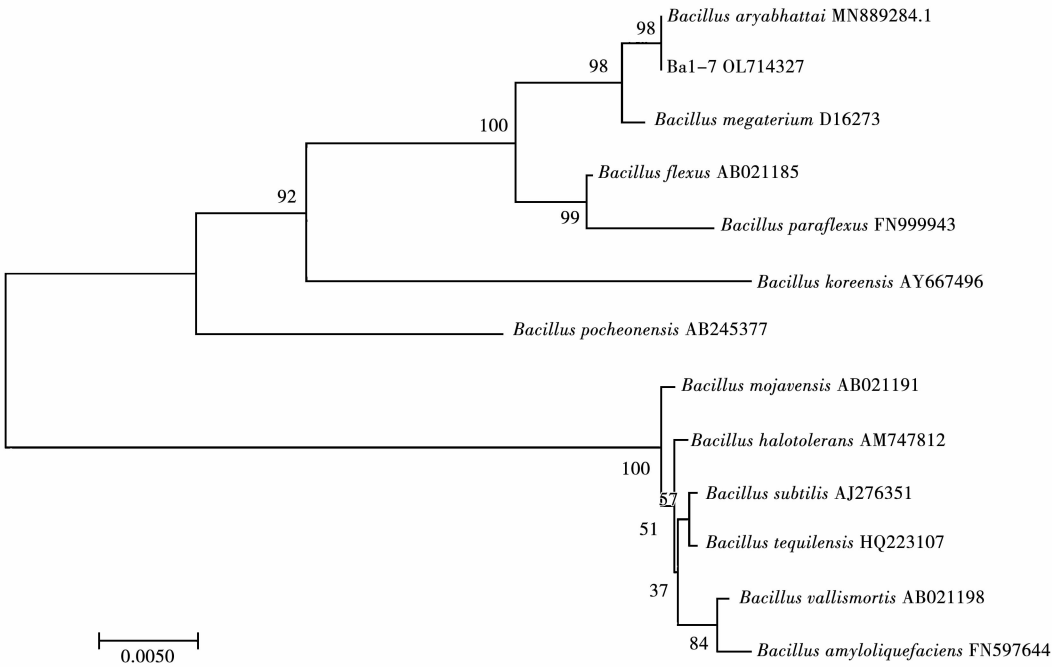


图 2 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树

3 讨论

胞囊的抗逆性极强,且可在土中长时间存活,能随着流动的土壤、水流、风、农机具及动物传播。这些因素使大豆胞囊线虫病的防治更加困难。2021 年中央一号文件提出“坚决守住 18 亿亩耕地红线,强化现代农业科技和物质装备支撑,推进农业绿色发展”。研究表明,土壤中可被培养的微生物仅有 0.3% 左右^[14],芽孢杆菌属包含多种植物病原物的拮抗菌,是很好的生防资源。

将菌株培养特征、生理生化特征与 16S rRNA 序列分析结合起来进行微生物的分类鉴定是一种广泛应用的方法^[15-16]。经 16S rRNA 序列发育分析表明,菌株 Ba1-7 与菌株 *B. aryabhattai* MN889284.1 的亲缘关系最近,可聚为一类;结合该菌的培养特征和生理生化特征,最终将其鉴定为阿氏芽孢杆菌(*B. aryabhattai*)。

阿氏芽孢杆菌具有极强的抗逆性,且可帮助植物抵御不良环境^[17]。研究表明,阿氏芽孢杆菌多用于修复重金属污染或缓解植物的重金属胁迫

迫^[18-19]。阿氏芽孢杆菌也可用来防治植物病害,如烟草黑胥病^[20]和根结线虫病^[21]。此外,Zhao 等^[3]发现阿氏芽孢杆菌 Sneb517 田间应用时可降低大豆根内线虫数量和根围土中胞囊数量。因此,阿氏芽孢杆菌可作为防治大豆胞囊线虫的潜在生防制剂。

4 结论

本研究从土壤中分离得到一株有效抑制大豆胞囊线虫的芽孢杆菌 Ba1-7,结合形态学、生理生化反应及分子生物学鉴定的结果,确定生防菌 Ba1-7 为阿氏芽孢杆菌 *B. aryabhattai*。阿氏芽孢杆菌(*B. aryabhattai*) Ba1-7 在大豆胞囊线虫防治中有一定的应用潜力,可用于大豆胞囊线虫的生物防治。

参考文献:

[1] CHEN S Y, PORTER P M, ORF J H, et al. Soybean cyst nematode population development and associated soybean yields of resistant and susceptible cultivars in Minnesota [J]. Plant Disease, 2001, 85(7): 760-766.
[2] 段玉玺. 植物线虫学[M]. 北京: 科学出版社, 2011.

- [3] ZHAO J, LIU D, WANG Y Y, et al. Evaluation of *Bacillus aryabhattai* Sneb517 for control of *Heterodera glycines* in soybean[J]. Biological Control, 2020, 142: 104147.
- [4] CHINHEYA C C, YOBO K S, LAING M D. Biological control of the root knot nematode, *Meloidogyne javanica* (Chitwood) using *Bacillus* isolates, on soybean[J]. Biological Control, 2017, 109, 37-41.
- [5] KANG W S, ZHU X F, WANG Y Y, et al. Transcriptomic and metabolomic analyses reveal that bacteria promote plant defense during infection of soybean cyst nematode in soybean[J]. BMC Plant Biological, 2018, 18: 86.
- [6] 冯永新, 关辉, 靳彦峰, 等. 短小芽孢杆菌与化学杀细菌剂协同防治烟草青枯病研究[J]. 中国烟草科学, 2021, 42(4): 44-49.
- [7] 周华飞, 杨红福, 姚克兵, 等. FlhZ 调控枯草芽孢杆菌 Bs916 生物膜形成及其对水稻纹枯病的防治效果[J]. 中国农业科学, 2020, 53(1): 55-64.
- [8] LIU D, CHEN L, ZHU X F, et al. *Klebsiella pneumoniae* SnebYK mediates resistance against *Heterodera glycines* and promotes soybean growth[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1134.
- [9] ZHAO J, LIU D, WANG Y Y, et al. Biocontrol potential of *Microbacterium maritropicum* Sneb159 against *Heterodera glycines*[J]. Pest Management Science, 2019, 75: 3381-3391.
- [10] ZHOU Y Y, CHEN J S, ZHU X F, et al. Efficacy of *Bacillus megaterium* strain Sneb207 against soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*) in soybean [J]. Pest Management Science, 2021, 77(1): 568-576.
- [11] 龚国淑, 张世熔, 唐志燕, 等. 土壤芽孢杆菌分离方法的比较——以成都郊区土壤为例[J]. 中国农业科学, 2008 (11): 266-271.
- [12] Buchanan R E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984.
- [13] 东秀珠. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 353-398.
- [14] AMANN R I, LUDWING W, SCHLEIFER K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiological Reviews, 1995, 59(1): 143-169.
- [15] WEISSBURG W G, BAMS S M, PELLETIER D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study [J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(2): 697-703.
- [16] 张立强, 黄惠琴, 崔莹, 等. 一株抗根结线虫芽孢杆菌的分离筛选及鉴定 [J]. 热带作物学报, 2014, 35 (9): 1825-1829.
- [17] BHATTACHARYYA C, BAKSHI U, MALLICK I, et al. Genome-guided insights into the plant growth promotion capabilities of the physiologically versatile *Bacillus aryabhattai* strain AB211[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 411.
- [18] RAMESH A, SHARMA S K, SHARMA M P, et al. Inoculation of zinc solubilizing *Bacillus aryabhattai* strains for improved growth, mobilization and biofortification of zinc in soybean and wheat cultivated in Vertisols of central India[J]. Applied Soil Ecology, 2014, 73: 87-96.
- [19] LEE S, KA J, SONG H. Growth promotion of *Xanthium italicum* by application of rhizobacterial isolates of *Bacillus aryabhattai* in microcosm soil [J]. The Journal of Microbiology, 2012, 50(1): 45-49.
- [20] 冯云利, 奚家勤, 马莉, 等. 烤烟品种 NC297 内生细菌中拮抗烟草黑胫病的生防菌筛选及种群组成分析[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2011, 33(4): 488-496.
- [21] XIANG N, LAWRENCE K S, KLOPPER J W, et al. Biological control of *Meloidogyne incognita* by spore-forming plant growth-promoting rhizobacteria on cotton[J]. Plant Disease, 2017, 101(5): 774-784.

Separation and Identification of *Bacillus* sp. Antagonistic to Soybean Cyst Nematode

FU Yao¹, LI Jing¹, ZHANG Zi-an¹, ZHOU Yuan-yuan^{1,2}

(1. Agricultural College, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163316, China; 2. National Coarse Cereals Engineering Research Center, Daqing 163319, China)

Abstract: In order to screen biocontrol strains against soybean cyst nematode, *Bacillus* Ba1-7 was isolated from soybean rhizosphere soil, identified by morphological, physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequence alignment analysis. The inhibition rate of the fermentation of the strain Ba1-7 on soybean cyst nematode were determined. The results showed that the isolated and screened Ba1-7 was *Bacillus aryabhattai*. The corrected mortality rate of the Ba1-7 fermentation on the hatching of J2 was 83.32%. Strain Ba1-7 can be used as a biocontrol agent against soybean cyst nematode.

Keywords: *Heterodera glycines*; *Bacillus*; separation; identification