

短小芽孢杆菌 BX-4 抗生素标记及定殖效果研究

肖相政, 刘可星, 廖宗文

(华南农业大学新肥料资源研究中心, 广东 广州 510642)

摘要:为研究短小芽孢杆菌 BX-4 在作物根际的定殖及防病效果,通过浓度梯度法用氨苄青霉素对其进行了抗性标记,并通过番茄盆栽试验研究了其在根际土壤中的定殖规律。结果表明,筛选出的突变体菌株 BX-4'能够耐受浓度为 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的氨苄青霉素,并且具有耐药和遗传双重稳定性;应用试验显示该突变体菌株能成功在番茄根际定殖,接种 20 d 后根际土壤中存活数量达到最高值 $1.34 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 干土,以后逐渐下降,到 50 d 时趋于稳定;筛选的突变体菌株对番茄青枯病具有明显的防治效果,防效达 37.9%~50.9%。短小芽孢杆菌 BX-4 在作物根部的定殖规律为揭示其生防机理及应用该菌提供了科学根据。

关键词:短小芽孢杆菌;抗生素抗性;定殖效果

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2009)06-1172-05

Ampicillin-resistant *Bacillus pumilus* BX-4 and Its Colonization in the Tomato Rhizosphere

XIAO Xiang-zheng, LIU Ke-xing, LIAO Zong-wen

(New fertilizer resources center, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: *Bacillus pumilus* BX-4 was marked by the method of concentration grads with Ampicillin for studying its disease-controlling and colonization effects in the tomato rhizosphere, and the colonizing dynamics was also studied in pot experiment. The results indicated that the selected mutant BX-4' can tolerate Ampicillin at a rate of $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, meanwhile the mutant strain has the stabilities of Ampicillin resistance and heredity, and the growth and pH curve take the same tendency with the original strain BX-4, and the mutant strain has also kept the same resistance to *Ralstonia solanacearum*. The mutant strain can colonize in the tomato rhizosphere successfully, and the survival number reached the peak value $1.34 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ dry soil after inoculation of 20 days, then descended gradually, and tended to be stable in 50 days. At the same time, the mutant strain had obvious disease-controlling effect on the tomato bacterial wilt, and the disease-controlling rate reached 37.9%~50.9%. With the decline of the mutant number in soil, the effect became lower. In addition, the strain DNA sequences were also measured, which testified that the mutant strain is *Bacillus pumilus* by contrasting with the GenBank data. The colonization of BX-4 in the rhizosphere affords scientific basis for its application and the further research on bio-controlling mechanism.

Keywords: *Bacillus pumilus*; antibiotic resistance; colonization

植物根际促生菌 (Plant Growth-promoting Rhizobacteria, PGPR)是指存在于植物根际环境,能促进植物生长的一类有益微生物^[1]。短小芽孢杆菌是土壤、植物根际重要的 PGPR 菌群之一。研究表明,它能促进植物生长和产生抗菌物质,是植物病害生防菌株的重要来源。通过对生防菌株进行遗传标记,是研究其在生态环境中生物行为规律的重要技术手段和有效

途径。目前对引入植物根际的微生物检测方法主要包括:天然抗生素标记、外来基因标记(如绿色荧光蛋白)、DNA 和 RNA 探针法等^[2]。绿色荧光蛋白标记系统具有标记基因小,直接肉眼检测荧光,对细胞安全、稳定等优点^[3]。但野生型芽孢杆菌存在复杂的遗传修饰系统,因此用绿色荧光蛋白进行标记时往往存在遗传转化效率低甚至不能转化等缺点^[4]。DNA 和 RNA 探针法具有较高灵敏度,不但可以检测活细胞,还可以检测死的细胞,但检测前需测试探针的专化性能,成本较高;而抗生素标记具有简便、快速、消耗低、实用、实验结果可以进行统计分析等优点,且不会导致原始菌株的遗传稳定性及其他重要特性变异甚至丧

收稿日期:2008-12-18

基金项目:农业部 948 项目(2006-G62)

作者简介:肖相政(1972—),男,湖南邵阳人,副研究员,博士研究生,主要从事生物肥料等方面的研究工作。

E-mail:xxzlj@126.com

通讯作者:廖宗文 E-mail:zwliao@sohu.com

失,因此抗生素标记方法被作为一种常用的手段用来跟踪接入微生物在土壤中的存活状况。许多研究表明,抗生素标记能有效跟踪接入微生物在土壤及植物体内的定殖状况。吴霭民等^[5]用抗利福平标记法,对来自棉花的内生菌 73a 在不同抗性棉花品种体内的定殖消长动态进行了研究。蔡学清等^[6]用抗菌素和抗病原真菌双重标记的方法研究了枯草芽孢杆菌 BS-2 和 BS-1 在辣椒体内的定殖,并从辣椒体内回收到了标记菌株,经菌落形态、颜色及抗菌活性等测定均与原始菌株相同,用 Biolog 鉴定,回收菌株均为枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)。郭小芳等^[7]用链霉素、四环素、利福平等不同抗生素对 6 种放线菌进行了标记,并测定了其在不同植株体内的定殖能力,结果显示部分菌株能在作物体内有效定殖,而另一些菌株则在作物组织内无法检测到。游春平等^[8]用利福平和青霉素标记了对香蕉枯萎病具有很好拮抗效果的生防菌,并证明了该菌在土壤中具有很好的定殖能力,接种后 10 至 30 d,拮抗细菌数量呈递增趋势。

本文所述短小芽孢杆菌 BX-4 系华南农业大学新肥料资源研究中心分离筛选的植物根际促生菌,室内研究证明该菌具有拮抗番茄青枯病、香蕉枯萎病等多种土传病菌的作用。笔者通过抗生素标记法研究了其在根际土壤中的动态变化规律,为阐明短小芽孢杆菌 BX-4 对番茄青枯病的防治效果提供了科学根据,同时从根际微生物动态变化角度为施肥防病技术提供了一种科学的研究方法。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 出发菌株

短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)BX-4,华南农业大学新肥料资源研究中心分离保藏。

1.1.2 抗生素

3 种抗生素均购自广州捷倍斯生物技术有限公司,见表 1。

1.1.3 培养基(NA)

牛肉膏 5 g,蛋白胨 10 g,氯化钠 5 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 7.2~7.4。

1.1.4 扩增引物

采用 16S rRNA 基因的引物 L354/R674,由英骏(广州)生物技术有限公司合成,如下:

正向引物(L354):5'-AGGGAAGAACAAGTGC (GA) AGAG-3'
反向引物(R674):5'-GCTCCTCAGCGTCAGTTACA-3'

表 1 标记菌株用抗生素及其浓度

Table 1 The antibiotics and concentration used for marking

抗生素		溶剂	贮存浓度/mg·mL ⁻¹
中文名称	英文缩写		
利福平	Rif	95%乙醇	10
氨苄青霉素	Ap	d ₂ H ₂ O	20
卡那霉素	Km	d ₂ H ₂ O	20

注:试验中抗生素配好后经 0.22 μm 的微孔滤膜抽滤除菌。

Note: The antibiotics were filtrated through 0.22 μm membrane.

1.2 试验方法

1.2.1 耐药突变体菌株的获得^[9]

分别配制抗生素浓度为 20、50、100 μg·mL⁻¹ 的梯度平板,对试验菌株 BX-4 进行天然耐药性检测。根据天然抗药性检测结果(表 2),BX-4 对 3 种抗生素在试验浓度下均不具天然抗性,因此均可作为菌株标记用,本试验选择 Ap 作为标记用抗生素。

取纯化好的 BX-4 单菌落接种到含 5 μg·mL⁻¹Ap 的牛肉膏蛋白胨液体培养基中,200 r·min⁻¹、30 ℃培养,待出现混浊后稀释菌液,取 3 个不同浓度的稀释液 100 μL 加到含相同浓度 Ap 的 NA 平板上,涂匀,继代培养 1 次,待长出单菌落后转入下一高浓度的抗性液体培养基中,依次类推。试验最后筛选出耐 Ap 浓度为 200 μg·mL⁻¹ 的突变体菌株,标记为 BX-4'。

表 2 菌株 BX-4 对不同抗生素的耐性

(抗生素浓度单位:μg·mL⁻¹)

Table 2 The resistance of BX-4 to different antibiotics(unit:μg·mL⁻¹)

抗生素	Rif				Km				Ap			
	0	20	50	100	0	20	50	100	0	20	50	100
菌株 BX-4	++	-	-	-	++	-	-	-	++	-	-	-

注:“++”表示生长良好;“-”表示没有生长。

Note: “++” means good growth; “-” means no growth.

1.2.2 耐药突变体菌株稳定性试验

耐药突变体菌株稳定性试验参照文献[9]。将耐药菌株在不含 Ap 的 NA 培养基上连续传代 18 次后,接种到牛肉膏蛋白胨液体培养基中培养,然后涂布于含 200 μg·mL⁻¹Ap 的 NA 培养基上,观察其生长情况;将低温(4 ℃)保存 2 个月的 BX-4' 菌株接种到含 200 μg·mL⁻¹Ap 的液体培养基中进行培养,待液体变混浊后稀释涂平板,观察是否有菌落出现。

经过上述两种不同方法的试验,结果都有丰满完

整的抗药菌株出现,说明所获耐药突变体菌株 BX-4' 具有良好的抗药稳定性。

1.2.3 耐药突变体菌株的生长曲线及对青枯菌的拮抗作用

将出发菌株 BX-4 及耐药突变体菌株 BX-4' 分别接种到牛肉膏蛋白胨液体培养基中, $200\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养, 每 4 h 取样测定其含菌量及发酵液 pH; 同时分别取 16 和 36 h 的突变体菌株发酵液用滤纸片法测定其对青枯菌(*Ralstonia solanacearum*)的抑制效果。

1.2.4 耐药突变体菌株在番茄根际的定殖研究及防病效果

通过盆栽试验检验耐药突变体菌株 BX-4' 在根际土壤的定殖情况及对番茄青枯病的防治效果。试验用盆为聚乙烯塑料盆, 每盆装土 4 kg, 试验设①空白对照(CK); ②BX-4(T1); ③BX-4'(T2) 3 个处理, 每处理接种量为 $10^6\text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ 土, 番茄移苗时通过菌液浸根接种, 剩余菌液平均浇到各移栽穴中, 每处理 3 次重复。番茄移栽 1 周后接种青枯菌 $3.0\times 10^5\text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ 土。分别在移栽第 0、5、10、20、30、40、50、60 d 取土样用含 $200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Ap 的 NA 培养基检测接入突变体菌株 BX-4' 数量。同时跟踪调查各处理发病情况, 计算病情指数, 具体方法参考文献[10]。

1.2.5 番茄根际土壤回收耐药突变体菌株与出发菌株 DNA 同源性比较

对从根际土壤回收的耐药突变体菌株 BX-4' 与出发菌株 BX-4 通过分子生物学方法进行 DNA 同源性比较。通过提取菌体 DNA, 用选择的引物进行 PCR 扩增, PCR 产物经纯化后测序, 用 BLAST 软件将所得序列与 GenBank 中已知的核酸序列进行同源性比较。

1.2.6 数据处理

文中数据采用 SAS 8.0 进行统计分析(SAS Institute, Gary, NC, USA); 图表制作采用 Excel 2003 软件(Microsoft Company, USA); 序列分析用 DNAMAN 软件(Version 4.0, Lynnon Biosoft)。

2 结果与分析

2.1 耐药突变体菌株 BX-4' 生长曲线及对青枯菌的抑制效果

耐药突变体菌株 BX-4' 经连续传代 18 次以后, 接种到液体培养基中, 其生长曲线见图 1。从图中可以看出, 经耐药处理后, 其生长趋势与出发菌株基本一致, 8 h 后进入对数生长期, 24 h 菌数达到最高峰,

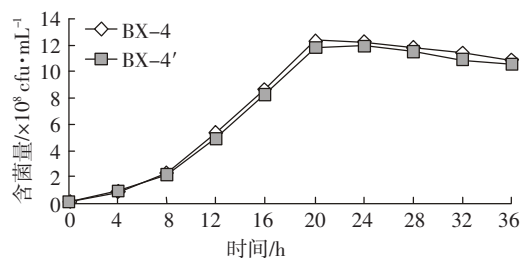


图 1 菌株生长曲线

Figure 1 The growth curve of BX-4 and BX-4'

为 $12.0\times 10^8\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$, 以后趋于平稳。同时从 pH 变化曲线(图 2)可知, 20 h 时发酵液中 pH 最低, 与菌数达到最高峰基本处于同一时期, 此后随着芽孢的形成, pH 逐渐回升。

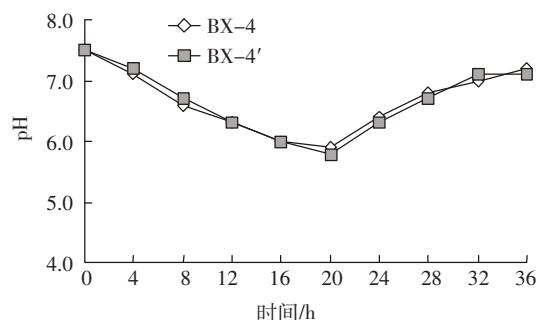


图 2 pH 变化曲线

Figure 2 The pH changing curve of BX-4 and BX-4'

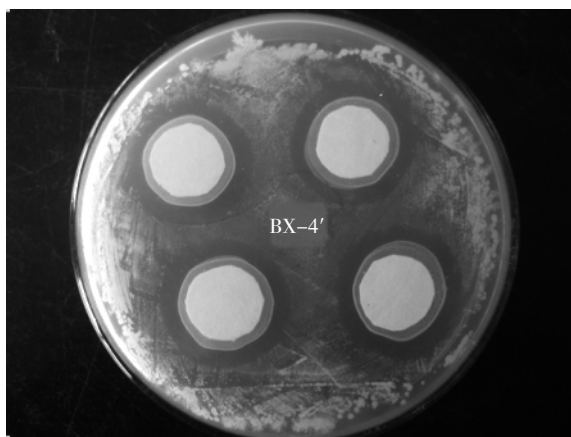
耐药突变体菌株 BX-4' 拮抗青枯菌试验结果(图 3)表明, 菌株 BX-4 经 $200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Ap 耐药处理后, 其抗病性质没有改变, 拮抗效果明显, 滤纸片周围有明显的抑菌圈, 同时 16 h 发酵液和 36 h 时的样品抑菌效果差异不大, 说明菌株抑菌作用的发挥不依赖芽孢的形成, 可能与菌株产生的代谢产物有关。

2.2 耐药突变体菌株 BX-4' 在番茄根际土壤的定殖

利用含氨苄青霉素的平板测定耐药突变体菌株 BX-4' 在番茄根际的定殖密度和动态变化规律(图 4)。结果显示, 接种突变体菌株后即开始在根际土壤迅速增殖, 20 d 后达到最高峰 ($1.34\times 10^8\text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ 干土), 此时番茄植株正处于营养生长旺盛期, 拮抗菌的大量繁殖为抑制青枯病发生奠定了基础; 此后随着气温的降低和植株进入生殖生长期, BX-4' 在根围土壤含量逐渐下降, 到 50 d 时降为 $5.1\times 10^7\text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ 干土, 并趋于平稳。

2.3 耐药突变体菌株 BX-4' 对番茄青枯病的防治效果

从表 3 结果可以看出, 两菌株单独使用时对青枯



图中滤纸片上为耐药突变体菌株发酵液,加量为 $100 \mu\text{L} \cdot \text{片}^{-1}$ (滤纸片直径 1 cm); 左边两滤纸片为 16 h 样品, 右边两滤纸片为 36 h 样品。

Note: The mutant fermentation solution was added $100 \mu\text{L}$ per piece (Diameter: 1 cm); The left was the samples fermented for 16 h, and the right was the samples fermented for 36 h.

图 3 耐药突变体菌株 BX-4' 对青枯菌的抑制作用

Figure 3 The disease-controlling effect of the mutant BX-4' on *Ralstonia solanacearum*

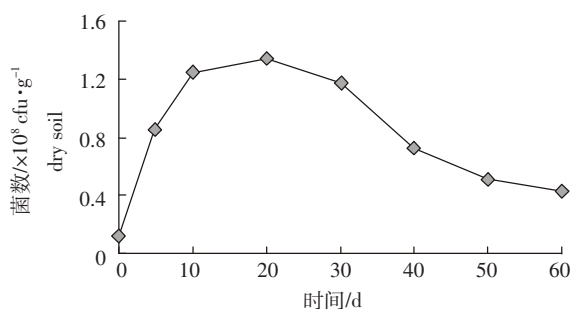


图 4 耐药突变体菌株 BX-4' 在番茄根围的动态变化

Figure 4 The dynamics of the mutant BX-4' in the tomato rhizosphere

表 3 耐药标记菌株 BX-4' 对番茄青枯病的防治效果

Table 3 The disease-controlling effect of the mutant BX-4' on tomato bacterial wilt

处理	病情指数		防病效果/%	
	40 d	60 d	40 d	60 d
CK	34.4b	90.6b		
T1	18.8a	53.1a	45.3	41.4
T2	16.9a	56.3a	50.9	37.9

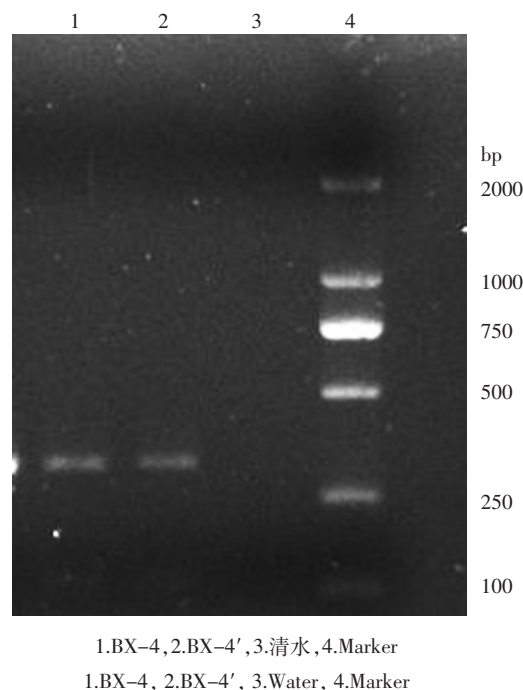
注: 同一栏中不同字母代表 Duncan's 多重比较差异显著 ($P \leq 0.05$)。

Note: Numbers with different letter in the same column show Duncan's significant differences at $P \leq 0.05$.

病均有较好的防治效果, 达 37.9%~50.9%, 40 d 时耐药突变体菌株 BX-4' 的防病要略好于出发菌株, 病情指数分别为 16.9 和 18.8, 与对照相比, 均达到差异显著水平。60 d 时对照的病情指数达到 90 以上, 而 BX-4 和 BX-4' 分别为 53.1、56.3, 与对照相比差异明显。表中数据表明, 出发菌株对青枯病的防病稳定性要好于突变体菌株, 但二者之间差异不大, 说明通过抗生素标记不影响菌株的抗病效果。

2.4 耐药突变体菌株 BX-4' 与出发菌株 BX-4 的 DNA 同源性比较

用含氨苄青霉素的 NA 培养基从根际土壤中回收突变体菌株, 经多次纯化, 提取其 DNA, 用 16S rRNA 基因的引物 L354/R674 对其扩增, 并与出发菌株 BX-4 比较。从图 5 可以看出, 两菌株的 DNA 条带位置基本一致, 分子量介于 300~350bp 之间, 对扩增产物进行纯化测序, 经 NCBI 的 BLAST 比对, 两菌株与短小芽孢杆菌的相似性均达到 99% 以上。



1.BX-4, 2.BX-4', 3.清水, 4.Marker
1.BX-4, 2.BX-4', 3.Water, 4.Marker

图 5 PCR 扩增电泳图

Figure 5 The electrophoresis map of PCR enlarging

3 结论与讨论

本研究通过浓度梯度法筛选出抗 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素突变体菌株 BX-4', 该突变体菌株具有耐药和遗传双重稳定性。盆栽试验结果表明, 该菌能成功在番茄根部定殖, 定殖数量表现出先升后降的趋势, 接种后即开始增殖, 20 d 时土壤中存活量达到最

高值 1.34×10^8 cfu·g⁻¹ 干土,以后逐渐下降,到 50 d 时趋于稳定,通过回收菌株并对其 DNA 测序,结果表明其与出发菌株同源性一致。同时应用试验表明,该突变体菌株对番茄青枯病具有比较明显的防治效果,防效可达 37.9%~50.9%。

关于拮抗菌的抗药性标记方法,目前大多采用含药培养液诱导法,也有人采用含药固体培养基诱导法^[7]。而本试验中先采用含药液诱导,然后经含药固体培养基加强其抗药性,通过此方法获得的耐药菌株其抗性稳定,经连续传代培养和低温长时间保存,仍然能在含高浓度($200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)的氨苄青霉素培养基上生长,因此有利于排除土著微生物中具有天然抗性菌株的干扰。此外,从本研究结果中还可以发现,短小芽孢杆菌在作物根际的定殖与抗病效果密切相关,这为揭示其防病机理及实际应用提供了科学根据。本研究中短小芽孢杆菌施入番茄土壤后其定殖数量表现出先升后降的趋势,这与以前相关研究结果一致^[11-13],但以前的研究只是停留在描述标记菌株在根际及植株体内的定殖效果及动态变化规律方面,并未对定殖结果结合其相应的功能进行深入分析。

本研究结果显示,短小芽孢杆菌突变株接入 20 d 后根围土壤中含量达到最高,并且自第 10 d 起到 30 d 时一直维持较高的水平,这说明在此时间段内拮抗菌数量最多、对病菌抑制力最强,是抑制青枯菌的最佳时期,这对指导该菌的适时施用具有重要的价值。在施肥防病研究中,施肥的数量与次数主要取决于其中拮抗微生物的定殖,定殖拮抗菌的数量多少直接影响其抗病效果,同时接入拮抗菌在土壤中大量存在的时间长短可作为接种该菌频次的依据。对番茄青枯病的防治,前期是关键,前期是病原菌开始滋生繁殖的时期,此时应尽可能创造一个土壤微生物多样性指数高的微域环境,以抑制病菌生长,因此根据短小芽孢杆菌在土壤中的定殖情况,可每隔 20 d 左右再次接种,这样可使其在土壤中长时间保持一个较高的定殖数量,保证拮抗作用的持久稳定,有效地抑制病菌繁殖生长。

参考文献:

- [1] Kloepper J W, Schroth M N. Plant growth-promoting rhizobacteria on radish[C]//Proceedings of 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. Gibert-Charey, Tours, France. 1978:879-882.
- [2] 张炳欣, 张 平. 根际引入微生物的检测[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2000, 26(6): 624-628.
- [3] Halfie M, Tu Y, Euskirchen G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression[J]. *Science*, 1994, 263: 802-805.
- [4] CHEN Zhong-Yi, ZHANG Jie, CAO Jing-Ping, et al. Construction of genetically engineered strains of *Bacillus subtilis* against insect pests and plant pathogens[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 1999, 15(2): 215-220.
- [5] 吴霁民, 顾本康, 傅正擎, 等. 内生菌 73a 在不同抗性品种棉花体内的定殖和消长动态研究[J]. 植物病理学报, 2001, 31(4): 289-294.
- [6] 蔡学清, 何 红, 胡方平. 双标记法测定枯草芽孢杆菌 BS-2 和 BS-1 在辣椒体内的定殖动态[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2003, 32(1): 41-45.
- [7] 郭小芳, 宗兆锋, 杨洪俊. 6 种放线菌抗药性标记及其在植株体内定殖能力测定[J]. 西北农业学报, 2005, 14(2): 69-73.
- [8] 游春平, 刘 任, 肖爱萍, 等. 拮抗细菌 Bio-d5 在香蕉根部定殖能力的测定[J]. 华中农业大学学报, 2008, 27(3): 363-366.
- [9] 吴胜春, 李良谟, 李振高, 等. 根际优势菌耐药菌株的获得及其 15N 标记[J]. 微生物学通报, 1994, 21(4): 195-198.
- [10] 方中达. 植物研究方法(第三版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [11] Wiehe W, Hoflich G. Survival of plant growth rhizosphere bacteria in the rhizosphere of different crops and migration to non-inoculated plants under field conditions in north-east Germany[J]. *Microbiol Res*, 1995, 150: 201-206.
- [12] 杨合同, 陈 凯, 李纪顺, 等. 重组巨大芽孢杆菌在小麦根际的定殖及对植物真菌病害的防治效果[J]. 山东科学, 2003, 16(3): 12-17.
- [13] 盛下放. 硅酸盐细菌 NBT 菌株在小麦根际定殖的初步研究[J]. 应用生态学报, 2003, 14(11): 1914-1916.

ZHANG Bing-xin, ZHANG Ping. Detection of introduced microorgan-