



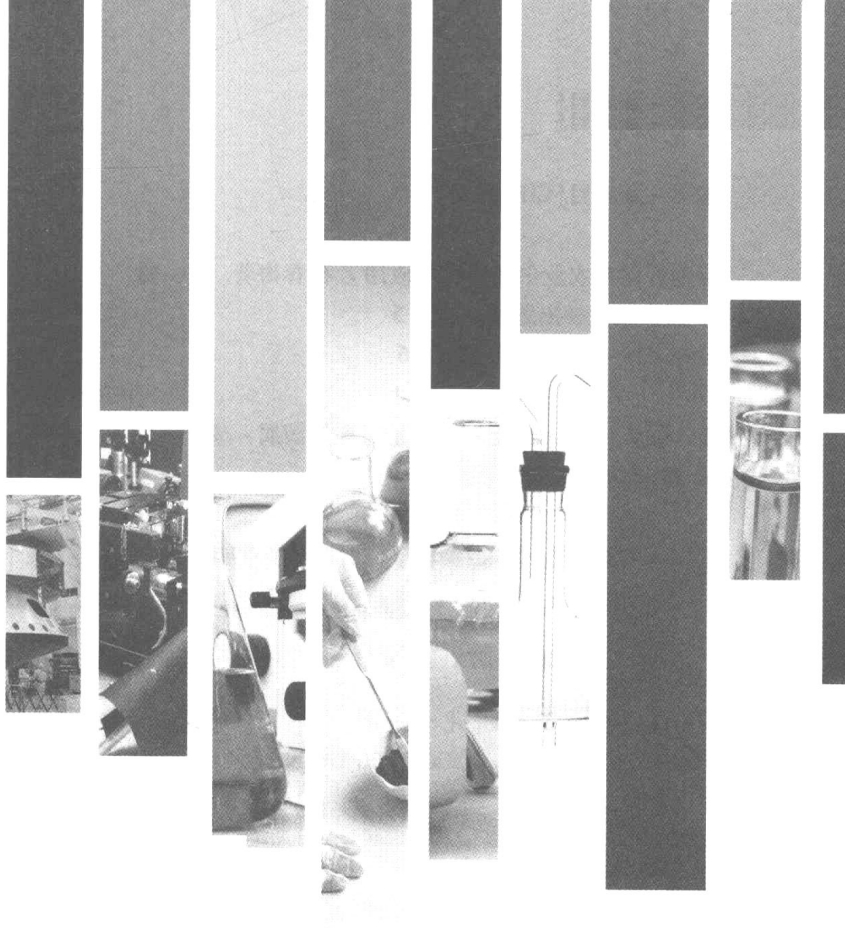
YABAO GANJUN ZAI NONGYE ZHONG DE
YANJIU YU YINGYONG

芽孢杆菌在农业中的 研究与应用

杜春梅◇著

 黑龙江大学出版社
HEILONGJIANG UNIVERSITY PRESS

YABAO GANJUN ZAI NONGYE ZHONG DE
YANJIU YU YINGYONG



芽孢杆菌在农业中的 研究与应用

杜春梅◇著

 黑龙江大学出版社
HEILONGJIANG UNIVERSITY PRESS

图书在版编目(CIP)数据

芽孢杆菌在农业中的应用 / 杜春梅著. -- 哈尔滨: 黑龙江大学出版社, 2013.5

ISBN 978-7-81129-501-6

I. ①芽… II. ①杜… III. ①芽孢杆菌属-应用-农业技术 IV. ①Q939.123

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 133703 号

芽孢杆菌在农业中的应用

YABAO GANJUN ZAI NONGYE ZHONG DE YANJIU YU YINGYONG

杜春梅 著

责任编辑 张永生 于丹
出版发行 黑龙江大学出版社
地 址 哈尔滨市南岗区学府路 74 号
印 刷 哈尔滨市石桥印务有限公司
开 本 880 × 1230 1/32
印 张 9.75
字 数 211 千
版 次 2013 年 5 月第 1 版
印 次 2013 年 5 月第 1 次印刷
书 号 ISBN 978-7-81129-501-6
定 价 26.00 元

本书如有印装错误请与本社联系更换。

版权所有 侵权必究

前 言

芽孢杆菌是自然界中广泛存在的细菌,不仅在土壤、植物根际等外界环境中广泛存在,还是植物体内常见的内生细菌,绝大多数对人类没有致病性。大多数芽孢杆菌菌株在工农业生产中发挥着重要的作用。尤其是近几十年来,随着现代社会中有机农业、生态农业、绿色农产品等各种新兴理念的普及,人们对自身健康、环境安全、有害生物综合治理、农业可持续发展的关注度越来越高,作为一种较为理想的微生物资源,芽孢杆菌在农业科学研究中也受到越来越广泛的关注。目前有些菌株已经在生产中得到应用,并取得了较好的社会效益和经济效益。

芽孢杆菌制剂虽然不能取代化学农药和肥料,但是在改善农药和肥料的结构上,起着至关重要的作用。而芽孢杆菌在农业上的推广和应用除了依靠人们生态意识的提高,更重要的是要通过科学研究,获得大量的菌种资源,并对芽孢杆菌进行高效菌株的选育,降低发酵成本,提高发酵控制水平,减少后处理过程中有效成分的损失,从而在资源和技术上达到高效价、低成本、规模化。

本书的前三章内容主要以科普的方式来介绍芽孢杆菌的基础知识及其在农业上的研究现状与应用领域,后七章的内容主

要通过笔者的一些科学研究实例来介绍研究芽孢杆菌常用的方法和技术手段,以期让更多的人了解芽孢杆菌在人类生活中的重要地位,并能给从事相关研究工作的人员提供一点参考。

由于笔者水平有限,本书仍有很多不足之处,敬请读者批评指正。

目 录

第 1 章 芽孢杆菌基础知识	1
1.1 芽孢杆菌的分类和进化	1
1.2 芽孢杆菌的营养与生长	20
1.3 芽孢杆菌的细胞结构	22
1.4 芽孢杆菌的遗传	26
1.5 芽孢杆菌的生态生理群	27
1.6 芽孢杆菌典型种的特征	31
1.7 芽孢杆菌的应用	38
第 2 章 芽孢杆菌在农业中的研究与应用	44
2.1 芽孢杆菌抗植物病原菌的研究与应用	44
2.2 芽孢杆菌抗植物寄生线虫的研究与应用	82
2.3 芽孢杆菌抗虫的研究与应用	87
2.4 芽孢杆菌生物防治的发展方向	93
2.5 芽孢杆菌解磷、解钾、固氮的研究与应用	94
2.6 芽孢杆菌降解有毒物质的研究与应用	99
第 3 章 芽孢杆菌的代谢产物	105
3.1 核糖体合成途径产生的抗菌物质	105
3.2 非核糖体合成途径产生的抗菌物质	112

第 4 章	两株生防芽孢杆菌的鉴定	132
4.1	形态学观察	133
4.2	生理生化特征测定	135
4.3	16S rDNA 序列分析	136
4.4	鉴定结果	143
第 5 章	侧孢短芽孢杆菌的诱变选育	144
5.1	出发菌株的筛选	144
5.2	抑菌谱的测定	146
5.3	生长周期的确定	147
5.4	效价值的测定方法	148
5.5	菌株的诱变选育	150
第 6 章	芽孢杆菌发酵条件的优化	157
6.1	均匀设计法优化侧孢短芽孢杆菌 BL-1 的 发酵条件	158
6.2	响应面法优化枯草芽孢杆菌 HNDF2 发酵 条件	170
第 7 章	侧孢短芽孢杆菌抗菌物质的分离纯化	184
7.1	发酵液的预处理	184
7.2	发酵液的理化特性分析	185
7.3	薄层层析法分析抗菌物质的组分	186
7.4	硫酸铵沉淀法分离抗菌物质	189
7.5	CM-Sephrose Fast Flow 离子交换层析分离 抗菌物质	191
7.6	凝胶层析法分离抗菌物质	194
7.7	SDS-PAGE 电泳分离抗菌蛋白	198

第 8 章	芽孢杆菌共培养的研究	203
8.1	混菌发酵液的制备	204
8.2	混菌与单菌发酵液室内抑菌效果对比分析	204
8.3	混菌和单菌发酵动态过程的对比分析	209
8.4	混菌发酵中优势菌的确定	211
8.5	混菌与单菌发酵液理化特性的对比分析	215
8.6	HNDF2 代谢产物对 BL-21 产抗菌物质的影响	231
第 9 章	抗大豆根病芽孢杆菌种衣剂的研发	239
9.1	试验材料	239
9.2	生物种衣剂活性成分的筛选	240
9.3	种衣剂助剂的选择	246
9.4	种衣剂产品粗加工及各项指标的测定	254
9.5	室内盆栽防效试验	257
9.6	田间防效试验	259
第 10 章	侧孢短芽孢杆菌降解有机磷农药的作用	264
10.1	水胺硫磷降解率的测定	266
10.2	菌株 BL-21 降解有机磷农药特性的研究	268
10.3	菌株 BL-21 降解水胺硫磷条件的研究	271
10.4	菌株 BL-21 降解有机磷农药的酶的研究	277
10.5	菌株 BL-21 的质粒与降解有机磷农药关系的研究	282
10.6	水胺硫磷降解产物及降解途径的研究	287
附 录		293
附录 1	菌种来源	293

附录2 主要药品与试剂	293
参考文献	295
后 记	300

第1章 芽孢杆菌基础知识

在自然界中,芽孢杆菌是普遍存在的,多数为腐生菌。同其他微生物相比,芽孢杆菌有非凡的抵抗力,能产生对热、紫外线、电磁辐射和某些化学药品有很强抗性的芽孢,因此可以耐受各种不良环境,如其可以在 pH 值为 2.0~3.0 的地方生存,也可以在温度 75~80 ℃ 的条件下存在,即使在南极寒冷的冰雪中也能见到它们的踪迹。

芽孢非同寻常的抵抗力,芽孢的形成周期,芽孢和蛋白质晶体对许多昆虫的毒性,抗生素的产生以及炭疽芽孢杆菌等,一直吸引着众多科学家的注意。人们对该菌属的研究越来越深入,兴趣越来越浓厚。

芽孢杆菌中存在很多有特殊功能的菌株,它们在工业、农业、医学、军事等科学研究中有较高的应用价值。

1.1 芽孢杆菌的分类和进化

从分离纯培养至今,人们对芽孢杆菌的认识和研究已有 100 多年的历史。1835 年 Ehrenberg 曾经描述并命名了一种属于纤毛虫纲的“枯草弧菌”,成为第一个发现和描述芽孢杆菌属

的模式种——枯草芽孢杆菌的人。1872年,德国 Breslau 大学植物生理研究所的 Cohn 识别并正式命名了枯草芽孢杆菌。这种生物被用来代表一类大量并且多样的细菌——芽孢杆菌,芽孢杆菌属自此创建。枯草芽孢杆菌成为芽孢杆菌属最先发现和命名的种,也是芽孢杆菌属的模式菌株。该科的最明显特征就是产生芽孢(Endospore),芽孢是在菌体细胞内形成的折光率高的休眠体。在1872年的一篇文章中,Cohn把细菌分为4个类群,其中,他将定义的新属 *Bacillus* 归入第三群。*Bacillus* 的特征为:细胞伸展成为非弯曲的细丝状。该属的第一个种为枯草芽孢杆菌,实际上就是 Ehrenberg 所说的“枯草弧菌”,*B. anthracis* 也归为该属。1877年 Cohn 证明了枯草芽孢杆菌的芽孢有耐热性。同年,Koch证实了炭疽芽孢杆菌的生活史是从营养细胞到抗性孢子再到营养细胞。

1895年,Fischer等建立了芽孢杆菌科 Bacillaceae,其中有5个形成芽孢的属。*Bacillus* 是芽孢杆菌中命名最早的一个属,与其他形成芽孢的细菌的最大区别在于该属的微生物是一大群需氧或兼性厌氧的、革兰氏阳性的(目前发现有个别为革兰氏阴性的)、产生过氧化氢酶的化能异养菌。最初芽孢杆菌科中的其他能形成芽孢的属是芽孢乳杆菌属(*Sporolactobacillus*)、梭菌属(*Clostridium*)、脱硫肠状菌属(*Desulfotomaculum*)、芽孢八叠球菌属(*Sporosarcina*)。

在《伯杰氏系统细菌学手册》(1986)中,*Bacillus* 被描述为产生芽孢的 G^+ (革兰氏阳性)杆菌或球菌。分为34个种(表1-1中的前34号)。在此版中,大部分芽孢杆菌的种均归在芽孢杆菌属内。分类阶元为芽孢杆菌科(Bacillaceae),芽孢杆菌

属(*Bacillus*)。自1987年至1996年发现的芽孢杆菌见表1-1中35号至95号。

表1-1 芽孢杆菌中文名与拉丁学名对照表

序号	中文名	拉丁学名
1	枯草芽孢杆菌	<i>B. subtilis</i>
2	酸温芽孢杆菌	<i>B. acidocaldarius</i>
3	嗜碱芽孢杆菌	<i>B. alcalophilus</i>
4	蜂房芽孢杆菌	<i>B. alvei</i>
5	炭疽芽孢杆菌	<i>B. anthracis</i>
6	产氮芽孢杆菌	<i>B. azotoformans</i>
7	栗褐芽孢杆菌	<i>B.adius</i>
8	短芽孢杆菌	<i>B. brevis</i>
9	蜡状芽孢杆菌	<i>B. cereus</i>
10	环状芽孢杆菌	<i>B. circulans</i>
11	凝结芽孢杆菌	<i>B. coagulans</i>
12	挑剔芽孢杆菌	<i>B. fastidiosus</i>
13	坚强芽孢杆菌	<i>B. firmus</i>
14	圆孢芽孢杆菌	<i>B. globisporus</i>
15	异常芽孢杆菌	<i>B. insolitus</i>
16	幼虫芽孢杆菌	<i>B. larvae</i>
17	侧孢芽孢杆菌	<i>B. laterosporus</i>
18	缓病芽孢杆菌	<i>B. lentimorbus</i>
19	缓慢芽孢杆菌	<i>B. lentus</i>
20	地衣芽孢杆菌	<i>B. licheniformis</i>

续表

序号	中文名	拉丁学名
21	浸麻芽孢杆菌	<i>B. macerans</i>
22	马阔里芽孢杆菌	<i>B. macquariensis</i>
23	海洋芽孢杆菌	<i>B. marinus</i>
24	巨大芽孢杆菌	<i>B. megaterium</i>
25	蕈状芽孢杆菌	<i>B. mycoides</i>
26	泛酸芽孢杆菌	<i>B. pantothenicus</i>
27	巴氏芽孢杆菌	<i>B. pasteurii</i>
28	多黏芽孢杆菌	<i>B. polymyxa</i>
29	日本金龟子芽孢杆菌	<i>B. popilliae</i>
30	短小芽孢杆菌	<i>B. pumilus</i>
31	施氏芽孢杆菌	<i>B. schlegelii</i>
32	球形芽孢杆菌	<i>B. sphaericus</i>
33	嗜热脂肪芽孢杆菌	<i>B. stearothermophilus</i>
34	苏云金芽孢杆菌	<i>B. thuringiensis</i>
35	酸土芽孢杆菌	<i>B. acidoterrestris</i>
36	黏醇芽孢杆菌	<i>B. agaradhaerans</i>
37	农田芽孢杆菌	<i>B. agri</i>
38	溶藻芽孢杆菌	<i>B. alginolyticus</i>
39	解淀粉芽孢杆菌	<i>B. amyloliquefacien</i>
40	溶维生素 B ₁ 芽孢杆菌	<i>B. aneurinolyticus</i>
41	假坚强芽孢杆菌	<i>B. pseudofirmus</i>
42	冷解糖芽孢杆菌	<i>B. psychrosaccharolyticus</i>

续表

序号	中文名	拉丁学名
43	鲁氏芽孢杆菌	<i>B. reuszeri</i>
44	简单芽孢杆菌	<i>B. simpler</i>
45	史氏芽孢杆菌	<i>B. smithii</i>
46	耐热孢芽孢杆菌	<i>B. sporothermodurans</i>
47	热嗜氧芽孢杆菌	<i>B. thermoaerophilus</i>
48	热解淀粉芽孢杆菌	<i>B. thermoamylovorans</i>
49	黑棕芽孢杆菌	<i>B. atrophaeus</i>
50	解苯芽孢杆菌	<i>B. benzoevorans</i>
51	波城芽孢杆菌	<i>B. borstelensis</i>
52	嗜碳芽孢杆菌	<i>B. carboniphilus</i>
53	中央芽孢杆菌	<i>B. centrosporus</i>
54	溶几丁芽孢杆菌	<i>B. chitinolyticus</i>
55	铍子芽孢杆菌	<i>B. choshinensis</i>
56	软骨素芽孢杆菌	<i>B. chondroitinus</i>
57	克拉克氏芽孢杆菌	<i>B. clarkii</i>
58	克劳斯氏芽孢杆菌	<i>B. clausii</i>
59	康氏芽孢杆菌	<i>B. cohnii</i>
60	溶菌多糖芽孢杆菌	<i>B. curdlanolyticus</i>
61	环庚烷芽孢杆菌	<i>B. cycloheptanicus</i>
62	蜥蜴芽孢杆菌	<i>B. dipsosauri</i>
63	Ehime 氏芽孢杆菌	<i>B. ehimensis</i>
64	柔芽孢杆菌	<i>B. flexus</i>

续表

序号	中文名	拉丁学名
65	美丽芽孢杆菌	<i>B. formosus</i>
66	纺锤芽孢杆菌	<i>B. fusiformis</i>
67	嗜半乳糖芽孢杆菌	<i>B. galactophilus</i>
68	吉氏芽孢杆菌	<i>B. gibsonii</i>
69	解葡聚糖芽孢杆菌	<i>B. glucanolyticus</i>
70	戈登氏芽孢杆菌	<i>B. gordonae</i>
71	哈乌帕拉斯芽孢杆菌	<i>B. halmपालus</i>
72	嗜盐碱芽孢杆菌	<i>B. haloalkaliphilus</i>
73	嗜盐脱氮芽孢杆菌	<i>B. halodenitrificans</i>
74	耐热芽孢杆菌	<i>B. halodurans</i>
75	堀越氏芽孢杆菌	<i>B. horikoshii</i>
76	土下芽孢杆菌	<i>B. infernus</i>
77	嗜热芽孢杆菌	<i>B. kauslophilus</i>
78	神户芽孢杆菌	<i>B. kobensis</i>
79	左旋乳糖芽孢杆菌	<i>B. laevolacticus</i>
80	甲醇芽孢杆菌	<i>B. methanolicus</i>
81	米氏芽孢杆菌	<i>B. migulans</i>
82	莫哈韦氏芽孢杆菌	<i>B. mojaviensis</i>
83	长崎芽孢杆菌	<i>B. naganoensis</i>
84	烟酸芽孢杆菌	<i>B. niacini</i>
85	奥列伦芽孢杆菌	<i>B. oleronius</i>
86	苍白芽孢杆菌	<i>B. pallidus</i>

续表

序号	中文名	拉丁学名
87	副短芽孢杆菌	<i>B. parabrevis</i>
88	皮城芽孢杆菌	<i>B. peoriae</i>
89	嗜热链状芽孢杆菌	<i>B. thermocatenuatus</i>
90	嗜热污水芽孢杆菌	<i>B. thermocloaceae</i>
91	热芽孢杆菌	<i>B. thermoleovorans</i>
92	热圆芽孢杆菌	<i>B. thermorphaericus</i>
93	解硫胺芽孢杆菌	<i>B. thiaminolyticus</i>
94	花城芽孢杆菌	<i>B. vallismortis</i>
95	威氏芽孢杆菌	<i>B. vedderi</i>

自20世纪90年代以来,由于16S rRNA及16S rDNA序列分析技术的发展、推广和应用,芽孢杆菌的分类研究取得了重大突破,许多研究者根据16S rRNA基因部分序列或全序列分析的结果,对芽孢杆菌及相关细菌进行了系统发育研究及分类鉴定研究。1991年,Ash等人研究了芽孢杆菌属51个种的16S rRNA的小亚基序列,并分析了它们的系统发育地位,发现芽孢杆菌属至少有5个独立的系统发育分支。这个结果引发了人们对芽孢杆菌属系统发育分类的研究。1992年以后,由于分类技术的进步,某些细菌陆续从芽孢杆菌属中分出,另立为7个新属(见表1-2),有脂环酸芽孢杆菌属(*Alicyclobacillus*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、喜盐芽孢杆菌属(*Halobacillus*)、分支(枝)芽孢杆菌属(*Virgibacillus*)、短芽孢杆菌属(*Brevibacillus*)、解硫胺素芽孢杆菌属(*Aneurinibacillus*)、细长(薄壁)芽孢杆菌属(*Gracilibacillus*)。

表 1-2 菌种中文名与拉丁学名对照表

属名		种名	
中文名	拉丁学名	中文名	拉丁学名
脂环酸芽孢杆菌属	<i>Alicyclobacillus</i>	酸热脂环酸芽孢杆菌	<i>A. acidocaldarius</i>
		酸土脂环酸芽孢杆菌	<i>A. acidoterrestriis</i>
		环庚基脂环酸芽孢杆菌	<i>A. cycloheptanicus</i>
解硫酸素芽孢杆菌属	<i>Aneurinibacillus</i>	解硫酸素芽孢杆菌	<i>A. aneurinolyticus</i>
		米氏溶硫酸素芽孢杆菌	<i>A. migulanus</i>
短芽孢杆菌属	<i>Brevibacillus</i>	农田短芽孢杆菌	<i>B. agri</i>
		波茨坦短芽孢杆菌	<i>B. borstelensis</i>
		短短芽孢杆菌	<i>B. brevis</i>
		中央短芽孢杆菌	<i>B. centrosporus</i>
		铍子短芽孢杆菌	<i>B. choshinensis</i>
		美丽短芽孢杆菌	<i>B. formosus</i>
		侧孢短芽孢杆菌	<i>B. laterosporus</i>
		副短短芽孢杆菌	<i>B. parabrevis</i>
		鲁氏短芽孢杆菌	<i>B. reuszeri</i>
		嗜热红色短芽孢杆菌	<i>B. thermoruber</i>
类芽孢杆菌属	<i>Paenibacillus</i>	溶藻酸类芽孢杆菌	<i>P. alginoliticus</i>
		蜂房类芽孢杆菌	<i>P. alvei</i>
		解淀粉类芽孢杆菌	<i>P. amylolyticus</i>
		蜜蜂类芽孢杆菌	<i>P. apiarius</i>