

蚯蚓粪中放线菌分离及其抗菌活性研究

汪学军^{1,2*}, 闫双林^{1,2}, 闵长莉^{1,2}, 杨艳¹

(1. 皖西学院 生物与制药工程学院, 安徽 六安 237012;

2. 皖西学院 大别山植物内生真菌资源研究中心, 安徽 六安 237012)

[摘要] 采用平板涂布法分离蚯蚓粪中的放线菌, 采用琼脂块法初步研究了蚯蚓粪中放线菌的抗菌活性, 通过形态观察、生化特性和 16S rDNA 基因序列分析对抗菌活性较强的菌株进行鉴定。实验结果表明, 从蚯蚓粪中共分离到放线菌 26 株, 其中 16 株对指示菌株有抗菌活性, 占分离放线菌总数的 61.54%; 菌株 QYF12、QYF22 对藤黄八叠球菌 *Micrococcus luteus* 具有较强的拮抗作用, 其抑菌圈直径分别为 27、31 mm; 菌株 QYF26 对枯草芽孢杆菌的抗菌活性较强, 抑菌圈直径为 21 mm。菌种鉴定结果表明, 菌株 QYF12 为教酒链霉菌 *Streptomyces chartreusis*, QYF22 为吸水链霉菌奥萨霉素亚种 *S. ossamyceticus*, QYF26 为灭癌素链霉菌 *S. gancidicus*, 该研究为下一步分离抗菌物质用于生物防治提供了理论依据。

[关键词] 蚯蚓粪; 抗菌活性; 放线菌分离; 鉴定

Isolation and antimicrobial activities of actinomycetes from vermicompost

WANG Xue-jun^{1,2*}, YAN Shuang-lin^{1,2}, MIN Chang-li^{1,2}, YANG Yan¹

(1. College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, West Anhui University, Lu'an 237012, China;

2. Research Center for Endophytic Fungi Resources of Dabie Mountain, West Anhui University, Lu'an 237012, China)

[Abstract] In this paper, actinomycetes were isolated from vermicompost by tablet coating method. Antimicrobial activities of actinomycetes were measured by the agar block method. Strains with high activity were identified based on morphology and biochemical characteristics, as well as 16S rDNA gene sequence analysis. The results showed that 26 strains of actinomycetes were isolated, 16 of them had antimicrobial activities to the test strains which accounts for 61.54% of all strains. Among the 16 strains, the strain QYF12 and QYF22 had higher antimicrobial activity to *Micrococcus luteus*, with a formed inhibition zone of 27 mm and 31 mm, respectively. While the strain QYF26 had higher antimicrobial activity to *Bacillus subtilis*, and the inhibition zone diameter was 21 mm. Based on the identification of strains with high activity, the strain QYF12 was identified as *Streptomyces chartreusis*, the strain QYF22 was *S. ossamyceticus* and the strain QYF26 was *S. gancidicus*. This study provided a theoretical basis for further separate antibacterial product used for biological control.

[Key words] vermicompost; antimicrobial activity; actinomycetes isolated; identification

doi: 10.4268/cjcm20150408

蚯蚓粪是蚯蚓对其生活环境周围的有机物质进行利用和降解的产物, 是一种含有多孔团粒状结构的细碎类物质。该结构决定了蚯蚓粪具有许多良好的物理学特性, 如疏松通气、维持适当水分和对周围有机物质的吸收和运输能力等^[1]。蚯蚓在代谢

的过程中会分泌降解有机物的酶类物质, 如甲壳素酶、分解脂肪酶、蛋白质水解酶和淀粉水解酶等, 能有效地促进复杂大分子物质降解转化为小分子结构^[2]。蚯蚓粪中含有丰富的放线菌、细菌及真菌, 研究发现这些微生物既可以让复杂物质矿化变成易

[收稿日期] 2014-08-27

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31100019); 安徽省高等学校省级自然科学研究重点项目(KJ2013A266); 六安市定向委托皖西学院市级研究项目(2012LWA019)

[通信作者] * 汪学军, 副教授, 研究方向为微生物及代谢产物的应用, Tel: (0564) 3305073, E-mail: xjwang@163.com

• 614 •

于被植物吸收的有效物质,同时又合成了一些具有生物活性的物质,如抗菌物质、氨基酸以及糖等,这些物质成分赋予了蚯蚓粪具有一些特殊的性质^[3]。近年来,在环境保护方面,人们研究的热点主要集中在利用蚯蚓资源化处理污泥、粪便、工业废弃物和除臭等^[4-6]。在农业方面,蚯蚓粪作为一种优质生态肥料可用于促进作物的生长、增强植物的抗逆性和改善土壤土质等方面^[7-11],但有关从蚯蚓粪中分离微生物并对其代谢产物进行抑菌活性的研究还很少见。据文献资料报道,有学者已经从蚯蚓粪中分离出2株抑菌谱广的拮抗放线菌O103A、O104A,该2株菌在蔬菜苗期病害的控制中起重要作用^[12]。也有报道从蚯蚓粪中分离出54株具有产酸性能的菌株,其中6个菌株对大肠杆菌具有拮抗作用^[13]。本研究主要以新鲜的蚯蚓粪为研究对象,对其中的放线菌进行分离及抑菌活性的研究,并对抗菌效果较好的3株放线菌进行初步的分类鉴定,以期对蚯蚓粪中的放线菌用于生物防治提供更多的理论支持。

1 材料

采集时间为2013年8月16日,挑选蚯蚓刚产生的尚未干燥,颜色为黑色,大小均匀的新鲜蚯蚓粪便,用镊子轻轻夹入无菌的纸袋中,带回实验室进行分离。采集地点皖西学院校园的竹林内。

藤黄八叠球菌 *Micrococcus luteus*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、大肠杆菌 *Escherichia coli*、黑曲霉 *Aspergillus niger* 均由本实验室保存的菌种。

放线菌分离培养基为改良高氏2号培养基^[14];放线菌纯化和菌种保存培养基为高氏1号培养基;细菌抗菌活性测定采用牛肉膏蛋白胨培养基;真菌抗菌活性测定采用马丁氏培养基^[15]。

2 方法

2.1 蚯蚓粪预处理

采回的蚯蚓粪连同纸袋放入120℃的烘箱内进行干燥加热处理1h后,用试剂瓶轻轻把蚯蚓粪碾成粉末。在装有玻璃珠的90 mL无菌生理盐水锥形瓶中加入10 g蚯蚓粪粉末,同时,向瓶中滴加1 mL 10%的石炭酸,置于摇床上震荡1h,充分混匀。

2.2 蚯蚓粪放线菌的分离

取1 mL蚯蚓粪悬液至装有9 mL无菌生理盐水的试管中,充分震荡摇匀后,制成 1×10^{-1} 倍蚯蚓粪悬液,按同样方法依次稀释成 1×10^{-2} 、 1×10^{-3} 倍蚯蚓粪悬液。分别用无菌吸量管吸取 1×10^{-1} 、 $1 \times$

10^{-2} 、 1×10^{-3} 倍蚯蚓粪悬液0.2 mL置于改良高氏2号培养基平板中央,用玻璃涂布器涂抹均匀。每个浓度做3块平板,倒置于28℃恒温恒湿培养箱中培养14 d。

2.3 放线菌的纯化与菌种保存

把2.2培养蚯蚓粪悬液涂布平板每2 d观察1次,并把新长出的放线菌接种到高氏1号培养基平板上进行纯化培养,如果传代的平板菌落不纯,继续接种、传代培养,直至菌落大小、颜色和形状等特征一致;并把纯化的菌落接种至高氏1号培养基斜面上进行菌种编号,置于4℃低温保存。

2.4 蚯蚓粪放线菌抗菌活性测定

指示菌平板的制备,分别吸取0.5 mL的 *M. luteus*、*B. subtilis*、*E. coli* 菌悬液置于50 mL已熔化后冷却至45℃左右牛肉膏蛋白胨培养基中迅速摇匀后倒在直径为150 mm培养皿中,制备成混菌平板;同样的方法吸取 *A. niger* 的菌悬液至马丁氏培养基中,制备成混菌平板。将2.3分离纯化到的所有放线菌分别接种到高氏1号平板上于28℃培养7 d后,分别用内径为6 mm的无菌打孔器制备放线菌菌饼,置于4种指示菌平板的对应的位置处进行抗菌实验^[16]。*M. luteus*、*B. subtilis*、*E. coli* 的指示菌置于37℃的培养箱中培养24 h, *A. niger* 平板置于28℃的培养箱中培养72 h。观察并记录实验现象和实验结果。

2.5 蚯蚓粪中抗菌活性放线菌菌株鉴定

根据2.4抗菌活性筛选结果,选取有较高抗菌活性的放线菌菌株进行形态学和分子生物学鉴定。

2.5.1 形态培养特征、生理生化特性和碳源利用情况的研究 将放线菌菌株以划线接种至高氏平板上,在划线部位以45°斜插入盖玻片于28℃进行培养5~20 d,定期显微观察并记录形态特征^[17]。参照Shirling^[18]的方法对其培养特征、生理生化特性和碳源的利用情况进行研究并记录结果。

2.5.2 分子生物学鉴定 DNA提取和PCR扩增参照Chun等人的方法^[19]。16S rDNA序列PCR扩增采用保守引物1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')和27F(5'-AGTTTGATCMTGGCTCAG-3')。PCR扩增产物由上海生工生物工程有限公司完成纯化和测序工作。

序列测定结果在Bankit上依次完成序列提交和菌株的相关数据、选取并下载与目标菌株测定序

列相似性高的菌株系列;目标菌株序列和相似性高的菌株序列用 Clustal X 1.81 软件进行序列比对;最后采用 MEGA 5.0 软件构建系统发育树。

3 结果和分析

3.1 蚯蚓粪中放线菌分离

在改良高氏 2 号培养基平板上选取的菌落小、较为干燥、菌落不透明、带有明显的泥腥味、与培养基结合较为紧密的菌落,并且在显微镜下观察为丝状交织的菌丝结构,因此,能够确认分离到的微生物均为放线菌,而不是细菌或霉菌。

由改良高氏 2 号平板分离,高氏 1 号平板纯化,共分离得到放线菌 26 株,依次编号为 QYF01 ~ QYF26,并在高氏 1 号斜面上保藏。

3.2 具有抗菌活性蚯蚓粪放线菌测定

通过对 4 种指示菌株的抗菌实验,26 株放线菌中共有 16 株能对 1 种或几种指示菌具有抗菌效果,占总分离放线菌的 61.54%,具体抗菌活性见表 1、图 1。由表 1 可以看出,蚯蚓粪中所分离出的放线菌对 *M. luteus* 的抗菌效果最好,共有 15 株菌具有不同的抗菌能力,以 QYF22、QYF12 抗菌能力最强,其抑菌圈直径分别为 31、27 mm;其次,分离出的放线菌对 *B. subtilis* 抗菌效果较好,共有 9 株菌具有不同的抗菌能力,以 QYF26 抗菌能力最强,其抑菌圈直径分别为 21 mm;但是所分离得到的放线菌对指示菌 *E. coli*、*A. niger* 抗菌能力最差,分别有 2、3 株,并且形成的抑菌圈直径也较小。

3.3 具有较强抗菌活性 3 株放线菌鉴定

3.3.1 放线菌的形态特征 QYF12 在高氏 1 号平板上气生菌丝为灰色,基内菌丝为浅黄色,孢子丝为较为紧密的螺旋形,螺旋 3~7 环,孢子的表面粗糙、呈椭圆形,产生黄色可溶性色素。QYF22 气生菌丝为白色,基内菌丝无色,孢子丝为紧密的螺旋形,螺旋 3~5 环,孢子的表面光滑、呈长圆形,无可溶性色素产生。QYF26 为灰褐色气生菌丝,基内菌丝为黄色,孢子丝为波曲状、较长,孢子的表面粗糙、呈球状,产生黄色可溶性色素。

3.3.2 菌株的培养特征 菌株在 8 种不同培养基上培养特征见表 2。该菌株气生菌丝颜色以白色占优势,产色素居多。

3.3.3 生理生化特性和碳源的利用 3 株放线菌生理生化和碳源利用实验结果见表 3。3 株放线菌在 18~37℃ 均可正常生长,50℃ 以上几乎不能生

表 1 蚯蚓粪放线菌的抗菌活性

Table 1 Antimicrobial activity of actinomycetes from vermicompost

菌株编号	抑菌圈直径/mm			
	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Aspergillus niger</i>
QYF01	16	-	18	-
QYF02	8	-	-	-
QYF03	20	11	17	-
QYF04	10	-	7	-
QYF05	-	-	-	-
QYF06	10	-	14	9
QYF07	11	-	12	-
QYF08	14	-	8	-
QYF09	15	-	-	-
QYF10	19	-	-	-
QYF11	-	-	-	-
QYF12	27	-	-	-
QYF13	-	-	-	-
QYF14	-	-	-	-
QYF15	-	-	-	16
QYF16	23	-	-	-
QYF17	-	-	-	-
QYF18	-	-	-	-
QYF19	-	-	-	-
QYF20	-	-	-	-
QYF21	-	-	-	-
QYF22	31	-	7	-
QYF23	25	14	-	10
QYF24	9	-	7	-
QYF25	-	-	-	-
QYF26	23	-	21	-

注“-”无抗菌活性。

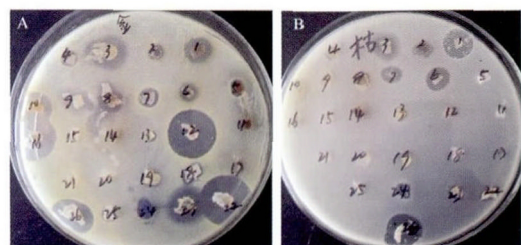


图 1 放线菌所形成抗菌效果
Fig. 1 Antimicrobial effect of actinomycetes

图 1 放线菌所形成抗菌效果

Fig. 1 Antimicrobial effect of actinomycetes

长;菌株 QYF12、QYF26 最适生长温度为 28℃、菌株 QYF22 为 30℃。只有菌株 QYF26 可使牛奶凝固;在明胶液化方面,菌株 QYF22 不能液化;菌株 QYF12 不能使牛奶酪化;菌株 QYF26 不能产生 H₂S

表2 3株放线菌培养特征

Table 2 The cultural characteristics of three actinomycetes strains

培养基	气生菌丝			基内菌丝			色素		
	QYF12	QYF22	QYF26	QYF12	QYF22	QYF26	QYF12	QYF22	QYF26
察氏平板	白色	无色	灰色	无色	白色	灰褐色	无色	棕色	黄色
甘油天门冬酰胺平板	蓝色	白色	灰白色	无色	淡黄色	褐色	无色	无色	无色
葡萄糖天门冬酰胺平板	蓝灰色	微白色	灰色	淡黄色	白色	灰色	黄色	无色	微黄色
无机盐淀粉平板	白色	灰白色	褐色	无色	白色	黄褐色	无色	灰色	褐色
马铃薯浸汁琼脂平板	灰色	白色	灰色	无色	褐色	黄褐色	无色	褐色	微红色
燕麦片平板	淡蓝色	灰褐色	灰白色	无色	灰色	淡黄色	无色	灰色	无
营养平板	无气丝	微白色	灰褐色	无色	灰黄色	白色	黄色	褐色	淡黄色
酵母膏麦芽膏平板	淡蓝色	灰褐色	白色	无色	灰白色	淡黄色	无色	褐色	无色

和黑色素。菌体生长适宜 pH 5.0 ~ 9.0 ,最适生长 pH 7.0。

表3 3株放线菌生理生化特征和碳源的利用情况

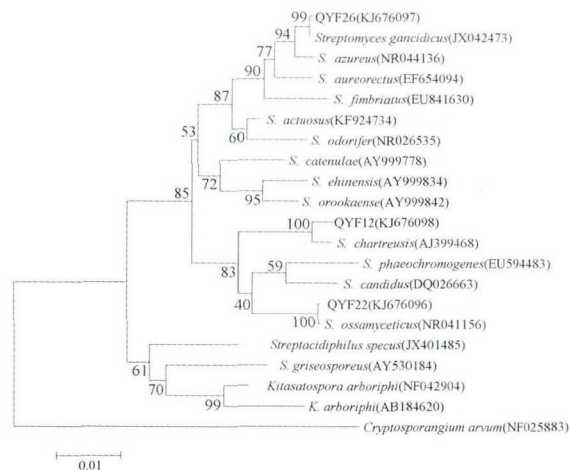
Table 3 The physiological and biochemical characteristics and the carbon utilization of three actinomycetes strains

放线菌	生理生化								碳源利用									
	明胶 液化	牛奶 凝固	牛奶 胨化	黑色素 产生	淀粉 水解	H ₂ S 产生	最适生长 pH	最适生长 温度/°C	革兰氏 染色	D- 木糖	D- 果糖	L- 阿拉伯糖	麦芽 糖	蔗糖	甘露 糖	D- 葡萄糖	L- 肌醇 山梨醇	L- 乳糖
QYF12	+	-	+	++	++	+	7.4	28	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+
QYF22	-	-	-	+	+	+	7	30	++	-	++	+	+	-	++	++	+	+
QYF26	+	+	-	-	+	-	7	28	++	+	++	++	+	-	+	++	+	++

3株放线菌碳源利用方面的特性: 菌株 QYF12 可以利用所有实验项目, 但是对 L-山梨醇和乳糖利用效果较差; 菌株 QYF22 不能利用 D-木糖、蔗糖和 L-山梨醇; 菌株 QYF26 不能利用蔗糖。表明 3 株放线菌对碳源利用情况是比较广泛的。

3.3.4 16S rDNA 序列测定和系统发育树的建立

3株放线菌菌株 QYF12 ,QYF22 ,QYF26 经测序后的 16S rDNA 序列的核苷酸全长分别为 1 384 ,1 405 ,1 383 bp; 提交到 GenBank 的 Bankit 后得到的基因登录号依次为 KJ676098 ,KJ676096 ,KJ676097。菌株 QYF12 ,QYF22 ,QYF26 序列提交到 GenBank 数据库中 Blastn 结果表明, 同源性最高的菌株分别为 教酒链霉菌 *Streptomyces chartreusis* ,吸水链霉菌奥萨霉素亚种 *S. ossamyceticus*、灭癌素链霉菌 *S. gancidicus*。分别选取相似性高的菌株 16SrDNA 序列进行比较, 经 Clustal X 软件进行 alignment 后, 以 MEGA 5.0 软件构建出其系统发育树, 见图 2。在进化树中菌株 QYF12 ,QYF22 ,QYF26 分别与 *S. chartreusis* (AJ399468) ,*S. ossamyceticus*(NR041156) 和 *S. gancidicus*(JX042473) 进化距离最近, 并且处于同一分支上。



分支上的树值为自举 1 000 次的结果, 线段 0.01 代表 1/100 进化距离单位。

图2 基于 16S rDNA 序列构建的系统发育树

Fig. 2 GenBank phylogenetic tree showing the relationships among type strains and experimental strains based on 16S rDNA sequences

QYF12 ,QYF22 ,QYF26 3株放线菌具有典型的链霉属的特征, 根据其形态学、培养特征和生理生化特征的研究结果^[20] 结合分子生物学的鉴定研究, 鉴定结果

依次为酿酒链霉菌 *S. chartreusis*、吸水链霉菌奥萨霉素亚种 *S. ossamyceticus*、灭癌素链霉菌 *S. gancidicus*。

4 讨论

适当的前处理与合适的分离培养基可以增加微生物的种类和数量^[21]。本实验在对蚯蚓粪中放线菌进行分离时发现,当直接用高氏1号培养基分离样品中的放线菌时,得到的放线菌的数量要少于从改良高氏2号培养基分离纯化得到的放线菌数量,估计这是因为改良高氏2号培养基中有机碳含量较少,可以抑制真菌及细菌的生长速度,从而有利于样品中放线菌的分离。同时高温处理样品后得到的放线菌的数量也会增加,120℃的高温处理可促进样品中放线菌的分离,故最终选择改良高氏2号培养基作为分离培养基,且样品放置于120℃的烘箱内进行干燥加热处理后再进行放线菌的分离。

采用上述方法,本研究从蚯蚓粪中共分离获得放线菌26株,抑菌活性筛选结果表明有16株放线菌对1种或几种指示菌具有抗菌效果,占分离所得放线菌菌株总数的61.54%,其中QYF22、QYF12、QYF26菌株,抑菌活性较强,占分离所得放线菌菌株总数的11.54%。同时也发现本研究中蚯蚓粪放线菌的抑菌活性主要体现在对 *M. luteus* (共有15个菌株表现抑菌活性) 与 *B. subtilis* (共有9个菌株表现抑菌活性) 上,而对于 *E. coli* 和 *A. niger* 的拮抗作用相对较差,这与已经报道的从蚯蚓粪中分离出的6个菌株对 *E. coli* 具有不同程度的拮抗作用有所不同,表明不同微生物的次级代谢产物不同,抑制对象也会不同^[13]。

根据形态特征、生理生化的研究结果与16S rDNA序列分析结果,上述3株抑菌活性较强的菌株QYF22、QYF12、QYF26均属于链霉菌属。这与多年以来的研究结果一致,目前在农业和医药上应用的抗生素大多数都来自于链霉菌属菌种,与其他放线菌产生的活性代谢产物相比,链霉菌属产生的微生物天然活性物质最多^[7,12-13]。本研究表明了蚯蚓粪放线菌能产生抑菌活性物质,具有较高的开发价值。而QYF22、QYF12、QYF26菌株,由于抑菌圈直径较大,有可能作为潜在的生物防治剂,具有潜在的应用前景,有待于进一步研究。

[参考文献]

[1] 马莉,殷秀琴. 污泥蚯蚓粪对万寿菊生长发育的影响[J].

应用生态学报,2010,21(5):1346.

- [2] 董炜华,殷秀琴. 蚯蚓在处理活性污泥过程中的生长繁殖[J]. 动物学报,2007,53(1):69.
- [3] Elvira C, Sampedro L, Benitez E, et al. Vermicomposting of sludges from paper mill and dairy industries with *Eisenia andrei*: a pilot-scale study[J]. Bioresour Technol, 1998, 63(3): 205.
- [4] 曾正清,孙振钧,Kempen T V,等. 牛粪和蚯蚓粪对猪排泄物中臭气化合物产量的影响[J]. 中国农业大学学报,2003,8(3):37.
- [5] 陈玉成,皮广洁,黄伦先,等. 城市生活垃圾蚯蚓处理的因素优化及其重金属富集研究[J]. 应用生态学报,2003,14(11):2006.
- [6] 白春节. 低繁殖量蚯蚓养殖法处理剩余污泥的可行性研究[J]. 安全与环境学报,2006,6(6):9.
- [7] 胡艳霞,孙振钧,周法永,等. 蚯蚓粪对黄瓜苗期土传病害的抑制作用[J]. 生态学报,2002,22(7):1106.
- [8] 崔玉珍,牛明芬. 蚯蚓粪对土壤的培肥作用及草莓产量和品质的影响[J]. 土壤通报,1998,29(4):156.
- [9] 吕振宇,马永良. 蚯蚓粪有机肥对土壤肥力与甘蓝生长、品质的影响[J]. 中国农学通报,2005,21(12):236.
- [10] 井大炜. 施用蚯蚓粪对杨树苗根际土壤生物学特征的影响[J]. 水土保持通报,2014,34(1):133.
- [11] 赵秋,高贤彪,宁晓光,等. 适用于滨海盐碱土改良剂的应用研究[J]. 西北农业学报,2014,23(3):107.
- [12] 胡艳霞,孙振钧,王东辉,等. 蚯蚓粪中拮抗微生物分析[J]. 应用与环境生物学报,2004,10(1):99.
- [13] 刘雪莲,张宁,崔东良,等. 蚯蚓粪中乳酸菌的分离及其在大肠杆菌 O157:H7 中的抗菌活性[J]. 基因组学与应用生物学,2011,30(1):1.
- [14] 姜怡,段淑蓉,唐蜀昆,等. 稀有放线菌分离方法[J]. 微生物学通报,2006,33(1):181.
- [15] 沈萍,陈向东. 微生物学实验[M]. 北京:高等教育出版社,2007:241.
- [16] 闵长莉,汪学军,刘文博. 春兰内生真菌的分离及其抑菌活性的初步研究[J]. 西北植物学报,2012,32(3):596.
- [17] Stackebrandt E, Rainey F A, Ward-Rainey N L. Proposal for a new hierarchic classification system *Actinobacteria classis nov*[J]. Int J Syst Bacteriol, 1997, 47(2): 479.
- [18] Shirling E B, Gittlieb D. Methods for characterization of *streptomyces* species[J]. Int J Syst Bacteriol, 1966, 16(3): 313.
- [19] Chun J, Goodfellow M. A phylogenetic analysis of the genus *No-cardia* with 16S rRNA gene sequences[J]. Int J Syst Bacteriol, 1995, 45(2): 240.
- [20] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,1975:174.
- [21] 司美茹,薛泉宏,来航线. 放线菌分离培养基筛选及杂菌抑制方法研究[J]. 微生物学通报,2004,31(2):61.

[责任编辑 吕冬梅]