

红树林内生细菌的分离及拮抗菌筛选*

陈振明 何进坚 何红** 张兴锋 宋文东

(广东海洋大学农学院 湛江 524088)

摘要: 红树林内生细菌及拮抗菌分离筛选结果表明: 各品种红树体内均有大量的内生细菌, 不同红树品种及部位内生细菌的数量不同, 其中以红海榄体内的含量最高, 达 4.225×10^4 cfu/g (fw), 其它依次为木榄、桐花树、秋茄和白骨壤等; 不同部位以茎组织体内内生细菌的含量最多, 达 1.649×10^4 cfu/g (fw), 其次为根和叶。获得的内生细菌中约有 43.53% 的内生细菌菌株对枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum*)、炭疽病菌 (*Colletotrichum* sp.) 等病原真菌及番茄青枯病菌 (*Ralstonia solanaceae*) 具有较强拮抗作用。对番茄生长测定发现, 13 株菌株中有 9 株 (69.23%) 表现为促进生长效果, 4 株 (30.77%) 表现为抑制生长作用。经初步鉴定, 上述拮抗菌均为芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.)。

关键词: 红树, 内生细菌, 拮抗菌, 分离, 筛选

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 03-0018-06

Isolation and Screening of Endophytic Antifungal Bacteria from Mangroves*

CHEN Zhen-Ming HE Jin-Jian HE Hong** ZHANG Xing-Feng SONG Wen-Dong

(College of Agriculture, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088)

Abstract: The endophytic bacteria of the mangroves were studied in this paper. The results show that there are $1.728 (0.195 \sim 4.225) \times 10^4$ cfu/g (fw) bacterial endophytes in the variety of mangroves, the most population of the endophytic bacteria was found in *Rhizophora stylosa*, the figure was 4.225×10^4 cfu/g (fw), the next was *Bruguiera gymnorhiza*, *Aegiceras corniculatum*, *Kandelia candel* and *Avicennia marina*. In parts of the mangroves, the contents of the bacteria in stem was the most, the figure was 1.649×10^4 cfu/g (fw), then the root and the leaf. Of the bacteria, about 43.53% strains expressed the antagonism against the growth of the plant pathogens, such as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *Colletotrichum* sp. and *Ralstonia solanaceae* etc. and these bacteria were identified as *Bacillus* sp.. The results also showed that 9 of the 13 strains (69.23%) could promote the growth of the tomato, while 4 strains (30.77%) restrained the tomato's growth.

Key words: Mangrove, Endophytic bacteria, Antagonism, Isolation, Screening

红树林是生长在热带、亚热带海岸潮间带的一种海陆两栖的特殊植物群落, 不仅是鸟类、鱼虾蟹贝类等生物的栖息地, 同时也是海洋微生物生长繁衍的温床, 关于红树林共附生海洋微生物, 目前以对其根际放线菌和内生真菌, 尤其是内生真菌及其活性物质研究较多, 并从这些微生物中分离到大量的具有抗菌、抗肿瘤等广泛生物学作用的活性物质^[1], 但红树林内生细菌, 国内外尚未见有详细报道。本文对湛江海岸边大量生长的红树林内生细菌及其对植物病原菌的拮抗菌等进行了分离筛选, 并测定了拮抗菌对植物生长的影响。

* 教育部科学技术研究重点项目 (No. 206106)

广东省自然科学基金资助项目 (No. 05011780)

** 通讯作者 Tel: 0759-2382084, E-mail: hehong893@163.com

收稿日期: 2005-07-05, 修回日期: 2005-09-25

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 红树品种:选广东湛江地区海域普遍生长的红树林,如秋茄(*Kandelia candel*)、红海榄(*Rhizophora stylosa*)、木榄(*Bruguiera gymnorrhiza*)、桐花树(*Aegiceras corniculatum*)、白骨壤(*Auicennia marina*)等进行内生细菌分离。

1.1.2 病原菌:供试病原菌为辣椒疫霉菌(*Phytophthora capsici*)、香蕉枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*)、西瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*)、黄瓜枯萎菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)、香蕉炭疽病菌(*Colletotrichum musae*)、大豆炭疽病菌(*Colletotrichum glycines*)、水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)、番茄青枯菌(*Ralstonia solanaceance*)、辣椒疮痂病菌(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和富贵竹叶斑病菌(病原菌未鉴定)等。供试病原菌均为本实验室分离保存。

1.2 红树内生细菌分离培养基和表面消毒方法

1.2.1 分离培养基:为选择红树林内生细菌的分离培养基,本研究对 2216E、海水 SPA、海水 KB、海水 NA、海水高氏 1 号等培养基进行了分离测定。结果发现以海水 NA 培养基中出现菌落数量最多,而且较为稳定。因此,本研究以海水 NA 培养基(蛋白胨 5.0g,葡萄糖 2.5g,牛肉膏 3.0g,琼脂 15~17g,陈海水定容至 1.000L, pH7.0~7.2)为红树内生细菌分离培养基。

1.2.2 表面消毒方法:清除植物表面附生菌是分离内生细菌的关键。本研究对 4 种表面消毒方法进行测试的结果发现,以 70% 酒精擦洗 + 0.1% 升汞处理 1.0min + 无菌陈海水清洗 3 次效果最好。为此,本研究红树林内生细菌分离时以此法进行表面消毒处理。

1.3 红树各品种内生细菌的数量测定

选用长势良好无病的红树各品种植株,取其根茎叶,用自来水冲洗晾干后,各称取 5g,用 1.2.2 中的方法表面消毒后,每样品加 5mL 无菌海水碾碎后静止 15min,各取 100 μ L 样品液,在海水 NA 培养基涂平板,每处理重复 3 次,25 $^{\circ}$ C 下黑暗培养 48~72h,计算菌落数,并根据菌落形态、颜色等挑取单菌落,按常规方法纯化后保存,供测试鉴定。

1.4 室内拮抗植物病原菌的红树林内生细菌的筛选测定

1.4.1 拮抗病原真菌测定:在直径为 9cm 的 PDA 平板中央接入一直径为 8mm 的病原真菌菌块,同时在平板边缘接入一小环待测细菌菌落(28 $^{\circ}$ C 下,海水 NA 上培养 24h),27 $^{\circ}$ C 下黑暗培养 5~7d,每菌株至少重复 3 次,分别测量抑菌半径大小。

1.4.2 拮抗病原细菌测定:取 28 $^{\circ}$ C 下培养 24h 的各植物病原细菌,用淡水 NA 培养基制成带菌平板,在平板上接入一小环待测细菌菌落(28 $^{\circ}$ C 下,海水 NA 上培养 24h),27 $^{\circ}$ C 下黑暗培养 24~48h,每菌株至少重复 3 次,分别测量抑菌半径大小。

1.5 细菌鉴定

参见东秀珠等^[2]方法,进行格蓝氏染色,芽孢染色等常规鉴定。

1.6 红树林内生细菌对番茄苗生长影响测定

将番茄种子用菌株 NB 培养液(28 $^{\circ}$ C、180r/min、48h)浸泡 24h 后,播入于无菌土盆钵中,以无菌水浸种为对照,每处理 3 盆,每盆播 30~50 粒种子,按常规方法育

苗管理。出苗10d后用各菌株培养液灌根每盆浇灌菌液100mL。于出苗后20d每处理随机抽取10~35株番茄苗,用自来水清洗干净后晾干,测其鲜重及株高。在80℃条件下烘干24h,称其干重。

2 结果与分折

2.1 不同品种红树林内生细菌的数量

不同品种红树林内生细菌分离结果表明(表1),所含有内生细菌的数量有所不同,所测定红树林内生细菌含量平均为 $1.73(0.20 \sim 4.23) \times 10^4 \text{ cfu/g (fw)}$,其中以红海榄体内内生细菌含量最高,达 $4.23 \times 10^4 \text{ cfu/g (fw)}$,其它依次为木榄、桐花树、秋茄和白骨壤,分别达 $2.20 \times 10^4 \text{ cfu/g (fw)}$ 、 $1.82 \times 10^4 \text{ cfu/g (fw)}$ 、 $2.04 \times 10^3 \text{ cfu/g (fw)}$ 和 $1.95 \times 10^3 \text{ cfu/g (fw)}$ 。从表1还可以看出,同一品种不同部位其内生细菌的含量也有所不同,以茎内含量最多,达 $3.71 \times 10^4 \text{ cfu/g (fw)}$,其次为根和叶,分别为 $1.10 \times 10^4 \text{ cfu/g (fw)}$ 和 $3.71 \times 10^3 \text{ cfu/g (fw)}$ 。

表1 不同红树林品种及部位内生细菌的含量

部位	内生细菌数量 ($\times 10^3 \text{ cfu/g} \cdot \text{fw}$)					
	秋茄	红海榄	木榄	桐花树	白骨壤	平均
根	0.38	44.75	6.00	1.39	2.57	11.02
茎	1.79	72.27	56.64	51.84	3.12	37.13
叶	3.96	9.74	3.28	1.40	0.15	3.71
平均	2.04	42.25	21.97	18.21	1.95	17.28

2.2 各红树品种中拮抗植物病原菌的内生细菌含量测定结果

以黄瓜枯萎病菌等为目标菌,用对峙生长法,测试了不同红树品种内生细菌各菌株对植物病原真菌的拮抗作用。结果表明(表2),各红树品种中均含有对植物病原真菌具有拮抗作用的内生细菌,平均拮抗菌株率为43.53%(12.50%~69.23%),其中以白骨壤体内拮抗细菌的比例最高,达到69.23%,其次为秋茄,达62.96%,其它依次为桐花树56.25%、木榄16.67%和红海榄12.50%。可见,不同品种红树林其内生拮抗细菌的含量有一定的差别。

表2 不同红树林品种拮抗内生细菌的含量

品种	测定菌株数	拮抗菌株数	拮抗菌株率(%)
秋茄	32	22	62.96
红海榄	16	2	12.50
木榄	30	5	16.67
桐花树	32	18	56.25
白骨壤	13	9	69.23
合计	123	56	43.53(平均)

2.3 红树林内生细菌对植物病原菌的拮抗谱

从表2结果中随机选用28株细菌,用对峙生长法,测定它们对部分植物病原真菌和细菌的拮抗作用结果表明(表3),28株内生细菌对所选用的植物病原真菌均有不同程度的拮抗作用。从表3还可以看出,128、182、BI3、CI2和CⅢ1等菌株对所选的植物病原真菌和细菌均有较强的拮抗作用,尤其是CⅢ1菌株对番茄青枯病菌的拮抗较

强, 抑菌圈半径达 7.0mm, 进一步测定发现, 该菌株还对黄瓜疫霉、烟草疫霉及水稻白叶枯、香蕉茎腐等病原菌也有较强的拮抗效果, 另外, 在植物体内定殖及防病测定结果表明, CⅢ1 菌株可以在辣椒、番茄等多种植物体内及根际土壤中定殖, 在田间对辣椒青枯病具有 50% 以上的防病效果 (结果另文报道), 显示出该菌株具有良好的开发应用前景。

表 3 红树林内生细菌对病原菌的拮抗谱测定结果

菌株	菌株来源	抑菌圈半径 (mm)								
		水稻纹枯菌	香蕉炭疽菌	西瓜枯萎菌	大豆炭疽菌	富贵竹叶斑菌	香蕉枯萎菌	黄瓜枯萎菌	辣椒疫霉菌	番茄青枯菌
77	秋茄叶	3.9	6.2	4.8	7.0	1.8	3.5	4.8	ND	0
80	秋茄叶	0.7	11.2	5.2	8.1	1.5	2.4	4.4	2.1	0
118	秋茄根	3.2	10.8	4.2	9.9	2.3	3.3	6.2	4.8	0
128	秋茄叶	3.3	6.8	4.2	8.0	4.1	5.1	5.3	ND	1.5
133	秋茄茎	1.1	10.7	1.8	7.8	1.1	3.2	5.8	ND	0
178	秋茄叶	2.9	7.4	2.1	7.0	1.2	1.8	1.8	5.8	0
180	秋茄叶	5.6	3.8	3.1	9.0	4.3	4.1	4.3	ND	0
182	秋茄叶	2.1	7.1	3.8	9.8	3.2	4.2	3.5	ND	2.2
212	桐花树	0.4	9.4	5.5	9.2	5.7	4.1	8.6	8.9	0
225	桐花树	0.7	9.1	5.6	9.8	4.5	7.5	10.0	6.8	0
251	木榄叶	2.5	10.1	4.9	8.9	4.1	6.8	11.2	6.1	0
255	木榄叶	2.1	3.8	3.2	9.4	0.8	5.1	7.0	6.3	0
261	红海榄	1.9	8.3	5.5	9.6	4.0	5.9	4.2	7.2	0
BⅢ3	秋茄	4.1	10.9	8.1	11.2	7.2	8.2	13.6	0.9	1.5
BⅢ2	秋茄	5.7	11.2	5.0	5.1	5.6	7.5	11.2	1.1	0
BⅢ5	秋茄	6.5	12.6	6.2	10.9	7.8	7.9	14.0	0.1	ND
BⅢ6	秋茄	8.0	11.1	5.4	10.9	6.4	9.0	15.0	4.1	ND
BⅢ7	秋茄	4.3	13.1	8.3	10.5	9.8	8.4	11.0	ND	0
CⅢ1	木榄	3.1	11.4	6.1	10.7	8.1	10.2	14.0	6.9	ND
CⅢ2	木榄	8.9	12.3	8.4	11.5	6.8	7.2	14.6	2.9	1.0
CⅢ2	木榄	1.8	13.3	7.0	11.1	7.2	9.4	14.4	0.1	0
CⅢ1	木榄	2.1	4.8	9.4	4.1	4.1	12.5	13.0	9.5	7.0
CⅢ2	木榄	7.8	12.4	8.2	7.8	7.0	8.4	14.4	8.2	ND
CⅢ3	木榄	4.2	12.8	5.8	11.2	3.3	8.1	15.0	ND	0
DⅢ1	红海榄	4.2	12.1	1.2	8.7	7.5	5.5	10.8	1.0	ND
DⅢ2	红海榄	4.7	8.5	6.6	10.2	6.1	8.5	6.2	ND	ND
DⅢ8	红海榄	4.0	6.8	6.3	5.6	5.3	6.8	13.0	9.1	0
DⅢ3	红海榄	3.0	4.9	4.8	10.2	7.0	6.2	13.3	4.9	0

注: ND 表示未测定

2.4 红树林内生细菌对番茄苗生长的影响

为了解上述海洋细菌对陆生植物生长的影响, 本研究选用上述部分菌株, 在室内盆栽条件下, 测定了它们对番茄生长的作用, 结果表明 (表 4), 不同菌株对番茄生长表现出不同的作用效果, 有的对番茄生长有促生作用, 如 180、255、77、178、128、

212、225、182、80 等菌株培养液浸种出苗后 20d, 番茄苗鲜重分别比对照增加了 114.29%、52.45%、56.20%、67.35%、45.80%、138.04%、87.59%、45.84%、19.84%, 促生作用主要表现为番茄苗生长旺盛, 叶色浓绿, 植株高大、强壮。而有的菌株对番茄生长表现出抑制作用, 如 118、133、261、251 等菌株, 培养液浸种出苗后 20d, 番茄苗鲜重分别比对照减少了 11.22%、0.61%、16.78%、24.37%, 抑制作用主要表现为株体弱小, 叶片小、叶色淡绿等。

表 4 菌株对番茄苗生长影响测定结果

菌株	测定株数	鲜重 (株)		干重 (株)		株高 (株)		
		重量 (g)	比 CK +/- (%)	重量 (g)	比 CK +/- (%)	数量 (cm)	比 CK +/- (%)	差异显著性 (<i>P</i> =0.01)
180	12	0.5250	114.29	0.0433	39.67	7.28	57.91	A
225	26	0.4596	87.59	0.0435	40.32	6.11	32.54	AB
212	19	0.5832	138.04	0.0558	79.97	5.71	23.86	AB
182	26	0.3573	45.84	0.0338	9.03	5.46	18.44	AB
178	20	0.4100	67.35	0.0365	17.74	5.34	15.84	BC
77	15	0.3827	56.20	0.0373	20.32	5.29	14.75	BCD
255	23	0.3735	52.45	0.0335	8.06	4.91	6.51	BCD
128	25	0.3572	45.80	0.0352	13.55	4.75	3.04	BCD
80	11	0.2936	19.84	0.0318	2.58	4.50	-2.39	CDEF
CK	10	0.2450	/	0.0310	/	4.61	/	CDEF
118	12	0.2175	-11.22	0.0242	-21.94	4.44	-3.69	DEF
133	20	0.2435	-0.61	0.0290	-6.45	4.07	-11.71	EFG
251	19	0.1853	-24.37	0.0189	-39.03	3.09	-32.97	FG

2.5 红树林内生拮抗细菌的鉴定

用枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) BS-2 菌株^[3]为对照, 经形态观察和常规染色等常规方法, 对 77、80、118、128、133、178、180、182、212、225、251、255、261、CⅢ1 等菌株鉴定结果表明, 上述菌体均为杆状, 菌落乳白色、圆形、有的中央隆起, 革兰氏染色阳性, 周生鞭毛, 产芽孢、芽孢椭圆形、在菌体中央或一端形成, 兼性厌氧, 接触酶阳性等。参照东秀珠等^[2]的方法, 初步鉴定芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.), 其种名尚有待进一步鉴定。

3 讨论

植物病害是影响农业生产高产稳产和优质的主要因素之一。目前植物病害防治主要还是采用化学方法, 但由于残留、抗性、污染, 甚至危及人们身体健康等一系列问题, 而使人们一直在寻找安全、有效、无污染的防治方法。大量研究表明, 生物防治具有潜在的重要作用。并已从土壤、植物体内等分离筛选到大量的对植物病害具有良好抑制或防病效果的陆源微生物, 其中内生细菌由于其存在植物体内, 受到植物体的保护, 不易受外界环境的影响等优势, 而倍受研究者的青睐, 普遍认为, 植物内生细菌是植物病虫害生物防治的天然资源菌, 具有十分广泛的理论研究和开发应用价值^[4-6]。但随着对陆地资源的深入开发, 从中发现新的药物先导化合物和新的动植物病虫害生防资源菌已变得越来越困难, 因此, 探索、研究、开发和利用新型生物药物

资源已引起世界各国的普遍关注。

海洋占地球表面的 71%，其中蕴含着大量的微生物，这些微生物由于可以产生许多结构新颖、作用特殊的生物活性物质，在新型医药药物或其先导化合物研究以及植物病虫害生物防治中，均具有良好的开发应用前景^[7,8]。本研究结果表明，红树林体内含有大量的对植物病原真菌和细菌具有较强拮抗和防病作用的海洋细菌，显示出红树林内生细菌可能在植物病害生物防治中具有巨大开发应用潜力，对此有待进一步研究。

本研究发现，虽然红树林内生细菌中含有大量的对植物病原菌具有拮抗作用的内生海洋细菌，但这些内生海洋细菌对植物（番茄）生长的作用有所不同，有的菌株对植物生长可能表现出抑制作用。因此，在进行植物病害生防菌株筛选和评估生防菌株的作用效果时，不仅要测定菌株的防病效果，同时还要评估菌株对植物生长的影响，以期筛选出既有防病作用又有促生作用的菌株。

参 考 文 献

- [1] 林永成, 周世林. 海洋微生物及其代谢产物. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [2] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2000.
- [3] 何 红, 邱思鑫, 蔡学清, 等. 微生物学报, 2004, 44 (1): 13 ~ 18.
- [4] Sturz A V, Christie B R, Nowak J. Critical Reviews in Plant Sciences, 2000, 19 (1): 1 ~ 30.
- [5] 杨海莲, 孙晓璐, 宋 未. 微生物学通报, 1998, 25 (4): 224 ~ 227.
- [6] 何 红, 邱思鑫, 胡方平, 等. 微生物学杂志, 2004, 24 (3): 40 ~ 45.
- [7] 胡江春, 薛德林, 王书锦, 等. 应用生态学报, 2002, 13 (9): 1095 ~ 1098.
- [8] 田 黎, 顾振芳, 陈 杰, 等. 植物病理学报, 2003, 33 (1): 77 ~ 80.