

3 株抗植物病原真菌的海洋细菌的分离筛选

暴增海, 蒋 茜

(淮海工学院 海洋学院, 江苏 连云港 222005)

摘要: 从连云港附近海域及市场采集的褐藻、绿藻、虾、三疣梭子蟹、日本鲟、文蛤以及海水和海泥等 150 个样品, 分离到海洋细菌 385 株。采用平板对峙法测定了分离到的海洋细菌对辣椒疫霉病菌(*Phytophthora capsici*)、玉米小斑病菌(*Bipolaria maydis*)、玉米斑枯病菌(*Septario zeicola*)、玉米圆斑病菌(*Helminthosporium carbonum*)、小麦赤腐霉病菌(*Fusarium graminearum*)、镰刀菌(*Fusarium spp.*)、雪腐镰刀菌(*Fusarium nivale*)、枯萎病原菌(*Fusarium oxysporum*)、链格孢菌(*Alternaria sp.*)和立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)10 种植物病原真菌的抑制作用, 从中获得具抑菌作用的细菌 3 株, 分别是分离自连岛死鱼样品的 L₁-9 菌株、黄窝漂浮枯草样品的 HW₁-2 菌株和分离自西墅蛭蛭样品的 XS₁-4 菌株。菌株 L₁-9 对 10 种植物病原真菌都有明显的抑制作用, 对小麦赤腐霉病菌(*Fusarium graminearum*)的抑制作用最为明显。采用滤纸片培养法测定的结果表明: 3 个菌株发酵液对供试的植物病原真菌也有一定的抑菌作用, 但抑菌作用低于菌株的直接作用。

关键词: 海洋细菌; 植物病原真菌; 抑菌作用

中图分类号: S432.4⁺4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2007)03-0049-04

当今世界, 由于农业生产过程中过量的使用农药给环境造成很大的压力, 同时不少病原菌对农药产生了一定的抗性, 因此, 越来越多的科研工作者把目光投向了植物病害的生物防治。由于陆源生防微

生物的局限, 研究者希望从海洋微生物中开发出可抗病原菌的活性物质, 利用微生物防治植物病原菌, 以减少农药的使用^[1]。在该领域人们陆续开展了相关工作, Jung-Hee Woo 等^[2]分离出 1 株海洋细菌

收稿日期: 2006-10-20

基金项目: 淮海工学院科研基金资助(kk05009, Z2006034)

作者简介: 暴增海(1962-), 男, 河北苍州人, 教授, 硕士, 主要从事微生物学的教学和科研工作。

最高; 到成熟期时, 土壤中的有效磷含量以 9 叶移栽最低, 有效钾含量以 7 叶移栽最低。深移栽结合一次性双层施肥可以提高磷和钾的利用率和使烟株提前进入第 2 次吸收高峰, 有利于提高烤烟烟叶的品质。

参考文献:

[1] Collins W K, Hawks S N. 烤烟生产原理[M]. 陈江华, 杨国安, 译. 北京: 科学技术出版社, 1995.
[2] 韩锦峰, 范艺宽, 李社潮. 不同栽培方式对烤烟生长发育及产质的影响[J]. 中国烟草科学, 1998(4): 1-4.
[3] 孙敬权, 薛明德, 李桐, 等. 烟苗茎高和移栽方法对栽后根系生长的影响[J]. 中国烟草科学, 1998(2): 23-25.
[4] 韩锦峰, 范艺宽, 王根恒, 等. 不同栽培方式对烤烟根系发育的影响[J]. 河南农业科学, 1996(16): 12-13.
[5] 韩锦峰, 齐群刚. 烟株根系活力与烟叶性状、化学成分的相关关系研究及提高根系活力的栽培措施[J]. 中国烟草, 1988(2): 11-13.

[6] Li C H, Ma B L, Zhang T Q. Soil dulk densin effects on microbial population and enzyme activities during the growth of maize mays planted large pots under field exposure[J]. Canadian Journal of Soil Science, 2002, 82: 147-154.
[7] 中国农业科学院烟草研究所. 中国烟草栽培学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987.
[8] Tandon H S. Fertilizers organic manures, recyclable wastes and bio-fertilizers[M]. New Delhi(India): Fertilizer Development and Consulation Organisation, 1992.
[9] 奚振邦. 烤烟双层施肥技术[J]. 中国烟草, 1992(1): 29-34.
[10] Hawks S N, Collins Jr W C. Principles of Flue-culted Tobacco Production[M]. N C State University USA, 1983.
[11] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
[12] 马新明, 刘国顺. 烟草根系生长发育与地上部相关性的研究[J]. 中国烟草学报, 2002(3): 26-29.

(*Streptomyces* sp. Strain) AP77, 能产生胞外蛋白, 对引起紫菜赤腐病的病原真菌 (*Pythium porphyrae*) 有特异性较强的抑制作用。田黎等^[3] 从海洋生境中分离出 1 株海洋细菌 B-9987 (*Bacillus* sp.), 其胞外代谢产物在植物活体上进行了防治番茄早疫病和黄瓜霜霉病的试验, 结果表明, B-9987 的提取物除抑制病原真菌外, 对植物生长还有一定的促进作用。利用生物防治植物病害是发展方向, 而且海洋又是有益细菌资源的巨大宝库。因此, 海洋生防菌的开发和利用不仅具有必要性, 而且具有美好的产业化前景。为了更好地利用海洋细菌资源, 我们于 2005~2006 年开展了该项研究, 现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试病原真菌 玉米小斑病菌 (*Bipolaria maydis*)、玉米斑枯病菌 (*Septario zeicola*)、玉米圆斑病菌 (*Helminthosporium carbonum*)、小麦赤腐霉病菌 (*Fusarium graminearum*)、辣椒疫霉病菌 (*Phytophthora capsici*)、镰刀菌 (*Fusarium* sp.)、雪腐镰刀菌 (*Fusarium nivale*)、枯萎病原菌 (*Fusarium oxysporum*)、链格孢菌 (*Alternaria* sp.) 和立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) 由中国农科院土传病害实验室提供。

1.1.2 培养基 富集培养基: 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g、酵母膏 5 g、牛肉膏 5 g、琼脂 20 g、陈海水 1000 mL, pH 7.5~8.0。

分离培养基: 采用 2216E 培养基, 其成分为: 蛋白胨 5 g、酵母膏 1 g、琼脂 20 g、陈海水 1000 mL, pH 7.5~8.0。

抑菌筛选培养基 (淡水): 马铃薯浸汁 (20%) 100 mL, 葡萄糖 2 g, 琼脂 1.5~2 g, 自然 pH。

2216E 发酵培养液: 蛋白胨 5 g、酵母膏 1 g、陈海水 1000 mL, pH 7.5~8.0。

1.2 方法

1.2.1 样品的采集 分别在 2005 年 8 月至 2006 年 5 月, 从连云港海域近距离海岸处、高公岛、连岛、西墅、西大堤、国展中心及市场等地分别采集海洋生物、海洋漂浮物、海泥和海水样品。

1.2.2 样品的处理 海水样品: 经稀释, 取样品液均匀涂布于海水 2216E 培养基平板上, 并于 25℃ 条件下培养。海泥样品: 将海泥加入盛有 10 mL 无菌

海水中振荡摇匀, 取 5 mL 悬浮液加入 50 mL 富集培养基中。鱼体样品: 鱼体解剖之后, 将肠道部分放入无菌研钵中研磨至糊状, 并加入到富集培养基中。海藻样品: 用无菌海水冲洗海藻样品 3 次, 去掉附着微生物, 加入灭菌的并有一定量无菌海水的 50 mL 离心管中, 于振荡器中充分振荡 10 min, 然后取部分液体加入到富集培养基中。贝类样品: 用无菌海水浸泡样品, 20℃ 保温过夜, 离心浸泡液, 取上清液置 7℃ 水浴保温 10 min, 备用。

1.2.3 样品的富集培养 将富集培养基分装在 250 mL 的三角烧瓶中, 50 mL/瓶, 并灭菌, 再把处理好的样品取 5 mL 加入到富集培养基中, 在 25℃ 下, 转速 190 r/min, 摇床振荡培养 2 d。

1.2.4 细菌的分离和纯化 用移液枪取摇床培养了 2 d 的富集后的样品 1.0 mL 加至 9.0 mL 无菌海水的试管中, 制备成 10^{-1} 稀释样。然后, 用一系列装有 9.0 mL 无菌海水的试管连续稀释, 制备成 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} 稀释样, 并充分振荡。取 10^{-5} 和 10^{-6} 的稀释样涂布到 2216E 固体培养基上, 在 25℃ 的培养箱中培养 2 d, 挑取不同形态的单菌落。根据菌落形态特征, 即大小、表面特征、边缘、隆起和颜色等, 将不同的细菌转到 2216E 培养基平皿上进行纯化, 再转入到 2216E 斜面培养基培养后, 4℃ 保存。

1.2.5 分离细菌抑菌活性测定 分离细菌的抑制作用的测定^[4]: 采用平板对峙培养法, 在淡水 PDA 培养基平板中央接种直径为 5 mm 的植物病原真菌菌苔, 在真菌周围距培养皿壁 15 mm 处接种细菌, 25℃ 倒置恒温培养, 观察病原菌的生长状况, 培养 5 d 后测量抑菌带宽度。对照为周围不接细菌的平板。每处理 3 次重复。

无菌发酵液对病原真菌生长的抑制作用测定: 用接种环将上述对峙培养中有活性的海洋细菌菌株从试管内接种到盛有 50 mL 2216E 培养液的三角瓶内, 25℃, 190 r/min 振荡培养 48 h, 得到菌液。将菌液 4℃ 5000 r/min 离心 10 min, 上清液用细菌过滤器 (直径 0.2 μm) 过滤, 得无菌发酵液^[5]。然后采用滤纸片培养法^[6]: 将病原真菌菌苔 (直径为 5 mm) 接于 PDA 平板中央, 每培养皿呈三角形放置 3 块直径为 5 mm 的无菌滤纸片, 分别滴上 15 μL 菌液、无菌发酵液, 25℃ 恒温培养, 观察病原菌培养 5 d 后的菌落生长状况并测量抑菌带宽度。对照滤纸片上滴无菌水。每处理 3 次重复。

2 结果与分析

2.1 样品中细菌的分离结果

本试验采集的样品共 150 份, 分离得到细菌 385 株。其中, 动物样品共 113 份, 分离得到细菌 303 株; 植物样品 19 种, 分离得到细菌 44 株; 海洋漂浮物样品 6 份, 分离得到细菌 13 株; 海水样品 5 份, 分离细菌 9 株; 海泥样品 7 份, 分离细菌 16 株。

2.2 分离细菌的抑菌作用测定结果

分离得到的细菌中有 3 株对植物病原真菌的抑制作用明显, 分别为分离自连岛死鱼样品的 L₁-9 菌株、黄窝漂浮枯草的 HW₁-2 菌株和分离自西墅的蛭蛭的 XS₁-4 菌株。菌株 L₁-9 对 10 种供试的病原真菌均有明显的抑制作用, 其对小麦赤腐霉病菌的抑制作用最为明显, 抑菌带宽达到了 11.5 mm, 对链格孢菌的抑制作用最弱, 但也达到了 6.0 mm; 而菌株 HW₁-2 和菌株 XS₁-4 对病原菌的抑制作用低于菌株 L₁-9, 菌株 HW₁-2 对雪腐镰刀菌的抑制作用最强, 抑菌带宽达到了 9.3 mm, 对枯萎病原菌的抑菌作用较弱, 却也达到了 5.1 mm, 菌株 XS₁-4 则对立枯丝核菌的抑制作用最为明显, 抑制带宽度为 7.1 mm, 对枯萎病原菌的抑菌带宽只有 3.6 mm, 对玉米小斑病菌的抑制作用较弱, 只有 4.1 mm, 对辣椒疫霉病菌没有抑制作用。

表 1 分离的海洋细菌对 10 种植物病原真菌生长的抑菌带宽度 (mm)

供试病原菌	菌 株 号		
	L ₁ -9	HW ₁ -2	XS ₁ -4
小麦赤腐霉病菌	11.5	5.8	4.6
枯萎病原菌	10.1	5.1	3.6
玉米圆斑病菌	9.3	5.5	4.3
玉米斑枯病菌	9.0	8.9	4.3
辣椒疫霉病菌	9.0	4.8	0
镰刀菌	8.1	7.0	5.6
立枯丝核病菌	7.5	6.3	7.1
雪腐镰刀菌	7.3	9.3	5.0
玉米小斑病菌	6.3	7.0	4.1
链格孢菌	6.0	9.2	6.2

2.3 分离细菌发酵液的抑菌作用测定结果

将分离筛选出来的具有抑制植物病原真菌作用的 3 株海洋细菌进行摇床发酵培养 2 d 后, 取菌液和发酵液对植物病原真菌进行抑制作用试验, 结果

显示(表 2), 发酵液对植物病原真菌的抑制作用与菌液对植物病原真菌的抑制作用有很大的差别, 菌株 L₁-9 的菌液对小麦赤腐霉病菌的抑制作用最强, 抑菌带宽度达到 10.7 mm, 对链格孢菌的抑制作用最弱, 其抑菌带宽度为 5.7 mm; 而发酵液则对小麦赤腐霉菌、玉米圆斑病菌和立枯丝核菌的抑制作用相对较高, 抑菌带宽分别为 5.8 mm, 5.6 mm 和 5.7 mm, 对玉米小斑病菌的抑制作用最弱, 抑菌带宽为 3.7 mm。菌株 HW₁-2 的菌液对雪腐镰刀菌的抑制作用最强, 抑菌带宽为 8.7 mm, 对辣椒疫霉病菌的抑制作用最弱, 抑菌带宽为 3.6 mm; 而发酵液虽然对雪腐镰刀菌的抑制作用最强, 但其抑菌带宽只有 3.9 mm, 对玉米圆斑病菌抑制作用最弱, 抑菌带宽仅为 1.1 mm。菌株 XS₁-4 的菌液和发酵液对辣椒疫霉病菌没有抑制作用, 菌液和发酵液都对立枯丝核菌的抑制作用最强, 分别为 6.3 mm 和 2.7 mm; 但菌液对枯萎病原菌的抑制作用最弱, 抑菌带宽为 3.2 mm; 而发酵液则对链格孢菌抑制作用最弱, 抑菌带宽为 0.7 mm。

试验结果表明: 无菌发酵液对植物病原真菌的抑制作用明显地低于菌液。且由这些数据可以看出菌液和无菌发酵液对不同植物病原真菌的抑制作用效果有很大的差别, 这可能是因为所选择的发酵培养液或其他发酵条件并不适合所筛选的海洋细菌生长或者不适合这些细菌产生抗菌物质所致, 这一点有待于进一步研究。

表 2 分离的海洋细菌菌液及其发酵液对 10 种植物病原真菌生长的抑菌带宽度 (mm)

供试病原菌	菌 株 号					
	L ₁ -9		HW ₁ -2		XS ₁ -4	
	菌液	发酵液	菌液	发酵液	菌液	发酵液
小麦赤腐霉病菌	10.7	5.8	4.6	2.7	4.3	2.0
枯萎病原菌	9.6	4.3	4.6	2.1	3.2	1.7
玉米圆斑病菌	8.9	5.6	4.3	1.1	4.1	1.7
玉米斑枯病菌	7.0	4.7	7.3	3.1	4.0	1.9
辣椒疫霉病菌	7.4	4.1	3.6	1.4	0	0
镰刀菌	6.6	4.1	6.1	2.1	5.1	2.1
立枯丝核病菌	7.2	5.7	5.1	2.7	6.3	2.7
雪腐镰刀菌	7.1	4.3	8.7	3.9	3.9	0.9
玉米小斑病菌	6.2	3.7	6.1	2.3	3.9	1.1
链格孢菌	5.7	4.2	7.3	3.1	5.7	0.7

3 讨论

研究表明, 海洋中存在着丰富的抗菌资源。

Egan 等^[7] 从澳大利亚悉尼周围海域石莼表面分离到 5 株细菌, 其中 3 株可抑制多种细菌和真菌的生长。马悦欣等^[8] 从 10 种不同海藻中分离到 122 株细菌, 对其进行的抑菌试验表明, 60.7% 的菌株有抗菌活性, 且对海洋细菌和陆生细菌均有作用。郑忠辉等^[9] 从厦门海区潮间带的石莼和浒苔中各分离的 8 株拮抗菌中分别有 2 株对枯草杆菌有抑制作用。可见不同样品、同种样品不同海域环境分离的海洋细菌有不同的抗菌机制。同时, 不同海域生物样品中拮抗菌的分离比例不同。Burgess 等^[10] 发现从苏格兰沿岸海藻及无脊椎动物样品分离的体表附生菌中, 35% 的菌株有拮抗活性。骆祝华等^[4] 从厦门海域生物样中分离到 30 株细菌, 拮抗菌株占 30%; 从红树林区生物样中分离的菌株拮抗比例高达 69.2%。而黄耀坚等^[11] 从厦门海域的石莼和浒苔分离拮抗菌的比例是 17.4% 和 15.4%, 这反映了拮抗菌在地域上的差异。本研究分离得到 3 株对植物病原真菌具有明显抑制作用的细菌。

自海洋生境中分离的细菌自身存在着很多优点, 如繁殖快, 生活力强, 对其他拮抗生物没有伤害, 而且对寄主植物也无害等。人们推测拮抗机理除代谢产物对病原菌的拮抗作用外, 可能还有其他拮抗机制, 如营养竞争和空间位点的竞争等。

本研究对抑菌作用测定时接种试验菌株的培养时间确定为 5d, 是为了让其菌落生长的足够大、抑菌物质充分的产生和释放而提供对指示菌可测量的抑菌圈, 但培养 2d 也可检测到抑制作用。James 等^[3] 对海洋细菌 D2 所进行的抑菌试验结果表明, 当指示细胞菌龄为 2d 时, 试验菌株生长 7d 的菌落的抑菌圈直径大于生长 2d 的。本次抑菌试验用的敏感指示菌都是生产上重要的植物病原菌, 对农作物均能造成一定的危害^[13], 菌株 L1-9 对供试病原菌具有较强的抑菌作用, 可进一步研究 3 个海洋细菌菌株的生长特性和发酵条件, 为优良菌株应用于农作物病害的生物防治提供理论依据。

参考文献:

[1] 刘全永, 胡江春, 薛德林, 等. 海洋微生物生物活性物质

研究[J]. 应用生态学报, 2002, 13(7): 901—905.

- [2] Jung-Hee Woo, Etsushi Kitamura, Hisashi Myouga, et al. An antifungal protein from the marine bacterium *Streptomyces* sp. strain AP77 Is specific for *Pythium porphyrae*, a causative agent of red rot disease in *Porphyra* spp.[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 6: 2666—2675.
- [3] 田黎, 顾振芳, 陈杰, 等. 海洋细菌 B-9987 菌株产生的抑菌物质及对几种植物病原真菌的作用[J]. 植物病理学报, 2003, 33(1): 77—80.
- [4] 骆祝华, 黄翔玲, 王琳, 等. 海洋细菌抑菌活性菌株的筛选[J]. 台湾海峡, 2002, 21(2): 181—186.
- [5] 刘永锋, 高渊, 黄建华, 等. 拮抗菌 B-916 及其分泌物对几种植物病原菌的毒力分析[J]. 中国生物防治, 2002, 18(1): 45—46.
- [6] 魏松红, 曹远银, 包明繁, 等. 番茄灰霉病菌拮抗细菌的筛选与发酵条件研究[C] // 杨怀文. 迈入二十一世纪的中国生物防治, 北京: 中国农业科学技术出版社, 2005: 434—438.
- [7] Egan S, Thomas T, Holmstrom G, et al. Phylogenetic relationship and antifouling activity of bacterial epiphytes from marine *Ulva lactuca*[J]. Environmental Microbiology, 2000, 2(3): 343—347.
- [8] 马悦欣, 王岩, 刘璐, 等. 大连海区潮间带海藻附生细菌的抗微生物活性[J]. 大连水产学院学报, 2003, 18(4): 252—257.
- [9] 郑忠辉, 陈连兴, 黄耀坚, 等. 厦门海区潮间带海洋动植物共附生微生物的抗菌活性[J]. 台湾海峡, 1998, 17(4): 439—444.
- [10] Burgess J G, Jordan E M, BREGU M, et al. Microbial antagonism; a neglected avenue of natural products research[J]. Journal of Biotechnology, 1999, 70: 27—32.
- [11] 黄耀坚, 陈连兴, 郑忠辉, 等. 厦门海区潮间带海洋动植物共附生拮抗微生物的分布[J]. 海洋通报, 1998, 17(2): 37—41.
- [12] 暴增海, 马桂珍, 杨文兰, 等. 生防细菌 BMY-1 对几种植物病原真菌的抑制作用[J]. 中国植保导刊, 2005, 144(11): 5—7.