

产气克雷伯氏杆菌 *Klebsiella aerogenes* S2 对植物病原真菌的抑菌活性及番茄促生效果

杨淼岭^{1#}, 王 威^{1#}, 申乃坤², 李时勇², 黄文善²,
施李鸣¹, 姜明国², 张克诚¹, 葛蓓亭^{1*}

(1. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193;

2. 广西民族大学海洋与生物技术学院, 南宁 530006)

摘要 本研究以广西红树林的根际土壤为材料, 利用选择性培养基分离筛选多功能菌株, 并利用生理生化和分子生物学相结合的方法进行鉴定。采用平板对峙法测定筛选获得的菌株对几种植物病原真菌的拮抗效果, 同时通过盆栽试验和发芽试验研究其对番茄幼苗和种子的促生效果, 从而挖掘兼具促生防病功能的植物根际促生菌(plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)。经筛选获得一株具有溶磷及分泌生长素(indole-3-acetic acid, IAA)能力的细菌菌株 S2, 经鉴定该菌株属于克雷伯氏菌属 *Klebsiella*, 其对禾谷镰孢 *Fusarium graminearum*, 玉蜀黍平脐蠕孢 *Bipolaris maydis* 等 3 种植物病原真菌具有一定的拮抗效果, 菌株发酵液浓度为 1×10^4 、 2×10^4 cfu/mL 时对番茄种子和幼苗的促生效果最好。综上, 菌株 S2 是一株新型且兼具促生防病效果的多功能 PGPR 菌株, 该结果为绿色现代农业开发土壤微生物菌肥和植物生长调节剂提供优质菌源参考。

关键词 红树林; 分子鉴定; 克雷伯氏菌属; 根际促生菌

中图分类号: S154.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2021394

Antifungal activity of *Klebsiella aerogenes* S2 against plant pathogenic fungi and its growth promotion to tomato

YANG Miaoling^{1#}, WANG Wei^{1#}, SHEN Naikun², LI Shiyong², HUANG Wenshan²,
SHI Liming¹, JIANG Mingguo², ZHANG Kecheng¹, GE Beibei^{1*}

(1. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. School of Marine Sciences and Biotechnology, Guangxi University for Nationalities, Nanning 530006, China)

Abstract In this study, the multi-functional strains were isolated and screened by selective medium from rhizosphere soil of mangrove in Guangxi. The classification status of biocontrol bacteria was identified based on colony phenotype, physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequence. And the antagonistic effect of the screened strains against variety plant pathogenic fungi were evaluated by plate confrontation method, and the growth-promoting effect on tomato seedlings and seeds were studied by pot experiment and germination experiment, so as to excavate plant growth-promoting rhizobacteria with the function of promoting growth and preventing disease. A bacterial strain S2 that can dissolve phosphorus and secrete IAA (indole-3-acetic acid) was screened and identified as *Klebsiella*. It displayed antagonistic activity on three plant pathogenic fungi, including *Fusarium graminearum*, *Bipolaris maydis* and so on. In addition, the fermentation broth concentration of the strain S2 was 1×10^4 cfu/mL and 2×10^4 cfu/mL, respectively, which had the best growth promotion effect on tomato seedlings and seeds. In conclusion, strain S2 is a new multi-functional PGPR

收稿日期: 2021-07-03 修订日期: 2021-08-27

基金项目: 广西科技重大专项(桂科 AA18242026); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(Y2020PT04); 广西科技基地和人才专项(桂科 AD18126005)

* 通信作者 E-mail: gbbcsx@126.com

为并列第一作者

strain with both growth promotion and disease prevention, which provides a high-quality reference for the development of soil microbial fertilizer and plant growth regulators in green modern agriculture.

Key words mangrove; molecular identification; *Klebsiella*; plant growth-promoting rhizobacteria

具有“海洋绿肺”美誉的红树林(mangrove)是一种典型的生长于热带、亚热带且兼具海陆特质的生态系统^[1]。由于受海水周期性浸淹,红树林具有耐高盐高湿等特性^[2]。而生长于此独特生境的微生物,形成了结构复杂的微生物群落及较高的微生物多样性,从而使红树林生态系统成为挖掘活性菌株的理想宝库^[3]。

1904年,德国学者 Hiltner 提出“根际”这一概念,它指包含植物根系及根系周围的土壤微区^[4]。由于植物根系不断向周围土壤输送各种脱落物和分泌物,包括死亡的根系细胞(根毛、表皮细胞、根冠等)、可溶性有机酸以及挥发性有机碳等,吸引大量土壤微生物在其周围生长、繁殖。因此在植物根际周围形成了种类丰富的根际微生物^[5]。其中,植物根际促生菌(plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)是植物根际生态系统中的重要组成,在减少生物或非生物对植物的胁迫,维护植物健康生长,增加作物产量等方面发挥着重要作用^[6-9]。

目前,有关红树林植物根际促生菌已在国内外进行了较为广泛的探索研究。刘慧杰等采用 PCR-DGGE 技术揭示了福建九龙江口浮宫红树林区细菌多样性高于非红树林区,表明红树林沉积物中微生物多样性丰富^[10]。林鹏等通过研究红树林土壤微生物分布发现,细菌中以芽胞杆菌居多^[11]。Baskar 等从红树林副溶血弧菌 *Vibrio parahaemolyticus* 中分离纯化得到对哈氏弧菌 *Vibrio harveyi* 具有强抑制性的抗菌肽类弧菌素^[12]。研究发现红树林根际土壤中含有丰富的放线菌,并从中发现了具有抗菌促生活性的新型生防菌^[13-15]。黄媛林等自广西红树林根际土壤分离得到微小链霉菌 *Streptomyces parvulus* MCGG 2008,其具有拮抗植物病原真菌的生防潜力,所产的活性化合物为放线菌素 D^[16]。何仁发等在根际土壤中找到一株曲霉属真菌 *Aspergillus ochraceopetaliformis* F5,能分泌具有较强抗菌活性的发酵产物^[17]。王威等从广西红树林中分离筛选获得一株促进番茄生长的烟草肠杆菌 *Enterobacter tabaci* S4^[18]。Sengupta 等从不同种类红树林沉积物、根际及根表分离出多种归属于不同种属

的固氮菌,包括固氮螺菌属 *Azospirillum*、固氮菌属 *Azotobacter*、根瘤菌属 *Rhizobium* 和梭菌属 *Clostridium*^[19]。在现代绿色农业生产中,微生物菌肥的使用既响应了国家减施化肥的倡导,也维持了土壤安全并提高了作物产量。此外,微生物生防制剂因无毒无害、绿色环保等优点,广泛应用于绿色有机农业。因此,PGPR 的筛选和应用对农业可持续发展具有重大的意义。

本研究从具有丰富根际微生物的红树林根际土壤中筛选得到了一株具有促生防病的多功能 PGPR 菌株,利用分子生物学方法对其进行分类鉴定,以期新型微生物菌肥的开发提供优质的菌种资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 土壤样品的采集

土壤样品取自我国广西北海的红树林,挖取深度约为 2~40 cm 的红树林根际土壤沉积物,将采集的土壤放置无菌袋中,置于冰盒中低温保存带回实验室后-80℃保存备用。

1.1.2 番茄品种

试验所用番茄品种为‘改良毛粉 802’,购自天津市宏程芹菜研究所。

1.1.3 供试真菌

尖孢镰孢 *Fusarium oxysporum*、苜蓿疫霉 *Phytophthora boehmeriae*、麦根腐平脐蠕孢 *Bipolaris sorokiniana*、灰葡萄孢 *Botrytis cinerea*、茶蔗子葡萄座腔菌 *Botryosphaeria dothidea*、苹果黑腐皮壳菌 *Valsa mali*、瓜类炭疽菌 *Colletotrichum orbiculare*、稻绿核菌 *Ustilaginoidea virens*、禾谷镰孢 *Fusarium graminearum*、链格孢 *Alternaria alternata*、茶蔗子新壳梭孢 *Neofusicoccum ribis*、禾谷丝核菌 *Rhizoctonia cerealis*、玉米大斑凸脐蠕孢 *Exserohilum turcicum*、葡萄球座菌 *Guignardia bidwellii*、核盘菌 *Sclerotinia sclerotiorum*、玉蜀黍平脐蠕孢 *Bipolaris maydis*、天门冬拟茎点霉 *Phomopsis asparagi*、稻梨孢 *Pyricularia oryzae*、黑根霉 *Rhizopus nigricans* 由中国农业科学院植物保护研究所农

用抗生素研究室提供。

1.1.4 主要试剂和培养基

LB 培养基用于菌株的富集分离、发酵培养和保存。

DF 盐培养基: $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, KH_2PO_4 4.0 g, Na_2HPO_4 6.0 g, 柠檬酸 2.0 g, 葡萄糖 2.0 g, 葡萄糖酸钠 2.0 g, 组分一与组分二溶液各取 0.1 mL, H_2O 1 000 mL, pH 7.2。(组分一: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 78.2 mg, MoO_3 10.0 mg, H_3BO_3 10.0 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 124.6 mg, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 11.9 mg, 溶解于 100 mL 灭菌蒸馏水中。组分二: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100 mg 溶于 10 mL 灭菌蒸馏水中, 充分振荡)

ADF 培养基: 把 ACC(1-氨基环丙烷-1-羧酸)溶于超纯水, 用细菌过滤器过滤灭菌, 加入到不含有 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 且预先灭菌的 DF 盐培养基中, pH 7.2。ACC 添加的终浓度为 3.0 mmol/L。ADF 固体培养基: 每 1 L ADF 培养基中添加琼脂 20.0 g。用于 ACC 脱氨酶活性菌株的筛选。

生长素产出菌筛选培养基(R2A): 酵母粉 0.5 g, 葡萄糖 2.0 g, 胰蛋白胨 0.5 g, 酪蛋白氨基酸 0.5 g, 可溶性淀粉 0.5 g, K_2HPO_4 0.3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, 丙酮酸 0.3 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.2。使用时每 100 mL R2A 液体培养基与 100 μL 50 mg/mL 色氨酸溶液混合用于菌株的初筛。

蒙金娜无机磷培养基: 葡萄糖 10.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, NaCl 0.3 g, KCl 0.3 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g, 卵磷脂 0.2 g, CaCO_3 5.0 g, 酵母膏 0.4 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0。用于菌株溶磷能力的筛选。

Salkowski 试剂^[18]: 50 mL 35% HClO_4 + 1 mL 0.5 mol/L FeCl_3 。用于菌株分泌生长素(indole-3-acetic acid, IAA)能力的筛选。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株的筛选

菌株的富集及分离: 称取 5 g 土壤样品, 加入装有 20 mL 无菌水的锥形瓶内, 于 30℃、200 r/min 避光振荡培养 30 min, 形成悬浊液后, 取出静置分层。取 5 mL 上清液于 30 mL LB 液体培养基中, 30℃、200 r/min 避光振荡培养 24 h。取 1 mL 悬浮液至 50 mL DF 盐培养液中, 相同条件下培养 24 h, 然后

再取 1 mL 悬浮液至 ADF 培养基中, 转接 3 次后, 用接种环蘸取少量培养液, 在 ADF 固体培养基上划线分离, 30℃培养, 待平板上出现单菌落后, 挑取单菌落转接至 LB 斜面培养基上。

菌株的初筛及纯化: 将形态不同的单菌落挑取至 2 mL 含色氨酸的 R2A 液体培养基的离心管中, 于 30℃、200 r/min 摇床避光振荡培养 24 h, 以获得对应菌株的细菌悬浮液。

具溶磷能力的菌株筛选: 取 1 μL 浓度为 1×10^4 cfu/mL 初筛细菌悬浮液涂布于蒙金娜无机磷培养基中, 置于 34℃恒温培养箱中避光培养 24 h, 筛选有溶磷效果的菌株。若单菌落周围出现溶磷圈, 则说明菌株具有溶磷作用, 溶磷圈与单菌落直径比值越大代表该菌株的溶磷作用越强。

具产 IAA 能力的菌株筛选: 将具有溶磷能力的细菌悬浮液 12 000 r/min 离心 10 min, 取 100 μL 上清液与 100 μL Salkowski 比色液在 96 孔板内混合, 置于 38℃条件下避光保温 30 min, 测定 OD_{530} 。根据 IAA 标准曲线回归方程计算菌液中 IAA 含量。若显色时颜色变红, 则说明菌株具有产 IAA 的能力, 颜色越深说明该菌株产 IAA 的能力越强。

平板划线法对既具有溶磷作用又有产 IAA 能力的菌株进行纯化。将纯化后的单菌落移至 LB 液体培养基中, 于 30℃、200 r/min 避光振荡培养 24 h。将 500 μL 细菌悬浮液与 500 μL 40% 甘油混合, 置于一80℃保存。分离得到的菌株命名为 S2。

1.2.2 菌株的鉴定

1.2.2.1 形态及生理生化鉴定

观察菌株 S2 在 LB 培养基上的菌落颜色、形态及菌体的形态。按照细菌鉴定常规方法对菌株 S2 进行革兰氏染色及生化鉴定试验^[20]。

1.2.2.2 分子水平鉴定

将纯化后的菌株用 LB 液体培养基培养至对数生长期, 离心收集菌体, 提取细菌的基因组 DNA, 采用通用引物^[21](正向引物: 5'-AGAGTTTGATC-CTGGCTCAG-3'; 反向引物: 5'-ACGGCTACCTT-GTTACGACTT-3')扩增其 16S rRNA 基因片段。扩增产物经测序后, 将序列于 NCBI 中进行 BLAST 相似性检索, 采用 MEGA-X 软件构建基于 16S rRNA 序列的系统发育树。

1.2.3 菌株发酵液的制备

将纯化的菌株接种至 LB 固体培养基,置于恒温培养箱中 28℃ 遮光培养 24 h。在无菌条件下取约 1 cm² 大小的菌饼至 100 mL LB 液体培养基,28℃、220 r/min 振荡培养 24 h。将其分装于 50 mL 离心管中于 27℃、6 000 r/min 离心 6 min,取上清即得到发酵液。

取 9 个无菌离心管,将菌株发酵液依次按 10、10²、10³、10⁴、10⁵、10⁶、10⁷、10⁸、10⁹ 稀释倍数进行稀释,取 100 μL 稀释的菌液均匀涂布于 LB 固体培养基上,做 3 组平行试验,恒温培养箱中 28℃ 避光培养 24 h,对菌落数在 10~100 的平板进行菌落计数,求平均值^[8]。将菌株发酵液稀释为 1×10⁷ cfu/mL 并用 0.22 μm 细菌过滤器过滤,滤液用于番茄种子发芽试验和番茄幼苗生长试验。

1.2.4 菌株抑菌活性测定

采用平板对峙法测定菌株对供试病原真菌的拮抗活性。在无菌条件下,打取直径 6 mm 的病原真菌菌饼置于 PDA 平板中央,接种环挑取菌株 S2 在距平板中央 3 cm 处划直线,对照处理组仅接种病原真菌菌饼,每处理 3 次重复,置于培养箱中 27℃ 避光培养至对照组菌落长至平板的 3/4 后测量抑菌带宽度。若有明显的抑菌带,则说明 S2 菌株对该病原真菌具有拮抗作用,且抑菌带宽度越大,其拮抗作用越强。

1.2.5 菌株对番茄种子萌发的影响

选取籽粒饱满、大小一致的番茄种子,用 0.4% 高锰酸钾浸泡 10 min 进行表面消毒,用无菌水清洗 4~6 次,置于灭菌滤纸上晾干。将浓度为 1×10⁷ cfu/mL 菌株发酵滤液分别稀释为 1×10⁶、1×10⁵、2×10⁴、1×10⁴、5×10³ cfu/mL,取 5 个 50 mL 无菌离心管,每管放入 50 粒番茄种子,分别加入 10 mL 不同浓度的发酵滤液浸泡种子,24 h 后将种子整齐摆放于铺有无菌湿润滤纸的培养皿中,每处理设 3 次重复,对照组添加相同体积、相同稀释倍数的 LB 液体培养基,再设置一组无菌水对照,置于光照培养箱(28℃,L//D=16 h//8 h)培养。每天喷洒少量无菌水以确保种子湿润。

当胚根与种子等长,胚芽是种子 1/2 长时视为发芽。以发芽试验当天记作 0 d,8 d 后统计发芽势,10 d 后计算发芽率,计算发芽指数和活力指数^[7],运用 SPSS 20.0 软件进行数据处理。

发芽指数 $G_t = \sum \frac{G_t}{D_t}$,式中: G_t 为发芽试验 t 日

当日的发芽数; D_t 为相应的发芽日数; $\sum$ 为总和。

活力指数 $V = G_p \times G_t$,式中: G_p 为幼苗的生长势,本试验以幼苗平均根质量计算。

1.2.6 菌株对盆栽番茄幼苗生长的影响

试验所用营养基质按营养土:蛭石:珍珠岩=3:1:1 的比例配置,加入适量水拌匀后将其均匀置于穴盘中。在每个穴盘中播 3~4 粒番茄种子,在种子表面再覆盖一层薄薄的营养基质,用保鲜膜覆盖,置于光照培养箱(25℃,相对湿度 60%,L//D=16 h//8 h)中培养。待番茄幼苗长出 2 片子叶后去掉保鲜膜,间苗,保留长势较好的幼苗以备后续试验。

当番茄幼苗长至两片真叶时,选取长势一致的番茄幼苗,测定不同稀释倍数的菌株发酵液和 LB 液体培养基对番茄幼苗生长性状的影响,每个处理 20 株幼苗,进行 3 次平行试验,以施用等量清水为对照。每盆浇灌 30 mL,7 d 为一循环周期,共灌根 5 次,最后一次灌根结束后 7 d,测定各处理番茄幼苗的根长、株高和鲜质量,其中根长为根茎结合处到番茄根尖的长度,株高为子叶到生长点的长度。最后将番茄幼苗放入烘箱中,60℃ 烘干后测量干质量。

1.3 数据分析

本试验采用 MEGA-X 软件进行 Muscle 多序列同源性分析,并利用邻接法(neighboring-joining, NJ)构建系统发育树;采用 SPSS 24.0 (IBM, Armok, NY, USA)统计软件对番茄农艺指标进行单因素方差分析和 LSD 多重比较。

2 结果与分析

2.1 广西红树林根际土壤细菌菌株分离结果

前期初筛并纯化获得了 10 株细菌菌株(表 1)。各细菌菌株在蒙金娜无机磷固体培养基中溶磷圈直径以菌株 Gx-III2 和 Gx-III15 的最大,分别为 6.23 cm 和 6.13 cm。利用 IAA 标准曲线基于各菌株发生显色反应后的 OD₅₃₀ 计算得到其 IAA 产量,结果表明,菌株 Gx-III2 和 Gx-IV8 分泌的 IAA 产量相对较高,IAA 浓度分别为 13.311 μg/mL 和 9.196 μg/mL。综合溶磷及分泌 IAA 能力两个指标,选取溶磷及产 IAA 能力均较强的菌株 Gx-III2 进行下一步研究,并将其命名为菌株 S2。

表 1 广西红树林根际土壤细菌中具溶磷及产 IAA 能力的菌株筛选

Table 1 Screening of bacterial strain with phosphorus solubilization and IAA production capacity from rhizosphere soil of mangrove in Guangxi

菌株 Strain	溶磷圈直径/cm Diameter of soluble phosphorus circle	IAA 浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ IAA concentration
Gx-Ⅳ14	3.14±0.16	6.813±0.635
Gx-Ⅳ10	1.02±0.17	5.772±0.273
Gx-Ⅲ2	6.23±0.88	13.311±0.151
Gx-Ⅱ14	2.14±0.36	5.731±0.119
Gx-Ⅳ8	5.70±0.75	9.196±0.512
Gx-Ⅳ9	0.98±0.55	1.902±0.668
Gx-Ⅳ16	2.31±0.36	4.567±0.149
Gx-Ⅲ10	1.20±0.76	2.237±0.809
Gx-Ⅱ17	2.30±0.86	2.772±0.273
Gx-Ⅲ15	6.13±0.23	5.635±0.327

2.2 菌株 S2 的鉴定

2.2.1 形态及生理生化特征

菌株 S2 在 LB 培养基上的菌落呈乳白色，圆

形，表面光滑、湿润，革兰氏染色结果为阴性，菌体杆状。细菌微量生化鉴定检测结果表明(表 2)，菌株 S2 对吡啶试验、甲基红、阿拉伯糖、甘露醇、鼠李糖、蔗糖、柠檬酸盐试验呈阳性，对葡萄糖、侧金盏花醇、乳糖和山梨醇试验为阴性。

2.2.2 16S rRNA 序列分析

利用所提取的细菌总 DNA 为模板扩增该菌株的 16S rRNA 片段，得到了长度为 1 300 bp 的目的片段(图 1)，测序后在 NCBI 中进行 BLAST 相似性检索，得到同源性较高的菌株，通过构建 16S rRNA 基因序列系统发育树(图 2)表明，分离菌株与从土壤中分离得到的产气克雷伯氏杆菌 *Klebsiella aerogenes* ATCC13048(MW322925)聚为一支，亲缘关系较近，一致性达到 99%。初步将菌株 S2 归属于克雷伯氏菌属 *Klebsiella*。

表 2 从广西红树林根际土壤分离的细菌菌株 S2 的生理生化特征¹⁾

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of bacterial strain S2 isolated from rhizosphere soil of mangrove in Guangxi

测定项目 Testing item	生理生化特征 Physiological and biochemical characteristics	测定项目 Testing item	生理生化特征 Physiological and biochemical characteristics
革兰氏染色 Gram's stain	—	阿拉伯糖 Arabinose	+
吡啶试验 Indole	+	葡萄糖 Glucose	—
甲基红 Methyl red	+	乳糖 Lactose	—
甘露醇 Mannitol	+	山梨醇 Sorbitol	—
鼠李糖 Rhamnose	+	侧金盏花醇 Adonitol	—
蔗糖 Sucrose	+	柠檬酸盐 Citrate	+

1) “+”代表阳性; “—”代表阴性。
“+” represents positive; “—” represents negative.

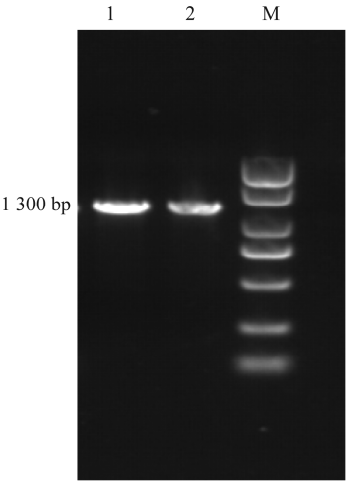


图 1 从广西红树林根际土壤中分离的细菌菌株 S2 16S rRNA 基因片段的扩增
Fig.1 Amplification of 16S rRNA gene fragment of bacterial strain S2 isolated from rhizosphere soil of mangrove in Guangxi

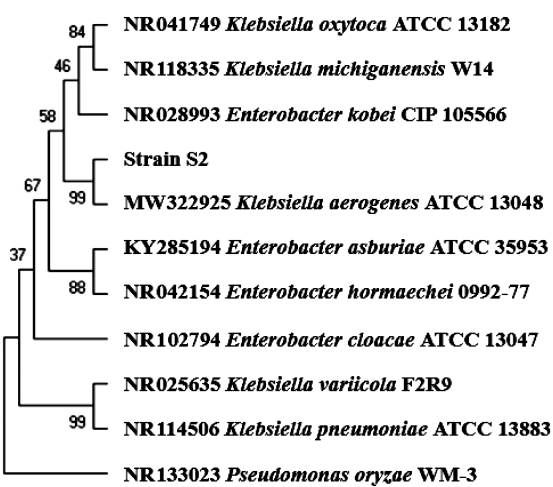
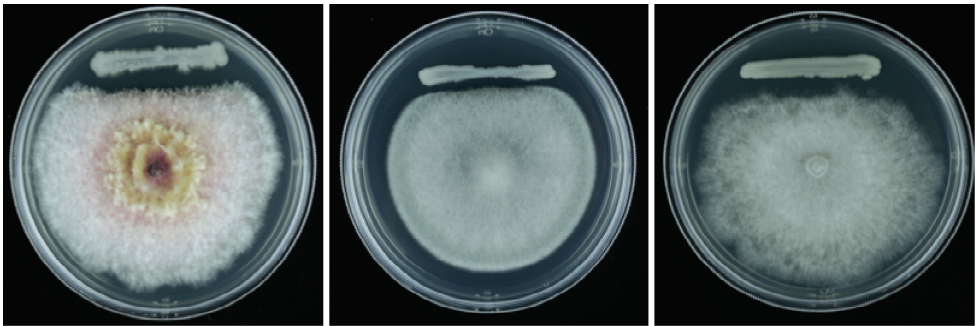


图 2 基于广西红树林根际土壤中分离的细菌菌株 S2 及相关细菌 16S rRNA 序列的系统发育树
Fig.2 The phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences of bacterial strain S2 isolated from rhizosphere soil of mangrove in Guangxi and related bacteria strains

2.3 菌株 S2 的抑菌活性

通过平板对峙培养试验测定 S2 菌株对 19 种植物病原真菌的拮抗效果,结果(图 3)表明,S2 菌株对其中 3 种病原真菌具有不同程度的拮抗效果,对禾谷镰孢 *Fusarium graminearum* 和茶蔗子新壳梭孢

Neofusicoccum ribis 的拮抗作用最强,抑菌带宽度分别达到 0.57 cm 和 0.55 cm,对玉蜀黍平脐蠕孢 *Bipolaris maydis* 的拮抗作用相对较弱,抑菌带宽度为 0.36 cm。对其他 16 种病原真菌不具拮抗效果。



从左到右依次为: 禾谷镰孢、玉蜀黍平脐蠕孢和茶蔗子新壳梭孢
From left to right: *Fusarium graminearum*, *Bipolaris maydis* and *Neofusicoccum ribis*

图 3 广西红树林根际土壤中分离的细菌菌株 S2 对 3 种病原真菌的拮抗效果

Fig. 3 Antagonistic effects of bacterial strain S2 isolated from rhizosphere soil of mangrove in Guangxi against three pathogenic fungi

2.4 菌株 S2 对番茄种子萌发的影响

S2 菌株对番茄种子萌发的试验结果(表 3)表明,清水浸种处理后番茄种子发芽率和发芽势分别为 71.33% 和 60.00%,经 S2 菌株发酵液稀释 1 000 倍(即 1×10^4 cfu/mL)处理后分别达到 90.67% 和 74.00%,高于发酵培养基稀释 2 000 倍

浸泡处理后的 80.67% 和 62.67%。从发芽指数和活力指数来看,仅有 1×10^4 cfu/mL 菌株发酵液浸泡后番茄种子的发芽指数和活力指数显著高于清水对照。因此,当菌株发酵液浓度在 1×10^4 cfu/mL 时促生效果最佳,随着浓度的升高,对番茄种子萌发则表现出一定的抑制作用。

表 3 广西红树林根际土壤中分离的细菌菌株 S2 发酵液对番茄种子萌发的影响¹⁾

Table 3 Effects of fermentation broth of bacterial strain S2 isolated from rhizosphere soil of mangrove in Guangxi on germination of tomato seeds

处理 Treatments	稀释倍数/倍 Dilution multiple	发芽率/% Germination rate	发芽势/% Germination potential	发芽指数 Germination index	活力指数 Vigor index
1×10 ⁷ cfu/mL 菌株发酵液 1×10 ⁷ cfu/mL fermentation broth	10	(60.00±0.70)d	(51.33±0.19)c	(20.62±0.35)c	(89.08±3.15)d
	100	(74.67±1.21)c	(57.67±0.23)c	(25.22±0.25)b	(115.01±5.32)c
	500	(81.33±0.14)b	(67.33±1.03)ab	(29.16±0.75)ab	(159.21±6.74)b
	1 000	(90.67±1.07)a	(74.00±1.24)a	(35.59±0.26)a	(218.52±7.12)a
	2 000	(80.67±0.98)b	(62.67±0.13)b	(28.21±1.23)b	(168.77±5.44)b
LB	10	(57.33±1.32)d	(52.67±0.87)c	(17.72±0.63)d	(65.21±5.36)d
	100	(70.67±0.32)c	(60.67±0.76)b	(26.54±1.06)b	(126.86±7.13)c
	500	(71.33±1.85)c	(61.33±0.76)b	(28.21±1.72)b	(163.05±8.36)b
	1 000	(79.33±1.37)b	(64.67±1.12)b	(32.14±1.04)ab	(131.77±3.99)c
	2 000	(80.67±0.95)b	(68.00±1.42)ab	(32.59±0.85)ab	(164.25±6.15)b
清水 CK	—	(71.33±0.94)c	(60.00±0.56)b	(25.46±0.63)b	(164.39±7.19)b

1) 表中数据为平均值±标准差。采用 LSD 法进行显著性分析,不同小写字母表示同列数据在 0.05 水平差异显著。下同。
The data are mean±SD. Different lowercase letters in the same column indicate significant differences at 0.05 level based on LSD test. The same applies below.

2.5 菌株 S2 对盆栽番茄幼苗生长的影响

对菌株发酵液和 LB 培养基处理后的番茄幼

苗根长、株高、鲜质量和干质量等农艺学指标的测定结果表明(表 4),S2 菌株发酵液稀释 500 倍和

1 000 倍(即 2×10^4 、 1×10^4 cfu/mL)与同样稀释倍数的 LB 培养基处理后的番茄幼苗在根长、株高、鲜质量和干质量方面都存在显著差异。其中菌株发酵

液浓度为 2×10^4 cfu/mL 时对番茄的促生效果最好,其根长、株高、鲜质量和干质量分别 7.25 cm、7.19 cm、0.58 g 和 0.05 g。

表 4 广西红树林根际土壤中分离的细菌 S2 菌株发酵液对番茄幼苗生长的影响

Table 4 The effect of fermentation broth of strain S2 isolated from rhizosphere soil of mangrove in Guangxi on tomato growth

处理 Treatment	稀释倍数/倍 Dilution multiple	根长/cm Root length	株高/cm Plant height	鲜质量/g Fresh weight	干质量/g Dry weight
1×10 ⁷ cfu/mL 菌株发酵液	500	(7.25±1.20)a	(7.19±0.97)a	(0.58±0.14)a	(0.05±0.01)a
1×10 ⁷ cfu/mL fermentation broth	1 000	(6.40±1.64)b	(6.82±0.94)ab	(0.57±0.13)a	(0.04±0.01)a
LB	500	(6.74±1.40)ab	(5.76±0.86)c	(0.38±0.10)b	(0.03±0.01)b
	1 000	(7.21±1.72)a	(6.64±1.12)b	(0.42±0.09)b	(0.03±0.01)b
清水 CK	—	(5.44±0.92)c	(5.09±0.79)d	(0.29±0.06)c	(0.02±0.01)c

3 结论与讨论

PGPR 作为植物根际生态系统的重要组成部分,在改善植物营养、促进作物生长、提高肥药效和减施化肥农药等方面发挥着重要的作用。因此,从被认识发现以来一直是国内外科研工作者的研究热点,也被农业生产者广泛应用于农、林、园艺以及环境修复等方面。

目前已报道的植物根际促生菌大多属于芽胞杆菌属 *Bacillus* 和假单胞菌属 *Pseudomonas*,此外,还包括黄单孢菌属 *Xanthomonas*、节杆菌属 *Arthrobacter*、伯克霍氏菌属 *Burkholderia*、弗兰克氏菌属 *Frankia*、固氮菌属 *Azotobacter* 等^[6]。本研究从红树林根际土壤中分离获得一株兼具防病促生的细菌菌株 S2,经形态、生理生化及分子生物学鉴定为产气克雷伯氏菌,属于肠杆菌目 Enterobacterales,肠杆菌科 Enterobacteriaceae,克雷伯氏菌属 *Klebsiella*,是革兰氏阴性菌,在系统发育树中与产气克雷伯氏菌 *K. aerogenes* ATCC13048 亲缘关系较近。*K. aerogenes* 最初被划分于产气杆菌属 *Aerogenes*,直到 1960 年,产气杆菌属被重新命名为肠杆菌属 *Enterobacter*。最近,基于全基因组测序(whole genome sequencing)分析结果,将其重新命名为产气克雷伯氏菌 *K. aerogenes*^[21-25]。目前,国内外未有将产气克雷伯氏菌作为一种具有防病促生潜力的多功能植物根际促生菌的相关报道。

PGPR 的作用机制主要包括活化土壤养分(生物固氮、活化土壤有机氮、难溶性磷和钾等)、合成植物生长激素(生长素、赤霉素、细胞分裂素、脱落酸、乙烯等)、分泌铁载体以及拮抗病原微生物等^[26]。将土壤中难溶性无机磷及有机磷活化并释放有效磷

是 PGPR 的重要作用机理之一。本研究首次发现产气克雷伯氏菌 S2 兼具溶磷和产 IAA 能力,同时具有较好的促生效果。研究发现,产酶溶杆菌 *Ly-sobacter enzymogenes* LE16 能活化土壤中有机磷并促进植物生长^[27]。葛春辉等发现,短小芽胞杆菌 *Bacillus pumilus* SGM7 因具产 IAA 能力对黄瓜幼苗生长具有显著的促进作用^[28]。PGPR 的生防作用是间接促进植物生长的重要原因之一,一般是多种机制共同发挥作用。研究表明,PGPR 主要通过产生抗生素、分泌 β -1,3-葡聚糖酶(β -1,3-glucanase)、几丁质酶(chitinase)等一系列水解酶、诱导系统抗性(induced systemic resistance, ISR)以及与土壤病原微生物竞争营养及生态位等发挥作用,从而有效拮抗病原微生物。Odhiambo 等发现产酶溶杆菌 *L. enzymogenes* OH11 能分泌一种具有热稳定性的次生代谢产物,能够分解禾谷镰孢 *Fusarium graminearum* PH1 的菌丝^[29]。沙雷氏菌属 *Serratia* 和芽胞杆菌属细菌能分泌多种类型的几丁质酶,作用于病原真菌细胞壁中几丁质的糖苷键,从而抑制病原真菌的生长繁殖^[30]。本研究发现产气克雷伯氏菌菌株 S2 对多种植物病原真菌具有一定的抑制效果,但对其具体抗病机理还未明确。综上,本研究丰富了 PGPR 的种类,为进一步研究开发新型、高效微生物菌肥提供了理论依据,对促进绿色可持续农业生产具有重大的意义。

参考文献

[1] 廖雨霞,潘良浩,阎冰,等. 广西廉州湾红树林群落分布特征及物种多样性分析[J]. 广西科学院学报, 2020, 36(4): 361-370.
[2] 韩敏敏,李蜜,高程海,等. 海南西海岸 4 种真红树植物根际土壤细菌多样性及其生物活性研究[J]. 南方农业学报, 2020,

- 51(2): 327–334.
- [3] 叶景静. 广西茅尾海红树林植物根际土壤放线菌多样性及抗菌活性研究[D]. 桂林: 桂林医学院, 2020.
 - [4] HILTNER L. Über neuer erfahrungen und probleme auf dem gebiete der bodenbakteriologie unter besonderden berucksichtigung und brache [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1904, 32: 1405–1417.
 - [5] HAICHAR F Z, MAROL C, BERGE O, et al. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure [J]. The ISME Journal, 2008, 2(12): 1221–1230.
 - [6] 曹莹. 湿地根际微生物对磷的转化释放及植物吸收的影响[D]. 南京: 东南大学, 2018.
 - [7] 方静, 赵小庆, 史功赋, 等. 农作物根际微生物的研究进展[J]. 北方农业学报, 2019, 47(4): 102–107.
 - [8] 韩笑. 根际促生菌的筛选及其促进水稻在盐碱胁迫下生长的作用[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2019.
 - [9] 陈丹梅. 产酶溶杆菌新株 *Lysobacter enzymogenes* LE16 的促生防病作用及机理[D]. 重庆: 西南大学, 2020.
 - [10] 刘慧杰, 杨彩云, 田蕴, 等. 基于 PCR-DGGE 技术的红树林区微生物群落结构[J]. 微生物学报, 2010, 50(7): 923–930.
 - [11] 林鹏, 张瑜斌, 邓爱英, 等. 九龙江口红树林土壤微生物的类群及抗菌活性[J]. 海洋学报, 2005(3): 133–141.
 - [12] BASKAR B, JAYAPPRIYAN K, SATHISH T, et al. Purification characterization and production optimization of a vibriocin produced by mangrove associated *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2014, 4(4): 253–261.
 - [13] 郑红芸. 广西茅尾海红树林根围淤泥放线菌多样性及抗菌活性[D]. 桂林: 桂林医学院, 2019.
 - [14] 赵雅慧, 张舒琳, 吴家法, 等. 山口红树林根际土壤可培养细菌多样性及其活性筛选[J]. 海洋学报, 2018, 40(8): 138–151.
 - [15] 吴家法, 吴思婷, 李智鸣, 等. 茅尾海红树林土壤可培养放线菌多样性及其抗尖孢镰刀菌活性分析[J]. 中国抗生素杂志, 2017, 42(4): 294–301.
 - [16] 黄媛林, 潘信利, 陆璐, 等. 一株红树林链霉菌所产抑菌活性化合物的分离及其生物合成基因簇的研究[J]. 中国抗生素杂志, 2021, 46(12): 1090–1101.
 - [17] 何仁发, 李明月, 王娟, 等. 木榄根际土壤来源的曲霉属真菌 F5 及其抗菌活性代谢产物[J]. 菌物学报, 2010, 29(5): 732–738.
 - [18] 王威, THINZAR T, 张亚, 等. 一株烟草肠杆菌(*Enterobacter tabaci*)S4 菌株的鉴定及其效果测定[J]. 农业资源与环境学报, 2020, 37(3): 407–412.
 - [19] SENGUPTA A, CHAUDHURI S. Halotolerant rhizobium strains from mangrove swamps of the Ganges River Delta [J]. Indian Journal of Microbiology, 1990, 30: 483–484.
 - [20] 蔡妙英, 东秀珠. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
 - [21] MARTIN-LAURENT F, PHILIPPOT L, HALLET S, et al. DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 6(5): 2354–2359.
 - [22] WESEVICH A, SUTTON G, FOUTS D, et al. Newly-named *Klebsiella aerogenes* is associated with poor clinical outcomes relative to *Enterobacter cloacae* complex in patients with bloodstream infection [J]. Open Forum Infectious Diseases, 2019, 58(9): 129–136.
 - [23] BROOKE M. The differentiation of *Aerobacter aerogenes* and *Aerobacter cloacae* [J]. Journal of Bacteriology, 1953, 66(6): 721–726.
 - [24] DAVIN-REGLI A, PAGÈS J. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae* versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment [J/OL]. Front Microbiology, 2015, 6: 392. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00392.
 - [25] CHAVDA K, CHEN L, FOUTS D, et al. Comprehensive genome analysis of carbapenemase-producing *Enterobacter* spp.: new insights into phylogeny, population structure, and resistance mechanisms [J/OL]. mBio, 2016, 7: e02093–16. DOI: 10.1128/mBio.02093-16.
 - [26] TINDALL B, SUTTON G, GARRITY G, et al. *Enterobacter aerogenes* Hormaeche and Edwards 1960 (Approved Lists 1980) and *Klebsiella mobilis* Bascomb et al. 1971 (Approved Lists 1980) share the same nomenclatural type (ATCC 13048) on the Approved Lists and are homotypic synonyms, with consequences for the name *Klebsiella mobilis* Bascomb et al. 1971 (Approved Lists 1980) [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2017, 67(2): 502–504.
 - [27] CHEN Danmei, HUANG Jiangguo, YUAN Ling, et al. A new function of the biocontrol bacterium *Lysobacter enzymogenes* LE16 in the mineralization of soil organic phosphorus [J]. Plant and Soil, 2019, 442(1/2): 299–309.
 - [28] 葛春辉, 孟阿静, 马彦茹, 等. 一株黄瓜根际促生菌的筛选、鉴定及其发酵特性[J]. 生物技术通报, 2014(3): 94–99.
 - [29] ODHIAMBO B O, XU Gaoge, QIAN Guoliang, et al. Evidence of an unidentified extracellular heat-stable factor produced by *Lysobacter enzymogenes* (OH11) that degrade *Fusarium graminearum* PH1 hyphae [J]. Current Microbiology, 2017, 74(4): 437–448.
 - [30] RATHORE A, GUPTA R. Chitinases from bacteria to human: properties, applications, and future perspectives [J/OL]. Enzyme Research, 2015(5): 791907. DOI: 10.1155/2015/791907.

(责任编辑: 杨明丽)