

文章编号 :1003-8701(2009)01-0014-03

BPS28 发酵液抗菌谱及抗菌物质稳定性测试

姜海波^{1,2},徐文静²,杜茜²,许修宏^{1*},李启云^{2*}

(1.东北农业大学,哈尔滨 150030;2.吉林省农业科学院生物技术中心,长春 130033)

摘要:链霉菌菌株 *Streptomyces baichengensis* BPS28 是本实验室分离得到的一株对多种植物病原菌有拮抗作用的菌株。本文对 BPS28 发酵液的抗菌谱及在不同条件下的稳定性进行了测定,结果表明,BPS28 对实验中的 21 种病原菌均有很好的抑菌作用,对水稻稻瘟病的抑菌率达 75% 以上,其发酵液的热稳定性差、光稳定性较好、在 pH3~7 的环境下稳定、不宜室温保存、可在 4℃ 冰箱保存 1~6 个月。

关键词:农用抗生素;BPS28;发酵液;抑菌谱;稳定性

中图分类号:S482.2[†]8

文献标识码:A

The Inhibition Spectrum and Stability Determination of BPS28 Fermentation Production

JIANG Hai-bo^{1,2}, XU Wen-jing², DU Qian², XU Xiu-hong^{1*}, LI Qi-yun^{2*}

(1. Northeast Agricultural University, Harbin 150030; 2. Biotechnology Research Center, Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province, Changchun 130033, China)

Abstract: BPS28, which was a kind of antagonistic microorganisms against many plant pathogens, was isolated from soil by Biotechnology Research Center, Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province. In this paper, the inhibition spectrum and stability of BPS28's fermentation production were confirmed. The results showed that it had better activity to twenty-one kinds of plant pathogens and its inhibition rate to Rice Blast was more than 75% in our experiment. It was sensitive to temperature and was steady-going to illumination. It was steady at pH 3-7. It was not suitable for keeping in room condition, but it can be stored for about 1-6 months in 4℃ refrigerator.

Key words: Agricultural antibiotics; BPS28; Fermentation production; Inhibition spectrum; Stability

农用抗生素作为生物农药的重要类群之一,正日益受到世界各国的青睐^[1-3],而链霉菌菌株是产生抗生素的主要来源。本实验室几年来一直致力于农用抗生素的基础研究,链霉菌 BPS28 是本实验室从吉林省白城市土样中分离得到的一株放线菌,经鉴定、命名为 *Streptomyces baichengensis* BPS28,其发酵液对水稻稻瘟病有拮抗作用,平均抑菌率达 75% 以上。经平板拮抗试验证实,该菌株发酵液对 21 株植物病原菌有拮抗作用,是一种极具应用前景的新型广谱农用抗生素菌株,其

稳定性将直接影响该菌株的抗生素提取工艺及产业化前景。因此,本文对链霉菌菌株 *Streptomyces baichengensis* BPS28 的发酵液在不同条件下的稳定性进行了测定,其结果为抗生素的提取及开发新型农用抗生素提供了必要的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株

链霉菌菌株 *Streptomyces baichengensis* BPS28 是本试验室分离得到的一株放线菌(以下简称为 BPS28)。

发酵液活性检测指示菌为水稻稻瘟病菌 (*Magnaporthe grisea*),由吉林省农科院植保所提供。

收稿日期:2008-03-01

作者简介:姜海波(1982-),女,硕士,从事生物农药研究。

通讯作者:李启云,男,博士,研究员,E-mail:qyli@cjaas.com

许修宏,男,博士,教授,E-mail:howard2857@hotmail.com

供试病原菌构巢曲霉菌、大肠杆菌、枯草杆菌、金黄色葡萄球菌和分枝杆菌从中国科学院微生物研究所购买,其他菌株由本实验室提供。

1.1.2 供试培养基

BPS28 生长培养基(高氏一号):可溶性淀粉 20 g、硝酸钾 1 g、氯化钠 0.5 g、磷酸氢二钾 0.5 g、硫酸镁 0.5 g、硫酸亚铁 0.01 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1 000 mL、pH 7.2~7.4,高压灭菌后使用。

BPS28 发酵培养基(本实验筛选):葡萄糖 2.0%、黄豆饼粉 2.0%、可溶性淀粉 1.5%、蛋白胨 0.6%、碳酸钙 0.4%、硫酸铵 0.3%、氯化钠 0.3%、硫酸镁 0.05%、磷酸二氢钾 0.05%、硫酸亚铁 0.005%、pH 6.0,250 mL 的三角瓶每瓶分装 40 mL,高压灭菌后备用。

活性检测培养基(PDA):去皮马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 15 g、蒸馏水 1 000 mL,pH 自然,高压灭菌后备用。

1.2 方法

1.2.1 BPS28 发酵液的制备

取直径为 7 mm 的 BPS28 菌块接种到发酵培养基中,28℃、190 r/min 摇床振荡培养 72 h 后取出,4℃冰箱保存备用。

1.2.2 BPS28 发酵液抗菌谱的测定

采用生长速率法^[4]对 21 种植物病原菌进行 BPS28 发酵液抑菌谱测定,将发酵液和 PDA 培养基以 1:40 的比例混匀后倒平板,平板中心接直径为 10 mm 的病原菌菌块,设清水为对照,每个处理重复 3 次,28℃倒置培养,生长 7~10 d 后分别测量菌落直径,按下列公式计算抑菌率。

抑菌率(%)=(对照菌菌落直径 - 处理菌菌落直径)/(对照菌菌落直径 - 菌块直径)× 100

1.2.3 BPS28 发酵液的稳定性测试

1.2.3.1 BPS28 发酵液热稳定性测试

取若干个试管,每管分装 10 mL 发酵液,分别在 40、60、80、100℃下水浴 30、60、90、120、180 min 及在 121℃高压下灭菌 15 min,待自然冷却后以原始发酵液为对照测各处理的抑菌活性,活性指示菌为水稻稻瘟病菌,测定方法参照拮抗法^[5],BPS28 发酵液的点样量为 50 μL,设清水为对照,每个处理 3 个重复,28℃倒置培养 7 d 后测处理菌生长半径及对照菌生长半径,按下列公式计算抑菌率。

抑菌率(%)=(对照菌生长半径 - 处理菌生长半径)/对照菌生长半径× 100

1.2.3.2 BPS28 发酵液光稳定性测试

取 10 mL 发酵液于试管中,分别在自然光下照射 6、12、18、24 h 后测定其抑菌活性的变化,活性测定方法同 1.2.3.1。

1.2.3.3 BPS28 发酵液酸碱稳定性测试

取 13 份发酵液样品,每份 10 mL 发酵液,分别用 1 mol·L⁻¹草酸、1 mol·L⁻¹NaOH 将样品分别调成 pH 值 1.0~13.0,同时测原始发酵液活性,活性测定方法同 1.2.3.1。

1.2.3.4 BPS28 发酵液常温保存的稳定性测试

取 24 份发酵液样品,每管分装 5 mL,一份室温保存,一份 4℃冰箱保存,每隔 1 个月测定样品的抑菌活性,测定 12 个月,活性测定方法同 1.2.3.1。

2 结果与分析

2.1 BPS28 发酵液的抗菌谱测定

在 BPS28 发酵液抑菌谱测定采用的 21 株病原菌中(表 1),BPS28 发酵液对其中的 16 株病原菌的抑菌活性都达到了 50%以上,其中对大肠杆菌、水稻恶苗菌、构巢曲霉菌的抑菌率达到 90%以上,对禾谷镰刀病原菌、枯草杆菌、金黄色葡萄球菌、番茄灰霉病原菌及小麦赤霉病菌等 4 株病原菌的抑菌率达到 80%以上,说明 BPS28 发酵液对试验中的 21 种植物病原菌有较好的抑制作用。

表 1 BPS28 发酵液的抑菌谱测定

病原菌名称	抑菌率(%)
大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>)	94.24
水稻恶苗(<i>Fusarium moniliforme</i> Sheld)	93.62
构巢曲霉菌(<i>Aspergillus nidulans</i>)	92.25
禾谷镰刀病原菌(<i>Fusarium graminearum</i>)	89.06
枯草杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>)	86.44
金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)	83.56
番茄灰霉病原菌(<i>Botrytis cinerea</i>)	82.81
小麦赤霉病菌(<i>Fusarium graminearum</i>)	80.53
烟草赤星病菌(<i>Alternaria alternata</i>)	72.22
大豆霜霉病原菌(<i>Peronospora manshurica</i>)	71.05
黄瓜黑星病菌(<i>Cladosporium cucumerinum</i>)	68.00
玉米穗腐病原菌(<i>Gibberella zeae</i>)	67.95
大豆灰斑病菌(<i>Cercosporidium sojinum</i>)	65.81
番茄叶霉病原菌(<i>Fulvia fulva</i>)	64.58
分枝杆菌(<i>Mycobacterium</i>)	53.13
番茄炭疽病菌(<i>Colletotrichum coccodes</i>)	50.00
葡萄霜霉病原菌(<i>Plasmopara viticola</i>)	47.27
辣椒黑斑病原菌(<i>Alternaria alternate</i>)	20.95
白菜白斑病菌(<i>Pseudocercospora ellacapsella</i>)	16.67
番茄早疫病原菌(<i>Alternaria solani</i>)	16.49
玉米弯孢病菌(<i>Curvularia lunata</i>)	14.77

2.2 BPS28 发酵液稳定性测试

2.2.1 热稳定性

处理温度的提高和处理时间的延长对 BPS28 发酵液的抑菌活性影响都很大(图 1),当处理温度

一定时,随着处理时间的延长,BPS28 发酵液的抑菌活性逐渐降低;当处理时间一定时,随着处理温

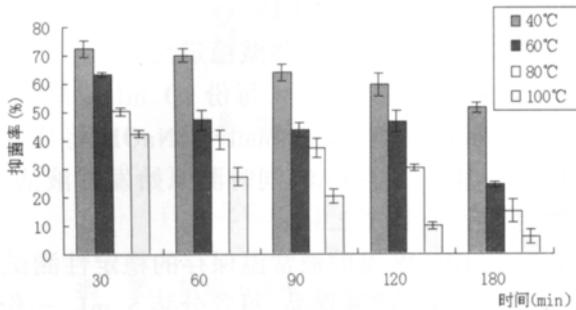


图1 BPS28 发酵液热稳定性

度的升高,BPS28 发酵液的抑菌活性逐渐降低。

当 BPS28 发酵液在 40℃ 水浴处理下从 30 min 延长到 180 min 时,抑菌率从 72% 下降到 52%,表明在低温处理时,随着处理时间的延长,发酵液的抑菌活性逐渐下降,说明低温对发酵液的抑菌活性也有影响。当 BPS28 发酵液在 100℃ 水浴处理 30 min 时,抑菌活性就降到了 50% 以下,处理 120 min 时几乎没有活性,而在 121℃ 高压灭菌 15 min 时,抑菌活性完全丧失,说明高温对发酵液的抑菌活性影响很大。综上所述,BPS28 发酵液对热敏感,热稳定性差。

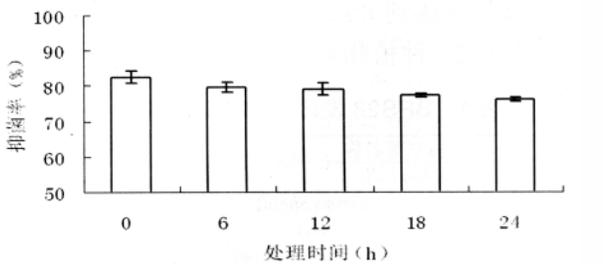


图2 BPS28 发酵液光稳定性

2.2.2 光稳定性

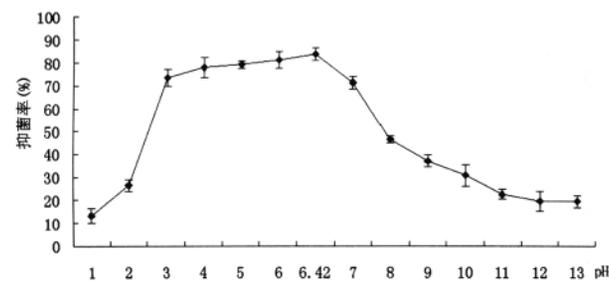


图3 BPS28 发酵液酸碱稳定性

当持续光照 24 h 时,抑菌活性从 82% 逐渐下降到 76%(图 2),说明光照对 BPS28 发酵液有一定的影响,但不是影响 BPS28 发酵液抑制活性的主要因素。

2.2.3 酸碱稳定性

BPS28 发酵液的初始 pH 值为 6.42,其抑菌活性为 84%,当 pH 在 3.0~7.0 的范围内时,其抑菌活性和原始发酵液相差不大(图 3),都在 70% 以上,当 pH 调到 2.0 时,抑菌活性显著下降到 30% 以下,当 pH 调到 7.0~13.0 时,抑菌活性逐渐从 70% 下降到 20% 以下,说明 BPS28 发酵液是在微酸性条件下抑菌活性比较好,强酸强碱抑制 BPS28 发酵液的抑菌活性。

2.2.4 常温保存的稳定性

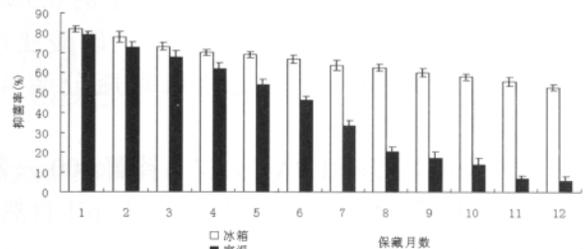


图4 BPS28 发酵液长期保存的稳定性

BPS28 发酵液在室温放置 12 个月时,抑菌活性从 79% 急剧下降到 6%(图 4),几乎没有活性;而在 4℃ 冰箱保存 12 个月时,抑菌活性也有下降,从 81% 下降到 52%。由此说明,BPS28 发酵液不适宜室温保存,即使在 4℃ 冰箱保存也是对活性有影响的,不宜长期保存。

3 结论和讨论

BPS28 发酵对多种植物病原菌具有抑制作用,是一株广谱的农用抗生素拮抗菌株,具有良好的产业化前景。BPS28 发酵液具有较好的光稳定性,在 pH 为 3.0~7.0 的环境中可保持稳定的抑菌活性,但其热稳定性差、不宜在室温保存、在 4℃ 冰箱中也不适宜长期保存的特性,对该菌株发酵液的稳定性有一定的影响,需要对该菌株的抗菌物质进行进一步的提取,并对其贮藏条件进行进一步的研究,以拓宽该菌株的开发应用前景。

参考文献:

- [1] 王镜岩,朱对庚,徐长法.生物化学[M].北京:高等教育出版社(第三版),2004,537-546.
- [2] 余凤玉,李振华,曾会才.抗真菌农用抗生素的研究进展[J].热带农业科学,2005,25(1):60-64.
- [3] 包建中,古德祥.中国生物防治[M].太原:山西科学技术出版社,1998:521-522.
- [4] 疏秀林.土壤拮抗放线菌的分离、筛选及活性产物的研究[D].西北农林科技大学,硕士论文,2005:6-30.
- [5] 方中达.植物病理研究方法[M].北京:农业出版社,1979.