

文章编号:1003-8701(2010)02-0027-03

放线菌菌株 1a 发酵液抗菌谱及 抗菌物质稳定性研究

王琳¹, 姜云², 马贵龙^{1*}

(1. 吉林农业大学农学院, 长春 130118; 2. 吉林农业大学生命科学学院, 长春 130118)

摘要: 采用琼脂扩散法对放线菌菌株 1a 发酵液进行了抗菌谱测定。结果表明, 菌株 1a 发酵液对 9 种常见植物病原真菌有很好的抑制作用, 其中对人参锈腐菌抑菌活性最强, 抑菌圈直径可达 22 mm。稳定性测定结果表明菌株 1a 发酵液低温贮藏效果好, 对热及紫外光照稳定性较强, 对极端酸碱环境稳定性较差。

关键词: 放线菌; 菌株 1a; 发酵液; 抗菌谱; 稳定性

中图分类号: S482.28

文献标识码: A

Studies on Antifungal Spectrum and Stability of Fermentation Liquid from Actinomycete Strain 1a

WANG Lin¹, JIANG Yun², MA Gui-long¹

(1. College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130118;

2. College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: Antifungal spectrum of fermentation liquid from actinomycetes strain 1a was determined by the use of agar diffusion method in the experiment. The results showed that the fermentation liquid had good inhibiting effects against nine common plant pathogenic fungi, among which the best inhibiting effect was against *Cylindrocarpon destructans*, the diameter of inhibition ring was 22 millimeters. Results of Stability tests showed that it had strong stabilities towards heat and UV-irradiation and should be stored in low temperature, but it easily lost stability in extreme acid-base environment.

Keywords: Actinomycetes; Strain 1a; Fermentation liquid; Antifungal spectrum; Stability

农用抗生素来源于微生物, 特别是放线菌, 据统计, 在 1000 多种抗生素中约有 2/3 以上是由放线菌产生的, 而链霉菌属放线菌产生的抗菌素又占放线菌目的 90% 以上^[1]; 且放线菌广泛存在于各类土壤中。单就微生物而言, 已被人类研究过的不足自然界存在的 1%, 而这些研究过的微生物中, 只发现了其中的 1% 能产生生物活性物质, 其潜力是显而易见的。放线菌菌株 1a 是属于链霉菌属的一株放线菌^[2]。本研究对其发酵液的抗菌谱范围及其在不同条件下抗菌活性的稳定性进行

了测定, 以便为菌株 1a 的进一步开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株

放线菌菌株 1a 由吉林农业大学农学院真菌研究室提供。

发酵液活性检测指示菌为人参锈腐菌(*Cylindrocarpon destructans*)。

其它供试病原菌见表 1。

1.1.2 培养基

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

收稿日期: 2010-02-22

基金项目: 吉林省教育厅项目(2008-307)

作者简介: 王琳(1985-), 女, 硕士, 从事生物防治研究。

通讯作者: 马贵龙, 男, 博士, 教授, E-mail: guilongma@163.com

mL, pH 7.2~7.4, 高压灭菌后备用。

发酵培养基:玉米粉 3%、葡萄糖 1%、大豆粉 2%、酵母粉 0.3%、 KH_2PO_4 0.1%、 CaCO_3 0.3%、 NaCl 0.1%, pH 值为 7.0, 250 mL 的三角瓶每瓶分装 30 mL, 高压灭菌后备用。

种子液培养基同发酵培养基。

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 菌株 1 a 发酵液的制备

菌株 1 a 种子液的制备:取直径 10 mm 的菌饼接种到灭菌后的发酵培养基中, 28℃、200 r/min 摇床振荡培养 28 h 后取出, 4℃冰箱保存备用。

菌株 1 a 发酵液的制备:以 6%(v/v)接种量接种于上述发酵培养基中, 在 28℃、200 r/min 下培养 60 h。培养结束后, 将培养物转入无菌离心管中, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 得无菌体发酵液备用。

1.2.2 菌株 1 a 发酵液抗菌谱测定

以琼脂扩散法^[3]对 9 株植物病原真菌进行抗菌谱测定, 取 1 mL 真菌菌悬液与 150 mL 已融化冷却到 45℃的 PDA 培养基迅速混匀, 平均倒入 10 个无菌培养皿内, 待培养基凝固后用打孔器(直径 10 mm)在每个培养皿内打孔, 注入发酵上清液 200 μL , 置于 26℃的恒温箱中进行培养, 72 h 后测量抑菌圈直径。每个处理重复 3 次。

1.2.3 菌株 1 a 发酵液稳定性测试

1.2.3.1 菌株 1 a 发酵液热稳定性测试

参照张玲玲等报道的方法^[4], 取 21 mL 菌株 1 a 发酵液, 分成 7 组, 再把每组分装到 3 个 1.5 mL 离心管中, 每份 1 mL, 将分装好的发酵液分别在 40、50、60、70、80、90 和 100℃下水浴处理 30、60 和 90 min, 待自然冷却到常温, 定容到 1 mL, 以未处理的发酵液为对照, 琼脂扩散法测各处理的抑菌活性, 每个处理 3 次重复, 置于 28℃培养, 72 h 后测量抑菌圈直径, 根据抑菌圈直径来确定其热稳定性。

1.2.3.2 菌株 1 a 发酵液酸碱稳定性测试

参照姜海波等报道的方法^[5], 取 6 组菌株 1 a 发酵液, 每份 6 mL, 用 1 mol/L 的 NaOH 溶液和 1 mol/L 的 HCl 溶液分别调 pH 值为 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 和 12.0, 再将每组分装成 3 份, 每份 2 mL, 将其置于 50℃下水浴分别处理 30、60 和 90 min, 待自然

冷却到常温, 定容到 2 mL, 以未处理的发酵液为对照, 琼脂扩散法测各处理的抑菌活性, 每个处理 3 次重复, 置于 28℃培养, 72 h 后测量抑菌圈直径, 根据抑菌圈直径来确定其酸碱稳定性。

1.2.3.3 菌株 1 a 发酵液紫外、日光稳定性测试

取 12 mL 菌株 1 a 发酵液, 分成两组, 每组 6 份, 每份 1 mL。将一组分别置于紫外灯 30 cm 处照射 20、30、40、50、60 和 70 min, 定容到 1 mL, 将另一组置于自然光下分别照射 1、2、3、4、5 和 6 h, 定容到 1 mL, 以未处理的菌株 1 a 发酵液为对照, 琼脂扩散法测各处理的抑菌活性, 每个处理 3 次重复, 置于 28℃培养, 72 h 后测量抑菌圈直径, 根据抑菌圈直径来确定其紫外、日光稳定性。

1.2.3.4 菌株 1 a 发酵液贮藏稳定性测试

取 12 mL 菌株 1 a 发酵液, 分成 3 组, 每组 4 份, 每份 1 mL, 将 3 组分别置于室温、4℃、-20℃条件下保存 3 d、7 d、15 d 和 30 d, 定容到 1 mL, 以新发酵完的发酵液为对照, 琼脂扩散法测各处理的抑菌活性, 每个处理 3 次重复, 置于 28℃培养, 72 h 后测量抑菌圈直径, 根据抑菌圈直径来确定其贮藏稳定性。

2 结果与分析

2.1 菌株 1 a 发酵液抗菌谱测定

菌株 1 a 发酵液对 9 种植物病原菌均有抑菌活性, 其中对人参锈腐菌抑菌活性最强, 抑菌圈直径可达到 22 mm(表 1)。

表 1 菌株 1 a 发酵液对各病原菌的抑菌活性

病原菌	抑菌圈直径(mm)			
	平均值			
1 稻瘟病菌 (<i>Pyricularia grisea</i>)	21.00	21.00	21.00	21.00
2 禾谷镰刀病菌 (<i>Fusarium graminearum</i>)	19.50	19.50	19.00	19.33
3 玉米弯孢霉叶斑病菌 (<i>Curvularia lunata</i>)	14.00	14.00	13.50	13.83
4 烟草赤星病菌 (<i>Alternaria alternata</i>)	17.00	16.50	17.00	16.83
5 玉米大斑病菌 (<i>Exserohilum Helminthosorium turcicum</i>)	17.50	17.50	17.20	17.40
6 黄瓜黑星病菌 (<i>Cladosporium cucumerinum</i>)	15.00	15.00	15.00	15.00
7 蕃茄炭疽病菌 (<i>Colletotrichum cocclides</i>)	16.00	16.00	16.30	16.10
8 禾草离蠕孢菌 (<i>Bipolaris sorokiniana</i>)	14.50	14.50	13.90	14.30
9 人参锈腐菌 (<i>Cylindrocarpon destructans</i>)	22.00	22.00	22.00	22.00

2.2 菌株 1 a 发酵液稳定性测试

2.2.1 菌株 1 a 发酵液热稳定性

由表 2 可见, 菌株 1 a 发酵液在 40~80℃随

温度的升高活性略有下降,但仍保持较好的活性,在 90℃ 处理 30 min 和 60 min 仍有一定活性,说明该发酵液热稳定性较好。在 90℃ 处理 90 min 及 100℃ 处理的情况下,均丧失活性。

表 2 菌株 1 a 发酵液对不同温度的稳定性

不同温度(℃)	不同时间处理抑菌圈直径(mm)		
	30 min	60 min	90 min
40	20.3	20.3	20.3
50	20.3	20.3	19.0
60	20.3	19.3	18.6
70	19.3	18.0	17.6
80	17.6	17.0	16.3
90	11.0	10.0	0
100	0	0	0
对照	20.9	20.9	20.9

2.2.2 菌株 1 a 发酵液酸碱稳定性

表 3 菌株 1 a 发酵液对不同 pH 值的稳定性

不同 pH 值处理	不同时间处理抑菌圈直径(mm)		
	30 min	60 min	90 min
pH2	0	0	0
pH4	11.5	0	0
pH6	15.0	15.0	15.0
pH8	14.0	13.5	15.0
pH10	14.0	0	0
pH12	0	0	0
对照	16.0	16.0	16.0

菌株 1 a 发酵液原始 pH 值为 7.8,在改变酸碱条件后,在弱酸弱碱条件下活性损失较小,强酸强碱条件下活性损失较大(表 3),说明该发酵液酸碱变化较为敏感。在处理该发酵液时要注意控制 pH 值,尽量控制在中性,以减少活性的损失。

2.2.3 菌株 1 a 发酵液紫外、日光稳定性

表 4 菌株 1 a 发酵液紫外稳定性

不同时间(min)	抑菌圈直径(mm)			平均值
	20	30	40	
20	20.0	20.0	17.0	19.0
30	20.0	19.0	16.0	18.3
40	20.0	18.0	17.0	18.3
50	22.0	20.0	21.0	21.0
60	21.0	24.0	21.0	22.0
70	21.0	24.0	20.0	21.6
对照	23.0	21.0	22.0	22.0

表 5 菌株 1 a 发酵液日光稳定性

不同时间(h)	抑菌圈直径(mm)			平均值
	1	2	3	
1	20.0	20.0	20.0	20.0
2	20.0	18.0	19.0	19.0
3	20.0	18.0	19.0	19.0
4	18.0	18.0	19.0	18.3
5	18.0	17.0	17.0	17.6
6	17.0	16.0	16.0	16.3
对照	20.0	20.0	21.0	20.3

由表 4 所示,连续 70 min 的紫外照射,对菌株 1 a 发酵液的活性基本无影响,说明该发酵液紫外稳定性强;另由表 5 所示,连续 6 h 的自然光照射,1 a 发酵液仍保持着较高的抑菌活性,说明该发酵液日光稳定性强。

2.2.4 菌株 1 a 发酵液贮藏稳定性

表 6 菌株 1 a 发酵液贮存稳定性

不同保存环境	不同时间抑菌圈直径平均值(mm)			
	3 d	7 d	15 d	30 d
-20℃	21.0	21.0	21.0	20.0
4℃	20.6	20.6	20.6	19.3
室温	20.3	19.6	19.3	18.0
对照	22.3	22.3	22.3	22.3

由表 6 所示,菌株 1 a 发酵液保存在 -20℃ 环境 3~30 d,几乎没有活性损失;在 4℃ 环境下,在 30d 后活性开始下降;在室温保存的发酵液 7 d 后活性就开始下降;说明发酵液有较好的贮存稳定性,在低温环境有利于发酵液的保存。

3 结论与讨论

菌株 1 a 发酵产物对供试的 9 种常见植物病原菌都具有一定抑菌效果,且具持效性,该菌株具有潜在的开发和应用价值。本试验采用冷藏、酸碱、加热及光照 4 种处理测定了菌株 1a 发酵液的稳定性,发现其在低温下储藏效果较好,90℃ 以下可保持活性,但不耐 90℃ 以上的高温,对紫外光、日光稳定,而对酸碱稳定性较差,在强酸碱条件下活性损失较大。这为菌株 1 a 发酵液抗菌活性成分的分离纯化提供了理论依据,为该菌株的进一步研究开发奠定了基础。

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] 马贵龙,张阿桃,王美英,等.人参锈腐病拮抗放线菌筛选、形态及培养特征研究[J].吉林农业大学学报,2008,30(5):687-691.
- [3] 李璐宁,张薇,赵永强,等.放线菌 Y23 菌株发酵液抗菌活性及稳定性测定[J].山东农业科学,2009(1):71-74.
- [4] 张玲玲,董美玉,许凤春,等.放线菌 C3-11 的抗菌活性筛选及发酵液稳定性研究[J].现代农业科技,2009(3):109-110,113.
- [5] 姜海波,徐文静,杜茜,等.BPS28 发酵液抗菌谱及抗菌物质稳定性测试[J].吉林农业科学,2009,34(1):14-16.