

链霉菌 4301 菌株的抑菌活性与液体发酵的优化

陈 敏^{1,2}, 谢丽君², 李春远³, 曾任森², 石木标⁴

(1 华南农业大学 公共基础课实验教学中心, 广东 广州 510642; 2 华南农业大学 农学院, 广东 广州 510642;

3 华南农业大学 理学院, 广东 广州 510642; 4 华南农业大学 食品学院, 广东 广州 510642)

摘要:从土样中分离筛选链霉菌 4301 菌株的代谢产物, 固体培养 4301 菌株。结果表明, 4301 菌株对荔枝霜疫霉菌 *Peronophythora litchii* 和荔枝炭疽病菌 *Clomerella cingulata* 的抑菌圈透明, 对荔枝霜疫霉菌的抑菌圈直径达到 25.5 mm。以荔枝霜疫霉菌为指示菌, 对菌株 4301 发酵培养基和发酵条件进行优化研究, 得到的最佳培养基组成(*w*)为:葡萄糖 2%、可溶性淀粉 2%、黄豆饼粉浸液 3%、蛋白胨 0.3%、FeSO₄ 0.001%、NaCl 0.2%、CaCO₃ 0.25%、K₂HPO₄ 0.02%; 优化后的培养条件:发酵时间为 96 h、发酵温度为 28 ℃、接种量(*w*)为 8%、装液量为 75 mL, 优化后 4301 菌株对荔枝霜疫霉菌的抑菌圈直径达到 28.8 mm。

关键词:链霉菌; 抑菌活性; 发酵条件; 荔枝霜疫霉菌

中图分类号:S476.1

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2009)02-0015-04

Studies on Fungicidal Activity and Liquid Fermentation Optimization of *Streptomyces* Strain 4301

CHEN Min^{1,2}, XIE Li-jun², LI Chun-yuan³, ZENG Ren-sen², SHI Mu-biao⁴

(1 Center of Experimental Teaching for Common Basic Courses, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

3 College of Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

4 College of Food Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: *Streptomyces* strain 4301 was isolated from the soil. Metabolites produced by this strain showed fungicidal activity. The diameter of inhibitory cycles of *Peronophythora litchii* affected by *Streptomyces* strain 4301 was 25.5 mm in solid culture. Optimal fermentation conditions and medium of liquid culture for *Streptomyces* strain 4301 were investigated. The results indicated that the optimal fermentation medium and conditions were as follows: glucose 2%, soluble starch 2%, beancake powder extract 3%, protose peptone 0.3%, FeSO₄ 0.001%, NaCl 0.2%, CaCO₃ 0.25%, K₂HPO₄ 0.02%; inoculation volume 8% for 75 mL fermentation medium in 500 mL flask, culture temperature 28 ℃ and period 96 h. The diameter of inhibitory cycles of *P. litchii* affected by *Streptomyces* strain 4301 was 28.8 mm in the optimum medium and optimum fermentation conditions.

Key words: *Streptomyces*; fungicidal activity; fermentation conditions; *Peronophythora litchii*

荔枝 *Litchi chinensis* Sonn. 是著名的岭南佳果, 是我国在世界上最具竞争优势的热带亚热带水果之一, 以广东、广西、福建、海南等省区为主产区。荔枝霜疫霉菌 *Peronophythora litchii* 不但是引致荔枝产前

生产上的一个主要病害的病原, 也是荔枝采后贮藏保鲜中主要的致腐菌^[1], 是引起荔枝长期产量低、不稳产的主要原因之一^[2]。目前, 生产中普遍采用化学农药来防治荔枝霜疫霉病。然而, 化学农药的长期

收稿日期:2008-09-01

作者简介:陈 敏(1967—), 女, 实验师, 硕士; 通讯作者:曾任森(1965—), 男, 教授, 博士, E-mail: rszeng@scau.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金(30670331); 广东省自然科学基金重点项目(04105977, 8451064201001012); 广东省科技计划项目(2008B021500001)

使用,使病菌产生了耐药性,造成药效减弱,且在环境中不易分解,残留药剂严重污染环境。利用拮抗微生物代谢产物开发农用抗生素是发展环境友好型农药的重要途径之一。在众多拮抗菌中,放线菌为研究最多的一类微生物,近10年来从微生物中发现的新活性物质中放线菌产生的活性物质占70%以上,而其中的75%是来自于链霉菌 *Streptomyces*^[3,4]。因此,寻找荔枝霜疫霉的拮抗菌,并从中研制开发低毒、高效和环境友好型的农用抗菌素,是防治荔枝霜疫霉病等果蔬病害的一条可行途径。本文研究了链霉菌4301菌株对植物病原菌的抑菌活性,并以荔枝霜疫霉为指示菌,对该菌株的液体发酵培养基和发酵条件进行了优化,为进一步研制荔枝霜疫霉病生防制剂和杀菌剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 菌株 从湖南省安乡县安丰乡稻田土样中分离出的1株4301放线菌,经鉴定该菌株属链霉菌属 *Streptomyces*。

1.1.2 供试植物病原菌 香蕉炭疽病菌 *Colletotrichum musae*、荔枝炭疽病菌 *Glomerella cingulata*、荔枝霜疫霉菌 *Peronophythora litchii* 和小麦赤霉病菌 *Fusarium graminearum*,均由华南农业大学植物病理学系周而勋教授提供。

1.1.3 培养基 高氏一号培养基,PDA培养基。发酵种子培养基(*w*):黄豆饼粉浸液3%、葡萄糖1%、氯化钠0.25%、蛋白胨0.3%、碳酸钙0.2%,用蒸馏水定容至1000 mL,pH 7.2~7.4。

1.2 方法

1.2.1 液体种子培养 接一环生长良好的斜面培养物至装有100 mL种子培养基的500 mL三角瓶中,30℃、180 r/min振荡培养2 d。

1.2.2 4301菌株初始发酵条件及发酵产物处理 取液体种子培养液10 mL接种于装有100 mL发酵液的500 mL三角瓶中,在30℃、180 r/min的恒温摇床中振荡培养5 d后,用布氏漏斗减压抽滤得发酵液和菌丝,发酵液用于抗菌活性鉴定。

1.2.3 抑菌活性测定 在固体培养条件下采用琼脂移块法测定供试菌的抗菌活性^[5]。在液体培养条件下,采用管碟法测定抗菌活性^[6]。

1.2.4 液体发酵培养氮源的筛选 在氮源选择基础培养基(葡萄糖+氯化钠+碳酸钙,*w*分别为2%、0.2%和0.25%,水定容至1000 mL,pH 7.2~7.4)的基础上,分别用*w*=3%黄豆饼粉浸液、*w*=3%玉米粉浸液、*w*=0.3%蛋白胨、KNO₃、NH₄Cl(无机氮的

添加量按培养基中所含氮元素0.3 g/L为标准)、黄豆饼粉+玉米粉(*w*均为3%)和黄豆饼粉+蛋白胨(*w*分别为3%和0.3%)作为氮源。各自分装100 mL于500 mL的三角瓶中,接入φ=10%的种子菌,在30℃、180 r/min的条件下振荡培养5 d,然后用灭过菌的8层纱布过滤,上清液用于抗菌活性的研究,以荔枝霜疫霉菌为供试病原菌筛选最佳氮源。

1.2.5 液体发酵培养碳源的筛选 在氮源筛选基础上,确定用作碳源筛选的基础培养基(*w*)为黄豆饼粉浸液3%+蛋白胨0.3%+氯化钠0.2%+碳酸钙0.25%,用蒸馏水定容至1000 mL,pH 7.2~7.4。

在碳源选择基础培养基的基础上,分别加入*w*=2%的葡萄糖、蔗糖、淀粉、麦芽糖、醋酸镁、葡萄糖+蔗糖、葡萄糖+淀粉等7种不同碳源。发酵及生测方法同1.2.4。

1.2.6 液体发酵培养无机盐的筛选 在氮源和碳源筛选的基础上,确定用作该菌株液体发酵培养无机盐筛选的基础培养基(*w*)为黄豆饼粉浸液3%+蛋白胨0.3%+葡萄糖2%+淀粉2%,用蒸馏水定容至1000 mL;调节pH 7.2~7.4。

在无机盐选择基础培养基的基础上,分别用*w*(K₂HPO₄)=0.02%、*w*(KH₂PO₄)=0.02%、*w*(FeSO₄·7H₂O)=0.001%、*w*(CaCO₃)=0.25%、*w*(NaCl)=0.25% 5种不同的物质作为唯一无机盐矿质元素,以NaCl+CaCO₃、FeSO₄+NaCl+CaCO₃、FeSO₄+NaCl+CaCO₃+KH₂PO₄、FeSO₄+NaCl+CaCO₃+KH₂PO₄+K₂HPO₄作为复合无机盐。发酵及生测方法同1.2.4。

1.2.7 液体发酵培养基的优化 在以上筛选的最佳培养基基础上,优化4301菌株的液体发酵条件,包括发酵时间、发酵温度、接种量和装液量等。以荔枝霜疫霉菌为测试病原菌优化液体发酵条件。

2 结果与分析

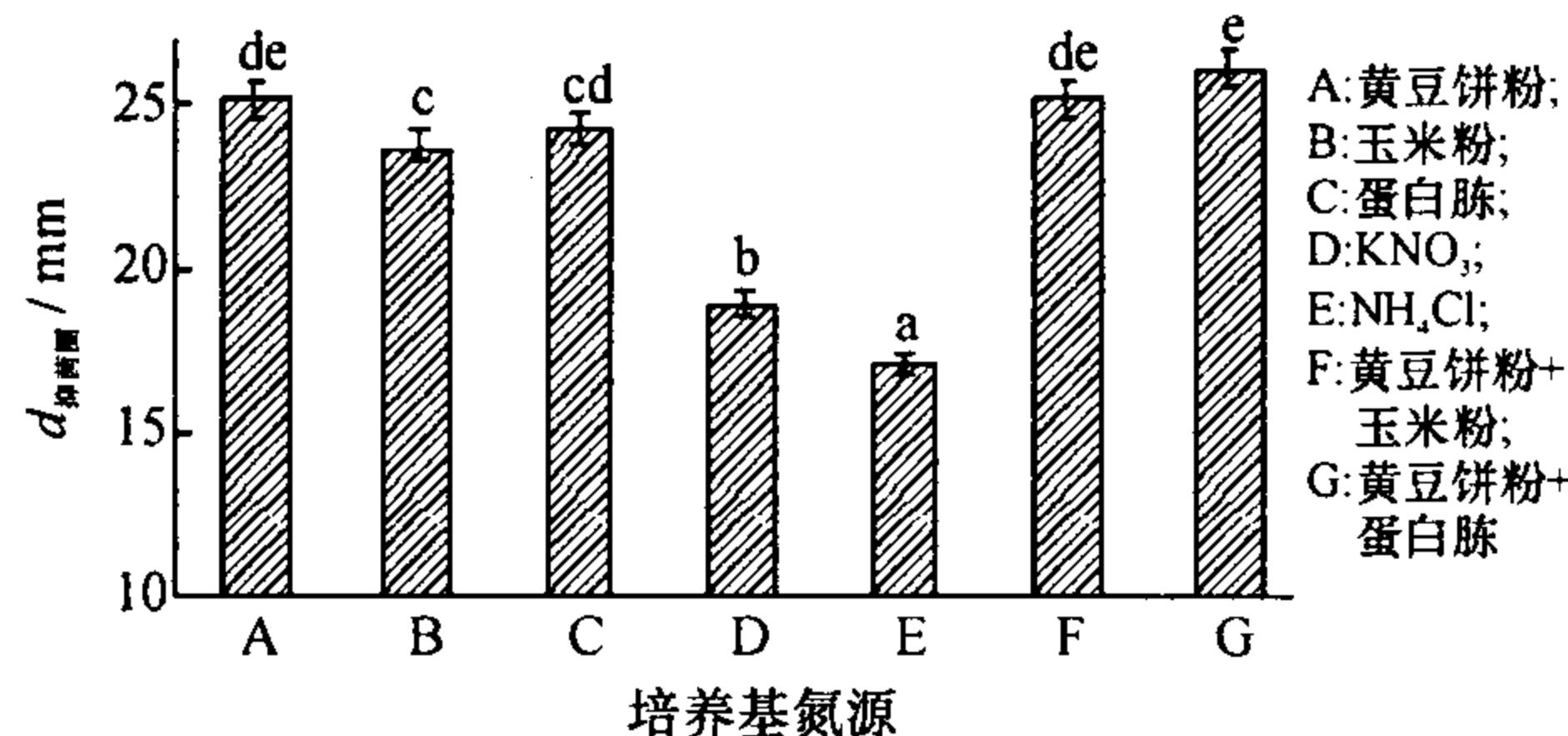
2.1 链霉菌4301菌株固体培养条件下的抑菌活性

在固体培养条件下,测定链霉菌4301菌株对香蕉炭疽病菌、荔枝炭疽病菌、荔枝霜疫霉菌和小麦赤霉病菌的抗菌活性。结果表明,该菌株对香蕉炭疽病菌没有拮抗作用,而对其他3种植物病原菌都有不同程度的抑菌活性。该菌株对小麦赤霉病菌和荔枝炭疽病菌的抑菌圈直径分别为12.4和17.3 mm,对荔枝霜疫霉病菌的抑制作用最强,其抑菌圈直径达到了25.5 mm。因此,4301菌株液体发酵培养基和培养条件的优化均以荔枝霜疫霉菌作为测试病原菌。

2.2 氮源、碳源和无机盐对菌株抗菌活性的影响

2.2.1 氮源 在液体培养条件下,选择7种不同的氮源培养4301菌株,并测定各自发酵液对荔枝霜疫

霉菌的抑菌活性。结果(图1)显示,使用无机氮源硝酸钾和氯化铵,发酵液对荔枝霜疫霉抑菌能力差。其他5种有机氮源培养基发酵液对荔枝霜疫霉都有较好的抑菌效果,黄豆饼粉作为主要氮源成分可满足链霉菌4301菌株发酵的氮源营养及合成抗生物质需要,蛋白胨和玉米粉的加入使4301菌株的活性提高,且黄豆饼粉+蛋白胨培养基抑菌圈透明。因此,黄豆饼粉+蛋白胨为4301菌株液体培养的最佳氮源培养基配方,所以在后续的碳源及无机盐的筛选中选黄豆饼粉+蛋白胨为基础培养基的氮源。

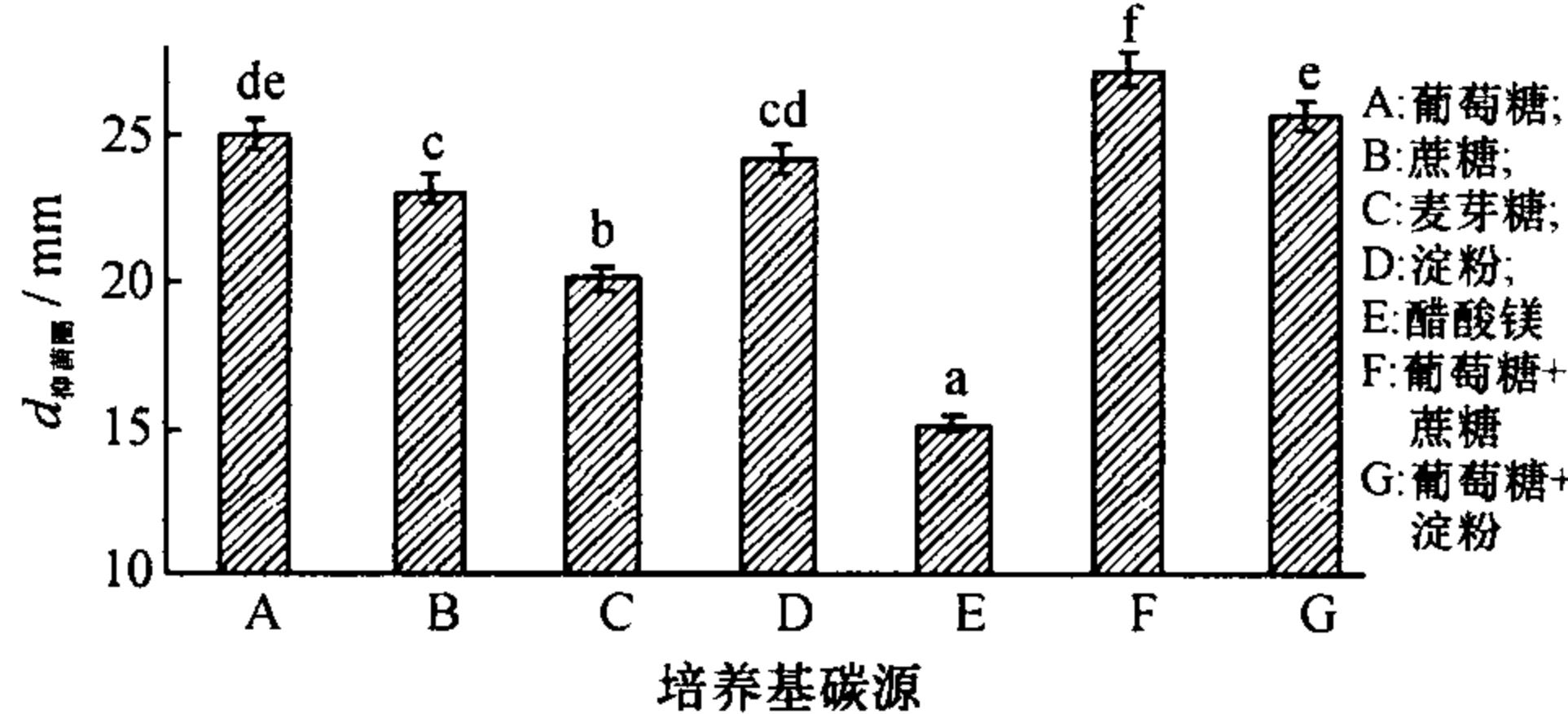


柱上小写英文字母不同者示0.05水平差异显著(Duncan's法)

图1 不同氮源液体培养条件下4301菌株的抑菌活性

Fig. 1 Fungicidal activity of strain 4301 against *Peronophythora litchii* in liquid culture with different nitrogen sources

2.2.2 碳源 以黄豆饼粉+蛋白胨为氮源,选择7种不同的碳源培养4301菌株,结果(图2)表明,最适合4301菌株液体发酵培养产生抑制荔枝霜疫霉菌活性物质的碳源为葡萄糖+淀粉、葡萄糖+蔗糖2种双碳源组合,其次是葡萄糖、淀粉2种单一碳源。虽然以葡萄糖+蔗糖为双碳源时其对荔枝霜疫霉抑菌圈透明且抑菌圈直径平均也达到25.7 mm,但考虑到蔗糖的价格比淀粉高,并且葡萄糖+淀粉作为碳源时抑菌圈直径达到27.2 mm,故在后续试验中以葡萄糖+淀粉为碳源作进一步研究。



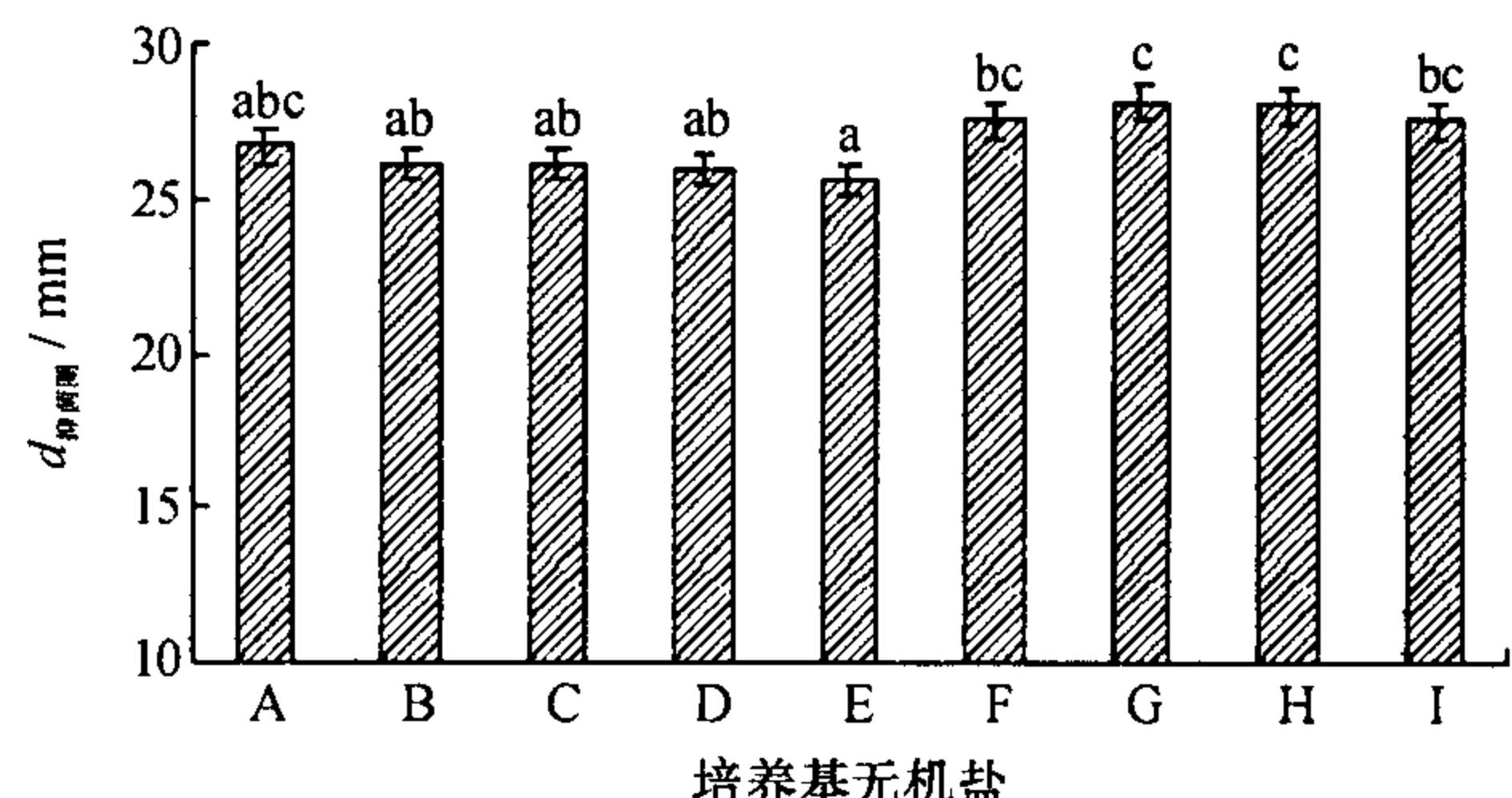
柱上小写英文字母不同者示0.05水平差异显著(Duncan's法)

图2 不同碳源液体培养条件下4301菌株的抑菌活性

Fig. 1 Fungicidal activity of strain 4301 against *Peronophythora litchii* in liquid culture with different carbonic sources

2.2.3 无机盐 以葡萄糖+淀粉为碳源、黄豆饼粉+蛋白胨为氮源,比较FeSO₄、NaCl、CaCO₃、K₂HPO₄、KH₂PO₄等不同无机盐4301菌株液体发酵液对荔枝霜疫霉菌的抑菌活性。结果(图3)显示,单一的5种

无机盐之间抑菌活性差别不大,而抑菌活性最好的是4种无机盐的组合,其抑菌圈直径平均达到28 mm,且抑菌圈透明。



A: FeSO₄; B: NaCl; C: CaCO₃; D: K₂HPO₄; E: KH₂PO₄; F: NaCl + CaCO₃; G: FeSO₄ + NaCl + CaCO₃; H: FeSO₄ + NaCl + CaCO₃ + KH₂PO₄; I: FeSO₄ + NaCl + CaCO₃ + KH₂PO₄ + K₂HPO₄

柱上小写英文字母不同者示0.05水平差异显著(Duncan's法)

图3 不同无机盐液体培养条件下4301菌株的抑菌活性

Fig. 3 Fungicidal activity of strain 4301 against *Peronophythora litchii* in liquid culture with different inorganic salts

根据以上的试验得出优化培养基组成(*w*)为葡萄糖2%+淀粉2%+黄豆饼粉3%+蛋白胨0.3%+FeSO₄0.001%+NaCl0.2%+CaCO₃0.25%+K₂HPO₄0.02%。

2.3 链霉菌4301菌株液体发酵条件的优化

2.3.1 发酵时间 在以上优化培养基的基础上,进行4301菌株发酵培养条件的优化。将一级种子菌接种到优化后的发酵培养基,在28℃、180 r/min条件下振荡培养。不同时间取样,测定发酵上清液对荔枝霜疫霉菌的抑制活性。结果(图4)表明,4301菌株发酵上清液对荔枝霜疫霉菌的抑制活性在0~96 h内随发酵时间的增加,其抑菌圈直径增大,在96 h抑菌圈直径达最大值;发酵时间继续延长,其抑菌圈直径不再增大,故最适的发酵周期为96 h左右。

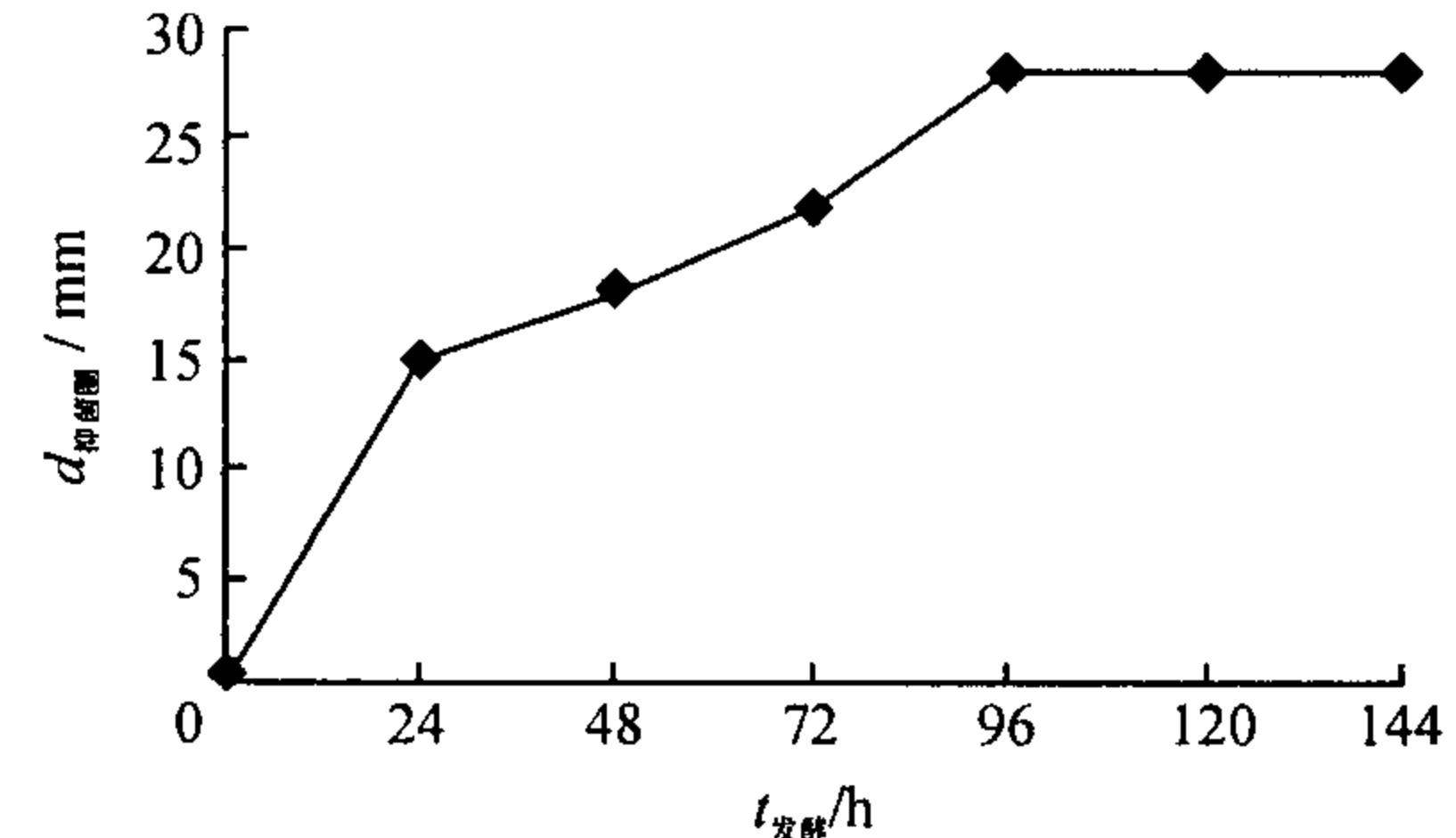


图4 发酵时间对4301菌株抑菌活性的影响

Fig. 4 Effects of fermented period on fungicidal activity of strain 4301 against *Peronophythora litchii*

2.3.2 发酵温度 分别在24、28、32和36℃振荡培养4301菌株96 h,离心取上清液,测定上清液对荔枝霜疫霉菌的抑制活性。结果(表1)表明,培养温度对该菌株抑菌活性影响较大,28℃培养4301菌株的发酵液抑菌活性最大。

表1 发酵温度、接种量和装液量对链霉菌4301菌株抑制荔枝霜疫霉菌活性的影响¹⁾

Tab. 1 Effects of fermentation temperatures, inoculation rate and liquid volume on fungicidal activity of strain 4301 against *Peronophythora litchii*

<i>t</i> / ℃	<i>d</i> _{抑菌圈} /mm	接种量 (φ)/%	<i>d</i> _{抑菌圈} /mm	装液量 /mL	<i>d</i> _{抑菌圈} /mm
24	14.8 ± 0.4a	4	18.1 ± 0.3a	50	23.1 ± 0.4a
28	28.1 ± 0.4d	6	23.2 ± 0.4b	75	28.8 ± 0.4d
32	19.8 ± 0.5c	8	28.0 ± 0.4d	100	26.4 ± 0.6c
36	17.8 ± 0.4b	10	26.0 ± 0.4c	125	24.8 ± 0.5b
		12	23.5 ± 0.6b		

1) 表中数据为平均值±标准误,同列数据后小写字母不同者表示0.05水平差异显著(Duncan's法)

2.3.3 接种量 分别以 φ 为4%、6%、8%、10%、12%的接种量将种子液接种到装有100 mL优化发酵培养基的500 mL三角瓶中,28 ℃振荡培养96 h,离心取上清液,测定上清液对荔枝霜疫霉菌的抑制活性。在接种量 φ 为8%时,发酵液对荔枝霜疫霉菌的抑制活性最强(表1)。因而选取 φ 为8%的接种量最佳。

2.3.4 装液量 在500 mL三角瓶中分别装50、75、100和125 mL上述优化的发酵培养基,按 φ 为8%接种量接种种子液,28 ℃振荡培养96 h,离心取上清液,测定上清液对荔枝霜疫霉菌的抑制活性。由表1可以看出,500 mL三角瓶最佳装液量为75 mL培养基。链霉菌是好氧菌,适当的装液量可以保证好的供氧条件,使菌丝生长良好,抑菌活性增强。

3 结论

本研究表明,链霉菌4301菌株对一些植物病原菌有拮抗作用,特别是对荔枝霜疫霉菌有很好的抗菌效果。链霉菌4301菌株产生最佳抑菌效果的液体发酵培养基(*w*):以2%葡萄糖和2%可溶性淀粉为双碳源,3%黄豆饼粉浸液和0.3%蛋白胨为双氮源,培养基中同时加入4种无机盐(*w*):FeSO₄ 0.001%、NaCl 0.2%、CaCO₃ 0.25%、K₂HPO₄ 0.02%。最佳发酵培养条件:发酵时间为96 h、发酵温度为28 ℃、接种量(φ)为8%、500 mL容量瓶中装液量为75 mL。在优化培养基及最佳优化发酵条件下,4301菌株对荔枝霜疫霉菌的抑菌圈直径达到28.8 mm。

链霉菌产生次生代谢物质是一个复杂的过程,培养方法和营养物质的不同,其所产生的物质种类及含量也不同^[7-9]。抗菌物质的产生除了受培养基的碳氮比、微量元素影响之外,还受培养时间,培养温

度、通气量等因素的影响。4301菌株在发酵的前期,主要是菌丝的生长阶段,营养物质被消耗;发酵中期,生长逐步缓慢,抗生素迅速产生;到发酵后期,抗生素增长缓慢,96 h后就没有增长。原因可能是由于菌体衰老,细胞开始自溶,发酵液中终产物的积累或其他有害代谢物增加使产生菌处于一种对其进一步合成产物不利的环境中,或者是由于抗生素合成所需的前体和其他因子的不足造成的。从试验结果也可以看出,较低的装液量,保持良好的供氧情况,对抗菌活性物质产生有利。

本研究为进一步利用链霉菌4301菌株进行一些植物病害尤其是荔枝霜疫病的生物控制,并利用该菌株的次生代谢产物研制农用抗菌素奠定了基础,也为该菌株的进一步发酵罐培养提供依据。该菌株在田间的实际防效以及对病原菌控制的持续作用还需进一步深入研究,对其活性物质的提取、分离和结构鉴定正在研究之中。

参考文献:

- [1] 戚佩坤,潘雪萍,刘任. 荔枝霜疫病的研究 I. 病原菌的鉴定及其侵染过程[J]. 植物病理学报, 1984, 14(2): 113-119.
- [2] 彭埃天,李鑫,刘景梅,等. 10% 氟霜唑悬浮剂对荔枝霜疫霉毒力测定与防治试验[J]. 植物保护, 2007, 33(6): 137-140.
- [3] BAKER D D, ALVI K A. Small-molecule natural products: new structures, new activities[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2004(15): 576-583.
- [4] PETER J N, GRAHAM H F, GILLIAN M H. Pesticides as a source of microbial contamination of salad vegetables [J]. International Journal of Food Microbiology, 2005(101): 237-250.
- [5] 李顺鹏. 微生物学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 87-90.
- [6] 慕立义. 植物化学保护研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997: 47-51.
- [7] MASKEY R P, LI F C, QIN S, et al. Chandrananimycins A ~ C: production of novel anticancer antibiotics from a marine actinomadura sp. isolate M048 by variation of medium composition and growth conditions[J]. Journal Antibiotics, 2003, 56(7): 622-629.
- [8] OKAMI Y, HOTTA K, YOSHIDA M, et al. New aminoglycoside antibiotics, istamycins A and B [J]. Journal Antitiotics, 1979, 32(9): 964-966.
- [9] 刘翠娟,段琦梅,安德荣. 抗真菌拮抗放线菌的筛选及摇床发酵条件的优化[J]. 微生物学杂志, 2004, 24(4): 12-14.

【责任编辑 周志红】