

缙云山土壤拮抗放线菌的分离、筛选与发酵条件优化

张攀, 陈林, 彭玉梅, 马冠华, 孙现超*

(西南大学植物保护学院, 重庆 400716)

摘要: 以烟草赤星病菌为指示菌, 从缙云山土壤中分离和筛选出 6 株拮抗放线菌, 其中 JY-22 对指示菌拮抗效果最好。对 JY-22 的抑菌谱测定结果表明: JY-22 对棉花枯萎病菌、烟草赤星病菌、小麦纹枯病菌、柑橘疮痂病菌、茶云纹叶枯病菌和柑橘青霉病菌都具有较强的拮抗作用, 抑菌率达 41.9%~75.7%。通过单因子和正交试验对拮抗放线菌 JY-22 进行发酵条件的研究, 结果表明, 其最佳培养基组成和培养条件为: 1000 mL 培养基中含葡萄糖 2.0%、玉米粉 1.5%、黄豆粉 3.0%、氯化钠 0.25%、碳酸钙 0.2%, 初始 pH 值为自然, 250 mL 三角瓶装液量为 50 mL, 发酵周期为 72 h。

关键词: 缙云山; 放线菌; 分离; 筛选; 发酵条件

中图分类号: S482.2⁺92 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2010)08-0082-04

Isolation, Screening and Optimizing Fermentation Conditions of Antagonistic *Actinomycetes* spp. from the Soil of Jinyun Mountain

ZHANG Pan, CHEN Lin, PENG Yu-mei, MA Guan-hua, SUN Xian-chao*

(College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: Six antagonistic isolates of *Actinomycetes* spp. were isolated from the cultivated soil samples of Jinyun mountain, among which JY-22 exhibited the highest antagonistic activity against *Alternaria alternata*. Further antimicrobial spectrum of JY-22 was tested against *Alternaria alternata*, *Bipolaris maydis*, *Fusarium oxysporum*, *Ceratobasidium cornigerum*, *Sphaceloma fewcetti*, *Colletotrichum camelliae* and *Penicillium italicum*. The results indicated that JY-22 showed the inhibition rate between 41.9% to 75.7%. The optimal fermentation conditions for antibacterial substance production of JY-22 were pH being natural, 28 °C in yeast peptone glucose liquid medium shaking for 72 h with 50 mL fermentation fluid in a 250 mL triangular flask.

Key words: Jinyun mountain; *Actinomycetes* spp.; Isolation; Selection; Fermentation conditions

放线菌是一类具有重要经济价值和多种用途的微生物。目前从微生物中发现的 8000 多种活性物

质中, 有近 70% 是放线菌产生的^[1]。但是, 目前人们分离到的放线菌仅占土壤中所有放线菌的 10%

收稿日期: 2010-04-01

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(20080322); 西南大学本科学生创新基金项目

作者简介: 张攀(1986-), 女, 河南三门峡人, 本科, 研究方向: 植物病理。

* 通讯作者: 孙现超(1977-), 男, 河南许昌人, 副教授, 博士, 主要从事植物病毒学和微生物资源利用研究。

E-mail: sunxianchao@163.com

左右^[2]。开展大规模放线菌资源调查和建立有效的放线菌分离方法是发现放线菌新种属和新活性物质产生菌的重要途径之一。国内研究者对我国西藏、云南和青海等具有典型气候和植被特征的地区进行了放线菌资源的调查, 获得了大量有价值的放线菌株^[3-8]。重庆缙云山是全国自然保护区, 该区气候温和, 雨量充沛, 气候属于典型的中亚热带温暖湿润的生物气候类型。缙云山自然环境多样, 植物种类丰富, 森林植被繁茂, 是长江中上游保存较为完好的亚热带常绿阔叶林和植物种质基因库, 同时也具有丰富的微生物资源。目前, 对该山区土壤放线菌资源研究较少。鉴此, 自 2007 年开始对缙云山不同植被下土壤内的拮抗放线菌资源进行调查研究, 获得了一些具有良好应用前景的拮抗菌株。同时对拮抗效果显著的 JY-22 菌株的抑菌谱进行了测定, 并对其发酵条件进行了初步优化。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 土样 供试土样于 2007 年 5 月采自缙云山竹林地表 10 cm 土层。

1.1.2 供试病原菌 烟草赤星病菌 (*Alternaria alternata*)、小麦纹枯病菌 (*Ceratobasidium cornigerum*)、玉米小斑病菌 (*Bipolaris maydis*)、棉花枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum*)、柑橘疮痂病菌 (*Sphaceloma fawcetti*)、茶云纹叶枯病菌 (*Colletotrichum camelliae*)、柑橘青霉病菌 (*Penicillium italicum*) , 以上病原菌均由西南大学植物保护学院植物病理实验室分离保存。

1.1.3 培养基 放线菌分离培养基: 高氏一号培养基^[9]; 真菌培养基和抑菌活性测定培养基: PDA 培养基; 发酵液培养基 (各成分均为 1 000 mL 时的含量)有: A、B、C、D 4 种。

A 培养基: 葡萄糖 15 g、黄豆粉 15 g、氯化钠 15 g、酵母膏 1 g、碳酸钙 1 g、甘油 2.5 mL。

B 培养基: 黄豆粉 10 g、葡萄糖 10 g、氯化钠 2.5 g、碳酸钙 2 g、蛋白胨 3 g。

C 培养基: 马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g。

D 培养基: 玉米粉 50 g、磷酸氢二钾 0.23 g、磷酸氢二钠 1.15 g、硫酸镁 0.2 g、氯化钾 0.2 g。

1.2 方法

1.2.1 土壤放线菌的分离与纯化 (1)采用稀释法、涂沫法、混菌法^[8]从采集的土壤中分离放线菌。分离过程中加入最终质量浓度为 1 g/L 的氨苄青霉

素和 0.5 mg/L 的 50% 多菌灵可湿性粉剂, 即细菌和真菌抑制剂。(2)纯化: 经常观察平板上放线菌的生长情况, 并记录菌株的原始培养结果, 统一编号, 待生长成熟后, 根据放线菌的特征, 挑取单个放线菌菌落至已准备好的高氏一号培养基斜面上, 采用划线分离的方法接种斜面, 纯化菌落, 然后放入 28℃ 恒温箱中继续培养。

1.2.2 拮抗放线菌的筛选 采用对峙培养法^[10, 11]进行拮抗菌株初筛, 筛选出对烟草赤星病菌有拮抗活性的菌株; 再采用对峙培养法和抑菌圈法进行拮抗菌株复筛, 筛选出对棉花枯萎病菌、烟草赤星病菌、小麦纹枯病菌、柑橘疮痂病菌、茶云纹叶枯病菌和柑橘青霉病菌均有拮抗活性的菌株, 并计算其抑菌率。筛选出的拮抗放线菌用液体石蜡保存备用^[12]。

菌丝生长抑制率 = (对照菌落直径 - 处理菌落直径) / 对照菌落直径 × 100%。

1.2.3 拮抗放线菌发酵条件优化

1.2.3.1 对 JY-22 菌株发酵液培养基的筛选 采用 1.1.3 所列 4 种发酵液培养基, 在 28℃, 转速 160 r/min 条件下培养 72 h, 以烟草赤星病菌为靶标菌, 用生长速率法测定不同培养基发酵液的抑菌活性。

1.2.3.2 对 JY-22 菌株碳、氮源和摇瓶装样量的筛选优化 在碳、氮含量和其他培养条件不变的情况下, 以 B 培养基为基础培养基, 分别以果糖、玉米粉、蔗糖、淀粉替换葡萄糖作为有机碳源, 进行碳源优化; 分别以牛肉膏、黄豆粉、酵母粉、硫酸铵替换蛋白胨作为氮源, 进行氮源优化。分别在 250 mL 三角瓶中装入发酵培养基 20 mL、30 mL、50 mL、70 mL、80 mL、100 mL、150 mL, 进行装样量优化。在此单因素试验的基础上, 再进行碳氮源正交试验。

1.2.3.3 碳氮源正交试验 根据上述有机碳、氮源和摇瓶装液量的筛选结果, 选用葡萄糖和玉米粉做为有机碳源, 黄豆粉做为氮源。按照表 1 设计不同因素和水平, 进行碳、氮源正交试验。

表 1 碳氮源正交试验选用因素和水平 %

水平	葡萄糖	玉米粉	黄豆粉
1	1.0	1.5	2.0
2	2.0	2.0	3.0

2 结果与分析

2.1 拮抗放线菌的初筛结果

从缙云山竹林地表土壤中, 共分离到 165 株放

线菌,以烟草赤星病菌为靶标菌,进行拮抗性筛选,获得有拮抗作用的放线菌 6 株。其中 21、22、41 号放线菌株的拮抗作用比较强,而 22 号菌株(命名为: JY-22)拮抗作用相对最强。

2.2 JY-22 抑菌谱的测定结果

从表 2 可以看出, JY-22 对 6 种供试真菌都有较强的拮抗性,抑制率达 41.9%~75.7%,并且对柑橘疮痂病菌的拮抗性相对最强,抑制率显著高于其他病原菌。

表 2 JY-22 拮抗放线菌对供试真菌的抑制效果

病原真菌名称	对照菌落直径/mm	处理菌落直径/mm	抑制率/%
柑橘疮痂病菌	70	17	75.7a
烟草赤星病菌	82	28	65.9b
茶云纹叶枯病菌	50	18	64.0b
柑橘青霉病菌	84	34	59.5c
棉花枯萎病菌	75	35	53.5d
小麦纹枯病菌	31	18	41.9e

注: 同列不同小写字母表示差异达 0.05 显著水平

2.3 JY-22 发酵条件的优化结果

2.3.1 培养基 从图 1 可以看出, A、B、C、D 培养基的发酵液都能抑制烟草赤星病菌的生长。其中 C、D 培养基发酵液抑制烟草赤星病菌生长的活性相对较弱,而 A、B 培养基发酵液对烟草赤星病菌的抑制活性明显地高于 C、D 培养基发酵液, A、B 2 种培养基发酵液对烟草赤星病菌的抑制活性差异不显著,但 B 培养基发酵液的抑菌活性稍高于 A 培养基发酵液,抑菌圈直径为 3.07 mm。所以选择 B 培养基作为基础培养基,进一步来筛选其他的发酵条件。

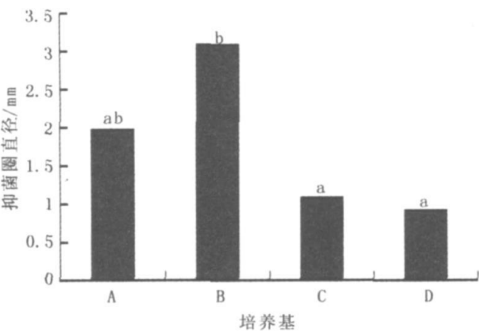


图 1 不同发酵培养基发酵液的抑菌效果

2.3.2 碳源 由图 2 可知,以葡萄糖作为碳源时, JY-22 发酵液产生了较强的抑菌活性,玉米粉的效果次于葡萄糖,两者之间差异不显著,蔗糖效果最差。因此,选用玉米粉和葡萄糖作混合碳源。

2.3.3 氮源 利用黄豆粉、蛋白胨、牛肉膏酵母粉

作为氮源时,放线菌 JY-22 产生的发酵液均有抑菌作用,其中,以黄豆粉作为氮源时发酵液抑菌活性较强,显著高于其他氮源的抑菌活性。值得注意的是以硫酸铵作为氮源时,放线菌不能利用培养基中的营养物质,不能生长,不产生抑菌物质(图 3)。因此,选黄豆粉为氮源进一步优化发酵条件。

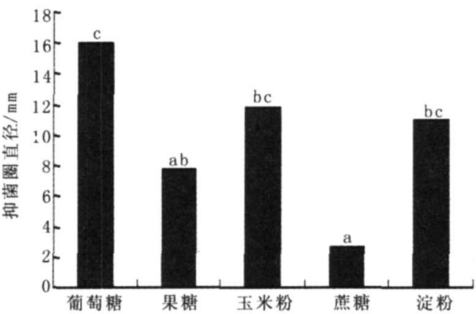


图 2 不同碳源对 JY-22 发酵液抑菌活性的影响

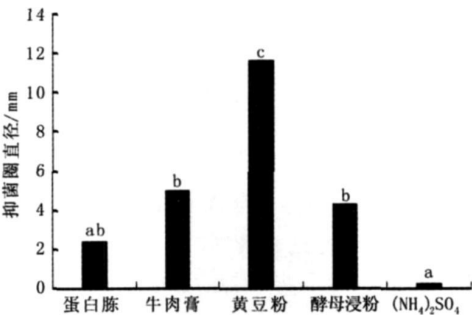


图 3 不同氮源对 JY-22 发酵液抑菌活性的影响

2.3.4 摇瓶装液量 不同摇瓶装液量条件下,发酵液的抑菌活性不同,随着装液量的增加,发酵液的抑菌活性不断增强,当摇瓶装液量大于 50 mL 时,发酵液的抑菌活性随着装液量增加其抑菌活性降低,装液量为 50 mL 时,发酵液的抑菌活性最强。由此可见,在摇床培养时,在 250 mL 的三角瓶中装液量为 50 mL 时,放线菌的发酵液抑菌活性最强(图 4)。

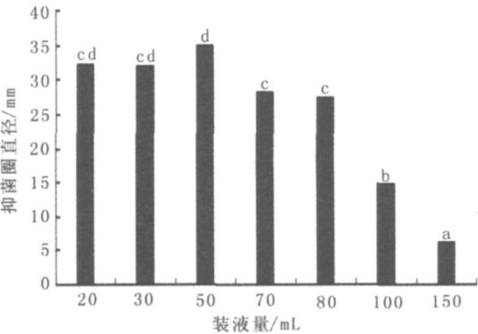


图 4 摇瓶不同装液量对 JY-22 发酵液抑菌活性的影响

2.3.5 碳、氮源正交试验结果 通过正交试验,确

定3种因素对发酵液抑菌活性的影响大小依次为玉米粉> 黄豆粉> 葡萄糖(表3)。因此, 最终得出拮抗放线菌JY-22发酵培养基成分的最佳组合为葡萄糖2.0%、玉米粉1.5%、黄豆粉3.0%、氯化钠0.25%和碳酸钙0.2%。

表3 碳氮源正交试验结果

编号	葡萄糖	玉米粉	黄豆粉	抑菌圈直径/mm
1	1	1	1	22.0
2	1	2	2	19.4
3	2	1	2	23.8
4	2	2	1	19.3
K ₁	41.4	45.8	41.3	K ₂ +K ₁ =84.5
K ₂	43.1	38.7	43.2	
K ₂ -K ₁	1.7	-7.1	1.9	

注: K₁ 代表该因素第一水平和其他因素不同水平组合时发酵液产生的抑菌圈之和; K₂ 代表该因素第二水平和其他因素不同水平组合时发酵液产生的抑菌圈之和

3 讨论

在土壤放线菌的分离过程中, 由于土壤中微生物种类繁多, 数量巨大, 分离所用的培养基不仅有利于放线菌的生长, 而且适合一些细菌和真菌的生长, 且生长速度快, 培养3d即可覆盖满整个培养皿, 导致挑菌困难, 污染率高。因此, 在分离过程中需要在培养基中加入抑制剂以抑制细菌和真菌的生长^[13, 14]。在本次试验中, 选择的抑制剂为多菌灵和氨卞青霉素, 采用逐步降低其浓度的方法来探测哪种浓度比较适合放线菌的生长, 而且又能抑制细菌和真菌的生长。经过多次试验, 发现在高氏一号培养基中加入终质量浓度为1g/L的氨卞青霉素和0.5mg/L的50%多菌灵可湿性粉剂有利于放线菌的生长, 还能有效地抑制细菌和真菌生长, 培养出来的放线菌个数较多, 而且长势较好。

本试验没有对pH值和发酵时间进行筛选, 原因是很多学者在这方面已经进行了大量的研究^[15], 结果均表明, 放线菌在72h, 自然pH条件下, 能很好地生长, 本试验也证实了这点。综合以上试验分析结果, 拮抗放线菌JY-22最佳发酵条件为28℃条件下培养72h, 培养初始pH为自然, 发酵培养基成分为葡萄糖2.0%、玉米粉1.5%、黄豆粉3.0%、氯化钠

0.25%、碳酸钙0.2%、蒸馏水定容至1000mL, 250mL三角瓶装液量为50mL。影响放线菌产生抗生素的因素还有温度、转速、菌龄和接种量等, 有待于进一步的试验探索, 从而为产业化生产奠定基础。

参考文献

[1] 姜成林. 放线菌资源开发利用[J]. 工业微生物 1989, 19(6): 31-35.

[2] 张纪忠, 黄静娟, 盛宗斗, 等. 微生物分类学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1985: 214-218.

[3] 史学群, 宋海超, 何秋香, 等. 海南省土壤拮抗放线菌的分离筛选及发酵液抑菌作用测定[J]. 中国农学通报 2008, 24(4): 332-336

[4] 何建清, 吴云锋, 张格杰. 藏东南地区土壤放线菌的生态分布及活性研究[J]. 微生物学报, 2006, 46(5): 773-777.

[5] 徐丽华, 杨宇容, 姜成林. 云南土壤放线菌生态分布的研究[J]. 微生物学报, 1996, 36(3): 220-226.

[6] 蔡艳, 薛泉宏, 陈占全, 等. 青藏高原东部几种自然土壤放线菌的生态分布[J]. 应用与环境生物学报 2004, 10(3): 378-383.

[7] 蔡艳, 薛泉宏, 陈占全, 等. 青海湖水及湖滨盐化土壤放线菌的分类及耐盐性[J]. 微生物学杂志, 2005, 25(4): 100-101.

[8] 潘争艳, 傅俊范, 刘博, 等. 药用植物土壤中拮抗放线菌的分离、筛选及初步鉴定[J]. 河南农业科学 2007(3): 67-68.

[9] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999.

[10] 孙现超, 安德荣, 李爱荣, 等. 土壤拮抗放线菌s-930-6菌株活性产物抑菌作用[J]. 植物保护学报, 2005, 32(1): 33-36.

[11] 安德荣, 慕小倩, 刘翠娟, 等. 土壤拮抗放线菌的分离和筛选[J]. 微生物学杂志, 2002, 22(5): 1-3.

[12] 陈丽红. 土壤拮抗放线菌的筛选及活性产物的初步研究[D]. 西安: 西北大学, 2006.

[13] 司美茹, 薛泉宏, 来航线. 放线菌分离培养基筛选及杂菌抑制方法研究[J]. 微生物学报, 2004, 31(2): 61-65.

[14] 闫建芳, 刘秋, 刘志恒, 等. 瓜类枯萎病菌拮抗放线菌分离方法的研究[J]. 河南农业科学, 2006(4): 81-83.

[15] 李海峰, 王素英. 生防菌TS67发酵条件优化研究[J]. 河南农业科学, 2007(6): 70-73.