

土壤拮抗放线菌 S-5210-6 的筛选及其初步分类鉴定^{*}

疏秀林¹, 安德荣¹, 张勤福², 马 驰²

(1 西北农林科技大学 植保学院, 陕西 杨凌 712100;

2 西安海浪生物研究所, 陕西 西安 710000)

[摘 要] 从秦岭山区不同海拔、不同植被类型土壤中分离出 750 株放线菌, 对其进行皿内琼脂平板、放线菌发酵液及拮抗菌单胞菌的拮抗性筛选。结果表明, S-5210-6 号菌株对稻瘟病菌 (*Pyricularia grisea*)、小麦赤霉病菌 (*Fusarium graminearum*)、小麦根腐病菌 (*Bipolaris sorokiniana*)、玉米大斑病菌 (*Exserohilum turcicum leonard*)、黄瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerium*)、番茄枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)、番茄早疫病病菌 (*Alternaria solani*)、小麦白粉病菌 (*Erysiphe graminis*) 8 种供试病原真菌具有强烈的拮抗和溶菌作用, 根据其形态特征、培养特征、生理生化特征及细胞壁化学成分分析, 确定其归属于链霉菌属 (*Streptomyces*)。

[关键词] 土壤放线菌; 拮抗性筛选; 分类鉴定; 链霉菌

[中图分类号] S154.38⁺3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)12-0057-04

近年来, 研究有益微生物是国内外生物防治研究的热点。生防微生物的应用是植物病虫害综合治理的重要手段, 是保护生态环境, 实现农业可持续发展的有力保证。通过自然菌株的选育, 开发微生物农药已有相当久远的历史, 其对农业生产的发展起到了重要作用^[1~3]。土壤中有益微生物种类繁多, 尤其是放线菌在土壤中分布广泛, 大多数种类可以产生抗菌物质, 降解病菌细胞壁和酶。放线菌及其产生的抗菌素, 耐干耐热, 便于商业化生产, 是一类具有巨大实用价值的微生物种群^[4,5]。

秦岭山区位于我国南北、西南和中原的交界处, 横跨陕、甘、豫、川、鄂五省, 是我国西南地区从北亚热带向暖温带过渡的一个分水岭, 是长江上游的一个重要生态屏障, 是一个巨大的自然资源宝库。陕境秦岭是秦岭山系的骨干, 其放线菌资源具有巨大的培养潜力。本研究以采自秦岭山区不同海拔、不同植被、不同土壤类型的土壤放线菌为研究对象, 以期从中筛选出对多种主要农作物病原菌有显著抑制作用的拮抗菌, 为丰富我国生防菌种类提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 拮抗菌的筛选^[6]

1.1.1 菌株来源 放线菌采自秦岭不同海拔、不同

地区、不同植被的土壤, 采集地点主要有: 海拔 830 m 商南县槐树坪的杂草荒地(垆土), 海拔 1 660 m 宁陕县小川的华北落叶松林(山地棕壤)和海拔 3 000 m 眉县大转弯的太白红杉林(暗棕壤)^[7]。

1.1.2 供试病原菌 稻瘟病菌 (*Pyricularia grisea*)、小麦赤霉病菌 (*Fusarium graminearum*)、小麦根腐病菌 (*Bipolaris sorokiniana*)、玉米大斑病菌 (*Exserohilum turcicum leonard*)、黄瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerium*)、番茄枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)、番茄早疫病病菌 (*Alternaria solani*)、小麦白粉病菌 (*Erysiphe graminis*), 均由本实验室提供。

1.1.3 培养基 ①拮抗试验用培养基 PDA; ②发酵试验用培养基: 黄豆粉 15 g, 玉米淀粉 17 g, 葡萄糖 4 g, 硫酸氨 3 g, 磷酸氢二钾 0.8 g, 碳酸钙 5 g, 氯化钠 0.4 g, 水 1 000 mL。

1.1.4 皿内琼脂平板直接测定 采用“十”字交叉法, 即在 PDA 平板培养基上, 以原点为中心划直的“十”字, 中心接病原菌, 十字一条线的两端接相同的放线菌, 另一条线接另一种放线菌。培养一定时间, 看是否有抑菌圈产生; 有抑菌圈的, 测量其半径。

1.1.5 放线菌发酵液拮抗性测定 将放线菌接于发酵试验用培养基, 于 120 r/min, 28 °C, pH 7.2 条件下液体发酵 48 h, 发酵液 80 °C 水浴 30 min, 冷却后用 0.5 mL/L 草酸将 pH 值调至 4, 静置 1 h 后, 在

^{*} [收稿日期] 2003-11-13

[作者简介] 疏秀林(1980-), 女, 安徽枞阳人, 在读硕士, 主要从事植物病毒学和微生物药理学研究。

无菌条件下过滤,采用生长速率法测定拮抗性,即取发酵滤液 3 mL 注入培养皿中,然后将 20 ℃的培养基(约 30 mL)倒入皿中与其混合均匀,冷却后接病原菌的菌饼(十字交叉法),加蒸馏水和草酸作对照。3 d 后测量菌落直径,记录结果并按下式计算抑制率:

菌落直径/mm = 相垂直的两直径平均值 - 菌饼直径

抑制率/% = $\frac{\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}}{\text{对照菌落直径}}$

1.1.6 拮抗菌单胞菌的拮抗性筛选 将放线菌孢子(不带培养基),加入无菌水中稀释 $10^3, 10^4, 10^5$ 和 10^6 倍,制备不同浓度的孢子悬浮液,平板培养进行单胞分离,挑选单菌落进行直接平板测定(24 h)和发酵液皿内测定(48 h),方法同 1.1.4 和 1.1.5。

1.2 拮抗菌的鉴定

1.2.1 形态特征 将放线菌在高氏合成一号、PDA

等培养基上 28 ℃培养 78 d 后,用光学显微镜及电子显微镜进行常规的菌体形态观察并照相。

1.2.2 培养特征 参考文献[8]所推荐的培养基,28 ℃恒温培养,分别在第 4,7,14 和 28 天观察颜色并记录^[9]。

1.2.3 生理生化特性 参考文献[8,10]所推荐的培养基和方法。

1.2.4 细胞壁化学成分分析^[11,12] 采用快速薄板层析法(TCL),进行全细胞水解液的氨基酸和糖型分析。

2 结果与讨论

2.1 拮抗放线菌的筛选结果

2.1.1 土壤拮抗菌的分离和筛选 由表 1 可见,从秦岭山区土壤分离到的 750 株放线菌中,对供试病原菌具有拮抗作用的有 41 株,其中兼有强烈抑菌和溶菌作用的有 S-5210, S-4940, S-5320 3 个菌株。

表 1 拮抗放线菌的初步筛选

Table 1 Primary selection of antagonistic actinomycetes

拮抗作用 Antagonism	病原菌及抑菌强弱 Pathogen and the intension of inhibition						
	<i>P. riagrisea</i>	<i>B. sorokiniana</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>A. solani</i>	<i>P. cubensis</i>	<i>F. graminearum</i>	<i>E. turcicum leonard</i>
抑菌 Inhibition	S-5210 + + +	S-5210 + + +	S-5210 + + +	S-5320 + + +	S-4450 + +	S-5210 + +	S-5210 + + +
	S-4940 + +	S-4940 + +	S-4840 +	S-5210 + +	S-5320 + +	S-4940 +	S-320 +
	S-4450 +	S-513 + +	S-5230 +	S-5050 +	S-5210 + +	S-4350 +	S-5370 +
	S-5320 + +	S-5460 + +	S-494 +	S-3341 +	S-530 +		
	S-5450 +	S-4850 +	S-5320 +		S-5460 +		
	S-7933 +	S-501 +					
兼有 抑菌溶菌 Inhibition and bacter- iolysis	S-5780 +						
	S-512 + + +						
	S-490 + +						
	S-5388 +						
	S-5210	S-5210					
	S-4940	S-5460					
	S-4450	S-5320					

注:“+”表示有拮抗作用;“++”表示拮抗作用强;“+++”表示拮抗作用最强。

Note:“+”Indicates having antagonism;“++”Indicates having strong antagonism;“+++”Indicates having the strongest antagonism.

2.1.2 拮抗菌的抑菌测定 由表 2 可知, S-5210 发酵液对供试菌均有抑制作用,且对稻瘟病菌和小麦赤霉病菌的抑制效果最好。S-5210 单胞分离后, S-5210-6 菌株的发酵液对各病原菌的抑制率最高。

2.2 拮抗菌的分类鉴定

2.2.1 培养特征 S-5210-6 菌株在不同培养基上的培养特征如表 3 所示。由表 3 可知,在各种培养

基上, S-5210-6 的气生菌和基内菌丝变化均不是很明显,但在同种培养基上气生菌丝和基内菌丝之间变化很大,如在高氏一号琼脂培养基上,气生菌丝为淡紫灰或蛛网灰,而基内菌丝为葵扇黄、柠檬黄;另外, S-5210-6 仅在葡萄糖酵母膏琼脂上产生深色(落叶棕)的可溶性色素,而在其他培养基上产生的色素均很浅,甚至无色素产生。

表 2 拮抗放线菌的筛选试验

Table 2 Selection of antagonistic actinomycetes %

试验编号 No. of experi- mentation	菌株 Strain	病原菌 Pathogen						
		<i>P. riagrisea</i>	<i>B. sorokiniana</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>A. solani</i>	<i>P. cubensis</i>	<i>F. graminearum</i>	<i>E. turcicum</i> <i>leonard</i>
1	S-5210 *	81	67	76	64	57	89	79
	S-4940	93	62	30	46	0	75	12
	S-5320	67	34	51	80	77	0	24
2	S-5210-1	100	85	0	85	37	39	42
	S-52102	100	85	10	65	58	44	51
	S-5210-3	100	85	0	100	16	78	20
	S-5210-4	68	50	16	80	72	8	19
	S-5210-5	63	80	0	95	69	28	0
	S-5210-6 *	100	92	48	100	96	76	43
3	S-5210-1	81	53	10	82	61	19	37
	S-5210-2	75	57	7	78	64	19	32
	S-5210-3	81	75	5	95	67	51	51
	S-5210-4	65	24	2	70	65	9	21
	S-5210-5	59	48	4	75	86	24	0
	S-5210-6 *	90	62	15	86	90	27	44

注:试验 1,2,3 分别表示发酵液对病原菌的抑制率、单胞菌发酵液皿内测定抑制率(24 h)和单胞菌发酵液皿内测定抑制率(48 h);*表示效果显著。

Note: The experimentation 1,2,3 indicates the inhibition rate of actinomycetes fermentation to pathogen,the inhibition rate of cell fermentation in culture dish after 24 h and 48 h respectively; * indicates significant inhibitory effect.

表 3 S-5210-6 菌株在不同培养基上的培养特征

Table 3 Cultural characteristics of the strain S-5210-6 in different media

培养基 Medium	气生菌丝 Aerial mycelium	基内菌丝 Substrate mycelium	可溶性色素 Soluble pigment
高氏一号琼脂 Starch nutrient agar	淡紫灰或蛛网灰 Lilac or cobwebby grey	葵扇黄,柠檬黄 Kurajongs yellow ,citrine	无或豆汁黄 None or bean juice yellow
马铃薯琼脂 Potato agar	淡紫灰 Lilac grey	象牙黄 Ivory	无 None
马铃薯块 Potato block	无或极微红灰 None or the least red grey	浅驼色或沙石黄 Fleet camel or sand stone yellow	无或浅鸽子灰 None or fleet dovelike grey
蔗糖察氏琼脂 Sucrose czapek s agar	淡藤萝紫 Cany lilac	浅污黄 Fleet filthy yellow	无 None
淀粉合成琼脂 Starch agar	乳白色或灰白色 Milk white or offwhite	乳白或杏仁黄,中央底部大黑斑 Milk white or amygdaline , black spot in central bottom	无或浅驼色 None or fleet camel yellow
克氏合成一号琼脂 Salt-starch agar	极微淡红灰 The most fleet red grey	无色或乳白色 None or milk white	无 None
葡萄糖酵母膏琼脂 Glucose yeast extract agar	中紫灰 Middle purple grey	丁香棕或咖啡色 Clove brown or coffee	落叶棕 Clove brown or coffee

2.2.2 生理生化特征

由表 4 可知,S-5210-6 菌株能使明胶液化、淀粉水解、牛奶凝固和脲化,能产生硫化氢,并且能强烈

分解淀粉,但不能分解纤维素,不能利用酪氨酸产生色素。

表 4 S-5210-6 菌株的生理生化特性

Table 4 Physiological and biochemical characteristics of the strain S-5210-6

试验项目 Experiment	试验结果 Result	试验项目 Experment	试验结果 Result
纤维素分解 Utilization of cellulose	-	牛奶脲化 Peptonization of milk	++
明胶液化 Gelation liquefaction	++	硫化氢产生 Producing H ₂ S	++
淀粉水解 Hydrolysis of starch	+++	利用酪氨酸产生色素 Producing pigments in use of tyrosine	-
牛奶凝固 Coagulation of milk	++		

注:“-”表示负反应,“+-”表示可疑,“+”“++”“+++”表示反应的强弱程度。

Notes:“-”Indicates no activity,“+-”Indicates questionable results,“+”“++”“+++”Indicates the intensity of activity.

由表 5 可知,S-5210-6 菌株能强烈利用 D-葡萄糖 供试糖能利用但利用率很低。
糖和半乳糖,不能利用鼠李糖、乳糖和肌醇,对其他

表 5 S-5210-6 菌株的碳源利用情况

Table 5 Utilization of carbon sources of the strain of S-5210-6

碳源 Carbon sources	结果 Result	碳源 Carbon sources	结果 Result	碳源 Carbon sources	结果 Result
D-葡萄糖 D-glucose	+++	蔗糖 Sucrose	+	乳糖 Lactose	-
D-果糖 D-fructose	++	鼠李糖 L-rhamnose	-	半乳糖 Galactose	+++
D-木糖 D-xylose	+-	肌醇 L-inositol	-	空白对照 (CK)	-
L-阿拉伯糖 L-arabinose	+-	甘露醇 D-mannitol	+		

2.2.3 形态学特征 如图 1 所示,S-5210-6 菌株的
基内菌丝交织紧密,有大量分枝,无横隔膜,不断裂;
气生菌丝体形成孢子链;孢子丝直形、中长;孢子椭
圆形、表面光滑。

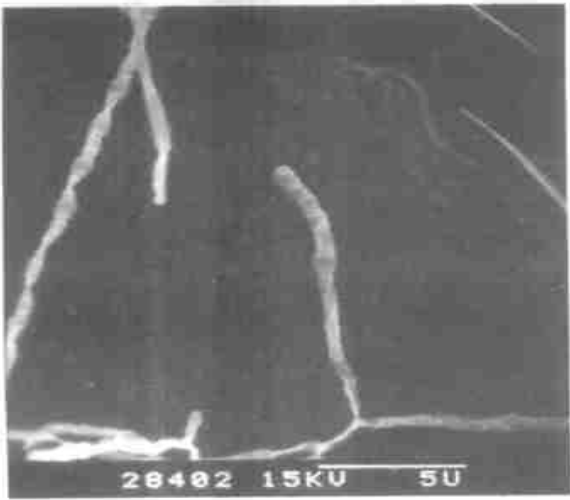


图 1 S-5210-6 菌株的产孢丝形态(4 000 ×)

Fig.1 Shape of the spore producing chains
of the strain S-5210-6 (4 000 ×)

2.2.4 细胞壁化学成分 含磷脂酰乙醇胺 (PE) ,
细胞壁为 I型,无特征性糖。

2.2.5 鉴定结论 由以上形态特征、培养特征、生
理生化特征及细胞壁化学组成分析,根据阎逊初^[10]
放线菌分类系统,可确定 S-5210-6 为链霉菌属

(*Streptomyces*)。

3 讨 论

本试验在拮抗放线菌的初筛过程中采用了平板
十字交叉法,这种方法的优点是工作量小,可在短时
间内对多数菌株进行筛选。然而,这种方法有时会
漏掉一些在拮抗试验中不表现抑菌,而其发酵液或
田间却有很好的抑菌效果的菌株;同时本试验所采
用的供试病原菌数量有限,也可能漏选一些对供试
病原菌之外其他病菌有拮抗作用的菌株;另外,本
试验仅进行了室内拮抗性试验,至于其发酵液在田
间的实际防效以及生物持续作用效果,还需进一
步测定。

本试验分离到的放线菌菌株基本上都是用经典
的分类方法进行鉴定分类的,这种方法在放线菌的
研究历史中发挥过重大作用,至今还是放线菌分
类鉴定的基础方法,一直为众多的研究者广泛应
用。但随着分子生物学技术的迅速发展,当代的微
生物分类已不只限于形态、培养特征的和简单的
生理生化描述,而进入了菌体内高分子物质结构
与功能方面的研究。但由于试验条件的限制,目
前无法在本实验室进行菌体内高分子物质,如蛋
白质、酶、脂肪、糖类与核酸的结构与功能方面
的研究分析试验,故放线菌 S-5210-6 还有待用
以上方法进行进一步验证。

[参考文献]

[1] 胡 萃,包建中,古德祥.中国生物防治[M].太原:山西科学技术出版社,1998.664.
[2] 徐汉虹,安玉兴.生物农药的发展动态与展望[J].农药科学与管理,2001,22(1):32-34.
[3] 张丽萍,张贵云.微生物农药研究进展[J].农业科学,2000,18(4):22-25.
[4] 游长芬.土壤微生物中的放线菌[J].土壤学进展,1986,(3):1-5.
[5] 张利平,陈冠平.放线菌化学分类的现状与发展趋势[J].微生物学报,1997,24(5):310-312.
[6] 方中达.植病研究方法[M].北京:中国农业出版社,1998.
[7] 安德荣,慕小情,刘翠娟,等.土壤拮抗微生物的分离和筛选[J].微生物学杂志,2002,22(5):1-3.
[8] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组.链霉菌鉴定手册[M].北京:科学出版社,1975.
[9] Ridgway R. Color Standards and Color Nomenclature[M]. Washington D C:Publish by the Author,1912.
[10] 瓦克斯曼.放线菌[M].闫逊初译.北京:科学出版社,1974.368.
[11] 王 平.测定放线菌菌体中氨基酸和单糖的快速方法——薄层层析法[J].微生物学通报,1986,13(5):228.
[12] 阮继生,刘志恒,梁丽糯,等.放线菌的研究及应用[M].北京:科学出版社,1990.358.

(下转第 64 页)

- [9] 皮茨 D. 传热学[M]. 北京:科学出版社,2002.
- [10] 华中农业大学. 蔬菜贮藏加工学[M]. 北京:农业出版社,1991.
- [11] 扈文盛. 食品常用数据手册[M]. 北京:中国食品出版社,1987.
- [12] 郑金宝,颜 波. 同时测定生物组织热物性参数(比热、导热系数和导温系数)的实验方法[J]. 低温工程,1991,62(4):44-50.
- [13] Lisowa H, Wujec M, Lis T. Influence of temperature and variety on the thermal properties of apples[J]. Int Agrophysics,2002,16:43-52.

Heat transfer analysis of apple during cold storage

ZHANG Min¹, ZHANG Bai-liang¹, SUN Zhi-qiang¹, ZHAO Hui-zhong²

(1 Key Laboratory of Renewable Energy, Ministry of Agriculture, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China;

2 College of Mechanical Engineering, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China)

Abstract :Based on heat transfer, the process of heat transfer in apple fruit after harvest is analyzed during the cold storage. One-dimensional unsteady conduction with internal heat generation to apple fruit by using numerical method is calculated. The effects of heat transfer caused by the environmental temperature and metabolized heat are quantitatively analyzed, which plays an important role in further researching of fruit products during cold storage and on plant stress resistance.

Key words :apple; keeping fresh in cold storage; heat transfer analysis

(上接第 60 页)

Selection and indentification of antagonistic actinomycetes S-5210-6 from siol

SHU Xiur-lin¹, AN De-rong¹, ZHAN Qin-fu², MA Chi²

(1 College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Xi'an Hi-level Chemical Industry Co. Ltd., Shaanxi, Xi'an 710000, China)

Abstract :750 strains of actionmycetes were isolated from different soil samples collected from various areas with different vegetations at different altitude in Qinling mountainous, from which we selected antagonistic actinomycetes through agar plate method in culture dish, fermentation process and cell fermentation process from different soil samples collected. The result indicates that S-5210-6 has both antagonism and bacteriolysis against *Pyricularia grisea*, *Fusarium graminearum*, *Bipolaris sorokiniana*, *Exserohilum turcicum leonard*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerium*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Altermaria solani*, *Erysiphe graminis* eight pathogenic fungi. According to its morphological, cultural, physio-biochemical characteristics and the analysis of the chemical components in its cell wall, it was designated as *streptomyces*.

Key words :soil-actinomycetes; antagonism selection; identification; *streptomyces*