

# 放线菌 Z<sub>139</sub> 菌株的分离、鉴定及其生物活性<sup>\*</sup>

张 波<sup>1</sup>, 吴文君<sup>2</sup>, 宗兆锋<sup>2</sup>

(1 陕西省出入境检验检疫局, 陕西 西安 710068;

2 西北农林科技大学 植保学院, 陕西 杨凌 712100)

**[摘 要]** 从陕西秦岭山区采集的土样中分离到 1 株具有广谱抗真菌活性的放线菌菌株 Z<sub>139</sub>, 经初步鉴定为小多孢菌属红棕褐小多孢菌(*Micropolyspora raborbranea*)的一个变种。该菌株发酵液对玉米小斑病菌、苹果轮纹病菌、棉花枯萎病菌、马铃薯干腐病菌和西瓜枯萎病菌菌丝的生长抑制中浓度(EC<sub>50</sub>)分别为 0.979, 0.505, 1.733, 0.425和 0.849 mL/L, 对玉米大斑病菌、番茄叶霉病菌、马铃薯干腐病菌和烟草赤星病菌的孢子萌发抑制中浓度(EC<sub>50</sub>)分别为 1.709, 0.375, 0.445 和 1.333 mL/L。对小麦白粉病的保护和治疗作用分别达到 98.6%和86.1%。

**[关键词]** 放线菌; 杀菌活性; 红棕褐小多孢菌

**[中图分类号]** Q939.13<sup>+</sup>2

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2005)08-0069-04

目前农用抗生素使用的数量有限,且长期频繁使用有可能使有害生物产生抗药性,因此需要研究开发新的高活性农用抗生素<sup>[1]</sup>。放线菌是产生抗生素的主要来源,从微生物中分离的生理活性物质有60%以上为放线菌的次级代谢产物<sup>[2,3]</sup>。因此,从放线菌中寻找农用抗活性物质有较为广阔的前景。本研究从陕西秦岭山区采集的土样中分离到 1 株土壤放线菌(编号为 Z<sub>139</sub>),该菌株的发酵液对多种农业植物病原菌有较强烈的抑制作用。现将该菌株的分离过程、鉴定结果及其对几种病原菌的生物活性研究结果报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

**1.1.1 菌株来源** 将采自陕西秦岭山区的土样自然风干,用研钵磨细,过孔径 0.1 mm 筛。采用混菌法,用高氏 1 号合成琼脂培养基(加 50 μg/mL 重铬酸钾作为细菌抑制剂)进行菌种分离,28℃ 培养,纯化后转接到斜面保存。

**1.1.2 培养基** 高氏 1 号合成培养基、PDA 培养基。液体发酵培养液:1% 小米浸出汁 1 000 mL,葡萄糖 10.0 g,蛋白胨 3.0 g,NaCl 2.5 g,CaCO<sub>3</sub> 2.0 g,pH 7.2~7.4。用 250 mL 三角瓶分装,每瓶 50 mL,121℃ 灭菌 30 min。

菌种鉴定培养基<sup>[4]</sup>:克氏 1 号琼脂培养基、蔗糖察氏琼脂培养基、葡萄糖酵母膏琼脂培养基、马铃薯浸汁琼脂培养基、马铃薯块培养基、葡萄糖天门冬素琼脂培养基、明胶液化培养基、柴斯纳琼脂(Tresner)培养基、牛奶凝固胨化培养基、淀粉水解琼脂培养基、纤维素水解培养基、硝酸盐还原培养基、碳源利用基础培养基。

**1.1.3 供试菌** 玉米小斑病菌(*Bipolaris maydis*)、苹果轮纹病菌(*Macrophoma kawatsukai*)、棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*)、马铃薯干腐病菌(*Fusarium solani*)、西瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*)、玉米大斑病菌(*Exserohilum turcicum*)、番茄叶霉病菌(*Fulvia fulva*)、烟草赤星病菌(*Aternaria longipes*)和小麦白粉病菌(*Blumeria graminis*)。

### 1.2 方 法

**1.2.1 抗真菌试验** (1)抑制菌丝生长速率法。将 1 mL Z<sub>139</sub> 菌株发酵液与 9 mL 融化的培养基混匀,倒入无菌培养皿中制成带毒培养基平面。培养基凝固后,在每个培养基平面放入 1 个供试菌菌饼(直径为 4 mm),使菌饼带菌丝的一面贴在培养基表面,每个处理 3 次重复。培养 72~96 h 后,用十字交叉法测定供试菌菌落生长直径,计算抑制率。

(2)孢子萌发法。取供试病原菌孢子配成 10<sup>6</sup>

\* [收稿日期] 2004-11-11

[基金项目] 国家 863 高技术计划项目(2002AA 245121)

[作者简介] 张 波(1978-),男,陕西渭南人,硕士,主要从事农药毒理学研究。

[通讯作者] 吴文君(1945-),男,四川洪雅人,教授,博士生导师,主要从事农药化学和农药毒理学研究。

mL<sup>-1</sup> 悬浮液, 在 10×10 低倍镜下, 每个视野有 30~40 个孢子。将 Z<sub>139</sub> 菌株发酵液与孢子悬浮液混合, 取 1 滴滴加在表面用火棉胶处理过的盖玻片上, 使液滴倒悬在保湿的小环境中, 每处理 3 个重复, 在 25℃ 下培养 6 h 后检查对照孢子的萌发。当对照孢子萌发率达到 85% 后, 检查所有处理的孢子萌发率。以孢子芽管长度大于孢子短半径者为萌发, 计算孢子萌发抑制率<sup>[5]</sup>。

(3) 盆栽试验。保护作用测定: 先在盆栽小麦苗(3 叶期)上喷稀释 10, 20, 40 倍及未稀释的 Z<sub>139</sub> 菌株发酵液, 以喷清水为对照, 24 h 后接种供试植物病原菌。每个处理 4 次重复, 每重复 1 盆。7 d 后按小麦白粉病的分级标准进行病情调查。

治疗作用测定: 先在保湿条件下接种(喷雾法或喷撒法)供试植物病原菌, 24 h 后将 Z<sub>139</sub> 菌株发酵液喷施在植株上。每个处理 4 次重复, 每重复 1 盆。7 d 后按小麦白粉病分级标准进行病情调查。

1.2.2 菌株的鉴定 参照阎逊初<sup>[6]</sup>的放线菌分类和鉴定标准, 对 Z<sub>139</sub> 菌株主要采用形态学方法进行鉴定<sup>[7]</sup>, 即观察基内菌丝、气生菌丝在各种培养基上的形态特征, 有无可溶性色素产生及生长状况, 以及其生理生化特征。

## 2 结果与分析

### 2.1 Z<sub>139</sub> 菌株发酵液抗真菌活性测定

2.1.1 离体测定结果 Z<sub>139</sub> 菌株发酵液抑制 5 种病原真菌菌丝生长的毒力如表 1 所示。由表 1 可知, Z<sub>139</sub> 菌株发酵液对 5 种供试真菌都有较强的抑制作用, 对苹果轮纹病菌和马铃薯干腐病菌菌丝的抑制作用较高, 其抑制中浓度分别为 0.505 和 0.425 mL/L。对棉花枯萎病菌、玉米小斑病菌和西瓜枯萎病菌的抑制中浓度(EC<sub>50</sub>)分别为 1.733, 0.979 和 0.849 mL/L。

表 1 Z<sub>139</sub> 菌株发酵液抑制 5 种病原真菌菌丝生长的毒力

Table 1 Toxicity of fermentation products of strain Z<sub>139</sub> on mycelium growth of plant pathogenic fungi

| 病原菌<br>Plant pathogenic fungi       | 毒力方程<br>Virulence equation | 相关系数<br><i>r</i> | EC <sub>50</sub> /(mL·L <sup>-1</sup> ) |
|-------------------------------------|----------------------------|------------------|-----------------------------------------|
| 苹果轮纹病菌 <i>Macrophoma kawatsukai</i> | $Y = 0.9089 + 1.5133x$     | 0.9828           | 0.505                                   |
| 棉花枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i>    | $Y = -0.2750 + 1.6287x$    | 0.9772           | 1.733                                   |
| 马铃薯干腐病菌 <i>Fusarium solani</i>      | $Y = 1.7724 + 1.2279x$     | 0.9722           | 0.425                                   |
| 玉米小斑病菌 <i>Bipolaris maydis</i>      | $Y = 1.0265 + 1.3284x$     | 0.9891           | 0.979                                   |
| 西瓜枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i>    | $Y = -0.0397 + 1.7204x$    | 0.9598           | 0.849                                   |

孢子萌发法测定结果(表 2)表明, Z<sub>139</sub> 菌株发酵液对 4 种病原真菌的孢子萌发均有较强的抑制作用, 其中对马铃薯干腐病菌和番茄叶霉病菌的孢子

萌发抑制作用优于其他两种病原菌, 其抑制中浓度(EC<sub>50</sub>)达到 0.445 和 0.375 mL/L。

表 2 Z<sub>139</sub> 菌株发酵液抑制 4 种病原真菌孢子萌发的毒力

Table 2 Toxicity of fermentation products of strain Z<sub>139</sub> on spore germination of plant pathogenic fungi

| 病原菌<br>Plant pathogenic fungi      | 毒力方程<br>Virulence equation | 相关系数<br><i>r</i> | EC <sub>50</sub> /(mL·L <sup>-1</sup> ) |
|------------------------------------|----------------------------|------------------|-----------------------------------------|
| 烟草赤星病菌 <i>Alternaria longipes</i>  | $Y = -0.6893 + 1.8207x$    | 0.9948           | 1.333                                   |
| 玉米大斑病菌 <i>Exserohilum turcicum</i> | $Y = -1.0117 + 1.8595x$    | 0.9477           | 1.709                                   |
| 马铃薯干腐病菌 <i>Fusarium solani</i>     | $Y = 1.3987 + 1.3595x$     | 0.9678           | 0.445                                   |
| 番茄叶霉病菌 <i>Fulvia fulva</i>         | $Y = 1.0977 + 1.5156x$     | 0.9874           | 0.375                                   |

2.1.2 盆栽试验结果 Z<sub>139</sub> 菌株发酵液对小麦白粉病的盆栽试验结果见表 3。盆栽试验结果(表 3)表明, Z<sub>139</sub> 菌株发酵液对小麦白粉病有较好的保护和治疗作用, 且保护作用优于治疗作用, 其原始发酵液对小麦白粉病的保护效果达到了 98.6%, 治疗效果也

达到了 86.1%。发酵液稀释 20 倍时, 其保护和治疗作用也在 50% 以上。但随着发酵液稀释倍数的增加, 防治效果逐渐下降, 当发酵液稀释 40 倍时, 对小麦白粉病菌的治疗和保护作用降低至 20% 左右。

表 3 Z<sub>139</sub> 菌株发酵液对小麦白粉病的盆栽试验结果

| 稀释倍数<br>Dilute times | 病情指数 Disease index       |                            | 防治效果/% Control effect    |                            |
|----------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|
|                      | 保护<br>Protected efficacy | 治疗<br>Therapeutic efficacy | 保护<br>Protected efficacy | 治疗<br>Therapeutic efficacy |
|                      |                          |                            |                          |                            |
| 未稀释 No dilute        | 0.9                      | 8.4                        | 98.6                     | 86.1                       |
| 10 ×                 | 15.6                     | 25.0                       | 75.1                     | 58.5                       |
| 20 ×                 | 27.7                     | 27.4                       | 55.8                     | 54.5                       |
| 40 ×                 | 48.7                     | 37.4                       | 22.1                     | 17.8                       |
| CK                   | 62.5                     | 60.2                       |                          |                            |

2.2 Z<sub>139</sub> 菌株的鉴定

培养特征 Z<sub>139</sub> 菌株在高氏 1 号培养基上 28 培养 7 d 后观察发现, 该菌株菌落圆形、粉状、隆起,

在培养基上不产生可溶性色素。Z<sub>139</sub> 菌株在 7 种不同培养基上的培养特征见表 4。

表 4 Z<sub>139</sub> 菌株的培养特征

| 培养基 Medium                                       | 气生菌丝体<br>Aerial mycelia  | 基内菌丝体<br>Mycelia in medium | 可溶性色素<br>Soluble pigment | 生长状况<br>Growth |
|--------------------------------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|----------------|
| 高氏 1 号合成培养基 Gause's No. 1 synthetic medium       | 苏木紫<br>Brazilwood violet | 象牙黄<br>Ivory yellow        | 无<br>Nothing             | +++            |
| 克氏 1 号琼脂培养基 Krasilnikoy's No. 1 synthetic medium | 粉白<br>Powder white       | 杏黄<br>Apricot yellow       | 无<br>Nothing             | ++             |
| 蔗糖察氏琼脂培养基 Sucrose Czapek's agar                  | 蛛网灰<br>Cobweb gray       | 无色<br>Achromatism          | 无<br>Nothing             | ++             |
| 葡萄糖天门冬素琼脂培养基 Glucose asparagines agar            | 浅象灰<br>Undertone gray    | 榴萼黄<br>Garnet yellow       | 无<br>Nothing             | +++            |
| 葡萄糖酵母膏琼脂培养基 Glucose yeast extract agar           | 淡红灰<br>Rosiness gray     | 酱棕<br>Dark reddish brown   | 中灰驼<br>Intermediate gray | +++            |
| 马铃薯浸汁琼脂培养基 Potato extract glucose agar           | 蛛网灰<br>Cobweb gray       | 炒米黄<br>Rice yellow         | 无<br>Nothing             | +++            |
| 马铃薯块培养基 Potato plug                              | 白<br>White               | 无色<br>Achromatism          | 无<br>Nothing             | +              |

注: +, ++, +++ 分别代表生长状况差、较好、好。  
Note: +, ++, +++ means the strain grows bad, good, excellent seperately.

**显微特征** Z<sub>139</sub> 菌株形成气生菌丝, 基质菌丝无横隔, 不断裂; 基丝和气丝上都有链状孢子形成, 孢子链直; 不产生孢囊; 孢子球形。

**生理生化特征** Z<sub>139</sub> 菌株可使明胶液化, 牛奶凝固且胨化, 可水解淀粉, 能使硝酸盐还原, 但不能利用纤维素, 也不在培养基上产生 H<sub>2</sub>S 气体。可以利用葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、肌醇、甘露醇、鼠李糖, 不能利用阿拉伯糖、木糖、果糖。

根据 Z<sub>139</sub> 菌株以上的培养特征、显微特征以及生理生化特性, 查阅张继忠<sup>[4]</sup>关于放线菌分类标准, 该菌株的生理生化特性与小多孢菌属的红棕褐小多孢菌 (*Micropolyspora raborbranea*) 相同, 在形态特征、培养特征上也相近似, 都在气丝和基丝上产生孢子, 形成孢子链, 孢子为不规则球形, 仅在马铃薯培养基和蛋白胨玉米琼脂上培养特征有所不同, 因此认为该菌株为小多孢菌属红棕褐小多孢菌的一个变种<sup>[7]</sup>。

3 讨 论

通过对 Z<sub>139</sub> 菌株形态特征、显微特征和生理生化特性进行试验观察, 初步鉴定该菌株为放线菌中小多孢菌属红棕褐小多孢菌的一个变种。目前发现的抗生素产生菌, 绝大多数为放线菌, 80% 以上抗生素都来自链霉菌属, 其次是诺卡氏菌属、游动放线菌属以及马拉杜放线菌属等, 而从稀有放线菌小多孢菌中发现的抗生素据报道迄今为止只有 4 种<sup>[3]</sup>, 在我国仅有四川抗菌素研究所的陆群等<sup>[8]</sup>发现的抗生素 H 4750-D 2 是由小多孢菌产生, 且这些抗生素仅具有医用活性。农用抗生素产生菌中还未见有关小多孢菌属的报道。因此, 该研究发现的菌株可被看作是农用抗生素的一个新来源, 对于新农用抗生素的开发研究有重要价值。

本研究结果表明, Z<sub>139</sub> 菌株产生的抗菌物质对多种农作物病原菌都有较强的抑制作用。活体盆栽试

验结果表明, Z<sub>139</sub> 发酵液对小麦白粉病的保护和治疗效果分别达到 98.6% 和 86.1%。因此, 该菌株直接利用在农业病虫害防治上有比较广阔的应用前景。但是目前对放线菌发酵产物的直接利用还存在很多问题, 其中一个重要问题就是放线菌发酵产生的次生代谢产物的产量很低, 这对于发酵液的直接应用

有一定限制。本文所研究的菌株同样也存在这方面的问题。因此, 如何大幅度提高放线菌菌株发酵产物中活性物质的含量是迫切需要解决的关键问题。要解决这一问题, 可以通过高产菌株的选育和进一步对其发酵条件进行深入研究, 以提高发酵产物中抗菌物质含量。

### [参考文献]

- [1] 周 启, 王道本. 农用抗生素和微生物杀虫剂[M]. 北京: 农业出版社, 1995
- [2] 张一宾. 由植物中放线菌产生的植物生理活性物质[J]. 世界农药, 2003, 25(1): 9- 12
- [3] 安德荣. 生物制药的原理及方法——抗生素的制备[M]. 北京: 中国科学文化出版社, 2002
- [4] 张继忠. 微生物分类学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1990. 144- 146
- [5] 李树正. 农药实验法——杀菌剂篇[M]. 北京: 农业出版社, 1991. 31
- [6] 阎逊初. 放线菌的分类和鉴定[M]. 北京: 科学出版社, 1992
- [7] 李淑彬, 王 军, 杨劲松, 等. 抗真菌抗生素 179M 产生菌的分离鉴定和生理特征研究[J]. 菌物系统, 2001, 20(3): 362- 367
- [8] 陆 群, 陆永乐, 吴林森. 新抗生素 H4750-D2 的研究——发酵、分离、结构鉴定和生物活性[J]. 中国抗生素杂志, 1998, 23(5): 326- 330

## Studies on isolation, identification and fungicidal activity of antagonistic actinomycete Z<sub>139</sub>

ZHANG Bo<sup>1</sup>, WU Wen-jun<sup>2</sup>, ZONG Zhao-feng<sup>2</sup>

(1 Shaanxi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xi'an, Shaanxi 710068, China;

2 College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** A Actinomycete strain producing a broad-spectrum antifungal substance was isolated from the soil of the Qiling mountain in Shaanxi. The strain numbered Z<sub>139</sub> was initially identified as a variety of *Micropolyspora raborbranea*. The results of mycelium growth rate showed that the value of EC<sub>50</sub> against *Bipolaria maydis*, *Macrophoma kawaii*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* were 0.979, 0.505, 1.733, 0.425 and 0.849 mL/L. The result of spore germination proved that the value of EC<sub>50</sub> against *Alternaria longipes*, *Exserohilum triticum*, *Fulvia fulva* and *Fusarium solani* were 1.709, 0.375, 0.445 and 1.333 mL/L. The results of pot test indicated that fermentation products of Z<sub>139</sub> exhibited 98.6% of protected efficacy and 86.1% of therapeutic efficacy.

**Key words:** actinomycetes; fungicidal activity; *Micropolyspora raborbranea*