海洋放线菌 I_{10} 菌株发酵产物抗菌活性及其初步分类鉴定

方丽萍，龙建友，姬志勤
(西北农林科技大学 农药研究所，陕西 杨凌 712100)

[摘 要] I_{10} 菌株是从渤海海水中分离得到的 1 株放线菌。为了测定 I_{10} 菌珠发酵产物的抗菌活性，以 13 种病原真菌、3 种病原细菌为供试菌，采用抑制菌丝生长速率法和双层平板法，对 I_{10} 菌株发酵液进行了室内杀菌活性测定和盆栽试验，并对其分类地位进行了初步鉴定。结果表明，I_{10} 菌株发酵液对 13 种供试病原真菌的菌丝生长抑制率在 80%以上的占到 76.92%，对 3 种供试病原细菌的抑菌圈直径达到 18 mm 以上；I_{10} 菌株发酵液原液对小麦白粉病的保护和治疗效果分别为 99.57%和 75.53%。稳定性研究发现，I_{10} 菌株连续转接 10 代，其培养特征和产生活性物质性能均表现稳定，第 10 代菌株发酵液的杀菌活性与出发菌株无明显差异。根据其形态特征、培养特征、生理生化特征，初步鉴定该菌珠为不吸水链霉菌(*S. ahygroscopicus*)的一个变种。

[关键词] 海洋放线菌；发酵产物；抗菌活性；分类鉴定；不吸水链霉菌
[中图分类号] S476⁺.1 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2007)04-0115-05

Antibiotic activity of fermentations of marine *Actinomycete* I_{10} and initial identification of strain

FANG Li-ping, LONG Jian-you, JI Zhi-qin
(*Institute of pesticide, Northwest A & F University, Yang ling, Shaanxi* 712100, *China*)

Abstract: Marine *Actinomycete* I_{10} was isolated and collected from seawater of Bohai. The paper invesitagated the antibiotic activity of fermen tatians of stain I_{10}, by means of mycelium growth rate and the double-layer method. The results indicated that more than 80% inhibiting ratio could be gained from the tested 13 varieties of plant pathogenic funguses (76.92% of the total); the diameter of inhibitory ring of 3 tested bacterias was more than 18 mm; the results of pot tests showed that the fermentation products of the strain I_{10} exhibited 99.57% of protective efficacy and 75.53% of therapeutic efficacy against *Pseudoperonospora cubensis*. Through the research of stability of strain, the results showed the cultural characteristics and antibiotic productivity of strain I_{10} were not altered when subcultured 10 generations, and the antibiotic activity of fermentations of the 10th strain did not decrease compared with original strain. According to its morphological, cultural, physi-biochemical characteristics, marine actinomycete I_{10} was initially identified as a variety of *S. ahygroscopicus*.

Key words: marine *Actinomycete*; fermentation prlducts; antibiotic activity; identification of strain; *S. ahygroscopicus*

[收稿日期] 2006-03-20
[基金项目] 国家"973"项目"从天然生物源小分子发现农用新作用靶标机制及先导结构"(2002AA245121)
[作者简介] 方丽萍(1980－)，女，山东寿光人，在读博士，主要从事生物源农药研究。E-mail: yichen-4240@163.com
[通讯作者] 姬志勤(1971－)，男，山西永济人，讲师，主要从事天然产物农药研究。E-mail: jizhijun@163.com

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

近年来,农用生物活性物质特别是微生物源农药的研究,已成为生物资源开发的热点。从陆地微生物资源中寻找新农药已获得巨大的成功,然而,随着陆地微生物资源的不断开发,发现新代谢物的可能性日趋减少,从而带来了对新资源的强烈要求。海洋微生物是一个巨大的尚待开发的资源,从其代谢产物中已分离到许多新的生物活性物质,其中相当一部分是陆地生物所没有的[1]。目前,被筛选的海洋微生物代谢产物仅约1%,因此海洋环境中多样的微生物资源为新药开发提供了巨大的可能。据不完全统计[2],近年来50%以上新发现的海洋微生物活性物质,是由海洋放线菌这个庞大的分类群产生的,这些活性化合物为新药研究提供了丰富的先导化合物,有些已进入研发阶段。I_{10}菌株是从渤海海水中分离纯化得到的1株放线菌,该菌株的发酵液对多种农业植物病原菌有较强的抑制作用,现将对该菌株的农用活性研究及初步分类鉴定结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 *供试菌株* 海洋放线菌I_{10}菌株,由作者从渤海海水中筛选得到。

1.1.2 *供试病原菌* 小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)、小麦根腐病菌(*Bipolaris sorokiniana*)、烟草赤星病菌(*Alternaria alternata*)、玉米小斑病菌(*Glomerella cingulata*)、苹果轮纹病菌(*Macrophoma kawatsukai*)、马铃薯干腐病菌(*Fusarium oxysporium*)、葡萄霜霉病菌(*Pseudoperonospora cubensis*)、苹果腐烂病菌(*Cytospora sp*)、玉米弯孢叶斑病菌(*Curvalation lunata*)、番茄早疫病菌(*Alternaria solani*)、番茄叶霉病菌(*Fulvia fulva*)、西瓜枯萎病菌(*Fusarium bulbigenum*)、番茄灰霉病菌(*Botrytis cintrea*)、小麦白粉病菌(*Blumeria guaminis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtills*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),均由西北农林科技大学植保学院农药研究所提供。

1.1.3 *培养基* (1)抗菌生测试验用培养基:PDA培养基、牛肉膏蛋白胨培养基。

(2)发酵试验用液体培养基:小米浸液培养液。

(3)菌种鉴定培养基:高氏1号培养基、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。

1.2 方 法

1.2.1 *I_{10}菌株的培养* 将I_{10}菌株接种在高氏1号培养基上,置于28 ℃培养箱中培养4 d。

1.2.2 *I_{10}菌株发酵液的制备* 采用摇瓶发酵培养法。在250 mL三角瓶中装入100 mL液体培养基,接种量10%,在摇床转速180 r/min,28 ℃条件下振荡培养4 d。

1.3 生物活性测定

1.3.1 *I_{10}菌株发酵液对病原真菌的抑制作用* 采用抑制菌丝生长速率法[3-5]。将原始I_{10}菌株发酵液1 mL与9 mL融化的PDA培养基混匀,倒入无菌培养皿中制成带药培养基平板。培养基凝固后,在每个培养基平板上放入1个供试病原真菌菌饼(直径为4 mm),使菌饼带菌丝的一面贴在培养基表面,每处理重复3次。置于25℃恒温箱中培养72~96 h后,用十字交叉法测量供试病原真菌菌落生长直径,用下式计算抑制率:

$$抑制率/\% = \frac{对照菌落生长直径 - 处理菌落生长直径}{对照菌落生长直径} \times 100\%。$$

1.3.2 *I_{10}菌株发酵液对病原细菌的抑制作用* 采用双层平板法[1]。底层培养基采用2%琼脂培养基,上层培养基采用牛肉膏蛋白胨培养基。在每个培养皿中用无菌吸管加入10 mL底层培养基,待冷凝后,再将7 mL已融化冷却至45 ℃的上层培养基(已接种供试病原细菌)倒入已凝固的底层培养基表面,待凝固后即可在每个培养皿上轻轻放置无菌牛津杯,每皿放置4个,牛津杯之间的距离相等。然后在每个牛津杯中接入I_{10}菌株发酵液0.2 mL,置于25 ℃恒温箱中培养,24 h后测量抑菌圈大小。

1.3.3 *盆栽试验* 保护作用测定[4]:先在盆栽小麦植株上喷施I_{10}菌株发酵液原液及稀释10倍液,以清水为对照,24 h后接种供试小麦白粉病菌。每处理重复4次,每重复1盆。1周后按小麦白粉病的分级标准进行病情调查,计算病情指数和防治效果。

治疗作用测定[4]:先在保湿条件下采用喷雾法接种供试的小麦白粉病菌,24 h后在植株上喷施I_{10}菌株发酵液原液及稀释10倍液,以清水为对照。每处理重复4次,每重复1盆。1周后按小麦白粉病的分级标准进行病情调查,计算病情指数和防治效果。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

$$病情指数 = \frac{\sum(病级叶数 \times 代表级数)}{叶数总数 \times 最高代表级别} \times 100;$$

$$防治效果/\% = \frac{对照组病情指数 - 处理组病情指数}{对照组病情指数} \times 100\%。$$

1.4　I_{10} 菌株发酵液抗菌效果的传代稳定性测定

将 I_{10} 菌株在高氏 1 号平面培养基上每隔 3 d 传代 1 次，连续传代 10 次，分别培养发酵，然后以苹果轮纹病菌和小麦根腐病菌为指示病原菌，采用抑制菌丝生长速率法测定各代菌株发酵液的抑菌活性[6-7]。

1.5　I_{10} 菌株的初步分类鉴定

参照有关放线菌分类和鉴定标准，对 I_{10} 菌株主要采用形态学方法进行鉴定，即在显微镜下观察 I_{10} 菌株基内菌丝、气生菌丝的生长形态，在各菌种鉴定培养基上的培养特征，有无可溶性色素产生及生长状况，以及其生理生化特征[8-9]。

2　结果与分析

2.1　I_{10} 菌株发酵液的生物活性

2.1.1　对病原真菌的抑制作用　从表 1 可以看出，I_{10} 菌株发酵液对葡萄霜霉病菌、苹果轮纹病菌、小麦根腐病菌、玉米小斑病菌 4 种病原真菌的菌丝生长抑制率均在 95% 以上；对苹果腐烂病菌、烟草赤星病菌、番茄早疫病菌、番茄叶霉病菌、小麦赤霉病菌、马铃薯干腐病菌 6 种病原真菌的菌丝生长抑制率均在 80% 以上；对西瓜枯萎病菌、番茄灰霉病菌的菌丝生长抑制率在 60% 以上，而对玉米弯孢叶斑病菌的菌丝生长抑制率低于 60%。其中抑制率在 80% 以上的占供试真菌总数的 76.92%，说明 I_{10} 菌株抗菌谱广，抗菌效果好。

2.1.2　对病原细菌的抑制作用　从表 2 可以看出，I_{10} 菌株发酵液对枯草芽孢杆菌和大肠杆菌的抑菌圈直径均在 18 mm 以上，且抑菌圈清晰透明，对金黄色葡萄球菌的抑制作用较高，抑菌圈直径达到 25 mm 以上。说明 I_{10} 菌株对革兰氏阳性、阴性菌均有较好的抑菌活性。

表 1　I_{10} 菌株发酵液对病原真菌的抑制作用

Table 1　Analysis of variance tests of fermentation products of the strain I_{10} against fungus

供试病原菌 Tested pathogens	抑制率% Inhibition		供试病原菌 Tested pathogens	抑制率% Inhibition	
葡萄霜霉病菌 *Pseudoperonospora cubensis*	100	Aa	番茄叶霉病菌 *Fulvia fulva*	87.79	FGe
苹果轮纹病菌 *Macrophoma kuwatsukai*	99.45	Bb	小麦赤霉病菌 *Fusarium graminearum*	86.48	Ge
小麦根腐病菌 *Bipolaris sorokinana*	97.73	Cc	马铃薯干腐病菌 *Fusarium oxysporium*	82.37	Hf
玉米小斑病菌 *Glomerella cingulata*	97.17	Cc	西瓜枯萎病菌 *Fusarium bulbigenum*	79.59	Hf
苹果腐烂病菌 *Cytospora sp*	92.06	Dd	番茄灰霉病菌 *Botrytis cintrea*	62.13	Ig
烟草赤星病菌 *Alternaria longipes*	91.08	DEd	玉米弯孢叶斑病菌 *Curvalation lunata*	58.14	Ig
番茄早疫病菌 *Alternaria solani*	89.68	EFde			

注：表中数据为 3 次重复的平均值；不同大写字母表示差异极显著，不同小写字母表示差异显著。

Note: All values are means of three replicates different capita letters indicate the dignificant difference; different small letlers indicate disitinctive difference.

表 2　I_{10} 菌株发酵液对病原细菌的抑制作用

Table 2　Tests of fermentation products of the strain I_{10} against bacteria

供试病原菌 Tested pathogens	抑菌圈直径/mm Diameter of inhibitory ring
枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtills*	21.36(+++)
金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*	26.17(++)
大肠杆菌 *Escherichia coli*	18.71(+++)

注：+表示抑菌圈可见；++表示抑菌圈清晰；+++表示抑菌圈突出。

Note: + means eyeable, ++ means clear, +++ mean outstanding.

2.1.3　对小麦白粉病的防治效果　I_{10} 菌株发酵液对小麦白粉病的防治效果如表 3 所示。从表 3 可以看出，I_{10} 菌株发酵液原液对小麦白粉病的保护和治疗效果分别为 99.57% 和 75.53%；发酵液稀释 10 倍后，对小麦白粉病的保护和治疗效果分别为 62.87% 和 53.57%，两个处理对小麦白粉病的保护作用均优于治疗作用。

2.2　I_{10} 菌株发酵液抗菌效果的传代稳定性

从表 4 可见，I_{10} 菌株经连续 10 次转管培养后，其发酵液对苹果轮纹病菌的生长抑制率在 99.55%～95.43%，对小麦根腐病菌的生长抑制率在 99.13%～94.37%，说明 I_{10} 菌株的抗菌效果较稳定。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表3 I_{10}菌株发酵液对小麦白粉病的防治效果

Table 3 Tests of fermentation products of the strain I_{10} against *Blumeria guaminis*

稀释倍数 Dilute time	保护效果 Protected efficacy		治疗效果 Therapeutic efficacy	
	病情指数 Disease index	防治效果/% Control effect	病情指数 Disease index	防治效果/% Control effect
原液 No dilute	1.13	99.57	16.14	75.53
10×	30.60	62.87	37.13	53.57
清水 Water (CK)	65.80		66.17	

表4 I_{10}各代菌株发酵液对供试病原菌的生长抑制率

Table 4 Inhibition of fermentation products of the strain I_{10} at different generations against fungus %

供试病原菌 Tested pathogens	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
苹果轮纹病菌 *Macrophoma kuwatsukai*	99.55	98.79	98.64	99.13	95.43	99.28	96.45	95.64	97.17	96.89
小麦根腐病菌 *Biploaris sorokinana*	99.13	95.74	99.09	96.56	97.44	98.89	99.13	98.64	94.37	98.31

2.3 I_{10}菌株分类地位的鉴定

2.3.1 形态观察 在高氏1号培养基上于28℃培养时,I_{10}菌株生长迅速,培养3 d即可产生大量孢子;气生菌丝灰褐色,有白色次生菌丝,基丝浅黄色。在显微镜下观察发现,气生菌丝和基内菌丝都很发达,基内菌丝有横隔,不断裂;孢子丝紧密螺旋形,气生菌丝上都有孢子形成,孢子椭圆形,表面有突起。

2.3.2 培养特征 从表5可见,I_{10}菌株在不同的菌种鉴定培养基上表现出不同的培养特征,其气生菌丝体、基内菌丝体均有一定差异。在不同培养基上,I_{10}菌株的气生菌丝和基内菌丝变化均不是很明显,但在同种培养基上变化很大,如在高氏1号培养基上,气生菌丝为灰褐色,而基内菌丝为浅黄色;另外,I_{10}菌株仅在高氏1号培养基和马铃薯块培养基上产生浅黄色的可溶性色素,而在其他培养基上均无色素产生。I_{10}菌株在葡萄糖天门冬素琼脂培养基上生长微弱,在其他菌种鉴定培养基上均生长旺盛。

表5 I_{10}菌株的培养特征

Table 5 Cultural characteristics of the strain I_{10} in different medium

培养基 Medium	气生菌丝 Aerial mycelia	基内菌丝 Mycelia in medium	可溶性色素 Soluble pigment	生长状况 Growth
高氏1号培养基 Gauseps No. 1 synthetic medium	灰褐色 Dust-colour	浅黄色 Buff	浅黄色 Buff	+++
克氏1号琼脂培养基 Krasilnikoyps No. 1 synthetic medium	淡红灰色 Thin red-gray	灰黄色 Lark	无色 Achromatism	++
蔗糖察氏琼脂培养基 Sucro se Czapekps agar	中灰驼色 Media gray-camel	灰黄色 Lark	无色 Achromatism	++
葡萄糖天门冬素琼脂培养基 Gluco se asparagines agar	浅灰色 French grey	无色 Achromatism	无色 Achromatism	+
葡萄糖酵母膏琼脂培养基 Gluco se yeast extract agar	灰褐色 Dust-colour	棕黄色 Brown-yellow	无色 Achromatism	+++
马铃薯浸汁琼脂培养基 Potato extract gluco seagar	银鼠灰色 Silver gray	象牙黄 Ivory-yellow	无色 Achromatism	+++
马铃薯块培养基 Potato p lug	灰白色 Offwhite	无色 Achromatism	淡黄色 Primrose yellow	+++

注:+,++,+++分别代表生长的强弱程度,-代表不生长。表6,7同。

Note: +,++,+++ indicates the intensive of growth; - indicate no grouth. Table 6 and 7 are same.

表6 I_{10}菌株的生理生化特征

Table 6 Physiological and biochemical characteristics of the strain I_{10}

试验项目 Experiment	结果 Result	试验项目 Experiment	结果 Result
明胶液化 Gelationliquefaction	++	纤维素利用 Utilization of cellulose	++
牛奶凝固 Coagulation of milk	++	硝酸盐还原 Deoxidize of nitrate	+++
牛奶胨化 Peptonization of milk	++	硫化氢产生 Producing H_2S	-
淀粉水解 Hydrolysis of starch	+++		

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.3.3　生理生化特征　从表 6 可以看出,I_{10} 菌株能使明胶较快液化,牛奶凝固并产生胨化,可使淀粉强烈水解,能利用纤维素,还原硝酸盐,但不产生黑色素。从表 7 可以看出,I_{10} 菌株能很好的利用葡萄糖、木糖、甘露醇,较好的利用麦芽糖,对蔗糖、肌醇、鼠李糖、果糖利用较差,不能利用糊精。

表 7　I_{10} 菌株对各种碳源的利用情况

Table 7　Utilization of carbon sources of the strain I_{10}

碳源 Carbon sources	结果 Result	碳源 Carbon sources	结果 Result	碳源 Carbon sources	结果 Result
葡萄糖 Glucose	+++	糊精 Dextrine	−	甘露醇 Mannitol	+++
蔗糖 Sucrose	+	木糖 Xylose	+++	鼠李糖 Hamnose	+
麦芽糖 Maltobiose	++	肌醇 Inositol	+	果糖 Fructose	+

根据 I_{10} 菌株以上的培养特征、形态特征以及生理生化特性,经查阅链霉菌鉴定手册,该菌株的生理生化特性与链霉菌属金色类群中的不吸水链霉菌基本相同,但不吸水链霉菌不能利用纤维素,这与 I_{10} 菌株有所不同。因此,该菌株初步鉴定为不吸水链霉菌(*S. ahygroscopicus*)的一个变种。

3　结论与讨论

本试验结果表明,I_{10} 菌株发酵液抗菌谱广,不仅对多种作物病原真菌有较强的抑制作用,而且对部分细菌也有很好的抑制作用;发酵液对小麦白粉病菌有较好的保护和治疗作用,且保护效果优于治疗效果;I_{10} 菌株具有很好的遗传稳定性,在连续传代过程中产生活性物质的能力保持稳定。以上研究结果为 I_{10} 菌株的进一步开发利用提供了有力的理论和事实依据。但是,本试验过程中用的发酵液为多种成分的复合体,因此对其代谢产物中的有效成分、含量及有效成分的分子结构还需要进一步研究。

通过对 I_{10} 菌株形态特征、培养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不吸水链霉菌(*S. ahygroscopicus*)的一个变种。但该鉴定试验采用的是经典的传统分类学方法,此分类方法只能初步的鉴定其种属地位,并不能准确说明微生物的遗传进化地位和关系。因此,对该菌株还需要进一步从细胞壁化学成分分析和分子生物学角度进行更为准确的鉴定。

[参考文献]

[1]　方金瑞. 海洋微生物:开发海洋药物的重要资源 [J]. 中国海洋药物,1998,17 (3):53-56.

[2]　田　黎,陈　杰,何运转,等. 农用抗生素的新资源——海洋微生物 [J]. 中国生物防治,2003,19(3):121-124.

[3]　张　穗. 杀菌剂生物测定技术[J]. 植物保护,1999,25(3):35-37.

[4]　慕立义,吴文君,王开运. 植物化学保护研究方法[M]. 北京:中国农业出版社,1991.

[5]　黄昌华,郭崇明. B-HCH 菌株发酵滤液对植物病原真菌的作用 [J]. 中国生物防治,1996,12(3):107-109.

[6]　刘晓妹,陈秀蓉,蒲金基,等. 两株芽孢杆菌无菌液抗菌谱及稳定性测定 [J]. 中国生物防治,2003,19(3):141-143.

[7]　赵国方,赵步贵,覃重军,等. 农抗 5102 产生菌工程菌株 WH-1 的稳定性 [J]. 中国抗生素杂志,1996,21(5):329-333.

[8]　阎逊初. 放线菌的分类鉴定[M]. 北京:科学出版社,1992:858.

[9]　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.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net