

生防菌弗氏链霉菌 S-221 所产抗菌物质的抗菌活性测定

倪国荣^{1,2}, 潘晓华¹, 张智平², 涂国全^{2*}

(1. 江西农业大学 作物生理生态与遗传育种教育部重点实验室/农业部双季稻生理生态与栽培重点开放实验室/江西省作物生理生态与遗传育种重点实验室, 江西 南昌 330045; 2. 江西农业大学 生物科学与工程学院, 江西 南昌 330045)

摘要: 对弗氏链霉菌 S-221 所产抗菌物质的抗菌活性进行研究, 通过弗氏链霉菌 S-221 所产抗菌物质对 7 种细菌和 10 种植物病原真菌的抗菌活性测定, 抗菌活性物质对被检测的大肠杆菌 7 种细菌最低抑菌质量浓度为: 0.098 ~ 3.130 mg/L; 抗菌活性物质分别对水稻纹枯病等供试 10 种病原真菌的 EC_{50} 为 0.39 ~ 4.83 mg/L 和 EC_{90} 范围为 8.17 ~ 28.44 mg/L。实验结果显示弗氏链霉菌 S-221 所产抗菌物质具有广谱和强效的抗菌性, 具有较广的应用前景。

关键词: 弗氏链霉菌 S-221; 抗菌活性; 植物病原菌

中图分类号: Q939.92 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)02-0355-05

Determination of the Antimicrobial Activity of Antibacterial Substances Produced by Biocontrol Bacteria *Streptomyces fradiae* var S-221

NI Guo-rong^{1,2}, PAN Xiao-hua¹, ZHANG Zhi-ping², TU Guo-quan^{2*}

(1. Crop Physiology and Ecology and Genetics and Breeding with the Ministry of Education Key Laboratory, Double-crop Rice Ecology and Physiology and Cultivation with Ministry of Agriculture Key Open Laboratory Crop Physiology, JAU, Nanchang 330045, China; 2. Bioscience and Biotechnology College, JAU, Nanchang 330045, China)

Abstract: To explore the antimicrobial activity of antibacterial substances produced by *Streptomyces fradiae* var S-221. The antimicrobial activity of antibacterial substances produced by *Streptomyces fradiae* var S-221 on 7 kinds of bacteria and 10 kinds of plant pathogens was determined. The range of MIC to *Escherichia coli* at on 7 kinds of bacteria is from 0.098 to 3.130 mg/L, the range of EC_{50} on 10 kinds of plant pathogens is from 0.39 ~ 4.83 mg/L and the range of EC_{90} on 10 kinds of plant pathogens is from 8.17 ~ 28.44 mg/L. The inhibitory action of antibacterial substance produced by *Streptomyces fradiae* Var S-221 is powerful and the pedigree of antimicrobial is wide.

Key words: *Streptomyces fradiae* var S-221; Antimicrobial activity; plant pathogens

植物病虫害是农业生产的大敌, 据统计, 全球每年植物因遭受病虫害而造成的减产损失平均为总产量的 45%^[1-2], 尤其是一些重要的经济作物, 如稻谷、小麦、土豆、棉花和咖啡等^[3], 给各国经济都造成

收稿日期: 2010-09-26 修回日期: 2011-02-15

基金项目: 国家十一五科技支撑计划项目(2006BAD02A04) 和江西省研究生创新专项资金项目(YC08A054)

作者简介: 倪国荣(1983—), 男, 博士生, 主要从事微生物与作物高产研究, E-mail: ngr314@163.com; * 通讯作者: 涂国全, 教授, E-mail: tuguquan@263.net。

了巨大损失。在控制植物病虫害时,目前主要使用的还是农药,人类对农药的研究主要经历了3个时期——无机农药、有机合成农药、生物农药^[4]。化学农药由于其成本较低、生产规模较大,目前仍然起着主要的作用,但是,过多地使用化学农药,已经给环境造成了严重的污染和破坏,并且使病虫害的抗性直线上升^[5-6]。生物农药则具有既能控制有害生物又具有无公害的优点,因此生物农药的研究开发受到普遍地重视,发展前景广阔。

弗氏链霉菌 S-221 (*Streptomyces fradiae* var S-221) 是由江西农业大学应用微生物实验室在进行角蛋白酶产生菌的分离筛选研究中,分离得到1株对羽毛角蛋白分解利用能力极强的菌株^[7]。研究发现,其发酵液不仅有极强的分解角蛋白能力而且也具有显著的抑菌效果^[8]。研究发现该菌株发酵液对细菌及植物病原菌具有良好的抗菌活性,同时抗菌物质对温度、紫外光、光照和酸碱都具有很好的稳定性^[9-10],这些研究已经显示了其作为生物杀菌剂的广阔前景。本文报导了弗氏链霉菌 S-221 所产抗菌物质对7种细菌和10种植物病原真菌的抗菌活性。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 弗氏链霉菌 S-221 所产抗菌物质 由江西农业大学生物工程系应用微生物实验室提供^[10],其它化学试剂均为分析纯或按国家标准(GB)规定要求。

1.1.2 供试菌 蜡质芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megenterium*)、柑桔溃疡病菌(*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*)、紫荆炭疽病菌(*Gloeosporium* sp.)、辣椒根腐病菌(*Fusarium solani*)、车前草穗枯病菌(*Plantain head blight*)、小麦赤霉病菌(*Gibberella zeae*)、车前草菌核病菌(*Plantain sclerotinose*)、水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)、棉花黄萎病菌(*Verticillium dahliae*)、烟草赤星病菌(*Alternaria alternate*)、葡萄炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)和富贵竹炭疽病菌(*Colletotrichum* sp.)。

1.1.3 培养基 (1) PDA 培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1 000 mL。(2) NA 培养基: 牛肉膏 3 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 葡萄糖 10 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0。

1.2 仪器与设备

Adventurer™ 电子精密天平、手提式蒸汽压力灭菌锅、卧式灭菌锅、无菌操作工作台、LRH-250A 型生化培养箱、打孔器、玻璃器皿等。

1.3 方 法

1.3.1 发酵液对细菌抗菌活性的测定 取无菌平皿数只,分别加入同定量不同浓度但成倍比系的药液,然后分别加入相同量的牛肉膏蛋白胨培养基,充分摇匀并倾入无菌平皿后,用微量加样器吸取 0.01 mL 菌液接种于上述各琼脂平板,接种试验菌,每处理重复 3 次。设 1 份不含药物的琼脂平板作为阳性菌生长对照,在 30 ℃ 培养箱中培养 3 d 后,检查各平板接种的部位有否试验菌生长,试验菌不生长的最低药物浓度即为该菌的最低抑菌浓度。

1.3.2 抗菌物质对 10 种植物病原真菌的抗菌活性的测定 —带毒平板检测法^[11]。(1) 含药平板的制备。配制 PDA 培养基,定量分装于三角瓶内灭菌,待培养基冷却至 50 ℃ 左右时加入相应的发酵液上清,制成含有不同浓度抑菌活性物质的培养基,摇匀后倒入培养皿内冷凝备用。

(2) 发酵液抑菌效果测定。将各指示菌株接种至 PDA 平板上,25 ℃ 培养 48 h,用直径为 9 mm 打孔器打取菌落边缘菌块作为接种物。将菌块随机转接到备用培养皿的中央,以不加发酵液上清的培养基作空白对照,每一处理重复 3 次,置于相应的温度下培养,测量每个平板上菌落直径按照公式(1)求出发酵液对供试菌的抑制率。

$$\text{菌丝生长抑制率} = \frac{\text{对照菌丝总生长量} - \text{处理菌丝总生长量}}{\text{对照菌丝总生长量}} \times 100\% \quad (1)$$

(3) EC_{50} 、 EC_{90} 的计算。根据生物统计几率值换算表,将菌丝生长抑制率换算成几率值,以几率值作为依变量,以药用质量浓度的对数为自变量建立毒力回归方程,利用方程求得几率值为 5 时的浓度即为 EC_{50} ,几率值为 6.281 5 时的质量浓度为 EC_{90} 。

2 结果与分析

2.1 弗氏链霉菌 S-221 发酵液对细菌的抑菌效果

弗氏链霉菌 S-221 所产抗菌物质对细菌的抑菌试验结果如表 1 所示, 发酵液对各种细菌的的抑菌试验结果如表 1、表 2 所示。弗氏链霉菌 S-221 所产抗菌物质对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、蜡质芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌和柑橘溃疡病菌的最低抑菌质量浓度分别为: 3.13, 0.19, 0.09, 0.39, 0.19, 0.78, 1.56 mg/L。由数据可知, 该抗菌物质对被测的 7 种细菌具有很强的抑制作用。

表 1 弗氏链霉菌 S-221 所产抗菌物质对细菌的抑菌试验

Tab.1 The suppressive experiment of antimicrobial compound produced by *Streptomyces fradiae* var S-221 to bacterias

质量浓度 /(mg · L ⁻¹)	供试细菌 Bacteria supplied						
Concentration of chemical	<i>Escherichia coli.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus sabtills</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus megeterium</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>
50.00	-	-	-	-	-	-	-
25.00	-	-	-	-	-	-	-
12.50	-	-	-	-	-	-	-
6.250	-	-	-	-	-	-	-
3.130	-	-	-	-	-	-	-
1.560	+	-	-	-	-	-	-
0.780	+	-	-	-	-	-	+
0.390	+	-	-	-	-	+	+
0.195	+	-	-	+	-	+	+
0.098	+	+	-	+	+	+	+
0.049	+	+	+	+	+	+	+
0.025	+	+	+	+	+	+	+
0.000	+	+	+	+	+	+	+

“+”表示平板上有菌落,“-”表示平板上没有菌落。

“+”means the plates had bacterial colonies,“-”means the plates didn't have bacterial colonies.

表 2 弗氏链霉菌 S-221 发酵液对细菌的最低抑菌浓度

Tab.2 The determination of the minimal inhibitory concentration of bacteria

供试细菌 Bacteria supplied	学名 Scientific name	最低抑菌质量浓度/(mg · L ⁻¹) Minimal inhibitory concentration
大肠杆菌	<i>Escherichia coli.</i>	3.130
金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.195
枯草芽孢杆菌	<i>Bacillus sabtills</i>	0.098
蜡质芽孢杆菌	<i>Bacillus cereus</i>	0.390
巨大芽孢杆菌	<i>Bacillus megeterium</i>	0.195
苏云金芽孢杆菌	<i>Bacillus thuringiensis</i>	0.780
柑橘溃疡病菌	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	1.560

2.2 弗氏链霉菌 S-221 所产抗菌物质对 10 种植物病原真菌的抑菌效果

弗氏链霉菌 S-221 发酵液对 10 种植物病原真菌作用后的菌丝生长抑制率见表 3 所示, 抗菌物质对各种植物病原真菌的毒力方程、EC₅₀ 和 EC₉₀ 见表 4, 对被测植物病原菌的 EC₅₀ 和 EC₉₀ 范围分别为 3.4 ~ 61.7 mg/L 和 137 ~ 326 mg/L。由数据可知, 供试的植物病原真菌对弗氏链霉菌 S-221 所产抗菌物质敏感。

表3 弗氏链霉菌 S-221 发酵液对十种植物病原真菌的抑制作用

Tab.3 The suppression action of *Streptomyces fradiae* var S-221 to 10 plant pathogenic fungi

供试病原真菌 Plant pathogenic fungi supplied	质量相对抑制率/% The relative inhibitory rate					毒力回归方程 Toxicity regression equations
	2 mg/L	4 mg/L	8 mg/L	16 mg/L	32 mg/L	
水稻纹枯病菌(<i>Rhizoctonia solani</i>)	55.53	70.82	79.49	91.71	97.32	$y = 0.6378x + 4.6593$
车前草穗枯病菌(<i>Plantain head blight</i>)	75.12	80.83	87.05	92.45	95.88	$y = 0.3882x + 5.3681$
紫荆炭疽病菌(<i>Gloeosporium</i> sp)	42.19	53.87	64.54	85.97	96.3	$y = 0.6278x + 4.302$
车前草菌核病菌(<i>Plantain sclerotinose</i>)	56.71	72.39	79.97	94.93	100	$y = 0.9959x + 3.9676$
小麦赤霉病菌(<i>Gibberella zeae</i>)	60.23	74.35	85.07	91.82	98.45	$y = 0.6428x + 4.7727$
富贵竹炭疽病菌(<i>Colletotrichum</i> sp.)	69.12	79.04	88.75	95.06	98.33	$y = 0.5976x + 5.0264$
烟草赤星病菌(<i>Alternaria alternate</i>)	61.26	69.22	80.3	86.7	92.13	$y = 0.4126x + 4.975$
棉花黄萎病菌(<i>Verticillium dahliae</i>)	50.24	67.55	80.59	90.16	95.18	$y = 0.5939x + 4.6177$
葡萄炭疽病菌 (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	50.01	71.34	85.87	95.5	99.32	$y = 0.8755x + 4.3396$
辣椒根腐病菌(<i>Fusarium solani</i>)	25.72	47.26	63.34	77.96	92.41	$y = 0.7228x + 3.8618$

表4 各种植物病原真菌对弗氏链霉菌 S-221 抗菌物质的敏感性

Tab.4 The sensibility of fermentation broth to plant Pathogenic fungi

供试病原真菌 Plant pathogenic fungi supplied	毒力回归方程 Toxicity regression equations	相关系数 Correlative coefficient	EC ₅₀ /(mg · L ⁻¹)	EC ₉₀ /(mg · L ⁻¹)
水稻纹枯病菌(<i>Rhizoctonia solani</i>)	$y = 0.6378x + 4.6593$	$R = 0.9975$	1.71	12.72
车前草穗枯病菌(<i>Plantain head blight</i>)	$y = 0.3882x + 5.3681$	$R = 0.9971$	0.39	10.52
紫荆炭疽病菌(<i>Gloeosporium</i> sp.)	$y = 0.6278x + 4.302$	$R = 0.9966$	3.04	23.41
车前草菌核病菌(<i>Plantain sclerotinose</i>)	$y = 0.9959x + 3.9676$	$R = 0.9979$	2.82	10.21
小麦赤霉病菌(<i>Gibberella zeae</i>)	$y = 0.6428x + 4.7727$	$R = 0.9974$	1.42	10.46
富贵竹炭疽病菌(<i>Colletotrichum</i> sp.)	$y = 0.5976x + 5.0264$	$R = 0.9969$	0.96	8.17
烟草赤星病菌(<i>Alternaria alternate</i>)	$y = 0.4126x + 4.975$	$R = 0.9980$	1.11	24.78
棉花黄萎病菌(<i>Verticillium dahliae</i>)	$y = 0.5939x + 4.6177$	$R = 0.9992$	1.90	16.47
葡萄炭疽病菌(<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	$y = 0.8755x + 4.3396$	$R = 0.9967$	2.13	9.19
辣椒根腐病菌(<i>Fusarium solani</i>)	$y = 0.7228x + 3.8618$	$R = 0.9963$	4.83	28.44

3 小结与讨论

(1) 弗氏链霉菌 S-221 所产抗菌活性物质对所检测的大肠杆菌等 7 种细菌具有很好的抗菌作用, 其最低抑菌浓度 MIC 为 0.09 ~ 3.13 mg/L。弗氏链霉菌 S-221 所产抗菌活性物质对所检测的水稻纹枯病等 10 种植物病原真菌具有很好的抗菌作用, 根据各自的毒力方程其 EC₅₀ 为 0.39 ~ 4.83 mg/L 和 EC₉₀ 为 8.17 ~ 28.44 mg/L。

(2) 弗氏链霉菌 S-221 所产抗菌活性物质对细菌和植物病原真菌的都表现出了良好的抑制效果, 且细菌较植物病原真菌对抗菌物质更敏感。广谱的抗菌谱和较强的抗菌活性, 为其开发生物农药提供了依据。

(3) 目前对弗氏链霉菌研究表明, 现已发现的弗氏链霉菌产生的抗菌物质主要有泰乐菌素^[12] 和新霉素^[13-14], 弗氏链霉菌 S-221 产生的抗菌物质的抗菌谱与已发现的泰乐菌素和新霉素不同, 其具体成分和抑菌机理需有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Strand, J F. Some agrometeorological aspects and diseases management for the 21st century [J]. *Agricultural and Forest Meteorology*, 2000(103) : 73 – 82.
- [2] Emilio Montesinos. Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection [J]. *International Microbiology*, 2003, 6(4) : 245 – 252.
- [3] Chakraborty S, Tiedemann A V, Tend P S. Climate change: Potential impact on plant diseases [J]. *Environmental Pollution*, 2000(108) : 317 – 326.
- [4] 张兴. 试论无公害农药 [J]. *西北农业大学学报*, 1995, 23(6) : 90 – 91.
- [5] Lenteren V, Joop C. A greenhouse without pesticides: Fact or fantasy [J]. *Crop Protection*, 2000(19) : 375 – 384.
- [6] Zheng W, Hong Z Z, Hong J J. The chemical structure of antifungal antibiotic 414 [J]. *Chin J Antibiot*, 2000, 25(4) : 266.
- [7] 涂国全, 于静. 一株分解羽毛角蛋白的弗氏链霉菌变种的初步鉴定 [J]. *江西农业大学学报*, 1994(4) : 399 – 403.
- [8] 赖崇德, 涂晓嵘, 倪国荣, 等. 弗氏链霉菌变种 S-221 所产生物活性物质对细菌、霉菌及酵母类抑菌效果的初步研究 [J]. *江西农业大学学报*, 2008(2) : 354 – 357.
- [9] 赖崇德, 涂晓嵘, 倪国荣, 等. 弗氏链霉菌变种 S-221 所产生物活性物质抑菌活性的初步研究 [J]. *江西农业学报*, 2007(9) : 102 – 104.
- [10] 倪国荣, 涂晓嵘, 张智平, 等. 弗氏链霉菌 S-221 变种发酵液的抗菌活性及稳定性研究 [J]. *中国酿造*, 2009(2) : 37 – 39.
- [11] Quiroga E N, Sampietro A R, Vattuone M A. Screening antifungal activity of selected medicinal plants [J]. *Ethnopharmacol*, 2001, 74(1) : 89 – 96.
- [12] Okamura Tokumitsu, 廖福荣. 抗生素链霉菌与弗氏链霉菌原生质体的种间电融合 [J]. *国外医药(抗生素分册)*, 1990(4) : 256 – 258.
- [13] 李焕姿, 陈正道. 新霉素产生菌弗氏链霉菌灭活原生质体的融合 [J]. *抗生素*, 1984(6) : 445 – 449.
- [14] 石贤爱, 李聪颖, 陈飞, 等. 清洁生产驱动的弗氏链霉菌新霉素发酵过程优化策略 [J]. *福州大学学报: 自然科学版*, 2010(1) : 147 – 152.

(上接第 321 页)

- [2] 谢锦升, 杨玉盛, 陈光水, 等. 植被恢复对退化红壤团聚体稳定性及碳分布的影响 [J]. *生态学报*, 2008, 28(2) : 702 – 709.
- [3] 郑华, 欧阳志云, 易自力, 等. 红壤侵蚀区恢复森林物种多样性对土壤生物学特性的影响 [J]. *水土保持学报*, 2004, 18(4) : 137 – 141.
- [4] 姜培坤, 周国模, 钱新标. 侵蚀红壤植被恢复后土壤养分含量与物理性质的变化 [J]. *水土保持学报*, 2004, 18(1) : 12 – 14.
- [5] 胡实, 谢小立, 王凯荣, 等. 红壤坡地生态系统恢复过程植被群落的演替 [J]. *生态环境*, 2008, 17(1) : 327 – 333.
- [6] 王会利, 乔洁, 曹继钊, 等. 红壤侵蚀裸地不同植被恢复后林地土壤微生物特性的研究 [J]. *土壤*, 2009(6) : 952 – 956.
- [7] 周国模, 姜培坤. 不同植被恢复对侵蚀型红壤活性碳库的影响 [J]. *水土保持学报*, 2004, 18(6) : 68 – 70.
- [8] Llambi L D, Fontaine M, Rada F, et al. Ecophysiology of dominant plant species during Old – Field succession in a high tropical andean ecosystem [J]. *Arctic Antarctic and Alpine Research*, 2003, 35: 447 – 453.
- [9] 徐叨兴, 高智慧, 陈顺伟. 化香植被的人工促进天然更新技术初步研究 [J]. *浙江林业科技*, 2005, 25(1) : 39 – 41.
- [10] 温达志, 叶万辉. 全光和遮阴下两种亚热带木本植物的光合作用对光的响应 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2001, 9(3) : 248 – 255.
- [11] 程煜, 胡喜生, 洪伟, 等. 木荷马尾松林更新层种群生态位分析 [J]. *福建林学院学报*, 2009(3) : 220 – 225.
- [12] 张进忠, 林桂株, 林植芳, 等. 几种南亚热带木本植物光合作用对生长光强的响应 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2005, 13(5) : 413 – 418.
- [13] 吴家胜, 应叶青, 黎章矩. 杨桐苗期光合特性的研究 [J]. *江西农业大学学报*, 2004, 26(6) : 896 – 900.
- [14] 刘锦春, 钟跃军, 何跃军, 等. 重庆石灰岩地区十大功劳的光合响应研究 [J]. *武汉植物学研究*, 2005, 30(2) : 316 – 320.
- [15] 孙清斌, 董晓英, 沈仁芳. 施用磷、钙对土壤上胡枝子生长和矿质元素含量的影响 [J]. *土壤*, 2009(2) : 206 – 211.