

蒋桂芳, 宋 力. 拮抗放线菌 F2 发酵液的稳定性[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(9): 184–185, 330.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.058

# 拮抗放线菌 F2 发酵液的稳定性

蒋桂芳<sup>1</sup>, 宋 力<sup>2</sup>

(1. 重庆文理学院林学与生命科学学院, 重庆 402160; 2. 重庆文理学院材料与化工学院, 重庆 402160)

**摘要:**采用抑制菌丝生长速率法测定放线菌 F2 发酵液的抑菌活性及发酵液的稳定性。结果发现, F2 发酵液对辣椒炭疽病菌有较强的拮抗作用, 且在低温贮藏下仍有很好的抑菌效果, 在偏酸性或偏碱性条件下稳定, 抗热性较差, 具有较强的抗紫外线能力, 该活性物质在有机溶剂中的分配率较高, 为一种酯溶-水溶性抗生素。

**关键词:**放线菌; 发酵液; 活性物质; 稳定性

**中图分类号:** S432.4<sup>+</sup>3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)09-0184-02

辣椒炭疽病 (*Colletotrichum capsici*) 是危害甜椒、辣椒生产的主要病害之一。目前, 辣椒炭疽病的防治主要集中于施用化学农药及抗病品种选育等农业措施, 大量化学农药的长期使用导致农药残留、病虫害抗性增加、环境污染等问题, 严重影响农业可持续发展<sup>[1]</sup>。农用抗生素是微生物产生的一类次级代谢产物, 可用来杀虫、灭菌、除草及调节作物生长发育的一类微生物农药<sup>[2]</sup>。随着环境保护、绿色食品及农业可持续发展的需要, 农用抗生素以其选择性强、高效低毒、残留短等优点, 正日益受到人们的重视。目前, 已发现的抗生素中大约有 2/3 由放线菌产生, 从土壤中分离具有农用活性的放线菌是目前微生物农药开发的一个重要途径<sup>[3]</sup>。本研究从重庆地区的土壤中分离筛选出 1 株对辣椒炭疽病菌具较强抑菌活性的放线菌 F2, 对该拮抗菌发酵液的抑菌稳定性进行研究, 以便为该菌株的进一步开发利用提供理论和实践依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试菌株

拮抗放线菌 F2 和辣椒炭疽病菌由笔者所在的实验室自行分离保存。

### 1.2 培养基

**PDA 培养基:**用于辣椒炭疽病菌培养及抑菌试验。高氏一号培养基: 用于放线菌 F2 培养。种子培养基: 20 g 可溶性淀粉, 0.5 g  $K_2HPO_4$ , 1 g  $KNO_3$ , 0.5 g  $NaCl$ , 0.5 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.01 g  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1 000 mL  $H_2O$ , pH 值 7.2~7.4。发酵培养基: 20 g 大豆粉(沸水煮 30 min, 纱布过滤后保留滤液), 10 g 蔗糖, 5 g 可溶性淀粉, 2 g 蛋白胨, 2 g 酵母膏, 2 g  $NaCl$ , 1 g  $CaCO_3$ , 0.5 g  $KH_2PO_4$ , 0.5 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1 000 mL  $H_2O$ , pH 值 7.0。

### 1.3 培养方法

**种子液制备:**挑取活化菌种 F2, 接入装有 50 mL 种子培养基的 150 mL 三角瓶中, 在 28 ℃、180 r/min 下培养 48 h 作

为活化的种子液。发酵液的制备: 取 1 mL 种子液接入装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 在 28 ℃、180 r/min 条件下振荡培养 5 d。将发酵液经粗滤后再经微孔滤膜 (0.22 μm) 过滤, 得到无菌发酵滤液, 无菌容器保存备用。

### 1.4 菌株 F2 发酵液中活性产物的抑菌作用测定

采用菌丝生长速率法<sup>[4-5]</sup>, 以辣椒炭疽病菌为检测菌, 测定菌株 F2 发酵液中活性代谢产物的抑菌作用。将菌株 F2 的发酵液与 PDA 培养基按 1:3 混匀, 倒平板, 待凝固后将辣椒炭疽病菌菌饼 (8 mm) 倒置放在平板中央, 每处理 3 次重复, 以无菌水和 PDA 培养液处理为对照。培养 96 h 后, 用“十”字交叉法测量菌落直径, 计算抑制率: 抑制率 = (对照菌落直径 - 处理菌落直径) / (对照菌落直径 - 菌饼直径) × 100%。

### 1.5 F2 菌株发酵液性质测定<sup>[6-10]</sup>

**1.5.1 热稳定性试验** 将 F2 菌株发酵液经 40、50、60、70、80、90、100 ℃ 分别处理 30 min, 以未处理的发酵液为对照, 用抑制菌丝生长速率法测定抑菌活性, 重复 3 次。

**1.5.2 pH 值稳定性试验** 将 F2 菌株发酵液用 1 mol/L  $NaOH$  溶液和 1 mol/L  $HCl$  溶液分别调 pH 值为 3、4、5、6、7、8、9、10, 并于 4 ℃ 冰箱中过夜, 然后将各发酵液的 pH 值调回至原发酵液 pH 值为 6.5, 以未处理的发酵液为对照, 用抑制菌丝生长速率法测定抑菌活性, 重复 3 次。

**1.5.3 紫外照射对发酵液稳定性的影响** 将 F2 菌株发酵液于 254 nm 紫外灯下分别照射 5、10、15、20、25、30 min 后, 以未处理的发酵液为对照, 用抑制菌丝生长速率法测定抑菌活性, 重复 3 次。

**1.5.4 储藏稳定性试验** 将 F2 菌株发酵液在 4 ℃ 和室温 (25 ℃) 条件下分别保存 3、7、15 d 后, 以未处理的发酵液为对照, 用抑制菌丝生长速率法测定抑菌活性, 重复 3 次。

**1.5.5 活性物质萃取试验** 取 40 mL 发酵液分成 4 份, 分别加入等体积的正丁醇、乙酸乙酯、三氯甲烷、石油醚, 在磁力搅拌器上搅拌均匀, 于分液漏斗中静置过夜。以未处理的发酵液为对照, 用抑制菌丝生长速率法测定抑菌活性, 重复 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株 F2 发酵液对辣椒炭疽病菌的抑制作用

将拮抗放线菌 F2 的发酵液与 PDA 培养基混合制平板,

收稿日期: 2014-09-11

基金项目: 重庆市教育委员会项目 (编号: KJ081203; KJ121207); 重庆文理学院校级项目 (编号: Y2009SK64)。

作者简介: 蒋桂芳 (1982—), 女, 广西全州人, 硕士, 讲师, 主要从事植物病害生物防治研究。E-mail: jiang3233@126.com。

接种辣椒炭疽病菌培养 4 d。与对照相比,处理组平板上炭疽病菌株生长缓慢,菌落边缘蔓延不明显,经测定该发酵液的抑菌率达到 81.81% (图 1)。以上结果表明,F2 发酵液对辣椒炭疽病菌丝生长有显著的拮抗作用。

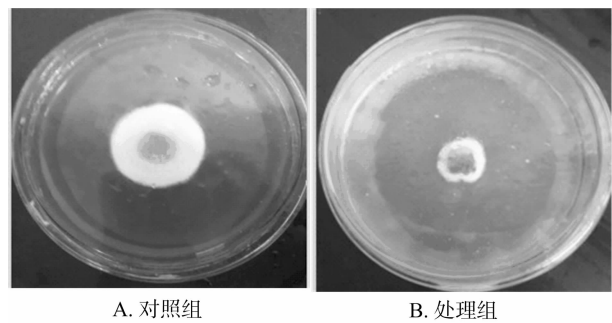


图1 F2 发酵液对辣椒炭疽病菌的拮抗效果

2.2 温度对稳定性的影响

随着处理温度升高,F2 发酵液的抑菌活性缓慢下降,与对照比较,在 70 ℃ 条件下抑菌率为 60% 以上,但 70 ℃ 后发酵液的抑菌效果明显降低,90 ℃ 处理后抑菌率降低到 27% (图 2)。以上结果表明,F2 发酵液中生物活性物质热稳定性较弱,高温会对其活性造成严重影响。

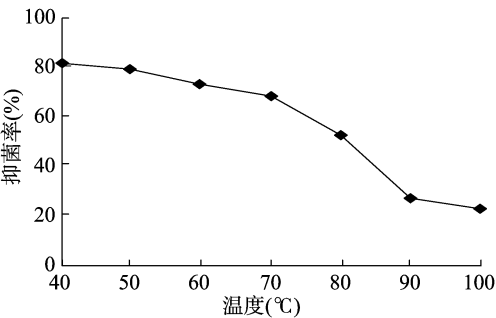


图2 温度对菌株F2发酵液抑菌活性的影响

2.3 pH 值对稳定性的影响

在室温下 F2 发酵液中活性代谢产物在酸性条件下抑菌活性较稳定,pH 值在 3~5 范围内,发酵液活性代谢产物的抑菌活性与对照发酵液相近,稳定性较好。随着碱性增强,抑菌率呈下降趋势,但幅度不大,pH 值在 10 下依然保持着较强的抑菌活性,抑菌率为 72.7% (图 3)。因此,F2 发酵滤液 pH 值在 3~10 范围内,对酸碱具有较好的稳定性,但要注意控制 pH 值范围,以尽量减少活性成分的损失。

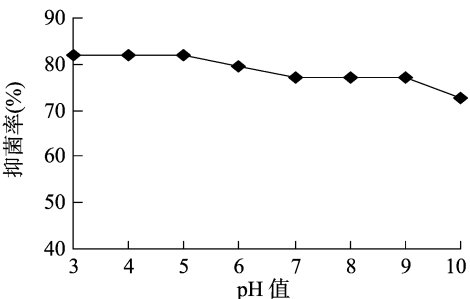


图3 不同 pH 值下活性代谢产物的稳定性

2.4 紫外照射对稳定性的影响

在紫外线照射 5~30 min 的情况下,随着紫外线照射时间的增长,活性物质的抑菌率有下降趋势,经过半个小时照射,活性物质的抑菌率为 63.6%,与对照比较下降幅度小于 5% (图 4)。以上结果表明,该菌株发酵液中活性代谢产物对紫外线不敏感,有较强的抗紫外线照射的能力,可以用紫外光适当照射发酵液来杀灭杂菌。

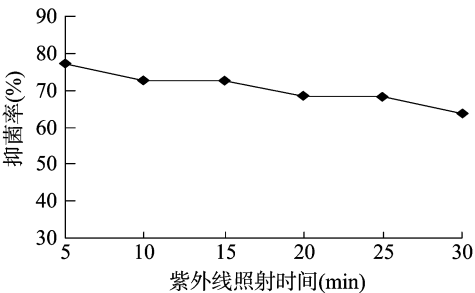


图4 不同紫外线照射时间活性代谢产物的稳定性

2.5 储藏时间对稳定性的影响

在室温与冷藏条件下活性物质抑菌率都呈下降趋势,但冷藏条件下抑菌率下降缓慢,经 15 d 储藏后抑菌率为 72.72%,其抑菌活性变化均不明显。而室温条件下储藏 3 d 时活性明显降低,经过 15 d 储藏后抑菌率为 63.6%,与对照相比下降了 9.09 百分点(图 5)。以上结果表明,F2 发酵液中活性代谢产物储藏稳定性较好,且低温储藏效果更好。

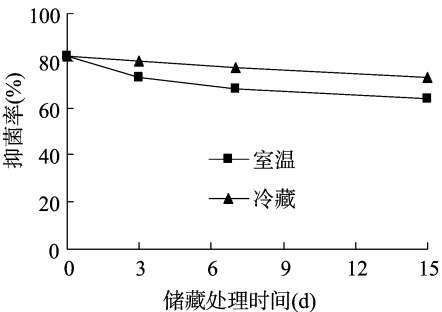


图5 不同储藏时间活性代谢产物的稳定性

2.6 不同有机溶剂对活性物质萃取的影响

活性物质在原始 pH 值条件下能被三氯甲烷、乙酸乙酯、石油醚及正丁醇萃取,且萃取效果较明显,大部分抑菌活性物质都进入到有机相中,只有石油醚萃取活性物质能力较弱(表 1)。根据相似相溶原理,可大致判断该活性物质极性较强。此外,该活性物质既能溶于溶媒又能溶于水,是一种酯溶-水溶性抗生素,且乙酸乙酯、正丁醇的萃取效果比三氯甲烷和石油醚的效果好。

表 1 发酵上清液萃取试验结果

萃取溶剂	生长抑菌率(%)	
	水相	有机相
三氯甲烷	18.19	77.27
乙酸乙酯	63.63	81.81
石油醚	81.81	27.28
正丁醇	54.55	81.81

度<sup>[20]</sup>,这很好地解释了不同变黄处理烟叶内主要化学成分的变化速率差异。值得一提的是,堆积变黄烟叶在处理 72 h 时总糖和还原糖含量远远低于烘烤变黄处理,但在经历定色和干筋期后,总糖和还原糖含量反而明显高于烘烤变黄,笔者推测,这是因为堆积变黄基本不排湿,导致烟叶内部水分十分充足,即使进入烘烤模式,温度直接升至 42 ℃,其排湿仍然需要一个过程,这使得烟叶细胞内部的相关酶活跃时间较长,从而导致烟叶内化学成分的转化较对照更为充分。

总而言之,相对于烘烤变黄,堆积变黄条件下烤房内相对湿度较大,烟叶失水速率变慢,烟叶的变黄速率和化学成分变化速率也均相对变慢,这可能对后期烟叶内化学成分尤其是碳水化合物充分转化有利,与常规烘烤延长变黄期的原理基本一致。另外,堆积变黄会缩短烟叶在烤房中的加热时间,极大地降低了热能损耗,堆积烘烤在烤烟烘烤环节具有一定的研究价值和实践意义。需指出的是,本研究仅仅对比 2 个处理在变黄阶段的理化指标变化,缺乏更多香气相关物质的转化或形成机理研究,欲充分了解堆积烘烤在生产实践上的应用意义,尚需对烘烤调制全过程烟叶内香味物质进行更为全面的研究探讨。

#### 参考文献:

- [1]徐增汉,王能如,崔 焰,等. 我国烟叶烤房的节能改革[J]. 安徽农业科学,2000,28(6):795-798.
- [2]汤 明. 烤烟烘烤节能现状与展望[J]. 安徽农业科学,2007,35(15):4549-4550.
- [3]宋朝鹏,贺 帆,王战义,等. 提高烤房热能利用率的途径初探[J]. 安徽农业科学,2008,36(18):7743-7744,7751.
- [4]宋朝鹏,艾绥龙,王胜雷,等. 烟叶烘烤能耗与节能途径分析[J]. 安徽农业科学,2009,32(2):647-649.
- [5]李晓东,傅 钢,尤孝方,等. 不同煤种燃烧生成多环芳烃的研究[J]. 热能动力工程,2003,18(2):125-127.
- [6]李余湘,朱贵川,徐增汉,等. 密集烤房利用太阳能辅助烘烤烟叶

的效果[J]. 贵州农业科学,2011,39(3):84-86,90.

- [7]潘建斌,王卫峰,宋朝鹏,等. 热泵型烟叶自控密集烤房的应用研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2006,34(1):25-29.
- [8]王汉文,郭文生,王家俊,等. “秸秆压块”燃料在烟叶烘烤上的应用研究[J]. 中国烟草学报,2006,12(2):43-46.
- [9]崔志军,孟庆洪,刘 敏,等. 烟草秸秆气化替代煤炭烘烤烟叶研究初报[J]. 中国烟草科学,2010,31(3):70-72,77.
- [10]林玉红,闫亚明,罗登山,等. 烤烟叶丝微波干燥特性研究[J]. 烟草科技,2006(4):5-8,19.
- [11]邹 焱,谢已书,卢贤仁. 分米波烘烤对烟叶品质及用工能耗的影响[J]. 贵州农业科学,2011,39(9):51-54.
- [12]邹 焱,谢已书,卢贤仁,等. 烟叶自然变黄过程中的主要化学成分变化[J]. 贵州农业科学,2012,40(10):38-40.
- [13]徐增汉,王能如,王东胜,等. 半晾半烤法提高烤烟上部叶可用性的研究[J]. 浙江农业科学,2003(5):259-261.
- [14]黄锡才. 烤烟半晾半烤法节本增效研究[D]. 贵阳:贵州大学,2008:3-11.
- [15]虞 蛟,吴 勇,陈宗屏. 不同变黄温度与湿度对烤烟吸食品质的影响[J]. 贵州农业科学,2007,35(4):50-51,55.
- [16]王 凌,苗果园,刘华山,等. 烘烤温湿度对烟叶香气物质的影响[J]. 河南农业科学,2007(8):36-39.
- [17]高玉珍,王卫峰,张 骏,等. 密集烘烤不同变黄温湿条件对烟叶中性致香物质的影响[J]. 云南农业大学学报,2008,23(2):215-219.
- [18]代 丽,黄永成,官长荣,等. 密集式烘烤条件下不同变黄温湿度对烤后烟叶致香物质的影响[J]. 华北农学报,2008,23(6):148-152.
- [19]谢已书,邹 焱,王能如,等. 烤烟成熟采收与密集烘烤[M]. 贵阳:贵州科技出版社,2012:385-391.
- [20]王爱华,徐秀红,王松峰,等. 变黄温度对烤烟烘烤过程中生理指标及烤后质量的影响[J]. 中国烟草学报,2008,14(1):27-31.

(上接第 185 页)

### 3 结论

菌株 F2 发酵液中的活性物质对辣椒炭疽病菌有很好的抑制作用,菌丝生长抑制率达到 80% 以上,对用于防治辣椒炭疽病具有较高潜在价值。

菌株 F2 发酵液活性物质对高温的稳定性差,对酸碱具有较好的稳定性,有较强的抗紫外线能力,耐低温贮藏。

菌株 F2 发酵液经初步处理,采用有机溶剂进行萃取活性物质在有机溶剂中的分配率较高,是一种酯溶-水溶性抗生素,可进一步分离纯化应用于辣椒炭疽病的生物防治。

#### 参考文献:

- [1]蔣桂芳,宋 力. 辣椒炭疽病生物防治技术的研究与展望[J]. 湖北农业科学,2014,53(11):2481-2484,2485.
- [2]朱昌雄,宋 渊. 我国农用抗生素的现状与发展趋势探讨[J]. 中国农业科技导报,2006,8(6):17-19.

- [3]沈寅初. 农用抗生素研究开发新进展[J]. 植保技术与推广,1997,19(6):35-37.
- [4]张玲玲,董美玉,许凤春,等. 放线菌 C3-11 的抗菌活性筛选及发酵液稳定性研究[J]. 现代农业科技,2009(3):109-110,113.
- [5]黄 剑,李天华,崔艺久,等. 放线菌 H50 发酵液抑菌活性及其稳定性测定[J]. 沈阳农业大学学报,2012,43(3):311-315.
- [6]于银霞. 168 号放线菌发酵产物的分离提取和活性研究[D]. 北京:首都师范大学,2009.
- [7]王守彬,王 倩,姜晓艳,等. 一株拮抗放线菌的分离鉴定及抑菌活性物质的初步研究[J]. 曲阜师范大学学报:自然科学版,2012,38(4):75-79.
- [8]冯俊涛,张锦恬,韩立荣,等. 放线菌 HJ1-2 菌株发酵液抑菌谱及稳定性的研究[J]. 西北农业学报,2009,18(6):280-284.
- [9]李璐宁,张 薇,赵永强,等. 放线菌 Y23 菌株发酵液抗菌活性及稳定性测定[J]. 山东农业科学,2009(1):71-74.
- [10]杨晓楠,李 杨,苗建强,等. 拮抗放线菌 T111 菌株鉴定、发酵液理化性质测定及发酵条件优化[J]. 应用与环境生物学报,2011,17(4):541-547.