

沈 硕. 1 株中度嗜盐菌提取物对辣椒疫霉菌的抑制活性[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(10): 170–171.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.10.052

1 株中度嗜盐菌提取物对辣椒疫霉菌的抑制活性

沈 硕

(青海省农林科学院生物技术研究所/教育部青藏高原生物技术重点实验室, 青海西宁 810016)

摘要:为研制辣椒疫霉病新型杀菌剂,测定了 1 株活性中度嗜盐菌发酵液的提取物对辣椒疫霉菌的抑制作用及抑制中浓度。结果表明,在 2、1 mg/mL 的供试浓度下,菌株 E0102B1 发酵产物的水溶性部分对辣椒疫霉菌的抑制率最高,为 79.45%;总粗提物部分抑制率为 66.92%。通过回归方程计算对辣椒疫霉菌的抑制中浓度值(EC_{50})为 1.09 mg/mL。

关键词:中度嗜盐菌;提取物;辣椒疫霉菌;抑菌活性;生物防治

中图分类号: S436.48.1*9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)10-0170-02

嗜盐菌是极端环境微生物的重要类群之一,作为重要的盐田生物,更作为一种新型微生物资源,它不仅为微生物生理、遗传和分类及生命科学和相关学科许多领域的研究提供新的课题,也为生物进化、生命起源的研究提供新的材料,展现了它潜在而广阔的应用前景^[1]。目前,有关嗜盐菌的研究报道主要涉及到新菌种的发现、多相分类学的鉴定及菌株同源进化关系等方面^[2-6],但针对嗜盐菌的生物活性及其应用开发方面的研究较少。

青海省境内有大面积的盐湖,是研究盐碱环境微生物资源的理想场所。近年来,研究人员对青海省柯柯盐湖^[7]、茶卡盐湖^[7-9]、青海湖^[10]等盐湖区域中的微生物资源进行了一系列研究,从中发现了较多的嗜盐细菌和放线菌等微生物新类群,并筛选出了一批具有较强生物活性的菌株,分析了该地区嗜盐微生物资源的多样性,为我国西北盐碱环境中微生物资源的利用与保护打下了基础。

从盐湖极端环境中生长的各种微生物,必然会产生一些独特的次级代谢产物,从中分离到新颖结构及新活性的化合物的概率也会大大增加,将研究得到的化合物应用于农业生产及医药方面,必将开发出一系列新型农药制剂的先导化合物或抗肿瘤临床用药的先导化合物,具有一定的理论及实践意义^[11]。

本试验以本研究小组之前筛选出的具有抑制辣椒疫霉菌活性的嗜盐菌菌株为靶标菌,对其次级代谢产物粗提物开展进一步的活性追踪试验,研究粗提物抑制辣椒疫霉活性的活性部位,为下一步开展活性菌株田间试验及分离活性化合物、开发新型生物活性农药奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株 供试活性嗜盐菌菌株 E0102B1 由本实验室分离自察尔汗盐湖湖泥样品,辣椒疫霉菌(*Phytophthora capsici*)为青藏高原生物技术教育部重点实验室保藏菌种。

收稿日期:2015-04-16

基金项目:教育部青藏高原生物技术重点实验室开放基金(编号:201101);2014 年中国科学院西部之光人才培养计划。

作者简介:沈 硕(1981—),女,山东济南人,博士,副研究员,研究方向为植物病害生物防治。E-mail: fjfzss@126.com。

1.1.2 培养基 嗜盐菌培养基为 ATCC213 改良培养基^[12]: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 10 g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.2 g, KCl 5 g, 蛋白胨 2.5 g, 酵母膏 10 g, NaCl 150 g, 琼脂粉 12 g, 加蒸馏水至 1 000 mL, pH 值 7.2~7.4。病原真菌培养基及对峙培养培养基均为马铃薯葡萄糖固体培养基(PDA 培养基)^[13]: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 15 g, 琼脂 15 g, 水 1 000 mL, pH 值自然。

1.2 菌株发酵产物水溶性提取物的制备

将活性菌株接种于发酵培养基中,于摇瓶柜中 28 ℃ 培养 7 d 后,按一定的比例加入甲醇浸泡 5 d,取液体部分于旋转蒸发仪上浓缩,得到浸膏 A。向浸膏 A 中加入等体积的蒸馏水使其充分溶解,不溶于水的部分即脂溶性部分,溶于水的部分过滤后,经 D-101 大孔树脂柱蒸馏水洗脱,取液体部分于旋转蒸发仪上减压浓缩,得到的浸膏为大分子部分。继续经甲醇洗脱后,取液体部分于旋转蒸发仪上减压浓缩,得到的浸膏为水溶性部分。浸膏 A 中不溶于水的部分即为脂溶性部分。

1.3 水溶性提取物对辣椒疫霉菌抑制活性的测定

采用滤纸片法^[14],将菌饼及含有不同浓度水溶性提取物溶液的滤纸片分别移植到培养基平板上,置于培养箱中 28 ℃ 恒温培养 5 d,试验设置 3 个重复。每天以十字交叉法测量抑菌圈直径,取平均值,根据下式计算抑制生长率:抑制率=(对照抑菌圈直径-处理抑菌圈直径)/对照抑菌圈直径×100%。

1.4 水溶性提取物抑制辣椒疫霉菌的中浓度(EC_{50})

采用滤纸片法,即用 5 mm 直径的打孔器在培养好的各植物病原真菌菌落外缘切下菌饼。将滤纸片分别蘸取终浓度为 2.000、1.000、0.500、0.250、0.125 mg/mL 的水溶性提取物溶液。根据统计回归方法计算菌株发酵产物水溶性提取物对植物病原真菌的抑制中浓度值。

1.5 数据处理

采用 SPSS 13.0 软件进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 活性菌株发酵产物提取物抑制辣椒疫霉菌的活性

为了进一步确定发酵产物粗提物的活性部位,在 2、1 mg/mL 的供试浓度下,利用生长速率法测定了菌株 E0102B1 发酵产物粗提物的各个部分抑制辣椒疫霉菌的活性,粗提物各部分见图 1。从表 1 可以看出,粗提物 3 个部分

中,水溶性部分对辣椒疫霉菌的抑制率最高,为 79.45%;高于总粗提物部分的抑制率,总粗提物抑制率为 66.92%。大分子部分的抑制活性较低。因此,将水溶性部分确定为菌株 E0102B1 发酵产物粗提物的活性部位。



图1 菌株 E0102B1 发酵产物的粗提物

表1 菌株 E0102B1 粗提物各部分抑制辣椒疫霉菌的活性

粗提物部分	抑制率 (%)	
	2 mg/mL	1 mg/mL
水溶性	79.45 ± 0.42a	48.62 ± 0.33a
大分子	3.16 ± 0.51d	2.32 ± 0.31d
脂溶性	14.53 ± 0.38c	9.19 ± 0.28c
总粗提物	66.92 ± 0.43b	40.05 ± 0.61b

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

2.2 活性菌株水溶性提取物抑制辣椒疫霉菌的中浓度

对活性较高的水溶性提取物部分,通过对起始浓度进行倍比稀释为 5 个浓度梯度,在 2.000、1.000、0.500、0.250、0.125 mg/mL 的浓度下,菌株 E0102B1 的水溶性提取物对辣椒疫霉菌的抑制率分别为 79.45%、48.62%、35.21%、21.83%、11.05%。对其建立浓度对数值-抑制率曲线,通过回归方程计算其对辣椒疫霉菌的抑制中浓度值为 1.09 mg/mL (图 2、图 3)。



图2 菌株 E0102B1 水溶性提取物抑制辣椒疫霉菌的培养情况

3 讨论

菌株 E0102B1 粗提物各部分抑制辣椒疫霉菌的活性结果表明,菌株 E0102B1 的水溶性提取物对辣椒疫霉菌抑制率高于总粗提物的抑制率,说明该菌株的发酵产物抑制辣椒疫霉菌的活性部位主要存在于水溶性提取物部分。今后可以做田间试验以进一步开发利用。

现有的抗菌药物的不足之处在于抗菌谱普遍较窄。我们将对本研究中的抑菌活性较好的活性部分进行更深入的抗菌谱方面的研究,同时结合天然产物化学的手段,希望从中找出相关新的具有广谱抗菌活性的物质,为以后的抗菌机制研究、新型农药制剂开发与农业综合防治等方面打下基础。

盐湖中的生物多样性蕴藏着重要的经济效益和巨大而特

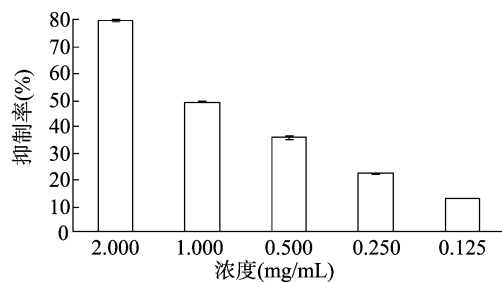


图3 菌株E0102B1水溶性提取物抑制辣椒疫霉菌的活性

殊的基因资源,也是我们需要探究的对象。盐湖中新物种客观存在,有待去发现与挖掘。开展盐湖生物基因工程研究是现代生物技术的关注点;探索盐湖微生物资源效能及应用价值很有潜力,并具有广阔的开发前景。

参考文献:

- [1] 宁卓,张波.嗜盐菌的研究进展及应用[J].苏盐科技,2007(1):31-32.
- [2] Lim J M, Jeon C O, Kim C J. *Bacillus taeanensis* sp. nov., a halophilic Gram-positive bacterium from a solar saltern in Korea[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56(12): 2903-2908.
- [3] Usami R, Echigo A, Fukushima T, et al. *Alkalibacillus silvisoli* sp. nov., an alkaliphilic moderate halophile isolated from non-saline forest soil in Japan[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(4): 770-774.
- [4] Liebgott P P, Joseph M, Fardeau M L, et al. *Clostridiisolibacter paucivorans* gen. nov., sp. nov., a novel moderately halophilic bacterium isolated from olive mill wastewater[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58(1): 61-67.
- [5] Antunes A, Rainey F A, Wanner G, et al. A new lineage of halophilic, wall-less, contractile bacteria from a brine-filled deep of the Red Sea[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(10): 3580-3587.
- [6] Borsodi A K, Múrialiget K, Szabó G, et al. *Bacillus aurantiacus* sp. nov., an alkaliphilic and moderately halophilic bacterium isolated from Hungarian soda lakes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58(4): 845-851.
- [7] 柴丽红,王涛,李沁元,等.应用 DGGE 法对青海相邻两盐湖中细菌多样性的快速检测[J].生物学杂志,2003,20(1):13-14,19.
- [8] 柴丽红,王涛,崔晓龙,等.青海柯柯盐湖 16 株细菌的 ARDRA 筛选及系统发育初步分析[J].云南大学学报:自然科学版,2003,25(6):541-544.
- [9] 姜怡,李文均,徐平,等.盐碱环境放线菌多样性研究[J].微生物学报,2006,46(2):191-195.
- [10] 赵泽孝.极端环境下某些细菌的分离及多相分类初步研究[D].重庆:第三军医大学,2004.
- [11] 吕爱军,胡斌,温洪宇,等.极端嗜盐菌的特性及其应用前景[J].微生物学杂志,2005,25(2):65-68.
- [12] 王钱福.嗜盐菌的分离及其多相分类学研究[D].兰州:兰州大学,2007.
- [13] 沈硕,李玮,欧阳明安,等.两株海洋真菌的鉴定及其次级代谢产物抑制烟草花叶病毒及抗肿瘤活性[J].微生物学报,2009,49(9):1240-1246.
- [14] 田黎,顾振芳,陈杰,等.海洋细菌 B-9987 菌株产生的抑菌物质及对几种植物病原真菌的作用[J].植物病理学报,2003,33(1):77-80.