



胡红涛,刘振香,徐文凤,等.生防菌弗氏链霉菌 K-7 所产抑菌物质的稳定性研究[J].黑龙江农业科学,2019(7):85-88.

生防菌弗氏链霉菌 K-7 所产抑菌物质的稳定性研究

胡红涛^{1,2,3},刘振香¹,徐文凤¹,顾志光¹,孟祥坤^{1,2,3},范玲超^{1,2,3}

(1.金正大生态集团股份有限公司,山东 临沂 276700;2.养分资源高效开发与综合利用国家重点实验室,山东 临沂 276700;3.农业部植物营养与新型肥料创制重点实验室,山东 临沂 276700)

摘要:为探明生防菌弗氏链霉菌 K-7 发酵液上清中抑菌物质的成分及其在功能性肥料中添加使用的可能性,对生防菌弗氏链霉菌 K-7 所产抑菌物质分别通过 60 和 80 ℃ 高温处理 4 h 和 100 g·L⁻¹ 的高浓度 KH₂PO₃ 处理 48 h 后,采用菌丝生长速率法测定发酵液上清抑菌物质的抑菌效果来研究 K-7 所产抑菌物质的稳定性。结果表明:生防菌弗氏链霉菌 K-7 所产抑菌物质经过 60 和 80 ℃ 高温处理 4 h 抑菌活性无明显变化,说明所产抑菌物质对高温稳定;和 100 g·L⁻¹ 的高浓度 KH₂PO₃ 复配后抑菌活性显著优于单独发酵液上清,显著优于单独的亚磷酸二氢钾溶液,说明所产抑菌物质在高盐条件下稳定。为所产抑菌物质的纯化、成分分析及在功能性肥料中添加使用提供了一定的理论基础,具有较广的应用前景。

关键词:弗氏链霉菌 K-7;温度;亚磷酸二氢钾

放线菌(*Actinomycetales*)是一类介于细菌与丝状真菌之间而又接近于细菌的一类丝状原核生物,因气生菌丝呈放射状而得名,放线菌目可分为 10 个亚类,其代表菌属主要有链霉菌属(*Streptomyces*)、小单孢菌属(*Micromonospora*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、马杜拉放线菌属(*Actinomadura*)、游动放线菌属(*Actinoplanes*),其中以链霉菌

属为主^[1-2]。放线菌能产生丰富的、活性多样的次级代谢产物,人类的生产、生活有着极为密切的关系,其天然代谢产物一直是现代医药业、农业和畜牧业中药物先导化合物的一个重要来源,如阿维菌素、链霉素、宁南霉素、多抗霉素等,在农业生产中有很重要的地位,同时应用代谢产物防治植物病害,可减少农药的用量,维系生态平衡,确保农业可持续发展。

生防菌弗氏链霉菌 K-7 为金正大微生物实验室前期从临沭黄瓜大棚中筛选得到,其发酵液上清对黄瓜枯萎病菌、香蕉枯萎病菌等多种病原菌都有很强的抑制作用,为进一步研究其抑菌物质的成分及能否在功能性肥料中添加使用,本研

收稿日期:2019-03-11

基金项目:山东省重点研发计划(2016ZDJQ0701)。

第一作者简介:胡红涛(1989-),男,硕士,农艺师,从事农用微生物防治植物病害研究。E-mail:hht4275@163.com。

通讯作者:范玲超(1974-),男,学士,高级工程师,从事微生物肥料研制及应用方面的研究。E-mail:fanlingchao@kingenta.com。

Abstract: In order to understand the status of 17 pesticide residues in the three cash crops of the city of Xiran from 2016 to 2018 and the existing risk points, data support was provided for the relevant departments to further develop and adopt effective preventive and control measures. Qualitative and quantitative determination was carried out by liquid chromatography mass spectrometer. The results showed that imidacloprid was a common pesticide for melon, cherry and grape cultivation, and there was no limit requirement on all three fruits, but its maximum detection value was lower than the limit requirement in most other countries, so the risk was low. Abamectin is a highly toxic pesticide, and it is not registered and unlimited in grape cultivation. Therefore, there are hidden risks in grape cultivation and management should be strengthened. Whether it is highly toxic or low-toxic pesticides, even if the detection value does not exceed the limit requirement, it is a risk risk in itself as an unregistered pesticide. It is suggested that the relevant departments should strengthen the management of unregistered pesticides and unlimited quantities of pesticides, and at the same time the agro-technical promotion department should strengthen the scientific and rational use of medicines, so that the vast number of fruit growers produce safe and reliable agricultural products and avoid the occurrence of agricultural product quality and safety accidents.

Keywords: fruit; pesticide residues; risk profile; analysis

究通过对 K-7 发酵液上清经过高温和高盐分处理,看发酵液上清中抑菌物质对温度和盐分的耐受性,为后期纯化、成分分析及在农业生产中使用提供依据^[3]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 生防菌 生防菌弗氏链霉菌 K-7 为金正大微生物实验室保存,前期研究表明在其发酵液上清中含有抑菌物质。

1.1.2 供试病原菌 黄瓜立枯病菌(*cucumber Rhizoctonia solani*)、香蕉枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*),所用供试病原菌菌株均由本实验室保存。

1.1.3 培养基 PDA 液体培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,蒸馏水 1 000 mL。PDA 固体培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 15 g,蒸馏水 1 000 mL。

1.1.4 试剂 亚磷酸二氢钾,分析纯,由金正大生态集团股份有限公司提供;实验所用其它化学试剂均为分析纯或按国家标准(GB) 规定要求。

1.1.5 仪器与设备 梅特勒 MS-TS 分析天平、智微立式灭菌锅、无菌操作工作台、生化培养箱、知楚摇床、打孔器、玻璃器皿等。

1.2 方法

1.2.1 弗氏链霉菌 K-7 发酵液上清制备 取 4 ℃冰箱中 PDA 斜面保存的 K-7 菌株在固体 PDA 平板上划线活化,放于 28 ℃生化培养箱培养 4 d。然后在超净工作台中用直径 9 mm 的打孔器打菌片,挑取 4 片放入装有 200 mL 培养基的 1 L 三角瓶中,放入 28 ℃恒温摇床培养 60 h。培养完成后 8 000 r·min⁻¹,离心 20 min,上清即为弗氏链霉菌 K-7 发酵液上清。

1.2.2 带毒平板检测法测定抑菌物质活性 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物质的培养基,摇匀后倒入培养皿内冷凝备用^[4]。

发酵液抑菌效果测定:将各指示菌株接种至

PDA 平板上,28 ℃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。将菌块随机转接到含有不同浓度抑菌物质的培养皿中央,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 28 ℃下培养 2 d,利用十字交叉法测量菌落直径按照下面求出发酵液对供试菌的抑制率^[5]。

抑制率(%)=(对照菌落直径-处理菌落直径)/对照菌落直径×100

1.2.3 温度对放线菌代谢产物的影响 取灭菌的 10 mL 离心管数只,每只装入 5 mL 弗氏链霉菌 K-7 发酵液上清,分别放到 25,60,80 ℃(分别标记为 T1、T2、T3)恒温烘箱,处理时间为 4 h。处理完成后按 1.2.2 的活性测定方法测定高温处理后的上清液中抑菌物质的活性,纯 PDA 培养基(CK)作为对照。

1.2.4 亚磷酸二氢钾对放线菌代谢产物的影响

取发酵液上清加入一定量的亚磷酸二氢钾配成母液,充分溶解后室温放置 48 h 后按 1.2.2 的方法测定上清液抑菌成分对黄瓜立枯病菌抑菌活性,等浓度的亚磷酸二氢钾溶液和未加盐处理的上清液作为对照。试验处理分别为 T1:100 g·L⁻¹的亚磷酸二氢钾;T2:100 g·L⁻¹的亚磷酸二氢钾和发酵液上清复配;T3:发酵液上清,配置带毒平板时按 10、20、50 和 100 倍稀释加入。

1.2.5 数据分析 采用 Excel 2013 和 SPSS 18.0 进行数据处理^[6],采用 Duncan's multiple range test 中的方差分析(ANOVA)方法进行分析。

2 结果与分析

2.1 温度对放线菌代谢产物的影响

由表 1 可知,不同温度处理的弗氏链霉菌 K-7 发酵液上清对黄瓜立枯病菌、香蕉枯萎病菌均有不同程度的抑制作用,比较 T1、T2、T3 三个温度处理后对立枯病菌和枯萎病菌的抑制率均无显著差异,抑制率没有明显变化,说明发酵液上清经 60 和 80 ℃处理后,其中的抑菌物质活性没有明显变化,说明其抑菌物质对 80 ℃高温较为稳定。

表 1 不同温度下不同处理对立枯病菌和枯萎病菌的抑制情况

Table 1 Inhibition situation of different treatments with different temperature on mycelial growth of *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

处理 Treatment	处理温度 Temperature/℃	立枯病菌 <i>Rhizoctonia solani</i>		枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	
		菌落平均直径	抑制率	菌落平均直径	抑制率
		Average diameter of colonies/cm	Inhibition rate/%	Average diameter of colonies/cm	Inhibition rate/%
CK		8.13±0.67	-	7.75±0.58	-
T1	25	2.05±0.23	71.71±2.78 a	2.52±0.28	67.47±3.70 a
T2	60	2.28±0.47	71.92±5.79 a	2.39±0.36	69.10±4.70 a
T3	80	2.30±0.23	74.78±2.80 a	2.45±0.35	68.40±4.47 a

同一列不同小写字母表示显著性差异($P<0.05$, $n=6$)。下同。
Different lowercase letters in the same column indicate significant difference($P<0.05$, $n=6$). The same below.

2.2 亚磷酸二氢钾对放线菌代谢产物的影响

由表 2 可知,不同处理的弗氏链霉菌 K-7 发酵液上清对黄瓜立枯病菌均有不同程度的抑制作用,比较同一稀释梯度抑制率,可以看出 K-7 发酵液上清和高浓度亚磷酸二氢钾复配(T2)后,对丝核菌的抑制效果显著优于单独上清液(T3),二者显著优于单独的亚磷酸二氢钾(T1)处理,说明发酵液上清中的抑菌物质对高浓度亚磷酸二氢钾较为稳定。

表 2 不同处理对黄瓜立枯病菌的抑制情况

Table 2 Inhibiton of different treatments on mycelial growth of cucumber *Rhizoctonia solani*

处理 Treatment	抑制率 Inhibition rate/%			
	稀释 10 倍	稀释 20 倍	稀释 50 倍	稀释 100 倍
CK	-	-	-	-
T1	68.8±2.46 c	60.0±2.21 c	44.4±2.53 c	37.5±2.25 c
T2	87.5±2.07 a	80.0±1.94 a	69.4±2.13 a	55.6±3.04 a
T3	71.3±1.89 b	72.0±2.07 b	58.1±2.56 b	42.5±2.76 b

3 结论与讨论

通过对生防菌弗氏链霉菌 K-7 所产抑菌物质的稳定性研究发现,K-7 所产抑菌物质能在 80 ℃下放置 4 h 其抑菌活性没有显著下降,说明对温度较为稳定,因为在后期提纯过程会经过高温灭活、喷雾干燥等过程,K-7 所产抑菌物质对高温较为稳定,有助于后期进行提纯并对其化学结

构、理化性质进行进一步的研究。

弗氏链霉菌 K-7 发酵液上清和亚磷酸二氢钾复配成 100 g·L⁻¹ 的盐溶液放置 48 h 后,复配液对黄瓜立枯病菌的抑制率优于单独的 K-7 发酵液上清,优于单独的亚磷酸二氢钾溶液,说明 K-7 所产抑菌物质对高浓度亚磷酸二氢钾较为稳定。有研究认为,亚磷酸盐能干扰和抑制病菌菌丝生长及产孢,直接保护寄主,同时亚磷酸盐施用后被叶片、根部吸收,运送至植株体内,等植物病菌入侵时,刺激植株产生植物防御素^[7-8]。K-7 所产抑菌物质对高浓度亚磷酸二氢钾较为稳定,同时能加强亚磷酸盐对立枯病菌、枯萎病菌等植物病害的抑制作用,可以复配成农药或者肥料,在农业生产中应用^[9]。

植物病害是严重威胁农业生产的自然生物灾害之一,植物的健康和人的生活和健康息息相关。常年化学农药的防治,导致防治效果下降,同时污染了环境,也影响着人们的身体健康;放线菌种类繁多,代谢功能各异,能产生大量的,种类繁多的抗生素,在农业生产上起重要作用,如用阿维菌素防治根结线虫^[10],用井冈霉素防治水稻纹枯病^[11],用宁南霉素防治烟草花叶病毒病都取得了极好的效果^[12],同时又绿色环保,不会污染环境和影响人类健康。

本试验结果为生防菌弗氏链霉菌 K-7 所产

抑菌物质的后期纯化、使用提供了一定的理论基础,但室内平板抑菌测定结果仅说明抑菌物质对在离体条件下的生植物病原菌的直接活性,由于生态环境对防效具有显著的影响,对于生防菌弗氏链霉菌 K-7 使用和大田防效还有待于进一步进行田间试验研究。

参考文献:

- [1] 陆胜利,祁超.海洋放线菌代谢产物、非核糖体多肽、腺苷化结构域研究进展[J]. 华中师范大学学报:自然科学版, 2015(1):114-124.
- [2] 李利.内蒙古地区土壤放线菌的分离及其发酵产物农用活性研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2013.
- [3] 许家慧.海洋放线菌 TXC6-16 活性次级代谢产物的分离纯化及结构鉴定[D]. 上海:华东理工大学,2017.
- [4] Quiroga E N, Sampietro A R, Vattuone M A. Screening antifungal activity of selected medicinal plants[J]. Journal Ethnopharmacology, 2001, 74(1): 89-96.
- [5] 顾志光,徐文凤,范玲超,等.拮抗放线菌固态发酵菌剂及其

盆栽促生效果[J]. 北方园艺, 2017(8): 124-128.

- [6] Allen P, Kellie B. PASW Statistics by SPSS: A Practical Guide: Version 18. 0 [M]. London: Cengage Learning Emea, 2010.
- [7] 楚雯琰,段增强.亚磷酸盐作缓释磷肥对黄瓜体内养分吸收和光合特性的影响[M]. 植物营养与肥料学报, 2013, 19(3): 753-759.
- [8] 徐文凤,顾志光,任士伟,等.亚磷酸二氢钾对生姜茎基腐病菌腐霉的抑制作用[J]. 黑龙江农业科学, 2018(7): 60-63.
- [9] 任士伟,马存金,王亮亮,等.亚磷酸二氢钾对辣椒光合特性及根系生长的影响[J]. 磷肥与复肥, 2018, 33(4): 41-43.
- [10] 陈兵,韩佩娥,朱凤香,等.生物农药阿维菌素防治果蔬根结线虫病试验[J]. 浙江农业科学, 2003(2): 39-41.
- [11] 李涛,路雪君,廖晓兰,等.水稻纹枯病的发生及其防治策略[J]. 江西农业学报, 2010, 22(9): 91-93.
- [12] 蔡学建,陈卓,宋宝安,等.2%宁南霉素水剂对烟草花叶病毒的抑制及作用机制的初步研究[J]. 农药, 2008(1): 37-40.

Study on the Stability of Antibacterial Substance Produced by Biocontrol Bacterium *Streptomyces fradiae* var K-7

HU Hong-tao^{1,2,3}, LIU Zhen-xiang¹, XU Wen-feng¹, GU Zhi-guang¹, MENG Xiang-kun^{1,2,3}, FAN Ling-chao^{1,2,3}

(1. Kingenta Ecological Engineering Group Limited Company, Linyi 276700, China; 2. State Key Laboratory of Nutrition Resources Integrated Utilization, Linyi 276700, China; 3. Key Laboratory of Plant Nutrition and New Fertilizer Research and Development, Ministry of Agriculture, Linyi 276700, China)

Abstract: In order to study the composition of antibacterial substances in the supernatant of fermentation broth of biocontrol bacterium *Streptomyces fradiae* var K-7 and whether it can be added into functional fertilizers, the stability of antibacterial substances produced by biocontrol bacterium *Streptomyces fradiae* var K-7 was studied by mycelial growth rate method after respectively through 60 °C or 80 °C high temperature treatment 4 h or a high concentration of 100 g·L⁻¹ KH₂PO₃ treatment 48 h. The results showed that the antimicrobial activity of the antimicrobial substances produced by biocontrol bacterium *Streptomyces fradiae* var K-7 had no significant change after being treated at 60 °C or 80 °C for 4 hours, which indicated that the antimicrobial substances was stable to high temperature; the antimicrobial activity of the compound with 100 g·L⁻¹ high concentration KH₂PO₃ was significantly better than that of the supernatant of the fermentation broth alone, which was significantly better than that of the single potassium dihydrogen phosphate solution, indicating that the antimicrobial substances produced was stable under high salt conditions. It provides a theoretical basis for the purification, composition analysis of the antimicrobial substances and application in functional fertilizers, and has broad application prospects.

Keywords: *Streptomyces fradiae* var K-7 ; temperature; potassium dihydrogen phosphite