

发光杆菌 NJ 菌株的抑菌活性研究

马丽丽^{1,2}, 台莲梅^{1*}, 许艳丽², 李春杰², 韩新华²

(1 黑龙江八一农垦大学植保系, 大庆 163319, 2 中国科学院东北地理与农业生态研究所, 哈尔滨 150081)

摘要 测定了发光杆菌 NJ 菌株对 16 种植物病原真菌的抑菌活性, 结果表明该细菌具有较广的抑菌谱, 其中对甘蓝黑斑病菌、玉米大斑病菌、番茄猝倒病菌、玉米小斑病菌等植物病原真菌具有较强抑制作用。对该菌的发酵条件研究表明, 该菌在种龄为 24 h、接种量在 4%~6% 条件下, 在 TSY 培养液中 72 h 即可获得较高的抑菌活性。而装瓶量为 10~50 mL/100 mL 锥形瓶, 转速为 120~200 r/min 对菌的活性影响不大。不同温度处理发酵液, 其抑菌活性发生变化, 其中经 60 °C 处理 10 min 后, 抑菌活性降低约 50%, 说明发酵液中的抑菌活性成分可能有多种。

关键词 发光杆菌, 植物病原真菌, 抑菌活性; 培养条件

中图分类号 S 476 11

A study on the antifungal activity of *Photobacterium* sp. NJ

Ma Lili^{1,2}, Tai Lianmei¹, Xu Yanli², Li Chunjie², Han Xinhua²

(1 Department of Plant Protection, Heilongjiang August First Land Reclamation University,

Daqing 163319, China, 2 Northeast Institute of Geography and Agriculture

Ecology, Chinese Academy of Sciences, Harbin 150081, China)

Abstract The antifungal activity of *Photobacterium* sp. NJ to 16 kinds of plant pathogenic fungus were determined. The results showed that the bacteria showed a wide spectrum in antibiotic activity, especially to *Alternaria brassicicola*, *Exserohilum turcicum*, *Cercospora sojae*, *Bipolaris maydis* and so on. The optimum medium and culture conditions for the NJ strain were studied, which showed that when the stock was cultured for 24 hours, with an inoculation quantity of 4%~6% and 72 hours of fermentation time, the yield of antibiotics could be raised. The antifungal activity changed when the fermentation broth were treated under different temperatures. When treated for 10 minutes under 60 °C, its inhibiting effect reduced by a half, which indicated that there may be more than one antibiotic substances.

Key words *Photobacterium*; plant pathogenic fungus; antifungal activity; culture conditions

发光杆菌 (*Photobacterium*) 是一类与异小杆属 (*Heterorhabditis*) 昆虫病原线虫互惠共生的细菌。

收稿日期 2007-11-02 修订日期 2008-03-10

基金项目 黑龙江省“十一五”科技攻关重点项目 (GB06B105), 国家“十一五”科技支撑计划 (2006BAD21B01)

* 通讯作者 Tel 0459-6819182, E-mail taihianmei@sina.com

该菌存在于昆虫病原线虫3龄侵染期幼虫的肠道中,以线虫为载体侵入昆虫并被释放到昆虫血腔内进行大量繁殖,随后产生毒素和抑菌物质,使昆虫患败血症死亡;同时产生抗生素,抑制其他杂菌的二次污染,为线虫的生长繁殖提供良好的生存环境,这一特性引起了国内外学者的兴趣,并进行了大量的研究。研究表明,共生细菌能够产生多种次生代谢产物^[1-2],抑制其他微生物的生长,尤其对植物病原真菌具有普遍的抑制作用^[3-9]。目前,已从共生细菌中分离鉴定出30多种具有生物活性的代谢产物。从发光杆菌属(*Photobacterium*)中分离得到的抑菌物质主要有萘醌类、羟化二苯乙烯类、细菌素(bacteriocin)和几丁质酶类。

陆秀君等人测定了发光杆菌 HBgy13 对蔬菜病原菌的抑制活性^[9],发现该菌株对黄瓜灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)和萝卜褐腐病菌(*Rhizoctonia solani*)具有较好的抑制效果。本文通过对植物病原真菌的筛选得到发光杆菌 NJ 菌株,为了提高该菌株产生抑菌活性物质的水平,从而为发挥共生菌的最大生产潜能提供支持并对抑菌物质性质进行初步了解,对 NJ 菌株的发酵条件和抑菌活性物质的稳定性进行研究。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

供试植物病原真菌:甘蓝黑斑病菌(*Alternaria brassicicola*)、玉米大斑病菌(*Exserohilum turcicum*)、葱紫斑病菌(*Alternaria porri*)、番茄猝倒病菌(*Pythium aphanidermatum*)、番茄叶霉病菌(*Fulvia fulva*)、大豆灰斑病菌(*Cercospora sojae*)、玉米小斑病菌(*Bipolaris maydis*)、黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)、大豆紫斑病菌(*Cercospora kikuchii*)、大豆根腐病菌(*Fusarium avenaceum*)、大豆菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、大豆根腐病菌(*Rhizoctonia solani*)、亚麻枯萎病菌(*Fusarium moniliforme*)、长蠕孢(*Helminthospora* sp.)、链格孢(*Alternaria* sp.)、大豆黑斑病菌(*Alternaria alternata*)等由中国科学院东北地理与农业生态研究所提供。

供试共生细菌:发光杆菌 NJ 菌株,由本试验室保存的异小杆属昆虫病原线虫(*Heterorhabditis bacteriophora*)体内直接分离获得。取被昆虫病原

线虫侵染的大蜡螟幼虫体液,转接于 NBTA 上,28℃恒温画线培养48h,平板上出现的蓝色单菌落为所需 I 型共生细菌。

1.2 供试培养基

NBTA. 营养琼脂 45 g, 溴百里酚兰 0.025 g, 氯化三苯基四氮唑 0.04 g, 水 1 000 mL;

TSY 酵母膏 5 g, TSB 40 g, 水 1 000 mL, pH7.2~7.4;

TSB. 大豆胨 5 g, 胰蛋白胨 15 g, NaCl 5 g, 水 1 000 mL, pH7.2~7.4;

LB. 胰蛋白胨 10 g, 酵母膏 5 g, NaCl 10 g, 水 1 000 mL, pH7.2~7.4;

NB: 牛肉膏 3 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 水 1 000 mL, pH7.2~7.4。

1.3 发光杆菌 NJ 菌株抑菌活性测定

采用点接法,在 PDA 平板的中央接种玉米大斑病菌菌块,用接种针挑取 NBTA 平板上的初生型发光杆菌 NJ 单菌落,点接种于平板上距病原真菌菌块中心 3 cm 处。待对照病原菌菌丝生长到达接入点形成较明显的抑菌带或抑菌圈时,测定比较各抑菌圈的大小。

1.4 培养条件对 NJ 菌株发酵液抑菌活性的影响

对 NJ 菌株进行发酵培养,通过改变不同的培养参数^[10],培养基、培养时间、接种量、种龄以及通气量等,探讨各指标对 NJ 菌株生长及抑菌活性的影响。

1.5 发酵液抑菌活性物质稳定性测定

将制备的 NJ 菌株 72 h 发酵液分别经不同温度(28、40、60、80、100℃)水浴处理 10 min 后,测定各处理液的抑菌圈直径。

1.6 数据统计与分析

试验数据用 SPSS 软件进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 发光杆菌 NJ 菌株对病原菌的抑制作用

测定结果表明,发光杆菌 NJ 菌株对 16 种植物病原菌均有不同程度的抑制作用,抑菌圈直径差异较大,最小的仅为 2.2 mm,最大的可达 19.0 mm。其中对甘蓝黑斑病菌、玉米大斑病菌、葱紫斑病菌、番茄猝倒病菌、玉米小斑病菌及大豆灰斑病菌均有较强的抑制效果(表 1),抑菌圈直径达 14 mm 以上。

表 1 共生细菌对植物病原真菌的抑制作用¹⁾

病原菌	抑菌活性	病原菌	抑菌活性
甘蓝黑斑病菌(<i>Alternaria brassicicola</i>)	+++	大豆黑斑病菌(<i>Alternaria alternata</i>)	++
玉米大斑病菌(<i>Erysiphe turicum</i>)	+++	大豆根腐病菌(<i>Fusarium avenaceum</i>)	+
葱紫斑病菌(<i>Alternaria porri</i>)	+++	大豆菌核病菌(<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>)	+
番茄猝倒病菌(<i>Pythium aphanidermatum</i>)	+++	大豆根腐病菌(<i>Rhizoctonia solani</i>)	++
大豆紫斑病菌(<i>Cercospora kikuchii</i>)	+	番茄叶霉病菌(<i>Fulvia fulva</i>)	++
大豆灰斑病菌(<i>Cercospora sojina</i>)	+++	亚麻枯萎病菌(<i>Fusarium moniliforme</i>)	+
玉米小斑病菌(<i>Bipolaris maydis</i>)	+++	长蠕孢(<i>Helianthopora</i> sp.)	++
黄瓜枯萎病菌(<i>Fusarium oxysporum</i>)	+	链格孢(<i>Alternaria</i> sp.)	+++

1) -表示无抑制作用, +表示抑菌直径为 0~8 mm, ++表示抑菌圈直径为 8~14 mm, +++表示抑菌直径大于 14 mm。

2.2 培养条件对 NJ 菌株发酵液抑菌活性的影响

2.2.1 培养基对发酵液抑菌活性的影响

将制备的 24 h 种子液以 4% 的接菌量分别接入 NB、LB、TSY、TSB 培养液中, 28 ℃, 120 r/min 条件下发酵培养 72 h, 测定各处理的 A_{600} 及抑菌圈直径。结果表明: 不同培养液对于菌的生长影响较大, 各处理 A_{600} 差异显著 ($p \leq 0.05$)。NJ 菌株在 TSY 培养液中生长最好, 菌群密度最大, A_{600} 为 3.033, 在 NB 培养液中生长 72 h 后, 菌体的密度最小, 其 A_{600} 只有 2.060。除 TSB 的抑菌活性稍低外, 其他 3 种培养液的抑菌活性差异不大。可能是由于在培养液中加入酵母抽提物有利于菌的生长以及抑菌活性物质的产生(图 1)。

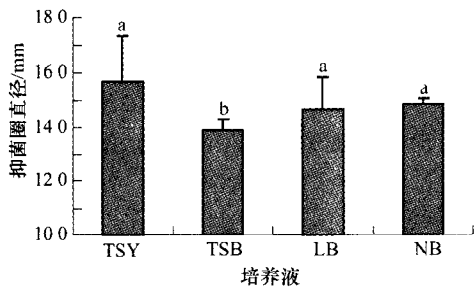


图 1 培养液对 NJ 菌株抑菌活性的影响

2.2.2 培养时间对发酵液抑菌活性的影响

将制备的 24 h 种子液以 4% 的接菌量接入 TSY 培养液中, 28 ℃, 120 r/min, 分别培养 24、48、72、96、120、144 h, 测定发酵液的 A_{600} 及抑菌活性。结果表明: 培养时间在 24~72 h 范围内, 随着时间的增长, 发酵液的菌体浓度及抑菌活性逐渐增加, 在 72 h 达到最大值, A_{600} 为 3.100, 且菌体生长曲线与抑菌活性曲线基本一致。之后, 随着时间的延长, A_{600} 及抑菌活性变化不大(图 2)。细菌生长达到稳定期后, 菌体密度基本保持稳定, 而此时产生的抑菌活性物质也达到一种平衡状态, 说明在其他培养参数一定的情况下, 抑菌活性物质的产量与菌体密度成正比, 菌体密度越大, 抑菌活性越高。

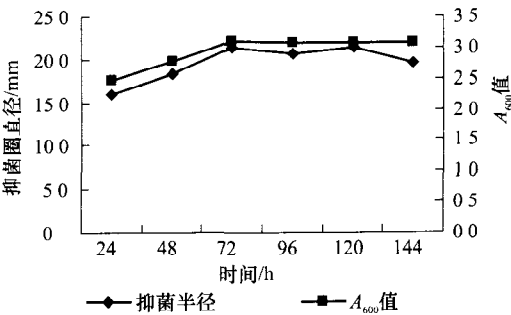


图 2 培养时间对 NJ 菌株抑菌活性的影响

2.2.3 种子液对发酵液抑菌活性的影响

在灭菌的装有 10 mL TSY 培养液的锥形瓶中接入 NJ 菌株 I 型单菌落, 在 28 ℃, 120 r/min 条件下, 分别发酵培养 12、16、20、24 h 和 28 h 作为种子液, 以 4% 的接菌量接入培养液中, 相同条件下发酵 72 h, 测定发酵液的 A_{600} 及抑菌圈直径。结果表明: 在 12~28 h 种龄范围内, 各处理的 A_{600} 及抑菌活性差异显著 ($p \leq 0.05$)。12~28 h 范围内种子液的 A_{600} 呈上升趋势, 从 0.253 升到 2.055。随着种龄的增加, 发酵液的抑菌活性增强, 以 24 h 种子液接种的发酵液抑菌活性最高, 达到最高峰(图 3), 随后抑菌活性呈下降趋势, 这可能是与不同时间种子液菌体的生长状态有关, 此时菌体处于对数生长期, 适应力强, 代谢快, 因而当种子液接种到培养液中进行培养时更有利于菌的生长以及抑菌物质的产生。

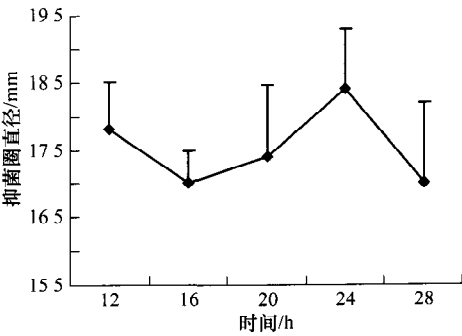


图 3 不同时间种子液对 NJ 菌株抑菌活性的影响

2.2.4 接菌量对发酵液抑菌活性的影响

分别以1%、2%、4%、6%、8%、10%的接菌量向培养液中加入24 h种子液,28℃,120 r/min发酵培养72 h,测定发酵液的 A_{600} 及其抑菌活性。结果表明:1%~10%的接菌量对于菌的生长无影响,各处理间 A_{600} 值差异不显著($p \geq 0.05$)。接菌量为4%时发酵液的抑菌圈直径最大,抑菌活性最高,抑菌圈直径达15.60 mm,随着接菌量的增加,抑菌活性有降低趋势,接菌量为8%时,抑菌圈直径仅为13.60 mm(图4)。

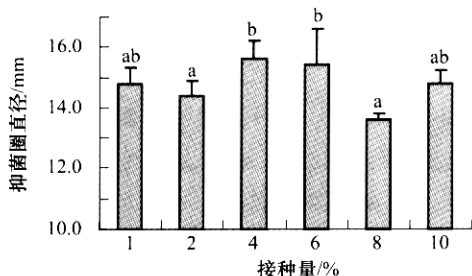


图4 接种量对NJ菌株抑菌活性的影响

2.2.5 通气量对发酵液抑菌活性的影响

在对菌进行发酵培养的过程中,转速和装瓶量是影响通气量的两个因素。由此可以推断该菌对氧气的需求程度。

2.2.5.1 转速对发酵液抑菌活性的影响

将发酵液置于28℃,在不同的转速条件120、160、200 r/min,进行发酵培养72 h,测定发酵液的 A_{600} 及抑菌活性。结果表明:转速在120~200 r/min范围内,菌体密度与发酵液的抑菌活性差异不显著(表2),说明转速不影响菌的生长及抑菌活性物质的产生。

表2 转速对NJ菌株生长及抑菌活性的影响

转速 /r · min ⁻¹	A_{600}	抑菌半径 /mm
120	3.067	16.80
160	2.972	16.20
200	3.067	16.60

2.2.5.2 装瓶量对发酵液抑菌活性的影响

在100 mL锥形瓶中分别加入10、20、30、40、50 mL培养液,以4%的接菌量接入24 h种子液,培养72 h,测定各发酵时间发酵液的 A_{600} 及抑菌活性。结果表明:不同装瓶量处理对菌体生长及抑菌活性无显著影响(图5),各处理的 A_{600} 在3.000左右,抑菌圈直径均在15.00 mm左右。

由此推测,通气量并不是影响共生菌生长及抑菌活性物质产生的主要因素。

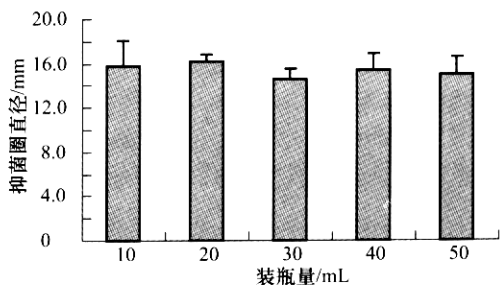


图5 装瓶量对NJ菌株抑菌活性的影响

2.3 抑菌活性成分稳定性测定

将制备的72 h发酵液分别经28、40、60、80、100℃恒温水浴处理10 min,测定各处理的抑菌圈直径。结果表明:原液与不同温度处理发酵液的抑菌活性差异显著,28℃发酵液的抑菌圈直径达16.00 mm,而经60℃处理后,发酵液的抑菌圈直径为9.00 mm,抑菌活性降低了约50%(图6)。经60、80、100℃处理的发酵液抑菌活性差异不显著。说明抑菌物质部分可能为蛋白类等对热不稳定的物质,而还有一部分物质可能是对热稳定的抗生素类物质。

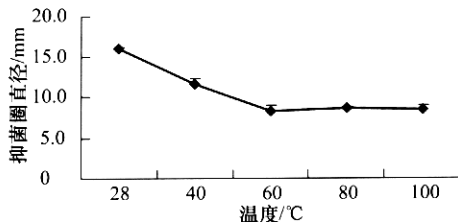


图6 温度对NJ菌株抑菌活性的影响

3 结论与讨论

本研究对从异小杆属昆虫病原线虫(*H. bacteriophora*)中分离的NJ菌株进行了抑菌活性测定,结果表明该菌株对多种植物病原菌具有较好的抑制效果。研究发现,NJ菌株在含有酵母抽提物的培养液中更有利于菌的生长。发酵液的抑菌活性与菌体的生长基本保持一致,在72 h达到最大值,此后,抑菌活性基本维持稳定。转速在120~200 r/min,装瓶量为10~50 mL/100 mL容量瓶对菌的生长及抑菌活性无显著影响。种龄在24 h,接种量为4%~6%时菌的抑菌活性较高。

发光杆菌是一类生活于昆虫病原线虫体内的特殊细菌,因而对于培养条件具有特殊的要求。对培养条件进行优化,有利于提高此类细菌的产素水平,增强其抑菌活性。本文分析了培养条件对发酵液抑菌活性的影响,而由于此类细菌存在两型现象,只有初生型能够产生抗生素类物质^[2],要进一步提高该菌产生抑菌物质

的能力,需要对其型变现象进行进一步的研究。

参考文献

- [1] Ng K K, Webster J M Antimycotic of *Xenorhabdus bovienii* (Enterobacteriaceae) metabolites against *Phytophthora infestans* on potato plant[J] Canadian Journal of Plant Pathology, 1997, 19(2) 123 - 236
- [2] 王立霞,杨秀芬,简恒 昆虫病原线虫共生细菌的代谢产物[J] 微生物学报, 2001, 41(6) 753 - 756
- [3] 杨秀芬,杨怀文,简恒 嗜线虫杆菌发酵液对兰麻疫霉的抑制作用[J] 中国生物防治, 1998, 14(1) 21 - 24
- [4] 杨秀芬,杨怀文,简恒 嗜线虫致病杆菌代谢物拮抗大豆疫霉[J] 大豆科学, 2002, 24(1) 52 - 55
- [5] 杨怀文,张志明,杨秀芬,等 嗜线虫杆菌代谢物对马铃薯晚疫病的抑制作用[J] 中国生物防治, 2000, 16 (3) 111 - 113
- [6] 陆秀君,王勤英,赵光耀,等 发光杆菌 *Photorhabdus* spp HB-gy13 菌株对 4 种蔬菜病原菌的抑菌活性[D] 河北农业大学学报, 2003, 26(4) 18 - 20
- [7] 辛智海,邱礼鸿,崔龙,等 线虫共生菌对水稻纹枯病和稻瘟病的抑菌活性[J] 中山大学学报(自然科学版), 2004, 43(5) 69 - 72
- [8] Isaacson P J, Webster J M Antimicrobial activity of *Xenorhabdus* sp RIO (Enterobacteriaceae), symbiont of the entomopathogenic nematode, *Steinernema robur* (Rhabditida: Steinernematidae) [J] Journal of Invertebrate Pathology, 2002, 79 146 - 153
- [9] Chen G, Dunphy G B, Webster J M Antifungal activity of two *Xenorhabdus* species and *Photorhabdus luminescens*, bacteria associated with the nematodes *Steinernema* species and *Heterohabditis megidis* [J] Biological Control, 1994, 4 157 - 162
- [10] 杨秀芬,杨怀文,简恒,等 高毒力杀虫细菌嗜线虫致病杆菌 CB6 菌株的培养基优化[J] 中国生物防治, 2005, 20(2) 118 - 121