

# 一株放线菌次生代谢产物抗菌活性的初步研究

田小卫，龙建友，白红进，吴文君\*

(西北农林科技大学农药研究所, 陕西杨凌 712100)

**摘要** 从秦岭山区土样中筛选得到一株放线菌, 编号为 NO.24, 对其产生的次生代谢产物的抑菌活性进行了测定。生测结果表明, 离体条件下发酵液浓度 2 000 mg/L 时对烟草赤星病菌、马铃薯干腐病菌、玉米大斑病菌、番茄灰霉病菌、番茄早疫病菌、番茄晚疫病菌、小麦赤霉病菌、小麦根腐病菌菌丝生长或孢子萌发均有较强的抑制作用。对玉米大斑病菌和番茄灰霉病菌菌丝生长抑制中浓度为 240.1 mg/L 和 350.5 mg/L; 对玉米大斑病菌和马铃薯干腐病菌孢子萌发的抑制中浓度分别为 155.0 mg/L 和 124.1 mg/L。盆栽试验在浓度为 6 000 mg/L 时对小麦白粉病的保护和治疗作用分别为 76.13% 和 70.78%, 对黄瓜霜霉病的保护和治疗作用分别为 63.93% 和 59.66%。对 NO.24 菌株代谢产物进行了粗分离, 其抑菌活性成分主要为水溶性物质。

**关键词** 有害生物生物防治; 放线菌; 发酵产物; 抑菌活性

中图分类号 S 476.8

## Studies on the fungicidal activity of secondary metabolic products of actinomycetes

TIAN Xiao-wei, LONG Jian-you, BAI Hong-jin, WU Wen-jun

(Institute of Pesticide, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract** The fermentation extracts of NO.24 strain of actinomycete isolated from the soil of Qinling mountainous areas were assayed. The results showed that the fermentation extracts had a high fungicidal activity to mycelium growth or spore germination of *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum*, *Alternaria longipes*, *Fusarium oxysporum*, *Exserohilum turcicum*, *Alternaria solani* and *Bipolaris sorokiniana* at the concentration of 2 000 mg/L. The mycelium growth EC<sub>50</sub> values for *E. turcicum* and *B. cinerea* were 240.13 mg/L and 350.48 mg/L, respectively. The spore germination EC<sub>50</sub> values for *E. turcicum* and *F. oxysporum* were 155.01 mg/L and 124.15 mg/L, respectively. The results of pot tests showed that the fermentation extracts exhibited a protective efficacy of 76.13% and a therapeutic efficacy of 70.78% against *Pseudoperonospora cubensis*, a protective efficacy of 63.93% and a therapeutic efficacy of 59.66% against *Blumeria graminis* at the concentration of 6 000 mg/L. The results of preliminary isolation of the fermentation extracts from strain NO.24 indicated that the main active components was water-solubable.

**Key words** pest biocontrol; actinomycetes; fermentation products; inhibitory activity

放线菌是产生抗生素活性物质最大的一类微生物。迄今, 不论是在工业、医学还是在农业上都有许多利用放线菌产生抗生物质的成功实例。例如医药红霉素和新霉素, 农药井冈霉素、春雷霉素等<sup>[1]</sup>。为开发新的农用抗生素, 研究发现从秦岭山区土样中筛选到的一株放线菌代谢产物对植物病原菌具有极高的抑菌活性。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试菌株及其来源

从陕西秦岭山区采回的土样中分离得到一株放线菌, 编号为 NO.24, 经初步鉴定为链霉菌属

(*Streptomyces*), 接种于试管斜面培养基, 4℃保存。

### 1.2 供试药剂

将保存的菌种接种于高氏一号平板培养基上, 25℃培养 7 d 后移接于液体培养基(小米 10 g, 葡萄糖 20 g, 蛋白胨 3.0 g, 碳酸钙 2.0 g, 氯化钠 2.5 g, 蒸馏水 1 000 mL)。29℃温度下摇瓶发酵 5 d, 将发酵液浓缩后置于搪瓷盘中吹干作为供试药剂。

### 1.3 供试病原菌

以番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)、烟草赤星病菌(*Alternaria longipes*)、马铃薯干腐病菌(*Fusarium*

\* 收稿日期: 2003-11-19

基金项目: 国家 863 高技术计划项目(2002AA245121)

\* 通讯作者

*coeruleum*)、玉米大斑病菌(*Exserohilum turcicum*)、番茄早疫病菌(*Alternaria solani*)、小麦根腐病菌(*Bipolaris sorokiniana*)、黄瓜霜霉病菌(*Pseudoperonospora cubensis*)、番茄晚疫病菌(*Phytophthora infestans*)为离体生测供试病原菌。盆栽以黄瓜霜霉病和小麦白粉病菌(*Blumeria graminis*)为活体测定供试病原菌。所有供试病原菌由西北农林科技大学农药研究所提供。

## 1.4 试验方法

### 1.4.1 离体生测

(1)抑制菌丝生长速率法:用蒸馏水将准确称量的发酵液固形物(药物)稀释4个浓度梯度和灭菌的定量培养基混合后,倒入直径为9 cm培养皿内制成长条培养基,每浓度重复3次,以蒸馏水为对照。用直径为5 mm的打孔器在培养好的供试菌菌落边缘切下菌饼反接于培养皿内,25℃培养3 d,用十字交叉法测量菌落扩展直径,求出菌丝生长抑制率<sup>[2]</sup>。

(2)抑制孢子萌发法:将定量的药液和病菌孢子悬浮液充分混合,以清水为对照,滴加在洁净干燥的凹玻片上,25℃保湿培养24 h,在显微镜下检查孢子的萌发率,计算孢子萌发的抑制率<sup>[2]</sup>。

(3)管碟法:用蒸馏水将供试药物配成不同的浓度梯度后,将培养好的酵母菌与适量的PDA混匀,倒入9 cm培养皿制成带菌平板,在平板上放入6个牛津杯,其中5管分别加入不同浓度药液0.2 mL,

对照管加0.2 mL蒸馏水,25℃恒温箱中培养24 h后,用十字交叉法测量抑菌圈直径<sup>[2]</sup>。

### 1.4.2 盆栽试验

(1)保护作用的测定:先在盆栽作物(小麦品种为辉县红、黄瓜品种为农城三号)上喷供试药剂,24 h后在保湿条件下接种供试病原菌。每个处理4次重复,每重复为一盆,以清水为对照。7 d后按小麦白粉病或黄瓜霜霉病的分级标准进行病情调查。

(2)治疗作用的测定:先在保湿条件下接种供试病原菌,24 h后在植株上喷施供试药剂。每个处理4次重复,每重复为一盆,以清水为对照。7 d后按小麦白粉病或黄瓜霜霉病的分级标准进行病情调查。

## 2 结果与分析

### 2.1 抑菌活性

#### 2.1.1 对真菌菌丝生长和孢子萌发的抑制作用

生测结果表明,放线菌NO.24菌株的发酵液对7种供试植物病原菌的菌丝生长均有较高的抑制率。发酵液浓度为2 000 mg/L时除小麦赤霉菌外,抑制率都在80%以上,而对番茄灰霉病菌和玉米大斑病菌的菌丝生长的抑制作用尤为强烈,抑制作用达100%,其EC<sub>50</sub>分别为350.48 mg/L和240.13 mg/L。随着浓度的减小其抑制作用也随之降低,当浓度为250 mg/L时,相对抑制率均低于60%(表1)。生测结果还可看出,NO.24号菌株的发酵

表1 放线菌NO.24菌株发酵液对病菌菌丝生长的抑制作用

发酵液浓度 (mg/L)	相对抑制率(%)						
	玉米大斑 病菌	小麦赤霉 病菌	小麦根腐 病菌	烟草赤星 病菌	番茄早疫 病菌	马铃薯 干腐病菌	番茄灰霉 病菌
2 000	100.0	62.7	80.4	89.4	87.8	91.9	100.0
1 000	83.3	48.8	75.8	75.1	70.2	68.6	85.3
500	74.1	40.3	65.3	61.8	53.1	45.6	40.3
250	46.6	29.6	59.4	48.8	40.5	26.5	25.9

度为6 000 mg/L时对小麦白粉病菌的孢子萌发具有一定抑制活性,其中对玉米大斑病菌和马铃薯干腐病菌的孢子萌发抑制活性相对较高,2 000 mg/L浓度下的抑制率分别为85.6%和96.1%,其

EC<sub>50</sub>分别为155.01 mg/L和124.15 mg/L(表2)。

#### 2.1.2 盆栽试验结果

放线菌NO.24菌株的发酵液对小麦白粉病和黄瓜霜霉病均有较好的保护和治疗作用,发酵液浓

表2 放线菌NO.24菌株发酵液对病菌孢子萌发的抑制作用

发酵液浓度 (mg/L)	相对抑制率(%)				
	玉米大斑 病菌	烟草赤星 病菌	马铃薯 干腐病菌	黄瓜 霜霉病	番茄晚疫 病菌
2 000	85.6	58.9	96.1	66.4	72.3
1 000	79.3	32.3	93.6	50.7	64.6
500	66.4	20.4	73.3	32.9	52.2
250	60.4	9.9	57.2	28.4	34.7

度为 6 000 mg/L 时对小麦白粉病和黄瓜霜霉病的保护作用分别为 76.1% 和 63.9%；对小麦白粉病和黄瓜霜霉病的治疗作用分别为 70.8% 和 59.7%，对小麦白粉病的防治效果高于黄瓜霜霉病。在 1 500 mg/L 的低浓度下，对黄瓜霜霉病几乎没有作用。

**表 3 放线菌 NO.24 菌株发酵液对小麦白粉病和黄瓜霜霉病的保护作用**

发酵液浓度 (mg/L)	小麦白粉病		黄瓜霜霉病	
	病指	防效(%)	病指	防效(%)
6 000	18.9	76.1	13.8	63.9
3 000	27.7	64.9	17.6	54.1
1 500	53.9	31.8	27.9	27.3
CK	79.1	-	38.3	-

**表 4 放线菌 NO.24 菌株发酵液对小麦白粉病和黄瓜霜霉病的治疗作用**

发酵液浓度 (mg/L)	小麦白粉病		黄瓜霜霉病	
	病指	防效(%)	病指	防效(%)
6 000	23.1	70.8	15.4	59.7
3 000	34.4	56.4	24.1	37.3
1 500	55.2	30.1	35.8	6.5
CK	79.1	-	38.3	-

## 2.2 活性成分的分离

### 2.2.1 柱层析的分离结果

在 50 mm × 800 mm 的开口柱中装 200~300 目的硅胶，干法上柱。首先以 1 000 mL 的甲醇渗滤，再以 1 000 mL 的蒸馏水渗滤，即得甲醇滤液和水滤液。将两部分滤液分别稀释 10 倍和 50 倍对供试病原真菌进行生测。结果见表 5 和表 6 所示。

从表 5 中看出，放线菌 NO.24 发酵液甲醇洗脱液对 5 种供试病菌活性都很低，甚至没有活性，这说明发酵液中的活性物质在甲醇中可能不溶解。

由表 6 可以看出，水洗脱液对 5 种供试病菌菌丝的抑制作用较强，稀释 10 倍抑制率均为 100%；

**表 5 放线菌 NO.24 发酵液的柱层析甲醇洗脱液对供试病菌菌丝生长的抑制率<sup>1)</sup>**

供试病菌	抑制率(%)	
	10 倍菌液	50 倍菌液
番茄灰霉病菌	0	0
玉米大斑病菌	16.39	8.47
苹果轮纹病菌	23.55	5.20
小麦赤霉病菌	58.50	23.50
烟草赤星病菌	41.96	13.99

1) 表中 10 倍菌液相当于原始发酵液稀释 3 倍；50 倍菌液相当于原始发酵液稀释 15 倍。

**表 6 放线菌 NO.24 发酵液的柱层析水洗脱液对供试病菌菌丝生长的抑制率<sup>1)</sup>**

供试病原菌	抑制率(%)	
	10 倍菌液	50 倍菌液
番茄灰霉病菌	100	73.09
玉米大斑病菌	100	12.57
苹果轮纹病菌	100	96.94
小麦赤霉病菌	100	68.50
烟草赤星病菌	100	90.91

1) 10 倍菌液相当于原始发酵液稀释 3 倍；50 倍菌液相当于原始发酵液稀释 15 倍。

稀释 50 倍对苹果轮纹病菌和烟草赤星病菌的抑制作用分别为 96.94% 和 90.91%。这一结果提示了此活性物质易溶于水。

### 2.2.2 高效液相色谱分离结果

将发酵液硅胶柱的水洗脱液经脱盐作用后用 C-18 柱进行切割，得到 8 个馏分，以培养好的酵母菌为指示菌，采用管碟法活性追踪，结果见表 7。

**表 7 放线菌 NO.24 发酵液色谱制备组分对酵母菌的抑菌作用**

馏分	抑菌圈直径(cm)				
	a	b	c	d	平均值
1	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7
2	1.8	1.9	1.9	1.8	1.9
3	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
4	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
5	1.8	1.9	1.8	1.9	1.9
6	1.8	1.9	1.9	2.0	1.9
7	2.4	2.4	2.5	2.4	2.4
8	2.1	2.1	2.1	2.2	2.1

从表 7 可以看出，馏分 3 和 4 几乎没有杀菌活性，而馏分 1、2、5、6、7 和 8 均有杀菌活性，但以馏分 7 的杀菌活性最强，抑菌圈直径平均为 2.4 cm。这说明馏分 7 是放线菌 NO.24 菌株发酵液中的主要杀菌活性成分。

## 3 小结

试验结果表明，放线菌 NO.24 菌株发酵液对多种引致作物病害的病原菌均有很强的抑制作用。在离体条件下，采用抑制菌丝生长速率法和抑制孢子萌发法，NO.24 菌株发酵液对几种供试病原菌均有明显的抑制作用，说明其有广谱的抑菌活性，尤其是对玉米大斑病菌、番茄灰霉病菌和马铃薯干腐病菌；盆栽试验对小麦白粉病和黄瓜霜霉病菌也都有一定的保护和治疗作用，对小麦白粉病的防治效果优于黄瓜霜霉病，保护效果优于治疗效果。对

NO.24 菌株发酵产物进行粗分离, 其活性成分可能是水溶性的物质。对其抗生物质的进一步分离、提纯以及生理生化特性的研究正在进行之中, 从目前的研究状况来看, 放线菌 NO.24 菌株的次生代谢产物是一个很有发展前景的杀菌活性物质。

## 参考文献

[1] 安德荣 . 生物制药的原理和方法 – 抗生素的制备 [J]. 北京: 中国科学文化出版社, 2002.

- [2] 吴文君 . 植物化学保护实验技术导论 [M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1988, 43~173.
- [3] 黄昌华 . B-HCH 菌株的培养及代谢物的初步研究 [J]. 中国生物防治, 1996, 12(1): 11~14.
- [4] 慕立义, 吴文君, 王开运, 等 . 植物化学保护研究方法 [M]. 北京: 中国农业出版社 . 1991.
- [5] 方羽生 . 放线菌对 4 种病原真菌的拮抗作用初探 [J]. 中国生物防治, 2001, (5): 39~41.
- [6] 时春喜, 龙书生 . 菜病清杀菌谱及田间药效研究 [J]. 西北农业学报, 1998, (7)4: 28~31.