

## 抑制农业病害真菌的海洋微生物筛选及发酵工艺优化

曲均革, 吴慧梅, 陈雄剑 (浙江医药高等专科学校制药工程学院, 浙江宁波 315100)

**摘要** [目的] 从海洋中筛选对农业病害真菌有较强拮抗作用的海洋微生物。[方法] 以5种农业病害真菌为筛选模型, 采用平皿拮抗法对分离获得的菌株进行初步筛选, 对有活性的菌株再进行复筛, 并选择活性高的菌株进行发酵工艺优化。[结果] 初筛中有拮抗作用的海洋细菌有21株, 进行复筛后菌株MB133在稻瘟菌平板上抑菌效果最明显, 菌株MB025、MB026、MB133在油菜菌核病菌、辣椒炭疽病菌、番茄灰霉病菌平板上均存在抑菌效果。抑菌效果最明显的菌株MB133的优化发酵工艺: 最适装液量为12%, 最适接种量为2.0%, 最适培养基pH 7.0。[结论] 该研究为农用抗生素的推广和应用奠定了资源基础。

**关键词** 海洋细菌; 农业病害真菌; 筛选; 农用抗生素

中图分类号 Q938 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)15-0007-03

## Screening of Marine Microorganisms and Optimization of Fermentation Technology for Inhibiting the Agricultural Disease Fungi

QU Jun-ge, WU Hui-mei, CHEN Xiong-jian (Department of Pharmaceutical Engineering, Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo, Zhejiang 315100)

**Abstract** [Objective] The aim was to screen the marine microorganisms with strong antagonism to the agricultural disease fungi. [Method] Five kinds of agricultural disease fungi were selected as screening models, and the isolated strains were screened by Petri dish antagonism. The active strains were rescreened, and the strain with highest activity was selected to optimize the fermentation process. [Result] There were 21 strains of marine bacteria that had antagonistic effects in the initial screening. The bacteriostasis effect of MB133 strain on the plate of *Pyricularia oryzae* was most obvious after rescreening. The bacteriostasis effects of MB025, MB026 and MB133 strains on *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotrichum capsic* and *Botrytis cinerea* were also found. The optimum fermentation process of MB133 strain was as followed: the optimum liquid amount was 12%, and the optimum inoculation amount was 2.0%, the optimum medium was pH 7.0. [Conclusion] This research has laid the resource base for the popularization and application of agricultural antibiotics.

**Key words** Marine bacterium; Agricultural disease fungi; Strain screening; Agricultural antibiotics

农业是人类的生存之本, 农药是粮食和蔬果产量的重要保障。化学农药的使用是农业生产史上的一次重大变革, 为现代农业的发展做出了突出贡献。然而, 大规模使用化学农药, 在确保了粮食和蔬果产量提高的同时, 也给生态环境和人类健康带来了巨大威胁<sup>[1-4]</sup>。微生物农药具有选择性强、抗菌谱广、活性功能多样化及活性物质丰富、不易出现抗性、不污染环境以及对动植物安全等优点。由于海洋微生物所处的生态环境的独特性, 导致海洋生物体内新陈代谢过程与陆地生物不同, 可能产生许多结构新颖、作用特殊的活性物质。海洋微生物还具有生产周期短, 不受季节、地域和病虫害条件限制等多种优良性质<sup>[5-9]</sup>。我国既是一个农业大国, 也是一个海洋大国, 从海洋微生物资源中寻找具有特殊功能的活性物质应用于农业是一个较新的研究方向, 有着很强的创新性和巨大的应用潜力<sup>[10]</sup>。随着植物病原菌对已有农药的耐药性及新病害的出现, 要求人们不断开发新的农药。寻找新的微生物源农用活性先导化合物是农药创制的主要手段之一。笔者结合浙江的地域优势和资源特色, 从浙江海域的海洋微生物中开发了具有抗农业病害真菌特性的农用抗生素, 对推动具有浙江特色的海洋经济的快速发展具有十分重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试海洋细菌。待筛选的海洋细菌菌株为实验室中

从宁波洋沙山和象山海域分离纯化到的菌种资源。

1.1.2 供试病原菌。稻瘟病菌 (*Pyricularia oryzae*, ACCC 37631)、番茄灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*, ACCC 36028)、水稻纹枯病菌 (*Rhizoctonia solani*, ACCC 36246)、油菜菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*, ACCC 37700)、辣椒炭疽病菌 (*Colletotrichum capsic*, ACCC 37049) 均来源于中国农业微生物菌种保藏中心。

1.1.3 培养基。富集、活化、发酵培养采用 2216E 液体培养基, 病原真菌培养采用 PDA 培养基。

### 1.2 方法

1.2.1 农业病害菌的接种培养。取事先配制好的 PDA 培养板用于培养稻瘟病菌 (*Pyricularia oryzae*, ACCC 37631)、番茄灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*, ACCC 36028)、水稻纹枯病菌 (*Rhizoctonia solani*, ACCC 36246)、油菜菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*, ACCC 37700)、辣椒炭疽病菌 (*Colletotrichum capsic*, ACCC 37049) 5 种病害菌。将保藏好的 5 种病害菌的斜面培养基, 利用接种铲依次将 5 种病害菌接种至相应的平板正中间, 平板上做好相应的标记, 将接种后的所有培养板置于 25 °C 培养箱中培养 3 d。

1.2.2 活化分离得到的海洋细菌。取保藏的海洋细菌, 接种于 2216E 液体培养基 (25 mL/250 mL 锥形瓶) 中, 于 23 °C、150 r/min 恒温摇床培养 24 h。

1.2.3 离心取活化细菌的发酵产物。取 2 mL 活化后的海洋细菌菌悬液于离心管中, 4 °C、11 000 r/min 条件下冷冻离心 10 min, 取上清液。

1.2.4 抗农业病害真菌农用抗生素活性菌株筛选。初筛利用牛津杯法, 将活化细菌的离心发酵液与 5 种病害菌置于

PDA平板上对峙培养。在每块平板下方用记号笔划出6个相等的区域,每个区域标上相应的编号,每块接种6株海洋细菌发酵液。用镊子夹取牛津杯于酒精灯上灼烧后放于平板对应位置,用移液枪加入200  $\mu$ L菌液上清于对应平板分区的牛津杯中,每个处理3个重复。接种后的平板继续放在25  $^{\circ}$ C生化培养箱中培养观察,选出拮抗作用较为明显的菌株,进行复筛试验。

**1.2.5 抗农业病害真菌农用抗生素活性菌株的复筛。**采用初筛的方法,对初筛得到的具有抑菌活性的海洋细菌进行2~3次活性菌株复筛。在重复复筛过程中,加入空白对照,对照将200  $\mu$ L细菌发酵液替换为200  $\mu$ L无菌2216E培养基,其他条件和方法同“1.2.4”,排除试验中其他因素对试验结果的干扰。

**1.2.6 发酵条件的优化。**在250 mL三角瓶中进行液体发酵,将一定量菌液接种于2216E培养基中,23  $^{\circ}$ C、150 r/min条件下培养24 h。改变某一条件,并保持其他发酵条件不变,通过测量菌株的抑菌圈,研究装液量、接种量及pH对农业病害真菌抑菌效果的影响。

**1.2.6.1 装液量对抑菌效果的影响。**将菌株活化24 h的种子液,按2%的接种量,接种于装有25、30、35、40 mL发酵培养基的250 mL三角烧瓶中,在150 r/min、pH 7.5~7.8、23  $^{\circ}$ C条件下培养2 d,测定装液量对油菜菌核病菌抑菌效果的影响,确定最佳装液量。

**1.2.6.2 接种量对抑菌效果的影响。**分别按2%、4%、6%、8%、10%的接种量,将菌株接种于装有30 mL发酵培养基的250 mL三角烧瓶中,在150 r/min、pH 7.5~7.8、23  $^{\circ}$ C条件下培养2 d,测定接种量对油菜菌核病菌抑菌效果的影响,确定最佳接种量。

**1.2.6.3 pH对抑菌效果的影响。**将菌株活化24 h的种子液,按2%的接种量,分别接种于装有30 mL发酵培养基的250 mL三角烧瓶中,pH分别设5.0、6.0、7.0、8.0、9.0,在150 r/min、23  $^{\circ}$ C条件下培养2 d,测定pH对油菜菌核病菌抑菌效果的影响,确定最佳pH。

## 2 结果与分析

**2.1 海洋细菌菌株的初筛结果** 采用平皿拮抗法对99株海洋微生物菌进行农用抗真菌活性的初筛,该方法操作简便,能够直接观察到微生物之间的拮抗作用,从而筛选出活性菌株。

在初筛中观察到21株海洋细菌可能具有抑菌作用,供试菌对稻瘟病菌(*Pyricularia oryzae*, ACCC 37631)、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*, ACCC 36028)、水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*, ACCC 36246)、油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*, ACCC 37700)、辣椒炭疽病菌(*Colletotrichum capsic*, ACCC 37049)5种病害菌的试验结果见表1。

**2.2 具有抗菌活性菌株的复筛结果** 采用牛津杯法将初筛得到的21株活性海洋细菌进行进一步的抗菌试验,对活性菌株进行活性复筛,得到3株具有抑菌效果的海洋细菌,然后测定其抑菌圈直径。

表1 初筛具有抑菌活性的海洋细菌及对应的病害菌菌株

Table 1 The marine bacteria with antibacterial activity after original screening and their corresponding disease bacteria strains

序号 No.	病害菌 Disease bacteria	海洋细菌编号 Marine bacteria No.
1	稻瘟病菌( <i>Pyricularia oryzae</i> , ACCC 37631)	MB027、MB133
2	番茄灰霉病菌( <i>Botrytis cinerea</i> , ACCC 36028)	MB004、MB025、MB026、MB133
3	水稻纹枯病菌( <i>Rhizoctonia solani</i> , ACCC 36246)	MB025、MB230、MB271
4	辣椒炭疽病菌( <i>Colletotrichum capsic</i> , ACCC 37049)	MB021、MB025、MB026、MB027、MB056、MB057、MB089、MB104、MB105、MB133、MB334、MB376、MB386、MB389
5	油菜菌核病菌( <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , ACCC 37700)	MB021、MB025、MB026、MB087、MB103、MB133、MB386

由图1可知,菌株MB025、MB026、MB133对油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*, ACCC 37700)有明显的抑菌效果,同时形成3个抑菌圈,用直尺测定直径。由表2可知,菌株MB025、MB026、MB133对油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*, ACCC 37700)的抑菌圈 $\geq 17$  mm。

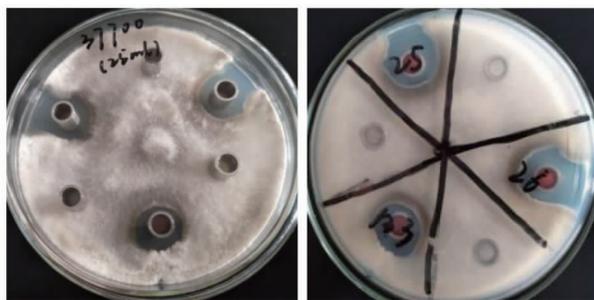


图1 菌株MB025、MB026、MB133对油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)的抑菌效果

Fig. 1 The antibacterial activity of strains MB025, MB026 and MB133 against *Sclerotinia sclerotiorum*

表2 3株拮抗菌对油菜菌核病菌的抑菌效果

Table 2 The antibacterial activity of three antagonistic bacteria strains against *Sclerotinia sclerotiorum* mm

菌株 Strain	菌落直径 Diameter of the colony	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter
MB025		17.60
MB026	7.40	18.05
MB133		17.00

由图2~4可知,菌株MB025、MB026和MB133对番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*, ACCC 36028)、辣椒炭疽病菌(*Colletotrichum capsic*, ACCC 37049)都具有抑菌效果,但其抑菌效果不明显,无法测量抑菌圈。MB133菌株对稻瘟病菌(*Pyricularia oryzae*, ACCC 37631)抑菌效果明显,其抑菌圈直径为18.20 mm。

**2.3 发酵条件优化** 采用牛津杯法对初筛得到的21株活

性海洋细菌进行复筛,发现菌株 MB133 的抑菌效果最明显,



图2 菌株 MB025、MB026、MB133 对番茄灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*) 的抑菌效果

Fig.2 The antibacterial activity of strains MB025, MB026 and MB133 against *Botrytis cinerea*

故将 MB133 菌株进行发酵条件优化。

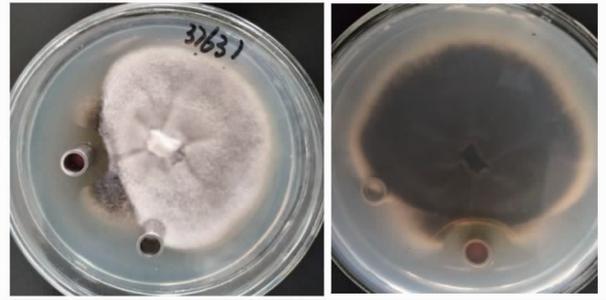


图3 菌株 MB133 对稻瘟病菌 (*Pyricularia oryzae*) 的抑菌效果

Fig.3 The antibacterial activity of strain MB133 against *Pyricularia oryzae*



图4 菌株 MB025、MB026、MB133 对辣椒炭疽病菌 (*Colletotrichum capsic*) 的抑菌效果

Fig.4 The antibacterial activity of strains MB025, MB026 and MB133 against *Colletotrichum capsic*

2.3.1 装液量对菌株抑菌作用的影响。装液量的多少会影响发酵液中的溶氧。由图5可知,12%的装液量抑菌效果最明显,抑菌圈直径为14.85 mm,以装液量30 mL为最佳装液量。

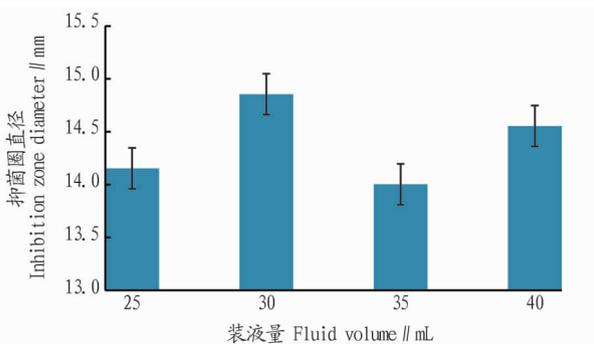


图5 装液量对菌株 MB133 抗油菜菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 抑菌效果的影响

Fig.5 Effect of fluid volume on the antibacterial activity of strain MB133 against *Sclerotinia sclerotiorum*

2.3.2 接种量对菌株抑菌作用的影响。接种量主要影响的是发酵周期,大量地接种种子发酵液会使菌体迅速进入对数生长期,缩短了延滞期,从而缩短了发酵周期。当接种量过大时,会使菌体提前衰退,降低细胞浓度,影响发酵水平。由图6可知,接种量为10%时,抑菌圈直径最大为15.85 mm,当接种量为2%时,抑菌圈直径为15.15 mm,以接种量2%为最佳接种量。

2.3.3 pH对菌株抑菌作用的影响。发酵培养基初始pH对微生物的生长的影响较大,pH可能会影响菌体的生长和代

谢产物的合成。由图7可知,初始pH在7.0时抑菌效果最好,抑菌直径为10.95 mm。

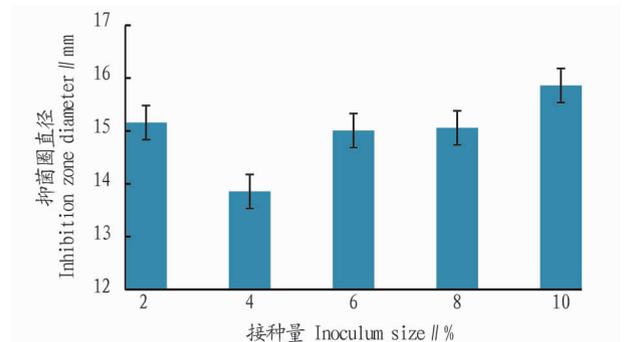


图6 接种量对菌株 MB133 抗油菜菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 抑菌效果的影响

Fig.6 Effect of inoculum size on the antibacterial activity of strain MB133 against *Sclerotinia sclerotiorum*

### 3 结论与讨论

在初筛试验过程中,共筛选到21株具有抑菌活性的海洋细菌。经过复筛试验,发现有3株海洋细菌具有较强抑菌活性,分别是编号为MB025、MB026、MB133的海洋细菌,它们在油菜菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*, ACCC37700) 平板上具有较明显的抑制作用,且菌株MB133对稻瘟病菌 (*Pyricularia oryzae*, ACCC 37631) 的抑菌效果最明显。这3株海洋细菌均在初筛和复筛平板上有较明显的抑菌圈,所以确定其具有抗菌活性。另外,通过发酵条件优化得出,菌株 (下转第33页)

- [J]. 茶叶通讯,2016,43(3):37-40.
- [10] 金莉莎. 茶对肠道功能调节作用的研究[D]. 长沙:湖南农业大学,2013.
- [11] 许靖逸,崔修丹,陈昌辉,等. 六大茶类对部分肠道致病菌抑菌效果的研究[J]. 食品工业科技,2013,34(16):140-142.
- [12] 王韵阳,张超英,闫志勇. 茶叶水浸液对部分肠道致病菌的抑菌作用[J]. 青岛大学医学院学报,2011,47(6):537-538.
- [13] 鲁晓晴,张超英,王斌. 茶叶水浸液对肠道致病菌抑菌作用的研究[J]. 中华医院感染学杂志,2009,19(5):532-533.
- [14] 刘志彬,蓝雪铭,倪莉. 武夷岩茶对大鼠肠道菌群的影响[C]//中国食品科学技术学会. 中国食品科学技术学会第十一届年会论文摘要集. 北京:中国食品科学技术学会,2014:2.
- [15] 吴香兰. 黑茶改善小鼠胃肠道功能的实验研究[D]. 长沙:湖南农业大学,2013.
- [16] 张娇蕊,周裔彬,耿照玉. 日粮中添加绿茶粉对白羽肉鸡肠道菌群的影响[J]. 山西农业大学学报(自然科学版),2015,35(4):426-429.
- [17] 衣喆,刘婷,陈然,等. 金花黑茶对 BALB/c 小鼠通便和调节肠道菌群的作用[J]. 食品科技,2016(6):61-66.
- [18] 李解,陈雪皎,郭承义,等. 雅安藏茶和低聚木糖复配物润肠通便作用[J]. 食品科学,2015,36(1):220-224.
- [19] 金莉莎,刘中华,黄建安,等. 大红袍与红茶对肠道菌群失衡的作用研究[J]. 食品与机械,2013(3):1-3,46.
- [20] 岳随娟,刘建,龚加顺. 普洱茶茶褐素对大鼠肠道菌群的影响[J]. 茶叶科学,2016,36(3):261-267.
- [21] 陈欣. 普洱茶茶褐素与 EGCG 在大鼠肠道菌群作用下代谢产物分析[D]. 合肥:安徽农业大学,2016.
- [22] ETXEBERRIA U, FERNÁNDEZ-QUINTELA A, MILAGRO F I, et al. Impact of polyphenols and polyphenol-rich dietary sources on gut microbiota composition[J]. Journal of agricultural and food chemistry,2013,61(40):9517-9533.
- [23] 董璐,代增英,韩晴,等. 茶多酚的抑菌作用研究进展[J]. 山东食品发酵,2014(3):42-44.
- [24] 王丽,许奇,徐顺,等. 茶多酚对微生物生长影响的研究进展[J]. 现代食品科技,2013,29(7):1737-1741.
- [25] ASFAR S, ABDEEN S, DASHTI H, et al. Effect of green tea in the prevention and reversal of fasting-induced intestinal mucosal damage[J]. Nutrition,2003,19(6):536-540.
- [26] VAN DUYNHOVEN J, VAUGHAN E, VAN DORSTEN F, et al. Interactions of black tea polyphenols with human gut microbiota: Implications for gut and cardiovascular health[J]. The American journal of clinical nutrition,2013,98:1631-1641.
- [27] KEMPERMAN R A, GROSS G, MONDOT S, et al. Impact of polyphenols from black tea and red wine/grape juice on a gut model microbiome[J]. Food research international,2013,53(2):659-669.
- [28] 张凯,关家伟,季煜,等. 茶多酚的提取及其对抗生素所致肠道菌群失衡的调整和调节作用[J]. 天然产物研究与开发,2014,26(10):1654-1658,1704.
- [29] 刘智伟,曾本华,张晓婧,等. 茶多酚饮食对 HFA 小鼠肠道菌群和脂肪代谢的影响[J]. 中国食品学报,2015(6):26-31.
- [30] 李桂花,曾本华,王玮,等. 茶多酚对 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠肠道菌群多样性的影响[J]. 中国微生物学杂志,2012,24(8):673-676.
- [31] 刘婷. 饲喂乳酸菌和茶多酚对肉鸡生理与肠道功能的影响[D]. 长沙:湖南农业大学,2014.
- [32] HARA H, ORITA N, HATANNO S, et al. Effect of tea polyphenols on fecal flora and fecal metabolic products of pigs[J]. J Vet Med Sci,1995,57(1):45-49.
- [33] TERADA A, HARA H, NAKAJYO S, et al. Effect of supplements of tea polyphenols on the caecal flora and caecal metabolites of chicks[J]. Microbial Ecol Health Dis,1993,6(1):3-9.
- [34] 张鑫,马丽苹,张芸,等. 茶叶儿茶素对肠道微生态的调节作用[J]. 食品科学,2013,34(5):232-237.
- [35] 葛艳. 夏秋绿茶中茶氨酸的提取分离纯化及对肠道微生态的影响[D]. 南京:南京农业大学,2013.
- [36] 郭虹雯,许翔雨,陈莹婕,等. 绿茶茶汤对肥胖相关肠道菌群的影响[J]. 茶叶科学,2016,36(4):354-362.
- [37] OKUBO T, ISHIHARA N, OURA A, et al. In vivo effects of tea polyphenol intake on human intestinal microflora and metabolism[J]. Bioscience, biotechnology, and biochemistry,1992,56(4):588-591.

(上接第9页)

MB133 培养的最适 pH 为 7.0,接种量为 2%,装液量为 12%。该研究为农用抗生素的推广和应用奠定了基础,后续试验将进行抑菌活性物质的分离、提取及鉴定。



图7 pH对菌株MB133抗油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)效果的影响

Fig.7 Effect of pH on the antibacterial activity of strain MB133 against *Sclerotinia sclerotiorum*

#### 参考文献

- [1] 邱德文. 生物农药的发展现状与趋势分析[J]. 中国生物防治学报,2015,31(5):679-684.
- [2] 包水明. 浅谈大量使用化学农药的负面效应及对策[J]. 生物学教学,2002,27(9):30-32.
- [3] WAN M T. Ecological risk of pesticide residues in the British Columbia environment:1973-2012[J]. Journal of environmental science and health part B: Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes,2013,48(5):344-363.
- [4] HOU B, WU L H. Safety impact and farmer awareness of pesticide residues[J]. Food and agricultural immunology,2010,21(3):191-200.
- [5] BERNAN V S, GREENSTEIN M, MAIESE W M. Marine microorganisms as a source of new natural products[J]. Advances in applied microbiology,1997,43(4):57-90.
- [6] DONIA M, HAMANN M T. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents[J]. The lancet infectious diseases,2003,3(6):338-348.
- [7] MAYER A M S, RODRÍGUEZ A D, BERLINCK R G S, et al. Marine pharmacology in 2007-8: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous system, and other miscellaneous mechanisms of action[J]. Comparative biochemistry and physiology part C: Toxicology & pharmacology,2011,153(2):191-222.
- [8] WATERS A L, HILL R T, PLACE A R, et al. The expanding role of marine microbes in pharmaceutical development[J]. Current opinion in biotechnology,2010,21(6):780-786.
- [9] 田黎,陈杰,何运转,等. 农用抗生素的新资源——海洋微生物[J]. 中国生物防治,2003,19(3):121-124.
- [10] 曲均革,姚晓敏,朱鹏,等. 产纤维素酶海洋细菌的筛选鉴定和产酶条件优化[J]. 上海海洋大学学报,2012,21(6):1053-1057.