

# 展青霉素产生菌拮抗放线菌的分离、筛选与初步鉴定<sup>\*</sup>

朱从会 师俊玲 杨保伟 令贞民 王 瑞

**【摘要】** 毒素产生菌在苹果贮藏期间容易产生展青霉素,为此,从苹果园、猕猴桃园、菜园的土壤中分离出 154 株放线菌,从中筛选出对 3 株展青霉素产生菌有拮抗作用的放线菌 4 株,复筛选得到抑菌效果最好的 1 株(C16),对展青霉的抑菌直径达 2.33 cm。通过形态观察、生理生化特征等方面的检测,初步鉴定该菌株属于放线菌目 (*Actinomycetales*) 第Ⅷ科小单胞菌科 (*Micromonosporaceae*) 第Ⅵ属小多胞菌属 (*Micropolyspora*)。

**关键词:** 苹果 展青霉素 拮抗放线菌 筛选 鉴定

**中图分类号:** Q939.92

**文献标识码:** A

## Isolation Screening and Identification of Antagonistic Actinomycetes Having Ability in Inhibiting Patulin-producing *Penicillium*

Zhu Conghui Shi Junling Yang Baowei Ling Zhenmin Wang Rui  
(Northwest A & F University)

### Abstract

In order to find out actinomycetes having ability in patulin-producing penicillium, 154 strains of actinomycetes having different colony characteristics were isolated from soils of apple orchard, kiwifruit orchard and vegetable orchard. After screening, 4 strains were selected for further screening because they had high ability in inhibiting the growth of 3 strains of patulin-producing penicillium on the agar medium. Strain C16 showed the highest inhibiting ability by producing 2.33 cm inhibitory diameter in agar plate tests. Based on the morphologic, physiological and biochemical characteristics, C16 was identified as the Order of *Actinomycetales*, the Family of *Micromonosporaceae*, and the Genus of *Micropolyspora*.

**Key words** Apple, Patulin, Antagonistic actinomycetes, Screening, Identification

### 引言

展青霉素 (Patulin, 简称 PAT) 是一种具有致癌、致畸、致突变作用的神经性真菌毒素<sup>[1~2]</sup>, 长期食用会导致人体免疫能力下降<sup>[3~4]</sup>。苹果汁中展青霉素的根本来源是毒素产生菌在苹果上的生长与产毒, 展青霉素产生菌侵染苹果主要发生在苹果贮藏期<sup>[5~7]</sup>。如果能在贮藏期抑制毒素产生菌的生长与产毒, 则可以根除展青霉素的污染。利用微生物

间的拮抗作用抑制展青霉素产生菌的生长与产毒具有环境友好、没有农药残留等优点。放线菌广泛存在于各种土壤中, 能够产生多种抑菌活性物质, 易于液体培养。目前, 对放线菌能否产生展青霉素产生菌抑制物的研究尚无报道。

为了获得抑制展青霉素产生菌生长的放线菌, 本文对苹果园、猕猴桃园、菜园土壤中的放线菌进行分离, 从中筛选出对展青霉毒产生菌有拮抗作用的菌种, 并对其种属进行初步鉴定。

收稿日期: 2007-08-13

<sup>\*</sup> 西北农林科技大学青年学术骨干支持计划资助项目(项目编号:2005-2008)

朱从会 西北农林科技大学食品科学与工程学院 硕士生, 712100 陕西省杨凌

师俊玲 西北农林科技大学食品科学与工程学院 副教授 博士 通讯作者

杨保伟 西北农林科技大学食品科学与工程学院 讲师 博士

令贞民 西北农林科技大学食品科学与工程学院 本科生

王 瑞 西北农林科技大学食品科学与工程学院 本科生

## 1 试验

### 1.1 材料与设备

#### 1.1.1 土壤样品

采自陕西杨凌地区苹果园、猕猴桃园、菜园。

#### 1.1.2 展青霉素产生菌

SP2201、SP2204、SP2205,从腐烂的苹果中分离得到,在苹果汁中培养7 d后,每千克果汁中展青霉素产量均在1 000 mg以上。

#### 1.1.3 培养基

分离用培养基:高氏一号培养基和重铬酸钾<sup>[8-9]</sup>( $0.6 \times 10^{-6} \sim 0.7 \times 10^{-6}$  g/L),pH值7.4。

放线菌固体培养基:高氏一号琼脂培养基。

展青霉素产生菌培养基:马铃薯蔗糖琼脂培养基(蔗糖20 g,琼脂粉15 g,马铃薯浸汁1 000 mL,pH值为6.8)。

放线菌液体培养基:液体马铃薯蔗糖培养基(蔗糖20 g,马铃薯浸汁1 000 mL,pH值为6.8)。

放线菌分类鉴定用培养基<sup>[10-11]</sup>:高氏一号琼脂培养基;察氏琼脂培养基;葡萄糖-天门冬素琼脂培养基;克氏一号琼脂培养基;马铃薯浸汁培养基;葡萄糖-酵母膏琼脂培养基。

#### 1.1.4 主要仪器与设备

SPX-300B-II型生化培养箱,PHS-3C型精密pH计,TGL-16C型高速离心机,ZHWY-2102型恒温培养振荡器,Autoclavo ES-315型高压灭菌锅,T-203型电子天平,赛福霉菌培养箱,SW-CJ-2FD型超净工作台,Motic BA400型数码成像光学显微镜,JSM-6360LV型电子扫描显微镜。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 分离、纯化及保藏

以重铬酸钾( $0.6 \times 10^{-6} \sim 0.7 \times 10^{-6}$  g/L)为抑菌剂<sup>[8-10]</sup>,采用稀释法分离,划线法进一步分离纯化。培养条件为28℃、7 d。纯化后的菌种分别接种到高氏一号斜面上,4℃保藏。

### 1.2.2 初筛

采用固体平板发酵培养的方法筛选<sup>[12]</sup>,即高氏一号培养放线菌7 d,打孔后反向放置于接种有展青霉素产生菌孢子(每皿 $1.6 \times 10^6 \sim 1.8 \times 10^6$ 个孢子)的平板中央,28℃条件霉菌培养箱中培养2~3 d后观察测量抑菌圈。试验过程均设3个重复。

### 1.2.3 复筛

将初筛所得放线菌菌株在28℃、180 r/min条件下液体振荡培养3 d,将培养物10 000 r/min离心10 min,将无菌滤纸片(0.45 cm)在离心所得上清液中浸泡3 min后,置于已用涂布法接种展青霉

素产生菌孢子(每皿 $1.6 \times 10^6 \sim 1.8 \times 10^6$ 个孢子)的PDA平板中央,28℃培养48 h后测量抑菌圈的直径。对照为浸有无菌水的滤纸片。试验设3个重复。

### 1.2.4 放线菌的分类鉴定

从菌落形态、显微特征、培养特性、生理生化特征等几个方面进行初步分类和鉴定<sup>[10-11,13]</sup>。每个试验设2个重复。

## 2 试验结果与分析

### 2.1 分离及初筛

从所采土样中共分离出放线菌154株,其中,50株来自苹果园,43株来自猕猴桃园,61株来自菜园。在这些放线菌中,对3株展青霉素均有明显拮抗作用的有4株,其中1株来自苹果园,3株来自菜(辣椒)园,编号分别为P50,C11,C16,C60。

### 2.2 复筛

对初筛所得4株放线菌进行液体培养,取其发酵液进行抑菌试验。结果发现4株放线菌的液体培养物对试验用3株展青霉素产生菌(SP2201、SP2204、SP2205)均有明显的拮抗作用(见表1),平均抑菌直径分别达到 $1.99 \pm 0.067$  cm、 $1.57 \pm 0.067$  cm、 $2.33 \pm 0.066$  cm、 $1.61 \pm 0.078$  cm。用SAS 8.0软件对各菌株抑菌效果间的差异进行方差分析和多重比较分析可见,4株放线菌对展青霉素产生菌的总体抑制作用存在显著差异,同一株放线菌对不同展青霉素产生菌的抑制作用也显著不同,见表2、3。菌株C16的抑菌效果最好;各拮抗菌对SP2205的抑制作用明显好于其他2株展青霉素产生菌。

表1 放线菌对展青霉素产生菌的抑菌直径

Tab.1 Ability of actinomycetes in inhibiting the growth of patulin-producing *penicillium* cm

放线菌 菌株	展青霉素产生菌菌株			平均值
	SP2201	SP2204	SP2205	
P50	$1.70 \pm 0.090$	$1.77 \pm 0.078$	$2.50 \pm 0.033$	$1.99 \pm 0.067$
C11	$1.38 \pm 0.056$	$1.27 \pm 0.056$	$2.07 \pm 0.089$	$1.57 \pm 0.067$
C16	$1.87 \pm 0.089$	$2.17 \pm 0.022$	$2.95 \pm 0.086$	$2.33 \pm 0.066$
C60	$1.62 \pm 0.078$	$1.57 \pm 0.078$	$1.65 \pm 0.080$	$1.61 \pm 0.078$
对照	$0.43 \pm 0.011$	$0.45 \pm 0.029$	$0.43 \pm 0.013$	$0.44 \pm 0.017$

### 2.3 放线菌 C16 的分类鉴定

#### 2.3.1 形态与培养特征

表4是该菌株在6种放线菌鉴定用培养基中的试验结果。可知,其在高氏一号培养基上生长最好,并有大量孢子产生;在葡萄糖-天门冬素琼脂、克氏一号、马铃薯浸汁培养基上生长良好,但是孢子产量

表2 不同菌株间拮抗作用的方差分析结果( $\alpha = 0.05$ )Tab.2 Analysis of variance for different stains in the inhibition ability ( $\alpha = 0.05$ )

来源	自由度	离均差平方和	均方	F 值	$P > F$
拮抗放线菌 A	4	18.245 5	4.561 4	395.25	<0.000 1
展青霉素产生菌 B	2	2.456 8	1.228 4	106.44	<0.000 1
A × B	8	1.728 3	0.216 0	18.72	<0.000 1
误差 e	24	0.276 9	0.011 5		
总变异	44	22.806 5			

注:  $C_V = 6.755, R^2 = 0.9879$ 。表3 不同菌株间拮抗作用的多重比较分析( $\alpha = 0.05$ )Tab.3 Duncan's multiple range test ( $\alpha = 0.05$ )

拮抗放线菌	平均抑菌直径/cm	差异显著性	展青霉素产生菌	平均抑菌直径/cm	差异显著性
C16	2.33	A	2 205	1.92	A
P50	1.99	B	2 204	1.45	B
C60	1.62	C	2 201	1.40	B
C11	1.57	C			
对照	0.44	D			

注:不同大写字母表示差异显著

表4 菌株 C16 的培养特征

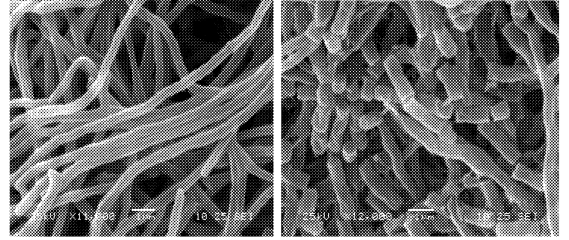
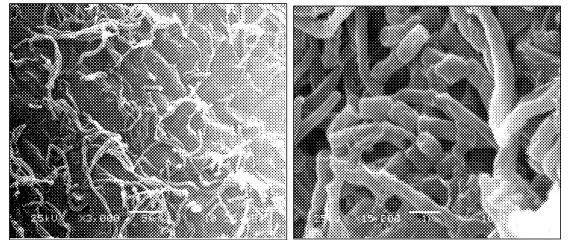
Tab.4 Characteristics of strain C16 on different mediums

培养基	气生菌丝生长	基内菌丝生长	颜色	可溶性色素	孢子产生情况
高氏一号琼脂	++++	+++	白色/中灰/淡橙黄	无	数量多
克氏一号琼脂	++	++	白/淡灰	无	数量一般
察氏琼脂	++	+	浅灰/淡橙黄	无	产孢子少
葡萄糖-天门冬素琼脂	++	++	白色/淡灰	无	数量不多
葡萄糖-酵母膏浸汁	++-	++-	淡橙黄	无	产孢子不明显
马铃薯浸汁	+++	+++	白/浅橙黄	无	数量较多

注:++++生长好;+++生长良好;++生长较好;+生长一般;+-生长不好。

有所差异;在察氏及葡萄糖酵母培养基上生长情况相对较弱。高氏一号培养基培养,菌株的气生菌丝生长伸展,基内菌丝生长相对比较密集,如图 1、2 所示。在所有培养基上,菌株的气生菌丝的颜色和形态均不同于基内菌丝。菌体在不同培养基上的菌丝颜色差异不大,且均没有可溶性色素产生。基内菌丝和气生菌丝均能产生孢子,但基内菌丝孢子的产生早于气生菌丝,颜色略深,孢子单个或是短链状,无孢子囊,孢子圆形或椭圆形,表面不光滑,有刺状

褶皱。参考相关放线菌鉴定手册,这些培养特征与小多胞菌属相似。

图1 C16 气生菌丝及孢子在高氏一号培养基上的形态  
Fig.1 Aerial mycelium and spore of C16 on Gause's 1 medium图2 C16 基内菌丝及孢子在高氏一号培养基上的形态  
Fig.2 Substrate mycelium and spores of C16 on Gause's 1 medium

### 2.3.2 生理生化特征

由表 5 可知,菌株 C16 号在明胶液化、淀粉水解、牛奶凝固及牛奶酪化中的培养特性均呈阳性,纤维素利用呈阴性,不产生硫化氢。碳源利用情况表明该菌株能利用多种碳源,能较好的利用果糖、木糖、甘露醇,相比较而言,对蔗糖、葡萄糖、肌醇及阿拉伯糖的利用相对较弱。

表5 菌株 C16 的生理生化特性

Tab.5 Phenotypic characteristics of strain C16

项目	特征	C16
生理生化特征	牛奶凝固	+
	牛奶酪化	+
	淀粉水解	+
	H <sub>2</sub> S 生成	-
	明胶水解	+
	纤维素利用	-
	碳源利用	葡萄糖
木糖		++
肌醇		+-
甘露醇		++
果糖		+++
阿拉伯糖		+-
蔗糖		+-
其它	生长温度	28℃ 良好, 45℃ 不生长
	需氧情况	好氧

注:+++生长良好;++生长较好;+生长一般;+-生长不好;-不生长。

综合其形态特性和生理生化特性,参考相关的放线菌鉴定手册,初步鉴定菌株 C16 为放线菌目

(*Actinomycetales*) 第 VIII 科小单胞菌科 (*Micromonosporaceae*), 再对照小单胞菌科 (*Micromonosporaceae*) 的各属检索表, 可定其为第 VI 属小多胞菌属 (*Micropolyspora*)<sup>[13~14]</sup>。

### 3 结束语

从苹果园和菜园土壤中分离得到 4 株对展青霉

素产生菌有显著抑制作用的放线菌。通过复筛, 菌株 C16 抑制效果最好, 其对 3 种展青霉素产生菌的平均抑菌直径达到  $2.33 \pm 0.066$  cm。对培养特性、生理生化特征等几个方面进行初步分类和鉴定结果表明, 其为放线菌目 (*Actinomycetales*) 小单胞菌科 (*Micromonosporaceae*) 小多胞菌属 (*Micropolyspora*)。

### 参 考 文 献

- 1 贺玉梅, 贾珍珍, 齐祖桐. 展青霉素产生菌产毒性能研究[J]. 中国卫生检疫杂志, 2001, 11(3): 302~303.
- 2 Mahfoud R, Maresca M. The mycotoxin patulin alter the barrier function of the intestinal epithelium; mechanism action of the toxin and protective effects of glutathione[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2002, 181(3): 209~218.
- 3 Paucod J C, Krivobok S, Vidal D. Immunotoxicity testing of mycotoxins T-2 and patulin on Balb/C mice[J]. Acta Microbiologica Hungarica, 1990, 37(4): 331~339.
- 4 Sharma R P. Immunotoxicity of mycotoxins[J]. Journal of Dairy Science, 1993, 76(3): 892~897.
- 5 张小平, 李元瑞. 苹果汁中棒曲霉素控制技术进展[J]. 中国农业科学, 2004, 37(11): 1672~1676.
- 6 Vural Gokmen, Nevzat Artik, Jale Acar, et al. Effects of various clarification treatments on patulin, phenolic compound and organic acid composition of apple juice [J]. European Food Research and Technology, 2001, 213: 194~199.
- 7 耿建暖, 仇农学. 果汁中农药残留和棒曲霉素及其去除方法的研究进展[J]. 饮料工业, 2004, 7(1): 12~15.
- 8 刘志恒, 姜成林. 放线菌现代生物学与生物技术[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 242~250.
- 9 安德荣, 幕小情, 赵文军. 土壤放线菌分离中抑菌剂的应用研究[J]. 西北农业学报, 2002, 11(1): 106~108.
- 10 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 164~194.
- 11 阎逊初. 放线菌分类和鉴定[M]. 北京: 科学出版社, 1992.
- 12 张致平. 微生物药理学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 10~16.
- 13 Buchanan R E. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 8版. 北京: 科学出版社, 1984.
- 14 Lechevalier A, Solotorovsky M. A new genus of the *Actinomycetales*: *Micropolyspora* gen. nov.[J]. Journal of General Microbiology, 1961, 26(1): 11~18.

(上接第 48 页)

### 参 考 文 献

- 1 陈昌春. 灌区农业节水与土地可持续利用研究[J]. 干旱地区农业研究, 2004, 22(4): 135~142.
- 2 西北农业科技大学. 一种集水覆膜点穴施灌播种机: 中国专利, ZL200510041897.3[P]. 2007-12-05.
- 3 山东省农业科学院. 中国玉米栽培学[M]. 上海: 上海科技出版社, 1986.
- 4 高昌珍, 郑德聪, 张文焕, 等. 施水播种条件下土壤灌溉水入渗模型研究[J]. 干旱地区农业研究, 2005, 35(2): 48~50.
- 5 朱瑞祥, 张秀琴, 薛少平, 等. 对玉米施水硬茬播种机的试验研究[J]. 西北农业大学学报, 2000, 6(3): 57~60.
- 6 孙骊, 吕新民. 旱地节水型播种机施水问题研究[J]. 干旱地区农业研究, 1997(2): 94~98.
- 7 陈礼德, 鄂卓茂, 王继成, 等. 2BSL-1 型垄作施水播种机的开发研究[J]. 中国农业大学学报, 2000, 5(6): 43~46.
- 8 Yang C. A variable rate applicator for controlling rates of two liquid fertilizers[J]. Applied Engineering in Agriculture, 2001, 17(3): 409~417.
- 9 张书慧, 马成林. 精确农业自动变量施肥机控制系统设计与实现[J]. 农业工程学报, 2004, 20(1): 113~116.
- 10 杨青, 庞树杰, 李勇军, 等. 基于 GPS 和 GIS 的变量施水控制系统设计[J]. 农业机械学报, 2006, 37(12): 126~129.
- 11 任文涛, 黄毅, 杨懿, 等. 玉米精量施水播种机的研制[J]. 沈阳农业大学学报, 2005, 36(1): 71~74.