

变棕溶杆菌OH23次生代谢产物抗菌活性的分析 及其发酵培养基优化

朱润杰^{1,2}, 赵延存², 凌军², 宋志伟², 赵杨扬², 薛雪¹, 刘凤权^{1,2*}

(1. 南京农业大学植物保护学院, 南京 210095; 2. 江苏省农业科学院植物保护研究所, 南京 210014)

摘要: 本研究通过对变棕溶杆菌 *Lysobacter brunescens* OH23 菌株发酵产物的拮抗谱进行检测, 发现其发酵产物对黄单胞属植物病原细菌具有特异拮抗活性, 并且对水稻黄单胞菌不同菌株的拮抗活性存在差异。本研究进一步对 OH23 次生抗菌物质稳定性进行了分析, 发现 OH23 产生的次生抗菌物质对高温、紫外光照、蛋白酶、非强碱性环境均表现稳定, 但在强碱性环境 (pH 11.0) 下拮抗活性丧失。最后, 采用单因素试验和正交试验设计对 OH23 发酵培养基组分进行了优化, 最终确定 OH23 高产次生抗菌物质的培养基配方为高聚蛋白胨 5 g/L、酵母粉 5 g/L、可溶性淀粉 6 g/L、FeSO₄·7H₂O 15 mg/L、ZnSO₄·7H₂O 5 mg/L。

关键词: 变棕溶杆菌; 水稻黄单胞菌; 次生代谢产物; 抗菌活性; 培养基优化

中图分类号: S476 文献标识码: A 文章编号: 1005-9261(2019)03-0426-11

Study on the Antibacterial Activity of Secondary Metabolites from *Lysobacter brunescens* OH23 and Optimization of Fermentation Medium

ZHU Runjie^{1,2}, ZHAO Yancun², LING Jun², SONG Zhiwei², ZHAO Yangyang², XUE Xue¹, LIU Fengquan^{1,2*}

(1. College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: In this study, the antimicrobial spectrum of secondary metabolites of *Lysobacter brunescens* OH23 was tested. The results showed that OH23 was a potential biocontrol strain with specific activity against *Xanthomonas* sp. At the same time, the secondary metabolites of OH23 showed different antagonistic activity against different strains of *Xanthomonas oryzae*. Stability test indicated that the active secondary metabolites were stable with high temperature, ultraviolet light, protease and non-strong alkaline environment. However, the antagonistic activity almost completely lost under strong alkaline conditions (pH=11.0). Single factor test and orthogonal design were used to screen and optimize the carbon source, nitrogen source and metal ion of OH23 fermentation medium. The final formulation for high yield of active secondary metabolites included high polypeptone at 5 g/L, yeast powder at 5 g/L, soluble starch at 6 g/L, FeSO₄·7H₂O at 15 mg/L and ZnSO₄·7H₂O at 5 mg/L.

Key words: *Lysobacter brunescens*; *Xanthomonas oryzae*; secondary metabolites; antibacterial activity; medium optimization

溶杆菌 *Lysobacter* 由 Christensen 和 Cook 在 1978 年建立分类, 包括 4 个种, 分别为产酶溶杆菌 *L. enzymogenes*、抗生素溶杆菌 *L. antibioticus*、变棕溶杆菌 *L. brunescens* 和胶状溶杆菌 *L. gummosus*, 并建立

收稿日期: 2018-10-10

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金 (CX-16-1049); 中国博士后面上项目 (2017M610310)

作者简介: 朱润杰, 硕士研究生, E-mail: zhurunjie1994@163.com; *通信作者, 博士, 研究员, E-mail: fqliu20011@sina.com。

DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2019.03.009

了新的家族 *Lysobacteraceae*, 属于黄单胞科 *Xanthomonadaceae*, γ -变形菌门。溶杆菌的重要特征包括具有滑行性、高 (G+C) % 含量 (65%~70%), 无鞭毛、捕食微生物等^[1]。

溶杆菌属细菌具有溶解或抑制其他多种植物病原微生物的能力, 有研究表明产酶溶杆菌 3.1T8 对瓜果腐霉 *Pythium aphanidermatum* 引起的黄瓜病害具有防治作用^[2,3]; 产酶溶杆菌 C3 可以有效防治由立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani* 引起的草坪草褐斑病^[4]; 抗生素溶杆菌 HS124 能够抑制辣椒疫病的发生^[5]。溶杆菌的这种活性除了归功于多种胞外酶的分泌外^[6], 更主要是因为其能够产生多种次生抗菌物质。如, 产酶溶杆菌 OH11 产生广谱抗真菌物质 HSAF (heat stable antifungal factor) 及抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (anti-MRSA) 的物质 WAP8294A2^[3,7]; 抗生素溶杆菌 OH13 产生一种具有广谱抗菌活性的物质 myxin^[8]; 辣椒溶杆菌 *L. capsici* AZ78 产生的 2,5-二酮哌嗪对马铃薯晚疫病菌 *Phytophthora infestans* 和霜霉病菌 *Plasmopara viticola* 具有较高的拮抗活性^[9]; 溶杆菌 ATCC53042 产生对多种病原细菌都有很强拮抗活性的环羧酸肽类产物 Lysobactin (katanosin B)^[10,11]; 溶杆菌 BMK333-48F3 产生多种环肽类化合物 Tripropeptin, 其中酰基侧链最长的 Tripropeptin C 对于革兰氏阳性细菌的拮抗活性最强^[12-14]。

溶杆菌是一类有待于开发的新型生防细菌, 目前关于溶杆菌的报道主要集中于产酶溶杆菌、抗生素溶杆菌和辣椒溶杆菌, 而对于变棕溶杆菌的研究还很少。变棕溶杆菌于 1978 年首次被报道分类后, 仅 Sangnoi 等^[15]从淡水中分离得到一株变棕溶杆菌 RPD027, 发现其对霍乱弧菌 *Vibrio cholerae*、大肠杆菌 *Escherichia coli*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 等 7 种致病菌均无拮抗活性。因此, 我们对变棕溶杆菌的研究有利于丰富溶杆菌资源信息, 进一步为新型生防细菌的开发提供基础。变棕溶杆菌 OH23 是本实验室从作物根际土壤分离得到的一株具有抗菌活性的菌株, 为了明确其抗菌谱和开发应用潜力, 进行了本研究, 发现其发酵产物对植物病原黄单胞菌具有特异拮抗活性, 并且对高温、紫外光照、蛋白酶和非强碱环境表现高度稳定性, 最后优化了高产次生抗菌物质的发酵培养基, 为后续变棕溶杆菌活性代谢产物的分离鉴定以及其生防应用提供了试验和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 变棕溶杆菌 OH23, 水稻细菌性条斑病菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* 菌株 AH、JS、Strong、Weak 和 Moderate, 水稻白叶枯病菌 *X. oryzae* pv. *oryzae* 菌株 GD401、GD414、JL33、YN1 和 YN24, 上述菌株均由本实验室分离、鉴定和保存。乳酸乳球菌 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 菌株 SLPE1-3、野油菜黄单胞菌野油菜致病变种 *X. campestris* pv. *campestris*、地毯草黄单胞菌大豆致病变种 *X. axonopodis* pv. *glycines*、西瓜嗜酸菌 *Acidovorax citrulli*、丁香假单胞菌黄瓜致病变种甜瓜株系 *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*、金黄色葡萄球菌、梨火疫病菌 *Erwinia amylovora*、大豆细菌性斑疹病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*、大肠杆菌菌株 Top10 等病原菌菌株均由本实验室收集保存。

1.1.2 培养基 基础培养基: 胰蛋白胨 5 g/L、蔗糖 10 g/L。NB 液体培养基: 牛肉膏 3 g/L、胰蛋白胨 10 g/L、蔗糖 10 g/L、酵母粉 1 g/L。LB 液体培养基: 胰蛋白 10 g/L、酵母粉 5 g/L、NaCl 10 g/L。MRS 液体培养基: 蛋白胨 10 g/L、牛肉膏 10 g/L、酵母粉 5 g/L、葡萄糖 20 g/L、柠檬酸氢二氨 2 g/L、乙酸钠 5 g/L、吐温-80 1 mL/L、K₂HPO₄ 5 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.58 g/L、MnSO₄·H₂O 0.25 g/L。固体培养基在液体培养基配方基础上添加 16 g/L 琼脂粉。

1.2 种子菌培养

1.2.1 乳酸乳球菌种子菌培养 将乳酸乳球菌 SLPE1-3 甘油菌在 MRS 固体平板上划线活化, 28 °C 培养 36 h。取单菌落接种至 50 mL MRS 液体培养基中, 28 °C 静置培养至 OD₆₀₀=1.0 备用。

1.2.2 大肠杆菌 Top10 种子菌培养 将大肠杆菌菌株 Top10 甘油菌在 LB 固体平板上划线活化, 37 °C 培养 36 h。取单菌落接种至 50 mL LB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 培养至 OD₆₀₀=1.0 备用。

1.2.3 其他菌株种子菌培养 将变棕溶杆菌 OH23、水稻细菌性条斑病菌菌株 (Rs105、AH、JS、Strong Weak、Moderate)、水稻白叶枯病菌菌株 (PXO99^A、D401、GD414、JL33、YN1、YN24)、野油菜黄单胞菌野油菜致病变种、地毯草黄单胞菌大豆致病变种、西瓜嗜酸菌、丁香假单胞菌黄瓜致病变种甜瓜株系、

金黄色葡萄球菌、梨火疫病菌、大豆细菌性斑疹病菌甘油菌分别在 NA 固体平板上划线活化，待长出单菌落，取单菌落接种至 50 mL NB 液体培养基中，28 °C、180 r/min 培养至 $OD_{600}=1.0$ 备用。

1.3 拮抗活性测定

1.3.1 OH23 无菌发酵液的制备 将 OH23 种子液按 2% (v/v) 接种至 50 mL 优化培养基中，28 °C、180 r/min 培养 48 h，6000 r/min 离心 15 min，利用 0.22 μ m 细菌过滤器过滤上清液，保存于 -80 °C 备用。

1.3.2 OH23 无菌发酵液抗菌谱及对水稻黄单胞菌不同菌株拮抗活性测定 分别取 1.2 中制备的病原菌种子菌 300 μ L，加入到 100 mL NA 固体培养基中，迅速混匀倒平板备用。用直径 6 mm 的打孔器在培养基上打孔，并将制备好的 30 μ L OH23 无菌发酵液注入孔中，以等体积的 NB 培养基和 200 μ g/mL 硫酸链霉素作对照，28 °C 培养 48 h，测量抑菌圈半径。OH23 无菌发酵液对大肠杆菌 Top10 的拮抗活性检测方法，需要将上述的 NA 固体培养基换为 LB 固体培养基，其余方法不变。次生抗菌物质稳定性分析及培养基优化试验均选取水稻细菌性条斑病菌 Rs105 作为指示菌。

1.4 次生抗菌物质稳定性分析

1.4.1 热稳定性 取 OH23 无菌发酵液 1 mL 于 1.5 mL EP 管，分别以 30 °C 30 min、50 °C 30 min、65 °C 30 min、85 °C 30 min、100 °C 30 min、100 °C 5 min 水浴处理，以未处理作对照。分别检测抑菌活性，试验设置 3 个重复。

1.4.2 pH 稳定性 取 OH23 无菌发酵液 5 mL 于 15 mL 离心管，分别调 pH 至 3.0、5.0、7.0、9.0、11.0，另有 1 管不处理作为对照，室温放置 1 h 后，将发酵液的 pH 均调为 7，用 0.22 μ m 细菌过滤器过滤。分别检测抑菌活性，试验设置 3 个重复。

1.4.3 紫外稳定性 取 2 个无菌培养皿，分别加入 15 mL 的 OH23 无菌发酵液，一份打开皿盖置于超净工作台 25 W 紫外灯下 60 cm 处，垂直向下照射处理 1 h；以未紫外照射无菌发酵液作为对照。分别检测抑菌活性，试验设置 3 个重复。

1.4.4 蛋白酶稳定性 取 OH23 无菌发酵液 1 mL 于 1.5 mL EP 管，分别用终浓度为 100 μ g/mL 的蛋白酶 K、胃蛋白酶和胰蛋白酶处理，并设置 1 管加水作对照，37 °C 处理 6 h。分别检测抑菌活性，试验设置 3 个重复。

1.5 培养基优化单因素试验

1.5.1 碳源筛选 分别以可溶性淀粉 10 g/L、玉米粉 10 g/L、蔗糖 6 g/L、麦芽糖 6 g/L、果糖 6 g/L、葡萄糖 6 g/L 替换基础培养基中的蔗糖，其他成分不变，将培养基 pH 均调为 7.0，然后 121 °C 灭菌 20 min。按照 2% (v/v) 接种 OH23 种子菌，在 180 r/min、28 °C 条件下培养，并分别于 24、36 和 48 h 测量 OD_{600} 值和检测无菌发酵液抑菌活性，每个处理 3 个重复。

1.5.2 氮源筛选 分别以高聚蛋白胨 8 g/L、 $(NH_4)_2SO_4$ 2 g/L、L-谷氨酸 2 g/L、 NH_4Cl 5 g/L、牛肉膏 5 g/L、酵母粉 5 g/L、豆粉 5 g/L、蛋白胨 5 g/L 替换基础培养基中的氮源胰蛋白胨，其他条件同上。每个处理 3 个重复。

1.5.3 金属离子筛选 分别配制含有终浓度 25 mg/L 的 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $CuSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $MnSO_4 \cdot H_2O$ ，0.5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $CaCl_2$ ，1 g/L KH_2PO_4 、NaCl 以及微量元素（包含 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.14 mg/L、 $CuSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.16 mg/L、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.15 mg/L、 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 5 mg/L）的基础培养基，以不添加金属离子的基础培养基作为对照，其他条件同上。每个处理 3 个重复。

1.6 培养基优化正交试验设计

以可溶性淀粉作为碳源，以酵母粉和高聚蛋白胨作为氮源，以 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 作为金属离子。采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行 5 因素 4 水平正交试验，共 16 个试验组合处理，试验因素水平设置见表 1。培养条件同上，每个处理 3 个重复。

2 结果与分析

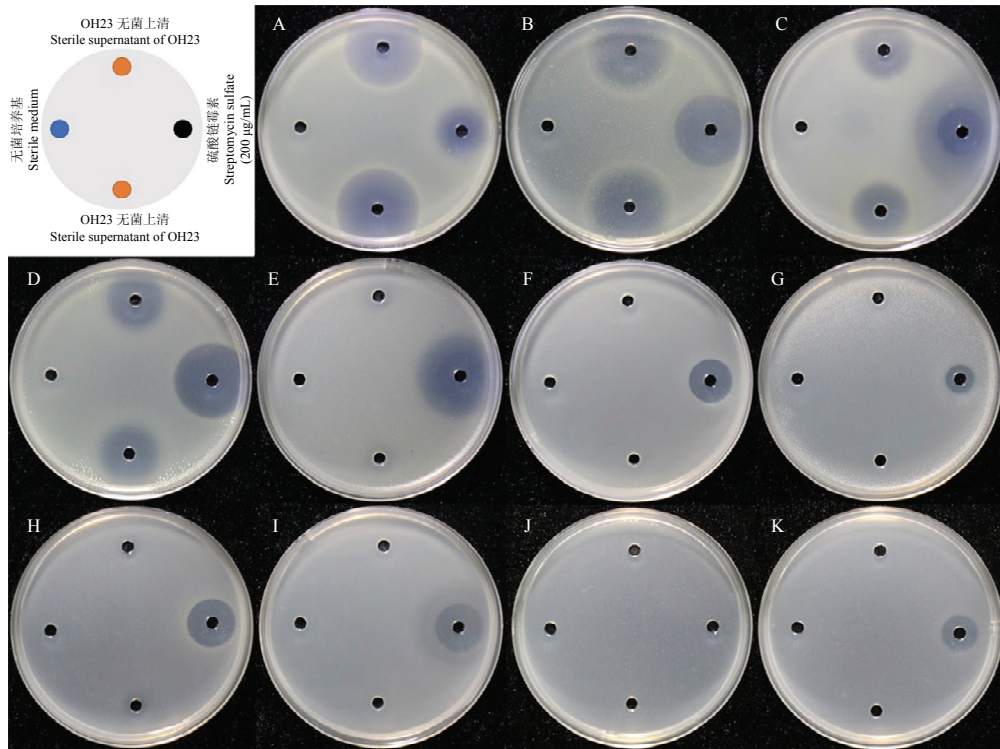
2.1 变棕溶杆菌 OH23 发酵产物拮抗谱

从图 1 可以看出，变棕溶杆菌 OH23 培养 48 h 的无菌发酵液对野油菜黄单胞菌致病变种、水稻白叶枯

表 1 变棕溶杆菌 OH23 发酵培养基优化正交试验设计因素水平

Table 1 The factors and levels of orthogonal experimental design for medium optimization of strain OH23

水平/因素 Level/factor	1	2	3	4
Hipolypepton	2	3	4	5
酵母粉 Yeast extract	2	3	4	5
可溶性淀粉 Soluble starch	6	8	10	12
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5	15	25	40
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	5	15	25	40



A: *X. oryzae* pv. *oryzicola* Rs105; B: *X. axonopodis* pv. *glycines*; C: *X. oryzae* pv. *oryzae* PXO99^A; D: *X. campestris* pv. *campestris*; E: *A. citrulli*; F: *Erwinia amylovora*; G: *P. syringae* pv. *lachrymans*; H: *S. aureus*; I: *P. syringae* pv. *glycinea*; J: *E. coli*; K: *L. lactis* subsp. *lactis* SLPE1-3

注：图上不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。

Note: Data with the different lowercase letters indicated significant difference at 0.05 level.

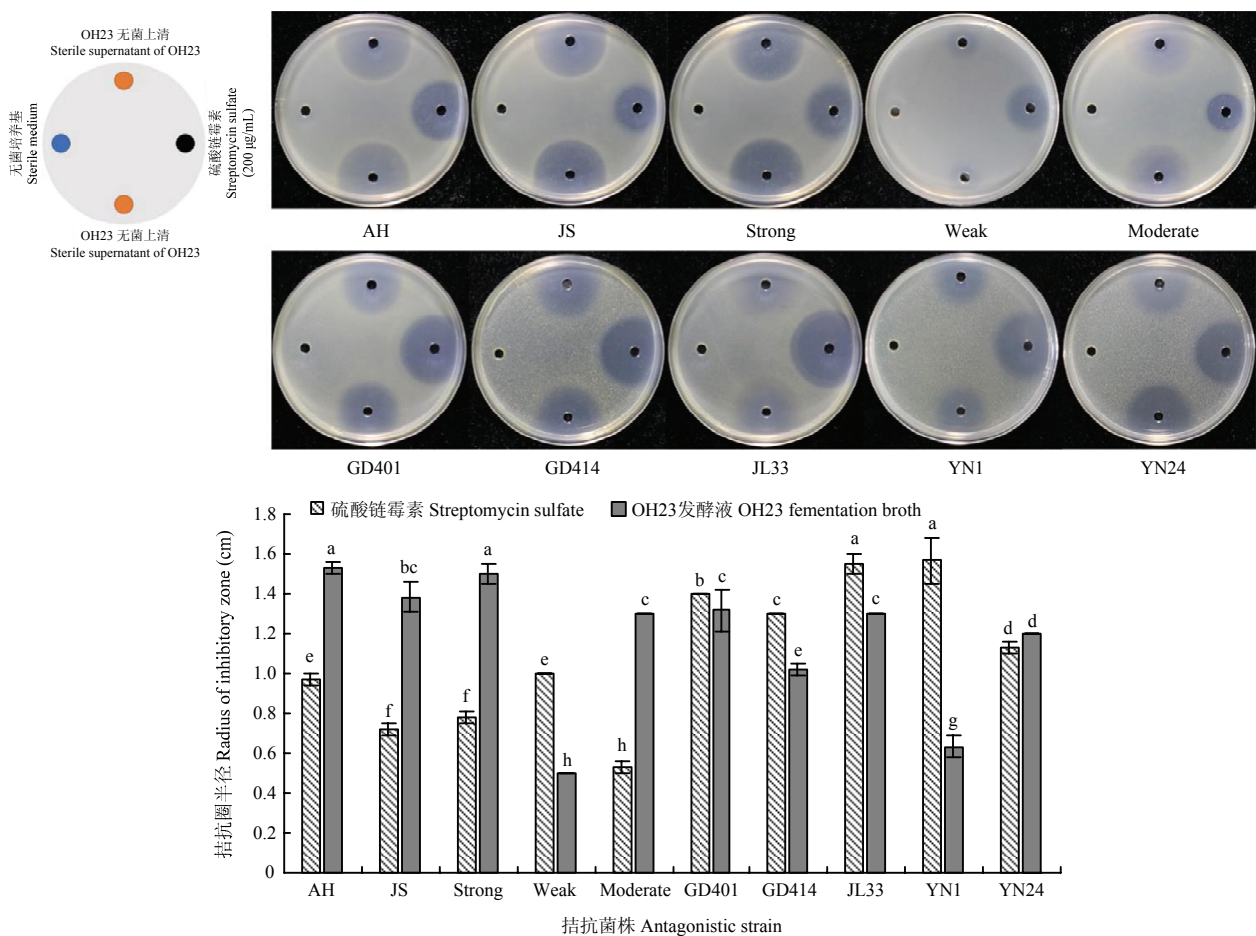
图 1 变棕溶杆菌 OH23 无菌发酵液对 11 种病原细菌的拮抗性检测

Fig. 1 Determination of antibacterial activity of OH23 fermentation broth against pathogenic bacteria

病菌 PXO99^A 菌株、水稻细菌性条斑病菌 Rs105、地毯草黄单胞菌大豆致病变种具有明显的拮抗活性。而对西瓜嗜酸菌、丁香假单胞菌黄瓜致病变种甜瓜株系、金黄色葡萄球菌、梨火疫病病菌、大豆细菌性斑疹病菌、大肠杆菌以及乳酸乳球菌没有拮抗活性，表明变棕溶杆菌 OH23 能产生对植物病原黄单胞菌具有特异拮抗活性的次生代谢产物。此外，试验以 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硫酸链霉素作为对照，从拮抗圈大小可以看出，变棕溶杆菌 OH23 48 h 无菌发酵液对水稻细菌性条斑病菌、水稻白叶枯病菌和地毯草黄单胞菌大豆致病变种的拮抗活性要显著强于 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硫酸链霉素 ($P < 0.05$)，这也说明变棕溶杆菌 OH23 具有较大的生防应用潜力。

2.2 变棕溶杆菌 OH23 发酵产物对水稻黄单胞菌不同菌株的拮抗活性

OH23 48 h 无菌发酵液和 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硫酸链霉素对 10 株水稻黄单胞菌均有拮抗活性，但是两者对不同水稻黄单胞菌的拮抗活性存在明显的差异，OH23 无菌发酵液对水稻细菌性条斑病菌菌株 AH、JS、Strong 和 Moderate 的拮抗活性均显著强于 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硫酸链霉素 ($P < 0.05$)，OH23 无菌发酵液对于水稻白叶枯病菌菌株 GD401、GD414、JL33 和 YN1 的拮抗活性均显著弱于 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硫酸链霉素 ($P < 0.05$)，这也表明变棕溶杆菌 OH23 对水稻细菌性条斑病菌的拮抗效果要强于水稻白叶枯病菌 (图 2)。



注：图上不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。下同。

Note: Data with the different lowercase letters indicated significant difference at 0.05 level. The same below.

图 2 变棕溶杆菌 OH23 对 10 株水稻黄单胞菌的拮抗活性检测

Fig. 2 Determination of antibacterial activity of OH23 fermentation broth against ten strains of *X. oryzae*

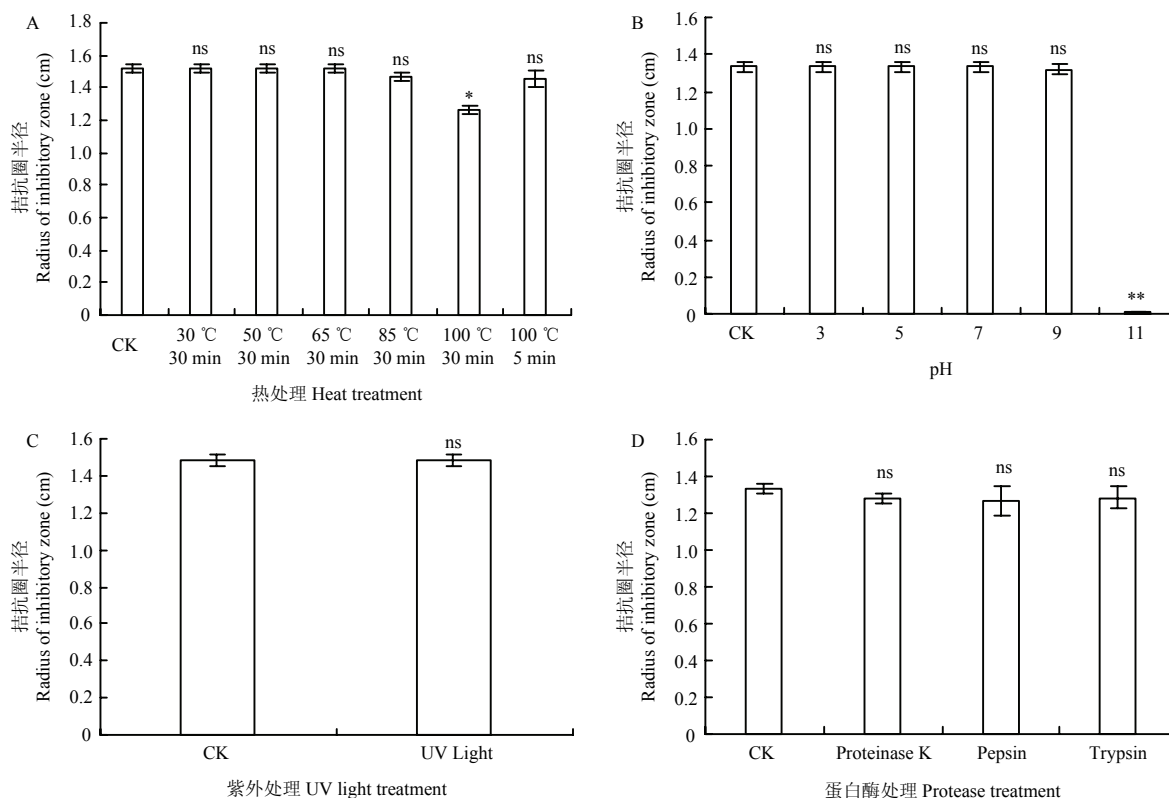
2.3 变棕溶杆菌 OH23 次生抗菌物质的稳定性

各温度处理对 OH23 无菌发酵液的抑菌活性没有显著差异 ($P > 0.05$)，100 $^{\circ}\text{C}$ 处理 30 min 后，拮抗圈半径下降了 13.61% ($P < 0.001$)。整体上看，OH23 产生的次生抗菌物质的热稳定性较好 (图 3A)。

OH23 无菌发酵液在经过 pH 3.0、pH 5.0、pH 7.0、pH 9.0 处理后, OH23 无菌发酵液的抑菌活性依旧稳定; 但在 pH 11.0 的强碱性条件下, OH23 无菌发酵液的抑菌活性几乎完全丧失。结果表明 OH23 产生的次生抗菌物质在非强碱条件下是稳定的, 但在强碱条件下不稳定 (图 3B)。

经过紫外照射处理的 OH23 无菌发酵液和未经紫外照射处理的 OH23 无菌发酵液的抑菌活性没有显著差异 ($P>0.05$), 说明 OH23 产生的次生抗菌物质对紫外光稳定, 能够抵御大田环境中的紫外光照射 (图 3C)。

经过蛋白酶 K、胃蛋白酶和胰蛋白酶处理的 OH23 无菌发酵液和未经蛋白酶处理的 OH23 无菌发酵液的抑菌活性差异不显著 ($P>0.05$), 说明 OH23 产生的次生抗菌物质对蛋白酶稳定。同时, 推测 OH23 产生的次生抗菌物质可能不是蛋白类物质 (图 3D)。



注: ns 代表处理与对照间无显著差异, *和**分别代表在 0.05 和 0.01 水平差异显著。

Note: ns indicated no significant difference between treatment and CK. * and ** indicated significant difference between treatment and CK at 0.05 and 0.01 level, respectively.

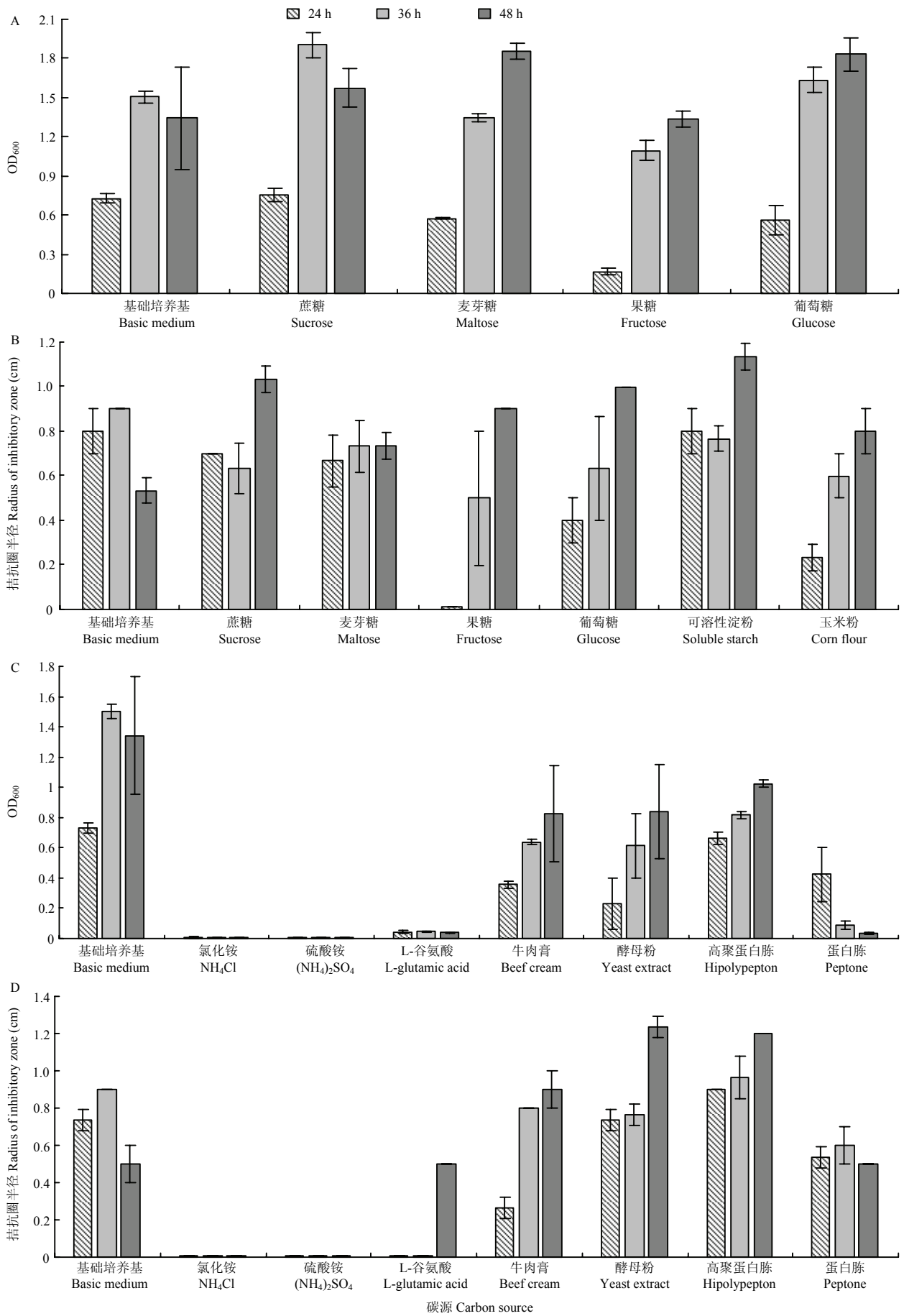
图3 温度 (A)、pH (B)、紫外光 (C) 和蛋白酶 (D) 对 OH23 次生代谢产物抗菌活性的影响

Fig. 3 Effects of temperature (A), pH (B), UV (C) and protease (D) on antibacterial activity of secondary metabolites of OH23

2.4 变棕溶杆菌 OH23 发酵培养基优化

2.4.1 单因素优化 生防菌 OH23 在果糖作为碳源的培养基中生长量最低, 在蔗糖、麦芽糖以及葡萄糖作为碳源的培养基中生长较为相近, 而在可溶性淀粉和玉米粉作为碳源的培养基中出现明显沉淀, 所以较难进行 OD₆₀₀ 的测定 (图 4A)。以可溶性淀粉为碳源的 48 h 无菌发酵液抑菌圈半径最大, 达到 1.13 cm (图 4B)。因此, 选择可溶性淀粉作为培养基碳源进行后续优化。

试验结果表明, 氮源是影响 OH23 发酵液菌体密度和拮抗活性的重要因素。生长量的顺序依次为对照 > 高聚蛋白胨 > 酵母粉 > 牛肉膏 > 蛋白胨 > L-谷氨酸, OH23 在 NH₄Cl 和 (NH₄)₂SO₄ 作为氮源的培养基中不生长, 在对照培养基中的生长量显著高于在其他氮源培养基中的生长量 ($P<0.05$) (图 4C)。培养 48 h 各种氮源培养基无菌发酵液拮抗圈半径由大到小顺序为酵母粉 > 高聚蛋白胨 > 对照、牛肉膏 > 蛋白胨,



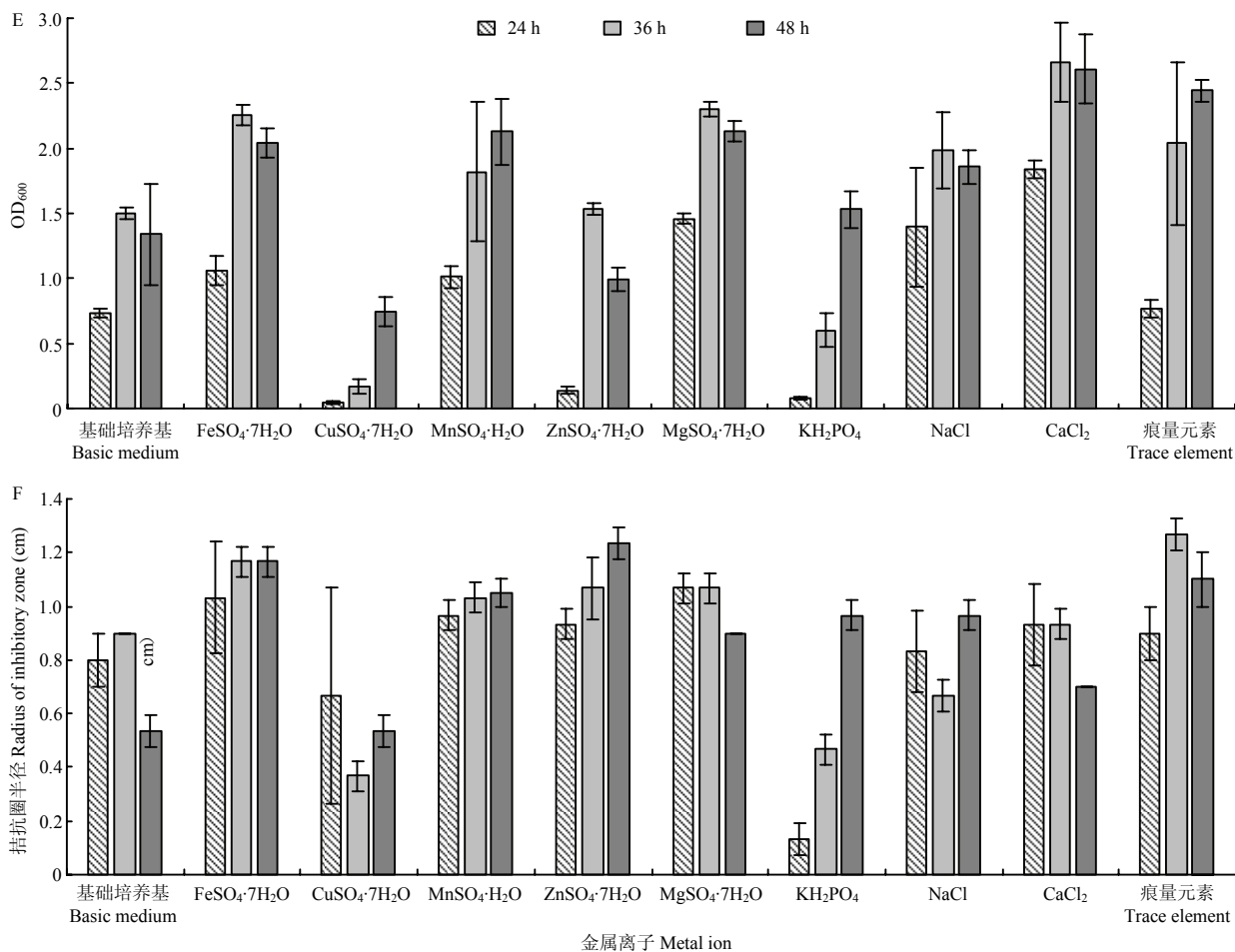


图4 不同碳源、氮源、金属离子对 OH23 生长量和次生代谢产物拮抗活性的影响

Fig. 4 Effect of different carbon source, nitrogen sources, metal ions on the growth of OH23 and antibacterial activity of secondary metabolites

而以酵母粉和高聚蛋白胨作为培养基氮源的无菌发酵液的拮抗圈半径显著大于以其他氮源作为培养基的无菌发酵液的拮抗圈半径 ($P < 0.05$), 分别为 1.23 和 1.2 cm, 分别是对照的 2.46 和 2.4 倍 (图 4D)。因此, 选择酵母粉和高聚蛋白胨作为培养基氮源进行后续优化。

在加入 CaCl_2 的培养基中, 生防菌 OH23 在 3 个时间点的生长量均为最高 (图 4E)。48 h 时, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 对于发酵液拮抗活性的提升效果最大, 较对照分别增加了 121% 和 132% (图 4F)。因此, 选择 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 作为培养基金属离子进行后续优化。

2.4.2 培养基组分正交试验 根据以上单因素试验的结果, 选取高聚蛋白胨、酵母粉、可溶性淀粉、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、以及 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 添加量梯度, 并以培养 48 h 的 OH23 无菌发酵液对 Rs105 的拮抗活性作为测定标准进行正交试验结果表明, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 对 OH23 无菌发酵液抗菌活性物质产量影响最大, 其次是可溶性淀粉, 高聚蛋白胨、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和酵母粉的影响相对较小, 最佳配比组合为 A4B4C1D2E1。因此, 根据上述试验结果确定的优化后培养基配方为高聚蛋白胨 5 g/L、酵母粉 5 g/L、可溶性淀粉 6 g/L、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 15 mg/L、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 mg/L (表 2)。

3 讨论

目前化学农药依旧是防治农业植物病害的主要选择^[16], 但其对食品安全和生态环境产生不利的影响^[17], 不符合当下我国建设安全环保型农业的方向^[18]。微生物源农药具有安全、作用机制独特、环境相容性好的特点, 展现出广阔的应用前景^[19,20]。

表 2 培养基各组分配比优化的正交试验结果及评价分析

Table 2 Orthogonal experimental statistical results and evaluation for every proportion of medium

试验号 No. of experiment	因素					抑菌圈半径 Radius of inhibition zone (cm)
	高聚蛋白胨 Hipolypepton (g/200 mL)	酵母粉 Yeast extract (g/200 mL)	可溶性淀粉 Soluble starch (g/200 mL)	FeSO ₄ ·7H ₂ O (mg/200 mL)	ZnSO ₄ ·7H ₂ O (mg/200 mL)	
1	0.4	0.4	1.2	1	1	1.417 ^{af}
2	0.4	0.6	1.6	3	3	1.217 ^{bc}
3	0.4	0.8	2	5	5	0.000 ^c
4	0.4	1	2.4	8	8	1.333 ^{dh}
5	0.6	0.4	1.6	5	8	0.000 ^c
6	0.6	0.6	1.2	8	5	1.267 ^{dc}
7	0.6	0.8	2.4	1	3	1.417 ^{af}
8	0.6	1	2	3	1	1.250 ^e
9	0.8	0.4	2	8	3	1.250 ^e
10	0.8	0.6	2.4	5	1	1.450 ^f
11	0.8	0.8	1.2	3	8	1.600 ^f
12	0.8	1	1.6	1	5	1.233 ^{bc}
13	1	0.4	2.4	3	5	1.467 ^f
14	1	0.6	2	1	8	1.167 ^b
15	1	0.8	1.6	8	1	1.350 ^{ah}
16	1	1	1.2	5	3	1.567 ^g
K1	3.967	4.134	5.852	5.234	5.467	
K2	3.934	5.101	3.800	5.534	5.451	
K3	5.533	4.367	3.667	3.017	3.967	
K4	5.551	5.383	5.667	5.200	4.100	
k1	0.992	1.034	1.463	1.309	1.367	
k2	0.984	1.275	0.950	1.384	1.363	
k3	1.383	1.092	0.917	0.754	0.992	
k4	1.388	1.346	1.417	1.300	1.025	
R	0.404	0.312	0.546	0.630	0.375	

注：表上不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。

Note: Data with the different lowercase letters indicated significant difference at 0.05 level.

产酶溶杆菌 OH11、抗生素溶杆菌 OH13 等溶杆菌属生防细菌都具有较为广谱的拮抗活性^[7,8]，而本文研究的变棕溶杆菌 OH23 和它们有着明显的差别，OH23 是一株对植物病原黄单胞菌具有特异性拮抗活性的细菌，并且其 48 h 无菌发酵液对于水稻细菌性条斑病菌 AH *Xoc*、JS *Xoc*、*Xoc* Strong、*Xoc* Moderate 等黄单胞菌的拮抗效果显著强于 200 μg/mL 硫酸链霉素 ($P < 0.05$)，说明 OH23 次级代谢产物对黄单胞菌有着较强的抑菌活性。

生防菌剂的稳定性一直都是限制其田间应用和大规模推广的主要因素，同时也是生防菌是否具备较好应用前景和商业化价值的主要依据^[21]。因此，很多学者都较为重视生防菌抑菌代谢物质的稳定性。田因^[22]选取稻瘟霉菌 *Pyricularia oryzae* 作为指示菌，对产酶溶杆菌 C3 菌株活性次生代谢产物 HSAF 的抗真菌活性稳定性进行了检测，发现 HSAF 对酸碱、高温、紫外、自然光都有很好的稳定性。张孟等^[23]探究了对单

核细胞增生李斯特菌 *Listeria monocytogenes*、维氏气单胞菌 *Aeromonas veronii* 和金黄色葡萄球菌具有较好拮抗活性的海洋放线菌 *Micromonospora endolithica* Y15 抑菌活性物质的稳定性,发现 Y15 抑菌活性物质在 $-20\sim 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 抑菌活性稳定,在 $80\sim 120\text{ }^{\circ}\text{C}$ 活性逐渐下降;在 pH 7.0~10.0 抑菌活性稳定,在 pH 2.0~6.0 和 pH 11.0~12.0 抑菌活性均有所下降;Y15 抑菌活性物质对于紫外和蛋白酶处理均保持稳定。畅涛等^[24]以马铃薯坏疽病菌 *Phoma foveata* 为靶标菌株,对高寒草地禾草内生细菌 B-401 抑菌物质的稳定性进行了研究,发现菌株 B-401 所产抑菌物质在 $25\sim 90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 具有较好稳定性,抑菌活性均大于 75%,对酸碱性和紫外照射稳定,相对活性分别在 77.45%和 98%以上。而本文研究的变棕溶杆菌 OH23 产生的次生抗菌物质对高温、紫外光照、蛋白酶、非强碱性环境均表现稳定,仅在强碱性环境 (pH 11.0) 下拮抗活性丧失,其较强的稳定性方便了进一步的加工,同时也保障了其在田间较为稳定的防效。

本研究发现生防菌 OH23 活性次级代谢产物的产量和菌体的生长量不呈正相关。在氮源筛选的试验中,我们发现在基础培养基中 OH23 的生长最好,培养 48 h 的 OD₆₀₀ 值可以达到 1.34,而分别以高聚蛋白胨和酵母粉为氮源时,培养 48 h 的 OD₆₀₀ 分别只有 0.841 和 1.025,但是其发酵液的抑菌圈半径却分别是基础培养基的 2.46 和 2.4 倍。章四平等^[25]对于生防菌株 NJ-18 的发酵条件优化中也出现了相似的现象。此外,由于溶杆菌属细菌普遍容易发生自溶现象,所以本文以抗菌物质作为发酵培养基优化的衡量指标。本试验只是在摇床条件下对发酵培养基的成分进行优化,还需要在发酵罐中进一步的验证,同时装液量、接种量、pH、温度、转速、发酵时间等发酵条件对于提升生防菌活性次级代谢产物的产量也有重要作用^[26-28]。所以,还需在发酵条件上进一步的研究,并且其活性代谢产物有待进一步分离鉴定。

参 考 文 献

- [1] Christensen P, Cook F. *Lysobacter*, a new genus of nonhitting, gliding bacteria with a high base ratio[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1978, 28: 367-393.
- [2] Folman L, Postma J, van Veen J. Characterisation of *Lysobacter enzymogenes* (Christensen and Cook 1978) strain 3.1T8, a powerful antagonist of fungal diseases of cucumber[J]. Microbiological Research, 2003, 158: 107-115.
- [3] Folman L, Klein M, Postma J, et al. Production of antifungal compounds by *Lysobacter enzymogenes* isolate 3.1T8 under different conditions in relation to its efficacy as a biocontrol agent of *Pythium aphanidermatum* in cucumber[J]. Biological Control, 2004, 31(2): 145-154.
- [4] Giesler L, Yuen G. Evaluation of *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3 for biocontrol of brown patch disease[J]. Crop Protect, 1998, 17: 509-513.
- [5] Ko H, Jin R, Krishnan H, et al. Biocontrol ability of *Lysobacter antibioticus* HS124 against *Phytophthora blight* is mediated by the production of 4-hydroxyphenylacetic acid and several lytic enzymes[J]. Current Microbiology, 2009, 59: 608-615.
- [6] Kobayashi D Y, Reedy R M, Palumbo J D, et al. A *clp* gene homologue belonging to the Crp gene family globally regulates lytic enzyme production, antimicrobial activity, and biological control activity expressed by *Lysobacter enzymogenes* strain C3[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(1): 261.
- [7] Zhang W, Li Y, Qian G, et al. Identification and characterization of the anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* WAP-8294A2 biosynthetic gene cluster from *Lysobacter enzymogenes* OH11[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(12): 5581-5589.
- [8] Zhao Y, Qian G, Ye Y, et al. Heterocyclic aromatic N-oxidation in the biosynthesis of phenazine antibiotics from *Lysobacter antibioticus*[J]. Organic Letters, 2016, 18(10): 2495-2498.
- [9] Puopolo G, Cimmino A, Palmieri M C, et al. *Lysobacter capsici* AZ78 produces cyclo(L-Pro-L-Tyr), a 2,5-diketopiperazine with toxic activity against sporangia of *Phytophthora infestans* and *Plasmopara viticola*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2015, 117(4): 1168-1180.
- [10] O'Sullivan J, McCullough J, Tymiak A, et al. Lysobactin, a novel antibacterial agent produced by *Lysobacter* sp. I. Taxonomy, isolation and partial characterization[J]. Journal of Antibiotics, 1988, 41: 1740-1744.
- [11] Bonner D, Osullivan J, Tanaka S, et al. Lysobactin, a novel antibacterial agent produced by *Lysobacter* sp. II. Biological properties[J]. Journal of Antibiotics, 1988, 41: 1745-1751.
- [12] Hashizume H, Igarashi M, Hattori S, et al. Tripropeptins, novel antimicrobial agents produced by *Lysobacter* sp. I. Taxonomy, isolation and biological activities[J]. Journal of Antibiotics, 2001, 54(12): 1054-1059.
- [13] Hashizume H, Hattori S, Igarashi M, et al. Tripropeptin E (I), a new tripropeptin group antibiotic produced by *Lysobacter* sp. BMK333-48F3[J]. Journal

- of Antibiotics, 2004, 57(6): 394.
- [14] Hashizume H, Sawa R, Harada S, *et al.* Tripropeptin C blocks the lipid cycle of cell wall biosynthesis by complex formation with undecaprenyl pyrophosphate[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(8): 3821-3828.
- [15] Sangnoi Y, Anantapong T, Kanjanaopas A. Antibacterial activity of aquatic gliding bacteria[J]. *Springerplus*, 2016, 5(1): 116.
- [16] 张越, 张琦, 贺润平, 等. 植物病害防控方向和措施的研究探讨[J]. *山西农业科学*, 2015, 43 (1): 75-78.
- [17] 孔祥睿. 化学农药对环境的污染及其防控对策建议[J]. *南方农药*, 2017(6): 32-34.
- [18] 杜士杰. 微生物源农药的应用现状及发展研究 W[J]. *科学技术创新*, 2016(25): 155-155.
- [19] 束长龙, 曹蓓蓓, 袁善奎, 等. 微生物农药管理现状与展望[J]. *中国生物防治学报*, 2017, 33 (3): 297-303.
- [20] 符泽, 邱光. 微生物农药的研发推广及未来发展趋势[J]. *农药市场信息*, 2018(6): 6-10.
- [21] 孙洋, 王树桐, 曹克强. 影响生防菌田间药效环境因素的研究进展[C]//*粮食安全与植保科技创新*, 2009.
- [22] 田囡. 产酶溶杆菌 C3 产生热稳定性抗真菌因子(HSAF)的研究[D]. 山东轻工业学院, 2011, 62-65.
- [23] 张孟, 王艳婷, 汪立平, 等. 海洋抑菌放线菌 Y15 的筛选、鉴定及其代谢产物理化性质[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(3): 513-524.
- [24] 畅涛, 冯中红, 杨成德, 等. 一株抗马铃薯坏疽病生防细菌 B-401 产抑菌物质条件优化及稳定性[J]. *中国生物防治学报*, 2016, 32(3): 365-371.
- [25] 章四平, 刘圣明, 王建新, 等. 枯草芽孢杆菌生防菌株 NJ-18 的发酵条件优化[J]. *南京农业大学学报*, 2010, 33(2): 58-62.
- [26] 王云霞, 钱国良, 胡白石, 等. 产酶溶杆菌 OH11 菌株摇瓶发酵条件研究[J]. *中国生物防治学报*, 2008, 24(3): 267-271.
- [27] 王亚娇, 纪莉景, 栗秋生, 等. 列当生防菌层出镰刀菌 Br-1 发酵条件的优化及田间防治效果[J]. *中国生物防治学报*, 2017, 33(5): 692-698.
- [28] 乔俊卿, 刘卮洲, 张荣胜, 等. 枯草芽孢杆菌 T-500 产脂肽类抗生素的摇瓶发酵工艺优化[J]. *南京农业大学学报*, 2018, 41(3): 447-455.