

黄瓜灰霉病拮抗细菌 NZT-19-241 抗菌物质产生条件的研究

张雪辉^{1,2,3}, 唐蕊³, 鹿秀云¹, 马平¹, 董金皋²

(1. 河北省农林科学院 植物保护研究所, 河北 保定 071000; 2. 河北农业大学 植物保护学院,

河北 保定 071001; 3. 邢台学院 生物化学系, 河北 邢台 054001)

摘要: 对拮抗黄瓜灰霉病菌的细菌 NZT-19-241 产生抗菌物质的条件进行了研究。结果表明: 在 28℃, 170 rpm 振荡培养条件下, 培养时间 48 h, 接种量为 5 mL/100 mL 培养基、培养液的初始 pH 7~8 为产生抗菌物质的最佳条件。

关键词: 黄瓜灰霉病菌; 拮抗细菌; 抗菌物质; 培养条件

中图分类号: S 482.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)11-0092-02

黄瓜灰霉病主要是由灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea* Pers.) 侵染引起的。为害严重, 直接影响黄瓜的产量及农民的收入, 已成为设施黄瓜栽培的限制性障碍。生产上以化学防治为主, 但由于化学农药大量长期的使用, 不仅容易产生抗药性, 还污染环境, 对人畜造成了极大的危害。该研究旨在对该病的拮抗细菌的抗菌物质产生条件进行研究, 为开发生物农药提供理论基础, 从而为黄瓜的绿色生产服务。

1 材料与方法

1.1 试验材料

拮抗细菌 NZT-19-241 由土壤中分离所得; 黄瓜灰霉病菌由河北省农科院植物保护研究所病害生物防治室提供; PDA; LB 培养基; LB 培养液。

1.2 试验方法

1.2.1 拮抗细菌母液的制备 将试管保存的菌种转接至 LB 培养基平板上活化, 24 h 后挑取一环接于 100 mL 液体培养基中, 摇床上 28℃, 170 rpm 振荡培养 24 h, 制成 4.5×10^8 cfu/mL 的悬浮液, 称为母液。

1.2.2 最佳发酵时间的测定 将母液按 1:20 的比例接种于盛有 100 mL LB 培养液的三角瓶, 28℃, 170 rpm 的条件下振荡培养, 分别在 0、8、16、24、32、40、48、56、64、72 h 取出, 离心过滤, 采用牛津杯法进行生物测定, 每个牛津杯加入 20 μ L 培养液, 以无菌水做对照, 28℃培养 72 h, 测定抑菌活性。

1.2.3 不同接种量对发酵液抑菌活性的影响 将母液以 0.5、1、3、5、7、10、15 mL 接种于 100 mL 的 LB 培养液中, 摇床上 28℃, 170 rpm 振荡培养, 在 48 h 取出, 离心、过滤, 测定无菌发酵液的抑菌活性(同 1.2.2)。

1.2.4 培养液初始 pH 对发酵液抑菌活性的影响 将培养液用 1 M HCl 或 1 M NaOH 精确调 pH 分别为 4、5、6、7、8、9、10、11, 经 121℃高压湿热灭菌 30 min。将母液按 1:20 的比例加入到培养液中, 摇床上 28℃, 170 rpm 振荡培养 48 h, 取出后离心、过滤, 测定无菌发酵液的抑菌活性(同 1.2.2)。

1.2.5 培养方式对发酵液抑菌活性的影响 将母液按 1:20 比例加入到盛有 100 mL 的 LB 培养液中, 设置静止、间歇振荡(12 h/d)和振荡(24 h/d)(170 rpm)3 个处理, 28℃培养, 48 h 后测定其无菌滤液的抑菌活性(同 1.2.2), 确定其最佳培养方式。

2 结果与分析

2.1 最佳发酵时间测定结果

从图 1 可见, NZT-19-241 菌株发酵液开始随着培养时间的延长抑菌活性逐渐提高, 培养 40~48 h 其抑菌活性骤然提高, 至 48 h 抑菌活性达到最高(63.64%), 48~56 h 抑菌活性平稳, 随后活性则开始下降。所以最佳发酵时间应为 48~56 h, 以下培养时间均为发酵培养 48 h。

2.2 不同接种量在培养 48 h 时的抑菌活性测定结果

从图 2 可见, 不同接种量对抑菌活性有一定的影响。而且随着接种量的增加, 发酵滤液的抑菌活性增高, 加入 5 mL 时的活性达最高, 随后接种量越大, 抗菌活性降低。所以该试验采用每 100 mL 培养基中加入 5 mL 母液的接种量。

2.3 培养液初始 pH 对发酵液抑菌活性的影响测定

由表 1 可以看出, 发酵液的初始 pH 对 NZT-19-241 菌株的发酵液抑菌活性影响很大。在 pH 4~6 之间随着 pH 的增大, 抑菌活性明显增强, 在 pH 6 以后抑菌活

第一作者简介: 张雪辉(1976-), 男, 河北邢台人, 硕士, 讲师, 现从事植物病理学教学与科研工作。E-mail: xtxytr@126.com。

通讯作者: 马平(1964-), 男, 江苏南京人, 博士, 研究员, 现从事作物病害生物防治及作物抗病性鉴定利用等方面研究工作。E-mail: hjbdmpin@heinfo.net。

收稿日期: 2009-06-20

性逐渐增强,在 pH 7 时抑制活性达到最大值,在 pH 7~8 时保持平稳,随后活性骤然降低。说明在酸性条件下不利于抑菌物质的产生,同时碱性过强直接影响着该菌的生长,也不利于抑菌物质的产生,只有在 pH 7~8 的弱碱性条件下才有利于产物活性成分的提高。

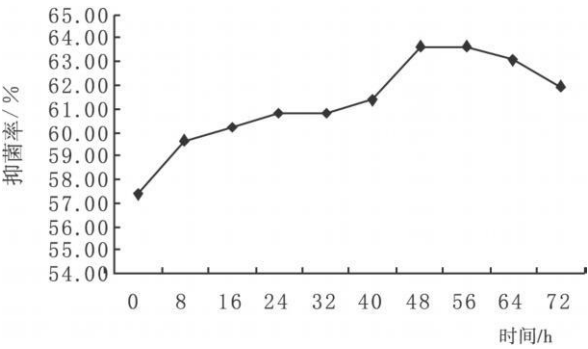


图 1 不同培养时间对抑菌活性的影响

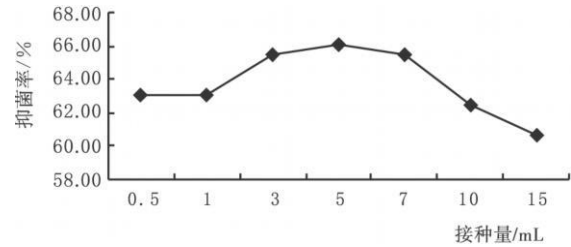


图 2 不同接种量 48 h 抑菌活性

2.4 培养方式对发酵液抑菌活性的影响

由表 2 可见,培养方式对 NZT-19-241 菌株产生抗菌物质的影响较大。振荡培养有利于抗菌物质的产生,其无菌滤液对灰霉菌的抗菌活性(抑菌率 66.48%)高于间歇振荡培养(抑菌率 55.68%)和静止培养(0%)。值得关注的是,静止培养的发酵液对灰霉菌无任何影响,表明该菌抑菌物质需要有充足的氧的供应才能产生。

表 1 不同 pH 值对 NZT-19-241 菌株产生抗菌物质的影响

pH 值	生长量/mm	抑菌率/%	抑菌带/mm
CK	43.00	0.00a	0.00
11	40.00	6.98a	0.00
10	39.25	8.72a	0.00
4	38.50	10.47a	0.00
5	31.25	27.33b	0.00
9	23.25	45.93c	0.00
6	18.75	56.40d	1.25
8	15.75	63.37e	1.75
7.2	15.00	65.12e	1.75
7	15.00	65.12e	2.00

表 2 不同培养方式对 NZT-19-241 菌株产生抗菌物质的影响

处理	生长量/mm	抑菌率/%	抑菌带/mm
振荡	14.75	66.48a	1.50
间歇振荡	19.5	55.68b	0.00
静止	44.00	0.00c	0.00
CK	44.00	0.00c	0.00

3 讨论

试验结果表明 NZT-19-241 菌株在 28℃, 170 rpm 振荡培养条件下,培养时间 48 h、接种量为 5 mL/100mL 培养基、培养液的初始 pH 7~8 为产生抗菌物质的最佳条件。但该菌株是通过室内对峙培养和温室内黄瓜苗期生物测定筛选出的拮抗菌,对其抗菌物质产生条件也仅是通过室内摇瓶培养试验测得,旨在为其工业化生产提供参考。还应进一步对其最佳防治剂量、最佳防治时间及最佳定植条件等进行研究,使得生产者在使用生防菌时,能科学的施用,人为地调控田间及棚室的环境因素,充分发挥其生防潜能。

参考文献

[1] 韩兆均. 植物保护学通论[M]. 北京: 高等教育出版社, 2001.
[2] 李俊, 纪明山, 刘浩强. 等. 番茄灰霉病拮抗菌 R26 抗菌物质产生条件的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2004 35(2): 105-108.
[3] 韩斯琴, 徐梅, 白震. 等. 番茄灰霉病拮抗菌 D2-4 发酵条件的研究[J]. 东北农业大学学报, 2004 35(1): 93-98.

Culture Conditions of Antagonistic Bacteria NZT-19-241 for Producing Antibiotic Substances against *Botrytis cinerea* on Cucumber

ZHANG Xue-hui^{1,2,3}, TANG Rui³, LU Xi-ryun¹, MA Ping¹, DONG Jin-gao²

(1. Institute of Plant Protection, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences Baoding Hebei 071001, China; 2. College of Plant Protection Agricultural University of Hebei, Baoding Hebei 071001, China; 3. Department of Biology and Chemistry, College of Xingtai, Xingtai Hebei 054001, China)

Abstract: This paper studied the optimum culture conditions of NZT-19-241 for producing antibiotic substances against *Botrytis cinerea* on cucumber. The results showed that the optimum culture time was 48 hours, the suitable inoculated volume was 5 mL seed liquid to 100 mL culture medium, the best pH was 7~8 on the condition of 28℃, 170 rpm.

Key words: *Botrytis cinerea*; Antagonistic bacteria; Antagonistic; Culture condition