

# 白菜软腐病拮抗菌 M-14 抗菌物质产生条件研究

张雪辉, 唐蕊

(邢台学院 生物化学系, 河北 邢台 054001)

**摘要:**通过室内筛选得到对白菜软腐病有较强拮抗性的菌株 M-14, 对其抗菌物质产生条件进行了初步研究。结果表明: M-14 菌株发酵最佳条件为培养基初始 pH 值为 6.0, 接种量为 5%, 32℃ 培养 42 h。

**关键词:**白菜软腐病; 拮抗菌; 抗菌物质; 培养条件

**中图分类号:**S 436.421 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)04-0048-02

近年来,随着白菜栽培面积的不断扩大和种植年限的不断增加,尤其在前期干旱、后期多雨或灌溉不当情况下,由软腐欧文氏菌引起的白菜软腐病很容易在生产中大面积流行,造成严重损失,这是影响白菜优质、稳产的重要因素。目前,对于白菜软腐病农业生产上主要采用选育抗病品种和药剂防治相结合的方法,但白菜软腐病病原菌种群、致病力分化尚不明确,所以防治效果也并不十分理想<sup>[1-2]</sup>。化学杀菌剂的使用不仅污染了环境、破坏生态平衡,而且使病菌抗性增强,且它的残毒问题也令人担忧。生物防治被认为是最具有发展潜力的防治方法。通过抑菌圈法,对从不同生态环境下分离到的微生物菌株进行筛选,得到对白菜软腐病菌表现出有较强抑制作用的拮抗菌 M-14,现对其抗菌物质产生条件进行了优化研究,以期对生物农药的开发奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

拮抗菌 M-14 由土壤中分离所得;白菜软腐病菌,由邢台学院微生物实验室提供;LB 培养基;LB 培养液。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 拮抗菌母液的制备** 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 30℃,180 r/min 振荡培养 24 h,制成  $3 \times 10^8$  cfu/mL 的悬浮液,为母液。

### 1.2.2 培养基初始 pH 值对 M-14 菌株抑菌活性的影响

用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 将培养基 pH 调至 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0,装瓶。每瓶装量为 100 mL,灭菌后,接入 5 mL 母液,30℃ 下,180 r/min 培养 48 h 后取培养滤液,采用牛津杯法进行生物测定,每个牛津杯加入 20  $\mu$ L 培养液,以无菌水做对照,30℃ 培养 48 h,测量抑菌圈直径<sup>[3]</sup>。

**1.2.3 接种量对 M-14 菌株抑菌活性影响** 将母液分别以 0.5、1.3、5、7、10、15 mL 接种于 100 mL 的 LB 培养液中,摇床上 30℃,180 r/min 振荡培养 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 培养温度对 M-14 菌株抑菌活性的影响** 将 pH 6.0 的 100 mL 培养基,接入 5 mL 母液的拮抗菌,在 24、28、30、32、36℃,180 r/min 条件下培养 48 h 取出,离心、过滤,测定无菌发酵液的抑菌活性(同 1.2.2)。

**1.2.5 培养时间对 M-14 菌株抑菌活性的影响** 将 pH 6.0 的 100 mL 培养基,接入 5 mL 母液的拮抗菌在 32℃ 下 180 r/min 培养,在培养 6、12、18、24、30、36、42、48、60 h 时,测定无菌发酵液的抑菌活性(同 1.2.2)。

## 2 结果与分析

### 2.1 初始 pH 值对 M-14 菌株抑菌活性的影响

由图 1 可知,M-14 菌株在培养基初始 pH 5~6 时,随着 pH 升高,抑菌活性增强;在 pH 6~8 时,抑菌活性随着 pH 增加抑菌活性显著下降;pH 8~9 时只显示出微弱的抑菌活性。结果表明,pH 6 是其抑菌活性物质产生较为合适的条件。

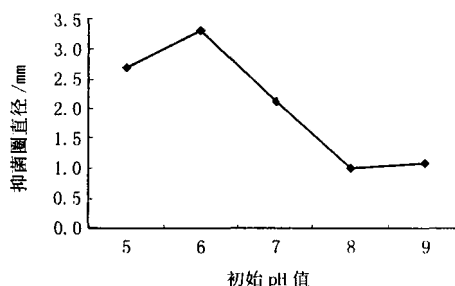


图 1 培养基初始 pH 值对菌株 M-14 抑菌活性的影响

### 2.2 接种量对 M-14 菌株抑菌活性的影响

由图 2 可知,M-14 菌株随着接种量的增加其抑菌活性逐渐增强,当接种量达到 5 mL 抑菌活性最高,7 mL 时次之,随后随接种量的增加抑菌活性显著减弱。结果表明,接种量为 5 mL(即培养基的 5%)时其抑菌活性物质产生量最多。

**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:xtxyzxh@126.com。

**收稿日期:**2010-12-07

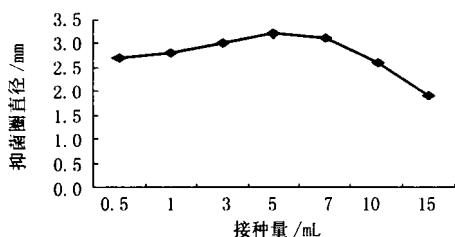


图2 不同接种量对菌株 M-14 抑菌活性的影响

## 2.3 培养温度对 M-14 菌株抑菌活性的影响

由图3可看出, M-14 菌株随着培养温度的增加其抑菌活性逐渐增强, 当温度达到 32℃ 时抑菌活性最高, 之后随温度的增加抑菌活性显著减弱。结果表明, 在 32℃ 培养条件下, 更有利于其抑菌活性物质的产生。

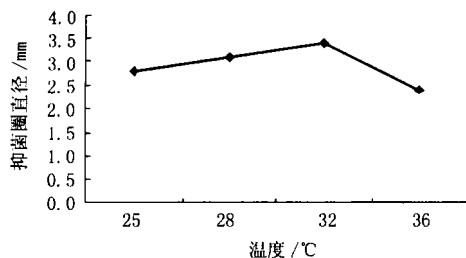


图3 培养温度对菌株 M-14 抑菌活性的影响

## 2.4 培养时间对 M-14 菌株抑菌活性的影响

由图4可看出, M-14 菌株随着培养时间的延长其抑菌活性显著增强, 当培养时间达 42 h 时抑菌活性最高, 之后随培养时间的延长抑菌活性显著减弱, 48 h 后抑菌活性较为平稳。结果表明, M-14 菌株最佳培养时间应为 42 h。

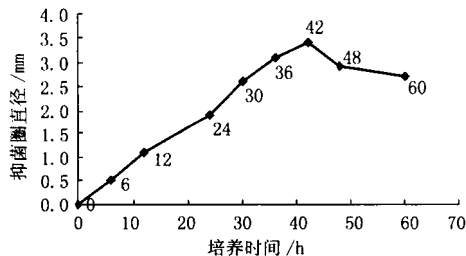


图4 培养时间对菌株 M-14 抑菌活性的影响

## 3 讨论

根据拮抗作用的选择性, 可将微生物间的拮抗关系分为非特异性拮抗关系和特异性拮抗关系二类。许多微生物在生命活动过程中, 能产生某种抗生素, 具有选择性地抑制或杀死别种微生物的作用, 这是一种特异拮抗关系<sup>[4]</sup>。试验中通过牛津杯法证实 M-14 菌株对白菜软腐菌的拮抗效应源自其产生的代谢物。结果表明, M-14 菌株在培养基初始 pH 6.0, 装液量为 5%, 32℃ 条件下培养 42 h, 有利于对白菜软腐病拮抗物质的产生。但应注意以下几方面: 一是 M-14 菌株培养在 32℃ 时抑菌活性最高, 随后随温度的增加抑菌活性显著减弱, 可能因为高温不利于活性物质的产生或是活性物质不够稳定或是与其它代谢产物的产生与积累有关; 二是 M-14 菌株是一种放线菌, 一般放线菌生长的最适 pH 偏碱性, 但试验中发现其在偏酸(pH 6)的环境下更有利于拮抗物质的产生, 也应证了菌体生长条件与代谢产物产生条件是不同的; 三是当培养时间超过 42 h 后, 抑菌活性表现为减弱, 其原因可能是代谢物质间发生反应或者有干扰, 导致活性物质质量的减少或活性的降低。培养 48 h 以后, 抑菌活性表现为趋于稳定, 可能是随着培养时间延长代谢产物积累到一定浓度影响到菌体代谢, 抑菌活性物质不再增多所致。当然, 有关 M-14 菌株抑菌活性物质的分离、鉴定, 理化性质、酸碱稳定性、热稳定性等均需进一步研究测试。另外, M-14 菌株在白菜内的定殖力、对白菜生长的影响等也需进一步研究。

## 参考文献

- [1] 鲁燕汶. 大白菜软腐病病原细菌的分离、筛选及鉴定[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2006.
- [2] 臧威, 张耀伟, 孙剑秋, 等. 大白菜软腐菌种群组成及优势菌致病型的研究[J]. 植物资源与环境学报, 2006, 15(1): 26-29.
- [3] 张雪辉, 唐蕊, 鹿秀云, 等. 黄瓜灰霉病拮抗细菌 NZT-19-241 抗菌物质产生条件的研究[J]. 北方园艺, 2009(11): 92-93.
- [4] 诸葛健, 李华钟. 微生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 297-300.

## Study on the Anti-bacteria Producing Conditions of M-14 Strain Against Chinese Cabbage Soft Rot

ZHANG Xue-hui, TANG Rui

(Department of Biology and Chemistry, Xingtai University, Xingtai, Hebei 054001)

**Abstract:** M-14 strain was selected by screening against Chinese Cabbage Soft Rot and the primary study on the antibacteria producing conditions was done. The results showed that the optimum culture time was 42 hours, the suitable inoculated volume was 5 L seed liquid to 100 L culture medium, the best pH was 6 on the condition of 32℃.

**Key words:** *Erwinia carotovora*; antagonistic bacteria; antagonistic; culture condition