

# 地黄枯萎病拮抗菌 S15 发酵条件的初步研究

张艳丽<sup>1</sup>, 高玉红<sup>1</sup>, 李洪连<sup>2</sup>

(1. 郑州职业技术学院 生物工程系, 河南 郑州 450121; 2. 河南农业大学, 河南 郑州 450002)

**摘要:**从地黄田土壤中筛选到 1 株对地黄枯萎病有较强拮抗作用的菌株 S15, 并对 S15 进行发酵条件的初步研究。结果表明: 生防菌 S15 发酵最合适的条件为: 28℃、pH 7.5 的黄豆饼粉浸出液 1%, 葡萄糖 10 g, NaCl 2.5 g, CaCO<sub>3</sub> 2 g, 蛋白胨 3 g, 蒸馏水 1 000 mL 的培养液中以 170 r/min 的速度振荡培养 4 d。

**关键词:**地黄枯萎病; 发酵条件; 发酵培养基

**中图分类号:**S 567.23<sup>+</sup>9 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2012)17-0127-03

地黄枯萎病是地黄生产上主要病害之一, 寄主范围广, 植物受害严重。病害发生后常使植株枯死和块根腐烂, 一般减产 50% 左右, 严重的高达 80%。同时它能使真菌和细菌易于侵染植物, 可诱发作物其它病害。常年发病率 20%~30%, 严重影响了地黄的品质和产量<sup>[1]</sup>。目前生产上主要采用化学杀菌剂防治该病, 但化学防治可导致地黄土壤环境污染, 使地黄品质下降, 而且农药残留严重, 直接影响地黄的经济价值和国际市场竞争力, 不能满足药用植物 GAP 栽培的要求。因此研制防效好、无污染的生物防治剂成为药用植物病害防治的必然趋势<sup>[2-3]</sup>。为了实现微生物拮抗菌株的工业化生产, 需要对菌株发酵条件和培养基组分进行优化, 提高菌株产量。拮抗菌株 S15 为课题组从地黄根际土壤中筛选, 经生物测定, 该菌株对地黄枯萎病菌有很好的拮抗活性, 现对菌株 S15 摇瓶发酵条件进行优化, 旨在为菌株进行工厂发酵生产和生防的研发奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

拮抗生防菌 S15 由地黄健株根际土壤分离所得。

### 1.2 试验方法

1.2.1 培养基选择 根据放线菌的生长需求, 结合常规的放线菌培养基, 进行初步筛选研究。将生防放线菌在下列相应的不同培养基中培养, 发酵的其它条件固定为 pH 7.0, 转速 170 r/min, 装液量 100 mL/250mL, 温度 28℃。5 d 后用菌丝生长量测定方法, 每 50 mL 培养基

中加入 1 mL 新鲜培养液, 取出样品后将发酵液过滤, 过滤后的菌丝在 60℃ 烘箱中烘干, 称量其干重, 根据菌丝干重确定最佳发酵配方<sup>[4-5]</sup>。每处理重复 3 次。供试培养基: I: 可溶性淀粉 10 g, MgSO<sub>4</sub> 1 g, NaCl 0.5 g, KNO<sub>3</sub> 1 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3 g, pH 7.2, 蒸馏水 1 000 mL; II: 葡萄糖 15 g, 大豆粉 15 g, NaCl 5 g, 酵母膏 1 g, CaCO<sub>3</sub> 1 g, 甘油 2.5 mL, 蒸馏水 1 000 mL; III: 黄豆饼粉浸出液 1%, 葡萄糖 10 g, NaCl 2.5 g, CaCO<sub>3</sub> 2 g, 蛋白胨 3 g, 蒸馏水 1 000 mL; IV: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 蒸馏水 1 000 mL; V: 玉米粉 50 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.23 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.15 g, MgSO<sub>4</sub> 0.2 g, KCl 0.2 g, 蒸馏水 1 000 mL; VI: 小米 10 g, 葡萄糖 20 g, 蛋白胨 3 g, 碳酸钙 2 g, 氯化钠 25 g, 蒸馏水 1 000 mL; VII: 麦麸浸提液 2%, 葡萄糖 10 g, NaCl 2.5 g, CaCO<sub>3</sub> 2 g, 蛋白胨 3 g, 蒸馏水 1 000 mL。

1.2.2 pH 的选择 利用选出的培养基, 液培转速为 170 r/min, 装液量 100 mL/250mL, 培养温度 28℃, 进行最适生长 pH 测定。灭菌前 pH 分别为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、7.5、8.0、9.0、10.0, 培养 5 d 后过滤烘干测干菌丝重。每处理重复 3 次。

1.2.3 发酵时间选择 利用培养基优化试验结果, 装液量 100 mL/250mL, 培养温度 28℃, pH 7.5, 转速 170 r/min 条件下振荡培养生防放线菌, 进行最适摇瓶发酵时间选择。分别于 1、2、3、4、5、6、7 d 后过滤烘干测干菌丝重, 每处理重复 3 次。

1.2.4 发酵培养温度的选择 利用培养基优化试验结果, 装液量 100 mL/250mL, pH 7.5, 设置 15、20、25、28、30、35、38、42℃ 共 8 个温度标准; 在 170 r/min 下振荡培养, 4 d 后过滤烘干测干菌丝重, 每处理重复 3 次。

**第一作者简介:**张艳丽(1979-), 女, 河南安阳人, 硕士, 讲师, 现主要从事植物病虫害等教学与研究工作。E-mail: katie\_zy1@163.com.

**收稿日期:**2012-05-17

## 2 结果与分析

### 2.1 不同培养基与放线菌 S15 生长的关系

由图 1 可知,生防菌 S15 在 7 种不同的培养液中以 28℃、pH 7.0、170 r/min 发酵培养 4 d,Ⅲ号培养基最适合放线菌 S15 的液体发酵培养,表现为放线菌菌体的生长量最大,形成小球状菌团,培养液颜色为浅红褐色。

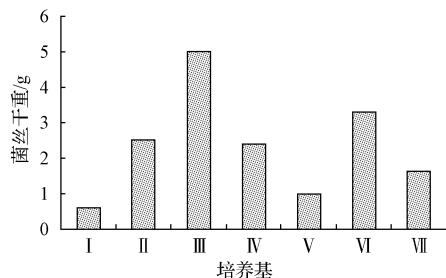


图 1 不同培养基对 S15 生长的影响

### 2.2 振荡时间与放线菌 S15 生长量的关系

由 2.1 中选用Ⅲ号培养基做进一步试验。由图 2 可知,生防菌 S15 在Ⅲ号培养液中以 28℃、pH 7.0、170 r/min 发酵培养,在测定 S15 的生长曲线时发现菌体的干重最高峰出现在第 4 天,达到 1.55 g,而在第 4 天以前处于快速生长期,第 4 天以后生长滞后,菌体干重降低。

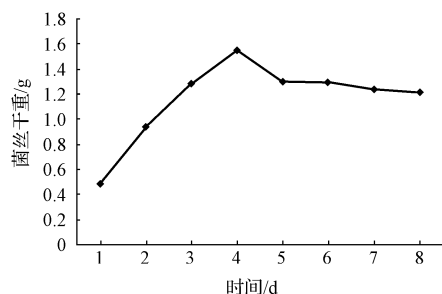


图 2 振荡时间对 S15 生长的影响

### 2.3 温度与放线菌 S15 生长的关系

生防菌 S15 在Ⅲ号培养液中以 pH 7.0、170 r/min 发酵培养 4 d,由图 3 可知,生防菌 S15 在温度小于 28℃ 时菌丝体干重呈不断增加的趋势,在温度为 28℃ 时菌体干重达到最大值,之后随着温度的上升菌体干重下降,说明 28℃ 是生防菌 S15 的最合适发酵温度。

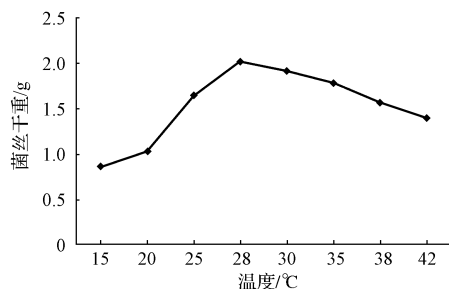


图 3 不同温度对 S15 生长的影响

### 2.4 pH 与放线菌 S15 生长的关系

生防菌 S15 在Ⅲ号培养液中以温度 28℃、170 r/min 发酵培养 4 d,对于不同 pH 的培养液进行发酵培养,结果发现生防菌 S15 在 pH 过高或过低时,生长均不是太好,pH 为 7.5 时菌丝干重达到最大值,说明 pH 7.5 为 S15 液体发酵培养的最适值(图 4)。

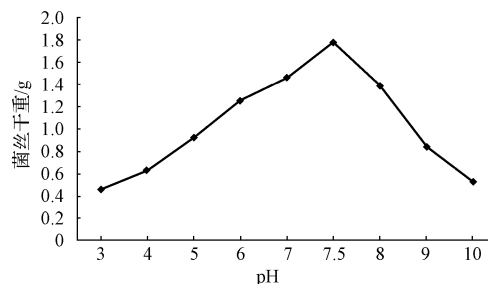


图 4 pH 与生防菌 S15 生长的关系

## 3 结论与讨论

国家食品药品监督管理局 2002 年制订了[中药材生产质量管理规范](GAP 标准),标准要求植物病害防治上使用广谱、低毒、低残留的药物,禁止使用高剧毒农药,提倡使用生防菌剂。筛选、开发和引入拮抗微生物能够从本质上改善植物根际微生态环境,从而达到控制病害的目的,既符合中药 GAP 栽培标准,又保障了药材的品质。

该试验通过对生防放线菌 S15 对培养基、温度、pH 值、发酵时间 4 个方面的选择进行了初步研究,获得了生防菌 S15 最佳发酵条件组合为 28℃、pH 为 7.5 在Ⅲ号培养液(黄豆饼粉浸出液 1%,葡萄糖 10 g,NaCl 2.5 g,CaCO<sub>3</sub> 2 g,蛋白胨 3 g,蒸馏水 1 000 mL)中以 170 r/min 振荡培养 4 d 其生长量最好。但发酵是一个复杂的生命过程,该试验仅对发酵条件中一些主要影响因素进行了分析,有些因素尚需进一步研究,另外该研究仅对该菌的适宜摇瓶发酵条件进行了初步分析,而菌剂的大量生产广泛采用的是罐发酵,虽然摇瓶试验的结果为罐发酵提供一些可参考的数据以加速罐试验的进程,但摇瓶发酵放大到发酵罐发酵时往往二者结果并不一致。因此尚需对发酵罐发酵条件进行研究,为生防菌的大规模生产奠定基础,提供一定数据支持和理论依据。

### 参考文献

- [1] 王天亮,张宝华,赵正伟,等.地黄枯萎病的发生及防治[J].植物保护,2002(11):39.
- [2] 马贵龙,赫荣琳,毛永娜,等.人参锈腐病菌拮抗放线菌 JY36 发酵条件研究[J].吉林农业大学学报,2009,31(2):138-142.
- [3] 周如军,傅俊范,卯婷婷,等.人参锈腐病拮抗菌 BS015 最适发酵条件研究[J].吉林农业大学学报,2011,33(3):278-282.
- [4] 方中达.植物研究方法[M].北京:农业出版社,1979.
- [5] 郭晓芳,宗兆峰.5 株生防放线菌发酵条件初探[J].西藏大学学报(自然科学版),2010(6):112-116.

# 53%多菌灵·中生菌素可湿性粉剂 防治苹果轮纹病药效试验

雷 琼, 马 文哲

(杨凌职业技术学院 生物工程系, 陕西 杨凌 712100)

**摘 要:**以 12 a 生“红富士”苹果树为试材, 评价 53%多菌灵·中生菌素可湿性粉剂对苹果轮纹病的防治效果, 及对苹果树生长的安全性, 并采取田间小区的试验方法进行了大田药效试验。结果表明: 53%多菌灵·中生菌素可湿性粉剂对苹果轮纹病有显著的防治效果, 其 1 000~2 000 倍液对采收期的防效达 80%~93%左右, 对贮藏 30 d 后的防效达 82%以上。

**关键词:**53%多菌灵·中生菌素可湿性粉剂; 苹果轮纹病; 药效试验

**中图分类号:**S 436. 611. 1<sup>+</sup>9 **文献标识码:**B **文章编号:**1001—0009(2012)17—0129—02

苹果轮纹病又称疣皮病或粗皮病, 主要危害枝干和果实。枝干受害, 初期以皮孔为中心形成圆形或扁圆形的瘤状物, 边缘龟裂与健康组织形成一道环沟, 后期病组织翘起如马鞍状, 许多病斑连在一起, 使表皮粗糙。果实受害, 在近成熟期或贮藏期, 以皮孔为中心, 初期生成水渍状褐色小斑点, 很快形成同心轮纹状, 并向四周扩大, 整个果实软腐<sup>[1]</sup>。在生产实际中, 对该病的防治方法主要采用化学防治, 多采用休眠期喷施杀菌剂如石硫合剂铲除潜伏病原; 发病前施用保护性杀菌剂如波尔多液控制病原; 发病时采用内吸性治疗剂如多菌灵进行防治<sup>[2]</sup>。但是, 病原菌对上述药剂已产生了明显的抗药性。为了筛选出防治苹果轮纹病经济有效的杀菌剂品种, 延缓抗药性的产生及发展, 该试验对多菌灵与中生

菌素混用防治苹果轮纹病的效果进行了研究, 以明确其适宜的防治时期、科学配比、用药剂量及合理的使用技术, 为生产上防治苹果轮纹病提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验地概况

该试验设在陕西省杨凌示范区农户的苹果园内, 果园面积 1 000. 5 m<sup>2</sup>, 株行距 3 m×4 m, 土壤 pH 中性, 杂草较少, 果园管理水平中等。

### 1.2 试验材料

1.2.1 供试材料 12 a 生“红富士”苹果树。

1.2.2 供试药剂 53%多菌灵·中生菌素可湿性粉剂(东莞市瑞德丰生物科技有限公司); 50%多菌灵可湿性粉剂(东莞市瑞德丰生物科技有限公司); 3%中生菌素可湿性粉剂(福建省福州凯立生物制品有限公司)。

### 1.3 试验方法

试验设 53%多菌灵·中生菌素可湿性粉剂 1 000 倍

**第一作者简介:**雷琼(1977-), 女, 硕士, 讲师, 现主要从事农业植物病虫害的教学与科研工作。E-mail: lhrhym@yahoo. com. cn.

**收稿日期:**2012—05—16

## Primary Study on Fermentation Conditions of Antagonistic Strain S15 Against *Rehmanniae Fusarium Wilt*

ZHANG Yan-li<sup>1</sup>, GAO Yu-hong<sup>1</sup>, LI Hong-lian<sup>2</sup>

(1. Department of Biological Engineering, Zhengzhou Technical College, Zhengzhou, Henan 450121; 2. Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002)

**Abstract:** An actinomycete strain S15 antagonistic against *Rehmanniae Fusarium Wilt* was isolated from the soil in *Rehmanniae* field and the fermentation conditions were primary investigated. The results showed that the optimal fermentation conditions were lixivium of soybean cake 1%, glucose 10 g, NaCl 2.5 g, CaCO<sub>3</sub> 2 g, peptone 3 g, distilled water 1 000 mL, pH 7.5, temperature 28°C, 170 r/min, fermenting 4 days.

**Key words:** rehmanniae fusarium wilt; fermentation condition; fermentation medium