

立枯丝核菌拮抗青霉菌发酵液稳定性研究

安婧婧¹, 沈瑞清² (1. 银川市兴庆区农业农村和水务局, 宁夏银川 750001; 2. 宁夏农林科学院植物保护研究所, 宁夏银川 750001)

摘要 研究立枯丝核菌拮抗青霉菌绳状青霉和草酸青霉发酵液稳定性, 为今后生防青霉菌的开发提供理论依据。采用牛津杯法测定立枯丝核菌拮抗青霉菌绳状青霉、草酸青霉发酵液对于温度和酸碱度的稳定性, 结果发现, 绳状青霉菌发酵液在 20 ℃、处理 10 min 和 pH=3、处理 2 h 的情况下, 抑菌活性最高, 而当温度超过 50 ℃, 中性条件会抑制绳状青霉菌的抑菌活性; 草酸青霉菌发酵液在 40 ℃、处理 10 min 和 pH=9、处理 2 h 的情况下抑菌活性最高, 而当温度超过 60 ℃, 中性条件或过碱性条件会抑制该菌株的抑菌活性。

关键词 拮抗菌; 发酵液; 稳定性; 牛津杯法

中图分类号 S432.4⁺4 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2022)08-0129-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.08.035



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Stability of Fermentation *Penicillium* Produced by Antagonistic Strain against *Rhizoctonia solani*

AN Jing-jing¹, SHEN Rui-qing² (1. Agricultural, Rural and Water Bureau of Xingqing, Yinchuan, Ningxia 750001; 2. Institute of Plant Protection, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Yinchuan, Ningxia 750001)

Abstract To explore the stability of fermentation *Penicillium funiculosum* produced by antagonistic strain against *Rhizoctonia solani*, which could provide theory basis for the future development of *Rhizoctonia solani* biocontrol agents. This study tested the temperature stability, acid and alkali stability of fermentation *Penicillium funiculosum* and *Penicillium oxalicum* produced by antagonistic strain against *Rhizoctonia Solani-In* by Oxford cup method. The study showed that *Penicillium funiculosum* had the highest antibacterial activity while 20 ℃, 10 min and pH=3, 2 h, but when the temperature was higher than 50 ℃, and neutral conditions would inhibit the antibacterial activity of its strain, and *Penicillium oxalicum* had the highest antibacterial activity while 40 ℃, 10 min and pH=9, 2 h, but when the temperature was higher than 60 ℃, and neutral conditions and more alkaline conditions would inhibit the antibacterial activity of its strain.

Key words Antagonistic bacteria; Fermentation broth; Stability; Oxford cup method

立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)分布广泛, 适应能力强, 生长速度快, 由它引起的立枯病在全国各地均有不同程度的发生, 尤其在育苗中后期发病严重, 常造成大量死苗甚至毁床^[1-2]。近年宁夏区内有许多马铃薯种植区无法倒茬, 致使土壤中病原菌数量逐年增加, 因此加重了黑痣病的发生并带来了较大的经济损失^[3]。目前对于病原真菌的控制方法主要有加强田间管理、培育抗病品种、使用化学药剂等。但在实践中发现这些方法都很难达到防治效果, 因此采用生防制剂防治病原微生物受到越来越多的重视, 且已经成为防治植物病害的重要途径。生防制剂在实际应用过程中, 容易受到自身稳定性的影响, 同时其生物活性物质能否有效地发挥作用也与自身的稳定性有密切关系^[4-6]。即使筛选得到了抑菌效果良好的菌株, 也可能因生物活性物质稳定性差而无法在生产实践中应用, 因此对拮抗生防菌抑菌活性稳定性探究十分必要。笔者对立枯丝核菌拮抗青霉菌发酵液稳定性进行研究, 为生防菌的开发和抑菌活性物质的分离纯化提供理论依据^[6-8]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 立枯丝核菌。立枯丝核菌来自宁夏农林科学院植物保护研究所植物病理实验室, 分离自立枯丝核菌侵染的马铃薯病薯。

1.1.2 青霉菌。毒霉菌分离自土壤中。

1.1.3 培养基。发酵所用的培养基为 PDA 液体培养基; 对

峙所用的培养基为 PDA 培养基^[9]。

1.2 方法

1.2.1 拮抗青霉菌菌株发酵液的制备。将接于 PDA 平板上经活化的绳状青霉菌和草酸青霉菌用直径 5 mm 的打菌器打成菌饼, 接于 50 mL 的 PDA 液体培养基中, 在摇床上振荡 3 d, 将发酵液在高速离心机 800 r/min 下离心 15 min, 后用微孔滤膜过滤, 得到青霉菌菌株的无菌发酵液^[10-11]。

1.2.2 菌株发酵液对温度的稳定性。将菌株的浓缩发酵液分别在 20、30、40、50、60 ℃ 条件下处理 10、20、30 min 后, 吸取 5 μL 浓缩发酵液, 用牛津杯法做与立枯丝核菌的对峙试验, 每个温度梯度重复 3 次, 根据其生长情况测定发酵液对温度的稳定性。

1.2.3 菌株发酵液对 pH 的稳定性。分别配制 1 mol/L 的 HCl 和 1 mol/L 的 NaOH, 用该酸和碱将无菌发酵液的 pH 分别调至 3、5、7、9、11 后, 分别放置 1、2、3 h, 再将发酵液调回到原始酸碱度, 吸取浓缩发酵液 5 μL, 用牛津杯法做与禾谷镰刀菌的对峙试验, 每个梯度重复 3 次, 根据菌株生长情况测定发酵液对酸碱的稳定性。

2 结果与分析

2.1 绳状青霉菌菌株对温度和 pH 的稳定性 绳状青霉菌菌株无菌发酵液在试验各温度梯度处理不同时间与立枯丝核菌做对峙培养的生长情况见表 1。从表 1 可以看出, 在所有温度梯度的不同时间处理下, 拮抗活性最好的处理是 20 ℃、10 min, 在 20~40 ℃ 的处理温度下, 其拮抗活性的变化没有明显规律, 当温度升高到 50 ℃ 时, 菌株发酵液的拮抗活性随温度的升高和处理时间的增长而呈下降趋势, 即当温度升高到 50 ℃, 菌株发酵液的抑菌活性开始下降, 且随着处理时间

基金项目 宁夏人才托举工程项目(TJGC2019081)。

作者简介 安婧婧(1991—), 女, 宁夏固原人, 硕士研究生, 研究方向: 青霉属真菌分类。

收稿日期 2021-08-06

的增长,下降幅度越大,但当温度升高到 60 ℃ 时,则抑制了菌株发酵液的生长。由此可知,立枯丝核菌拮抗绳状青霉的

抑菌活性物质在 40 ℃ 以下具有相对稳定性,对高温不具有耐受力。

表 1 不同温度处理对绳状青霉菌株发酵液稳定性的影响

Table 1 Effect of different temperature treatments on the stability of *Penicillium funiculosum* fermentation broth

温度 Temperature//℃	时间 Time//min	直径 Diameter//mm					
		5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d
20	30	34.0	36.0	38.0	41.0	43.0	45.5
	20	25.5	30.5	33.5	37.5	46.5	48.5
	10	32.5	38.5	42.0	49.0	53.0	56.0
30	30	28.0	32.0	34.0	38.0	44.0	48.0
	20	31.0	34.5	36.0	39.5	45.5	49.5
	10	31.5	35.0	37.0	39.0	45.0	48.5
40	30	26.0	33.0	35.0	41.0	52.0	54.0
	20	25.0	30.0	32.0	39.5	51.0	51.0
	10	24.0	28.0	34.0	39.5	48.0	51.0
50	30	21.0	24.0	31.0	36.0	41.0	45.0
	20	23.0	26.0	31.0	36.5	43.0	47.0
	10	24.0	26.5	32.5	37.0	45.5	49.5
60	30	0	0	0	0	0	0
	20	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0
CK	—	28.0	32.0	37.0	45.0	50.0	55.0

绳状青霉菌株发酵液在不同 pH 下处理不同时间与立枯丝核菌做对峙试验,结果见表 2。由表 2 可知,在所有处理中,pH=3、处理 2 h 时菌株发酵液具有最高活性,其生长势最好,对立枯丝核菌的抑制效果最强,pH=9、处理 1 h 抑制效果次之。而抑菌活性最弱的处理是 pH=7、处理 2 h,表现为生

长势最弱。其他不同 pH 下的处理之间和相同 pH 不同时间的处理之间均无显著差异。由此可知,立枯丝核菌拮抗绳状青霉菌菌株的抑菌物质在酸性和碱性条件下均能发生抑菌作用,而在中性条件下抑菌活性最低,即中性条件会抑制该菌株发酵液的抑菌活性。

表 2 不同 pH 处理对绳状青霉菌株发酵液稳定性的影响

Table 2 Effect of different pH treatments on the stability of *Penicillium funiculosum* fermentation broth

pH	时间 Time//h	直径 Diameter//mm					
		5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d
3	3	30.0	34.0	41.0	47.0	51.0	56.3
	2	34.0	40.3	46.0	55.5	61.0	66.3
	1	30.0	35.3	41.3	48.0	53.0	57.2
5	3	29.7	35.0	39.5	46.0	50.3	55.5
	2	28.7	33.5	39.7	47.0	52.5	57.3
	1	31.3	35.8	40.3	46.5	54.3	59.0
7	3	25.5	30.3	35.8	41.5	47.0	52.5
	2	23.8	27.0	32.5	38.5	45.8	51.0
	1	28.8	31.5	36.5	42.0	48.5	53.3
9	3	25.5	31.0	36.8	42.8	47.0	53.5
	2	24.5	30.5	36.5	42.5	48.3	54.0
	1	33.0	38.3	43.8	53.8	58.3	62.5
11	3	28.5	33.5	38.8	45.8	50.5	56.0
	2	24.5	29.5	36.8	42.0	47.8	53.5
	1	29.0	32.5	37.5	44.5	50.5	55.3
CK	—	28.0	32.0	37.0	45.0	50.0	55.0

2.2 草酸青霉菌株对温度和 pH 的稳定性 草酸青霉菌株无菌发酵液在试验各温度梯度下处理不同时间与立枯丝核菌对峙培养的生长情况见表 3。由表 3 可知,在 40 ℃、10 min 的处理下,该菌株发酵液的生长情况最好,与未经处理的对照组最为接近。20 ℃、20 min 的处理和 60 ℃、10 min 的处理次之,生长情况最差的是 50 ℃、30 min 的处理,而当

60 ℃ 处理 20 min 以上则完全抑制菌株发酵液的生长,其他处理之间差异不大。单看各温度的组内处理之间的生长情况,发现除 20 ℃ 外,其他温度组内处理之间都是 10 min 处理下的生长情况优于 20、30 min 处理下的生长情况。由此可知,立枯丝核菌生防青霉菌草酸青霉菌株发酵液在 40 ℃、处理 10 min 时具有最高活性,对高温不具有耐受力且处理时间不宜过长。

表 3 不同温度处理对草酸青霉菌株发酵液稳定性的影响

Table 3 Effect of different temperature treatment on the stability of *Penicillium oxalicum* fermentation broth

温度 Temperature//°C	时间 Time//min	直径 Diameter//mm					
		5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d
20	30	25.0	28.0	30.0	31.0	32.0	33.0
	20	26.0	28.0	31.0	33.0	35.0	37.0
	10	26.0	27.0	31.0	33.0	34.0	35.0
30	30	24.0	26.0	27.5	29.0	32.0	33.5
	20	24.0	26.0	28.0	30.5	32.0	33.5
	10	26.0	27.0	29.5	31.0	33.0	35.0
40	30	22.0	25.0	27.0	28.0	31.0	35.0
	20	21.0	23.0	25.0	27.0	30.0	33.0
	10	29.0	33.0	34.0	36.0	37.0	40.5
50	30	21.0	23.0	24.5	26.0	27.0	28.5
	20	23.0	26.0	27.0	30.0	32.0	33.5
	10	24.0	26.5	28.0	31.0	33.0	35.5
60	30	0	0	0	0	0	0
	20	0	0	0	0	0	0
	10	23.0	27.0	31.0	33.0	35.0	37.0
CK	—	24.0	28.0	30.0	33.0	35.0	39.0

草酸青霉菌株发酵液在不同 pH 下处理不同时间与立枯丝核菌做对峙试验的生长情况见表 4。由表 4 可知,在 pH=9、处理 2 h 时,该菌株发酵液具有最高抑菌活性,pH=5、处理 1 h 时抑菌活性次之,而在 pH=11、处理 3 h 时抑菌活性

最低,表现为生长状况最差。从整体看,抑菌情况最差的是 pH 为 7 和 11 时,由此可以推断,该立枯丝核菌拮抗青霉菌草酸青霉菌株发酵液在中性条件和偏碱性条件下抑菌效果较差,即这 2 种条件会抑制该菌株发酵液的抑菌活性。

表 4 不同 pH 处理对草酸青霉菌株发酵液稳定性的影响

Table 4 Effect of different pH treatment on the stability of *Penicillium oxalicum* fermentation broth

pH	时间 Time//h	直径 Diameter//mm					
		5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d
3	3	26.0	29.0	32.0	36.0	39.0	41.0
	2	27.0	31.0	35.0	37.0	39.0	43.0
	1	25.0	28.0	32.0	36.0	39.0	44.0
5	3	23.0	25.0	29.0	32.0	35.5	37.0
	2	24.0	27.0	32.0	36.0	39.0	43.0
	1	28.0	32.0	36.0	38.0	41.0	44.5
7	3	24.0	26.0	28.0	33.0	35.5	37.5
	2	25.0	29.0	31.0	34.0	37.0	38.5
	1	24.0	28.0	30.0	33.0	35.0	37.5
9	3	23.0	26.0	29.0	34.0	36.0	39.0
	2	26.5	31.0	38.0	42.0	44.0	47.5
	1	26.0	31.5	34.0	36.0	39.0	42.0
11	3	19.0	22.0	25.0	27.0	29.0	32.0
	2	25.0	27.0	31.0	33.0	35.0	37.0
	1	24.0	26.0	31.0	33.0	35.0	38.0
CK	—	24.0	28.0	30.0	33.0	35.0	39.0

3 结论与讨论

生物防治是克服化学农药负效应的一条有效途径^[6],筛选生防菌、生防制剂等对于防治立枯丝核菌病具有十分重要的意义。该试验从土壤中筛选得到 2 株对立枯丝核菌拮抗作用较好的生防青霉菌,探究了温度和 pH 对其抑菌活性的影响,结果表明,绳状青霉菌菌株发酵液在温度 20 °C、处理 10 min 和 pH=3、处理 2 h 时,抑菌效果达到最好,对中性条件和高温不具有耐受力。草酸青霉菌株发酵液在 40 °C、处理 10 min 和 pH=9、处理 2 h 的情况下抑菌活性最高,对高

温、中性或过碱性条件不具有耐受力。

该研究结果表明,这 2 株拮抗青霉菌均具有相对稳定的热稳定性和酸碱稳定性,因此具有可开发成生防制剂的潜能。当然温度和 pH 也只是影响抑菌活性的部分因素,还有其他影响因子,如紫外光照射、无菌发酵液的培养条件^[12]等,都需进一步进行验证,此外,还需要进行田间防病试验,进一步检验其防效的稳定性,以便应用于生产实践,更好地发挥其生防作用。

(下转第 151 页)

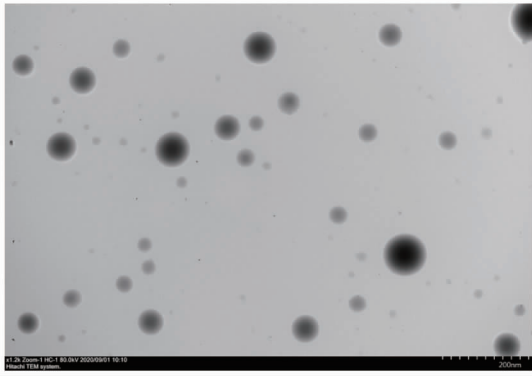


图2 呋塞米微乳透射电子显微镜照片

Fig.2 Electron microscope photograph of furosemide microemulsion

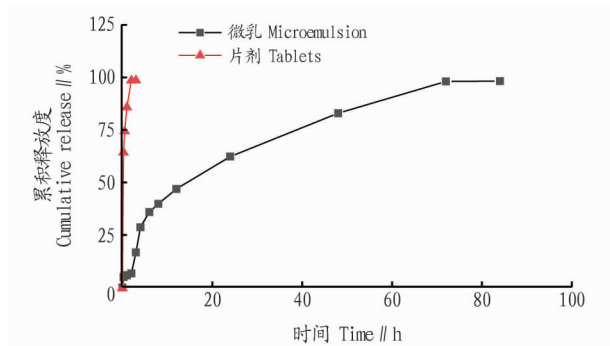


图3 呋塞米微乳与片剂体外累积释放曲线

Fig.3 Cumulative release curve of furosemide microemulsion and tablets in vitro

呋塞米处方中油相用量、 S_{mix} 与水的质量比、乳化时间 3 个因素建立多元回归模型,绘制效应面图,得到最佳处方,并通过验证,最终得到均一透明、载药量高、粒径小、透光率好、稳定性高的水包油型呋塞米微乳,可直接用于小儿口服,减小给药频率,增加呋塞米的生物利用度,也可以将其制备成软

胶囊、凝胶、滴丸等剂型,以满足不同的临床用药需求。

参考文献

- [1] VLACHOU M, GERANIOU E, SIAMIDI A. Modified release of furosemide from Eudragits® and poly(ethylene oxide)-based matrices and dry-coated tablets[J]. *Acta Pharm*, 2020, 70(1): 49-61.
- [2] THAPLIYAL A, KHAR R K, CHANDRA A. AgNPs loaded microemulsion using gallic acid inhibits MCF-7 breast cancer cell line and solid ehrlich carcinoma[J]. *Int J Polym Mater Polym Biomater*, 2020, 69(5): 292-316.
- [3] OKUR M E, AYL A S, YOZGATLI V, et al. Evaluation of burn wound healing activity of novel fusidic acid loaded microemulsion based gel in male Wistar albino rats[J]. *Saudi Pharm J*, 2020, 28(3): 338-348.
- [4] NAYAK K, MISRA M. Triamcinolone acetate-loaded PEGylated microemulsion for the posterior segment of eye[J]. *ACS Omega*, 2020, 5(14): 7928-7939.
- [5] ABU-AZZAM O, NASR M. *In vitro* anti-inflammatory potential of phloretin microemulsion as a new formulation for prospective treatment of vaginitis[J]. *Pharm Dev Technol*, 2020, 25(8): 930-935.
- [6] 赵颖, 宋婷, 屈梦华, 等. 松萝酸自微乳的处方优化及质量评价[J]. *中国药房*, 2018, 29(3): 312-317.
- [7] ZHAO L L, WANG Y, ZHAI Y J, et al. Ropivacaine loaded microemulsion and microemulsion-based gel for transdermal delivery: Preparation, optimization, and evaluation[J]. *Int J Pharm*, 2014, 477(1/2): 47-56.
- [8] 胡佳慧. 五味子木脂素自微乳滴丸的制备及其在大鼠体内的药动学研究[D]. 长春: 吉林大学, 2019.
- [9] PATEL H K, BAROT B S, PAREJIYA P B, et al. Topical delivery of clobetasol propionate loaded microemulsion based gel for effective treatment of vitiligo: *Ex vivo* permeation and skin irritation studies[J]. *Colloids Surf B: Biointerfaces*, 2013, 102: 86-94.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版 二部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 466.
- [11] 陈伶俐, 晏亦林, 罗燕娜, 等. Box-Behnken 实验设计法优化岩白菜素自微乳剂处方的研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2017, 28(4): 528-533.
- [12] 徐翔英, 谢秋情, 郑冬梅, 等. 星点设计-响应面法优选细梗香草总皂苷自微乳处方[J]. *中国药学杂志*, 2017, 52(22): 2012-2017.
- [13] 张菁楠, 胡艳秋, 张军威, 等. Box-Behnken 响应面法优化交泰丸有效部位口服自微乳的制备方法[J]. *华西药学杂志*, 2018, 33(4): 359-363.
- [14] 龙凯花, 王春柳, 李晔, 等. Box-Behnken 响应面法优化穿心莲内酯自微乳的制备工艺[J]. *中国药房*, 2018, 29(24): 3372-3375.
- [15] 钟琳琳, 田湾湾, 刘彩凤, 等. 川芎嗪微乳的制备及不同粒径微乳体外释放对比研究[J]. *中草药*, 2019, 50(21): 5231-5238.
- [16] ZHAO Z Y, LIAN Y F, ZHU Y H, et al. Depot lidocaine-loaded microemulsion for prolonged local anesthesia: Different efficacy model studies[J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2020, 55: 2021-01-17. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101404>.

(上接第 131 页)

参考文献

- [1] 田淑慧, 张启林, 杜宜新, 等. 拮抗立枯丝核菌的木霉菌株筛选[J]. *仲恺农业技术学院学报*, 2006, 19(1): 14-17.
- [2] 王迪轩. 大棚蔬菜苗期立枯病的防治[J]. *湖南农业*, 2004(3): 13.
- [3] 曹春梅, 李文刚, 张建平, 等. 马铃薯黑痣病的研究现状[J]. *中国马铃薯*, 2009, 23(3): 171-173.
- [4] 嵇豪, 蒋冬花, 杨叶, 等. 响应面法优化超声波辅助提取红曲米中水溶性色素[J]. *浙江师范大学学报(自然科学版)*, 2011, 34(1): 91-96.
- [5] 张华东. 立枯丝核菌毒素的产生及与致病力的关系[D]. 扬州: 扬州大学, 2003.
- [6] 张艳军. 番茄早疫病病菌拮抗菌发酵液稳定性分析[J]. *生物技术*, 2012, 22(6): 74-77.
- [7] VISAGIE C M, HOUBRAKEN J, FRISVAD J C, et al. Identification and no-

menclature of the genus *Penicillium*[J]. *Studies in mycology*, 2014, 78: 343-371.

- [8] 彭振红. 马铃薯黑痣病生防菌的筛选及抑菌机理的初步研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2012.
- [9] 杨利珍, 周乐, 徐虹, 等. 一株青霉菌的分离鉴定及抑菌活性成分研究[J]. *西北农业学报*, 2009, 18(4): 98-102.
- [10] 辛志宏, 方玉春, 朱天骄, 等. 海绵来源真菌黄灰青霉 Sp-19 中的抗肿瘤活性成分研究[J]. *中国海洋药物*, 2006, 25(6): 1-6.
- [11] GE H M, SHEN Y, ZHU C H, et al. Penicidones A-C, three cytotoxic alkaloidal metabolites of an endophytic *Penicillium* sp.[J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(2): 571-576.
- [12] REN H, GU Q Q, CUI C B. Anthraquinone derivatives produced by marine-derived *Penicillium flavidorsum* SHK1-27 and their antitumor activities[J]. *Chinese journal of medicinal chemistry*, 2007, 17(3): 148-154.