

# Study on Antibacterial Activity of *Streptomyces* sp. Fermenting Products

Juan Hu\*, Li Zhao, Yongjun Kan, Chang Jiang

Fujian Academy of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou Fujian  
Email: \*huj@fjtcn.edu.cn

Received: Jul. 12<sup>th</sup>, 2019; accepted: Jul. 31<sup>st</sup>, 2019; published: Aug. 7<sup>th</sup>, 2019

## Abstract

In this paper, the antibacterial activity of *Streptomyces* sp. fermenting products against plant pathogenic fungus was studied. The mycelial growth rate method and the crosshair line method were used to determine the diameter of colony expansion and to observe *Streptomyces* fermenting broth effect on the activity of *Pseudomonas aeruginosa*, *Thermoascus aurantiacus* and *Fusarium equiseti*. When *Streptomyces* fermenting broth was co-cultured with pathogenic bacteria for 72 hours, the average inhibition rates were 30.64% ( $P < 0.01$ ), 51.37% ( $P < 0.01$ ) and 12.29 ( $P < 0.05$ ) for *Pseudomonas aeruginosa*, *Fusarium equiseti* and *Thermoascus aurantiacus*, respectively. *Streptomyces* fermenting broth has the strongest inhibitory effect on *Fusarium equiseti*, and its principle is related to blocking the production of bacterial nucleic acid. *Streptomyces* fermenting broth had the weakest inhibitory effect on *Thermoascus aurantiacus* and had no significant effect on nucleic acid content of *Pseudomonas aeruginosa* and *Thermoascus aurantiacus*. *Streptomyces* fermenting broth showed different antibacterial activity against three kinds of plant pathogenic fungus.

## Keywords

*Streptomyces* Fermenting Broth, *Pseudostellaria heterophylla*, Plant Pathogenic Fungus, Inhibitory Action

## 链霉菌发酵产物抗菌活性的研究

胡娟\*, 赵立, 阚永军, 蒋畅

福建省中医药研究院, 福建 福州  
Email: \*huj@fjtcn.edu.cn

收稿日期: 2019年7月12日; 录用日期: 2019年7月31日; 发布日期: 2019年8月7日

\*通讯作者。

## 摘要

本文研究链霉菌发酵液对植物病原菌的抗菌活性。采用菌丝生长速率法、十字交叉法测定菌落扩展直径,考察链霉菌发酵液对所选大叶镰刀菌、子囊菌和木贼镰孢菌3种太子参种植中病原真菌活性的影响。链霉菌发酵液与病原菌共培养72 h,对大叶镰刀菌和木贼镰孢菌的平均抑制率分别为30.64%和51.37% ( $P < 0.01$ ),对子囊菌的抑制率为12.29 ( $P < 0.05$ )。链霉菌发酵液对木贼镰孢菌的抑制作用最强,其原理涉及阻碍菌体核酸的生成;大叶镰刀菌次之,对子囊菌的抑制作用最弱,对大叶镰刀菌和子囊菌的核酸含量没有显著的影响。链霉菌发酵液对3种植物病原菌呈现不同程度的抗菌活性。

## 关键词

链霉菌发酵产物, 太子参, 病原真菌, 抑制作用

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

链霉菌具有杀菌抑菌活性,通过发酵使其产生活性代谢产物是目前微生物农药开发的一个重要途径[1]。

福建柘荣太子参的种植面积及产量居全国之首,产销量占全国三分之二,成为农民收入的最主要来源。近几年,随着栽培年限的延长,太子参生产过程中出现了连作障碍现象,如长势变弱、病害加重、产量下降等问题[2][3]。太子参种植土壤酚酸类自毒物质含量增加,是产生连作障碍原因之一[4]。有学者认为连作障碍是由于作物长期连作导致土壤微生物群落受到破坏、多样性水平下降,病原微生物数量增加引起[5]。微生物菌肥在农业、中药种植中的应用受到人们广泛关注[6][7]。

太子参叶斑病和太子参根腐病是由真菌引起两种主要的病害,本文考察链霉菌的发酵产物对大叶镰刀菌、子囊菌和木贼镰孢菌等3种太子参种植中常见病原真菌生物活性的影响,为扩大链霉菌发酵产物应用范围、探索微生物菌肥的作用机制奠定基础。

## 2. 材料和方法

### 2.1. 仪器

XMT-A7000 型隔水式电热培养箱(上海实验仪器总厂), SW-CJ-1F 超净工作台(苏州净化设备有限公司), YXQG02 电热式蒸汽消毒器(山东新华医疗器械厂), ZHWY-200D 型摇床(上海智城分析仪器制造有限公司), 移液枪(德国 Eppendorf), DMI8/DFC550 型倒置荧光显微镜(德国 Leica 公司), VARIOSKAN FLASH 全波长扫描式多功能酶标仪(美国 Thermo 公司), ExCell biology 96 孔板。

### 2.2. 菌种和培养基

链霉菌(*Streptomyces* sp.), 大叶镰刀菌或铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*), 嗜热子囊菌(*Thermoascus aurantiacus*), 木贼镰孢菌(*Fusarium equiseti*)。以上菌种由宁德市南岭农业有限公司提供。

菌株培养基为葡萄糖 10.0 g, 酵母提取物 20.0 g, 蛋白胨 5.0 g, 磷酸氢二钾 2.0 g, 七水硫酸镁 0.5 g; 蒸馏水 1000 ml, 调节 pH 至  $7.0 \pm 0.2$ 。

发酵培养基为黄豆饼粉培养基(黄豆饼粉 20 g, 葡萄糖 20 g,  $\text{CaCO}_3$  8 g, NaCl 10 g, 蛋白胨 10 g, 蒸馏水 1000 ml, 调节 pH 7.2~7.4)。

菌活性测定培养基为 PDA 培养基(马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 15~20 g, 蒸馏水 1000 ml), 自然 pH。

肉汤培养基(北京陆桥有限公司), 一次性营养琼脂平板(规格 9 cm, 青岛海博生物技术有限公司)。

### 2.3. 链霉菌发酵产物制备

无菌水洗下培养好的链霉菌孢子, 配成孢子悬浮液。250 ml 三角瓶中装 100 ml 培养基, 按体积比 1:10 将孢子悬浮液加入发酵培养基中,  $28^\circ\text{C}$ ~ $30^\circ\text{C}$  发酵。96 h 后滤去菌丝, 冷冻干燥, 将得到的干物质用蒸馏水配成一定浓度, 备用。

### 2.4. 链霉菌发酵产物抗菌活性测定

采用菌丝生长速率法[8]测定链霉菌发酵产物对对所选 3 种植物病原菌的抗菌活性。PDA 培养基加热溶化高压灭菌, 冷却至  $50^\circ\text{C}$ ; 用蒸馏水将准确称量的链霉菌发酵液冻干粉稀释为 2 个浓度(1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 与灭菌的定量 PDA 培养基, 封盖, 放入 120 r/min 摇床中振荡充分摇匀, 并以等体积的蒸馏水加入到 PDA 培养基中作对照, 然后分别倒入直径为 90 mm 培养皿中冷却, 待培养基凝固制成平板。

将培养至对数生长期的大叶镰刀菌、嗜热子囊菌、木贼镰孢菌, 以 1%接种量(菌体浓度为  $10^6$  个/mL) 接种到肉汤培养基中, 制备菌饼。

以无菌操作手续, 用打孔器在每个培养基中央接入已制备好的供试病原菌菌饼(直径为 4 mm)菌丝面向下, 每皿等距离放置 3 个菌种, 然后将培养皿置于  $27^\circ\text{C}$  下恒温箱培养 3 d, 于接种后不同的时间点, 用十字交叉法测量菌落的 2 个直径, 取其平均值作为代表菌落的直径, 求出菌丝生长抑制率。抑菌率(%) = [(对照菌落直径 - 给药菌落直径)/对照菌落直径]  $\times$  100。

### 2.5. 菌体 DNA 和 RNA 相对含量变化的测定

取链霉菌发酵液高/中/低三种浓度作用 0 h, 4 h, 8 h, 12 h, 16 h, 20 h 和 24 h 的菌体样液(菌体浓度为  $10^6$  个/mL), 加入 3 倍体积的 4',6-二咪基-2-苯基吡啶(DAPI)染色液, 振荡 10 min 使其混匀, 然后立即用酶标仪进行荧光检测, DNA 和 RNA 的激发波长分别为 364 nm 和 400 nm, 测定三种不同菌种的 DNA 和 RNA DAPI 染色的荧光强度, 每组重复 3 次, 以等浓度的链霉菌发酵液为空白对照。

### 2.6. 统计分析

采用 SPSS 15.0 软件, 数据以均值( $\bar{x} \pm se$ )的形式表示, 二组间的比较用检验, 二个以上组间的比较用 ANOVA/Holm-Sidak 统计软件处理。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义,  $P < 0.01$  为有非常显著差异。

## 3. 结果与讨论

### 3.1. 链霉菌发酵液对病原菌的抑制作用

在链霉菌发酵液浓度为 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时完全抑制菌丝生长。当供试浓度降为 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 链霉菌发酵液与病原菌共培养 24 h 后真菌开始繁殖; 共培养 48 h, 与空白对照组相比大叶镰刀菌和木贼镰孢菌的

菌落直径减小( $P < 0.05$ ), 而子囊菌减小的差异性不显著; 共培养 72 h, 与空白对照组相比大叶镰刀菌和木贼镰孢菌的菌落直径显著减小( $P < 0.01$ ), 子囊菌的菌落直径也有所减小( $P < 0.05$ )。见表 1。

**Table 1.** Diameter of bacteriostatic circle of Streptomyces fermentation broth to different strains ( $n = 3, \bar{x} \pm se$  mm)

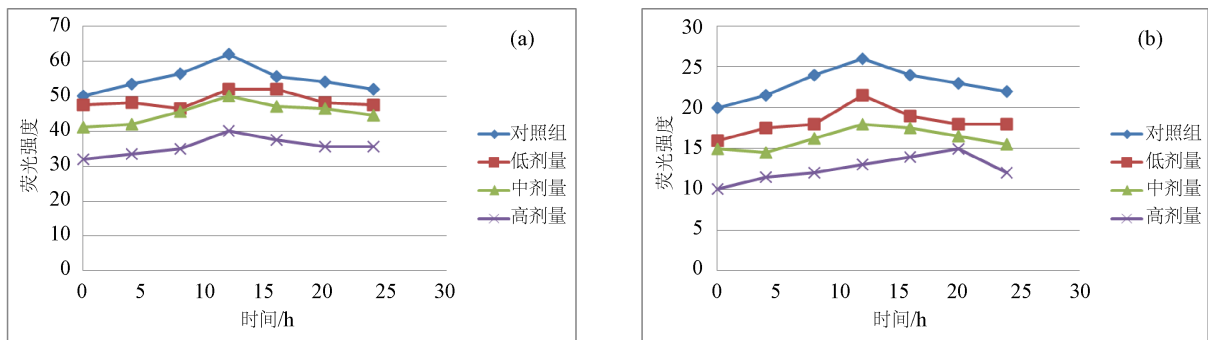
**表 1.** 链霉菌发酵液对不同菌种的抑菌圈直径( $n = 3, \bar{x} \pm se$  mm)

菌种类别	菌株在链霉菌发酵液中培养的时间					
	0 h		24 h		48 h	
			对照组	菌株组	对照组	菌株组
大叶镰刀菌	0 ± 0.00	0 ± 0.00	5.3 ± 2.88	4.6 ± 4.12*	17.3 ± 4.58	12.0 ± 4.23**
子囊菌	0 ± 0.00	0 ± 0.00	10.5 ± 3.60	9.8 ± 3.04	17.9 ± 3.26	15.7 ± 3.03*
木贼镰孢菌	0 ± 0.00	0 ± 0.00	4.9 ± 2.45	3.7 ± 1.77*	14.6 ± 2.45	7.1 ± 2.48**

注: 与对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

### 3.2. 链霉菌发酵液对病原菌的核酸含量的影响

空白对照组和 1000 μg/mL、500 μg/mL、100 μg/mL 三个不同剂量链霉菌发酵液组核酸含量的变化见图 1 所示, 经不同剂量链霉菌发酵液作用的木贼镰孢菌的核酸含量均比对照组降低, 当共培养 12 h 后, DNA 和 RNA 的荧光强度比对照组显著降低, 不同剂量链霉菌发酵液组的核酸含量都比对照组低, 说明链霉菌发酵液能阻碍木贼镰孢菌核酸的生成; 其中高剂量组减少的幅度最大, 作用效果比较好。与空白对照组比较, 经不同剂量链霉菌发酵液作用不同时间, 链霉菌发酵液对大叶镰刀菌和子囊菌的核酸含量没有显著的影响。



**Figure 1.** Effects of different doses of Streptomyces fermentation solution on the content of DNA (a) and RNA (b) of *Fusarium equiseti*

**图 1.** 不同剂量链霉菌发酵液对木贼镰孢菌 DNA (a)和 RNA (b)含量的影响

链霉菌发酵液与病原菌共培养 48 h, 对大叶镰刀菌和木贼镰孢菌的平均抑制率分别为 13.21%和 24.49% ( $P < 0.05$ ), 而对子囊菌的抑制率为 6.67%差异性不显著; 共培养 72 h, 对大叶镰刀菌和木贼镰孢菌的平均抑制率分别为 30.64%和 51.37% ( $P < 0.01$ ), 对子囊菌的抑制率为 12.29 ( $P < 0.05$ )。链霉菌发酵液对木贼镰孢菌的抑制作用最强, 大叶镰刀菌次之, 对子囊菌的抑制作用最弱。

## 4. 结论

微生物的代谢产物中发现了大量有价值的药物或先导化合物。目前, 用于临床的抗生素约有 80%来源于链霉菌, 其代谢产物为医药工作者提供了大量的研究素材, 包括大环内酯类、他汀类, 多肽类、氨

基香豆素等种类繁多的活性化合物。本课题组成员前期筛选实验中,发现了一株链霉菌,编号为 BOR-1227,其单菌落琼脂块具有抑菌活性。发酵液粗提物具有一定的抗血管新生能力,可进一步研究其抗癌活性。

本项目应用链霉菌发酵液的抗菌活性,选择太子参种植过程中可能出现的 3 类病原菌,考察链霉菌发酵液对大叶镰刀菌、木贼镰孢菌、子囊菌 3 个菌株的活性抑制率,链霉菌发酵液木贼镰孢菌的抑制作用最强,大叶镰刀菌次之,对子囊菌的抑制作用最弱。DAPI 即 4',6-二脒基-2-苯基吲哚,是一种能够与 DNA 强力结合的荧光染料。当 DAPI 与 DNA 结合时,DAPI-DNA 分子荧光强度大约会提高 20 倍;DAPI 也能够结合 RNA,其荧光强度是 DAPI-DNA 分子的 1/5;根据荧光强度的大小可以确定 DNA 和 RNA 的含量。本文研究表明,经链霉菌发酵液作用后木贼镰孢菌核酸含量降低,说明核酸的合成受到阻碍,经链霉菌发酵液可能是通过抑制菌落核酸的合成而达到抑菌效果。但链霉菌发酵液对大叶镰刀菌和子囊菌的核酸含量没有显著的影响。

本研究探索扩大链霉菌发酵产物应用范围、为中药材种植微生物菌肥的开发奠定基础。

## 基金项目

2016 年第一批福建省中青年教育科研项目(JAT160231)。

## 参考文献

- [1] 李晓虹,裴永娜,李学锋,李君剑,刘德容. 几株农用拮抗链霉菌的初步研究[J]. 微生物学杂志, 2006, 26(1): 26-28.
- [2] 林燕华,韩静,徐蔚,等. 太子参连作障碍的研究概况[J]. 中国民族民间医药, 2015, 24(18): 150-151.
- [3] 林茂兹,王海斌,林辉锋. 太子参连作对根际土壤微生物的影响[J]. 生态学杂志, 2012, 31(1): 106-111.
- [4] 吴丹,赵立,庞文生,周美兰,胡娟. 太子参根际土壤酚酸类自毒物质的分析测定[J]. 中国民族民间医药, 2017, 26(24): 32-34.
- [5] 袁婧,李金玲,刘宇鹏,武子茜,曹国瑶,赵致,王华磊,刘红昌. 不同生长期太子参根际土壤的理化性质及微生物数量[J]. 贵州农业科学, 2014, 42(10): 138.
- [6] 武兴友. 微生物菌肥对农业生产的影响及研究趋势分析[J]. 中国果菜, 2018, 38(4): 9-11, 15.
- [7] 吕亚慈. 微生物菌肥对麻山药产量及品质的影响[J]. 衡水学院学报, 2018, 20(3): 15-17.
- [8] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.

### 知网检索的两种方式:

1. 打开知网首页: <http://cnki.net/>, 点击页面中“外文资源总库 CNKI SCHOLAR”, 跳转至: <http://scholar.cnki.net/new>, 搜索框内直接输入文章标题, 即可查询; 或点击“高级检索”, 下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2324-7967, 即可查询。
2. 通过知网首页 <http://cnki.net/> 顶部“旧版入口”进入知网旧版: <http://www.cnki.net/old/>, 左侧选择“国际文献总库”进入, 搜索框直接输入文章标题, 即可查询。

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: [ije@hanspub.org](mailto:ije@hanspub.org)