

EXTRACTION AND APPLICATION OF
BIOGENIC ANTAGONISTIC SUBSTANCES



生物源拮抗物质的 提取及应用

于淑池 著

 北京理工大学出版社
BEIJING INSTITUTE OF TECHNOLOGY PRESS

生物源拮抗物质的 提取及应用

于淑池 著

 **北京理工大学出版社**
BEIJING INSTITUTE OF TECHNOLOGY PRESS

前 言

生物防治是借自然的作用或拮抗物以减少病原菌接种体密度的方法。传统的病害防治是根据微生物间的相生相克,利用或引进无害微生物来控制有害微生物生长的。1987年,Baker将病害生物防治的定义扩大为:“以一种或多种生物(包括寄主植物,但人除外)来减少病原菌数量或控制病害发生发展,以实现病害防治的方法。”这使得现代生物防治已不再仅仅是利用微生物间的相克作用,植物、微生物通过释放化学物质到环境中而产生对其他生物直接或间接的有害作用。这些物质称为拮抗物质或化感物质,它们主要是微生物或植物的次生代谢产物,分子量小、结构简单、易于提取、对病原菌作用强、对环境无害,因此利用拮抗物质进行生物防治,不会产生新的生态和环境问题,属于环境友好型生物活性物质。

本书共分三部分,分别从细菌源拮抗物质、植物源芦苇、香樟拮抗物质的提取及抑菌活性应用研究等方面进行阐述。每一部分都自成一体,理论联系实际,具有很强的科研指导性。全书重点在第一部分,详细阐述了拮抗菌的分离、鉴定,细菌源拮抗物质即抗菌蛋白的提取、纯化,及活菌实际田间抗真菌应用定植实践。第二、三部分分别对植物源芦苇和香樟叶水提取和有机物提取的方法、抑菌活性展开了详细的分析研究。本书把实验室的科学研究和实际应用联系起来,突出了科研的应用性,更是侧重介绍读者如何具体开展科学研究实验,有利于读者快速了解并掌握相关研究方法和研究背景。

本书的第一部分,由著者在石志琦、张立平老师的指导下完成,第二、三部分由著者指导湖州师范学院生命科学学院的多名学生完成,她们分别是邓红英、姜燕、汪晓莹、李经纬、童铁璇、汪梓欣、张虹、莫晓意、卢亚丽,在此对她们

所做的试验工作表示最深切的谢意,并对石志琦、张立平老师表示深深的谢意。

本书集实验室研究和实践应用于一体。通过实验材料和方法的详细阐述,总结整理出实验结果和相应结论,并展开详细的讨论分析。为从事相关研究的读者提供了研究基础、理论背景和相应研究进展。另外,紧扣生物研究实际,对生物资源的提取、拮抗成分的开发利用指出了新的方向,可以为新型生物农药的研究提供来源,同时又是环境保护对当今科研提出的要求,生物源拮抗物质取自生物,安全无污染,在农业生产以化学农药占主导地位的当下,本书的应用研究就显得意义更加重大。本书行文言简意赅、易读易懂,对不同层次的读者都有一定的借鉴作用。

由于著者水平有限,缺点和错误在所难免,请广大读者和同行专家提出宝贵意见。

著者

2015年12月

目 录

第一部分

第1章 细菌拮抗物质的提取及应用	3
1.1 拮抗细菌作为生物防治手段研究概况	3
1.2 拮抗细菌产生的活性物质和拮抗机理研究概况	9
1.3 拮抗细菌在生防领域的应用	14
1.4 本研究的主要内容及意义	19
第2章 拮抗菌 B-FS01 的鉴定	22
2.1 材料与方法	22
2.2 结果与分析	23
2.3 小结	26
第3章 拮抗菌 B-FS01 对植物病原真菌的拮抗作用	28
3.1 材料与方法	28
3.2 结果与分析	30
3.3 小结	32
第4章 拮抗菌 B-FS01 在番茄体表的定殖试验	34
4.1 材料与方法	34
4.2 结果与分析	38
4.3 小结	40

第5章 B-FS01 拮抗蛋白的纯化及理化性质分析	41
5.1 材料与方法	41
5.2 结果与分析	46
5.3 小结	52
参考文献	56

第二部分

第1章 芦苇浸出液对铜绿微囊藻的抑藻作用	69
1.1 引言	69
1.2 材料与方法	70
1.3 结果	72
1.4 讨论	77
1.5 总结与展望	79
参考文献	80
第2章 不同环境条件对芦苇化感物质抑藻的影响	83
2.1 引言	83
2.2 材料与方法	84
2.3 结果	88
2.4 讨论	92
2.5 总结与展望	94
参考文献	95
第3章 芦苇秆浸出液抑藻的最佳环境条件研究	99
3.1 引言	99
3.2 材料与方法	100
3.3 结果	105
3.4 讨论	111

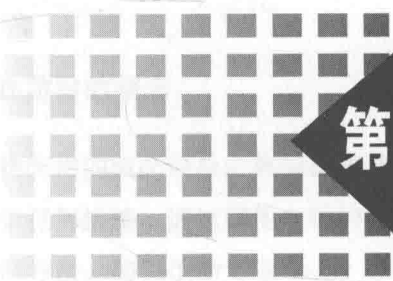
3.5 总结与展望	113
参考文献	114
第4章 芦苇有机提取物对铜绿微囊藻抑制作用的研究	117
4.1 引言	117
4.2 材料与方法	118
4.3 结果	122
4.4 讨论	125
4.5 总结与展望	129
参考文献	129

第三部分

第1章 香樟叶水提物对铜绿微囊藻抑制作用研究	135
1.1 引言	135
1.2 材料与方法	136
1.3 结果与分析	141
1.4 讨论	145
1.5 总结与展望	146
参考文献	147
第2章 香樟叶不同有机溶剂提取物抑藻作用研究	150
2.1 引言	150
2.2 材料与方法	151
2.3 结果	154
2.4 讨论	160
2.5 总结与展望	162
参考文献	163
第3章 香樟叶分级萃取物抑藻作用研究	166

3.1 引言	166
3.2 材料与方法	167
3.3 结果与分析	169
3.4 讨论	175
3.5 总结与展望	177
参考文献	177

植物与动物作为生物圈的重要组成部分



第一部分

植物与动物

植物与动物

植物与动物作为生物圈的重要组成部分

植物与动物作为生物圈的重要组成部分

植物与动物作为生物圈的重要组成部分

植物与动物作为生物圈的重要组成部分

植物与动物作为生物圈的重要组成部分

植物与动物作为生物圈的重要组成部分

植物与动物作为生物圈的重要组成部分

植物与动物作为生物圈的重要组成部分

植物与动物作为生物圈的重要组成部分

植物与动物作为生物圈的重要组成部分

植物与动物作为生物圈的重要组成部分

植物与动物作为生物圈的重要组成部分

植物与动物作为生物圈的重要组成部分

植物与动物作为生物圈的重要组成部分

第1章 细菌拮抗物质的提取及应用

1.1 拮抗细菌作为生物防治手段研究概况

1.1.1 生物防治的概念

植物病害生物防治的概念最早由英国植病学家 Garratt (1965) 提出, 即在任何条件下或借助于任何措施, 通过其他生物的作用减少病原物的生存和活动, 从而减轻病害发生的办法。美国生防专家 Baker (1974) 指出^[1]: 植物病害的生物防治是借自然的作用或借调节环境、寄主或拮抗物, 以减少病原菌接种体密度的方法。传统的病害防治是根据微生物间的相生、相克, 利用或引进无害微生物, 以控制有害微生物, 防治病害。1987 年, Baker 将病害生物防治的定义扩大为: “以一种或多种生物 (包括寄主植物, 但人除外) 减少病原菌数量或病害发生发展, 以实现病害防治的方法。”这使得现代生物防治已不再仅仅是利用微生物间的相克作用, 还包括微生物之间在氧、水分、营养及空间等各方面的竞争作用, 微生物间的交叉保护作用, 天然植物防病及抗菌物质以及以分子生物学手段和诱导剂等提高植物的抗病性等。近年来, 对生物防治的研究主要集中在诱发寄主抗性、利用植物次生物质和拮抗微生物等方面^[2]。

1.1.2 生物防治的重要性

半个世纪以来, 用化学农药防治病虫害对农业生产起了十分重要的作用。虽

然农药对农业生产的发展功不可没,但长期、广泛、大量、连续地使用化学农药,已造成一系列严重后果^[3]:

(1) 植保工作方面

过量地使用农药杀伤了病菌、害虫在自然界的天敌,导致病虫害再度猖獗,并造成病菌、害虫产生抗药性,而且用药量越来越大,形成恶性循环;同时,有害生物的多样性和变异性给病虫害的化学防治也带来了困难。这些都造成病虫害越来越严重,同时带来防治费用急剧增加等问题。实践说明,单靠化学农药已不能解决植保问题。

(2) 环境污染问题

化学农药的工厂生产和田间使用都是产生环境污染的重要来源。农药的使用对空气、土壤和水域造成污染,土壤残留量严重超标,进而使农副产品及畜牧产品农药残留严重超标,不仅危害了人类的身体健康,而且造成了很大的经济损失。

(3) 能源危机问题

当今世界,不论是发达国家,还是发展中国家,能源危机已成严重问题,节约能源的工作正在广泛开展。由于化学农药的工厂生产和使用都要消耗大量能源,而制造农药的原药,大多又是石油化工产品。不能过分依赖化学农药已成为全球共识。不少国家确定5~10年内减少50%化学农药用量的目标。为此,要积极利用生物防治手段防治农作物病虫害,减少化学农药的用量。生物防治,特别是生物农药的研究和开发自20世纪80年代以来受到了广泛重视。

生物防治是以生态学为基础,控制有害生物,是综合防治体系中一个必不可少的组成部分。它避免了化学农药使用带来的一系列植保、环境和能源方面的问题,避免了农药残留对人畜的危害,更重要的是促进了农业的可持续发展。

1.1.3 拮抗细菌作为生物防治手段的研究进展

以生物防治手段控制农作物病害的尝试,早在20世纪20年代就已经开始。1921年C. Hartley报道可以用十几种常见土壤腐生真菌和细菌防治树苗的腐霉根腐病。1926年Sanford报道土壤中某些拮抗性微生物对于土传病原菌具有抑制性^[4]。当时美国马铃薯上发生一种放线菌(*Streptomyces scabies*)引起的疮痂病。

1921年 Millard 报道施用绿肥可减轻这种病害,而 Sanford 经分析证明它是由于绿肥促使土中拮抗性放线菌增长所致,并指出其生物学防治的实质^[5],从此开始了寻找土壤拮抗微生物作为病害生防因子的研究。40年代和50年代开发利用拮抗性放线菌及它们产生的抗生素吸引了众多的科研工作者。60年代开始,人们逐渐转向寻找其他拮抗性微生物和生防技术的研究^[6],由拮抗性放线菌发展为利用一些快速生长繁殖的真菌、细菌以及病毒等,从利用腐生的土壤微生物发展到利用植物体微生态系中的微生物,防治的病害种类从种传和土传病害扩大到地上部分的气传和虫传病害。70年代以来,病害生物防治的研究和实践更为活跃,而且发展迅速。到80年代,我国陈延熙等研制出植物保健益菌——“增产菌”菌剂,提出“植物体自然生态系”的观点^[7],浙江、山西、四川等地应用拮抗性木霉菌防治丝核菌和小菌核菌所致病害也取得明显进展。进入80年代中后期,对芽孢杆菌 (*Bacillus spp*) 的研究更是进入了空前时期。

从各种生态环境中筛选出来的具有拮抗作用的细菌应用最多的只有几个属,主要是芽孢杆菌 (*Bacillus spp*)、假单胞菌 (*Pseudomonas spp*) 和放射性土壤杆菌 (*Agrobacterium radiobacter*) 等^[8-9]。现将其研究进展分述如下:

(1) 芽孢杆菌 (*Bacillus spp*)

芽孢杆菌是一群好氧或兼性厌氧、产芽孢的 G^+ 杆菌的总称。其生理特征丰富多样,分布极其广泛,极易分离培养,是土壤和植物体表、根际的重要微生物种群。芽孢杆菌突出的特征是能产生耐热抗逆的芽孢。这有利于生防菌剂的生产、剂型加工及在环境中的存活、定殖与繁殖^[10]。批量生产上工艺简单,成本也较低,施用方便,储存期长,是一种较理想的生防微生物。

芽孢杆菌可对马铃薯疮痂病、苹果红癌病、赤霉病等许多土传病害和地上部病害具有生防效果。用于生防的芽孢杆菌种类有枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)、多粘芽孢杆菌 (*B. polymyxa*)、蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、蕈状菌变种 (*B. cereus var. mycoides*) 等^[11]。现分述如下:

① 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的研究现状及应用

由于枯草芽孢杆菌具有抑制植物病害的能力,又是自然界中广泛存在的非致病细菌,对人畜无害,不污染环境,故备受各国研究工作者的青睐^[12]。

很多优良的枯草芽孢杆菌菌株已经被应用于生产实践。美国迄今已有 4 株枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 生防菌株获得环保局 (EPA) 商品化或有限商品化生产应用许可。它们是 GBO3, MBI600, QST713, 以及 *B. subtilis*, *amyloliquefaciens* FZB24^[13]。GBO3 和 MBI600 分别由美国 Gustafson 公司和 Microbio Ltd. 公司开发。根部施用或拌种可防治 *Fusarium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, 以及 *Rhizoctonia* 引起的豆类、麦类、棉花和花生根部病害。FZB24 为 Tensa 公司的产品, 商品名 Taegro TM, 被施用于温室或室内栽培树苗、灌木和装饰植物根部, 可防治 *Fusarium* 和 *Rhizoctonia* 引起的根腐病和枯萎病。QST713 为 AgraQuest 公司的产品, 商品名 Serenade[®]。叶面施用它, 能防治蔬菜、樱桃、葡萄、葫芦和胡桃的细菌和真菌的病害。此外, 澳大利亚开发的 *B. subtilis* A-13 对麦类和胡萝卜立枯病以及其他土传病害具有很好的防治和增产作用^[14]。日本东京技术研究所的 *B. subtilis* RB14 和 *B. subtilis* NB22 分别对 *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, 以及 *Pseudomonas solanacearum* 引起的番茄病害有良好的防效^[15]。

我国利用枯草芽孢杆菌防治植物病害的应用研究也达到了世界先进水平, 现已开发出一批生防作用优良的枯草芽孢杆菌菌株, 如 B916, B908, B3, B903, BL03, 以及 XML6^[16-19]。江苏农业科学院植物保护研究所的 B916 菌株对多种病原真菌和水稻白叶枯病菌都有显著抑制作用, 自从 1991 年至今对水稻纹枯病的田间防效稳定在 50%~81%, 目前已进行农药登记, 年使用面积达 6.7 万 hm²。南京农业大学生防菌 B3 (商品名麦丰宁) 对小麦纹枯病的田间防效为 50%~80%。莱阳农学院的 BL03 和 XML6 菌株对苹果霉心病和棉花炭疽病的田间防效达 90%^[18]。林东等 (2001) 发现, 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) S0113 对水稻白叶枯病菌 (*Xanthomonas oryzae*) 具有强烈的抑菌作用。谢栋等 (1998) 分离的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) BS-98, 能强烈抑制苹果轮纹病菌 (*Physalospora piricola*) 等植物病原真菌的拮抗菌株。将 *Bacillus subtilis* 接种在土壤中或做种子包衣, 可以防治玉米立枯病、洋葱黑腐菌核病等。该菌不但能减轻发病程度, 而且能促进小麦的生长, 增加产量^[20]。

② 其他的芽孢杆菌

Wadling 等 (1998) 报道, 短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) NCIMB 13374

能抑制草莓灰霉病菌的生长。崔云龙等(1995)通过平皿培养试验表明,短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*) D82 对小麦根腐病有强抗生作用。*B. pumilus* 和乳芽孢杆菌(*Lactobacillus sp.*) 都有防治豆类和番茄灰霉病的作用,能降低灰葡萄孢分生孢子的萌发和叶片腐烂的严重程度。

Oita 等和 Park Seonlee 等分别报道地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*) 和 *P. polymyxa* 对灰霉病菌的拮抗作用^[21]。黄绍宁等(1999)应用地衣芽孢杆菌和木霉防治基质栽培黄瓜苗期猝倒病。

裴炎等(1999, 2002)发现蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) 对多种作物真菌性病害有良好的防效^[22]。

Walker 等从豌豆和矮化法国菜豆外种皮和子叶上获得多粘芽孢杆菌(*B. polymyxa* = *Paenibacillus polymyxa*, 多粘类芽孢杆菌), 具有抗灰霉病菌的能力。张中鸽等(1994)在宁夏春全蚀病等土传病害发生严重的田块中, 从无显发病症状的植株根样中分离获得生防菌株多粘芽孢菌(*Bacillus polymyxa*) B48, 对棉花黄萎、黑根腐、炭疽病菌、赤霉病菌、玉米全蚀病菌、水稻白叶枯病菌、花生青枯病菌、马铃薯软腐病菌、黄瓜角斑、青椒疮痂等均具有强烈的抑制作用^[23]。

(2) 假单胞菌(*Pseudomonas spp*) 及其应用

近来, *Pseudomonas spp* 作为生防因子吸引了许多研究者的注意。20 世纪 70 年代, 美国的加州大学率先研究了该菌, 当时就引起了普遍关注。1978 年 Burv 等报道, 将 *P. fluorescens* 和 *P. pudita* 用在马铃薯种薯上可以改善马铃薯生长。已经证实, 将其应用在甜菜和萝卜上同样能改善其生长。Schroth 和 Hancock 总结来自大田试验的报告指出, 荧光假单胞菌能使马铃薯增产 5% ~ 33%。

Pseudomonas 属细菌在植物根围土壤中常常能大量增殖。许多菌株对植物有抑制病害、促进生长的作用。何远礼等人用荧光假单胞菌(*P. fluorescens*) JF1 菌株对花生种子浸泡接种, 菌液对土壤中青枯菌的侵染具有明显保护能力^[24]。在种类繁多的根际有益微生物中, 以荧光性假单胞菌(*fluorescent Pseudomonas spp.*, 包括 *P. fluorescens*, *P. cepacia*, *P. pudita* 等) 为主的植物促生菌(Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR) 由于具有营养要求简单、繁殖速度快, 以及根际定殖能力强等独有优点而成为 20 多年来研究报道最多、最具防病潜力和应用价

值的一类生防菌。祝新德等(2001)从上海郊区甜瓜地中分离得到一株具有广谱抑制植物真菌病害,并促进植物生长双重功能的荧光性假单胞菌 ML8 (*P. fluorescent* ML8)。楼兵干等(2001)发现铜绿假单胞菌 CR56 (*Pseudomonas aeruginosa* CR56)作为种子处理时,能有效地防治由腐霉(*Pythium spp*)和茄丝核菌(*Rhizoctonia solani*)引起的黄瓜和番茄的苗期猝倒病。研究表明,黄瓜根围比番茄根围更适合该菌的定殖^[25]。王远山等(2002)利用离体拮抗试验和烟草幼苗生物测定法研究了棉花根围细菌绿针假单胞菌(*Pseudomonas choloeaphitis*) PL9 菌株对烟草黑胥病病原菌——烟草疫霉——的拮抗作用。该菌株对烟草疫霉菌丝体有很强的抑制作用,并且可以完全抑制烟草疫霉游动孢子对烟草幼苗的侵染,其液体培养物浓缩过滤液也有相同的作用^[26]。

荧光假单胞菌株也能抑制植物的主要病原。例如全蚀病的生物控制,长期以来由于缺乏抗病寄主和经济的化学方法而无法控制。Weller 和 Cook 从全蚀病衰退的土壤中分离得到荧光假单胞杆菌。将单克隆菌株用于种子处理,可增产 10% 左右。将几个菌株结合使用,效果更好,可以增产 27% 以上。荧光假单胞菌还可以有效地防治 *Pythium ultimum* 引起的棉花猝倒病。

(3) 放射性土壤杆菌 (*Agrobacterium radiobacter*)

细菌作为生防因子应用的例子,是 20 世纪 70 年代澳大利亚的 Kerr 和 New 等用放射土壤杆菌 (*Agrobacterium radiobacter*) K84 菌株防治由 *Agrobacterium tumefaciens* 引起的许多植物的根癌病,并在许多国家得到推广^[27]。

澳大利亚的科学家发现,利用蔷薇、核果类果树的根肿病菌的近缘种 *Agrobacterium radiobacter* strain 84 能够防治这类根肿病;后来,又发现它对桃、苦扁桃根肿病也有很好的防治效果,现已被普遍应用于世界各地。将 *Agrobacterium radiobacter* strain 84 施于核果类果树或花卉根围土壤内,阻碍癌肿病原的蛋白质及细胞壁的合成,因而可预防根癌肿病^[24]。

近年来,放射性土壤农杆菌的研究取得了新进展,进一步证实了 K84 菌株对生物 II 型和生物 III 型(部分)土壤农杆菌的抑制性,对来自葡萄的生物 III 型细菌无效,但对核桃根癌病的防效可达 100%,并试验性地开发出了 K84 生物农药——根癌宁^[28]。

当然,拮抗细菌还有很多。如:Beer和Rnodle报道,草生欧文氏杆菌(*Erwinia herbicola*)能防治梨火疫病(*E. amylovora*)。张玉勋等(2000)研究了*P. fluorescence* 5号、15号菌株和*B. subtilis* M9及ML1菌株在大棚温室番茄上的定殖情况及其对灰霉病的控制效果。嗜麦芽黄单胞菌(*Xanthomonas maltophilia*)和假单胞菌的一些分离物具有防治豆类和番茄灰霉病的作用。*P. cepacia*和玫瑰花表生欧文氏菌(*Erwinia sp.*),以及另一种棒棍型细菌可防治玫瑰灰霉病。其效果与扑海因相似。Bryk等(1998)研究表明,草生欧文氏菌(*E. herbicola* = *Pantoea agglomerans*,成团泛菌)能抑制灰霉病菌孢子的萌发。Whitman等(1998)发现液化沙雷氏菌(*Serratia liquefaciens* = *S. proteamaculans* subsp. *proteamaculans*,变形沙雷氏菌变形斑变种)能抑制葡萄上灰霉病菌分生孢子的形成。

综上所述,近年来,拮抗细菌的筛选研究工作在我国十分活跃,研究者甚多,但缺乏系统性。筛选到的植物真菌病害的生防菌种类尽管繁多,但大多停留在拮抗活性的研究和田间防效上,真正分离到活性物质,并被应用于实际的菌种还很少。因此,我国在这方面应该加强研究。

1.2 拮抗细菌产生的活性物质和拮抗机理研究概况

1.2.1 拮抗细菌拮抗作用的物质基础

拮抗微生物在代谢活动中通过分泌抗菌物质直接对病原物产生抑制是自然界中普遍存在的现象,也是众多拮抗微生物应用的物质基础。作为微生物代谢产物的抗生素,对于抑制病原菌的侵染和病害的发展有着重要作用。传统的方法是用对峙培养法测定抑菌圈,以确定该菌在生物防治中是否有抗生素的涉及,但这种方法并不能直接证实实际的生态环境中抗生素依然产生并起到抑制病原的作用。最近,液相色谱分析证实了荧光假单胞菌在土壤中仍然可以产生抗生素。进一步运用遗传工程技术使荧光假单胞菌丧失抗生素的产生能力并随之失去防病能力,经修复还原抗生素代谢能力后,生物防治活性也恢复到野生菌株的水平,从而证明了抗生素在生防中的重要作用^[29]。