

DOI: 10.12101/j.issn.1004-390X(n).201805023

放线菌菌株 1331 发酵工艺优化及对南方根结线虫的作用效果^{*}

胡梦君，胡先奇^{**}，刘沛，梁艳，杨艳梅

(云南农业大学，省部共建云南生物资源保护与利用国家重点实验室，云南昆明 650201)

摘要:【目的】研究放线菌菌株 1331 的最佳发酵工艺条件，并探究其发酵液对南方根结线虫 2 龄幼虫的抑杀作用。【方法】在摇瓶试验中采用单因素筛选和正交试验对其发酵条件进行优化。【结果】该菌株的最佳摇瓶发酵培养基为发酵培养基Ⅱ；最佳发酵条件为装液量 80 mL (500 mL 摆瓶)，种子液接种量为 5% (体积分数)，初始 pH 值 7.0，培养温度 25 ℃，150 r/min 培养 7 d。该条件下菌株 1331 产孢量为 1.68×10^9 CFU/mL，其 5% 发酵稀释液处理南方根结线虫卵 9 d，卵孵化率与对照相比降低了 70.59%；10% 和 20% 发酵稀释液对南方根结线虫 2 龄幼虫 48 h 的校正死亡率分别达 88.97% 和 100%。【结论】放线菌菌株 1331 发酵液可有效抑杀南方根结线虫，具有潜在生防价值。

关键词: 放线菌；菌株 1331；发酵工艺；优化；根结线虫；生物防治

中图分类号: S 432.45 文献标识码: A 文章编号: 1004-390X (2020) 02-0213-08

Optimization of the Fermentation Conditions of Actinomycete Strain 1331 and Its Effects on *Meloidogyne incognita*

HU Mengjun, HU Xianqi, LIU Pei, LIANG Yan, YANG Yanmei

(State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources in Yunnan,
Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: [Purpose] In order to study the optimization of fermentation conditions and explore toxicity effects of 1331 fermented fluid to the second-stage juveniles of *Meloidogyne incognita* (Mi J2). [Method] Single-factor and orthogonal test were used in shaking flasks to optimize the fermentation conditions of strain 1331. [Result] The optimum fermentation culture medium was fermentation medium II. And the optimal fermentation condition was as follows: medium volume 80 mL in 500 mL shaking flask, inoculation size of 5% (volume fraction), initial pH 7.0, culture temperature 25 ℃, shaking at 150 r/min for 7 days. Under this condition, the sporulation of strain 1331 was 1.68×10^9 CFU/mL; compared with the control, the hatching rate of Mi J2 was lowered down by 70.59% by dealing with 5% 1331 supernatant fermented fluid 9 d, and the corrected mortality rate of Mi J2 was 88.97% and 100% by dealing with 10% and 20% 1331 supernatant fermented fluid for 48 h. [Conclusion] The strain 1331 fermented fluid had toxicity to Mi J2.

Keywords: actinomycetes; strain 1331; fermentation; optimization; root-knot nematode; biological control

收稿日期: 2018-05-10 修回日期: 2018-05-15 网络首发时间: 2020-04-27 09:40:09

*基金项目: 云南省现代农业蔬菜产业技术体系建设专项 (2018KJTX0011)。

作者简介: 胡梦君 (1991—)，女，河南商丘人，硕士研究生，主要从事植物线虫病害防治研究。

E-mail: hmj521dyx@126.com

**通信作者 Corresponding author: 胡先奇 (1965—)，男，云南盐津人，博士，教授，主要从事植物病理学和植物线虫学研究。E-mail: xqhoo@126.com

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20200426.1731.003.html>



根结线虫属于侧尾腺纲 (Secerneentea)、垫刃目 (Tylenchida)、根结线虫科 (Meloidogynidae)、根结线虫属 (*Meloidogyne*)^[1]，是一类高度专化型的植物内寄生线虫，也是世界各国对外检疫对象^[2]。植物根结线虫病是设施蔬菜生产中的常发病害，发生程度逐年加重，致使蔬菜减产 30%~50%，甚至绝收^[3]。其中，南方根结线虫 (*M. incognita*)、花生根结线虫 (*M. arenaria*)、爪哇根结线虫 (*M. javanica*) 和北方根结线虫 (*M. hapla*) 4 种线虫危害最重。在中国，以南方根结线虫分布最广，危害最大。因此，如何有效防治植物根结线虫病是人类面临的重要问题。多年来，化学农药的广泛应用造成严重的环境和健康问题，用生物防治根结线虫病，因其有效、安全和经济的特点越来越受到人们的重视^[4]。

筛选线虫生防菌和开发利用线虫生防资源菌株是根结线虫生物防治的一个重要环节。在 20 世纪 70~80 年代，欧美国家植物线虫防治工作者就对防治植物寄生线虫菌物进行了较详细的调查。这些调查主要集中在胞囊线虫 (*Heterodera* sp. 和 *Globodera* sp.) 的生防菌上，根结线虫生防菌的调查则较少。在世界各国科技工作者的不懈努力下，根结线虫生防菌的调查研究工作已经取得了一定的进展。放线菌作为一类控制植物病原传播的重要微生物资源，对病原生物有很高的拮抗作用和寄生性。由放线菌产生的活性物质已超过 10 000 个，为所有微生物活性代谢物的 45%^[5]，因此放线菌在药物开发中占有非常重要的地位。1975 年，日本北里研究所从采自静冈县的土样中分离得到 1 株链霉菌，命名为除虫链霉菌 (*Streptomyces avermitilis*)。之后，日本北里大学大树智等和美国 Merck 公司联合从该菌中开发出阿维菌素这一具有杀虫、杀螨和杀线虫活性的杀虫剂^[6]。中国植物根结线虫的生物防治从资源调查、高效生防菌株筛选、菌剂研制及田间应用技术等方面已进行了大量研究，并在植物根结线虫的控制上取得了初步成效。至今，国内外对生防真菌与细菌的研究较多，有关放线菌的研究较少，而放线菌是具有潜力和优质杀线虫效果的微生物。本研究对实验室前期筛选获得的具有抑杀根结线虫活性的放线菌菌株 1331，通过采用单因素筛选和正交试验，对影响发酵的培养基和培养条件进行筛选和优化，以期为该菌株工业发酵生产和研究生

防菌新剂型提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试菌株：放线菌菌株 1331，由云南农业大学植物线虫实验室分离、鉴定和保藏，鉴定其为链霉菌 (*Streptomyces* sp.)。

供试线虫：从云南省楚雄市元谋县田间番茄根结样品中分离，在植物线虫实验室的温室内用番茄培养繁殖及纯化，经鉴定其为南方根结线虫 (*Meloidogyne incognita*)。

1.2 培养基

斜面培养基 (高氏一号培养基)(g/L) 配方参考文献[7]。

发酵培养基 I (g/L): 葡萄糖 15 g，酵母粉 15 g， KH_2PO_4 0.5 g， CaCO_3 0.5 g， NaCl 0.5 g， MgSO_4 0.5 g，pH 7.5。

发酵培养基 II (g/L): 可溶性淀粉 20 g，葡萄糖 5 g，蛋白胨 5 g，牛肉膏 5 g，酵母粉 5 g，黄豆粉 10 g， CaCO_3 3 g， CoCl_2 0.002 g，pH 7.5。

1.3 菌株活化

在无菌超净工作台上，将实验室低温保存的放线菌株 1331 接种到预先制备好的斜面培养基上，于 28 ℃ 培养箱中培养 7 d，培养完成后置于 4 ℃ 冰箱中保存备用。

1.4 发酵种子液的制备

刮取活化后的放线菌菌丝于 10 mL 无菌水中，充分混匀后接种到发酵培养基 II 中，于 28 ℃、150 r/min 条件下振荡培养 1 d 后，制得发酵种子液备用。

1.5 初始发酵液的制备

吸取种子液以 10% (体积分数) 接种量接入到 100 mL 初始发酵培养基内 (500 mL 摆瓶)，培养基初始 pH 7.5，于 28 ℃、150 r/min 摆床发酵 7 d。稀释涂布平板法^[8] 测定菌株 1331 产孢量。将发酵液用 50 mL 离心管分装，在 4 000 r/min 的条件下离心 20 min，收集离心后的发酵上清液，备用。

1.6 南方根结线虫卵和 2 龄幼虫悬浮液的制备

参考文献[9]，并加以改进，取一部分虫卵置于 (28 ± 1) ℃ 培养箱孵化培养，24 h 后定期收集 2 龄幼虫配制成线虫悬浮液，备用。

1.7 菌株发酵液对南方根结线虫的影响

菌株发酵液对南方根结线虫卵孵化的影响：

参考文献[10]。菌株发酵液对南方根结线虫 2 龄幼虫的抑杀作用: 采用直接触杀法^[11]。

$$\text{孵化率} = (\text{2 龄幼虫孵化数}/\text{总卵数}) \times 100\%;$$

$$\text{线虫死亡率} = (\text{死亡线虫数}/\text{供试线虫数}) \times 100\%;$$

$$\text{校正死亡率} = (\text{处理线虫死亡率} - \text{对照线虫死亡率})/(1 - \text{对照线虫死亡率}) \times 100\%;$$

所得数据经 Excel 2007 进行数据处理和方差分析, 并使用 SPSS 18.0 进行差异性显著分析。

1.8 发酵工艺优化

1.8.1 发酵培养基对菌株发酵液抑杀线虫活性的影响

分别配制高氏一号液体培养基(g)、发酵培养基 I(g I)、发酵培养基 II(g II), 500 mL 摆瓶装液量 100 mL, 接种量 10%, 28 °C、150 r/min 摆床振荡培养 7 d。然后测定发酵液中菌株产孢量及对南方根结线虫 2 龄幼虫的致死率。每个处理 3 次平行试验, 每次试验 3 次重复。

1.8.2 初始 pH 对菌株发酵液抑杀线虫活性的影响

以筛选出的发酵培养基 II(g II)为基础, 用 pH 计将发酵培养基的初始 pH 分别调为 6.5、7.0、7.5 和 8.0, 其他培养条件同 1.5 节一致, 摆床培养后测定菌株产孢量及发酵液对南方根结线虫 2 龄幼虫的致死率。

1.8.3 摆床转速对菌株发酵液抑杀线虫活性的影响

将发酵培养基的 pH 调为 7.0, 其他培养条件同 1.5 节一致, 在 120、150 和 180 r/min 摆床培养后测定菌株产孢量及发酵液对南方根结线虫 2 龄幼虫的致死率。

1.8.4 装液量对菌株发酵液抑杀线虫活性的影响

500 mL 摆瓶分别装液 80、100、120 和 150 mL, 初始发酵 pH 7.0, 120 r/min 摆床培养后测定菌株产孢量及发酵液对南方根结线虫 2 龄幼虫的致死率。

1.8.5 接种量对菌株发酵液抑杀线虫活性的影响

将种子液以 5%、10%、15% 和 20% (体积分数) 的接种量加入到 80 mL 发酵培养基中, 初始发酵 pH 7.0, 120 r/min 摆床培养后测定菌株产孢量及发酵液对南方根结线虫 2 龄幼虫的致死率。

1.8.6 培养时间对菌株发酵液抑杀线虫活性的影响

将种子液以 5% 的接种量加入到 80 mL 发酵培养基中, 初始发酵 pH 7.0, 120 r/min 摆床培养 5、6、7、8 和 9 d 后测定菌株产孢量及发酵液对南方根结线虫 2 龄幼虫的致死率。

1.9 正交试验

结合单因素试验结果, 探究装液量、接种量、培养时间、pH、培养温度和摇床转速 6 个因素对菌株产孢量及发酵液抑杀线虫活性的影响, 按照 $L_8(2^6)$ 六因素二水平正交表 (表 1) 安排试验, 优化发酵参数。

表 1 正交试验因素水平表

Tab. 1 Factors and levels of orthogonal test

水平 levels	因素 factors					
	装液 量/mL medium volume	接种量/% inoculation amount	培养 时间/d culture time	pH	温度/°C temperature	摇床转速/ (r·min ⁻¹) rotation speed
1	80	5	7	6.5	25	120
2	100	10	8	7.0	30	150

2 结果与分析

2.1 发酵培养基对菌株发酵液抑杀线虫活性的影响

菌株 1331 在 3 种供试培养基中的产孢量有显著差异, 不同培养基中 10% 菌株发酵液对南方根结线虫 2 龄幼虫的抑杀活性不同。菌株 1331 在发酵培养基 II(g II) 中产孢量最大, 为 1.32×10^9 CFU/mL, 发酵培养基 I(g I) 中产孢量次之, 高氏液体培养基(g) 中最小(表 2)。从南方根结线虫 2 龄幼虫的致死率看, g II 中的菌株发酵液处理 2 龄幼虫 48 h 后的校正死亡率最大, 达 79.54%, 且与其他两种培养基相比差异极显著。因此选用发酵培养基 II 进行后续试验。

表 2 不同培养基对菌株 1331 发酵液的影响

Tab. 2 Effects of different media on the strain 1331 fermentation fluid

培养基 media	产孢量 $\times 10^8$ / (CFU·mL ⁻¹) sporulation	校正死亡率/% corrected mortality rate	
		24 h	48 h
g	2.4	45.46±3.13 cC	55.01±6.93 cC
g I	6.0	58.87±3.28 bB	66.15±2.84 bB
g II	13.2	72.13±4.77 aA	79.54±5.51 aA

注: 同列数据后不同小写字母表示数据间差异显著($P < 0.05$), 不同大写字母表示数据间差异极显著($P < 0.01$); 下同。

Note: Different lowercase letters in the same columns indicate significant difference at 0.05 level and different capital letters indicate extremely significant difference at 0.01 level; the same as below.

2.2 初始 pH 值对菌株发酵液抑杀线虫活性的影响

菌株 1331 的产孢量随 pH 的升高呈先上升后下降的趋势, 当培养基初始 pH 为 7.0 时, 菌株

产孢量达最大值(1.24×10^9 CFU/mL), pH 6.5时产孢量次之(表3);初始pH为7.0时,10%菌株发酵液处理48 h后,2龄幼虫的校正死亡率较大,与pH 6.5相比差异显著。故选择起始pH为7.0。

表3 不同pH对菌株1331发酵液的影响

Tab. 3 Effects of different initial pH on the strain 1331 fermentation fluid

pH	产孢量/ $\times 10^8$ (CFU·mL $^{-1}$) sporulation	校正死亡率/% corrected mortality rate	
		24 h	48 h
6.5	9.0	64.03 \pm 1.80 bAB	71.44 \pm 3.87 bAB
7.0	12.4	68.90 \pm 6.45 aA	76.90 \pm 3.77 aA
7.5	8.3	60.36 \pm 4.21 bB	68.40 \pm 6.01 bB
8.0	3.4	50.69 \pm 8.75 cC	54.45 \pm 8.57 cC

2.3 摆床转速对菌株发酵液抑杀线虫活性的影响
摇床转速在120 r/min时,菌株1331的产孢量最大,为 1.33×10^9 CFU/mL,转速150 r/min时产孢量次之(表4);从南方根结线虫2龄幼虫的致死率看,摇床转速120 r/min和150 r/min时,10%菌株发酵液处理48 h后,2龄幼虫的校正死亡率差异虽不显著,但120 r/min时死亡率稍大。综合考虑菌株产孢量和菌株发酵液对2龄幼虫的致死率,最佳起始转速选120 r/min。

表4 不同摇床转速对菌株1331发酵液的影响

Tab. 4 Effects of different rotation speed on the strain 1331 fermentation fluid

转速/(r·min $^{-1}$) rotation speed	产孢量/ $\times 10^8$ (CFU/mL) sporulation	校正死亡率/% corrected mortality rate	
		24 h	48 h
120	13.3	70.31 \pm 5.05 aA	77.04 \pm 4.27 aA
150	12.5	65.70 \pm 1.41 aA	72.63 \pm 4.80 aA
180	3.6	49.34 \pm 8.92 bB	51.96 \pm 5.83 bB

2.4 装液量对菌株发酵液抑杀线虫活性的影响
当装液量为80 mL时,南方根结线虫2龄幼虫的校正死亡率最大,与装液量100 mL时相比差异不显著;但装液量为80 mL时,菌株1331产孢量最大,且随着装液量的增加,产孢量呈现下降的趋势(表5)。因此,综合考虑菌株产孢量和菌株发酵液对2龄幼虫的致死率,装液量选为80 mL。

2.5 接种量对菌株发酵液抑杀线虫活性的影响

菌株1331产孢量随接种量的增加呈现降低的趋势,接种量为5%时菌株产孢量为最高值,

达 1.45×10^9 CFU/mL(表6);且在此条件下的2龄幼虫校正死亡率也达最大,与另外几个接种量相比差异显著。因此接种量选为5%。

表5 不同装液量对菌株1331发酵液的影响

Tab. 5 Effects of different medium volume on the strain 1331 fermentation fluid

装液量/mL medium volume	产孢量/ $\times 10^8$ CFU·mL $^{-1}$ L sporulation	校正死亡率/% corrected mortality rate	
		24 h	48 h
80	14.2	74.99 \pm 7.08 aA	82.51 \pm 4.76 aA
100	13.3	70.43 \pm 2.33 aA	79.17 \pm 8.55 aA
120	6.6	55.32 \pm 3.70 bB	67.94 \pm 8.73 bB
150	5.2	52.73 \pm 7.15 cB	60.07 \pm 5.70 cB

表6 不同接种量对菌株1331发酵液的影响

Tab. 6 Effects of different inoculation amount on the strain 1331 fermentation fluid

接种量/% inoculation amount	产孢量/ $\times 10^8$ CFU·mL $^{-1}$ sporulation	校正死亡率/% corrected mortality rate	
		24 h	48 h
5	14.5	76.00 \pm 3.04 aA	84.29 \pm 6.13 aA
10	12.2	70.26 \pm 5.05 bA	78.07 \pm 4.27 bA
15	5.7	55.45 \pm 4.53 cB	61.99 \pm 6.65 cB
20	4.3	53.02 \pm 3.70 cB	60.29 \pm 6.50 cB

2.6 培养时间对菌株发酵液抑杀线虫活性的影响

菌株1331在培养到第7天时产孢量最大,第8天时次之,但当培养时间少于6 d或多于8 d时,菌株产孢量均显著下降(表7);从南方根结线虫2龄幼虫的致死率看,不同培养时间的菌株1331发酵液对南方根结线虫2龄幼虫的校正死亡率有显著差异,在第8天时的2龄幼虫校正死亡率最大。因此,综合考虑菌株产孢量和菌株发酵液对2龄幼虫的致死率,选择最佳培养时间为8 d。

表7 不同培养时间对菌株1331发酵液的影响

Tab. 7 Effects of different culture time on the strain 1331 fermentation fluid

培养时间/d culture time	产孢量/ $\times 10^8$ CFU·mL $^{-1}$ sporulation	校正死亡率/% corrected mortality rate	
		24 h	48 h
5	7.5	59.35 \pm 3.05 dD	67.37 \pm 5.29 dD
6	10.7	65.88 \pm 6.72 bcBC	73.29 \pm 5.25 bcBC
7	14.4	68.23 \pm 5.91 bB	75.60 \pm 5.14 bB
8	11.9	77.66 \pm 2.21 aA	82.62 \pm 3.42 aA
9	8.4	63.69 \pm 3.43 cdCD	69.95 \pm 3.22 cdCD

2.7 正交试验结果与分析

以2龄幼虫的校正死亡率为评价指标, 各因素对放线菌菌株1331抑杀线虫活性的影响次序为C(时间)>E(温度)>A(装液量)>B(接种量)>D(pH)>F(转速), 最优组合为A₁B₁C₁D₂E₁F₂(表8)。装液量、培养时间和温度对放线菌1331

抑杀线虫活性的影响显著, 而其他因素不显著(表9), 与直观分析结果一致。因此, 从促进菌株产孢量和抑杀线虫活性角度综合考虑, 确定较优的发酵工艺条件为A₁B₁C₁D₂E₁F₂, 即500 mL摇瓶装液量80 mL, 接种量5%, 初始pH 7.0, 温度25 °C, 150 r/min 摆床培养7 d。

表8 优化发酵条件的正交试验结果与分析

Tab. 8 Results of orthogonal test of culture conditions

试验号 No.	A	B	C	D	E	F	产孢量×10 ⁹ / (CFU·mL ⁻¹)	校正死亡率/% corrected mortality rate
	装液量/mL medium volume	接种量/% inoculation amount	培养时间/d culture time	pH	温度/°C temperature	转速/(r·min ⁻¹) rotation speed	sporulation	
1	1	1	1	1	1	1	1.61	87.09±3.64
2	1	1	1	2	2	2	1.56	85.57±1.74
3	1	2	2	1	1	2	1.35	80.94±3.99
4	1	2	2	2	2	1	1.18	76.25±4.27
5	2	1	2	1	2	1	1.10	73.28±3.61
6	2	1	2	2	1	2	1.40	82.96±6.27
7	2	2	1	1	2	2	1.30	80.07±6.90
8	2	2	1	2	1	1	1.51	84.69±6.82
K ₁	1.425	1.417	1.495	1.340	1.467	1.350		
K ₂	1.327	1.335	1.257	1.413	1.285	1.403		
R	0.097	0.082	0.237	0.073	0.182	0.053		

表9 正交试验结果的方差分析(产孢量)

Tab. 9 Variance analysis of orthogonal test (sporulation)

因素 factors	偏差平方和 deviation squares	自由度 free degree	F 比 F ratio	F 临界值 F critical value	显著性 conspicuousness
A	1.901	1	169.000	161.000	*
B	1.361	1	121.000	161.000	
C	11.281	1	1 002.778	161.000	*
D	1.051	1	99.444	161.000	
E	6.661	1	592.111	161.000	*
F	0.551	1	49.000	161.000	

2.8 最优发酵工艺的效果验证

对正交试验确定的发酵条件进行3次验证试验, 所得菌株产孢量为1.68×10⁹ CFU/mL, 与初始发酵条件相比增加了27.27%; 10%菌株1331发酵液处理48 h后对南方根结线虫2龄幼虫校正死亡率为88.97%, 与初始发酵条件相比提高了11.85%(表10), 证明其是最优发酵条件。

2.9 菌株1331发酵液对南方根结线虫卵孵化的抑制作用

观察发现: 菌株1331发酵液对南方根结线虫卵孵化具有较好的抑制作用。处理3、6和

表10 最优发酵工艺的效果验证

Tab. 10 Validation of optimum fermentation process

发酵工艺 fermentation process	产孢量/(×10 ⁸ CFU·mL ⁻¹) sporulation	校正死亡率/% corrected mortality rate
初始发酵条件 initial process	13.2	79.54±5.51
最优发酵条件 optimum process	16.8	88.97±1.67

9 d后, 体积分数为0.5%、1%和5%的菌株1331发酵液中卵孵化率与对照相比差异显著。特别是菌株1331发酵液体积分数为5%时, 其处理南方根结线虫卵3、6和9 d后, 卵孵化率与对照相比差异极显著, 与对照相比分别降低了87.40%、77.39%和70.59%(表11)。结果说明菌株1331发酵液具有较好的抑制卵孵化活性。

2.10 菌株1331发酵液对南方根结线虫2龄幼虫的抑杀活性

5%、10%和20%菌株1331发酵液处理24 h后, 南方根结线虫2龄幼虫校正死亡率与对照相比差异极显著; 处理48 h后的校正死亡率分别为76.01%、88.97%和100%(表12)。这表明菌株1331发酵液对南方根结线虫有较好的抑杀活性。

表 11 菌株 1331 发酵液对南方根结线虫卵孵化的抑制作用

Tab. 11 Inhibition eggs hatching of *M. incognita* by the strain 1331 fermentation fluid

时间/d time	发酵液体积分数/% volumn fraction of fermented liquid	孵化率/% hatching rate
3	0	63.59±5.03 aA
	0.1	40.41±6.68 bB
	0.5	38.57±6.64 cB
	1	29.24±2.08 dC
	5	8.01±2.87 eD
6	0	76.91±4.04 aA
	0.1	52.03±3.34 bB
	0.5	49.14±2.95 cB
	1	41.72±3.00 dC
	5	17.39±2.89 eD
9	0	81.82±3.46 aA
	0.1	61.50±5.94 bB
	0.5	54.18±2.34 cB
	1	50.69±2.17 dC
	5	24.06±5.41 eD

表 12 菌株 1331 发酵液对南方根结线虫 2 龄幼虫的抑杀活性

Tab. 12 Inhibitory activity of the strain 1331 fermentation fluid to the second-stage juveniles of *M. incognita*

时间/h time	发酵液体积分数/% volumn fraction of fermented liquid	死亡率/% mortality	校正死亡率/% corrected mortality rate
24	0	0 dD	0 dD
	5	66.73±5.10 cC	66.73±5.10 cC
	10	80.63±2.94 bB	80.63±2.94 bB
	20	92.06±4.07 aA	92.06±4.07 aA
48	0	3.56±0.39 dD	0 dD
	5	76.86±5.76 cC	76.01±5.76 cC
	10	89.36±1.67 bB	88.97±1.67 bB
	20	100 aA	100 aA
72	0	6.35±0.34 dD	0 dD
	5	84.04±4.46 cC	82.95±4.46 cC
	10	96.43±1.75 bB	96.19±1.75 bB
	20	100 aA	100 aA

3 讨论

3.1 放线菌菌株 1331 发酵条件的优化

微生物发酵是一个复杂的过程，微生物的活性与其培养条件密切相关。所以，对微生物培养条件的优化是必不可少的步骤。本研究结合单因素筛选试验和正交试验方法对菌株 1331 的发酵

条件进行了优化，确定了本试验的最佳培养基和摇瓶发酵条件。试验发现：菌株产孢量和抑杀线虫活性的最佳 pH 值都在 7.0 左右，但在 6.5~7.5 的范围内影响较小，说明其对于 pH 有一定的适应范围，这降低了生防菌在工业发酵中的难度，减小了发酵过程中连续调节 pH 值的工作量。在转速试验中发现：当摇床转速过高时，菌体的生长可能受到机械作用力的影响，导致菌株产孢量下降；若转速较低，放线菌菌体之间缠绕重叠，致使瓶内溶氧量不高，也不利于菌体生长。在确定接种量的试验中，菌株生长随接种量的增加呈现降低的趋势，主要原因是，摇瓶接近于微氧环境，装液量少，接种量过大由于在发酵初期消耗过多的营养成分而不利于菌体繁殖，因此考虑到菌种的高效利用和发酵成本的影响，最佳接种量选为 5%。

在对发酵工艺优化的正交试验中发现各因素对菌株 1331 抑杀线虫活性的影响次序为培养时间>温度>装液量>接种量>pH 值>转速，由此可见，装液量、培养时间和温度对菌株 1331 抑杀线虫活性的影响显著。菌株产孢量随装液量的增加大致呈现降低的趋势，这是因为放线菌为丝状菌，发酵过程中需氧量大，摇瓶接近于微氧环境，不利于菌体增殖，添加量少可相对提高发酵液中的溶解氧含量，而过多的装液量不利于菌体的生长繁殖，这一问题在今后的工业发酵生产中可以通过加大通气量来解决。装液量与培养基中的溶氧密切相关，可以初步说明溶氧与菌株 1331 活性密切相关。温度的高低影响着微生物的生长繁殖速度，所以温度过高或过低都会影响菌株 1331 的生长繁殖，故最佳发酵温度选择 25 ℃。在培养时间对菌株发酵的影响中发现：随着培养时间的增长，菌株 1331 产孢量不断增加，在培养到第 7 天时产孢量达最大；但其发酵液处理南方根结线虫 2 龄幼虫的校正死亡率在培养到第 8 天时才达最大，其原因可能是菌株 1331 发酵液里的活性成分在第 8 天时仍处于小幅增长状态，虽然菌株产孢量略有下降，但活性成分依然有所增加。随着培养时间继续增加，发酵培养基内营养成分和氧气量等都已经比较匮乏，菌株代谢活动趋于停止，阻碍了活性成分的产生。因此，综合考虑菌株生长情况和发酵液抑杀线虫活性，选择菌株 1331 的最佳培养时间为 8 d。

上述试验表明: 培养条件不仅影响菌株产孢量, 也影响活性成分的产生。本研究优化得到的最适培养条件, 较原有培养条件更有利于菌株产孢量和活性成分的产生。但是, 本研究还仅仅局限于实验室条件, 液体发酵只是在摇瓶中进行, 结果只为工业化生产奠定基础, 有关该放线菌菌株的液体发酵过程还需要进一步的研究和实践。

3.2 菌株 1331 发酵液对南方根结线虫卵和 2 龄幼虫的抑杀活性

放线菌是自然界中一类很重要的微生物资源, 其次生代谢产物被广泛应用于医药、食品及农业领域。从 1875 年 COHN 发现放线菌至今, 已经报道了 240 多个属 3 000 多个种^[12], 用在植物病害生物防治中的主要是链霉菌属 (*Streptomyces*) 及其相关类群, 国内外对其研究得比较深入。放线菌中的一些种类能够产生具有杀线虫特性的化合物, 链霉菌产生的阿维菌素已成功应用于南方根结线虫的预防与治疗^[13]。鄢小宁等^[14]对分离自江苏多地的 344 株放线菌菌株进行筛选, 得到了 1 株对南方根结线虫有较高抑杀活性的玫瑰暗黄链霉菌 (*Streptomyces roseofulvus*) 菌株 LH121。RASHAD 等^[15]从 112 株链霉菌中筛选出至少 29 株对线虫具有抑杀活性的菌株。魏学军等^[16]从 120 株链霉菌中筛选出了对蔬菜根结线虫具有一定防治作用的链霉菌菌株 6 株。刘亮山^[17]从中国多个省市采集的土样中分离得到了 303 株链霉菌菌株, 初步筛选出了 15 株对南方根结线虫 2 龄幼虫具有击倒活性的菌株, 可以作为研制线虫生防菌剂的出发菌株。

本研究分离筛选得到 1 株放线菌菌株 1331, 鉴定为链霉菌, 其发酵液对南方根结线虫卵和 2 龄幼虫有较好的抑杀作用。其 5% 菌株 1331 发酵稀释液处理南方根结线虫卵 6 d 和 9 d, 卵孵化率为 17.39% 和 24.06%, 与对照相比分别降低了 77.39% 和 70.59%; 用 20% 菌株发酵液处理南方根结线虫 2 龄幼虫 24 h, 南方根结线虫 2 龄幼虫校正死亡率为 92.06%, 处理 48 h 校正死亡率达到 100%, 其抑杀作用达到或超过相关文献^[18-20]报道的水平, 且菌株 1331 发酵液抑杀线虫所用时间较短, 所以效果更佳。本研究分离获得的放线菌菌株 1331 与报道的其他生防菌株相比, 使用浓度低, 节约了生产成本。菌株 1331 发酵液对南方根结线虫具有很强的杀线虫活性, 如果应用

于生产, 将对中国蔬菜根结线虫的防治产生重大影响。

4 结论

本研究采用单因素筛选和正交试验设计相结合的方法对菌株 1331 进行发酵条件的优化, 并探究其发酵液对南方根结线虫卵和 2 龄幼虫的抑杀作用, 得到了如下结论:

(1) 确定了菌株 1331 培养基为: 发酵培养基 II, 配方为 (g/L): 可溶性淀粉 20 g, 葡萄糖 5 g, 蛋白胨 5 g, 牛肉膏 5 g, 酵母粉 5 g, 黄豆粉 10 g, CaCO₃ 3 g, CoCl₂ 0.002 g。在此培养基下发酵, 10% 菌株 1331 发酵液对南方根结线虫 2 龄幼虫处理 48 h 后的校正死亡率达 79.54%, 与另两种培养基相比分别提高了 44.59% 和 20.24%。

(2) 在优化培养基的基础上对摇瓶发酵条件进行了探索, 最佳发酵条件为: 装液量 80 mL (500 mL 摆瓶), 种子液接种量为 5% (体积分数), 初始 pH 值 7.0, 培养温度 25 ℃, 150 r/min 发酵培养 7 d。在此条件下发酵, 与初始发酵培养条件相比, 10% 菌株 1331 发酵液对南方根结线虫 2 龄幼虫处理 48 h 后的校正死亡率从优化前的 79.54% 提高到 88.97%。

(3) 采用新的发酵条件进行发酵, 测定菌株 1331 发酵液对南方根结线虫卵和 2 龄幼虫的影响: 5% 菌株 1331 发酵稀释液处理南方根结线虫卵 6 d 和 9 d, 卵孵化率为 17.39% 和 24.06%, 与对照相比分别降低了 77.39% 和 70.59%; 菌株 1331 发酵液体积分数为 5%、10% 和 20%, 处理 24 h 后, 南方根结线虫 2 龄幼虫校正死亡率与对照相比差异显著; 处理 48 h 后, 南方根结线虫 2 龄幼虫的校正死亡率分别为 76.01%、88.97% 和 100%。表明菌株 1331 发酵液对南方根结线虫有较好的抑杀作用。

[参考文献]

- [1] 刘维志. 植物线虫志 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- [2] SAUCET S B, VAN GHELDER C, ABAD P, et al. Resistance to root-knot nematodes *Meloidogyne* spp. in woody plants [J]. New Phytologist, 2016, 211(1): 41. DOI: 10.1111/nph.13933.
- [3] 王艳艳, 魏珉, 杨凤娟, 等. 蔬菜根结线虫致病机理及其防控技术研究进展 [J]. 中国蔬菜, 2014(2): 9. DOI: 10.3969/j.issn.1000-6346.2014.02.004.
- [4] VAN LENTEREN J C. The state of commercial aug-

- mentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake[J]. BioControl, 2012, 57(1): 1. DOI: [10.1007/s10526-011-9395-1](https://doi.org/10.1007/s10526-011-9395-1).
- [5] 罗明和, 汪中文, 黄洪波, 等. 海洋链霉菌 *Streptomyces* sp. SCSIO 1672 及其代谢产物水杨酸的分离鉴定[J]. 微生物学杂志, 2010, 30(6): 22. DOI: [10.3969/j.issn.1005-7021.2010.06.005](https://doi.org/10.3969/j.issn.1005-7021.2010.06.005).
- [6] 吴建兰, 仲苏林. 阿维菌素水乳剂的研制[J]. 现代农药, 2011, 10(1): 27. DOI: [10.3969/j.issn.1671-5284.2011.01.007](https://doi.org/10.3969/j.issn.1671-5284.2011.01.007).
- [7] 赵莹, 周国英, 高月庭, 等. 油茶叶枯病拮抗放线菌 GR54 发酵条件的优化[J]. 中南林业科技大学学报, 2013, 33(7): 81.
- [8] 朱运平, 褚文丹, 李秀婷, 等. 一株产木聚糖酶放线菌的液体发酵条件优化及水解特性研究[J]. 食品科学, 2012, 33(21): 177.
- [9] 赵迪, 刘彬, 李玲玉, 等. 白僵菌及其伴生菌发酵液对线虫的毒力研究[J]. 农药学学报, 2013, 15(2): 178. DOI: [10.3969/j.issn.1008-7303.2013.02.09](https://doi.org/10.3969/j.issn.1008-7303.2013.02.09).
- [10] 周银丽, 袁绍杰, 潘云梅, 等. 放线菌 JS2 对石榴枯萎病菌及南方根结线虫的毒力研究[J]. 江西农业大学学报, 2016, 38(2): 268.
- [11] 周银丽, 杨艳丽, 袁绍杰, 等. 石榴枯萎病菌拮抗放线菌对南方根结线虫的毒力[J]. 植物保护, 2016, 42(5): 58. DOI: [10.3969/j.issn.0529-1542.2016.05.009](https://doi.org/10.3969/j.issn.0529-1542.2016.05.009).
- [12] 刘志恒, 王剑, 张立新. 基因组时代的放线菌系统学及其研究进展[J]. 微生物学报, 2011, 51(2): 141.
- [13] 徐兴阳, 杨艳梅, 李杰, 等. 昆明烟区根结线虫种类及生防制剂防效评价[J]. 昆明学院学报, 2017, 39(6): 1.
- [14] 鄢小宁, 林茂松, 刘亮山. 南方根结线虫拮抗链霉菌的筛选和鉴定[J]. 中国生物防治, 2004, 20(3): 202. DOI: [10.3321/j.issn:1005-9261.2004.03.014](https://doi.org/10.3321/j.issn:1005-9261.2004.03.014).
- [15] RASHAD F M, FATHY H M, EL-ZAYAT A S. Isolation and characterization of multifunctional *Streptomyces* species with antimicrobial, nematicidal and phytohormone activities from marine environments in Egypt[J]. Microbiological Research, 2015, 175(SI): 34. DOI: [10.1016/j.micres.2015.03.002](https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.03.002).
- [16] 魏学军, 杨文香, 刘大群, 等. 蔬菜根结线虫生防菌的筛选[J]. 河北农业大学学报, 2005, 28(5): 67. DOI: [10.3969/j.issn.1000-1573.2005.05.016](https://doi.org/10.3969/j.issn.1000-1573.2005.05.016).
- [17] 刘亮山. 根结线虫病生防链霉菌的筛选及其应用研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2005.
- [18] 田阳, 李平, 张莉, 等. 海洋放线菌 M1D14 代谢产物对几种重要植物寄生线虫的抑制作用[J]. 植物保护, 2012, 38(4): 96. DOI: [10.3969/j.issn.0529-1542.2012.04.019](https://doi.org/10.3969/j.issn.0529-1542.2012.04.019).
- [19] 陈井生, 朱峰, 鲁旭鹏, 等. 南方根结线虫拮抗放线菌的分离、鉴定与杀线虫活性分析[J]. 中国蔬菜, 2015(4): 41. DOI: [10.3969/j.issn.1000-6346.2015.04.012](https://doi.org/10.3969/j.issn.1000-6346.2015.04.012).
- [20] RUANPANUN P, LAATSCH H, TANGCHITSOMKID N, et al. Nematicidal activity of ferverulin isolated from a nematicidal actinomycete, *Streptomyces* sp. CMU-MH021, on *Meloidogyne incognita*[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2011, 27(6): 1373. DOI: [10.1007/s11274-010-0588-z](https://doi.org/10.1007/s11274-010-0588-z).

责任编辑: 何承刚