

研究报告

核桃黑斑病拮抗放线菌 WMF106 发酵条件优化和抑菌物质稳定性

瞿佳¹, 孙晓宇¹, 陈锐¹, 门欣¹, 赵玲侠¹, 宁硕瀛^{*2}

1 陕西省微生物研究所, 陕西 西安 710043

2 陕西省动物研究所, 陕西 西安 710032

瞿佳, 孙晓宇, 陈锐, 门欣, 赵玲侠, 宁硕瀛. 核桃黑斑病拮抗放线菌 WMF106 发酵条件优化和抑菌物质稳定性[J]. 微生物学通报, 2022, 49(1): 88-100

Qu Jia, Sun Xiaoyu, Chen Rui, Men Xin, Zhao Lingxia, Ning Shuoying. Optimization of fermentation conditions and stability evaluation of antimicrobial active substance for antagonistic actinomycete WMF106 against walnut blight[J]. Microbiology China, 2022, 49(1): 88-100

摘要:【背景】暗蓝色链霉菌 WMF106 对核桃黑斑病病原菌野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)有较好的抑制作用, 优化其发酵培养基与发酵条件将为核桃黑斑病生防菌剂的制备与应用提供参考。【目的】优化核桃黑斑病生防菌株 WMF106 的发酵条件, 测定其抑菌物质稳定性, 并通过田间防效测定验证防治效果, 为后期规模化发酵以及菌剂的开发奠定基础。【方法】采用单因素和正交试验优化菌株 WMF106 的发酵培养基和发酵条件, 观察 pH、温度、光照、储藏温度对抑菌物质稳定性的影响, 了解抑菌物质的极性, 测定发酵液的田间防效。【结果】优化的最佳培养基为酵母浸粉 2.0 g/L、燕麦 20.0 g/L、NaCl 0.5 g/L、K₂HPO₄ 0.5 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L。发酵条件为起始 pH 6.0、接种量 8%、装液量 150 mL/500 mL、发酵时间 9 d、发酵温度 28 °C、转速 180 r/min 时, 抑菌物质活性最强。抑菌物质耐碱但对酸性环境敏感, 具有较好的热、光及储藏温度稳定性, 经乙酸乙酯萃取可获得最多的抑菌物质。施药后对叶片和果实的防效分别超过 65.33%和 61.21%。【结论】确定了菌株 WMF106 的最佳发酵培养基和发酵条件, 抑菌物质有较好的稳定性及田间防治效果, 应用开发前景广阔。

关键词: 核桃黑斑病; 拮抗放线菌; 发酵优化; 抑菌物质

基金项目: 陕西省科学院科技计划(2018nk-09, 2018nk-01); 陕西省自然科学基金基础研究计划(2020JQ-973); 陕西省重点研发计划(2020NY-038)

Supported by: Science and Technology Research Project of Shaanxi Provincial Academy of Sciences (2018nk-09, 2018nk-01); Natural Science Basic Research Program of Shaanxi Province (2020JQ-973); Key Research and Development Program of Shaanxi Province (2020NY-038)

*Corresponding author: E-mail: ns_ying@163.com

Received: 2021-03-18; Accepted: 2021-05-03; Published online: 2021-05-18

Optimization of fermentation conditions and stability evaluation of antimicrobial active substance for antagonistic actinomycete WMF106 against walnut blight

QU Jia¹, SUN Xiaoyu¹, CHEN Rui¹, MEN Xin¹, ZHAO Lingxia¹, NING Shuoying^{*2}

¹ Microbiology Institute of Shaanxi, Xi'an 710043, Shaanxi, China

² Shaanxi Institute of Zoology, Xi'an 710032, Shaanxi, China

Abstract: [Background] As an important biocontrol actinomycetes, *Streptomyces caeruleatus* WMF106 exhibits good antagonistic effect on the pathogen of walnut blight, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. To promote the preparation and application of antimicrobial agent in the control of the disease, it is necessary to improve the biomass, antimicrobial activity and stability of antimicrobial active substance for strain WMF106. [Objective] The present study aimed to explore an optimal fermentation condition and evaluate the stability and field control effect of antimicrobial active substance for *Streptomyces* strain WMF106. This study will be benefit for formulating large-scale fermentation procedure and development of bioagent. [Methods] Single factor experiment and orthogonal tests were used to optimize the fermentation medium and conditions. The effects of pH, temperature, light, ultraviolet, storage temperature on the stability of active substances and the polarity nature was determined by the single factor method respectively. To evaluate the results of optimization, the methods of field trials on leaves and fruits were used. [Results] The optimum composition of the fermentation medium was yeast extract 2.0 g/L, octmeal 20.0 g/L, NaCl 0.5 g/L, K₂HPO₄ 0.5 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L. The optimized fermentation condition was initial pH 6.0, inoculation amount 8%, medium volume 150 mL/500 mL, fermentation time 9 d, fermentation temperature 28 °C and rotate speed 180 r/min. The results of the fermentation broth stability showed that the fermentation broth was alkali resistant but sensitive to acidic environments and had good heat, light and temperature tolerance. The active substances that obtained by using ethyl acetate has the highest antibacterial activity. The control effects of the fermentation broth against the disease that infected leaves and fruits were more than 65.33% and 61.21%, respectively. [Conclusion] The optimal fermentation medium and conditions were obtained. Moreover, it is also concluded that the fermentation broth of strain WMF106 not only possess the great stability, but also have better field control efficacy. Therefore, the strain WMF106 may be considered as potential biocontrol agent against walnut blight.

Keywords: walnut blight; antagonistic actinomycetes; fermentation optimization; antibacterial substances

放线菌是自然界中广泛存在的微生物资源, 部分菌株分泌的次级代谢产物对多种植物病原细菌、真菌、线虫具有良好的防治效果, 在农业绿色防治技术开发领域具有较大的应用潜力^[1]。据统计, 目前已知的由放线菌产生的

天然抗生素中 70%以上来源于链霉菌属, 由该属放线菌产生的次生代谢产物在植物病害防治中应用广泛^[2], 已有研究报道其产生的如四环素类抗生素、环六肽类似物和挥发萜类等代谢产物对野油菜黄单胞菌大豆致病变种

(*Xanthomonas campestris* pv. *glycine*)^[3]、串珠镰刀菌(*Fusarium moniliforme*)^[4]、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)^[5]、灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)^[6]等多种植物病原菌均具有较好的抑菌活性。近年来,随着生活水平的提高及环保意识的增强,人们对各类农产品的质量提出了更高的要求,农作物品质及食品安全已经成为影响农业可持续发展的重要因素^[7]。微生物农药由于具有广谱高效、兼容配套、环境友好、不易产生抗性等优点,利用有益微生物进行植物病害的生物防治满足当今社会发展的需要^[8]。

核桃黑斑病(walnut blight)作为核桃生产中的主要病害之一,可危害核桃叶片、枝条和果实,严重影响核桃的产量和品质^[9]。目前,国内外防治核桃黑斑病的主要措施仍以化学防治手段为主,配合物理、农业防治方法,然而长期使用化学农药将会带来诸如抗性产生、环境污染、产品品质下降和食品安全等不良影响,亟待开发靶向高效的微生物菌剂^[10-11]。微生物的生长、产孢、产酶及其他代谢产物生成会受到发酵条件如培养基配方、pH、温度、发酵时间等的影响,通过对发酵参数进行优化,获得最适菌株生长的发酵条件,不仅可以缩短发酵周期、提高发酵效率,还能获得更高性能的发酵产物^[12]。本实验室前期从核桃根际土壤中筛选到一株对核桃黑斑病病原菌野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)具有较强拮抗作用的生防菌株 WMF106,鉴定为暗蓝色链霉菌(*Streptomyces caeruleatus*)^[13],但有关该菌株高产量、低成本发酵条件与发酵液抑菌物质特性还不清楚。基于此,本研究重点围绕菌株 WMF106 的发酵条件优化、抑菌活性物质性质和田间防效开展研究,以明确影响该菌株抗菌活性物质合成的关键因素及其应用潜力,

为后期规模化发酵及菌剂开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株

拮抗放线菌菌株 WMF016 由本实验室从陕西安康核桃园健康植株根际土壤中分离筛选获得,并将其鉴定为暗蓝色链霉菌 *S. caeruleatus*,抑菌活性指示菌为核桃黑斑病病原菌野油菜黄单胞菌(*X. campestris* pv. *campestris*),供试菌株保藏于陕西省微生物研究所菌种资源中心。

1.1.2 培养基

活性检测培养基用 LB 培养基(g/L): NaCl 10.0, 蛋白胨 10.0, 酵母浸粉 5.0, pH 7.0, 用于供试病原菌的培养及拮抗放线菌活性筛选。种子液培养基用高氏一号(Gause's Synthetic Agar)培养基(g/L): 可溶性淀粉 20.00, K₂HPO₄ 0.50, NaCl 0.50, MgSO₄·7H₂O 0.50, KNO₃ 1.00, FeSO₄·7H₂O 0.01, pH 7.2。如需配制固体培养基,加入 18.0 g/L 琼脂粉即可。所有培养基均在 1×10⁵ Pa 灭菌 30 min。

1.1.3 主要试剂和仪器

葡萄糖、可溶性淀粉、酵母浸粉、牛肉膏等试剂,北京奥博星生物技术有限责任公司;30%琥胶肥酸铜可湿性粉剂,齐齐哈尔四友化工有限公司;2%春雷霉素水剂,日本北兴化学工业株式会社。恒温培养箱,北京科伟永兴仪器有限公司;恒温振荡培养箱,上海天呈实验仪器制造有限公司;高速冷冻离心机,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;真空旋转蒸发仪,BIBBY 公司;全自动菌落分析仪,杭州迅数科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 目标菌株 WMF106 发酵液制备

种子液制备:将菌株 WMF106 在高氏一号

合成培养基平板上划线接种, 28 °C 倒置培养 5 d。用直径 8 mm 的无菌打孔器打取 3 个菌饼接种于高氏一号液体培养基中, 装液量为 100 mL/250 mL, 28 °C、150 r/min 振荡培养 7 d。

发酵: 以 10% 接种量(体积分数)在发酵培养基中接入种子液, 装液量为 100 mL/500 mL, 28 °C、150 r/min 振荡培养 7 d。发酵液于 12 000 r/min 离心 15 min, 吸取上清后经 0.22 μ m 微孔滤膜过滤, 获得无菌发酵液用于抑菌活性测定。

1.2.2 抑菌物质活性测定

将保存于-80 °C 的野油菜黄单胞菌在 LB 固体培养基上划线活化, 28 °C 培养 2 d, 挑取单菌落于液体 LB 培养基中 28 °C、150 r/min 培养 24 h, 配制成 10^8 CFU/mL 菌悬液, 以 2% (体积分数) 接种量加入冷却至 50 °C 的 LB 固体培养基后混合均匀, 制成含病原菌平板。待平板凝固后用无菌打孔器打取直径为 8 mm 的孔, 每孔加入 50 μ L 无菌发酵液, 每处理重复 3 次, 28 °C 培养 3 d, 通过全自动菌落分析仪拍照并测量抑菌圈直径, 以此判断菌株发酵液的抑菌活性^[14-15]。

1.2.3 培养基与发酵条件优化

培养基碳源、氮源条件优化: 采用单因素实验法, 在高氏一号液体培养基基础上, 分别选用葡萄糖(glucose)、麦芽糖(maltose)、乳糖(lactose)、甘油(glycerol)、燕麦(oatmeal)作为碳源; 分别选用牛肉膏(beef extract)、麦芽提取物(malt extract)、酵母浸粉(yeast extract)、蛋白胨(peptone)、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为氮源, 参照 1.2.2 方法测定抑菌活性。发酵培养后, 将发酵液用定量滤纸过滤并烘干至恒重, 称量菌体干重并计算 1 L 发酵液所含菌体干重(g/L)。以上测定均重复 3 次, 确定最佳碳源、氮源。

培养基营养条件正交试验筛选: 根据高氏一号培养基中 3 种无机盐成分以及筛选出的最

佳碳源、氮源, 设计 5 因素 4 水平的正交试验(表 1), 每组试验重复 3 次, 以抑菌活性为标准确定最佳培养基配方, 并测定菌体干重^[16]。

发酵条件优化: 在确定的最佳培养基配方基础上, 参照 1.2.2 和 1.2.3 的方法测定不同发酵条件下菌株 WMF106 对野油菜黄单胞菌的抑菌活性和菌株 WMF106 的菌体干重, 逐步确定最佳发酵参数。(1) 起始 pH 值: 调节培养基起始 pH 值为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0, 28 °C、150 r/min 培养 7 d, 确定最适 pH; (2) 接种量: 将种子液按 1%、2%、5%、8%、10% (体积分数) 接种量接入培养基中, 28 °C、150 r/min 培养 7 d, 确定最适接种量; (3) 装液量: 在 500 mL 三角瓶中分别装入 50、100、150、200 mL 的优化培养基, 28 °C、150 r/min 培养 7 d, 确定最适装液量; (4) 发酵时间: 分别培养 5、6、7、8、9、10 d, 28 °C、150 r/min 培养, 确定最佳发酵时间; (5) 发酵温度: 设置 20、24、28、32、36 °C, 150 r/min 培养, 确定最佳发酵温度; (6) 转速: 设置摇床转速为 140、160、180、200、220 r/min, 确定最佳培养转速。以上每组处理重复 3 次。

1.2.4 抑菌物质的稳定性测定

(1) 酸碱稳定性: 取发酵滤液 10 mL, 分别调节 pH 值为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0, 4 °C 放置过夜后回调 pH 至 7.0, 参照 1.2.2 的方法测定各组抑菌活性; (2) 热稳定

表 1 正交实验因素和水平设计

Table 1 The orthogonal test on factors and levels

因素 Factors	水平 Levels			
	1	2	3	4
A 酵母浸粉 Yeast extract (g/L)	1.0	2.0	5.0	10.0
B 燕麦 Oatmeal (g/L)	5.0	10.0	15.0	20.0
C NaCl (g/L)	0.5	1.0	1.5	2.0
D K_2HPO_4 (g/L)	0.5	1.0	1.5	2.0
E $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L)	0.5	1.0	1.5	2.0

性：取发酵滤液 10 mL，分别于 4、30、50、70、100 °C 处理 10、30 min，以未做处理的发酵液作为对照，测定各组抑菌活性；(3) 光照稳定性：取发酵滤液 10 mL，紫外和日光条件下距 10 cm 照射 1、3、6、9、12 h，以未处理的发酵液作为对照，测定各组抑菌活性；(4) 储藏温度稳定性：取发酵滤液 10 mL，分别于 -20、4、20 °C 条件下储藏 5、15、30 d，测定各组抑菌活性；(5) 亲水性和疏水性：发酵液于 5 000 r/min 下离心 5 min，上清液用 4 倍体积的 95% 乙醇洗脱，随后分别加入等体积的石油醚 (petrol ether)、正丁醇 (n-butanol)、氯仿 (chloroform) 和乙酸乙酯 (ethyl acetate)，振荡后静置 24 h 萃取。有机相用真空旋转蒸发仪 45 °C 减压浓缩蒸干，并用甲醇配制成 10 mg/mL 的浓度，在无菌滤纸片上滴加 10 μ L，置于酒精灯旁直至溶剂挥发后，采用滤纸片扩散法测定抑菌活性^[17]。以上每组处理重复 3 次。

1.2.5 WMF106 发酵液的田间防效测定

试验于 2020 年 4 月至 8 月进行，地点位于陕西省宝鸡市岐山县张家村。选择条件相对一致、集中连片、近年来核桃黑斑病发病较为严重的核桃园内进行。园地为沙壤土，肥力中等，果园管理良好，基本无杂草。供试核桃品种为“香玲”，树龄 5–6 年生，栽植行株距为 4.5 m×4.0 m，树高 4–5 m，郁闭度 0.8–0.9，在该园病叶、病果种均检出病原菌 *X. campestris*

pv. campestris。将获得的供试菌株 WMF106 发酵液制备为菌剂 (活菌数 $\geq 5 \times 10^8$ CFU/mL)，稀释为 800 倍液作为供试药剂。对照药剂喷施 30% 琥胶肥酸铜可湿性粉剂 850 倍液、2% 春雷霉素水剂 1 000 倍液，同时设置空白对照。

田间小区随机分布排列，每个处理组 10 株，重复 3 次。将药剂均匀喷施在病叶、病果表面，确保叶片正反面及果实均匀着药，稍有药液下滴。喷药结束后，悬挂标识牌并记录。每次喷药间隔 15 d，期间不进行其他农事处理。田间调查时间为施药后 10 d，每个处理组随机抽样调查 3 株。调查时每株选取 8 个样点，分别位于植株东、南、西、北方向的中层枝和下层枝，各样点随机调查 5 片树叶或果实^[11]。依据黑斑面积设定病级^[18] (表 2)，统计数据、计算病情指数及药剂防治效果，公式如下：

$$\text{病情指数} = \frac{\sum (\text{各级病叶(果)数量} \times \text{代表值})}{\text{调查总叶(果)数} \times 5} \times 100;$$

$$\text{防治效果}(\%) = \frac{(\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数})}{\text{对照病情指数}} \times 100.$$

1.2.6 数据处理

使用 Excel 2010 记录原始数据，通过 SPSS 22 分析抑菌物质活性测定、培养基与发酵条件优化单因素实验、抑菌物质稳定性及田间防效测定的实验结果，通过 Minitab 18 (Pennsylvania State University) 设计正交试验并分析结果；利用 Sigmaplot 12.5 (SysTat software) 绘图。

表 2 核桃黑斑病病害分级标准

Table 2 Scale for level disease severity of walnut blight

代表值 Value	分级标准 Grading standard
0	无病斑 No lesions on surface of leaves and fruits
1	病斑面积占叶片或果实面积的 5% 以下 Lesions less than 5% of surface area
2	病斑面积占叶片或果实面积的 6%–15% Lesions less than 15%, more than 6% of surface area
3	病斑面积占叶片或果实面积的 16%–25% Lesions less than 25%, more than 16% of surface area
4	病斑面积占叶片或果实面积的 26%–50% Lesions less than 50%, more than 26% of surface area
5	病斑面积占叶片或果实面积的 50% 以上 Lesions more than 50% of surface area

2 结果与分析

2.1 培养基与发酵条件优化

2.1.1 培养基碳源、氮源的优化

通过 5 种碳源培养菌株 WMF106 获得的发酵液对野油菜黄单胞菌(*X. campestris* pv. *campestris*)均有抑制作用(表 3)。其中,将燕麦作为碳源时菌株发酵液抑菌圈直径最大,为 18.78 mm;而将麦芽糖作为碳源时抑菌圈直径最小,为 9.49 mm。葡萄糖和燕麦培养的菌体干重无显著差异,其余处理组间差异显著。以燕麦培养获得的菌体干重最高,为 3.97 g/L;以麦芽糖培养获得的菌体干重最低,为 1.39 g/L。因此,可选择燕麦作为最佳碳源。

通过 5 种氮源培养菌株 WMF106 获得的发酵液对野油菜黄单胞菌(*X. campestris* pv. *campestris*)均具有抑制作用(表 4)。以酵母浸粉作为氮源时菌株发酵液抑菌圈直径最大,为 17.78 mm; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为氮源时抑菌圈直径最小,为 12.89 mm。以酵母浸粉培养获得的菌体干重最高,为 4.35 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 培养获得的

表 3 不同碳源对菌株 WMF106 抑菌活性和菌体干重的影响

Table 3 Effect of different carbon sources on inhibition activity and mycelium accumulation of strain WMF106

碳源 Carbon source	抑菌圈直径 Inhibition zone diameters (mm)	菌体干重 Dry weight (g/L)
葡萄糖 Glucose	16.62±0.12b	3.60±0.15a
麦芽糖 Maltose	9.49±0.13e	1.39±0.15d
乳糖 Lactose	13.83±0.12c	2.82±0.22b
甘油 Glycerol	12.06±0.12d	2.06±0.11c
燕麦 Oatmeal	18.78±0.15a	3.97±0.12a

注:表中数据为平均值±标准误。同列数据后不同字母表示经 Duncan's 新复极差法检验,在 $P<0.05$ 水平差异显著
Note: Values are means ± standard errors. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ by using Duncan's test analysis.

表 4 不同氮源对菌株 WMF106 抑菌活性和菌体干重的影响

Table 4 Effect of different nitrogen sources on inhibition activity and mycelium accumulation of strain WMF106

氮源 Nitrogen source	抑菌圈直径 Inhibition zone diameters (mm)	菌体干重 Dry weight (g/L)
牛肉膏 Beef extract	14.87±0.14c	3.54±0.19bc
麦芽提取物 Malt extract	13.61±0.17d	3.17±0.14c
酵母浸粉 Yeast extract	17.78±0.16a	4.35±0.16a
蛋白胨 Peptone	15.66±0.15b	3.71±0.16b
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	12.89±0.24e	2.53±0.10d

注:表中数据为平均值±标准误。同列数据后不同字母表示经 Duncan's 新复极差法检验,在 $P<0.05$ 水平差异显著
Note: Values are means ± standard errors. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ by using Duncan's test analysis.

菌体干重最低,为 2.53 g/L。因此,可选择酵母浸粉作为最佳碳源。

2.1.2 培养基营养条件正交试验

根据 2.1 中筛选获得的碳源、氮源,选择酵母浸粉(A)、燕麦(B)、NaCl (C)、 K_2HPO_4 (D)和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (E)设计 5 因素 4 水平正交试验(表 1),根据抑菌活性和菌体干重确定最终发酵营养配方。正交试验结果表明(表 5),5 个因素影响菌株 WMF106 发酵液对野油菜黄单胞菌抑菌效果的顺序为 $\text{B}>\text{A}>\text{C}>\text{E}>\text{D}$,最佳水平组合为 $\text{A}_2\text{B}_4\text{C}_2\text{D}_3\text{E}_2$,即最佳培养基配方为:酵母浸粉 2.0 g/L,燕麦 20.0 g/L,NaCl 1.0 g/L, K_2HPO_4 1.5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g/L;5 个因素影响菌株 WMF106 菌体干重的顺序为 $\text{B}>\text{A}>\text{C}>\text{E}>\text{D}$,最佳水平组合为 $\text{A}_2\text{B}_4\text{C}_1\text{D}_2\text{E}_3$,即最佳培养基配方为:酵母浸粉 2.0 g/L,燕麦 20.0 g/L,NaCl 0.5 g/L, K_2HPO_4 1.0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g/L。方差分析结果表明,C、D、E 因素各水平的抑菌圈直径无显著差异。综合两者结果并出于成本考虑,确定最佳组合为 $\text{A}_2\text{B}_4\text{C}_1\text{D}_1\text{E}_1$,即 1 L 发

表 5 菌株 WMF106 发酵培养基营养条件正交试验

Table 5 Results of the orthogonal test with different nutritional constituent on inhibition activity and mycelium accumulation of strain WMF106

No.	A	B	C	D	E	抑菌圈直径 Inhibition zone diameters (mm)	菌体干重 Dry weight (g/L)
1	1	1	1	1	1	15.39	2.87
2	1	2	2	2	2	19.06	3.33
3	1	3	3	3	3	8.31	1.88
4	1	4	4	4	4	20.57	3.25
5	2	1	2	3	4	20.46	4.29
6	2	2	1	4	3	20.29	4.18
7	2	3	4	1	2	10.85	2.06
8	2	4	3	2	1	23.16	3.11
9	3	1	3	4	2	17.96	2.23
10	3	2	4	3	1	17.11	1.88
11	3	3	1	2	4	11.52	3.06
12	3	4	2	1	3	26.43	4.32
13	4	1	4	2	3	10.12	2.33
14	4	2	3	1	4	8.21	1.98
15	4	3	2	4	1	8.46	1.28
16	4	4	1	3	2	25.07	3.25
K_1	15.83	15.98	18.07	15.22	16.03		
K_2	18.69	16.17	18.60	15.97	18.24		
K_3	18.26	9.79	14.41	17.39	16.28		
K_4	12.97	23.81	14.66	16.82	15.19		
R	5.73	14.02	4.19	2.52	3.05		
K_1'	2.83	2.93	3.34	2.81	2.29		
K_2'	3.41	2.84	3.31	2.96	2.72		
K_3'	2.87	2.07	2.30	2.83	3.18		
K_4'	2.21	3.48	2.38	2.74	3.15		
R'	1.20	1.41	1.04	0.22	0.89		

酵培养基含酵母浸粉 2.0 g、燕麦 20.0 g、NaCl 0.5 g、 K_2HPO_4 0.5 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g。

2.1.3 发酵条件优化

在确定了最优发酵培养基的基础上,逐步设置不同发酵参数,如图 1 所示,结果表明:起始 pH 6.0、接种量 8%、装液量 150 mL/500 mL、发酵时间 9 d、发酵温度 28 °C、转速 180 r/min 时,发酵液抑菌活性最佳;起始 pH 7.0、接种量 8%、装液量 200 mL/500 mL、发酵时间 8 d、发酵温度 24 °C、转速 200 r/min 时,菌体干重最大。

除接种量外,不同发酵条件下的菌体干重差异不显著,在优先考虑抑菌活性的前提下,设置菌株 WMF106 的最佳发酵条件为:起始 pH 6.0,接种量 8%,装液量 150 mL/500 mL,发酵时间 9 d,发酵温度 28 °C,转速 180 r/min。

2.2 菌株 WMF106 抑菌物质的稳定性与极性

对菌株 WMF106 发酵液中抑菌物质的酸碱稳定性、热稳定性、光稳定性、储藏温度稳定性、抑菌物质极性进行测定,结果表明:

(1) pH<6.0 时,抑菌活性随 pH 值降低显著降低,

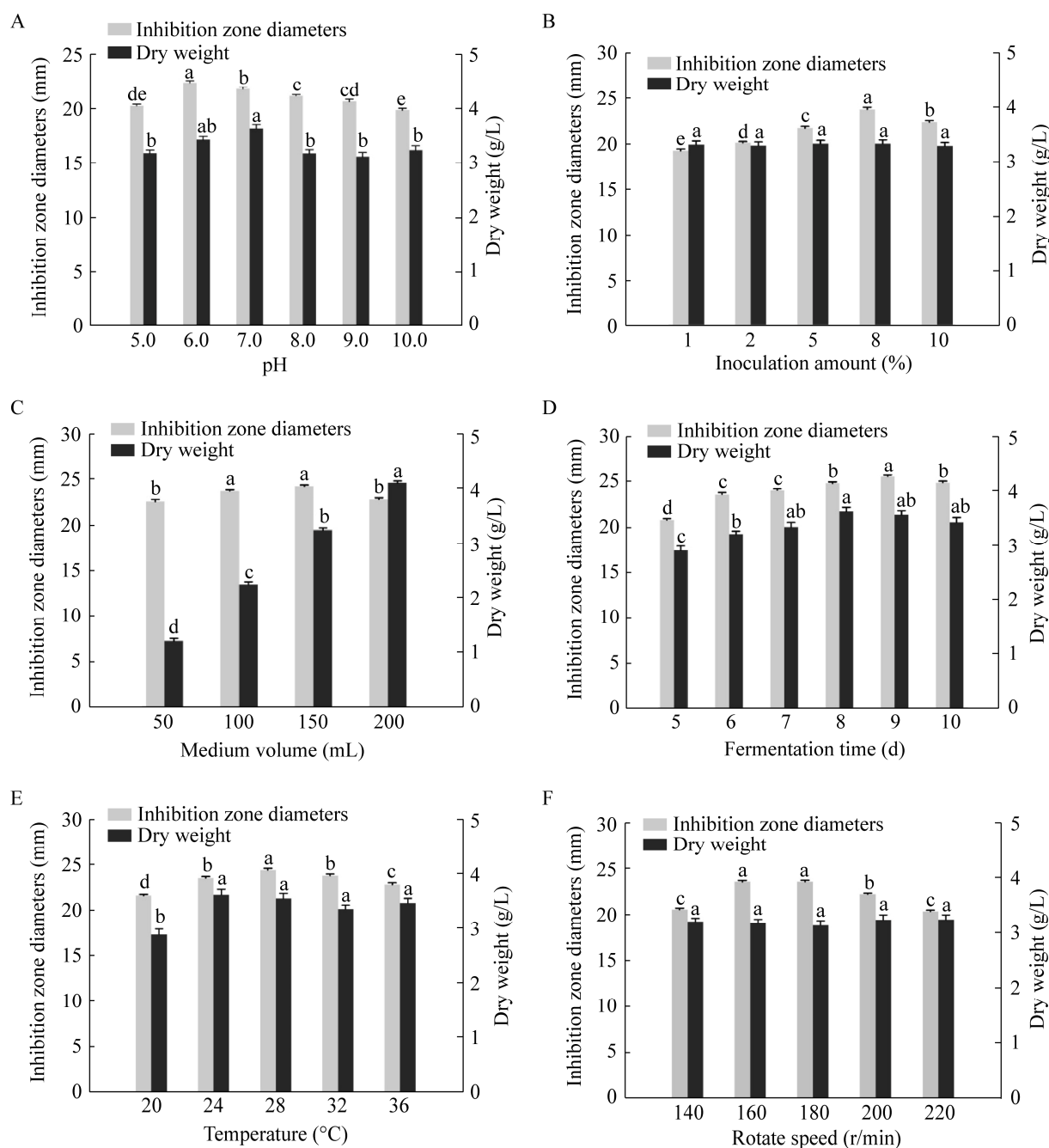


图 1 不同发酵条件对菌株 WMF106 发酵液抑菌活性和菌体干重的影响 A: 起始 pH 值; B: 接种量; C: 装液量; D: 发酵时间; E: 发酵温度; F: 转速。不同字母表示不同处理间经 Duncan's 新复极差法检验, 在 $P < 0.05$ 水平差异显著

Figure 1 Effect of different culture conditions on inhibition activity and mycelium accumulation of strain WMF106. A: Initial pH value; B: Inoculation amount; C: Medium volume; D: Fermentation time; E: Fermentation temperature; F: Rotate speed. Different letters in the figure indicate significant difference ($P < 0.05$ by using Duncan's test analysis) among treatments.

在 pH 6.0–12.0 范围内波动较小; (2) 4–50 °C 处理时抑菌活性无明显变化, 超过 70 °C 时随着处理时间增加而降低; (3) 紫外和日光处理条件下, 抑菌活性无明显变化; (4) 在 -20 °C、4 °C 条件下储藏

对抑菌活性影响不大, 而 20 °C 条件下储藏 30 d 时抑菌活性有一定幅度降低; (5) 通过乙酸乙酯萃取的有机相抑菌活性最高, 氯仿次之, 石油醚和正丁醇较差, 表明抑菌活性物质极性较小(图 2)。

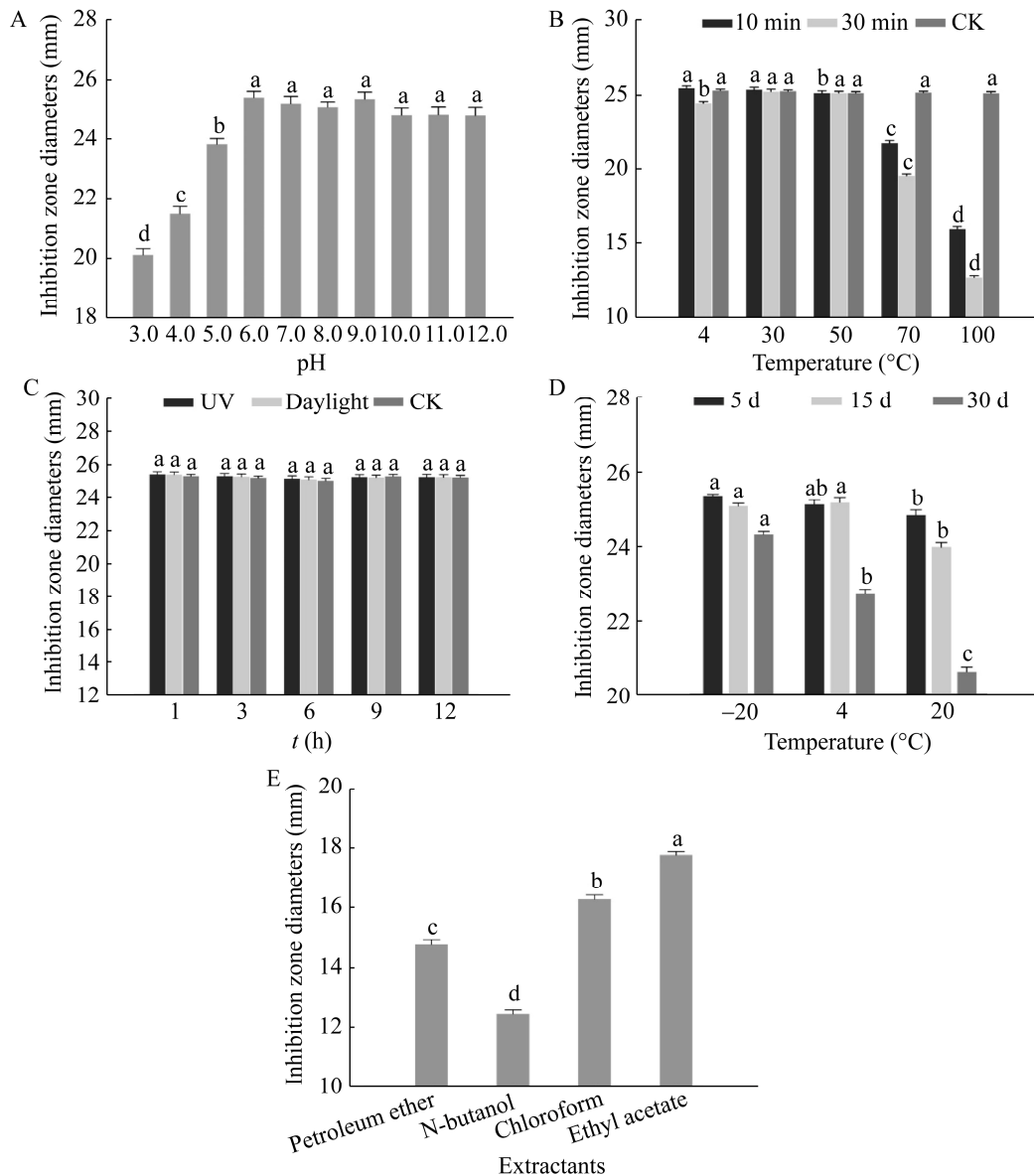


图 2 菌株 WMF106 的抑菌物质稳定性 A: 酸碱稳定性; B: 热稳定性; C: 光稳定性; D: 储藏温度稳定性; E: 抑菌物质极性。不同字母表示不同处理间经 Duncan's 新复极差法检验, 在 $P < 0.05$ 水平差异显著

Figure 2 Stability of antagonistic substances of strain WMF106 under different conditions. A: pH stability; B: Heat stability; C: Light stability; D: Storage temperature stability; E: Antagonistic activity of extracts. Different letters in the figure indicate significant difference ($P < 0.05$ by using Duncan's test analysis) among treatments.

2.3 菌株 WMF106 发酵液对核桃黑斑病的田间防效

喷施菌株 WMF106 发酵液对野油菜黄单胞菌引起的核桃黑斑病具有很好的防治效果, 3 次施药后对叶片的防效分别为 65.33%、71.33% 和 76.21%, 对果实的防效分别为 61.21%、64.52%和 71.21%, 与常用防治药剂琥胶肥酸铜和春雷霉素相比, 其防效提高 6%–10% (表 6, 表 7)。

3 讨论与结论

放线菌由于其活性产物数量和开发程度显著高于细菌和真菌, 被广泛应用于植物病害的

生物防治。发酵是微生物活性物质产业化的基础, 优化拮抗菌培养条件是提高其抑菌能力、增加产量的重要途径。在生产应用过程中若缺乏合理的发酵工艺将会造成菌株活性物质不稳定等问题, 导致活性物质抗菌稳定性和抗菌谱存在差异^[19-20]。开展发酵条件优化对降低微生物次级代谢产物生产成本及充分发挥生产力具有重要意义。

研究表明,碳源和氮源是链霉菌发酵的关键影响因子, 不同微生物对碳源、氮源种类的选择存在明显差异^[21]。此外, 温度、pH、接菌量等因素也会影响发酵效果及发酵产物的活性^[22]。本研究结果发现, 酵母浸粉(氮源)含量、燕麦(碳

表 6 菌株 WMF106 对核桃细菌性黑斑病(叶片)的田间防效
Table 6 Biocontrol effect of strain WMF106 against walnut blight on leaves

药剂 Bactericides	第 1 次施药 10 d 后 Ten days after 1st treatment		第 2 次施药 10 d 后 Ten days after 2nd treatment		第 3 次施药 10 d 后 Ten days after 3rd treatment	
	病情指数	防效	病情指数	防效	病情指数	防效
	Disease index	Biocontrol effect (%)	Disease index	Biocontrol effect (%)	Disease index	Biocontrol effect (%)
WMF106	7.16±0.33b	65.33±1.50a	10.17±0.33c	71.33±1.06a	13.33±0.72b	76.21±1.25a
Cupric succinate	8.33±0.60b	59.64±3.14a	12.33±0.73b	65.19±2.48ab	15.16±1.16b	73.05±1.00ab
Kasugamycin	8.33±0.44b	59.64±2.43a	13.17±0.83b	62.96±1.85b	17.33±1.01b	68.90±2.85b
CK	20.67±0.17a		35.50±0.50a		56.17±2.62a	

注: 表中数据为平均值±标准误。同列数据后不同字母表示经 Duncan’s 新复极差法检验, 在 $P<0.05$ 水平差异显著
Note: Values are means ± standard errors. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ by using Duncan’s test analysis.

表 7 菌株 WMF106 对核桃细菌性黑斑病(果实)的田间防效
Table 7 Biocontrol effect of strain WMF106 against walnut blight on fruits

药剂 Bactericides	第 1 次施药 10 d 后 Ten days after 1st treatment		第 2 次施药 10 d 后 Ten days after 2nd treatment		第 3 次施药 10 d 后 Ten days after 3rd treatment	
	病情指数	防效	病情指数	防效	病情指数	防效
	Disease index	Biocontrol effect (%)	Disease index	Biocontrol effect (%)	Disease index	Biocontrol effect (%)
WMF106	5.33±0.6b	61.21±1.72a	8.50±0.76c	64.52±4.13a	10.83±1.09c	71.21±1.74a
Cupric succinate	7.17±0.16b	47.04±3.92b	11.50±0.50b	51.95±4.28b	13.83±0.44b	62.84±2.76b
Kasugamycin	6.67±0.47b	51.22±0.62b	10.83±0.60b	54.71±4.42b	14.33±1.20b	61.53±4.13b
CK	13.67±0.93a		24.16±1.43a		37.50±1.89a	

注: 表中数据为平均值±标准误。同列数据后不同字母表示经 Duncan’s 新复极差法检验, 在 $P<0.05$ 水平差异显著
Note: Values are means ± standard errors. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ by using Duncan’s test analysis.

源)含量和 pH 是影响菌株 WMF106 发酵产物抑菌活性的主要条件,与链霉菌属其他拮抗菌株相比,菌株 WMF106 发酵过程中发酵产物的抑菌活性受氮源、碳源影响较大,发酵过程中不需要添加其他氮源,与链霉菌 HD-010^[23] (氮源和碳源分别为玉米粉和葡萄糖)、链霉菌 16-3-10^[24] (氮源和碳源分别为小米和乳糖)、链霉菌 A12-2-1^[25] [氮源和碳源分别为(NH₄)₂SO₄和蔗糖]等相同,而有的拮抗链霉菌发酵过程中则需要额外补充氮源,如链霉菌 TD-1^[26] (氮源为黄豆粉+硝酸钾)。

适宜的发酶条件能够促进菌体刺激代谢产物高产^[27],但影响不同拮抗链霉菌产物抑菌活性的关键发酶条件存在差异,如链霉菌 TD-1^[26]是发酶时间、链霉菌 SL01^[28]是温度和起始 pH、链霉菌 LG-9^[29]是起始 pH 和发酶温度。本研究中 pH 和装液量对菌株 WMF106 的产物抑菌活性和菌体产量具有较大影响,与其他拮抗链霉菌相比,温度和装液量等其他发酶条件对菌株 WMF106 抑菌活性的影响不大。由此可见,同属不同菌株在碳源、氮源利用和发酶条件方面存在一定差异,造成差异的原因可能与菌种自身遗传、生理特征、分离来源及病原靶标抑菌活性评价有关。从应用的角度看,应以保障发酶产物抑菌活性为前提来优化培养基和发酶条件,以节约生产成本。

抑菌活性物质稳定性是菌剂制备和生产的前提。张楠等^[30]报道链霉菌 BS-112 产生的抗植物病原菌活性物质对紫外光较为敏感,限制了其在大田的应用;周丽娜等^[31]报道 2 株链霉菌 HD-109、HD-103 的抗菌活性物质不耐高温,不易保存。与其他拮抗链霉菌发酶产物相比,菌株 WMF106 发酶液的抑菌物质具有耐热、耐光、储藏稳定性好、极性较小等特点,但在酸性条件下发酶液抑菌活性显著降低。

目前,生产中对核桃黑斑病的田间防治效果较好的药剂有硫酸链霉素、琥胶肥酸铜、春雷霉素等^[11,17]。本研究通过田间防效测定,菌株 WMF106 发酶液对叶片、果实上发生的核桃黑斑病均有较好的防治效果,对比药剂琥胶肥酸铜和春雷霉素可提高防效 6%–10%,表明该菌株可作为创制核桃黑斑病微生物杀菌剂的出发菌株。

本研究明确了菌株 WMF106 的较优发酶条件和生防菌剂开发潜力,但其抗菌物质的种类与作用机制、提取纯化工艺、制剂化应用等问题在后续还有待进一步深入研究。

REFERENCES

- [1] Chavan DV, Mulaje SS, Mohalkar RY. A review on actinomycetes and their biotechnological application[J]. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 2013, 4(5): 1730-1742
- [2] Subramani R, Aalbersberg W. Marine actinomycetes: an ongoing source of novel bioactive metabolites[J]. Microbiological Research, 2012, 167(10): 571-580
- [3] Mingma R, Pathom-Aree W, Trakulnaleamsai S, Thamchaipenet A, Duangmal K. Isolation of rhizospheric and roots endophytic actinomycetes from Leguminosae plant and their activities to inhibit soybean pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *glycine*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, 30(1): 271-280
- [4] 王志芳,李贞景,杨明冠,路来风,王昌禄,李政,张健飞,巩继贤. *Streptomyces alboflavus* 抗真菌物质对串珠镰刀菌的抑制机理研究[J]. 食品科学技术学报, 2019, 37(5): 64-71
Wang ZF, Li ZJ, Yang MG, Lu LF, Wang CL, Li Z, Zhang JF, Gong JX. Inhibition mechanism of *Streptomyces alboflavus* antifungal substance against *Fusarium moniliforme*[J]. Journal of Food Science and Technology, 2019, 37(5): 64-71 (in Chinese)
- [5] Zamoum M, Goudjal Y, Sabaou N, Barakate M, Mathieu F, Zitouni A. Biocontrol capacities and plant growth-promoting traits of endophytic actinobacteria isolated from native plants of Algerian Sahara[J]. Journal of Plant Diseases and Protection, 2015, 122(5/6): 215-223

- [6] 单丽萍. 白黄链霉菌 TD-1 抑制番茄灰霉病菌作用机理的初步研究[D]. 天津: 天津科技大学硕士学位论文, 2015
Shan LP. Studies on action mechanism of *Streptomyces albobflavus* TD-1 against *Botrytis cinerea*[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University of Science & Technology, 2015 (in Chinese)
- [7] 章家恩, 刘文高. 微生物资源的开发利用与农业可持续发展[J]. 土壤与环境, 2001, 10(2): 154-157
Zhang JE, Liu WG. Utilization of microbes resources and sustainable development of agriculture[J]. Soil and Environmental Sciences, 2001, 10(2): 154-157 (in Chinese)
- [8] 李文均, 职晓阳, 唐蜀昆. 我国放线菌系统学研究历史、现状及未来发展趋势[J]. 微生物学通报, 2013, 40(10): 1860-1873
Li WJ, Zhi XY, Tang SK. Actinobacterial systematics in China: past, present and future[J]. Microbiology China, 2013, 40(10): 1860-1873 (in Chinese)
- [9] 曲文文. 山东省核桃(*Juglans regia*)主要病害病原鉴定[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2011
Qu WW. Identification of pathogens on walnut (*Juglans regia*) in Shandong province[D]. Tai'an: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2011 (in Chinese)
- [10] 刘萌. 陕西省核桃产业发展问题与对策研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2015
Liu M. Research on development problems and countermeasures of walnut industry in Shaanxi province[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2015 (in Chinese)
- [11] 郭安柱, 张力元, 李岩, 朱姝颖, 唐光辉. 防治核桃黑斑病药剂筛选及田间药效试验[J]. 西北林学院学报, 2020, 35(1): 177-182
Guo AZ, Zhang LY, Li Y, Zhu SY, Tang GH. Selection and field application of effective bactericides against walnut blight[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2020, 35(1): 177-182 (in Chinese)
- [12] Sreekumar G, Soundarajan K. Enhanced biomass production study on probiotic *Bacillus subtilis* SK09 by medium optimization using response surface methodology[J]. African Journal of Biotechnology, 2010, 9(47): 8078-8084
- [13] 瞿佳, 门欣, 陈锐, 孙晓宇, 赵玲侠, 宁硕瀛. 核桃黑斑病拮抗放线菌 WMF106 的筛选、鉴定及防效[J]. 微生物学通报, 2021, 48(10): 3621-3631
Qu J, Men X, Chen R, Sun XY, Zhao LX, Ning SY. Screening, identification and biocontrol effect of antagonistic actinomycete WMF106 against walnut blight[J]. Microbiology China, 2021, 48(10): 3621-3631 (in Chinese)
- [14] 赵里京, 支月娥, 刘焕然, 张丹, 周培. 放线菌 JSD-1 抑菌活性初探及影响其抑菌活性的发酵条件优化[J]. 现代食品科技, 2019, 35(12): 176-181, 121
Zhao LJ, Zhi YE, Liu HR, Zhang D, Zhou P. Preliminary study on antibacterial activity of actinomycete JSD-1 and optimization of fermentation conditions affecting the antibacterial activity of JSD-1[J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(12): 176-181, 121 (in Chinese)
- [15] Alonso CA, Domínguez C, Heras J, Mata E, Pascual V, Torres C, Zarazaga M. AntibioGram: a tool for analysing images from disk diffusion tests[J]. Computer Methods and Programs in Biomedicine, 2017, 143: 159-169
- [16] 刘一贤, 施玉萍, 戴利铭, 李岚岚, 蔡志英. 橡胶褐根病拮抗放线菌 17-7 的筛选、鉴定及发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2020, 47(1): 118-129
Liu YX, Shi YP, Dai LM, Li LL, Cai ZY. Screening, identification and fermentation optimization of an antimicrobial actinomycete strain 17-7 to *Phellinus noxius*[J]. Microbiology China, 2020, 47(1): 118-129 (in Chinese)
- [17] 瞿佳, 赵玲侠, 陈锐, 路鹏鹏, 孙晓宇, 沈卫荣. 抗结核海洋放线菌的筛选及菌株 HY286 生物活性研究[J]. 生物技术通报, 2017, 33(11): 194-199
Qu J, Zhao LX, Chen R, Lu PP, Sun XY, Shen WR. Screening of anti-tuberculosis marine actinomycetes and the bioactivity of strain HY286[J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(11): 194-199 (in Chinese)
- [18] 瞿佳, 门欣, 孙晓宇, 赵玲侠, 宁硕瀛, 陈锐. 陕西核桃黑斑病病原菌鉴定及药剂防治研究[J]. 西北农业学报, 2021, 30(3): 452-461
Qu J, Men X, Sun XY, Zhao LX, Ning SY, Chen R. Study on the identification of the causal agent and control of walnut blight in Shaanxi province[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2021, 30(3): 452-461 (in Chinese)
- [19] 刘姝. 海洋链霉菌 GB-2 的分离筛选及其抗菌物质的研究[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2007
Liu S. Isolation of marine *Streptomyces* sp. GB-2 and studies on its antimicrobial substances[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2007 (in Chinese)
- [20] 牛世全, 文娜, 韩建山, 赵晓霞, 陈腾. 一株抗植病放线菌的发酵条件优化及活性产物研究[J]. 西北师范大学学报(自然科学版), 2020, 56(1): 69-77
Niu SQ, Wen N, Han JS, Zhao XX, Chen T. Optimization of fermentation condition and study on

- bioactive product of an actinomycete against plant pathogenic[J]. Journal of Northwest Normal University: Natural Science, 2020, 56(1): 69-77 (in Chinese)
- [21] 邹立飞, 余小兰, 邹雨坤, 李光义, 李晓亮, 郑鹏, 李勤奋. 拮抗甜瓜枯萎病链霉菌 D2 菌株发酵条件的优化[J]. 南方农业学报, 2018, 49(5): 905-911
- Zou LF, Yu XL, Zou YK, Li GY, Li XL, Zheng P, Li QF. Optimition of fermentation conditions of *Streptomyces* strain D2, an antagonistic strepomyces against muskmelon *Fusarium* wilt[J]. Journal of Southern Agriculture, 2018, 49(5): 905-911 (in Chinese)
- [22] Trupkin S, Levin L, Forchiassin F, Viale A. Optimization of a culture medium for ligninolytic enzyme production and synthetic dye decolorization using response surface methodology[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2003, 30(12): 682-690
- [23] 张海秀. 菌株 HD-010 抗辣椒根腐病菌活性产物发酵条件的研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江大学硕士学位论文, 2009
- Zhang HX. Study on the fermentation condition of the bacterial active product of HD-010[D]. Harbin: Master's Thesis of Helongjiang University, 2009 (in Chinese)
- [24] 王彦, 牛世全, 郑豆豆, 周璇, 朱学泰, 孔维宝, 韩建山, 张爱梅. 黄瓜枯萎病拮抗放线菌的筛选、鉴定及发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2019, 46(5): 1062-1073
- Wang Y, Niu SQ, Zheng DD, Zhou X, Zhu XT, Kong WB, Han JS, Zhang AM. Screening, identification and optimization of fermentation conditions of an antagonistic actinomycetes to cucumber *Fusarium* wilt[J]. Microbiology China, 2019, 46(5): 1062-1073 (in Chinese)
- [25] 牛世全, 赵丹, 豆建涛, 豆雅楠, 朱学泰. 敦煌盐碱土中抗黄芩根腐病放线菌的筛选、鉴定及发酵条件优化[J]. 西北师范大学学报: 自然科学版, 2018, 54(3): 71-76
- Niu SQ, Zhao D, Dou JT, Dou YN, Zhu XT. Screening, identification and optimization of fermentation conditions of actinomycetes on *Astragalus membranaceus* root rot isolated from saline-alkali soils in Dunhuang[J]. Journal of Northwest Normal University: Natural Science, 2018, 54(3): 71-76 (in Chinese)
- [26] 张红. 白黄链霉菌 TD-1 抗菌活性物质发酵条件优化及分离纯化[D]. 天津: 天津科技大学硕士学位论文, 2013
- Zhang H. Optimization of fermentation conditions and purification of antifungal substances from *Streptomyces alboflavus* TD-1[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University of Science & Technology, 2013 (in Chinese)
- [27] Yang YC, Guan ZB, Ding YR, Liao XR, Cai YJ. Fermentation optimization, cloning and sequence analysis of the laccase gene from *Shiraia* sp. SUPER-H168[J]. Annals of Microbiology, 2015, 65(1): 575-583
- [28] 戴蓬博, 蓝星杰, 宗兆锋, 王阳. 极长链霉菌 SL01 菌株抑菌活性物质的发酵条件优化和稳定性研究[J]. 农药学报, 2016, 18(6): 729-737
- Dai PB, Lan XJ, Zong ZF, Wang Y. Optimization of fermentation conditions for antifungal substance production of *Streptomyces longissimus* SL01 and its stability evaluation[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2016, 18(6): 729-737 (in Chinese)
- [29] 陈明, 穆凯热姆·阿卜来提, 刘政, 王晓东. 响应面法优化链霉菌 LG-9 发酵条件及对棉花黄萎病菌的抑菌作用[J]. 湖北农业科学, 2018, 57(8): 71-76
- Chen M, Mukaram A, Liu Z, Wang XD. Optimization of fermentation conditions for anti-*Streptomyces* LG-9 using response surface methodology and its inhibiton on *Verticillium dahliae*[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2018, 57(8): 71-76 (in Chinese)
- [30] 张楠, 孙长坡, 宋振, 国辉, 张本峰, 仇念全, 刘训理. 吸水链霉菌 BS-112 产生的抗真菌活性物质的分离纯化与结构鉴别[J]. 微生物学报, 2011, 51(2): 224-232
- Zhang N, Sun CP, Song Z, Guo H, Zhang BF, Qiu NQ, Liu XL. Isolation, purification and characterization of antifungal substances from *Streptomyces hygroscopicus* BS-112[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(2): 224-232 (in Chinese)
- [31] 周丽娜, 王莉莉, 张永娜, 杜春梅. 2 株放线菌的抗菌活性及分类学地位[J]. 中国农学通报, 2015, 31(11): 182-189
- Zhou LN, Wang LL, Zhang YN, Du CM. Antifungal activity and taxonomic status of two actinomycetes[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2015, 31(11): 182-189 (in Chinese)