

## 研究报告

# 具有杀线虫活性的郭霍氏芽孢杆菌发酵条件优化及稳定性评价

徐宇飞<sup>1,2</sup>, 张晓敏<sup>1</sup>, 朱佳美<sup>1</sup>, 王庆彬<sup>2</sup>, 张晓英<sup>2</sup>, 王洪凤<sup>2</sup>, 刘峰<sup>\*1</sup>, 慕卫<sup>\*1</sup>

1 山东农业大学植物保护学院农药毒理与应用技术重点实验室, 山东 泰安 271018

2 山东蓬勃生物科技有限公司, 山东 泰安 271018

徐宇飞, 张晓敏, 朱佳美, 王庆彬, 张晓英, 王洪凤, 刘峰, 慕卫. 具有杀线虫活性的郭霍氏芽孢杆菌发酵条件优化及稳定性评价[J]. 微生物学通报, 2022, 49(7): 2612-2624

Xu Yufei, Zhang Xiaomin, Zhu Jiamei, Wang Qingbin, Zhang Xiaoying, Wang Hongfeng, Liu Feng, Mu Wei. Optimization of fermentation conditions and evaluation of stability of *Bacillus kochii*[J]. Microbiology China, 2022, 49(7): 2612-2624

**摘要:**【背景】芽孢杆菌是一类常见的生防菌, 在植物病害防治中展现出巨大潜力。【目的】对一株具有杀线虫活性的郭霍氏芽孢杆菌(*Bacillus kochii*) DDWB 进行发酵条件优化和稳定性评价, 为菌株的开发提供理论支持。【方法】以发酵液上清杀线虫率及细菌发酵液  $OD_{600}$  值为指标, 通过单因素法与正交试验设计, 对菌株的培养基与发酵参数进行优化; 同时对菌株发酵液酸碱、温度、紫外、遗传及储存稳定性进行评价。【结果】DDWB 菌株培养基优化后为: 蔗糖 2%, 酵母提取物 1%, 氯化钾 2%; 优化后初始 pH 值为 8.0, 装液量为 150 mL/250 mL 锥形瓶, 发酵时间为 48 h, 接种量为 8%, 转速为 160 r/min, 发酵温度为 31 °C; 稳定性测定结果显示发酵液对酸碱敏感, 紫外光照射 4 h 后活性物质发生降解, 但发酵液对温度不敏感且杀线虫活性相关基因可稳定遗传。【结论】本研究优化了 DDWB 菌株的发酵条件, 并对发酵液中活性物质的稳定性进行了多因素评价, 使得菌株可以快速扩繁并长期稳定保持对根结线虫的抑制活性, 为进一步评价菌株田间防效和研究生防机制奠定了基础。

**关键词:** 郭霍氏芽孢杆菌; 根结线虫; 发酵条件; 稳定性

基金项目: 山东省蔬菜产业技术体系项目(SDAIT-05)

Supported by: Project of Modern Agricultural Industry Technology System for Vegetables in Shandong Province (SDAIT-05)

\*Corresponding authors: E-mail: LIU Feng: [fliu@sdau.edu.cn](mailto:fliu@sdau.edu.cn); MU Wei: [muwei@sdau.edu.cn](mailto:muwei@sdau.edu.cn)

Received: 2021-11-20; Accepted: 2021-12-31; Published online: 2022-03-16

## Optimization of fermentation conditions and evaluation of stability of *Bacillus kochii*

XU Yufei<sup>1,2</sup>, ZHANG Xiaomin<sup>1</sup>, ZHU Jiamei<sup>1</sup>, WANG Qingbin<sup>2</sup>, ZHANG Xiaoying<sup>2</sup>, WANG Hongfeng<sup>2</sup>, LIU Feng<sup>\*1</sup>, MU Wei<sup>\*1</sup>

1 Key Laboratory of Pesticide Toxicology and Application Technology, College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong, China

2 Shandong Pengbo Biotechnology Limited Company, Tai'an 271018, Shandong, China

**Abstract:** [Background] As common biocontrol bacteria, *Bacillus* exhibit great potential in the prevention and control of plant diseases. [Objective] In this study, we optimized the fermentation conditions and evaluated the stability of *Bacillus kochii* DDWB with nematicidal activity, aiming to provide theoretical support for the development and application of the strain. [Methods] With the nematicidal activity of supernatant and the  $OD_{600}$  of fermentation broth as indexes, we optimized the culture medium and fermentation parameters of DDWB strain via single factor tests and orthogonal design. Furthermore, we analyzed nematicidal activity about pH, temperature, UV irradiation, heredity, and storage stability of the fermentation broth. [Results] The optimized culture medium for DDWB strain contained 2% sucrose, 1% yeast extract, and 2% potassium chloride. The optimized fermentation conditions were initial pH 8.0, the filling volume of 150 mL/250 mL conical flask), the fermentation time of 48 h, the inoculum volume of 8%, the rotation speed of 160 r/min, and the fermentation temperature of 31 °C. The fermentation broth was sensitive to acid and alkali, and its nematicidal activity degraded after 4 h of UV irradiation. However, the fermentation broth was not sensitive to temperature, and the genes related to nematicidal activity could be stably inherited. [Conclusion] We optimized the fermentation conditions and evaluated the stability of active substances in the fermentation broth of DDWB strain, aiming to make the strain rapidly propagate and maintain its long-term and stable nematicidal activity against root-knot nematodes. The findings laid a foundation for evaluating the field efficacy and biocontrol mechanism of DDWB strain.

**Keywords:** *Bacillus kochii*; root-knot nematode; fermentation conditions; stability

植物根结线虫病是一类全球性病害, 每年因根结线虫导致的经济损失达到 1 700 亿美元。根结线虫寄主范围广, 能够侵染粮食作物、蔬菜、果树、茶叶、烟草、杂草等 3 000 多种植物<sup>[1-2]</sup>, 其中为害最重的主要有南方根结线虫(*Meloidogyne incognita*)、北方根结线虫(*M. hapla*)、爪哇根结线虫(*M. javanica*)和花生根结线虫(*M. arenaria*)四类<sup>[3-4]</sup>。根结线虫主要通过口针破坏植物根部造成机械损伤, 输导组

织被破坏, 导致植物因营养不良而矮小发黄, 严重时甚至会造成整株死亡<sup>[5-6]</sup>。目前根结线虫病的防治以药剂熏蒸、撒施、灌根等化学防治为主, 辅以抗性品种、土壤消毒、田间清洁、合理轮作、天敌等农业、物理、生物防治手段<sup>[7-10]</sup>。其中生物农药来源于自然, 环境友好, 其开发利用是当下病害防治的热门之一<sup>[11]</sup>。

芽孢杆菌是根结线虫病最普遍和最多样化

的生物资源<sup>[12]</sup>。芽孢杆菌能够产生许多具有杀线虫活性的次生代谢物,如胶原酶、几丁质酶、丝氨酸蛋白酶等<sup>[13-15]</sup>,这些物质能够破坏线虫的体壁或肠道,从而起到杀线虫效果<sup>[16]</sup>;某些芽孢杆菌还能够诱导宿主产生系统抗性,如短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)产生的吲哚-3-乙酸(3-indoleacetic acid, IAA)能够促进植物生长的同时抑制病害;施用到田间后能在植物根系定殖,并在根系表面形成一层保护膜,占据植株根部生态位,阻碍病原物对植株的侵染<sup>[17]</sup>。目前已登记用于根结线虫病防治的芽孢杆菌主要有坚强芽孢杆菌(*B. firmus*)、蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)、苏云金杆菌(*B. thuringiensis*)等<sup>[18]</sup>,展现出较好的开发和利用前景。

本实验室前期筛选到一株具有强杀线虫活性的郭霍氏芽孢杆菌(*B. kochii*) DDWB, 本文对该菌株的发酵条件进行了优化,力求得到稳定的生防菌株的同时提升发酵的产量与质量,同时考察发酵液的稳定性,明确其对环境条件的敏感性,以期为该菌株的进一步开发利用提供数据支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

供试菌株:郭霍氏芽孢杆菌(*B. kochii*) DDWB 菌株<sup>[19]</sup>,分离自山东省泰安市岱岳区大汶口镇东大吴村(117°8'21"E, 35°59'7"N)常年发生根结线虫病的土壤中。

供试线虫:南方根结线虫(*M. incognita*)分离自山东省泰安市岱岳区设施番茄病株。

线虫消毒:使用贝曼氏漏斗法获得根结线虫二龄幼虫<sup>[20]</sup>,将 1 mL 线虫悬浮液转移至离心管中,1%的次氯酸钠溶液补充至 10 mL,轻轻摇匀约 30 s, 3 500 r/min 离心 4 min,弃去上清液,得到的线虫沉淀中加入灭菌蒸馏水,轻

摇约 30 s 混匀以清洗次氯酸钠残留,再次离心。此步骤重复 3 次即可得到无菌根结线虫,保存于 4 °C 备用。

### 1.2 菌株培养

种子培养基用 LB 培养基(g/L): NaCl 10.0, 酵母提取物 5.0, 胰蛋白胨 10.0, pH 7.0; 固体培养基加入 15.0 g 琼脂粉。

碳源基础培养基(g/L): 酵母提取物 10.0, NaCl 10.0。

氮源基础培养基(g/L): 葡萄糖 10.0, NaCl 10.0。

无机盐基础培养基(g/L): 葡萄糖 10.0, 酵母提取物 10.0。

种子液培养:取于-80 °C 甘油中保存的 DDWB 菌液 10 μL, 转接到 LB 平板上,涂布均匀, 25 °C 培养 36 h, 挑取单菌落, 转接到 LB 液体培养基中, 25 °C、160 r/min 培养 36 h 得到种子液。

### 1.3 杀线虫活性测定

将 DDWB 菌株种子液接种至新的 LB 培养基中, 25 °C、160 r/min 培养 48 h 得到发酵液, 将发酵液于 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min, 得到发酵液上清, 用 0.45 μm 滤膜过滤得到无菌发酵液上清。

浸虫法:根据修改后的行业标准 NY/T 1833.1—2009 进行试验<sup>[21]</sup>。将无菌线虫悬浮液用灭菌蒸馏水稀释至 200 头/mL, 取 500 μL 线虫悬浮液加至无菌 12 孔板中,同时加入 500 μL 无菌发酵液上清,于 25 °C 培养 12 h 后,观察二龄幼虫的致死情况,线虫僵直并用挑针触动不动者为死虫,线虫呈弯曲蠕动状或挑针触动后活动者为活虫。

死亡率(%)=死亡的线虫数量/线虫总数×100;

校正死亡率(%)=(处理组的死亡率-对照组的死亡率)/(100-对照组的死亡率)×100。

## 1.4 培养基成分优化

### 1.4.1 单一成分的优化

碳源的优化: 在碳源基础培养基中分别加入 1% (质量体积分数) 甘露醇、乳糖、果糖、蔗糖、葡萄糖作为培养基的碳源; 氮源的优化: 在氮源基础培养基中分别加入 1% (质量体积分数) 干酪素、牛肉膏、蛋白胨、硝酸钾、酵母提取物作为培养基的氮源; 无机盐的优化: 在无机盐基础培养基中分别加入 1% (质量体积分数)  $MgSO_4$ 、KCl、 $K_2HPO_4$ 、 $CaCl_2$ 、 $CaCO_3$  作为培养基的无机盐。分别装入锥形瓶中, 接种 5% (质量体积分数) DDWB 菌株种子液, 用无菌封口膜封口, 25 °C、150 r/min 振荡培养 48 h, 测定发酵液在  $OD_{600}$  处的吸光度及其无菌上清液的杀线虫活性(参照 1.3)。

### 1.4.2 添加量的优化

在碳源基础培养基中分别加入 0.5%、1.0%、2.0%、4.0%、8.0% (质量体积分数) 优化后的碳源; 在氮源基础培养基中分别加入 0.1%、0.5%、1.0%、5.0%、10.0% (质量体积分数) 优化后的氮源; 在无机盐基础培养基中分别加入 0.5%、1.0%、2.0%、4.0%、8.0% (质量体积分数) 优化后的无机盐。相同条件下发酵培养, 测定发酵液在  $OD_{600}$  处的吸光度值以及无菌上清液的杀线虫活性。

以上试验均设对应基础培养基为对照, 各处理设 3 个重复, 试验重复 3 次。

### 1.4.3 正交试验

根据单因素试验筛选出的优化后培养基, 进行正交试验设计如表 1 所示, 试验为三水平三因素。试验重复 3 次。

## 1.5 发酵参数优化

在筛选出的最佳培养基配方的基础上进行各项参数的优化。

初始 pH 优化: 用 1 mol/L 的 NaOH 和 1 mol/L 的 HCl 调节培养基的 pH 值分别为 2.0、

表 1 正交试验设计因素水平表

Table 1 Orthogonal factor level table

水平 Level	因素 Factor		
	蔗糖 Sucrose (%)	酵母提取物 Yeast extract (%)	氯化钾 KCl (%)
1	1.0	0.5	2.0
2	2.0	1.0	4.0
3	4.0	5.0	8.0

3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 和 11.0, 接入 5% (质量体积分数) DDWB 菌株种子液, 25 °C、150 r/min 培养 48 h。

装液量优化: 以 250 mL 的锥形瓶为装液瓶, 分别装入 25、50、75、100、125、150、175 和 200 mL 液体培养基, 其余条件相同。

发酵时间优化: 其他条件相同的基础上, 分别发酵培养 12、24、36、48、60、72、84、96、108 和 120 h。

接种率优化: 培养基中分别接入 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9% 和 10% (质量体积分数) 种子液, 其余条件相同。

转速优化: 分别在 100、130、160、190、220 和 250 r/min 条件下进行发酵培养。

温度优化: 其他条件相同的情况下, 分别设置培养温度为 22、25、28、31、34 和 37 °C。

测定发酵液在  $OD_{600}$  处的吸光度值以及无菌上清液的杀线虫活性。试验设培养基对照, 各处理设置 3 个重复。

## 1.6 发酵液稳定性测定

酸碱稳定性: 将发酵液上清用 1 mol/L 的 NaOH 调节 pH 值分别为 8.0、9.0、10.0、11.0、12.0、13.0 和 14.0, 用 1 mol/L 的 HCl 调节 pH 值分别为 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 和 6.0, 4 °C 放置 12 h 之后再次将 pH 调回中性, 参照 1.3 测定杀线虫活性。

紫外稳定性: 发酵液上清置于 15 W 紫外灯下约 15 cm 处, 分别照射 1、2、3、4、5 和 6 h,

测定杀线虫活性。

**温度稳定性:** 将发酵液上清分别于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理 12 h 后, 分别于 20、40、60、80 和  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴处理 30 min, 之后  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  高温处理 30 min, 测定杀线虫活性。

**遗传稳定性:** 将甘油中保存的 DDWB 菌株转接至 LB 平板中, 于  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 48 h 作为第一代; 挑取单菌落, 平板划线转移至新的 LB 平板中, 于  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 48 h 作为第 2 代; 以此方法转接培养至第 10 代。挑取第 1、3、5、7 和 9 代的单菌落转移至新的培养基中进行发酵培养, 测定杀线虫活性。

**储藏稳定性:** 发酵液上清  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存, 取不同时间段测定杀线虫活性。同样的处理, 将发酵液上清于  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存, 取不同时间段测定杀线虫活性。

以上试验均设培养基为阴性对照, 以未经处理的发酵液上清为阳性对照, 各处理均设置 3 个重复, 试验重复 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 DDWB 菌株对根结线虫的致死作用

DDWB 菌株发酵液上清处理线虫 12 h, 显微镜下观察发现根结线虫二龄幼虫呈僵直状态, 挑针触动虫体不动(图 1)。说明 DDWB 菌株发酵液上清对根结线虫二龄幼虫具有致死作用。

### 2.2 培养基成分优化结果

#### 2.2.1 单一因素的优化结果

**碳源优化:** 通过单因素法进行筛选, 得到的结果如图 2A 所示, 当添加蔗糖作为培养基的碳源时, DDWB 菌株发酵液上清对根结线虫抑制活性最高, 线虫的校正死亡率为 89.53%, 不添加碳源的对照处理组及乳糖、葡萄糖、果糖处理组的线虫校正死亡率分别为 79.46%、83.08%、85.08%和 89.15%, 4 组之间无显著差异( $P>0.05$ ); 添加甘露醇作为培养基的碳源时, 发酵液对根结线虫的抑制活性最弱, 线虫校正死亡率只有 70.58%。综合考虑选取蔗糖为最佳碳源。

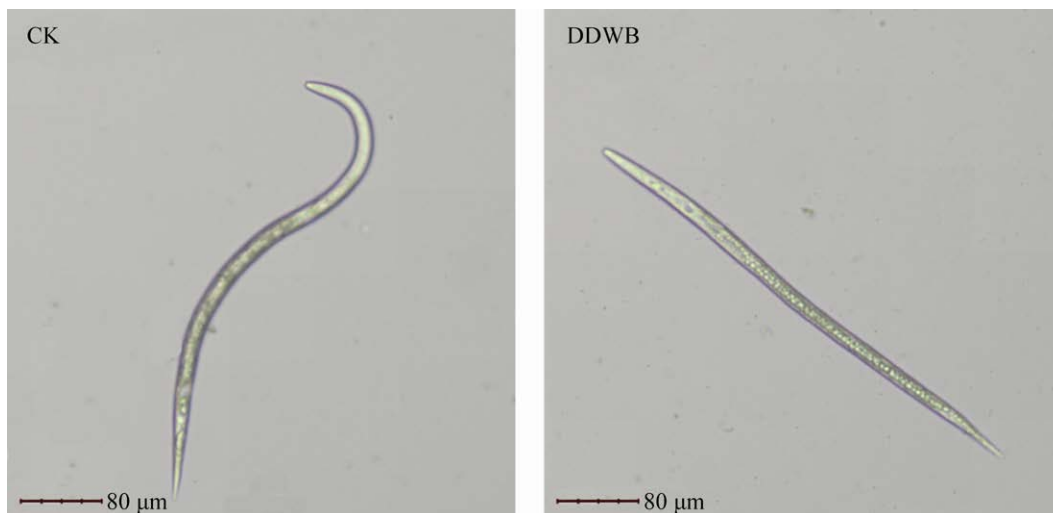


图 1 DDWB 菌株发酵液上清对根结线虫二龄幼虫的致死作用

Figure 1 Nematicidal activity of the supernatant of fermentation broth of DDWB strain against the second-stage juveniles of *Meloidogyne incognita*.

氮源优化: 当添加酵母提取物作为氮源时, DDWB 菌株发酵液上清对根结线虫抑制活性最高, 线虫的校正死亡率为 85.16% (图 2B), 与不加氮源的对照处理组和其他 4 种氮源处理组的杀线虫活性存在显著性差异( $P<0.05$ ); 其线虫校正死亡率分别为牛肉膏 57.78%、蛋白胨 43.90%、

硝酸钾 38.95%, 而干酪素的效果最差, 线虫的校正死亡率只有 2.83%。可能是由于干酪素在中性条件下溶解性较差, 无法发挥其效果。

无机盐优化: 当添加氯化钾作为无机盐时, DDWB 菌株发酵液上清对根结线虫抑制活性最高, 线虫的校正死亡率为 86.51% (图 2C), 与不

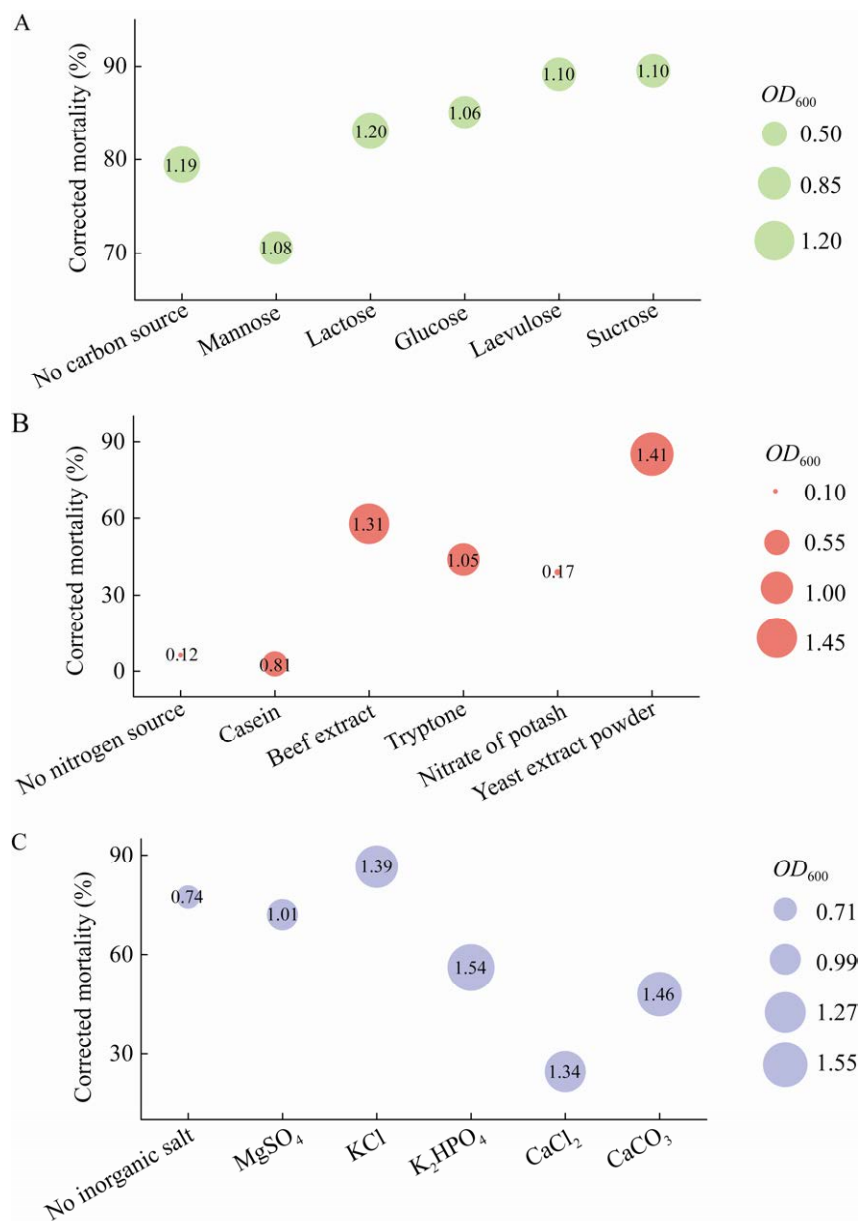


图 2 不同碳源(A)、氮源(B)、无机盐(C)对 DDWB 菌株发酵的影响

Figure 2 Effects of different carbon sources (A), nitrogen sources (B) and inorganic salts (C) on fermentation of DDWB strain.

加无机盐的对照处理组和其他 4 种无机盐处理组的杀线虫活性存在显著性差异( $P<0.05$ ); 其线虫校正死亡率分别为硫酸镁 71.99%、磷酸氢二钾 56.08%、碳酸钙 47.96%, 而氯化钙的效果最差, 线虫的校正死亡率只有 24.63%。

### 2.2.2 各元素添加量的优化结果

在优化培养基的基础上筛选不同比例添加量。

利用单因素法进行蔗糖添加量的优化, 得到的结果如图 3A 所示, 蔗糖为 2.0% 时, DDWB 菌株发酵液上清对根结线虫抑制活性最高, 线虫的校正死亡率为 90.34%; 减少蔗糖添加时, 发酵液对线虫抑制活性也降低, 在蔗糖添加量为 0.5% 或 1.0% 时, 线虫校正死亡率分别为 84.41% 与 87.21%; 提高蔗糖添加量, 线虫死亡率同样降低, 当添加量为 8% 时, 线虫死亡率明显降低, 只有 70.49%, 说明过量的蔗糖不仅造成营养过剩, 而且提高了发酵液的渗透压, 不利于郭霍氏芽孢杆菌(*B. kochii*) 的生长繁殖。

对酵母提取物添加量的优化结果如图 3B 所示, 酵母提取物为 1.0% 时, 发酵液上清对根结线虫抑制活性最高, 校正死亡率为 83.09%; 随着酵母提取物添加量降低, 发酵液上清对线虫的抑制活性也快速降低, 在添加量为 0.1%、0.5% 时, 线虫校正死亡率分别为 22.76% 和 61.28%, 显著低于添加量 1.0% ( $P<0.05$ ), 这说明低量氮元素不利于 DDWB 菌株的发酵。

优化得到的无机盐 KCl 添加量为 4.0% 时, DDWB 菌株发酵液上清对根结线虫抑制活性最高, 线虫的校正死亡率为 93.23% (图 3C); 随着 KCl 添加量的增加或降低, 发酵液对线虫的抑制活性也随之降低。

### 2.2.3 正交试验结果

运用 SPSS 数据处理软件, 以蔗糖、酵母提取物、KCl 为试验因素, 设计  $L_9(3^4)$  的正交试验, 如表 2 所示, 极差分析结果表明, 3 个因

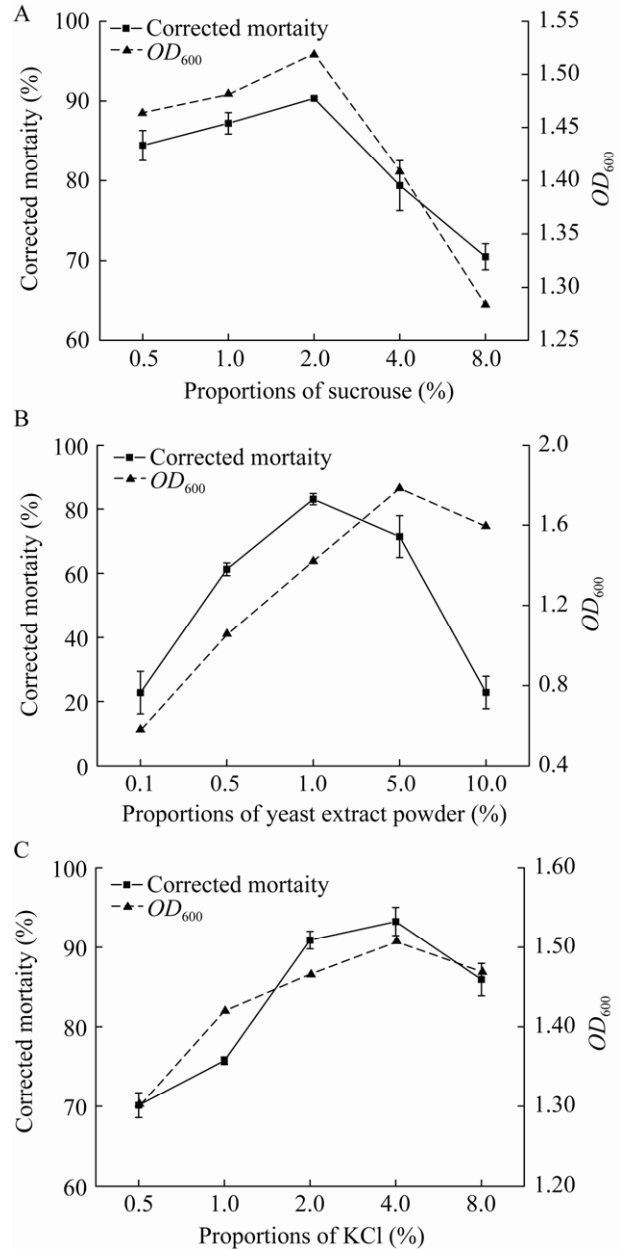


图 3 不同添加量的培养基对 DDWB 菌株发酵的影响

Figure 3 Effects of different supplemental levels of medium on the fermentation of DDWB strain.

素对发酵液抑制线虫活性的影响为酵母提取物>蔗糖>氯化钾; 说明酵母提取物对发酵液中活性物质的产生影响较大, 氮源对于 DDWB 菌株发酵有较大影响。根据各个处理组的结果可

表 2 培养基成分正交试验设计表

Table 2 Orthogonal experimental design of medium composition

Code	A	B	C	Corrected mortality (%)
	Sucrose (g/L)	Yeast extract (g/L)	KCl (g/L)	
1	10	5	20	94.19
2	10	10	40	95.66
3	10	50	80	74.48
4	20	5	40	90.74
5	20	10	80	96.64
6	20	50	20	93.03
7	40	5	80	91.92
8	40	10	20	86.50
9	40	50	40	83.86
$K_1$	264.34	276.85	273.73	
$K_2$	280.41	278.81	270.26	
$K_3$	262.28	251.38	263.04	
R	18.12	27.43	10.68	
Priorities	$B>A>C$			
Optimal levels	$A_2$	$B_2$	$C_1$	

知, DDWB 菌株发酵培养基的最佳组合为酵母提取物 10 g/L、蔗糖 20 g/L、氯化钾 20 g/L。

### 2.3 发酵参数优化结果

初始 pH: pH 值为 8.0 时, DDWB 菌株发酵液上清对南方根结线虫抑制活性最高;随着碱性的增强, 其杀线虫活性缓慢降低, 而在添加酸的条件下, 其杀线虫活性快速降低, 在 pH 值为 2.0–5.0 时, 线虫的校正死亡率只有 14.06%–16.52%, 显著低于碱性条件下线虫的死亡率( $P<0.05$ ) (图 4A)。

装液量: 装液量为 150 mL/250 mL 时, DDWB 菌株发酵液上清对根结线虫抑制活性最高, 线虫的校正死亡率为 81.83% (图 4B)。装液量与通气量有关, 通气量过多或过少均会影响 DDWB 发酵液中活性物质的产生。

发酵时间: 随培养时间的增加, 细菌数量急速增加, 产生的活性物质也持续增多, 48 h 后发酵趋于稳定, 各发酵时间下线虫的死亡率

无显著性差异, 因此选择 48 h 作为最佳发酵时间(图 4C)。

接种率: 如图 4D 所示, 接种量为 8% 时, DDWB 菌株发酵液上清对线虫抑制活性最高, 线虫校正死亡率为 82.61%, 接种量过高或过低均不利于菌株的发酵。

转速: 转速为 160 r/min 时, DDWB 菌株发酵液上清对线虫抑制活性最高, 线虫的校正死亡率为 80.25% (图 4E), 转速过高或过低均会导致发酵液溶氧量减少, 最终影响发酵液活性物质的产量。

温度: 31 °C 培养条件下, DDWB 菌株发酵液上清对线虫抑制活性最高, 线虫校正死亡率为 84.64%, 而 34 °C 培养条件下的死亡率为 83.79%, 二者之间无显著性差异( $P>0.05$ ) (图 4F), 试验选择 31 °C 作为优化后的培养温度。

### 2.4 发酵液稳定性测定结果

酸碱稳定性: DDWB 菌株发酵液初始 pH 值为 8.0 左右, 此时发酵液对线虫的抑制活性最高(图 5A); 随着 pH 值的降低, 发酵液中开始出现沉淀物, 而且 pH 值越低沉淀物越多, 随之发酵液的杀线虫活性也越低, 在 pH 值为 1.0 时, 线虫的校正死亡率只有 13.28%; 当 pH 值缓慢增加时, 发酵液的杀线虫活性也开始降低, 但是始终保持清澈。

紫外稳定性: 如图 5B 所示, 紫外光照射 4 h 以内, 对发酵液杀线虫活性影响较小, 各处理间无显著性差异( $P>0.05$ ); 随着照射时间增加, 发酵液杀线虫活性开始降低, 照射 6 h 后线虫校正死亡率只有 65.07%。

温度稳定性: 将 DDWB 菌株发酵液进行不同温度处理后得到的结果如图 5C 所示, 各处理间无显著性差异( $P>0.05$ ), 说明短时间的高温或低温处理对发酵液中活性物质稳定性的影响很微小。



遗传稳定性: 转接 9 代后, 各处理间杀线虫活性无显著性差异( $P>0.05$ ), 发酵液对线虫的抑制活性依然处于较高水平(图 5D)。

储存稳定性: 4 °C 储存 60 d 以内, 发酵液对南方根结线虫的抑制活性无显著性差异, 但

是储存 120 d 后, 线虫的校正死亡率只有 65.07% (图 5E); 25 °C 条件下, 随储存时间增加, 杀线虫活性逐渐减弱, 储存 12 d 时间内, 发酵液对线虫的抑制活性无显著性差异( $P>0.05$ ), 储存 24 d 后线虫校正死亡率显著降低, 仅有 69.02% (图 5F)。

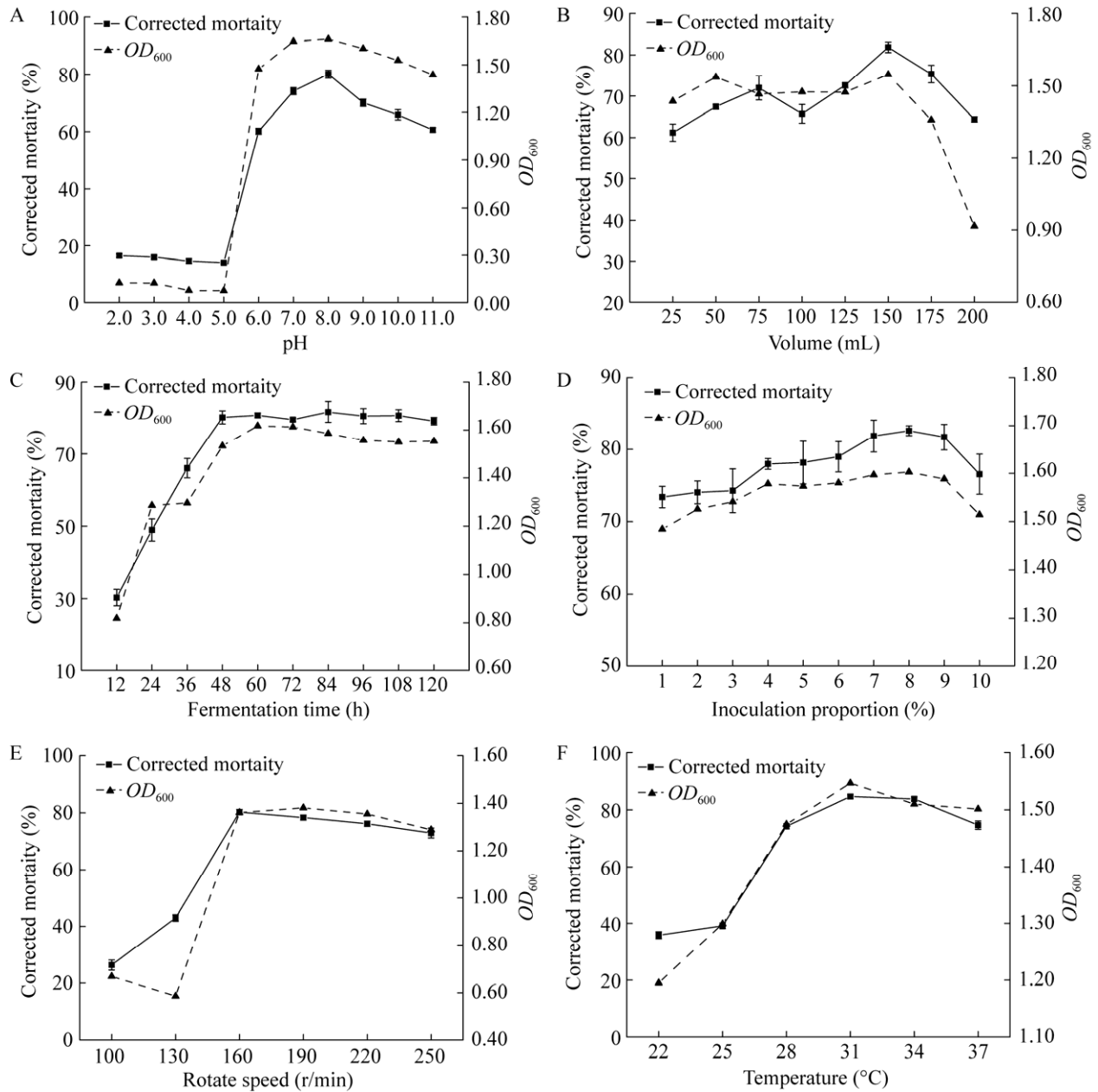


图 4 各发酵参数对 DDWB 菌株发酵的影响

Figure 4 Effects of fermentation parameters on DDWB strain fermentation.

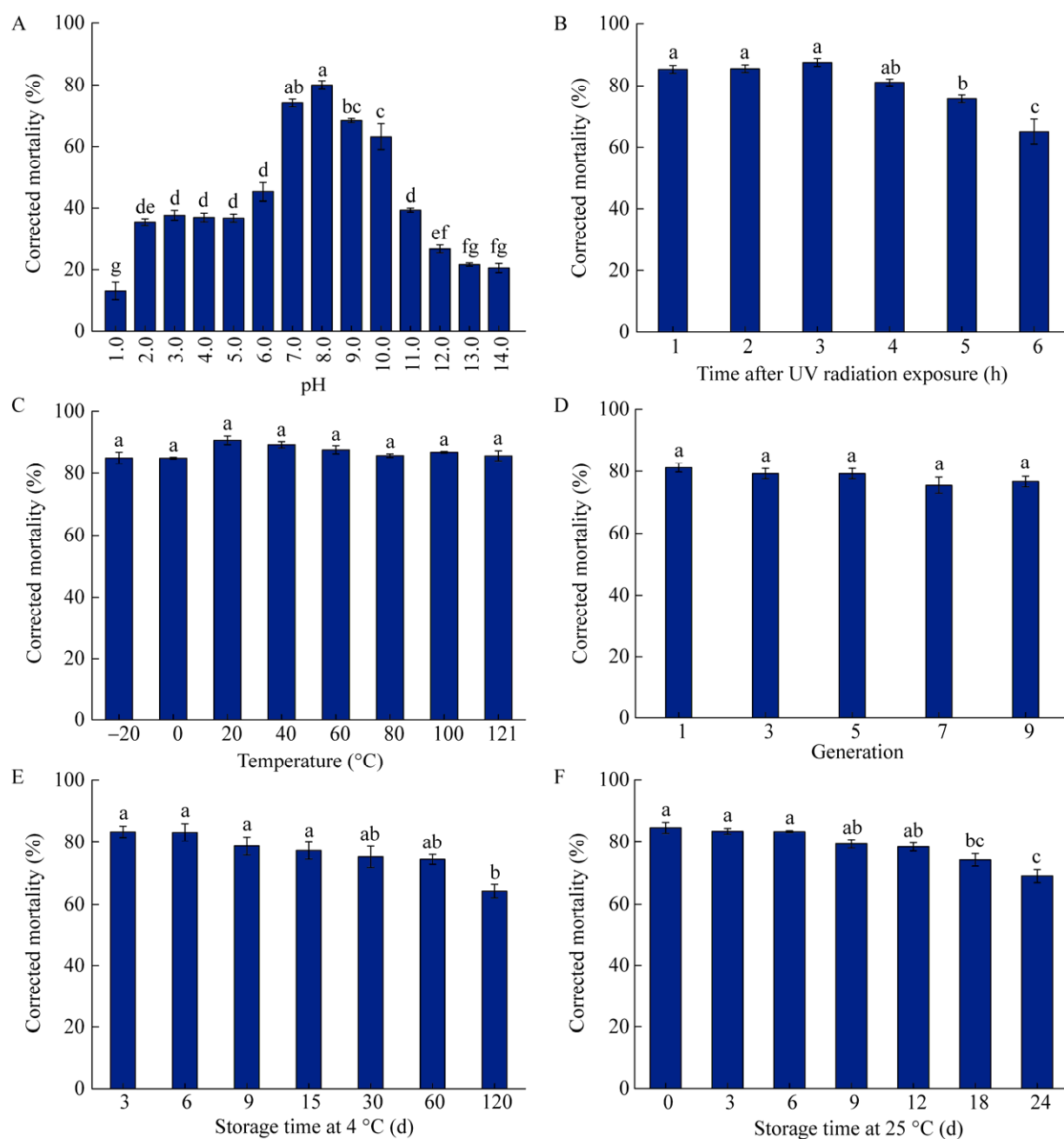


图5 DDWB菌株发酵液上清稳定性

Figure 5 Stability of the fermentation broth supernatant of DDWB strain.

### 3 讨论与结论

芽孢杆菌是一类较为常见的生防细菌<sup>[22]</sup>, 其种类多, 对多种植物病虫害具有防治作用, 在根结线虫病的生物防治中具有巨大潜力。目

前已登记用于根结线虫病防治的坚强芽孢杆菌(*B. firmus*)、蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)和苏云金杆菌(*B. thuringiensis*)等生防菌制剂多以活菌的形式进行病害防治, 因此菌株在环境中的生存状态极大影响施用效果。

由于实际防治效果与生防菌自身生长繁殖状况关系密切<sup>[23]</sup>, 因此本研究对具有强杀线虫活性的 DDWB 菌株的发酵条件进行优化。在试验中发现, 氮元素对于菌株生长繁殖以及活性物质的产生具有很大影响, 而无机盐等物质主要通过影响细胞渗透压进而影响菌株的生殖代谢, 最终影响其对根结线虫的防治效果。进一步进行发酵参数优化, 细化 DDWB 菌株的发酵条件, 试验发现, pH 值为 8.0 时 DDWB 菌株的发酵状况最优, 多数芽孢杆菌在酸性条件下无法存活, 因此 DDWB 菌株极不耐酸。发酵时间也会影响菌株的生长繁殖, 时间短则活菌数量少, 代谢产生的活性物质也少; 时间太长则菌株衰老, 防效变差<sup>[24]</sup>; 装液量与转速主要影响菌株发酵的溶氧量, 适宜的溶氧量有利于菌株生长繁殖和活性物质的产生<sup>[18,25]</sup>。通过培养基和发酵条件的优化, 提高了 DDWB 菌株生产效率, 节约了成本, 而且极大地提升了菌株的发酵潜力, 为菌株产业化生产提供了重要价值。

芽孢杆菌能够产生许多具有杀虫抗菌活性的次生代谢物, 主要包括脂肽、蛋白和一些小分子化合物<sup>[26-27]</sup>, 活性物质的稳定性影响实际应用的效果<sup>[28]</sup>。通过试验发现, DDWB 菌株发酵液不耐酸碱, 使用时最好避免强酸强碱环境; 其对高温和低温均不敏感, 短时间的紫外光照射对其活性物质稳定性的影响不大, 但是长时间照射后活性物质开始分解, 因此实际应用中应尽量避光保存。DDWB 菌株遗传稳定, 转接多代后杀线虫活性并未降低, 因此具有深入开发潜力。其在 4 °C 可以储存较长时间, 因此实际生产应用中为保持其杀线虫活性, 应低温保存。稳定性的测定可以对活性物质的性质做出简单的分析, 为实际应用生产提供数据支持。在此基础上后续研究将进行活性物质的提取鉴

定, 以明确 DDWB 菌株的杀线虫机制, 为其进一步开发利用指明方向。

## REFERENCES

- [1] 冯辉, 赵敏, 周冬梅, 张金凤, 张爱华, 杨荣明, 黄文坤, 魏利辉. 南方根结线虫中国分离群体种内变异分析[J]. 植物保护学报, 2021, 48(2): 423-433  
Feng H, Zhao M, Zhou DM, Zhang JF, Zhang AH, Yang RM, Huang WK, Wei LH. Intraspecific variability of the southern root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in China[J]. Journal of Plant Protection, 2021, 48(2): 423-433 (in Chinese)
- [2] 孙宜川, 黄卜. 根结线虫病发生特点及综合防治技术[J]. 西北园艺: 综合, 2020(6): 46-47  
Sun YC, Huang B. Occurrence characteristics and integrated control techniques of root-knot nematode disease[J]. Northwest Horticulture, 2020(6): 46-47 (in Chinese)
- [3] 晋治波, 解玲, 朱正杰, 刘芳. 丛枝菌根真菌对不同番茄品种抗根结线虫病的影响[J]. 微生物学通报, 2021, 48(3): 755-764  
Jin ZB, Xie L, Zhu ZJ, Liu F. Effect of inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi on root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in tomato cultivars[J]. Microbiology China, 2021, 48(3): 755-764 (in Chinese)
- [4] Jones JG, Kleczewski NM, Desaegeer J, Meyer SLF, Johnson GC. Evaluation of nematicides for southern root-knot nematode management in *Lima bean*[J]. Crop Protection, 2017, 96: 151-157
- [5] 李磊, 赵俊杰, 刘莹莹, 甄静, 李亮亮, 陈国参, 慕琦, 王继雯. 高效根结线虫生防真菌筛选及其性能研究[J]. 生物学杂志, 2021, 38(6): 70-74, 81  
Li L, Zhao JJ, Liu YY, Zhen J, Li LL, Chen GC, Mu Q, Wang JW. Screening and performance of high-efficiency root-knot nematode biocontrol fungi[J]. Journal of Biology, 2021, 38(6): 70-74, 81 (in Chinese)
- [6] 刘晓宇, 陈立杰, 邢志富, 王海明, 段玉玺. 4 种生物源杀线剂对番茄根结线虫的田间防效[J]. 植物保护, 2020, 46(6): 228-232, 253  
Liu XY, Chen LJ, Xing ZF, Wang HM, Duan YX. Field efficacy of four bio-nematicides against tomato root-knot nematodes[J]. Plant Protection, 2020, 46(6): 228-232, 253 (in Chinese)
- [7] 王丹, 刘存辉, 石朝鹏, 刘永高, 李玲玲, 王增君, 孙作文. 轮作万寿菊对芹菜根结线虫病的防控效果[J]. 中国植保导刊, 2020, 40(12): 46-48

- Wang D, Liu CH, Shi ZP, Liu YG, Li LL, Wang ZJ, Sun ZW. Effect of rotation with marigold on the prevention and control of celery root-knot nematode[J]. *China Plant Protection*, 2020, 40(12): 46-48 (in Chinese)
- [8] 宋展树, 李金章, 白欣可, 卢晶, 石文静, 刘建平, 惠翌华, 高鹏聪. 庆阳西瓜根结线虫病的绿色综合防控技术[J]. *中国瓜菜*, 2020, 33(12): 128-129
- Song ZS, Li JZ, Bai XK, Lu J, Shi WJ, Liu JP, Hui ZH, Gao PC. Green comprehensive control techniques for root-knot nematode disease of cantaloupe in Qingyang[J]. *China Cucurbits and Vegetables*, 2020, 33(12): 128-129 (in Chinese)
- [9] 侯富恩, 郝科星, 苏东涛, 张涛, 王铭, 张曼, 侯东颖. 抗 TYLCV 番茄新品种龙番 1 号的选育[J]. *中国蔬菜*, 2020(10): 89-92
- Hou FE, Hao KX, Su DT, Zhang T, Wang M, Zhang M, Hou DY. A new tomato F1 hybrid with resistant to TYLCV: 'longfan No.1'[J]. *China Vegetables*, 2020(10): 89-92 (in Chinese)
- [10] 张建. 蔬菜主要病虫害的危害症状及绿色高效防控措施[J]. *现代农业科技*, 2021(8): 82-83
- Zhang J. Harmful symptoms of main vegetable diseases and insect pests and green and efficient prevention and control measures[J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2021(8): 82-83 (in Chinese)
- [11] 张琦, 申帅, 胡先奇. 蔬菜根结线虫生防放线菌 LY4 的筛选及其鉴定[J]. *江西农业大学学报*, 2020, 42(6): 1107-1115
- Zhang Q, Shen S, Hu XQ. Screening and identification of biocontrol *Atinomyces* spp. LY4 against *Meloidogyne incognita*[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2020, 42(6): 1107-1115 (in Chinese)
- [12] 赵婷婷, 闫凤超. 细菌源蛋白质农药研究现状与展望[J]. *现代化农业*, 2019(12): 6-11
- Zhao TT, Yan FC. Research status and prospect of bacteria-derived protein pesticides[J]. *Modernizing Agriculture*, 2019(12): 6-11 (in Chinese)
- [13] Huang XW, Tian BY, Niu QH, Yang JK, Zhang LM, Zhang KQ. An extracellular protease from *Brevibacillus laterosporus* G4 without parasporal crystals can serve as a pathogenic factor in infection of nematodes[J]. *Research in Microbiology*, 2005, 156(5/6): 719-727
- [14] Yang JK, Liang LM, Li J, Zhang KQ. Nematicidal enzymes from microorganisms and their applications[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(16): 7081-7095
- [15] Geng C, Nie XT, Tang ZC, Zhang YY, Lin J, Sun M, Peng DH. A novel serine protease, Sep1, from *Bacillus firmus* DS-1 has nematicidal activity and degrades multiple intestinal-associated nematode proteins[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 25012
- [16] Hu HJ, Gao Y, Li X, Chen SL, Yan SZ, Tian XJ. Identification and nematicidal characterization of proteases secreted by endophytic bacteria *Bacillus cereus* BCM2[J]. *Phytopathology*<sup>®</sup>, 2020, 110(2): 336-344
- [17] Hofemeister J, Conrad B, Adler B, Hofemeister B, Feesche J, Kucheryava N, Steinborn G, Franke P, Grammel N, Zwintscher A. Genetic analysis of the biosynthesis of non-ribosomal peptide- and polyketide-like antibiotics, iron uptake and biofilm formation by *Bacillus subtilis* A1/3[J]. *Molecular Genetics and Genomics: MGG*, 2004, 272(4): 363-378
- [18] Wang KD, Tian YP, Zhou ND, Liu DH, Zhang DW. Studies on fermentation optimization, stability and application of prolyl aminopeptidase from *Bacillus subtilis*[J]. *Process Biochemistry*, 2018, 74: 10-20
- [19] Liu GY, Lin X, Xu SY, Liu G, Liu F, Mu W. Screening, identification and application of soil bacteria with nematicidal activity against root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) on tomato[J]. *Pest Management Science*, 2020, 76(6): 2217-2224
- [20] 刘广. 阿维菌素纳米囊的制备及对黄瓜根结线虫病防治作用[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2020
- Liu G. Preparation of abamectin nanocapsules and its against root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) disease[D]. Tai'an: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2020 (in Chinese)
- [21] 中华人民共和国农业部. 农药室内生物测定试验准则 杀线虫剂 第 1 部分: 抑制植物病原线虫试验 浸虫法: NY/T 1833.1—2009[S]. 北京: 中国农业出版社, 2010
- Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Guideline for laboratory bioassay of pesticides. Part 1: immersion test for nematocides inhibiting nematode: NY/T 1833.1—2009[S]. Beijing: Chinese Agriculture Press, 2010 (in Chinese)
- [22] 黄慧婧, 罗坤. 芽孢杆菌与杀菌剂复配防治植物病害的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(3): 938-947
- Huang HJ, Luo K. Research progress in the control of plant diseases by the combination of *Bacillus* and fungicides[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(3): 938-947 (in Chinese)

- [23] 叶云峰, 黎起秦, 袁高庆, 付岗, 缪剑华, 林纬. 枯草芽孢杆菌 B47 菌株高产抗菌物质的培养基及发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2011, 38(9): 1339-1346  
Ye YF, Li QQ, Yuan GQ, Fu G, Miao JH, Lin W. Optimization of culture medium and fermentation conditions for high production of antimicrobial substance by *Bacillus subtilis* strain B47[J]. Microbiology China, 2011, 38(9): 1339-1346 (in Chinese)
- [24] Ohno A, Ano T, Shoda M. Effect of temperature change and aeration on the production of the antifungal peptide antibiotic iturin by *Bacillus subtilis* NB22 in liquid cultivation[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1993, 75(6): 463-465
- [25] 刘翠娟, 段琦梅, 安德荣. 抗真菌拮抗放线菌的筛选及摇床发酵条件的优化[J]. 微生物学杂志, 2004, 24(4): 12-14  
Liu CJ, Duan QM, An DR. Screening of streptomycetes which inhibit pathogenic fungi and the optimization of fermentation conditions in the shaker[J]. Journal of Microbiology, 2004, 24(4): 12-14 (in Chinese)
- [26] Jourdan E, Henry G, Duby F, Dommes J, Barthélemy JP, Thonart P, Ongena M. Insights into the defense-related events occurring in plant cells following perception of surfactin-type lipopeptide from *Bacillus subtilis*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI, 2009, 22(4): 456-468
- [27] 方传记, 陆兆新, 孙力军, 别小妹, 吕凤霞, 黄现青. 淀粉液化芽孢杆菌抗菌脂肽发酵培养基及发酵条件的优化[J]. 中国农业科学, 2008, 41(2): 533-539  
Fang CJ, Lu ZX, Sun LJ, Bie XM, Lü FX, Huang XQ. Optimization of fermentation technology for lipopeptides producing bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2-4[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2008, 41(2): 533-539 (in Chinese)
- [28] 梁念, 朱道辰, 孙建中. 一株枯草芽孢杆菌 Y1 的生长条件优化[J]. 饲料研究, 2020, 43(8): 63-68  
Liang N, Zhu DC, Sun JZ. Optimization of a *Bacillus subtilis* strain Y1 growth conditions[J]. Feed Research, 2020, 43(8): 63-68 (in Chinese)