

研究报告

广谱拮抗放线菌 S5-1 的鉴定、发酵工艺优化及发酵粗提物抑菌活性评价

刘金丽, 卢丹, 姚佳, 陈雨, 陈崇艺, 朱露露, 柴春月*

南阳师范学院 生命科学学院, 河南 南阳 473061

刘金丽, 卢丹, 姚佳, 陈雨, 陈崇艺, 朱露露, 柴春月. 广谱拮抗放线菌 S5-1 的鉴定、发酵工艺优化及发酵粗提物抑菌活性评价[J]. 微生物学通报, 2024, 51(8): 2905-2921.

LIU Jinli, LU Dan, YAO Jia, CHEN Yu, CHEN Chongyi, ZHU Lulu, CHAI Chunyue. Identification, Optimization of fermentation process of an antagonistic actinomycete S5-1 and evaluation of antibacterial activity of the fermented crude extract[J]. Microbiology China, 2024, 51(8): 2905-2921.

摘要: 【背景】如何有效防治植物病害、实现农作物安全生产、保护农业生态环境, 是农业可持续发展中亟待解决的问题之一。【目的】开展放线菌 S5-1 在植物病害生物防治中的应用潜能和代谢活性物质研究, 可为植物病害的生物防治提供有效菌源, 具有重要的实践意义。【方法】采用平板对峙法和发酵液制备带药平板法检测抑菌活性; 通过形态和生理生化特征及 16S rRNA 基因序列分析确定分类地位; 利用单因素试验和正交试验优化发酵工艺条件、测评发酵粗提物抑菌活性。【结果】菌株 S5-1 对 10 种植物病原菌具有较强的抑菌活性, 菌株 S5-1 被鉴定为毒三素链霉菌(*Streptomyces toxytricini*), 在发酵培养基为 TSB、初始 pH 6.5、250 mL 三角瓶中装液量 100 mL、接种量 10%、28 °C、发酵 7 d 的发酵液抑菌相对效价最高。发酵粗提物能有效抑制烟草疫霉(*Phytophthora parasitica*)和灰霉菌(*Botrytis cinerea*)的菌丝生长、孢子萌发, 并抑制烟草疫霉对烟草叶片和灰霉菌对圣女果果实的侵染, 发酵液粗提物适宜 pH 6.0–7.0, 超过 37 °C 易失活, –20 °C 储存 30 d、紫外光处理不超过 6 h 的条件下仍能保持稳定的抑菌活性。【结论】对菌株 S5-1 的开发利用将有助于植物病害的绿色防控, 为拮抗放线菌的生防应用提供优良菌株资源, 同时为新型抑菌活性药物的研究和应用提供实验基础。

关键词: 拮抗放线菌; 抑菌谱; 分类鉴定; 发酵条件优化; 毒三素链霉菌

资助项目: 河南省高等学校重点科研项目(23A210018); 农业农村部华中作物有害生物综合治理重点实验室/农作物重大病虫害防控湖北省重点实验室开放基金(2021ZTSJJ5); 南阳师范学院研究生创新基金(2022CX001, 2023CX002); 河南省高等学校大学生创新计划(202310481004)

This work was supported by the Key Scientific Research Program of Higher Education Institutions of Henan Province (23A210018), the Open Fund of Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Central China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Hubei Key Laboratory of Crop Diseases, Insect Pests and Weeds Control (2021ZTSJJ5), the Nanyang Normal University Graduate Innovation Fund (2022CX001, 2023CX002), and the College Student Innovation Training Program of Higher Education Institutions of Henan Province (202310481004).

*Corresponding author. E-mail: ccyuer1019@126.com

Received: 2023-11-22; Accepted: 2023-12-19; Published online: 2024-01-29

Identification, Optimization of fermentation process of an antagonistic actinomycete S5-1 and evaluation of antibacterial activity of the fermented crude extract

LIU Jinli, LU Dan, YAO Jia, CHEN Yu, CHEN Chongyi, ZHU Lulu, CHAI Chunyue*

College of Life Sciences, Nanyang Normal University, Nanyang 473061, Henan, China

Abstract: [Background] How to effectively prevent and control plant diseases and achieve safe crop production without causing damage to the agro-environment is a key problem to be solved in the sustainable development of agriculture. [Objective] The strains and active metabolites of *Streptomyces* strains were screened out to provide the strain resources and approaches for the biocontrol of plant diseases, which is of great practical significance for the research on the potential application of strain S5-1 in the biocontrol of plant diseases. [Methods] The antimicrobial activity was examined by the plate confrontation method and the plate culture method with the fermentation broth of the strain. The strain was identified based on the morphological and physicochemical characteristics and 16S rRNA gene sequences. Furthermore, the single factor and orthogonal experiments were carried out to optimize the fermentation conditions, and the antimicrobial activity of the fermented crude extract was examined. [Results] The strain S5-1 had strong inhibitory activities on ten plant pathogens and was identified as *Streptomyces toxytricini*. The fermentations conditions were optimized as follows: TSB medium, initial pH 6.5, medium loading capacity of 100 mL/250 mL, inoculation amount of 10%, and fermentation at 28 °C for 7 d. The fermented crude extract inhibited the mycelial growth and spore germination of *Phytophthora parasitica* and *Botrytis cinerea*. Furthermore, it reduced the infection of the two pathogens in tobacco leaves and cherry tomatoes. The extract was stable at pH 6.0–7.0 and lost activity at the temperature above 37 °C. In addition, the storage at –20 °C for 30 d and ultraviolet irradiation not exceeding 6 h caused slight changes in the extract activity. [Conclusion] The development and utilization of strain S5-1 contribute to the green prevention and control of plant diseases and provide excellent strain resources of actinomycetes for biocontrol. This study provide an experimental basis for the research and application of new antimicrobial agents.

Keywords: antagonistic actinomycetes; antimicrobial spectrum; identification; fermentation condition optimization; *Streptomyces toxytricini*

植物病害是农作物安全生产的严重威胁之一, 如由植物病原细菌、真菌、卵菌或病毒等病原微生物的侵染而造成的植物病害, 不仅会导致农作物品质的下降, 还严重降低农作物的产量, 给农业生产造成巨大损失^[1]。据统计, 在世界范

围内, 每年由植物病害侵染造成农作物生产的损失高达 20%–40%^[2]。因此, 安全有效地防治植物病害是实现农作物安全生产和农业可持续发展的重要主题。众所周知, 植物病原真菌除了在侵染植物时造成直接危害和损失外, 许多病原真

菌还能在侵染过程中分泌真菌毒素及其他有害代谢物,直接危及人畜的生命安全^[3]。植物病原卵菌则多可导致农作物的毁灭性病害,一些防治真菌病害的化学药剂却对卵菌病害无效。目前,生产上对植物病害的有效防控措施还是以化学防治为主,其他防控措施为辅。我国已经实现了化学农药使用“负增长”的趋势,但每年化学农药防治面积仍然高达 5.6 亿 hm^2 以上,其用量是实际耕地面积的 4 倍多^[4],化学农药的使用对农业生态环境的破坏显而易见,如药害、农药残留和环境污染等问题不容小觑。因此,如何有效防治植物病害、实现农作物安全生产、保护农业生态环境,是农业可持续发展中亟待解决的问题之一。

生物防治被认为是实现农作物安全生产并促进农业可持续发展的重要措施之一。例如,通过生防微生物与病原菌之间的营养竞争或直接拮抗作用来实现控制植物病害的目的。其中,放线菌因具有生长速度快、代谢活性强、代谢产物多等特点,被广泛应用于医药、食品和农业生产等领域,而放线菌产生的代谢产物中有 75%来自链霉菌属(*Streptomyces*)^[5],链霉菌作为生防菌剂同样具有生长速度快、毒性低、防效高等优点。目前我国推广应用的生防放线菌制剂为“5406”,其对小麦根腐病、棉花枯萎病和水稻烂秧病等均有良好的防治效果,并且增产作用显著^[6]。邢梦玉^[7]筛选到 2 株对荔枝霜疫霉有强烈抑制效果的链霉菌,在优化链霉菌的发酵条件之后,发现其发酵滤液对荔枝霜疫病有很好的防效,10%发酵滤液喷雾接种叶片的发病率为 24.1%且病斑直径为 2.6 mm,显著低于对照组 97.3%的发病率和 18.3 mm 的病斑直径。因此,开展链霉菌生防菌株的筛选和代谢活性物质的研究,可为植物病害的生物防治提供有效菌源和防治途径,具有重要的实践意义。

本研究从一株放线菌菌株 S5-1 出发,以不

同的植物病原真菌和病原卵菌作为靶标菌,通过平板对峙法和发酵液制备带药平板法检测其抑菌谱,根据对菌株 S5-1 的培养特征观察、显微形态观察、生理生化特征和 16S rRNA 基因鉴定确定其分类地位,并采用单因素试验对菌株 S5-1 产抑菌活性物质的发酵培养基进行筛选,通过正交试验对菌株 S5-1 的发酵工艺条件进行优化,旨在提升菌株 S5-1 产抑菌活性物质的能力,进一步对发酵粗提物的抑菌活性、生防效果及生理生化特征进行研究,为生防放线菌的开发利用提供有效菌源和实验基础。

1 材料与方 法

1.1 样品

供试放线菌菌株 S5-1 由南阳师范学院资源微生物实验室提供。

供试病原菌:立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*),灰霉菌(*Botrytis cinerea*),茄链格孢(*Alternaria solani*),细极链格孢(*Alternaria tenuissima*),石榴垫壳孢(*Coniella granati*),林栖腐霉(*Pythium sylvaticum*),宽雄腐霉(*Pythium dissotocum*),烟草疫霉(*Phytophthora parasitica*),荔枝疫霉(*Phytophthora litchii*)和苧麻疫霉(*Phytophthora boehmeriae*),由南阳师范学院资源微生物实验室提供。

供试植物(由南阳师范学院资源微生物实验室提供):本氏烟(*Nicotiana benthamiana*),将本氏烟种子播种于蛭石中,置于 23–25 °C 的恒温培养室内,保持 65%–75% 的湿度条件,待 1 周后长出幼苗,调节培养室 14:10 (光照:黑暗)的光照条件,待本氏烟生长 4–6 周(5 叶期)后,叶片用于菌株 S5-1 对烟草疫霉病的生防效果研究。圣女果果实,在超市挑选大小一致,果实饱满,无腐烂的新鲜圣女果果实,用于菌株 S5-1 对灰霉菌的生防效果研究。

1.2 培养基

PDA 培养基、高氏一号培养基、链霉菌分类标准培养基 ISP-1-ISP-6、基础发酵培养基、ISP-2 液体发酵培养基、黄豆饼粉培养基、本尼特培养基、无机盐蔗糖培养基、明胶液化培养基、柴斯纳培养基、淀粉酶、碳氮源利用培养基、牛奶凝固或脲化培养基、脲酶、几丁质酶和纤维素酶活性检测培养基, 均参考文献[8]配制; TSB 发酵培养基参考文献[9]配制; 10% V8 果汁培养基参考文献[10]配制; 蛋白酶活性检测培养基和溶磷培养基参考文献[11]配制; ISP-7 固体培养基参考文献[12]进行配制。

1.3 主要试剂和仪器

葡萄糖和琼脂粉, 北京索莱宝公司; Gel Red 核酸染料, Biosharp 公司; 2×*San Taq* PCR Mix, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 赛默飞公司。

PCR 仪, 杭州柏恒科技有限公司; 电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; 凝胶成像系统, Bio-Rad 公司; 旋转蒸发仪, 亚荣生化仪器有限公司; 干涉显微镜, 蔡司公司。

1.4 菌株 S5-1 的抑菌活性测定

1.4.1 平板对峙试验

采用平板对峙法进行菌株 S5-1 的抑菌效果测定^[13]。处理组: 将直径为 6 mm 的病原菌菌饼接种在 PDA 培养基平皿中央, 放线菌 S5-1 同时接于距平皿边缘 1 cm 处; 不接种菌株 S5-1 作为对照组, 于 28 °C 培养 7-10 d, 每组实验重复 3 次。采用十字交叉法测量处理组抑菌带直径, 根据以下公式计算抑菌率:

菌落增长半径(mm)=菌落测量半径-接种菌丝块半径(6 mm) (1)

抑菌率(%)=[(对照组菌落增长半径-处理组菌落增长半径)/对照组菌落增长半径]×100 (2)

1.4.2 无菌发酵滤液的制备

将菌株 S5-1 接种到高氏一号固体培养基上

28 °C 培养 7-10 d, 用灭菌蒸馏水冲洗菌落表面的孢子并收集于 2 mL EP 管中, 振荡 1 min 后经四层灭菌滤纸过滤菌丝, 收集放线菌的孢子悬液, 用无菌水调整孢子浓度为 1×10^6 个/mL 备用。

以 10% 的接种量将制备的孢子悬液接种至装有 100 mL 基础发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 28 °C、180 r/min 振荡培养 7 d 后 8 000 r/min 离心 10 min 收集发酵上清液, 使用 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 4 °C 保存备用^[14]。

1.4.3 发酵滤液的抑菌效果测定

采用抑制菌丝生长速率法测定放线菌 S5-1 的抑菌效果^[15]。实验组: PDA 培养基中加入 10% 1.4.2 制备的无菌发酵滤液, 充分混匀后制备固体平板; 对照组: PDA 培养基加入 10% 无菌水, 充分混匀后制备固体平板。分别在平皿中央接入直径为 6 mm 的病原菌菌饼, 28 °C 恒温培养 7-10 d, 用十字交叉法测量病原菌菌落直径, 每组实验重复 3 次。

1.5 拮抗菌 S5-1 的鉴定

1.5.1 菌落及显微形态观察

将菌株 S5-1 划线接种于高氏一号培养基或国际链霉菌分类标准培养基(ISP-1-ISP-7)上, 28 °C 恒温培养, 观察记录菌株的生长状况、菌落特征、菌丝特征等, 采用插片法观察菌丝及孢子的显微结构。

1.5.2 生理生化特征测定

参照《链霉菌鉴定手册》^[16]对菌株 S5-1 的生理生化特征进行观察测定。

1.5.3 16S rRNA 基因的鉴定

菌株基因组 DNA 的提取参照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行, 利用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGAT CMTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTG TTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 (25 μL): 模板(10 mmol/L) 1 μL, 引物(5 μmol/L)

各 1 μL , 2 \times San Taq PCR Mix 9.5 μL , ddH₂O 12.5 μL 。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 32 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 将测序结果提交 NCBI 核酸数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)中进行 BLAST 比对, 挑选相似度较高相关种的 16S rRNA 基因序列, 用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树, 并进行 Bootstrap 分析, 重复次数为 1 000 次。

1.6 最佳发酵培养基的筛选

将菌株 S5-1 接种于基础发酵培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 2 d 获得种子发酵液, 以 10%的接种量分别接种到 TSB、ISP-2、本尼特培养基、黄豆饼粉培养基和无机盐蔗糖发酵培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 7 d, 取发酵液测定生物量及抑菌相对效价(relative titer, RT), 考察不同发酵培养基对菌株 S5-1 产抑菌活性物质的影响。

1.7 发酵条件优化

将菌株 S5-1 接种于最佳发酵培养基内进行摇瓶发酵, 设计单因素试验, 考察初始 pH 值、装液量、接种量、发酵温度和发酵时间等不同发酵工艺条件对菌株 S5-1 产抑菌活性物质的影响。在上述单因素试验结果的基础上, 以发酵液的抑菌相对效价值为指标, 采用正交试验对发酵条件进行优化。根据正交设计方法进行三因素三水平的发酵培养, 各个因素水平见表 1。

表 1 正交试验因素水平

Table 1 Factor levels of orthogonal test

水平 Level	因素 Factor		
	A 初始 pH	B 发酵温度	C 发酵时间
	A Initial pH	B Fermentation temperature ($^{\circ}\text{C}$)	C Fermentation time (d)
1	6.5	25	6
2	7.0	28	8
3	7.5	31	10

1.8 发酵粗提物的抑菌活性评价

1.8.1 发酵粗提物的制备

将菌株 S5-1 孢子悬浮液接种于基础发酵培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 7 d 得到大约 20 L 的发酵液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、6 000 r/min 离心 25 min 分离菌丝体和发酵上清液, 菌丝体中加入适量 80%丙酮浸取过夜, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 40 $^{\circ}\text{C}$ 旋转蒸发除去丙酮得到菌丝体浸膏; 发酵上清液加入等体积乙酸乙酯萃取 3 次, 5 000 r/min 离心 10 min, 收集乙酸乙酯层在 40 $^{\circ}\text{C}$ 条件下旋转蒸发, 浓缩至干, 得到发酵上清液浸膏, 将菌丝体和发酵上清液的浸膏合并即为菌株 S5-1 活性粗提物。用 1% DMSO 溶解粗提物配制成浓度为 10 mg/mL 的母液待用^[17]。

1.8.2 发酵粗提物对病原菌菌丝生长的影响

将发酵粗提物分别加入 PDA 和 10% V8 果汁培养基中^[18], 配制成终浓度为 100、150、200、250、300、350 和 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加发酵粗提物的带药固体培养基, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养靶标病原菌, 3 d 后观察病原菌菌丝的生长情况。

1.8.3 发酵粗提物对病原菌孢子萌发的影响

取病原菌孢子悬液与粗提物母液, 分别配制成终浓度为 200、400、600、800、1 000、1 200 和 1 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的药液孢子混合液, 分别吸取 50 μL 混合液滴加在无菌凹玻片中, 空白对照为等量 1%蔗糖孢子混合液^[19], 将凹玻片放在无菌培养皿中, 转移至 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱, 10 h 后在普通光学显微镜下随机观察 100 个孢子萌发情况, 期间注意用无菌水保持湿度, 每个处理重复 3 次。发

芽标准以发芽管长度超过孢子短直径长度的一半视为已经萌发的孢子,按照以下公式计算孢子萌发率和孢子萌发抑制率:

$$\text{孢子萌发率(\%)} = \frac{\text{萌发孢子数}}{\text{检查孢子总数}} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{孢子萌发抑制率(\%)} = \left[\frac{\text{对照萌发数} - \text{处理萌发数}}{\text{对照萌发数}} \right] \times 100 \quad (4)$$

1.8.4 发酵粗提物对烟草疫霉的抑菌效果测评

挑选大小一致、健康的5周龄本氏烟叶片,吸取50 μL烟草疫霉孢子悬液(100个/μL)接种于叶片背面的主叶脉两侧,在接种点滴加等体积500 μg/mL的发酵粗提物(由1.8.3制备的药液孢子混合液)作为处理组,在接种点滴加等体积蒸馏水的叶片作为对照组,25 °C黑暗保湿,分别在接种后0、12、24、36、48、60、72和84 h观察接种点病斑扩展情况。

1.8.5 发酵粗提物对灰霉菌的抑菌效果测评

挑选健康圣女果果实在70%乙醇中浸泡3 min,无菌水冲洗3次,用无菌手术刀在果实表皮创造4 mm×4 mm伤口,在伤口处滴加100 μL灰霉菌孢子悬浮液,同时滴加等体积的500 μg/mL发酵粗提物作为处理组,滴加等量无菌水的果实作为对照组,25 °C恒温条件下避光放置,分别在接

种后0、24、36、48、60和72 h观察接种点周围直径2 cm范围内的果肉组织变化及菌丝扩展情况,拍照记录。

1.8.6 发酵粗提物的稳定性

设置影响发酵液稳定性的储藏温度为4 °C、-20 °C及室温条件,放置时间分别为0、10、20、30、40、50和60 d;温度分别为20、37、55、80和100 °C的恒温水浴中1 h;pH值分别为4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0和10.0;紫外线处理0、1、3、6、9 h,使带药平板中粗提物终浓度为300 μg/mL,分别测定抑菌率,每组实验重复3次。

2 结果与分析

2.1 菌株 S5-1 的抑菌效果

2.1.1 菌株 S5-1 的平板抑菌效果

平板对峙结果如图1所示,直接与菌株S5-1对峙一侧的病原菌菌丝生长均受到了不同程度的抑制,表现为生长缓慢,菌丝溶解,整个病原菌菌落逆向菌株S5-1菌落,呈现出不规则的扇形。对抑菌带宽度和抑菌率的统计结果见表2,菌株S5-1对5株病原真菌和5株病原卵菌的抑菌率均超过50%,抑菌带宽度均大于6 mm,推测菌株S5-1具有较强且广谱的抑菌活性。

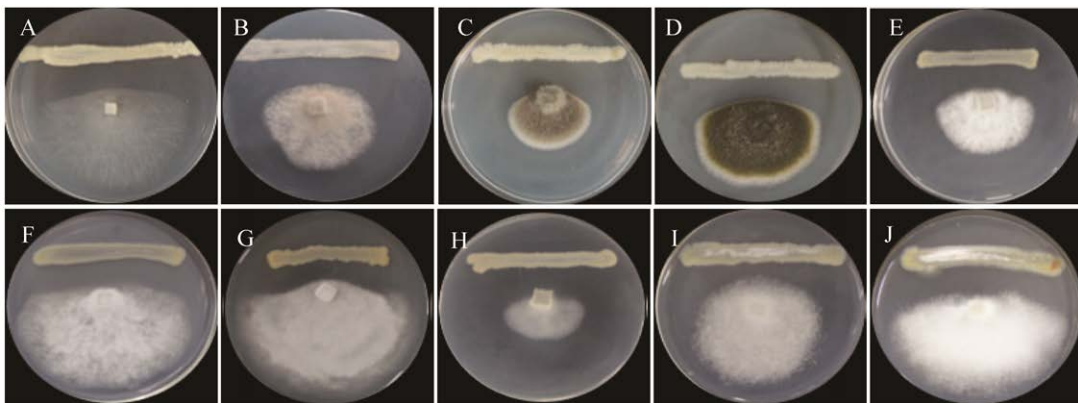


图1 菌株S5-1与植物病原菌的平板对峙试验结果 A-J分别为立枯丝核菌、灰霉菌、茄链格孢、细极链格孢、石榴垫壳孢、林栖腐霉、宽雄腐霉、烟草疫霉、荔枝疫霉、苜蓿疫霉

Figure 1 Experimental results of plate confrontation between strain S5-1 and plant pathogens. A-J are *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Alternispora solani*, *Alternispora tenuissima*, *Coniella granati*, *Pythium sylvaticum*, *Pythium dissotocum*, *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora litchii*, *Phytophthora boehmeriae*, respectively.

表 2 平板抑菌实验抑菌带和抑菌率统计结果

Table 2 Statistical results of antimicrobial zone and antimicrobial rate in plate antimicrobial experiment

序号 Serial No.	病原菌 Pathogenic bacteria	抑菌带 Antibacterial zone (mm)	抑菌率 Antibacterial rate (%)
1	立枯丝核菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	10.5	56.7
2	茄链格孢 <i>Alternaria solani</i>	11.5	58.9
3	灰霉菌 <i>Botrytis cinerea</i>	12.5	63.2
4	细极链格孢 <i>Alternaria tenuissima</i>	12.0	60.5
5	石榴垫壳孢 <i>Coniella granati</i>	9.0	53.3
6	林栖腐霉 <i>Pythium sylvaticum</i>	11.5	58.9
7	宽雄腐霉 <i>Pythium dissotocum</i>	10.0	55.6
8	荔枝疫霉 <i>Phytophthora litchii</i>	6.5	52.2
9	烟草疫霉 <i>Phytophthora parasitica</i>	13.0	63.4
10	苜麻疫霉 <i>Phytophthora boehmeriae</i>	12.0	62.2

2.1.2 菌株 S5-1 发酵滤液的抑菌活性

将发酵滤液直接加入 PDA 培养基, 制备带药平板, 统计参试不同病原菌的菌落直径和抑菌率, 结果如表 3 所示, 发酵滤液对烟草疫霉、灰霉菌、苜麻疫霉、细极链格孢和茄链格孢的抑菌率均超过 30%, 分别为 60.3%、55.0%、43.2%、42.1%和 33.3%。由此可见, 参试病原菌在带药平板上生长时, 其菌丝生长受到菌株 S5-1 发酵液不同程度的影响, 生长速度减慢、菌落直径变小, 总体生长受到抑制, 这一结果

验证了菌株 S5-1 具有广谱且较强的抑制病原真菌和卵菌的活性。

2.2 菌株 S5-1 的鉴定结果

2.2.1 形态观察

菌株 S5-1 在高氏一号培养基上的菌落形态如图 2A、2B 所示, 菌落颜色为肉粉色, 单菌落呈隆起的圆顶形, 菌落边缘呈锯齿状, 未见可溶性色素产生。菌株 S5-1 的显微形态如图 2C-2F 所示, 菌丝较细, 有少量分枝, 成熟的孢子链呈松散螺旋状, 孢子为短圆形, 大小为 2.0-2.5 μm 。

表 3 发酵滤液抑菌实验统计结果

Table 3 Statistical results of antimicrobial experiment of fermentation filtrate

序号 Serial number	病原菌 Pathogenic bacteria	菌落直径 Colony diameter (mm)		抑菌率 Antibacterial rate (%)
		PDA 培养基 Potato dextrose agar medium	添加发酵粗提物的 PDA 培养基 Medicated potato dextrose agar medium fermented crude extract	
1	立枯丝核菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	88.0	70.4	20.0
2	灰霉菌 <i>Botrytis cinerea</i>	94.9	42.7	55.0
3	茄链格孢 <i>Alternaria solani</i>	72.2	48.4	33.3
4	细极链格孢 <i>Alternaria tenuissima</i>	86.1	49.9	42.1
5	石榴垫壳孢 <i>Coniella granati</i>	68.7	62.7	8.8
6	林栖腐霉 <i>Pythium sylvaticum</i>	87.9	67.9	22.8
7	宽雄腐霉 <i>Pythium dissotocum</i>	86.5	73.6	15.0
8	烟草疫霉 <i>Phytophthora parasitica</i>	94.2	37.4	60.3
9	荔枝疫霉 <i>Phytophthora litchii</i>	90.4	58.3	35.5
10	苜麻疫霉 <i>Phytophthora boehmeriae</i>	81.2	66.1	43.2

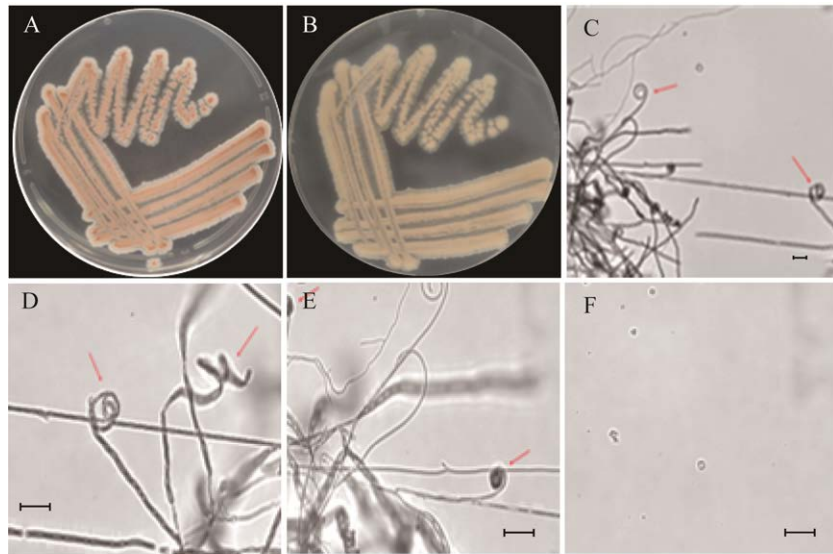


图2 菌株 S5-1 的菌落形态及显微形态 A、B: 菌株 S5-1 在高氏一号培养基的正、反面菌落形态. C-F: 孢子丝和孢子显微形态, 比例尺为 10 μm

Figure 2 Colony morphology and micromorphology of strain S5-1. A and B: Positive and negative colony morphology of strain S5-1 in Gao No. 1 medium, respectively. C-F: Spore filament and microscopic morphology, with a scale of 10 μm .

菌株 S5-1 在 ISP-1 培养基上(图 3A), 其菌落为灰白色, 产孢量较少, 生长较慢。在 ISP-2 培养基上(图 3B), 菌落为粉白色, 菌落表面隆起且干燥, 产孢量较多。在 ISP-3 培养基上(图 3C), 菌落表面干燥, 呈淡橘色, 产生中等量的孢子。在 ISP-4 培养基上(图 3D), 菌落隆起且干燥, 呈灰粉色, 产较多的孢子。在 ISP-5 培

培养基上(图 3E), 菌落表面湿润且边缘光滑, 生长速度明显减慢, 产孢量明显减少。在 ISP-6 培养基上(图 3F), 菌落周围变黑, 有黑色素产生, 很少观察到孢子。在 ISP-7 培养基上(图 3G), 菌丝和孢子均为白色且产孢量丰富。在高氏一号培养基(图 3H)上生长的菌落为灰粉色, 产孢量较多, 生长较快。

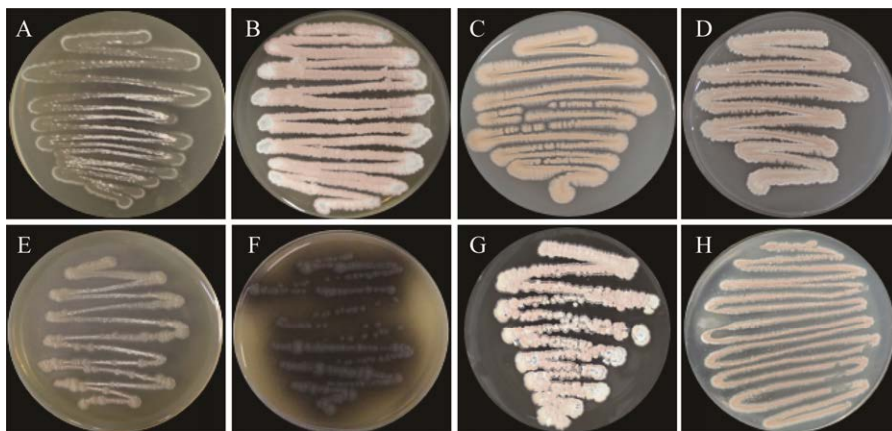


图3 菌株 S5-1 在不同培养基上的培养特征 A-H 培养基依次为: ISP-1、ISP-2、ISP-3、ISP-4、ISP-5、ISP-6、ISP-7、高氏一号

Figure 3 Culture characteristics of strain S5-1 on different medium. A-H: ISP-1, ISP-2, ISP-3, ISP-4, ISP-5, ISP-6, ISP-7, and Gao No. 1 medium.

2.2.2 生理生化特征观察

对菌株 S5-1 生理生化特征的测定结果见表 4, 菌株 S5-1 可以产生多种胞外水解酶, 如蛋白酶、淀粉酶、脲酶和几丁质酶等(图 4), 推测这些酶类可能与菌株较强的抑菌活性相关。

表 4 菌株 S5-1 的生理生化特征测定

Table 4 Determination of physiological and biochemical characteristics of strain S5-1

项目 Item	结果 Result
阿拉伯糖 Arabinose	+
甘油 Glycerin	+
鼠李糖 Rhamnose	+
肌醇 Inositol	+
半乳糖 Galactose	+
甘露醇 Mannitol	++
蔗糖 Cane sugar	+
麦芽糖 Maltose	++
酒石酸钾钠 Potassium sodium tartrate	-
苯丙氨酸 Phenylalanine	+
硝酸钾 Potassium nitrate	+
酵母粉 Yeast powder	++
天冬氨酸 Aspartic acid	+
酪氨酸 Tyrosine	++
大豆粉 Soybean powder	++
蛋白胨 Peptone	++
明胶液化 Gelatin liquefaction	-
牛奶凝固 Curdling of milk	++
牛奶胨化 Milk peptonization	++
蛋白酶 Protease	++
纤维素酶 Cellulase	-
淀粉酶 Diastase	++
H ₂ S	-
几丁质酶 Chitinase	++
脲酶 Urease	++
黑色素 Melanin	++
磷元素 Phosphorus	-

++: 活性较强; +: 活性或效果较差; -: 阴性

++: Higher activity; +: Lower activity or effect; -: Negative.

2.2.3 16S rRNA 基因的鉴定结果

以菌株 S5-1 基因组 DNA 为模板, 扩增其 16S rRNA 基因序列, 获得了长度大约为 1 500 bp 的电泳条带, 将 PCR 产物纯化后送测序, 将获得的序列提交至 NCBI, 其登录号为 OP597696, 对序列进行 BLAST 比对分析, 结果显示, 该菌株的 16S rRNA 基因序列与已报道的 *Streptomyces toxytricini* SAS-30 (MK559626) 的相似性达 99.9%。挑选与其相似性较高的相关序列构建系统发育树(图 5)。结合菌株 S5-1 的显微形态、培养特征、生理生化特征, 鉴定该菌株为毒三素链霉菌(*Streptomyces toxytricini*)。

2.3 最适发酵培养基筛选结果

为了提高拮抗菌 S5-1 的抑菌活性, 进一步选择了 5 种营养成分及碳氮比不同的发酵培养基对菌株 S5-1 进行发酵培养, 以基础发酵培养基的效价为 100%, 分别测定不同发酵培养基的生物量和抑菌相对效价, 结果如图 6A 所示, 使用 TSB 培养基进行发酵时, 其抑菌相对效价和生物量均高于其他发酵培养基, 因此选择 TSB 培养基作为后续发酵工艺条件优化的培养基。

2.4 发酵条件优化结果

设计单因素试验, 分别对发酵初始 pH 值、装液量、接种量、发酵温度和发酵时间进行优化, 以不同条件对菌体生物量(packed mycelial volume, PMV)及效价为评价指标, 其发酵条件的优化结果如图 6B-6F 所示, 在发酵培养基为 TSB 时, 最佳初始 pH 6.5、在 250 mL 三角瓶中装液量为 100 mL, 最佳接种量为 10%, 发酵温度不宜超过 28 °C, 发酵时间不超过 7 d。依据单因素试验结果进一步设计正交试验, 确定最优发酵条件组合为: 在发酵培养基为 TSB 时, 最佳初始 pH 6.5、在 250 mL 三角瓶中装液量为 100 mL, 最佳接种量为 10%, 发酵温度 28 °C,

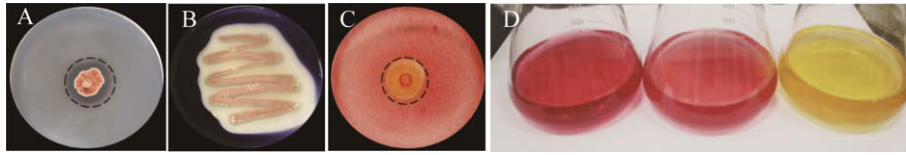


图4 菌株 S5-1 产酶定性测定结果 A: 脱脂奶粉琼脂培养基. B: 含淀粉的牛肉膏蛋白胨琼脂培养基. C: 经 0.1% 刚果红染色的几丁质培养基. D: 尿素-酚红试剂

Figure 4 Qualitative determination of enzyme production in strain S5-1. A: Skimmed milk powder agar medium. B: Starch containing beef extract peptone agar medium. C: Chitin medium stained with 0.1% Congo red. D: Urea-phenol red reagent.

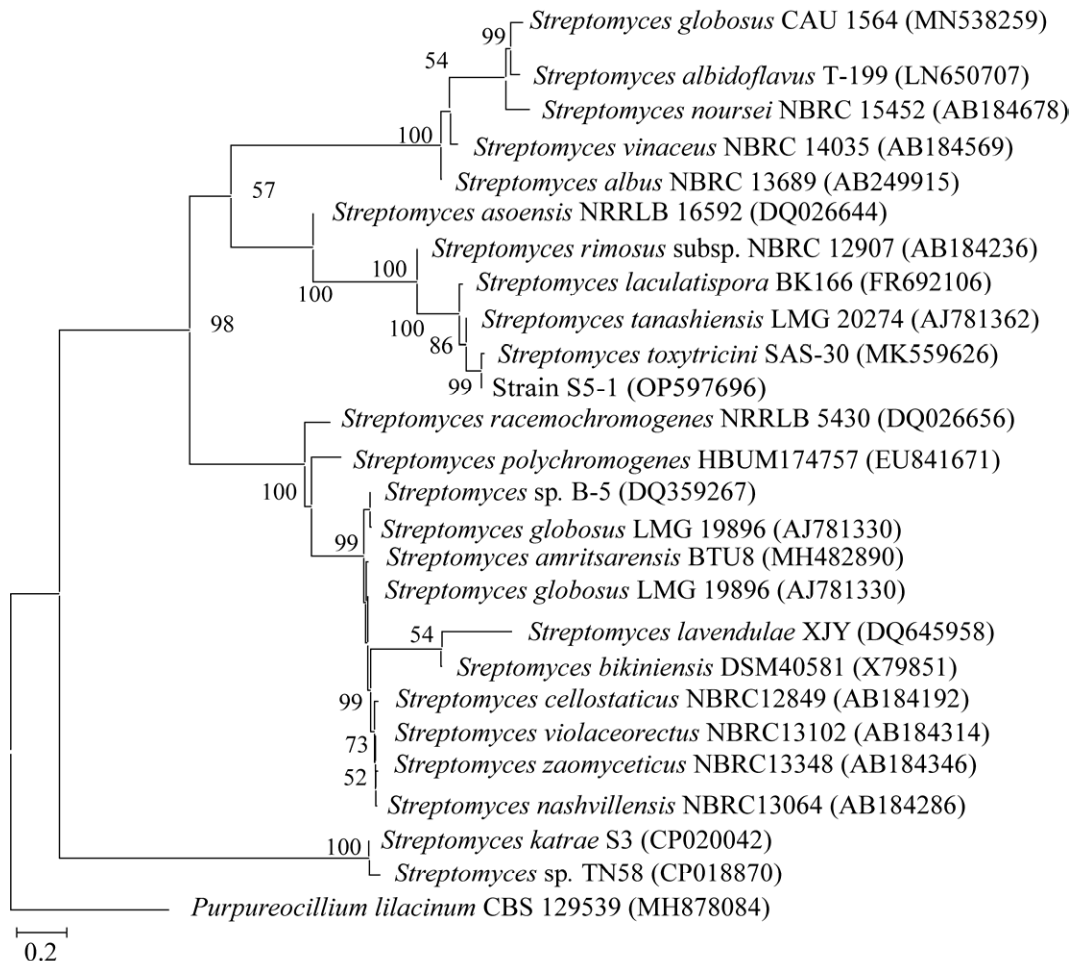


图5 基于菌株 S5-1 的 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 分支处数值表示 bootstrap 值; 括号内数值为 GenBank 登录号; 标尺 0.2 代表序列的进化差异

Figure 5 Phylogenetic tree constructed based on the 16S rRNA gene sequence of strain S5-1. The value at the branch indicates the bootstrap value; The value in parentheses is the GenBank accession number; Scale 0.2 represents the evolutionary difference of the sequence.

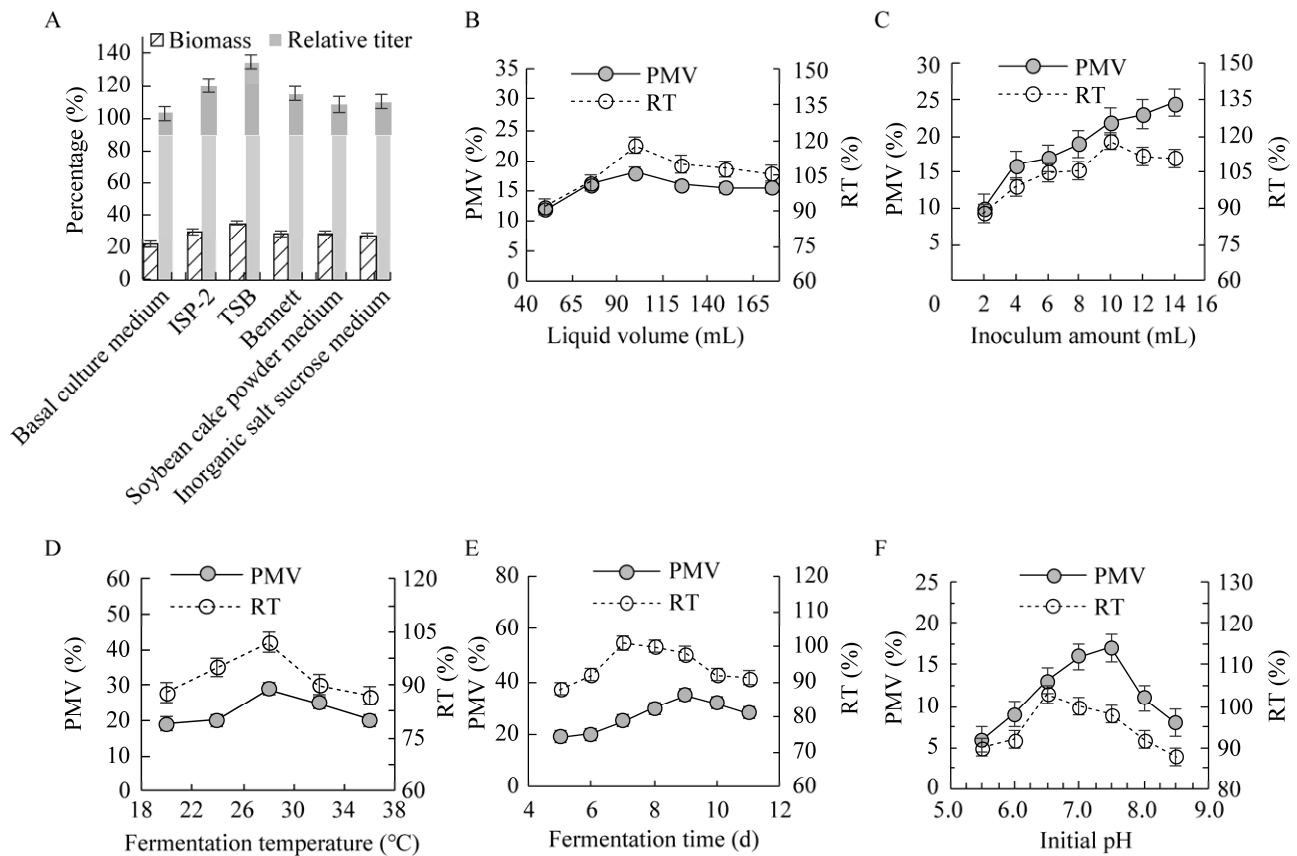


图 6 不同培养条件对菌株 S5-1 发酵液抑菌相对效价及菌体生物量的影响 A: 不同培养基; B: 不同装液量; C: 不同接种量; D: 不同温度; E: 不同时间; F: 不同初始 pH. PMV: 菌体生物量; RT: 抑菌相对效价
 Figure 6 The effects of different culture conditions on antimicrobial relative titer and packed mycelial volume of the fermentation broth of strain S5-1. A: Different medium; B: Different liquid volume; C: Different inoculation amount; D: Different temperature; E: Different time; F: Different initial pH. PMV: Packed mycelial volume; RT: Relative titer.

发酵时间为 7 d。通过检测菌株在优化后的发酵条件下的生物量和抑菌相对效价,统计结果见表 5。在不同的发酵时间内,优化组的效价值和生物量始终高于对照组,且优化组在发酵 168 h 时,其效价值达 743.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$,生物量为 36.1%,较对照组的效价值 613.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和生物量 27.7% 分别提高 21.2% 和 23.3%。

2.5 发酵粗提物的抑菌活性评价结果

2.5.1 发酵粗提物的抑菌活性

将发酵粗提物制备不同浓度的带药平板,分

别进行烟草疫霉和灰霉菌的培养,检测其对两种病原菌的抑制效果,结果如图 7 所示。灰霉菌的菌丝出现膨大、扭曲、菌丝隔膜消失,内容物增多;烟草疫霉的菌丝分枝增多、菌丝膨大、扭曲、内容物外渗,抑菌率的统计结果见表 6。不同浓度的发酵粗提物对这两种病原菌均有抑制作用,并且随着粗提物浓度的升高其抑菌率升高。当发酵粗提物浓度为 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对灰霉菌的抑菌率为 65.70%,对烟草疫霉的抑菌率为 88.70%。两种病原菌孢子萌发率统计结果见表 7。当粗提

表 5 优化前后发酵液抑菌相对效价和菌体生物量统计

Table 5 Statistic the antimicrobial relative titer and packed mycelial volume of the fermentation broth before and after optimization

发酵时间 Fermentation time (h)	效价 Titer ($\mu\text{g/mL}$)		生物量 Biomass (%)	
	对照组 Control group	优化组 Optimization group	对照组 Control group	优化组 Optimization group
	24	0.00 \pm 0.20	0.00 \pm 0.15	0.22 \pm 0.10
48	51.30 \pm 0.45	82.30 \pm 0.17	2.56 \pm 0.12	4.21 \pm 0.21
72	210.20 \pm 0.66	245.00 \pm 0.31	10.60 \pm 0.11	13.66 \pm 0.16
96	305.90 \pm 0.12	374.60 \pm 0.46	16.10 \pm 0.15	19.80 \pm 0.20
120	384.40 \pm 0.73	513.70 \pm 0.27	20.24 \pm 0.20	26.10 \pm 0.24
144	494.40 \pm 0.54	633.80 \pm 0.33	24.30 \pm 0.14	32.40 \pm 0.23
168	613.00 \pm 0.81	743.30 \pm 0.49	27.70 \pm 0.11	36.10 \pm 0.22

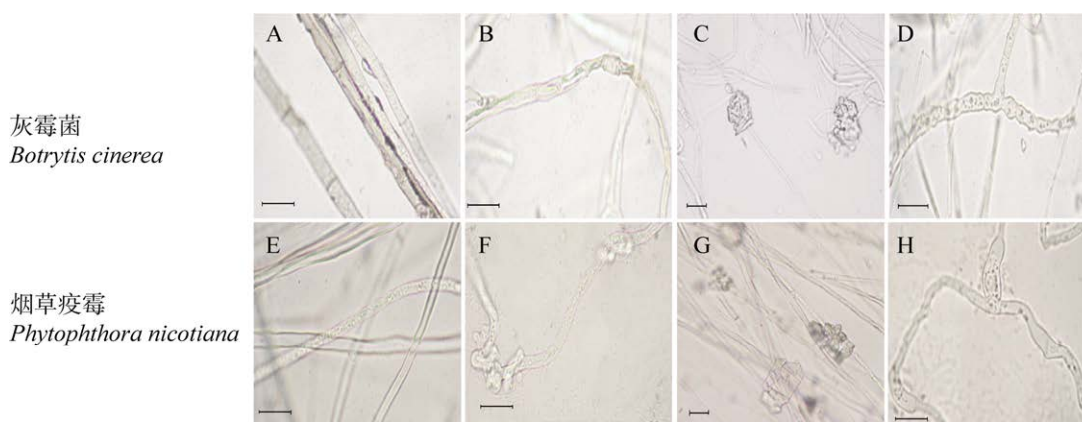


图 7 发酵粗提物对灰霉菌丝及烟草疫霉菌丝的影响 A: 正常培养的灰霉菌菌丝. B-D: 发酵粗提物处理后的灰霉菌菌丝. E: 正常培养的烟草疫霉菌丝. F-H: 发酵粗提物处理后的烟草疫霉菌丝. 比例尺为 10 μm

Figure 7 The effects of fermented crude extract on the mycelia of *Botrytis cinerea* and *Phytophthora parasitica*. A: The mycelia of normal cultured *B. cinerea*. B-D: The mycelia of *B. cinerea* treated with the fermented crude extract. E: The mycelia of normal cultured *P. parasitica*. F-H: The mycelia of *P. parasitica* treated with fermented crude extract, with a scale of 10 μm .

表 6 发酵粗提物对病原菌的抑菌率

Table 6 The effects of fermented crude extract on *Botrytis cinerea* and *Phytophthora parasitica* mycelia growth

粗提物浓度 Fermented crude extract concentration ($\mu\text{g/mL}$)	抑菌率 Inhibition rate (%)	
	灰霉菌 <i>Botrytis cinerea</i>	烟草疫霉 <i>Phytophthora parasitica</i>
100	22.60	49.33
150	25.70	62.42
200	33.33	68.10
250	38.60	72.60
300	41.12	76.45
350	52.40	83.33
400	65.70	88.70

表 7 发酵粗提物对灰霉菌及烟草疫霉孢子萌发的影响

Table 7 The effects of fermented crude extract on *Botrytis cinerea* and *Phytophthora parasitica* spore germination

粗提物浓度 Fermented crude extract concentration ($\mu\text{g/mL}$)	灰霉菌 <i>Botrytis cinerea</i>		烟草疫霉 <i>Phytophthora parasitica</i>	
	萌发率	抑菌率	萌发率	抑菌率
	Germination rate (%)	Antibacterial rate (%)	Germination rate (%)	Antibacterial rate (%)
200	33.6	60.5	39.7	58.6
400	30.4	69.8	32.6	68.7
600	27.4	72.3	26.4	71.4
800	15.6	86.4	16.9	79.7
1 000	8.4	90.1	12.1	82.4
1 200	2.1	98.4	7.2	88.6
1 400	0.0	100.0	1.4	98.5
对照组 Control	89.4	No data	88.2	No data

物浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时,对灰霉菌和烟草疫霉孢子萌发的抑菌率分别为 60.5%和 58.6%;当粗提物浓度为 1 400 $\mu\text{g/mL}$ 时,对灰霉菌和烟草疫霉孢子萌发的抑菌率分别为 100%和 98.5%,说明该粗提物能强烈抑制两种病原菌孢子的萌发。

分别通过灰霉菌与圣女果果实(图 8)和烟草疫霉与烟草叶片(图 9)的互作体系,观察到发酵粗提物能显著降低病原菌在侵染点的菌丝扩展和对植物的侵染,表现为菌丝扩展减慢、病斑直径变小,在降低病原菌致病性的同时,降低了植

物的发病程度。

2.5.2 发酵粗提物的稳定性影响因素

发酵粗提物的稳定性实验结果如图 10 所示,在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温条件下可储存 30 d 以上(图 10A)、在不超过 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理 1 h,其抑菌活性变化不显著,当超过 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时抑菌活性迅速下降,在 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时完全丧失抑菌活性(图 10B),适宜的 pH 值范围为 6.0–7.0(图 10C),紫外光处理不超过 6 h,仍能够保持稳定的抑菌活性(图 10D)。

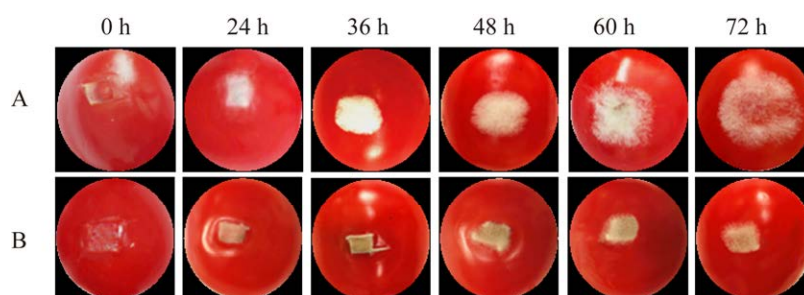


图 8 发酵粗提物对灰霉菌的抑菌效果 A: 接种灰霉菌孢子悬液及无菌水的圣女果果实. B: 同时接种发酵粗提物及灰霉菌孢子悬液的圣女果果实

Figure 8 Antimicrobial effect of fermented crude extract on *Botrytis cinerea*. A: Cherry tomatoes inoculated with *B. cinerea* spore suspension and sterile water. B: Cherry tomatoes inoculated with fermented crude extract and *B. cinerea* spore suspension.

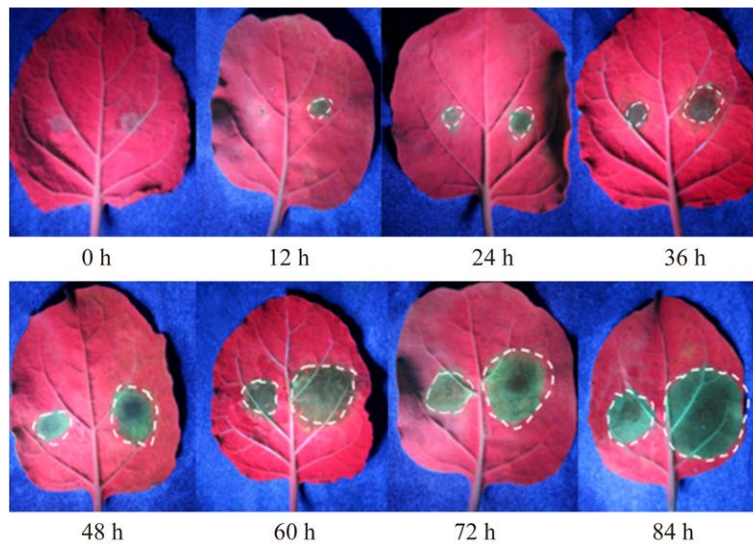


图9 发酵粗提物对烟草疫霉的抑菌效果 叶脉左侧部分接种烟草疫霉孢子悬液加发酵粗提物, 右侧接种烟草疫霉孢子悬液加无菌水

Figure 9 Antimicrobial effect of fermented crude extract on *Phytophthora parasitica*. The left side of the vein of the tobacco leaf was inoculated with a suspension of *P. parasitica* spores and fermented crude extract, and the right side was inoculated with a suspension of *P. parasitica* spores and sterile water.

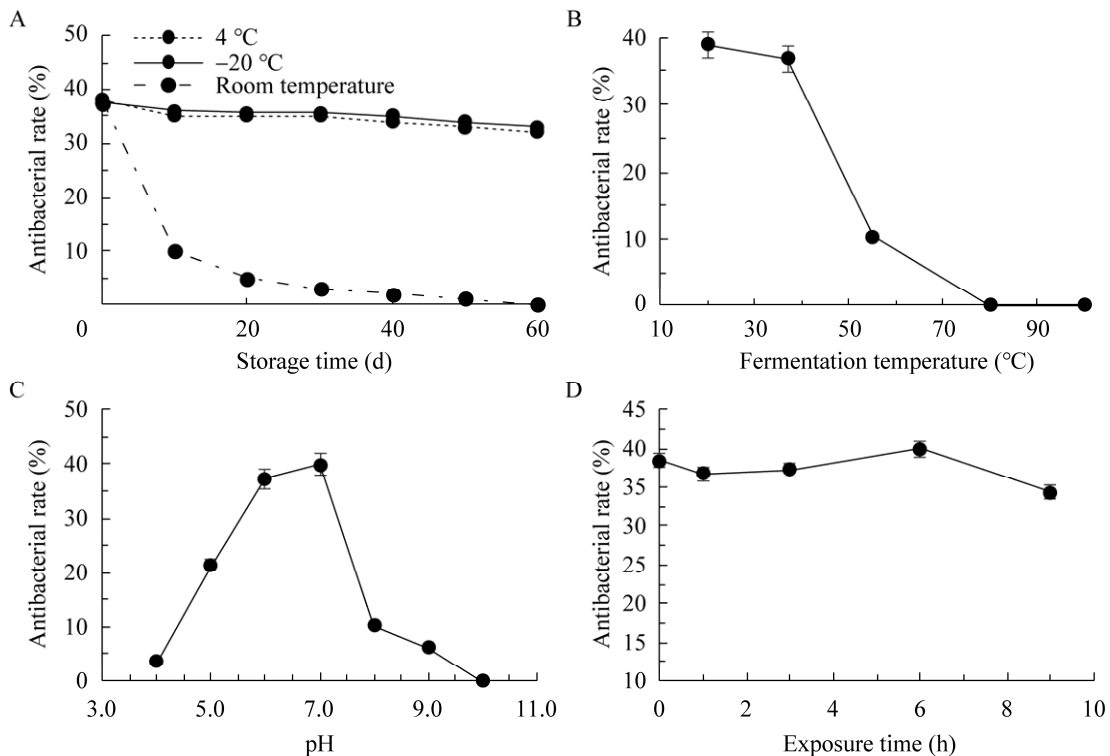


图10 发酵粗提物溶液稳定性的影响因素 A: 储藏温度稳定性. B: 热稳定性. C: 酸碱稳定性. D: 紫外处理时间稳定性

Figure 10 The stability affecting factors of the fermented crude extract. A: Storage temperature stability. B: Heat stability. C: pH stability. D: UV treatment time stability.

3 讨论与结论

拮抗微生物作为一种生防菌剂,相较于化学农药的优势在于能够有效防治病虫害的同时,兼具对环境友好、对非靶标生物无影响等优点,可以保护田间生态环境的多样性,对农业生产的可持续发展具有重要意义^[20]。放线菌作为一类重要的生防微生物类群,在植物病害防治方面具有广泛的应用前景。

链霉菌(*Streptomyces* sp.)是好氧革兰氏阳性菌,分类上属于放线菌纲放线菌目。目前,大约 60%以上的已知抗生素从链霉菌中分离获得,如链霉素、氯霉素等^[21]。截至目前,链霉菌属的多株放线菌也被报道对植物病害具有抑制作用,如范三微等^[22]分离到一株与毒三素链霉菌关系非常密切的放线菌,对白色念珠菌及黑曲霉具有抑制作用;张强等^[23]报道一株黄三素链霉菌对禾谷镰刀菌有抑菌作用;贺赛雅等^[24]报道一株灰色橙黄链霉菌对辣椒疫霉等 8 种植物病原菌具有抑制效果。本研究通过平板对峙试验和发酵液制备带药平板实验对放线菌菌株 S5-1 的抑菌活性进行检测,发现该菌株能对包括烟草疫霉和灰霉菌在内的 5 种病原真菌和 5 种病原卵菌同时具有较强的抑菌效果。通过显微形态、在 7 种国标培养基上的培养特征、生理生化分析和 16S rRNA 基因序列分子鉴定,将菌株 S5-1 鉴定为毒三素链霉菌(*Streptomyces toxytricini*)。胡莎莎等^[25]报道首次从毒三素链霉菌中分离鉴定到链丝菌素 B 和链丝菌素 C,链丝菌素是一类由放线菌产生的碱性、水溶性广谱抗生素,在本研究中,菌株 S5-1 呈现广谱抑制活性,可能与其含链丝菌素有关。

本研究结果显示,拮抗放线菌 S5-1 能引起烟草疫霉或灰霉菌菌丝的畸变、菌丝溶解,产生多种胞外水解酶,如蛋白酶、淀粉酶、几丁质酶

和脲酶等。这些结果提示此菌株可能具有多种酶类和蛋白类拮抗物质,它们可作用于病原菌的细胞壁和细胞膜,损害细胞结构,从而影响细胞各种能量代谢和生物分子合成系统,达到杀死病菌的效果^[26];脲酶活性提示此菌株在植物促生方面可能也发挥了重要作用,因为脲酶参与了土壤中许多有机物的转化,它能把高分子化合物水解成为植物易吸收的营养物质,从而达到增肥土壤的作用。

放线菌通过发酵产生大量的抑菌代谢物。本研究通过培养基筛选实验、单因素试验和正交试验对菌株 S5-1 的发酵工艺条件进行了优化,在发酵培养基为 TSB、初始 pH 值为 6.5、发酵温度 28 °C、发酵时间 7 d 的条件下,其发酵液的抑菌相对效价和生物量分别为 743.3 μg/mL 和 36.1%,较对照组分别提高 21.2%和 23.3%。进一步对菌株 S5-1 的发酵粗提物抑菌效果进行测评,发现当发酵粗提物浓度为 400 μg/mL 时对灰霉菌及烟草疫霉的抑菌率分别为 65.70%和 88.70%,且能使病原菌的菌丝发生扭曲变形、隔膜消失,胞内物外渗;当发酵粗提物浓度为 1 400 μg/mL 时其对灰霉菌和烟草疫霉的孢子萌发有强烈的抑制效果,抑菌率分别为 100.0%和 98.5%。两组植物离体试验表明,500 μg/mL 的发酵粗提物能分别抑制灰霉菌在番茄果实上和烟草疫霉在烟草叶片上的侵染和扩展速度,降低植物的发病程度。发酵粗提物的稳定性检测实验结果显示,粗提物溶液在-20 °C低温条件下储存 30 d, pH 6.0-7.0,紫外光处理 6 h 的条件下,仍保持稳定的抑菌活性。综上,放线菌 S5-1 对灰霉菌和烟草疫霉等 10 株病原菌有较强的抑菌效果,对其开发利用将有助于植物病害的绿色防控,在为拮抗放线菌的生防应用提供优良菌株资源的同时,也为新型抑菌活性药物的研究和应用

提供实验基础。

致谢

本研究得到我校河南省高校农业生物质资源化工程技术研究中心的支持和帮助,在此表示衷心感谢。

REFERENCES

- [1] 王志新, 鲁雷震, 周景波, 封成玲, 贾紫伟, 宁亚维, 贾英民. 抗真菌肽研究进展[J]. 生物技术通报, 2021, 37(3): 206-218.
WANG ZX, LU LZ, ZHOU JB, FENG CL, JIA ZW, NING YW, JIA YM. Research progress of antifungal peptides[J]. Bulletin of Biotechnology, 2021, 37(3): 206-218 (in Chinese).
- [2] WENG, SZ, HU, XJ, WANG, JH, TANG, L, LI, P, ZHENG, SG, ZHENG, L, HUANG, LS, XIN, ZH. Advanced application of Raman spectroscopy and surface-enhanced Raman spectroscopy in plant disease diagnostics: a review[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(10): 2950-2964.
- [3] 刘文德, 代玉立, 邵小龙, 张昊, 陈华民, 靳怀冰, 刘文文, 彭焕, 张丹丹, 李智强, 钱国良, 刘太国, 陈捷胤. 我国主要农作物病害灾变机制与综合防控研究进展: 2018–2022年[J]. 植物保护, 2023, 49(5): 1-31.
LIU WD, DAI YL, SHAO XL, ZHANG H, CHEN HM, JIN HB, LIU WW, PENG H, ZHANG DD, LI ZQ, QIAN GL, LIU TG, CHEN JY. Research progresses on the disaster mechanism and integrated management of major crop diseases in China: 2018–2022[J]. Plant Protection, 2023, 49(5): 1-31 (in Chinese).
- [4] 雷映霞, 张艳, 罗颖, 周青平, 杨瑞武. 三类植物卵菌的全基因组比较[J]. 植物保护学报, 2023, 50(3): 696-704.
LEI YX, ZHANG Y, LUO Y, ZHOU QP, YANG RW. Genome-wide comparison of three types of plant pathogenic oomycete species[J]. Journal of Plant Protection, 2023, 50(3): 696-704 (in Chinese).
- [5] 刘晓敏. 蒺藜果实和四种微生物化学成分研究[D]. 固原: 宁夏师范学院硕士学位论文, 2023.
LIU XM. Study on chemical constituents of *Fructus Tribulus* and four kinds of microorganisms[D]. Guyuan: Master's Thesis of Ningxia Normal University, 2023 (in Chinese).
- [6] 胡丽可. 连作大棚施用 5406 抗生素肥的效果研究[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2016.
HU LK. Research on the effect of 5406 antibiotic fertilizer applied in continuous *Capsicum annuum* cropping greenhouse[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [7] 邢梦玉. 两株链霉菌对荔枝霜疫病的防病潜力和防病机理研究[D]. 广州: 华南农业大学博士学位论文, 2020.
XING MY. Study on biocontrol potential and antifungal mechanism of *Streptomyces* TJGA-19 and BWL-H1 against litchi downy blight[D]. Guangzhou: Doctoral Dissertation of South China Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [8] 吕昂. 链霉菌 3-10 抗真菌代谢产物鉴定及防病潜力评估[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2017.
LÜ A. Identification of the antifungal metabolites from *Streptomyces* sp. 3-10 and evaluation of their efficacy against plant fungal diseases[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [9] 付克剑, 崔永和, 黄智华, 张继来, 张立猛, 邓毅书, 张智浩, 聂强, 周洪印, 苏友波. 抗烟草黑胫病菌生防细菌筛选、鉴定及体外拮抗机理初探[J]. 南方农业学报, 2023, 54(8): 2245-2256.
FU KJ, CUI YH, HUANG ZH, ZHANG JL, ZHANG LM, DENG YS, ZHANG ZH, NIE Q, ZHOU HY, SU YB. Screening, identification and antagonistic mechanism *in vitro* of biocontrol bacteria against tobacco black shank pathogen[J]. Acta Agriculturae Australis Sinica, 2023, 54(8): 2245-2256 (in Chinese).
- [10] 章舸, 彭玉龙, 苟剑渝, 何楷, 李章海, 汪章勋, 齐永霞. 烟草疫霉拮抗放线菌的生防潜力评价[J]. 中国生物防治学报, 2023, 39(3): 667-675.
ZHANG G, PENG YL, GOU JY, HE K, LI ZH, WANG ZX, QI YX. Evaluation of biocontrol potential of the antagonistic *Actinomycetes* against *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2019, 39(3): 667-675 (in Chinese).
- [11] 曾钰涵, 赵心宇, 胡玉, 魏登琴, 尚静, 常小丽. 大豆根腐病生防链霉菌 IRHB47 的鉴定、生物学特性及防治效果[J]. 四川农业大学学报, 2023, 41(5): 801-810.
ZENG YH, ZHAO XY, HU Y, WEI DQ, SHANG J, CHANG XL. Identification, biological characteristics and control efficacy of *Streptomyces virginiae* IRHB47 against soybean root rot[J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2019, 41(5): 801-810.
- [12] 任彩玲. 放线菌活性天然产物的挖掘以及底盘的开发[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2023.
REN CL. Mining of bioactive natural products from actinomycetes and development of chassis[D]. Jinan:

- Master's Thesis of Shandong University, 2023 (in Chinese).
- [13] SYED AB RAHMAN SF, SINGH E, PIETERSE CMJ, SCHENK PM. Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens[J]. *Plant Science*, 2018, 267: 102-111.
- [14] 赵阿娜, 丁万隆. 利用拮抗微生物防治中药材土传病害研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2005, 30(7): 485-487
- ZHAO AN, DING WL. Progress on the control of medicinal plants soil-borne disease by anti-microorganism[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2005, 30(7): 485-487 (in Chinese).
- [15] 王艺茹, 潘培培, 沈虎生, 张林林, 王润东, 何梦菡, 申顺善. 番茄疫霉根腐病菌拮抗细菌 HP8-1 的鉴定及生物防治潜力[J]. *河南农业大学学报*, 2024, 58(1): 78-86.
- WANG YR, PAN PP, SHEN HS, ZHANG LL, WANG RD, HE MH, SHEN SS. Identification and biocontrol potential of antagonist bacteria HP8-1 against *Phytophthora* root rot of tomato[J]. *Journal of Henan Agricultural University*, 2024: 58(1): 78-86 (in Chinese).
- [16] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1975.
- Actinomycetes* Taxon, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences. *Streptomyces* Identification Manual[M]. Beijing: Science Press, 1975 (in Chinese).
- [17] 苏亚蕊, 范慧霞, 马跃然, 梁利慧, 康文艺, 郜晓峰. 植物精油对病原真菌抑制作用的研究进展[J]. *食品科学*, 2023, 44(13): 281-288.
- SU YR, FAN HX, MA YR, LIANG LH, KANG WY, GAO XF. Advances in the antifungal effects of plant essential oils[J]. *Food Science*, 2023, 44(13): 281-288 (in Chinese).
- [18] 何梦妮, 彭政, 张娟. 痤疮丙酸杆菌拮抗菌的筛选、发酵优化及安全性评价[J]. *食品与发酵工业*, 2023, 49(16): 26-34.
- HE MN, PENG Z, ZHANG J. Screening, fermentation optimization, and safety evaluation of antagonistic bacteria of *Cutibacterium acnes*[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2023, 49(16): 26-34 (in Chinese).
- [19] 吴惠贞, 鲍志宁, 林伟锋. 罗伊氏乳杆菌发酵液的抑菌特性与抑菌成分性质初探[J]. *食品科技*, 2019, 44(10): 8-13.
- WU HZ, BAO ZN, LIN WF. Antimicrobial characteristics of *Lactobacillus reuteri* fermentation liquid and properties of its antimicrobial substances[J]. *Food Science and Technology*, 2019, 44(10): 8-13 (in Chinese).
- [20] 李小伟, 李兴昱, 薛应钰. 公牛链霉菌 JPD-1 可湿性粉剂的研制及对苹果斑点落叶病的防效[J]. *中国生物防治学报*, 2023, 39(2): 355-365.
- LI XW, LI XY, XUE YY. Development of *Streptomyces tauricus* JPD-1 wettable powder and its biocontrol efficiency on apple *Alternaria* leaf spot determination[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2023, 39(2): 355-365 (in Chinese).
- [21] KLEMENTZ D, DÖRING K, LUCAS X, TELUKUNTA KK, ERXLEBEN A, DEUBEL D, ERBER A, SANTILLANA I, THOMAS OS, BECHTHOLD A, GÜNTHER S. StreptomeDB 2.0—an extended resource of natural products produced by *Streptomyces*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(D1): D509-D514.
- [22] 范三微, 吴祖芳, 翁佩芳. 一株抗真菌海洋放线菌的筛选、分离和多相分类鉴定[J]. *核农学报*, 2022, 36(10): 1945-1952.
- FAN SW, WU ZF, WENG PF. Screening, isolation and polyphasic taxonomic identification of an anti-fungal marine *Actinomycete*[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2022, 36(10): 1945-1952 (in Chinese).
- [23] 张强, 张艳茹, 石红利, 霍云凤. 一株链霉菌 21-1 的分离鉴定及其对禾谷镰刀菌的抑菌活性[J]. *微生物学通报*, 2024, 51(2): 471-482.
- ZHANG Q, ZHANG YR, SHI HL, HUO YF. *Streptomyces* strain 21-1: isolation, identification, and activity against *Fusarium graminearum*[J]. *Microbiology China*, 2024, 51(2): 471-482 (in Chinese).
- [24] 贺赛雅, 袁加升, 周星海, 刘学瑞, 魏兰芳, 姬广海. 生防链霉菌菌株 S16 鉴定和防蔬菜根肿病的潜力评价[J]. *植物病理学*, 2024, 54(2): 410-418.
- HE SY, YUAN JS, Zhou XH, Liu XR, Wei LF, Ji GH. Identification of *Streptomyces* strain S16 and evaluating its biocontrol potential against *Plasmodiophora brassicae*[J]. *Plant Pathology*, 2024, 54(2): 410-418 (in Chinese).
- [25] 胡莎莎, 吴勇, 顾鸽青, 张喜全, 冯军. 毒三素链霉菌 SIPI-2012406 抑菌活性产物的分离纯化和结构鉴定[J]. *中国医药工业杂志*, 2013, 44(10): 980-985.
- HU SS, WU Y, GU GQ, ZHANG XQ, FENG J. Isolation, purification and structural identification of antimicrobial products from *Streptomyces toxytricini* SIPI-2012406[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Industry*, 2013, 44(10): 980-985 (in Chinese).
- [26] 张明明, 马卫宾, 王冲, 谢岩黎. 食品香料 4-丙基苯酚对黄曲霉菌的抑制作用研究[J]. *河南工业大学学报(自然科学版)*, 2022, 43(4): 54-60.
- ZHANG MM, MA WB, WANG C, XIE YL. Study on the inhibitory effect of food flavor 4-propyl phenol on *Aspergillus flavus*[J]. *Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition)*, 2022, 43(4): 54-60 (in Chinese).