

# 黄瓜枯萎病生防菌 HD-087 产抗菌物质条件的优化及抑菌作用初探

赵帅<sup>1,2</sup> 田长彦<sup>2</sup> 史应武<sup>3</sup> 杜春梅<sup>1\*</sup>

(1. 黑龙江大学 微生物学黑龙江省高校重点实验室 黑龙江 哈尔滨 150080)

(2. 中国科学院新疆生态与地理研究所 荒漠与绿洲生态国家重点实验室 新疆 乌鲁木齐 830011)

(3. 新疆农业科学院微生物应用研究所 新疆 乌鲁木齐 830011)

**摘要:** 【目的】优化比基尼链霉菌 HD-087 摇瓶发酵条件, 提高菌株发酵液对黄瓜枯萎病菌 HU-M 的抑制率, 并通过拮抗试验初步评价发酵液的抑菌作用效果。【方法】采用单因素筛选及正交试验对 HD-087 的发酵培养基和发酵条件进行优化。经发酵液处理后, 光学显微镜观察 HU-M 菌丝形态和孢子萌发抑制率, 测定 HU-M 菌丝电导率。【结果】改进的发酵培养基配方为: 淀粉 1.00%、黄豆粉 0.80%、酵母粉 0.12%、CaCO<sub>3</sub> 0.40%。对发酵条件的研究表明: pH 为 6.8, 180 r/min, 28 °C 条件下, 250 mL 三角瓶装液量为 40 mL, 接种 1 mL 种龄为 2 d 的种子, 发酵 5 d 为最佳培养条件。抑菌结果表明, HD-087 产抗菌物质能造成病原菌 HU-M 菌丝细胞质渗漏, 菌丝畸形, 分生孢子萌发受抑制, 5 倍发酵稀释液孢子抑制率达 72.1%; 除此之外还能引起菌丝电解质渗漏, 造成菌丝细胞膜受损。【结论】优化后的摇瓶发酵条件能提高生防菌 HD-087 发酵液抑菌效果, 并且发酵液可破坏细胞膜明显抑制病原菌 HU-M 生长, 具有较大开发应用潜力。

**关键词:** 比基尼链霉菌, 黄瓜枯萎病, 发酵条件优化, 生物防治

# Fermentation conditions for the biocontrol strain HD-087 against cucumber *Fusarium* wilt and it's antibacterial effect

ZHAO Shuai<sup>1,2</sup> TIAN Chang-Yan<sup>2</sup> SHI Ying-Wu<sup>3</sup> DU Chun-Mei<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Microbiology, College of Life Sciences, Heilongjiang University, Harbin, Heilongjiang 150080, China)

(2. State Key Laboratory of Desert and Oasis Ecology, Xinjiang Institute of Ecology and Geography, Chinese Academy of Sciences, Urumqi, Xinjiang 830011, China)

(3. Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi, Xinjiang 830011, China)

**Abstract: [Objective]** In order to improve the inhibitory rate of fermentation broth of *Streptomyces bikiniensis* strain HD-087 against *Fusarium oxysporum* strain HU-M, the shake-flask fermentation conditions of biocontrol agent HD-087 were optimized. Restraining effectiveness of broth towards HU-M has been tested at the same time. **[Methods]** The liquid fermentation medium and conditions of HD-087 were optimized by single factor experiments and orthogonal experiments. After inoculation with broth, HU-M hyphae morphology and germination of conidia were then examined under the light microscope, and the relative conductivity of HU-M hyphae was measured using a conductivity meter. **[Results]** The composition of the optimal medium was 1.00% (W/V) starch, 0.80% (W/V) soybean flour, 0.12% (W/V) yeast extract, 0.40% (W/V) CaCO<sub>3</sub>. The optimal fermentation conditions were the combination of temperature 28 °C, initial pH 6.8, 180 r/min, incubation time 5 d, 1 mL inoculum volume and medium volume 40 mL/250 mL. The result of antibacterial effect can be concluded as follows: abnormality of pathogen hyphae and leakage of cytoplasm after treated with broth; meanwhile the inhibitive rate to conidia germination reached 72.1% when the broth diluted by 5 times. In addition to that, exosmosis of hyphae content, conductance rate increased. **[Conclusion]** All these changes indicate that optimal shake-flask fermentation conditions can improve the inhibitory activity of HD-087 broth against *F. oxysporum* HU-M, and the broth has been proved efficient for suppression of HU-M by severely destroying cell membrane structure, it's of great potential application value.

**Keywords:** *Streptomyces bikiniensis*, Cucumber *Fusarium* wilt, Optimization of fermentation condition, Biocontrol

黄瓜枯萎病由 *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cucumerinum* 引起, 是世界性的土传病害, 严重制约黄瓜产量和品质<sup>[1]</sup>。近年来, 利用拮抗微生物对黄瓜枯萎病进行生物防治取得较大进展, 已

成为防治该病害的重要手段。

利用拮抗微生物一方面是应用活菌进行防治, 如 Liu 等<sup>[2]</sup>研究表明接种根际促生菌 *Pseudomonas putida* 89B-27 和 *Serratia marces-*

*cens* 90-166 均能刺激黄瓜植株产生诱导抗性提高抗枯萎病能力。Hammad 等<sup>[3]</sup>将分离得到的一株 *Streptomyces* spp. 和一株 *Bacillus mycoides* 分别接种到土壤中显著降低黄瓜枯萎病菌含量。Singh 等<sup>[4]</sup>报道了利用 *Paenibacillus* sp. 300 和 *Streptomyces* sp. 385 混合施用对黄瓜枯萎病有较好防治效果。王倡宪等<sup>[5]</sup>报道接种 *Glomus versiforme* 与 *Glomus intraradices* 两种 AM 真菌均可促进黄瓜幼苗的生长并减轻枯萎病病害。另一方面是应用拮抗菌的代谢产物进行防治, 如柳春燕等<sup>[6]</sup>将 *Trichoderma pseudokoningii* 和 *Bacillus subtilis* 菌株的发酵液混合施用, 能较好抑制黄瓜枯萎病菌。李晓虹等<sup>[7]</sup>研究表明链霉菌 MH4 和 MH122 产生的抗生素对黄瓜枯萎病菌等 10 多种植物病原真菌具有明显的抑制作用。Chen 等<sup>[8]</sup>研究表明, *Bacillus subtilis* B579 无菌培养液导致黄瓜枯萎病菌菌丝畸形, 抑制孢子萌发, B579 培养液灌根接种防治效果可达 73.6%。

菌株 HD-087 分离自土壤, 经鉴定为比基尼链霉菌<sup>[9]</sup>, 少见关于其对拮抗黄瓜枯萎病菌的报道。本研究以获得价廉高效的发酵培养基, 提高比基尼链霉菌菌株 HD-087 发酵液中抑菌物质产量为目标, 对菌株 HD-087 进行摇瓶发酵培养基及发酵条件优化, 同时初步分析菌株 HD-087 产生的活性产物对黄瓜枯萎病菌的作用效果, 以期为该菌株的进一步开发应用提供理论基础和科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试菌株

比基尼链霉菌菌株 HD-087、黄瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum*) HU-M 菌株均由黑龙江大学微生物重点实验室提供。菌株 HD-087 于 28 °C 的高氏一号培养基斜面培养。菌株 HU-M 分离自病株, 于 28 °C 的 PDA 斜面培养。

### 1.2 种子液的制备

将培养 7 d 的 HD-087 菌株接种于种子培养基 (0.5% 蛋白胨, 0.5% 葡萄糖, 0.2%  $K_2HPO_4$ , pH 7.0–7.2) 中, 180 r/min、28 °C 摇床培养 48 h, 备用。

### 1.3 发酵液制备

原始发酵培养基参照文献[10–13]描述采用添加酵母粉为辅助氮源, 略作修改, 配方为 (W/V): 1.5% 葡萄糖, 1.5% 黄豆粉, 0.1% NaCl, 0.1% 酵母粉, 0.25 mL 甘油, 自然 pH。发酵培养基制作时先将黄豆粉加水煮沸后过滤, 去除滤渣, 分装后  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min, 备用。初始培养条件为: pH 7.0, 三角瓶中的装液量为 40 mL/250 mL, 接种量 1%, 于 180 r/min、28 °C 条件下摇瓶培养 5 d。液体培养物于 5 000 r/min 离心 15 min, 上清液用细菌滤器 (0.45  $\mu$ m) 过滤, 得到发酵液的无菌滤液, 用于抗菌活性测定。

### 1.4 发酵液抑菌活性测定方法

采用双层平板法。10 mL 琼脂培养基平铺于 9 cm 直径的培养皿中, 冷凝形成水平均匀的琼脂层, 然后取 100 mL PDA (50 °C) 注入  $1 \times 10^7$  CFU/mL 新鲜培养 HU-M 分生孢子悬液, 混匀后取 6 mL 加入培养皿中。在制成的双层平板上放置无菌牛津杯, 每个牛津杯中加入 200  $\mu$ L 发酵液。28 °C 恒温培养 72 h 后, 游标卡尺测量拮抗圈直径。每处理重复 3 次。

### 1.5 发酵培养基组分的单因素筛选

最佳碳源及浓度测定: 分别以等量的蔗糖、麦芽糖、乳糖、可溶性淀粉、玉米粉替换原始发酵培养基中的葡萄糖, 其他成份不变, 以原始发酵培养基作对照, 测定不同碳源对 HD-087 菌株产抗生素的影响。确定最佳碳源后, 配制不同碳源浓度的发酵培养基 0.60%–1.80%, 以 0.30% 为梯度, 测定抗菌活性, 重复 3 次(下同)。

最佳氮源及浓度测定: 分别用等量的蛋白

胨、干酪素、尿素、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  替换原始发酵培养基中的黄豆粉和酵母粉, 以原始发酵培养基作对照, 测定不同有机氮源对菌株产抗的影响。确定最佳氮源后, 配制不同浓度氮源的发酵培养基 0.50%–2.50%, 以 0.50% 为梯度, 测定抗菌活性。

辅助因子对发酵液活性的影响: 以只含最佳碳、氮源的培养基为对照培养基, 根据微生物对大量元素与微量元素的利用情况不同, 按 0.50%、0.80%、1.00%、1.50% 的量分别加入 NaCl; 按 0.02%、0.05%、0.10% 的量分别加入  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 按 0.10%、0.20%、0.30% 的量分别加入  $\text{CaCO}_3$ ; 按 0.10%、0.25%、0.40% 的量分别加入甘油, 测定发酵液抗菌活性。

### 1.6 发酵培养基配方的正交优化

在上述单因子筛选的基础上以淀粉、黄豆粉、酵母粉、 $\text{CaCO}_3$  为考察因素, 采用  $L_9(3^4)$  正交表进行 4 因素 3 水平正交实验, 比较各组分配比对 HD-087 菌株发酵液抗菌活性的影响。正交实验各因素及水平见表 1。

### 1.7 最佳培养条件的单因素筛选

初始 pH 分别设为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0; 装液量分别设为在 250 mL 的三角瓶中装入体积为 20、40、60、80、100 mL 的优化培养基; 接种量分别设为 1、5、10、20 mL; 发酵温度分别设为 20 °C、25 °C、28 °C、30 °C、32 °C; 摇床转速分别调节为 100、150、180、200 和 220 r/min; 培养时间分别为 3、4、5、6、7 d。

表 1 因素和水平的设置  
Table 1 Arrangement of factors and levels

水平 Levels	因素 Factors (%)			
	淀粉 Starch	黄豆粉 Soybean flour	酵母粉 Yeast extract	碳酸钙 $\text{CaCO}_3$
1	0.80	0.30	0.08	0.30
2	1.00	0.50	0.10	0.40
3	1.20	0.80	0.12	0.50

### 1.8 发酵液对病菌抑制作用

发酵液对黄瓜枯萎病菌 HU-M 形态的影响: 将 HU-M 置于含发酵液的毒力平板上, 28 °C 培养 96 h 后于显微镜下观察菌落边缘菌丝形态。采用双凹玻片法, 将发酵液和 HU-M 孢子悬浮液各滴加 100  $\mu\text{L}$ , 设清水处理为对照。27 °C 培养并分别于 2、4、8 h 后检测孢子萌发情况。

对病菌 HU-M 菌丝细胞膜渗透性的影响: HU-M 分生孢子接种于 30 mL PDA 液体培养基中 (孢子的最终浓度约为  $1 \times 10^6$  CFU/mL) 摇床培养 (180 r/min、28 °C) 72 h 后, 离心收集菌丝体。称取 2 g 湿菌丝体各 4 份, 分别加入 20 mL 无菌水中, 再分别加入 1.0、1.5、3.0、6.0 mL 发酵液。立即用电导仪测定各处理液体的电导率, 继续振荡培养 1 h 和 2 h 后, 离心, 测定上清液电导率<sup>[14]</sup>。

### 1.9 数据统计

试验数据统计采用 SPSS 17.0, 单因素方差分析使用 One-Way ANOVA (LSD) 进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵培养基组分单因素筛选

**2.1.1 碳源的筛选:** 菌株 HD-087 在以葡萄糖或淀粉作为碳源时无菌滤液的抗菌活性最高, 其后依次为麦芽糖、乳糖。葡萄糖和淀粉并无显著差异, 鉴于淀粉成本低廉, 且使用淀粉时发酵液的颜色较浅, 利于下游工艺, 因此选择淀粉为碳源。当淀粉浓度为 0.90% 和 1.20% 时, 抑菌活性显著高于其余浓度, 但两者之间无显著差异 (图 1)。因此初步判断 1.00% 左右的淀粉为最佳碳源。

**2.1.2 氮源的筛选:** 菌株 HD-087 在以黄豆粉作为氮源时, 发酵液抑菌活性高于蛋白胨、干酪素、尿素或  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。随着黄豆粉浓度的增加, 发酵液的抑制活性下降 (图 1), 说明过高浓度的氮源会抑制菌株次级代谢产物的生成。初步判断 0.50% 左右的黄豆粉浓度为最佳氮源。由于不同

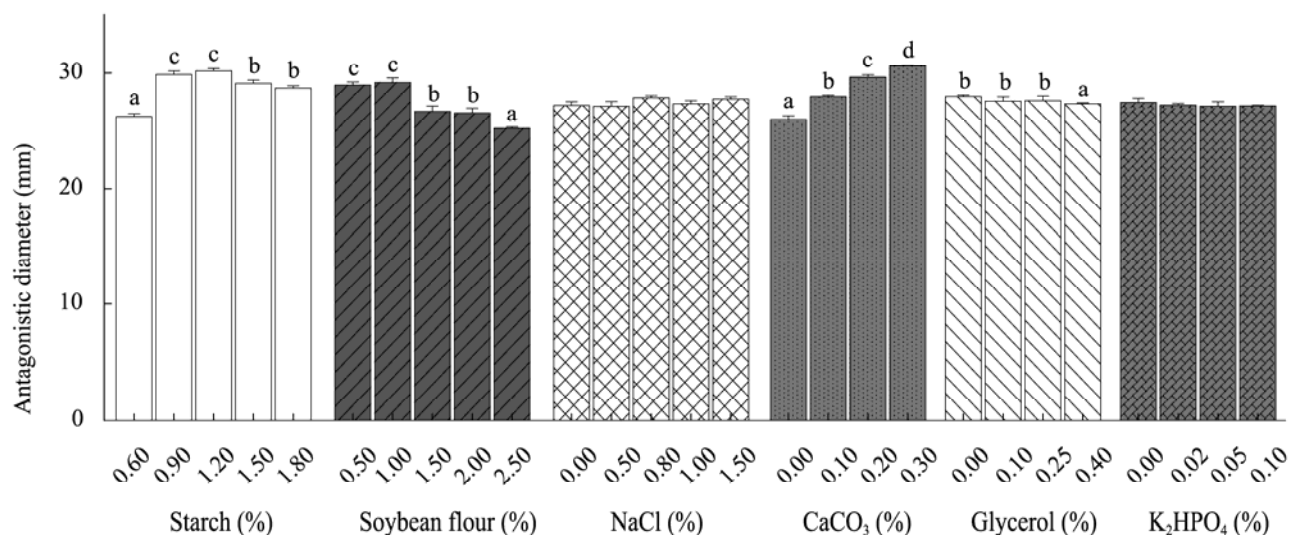


图1 淀粉、黄豆粉和辅助因子对发酵液抗菌活性的影响

Fig. 1 Effects of starch, soybean flour or accessory factors on the antimicrobial activity of broth

品质黄豆粉会造成发酵结果出现差异,因此需要加入质量相对稳定而且能被微生物快速利用的氮源作为辅助氮源,本研究选择效果最佳的酵母粉作为发酵的辅助氮源。

**2.1.3 辅助因子的筛选:** 所得发酵液的抗菌活性因辅助因子的种类不同而有明显差异(图 1),不同浓度 NaCl、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>对菌株发酵液抑菌活性无显著影响,而 0.40%浓度甘油引起发酵液抑菌活性显著降低。随着 CaCO<sub>3</sub>浓度的增加,发酵液抑菌活性升高,进一步对比不同 CaCO<sub>3</sub>浓度最终发酵液 pH 值发现,加入 0.30% CaCO<sub>3</sub>发酵液最终 pH 为 6.8,菌丝体的量较多。这表明 CaCO<sub>3</sub>在发酵过程中能调节 pH,有利于菌株 HD-087 产生抗菌物质。

## 2.2 正交试验优化发酵培养基

抗菌活性最强的是 6 号培养基,抗菌活性最弱的是 1 号培养基(表 2)。其中 1 号培养基配方所含营养成分均为最少,说明较低的营养成分含量不利于菌株产生抗菌物质。由各列 *K* 值可以看出,随着各营养成分含量的升高,发酵液的抗菌活性先增长后下降,说明过高的营养物质含量同样不

利于菌株产抗菌物质。由极差 *R* 值可以看出,培养基配方中的 4 种组分对发酵液抗菌活性影响力的强弱顺序为:淀粉>黄豆粉>碳酸钙>酵母粉。方差分析结果表明 A、B、C、D 四个因素对拮抗效果均达到显著水平,分析其原因可能是通过单因素优化后将正交试验所选主因素水平范围大幅缩小,所以统计结果不显著。但是从拮抗圈直径仍可以看出不同配方组合对拮抗效果具有比较明显的影响,通过极差直观分析得出培养基配方最佳组合为 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>D<sub>2</sub>,即淀粉 1.00%,黄豆粉 0.80%,酵母粉 0.12%,CaCO<sub>3</sub> 0.40%。

## 2.3 最佳培养条件的筛选

**2.3.1 最佳初始 pH 值:** 由图 2 可见当培养液初始 pH 为 7.0 时,发酵液抑菌活性最高,进一步细化发现 pH 6.8 为最佳值,过高或过低均不利于抗生素的产生。pH 6.8 与发酵培养基的自然 pH 接近,所以发酵培养基配制后不用调 pH,可直接接种使用。

**2.3.2 最佳装液量:** 在转速为 180 r/min 时,装液量为 40 mL 时发酵液抑菌活性最大(图 2)。装液量为 20 mL 时溶氧量虽然充足但抑菌活性降低。

表 2 培养基配方正交实验结果  
Table 2 Results of the medium orthogonal experiment

培养基号 Numbers	因素 Factor				拮抗圈平均直径 Average antagonistic diameter (mm)
	淀粉 Starch (%)	黄豆粉 Soybean flour (%)	酵母粉 Yeast extract (%)	碳酸钙 CaCO <sub>3</sub> (%)	
	A	B	C	D	
1	1 (0.80)	1 (0.30)	1 (0.08)	1 (0.30)	25.54±0.37
2	1 (0.80)	2 (0.50)	2 (0.10)	2 (0.40)	32.18±0.42
3	1 (0.80)	3 (0.80)	3 (0.12)	3 (0.50)	32.58±0.18
4	2 (1.00)	1 (0.30)	2 (0.10)	3 (0.50)	32.50±0.20
5	2 (1.00)	2 (0.50)	3 (0.12)	1 (0.30)	34.55±0.11
6	2 (1.00)	3 (0.80)	1 (0.08)	2 (0.40)	35.16±0.24
7	3 (1.20)	1 (0.30)	3 (0.12)	2 (0.40)	31.50±0.31
8	3 (1.20)	2 (0.50)	1 (0.08)	3 (0.50)	31.02±0.12
9	3 (1.20)	3 (0.80)	2 (0.10)	1 (0.30)	30.52±0.47
$K_1^a$	90.30	89.54	91.72	90.61	
$K_2$	102.21	97.75	95.20	98.84	
$K_3$	93.04	98.26	98.63	96.10	
$K'_1^b$	30.10	29.85	30.57	30.20	
$K'_2$	34.07	32.58	31.73	32.95	
$K'_3$	31.01	32.75	32.88	32.03	
$R^c$	3.97	2.91	2.31	2.75	

注: <sup>a</sup>:  $K_1$  表示各因素的第 1 水平 3 次试验结果之和,  $K_2$  表示各因素的第 2 水平 3 次试验结果之和,  $K_3$ 、 $K_4$  依次类推; <sup>b</sup>:  $K'_1$  表示各因素的第 1 水平 3 次试验结果之平均数,  $K'_2$  表示各因素的第 2 水平 3 次试验结果之平均数,  $K'_3$ 、 $K'_4$  依次类推; <sup>c</sup>:  $R$  表示各因素的最好水平与最差水平之差, 即  $K'$  最大与  $K'$  最小之差。

Note: <sup>a</sup>:  $K_1$  means the sum of 3 test results at level 1 of each factor;  $K_2$  means the sum of 3 test results at level 2 of each factor;  $K_3$ ,  $K_4$ , and so on; <sup>b</sup>:  $K'_1$  means the average of 3 test results at level 1 of each factor;  $K'_2$  means the average of 3 test results at level 2 of each factor;  $K'_3$ ,  $K'_4$  and so on; <sup>c</sup>:  $R$  means the difference between the best and worst levels of each factor.

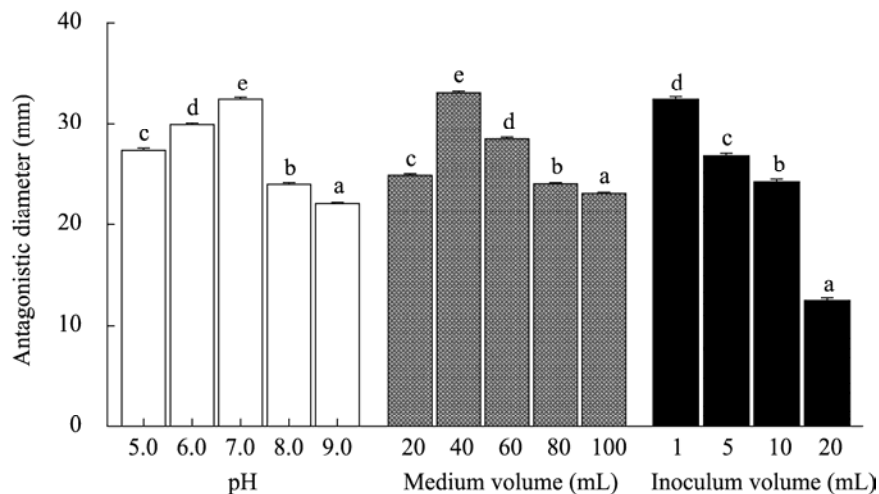


图 2 pH、装液量和接种量对发酵液抗菌活性的影响

Fig. 2 Effects of pH, medium volume and inoculum volume on the antimicrobial activity of broth

随着装液量的增加,发酵过程中溶氧量不足,菌体生长受到抑制,抗生素产量逐渐降低。因此在本试验条件下,每三角瓶装液量 40 mL 较为合理,可满足发酵过程中对溶氧的要求。

**2.3.3 最佳接种种龄和接种量:**当种子液培养时间在 24 h 时,发酵液抑菌活性最高,高或低于 24 h,抑菌活性均较低。因此,种龄对发酵培养及产物形成具有非常明显的影响,在本试验条件下确定种子液的培养时间以 24 h 为宜。在 1–20 mL 接种量范围内,接种量与抗生素产量成反比(图 2),因此选用 1 mL 的接种量最好。

**2.3.4 最佳发酵温度、时间及转速:**分别在不同温度下进行发酵,结果表明发酵温度在 28 °C 时最有利抗生素的产生,这也是菌株最适生长温度(图 3)。在发酵过程中,每隔 24 h 对发酵液抑菌活性进行测定,结果表明 1–2 d 无抗生素产生,3–5 d 内随着时间的延长抗生素产生量逐渐增大,并于第 5 天达到最高值,其后趋于稳定进入平台期(图 3)。在所设的 5 个不同处理中,当摇床转速为 180 r/min 时,发酵液活性显著高于其

它处理(图 3)。因此可以确定 28 °C 为最佳发酵温度,最佳发酵时间为 5 d,而 180 r/min 为最佳转速。

## 2.4 发酵液对病菌 HU-M 抑制作用

**2.4.1 形态影响:**显微观察结果表明正常生长的病菌 HU-M 菌丝均匀顺直,分枝较少(图 4A、B、C),发酵液处理后的 HU-M 菌丝分枝增加并且出现泡状结构(图 4D),菌丝顶端畸形且比正常菌丝粗大(图 4E),部分菌丝细胞质渗漏(图 4F)。孢子萌发试验结果表明未经发酵液处理的 HU-M 孢子正常萌发,而经过发酵液处理的孢子萌发受抑制,5 倍稀释液 24 h 抑制率高达 72.1% (表 3)。

**2.4.2 对病菌 HU-M 菌丝细胞膜透性影响:**电导率的变化反映细胞膜渗透性的改变。当加入 1 mL 发酵液,在培养 1 h 或/和 2 h 后, HU-M 培养液的电导率值及其变化值均显著高于对照(表 4),说明发酵液使 HU-M 菌丝细胞膜渗透性增大,导致电解质渗漏,对病原菌丝造成损害。而且其效果随发酵液加入剂量的逐渐增大而愈加明显。

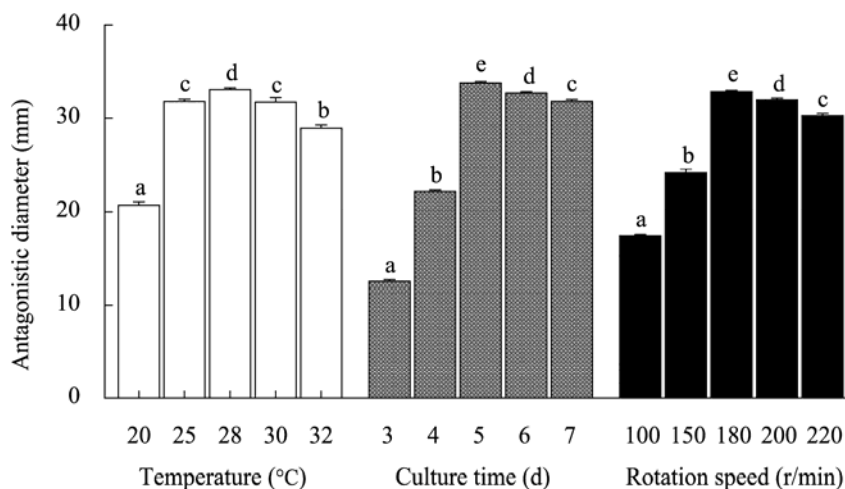


图 3 温度、培养时间和转速对发酵液抗菌活性的影响

Fig. 3 Effects of temperature, culture time or rotation speed on the antimicrobial activity of broth

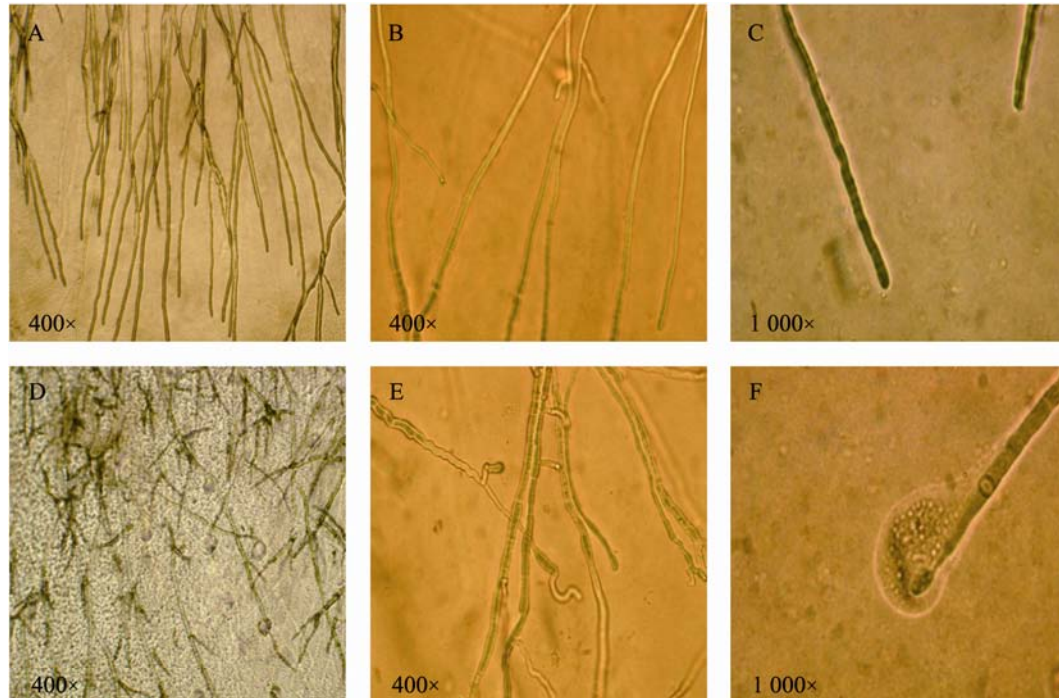


图 4 发酵液对菌丝形态影响

Fig. 4 Effect of broth on morphology of *F. oxysporum* strain HU-M

注: A-C: 正常菌丝形态; D-F: 发酵液处理后菌丝形态.

Note: A-C: Normal hyphae of strain HU-M; D-F: Morphological deformities of strain HU-M hyphae treated by broth.

表 3 发酵液对黄瓜枯萎病菌 HU-M 分生孢子萌发的影响  
Table 3 Effect of broth on the conidial germination of *F. oxysporum* strain HU-M

处理 Treatment	CK	200 倍液	100 倍液	20 倍液	10 倍液	5 倍液
		200×	100×	20×	10×	5×
4 h						
Germination (%)	24.2±1.7	13.5±2.2	9.1±1.5	5.6±1.5	2.4±1.4	0
Inhibition (%)	/	46.7±2.2	64.0±1.5	77.9±1.5	90.5±1.4	100
8 h						
Germination (%)	100	93.0±3.6	86.8±3.2	69.1±2.7	39.4±2.5	18.2±2.2
Inhibition (%)	/	7.0±3.6	13.2±3.2	30.9±2.7	60.6±2.5	81.8±2.2
12 h						
Germination (%)	100	100	98.1±2.4	94.3±3.8	91.2±3.7	23.8±2.5
Inhibition (%)	/	0	1.9±2.4	5.7±3.8	8.8±3.7	76.2±2.5
24 h						
Germination (%)	100	100	100	100	100	27.9±5.7
Inhibition (%)	/	0	0	0	0	72.1±5.7



表4 发酵液处理对黄瓜枯萎病菌 HU-M 培养液电导率值的影响  
Table 4 Effect of broth on the electric conductivity of *F. oxysporum* strain HU-M culture medium

发酵液量 Fermentation liquor quantity (mL)	电导率值			电导率变化	
	Value of electric conductivity (ms/cm)			Changes of electric conductivity (%)	
	0 h	1 h	2 h	1 h	2 h
0	29.4±0.1	29.7±0.2	29.9±0.4	1.02	1.70
1.0	147.3±2.1	157.7±2.2	160.6±2.1	7.06	9.03
1.5	182.1±2.6	198.4±2.4	201.9±2.8	8.95	10.87
3.0	223.0±3.2	255.0±3.1	260.0±3.4	14.35	16.59
6.0	306.0±3.5	357.0±3.9	365.0±3.5	16.66	19.28

### 3 结论与讨论

生物农药在植物病害的生物防治中具有重要作用<sup>[15]</sup>。在利用拮抗链霉菌进行生物防治过程中,通过发酵获得尽可能多的抗菌物质是研究其抑菌机理和工业化生产的基础<sup>[16]</sup>。微生物发酵的生长繁殖条件和活性物合成条件并不完全相同<sup>[13,16-18]</sup>,对于同为链霉菌属而不同种的菌株产抗菌物质条件也存在差异<sup>[19-21]</sup>,如李周等<sup>[22]</sup>研究表明不同培养基对萎彻氏链霉菌 ATCC10739 产 Borrelidin 影响很大,附加碳源尤其是添加 1% 的甘油能显著提高 Borrelidin 产量,附加氮源对产量提高作用不明显。而本研究中添加 0.4% 浓度甘油引起比基尼链霉菌菌株 HD-087 发酵液抑菌活性显著降低,因此,对于不同菌种情况需进行摇瓶发酵先行探索。本文对生防菌株比基尼链霉菌 HD-087 的发酵培养基进行了优化,改进了发酵培养基的配方为:淀粉 1.00%、黄豆粉 0.80%、酵母粉 0.12%、CaCO<sub>3</sub> 0.40%。对发酵条件的研究表明:pH 为 6.8, 180 r/min、28 °C 条件下,250 mL 三角瓶装液量为 40 mL,接种 1 mL 种龄为 2 d 的种子,发酵 5 d 为最佳培养条件。从上述结果中可以看出,比基尼链霉菌菌株 HD-087 对碳源、氮源等营养元素的需求并不苛刻,在基础物料上就能较好生长,这为降低生产成本和进一步规模化生产提供了保障,但是本文结果是在三角瓶培

养水平上获得,要实现产业化开发还须进行发酵罐条件下实验,有关工作正在进行中。

作用于细胞膜的抗生素能够破坏细胞膜超微结构,造成细胞内成分渗漏<sup>[18]</sup>;或者作为特异离子运载体<sup>[23]</sup>,影响细胞内外离子的正常交换,导致细胞调节渗透能力的丧失。Lee 等<sup>[14]</sup>发现二甲酰亚胺杀菌剂能氧化病原菌细胞膜导致细胞质渗漏造成细胞死亡。本文发现比基尼链霉菌菌株 HD-087 的发酵液能导致病菌 HU-M 菌丝分枝增多并且出现泡状结构,菌丝畸形,部分菌丝细胞质渗漏,明显抑制分生孢子的萌发。进一步试验发现发酵液处理后 HU-M 培养液电导率显著增大,说明发酵液中的抗生素能够增大 HU-M 细胞膜的渗透性,在黄瓜枯萎病菌 HU-M 细胞膜上可能存在着该抗生素的作用位点。有研究表明<sup>[24]</sup>一些抗生素如青霉素 (Penicillin)、多氧霉素 (Polyoxin) 等能抑制微生物细胞壁的合成,使细胞壁变薄或失去完整性而造成细胞膜暴露,菌丝尖端膨大。本文中病原菌丝出现的泡状结构是否由比基尼链霉菌菌株 HD-087 产生的抗生素引起,该抗生素是否还对菌丝蛋白质,核酸的合成等造成影响有待于进一步研究。

### 参考文献

- [1] Ahn IP, Chung HS, Lee YH. Vegetative compatibility groups and pathogenicity among isolates of

- Fusarium oxysporum* f. sp. *Cucumerinum*[J]. Plant Disease, 1998, 82(2): 244-246.
- [2] Liu L, Kloeppe JW, Tuzun S. Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth-promoting rhizobacteria[J]. Phytopathology, 1995, 85(6): 695-698.
- [3] Hammad AMM, El-Mohandes MAO. Controlling *Fusarium* wilt disease of cucumber plants via antagonistic microorganisms in free and immobilized states[J]. Microbiological Research, 1999, 154(2): 113-117.
- [4] Singh PP, Shin YC, Park CS, et al. Biological controls of *Fusarium* wilt of cucumber by chitinolytic bacteria[J]. Phytopathology, 1999, 89(1): 92-99.
- [5] 王倡宪, 李晓林, 宋福强, 等. 两种丛枝菌根真菌对黄瓜苗期枯萎病的防效及根系抗病相关酶活性的影响[J]. 中国生态农业学报, 2012, 20(1): 53-57.
- [6] 柳春燕, 郭敏, 林学政, 等. 拟康氏木霉和枯草芽孢杆菌对黄瓜枯萎病的协同防治作用[J]. 中国生物防治, 2005, 21(3): 206-208.
- [7] 李晓虹, 裴永娜, 李学锋, 等. 几株农用拮抗链霉菌的初步研究[J]. 微生物学杂志, 2006, 26(1): 26-28.
- [8] Chen F, Wang M, Zheng Y, et al. Quantitative changes of plant defense enzymes and phytohormone in biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt by *Bacillus subtilis* B579[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 26(4): 675-684.
- [9] Zhao S, Du CM, Tian CY. Suppression of *Fusarium oxysporum* and induced resistance of plants involved in the biocontrol of Cucumber *Fusarium* Wilt by *Streptomyces bikiniensis* HD-087[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28(9): 2919-2927.
- [10] Ariff AB, Webb C. Effect of initial carbon and nitrogen sources concentrations on growth of *Aspergillus awamori* and glucoamylase production[J]. Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology, 1998, 6(2): 161-169.
- [11] Rosfarizan M, Ariff AB. Kinetics of kojic acid fermentation by *Aspergillus flavus* using different types and concentrations of carbon and nitrogen sources[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2000, 25(1): 20-24.
- [12] 胡蓉, 陈长华, 张琪, 等. 丙三醇对螺旋霉素生物合成过程的影响[J]. 华东理工大学学报: 自然科学版, 2009(1): 30-35.
- [13] 陈长华, 肇玉朋, 张志勇, 等. 螺旋霉素发酵培养基的改进[J]. 中国抗生素杂志, 1994, 19(4): 271-274.
- [14] Lee HJ, Choi GJ, Cho KY. Correlation of lipid peroxidation in *Botrytis cinerea* caused by dicarboximide fungicides with their fungicidal activity[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(2): 737-741.
- [15] 刘志恒. 放线菌-微生物药物的重要资源[J]. 微生物学通报, 2005, 32(6): 143-145.
- [16] 叶云峰, 黎起秦, 袁高庆, 等. 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.
- [17] 段海明, 王开运, 于彩虹. 耐盐性毒死蜱降解菌 HY-1 的产酶培养基及发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2011, 38(3): 355-361.
- [18] 徐铮, 曹永兵, 姜远英. 麦角甾醇生物合成途径中的抗真菌药作用靶酶[J]. 国外医药抗生素分册, 2001, 22(5): 193-197.
- [19] 朱春玉, 朱俊丰, 马杰良, 等. 生防链霉菌 F-15 摇瓶发酵条件的优化[J]. 植物保护, 2010, 36(6): 58-61.
- [20] 孟庆芳, 张汀, 杨文香, 等. 拮抗链霉菌 S23 发酵条件的研究[J]. 中国生物防治, 2002, 18(2): 79-82.
- [21] 穆燕魁, 王占武, 张翠绵, 等. 根际益生菌链霉菌 S506 固体发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2008, 35(10): 1600-1605.
- [22] 李周, 赵圣印. 娄彻氏链霉菌 ATCC10739 产抗生素 Borrelidin 发酵条件优化及其分离纯化[J]. 微生物学通报, 2011, 38(7): 1051-1055.
- [23] 甘亚, 吕丁. 抗真菌药物的作用机制[J]. 国外医药抗生素分册, 1998, 19(6): 460-465.
- [24] 顾觉奋. 抗生素[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2001: 13-20.