

链霉菌 Js-1^T 发酵条件及其对疣孢霉病的防治效果研究

李兵兵^{1,2}, 温志强^{1*} (1. 福建农林大学, 福建福州 350002; 2. 江苏省淮安市疾病预防控制中心, 江苏淮安 223001)

摘要 [目的]探讨链霉菌 Js-1^T 的发酵条件及防治效果。[方法]通过单因素试验优化链霉菌菌株 Js-1^T 防治疣孢霉病的发酵培养基和条件,测定其发酵液对疣孢霉菌(*Mycogone perniciosa*)的田间防治效果。[结果] Js-1^T 菌株的最佳培养基配方为:甘露糖 30.0 g, KNO₃ 2.0 g, MgSO₄ 1.5 g, K₂HPO₄ 1.0 g, NaCl 0.1 g, 水 1 000 ml;最佳发酵条件为:30 ℃, pH=8, 250 ml 三角瓶装液量为 100 ml。发酵液对疣孢霉菌的田间防治效果显著,对Ⅰ类、Ⅱ类、Ⅲ类 3 个类群疣孢霉菌引起的疣孢霉病的防治效果分别达 68.77%、83.84%、85.62%。[结论]链霉菌 Js-1^T 在疣孢霉病防治上具有很好的应用前景。
关键词 链霉菌 Js-1^T; 发酵优化; 疣孢霉菌; 生物防治
中图分类号 S436.46 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)27-094-03

Optimization on Fermentation Conditions of *Streptomyces* Js-1^T and Inhibition of the Fermented Liquid against *Mycogone perniciosa*
LI Bing-bing^{1,2}, WEN Zhi-qiang^{1*} (1. Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002; 2. Huai'an Center for Disease Control and Prevention, Huai'an, Jiangsu 223001)
Abstract [Objective] The aim was to study fermentation conditions and control effect of *Streptomyces* Js-1^T. [Method] In order to increase the productivity of activities substance of strain Js-1^T, the composition of fermenting solution and fermenting conditions were optimized by single factor. The inhibition of its fermented liquid against *Mycogone perniciosa* was also tested. [Result] The optimum fermenting solution were Mannose 30.0 g, KNO₃ 2.0 g, MgSO₄ 1.5 g, K₂HPO₄ 1.0 g, NaCl 0.1 g, and water 1 000 ml; the optimal fermenting conditions were temperature 30 ℃, pH=8, and 100 ml liquid medium in 250 ml flask. The inhibition of its fermented liquid against *Mycogone perniciosa* I, II and III were 68.77%, 83.84% and 85.62%, respectively. [Conclusion] *Streptomyces* strain Js-1^T had certain application prospect in control of *Mycogone perniciosa*.
Key words *Streptomyces* strain Js-1^T; Fermenting optimization; *Mycogone perniciosa*; Biological control

双孢蘑菇疣孢霉病是由疣孢霉菌感染引起的一种世界性病害^[1-2],近年来我国双孢蘑菇疣孢霉病发生日趋严重,已成为制约我国双孢蘑菇生产发展的重要因素之一^[3]。目前,疣孢霉病主要使用化学药剂来防治,但化学药剂容易造成农药残留和环境污染。目前利用生物防治控制疣孢霉病的研究较少,蔡少芬等^[4]分离到一株对疣孢霉菌有抑制作用的枯草芽孢杆菌,王勇等^[5]研究发现裂褶菌发酵液对疣孢霉菌丝生长的抑制率达 48.96%。Js-1^T 菌株是从银耳栽培料中分离得到的一株链霉菌,初步研究发现该菌株对疣孢霉菌具有很强的抑制作用。笔者对 Js-1^T 菌株的发酵培养基和条件进行了初步优化,并测定了发酵液对疣孢霉菌的防治效果,以期对 Js-1^T 菌株的进一步开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株。链霉菌 Js-1^T 菌株,从银耳杨梅霜病发病菌筒分离获得并保存于中国典型培养物保藏中心(保藏号: CCTCCM2011365)。疣孢霉菌、双孢蘑菇 2796 菌株均由福建农林大学菌物研究中心提供。

1.1.2 培养基。葡萄糖马铃薯培养基(PDA):马铃薯 200.0 g,葡萄糖 20.0 g,琼脂 20.0 g,水 1 000 ml, pH 自然。Bennett 培养基:葡萄糖 10.0 g,酵母浸膏 1.0 g,牛肉浸膏 1.0 g,酶水解酪素 2.0 g,水 1 000 ml。发酵基础培养基:碳源 25.0 g,氮源 3.0 g, MgSO₄ 1.5 g, K₂HPO₄ 1.0 g, NaCl 0.1 g, 水 1 000 ml,

pH 7。

1.2 方法

1.2.1 菌株活化。将 Js-1^T 菌株接种于液体 Bennett 培养基中,在转速为 160 r/min、温度为 30 ℃ 的恒温摇床中培养 4 d。吸取 50 μl 培养好的液体菌种涂布于 PDA 平板上,30 ℃ 培养 7 d,供试验用。

1.2.2 发酵液活性测定。以疣孢霉菌作为指示菌,采用生长速率法^[5-6]测定发酵液的活性。用直径为 0.22 μm 的一次性细菌过滤器过滤发酵液,取 13 ml 上述无菌发酵液添加到 100 ml 温度为 40 ℃ 左右的固体 PDA 中,充分混合均匀后倒平板。待培养基凝固后,接种直径为 1 cm 的疣孢霉菌菌饼,每个处理 5 次重复。同时,以添加 13 ml 无菌水的培养基作为对照。25 ℃ 下培养,待空白对照接近长满培养皿时,测量菌落半径,并计算抑菌率。

抑制率 = (对照组菌落直径 - 处理组菌落直径) / (对照组菌落直径 - 原菌饼直径) × 100%^[7]

1.2.3 种子培养液的制备。用无菌接种环挑取 Js-1^T 菌株的孢子接到装有 100 ml 发酵基础培养基的 250 ml 三角瓶中,160 r/min、30 ℃ 培养 4 d。

1.2.4 碳源筛选。在发酵基础培养基中分别添加 2% (W/V) 的可溶性淀粉、蔗糖、葡萄糖、麦芽糖、甘露醇、甘油作为唯一碳源,按 6 ml/100 ml 接种量接种种子发酵液,30 ℃ 培养 14 d。按照“1.2.2”方法测定发酵液的抑菌活性。

1.2.5 氮源筛选。在发酵基础培养基中分别添加 0.3% (W/V) 的蛋白胨、硫酸铵、硝酸钾、酵母提取物作为唯一氮源,按 6 ml/100 ml 接种量接种种子发酵液,30 ℃ 培养 14 d。按照“1.2.2”方法测定发酵液的抑菌活性。

1.2.6 碳源添加量试验。将“1.2.4”筛选出的碳源按

基金项目 国家支撑计划项目(2013BAD16B03)。
作者简介 李兵兵(1986-),男,江苏淮安人,硕士,从事应用微生物学与基因工程研究。*通讯作者,教授,从事食用菌及病虫害防治研究。
收稿日期 2015-08-03

1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、4.0%、5.0% (W/V) 添加量加入培养基,按 6 ml/100 ml 接种量接种种子发酵液,30 ℃ 培养 14 d。筛选出最适碳源添加量。

1.2.7 氮源添加量试验。将“1.2.5”筛选出的氮源按 0.1%、0.2%、0.3%、0.5%、0.6% (W/V) 添加量加入培养基,按 6 ml/100 ml 接种量接种种子发酵液,30 ℃ 培养 14 d。筛选出最适氮源添加量。

1.2.8 温度对发酵液活性的影响试验。以筛选出的碳源、氮源按照最适添加量配制培养基,按 100 ml/250 ml 装液量接种 6 ml 种子发酵液,分别测定 20、25、28、30、35 ℃ 条件下发酵液的抑菌活性。

1.2.9 初始 pH 对发酵液活性的影响试验。将最适培养基的 pH 分别调节至 5、6、7、8、9,接种 6 ml 种子发酵液,30 ℃ 恒温培养 14 d。培养结束后将发酵液的 pH 调至中性,测定发酵液的活性。

1.2.10 装液量对发酵液活性的影响试验。分别将 50、100、150、200 ml 的培养基装入 250 ml 三角瓶中。按选出的最佳接种量接入种子发酵液,30 ℃ 恒温培养 14 d。测定发酵液的活性。

1.2.11 发酵液对 3 个类群疣孢霉菌的田间防治试验。分别用 3 个类群疣孢霉菌的孢子悬液感染双孢蘑菇覆土,然后用 Js-1^T 菌株发酵液处理覆土,每个处理设置 20 m² 的出菇面积,10 d 后按 5 点取样法统计新长出双孢蘑菇子实体的病菇和健菇的数目,计算发病率和防治效果。

2 结果与分析

2.1 碳源筛选 由图 1 可知,甘油作为碳源时,发酵液对疣孢霉抑制作用最低(2.01%);甘露糖作为碳源时,发酵液抑菌活性最高(23.43%);其余依次为麦芽糖、淀粉、蔗糖和葡萄糖。

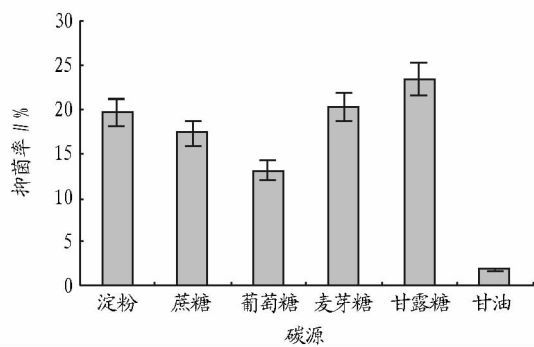


图1 不同碳源对发酵液抑菌活性的影响

2.2 氮源筛选 由图 2 可见,在供筛选的 4 种氮源中,(NH₄)₂SO₄、KNO₃ 2 种无机氮源比有机氮源酵母提取物和蛋白胨抑菌效果好,氮源为 KNO₃ 时 Js-1^T 菌株发酵液的抑菌活性最强,抑菌率为 15.20%。

2.3 碳源添加量 碳源添加量对发酵液的抑菌活性有显著影响(图 3),添加量在 10~30 g/L 时,随着添加量的增加,发酵液抑菌活性逐渐增强,添加量为 30 g/L 时发酵液抑菌活性达到最高(17.64%)。继续添加甘露糖,发酵液抑菌活性开始下降。

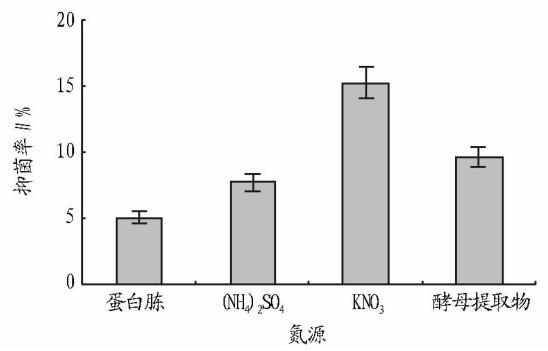


图2 不同氮源对发酵液抑菌活性的影响

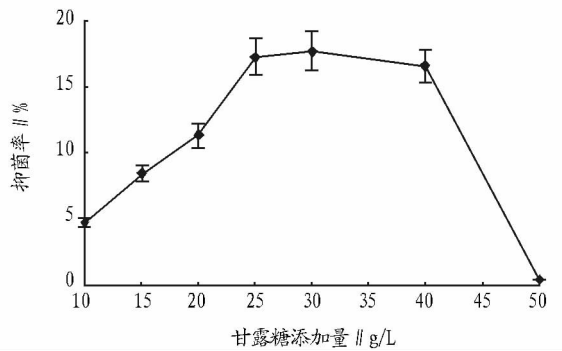


图3 甘露糖添加量对发酵液抑菌活性的影响

2.4 氮源添加量 根据“2.2”试验结果选择 KNO₃ 作为氮源,添加量为 2.0 g/L 时,发酵液对疣孢霉抑菌效果最佳,抑菌率为 20.76% (图 4),之后随添加量的增加,发酵液的抑菌活性开始降低。

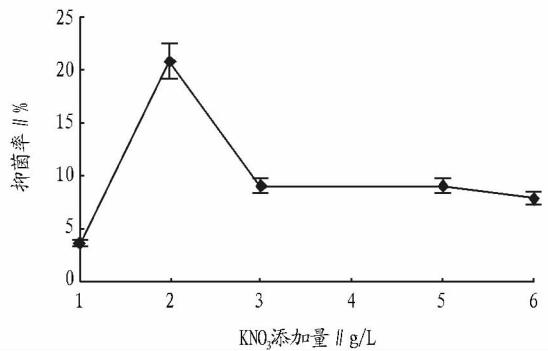


图4 KNO₃ 添加量对发酵液抑菌活性的影响

2.5 温度对 Js-1^T 菌株发酵液抑菌活性的影响 由图 5 可知,30 ℃ 为 Js-1^T 菌株发酵产生活性物质的最佳温度,此时发酵液的抑菌活性为 26.28%。

2.6 初始 pH 对 Js-1^T 菌株发酵液抑菌活性的影响 初始 pH 对 Js-1^T 菌株发酵液的抑菌活性有显著影响。在酸性和强碱环境中发酵液的抑菌活性较低,初始 pH 为 8 时发酵液的抑菌活性最强,但当发酵液初始 pH 等于 9 时,发酵液对疣孢霉几乎没有抑制作用(图 6)。

2.7 装液量对 Js-1^T 菌株发酵液抑菌活性的影响 在 250 ml 三角瓶中装 100 ml 发酵液时,对疣孢霉菌的抑制活性最强,再增加装液量,抑菌活性则降低(图 7),说明 Js-1^T 菌株

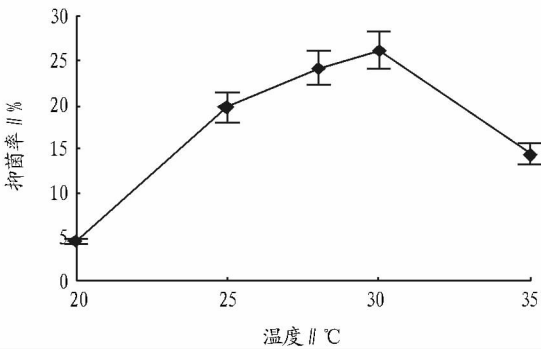


图5 温度对发酵液抑菌活性的影响

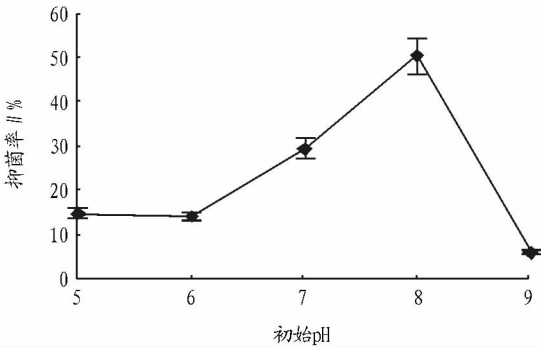


图6 初始pH对发酵液抑菌活性的影响

发酵时对氧气需求较高。因此,Js-1^T菌株发酵时的装液量选择100 ml/250 ml。

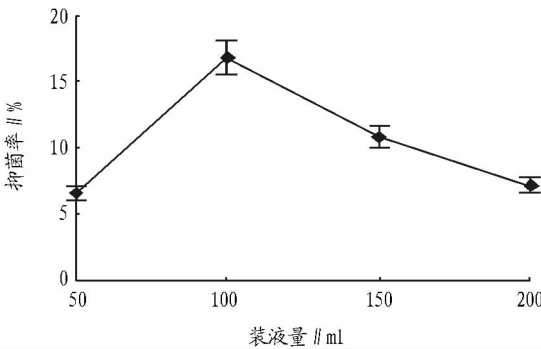


图7 装液量对发酵液抑菌活性的影响

2.8 发酵液对3个类群疣孢霉菌的田间防治效果 由表1可知,Js-1^T菌株发酵液使双孢蘑菇的疣孢霉菌发病率明显降低。其中,对疣孢霉I类引起的栽培中双孢蘑菇2796的防治效果相对较低,为68.77%,对II类和III类疣孢霉菌的防治效果较高,分别达83.84%、85.62%。由此可见,Js-1^T菌株发酵液在孢霉菌的防治方面具有很好的应用价值。

3 结论与讨论

通过单因素筛选初步确定了Js-1^T菌株发酵的最佳培养基配方为:甘露糖30.0 g, KNO₃ 2.0 g, MgSO₄ 1.5 g, K₂HPO₄ 1.0 g, NaCl 0.1 g, 水1 000 ml;最佳发酵条件为:温度30℃,

pH=8, 250 ml三角瓶中装100 ml发酵液。田间防治试验结果表明,Js-1^T菌株发酵液对I类、II类、III类3个类群疣孢霉菌引起的栽培中双孢蘑菇2796的疣孢霉菌病的防治效果显著,防治效果分别达68.77%、83.84%、85.62%。发酵是一个十分复杂的过程,许多因素会影响到最终试验结果^[6-7]。该研究通过单因素试验方法确定了Js-1^T菌株的最佳发酵条件,提高了Js-1^T菌株代谢产生拮抗物质的能力,但是还需通过正交或响应面法进一步优化发酵条件。

表1 Js-1^T菌株发酵液对3类疣孢霉菌引起双孢蘑菇病害的防治效果

疣孢霉菌类群	健康菇数朵	发病菇数朵	发病率/%	防治效果/%
I类	803	304	27.46	68.77
II类	912	151	14.21	83.84
III类	974	141	12.65	85.62
CK	127	926	87.94	

自1943年Waksman首先发现链霉菌可以产生链霉素以来,放线菌已经成为公认的新抗生素产生菌的主要来源^[8]。目前已经发现的抗生素有80%以上是由放线菌产生的,其中又以链霉菌属的菌株产生的最多^[9]。农用抗生素作为抗生素的一类,具有活性高、对使用环境的污染少、在环境中不易积累、来源广、可再生等优点^[10],在农业生产中有很好的应用前景。Js-1^T菌株是从银耳发病菌筒中分离到的链霉菌,并且福建农林大学菌物研究中心已经利用多相分类鉴定该菌株为链霉菌属的一个新种,因此,该菌株产生新的抑菌活性物质的可能性较高。从Js-1^T菌株发酵液中提取、鉴定有效活性物是下一步研究的重点。此外,利用链霉菌防治疣孢霉菌病的研究目前尚未见报道,该试验结果对后续发酵中试放大、有效活性物质的分离纯化以及疣孢霉菌病的防治具有重要意义。

参考文献

[1] UMAR M H, GEELS F P, VAN GRIENSVEN L J L D, et al. Pathology and pathogenesis of *Mycogone perniciosa* infection of *Agaricus bisporus* [C]// Proceedings of the 15th International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi. Maastricht, 2000: 561-567.

[2] 黄清铨, 王庆福, 刘新锐, 等. 双孢蘑菇疣孢霉菌病研究进展[J]. 食用菌学报, 2013, 20(2): 69-74.

[3] 范建奇, 张晖, 张振伟, 等. 双孢蘑菇疣孢霉菌病的综合防治技术[J]. 北方园艺, 2012(6): 168-170.

[4] 蔡少芬, 温志强, 张婷, 等. 对一种可以抑制疣孢霉生长的细菌的鉴定[J]. 食用菌学报, 2009, 16(1): 92-94.

[5] 王勇, 杜东兵, 陈杭, 等. 几种高等真菌菌丝及发酵产物对有害疣孢霉菌丝作用研究[J]. 食用菌, 2009(1): 57-59.

[6] 隋丽, 徐文静, 杜茜, 等. 放线菌769防治水稻稻瘟病的发酵条件研究[J]. 吉林农业科学, 2010, 35(4): 36-40, 55.

[7] 郭小芳, 宗兆锋. 5株生防放线菌发酵条件初探[J]. 西藏大学学报(自然科学版), 2010, 25(1): 112-116.

[8] 徐丽华, 李文均, 刘志恒, 等. 放线菌系统学[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 19-20.

[9] 阮继生, 刘志恒, 杨德成. 放线菌研究及应用[M]. 北京: 科学出版社, 1990: 479.

[10] 张宁波. 农用抗生素研究进展[J]. 湖北农业科学, 2006, 45(6): 830-833.