

日本曲霉ZW1发酵滤液的杀线虫活性和发酵条件优化

何琼, 李丙雪, 王冬亚, 吴海燕*

(广西大学农学院/广西农业环境与农产品安全重点实验室, 南宁 530004)

摘要: 根结线虫是一类严重为害作物的寄生线虫, 分布于世界各地, 且寄主范围广。前期试验表明, 日本曲霉 *Aspergillus japonicus* ZW1 发酵滤液对南方根结线虫 *Meloidogyne incognita* 2 龄幼虫 (J2) 具有毒杀作用, 发酵过程中产生表面光滑球形菌丝体和表面辐射状球形菌丝体, 且两种菌丝体发酵滤液的杀线虫效果具有显著差异。表面光滑球形菌丝体的发酵滤液处理南方根结线虫 J2 的校正死亡率在 24 h 达 100%, 显著高于表面辐射状球形菌丝体发酵滤液处理的死亡率 (12.7%)。本研究通过对菌株 ZW1 发酵的温度、转速、培养基、光照和黑暗等条件优化表明, 菌株 ZW1 的最优培养温度 25 °C 和转速 150 r/min, 以 Czapek 培养基为基础培养基的最优碳源为蔗糖 30 g/L 和氮源 KNO₃ 3 g/L, 光照和黑暗条件下培养不影响菌株 ZW1 杀线虫活性; 评价煮沸和 4 °C 保存发酵滤液的杀虫效果结果表明, 发酵液杀线虫活性随着贮藏时间发生变化, 发酵液煮沸对菌株 ZW1 发酵液的杀线虫活性无影响, 4 °C 保存 1 年的发酵滤液处理 J2 的校正死亡率仍保持 87.8%。菌株 ZW1 代谢产物对南方根结线虫 J2 具有良好的毒杀作用, 值得进一步研究和开发利用。

关键词: 日本曲霉; 南方根结线虫; 营养条件优化; 贮藏条件

中图分类号: S476 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-9261(2020)04-0619-09

Nematicidal Activity of *Aspergillus japonicus* ZW1 Fermentation Filtrate and Optimization of Fermentation Conditions

HE Qiong, LI Bingxue, WANG Dongya, WU Haiyan*

(Guangxi Key Laboratory of Agric-Environment and Agric-products Safety, Agricultural College of Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: Root-knot nematodes are parasitic nematodes that seriously damage crops and distribute all over the world, which have a wide range of hosts. Preliminary tests showed that *Aspergillus japonicus* ZW1 fermentation filtrate had strong toxic effects on *Meloidogyne incognita* J2. However, the smooth surface pellet mycelia and radial surface pellet mycelia were produced during the fermentation process, and the fermentation filtrate from the two cultures had significantly different effect on mortality of nematodes. Fermentation filtrate of the strain ZW1 with smooth surface pellet mycelium had great nematicidal activity on *M. incognita* J2, with the corrected mortality of 100% at 24 h after exposure, significantly higher than that of radial surface pellet mycelia (12.7%). The culture conditions, such as temperature, rotation speed, medium, light and darkness of strain ZW1, were screened and analyzed, and the nematicidal activity of fermentation filtrate treated with boiling and 4 °C storage was determined. The results showed that optimal culture temperature and rotation speed of strain ZW1 were 25 °C and 150 r/min, respectively. Based on Czapek medium, the optimal carbon source, nitrogen source and amount were sucrose 30 g/L and KNO₃ 3 g/L, respectively. Nematicidal activity of strain ZW1 fermentation filtrate was not influenced by light and dark conditions, as well as boiling. Treated with strain ZW1 fermentation filtrate after storage at 4 °C for 1

收稿日期: 2019-12-02

基金项目: 国家现代农业产业技术体系广西创新团队 (nycytxgxcxt-d-10-04); 国家自然科学基金 (31660511)

作者简介: 何琼, 博士研究生, E-mail: heqiong3344@163.com; *通信作者, 教授, E-mail: wuhy@gxu.edu.cn。

DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2020.04.024

year, the corrected mortality of J2 treated still reached 87.4%. The fermentation filtrate of strain ZW1 has great nematicidal activity on *M. incognita* J2, which is worthy of further research and development.

Key words: *Aspergillus japonicus*; *Meloidogyne incognita*; nutrient optimization; storage condition

植物寄生线虫每年造成全球农业损失约 1570 亿美元^[1]。根结线虫 *Meloidogyne* spp. 是对世界各地经济具有影响的植物寄生线虫之一^[2]，其中南方根结线虫 *Meloidogyne incognita*、爪哇根结线虫 *M. javanica*、北方根结线虫 *M. hapla* 和花生根结线虫 *M. arenaria* 为主要种，占寄生线虫 95%，引起平均 5% 的作物损失^[3]。根结线虫在蔬菜上的发病率可达 80%~90%^[4]，每年可造成 70% 产量损失^[5]。南方根结线虫是目前严重为害作物的一类植物寄生线虫，其危害面积大，寄主范围广，在热带和亚热带地区造成蔬菜产量损失 5%~43%^[6]。目前，根结线虫病的防治主要依靠化学药剂，对环境 and 人类健康构成严重威胁，高毒高残留的一些化学药剂已被禁用，如溴甲烷^[7]、呋喃丹^[8]。因此，生产上急需环境友好的生防制剂。如捕食、寄生或产毒微生物用于根结线虫病的防治，圆锥节从孢 *Arthrobotrys conoides* 和嗜线虫真菌 *Duddingtonia flagrans* 能够捕食根结线虫 *Meloidogyne* spp.，在 24 h 的捕食率分别为 92%~95% 和 22%~29%^[9]，条纹炭角菌 *Xylaria grammica* KCTC 13121BP 的代谢产物分别处理南方根结线虫 2 龄幼虫和卵，在 72 h 对 2 龄幼虫的 EC₅₀ 为 15.9 μg/mL，在 14 d 对卵的 EC₅₀ 为 5.87 μg/mL^[10]。

利用微生物代谢产物防治植物线虫病害是当前的研究热点。球毛壳菌 *Chaetomium globosum* YSC5 产生的球毛壳菌素 A (chaetoglobosin A)、球毛壳菌素 B (chaetoglobosin B) 和黄柄曲霉素 (flavipin) 均对南方根结线虫表现出很强的杀虫活性，处理 72 h 后的 LC₅₀ 分别为 88.4、107.7 和 99.2 μg/mL^[11]；日本假黄单胞菌 *Pseudoxanthomonas japonensis* 的代谢产物 3-甲基氧杂环丁烷-1, 2-酮 3-methoxycyclobutane-1, 2-dione 处理南方根结线虫 J2 后，48 h 死亡率为 72.2%，LC₅₀ 为 447 μg/mL^[12]。而微生物的活性代谢产物的分泌和积累与培养条件密切相关^[13]。本研究在前期研究已明确菌株 ZW1 发酵液产物具有毒杀南方根结线虫 J2 作用的基础上，通过对该菌株培养的温度、转速、光照和培养基等的条件的筛选，确定其产生杀线虫活性代谢产物的最优培养条件，为菌株 ZW1 的开发应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

日本曲霉 *A. japonicus* ZW1 从土壤中分离获得，GenBank 登录号为 KR708636.1，保存于中国菌种保藏中心（保藏号 CCTCC No. M 2014641）。

1.2 基础发酵液制备

25 °C 恒温培养箱中，菌株 ZW1 在 PDA 平板（培养皿直径 9 cm）培养 5 d，取菌落边缘菌块（直径 0.6 cm），然后转接至装有 100 mL Czapek 培养基（NaNO₃ 0.2 g，KCl 0.05 g，FeSO₄ 0.001 g，K₂HPO₄ 0.1 g，MgSO₄ 0.05 g，蔗糖 3.0 g，H₂O 100 mL）的 250 mL 三角瓶中，然后将三角瓶置于 28 °C 的恒温摇床（型号：MQD-B1NR，上海旻泉仪器有限公司，上海，中国）培养，150 r/min 培养 2 周。

1.3 供试线虫

南方根结线虫来源为广西大学农学院植物线虫研究室。取侵染南方根结线虫 35 d 后的番茄（品种：以色列 F1，广州亚蔬园艺种苗有限公司）植株根系置于 500 mL 烧杯中，用 2% 次氯酸钠浸没根系，快速搅拌 20~30 s，使卵囊被分解后，倒入 500 目筛子，收集虫卵，制得卵悬液^[14]。移至孵化筛，置于 25 °C 黑暗环境下孵化，24 h 收集孵出的新鲜 J2 用于试验。

1.4 培养条件优化

1.4.1 产生不同形状菌丝体的发酵液杀虫活性比较 在菌种培养发酵过程中，发酵液中会产生不同形状的菌丝体，分别统计菌丝体数量和孢子数量，在体视显微镜（SZX2-ILLT，Olympus Corporation，日本东京）下观察记录菌丝体数量，用血球计数板观察记录孢子数量。然后将发酵液分别用 0.45 μm 过滤器过滤，再稀释成 10% 的浓度，检测两组发酵滤液毒杀 J2 活性，每组 3 次重复，方法同 1.5。前期研究发现菌株 ZW1 杀线活性最优的发酵时间是 2 周（未发表），为明确菌株 ZW1 活性物质的最优产生条件，对其他发酵条

件进行优化。

1.4.2 温度对发酵液杀虫活性的影响 设置温度 22 °C、25 °C、28 °C 和 31 °C, 摇床转速 150 r/min, 黑暗培养, 其他条件同 1.2。每个温度处理设置 5 个重复, 发酵 2 周后, 用孔径 0.45 μm 过滤器过滤, 然后稀释成 10% 发酵滤液检测毒杀 J2 活性, 方法同 1.5。整个试验重复进行 2 次。

1.4.3 转速对发酵液杀虫活性的影响 设置转速 100、150、200 r/min, 温度 25 °C, 按照 1.2 的方法培养。每个转速处理设置 5 个重复, 发酵 2 周后, 用孔径 0.45 μm 过滤器过滤, 然后稀释成浓度为 10% 的发酵滤液。检测发酵滤液的毒杀 J2 活性的方法同 1.5。整个试验重复进行 2 次。

1.4.4 营养条件优化 基础培养基为 Czapek 培养基, 蔗糖 30 g/L, NaNO₃ 2 g/L, KNO₃ 0.5 g/L, MgSO₄ 0.5 g/L, FeSO₂ 0.01 g/L, K₂HPO₃ 1.0 g/L。

碳源筛选: 分别以葡萄糖、麦芽糖、乳糖、可溶性淀粉和甘油 5 种碳源等量替代 Czapek 培养基中的蔗糖, 其他成分不变。每种碳源培养基 500 mL, 分别装入 5 个 250 mL 的三角瓶中, 每瓶 100 mL (即 5 个重复), 发酵方法同 1.2, 摇床温度 25 °C, 转速为 150 r/min。发酵 2 周后取出, 用 0.45 μm 过滤器过滤, 并进行杀虫活性试验, 方法同 1.5, 无菌水为对照。整个试验重复进行 2 次。

氮源筛选: 分别以 KNO₃、NH₄NO₃、NH₄Cl、(NH₄)₂SO₄ 和 (NH₄)₂HPO₄ 5 种氮源等量替代 Czapek 培养基中的 NaNO₃, 其他成分不变。每种氮源培养基设置 5 个重复, 然后用 1.2 的方法培养菌株 ZW1, 摇床温度均为 25 °C, 转速为 150 r/min。发酵 2 周后取出, 用 0.45 μm 过滤器过滤, 随后进行杀虫活性试验, 方法同 1.5, 以无菌水为对照。整个试验重复进行 2 次。

正交设计试验: 用筛选出的最佳碳源 A (A₁=1 g、A₂=3 g 和 A₃=5 g) 和氮源 B (B₁=0.1g、B₂=0.2 g 和 B₃=0.3 g) 进行 2 因素 3 水平的正交设计试验。然后按照 1.2 的方法培养菌株 ZW1, 摇床温度均为 25 °C, 转速为 150 r/min。各处理设置 5 个重复, 2 周后取出, 用 0.45 μm 过滤器过滤, 随后按照 1.5 方法进行杀虫活性试验, 无菌水为对照。整个试验重复进行 2 次。

1.4.5 光照和黑暗条件对菌株 ZW1 发酵滤液杀虫活性的影响 设置光照和黑暗条件, 各处理设置 5 个重复, 摇床温度均为 25 °C, 转速为 150 r/min, 按照 1.2 的方法培养。发酵 2 周后, 用孔径 0.45 μm 过滤器过滤, 然后稀释成 10% 发酵滤液检测毒杀 J2 活性, 方法同 1.5。整个试验重复进行 2 次。

1.5 发酵液杀虫活性检测

将新鲜 J2 转移到 96 孔板, 每孔约 50 条。然后每孔加入 200 μL 10% 发酵滤液, 以 20% Czapek 培养基和无菌水作对照, 每个处理重复 4 次, 将 96 孔板置于 25 °C 恒温培养箱。处理 6、12、24 和 48 h 后在显微镜 (Ti-S Nikon, Nikon Instruments Inc., 日本东京) 下观察 J2, 并统计 J2 的死亡数。线虫死亡的判定标准: 线虫僵直, 且用毛针刺激后不活动, 确定线虫死亡^[15]。校正死亡率 (%) = (处理组死亡线虫数 - 对照组死亡率 / 1 - 对照组死亡率) × 100。

1.6 煮沸和贮藏温度对菌株 ZW1 发酵液杀虫活性的影响

1.6.1 煮沸 20 mL 的菌株 ZW1 发酵滤液平均分成 2 份, 一份用微波炉煮沸 10 min, 冷却至室温, 另一份不作处理, 检测这两份发酵滤液对 J2 的毒杀活性, 每组 5 个重复。方法同 1.5。以无菌水为对照。此试验重复进行 3 次。

1.6.2 不同贮藏条件 20 mL 的菌株 ZW1 发酵滤液分成 2 份, 置于 4 °C 条件下的避光纸箱内, 每组 5 个重复。分别放置 1 年、2 年和 3 年后取出, 再用 0.45 μm 过滤器分别过滤, 检测发酵滤液对 J2 的毒杀活性。方法同 1.5。无菌水为对照。整个试验重复进行 3 次。

1.7 数据统计与分析

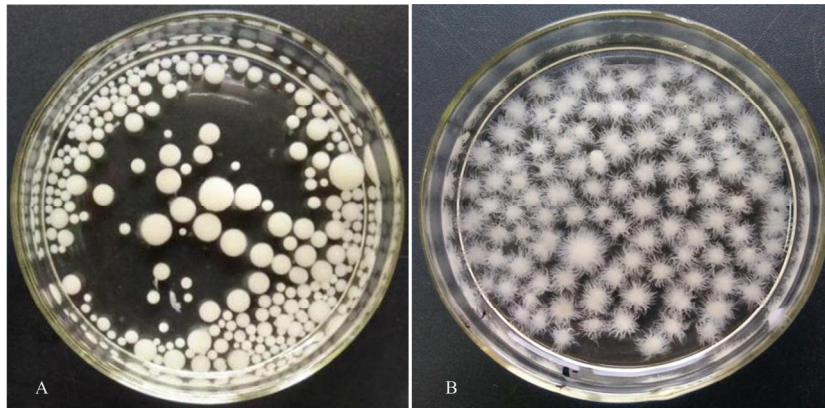
用 SPSS 19.0 进行试验数据的方差分析, 根据 Duncan's 新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平的差异显著性, 用 Sigmaplot 10.0 作图。

2 结果与分析

2.1 产生不同形状菌丝体的发酵液杀虫活性对比

菌株 ZW1 在 28 °C 和 150 r/min 条件下培养 2 周的过程中, 产生了菌丝体形状呈表面光滑的球形 (图

1A) 和表面辐射状的球形 (图 1B)。表面光滑菌丝体发酵液中孢子浓度和菌丝体浓度分别为 19.5×10^5 孢子/mL 和 7.2 个菌丝体/mL; 表面辐射状菌丝体发酵液中孢子浓度和菌丝体浓度分别为 23.6×10^5 孢子/mL 和 7.0 个菌丝体/mL, 不同形状菌丝体发酵液中的孢子浓度和菌丝体浓度均无显著差异 (表 1)。两种不同形态菌丝体的发酵滤液毒杀 J2 的活性具有显著差异。表面光滑的菌丝体的发酵滤液中, J2 在处理 24 h 的校正死亡率达到 100.0%, 显著高于表面辐射状的菌丝体发酵滤液中 J2 校正死亡率 (12.7%, $P < 0.05$) (表 2)。说明某个发酵条件影响了发酵液中毒杀 J2 活性物质的产生。故在后续的试验中对 Czapek 培养基的碳源和氮源进行了优化, 研究光照/黑暗培养、温度和转速等条件对菌株 ZW1 发酵液杀虫活性的影响, 以获得菌株 ZW1 产生毒杀线虫活性最佳培养条件。



A: 球形且表面光滑的菌丝体 The pellet and smooth surface of mycelium shape; B: 球形且表面辐射状菌丝的菌丝体 The pellet and radial mycelia of mycelium shape

图 1 发酵 2 周的本日本曲霉 ZW1 发酵液中不同菌丝体形态

Fig. 1 Different mycelium shape produced by 2 weeks in *A. japonicus* ZW1 fermentation broth

表 1 不同菌丝体形状的日本曲霉 ZW1 的发酵液中孢子数量和菌丝体数量

Table 1 The number of spore and mycelium in *A. japonicus* ZW1 fermentation broth with different mycelium shape

菌丝体形状 Mycelium shape	孢子浓度 Spore concentration (spore/mL)	菌丝体浓度 Mycelium concentration (number/mL)
球形, 表面光滑 Pellet, smooth surface	$(19.5 \pm 9.1) \times 10^5$ a	7.2 ± 0.2 a
球形, 表面辐射状菌丝 Pellet, surface radial mycelia	$(23.6 \pm 1.0) \times 10^5$ a	7.0 ± 0.2 a

注: 同列平均数后的相同字母表示根据 Duncan's 新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平无差异显著。

Note: Mean followed by the same letters in the same column are not significantly different at 0.05 level based on Duncan's new multiple range test.

表 2 不同菌丝体形状的日本曲霉 ZW1 发酵滤液处理南方根结线虫 J2 的校正死亡率 (%)

Table 2 Adjusted mortality rate (%) of *M. incognita* J2 in *A. japonicus* ZW1 fermentation filtrate with different mycelium shape

菌丝体形状 Mycelium shape	处理时间 Incubation time (h)			
	6	12	24	48
球形, 表面光滑 Pellet, smooth surface	68.3 ± 0.4 a	81.8 ± 0.5 a	100.0 ± 0.0 a	100.0 ± 0.0 a
球形, 表面辐射状菌丝 Pellet, surface radial mycelia	4.2 ± 0.2 b	8.5 ± 0.3 b	12.7 ± 0.5 b	18.5 ± 0.9 b

注: 同列平均数后的相同字母表示根据 Duncan's 新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平无差异显著。

Note: Mean followed by the same letters in the same column are not significantly different at 0.05 level based on Duncan's new multiple range test.

2.2 培养条件优化

2.2.1 温度 不同温度条件下, 菌株 ZW1 发酵滤液毒杀 J2 的活性具有影响 (表 3)。在 24 h, 25 °C 条件下所得的发酵滤液处理 J2 的校正死亡率达到 100.0%, 显著高于其他处理 ($P < 0.05$)。在 48 h, 22 °C、28 °C 和 31 °C 条件下的发酵滤液处理 J2 的校正死亡率分别为 53.0%、71.6% 和 9.4%。说明 25 °C 是菌株 ZW1 产生的毒杀 J2 活性物质的最适温度。

2.2.2 转速 不同转速条件下, 所得的菌株 ZW1 发酵滤液的毒杀 J2 活性有差异 (表 4)。在 6、12 和 48 h, 100 和 200 r/min 条件下的发酵滤液处理 J2 的校正死亡率均显著低于 150 r/min 条件下的发酵滤液处理 J2

表 3 不同培养温度的日本曲霉 ZW1 发酵滤液处理南方根结线虫 J2 的校正死亡率 (%)

Table 3 Adjusted mortality rate (%) of *M. incognita* J2 in *A. japonicus* ZW1 fermentation filtrate with different temperatures culture conditions (%)

温度 Temperature (°C)	处理时间 Incubation time (h)			
	6	12	24	48
22	10.0±0.1 c	20.4±0.3 c	32.2±0.8 c	53.0±0.8 c
25	51.1±0.3 a	99.2±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a
28	13.9±0.2 b	25.9±0.1 b	47.4±0.2 b	71.6±0.1 b
31	0.0±0.0 d	0.0±0.0 d	5.9±0.1 d	9.4±0.4 d

注：同列平均数后的相同字母表示根据 Duncan's 新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平无差异显著。

Note: Mean followed by the same letters in the same column were not significantly different at 0.05 level based on Duncan's new multiple range test.

的校正死亡率 ($P < 0.05$)。在 12 h、150 r/min 条件下的发酵滤液处理 J2 的校正死亡率达到 100.0%，显著高于其他处理 ($P < 0.05$)。在 48 h、100、150 和 200 r/min 条件下的发酵滤液处理 J2 的校正死亡率分别为 52.8%、100%和 41.8%。说明 150 r/min 是菌株 ZW1 产生的毒杀 J2 活性物质的最适转速。

2.2.3 营养条件 碳源优化：以 Czapek 培养基为基础培养基，在不同碳源条件下，培养菌株 ZW1 获得的发酵滤液对 J2 的毒杀效果具有显著差异 (图 2)。在 12 h，蔗糖作为碳源时，获得的发酵滤液处理 J2 的校正死亡率为 42.9%，显著高于其他碳源所得的发酵滤液处理 ($P < 0.05$)。处理 24 h 后，麦芽糖、乳糖、葡萄糖、淀粉、甘油作为碳源所得的发酵滤液处理 J2 的校正死亡率分别是和 23.7%、0.0、10.3%、20.5%、2.3%，均显著低于以蔗糖作碳源所得的发酵滤液中 J2 的校正死亡率 85.4% ($P < 0.05$)。说明蔗糖是菌株 ZW1 发酵产生毒杀 J2 活性物质的最适碳源。

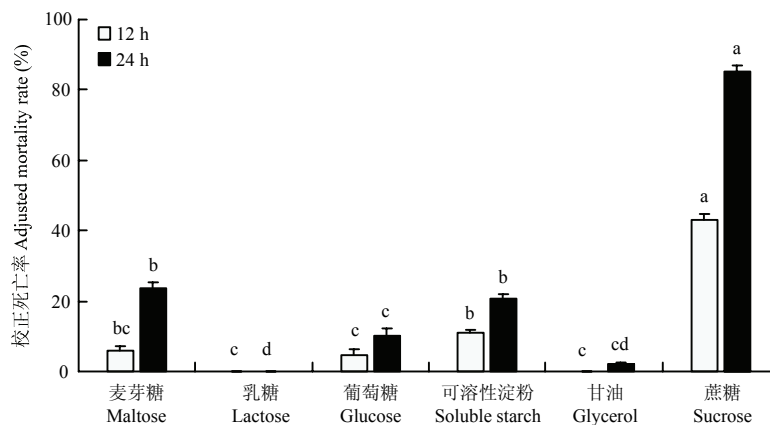
表 4 不同培养转速的日本曲霉 ZW1 发酵滤液处理南方根结线虫 J2 的校正死亡率 (%)

Table 4 Adjusted mortality rate (%) of *M. incognita* J2 in *A. japonicus* ZW1 fermentation filtrate with different revolutions per minute culture conditions

转速 Revolutions (r/min)	处理时间 Incubation time (h)			
	6	12	24	48
100	0.0±0.0 b	11.0±0.4 b	25.2±0.3 b	52.8±2.5 b
150	50.1±0.3 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a
200	0.0±0.0 b	7.1±0.3 c	22.0±0.2 c	41.8±0.2 c

注：同列平均数后的相同字母表示根据 Duncan's 新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平无差异显著。

Note: Mean followed by the same letters in the same column were not significantly different at 0.05 level based on Duncan's new multiple range test.



注：相同柱子上相同字母表示根据 Duncan's 新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平无差异显著。

Note: The same letters on the bars were not significantly different at $P < 0.05$ based on Duncan's new multiple range test.

图 2 不同碳源日本曲霉 ZW1 发酵滤液的处理南方根结线虫 J2 的校正死亡率

Fig. 2 Adjusted mortality rate of *M. incognita* J2 in different carbon source of *A. japonicus* ZW1 fermentation filtrate

氮源优化: 以 Czapek 培养基为基础的培养基, 测得不同氮源的培养基培养菌株 ZW1 所得的发酵滤液对 J2 的毒杀作用具有显著差异 ($P < 0.05$) (表 5)。在 12 h, KNO_3 为氮源的发酵滤液处理 J2 的校正死亡率为 74.1%, 显著高于其他氮源所得发酵滤液处理 ($P < 0.05$)。在 24 h, 分别以 NaNO_3 、 NH_4NO_3 、 NH_4Cl 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 作氮源的发酵滤液处理中 J2 的校正死亡率分别为 53.6%、95.9%、0.0%、71.6%、0.8% 和 78.1%, 显著低于 KNO_3 作氮源所得发酵滤液处理 J2 的校正死亡率 95.9% ($P < 0.05$)。说明 KNO_3 是菌株 ZW1 发酵产生杀毒杀 J2 活性物质的最适氮源。

表 5 不同氮源的日本曲霉 ZW1 发酵滤液处理南方根结线虫 J2 的校正死亡率 (%)

Table 5 Adjusted mortality rate (%) of *M. incognita* J2 in different nitrogen source of *A. japonicus* ZW1 fermentation filtrate

氮源 Nitrogen source	处理时间 Treatment time (h)	
	12	24
NaNO_3	30.1±3.3 c	53.6±6.3 c
KNO_3	74.1±4.8 a	95.9±4.1 a
NH_4NO_3	0.0±0.0 d	0.0±0.0 d
NH_4Cl	51.4±1.4 b	71.6±1.6 b
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.0±0.0 d	0.8±0.2 d
$(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$	51.0±4.3 b	78.1±0.4 b

注: 同列平均数后的相同字母表示根据 Duncan's 新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平无差异显著。

Note: Mean followed by the same letters in the same column were not significantly different at 0.05 level based on Duncan's new multiple range test.

正交试验: 根据上述单因素试验结果, 最佳碳源和氮源各设计 3 个用量, 分别为蔗糖 10、30 和 50 g/L, KNO_3 为 1、2 和 3 g/L, 以此作为 2 因素 3 水平进行正交试验设计 (表 6)。进行正交试验后的不同培养基用于菌株 ZW1 培养, 所得发酵 2 周的发酵滤液用于毒杀 J2。结果显示, 处理组 6 未出现辐射状球形菌丝体, 其发酵滤液在 12 和 24 h 毒杀南方根结线虫 2 龄幼虫的效果显著高于其他处理组, 线虫的校正死亡率分别达到 76.4% 和 98.0% ($P < 0.05$)。说明处理组 6 的碳源和氮源配比 (蔗糖 3 g/100 mL, KNO_3 0.3 g/100 mL) 是培养菌株 ZW1 产生毒杀 J2 活性物质的最佳配比。

表 6 碳源和氮源正交试验结果及评价分析

Table 6 The orthogonal experiment about carbon source and nitrogen source and evaluation of proportion of medium

处理组编号 Treatment number	蔗糖 Sucrose (g/100 mL)	KNO_3 (g/100 mL)	南方根结线虫 J2 的校正死亡率 Adjusted mortality of rate <i>M. incognita</i> J2 (%)	
			12 h	24 h
1	1	0.1	16.3±1.1 c	37.8±1.3 c
2	1	0.2	6.0±1.7 f	7.5±0.9 f
3	1	0.3	0.2±0.1 g	4.6±1.6 f
4	3	0.1	9.0±0.4 e	17.6±2.6 e
5	3	0.2	56.1±0.4 b	63.1±1.8 b
6	3	0.3	76.4±1.1 a	98.0±1.2 a
7	5	0.1	9.3±0.2 e	17.0±0.9 e
8	5	0.2	16.1±0.8 c	29.7±2.1 d
9	5	0.3	13.2±0.6 d	20.2±1.4 e

注意: 同列平均数后的相同字母表示根据 Duncan's 新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平无差异显著。

Note: Mean followed by the same letters in the same column were not significantly different at 0.05 level based on Duncan's new multiple range test.

2.2.4 光照和黑暗对菌株 ZW1 发酵液杀线虫活性的影响 菌株 ZW1 在光照和黑暗条件下培养, 所得的发酵滤液毒杀 J2 的活性无差异 (表 7)。光照和黑暗条件下的发酵滤液处理 48 h, J2 的校正死亡率分别为 89.1% 和 89.8%, 无显著差异。说明光照和黑暗对菌株 ZW1 产生毒杀 J2 活性物质无影响。

2.3 贮藏条件和煮沸对菌株 ZW1 发酵滤液毒杀 J2 活性的影响

2.3.1 不同贮藏温度和时间的菌株 ZW1 发酵滤液对 J2 的毒杀作用 贮藏 1 年、2 年和 3 年后, 菌株 ZW1 发酵滤液的杀虫活性具有差异 (表 8)。在 4 °C 条件下放置 1 年、2 年和 3 年的发酵滤液处理 J2 的校正死亡率在 48 h 分别为 87.4%、60.2%和 45.7%。在 4 °C 条件下, 菌株 ZW1 发酵滤液的杀虫活性随着贮藏年限的增加而降低, 但杀虫活性物质分解缓慢, 贮藏 1 年的发酵滤液对 J2 的致死率在 48 h 仍可达到 87.4%。

表 7 光照和黑暗条件下的日本曲霉 ZW1 发酵滤液处理南方根结线虫 J2 的校正死亡率 (%)

Table 7 Adjusted mortality rate (%) of *M. incognita* J2 in *A. japonicus* ZW1 fermentation filtrate with light and dark conditions

培养条件 Conditions of culture	处理时间 Treatment time (h)			
	6	12	24	48
光照培养 Light culture	25.9±0.5 a	45.3±0.6 a	67.2±0.7 a	89.1±0.5 a
黑暗培养 Dark culture	26.1±0.2 a	45.8±0.6 a	66.8±0.3 a	89.8±0.3 a

注: 同列平均数后的相同字母表示根据 Duncan's 新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平无差异显著。

Note: Mean followed by the same letters in the same column were not significantly different at 0.05 level based on Duncan's new multiple range test.

表 8 不同贮藏条件的日本曲霉 ZW1 发酵滤液处理南方根结线虫 J2 的校正死亡率 (%)

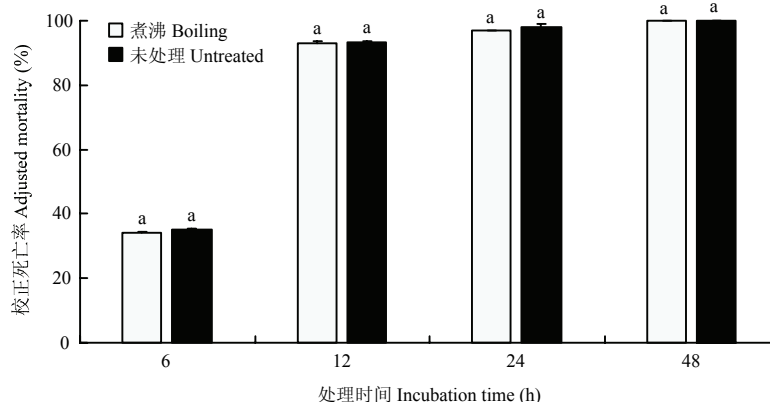
Table 8 Adjusted mortality rate (%) of *M. incognita* J2 in *A. japonicus* ZW1 fermentation filtrate with different storage conditions

贮藏条件 Treatments	贮藏时间 Storage time	处理时间 Treatment time (h)			
		6	12	24	48
4 °C	1 年 1-year	56.8±1.1 a	68.5±1.0 a	86.9±1.7 a	87.4±0.9 a
	2 年 2-year	20.3±0.4 b	32.4±0.6 b	55.7±0.8 b	60.2±0.5 b
	3 年 3-year	12.7±1.5 c	18.8±1.1 c	33.5±0.5 c	45.7±1.1 c

注: 同列平均数后的相同字母表示根据 Duncan's 新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平无差异显著。

Note: Mean followed by the same letters in the same column were not significantly different at 0.05 level based on Duncan's new multiple range test.

2.3.2 煮沸对菌株 ZW1 发酵滤液毒杀 J2 活性的影响 未经处理和加热煮沸的发酵滤液对 J2 的毒杀活性无显著差异 (图 3)。在 48 h, 未经处理和加热煮沸的发酵滤液中 J2 的校正死亡率均达到 100%。



注: 相同柱子上相同字母表示根据 Duncan's 新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平无差异显著。

Note: The same letters on the bars were not significantly different at 0.05 level based on Duncan's new multiple range test.

图 3 煮沸的日本曲霉 ZW1 发酵滤液处理南方根结线虫 J2 的校正死亡率 (%)

Fig. 3 Adjusted mortality rate (%) of *M. incognita* J2 treated with boiling *A. japonicus* ZW1 fermentation filtrate

3 讨论

利用微生物代谢产物防治植物病害是生物防治中的重要手段之一^[16]。但在生防微生物代谢过程中, 溶氧量、温度、转速、pH、培养基种类、培养基成分等都能影响真菌代谢产物的积累。发酵液表面产生大量

气泡限制氧气交换^[17]和真菌菌丝的丝状生长增加液体培养基粘度^[18], 均能降低溶氧量, 从而影响微生物代谢活性物质的产率。本研究试验过程中菌株 ZW1 在 Czapek 培养基中形成不同的菌丝体形态, 且表面光滑球形菌丝体的发酵滤液杀虫活性显著高于表面辐射状菌丝体的发酵滤液, 推测因为辐射状菌丝体占据了空间, 减少了发酵液中氧气含量, 从而降低了其代谢活性物质的产率, 导致发酵滤液的杀虫活性降低。在生产中, 人们可利用简单且经济的微生物发酵工艺获得目标产物, 通过优化培养基组分含量和培养条件提高目标代谢产物产量。天冬酰胺酶在改良的 Czapek 培养基中发酵时产量最高, 而用麦麸作基底物的固态发酵时产量低^[19,20]; 米曲霉 *Aspergillus oryzae* DIA-MF 在龙舌兰汁浓度大于 40 g/L 的培养基中培养 24 h, 分泌 Fructo-oligosaccharides 的产量达到最高^[21]; 链霉菌属 *Streptomyces kanasensis* ZX01 分泌新型糖蛋白 GP-1 的产量提高可通过对小米培养基 (Millet medium) 成分优化来实现^[22]; 枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* 46/H1 对尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* 的抗菌活性的最优培养温度为 30 °C, 且 LBG 液体培养基中氮源和碳源分别为果糖和大豆蛋白胨时可增加枯草芽胞杆菌 46/H1 的抑菌活性^[23]。本试验 Czapek 培养基的碳源和氮源经过优化后, 碳源为蔗糖 30 g/L, 氮源为 KNO₃ 3 g/L 时, 能够降低菌株 ZW1 发酵液中辐射状菌丝体的产生, 发酵滤液 10 倍稀释液处理南方根结线虫 24 h 后的死亡率高达 98.0%。生产上还可通过调节微生物的温度、转速和光照等培养条件, 获得大量目标产物, 如藤仓赤霉菌 *Gibberella fujikuroi* 产生赤霉素 (GA3) 的最适温度为 28 °C^[24]; 色二孢菌 *Lasiodiplodia theobromae* 在 25 °C 可产生茉莉酸 (jasmonic acid), 而在 37 °C 可产生球二孢菌素 (botryodiplodins)^[25]; 杨晓坡等^[26]研究发现二型附毛孔菌 *Trichaptum biforme* 在光照条件下的 T-AOC 和分泌的多酚含量于第 10 d 和 12 d 达到峰值。本研究中光照和黑暗条件不影响菌株 ZW1 发酵滤液的杀 J2 活性, 但温度和转速对其有显著影响, 该菌株发酵产生毒杀 J2 的活性物质的最适温度和转速分别是 25 °C 和 150 r/min。

农业药剂要求性质稳定、成本低、持效时间长、对环境危害小, 其中热稳定性是需要明确的重要指标之一。微生物代谢产物作为农药的重要来源, 耐热是其应当具备的重要特性, 滇重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *Yunnanensis* (French.) Hand.-Nazz. 内生灰黄青霉 *Penicillium griseofulvum* 代谢产物具有耐高温作用, 经高温 121.3 °C 处理 20 min 后, 仍对金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、伤寒沙门菌 *Salmonellatyphi* 和屎肠球菌 *Enterococcus faecium* 具有较强抑菌效果^[27]; 放线菌 *Actinomyces* sp. WZ-05 发酵上清液在 80 °C 下加热处理 60 min, 对番茄叶霉病菌 *Fulria fulva*、烟草疫霉菌 *Phytophthora nicotianae*、烟草赤星病菌 *Alternaria alternata*、水稻纹枯病菌 *Rhizotonia solani* 等病原菌的抑菌效果不变^[28]; 苏云金芽胞杆菌 *Bacillus thuringiensis* 的代谢产物苏云金素 (Thuringiensin) 在 121 °C 处理 15 min 后, 仍能保持其生物活性^[29]。菌株 ZW1 发酵滤液加热煮沸处理对其毒杀南方根结线虫 2 龄幼虫的活性无影响, 杀虫活性产物的热稳定性好, 说明发酵液中的杀线虫活性产物在高温下不失活。

贮藏温度和时间也会影响微生物代谢产物的活性。一般来说, 贮藏时间越长或温度越高, 物质越容易变质。菌株 ZW1 的发酵滤液在 4 °C 条件下贮藏 1 年后, 其毒杀 J2 的校正死亡率仍然较高, 为 87.4%。因此, ZW1 菌株代谢产物的稳定性好, 适于投入发酵生产。菌株 ZW1 在发酵罐中的发酵条件需进一步验证和研究。

参 考 文 献

- [1] Abad P, Gouzy J, Aury J M, et al. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*[J]. *Nature Biotechnology*, 2008, 26(8): 909-915.
- [2] Kayani M Z, Mukhtar T, Hussain M A. Effects of southern root knot nematode population densities and plant age on growth and yield parameters of cucumber[J]. *Crop Protection*, 2017, 92: 207-212.
- [3] Sasser J N, Eisenback J D, Carter C C, et al. The International *Meloidogyne* Project-Its Goals and Accomplishments[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 1983, 21(1): 271-288.
- [4] 徐建华, 魏大为, 詹裕定, 等. 江苏省大棚蔬菜寄生线虫的种类和发生[J]. *南京农业大学学报*, 1994, 17(1): 47-51.
- [5] Wang C, Hu H J, Li X, et al. Effects of varying environmental factors on the biological control of *Meloidogyne incognita* in tomato by *Bacillus cereus* strain BCM2[J]. *Biocontrol Science and Technology*, 2018, 28(4): 359-376.

- [6] Seid A, Fininsa C, Mekete T, *et al.* Tomato (*Solanum lycopersicum*) and root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.)—a century-old battle[J]. *Nematology*, 2015, 17(9): 995-1009.
- [7] Schneider S M, Roskopf E N, Leesch J G, *et al.* United states department of agriculture-agricultural research service research on alternatives to methyl bromide: Pre-plant and post-harvest[J]. *Pest Management Science*, 2003, 59(6): 814-826.
- [8] Campos-Garcia J, Martinez D S T, Rezende K F O, *et al.* Histopathological alterations in the gills of Nile tilapia exposed to carbofuran and multiwalled carbon nanotubes[J]. *Ecotoxicology and Environment Safety*, 2016, 133: 481-488.
- [9] Pandit R J, Kunjadia P D, Mukhopadhyaya P N, *et al.* Isolation, molecular characterization and predatory activity of two Indian isolates of nematode-trapping fungi[J]. *Applied Biological Research*, 2014, 16(1): 10-20.
- [10] Kim T Y, Jang J Y, Yu N H, *et al.* Nematicidal activity of grammicin produced by *Xylaria grammica* KCTC 13121BP against *Meloidogyne incognita*[J]. *Pest Management Science*, 2018, 74(2): 384-390.
- [11] Khan B, Yan W, Wei S, *et al.* Nematicidal metabolites from endophytic fungus *Chaetomium globosum* YSC5[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2019, 366(14): fnz169.
- [12] Hu Y, Li J, Li J F, *et al.* Biocontrol efficacy of *Pseudoxanthomonas japonensis* against *Meloidogyne incognita* and its nematostatic metabolites[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2019, 366(2): 1-7.
- [13] 张素玮, 王艳玲, 负建民. 马铃薯干腐病拮抗菌 *Pseudomonas* sp.YL11 发酵液理化性质测定及发酵条件优化[J]. *中国食品工业*, 2017(11): 72-76.
- [14] Hussey R S, Barker K R. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* ssp. including a new technique[J]. *Plant Disease Reporter*, 57: 1025-1028.
- [15] Choi I H, Kim J, Shin S C, *et al.* Nematicidal activity of monoterpenoids against the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*)[J]. *Russian Journal of Nematology*, 2007, 15(1): 35-40.
- [16] Shields M W, Johnson A C, Pandey S, *et al.* History, current situation and challenges for conservation biological control[J]. *Biological Control*, 2019, 131(1): 25-35.
- [17] Lee S I, Lee K J, Chun H H, *et al.* Process development of oxalic acid production in submerged culture of *Aspergillus niger* F22 and its biocontrol efficacy against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2018, 41(3): 345-352.
- [18] Pazouki M, Panda T. Understanding the morphology of fungi[J]. *Bioprocess Engineering*, 2000, 22(2): 127-143.
- [19] Kumar M N S, Ramasamy R, Manonmani H K. Production and optimization of L-asparaginase from *Cladosporium* sp. using agricultural residues in solid state fermentation[J]. *Industrial Crops and Products*, 2013, 43: 150-158.
- [20] Souza P M, de Freitas M M, Cardoso S L, *et al.* Optimization and purification of L-asparaginase from fungi: A systematic review[J]. *Critical reviews in Oncology/Hematology*, 2017, 120: 194-202.
- [21] Muñiz-Márquez D B, Teixeira J A, Mussatto S I, *et al.* Fructo-oligosaccharides (FOS) production by fungal submerged culture using aguamiel as a low-cost by-product[J]. *LWT- Food Science and Technology*, 2019, 102: 75-79.
- [22] Zhou Y, Sun Y B, He H W, *et al.* Optimization of medium compositions to improve a novel glycoprotein production by *Streptomyces kanasensis* ZX01[J]. *AMB Express*, 2017, 7(1): 1-9.
- [23] Tumbariski Y, Petkov E, Cholakov R, *et al.* Influence of the culture conditions and the composition of culture medium on the antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* strain 46/H1 against some filamentous fungi[J]. *Journal of BioScience and Biotechnology(S)*, 2015, SE/ONLINE: 189-194.
- [24] 王卫, 吴耀辉, 黎继烈, 等. 温度对赤霉素发酵的影响及优化策略[J]. *应用与环境生物学报*, 2017, 23(3): 432-436.
- [25] Félix C, Salvatore M M, DellaGreca M, *et al.* Secondary metabolites produced by grapevine strains of *Lasiodiplodia theobromae* grown at two different temperatures[J]. *Mycologia*, 2019, 111(3): 466-476.
- [26] 杨晓坡, 郑飞, 刘铁志, 等. 光照和 pH 对药用真菌二型附毛孔菌液体培养过程中抗氧化活性的影响[J]. *菌物学报*, 2017, 36(1): 71-82.
- [27] 吴怡, 陈芬清, 李雅静, 等. 滇重楼内生灰黄青霉抑菌产物的热稳定性[J]. *昆明医科大学学报*, 2017, 38(7): 22-26.
- [28] 吴石金, 阮晓丽, 张岚. 放线菌 WZ-05 代谢产物的抑菌杀螨效果[J]. *浙江农业学报*, 2008, 20(2): 118-122.
- [29] McConnell E, Richards A G. The production by *Bacillus thuringiensis* Berliner of a heat stable substance toxic for insects[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1959, 5(2): 161-168.