

蒙春蕾,王勇勇,黄敏,等.不同氮源对海洋真菌 BH0531 发酵液杀线虫活性的影响[J].江苏农业科学,2015,43(5):121-123.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.05.040

# 不同氮源对海洋真菌 BH0531 发酵液杀线虫活性的影响

蒙春蕾<sup>1</sup>,王勇勇<sup>1</sup>,黄敏<sup>1</sup>,蔡爽<sup>1</sup>,孟庆恒<sup>2</sup>,孙建华<sup>2</sup>

(1. 天津师范大学生命科学学院,天津 300387; 2. 天津市动植物抗性重点实验室,天津 300387)

**摘要:**海洋来源的枝顶孢霉(*Acremonium*, BH0531)是一株以松材线虫为靶标筛选出的杀线虫真菌。氮源的化合态和种类对该菌株的生长以及代谢产物的活性有显著影响。研究结果显示,不同氮源对菌体生长量的影响差异显著,有机氮优于无机氮;代谢物的杀线虫活性则表现为无机氮优于有机氮,其中以  $\text{NaNO}_3$  为氮源的发酵液对松材线虫的杀线率以及  $\text{NH}_4\text{Cl}$  为氮源的发酵液对根结线虫的杀线率分别高达 95.67% 和 96.60%,均高于有机氮源中最高的蛋白胨。根结线虫对各种无机氮源发酵液的敏感性普遍高于松材线虫。此外,经高温处理的代谢物仍观察到较强的杀线虫活性,显示出良好的热稳定性。

**关键词:**海洋枝顶孢霉;氮源;杀线活性;松材线虫;根结线虫

**中图分类号:**Q939.9;S432.4<sup>+</sup>5 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)05-0121-03

植物寄生线虫是一类世界性分布的重要植物病原物,其寄生范围广,环境适应性强,几乎每种作物都受到植物线虫的侵害,其危害程度仅次于真菌,已超过细菌、病毒,成为第二大植物病害,防控形势严峻<sup>[1]</sup>。真菌杀线剂(具杀线活性的代谢产物)是一类环境友好型生防因子,越来越受到广泛重视<sup>[2]</sup>。已经报道的具有杀线虫活性的真菌种类超过 700 种,已分离得到的杀线虫活性代谢产物多达 230 余种<sup>[3]</sup>。这些杀线虫真菌及其代谢物的研究主要集中在陆生性真菌(包括病原菌和内生真菌),如淡紫拟青霉活菌剂<sup>[2]</sup>和总状共头霉(*Sr18* 菌)<sup>[4]</sup>等。海洋来源的枝顶孢霉(*Acremonium*, BH0531)是一株已被证实具有较好杀线虫作用的海洋真菌<sup>[5]</sup>。不同于陆生性真菌,该菌在添加海水的培养基中的生长情况和杀线虫活性均优于普通察氏培养基<sup>[6]</sup>,且其代谢活性物具有含氮化合物属性<sup>[1]</sup>;因此,探究不同化合态的氮源对该菌在察氏培养基生长及其代谢物杀线虫活性的影响,将有助于活性代谢产物发酵条件的优化,克服海水高盐组分对发酵设备的影响。据此,本试验以松材线虫、黄瓜根结线虫二龄幼虫(J2)为对象,以杀线虫效果(杀线率)为指标,测定了  $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{KNO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  等不同氮源对 BH0531 菌

株生长状况及其活性代谢产物的影响,旨在为进一步优化该菌的发酵条件提供试验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 海洋枝顶孢霉(*Acremonium*, BH0531),菌种保藏号 CGMCC-5445;灰葡萄孢霉(*Batrytis cinerea*, BC 菌),以上菌种由天津师范大学生命科学学院微生物实验室提供。

1.1.2 供试线虫 松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus*),中国农业科学院植物保护研究所提供;黄瓜根结线虫(*Meloidogyne incognita*)取自天津市宝坻区黄瓜大棚基地。

1.1.3 供试培养基 (1)活化培养基:去皮马铃薯 200 g/L 煮汁,葡萄糖 20 g/L,琼脂 20 g/L,蒸馏水定容至 1 000 mL;用于活化 BH0531 菌株。(2)发酵培养基:2 g/L 氮源,1 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,0.5 g/L  $\text{MgSO}_4$ ,0.5 g/L  $\text{KCl}$ ,0.01 g/L  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,20 g/L 葡萄糖,pH 值自然。氮源分别为  $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{KNO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、蛋白胨、牛肉膏、酵母膏。(3)大麦仁培养基:10 g 大麦仁,8 mL 去离子水,大试管浸泡 3~6 h,灭菌,用于 BC 菌培养。

### 1.2 试验方法

1.2.1 BH0531 菌株的培养 将保藏的 BH0531 菌种接种至活化培养基斜面试管,26 °C 培养 5~7 d。

1.2.2 灰葡萄孢霉的培养 将灰葡萄孢霉接入大麦仁培养基,21 °C 生化培养箱内培养 7 d,用于松材线虫的培养。

1.2.3 松材线虫的培养 将松材线虫接种于培养好的 BC 菌上,25 °C 下避光培养 7 d;通过贝尔曼漏斗法收集松材线

收稿日期:2015-01-12

基金项目:国家自然科学基金(编号:31272019)。

作者简介:蒙春蕾(1990—),女,贵州三都人,硕士,主要从事微生物的活性物质研究。E-mail:977785854@qq.com。

通信作者:孟庆恒,副教授,主要从事应用微生物研究。E-mail:jbv3139@163.com。

92:7-13.

[30] Murakami A, Gallo - Meagher M, Gorbett D W, et al. Utilizing immunoassays to determine systemic tomato spotted wilt virus infection for elucidating field resistance in peanut[J]. Crop Protection, 2006, 25 (3): 235-243.

[31] Morsello S C, Kennedy G G. Spring temperature and precipitation affect tobacco thrips, *Frankliniella fusca*, population growth and to-

to spotted wilt virus spread within patches of the winter annual weed *Stellaria media*[J]. Entomologia Experimentalis et Applicata, 2009, 130(2): 138-148.

[32] Ramkat R C, Wangai A W, Ouma J P, et al. Cropping system influences tomato spotted wilt virus disease development, thrips population and yield of tomato (*Lycopersicon esculentum*) [J]. Annals of Applied Biology, 2008, 153(3): 373-380.

虫<sup>[7]</sup>,制备成浓度为 10 000 条/mL 的线虫悬液。

1.2.4 黄瓜根结线虫二龄幼虫(J2)的制备 将大田取得的黄瓜病根剪成 1 cm 小段;在 1% 次氯酸钠溶液中漂洗 4 min,再在匀浆机里搅拌 2 min;利用 100 目、300 目和 500 目的网筛冲洗并收集虫卵。再将卵收集到的离心管中,在底部加入 40% 蔗糖溶液,3500 r/min 密度梯度离心 5 min。之后吸取界面溶液过 500 目网筛,反复冲洗收集卵。将上述收集得到的卵置于已消毒的培养皿中,垫上湿润滤纸,25 ℃ 下孵化 4 d。

1.2.5 发酵液的制备 取活化的 BH0531 菌株斜面,加入无菌水洗脱孢子,制备浓度为  $2 \times 10^6$  CFU/mL 的孢子悬液,以 1% 的接种量分别接入不同氮源发酵培养基中,26 ℃、120 r/min 培养 96 h。发酵菌液经离心除菌(6 000 r/min 30 min,Eppendorf -5810),再经孔径为 0.22 μm 的微孔滤膜过滤,即为发酵滤液,用于活性分析。

1.2.6 不同氮源发酵液杀线虫活性检测 将所获发酵液分为灭菌组和未灭菌组,以无菌水为对照,分别以松材线虫和黄瓜根结线虫(J2)为靶标,进行杀线虫活性检测。具体方法如下:取 96 孔板,每孔加入靶标线虫悬液 10 μL(约 100 条),再分别加入 100 μL 不同氮源的发酵液,设 3 次重复,25 ℃ 下培

养,3 d 后体视显微镜下观测线虫死亡情况,按下式统计线虫校正死亡率:

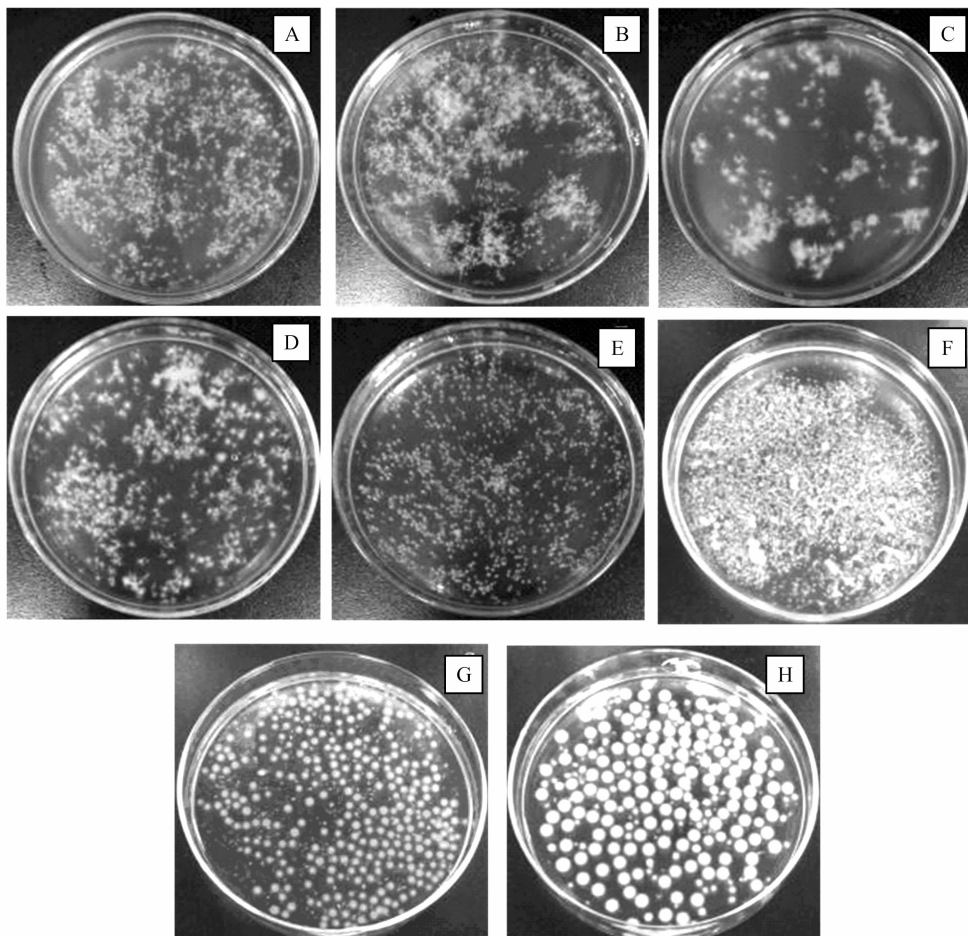
线虫校正死亡率 = (处理线虫死亡率 - 对照线虫死亡率) / (1 - 对照线虫死亡率) × 100%。

应用 SPSS 12.0 软件对结果进行统计分析,并且采用 Duncan's 新复极差法进行差异显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同氮源对 BH0531 菌体生长的影响

试验结果(图 1、表 1)表明,不同氮源对 BH0531 菌丝体的外观和生物量有明显影响。图 1 结果显示,经不同无机氮源发酵后,发酵液透明,呈淡黄色,菌丝球结构松散,外观不规整(图 1-A 至 E);而在蛋白胨和酵母膏条件下,菌丝体外观结构紧密,呈均匀球状分布,直径明显大于无机氮源条件(图 1-G 至 H);牛肉膏中菌丝体则介于二者之间(图 1-F)。生物量测定结果进一步证实了不同氮源对该菌的影响存在明显的差异( $\alpha=0.05$ ),尤其体现在有机氮源和无机氮源之间(表 1)。不同氮源对菌体生长的作用由大到小依次为蛋白胨 > 酵母膏 > 牛肉膏 >  $\text{KNO}_3$  >  $\text{NaNO}_3$  >  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  >  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  >  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 。



A— $\text{NaNO}_3$ ; B— $\text{KNO}_3$ ; C— $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; D— $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; E— $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; F—牛肉膏; G—酵母膏; H—蛋白胨

图1 不同氮源发酵液中 BH0531 生长状况

### 2.2 不同氮源发酵液对松材线虫活性的影响

在试验选定的 8 种氮源中,以  $\text{NaNO}_3$  作为氮源的发酵液表现出了较好的杀线虫活性,杀线率  $\geq 90\%$ ,达到 A 级(表

1),其次为蛋白胨、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  和  $\text{KNO}_3$ 。值得关注的是除  $\text{NH}_4\text{Cl}$  外,其余 3 种氮源的发酵液经灭菌后其代谢产物仍然具有  $\geq 60\%$  的杀线活性,表明活性代谢产物具有较好的耐热性。表

表 1 不同氮源对 BH0531 生长量及代谢物杀线虫活性的影响

氮源	菌体干质量 (g/L)	松林线虫校正死亡率(%)	
		灭菌组	未灭菌组
NaNO <sub>3</sub>	1.92 ± 0.12b	60.12 ± 1.53eE	95.67 ± 2.52gG
KNO <sub>3</sub>	2.46 ± 0.11c	62.33 ± 2.06eE	62.43 ± 3.56eE
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.54 ± 0.12a	27.0 ± 0.58dD	24.12 ± 2.03cC
NH <sub>4</sub> Cl	1.88 ± 0.17b	10.63 ± 0.59bB	68.02 ± 2.8fEF
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.84 ± 0.21b	7.05 ± 0.60bB	16.33 ± 3.27bB
牛肉膏	2.58 ± 0.13c	17.11 ± 0.72cC	25.33 ± 2.03cC
酵母膏	3.01 ± 0.15d	24.02 ± 1.15dD	31.5 ± 2.58dD
蛋白胨	3.46 ± 0.21e	60.31 ± 0.59eE	71.33 ± 2.04fF
CK		0.67 ± 0.33aA	1.33 ± 0.33aA

注:同列数据后不同大写字母、小写字母分别表示差异极显著( $P < 0.01$ )、显著( $P < 0.05$ )。

1 的分析结果显示,代谢物的杀线虫活性主要与氮源的种类密切相关,菌体生物量与代谢物杀线虫活性在选定用量范围内未显示出明确的相关性。这一结果提示,选用适当的无机氮源如 NaNO<sub>3</sub> 用于发酵,从代谢活性物的角度可以代替海水培养基来获得高活性的代谢产物。

2.3 不同氮源发酵液对黄瓜根结线虫(J2)存活的影响

研究结果表明,BH0531 代谢物不仅对松材线虫有确切的杀线活性,对根结线虫也有显示出很强的杀线活性。不同氮源发酵液在灭菌前后,对黄瓜根结线虫幼虫 J2 的杀线率均较高,除牛肉膏、酵母膏外,其他 6 种氮源对根结线虫的校正死亡率均大于 75%(表 2)。以 NH<sub>4</sub>Cl 为氮源的发酵液对黄瓜根结线虫的杀线率最高,达到 96%,与该发酵液对松材线虫的杀线率差异较大。表 2 结果还显示,灭菌组中各氮源发酵液对黄瓜根结线虫杀线率不仅差异显著,还突出地表现出无机氮源的优势;未灭菌组中有机氮源间杀线率差异极显著( $P < 0.01$ ),无机氮源发酵液间杀线率差异虽不显著,但其杀线率均在 B 级(≥85%)以上,具有较高的杀线活性。进一步表明选用适当的无机氮源用于 BH0531 活性代谢物的发酵,可以用来替代海水培养基获得高活性的代谢产物。

表 2 不同氮源发酵液处理 3 d 对黄瓜根结线虫存活的影响

氮源	校正死亡率(%)	
	灭菌组	未灭菌组
NaNO <sub>3</sub>	76.58 ± 1.89dD	88.80 ± 0.12dD
KNO <sub>3</sub>	86.90 ± 0.69eE	88.6 ± 1.71dD
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	87.20 ± 1.63eE	87.2 ± 1.63dD
NH <sub>4</sub> Cl	96.60 ± 0.56fF	89.47 ± 1.72dD
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	76.4 ± 1.61dD	89.60 ± 1.29dD
牛肉膏	58.2 ± 1.19bB	61.99 ± 1.09bB
酵母膏	65.64 ± 1.45cC	71.09 ± 2.14cC
蛋白胨	79.93 ± 1.50dD	89.74 ± 0.86dD
CK	0.67 ± 0.33aA	1.33 ± 0.33aA

注同表 1。

3 讨论

海洋来源的枝顶孢霉(*Acremnium*, BH0531)是一株以松材线虫为靶标筛选出的生防菌,但该菌在海水培养基中显示

的生长优势并不适用于规模发酵的设备条件要求。而含氮无机盐是海水中的重要成分,因此,探究其在不含海水的培养条件下的生长要素及其对杀线虫活性代谢物的影响就显得十分必要。研究结果表明,不同氮源,特别是无机氮源对 BH0531 生长状况的影响较大。有机氮源虽然有利于菌丝体的增加,但其杀线率的优势并未随菌丝体的增加而提高。试验结果表明,以 NaNO<sub>3</sub> 和 NH<sub>4</sub>Cl 2 种不同化合态的无机氮作为氮源时,菌体的生长状况虽然不如有机氮,但所产生的代谢产物对松材线虫与黄瓜线虫分别显示出较高的抑制率,且其活性产物均显示出良好的热稳定性,为今后进一步优化发酵条件、完全取代海水培养基提供了试验依据。

研究还发现,BH0531 代谢物对松材线虫和根结线虫的杀线效果存在一定的差异。根结线虫对于以察氏培养基为基础的无机氮源的发酵产物的敏感性明显高于松材线虫。有报道显示,不同离子对南方根结线虫的排斥性为 K<sup>+</sup>、NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 和 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> > Cl<sup>-</sup> [8-9],其中 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 和 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 组成的化合物 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 对南方根结线虫有强烈的排斥力 [10],且随着浓度升高而上升 [11]。所不同的是,各种含氮无机盐在 BH0531 的培养过程中作为氮源会被菌体转化利用,而且用量仅为 2 g/L,低于察氏培养基的标准用量(3 g/L),因此其高效的杀线虫活性主要取决于代谢活性物的生成。至于其活性代谢物杀线虫的机理还有待深入研究。

参考文献:

[1]路雪君,廖晓兰,成飞雪,等. 根结线虫的生物防治研究进展[J]. 中国农业科技导报,2010,12(4):44-48.

[2]Li G H,Zhang K Q,Xu J P,et al. Nematicidal toxin from fungi[J]. Recent Patents on Biotechnology,2007,1(2):1-22.

[3]张颖,李国红,张克勤. 食线虫真菌资源研究概况[J]. 菌物学报,2011,30(6):836-845.

[4]孙建华,齐军山,冯欣,等. Sr18 生物杀线虫制剂防治黄瓜根结线虫病研究[J]. 华北农学报,2005,20(4):74-78.

[5]Meng Q H,Shi X X. Isolation of an *Acronium* sp. from a screening of 52 seawater fungal isolates and preliminary characterization of its growth conditions and nematicidal activity[J]. Biotechnol Lett, 2012,34(10):1847-1850.

[6]史晓讯. 丝状海洋真菌杀线虫代谢物的性质及发酵条件研究[D]. 天津:天津师范大学,2010:25-35.

[7]杜海霞,蒙春蕾,王勇勇,等. 海洋枝顶孢霉 BH0531 代谢产物对松材线虫形态和酶活性的影响[J]. 中国酿造,2014,33(6):23-26.

[8]孟丽,漆永红,刘玉霞,等. 南方根结线虫二龄幼虫对不同类型盐离子的趋化反应[J]. 植物保护,2014,40(2):85-89.

[9]吕和平,漆永红,曹素芳,等. 四种无机盐对南方根结线虫卵囊、卵孵化及其幼虫存活的影响[J]. 植物保护学报,2012,39(5):449-455.

[10]Biesmeijer J C,Roberts S P M,Reemer M,et al. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands[J]. Science,2006,313(5785):351-354.

[11]白春明,段玉玺,陈立杰,等. 铵类化合物对南方根结线虫 2 龄幼虫存活的影响[J]. 植物保护,2009,35(1):74-78.