

化感链霉菌 6803 菌株液体发酵工艺优化的研究

王瑞龙^{1,2}, 黄珂^{1,2}, 石木标³, 宋圆圆^{1,2}, 陈敏^{1,2}, 苏贻娟^{1,2}, 曾任森^{1,2*}

1. 华南农业大学亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广东 广州 510642;

2. 农业部华南热带农业环境重点实验室, 广东 广州 510642; 3. 华南农业大学食品学院, 广东 广州 510642

摘要: 土壤微生物链霉菌 6803 菌株被证明对高等植物具有化感作用。采用单因子实验方法, 研究液体发酵碳源、氮源、无机盐、发酵温度、发酵液初始 pH 值、摇床转速、发酵时间等对链霉菌 6803 菌株菌丝体产量及发酵液化感作用的影响, 用均匀试验设计法优化了发酵工艺条件。结果表明: 链霉菌 6803 菌株生长和产生化感作用的最佳发酵条件为: $\rho(\text{淀粉})=26.67 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\rho(\text{蔗糖})=25.15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\rho(\text{NH}_4\text{Cl})=0.30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 黄豆饼粉浸液 8.88%, $\rho[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]=0.18 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\rho(\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})=0.002 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\rho(\text{NaCl})=0.75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 值 7.6, 装量系数 0.16, 接种量 3%, 温度 36 °C, 转速 200 r·min⁻¹, 发酵 144 h。本研究为利用微生物次生代谢产物作为天然除草剂奠定了基础。

关键词: 链霉菌 6803 菌株; 化感作用; 发酵工艺; 微生物源除草剂

中图分类号: TQ920.6

文献标识码: A

文章编号: 1674-5906 (2012) 05-0870-06

田间杂草对农业生产造成严重的损失, 化学除草剂的使用为农业生产带来巨大经济效益的同时因具有残留高、难降解、易引起杂草抗药性的特性, 对生态环境造成严重地危害^[1-3]。利用杂草的专食性天敌和特异病原菌对靶标杂草进行生物防治具有专一性强、不易产生抗性、防治成本低等优点^[4-6]。但利用活体微生物除草易受到气候等环境因素的影响, 而使用微生物代谢产物防治杂草可以克服这些缺点^[7]。因此, 利用微生物代谢产物作为生物源除草剂日益引起人们的关注^[8-10]。

化感作用(Allelopathy)是植物和微生物通过向周围环境释放次生代谢产物从而直接或间接地影响邻近其它植物和微生物生长发育的现象^[2,11]。高等植物的化感作用在国内外均有较多研究, 微生物间的化感作用(拮抗作用)在医药领域有广泛的研究, 但微生物对高等植物的化感作用研究较少。有些微生物不是植物病原菌, 但其代谢产物能够影响植物的生长, 如放线菌产生的放线菌酮具有很好的除草活性, 链霉菌产生的茴香霉素能强烈抑制稗草(*Echinochloa crusgalli*)和马唐(*Digitaria sanguinalis*)的生长, 以此化合物为结构模板开发了除草剂苯草酮^[12-15]。目前, 微生物对高等植物的化感作用研究日益引起人们的重视^[16-19]。

前期研究工作表明链霉菌 6803 菌株(*Streptomyces* sp. 6803)的发酵液对稗草(*Echinochloa crusgalli*)和油菜(*Brassica campestris*)的生长有强烈地化感抑制作用^[20], 有望开发利用它的次生代谢产物作为新型天然除草剂。本研究筛选

了链霉菌 6803 菌株液体发酵的最佳碳源、氮源、无机盐、pH 值、装量系数、接种量、温度、转速等发酵条件, 优化了链霉菌 6803 菌株的发酵工艺。

1 材料与方法

1.1 材料

链霉菌 6803 菌株是本实验室从湖南省安乡县安丰乡稻田土样中分离。

稗草种子采自华南农业大学实验农场、油菜种子购自广州市种子公司。

1.2 液体发酵基础培养基

碳源选择基础培养基: 黄豆饼粉浸液(3%) 1 L; CaCO_3 2 g; NaCl 2.5 g; pH 7.2~7.4。

氮源选择基础培养基: 葡萄糖 10 g; CaCO_3 2 g; NaCl 2.5 g; H_2O 1 L; pH 7.2~7.4。

无机盐选择基础培养基: 黄豆饼粉浸液(3%) 1 L; 葡萄糖 10 g; pH 7.2~7.4。

1.2.1 碳源的筛选

在碳源选择基础培养基中分别加入 20 g·L⁻¹ 的葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘油、醋酸镁、糊精、蔗糖、淀粉等 8 种物质作为碳源, 灭菌后取 50 mL 分别加入到 250 mL 的三角瓶中, 加入 10% 的种子菌。在转速为 180 r·min⁻¹, 温度为 30 °C 条件下培养 5 d, 定性滤纸过滤, 滤液用于生测实验, 菌丝体 50 °C 烘干至恒重后称质量。

1.2.2 氮源的筛选

在氮源选择基础培养基中分别加入 3% 麦麸浸液、3% 玉米粉浸液、3% 黄豆饼粉浸液、0.3% 酵母膏、0.3% 牛肉膏、0.3% 蛋白胨、 $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ 、

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31000260; 31100286); 广东省科技计划项目(20110205)

作者简介: 王瑞龙(1976 年生), 男, 博士, 助理研究员, 从事化学生态学研究。E-mail: rlw2009@scau.edu.cn

*通信作者: 曾任森(1965 年生), 男, 教授, 博士生导师, 从事化学生态学研究。E-mail: rszeng@scau.edu.cn

收稿日期: 2012-04-02

KNO₃、NH₄NO₃、NaNO₃、NH₄Cl、(NH₄)₂SO₄、(NH₄)₃PO₄、(NH₄)H₂PO₄等 14 种物质作为氮源。其中无机氮的添加量按培养基中 $\rho(\text{氮})$ 为 0.3 g·L⁻¹，灭菌及培养条件同 1.2.1。

1.2.3 无机盐的筛选

在无机盐选择基础培养基中分别加入 K₂HPO₄、KH₂PO₄、Na₂SO₄、Na₂S₂O₃、FeSO₄·7H₂O、MgSO₄·7H₂O、ZnSO₄·H₂O、CoCl₂·6H₂O、CuSO₄·5H₂O、MnCl₂·4H₂O、NaCl、CaCO₃、Pb(CH₃COO)₂·3H₂O、KCl 等 14 种物质作为无机盐，各物质的添加量按培养基中所含相应元素为 0.05 g·L⁻¹，灭菌及培养条件同 1.2.1。

1.3 液体培养基的优化

根据均匀设计试验确定的主要发酵因素，进行均匀设计试验，培养条件及方法同 1.2.1。

1.4 生测试验

稗草和油菜种子用 0.1%氯化汞消毒 10 min，灭菌水冲洗 3~5 次。直径为 9 cm 培养皿中放入 2 层滤纸，分别加入 5 mL 稀释 5 倍的发酵上清液，每皿中放种子 20 粒，对照组加入等量不接种且在相同条件下培养 5 d 的液体培养基 5 倍稀释液。置于人工气候箱(温度 28 ℃，光照 3 800 lx，9 h·d⁻¹)中培养，实验设 3 次重复，7 d 后分别测量幼苗的根长和苗高。

1.5 统计方法

试验数据用 SPSS 16.0 进行单因素方差分析，差异显著性分析采用 Duncan 多重比较法检验，所有数据均为平均值±标准误。

2 结果与分析

2.1 最佳碳源的筛选

不同碳源的发酵液对稗草根长和苗高的抑制率分别介于 68.5%~96.7%和 16.8%~40.4%，其中以葡萄糖为碳源的发酵液对稗草根生长的抑制作用最强，抑制率为 96.7%，以糊精、葡萄糖、淀粉、乳糖、麦芽糖为碳源的发酵液对稗草苗高的抑制率分别为 37.2%、35.4%、40.4%，34.5%和 34.2%。8 种不同碳源的发酵液以糊精为碳源的发酵液对油菜的化感作用最强，对其根长和苗高的抑制率分别为 84.3%和 72.8% (表 1)。

不同碳源培养基对链霉菌 6803 菌株菌丝体产量的影响见图 1，其中以醋酸镁为碳源发酵所得的 $\rho(\text{菌丝生物量})$ 最多为 12.2 g·L⁻¹，其次是蔗糖和淀粉分别为 10.4、9.4 g·L⁻¹；以麦芽糖为碳源发酵所得的 $\rho(\text{菌丝生物量})$ 最少为 2.6 g·L⁻¹。因此选择蔗糖和淀粉为链霉菌 6803 菌株的最佳复合碳源。

2.2 最佳氮源的筛选

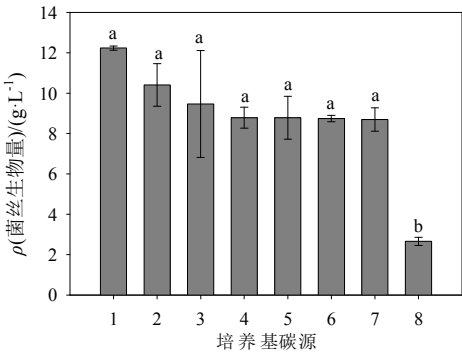
不同氮源发酵稀释液均抑制了稗草和油菜幼苗

表 1 链霉菌 6803 菌株在不同碳源培养基发酵培养液稀释 5 倍对稗草和油菜生长的影响

Table 1 Effects of dilute solution (×5) of fermented broths of *Streptomyces* sp. 6803 cultured in media with different carbon nutrients on seedling growth of barnyardgrass and rape

碳源	稗草		油菜	
	根长/cm	苗高/cm	根长/cm	苗高/cm
对照	5.15±0.33 c	5.91±0.21 c	3.25±0.24 c	3.01±0.95 c
糊精	0.21±0.08 a	3.71±0.23 a	0.51±0.06 a	0.82±0.26 a
葡萄糖	0.17±0.07 a	3.82±0.27 a	0.74±0.05 ab	0.97±0.31 a
醋酸镁	0.53±0.18 a	4.26±0.35 ab	0.62±0.06 ab	1.08±0.34a
淀粉	0.20±0.06 a	3.52±0.46 a	0.58±0.04 ab	1.01±0.32 a
乳糖	0.26±0.11 a	3.87±0.31 a	0.78±0.12 ab	1.14±0.36 a
蔗糖	0.37±0.11 a	4.13±0.34 ab	0.80±0.07 b	1.91±0.60 b
甘油	1.24±0.25 b	4.92±0.17 ab	0.72±0.06 ab	2.15±0.68 b
麦芽糖	1.62±0.25 b	3.89±0.40 a	0.54±0.04 ab	2.87±0.91 c

同列中不同字母间差异显著($P<0.05$)



1. 醋酸镁；2. 蔗糖；3. 淀粉；4. 乳糖；5. 糊精；6. 甘油；7. 葡萄糖；8. 麦芽糖
图 1 不同碳源培养基液体发酵培养链霉菌 6803 菌株的菌丝体生物量
Fig.1 Mycelial biomass of *Streptomyces* sp. 6803 cultured in liquid media with different carbon sources

的生长(表 2)。其中以黄豆饼粉为氮源的发酵稀释液对稗草生长的化感作用最强，对其根长和苗高的抑制率分别为 95.5%和 24.8%。14 种不同氮源的发酵液对油菜根长和苗高的抑制率分别介于 56.5%~88.3%和 21.0%~65.8%。以 NH₄Cl 为氮源的发酵稀释液对油菜苗高的抑制作用最大，而以黄豆饼粉为氮源的发酵稀释液对油菜根长的抑制率最强。

链霉菌 6803 菌株在不同氮源发酵液中培养所得菌丝体产量见图 2，其中以黄豆饼粉为氮源发酵得到的 $\rho(\text{菌丝生物量})$ 最多为 10.8 g·L⁻¹，以 NaNO₃ 为氮源发酵所得的 $\rho(\text{菌丝生物量})$ 最少为 2.9 g·L⁻¹，表明链霉菌 6803 菌株利用有机氮源的能力比硝态氮和铵态氮强。因此选择 NH₄Cl、(NH₄)H₂PO₄ 和黄豆饼粉作为链霉菌 6803 菌株液体发酵的最佳复合氮源。

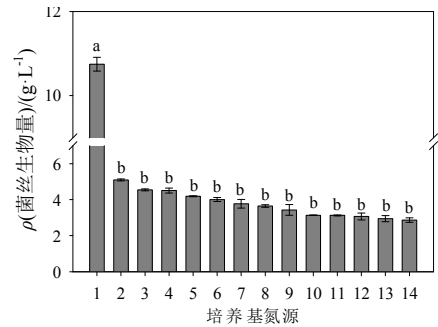
2.3 最佳无机盐的筛选

不同无机盐的发酵液对稗草根长和苗高的抑制率分别介于 49.7%~94.4%和 11.9%~28.3%，其中

表 2 链霉菌 6803 菌株在不同氮源培养基发酵培养液稀释 5 倍对油菜和稗草生长的影响

氮源	稗草		油菜	
	根长/cm	苗高/cm	根长/cm	苗高/cm
对照	6.48±0.32 h	7.50±0.29 ef	6.73±0.17 I	2.95±0.10 f
黄豆饼粉	0.29±0.12 a	5.64±0.39 a	0.78±0.06 a	1.42±0.12 b
NH ₄ Cl	0.65±0.10 ab	6.80±0.30 bcdef	0.86±0.10 ab	1.01±0.11 a
(NH ₄)H ₂ PO ₄	1.42±0.52 bcdef	5.63±0.80 a	1.34±0.11 bcde	2.33±0.19 de
牛肉膏	0.69±0.20 abc	5.98±0.29 ab	1.24±0.20 abcd	1.02±0.08 a
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.90±0.27 abc	7.14±0.20 cdef	1.13±0.15 abc	1.43±0.13 b
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	1.04±0.22 abcd	7.36±0.39 def	1.86±0.21 efg	1.48±0.15 b
NH ₄ NO ₃	1.06±0.23 abcd	5.91±0.50 ab	1.94±0.20 fg	1.41±0.20 b
(NH ₄) ₃ PO ₄	1.18±0.37 bcde	6.15±0.74 abc	2.93±0.34 h	2.18±0.13 de
玉米粉	1.37±0.29 bcdef	6.39±0.40 abcde	1.76±0.16 defg	2.41±0.13 e
蛋白胨	1.49±0.24 cdef	6.73±0.27 abcdef	1.48±0.22 cdef	1.71±0.13 bc
NaNO ₃	1.79±0.34 def	6.34±0.29 abcd	1.57±0.23 cdef	1.43±0.10 b
KNO ₃	1.92±0.34 ef	7.37±0.18 def	2.17±0.21 g	2.06±0.17 cde
麦麸	2.16±0.33 fg	7.65±0.32 f	1.08±0.14 abc	2.00±0.13 cd
酵母膏	2.88±0.33 g	7.21±0.16 cdef	1.21±0.20 abc	2.03±0.10 cd

同列中不同字母间差异显著(P<0.05)



1: 黄豆饼粉; 2: (NH₄)H₂PO₄; 3: 酵母膏; 4: 牛肉膏; 5: NH₄NO₃; 6: 麦麸; 7: KNO₃; 8: 蛋白胨; 9: 玉米粉; 10: NH₄Cl; 11: Ca(NO₃)₂·4H₂O; 12: (NH₄)₃PO₄; 13: (NH₄)₂SO₄; 14: NaNO₃
图2 在不同氮源培养基液体发酵培养链霉菌 6803 菌株的菌丝生物量
Fig.2 Mycelial biomass of *Streptomyces* sp. 6803 cultured in liquid media with different nitrogen sources

以 KCl 为无机盐的发酵液对稗草根长的抑制作用最强为 94.4%，以 FeSO₄·7H₂O 为无机盐的发酵液对稗草苗高的化感作用最强，抑制率为 28.3%。以 NaCl 为无机盐的发酵液稀释液对油菜生长的抑制效果最显著，对其根长和苗高的抑制率分别为

86.8%和 70.6% (表 3)。
链霉菌 6803 菌株在不同无机盐培养基发酵所得的菌丝体产量如图 3 所示，以 K₂HPO₄、FeSO₄·7H₂O、MgSO₄·6H₂O、NaCl 和 KCl 为无机盐的培养基所得菌丝生物量相对较多，分别为 4.3、4.1、4.4、4.1 和 4.5 g·L⁻¹。而以 ZnSO₄·H₂O、KH₂PO₄、CuSO₄·5H₂O 为无机盐的培养基所得菌丝生物量较少，分别为 2.6、2.3、0.8 g·L⁻¹。因此选择 NaCl 和 FeSO₄·7H₂O 为链霉菌 6803 菌株液体发酵的最佳复合无机盐。

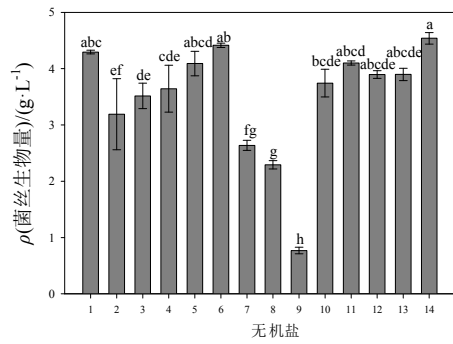
2.4 液体培养基的均匀设计

对最佳复合碳源、氮源和无机盐进行发酵培养基的均匀设计实验、不同培养基组分对链霉菌 6803 菌株菌丝生物量及其发酵稀释液对油菜苗高影响见表 4。对链霉菌 6803 菌株菌丝体产量进行二次多项式逐步回归分析表明：链霉菌 6803 菌株的最佳生长培养基组份为： $\rho(\text{淀粉})=24.51 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ， $\rho(\text{蔗$

表 3 链霉菌 6803 菌株在不同无机盐培养基发酵液稀释 5 倍对油菜和稗草生长的影响

无机盐	稗草		油菜	
	根长/cm	苗高/cm	根长/cm	苗高/cm
对照	5.01±0.25 e	8.01±0.19 g	5.47±0.32 f	3.50±0.22 h
NaCl	0.38±0.14 ab	6.59±0.20 cdef	0.72±0.05 a	1.03±0.05 a
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.54±0.19 abc	5.74±0.21 a	1.15±0.16 bcd	1.44±0.06 bcd
K ₂ HPO ₄	0.31±0.09 a	6.38±0.24 bcde	1.51±0.12 de	1.50±0.06 bcd
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.83±0.24 bc	6.02±0.18 abc	1.46±0.15 de	1.95±0.11 e
Na ₂ SO ₄	0.47±0.12 abc	6.13±0.29 abc	1.12±0.13 abc	1.73±0.12 de
Na ₂ S ₂ O ₃	0.53±0.13 abc	6.27±0.20 abcd	0.80±0.09 ab	1.34±0.07 b
MgSO ₄ ·6H ₂ O	0.56±0.12 abc	6.94±0.24 ef	0.88±0.08 ab	1.28±0.10 ab
ZnSO ₄ ·H ₂ O	0.90±0.19 c	6.83±0.23 def	1.33±0.08 cde	1.68±0.08 cde
KH ₂ PO ₄	2.52±0.38 d	6.99±0.22 f	1.60±0.24 e	2.81±0.18 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.65±0.14 abc	7.06±0.15 f	1.44±0.10 de	2.36±0.06 f
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.34±0.13 ab	6.29±0.16 abcd	0.98±0.07 abc	1.36±0.10 b
CaCO ₃	0.37±0.12 ab	6.33±0.28 abcd	1.19±0.18 bcd	1.39±0.07 bc
Pb(CH ₃ COO) ₂ ·3H ₂ O	0.52±0.14 abc	5.90±0.18 ab	0.81±0.04 ab	1.22±0.04 ab
KCl	0.28±0.10 a	6.53±0.24 cdef	1.03±0.09 abc	1.39±0.08 bc

同列中不同字母间差异显著(P<0.05)



1: K_2HPO_4 ; 2: $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; 3: Na_2SO_4 ; 4: $Na_2S_2O_3$; 5: $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 6: $MgSO_4 \cdot 6H_2O$; 7: $ZnSO_4 \cdot H_2O$; 8: KH_2PO_4 ; 9: $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 10: $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; 11: $NaCl$; 12: $CaCO_3$; 13: $Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$; 14: KCl

图3 不同无机盐培养基对链霉菌 6803 菌株菌丝体生物量的影响
Fig.3 Effect of inorganic salts in culture media on the biomass *Streptomyces sp. 6803*

糖)=10.13 g·L⁻¹，w(黄豆饼粉浸液)=5.47%， $\rho(NH_4Cl)$ =0.06 g·L⁻¹， $\rho[(NH_4)H_2PO_4]$ =0.30 g·L⁻¹， $\rho(FeSO_4 \cdot 7H_2O)$ =0.018 g·L⁻¹， $\rho(NaCl)$ =0.58 g·L⁻¹时， ρ (菌丝体生物量)=为 8.38 g·L⁻¹。

同理不同培养基组分对油菜苗高的影响进行二次多项式逐步回归分析可得：链霉菌 6803 菌株对油菜具有最强化感作用的最佳培养基组份为： ρ (淀粉)=26.67 g·L⁻¹， ρ (蔗糖)=25.15 g·L⁻¹，w(黄豆饼粉浸液)=8.88%， $\rho(NH_4Cl)$ =0.30 g·L⁻¹， $\rho[(NH_4)H_2PO_4]$ =0.18 g·L⁻¹， $\rho(FeSO_4 \cdot 7H_2O)$ =0.002 g·L⁻¹， $\rho(NaCl)$ =0.75 g·L⁻¹，此时油菜苗高为 0.51 cm。

2.5 液体发酵条件的筛选

在链霉菌 6803 菌株最佳培养基配方的基础上，对 pH 值、装量系数、接种量、温度、转速等发酵条件进行均匀试验设计，培养 5 d 后，用其 5 倍发酵稀释液进行生测实验(表 5)。对不同发酵条件对油菜苗高的影响进行二次多项式逐步回归分析可得，使链霉菌 6803 菌株对油菜具有最强化感作用的最

表 5 链霉菌 6803 菌株发酵培养条件均匀设计试验方案及最终发酵液对油菜幼苗生长的影响

Table 5 Uniform experiment design of liquid culture conditions for *Streptomyces sp. 6803* fermentation and effects of dilute solution (×5) of their final fermented broths on seedling growth of rape

试 验 号	X ₁ pH 值	X ₂ 装量系数 (V·V ⁻¹)	X ₃ 接种量/ %	X ₄ 温度/ ℃	X ₅ 转速/ (r·min ⁻¹)	Y ₁ 油菜苗高/ cm	Y ₂ ρ (生物量)/ (g·L ⁻¹)
1	6.8	0.20	8	36	170	1.55±0.08	6.93±0.18
2	7.6	0.35	5	34	180	1.22±0.07	5.98±0.10
3	7.0	0.30	6	26	150	1.20±0.07	6.76±0.16
4	7.4	0.15	7	28	190	1.07±0.03	11.56±0.24
5	6.6	0.25	4	30	200	0.52±0.07	9.01±0.23
6	7.2	0.10	3	32	160	1.26±0.06	8.27±0.13

佳发酵条件为：pH 7.6，装量系数 0.16，接种量 3%，转速 200 r·min⁻¹，温度 36℃，此时油菜苗高为 0.48 cm。

同理对菌丝产量进行二次多项式逐步回归分析表明链霉菌 6803 菌株的最佳生长条件为：pH 7.6，装量系数 0.1，接种量 8%，温度 26℃，转速 200 r·min⁻¹，链霉菌 6803 菌株的 ρ (菌丝生物量)为 13.8 g·L⁻¹。

2.6 链霉菌6803菌株液体发酵工艺优化

最佳发酵条件培养链霉菌 6803 菌株，每隔 12 h 测菌丝体生物量，发酵液 5 倍稀释液进行生测试验。结果链霉菌 6803 菌株 12 h 以内进入生长对数期，48 h 后进入生长平衡期， ρ (菌丝生物量)为 26 g·L⁻¹；132 h 时，菌丝体开始自溶；144 h 时， ρ (菌丝生物量)下降为 20.38 g·L⁻¹。发酵液的 5 倍稀释液对油菜苗高的抑制作用随着发酵时间的增加而增强，表明链霉菌 6803 菌株可分泌大量的次生物质到发酵液中(图 4)。因此适合链霉菌 6803 菌株生长和发酵液有最强化感作用的发酵培养基和条件为： ρ (淀粉)=26.67 g·L⁻¹， ρ (蔗糖)=25.15 g·L⁻¹， $\rho(NH_4Cl)$ =0.30 g·L⁻¹，w(黄豆饼粉浸液)=8.88%， $\rho[(NH_4)H_2PO_4]$ =0.18 g·L⁻¹，

表 4 链霉菌 6803 菌株发酵液体培养基均匀设计试验方案及最终发酵液对油菜幼苗生长的影响
Table 4 Uniform experiment design of liquid culture media for *Streptomyces sp. 6803* fermentation and effects of dilute solution (×5) of their final fermented broths on seedling growth of rape

试 验 号	X ₁ ρ (淀粉)/ (g·L ⁻¹)	X ₂ ρ (蔗糖)/ (g·L ⁻¹)	X ₃ w(黄豆饼粉浸液)/ %	X ₄ $\rho(NH_4Cl)$ (以 N 计)/ (g·L ⁻¹)	X ₅ $\rho[(NH_4)H_2PO_4]$ (以 N 计)/(g·L ⁻¹)	X ₆ $\rho(FeSO_4 \cdot 7H_2O)$ / (g·L ⁻¹)	X ₇ $\rho(NaCl)$ / (g·L ⁻¹)	Y ₁ 油菜苗高/ cm	Y ₂ ρ (生物量)/ (g·L ⁻¹)
1	18	24	6	0.09	0.24	0.014	0.1	1.34±0.04	7.53±0.02
2	21	27	5	0.30	0.12	0.004	0.6	0.50±0.12	6.07±0.01
3	24	12	8	0.21	0.3	0.010	0.8	1.34±0.09	7.60±0.03
4	15	15	4	0.06	0.21	0.002	0.7	1.05±0.06	5.67±0.03
5	9	21	1	0.18	0.18	0.016	0.9	0.89±0.05	2.53±0.02
6	3	15	3	0.24	0.27	0.006	0.2	1.07±0.07	3.60±0.01
7	6	18	9	0.12	0.06	0.008	0.5	1.11±0.03	6.20±0.02
8	12	3	7	0.27	0.15	0.018	0.4	1.38±0.06	6.73±0.03
9	27	9	2	0.15	0.09	0.012	0.3	1.16±0.07	4.00±0.01

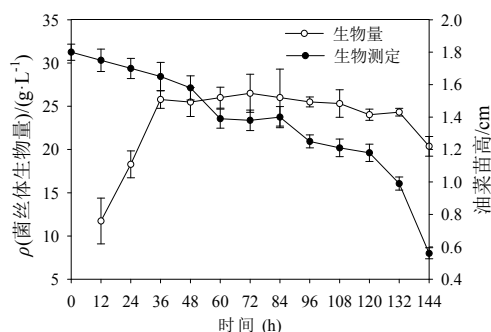


图4 在最佳发酵工艺条件下不同时间链霉菌 6803 菌株菌丝生物量及对油菜苗高的影响

Fig.4 Effect of the fermented broths of *Streptomyces* sp. 6803 on the seedling growth of rape and the biomass of *Streptomyces* sp. 6803 under optimal fermentation conditions

$\rho(\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}) = 0.002 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\rho(\text{NaCl}) = 0.75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.6, 装量系数 0.16, 接种量 3%, 温度 36°C , 转速 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 发酵 144 h。

3 讨论与结论

据统计全世界约有 30 000 种杂草, 其中约 1 800 余种杂草所造成的损失占粮食总产量的 9.7%^[21]。我国分布的杂草有 1 400 多种, 其中农田杂草 704 种, 分属 366 属 87 科^[10,22]。化学除草剂的大量使用导致抗药性杂草种类不断增加^[6,23], 已有 185 种杂草对化学除草剂产生了不同程度的抗药性, 对农业可持续发展造成严重危害^[3,17]。

放线菌是微生物中产生抗生素种类和数量最多的类群, 作为新农药开发的潜力较大, 用于植物病害生物防治中的主要是链霉菌属 (*Streptomyces*) 及其相关类群^[24], 其中许多已开发成除草剂、杀菌剂和杀虫剂等^[25-27]。上海农药研究所筛选到的 1 株链霉菌产生的两类环己酰亚胺物质具有极强的杀草活性, 用其发酵液的稀释液对反枝苋 (*Amaranthus retroflexus*)、春蓼 (*Polygonum persicaria*) 进行苗前处理防效分别为 78.6%、64.9%, 苗后处理的防效可达 100%。采用 Ames 检测结果表明此抗生素为低毒化合物, 在细菌试验中无诱变作用^[28]。杨超等筛选的 1 株拮抗放线菌的发酵液对高粱 (*Sorghum bicolor*)、小麦 (*Triticum aestivum*)、辣椒 (*Capsicum annuum*)、番茄 (*Capsicum annuum*)、黄瓜 (*Cucumis sativus*) 等 5 种作物具有化感作用, 稀释 200 倍后对供试作物的根长和苗高均有显著地抑制作用, 稀释 400 倍对辣椒、黄瓜和番茄有一定的抑制作用, 而稀释 600 倍则对番茄和辣椒有抑制作用, 表明该培养液对单子叶作物是安全的, 对双子叶作物则要慎用^[24]。生防放线菌 28G14 不但具有广谱抗菌活性, 而且它的发酵液对莴苣 (*Lactuca sativa*)、油菜、三叶鬼针草 (*Bidens pilosa*)、苜蓿 (*Medicago sativa*) 和小麦等植物的种子萌发和根生长有抑制作用, 表明放线菌

28G14 对真菌和高等植物均有化感作用^[25]。

本研究对链霉菌 6803 菌株的发酵工艺进行优化, 筛选出最佳的发酵条件, 为进一步利用链霉菌 6803 菌株作为新型的天然源除草剂奠定了基础。链霉菌 6803 菌株发酵液中有效化学成分及其对杂草的作用机理有待深入研究。

参考文献:

- [1] 张红玉. 植物病原真菌毒素除草剂活性研究现状[J]. 草业科学, 2009, 26(10): 160-164.
ZHANG Hongyu. Research review on herbicide activity of phytopathogen mycotoxins[J]. Pratacultural Science, 2009, 26(10): 160-164.
- [2] MACÍAS F A, MOLINILLO J M G, VARELA R M, et al. Allelopathy - a natural alternative for weed control[J]. Pest Management Science, 2007, 63(4): 327-348.
- [3] 叶非, 冯理. 微生物除草剂的研究与应用进展[J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(4): 139-143.
YE Fei, FENG Li. Progress of research and application on microbial herbicides[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2010, 41(4): 139-143.
- [4] 黄顶成, 尤民生, 侯有明, 等. 化学除草剂对农田生物群落的影响[J]. 生态学报, 2005, 25(6): 1451-1458.
HUANG Dingcheng, YOU Minsheng, HOU Youming, et al. Effects of chemical herbicides on bio-communities on agroecosystems[J]. Acta Ecologica Sinica, 2005, 25(6): 1451-1458.
- [5] BUHLER D D, LIBEMAN M, OBYREKI J J. Theoretical and practical challenges to an IPM approach to weed management[J]. Weed Science, 2000, 48(3): 274-280.
- [6] 陈勇强, 但汉斌, 郭富常. 国外微生物除草剂的研究及应用现状[J]. 天津农业科学, 1998, 4(2): 5-9.
CHEN Yongqiang, DAN Hanbin, GUO Fuchang. The current situation of application research on microbial weedicides in abroad[J]. Tianjin Agricultural Sciences, 1998, 4(2): 5-9.
- [7] CHANDRAMOHAN S, CHARUDATTAN R, SONODA R M, et al. Field evaluation of a fungal pathogen mixture for the control of seven weedy grasses[J]. Weed Science, 2002, 50(2): 204-213.
- [8] 马瑞燕, 王韧, 丁建清. 利用传统生物防治控制外来杂草的入侵[J]. 生态学报, 2003, 23(12): 2677-2688.
MA Ruiyan, WANG Ren, DING Jianqing. Classical biological control of exotic weeds[J]. Acta Ecologica Sinica, 2003, 23(12): 2677-2688.
- [9] 李水清, 赵春. 我国生物除草剂的研究进展[J]. 湖北农学院学报, 2003, 23(2): 135-139.
LI Shuiqing, ZHAO Chun. The research progress on bioherbicide in China[J]. Journal of Hubei Agricultural College, 2003, 23(2): 135-139.
- [10] 顾成波, 赵长山. 微生物及其天然产物防治杂草的发展及展望[J]. 农药科学与管理, 2003, 24(2): 19-21.
GU Chengbo, ZHAO Changshan. The potential of using microbes and microbial nature products for control of weeds[J]. Pesticide Science and Administration, 2003, 24(2): 19-21.
- [11] BAIS H P, VEPACHEDU R, GILROY S, et al. Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions[J]. Science, 2003, 301(5638): 1377-1380.
- [12] TEBEEST D O. The status of biological control of weeds with fungal pathogens[J]. Annual Review of Phytopathology, 1992(30): 637-658.
- [13] RIDINGS W H. Biological control of strangervine in citrus a researcher's view[J]. Weed Science, 1986, 34(Suppl. 1): 31-32.

- [14] FGUIRA L F B, FOTSO S, AMEUR-MEHDI R B, et al. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80[J]. Research in Microbiology, 2005, 156(3): 341-347.
- [15] DUKE S O, DAYAN F E, RIMANDO A M, et al. Chemicals from nature for weed management[J]. Weed Science, 2002, 50(2): 138-151.
- [16] MCRAC C F. Role of conidial matrix of *Colletotrichum orbiculare* in pathogenesis of *Xanthium spinosum*[J]. Mycology Research, 1990, 94(7): 890-896.
- [17] 孙巍, 张蕾, 吴迪, 等. 微生物除草剂的研究进展与展望[J]. 微生物学杂志, 2006, 26(2): 88-91.
SUN Wei, ZHANG Lei, WU Di, et al. Progress and perspectives on microbial herbicide[J]. Journal of Microbiology, 2006, 26(2): 88-91.
- [18] 李颖慧, 陈勇. 杂草对百草枯的抗性机制研究进展[J]. 生态学杂志, 2012, 31(1): 194-199.
LI Yinghui, CHEN Yong. Research advances in paraquat-resistance mechanisms of weeds[J]. Chinese Journal of Ecology, 2012, 31(1): 194-199.
- [19] ZHANG Z Y, PAN L P, LI H H. Isolation, identification and characterization of soil microbes which degrade phenolic allelochemicals[J]. Journal of Applied microbiology, 2010, 108(5): 1839-1849.
- [20] Chen M, Xie LJ, Zhou JR, et al. Collection, purification and structure elucidation of allelochemicals of *Streptomyces* sp. 6803[J]. Allelopathy Journal, 2010, 25(1): 93-106.
- [21] LI Y Q, SUN Z L, ZHUANG X F, et al. Research progress on microbial herbicides[J]. Crop Protection, 2003, 22(2): 247-252.
- [22] 强胜. 我国杂草学研究现状及其发展策略[J]. 植物保护, 2010, 36(4): 1-5.
QIANG Sheng. Current status and development strategy for weed science in China[J]. Plant Protection, 2010, 36(4): 1-5.
- [23] 蔡建, 刘志, 王跃强, 等. 蓝藻发酵生产微生物农药的影响因素研究[J]. 生态环境学报, 2011, 20(5): 951-955.
CAI Jian, LIU Zhi, WANG Yueqiang, et al. Factors affecting the production of *Bacillus thuringiensis* biopesticide using blue algae as raw material[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2011, 20(5): 951-955.
- [24] 杨超, 慕小倩, 安德荣. 一株拮抗放线菌培养液对 5 种作物化感作用的初步研究[J]. 微生物学杂志, 2005, 25(4): 105-107.
YANG Chao, MU Xiaoqian, AN Derong. Allelopathy of an antagonistic actinomycetes strains culture fluid on five different crops[J]. Journal of Microbiology, 2005, 25(4): 105-107.
- [25] 张炜玲, 赵媛, 高锦明, 等. 生防放线菌 28G14 的生物活性初探[J]. 西北农林科技大学学报, 2010, 38(4): 164-170.
ZHAO Weiling, ZHAO Yuan, GAO Jinming, et al. Preliminary studies on the bioactivity of actinomycete 28G14[J]. Journal of Northwest A&F University, 2010, 38(4): 164-170.
- [26] 徐文平, 陶黎明, 顾学斌, 等. 生物除草剂 9018 的研究[J]. 上海化工, 1999, 24(15): 21-22.
XU Wenping, TAO Liming, GU Xuebin, et al. Study of microbiologic herbicide 9018[J]. Shanghai Chemical Industry, 1999, 24(15): 21-22.
- [27] 常明, 周顺桂, 卢娜, 等. 微生物转化污泥制备苏云金杆菌生物杀虫剂[J]. 环境科学, 2006, 27(7): 1450-1454.
CHANG Ming, ZHOU Shungui, LU Na, et al. Bioconversion of sewage sludge to biopesticide by *Bacillus thuringiensis*[J]. Environmental Science, 2006, 27(7): 1450-1454.
- [28] ABBAS H K, TANAKA T, DUKE S O, et al. Susceptibility of various crop and weed species to AAL-toxin, a natural herbicide[J]. Weed Technology, 1995, 9(1): 125-130.

Study on optimization of fermentation of *Streptomyces* sp. 6803 with allelopathic effects

WANG Ruilong^{1,2}, HUANG Ke^{1,2}, SHI Mubiao³, SONG Yuanyuan^{1,2},
CHEN Min^{1,2}, SU Yijuan^{1,2}, ZENG Rensen^{1,2*}

1. State Key Laboratory of Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, Guangzhou 510642, China;

2. Ministry of Agriculture Key Laboratory of Tropical Agro-environment, Guangzhou 510642, China;

3. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

Abstract: It has been demonstrated that *Streptomyces* sp. 6803 has allelopathic effects on higher plants. The single factor test was used to determine the optimal carbon source, nitrogen source, inorganic salts, temperature, initial medium pH, shaker rotation velocity, culture duration for mycelium growth and allelopathic effects on the seedling growth of barnyardgrass (*Echinochloa crusgalli*) and rape (*Brassica campestris*). Uniform design was used to optimize fermentation media and conditions for *Streptomyces* sp. 6803. The result showed that the optimal fermentation conditions of *Streptomyces* sp. 6803 were soluble starch 26.67 g·L⁻¹, sucrose 25.15 g·L⁻¹, beancake powder extract 8.88%, ammonium chloride 0.30 g·L⁻¹, ammonium phosphate monobasic 0.18 g·L⁻¹, ferrous sulfate, 0.002 g·L⁻¹, sodium chloride 0.75 g·L⁻¹, pH 7.6, loading coefficient 0.16, pitching rate 3%, temperature 36 °C, rotational speed 200 r·min⁻¹ and fermented duration 144 h. This study provides the basic information on using secondary metabolites of microorganisms as natural herbicide.

Key words: *Streptomyces* sp. 6803; allelopathy; fermentation process; natural herbicide