

## 拮抗链霉菌 R<sub>2</sub>A-15 发酵条件优化及其活性稳定性分析

梁嘉振, 郭家勇, 杨铮蕴, 罗婉, 罗东程, 杨春敏, 李羽, 谢雨轩\*

广州工商学院, 广东佛山 528135

**摘要:** 柑橘是我国最重要的水果之一, 其采后发生的柑橘绿霉病严重威胁柑橘的质量安全, 而且还会引起果品中真菌毒素的污染。本团队从广东省湛江市廉江九洲江红橙园的红橙植株根部土壤中, 分离筛选出一株对柑橘绿霉病原菌具有良好拮抗作用的链霉菌 R<sub>2</sub>A-15, 对其进行发酵条件优化和抑菌活性稳定性分析, 为柑橘绿霉病生防菌剂的制备与应用提供参考。本研究以指状青霉 (*Penicillium digitatum*) 为靶标菌, 根据纸片扩散法的抑菌圈直径大小判断发酵液抑菌活性。采用单因素和交叉组合试验优化菌株 R<sub>2</sub>A-15 发酵培养基, 通过响应面分析法对发酵条件进行优化, 提高发酵液抑菌活性, 并对发酵液进行不同的酸碱、温度和紫外线条件的稳定性研究。在单因素试验和交叉组合试验中, 菌株发酵培养基的最适碳源为玉米面, 最适氮源为酸水解酪蛋白。根据响应面分析法, 得出玉米面和发酵时间对发酵液抑菌活性有显著影响。经验证试验得出, 最大的发酵液抑菌活性的最优发酵培养基为: 玉米面 12.09 g, 酸水解酪蛋白 4.00 g, 碳酸钙 2.00 g, 硫酸镁 2.00 g, 磷酸氢二钾 2.00 g, 氯化钠 1.00 g, 蒸馏水 1 L; 最优发酵条件为: 发酵初始 pH 7.0、发酵时间 37.50 h、发酵温度 34 ℃、接种量 3%、摇瓶装液量 100 mL/250 mL。菌株发酵液抑菌活性优化后比优化前提提高了 39%。菌株发酵液经过不同的温度和紫外线条件处理后, 整体抑菌活性能维持在一个相对稳定的高活性水平上, 但在强酸强碱条件下, 发酵液抑菌活性有所下降。结果表明, 链霉菌 R<sub>2</sub>A-15 对柑橘绿霉病原菌具有较好的稳定抑菌效果, 有较好的实际应用前景, 为后期规模化发酵以及菌剂的开发奠定基础。

**关键词:** 指状青霉; 链霉菌 R<sub>2</sub>A-15; 抑菌活性; 发酵优化; 稳定性

中图分类号: S436.6

文献标志码: A

## Optimization of Fermentation Conditions and Analysis of Activity Stability of Antagonist *Streptomyces* sp. R<sub>2</sub>A-15

LIANG Jiazhen, GUO Jiayong, YANG Zhengyun, LUO Wan, LUO Dongcheng, YANG Chunmin, LI Yu, XIE Yuxuan\*

Guangzhou College of Technology and Business, Foshan, Guangdong 528135, China

**Abstract:** Citrus is one of the most important fruits in China, and its post-harvest occurrence of citrus green mold is a serious threat to the quality and safety of citrus, and also causes mycotoxin contamination in the fruit. A strain of *Streptomyces* sp. R<sub>2</sub>A-15 with good antagonistic effect on the pathogen of citrus green mold was isolated from the root soil of red orange plants in the red orange orchard of Jiuzhoujiang, Lianjiang, Zhanjiang city, Guangdong province. The optimization of the fermentation conditions and stability analysis of the bacterial inhibition activity were studied to provide reference for the preparation and application of the biocontrol agent of citrus green mold. In this study, *Penicillium digitatum* was used as the target fungus, and the fermentation broth was used as the inhibitory activity according to the size of the diameter of the inhibition zone by paper diffusion method. The fermentation medium of strain R<sub>2</sub>A-15 was optimized using one-way and cross-combination tests, and the fermentation conditions were optimized by response surface analysis to improve the inhibitory activity of the fermentation broth, and the stability of the fermentation broth was

收稿日期 2023-09-15; 修回日期 2023-12-05

基金项目 广州工商学院 2021 年度国家级大学生创新创业训练计划项目 (No. 202113714005); 广州工商学院 2023 年度国家级大学生创新创业训练计划项目 (No. 202313714005); 广州工商学院 2022 年度校级科研项目 (No. KYYB202225)。

作者简介 梁嘉振 (1999—), 男, 学士, 研究方向: 食品质量与安全。\*通信作者 (Corresponding author): 谢雨轩 (XIE Yuxuan), E-mail: 357448763@qq.com。

investigated under different acid-base, temperature and ultraviolet light conditions. The optimum carbon source for the fermentation medium of the strain was cornmeal and the optimum nitrogen source was acid-hydrolyzed casein in the one-way and cross-combination tests. Based on response surface analysis, it was concluded that cornmeal and fermentation time had a significant effect on the bacteriostatic activity of the fermentation broth. The optimal fermentation medium for maximum inhibitory activity of the fermentation broth, as determined by validation tests, was 12.09 g of cornmeal, 4.00 g of acid-hydrolyzed casein, 2.00 g of calcium carbonate, 2.00 g of magnesium sulfate, 2.00 g of dipotassium hydrogen phosphate, 1.00 g of sodium chloride, and 1 L of distilled water. The optimal fermentation conditions were: initial fermentation pH 7.0, fermentation time 37.50 h, fermentation temperature 34 °C, inoculum volume 3%, and shake flask filling volume 100 mL/250 mL. The bacteriostatic activity of the fermentation broth of the strains increased by 39% after optimization. The overall bacteriostatic activity of the fermentation broth of the strain could be maintained at a relatively stable and high activity level after treatment with different temperatures and ultraviolet light conditions, but the bacteriostatic activity of the fermentation broth decreased under strong acid and alkali. The results indicate that *Streptomyces* sp. R<sub>2</sub>A-15 has a good and stable inhibitory effect on the citrus green mold pathogen, and has a good prospect for practical application, which lays a foundation for the later scale fermentation as well as the development of bacterial agents.

**Keywords:** *Penicillium digitatum*; *Streptomyces* sp. R<sub>2</sub>A-15; antibacterial activity; fermentation optimization; stability

**DOI:** 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.08.018

放线菌是自然界中普遍存在的一类微生物,其存在于土壤、空气和水中,尤其是在含水量较低、有机物含量较高的中性或弱碱土壤中。它们是一种重要的生物资源,可以产生新的活性物质<sup>[1-2]</sup>。近几年,以放线菌为材料,制备微生物菌剂是防治植物病害的研究热点<sup>[3-4]</sup>。据研究报道,放线菌发酵液对黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)<sup>[5]</sup>、大豆斑疹病菌(*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*)<sup>[6]</sup>、水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)<sup>[7]</sup>等植物病原菌具有良好的抑菌活性。随着人们对食品安全越来越重视,农用抗生素放线菌的筛选与利用已成为当前农业微生物领域的一个重要课题<sup>[8-9]</sup>。

指状青霉(*Penicillium digitatum*)感染所致的柑橘绿霉病是柑橘采后中最为普遍的一种病害,每年成熟时都会导致大量的霉烂,给柑橘产业造成巨大的经济损失。传统的控制手段主要是利用化学农药,但是化学农药会带来农药残留、环境污染、病原菌抗性和长期使用后药效下降等问题<sup>[10]</sup>。而利用拮抗微生物的生物防治方法具有安全、环保、经济效益高等优点,本团队从广东省湛江市廉江红橙植株根部土壤中分离筛选出的 1 株放线菌 R<sub>2</sub>A-15 对指状青霉具有较好拮抗作用。采用 16S rRNA 基因序列测定初步鉴定该菌株为弗吉尼亚链霉菌(*Streptomyces virginiae*),相似性为 99.29%。本团队将进一步对菌株 R<sub>2</sub>A-15 开展试验,以发酵液的抑菌活性为标准找出最优发酵条件,为其进一步开发和利用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试菌株和病原真菌 从广东省湛江市廉江九洲江红橙园红橙植株根部土壤分离筛选出拮抗链霉菌 *Streptomyces* sp. R<sub>2</sub>A-15。

指状青霉(*Penicillium digitatum*)由西南大学食品科学学院曾凯芳教授惠赠。

1.1.2 培养基 菌株生长培养基:ISP4 培养基<sup>[11]</sup>。菌株发酵培养基:ISP1 培养基、ISP2 培养基、ISP3 培养基、ISP4 培养基、ISP5 培养基、ISP6 培养基、ISP7 培养基、R<sub>2</sub>A 培养基<sup>[12]</sup>和改良高氏二号培养基。活性检测培养基:PDA 培养基<sup>[13]</sup>。

改良高氏二号培养基:葡萄糖 1.00 g,蛋白胨 0.50 g,胰蛋白胨 0.30 g,氯化钠 0.50 g,蒸馏水 1 L, pH 7.0。

### 1.2 方法

1.2.1 培养条件 菌种活化:将保存的菌种转接到 ISP4 固体培养基中,28 °C 培养 5 d。

种子液制备:用直径 8 mm 的无菌打孔器打取 3 个菌饼接种于 ISP4 液体培养基中,装液量为 100 mL/250 mL,在 28 °C、180 r/min 下培养 3 d,作为种子液<sup>[14]</sup>。

初始摇瓶发酵:将 5%接种量的种子液加入到发酵培养基中,装液量为 100 mL/250 mL,28 °C、180 r/min,培养 5 d<sup>[15]</sup>。

1.2.2 发酵液抑菌活性检测 收集发酵上清液,以 3000 r/min 离心 15 min,用 0.22 μm 的微孔滤

膜过滤,用纸片扩散法测量抑菌圈的直径。在 PDA 固体培养平板涂布接种 0.20 mL 指状青霉菌悬液。用无菌镊子将滤纸片(直径 6 mm)平整贴在平板表面,再在滤纸片上滴加 20  $\mu$ L 发酵滤液。在 28  $^{\circ}$ C 培养 3 d,测量抑菌圈的直径,并重复 3 次试验。

**1.2.3 菌株 R<sub>2</sub>A-15 发酵培养基的优化** 向 250 mL 三角瓶中分别加入 1.1.2 中的 9 种不同的 100 mL 液体培养基,进行摇瓶发酵,参照 1.2.2 的方法测定抑菌活性,从中选择最优培养基作为基础培养基<sup>[16-17]</sup>。

采用单因素试验法,在基础培养基上,分别选用硫酸铵、牛肉膏、蛋白胨、大豆蛋白胨、鱼蛋白胨、酸水解酪蛋白、酵母提取物、大豆粉和麦芽粉作为氮源<sup>[18]</sup>;分别选用葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、甘露醇、淀粉、小米、玉米面、大米和燕麦片作为碳源<sup>[19]</sup>。参照 1.2.2 的方法测定抑菌活性,筛选出最优的 3 种氮源和碳源。

采用交叉组合试验,将最优的 3 种氮源和碳源进行交叉组合,参照 1.2.2 的方法测定抑菌活性,确定最优的氮源、碳源组合作为最优发酵培养基配方<sup>[20]</sup>。

**1.2.4 菌株 R<sub>2</sub>A-15 发酵条件的优化** 在确定了最优的发酵培养基配方之后,参照 1.2.2 的方法,对菌株 R<sub>2</sub>A-15 在不同发酵条件下的发酵液进行指状青霉的抑菌活性的测定,确定最优发酵参数<sup>[21-23]</sup>。在 28  $^{\circ}$ C,250 mL 三角瓶,180 r/min 摇床培养,选取不同的发酵初始 pH<sup>[24-26]</sup>:5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0;不同的发酵时间:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 d;不同的发酵温度:22、24、26、28、30、32、34、36、38  $^{\circ}$ C;不同的接种量:1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%;不同的摇瓶装液量:25、50、75、100、125 mL。

**1.2.5 影响发酵液抑菌活性的关键因子筛选** 采用 Minitab20 软件,根据单因素试验所得各因素的范围,对发酵培养基和发酵培养条件中的 7 个因素进行 Plackett-Burman 试验设计<sup>[27]</sup>,每个因素选取高、低 2 个水平,以发酵液抑菌活性为响应值进行试验次数为 12 次的试验设计。根据试验设计方案,对其进行发酵培养,并对其抑菌活性进行测定。通过对试验数据的统计分析,找出对发酵液具有显著抑菌活性的关键因子。

**1.2.6 最陡爬坡试验** 根据抑菌效应的正负,对发酵液具有显著抑菌活性的关键因子进行最陡爬

坡试验。正效应则提高因子水平,负效应则降低因子水平,并找到活性最高的区域。以响应面中心复合试验的中心点,选取发酵液抑菌活性最高的处理条件为研究对象。

**1.2.7 响应面设计试验** 在最陡爬坡试验的基础上,开展中心复合设计(CCD)试验,得到二次多项回归方程,对各因素进行分析,寻找最优值,对最优的发酵液抑菌活性进行预测。

**1.2.8 验证试验** 在优化后的发酵培养基和发酵条件基础上,对该菌株的抑菌活性进行检测,并对其进行验证和可靠性分析,从而获得该菌株最优发酵培养基配方及发酵条件。

**1.2.9 发酵液的抑菌活性稳定性测定** 取离心后的发酵上清液 10 mL,分别在 4、10、20、30、40、50、60  $^{\circ}$ C 处理 1 h,以未经处理的发酵液作为对照<sup>[28-29]</sup>,参照 1.2.2 的测定方法测定抑菌活性。

取离心后的发酵上清液 10 mL,用 1 mol/L 的 HCl 和 1 mol/L 的 NaOH 将 pH 调为 2.0、4.0、6.0、7.0、8.0、10.0、12.0,在室温放置 1 h 后,将 pH 调为原始值,以未经处理的发酵液作为对照,参照 1.2.2 的测定方法测定抑菌活性。

取离心后的发酵上清液 10 mL,分别置于波长 254 nm,功率 30 W 的紫外灯下 20 cm 处照射 1、2、3、4、5、6、7、8、9 h,以未经处理的发酵液为对照,参照 1.2.2 的测定方法测定抑菌活性。

## 1.3 数据处理

结果以平均值  $\pm$  标准差表示。原始数据用 Excel 2010 软件整理处理后,采用统计学软件 SPSS 25.0 进行显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株 R<sub>2</sub>A-15 发酵培养基的优化

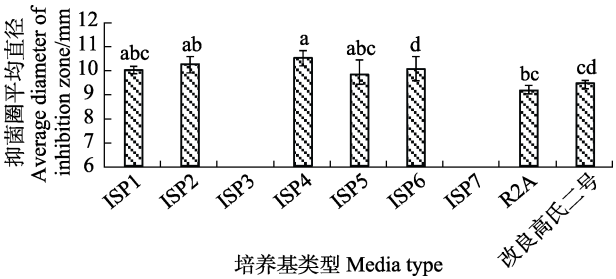
通过对 9 种不同的液体培养基发酵液进行抑菌活性检测,结果见图 1。抑菌活性较强的培养基分别有 ISP2、ISP4 和 ISP6,3 种培养基发酵液对靶标菌的抑菌圈平均直径均为 10.00 mm 以上。其中 ISP4 培养基对靶标菌抑菌活性最优,抑菌圈平均直径为 10.47 mm,因此基于 ISP4 培养基进行后续氮源、碳源组合的优化。

在 ISP4 基础培养基中分别选用 9 种不同氮源对菌株 R<sub>2</sub>A-15 进行发酵培养,结果见图 2。选用

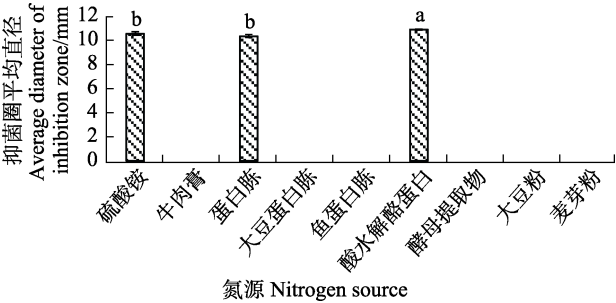
硫酸铵、蛋白胨和酸水解酪蛋白分别作为氮源时, 3 种发酵液对靶标菌的抑菌圈平均直径分别 10.53、10.32、10.88 mm, 具有较强的抑菌活性。3 种氮源发酵液抑菌圈平均直径排序为酸水解酪蛋白>硫酸铵>蛋白胨, 初步确定酸水解酪蛋白、硫酸铵和蛋白胨为菌株 R<sub>2</sub>A-15 最优的发酵氮源。

在 ISP4 基础培养基中分别选用 10 种不同碳源对菌株 R<sub>2</sub>A-15 进行发酵培养, 结果见图 3。选用小米、玉米面和燕麦片作为碳源时, 3 种发酵液对靶标菌的抑菌圈平均直径分别达到 10.66、11.29、10.84 mm, 具有较强的抑菌活性。3 种碳源发酵液抑菌圈平均直径排序为玉米面>燕麦片>小米, 初步确定玉米面、燕麦片和小米为菌株 R<sub>2</sub>A-15 最优的发酵碳源。

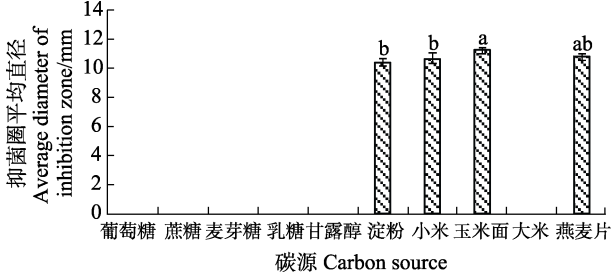
根据筛选获得的最优氮源、碳源进行交叉组合对菌株 R<sub>2</sub>A-15 进行发酵培养, 结果见表 1。选用酸水解酪蛋白和玉米面的组合抑菌活性最优, 抑菌圈平均直径为 11.35 mm, 其次是硫酸铵和玉米面的组合, 抑菌圈平均直径为 11.23 mm。因此选择酸水解酪蛋白和玉米面作为菌株 R<sub>2</sub>A-15 发酵的最优氮源、碳源组合。



不同小写字母表示差异显著 (  $P<0.05$  )。  
Different lowercase letters indicate significant difference (  $P<0.05$  ).  
图 1 培养基对菌株 R<sub>2</sub>A-15 发酵液抑菌活性的影响  
Fig. 1 Effect of culture medium on inhibitory activity of fermentation broth of strain R<sub>2</sub>A-15



不同小写字母表示差异显著 (  $P<0.05$  )。  
Different lowercase letters indicate significant difference (  $P<0.05$  ).  
图 2 氮源对菌株 R<sub>2</sub>A-15 发酵液抑菌活性的影响  
Fig. 2 Effect of nitrogen source on inhibitory activity of fermentation broth of strain R<sub>2</sub>A-15



不同小写字母表示差异显著 (  $P<0.05$  )。  
Different lowercase letters indicate significant difference (  $P<0.05$  ).  
图 3 碳源对菌株 R<sub>2</sub>A-15 发酵液抑菌活性的影响  
Fig. 3 Effect of carbon source on inhibitory activity of fermentation broth of strain R<sub>2</sub>A-15

表 1 碳源、氮源组合对菌株 R<sub>2</sub>A-15 发酵液抑菌活性的影响  
Tab. 1 Effect of combination of carbon and nitrogen sources on inhibitory activity of fermentation broth of strain R<sub>2</sub>A-15

| 氮源<br>Nitrogen source | 碳源<br>Carbon source | 抑菌圈平均直径<br>Average diameter of inhibition zone/mm |
|-----------------------|---------------------|---------------------------------------------------|
| 硫酸铵                   | 小米                  | 10.50±0.06 <sup>b</sup>                           |
| 硫酸铵                   | 玉米面                 | 11.23±0.07 <sup>a</sup>                           |
| 硫酸铵                   | 燕麦片                 | 10.55±0.05 <sup>b</sup>                           |
| 蛋白胨                   | 小米                  | 10.41±0.06 <sup>c</sup>                           |
| 蛋白胨                   | 玉米面                 | 10.89±0.04 <sup>a</sup>                           |
| 蛋白胨                   | 燕麦片                 | 10.67±0.03 <sup>b</sup>                           |
| 酸水解酪蛋白                | 小米                  | 10.42±0.07 <sup>b</sup>                           |
| 酸水解酪蛋白                | 玉米面                 | 11.35±0.09 <sup>a</sup>                           |
| 酸水解酪蛋白                | 燕麦片                 | 10.87±0.53 <sup>ab</sup>                          |

注: 不同小写字母表示差异显著 (  $P<0.05$  )。  
Note: Different lowercase letters indicate significant difference (  $P<0.05$  ).

## 2.2 菌株 R<sub>2</sub>A-15 发酵条件的优化

菌株 R<sub>2</sub>A-15 发酵液的抑菌活性随发酵初始 pH 的增大呈现先增大后减小的趋势, 结果见图 4。当 pH 为 7.0 时该菌株发酵液抑菌活性最优, 抑菌圈平均直径达到 11.40 mm。该菌株在 pH 为 10.0 时无活性, pH 为 5.0 时抑菌活性明显下降, 说明菌株 R<sub>2</sub>A-15 不宜在强酸碱性环境中产生活性物质。因此确定 pH 为 7.0 是菌株 R<sub>2</sub>A-15 的最优发酵初始 pH。

菌株 R<sub>2</sub>A-15 发酵液的抑菌活性随发酵时间的增长呈现先增大后减小的趋势, 结果见图 5。第 2 天的发酵液抑菌活性最优, 其抑菌圈平均直径为 12.30 mm。因此确定发酵时间为 2 d 是菌株 R<sub>2</sub>A-15 的最优发酵时间。

在 30~34 °C 温度区间内其抑菌活性随温度升

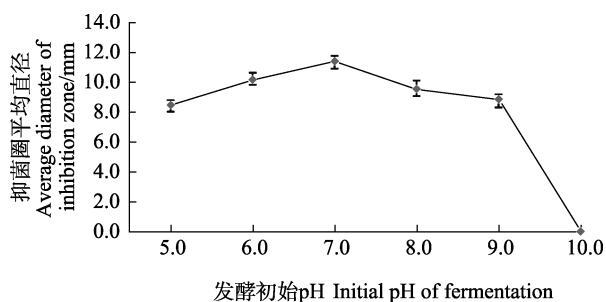


图 4 发酵初始 pH 对菌株 R<sub>2</sub>A-15 发酵液抑菌活性的影响

Fig. 4 Effect of initial pH of fermentation on inhibitory activity of fermentation broth of strain R<sub>2</sub>A-15

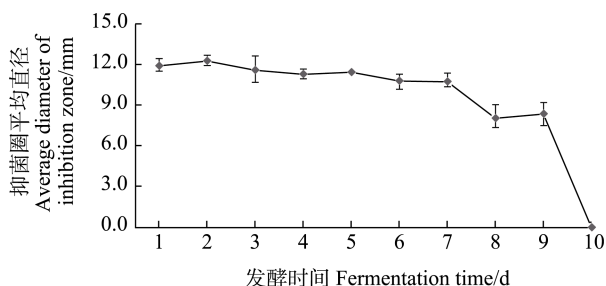


图 5 发酵时间对菌株 R<sub>2</sub>A-15 发酵液抑菌活性的影响

Fig. 5 Effect of fermentation time on bacteriostatic activity of fermentation broth of strain R<sub>2</sub>A-15

高而增强, 结果见图 6。在 34 °C 下对靶标菌的抑菌圈平均直径为 12.90 mm, 抑菌活性最优。在 34 °C 以上, 其发酵液的抑菌活性明显下降, 38 °C 时对靶标菌无抑菌活性, 说明菌株 R<sub>2</sub>A-15 不宜在高温环境下产生活性物质。因此确定 34 °C 是菌株 R<sub>2</sub>A-15 的最优发酵温度。

菌株 R<sub>2</sub>A-15 发酵液的抑菌活性随接种量的增多呈现先增大后减小的趋势, 结果见图 7。当接种量为 3% 时该菌株发酵液对靶标菌的抑菌活性最优, 抑菌圈平均直径为 11.78 mm。低于或超过此量均会使菌株 R<sub>2</sub>A-15 的抑菌活性降低。随着接种量的增加, 菌株的代谢物含量有所提高, 抑菌活性能力增强。然而, 当接种量超过 3% 时, 发酵液中的营养物质有限, 不利于细胞活性成分的生成, 导致抑菌活性下降。因此确定接种量为 3% 是菌株 R<sub>2</sub>A-15 的最优接种量。

菌株 R<sub>2</sub>A-15 发酵液的抑菌活性随装液量的增多呈现先增大后减小的趋势, 结果见图 8。当装液量为 100 mL 时该菌株发酵液抑菌活性最优, 抑菌圈平均直径为 11.57 mm。锥形瓶中营养物质的增加使菌株 R<sub>2</sub>A-15 产生活性物质的能力更强, 但液体体积逐渐增加后, 锥形瓶中的氧含量逐渐降低, 从而影响活性物质的产生能力。因此确定

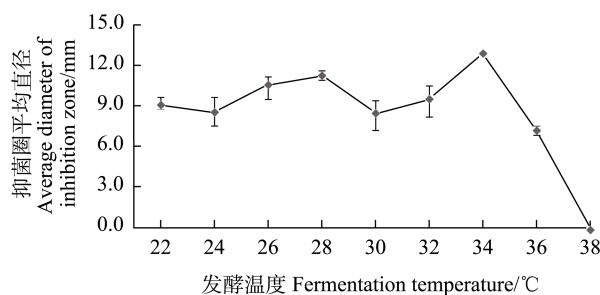


图 6 发酵温度对菌株 R<sub>2</sub>A-15 发酵液抑菌活性的影响

Fig. 6 Effect of fermentation temperature on bacteriostatic activity of fermentation broth of strain R<sub>2</sub>A-15

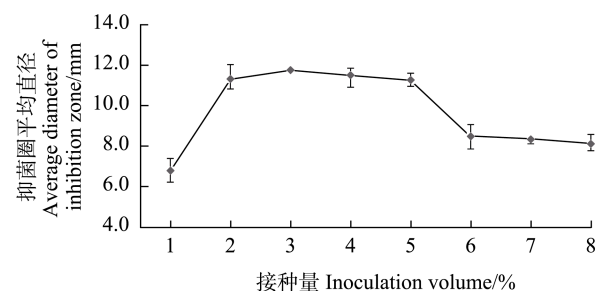


图 7 接种量对菌株 R<sub>2</sub>A-15 发酵液抑菌活性的影响

Fig. 7 Effect of inoculum amount on inhibitory activity of fermentation broth of strain R<sub>2</sub>A-15

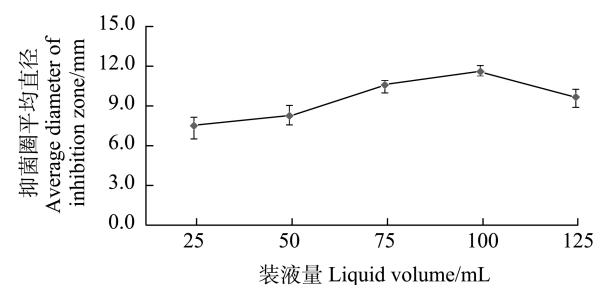


图 8 装液量对菌株 R<sub>2</sub>A-15 发酵液抑菌活性的影响

Fig. 8 Effect of loading volume on inhibitory activity of fermentation broth of strain R<sub>2</sub>A-15

装液量为 100 mL 是菌株 R<sub>2</sub>A-15 的最优装液量。

### 2.3 影响发酵液抑菌活性的关键因子筛选

以单因素试验得到的 7 个因子范围为基础, 对 7 个因子选取高低两水平, 设计见表 2。按照 Plackett-Burman 试验对 7 个因子高低两水平设计, 进行 12 次试验检测发酵液抑菌活性, 结果见表 3。

采用 Minitab 20 软件, 将发酵液的抑菌活性作为响应值, 构建一次回归方程: 抑菌圈平均直径 =  $11.902 - 0.209X_1 - 1.046X_2 + 0.617X_3 - 0.289X_4 - 0.631X_5 + 0.856X_6 + 0.042X_7$ 。回归方程的多元相关系数  $R^2$  大于 90%, 表明该方程的拟合性良好, 可以用于预测各因子对发酵液抑菌活性的变化。根据回归分析, 7 个因子对发酵液抑菌活性的显著性影

表 2 因素的种类和高低两水平  
Tab. 2 Types and levels of factors

| 因素编号<br>Factor No. | 因素种类<br>Type of factor | 低水平<br>Low level<br>(-1) | 高水平<br>High level<br>(+1) |
|--------------------|------------------------|--------------------------|---------------------------|
| X <sub>1</sub>     | 发酵初始 pH                | 6.0                      | 8.0                       |
| X <sub>2</sub>     | 发酵时间/d                 | 1                        | 3                         |
| X <sub>3</sub>     | 发酵温度/℃                 | 32                       | 36                        |
| X <sub>4</sub>     | 接种量/%                  | 2                        | 4                         |
| X <sub>5</sub>     | 装液量/mL                 | 75                       | 125                       |
| X <sub>6</sub>     | 玉米面/g                  | 8.00                     | 12.00                     |
| X <sub>7</sub>     | 酸水解酪蛋白/g               | 3.00                     | 5.00                      |

响分析结果见表 4，在所考察的 7 个因子中，发酵时间的 *P* 值为 0.013，玉米面的 *P* 值为 0.026，均小于 0.05，表明这 2 种因子对发酵液的抑菌活性有显著影响。其他 5 个因素对发酵液的抑菌活性均无显著性影响。发酵时间和玉米面的 *T* 值分别为-4.22

和 3.46，表明发酵时间对发酵液的抑菌活性是负影响，而玉米面对发酵液的抑菌活性是正影响。

2.4 最陡爬坡试验结果分析

从 Plackett-Burman 试验可以看出，发酵时间和玉米面是影响菌株 R<sub>2</sub>A-15 发酵液对抑菌活性的关键因素。发酵时间是负效应，要适当缩短发酵时间；玉米面是正效应，可在发酵培养基中适当提高其含量。通过对 2 种因子的正、负效应及影响程度的分析，确定了 2 种因子的变化方向及步长：从 48 h 开始，发酵时间逐渐缩短；从 10.00 g 开始，增加玉米面的添加量。其他非主要因子，以单因素试验的最优值为发酵条件，对其进行发酵培养，并测定发酵液的抑菌活性。最陡爬坡试验结果见表 5。当发酵时间为 36 h、玉米面为 12.00 g 时，发酵液的抑菌活性最大，故以此为各因子的中心点，进行后续的响应面分析优化。

表 3 Plackett-Burman 试验对各因子高低水平设计  
Tab. 3 Plackett-Burman test for high and low level designs for each factor

| 编号<br>No. | X <sub>1</sub> | X <sub>2</sub> | X <sub>3</sub> | X <sub>4</sub> | X <sub>5</sub> | X <sub>6</sub> | X <sub>7</sub> | 抑菌圈平均直径<br>Average diameter of inhibition zone/mm |
|-----------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---------------------------------------------------|
| 1         | +              | -              | +              | -              | -              | -              | +              | 13.84±0.04                                        |
| 2         | +              | +              | -              | +              | -              | -              | -              | 9.18±0.06                                         |
| 3         | -              | +              | +              | -              | +              | -              | -              | 10.49±0.04                                        |
| 4         | +              | -              | +              | +              | -              | +              | -              | 14.06±0.08                                        |
| 5         | +              | +              | -              | +              | +              | -              | +              | 8.59±0.11                                         |
| 6         | +              | +              | +              | -              | +              | +              | -              | 11.69±0.07                                        |
| 7         | -              | +              | +              | +              | -              | +              | +              | 13.79±0.11                                        |
| 8         | -              | -              | +              | +              | +              | -              | +              | 11.25±0.07                                        |
| 9         | -              | -              | -              | +              | +              | +              | -              | 12.81±0.29                                        |
| 10        | +              | -              | -              | -              | +              | +              | +              | 12.80±0.06                                        |
| 11        | -              | +              | -              | -              | -              | +              | +              | 11.40±0.06                                        |
| 12        | -              | -              | -              | -              | -              | -              | -              | 12.93±0.02                                        |

表 4 Plackett-Burman 试验显著性分析  
Tab. 4 Plackett-Burman test significance analysis

| 因素 Factor | 系数 Ratio | <i>T</i> 值 <i>T</i> -value | <i>P</i> 值 <i>P</i> -value |
|-----------|----------|----------------------------|----------------------------|
| 常量        | 11.902   | 48.06                      | 0.000                      |
| 发酵初始 pH   | -0.209   | -0.84                      | 0.446                      |
| 发酵时间      | -1.046   | -4.22                      | 0.013                      |
| 发酵温度      | 0.617    | 2.49                       | 0.067                      |
| 接种量       | -0.289   | -1.17                      | 0.308                      |
| 装液量       | -0.631   | -2.55                      | 0.063                      |
| 玉米面       | 0.856    | 3.46                       | 0.026                      |
| 酸水解酪蛋白    | 0.042    | 0.17                       | 0.872                      |

表 5 最陡爬坡试验设计  
Tab. 5 Experiment design of steepest ascent

| 序号<br>No. | 发酵时间<br>Fermentation time/h | 玉米面<br>Cornmeal/g | 抑菌圈平均直径<br>Average diameter of inhibition zone/mm |
|-----------|-----------------------------|-------------------|---------------------------------------------------|
| 1         | 24                          | 10.00             | 13.61±0.16                                        |
| 2         | 30                          | 11.00             | 14.07±0.17                                        |
| 3         | 36                          | 12.00             | 14.56±0.06                                        |
| 4         | 42                          | 13.00             | 14.24±0.05                                        |
| 5         | 48                          | 14.00             | 13.83±0.06                                        |

2.5 响应面试验设计结果分析

根据最陡爬坡试验结果发现，显著性因子发

酵时间和玉米面分别为 36 h 和 12.00 g 时，发酵液抑菌活性最大，抑菌圈平均直径达到 14.56 mm。以发酵时间（36 h）和玉米面（12.00 g）为中心点，对发酵时间和玉米面进行 5 个水平的中心复合试验设计，中心复合试验设计见表 6。根据中心复合试验设计，开展 13 组试验检测发酵液抑菌活性，中心复合试验结果见表 7。

用 Minitab 20 软件进行二元回归拟合，获得抑菌圈平均直径（Y）对发酵时间（X<sub>2</sub>）和玉米面（X<sub>6</sub>）的二次多项回归方程： $Y=1.76+0.1911X_2+1.524X_6-0.002271X_2^2-0.06050X_6^2-0.00167X_2X_6$ 。

经显著性和方差分析后，得到 F 值为 25.78，P 值为 0.000，说明回归方程拟合较好，可靠性高。抑菌圈平均直径与发酵时间、玉米面的曲面见图 9，等值线见图 10。由响应面的形状可知，当发

酵时间（X<sub>2</sub>）为 37.5，玉米面（X<sub>6</sub>）为 12.09 时，最大的抑菌圈平均直径为 14.56 mm。

2.6 验证试验

用优化的发酵培养基和发酵条件，对菌株 R<sub>2</sub>A-15 的发酵液抑菌活性进行验证试验(图 11)。结果表明，抑菌圈平均直径达到 14.56 mm，与理论计算结果 14.56 mm 一致，比优化前 10.47 mm 高 4.09 mm。

采用单因素试验、Plackett-Burman 试验以及响应面分析法，经验证试验最终得到菌株 R<sub>2</sub>A-15 的最优培养基为：玉米面 12.09 g，酸水解酪蛋白 4.00 g，碳酸钙 2.00 g，硫酸镁 2.00 g，磷酸氢二钾 2.00 g，氯化钠 1.00 g，蒸馏水 1 L；最优发酵条件为：发酵初始 pH 7.0、发酵时间 37.50 h、发酵温度 34 ℃、接种量 3%、摇瓶装液量 100 mL/250 mL。

表 6 中心复合试验设计因子水平  
Tab. 6 Center composite experimental design factor levels

| 因素编号<br>Factor No. | 因素名称<br>Factor name | 自变量水平 Level of independent variable |       |       |       |       |
|--------------------|---------------------|-------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
|                    |                     | -1.414                              | -1    | 0     | 1     | 1.414 |
| X <sub>2</sub>     | 发酵时间/h              | 19.03                               | 24.00 | 36.00 | 48.00 | 52.97 |
| X <sub>6</sub>     | 玉米面/g               | 9.17                                | 10.00 | 12.00 | 14.00 | 14.83 |

表 7 中心复合试验结果  
Tab. 7 Center composite test results

| 编号<br>No. | 发酵时间<br>Fermentation time/h | 玉米面<br>Cornmeal/g | 抑菌圈平均直径<br>Average diameter of inhibition zone/mm |
|-----------|-----------------------------|-------------------|---------------------------------------------------|
| 1         | 24.00                       | 10.00             | 13.81±0.04                                        |
| 2         | 48.00                       | 10.00             | 13.95±0.12                                        |
| 3         | 24.00                       | 14.00             | 14.01±0.14                                        |
| 4         | 48.00                       | 14.00             | 13.99±0.06                                        |
| 5         | 19.03                       | 12.00             | 13.73±0.17                                        |
| 6         | 52.97                       | 12.00             | 14.16±0.32                                        |
| 7         | 36.00                       | 9.17              | 14.13±0.12                                        |
| 8         | 36.00                       | 14.83             | 14.10±0.07                                        |
| 9         | 36.00                       | 12.00             | 14.56±0.09                                        |
| 10        | 36.00                       | 12.00             | 14.52±0.11                                        |
| 11        | 36.00                       | 12.00             | 14.53±0.07                                        |
| 12        | 36.00                       | 12.00             | 14.56±0.04                                        |
| 13        | 36.00                       | 12.00             | 14.60±0.02                                        |

2.7 发酵液的抑菌活性稳定性分析

菌株 R<sub>2</sub>A-15 的发酵液经不同温度处理后，抑菌圈平均直径均在 13.00 mm 以上，波动范围在 ±1.04 mm，总体活性表现稳定，结果见图 12，表明其抑菌活性不随温度的变化而变化。

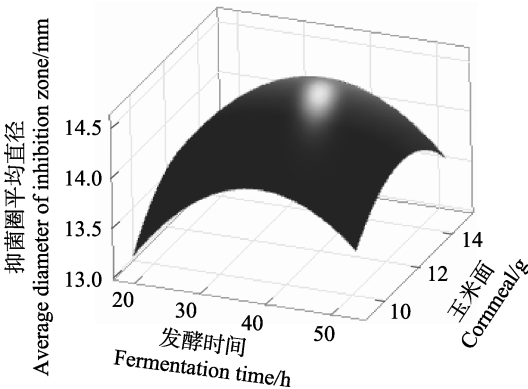


图 9 发酵时间和玉米面影响发酵液抑菌活性的响应面曲面图

Fig. 9 Response surface plots of fermentation time and cornmeal affecting inhibitory activity of fermentation broth

在不同 pH 条件下，菌株 R<sub>2</sub>A-15 发酵液的抑菌活性表现为先上升后下降的变化，结果见图 13。经 pH 为 6.0~8.0 处理后抑菌圈平均直径均大于 13.00 mm，抑菌活性较为稳定。在 pH 为 2.0 的条件下，对靶标菌无抑菌活性；在 pH 为 12.0 的条件下，对靶标菌的抑菌活性明显下降。说明强酸强碱能抑制该菌株发酵液活性。

菌株 R<sub>2</sub>A-15 的发酵液经不同时间紫外光照后，其抑菌活性变化不显著，结果见图 14。经

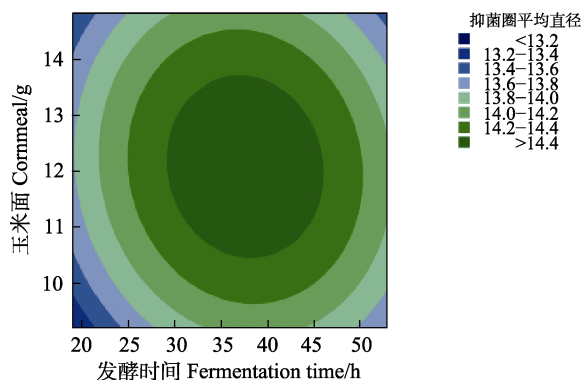
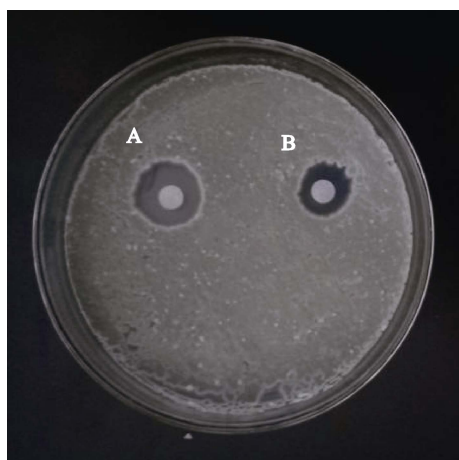


图 10 发酵时间和玉米面影响发酵液抑菌活性的等值线图

Fig. 10 Contour plot of fermentation time and cornmeal affecting inhibitory activity of fermentation broth



A: R<sub>2</sub>A-15 优化后的抑菌活性; B: R<sub>2</sub>A-15 原发酵液的抑菌活性。

A: The inhibitory zone of R<sub>2</sub>A-15 after optimization; B: The inhibitory zone of the original fermentation broth of strain R<sub>2</sub>A-15.

图 11 菌株 R<sub>2</sub>A-15 发酵液对柑橘绿霉病优化前后抑菌效果对比

Fig. 11 Comparative results of bacterial inhibition of citrus green mold by fermentation broth of strain R<sub>2</sub>A-15 before and after optimization

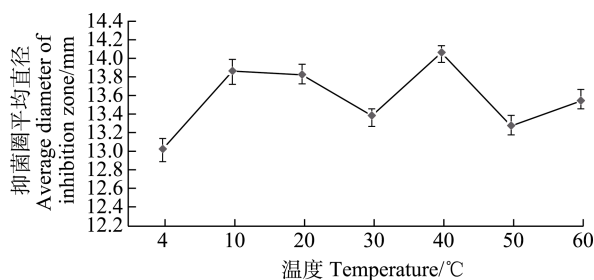


图 12 菌株 R<sub>2</sub>A-15 发酵液的温度稳定性

Fig. 12 Temperature stability of fermentation broth of strain R<sub>2</sub>A-15

紫外光照射后该菌株发酵液抑菌活性直径在 15.00 mm 左右, 且波动较小, 发酵液的抑菌活性在紫外条件下有所提高, 最大抑菌圈平均直径达

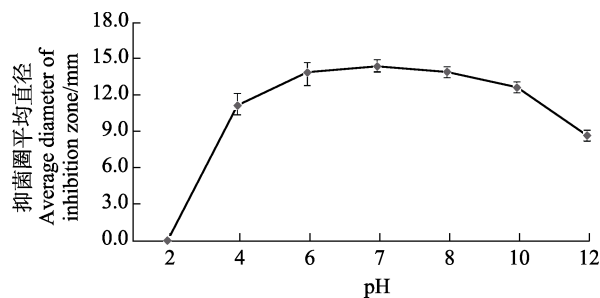


图 13 菌株 R<sub>2</sub>A-15 发酵液的酸碱稳定性

Fig. 13 Acid-base stability of fermentation broth of strain R<sub>2</sub>A-15

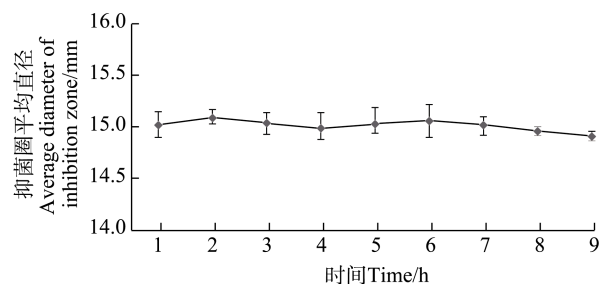


图 14 菌株 R<sub>2</sub>A-15 发酵液的紫外光稳定性

Fig. 14 Ultraviolet stability of fermentation broth of strain R<sub>2</sub>A-15

15.09 mm。结果表明, 发酵液的抑菌活性在紫外线照射下有所提高。

菌株 R<sub>2</sub>A-15 发酵液经过不同的温度、酸碱和紫外线条件处理后, 能维持较好的活性稳定性, 为今后柑橘绿霉病生防菌剂的制备与应用提供参考, 也将为菌株 R<sub>2</sub>A-15 发酵的代谢活性物开发和利用提供理论依据。

### 3 讨论

放线菌的代谢活性物往往含量较少, 分离纯化难度大。此外, 放线菌的生长和代谢是一个复杂的过程, 会受到许多环境及培养条件的影响, 在生产应用的过程中, 如果缺少稳定的发酵方法, 就会导致放线菌的代谢活性物在不同批次的含量波动较大, 从而导致不同批次的农用抗生素的抑菌效果不同。因此, 优化菌株的发酵培养基和发酵条件, 是稳定提高微生物代谢活性物含量必不可少的一部分。

研究表明, 不同的碳氮源选择对微生物的发酵存在不同影响, 本研究对菌株 R<sub>2</sub>A-15 的优化结果发现, 玉米面 (碳源) 含量对发酵液抑菌活性有显著影响, 放线菌 A12-2-11<sup>[30]</sup> (蔗糖为碳源)、放线菌 16-3-10<sup>[31]</sup> (乳糖为碳源) 等均受碳源影响。此外, 发酵初始 pH、发酵时间、发酵温度等因素

能刺激放线菌代谢活性物产生,如放线菌 B11<sup>[27]</sup>是发酵时间和接种量等因素,放线菌 LG-9<sup>[32]</sup>是发酵时间和发酵温度等因素,本研究结果表明发酵时间对发酵液抑菌活性有显著影响。通过对菌株 R<sub>2</sub>A-15 的发酵培养基及发酵条件的优化,使抑菌效果提高了 39%,优化后的抑制圈平均直径为 14.56 mm 明显比优化前(10.47 mm)的抑菌效果好。且经过筛选,发酵时间从 5 d 缩减到 37.5 h,大大提升发酵效率,节约生产成本。

放线菌是被应用于植物病害防治的微生物,但其产生的主要活性物质在生产应用中很不稳定,从而影响放线菌的开发与应用。放线菌 WMF106<sup>[21]</sup>发酵液的抑菌物质具有耐热和耐光,但对酸敏感,放线菌 DA4-3-12<sup>[33]</sup>的发酵液在不同酸碱、温度和紫外照射条件下均表现良好的稳定性。与其他放线菌发酵液稳定性相似,菌株 R<sub>2</sub>A-15 发酵液在 4~60 °C 的温度下,其抑菌圈平均直径下降幅度不超过 11%,维持了较高的抑菌活性,在紫外线照射 1~9 h 下抑菌活性有所提高,而在 pH 为 6.0~8.0 的范围内抑菌活性较稳定,但在强酸强碱环境下,菌株 R<sub>2</sub>A-15 发酵液中抑菌活性有所下降。初步探究菌株 R<sub>2</sub>A-15 发酵液经过不同的温度、酸碱和紫外线条件处理后,能维持较好的活性稳定性。

菌株发酵液具有较好的抑菌活性和稳定性,能更好的开发和利用其发酵产物。HE 等<sup>[34]</sup>报道放线菌 A217 发酵液有较好的抑菌和防病效果,其发酵产物对多种植物病原真菌和细菌表现出较好的抑菌活性,放线菌 A217 可作为植物病害生物防治剂的潜在应用。XIU 等<sup>[35]</sup>报道菌株 AM-4 发酵液对指状青霉的菌丝生长抑制率为 66.23%,菌株 AM-4 的发酵提取物对柑橘绿霉病的防治效果好,作为生防菌株具有良好的开发利用前景。在本研究中,从红橙植株根部土壤中分离的菌株 R<sub>2</sub>A-15,具有产生对指状青霉抑菌活性强、稳定性好的代谢产物的能力,可进一步开展菌株 R<sub>2</sub>A-15 在柑橘绿霉病染病植株上的抑菌效果评估等应用试验,从而为实现拮抗柑橘绿霉病的生防菌产品开发和利用奠定基础。

## 参考文献

[1] MATH H H, NAYAKA S, RUDRAPPA M, KUMAR R S, ALMANSOUR A I, PERUMAL K, KANTLI G B. Isolation,

characterization of pyraclostrobin derived from soil actinomycete *Streptomyces* sp. HSN-01 and its antimicrobial and anticancer activity[J]. *Antibiotics* Basel, 2023, 12(7): 1211.

- [2] QIAN M A, YANG Y B, HU B Y, XU Y, WANG Z H, LI Q Y, GAO Y H, LUO X D, ZHAO L X. Baoshanmycin and a new furanone derivative from a soil-derived actinomycete, *Amycolatopsis* sp. YNNP 00208[J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2022, 19(5): e202200064.
- [3] NGAMCHARUNGCHIT C, CHAIMUSIK N, PANBANGRED W, EUANORASETR J, INTRA B. Bioactive metabolites from terrestrial and marine actinomycetes[J]. *Molecules* Basel, 2023, 28(15): 5915.
- [4] EMILIA P, YAOJUN T, SANG Y L, TILMANN W. Synthetic biology and metabolic engineering of actinomycetes for natural product discovery[J]. *Biotechnology Advances*, 2019, 37(6): 107366.
- [5] 李培谦, 药震, 邵元元, 冯宝珍. 黄瓜枯萎病拮抗放线菌的筛选及防治效果[J]. *江苏农业科学*, 2022, 50(17): 115-121.  
LI P Q, YAO Z, SHAO Y Y, FENG B Z. Screening of antagonistic actinomycetes of cucumber wilt and their control effects[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2022, 50(17): 115-121. (in Chinese)
- [6] 王炫栋, 杨孙玉悦, 高润杰, 余俊杰, 郑丹沛, 倪峰, 蒋冬花. 拮抗大豆斑疹病菌放线菌菌株的筛选和促生作用及防效研究[J]. *作物学报*, 2022, 48(6): 1546-1557.  
WANG X D, YANG S Y Y, GAO R J, YU J J, ZHENG D P, NI F, JIANG D H. Screening *Streptomyces* against *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* and study of growth-promoting and biocontrol effect[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2022, 48(6): 1546-1557. (in Chinese)
- [7] 马静静, 潘妍妍, 杨孙玉悦, 王嘉琦, 蒋冬花. 硫藤黄链霉菌 St-79 对水稻白叶枯病的防效和促生作用[J]. *中国水稻科学*, 2022, 36(6): 623-638.  
MA J J, PAN Y Y, YANG S Y Y, WANG J Q, JIANG D H. Control effect of St-79 (*Streptomyces thioluteus*) on rice bacterial blight and its growthpromoting effect[J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2022, 36(6): 623-638. (in Chinese)
- [8] FARDA B, DJEBAILI R, VACCARELLI I, DEL G M, PELLEGRINI M. Actinomycetes from caves: an overview of their diversity, biotechnological properties, and insights for their use in soil environments[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(2): 453-453.
- [9] ELSHAFIE H S, DE M L, FORMISANO C, FORMISANO C, CAPUTO L, DE F V, CAMELE I. Chemical identification of secondary metabolites from rhizospheric actinomycetes using LC-MS analysis: in silico antifungal evaluation and growth-promoting effects[J]. *Plants* Basel, 2023, 12(9): 1869.

- [10] SANCHEZ-TORRES P. Molecular mechanisms underlying fungicide resistance in citrus postharvest green mold[J]. *Journal of Fungi*, 2021, 7(9): 783-783.
- [11] 谢雨轩. 3 株放线菌新物种多相分类与易变链霉菌 TRM45540 *ActD*-24 基因重组质粒的构建[D]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2016.
- XIE Y X. The polyphasic taxonomy of three novel actinomycetes and construction of *ActD*-24 gene recombinant plasmid of *Streptomyces mutabilis* TRM45540[D]. Aral: Tarim University, 2016. (in Chinese)
- [12] 胡元森, 李翠香, 孙富林, 吴坤, 贾新成. 不同培养基组合提高土壤细菌可培养性的研究[J]. *微生物学报*, 2007(5): 882-887.
- HU Y S, LI C X, SUN F L, WU K, JIA X C. Improved culturability of soil bacteria using proper combination with various culturing medium[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007(5): 882-887. (in Chinese)
- [13] 夏占峰. 新疆极端环境放线菌多相分类及抑菌活性物质研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2015.
- XIA Z F. Polyphasic identification and antifungal metabolite analysis of extreme actinomycetes isolated in Xinjiang[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2015. (in Chinese)
- [14] SELVARAJ J N, GANAPATHI U, VINCENT S G P, RAMAMOORTHY S, THAVASIMUTHU C. Statistical optimization of media components for antibiotic production in *Streptomyces* sp. CMSTAAHAL-3[J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2023, 65: 1-13.
- [15] WANG D Y, WANG C, GUI P Y, LIU H S, KHALAF S M H, ELSAYED E A, WADAAN M A M, HOZZEIN W N, ZHU W M. Identification, bioactivity, and productivity of actinomycins from the marine-derived *Streptomyces heliomycini*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1147.
- [16] GUROVIC M S V, OLIVERA N L. Antibacterial producing actinomycetes from Extra Andean *patagonia*[J]. *Journal of Arid Environments*, 2017, 144: 216-219.
- [17] RAN Y, ZHANG Y, WANG X, LI G H. Nematicidal metabolites from the actinomycete *Micromonospora* sp. WH06[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(11): 2274.
- [18] FANGCHENG B, DANA M, NETA L, XIANGCHUN M, DOV P. Mutation of *AREA* affects growth, sporulation, nitrogen regulation, and pathogenicity in *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2017, 99: 29-39.
- [19] PENG C, AN D P, DING W X, ZHU Y X, YE L, LI J Y. Fungichromin production by *Streptomyces* sp. WP-1, an endophyte from *Pinus dabeshanensis*, and its antifungal activity against *Fusarium oxysporum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(24): 10437-10449.
- [20] FATMA M, SAOUSSEN B K, AMEL K, NABIL Z, SLIM T, MOHAMED T. Combinatorial effect of mutagenesis and medium component optimization on *Bacillus amyloliquefaciens* antifungal activity and efficacy in eradicating *Botrytis cinerea*[J]. *Microbiological Research*, 2017, 197: 29-38.
- [21] 瞿佳, 孙晓宇, 陈锐, 门欣, 赵玲侠, 宁硕瀛. 核桃黑斑病拮抗放线菌 WMF106 发酵条件优化和抑菌物质稳定性[J]. *微生物学通报*, 2022, 49(1): 88-100.
- QU J, SUN X Y, CHEN R, MEN X, ZHAO L X, NING S Y. Optimization of fermentation conditions and stability evaluation of antimicrobial active substance for antagonistic actinomycete WMF106 against walnut blight[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(1): 88-100. (in Chinese)
- [22] 刘一贤, 施玉萍, 戴利铭, 李岚岚, 蔡志英. 橡胶褐根病拮抗放线菌 17-7 的筛选、鉴定及发酵条件优化[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(1): 118-129.
- LIU Y X, SHI Y P, DAI L M, LI L L, CAI Z Y. Screening, identification and fermentation optimization of an antimicrobial actinomycete strain 17-7 to *Phellinus noxius*[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(1): 118-129. (in Chinese)
- [23] 段雅婕, 梅志刚, 孙德权, 李伟明, 庞振才, 胡会刚. 拮抗放线菌菌株 FS-4 发酵工艺筛选[J]. *热带作物学报*, 2020, 41(2): 339-345.
- DUAN Y J, MEI Z G, SUN D Q, LI W M, PANG Z C, HU H G. Optimization of fermentation conditions of antagonistic actinomycetes FS-4[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2020, 41(2): 339-345. (in Chinese)
- [24] 杨祁云, 王成, 冼海辉, 蒲小明, 沈会芳, 张景欣, 孙大元, 林壁润. 海洋放线菌株 H74-18 抗菌活性及其发酵条件优化[J]. *中国海洋药物*, 2020, 39(5): 52-58.
- YANG Q Y, WANG C, XIAN H H, PU X M, SHEN H F, ZHANG J X, SUN D Y, LIN B R. Antimicrobial activity and fermentation technology of marine actinomycete strain H74-18[J]. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2020, 39(5): 52-58. (in Chinese)
- [25] 胡梦君, 胡先奇, 刘沛, 梁艳, 杨艳梅. 放线菌菌株 1331 发酵工艺优化及对南方根结线虫的作用效果[J]. *云南农业大学学报(自然科学)*, 2020, 35(2): 213-220.
- HU M J, HU X Q, LIU P, LIANG Y, YANG Y M. Optimization of the fermentation conditions of actinomycete strain 1331 and its effects on *Meloidogyne incognita*[J]. *Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science)*, 2020, 35(2): 213-220. (in Chinese)
- [26] HOUSSAM M A, BAKRY M H, MOHAMED A K. Physico-chemical characteristics of vernamycin-A antibiotic biosynthesis by *Streptomyces* SP-AZ-SH-29[J]. *Journal of Saudi Chemical Society*, 2011, 15(3): 247-255.

- [27] 曹利, 车程川, 刘金锋, 巩志金, 梁光杰, 杨革. 拮抗黄曲霉海洋放线菌的筛选及发酵条件优化[J]. 中国酿造, 2019, 38(3): 104-109.
- CAO L, CHE C C, LIU J F, GONG Z J, LIANG G J, YANG G. Screening and fermentation conditions optimization of marine actinomycetes of antagonistic *Aspergillus flavus*[J]. China Brewing, 2019, 38(3): 104-109. (in Chinese)
- [28] 蒋欢, 唐贵婷, 吴朝君, 张勇, 彭玉梅, 苏宁, 赵冰峰, 王旭祎. 根肿病生防放线菌 B18 发酵条件的研究[J]. 植物保护, 2021, 47(3): 127-135.
- JIANG H, TANG G T, WU C J, ZHANG Y, PENG Y M, SU Y, ZHAO B F, WANG X Y. A study of cultural conditions for biocontrol actinomycetes strain B18 against club-root disease[J]. Plant Protection, 2021, 47(3): 127-135. (in Chinese)
- [29] 王卫, 王彬, 刘爱华, 王茜, 邢朝斌, 解云英, 袁丽杰. 产抗生素 siomycin A 放线菌株 13-12 抗菌活性探究及菌种鉴定[J]. 西北农业学报, 2019, 28(2): 305-314.
- WANG W, WANG B, LIU A H, WANG Q, XING Z B, YIE Y Y, YUAN L J. Study on antimicrobial activity and identification of antibiotics-siomycin A-producing strain 12, an endophytic actinomycetes isolated from *Acanthopanax senticosus*[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2019, 28(2): 305-314. (in Chinese)
- [30] 牛世全, 赵丹, 豆建涛, 豆雅楠, 朱学泰. 敦煌盐碱土中抗黄芩根腐病放线菌的筛选、鉴定及发酵条件优化[J]. 西北师范大学学报(自然科学版), 2018, 54(3): 71-76.
- NIU S Q, ZHAO D, DOU J T, DOU Y N, ZHU X T. Screening, identification and optimization of fermentation conditions of actinomycetes on *Astragalus membranaceus* root rot isolated from saline-alkali soils in Dunhuang[J]. Journal of Northwest Normal University (Natural Science), 2018, 54(3): 71-76. (in Chinese)
- [31] 王彦, 牛世全, 郑豆豆, 周璇, 朱学泰, 孔维宝, 韩建山, 张爱梅. 黄瓜枯萎病拮抗放线菌的筛选、鉴定及发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2019, 46(5): 1062-1073.
- WANG Y, NIU S Q, ZHENG D D, ZHOU X, ZHU X T, KONG W B, HAN J S, ZHANG A M. Screening, identification and optimization of fermentation conditions of an antagonistic actinomycetes to cucumber *Fusarium wilt*[J]. Microbiology China, 2019, 46(5): 1062-1073. (in Chinese)
- [32] 陈明, 穆凯热姆·阿卜来提, 刘政, 王晓东. 响应面法优化链霉菌 LG-9 发酵条件及对棉花黄萎病菌的抑菌作用[J]. 湖北农业科学, 2018, 57(8): 71-76.
- CHEN M, MUKARAM A, LIU Z, WANG X D. Optimization of fermentation conditions for anti-*Streptomyces* LG-9 using response surface methodology and its inhibition on *Verticillium dahliae*[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2018, 57(8): 71-76. (in Chinese)
- [33] 牛世全, 文娜, 韩建山, 赵晓霞, 陈腾. 一株抗植病放线菌的发酵条件优化及活性产物研究[J]. 西北师范大学学报(自然科学版), 2020, 56(1): 69-77.
- NIU S Q, WEN N, HAN J S, ZHAO X X, CHEN T. Optimization of fermentation condition and study on bioactive product of an actinomycete against plant pathogenic[J]. Journal of Northwest Normal University (Natural Science), 2020, 56(1): 69-77. (in Chinese)
- [34] HE H, HAO X, ZHOU W, SHI N, FENG J, HAN L. Identification of antimicrobial metabolites produced by a potential biocontrol actinomycete strain A217[J]. Journal of Applied Microbiology, 2020, 128(4): 1143-1152.
- [35] XIU R H, BAO P C, DAN C D, ZHEN D H, ZHAN X P, GUO Q C, AI T P, LIAN M L. Isolation and identification of a marine actinomycete strain and its control efficacy against citrus green and blue moulds[J]. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2019, 33(1): 719-729.