

指状青霉拮抗放线菌 R₂A-77 的鉴定及发酵条件优化

黄吉力, 罗东程, 陈苑玲, 唐 诗, 陈真凤, 梁嘉振, 杨春敏, 谢雨轩*

广州工商学院, 广东佛山 528135

摘 要: 柑橘是我国优势水果产业, 对推动乡村振兴具有重要意义。但柑橘表面存在许多自然孔口, 在采后贮藏和运输过程中极易受到病原菌的侵染而发生病害。其中, 柑橘绿霉病是由指状青霉 (*Penicillium digitatum*) 侵染而成, 发病过程快, 传染性强, 造成果实采收后品质严重下降, 给柑橘产业带来巨大的经济损失。本团队以柑橘绿霉病原菌为靶标菌, 从广东省湛江市廉江九洲江红橙园红橙植株的根部土壤中分离筛选出 1 株对柑橘绿霉病原菌具有良好拮抗作用的放线菌 R₂A-77, 对菌株进行形态学观察、生理生化特征和分子生物学鉴定, 采用生长速率法对靶标菌生长圈直径判断发酵液的抑菌活性, 采用单因素和交叉组合试验优化菌株发酵条件, 以提高发酵液抑菌活性。结果表明: 放线菌 R₂A-77 初步鉴定为链霉菌属 (*Streptomyces*); 最优发酵培养基为蔗糖 10 g/L、大豆蛋白胨 35 g/L、蒸馏水 1000 mL; 最优发酵条件为发酵初始 pH 7.0、发酵时间为 6 d、接种量为 3%、装液量为 150 mL/250 mL; 放线菌 R₂A-77 发酵条件优化后, 其发酵液的抑菌活性比优化前提高 15%, 抑菌率为 98%。结果说明, 放线菌 R₂A-77 对指状青霉具有较好的拮抗效果, 有较好的实际应用前景, 该研究结果为绿色防控柑橘绿霉病积累了资源, 为后期规模化发酵以及生防菌剂的开发奠定基础。

关键词: 指状青霉; 链霉菌属; 分类鉴定; 抑菌活性; 发酵优化

中图分类号: S436.66; S476.1 文献标志码: A

Identification and Optimization of Fermentation Conditions of Antagonistic Actinomycete R₂A-77 by *Penicillium digitatum*

HUANG Jili, LUO Dongcheng, CHEN Yuanling, TANG Shi, CHEN Zhenfeng, LIANG Jiazhen, YANG Chunmin, XIE Yuxuan*

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

Abstract: Citrus is a dominant fruit industry in China, which is of great significance for promoting rural revitalization. However, there are many natural pores on the surface of citrus fruits. During post-harvest storage and transportation, they are highly susceptible to infection by pathogens, leading to diseases. Among them, citrus green mold is caused by the infection of *Penicillium digitatum*. The disease progresses rapidly and is highly contagious, severely deteriorating the quality of fruits after harvest and causing huge economic losses to the citrus industry. Our research team targeted the pathogen of citrus green mold. An actinomycete strain, R₂A-77, which exhibits excellent antagonistic effects against the pathogen of citrus green mold, was isolated and screened from the rhizosphere soil of red-orange plants in the Jiuzhoujiang Red-orange Orchard in Lianjiang, Zhanjiang, Guangdong. The strain was characterized through morphological observation, physiological and biochemical tests, and molecular biological identification. The antibacterial activity of the fermentation broth was determined by measuring the diameter of the growth inhibition zone of the target bacteria according to the growth rate method. Single-factor and cross-combination experiments were conducted to optimize the fermentation conditions of the strain, aiming to enhance the antibacterial activity of the fermentation broth.

收稿日期 2025-02-28; 接受日期 2025-05-07

基金项目 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 2021 年度国家级大学生创新创业训练计划项目 (No. 202113714005); 2024 年度广东省重点建设学科科研能力提升项目 (No. 2024ZDJS089)。

作者简介 黄吉力 (2002—), 男, 本科生, 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。

The results indicated that the actinomycete R₂A-77 was preliminarily identified as the genus *Streptomyces*. The optimal fermentation medium was sucrose 10 g/L, soybean peptone 35 g/L, and distilled water 1000 mL. The optimal fermentation conditions were as follows: initial pH of 7.0, fermentation time of 6 days, inoculum size of 3%, and liquid volume of 150 mL in a 250 mL flask. After optimization, the antibacterial activity of the fermentation broth of actinomycete R₂A-77 increased by 15% compared to that before optimization, with an antibacterial rate of 98%. The results suggest that actinomycete R₂A-77 has a good antagonistic effect against *P. digitatum*, demonstrating promising practical application prospects. It would accumulate resources for the green prevention and control of citrus green mold and lays a foundation for large-scale fermentation and the development of microbial agents in the future.

Keywords: *Penicillium digitatum*; *Streptomyces*; classification and identification; antimicrobial activity; fermentation optimization

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.08.017

放线菌是一类极具开发潜力的生物资源,在空气、土壤以及水体中均可生存,且具有生长速度快和代谢产物多等特点,已被广泛应用于食品、药品和农业等领域^[1-2]。目前,利用生防放线菌与病原菌的竞争关系或拮抗作用来控制病害已成为研究热点^[3-4]。已有研究表明,放线菌发酵液对辣椒白绢病菌 (*Sclerotium rolfsii*)^[5]、山茶炭疽病菌 (*Colletotrichum camelliae*)^[6]、禾谷镰孢菌 (*Fusarium graminearum*)^[7]等植物病原菌具有良好的抑菌活性。在公众对食品安全关注度持续攀升的当下,利用生物手段防治农作物病害,已成为农业微生物领域的关键研究课题^[8-9]。

指状青霉 (*Penicillium digitatum*) 是一种坏死营养型的病原真菌,可通过果实表面的损伤入侵果实内部组织,导致宿主细胞死亡,进而利用营养进行生长^[10]。柑橘在田间生长、采收及贮藏运输过程中极易受到物理损伤而产生伤口^[11],这为病原微生物的入侵创造了条件,最终导致果实腐烂,造成严重的经济损失。长期以来,国内外对水果病害的防治主要依赖化学杀菌剂,但长期使用化学杀菌剂不仅会导致病原菌产生耐药性而降低防治效果,还会严重危害人体健康和环境^[12]。而生物防治法采用具有安全性、有效性、环保性和高经济效益优势的拮抗微生物,可实现农业的安全生产^[13]。NAJMEH 等^[14]从农田土壤中分离出的 110 株链霉菌菌株对指状青霉具有良好的抑制作用。林书华等^[15]揭示了链霉菌 X33 发酵提取物 (SLFE) 对柑橘绿霉病菌具有防治效果。本团队从广东省湛江市廉江九州江红橙园红橙植株根部土壤中分离筛选出 1 株对指状青霉具有较好拮抗活性的放线菌 R₂A-77,本研究对该菌株进行鉴定以及发酵条件优化,为廉江红橙土壤微生物资源及活性物质的开发奠定基础。

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州江红橙园红橙植株根部土壤分离筛选出放线菌 R₂A-77。指状青霉由西南大学食品科学学院曾凯芳教授惠赠。

1.1.2 培养基 菌株鉴定固体培养基:ISP 系列培养基 (ISP1~ISP7)^[16]、PDA 培养基、R₂A 培养基^[17]、GA 培养基^[18]、改良 G2 培养基^[19]、MS 培养基^[20]、NA 培养基^[21]、黑色素培养基、硫化氢培养基、明胶液化培养基、牛奶凝固与胨化培养基^[22]。

菌株液体发酵培养基:ISP 系列培养基 (ISP1~ISP7)、PDA 培养基、GA 培养基、改良 G2 培养基、MS 培养基。

生长培养基:改良 G2 培养基。

1.2 方法

1.2.1 菌株鉴定 (1) 形态学观察。将菌株划线接种至 ISP3 固体培养基,28℃ 条件培养 5 d,用扫描电镜观察菌丝特征及孢子形态。

采用固体培养基 (固体培养基见 1.1.2) 划线接种菌株,在 28℃ 下培养 10 d。在第 3、5、7、10 天采用平皿插片法和光学显微镜观察菌株菌体形态,筛选出菌株最优生长培养基作为基础培养基。

(2) 生理生化特征测定。参考文献[22]中的方法对菌株的生理生化特性进行测定。测定内容包括:最适温度、最适盐浓度、最适培育 pH、过氧化氢酶的产生、黑色素/硫化氢的产生、明胶液化、牛奶凝固或胨化。

(3) 16S rRNA 基因序列测定与分析。将菌株送至北京擎科生物科技有限公司进行 16S rRNA 基因序列测定。测序结果与 EzBioCloud 数据库进

行比对,筛选相似菌株。采用 MEGA 11 软件进行邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 系统发育分析,设置 1000 次 bootstrap 评估拓扑结构,构建 16S rRNA 基因的系统发育树,确定菌株的种属。

1.2.2 菌株抑菌能力测定 (1) 菌种活化和制备种子液。菌种活化:将菌种接种至改良 G2 固体培养基中,于 28 ℃ 培养 5 d。

制备种子液^[23]:将菌株接种至 150 mL/250 mL 的改良 G2 液体培养基中,于 28 ℃、180 r/min 摇床培养 3 d。

(2) 制备菌株无菌发酵液。将 3% 的种子液加入到 150 mL/250 mL 发酵培养基中,于 28 ℃、180 r/min 培养 5 d。取发酵上清液,于 10 000 r/min 离心 15 min,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤后得到无菌发酵滤液^[24]。

(3) 发酵液抑菌活性测定。采用生长速率法^[25]测定菌株发酵液对靶标菌的抑菌活性。发酵液与 PDA 培养基按 1:10 (V/V) 制成平板。将 8 mm 靶标菌菌饼置于平板中央,于 28 ℃ 培养 5 d 后,采用十字交叉法测量菌落直径,计算平均值和抑菌率。抑菌率=[(对照病原菌菌落直径-处理病原菌菌落直径)/(对照病原菌菌落直径-菌饼直径)]×100%^[26]。

1.2.3 菌株发酵培养基优化及发酵条件优化

(1) 菌株发酵培养基的优化。将 11 种不同的液体培养基各 100 mL 分别添加至 250 mL 锥形瓶中,然后加入种子液发酵,参照 1.2.2-(3) 的方法测定抑菌活性,筛选出最优的培养基作为后续试验的基础培养基。

采用单因素试验法,在筛选出的基础培养基上,以葡萄糖、大米、小米、玉米面、蔗糖、燕麦、麦芽糖、淀粉、乳糖、甘露醇作为碳源;以酸水解酪蛋白胨、牛肉膏、大豆蛋白胨、硫酸铵、酵母膏、胰蛋白胨、大豆粉、鱼蛋白胨、麦芽粉、蛋白胨作为氮源,参照 1.2.2-(3) 的方法测定抑菌活性,筛选出 3 种较好的氮源和碳源。

利用交叉组合试验,将筛选出的 3 个碳源和 3 个氮源进行交叉组合,确定最优的碳源和氮源组合,参照 1.2.2-(3) 的方法进行抑菌活性测定,得到最优碳氮源组合。

以最优碳氮源组合固定碳源或氮源,将氮源或碳源浓度分别设置为 5、10、15、20、25、30、35、40 g/L,参照 1.2.2-(3) 的方法测定抑菌活性,确定最优碳源、氮源浓度为最优发酵培养基配方。

(2) 菌株发酵条件的优化。在最优发酵培养基下,优化菌株的发酵条件。采用单因素试验,分别选择不同的发酵初始 pH: 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;不同的接种量:1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%;250 mL 锥形摇瓶中不同的装液量:75、100、125、150、175、200 mL^[27]。参照 1.2.2-(3) 的方法测定抑菌活性,确定最优发酵初始 pH、发酵时间、接种量和装液量。

1.3 数据处理

采用 Excel 2019 软件进行数据统计,采用 IBM SPSS Statistics 27 软件进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 形态学观察

在 ISP3 培养基上,放线菌 R₂A-77 单菌落形态呈圆形,气生菌丝生长繁茂,产生密集孢子堆,菌落呈现灰棕色。通过扫描电镜观察可知,菌株菌丝众多,孢子链伸展,形状为长圆形(图 1)。

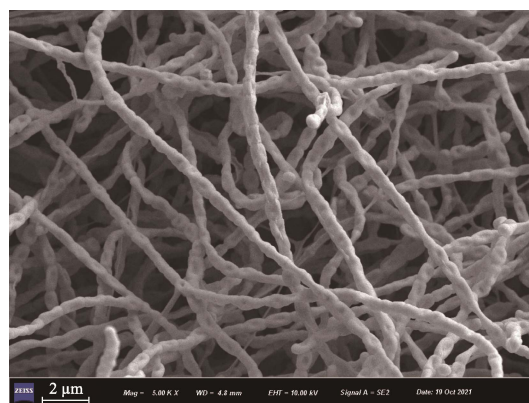


图 1 放线菌 R₂A-77 扫描电子显微镜照片
Fig. 1 Scanning electron micrograph of actinomycete R₂A-77

放线菌 R₂A-77 菌株在不同鉴定培养基上的生长存在明显差异,其气生菌丝、基内菌丝的生长状况等方面均有差异,在 ISP1、ISP2、ISP6、ISP7 培养基上产生可溶性黄色色素,在 ISP1、ISP3、R₂A、MS 培养基上生长旺盛(表 1)。

相较于其他培养基,放线菌 R₂A-77 菌株在 MS 培养基上的生长状况较好(图 2),菌落颜色为灰白色,形状为圆形,菌落易挑起,气生菌丝呈灰白色,基内菌丝呈乳黄色,无可溶性色素。因此,确定放线菌 R₂A-77 菌株的最适生长培养基为 MS 培养基。

表 1 放线菌 R₂A-77 的培养特征

Tab. 1 Cultivation characteristics of actinomycete R₂A-77

培养基 Culture medium	气生菌 丝颜色 Color of aerial hy- phae	基内菌丝 颜色 Substrate mycelium color	可溶性 色素 Soluble pigment	生长状况 Growth condition
ISP1	灰色	黄色	黄色	+++
ISP2	乳黄色	黄色	黄色	+
ISP3	灰棕色	黑色	无	+++
ISP4	乳黄色	黄色	无	++
ISP5	乳黄色	黄色	无	+
ISP6	白色	黄色	黄色	++
ISP7	白色	黄色	黄色	++
R ₂ A	白色	黄色	无	+++
MS	灰白色	黄色	无	+++
GA	灰白色	黄色	无	+
PDA	乳黄色	黄色	无	++
G2	乳黄色	黄色	无	+
NA	乳黄色	黄色	无	++

注：+、++、+++分别表示生长状况一般、良好、旺盛。
Note: +, ++, +++ indicate average growth, good growth and vigorous growth, respectively.



图 2 放线菌 R₂A-77 在 MS 培养基上的菌落形态
Fig. 2 Colony morphology of actinomycete R₂A-77 on MS medium

2.2 生理生化特征

放线菌 R₂A-77 菌株在 37 ℃ 时生长状态最佳，低于 19 ℃ 和高于 40 ℃ 时菌株停止生长。NaCl 的浓度为 0% 时，生长状态最佳，培养 4 d 便有大量孢子覆盖于菌落表面，形成表面干燥、凸起、灰白色的圆形菌落；NaCl 浓度为 0%~1% 时菌株生长，2% 时完全停止生长。菌株在 pH 为 5.0~12.0 时均能生长，且 pH 为 5.0 时菌落较大，产孢子丰富，生长状况最佳。

放线菌 R₂A-77 菌株可使明胶液化，可产过氧化氢酶，但无法使牛奶凝固或胨化，同时也不产

硫化氢和黑色素。

2.3 16S rRNA 基因测序结果

通过序列测定，放线菌 R₂A-77 菌株的 16S rRNA 基因长度为 1446 bp，且完整性为 99.8%。通过 EzBioCloud 平台对放线菌 R₂A-77 菌株进行 16S rRNA 基因序列比对，与该菌株高度同源的菌株均来自链霉菌属（*Streptomyces*）。其中，与放线菌 R₂A-77 最相似的菌株为 *S. salinarius* SS06011，相似度为 99.93%，其 GenBank 登录号为 LC430995。

基于 16S rRNA 基因序列建立系统发育树中（图 3），经过 1000 次聚类，菌株与 *S. salinarius* SS06011 进化关系最近。经形态学观察、生理生化特征检测，结合 16S rRNA 序列测序与系统进化分析，确定放线菌 R₂A-77 为链霉菌（*Streptomyces*）。

2.4 放线菌 R₂A-77 菌株发酵培养基的优化

2.4.1 基础培养基 通过对 11 种不同的液体培养基发酵液进行抑菌活性测定（图 4），结果表明，放线菌 R₂A-77 菌株在不同的发酵培养基中的抑菌活性具有一定差异，在 MS 培养基中的抑菌活性最优，指状青霉生长圈平均直径为 20.54 mm。基于此，选定 MS 培养基作为基础培养基。

2.4.2 碳源 以 MS 培养基作为基础培养基，分别采用 10 种不同碳源进行抑菌活性测定（图 5）。结果表明，在以玉米面、蔗糖、淀粉为碳源发酵液中，指状青霉生长圈平均直径分别为 16.58、16.37、16.79 mm，具有较强的抑菌活性，因此选用玉米面、蔗糖、淀粉作为进一步研究的碳源。

2.4.3 氮源 以 MS 培养基作为基础培养基，分别采用 10 种不同氮源进行抑菌活性测定（图 6）。结果表明，以大豆蛋白胨、大豆粉、蛋白胨为氮源的发酵液中，指状青霉生长圈平均直径分别为 11.20、22.10、24.24 mm，具有较强的抑菌活性，因此选用大豆蛋白胨、大豆粉、蛋白胨作为进一步研究的氮源。

2.4.4 碳源与氮源组合 根据筛选的氮源和碳源对放线菌 R₂A-77 菌株进行交叉组合发酵培养（图 7）。结果表明，蔗糖+大豆蛋白胨组合的发酵液表现出最优的抑菌活性，指状青霉生长圈平均直径为 10.87 mm；蔗糖+大豆粉组合的抑菌活性次之，指状青霉生长圈平均直径为 16.54 mm。因此确定蔗糖与大豆蛋白胨作为放线菌 R₂A-77 菌株发酵的最优氮源、碳源组合。

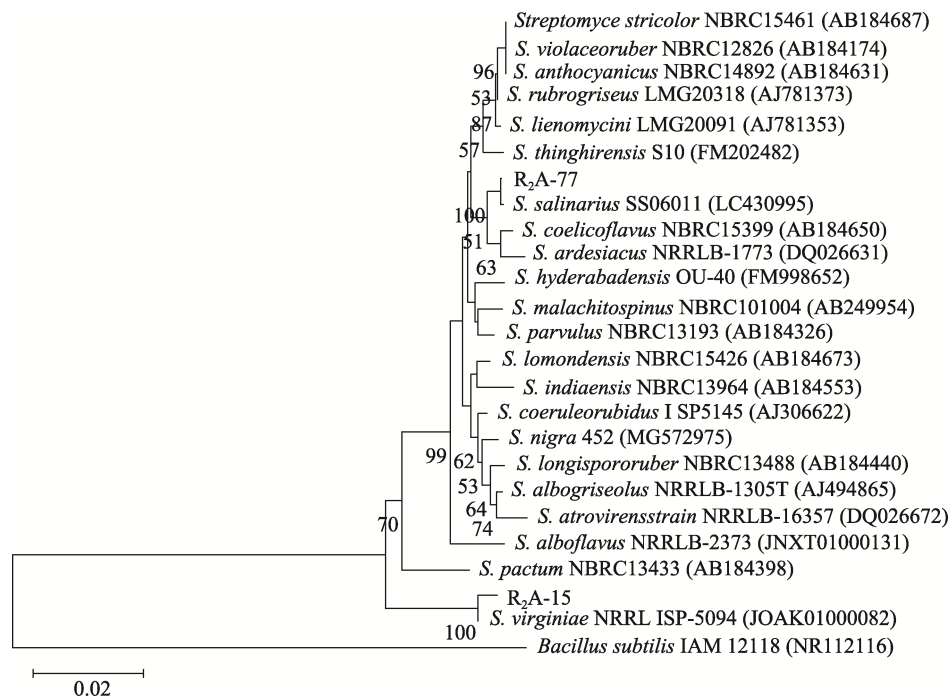
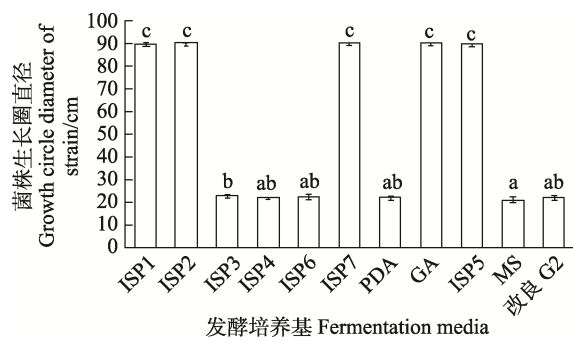
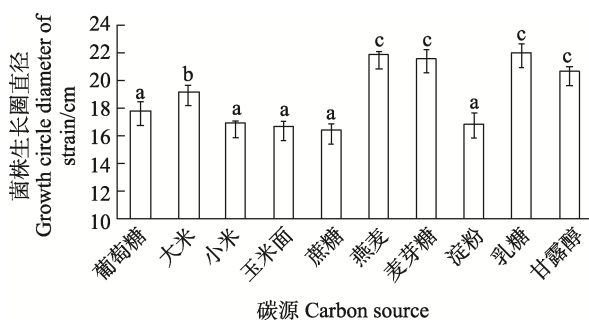


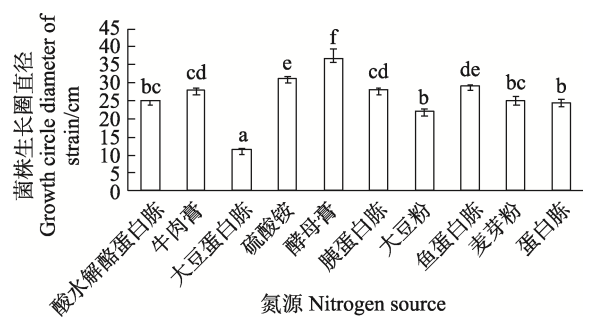
图 3 基于 16S rRNA 基因的系统进化树
Fig. 3 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene



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 4 不同培养基对放线菌 R₂A-77 发酵液
抑菌活性的影响
Fig. 4 Effects of different media on antibacterial activity
of actinomycete R₂A-77 fermentation broth



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 5 不同碳源对放线菌 R₂A-77 发酵液抑菌活性的影响
Fig. 5 Effect of different carbon sources on antibacterial
activity of actinomycete R₂A-77 fermentation broth

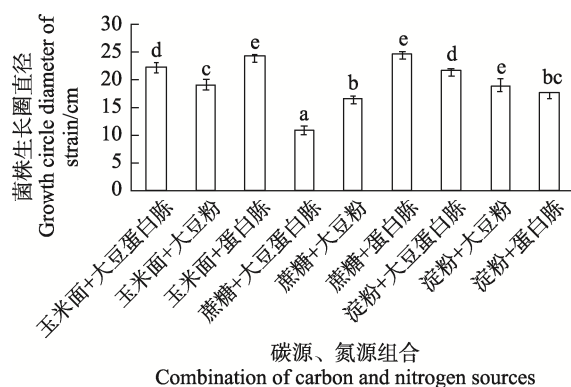


不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。
Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).
图 6 不同氮源对放线菌 R₂A-77 发酵液抑菌活性的影响
Fig. 6 Effect of different nitrogen sources on antibacterial
activity of actinomycete R₂A-77 fermentation

2.4.5 碳源与氮源浓度 基于最优碳源、氮源组合,将碳源和氮源浓度分别设置为 10 个不同浓度梯度对放线菌 R₂A-77 菌株进行发酵培养(图 8)。结果表明,碳源浓度为 10 g/L 时,发酵液的抑菌活性最优,指状青霉的生长圈平均直径为 9.07 mm;氮源浓度为 35 g/L 时,发酵液的抑菌活性最优,指状青霉生长圈平均直径为 9.46 mm。因此碳源浓度选用 10 g/L,氮源浓度选用 35 g/L。

2.5 放线菌 R₂A-77 菌株发酵条件的优化

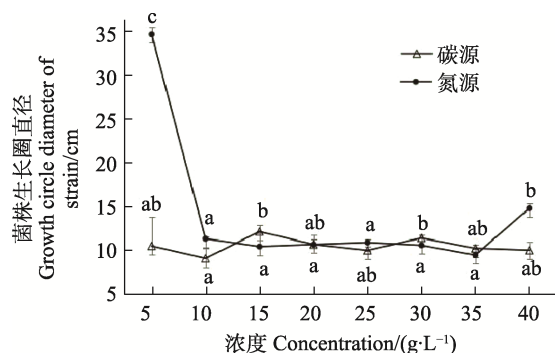
2.5.1 pH 指状青霉生长圈随发酵初始 pH 的增大呈先缓慢减小后增大的趋势(图 9)。pH 为 7.0 时,指状青霉的生长圈最小,生长圈平均直径为 10.27 mm;发酵初始 pH 低于 7.0 时,菌圈呈现出



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 7 不同碳源、氮源组合对放线菌 R_2A-77 发酵液抑菌活性的影响

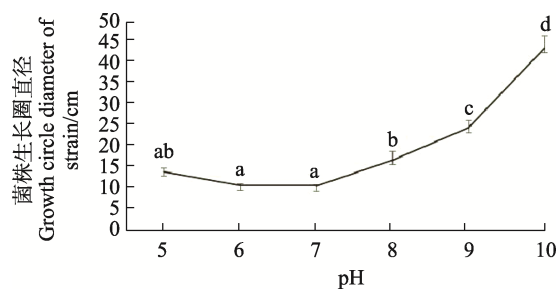
Fig. 7 Effect of different combinations of carbon and nitrogen sources on inhibitory activity of actinomycete R_2A-77 fermentation broth



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 8 不同碳源和氮源浓度对放线菌 R_2A-77 发酵液抑菌活性的影响

Fig. 8 Effects of different concentrations of carbon and nitrogen sources on antibacterial activity of fermentation broth of actinomycete R_2A-77



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

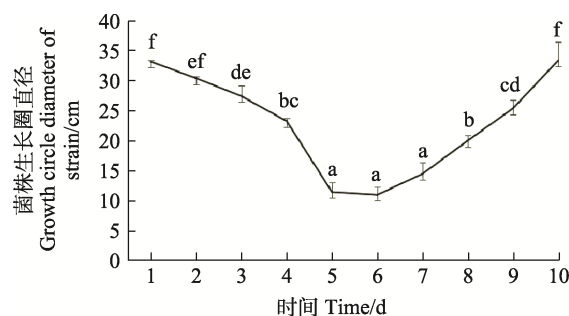
图 9 不同 pH 对放线菌 R_2A-77 发酵液抑菌活性的影响

Fig. 9 Effect of different pH on antibacterial activity of actinomycete R_2A-77 fermentation broth

逐步扩张的态势；而随着 pH 不断增大，指状青霉的生长圈随之增大。说明放线菌 R_2A-77 菌株在强酸或强碱条件下，并不适宜产生具有活性的物

质。因此，确定 pH 为 7.0 作为放线菌 R_2A-77 菌株发酵的最优初始 pH。

2.5.2 发酵时间 指状青霉生长圈随发酵时间的延长呈先下降后上升的趋势（图 10）。发酵至第 6 天时指状青霉生长圈最小，生长圈平均直径为 10.85 mm。故发酵时间选用 6 d 作为放线菌 R_2A-77 菌株的最优发酵时间。

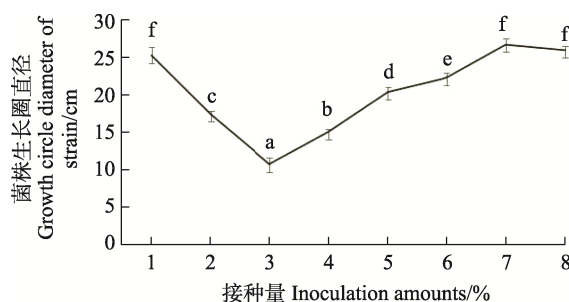


不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。
Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).

图 10 不同发酵时间对放线菌 R_2A-77 发酵液抑菌活性的影响

Fig. 10 Effect of different fermentation time on the antibacterial activity of actinomycete R_2A-77 fermentation broth

2.5.3 接种量 指状青霉生长圈随放线菌 R_2A-77 接种量的增加呈先降后升的趋势（图 11）。当接种量为 3% 时，指状青霉的生长圈最小，生长圈平均直径为 10.75 mm；其他接种量均导致放线菌 R_2A-77 菌株的抑菌活性下降。在接种量逐渐增加的初期阶段，放线菌 R_2A-77 菌株产生的代谢物含量随之上升，使得抑菌活性逐渐增强；接种量大于 3%，发酵液中的营养物质难以满足过量细胞的需求，细胞活性成分的合成过程受到限制，最



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 11 不同接种量对放线菌 R_2A-77 发酵液抑菌活性的影响

Fig. 11 Effect of different inoculation amounts on antibacterial activity of actinomycete R_2A-77 fermentation broth

终导致抑菌活性降低。因此，确定 3%作为放线菌 R₂A-77 菌株的最优接种量。

2.5.4 装液量 指状青霉的生长圈随装液量的增加呈先降后升的趋势（图 12）。当 250 mL 锥形瓶的装液量为 150 mL 时，指状青霉的生长圈最小，生长圈平均直径为 9.83 mm；在装液量逐渐增加的初始阶段，由于锥形瓶内营养物质随之增多，为放线菌 R₂A-77 菌株提供了更丰富的原料，使其产生抑菌活性物质的能力增强，然而，随着装液量的进一步增加，锥形瓶内的气体空间被压缩，氧气含量逐渐减少难以满足放线菌 R₂A-77 有氧呼吸的需求，当氧气不足时，放线菌 R₂A-77 的生长与代谢活动受到抑制，进而影响其产生抑菌活性物质的能力。因此，确定放线菌 R₂A-77 菌株的最优装液量为 150 mL/250 mL。

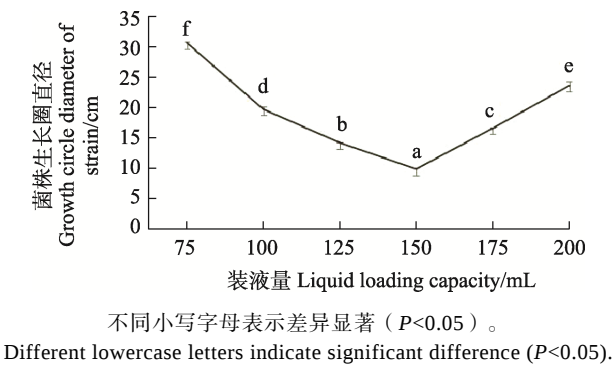


图 12 不同装液量对放线菌 R₂A-77 发酵液抑菌活性的影响

Fig. 12 Effect of different liquid loading amounts on antibacterial activity of actinomycete R₂A-77 fermentation broth

2.6 验证试验

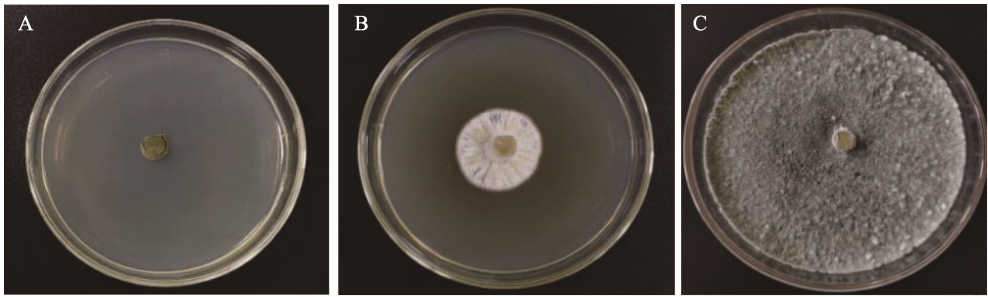
综合以上优化结果，以 10 g/L 蔗糖、35 g/L 大豆蛋白胨、1000 mL 蒸馏水的改良 MS 发酵培养基，以发酵初始 pH 为 7.0，接种量为 3%，装

液量为 150 mL/250 mL，发酵 6 d，对发酵液的抑菌活性进行测定，结果表明，优化后的发酵液抑菌率为 98%，优化前的抑菌率为 83%。抑菌效果见图 13。

3 讨论

放线菌是一个丰富的微生物类群，已鉴定出至少有 180 个属 2000 多个种^[28]。而放线菌合成抗生素物质是人们关注的焦点之一，据研究统计，70%的抗生素来自放线菌，50%来自链霉菌^[29]。除了产生抗生素外，放线菌发酵产物在农业病虫害防治及医学抗真菌药物研制方面也是重要材料^[30]。国内外学者通过对多种链霉菌进行了深入研究。例如，王宁等^[31]通过形态学观察、生理生化特征以及 16S rRNA 序列分析等手段成功鉴定出苹果树腐烂病生防菌株 A144 为娄彻氏链霉菌；蒋冬阳等^[32]筛选到对引起大豆根腐病的多种病原菌以及大豆白绢病菌、草莓灰霉病菌、稻瘟病菌等均有很好抑制作用的弗吉尼亚链霉菌 IRHB 47；HAMED 等^[33]从海洋沉积物中分离到 1 株对白色念珠菌 ATCC 10231 具有极强拮抗活性的放线菌菌株 MK388207，经鉴定，该菌株为链霉菌属。而较少有关链霉菌防治指状青霉的研究报道。本研究从广东省湛江市廉江九洲江红橙园红橙植株的根部土壤中分离的放线菌 R₂A-77 属链霉菌，对指状青霉具有良好的抑制作用。

已有研究表明，优化活性菌株的发酵培养基和发酵条件可提升抑菌活性物质的作用^[34-35]。刘一贤等^[36]通过研究表明，发酵培养链霉菌 17-7 菌株的最适合碳源为玉米粉 10 g/L 和葡萄糖 10 g/L，最适氮源为大豆粉 25 g/L 和酵母粉 2 g/L。刘芳等^[37]优化的链霉菌 SZF-179 最适发酵培养基中的碳源为麦芽糖 15.86 g/L 和土豆淀粉 10.00 g/L，氮源为



A: 优化后; B: 优化前; C: 对照。
A: After optimization; B: Before optimization; C: CK.

图 13 发酵优化前后的抑菌效果

Fig. 13 Antibacterial effect before and after fermentation optimization

酵母膏 8.15 g/L。由此可知,不同的链霉菌在发酵中会受碳源、氮源的种类及其浓度的影响。此外,适当的发酵初始 pH、发酵时间、发酵装液量和接种量能促进发酵活性物质的产生^[38]。例如,对多种植物真菌具有拮抗作用的链霉菌 FIM-B0711 的最佳发酵条件: pH 为 7.0, 接种量为 3%, 装液量为 30 mL/250 mL, 发酵时间为 96 h, 在该发酵条件下发酵物产量提升了 57.69%^[39]。高加索链霉菌(*S. ciscaucasicus*) SS9-1 的最佳发酵条件: 装液量为 150 mL, 接种量为 3%, pH 为 8.0, 发酵时间为 7 d, 在该发酵条件下发酵物对番茄灰霉病的拮抗效果提高到 98.43%^[40]。因此不同的链霉菌有不同的营养要求和发酵条件。本研究对放线菌 R₂A-77 菌株的发酵培养基与发酵条件进行优化。通过优化, 该菌株的抑菌率提升 15%, 抑菌率达到 98%。

本研究的放线菌 R₂A-77 与前期研究的放线菌 R₂A-15^[19]同属于链霉菌, 但是 16S rRNA 基因序列不同, 通过在 NCBI 上进行 blastn 比对, 发现 2 株菌的 16S rRNA 基因序列相似性仅为 95.29%。在进化关系上, 与放线菌 R₂A-77 最相似菌株为 *S. salinarius* SS06011, 与放线菌 R₂A-15 最相似菌株为 *S. virginiae* NRRL ISP-5094。放线菌 R₂A-15 在 MS 培养基上形成的菌落较大, 气生菌丝呈粉色, 基内菌丝呈米黄色, 表型特征明显与放线菌 R₂A-77 不同。本研究采用生长速率法测定放线菌 R₂A-77 发酵液对靶标菌的抑菌活性, 筛选获得的最优发酵培养基仅含蔗糖、大豆蛋白胨和蒸馏水, 而放线菌 R₂A-15 的最优发酵培养基包含玉米面、酸水解酪蛋白、碳酸钙、硫酸镁、磷酸氢二钾、氯化钠和蒸馏水, 表明放线菌 R₂A-77 的发酵培养基原料种类更简单、成本更低廉。但在发酵条件上放线菌 R₂A-15 的发酵时间仅需 37.54 h, 摇瓶装液量减少至 100 mL/250 mL, 因此其发酵效率更高。研究表明, 放线菌 R₂A-15 和放线菌 R₂A-77 对指状青霉均有较高的抑菌活性, 因此, 这 2 株放线菌均具有重要的研究价值和应用潜力。后续研究重点将聚焦于其发酵活性物质的分离与鉴定。

参考文献

- [1] 刘金丽, 卢丹, 姚佳, 陈雨, 陈崇艺, 朱露露, 柴春月. 广谱拮抗放线菌 S5-1 的鉴定、发酵工艺优化及发酵粗提物抑菌活性评价[J]. 微生物学通报, 2024, 51(8): 2905-2921.
- [2] LIU J L, LU D, YAO J, CHEN Y, CHEN C Y, ZHU L L, CHAI C Y. Identification optimization of fermentation process of antagonistic actinomycete S5-1 and evaluation of antibacterial activity of the fermented crude extract[J]. Microbiology China, 2024, 51(8): 2905-2921. (in Chinese)
- [3] 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.
- [4] NGAMCHARUNGCHIT C, CHAIMUSIK N, PANBANGRED W, EUANORASETR J, INTRA B. Bioactive metabolites from terrestrial and marine actinomycetes[J]. Molecules, 2023, 28(15): 5915.
- [5] 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.
- [6] 刘仕达, 邱泽澜, 李晓刚, 钟杰, 朱俊子. 辣椒白绢病拮抗放线菌 SD-64 的鉴定及作用机制研究[J]. 园艺学报, 2024, 51(1): 175-189.
- [7] LIU S D, QIU Z L, LI X G, ZHONG J, ZHU J Z. Identification and mechanism characterization of antagonistic actinomycetes SD-64 against pepper southern blight[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2024, 51(1): 175-189. (in Chinese)
- [8] 温丽霞. 山茶炭疽病菌分离及内生拮抗放线菌筛选[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2023.
- [9] WEN L X. Isolation of the pathogen of *Camellia japonica* anthracnose and screening of endophytic antagonistic actinomycetes[D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2023. (in Chinese)
- [10] 范江龙. 禾谷镰孢菌拮抗放线菌的分离及活性研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2023.
- [11] FAN J L. Isolation and activity study of *Fusarium graminearum* antagonistic actinomycetes[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2023. (in Chinese)
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] YANG Q Y, QIAN X, DHANASEKARAN S, BOATENG

- N A S, YAN X L, ZHU H M, HE F T, ZHANG H Y. Study on the infection mechanism of *Penicillium digitatum* on postharvest citrus (*Citrus reticulata* Blanco) based on transcriptomics[J]. Microorganisms, 2019, 7(12): 672.
- [11] 高笑全, 王文军, 张鸿雁, 陈鸥, 张雄, 曾凯芳. 愈伤处理提高采后柑橘果实绿霉病抗病性的机制研究[C]. 中国植物病理学会 2023 年学术年会论文集, 北京: 中国农业科学技术出版社, 2023: 252.
- GAO X Q, WANG W J, ZHANG H Y, CHEN O, ZHANG X, ZENG K F. Study on the mechanism of callus treatment to improve the resistance of postharvest citrus fruit to green mold[C]. Proceedings of the 2023 Annual Meeting of China Society of Plant Pathology, Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2023: 252. (in Chinese)
- [12] 雷国风, 李至敏, 王小琴, 李志敏. 柑橘果实采后绿霉病防治研究进展[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(21): 27-30.
- LEI G F, LI Z M, WANG X Q, LI Z M. Research progress on the control of green mold in post-harvest citrus fruits[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2018, 46(21): 27-30. (in Chinese)
- [13] 吴焕振, 杨野, 崔秀明, 刘源. 农业生物防治技术的现状及改进策略[J]. 生物技术进展, 2024, 14(5): 697-711.
- WU H Z, YANG Y, CUI X M, LIU Y. The current status and improvement strategies of agricultural biological control technology[J]. Current Biotechnology, 2024, 14(5): 697-711. (in Chinese)
- [14] NAJMEH S, HOSEIN S B G, SAREH S, BONJAR L S. Biological control of citrus green mould, *Penicillium digitatum*, by antifungal activities of *Streptomyces* isolates from agricultural soils[J]. African Journal of Microbiology Research, 2014, 8(14): 1501-1509.
- [15] 林书华, 汪林兰, 罗攀, 张斌, 吴晓玉. 淡紫灰链霉菌 X33 发酵提取物对采后柑橘绿霉病菌的抑制作用[J]. 中国食品学报, 2022, 22(1): 206-214.
- LIN S H, WANG L L, LUO P, ZHANG B, WU X Y. Inhibitory effect of fermentation extract of *Streptomyces lavendulae* strain X33 on postharvest citrus green mold[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(1): 206-214. (in Chinese)
- [16] 杨鹭, 袁源, 方志锴, 林如, 江红, 周剑. 一株链霉菌的鉴定及其产格尔德霉素的发酵工艺研究[J]. 生物技术通报, 2024, 40(6): 299-309.
- YANG L, YUAN Y, FANG Z K, LIN R, JIANG H, ZHOU J. Identification of a *Streptomyces* strain and study on the fermentation process of geldanamycin production[J]. Biotechnology Bulletin, 2024, 40(6): 299-309. (in Chinese)
- [17] 孙慧洁, 黄惠琴, 朱军, 孙前光, 余中华, 鲍时翔. 2 株海绵细菌的分离与鉴定[J]. 微生物学杂志, 2010, 30(3): 1-4.
- SUN H J, HUANG H Q, ZHU J, SUN Q G, YU Z H, BAO S X. Isolation and identification of two bacterial strains from marine sponge[J]. Journal of Microbiology, 2010, 30(3): 1-4. (in Chinese)
- [18] 马思嘉, 刘玉香. 绿脓菌素产量优化及其降解含氮化合物[J]. 化学工程, 2024, 52(2): 23-28, 60.
- MA S J, LIU Y X. Yield optimization of pyocyanin and its degradation of nitrogenous compounds[J]. Chemical engineering, 2024, 52(2): 23-28, 60. (in Chinese)
- [19] 梁嘉振, 郭家勇, 杨铮蕴, 罗婉, 罗东程, 杨春敏, 李羽, 谢雨轩. 拮抗链霉菌 R₂A-15 发酵条件优化及其活性稳定性分析[J]. 热带作物学报, 2024, 45(8): 1685-1695.
- LIANG J Z, GUO J Y, YANG Z Y, LUO W, LUO D C, YANG C M, LI Y, XIE Y X. Optimization of fermentation conditions and activity stability of *Penicillium digitatum* antagonist *Streptomyces* sp. R₂A-15[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2024, 45(8): 1685-1695. (in Chinese)
- [20] 虞旭昶, 游蕤翔, 吴雨洙, 孙润泽, 陈少欣, 吴辉, 李雷. 雷帕链霉菌未知天然产物合成基因簇异源表达与新结构混源萜 rapamylic acids A-C 鉴定[J]. 微生物学报, 2025, 66(5): 2214-2228.
- YU X C, YOU R X, WU Y Z, SUN R Z, CHEN S X, WU H, LI L. Heterologous expression of unknown natural product biosynthetic gene clusters from *Streptomyces rapamycinicus* and identification of novel meroterpenoids rapamylic acids A-C[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 66(5): 2214-2228. (in Chinese)
- [21] 宋振, 温丽慧, 胡佳燕, 吴芷玥, 章雨君, 沈之涵, 蒋冬花. 生防放线菌 Sc-7 的分离、鉴定、抑菌活性及其对水稻的促生作用[J]. 农药学报, 2024, 26(3): 492-503.
- SONG Z, WEN L H, HU J Y, WU Z Y, ZHANG Y J, SHEN Z H, JIANG D H. Isolation, identification, bacteriostatic activity of the biocontrol actinomycete Sc-7 and its growth-promoting effect on rice[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2024, 26(3): 492-503. (in Chinese)
- [22] 阮继生. 放线菌快速鉴定与系统分类[M]. 北京: 科学出版社, 2011.
- RUAN J S. Rapid identification and systematic classification of actinomycetes[M]. Beijing: Science Press, 2011. (in Chinese)
- [23] 刘媛媛, 张亚南, 肖性龙, 林旖晗, 张自强, 曹怡芳. 二氢香豆素纳米乳液制备及在紫甘蓝贮藏中的应用[J]. 现代食品科技, 2025, 41(2): 116-123.
- LIU Y Y, ZHANG Y N, XIAO X L, LIN Y H, ZHANG Z Q, CAO Y F. Preparation of dihydrocoumarin nanoemulsion and its application in purple cabbage storage[J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(2): 116-123. (in Chinese)

- [24] 李慧, 郑肖兰, 侯会霞, 吴伟怀, 谭施北, 罗磊, 吴昊, 易克贤. 铜绿假单胞菌 PaHNHK01 的鉴定及其对剑麻烟草疫霉的生防效果研究[J]. 热带作物学报, 2024, 45(10): 2171-2182.
- LI H, ZHENG X L, HOU H X, WU W H, TAN S B, LUO L, WU H, YI K X. Identification and biocontrol of *Pseudomonas aeruginosa* PaHNHK01 against sisal zebra disease[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2024, 45(10): 2171-2182. (in Chinese)
- [25] YIN Y J. Study of the effects of antagonistic bacteria RB5 and RB10 fermentation broth on *Rhizoctonia cerealis*[C]. Abstracts of the 13th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology, Henan University of Technology, 2015: 2.
- [26] 郭宇豪, 刘绍波, 葛菁萍, 平文祥. 放线菌 4-1 的鉴定及其发酵液抑菌作用和稳定性探究[J]. 中国农学通报, 2024, 40(9): 117-123.
- GUO Y H, LIU S B, GE J P, PING W X. Identification of actinomycetes 4-1 and study on bacteriostasis and stability of its fermentation broth[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2024, 40(9): 117-123. (in Chinese)
- [27] 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)
- [28] 吴金山. 木薯细菌性枯萎病生防菌定殖能力鉴定及其对叶围微生物群落的影响[D]. 海口: 海南大学, 2019.
- WU J S. The colonization of biocontrol bacteria against cassava bacterial blight disease and their effects on leaf microbial communities[D]. Haikou: Hainan University, 2019. (in Chinese)
- [29] HUTCHINGS M I, TRUMAN A W, WILKINSON B. Antibiotics: past, present and future[J]. Current Opinion in Microbiology, 2019, 51(8): 72-80.
- [30] MOHAMMADIPANAH F, WINK J. Actinobacteria from arid and desert habitats: diversity and biological activity[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 6: 1541.
- [31] 王宁, 黄伟, 鲁致远, 罗义, 马昊翔, 张丽娟, 王玮. 苹果树腐烂病生防链霉菌 A144 的鉴定及其代谢产物的抑菌活性[J]. 西北农业学报, 2023, 32(3): 440-449.
- WANG N, HUANG W, LU Z Y, LUO Y, MA H X, ZHANG L J, WANG W. Identification of biocontrol *Streptomyces* A144 against apple tree valsa cancer and antifungal activity of its metabolites[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2023, 32(3): 440-449. (in Chinese)
- [32] 蒋冬阳, 吴冰越, 季文平, 陈宸, 陈夕军. 拮抗放线菌 2-1-2F 的鉴定及其对黄瓜枯萎病的防效[J]. 中国生物防治学报, 2024, 40(2): 411-423.
- JIANG D Y, WU B Y, JI W P, CHEN C, CHEN X J. Identification of antagonistic actinomycetes 2-1-2F and its control effect on cucumber *Fusarium* wilt[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2024, 40(2): 411-423. (in Chinese)
- [33] HAMED M M, ABDELFAHATTAH L S, FAHMY N M. Antimicrobial activity of marine actinomycetes and the optimization of culture conditions for the production of antimicrobial agent(s)[J]. Journal of Pure and Applied Microbiology, 2019, 13(4): 2177-2188.
- [34] 马云涛, 胡丽娜, 孙文婧, 唐莲庚, 孙思远, 邓欣雨, 孙黎. 梨火疫病拮抗菌 JK2 的筛选鉴定及发酵条件优化[J]. 生物技术通报, 2024, 40(11): 202-213.
- MA Y T, HU L N, SUN W J, TANG L G, SUN S Y, DENG X Y, SUN L. Screening and identification of antagonistic bacterium JK2 against fire blight disease and the optimization of its fermentation conditions[J]. Biotechnology Bulletin, 2024, 40(11): 202-213. (in Chinese)
- [35] 何伟, 罗文芳, 周军辉, 许建军, 孙晓军. 贝莱斯芽孢杆菌 JTB8-2 对加工番茄促生作用及其安全性评价[J]. 新疆农业科学, 2022, 59(5): 1260-1269.
- HE W, LUO W F, ZHOU J H, XU J J, SUN X J. Growth promoting effect and safety evaluation of *Bacillus velezensis* JTB8-2 on processed tomato[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2022, 59(5): 1260-1269. (in Chinese)
- [36] 刘一贤, 施玉萍, 李岚岚, 戴利铭, 蔡志英. 生防链霉菌 17-7 菌株发酵配方优化及发酵滤液稳定性研究[J]. 热带作物学报, 2024, 45(12): 2689-2696.
- LIU Y X, SHI Y P, LI L L, DAI L M, CAI Z Y. Optimization of fermentation formula and stability of cultural filtrate produced by *Streptomyces samsunensi* 17-7[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2024, 45(12): 2689-2696. (in Chinese)
- [37] 刘芳, 权婷婷, 王开梅, 石丽桥, 温少华, 张菲, 杨晓平. 响应面法优化梨黑斑病生防链霉菌 SZF-179 发酵培养基[J]. 中国生物防治学报, 2024, 40(4): 936-947.
- LIU F, QUAN T T, WANG K M, SHI L Q, WEN S H, ZHANG F, YANG X P. Optimization of fermentation media through response surface methodology for *Streptomyces odonellii* SZF-179 against *Alternaria alternata*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2024, 40(4): 936-947. (in Chinese)
- [38] 姚作雄, 陈晓霞, 李雅芸, 高海宁, 李彩霞, 焦扬, 张勇. 一株产中温淀粉酶芽孢杆菌的培养条件优化[J]. 中国酿造, 2012, 31(3): 48-53.
- YAO Z X, CHEN X X, LI Y Y, GAO H N, LI C X, JIAO Y, ZHANG Y. Optimizing cultivation conditions of a mesophilic amylase-producing *Bacillus* sp.[J]. China Brewing, 2012,

- 31(3): 48-53. (in Chinese)
- [39] 陈海敏, 孙菲, 袁源, 吴佳雯, 江红, 周剑. 紫外诱变选育巴弗洛霉素 A1 高产菌株及其培养基优化[J]. 生物技术通报, 2025, 41(3): 51-61.
- CHEN H M, SUN F, YUAN Y, WU J W, JIANG H, ZHOU J. The high-yield bafilomycin A1 strain obtained from UV mutagenesis and its medium optimization[J]. Biotechnology Bulletin, 2025, 41(3): 51-61. (in Chinese)
- [40] 付麟云, 李晶, 李娜, 刘锦霞, 丁品, 聂焱琰, 武建荣, 杨成. 链霉菌 SS9-1 发酵条件优化及其对番茄灰霉病的防治效果研究[J]. 中国生物防治学报, 2024, 40(1): 126-136.
- FU L Y, LI J, LI N, LIU J X, DING P, NIE Y Y, WU J R, YANG C. Optimization of fermentation conditions of *Streptomyces* sp. SS9-1 and its control effect on tomato gray mold[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2024, 40(1): 126-136. (in Chinese)