

禾谷孢囊线虫生防真菌 AT9 的固体发酵条件优化

卢智琴, 李惠霞, 罗 宁, 李 瑞, 李佳佳, 陈秀菊

(甘肃农业大学 植物保护学院/甘肃省农作物病虫害生物防治工程实验室, 甘肃 兰州 730070)

摘要: AT9 菌是对禾谷孢囊线虫(*Heterodera avenae*)具有生防作用的真菌。通过固体发酵底物、营养物质以及发酵条件进行优化, 以期为该菌生产应用奠定基础。首先, 采用正交设计筛选了 AT9 固体发酵基质。其次, 通过单因素及正交设计分析了不同碳、氮源以及无机盐的最优配比。最后, 运用单因素方差分析筛选了 AT9 的最佳发酵条件。结果表明: (1) AT9 最佳发酵基质为麦麸、玉米粉、玉米秸秆粉按 2:1:3 质量比混配; (2) 最佳碳源、氮源与无机盐比例为 4% 葡萄糖、6% 硝酸钾、2% 碳酸钙; (3) 固料: 水为 1:1.2, 20% 的接种量, 32℃ 黑暗条件培养 8 d 为最佳发酵条件。

关键词: 小麦孢囊线虫; 生物防治; 固体发酵; 发酵条件

中图分类号: S476 **文献标志码:** A **文章编号:** 1009-5500(2020)01-0035-07

DOI: 10.13817/j.cnki.cyycp.2020.01.005

禾谷孢囊线虫(*Heterodera avenae*)是世界上温带小麦等作物上重要植物病原线虫, 该线虫引起的孢囊线虫病是全球范围内小麦生产上的重要病害之一^[1-4]。自 1989 年在我国湖北首次发现以来, 该线虫在河南、河北、北京、内蒙古、青海、陕西、宁夏、甘肃、山东、山西、安徽、湖北、江苏、天津、西藏和新疆等 16 个省、市、自治区陆续报道, 受害面积达 300 多万 hm^2 , 约占全国种植面积的 10%, 已对我国小麦生产和粮食安全构成威胁^[5-7]。

小麦孢囊线虫地理分布较广泛, 目前生产上缺乏高效低毒的化学药剂和高抗品种, 轮作等农业防治措施实施困难, 因此, 利用生物防治技术控制小麦孢囊线虫成为国内外研究热点和重点。Stein 等^[8]发现镰刀菌(*Fusarium* sp.)和轮枝菌(*Verticillium* sp.)等真菌对小麦孢囊线虫有很好的防治效果。张洁等^[9]从 *H. avenae* 上分离到具有较高潜在开发价值寄生真菌

08F04, 连续两年对该菌株进行了室内盆栽及大田防效试验, 孢囊减退率可达 50% 以上。因此, 生物防治被认为是控制线虫病害的较为有效的方法^[10]。前期试验发现, AT9 孢子悬浮液对小麦孢囊线虫的卵具有明显的寄生和抑制孵化作用, 经鉴定, 为土曲霉(*Aspergillus terreus*)^[11]。

目前, 植物病害生物防治较有效的方法是将生防菌制成活菌制剂, 施入土壤防治植物病害^[12]。通常, 菌制剂是通过生防菌液体发酵或固体发酵制备, 但液体发酵易受杂菌污染, 且菌种易退化, 从而导致生防效果不稳定^[13], 而固体生防制剂因其便于贮存和效果稳定, 尤其适用于防治线虫病害和其他土传病害。近年来, 有关生防菌发酵条件优化的报道很多^[14-15], 贲庆贺等^[16]利用单因子分析法筛选出一株螺旋粉病原真菌—蜡蚧轮枝菌最佳固体发酵基质即花生饼: 小米: 磷酸盐: 稻壳 = 1:2:2:2。朱海霞等^[17]筛选生防菌株多孢木霉 HZ-31 固态发酵碳源、氮源, 发现小麦粉为最适碳源, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为最适氮源, 此时产孢量达 4.45×10^9 cfu/mL, 是无碳、氮源产孢量的 7.21 倍。肖荣凤等^[18]以产孢量为指标, 优化了尖孢镰刀菌 FJAT-9290 固体发酵的条件, 当发酵培养温度为 28℃、初始含水量为 50%、接种量为 7% 时, 产孢数量

收稿日期: 2019-04-09; 修回日期: 2019-04-24

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(20150311);

甘肃省科技支撑计划(1604NKCA053-2)资助。

作者简介: 卢智琴(1993-), 女, 甘肃景泰人, 在读研究生。

E-mail: 1831325589@qq.com

李惠霞为通讯作者。E-mail: lihx@gsau.edu.cn

较初始增加了 4 个数量级,高达 6.35×10^8 cfu/g。

因此,研究拟对 AT9 菌株固体发酵培养基及其发酵条件进行摸索和筛选,以期为小麦孢囊线虫病害生物防治和生防产品研发奠定基础。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试菌株 AT9(*A. terreus*)由甘肃农业大学植物线虫学实验室保存和提供。

1.2 供试方法

1.2.1 菌株的活化和孢子悬浮液的制备 将低温保存的菌株在 PDA 培养基上 25°C 培养 7 d,向活化的菌株中加入一滴 Tween-80 和 2 mL 无菌水冲洗,使分生孢子脱落在无菌水中,即得到分生孢子悬浮液,用血球计数板计算孢子数,将浓度调整为 5.0×10^7 cfu/mL。

1.2.2 固体培养方法 将 1 mL 孢子悬浮液接种于固体发酵培养基(固水比为 1:1),每个培养皿约含 15 g 基质,在 28°C 、黑暗条件下培养 7 d,每次处理重复 3 次。

1.2.3 固体发酵培养基质的筛选 将麦麸、玉米粉、玉米秸秆粉、花生壳、大豆秸秆、玉米芯等 6 种单一基质进行固体发酵,筛选出产孢量较高的 3 种基质,并根据不同的质量比将每种基质设定在 3 个水平上,设计 $L_9(3^3)$ 的正交试验因素水平(表 1),根据孢子形成量筛选出最佳培养基质。

表 1 正交试验 $L_9(3^3)$ 因素水平表

Table 1 The factors and levels of orthogonal test $L_9(3^3)$

水平	因素		
	A 麦麸	B 玉米粉	C 玉米秸秆粉
1	1	1	1
2	2	2	2
3	3	3	3

1.2.4 碳源、氮源和无机盐的筛选 设计单因素试验,检测不同碳源(蔗糖、乳糖、麦芽糖、葡萄糖、可溶性淀粉、甘露醇)、氮源(硝酸钾、尿素、氯化铵、蛋白胨、硫酸铵、牛肉膏)和无机盐(氯化钠、碳酸钙、氯化钾、硫酸铜、硫酸锰、磷酸二氢钾)对菌株 AT9 固体发酵的影响,对已筛选出的最佳碳氮源和无机盐的添加量设置不同梯度,运用正交试验确定最适合 AT9 产孢的

组合。

1.2.5 固体发酵条件的优化 (1) 温度对固体发酵产孢量的影响 根据 1.2.3 试验结果,将发酵温度设为 24°C 、 26°C 、 28°C 、 30°C 、 32°C 、 34°C 和 36°C ,恒温处理,每组处理 3 次重复,黑暗条件下培养 7 d,测定不同温度对 AT9 产孢量的影响。

(2) 含水量的固体发酵对 AT9 产孢量的影响 根据上述试验结果,将培养基中的含水量设置 7 个处理,即固体培养基与水的比例分别为:1:0.4、1:0.6、1:0.8、1:1、1:1.2、1:1.4、1:0.6,其他培养及检测方法同上。

(3) 固体发酵接种量对产孢量的影响 根据上述试验结果,将接种量设置 7 个处理,孢子悬浮液分别为固料的 1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%,每处理重复 3 次,其他培养及检测方法同上。

(4) 发酵时间对产孢量的影响:在试验结果的基础上,将固体发酵时间设为接种后 4、5、6、7、8、9、10、11 d,测定产孢量,确定最佳发酵时间。

1.2.6 产孢量测定 称取 1 g 带菌的培养基在研钵中研磨充分,加 99 mL 水和一滴吐温 80,充分搅拌,振荡混匀后,用血球计数板统计孢子数,每处理重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对菌株 AT9 产孢量的影响

生防菌 AT9 在麦麸、玉米粉、玉米秸秆和花生壳 4 种单一基质上产孢量比较高,而在大豆秸秆和玉米芯基质上的产孢量较低(图 1)。麦麸与玉米粉差异不显著,与玉米秸秆、花生壳之间有差异但不显著,与大豆秸秆、玉米芯之间差异显著($P < 0.05$)。依据产孢情况将麦麸、玉米粉、花生壳和玉米秸秆等 4 种单一基质确定为 AT9 固体发酵的基础培养基。

AT9 菌株在麦麸+玉米粉和麦麸+玉米秸秆组合的固体培养基上产孢量最多,分别为 10.10×10^7 cfu/mL 和 9.58×10^7 cfu/mL,这 2 个组合之间差异不显著($P < 0.05$)。玉米秸秆+花生壳与麦麸+花生壳产孢量较低,且与与麦麸+玉米粉和麦麸+玉米秸秆组合产孢量差异显著($P < 0.05$)(图 2)。

在总物料相同的情况下,接种后培养 7 d,AT9 在复合基质上的产孢量较单一基质都有不同程度的提

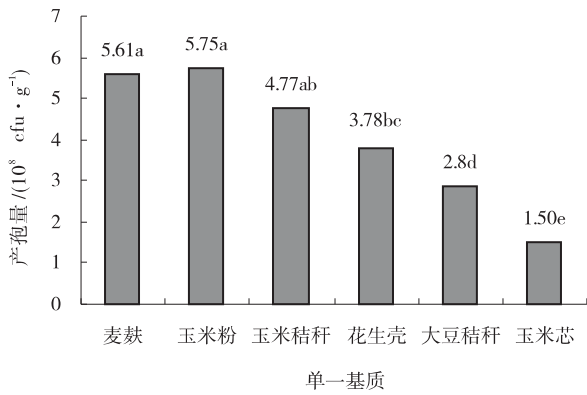


图 1 单一基质对 AT9 固体发酵产孢量的影响

Fig. 1 Effects of single matrix on sporulation of AT9 solid fermentation

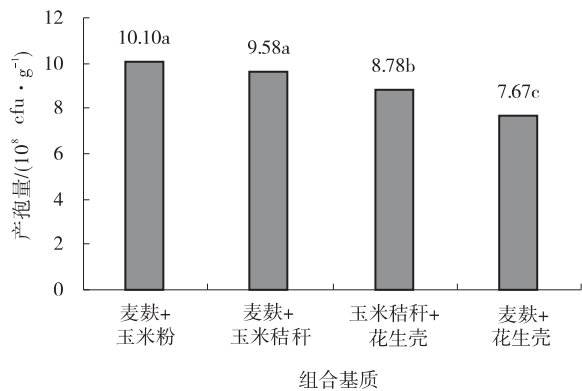


图 2 组合固体基质对 AT9 固体发酵产孢量的影响

Fig. 2 Effects of combined solid substrate on sporulation of AT9 solid fermentation

升。根据 R 值,影响因素排序是:玉米秸秆>麦麸>玉米粉,最佳工艺条件为 8 号 A₂B₁C₃,各组分分别为麦麸 5.0 g,玉米粉 2.5 g 和玉米秸秆 7.5 g 时,产孢量最高,为 12.63×10⁸ cfu/g(表 2)。依据 K 值,最佳组合为 A₁B₂C₃,由于不在正交设计表范围内,需要进一

表 3 不同碳源、氮源以及无机盐对 AT9 固体发酵产孢量的影响

Table 3 Effect of different carbon, nitrogen sources and inorganic salts on sporulation of AT9 solid fermentation

因子	碳源 产孢量 10 ⁸ cfu/g	氮源 产孢量 10 ⁸ cfu/g	无机盐 产孢量 10 ⁸ cfu/g
A	蔗糖 14.27±0.39 ^e	硝酸钾 30.25±0.07 ^a	氯化钠 16.59±0.35 ^d
B	乳糖 14.58±0.05 ^e	尿素 17.34±0.09 ^d	碳酸钙 19.80±0.15 ^g
C	麦芽糖 19.16±0.08 ^c	氯化铵 7.56±0.18 ^f	氯化钾 17.79±0.41 ^c
D	葡萄糖 24.19±0.02 ^a	蛋白胨 28.65±0.10 ^c	硫酸铜 2.41±0.11 ^g
E	淀粉 21.14±0.12 ^b	硫酸铵 3.16±0.35 ^g	硫酸锰 18.57±0.31 ^b
F	CK 12.64±0.02 ^e	CK 12.64±0.20 ^e	CK 12.64±0.20 ^e
G	甘露醇 18.19±0.28 ^d	牛肉膏 29.20±0.24 ^b	KH ₂ PO ₄ 5.35±0.05 ^f

步验证。在 A₁B₂C₃组合上发酵,产孢量为 11.42×10⁸ cfu/g,其结果低于组合 A₂B₁C₃,因此,发酵培养基最佳组合确定为 A₂B₁C₃。

表 2 不同复合基质对 AT9 固体发酵产孢量的影响

Table 2 Effect of different composite substrates on the sporulation of AT9 solid fermentation

编号	麦麸/g	玉米粉/g	玉米秸秆粉/g	产孢量 10 ⁸ cfu/g
1	7.5	2.5	5.0	5.70
2	5.0	7.5	5.0	7.25
3	2.5	7.5	7.5	9.00
4	2.5	5.0	5.0	11.71
5	7.5	7.5	2.5	10.32
6	2.5	2.5	2.5	8.48
7	7.5	5.0	7.5	9.72
8	5.0	2.5	7.5	12.63
9	5.0	5.0	2.5	7.62
K ₁	9.71	8.94	8.81	
K ₂	9.17	9.68	8.22	
K ₃	8.58	8.85	10.45	
R	1.13	0.83	2.23	

2.2 不同碳源、氮源和无机盐固体发酵对产孢量的影响

AT9 菌株在不同碳源、氮源以及无机盐的培养基上都能产孢,但在葡萄糖上的产孢量为 24.19×10⁸ cfu/g,显著高于其他碳源。在硝酸钾上的产孢量为 30.25×10⁸ cfu/g,显著高于其他氮源,在碳酸钙上的产孢量为 19.80×10⁸ cfu/g,显著高于其他无机盐(表 3)。因此,将葡萄糖,硝酸钾和碳酸钙确定为 AT9 最适宜产孢的碳源、氮源和无机盐种类。

对葡萄糖,硝酸钾和碳酸钙的添加量进行筛选,发现在添加4%葡萄糖时,AT9的产孢量与其他处理差异显著($P < 0.05$),添加6%的硝酸钾时,产孢量与其他处理差异显著($P < 0.05$),添加4%的碳酸钙时,产孢量与其他处理的差异显著($P < 0.05$)(表4)。

表4 AT9 固体发酵最佳碳源、氮源和无机盐添加量的筛选

Table 4 Screening of optimum carbon, nitrogen and inorganic salt additions for AT9 solid fermentation

添加量/%	产孢量 10^8 cfu/g		
	葡萄糖	硝酸钾	碳酸钙
0	12.52±0.22 ^f	12.52±0.08 ^e	12.52±0.23 ^e
1	14.85±0.08 ^e	—	—
2	18.36±0.05 ^c	17.42±0.05 ^d	15.62±0.76 ^c
3	21.87±0.04 ^b	—	—
4	24.35±0.03 ^a	26.79±0.05 ^b	19.16±0.68 ^a
5	15.92±0.04 ^d	—	—
6	7.74±0.06 ^g	31.51±0.10 ^a	17.92±0.20 ^b
7	—	—	—
8	—	22.80±0.15 ^c	15.15±0.37 ^d
9	—	—	—
10	—	7.22±0.09 ^f	10.50±0.56 ^f
11	—	—	—
12	—	5.79±0.04 ^g	2.58±0.16 ^g

注:同列数字后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)

正交试验结果表明,AT9产孢量的影响因素顺序为:氮源>碳源>无机盐。通过正交试验,优化AT9菌株适宜生长的最佳碳、氮源和无机盐离子的含量配比,结果表明,AT9菌株在处理8(A₃B₂C₁)中的产孢量最高,为 47.35×10^8 cfu/g,即4%葡萄糖,6%硝酸钾和2%碳酸钙配比为最佳产孢组合。(表5)。

2.3 真菌 AT9 固体发酵条件的筛选

2.3.1 温度对 AT9 产孢量的影响 AT9 菌株在 22~36℃均能产孢,当发酵温度为 32℃时,产孢量达到最大值,为 5.36×10^9 cfu/g,显著高于其他温度($P < 0.05$),因此,确定 32℃是 AT9 菌株的最佳发酵温度(图3)。

2.3.2 含水量对 AT9 产孢量的影响 AT9 菌株在不同湿度的培养基上均能产孢,当固料:水=1:1.2时,产孢量达到最大值,为 5.62×10^9 cfu/g,显著高于其他条件下产孢量($P < 0.05$),说明固料:水=1:1.2最适合 AT9 菌株产孢(图4)。随着固料:水的比值升高或者降低,生防真菌固体发酵的产孢量均出现降低。

表5 AT9 固体发酵最佳碳源、氮源以及无机盐最优组合的筛选

Table 5 Screening of the best combination of optimal carbon source, nitrogen source and inorganic salt for AT9 solid fermentation

因子 试验号	AT9			产孢量 10^8 CFU/g
	葡萄糖	硝酸钾	碳酸钙	
1	2%	4%	2%	41.98
2	2%	6%	4%	44.76
3	2%	8%	6%	42.27
4	3%	4%	4%	43.1
5	3%	6%	6%	40.53
6	3%	8%	2%	39.87
7	4%	4%	6%	44.77
8	4%	6%	2%	47.35
9	4%	8%	4%	38.11
X1	43.00	43.28	43.06	
X2	41.17	44.15	41.99	
X3	43.41	40.08	42.66	
R	2.24	4.07	1.07	

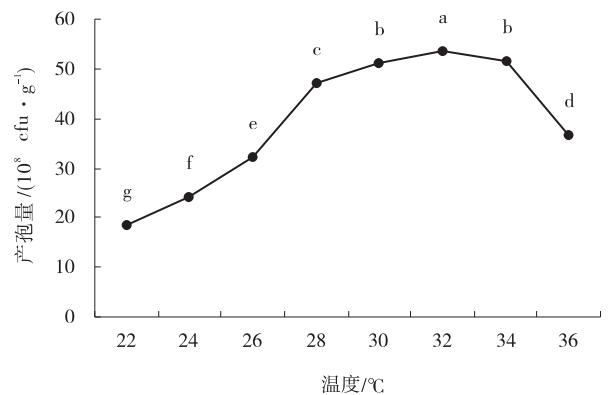


图3 温度对 AT9 固体发酵产孢的影响

Fig. 3 Effects of temperature on sporulation of AT9 solid fermentation

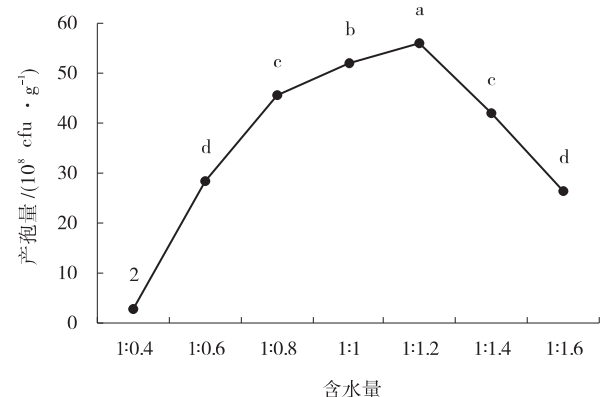


图4 含水量对 AT9 固体发酵产孢的影响

Fig. 4 Effects of water content on sporulation of AT9 solid fermentation

2.3.3 接种量对 AT9 产孢量的影响 AT9 菌株在不同接种量下产孢量差异显著,产孢量在一定范围随接种量的增加而增加,接种量为 20% 时,产孢量最高。考虑生防菌的节省利用,将菌株发酵的最佳接种量确定为 20% (图 5)。

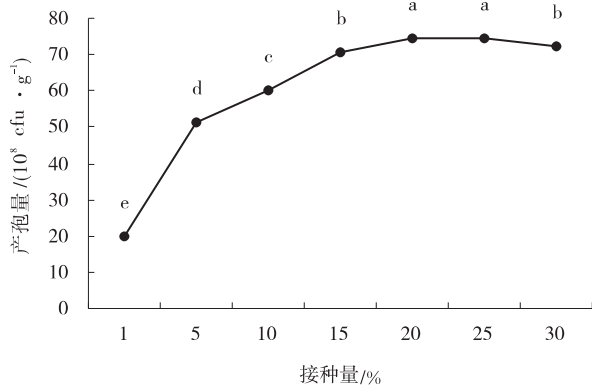


图 5 接种量对 AT9 固体发酵产孢的影响

Fig. 5 Effects of inoculum size on sporulation of AT9 solid fermentation

2.3.4 发酵时间对 AT9 产孢量的影响 在其他条件不变的情况下,培养不同的时间后测定固体发酵的产孢量,发现在第 8 d 时产孢量最大。AT9 菌株在 4~10 d 产孢量有所增加,但发酵 8 d 之后,产孢量的增量不显著,将菌株发酵的最佳发酵时间确定为 8 d (图 6)。

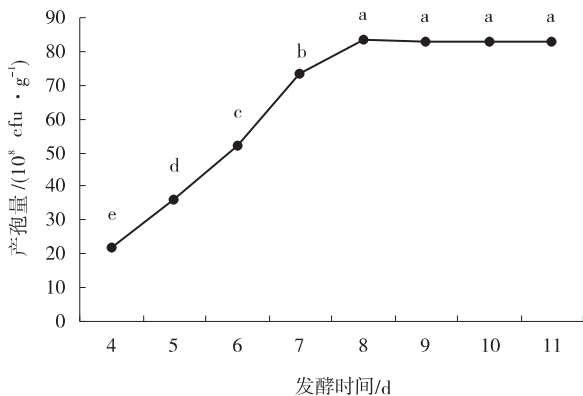


图 6 发酵时间对 AT9 固体发酵产孢的影响

Fig. 6 Effects of fermentation time on sporulation of AT9 solid fermentation

3 讨论

在微生物发酵试验中,固体发酵利用低成本的农业或工农业副产物或其废弃物作为发酵基质,筛选适于真菌生长的最佳基质作为发酵底物,同时菌体的生长受水分含量、接种量、温度等的影响。采用单因素和正交试验方法可有效地反映各种因素对菌株发酵的影

响^[19]。试验结果表明,AT9 在优化条件下产孢量最大,为 AT9 的应用以及曲霉生物制剂的开发利用提供了依据。

试验所采用的材料来源广且价格低廉、易做青贮饲料,这为微生物的生长提供了充足及必需的营养物质,同时有效地利用了农副产品。罗洋等^[20]采用单因素试验筛选里氏木霉 FS10-C 的固体发酵底物,当桔皮与麦麸比例为 1:1 时,获得较好的发酵效果。这与本试验所采用的材料相似,不仅降低成本而且解决了田间秸秆处理难题,实现农业副产品回收再利用。此外,不同的微生物菌株由于自身的生理特征的不同致使发酵工艺条件也有所差异,当含水量较低时,基质的膨胀程度较低而不利于真菌吸收营养物质,导致菌体生长速度减慢;高的含水量会造成基质粘结,从而多孔性降低,大量的水分游离于空隙中,阻碍了空气的流动和氧气的传递;真菌产孢量通常伴随接种量的增加而增大,当接种量增加到一定范围时,产孢量不再增加甚至降低。原因是当接种量较大时使得基质的含水量过大造成供氧不足导致产孢量降低。蒋冬花等^[21]通过响应面法筛选出红曲霉 Mp-41 菌株固体发酵最优条件为培养温度 32℃、初始 pH 6.0、初始含水量为 44.81%、接种量为 2.65 mL/30 g、发酵时间为 10.19 d^[21]。研究表明不同菌株的最佳发酵条件不同,每个菌株都有其独特的生长需求。因此,选择适合菌株自身生长的培养基组分和最佳发酵条件,有利于提高菌体产量,使菌株的生防潜力获得充分的发挥。有研究报告,固体发酵培养基底物、碳氮源和无机盐以及培养条件的不同,都会较大影响到生防菌的产孢量^[22-24]。鲁海菊等^[25]筛选深绿木霉 P3.9 生防菌株固体发酵最佳培养基为以米糠为底物基质,在其中添加 0.5% 葡萄糖、0.5% D-果糖、0.5% 磷酸二氢铵、0.05% 磷酸氢二钠,最佳培养条件为 40% 含水量、5% 接种量、光暗交替 28℃ 静止培养 9 d;按优化后的培养条件培养,最高产孢量可达 7.5×10^9 cfu/g 培养物质,与此次研究所得结果一致。这表明通过改变发酵底物以及工艺条件可使生防菌微生物快速生长与大量繁殖。

4 结论

研究发现 AT9 菌株固体发酵培养基为麦麸:玉米粉:玉米秸秆粉 = 2:1:3,其中添加 4% 葡萄糖、6% 硝酸钾、2% 碳酸钙,当发酵温度为 32℃、初始固料:水 =

1:1、接种量为20%、黑暗条件下发酵8 d时,产孢量达到最大值,可为后续研究和应用提供参考。

参考文献:

- [1] Association analysis of resistance to cereal cyst nematodes (*Heterodera avenae*) and root lesion nematodes (*Pratylenchus neglectus* and *P. thornei*) in CIMMYT advanced spring wheat lines for semi-arid conditions[J]. *Breeding Science Preview*, 2016, 66(5): 692—702.
- [2] Bonfil D J, Dolgin B, Mufradi I, et al. Bioassay to forecast cereal cyst nematode damage to wheat in fields[J]. *Precision Agriculture*, 2004, 5: 329—344.
- [3] Nicol J M, Elekcioçğlu I H, Bolat N, et al. The global importance of the cereal cyst nematode (*Heterodera* spp.) on wheat and international approaches to its control[J]. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 2007, 72: 677—686.
- [4] Peraldi A, Griffie L L, Burt C, et al. Nicholson P. 2014. *Brachypodium distachyon* exhibits compatible interactions with *Oculimacula* spp. and *Ramularia collo-cygni*, providing the first pathosystem model to study eyespot and ramularia leaf spot diseases[J]. *Plant Pathology*, 63: 554—562.
- [5] 赵鹏,李惠霞,李健荣,等. 2015年宁夏小麦田禾谷孢囊线虫的分布[J]. *麦类作物学报*, 2016, 36(6): 808—813.
- [6] 欧师琪,彭德良,李玉. 青海、陕西部分地区禾谷孢囊线虫 rDNA-ITS-RFLP 的特征分析[J]. *植物病理学报*, 2011, 41(4): 411—420.
- [7] 侯生英,马麟. 209份国外春小麦种质对禾谷孢囊线虫的抗性[J]. *麦类作物学报*, 2018, 38(1): 35—40.
- [8] Stein B, Grabert D. Isolation of fungi from cysts and eggs of *Heterodera avenae* Wollenweber, 1924 and tests of their pathogenicity to the nematode. 1992, 38(1): 375—384
- [9] 张洁,袁虹霞,孙炳剑,等. 小麦孢囊线虫病生防真菌 08F04 菌株的鉴定及防效测定[J]. *中国生物防治学报*, 2013, 29(4): 509—514.
- [10] Dicklow M B, Aeosta N, Zuckerman B M. A novel species for controlling plant-parasitic nematodes[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 1993, 19(2): 159—173.
- [11] 坚晋卓,徐鹏刚,张虎忠,等. 真菌 AT9 对禾谷孢囊线虫的寄生作用及种类鉴定[J]. *甘肃农业大学学报*, 2016, 51(5): 71—77.
- [12] El-Hassan S A, Gowen S R. Formulation and delivery of the bacterial antagonist *Bacillus subtilis* for management of lentil vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*[J]. *Journal of Phytopathology*, 2006, 154: 148—155.
- [13] 兰玲峰,李学优,曹丁,等. 地衣芽孢杆菌固体高密度发酵研究[J]. *轻工科技*, 2018, 34(5): 22—24.
- [14] Fatma M, Saoussen B K, Amel K, et al. 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.
- [15] 石振宇,纪明山. 蜡蚧轮枝菌 VL17 菌株固体发酵培养基筛选及发酵条件优化[J]. *江苏农业科学*, 2009(4): 129—130.
- [16] 贲庆贺,黄武仁,牛黎明,等. 一株螺旋粉虱病原真菌发酵基质的筛选和发酵条件初探[J]. *热带作物学报*, 2011, 32(12): 2320—2323.
- [17] 朱海霞,马永强,魏有海,等. 多孢木霉 HZ-31 菌株发酵条件研究[J]. *西北农业学报*, 2017, 26(1): 132—136.
- [18] 肖荣凤,陈燕萍,刘波,等. 非致病性尖孢镰刀菌固体发酵条件筛选[J]. *福建农业学报*, 2017, 32(12): 1350—1353.
- [19] 王亚娇,纪莉景,栗秋生,等. 列当生防菌层出镰刀菌 Br-1 发酵条件的优化及田间防治效果[J]. *中国生物防治学报*, 2017, 33(5): 692—698.
- [20] 罗洋,滕应,刘方,等. 里氏木霉 FS10-C 固体发酵基质筛选及发酵条件初探[J]. *生物技术通报*, 2014(3): 111—116.
- [21] 蒋冬花,孙蕾,陈璨,等. 高产色素红曲霉菌株的筛选、鉴定和固体发酵条件优化[J]. *浙江农业大学学报*, 2015, 27(9): 1639—1645.
- [22] 刘欢,雷平,郭照辉,等. 生防放线菌 HNA30 的固体发酵条件[J]. *贵州农业科学*, 2017, 45(4): 75—78.
- [23] 董伟洁,朱永明,姜军坡,等. 耐酸产蛋白酶芽孢杆菌菌株的筛选及其生料固体发酵豆粕效果评价[J]. *饲料工业*, 2017, 38(24): 46—55.
- [24] 张正杰,韩金秀,刘学周,等. 内生菌株 B16 发酵条件优化及其对人参锈腐病的防效[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(11): 2698—2707.
- [25] 鲁海菊,王波,潘柳君,等. 深绿木霉 P39 生防菌株固体发酵条件优化筛选[J]. *北方园艺*, 2014(14): 119—123.

Effects of different utilization patterns on soil physicochemical properties in alpine meadow

ZHANG Miao-miao¹, ZHANG De-gang¹, CHEN Wei²

(1. College of Grassland Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2. College of Geography and Environmental Engineering, Lanzhou City University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: In order to explore the effects of utilization patterns on the soil physicochemical properties of alpine meadow in Qinghai province, the soil particle composition, pH value, organic carbon, total nitrogen, total phosphorus and total potassium in 0~10 cm and 10~20 cm layers were studied under 4 utilization patterns, including grazing land, returning farmland to forest, secondary seabuckthorn forest land and farming land, were measured. The results showed that the grazing land soil contained more silt and clay, less coarse sand, and farming land soil contained more coarse sand and less silt and clay. The order of soil pH value from high to low was farming land > secondary seabuckthorn forest land > returning farmland to forest land > grazing land. Soil organic carbon and total nitrogen contents basically follow the trend of grazing land > returning farmland to forest land > secondary seabuckthorn forest land > farming land. There was a significant positive correlation ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) between organic carbon, total nitrogen and the amounts of clay, and they were also negatively correlated with pH values ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The effects of different utilization patterns on the contents of organic carbon, total nitrogen, coarse sand and total potassium were remarkable.

Key words: alpine meadow; soil physical and chemical properties; utilization pattern

(上接 40 页)

Optimization of solid fermentation conditions of *Aspergillus terreus* for wheat cyst nematode biocontrol

LU Zhi-qin, LI Hui-xia, LUO Ning, LI Rui, LI Jia-jia, CHEN Xiu-ju

(College of Plant Protection, Gansu Agricultural University/Biocontrol Engineering Laboratory of Crop Diseases and Pests of Gansu Province, Lanzhou 730070, China)

Abstract: *Aspergillus terreus* AT9 is a fungus with biological control effect against cereal cyst nematode (*Heterodera avenae*). The solid fermentation substrate, nutrients and fermentation conditions of AT9 was optimized to provide a foundation for its production and application. Orthogonal design was used to screen different substrates for solid fermentation. Single factor and orthogonal design were used to analyze the optimal proportion of different carbon and nitrogen sources. One-way analysis of variance was used to screen the optimal fermentation conditions. The results showed that 1) The optimal fermentation substrate was mixture of wheat bran, corn flour and corn straw powder (2:1:3); 2) The optimal carbon source, nitrogen source and inorganic salt ratio were 4% glucose, 6% potassium nitrate and 2% calcium carbonate; 3) The best fermentation conditions were solid material/water ratio 1:1.2, 20% inoculum at 32 °C in dark for 8 days.

Key words: wheat cyst nematode; biological; solid fermentation; fermentation condition