

## 一株抗茄子黄萎病芽孢杆菌发酵条件的初步研究

王慧萍 杨启银 闫淑珍 张辉

( 南京师范大学生命科学学院微生物工程实验室, 210097, 江苏, 南京 )

[ 摘要 ] 初步探讨抗茄子黄萎病芽孢杆菌 F53( *Bacillus* sp. ) 的发酵条件, 通过培养条件优化及正交试验得出最佳培养基质量分数配方为( % ): 蔗糖 0.3, 玉米淀粉 0.3, 蛋白胨 1.0, 豆粕粉 0.3, NaCl 0.5,  $\text{FeSO}_4 \cdot 0.002$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 0.04$ , 最佳培养条件为: 起始 pH 值 7.0 ~ 8.0、250 mL 三角瓶装液量 50 mL、摇瓶速度 150 r/min、接种量 4%、温度 34℃, 在此条件下培养 F53 菌株 48 h 其无菌发酵液对茄子黄萎病菌抑菌圈直径达  $2.25 \pm 0.0763$  cm.

[ 关键词 ] 芽孢杆菌 F53, 发酵条件, 抑制, 茄子黄萎病

[ 中图分类号 ] Q939.96, [ 文献标识码 ] A, [ 文章编号 ] 1001-4616(2005)02-0083-05

## Preliminary Study of Fermental Condition of *Bacillus* sp. Antagonistic to *Verticillium Dahliae*

Wang Huiping, Yang Qiyin, Yan Shuzhen, Zhang Hui

( Key Laboratory of Microbial Engineering, School of Life Science, Nanjing Normal University, 210097, Nanjing, China )

**Abstract** The fermental condition influence on the inhibitory effect of *bacillus* sp. F53 antagonistic to *Verticillium dahliae* is studied. Through culture condition and orthogonal tests, we obtain a optimal medium composition( % ): cance sugar 0.3, corn flour 0.3, peptone 1.0, soybean meal 0.3, NaCl 0.5,  $\text{FeSO}_4 \cdot 0.002$  and  $\text{MgSO}_4 \cdot 0.04$ ; when the strain is cultured with conditions as following: initial pH7.0 ~ 8.0, inoculation level 4% a 150 r/min shake revolutions with 50ml medium in 250 mL flask, culture temperature 34℃ and culture time 48 hours, the diameter of inhibition zone reaches  $2.25 \pm 0.0763$  cm.

**Key words** *bacillus* sp. F53, fermental condition, inhibition, *verticillium dahliae*

## 0 引言

植物病害常常给农业生产带来重大损失, 其中 80% 是由真菌引起的<sup>[1]</sup>. 不可否认, 化学药剂在减轻或避免真菌造成的危害方面曾经起了重要作用, 而且现在仍然是对付有害真菌的重要手段. 但是, 化学药剂对环境的污染和对健康的危害引起了广泛关注. 利用拮抗微生物及其代谢产物被认为是一个很有前途的方向<sup>[2]</sup>. F53 菌株是本实验室从茄子根际土壤筛选得到的一株芽孢杆菌( *Bacillus* sp. ), 前期的研究表明, 其发酵液对茄子黄萎病菌( *Verticillium dahliae* ), 番茄青枯病菌( *Ralstonia solanacearum* ), 黄瓜枯萎病菌( *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* ), 油菜菌核病菌( *Sclerotinia sclerotiorum* ), 烟草赤星病菌( *Alternaria alternata* )等多种植物病菌具强抑制作用, 抑菌谱与多数文献报道的有所不同<sup>[3-5]</sup>. 该菌株发酵液制成的菌剂用于温室盆栽试验, 对苗期人工接种黄萎病菌的茄子防效达 77.5%. 微生物发酵液对病原菌的抑制效果除取决于内在因素外, 还取决于外界条件, 包括营养物质的浓度和培养条件等, 为了获得 F53 菌株最佳发酵条件, 本文对该菌的培养基配方和培养条件进行了优化选择.

收稿日期: 2004-10-15.

基金项目: 江苏省教育厅高新技术产业发展资助项目( 2002SWXTSJ3002 ).

作者简介: 王慧萍, 女, 1978—, 硕士研究生, 主要从事微生物学的学习和研究. E-mail: whp95@126.com

通讯联系人: 杨启银, 1951—, 副教授, 主要从事微生物学的教学与研究. E-mail: yangqiyin@163.com

1 材料和方法

1.1 菌种

芽孢杆菌 F53( *Bacillus* sp. ) 本实验室筛选保存 ;茄子黄萎病原菌( *Verticillium dahliae* ) ,江苏省农科院提供.

1.2 培养基

斜面及种子培养基 :NA 培养基<sup>[6]</sup>.  
基础培养基 :牛肉膏蛋白胨培养基.  
发酵培养基 :碳源( 玉米粉、玉米淀粉、麦芽糖、葡萄糖、糖蜜、乳糖、蔗糖、木糖、可溶性淀粉 ) ,氮源( 进口鱼粉、蚕蛹粉、豆饼粉、蛋白胨、酵母膏、硝酸铵、硫酸铵、氯化铵 ) ,无机盐(  $K_2HPO_4$ 、 $FeSO_4$ 、 $ZnSO_4$ 、 $MnSO_4$ 、 $MgSO_4$  ) pH7.0 ~ 7.2.  
分析培养基 :马铃薯蔗糖培养基( PDA ).

1.3 培养方法

1.3.1 菌种活化

将斜面保存的 F53 菌株接一环到种子培养液中 250 mL 三角瓶装液量 50 mL ,31℃ ,180 r/min 振荡培养 36 h( 菌量为  $3.5 \times 10^8$  cfu/mL ).

1.3.2 培养基配方的选择

采用发酵培养基 250 mL 三角瓶装液量 50 mL、摇瓶速度 180 r/min、接种量 2%、温度 31℃ 培养时间 48 h ,分别检测不同的碳源、氮源以及无机盐对 F53 菌株发酵液抑菌效果的影响 ,重复 3 次.

1.3.3 培养条件的优化

采用基础培养基 采取 1.3.2 相同的培养条件 ,分别检测不同培养时间、起始 pH、装液量、摇瓶速度、接种量和培养温度对 F53 菌株发酵液抑菌效果的影响 ,重复 3 次.

1.4 分析方法

将灭菌牛津杯置于已涂布 0.2 mL 黄萎病原菌悬液(  $1 \times 10^7$  cfu/mL )的 PDA 平板上 ,加入经 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜过滤的发酵液 100  $\mu$ L 25℃ 恒温箱培养 72 h 测量抑菌圈直径 ,每个处理重复 4 ~ 5 次.

2 结果与分析

2.1 培养基配方的选择

2.1.1 不同碳源对发酵液抑菌效果的影响

对常见的 9 种碳源 :玉米粉、玉米淀粉、麦芽糖、葡萄糖、糖蜜、乳糖、蔗糖、木糖、可溶性淀粉 ( 质量体积浓度为 3 g/L ) ,与 CK( 不加碳源 )作比较 ( 图 1 ). 结果表明 培养基中碳源种类不同 ,F53 菌株发酵液对黄萎病菌抑制效果亦不同 ,蔗糖或玉米淀粉作碳源 ,发酵液抑菌效果最好 ,抑菌圈直径达到  $1.97 \pm 0.1215$  cm 和  $1.88 \pm 0.0769$  cm ;不加碳源的 CK 组发酵液抑菌活性最差.

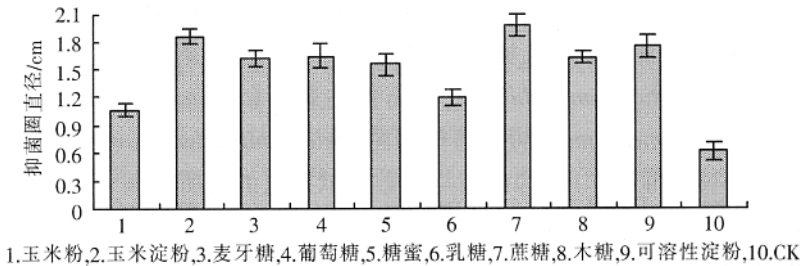


图 1 不同碳源对发酵液抑菌效果的影响

2.1.2 不同氮源对发酵液抑菌效果的影响

对常见的 8 种氮源 :进口鱼粉、蚕蛹粉、豆饼粉、蛋白胨、酵母膏、硝酸铵、硫酸铵、氯化铵( 有机氮源浓度为 10 g/L ,无机氮源浓度为 5 g/L<sup>[7]</sup> ) ,与 CK( 不加氮源 )作比较( 表 1 ). 结果表明 ,培养基氮源种类对 F53菌株发酵液的抑菌效果亦有很大影响. 以进口鱼粉、蚕蛹粉、硝酸铵、硫酸铵、氯化铵为氮源的培养基

以及 CK 组发酵液均无抑菌活性,可能由于进口鱼粉无机盐含量较高、蚕蛹粉油脂含量较高、F53 菌株不能利用硝酸铵、硫酸铵、氯化铵等无机氮源以及该菌在无氮源的条件下不能生长,该菌株可以利用豆饼粉、蛋白胨、酵母膏,其中,蛋白胨不仅基本氮源含量丰富,而且可能由于其含有的某种维生素或糖类物质适合该菌株生长与繁殖,以蛋白胨作为氮源抑菌圈直径最大。

2.1.3 不同无机盐对发酵液抑菌效果的影响

培养基中分别加入不同无机盐<sup>[8]</sup>:0.07%  $K_2HPO_4$ 、0.002%  $FeSO_4$ 、0.001%  $ZnSO_4$ 、0.02%  $MnSO_4$  和 0.04%  $MgSO_4$ ,以肉汤培养基作为 CK(图 2)。结果表明,0.002%  $FeSO_4$  和 0.04%  $MgSO_4$  能提高 F53 菌株发酵液抑菌效果,而其余 3 种无机盐对发酵液的抑菌活性产生不良影响。

2.2 培养条件的优化

2.2.1 培养时间对发酵液抑菌效果的影响

分别于接种后 12、24、36、48、60、72、84、96 h 取样测定抑菌活性(图 3)。结果表明,在培养起始阶段(0~12 h),主要是菌体的营养生长,发酵液无抑菌活性,随后发酵液抑菌效果逐步提高,培养至 48 h 时发酵液抑菌活性达到最高,培养至 96 h 发酵液抑菌活性不再增加。

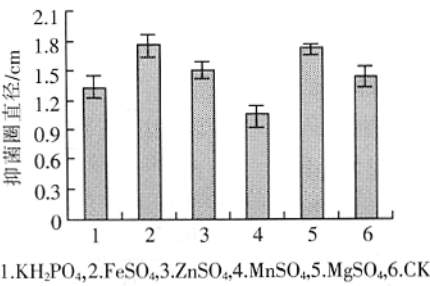


图 2 不同无机盐对发酵液抑菌效果的影响

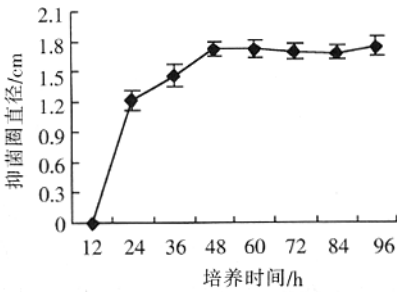


图 3 不同培养时间对发酵液抑菌效果的影响

2.2.2 起始 pH 值对发酵液抑菌效果的影响

用 NaOH 和 HCl 将培养基起始 pH 值分别调为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0, pH 值均用 pH S-25 型酸度计测量(图 4)。结果表明, pH 为 7.0~8.0 时 F53 菌株发酵液抑菌活性较高, pH 低于 5.0 或大于 9.0 时抑菌活性显著下降,当 pH 为 10.0 时发酵液完全不能抑制病原菌的生长,说明中性及弱碱性培养条件有利于 F53 菌株发酵液对黄萎病原菌的抑制作用。

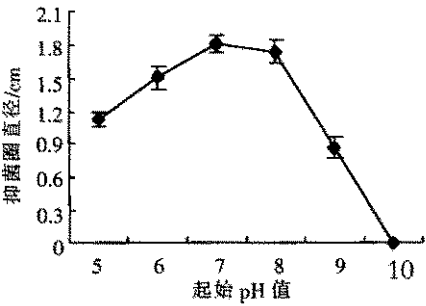


图 4 不同起始 pH 值对发酵液抑菌效果的影响

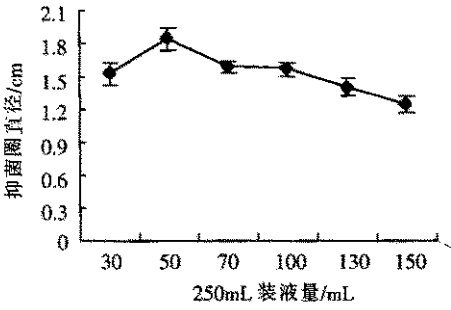


图 5 不同装液量对发酵液抑菌效果的影响

2.2.3 装液量对发酵液抑菌效果的影响

250mL 三角瓶中分别加入 30、50、70、100、130、150 mL 培养基培养 F53 菌株,考察溶氧对发酵液抑菌效果的影响(图 5)。以装液量为 50 mL 时 F53 菌株发酵液抑菌活性最高,装液量分别为 30 mL 和 70 mL 时次之,说明通气量过大或过小,都不利于发酵液的抑菌效果。

2.2.4 摇瓶速度对发酵液抑菌效果的影响

将摇瓶速度分别设为 120、150、175、200、230 r/min 进行培养(图 6)。以摇瓶速度 150 r/min 时 F53 菌株发

酵液抑菌效果最好,而摇瓶速度大于 150 r/min 时,发酵液抑菌活性随转速的提高而逐渐降低,说明通气量对 F53 菌株发酵液抑菌效果有影响,这与 2.2.3 的结论一致.

2.2.5 接种量对发酵液抑菌效果的影响

分别将 0.2%、1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、6.0% F53 菌株种子培养液接入发酵培养液中,检测接种量对发酵液抑菌效果的影响(图 7).结果表明,接种量在 4% 时发酵液抑菌活性最高,接种量 <3% 或 >6% 时,发酵液抑菌活性有所降低.

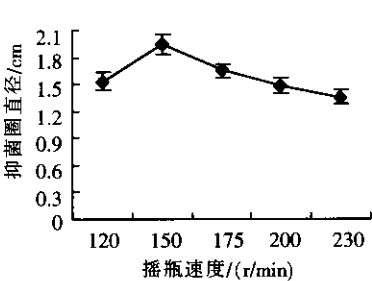


图 6 不同摇瓶速度对发酵液抑菌效果的影响

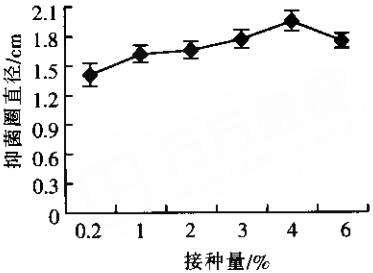


图 7 不同接种量对发酵液抑菌效果的影响

2.2.6 培养温度对发酵液抑菌效果的影响

分别在 25、28、31、34、37℃ 条件下培养 F53 菌株,温度对发酵液抑菌效果有一定的影响(图 8),在 25 ~ 34℃ 范围内,发酵液抑菌活性随培养温度的升高而提高,以 34℃ 时培养 F53 菌株发酵液抑菌活性最高,当培养温度在 37℃,发酵液抑菌效果开始下降.

2.3 正交试验

根据上述实验结果,碳源选择蔗糖和玉米淀粉,氮源选择蛋白胨和豆粕粉,按正交设计表  $L_9(4^3)^{[9]}$  进行试验,培养基中分别加入无机盐(%) :  $\text{NaCl}$  0.5,  $\text{FeSO}_4$  0.002,  $\text{MgSO}_4$  0.04,培养条件:起始 pH 值 7.0 ~ 8.0、250 mL 三角瓶装液量 50 mL、接种量 4%、培养温度 34℃、150 r/min 振荡培养 48 h. 各因素水平设置及实验结果见表 2.

由表 2 可知,F53 菌株发酵液最高抑菌活性培养基的最优组合为:  $A_2B_3C_2D_2$ ,即为(%) :蔗糖 0.3,玉米淀粉 0.3,蛋白胨 1.0,豆粕粉 0.3,在该配方及上述培养条件下,F53 菌株发酵液对茄子黄萎病原菌抑菌圈直径达  $2.25 \pm 0.0763$  cm.

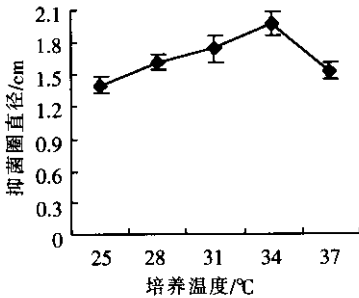


图 8 不同培养温度对发酵液抑菌效果的影响

表 2 碳源、氮源正交试验  $L_9(4^3)$  分析

No.	A 蔗糖/%	B 玉米淀粉/%	C 蛋白胨/%	D 豆粕粉/%	抑菌圈直径/cm
1	0.1	0.1	0.8	0.2	1.43 ± 0.065 2
2	0.1	0.2	1.0	0.3	1.71 ± 0.084 3
3	0.1	0.3	1.2	0.4	1.69 ± 0.102 7
4	0.3	0.1	1.0	0.4	1.74 ± 0.047 6
5	0.3	0.2	1.2	0.2	1.71 ± 0.055 4
6	0.3	0.3	0.8	0.3	1.83 ± 0.095 5
7	0.5	0.1	1.2	0.3	1.70 ± 0.113 2
8	0.5	0.2	0.8	0.4	1.50 ± 0.070 1
9	0.5	0.3	1.0	0.2	1.95 ± 0.086 3
I	4.83	4.87	4.76	5.09	
II	5.28	4.92	5.40	5.24	
III	5.15	5.47	5.10	4.93	
I/3	1.61	1.62	1.59	1.70	
II/3	1.76	1.64	1.80	1.75	
III/3	1.72	1.82	1.70	1.64	
R	0.45	0.60	0.64	0.31	

最优组合  $A_2B_3C_2D_2$ ,影响因子  $R_C > R_B > R_A > R_D$ .

### 3 结论

芽孢杆菌的液体培养物具备抑制植物病原微生物生长的能力,在生物防治中起着重要的作用<sup>[10]</sup>,而不同培养基配方及培养条件影响液体培养物的抑菌效果,因此要获得好的抑菌效果,深入研究发酵条件是必要的。根据试验结果可知,F53菌株对不同碳源都可利用,但以蔗糖和玉米淀粉为最好,而对氮源的利用具有选择性,对有机氮源中的豆饼粉、蛋白胨和酵母膏可以利用,而不利用鱼粉和蚕蛹粉,对无机氮源中的硝酸铵、硫酸铵和氯化铵亦不利用。本文通过对该菌培养基配方和培养条件的优化选择以及碳、氮源的正交试验,初步确定最适宜F53菌株生长的培养基配方及培养条件如下:蔗糖0.3%,玉米淀粉0.3%,蛋白胨1.0%,豆饼粉0.3%,NaCl 0.5%,FeSO<sub>4</sub>0.002%,MgSO<sub>4</sub>0.04%,培养基起始pH值7.0~8.0、250 mL三角瓶装液量50 mL、摇瓶速度150 r/min、接种量4%、温度34℃、培养时间48h,这为F53菌株的发酵罐放大试验提供了理论依据。

要发挥拮抗细菌的防治效果,取决于它对植物的有效定殖,其中对环境的适应能力是一个重要的因素<sup>[11]</sup>,有关F53菌株在土壤中的定殖情况及该菌株对病原菌抑菌机理的研究正在进行中。

### [参考文献]

- [1] 刘伊强,王雅平,潘乃璁,等.拮抗菌TG26的鉴定及其抗菌蛋白BI的纯化及部分特性[J].植物学报,1994,36(3):197—203.
- [2] 罗明典.生物技术若干领域研究进展[J].生物工程进展,1992,12(2):7—10.
- [3] 王雅平,刘伊强,潘乃璁,等.抗真菌蛋白BII的分离纯化及其性质研究[J].生物化学与生物物理学报,1993,25(4):391—397.
- [4] 刘颖,徐庆,陈章良,等.抗真菌肽LP-1的分离纯化及特性分析[J].微生物学报,1999,39(5):441—447.
- [5] 伍明俊,金丹,李晖,等.抗真菌菌株JW-725的分离、鉴定及发酵产物性质的初步分析[J].四川大学学报(自然科学版),2003,40(5):945—948.
- [6] 袁宗胜,胡方平,洪永聪,等.花生品种(系)对青枯菌的抗性鉴定[J].福建农林大学学报(自然科学版),2002,32(2):174—176.
- [7] 陈亚成,陈红歌,王石磊,等.产碱性几丁质酶菌种的筛选与发酵条件的研究[J].河南农业大学学报(自然科学版),1998,32(4):389—393.
- [8] 丁立孝,杨增军.防治烟草赤星病农用抗生素产生菌S-10菌株发酵条件的研究[J].莱阳农学院学报,1996,13(3):164—168.
- [9] 杜荣骞.生物统计学[M].北京:高等教育出版社,1999.
- [10] Hiraoka H,Asaka O,Ano T *et al.* Characteristics of *Bacillus subtilis* RB14, coproducer of peptide antibiotics iturin A and surfactin[J]. Journal of General and Applied Microbiology, 1992, 38(4): 635—640.
- [11] Mew T W, Rosales A M. Bacterization of rice plant of sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*[J]. Phytopathology, 1986, 76(11):1260—1264.

[责任编辑:孙德泉]