

枯草芽孢杆菌 B26 生产多隔镰孢霉抑制物 工艺优化

张丽珍¹, 耿海峰², 樊晶晶³, 牛伟⁴, 纪春³, 赵婷婷², 牛宇⁵

(1.山西大学生命科学学院, 山西 太原 030006; 2.山西大学生物工程学院, 山西 太原 030006;

3.山西大学生物技术研究所, 山西 太原 030006; 4.山西省农业科学研究院, 山西 太原 030006;

5.山西省农业科学院农业资源综合考察研究所, 山西 太原 030006)

摘要: 采用正交试验设计对枯草芽孢杆菌 B26 抑制多隔镰孢霉培养基配方及用量进行优化, 单因素试验对 B26 产生活性物质的发酵条件进行选择。以多隔镰孢霉的抑制率为指标, B26 产生拮抗效果最好的发酵培养基配方用量是: 蛋白胨 25g/L、淀粉 45g/L、氯化钠 1.5g/L、硫酸铵 1.0g/L、磷酸氢二钾 1.5g/L。产生活性物质的最优发酵条件为: 种子菌龄 24h、接种量 5%、初始 pH7、装液量 20%、吐温-80 用量 0.5%、发酵温度 30℃、转速 150r/min、发酵时间 60h, 获得 B26 菌株发酵液对多隔镰孢霉的抑制直径为 26mm, 优于其他条件培养获得的拮抗效果。

关键词: 多隔镰孢霉; 生物防治; 正交试验; 发酵条件

Optimization of Medium Composition and Fermentation Conditions for the Production of *Fusarium decemcellulare* Brick Inhibitor by *Bacillus subtilis* B26

ZHANG Li-zhen¹, GENG Hai-feng², FANG Jing-jing³, NIU Wei⁴, JI Chun³, ZHAO Ting-ting², NIU Yu⁵

(1. College of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2. College of Biological Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 3. Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 4. Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030006, China; 5. Integrated Review Institute of Agriculture Resources, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030006, China)

Abstract: A four-factor, three-level orthogonal array design was employed to optimize four medium components for the production of *Fusarium decemcellulare* Brick inhibitor by *Bacillus subtilis* B26, and the effects of fermentation conditions on the production of *Fusarium decemcellulare* Brick inhibitor were explored through single factor experiments. The optimal medium composition for maximizing inhibition rate against *Fusarium decemcellulare* Brick was found to be composed of peptone 25 g/L, starch 45 g/L, sodium chloride 1.5 g/L, ammonium sulfate 1.0 g/L, and dipotassium hydrogen phosphate 1.5 g/L. Seed age of 24 h, inoculum size of 5%, initial pH of 7, the volume of medium in the fermentation vessel of 20%, the amount of added Tween-80 of 0.5%, fermentation temperature of 30 °C, rotational speed of 150 r/min and fermentation period of 60 h were found optimal. The inhibition circle diameter of the fermentation broth obtained under these conditions was 26 mm.

Key words: *Fusarium decemcellulare* Brick; biological control; orthogonal array design; fermentation conditions

中图分类号: Q939.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)23-0128-04

由多隔镰孢霉(*Fusarium decemcellulare* Brick)引起的黑斑病对采后冬枣产量和品质产生严重影响。应用微生物拮抗菌产生的活性物质进行水果采后病害防治是目前生物防治的一种主要方式^[1-3]。枯草芽孢杆菌(*Bacillus*

subtilis)代谢产物除具有其他微生物代谢产物所具有培养周期短, 生产方便, 储藏期相对较长优点外, 还具有耐热、抗逆性强等特点, 具有作为工业生防菌的优势^[4-6]。但是在实际生产中, 抗菌物质的产生水平不仅取决于生

收稿日期: 2010-06-28

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAD01A16); 山西省留学人员科研项目(2008-119);

山西省科技攻关项目(20100311001-7); 山西省高校学科建设项目(2010)

作者简介: 张丽珍(1977—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为生物资源筛选及利用。E-mail: lizhen@sxu.edu.cn

产菌种本身的性能,还与拮抗菌代谢过程中各种环境条件(包括营养条件^[8-9]和培养条件^[10])密切相关,即活性物质产量的多少受营养条件、pH值、温度、通气量、发酵时间等诸多因素影响。为了使发酵产品的生产水平达到最佳效果,通过优化菌株的发酵条件和工艺以提高菌量及抗菌物质产率是必要的。

本实验所用枯草芽孢杆菌菌株B26为本实验室分离、筛选、鉴定和保存的优良拮抗菌株。该菌对细交链格孢(*Alternaria alternata*)、多隔镰孢霉(*Fusarium decemcellulare* Brick)和串珠霉(*Monilia fructicola*)等都有较好抑制作用,具有很好的应用前景^[7]。本实验对该菌产生拮抗活性物质的培养基及发酵条件进行优化,为下一步生物农药开发应用提供参考,以期有效减少水果腐烂所带来的损失。

1 材料与方法

1.1 菌种

枯草芽孢杆菌B26由本实验室分离保存。

供试病原菌:多隔镰孢霉(*Fusarium decemcellulare* Brick)由山西省农业科学院保鲜所惠赠。

1.2 培养基

PDA培养基:马铃薯(去皮)200g、葡萄糖20g、琼脂20g、H₂O 1μL;种子培养基:蛋白胨5g、酵母膏3g、葡萄糖2g、牛肉膏1g、H₂O 1μL;液体发酵培养基:蛋白胨25g、淀粉40g、NaCl 1.5g、(NH₄)₂SO₄ 0.8g、K₂HPO₄ 1.5g、H₂O 1L, pH7.0。

1.3 仪器与设备

BS-S恒温振荡器、HH-2数显恒温水浴锅 常州国华电器有限公司;HH.BII.600电热恒温培养箱 上海跃进医疗器械厂;可调式微量移液器 热电上海仪器有限公司;YXQ-LS-50压力蒸汽灭菌锅、SW-CJ-1FD洁净工作台 上海博讯实业有限公司医疗设备厂;TGL-16G-C高速台式冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂;752PC紫外可见分光光度计 上海光谱仪器有限公司;3-Star酸度计 美国奥立龙公司。

1.4 方法

1.4.1 发酵培养基基础成分的正交试验设计

试验因素及水平见表1,淀粉及矿质元素按正交配方加入2.5%蛋白胨,pH值自然,灭菌备用。

表1 培养基成分的正交试验的因素和水平
Table 1 Factors and levels in orthogonal array design

水平	淀粉/(g/L)	氯化钠/(g/L)	硫酸铵/(g/L)	磷酸氢二钾/(g/L)
1	35	1.5	0.5	0.5
2	40	2.0	0.8	1.0
3	45	2.5	1.0	1.5

1.4.2 拮抗菌发酵液抑菌活性测定

挑取在PDA培养基上过夜活化的B26单菌落,接种到种子培养基内30℃、150r/min培养24h后,以5%的接种量接入灭菌的1~9号培养基内,设3次重复,30℃、150r/min振荡培养24h。采用平板涂布打孔法测定发酵液抑菌活性。将指示菌制成菌悬液(1×10^8 CFU/mL),吸取200μL均匀涂布于PDA平板上,待培养基表面风干后用打孔器(直径6mm)打孔,吸取50μL菌液加入孔中,37℃下培养5d,并设置不接种的相同培养基制备的空白液为对照,观察并记录不同培养基配方组合下的B26菌液抑菌圈直径和发酵菌液的光密度值(OD_{600nm}),通过极差分析和方差分析确定发酵培养基基础配方。

1.4.3 不同碳源对抑菌作用的影响

分别取淀粉、葡萄糖、蔗糖、淀粉、麦芽糖、乳糖、麸皮和糠皮作为液体发酵培养基成分中的碳源,制成不同碳源的发酵培养基,30℃、150r/min振荡培养24h。

1.4.4 不同氮源对抑菌作用的影响

分别取蛋白胨、胰蛋白胨、牛肉膏、酵母膏、硝酸铵、硫酸铵和硝酸钾作为液体发酵培养基成分中的氮源,制成不同氮源的发酵培养基,30℃、150r/min振荡培养24h。

1.4.5 不同初始pH值对抑菌作用的影响

用0.5mol/L盐酸和0.5mol/L的氢氧化钠调节液体发酵培养基初始pH值为5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0。

1.4.6 吐温-80的不同加入比例对抑菌作用的影响

取吐温-80按体积分数0.05%、0.1%、0.5%、1%、1.5%、2%添加到液体发酵培养基中,以不加吐温-80作对照。

1.4.7 不同培养时间对抑菌作用的影响

采用液体发酵培养基,设置6、12、24、36、48、72、84h 7个处理。

1.4.8 不同培养温度对抑菌作用的影响

采用液体基础培养基,设置25、30、35、40、45℃ 5个处理。

1.4.9 不同接种量对抑菌作用的影响

分别按1%、2%、5%、10%、15%、20% 6个梯度将种子培养液加入液体发酵培养基。

1.4.10 不同装液量对抑菌作用的影响

将液体发酵培养基按照10、25、50、100、150、125、200mL 7个处理装入250mL的三角瓶中。

2 结果与分析

2.1 正交试验结果

对利用不同培养基配方培养出的拮抗菌 B26 菌液的打孔实验的拮抗直径结果进行极差和方差分析, 结果见表 3、4。

表 2 试验结果的极差分析

Table 2 Orthogonal array design matrix and experimental results

试验号	淀粉	氯化钠	硫酸铵	磷酸氢二钾	抑菌直径/mm
1	1	1	1	1	18.7
21	1	2	2	2	18.1
3	1	3	3	3	20.3
4	2	1	2	3	20.0
5	2	2	3	1	20.0
6	2	3	1	2	17.3
7	3	1	3	2	20.1
8	3	2	1	3	20.3
9	3	3	2	1	19.7
K_1	57.1	58.8	56.3	58.4	
K_2	57.3	58.4	57.8	55.5	
K_3	60.1	57.3	60.4	60.6	
k_1	19.1	19.6	18.8	19.5	
k_2	19.3	19.5	19.3	18.5	
k_3	20.0	19.1	20.1	20.2	
R	0.9	0.5	1.3	1.7	

表 3 试验结果的方差分析

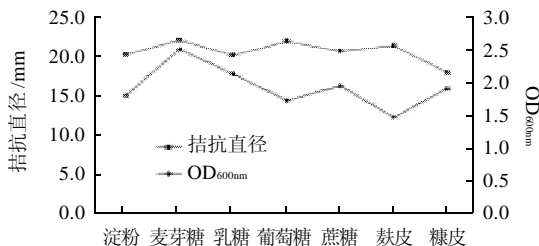
Table 3 Analysis of variance for the diameter of inhibition circle with various medium components

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著性	P
磷酸氢二钾	4.36	2	2.18	10.9	**	$P < 0.01$
淀粉	1.88	2	0.94	4.7	*	$P < 0.05$
硫酸铵	2.87	2	1.435	7.175	*	$P < 0.05$
误差	0.4	2	0.2			
总和	9.51	8				

注: $F_{0.05(2,8)}=4.459$; $F_{0.01(2,8)}=8.649$ 。

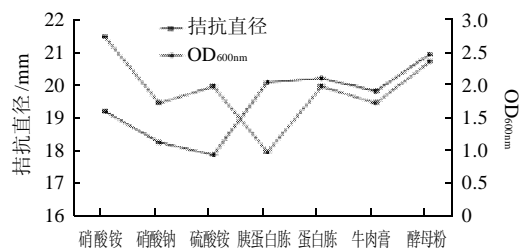
由表 3、4 可知, 经极差分析和方差分析获得的结果一致, 各因素主次顺序均为磷酸氢二钾>硫酸铵>淀粉, 由此得到培养基最优配方用量: 蛋白胨 25g/L、淀粉 45g/L、氯化钠 1.5g/L、硫酸铵 1.0g/L、磷酸氢二钾 1.5g/L。以最优配方为基准进行单因子试验, 具体包括: 碳源、氮源、培养时间、培养温度、培养液的初始 pH 值、吐温-80 的加入量、接种量、加液量, 通过比较不同培养基配方下的拮抗直径来确定最优培养条件。

2.2 不同碳源对抑菌作用的影响

图 1 不同碳源条件下的拮抗直径和 OD_{600nm} Fig.1 Effect of carbon sources on the production of *Fusarium decemcellulare* Brick inhibitor

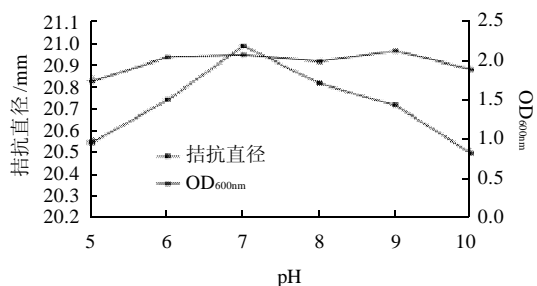
由图 1 可知, 当使用麦芽糖和葡萄糖为碳源时, 拮抗效果较好, 抑菌直径分别达到 22.5、22.3mm, 同时发现使用麸皮也可以达到较好的抑制效果, 抑菌直径为 21.7mm。因此在大规模生产中可以考虑以来源广价格低的麸皮作为碳源生产拮抗菌的活性物质。

2.3 不同氮源对拮抗直径的影响

图 2 不同氮源条件下的拮抗直径和 OD_{600nm} Fig.2 Effect of nitrogen sources on the production of *Fusarium decemcellulare* Brick inhibitor

由图 2 可知, 在不同氮源下, 包括无机氮源和有机氮源, 枯草芽孢杆菌 B26 均能生长, 并产生具有拮抗活性的物质。无机氮源中, 以硝酸铵为氮源的培养基拮抗效果最好, 达到 21.2mm; 有机氮源中酵母粉的抑菌效果最好, 为 20.5mm。

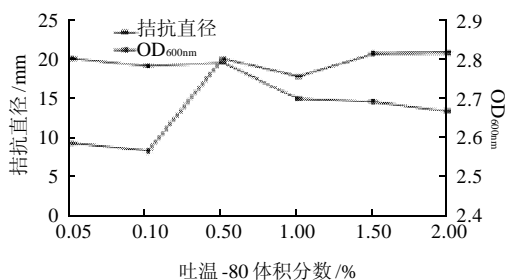
2.4 初始 pH 值对抑菌作用的影响

图 3 培养基不同 pH 值的拮抗直径和 OD_{600nm} Fig.3 Effect of initial medium pH on the production of *Fusarium decemcellulare* Brick inhibitor

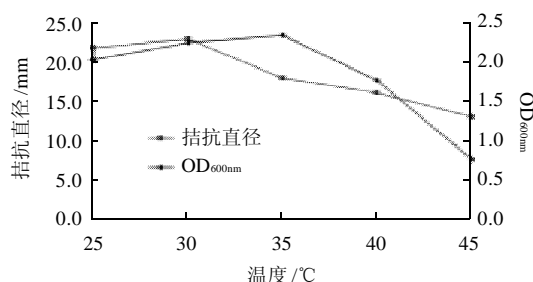
由图 3 可知, 在不同初始 pH 值条件下, 拮抗菌的生物量不同, 拮抗效果也不同: 表现为随着 pH 值升高, 拮抗直径逐渐变大。到 pH 7 时最大; 随着 pH 值继续升高, 拮抗直径逐渐变小, 但变化幅度不大。表明枯草芽孢杆菌 B26 在偏酸或偏碱性条件下都能生长, 但在 pH 7 的条件下产生的拮抗活性物质对病菌拮抗直径最大, 达到 21.0mm。

2.5 吐温-80 用量对抑菌作用影响

由图 4 可知, 吐温-80 在体积分数 0.5% 时, B26 OD_{600nm} 值最大, 菌体浓度最高; 此时 B26 菌液对病菌抑菌圈直径最大。

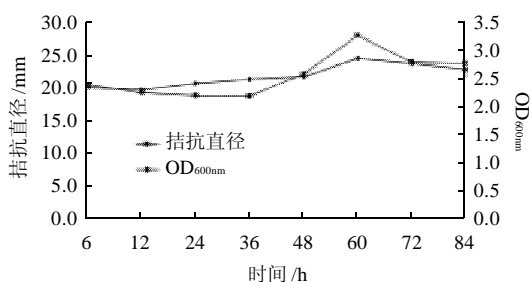
图4 吐温-80不同体积分数的拮抗直径和OD_{600nm}Fig.4 Effect of Tween-80 amount on the production of *Fusarium decemcellulare* Brick inhibitor

2.6 培养温度对抑菌作用的影响

图5 不同培养温度的拮抗直径和OD_{600nm}Fig.5 Effect of culture temperature on the production of *Fusarium decemcellulare* Brick inhibitor

由图5可知,在30℃以前,随着温度的升高,拮抗直径逐渐升高(OD_{600nm}持续到35℃,可能培养液中已产生细菌死菌体所致),但到达30℃以后,随着温度的升高,拮抗直径逐渐变小,呈梯度变小的趋势。在30℃,虽然OD_{600nm}不是最大的,但拮抗效果最好,拮抗直径达到23.3mm,从而获得拮抗菌B26的最佳发酵培养温度为30℃。

2.7 培养时间对抑菌作用的影响

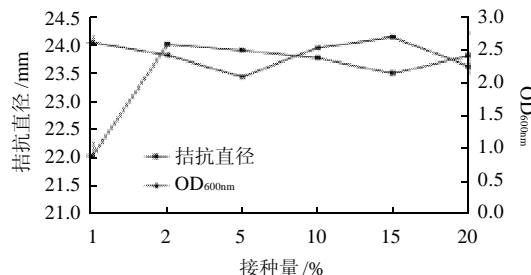
图6 不同培养时间下的拮抗直径和OD_{600nm}Fig.6 Effect of culture time on the production of *Fusarium decemcellulare* Brick inhibitor

由图6可知,枯草芽孢杆菌B26是在60h后进入稳定期,枯草芽孢杆菌的菌体量达到最多,此时产生的拮抗活性物质较多,抑菌效果保持相应较高的水平。

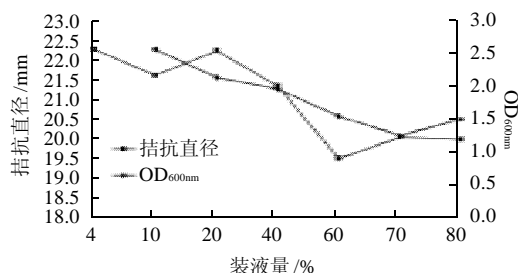
2.8 接种量对抑菌作用的影响

由图7可知,随着枯草芽孢杆菌B26种子培养基加入量逐渐加大,拮抗直径逐渐变大,但在加入量达到

5%之后,抑菌直径增加幅度很小(24~24.8mm)。

图7 不同接种量的拮抗直径和OD_{600nm}Fig.7 Antagonistic diameters and OD_{600nm} at different inoculum sizes

2.9 装液量对抑菌作用的影响

图8 不同装液量的拮抗直径和OD_{600nm}Fig.8 Antagonistic diameters and OD_{600nm} at different aeration rates

由图8可知,装液量为20%时,拮抗效果最好,拮抗直径为22.3mm;随着加液量的增加,过多的装液量限制了微生物产生拮抗物质,拮抗直径也逐渐变小。

3 结论

3.1 通过正交试验确定拮抗菌产生活性物质的最佳配方比例是:蛋白胨25g/L,淀粉45g/L,氯化钠1.5g/L、硫酸铵1.0g/L、磷酸氢二钾1.5g/L。

3.2 产生活性物质的最佳发酵工艺:种子培养24h后,按照5%的接种量接入初始pH7,吐温-80体积分数0.5%,装液量为20%的最优液体发酵培养基内,在30℃、转速为150r/min,发酵培养60h后获得拮抗菌抑制多隔镰孢霉的抑制直径可达26mm,大于其他条件的拮抗直径。

参考文献:

- [1] 吴士云,孙力军,周声,等.植物内生多粘类芽孢菌对油桃采后青霉病抑制效果的研究[J].食品科学,2007,28(11):579-583.
- [2] 杨振,郭红莲,张晓波,等.枯草芽孢杆菌BS-331防治油桃采后病害的研究[J].中国果树,2008(6):35-38.
- [3] 范青,田世平,李永兴,等.枯草芽孢杆菌(B-912)对采后柑桔果实青、绿霉病的抑制效果[J].植物病理学报,2000,30(4):343-348.
- [4] 吴泽柱,曹龙奎.枯草芽孢杆菌水解玉米蛋白粉培养基的优化[J].食品科学,2009,30(17):195-199.
- [5] 李明,双宝,李海涛,等.枯草芽孢杆菌的研究与应用[J].东北农业大学学报,2009,40(9):111-114.
- [6] 姜莉莉,陈彦闯,辛明秀.枯草芽孢杆菌在防治植物病害上的应用及研究进展[J].安徽农学通报,2009,15(7):37-39.
- [7] 耿海峰,张丽珍,牛伟.冬枣采后病害拮抗菌的筛选和鉴定[J].食品科学,2010,31(9):150-155.
- [8] 吕思伊,刘齐,黄行健,等.嗜酸乳杆菌胞外多糖发酵条件的优化[J].食品科学,2009,30(19):255-258.
- [9] 吴泽柱,曹龙奎.枯草芽孢杆菌水解玉米蛋白粉培养基的优化[J].食品科学,2009,30(17):195-199.
- [10] 李术娜,姜军坡,朱莹,等.大丽轮枝菌拮抗细菌枯草芽孢杆菌12234菌株发酵产抗菌蛋白的条件优化[J].植物保护,2009,35(3):51-56.