

胶冻样类芽孢杆菌 PS04 产抗真菌物质 培养条件的优化

胡亮亮 徐汉虹 廖美德

华南农业大学资源环境学院/天然农药与化学生物学教育部重点实验室, 广州 510642

摘要 以胶冻样类芽孢杆菌(*Paenibacillus kribbensis*) PS04 为试验材料, 运用传统的单次单因子法, 筛选得到适合胶冻样类芽孢杆菌 PS04 生防菌株生长及其拮抗物质产生的最佳碳源为蔗糖, 最佳氮源为 NaNO_3 , 并在逐因子试验的基础上进行正交试验, 得到该培养基各组分的最佳含量: 蔗糖 3%, NaNO_3 0.15%, K_2HPO_4 0.1%。在确定适合该菌株的培养基组分基础上, 对其培养条件进行优化试验, 结果表明在初始 pH 7~8、温度 30℃、转速 180 r/min、100 mL/1 000 mL 摇瓶培养 84 h 时, 菌株生长及抑菌活性均达到最大值。

关键词 胶冻样类芽孢杆菌; 抗真菌; 培养条件; 优化

中图分类号 S 482.2⁺8 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)03-0276-04

随着病原真菌耐药性问题的日趋严重, 微生物来源的抗真菌抗生素研究得到了飞速发展, 并已取得显著成果。笔者从土壤中分离得到具有高抑真菌活性细菌菌株 PS04。通过 16S rDNA 分析, 表明该菌为胶冻样类芽孢杆菌(*Paenibacillus kribbensis*), 培养液乙醇粗提物抗真菌活性强, 作用菌谱广^[1]。该菌株产生的抗真菌素具有较好的水溶性和耐热性, 有可能是一种新型抑真菌素产生菌, 具有良好的开发应用前景。笔者探讨了 PS04 菌株生长最佳培养基组成, 并通过正交试验确定各组分的最佳配比, 观察培养条件对 PS04 菌株生长及发酵液活性的影响和主要影响因子与菌株生长及抑菌活性的关系, 旨在建立最优培养条件, 为该菌株的工业生产并获得高产抗菌物质提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

胶冻样类芽孢杆菌(*Paenibacillus kribbensis*) PS04 菌株, 由笔者所在实验室保存; 水稻纹枯病原菌(*Rhizoctonia solani*) 由华南农业大学植物病理学研究室提供。

1.2 培养基

查氏培养基: 硝酸钠 3 g, 磷酸氢二钾 1 g, 硫酸

镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.5 g, 氯化钾 0.5 g, 硫酸亚铁 0.01 g, 蔗糖 30 g, 蒸馏水 1 000 mL, 用于 PS04 菌株培养。

马铃薯培养基(PDA): 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 水 1 000 mL, 自然 pH。称取 200 g 马铃薯, 洗净去皮切成小块, 加水煮沸 20~30 min, 用 4 层纱布过滤, 加入葡萄糖和琼脂各 20 g, 继续加热搅拌混匀, 稍冷却后再补足水至 1 000 mL, 分装(121℃)灭菌 20 min, 用于抗菌活性测定。

1.3 种子液的培养

刮取新鲜的菌苔 1~2 环接种在装有 100 mL 种子培养基的 500 mL 锥形瓶中, 30℃、180 r/min 振荡培养 24 h。

1.4 菌体生物量测定

将种子液接种到查氏培养基中恒温振荡培养, 得到发酵液, 用 721 型分光光度计, 在波长 600 nm 处测定用蒸馏水稀释 5 倍后发酵液的吸光度 D_{600} , 以未接菌的查氏培养基为对照。以光密度值 D_{600} 为标准判断菌体生物量, D_{600} 值大表示菌体量多, D_{600} 值小表示菌体量少。

1.5 抑菌活性的测定

取 PS04 菌株发酵液, 按 2 mL/50 mL 的比例添加到已融化的马铃薯培养基中, 待凝固后接种水

稻纹枯病原菌的菌饼(菌饼直径为 0.5 cm),置于(28±1)℃培养箱中,保温培养 3~5 d。当对照组菌落直径大约为培养皿直径 80%时,用十字交叉法测量菌落直径,并计算抑制率。

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照组菌落直径} - \text{处理组菌落直径}}{\text{对照组菌落直径} - \text{菌饼直径}} \times 100\%$$

1.6 培养基条件优化试验设计

1)最佳碳源筛选。分别以柠檬酸、半乳糖、乳糖、鼠李糖、果糖、无水乙醇、棉子糖、可溶性淀粉、葡萄糖、蔗糖 10 种碳源替换查氏培养基中的蔗糖,其他成分不变^[2-4]。将不同碳源制成的培养基 pH 值均调至 7.0,分别取 100 mL 装入 500 mL 三角瓶中,0.1 MPa,121℃灭菌 20 min。接种量为每个摇瓶中接种 5 mL 培养 24 h 的 PS04 菌株种子液,30℃下 180 r/min 摇床培养,定期取样测定培养液光密度(D_{600})和抑菌活性。

2)最佳氮源筛选。分别以尿素、 NH_4NO_3 、胰蛋白胍、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4 种氮源替换查氏培养基中的 NaNO_3 ,其他条件同上。

3)培养基组分配比优化。以优化得到的蔗糖(碳源)、 NaNO_3 (氮源)和 K_2HPO_4 (含磷化合物)进行 3 因素 3 水平的正交试验,采用 $L_9(3^4)$ 正交表确定培养基各组分的最佳配比(表 1)。

1.7 培养条件优化试验设计^[5-9]

1)发酵温度。培养基按 150 mL/500 mL 比例分装至锥形瓶,按 5% (V/V)接种量等量接种,分别置于 20,25,30,35,40℃下 180 r/min 摇床培养,定期取样测 D_{600} 和抑菌活性,进入平台期后结束。

2)培养基初始 pH 值。用稀 HCl 和稀 NaOH 将培养基 pH 值调为 5.0,6.0,7.0,8.0,9.0,按 150 mL/500 mL 比例分装至锥形瓶,按 5% (V/V)接种量等量接种,30℃下 180 r/min 摇床培养,定期取样测 D_{600} 和抑菌活性,进入生长平台期后结束。

3)装液量。1 000 mL 锥形瓶分别装培养基 100,200,300,400,500 mL,按 5% (V/V)接种量等量接种,30℃下 180 r/min 摇瓶发酵培养,定期取样测 D_{600} 和抑菌活性。

4)接种量。培养基按 100 mL/1 000 mL 锥形瓶分装,分别按 1%,3%,5%,7%,10% (V/V)比例接种,30℃下 180 r/min 摇床培养,定期取样测 D_{600} 和抑菌活性,进入生长平台期后结束。

5)发酵过程中菌株生长和发酵液活性变化的观察。按上述试验结果确定发酵条件,并按照该条件

发酵,定期取样测 D_{600} 和抑菌活性,观察菌株生长和发酵液活性随发酵时间变化的情况。

2 结果与分析

2.1 培养基的优化

1)碳源、氮源对 PS04 菌株生长和抑菌活性的影响。试验结果表明,棉子糖、无水葡萄糖、蔗糖和可溶性淀粉有利于 PS04 菌株的生长,且产生大量的胞外多糖,菌株对柠檬酸、半乳糖、乳糖、无水乙醇、鼠李糖、果糖的利用率不高;菌株能以有机态氮源和硝态氮源作唯一氮源生长,几乎不能以尿素、铵态氮作唯一氮源生长,从 NH_4NO_3 作唯一氮源可看出铵态氮能明显抑制菌体对硝态氮的利用。

2)正交试验法优化筛选培养基各组分的配比。由表 1 可见,蔗糖是影响 PS04 菌株生长和抑菌活性最主要的因素,随着蔗糖浓度的升高菌株生长量和抑菌活性都有很大的提高;不同浓度的 NaNO_3 对菌株的生长和抑菌活性也有一定的影响。综合这 3 个因素不同水平对发酵的影响,确定最适合该菌株生产的培养基各组分为蔗糖 3%, NaNO_3 0.15%, K_2HPO_4 0.1%。

表 1 培养基各组分配比优化的正交试验设计及统计结果

Table 1 Orthogonal experimental design and statistical results for every proportion of medium

序号 No.	蔗糖/(g/L) Sucrose	NaNO_3 / (g/L)	K_2HPO_4 / (g/L)	D_{600}	抑菌率/% Inhibitory rate
1	10	1.0	1	0.34	32.6
2	10	1.5	1.5	0.42	35.4
3	10	2.0	2.0	0.37	35.5
4	20	1.0	1.5	0.52	61.2
5	20	1.5	2.0	0.59	65.3
6	20	2.0	1.0	0.63	68.4
7	30	1.0	2.0	0.98	76.9
8	30	1.5	1.0	1.12	85.5
9	30	2.0	1.5	1.05	80.3

2.2 培养条件的优化

1)发酵温度对菌株生长和发酵液活性的影响。试验结果表明:PS04 菌株在 20~40℃时均可生长,其中在 30~35℃时菌体生长量较高,温度低于 20℃或高于 40℃不适于该菌株生长;在发酵液活性方面,30℃时发酵液显示出较强的抑菌活性,对水稻纹枯菌的抑制活性达到 70%左右,而 40℃时发酵液活性较低。

2)培养基初始 pH 值对菌株生长和发酵液活性的影响。试验结果(图 1,图 2)表明:PS04 菌株在 pH 6.0~9.0 时均可生长,其中在 pH 7.0~9.0 时菌体生长量较高,pH 5.0~6.0 时菌株生长受到一

定的抑制,说明碱性条件有利于菌株生长;在发酵液活性方面,初始 pH 7.0~9.0 时的发酵液活性明显高于 pH 5.0~6.0 时的发酵液活性。

3)装液量对菌株生长和发酵液活性的影响。试验结果(图 3,图 4)表明:装液量 10%、通气量 90% 时菌体生长最为旺盛,发酵液抑菌活性也最高;而通气量为 50%~90%时,菌体生长随着通气量的增加而增加,抑菌活性也有同样的趋势。这说明 PS04 菌株生长和产抑菌物质均需要较大的通气量。因此,在发酵过程中发酵罐装液量减少(通气量增加)有利于菌体生长和抑菌物质的积累。

4)接种量对菌株生长和发酵液活性的影响。试验结果(图 5,图 6)表明:从 12~96 h 的测量中发现,1%~10% 的接种量对菌体生长影响不大,抑菌活性也没有表现出较大差异,说明接种量对菌株生

长和抑菌活性的物质的产生影响不大。

5)发酵过程中菌株生长和发酵液活性随发酵时间的变化。试验结果表明,菌株在培养 0~12 h 内处于迟缓期,生长平缓,之后菌株生长进入对数期,24~48 h 达最大值;随着培养时间的延长(48~72 h),菌株生长处于稳定期,生长量保持平稳,此结果恰好符合细菌生长周期规律。在培养 96 h 后菌液由乳白色变成淡黄色,D 值又开始增加,这是因为细菌生长后期产生色素而引起的变化。发酵液抑菌活性测定结果表明,在 12~48 h 内随着培养时间的延长,抑菌率呈逐渐增大的趋势,这是由于培养时间的延长,菌株产生的抑菌物质不断积累;在培养 84 h 后,抑菌率达到最大值,并在此之后一段时间内保持较高的抑菌率。从节省时间上考虑,菌株以培养 84 h 较为适宜。

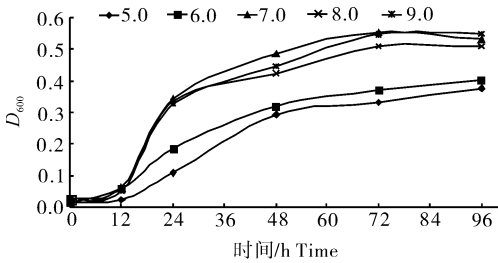


图 1 培养基初始 pH 值对菌株生长的影响
Fig. 1 Effect of pH of culture medium on the growth of PS04

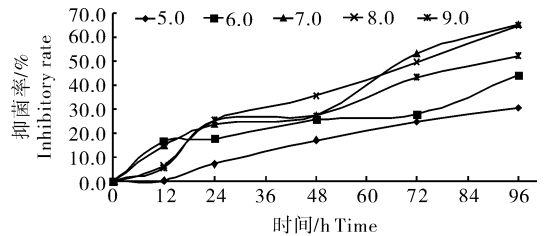


图 2 培养基初始 pH 值对菌株发酵液活性的影响
Fig. 2 Effect of pH of culture medium on the activity of PS04

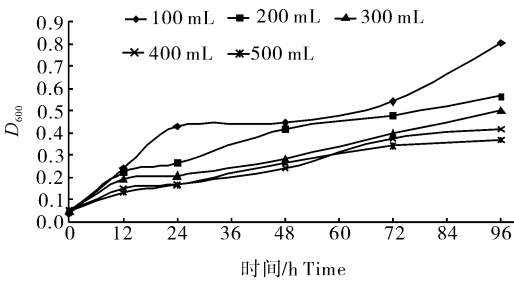


图 3 装液量对菌株生长的影响
Fig. 3 Effect of volume on the growth of PS04

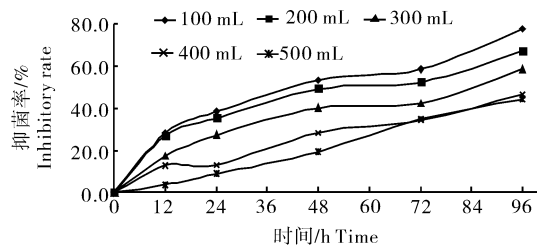


图 4 装液量对菌株发酵液活性的影响
Fig. 4 Effect of volume on the activity of PS04

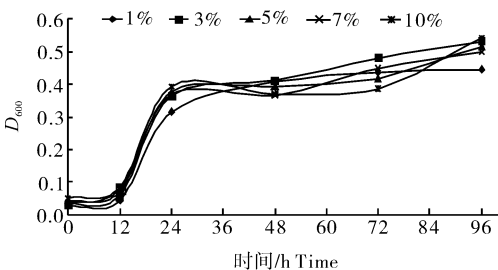


图 5 接种量对菌株生长的影响

Fig. 5 Effect of inoculation dose on the growth of PS04

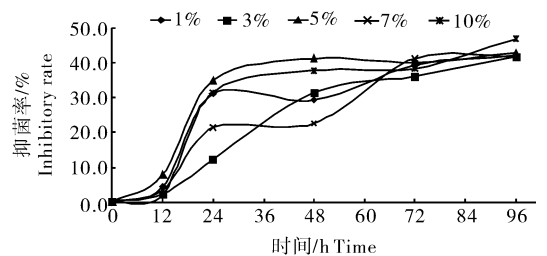


图 6 接种量对菌株发酵液活性的影响

Fig. 6 Effect of inoculation dose on the activity of PS04

3 讨论

通过单因素试验和正交试验相结合,初步得到了适合摇瓶条件下 PS04 菌株发酵的培养基配方为蔗糖 3%, NaNO₃ 0.15%, K₂HPO₄ 0.1%; 最适培养条件为初始 pH 7~8, 培养温度 30 °C, 1 000 mL 摇瓶装液量 100 mL, 接种量 2%~5%, 培养时间 84 h, 转速 180 r/min。此条件下, PS04 的培养液 D₆₀₀ 值及抑菌率分别达到 1.1 和 82%, 比在查氏培养基中 30 °C 下 180 r/min 培养 84 h 时 D₆₀₀ 值 0.8 和抑菌率 70% 有显著提高。

本研究结果表明, 双糖、三糖和多糖作为碳源有利于 PS04 菌株菌体生长, 该菌株除葡萄糖外几乎不能利用其他单糖。优化氮源时, 发现该菌株在供试的几种氮源作为唯一氮源中, 有机氮源和硝态氮源有利于菌体生长, 难以利用铵态氮源, 且铵态氮能抑制菌体生长和对硝态氮的利用。比较相同碳源、氮源或金属离子条件下菌株的生长量与其发酵滤液的活性, 发现菌株的生长量与其发酵滤液的活性呈正相关。

在优化培养条件时, 发现 PS04 菌株最适宜培养基 pH 7~8, 说明该菌株喜欢在偏碱性的环境中生长, 温度在 40 °C 以上时菌株的生长量显著下降, 说明该菌株不耐高温。在本研究获得的优化培养基组分和培养条件下, PS04 菌株的生长量及抑菌代谢

产物都得到了显著提高, 而且盆栽试验结果表明, 此发酵滤液防治水稻纹枯病的效果显著增强。

本试验只是在摇床条件下对 PS04 菌株发酵培养基的组成及其培养条件进行了优化, 今后尚需在发酵罐中进行验证, 在实际生产中对发酵条件的控制方法也需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 廖美德, 楚娟娟, 徐汉虹. PS04 菌株的抗真菌活性[J]. 长江大学学报: 自然科学版, 2008, 5(1): 59-63.
- [2] 章四平, 刘圣明, 王建新, 等. 枯草芽孢杆菌生防菌株 NJ-18 的发酵条件优化[J]. 南京农业大学学报, 2010, 33(2): 58-62.
- [3] 方传记, 陆兆新, 孙力军, 等. 淀粉液化芽孢杆菌抗菌脂肽发酵培养基及发酵条件的优化[J]. 中国农业科学, 2008, 41(2): 533-539.
- [4] 李文鹏, 蔡磊, 毕廷菊, 等. 冻冻样芽孢杆菌 (*Bacillus mucilaginosus*) 的分离、筛选及其发酵培养基研究[J]. 土壤通报, 2001, 32(2): 70-72.
- [5] 杨好. 中国东海枯草芽孢杆菌 321122 的鉴定、发酵及其次级代谢产物的研究[D]. 上海: 第二军医大学图书馆, 2006.
- [6] 黄六容, 何冬兰, 刘梅芳. 产谷氨酰胺转氨酶菌株的筛选及其产酶条件研究[J]. 华中农业大学学报, 2005, 24(4): 369-372.
- [7] 陈双臣, 刘爱荣, 王晓清, 等. 放线菌株 F 培养条件优化和抗菌物质的稳定性研究[J]. 生物技术, 2009, 19(2): 76-79.
- [8] 郑媛, 王跃军, 孙溢. 海洋侧孢短芽孢杆菌 *Brevibacillus laterosporus* Lh-1 产抗菌肽 R-1 的培养条件优化[J]. 微生物学通报, 2009, 36(3): 398-403.
- [9] 周靖, 廖美德, 徐汉虹. 淡紫拟青霉 (*Paecilomyces lilacinus*) 培养条件的优化[J]. 微生物学杂志, 2007, 27(2): 45-48.

Optimization of culture conditions for a strain of PS04 producing antifungal antibiotics

HU Liang-liang XU Han-hong LIAO Mei-de

College of Resources and Environment, South China Agricultural University/Key Laboratory of Natural Pesticide and Chemical Biology Ministry of Education, Guangzhou 510642, China

Abstract The favorable condition for the growth and antagonistic production of a *Paenibacillus kribbensis* PS04, a biological control agent, by single factor experiments was presented in this study. The results showed that the best carbon source was sucrose, the best nitrogen was NaNO₃. The best composition of the media contained: sucrose 3%, NaNO₃ 0.15% and K₂HPO₄ 0.1% by the orthogonal experiment. Subsequently the culture conditions were optimized and the results showed the medium initial pH was 7-8, the culture temperature was 30 °C, the quantity of medium was 100 mL in a 1 000 mL flask, the culture cycle was 84 h, and the rotation speed was 180 r/min respectively.

Key words *Paenibacillus kribbensis*; antifungal; culture conditions; optimization