

1株解淀粉芽孢杆菌发酵条件的优化 及其对油茶炭疽病的防效

信珊珊¹ 祁高富¹ 朱发银¹ 逯晋忠¹
李菁菁¹ 王圣英¹ 柳艳军² 陈京元³ 王义勋³ 赵秀云¹

1. 华中农业大学生命科学技术学院/农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070;
2. 武汉市林业科技推广站, 武汉 430023; 3. 湖北省林科院森林保护研究所, 武汉 430075

摘要 以从水稻根部分离到的1株解淀粉芽孢杆菌WH1为材料,通过红外吸收光谱对其发酵液中的抗菌活性物质进行了鉴定,并通过平板抑制试验和离体叶片防治试验,研究其发酵液对油茶炭疽病的抑制作用。结果表明:WH1发酵液中的抗菌活性物质为脂肽,该成分能够使油茶炭疽病菌丝畸形,高稀释倍数的发酵液对离体油茶叶片上的炭疽病仍然有显著的防效。以WH1作为防治油茶炭疽病的生物农药,通过Plackett-Burman设计和田口设计对WH1的发酵条件进行了优化,使抗菌脂肽产量大幅上升。在3、20、500 L的发酵罐上进行放大,控制溶氧在30%以上,成功的完成250 mL摇瓶到500 L罐的放大。500 L罐上培养48 h后发酵液10倍稀释液在PDA平板上的抑菌率为50.8%,对发酵液进行喷雾干燥后药效存留率为86.2%。

关键词 解淀粉芽孢杆菌; 脂肽; 油茶炭疽病; 抗菌活性; 生物农药

中图分类号 S 432.4⁺4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)04-0411-05

油茶是我国特有的优良乡土树种,与油棕、橄榄油和椰子并称为世界四大木本食用油树种^[1]。茶油具有极高的营养价值和经济效益,可媲美橄榄油,大力发展油茶业,不仅可以提高我国食用植物油生产能力,提高人民健康水平,还可增加农民收入以及改善生态环境。油茶炭疽病是油茶生产上的重要病害之一,不仅造成油茶籽产量下降,而且严重影响茶油品质,甚至危害消费者健康,各主要油茶产区经常因此减产10%~30%,重病区可减产40%~50%^[2]。目前,油茶炭疽病防治技术的研究还处在起步阶段,而且主要是采用农业和化学药剂防治^[3]。由于农业防治的局限性和化学药剂对环境和食品安全的危害,因此开发稳定高效的生物农药是油茶行业目前的重要任务。

芽孢杆菌能产生抗逆性芽孢和种类繁多的抗菌物质来抑制病原真菌的生长,这些抗菌物质大多被鉴定出具有环脂肽的特征^[4-5]。环状脂肽具有广谱的抗菌效果^[6],在自然条件下非常稳定,耐热、抗紫外、耐酸碱,且由于容易被消化酶降解,因此不会产

生耐药性、残留和环境污染等问题^[7]。脂肽类物质所具有的优良特性,使之成为防治油茶炭疽病的首选生物农药。

笔者所在实验室从水稻根部分离到的1株解淀粉芽孢杆菌,在含豆粕的培养基中能够发酵产生高浓度脂肽,对油茶炭疽病有良好的防治效果,有望被开发成防治油茶炭疽病的生物农药,笔者对其抑菌效果和发酵生产工艺进行了进一步的探索,以提高抗菌脂肽的产量。

1 材料与方法

1.1 菌株与培养基

解淀粉芽孢杆菌WH1(*Bacillus amyloliquefaciens*, WH1),笔者所在实验室从华中农业大学水稻田分离;油茶炭疽病,笔者所在实验室从武汉市九峰森林公园油茶中分离得到。

PDB培养基:马铃薯200 g,蔗糖20 g,蒸馏水定容至1 L;PDA培养基:马铃薯200 g,蔗糖20 g,琼脂20 g,蒸馏水定容至1 L。以上培养基均采用

收稿日期: 2011-02-23

基金项目:国家“863”计划项目(2006AA10A210)和武汉市科技攻关计划项目(201020722306)

信珊珊,硕士研究生,研究方向:微生物工程与制剂。E-mail: xinshanshan1985@163.com

通讯作者:赵秀云,博士,副教授。研究方向:生物防治。E-mail: xiuyunzh@mail.hzau.edu.cn

121 ℃ 湿热灭菌 20 min。

1.2 WH1 抑菌活性物质的鉴定

将活化好的解淀粉芽孢杆菌 WH1 用 PDB 培养基在 30 ℃ 培养 2 d,离心收集上清液,上清液用等体积的乙酸乙酯萃取后取水相,再以等体积的正丁醇萃取后收集正丁醇相,真空旋转蒸发器 65 ℃ 蒸干,再用少量的蒸馏水溶解。溶解后液体用葡聚糖 Sephadex G-25 柱进行分离纯化,蒸馏水洗脱,收集各洗脱组分,并测定 $D_{280\text{ nm}}$ 和 $D_{210\text{ nm}}$,绘制洗脱曲线。洗脱曲线各峰值的组分,经过滤除菌后与 PDA 培养基以体积比 1 : 9 混合后接种油茶炭疽病,进行抗菌活性检测。在抗真菌活性分析后,对具有抗真菌活性的样品命名为 WH1fugin。

对分离到的有抗菌活性的成分于 -53 ℃ 进行真空冷冻干燥,冻干粉末用 KBr 压片法测红外吸收光谱。

1.3 WH1 发酵液抑制油茶炭疽病菌丝生长试验

将经 0.22 μm 滤膜过滤除菌的 WH1 发酵液与 PDA 培养基分别按体积比为 1 : 50、1 : 20、1 : 10 的比例混合倒平板备用,以不添加发酵液的 PDA 培养基作为对照。将油茶炭疽病孢子用无菌水稀释到 $1\times10^5/\text{mL}$,取 200 μL 涂布平板,37 ℃ 倒置培养 24 h。取菌丝压片,显微镜下观察菌丝形态。

1.4 离体叶片上油茶炭疽病的防效

采集大小一致的新鲜油茶嫩叶,用蒸馏水冲洗干净后放置在铺有 1 层湿滤纸的培养皿中,在叶柄处盖上用蒸馏水湿润的脱脂棉。试验组用蒸馏水稀释 50 倍的无菌发酵液喷洒叶片,室温自然干燥后接种 1 个油茶炭疽病菌饼;对照组的叶片喷洒蒸馏水干燥后接种 1 个油茶炭疽病菌饼,两组同时置于温度为 26 ℃,湿度为 95 % 的光照培养箱中培养,每 24 h 观察 1 次并添加适量蒸馏水,使脱脂棉保湿。

1.5 发酵条件优化

先采用 Plackett-Burman 设计,从 11 个因子中选出对脂肽产量有显著性影响的因子,分别对选出的重要因子进行优化,再利用田口设计确定最终的培养基成分。以对油茶炭疽病的抑菌率为发酵试验的唯一响应量。

种子液在 PDB 培养基中培养 12 h 后,以 5 % 接种量接入装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中,发酵 48 h。发酵液 8 000 r/min,离心 5 min,收集上清液并以 0.22 μm 滤膜过滤除菌后,与 PDA

培养基以 1 : 50 体积比混合倒置平板备用。将在 PDA 平板中培养好的油茶炭疽病菌,用打孔器打取直径为 0.5 cm 的菌饼,将菌饼接种到上述含 WH1 过滤除菌发酵液的 PDA 平板中,以菌饼接种在不含 WH1 发酵液的 PDA 平板上做对照。28 ℃ 倒置培养,待对照平皿中菌丝快要长满平皿时,测量试验组 and 对照组的菌落直径,计算抑菌率。

1)Plackett-Burman 设计^[8-9]。把有可能影响脂肽产量的 9 个培养基成分,连同发酵温度和发酵 pH 值作为试验因子进行 Plackett-Burman 设计。

表 1 Plackett-Burman 设计因子水平范围

Table 1 Level of variables in Plackett-Burman design

变量 Variables	低水平变量(-) Low level	高水平变量(+) High level
豆粕粉/(g/L) Soybean meal	20	30
玉米粉/(g/L) Corn meal	10	15
淀粉/(g/L) Starch	10	15
酵母粉/(g/L) Yeast powder	0.6	0.9
NH ₄ NO ₃ /(g/L)	30	45
MgSO ₄ /(g/L)	0.3	0.45
KH ₂ PO ₄ /(g/L)	2	3
Na ₂ HPO ₄ /(g/L)	8	12
CaCl ₂ /(g/L)	0.08	0.12
pH	6.0	7.5
培养温度/℃ Fermentation temperature	30	37

2)田口设计及验证试验。根据 Plackett-Burman 设计的结果,选择对脂肽产量影响较大的 3 个培养基成分,与用量较大的淀粉共 4 个因素,各设 3 个水平,进行 L₉(3⁴)田口试验。根据田口试验结果对产量较高的培养基组合进行验证。

1.6 发酵过程放大及发酵液后处理

依次在 3、20、500 L 发酵罐中进行发酵过程的放大,控制溶氧不低于 30 %,因为发酵产物本身为表面活性剂,在发酵产脂肽阶段,密切关注气泡产生情况,及时添加消泡剂。发酵完成后,发酵液经 65 ℃,0.09 MPa 真空浓缩为原体积的 25 %。浓缩后的发酵液用喷雾干燥塔以进风口温度 160 ℃,出风口温度 80 ℃,进液量 10 mL/min 的条件进行喷雾干燥处理。

2 结果与分析

2.1 WH1 抑菌活性物质的分离纯化与鉴定

WH1 发酵液经乙酸乙酯萃取后,活性物质在水相中,正丁醇萃取后能溶于正丁醇,经真空旋转蒸

发后进行葡聚糖 G-25 分子筛检测,能检测到 5 个洗脱峰(图 1),活性测定主要在第 1 个洗脱峰内。

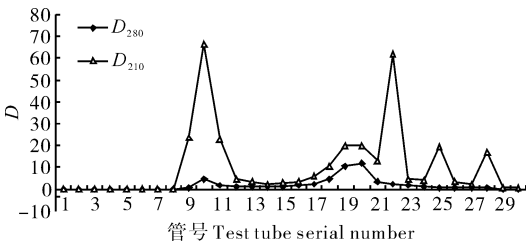
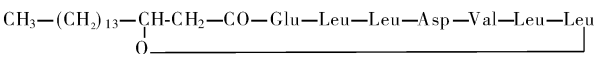


图 1 抑菌活性物质经葡聚糖 G-25 柱分离时洗脱曲线

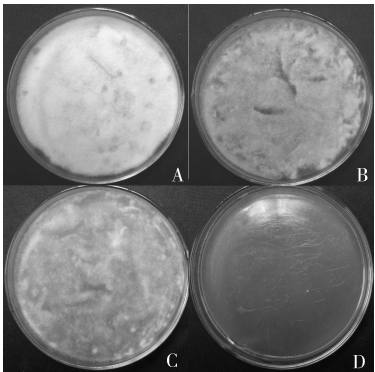
Fig. 1 Anti-fungal substance in WH1 culture was separated by Sephadex G-25

经红外吸收光谱分析表明,其含有氨基、甲基、酰胺基、羰基、亚甲基、甲基等基团,与脂肽的功能基团和功能键一致,因此推测所分离的抗真菌物质是一种脂肽,LC/ESI-MS 分析显示其相对分子质量为 1 043,推测其为 Surfactin 类的脂肽,序列为:



2.2 WH1 发酵液对油茶炭疽病菌丝生长的抑制

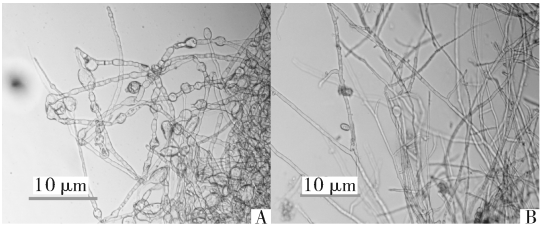
图 2 显示,在培养基中加入 WH1 发酵液能够显著地抑制油茶炭疽病菌丝的生长。在含发酵液的培养基上生长的菌丝与在普通 PDA 培养基上生长的菌丝出现膨大畸形,如图 3 所示。



A: 油茶炭疽病孢子在 PDA 平板上生长 24 h 的状态 The Colletotrichum gloeosporioides spore growth in PDA plate for 24 h; B, C, D: 油茶炭疽病孢子在含 1/50、1/20、1/10 发酵液的 PDA 平板上生长 24 h 的状态 The Colletotrichum gloeosporioides spore growth in PDA plate containing 1/50, 1/20, 1/10 WH1 fermentation broth respectively for 24 h.

图 2 WH1 发酵液对油茶炭疽病菌丝生长的抑制作用

Fig. 2 Fermentation broth of WH1 suppress the growth of Colletotrichum gloeosporioides



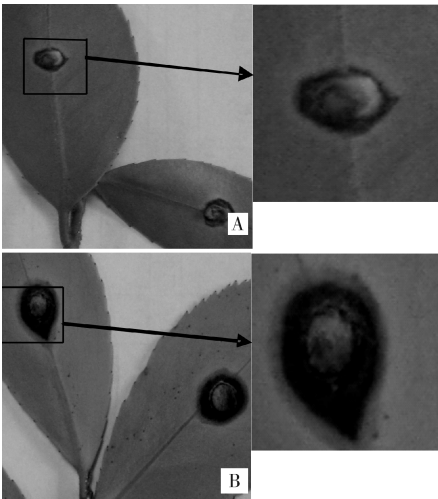
A: 在含 1/10 发酵液的 PDA 平板上生长 24 h 的油茶炭疽病菌丝 The Colletotrichum gloeosporioides mycelium growth in PDA plate containing 1/10 fermentation broth for 24 h; B: 在 PDA 平板上生长 24 h 的油茶炭疽病菌丝 The Colletotrichum gloeosporioides mycelium growth in PDA plate for 24 h.

图 3 WH1 发酵液对油茶炭疽病菌丝的致畸作用

Fig. 3 WH1 fermentation broth deform the mycelium of Colletotrichum gloeosporioides

2.3 WH1 发酵液对离体叶片上油茶炭疽病的防效

在离体叶片上喷洒稀释的发酵液,同样能够有效地抑制油茶炭疽病菌斑的蔓延,保护油茶不被病菌侵染。用稀释 50 倍的 WH1 发酵液喷洒油茶叶片,5 d 内对油茶炭疽病的防治效果达 87.5%。结果如图 4 所示,中心的白色部分为接种的真菌菌饼。图 4-A 中叶片上接种的病原菌基本未蔓延,图 4-B 中炭疽病在叶片上迅速蔓延,在病灶边缘形成水渍状态。



A: 喷洒稀释 50 倍的 WH1 发酵液后,接入油茶炭疽病,培养 5 d Leaf was inoculated with Colletotrichum gloeosporioides for 5 days after sprayed with 1/50 WH1 culture; B: 喷洒蒸馏水后,接入油茶炭疽病,培养 5 d Leaf was inoculated with Colletotrichum gloeosporioides for 5 days after sprayed with water.

图 4 WH1 发酵液抑制油茶炭疽病在离体油茶叶片上生长

Fig. 4 WH1 fermentation broth suppress Colletotrichum gloeosporioides in vitro

2.4 Plackett-Burman 设计结果

用软件 Design-Expert 7.0 对各因素的显著性进行分析,结果显示在 $P<0.05$ 范围内,豆粕粉、 NH_4NO_3 、 Na_2HPO_4 和温度是影响脂肽产量的主要因素,由于温度对脂肽产量为负影响,所以发酵温度选取 $30\text{ }^\circ\text{C}$,其他 3 个培养基因子用田口设计进一步优化。

2.5 田口设计结果

田口设计结果如表 2 所示,借助软件 Minitab15.0 对试验结果进行分析,培养基各因子的最佳水平组合为豆粕粉 12 g/L 、 $\text{NH}_4\text{NO}_3\text{ }2\text{ g/L}$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{ }2\text{ g/L}$ 、淀粉 20 g/L ,各因子对脂肽产量的影响排秩为 $\text{NH}_4\text{NO}_3>\text{豆粕粉}>\text{淀粉}>\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 。用最佳水平组合做验证试验,抑菌率为 $(74.9\pm1.9)\%$,与实际最大值无显著差异。由于淀粉在 15 和 20 g/L 水平上差异不显著,故选用 15 g/L ,以节约发酵成本。

表 2 田口设计试验和结果¹⁾

编号 No.	变量/(g/L) Variables				抑菌率/% Inhibitory rate
	豆粕粉 Soybean powder	淀粉 Starch	NH_4NO_3	Na_2HPO_4	
1	8	10	2	2	$59.6\pm3.8\text{ de}$
2	8	15	2	4	$56.4\pm0.8\text{ def}$
3	8	20	6	6	$51.1\pm2.3\text{ f}$
4	12	20	2	4	$75.6\pm0.6\text{ a}$
5	12	10	4	6	$58.5\pm1.8\text{ de}$
6	12	15	6	2	$61.4\pm1.5\text{ cd}$
7	16	15	2	6	$72.9\pm3.5\text{ ab}$
8	16	20	4	2	$66.9\pm6.2\text{ bc}$
9	16	10	6	4	$53.0\pm1.3\text{ ef}$

1)表中纵列数据后字母相同者表示差异不显著($P>0.05$)。

The data within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% level.

2.6 发酵放大及发酵液喷雾干燥

发酵放大的过程中由于通气和搅拌方式的改变,溶氧增强,发酵时间由原来的 48 h 缩短为 24 h,同时由于芽孢生产前期产脂肽时间缩短,脂肽产量比摇瓶发酵下降 30%。

喷雾干燥的粉末成品产量为 6.5 g/L ,药效存留率为发酵液的 86.2%。粉末可溶性好,性质稳定,可长期保存,同时保留了益生芽孢,可在施药过程中直接回接到油茶叶片上和土壤中,增强药效。

3 讨 论

脂肽是一种油水两亲的小分子化合物,结构由

水溶性的环状肽和脂溶性侧链组成^[10]。脂肽的侧链能够溶解细胞壁或细胞膜,造成原生质体泄露以及菌体断裂或畸形^[11-12],同时抑制孢子的萌发。此外,脂肽中的表面活性剂能够在植物的根部形成保护膜,阻止病原菌的入侵^[11]。Qi 等^[13]报道,脂肽在低浓度时能通过诱导真菌细胞凋亡的形式抑制病原真菌生长。脂肽类抗菌物质有广泛的抑菌谱,在准确测定抑菌谱的基础上研制广谱的抗菌农药,有较大的发展潜力。

通过对 1 株产脂肽解淀粉芽孢杆菌的抗真菌效果进行研究,发现其能够使油茶炭疽病菌丝产生畸形,从而抑制其生长。试验表明,高稀释倍数的发酵液对离体油茶叶片上的炭疽病仍然有显著的防效,对 WH1 产脂肽的发酵条件进行优化,可以作为防治油茶炭疽病的专用生物制剂。经过对培养基进行优化,脂肽产量有了大幅增长。进行的 WH1 发酵液防治油茶炭疽病田间苗圃试验显示,发酵液相比常用的化学农药多菌灵和托布津,防效更为显著(数据另文发表)。本试验表明,以脂肽类物质作为防治油茶炭疽病的生物农药是可行的。

发酵放大的过程中,脂肽在发酵罐中的发酵时间缩短,产量较摇瓶中有明显的降低,这可能是由于脂肽的产生阶段主要为芽孢产生前期,在发酵罐中发酵时,溶氧量激增,WH1 代谢增强,营养物质被迅速耗尽,WH1 形成芽孢速度加快所致。关于发酵的溶氧条件需要进行进一步试验研究。

在喷洒脂肽进行油茶炭疽病的防治时,喷洒后短期内脂肽浓度较高,可以直接杀死真菌细胞。喷洒后一段时间,经过雨水冲刷,脂肽浓度有所降低,依然能通过诱导凋亡的形式抑制真菌生长。由于油茶炭疽病发病高峰在高温多雨的 7—9 月,为了保证药效,最好能在雨后及时补喷,而且 WH1 发酵液中脂肽属于表面活性剂,喷洒时需要注意剂量,过量使用容易产生烧苗现象。

WH1 发酵原料价格低廉,发酵工艺简单、时间短,脂肽产量高,并且产物均为对环境友好的无污染绿色产品,发酵液喷雾干燥以后可以较长时间的保存,这些特征表明脂肽可以作为高效、稳定、绿色、环保的生物农药用于植物病害油茶炭疽病的防治。

参 考 文 献

- [1] 徐学兵. 茶油研究进展述评[J]. 中国油脂,1995,20(5):7-9.
- [2] 罗万周,罗万业. 油茶炭疽病及其防治方法[J]. 农技服务,

2007,24(6):70.

[3] 靳爱仙,周国英,李河. 油茶炭疽病的研究现状、问题与方向[J]. 中国森林病虫,2009,28(2):27-31.

[4] ONGENA M,JACQUES P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol[J]. Trends Microbiol,2008,16: 115-125.

[5] VANITTANAKOM N,LOEFFLER W,KOCH U,et al. Fengycin—a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3[J]. J Antibiot,1986,39(7):888-901.

[6] ARGUELLES-ARIAS A,ONGENA M,HALIMI B,et al. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens[J]. Microbiol Cell Factories,2009,8:63.

[7] 崔艳红,黄现青. 生物表面活性剂——表面活性素[J]. 生物技术,2006,16(5):91-94.

[8] 褚以文. 微生物培养基优化方法及其 OPTI 优化软件[J]. 国外医药抗生素分册,1999,20(2):58-60.

[9] 胡运权. 试验设计方法[M]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学出版社,1997.

[10] 唐金山,高昊,戴毅,等. 环脂肽类成分研究进展[J]. 药学报,2008,43(9):873-883.

[11] 程洪斌,刘晓桥,陈红漫,等. 枯草芽孢杆菌防治植物真菌病害研究进展[J]. 上海农业学报,2006,22(1):109-112.

[12] 朱发银. 解淀粉芽孢杆菌 WH1 抗真菌机制的研究[D]. 武汉:华中农业大学生命科学技术学院,2010.

[13] QI G F,ZHU F Y,DU P,et al. Lipopeptide induces apoptosis in fungal cells by a mitochondria-dependent pathway[J]. Peptides,2010,31:1978-1986.

Optimization of fermentation condition for *Bacillus amyloliquefaciens* WH1 and its biological control effect on *Colletotrichum gloeosporioides*

XIN Shan-shan¹ QI Gao-fu¹ ZHU Fa-yin¹ LU Jin-zhong¹
LI Jing-jing¹ WANG Sheng-ying¹ LIU Yan-jun² CHEN Jing-yuan³
WANG Yi-xun³ ZHAO Xiu-yun¹

1. College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University /
State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Wuhan 430070, China;
2. Wuhan Forestry Science and Technology Extension Station,
Wuhan 430023, China;
3. Hubei Academy of Forestry, Wuhan 430075, China

Abstract The antifungal substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* WH1, isolated from the root of rice, was identified with infrared spectra. The inhibitory effect of WH1 towards *Colletotrichum gloeosporioides* was measured by suppression tests both in the plate and leaves *in vitro*. The results showed that the antifungal substance WH1 produced was cyclic lipopeptide, the fermentation broth was detected with the activity to deform the mycelium of *C. gloeosporioides*, and the highly diluted fermentation broth still had a significant control effect *in vitro*. In order to make WH1 a dedicated formulation to control *C. gloeosporioides*, the fermentation condition of WH1 was optimized by Plackett-Burman design and Taguchi array design. After optimization, the lipopeptide production has increased significantly. Keeping the dissolved oxygen above 30%, the fermentation in fermentor of 3 L, 20 L and 500 L was scaled up successfully. Tenfold diluted fermentation broth of fermentation in 500 L fermentor has inhibitory rate of 50.8% on *C. gloeosporioides*, and still kept inhibitory rate of 86.2% on fungus after spray drying.

Key words *Bacillus amyloliquefaciens*; cyclic lipopeptide; *Colletotrichum gloeosporioides*; antibacterial activity; biopesticide

(责任编辑:陆文昌)