

文章编号: 1674-7054(2016)03-0343-05

香蕉枯萎病生防链霉菌 DJ15 发酵条件的优化

杨李玲^{1,2}, 黄绵佳¹, 张锡炎², 高祝芬²

(1. 海南大学 园艺园林学院, 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所, 海口 571101)

摘要: 笔者采用从药用植物密毛山梗菜 (*Lobelia clavata*) 植株中分离得到的放线菌菌株 DJ15 为材料, 对其培养基配方和发酵条件进行试验, 筛选出最优配方和发酵条件, 旨在从药用植物中分离筛选出微生物用于香蕉枯萎病的防治。结果表明, 菌株 DJ15 最优培养基配方为: 葡萄糖 1.5%, 黄豆粉 1.0%, 蛋白胨 3%, 氯化铵 1.0%, 氯化钠 0.4%, 碳酸钙 0.3%, 硫酸镁 0.1% 和硫酸钾 0.1%; 最优培养条件为: pH6, 接种量 15%, 摇床转速 100 r·min⁻¹, 培养时间 120 h。优化发酵条件后, 放线菌菌株 DJ15 对香蕉枯萎病病原菌的抑制率达到 73.58%, 比优化前提高 135.11%。

关键词: 内生放线菌菌株 DJ15; 培养基组分; 发酵条件; 优化

中图分类号: S668.1 **文献标志码:** A **DOI:** 10.15886/j.cnki.rds wxb.2016.03.011

随着化学农药大量且长期的应用, 有害生物抗药性问题日渐突显, 给人类健康及环境安全也带来严重隐患。生物防治因具有高效性、强选择性、不易产生有害生物抗药性、对人畜低毒等特点, 已成为研究热点。植物内生菌作为一类重要的微生物资源, 它包括植物内生细菌、真菌、放线菌^[1]。香蕉枯萎病一直以来是人们关注的难题^[2], 其拮抗放线菌绝大多数来自土壤^[3-4], 然而从植株内尤其是药用植物内分离筛选出微生物用于香蕉枯萎病的防治却鲜有报道。从药用植物密毛山梗菜 (*Lobelia clavata*) 植株提取的内生放线菌经分离鉴定, 对香蕉枯萎病病原菌有很强的拮抗作用。笔者以从密毛山梗菜植株中分离得到的 1 株抗菌内生放线菌 DJ15 为材料, 对其培养基配方和发酵条件进行试验, 筛选出最优配方和发酵条件, 以提升其对香蕉枯萎病的拮抗能力和抗病性, 为药用植物内生放线菌对抗香蕉枯萎病方面的研究及进一步开发利用生物防治工作提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株 链霉菌 (*Streptomyces*) DJ15 菌株分离自我国云南地区药用植物密毛山梗菜 (*Lobelia clavata*) 植物中, 香蕉枯萎病菌 4 号小种菌株 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, Foc) 取自笔者实验室分离保存的样品。

1.2 培养基 链霉菌 DJ15 种子培养基为高氏一号培养基, 参考沈萍方法制备^[5]。黄豆粉发酵培养基: 每 100 mL 中含有 2 g 可溶性淀粉, 0.2 g 蛋白胨, 0.5 g 酵母粉, 1.5 g 黄豆粉, 0.4 g 氯化钠, 0.4 g 碳酸钙, pH7.2。将 DJ15 菌株接种于高氏 1 号平板培养基上, 28 °C 培养 7 d 后, 以 5% 的接种量接种至盛有 50 mL 种子培养基的三角瓶中, 置于 28 °C, 150 r·min⁻¹ 摇床振荡培养 4 d, 为备用种子液。

1.3 培养基组分的优化

1.3.1 碳源 将蔗糖、木糖、甘露醇、 α -乳糖、可溶性淀粉 5 种碳源代替初始黄豆粉发酵培养基中的碳源, 质量分数均为 1%, 其他成分保持不变, 每处理重复 3 次, 使用滤纸法^[6] 和抑菌圈大小^[7] 来测定发酵液抑制率, 比较不同碳源对发酵液抑制率的影响^[8]。

收稿日期: 2016-06-12

基金项目: 海南省科技合作专项资金项目 (KJHZ2015-26); 现代农业产业技术体系专项资金 (CARS-32)

作者简介: 杨李玲 (1982-), 女, 海南大学园艺园林学院 2014 级硕士研究生, E-mail: 3028267@qq.com

通信作者: 黄绵佳 (1964-), 男, 广东汕头人, 博士, 教授, 研究方向: 植物生理生化, E-mail: hmj886@163.com

1.3.2 氮源 在确定合适碳源的发酵培养基基础上,以蛋白胨、黄豆粉、草酸铵、尿素、硝酸铵、氯化铵等 6 种有机氮源(氮素质量分数均为 1%) 代替初始黄豆粉发酵培养基中的氮源,其他成分一致,并筛选出最佳氮源。

1.3.3 无机盐 在上述优化完成的培养基中添加 0.1%、0.2%、0.3%、0.4% 4 个梯度质量分数的硫酸镁、氯化钙、硫酸钾,采用 L9(34) 正交表正交法^[9]进行正交试验设计,测定不同无机盐质量分数对发酵液抑制率的影响。

1.4 培养条件的优化

1.4.1 pH 选择 pH 分别为 9.0、8.0、7.0、6.0、5.0、4.0、3.0,在 250 mL 发酵罐内分别发酵,搅拌速度控制在 100 r·min⁻¹,每隔 3 h 测定菌落数,选择其最佳 pH。

1.4.2 发酵时间 将上述所有优化完成的组分及条件分别按 72、96、120、144、168、192 h 6 个时间进行发酵后测其抑菌活性。

1.4.3 接种量 在 250 mL 三角瓶中分别加入质量分数为 1%、5%、10%、15%、20%、30% 的种子液,在以上基础上优化的培养基进行发酵后测其抑菌活性。

1.4.4 摇床转速 将发酵摇床设置 4 个转速水平,分别为 100、150、200、250 r·min⁻¹,发酵后测定抑菌活性。

1.5 平板拮抗 采用平板对峙培养法^[10]。用直径 5 mm 的打孔器取已接种 5 天的菌饼,放置于 PDA 平板中央,距菌饼中央 2.5 cm 处接种待测菌,每皿接种 4 个供试菌株,以只接种病原菌作为对照,28℃ 培养 5 d 后观察并测量记录抑菌圈直径。

1.6 数据处理 用 Excel2003 对数据进行整理作图,用 SAS 统计分析软件进行邓肯多重比较。

2 结果与分析

2.1 发酵培养基配方的优化

2.1.1 碳源优化 选取蔗糖、木糖、甘露醇、α-乳糖、可溶性淀粉 5 种为碳源,测定其对抑菌活性的影响。结果表明,葡萄糖为碳源时,产生的抑菌活性最大,抑菌圈直径达 19.9 mm;淀粉和蔗糖抑制率次之,分别为 19.2 和 18.8 mm;木糖、甘露醇和 α-乳糖抑制率较低,其中 α-乳糖抑制率最低,仅为 16.3 mm (图 1)。试验结果分析表明,由于放线菌 DJ15 菌株在葡萄糖中的抑菌率活性最大,原培养基中的可溶性淀粉可以被葡萄糖所代替作为碳源进一步优化。

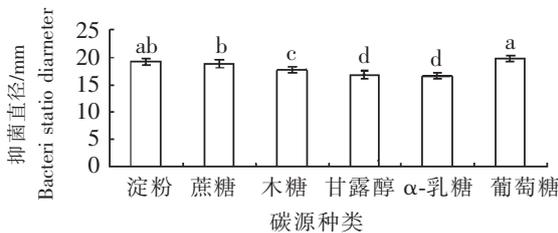


图 1 不同碳源对抑菌物质活性的影响

a,b,c,d,e 为多重比较结果,不同小写字母表示各处理间差异显著(P < 0.05),相同小写字母表示差异不显著,以下同

Fig.1 Effect of different carbon sources on antibacterial activity of endophytic actinomycete DJ15

Different lowercase letters indicate significant difference between treatments at P<0.05, similarly here in after

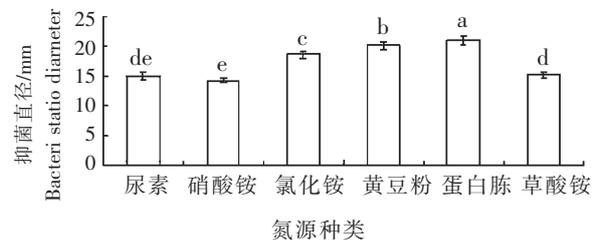


图 2 不同氮源对抑菌物质活性的影响

Fig.2 Effect of different organic nitrogen sources on antibacterial activity of endophytic actinomycete DJ15

2.1.2 氮源优化 选取蛋白胨、黄豆粉、草酸铵、尿素、氯化铵和硝酸铵 6 种物质用作氮源优化。结果表明,菌株 DJ15 在蛋白胨、黄豆粉、草酸铵、尿素、氯化铵和硝酸铵的抑菌率有很大的不同,其中蛋白胨的抑菌率最大;氯化铵和黄豆粉作为氮源较为适中,抑菌圈直径分别为 20 和 21 mm;其余物质对菌株的生长及产生活性物质的能力均较差,不适合作为氮源使用(图 2)。

2.1.3 无机盐优化 根据表 1 各因素极差分析结果可知,不同无机盐影响下的发酵液抑制率关系依次

为 $\text{NaCl} > \text{CaCl}_2 > \text{K}_2\text{SO}_4 > \text{MgSO}_4$; 以各因素不同水平下抑制率的最大值作为最佳水平, 因此, 发酵液培养基最佳无机盐配比为 $0.2\% \text{NaCl} + 0.3\% \text{CaCl}_2 + 0.05\% \text{K}_2\text{SO}_4 + 0.1\% \text{MgSO}_4$ 。

表1 无机盐浓度对发酵液抑制率影响的正交试验设计

Tab. 1 The design of orthogonal test for effect of inorganic salt on inhibition rate of fermentation broth

序号 Code	因素 Factor				抑菌率/% Inhibition rate
	NaCl%	CaCl ₂ %	MgSO ₄ %	K ₂ SO ₄ %	
1	0.10	0.20	0.01	0.05	58.78
2	0.10	0.30	0.05	0.10	80.39
3	0.10	0.40	0.10	0.20	60.44
4	0.20	0.20	0.01	0.05	75.57
5	0.20	0.30	0.05	0.10	81.66
6	0.20	0.40	0.10	0.20	78.39
7	0.30	0.20	0.01	0.05	5.53
8	0.30	0.30	0.05	0.10	68.72
9	0.30	0.40	0.10	0.20	71.42
K1	75.26	65.50	63.16	75.27	
K2	69.52	68.88	61.72	66.65	
K3	59.46	74.63	68.94	69.43	
R	15.80	9.13	7.21	8.32	

2.2 发酵培养基条件的优化

2.2.1 pH 优化 试验结果表明(图3), 菌株 DJ15 在 pH 为 3.0~9.0 时均可以生长, pH6.0 时发酵液抑菌效果最好, 抑菌圈直径达 21.4 mm, pH 为 3.0~6.0 时抑制效果随 pH 增加而增加, 大于 6.0 后随 pH 增加而降低。

2.2.2 发酵时间优化 试验结果表明(图4), 发酵时间为 120 h 效果最好, 抑菌圈直径为 22.1 mm, 其次是发酵 192 h, 抑菌圈直径为 20.5 mm, 培养 96 h 与培养 144 h 差异不显著。

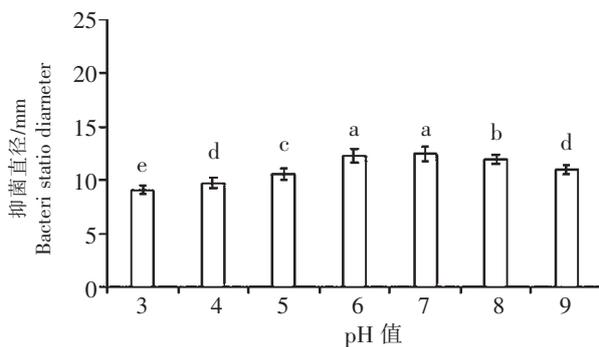


图3 pH 对抑菌物质活性的影响

Fig.3 Effect of different pH on antibacterial activity of endophytic actinomycete DJ15

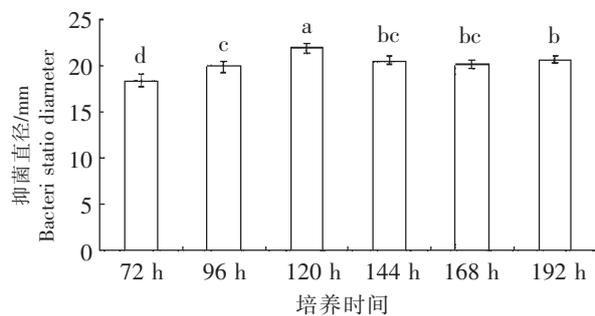


图4 发酵时间对抑菌物质活性的影响

Fig.4 Effect of different fermentation time duration on antibacterial activity of endophytic actinomycete DJ15

2.2.3 接种量和摇床转速优化 试验结果表明(图5, 6), 接种种子液量和摇床转速对菌株 DJ15 产生抑菌活性物质也产生影响, 接种量为 15% 时, 效果最好, 抑菌圈直径为 21.8 mm, 发酵液的抑菌效果有所增加。接种量在 1%~15% 时, 差异不显著。当摇床转速为 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 时效果最好, 抑菌圈直径达 22.4 mm, 转速越大抑菌效果明显下降。

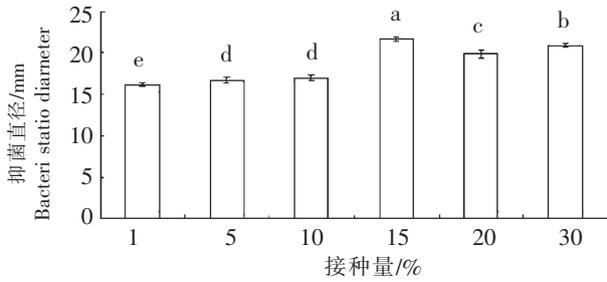


图 5 接种量对抑菌物质活性的影响
Fig.5 Effect of the inoculation amount on antibacterial activity of endophytic actinomycete DJ15

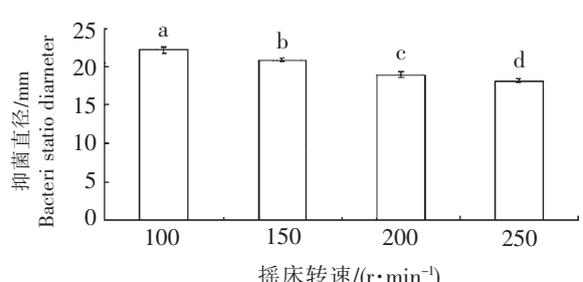


图 6 摇床转速对抑菌物质活性的影响
Fig.6 Effect of table speed on antibacterial activity of endophytic actinomycete DJ15

3 结 论

目前临床应用的抗生素约 2/3 来源于链霉菌属^[11] ,而链霉菌又能产生多种次级代谢物 ,除抗生素外还包括抗肿瘤剂、杀虫剂、酶抑制剂、色素及酶类等^[12] 。发酵是抗生素在生物工程产业化的基础 ,即使拮抗菌性能优良 ,但缺乏合理的发酵工艺也不能将其潜力完全发挥。发酵过程控制的优化成为抗生素发酵生产中迫切需要解决的课题^[13-14] 。微生物初级代谢产物和次级代谢的生物合成其发酵机理十分复杂 ,受多种因素影响 ,如培养基组成、培养温度、pH、发酵时间、菌种理化特性及发酵工艺等 ,适宜的培养基配方和合适的发酵条件成为产物生成量高低和原料利用率高低的决定因素^[15] 。一般培养基的组分繁多且各成分间还可能存在着错综复杂的交互作用 ,因而对微生物培养基的组成进行优化 ,具有十分重要的意义。熊涛等对植物乳杆菌 NCU116 的发酵培养基的配方进行优化研究 ,通过高密度培养 ,经单因素试验以及响应面试验设计分析 ,得到发酵培养基的最佳配方为葡萄糖质量分数 5.43%、蛋白胨质量分数 0.98%、K₂HPO₄ 质量分数 0.59% ,在接种量为 3%、培养温度 35℃、pH6.5 ,中和法和指数流加综合利用 ,培养结束后最终菌浓度达到 9.3 × 10⁹ CFU · mL⁻¹^[16] 。本研究以提高放线菌菌株 DJ15 对拮抗香蕉枯萎病病原菌的抑菌活性为研究目标 ,采用摇瓶发酵的方法 ,确定了培养基中不同组分对链霉菌菌株 DJ15 产抑菌活性物质的影响 ,筛选出适宜发酵的培养基配方和发酵条件。通过极差 R 判断 ,最终确定培养基组成成分为:葡萄糖 1.5% ,黄豆粉 1.0% ,蛋白胨 3% ,氯化铵 1.0% ,氯化钠 0.4% ,CaCO₃ 0.3% ,MgSO₄ 0.1% , K₂SO₄ 0.1% 。

运用生物防治对香蕉枯萎病进行防控 ,是十分有效的手段。目前 ,许多对香蕉枯萎病病原具有良好抑制作用的生防菌被发现 ,并应用于香蕉产业中 ,促进了经济的发展。据报道 ,在健康的香蕉植株中分离到的 1 株内生芽孢杆菌 ,对 FOC4(香蕉枝萎疾病病原菌尖孢镰刀菌古巴专化型 4 号生理小种) 起到强抑制作用 ,其抑制率达到 80% 以上 ,而且内生拮抗细菌在香蕉植株不同组织的定殖呈根 > 球茎 > 假茎 > 叶的递减趋势^[17] 。研究表明 ,用从饼肥发酵液中分离得到的 1 株甲基营养型芽孢杆菌 ,进行平板对峙试验 ,发现该拮抗菌对包括 FOC4 在内的 12 种病原菌均有显著的抑制性 ,对 FOC4 的抑制率可以达到 87.2%^[18] 。余超等人利用香蕉内生铜绿假单胞菌对香蕉枯萎病进行防治 ,其防效达 83.67%^[19] 。本研究中 ,经优化培养条件 ,菌株 DJ15 对拮抗香蕉枯萎病病原菌的抑制率达到 73.58% 。由于微生物种类不同 ,pH ,生长环境都不同 ,即使同一种微生物在不同的生长阶段和不同的生理、生化过程 ,也有最适应 pH 要求^[20] ,同时考虑到拮抗菌拮抗产物的形成及产量和发酵培养时间有紧密的关系^[21] ,故从 pH ,发酵时间 ,摇床转速及接种量 4 方面培养条件进行筛选 ,得到较佳培养条件为 pH 为 6 ,在接种量为 15% ,将摇床转速设置在 100 r · min⁻¹ 时 ,培养发酵时间在 120 h ,抑菌物质的活性较优化前提高了 19.12% 。以上结果为 DJ15 菌株日后进行发酵罐扩大培养提供了依据。

参考文献:

[1] Tan R X , Zou W X. Endophytes: a rich source of functional metabolites [J]. Nat Prod Rep , 2001 , 18: 448 - 459.

- [2] 张志红 彭桂香 李华兴, 等. 生物肥与甲壳素和恶霉灵配施对香蕉枯萎病的防治效果[J]. 生态学报, 2011, 31(4): 1149–1156.
- [3] 秦涵淳 杨腊英 李松伟, 等. 香蕉镰刀菌枯萎病拮抗放线菌的分离筛选及其抑制效果的初步评价[J]. 中国生物防治, 2010, 26(2): 174–180.
- [4] Chen C Y, Wang Y H, Huang C J. Enhancement of the antifungal activity of *Bacillus subtilis* F29–3 by the chitinase encoded by *Bacillus circulans* chiA gene. [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2004, 50(6): 451–454.
- [5] 沈萍 范秀荣 李广武. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1988.
- [6] 刘翠娟 段琦梅 安德荣. 抗真菌拮抗放线菌的筛选及摇床发酵条件的优化[J]. 微生物学杂志, 2004, 24(4): 12–14.
- [7] 赵育卉 李连强 湛东锐, 等. 盐生海芦笋内生真菌 S19 的分离鉴定与抗氧化发酵条件优化[J]. 南京农业大学学报, 2013, 36(2): 137–144.
- [8] 周启升 刘训理 张楠, 等. 拮抗链霉菌 S24 发酵培养基的优化及其对黄曲霉的抑菌作用[J]. 生物工程学报, 2011, 27(2): 203–211.
- [9] 阚国仕 谢建飞 陈红漫. 一株高产 Mn-SOD 菌发酵条件的优化[J]. 中国酿造, 2009, 28(4): 118–120.
- [10] 孙建波 王宇光 李伟, 等. 产几丁质酶香蕉枯萎病拮抗菌的筛选、鉴定及抑菌作用[J]. 果树学报, 2010, 27(3): 427–430.
- [11] Procópio R E, Silva I R, Martins M K, et al. Antibiotics produced by *Streptomyces* [J]. Braz J Infect Dis, 2012, 16(5): 466–471.
- [12] Dharmaraj S. Marine *Streptomyces* as a novel source of bioactive substances [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2010, 26(12): 2123–2139.
- [13] 李绪友. 现代生物技术 in 抗生素生产中的应用[J]. 武汉工程大学学报, 2014, 36(1): 14–20.
- [14] 王辰 张谷月. 白刺链霉菌(*Streptomyces albospinus*) CT205 菌株发酵条件优化及其次生代谢产物性质研究[J]. 南京农业大学学报, 2015, 38(2): 304–310.
- [15] 肖怀秋 李玉珍. 微生物培养基优化方法研究进展[J]. 酿酒科技, 2010, (1): 90–94.
- [16] 熊涛 黄锦卿 宋苏华, 等. 植物乳杆菌发酵培养基的优化及其高密度培养技术[J]. 食品科学, 2011, 37(7): 262–268.
- [17] 付业勤 蔡吉苗 刘先宝, 等. 香蕉内生细菌分离、活性评价及数量分布[J]. 热带作物学报, 2007, 28(4): 78–83.
- [18] 黄霄 陈波 周登博, 等. 菌株 BM-24 的分离鉴定及对香蕉枯萎病菌的抑菌活性[J]. 植物保护学报, 2013, 40(2): 121–127.
- [19] 余超 肖荣凤 刘波, 等. 生防菌 FJAT-346-PA 的内生定殖特性及对香蕉枯萎病的防治效果[J]. 植物保护学报, 2010, 37(6): 493–498.
- [20] 杨革 徐承水. 二十碳五烯酸的菌种选育及发酵条件[J]. 菌物系统, 2000, 19(3): 366–370.
- [21] 权春善 王军华 徐洪涛, 等. 一株抗真菌解淀粉芽孢杆菌的分离鉴定及其发酵条件的初步研究[J]. 微生物学报, 2006, 46(1): 7–12.

Optimization of Fermentation Conditions for *Streptomyces* Strain DJ15 with Biological Control of Banana Fusarium Wilt

YANG Liling¹, HUANG Mianjia¹, ZHANG Xiyan², GAO Zhufeng²

(1. College of Horticulture and Landscape Architecture, Hainan University, Haikou, Hainan 570228;

2. Institute of Tropical and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China)

Abstract: Endophytic actinomycete strain DJ15 was isolated from *Lobelia clavata*, a medicinal plant, and used to antagonize fusarium wilt pathogen. The carbon source test, nitrogen source test, different inorganic salts single-factor test, orthogonal test and main fermentation conditions test were carried to optimize the cultural medium and conditions for this strain. The results showed that the optimum medium formula for the strain DJ15 were glucose 1.5%, soybean powder 1%, peptone 3%, NH₄Cl 0%, NaCl 0.4%, CaCO₃ 0.3%, MgSO₄ 0.1% and K₂SO₄ 0.1%. Optimal culture conditions were pH6, 15% inoculation quantity, rotation speed 100r • min⁻¹ and culture time 120 h. After optimization, the inhibitory rate of the strain DJ15 on the banana fusarium wilt was 73.58%, which was 135.11% higher than that reported earlier.

Keywords: Endophytic Actinomycetes Strain DJ15; medium component; fermentation condition; optimization