

屈俊廷, 金海强, 沈国娟, 等. 人参锈腐病生防用解淀粉芽孢杆菌 Y-S-Y12 菌株发酵条件的优化[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(3): 158-161. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.03.042

人参锈腐病生防用解淀粉芽孢杆菌 Y-S-Y12 菌株发酵条件的优化

屈俊廷^{1,2}, 金海强³, 沈国娟^{1,2}, 杨超博^{1,2}, 李熙英^{1,2}

(1. 延边大学长白山生物资源与功能分子教育部重点实验室, 吉林延吉 133002;

2. 延边大学农学院, 吉林延吉 133002; 3. 吉林省延边朝鲜族自治州农业科学院, 吉林龙井 133400)

摘要: 研究了解淀粉芽孢杆菌 Y-S-Y12 菌株液体最佳发酵条件, 旨在为提高其活性次级代谢产物的产量提供技术支持。通过不同培养条件、营养条件、单因素试验和均匀设计试验, 对该菌株的最适发酵条件进行了优化, 结果发现, Y-S-Y12 菌株的最佳发酵时间为 3 d, 最佳发酵温度为 28~33 ℃, 最佳转速为 150 r/min, 最佳装液量为 125 mL (培养容器的容量为 250 mL), 最佳初始 pH 值为 6, 供试培养基中 Y-S-Y12 菌株在 NA 培养基中的发酵效果最佳。Y-S-Y12 菌株最优配方为 1.20 g 葡萄糖、3.10 g 酵母粉、2.00 g 磷酸氢二钾、24.86 g 牛肉膏。

关键词: 解淀粉芽孢杆菌; 抑菌率; 均匀设计; 发酵条件优化; 人参锈腐病

中图分类号: S435.675 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)03-0158-03

解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 广泛分布在自然界中, 如植物体内、植物根际、土壤、深海中均有分布。它们与枯草芽孢杆菌亲缘性很高, 可以产生对多种真菌与细菌具有抑制作用的多种代谢产物。因为解淀粉芽孢杆菌存在广泛、易分离、易培养, 能抑制植物病害, 非致病, 安全使用对普通人畜群体无害, 而且不污染环境, 因而特别受重视^[1-5]。将解淀粉芽孢杆菌制成生物制剂, 植物花部、枝干、叶、根部都可使用, 施用方法可以采取对农作物拌种、灌根、喷施等, 可广泛应用于作物采收前后的病害防治上, 也有研究指出可应用于粮食果蔬储存保鲜上^[6]。因此, 解淀粉芽孢杆菌在植物病害生物防治方面具有广阔的应用前景。

Y-S-Y12 菌株是金海强等^[7-8]从杨树枝条中分离出来的拮抗菌株。结合形态学、培养特征及分子生物学方法鉴定 Y-S-Y12 菌株为解淀粉芽孢杆菌, 是一种与枯草芽孢杆菌亲缘性很高的细菌, 该菌在生长过程中可以产生一系列能够抑制真菌和细菌活性的代谢物, 对植物病原菌具有强烈抑制作用^[3,9]。经过田间防病试验和室内抑菌试验, Y-S-Y12 菌株对人参锈腐病 (*Cylindrocarpon destructans*) 的抑制作用最强, 同时还有促进人参生长作用。另外, Y-S-Y12 发酵浓缩液对人参锈腐病菌也具有较弱的抑制活性。有关 Y-S-Y12 菌株发酵条件优化方面未见报道。对此, 进行 Y-S-Y12 菌株发酵条件的优化试验, 以期对 Y-S-Y12 菌株的扩大培养以及规模化生产菌剂打下基础。

1 材料与方法:

1.1 供试菌和培养基

供试菌为人参锈腐病菌和 Y-S-Y12 菌株, 均由延边大学植物病理实验室保存。

供试培养基为 NA 培养基、PDA 培养基、KB 培养液、LB 培养液, NA 培养液, PDA 培养液、基础发酵培养基^[10]。

1.2 方法

1.2.1 菌种活化及种子菌的制备 将 Y-S-Y12 菌株转接在 NA 培养基中, 在 25 ℃ 培养箱中培养 48 h 后取 2 环接种在 NA 培养液中, 放入恒温 30.6 ℃, 转速为 120 r/min 摇床中振荡培养 48 h, 得到种子菌。

1.2.2 发酵浓缩液 将不同培养条件的发酵液用 4 000 r/min 离心机分离 20 min, 再过滤, 将滤液浓缩到 10%, 灭菌待用。

1.2.3 不同培养条件对 Y-S-Y12 菌株发酵的影响 以温度为 30.6 ℃, 种子菌的接种量为 1%, 转速 120 r/min, 培养 48 h 为基本条件。在基础条件不变的情况下, 不同培养时间 (1、2、3、4、5、6、7 d), 不同培养温度 (23、28、33、38、43、48、53 ℃), 不同转速 (70、90、110、130、150、170、190 r/min), 不同装液量 (在 250 mL 的三角瓶中加入培养基量为 50、75、100、125、150、175、200 mL), 不同的起始 pH 值 (4、5、6、7、8、9、10) 及不同培养基 (LB、NA、KB、PDA), 测定发酵液在 580 nm 处的吸光值及发酵浓缩液对人参锈腐病菌的抑菌率, 根据不同处理的菌体生长量和抑菌活性的大小确定最佳发酵条件。

抑菌活性测定采用双层培养基打孔法。先在 PDA 平板中间放入直径 8 mm 的人参锈腐病菌的菌碟 1 片, 在菌碟两边 1.5 cm 处将第 2 层培养基打孔放置滴 200 μL 发酵浓缩液 (2 边对称), 以只放置人参锈腐病菌菌碟的为对照, 每个处理重复 3 个培养皿, 放入 20 ℃ 恒温箱培养 6 d, 测人参锈腐病菌菌落直径, 计算抑菌率。

收稿日期: 2015-09-30

基金项目: 吉林省教育厅重点项目 (编号: 2011800-611010002); 延边大学科技发展计划项目 (编号: 200802)。

作者简介: 屈俊廷 (1990—), 女, 吉林辽源人, 硕士研究生, 主要从事植物病害生物防治。E-mail: 475585924@qq.com。

通信作者: 李熙英, 教授。E-mail: xlyi@ybu.edu.cn。

抑菌率 = $\frac{\text{对照病菌菌落宽度} - \text{处理病菌菌落宽度}}{\text{对照病菌菌落宽度} - \text{接种时菌碟宽度}} \times 100\%$ 。

1.2.4 不同碳源对 Y-S-Y12 菌株发酵的影响 在基础发酵培养基中氮源含量和其他培养条件不变的情况下^[11-13], 分别用蔗糖、柠檬酸钠、乙酸钠、乳糖、麦芽糖、淀粉等量替换基础发酵培养基中的葡萄糖, 以基础发酵培养基作对照, 测定不同碳源的发酵无菌液对人参锈腐病菌抑菌活性的影响, 抑菌活性大小和菌量测定方法同“1.2.3”节。

1.2.4 不同氮源对 Y-S-Y12 菌株发酵的影响 在基础发酵培养基中碳源含量和其他培养条件不变的情况下, 分别用牛肉膏、硝酸钠、硝酸钾、氯化铵、尿素等量替换基础发酵培养基中的胰蛋白胨, 以基础发酵培养基作对照, 测定不同氮源的发酵无菌液对人参锈腐病菌抑菌活性的影响, 抑菌活性大小和菌量测定方法同“1.2.3”节。

1.2.5 无机盐对发酵液抑菌活性的影响 在基础发酵培养基中碳源含量、氮源含量和其他培养条件不变的情况下, 用硫酸镁、硫酸铁、硫酸锌、磷酸二氢钾等量替换培养基中的碳酸钙, 以基础发酵培养基作对照, 测定不同无机盐对人参锈腐病菌抑菌活性的影响, 抑菌活性大小和菌量测定方法同“1.2.3”节。

1.2.6 均匀设计试验 在确定主要碳、氮源的基础上, 对葡萄糖、牛肉膏、酵母粉、磷酸氢二钾进行单因子试验, 采用不同浓度梯度(葡萄糖 0~2 g, 依次增加 0.4 g; 酵母粉 0~0.1 g, 依次增加 0.02 g; 磷酸氢二钾 0.1~0.2 g, 依次增加 0.02 g; 牛肉膏 1.5~2.5 g, 依次增加 0.2 g)。本研究采用 DPS 7.05 数据处理软件进行统计分析, 在以上试验的基础上选择均匀设计法^[14-15] U_6 的均匀设计表, 用均匀设计使用表设计方案进行了多水平试验, 并结合偏最小二乘回归分析^[16] 对其营养条件进行了优化。

2 结果与分析

2.1 不同培养条件对 Y-S-Y12 菌株发酵的影响

2.1.1 不同培养时间对 Y-S-Y12 菌株发酵的影响 随着培养天数的增加, D 值和抑菌率均有增加的趋势, 其中培养 3 d 时 D 值和抑菌率达到了高峰, 随后 D 值和抑菌率均有下降趋势(表 1)。结果表明, Y-S-Y12 菌株的最佳发酵时间为 3 d。

表 1 不同培养天数对 Y-S-Y12 菌株发酵的影响

天数 (d)	D 值	平均抑菌率 (%)
1	1.260	35.21 d
2	1.356	41.25 c
3	1.555	49.98 a
4	1.157	48.32 ab
5	1.315	48.11 ab
6	1.109	48.06 ab
7	1.054	47.87 b

2.1.2 不同温度处理对 Y-S-Y12 菌株发酵的影响 随着温度的增加, Y-S-Y12 菌株的 D 值和抑菌率均有增加的趋势。当培养温度为 28 ℃ 时 D 值最高, 其次为 33 ℃ 时的 D 值; 培养温度为 33 ℃ 时的抑菌率最高, 其次为 28 ℃ 时的抑菌

率。之后随着温度的增高 D 值和抑菌率均有下降的趋势(表 2)。结果表明, Y-S-Y12 菌株的最佳发酵温度为 28~33 ℃。

表 2 不同温度对 Y-S-Y12 菌株发酵的影响

温度 (℃)	D 值	平均抑菌率 (%)
23	1.307	51.58bc
28	1.616	53.15b
33	1.483	57.55a
38	1.242	50.21c
43	0.961	37.87d
48	0.905	24.48e
53	0.533	20.94f

2.1.3 不同转速处理对 Y-S-Y12 菌株发酵的影响 随着转速的增加, Y-S-Y12 菌株的 D 值和抑菌率均有增加的趋势。当转速为 150 r/min 时 D 值和抑菌率达到了高峰(表 3)。结果表明, Y-S-Y12 菌株最佳发酵转速为 150 r/min。

表 3 不同转速对 Y-S-Y12 菌株发酵的影响

转速 (r/min)	D 值	平均抑菌率 (%)
70	1.306	44.81e
90	1.487	48.89d
110	1.597	49.40d
130	1.664	59.04bc
150	1.854	63.37a
170	1.830	62.48ab
190	1.484	60.27b

2.1.4 不同装液量处理对 Y-S-Y12 菌株发酵浓缩液的影响 随着装液量的增加, Y-S-Y12 的 D 值和抑菌率均有增加的趋势。当装液量为 125 mL 时 D 值和抑菌率达到了高峰, 其次是 100 mL 的 D 值和抑菌率(表 4)。结果表明, Y-S-Y12 菌株最佳发酵装液量为 125 mL。

表 4 不同装液量对 Y-S-Y12 菌株发酵的影响

装液量 (mL)	D 值	平均抑菌率 (%)
50	0.970	42.25cd
75	1.351	43.14c
100	2.024	51.25b
125	2.420	53.31a
150	1.627	40.44d
175	1.625	38.22e
200	1.508	37.12e

2.1.5 不同 pH 值处理对 Y-S-Y12 菌株发酵的影响 随着 pH 值的增加, Y-S-Y12 的 D 值和抑菌率均有增加的趋势。当 pH 值=6 时 D 值和抑菌率达到了高峰, 之后随着 pH 值的增加 D 值和抑菌率有下降趋势(表 5)。结果表明, Y-S-Y12 菌株最佳发酵 pH 值为 6。

2.1.6 不同培养基处理对 Y-S-Y12 菌株发酵的影响 在 NA 培养基上 Y-S-Y12 菌株的 D 值和抑菌率最高, 其次为 KB 培养基和 LB 培养基上的 D 值和抑菌率(表 6)。结果表明, Y-S-Y12 菌株在 NA 培养基上发酵较好。

表 5 不同 pH 值对 Y-S-Y12 菌株发酵的影响

pH 值	D 值	平均抑菌率 (%)
4	0.8461	25.76e
5	1.824	53.29b
6	1.878	58.81a
7	1.868	53.93b
8	1.846	43.06c
9	1.695	42.60c
10	0.809 3	32.65d

表 6 不同培养基对 Y-S-Y12 菌株发酵的影响

培养基	D 值	平均抑菌率 (%)
LB	2.881	46.32b
NA	3.732	54.54a
KB	3.480	47.32b
PDA	2.330	41.29c

2.2 不同营养条件对 Y-S-Y12 菌株发酵的影响

不同碳源对 Y-S-Y12 菌株发酵的影响较大。其中以葡萄糖为碳源时的 D 值和抑菌率最高,其次为蔗糖,再次为麦芽糖(表 7)。结果表明,Y-S-Y12 菌株最佳发酵碳源为葡萄糖。

表 7 不同碳源 Y-S-Y12 菌株发酵的影响

碳源	D 值	平均抑菌率 (%)
葡萄糖	8.098	55.48 a
蔗糖	7.633	54.61 b
麦芽糖	7.492	53.76 c
乙酸钠	5.945	31.64 f
乳糖	6.796	48.30 d
柠檬酸钠	6.045	44.65 e

不同氮源对 Y-S-Y12 菌株发酵的影响较大。其中以牛肉膏为氮源时的 D 值和抑菌率最高,其次为胰蛋白胨,再次为硝酸钠(表 8)。结果表明,Y-S-Y12 菌株最佳发酵氮源为牛肉膏。

表 8 不同氮源对菌株发酵浓缩液的抑菌率及菌量影响情况

氮源	D 值	平均抑菌率 (%)
胰蛋白胨	5.135	48.90 b
牛肉膏	5.681	49.43 a
硝酸钠	5.089	44.03 c
尿素	4.918	35.41 e
氯化铵	4.421	30.09 f
硝酸钾	4.866	37.94 d

不同无机盐对 Y-S-Y12 菌株发酵的影响较大。其中磷酸氢二钾为无机盐时的 D 值和抑菌率最高,其次为硫酸镁和硫酸铁,再次为碳酸钙(表 9)。结果表明,Y-S-Y12 菌株最佳发酵无机盐为磷酸氢二钾。

2.3 碳、氮源单因素试验和均匀设计法优化

均匀设计方案及试验结果见表 10。采用偏最小二乘回归法对试验结果进行回归建模分析,得到如下二次多项式回

表 9 不同无机盐对菌株发酵浓缩液的抑菌率及菌量影响情况

无机盐	D 值	平均抑菌率 (%)
碳酸钙	2.974	41.05 c
磷酸氢二钾	3.137	47.07 a
硫酸铁	3.126	42.53 b
硫酸锌	2.882	20.45 d
硫酸镁	3.107	42.64 b

归模型:
$$Y = 74.474 3 + 0.39X_1 + 0.405 4X_2 - 14.340 9X_3 - 2.111 5X_4 + 0.013 3X_1^2 - 0.273 1X_2^2 + 1.498 4X_3^2 + 0.053 3X_4^2 + 0.044 6X_1X_2 - 0.174 2X_1X_3 - 0.026 6X_1X_4 + 1.588 4X_2X_3 - 0.089 2X_2X_4 + 0.348 4X_3X_4。$$

模型拟合的决定系数 R^2 为 0.844 5(表 11),且模型的误差平方和及 Press 均较小,表明回归模型的拟合程度和模型的预测能力较好^[17]。经分析得最优配方为 1.20 g 葡萄糖、3.10 g 酵母粉、2.00 g 磷酸氢二钾、24.86 g 牛肉膏,此时抑菌率为 51.10%。

表 10 均匀设计试验方案及试验结果

水平	因素				抑菌率 (Y,%)
	X ₁ :葡萄糖	X ₂ :酵母粉	X ₃ :K ₂ HPO ₄	X ₄ :牛肉膏	
1	0	1	1.4	25	50.28
2	4	3	2	23	48.55
3	8	5	1.2	21	44.16
4	12	0	1.8	19	39.43
5	16	2	1	17	49.34
6	20	4	1.6	15	47.28

表 11 误差平方和及决定系数

考察指标	误差平方和	决定系数 R^2	Press 统计量
Y1	0.777 3	0.844 5	2.310 6

注:考察指标 Y1 为抑菌率。

3 结论

Y-S-Y12 菌株的单因素培养条件优化结果表明,培养时间为 3 d,培养温度为 28~33 ℃,转速为 150 r/min,装液量为 125 mL(培养容器的容量为 250 mL),初始 pH 值为 6 时的发酵效果最好;供试培养基中 Y-S-Y12 菌株在 NA 培养基中的发酵效果最佳。

通过不同碳源、氮源及无机盐对 Y-S-Y12 菌株发酵的影响研究,以葡萄糖为碳源,牛肉膏为氮源,磷酸氢二钾为无机盐时的发酵效果最好。进一步使用均匀设计法寻找最佳培养基配方,结果表明,最优配方为 1.20 g 葡萄糖、3.10 g 酵母粉、2.00 g 磷酸氢二钾、24.86 g 牛肉膏,此时抑菌率为 51.10%。

参考文献:

[1] 吴一品,林艺芬,林河通,等. 生防菌解淀粉芽孢杆菌研究进展[J]. 包装与食品机械,2012(6):49-52.
[2] 车晓曦,李校堃. 解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)的研究进展[J]. 北京农业,2010(3):7-10.
[3] 关晓欢,姜 华. 解淀粉芽孢杆菌研究进展[J]. 生物技术世界,2013(1):4-9.

龚 勋,王珩义. 不同年生紫茎泽兰不同部位水浸液对甜荞种子萌发的影响[J]. 江苏农业科学,2016,44(3):161-164.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.03.043

不同年生紫茎泽兰不同部位水浸液 对甜荞种子萌发的影响

龚 勋^{1,2}, 王珩义²

(1. 贵州理工学院轻工工程学院, 贵州贵阳 550003; 2. 贵州工程应用技术学院生态工程学院, 贵州毕节 551700)

摘要:以甜荞种子作为受体,采用培养皿滤纸法初步研究不同年生(一年生和多年生)紫茎泽兰不同部位(叶、茎、根)的水浸液在不同浓度(10、20、30、40、50 g/L)下对甜荞种子萌发的影响。结果发现,一年生和多年生紫茎泽兰叶水浸液在较高浓度(40、50 g/L)时,对甜荞种子发芽率和发芽指数均有显著影响;而一年生紫茎泽兰根水浸液只在浓度为 40 g/L 时,对甜荞种子发芽率有显著影响;一年生和多年生紫茎泽兰茎水浸液对甜荞种子发芽率和发芽指数均无显著影响。从发芽率化感效应敏感指数来看,一年生紫茎泽兰叶和根水浸液的化感效应对甜荞种子萌发的影响表现出明显的低促高抑;而多年生紫茎泽兰叶水浸液则只表现出明显的抑制作用。

关键词:紫茎泽兰;水浸液;甜荞;种子萌发;杂草;化感作用

中图分类号: S517.04 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)03-0161-04

紫茎泽兰(*Eupatorium adenophorum*)属菊科泽兰属,为多年生草本或亚灌木。目前,紫茎泽兰已经位居生物入侵种名单之首,由于其具有生活力强、适应性广、化感作用强烈等特点而易成为群落中的优势种,甚至发展为单一优势群落^[1]。紫茎泽兰的蔓延破坏了畜牧业、农林业的生产,破坏群落结构和生物的多样性,也危害着人类的健康^[2-3]。研究表明化感作用是紫茎泽兰成功入侵并扩张的重要原因^[4-7]。目前成株化感作用的研究受到竞争和化感作用分离方法的限制,因而主要利用生物测试方法进行化感作用的研究^[8],观测植物水浸液对植物种子萌发和幼苗生长的影响^[9]。近年来,随着紫茎泽兰的逐步侵入,很多地区的经济作物受到了威胁。本研

究以贵州省重要的经济作物荞麦作为紫茎泽兰化感作用的受体植物。荞麦属蓼科(Polygonaceae)荞麦属(*Fagopyrum*),而甜荞麦(*Fagopyrum esculentum* Moench)作为主要栽培品种^[10],是一种重要的经济作物和食物来源,其种子具有适合人类需求的营养物质,具有很高的药用价值^[11]。目前以不同的植物作为受体对紫茎泽兰化感作用的研究较多^[12-16],但关于紫茎泽兰的化感作用对荞麦种子萌发的影响至今尚未见任何报道。因此,本研究以荞麦中的甜荞种子为受体,探讨不同年生紫茎泽兰不同部位的水浸液对甜荞种子萌发的影响,以期比较出不同年生紫茎泽兰的不同部位化感作用对荞麦种子萌发的敏感性差异,为当地农作物的栽培提供参考,为保护生物资源多样性提供理论依据。

收稿日期:2015-03-12

基金项目:贵州省科学技术基金(编号:黔科合 J 字[2013]2007);贵州省教育厅自然科学研究项目(编号:黔教合 KY 字[2013]180)。
作者简介:龚 勋(1983—),女,湖南益阳人,博士,副教授,研究方向为生理生态学。E-mail:gongxunplmm@163.com。

[4] 刘 俏,权春善,范圣第. 超滤解淀粉芽孢杆菌发酵液提取抗菌物质的研究[J]. 食品科技,2006(7):70-72.

[5] Lisboa M P, Bonatto D, Bizani D, et al. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest [J]. International Microbiology, 2006, 9(2):111-118.

[6] 洪 鹏,安国栋,胡美英,等. 解淀粉芽孢杆菌防治果蔬采后病害研究进展[J]. 中国农学通报,2013,29(12):168-173.

[7] 金海强,贾 斌,李熙英. 杨树腐烂病内生拮抗细菌鉴定及防治研究[J]. 中国森林病虫,2012,31(6):1-4,35.

[8] 金海强,朴光一,屈俊廷,等. 解淀粉芽孢杆菌 Y-S-Y 菌株对人参锈腐病的生防作用[J]. 中国森林病虫,2015,34(2):22.

[9] 张荣胜,戴秀华,陈志谊. 解淀粉芽孢杆菌 Lx-11 对水稻细菌性条斑病的防治效果[J]. 江苏农业科学,2014,42(10):115-116.

[10] 姜 云,尹 望,陈长卿,等. 人参内生拮抗细菌 NJ13 的鉴定及

1 材料与方法

1.1 试验材料

紫茎泽兰采集于贵州省毕节市大方县,分为一年生和多年生。发酵条件[J]. 农药,2013,52(2):97-101.

[11] 候美玲,辛媛媛,郝志敏,等. 玉米内生细菌 YY1 菌株高产抗菌物质的发酵条件优化[J]. 玉米科学,2012,20(3):142-147.

[12] 文才艺,王凯旋,尹志刚. 樟树内生细菌 EBS05 发酵条件的研究[J]. 微生物学杂志,2010,30(4):52-57.

[13] 阮璐璐,程敬丽,陆一夫,等. 球毛壳菌素 A 发酵工艺优化及有效成分的提取分离[J]. 农药,2011,50(12):884-887.

[14] 方开泰. 均匀设计与均匀设计表[M]. 北京:科学出版社,1994.

[15] Luo D H. Optimization on the extraction of polysaccharides from ginseng using uniform design [J]. Natural Product Research and Development, 2008, 20:383-387.

[16] 王惠文. 偏最小二乘回归方法及其应用[M]. 北京:国防工业出版社,1999.

[17] 唐启义,冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统[M]. 北京:科学出版社,2002.