

何建清, 张格杰, 尹明远. 番茄早疫病拮抗放线菌 10-4 菌株的发酵条件[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(14): 79-81.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.14.022

番茄早疫病拮抗放线菌 10-4 菌株的发酵条件

何建清, 张格杰, 尹明远

(西藏大学农牧学院, 西藏林芝 860000)

摘要:放线菌 10-4 菌株对番茄早疫病具有良好的拮抗效果, 为进一步提高放线菌 10-4 菌株发酵液生产抑菌活性物质的产量, 通过单因素和正交试验研究发酵培养液、培养温度、种龄、初始 pH 值、接种量等条件对 10-4 菌株抑制番茄早疫病病原菌效果的影响。结果表明, 最佳发酵培养液配比为 2.000 g 可溶性淀粉、0.001 g FeSO_4 、0.050 g NaCl 、0.050 g K_2HPO_4 、0.050 g MgSO_4 、0.100 g KNO_3 、100 mL 蒸馏水。10-4 菌株发酵的优化条件: 温度为 28~34 ℃, 种龄为 32 h, 初始 pH 值为 8, 接种量为 5%。正交试验结果表明, 发酵条件的最优组合为 $A_1B_1C_1$, 即发酵温度为 28 ℃, 发酵时间为 72 h, 装液量为 60 mL (装液瓶为 250 mL), 此时 10-4 菌株生产抑菌活性物质的效果最好, 生防放线菌 10-4 菌株的发酵培养液可有效抑制番茄早疫病病原菌, 抑制率高达 96.2%。

关键词:番茄早疫病; 拮抗效果; 放线菌 10-4; 发酵条件; 优化; 抑菌活性; 产量

中图分类号: S436.412.1⁺4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)14-0079-03

早疫病是番茄生产上重要的病害之一, 由茄链格孢属真菌 (*Alternaria solani*) 引起, 该菌寄生范围广泛, 除番茄外, 还可感染辣椒、茄子、曼陀罗和马铃薯等^[1]。该病常年造成番茄减产 20%~30%, 严重时可达 50% 以上, 甚至绝产^[2]。目前生产上并无高抗或免疫的品种, 因此运用抗病种质防治该病并不现实^[3], 而化学农药的长期过量使用, 又会导致病原菌抗性增强, 对环境污染加重, 以及番茄果实有农药残留等现象, 因而, 探寻新的防治番茄早疫病的方法和药剂是目前生产上亟待解决的问题。利用微生物来防治植物真菌病害是当今植物真菌病害界十分热门的研究领域之一。微生物防治是指通过生物间的相互作用, 利用有益微生物或其代谢产物抑制致病微生物生长的生物防治手段^[4]。微生物资源丰富、选择性强、无残留、无污染、成本低、兼防兼治、增产增收、保持生态平衡、起到长效的作用, 所以具有广阔的发展前景^[5]。放线菌是最早被研究且应用到生产中的能产生大量抗生素的一种生防微生物, 已有利用放线菌防治番茄早疫病害的报道^[6]。菌株 10-4 是笔者所在课题组从西藏色季拉山亚高山草甸土壤中分离筛选出的 1 株对番茄早疫病菌有较强抑制作用的菌株, 初步鉴定为腐生链霉菌^[7]。为提高其产素水平, 为工业发酵生产提供依据, 本研究采用生长速率法对不同培养基和发酵条件下 10-4 菌株发酵液的抑菌活性进行测定, 旨在筛选适宜的培养基和优化其适宜的发酵条件, 以期对农用活性物质的开发和分离提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

收稿日期: 2016-03-16

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31260005)。

作者简介: 何建清 (1971—), 女, 四川南充人, 硕士, 教授, 主要从事放线菌资源及生物防治研究。Tel: (0894) 5831835; E-mail: hejianqingxz@163.com。

1.1.1 试验菌 菌株 10-4, 分离自西藏色季拉山亚高山草甸土壤中。

1.1.2 指示菌 番茄早疫病菌, 由西藏大学农牧学院真菌实验室提供。

1.1.3 培养基配方 种子培养液: 3 g 蛋白胨, 2.5 g 葡萄糖, 2 g CaCO_3 , 1 000 mL 1% 大豆饼粉浸汁, pH 值为 7.2。发酵培养液: 选用 12 种发酵培养基 (表 1)^[8-9], 各培养基 pH 值均为 7.2, 所有培养基均在 121 ℃、0.1 MPa 条件下灭菌 30 min 后备用。

1.2 试验方法

1.2.1 初始发酵培养液基筛选 将菌株 10-4 活化, 用打孔器打成直径为 5 mm 的菌块, 在 250 mL 三角瓶中接入 50 mL 种子培养液, 再将菌块放入三角瓶中, 于 28 ℃、160 r/min 培养 4 d, 获得种子液。在 250 mL 三角瓶中分别装入 50 mL 12 种发酵培养基, 按 1% 的体积分数接入种子液, 28 ℃、160 r/min 振荡培养 4 d 后, 培养滤液 10 000 r/min 离心 25 min, 上清液用直径为 0.45 μm 的无菌过滤膜过滤, 将滤液与 PDA 培养基按体积比 1:9 制成平板, 接入直径为 5 mm 预先活化的指示菌块, 以不加发酵液的 PDA 为对照培养基, 设 3 次重复。28 ℃下培养 4 d, 测量菌落直径, 计算抑菌率, 评价代谢物的活性。根据菌丝生长抑制率确定最佳发酵培养液。菌丝生长抑制率 = (对照菌落直径 - 处理菌落直径) / 对照菌落直径 × 100%。

1.2.2 培养温度对发酵液抑菌活性的影响 在 250 mL 三角瓶中先接入 50 mL “1.2.1” 节中筛选出的发酵培养液, 再接入 1% 种子液, 设 24、26、28、30、32、34 ℃ 等 6 个温度水平, 160 r/min 振荡培养 4 d。按 “1.2.1” 节中的方法确定最佳的培养温度。

1.2.3 种子液种龄对发酵液抑菌活性的影响 将 “1.2.1” 节中筛选出的培养基以 1% 的量分别接入种龄为 24、28、32、36、40、44、48、52、56、60 h 的种子液, 28 ℃、160 r/min 振荡培养 3 d, 按 “1.2.1” 节中的方法确定最佳的接种菌龄。

表 1 菌株 10-4 的发酵培养基配方

培养基编号	培养基组分(g/100 mL)
1	2.0 g 葡萄糖,2.5 g 大豆粉,0.4 g 酵母膏,1.0 g 淀粉,0.2 g NaCl
2	4.000 g 葡萄糖,4.500 g 大豆粉,0.400 g 酵母膏,0.100 g 牛肉膏,0.100 g NaCl,0.005 g Na ₂ HPO ₄ ,0.300 g (NH ₄) ₂ SO ₄
3	2.000 g 葡萄糖,2.500 g 大豆粉,0.400 g 酵母膏,1.000 g 淀粉,0.100 g 牛肉膏,0.200 g NaCl,0.005 g K ₂ HPO ₄
4	2.00 g 葡萄糖,1.50 g 大豆粉,0.30 g 酵母膏,2.00 g 淀粉,0.20 g NaCl,0.020 g K ₂ HPO ₄ ,0.50 g CaCO ₃
5	2.00 g 葡萄糖,2.00 g 大豆粉,0.10 g 酵母膏,1.00 g 淀粉,3.00 g 玉米粉,0.20 g NaCl,0.20 g (NH ₄) ₂ SO ₄ ,0.02 g K ₂ HPO ₄ ,0.03 g MgSO ₄ ,0.60 g CaCO ₃
6	3.00 g 葡萄糖,3.00 g 大豆粉,0.40 g 酵母膏,3.00 g 玉米粉,0.40 g (NH ₄) ₂ SO ₄ ,0.04 g MgSO ₄
7	5.0 g 大豆粉,2.0 g 淀粉,2.0 g 玉米粉,1.5 g NaCl
8	2.0 g 大豆粉,5.0 g 淀粉,0.2 g NaCl,0.1 g K ₂ HPO ₄ ,0.5 g CaCO ₃
9	2.000 g 可溶性淀粉,0.001 g FeSO ₄ ,0.050 g NaCl,0.050 g K ₂ HPO ₄ ,0.050 g MgSO ₄ ,0.100 g KNO ₃
10	0.25 g 葡萄糖,0.10 g 大豆粉,0.30 g 蛋白胨,0.20 g CaCO ₃
11	2.00 g 花生粉,5.00 g 玉米粉,0.25 g 蛋白胨,0.05 g FeSO ₄ ,0.05 g MgSO ₄ ,0.07 g CaCO ₃
12	2.0 g 葡萄糖,20.0 g 马铃薯

注:蒸馏水 100 mL。

1.2.4 初始 pH 值对发酵液抑菌活性的影响 将“1.2.1”节中筛选出的培养基用 HCl、NaOH 分别调节 pH 值为 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12,高压灭菌,接入 1 % 种子液,在 28 ℃、160 r/min 条件下培养 3 d,用生长速率法测定发酵液的抑菌作用。

1.2.5 接种量对发酵液抑菌活性的影响 将 50 mL 发酵液装于 250 mL 的三角瓶中,将培养 36 h 的种子液以 1%、3%、5%、7%、10%、15%、20% 的量(体积分数)分别接入发酵瓶中,培养 3 d 并进行效价的生物测定。

1.2.6 发酵条件的正交试验 在以上试验结果的基础上,选取发酵温度、装液量、发酵时间为主要发酵条件,设计 3 因素 3 水平的正交试验,结果如表 2 所示。按不同的发酵条件发酵培养后,测定发酵液抑菌率的大小。

表 2 菌株 10-4 发酵条件正交试验因素与水平

水平	因素		
	A:发酵温度(℃)	B:发酵时间(h)	C:装液量(mL)
1	28	72	60
2	30	96	80
3	32	120	100

注:装液瓶为 250 mL。

2 结果与分析

2.1 发酵培养基的筛选

由图 1 可知,10-4 菌株在 1 号培养基中发酵的滤液不能抑制番茄早疫病病原菌的生长;在其余 11 种发酵培养基中发酵,菌株 10-4 均能产生抑制番茄早疫病病原菌的抗生素,其中 9 号培养基的抑菌率较高,达 90.2%,因此,选择 9 号培养基进行后续试验。

2.2 培养温度对 10-4 菌株发酵液抑菌活性的影响

在发酵过程中,菌体生长和产物的形成是在众多酶的催化下进行的,适宜的温度是保证酶活性的基本条件,也是使产物高产的保证。由图 2 可知,温度对 10-4 菌株发酵液抑菌活性的影响较大,28~34 ℃有利于 10-4 菌株产生抑菌物质。

2.3 种子液种龄对 10-4 菌株发酵液抑菌活性的影响

将种子液按不同种龄以 1% 的量接入摇瓶发酵培养基

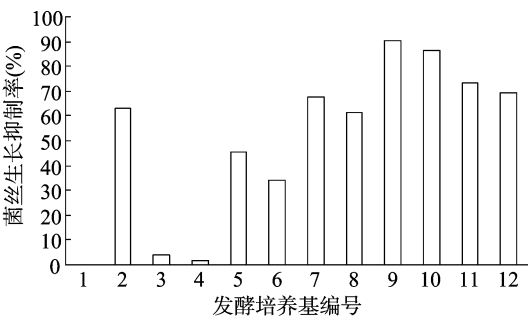


图1 不同发酵培养基对 10-4 菌株发酵液抑菌活性的影响

中,于 28 ℃、160 r/min 下振荡培养 3 d,测定其抑菌率。由图 3 可知,种子液种龄的最佳时间为 32 h,此时菌体处于生命力旺盛的对数生长期。种龄太短,菌体量太少,会使发酵周期延长;种龄太长,菌体衰老,产素率降低,菌体较早自溶,影响抗生素的提取。

2.4 初始 pH 值对 10-4 菌株发酵液抑菌活性的影响

将 9 号培养基分别调节 pH 值为 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12,高压灭菌,按 1% 的量接 10-4 菌株的种子液于发酵瓶,在 28 ℃、160 r/min 条件下培养 3 d,用生长速率法测定抑菌作用。由图 4 可知,发酵液的初始 pH 值对 10-4 菌株发酵液的抑菌活性影响较大,pH 值为 8 时,抑菌活性达到最高点,pH 值低于 6 或高于 9 都不利于 10-4 菌株生产抗生素。说明弱碱性有利于产物活性的提高。

2.5 接种量对 10-4 菌株发酵液抑菌活性的影响

由图 5 可知,最适的种子液接种量为 5%,此时 10-4 菌株发酵液的抑菌活性最高。

2.6 发酵条件的正交试验

在以上试验结果的基础上,选取发酵温度、装液量、发酵时间为主要发酵条件,设计 3 因素 3 水平的正交试验,按不同的发酵条件发酵培养后测定抑菌率。由表 3 可知,发酵条件的最优组合为 A₁B₁C₁,即发酵温度为 28 ℃,发酵时间为 72 h,装液量为 60 mL,此时 10-4 菌株生产抑菌活性物质的效率最高,生防放线菌 10-4 菌株的发酵培养液可有效抑制番茄早疫病病原菌,抑制率高达 96.2%。对正交试验的结果进行极差分析可知,各因素对 10-4 菌株生产抑菌活性物质的影响表现为发酵温度 > 装液量 > 发酵时间。

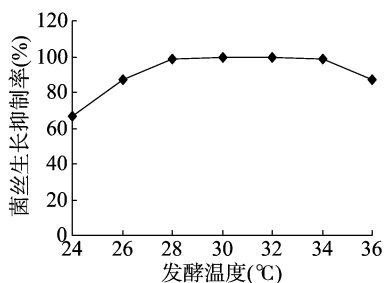


图2 不同发酵温度对 10-4 菌株发酵液抑菌活性的影响

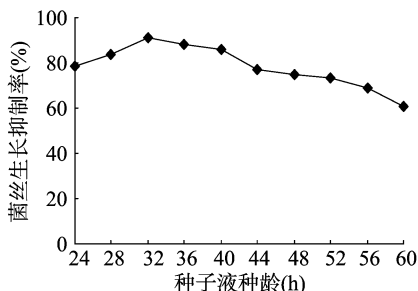


图3 不同种子液种龄对 10-4 菌株发酵液抑菌活性的影响

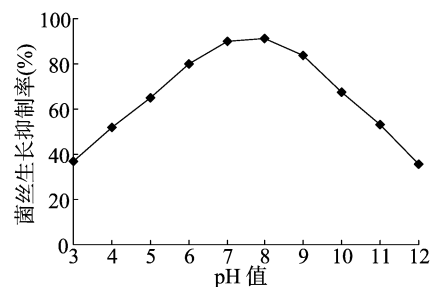


图4 初始 pH 值对 10-4 菌株发酵液抑菌活性的影响

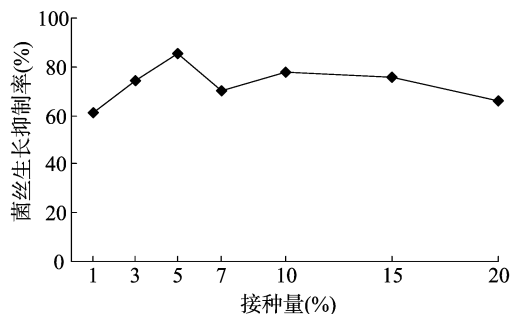


图5 不同接种量对 10-4 菌株发酵液抑菌活性的影响

表 3 菌株 10-4 发酵条件正交试验结果

编号	A:发酵温度(°C)	B:发酵时间(h)	C:装液量(mL)	平均抑菌率(%)
1	28	72	60	96.2
2	28	96	80	93.6
3	28	120	100	90.4
4	30	72	80	87.6
5	30	96	100	89.3
6	30	120	60	89.3
7	32	72	100	90.4
8	32	96	80	89.3
9	32	120	60	93.2
k_1	93.4	91.4	92.9	
k_2	88.7	90.7	90.2	
k_3	91.0	91.0	90.0	
R	4.7	0.7	2.9	
主次顺序 A > C > B				
最优水平 A ₁ B ₁ C ₁				

3 结论

从不同培养基对 10-4 菌株发酵液的生物活性来看, 10-4 菌株的最佳初始发酵培养基为 9 号培养基, 即 2.000 g 可溶性淀粉、0.001 g FeSO_4 、0.050 g NaCl 、0.050 g K_2HPO_4 、0.050 g MgSO_4 、0.100 g KNO_3 、蒸馏水 100 mL。10-4 菌株发酵液发酵过程的优化条件: 温度为 28~34 °C, 种龄为 32 h, 初始 pH 值为 8, 接种量为 5%。正交试验结果表明, 发酵条件的最优组合为 A₁B₁C₁, 即发酵温度为 28 °C, 发酵时间为 72 h, 装液量为 60 mL, 此时 10-4 菌株生产抑菌活性物质的效率最高, 生防放线菌 10-4 菌株的发酵培养液可有效抑制番茄早疫病病原菌, 抑制率高达 96.2%。由正交试验极差分析结果可知, 各因素对 10-4 菌株生产抑菌活性物质的影响

表现为发酵温度 > 装液量 > 发酵时间。

发酵是抗生素产业化的基础, 这是因为尽管生防菌产抗生素的性能优良, 但若缺乏合理的发酵工艺, 也不能将其潜力充分发挥。抗生素发酵除受营养因素的限制以外, 合适的发酵条件也是不可忽视的重要因素。目前, 就抗生素制备的农药数量、质量和品种而言, 还远远不能满足农业生产发展的需求。因此, 如何提高抗生素发酵的产量已成为近年来相关学者研究的热点^[10]。为了提高放线菌 10-4 菌株的抑菌活性, 本试验通过单因素试验和正交试验方法, 对其摇床发酵培养基及发酵条件进行研究。结果表明, 放线菌 10-4 菌株在初始 pH 值为 8 的 9 号培养液中, 28 °C 下持续振荡培养 32 h, 其抑菌物质的活性最高。

此外, 由于 10-4 菌株发酵液中活性物质的成分是未知的, 本试验采用生物活性测定作为指示方法, 但生物活性测定误差较大, 所以后续的研究中应在明确活性物质的种类后, 以活性物质的量为指标, 筛选出更佳的培养液配方和发酵工艺条件, 以便进一步开发利用 10-4 菌株。

参考文献:

- [1] 陈羽, 张顺琦, 陈夕军, 等. 番茄早疫病生防细菌 B731 的分离、鉴定及抑菌防病作用[J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(3): 361-368.
- [2] 曲一凡, 张琪, 浦冠勤. 番茄早疫病菌生物学特性及综防技术[J]. 长江蔬菜, 2010(23): 37-38.
- [3] Abdussamee H, Hussain M, Ali M, et al. Genetic response of tomato germplasm against early blight and its management through fungicides[J]. Applied Science Reports, 2014, 2(3): 119-127.
- [4] 刘琴, 刘翼, 何月秋, 等. 我国植物病害生物防治综述[J]. 安徽农学通报, 2012, 18(7): 67-69.
- [5] 胡青平. 番茄早疫病菌(*Alternaria solani*)广谱拮抗微生物的选育及拮抗机理研究[D]. 西安: 西北大学, 2008.
- [6] 董艳, 陈永福, 张和平. 番茄早疫病微生物防治研究进展[J]. 中国农学通报, 2015, 31(17): 111-115.
- [7] 何建清, 张格杰, 岳海梅, 等. 番茄早疫病菌拮抗放线菌 10-4 的鉴定[J]. 植物保护学报, 2010, 37(4): 307-312.
- [8] 孟庆芳, 张汀, 杨文香, 等. 拮抗链霉菌 S23 发酵条件的研究[J]. 中国生物防治学报, 2002, 18(2): 79-82.
- [9] 韩斯琴, 徐梅, 白震, 等. 番茄灰霉病菌拮抗菌 D2-4 发酵条件的研究[J]. 东北农业大学学报, 2004, 35(1): 93-98.
- [10] 魏松红, 付丹妮, 逢若霖, 等. 除草活性放线菌 DN5 发酵条件及发酵产物理化性质的研究[J]. 中国生物防治学报, 2011, 27(2): 246-253.