

生防放线菌 153 固态发酵条件的优化 及其耐热力检测

田晓丽,赵红杰,唐彩乐,宗兆锋

(西北农林科技大学 植物保护学院,陕西省农业分子生物学重点实验室,陕西 杨凌 712100)

[摘要] 【目的】探讨生防放线菌 153 的固态发酵条件,并考察其耐热力,为生防放线菌的大规模生产及活体菌剂的研制提供技术支持。【方法】将发酵物的含菌量作为筛选指标,以玉米粉、甘油、蔗糖、葡萄糖和可溶性淀粉为碳源,以小米粉、蛋白胨、酵母浸粉、黄豆粉和尿素为氮源,通过单因素试验获得适宜的碳、氮源,再采用 $L_{25}(5^6)$ 正交设计优化固体培养基配方,在此基础上确定固态发酵终点以及所需的接种量和种子液种龄。最后将壳聚糖、非耕作层黄土、高岭土、炉渣、碳酸钙、面粉和几丁质分别与生防放线菌 153 菌粉混合,55℃水浴至致死中时,测定生防放线菌 153 的耐热力,筛选适宜的载体。【结果】生防放线菌 153 固体培养基配方为:80 mg/g 麦麸、8 mg/g 玉米粉、10 mg/g 小米粉和 2 mg/g 蛋白胨,初始含水量(含 0.5 g/L 石灰的自来水)为 60%,在此条件下培养,培养物的含菌量较对照增加了 94.1%。生防放线菌 153 固态发酵培养终点为 216 h,接种量为 20%(每 100 g 固态培养基接种 20 mL 种子液),种子液种龄为 84 h。生防菌 153 的适宜载体为壳聚糖和非耕作层黄土。【结论】确定了生防放线菌 153 的固态发酵条件,该条件可以促进生防菌 153 的生长产孢,并提高菌株的保存稳定性;确定了筛选生放菌 153 载体的方法,即 55℃条件下水浴处理 136 min。

[关键词] 生防放线菌;正交设计;固体发酵培养基;耐热力;活体菌剂

[中图分类号] S476⁺.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2010)07-0181-06

Optimization of the fermentation of solid state medium for biocontrol actinomycetes 153 and its heat tolerance ability

TIAN Xiao-li, ZHAO Hong-jie, TANG Cai-le, ZONG Zhao-feng

(College of Plant Protection and Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture,
Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】The research was to investigate the best condition for solid-state fermentations of biocontrol actinomycetes 153 and its heat tolerance ability. 【Method】With corn meal, glycerol, sucrose, D-glucose and starch soluble as the carbon sources, with peptone, mille, yeast extract power, soybean flour and urea as nitrogen sources, appropriate carbon and nitrogen sources were obtained in the single factor experiment. Based on the sporulation quantity of SSF product and the single factor experiment, the medium was optimized by $L_{25}(5^6)$ orthogonal design. On this basis, the solid-state fermentation was optimized. Chitosan, non-cultivated loess, kaolin, furnace slag, calcium carbonate, flour and chitin were mixed with biocontrol actinomycetes 153 bacteria powder respectively. The heat tolerance ability and carriers of 153 strain were determined at 55℃. 【Result】The optimum solid state medium of biocontrol actinomycetes 153 was determined as follows: wheat bran 80 mg/g, mille 8 mg/g, corn meal 10 mg/g, peptone 2 mg/g and ini-

* [收稿日期] 2010-01-11

[基金项目] 教育部创新团队发展计划项目(200658);国家高等学校学科创新引智计划项目(B07049);西北农林科技大学创新团队项目

[作者简介] 田晓丽(1984—),女,山东潍坊人,在读硕士,主要从事植物病害生物防治研究。E-mail:lyacxiali@163.com

[通信作者] 宗兆锋(1956—),男,陕西泾阳人,教授,硕士生导师,主要从事植物病害生物防治研究。E-mail:zfzong@nwsuaf.edu.cn

tial moisture content 60% adjusted by water with 0.5 g/L lime. The spore content was 94.1% higher than that of the control under these conditions. The optimal fermentation effect was inoculating seed culture fluid of 20% seed volume and 84 h seed age duration, and cultivating it for 216 h. At 55 ℃, 136 min heat treatment was the standard of 153 thermal resistance; chitosan and Non-cultivated loess were the carriers of 153 strain. 【Conclusion】 The fermentation conditions for bio-control actinomycetes 153 solid-state were determined, which can not only greatly promote the 153 growths and reproduction, but also increase its storage stability. The conditions were good to its further development and application; At 55 ℃, 136 min heat tolerance ability can embody carriers' protection of 153 long-term storage, which was useful in screening large amount of carriers.

Key words: Biocontrol actinomycete; orthogonal design; solid state fermentation medium; heat tolerance ability; BCA

生防放线菌 153 抑菌谱广、适应性强,对梨状毛霉(*Mucor piriiformis*)、粉红聚端孢(*Trichothecium roseum*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)等多种病原菌有显著的持续抑制作用,且可在多种寄主的根、茎、果实等部位定殖^[1-2]。将放线菌制成活体菌剂用于生物防治具有作用持久、环保安全、可维护生物多样性等独特优势,是今后生防领域的研究热点和发展趋势^[3]。然而国内外对放线菌活体菌剂的研究报道较少^[4],菌株的培养方式和有效载体的筛选是制约活体菌剂发展的重要因素^[3-4]。为了进一步开发利用生防放线菌 153,本研究以发酵物含菌量为筛选指标,采用正交设计优化其固态培养基配方,并考察了菌株的耐热力,以期放线菌活体菌剂的研制提供理论依据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

生防放线菌 153,由西北农林科技大学植物保护学院植物病害生物防治实验室提供。

表 1 固态培养基正交试验的因素和水平

Table 1 Factors and levels of the solid state medium orthogonal design

水平 Level	因素 Factor					
	A	B	C	D	E	F
	玉米粉/(mg·g ⁻¹) Corn meal	蛋白胨和小米粉/ (mg·g ⁻¹) Peptone& Mille	交互项 Interaction item	石灰/(g·L ⁻¹) Lime	初始含水量/% Initial moisture content	误差项 Error term
1	60	20+100	1	0.500	50	1
2	80	40+150	2	0.250	60	2
3	100	60+200	3	0.125	70	3
4	120	80+250	4	0.063	80	4
5	140	100+300	5	0.031	90	5

注:用含石灰的自来水调节固态培养基 pH 值。
Note: The water contained lime was used to adjust pH of solid state medium

1.3.2 生防放线菌 153 固态发酵条件的优化 (1) 发酵终点的确定。将摇床培养 3 d 的种子液以 20% (每 100 g 固态培养基接种 20 mL 种子液)的接种量接种于优化固态培养基上,并分装于器皿中,设 3 次

重复,28 ℃静置培养,每 24 h 取样 1 次,培养 9 d 后取出发酵产物,自然风干,粉碎成菌粉,测定含菌量;同时,称取一定质量的发酵物,于 105 ℃烘干至恒质量,测定含水量,确定发酵终点。(2)种子液接种量的确定。取培养 3 d 的种子液,以 5%,10%,15%,20%,25%和 30%的接种量接种于固体培养基上,培养 9 d 后测定固态发酵物的含菌量。(3)种子液种龄的确定。分别取摇床培养 60,72,84,96,108 和 120 h 种龄的种子液,以 20%的接种量接种于固体培养基上,培养 9 d 后测定固态发酵物的含菌量。

1.3.3 生防放线菌 153 耐热力的测定及载体筛选

将固态发酵菌粉和种子液干燥物于 55 ℃水浴,每隔 20 min 取样 1 次,测定含菌量,确定存活率为 50%的时间(致死中时)。以壳聚糖、高岭土、几丁质、炉渣、碳酸钙、面粉和非耕作层黄土 7 种材料为载体,将其与菌粉按质量比 1:1 混合,55 ℃水浴至致死中时,以不加载体的菌粉为对照,测定含菌量,比较各处理的耐热力(耐热力用经致死中时热处理后的菌体存活率表示^[6-7])。将筛选出的载体与菌粉等量混合,测定常温贮存 120 d 的菌体存活率。

表 2 不同碳、氮源对生防放线菌 153 含菌量的影响

Table 2 Effect of carbon and nitrogen sources on growth yield of strain 153

碳源 Carbon source	lg CFU	氮源 Nitrogen source	lg CFU
玉米粉 Corn meal	8.252 Aa	小米粉 Mille	8.225 Aa
甘油 Glycerol	8.150 Bc	蛋白胨 Peptone	8.183 Bb
蔗糖 Sucrose	8.138 Cc	酵母浸粉 Yeast extract power	8.126 Cc
葡萄糖 D-Glucose	8.137 Cc	黄豆粉 Soybean flour	8.116 Ccd
可溶性淀粉 Starch soluble	8.118 Dd	尿素 Urea	8.039 De
对照 CK	8.117 Dd	对照 CK	8.108 Cd

注:同列数据后标不同大写字母表示在 0.01 水平上差异显著,标不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。下表同。

Note:Table entries followed by the different capital letters in column indicate very significant difference($P<0.01$),the different lower letters in the column indicate significant difference ($P<0.05$). The same with the below.

由表 3 可知,各因素对生防菌 153 发酵产物含菌量影响的大小顺序依次为:A>E>D>B>C;A、E 在测定的范围内对菌株 153 的固态培养效果影响显著,表明培养基中的碳源和初始含水量主导着菌

1.3.4 含菌量的测定

菌株 153 固体发酵培养基的优化、菌株生长曲线、耐热力和常温贮存期含菌量均采用稀释平板法^[8]测定,含菌量用 lg CFU 表示。

1.4 数据处理

数据采用 DPS 8.01 分析;用 EXCEL2003 制图。

2 结果与分析

2.1 生防放线菌 153 固态发酵培养基的优化

由表 2 可见,在碳源中,玉米粉对菌株 153 固态培养的促进作用最好,其含菌量较对照增加了 1.6%,极显著高于其他处理;添加碳源处理的效果均比对照好,这说明纯麦麸的营养远远不能满足菌株的生长。在氮源中,添加小米粉的培养基对菌株 153 的培养效果最好,其含菌量极显著高于其他氮源处理;添加尿素后,菌株 153 生长被抑制,培养的菌丝较稀疏。综合分析认为,玉米粉和小米粉对菌株 153 固态培养的促进作用最为突出,由于它们都是农产品,在提供足够的碳、氮源的同时,还能补充其他营养物质,如氨基酸、胡萝卜素、脂肪等,这些物质可能调节了菌株的生理活动,刺激了菌株的生长。

株 153 在固态条件下的生长产孢能力。几个组合中,以 A2B1D1E2 和 A2B2D1E2 组合最优。对 2 个最优组合进行验证试验,所得结果见表 4。

表 3 生防放线菌 153 固态培养基的正交优化试验结果

Table 3 Results of orthogonal test of solid state medium

因素 Factor	各水平发酵物的 lg CFU Amount of bacteria					极差 Rang
	1	2	3	4	5	
A	8.400	8.426	8.357	8.341	8.300	0.126 *
B	8.379	8.393	8.350	8.351	8.353	0.043
C	8.379	8.373	8.340	8.374	8.359	0.039
D	8.408	8.361	8.323	8.364	8.369	0.085
E	8.364	8.410	8.342	8.398	8.311	0.099 *
F	8.349	8.375	8.382	8.359	8.358	0.033

注:“*”表示该因素对正交试验结果影响显著。

Note:“*”Represent significant differences of results orthogonal test.

由表 4 可见,两最优组合间无显著差异,但从节约成本方面考虑,确定生防菌 153 的最优固态发酵培养基为 A2B1D1E2,即 80 mg/g 麦麸,8 mg/g 玉

米粉,10 mg/g 小米粉和 2 mg/g 蛋白胨,初始含水量(含 0.5 g/L 石灰的自来水)为 60%。在此条件下培养,发酵产物的含菌量较对照增加了 94.1%。

表 4 固态培养基优化验证试验结果
Table 4 Verification test of optimal medium

处理 Treatment	含菌量/($\times 10^8 \cdot \text{g}^{-1}$) Amount of bacteria	lg CFU	标准差 Standard deviation	95%置信区间 Confidence interval
A2B1D1E2	6.6	8.817 Aa	0.009	8.802~8.831
A2B2D1E2	6.6	8.819 Aa	0.010	8.803~8.834
对照 CK	3.4	8.536 Bb	0.011	8.518~8.553

2.2 生防放线菌 153 固体发酵条件的优化

2.2.1 发酵终点的确定 由图 1 可以看出,生防放线菌 153 需要 48 h 左右的适应期以调节自身的存在状态,在培养 96 h 后进入对数生长期,在 216 h 时发酵物含菌量达到最大,因而确定生防放线菌 153 的发酵终点为 216 h。含水量 48%~35%的时期是

固态发酵的对数增长期,即菌丝生长活跃的阶段,说明合适的含水量有利于菌丝在基质内外的扩展;含水量小于 35%的阶段是孢子大量产生的时期,即较干燥的环境宜于孢子的繁殖。这和吴振强等^[9]的结论类似。

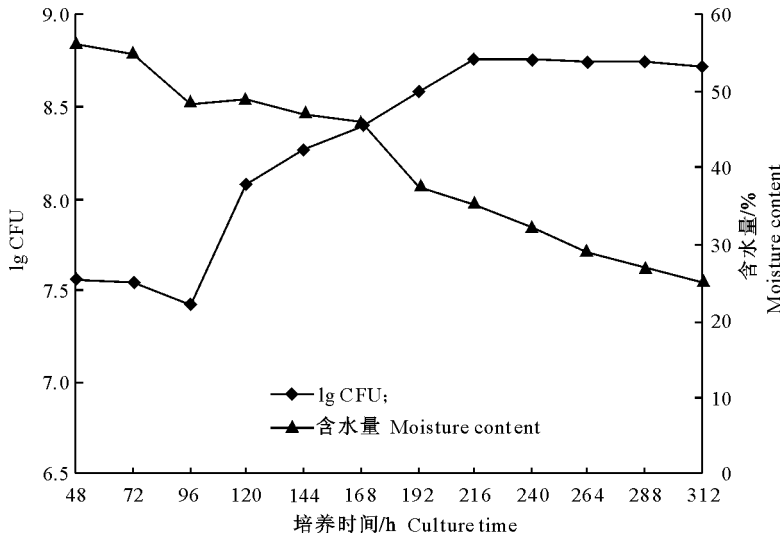


图 1 放线菌 153 固态发酵的生长曲线

Fig. 1 Growth curves of 153 solid state fermentation

2.2.2 种子液接种量及种龄的确定 确定种子液接种量及种龄的研究结果见表 5。

表 5 种子液接种量及种龄对放线菌 153 固态发酵的影响
Table 5 Effect of the inoculation amount and age for seed liquid on SSF

接种量/% Inoculation amount	lg CFU Amount of bacteria	种龄/h Seed age	lg CFU Amount of bacteria
5	8.025	60	8.053
10	8.385	72	8.146
15	8.608	84	8.316
20	8.689	96	8.248
25	8.581	108	8.204
30	7.943	120	8.090

表 5 表明,种子液可在短时间内提供大量接种体,能够促进菌株的固态发酵;20%的接种量最适合

于生防放线菌 153 的固态发酵,接种量过低或过高均不利于固体培养,接种量为 5%和 10%时,生防放线菌 153 在固体基质上生长缓慢,不能深入基质内部,容易被杂菌污染,而接种量高于 20%时,基质水分过多,严重阻碍了菌株的生长;培养 84 h 的种子液接种效果最好,发酵物含菌量最大,这和姚伟芳等^[10]的结论一致,说明此阶段的菌体生命力旺盛,能迅速适应基质的固态环境。

2.3 放线菌 153 耐热力的确定

2.3.1 致死中时间的确定 从图 2 可以看出,在 55℃条件下,固体发酵菌粉的含菌量在 30 min 后急剧下降,60 min 后迅速增加,100 min 时达到最大值,之后逐渐降低。这可能是由于随着加热时间的延长,含水量逐渐降低,菌粉孢子在高温和湿度相互

作用下有一个适应过程,100 min 后,温度对菌体产生损害作用,含菌量逐渐减少;种子液干燥物对高温十分敏感,在处理期间菌量出现了多次波动,这说明经固态发酵的 153 菌体对高温有较强的适应性。对固体发酵菌粉在 120 min 后的耐热力进行回归分析,可得到发酵物含菌量(y)与热处理时间(x)间的模拟方程为: $y=0.000\ 2x^2-0.078\ 7x+14.911$ ($r=0.999^{**}$),进而可求得在 55 ℃ 条件下,菌株 153 的致死中时间为 136 min。

2.3.2 载体对生防放线菌 153 耐热力和贮存存活

率的影响 表 6 表明,载体对生防放线菌 153 的耐热力和贮存稳定性有明显的影 响。经 55 ℃ 热处理 136 min 后,壳聚糖对放线菌 153 孢子的保护作用最好,菌株耐热力显著高于非耕作层黄土,极显著高于其他载体和对照;经 120 d 贮存后发酵物菌体存活率较对照下降了 25.5%;非耕作层黄土的耐热力也显著高于不加任何载体的菌粉;面粉、高岭土、炉渣、碳酸钙和几丁质等载体加剧了孢子的衰亡,导致菌株耐热力的下降。因此,壳聚糖和非耕作层黄土可作为放线菌 153 的载体。

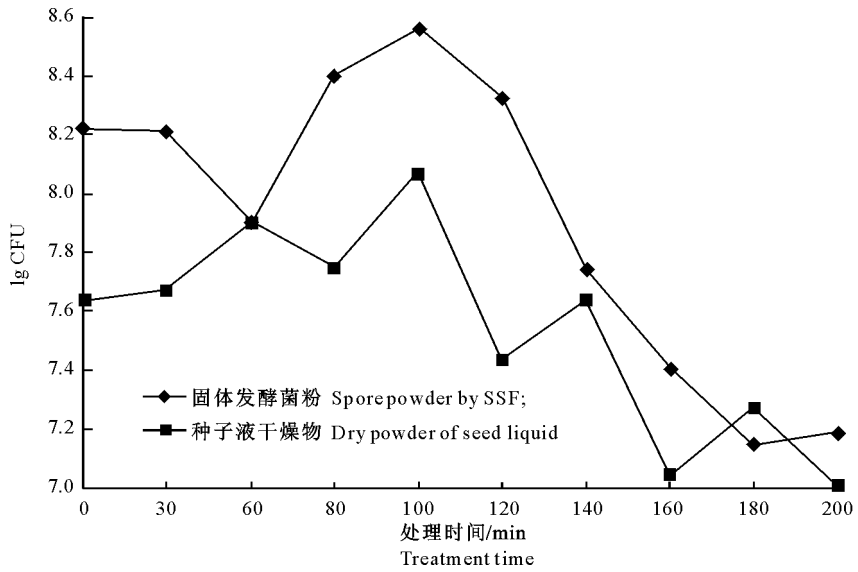


图 2 生防线菌 153 耐热力的测定

Fig. 2 Determination of 153 heat tolerance at 55 °C

贮存存活率检测结果表明,各处理经长期贮存后的存活率与 55 ℃ 的耐热力有关,两者之间存在显

著的正相关性($r=0.908$)。这说明菌株的耐热力可间接体现出载体在较长时期内对菌株的保护作用。

表 6 不同载体对生防菌 153 耐热力和贮存存活率的影响

Table 6 Effects of different carriers on 153 heat tolerant ability and storage survival rate			%		
处理 Treatment	耐热力 Heat tolerance ability	贮存存活率 Survival rate	处理 Treatment	耐热力 Heat tolerance ability	贮存存活率 Survival rate
壳聚糖 Chitosan	74.548 Aa	44.924 Aa	高岭土 Kaolin	38.243 Dd	32.962 Cd
非耕作层黄土 Non-cultivated loess	60.724 Bb	41.307 ABb	炉渣 Furnace slag	37.468 Dd	30.042 CDd
菌粉(CK) Spore powder by SSF(CK)	48.966 Cc	39.777 Bbc	碳酸钙 Calcium carbonate	28.941 Ee	25.730 De
面粉 Flour	46.770 Cc	37.691 Bc	几丁质 Chitin	26.486 Ee	16.690 Ef

3 结论与讨论

固态发酵是微生物常用的培养工艺,操作简便,产孢量大,培养物便于存储、运输和田间应用^[11-12]。合适的固态培养基是菌株高效发酵的基础,影响着生防菌的开发与利用。麦麸培养基通气性好、成本低廉^[13-14],但其保水能力差,营养单一,产孢量低。本研究在麦麸中添加适量的玉米粉和小米粉分别作

为碳源和氮源,优化了固态培养基,不仅极大地促进了菌株 153 的产孢量,而且改良了菌体的生理状态。

适宜的载体可有效地增加菌剂的稳定性,但载体的筛选是一项费时、费力的工作。本研究以菌株耐热力作为筛选菌剂载体的指标,利用该指标缩短了生防放线菌 153 载体的筛选周期,可作为研制菌剂的辅助手段,这为菌剂的大规模发酵生产提供了理论依据。

壳聚糖具有优良的生物降解性和生物亲和性,易成膜,产生的膜具有良好的黏着性、通透性和抗拉强度。本试验结果表明,壳聚糖能提高菌株 153 的贮存稳定性。将生防放线菌 153 开发成微胶囊剂、包囊剂,或将壳聚糖与其他多种载体共同使用是今后研究的重点。同时,对其他植物性材料载体,如玉米芯、麦麸和锯末等来源丰富的下脚料的筛选,还有待于进一步研究。

[参考文献]

[1] 韩立荣,顾 彪,宗兆锋,等. 5 株放线菌对 9 种靶标病原真菌的持续抑制作用 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2006,34(2):53-56.
Han L R,Gu B,Zong Z F,et al. Persistent inhibiting effects of five strains of actinomyces on nine strains of target pathogens [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition,2006,34(2):53-56. (in Chinese)

[2] 郭小芳,宗兆锋,杨洪俊. 6 种放线菌的抗药性标记和在植物体内定殖能力测定 [J]. 西北农业学报,2005,14(2):69-73.
Guo X F,Zong Z F,Yang H J. Resistance tag of 6 strains of actinomyces and their colonized ability in plants [J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2005, 14 (2): 69-73. (in Chinese)

[3] 朱昌雄,丁振华,蒋细良,等. 微生物农药剂型研究发展趋势 [J]. 现代化工,2003,23(3):4-8.
Zhu C X,Ding Z H,Jiang X L,et al. Research and development trends of microbial pesticide formulation [J]. Morden Chemical Industry,2003,23(3):4-8. (in Chinese)

[4] Sabaratnam S,Traquair J A. Formulation of a streptomyces biocontrol agent for the suppression of Rhizoctonia Damping-off in tomato transplants [J]. Biological Control,2002,23 (3): 245-253.

[5] 陈在佺,吴继星,张志刚,等. 我国苏云金杆菌液体深层发酵研究十年进展(1990 至 2000) [J]. 中国生物防治,2002,18(1): 33-35.
Cheng Z E,Wu J X,Zhang Z G,et al. The progresses on the studies of deep-fermentation of *Bacillus thuringiensis* for ten years in China [J]. Chinese Journal of Biological Control,2002,

18(1):33-35. (in Chinese)

[6] 王成树,王四宝,樊美珍,等. 球孢白僵菌菌株耐热力与贮藏稳定性的关系 [J]. 中国生物防治,1999,15(4):162-165.
Wang C S,Wang S B,Fan M Z,et al. Relationship between shelf-life and heat tolerance of the conidia of *Beauveria bassiana* [J]. Chinese Journal of Biological Control,1999,15(4): 162-165. (in Chinese)

[7] 李鸿文,冯明光. 球孢白僵菌不同菌株分生孢子的耐热能力 [J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版,2008,34 (2):158-162.
Li H W,Feng M G. Bioassay of conidial thermotolerance of *Beauveria bassiana* strains from different hosts and geographic origins [J]. Journal of Zhejiang University: Agri &. Life Sci, 2008,34 (2):158-162. (in Chinese)

[8] 方中达. 植病研究方法 [M]. 北京:中国农业出版社,1998:174-175.
Fang Z D. The method to study plant disease [M]. Beijing:China Agriculture Press, 1998:174-175. (in Chinese)

[9] 吴振强,彭景龙,李运南. 金龟子绿僵菌固态发酵环境变量优化研究 [J]. 农药,2004,43(3):123-126.
Wu Z Q,Peng J L,Li Y N. Study on optimizing environmental parameters for solid-state fermentation of *Metarhizium anisopliae* [J]. Chinese Journal of Pesticides,2004,43(3):123-126. (in Chinese)

[10] 姚伟芳,弓爱君,宋晓春. Bt 固态发酵条件的研究进展 [J]. 现代农药,2006,5(3):4-6.
Yao W F, Gong A J,Song X C. Review on solid state fermentation conditions of *Bacillus Thuringiensis* [J]. Modern Agrochemicals,2006,5(3):4-6. (in Chinese)

[11] Krishna C. Solid-state fermentation systems- an overview [J]. Critical Reviews in Biotechnology,2005, 25(1/2):1-30.

[12] Tunga R,Banerjee R,Bhattacharyya B C. Optimizing some factors affecting protease production under solid state fermentation [J]. Bioprocess Engineering,1998,19(3):187-190.

[13] Pandey A. Recent process developments in solid-state fermentation [J]. Process Biochemistry,1992,27(2):109-117.

[14] Laukevics J J,Apsite A F,Vieturs U E. Solid substrate fermentation of wheat straw to fungal protein [J]. Biotechnology and Bioengineering,1984,26(12):1465-1474.