

抗辣椒疫病枯草芽孢杆菌 BS18 液体发酵条件的研究

肖淑芹, 薛春生, 周雪, 曹远银

(沈阳农业大学 植物免疫室 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 初步探讨了抗辣椒疫病芽孢杆菌 BS18 的发酵条件, 通过培养条件优化及正交试验得出最佳培养基配方: 即牛肉膏+蛋白胨 3%, 麦芽糖 0.5%, NaCl 0.1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5%; 最佳培养条件为: 起始 pH 值 7.0~7.5、250 mL 三角瓶装液量 30 mL、接种量 0.5 mL、摇瓶速度 130 r/min、温度 30℃。在此条件下培养 BS18 菌株 48 h, 其无菌发酵液对辣椒疫霉菌抑菌圈直径达 2.85 cm。

关键词: 芽孢杆菌 BS18; 发酵条件; 抑制; 辣椒疫霉菌

中图分类号: S 436.418 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)12-0216-04

辣椒疫病是由 *Phytophthora capsici* 引起的一种毁灭性的土传病害。该病于 1918 年首次在美国发现, 现已在世界各地的辣椒种植区普遍发生。近年来, 我国许多省市均受到了辣椒疫病的严重危害, 成为我国辣椒生产的严重障碍^[1]。目前该病的防治主要依赖于化学药剂, 但由于该病发生多从根部侵染开始, 当植株地上部表现症状时再用化学防治往往达不到应有的效果^[2]。近年来的研究表明, 芽孢杆菌对许多植物病原微生物具有良好的防治作用^[3-4]。BS18 菌株是沈阳农业大学植物免疫实验室从辣椒根际土壤筛选得到的一株芽孢杆菌 (*Bacillus sp.*), 研究表明, BS18 菌株发酵液对辣椒炭疽病菌 (*Colletotrichum capsici*), 黄瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum f. sp. cucumerinum*), 黄瓜菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 和茄子黄萎病菌 (*Verticillium dahliae*) 等多种植物病原菌具有较好的抑制作用; 该菌株发酵液制成的菌剂用于温室盆栽试验和田间试验, 对辣椒疫病具有良好的防治效果 (试验结果将另文发表)。微生物发酵液对病原菌的抑制效果除取决于内在因素外, 还取决于外界条件, 包括营养物质的浓度和培养条件等, 为了获得 BS18 菌株最佳发酵条件, 对该菌的培养基配方和培养条件进行了优化选择。

1 材料和方法

1.1 菌种

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus sp.*) BS18 为实验室从辽宁丹东辣椒田根际土壤筛选获得, 辣椒疫霉菌 (*Phyto-*

phthora capsici) P-SM1 为实验室分离保存。

1.2 培养基

斜面培养基: 牛肉膏蛋白胨培养基 (%): 牛肉膏 0.3, 酵母膏 0.1, 蛋白胨 0.5, 葡萄糖 1, 琼脂粉 2, pH 7.0~7.2。种子培养基 (%): 牛肉膏蛋白胨培养基不加琼脂粉配成液体培养基。基础发酵培养基 (%): 牛肉膏 0.3, 蛋白胨 0.5, 葡萄糖 0.5, pH 7.0~7.2。分析培养基: 胡萝卜培养基 (CA)。

1.3 方法

1.3.1 菌种活化 将斜面保存的 BS18 菌株接一环到种子培养液中, 250 mL 三角瓶装液量 50 mL, $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$, 130 r/min 振荡培养 24 h (菌量约为 2.8×10^8 cfu/mL)。

1.3.2 培养基的优化 采用基础发酵培养基, 分别以不同的碳源 (蔗糖、麦芽糖、葡萄糖、乳糖、可溶性淀粉、甘油、木糖、玉米淀粉、玉米粉) 和氮源 (大豆粉、鱼粉、尿素、牛肉浸膏、蛋白胨、酵母浸粉、胰蛋白胨、 NH_4NO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4Cl 、 KNO_3 替代基础培养基中的碳氮源, 其他成分固定不变, 250 mL 三角瓶装液量 50 mL, 接种量 2%, 在温度 $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、摇瓶速度 130 r/min, 培养 48 h。在单因子试验基础上筛选确定优化培养基中碳源和氮源的种类, 采用 $L_9(3^4)$ 正交表, 4 因素 3 水平安排试验, 通过比较发酵液的抑菌活性来筛选碳源、氮源、NaCl 的用量。每处理 5 次重复。

1.3.3 培养条件的优化 采用 1.3.2 优化后的培养基分别检测起始不同培养时间、装液量、摇瓶速度、培养温度、pH 和接种量和对 BS18 菌株发酵液抑菌效果的影响, 每处理 3 次重复。

1.3.4 分析方法 采用孔碟法检测发酵液抑菌活性^[5]。

2 结果与分析

2.1 培养基的优化

2.1.1 氮源和碳源的筛选 碳源和氮源的筛选结果见

第一作者简介: 肖淑芹 (1971-), 女, 助理研究员, 在读博士, 主要从事蔬菜病害生物防治研究。E-mail: xshq@syau.edu.cn。

通讯作者: 曹远银。

基金项目: 辽宁省教育厅项目 (20060781)。

收稿日期: 2007-09-18

图 1、图 2。对常见的 9 种碳源:蔗糖、麦芽糖、葡萄糖、乳糖、可溶性淀粉、甘油、木糖、玉米淀粉、玉米粉, 与 CK (不加碳源)比较(图 1), 结果表明, 培养基中碳源种类不同, BS18 菌株发酵液对辣椒疫霉病菌抑制效果不同, 以麦芽糖作碳源, 发酵液抑菌效果最好, 抑菌带达到 1.44 ± 0.098 cm; 不加碳源的 CK 组发酵液抑菌活性最差, 抑菌带仅为 0.79 ± 0.114 cm。对常见 11 种氮源: 鱼粉、豆饼粉、蛋白胨、酵母膏、尿素、牛肉浸膏、胰蛋白胨、 NH_4NO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4Cl 、 KNO_3 (有机氮源浓度为 1%, 无机氮源浓度为 0.5%), 与 CK (不加氮源)作比较: 从图 2、3 可以看出, BS18 菌株可以利用的氮源种类较

广, 但培养基氮源种类对 BS18 菌株发酵液的抑菌效果亦有很大影响。在有机氮源中, 以利用牛肉浸膏的发酵液抑菌活性最好, 抑菌带为 1.47 ± 0.0985 cm; 无机氮源中, 以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮源, 发酵液的抑菌效果最好, 抑菌带为 1.29 ± 0.1026 cm。从图 2、3 中还发现, BS18 较易利用有机氮源, 在有机氮源中抑菌带在 1.2 cm 以上的有牛肉浸膏、蛋白胨、胰蛋白胨和豆饼粉, 而在无机氮源中, 只有硫酸铵抑菌带超过 1.2 cm。从经济角度比较, 最后发酵配方中氮源选用牛肉膏和胰蛋白胨同时补充一定量的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。

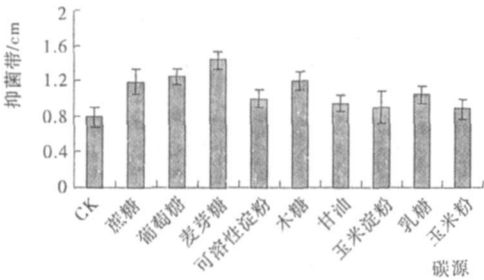


图 1 不同碳源对 BS18 产生抑菌活性的影响

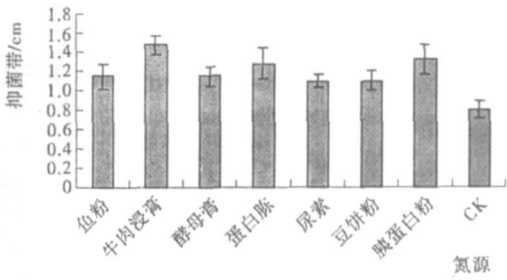


图 2 不同有机氮源对 BS18 抑菌活性的影响

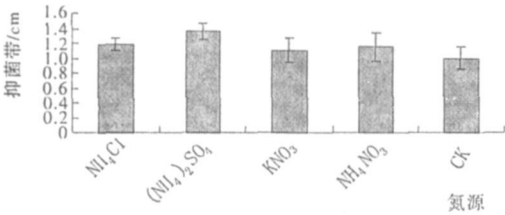


图 3 无机氮源对 BS18 抑菌活性的影响

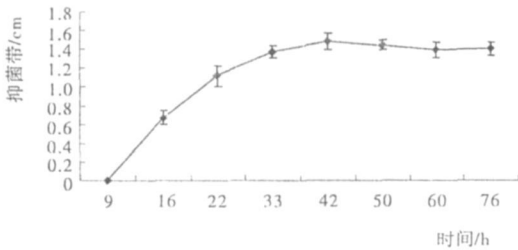


图 4 培养时间对发酵液抑菌活性的影响

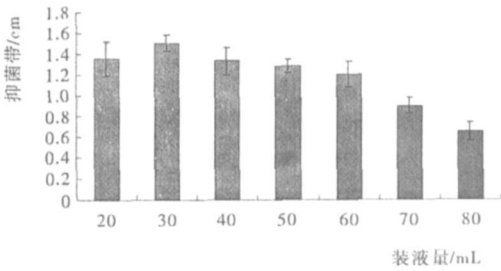


图 5 装液量对 BS18 产生抗菌物质的影响

2.2 培养条件

2.2.1 培养时间对 BS18 发酵液抑菌效果的影响 从图 4 中可以看出, 随着发酵时间的延长, 发酵液的抑菌活性增强, 发酵 9~42 h, 发酵液的活性呈上升趋势, 42 h 发酵液活性最强, 之后发酵液活性保持一个平稳的趋势。

2.2.2 装液量对 BS18 发酵液抑菌效果的影响 250 mL 三角瓶中分别装入 20、30、40、50、60、70 和 80 mL 培养液培养 BS18, 比较不同装液量对发酵液的抑菌效果的影响, 结果发现, 以 250 mL 三角瓶装入 30 mL 培养液, BS18 发酵液的抑菌活性最强。装液量过少或过大, 都不利于菌株的发酵。

表 1 培养基优化正交试验因素水平 %

水平	A 牛肉膏+蛋白胨	B NaCl	C 麦芽糖	D (NH ₄) ₂ SO ₄
1	0.5	0.1	0.3	0.1
2	1.0	0.3	0.5	0.3
3	3.0	0.5	1	0.5

2.2.3 摇瓶速度对发酵液抑菌效果的影响 将摇瓶转

速设为 110、130、150、170 和 200 r/min, 结果发现, 摇瓶速度 130 r/min 时, 发酵液的抑菌活性最强, 当摇瓶速度超过 170 r/min, 发酵液的抑菌活性显著下降, 说明通气量对 BS18 菌株的发酵抑菌效果有很大的影响(图 6), 这与 2.2.2 的分析结果是一致的。

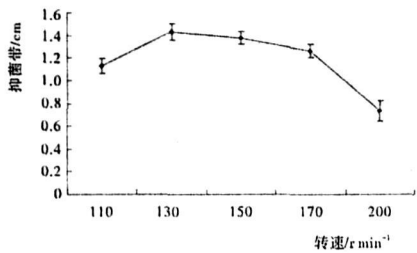


图 6 摇瓶速度对发酵液抑菌活性的影响

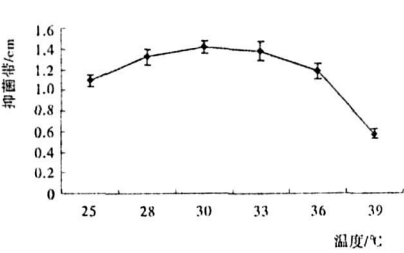


图 7 培养温度对发酵液抑菌活性的影响

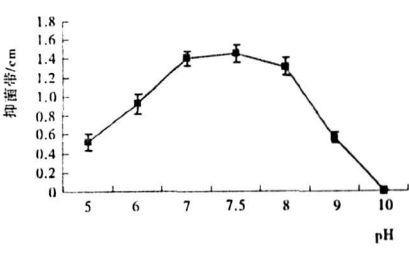


图 8 pH 对 BS18 产生抗菌物质的影响

表 2 培养基优化试验统计结果

处理号	A 牛肉膏+胰蛋白胨/%	B NaCl /%	C 麦芽糖 /%	D (NH ₄) ₂ SO ₄ /%	抑菌带 /cm
1	0.5	0.1	0.3	0.1	0.98
2	0.5	0.3	0.5	0.3	1.22
3	0.5	0.5	1	0.5	1.25
4	1.0	0.3	1	0.1	1.27
5	1.0	0.5	0.3	0.3	1.25
6	1.0	0.1	0.5	0.5	1.25
7	3.0	0.5	0.5	0.1	1.15
8	3.0	0.1	1	0.3	1.50
9	3.0	0.3	0.3	0.5	1.15
R	R ₁ =0.36	R ₂ =0.15	R ₃ =0.22	R ₄ =0.21	

注 R₁> R₃> R₄> R₂。

2.2.4 不同温度对发酵液抑菌活性的影响 温度对 BS-18 菌株的发酵液的抑菌活性有很大的影响(图 7)。在 28~36℃范围内, 发酵液的抑菌活性相差不大, 但在 30℃时菌株的发酵液抑菌活性最高。温度过高, 超过 39℃时发酵滤液的抑菌活性急剧下降, 说明温度过高或过低都不利于 BS18 菌株的发酵。

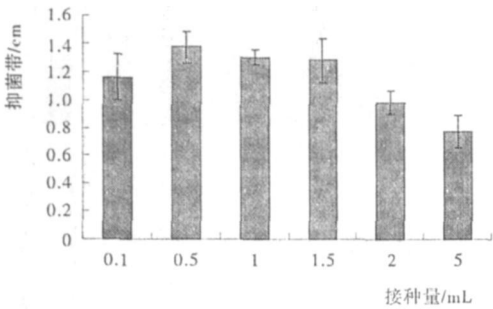


图 9 接种量对 BS18 产生抗菌物质的影响

2.2.5 初始 pH 值对发酵液抑菌活性的影响 用 NaOH 和 HCl 将培养基起始 pH 值分别调为 5.0、6.0、7.0、7.5、8.0、9.0、10.0(图 8)。结果表明, pH 为 6.0~

8.0 时 F53 菌株发酵液抑菌活性较高, pH 低于 6.0 或大于 9.0 时抑菌活性显著下降, 当 pH 为 10.0 时发酵液完全不能抑制病原菌的生长, 说明中性及弱碱性培养条件有利于 BS18 菌株发酵液对辣椒疫病病原菌的抑制作用。

2.2.6 不同接种量对拮抗细菌 BS-18 产量的影响 分别将 0.1、0.5、1、1.5、2.5 mL 的 BS18 菌株种子培养液接入发酵培养液中, 检测接种量对发酵液抑菌效果的影响(图 9)。结果表明, 接种量在 0.5 mL 时发酵液抑菌活性最高, 接种量小于 0.5 mL 或大于 1 mL, 发酵液抑菌活性有所降低。

3 结论

对芽孢杆菌发酵培养液进行抑菌活性物质的提取, 在植物病害的防治中具有重要的意义^[6]。不同的培养基及培养条件对芽孢杆菌产生抗菌物质具有重要的影响, 因此, 对于一株活性菌株有必要深入研究其发酵条件, 以期获得抗菌物质的最大产量。

试验结果表明, BS18 菌株对供试的碳源都能不同程度的利用, 但以利用麦芽糖最好; 对氮源中的牛肉浸膏、蛋白胨、胰蛋白胨 (NH₄)₂SO₄ 均可较好的利用, 这说明 BS18 可利用的碳源、氮源的范围较广。通过对该菌培养基配方和培养条件的优化选择以及碳、氮源的正交试验, 初步确定最适宜 BS18 菌株生长的培养基配方及培养条件如下: 即牛肉膏+蛋白胨 3%, 麦芽糖 0.5%, NaCl 0.1%, (NH₄)₂SO₄ 0.5%; 最适培养条件为: 起始 pH 值 7.0~7.5、250 mL 三角瓶装液量 30 mL、接种量 0.5 mL、摇瓶速度 130 r/min、温度 30℃。

参考文献

[1] 程云, 沈崇尧, 段道怀. 青椒疫霉菌为北京地区青椒死秧的主要原因[J]. 植物病理学报 1988 18(1):7-11.
[2] 易图永, 谢丙炎, 张宝玺, 等. 辣椒疫病防治研究进展[J]. 中国蔬菜 2002(5):52-55.

苹果轮纹病拮抗细菌 R8 发酵条件的初步研究

杨 华^{1,2}, 纪明山¹, 张广仁²

(1. 沈阳农业大学, 辽宁 沈阳 110160 2 辽宁省果树科学研究所, 辽宁 营口 115009)

中图分类号: S 436.611.1⁺9 文献标识码: A 文章编号: 1001—0009(2007)12—0219—02

苹果轮纹病 (*Macrophoma kawatsukai*) 主要为害果实、枝干, 也能为害叶片。该病在我国各苹果产区均有发生, 在以苹果生产为支柱产业的辽宁和山东两省发生尤其严重。重病树枝干上病斑累累, 树势衰弱, 甚至造成枝干枯死; 果实受害后腐烂, 病果率 30% 以上, 贮藏 1 个月后病果率可以达到 50% 以上, 严重影响产量和质量。生产上一直应用多菌灵来防治, 防治倍数由最初的 800 ~ 1 000 倍提高到现在 500 倍左右, 病菌对多菌灵已经产生了明显的抗性。赵白鸽和辛玉成等筛选出对轮纹病有抑制作用的拮抗菌, 但对拮抗菌的发酵条件研究不多。国外在生物防治轮纹病的方面报道也较少。

拮抗细菌 (*Bacillus sp.*) R8 从土壤中分离得到, 室内平板对峙测定结果表明对苹果轮纹病有较强的抑制作用, 抑菌带宽度达到 10 mm 以上。试验将筛选出的拮抗细菌 R8 的发酵条件进行优化, 得到最佳发酵培养基配方, 同时确定最佳发酵条件, 从而为进一步的中试放大及大规模生产提供必要的前提。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

拮抗细菌 (*Bacillus sp.*) R8 从土壤中分离得到, 苹果轮纹病菌从病果上分离得到。

1.2 培养基

真菌培养基 PDA: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL; 细菌培养基 NA: 牛肉浸膏 3 g, 蛋白胨 10 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL; 原始发酵培养基 NB: 蛋白胨 10 g, 牛肉浸膏 10 g, NaCl 5 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.3; 供试培养基 NB; YSP (酵母浸膏 5 g, 蔗糖 20 g, 蛋白胨 10 g); NYBD (牛肉浸膏 8 g, 酵母浸膏

第一作者简介: 杨华 (1974-), 女, 辽宁营口人, 助理研究员, 在读硕士, 主要从事果树病害生物防治研究, 中国植物保护学会会员。
E-mail: yanghua007@yahoo.com.cn.
通讯作者: 纪明山。
收稿日期: 2007—06—28

[3] A l g a m S A, X i e G L. C o m p r a t i v e p e r f o r m a n c e o f B a c i l l u s s p p. i n g r o w t h p r o m o t i o n a n d s u p p r e s s i o n o f t o m a t o b a c t e r i a l w i l t c a u s e d b y R a l s t o n i a s o l a n a c e u m s o a d [J] . J o u r n a l o f Z h e j i a n g U n i v e r s i t y (A g r i c . & l i f e s c i .) , 2 0 0 4 , 3 0 (6) : 6 0 3 - 6 1 0 .

[4] 唐丽娟, 纪兆林, 徐敬友, 等. 地衣芽孢杆菌 W10 对灰葡萄的抑制作用及其抗菌物质 [J] . 2005 21 (3) : 203 - 205 .

[5] 陈年春. 农药生物测定技术 [M] . 北京: 北京农业大学出版社, 1991: 168 .

[6] 陈中义, 张杰, 黄大昉. 植物病害生防芽孢杆菌机制与遗传改良研究 [J] . 植物病理学报, 2003 33 (2) : 97 - 100 .

Preliminary Study of Fermental Condition of *Bacillus sp.* Antagonistic to *Phytophthora capsici*

XIAO Shu-qin, XUE Chun-sheng, ZHOU Xue, CAO Yuan-yin

(Plant Immunity Institute, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161, China)

Abstract: The fermental condition influence on the inhibitory effect of *Bacillus sp.* BS18 antagonistic to *Phytophthora capsici* was studied. Through culture condition and orthogonal tests, we obtained an optimal medium composition: beef extract 2%, tryptone 2%, maltose 1%, NaCl 0.1%, (NH₄)₂SO₄ 0.3%; when the strain was cultured with conditions as following: initial pH 7.0~7.5, inoculation level 2%, 130 r/min shake revolutions with 30 mL medium in 250 mL flask. Culture temperature was 30℃ and culture time was 48 hours. The diameter of inhibition zone reached 2.85 cm.

Key words: *Bacillus sp.* BS18; Fermental condition; Inhibition; *Phytophthora capsici*