

Optimization of Fermentation Conditions for Endophytic Bacteria Strains YBS106*

Qinlan Guan¹, Tianxing Lin¹, Mingfu Gong^{#1,2}

¹School of Life Sciences, Leshan Normal University, Leshan

²Key Laboratory of Special Biological Resources in Mountain Emei, Leshan
Email: 1508666836@qq.com, 182476903@qq.com, #gongmingfu98@163.com

Received: Feb. 20th, 2013; revised: Mar. 12th, 2013; accepted: Mar. 19th, 2013

Abstract: To optimize the culture medium and the fermentation conditions, experiment was performed to the fermentation conditions of endophytic bacterium YBS106 isolated from *Arisaema erubescens* in Emei Mount. The antifungal activity of YBS106 fermenting borth was determined against *Fusarium oxysporum* with Cylinder plate method, and studied on the activity of metabolic products of strains under different culture medium and growth condition. Results showed that the optimal medium compositions were (g/1000mL): glucose 60 g, ammonium sulfate 2.5 g, bran 25 g, Trisodium citrate 2.0 g, K₂HPO₄·3H₂O 0.2 g, FeSO₄·7H₂O 0.05 g, MgSO₄·7H₂O 1.0 g. The optimal growth conditions were: pH 6.0, 28°C, 4% inoculation, fermentation time for 72 h with 200 r/min rotating speed. The inhibitory ratio of YBS106 fermenting solution against *Fusarium oxysporum* could reach to 56% under optimum fermenting solution and culture conditions.

Keywords: Endophytic Bacteria; *Fusarium oxysporum*; Fermentation Condition; Bacteriostasis

内生细菌 YBS106 菌株发酵条件优化*

管苓澜¹, 林天兴¹, 龚明福^{1,2#}

¹乐山师范学院生命科学院, 乐山

²峨眉山特色生物资源重点实验室, 乐山

Email: 1508666836@qq.com, 182476903@qq.com, #gongmingfu98@163.com

收稿日期: 2013年2月20日; 修回日期: 2013年3月12日; 录用日期: 2013年3月19日

摘要: 对一把伞南星内生细菌 YBS106 发酵条件进行研究, 确定其最佳发酵液培养基配方和最佳发酵条件。通过杯碟法测定 YBS106 发酵液对棉花枯萎病原菌的抑菌作用, 研究了该菌株在不同培养基, 不同生长条件下的代谢产物活性。菌株 YBS106 的最佳培养基为: 葡萄糖 60 g/L, 硫酸铵 2.5 g/L, 麸皮 25 g/L, 柠檬酸三钠 2.0 g/L, K₂HPO₄·3H₂O 0.2 g/L, FeSO₄·7H₂O 0.05 g/L, MgSO₄·7H₂O 1.0 g/L。最佳生长条件为: pH7.0, 28°C, 发酵 72 h, 接种量 4%, 摇床转速为 200 r/min。在最佳培养条件下, 该菌株对棉花枯萎病菌的抑菌率可达 56%。

关键词: 内生细菌; 棉花枯萎病; 发酵条件; 抑菌

1. 引言

棉花枯萎病(*Fusarium oxysporum*)是一种由棉花尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporium* f. sp. *vasinfectum*)引

起的、具有毁灭性的土传棉花病害, 在外界环境条件有利于枯萎病发生的情况下可引起棉花大幅度减产^[1]。通过生物防治方法减少或抑制土壤中病菌接种体数量或致病活性, 在小麦全蚀病等土传病害防治中已有成功报道^[2]。利用生防措施来控制棉花枯萎病为广大科研工作者所期望, 但目前为止尚缺乏高效稳定的

*基金项目: 乐山师范学院科研项目(编号: Z1160 和 Z1223), 四川省教育厅项目(编号: 12ZA240)。

#通讯作者。

生防菌株。内生细菌是一类生长在植物组织细胞间隙的微生物，其中部分内生菌能够产生与宿主相关的活性成分，是生防微生物的重要来源。

本课题组从一把伞南星 (*Arisaema erubescens* (Wall.) Schott) 组织中分离到一株对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (Methicillin-resistant *staphylococcus aureus*, MRSA) 和 *F. oxysporium* 具有高拮抗活性的内生细菌 YBS106, 同时也能诱导棉花产生系统抗性。

对微生物发酵工艺的优化主要包括初始条件的选择, 培养基的组成配比及培养条件的优化几个方面^[3]。本研究旨在对棉花枯萎病菌有拮抗作用的内生细菌 YBS106 的发酵工艺条件进行优化, 以期对棉花枯萎病的防治提供新的方法和途径。

2. 材料与方法

2.1. 试验材料

S. marcescens YBS106 由本课题组从 *A. erubescens* 中分离获得, 棉花枯萎病致病菌 (*F. oxysporium*) 从感病棉花植株中分离获得。

2.2. 培养基

实验中用到的培养基及配方见表 1。

Table 1. The medium used in the experiment (Reference in Research Methods in Plant Pathology [4])
表 1. 实验中用到的培养基(参考《植病研究法》^[4])

培养基	NA	NB	GAS	PDA
牛肉膏(g)	3	3		
蛋白胨(g)	10	10		
NaCl(g)	5	5		
琼脂(g)	20			20
水(L)	1	1	1	1
pH	7.0~7.2	7.0~7.2	7.0~7.2	
马铃薯(g)				200
葡萄糖(g)			2	20
硫酸铵(g)			1	
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O (g)			7	
KH ₂ PO ₄ ·H ₂ O (g)			3	
MgSO ₄ ·7H ₂ O (g)			0.1	
柠檬酸三钠(g)			0.5	

注: NA 为牛肉膏蛋白胨培养基, NB 为牛肉膏蛋白胨培养液, GAS 为葡萄糖铵盐培养基, PDA 为马铃薯培养基。

2.3. 菌种培养方法及拮抗活性测定

拮抗细菌的发酵培养: 先将保存在斜面上的菌种接入 NA 培养基平板表面进行活化, 然后将其接入到装有 100 mL 作为种子培养基的 500 mL 三角瓶中, 在 30℃、转速为 180 r/min 条件下培养 72 h, 再将然后将种子液按 1% 的接种量转接到 10 个装有 100 mL NB 培养基的 500 mL 三角瓶中, 以 200 r/min 的转速振荡培养 72 h。

病原菌平板的制备: 用打孔器从培养 5 d 的棉花枯萎病菌平板上打成直径 0.8 mm 的菌饼, 接到 PDA 培养的平板上, 28℃ 恒温箱培养 48 h。

抑菌活性的测定: 采用标准杯碟法^[4]测定拮抗菌的抑菌率。将培养 48 h 的长有棉花枯萎病菌的 PDA 平板上放置牛津杯, 向其中加入 200 μL 细菌发酵液, 静置 30 min 后, 置于 24℃ 恒温箱培养, 2 d 后观察抑菌结果。用直尺测量棉花枯萎病原菌直径, 以自然生长的枯萎病原菌为对照, 按照两者比例的大小来比较抑菌活性的大小: 内生细菌对棉花枯萎病菌的相对抑菌率计算如下:

$$\text{相对抑菌率} = \frac{\text{对照组病原真菌直径} - \text{试验组病原真菌直径}}{\text{对照组病原真菌直径}} \times 100\%$$

方法参照龚明福^[5]的方法进行。

2.4. 生长曲线的测定及接种量、最佳发酵时间的优化

生长曲线的测定: 用比浊法^[6]测出最佳检测波长, 结果显示在 540 nm 有最大吸收。准确吸取培养 24 h 的 YBS106 培养液 5 mL, 注入到含有 100 mL 种子培养基的 500 mL 三角瓶中, 振荡并充分摇匀, 每隔 2 h 取少许发酵液, 并用无菌水稀释 10 倍, 用分光光度计测量其光密度值 OD₅₄₀, 方法参照周德庆^[7]的方法进行。以培养时间为横坐标, OD₅₄₀ 值为纵坐标, 绘制生长曲线。

最佳接种量的选择: 将接种量(体积分数)分别调节为 1%、2%、4%、5%、6%、8%, 分别接入到液体葡萄糖铵盐培养基中进行培养 1 d, 再用杯碟法测定发酵液抑菌率。

最佳发酵时间的优化: 将 YBS106 菌悬液以 2% 接种量接种到液体葡萄糖铵盐培养基中, 在 pH 为 7.0,

28℃, 条件下培养, 每隔 12 h 取样再用杯碟法测定发酵液抑菌率^[8]。

2.5. 发酵培养基的优化

碳源和氮源的筛选: 参照葡萄糖铵盐培养基, 分别采用不同的碳源(包括葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、淀粉)和氮源(包括硫酸铵、硝酸铵、硝酸钠、尿素), 固定其他成分, 在 30℃ 和 180 r/min 条件下进行摇瓶培养 72 h, 然后接入到装有牛津杯的长有棉花枯萎病菌的平板中, 24 h 后测定抑菌率, 每次处理设 3 个平行。测出抑菌率, 筛选出合适的碳源和氮源。

碳源和氮源的优化: 筛选出最佳碳、氮源后, 参照葡萄糖铵盐培养基, 固定其他成分, 用最佳碳、氮源代替相应碳、氮源, 然后用正交设计试验^[9], 采用 L9(3⁴)正交表, 选用 3 因素 3 水平, 进行摇瓶培养, 通过比较抑菌率来确定筛选出的碳源(A)、氮源(B)和补充氮源 - 麸皮(C)的用量(表 2), 每次处理设 3 个重复样。麸皮的用法是加入适量水煮沸 1 h 后过滤取浸汁。

无机盐成分的优化: 在优化好碳源和氮源的基础上, 参照葡萄糖铵盐培养基, 固定其他成分, 用无机盐 C₆H₅Na₃O₇·2H₂O(a), K₂HPO₄·3H₂O(b), FeSO₄·7H₂O(c), MgSO₄·7H₂O(d)代替相应无机盐, 然后用正交设计试验^[9], 采用 L9(3⁴)正交表, 进行摇瓶培养, 每次处理设 3 个重复样(表 3)。

2.6. 最佳培养条件筛选

用正交试验优化好的培养基配方培养 YBS106, 再分别进行温度、培养基初始 pH、和摇床转速单因素试验^[10]。采用标准杯碟法测定拮抗菌的抑菌活性, 在培养 48 h 的长有棉花枯萎病菌的 PDA 平板上放置牛津杯, 向其中加入 200 μL 细菌发酵液, 静置 30 min 后, 置于 24℃ 恒温箱培养, 2 d 后观察抑菌结果。

初始 Ph^[11]: 将菌液注入到接有棉花枯萎病原菌的

Table 2. Orthogonal test factor levels for optimizing carbon and nitrogen sources in culture media
表 2. 培养基碳源和氮源优化的正交试验因素水平

Level	A(葡萄糖) /g·L ⁻¹	B(硫酸铵) /g·L ⁻¹	C(麸皮) /g·L ⁻¹
1	5	2.5	5
2	10	5	10
3	20	10	20

Table 3. Orthogonal test factor levels for optimizing inorganic salt components in culture media
表 3. 培养基无机盐成分优化的正交试验因素水平

Level	A'(C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ · 2H ₂ O)/g·L ⁻¹	B'(K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O)/g·L ⁻¹	C'(FeSO ₄ · 7H ₂ O)/g·L ⁻¹	D'(MgSO ₄ · 7H ₂ O)/g·L ⁻¹
1	0.5	0.1	0.05	0.25
2	1.0	0.2	0.1	0.5
3	1.5	0.3	0.2	1.0

PDA 培养基牛津杯中, 于 pH 为 5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、9.0 下培养 48 h, 每个梯度设三个重复, 观察菌株生长情况, 测出抑菌率。

温度^[11]: 将菌液注入到接有棉花枯萎病原菌的 PDA 培养基牛津杯中, 在最适 pH 下分别置于 20℃、25℃、28℃、32℃、37℃、42℃ 下恒温培养 72 h, 每个温度设三个重复, 观察菌株的生长情况, 并测定发酵液抑菌率。

摇床转速^[11]: 将菌液注入到接有棉花枯萎病原菌的 PDA 培养基牛津杯中, 在最适 pH、最适温度下分别置于摇床转速分别为 120、150、180、210、240 r·min⁻¹, 进行培养, 观察菌株的生长情况, 并测定发酵液抑菌率, 每个梯度设三个重复, 观察菌株生长情况, 测出抑菌率。

待测出菌株生长最适摇床转速范围后, 再在此范围内测出最佳转速, 每个转速设三个重复, 观察菌株的生长情况, 并测定发酵液抑菌率。

3. 结果与分析

3.1. 初始条件的选择

拮抗细菌 YBS106 菌株的生长曲线较明显地分为以下四个阶段: 调整期、对数生长期、稳定期、衰亡期。3~15 h 的种子培养液正处于对数生长期, 这时菌体生长速率最快, 最适于作为种子液, 其中最适宜作为接种用种子液为 12~15 h 的发酵液。

接种量: 不同接种量(体积分数)的发酵液抑菌活性结果如图 1 所示。YBS106 发酵液接种量对抑菌活性有一定影响, 随着接种量的增加, 抑菌活性先提高, 接种量达到 4% 以后逐渐趋于平稳, 因此生产上接种量为 4% 是最为经济有效的。

培养时间: YBS106 菌株在发酵培养基中培养时间对发酵液的抑菌活性有影响, 随着培养时间的延长, 发酵液的抑菌活性增强, 发酵 72 h 后抑菌活性趋

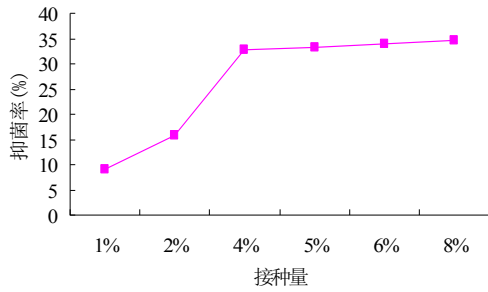


Figure 1. Effect of inoculation rate on antibacterial activity of strain YBS106 fermentation broth
图 1. 接种量对 YBS106 菌株发酵液抑菌活性的影响

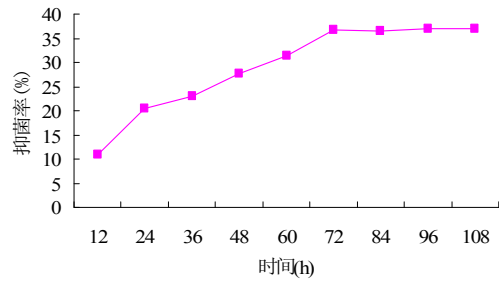


Figure 2. Effect of fermentation time on antibacterial activity of strain YBS106 fermentation broth
图 2. 发酵时间对 YBS106 菌株发酵液抑菌活性的影响

于平稳(如图 2 所示), 因此从经济的角度考虑, 生产上的发酵时间应为 72 h。

3.2. 发酵培养基的优化

培养基碳源和氮源单因子的筛选: 从表 4 看出, 在这 4 种碳源中, 该菌最易利用葡萄糖, 蔗糖其次, 而对麦芽糖和淀粉的利用效果较差。从表 5 看出, 硫酸铵作为氮源利用效果最好, 其次是硝酸铵, 硝酸钠效果次之, 尿素作为氮源的利用效果较差。因此, 适宜选择葡萄糖、硫酸铵作为该菌培养基的碳氮源。

碳氮源优化的正交试验结果统计培养基碳氮源优化的结果见表 6, 从表 6 可以看出, 葡萄糖、硫酸铵和麸皮的用量对菌株 YBS106 的生长均产生一定的影响, 从极差的大小来看, 以上三因子作用的顺序为葡萄糖, 麸皮, 硫酸铵。以菌株 YBS106 对棉花枯萎病抑菌率作为评价指标, 最终以 A2B2C3 为最佳配比, 即葡萄糖 10 g/L, 硫酸铵 5 g/L, 麸皮 20 g/L。

无机盐成分的优化: 培养基中各种无机盐成分优化的正交试验结果见表 7。培养基中无机盐的用量对菌株 YBS106 的生长均产生一定影响, 从极差 R'来看, 无机盐作用的主次顺序都是 A' > B' > C' > D', 即 C₆H₅Na₃O₇·2H₂O 对该菌增殖的影响最为显著, 其次是 K₂HPO₄·3H₂O, 而 FeSO₄·7H₂O 和 MgSO₄·7H₂O 的影响相对较小。以菌株 YBS106 对棉花枯萎病抑菌率作为评价指标, 最终选取第 6 号因素水平 A'3B'2C'1D'3, 即 C₆H₅Na₃O₇·2H₂O 2.0 g/L, K₂HPO₄·3H₂O 0.2 g/L, FeSO₄·7H₂O 0.05 g/L, MgSO₄·7H₂O 1.0 g/L, 为培养基中无机盐成分的最佳组合。

3.3. 最佳培养条件的优化

培养基初始 pH: pH 是影响菌株 YBS106 生长的

Table 4. Effect of different carbon sources on antibacterial activity of strain YBS106 fermentation broth
表 4. 不同碳源对 YBS106 菌株发酵液抑菌活性的影响

	Carbon source			
	Gloose	Maltose	Sucrose	Corn starch
Bacteriostatic effect	0.38 ± 0.01 ^{aA}	0.35 ± 0.02 ^{bB}	24.50 ± 0.02 ^{aA}	20.33 ± 0.01 ^{bB}

注: 同列数字后不同小写字母表示在 0.5 水平上有差异; 不同大写字母表示在 0.1 水平上有差异。

Table 5. Effect of different nitrogen sources on antibacterial activity of strain YBS106 fermentation broth
表 5. 不同氮源对 YBS106 菌株发酵液抑菌活性的影响

	NH ₄ NO ₃	NaNO ₃	CO(NH ₂) ₂	
Bacteriostatic effect	0.30 ± 0.01 ^{aA}	0.24 ± 0.04 ^{abAB}	0.17 ± 0.01 ^{bcAB}	0.12 ± 0.02 ^{cB}

Table 6. Orthogonal test statistical and evaluation results for optimizing carbon and nitrogen sources in culture media
表 6. 培养基碳源和氮源优化的正交试验评价结果

Number	Factor level			Percentage of inhibition zone
	A	B	C	
1	1	1	1	18.70%
2	1	2	2	20.70%
3	1	3	3	29.80%
4	2	1	2	24.27%
5	2	2	3	34.30%
6	2	3	1	26.80%
7	3	1	3	27.80%
8	3	2	1	24.27%
9	3	3	2	30.80%
K1	0.6920	0.7707	0.6977	
K2	0.8537	0.7927	0.7577	
K3	0.8287	0.8740	0.9190	
R	0.1617	0.1033	0.1613	

Table 7. Orthogonal test factor levels for optimizing inorganic salt components in culture media
表 7. 培养基无机盐成分优化的正交试验因素水平

Number	Factor level				Percentage of inhibition zone
	A'	B'	C'	D'	
1	1	1	1	1	0.095
2	1	2	2	2	0.119
3	1	3	3	3	0.184
4	2	1	2	3	0.217
5	2	2	3	1	0.307
6	2	3	1	2	0.336
7	3	1	3	2	0.286
8	3	2	1	3	0.224
9	3	3	2	1	0.3153
K1'	0.398	0.592	0.655	0.7173	
K2'	0.86	0.65	0.6513	0.741	
K3'	0.8253	0.8353	0.777	0.625	
R'	0.462	0.2433	0.1257	0.116	

重要因素，在一定的初始 pH 范围内，随着 pH 的上升，抑菌活性逐渐增强，在 pH 在 6.5~7.5 之间生长良好，当 pH 达到 7.0 附近时活性最高，之后随着 pH 上升，活性开始下降(如图 3 所示)。说明中性培养基条件有利于 YBS106 菌株代谢产物的产生。

养温度：培养温度是影响菌株 YBS106 生长的重要因素，随着温度的上升，抑菌活性逐渐提高，到 28℃ 附近时抑菌活性最高，之后随着温度的升高，抑菌活性逐渐降低(见图 4)。说明 28℃ 左右最适合抑菌活性物质产生。

转速：将摇床转速分别调整为 120、150、180、210、240 r·min⁻¹，进行培养并测定发酵液抑菌活性，结果摇床转数为 210 r/min 左右时，抑菌活性相对较高(如图 5 所示)。将摇床转速再分别调整为 190、200、210、220、230 r/min，从图 6 可知，当摇床转速为 200 r/min 时，抑菌活性较高。这可能是由于液体培养需要大量氧气来满足抗菌活性物质产生的需要，摇床转速提高导致溶氧浓度增大，代谢能力提高。

从以上得出的最佳培养基配方和最佳发酵条件为：葡萄糖 60 g/L，硫酸铵 2.5 g/L，麸皮 25 g/L，柠檬酸三钠 2.0 g/L，K₂HPO₄·3H₂O 0.2 g/L，FeSO₄·7H₂O

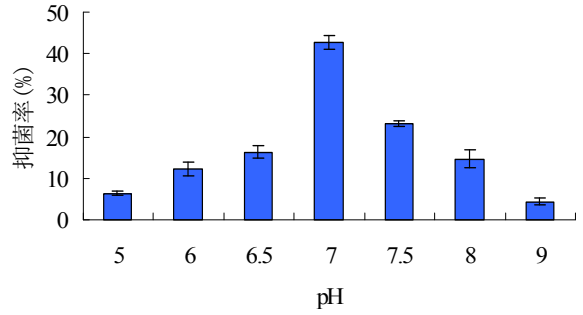


Figure 3. Effect of pH in initial culture medium on antibacterial activity of strain YBS106 fermentation broth
图 3. pH 对 YBS106 菌株发酵液抑菌活性的影响

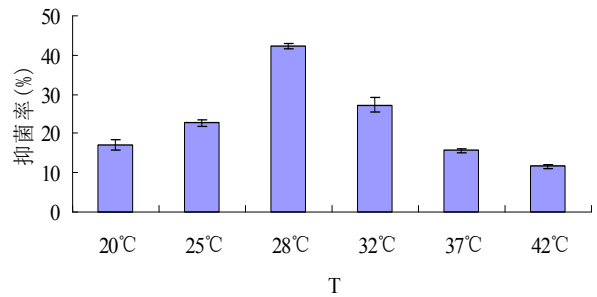


Figure 4. Effect of culture temperature on antibacterial activity of strain YBS106 fermentation broth
图 4. 培养温度对 YBS106 菌株发酵液抑菌活性的影响

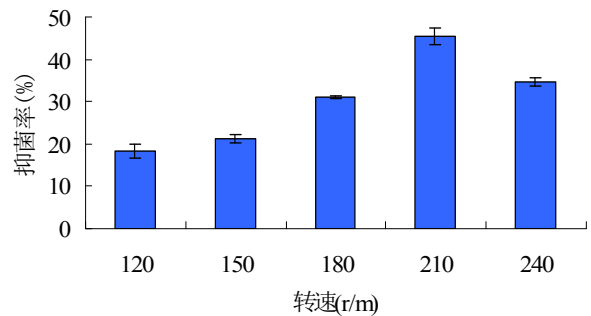


Figure 5. Effect of rotation speed on antibacterial activity of strain YBS106 fermentation broth
图 5. 摇床转速对 YBS106 菌株发酵液抑菌活性的影响

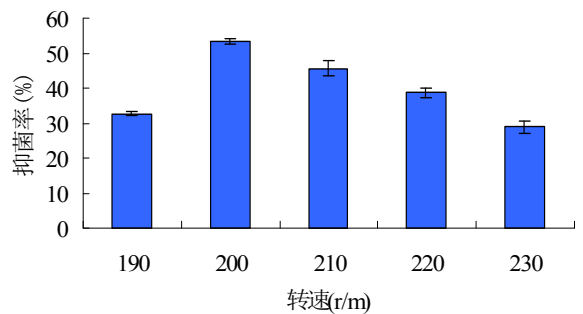


Figure 6. Effect of rotation speed on antibacterial activity of strain YBS106 fermentation broth
图 6. 摇床转速对 YBS 菌株发酵液抑菌活性的影响

0.05 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g/L, 初始 pH 7.0, 28℃左右, 发酵 72 h, 接种量 4%, 摇床转速为 200 r/min。在此条件下测试对抑菌活性的影响, 抑菌率为 56%。

4. 结论与讨论

本研究选取抑菌效果较好的 YBS106 作为实验菌株对抗菌物质产生条件进行了初步摸索。通过对该菌生长曲线的研究表明, 12~15 h 的种子培养基正处于对数生长期, 最适于做种子液。并且通过对培养基、发酵时间及发酵温度几个条件的研究发现, YBS106 在培养基中 28℃摇床恒温培养 48 h 后抑菌效果最好。另外通过对培养基的初始 pH 进行调节发现, 培养基的初始 pH 也会对抑菌效果产生重要影响。初始 pH 在中性条件下抑菌效果最好, 强酸强碱都会导致抑菌效果的下降。综合研究结果来看, 菌株 YBS106 的最佳培养基为: 葡萄糖 60 g/L, 硫酸铵 2.5 g/L, 麸皮 25 g/L, 柠檬酸三钠 2.0 g/L, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g/L, 水 1000 mL。最佳生长条件为: pH 7.0, 28℃, 发酵 72 h, 接

种量 4%, 摇床转速为 200 r/min。这一结果以期为菌株 YBS106 的开发利用奠定基础。

参考文献 (References)

- [1] 沈其益. 棉花病害基础研究与防治[M]. 北京: 科学出版社, 1992.
- [2] 张颖, 王刚, 郭建伟等. 利用小麦内生细菌防治小麦全蚀病的初步研究[J]. 植物病理学报, 2007, 37(1): 105-108.
- [3] 俞俊棠, 唐孝宣. 生物工艺学(上册)[M]. 上海: 华东化工学院出版社, 1991: 96-99.
- [4] 方中达. 植病研究法[M]. 第 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [5] 程丽娟, 薛泉宏. 微生物学实验指导[M]. 西安: 世界图书出版公司, 2000.
- [6] 龚明福, 林世利, 马玉红等. 拮抗棉花枯萎病菌的苦豆子内生细菌资源[J]. 新疆农业科学, 2009, 46(3): 531-535.
- [7] 马茜. 硫酸钡吸光比浊法测定大蒜中大蒜素含量[J]. 光谱实验室, 2007, 24(3): 345-347.
- [8] 周德庆. 微生物学实验教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 78-82.
- [9] 王瑞霞, 张兆红, 刘玉霞等. 枯草芽孢杆菌 B-903 最佳发酵时间研究[J]. 河南农业科学, 2005, 3: 46-48.
- [10] 杜荣骞. 生物统计学(第 2 版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003: 275.
- [11] 夏振远, 郭端强, 李铭刚等. 产环己酰亚胺菌株 YM41004 发酵条件的研究[J]. 工业微生物, 2005, 35(2): 37-40.