

一株马铃薯黑痣病生防菌的筛选及发酵条件优化

程永乐, 路晓培, 蒋莹, 李国光, 陈有君*, 霍烽, 李立民 (内蒙古农业大学生命科学学院, 内蒙古呼和浩特 010018)

摘要 采用平板对峙法从土壤中筛选并鉴定一株马铃薯黑痣病的生防菌, 并对该菌株发酵培养基和发酵条件进行了优化。结果显示, H13 菌株的最优培养基组成: 胰蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, 氯化钠 10 g/L, 葡萄糖 8 g/L, 蔗糖 6 g/L, 干酪素 6 g/L, 硫酸镁 1 g/L; 最佳培养条件为初始 pH 7.2, 发酵时间 35 h, 接种量 300 μ L 种子液, 转速 180 r/min, 发酵温度 28 $^{\circ}$ C。

关键词 生防菌; 发酵条件; 培养基

中图分类号 S435.42 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)23-0153-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.23.044

开放科学(资源服务)标识码(OSID): 

Screening of an Antagonistic Strain of Potato Black Nevoid Disease and Optimization of Fermentation Conditions

CHENG Yong-le, LU Xiao-pei, JIANG Ying et al (College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018)

Abstract A biocontrol strain of potato black nevoid disease was screened and identified by plate confrontation method, and the fermentation medium and fermentation conditions of the strain were optimized. The results showed that the optimum culture medium of strain H13 was tryptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, sodium chloride 10 g/L, glucose 8 g/L, sucrose 6 g/L, casein 6 g/L, magnesium sulfate 1 g/L. The optimum culture conditions were as follow: the initial pH value of 7.2, the fermentation time of 35 h, the inoculum size of 300 μ L seed solution, the rotating speed of 180 r/min, and the fermentation temperature of 28 $^{\circ}$ C.

Key words Biocontrol bacteria; Fermentation conditions; Culture medium

马铃薯黑痣病是由立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)引起的一种土传性真菌病害, 该病害既可通过土壤传播, 也可通过带病种薯传播^[1], 在世界各国马铃薯主产区均普遍发生, 严重影响马铃薯的产量和品质^[2]。目前, 马铃薯黑痣病主要以化学防治为主, 但化学农药污染环境, 破坏生态, 对食品安全产生了严重影响, 因此筛选马铃薯土传病的生防菌防治马铃薯黑痣病是有效途径之一, 且生防菌对生态、人类健康和环境安全^[3]。笔者采用平板对峙法从土壤中筛选并鉴定一株马铃薯黑痣病的生防菌, 并对该菌株发酵培养基和发酵条件进行了优化。

1 材料与与方法

1.1 菌株的分离与鉴定 利用分离芽孢杆菌的方法^[4]分离菌株, 用平板对峙法筛选具有拮抗效果的菌株, 参考文献^[5]扩增 16S rRNA 基因, PCR 产物送至北京博迈德生物有限公司进行测序。

1.2 初始发酵培养基的筛选 选择 5 种不同的发酵培养基, 分别是 1/2 R2A 培养基、MS 培养基、马丁培养基、高氏一号培养基、LB 培养基, 接种 200 μ L H13 种子液, 在 28 $^{\circ}$ C、160 r/min 条件下培养 40 h, 测定发酵液的 OD₆₀₀, 每种发酵培养基 3 次重复。

1.3 碳源、氮源、无机盐的确定 分别加入浓度为 0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0% 的麦芽糖、蔗糖、乳糖、甘露醇、葡萄糖、蛋白胨、干酪素、硫酸铵和磷酸氢二胺接种至 50/100 mL 三角瓶, 加入浓度为 0.05%、0.1%、0.15%、0.2%、0.25% 硫酸镁、碳酸钙和磷酸氢二钾接种至 50/100 mL 三角瓶, 确定最

优碳源、氮源、无机盐。

1.4 发酵培养基的优化 将筛选后得到的最佳碳源、氮源、无机盐 3 个重要的培养因素按照正交试验^[6-8] L₉(3⁴) 设计, pH 为 7.0, 在 28 $^{\circ}$ C、160 r/min 振荡培养 40 h, 以 OD₆₀₀ 作为指标考察 4 因素 3 水平对发酵培养基的影响, 从而确定最佳培养基配方。

1.5 发酵条件的优化 以优化的培养基为发酵培养基, 分别测定不同发酵时间初始 pH(4.3、5.5、5.8、7.2、7.7、8.0、8.6 和 9.2)、发酵温度(20、25、28、30、35、40 $^{\circ}$ C)、发酵时间(10、20、30、40、50、60、70 h)、摇床转速(150、160、180、210、230 r/min)、初始接种量(50、100、150、200、250、300、350 μ L), 对 H13 菌株 OD₆₀₀ 的影响, 以初始条件为基础, 每一因素的优化均在前一因素优化的基础上进行。

2 结果与分析

2.1 生防菌的筛选及进化树的构建 通过平板对峙试验, 筛选出 1 株具有拮抗效果的杆菌, 菌株编号为 H13, 抑菌效果见图 1。抑菌率达 42.52%, 经 16S rDNA 鉴定, 该菌株与 *Lysobacter firmicutimachus* 相似率为 99.6%(图 2)。

2.2 发酵基础培养基的筛选 由图 3 可知, H13 菌株在 LB 培养基发酵时, 其发酵液的 OD₆₀₀ 达最高, 为 0.78, 其次为马丁培养基、1/2 R2A 培养基, 在 MS 培养基中, 发酵液的 OD₆₀₀ 最低, 因此选择 LB 培养基作为菌株的基础培养基。

2.3 单因素试验结果

2.3.1 不同碳源对 H13 菌株的影响。 由图 4 可知, 葡萄糖、乳糖、麦芽糖和甘露醇浓度在 0.2%~0.6% 时, H13 菌株的 OD₆₀₀ 随着糖浓度的增加而增大, 在 0.6% 附近达到最大值, 分别为 1.187、1.058、1.067 和 1.029; 浓度在 0.6%~1.0% 时 OD₆₀₀ 随着糖浓度的增加而减小。蔗糖浓度在 0.2%~0.4% 时, OD₆₀₀ 随着糖浓度的增加而增加, 在 0.4% 附近 OD₆₀₀ 达到

作者简介 程永乐(1993—), 男, 山东济宁人, 硕士研究生, 研究方向: 微生物生理与发酵工艺; 路晓培(1994—), 女, 内蒙古乌兰察布人, 硕士研究生, 研究方向: 环境微生物。程永乐和路晓培为共同第一作者。* 通信作者, 教授, 博士, 从事微生物生理与发酵工艺研究。

收稿日期 2019-06-04; **修回日期** 2019-06-18

最大,为 1.090,浓度在 0.4%~1.0%时,随着糖浓度的增加 OD₆₀₀ 减小;回归分析(表 1)表明,培养 H13 后菌液 OD₆₀₀ 和糖浓度之间呈二次曲线关系,其中发酵液 OD₆₀₀ 与蔗糖浓度

之间相关达极显著水平,其他糖类与发酵液 OD₆₀₀ 相关达显著水平。综上所述,葡萄糖浓度在 0.6%附近显著高于其他碳源的 OD₆₀₀。

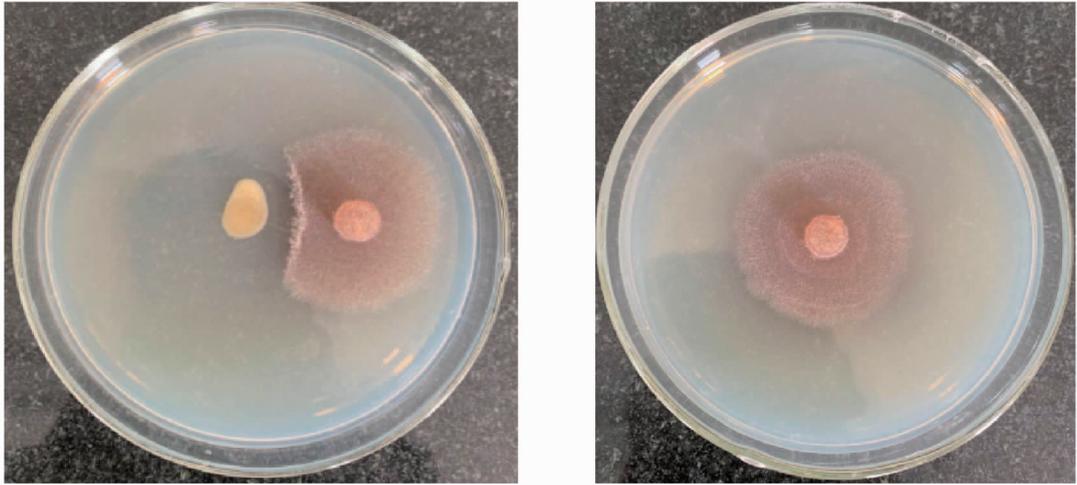


图 1 马铃薯黑痣病平板对峙试验

Fig. 1 Flat plate confrontation of potato black nevoid disease

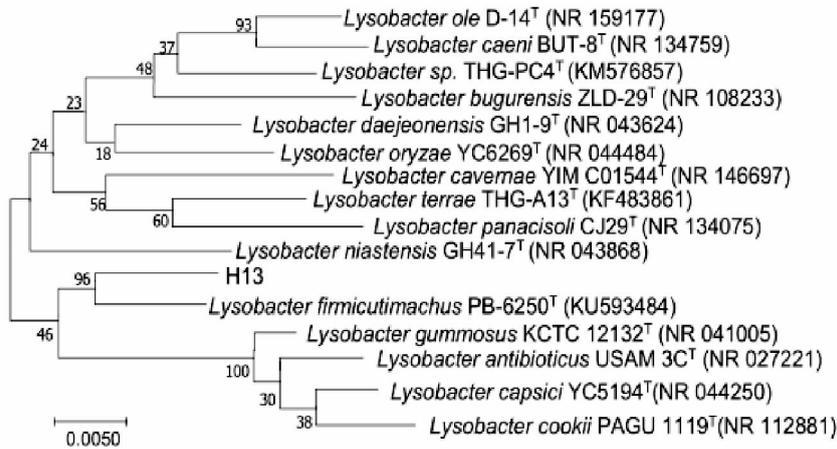


图 2 H13 系统进化树

Fig. 2 H13 systematic evolution tree

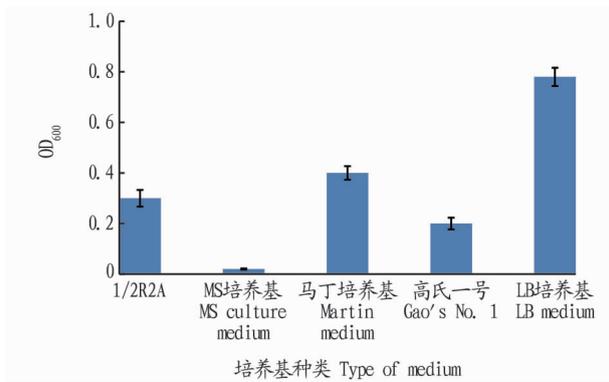


图 3 培养基对菌株生长的影响

Fig. 3 Effect of medium on the growth of strains

2.3.2 不同氮源对 H13 菌株的影响。由图 5 可知,干酪素和蛋白胨浓度在 0.2%~0.6%时,菌株的 OD₆₀₀ 随着氮源浓度的增加而增大,在 0.6%附近达到最大值,分别为 1.065 和 1.024,浓度在 0.6%~1.0%时,OD₆₀₀ 随着氮源浓度的增加而

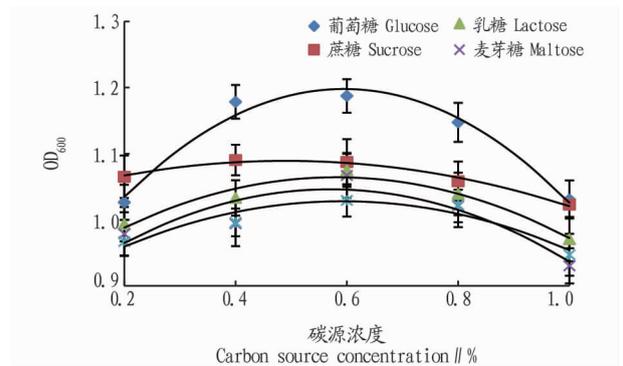


图 4 碳源浓度对菌株生长的影响

Fig. 4 Effect of carbon source concentrations on strain growth

减小;硫酸铵和蛋白胨浓度在 0.2%~0.4%时,OD₆₀₀ 随着氮源浓度的增加而增加,在 0.4%附近达到最大值,分别为 1.015 和 1.024,浓度在 0.4%~1.0%时,随着氮源浓度的增加,菌株 OD₆₀₀ 值减小;回归分析(表 2)结果表明,H13 菌液

培养后 OD_{600} 和氮源浓度呈二次曲线相关关系,发酵液 OD_{600} 与蛋白胨和硫酸铵浓度之间相关达显著水平。综上所述,干酪素浓度在 0.6%附近显著高于其他氮源的 OD_{600} 值。

表 1 碳源作用的回归分析

Table 1 Regression analysis of carbon source interaction

碳源种类 Carbon source type	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient	最适浓度 Optimal concentration//%
葡萄糖 Glucose	$y = -1.047 0x^2 + 1.245 3x + 0.827 5$	0.987 0*	0.59
蔗糖 Sucrose	$y = -0.263 1x^2 + 0.257 7x + 1.025 9$	0.991 0**	0.49
乳糖 Lactose	$y = -0.523 8x^2 + 0.608 9x + 0.887 3$	0.974 1*	0.57
麦芽糖 Maltose	$y = -0.591 1x^2 + 0.674 5x + 0.853 6$	0.900 1*	0.58
甘露醇 Mannitol	$y = -0.444 6x^2 + 0.526 7x + 0.871 9$	0.945 1*	0.59

注: * 为显著相关 ($P < 0.05$), ** 为极显著相关 ($P < 0.01$)

Note: * is significant correlation ($P < 0.05$), ** is extremely significant correlation ($P < 0.01$)

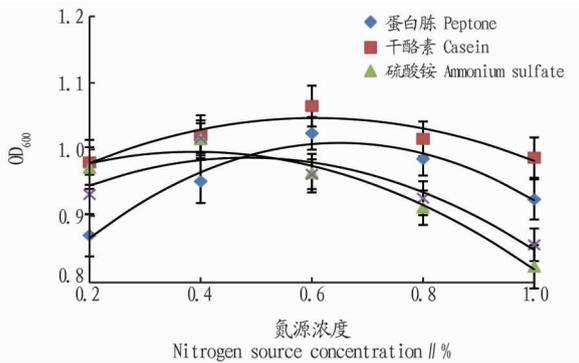


图 5 氮源浓度对菌株生长的影响

Fig. 5 Effect of nitrogen source concentrations on strain growth

表 2 氮源作用的回归分析

Table 2 Regression analysis of nitrogen source effect

氮源种类 Nitrogen source type	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient	最适浓度 Optimal concentration//%
蛋白胨 Peptone	$y = -0.704 8x^2 + 0.916 7x + 0.711 7$	0.980 3*	0.65
干酪素 Casein	$y = -0.413 1x^2 + 0.500 0x + 0.895 9$	0.922 8	0.61
硫酸铵 Ammonium sulfate	$y = -0.473 2x^2 + 0.368 0x + 0.924 9$	0.986 7*	0.39
磷酸氢二胺 Diamine phosphate	$y = -0.519 6x^2 + 0.502 7x + 0.866 1$	0.934 3	0.48

注: * 为显著相关 ($P < 0.05$), ** 为极显著相关 ($P < 0.01$)

Note: * is significant correlation ($P < 0.05$), ** is extremely significant correlation ($P < 0.01$)

2.3.3 不同无机盐对 H13 菌株的影响。由图 6 可知,硫酸镁浓度为 0.05%~0.15%时,菌株的 OD_{600} 随着无机盐浓度的增加而增大,在 0.15%达到最大值,为 1.037;碳酸钙浓度在 0.05%~0.10%时,菌株的 OD_{600} 随着无机盐浓度的增加而增大,在 0.10%附近达到最大值,为 1.033,浓度在 0.10%~0.20%时随着无机盐浓度的增加,菌株 OD_{600} 减小。回归分析(表 3)结果表明,由 H13 回归方程得到的最适硫酸镁、碳酸钙和磷酸氢二钾浓度为 0.13%、0.12%、0.13%,培养 H13 后菌液 OD_{600} 和无机盐浓度之间呈二次曲线关系,其中发酵

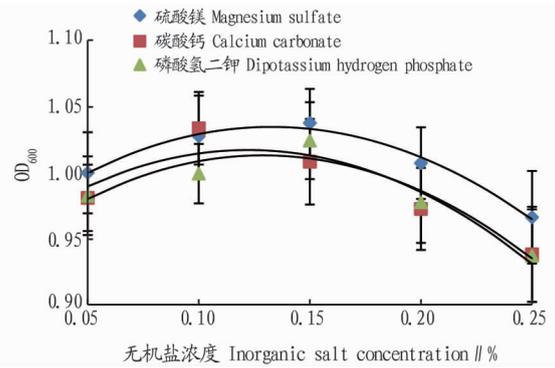


图 6 无机盐浓度对菌株生长的影响

Fig. 6 Effect of inorganic salt concentrations on the growth of strains

液 OD_{600} 与硫酸镁浓度之间相关达极显著水平,与磷酸氢二钾浓度之间相关达显著水平。

表 3 无机盐作用的回归分析

Table 3 Regression analysis of inorganic salts

无机盐种类 Inorganic salt types	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient	最适浓度 Optimal concentration//%
硫酸镁 Magnesium sulfate	$y = -5.076 2x^2 + 1.347 5x + 0.944 9$	0.992 8**	0.13
碳酸钙 Calcium carbonate	$y = -5.266 7x^2 + 1.287 3x + 0.938 2$	0.933 5	0.12
磷酸氢二钾 Dipotassium hydrogen phosphate	$y = -5.304 8x^2 + 1.366 8x + 0.924 8$	0.955 2*	0.13

注: * 为显著相关 ($P < 0.05$), ** 为极显著相关 ($P < 0.01$)

Note: * is significant correlation ($P < 0.05$), ** is extremely significant correlation ($P < 0.01$)

2.4 正交试验结果 从表 4 可以看出,不同水平的蔗糖、葡萄糖、干酪素、硫酸镁对 H13 的生长量有一定的影响,最佳培养基:蔗糖 6 g/L、葡萄糖 8 g/L、干酪素 6 g/L、硫酸镁 1 g/L。

表 4 H13 菌株正交设计

Table 4 Orthogonal design table of strain H13

序号 No.	蔗糖 Sucrose g	葡萄糖 Glucose g	干酪素 Casein g	硫酸镁 Magnesium sulfate g	OD_{600}
1	2	4	4	1.0	0.875±0.020 i
2	2	6	6	1.5	1.065±0.026 c
3	2	8	8	2.0	1.026±0.021 e
4	4	4	6	2.0	1.002±0.023 g
5	4	6	8	1.0	1.047±0.024 d
6	4	8	4	1.5	0.928±0.021 h
7	6	4	8	1.5	1.011±0.023 f
8	6	6	4	2.0	1.195±0.025 b
9	6	8	6	1.0	1.233±0.024 a

注: 同列不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Note: Different lowercases in the same column stand for significant differences at 0.05 level

2.5 发酵条件的优化

2.5.1 初始 pH。由图 7 可知,不同初始 pH 对菌株生长的影响不同,pH 在 4.4~7.2 时,随着 pH 的增加,菌株 OD_{600} 逐渐增加,在 pH 7.2 附近 OD_{600} 达到最大值,pH 在 7.2~9.3

时,菌株 OD_{600} 逐渐减小,因此,溶杆菌 H13 发酵培养基的最佳初始 pH 为 7.2。

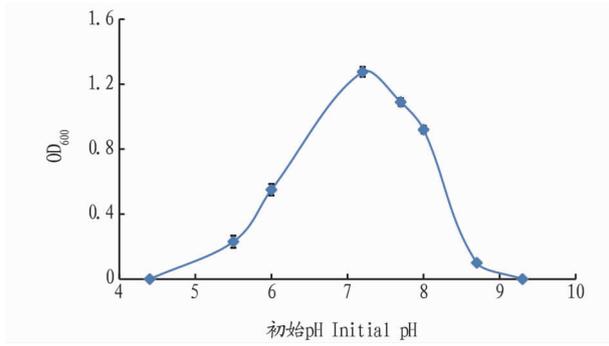


图7 不同 pH 对菌株生长的影响

Fig. 7 Effects of different pH values on the growth of strains

2.5.2 发酵温度。由图 8 可知,不同温度对溶杆菌 H13 的生长有较大影响。当温度在 20~28 °C 时,随着温度的升高菌株的生长量逐渐升高,当温度 28 °C 附近时,H13 的 OD_{600} 达到最大,当温度在 28~40 °C 时,随着温度的升高,菌株 H13 发酵液中的 OD_{600} 逐渐下降。因此确定 28 °C 为该菌株最佳发酵温度。

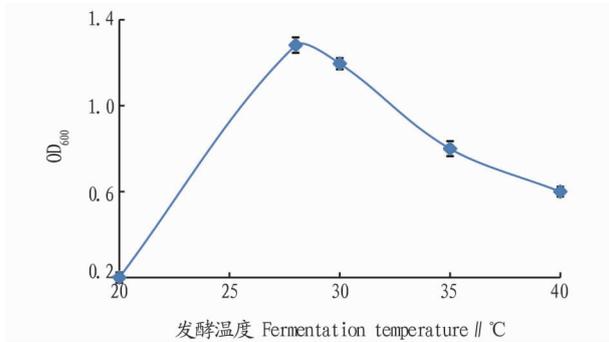


图8 不同发酵温度对菌株生长的影响

Fig. 8 Effects of different fermentation temperatures on the growth of strains

2.5.3 发酵时间。由图 9 可知,培养时间在 10~35 h 时,H13 菌株发酵液的 OD_{600} 显著升高,摇床振荡培养 35 h 附近时,发酵液的 OD_{600} 达到最大值,继续摇床培养后发现 H13 菌株的生物量逐渐下降。因此该菌株的最佳发酵时间为 35 h。

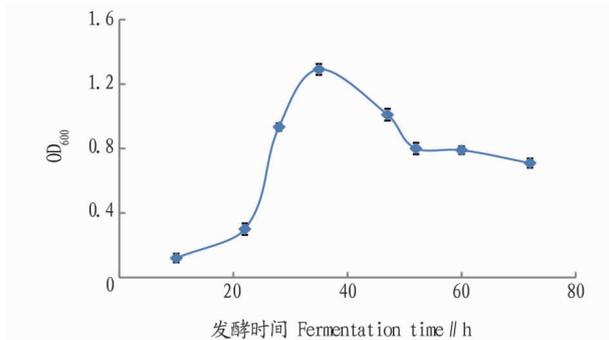


图9 不同发酵时间对菌株生长的影响

Fig. 9 Effects of different fermentation times on the growth of strains

2.5.4 摇床转速。由图 10 可知,不同摇床转速对 H13 的生

长影响较大,当转速在 150~180 r/min 时,随着转速的升高,该菌株的生长量逐渐升高,当转速为 180 r/min 附近时,其发酵液 OD_{600} 最大;当转速继续升高时,菌株发酵液的 OD_{600} 逐渐下降,因此 180 r/min 为菌株 H13 发酵培养基的最佳转速。

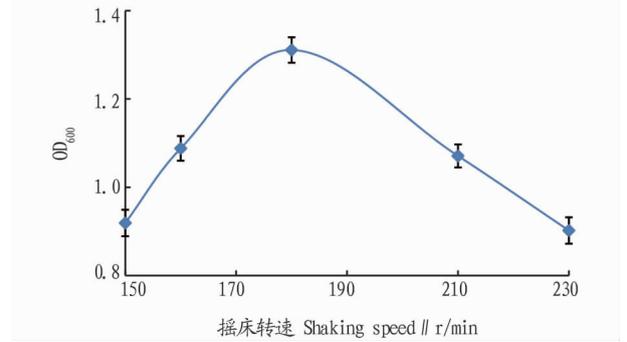


图10 不同摇床转速对菌株生长的影响

Fig. 10 Effect of different rotating speeds of shaking table on the growth of strain

2.5.5 接种量。由图 11 可知,当接种率在 50~300 μL 时,发酵液的 OD_{600} 逐渐升高,当接种量在 300 μL 附近时 OD_{600} 最大,在接种量为 300~400 μL 时,随着接种量的继续增加,H13 发酵液的 OD_{600} 逐渐下降。说明高接种量和低接种量均不利于 H13 菌株的生长,因此确定最佳接种量为 300 μL 。

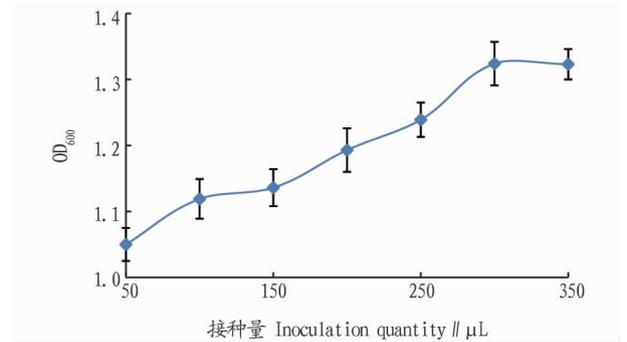


图11 不同接种量对菌株生长的影响

Fig. 11 Effect of different inoculation doses on growth of strain

3 结论与讨论

利用溶杆菌防治植物病害的研究较多,姬广海等^[9]研究表明,溶杆菌能有效控制魔芋软腐病,还有增产作用,防效可达 79.16%,增产 14.30%。姜英华等^[10]研究表明产酶溶杆菌 H11 对番茄青枯病有很好的防治效果,达 86.4%,且对瓜果腐霉菌和辣椒疫病病菌抑制率尤为突出。该研究证实 H13 菌株对马铃薯黑痣病具有防治效果,该菌具有拮抗、溶菌、营养和位点竞争、诱导植物抗病性以及根际促生等多种生防机制^[11]。

综上所述,H13 的碳源为蔗糖和葡萄糖,最佳氮源为干酪素,最佳无机盐为硫酸镁;结合单因素试验结果进行正交试验,结果显示胰蛋白胍 10 g/L,酵母提取物 5 g/L,氯化钠 10 g/L,葡萄糖 8 g/L,蔗糖 6 g/L,干酪素 6 g/L,硫酸镁 1 g/L;最佳培养条件为初始 pH 7.2,发酵温度 28 °C,发酵时间 35 h,转速 180 r/min,接种量 300 μL 。

(下转第 160 页)

生菌多样性水平较高,其次是苗期和成熟期;且各组织部位内生菌种群丰度和均一度均较高。该研究结果与前人相关研究结果一致^[13-14,16]。

小麦抽穗扬花期是小麦由营养生长完全转化为生殖生长的标志,也是决定麦穗籽粒多少的关键期。该阶段是小麦需水、肥的高峰期,水肥供应充足,小麦内生菌也会快速增殖,故在小麦扬花期时内生菌多样性水平较高。小麦扬花期叶片部位存在大量的内生菌,这可能与叶片光合作用有关。同时,在对小麦品种 AG1218 内生菌多样性研究中,还筛选到几株对小麦赤霉病菌有较强拮抗作用的内生菌。下一步将对这些拮抗菌株的生防能力及对小麦赤霉病的生防效果进行研究,深入探讨拮抗菌对小麦赤霉病的生物防治机理,旨在为小麦赤霉病的生物防治提供候选菌株。

参考文献

- [1] 赵芹,邓渊钰,李伟,等. 小麦幼苗内生菌多样性的宏基因组分析[J]. 植物病理学报,2017,47(3):313-324.
- [2] 邹文欣,谭仁祥. 植物内生菌研究新进展[J]. 植物学报,2001,43(9):881-892.
- [3] 张鑫. 苔藓内生菌的分离、鉴定及其代谢产物作用研究[D]. 济南:山东轻工业学院,2012:65.
- [4] LIGRONE R, POCOCK K, DUCKETT J G. A comparative ultrastructural study of endophytic basidiomycetes in the parasitic achlorophyllous hepatic *Cryptothallus mirabilis* and the closely allied photosynthetic species *Aneura pinguis* (Metzgeriales)[J]. Canadian journal of botany, 1993, 71(5):666-

679.

- [5] 葛慈斌,刘波,车建美,等. 武夷山地衣表生和内生芽孢杆菌种群的多样性[J]. 微生物学报,2015,55(5):551-563.
- [6] SATI S C, BELWAL M. Aquatic hyphomycetes as endophytes of riparian plant roots[J]. Mycologia, 2005, 97(1):45-49.
- [7] 马长乐,黄晓霞,艾星梅,等. 云南榭内生菌的分离及抗植物病原菌活性筛选[J]. 西部林业科学,2014,43(4):10-14.
- [8] GAGNÉ S, RICHARD C, ROUSSEAU H, et al. Xylem-residing bacteria in alfalfa roots[J]. Canadian journal of microbiology, 1987, 33(11):996-1000.
- [9] MCINROY J A, KLOEPPER J W. Studies on indigenous endophytic bacteria of sweet corn and cotton[M]//O' GARA F, DOWLING D N, BOESTE B. Molecular ecology of rhizosphere microorganisms; Biotechnology and the release of GMOs. New York: VCH, 2007.
- [10] GERMIDA J, SICILIANO S. Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of modern, recent and ancient wheat cultivars[J]. Biology and fertility of soils, 2001, 33(5):410-415.
- [11] 王瑶瑶,韩烈保,曾会明. 禾本科植物内生菌研究进展[J]. 生物技术通报,2008(3):33-38.
- [12] 秦华,林先贵,陈瑞蕊,等. DEHP 对土壤脱氢酶活性及微生物功能多样性的影响[J]. 土壤学报,2005,42(5):829-834.
- [13] 乔宏萍,黄丽丽,康振生. 小麦内生细菌及其对根茎部主要病原真菌的抑制作用[J]. 应用生态学报,2006,17(4):690-694.
- [14] 苗文莉. 小麦内生真菌多样性及其与宿主关系研究[D]. 郑州:郑州大学,2011:58.
- [15] 刘丽. 小麦内生菌的分离与鉴定[J]. 沈阳师范大学学报(自然科学版),1998,16(4):41-46.
- [16] 庞发虎. 小麦内生细菌的种群多样性调查及其在小麦条锈病生物防治中的利用研究[D]. 南宁:广西大学,2016:161.
- [17] 何佳,刘笑洁,赵启美,等. 植物内生真菌分离方法的研究[J]. 食品科学,2009,30(15):180-183.

(上接第156页)

参考文献

- [1] FRANK J A, LEACH S S. Comparison of tuberborne and soilborne inoculum in the Rhizoctonia disease of potato[J]. Phytopathology, 1980, 70(1):51-53.
- [2] HORNBY D. Diseases caused by soil-borne pathogens[M]//JONES D G. The epidemiology of plant diseases. Netherlands:Springer, 1998.
- [3] 李彩虹,杨志辉,张岱,等. 马铃薯枯萎病拮抗菌的筛选与鉴定[J]. 江苏农业科学,2018,46(13):92-95.
- [4] 杨杉杉. 耐盐植物根际促生细菌筛选及其对盐胁迫小麦幼苗的促生效应研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2018.
- [5] 杨鸿儒. 西鄂尔多斯荒漠灌木根际细菌多样性和群落结构的研究[D].

呼和浩特:内蒙古农业大学,2016.

- [6] 张广臣,雷虹,何欣,等. 微生物发酵培养基优化中的现代数学统计学方法[J]. 食品与发酵工业,2010,36(5):110-113.
- [7] 肖怀秋,李玉珍. 微生物培养基优化方法研究进展[J]. 酿酒科技,2010(1):90-94.
- [8] 赵丽坤,郭会灿. 微生物培养基优化方法概述[J]. 石家庄职业技术学院学报,2008,20(4):50-52.
- [9] 姬广海,吴亚鹏,白学慧,等. 抗生素溶杆菌对魔芋软腐病和根际微生物多样性的影响[J]. 江西农业大学学报,2009,31(3):499-503,544.
- [10] 姜英华,胡白石,刘凤权. 植物土传病原菌拮抗细菌的筛选与鉴定[J]. 中国生物防治,2005,21(4):260-264.
- [11] 王云霞,钱国良,胡白石,等. 产酶溶杆菌 OH11 菌株摇瓶发酵条件研究[J]. 中国生物防治,2008,24(3):267-271.