

油菜内生细菌 yc8 发酵条件优化研究

邢 鲲^{1,2}, 韩巨才¹, 乔 建², 张 丽²

(1. 山西农业大学 农学院 /山西省绿色生物农药工程技术研究中心, 山西 太谷 030081; 2 太原市科技局 太原市星火技术发展中心, 山西 太原 030009)

摘要: 从山西太谷、运城采集的油菜中分离得到 40 株植物内生细菌, 经过初步筛选得到具有生防潜力的菌株 yc8, 经鉴定为环状芽孢杆菌 (*B. circulans*)。采用正交试验设计对油菜内生细菌 yc8 进行营养配方和发酵条件的系统研究。通过 yc8 发酵液中细菌浓度、拮抗物质质量浓度和 yc8 发酵液对油菜菌核病 [*Sclerotinia sclerotiorum* (L h) de Bary] 的抑菌作用综合评定, 得到优化配方为: 麦芽糖 (30 g/L)、牛肉膏 (50 g/L)、酵母粉 (7 g/L)、MnSO₄ (2 g/L)、FeSO₄ (1 g/L)、ZnSO₄ (2 g/L)、CaSO₄ (2 g/L)、CuSO₄ (2 g/L)、K₂HPO₄ (2 g/L)、KAl(SO₄)₂ (1 g/L)、发酵温度 28 ℃、装液量 40%、摇床转速 150 r/min、发酵液 pH = 7.5, 使环状芽孢杆菌在摇瓶发酵条件产生拮抗物质质量浓度达到为 725.1 μg/mL 和对油菜菌核病菌的平板抑菌率达到 85.3%。

关键词: 植物内生细菌; 环状芽孢杆菌; 发酵条件

中图分类号: Q939.9 文献标志码: A 文章编号: 1000- 2286(2010)06- 1265- 09

A Study on Fermentation Condition for Endophytic Bacteria yc8 from Rape

XING Kun^{1,2}, HAN Ju-cai¹, QIAO Jian², Zhang Li²

(1. Engineering Research Center of Green Microbial Pesticide of Shanxi Province, College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China; 2. Science and Technology Bureau of Taiyuan, Spark Technique Development Center of Taiyuan, Taiyuan 030009, China)

Abstract Forty endophytic bacterium strains were isolated from rape which were collected from Taigu and Yuncheng County in Shanxi Province in P. R. China. Inhibitory activity of yc8 was obvious in the primary antagonistic screening experiment and the fermentation condition was studied. It was characterized to be *B. circulans*. This experiment which took different kinds of carbon source and nitrogen source, different concentrations of yeast powder and metal ion and fermentation condition as the basic factor, adopted orthogonal experimental design to test. Then, the optimized formula was selected by the comparison of bacterial concentration of yc8, the antagonistic substance concentration of yc8 production and the inhibitory activity of yc8 to *Sclerotinia sclerotiorum* (L h) de Bary. The result indicated the fermentation conditions were malt sugar (30 g/L), beef extract (50 g/L), yeast powder (7 g/L), MnSO₄ (2 g/L), FeSO₄ (1 g/L), ZnSO₄ (2 g/L), CaSO₄ (2 g/L), CuSO₄ (2 g/L), K₂HPO₄ (2 g/L), KAl(SO₄)₂ (1 g/L), fermentation temperature 28 ℃, the content of fermentation fluid 40%, the rotational speed of shaker 150 r/min, pH = 7.5, under which the concentration of the antagonistic substances produced by *B. circulans* reached 725.1 μg/mL and had strong inhibitory activity against *Sclerotinia sclerotiorum* (L h) de Bary.

Key words endophytic bacterium; *Bacillus circulans*; fermentation condition

收稿日期: 2010- 09- 10 修回日期: 2010- 10- 26

基金项目: 山西省留学归国基金项目 (2007061, 2009043)、山西省科技攻关项目 (2007031039) 和太原市大学生创新创业项目 (100115181)

作者简介: 邢鲲 (1980-), 男, 博士, 主要从事微生物农药与病虫害防治研究, E-mail: xingkun19801215@163.com

植物内生细菌^[1] (endophytic bacteria) 是定殖在健康植物组织内并与植物建立和谐联合关系的一类微生物。油菜内生细菌 yc8 作为植物内生细菌中的一种, 对植物具有较好的亲和性^[2], 还可以起到提高植物对不良环境条件的抵御能力^[3]、直接或间接促进植物生长^[4]、减少病虫害^[5]等作用。作为一种多方面有益生物学作用的天然资源和微生物农药筛选的一种新资源, 油菜内生细菌 yc8 不仅对实现农业可持续发展有十分深远的理论研究价值, 而且具有广阔的使用研究价值。

本文首次采用多因素正交试验, 对油菜内生细菌 yc8 的室内发酵条件进行优化, 并通过 yc8 发酵液中细菌浓度、拮抗物质质量浓度和 yc8 发酵液对油菜菌核病 [*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary] 的抑菌作用进行综合评定。此方法不仅系统地研究了不同发酵因素对油菜内生细菌 yc8 的影响, 而且将对油菜内生细菌 yc8 的后期大规模发酵以及更好地进行大田试验奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 油菜内生细菌 yc8 菌株, 自行分离得到; 指示菌: 油菜菌核病 [*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary]。

1.1.2 培养基 油菜内生细菌 yc8 斜面培养基: 牛肉膏蛋白胨 (NA) 培养基^[6]; 油菜菌核病指示菌平板培养基: PDA 培养基^[7]。

1.1.3 油菜内生细菌 yc8 初始发酵条件筛选 供试碳源种类为葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、果糖、乳糖; 供试碳源选取质量浓度为 30 g/L。

供试氮源种类为牛肉膏、蛋白胨、黄豆粉、 KNO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 供试氮源选取质量浓度为 50 g/L。供试酵母粉选取质量浓度为 3 g/L、5 g/L、7 g/L、9 g/L、10 g/L。供试金属离子种类为 MnSO_4 、 FeSO_4 、 ZrSO_4 、 CaSO_4 、 CuSO_4 、 K_2HPO_4 、 $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$; 供试金属离子选取质量浓度为 1 g/L 和 2 g/L 两种浓度。

1.2 方法

1.2.1 油菜内生细菌 yc8 培养 菌种培养: 将油菜内生细菌接种于 NA 培养基中, 置于恒温培养箱中 30 °C 暗箱培养 2~3 d。发酵培养: 将油菜内生细菌 yc8 制备成 10^7 cfu/mL 菌液, 按 3% 接入量接入筛选发酵培养基中, 进行发酵培养。

1.2.2 油菜菌核病指示菌的培养 将油菜菌核病 [*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary] 接种于 PDA 培养基上, 置于恒温培养箱中 25 °C, 暗箱培养 2~3 d。

1.2.3 油菜内生细菌 yc8 发酵基本营养物质筛选 以质量浓度为 30 g/L 的不同碳源 (葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、果糖、乳糖)、质量浓度为 50 g/L 的不同氮源 [牛肉膏、蛋白胨、黄豆粉、 KNO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$]、不同质量浓度的酵母粉 (3 g/L、5 g/L、7 g/L、9 g/L、10 g/L) 为主要原料, 试验采用 3 个因素 5 个水平的正交试验设计。在 28 °C 条件下, 采用 1 000 mL 三角瓶装液量为 30%, 转速为 130 r/min 进行 20 h 发酵^[8]。再以 yc8 发酵液的细菌浓度、yc8 产抗菌活性物质质量浓度、yc8 发酵液对油菜菌核病 [*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary] 抑菌作用, 进行综合评比后选出优化配方。

1.2.4 油菜内生细菌 yc8 发酵所需不同金属离子浓度条件筛选 以质量浓度为 1 g/L 或 2 g/L 的不同金属离子稳定合物 [MnSO_4 、 FeSO_4 、 ZnSO_4 、 CaSO_4 、 CuSO_4 、 K_2HPO_4 、 $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$] 为主要原料, 试验采用 7 个因素 2 个水平的正交试验设计。在 28 °C 条件下, 采用 1 000 mL 三角瓶装液量为 30%, 转速为 130 r/min 进行 20 h 发酵。再以 yc8 发酵液中细菌浓度、抗菌活性物质质量浓度和 yc8 发酵液对油菜菌核病 [*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary] 抑菌作用, 进行综合评比后选出优化配方。

1.2.5 油菜内生细菌 yc8 发酵条件筛选 以不同的发酵温度 (26 °C、28 °C、30 °C、32 °C)、1 000 mL 三角瓶不同装液量 (10%、20%、30%、40%)、不同摇床转速 (110 r/min、130 r/min、150 r/min、170 r/min)、不同发酵液 PH 值 (7.7、5.8、8.5) 为主要条件, 试验采用 4 个因素 4 个水平的正交试验设计, 进行 20 h 发酵。再以 yc8 发酵液的细菌浓度、yc8 的产拮抗物质质量浓度、yc8 发酵液的抑菌作用, 进行综合评比后选出优化配方。

1.2.6 检测方法 ①不同发酵液配方中细菌浓度测定。油菜内生细菌 yc8 发酵培养后, 采用分光光度法, 检测 600 nm 的吸收值 (以相应的发酵培养液为对照)。②不同发酵液配方中拮抗物质质量浓度测

定。油菜内生细菌 yc8 发酵培养后, 在 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min 去菌体, 取上清液与蒸馏水 1:19 混合后, 在 280 nm 和 260 nm 条件下比色 (以蒸馏水为对照)。③不同发酵液配方中拮抗物质抑菌作用测定。油菜内生细菌 yc8 发酵培养后, 将发酵培养液在 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min 去菌体。取上清液 1 mL 与 9 mL 的 PDA 培养基, 充分摇匀, 冷却后以直径为 4 mm 油菜菌核病 [*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary] 作为指示菌, 接入平板中间。以 10 mL 的 PDA 培养基为对照, 都置于 20 °C 恒温培养箱中, 暗箱培养 3~4 d, 进行测定, 检查抑菌圈的有无及大小。

1.2.7 数据分析 试验均设 3 次重复, 取平均值。并进行 Duncan 新复极差法多重比较。

$$\text{菌落生长直径} = 3 \text{ 次测量直径平均值} - 4.0 \text{ mm (接入指示菌直径)} \quad (1)$$

$$\text{菌丝生长抑制率} = (\text{对照菌落生长直径} - \text{处理菌落生长直径}) / \text{对照菌落生长直径} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{拮抗物质质量浓度} (\mu\text{g/mL})^{[9]} = 1.45A_{280\text{nm}} - 0.74A_{260\text{nm}} \quad (3)$$

2 结果及分析

2.1 油菜内生细菌 yc8 发酵基本营养物质筛选结果

不同碳源筛选的中, 麦芽糖能提高 yc8 发酵培养中拮抗物质质量浓度和 yc8 发酵液对油菜菌核病 [*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary] 抑菌率。不同氮源筛选中, yc8 对于有机氮的利用明显高于对无

表 1 油菜内生细菌 yc8 发酵基本营养物质筛选正交试验结果

Tab 1 Orthogonal design result of basic culture medium of yc8

编号 No	不同碳源 (α) Different carbon source	不同氮源 (β) Different nitrogen source	酵母粉含量 (γ) Different concentrations of yeast powder	OD _{600nm} 值 OD _{600nm} Value	拮抗物质质量浓度 (μg·mL ⁻¹) Antagonistic substances concentration	抑菌率 /% Inhibitory activity rate
1	1(葡萄糖)	1(牛肉膏)	1(3 g/L)	1.30ABC	0.352 1A BCD	52.03ABC
2	1	2(蛋白胨)	2(5 g/L)	1.81ABC	0.418 3A BCD	56.07ABC
3	1	3(黄豆粉)	3(7 g/L)	1.12ABC	0.550 0A BC	70.93AB
4	1	4(KNO ₃)	4(9 g/L)	1.14ABC	0.352 5A BCD	50.80ABC
5	1	5[(NH ₄) ₂ SO ₄]	5(10 g/L)	0.60BC	0.217 6A BCD	41.54ABC
6	2(蔗糖)	1	2	0.84ABC	0.576 9A	66.32AB
7	2	2	3	1.25ABC	0.457 0A BCD	64.23ABC
8	2	3	4	1.01ABC	0.365 1A BCD	44.65ABC
9	2	4	5	0.63BC	0.201 0BCD	40.23C
10	2	5	1	1.11ABC	0.320 8A BCD	41.04ABC
11	3(麦芽糖)	1	3(7 g/L)	1.94A	0.615 1A	82.50A
12	3	2	4	1.92A	0.439 2A BCD	63.20ABC
13	3	3	5	1.03ABC	0.486 1A BCD	50.54ABC
14	3	4	1	1.72ABC	0.156 3CD	35.60C
15	3	5	2	1.10ABC	0.254 0A BCD	39.41C
16	4(乳糖)	1	4	1.71ABC	0.601 3A B	82.21A
17	4	2	5	0.53C	0.405 8A BCD	50.15ABC
18	4	3	1	1.34ABC	0.358 4A BCD	56.24ABC
19	4	4	2	1.23ABC	0.247 6A BCD	42.34ABC
20	4	5	3	0.82ABC	0.203 3A BCD	43.31ABC
21	5(果糖)	1	5	0.71ABC	0.435 8A BCD	35.40C
22	5	2	1	1.03ABC	0.352 0A BCD	40.56BC
23	5	3	2	1.11ABC	0.402 3A BCD	48.64ABC
24	5	4	3	1.00ABC	0.218 4A BCD	34.73C
25	5	5	4	0.54C	0.104 6D	32.08C

不同字母 (A, B, C, D) 表示在 P = 0.01 水平差异显著。

Different letters above each value indicate significant differences at P = 0.01

机氮的利用。其中,蛋白胨可以明显高 yc8 拮抗物质的产生。较高或较低的酵母粉含量都不利于 yc8 拮抗物质的产生,含量为 7 g/L 较适合 yc8 拮抗物质的产生(表 1)。

油菜内生细菌 yc8 发酵基本营养条件正交试验优化结果分析。从正交试验菌体生长量结果分析表明,碳源对于 yc8 生长是主要因素,其次是酵母粉、氮源。从正交试验拮抗物质质量浓度结果分析表明,氮源对于 yc8 产拮抗物质质量浓度占重要作用,其因素作用分别大于酵母粉含量和氮源。从正交试验抑菌作用结果分析表明,因素主次顺序是氮源、碳源、酵母粉含量。选择 K 值最大的水平为因素的最佳

表 2 yc8 发酵基本营养条件正交试验菌体生长量结果分析

Tab 2 The growth analysis result of basic culture medium of yc8

因子 Factor	水平 Level	均值(K) Mean(K)	R	$P = 0.01$	因素主次 Factor order	优化方案 Optimize proposal
不同碳源(α) Different carbon source	3	1.54	0.67	A	$\alpha > \gamma > \beta$	$\alpha_3 \gamma_1 \beta_1$
	1	1.18		AB		
	4	1.10		AB		
	2	0.94		B		
	5	0.86		C		
不同氮源(β) Different nitrogen source	1	1.30	0.48	A		
	2	1.28		A		
	4	1.12		B		
	3	1.10		B		
	5	0.82		C		
酵母粉含量(γ) Different concentrations of yeast powder	1	1.28	0.60	A		
	4	1.24		AB		
	3	1.22		B		
	2	1.20		B		
	5	0.68		C		

不同字母(A, B, C, D)表示在 $P = 0.01$ 水平差异显著。

Different letters above each value indicate significant differences at $P = 0.01$

表 3 油菜内生细菌 yc8 发酵基本营养条件正交试验拮抗物质质量浓度结果分析

Tab 3 The protein concentration analysis result of basic culture medium of yc8

因子 Factor	水平 Level	均值(K) Mean(K)	R	$P = 0.01$	因素主次 Factor order	优化方案 Optimize proposal
不同碳源(α) Different carbon source	3	0.3901	0.0875	A	$\beta > \gamma > \alpha$	$\beta_1 \gamma_3 \alpha_3$
	2	0.3842		AB		
	1	0.3781		B		
	4	0.3633		B		
	5	0.3026		C		
不同氮源(β) Different nitrogen source	1	0.5162	0.2961	A		
	3	0.4324		A		
	2	0.4145		A		
	4	0.2352		B		
	5	0.2201		C		
酵母粉含量(γ) Different concentrations of yeast powder	3	0.4088	0.1008	A		
	2	0.3798		AB		
	4	0.3725		AB		
	5	0.3493		B		
	1	0.3079		C		

不同字母(A, B, C, D)表示在 $P = 0.01$ 水平差异显著。

Different letters above each value indicate significant differences at $P = 0.01$

水平, 综合 3 种上述结果分析(表 2 表 3 表 4), 最后优化方案为 $\alpha_3\beta_1\gamma_3$, 即麦芽糖 (30 g/L)、牛肉膏 (50 g/L) 和 7 g/L 酵母粉。此时, 发酵液中产生拮抗物质质量浓度和对油菜菌核菌的平板抑菌率分别为 0.615 $\mu\text{g/mL}$ 和 85.5%。

表 4 yc8 发酵基本营养条件正交试验抑菌作用结果分析

Tab 4 The inhibitory activity analysis result of basic culture medium of yc8

因子 Factor	水平 Level	均值 (K) Mean (K)	R	P = 0.01	因素主次 Factor order	优化方案 Optimize proposal
不同碳源 (α) Different carbon source	1	54.27	15.99	A	$\beta > \alpha > \gamma$	$\beta_1\alpha_1\gamma_3, \beta_1\alpha_3\gamma_3$
	3	54.25		A		
	4	53.85		AB		
	2	51.29		B		
	5	38.28		C		
不同氮源 (β) Different nitrogen source	1	63.69	24.81	A		
	2	54.84		B		
	3	53.80		B		
	4	40.74		BC		
	5	38.88		C		
酵母粉含量 (γ) Different concentrations of yeast powder	3	58.54	14.97	A		
	4	54.59		AB		
	2	50.56		B		
	1	44.70		B		
	5	43.57		B		

不同字母 (A, B, C, D) 表示在 $P = 0.01$ 水平差异显著。

Different letters above each value indicate significant differences at $P = 0.01$

2.2 油菜内生细菌 yc8 发酵所需不同金属离子浓度筛选结果

油菜内生细菌 yc8 发酵不同金属离子浓度正交试验优化分析结果表明 (表 5)。

表 5 油菜内生细菌 yc8 发酵不同金属离子质量分数筛选正交试验结果

Tab 5 Orthogonal design result of concentration of the metal ion effect on yc8

编号 No.	MnSO ₄ (α)	FeSO ₄ (β)	ZnSO ₄ (γ)	CaSO ₄ (δ)	CuSO ₄ (ϵ)	K ₂ HPO ₄ (ζ)	KAl(SO ₄) ₂ (η)	OD _{600nm} 值 OD _{600nm} value	拮抗物质质量浓度	抑菌率 %
									($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) Antagonistic substances concentration	Inhibitory activity rate
1	1(1 g/L)	1(1 g/L)	1(1 g/L)	1(1 g/L)	1(1 g/L)	1(1 g/L)	1(1 g/L)	1.35C	0.434 4F	53.57E
2	1	1	1	2	2	2	2	1.55BC	0.464 0E	56.73D
3	1	2(2 g/L)	2	1	1	2	2	1.41BC	0.382 2G	48.87F
4	1	2	2	2	2(2 g/L)	1	1	1.45BC	0.488 8D	55.97D
5	2(2 g/L)	1	2	1	2	1	2	1.42BC	0.440 5F	55.43D
6	2	1	2(2 g/L)	2(2 g/L)	1	2(2 g/L)	1	1.72A	0.6796 A	84.83A
7	2	2	1	1	2	2	1	1.60B	0.510 1C	59.27C
8	2	2	1	2	1	1	2	1.55BC	0.580 5B	64.63B

不同字母 (A, B, C, D) 表示在 $P = 0.01$ 水平差异显著。

Different letters above each value indicate significant differences at $P = 0.01$

从正交试验 OD₆₀₀ 结果分析表明, K₂HPO₄、MnSO₄、CaSO₄ 对于 yc8 生长是主要因素, 其次是 KAl(SO₄)₂、FeSO₄ 和 CuSO₄、ZnSO₄。从正交试验拮抗物质质量浓度结果分析表明, Ca²⁺ 对于 yc8 产生拮抗物质质量浓度占重要作用, 其因素作用分别大于 MnSO₄、KAl(SO₄)₂、CuSO₄、K₂HPO₄、FeSO₄、ZnSO₄。从正交试验抑菌作用结果分析表明, 因素主次顺序是 MnSO₄、CaSO₄、KAl(SO₄)₂、CuSO₄、K₂HPO₄、FeSO₄、

ZnSO₄。选择 K 值最大的水平为因素的最佳水平 (表 6、表 7、表 8), 综合 3 种上述结果分析, 最后优化方案为 α₂β₁γ₂δ₂ε₂ζ₂η₁, 即 2 g/L MnSO₄、1 g/L FeSO₄、2 g/L ZnSO₄、2 g/L CaSO₄、1 g/L CuSO₄、2 g/L K₂HPO₄ 和 1 g/L KAl(SO₄)₂。

表 6 油菜内生细菌 yc8 发酵不同金属离子正交试验菌体生长量结果分析

Tab 6 The growth analysis result of the metal ion effect on yc8

序号 No	MnSO ₄ (α)	FeSO ₄ (β)	ZnSO ₄ (γ)	CaSO ₄ (δ)	CuSO ₄ (ε)	K ₂ HPO ₄ (ζ)	KAl(SO ₄) ₂ (η)	因素主次 Factor order
K ₁	1.44	1.55	1.51	1.44	1.55	1.44	1.57	ζ = α = δ > η > β = ε > γ
K ₂	1.61	1.50	1.54	1.61	1.50	1.61	1.47	
R	0.17	0.05	0.03	0.17	0.05	0.17	0.10	
优化方案 (Optimize proposal) ζ ₁ (或 2) α ₁ (或 2) δ ₁ (或 2) η ₁ β ₁ (或 2) ε ₁ (或 2) γ ₂								

表 7 油菜内生细菌 yc8 发酵不同金属离子正交试验拮抗物质质量浓度结果分析

Tab 7 The protein concentration analysis result of the metal ion effect on yc8

序号 No	MnSO ₄ (α)	FeSO ₄ (β)	ZnSO ₄ (γ)	CaSO ₄ (δ)	CuSO ₄ (ε)	K ₂ HPO ₄ (ζ)	KAl(SO ₄) ₂ (η)	因素主次 Factor order
K ₁	0.4423	0.5046	0.4972	0.4418	0.5192	0.4861	0.5282	δ > α > η > ε > ζ > β > γ
K ₂	0.5527	0.4904	0.4978	0.5532	0.4759	0.5090	0.4668	
R	0.1104	0.0142	0.0005	0.1114	0.0433	0.0229	0.0614	
优化方案 (Optimize proposal) δ ₂ α ₂ η ₁ ε ₁ ζ ₂ β ₁ γ ₂								

表 8 油菜内生细菌 yc8 发酵不同金属离子正交试验抑菌作用结果分析

Tab 8 The inhibitory activity analysis result of the metal ion effect on yc8

序号 No	MnSO ₄ (α)	FeSO ₄ (β)	ZnSO ₄ (γ)	CaSO ₄ (δ)	CuSO ₄ (ε)	K ₂ HPO ₄ (ζ)	KAl(SO ₄) ₂ (η)	因素主次 Factor order
K ₁	53.78	62.39	58.55	54.28	62.73	57.40	63.16	α > δ > η > ε > β > ζ > γ
K ₂	65.79	57.18	61.03	65.29	56.85	62.18	56.42	
R	12.01	5.21	2.48	11.01	5.88	4.78	6.74	
优化方案 (Optimize proposal) α ₂ δ ₂ η ₁ ε ₂ β ₁ ζ ₂ γ ₂								

2.3 油菜内生细菌 yc8 发酵条件筛选结果

油菜内生细菌 yc8 发酵条件正交试验优化结果分析 (表 9) 结果表明, 装液量为 40% 有利于 yc8 的生长, 并且提高 yc8 发酵培养中拮抗物质质量浓度和 yc8 发酵液对油菜菌核病 [*Sclerotinia sclerotiorum* (Lb) de Bary] 抑菌率。不同摇床转数中, 150 r/min 能明显提高 yc8 的生长。28 ℃ 对于 yc8 提高抑菌作用有促进作用。较高或较低的 pH 都不利于 yc8 拮抗物质的产生, pH = 7.5 较适合 yc8 拮抗物质的产生。

油菜内生细菌 yc8 发酵条件正交试验优化结果分析结果表明, 装液量对于 yc8 生长是主要因素, 其次是摇床转数、pH 值、发酵温度。在不同装液量中, K₄ 值明显大于其余水平的 k 值, 并且在 1% 上与 K₁、K₂、K₃ 差异显著。在不同摇床转数中, K₃ > K₄ > K₁ > K₂, 150 r/min 是油菜内生细菌 yc8 生长的最佳摇床转数。在不同 pH 值中, 其 k 值在 1% 的水平上差异都不显著, 选择 k 值最大的水平为因素的最佳水平, pH = 7.5 有利于提高油菜内生细菌 yc8 中的生长。发酵温度的差异对于油菜内生细菌 yc8 生长的影响不明显, 表现在 1% 的水平上差异不显著。选择 K 值最大的水平为因素的最佳水平 (表 10、表 11、表 12), 综合上述结果分析, 最后优化方案为 β₄γ₃₆α₄, 即温度 28 ℃、装液量 40%、摇床转数 150 r/min 和 pH 值 7.5。发酵 20 h 后发酵液中的拮抗物质单位为 725.1 μg/mL 和对油菜菌核病菌的平板抑菌率达到 85.3%。

表 9 油菜内生细菌 yc8 发酵条件筛选正交试验结果

Tab 9 Orthogonal design result of the fermentable condition of yc8

编号 No	温度 (α) Temperature	装液量 (β) The content of fluid	摇床转数 (γ) Rotation speed	pH 值 (δ) pH Value	OD _{600nm} 值 OD _{600nm} value	拮抗物质质量浓度 (μg·mL ⁻¹) Antagonistic substances concentration	抑菌率 % Inhibitory activity rate
1	1(26℃)	1(10%)	1(110 r/min)	1(pH=7)	1.27DE	0.4389DE	60.57E
2	1	2(20%)	2(130 r/min)	2(pH=7.5)	1.20F	0.5090C	75.60C
3	1	3(30%)	3(150 r/min)	3(pH=8)	1.70A	0.4376DE	59.47F
4	1	4(40%)	4(170 r/min)	4(pH=8.5)	1.37D	0.4990DE	72.03A
5	2(28℃)	1	2	3	1.13F	0.5085C	75.98C
6	2	2	1	4	1.23E	0.5080C	74.10C
7	2	3	4	1	1.47C	0.4416DE	62.87E
8	2	4	3	2	1.79A	0.7251A	85.31A
9	3(30℃)	1	3	4	1.27DE	0.4446DE	60.40E
10	3	2	4	3	1.43CD	0.4787D	71.00D
11	3	3	1	2	1.30D	0.4505FG	64.00E
12	3	4	2	1	1.57B	0.4675F	63.23E
13	4(32℃)	1	4	2	1.37D	0.6954A	80.80AB
14	4	2	3	1	1.50C	0.3980H	49.67G
15	4	3	2	4	1.23E	0.5203B	75.90B
16	4	4	1	3	1.53C	0.5016C	74.63B

不同字母 (A, B, C, D) 表示在 $P = 0.01$ 水平差异显著。

Different letters above each value indicate significant differences at $P = 0.01$

表 10 油菜内生细菌 yc8 发酵条件正交试验菌体生长量结果分析

Tab 10 The growth analysis result of the fermentable condition of yc8

因子 Factor	水平 Level	均值 (K) Mean(K)	R	$P = 0.01$	因素主次 Factor order	优化方案 Optimize proposal
温度 (α) Temperature	4	1.41	0.07	A	$\beta > \gamma > \delta > \alpha$	$\beta_4 \gamma_3 \delta_1 \alpha_4$
	3	1.39		A		
	2	1.39		A		
	1	1.34		B		
装液量 (β) Content of fluid	4	1.55	0.31	A		
	3	1.40		AB		
	2	1.34		B		
	1	1.24		C		
摇床转数 (γ) Rotation speed	3	1.53	0.25	A		
	4	1.41		AB		
	1	1.31		B		
	2	1.28		C		
pH 值 (δ) pH value	1	1.43	0.15	A		
	3	1.42		AB		
	2	1.40		B		
	4	1.28		C		

不同字母 (A, B, C, D) 表示在 $P = 0.01$ 水平差异显著。

Different letters above each value indicate significant differences at $P = 0.01$

表 11 油菜内生细菌 yc8 发酵条件正交试验拮抗物质质量浓度结果分析

Tab 11 The protein concentration analysis result of the fermentable condition of yc8

因子 Factor	水平 Level	均值(K) Mean(K)	R	P = 0.01	因素主次 Factor order	优化方案 Optimize proposal
温度 (α) Temperature	2	0.5458	0.0855	A	δ > β > α > γ	δ ₂ β ₄ α ₂ γ _(2或3)
	4	0.5013		AB		
	1	0.4711		B		
	3	0.4603		B		
装液量 (β) The content of fluid	4	0.5483	0.1164	A		
	1	0.4943		AB		
	2	0.4734		AB		
	3	0.4625		B		
摇床转数 (γ) Rotation speed	2	0.5013	0.0266	A		
	3	0.5013		A		
	4	0.5012		A		
	1	0.4748		B		
pH 值 (δ) pH value	2	0.5675	0.1310	A		
	4	0.4930		B		
	3	0.4816		B		
	1	0.4365		C		

不同字母 (A, B, C, D) 表示在 P = 0.01 水平差异显著。

Different letters above each value indicate significant differences at P = 0.01

表 12 油菜内生细菌 yc8 发酵条件正交试验抑菌率作用结果分析

Tab 12 The inhibitory activity analysis result of the fermentable condition of yc8

因子 Factor	水平 Level	均值(K) Mean(K)	R	P = 0.01	因素主次 Factor order	优化方案 Optimize proposal
温度 (α) Temperature	2	75.07	10.41	A	δ > α > β > γ	δ ₂ α ₂ β ₄ γ ₂
	4	70.25		A		
	1	66.92		B		
	3	64.66		C		
装液量 (β) The content of fluid	4	74.30	8.74	A		
	1	69.44		B		
	2	67.59		B		
	3	65.56		C		
摇床转数 (γ) Rotation speed	2	72.68	8.46	A		
	4	71.68		AB		
	1	68.32		B		
	3	64.21		C		
pH 值 (δ) pH value	2	76.93	17.84	A		
	4	70.61		AB		
	3	70.27		AB		
	1	59.09		C		

不同字母 (A, B, C, D) 表示在 P = 0.01 水平差异显著。

Different letters above each value indicate significant differences at P = 0.01

3 讨 论

以往有关于植物内生细菌的发酵培养大多采用单因素多水平试验^[10], 评价指标也仅是发酵后植物内生细菌的浓度或对某种植物病原菌的抑菌率^[11-12]。这种方法虽然可以简单、快捷地得到植物内生细菌较好的发酵条件, 但是各种营养物质之间、不同发酵条件之间对植物内生细菌交互作用并没进行系统研究, 并且单一的评价指标不能更准确得到植物内生细菌的最佳生长条件。

本文首次采用多因素正交试验, 从多种考察因素中通过各考察因素之间的主次关系对油菜内生细菌 yc8 生长和产生有效物质的发酵条件进行系统研究。研究发现, 麦芽糖 (30 g/L)、牛肉膏 (50 g/L)、酵母粉 (7 g/L)、MnSO₄ (2 g/L)、FeSO₄ (1 g/L)、ZnSO₄ (2 g/L)、CaSO₄ (2 g/L)、CuSO₄ (2 g/L)、K₂HPO₄ (2 g/L)、KAL (SO₄)₂ (1 g/L)、发酵温度 28 ℃、装液量 40%、摇床转数 150 r/min 发酵液 pH = 7.5 发酵时间为 20 h 时, 得到油菜内生细菌 yc8 的最佳发酵条件。与杨华^[13]、柳凤^[14]、何红^[15] 等研究结果有所不同, 这说明不同植物内生细菌的最佳发酵条件是不同的。这可能与内生细菌寄居的植物内环境有一定关系^[16]。研究还发现油菜内生细菌 yc8 的生长、产生抗菌活性物质质量浓度和发酵液的抑菌作用互相成正相关。说明油菜内生细菌 yc8 可以产生多种对植物病原菌有拮抗的物质, 包括抗菌活性物质、多活性物质、核苷酸和生物碱类等抗菌物质, 与前人的结论相似^[17]。今后还将对油菜内生细菌 yc8 的罐装发酵试验以及大田防效进行深入研究。

参考文献:

- [1] Kloepper JW, Beauchamp C J. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria[J]. Can J Microbiol 1992, 38(5): 1219-1232
- [2] Sturz Christie M, Atheson, et al. Endophytic bacterial communities in the perilem of potato tubers and their potential to improve resistance to soilborne plant pathogens[J]. Plant Pathology, 2009, 48(3): 360-369
- [3] Kristina Ulrich, Andreas Ulrich, Dietrich Ewald. Diversity of endophytic bacterial communities in poplar grown under field conditions[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2008, 63(2): 169-180
- [4] Robert P Ryan, Kieran Gemaine, Ashley Franks, et al. Bacterial endophytes: Recent developments and applications[J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, 278(1): 1-9
- [5] 刘萍, 刘慧平, 韩巨才, 等. 油菜内生细菌 yc8 发酵产物特性初探[J]. 江西农业大学学报, 2007, 29(2): 301-304
- [6] 林运萍, 谭志琼, 张荣意. 香蕉冠腐病拮抗细菌 B68 的发酵条件[J]. 热带作物学报, 2006, 27(2): 82-94
- [7] 李景良, 宋达峰, 顾青. 植物乳杆菌 ZB16 生产细菌素[J]. 微生物学报, 2008, 48(6): 818-823
- [8] 邢鲲, 韩巨才, 刘慧平. 油菜内生细菌 yc8 拮抗作用初步研究[J]. 江西农业大学学报, 2005, 27(6): 852-856
- [9] 柳凤, 欧雄常, 何红, 等. 红树内生细菌 RS261 防治辣椒疫病机理的初步研究[J]. 植物病理学报, 2010, 42(1): 74-81
- [10] 任争光, 张志勇, 李丹, 等. 芽孢杆菌 BJ6 产抗菌物质发酵条件初探[J]. 中国农学通报, 2007, 23(5): 320-325
- [11] Tanyildizim S, Qzer D, Elibol M. Optimization of d-amylase production by *Bacillus* sp. using response surface methodology[J]. Biochemistry, 2005, 40(7): 2291-2296
- [12] Chen Q H, Ruan H, Zhang H F, et al. Enhanced production of elastase by *Bacillus licheniformis* ZJUEI 31410: Optimization of cultivation conditions using response surface methodology[J]. Journal of Zhejiang University Science (B), 2007, 31(8): 845-852
- [13] 杨华, 纪明山, 李广旭, 等. 不同发酵条件对苹果轮纹病拮抗细菌生长的影响[J]. 果树学报, 2007, 24(6): 799-802
- [14] 柳凤, 卢仕严, 何红, 等. 红树内生细菌 RS261 抗菌物质的发酵优化和性质分析[J]. 植物保护, 2009, 51(5): 70-75
- [15] 何红, 沈兆昌, 邱思鑫, 等. 内生拮抗枯草芽孢杆菌 BS-2 菌株的发酵条件[J]. 中国生物防治, 2004, 20(1): 38-41
- [16] Debnath T A, Gagliardi J V, Angle J S, et al. Influence of the zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* J & C Presl and the non-metal accumulator *Trifolium pratense* L. on soil microbial populations[J]. Can J Microbiol 2001, 47(5): 773-776
- [17] Gennaro M, Gonthier P, Nicolotti G. Fungal endophytic communities in healthy and declining *Quercus robur* L. and *Q. cerris* L. Trees in Northern Italy[J]. Journal of Phytopathology, 2003, 151(10): 529-534