

链霉菌 Q0102b 菌株培养条件优化

王再强, 何月秋, 陈 贤, 夏金娥, 周 红, 杨大庆

(云南农业大学, 农业生物多样性与病虫害控制教育部重点实验室, 云南 昆明 650201)

摘要: Q0102b 是一株具有广泛抑菌作用的链霉菌菌株. 本文研究了 7 种碳源和 4 种氮源对该菌株生长量及抑菌活性的影响. 当玉米淀粉为碳源、酵母浸出汁为氮源时, Q0102b 培养液对燕麦镰刀菌 *Fusarium avenaceum* (Corda et Fr.) Sacc. 的抑制作用最强. 正交试验结果表明, 该菌株高抑菌活性的最佳培养条件为玉米淀粉 40 g/L、酵母浸出汁 7 g/L、氯化钠 10 g/L、pH 8.0, 培养液不稀释, 不加碳酸钙, 28 ℃, 装液量 100 mL, 75 r/min 频率下振荡培养 12 d.

关键词: 放线菌; 培养条件; 优化

中图分类号: S432.43

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2011)02-0116-03

Optimum Cultural Conditions for *Streptomyces* sp. Q0102b

WANG Zai-qiang, HE Yue-qiu, CHEN Xian, XIA Jin-e, ZHOU Hong, YANG Da-qing

(The Ministry of Education Key Laboratory for Agricultural Biodiversity and Pest Management,
Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: *Streptomyces* sp. Q0102b has a wide fungal repression spectrum. The cultural conditions including 7 carbon and 4 nitrogen sources were studied for its growth amount and antifungal activity. The corn starch and yeast extract used as carbon and nitrogen sources showed the strongest repression on *Fusarium avenaceum*. Based on orthogonal test, the optimized cultural condition for Q0102b's strong antifungal activity is 40 g/L corn starch, 7 g/L yeast extract, 10 g/L NaCl, packed 100 mL in 250 mL flask at pH 8.0 and 28 ℃ for 12-day incubation in a shaker at 75 r/min.

Key words: *Streptomyces*; cultural condition; optimization

链霉菌 *Streptomyces* 代谢产物是抗生素类农药的重要来源, 其代谢产物产量受培养条件影响较大^[1-2]. Q0102b 是一株从土壤中分离筛选到的放线菌, 室内抑菌试验表明其对番茄早疫病菌、梨黑星病菌、烟草赤星病菌、燕麦镰刀病菌等病原真菌有较强的抑制作用. 为了提高该菌株的代谢物产量和进一步开发, 笔者对该菌株产生抗菌物质的适宜发酵条件进行了研究.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 链霉菌 Q0102b 菌株和燕麦镰刀菌

Fusarium avenaceum (Corda et Fr.) Sacc., 均是云南农业大学植物保护学院农药学实验室分离和保藏的菌株.

1.1.2 培养基 (1) 斜面 and 发酵菌种培养基: 均采用马铃薯和葡萄糖(PD)为基础, 固体培养基(PDA)是液体培养基的基础上加 15 g/L 琼脂; (2) 发酵基础培养液: K_2HPO_4 0.5 g, $MgSO_4$ 0.5 g, NaCl 0.5 g, $FeSO_4$ 0.01 g, 水 1 000 mL; (3) 碳源筛选培养液: 发酵基础培养液加入 KNO_3 1 g 作为氮源, 分别加入 20 g 玉米淀粉、马铃薯淀粉、麦麸、谷糠、甜荞粉、高粱粉、红薯淀粉作为碳源; (4) 氮源筛选培养液: 发酵基础培养液加入谷糠 20 g 作为碳源, 分别加入 1 g 酵

收稿日期: 2010-03-28

作者简介: 王再强(1972—), 男, 讲师, 硕士; 通信作者: 何月秋(1956—), 男, 教授, 博士, E-mail: ynfh2007@163.com

基金项目: 科技部国际合作项目(2009DFA32360); 国家自然科学基金(30660007); 云南省教育厅科学研究基金(08C0083); 昆明市校企合作项目(09H130301)

母浸出汁、尿素、硝酸铵、氯化铵作为氮源。

1.2 方法

1.2.1 链霉菌 Q0102b 孢子液的制作 将实验室保存的链霉菌 Q0102b 菌种转接于 PDA 斜面培养基上培养 5 d,待孢子长出后,从斜面培养基刮取链霉菌 Q0102b 孢子,接入装有 100 mL 灭菌 PD 培养液的三角瓶(250 mL)中,在室温下,转速为 75 r/min 的摇床上培养 5 d 后,用灭菌注射器吸取 1 mL 培养液作为接种源。

1.2.2 发酵培养 以发酵基础培养液为基础,筛选碳源时,以 KNO₃ 作为固定氮源,碳源分别为玉米淀粉、马铃薯淀粉、麦麸、谷糠、甜荞粉、高粱粉、红薯淀粉。筛选氮源时,以谷糠作为固定碳源,氮源分别为

酵母浸出汁、尿素、硝酸铵、氯化铵,其他成分不变,共配制成 11 种不同的培养液,分装于 250 mL 的三角瓶中,每瓶 100 mL,灭菌后接入制作好的链霉菌 Q0102b 孢子液 1 mL,于室温下在转速为 75 r/min 的摇床上培养 5 d。

1.2.3 优化培养条件的正交试验设计 以发酵基础培养液为基础,综合考虑生物量测定结果与抑菌活性测定情况,选用玉米淀粉和酵母浸出汁分别作为碳源和氮源,结合培养温度、pH、培养时间、营养量(稀释倍数)、氯化钠质量浓度、碳酸钙质量浓度,采用 L₂₇(3¹³) 正交表,进行 8 因素 3 水平的正交试验(表 1)。

表 1 正交试验因子水平表
Tab.1 Factors and levels of orthogonal experiments

水平	A ρ(玉米淀粉) /(g·L ⁻¹)	B ρ(酵母浸出汁) /(g·L ⁻¹)	C θ/ ℃	D 培养时间 /d	E pH	F 稀释倍数	G ρ(氯化钠) /(g·L ⁻¹)	H ρ(碳酸钙) /(g·L ⁻¹)
1	10	1	24	4	6.0	1.0	0	0
2	20	3	28	8	7.0	2.0	10	1.0
3	40	7	32	12	8.0	3.0	20	2.0

1.2.4 生物量测定 目测观察记录三角瓶中孢子量、孢子颜色、培养液颜色情况,然后把培养液转入布氏漏斗,减压抽滤至不再有液体滴下,于电子天平上称量残渣质量。

1.2.5 抑菌活性测定 采用管碟法测定^[3]。在均匀混有燕麦镰刀菌 *Fusarium avenaceum* (Corda et Fr.) Sacc. 的 PDA 培养基上插入内径 5 mm 的灭菌牛津杯,往杯内加入发酵培养液(2 500 r/min 离心 10 min,取上清液)0.1 mL,平放入 28 ℃ 的培养箱中培养 2 d 后测量抑菌圈直径。

2 结果与分析

2.1 生物量测定结果

表 2 的结果表明,碳源为高粱粉、马铃薯淀粉时,链霉菌 Q0102b 生长情况较好,产生的孢子最多,其次是甜荞粉、麦麸和玉米淀粉。以硝酸铵为氮源时产生的孢子较多,以其他 3 种物质为氮源培养时链霉菌 Q0102b 生长状况较差。

2.2 碳源和氮源对链霉菌 Q0102b 抑菌活性的影响

在以玉米淀粉作为碳源的情况下,链霉菌 Q0102b 菌株代谢物对燕麦镰刀菌的抑菌活性显著强于其他碳源,抑菌圈直径可达 8.07 mm,其次为甜荞粉、谷糠、马铃薯淀粉,抑菌圈直径分别为 5.78、

表 2 不同碳、氮源对链霉菌 Q0102b 生长发育的影响
Tab.2 Effect of carbon and nitrogen sources on the growth of *Streptomyces* Q0102b

碳或氮源	孢子量 ¹⁾	孢子颜色	培养液颜色	生物量/g
高粱粉	+++	浅紫色	浅黄色	25.0
玉米淀粉	++	浅粉色	乳白色	8.5
马铃薯淀粉	+++	浅粉色	灰白色	25.0
红薯淀粉	++	浅粉色	灰色	8.5
麦麸	++	浅粉色	浅黄色	12.3
甜荞粉	++	浅粉色	棕色	13.8
谷糠	+	浅粉色	浅黄色	5.0
尿素	+	浅粉色	米黄色	4.1
氯化铵	+	浅粉色	浅黄色	3.8
硝酸铵	++	浅粉色	浅黄色	10.9
酵母浸出汁	+	白色	深褐色	5.0

1) +++:培养液液面和瓶壁上有大量孢子; ++:瓶壁上有大量孢子; +:瓶壁上可见少量孢子。

3.47、3.25 mm;麦麸作为碳源时抑菌活性较弱,红薯淀粉、高粱粉为碳源时链霉菌 Q0102b 菌株代谢物抑菌活性最小,抑菌圈直径小于 1 mm(表 2)。利用酵母浸出汁作为氮源时抑菌活性最强,与其他氮源有明显差别,利用硝酸铵、氯化铵和尿素作为氮源时对链霉菌 Q0102b 抑菌活性影响没有显著差别,作用较小(表 3)。

表3 链霉菌 Q0102b 在不同碳、氮源培养基中对燕麦镰刀菌的抑菌圈¹⁾

Tab.3 Effect of media with different carbon and nitrogen sources on inhibitory zone of *Streptomyces* Q0102b against *Fusarium avenaceum*

碳源	$d_{\text{抑菌圈}}/\text{mm}$	氮源	$d_{\text{抑菌圈}}/\text{mm}$
玉米淀粉	8.07a	酵母浸出汁	9.85a
甜荞粉	5.75b	氯化铵	0.81b
谷糠	3.47c	尿素	0.70b
马铃薯淀粉	3.25cd	硝酸铵	0.40b
麦麸	1.42de		
红薯淀粉	0.42e		
高粱粉	0.10d		

1) 数据后凡是有一个相同小写字母相同者,表示差异不显著($P>0.05$, Duncan's 法)。

2.3 优化培养条件的正交试验结果

正交试验结果(图1)表明,试验的8个因子都对

链霉菌 Q0102b 代谢产物抑菌活性有影响,从因子趋势图可以看出,营养量是影响链霉菌 Q0102b 代谢产物抑菌活性最重要的因子,在试验范围内随着稀释倍数增加,抑菌能力迅速减弱,玉米淀粉、酵母浸出汁用量增高、pH 增大,抑菌圈直径明显加大;最适培养温度为 28℃,温度过高或过低都使抑菌圈直径减小。氯化钠的最适质量浓度为 10 g/L。碳酸钙会影响链霉菌 Q0102b 代谢产物抑菌活性,不宜加入,培养时间为 12 和 4 d 时抑菌圈直径均大于培养 8 d 的,可能是链霉菌 Q0102b 代谢物分解、菌体自溶解及其他因素互作的效应叠加使得其规律性不太明显。综合以上分析可知, A3B3C2D3E3F1G2H1 为这 8 种发酵因素的最佳组合,该组合为玉米淀粉 40 g/L、酵母浸出汁 7 g/L、NaCl 10 g/L、pH8.0, 不加入 CaCO_3 , 培养液不稀释, 28℃ 下培养 12 d。

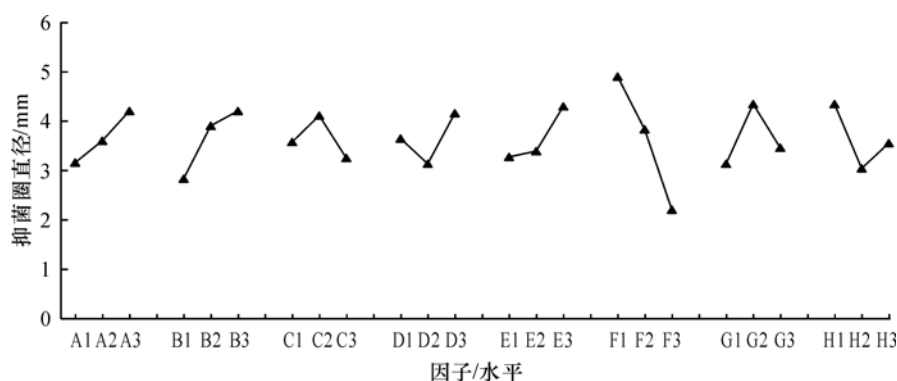


图1 培养条件正交试验的因子趋势

Fig.1 Cultural conditions orthogonal experiment factors trend

3 结论

不同培养条件下放线菌代谢产物的种类及数量也不同^[4-6]。本试验目的在于通过液体发酵条件的研究,提高链霉菌 Q0102b 代谢产物抑菌活性。碳、氮源筛选结果表明,链霉菌 Q0102b 能够较好地利用有机碳源,对有机氮的利用明显优于无机氮源。这与刘华等^[7]对樟芝发酵培养基的研究结果相似。由于放线菌在自然环境中生长较慢,在长期进化过程中形成了抗菌物质以抑制其他微生物生长而获得自身生长空间的能力,抗菌活性强的培养条件对其生长并不一定有利,因此研究者以抗菌活性为最重要的指标进行发酵条件的研究。本研究结果表明,碳酸钙会降低链霉菌 Q0102b 代谢产物抑菌活性,不宜加入;链霉菌 Q0102b 菌株最佳培养条件为:40 g/L 玉米淀粉,7 g/L 酵母浸出汁, pH8.0, 10 g/L 氯化钠,培养液不稀释, 28℃, 培养时间 12 d。

参考文献:

[1] 张宇,张敏,刘铭,等. 稻瘟病生防放线菌 A11 菌株的发

酵条件研究[J]. 中国农学通报, 2005, 21(5): 330-331.

- [2] GUPTA J C, PANDEY G, MUKHERJEE K J. Two-stage cultivation of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* to enhance plasmid stability under non-selective conditions: Experimental study and modeling[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2001, 28(1): 89-99.
- [3] 吴文君. 植物化学保护实验技术导论[M]. 陕西: 陕西科学技术出版社, 1988: 134-135.
- [4] MASUDUR R G, KOHZO K, MASAOKI Y, et al. Optimisation of cultural conditions and some properties of radical scavenging substance from *Sporobolomyces salmonicolor* [J]. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2004, 7(8): 1365-1370.
- [5] 汪世山, 陈守文, 喻子牛. 吸水链霉菌井冈霉素发酵中氮源及碳氮比的优选[J]. 华中农业大学学报, 2001, 20(6): 554-556.
- [6] 陈敏, 谢丽君, 李春远, 等. 链霉菌 4301 菌株的抑菌活性与液体发酵的优化[J]. 华南农业大学学报, 2009, 30(2): 15-18.
- [7] 刘华, 贾薇, 刘艳芳, 等. 珍稀药用真菌: 樟芝深层发酵培养条件的优化[J]. 微生物学通报, 2007, 34(1): 70-74.

【责任编辑 周志红】