

一株对稻瘟病菌有抗菌活性的特基拉芽孢杆菌 WRN032 的筛选及发酵条件优化

孙露¹, 单潇潇¹, 蒋建兰^{1*}, 张桂山^{2*}

¹天津大学化工学院 系统生物工程教育部重点实验室, 天津 300350;

²中国农业科学院农业资源与农业区划研究所 农业部农业微生物资源收集与保藏重点实验室, 北京 100081

摘要:采用牛津杯法抑菌试验, 根据多种芽孢杆菌对不同植物病原真菌的生长抑制效果进行筛选, 得到特基拉芽孢杆菌 WRN032 对稻瘟病菌的生长抑制效果最佳。以吸光度和抑菌圈直径为指标, 设计进行单因素试验、多因素显著性筛选试验和中心点复合试验对特基拉芽孢杆菌 WRN032 的发酵条件进行优化, 得到该菌株抗菌活性最优的发酵条件为: 接种量 1%, 摇瓶装液量 40%, 葡萄糖浓度 2%, 摇床转速 220 rpm, 初始 pH6.5, 培养时间 48 h, 培养温度 30 °C。在此条件下, 特基拉芽孢杆菌 WRN032 的发酵液吸光度和萃取物的抑菌圈直径与优化前相比分别提高了 186.63% 和 154.10%。

关键词:特基拉芽孢杆菌; 稻瘟病菌; 牛津杯法; 发酵条件

中图分类号: Q939.9

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2020)5-0860-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2020.5.020

Screening of *Bacillus tequilensis* WRN032 with *Magnaporthe oryzae* and its optimization of fermentation conditions

SUN Lu¹, SHAN Xiao-xiao¹, JIANG Jian-lan^{1*}, ZHANG Gui-shan^{2*}

¹Key Laboratory of Systems Bioengineering (Ministry of Education), School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300350, China;

²Key Laboratory of Agricultural Microbial Resources Collection and Preservation, Ministry of Agriculture, Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China.

Abstract: The Oxford cup method was used for bacteriostasis test, and the growth inhibition effects of different phytopathogenic fungi were screened according to a variety of *Bacillus* species, and *Bacillus tequilensis* WRN032 had the best inhibitory effect on the growth of *Magnaporthe oryzae*. Using the absorbance and the inhibition zone diameter as indicators, the single-factor test, Plackett-Burmann test and Central Composite test were designed to optimize the fermentation conditions of *Bacillus tequilensis* WRN032. The optimal fermentation conditions for the antibacterial activity of the strain were: inoculation volume 1%, flask filling volume 40%, glucose concentration 5%, shaker speed 220 rpm, initial pH6.5, incubation time 48 h, incubation temperature 30 °C. Under these conditions, the absorbance of the fermentation broth and the inhibition zone diameter of *Bacillus tequilensis* WRN032 increased by 186.63% and 154.10%, respectively, compared with initial fermentation.

Key words: *Bacillus tequilensis*; *Magnaporthe oryzae*; Oxford Cup method; fermentation conditions

水稻是当今世界最重要的粮食作物之一^[1,2], 而稻瘟病是对水稻危害最严重的真菌病害之一^[3]。近年来, 利用细菌拮抗植物病原真菌以防治植物病害的生物防治手段正逐步受到人们的关注^[4-6], 研究

发现, 芽孢杆菌能够产生多种防治动植物病原体的代谢产物^[7,8], 具有丰富的医学应用价值。据报道, 特基拉芽孢杆菌具有抗菌、促生等作用^[9,10], 可用于抗菌药物, 而针对细菌中抗菌活性物质的发酵优化也已成为研究热点^[11-13]。

目前细菌发酵条件的优化多采用单因素试验结合正交设计^[14]或响应面设计^[15]。相对于正交设计, 响应面设计考虑了随机误差, 能够对各个水平进

收稿日期: 2019-10-30 接受日期: 2020-04-24

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31670113)

* 通信作者 Tel: 86-22-27400388; E-mail: jljiang@tju.edu.cn, zhang-guishan@caas.cn

行分析,得到一定试验范围内的最优方案,具有操作简洁、模型选择性广、预测精度较高的特点。综合文献报道,选取在单因素试验基础上,利用响应面设计中的多因素显著性筛选试验(Plackett-Burman design, PBD)筛选出对抑菌活性有显著影响的3个因素,再运用中心复合设计(central composite design, CCD)进行试验,确定重要因素的最优条件。

本研究以不同的芽孢杆菌为来源菌、不同的植物病原真菌为靶标菌进行牛津杯法抑菌试验,筛选出对稻瘟病菌的生长有良好抑制效果的特基拉芽孢杆菌(*Bacillus tequilensis*) WRN032 菌株,然后对该菌株的发酵条件进行优化,以期得到最佳优化条件。

1 仪器与试剂

1.1 供试菌株

10种芽孢杆菌(见表1)由中国农业科学院农业资源与农业区划研究所分离保存,10种真菌(见表1)由中国农业微生物菌种保藏管理中心(Agricultural Culture Collection of China, ACCC)进行保藏。

1.2 试剂

Landy培养基(用于芽孢杆菌的发酵培养):MgSO₄ · 7H₂O 0.500 g/L、KH₂PO₄ 1.000 g/L、KCl 0.200 g/L、MnSO₄ · H₂O 0.010 g/L、FeSO₄ · 7H₂O 0.005 g/L、CuSO₄ · 5H₂O 0.002 g/L、yeast extract 1.000 g/L、L-phenylalanine 0.020 g/L、L-glutamic acid 5.000 g/L、(NH₄)₂SO₄ 2.000 g/L、柠檬酸钠

0.010 g/L、蒸馏水 950 mL、1%葡萄糖溶液 50 mL。

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar, PDA)用于稻瘟病菌的培养,购自Coolaber公司;二甲基亚砜(DMSO AR)、乙酸乙酯(AR)、石油醚(AR)和正丁醇(AR)购自天津市江天化工技术有限公司。

1.3 仪器

UV6000紫外可见分光光度计(上海元析仪器有限公司);ZWY-211B卧式恒温摇床(上海智城有限责任公司);ME204、ME802电子分析天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);MJB1-B001-Q3灭菌器(无锡益腾压力容器有限公司);LRH-70恒温生化培养箱、DZF-6050真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);SW-CJ-2FD洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);N-1100旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司);3K15台式冷冻离心机(SIGMA公司)。

2 方法

2.1 菌株筛选

2.1.1 菌种活化

芽孢杆菌活化:取保存于-80℃冰箱甘油保藏管中的10种芽孢杆菌(见表1)菌液,分别划线纯化后于37℃条件下培养24h,置于4℃冰箱中保存备用。

真菌活化:将保存于斜面培养基的10种真菌(见表1)接于PDA上,30℃恒温培养。

表1 菌株名称和编号

Table 1 Name and number of the strain

芽孢杆菌 <i>Bacillus</i>		植物病原真菌 Phytopathogenic fungi	
菌株编号 Strain No.	名称 Name	菌种保藏编号 Strain number	名称 Name
1	<i>B. aquimaris</i>	ACCC 32139	<i>Gliocladium oryzae</i>
2	<i>B. horikoshii</i>	ACCC 36023	<i>Alternaria solani</i>
50	<i>B. halosaccharovorans</i>	ACCC 36127	<i>Fusarium moniliforme</i>
59	<i>B. oryzaecorticis</i>	ACCC 36137	<i>F. niger</i>
2923	<i>B. niacini</i>	ACCC 36246	<i>Rhizoctonia solani</i>
15600	<i>B. drentensis</i>	ACCC 36415	<i>Botrytis cinerea</i>
15601	<i>B. bataviensis</i>	ACCC 37331	<i>F. graminearum</i>
101566	<i>B. cucumis</i>	ACCC 37631	<i>Magnaporthe oryzae</i>
WRN015	<i>B. quercus</i>	ACCC 38020	<i>Botryosphaeria dothidea</i>
WRN032	<i>B. tequilensis</i>	ACCC 38023	<i>F. lecanii</i>

2.1.2 种子液制备

用 250 mL 锥形瓶装入 95 mL 的 Landy 培养基, 灭菌, 加入 1% 的葡萄糖溶液 5 mL, 然后分别加入一环活化后的芽孢杆菌菌株, 于 37 °C、180 rpm 条件下培养 18 h, 即得种子液。

2.1.3 摇瓶发酵

用 250 mL 锥形瓶装入 95 mL、初始 pH 为 5.5 的 Landy 培养基, 灭菌, 加入 1% 的葡萄糖溶液 5 mL, 然后分别加入 1 mL 芽孢杆菌菌株的种子液, 于 37 °C、180 rpm 条件下培养 24 h, 即得发酵液。

2.1.4 样品前处理

取不同芽孢杆菌发酵液各 1 L, 依次用等体积的石油醚、乙酸乙酯和正丁醇按照极性从小到大的顺序对发酵液进行萃取, 每种有机溶剂均萃取三次, 合并同种萃取液后得到石油醚萃取液、乙酸乙酯萃取液和正丁醇萃取液。

将不同芽孢杆菌发酵液的有机溶剂萃取液分别

使用旋转蒸发仪进行减压浓缩, 然后利用真空干燥箱进行干燥, 最终得到 30 种干燥物, 置于棕色瓶中, 于 4 °C 冰箱中密封避光保存。

2.1.5 牛津杯法抑菌试验

取等量 30 种干燥物分别溶于 DMSO, 加入蒸馏水稀释至药液浓度 1 mg/mL。在 PDA 平面上均匀摆放三个牛津杯, 进行三组试验, 每组试验平行三次。试验组: 向牛津杯中滴加 100 μ L 1 mg/mL 药液; 空白对照: 滴加等体积 DMSO 溶液; 阴性对照: 滴加等体积蒸馏水。在 PDA 中央位置接种真菌, 30 °C 恒温培养 7~15 天, 观察并筛选出对一种或多种真菌具有抑菌效果的干燥物, 测定其抑菌圈直径。试验筛选得到特基拉芽孢杆菌 WRN032 发酵液的乙酸乙酯萃取干燥物对稻瘟病菌的抑菌效果最好 (见图 1), 该菌株从香菇菌糠中培养分离获得, 菌种保藏编号为 CGMCC 14405, 用特基拉芽孢杆菌 WRN032 进行后续试验。

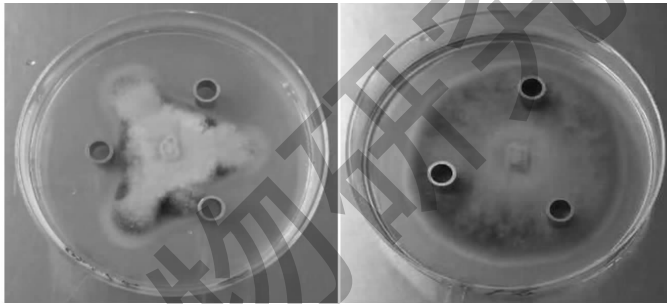


图 1 特基拉芽孢杆菌 WRN032 对稻瘟病菌的抑菌效果及空白对照

Fig. 1 Bacteriostatic effect of *B. tequilensis* WRN032 on *M. oryzae* and blank control

2.2 发酵条件优化

2.2.1 单因素试验

参考相关文献与研究经验, 在 Landy 培养基成分固定前提下, 测定 275 nm 波长处的吸光度 OD 及抑菌圈直径 d 为考察指标, 采用控制变量法分别考察初始 pH (A)、接种量 (B)、摇床转速 (C)、培养温度 (D)、培养时间 (E)、葡萄糖浓度 (F) 和摇瓶装液量 (G) 对特基拉芽孢杆菌 WRN032 发酵的影响, 试

验因素和水平见表 2。

2.2.2 PBD 试验设计

根据单因素试验结果, 在各影响因素趋势图 (见图 2) 中对两种指标均呈上升趋势的区间内, 选择最高值和最低值作为 PBD 试验设计中各因素高、低水平, 设计进行 PBD 试验, 继续后续优化。PBD 试验因素和水平见表 3。

表 2 单因素试验因素和水平

Table 2 The factor levels of single-factor test

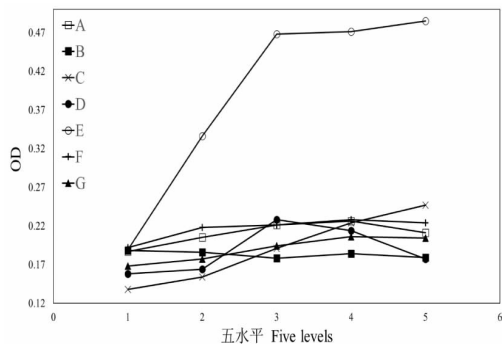
水平 Level	A	B (mL)	C (rpm)	D (°C)	E (h)	F (%)	G (mL)
1	5.5	1	140	26	24	1	50
2	6.0	2	160	28	36	2	75
3	6.5	3	180	30	48	3	100
4	7.0	4	200	34	60	4	125
5	7.5	5	220	37	72	5	150

2.2.3 CCD 试验设计

根据单因素和 PBD 试验结果(见表 4),筛选出影响显著的因素,并确定其他影响因素的最佳水平。利用 Design-expert 软件设计进行 CCD 试验,试验设计和结果见表 5。

2.2.4 验证试验设计

采用初始发酵和优化发酵条件分别对特基拉芽



孢杆菌 WRN032 菌株进行发酵,并进行样品前处理和牛津杯法抑菌试验,测定并对比两种发酵条件下的吸光度 OD 和抑菌圈直径 d。

3 结果

3.1 单因素试验结果

根据图 2 可知七种因素的趋势情况,分别在两指标共同上升区间内选择高、低水平进行后续 PBD

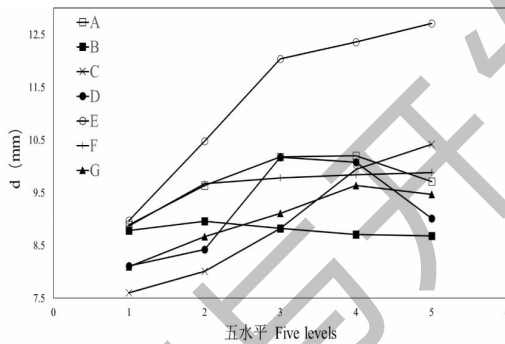


图 2 不同因素五水平对吸光度和抑菌圈直径的影响

Fig. 2 The influence of five levels of different factors on OD and d

试验。以培养温度为例进行详细说明:温度在 26 ~ 37 °C 范围内,OD 和 d 随温度的升高呈先升高后降低的趋势,且当温度在 30 °C 左右时,两种指标均最大,然后逐渐降低,温度的 3、4 水平分别为 30 和 34 °C,二者温差过大而指标降低幅度并不大,为避免出现误差,因此在后续 PBD 试验中,选择培养温度高、低水平为 32 和 26 °C。最终确定各因素高、低水平分别为:初始 pH 7.0 和 6.0;接种量 3 和 1 mL;摇床转速 220 和 140 rpm;培养温度 32 和 26 °C;培养时

间 72 和 24 h;葡萄糖浓度 5% 和 1%;摇瓶装液量 125 和 50 mL。其中,初始 pH 的低水平未选择 5.5 是由于在较低 pH 下 Landy 培养基灭菌后呈现浑浊状态,会影响菌株生长以及 OD 的测定。

3.2 PBD 试验结果

依据表 3 和表 4 分析可得:七种影响因素对特基拉芽孢杆菌 WRN032 发酵液吸光度 OD 的影响顺序为:培养时间 > 培养温度 > 初始 pH > 摇床转速 > 摇瓶装液量 > 接种量 > 葡萄糖浓度;对其抑菌圈直

表 3 PBD 试验设计及结果

Table 3 Design and results of PBD test

No.	A	B(mL)	C(rpm)	D(h)	E(°C)	F(mL)	G(%)	OD	d(mm)
1	6.0	1	140	24	26	50	1	0.135	7.21
2	7.0	1	220	24	32	125	5	0.228	10.28
3	7.0	3	140	24	26	125	1	0.161	8.33
4	7.0	1	220	72	32	50	1	0.481	12.60
5	6.0	1	220	72	26	125	1	0.381	11.12
6	7.0	3	220	24	26	50	5	0.218	9.76
7	6.0	3	220	24	32	50	1	0.192	8.98
8	7.0	1	140	72	26	50	5	0.325	9.47
9	7.0	3	140	72	32	125	1	0.442	11.94
10	6.0	3	140	72	32	50	5	0.418	11.47
11	6.0	3	220	72	26	125	5	0.389	11.20
12	6.0	1	140	24	32	125	5	0.143	7.96

表4 PBD 试验结果分析
Table 4 Result analysis on PBD test

影响因素 Influencing factor	<i>P</i>	
	OD	d (mm)
A	0.014 1	0.018 7
B (mL)	0.402 0	0.217 9
C (rpm)	0.049 6	0.072 5
D (h)	0.002 5	0.001 8
E (°C)	0.011 3	0.031 6
F (mL)	0.166 2	0.187 4
G (%)	0.421 4	0.290 9
模型 Model	0.002 1	0.008 8
R^2	0.915 5	0.945 6

径 *d* 的影响顺序为: 培养时间 > 初始 pH > 培养温度 > 摇床转速 > 摇瓶装液量 > 接种量 > 葡萄糖浓度。 $P < 0.05$ 为显著性影响因素, 取各因素交集并综合单指标进行分析, 得到培养时间、培养温度和初始 pH 为显著性影响因素, 在确定另外四种因素的最佳水平, 即摇床转速 220 rpm, 摇瓶装液量 100 mL/250 mL (即 40%), 接种量 1 mL/100 mL (即

1%), 葡萄糖浓度 0.4 g/mL 溶液 5 mL/100 mL (即 2%) 基础上, 选择初始 pH (X_1)、培养时间 (X_2) 和培养温度 (X_3) 三因素进行后续 CCD 试验。

3.3 CCD 试验结果

根据表 5 和表 6 分析可知: 进行回归分析后拟合可得 OD 和 *d* 的最适模型为二次多项式函数, 两模型 *P* 值分别为 < 0.000 1 和 0.004 0, 均小于 0.05

表5 CCD 试验设计及结果
Table 5 Design and results of CCD test

No.	X_1	X_2 (h)	X_3 (°C)	OD	d (mm)
1	6.0	36	28	0.388	11.26
2	7.0	60	28	0.463	12.36
3	7.341	48	30	0.422	11.73
4	7.0	36	28	0.374	11.03
5	6.0	60	28	0.465	12.45
6	6.5	48	30	0.519	16.78
7	6.5	48	26.64	0.462	12.05
8	6.0	36	32	0.389	11.49
9	6.5	27.82	30	0.399	11.93
10	6.5	48	30	0.516	16.86
11	6.5	48	30	0.515	17.22
12	6.5	68.18	30	0.526	20.13
13	7.0	36	32	0.372	11.07
14	6.5	48	30	0.524	19.91
15	6.5	48	30	0.536	22.27
16	6.5	48	30	0.534	22.31
17	7.0	60	32	0.465	14.21
18	6.0	60	32	0.477	16.31
19	5.659	48	30	0.399	12.37
20	6.5	48	33.36	0.454	13.35

表 6 方差分析结果及 R^2
Table 6 ANOVA results and R^2

来源 Source	OD		d (mm)	
	Pr > F	显著性 Significance	Pr > F	显著性 Significance
模型 Model	< 0.000 1	显著 Significant	0.004 0	显著 Significant
X_1	0.907 2		0.615 1	
X_2 (h)	< 0.000 1		0.009 2	
X_3 (°C)	0.993 3		0.304 6	
$X_1 X_2$	0.683 3		0.795 2	
$X_1 X_3$	0.754 6		0.711 2	
$X_2 X_3$	0.718 6		0.368 5	
X_1^2	< 0.000 1		0.000 5	
X_2^2	0.000 2		0.038 2	
X_3^2	< 0.000 1		0.001 0	
失拟项 Lack of fit	0.079 2	不显著 Not Significant	0.950 7	不显著 Not Significant
R^2	0.969 5		0.850 9	

(显著),失拟值分别为 0.079 2 和 0.950 7,均大于 0.05(不显著),表明 OD 和 d 的真实值与预测值之

间拟合度较好,且随机误差对试验结果的影响较小,可用此模型来预测两种指标的实际情况。

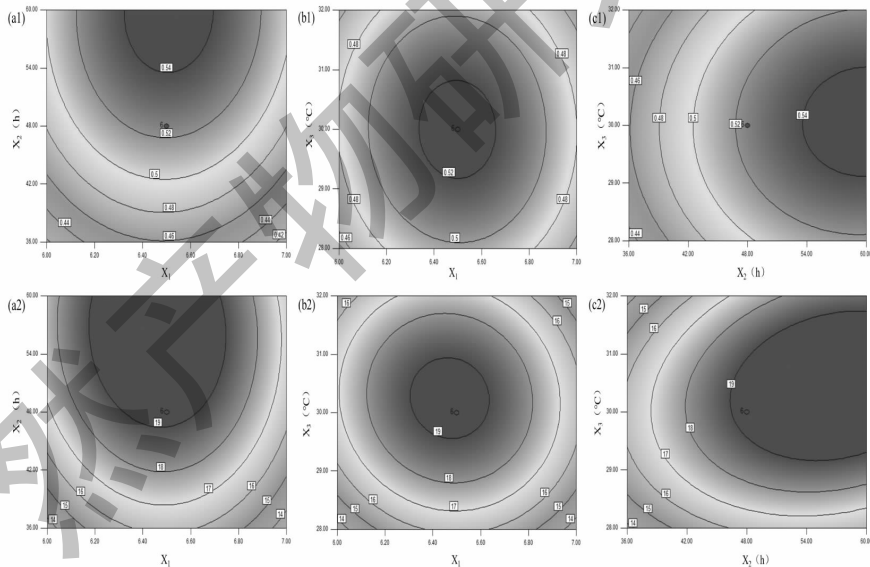


图 3 三种显著影响因素对吸光度和抑菌圈直径的交叉影响等高线图

Fig. 3 Cross-effect contour map of three significant influencing factors on OD and d

根据图 3 可知,图 a1、b1、c1 的考察指标为 OD,图 a2、b2、c2 的考察指标为 d。图中中心深色圆圈处表示两种指标达到最优,即 $OD \geq 0.52$, $d \geq 19$ mm。综合考虑各因素影响,最终确定特基拉芽孢杆菌 WRN032 的最佳发酵条件为:接种量 1%,摇瓶装液量 40%,葡萄糖浓度 2%,摇床转速 220 rpm,初始

pH6.5,培养时间 48 h,培养温度 30 °C。

3.4 验证试验结果

图 4 为初始发酵条件和优化发酵条件分别为:接种量 1% 和 1%,摇瓶装液量 40% 和 40%,葡萄糖浓度 1% 和 2%,摇床转速 180 和 220 rpm,初始 pH 5.5 和 6.5,培养时间 24 和 48 h,培养温度 37 和 30

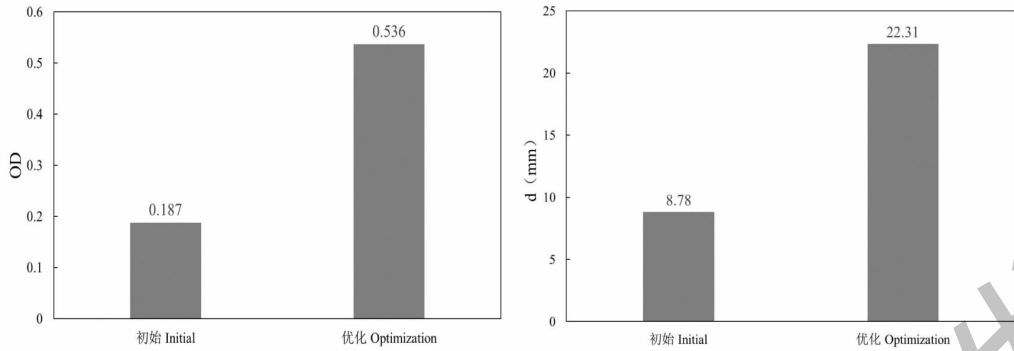


图4 初始发酵与优化发酵对两种指标的验证对比图

Fig. 4 Verification and comparison of two indicators for initial fermentation and optimized fermentation

℃,对 OD 和 d 两指标的验证对比图。优化条件下 OD 为 0.536,抑菌圈直径 d 为 22.31 mm,较初始发酵条件的 OD 为 0.187,抑菌圈直径 d 为 8.78 mm,分别增长了 186.63% 和 154.10%,增长幅度明显,优化后的抗菌活性较优化前有明显提高。

5 讨论

本研究通过牛津杯法抑菌试验筛选得到特基拉芽孢杆菌 WRN032 菌株对稻瘟病菌有较好的抗菌活性,然后利用单因素试验、PBD 设计试验和 CCD 设计试验对该菌株的发酵条件进行了优化,优化结果显示与初始发酵条件相比,在最优发酵条件下,特基拉芽孢杆菌 WRN032 菌株的发酵液吸光度 OD 提高了 186.63%,抑菌圈直径 d 增大了 154.10%,优化效果明显,说明采用单因素试验结合响应面设计能够有效提高该菌株发酵液的抗菌活性。

经验证,在试验范围,此发酵条件下,特基拉芽孢杆菌 WRN032 发酵液的吸光度和有机溶剂萃取物的抑菌圈直径均为最优,说明本次发酵条件优化的结果较为理想,特基拉芽孢杆菌有可能会成为天然抗菌活性物质的重要资源,展现出了其较高的研究和应用价值,为后续进一步对该菌发酵产物进行分离和抗菌活性物质的分析鉴定打下基础。

参考文献

- Capone R. Economic growth is necessary but not sufficient to accelerate reduction of hunger and malnutrition [R]. The State of Food Insecurity in the World. Rome:FAO,2012.
- Sha YX,Wang Q,Li Y. Screening and prevention of *Bacillus* biocontrol against rice blast[J]. Chin J Bio Control(中国生物防治学报),2016,32:474-484.
- Dagdas YF,Yoshino K,Dagdas G. Septin-mediated plant cell invasion by the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae* [J].

- Science,2012,336:1590-1595.
- Betran-Garcia MJ,White JF,Prado FM,et al. Nitrogen acquisition in *Agave tequilana* from degradation of endophytic bacteria[J]. Sci Rep,2014,4:6938.
- Chung EJ,Hossain MT,Khan A,et al. *Bacillus oryzicola* sp. nov. an endophytic bacterium isolated from the roots of rice with antimicrobial, plant growth promoting, and systemic resistance inducing activities in rice[J]. Plant Pathol J,2005,31:152-164.
- Li XH,Zhang YZ,Wei ZW,et al. Antifungal activity of isolated *Bacillus amyloliquefaciens* SYBC H47 for the biocontrol of peach gummosis[J]. PLoS One,2016,11(9):e0162125.
- Ye JJ,Cao NN,Zhang JF,et al. Research application progress on the *Bacillus* sp. in plant pathogenic fungi biocontrol [J]. Agr Sci Technol(农业科学与技术:英文版),2013,14:695-698.
- Xiang YP,Zhou HF,Liu YF,et al. Isolation and identification of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus amyloliquefaciens* B1619 and the inhibitory of the lipopeptide antibiotics to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* [J]. Sci Agr Sin(中国农业科学),2016,49:2935-2944.
- Gholami M,Khakvar R,Aliasgarzad N. Application of endophytic bacteria for controlling anthracnose disease(*Colletotrichum lindemuthianum*) on bean plants[J]. Arch Phytopathol Plant Prot,2013,46:1831-1838.
- Zhang HY,Huang YM,Wu XL,et al. Isolation and identification of an antagonistic *Bacillus* sp. of melanaphis sacchari [J]. J Yibin Univ(宜宾学院学报),2017,17(6):111-114.
- Pei HL,Guo XJ,Yang WH,et al. Directed evolution of abeta-1,3-1,4-glucanase from *Bacillus subtilis* MA139 for improving thermal stability and other characteristics [J]. J Basic Microbiol,2015,55:869-878.
- Zhang CM,Lan ZJ,Peng JL,et al. High density fermentation medium and condition optimization of *Bacillus tequilensis* B05 [J]. J Microbiol(微生物学杂志),2019,39(1):59-64.