

棉花黄萎病拮抗细菌 LC-04 菌株的抗菌蛋白产生条件研究

李术娜¹, 杜红方², 袁洪水¹, 张元亮², 朱宝成^{1,2*}

(1. 河北农业大学生命科学学院, 保定 071001; 2. 河北大学生命科学学院, 保定 071002)

摘要: LC-04 菌株是从棉花叶部组织中分离出的一株类芽孢杆菌, 其发酵液上清液的硫酸铵沉淀物对大丽轮枝菌 V-190 菌株的生长具有明显的拮抗作用, 实验证明发酵液中含有蛋白质类抗菌物质。LC-04 菌株的适宜发酵条件为: 在 pH7 的 LBG 培养基中于 30℃, 180 r·min⁻¹ 摇床振荡培养 48 h, 用 70% 硫酸铵对 LC-04 菌株发酵液上清液进行盐析, 可以沉淀最多的抗菌蛋白。

关键词: 棉花黄萎病; 大丽轮枝菌; 拮抗细菌; 发酵; 抗菌蛋白

中图分类号: S435.621 **文献标识码:** A

文章编号: 1002-7807(2006) 04-0233-05

Fermentation Conditions of Antagonistic Strain LC-04 Against *Verticillium dahliae*

LI Shu-na¹, DU Hong-fang², YUAN Hong-shui¹, ZHANG Yuan-liang², ZHU Bao-cheng^{1,2*}

(1. College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China; 2. College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002, China)

Abstract: An antagonistic bacterium LC-04 strain was isolated from cotton leaves, which showed obvious antagonistic effect against *Verticillium dahliae*. It was identified to be a kind of *Paenibacillus*. By centrifugation its fermentation fluid and removing the bacteria, (NH₄)₂SO₄ which end concentration achieves 70% degree of saturation was joined into the upper liquid. Over night, collecting precipitates and dissolving with the buffer solution, it is proved to have the antifungal activity; when the precipitate was heated up to 120℃ for 10 minutes, it lost the activity; meanwhile, when the fermentation fluid was extracted with the same volume chloroform, the extract has not the activity. Thus, the antifungal substance produced by strain LC-04 was identified to be a kind of protein; The result indicated, when (NH₄)₂SO₄ concentration was below 40% degree of saturation, the fermentation fluid precipitate had not displayed the antifungal activity; when the (NH₄)₂SO₄ concentration was 70% degree of saturation, the antifungal activity was the highest; The (NH₄)₂SO₄ saturation increased to 80% degree of saturation, deposit activity had not increased; The 70% (NH₄)₂SO₄ degree of saturation was the precipitation antifungal protein best salinity. And its optimum fermentation conditions of strain LC-04 were studied for the production of the antifungal protein: at the beginning, with the prolonging of the fermentation time, the quantity of the antifungal protein increased. when fermentation time reached to 48 hours, the antifungal protein quantity was the most. If continueing prolonging the fermentation time, the activity dropped instead, this was possibly because the excessivel long fermentation time had caused the antifungal protein digestion. Therefore 48 hour is the best fermentation time to LC-04 strain. Along with fermentation temperature, the fermentation fluid precipitate's antifungal activity changed, it was the highest at 30℃; When temperature was higher than 30℃, the activity

收稿日期: 2005-08-13 作者简介: 李术娜(1972-), 女, 硕士, 助研; * 通讯作者: zhu2222@126.com

基金项目: 河北省自然科学基金资助(398152)

dropped, therefore 30°C was the optimum fermentation temperature. The antagonistic bacteria strain LC-04 can produce antifungal protein in different media, but when it was cultured in LBG, the amount of the antifungal protein reached maximum, So the optimum medium is LBG. In the fermentation of strain LC-04, it is necessary to provide enough oxygen in the fermentor by changing the rotational speed of the shaker. Along with the rotational speed enhancement, the amount of the antifungal protein is also changing. when the rotational speed is low, oxygen does not favor the bacteria growth; when the shaker rotational speed is 180 r · min⁻¹, the activity of antifungal protein is the highest. But if the rotational speed is too quick, it would cause the bacteria premature autolysis. As the biomass reduced, antifungal active substance correspondingly reduced. therefore 180 r · min⁻¹ is the best rotational speed. It indicated that, the LC-04 strain secretes the antifungal protein in the different pH value culture media, when the initial pH of the medium is 7.0, the quantity of the antifungal protein reach the maximum.

Key words: *Verticillium* wilt; *Verticillium dahliae*; antagonistic bacterium; fermentation; antifungal protein

棉花黄萎病的防治是世界棉花生产中的难题,而生物防治被认为是最具有发展潜力的防治方法之一^[1-9]。本试验在分离筛选得到大丽轮枝菌拮抗细菌 LC-04 菌株的基础上,进一步对其产抗菌蛋白条件进行了研究,为分离抗菌蛋白、克隆抗菌蛋白基因,或获得生防工程菌株奠定基础^[10-19]。

1 材料和方法

1.1 菌种

大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae*): V-190 菌株,由中国农业科学院植物保护所提供。

类芽孢杆菌 (*Paenibacillus*): LC-04 菌株,本实验室分离自棉花叶部组织。

1.2 培养基

PDA 培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 15 g、蒸馏水 1000 mL,自然 pH。用于培养大丽轮枝菌。

NA 培养基:蛋白胨 10 g、牛肉膏 5 g、NaCl 5 g、琼脂 15 g、蒸馏水 1000 mL, pH 7.2~7.4。

NB 培养基:为 NA 培养基的液体培养基。

1.3 试验方法

1.3.1 LC-04 菌株拮抗物质的提取。将斜面活化的 LC-04 菌株接种到装有 50 mL NB 培养基的 250 mL 三角瓶中,在 30°C、180 r · min⁻¹ 摇床培养 48 h, 4000 r · min⁻¹、4°C 离心 30 min, 收集上清液。上清液加入硫酸铵至一定饱和度, 4°C 静置过夜, 4000 r · min⁻¹、4°C 离心 30 min 弃上清液, 沉淀用 0.1 mol · L⁻¹ 的磷酸缓冲液 (pH 7.5) 溶解,

并用相同缓冲液透析去盐, 供抗菌活性检测。

1.3.2 LC-04 菌株拮抗物质抗菌活性的检测。

用接种针从培养 10 d 的大丽轮枝菌斜面上刮取孢子, 放入 10 mL 带玻璃珠的无菌水中充分振荡均匀, 血球板计数 (约 10⁷ 个 · mL⁻¹)。取孢子悬液 5 mL 加入融化后冷却到 45°C 左右的 PDA 培养基中, 倒平板, 24°C 培养过夜, 制备病原菌平板。抗菌物质的活性测定采用杯碟法^[19]。在病原菌平板上放置牛津杯, 在杯中加入经微孔滤膜 (0.22 μm) 过滤除菌的 200 μL 待测拮抗蛋白溶液, 24°C 培养 9~10 d, 测定抑菌圈直径。以抑菌圈直径作为指标, 检测抗菌蛋白的抗菌活性。

1.3.3 LC-04 菌株的发酵培养。将经 30°C 活化培养 24 h 的 LC-04 菌株斜面用 4 mL 无菌水洗, 制成菌悬液, 吸取 1 mL 接入种子培养基, 在 30°C、180 r · min⁻¹ 旋转式摇床培养 20 h, 得到种子液, 根据实验方案改变培养基及培养条件, 进行发酵条件实验。

2 结果与讨论

2.1 LC-04 菌株抗菌活性物质的性质确定

LC-04 菌株发酵液离心除菌后, 向其中加入硫铵使其终浓度达到 80% 的饱和度, 放置过夜后收集沉淀, 用缓冲液溶解后, 测得结果具有抗菌活性; 发酵液的硫铵沉淀物经 120°C 加热处理 10 min, 没有抑菌圈出现; 发酵液用等体积的氯仿萃取, 其萃取物也未见有抑菌圈出现。通过这三种方法的测定, 证明 LC-04 菌株产生的拮抗物质为蛋白质。

2.2 最佳硫酸铵饱和度的选择

将 LC-04 菌株接种于 NB 培养基中, 30℃, 180 r·min⁻¹ 摇床振荡培养 48 h。发酵液离心除菌后, 选用不同饱和度的硫酸铵 (30%、40%、50%、60%、70%、80%) 沉淀, 透析除盐后, 用缓冲液稀释至体积相同, 测定蛋白沉淀物对大丽轮枝菌的抗菌活性 (图 1)。

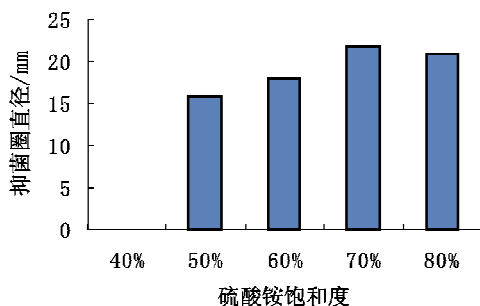


图 1 硫酸铵饱和度对抗菌蛋白沉淀效果的影响
Fig. 1 Effect of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ density to the activity of antifungal protein from LC-04 strain

结果表明, 硫酸铵在 40% 饱和度以下时, 发酵液的沉淀物没有表现出抗菌活性; 在 70% 饱和度时, 沉淀物抑菌圈最大, 则抗菌活性最高; 硫酸铵增加到 80% 饱和度, 沉淀物活性没有增加。以下试验均采用 70% 的硫酸铵沉淀抗菌蛋白。

2.3 发酵时间对 LC-04 菌株产抗菌蛋白的影响

LC-04 菌株接种于 NB 培养基中, 于 30℃, 180 r·min⁻¹ 摇床振荡培养, 分别于发酵 24、36、48、60、72 h 时, 用 70% 饱和度硫酸铵沉淀抗菌蛋白, 测定抗菌活性。由图 2 可见, LC-04 菌株抗菌蛋白的产量随发酵时间的延长而增加, 发酵时间在 48 h 时抑菌圈最大, 即产生抗菌蛋白的量最高。

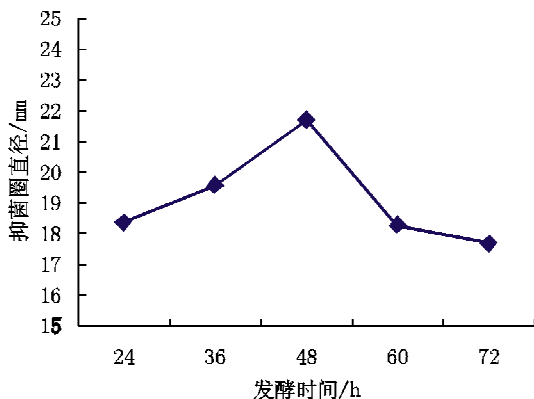


图 2 发酵时间对 LC-04 菌株产抗菌蛋白的影响
Fig. 2 Effect of ferment time to production of the antifungal protein from LC-04 strain

发酵时间再延长, 抑菌圈直径反而下降, 这可能是因为发酵时间过长导致了抗菌蛋白降解。因此 48 h 是 LC-04 菌株的最佳发酵时间。

2.4 发酵温度对 LC-04 菌株产抗菌蛋白的影响

LC-04 菌株接种于 NB 培养基中, 分别在 25℃、28℃、30℃、32℃、35℃ 的温度下, 180 r·min⁻¹ 摇床振荡培养 48 h, 发酵液沉淀物过滤除菌后, 测定抗菌活性。图 3 表明, 随着发酵温度的变化, 发酵液沉淀物的抑菌圈直径发生变化, 30℃ 时抑菌圈直径最大; 高于 30℃ 时, 抑菌圈直径下降, 因此 30℃ 是 LC-04 菌株最佳的发酵温度。

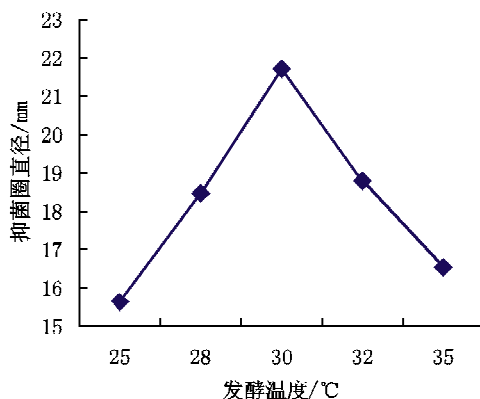


图 3 发酵温度对 LC-04 菌株产抗菌蛋白的影响
Fig. 3 Effect of ferment temperature to production of antifungal protein from LC-04 strain

2.5 通气量对 LC-04 菌株产抗菌蛋白的影响

LC-04 菌株产抗菌蛋白是好氧性发酵过程, 通过改变摇床转速来调节通气量。将 LC-04 菌株接种于装有 50 mL NB 培养基的 250 mL 三角瓶中, 于 30℃ 摇床培养, 控制摇床不同的转速 (100、120、140、160、180、200 r·min⁻¹) 分别培养 48 h, 取发酵液沉淀物测定抗菌活性。由图 4 可知, 随着摇床转速的提高, 抑菌圈的直径也在发生变化。转速小时, 通气量小, 不利于菌体生长; 但

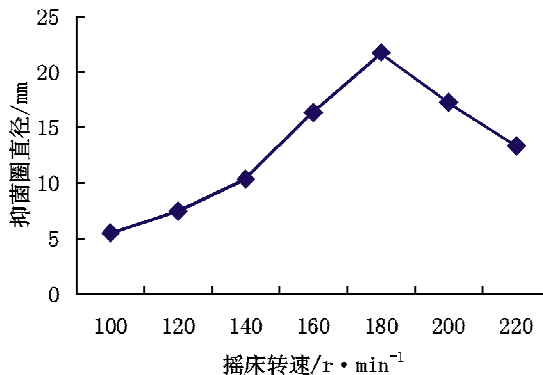


图 4 摇床转速对 LC-04 菌株产抗菌蛋白的影响
Fig. 4 Effect of rotation speed to production of the antifungal protein from LC-04 strain

摇床转速太大,会引起菌体过早自溶,使得生物量减少,抗菌活性物质相应减少。在摇床转速为 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 时,抑菌圈直径最大,转速增高抑菌圈直径反而下降,因此 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 是摇床的最佳转速。

2.6 不同培养基对 LC-04 菌株产抗菌蛋白的影响

将拮抗菌分别接种到 pH7.2 的不同培养基中(表 1),于 30°C , $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床振荡培养 48 h。发酵液沉淀物过滤除菌后,测定抗菌活性。由图 5 可以看出,类芽孢杆菌 LC-04 菌株在以上 7 种培养基中生长,其发酵液均有抑菌活性,但在 LBG 培养基中培养,发酵液沉淀物的抑菌圈直径最大,因此选用 LBG 培养基进行发酵培养。

表 1 不同发酵培养基组成

Table 1 The content of fermentation media %

培养基	蛋白胨	牛肉膏	酵母膏	NaCl	葡萄糖	K_2HPO_4
NB	1	0.5	-	0.5	-	-
NBP	1	0.5	-	0.5	-	0.1
LB	1	-	0.5	0.5	-	-
LBP	1	-	0.5	0.5	-	0.1
LBY	1	-	1	0.5	-	-
LBPY	1	-	1	0.5	-	0.1
LBG	1	-	0.5	0.5	0.5	-

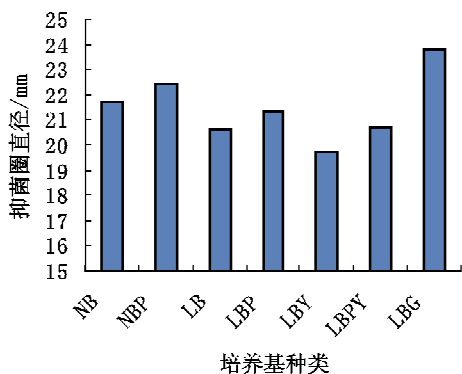


图 5 培养基对 LC-04 菌株产抗菌蛋白的影响

Fig. 5 Effect of medium to production of the antifungal protein from LC-04 strain

2.7 培养基 pH 值对 LC-04 菌株产抗菌蛋白的影响

将 LC-04 菌株分别接种到 pH 值为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 的 LBG 培养基中, 30°C 、 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床振荡培养 48 h。取发酵液粗沉淀物过

滤除菌后,测定抗菌活性。图 6 表明,LC-04 菌株在不同 pH 值的培养基中分泌抗菌物的状况不同,在 pH 值为 5.0 和 9.0 的培养基中产生抗菌蛋白的量小;在 pH 为 7.0 的培养基中产生的抗菌蛋白的抑菌活性最大,因此培养基的最佳 pH 为 7.0。

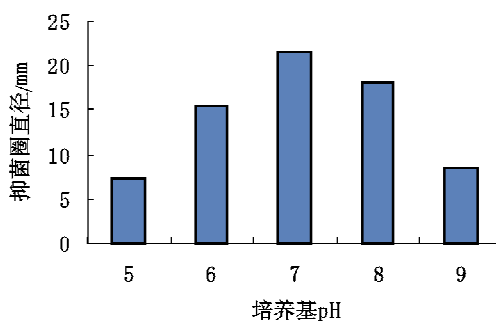


图 6 培养基 pH 值对 LC-04 菌株产抗菌蛋白的影响

Fig. 6 Effect of medium pH to production of the antifungal protein from LC-04 strain

3 结论与讨论

通过采用不同饱和度的硫酸铵对发酵液进行沉淀,采用不同的发酵时间、发酵温度、不同培养基和不同的培养基 pH 值对拮抗菌 LC-04 菌株进行培养,以大丽轮枝菌作为指示菌,得出了拮抗菌 LC-04 的最佳发酵条件:即在 pH7 的 LBG 培养基中于 30°C , $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床振荡培养 48 h,并且应采用 70% 的硫酸铵饱和度对抗菌蛋白进行盐析。

参考文献:

[1] 马平. 棉花黄萎病生物防治研究进展[J]. 河北农业科学, 2003, 7(3):38-40.
 [2] 石磊岩. 棉花黄萎病灾害因素分析[J]. 中国棉花, 1999, 26(7):8-9.
 [3] 李社增, 马平, 刘杏忠, 等. 利用拮抗细菌防治棉花黄萎病[J]. 华中农业大学学报, 2001, 20(5):422-425.
 [4] TJAMOS E C, Tsitsiyannis D I, Tjamos S E, et al. Selection and evaluation of rhizosphere bacteria as bio-control agents against *Verticillium dahliae* [M]. American Phytopathological Society Press, 2000: 244-248.
 [5] 刘学堂, 宋晓轩, 郭金城. 棉花黄萎病菌的研究及最新进展[J]. 棉花学报, 1998, 10(1): 6-13.

- [6] 李雪玲, 厉云, 张天宇. 利用拮抗真菌防治棉花黄萎病[J]. 棉花学报, 2003, 15(1): 26-28.
- [7] 简桂良, 卢美光, 仇家山, 等. 棉花黄萎病防治策略[J]. 中国植保导刊, 2004, 24(4): 30-31.
- [8] 丁笑生, 于广丽. 棉花黄萎病及其抗病育种的研究[J]. 生物技术, 2005, 15(1): 96-97.
- [9] 夏正俊, 顾本康, 吴荡民. 植物内生菌及根际土壤细菌诱导棉花对大丽轮枝菌抗性研究[J]. 中国生物防治, 1996, 12(1): 7-10.
- [10] SENER K, Sibel D, Suat S. Sensitivity of *Verticillium dahliae* to prochloraz and prochloraz-manganese complex and control of *Verticillium* wilt of cotton in the field[J]. Crop Protection, 2003(22): 51-55.
- [11] DONG Hezhong, Li Weijiang, Zhang Dongmei, et al. Differential expression of induced resistance by an aqueous extract of killed *Penicillium chrysogenum* against *Verticillium* wilt of cotton[J]. Crop Protection, 2003 (22) :129-134.
- [12] 李社增, 鹿秀云, 马平, 等. 棉花黄萎病生防细菌 NCD-2 抑菌物质提取初步研究[J]. 棉花学报, 2004, 16(1): 62-63.
- [13] 陈旭升, 王祝鸣. 棉花黄萎病菌致萎毒素的分离纯化方法[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2002, 20(2): 141-144.
- [14] 杜威世, 杜雄明, 马峙英. 棉花黄萎病抗性遗传和分子生物学研究进展[J]. 棉花学报, 2002, 14(5): 311-317.
- [15] 杜威世, 杜雄明, 马峙英. 棉花黄萎病抗性基因 SSR 标记研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2004, 32(3): 20-24.
- [16] 储昭庆, 贾军伟, 周向军, 等. 大丽轮枝菌分泌糖蛋白的分离及其致萎性研究[J]. 植物学报, 1999, 41(9): 972 - 976.
- [17] 刘伊强, 王雅平, 陈章良, 等. 拮抗菌 TG26 的鉴定及其抗菌蛋白 BI 的纯化和部分特性[J]. 植物学报, 1994, 36(3): 197-203.
- [18] 刘光焯, 林洋. 胶胨状芽孢杆菌拮抗菌株活性物质形成条件及其性质初步研究[J]. 微生物学通报, 2003, 30(1): 22-26.
- [19] LANCINI G, Parenti F, Gallo G G. Antibiotics: A multidisciplinary Approach [M]. New York and London: Plenum press, 1995: 21-35. ●