

厚壁轮枝菌摇瓶液体发酵培养的研究

刘春秀, 汪来发*, 朴春根, 田国忠, 李永

(中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 国家林业局森林保护学重点实验室, 北京 100091)

摘要: 厚壁轮枝菌对根结线虫虫卵有很强的寄生力, 是线虫的生防菌, 本文对其最适培养条件进行了研究。每 12 h 对其产孢情况进行跟踪, 探讨了不同 C、N 源, 初始 pH 值, 无机盐对其产孢量的影响, 确定了适宜的培养条件及发酵终止时间。结果显示, 28℃下, 在 160 r·min⁻¹ 摇床上, 以 500 mL 三角瓶 200 mL 的装量进行液体培养, 筛选出的最佳复合培养基配方为: 葡萄糖 20 g·L⁻¹, 玉米粉 20 g·L⁻¹, 黄豆粉 20 g·L⁻¹, KH₂PO₄ 0.5 g·L⁻¹, MgSO₄·7H₂O 0.5 g·L⁻¹。最佳 pH 值范围 5.0~7.0 最适发酵终止时间 120~144 h。

关键词: 厚壁轮枝菌; 液体发酵; 培养基

中图分类号: S718.81 文献标识码: A

Studies on the Liquid Fermentation Media for *Verticillium chlamydosporium*

LIU Chun-xiu, WANG Laifa, PIAO Chun-gen, TIAN Guo-zhong, LI Yong

(Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, CAF, Key Laboratory of Forestry Protection, State Forestry Administration, Beijing 100091, China)

Abstract Tests for fitting the culture medium for *Verticillium chlamydosporium* which had high parasitic rate on *Meloidogyne incognita* eggs were bioassayed. The experiment studied on the influence of different carbon source and nitrogen source, initial pH value, inorganic salts on the sporulation by observing the spore output every 12 hours. Under the culture condition of temperature 28℃, 200 mL inventory per 500 mL flask and speed of agitation 160 r·min⁻¹, the optimal fermentation medium was obtained which included glucose 20 g·L⁻¹, corn flour 20 g·L⁻¹, soybean powder 20 g·L⁻¹, KH₂PO₄ 0.5 g·L⁻¹, MgSO₄·7H₂O 0.5 g·L⁻¹. The best initial pH value ranged from 5.0 to 7.0 and the optimum time for fermentation was 120~144 h.

Key words *Verticillium chlamydosporium*; liquid fermentation; culture medium

厚壁轮枝菌 (*Verticillium chlamydosporium* Goddard) 属半知菌亚门 (Deuteromycotina) 丝孢纲 (Hyphomycetes), 是一种重要的噬植物线虫真菌, 最早在甜菜孢囊线虫 (*Heterodera schachtii* Salm. idt.) 和禾谷孢囊线虫 (*Heterodera avenae* Filipjev.) 上分离到^[1], 后来发现该菌对南方根结线虫 (*Meloidogyne incognita* (Kofoid et White) Chitwood)、花生根结线虫 (*Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood)、大豆孢囊线虫 (*Heterodera glycines* Ichinohe) 的雌虫、孢囊、卵囊或虫卵有很强的

寄生能力^[2]。Chen等^[3]对从大豆孢囊线虫上分离的 18 个种 21 株真菌进行致病力的测定, 表明 *V. chlamydosporium* 寄生指数最高, 同时卵的孵化率减少 74%。由于厚壁轮枝菌不会致病于植物, 所以被认为是一种潜力很大的线虫生防菌, 引起各国学者的注意。在其培养基质方面的研究中, Crump等^[4]报道, 厚壁轮枝菌可以在麦麸、大麦杆、小麦杆及粗沙混合组成的原料上生长。Jones等^[5]证实, 糖蜜、硅藻盐、褐煤及粘土等制成的培养基, 很适合该菌的生长。汪

收稿日期: 2005-08-12

基金项目: 国家科技基础条件平台项目 (2004DKA30620) 和引进国际先进农业科学技术项目 (2004-4-37)

作者简介: 刘春秀 (1979-), 女, 北京昌平人, 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所硕士研究生。

* 通讯作者: 汪来发 (1964-), 男, 安徽望江人, 从事森林病理学和植物线虫学研究。

来发^[6]在对线虫三种天敌真菌生物学特性的研究中报道,厚壁轮枝菌在以草炭为基质的培养基中生长最好。在商业生产上,生防菌常进行液体培养来大量生产孢子和菌丝^[7]。液体培养的研究可以为目前工业化生产效果最好的液固两相法生产分生孢子提供基础,并可探讨液体深层培养产孢技术^[8],但国内外对液体培养该菌的研究较少。所以,本实验利用摇瓶液体发酵培养,以碳氮源初级筛选为基础,研究适合厚壁轮枝菌产孢的复合培养基配方,探讨无机盐的有无和发酵初始 pH 值对其产孢量的影响,确定发酵终止时间,以期今后的扩大培养,工业罐发酵条件的研究提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 菌种

厚壁轮枝菌 (*Verticillium dahlmydosporium* Goddard) 来源美国,经寄生力测定对南方根结线虫 (*Meloidogyne incognita* (Kofoid et White) Chitwood) 卵的寄生率为 80.0%^[5]。

1.2 培养方法

1.2.1 菌种制备 取 15 mL 质量浓度为 0.005 g·L⁻¹ 的吐温 80 倒入经 PDA 培养 10 d 的厚壁轮枝菌

平板中,用无菌水洗下孢子,振荡,混匀制成孢子悬浮液,计数为 4×10^8 个·mL⁻¹。

1.2.2 培养条件 500 mL 三角瓶中装入培养基 200 mL,湿热灭菌 121 °C 下 30 min,冷却至室温,用体积浓度为 0.5 mol·L⁻¹ 的 HCl 和 NaOH 调节初始 pH 值为 6.0。在无菌条件下,接种孢子悬浮液,接种量为 20 mL·L⁻¹,置 28 °C 摇床 160 r·min⁻¹ 培养,每处理设 3 次重复。

1.3 实验方法

1.3.1 基础培养基的筛选

C 源: 葡萄糖,蔗糖,麦芽糖,可溶性淀粉,玉米粉;

N 源: NaNO₃, (NH₄)₂SO₄, 蛋白胨,尿素,黄豆粉。

对 C、N 源进行全排列组合,组成 25 种培养配方(见表 1)。每种培养基配比为: C 源,质量浓度为 40 g·L⁻¹; N 源,质量浓度为 20 g·L⁻¹, KH₂PO₄ 质量浓度为 0.5 g·L⁻¹, MgSO₄·7H₂O 质量浓度为 0.5 g·L⁻¹。接种后摇床同批培养,以产孢量作为筛选标准,筛选出基础培养基。

表 1 25 组培养基 C、N 源配合

培养基代码	C、N 组合	培养基代码	C、N 组合	培养基代码	C、N 组合
A1	葡萄糖 + (NH ₄) ₂ SO ₄	B ₁	蔗糖 + (NH ₄) ₂ SO ₄	C1	淀粉 + (NH ₄) ₂ SO ₄
A2	葡萄糖 + 黄豆粉	B ₂	蔗糖 + 黄豆粉	C2	淀粉 + 黄豆粉
A3	葡萄糖 + NaNO ₃	B ₃	蔗糖 + NaNO ₃	C3	淀粉 + NaNO ₃
A4	葡萄糖 + 蛋白胨	B ₄	蔗糖 + 蛋白胨	C4	淀粉 + 蛋白胨
A5	葡萄糖 + 尿素	B ₅	蔗糖 + 尿素	C5	淀粉 + 尿素
培养基代码	C、N 组合	培养基代码	C、N 组合		
D1	麦芽糖 + (NH ₄) ₂ SO ₄	E ₁	玉米粉 + (NH ₄) ₂ SO ₄		
D2	麦芽糖 + 黄豆粉	E ₂	玉米粉 + 黄豆粉		
D3	麦芽糖 + NaNO ₃	E ₃	玉米粉 + NaNO ₃		
D4	麦芽糖 + 蛋白胨	E ₄	玉米粉 + 蛋白胨		
D5	麦芽糖 + 尿素	E ₅	玉米粉 + 尿素		

1.3.2 复合培养基的筛选 从 25 种培养基组合中,对产孢量较多的 C、N 源进行复合 C、N 源的筛选。接种后摇床同批培养,以产孢量作为筛选标准,筛选出复合培养基。

1.3.3 无机盐对产孢量的影响 在基础培养基和复合培养基中分别添加及不添加无机盐 (KH₂PO₄ 质量浓度为 0.5 g·L⁻¹, MgSO₄·7H₂O 质量浓度为 0.5 g·L⁻¹),其它条件不变,接种后摇床同批培养。

1.3.4 初始 pH 值对产孢量的影响 以基础培养基为发酵培养基,用体积浓度 0.5 mol·L⁻¹ HCl 和

NaOH 将初始 pH 值分别调为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 接种后摇床同批培养。

1.3.5 发酵终点的确定 每种培养基组合和实验方案下均自发酵 24 h 开始,每隔 12 h 取发酵液,稀释一定倍数后血球计数板计数,绘制必要的产孢曲线,根据产孢量变化确定发酵终止时间。

2 结果

2.1 基础培养基的选择

表 2 25种培养基组合产孢量

项目	各组合产孢量									
培养基代码	A1	A2	A3	A4	A5	B1	B2	B3	B4	B5
产孢量 / (10^7 个 \cdot mL $^{-1}$)	13.61	42.50	0.75	0.08	0.05	24.90	12.19	4.02	0.075	0.078
培养基代码	C1	C2	C3	C4	C5	D1	D2	D3	D4	D5
产孢量 / (10^7 个 \cdot mL $^{-1}$)	32.62	14.45	0.55	0.07	0.06	15.26	10.13	3.67	0.86	0.06
培养基代码	E1	E2	E3	E4	E5					
产孢量 / (10^7 个 \cdot mL $^{-1}$)	42.05	10.65	0.30	0.061	0.08					

由表 2 可以看出: 不同培养基组合, 产孢量差异很大。其中 A2、B1、C1、E1 的 C、N 组合产孢量相对较高, 最高可达到 42.5×10^7 个 \cdot mL $^{-1}$, 产孢量顺序为 $A2 > E1 > C1 > B1$, 其它组合产孢量相对较低。对这 4 种培养基条件下产孢量随时间的变化情况作图 1, 可以看出孢子产量到达高峰的时间是不同的, 产孢高峰出现的顺序为: B1 (蔗糖 + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 168 h > A2 (葡萄糖 + 黄豆粉) 180 h > E1 (玉米粉 + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 192 h > C1 (可溶性淀粉 + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 210 h。这可能是由于作为 C 源的葡萄糖和蔗糖为单糖和双糖, 而 N 源 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为无机 N 源, 更便于厚壁轮枝菌直接利用。对于产孢量而言, 黄豆粉为有机 N 源其营养成分较 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 丰富, 使产孢量高于无机 N 源。根据产孢量和产孢高峰到达的时间以及考虑成本问题, 确定 A2 为实验的基础培养基。

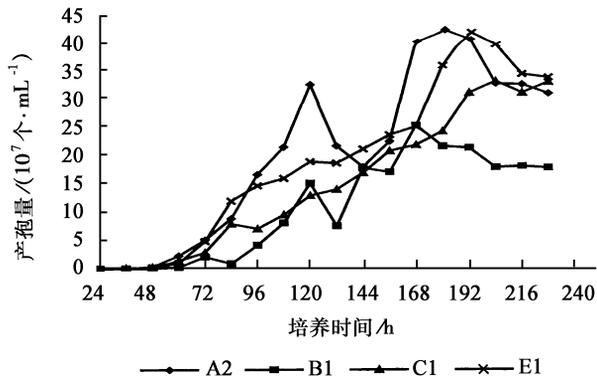


图 1 4种 C、N 组合培养基产孢曲线

2.2 复合培养基的筛选

根据表 2 各种培养基产孢情况, 选择适合产孢的 C、N 源, 筛选出 3 种复合培养基配方, 用 a、b、c 表示不同培养基配方。

a 葡萄糖 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 玉米粉 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 黄豆粉 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, KH_2PO_4 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

b 葡萄糖 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 黄豆粉 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, KH_2PO_4 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

c 葡萄糖 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 玉米粉 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 黄豆粉 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, KH_2PO_4 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

发酵 24 h 后, 每隔 12 h 计算产孢情况, 其产孢曲线如图 2 可以看出: 复合培养基 a 产孢量最高, 可达到 82.5×10^7 个 \cdot mL $^{-1}$, 比基础培养基产孢量高出了近 1 倍, 并且产孢高峰出现的时间相对于基础培养基由原来的 180 h 提前到 120 h, 提前了 60 h。而 b、c 两种复合培养基产孢量却低于基础培养基, 据观察此两种培养基生产的菌丝较为发达, 这可能是由于 b、c 两种复合培养基营养物质相对丰富, 使厚壁轮枝菌更偏向于营养生长, 从而产孢量较低。所以, 复合培养基 a 是筛选出的比较理想的培养基配方。

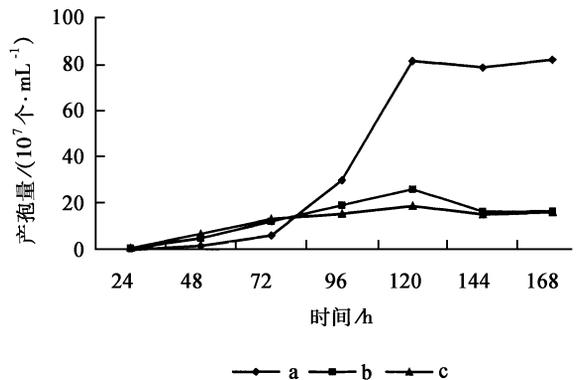


图 2 复合培养基产孢曲线

2.3 无机盐对产孢量的影响

基础培养基和复合培养基加盐及不加盐产孢量见图 3。证明无论是基础培养基, 还是复合培养基, 无机盐对产孢量的影响都是很大的。在不加盐的情况下, 产孢量大大下降, 基础不加盐比基础加盐产孢量下降了 75%, 复合不加盐也比复合加盐产孢量下降了 63.3%。所以 KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 作为培养基无机盐的成分是十分必要的。

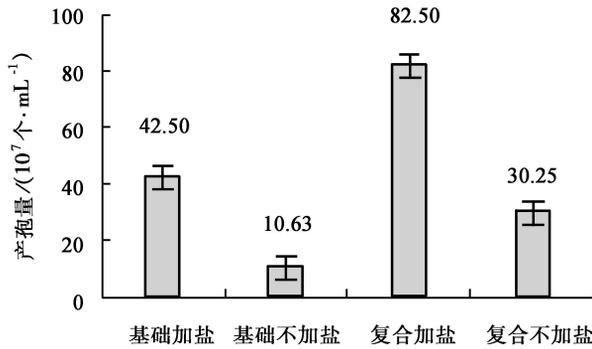


图 3 无机盐对产孢量的影响

2.4 初始 pH 值对产孢量的影响

根据图 4 可见, 该菌种有较广的生长适宜 pH 值范围, pH 值在 5.0~6.0~7.0 范围内产孢量较高。而 pH 值为 7.0 时产孢量最高。pH 值低于 5.0 或高于 7.0 产孢量均受到不同程度的抑制。在发酵过程中, 可以观察到随着发酵时间的延长发酵液的颜色相应发生变化, 当 pH 值从酸性逐渐变为碱性时, 发酵液从桔红色渐变为淡黄色最后至暗褐色。pH 值在 5.0~7.0 之间发酵液颜色基本保持初始的淡黄色。当 pH 值小于 4.0 时, 发酵液向桔红色转变, 当 pH 值大于 8.0 时向土黄色和暗褐色转变。

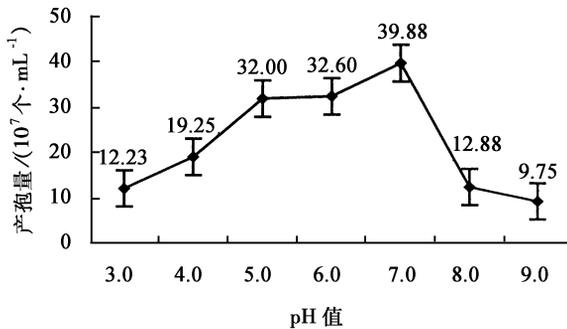


图 4 pH 值对产孢量的影响

2.5 发酵终点的确定

由图 1 和图 2 可知: 厚壁轮枝菌产孢情况与发酵时间关系生长曲线特性是其滞留适应期为 72 h, 72 h 后进入对数生长期, 96 h 开始进入快速生长期, 产孢量大大增加。利用基础培养基和复合培养基产孢高峰出现的时间有所差异, 经过改良的复合培养基产孢高峰比基础培养基的产孢高峰提前了 60 h, 即 120 h 后产孢量趋于稳定进入了稳定期。可见, 培养条件对产孢情况影响显著, 由于菌龄低的孢子生活力强, 发酵终止时间选择在 120~144 h 左右最好。

3 结论

本实验通过摇瓶液体培养, 筛选出适合厚壁轮枝菌生长的基础培养基和复合培养基配方, 使孢子产量增加近 1 倍。通过对无机盐、pH 值条件的研究, 证明在真菌发酵中添加少量无机盐是十分必要的。厚壁轮枝菌在 pH 值为 5.0~7.0 的培养液中产孢量最高。

在微生物发酵生产工艺中, 发酵终点的选择非常重要, 本试验跟踪孢子生长情况, 根据产孢曲线, 初步确定发酵周期为 120~144 h。

综上所述, 厚壁轮枝菌作为线虫的生防菌, 扩大培养在生防上具有十分重要的意义, 选择廉价培养基、掌握适宜培养条件, 以低成本获得最大量产品是将一个有潜力的菌株开发成为应用产品的先决条件^[9]。微生物生长是多种因素共同作用的结果, 任何因素的改变都会影响孢子产量和发酵终止时间。发酵过程中的生理指标, 菌丝生长, C、N 等物质代谢的变化规律的研究都有助于正确地判断发酵进程, 同时也是重要的指标。利用摇瓶液体发酵培养的试验结果, 为研究厚壁轮枝菌的扩大培养提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 林茂松, 沈素文. 厚壁轮枝菌防治南方根结线虫研究初报 [J]. 生物防治通报, 1994, 10(1): 7~10
- [2] 刘畅. 厚垣轮枝菌 *V₁₀* 菌株对南方根结线虫的寄生和防治作用 [J]. 广西农业科学, 2004, 35(2): 135~137
- [3] Chen S Y, Dickson D W, Mitchell D J et al. Pathogenicity of fungi to eggs of *Heterodera glycines* [J]. Journal of Nematology, 1996, 28(2): 148~158
- [4] 卢明科, 潘沧桑, 李舟. 厚垣轮枝孢菌 (*Verticillium chlamydosporium*) 防治植物线虫研究进展 [J]. 西北农林科技大学 (自然科学版), 2004, 32(4): 103~107
- [5] Jones R W, Pettit R E, Taber R A. Lignite and stillage carrier and substrate for application of fungal biocontrol agents to soil [J]. Phytopathology, 1984, 74: 1167~1170
- [6] 汪来发, 杨宝君. 根结线虫三种天敌真菌生物学特性的研究 [J]. 安徽农业大学学报, 1999, 26(2): 138~140
- [7] Papavizas G C, Dunn M T, Lewis J A, et al. Liquid fermentation technology for experimental production of biological fung [J]. Phytopathology, 1984, 74: 1171~1175
- [8] 殷华, 李锋, 蒋继宏. 蜡蚧轮枝菌液体发酵的代谢动力学 [J]. 安徽农业大学学报, 2004, 31(3): 340~343
- [9] 农向群, 金正俊, 邓春生. 小菜蛾白僵菌菌株的大量培养条件 [J]. 中国病毒学, 2000, 15: 130~133