

根际益生菌链霉菌 S506 固体发酵条件优化

穆燕魁^{1,2} 王占武^{1*} 张翠绵¹ 李洪涛¹ 田洪涛^{2*} 贾楠¹

(1. 河北省农林科学院遗传生理研究所 石家庄 050051)

(2. 河北农业大学 食品科技学院 保定 071001)

摘要: 链霉菌 S506 是一株具有广谱防病、促生和降解根系毒素功能的根际益生菌。采用液固两相发酵工艺,以活菌总数和分生孢子产生量为检测指标,研究了 S506 活菌制剂固体发酵物料的配方和工艺参数。获得固体发酵物料的最佳参数为:麸皮 100 g、M-1 15 g、磷酸氢二钾 0.3 g、氯化钠 0.25 g、硝酸钾 0.1 g、碳酸钙 0.8 g,自然 pH 值,液体菌种种龄 84 h,接种量 10%,发酵温度 30℃,料水比 10:6,发酵时间 60 h。在最佳发酵条件下,S506 固体菌剂的活菌总量达到 8.27×10^9 CFU/g,分生孢子数达到 6.23×10^9 CFU/g。

关键词: 根际益生菌, 固体发酵, 链霉菌, 发酵条件

Optimum of Solid Fermentation Parameters for *Streptomyces* sp. S506

MU Yan-Kui^{1,2} WANG Zhan-Wu^{1*} ZHANG Cui-Mian¹
LI Hong-Tao¹ TIAN Hong-Tao^{2*} JIA Nan¹

(1. Institute of Genetics and Physiology, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051)

(2. College of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001)

Abstract: *Streptomyces* sp. S506 is one of PGPR strains isolated from tomato rhizosphere. The optimum solid fermentation parameters were studied. According to the amount of alive cells and the rate of conidium production, the optimum parameters were obtained as follows: bran 100 g, mineral matter M-1 15 g, K_2HPO_4 0.3 g, NaCl 0.25 g, KNO_3 0.1 g, $CaCO_3$ 0.8 g, natural pH, liquid seed age 84 h, inoculum volume 10%, fermentation temperature 30℃, the ratio of material to water is 10:6, fermentation time 60 h. Under the optimized conditions, the alive cells amount of S506 will reach to 8.27×10^9 CFU/g, and the number of conidium is 6.23×10^9 CFU/g.

Keywords: PGPR, Solid fermentation, *Streptomyces*, Fermentation condition

链霉菌是目前研究和应用最广泛的生防因子之一^[1],开发应用的产品涉及杀菌、杀虫、除草、生长调节、抗病毒等多种制剂^[2,3]。但大多以抗生素等菌

体发酵产生的次级代谢产物的开发利用为主,将活菌体作为生防因子的还较少。研究表明,根际链霉菌不仅可促进植物生长、提高作物产量,而且可以

增加植物对病原菌的抗性^[4]。我国早在上世纪 60 年代就将链霉菌“5406”活菌制剂应用于生产实际,在防病促生方面效果显著^[5]。但是由于当时缺乏固态发酵设备,主要采用堆置发酵,产品质量没有保障,致使使用效果不稳定。虽然在发酵设备和工艺方面,深层液体发酵工艺都较为成熟,但用于农用微生物制剂的生产,存在成本高,代谢物不能充分利用,有废液排放等弊端,所以要将链霉菌活菌制剂应用于生产实际,需要在发酵设备和工艺两方面取得突破。近年来,固态发酵罐和发酵检测手段日臻完善,国产化的固体发酵设备已应用于生产,显示出诸多优于液体深层发酵的技术经济指标^[6]。这些都为规模化生产植物微生物生态制剂提供了前提。

链霉菌(*Streptomyces* sp.)S506 是从蔬菜根际分离获得一株多功能根际优势菌株。大量实验表明,将该菌的活菌体施入蔬菜根际,可有效防治枯萎病、根腐病、根结线虫病等多种蔬菜根部病害,并具有显著的促进根系发育和降解根系自毒物质功能^[7,8]。为尽快将该菌应用于农业生产,需要对活菌制剂的发酵条件进行研究。为提高菌剂浓度,降低生产和使用成本,减少废弃物排放,本研究采用液固两相发酵工艺,对其固体发酵条件进行了优化。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

链霉菌(*Streptomyces* sp.)S506, 由河北省农林科学院遗传生理研究所微生物工程实验室分离,保存。

1.2 培养基

高氏一号培养基,用于目的微生物的菌种活化和活菌计数;液体种子培养基:蔗糖 1%、麸皮 3%、淀粉 1%、豆粕 1%、花生饼 0.5%、氯化铵 0.3%、氯化钠 0.4%、碳酸钙 0.3%、磷酸氢二钾 0.3%、硫酸铁 0.05%、硫酸镁 0.05%。

1.3 方法

1.3.1 种子液的制备: 将斜面刮下的孢子悬液接种到液体种子培养基中, 30℃, 150 r/min 振荡培养 96 h, 制成活菌含量大于 10^8 CFU/mL 的种子液。

1.3.2 固体发酵载体的筛选: 分别选取麸皮、米糠、玉米粉、秸秆粉为发酵载体, 加 NaCl 0.25%、CaCO₃ 0.8%, 水适量, 分装于 500 mL 三角瓶中, 每瓶 50 g, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min, 5% 接种, 30℃ 静置培养

96 h。每 24 h 取样检测。

1.3.3 固体发酵营养添加物的筛选: 在固体发酵载体上添加不同营养元素, 以不添加营养物质的作对照, 进行单因子试验。每隔 12 h 取样, 检测活菌总数、孢子数, 比较确定较优因子。

1.3.4 固体发酵配方的筛选: 根据单因子试验结果, 采用正交试验^[9], 确定最优发酵物料组合。

1.3.5 发酵条件的优化: 分别检测不同种龄(72 h、84 h、96 h、108 h、120 h), 接种量(5%、8%、10%、12%), 培养温度(25℃、30℃、35℃、40℃), pH 值(5、6、7、8、9), 料水比(10:4、10:5、10:6、10:7)对 S506 总量和分生孢子数的影响。每处理 3 个重复。

1.3.6 检测方法: 活菌总量计数: 准确称取晾干的固体发酵物 0.5 g 于 5 mL 无菌水中, 玻璃珠打散, 系列稀释, 涂布平板计数。孢子量计数: 固体发酵物经 38℃ 烘干后, 准确称取 0.5 g, 用蒸馏水(含 0.2% 吐温)洗 3 次, 收集孢子悬浮液并定容。稀释到适宜浓度后, 用血球计数板测定孢子悬浮液浓度, 计算孢子含量(CFU/g)^[10]。

2 结果与分析

2.1 发酵载体的筛选

发酵载体是影响固体发酵效果的关键因素之一, 考虑生产成本和发酵特性等因素, 选择价廉易得的麸皮、米糠、玉米粉、秸秆粉等农副产品作为候选物料进行了发酵试验。从图 1 的生长曲线可见, S506 在麸皮上的发酵启动最快, 延滞期最短, 在 72 h 时就达到对数末期, 72 h 后菌量开始下降。其次为玉米

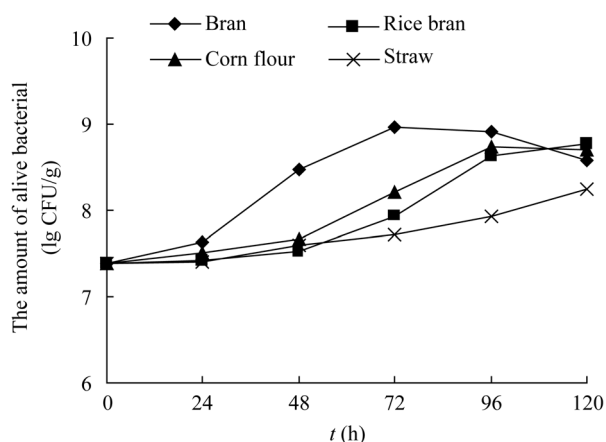


图 1 S506 在不同发酵载体中的生长曲线

Fig. 1 The growth curves of S506 in different mediums

粉、米糠和秸秆粉。选择麸皮作为固体发酵培养基的载体。

2.2 固体发酵营养添加物的筛选

2.2.1 碳源的筛选: 以麸皮为基础培养基, 分别添加 2% 葡萄糖、2% 蔗糖、2% 淀粉、2% 玉米粉作为碳源进行单因子试验。结果发现(图 2), 所有处理的活菌总量差别不显著($P>0.05$), 添加葡萄糖和蔗糖的处理, 虽然培养初期菌丝发育较快, 但产孢量较小, 在所有处理中数量最低。添加淀粉、玉米粉的处理与对照无差别, 可能与麸皮中含有残余面粉有关。表明, S506 可较好地利用麸皮中残存的淀粉和麸皮纤维作为碳源, 不必再添加其他碳源。

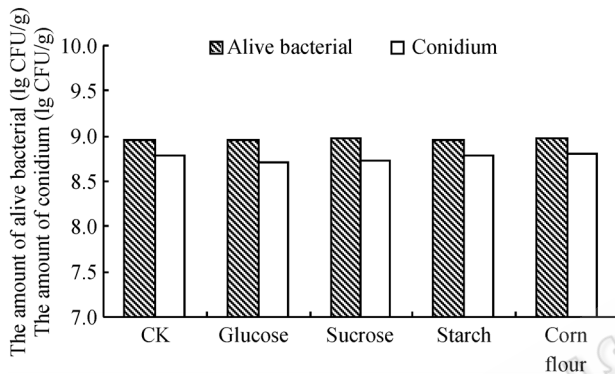


图 2 碳源对活菌总量和分生孢子产生量的影响

Fig. 2 The effect of carbon sources on biomass growth and conidiation

2.2.2 氮源的筛选: 分别添加 1% 黄豆饼粉、1% 菜粕、0.5% KNO_3 、0.5% NH_4NO_3 、0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为氮源, 以空白为对照进行单因子试验。从图 3 结果可见, 添加黄豆饼粉和 KNO_3 的处理, 活菌总量较高。黄豆饼粉作为有机氮源可以很好的刺激菌体生长, 但产孢量较少; S506 能较好的利用硝酸盐类物质, 且 KNO_3 能明显刺激产孢, 因此, 选择 KNO_3 作为添加氮源。

2.2.3 微量元素的筛选: 分别添加 15% M-1、0.5% MgSO_4 、0.5% CuSO_4 、0.5% FeSO_4 、0.5% MnSO_4 等微量元素, 以空白为对照进行单因子试验。从图 4 结果可见, 添加 M-1 和 MnSO_4 的活菌总数较高, 优于其他处理, 其中添加 M-1 的效果最好。M-1 是一种经活化处理的复合矿粉, 含有多种微量元素, 价格低廉。选用 M-1 为微量元素添加物。

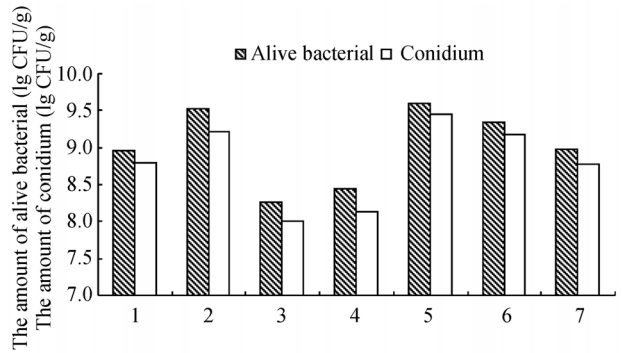


图 3 氮源对活菌总量和分生孢子产生量的影响

Fig. 3 The effect of nitrogen sources on biomass growth and condition

1: 对照; 2: 黄豆饼粉; 3: 菜粕; 4: 棉粕; 5: KNO_3 ; 6: NH_4NO_3 ; 7: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
1: CK; 2: Soybean cake powder; 3: Rapeseed meal; 4: Cottonseed meal; 5: KNO_3 ; 6: NH_4NO_3 ; 7: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

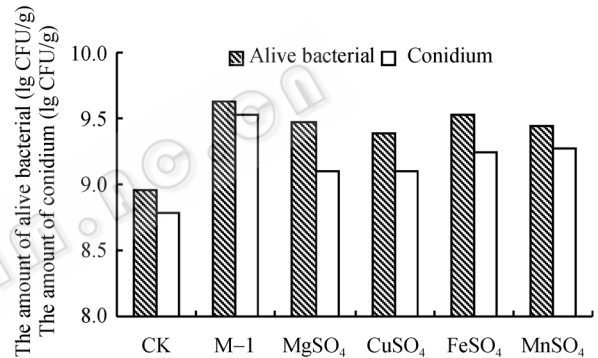


图 4 微量元素对活菌总量和分生孢子产生量的影响

Fig. 4 The effect of trace elements on biomass growth and condition

2.2.4 磷源的筛选: 分别添加 0.3% KH_2PO_4 、0.3% K_2HPO_4 、0.3% $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ 作为磷源, 以空白为对照进行单因子试验。由图 5 结果可见, 培养基中加入不同的磷源对菌体生长均有促进作用, K_2HPO_4 稍优于其他两种, 因此, 选 K_2HPO_4 作为磷源。

2.3 固体发酵配方的筛选

采用 4 因素 3 水平正交设计, 进行了固体发酵最佳配方的筛选试验。从表 1 结果可见。不同物质对菌体生长的影响次序为 $A > C > B > D$ 。活菌总量最高的培养基组合为 $A_2B_1C_2D_2$, 即麸皮 100 g、硝酸钾 0.1 g、M-1 15 g、磷酸氢二钾 0.3 g。以此配方配制培养基验证, 活菌总量达到 4.85×10^9 CFU/g, 孢子数为 2.82×10^9 CFU/g。因此, 在此后的发酵条件的优化试验中, 均采用此固体培养基配方。

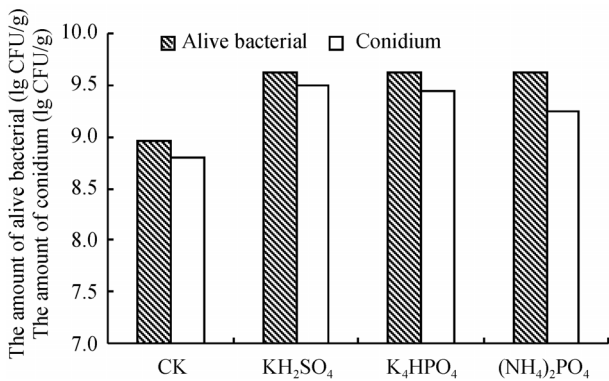


图5 磷源对活菌总量和分生孢子产生量的影响
Fig. 5 The effect of phosphorus sources on biomass growth and condition

2.4 最佳发酵工艺参数的筛选

2.4.1 液体种子种龄的影响：分别制得培养 72 h、84 h、96 h、108 h 的种子培养液，以 5% 的接种量接种于固体培养基中，30℃ 培养 108 h。由图 5 的生长曲线可见，种龄不同，发酵过程延迟期差别较大，以种龄 84 h 的最短，接种 60 h 后菌量达到稳定期，其次为种龄 96 h、72 h 和 108 h，到达稳定期的时间分别为 72 h、84 h 和 84 h。不同处理间，最高活菌总量差别不显著($P>0.05$)。因此，确定液体种子的最佳种龄为 84 h。

2.4.2 接种量的影响：分别以 5%、8%、10%、12% 的接种量接种固体培养基，发酵检测。由图 6 结果可见，大接种量有利于菌体的迅速生长，接种量为 10% 时，发酵启动迅速，60 h 达到稳定期；但接种量大于 10% 时，反而影响发酵进程，可能是液体混入较多，对培养基的透气性产生了影响。所以，选用 10% 的接种量，可进一步缩短固体发酵周期，60 h 即可达到稳定期，终止培养。

2.4.3 发酵温度的影响：从图 8 结果可见，在发酵温度为 30℃ 和 35℃ 时，S506 菌株的活菌总量和产孢量最高，二者间的差别不显著($P>0.05$)，选取 30℃ 为最佳发酵温度。

2.4.4 培养基起始 pH 值的影响：从图 9 结果可见，当培养基 pH 值范围在 6.0~8.0 时，活菌总量和产孢量无显著性差别($P>0.05$)。而当 pH 小于 6 或大于 8 时菌体生长受到影响。由于所选培养物料的 pH 值在 6.5 左右，所以采用自然 pH 即可。

2.4.5 料水比的影响：从图 10 结果可见，料水比对菌体的生长影响较大，含水量过高会影响发酵物料的透气性，不利于菌体的生长和分生孢子的分化。在料水比为 10:6 时的活菌总量和产孢量最大，故选用 10:6 的料水比。

表 1 L ₉ (3 ⁴)正交试验结果 Table 1 L ₉ (3 ⁴) orthogonal test design and results					
实验号 No.	A 麸皮 bran(g)	B KNO ₃ (g)	C M-1(g)	D K ₂ HPO ₄ (g)	活菌数量 The amount of alive bacterial (× 10 ⁸ 个/g)
1	80	0.1	12	0.1	21.59
2	80	0.3	15	0.3	26.32
3	80	0.5	18	0.5	22.10
4	100	0.1	15	0.5	46.21
5	100	0.3	18	0.1	38.56
6	100	0.5	12	0.3	34.99
7	120	0.1	18	0.3	29.35
8	120	0.3	12	0.5	20.87
9	120	0.5	15	0.1	28.09
K1	70.01	97.15	77.45	88.24	
K2	119.76	87.51	100.62	90.66	
K3	78.31	85.18	90.01	89.18	
K1/3	23.34	32.38	25.82	29.41	
K2/3	39.92	28.58	33.54	30.22	
K3/3	26.10	28.39	30.00	29.73	
R	16.58	3.99	7.73	0.81	

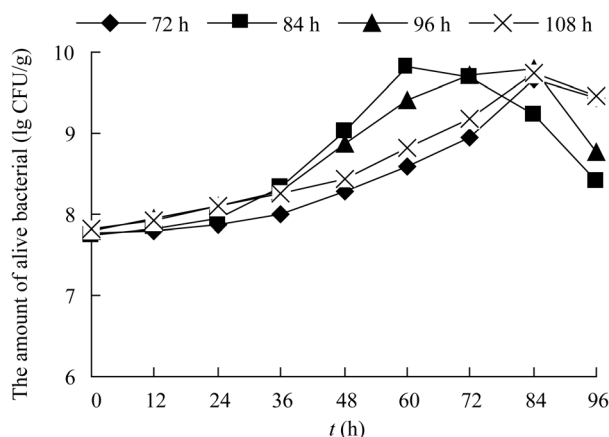


图 6 不同种龄的液体种子接种后固体发酵菌体生长曲线

Fig. 6 The growth curves of different seeds in solid medium

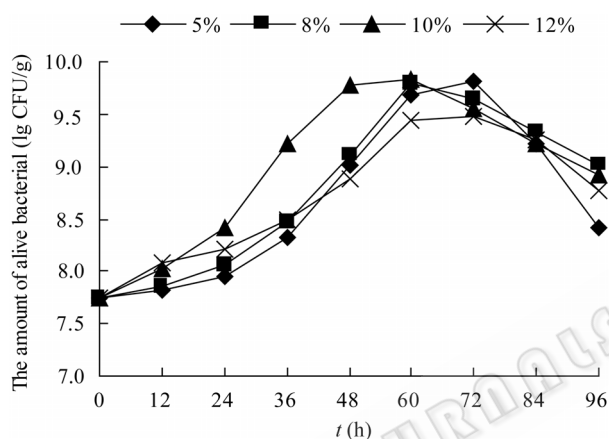


图 7 不同接种量固体发酵菌体生长曲线

Fig. 7 The growth curves of different inoculum levels in solid medium

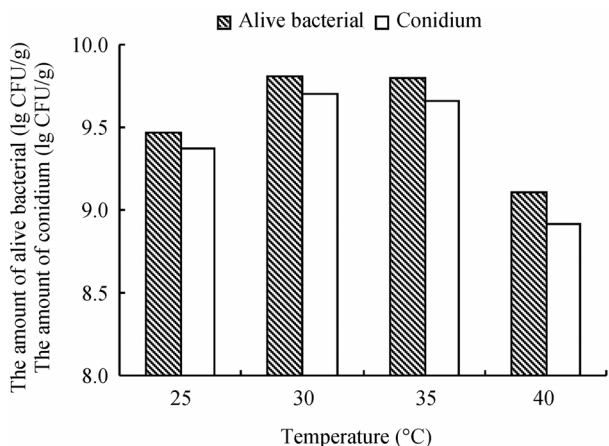


图 8 发酵温度对菌体生长的影响

Fig. 8 The effect of fermentation temperature on biomass growth

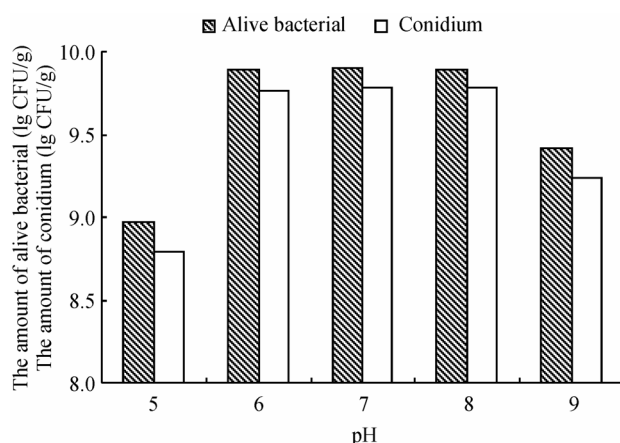


图 9 pH 值对菌体生长的影响

Fig. 9 The effect of pH on biomass growth

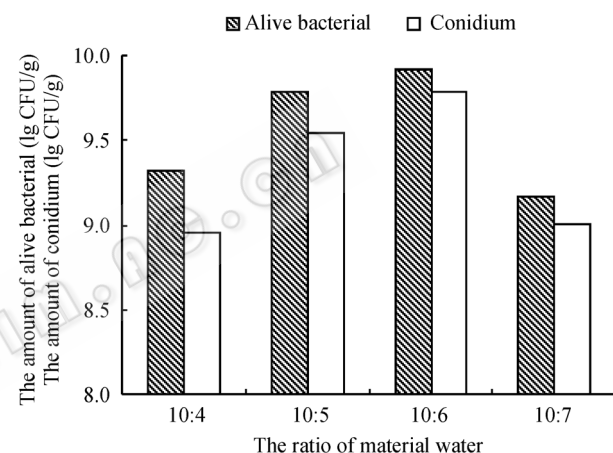


图 10 料水比对菌体生长的影响

Fig. 10 The effect of ratio of material and water on biomass growth

3 结论与讨论

1) 通过本实验, 获得 S506 固体发酵的最佳参数为: 麸皮 100 g、M-1 15 g、磷酸氢二钾 0.3 g、氯化钠 0.25 g、硝酸钾 0.1 g、碳酸钙 0.8 g, 自然 pH, 液体菌种种龄 84 h, 接种量 10%, 发酵温度 30°C, 料水比 10:6, 发酵时间 60 h。在最佳发酵条件下, S506 固体菌剂的活菌总量达到 8.27×10^9 CFU/g, 分生孢子数量达到 6.23×10^9 CFU/g。保存实验表明, 固体菌剂在室温下保存 18 个月, 活菌总量仍保持在每克 50 亿个左右, 可以满足实际生产的需要。

2) 从上述实验中可以看出, 菌株 S506 对碳源、磷源等营养元素的需求并不苛刻, 在基础物料上就能较好生长, 这为实现规模化生产, 降低生产成本提供了保障。

3) 本研究采用液固两相发酵工艺, 以廉价易得的农副产品麸皮和 M-1 作为主要发酵物料, 具有发酵周期短, 成本低, 发酵过程产生的活菌体及代谢产物全部利用, 没有废弃物排放的特点, 兼顾了效果、成本和环境等方面因素, 非常适于农用微生物活菌制剂的发酵生产, 这为产业化开发奠定了基础。

4) 采用液体种子接种, 固体发酵工艺, 主要是更适于工业化生产, 便于生产过程的标准化控制。但是, 菌种从液态转入固态发酵, 有一个适应过程, 存在延滞期过长的问題。本实验采用加大接种量, 选择最适种龄, 添加矿质元素等手段, 使接种后的延滞期大大缩短, 对降低污染率, 提高生产效率十分有力。

5) 接种量和料水比是影响固体发酵的两个关键参数, 二者存在交互影响。接种量大可提高菌体的繁殖速度, 但会相应提高物料的含水量, 影响透气性, 接种量太小发酵周期延长, 增大污染风险^[11,12]。物料含水量过高会影响固体颗粒之间的松散性、物料溶氧量和发酵热的散失, 含水量过低会影响营养基质的溶解和传递, 进而影响微生物对营养基质的利用^[13,14]。因此, 探索并掌握适宜的物料初始含水量和接种量的关系, 是保证发酵效果的关键。

6) 本实验结果仅是在三角瓶培养水平上获得的, 要实现产业化开发, 还须进行固体反应器条件下的中间放大实验, 有关工作正在进行中。

参 考 文 献

[1] Hardt IH, Steinmeta H. New natural epothilones from sporangium cellulosum, strains Soce 90/B2 and Soce 90:

isolation, structure, elucidation and SAR studies. *J Nat prod*, 2001, **64**(7): 847.

[2] 陈红军, 郭 明, 冯建菊. 我国生物农药的研究应用近况. *植物保护*, 2000, **20**(3): 21-22.

[3] 徐汉虹, 安玉兴. 生物农药的发展动态与趋势展望. *农药科学与管理*, 2001, **22**(1): 32-34.

[4] 曹理想, 周世宁. 植物内生放线菌研究. *微生物学通报*, 2004, **31**(4): 93-96.

[5] 施安辉. *经济微生物*. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1989, pp.359-361.

[6] 陈洪章, 李佐虎. 微生物固态发酵反应器. *化工科技市场*, 2001, **2**: 25-27.

[7] 王占武, 李晓芝, 张翠绵, 等. 防病促生功能性微生物的筛选及应用研究. *河北农业科学*, 2004, **8**(2): 28-31.

[8] 李洪涛, 张翠绵, 王占武, 等. 黄瓜根结线虫拮抗菌筛选及作用机理初探. *河北大学学报*, 2006, **26**(1): 91-96.

[9] 崔党群. *生物统计学*. 北京: 中国科学出版社, 1994, p.429.

[10] 黄永兵, 肖炎农, 黄 蓉, 等. 应用玉米秸秆生产淡紫拟青霉 36-1 菌株孢子. *中国生物防治*, 2007, **23**(4): 338-341.

[11] 陶玉贵. 生物农药固态发酵条件的研究. *安徽师范大学学报*, 2001, **24**(1): 31-34.

[12] 尹光琳, 战立克, 赵根楠. *发酵工业全书*. 北京: 中国医药科技出版社, 1992, p.216.

[13] Jackson AM, Whipps JM, Lynch JM. Effects of temperature, pH and water potential on growth of the four fungi with disease biocontrol potential. *World Microbiol Biotechnol*, 1991, **7**(2): 494-501.

[14] Kundsén GR, LI B. Effects of temperature, soil moisture, and wheat brab on growth of *Trichoderma harzianum* from the alginate pellets. *Phytopathology*, 1990, **90**(1): 724-727.