

## 诱导大豆抗阿特拉津青霉 snef960 菌株摇瓶发酵条件的筛选

潘琳琳,段玉玺,陈立杰,姜美英,刘大伟,潘 阳,李 颂

(沈阳农业大学 植物保护学院,辽宁 沈阳 110866)

**摘 要:**从实验室保存菌种中筛选出一株具有诱导大豆抗阿特拉津的青霉菌株 snef960。利用正交试验优化了发酵培养基组分,其最佳碳氮比为葡萄糖(4%)、硝酸铵(0.6%),发酵培养基中4种无机盐的最佳配比为:氯化钾(0.04%)、磷酸氢二钾(0.15%)、硫酸镁(0.04%)、硫酸亚铁(0.001%)。通过单因素试验确定青霉 snef960 的最佳摇瓶发酵条件:培养基初始 pH 值为8,发酵时间为9 d,转速为 $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,100 mL的三角瓶装液量为70 mL,接种量为10%。

**关键词:**大豆;阿特拉津;真菌;筛选;发酵条件

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2011)02-0272-05

## Screening of Fermentation Conditions for Fungi snef960 to Induce Anti-atrazine in Soybean

PAN Lin-lin, DUAN Yu-xi, CHEN Li-jie, JIANG Mei-ying, LIU Da-wei, PAN Yang, LI Song

(College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, Liaoning, China)

**Abstract:** Snef 960 which have efficiency to induce anti-atrazine in soybean was screened from laboratory save strains. Cultivation medium of snef960 was researched by orthogonal experiment. The result showed that the optimal C/N ratio was composed of 4% glucose, 0.6%  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , the optimal inorganic salts ratio was composed of 0.04% KCl, 0.15%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.04%  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.001%  $\text{FeSO}_4$ . The culture conditions were screened with mono-factor test, and the most suitable technical parameters were summed up as follows: pH8 before sterilized, fermentation time 9 d, agitation  $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ , volume 70/100mL, inoculated volume 10%.

**Key words:** Soybean; Atrazine; Fungi; Screening; Fermentation conditions

大豆是中国主要的粮食和经济作物,作为油脂、蛋白质及保健活性物质的重要来源以及食品、饲料等多种加工工业的原料,发展潜力巨大<sup>[1]</sup>。阿特拉津是一种抑制光合作用的持久性旱地广谱除草剂,可防除一年生禾本科杂草和阔叶杂草,对某些多年生杂草也有一定的抑制作用<sup>[2]</sup>。阿特拉津在土壤中的半衰期长达4~57周,因此容易对某些对阿特拉津敏感的后茬作物如大豆、小麦、水稻等产生毒害<sup>[3,4]</sup>。关于转基因大豆抗阿特拉津的报道和阿特拉津生物降解的研究报道很多,有许多属的细菌、放线菌和真菌均可以参与阿特拉津的生物降解<sup>[5-7]</sup>。但是对于利用真菌诱导大豆产生抗阿特拉津的报道较少。目前,利用植物诱导性来进行生物防治是具有发展潜力的防治方法之一。植物诱导抗性是开发植物内在抗性机制来防治病害,增强可控性、预防性,是现代植物病害防治的一条重要途

径<sup>[8]</sup>。课题组利用真菌发酵液对大豆种子进行包衣,筛选出一株具有诱导大豆抗阿特拉津的菌株 snef960,经形态学鉴定和 ITS 序列比对,其为青霉菌。试验证明其发酵液中菌丝体对大豆抗阿特拉津起到了明显的诱导作用,该研究探索青霉 snef960 发酵产生菌丝体的最适培养基和发酵条件,以期为该菌株的工厂化发酵生产工艺奠定基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 供试菌株

菌株 snef960,实验室保存。

#### 1.2 培养基

斜面和平板菌种培养基(PDA培养基):马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂17 g、蒸馏水1 000 mL。

种子培养基(查氏培养基):硝酸钠2.00 g、氯化钾0.50 g、硫酸亚铁0.01 g、磷酸氢二钾1.00 g、

收稿日期:2010-11-11

基金项目:现代农业产业技术体系岗位科学家专项资助项目。

第一作者简介:潘琳琳(1986-),女,在读硕士,研究方向为有害生物与环境安全。E-mail:panlin1986@163.com。

通讯作者:段玉玺(1964-),男,教授,博士生导师,现从事生物防治研究。E-mail:duanyx6407@163.com。

硫酸镁 0.50 g、蔗糖 30.00 g、蒸馏水 1 000 mL。

### 1.3 基础发酵培养条件

种子培养:将平板纯化的菌落用 5 mm 打孔器打菌饼,接种 5 个菌饼于摇瓶发酵培养基中,用 250 mL 三角瓶装液 100 mL,25℃、150 r·min<sup>-1</sup> 条件下摇床发酵 3 d。

为保证接种量的均匀且消除种子液中产生的生物活性成分对培养结果及其活性测定结果的影响,在无菌条件下取出培养 3 d 的种子液置于灭菌离心管中,5 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min 后去除上清液,加入无菌生理盐水冲洗,再次离心去上清,最后将菌体悬浮于生理盐水用于接种,接种量为 10%,以下试验相同。

### 1.4 生物量菌丝干重的测定

取发酵液,用已烘干并称重的滤纸过滤,用水洗至不再带有发酵液颜色为止。在 80℃ 恒温的烘箱中烘至恒重,然后称重。3 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min,去除上清液,菌体用蒸馏水洗涤至无发酵液颜色,80℃ 烘干至恒重,称重。

### 1.5 发酵培养基成分优化

**1.5.1 不同碳、氮源对菌株 *snf960* 菌体生长量的影响** 采用乳糖、麦芽糖、葡萄糖、淀粉等量替换发酵培养基原始配方中的蔗糖,以无碳源为对照;蛋白胨、脲、牛肉膏、硝酸铵等量替换发酵培养基原始配方中的硝酸钠,以无氮源为对照,测定不同碳、氮源对菌株 *snf960* 菌体生长量的影响。3 次重复。

**1.5.2 不同浓度优良碳、氮源对菌株 *snf960* 菌体生长量的影响** 在确定不同碳、氮源对菌株 *snf960* 菌体生长量的影响基础上,确定最适碳源为葡萄糖,最适氮源为硝酸铵,在其它因子不变的基础上,对葡萄糖和硝酸铵进行单因子试验。3 次重复。

**1.5.3 最佳碳、氮源正交试验** 在确定不同浓度的碳、氮源对菌株 *snf960* 菌体生长量的影响基础上,对碳源(葡萄糖)和氮源(硝酸铵)进行正交试验,确定其最佳配比。3 次重复。

**1.5.4 无机盐正交试验** 设计正交试验确定不同浓度的无机盐对菌株 *snf960* 菌体生长量的影响。无机盐的种类与种子培养基中的相同。从正交表中选用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 表,将每个因素设计 3 个水平。确定无机盐的最佳配比。3 次重复。

### 1.6 发酵条件的优化

采用基础优化条件,分别对培养基初始 pH 值、发酵时间、摇瓶转速、接种量和装液量进行单因素试验,测定菌株 *snf960* 菌体产量,确定最优的发酵条件。3 次重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 培养基主要组分对菌株 *snf960* 菌体产量的影响

不同碳源筛选试验结果表明,碳源对菌株 *snf960* 菌体产量的影响有较大差异。对菌株 *snf960* 菌体产量的影响从高到低依次为葡萄糖 > 蔗糖 > 麦芽糖 > 淀粉 > 乳糖 > 无碳源。最终选用葡萄糖作为菌株 *snf960* 发酵的最佳碳源(图 1)。

不同氮源筛选试验结果表明,菌株 *snf960* 在有氮和无氮的情况下均有菌体产量,但不同氮源对其菌体产量的影响具有一定的差异。对菌株 *snf960* 菌体产量的影响从高到低依次为硝酸铵 > 硝酸钠 > 蛋白胨 > 牛肉膏 > 无氮源 > 脲。最终选用硝酸铵作为菌株 *snf960* 发酵的最佳氮源(图 2)。

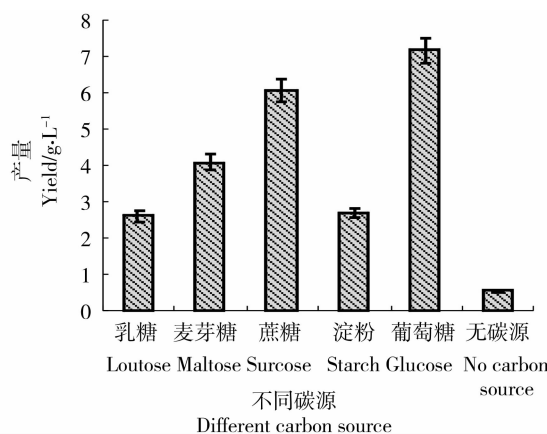


图 1 不同碳源对 *snf960* 产量的影响

Fig.1 Effect of different carbon source on yield of *snf960*

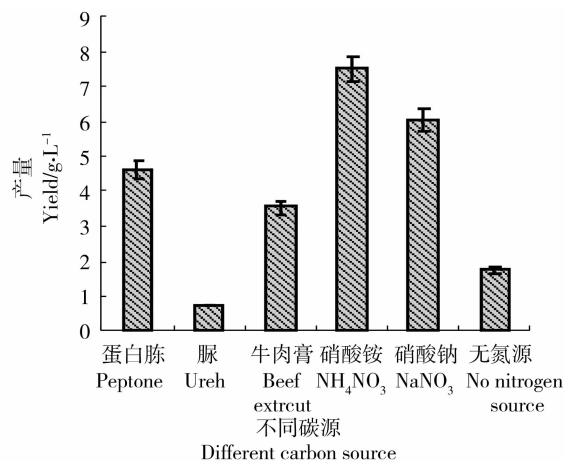


图 2 不同氮源对 *snf960* 产量的影响

Fig.2 Effect of different nitrogen source on yield of *snf960*

## 2.2 培养基各组分含量对菌株 snef960 菌体生长量的影响

由图 3 可知,发酵培养基中葡萄糖的含量在 0~2% 之间,随着葡萄糖含量的增加,菌株 snef960 菌体产量也增加。葡萄糖含量在 2%~5% 时,菌株 snef960 菌体产量呈下降趋势,因此葡萄糖的含量在 2%~4% 为宜。

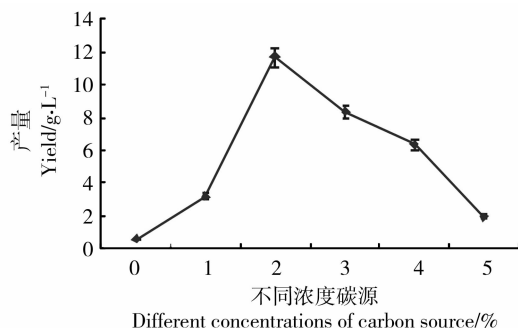


图 3 不同浓度碳源对 snef960 产量的影响

Fig.3 Effect of different concentration of carbon source on yield of snef960

由图 4 可知,发酵培养基中硝酸铵的含量在 0~0.8% 之间,随着硝酸铵含量的增加,菌株 snef960 菌体产量也增加。硝酸铵含量在 0.8%~1% 时,菌株 snef960 菌体产量呈下降趋势,因此硝酸铵的适宜含量为 0.6%~1.0%。

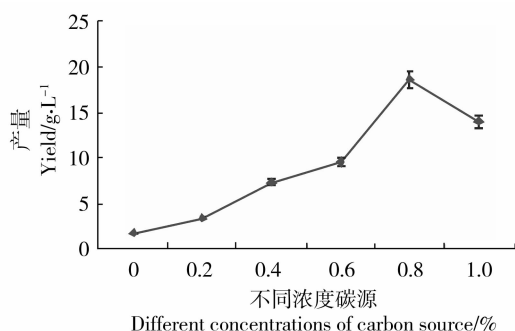


图 4 不同浓度氮源对 snef960 产量的影响

Fig.4 Effect of different concentration of nitrogen source on yield of snef960

## 2.3 最佳碳、氮源正交试验

为确定培养基中最佳碳氮比,在单因子试验基础上设计了碳、氮源的正交试验。根据极差 R 的大小,可以判断各因素对试验指标的影响程度。试验结果表明,碳源(葡萄糖)的含量对菌株 snef960 菌体产量的影响高于氮源(硝酸铵)。K<sub>i</sub> 代表在 i 水平下该因素和其它因素不同水平组合时的发酵液下菌体产量之和。选择较大 K<sub>i</sub> 值的水平作为该因素最佳水平,由表 1 可知,发酵培养基中碳、氮源最佳组合为:葡萄糖(4%)、硝酸铵(0.6%)。

表 1 碳、氮源正交试验

Table 1 The orthogonal design test of different carbon and nitrogen sources

处理 Treatment	葡萄糖 Glucose/%	硝酸铵 NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> /%	菌体产量 Yield of snef960 /g·L <sup>-1</sup>
1	2.00	0.60	49.77
2	2.00	0.80	38.35
3	2.00	1.00	43.33
4	3.00	0.60	49.96
5	3.00	0.80	37.68
6	3.00	1.00	26.53
7	4.00	0.60	55.84
8	4.00	0.80	52.65
9	4.00	1.00	52.77
K <sub>1</sub>	131.45	155.57	
K <sub>2</sub>	114.17	128.68	
K <sub>3</sub>	161.26	122.63	
k <sub>1</sub>	43.82	51.86	
k <sub>2</sub>	38.06	42.89	
k <sub>3</sub>	53.75	40.88	
R	15.69	10.98	
主次顺序 Order			葡萄糖 > 硝酸铵 Glucose > NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>
优水平 Optimal level			4%                      0.6%
优组合 Optimal combination			葡萄糖(4%) 硝酸铵(0.6%) Glucose(4%) NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (0.6%)

## 2.4 无机盐正交试验

无机盐在一定程度上也会影响微生物次生代谢产物的产量水平,选用原始培养基中的 4 种无机盐,各设置 3 个浓度梯度来进行正交试验。由表 2 中 R 值可以看出:不同无机盐对菌株 snef960 菌体产量的影响大小依次为硫酸镁 > 磷酸氢二钾 > 硫酸亚铁 > 氯化钾,根据 K<sub>i</sub> 值可得出无机盐的最佳组合为氯化钾(0.04%)、磷酸氢二钾(0.15%)、硫酸镁(0.04%)、硫酸亚铁(0.001%)。

## 2.5 发酵条件的优化

培养基初始 pH 值筛选试验结果(图 5)表明,在不同 pH 值处理下,菌株 snef960 菌体产量的变化很明显。随着 pH 值的增加,菌体产量先升高,后下降。当 pH 值达到 8 时,菌体产量达到最大值为 9.38 g·L<sup>-1</sup>。

表 2 无机盐正交试验  
Table 2 The scheme of orthogonal design  
test of different mineral salts

处理 Treatment	氯化钾 KCl/%	磷酸氢二钾 K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /%	硫酸镁 MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O/%	硫酸亚铁 FeSO <sub>4</sub> /%	菌体产量 Yield of snef960 /g·L <sup>-1</sup>
1	0.04	0.10	0.04	0.001	6.78
2	0.04	0.15	0.06	0.002	6.16
3	0.04	0.20	0.08	0.003	6.64
4	0.05	0.10	0.06	0.003	5.56
5	0.05	0.15	0.08	0.001	6.92
6	0.05	0.20	0.04	0.002	6.32
7	0.06	0.10	0.08	0.002	5.70
8	0.06	0.15	0.04	0.003	7.28
9	0.06	0.20	0.06	0.001	6.28
K <sub>1</sub>	19.58	18.04	20.38	19.98	
K <sub>2</sub>	18.80	20.36	18.00	18.18	
K <sub>3</sub>	19.26	19.24	19.26	19.48	
k <sub>1</sub>	6.53	6.01	6.79	6.66	
k <sub>2</sub>	6.27	6.79	6.00	6.06	
k <sub>3</sub>	6.42	6.41	6.42	6.49	
R	0.26	0.77	0.79	0.60	
主次顺序 Order	硫酸镁 > 磷酸氢二钾 > 硫酸亚铁 > 氯化钾 MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O > K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> > FeSO <sub>4</sub> > KCl				
优水平 Optimal level	0.04%	0.15%	0.04%	0.001%	
优组合 Optimal combination	氯化钾 (0.04%)、磷酸氢二钾 (0.15%)、硫酸镁 (0.04%)、硫酸亚铁 (0.001%)、KCl (0.04%)、K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0.15%)、MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (0.04%)、FeSO <sub>4</sub> (0.001%)				

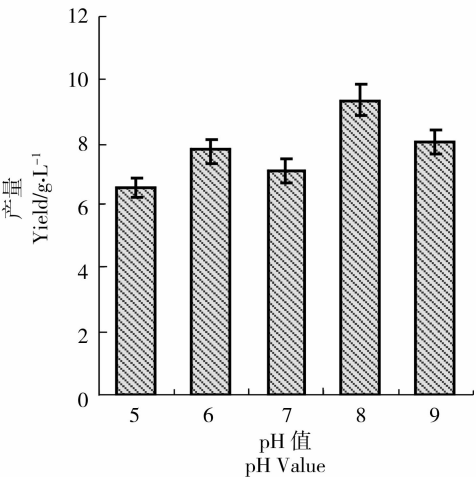


图 5 不同初始 pH 值对 snef960 产量的影响  
Fig. 5 The effect of different pH value on yield of snef960

发酵时间筛选试验结果 (图 6) 表明,菌体的产量随着时间的延长逐渐增加,培养时间至 9 d 时,菌体

产量达到最大值 8.84 g·L<sup>-1</sup>。

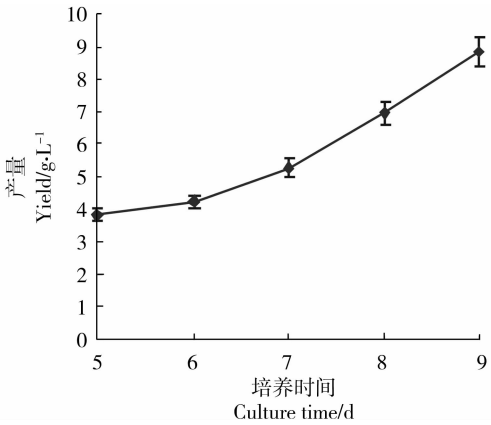


图 6 不同发酵时间对 snef960 产量的影响  
Fig. 6 The effect of different pH value on yield of snef960

摇瓶转速筛选试验结果 (图 7) 表明,不同摇瓶转速下,snef960 菌体的产量不同,转速为 180 r·min<sup>-1</sup>时,菌体产量最高(10.76 g·L<sup>-1</sup>)。

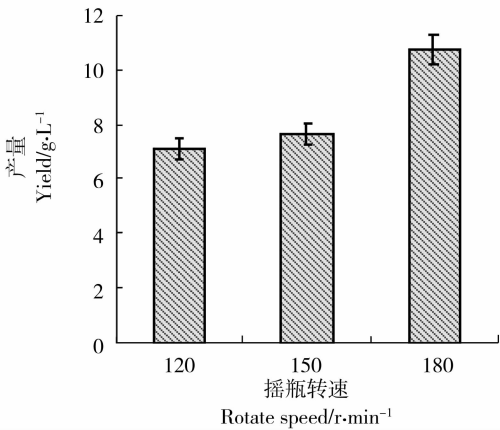


图 7 不同摇瓶转速对 snef960 产量的影响  
Fig. 7 Effect of different shaking speed on yield of snef960

摇瓶装液量是影响发酵过程中溶氧量的一个重要因素,装液量直接影响好氧微生物发酵生产及代谢。由图 8 可知,在试验设定范围内,发酵液中菌体产量与装液量呈正相关。装液量达到 70% 时,菌体产量达到最大值 17.57 g·L<sup>-1</sup>。

接种量筛选试验结果 (图 9) 表明,接种量由 5% 增至 10% 时,菌体产量快速增加,接种量达到 15% 菌体产量达最大值 8.78 g·L<sup>-1</sup>;此后随着接种量的增加菌体产量有所下降。

### 3 结论与讨论

试验研究了青霉 snef960 菌株培养基配方和培养条件的优化选择,试验首先筛选出适合青霉 snef960 菌株发酵产生菌体的最优碳、氮源,明确了

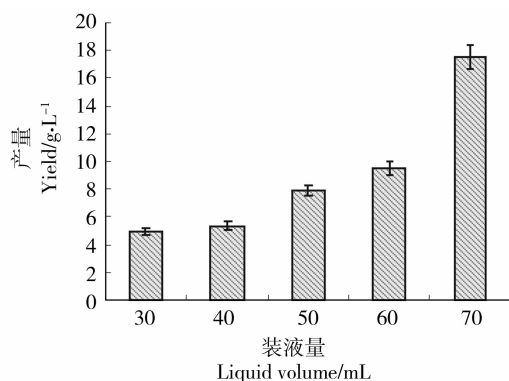


图8 不同装液量对 snef960 产量的影响

Fig.8 Effect of different medium volume in a 100 mL flask on yield of snef960

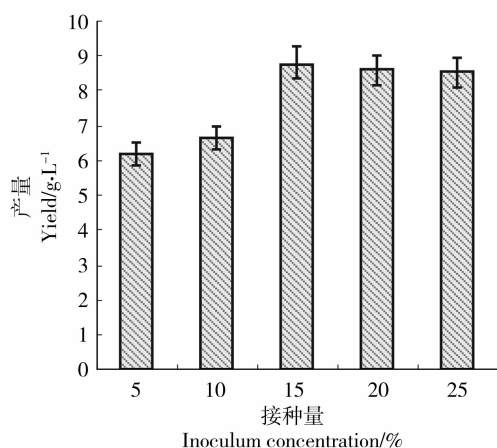


图9 不同接种量对 snef960 产量的影响

Fig.9 Effect of different seed volume for inoculation on yield of snef960

菌株摇瓶发酵培养基以葡萄糖为最佳碳源,以硝酸铵为最佳氮源。单因素试验结果表明,发酵培养基中葡萄糖适宜用量为0~2%、硝酸铵为0~0.8%。利用正交设计试验分析处理得到碳氮源最佳配比为:葡萄糖(4%)、硝酸铵(0.6%),发酵培养基中4种无机盐的最佳配比为:KCl(0.04%)、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(0.15%)、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O(0.04%)、FeSO<sub>4</sub>(0.001%)。试验获得了最佳摇瓶发酵条件:培养基初始pH值8,发酵时间9d,转速为180 r·min<sup>-1</sup>,100 mL的三角瓶装液量为70 mL,接种量10%。

该试验采用渐进法优化发酵条件,每确定一步,就在下一目标筛选中应用,这样得到的试验结果会更准确。培养基中的碳源种类,尤其是速效碳源对菌体的生长具有很大的作用。葡萄糖是最易被利用的碳源,所以常被用作加速微生物生长的速效碳源,也是多数微生物发酵的最佳碳源<sup>[9-10]</sup>。试

验结果也证明,青霉 snef960 菌株摇瓶发酵培养基以葡萄糖为最佳碳源。另外,在试验范围内,摇瓶转速、装液量与菌体产量呈正相关,说明菌株代谢旺盛,需氧量较大,而试验摇床最高转速只设到180 r·min<sup>-1</sup>,装液量为70%,更高的转速与装液量是否会有更好的发酵效果也还未知。因此,青霉 snef960 菌株发酵水平应该还有更大的上升潜力和空间。

## 参考文献

- [1] 赵团结,盖钧镒,李海旺,等.超高产大豆育种研究的进展与讨论[J].中国农业科学,2006,39(1):29-37. (Zhao T J, Cai J Y, Li H W, et al. Advances in breeding for super high-yielding soybean cultivars[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2006, 39(1): 29-37.)
- [2] 叶新强,鲁岩,张恒.除草剂阿特拉津的使用与危害[J].环境科学与管理,2006,31(8):95-97. (Ye X Q, Lu Y, Zhang H. The usage and permiciousness of the herbicide Atrazine[J]. Environment Protective Monitoring Station, 2006, 31(8): 95-97.)
- [3] 化学工业出版社.中国化工产品大全(下卷):除草剂[M].北京:化学工业出版社,1994. (Chemical Industry Press. China chemical products(third volume): Pesticide[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 1994)
- [4] 王焕民,张子明.新编农药手册[M].北京:农业出版社,1989. (Wang H Z, Zhang Z M. New pesticide manual[M]. Beijing: Agricultural Press, 1989.)
- [5] 武小霞,李文斌,张淑珍,等.我国大豆转基因研究进展[J].大豆科学,2005,24(2):144-149. (Wu X X, Li W B, Zhang S Z, et al. The research advance on soybean transgene in China[J]. Soybean Science, 2005, 24(2): 144-149.)
- [6] Strong L C, Rosendahl C, Johnson G, et al. Arthrobacter aurescens TC1 metabolizes diverse s-triazine ring compounds[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(12): 5973-5980.
- [7] Topp E, Mulbry W M, Zhu H, et al. Characterization of s-triazine herbicide metabolism by a Nocardioides sp. isolated from agricultural soils[J]. Applied & Environment Microbiology, 2000, 66(8): 3134-3141.
- [8] 董汉松.植物诱导抗性原理和研究[M].北京:科学出版社,1995. (Dong H S. Theory and research in plant induced resistance[M]. Beijing: Science Press, 1995.)
- [9] 余龙江.发酵工程原理与技术应用[M].北京:化学工业出版社,2006:52. (Yu L J. Principle and technology application of fermentation process[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006: 52.)
- [10] 曲音波.微生物技术开发原理[M].北京:化学工业出版社,2005:102-106. (Qu Y B, Microbial technology development principle[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 102-106.)