

嗜线虫致病杆菌产生抗生素的培养基及条件*

杨秀芬 杨怀文 简恒 刘峰

(中国农业科学院生物防治研究所 北京 100081)

摘要: 本文对嗜线虫致病杆菌(*Xenorhabdus nematophilus*)产生抗生素的发酵培养基和发酵条件进行了研究,同时对该菌代谢过程 pH 值、还原糖、总糖、氨基氮与抗生素产量的关系进行了分析。通过筛选该菌对碳源和氮源的要求,用正交试验初步确定了该菌产素的最佳发酵培养基和条件为:玉米粉 1%,大豆粉 3%,蔗糖 1%,蛋白胨 1.5%, KH_2PO_4 0.02%, MgSO_4 0.2%,活化剂 T 0.1%;发酵培养基的起始 pH 值在 6.0~8.0,种龄 16h,接种量 4%,500mL 摇瓶装量 15~150mL 的条件下培养 72h 可获得较高的抗生素产量;产素量与菌代谢过程中 pH、还原糖、总糖和氨基氮的变化有一定关系,通过培养基和培养条件的研究使该菌的产抗生素能力提高了 56.3%。

关键词: 嗜线虫致病杆菌, 抗生素, 培养条件

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2001)01-012-05

EFFECT OF FERMENTATION CONDITIONS ON ANTIBIOTIC PRODUCTION OF *XENORHABDUS NEMATOPHILUS*

YANG Xiu-Fen YANG Huai-Wen JIAN Heng LIU Zheng

(Institute of Biological Control, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100081)

Abstract: The optimum medium and fermentation conditions of the *Xenorhabdus nematophilus* from *Steinernema carpocapsae* BJ strain were studied. The relationship between antibiotic activity and pH, reducing sugar, total sugar, amino-nitrogen in process of fermentation was analyzed. The optimal medium contained trypton 1.5%, corn powder 1%, soybean flour 3%, sucrose 1%, KH_2PO_4 0.02%, MgSO_4 0.2% and activator 0.1%. Stock cultured for 16h, inoculum size at 4% (V/V) and primary pH of medium ranged from 6.0 to 8.0, fermentation for 72h were of benefit to the yield of antibiotic. The pH, reducing sugar, total sugar and amino nitrogen in process of fermentation were related to the antibiotic activity. The yield of antibiotic increased by 56.3% comparison with nutrient broth.

Key words: *Xenorhabdus nematophilus*, Antibiotic activity, Fermentation condition

嗜线虫致病杆菌(*Xenorhabdus nematophilus*)是生活在昆虫病原线虫肠道内的共生细菌,其代谢能产生以二硫吡咯和吲哚为主的抗生素,此抗生素对病原真菌特别是植物疫霉菌有较强的抑制作用^[1,2],室内用代谢粗提物 0.1mg/mL 即能有效抑制马铃薯晚疫菌的生长,田间 10mg/mL 使用 7d 后,能明显抑制疫病枯叶^[3]。为了提高该菌的产素水平,本文对该菌产素的发酵培养基和发酵条

* 中国农业科学院院长基金

农业部农作物病虫害生物防治资源研究与利用重点开放实验室资助项目

收稿日期:1999-11-29,修回日期:2000-02-25

件进行了初步研究。

1 材料与方 法

1.1 抗生素产生菌

嗜线虫致病杆菌(*Xenorhabdus nematophilus*)北京菌株(BJ菌株)初生型,系从小卷蛾斯氏线虫北京品系(*Steinernema carpocapsae*)体内分离获得。在营养琼脂(NA)平板上划线培养,以NBTA(营养琼脂18g,溴百里酚兰0.01g,氯化三苯基四唑0.016g,水400mL)为鉴别培养基确定菌的初生型^[4],将初生型菌在NA斜面石蜡油中常温保存。

1.2 种子菌液的培养

用牛肉汤培养基在28℃下、120r/min发酵培养24h的初生型菌悬液为种子菌液。

1.3 指示菌

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)由本所微生物研制中心提供,菌种在NA培养基上培养24h后,用无菌水洗下菌苔,制成 OD_{680} 值为0.32的菌悬液备用。

1.4 还原糖和总糖的测定

采用3,5-二硝基水杨酸比色定糖法测定^[5]。

1.5 氨基氮的测定

采用甲醛滴定法测定^[5]。

1.6 活性测定

采用牛津杯法在28℃下黑暗培养24h,测量抑菌圈大小^[6]。

2 结果与分析

2.1 碳源和氮源对产素量的影响

在牛肉汤培养基的基础上添加1%不同的碳源,结果表明:麦芽糖、葡萄糖和糊精对产素有利;在1%葡萄糖和0.5%NaCl的基础上加不同的氮源,结果以大豆胨最好(表1)。

2.2 发酵培养基成份的选择

根据以上筛选的有效碳源和氮源,用正交试验法对该菌的发酵培养基进行筛选。结果经方差分析表明,豆粉量对产素影响最大,其次为磷酸盐,玉米粉与豆粉和玉米粉与蛋白胨的交互作用可忽略不计。从 K_1 和 K_2 值可以看出,培养基成份中除豆粉外,其余均以高水平的抑菌活性较高,其中由于蛋白胨的两水平用量均较少,故水平间抑菌活性差异不明显(表2),因此需要进一步进行培养基成份及用量的调整。

2.3 培养基的优化

通过试验得知添加过量葡萄糖会使培养基变酸而不利于产素,因此在培养基中用蔗糖代替葡萄糖,另外重新对蛋白胨的用量进行了调整,结果表明:蛋白胨的量对产素影响最大,增加蛋白胨的量可以显著提高产素水平,其次活化剂T和玉米粉+豆粉与蔗糖的交互作用均对产素量有影响,根据 K_1 和 K_2 的分析结果,培养基的优化组合为:玉米粉1%,豆粉3%,蛋白胨1.5%, K_2HPO_4

表1 碳源和氮源对抑菌活性的影响

碳源	抑菌圈(mm)	氮源	抑菌圈(mm)
葡萄糖	24.47a	大豆胨	20.27a
蔗糖	21.46bc	胰蛋白胨	19.16b
麦芽糖	24.06a	牛肉蛋白胨	19.25b
淀粉	20.77c	牛肉膏	19.61ab
糊精	23.56ab	鱼胨	10.10c
乳糖	21.00c	酵母	10.0c
色拉油	21.00c	尿素	10.0c

0.02%, MgSO₄ 0.2%, 活化剂 T 0.1%, 此组合培养基正好是调整后抑菌活性最高的 2-2 号培养基, 其产素量比牛肉汤培养基提高了 56.3% (表 3)。

表 2 培养基成分的选择

培养基编号	玉米粉	豆粉		蛋白胨	葡萄糖		K ₂ HPO ₄	抑菌圈(mm)
1-1	1.0	1.5	(1)	0.2	0.0	(1)	0.0	22.38
1-2	1.0	1.5	(1)	0.5	1.0	(2)	0.01	22.37
1-3	1.0	4.5	(2)	0.2	0.0	(2)	0.01	20.88
1-4	1.0	4.5	(2)	0.5	1.0	(1)	0.0	20.88
1-5	1.5	1.5	(2)	0.2	1.0	(1)	0.01	23.23
1-6	1.5	1.5	(2)	0.5	0.0	(2)	0.0	21.95
1-7	1.5	4.5	(1)	0.2	1.0	(2)	0.0	21.10
1-8	1.5	4.5	(1)	0.5	0.0	(1)	0.01	21.33
K ₁	86.51	89.93	87.18	87.59	86.54	85.47	86.31	
K ₂	87.61	84.19	86.94	86.53	87.58	86.30	87.81	
K ₁ -K ₂	-1.1	5.74	0.24	1.06	-1.04	-0.83	-1.5	
S	0.15	4.12	0.0072	0.14	0.135	0.086	0.28	

注:牛肉汤培养基的抑菌圈直径为 19.7mm

表 3 培养基的优化

培养基编号	玉米粉 + 豆粉	蔗糖		K ₂ HPO ₄	蛋白胨	MgSO ₄	活化剂 T	抑菌圈 (mm)
2-1	1+3	1.0	(1)	0.01	0.8	0.1	0.0	25.76
2-2	1+3	1.0	(1)	0.02	1.5	0.2	0.1	30.79
2-3	1+3	2.0	(2)	0.01	0.8	0.2	0.1	26.82
2-4	1+3	2.0	(2)	0.02	1.5	0.1	0.0	25.46
2-5	1.5+1.5	1.0	(2)	0.01	1.5	0.1	0.1	27.17
2-6	1.5+1.5	1.0	(2)	0.02	0.8	0.2	0.0	21.10
2-7	1.5+1.5	2.0	(1)	0.01	1.5	0.2	0.0	27.92
2-8	1.5+1.5	2.0	(1)	0.02	0.8	0.1	0.1	24.23
K ₁	108.8	104.8	108.7	107.7	97.9	102.6	100.2	
K ₂	100.4	104.4	100.6	101.6	111.3	106.6	109.0	
K ₁ -K ₂	8.84	0.15	8.15	6.09	-13.43	-4.01	-8.77	
S	2.58	0.02	8.30	4.64	22.21	2.01	9.61	

2.4 接种量对产素量的影响

在 100mL 培养液中按不同接种量(2%, 4%, 6%, 8%, 10%)接入种子液, 在 28 C、120r/min 条件下培养 72h, 测定各处理的抑菌圈。结果表明:2%接种量处理、抑菌活性(26.98mm)较低, 与其它几个处理差异显著($p \leq 0.05$), 4%~10%接菌量均有较高的抗生素产量, 抑菌圈直径分别为 30.15、30.53、29.47 和 29.37mm, 后几个处理间差异不显著($p \leq 0.05$)。

2.5 种龄对产素量的影响

将 4mL 不同种龄(4h, 8h, 10h, 12h, 16h, 24h)的种子液接入 100mL 发酵培养基中, 培养 72h 后测定各处理的抑菌圈。结果表明: 种龄为 4h, 8h, 10h, 12h, 16h 和 24h 的抑菌圈直径分别为 11.5, 16.75, 19.4, 26.36, 29.62 和 29.84mm, 确定 16h 为最佳种龄。

2.6 通气量对产素量的影响

在 500mL 三角瓶中分别加入不同体积的培养基(15mL, 25mL, 50mL, 100mL, 150mL, 200mL), 在 28℃、120r/min 下摇床培养 72h 后, 测定不同装量发酵液的抑菌活性, 结果表明, 除了装量为 200mL 的抑菌圈较小外(23.80mm), 装量为 15~150mL 5 个处理的抑菌圈分别为 28.84, 29.24, 29.93, 30.17, 29.62, 后 5 个处理间抑制效果差异不显著($P \leq 0.05$)。

2.7 培养基起始 pH 值对产素量的影响

用优化后的最佳发酵培养基, 灭菌前用 HCl 和 NaOH 将培养基调成 pH 为 4.5, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 在 28℃、120r/min 下摇床培养 72h 后, 测定各处理发酵液的抑菌活性, 各处理的抑菌圈分别为 11.97, 13.16, 28.43, 28.73, 28.20, 28.29, 27.83 和 13.5mm, 表明培养基的 pH 值在 6.0~8.0 范围内均有较高的抑菌活性, 低于 6.0 或高于 8.0 不利于抗生素的产生。

2.8 发酵代谢参数的测定

发酵液中还原糖和总糖浓度随着发酵时间的延长逐渐下降, 48h 时, 还原糖量消耗达到最高点。从氨基氮的代谢曲线看, 发酵 48h 时氨基氮积累到最高值, 在此发酵阶段菌体对氮源的分解速度大于其利用速度, 以后氨基氮急剧下降。pH 值从初始 7.2 降为 6.5 左右, 以后随着代谢时间的延长, pH 值呈逐渐上升的趋势。发酵液的抑菌活性与 pH、还原糖、总糖以及氨基氮有直接关系, 当还原糖、总糖和氨基氮降低到最低水平, pH 稳定在 8.5 左右时, 抗生素抑菌活性达最高, 以后随着发酵时间的延长抑菌活性略有提高, 但从经济考虑, 以 72h 为最佳发酵终点(图 1)。

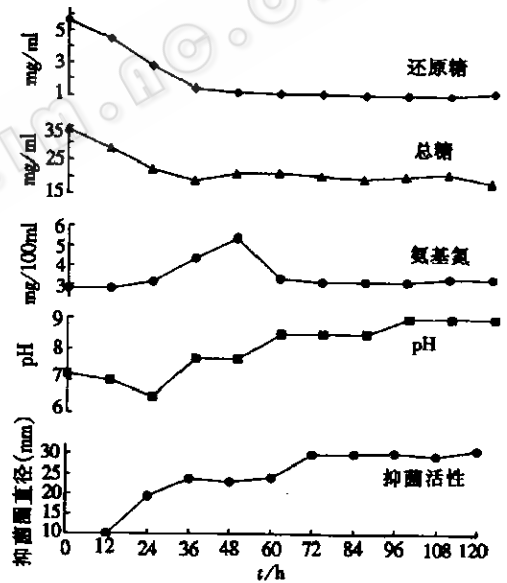


图 1 嗜线虫致病杆菌的代谢曲线

3 讨论

嗜线虫致病杆菌是生活在昆虫病原线虫体内的特殊细菌, 由于该菌长期生活在昆虫病原线虫的肠道内, 使其营养代谢不同于一般的肠杆菌科细菌, 其代谢产生的抗菌物质亦是首次发现的新抗生素。由于该菌消化酶系活性低, 不能完全分解培养基中的营养, 特别是氨基氮的供给不能满足菌体的需求, 因此, 通过调节培养基, 特别是在培养基中添加足够的氨基氮可能可以进一步提高抗生素的产量, 但由于增加蛋白胨会提高抗生素的生产成本, 因此如何提高抗生素的产量降低生产成本是今后进一步开发利用该抗生素的重要前提。

该菌在线虫体外培养过程中极易产生次生型, 而只有初生型才能产生抗生素^[7], 在发酵终止时, 从菌悬液中可分离出许多次生型菌落, 因此研究从初生型转变成次生型的条件, 以及如何保持菌的初生型是进一步研究该菌发酵参数的重要内容。

参 考 文 献

- [1] 杨秀芬,杨怀文,简恒,等. 中国生物防治,1998,14(1):21~24.
- [2] Chen C, Dunphy G B, Webster J M. Biological Control, 1994,4:157~162.
- [3] Ng K K, Webster J M. Journal of Plant Pathology 1997,19(2):123~236.
- [4] Boemare, N E, Akhurst R J. J Gen Microbiol. 1981. 34:751~731.
- [5] 张友翔,张庭芳,李令媛. 生化试验方法和技术. 北京:高等教育出版社,1997.
- [6] 邬行彦,熊宗贵,胡辛助. 抗生素生产工艺学. 北京:化学工业出版社,1985.
- [7] Akhurst R J. J Gen Microbiol. 1982,128:3061~3065.