

南极海洋细菌 BSw10005 生长特性研究*

郭少华¹ 王伟^{1**} 李元广¹ 陈波²

(华东理工大学海洋生化工程研究所 生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)¹

(中国极地研究中心 上海 200129)²

摘要: 从极地海洋细菌中筛选获得菌株 BSw10005, 其胞外代谢物质对植物病原真菌有显著的抑制作用。用盐水代替常规的海水来培养极地细菌。在摇瓶中, 考察了不同盐浓度、碳源对其生长的影响。利用 5L 生物反应器, 通过改变温度、氧供给条件和控制发酵液 pH 值, 对菌株 BSw10005 的生长特性作了系统的研究, 确定了温度、氧和 pH 值对菌株生长的影响及菌株培养的最优化的条件。对发酵液中的代谢抑菌活性物质作了初步分离, 获得到白色固体粗提物质。

关键词: 南极, 海洋细菌, 生长特性

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 01-0038-04

The Growth Characteristic of Antarctic Marine Bacterium BSw10005^{*}

GUO Shao-Hua¹ WANG Wei^{1**} LI Yuan-Guang¹ CHEN Bo²

(*Institute of Marine Bioprocess Engineering, State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237*)¹

(*Polar Research Institute of China, Shanghai 200129*)²

Abstract: The research had screened out an Antarctic marine bacterium BSw10005, which metabolite can prominently inhibit epiphytes contributing to plant pathogens. Bacterium BSw10005 had been cultured with NaCl solution instead of seawater. Using 5L bioreactor, the growth characteristic of BSw10005 have been researched particularly through changing cultivated conditions such as temperature, supply of oxygen and pH, which provide significant information specifically how influenced the growth of bacterium if we change the cultivated conditions. White solid antifungal substances isolated from cultivated marine broth was attained.

Key words: Antarctic pole, Marine bacterium, Growth characteristic

南极海洋微生物资源, 相继极地地理、矿藏资源之后, 成为各国竞相开发的对象。如在嗜冷菌方面, 美、法、俄等联合对南极的一个淡水湖 (Lake Vostok) 进行了系列研究^[1-3], 不仅从冰芯提取到微生物 DNA, 而且发现冰芯中存在着微生物进行的新陈代谢活动; 在低温酶方面, Clardiello^[4] 等人从南极细菌 *Psychrobacter* sp. TAD1 中分离纯化得到了 GDH (谷氨酸脱羧酶), 其中依赖于 NADP⁺ 的 GDH 在低温和常温下与从 *E. coli* 中分离得到的同工酶活力相当。我国于 20 世纪 80 年代中后期开始研究南极的嗜冷菌^[5,6], 内容涉及菌种的分离鉴定及一些低温蛋白酶的研究。

目前, 对于极地海洋细菌的培养, 通常是采用海水为培养基, 如 2216E 培养基等。由于海水对发酵罐的腐蚀作用, 使极地海洋细菌不能进行规模培养, 给其研究和活性

*上海市科学技术委员会资助 (No. 043919363)

**通讯作者 Tel: 86-021-64253707, E-mail: weiwang@ecust.edu.cn

收稿日期: 2005-03-25, 修回日期: 2005-04-19

物质的分离纯化带来困难。而探索极端环境微生物的培养条件, 还未见相关的报道。对于极地微生物活性物质在植物病害生物防治方面应用研究, 也未见报道。本文用盐水代替常规的海水来培养极地细菌, 系统地探索了具有抑制植物病原真菌活性的极地海洋细菌 BSw10005 的生长特性, 并对其胞外代谢活性物质作了分离, 旨在为极地海洋细菌的应用打下坚实基础, 探索海洋极地微生物作为新的农用抗生素资源的可能性。

1 材料与方法

1.1 菌株

极地海洋细菌: 菌株 BSw10005, 由中国极地研究中心提供; 植物病原真菌: 西瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum*), 指示菌。

1.2 培养基

PDA 培养基; 2216E 培养基^[5]。

1.3 不同培养条件下菌株 BSw10005 的生长

1.3.1 不同盐浓度对菌株 BSw10005 生长的影响: 培养基: (1) 酵母粉, 1g, 柠檬酸铁铵, 0.1g, 蛋白胨, 5g, 水定容至 1,000mL, NaCl 8 个浓度, 从 0~3%; (2) 培养条件: 30℃; 150r/min; 三角瓶装液量, 50mL/250mL; (3) 种子: 2216E 培养基摇瓶培养 11h; (4) 培养 11h 后 605nm 处测定发酵液的吸光值, 比较菌株的生长情况。

1.3.2 不同碳源对菌株生长的影响: 培养基: (1) 酵母粉 1g, 柠檬酸铁铵 0.1g, 葡萄糖 5g, NaCl 5g, 水定容至 1,000mL; (2) 在 (1) 的基础上用相同质量的蔗糖替代葡萄糖; (3) 在 (1) 的基础上用相同质量的蛋白胨替代葡萄糖; 其它同 1.3.1。

1.4 菌株 BSw10005 的生长特性研究

1.4.1 温度对菌株生长的影响: 在 5L 生物反应器中, 选择 25℃~30℃ 6 个不同的温度, 其它培养条件相同, 离线测定发酵液光吸收值。

1.4.2 氧供给条件对菌株生长的影响: 在 5L 生物反应器中, 取 100、200、300r/min 3 个不同的搅拌转速, 其它培养条件相同, 离线测定发酵液光吸收值。

1.4.3 pH 控制对菌株生长的影响: 在 5L 生物反应器中, 选择控制发酵过程中发酵液的 pH 在 6.5、7.0、7.5 3 个值, 其它培养条件相同, 离线测定发酵液光吸收值。

1.5 抑菌活性物质的粗提

菌株 BSw10005 于 5L 生物反应器中 28℃ 培养 48h, 取 50mL 发酵液 6,000r/min 离心 10min, 上清液冷冻干燥; 干燥后固体物质用 20mL 乙醚浸泡 20~30 min, 离心, 上清液干燥去乙醚, 得到白色固体物质。

1.6 抑菌活性的测定

利用打孔器 (10mm) 在双层平板上打孔替代在平板上放置牛津杯, 将发酵液或活性物质粗提物水溶液 (200μL) 注入所打孔中, 28℃ 培养 48h 后观察抑菌带。

2 结果与分析

2.1 不同盐浓度、碳源条件下菌株的生长

2.1.1 不同盐浓度下菌株 BSw10005 生长: 摇瓶试验显示, 2% NaCl 溶液替代海水的培养基培养 BSw10005, 能达到 2216E 培养基相近的培养效果。图 1 显示了不同盐浓度下

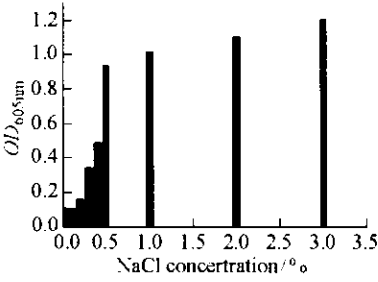


图1 不同盐浓度下菌株 BSw10005 的生长

中培养 BSw10005 的发酵培养基成份为: 蔗糖 5g, 酵母粉 1g, 柠檬酸铁铵 0.1g, 氯化钠 5g, 蒸馏水定容至 1,000mL。

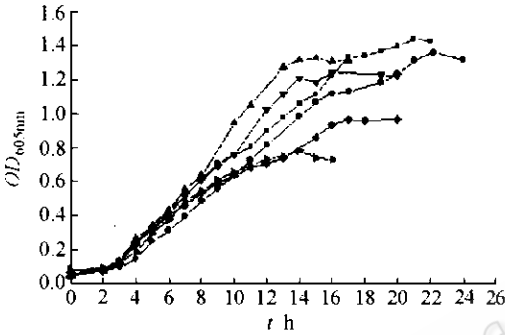


图2 不同培养温度下的生长曲线
—+— 25°C, —■— 26°C, —▼— 27°C,
—▲— 28°C, —◆— 29°C, —►— 30°C

28°C 为最适合, 而在减速期和静止期, 26°C 比较合适。

2.2.2 氧供给条件对菌株生长的影响: 在不同的氧供给条件下, 菌株生长有很大的差异 (图3)。在 100r/min 转速下, 由于氧供给能力较低, 发酵液中 DO 很快跌零, 虽然菌株在培养前期也能较好的生长, 但在后期生长速度变缓, 氧供给不足, 使得菌株在 14h 后有较大的死亡; 在 300r/min 搅拌转速下, 氧供给能力较高, 菌株在培养前期能较好的生长, 但在后期, 由于发酵液中维持着较高的氧浓度, 菌株生长受到抑制;

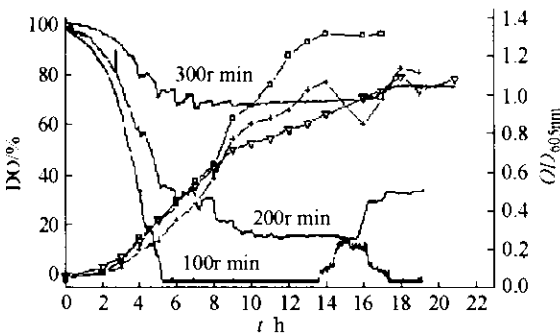


图3 不同氧供给条件下菌株生长和过程曲线
—+— 100r/min, —□— 200r/min, —▼— 300r/min,

菌株 BSw10005 的生长情况, 结合规模发酵培养中对盐浓度的考虑, 确定在 5L 生物反应器中培养基 NaCl 浓度为 0.5%。

2.1.2 不同碳源下菌株 BSw10005 的生长: 分别以葡萄糖、蔗糖和蛋白胨为碳源, 培养菌株 BSw10005, 实验结果表明以蔗糖替代原来 2216E 培养基中的蛋白胨, 能得到更好的培养效果, 蔗糖中培养 14h OD 值为 1.090, 大于在蛋白胨中的 0.870。因而确定在 5L 生物反应器

2.2 BSw10005 菌株生长特性

2.2.1 温度对菌株生长的影响: 在不同温度下对 BSw10005 的培养, 如图2, 在 26°C、27°C 和 28°C 3 个温度下, 前 8h 培养过程中没有多少区别, 有着相同的延迟期和生长速率; 在 8h 后培养开始出现差异, 随着温度的升高, 比生长速率也随着增加; 但在 26°C 条件下, 却有最大的细胞密度。因此认为, 菌株在不同的生理状态下或者说不同的营养环境下, 有不同的最适生长温度; 培养初期, 菌株在 26°C ~ 28°C 范围里不受温度的影响, 在对数生长期中后期, 培养温度以

在 200r/min 搅拌转速下, 合适的氧供给条件, 使得菌株有较稳定、较高的生长速度。而对于一般的陆生好氧细菌而言, 在溶解氧浓度超过一定值后, 细胞生长活力会维持在一定的水平而不是受到高氧浓度的限制, 这也是菌株 BSw10005 与陆生好氧细菌存在差异的地方。

2.2.3 pH 控制对菌株生长的影响: 通过图4, 可以看到, pH 自然条件下, 过程中的 pH 波动在 6.5 ~ 7.3 之间,

菌株的生长情况较 pH 控制条件下要好。当分别控制培养过程 pH 值在 6.5、7.0 和 7.5 时, 前 6h 生长曲线与 pH 自然条件几乎没有差异; 而在培养 6h 后, 控制过程培养基 pH 值 6.5 条件下, 菌株生长出现停滞; 控制过程培养基 pH 值 7.0、7.5 条件下, 菌株在 9h 左右生长趋缓(图 4)。由此可见, 在 pH 值 6.5 到 7.5 的小范围内, 菌株生长对环境 pH 值的控制非常敏感。具体原因尚不清楚, 正在进一步的研究中。

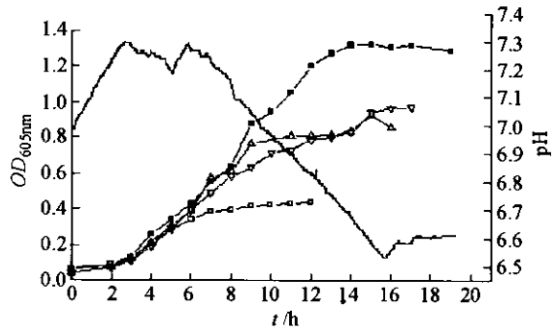


图 4 不同 pH 条件下的生长曲线

—■— 自然 pH, —□— pH6.5, —△— pH7.0, —▽— pH7.5

2.3 极地海洋细菌 BSw10005 抑菌活性物质的初步分离

采用乙醚萃取的方法, 获得了抑菌活性物质的粗提取物, 通过拮抗试验表明了粗提取物的抑菌活性(图 5)(指示菌为 *F. oxysporum*)。对 BSw10005 发酵液做盐析、乙醇沉淀、有机溶剂萃取以及用其他有机溶剂(如甲醇, 丙酮, 氯仿)浸提, 均未能得到具有生物活性的水溶液, 因此, 可以排除其属生物大分子的可能性。目前正开展乙醚浸提液薄层层析等试验。

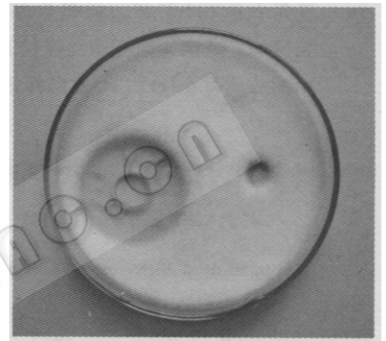


图 5 粗提物平板拮抗实验照片

3 讨论

通过对极地菌株 BSw10005 的研究, 表明用盐水代替海水进行菌株的培养是可行的, 并且盐水和海水培养获得的发酵液对 *F. oxysporum* 的抑菌活性无显著差异。可见, 对于极端条件下的微生物, 可以通过培养条件的探索进行规模培养, 这为极端微生物的进一步研究提供了基础。研究表明, 菌株 BSw10005 有着特殊的培养特性。首先, 菌株生长对环境因素的变化敏感, 温度、溶解氧的变化以及 pH 控制, 对菌株的生长都有较大的影响。其次, 菌株生长对环境因素变化的敏感是有阶段性的, 培养前期菌株对温度、溶解氧的变化反应相对迟钝, 对于氧供给条件、pH 控制的影响, 也有相类似的情况。

将南极海洋细菌在常温(28℃)、低盐度(0.5%)条件下培养, 基本上避开了低温菌规模培养的培养条件控制问题, 使其实际应用存在可能。随着海洋生物技术的不断发展和日趋完善, 海洋微生物将继续生微生物之后, 成为新的农用抗生素的来源。

参考文献

- [1] Jouzel J, Petit J R. *Science*, 1999, **286** (5447): 2138 ~ 2141.
- [2] Prisco J C, Adams E E. *Science*, 1999, **286** (5447): 2141 ~ 2144.
- [3] Karl D M, Bird D F. *Science*, 1999, **286** (5447): 2144 ~ 2147.
- [4] Clardiello M. Antonietta. *Ital J Zool*, 2000, **67** (Suppl.): 27 ~ 32.
- [5] 曾胤新, 陈波. *生物技术*, 2002, **12** (1): 10 ~ 12.
- [6] 肖昌松, 周培瑾, 王大珍. *微生物学报*, 1990, **30** (4): 233 ~ 242.