

温度对淡紫拟青霉 NH-PL-03 菌株培养特性及毒力的影响^{*}

李 芳¹ 刘 波^{2**} 黄素芳²

(1. 福建农林大学植保学院 福州 350002; 2. 福建省农业科学院生物技术中心 福州 350003)

摘 要 试验测定了淡紫拟青霉 NH-PL-03 菌株在不同温度条件(15~35℃)下培养过程中生长特性(OD 值、pH 值、菌丝干重、孢子量、基质消耗)的变化趋势及对线虫的致死率,系统研究温度对淡紫拟青霉生长的影响,结果表明:温度不仅影响菌体的生长,且影响次生代谢物的毒力。在 15~30℃ 范围内,菌体生长、孢子生成及基质消耗(C、N)速率随温度升高而升高;25℃ 为菌体生长的最适宜温度,培养第 5d 进入快速增长期,第 9d 菌丝干重达到 1.08g,第 10d 菌液孢子量达到 401.2 万个/mL;30℃ 时总体毒力最高,第 7d 培养液对茎线虫的致死率达到 64.60%,其次是 25℃ 和 20℃,最高致死率分别达到 56.17% 和 37.21%;15℃ 最高致死率仅为 24.71%。说明在一定范围内,温度上升有利于毒力产物生成。

关键词 淡紫拟青霉 温度 菌丝干重 孢子量 毒力

Effect of temperature on *Paecilomyces lilacinus* culture characteristics and its toxicity to *Ditylenchus destructor*. LI Fang¹, LIU Bo², HUANG Su-Fang² (1. Department of Plant Protection, Fujian University of Agriculture and Forestry, Fuzhou 350002, China; 2. Center of Biotechnology, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China), *CJEA*, 2007, 15(4): 130~133

Abstract In this paper, the effect of temperature on *Paecilomyces lilacinus* growth was investigated. The growth index for OD, pH, mycelia dry weight, and spore number and their toxic effect on nematodes at different temperatures (15~35℃) were analyzed. Results show that temperature is a key factor of fermentation. *Paecilomyces lilacinus* exhibits normal growth within 20~30℃, optimum mycelia growth and sporulation occur at 25℃, mycelia biomass reaches 1.08g in 9 days, spore number reaches 4.012×10^6 /mL in 10 days. Between 15~30℃, higher temperatures can increase C and N consumption and toxin production. At 30℃, cultured 7d, the toxicity to *Ditylenchus destructor* can reach 64.60%.

Key words *Paecilomyces lilacinus*, Temperature, Mycelia biomass, Sporulation, Toxicity

(Received Oct. 28, 2005; revised Dec. 31, 2005)

淡紫拟青霉 [*Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson] 是许多重要农作物病虫的生防菌,此菌能在土壤中习居并宿存,能寄生控制多种植物根结线虫,淡紫拟青霉还是多种非土栖害虫如荔枝蜡蛾、稻黑蜡、稻叶蝉等的天敌。同时,此菌还有明显的拮抗作用,能抑制多种农作物病原细菌、真菌等^[1]。温度是菌体生长的重要因子,温度会影响基质和氧在发酵液中的溶解和传递速度,影响菌体对某些基质的分解和吸收速度,直接影响发酵反应速率,还通过改变发酵液的物理性质间接影响产物合成。此外温度还能影响生物合成的方向和有毒物质的积累。温度对液体培养过程的影响是多方面的,它是各种因素综合作用的结果^[2]。据 Luciana 研究报道,最适于淡紫拟青霉生长与产孢的温度条件是 25~30℃,最适 pH 为 5~9^[9]。孙漫红等研究表明,淡紫拟青霉 M-14 菌株发酵滤液对大豆胞囊线虫二龄幼虫有较强的抑杀作用^[3]。国外学者研究证实,淡紫拟青霉发酵液对根结线虫 2 龄幼虫有明显的毒杀作用,可在 24h 内导致 100% 幼虫死亡,且滤液的毒力随发酵时间延长而增加^[10]。温度对淡紫拟青霉菌生长特性以及杀线虫代谢物毒力的影响报道较少。本研究设置 15℃、20℃、25℃、30℃、35℃ 5 个系列温度,从培养过程的 OD 值、pH、菌丝量、孢子量、C 和 N 含量、对茎线虫毒力等 6 方面综合考察温度对淡紫拟青霉生长的影响。

1 试验材料与方法

供试菌株为淡紫拟青霉 *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson str. NH-PL-03, 从感染根结线虫的番茄根围分离得到。供试甘薯茎线虫 (*Ditylenchus destructor*) 由福建省农业科学院生物技术中心农业环保技术

^{*} 福建省青年创新基金(2006F3025)资助

^{**} 通讯作者

收稿日期:2005-10-28 改回日期:2005-12-31

研究室提供。淡紫拟青霉 NH-PL-03 菌株培养基配方为马铃薯 200g,蔗糖 20g,水 1000mL,培养条件为每瓶(容量 250mL)装 50mL 培养液,用移液枪吸 0.2mL 淡紫拟青霉孢子悬浮液(≈ 5 万个/mL)于每瓶培养基中,恒温摇床温度分别为 15℃、20℃、25℃、30℃、35℃,转速为 110r/min,培养 24h 后开始取样检测。每 24h 取样 1 次,每次取样 3 瓶,3000r/min 离心 10min,取上清液做 OD 和 pH 分析;用 751 分光光度计、波长 620nm 测定 OD 值;用 pHS-25 酸度计(上海雷磁仪器厂)测定 pH 值。测定菌丝干重时每 24h 取样 1 次,每次 3 瓶,从三角瓶中倒出所有菌液,滤过双层纱布,烘干,称重。测定产孢量、总 N 量和含糖量时每 24h 取样 1 次,每次 3 瓶,产孢量用血球计数法;总 N 量检测用凯氏定 N 法^[4];糖含量测定用 3,5-二硝基水杨酸法^[4]。

对线虫毒力测定。带茎线虫的甘薯切成 0.15~0.20g 小块,浸泡于 40℃ 温水中 3h,让薯块中的茎线虫尽快游出,8000r/min、4℃ 离心 10min,弃上清,将底部的 1mL 带茎线虫的浓缩液(大约 100 只线虫)滴入 5mL 待测菌液中,25℃ 恒温箱置放 24h,采用盐刺激法(加 10% 的 NaCl 溶液)判断线虫的死活。设清水对照,3 次重复,计算甘薯茎线虫校正死亡率。

以上数据均应用 DPS 数据处理平台,采用 Duncan's 新复极差法进行差异显著性测定^[5]。

2 结果与分析

2.1 温度对淡紫拟青霉 NH-PL-03 菌株培养过程 OD_{620nm} 值与 pH 值的影响

温度对淡紫拟青霉 NH-PL-03 菌株培养过程 OD_{620nm} 值的影响见图 1a。在 15~30℃ 范围内 OD_{620nm} 值的上升速率与温度成正比,总体上 OD_{620nm} 值

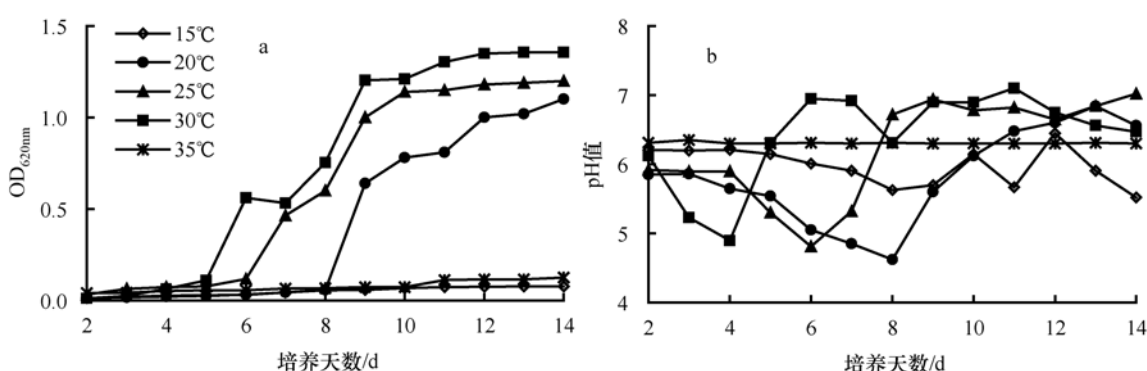


图 1 温度对淡紫拟青霉发酵过程 OD_{620nm}(a) 与 pH(b) 的影响

Fig.1 Effects of temperature on OD_{620nm} (a) and pH(b) of *Paecilomyces lilacinus*

随时间推延而上升,初期 OD_{620nm} 值缓慢上升,随后明显跃升,培养 9~11d 达到峰值,以后保持相对稳定。30℃ 条件下 OD_{620nm} 值上升速率最快,培养 9d 上升到 1.204;其次为 25℃,第 10d 达到 1.14,15℃ 和 35℃ 设置 OD_{620nm} 值变化处于停滞状态,35℃ 条件下培养后期 OD_{620nm} 上升主要是由菌液浓缩所引起。

温度对淡紫拟青霉 NH-PL-03 菌株培养过程 pH 值的影响见图 1b。pH 值总体上随菌丝快速生长而下降,随后上升并维持在中性左右。20~25℃ 菌液有明显的中性化趋势;30℃ 条件下,培养 4d,其 pH 值达到最低值 4.90;25℃、20℃ 培养,pH 分别在第 6d 和第 7d 达到最低值 4.80、4.85;15℃ 培养条件下 pH 值处于平稳变化状态;而 35℃ 条件下 pH 值一直保持初值 6.30。

2.2 温度对淡紫拟青霉 NH-PL-03 菌株培养过程菌丝干重与孢子量的影响

温度对培养过程菌丝干重的影响见图 2a。温度对菌液生物量积累有明显影响,总体上菌丝干重随培养历

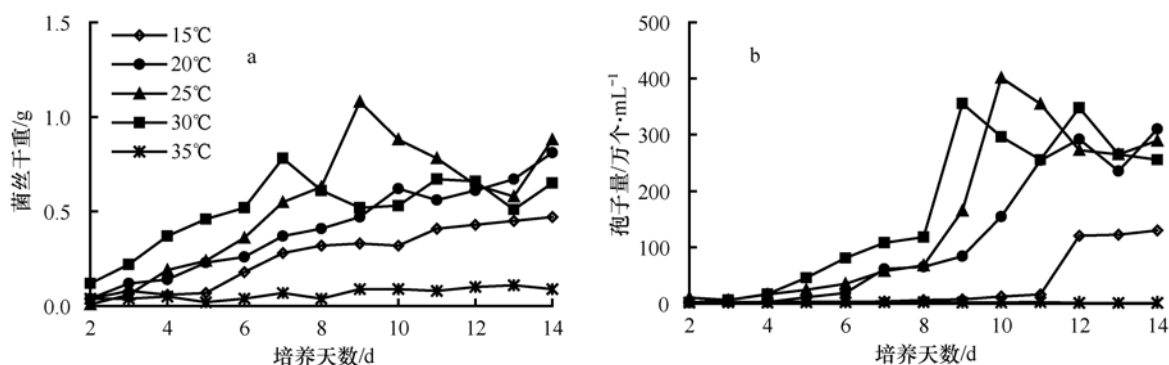


图 2 温度对淡紫拟青霉发酵过程菌丝重量(a)及产孢量(b)的影响

Fig.2 Effects of temperature on mycelia biomass(a) and sporulation(b) of *Paecilomyces lilacinus*

期推延而增长,培养初期(2~4d)菌丝重量增加缓慢,6~7d 菌丝量增长进入跃升期,约在 8~9d 达到峰值,随后

有所下降并保持相对稳定。25℃时菌丝干重增加最快,第 5d 进入快速增长期,第 9d 达到 1.08g;其次为 30℃ 和 20℃;15℃时菌丝干重缓慢增加,第 14d 菌丝干重仅达到 0.47g(菌丝干重表示菌丝累积的相对值,测定方式是将整瓶菌液进行过滤称重。然而,随着培养时间的推延,特别是高温处理,菌液浓缩日益显著,到后期菌液量均少于 50mL,因此菌丝干重的单位设为 g)。

温度对淡紫拟青霉 NH-PL-03 菌株培养过程产孢量的影响见图 2b。培养初期(2~3d)产孢量增加缓慢,培养4~5d产孢量增长进入跃升期,约在 9~12d 产孢量达到峰值,随后有所下降并保持动态平衡。温度对菌液的产孢速率与产孢量有明显影响,25℃条件下产孢量最多,第 10d 菌液孢子量达到 401.2 万个/mL;30℃次之,培养 9d 菌液孢子量达到 355.4 万个/mL;其次为 20℃和 15℃,孢子量峰值分别达到 292.2 万个/mL 和 120.8 万个/mL;35℃条件基本无孢子产生。说明 25~30℃最适宜产孢,温度太低或太高不利于孢子生成。

2.3 温度对淡紫拟青霉 NH-PL-03 菌株培养过程含 N 量与含糖量的影响

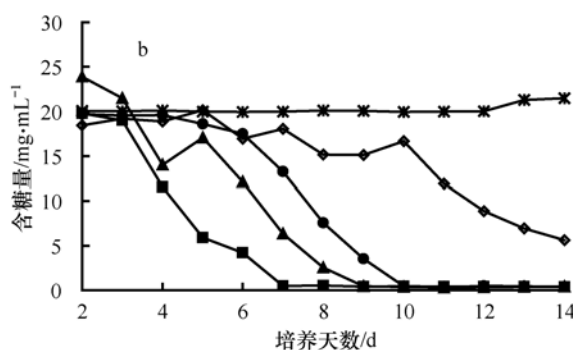
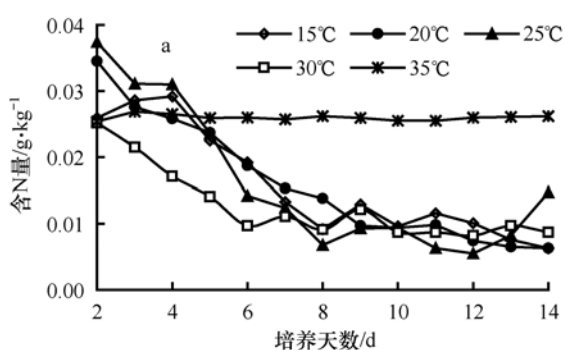


图 3 温度对淡紫拟青霉发酵过程含 N 量(a)与含糖量(b)的影响

Fig.3 Effects of temperature on contents of total nitrogen (a) and reducing sugar (b) of *Paecilomyces lilacinus*

子萌发和菌体崩解又释放出 N,由此导致 N 素的动态消解态势。培养 2~8d 菌液含 N 量快速下降,约在 9~12d 达到最低值,随后缓慢回升,进入动态平衡。在 15~30℃范围内, N 素消耗趋势大致相同,且 N 素消耗速率基本与温度成正比;培养 6d,30℃条件总 N 含量从 0.0252g/kg 下降到 0.0097g/kg, N 消耗 61.5%;同期 25℃、20℃、15℃条件下 N 消耗分别为 62.0%、45.8%、25.9%;35℃条件下 N 素基本没有消耗。

温度对含糖量消耗的影响试验见图 3b,总体上培养液的含糖量呈动态下降趋势,温度与糖消耗速率成正比。30℃糖消耗最快,培养 7d 糖含量从原有的 19.78mg/mL 下降到 0.48mg/mL,消耗量达 97.57%;其次为 25℃,培养 9d 糖含量从原有的 23.91mg/mL 下降到 0.42mg/mL,消耗 98.24%;20℃条件下培养 11d 糖含量从 19.72mg/mL 下降到 0.32mg/mL,消耗量达 98.38%;15℃条件下培养 14d 时培养液含糖量仍有 5.63mg/mL,糖仅消耗 69.44%;而 35℃时糖消耗基本处于抑制状态。

2.4 温度对淡紫拟青霉 NH-PL-03 菌株培养过程毒力的影响

表 1 温度对淡紫拟青霉 NH-PL-03 菌株培养过程毒力的影响

Tab.1	Effects of temperature on the toxicity of <i>Paecilomyces lilacinus</i> to <i>Ditylenchus destructor</i>						
培养温度	茎线虫校正死亡率/% The rectified mortality of <i>Ditylenchus destructor</i>						
Culturing temperature	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d
15℃	4.70±1.57	4.45±1.09	8.72±0.79	15.21±0.55	14.56±1.76	18.27±1.71	24.71±1.62
	cC	dD	cCD	dD	dC	dC	dD
20℃	4.49±1.09	14.75±2.19	21.91±1.78	24.17±1.58	37.21±1.37	37.08±2.16	36.31±2.22
	cC	cC	bB	cC	eB	eB	cC
25℃	9.84±1.24	22.01±2.30	22.44±1.06	28.60±1.67	41.81±1.72	47.62±1.01	56.17±1.65
	bB	bB	bB	bB	bB	bA	aA
30℃	14.1±1.52	26.54±0.91	32.52±2.51	38.82±1.46	57.77±5.63	64.60±5.95	52.23±1.75
	aA	aA	aA	aA	aA	aA	bA
CK	3.46±1.525	3.89±0.54	4.67±1.48	5.41±1.62	6.13±0.39	6.24±0.56	7.47±0.75
	dC	dD	dC	eE	eD	eD	eE

由表 1 可知,总体上培养液对茎线虫的毒力随发酵历期延长呈上升趋势。30℃条件其总体毒力最高,第 7d 培养液对茎线虫的致死率达到 64.60%;其次是 25℃和 20℃,最

高致死率分别达到 56.17%和 37.21%;15℃最高致死率仅为 24.71%;说明在一定范围内,温度上升有利于毒力产物生成。35℃条件下菌不能生长,故未做毒力测定。

3 小 结

试验表明,15~30℃淡紫拟青霉菌体都能正常生长,随着温度升高,菌体生长速度及营养消耗的速率也随之加快,进入生长稳定期的时间明显缩短。但过高的温度(35℃)却严重抑制菌的正常生长。发酵培养微生物的实质就是利用微生物细胞中酶的作用将培养基中无机或有机物质转化为菌体或代谢物。从酶促反应动力学来看,温度升高,反应速率加快,基质消耗和生长代谢加快,产物分泌提前,但酶本身也很容易因热而丧失活性,当温度超过一定限度(35℃),酶很快失去活性,菌体生长也处于停滞状态^[6]。本研究结果完全印证了这一规律。据 Fioretto 报道,在 15~35℃区间内,淡紫拟青霉菌体都能正常生长,这与本试验结果有一定差异,可能是因为菌株的差异所致^[11]。

温度既可以影响菌液生理指标(OD 值、pH 值)、菌丝生长及产孢速率,又影响 C、N 消耗和菌液次生代谢物的毒力。C、N 消耗有内在联系,当 C 消耗殆尽时,N 消耗也处于停滞状态^[7];同时 C、N 消耗与 OD 值、pH 值、菌体生物量有明显对应关系,当含 C 量迅速下降并达到最低值时,OD 值跃升,pH 值也随之下落,达到最低值,随后,菌丝生物量和孢子量达到峰值。

发酵过程 pH 值下降主要是缘于糖酵解产酸及菌丝合成过程产生有机酸,随着 N 素利用及发酵后期孢子消解,释放出碱性氨基酸,导致 pH 值回升,故温度对 pH 值影响的主要途径是改变菌体生长代谢速率。

25℃条件最适合于菌体生成与孢子产生,30℃条件有利于毒素分泌,菌体生长与次生代谢物生成所需的最佳温度有所区别,因此,发酵培养全过程不应只选择一种温度,而应根据发酵的不同阶段选择不同的培养温度。在生长阶段应选择最适生长温度 25℃,在次生代谢物分泌阶段,应选择次生代谢物生成的最佳温度 30℃,这样的变温发酵所得产物比较理想。

采用分批补料方式发酵培养真菌能明显延长菌生长的对数期,使菌体生物量得以显著增长^[8]。因此,研究温度对淡紫拟青霉培养过程 OD 值、pH 值、菌体生长、基质消耗以及次生代谢物的影响规律,有助于正确判断发酵进程,选择合适的调控时机与方法(添加基质或温度调节),从而为工厂化生产淡紫拟青霉菌剂打下基础。

参 考 文 献

- 1 李 芳,刘 波,黄素芳.淡紫拟青霉的研究概况与展望.昆虫天敌,2004,26(3):132~139
- 2 郭 勇.生物制药技术.北京:中国轻工业出版社,2000.77~89
- 3 孙漫红,刘杏忠.土壤抑菌作用对食线虫真菌及其制剂的影响.菌物系统,1997,16(2):149~154
- 4 宁正祥.食品成分分析手册.北京:中国轻工业出版社,1998.23~72
- 5 唐启义,冯明光.实用统计分析及其计算机处理平台.北京:科学出版社,2002.332~343
- 6 陈 坚,李 寅.发酵过程优化原理与实践.北京:化学工业出版社,2002.1~355
- 7 李 芳,刘 波,黄素芳.基质浓度对淡紫拟青霉“NH-PL-03”菌株生长的影响.中国生态农业学报,2006,14(4):153~156
- 8 张先恩,JONES A.两性绦霉菌生长的营养需求和发酵条件研究.微生物学报,1994,34(1):55~64
- 9 Villanueva L. M., Davide R. G. Influence of pH, temperature, light and agar media on the growth and sporulation of a nematophagous fungus, *Paecilomyces lilacinus*. Phil. Agri., 1984, 67: 228~231
- 10 Anke H., Stadler M., Mayer A., et al. Secondary metabolites with nematocidal and antimicrobial activity from nematophagous fungi and ascomycetes. Can. J. Botany, 1995, 72: 932~939
- 11 Fioretto A. M. C., Villacorta A. Thermal requirements for the development of the nematogenic fungi *Paecilomyces lilacinus*. Pesquisa Agropecuaria Brasileira, 1989, 24: 975~978