

密级：

论文编号：

中国农业科学院 学位论文

枯草芽孢杆菌 B-332 菌株发酵条件
及其抗菌物质分离纯化的研究

**Reserch on the Fermentation Media of *Bacillus Subtillus* B-332
and the Purification of Its Antifungal Substances**

硕士研究生：刘 雪

指导教师：朱昌雄 研究员

申请学位类别：理学硕士

专 业：微生物学

研 究 方 向：生物工程

培 养 单 位：农业环境与可持续发展研究所

研究生院

提交日期 2007 年 6 月

Secrecy:

No.

Chinese Academy of Agricultural Sciences
Master Dissertation

**Reserch on the Fermentation Media of *Bacillus Subtillus* B-332
and the Purification of Its Antifungal Substances**

Ms. Candidate: Liu Xue

Advisor: Professor Zhu Changxiong

Major: Microbiology

Specialty: Biological Engineering

Chinese Academy of Agricultural Sciences

June 2007

摘 要

稻瘟病是全世界稻区危害最严重的水稻病害之一，每年对世界水稻产量的影响高达 30%，现有防治稻瘟病的手段多以抗性植株和化学农药为主，化学农药会造成环境的污染及生态平衡的破坏，生物农药具有安全、无毒副作用、不污染环境等优点，大力发展生物农药已成为必然的趋势。因此，对水稻稻瘟病的植病生防领域研究具有重要的现实意义。本研究以枯草芽孢杆菌 B-332 菌株为实验材料，通过摸索该菌株摇瓶发酵工艺的技术和数据，确定该菌株发酵的最佳培养基和发酵条件，为该菌株的发酵生产奠定基础；此外，分离纯化和获得各分离的组分，测定它们质谱图及抗菌活性，对解析分离各组分对稻瘟病菌抑制的作用机理，揭示该菌株对稻瘟病菌防治的深层原因具有十分重要的意义。

1. 将芽孢数量作为评价发酵工艺的主要标准，抗菌粗提物含量作为辅助标准。采用结晶紫染色法和平板倾注法相结合的方法测量发酵液中的芽孢数量，用紫外分光光度计法测量发酵液中抗菌粗提物的含量。明确了发酵液中抗菌粗提物的浓度与其在 272.9nm 波长下的吸收值之间的线性关系，标准方程为 $y=0.06x+0.153$ ， R^2 为 0.9994，拟和效果较好。

2. 对枯草芽孢杆菌 B-332 菌株摇瓶发酵工艺进行了优化，确定正交优化后的培养基主要成分为：豆饼粉 6.0%、蔗糖 2.5%、硫酸铵 0.7%、柠檬酸三钠 0.3%等；培养条件方面，确定种龄为 18h、接种量为 10%，对装量、温度和转速等条件优化后确定装量 80mL/500mL、温度 30℃、转速 180r/min。基本明确了该综合条件下发酵过程的参数变化规律，发酵周期终点为 72h，此时芽孢数为 1.43×10^{11} cfu/mL，比出始条件的 4.03×10^9 cfu/mL 提高了 34.48 倍，抗菌粗提物含量达到 213.82mg/mL。

3. 等电点法提取该抗菌粗提物，即对该菌株发酵液离心后，将其 pH 值调至 4.0，抗菌粗提物可以完全沉淀出来，抗菌粗提物经过高效液相色谱-质联用仪的分离纯化，得到 5 个组分，按照出峰时间顺序，它们的荷质比 (m/z) 分别为 1045.0、1057.8、1072.3、1017.5 和 1031.1，预测 4 个组分的结构 (荷质比 (m/z) 为 1017.5 的除外)，依次为 Bacillomycin D (iso-C15)、Bacillomycin D (50%-iso-C16)或 Bacillomycin D (50%-n-C16)、Bacillomycin D (ante-iso-C17)及 Bacillomycin D (n-C14)，它们结构间的区别在于相差 1 个或几个 $-CH_2-$ 基团；各组分均对稻瘟病菌有抑制作用，荷质比 (m/z) 为 1045.0、1057.8、1072.3 组分的抑制效果最强，并且这 3 种组分对稻瘟病菌成熟菌丝体的致畸作用与 B-332 菌株的致畸作用相同，都是使稻瘟病菌菌丝体膨大、溶胀、破裂，这个结果更加证实了该菌株荷质比 (m/z) 为 1045.0、1057.8、1072.3 组分是 B-332 菌株产生对稻瘟病菌有抑制作用的主要原因。

关键词：枯草芽孢杆菌，分离纯化，芽孢，发酵，稻瘟病菌

Abstract

Rice blast is one of the most severe diseases on rice. It can cause 30% reduction of the world rice field. Now the products used to control the *Magnaporthe grisea* are mainly chemical pesticides. To maintain the sustainable development of environment and reduce the damage of the chemical pesticides to human and environment, developing a bio-pesticide that can control *Magnaporthe grisea* is indispensable. In this paper, the effective substances produced by strain B-332 and the flask fermentation condition of the strain were explored. The results were as follows:

B-332 strain of bacillus subtilis has great bio-control potential, which can strongly inhibit the germination of the spores of *Magnaporthe grisea* and deform the bud.

The effective substances were gained by the following procedures : amplification of the strain through fermentation-centrifuge-crude extraction by iso-electricity method. The effective substances presented a peak under the UV wavelength of 272.9nm. The content measurement of it was established.

The crude effective substances were separated and purified through HPLC-MS. Five components had a control effect on the *Magnaporthe grisea*. The molecular weights of the five components were defined by MC analysis and they belonged to Bacillomycin D.

Three methods to count the number of the spores were compared. The result showed that Gram dye is the best one, which can distinguish clearly the spore and body.

The optimization of the fermentation process of the *Bacillus Subtilis* B-332 strain laid a solid foundation for the manufactory production. In terms of media, carbon source, nitrogen source and inorganic soil were considered. The optimization experiment targeted at the principal components was conducted and the optimized media components were established: bean cake powder 6.0%, sucrose 2.5%, (NH₄)₂SO₄ 0.7%, Sodium citrate 0.3%; In terms of cultivation condition, the inoculation age and content were first explored, and the loading content, temperature and rotate speed were optimized afterwards. With the combination of the optimized media and fermentation condition, the metabolism parameters of the fermentation process were assessed. The rule of change was identified; the end point of the fermentation period is 72h, when the spore number reached $1.43 \times 10^{11}/\text{mL}$, which improved 34.48 times compared with the original condition. The producing level of the antibiotics reached 213mg/ml.

Key word: *Bacillus Subtilis* B-332 strain Separation and purification Spores Fermentation *Magnaporthe grisea*

目 录

第一章 绪论	1
1.1 稻瘟病菌的研究进展	1
1.1.1 稻瘟病菌生理小种的特点	1
1.1.2 稻瘟病菌侵染途径的研究进展	2
1.2 枯草芽孢杆菌产生抗菌物质	3
1.2.1 核糖体合成途径产生的抗菌物质	3
1.2.2 非核糖体合成途径产生的抗菌物质	4
1.3 枯草芽孢杆菌产品的应用情况	6
1.3.1 国外生防产品应用情况	6
1.3.2 国内生防产品应用情况	7
1.3.3 其他方面的应用情况	7
1.4 研究目的和意义	9
第二章 枯草芽孢杆菌 B-332 菌株摇瓶发酵培养基及发酵条件的研究	10
2.1 材料和方法	10
2.1.1 试验材料	10
2.1.2 研究方法	12
2.2 结果与分析	17
2.2.1 芽孢率统计方法的比较	17
2.2.2 活菌计数法的比较	18
2.2.3 摇瓶种子菌体生长曲线测定结果	19
2.2.4 基本发酵培养基成分的筛选	20
2.2.5 种龄对芽孢数量的影响	20
2.2.6 接种量对芽孢数量的影响	21
2.2.7 发酵培养基成分的正交优化	21
2.2.8 摇瓶发酵条件的正交优化	23
2.2.9 摇瓶发酵代谢曲线	24
2.3 小结	26
第三章 枯草芽孢杆菌 B-332 菌株有效抗菌物质的分离纯化	27
3.1 材料和方法	27
3.1.1 试验材料	27
3.1.2 研究方法	27
3.2 结果与分析	29
3.2.1 有效抗菌物质的生物测定方法	29

3.2.2 有效抗菌物质的紫外分光光度计测定法.....	31
3.2.3 生物法与紫外分光光度计法测定结果的相关性对比.....	32
3.2.4 有效抗菌物质的分离结果及分子量测定.....	33
3.2.5 分离的各组分对稻瘟病菌的拮抗效果.....	34
3.2.6 分离的组分对菌丝体的致畸作用.....	35
3.3 小结.....	36
第四章 全文结论.....	38
4.1 结论.....	38
4.2 讨论.....	39
参考文献.....	40
附录.....	45
致谢.....	49
作者简介.....	50

第一章 绪论

1.1 稻瘟病菌的研究进展

水稻是中国的主要粮食作物之一，农业部 2005 年的统计显示，全国水稻播种面积为 28,847 千公顷（农业部，2006），占粮食播种总面积的 27.66%，稻谷产量为 18,059 万吨，占粮食总产量的 37.31%。

稻瘟病是水稻最主要的病害之一，广泛分布在世界各水稻产区。据英联邦真菌研究所(CMI) 记载，85 个国家和地区曾发生过此病害，且危害以非洲、亚洲和拉丁美洲最重，稻瘟病对水稻产量造成的损失可高达 11%至 30% (Baker, 1997)，部分田块甚至颗粒无收(Ou S.H., 1985)；在 1975-1990 年的 16 年间，由稻瘟病菌引起的全球粮食损失高达 1.57 亿吨(Baker *et al.*, 1997)，全球范围内，每年由稻瘟病造成的水稻减产足以养活 6000 万以上的人口。

水稻稻瘟病 (*Magnaporthe grisea*) 又名稻热病，俗称火烧瘟、吊头瘟、掐颈瘟等，主要危害寄主植物的地上部分。该病害的病原是稻瘟病菌，稻瘟病菌的有性态为 *Magnaporthe grisea* (Hebert)Barr，子囊菌亚门 *Magnaporthe* 属；无性态为灰梨孢 *Pyricularia grisea* (Cooke)Sacc.，半知菌亚门梨孢属（朱献丰，2002）。在 85 个国家都已经发现稻瘟病的发生，稻瘟病菌具有较广的寄主范围，除水稻外，它还可使 50 多种栽培作物和园林植物致病，例如大麦、小麦、穆子、草坪草等(Mitchell *et al.*, 2003;Ou S.H., 1985)。一年四季，稻瘟病菌的孢子在世界水稻种植地区的高湿度环境中都能存活，这造成了稻瘟病菌的广泛传播。而且，在生长的任何阶段，这种真菌都能够侵袭水稻，真菌孢子还易于在作物间传播、在土地中潜伏，都能够导致水稻的减产或倒伏。

1.1.1 稻瘟病菌生理小种的特点

生理小种具有多样性的特点。可侵染 40 多种禾本科植物以及其他寄主，涉及到 15 个科、66 个属、118 个种、3 个亚种，并且存在致病分化的变异性（李成云，1995；何玉仙，1995）。稻瘟病有很多种生理小种，1955 年，日本首先建立起了一个“稻瘟病菌小种协作研究项目”，到 70 年代，日本选出了 12 个鉴别品种（中国 4 个、热带 2 个、日本 6 个），鉴定出 13 个小种并分为 F，C，和 N 群（何月秋，2001）。自 60 年代起，印度、菲律宾、韩国、哥伦比亚等国家都积极开展了生理小种方面的研究（OU S H. 1985）。日本又根据 Flor 的基因对基因学说，对品种进行了抗病性分析，于 1976 年建立了一套具有已知抗病基因的 9 个（米+梗）型品种组成的鉴别品系。我国稻瘟病菌遗传多样性的研究始于 1976 年，并于 1980 年筛选出特特普（Tetep）、珍龙 13、四丰 13、东农 363、关东 51、合江 18 和丽江新团黑谷等 7 个生理小种的鉴别品种，将中国稻瘟病菌划分为 43 个生理小种。用 7 个中国统一的鉴别品种，对 1997-1999 年采集自江苏省吴江、高邮等 5 个代表地区的 325 个稻瘟病菌株进行小种鉴别，3 年共检测到 21 个生理小种，其中，ZG1 小种出现的频率最高，达 57.80%-67.89% (陆凡，2002)，并比较一致认为各地区生理小种的组成相对稳定。随着参试菌株的增多，各国发现的生理小种数也在增加（Valent B, 1991）。2005 年，韩国首尔大学对稻瘟病菌的基因研究取得突破进展，使建立一套适合于世界各稻区共同使用的鉴别品种（系）成为可能，科学家们在对 2 万多种稻瘟病病原菌变体生物学试验后，确定了水稻稻瘟病

病原菌的 741 种遗传基因，其中 202 种是病原性遗传基因。今后，科学家们将联合生物学、遗传学和电脑方面的专家，建立生物信息学研究体系，进一步分析稻瘟病病原菌遗传基因之间的相互关系 (Dean RA, 2005)。

生理小种具有易变性的特点。关于稻瘟病菌的变异能力，有人认为，菌株的生理小种是非常不稳定的 (Ou S H., 1985)，单个病斑上分离的单孢菌株的致病性也不相同，田间稻瘟病菌株的组成也随年度、季节而有所变异，继代培养过程也可改变致病力 (IWAND.M, 1990)。有文献报道，保存 10 年的稻瘟病菌小种的单孢菌株，每个小种保存菌分化形成数个小种，致病力也发生了变异，并且，从不同保存菌上重新分离出保持原小种致病力菌株的几率也存在很大差异，利用重新分离单孢菌的方法可以获得保持原小种致病力的稳定菌株 (周维佳, 1990)。Bonman 等对 Ou 等研究过的菌株再鉴定，结果与原来的结论不一致，并推断，可能是他们接种时的条件差别导致他们的 Ou 结论，也可能是植株生长状况不一致或人为地判断差别所致 (Bonman, 1987)。何月秋通过试验也证实了 Bonman 等的观点，即接种时的环境条件不稳定是得出菌株高度变异的主要原因 (何月秋, 2001)。在众多菌株中存在少数稳定菌株，稳定菌株的致病性在 2-3 年内不会明显变异，但随着保存时间的延长，菌株的生活力和致病性均有下降和减弱趋势，转管继代是变异的促使因素，但大多数鉴别品种的致病性是比较稳定的 (王久林, 1993)。

1.1.2 稻瘟病菌侵染途径的研究进展

稻瘟病因危害时期、部位不同可分为苗瘟、叶瘟、叶枕瘟、节瘟、穗颈瘟、枝梗瘟和谷粒瘟等。其中以穗颈瘟对水稻的产量影响最大，以水稻叶片上的病害症状最为典型，即病斑呈梭形，中部坏死呈灰白色，病斑边缘红褐色 (Ou S.H., 1985)。稻瘟病菌在病斑上产生分生孢子，借助风雨传播进行再侵染，它侵染水稻的病害周期可以分为以下几个时期：A. 病菌得分生孢子接触到水稻叶片表皮细胞后，其尖端释放出粘液 (spore tip mucilage, 简称 STM) 以及发芽，使孢子附着于水稻叶片的表面；B. 在一定条件下分生孢子萌发产生芽管，芽管顶端膨大分化成特别的侵染结构即附着胞 (appressorium)；C. 附着胞壁上沉积黑色素，胞内膨压积累，这个细胞状的微小气泡的内压是汽车轮胎内压的 40 倍左右，可以炸开稻叶坚韧光滑的表面；D. 附着胞产生侵染栓直接穿透角质层和表皮细胞壁；E. 病菌在水稻叶片的表皮细胞内形成初生和次生菌丝并侵入邻近的细胞和叶肉细胞，然后，真菌释放出含有一种酶的小囊，这种酶会破坏植物细胞壁，真菌就可以侵入细胞了；F. 5-7 天后出现症状，新的分生孢子从水稻叶片的病斑处产生并释放出来，G. 这些新形成的分生孢子重新侵染寄主，进入下一轮病害周期 (周建明, 1999; 林福呈, 2001; Howard R J, 1994)。病菌的菌丝体和分生孢子在病稻草、病谷上越冬，完成其侵染循环。病稻草上的病菌在干燥的环境下可以存活 7-8 个月，在北方可存活 1 年。而埋入地下或浸入水中 1 个月就全部死亡。散落田间的草上的病菌 4 个月死亡。病菌传播主要靠风传播，雨、水流、昆虫也可传播。天气转暖，又有雨的情况下，越冬病菌会大量复苏，增殖，从堆在田边的病稻草上转移到水稻上。稻瘟病菌的侵染循环被认为植物病原真菌典型的植物-病原物互作模式而被广泛研究。

稻瘟病病菌的基因组序列已于 2005 年 4 月完成 (Dean, 2005)。最近，Martin J. Gilbert 查明了稻瘟病菌致病的一个关键基因-MgAPT2，该基因负责产生一种在小囊形成过程中发挥重要作用的蛋白质，并查明了一个传送引起稻瘟病的真菌的分泌系统。这一发现有助于更好地选择育种，

甚至通过基因工程手段培育抗稻瘟病菌的水稻新品种。这个突破使人们首次对这种疾病发生的过程有所了解,并使人们看到了开发一种环保杀真菌剂的希望,这种杀真菌剂针对的恰恰是这种病菌侵袭水稻的机理(Martin J. Gilbert, 2006)。

1.2 枯草芽孢杆菌产生抗菌物质

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是一种嗜热、好氧并产芽孢的 G⁺杆状细菌,其生理特征丰富多样,极易分离培养,能产生多种抗菌素和酶。枯草芽孢杆菌应用于植物病害生物防治的研究已经有很多年的历史,目前在黄瓜、辣椒、水稻、小麦、玉米等农作物病害上显出较好的防治效果。近年来,科学家们从枯草芽孢杆菌产生拮抗物质的类型、分子作用机理及田间应用等方面开展了广泛而深入的研究,为进一步明确枯草芽孢杆菌的作用机制和作用效果提供了科学依据。

早在1921年,就有利用有益微生物应用于植物病害的防治的报道,Hartely曾利用拮抗真菌防治棉苗碎倒病(*Pythium debaryanum*)。在1924年就有文献报道过枯草芽孢杆菌有降解作用,Trotman和Sutton研究了一株枯草芽孢杆菌对纺织品纤维素分解的性质,发现该菌株的次生代谢产物是分解作用的主要原因,而该菌株没有直接起作用(Trotman, 1924)。早在1945年,Johnson等就报道过枯草芽孢杆菌可以产生抗菌物质(Johnson F H, 1945),近一个世纪来,从枯草芽孢杆菌代谢产物中分离纯化出多种抗菌物质,并明确了一部分抗菌物质的组成、结构和生防作用,为枯草芽孢杆菌的植病生防领域的应用奠定了基础,提供了可行性依据。

一般将枯草芽孢杆菌产生抗菌物质的途径分为核糖体合成和非核糖体合成两种。

1.2.1 核糖体合成途径产生的抗菌物质

(1) 细菌素

一般认为,细菌素是一种小分子量蛋白类抗菌物质,它由细菌产生,通常只对产生菌同种的其它菌株或亲缘关系很近的种有作用,他们大多含有一些稀有的氨基酸结构,且一般是环肽。枯草芽孢杆菌能够产生 Subtilin 和 Subtilosin,迄今为止,Subtilin 是研究较深的细菌素之一,它的前体是 56 个 Aa 小肽,其中 24 个 Aa 为信号肽,经信号肽酶的切除和一系列修饰,如 Thr 脱水和 Ser 与 Cys 硫酸酯化都可以形成 32 个 Aa 的活性小肽,它们具有抗酸和抗热的特性。有不少关于枯草芽孢杆菌细菌素抑制结晶紫阳性细菌和真菌的报道。Zheng 等从枯草芽孢杆菌中分离出一种分子量为 3.4kD 新细菌素,它对对食品病原细菌 *B. aureus* 和 *Salmonella typhimurium* 有抑制作用(Zheng G, 1999),它可作为食品保鲜的抗菌物质。Foldes 从谷类根际分离得到一株枯草芽孢杆菌 IFS-01,它对食品腐败病原菌中的霉菌、酵母、细菌都有一定的抑制作用(Foldes T, 2000)。

(2) 酶类

真菌细胞壁的主要组分为几丁质和 β -葡聚糖,细菌分泌几丁质酶主要用于真菌细胞壁的降解和重组, β -葡聚糖酶抗真菌作用的主要原因是因为它能水解 $\beta(1\rightarrow3)$ 糖苷键。几丁质酶与 β -1,3-葡聚糖酶常常在植物体内被同时诱导,几丁质酶与 β -1,3-葡聚糖酶同时使用抑真菌作用更强(李林珂, 2006; Lan H Y, 2000),还可以完全消解病原菌细胞壁,抑制病原菌生长,达到抗菌防病的目的。

林福呈等将分离的 S9 菌株与立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、终极腐霉(*Pythium ultimum*)和西

瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*)对峙培养, 4d 后, 可使上述植物病原真菌的菌丝溶解, 而其对植物病原真菌的拮抗真菌绿色木霉 (*Trichoderma viride*) 等的生长没有影响 (林福星, 2003)。顾真荣等从土壤中分离产几丁质酶的 G3 菌株能够在自然土中对水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*) 菌核的形成产生抑制作用 (顾真荣, 2001), 对油菜菌核病菌和水稻纹枯病菌显出强烈的抑菌活性 (顾真荣, 2005), 并可用于防治番茄叶霉病 (顾真荣, 2003)。

(3) 活性蛋白质类

许多枯草芽孢杆菌生长代谢过程中会分泌一些抑制植物病害的活性蛋白, 生防作用显著。BS-98 菌株能强烈抑制苹果轮纹病菌 (*Phylospora piricola*) 等植物病原真菌。氨基酸组分分析表明, 该蛋白含 11 种不同的氨基酸, 尤其富含谷氨酸和半胱氨酸等。纯化后的蛋白组分对苹果轮纹病菌、芦笋茎枯病菌等有很强的抑制作用, 其抑菌机理主要是溶解细胞壁, 造成菌丝畸形、孢子不发芽或发芽异常 (胡剑, 1996)。

还有一些未知蛋白在抑制植物病原菌方面也表现出强烈的作用。SO113 菌株对水稻白叶枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) 有强烈的抑菌作用, 对中国各稻区的白叶枯病菌的 7 种致病型都有强烈的抑杀作用, 它分泌的蛋白对水稻白叶枯病菌表现出良好的广谱抗性以及丰富的抗菌活性峰 (林东, 2001); B-916 菌株能分泌多种抑菌蛋白, 对水稻纹枯病菌和水稻恶苗病菌有较强的抑制作用 (刘永峰, 2005); BS2LX04 菌株对桑炭疽病病原菌的菌丝生长和分生孢子的萌发具有较强的拮抗作用, 其产生的蛋白能使菌丝生长受阻并产生畸形 (刘振宇, 2005)。对 BS-98 菌株产生的拮抗物质进行分离纯化得到了抗菌蛋白, 该抗菌蛋白在电泳中显现出三条带, 热稳定性好, 对部分蛋白酶敏感, 对 BS98 菌产生的拮抗物质进行分离纯化, 得到一种抗菌蛋白 X98III。该蛋白分子量为 59000, 等电点为 4.50, 蛋白中含有糖及脂, 含糖量为 6%, 热稳定性好, 对蛋白酶部分敏感。该蛋白含有 11 种不同的氨基酸, 富含谷氨酸和半胱氨酸, 缺少天冬氨酸。其抑菌机理主要是溶解细胞壁, 造成菌丝畸形, 孢子不发芽或发芽异常 (胡剑, 1996)。1999 年, 童有仁、马志超等报道, 从水稻叶面分离到一株抗水稻白叶枯病的枯草芽孢杆菌 B034。对 B034 菌株中提取的拮抗物质研究发现: 该拮抗物质对热稳定, 对胰蛋白酶不敏感, 对蛋白酶 K、链霉菌蛋白酶 E 部分敏感, 对氯仿部分敏感。该拮抗物质由两组分组成: P1 显示为单一蛋白带, 分子量 5013kD, P2 的 N 端测出残基序列为 Ile2Ser2Asn2Pro2X2Ile2Asp2Val (童有仁, 1999)。对 TG26 菌株产生的拮抗物质进行分离纯化, 得到三种抗菌蛋白: 抗真菌蛋白 BI、BII 和抗真菌环肽 LP21。对 LP21 进行分析, 该环肽分子量为 105713Da, 热稳定性较好, 由 9 个氨基酸残基组成, 并通过比较, 确认 LP21 是一种新的环肽 (刘伊强, 1994)。对 A30 菌株产生的拮抗物质进行分离纯化, 得到一种抗菌蛋白 P1, 初步判断 P1 分子量为 1476Da, 该蛋白质热稳定性好, 对蛋白酶不敏感, 对有机溶剂也不敏感, 可能是一种环肽, 也可能是含有非氨基酸组分的肽类化合物 (何青芳, 2002)。B4、B6 菌株抑菌机理主要是通过产生抗性代谢产物抑制病菌的孢子萌发和菌丝生长。抗菌物质无挥发性, 为脂溶性和水溶性物质, 主要为蛋白质类, 分子量在 20-63kD 之间, 在酸性条件和中性条件下热稳定性好, 碱性条件下没有热稳定性 (叶华智, 2003)。

1.2.2 非核糖体合成途径产生的抗菌物质

1.2.2.1 脂肽类(lipopeptin)

它们是一类小分子环脂肽类物质, 由 7 个氨基酸和 1 个 β -氨基脂肪酸 (β AA, β -amino fatty acids) 组成, 其中包括伊枯草菌素 A、B、C、D、E 和芽孢菌素(bacillomycin)D、F、L 等 (Besson F, 1987), 其中以 Iturin A 抗真菌的活性最强。表面活性素(Surfactin)最初由 Arima 等 (Arima K, 1968) 鉴定和命名, 它的化学结构为一个 C_{13-15} -3-羟基-脂肪酸通过 β -羟基和羧基与 7 肽 (Glx-Leu-D-Leu-Val-Asp(Asn)-D-Leu-Leu(Ile or Val)) 末端基团形成内脂 (Kakinuma A, 1969), 被称为标准表面活性素, 它是已发现的最强的一类生物表面活性剂。Fengycin 是另一种研究得比较深入的脂肽类抗真菌素, 包括 FengycinA 和 B。F29-3 菌株产生的 Fengycin 是环状脂肽, 氨基酸结构为 L-Glu-D-Orn-L-Tyr-D-*allo*-Thr-L-Glu-D-Ala (D-Val)-L-Pro-L-Glu-D-Tyr L-Ile。其中, L-Tyr 和 L-Ile 形成内脂环状结构 (Vanittanakom N, 1986)。

从JA菌株中获得3种对水稻纹枯和小麦赤霉菌均有抑菌作用的抗菌肽AFP1、AFP2和AFP3, 分子量分别为1462.1645、1476.1390和1490.1530D, AFP1和AFP3两者氨基酸组成的区别只是Val与Ala的不同, AFP1由1个Ala, 1个Ile, 1个Pro, 1个Thr, 3个Glx(Glu或Gln), 2个Tyr和1个可能存在的Orn组成, 推断它们很可能是低分子量的环状脂肽, 3个抗菌肽与Fengycin A与Fengycin B在分子量和氨基酸组成上十分相似, 水溶性都非常好, 但是理化性质不尽相同 (刘静, 2004)。枯草芽孢杆菌B2仅含有表面活性素一种脂肽类抗生素, B2菌株的表面活性素变异体由13、14和15个碳原子的脂肪酸链以及L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Leu七环肽组成 (高学文, 2003)。

1.2.2.2 多肽类物质

枯草芽孢杆菌产生的抗菌多肽, 包括环状、线状和分支环状三种, 分子量多在 1kD 左右。一些枯草芽孢杆菌菌株还能够产生一种环状 13 肽—Mycobacillin (Banerjee A B, 1963), 结构为 D-Pro-D-Asp-D-Glu-Tyr-Asp-Tyr-Ser-D-Asp-Ala-D-Glu-Leu-D-Asp。从 TG26 菌株中分离出环状多肽 B1 分子量为 14,497D, N 末端部分序列为 Tyr-Gln-Ala-Pro-Glu-Tyr-Ile-Tyr- (刘伊强, 1994)。A30 对多种植物病原真菌, 例如水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)、稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*) 等有强烈抑制作用, 纯化该菌株抗菌活性物质得到拮抗环状多肽 P1, 分子量为 1476.7D (何青芳, 2002)。JM4 菌株能够产生 JM4-A 和 JM4-B 两种新型抗菌肽, 分子量分别为 1422.71D 和 1422.65D, 除了 3 个未知序列外, 它们的 7 个氨基酸序列组成相同, 有很强的同源性 (Wu Shimei, 2005)。BS-2 菌株分泌的抗菌多肽分子量 \leq 2884.39D; 该多肽对热稳定并能抗紫外线照射, 对植物炭疽病菌和番茄青枯病菌等多种植物病原真菌和细菌有强烈的抑制作用, 对辣椒果炭疽病具有 69.79% (9d 后)的防病效果 (何红, 2003)。

1.2.2.3 其他类别物质

Tamehiro 等研究发现, 一种新的磷脂类抗生素(命名为 bacilysocin)在 168 菌株细胞中积累, 通过核磁共振和质谱结构测定, 阐明其结构为 1-(12-甲基四癸酰基)-3-磷酸甘油, 针对某些真菌 bacilysocin 的抗菌活性显著 (Tamehiro, 2002)。

B2菌株多烯类化合物已报道的有bacillaene (高学文, 2003)、difficidin和oxydifficidin (Patel P S, 1995), 通过抑制原核生物的蛋白合成来抑制病原细菌的活性。高学文等研究发现的多烯类化合物与 bacillaene具有相近的分子量组成和紫外吸收光谱, 推测其由碳链变异体(isoforms)组成, 有抑制真菌孢子萌发的作用; 而推测另一种抑菌活性物质的分子量为564D, 紫外吸收峰为370nm。这些抑菌物质的具体化学组成和结构, 以及对其他植物病原微生物的抑制活性有待于进

一步鉴定。

Bs-1菌株能产生抗酵母样真菌和结晶紫阳性菌的抗生素。Bs-1在PDB培养基中发酵至少产生3种亲水性的抗真菌活性化合物，对其中一种化合物结构的初步分析表明，该化合物含有共轭双键但无任何氨基酸残基，与目前已知的枯草芽孢杆菌产生的抗生素都不同，很可能是一种新的非肽类抗真菌化合物。该化合物分子中不含氨基酸残基，这与枯草芽孢杆菌抗生素绝大部分是肽类或带有氨基酸残基的现象不同，也与目前我们所知的枯草芽孢杆菌非氨基酸类抗生素不同（谢海平，2003）。

1.3 枯草芽孢杆菌产品的应用情况

枯草芽孢杆菌具有抑制植物病害的能力，又是自然界中广泛存在的非致病细菌和植物内生细菌，对人畜无害，不污染环境而备受各国研究工作者的青睐。其芽孢具有抗逆性好、利于保藏的特点，又能忍受极端的外部环境而长期存活，较适合于制成生物制剂应用。目前，一些枯草芽孢杆菌优势菌株已经作为生物农药投入到植物病害应用中。迄今为止，已报道的枯草芽孢杆菌类生物农药产品基本都是芽孢制剂，还没有见到将枯草芽孢杆菌抗菌代谢产物直接加工成生物农药产品的报道。

1.3.1 国外生防产品应用情况

迄今已有4株枯草芽孢杆菌生防菌株QST713、GBO3、MBI600和*B. subtilis* var. *amyloliquefaciens* FZB24s菌株，它们得到了美国环保署（EPA）商品化或有限商品化生产应用许可。

QST713 (<http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides>)为AgraQuest公司产品，商品名Serenade[®]，是1995年AgraQuest Ltd公司从加利福尼亚桃园的土壤中分离得到。QST713得到食用作物病害应用的审批和认可，根据病害情况喷洒在叶面，可以抑制植物疾病和病源真菌体，包括枯萎病、痂病、灰霉病和几种霉菌病。附着于真菌病原体上，同植物上面有害细菌和真菌竞争营养来控制它们的生长，QST 713得到食用作物病害应用的审批和认可，包括樱桃、葫芦、葡萄、阔叶蔬菜、胡椒粉、红薯、马铃薯和胡桃，作用病害包括真菌和细菌病：痂病、白粉病、烂根病、霜霉病等。

GBO3（非基因改良菌株）商品名称为Kodiak[®]，GBO3菌株可以产生抗真菌化合物，分泌的挥发性物质还可以直接促进植物生长（http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/product/prod_006479.htm）。该菌株作为杀灭病原真菌的商品孢子制剂可以直接施用于土壤，主要抑制由丝核菌（*Rhizoctonia*）、镰刀菌（*Fusarium*）、交链孢（*Alternaria*）、曲霉（*Aspergillus*）等引起的植物根部病害；还可抑制侵染于花卉和观赏植物种子的真菌病害，该菌剂对人体健康和环境无任何毒害作用。

MBI600商品名为Subtilex[®]，同样得到了EPA的无毒害认可，分别由美国Gustafson公司和Microbio Ltd公司开发。2001年Gustafson Ltd公司又将能够分解淀粉的枯草芽孢杆菌和MBI600菌株制成混合生防药剂，称为Bio Yield[™]。

FZB24（<http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet129068.htm>）在美国的商品名为Taegro[™]或Tae-Technical，是Taensa公司产品，FZB24菌株在液体培养基中可以产生如伊枯草菌素（iturin）这样的脂肽类抗生素

(http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet_006480.htm.)，施用于温室或室内栽培树苗、灌木和装饰植物根部，可防治镰刀菌、丝核菌引起的根腐病和枯萎病。

日本的DB9011菌株于1990年由AHC Ltd公司分离得到，可以产生flagellin，是一种在flagella中的蛋白质，得到了日本、美国和欧洲等7个国家的专利认证(Krebs B, 1996)。DB9011菌株安全性很好，投放市场多年以及作为家畜饲料10多年以来，没有毒害报道，得到了东京食品安全协会的认可。B246菌株(Asano Y, 2000)得到了南非的农药登记应用许可。日本的已注册产品中的有效活性成分*B.subtilis* IK-1080菌株对稻瘟病的室内防效达到73.5%(Krishnamurthy K, 1998)，并且能够用来防治黄瓜、西红柿及茄子等蔬菜的灰霉病和白粉病(田口義広, 2003)。

1.3.2 国内生防产品应用情况

我国利用枯草芽孢杆菌防治植物病害的应用研究也达到了世界先进水平，现已成功开发并投入生产的商品制剂有亚宝、百抗、麦丰宁、纹曲宁等。陈志谊等也发现*Bacillus subtilis* BS-916菌株防治水稻纹枯病的效果达74.9%-84.6%(陈志谊, 2003)，与井冈霉素按一定比例混合后可提高防病效果，已在江苏等地推广2000hm²以上。

枯草芽孢杆菌BS-208菌株分泌的抑菌物质可以抑制病菌孢子发芽和菌丝生长，通过竞争性生长繁殖占居生存空间的方式来阻止植物病原真菌的生长，能在植物表面迅速形成一层高密保护膜，使植物病原菌得不到生存空间，从而保护了农作物免受病原菌为害。分泌的抑菌物质可以抑制病菌孢子发芽和菌丝生长，从而达到预防与治疗的目的，对真菌病害的防治效果尤为明显。由其制成的“亚宝”可湿性粉剂已经完成农药登记，BS-208可湿性粉剂其每克含活芽孢数与美、日、西欧登记的同类产品处于同一规格、同一水平。

“麦丰宁”是由枯草芽孢杆菌B3菌株制成的活体生物杀菌剂，对小麦纹枯病田间防效达50%-80%，B3产生两种不同类型得抗菌物质，一种对植物病原真菌有抗菌作用，另一种对水稻白叶枯病菌等植物病原细菌有抑制作用(刘焕利, 1994)，其防病机制主要表现在抑制小麦纹枯病病菌菌丝生长、菌核形成和菌核萌发。

“百抗”也已经获得农业部登记注册，“百抗”的主要有效成分是枯草芽孢杆菌B908，它通过营养竞争、位点占领等机制保护植物免受病原物的侵染，并杀灭病原菌，以菌治菌，从而达到防治病害促进增产的目的。对烟草、三七、花卉、小麦、白菜等易患土传病害的作物具有很好的防治效果，特别对水稻纹枯病的防治效果达70%以上，从而成为全国第一个在水稻上获得登记的芽孢杆菌杀菌剂，已在多个省推广使用，并将在泰国、越南等国推广应用。

1.3.3 其他方面的应用情况

1.3.3.1 水产养殖方面

枯草芽孢杆菌生命力强，代谢能力旺盛，在水产养殖中可以能够降低水体中的富营养化程度，为水生单细胞藻类提供营养，显著降低水产养殖过程中的用药量和水产品的药物残留水平，达到改良水产养殖水质的作用，在河蟹育苗、虾类养殖、黄鳝甲鱼等品种的养殖应用中都有应用(仇丽, 2002)。有效控制水产养殖过程中有害物质含量，有害生物类型及菌群数量，并能增强养殖对象的免疫力，减少疾病的发生。

除此之外，它还具有防病和营养作用。它的防病能力在于对养殖对象体内微生态环境的改善和机体免疫力的提高。当枯草芽孢杆菌通过水体进入水生动物肠道后，促进厌氧环境的产生从而产生有益的代谢产物如乳酸杆菌、分期杆菌等有益菌大量增殖，这些有益菌在肠道壁上形成生物膜可以阻碍病菌的入侵和定殖，通过发酵作用产生的乳酸、乙酸可以降低肠内pH值，维持正常的肠蠕动并使致病菌被排出体外。还可以激活机体吞噬细胞的活性和消化能力，从而提高机体的免疫能力。还可以向细胞外分泌淀粉酶、蛋白酶等消化酶类，提高鱼虾对饵料的消化吸收率。

已经推广应用的产品有“净水宝”、“福来宝”、“科新康盛”等。

1.3.3.2 饲料应用方面

枯草杆菌芽孢的商品制剂是美国食品和药物管理局(FDA)和美国饲料监控官协会(American Association of Feed Control Official)认可用作饲料原料的 GRAS(一般认为安全)级直接饲喂微生物制品(*Official Publication*, 2000)。

一种含枯草杆菌 C-3102 芽孢的直接饲喂商品微生物制剂，可用以取代鸡粮中的抗生素。这一枯草杆菌制品已作为非传统生长促进剂而在日本的肉鸡粮中应用多年了，并且已在 2000 年前被引进了美国市场作为非传统生长促进剂。这些年来已进行了许多科学研究和现场试验，结果表明肉鸡的体重、饲料利用率和胴体产量都得到了显著改善 (Danny Hooge, 2003)。

国内已经研制开发了一些枯草芽孢杆菌益生菌 (Probiotics) 作为饲料添加剂产品，益生菌是可以通过改善肠道平衡而对动物施加有利影响的活的微生物。可以降低抗生素在畜禽产品中的残留，降低对人类健康和环境安全的损害。对肉鸡还有一定的增重影响 (潘康成, 2004)。进入肠道的菌体可以分泌蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶等多种消化酶类，有助于降解植物性饲料中某些复杂碳水化合物的酶类，消耗氧气造成厌氧环境抑制大肠杆菌，沙门氏菌、巴氏杆菌、立氏杆菌等有害耗氧菌的生长，降低肠道 pH 值，促进乳酸菌等有益菌在体内快速繁殖，对 3 种常见肠道致病菌宋内志贺菌、致病性大肠杆菌、侵袭性大肠杆菌及产毒性大肠杆菌拮抗作用较为明显 (陈天游, 2004 年)，从而调节动物肠道的菌群平衡，有效维持动物肌体健康状态，提高其免疫能力。“宝肠安”、“复合枯草芽孢杆菌 TM (微生态制剂)”；以枯草芽孢杆菌为主要成分的“百合一号(复方枯草芽孢杆菌)”、“酪宝(复方酪酸芽孢杆菌)”及“神州圣业 6 号”，“神州圣业 6 号”可以促进奶牛产奶量，提高奶牛免疫力、乳脂率和乳蛋白等功效。

1.3.3.3 其他方面

枯草芽孢杆菌酶是工业酶市场的主体，其生产的蛋白酶、淀粉酶是工业酶中应用最为广泛的酶，仅二者就占到了整个工业酶市场的 50% (MARCUS Schallmey, 2004)。枯草芽孢杆菌可以产生多种活性酶类，如能够产生蛋白酶、 α -淀粉酶 (尹清强, 2005)、纤维素酶、 β -葡聚糖酶 (崔福绵, 1999)、植酸酶 (范继英, 2006)、果胶酶、木聚糖酶 (袁小平, 2004) 等十几种酶，均可应用于食品加工、洗涤行业、纺织行业中。日本学者发现在枯草杆菌发现的传统纳豆(Natto)食品中含有一种具有溶解血栓功能的纳豆激酶(Nattokinase)，是一种枯草杆菌蛋白激酶，可简称为枯激酶(Bacillokinase)。该酶在体内除可溶解血栓外，明显地缩短优球蛋白的溶解时间(ELT)，以及激活体内的血管内皮细胞产生，t-PA，由此可见，可探索开发一种新的溶栓药品。

白天鹅喷雾剂 (枯草芽孢杆菌 BS224 活菌体生物制品)，通过微生物间的拮抗作用对烧伤创面起到生物屏障和抑菌作用，有良好的抗感染作用，能抑制金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、假单胞杆菌等外袭的感染 (陈天游, 2004)，促进创面结痂愈合 (齐涵, 1998)。

1.4 研究目的和意义

本课题组以往的研究表明, 枯草芽孢杆菌 B-332 菌株对稻瘟病菌有很好的抑制作用, 是一株有潜力的生防菌株 (穆常青, 2006)。该菌株发酵条件摸索的成功, 将为成功开发一种抗稻瘟病菌的生防菌剂产生巨大的推动作用。近年来, 对枯草芽孢杆菌的研究比较多而且也日趋成熟, 还开发出一系列的植病生防产品, 对本项研究的进行起到了参考作用。

同时, 将枯草芽孢杆菌 B-332 菌株对稻瘟病菌的有效抗菌物质分离纯化, 确定分子量和物质名称, 有助于查明该菌株产生抗稻瘟病菌强烈抑制作用的主要物质和原因。该项研究具备了理论深度, 增强对该菌株的全面了解。为今后对该菌的进一步研究和开发打下基础, 并可以作为实际应用的理论依据。

另一方面, 开发对环境友好、对人类无害的生物防治方法可以从源头上减少由于施用化学农药带来的对土壤、水、大气产生的污染, 降低农业系统内部产生的污染因素, 带动可持续农业 (Sustainable Agriculture) 的发展。可持续农业强调在满足当代人生存需求的同时, 又不破坏后代人赖以生存的资源基础环境条件, 必须是生态上可以恢复、经济上保持盈利、社会上可以接受, 生物农药产品的开发和使用都能够满足可持续农业的发展要求, 发展可持续农业已经成为世界各国的共识, 对资源环境相对薄弱的中国显得尤为重要。

发展无公害农业, 生产绿色食品也一直是国家发展目标之一。生物农药具有相对安全、低毒无副作用、对环境有好等特点, 其使用可以降低化学农药残留对人体健康的伤害。为绿色食品生产起到重要保证, 使之成为可持续发展的必然选择。

我们赖以生存的地球环境需要人们选择更适宜人类安全生活生产的条件, 需要我们保护和爱惜周围的环境, 实现互相促进的良性循环, 环境的破坏程度是关系到人类自身健康和社会发展的大事, 充分利用已有的生物资源为人类和环境服务, 取之于自然用之于自然, 实现人类与其他物种的友好生存是需要我们长期研究的课题。本论文在明确了枯草芽孢杆菌 B-332 菌株对稻瘟病菌有效性的条件下, 进行了抑菌有效物质的分离、纯化和检测方面的研究, 探索了该菌株的发酵培养基和摇瓶发酵条件, 为其工厂化应用奠定了的基础, 具有重要的理论意义和现实价值。

第二章 枯草芽孢杆菌 B-332 菌株摇瓶发酵培养基 及发酵条件的研究

本研究室以往的研究表明, 枯草芽孢杆菌 B-332 菌体的芽孢和抗菌粗提物均对稻瘟病有很好的防治效果, 两者混合施用的防治效果更好, 达到 75.5% 以上, 几乎与三环唑相当(穆常青, 2006)。本试验将芽孢数量作为判定发酵条件优劣的主要指标, 抗菌粗提物含量作为辅助指标, 筛选出最适合 B-332 菌株发酵的培养基和条件, 为生产打下基础。

2.1 材料和方法

2.1.1 试验材料

2.1.1.1 供试菌种

枯草芽孢杆菌 B-332 菌株 (*Bacillus Subtilis*): 由中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所环境修复实验室保存。

2.1.1.2 培养基

(1) 种子培养基

肉汤培养基 (生化试剂, 北京生化试剂公司)

(2) 发酵培养基:

1 号培养基

淀粉 0.15%, 葡萄糖 0.5%, 尿素 0.1%, 磷酸氢二钾 0.3%, 磷酸二氢钾 0.15%, 硫酸镁 0.05%, 酵母膏 0.02%, 氯化铁 0.01%, 碳酸钙 0.01%, 大豆粕 1%, 3.08% 浓度的硫酸锰溶液 0.1%, pH 7.0-7.2

2 号培养基

豆饼粉 5.0%, 蔗糖 2.0%, 硫酸铵 1.5%, 柠檬酸三钠 0.25%, 磷酸氢二钾 0.03%, 硫酸镁 0.05%, 硫酸亚铁 0.005%, pH 7.0-7.2

3 号培养基

牛肉膏 0.3%, 蛋白胨 1%, 葡萄糖 1%, 氯化钠 0.5%, 淀粉 0.3%, 3.08% 浓度的硫酸锰溶液 0.1%, pH 7.0-7.2

4 号培养基

淀粉 0.5%, 尿素 0.2%, 磷酸氢二钾 0.6%, 磷酸二氢钾 0.3%, 酵母膏 0.04%, 硫酸镁 0.1%, 硫酸锰 0.02%, 豆汁 1.0%, pH 7.0-7.5

5 号培养基

葡萄糖 1.0%, 硫酸铵 0.15%, 酵母膏 0.01%, 氯化钾 0.01%, 硫酸镁 0.01%, 磷酸二氢钠 0.01%, 碳酸钙 0.1%, pH 7.5

6 号培养基

葡萄糖 5%, 酵母浸山膏 1%, 豆饼粉 6%, 碳酸钙 0.7%, 磷酸氢二钾 4%, pH 7.0-7.2

7 号培养基

葡萄糖 1.5%, 淀粉 0.2%, 豆饼粉 3%, 硫酸锰 0.1%, 磷酸二氢钾 0.15%, 硫酸镁 0.05%, 酵

母膏 0.02%，氯化铁 0.01%，碳酸钙 0.01%，pH7.0-7.2

8 号培养基

麸皮 1%，豆饼粉 1.5%，硫酸铁 0.03%，磷酸二氢钠 2.7%，磷酸氢二钠 3.5%，碳酸钙 0.1%，硫酸镁 0.03%，pH7.0-7.2

以上 8 种培养基的装液量为 100mL/500mL，121℃湿热灭菌 30min，将培养基冷却到室温后备用。

(3) PDA 培养基

马铃薯去皮、切块，加蒸馏水 1000mL 煮沸 20min，然后用纱布过滤，加葡萄糖及琼脂，融化后补水至 1000mL。分装后 121℃湿热灭菌 20min 备用。

2.1.1.3 主要化学试剂

葡萄糖 分析纯 北京化工厂
蔗糖 分析纯 北京化工厂
硫酸铵 分析纯 北京益利精品化学品有限公司
柠檬酸三钠 化学纯 北京化工厂
磷酸氢二钾 分析纯 北京新光化学试剂厂
硫酸镁 化学纯 北京化工厂
硫酸亚铁 分析纯 北京化工厂
琼脂粉 博大泰克 日本原装
氢氧化钠 分析纯 北京化工厂
盐酸 分析纯 北京化工厂
结晶紫 生物染色剂 北京市旭东化工厂

2.1.1.4 主要仪器

NBS Innova™ 4340 型摇床
PCV 型超净工作台
SANYO 全自动高压灭菌锅
SANYO MLR-350HT 型培养箱
Sartorius LP 520P 型天平
HORIBA D-22 型酸度计
Nichipet EX 型微量进样器
OLYMPUS BX51 型显微镜
Canon EOS 350D 型数码相机
DHG-9070A 型点热恒温鼓风干燥箱（上海精宏实验设备有限公司）
LG 微波炉
TCL BED-232WB 型冰箱
Heraeus D-37520 型离心机
Heraeus D-37520 型离心机
UV-2550 型紫外可见分光光度计
HOBIBA D-22pH 计

2.1.1.5 相关溶液

(1) 3', 5'-二硝基水杨酸试剂 (DNS 试剂)

先配置出甲液 (6.9g 结晶酚溶解于 15.2mL 10% 氢氧化钠中, 并稀释至 69mL, 在此溶液中加入 6.9g 亚硫酸氢钠), 再配置出乙液 (称取 255g 酒石酸氢钠, 加到 300mL 10% 氢氧化钠中, 再加入 880mL 1% 3', 5'-二硝基水杨酸溶液)。将甲液与乙液相混合即得到黄色试剂, 储存于棕色试剂瓶中, 在室温下, 放置 7-10d 以后使用。

(2) 0.1% 葡萄糖标准液

准确称取 100mg 分析纯的葡萄糖, 用少量蒸馏水溶解后定容至 100 mL, 冰箱保存备用

(3) 中性甲醛溶液

将试剂级甲醛 (36%-37%) 调到 pH7 (用 pH 计检查)。或是在 50mL 36-37% 甲醛中加入 1mL 0.1% 酚酞乙醇溶液, 然后用 0.2N 氢氧化钠溶液滴定到微红。(需临用前配置, 若放置一些时间后, 在使用前要重新中和)

(4) 1% 的酚酞溶液

称 1.0g 酚酞指示剂, 溶于 65mL 体积分数为 95% 的乙醇中, 用水稀释至 100mL

(5) 标准碱溶液

0.01N 氢氧化钠溶液, 称取氢氧化钠 0.1g, 使用前标定

(7) 结晶紫酒精饱和液

取 14.0g 结晶紫溶于 100mL 95% 的酒精内

(8) 5% 孔雀绿水溶液

取孔雀绿 5.0g, 溶解于 100mL 蒸馏水

(9) 0.05% 碱性复红

取碱性复红 0.05g, 溶解于 100mL 95% 的乙醇内

2.1.2 研究方法

2.1.2.1 芽孢计数方法的比较

(1) 加热除菌法

根据相关文献, 枯草芽孢杆菌的热力致死温度在 60℃ 以上 (<http://www.21food.cn/alibaba/spsc/showShouce.jsp?id=5610>), 即在此温度间, 发酵液中的菌体基本死亡, 芽孢由于抗逆性强存活下来。

接种一环 B-332 菌体于肉汤培养基中, 37℃、220r/min、100mL/500mL 条件下发酵 48h, 分别取 5mL 发酵液置于 3 根无菌试管中, 80℃、90℃、100℃ 的水浴锅中恒温水浴 15min、30min、60min, 然后, 用 2.1.2.2 的平板倾注法分别统计活菌数, 初步将此数目作为该条件下发酵液中的芽孢数目, 对比该发酵液中菌体总数 (25℃ 下) 即为该处理下的芽孢率。

某个处理下的芽孢总数 (cfu/mL) = 菌体总数 (cfu/mL) × 芽孢率 (%)

(2) 结晶紫染色法

制片的基本程序如下: 制片 → 固定 → 染色 → 水洗 → 干燥 → 镜检。

取待检菌芽孢体较多的培养物, 涂片、干燥及加热固定后, 滴加结晶紫染色剂于标本上, 静

置 0.5-1min, 然后用水流从标本的背面把多余染料冲洗掉, 被菌体吸附的染料则保留在载玻片上, 将标本晾干后即可在显微镜 (10×100 倍) 下, 共观察 10 个视野, 分别统计菌体数和芽孢数。

(3) 芽孢染色法

根据相关文献 (方中达, 1987), 取待检菌芽孢体较多的培养物, 涂片、干燥及加热固定后, 加孔雀绿染剂加热 1min, 勿使染液沸腾和干燥, 再加碱性品红染色 15min, 然后用水流从标本的背面把多余染料冲洗掉, 吸干后镜检。菌体被染成红色, 芽孢为绿色。

2.1.2.2 活菌计数方法的比较

(1) 平板涂布计数法

用十倍稀释法稀释发酵液, 将 72h 的发酵液稀释至 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 倍。分别吸取发酵稀释液 0.1mL, 接入相应标号的平皿中, 用玻璃刮铲将稀释液混匀铺平, 每个稀释度接三个平板, 倒置于 28-30℃ 恒温箱中培养 1-2d, 计数。

发酵液中活菌数 (cfu/mL) = 每皿平均菌体数 (cfu) × 10 × 该发酵液的稀释倍数

(2) 平板倾注计数法

吸取 72h 的发酵液 1mL, 加入装有 99 mL 无菌水的三角瓶中, 摇动 15 转, 即为稀释至 10^{-2} 倍的菌悬液 (百倍稀释法), 用该方法将发酵液稀释至 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 倍, 将各发酵稀释液 1mL 加入到 100mL 50℃ 左右的 PDA 培养基中, 充分混匀, 将每个稀释度接 5 个平板, 待琼脂凝固后将其盖朝下放置, 于 28-30℃ 中恒温培养 1-2d 后, 统计每一个稀释度的菌体总数。

发酵液中活菌数 (cfu/mL) = 5 个皿的菌体总数 (cfu) × 该发酵液的稀释倍数

2.1.2.3 菌体生长曲线的测定

接种一环 B-332 菌种于肉汤培养基中 (100mL/500mL), 37℃、220r/min 条件下发酵培养, 在培养第 3、6、9、12、15、18、21、24、27、30、33、36h 时取样, 每次取样 10mL, 每瓶菌液连续取样 4 次, 重复 3 次。

用光电比浊法 (turbidity estimation by spectrophotometer) 测定菌液在 600nm 下的吸光值, 并以时间为横坐标, 菌体的浓度 (OD_{600}) 为纵坐标, 绘制菌体生长曲线。

2.1.2.4 初始发酵培养基的筛选

查阅与细菌和枯草芽孢杆菌发酵方面的文献, 找到八种适合枯草芽孢杆菌发酵的培养基 (如 2.1.1.2)。接种一环 B-332 菌种于肉汤培养基中 (100mL/500mL), 并将其作为种子发酵液, 37℃、220r/min 条件下发酵培养 12h, 以 5% 的接种量接种到这八种培养基中, 37℃、220r/min 发酵培养 72h。发酵结束后, 根据终了芽孢数量, 选择一种较优的培养基作为 B-332 菌株发酵的初始培养基。每批试验设 3 个重复, 共进行 3 批。

2.1.2.5 种龄对芽孢数量的影响

无菌条件下, 将 12、15、18、21、24、27h 的种子发酵液以 5% 的接种量接种到初始培养基中, 37℃、220r/min 培养 72h, 发酵结束后, 测定 B-332 菌株的芽孢数量, 以此作为选择最佳种龄的依据。每批试验设 3 个重复, 共进行 3 批。

2.1.2.6 接种量对芽孢数量的影响

设置 2%、5%、7%、8%、10% 五个接种量, 按照 2.1.2.5 确定的种龄将种子发酵液接到初始培养基中, 37℃、220r/min 培养 72h, 发酵结束后, 测定 B-332 菌株的芽孢数量, 以此作为选择最佳接种量的依据。每批试验设 3 个重复, 共进行 3 批。

2.1.2.7 培养基成分的正交优化

把出初始培养基的主要成分磷酸二氢钾、硫酸镁、硫酸亚铁作为恒定因素，豆饼粉、蔗糖、硫酸铵、柠檬酸三钠作为试验因素，每个试验因素选取三个水平，各因素和水平表如表 2-1。

表 2-1 培养基成分正交试验的因素和水平

Table2-1 The factor and level table of the medium components

因素	A.豆饼粉 (%)	B.蔗糖 (%)	C.硫酸铵 (%)	D.柠檬酸三钠 (%)
水平 1	4.00	1.50	0.30	0.20
水平 2	5.00	2.00	0.50	0.25
水平 3	6.00	2.50	0.70	0.30

选择 $L_9(4^3)$ 正交表进行优化试验，表 2-2 为培养基成分正交试验的实施方案。

表 2-2 培养基成分正交试验的实施方案

Table2-2 The implementary scheme table of medium components

试验号	因素			
	A	B	C	D
CK	2	2	2	2
1	1	1	3	2
2	2	1	1	1
3	3	1	2	3
4	1	2	2	1
5	2	2	3	3
6	3	2	1	2
7	1	3	1	3
8	2	3	2	2
9	3	3	3	1

按照表 2-2 的实施方案，在无菌条件下以最佳接种龄、最佳接种量接种至表 2-2 的 9 种培养基中，装液量为 100mL/500mL，37℃，220r/min 培养 72h，将产芽孢数量最大的培养基作为优化培养基。每批试验设 3 个重复，共进行 3 批。

2.1.2.8 发酵条件正交试验

优化的培养基，将转速、温度和装量作为试验因素，各取两个水平，选择 $L_4(3^2)$ 正交表进行正交优化试验，表 2-3 为发酵条件正交试验各因素和水平表。

表 2-3 发酵条件正交试验的各因素和水平

因素		A.转 数 (r/min)	B.温 度 (°C)	C.装 量 (mL/500mL)
水平	1	180	30	80
	2	220	37	100

在无菌条件下,将培养至第 18h 的种子发酵液以 10%的接种量接种于 2.1.2.7 确定的培养基中,按照表 2-4 的实施方案优化发酵条件,共发酵培养 72h,将芽孢数量最大的发酵条件作为优化发酵条件。每批试验设 3 个重复,共进行 3 批。

表 2-4 发酵条件正交试验的实施方案

试验号	因素		
	A	B	C
CK	2	2	2
1	1	2	1
2	1	1	1
3	2	1	2

2.1.2.9 摇瓶发酵代谢曲线测定

按照以上优化后的培养基和发酵条件,发酵培养 B-332 菌株,每隔 12h 取样,至 96h 结束,测定发酵过程中的 pH 值、残糖、氨基氮、菌体数、芽孢率、抗菌粗提物的含量,以确定这些物质随发酵时间的变化趋势及发酵周期。每批设 3 个重复,进行 3 批试验。

- (1) 使用 pH 计测量对 pH 值进行测定;
- (2) 菌体计数方法采用平板倾注法,见 2.1.2.2 (2);
- (3) 芽孢率计数方法采用结晶紫染色法,见 2.1.2.1 (2);
- (4) 有效抗菌物质含量测定采用化学测定法,见 3.1.2.3;
- (5) 发酵液残糖的测定采用 3, 5-二硝基水杨酸法:

A. 葡萄糖标准曲线的确定

取 9 支大试管,按表 2-5 加入各种试剂,将各管溶液混匀后,在 UV-2550 型光电比色仪上 (OD520nm) 进行比色测定,用空白管溶液调零点,记录光密度值,以葡萄糖浓度为横坐标,光密度值为纵坐标绘制出标准曲线。

表 2-5 葡萄糖标准曲线的设计表

Table2-5 The design of the Glucose standard curve

	标 号								
	ck	1	2	3	4	5	6	7	8
含糖总量 (mg)	0	0.2	0.4	0.5	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6
葡萄糖液 (mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6
蒸馏水 (mL)	2.0	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0	0.8	0.6	0.4
DNS 试剂 (mL)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
加热	均在沸水浴中加热 5min								
冷却	立即用流动冷水冷却								
蒸馏水 (mL)	21.5	21.5	21.5	21.5	21.5	21.5	21.5	21.5	21.5

B. 发酵液的处理

取菌体发酵液 20mL, 10000r/min、18℃条件下离心 10min, 得到的上清液稀释一定倍数备用。

C. 发酵液中还原糖量的测定

将处理后的发酵液, 按照表 2-6 加入各种试剂后, 将各管混匀, 按照制作标准曲线是同样的操作测定各管的光密度值, 在标准曲线上查出相应的还原糖含量, 按公式: 还原糖%=(还原糖毫克数×样品稀释倍数)/样品体积×100, 计算出还原糖的百分含量。

表 2-6 发酵液中还原糖的测定数据

Table2-6 Mensuration of the Reductive Sugar of the Fermentation Liquid

	标 号			
	空白	1	2	3
样品量 (mL)	0	1.0	1.0	1.0
蒸馏水 (mL)	2.0	1.0	1.0	1.0
DNS 试剂 (mL)	1.5	1.5	1.5	1.5
加热	均在沸水浴中加热 5min			
冷却	立即用流动冷水冷却			
蒸馏水 (mL)	21.5	21.5	21.5	21.5

(6) 发酵液氨基氮的测定采用甲醛滴定氨基氮法

A. 发酵液的处理

取菌体发酵液 20mL, 10000r/min、18℃条件下离心 10min, 得到的上清液稀释一定倍数备用。

B. 发酵液中氨基氮的测定

取 3 个 25mL 锥形瓶, 编号。向第 1、2 号瓶内各加入 2mL 处理后的发酵液及 1-2 滴酚酞指示剂。向第 3 号瓶内加入 2mL 蒸馏水及 1-2 滴指示剂作为对照。混匀后, 用 0.01N 标准氢氧化钠溶液滴定第 1 号瓶内的溶液至微红色, 并保留作为掌握滴定终点的颜色标准。向第 2、3 号瓶内各加入 4mL 中型甲醛溶液, 混匀, 分别用 0.01N 标准氢氧化钠溶液将它们滴定至与第 1 号瓶颜色相同。按照上述方法进行测定, 平等做三份, 按公式: 氨基氮 (mg/mL) = $(V_2 - V_3) \times 0.14008 / 2$ 计算出每毫升发酵液中含有氨基氮的平均毫克数。公式中 V_2 为滴定第 2 号瓶 (即待测液) 耗用的 0.01N

标准氢氧化钠溶液的平均毫升数， V_3 为滴定第 3 号瓶（及对照液）耗用的 0.01N 标准氢氧化钠溶液的平均毫升数，公式中 0.14008 即 1mL0.01N 氢氧化钠溶液相当的氮的毫克数。

2.2 结果与分析

2.2.1 芽孢率统计方法的比较

2.2.1.1 加热除菌法

加热除菌法目的在于，找到合适的水浴时间和温度，基本除去发酵液中的菌体，同时芽孢由于抗高温能力而存活下来，再结合平板倾注法（见 2.1.2.2 (2)）测得的发酵液除菌前后菌体总数，计算出该发酵液中的芽孢率。

根据经验，培养 48h 的发酵液中，芽孢率大约为 30-40%。由表 2-7，水浴到 15min 时，100℃ 存活的芽孢数为 18%，与 80℃、90℃ 条件下的芽孢率 55% 相比减少将近 37%，100℃ 的芽孢存活率基本维持在这个低水平，由此判断，水浴温度为 100℃ 时，发酵液中除了大部分菌体被杀死外，一部分芽孢也被杀死，导致存活的芽孢量比实际发酵液中的芽孢量少，因此，100℃ 不是加热除菌法的最适温度。

适宜条件下，细菌生长繁殖速度非常快，大约 20-30min 就可以分裂、繁殖 1 次，菌体数目呈几何速度增长（刘俊利，2004），由表 2-7，80℃、90℃ 时，水浴 60min 时测得的芽孢率比 30min 时均有提高，可能是随着水浴时间的延长，发酵液中部分芽孢复苏、菌体繁殖导致测得芽孢率的误差增大。

90℃ 时芽孢的复苏量比 80℃ 时少，即 90℃ 水浴 30min，可以基本杀死菌体保留芽孢、保持芽孢量的稳定，再结合 2.1.2.1 (1) 的公式即可计算出发酵液的芽孢数量。

但加热除菌法存在一些不足：①水浴过程达 30min，耗时较长；②活菌计数法需要无菌操作，比较繁琐；③长时间水浴可能促使芽孢萌发，导致芽孢率结果的误差增大。

综上，加热除菌法误差较大、操作繁琐，不是统计芽孢率最佳的方法。

表 2-7 不同处理下的芽孢率

Table 2-7 The percents of spores in different conditions

温 度 (℃)	芽孢率 (%)		
	15min	30min	60min
80	55	11	32
90	55	34	35
100	18	11	13

2.2.1.2 芽孢染色法

根据细菌的芽孢和菌体对染料的亲和力不同，用不同的染料染色，芽孢和菌体呈不同颜色，便于区别。芽孢壁厚、透性低，着色、脱色均较困难，当用弱碱性染料孔雀绿在加热的情况下进行染色时，此染料可以进入菌体及芽孢使其着色，而进入芽孢的染料则难以透出。再复染（蕃红液）衬色，则菌体呈红色而芽孢呈绿色。

显微镜下观察（10×100倍）染色后的样品，视野中红色居多、绿色较少，且绿色极易被红色

覆盖。可能芽孢不易着色，易与染成红色的菌体混淆。

2.2.1.3 结晶紫染色法

如图 2-1，显微镜下观察，结晶紫染色后的 B-332 菌株的芽孢、菌体形态区别显著，芽孢为中等大小，椭圆形，多为中生或游离状；菌体为细杆状，末端稍尖呈梭形。

芽孢率 (%) = 芽孢总数 (个) / (芽孢总数 + 菌体总数) (个) (如表 2-8)

表 2-8 结晶紫染色法的芽孢率统计表

Table2-8 the statistics of spores

	标号										总数	芽孢率
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
芽孢数 (个)	172	273	142	212	112	177	106	196	176	114	1680	73.8%
菌体数 (个)	64	64	67	63	35	62	96	64	40	41	596	

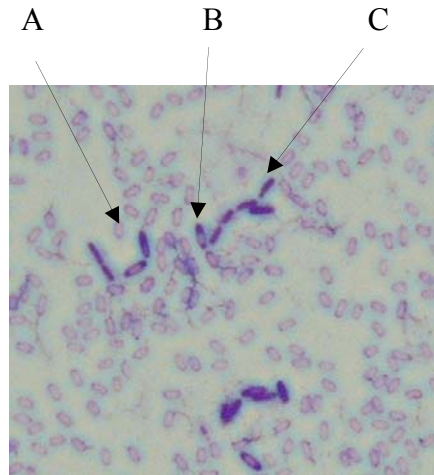


图 2-1 枯草芽孢杆菌光学显微镜下图像，放大倍数 10×100 倍

Fig.2-1 The Micrograph of *Bacillus Subtilis*

A: 游离芽孢 B: 芽孢 C: 菌体

A: dissociative spore B: spore C: bacteria body

结晶紫染色法与芽孢染色方法相比，视野中杂质干扰相对较少，芽孢壁为淡紫色，菌体被染色为深紫色，区别较清晰；芽孢染色法中，洗脱颜色的时间相对较长，不容易充分洗掉染色的杂质，绿色菌体和红色芽孢分辨清晰程度相对较差。

由此，采用结晶紫染色法作为统计 B-332 菌株芽孢率的最佳方法。

2.2.2 活菌计数法的比较

由表 2-9，采用不同稀释倍数、不同活菌计数法的同一发酵液，菌体计数结果不同。采用平板倾注计数法(pour plate method)计数，稀释 10^8 及 10^9 比 10^7 倍的菌体数提高 4.97%及 11.60%；平板涂布(plate count)法计数时，稀释 10^8 及 10^9 比 10^7 倍的菌体数提高 12.50%及 22.00%，即随着稀释倍数的增大，计数误差也逐渐增大，且平板涂布法的计数误差大于平板倾注法。两种方法比较，

平板倾注法计数法的菌体增长量较小，计数结果比较稳定（图 2-2）。

培养方法上比较发现，平板涂布法容易造成菌体在平板上生长密度不均，可能与操作及工作台不平有关，平皿盖上凝结的水珠流入涂过菌的平板也会影响菌落的分布，对菌落的计数的准确造成影响。

综上，平板倾注计数法操作更简便、误差几率更少，是比较理想的活菌计数法。

表 2-9 平板倾注计数法与平板涂布计数法菌体数量的比较

Table 2-9 The comparison of bacterias in the method of the pour plate and plate count

稀释倍数	菌体数 ($\times 10^{10}$ cfu/mL)		误差率 (%)	
	平板倾注法	平板涂布法	平板倾注法	平板涂布法
10^7	3.02	3.33	0	0
10^8	3.17	3.75	4.97	12.50
10^9	3.37	4.07	11.60	22.00

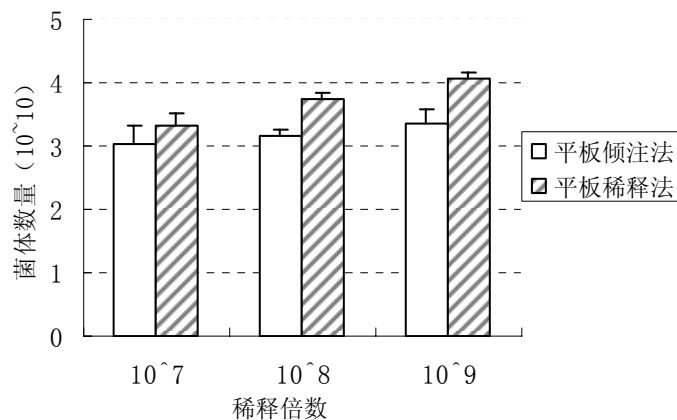


图 2-2 平板倾注计数法与平板涂布计数法活菌数的比较

Fig.2-2 The comparison of spores in the method of the pour plate and plate count

2.2.3 摇瓶种子菌体生长曲线测定结果

如图 2-3，曲线显示了枯草芽孢杆菌 B-332 菌株生长繁殖的 4 个时期：迟缓期，对数期，稳定期和衰亡期。① 0-6h 为延迟期(lag phase)，生长速率常数几乎为零，菌体生长很少，量和形态基本保持不变；② 6-12h 为对数期 (exponential phase)，600nm 下的吸光值由 0.1 增加到 1.5，菌体生长速率常数最大，表现为菌体量和形态的同时增长，代时(generation time)最短，细胞平衡生长，代谢旺盛；③ 15-24h 为稳定期(stationary phase)，600nm 下的吸光值保持在 1.5 到 1.6 之间变化，生长速率常数为零，菌体产量达最高点；④ 24-36h 为衰亡期 (decline phase; death phase)，由于营养耗尽，营养物比例失调，积累了有害代谢产物，菌体细胞逐渐衰亡、自溶，菌体出现负生长、自溶的现象，不宜作为种子，将稳定期作为确定种龄的时间范围。

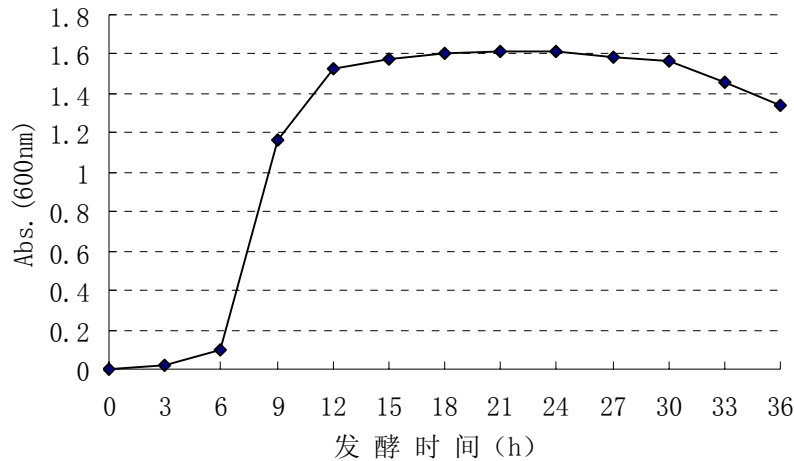


图 2-3 摇瓶培养的菌体生长曲线

Fig.2-3 Growth curve of B-332 in the shake flask cultivation

2.2.4 基本发酵培养基成分的筛选

图 2-4 表示了 8 种配方发酵产生的芽孢数量，2 号培养基配方发酵产生的芽孢数量最大，为 2.02×10^9 cfu/mL，其余 7 种培养基配方产生的芽孢总量都比 2 号少，8 号与 2 号培养基配方发酵产生的芽孢数量最接近，为 1.55×10^9 cfu/mL。由此，选择 2 号培养基配方作为初始培养基。

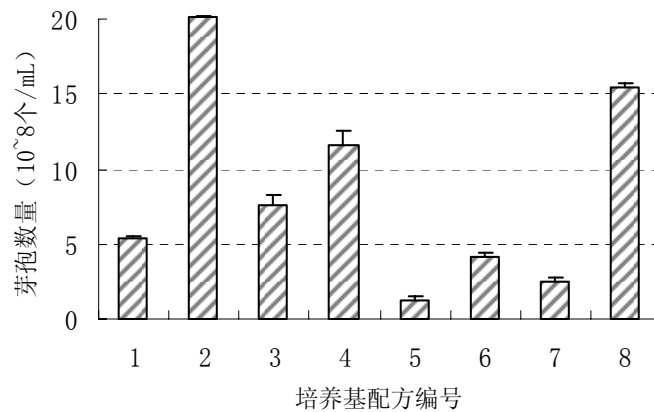


图 2-4 不同培养基配方对枯草芽孢杆菌 B-332 菌株芽孢数量的影响

Table 2-4 The effect of different medium components on the spore production of B-332

2.2.5 种龄对芽孢数量的影响

由图 2-5，种龄为 12-27h 时，产生的芽孢数差别不大，种龄为 18h 产生的芽孢数量最大，约 7.2×10^8 cfu/mL；种龄为 12h 产生的芽孢数量最少；种龄为 27h 产生的芽孢数量约为 6.2×10^8 cfu/mL，也较少，这因为 27h 时，菌体进入衰亡期，衰亡期的菌体在初始培养基中生长情况也不好。因此，确定 18h 为最佳种龄。

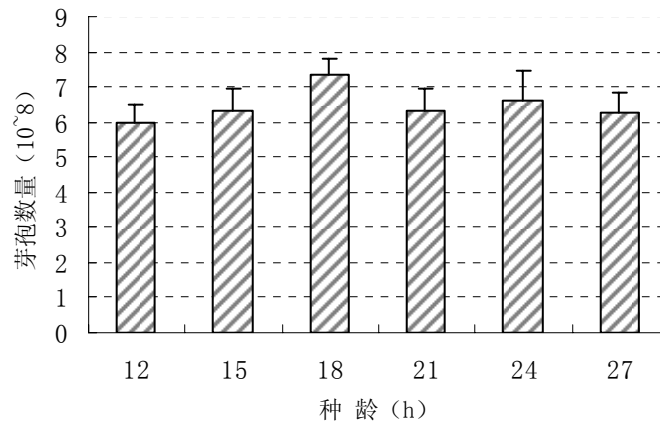


图 2-5 种龄对枯草芽孢杆菌 B-332 菌株芽孢数量的影响

Table 2-5 The effect of inoculation age on the spore production of B-332

2.2.6 接种量对芽孢数量的影响

由图 2-6，接种量逐渐加大，芽孢数量也不断增加，接种量为 10% 时，芽孢总数为 4.05×10^9 cfu/mL。接种量的大小与菌种的特性、种子的质量和发酵条件都有关系，不同微生物发酵的接种量不同，10% 的接种量相对较高，大接种量在发酵中优势明显，可以缩短菌种的延滞期，使生产期提前到来，还可以降低传代率，降低变异几率。但过大的接种量可能导致培养基养分提前消耗完，降低代谢产物的合成量及降低芽孢的数量。因此，确定 10% 的接种量为最适接种量。

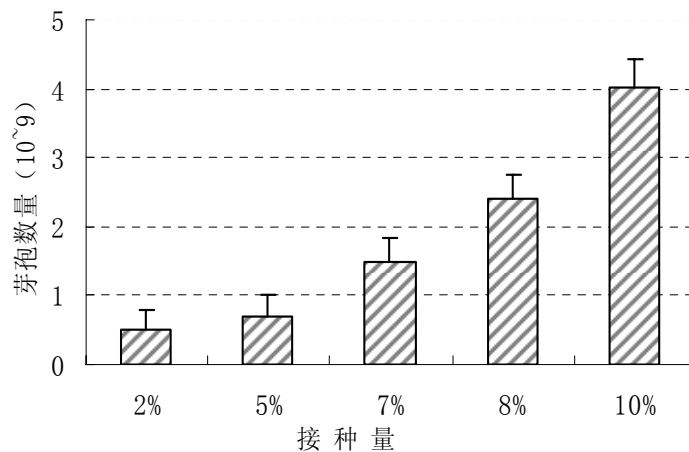


图 2-6 不同接种量对枯草芽孢杆菌 B-332 芽孢数量的影响

Table 2-6 The effect of the inoculation volume on the spore production of B-332

2.2.7 发酵培养基成分的正交优化

由表 2-10 可以看出，四个因子的级差 R 值不同，R 值的大小反应了不同因子对 B-332 菌株芽孢数量影响的大小，R 值越大则该因子的影响越大。表 2-10 中显示， $RK B > RK C > RK D > RK A$ ，说明蔗糖为最主要的影响因素，以后依次是硫酸铵、柠檬酸三钠、豆饼粉。

表 2-10 培养基四种主要成分对芽孢数量的影响

Table 2-10 The effect of the four principal medium component on the spore production

列号 试验号	因 素				芽孢总数 ($\times 10^9$ cfu/mL)
	A.豆饼粉 (%)	B.蔗 糖 (%)	C.硫酸铵 (%)	D.柠檬酸三钠 (%)	
CK	2	2	2	2	4.03
1	1	1	3	2	12.70
2	2	1	1	1	4.43
3	3	1	2	3	4.71
4	1	2	2	1	15.90
5	2	2	3	3	2.27
6	3	2	1	2	5.97
7	1	3	1	3	21.00
8	2	3	2	2	35.40
9	3	3	3	1	58.60
K1	49.60	21.84	31.40	78.93	(总和) 165.01
K2	42.10	24.14	56.01	54.07	
K3	69.28	115.00	73.57	42.38	
k1	16.53	7.28	10.47	26.31	
k2	14.03	8.05	18.67	18.02	
k3	23.09	38.33	24.52	14.13	
R	9.06	31.05	14.05	12.18	

通过比较 R 值, 可知最佳水平配置为 A3、B3、C3、D1 (图 2-7), 即豆饼粉 6%、蔗糖 2.5%、硫酸铵 0.7%、柠檬酸三钠 0.2%。可能蔗糖是较好的碳源物质, 在菌体的发酵中被迅速利用, 作为碳源对该发酵结果的影响最大; 硫酸铵作为快速利用氮源对发酵结果的影响也较大, 在本培养基成分中具有主要影响作用。无机氮源硫酸铵的影响也较大, 它们都是构成菌体细胞和代谢产物来源的营养物质 (邬行彦, 1977)。黄豆饼粉作为氮源含有大量蛋白质、脂肪、糖类、含磷化合物和维生素等, 它和提供碳源的柠檬酸三钠对本试验的影响都相对较小。

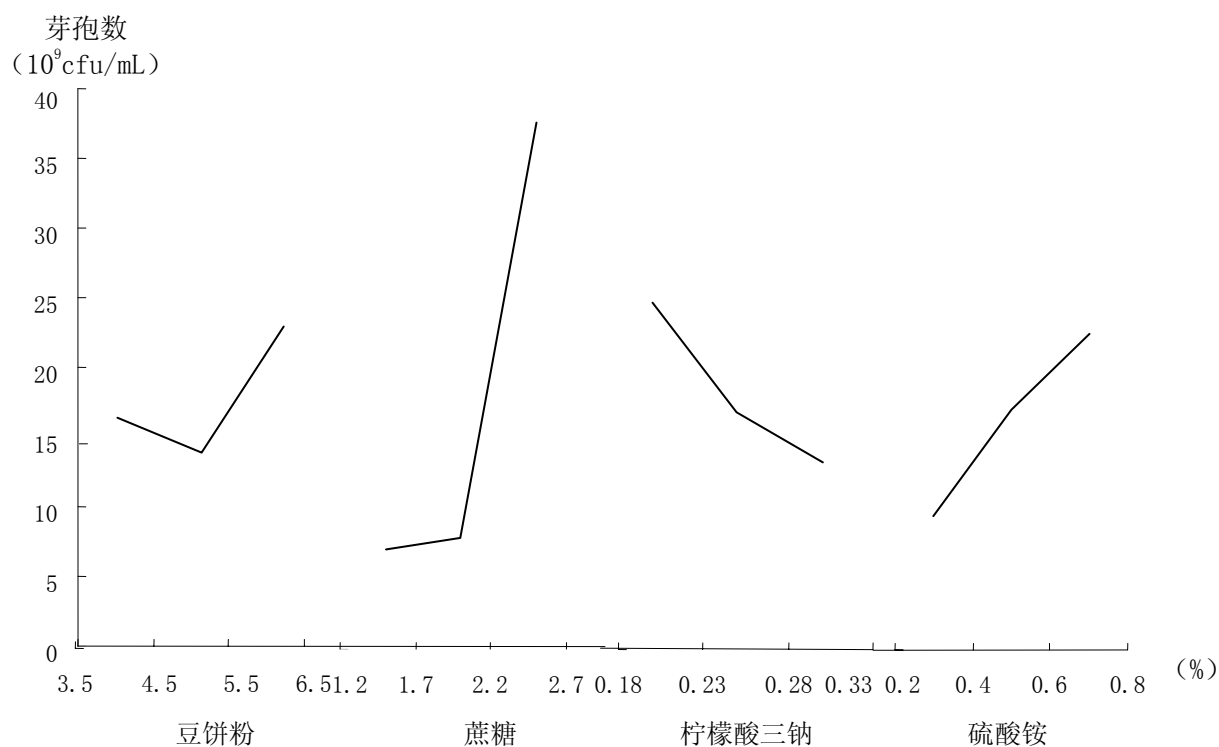


图 2-7 四种培养基主要成分对芽孢数量的影响

Table 2-7 The effect of the four principal medium component on the spore production

选择9号配方作为培养基成分正交的最佳结果，成分为豆饼粉6.0%、蔗糖2.5%、硫酸铵0.7%、柠檬酸三钠0.2%、磷酸氢二钠0.03%、硫酸镁0.05%及硫酸亚铁0.005%。

改良成分后的芽孢数量为 5.86×10^{10} cfu/mL，比出始配方培养基提高了13.54倍。

2.2.8 摇瓶发酵条件的正交优化

按因素水平表所确定的关系对号入座，填得如下试验方案。由表 2-11 可以看到，温度的 R 值最大，说明温度对芽孢数量的影响最大，摇床转速和摇瓶装量的影响都很小。相对于 37℃，30℃ 条件更利于芽孢的产量提高，可能相对低温更利于芽孢的产生，低温也有利于节约能源，降低生产成本。2 号和 3 号条件产生的芽孢总数曲别不大，但 2 号条件转速为 180r/min、3 号条件转速为 220r/min；2 号条件装量为 80 mL /500mL、3 号条件装量为 100mL/500mL，温度条件相同，可见，2 号条件的材料消耗量、耗电量及机器磨损量都比 3 号条件低。综上，确定 2 号条件为摇瓶发酵的最佳条件。

表 2-11 培养条件对芽孢数量的影响

标号	因素			芽孢总数 ($\times 10^{10}$ cfu/mL)
	A.转速 (r/min)	B.温度($^{\circ}$ C)	C.装量(mL /500mL)	
CK	2	2	2	4.62
1	1	2	1	2.11
2	1	1	1	8.68
3	2	1	2	8.96
4	2	2	2	1.41
K1	10.79	17.64	10.79	(总和)
K2	10.37	3.52	10.37	21.16
k1	5.395	8.82	5.395	
k2	5.185	1.76	5.185	
R	0.21	7.06	0.21	

2.2.9 摇瓶发酵代谢曲线

图 2-8 是葡萄糖浓度标准曲线，用此曲线测定摇瓶发酵过程中，不同时间还原糖的浓度，以确定培养基中残糖的含量。

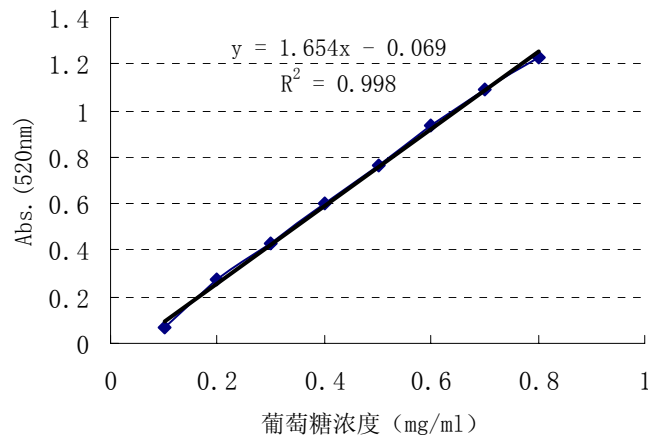


图 2-8 葡萄糖浓度标准曲线

Fig.2-8 Standard curve of the concentration of glucose

试验结果表明(表 2-12)，发酵 96h 的过程中，pH 值在 5.85 到 7.11 之间变化不大；还原糖浓度由 2.38mg/mL 降低到 0.55mg/mL，几乎耗尽(图 2-10)；氨基氮由 2.13mg/mL 提高到 2.62mg/mL，可能产物中有氨基基团的物质产生，或者该菌株的发酵对氮的消耗量不大；芽孢从第 36h 以后产生，72h 达到最大量 1.43×10^{10} cfu/mL，之后逐渐降低，此时，显微镜下观察到芽孢自溶、消减(图 2-9)；72h 以后，抗菌粗提物的含量还在增多，符合微生物次级代谢物质在发酵后期产量增大的理论。综上，将 72h 作为摇瓶发酵周期。

表 2-12 枯草芽孢杆菌 B-332 摇瓶发酵过程主要参数变化表

Table2-12 The flask fermentation process parameters of the *Bacillus Subtilis* B-332

发酵时间 (h)	pH 值	芽孢总数 ($\times 10^9$ cfu/mL)	氨基氮 (mg/mL)	还原糖 (mg/mL)	有效抗菌物质浓度 (mg/mL)
0	6.44	0	2.13	0	0
12	5.85	0	2.42	2.38	20.23
24	7.42	0	2.56	1.38	47.47
36	7.65	0	2.69	1.31	133.30
48	6.86	26	3.16	1.02	161.17
60	6.60	98	3.39	0.86	184.04
72	7.42	143	3.23	0.89	213.82
84	7.06	103	3.07	0.77	289.54
96	7.11	76	2.62	0.55	245.46

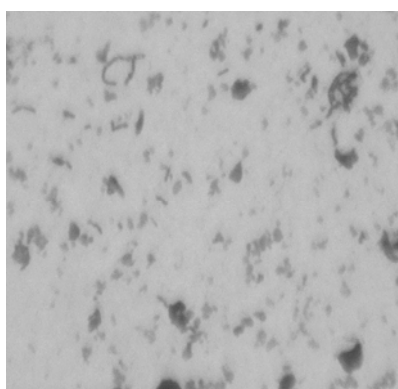


图 2-9 菌体自溶的照片 (96h)

Fig.2-9 Self-fusion of the bacterial body

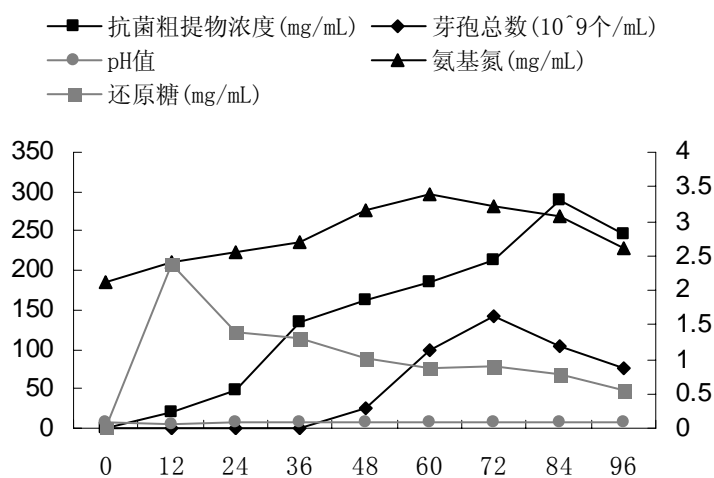


图 2-10 枯草芽孢杆菌 B-332 菌株的摇瓶发酵代谢曲线

Fig.2-10 The curve of the flask fermentation process parameters of the *Bacillus Subtilis* B-332

2.3 小结

本章对枯草芽孢杆菌 B-332 菌株的摇瓶发酵条件进行了研究。确定了该菌株摇瓶发酵的初始培养基，测定了该菌株在肉汤培养基中的菌体生长曲线。并确定种龄为 18h，接种量为 10%；对培养基成分及发酵条件正交优化，确定最佳培养基成分为豆饼粉 6.0%、蔗糖 2.5%、硫酸铵 0.7%、柠檬酸三钠 0.3%、磷酸氢二钾 0.03%、硫酸镁 0.05%、硫酸亚铁 0.005%；最适发酵条件为温度 30℃、摇床转速 180r/min、摇瓶装量 80mL/500mL。在该综合条件下，发酵的芽孢数为 1.43×10^{11} cfu/mL，比初始综合条件的芽孢总数 4.03×10^9 cfu/mL 提高了 34.48 倍。

对加热除菌、结晶紫染色和芽孢染色法进行比较，确定将结晶紫染色法为统计芽孢数的最佳方法；比较平板涂布法和平板倾注法的活菌计数误差，将平板倾注法作为测定发酵液中活菌总数的方法。

摇瓶发酵代谢数据显示，36h 以后芽孢开始产生，72h 时达到最大量，72h 以后，芽孢率逐渐降低；96h 时，培养基中的还原糖为 0.55mg/mL，几乎耗尽；抗菌粗提物的含量不断增多，84h 时达到最大。由于芽孢抗逆性好、易于储存，萌发的菌体定殖在水稻叶面上可以促进该细菌对稻瘟病的防治作用，而单独使用代谢产物不利于菌体定殖，会降低田间防效，72h 以后，芽孢数量急剧降低，减弱了芽孢制剂产品的生产能力；综上，确定摇瓶发酵周期为 72h。

第三章 枯草芽孢杆菌 B-332 菌株有效抗菌物质的分离纯化

枯草芽孢杆菌可以产生一系列对植物病害有抑制作用的物质（程洪斌，2006），本研究室的研究表明，枯草芽孢杆菌 B-332 菌株对稻瘟病菌有强烈的抑制作用，该菌株的抗菌粗提物不仅对稻瘟病菌的孢子萌发有抑制作用，并表现为对芽管的致畸效果，该菌株还能够在水稻叶片上有效定殖，是一个有生防潜力的菌株（穆常青，2006）。分离纯化该菌株的有效抗菌组分，有助于明确该菌株抑制稻瘟病菌的根本原因。

3.1 材料和方法

3.1.1 试验材料

3.1.1.1 菌种

枯草芽孢杆菌 B-332 菌株 (*Bacillus Subtilis*)、啤酒酵母菌(*Brewer's Yeast*)、青枯假单胞菌 (*Pseudomonas solanacearum E.F.Smit*)和荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*): 由中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所环境修复实验室保存;

稻瘟病菌 (*Magnaporthe grisea*) 为 91-17-2 生理小种，由中国农业科学院作物科学研究所稻瘟病害实验室提供;

巨大芽孢杆菌(*Bacillus megatherium*) ACCC11084、普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*) : 由中国农业科学院植物保护研究所药物工程实验室提供。

3.1.1.2 主要仪器

Heraeus D-37520 型离心机; UV-2550 型紫外可见分光光度计; pH-HJ908 型酸度计; 高效液相色谱 (Waters HPLC 2695); WATERS2996PDA 检测器; QUATTRO MICRO TPA 检测器; MILLI Q 超纯水机; WATERS2525; 2996PDA; WATERS2767 sample manager。

3.1.1.3 试剂、材料

超纯水, 乙腈 (ACN) (色谱级, Fisher), 冰乙酸 (分析纯), 2mL 进样瓶, sunfire C18 柱, 3.5 μ , 2.1 \times 150mm。

3.1.1.4 抗菌粗提物

有效活性物质的粗提品 (提取方法见 3.1.2.1)。

3.1.2 研究方法

3.1.2.1 抗菌物质的粗提

已有的试验结果初步认为, 枯草芽孢杆菌 B-332 菌株产生的抗菌活性物质可能是蛋白质类物质, 因此, 对有效抗菌物质粗提方法的研究上, 本试验尝试了硫酸铵沉淀法、乙醇沉淀法及等电点法, 等电点法是相对效果最好的提取方法。

等电点法(P.I. Kim, 2004)具体操作如下: 将 B-332 菌株发酵液于 10000r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 去菌体, 得上清。测定上清液初始 pH, 用 HCl (1N) 缓慢将上清 pH 值调至 4.0, 静置 1h, 再于 10000r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 10min, 得到抗菌粗提物。

用氢氧化钠 (1N) 将抗菌粗提物溶解, 调至初始 pH 值, 即得到抗菌粗提物溶液。

3.1.1.2.2 抗菌粗提物的生物测定法

由于稻瘟病菌生长速度较慢, 采用生长速率测定法 (肖炎农, 2000) 检测有效抗菌物质的活性需要 4d 以上, 为了加快试验进程, 希望找到一种测量发酵液中有有效抗菌物质含量的方法, 代替直接采用稻瘟病菌的生长速率测定法。

(1) 筛选平行指示菌

将巨大芽孢杆菌 ACCC11084、普通变形杆菌、啤酒酵母菌、大肠杆菌、青枯假单胞杆菌和荧光假单胞杆菌的菌种在 PDA 固体斜面培养 3 天, 用 0.8% 生理盐水洗下, 配成 OD₆₂₀ 值为 0.33 的菌悬液, 保存于 4℃ 冰箱备用。采用管碟法, 在铺有 PDA 培养基的平板上分别倒入 1mL 备用菌液, 用玻璃刮产铺平, 放上牛津杯, 注入发酵液, 28℃ 培养 16h, 测定抑菌圈直径。

(2) 不同浓度的抗菌粗提物溶液对稻瘟病菌的抑制效果测定

采用双向培养测定法 (方中达, 1998), 将稻瘟病菌 91-17-2 在铺有 PDA 培养基的平板上培养 4d, 培养温度为 27℃, 菌落边缘打成半径为 4.6mm 的菌饼, 备用。将 15mL PDA 培养基倒入直径为 9cm 的培养皿中, 冷却后, 将菌饼接种于中央, 在距离中央 20mm 处打孔 (半径=4.6mm), 并将 5mg/mL、10mg/mL、20mg/mL、40mg/mL 和 80mg/mL 的抗菌粗提物注入孔中, 每个浓度重复 5 皿, 培养第 3d 测定抑菌带宽的平均值。

抑菌带宽 (mm) = 自然生长的稻瘟病菌饼半径 (mm) - 被抑制的稻瘟病菌菌饼半径 (mm)

3.1.1.2.3 紫外分光光度计法测定抗菌粗提物的含量

(1) 吸收波长的确定

用 1N 氢氧化钠将抗菌粗提物溶解, 并稀释成不同浓度备用, 让其在 200-400nm 波长范围内扫描, 观察有吸收峰的波长位置 (张秀丽等, 2006)。

(2) 标准曲线的建立

测定 5mg/mL、10 mg/mL、20 mg/mL、40 mg/mL 的抗菌粗提物溶液在 272.9nm 下的 OD 值, 并以抗菌粗提物溶液的浓度为横坐标、OD_{272.9nm} 值为纵坐标作二次线性回归方程。

(3) 测定发酵液中抗菌粗提物含量的方法

10000r/min 将发酵液离心 10min, 去沉淀, 测量剩余液体的体积, 用 HCl (1N) 将液体的 pH 值调至 4.0, 将该液体于 10000r/min 离心 10min, 去上清, 用 1N 氢氧化钠将沉淀回溶至原体积, 在 272.9nm 处测溶液吸收度, 参照标准曲线计算抗菌粗提物的含量。

3.1.1.2.4 生物法与紫外分光光度计法测定结果的相关性对比

将 3.1.1.2.2 (2) 与 3.1.1.2.3 的实验结果比较, 分析不同浓度抗菌粗提物的紫外吸光值与稻瘟病菌抑菌带宽的相关性。

3.1.1.2.5 分离抗菌组分及测定其荷质比 (m/z)

(1) 上样:

- a. 将抗菌粗提物用 NaOH 溶液 (1N) 稀释为 10mg/mL, 将其置于 1.5mL EP 管中;
- b. 打开气阀, 进样量约 3 ul ; 自动进样;

(2) 色谱条件:

流动相 A: 水 (0.5% 冰乙酸), 流动相 B: 乙腈 (0.5% 冰乙酸); 检测波长: 210-500nm; 流速 0.3 mL/min (表 3-1)。

表 3-1 高效液相色谱条件

Table3-1 The condition of the HPLC

时间 (min)	A : B	流速 (mL/min)
0	95: 5	0.3
2	95: 5	0.3
27	0:100	0.3
32	0:100	0.3
37	95: 5	0.3
40	95: 5	0.3

(3) 质谱条件:

锥电压条件: 35ev, 扫描分子量范围: 100-1400Da, 扫描时间: 0-40min, 0.7ms, 扫描间隔时间: 0.1ms

3.1.2.6 分离组分对稻瘟病菌的平板拮抗作用

收集半制备色谱中分离的各组分。测定抑菌带的方法同 3.1.2.2, 同一平板的孔中注入相同组分, 分别于培养第 3d、4d 测定抑菌带宽。

3.1.2.7 分离各组分对成熟菌丝体致畸作用的观察

在光学显微镜下观察各组分对稻瘟病菌 (4d) 成熟菌丝体的致畸作用, 并与前期研究得到的 B-332 对成熟菌丝体致畸作用图 (穆常青, 2006) 比较, 观察其相似性。

3.2 结果与分析

3.2.1 有效抗菌物质的生物测定方法

3.2.1.1 平行指示菌的筛选

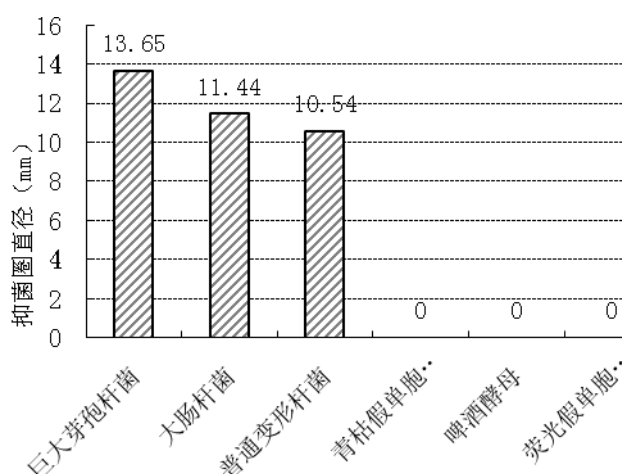


图 3-1 发酵液对不同细菌的抑制作用

Fig.3-1 The effect of antibiotic fermentation broth on the growth of test bacteria

由图 3-1, 发酵液对巨大芽孢杆菌的抑菌圈最大, 因此, 尝试采用巨大芽孢杆菌作为生物测

定的指示菌。

由图 3-2，抗菌粗提物溶液浓度的对数 (LgM) 与巨大芽孢杆菌的抑菌圈直径成线性关系，回归方程 $y=6.729x+2.442$ ， $R^2=0.889$ ，拟合程度不是很好；表 3-2 显示，抗菌粗提物溶液浓度为 5mg/mL、10mg/mL 时，其抑菌圈直径为 8.01mm，牛津杯的直径基本为 8.01mm，这说明低浓度的抗菌粗提物溶液对巨大芽孢杆菌没有抑制效果，即巨大芽孢杆菌对抗菌粗提物浓度的变化不是很灵敏，不宜作为替代稻瘟病菌的检测菌。

表 3-2 不同浓度的有效抗菌物质对巨大芽孢杆菌的抑菌效果

Table3-2 The result of the concentrations of antibiotic fermentation broth on the growth of *Bacillus megatherium*

有效抗菌物质的浓度 (mg/mL)	有效抗菌物质浓度的对数值 (LgM)	抑菌圈直径 (mm)
0	0	8.01
5	0.699	8.01
10	1.000	8.01
20	1.301	10.00
40	1.602	15.18
160	2.204	16.81

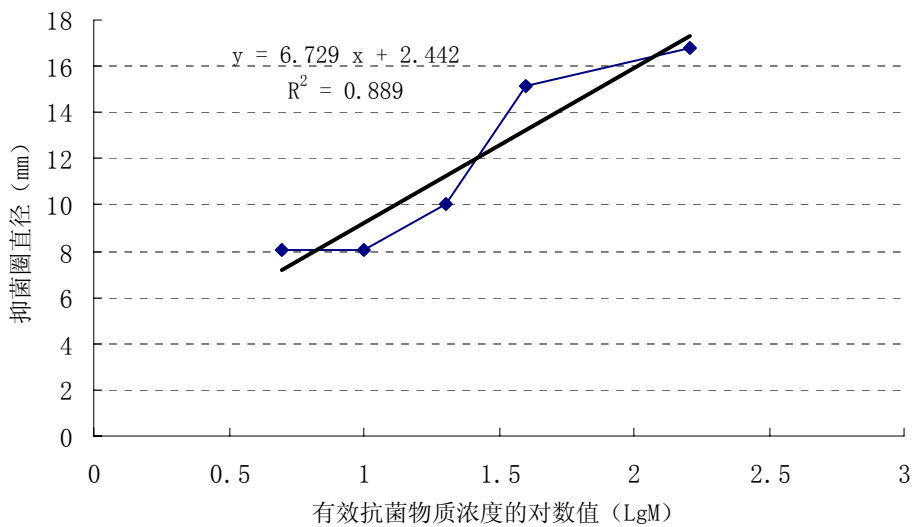


图 3-2 不同浓度抗菌物质对巨大芽孢杆菌作用

Fig.3-2 The effect of the concentrations of antibiotic fermentation broth on the growth of *Bacillus megatherium*

3.2.1.2 不同浓度的抗菌粗提物溶液对稻瘟病菌的抑制效果

如表 3-3，随着抗菌粗提物溶液浓度的增加，其对稻瘟病菌的抑菌带宽也在增大，图 3-3 显示，抑菌带宽 (mm) 与有效抗菌物质浓度的对数值 (LgM) 的 R^2 为 0.989。因此，可以认为抗菌粗提物溶液浓度的对数值与其对稻瘟病菌的菌带宽成正比例关系。

表 3-3 不同浓度的有效抗菌物质对稻瘟病菌的抑制作用

有效抗菌物质浓度 (mg/mL)	有效抗菌物浓度的对数值 (LgM)	抑菌带宽 (mm)
5	0.699	1.89
10	1.000	2.59
20	1.301	2.95
40	1.602	3.38
80	1.903	3.97

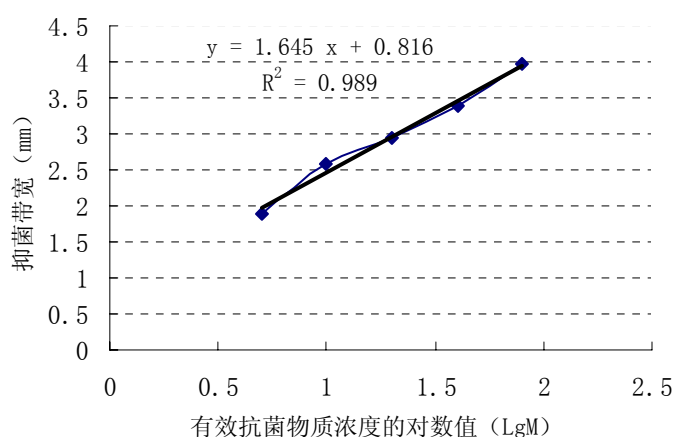


图 3-3 有效抗菌物的浓度与其抑菌效果的相关性

Fig.3-3 The relationship of concentration and antibiotic result by the effective antibiotic substance

3.2.2 有效抗菌物质的紫外分光光计测定法

由图 3-4, 不同浓度的抗菌粗提物溶液均在 272.9 nm 波长处有最大吸收峰, 由此, 选择 272.9nm 作为测定抗菌粗提物含量的吸收波长。

如图 3-5, 以溶液的浓度对 OD 值作线性回归关系, 得方程: $y = 0.06x + 0.153$, 其中 y 为溶液的吸收度, x 为溶液的浓度 (mg/mL), R^2 为 0.9994。由此, 1-50 mg/mL 范围内的抗菌粗提物溶液在与其 OD 值呈线性关系, 此标准曲线可以用来计算发酵液中抗菌粗提物的含量。

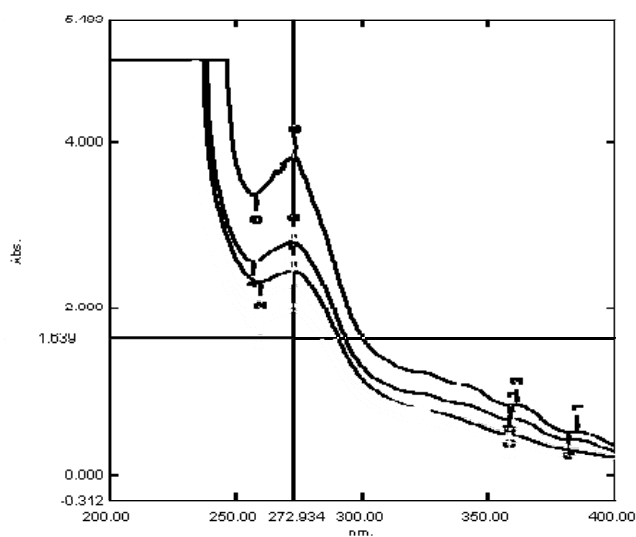


图 3-4 200-400nm 波长的紫外吸收峰

Fig.3-4 UV absorption peak between the wave length 200-400nm

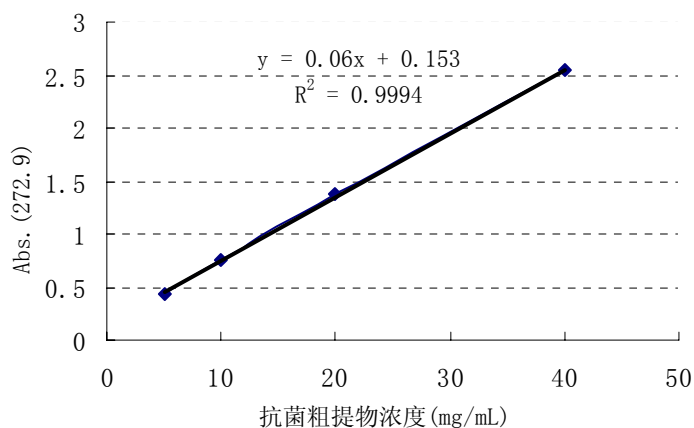


图 3-5 抗菌粗提物浓度与 OD 值 (272.9nm) 间的相关性

Fig. 3-5 The relationship of concentration and Abs.(272.9) by the effective antibiotic substance

3.2.3 生物法与紫外分光光度计法测定结果的相关性对比

如图 3-6, 显示了抗菌粗提物浓度 (mg/mL) 与其在 272.9nm 下的吸光值及抑菌带宽 (mm) 的相关性关系。两条线性关系直线不平行, 由此, 抗菌粗提物溶液的 OD 值越大, 其对稻瘟病菌的抑制效果也越强, 但 OD 值不能准确的证明该溶液对稻瘟病菌的抑制效果, 如果需要得到某个浓度抗菌粗提物对稻瘟病菌的精确抑制效果, 最好采用生长速率法验证。

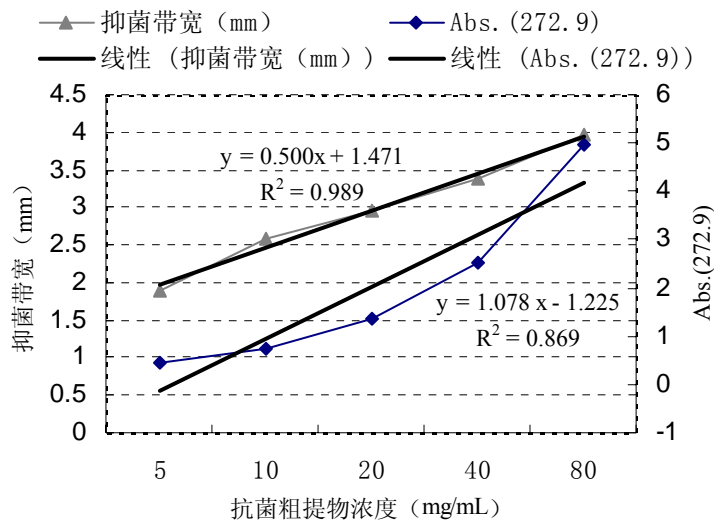


图 3-6 有效抗菌物质浓度与稻瘟病菌抑制带宽 (mm) 及吸光值 (272.9nm) 相关性分析

Fig.3-6 The relationship between the inhibition zone to *Magnaporthe grisea* and Abs.(272.9) and concentration of the effective antibiotic substances

3.2.4 有效抗菌物质的分离结果及分子量测定

由图 3-7，用高效液相色谱分离抗菌粗提物，得到 5 个组分，分别在分离的第 16.40min, 17.12min, 18.20min, 25.98min, 27.44min 时得到。

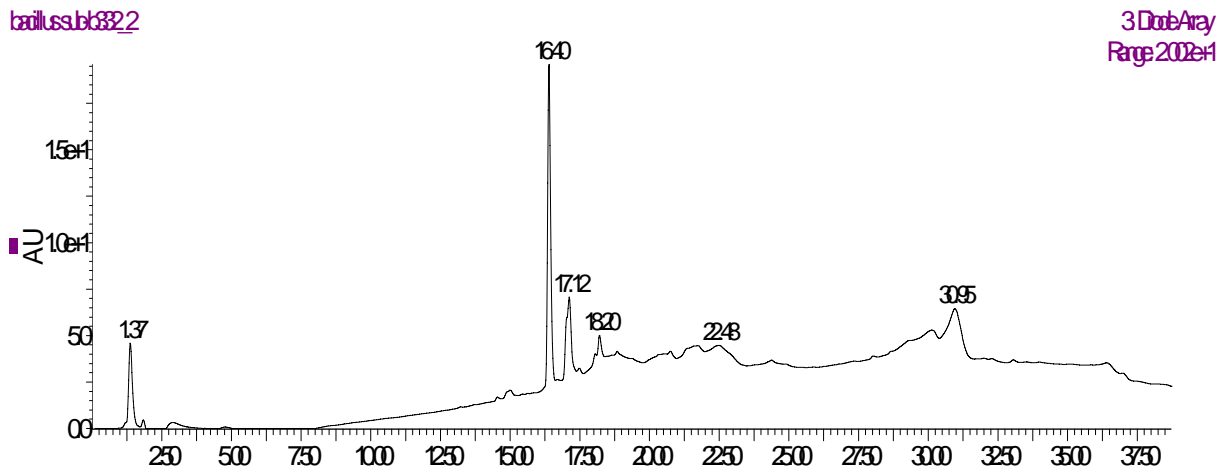


图 3-7 有效抗菌物质的分析色谱图

Fig.3-7 Analytical GC graph of the effective antimicrobial substance

利用质谱分析，测得 5 个组分的荷质比 (m/z) 分别为 1017.5、1031.1、1045.0、1057.8、1072.3 (图见附录)。

由表 3-4，经检索，5 个组分中，推测荷质比 (m/z) 为 1057.8 的物质可能是 Bacillomycin D (50%-iso-C16)或 Bacillomycin D (50%-n-C16); 荷质比 (m/z) 为 1072.3 的物质可能是 Bacillomycin

D (ante-iso-C17); 荷质比 (m/z) 为 1045.0 的物质可能是 Bacillomycin D (iso-C15); 荷质比 (m/z) 为 1031.1 的物质可能是 Bacillomycin D (n-C14)。

表 3-4 各组分可能对应的物质

Table3-4 The resbondant substances of the separation components

样品 标号	分离时间 (min)	荷质比 (m/z)	名称	种属	作用
A	17.12	1057.8	Bacillomycin D (50%-iso-C16)	<i>Bacillus</i>	抗真菌
			Bacillomycin D (50%-n-C16)	<i>Bacillus</i>	抗真菌
B	18.20	1072.3	Bacillomycin D (ante-iso-C17)	<i>Bacillus</i>	抗真菌
C	16.40	1045.0	Bacillomycin D (iso-C15)	<i>Bacillus</i>	抗真菌
D	27.44	1031.1	Bacillomycin D (n-C14)	<i>Bacillus</i>	抗真菌
E	25.98	1017.5	未查到	未查到	未查到

从 KFLGG 库中检索到 Bacillomycin D 的结构图 (图 3-8) (http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?compound+C12267, COMPOUND: C12267), Bacillomycin D (杆菌霉素 D) 的分子式是 $C_{37}H_{51}N_{10}O_{15}R$, 是一类小分子环脂肽类物质, 由枯草芽孢杆菌的非核糖体合成途径产生, 具有 7 个氨基酸和 1 个 β -氨基脂肪酸。已经明确它有很好的抗真菌作用。可作为一类潜在的抗真菌制剂。

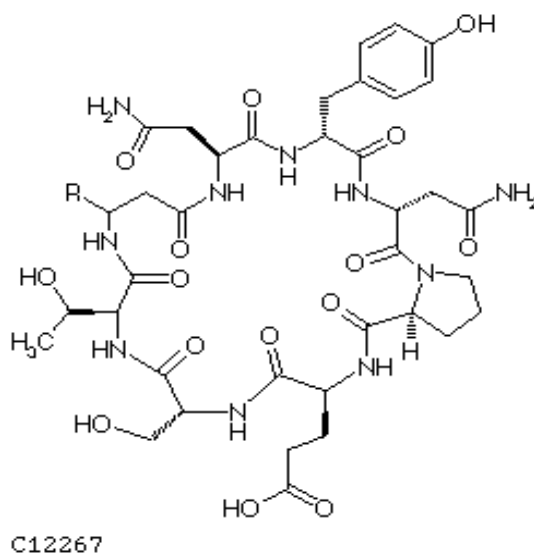


图 3-8 Bacillomycin D 的结构图

Fig.3-8 Structure of Bacillomycin D

3.2.5 分离的各组分对稻瘟病菌的拮抗效果

测定拮抗活性时 (图 3-9), 平板上标记的是半制备色谱的出峰时间, 由于半制备色谱的出峰时间比分析色谱早 2min, 所以半制备色谱的出峰时间 14.50 min、15.25 min、16.38 min、23 min、25 min 分别与分离时间 16.40min、17.12min、18.20min、25.98min、27.44min 相对应。

表 3-5 显示了各组分对稻瘟病菌的拮抗效果。比较抑菌带宽，C、A 两种组分对稻瘟病菌的抑制效果最显著；培养第 3 天，C、A 的抑菌带宽比 B、E、D 的抑菌带宽大 40%以上；表 3-5 可见，第 4 天与第 3 天相比，5 个组分的抑菌带宽增长量都小于 0.1mm，可见，5 个组分还发挥抑菌效果，但对稻瘟病菌基本达到最大抑菌效果。

表 3-5 分离各组分对稻瘟病菌的抑制效果

Table3-5 control effect of the separation components against the Rice Blast						
样品 标号	分子量 (Da)	分离时间 (min)	半制备时间 (min)	抑菌带宽 (mm)		抑菌带宽差值 (mm)
				3d	4d	
C	1045.0	16.40	14.50	0.297	0.317	0.020
A	1057.8	17.12	15.25	0.159	0.237	0.078
B	1072.3	18.20	16.38	0.094	0.135	0.041
E	1017.5	25.98	23.00	0.096	0.159	0.063
D	1031.1	27.44	25.00	0.038	0.120	0.082

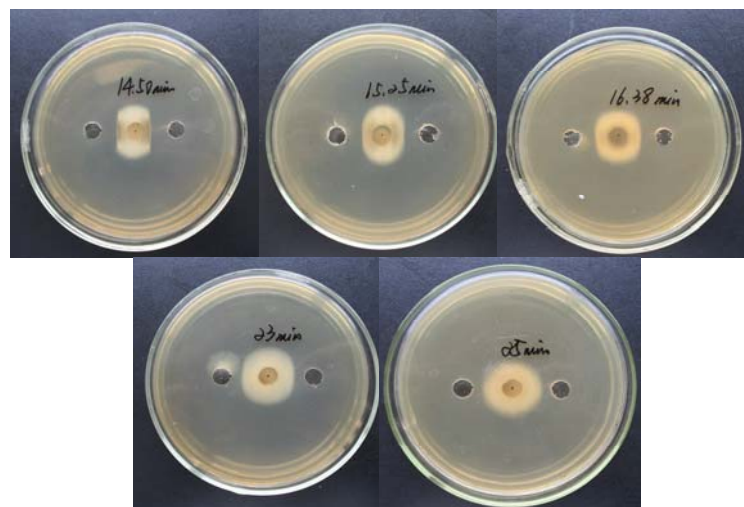


图 3-9 各组分对稻瘟病菌的拮抗效果图（培养第 3 天）

Fig.3-9 Resistant effect of the separation components against the Rice Blast (3d)

3.2.6 分离的组分对菌丝体的致畸作用

结果表明，对稻瘟病菌抑制效果最强烈的 C、A、B 组分可以是成熟的菌丝体产生球畸形（图 3-10），畸形逐渐膨大，细胞质溢出，菌丝体崩溃。与 B-332 菌株对成熟菌丝体的致畸作用结果相同（图 3-11），这个结果为该菌株分泌的 C、A、B 组分是 B-332 菌株产生对稻瘟病菌有抑制作用的主要原因提供了依据。

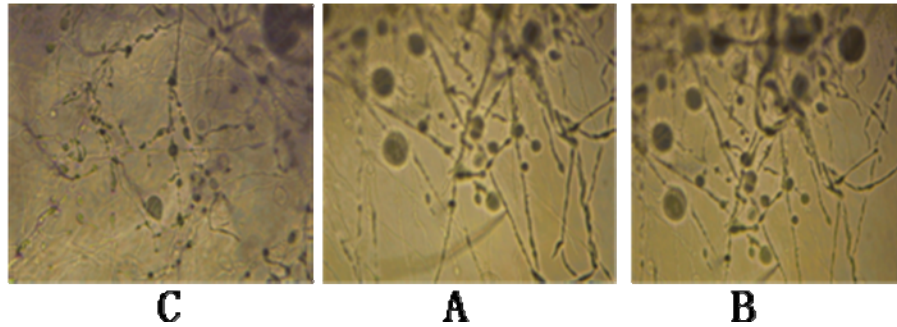


图 3-10 C、A、B 组分对成熟菌丝体的致畸作用图

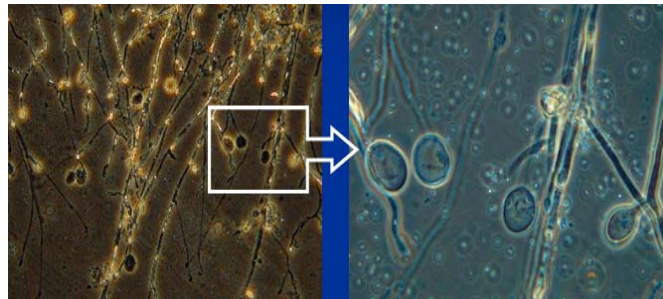
Fig.3-10 The deformed effect of *Magnaporthe grisea* by the separation components of C、A、B

图 3-11 B-332 菌株对成熟菌丝体的致畸作用图

Fig.3-11 The deformed effect of *Magnaporthe grisea* by B-332

3.3 小结

本章确定采用等电点沉淀法粗提取 B-332 菌株发酵液中的抗菌物质,该方法比硫酸铵沉淀法、乙醇沉淀法操作简单、损失小。

选择紫外分光光度计法测定发酵液中该物质的含量,以抗菌粗提物溶液的浓度对吸收度作线性回归,得方程: $y = 0.153 + 0.06x$, 其中 y 为抗菌粗提物溶液的吸收度 ($OD_{272.9}$), x 为溶液的浓度 (mg/mL), R^2 为 0.9994, 结果表明, 1-50 mg/mL 范围内的抗菌粗提物与溶液的吸收度成线性关系。抗菌粗提物的吸收度 ($OD_{272.9}$) 对稻瘟病菌的抑菌带宽(mm)的线性关系的回归方程为 $y = 1.08x - 1.227$, $R^2 = 0.871$, 拟合程度不是很好; 由以上结果可知, 紫外分光光度计法可以作为测定发酵液中抗菌粗提物含量的方法, 它对稻瘟病菌的抑菌效果与吸光度有一定的正比例关系, 但紫外分光光度计法不能作为判定不同浓度的抗菌粗提物对稻瘟病菌抑制效果的唯一指标, 最好采用生物法直接测定。

高效液相色谱-质谱联用仪分离纯化抗菌粗提物, 得到 5 个组分, 按照出峰时间顺序, 它们的荷质比 (m/z) 分别为 1045.0、1057.8、1072.3、1017.5 和 1031.1, 预测 4 个组分的结构 (荷质比 (m/z) 为 1017.5 的除外), 依次为 Bacillomycin D (iso-C15)、Bacillomycin D (50%-iso-C16) 或 Bacillomycin D (50%-n-C16)、Bacillomycin D (ante-iso-C17) 及 Bacillomycin D (n-C14), 它们结构间的区别在于相差 1 个或几个 $-CH_2-$ 基团; 各组分均对稻瘟病菌有抑制作用, 荷质比 (m/z) 为 1045.0、1057.8、1072.3 组分的抑制效果最强, 并且这 3 种组分对稻瘟病菌成熟菌丝体的致畸作

用与 B-332 菌株的致畸作用相同，都是使稻瘟病菌菌丝体膨大、溶胀、破裂，这个结果更加证实了该菌株分泌的荷质比 (m/z) 为 1045.0、1057.8、1072.3 组分是 B-332 菌株产生对稻瘟病菌有抑制作用的主要原因。

第四章 全文结论

稻瘟病广泛分布在世界水稻主产区, 由于其传播广、潜伏期长, 造成水稻产量大量降低, 抗病品种选育和化学农药施用是最主要的防治方法, 化学农药的大量施用造成环境污染和生态平衡的破坏, 威胁人类自身生命健康。生物防治方法具有无污染、不使昆虫产生抗药性等特点, 将成为稻瘟病防治方法的一个有价值的研究方向。

研究室以往的研究表明, 枯草芽孢杆菌 B-332 菌株是一株对水稻稻瘟病有良好防效的菌株, 本文探索了 B-332 菌株的摇瓶发酵工艺, 分离纯化了该菌株分泌的抗菌物质, 推测了各组分的结构, 主要得到了以下结论:

4.1 结论

(1) 确定了提取枯草芽孢杆菌 B-332 菌株分泌的抗菌物质的方法, 明确了抗菌组分的荷质比 (m/z), 预测了各组分的结构

采用等电点法 (pH4) 可以将抗菌粗提物从发酵液中沉淀出来; 高效液相色谱-质谱联用仪分离抗菌粗提物, 得到 5 个活性组分, 它们可能是不同结构的 Bacillomycin D (杆菌霉素 D), 依照分离出峰的时间顺序, 个组分的荷质比 (m/z) 分别为 1045.0、1057.8、1072.3、1017.5 和 1031.1, 对稻瘟病菌的抑制效果也依次降低; 除了分离量为 1017Da 的物质外, 预测 4 个组分的结构 (荷质比 (m/z) 为 1017.5 的除外), 依次为 Bacillomycin D (iso-C15)、Bacillomycin D (50%-iso-C16) 或 Bacillomycin D (50%-n-C16)、Bacillomycin D (ante-iso-C17) 及 Bacillomycin D (n-C14), 它们结构间的区别在于相差 1 个或几个 $-CH_2-$ 基团, Bacillomycin D 是已知的抗真菌脂肽, 这也验证了 B-332 菌株对真菌病害--稻瘟病菌有抑制作用的原因, 使我们对该菌株有了更加透彻的了解。

(2) 确定采用紫外分光光度计法测定 B-332 菌株发酵液中抗菌粗提物的含量

该物质在紫外光 272.9nm 处有最大吸收峰, 并确定采用紫外分光光度计法测定 B-332 菌株发酵液中抗菌粗提物的含量。即以抗菌粗提物溶液的浓度对吸收度作二次线性回归, 得方程: $y = 0.153 + 0.06x$, 其中 y 为抗菌粗提物溶液的吸收度 ($OD_{272.9}$), x 为该溶液的浓度 (mg/mL), R^2 为 0.9994。抗菌粗提物的吸收度 ($OD_{272.9}$) 对稻瘟病菌的抑菌带宽(mm)的线性回归方程为 $y=1.08x-1.227$, $R^2=0.871$, 拟合程度不是很好, 因此, 将分光光度计法作为衡量发酵液中抗菌粗提物含量的方法, 将生物测定法作为测定不同浓度抗菌粗提物的抑菌效果的最准确方法。

(3) 对几种芽孢计数法和几种活菌计数法进行了比较

比较加热除菌法、结晶紫染色法、芽孢染色法, 确定将结晶紫染色法作为统计发酵液中芽孢数的最佳方法; 比较平板涂布法和平板倾注法两种活菌计数法的误差情况, 确定本试验采用平板倾注法测定发酵液中的活菌总数。发酵液中的芽孢数的测定采用结晶紫染色法和平板倾注法相结合的方法。

(3) 初步明确了枯草芽孢杆菌 B-332 菌株摇瓶发酵的最佳培养基和最适发酵条件

绘制了肉汤培养基中该菌株的生长曲线, 对其生长繁殖规律有了一定的了解, 6-12h 是菌体生长的对数期、12-24h 是菌体生长的平稳期, 之后菌体数量逐渐减少, 进入衰亡期。筛选出摇瓶发酵的初始培养基, 并确定种龄为 18h, 接种量为 10%; 正交优化培养基的成分, 优化后培养基

的主要成分为豆饼粉 6.0%、蔗糖 2.5%、硫酸铵 0.7%、柠檬酸三钠 0.3%等，正交优化后的发酵条件为温度 30℃、摇床转速 180r/min、摇瓶装量 80mL/500mL，发酵 72h。以上综合发酵条件的芽孢数量为 1.43×10^{11} cfu/mL，比初始培养基及条件的芽孢数量提高了 34.48 倍。

4.2 讨论

(1) 产品质量标准的测定方面

生物农药产品大多是活菌制剂，保持产品中活菌数量的稳定是保证产品质量稳定性的关键。芽孢具有耐高温、存活时间长等特点，产品制剂较稳定、易储藏，本试验将芽孢数量作为评价该产品质量的主要指标，把抗菌粗提物的含量作为辅助指标，并确定了评价产品中芽孢含量和抗菌粗提物含量的测定方法。

将结晶紫染色法作为测定产品中芽孢含量的标准方法，该方法具有操作简便、误差小等优点，可以加快产品检测速度、降低产品质量评价误差，对工厂生产具有指导意义；将紫外分光光度计法作为测定产品中的抗菌粗提物含量的标准方法，该方法比生物测定法更快速、简便、用时短，是产品质量控制方面的快速辅助监测方法。

(2) 抗菌粗提物的提取方面

工厂生产中，快速、简便和低成本的获取发酵过程中的有效物质，是每个企业和研究人员追求的方向。本试验采用等电点沉淀法可以将有效抗菌物质从发酵液中快速提取出来，几乎没有损失，并且使用的仪器、试剂廉价易得，操作方法简便，这种简易的提取工艺为今后工厂生产获取有效抗菌物质打下了基础。

(3) 发酵工艺的优化方面

用最少的试验次数获得可靠的结果，就需要合理安排试验并正确分析试验结果，正交表具有搭配均衡的特点，能在所考察的范围内，通过所选出的代表性强的少数次试验，找到最优或较优的工艺方案。本试验采用正交的实验方法，优化了 B-332 菌株摇瓶发酵的最佳培养基和最适条件，芽孢数 1.43×10^{11} cfu/mL，比初始综合发酵条件的芽孢总数 4.03×10^9 cfu/mL 提高了 34.48 倍。

下一步将用自动发酵罐进行验证发酵，以获得更多、更详尽的优化参数，还可以把发酵芽孢数进一步提高，为生产放大做好铺垫。

(4) 产品制剂对应用的影响方面

已有试验结果表明芽孢和该菌株产生的抗菌物质混合施用，对稻瘟病的田间防效有加和作用，将该菌株的发酵液制成可湿性粉剂即可以保留芽孢又含有抗菌产物，相对于单独施用芽孢或者抗菌产物的产品，可湿性粉剂的产品剂型可以提高产品对稻瘟病的防治效果。本试验已经进行了可湿性粉剂方面的工作，由于时间关系，还没有取得明显结果，建议今后对该方面的工作进行进一步的研究和完善。

参考文献

1. 柴逸峰, 吴玉田, 李翔. 药物分析 II. 分析实验室, 2004, 23 (7): 72~75.
2. 陈志谊, 刘永锋, 陆凡. 水稻纹枯病生防菌Bs~916产业化生产关键技术. 植物保护学报, 2004, 31 (3): 230~233.
3. 程洪斌, 刘晓桥, 陈红漫. 枯草芽孢杆菌防治植物真菌病害研究进展. 上海农业学报, 2006, 22 (1): 109~112.
4. 仇丽. 渔业现代化, 2002 (4): 26.
5. 崔福绵, 石家骥, 鲁茁壮. 枯草芽孢杆菌中性 β -甘露聚糖酶的产生及性质. 微生物学报, 1999, 39 (1): 60~63.
6. 范继英, 何月秋. 枯草芽孢杆菌植酸酶的研究进展. 云南农业大学学报, 2006, 21 (6): 715~719.
7. 方中达. 植病研究方法. 北京: 中国农业出版社, 1987.
8. 高学文, 姚仕义, Huong Pham 等. 枯草芽孢杆菌B2 菌株产生的抑菌活性物质分析. 中国生物防治, 2003, 19(4): 175~179.
9. 顾真荣, 马承铸, 韩长安. 产几丁质酶芽孢杆菌的筛选鉴定和酶活力测定. 上海农业学报, 2001, 17 (3): 92~96.
10. 顾真荣, 马承铸, 徐华. 枯草芽孢杆菌 G3 菌剂防治番茄叶霉病田间试验. 中国生物防治, 2003, 19 (4): 206~2071.
11. 顾真荣, 魏春妹, 马承铸. 枯草芽孢杆菌 G3 菌株抑制立枯丝核菌菌核形成的影响因子分析. 中国生物防治, 2005, 21 (1): 33~36.
12. 何红, 蔡学清, 关雄等. 内生菌 BS~2 菌株的抗菌蛋白及其防病作用. 植物病理学报, 2003, 33(4): 373~378.
13. 何青芳, 陈卫良, 马志超. 枯草芽孢杆菌 A30 菌株产生的拮抗肽的分离纯化与理化性质研究. 中国水稻科学, 2002, 16(4): 361~365.
14. 何玉仙. 不同寄主分离的稻瘟病菌腊梅及可溶性蛋白质图谱研究. 西南农业学报, 1995, 8(3): 70~73.
15. 何月秋, 唐文华. 水稻稻瘟病菌研究进展 (一) 水稻稻瘟病菌多样性及其变异机制. 云南农业大学学报, 2001, 16 (1) 60~63.
16. 何月秋, 唐文华. 水稻稻瘟病菌研究进展. 云南农业大学学报, 2001, 16 (3): 60~64.
17. 贺荣. 血小板计数误差产生原因分析. 江西医学检验, 2002, 20 (1): 46~47.
18. 胡剑, 林心怡, 张九一等. 拮抗菌BS-98分泌抗菌蛋白的条件及其发酵液特性. 微生物学通报, 1996, 23 (6): 323~326.
19. 李成云. 稻瘟病菌的研究进展. 西南农业学报, 1995, 8 (3): 107~112.
20. 李林珂, 高玉千, 崔锦等. 一株蛋白酶产生菌的筛选及酶学性质的研究. 河南农业科学, 2006, 3: 50~52.
21. 林东, 徐庆, 刘忆舟等. 枯草芽孢杆菌 SO113 分泌蛋白的抑菌作用及抗菌蛋白的分离纯化. 农

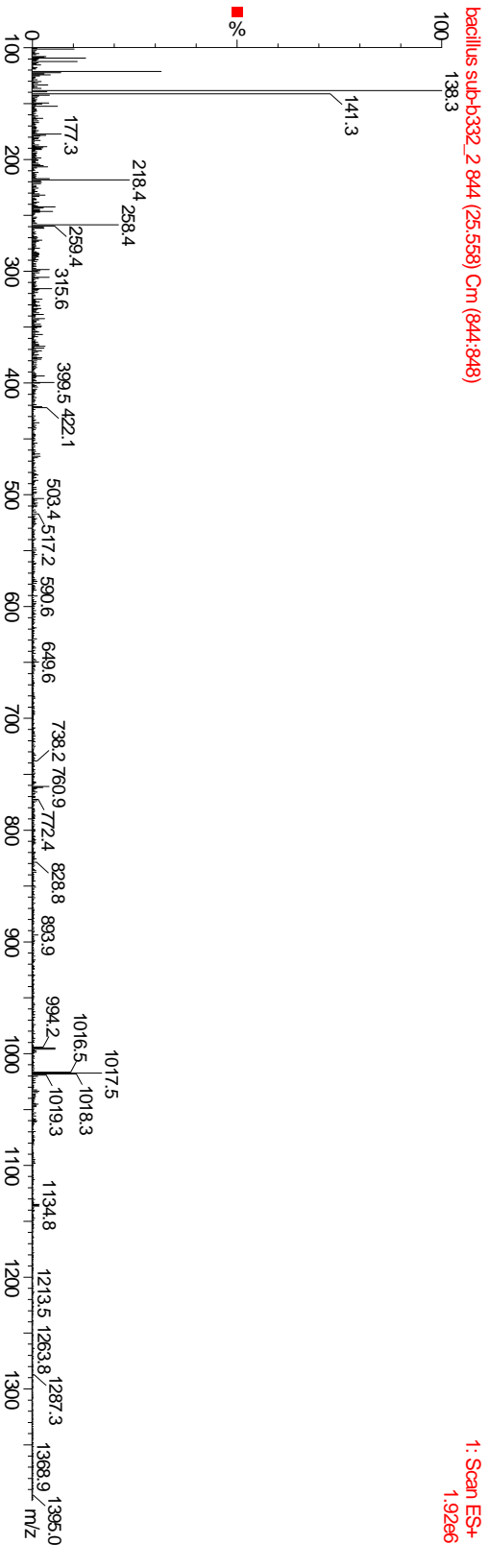
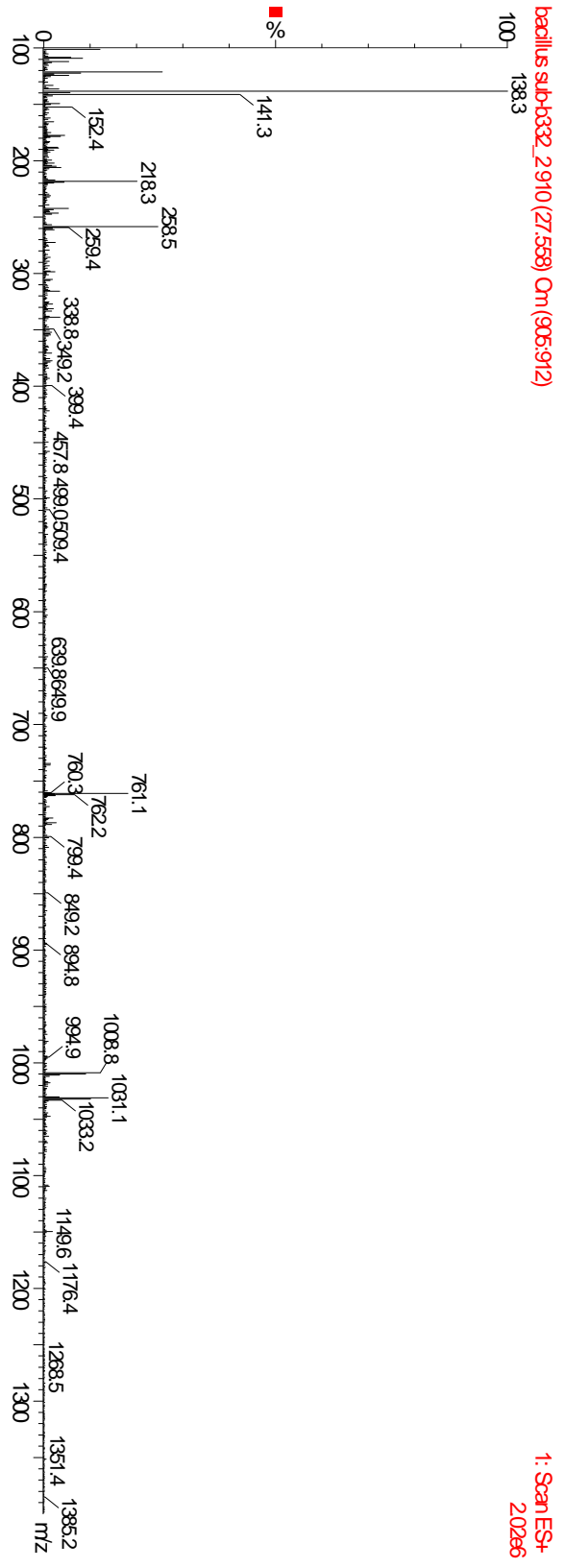
- 业生物技术学报, 2001, 9 (1): 77~80.
22. 林福呈, 李德葆. 稻瘟病菌分生孢子发芽和附着胞形成的影响因素研究. 中国水稻学, 2001, 15 (4) : 291~297.
 23. 林福呈, 李德葆. 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)S9 对植物病原真菌的溶菌作用. 植物病理学报, 2003, 33 (2): 174~177.
 24. 刘焕利, 张学君, 潘小玫等. 抗菌蛋白产生菌株的筛选. 南京农业大学学报, 1994, 17(增刊): 76~78.
 25. 刘静, 王军, 姚建铭等. 枯草芽孢杆菌 JA 抗菌物特性的研究及抗菌肽的分离纯化. 微生物学报, 2004, 44 (4) : 511~514.
 26. 刘俊利. 食用微生物油脂. 粮油仓储科技通讯, 2004 (1) : 50~51.
 27. 刘伊强, 王雅平等. 拮抗菌 TG26 的鉴定及其抗菌蛋白 BI 的纯化和部分特性. 植物学报, 1994, 36 (3) : 197~203.
 28. 刘永峰, 陈志谊, 张杰. 枯草芽孢杆菌 B-916 胞外抗菌蛋白质的性质. 江苏农业学报, 2005, 21 (4) : 288~293.
 29. 刘振宇, 柳韶华, 赵春青等. 枯草芽孢杆菌对桑炭疽病的抑制作用. 农业科学, 2005, 31 (4) : 409~412.
 30. 鲁润铭, 李万军, 董占双等. 枯草杆菌 B_224 菌培养物体外抑菌效果观察. 中国微生态学杂志, 1991, 3 (4) : 20.
 31. 陆凡, 郑小波, 陈志谊等. 江苏省稻瘟病菌小种的结构组成与变化趋势. 南京农业大学学报, 2002, 25 (1) : 39~42.
 32. 穆常青. 枯草芽孢杆菌 B-332 菌株及其抗菌物质对稻瘟病的生防作用研究 [硕士学位论文]. 北京: 中国农业科学院, 2006.
 33. 农业部国家统计局农村社会经济调查司. 中国农村统计年鉴, 北京: 中国统计出版社, 2006.
 34. 齐涵, 王淑芬, 邸文学等. 枯草杆菌 BS224 菌在防治III°烧伤创面感染中痂下组织细菌数量的动态观察. 中国微生态学杂志, 1997, 9 (3) : 20~22.
 35. 齐涵, 王淑芬, 任秋生等. 枯草芽孢杆菌 BS-224 菌活菌制剂(白天鹅气雾剂)治疗烧伤创面的环境细菌学监测. 中国微生态学杂志, 1998, 10 (3) : 174~176.
 36. 邵维忠. 农药助剂. 北京: 化学工业出版社, 2003: 135~184.
 37. 田口義広(Taguchi,Y. *et al.*) . Biological control of rice blast disease by *Bacillus subtilis* IK-1080. Japanese Journal of Phytopathology, 2003, 69(2):85~93.
 38. 田口義広(Taguchi,Y. *et al.*) . Method for adhering *Bacillus subtilis* IK-1080 to bumblebees and control of gray mold disease of tomato. Japanese Journal of Phytopathology, 2003,69(2):94~101.
 39. 童有仁, 马志超, 陈卫良等. 枯草芽孢杆菌B034拮抗蛋白的分离纯化及特性分析. 微生物学报, 1999, 39 (4) : 339~342.
 40. 王国珍, 茹庆华, 李华等. 稻瘟病菌致病性变异的初步研究. 宁夏农林科技, 1998 (6) : 5~8.
 41. 王久林, 凌忠专. 稻瘟病菌致病性变异及稳定菌系的筛选. 北京农学院学报, 1993, 8 (1) : 85~89.

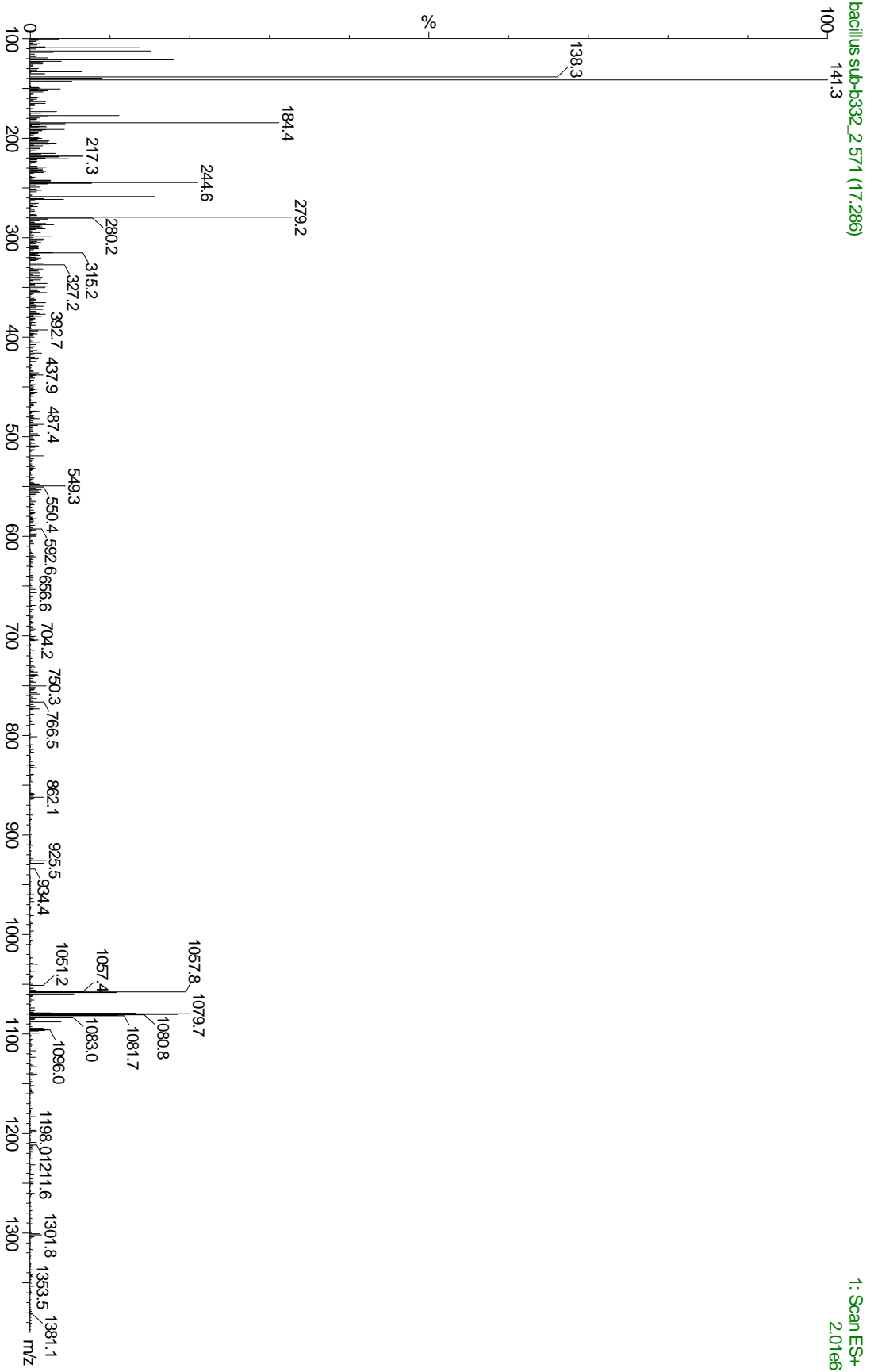
42. 邬行彦, 熊宗贵, 胡章助. 抗生素生产工艺学, 1977,55
43. 肖炎农, 程瑜, 王明祖等. 假单胞杆菌 B301 对稻瘟病的拮抗性. 植物保护学报, 2000, 27 (3): 227~230.
44. 谢海平, 黄晖, 黄登峰等. 海洋枯草芽孢杆菌Bs-1产生多种抗真菌活性物质. 中山大学学报(自然科学版), 2003, 42 (3) : 122~123.
45. 阳葵, 王福东, 段世铎等. 形态解析法用于菌体生长. 化工学报, 1999, 50 (4) : 573~575.
46. 叶华智, 余桂容, 严吉明等. 小麦赤霉病的生物防治研究III—拮抗芽孢杆菌B4、B6菌株的防病机制. 四川农业大学学报, 2003, 21 (1) : 18~21.
47. 尹清强, 韩彪, 郑秋红等. 枯草杆菌的淀粉酶基因在大肠杆菌中的表达. 畜牧与兽, 2005, 37 (6) : 7.
48. 袁小平, 王静, 姚惠源. 枯草芽孢杆菌内切木聚糖酶的纯化与性质研. 食品与发酵工业, 2004, 30 (8) : 55~59.
49. 张秀丽, 王欣颖, 史兰香. 紫外分光光度法测定7-氨基乙酰氧基头孢烷酸的含量. 化学工程师, 2006, (7): 19~20.
50. 周德庆. 微生物学教程. 北京: 高等教育出版社, 1993.
51. 周建明, 朱群, 白永延. 稻瘟病菌侵染水稻的机理. 植物生理学通讯, 1999, 35 (1) : 49~53.
52. 周维佳, 曾令祥, 代继跃等. 稻瘟病菌致病力的研究. 贵州农业科学, 1990 (1) : 21~24.
53. 朱献丰. 水稻稻瘟病菌研究进展. 江西农业科学, 2002, 14 (3) : 51~55.
54. Arima K, Kakinuma A, Tamura G . Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation , characterization and its inhibition of fibrin clot formation. Biochem Biophys Res Commun 1968, 31: 488~494.
55. Asano Y, Akaishi E, Tajima K, *et al.* . Establishment of monoclonal antibodies that discriminate *Bacillus subtilis* DB90. Biosci Biotechnol Biochem 2000, 64: 652~656.
56. Baker B *et al.* , Signaling in plant-microbe interactions. Science 1997, 276: 726~733.
57. Baker B,P Zambryski,B Staskawicz, *et al.* . Signaling in Plant-Microbe Interactions. Science 1997, 276: 726~733.
58. Banerjee A B, Bose S K . Amino-acid configuration of mycobacillin. Nature 1963, 200: 471.
59. Besson F, Michel G, Isolation and characterization of new iturins: iturin D and iturin E. Journal of Antibiotics 1987, 40:437~442.
60. Bonman J M, Vergel De Dios T I, Bandong J M, *et al.* . Pathogenic variability of monoconidial isolates of *Pyricularia oryzae* in Korea and in the Philippines. Plant Disease 1987,71:127~130.
61. Danny Hooge . Bacillus spores may enhance broiler performance. Feedstuf 2003, 28~31.
62. Dean RA, Talbot NJ, Ebbolle DJ, *et al.* . The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Nature,2005,434(21):980~986.
63. Foldes T, Banhegyi I, Herpai Z, *et al.* . Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and in vitro screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne pathogenic and spoilage micro-organisms. Journal of Applied Microbiology 2000, 89(5): 840~846.

64. Howard RJ, In:Zeigler RS,Leong S, Teng PS(edu). . Rice Blast Disease, Cell biology of pathogenesis., 1994:3~22.
65. <http://www.21food.cn/alibaba/spsc/showShouce.jsp?id=5610>.
66. http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet_129068.htm.
67. <http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides>.
68. http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet_006480.htm.
69. http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/product/prod_006479.htm.
70. http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?compound+C12267.
71. Iwand M, Lee J L, Kong P . Distribution of Pathogenic races and changes in virulence of rice blast fungus, *Pyricularis oryzae* Cav in Yunnan Province China 1990, 23:241~248.
72. Johnson F H, Campbell D H . The retardation of protein denaturation by hydrostatic pressure. *Journal of Cell Comp Physiol* 1945, 26:43~46.
73. Kakinuma A, Sugino K, Isono M, *et al.* . Determination of fatty acid in surfactin and elucidation of the total structure of surfactin. *Agric Biol Chem* 1969, 33: 973~976.
74. Krebs B, Ockhardt A, Hoeding B, *et al.* . Cyclic peptides from *Bacillus amylolique faciens* useful antimycotics, antivirals, fungicides, nematocides etc 1996. DE19641213.
75. Krishnamurthy K., Gnanamanickam S.S. . Biological control of Rice blast by *Pseudomonas fluorescens* Strain Pf7-14 Evaluation of a Marker Gene and Formulations. *Biological Control* 1998(13):158~165.
76. Lan H Y, Tian YC, Wang CH, *et al.* . Studies of transgenic tobacco plants expressing beta-1, 3-glucanase and chitinase genes and their potential for fungal resistance. *Yi Chuan Xue Bao*, 2000, 27: 70~77.
77. LUMSDEN R D, LEWIS J A, FRAVEL D R . Formulation and Delivery of Biocontrol Agents for Use against Soilborne Plant Pathogens//HALL F R, BARRY J W, eds. *Biorational Pest Control Agents*. WASHINGTON D C: American Chemical Society, 1995: 166~182.
78. Marcus Schallmey, Ajay Singh, Owenward . Developments in the Use of *Bacillus* Species for Industrial Production. *Canadian Journal of Microbiology*, 2004, 50(1): 1~17.
79. Martin J. Gilbert, Christopher R., Thornton, Gavin E., Wakley and Nicholas J. Talbot . A P-type ATPase required for rice blast disease and induction of host resistance. *Nature* 2006 440: 535~539.
80. Mitchell, T.K., M.R, Thon, J.S. Jeong, D. Brown, J. Deng, and R.A. Dean . The rice blast pathosystem as a case study for the development of new tools and raw materials for genome analysis of fungal plant pathogens. *New Phytologist* 2003, 159:53~61.
81. OU S H . Rice Diseases. Commonwealth Mycological Institute 1985.
82. Ou S.H . Rice Diseases. CAB International 1985.
83. P.I. Kim, H. Bai, D. Bai, H. Chae, S. Chung, Y. Kim, R . Park and Y.T. Chi. Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, 97:942~949.

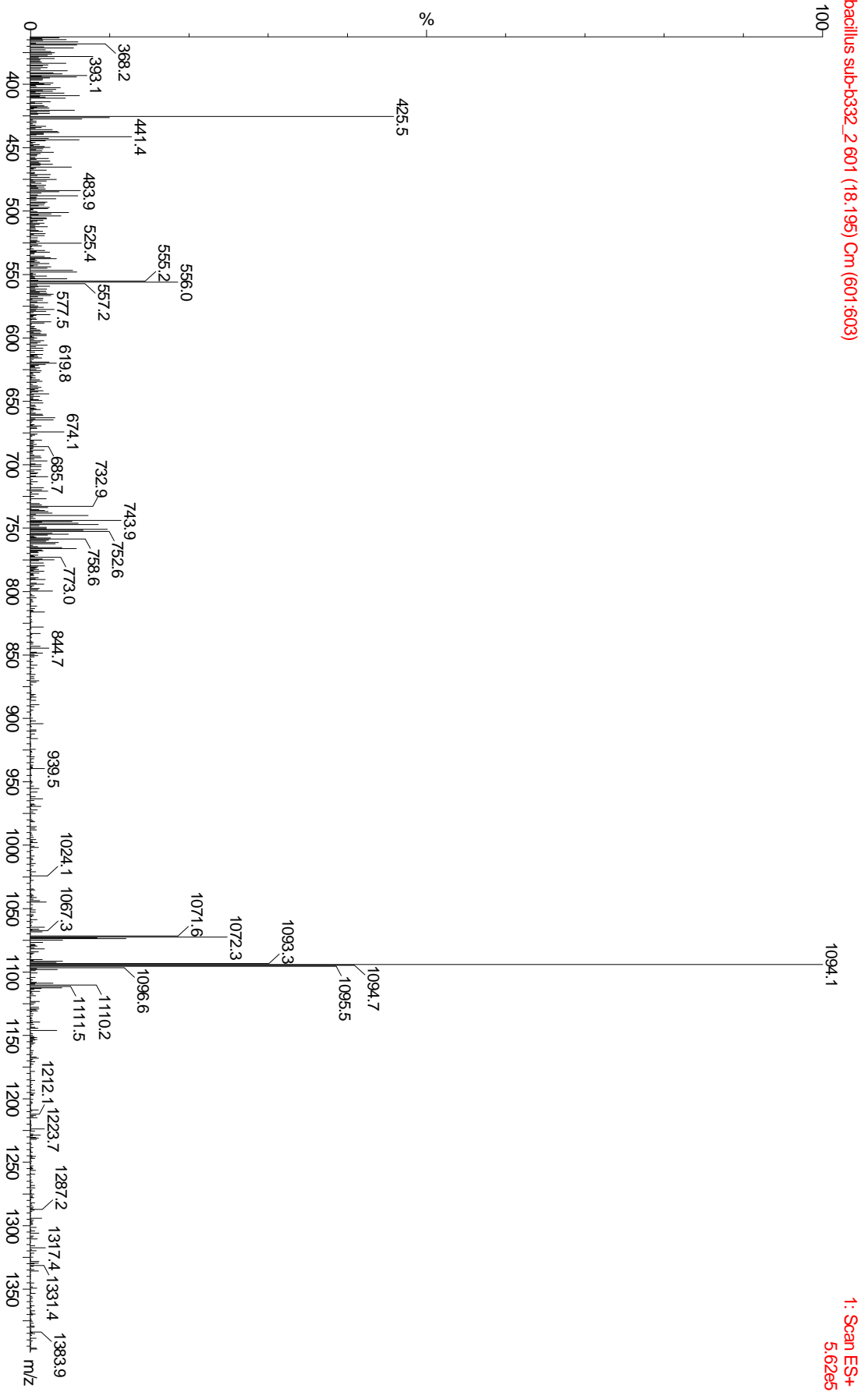
84. Patel P S, Huang S, Fisher S, *et al.* . Bacillaene, a novel inhibitor of prokaryotic protein synthesis produced by *Bacillus subtilis*: production, taxonomy, isolation, physicochemical characterization and biological activity .Antibiotics 1995, 48: 997~1003.
85. Tamehiro N, *et al.* . Antimicrob Agents Chemother 2002, 46(2): 315.
86. Trotman, Sutton. J Soc Chem Ind 1924, 43: 226.
87. Valent, B., Farrall, L., Chumley, F. G . Magnaporthe grisea genes for pathogenicity and virulence identified through a series of backcrosses.Genetics,1991,127:87~101.
88. Vanittanakom N, Loeffler W, Koch U, *et al.* . Fengycin, a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. J Antibiot 1986, 39: 888~901.
89. Wu Shimei, Jia Shifang, Sun Dandan, *et al.* . Purification and characterization of two novel antimicrobial peptides subpeptin JM4-A and subpeptin JM4-B produced by *Bacillus subtilis* JM4. Current Microbiology 2005, 51(5): 292~296.
90. Zheng G, Slavik M . Isolation, partial purification and characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain. Lett Appl Bacterio, 1999, 28: 363~367.

附录

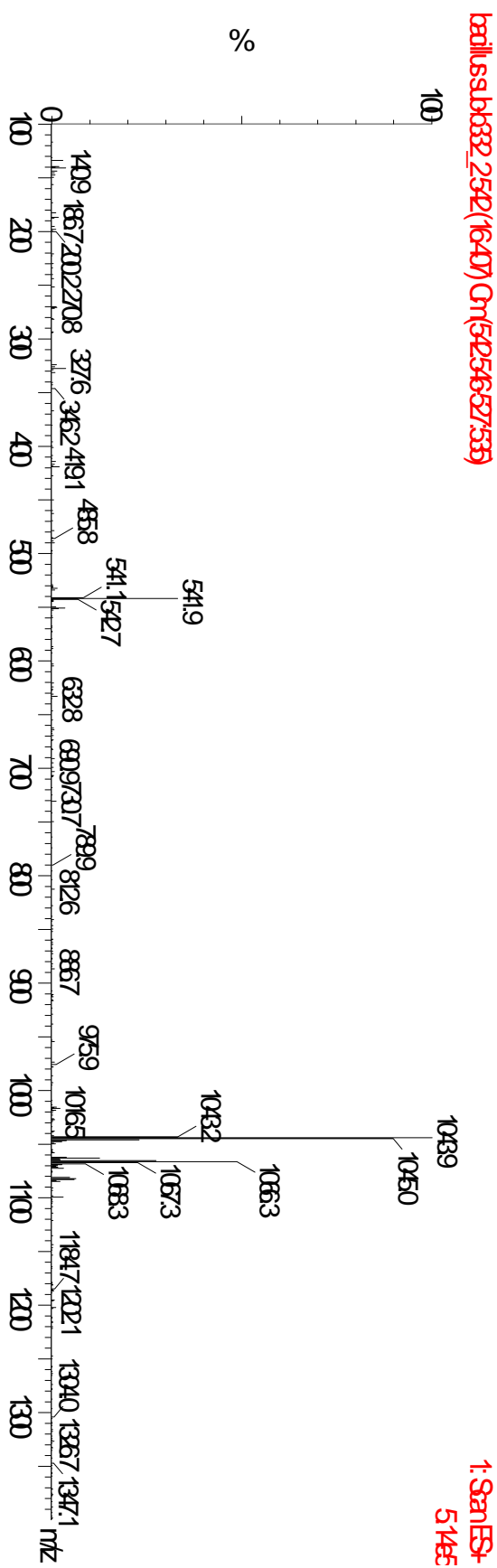




1: Scan ES+
2.01e6



1: Scan ES+
5.62e5



baill.s.u.b.6332.2542(16407) Cr(54256527533)

1: Scan ES+
51465

致 谢

本论文是在导师朱昌雄研究员的精心指导下完成的，从论文的选题、实验设计到论文的撰写、修改直至最后完成，每一步都凝结着导师的智慧和心血。朱老师精益求精、孜孜不倦的工作热情是我今后走上工作岗位学习的榜样；导师严谨认真的治学态度、勇于创新的科学思维令我终身难忘。

感谢蒋细良副研究员、郭萍副研究员、田云龙老师在实验和学习生活中对我的悉心指导和关怀，感谢杨秀芬老师为本实验提供菌种，感谢水稻病害实验室的支持。

特别感谢湖北省农药工程研究中心的江爱兵宾老师，在他的帮助下完成了用高效液相色谱-质谱联用仪分离纯化该菌株有效抗菌物质的内容，对我液谱质谱方面知识提供了巨大的指导。

还要感谢穆常青师兄对本研究方向的开拓工作，对我实验操作的入门提供了很多帮助，为这项研究打下了基础，黄亚丽博士、于江博士在生活 and 外语学习方面也给予了我很大的帮助和鼓励。

已毕业的刘喜凤、潘玮、王浩然、闫丽、李丽华、张丽硕士研究生，在读的霍炜洁、崔丽红、肖晶晶、叶婧、冉淦侨硕士研究生，工作人员张玉玲、周红梅、周红运女士，我们大家一起构建了融洽活跃的实验室气氛、自由浓郁的学术氛围，使我终生受益。同学武晓丽、李承雷、尚威、金鑫、赵明治硕士对我的分离纯化实验技术给予了耐心的帮助，帮我解决了很多试验难题。

朝夕相处的同寝密友吉叶梅、彭子欣、盛文萍、张茜与我结下了深厚的友谊，她们的开朗、热情、勤奋、幽默感染着我，寝室是温暖贴心的乐土，让我不舍离别。

感谢三年来一直培养我成长的研究生院及环发所的老师，老师们为人师表、宽厚豁达、积极乐观的人格魅力深深地影响着我，老师们的鼓励、支持和默默关心是我前行力量的源泉。

最后，衷心感谢和祝福我千里之外的父母。养育教化之恩，女儿末齿难忘。

时间仓促，以上感谢难免挂一漏万，在此，对所有帮助和关心过我的人一并感谢，愿好人一生平安。

刘雪

2007年6月

作者简介

刘雪，1981年7月出生于黑龙江省哈尔滨市，籍贯辽宁省海城市。2000-2004年，就读于东北农业大学生命科学学院生物技术专业；2004-2007年，就读于中国农业科学院研究生院微生物学专业。

硕士在读期间发表的文章及译著：

1. 刘雪，穆常青等. 枯草芽孢杆菌代谢物质的研究进展及其在植病生防中的应用. 中国生物防治, 2006, 22 (增刊): 179-184.
2. 穆常青，刘雪等. 枯草芽孢杆菌 B-332 菌株对稻瘟病的防治效果及定殖作用研究. 植物保护学报, 2007, 34 (2): 123-128.
3. 霍炜洁，刘雪等. 活性腐殖酸于水产养殖污染水体的修复. 农业生物资源与环境调控, ISBM 978-7-80233-206-5, 中国农业科技出版社, 2007.3.
4. 贺纯佩，邱敦莲，刘雪等. 翻译 Water Rights Administration, Experience, Issues and Guidelines, 中国农业科技文献出版社, ISBN 7-80167-703-X/S·533.