



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107557326 A

(43)申请公布日 2018.01.09

(21)申请号 201711027268.4

A01P 3/00(2006.01)

(22)申请日 2017.10.27

A01P 7/04(2006.01)

(83)生物保藏信息

A01P 21/00(2006.01)

CGMCC No.14476 2017.07.31

C12R 1/39(2006.01)

(71)申请人 山东大学

地址 250100 山东省济南市山大南路27号

申请人 德州迈科生物技术有限公司

(72)发明人 张友明 涂强 于芳楠 荆晓姝

(74)专利代理机构 北京中济纬天专利代理有限公司 11429

代理人 张祥明

(51)Int.Cl.

C12N 1/20(2006.01)

A01N 63/00(2006.01)

A01P 1/00(2006.01)

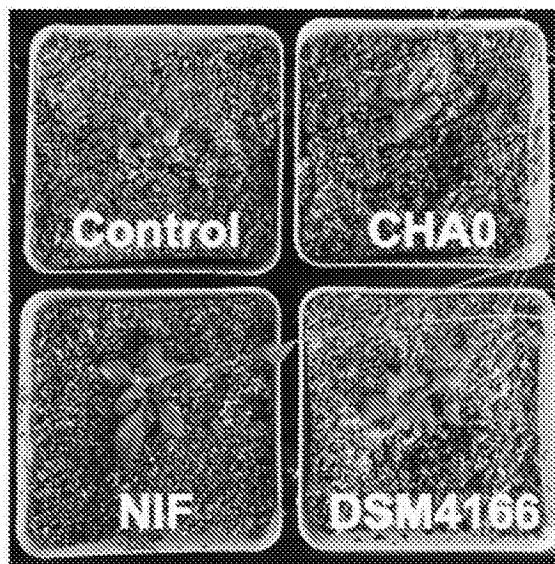
权利要求书1页 说明书6页 附图4页

(54)发明名称

一株杀菌固氮荧光假单胞菌及其发酵方法与应用

(57)摘要

本发明公开了一株杀菌固氮荧光假单胞菌(Pseudomonas protegens CHA0)突变菌株CHA0- $\Delta$ retS-NiF CGMCC No.14476及其发酵方法与应用。其最优培养条件为pH=7,温度28℃,转速600rpm。还公开了一种以荧光假单胞菌突变菌株CHA0- $\Delta$ retS-NiF为活性成分的微生物菌剂,对突变菌株进行扩大培养,菌体进入稳定期,细胞密度达到最大值时进行离心,对离心后的菌体进行冷冻干燥,即得,菌体干重为15.9g(DCW/L)。本发明的突变菌株CHA0- $\Delta$ retS-NiF固氮、杀菌能力强,在防治植物病害及促进植物生长方面具有广阔应用前景,具有产业化的可能性。



1. 荧光假单胞菌 (*Pseudomonas protegens* CHA0) 突变菌株为CHA0- $\Delta$ retS-NiF, 其保藏编号为: CGMCC No.14476。

2. 荧光假单胞菌 (*Pseudomonas protegens* CHA0) 突变菌株CHA0- $\Delta$ retS-NiF的发酵培养方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

(1) 种子活化: 从-80℃超低温冷冻存储箱中取出含有CHA0- $\Delta$ retS-NiF菌种的甘油管, 待解冻后取少量菌液划线于LB+genta 20平板上, 于30℃恒温生化培养箱中倒置培养20小时, 从平板上随机挑选5个单菌落进行菌落PCR验证以确保获得正确的目的菌株;

(2) 摇瓶种子培养: 将活化好的CHA0- $\Delta$ retS-NiF菌种接入KB培养基中, 放置在全温振荡培养箱中培养20小时, 得到种子液;

(3) 发酵罐培养: 将种子液接种到装有KB培养基发酵罐中, 接种量为5~10%, 即每100ml KB培养基加入5~10ml 种子液, 接种完毕后进行通气量, 溶氧, 温度, 转速, pH设置, 每隔6小时取菌液测定细胞密度, 发酵周期为96小时。

3. 根据权利要求2所述的发酵培养方法, 其特征在于, 步骤(2)与步骤(3)所述KB培养基的配方为: 每1000mL水中含甘油10mL, 蛋白胨20g,  $K_2HPO_4$  1.5g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1.5g。

4. 根据权利要求2所述的发酵培养方法, 其特征在于, 步骤(2)中培养条件为30℃, 200rpm。

5. 根据权利要求2所述的发酵培养方法, 其特征在于, 步骤(3)所述发酵罐培养条件为: 温度为26~32℃, pH为6~7.5, 转速为300~600rpm, 通气量为0.8~4.0L/min, 溶氧0.8~1.0L/min, 溶氧不与转速串联, 培养12~24小时后流加25~100mL的质量分数为50%葡萄糖水溶液, 此后每间隔2~6小时流加一次25~100mL的50%葡萄糖水溶液, 直到发酵结束, 期间用体积比为20%磷酸, 氨水维持pH的稳定, 体积比50%消泡剂进行消泡。

6. 根据权利要求5所述的发酵培养方法, 其特征在于, 步骤(3)所述发酵培养条件为: 温度为28℃, pH为7, 转速为600rpm。

7. 一种以荧光假单胞菌 (*Pseudomonas protegens* CHA0) 突变菌株CHA0- $\Delta$ retS-NiF为活性成分的微生物菌剂。

8. 根据权利要求7所述的微生物菌剂, 其特征在于, 其制备方法为: 步骤(3)所述发酵罐培养的菌体进入稳定期, 细胞密度达到最大值时进行离心, 冷冻干燥后收集菌体, 即得。

9. 权利要求1所述荧光假单胞菌突变菌株CHA0- $\Delta$ retS-NiF在杀菌固氮、促进植物生长方面的应用。

## 一株杀菌固氮荧光假单胞菌及其发酵方法与应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一株杀菌固氮荧光假单胞菌及其发酵方法与应用,尤其涉及其在生物防治中的应用。本发明属于生物技术领域。

### 背景技术

[0002] 荧光假单胞菌 (*Pseudomonas protegens*) 是一种植物生防菌,能分泌多种活性物质,在抗细菌、真菌、土栖害虫幼虫等方面都具有一定效果,因此在植物病害防治中具有很大的开发前景,具有替代化学农药的潜质。

[0003] 荧光假单胞菌CHA0 (*Pseudomonas protegens* CHA0) 分离自烟草根系,产生的次生代谢产物2,4-二乙酰基藤黄酚 (2,4-diacetylphloroglucinol, 2,4-DAPG) 能够有效地防治 *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* 引起的小麦全蚀病, *Thielaviopsis basicola* 引起的烟草黑根腐病和 *Ralstonia solanacearum* 引起的番茄细菌性青枯病。retS 基因是CHA0分泌的次生代谢产物2,4-DAPG及相关红色素合成负调控因子,因此为了获得一株杀菌活性更高、更有利于植物生长的菌株,使用生物工程手段对野生型 *Pseudomonas protegens* CHA0 进行了retS基因的敲除及固氮基因簇NiF的整入,最终获得杀菌固氮工程菌CHA0- $\Delta$ retS-NiF。

[0004] 近年来,由于化肥的过量使用使土壤机制发生变化,土壤连作障碍、次生盐渍化、板结和酸化情况严重等的现状,极大地阻碍农作物的产量提高。其中化肥中的氮是植物不可缺少的营养元素,而大自然中氮输入的最主要途径为生物固氮,研究表明固氮微生物可以有效地为植物提供氮营养,供其吸收与利用,促进其生长。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是为克服上述现有技术的不足,提供一株具有杀菌和固氮能力的荧光假单胞菌突变菌株CHA0- $\Delta$ retS-NiF。

[0006] 本发明还提供了上述菌株的发酵方法及其在生物防治中的应用。

[0007] 本发明所提供的荧光假单胞菌 (*Pseudomonas protegens* CHA0) 突变菌株为CHA0- $\Delta$ retS-NiF,其保藏编号为CGMCC No.14476,保藏单位:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所,保藏日期:2017年7月31日。对其革兰氏染色为阴性菌株,细胞为杆状,菌落呈淡土黄色,菌落边缘缺刻,进行有氧呼吸,在KB培养基中生长状态最佳,28℃为其最适生长温度,通常,经过一段时间的KB培养后其发酵液为土黄色或者浅砖红色,且伴有大量泡沫产生;和野生型的CHA0细菌相比,突变菌株CHA0- $\Delta$ retS-NiF染色体上retS基因被敲除,同时插入了具有生物固氮功能的NiF基因岛;

[0008] 荧光假单胞菌 (*Pseudomonas protegens* CHA0) 突变菌株CHA0- $\Delta$ retS-NiF的发酵培养方法,包括以下步骤:

[0009] (1) 种子活化:从-80℃超低温冷冻存储箱中取出含有CHA0- $\Delta$ retS-NiF菌种的甘

油管,待解冻后取少量菌液划线于LB+genta 20平板上,于30℃恒温生化培养箱中倒置培养20h,从平板上随机挑选5个单菌落进行菌落PCR验证以确保获得正确的目的菌株;

[0010] (2) 摇瓶种子培养:将活化好的CHA0- $\Delta$ retS-NiF菌种接入KB培养基中,放置在全温振荡培养箱中培养20h,得到种子液;

[0011] (3) 发酵罐培养:将种子液接种到装有KB培养基发酵罐中,接种量为5~10% (每100mLKB培养基加入5~10mL种子液),接种完毕后进行通气量,溶氧,温度,转速,pH设置,每隔6h取菌液测定细胞密度,发酵周期为96h。

[0012] 作为优选的技术方案之一,步骤(2)与步骤(3)所述KB培养基的配方为:每1000mL水中含甘油10mL,蛋白胨20g,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5g,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.5g。

[0013] 作为优选的技术方案之一,步骤(2)中摇瓶种子的培养条件为30℃,200rpm。

[0014] 作为优选的技术方案之一,步骤(3)所述发酵罐培养条件为:温度为26~32℃,pH为6~7.5,转速为300~600rpm,通气量为0.8~4.0L/min,溶氧0.8~1.0L/min,溶氧不与转速串联,培养12~24小时后流加25~100mL的质量分数为50%葡萄糖水溶液,此后每间隔2~6小时流加一次25~100mL的50%葡萄糖水溶液,直至发酵结束,期间用体积比为20%磷酸,氨水维持pH的稳定,体积比为50%消泡剂进行消泡。

[0015] 作为进一步优选的技术方案之一,步骤(3)所述发酵培养条件为:温度为28℃,pH为7,转速为600rpm。

[0016] 本发明还提供了一种以荧光假单胞菌(*Pseudomonas protegens* CHA0)突变菌株CHA0- $\Delta$ retS-NiF为活性成分的微生物菌剂。

[0017] 作为优选的技术方案之一,所述微生物菌剂的制备方法为:步骤(3)所述发酵罐培养的菌体进入稳定期,细胞密度达到最大值时进行离心,冷冻干燥后收集菌体,即得。

[0018] 本发明还提供了上述荧光假单胞菌突变菌株CHA0- $\Delta$ retS-NiF在杀菌固氮、促进植物生长方面的应用。

[0019] 本发明的有益效果:

[0020] 本发明提供一株荧光假单胞菌突变菌株CHA0- $\Delta$ retS-NiF的发酵方法,其最适生长条件为pH=7、温度28℃、转速600rpm。通过现有的文献可知,对于荧光假单胞菌发酵方法的报道鲜少,因此突变菌株CHA0- $\Delta$ retS-NiF的最适生长条件的确定既有利于对其扩大培养,得到大量菌体,增加了产业化生产的可能性,同时也为同属的其他荧光假单胞菌发酵培养提供借鉴。

[0021] 本发明提供了一株荧光假单胞菌突变菌株CHA0- $\Delta$ retS-NiF及其为活性成分的菌剂,室温盆栽试验证明该菌株能有效地促进植物生长。主要由于retS基因的敲除增加突变菌株分泌次生代谢产物2,4-DAPG产量,杀菌能力得到增强,同时固氮基因簇NiF的整入使得突变菌株具有固氮能力,为植物提供氮源,满足植物生长过程中对氮源的需求。

## 附图说明

[0022] 图1为突变菌株CHA0- $\Delta$ retS-NiF生长最优pH值探究;

[0023] 图2为突变菌株CHA0- $\Delta$ retS-NiF生长最优温度探究;

[0024] 图3为突变菌株CHA0- $\Delta$ retS-NiF生长最优转速探究;

[0025] 图4为突变菌株CHA0- $\Delta$ retS-NiF在5L发酵罐生长情况;

- [0026] 图5为突变菌株CHA0- $\Delta$ retS-NiF不同转化子固氮酶活性测定；
- [0027] 图6A为施加不同菌剂的拟南芥移栽入盆4周后的盆栽效果图；
- [0028] 图6B为施加不同菌剂拟南芥移栽入盆4周后莲座直径长度示意图；
- [0029] 保藏信息
- [0030] 分类名词:荧光假单胞菌 (*Pseudomonas protegens*) 突变菌株CHA0- $\Delta$ retS-NiF
- [0031] 保藏单位名称:中国普通微生物菌种保藏管理中心
- [0032] 保藏单位地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号
- [0033] 保藏日期:2017年7月31日
- [0034] 保藏号:CGMCC No.14476

## 具体实施方式

[0035] 下面结合附图和实施例对本发明进行进一步的阐述,应该说明的是,下述说明仅是为了解释本发明,并不对其内容进行限定。

[0036] 荧光假单胞菌 (*Pseudomonas protegens* CHA0) 突变菌株为CHA0- $\Delta$ retS-NiF,其保藏编号为CGMCC No.14476 (保藏单位:中国普通微生物菌种保藏管理中心,地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所,保藏日期:2017年7月31日)。

[0037] 实施例1:荧光假单胞菌 (*Pseudomonas protegens* CHA0) 突变菌株CHA0- $\Delta$ retS-NiF 发酵方法

[0038] (1) 种子活化:从-80℃超低温冷冻存储箱中取出菌种甘油管,待解冻后使用1ul接种环沾取少量菌液划线于LB+genta 20平板上,倒置于生化培养箱中,30℃,20h恒温培养,从平板上随机挑选5个单菌落进行菌落PCR验证以确保获得正确的目的菌株;

[0039] (2) 摇瓶种子培养:用1ul接种环在活化好种子的LB+genta 20平板上刮取少量菌体接入KB培养基中,摇瓶的装瓶量为500mL瓶体装液100mL KB培养基,放置于全温振荡培养箱30℃,200rpm,20h培养;KB培养基的配方为:每1000mL水中含有甘油10mL,蛋白胨20g,  $K_2HPO_4$  1.5g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1.5g;

[0040] (3) 发酵罐培养:待摇瓶的种子液培养成功后,在超净工作台中将种子液吸入规格为60ml的注射器中,然后通过穿刺法将菌液从接种口注射到1L罐中,接种量为发酵罐中盛有液体KB培养基总体积的5%,接种完毕后对通气量,溶氧,温度,转速,pH进行智能设置:通气量0.8L/min,溶氧量0.8L/min,溶氧不与转速串联;每隔6h取菌液测定细胞密度,发酵周期为96h,培养24h后开始流加25mL的50%葡萄糖水溶液,随后每间隔6h流加一次25mL的50%葡萄糖水溶液,直到发酵结束,期间用20%磷酸,氨水维持pH的稳定,50%消泡剂进行消泡。

[0041] 将上述步骤(3)所述pH值分别设置为6,6.5,7和7.5,其余条件及步骤不变,培养CHA0- $\Delta$ retS-NiF菌株,将不同pH培养条件下的CHA0- $\Delta$ retS-NiF菌株的生长情况进行对比,结果见图1。

[0042] 由图1可以看出在48h的培养期间,不同的pH生长环境对菌体的密度并没有产生较大影响,生长步伐几本保持一致,但48h过后,可能由于细胞密度达到了一定程度,分泌不利于菌体生长的代谢物质浓度达到了自身承受的最高能力从而阻碍了细胞的繁殖,最终导致在偏酸或偏碱的环境下菌体量不高。

[0043] 将上述步骤(3)所述温度分别设置为26℃,30℃和32℃,其余条件及步骤不变,培养CHA0- $\Delta$ retS-NiF菌株,将不同温度培养条件下的CHA0- $\Delta$ retS-NiF菌株的生长情况进行对比,结果见图2。

[0044] 由图2可以看出,28℃为工程菌株CHA0- $\Delta$ retS-NiF生长的最适温度,32℃培养条件下的目的菌株从一开始就表现出了不佳的生长状态,而到了36h后,28℃,30℃,26℃条件下各自的细胞增长量开始发生变化,最终28℃条件下菌体的生长优势相对明显。这可能与温度调控微生物的代谢途径,影响酶的反应速率有关。

[0045] 将上述步骤(3)所述转速分别设置为300rpm,400rpm和500rpm,其余条件及步骤不变,培养CHA0- $\Delta$ retS-NiF菌株,将不同转速培养条件下的CHA0- $\Delta$ retS-NiF菌株的生长情况进行对比,结果见图3。

[0046] 由图3可知600rpm为该菌的最适生长转速,但600rpm与500rpm之间的生长优势并不十分明显,这说明在500rpm的条件下也基本能满足菌体生长期间对氧的需求量。氧溶量可影响微生物的代谢途径,产物产量,酶的活性,适当的氧浓度有利于菌体生长,但过高的氧浓度会加速细胞的氧化,使菌体提早进入衰亡期。

[0047] 由上所述,本发明工程菌株CHA0- $\Delta$ retS-NiF的最优环境生长条件为pH=7,温度为28℃,转速为600rpm。

[0048] 实施例2:采用CHA0- $\Delta$ retS-NiF最优环境生长条件对其进行5L罐的扩大培养及收集菌体

[0049] (1) 种子活化:从-80℃超低温冷冻存储箱中取出菌种甘油管,待解冻后使用1ul接种环沾取少量菌液划线于LB+genta 20平板上,倒置于生化培养箱中,30℃,20h恒温培养;

[0050] (2) 摇瓶种子培养:用1ul接种环在活化好种子的LB+genta 20平板上刮取少量菌体接入KB培养基中,摇瓶的装瓶量为500mL瓶体装液100mL KB培养基,放置于全温振荡培养箱30℃,200rpm,20h培养;KB培养基的配方为:每1000mL水中含有甘油10mL,蛋白胨20g,  $K_2HPO_4$  1.5g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1.5g;

[0051] (3) 发酵罐培养:在5L罐接种口附近缠绕浸湿酒精的棉花,点燃,待火焰包围接种口后用镊子将接种口的螺丝旋开,此时快速将摇瓶中的菌液倒入罐中,在火焰熄灭以前迅速将螺丝拧回接种口,接种量为发酵罐中盛有液体KB培养基总体积的10%,接种完毕后通气量,溶氧,温度,转速,pH智能设置(温度28℃,pH=7,转速600rpm,通气量4L/min,溶氧量1.0L/min,溶氧不与转速串联);每隔6h取菌液测定细胞密度,发酵周期为96h,培养12h后开始流加100mL的50%葡萄糖,随后每间隔2h流加一次50mL的50%葡萄糖,直到发酵结束,期间用20%磷酸,氨水维持pH的稳定,50%消泡剂进行消泡。

[0052] (4) 待菌体进入稳定期,细胞密度达最大值时进行离心,冷冻干燥后收集菌体。

[0053] 从图4可以看出与1L发酵罐相比,菌体在5L发酵罐的生长对数期增长率明显增大,而且最终的菌体密度也有所增加,OD值为40.76,但对数期的生长趋势是大体相同的,即对数前期的生长率都优于对数阶段的中后期。主要原因为:5L罐的通风量与转速方面都优于1L罐,而且在培养过程中搅拌扇叶可以将菌体分散,避免结团,增加菌体与培养基的接触面积,利于氧的吸收。

[0054] 发酵完成后,将发酵产物进行离心,对离心后的菌体进行冷冻干燥,菌体干重为15.9g (DCW/L)。

[0055] 实施例3:荧光假单胞菌突变菌株CHA0- $\Delta$ retS-NiF在杀菌固氮、促进植物生长方面的应用

[0056] 1、采用乙炔还原法对突变菌株CHA0- $\Delta$ retS-NiF不同的转化子进行固氮酶活性测定,从不同的转化子中挑选出固氮酶活性最高的突变菌株CHA0- $\Delta$ retS-NiF进行后续盆栽试验:

[0057] (1) 在固体培养基中活化的菌株接种于LB培养基中,30℃培养8h;

[0058] (2) 在4℃下,5000rpm离心10min后收集菌液,用0.85%的生理盐水洗涤三遍,用无氮培养基重悬至OD=1.0;

[0059] (3) 在100mL的厌氧培养瓶中加入18mL的无氮培养基以及2mL上述菌液,排除空气并置换高纯氩气,使厌氧瓶成密封状态;加入1%的氧气,30℃,250rpm,培养6h后,抽取10%的混合气体并注入10%的乙炔气体,30℃,250rpm,培养4h后开始取样测定;取样用无菌注射器从瓶中取100 $\mu$ L混合气体,注入气相色谱仪进行乙烯含量测定,以不接菌注入乙炔的厌氧瓶为对照;

[0060] (4) 固氮酶活性=检测到的乙烯峰面积之差 $\times$ (三角瓶中气相体积/进样量)/(标准乙烯气体峰面积 $\times$ 反应时间 $\times$ 蛋白浓度)。

[0061] 蛋白浓度测定按照考马斯亮蓝的方法测定:

[0062] ①将20mL菌液4000rpm离心10min后,弃掉上清;

[0063] ②用200 $\mu$ L 0.5M NaOH重悬。煮沸5min后,加入200 $\mu$ L 0.5M HCl,12000rpm离心10min;

[0064] ③取100 $\mu$ L上清加入900 $\mu$ L G250,混匀,静置5min后,在OD595处测定蛋白含量。

[0065] 突变菌株CHA0- $\Delta$ retS-NiF不同转化子固氮酶活性测定结果如图5所示,不同的转化子由于固氮基因岛NiF随机插入到CHA0细菌染色体上位置的不同,所表达的固氮酶活性大小也不相同,结果显示转化子CHA0 2-3表达的固氮酶含量最高,甚至高于携带NiF的野生型菌株DSM4166。

[0066] 2、使用野生型拟南芥Col-0为试验对象,试验条件:温度为20℃,光照强度80  $\mu$ mol $\cdot$ m<sup>-2</sup> $\cdot$ s<sup>-1</sup>,光照周期:16小时光照,8小时黑暗;试验分为4个组:以未施加氮肥与施加野生型的荧光假单胞菌株CHA0菌液作为阴性对照,施加含有固氮基因簇的原始菌株DSM4166菌液作为阳性对照,施加上述步骤1优选的固氮酶活性最高的突变菌株CHA0 2-3菌液为试验组,盆栽效果如图6A所示。

[0067] 3、测量拟南芥的莲座直径长度,以此比较拟南芥的生长状态,莲座直径长度测量结果如图6B所示。

[0068] 由图6A和图6B可以看出,在拟南芥盆栽试验中,以未施加氮肥与施加野生型的荧光假单胞菌株作为阴性对照(Control和CHA0),施加含有固氮基因簇的原始菌株DSM4166作为阳性对照(DSM4166),施加CHA0- $\Delta$ retS-NiF菌液为试验组(NiF)。结果表明,未施加氮肥与施加野生型荧光假单胞菌株的拟南芥长势均不好,叶小茎短(图6A)。在未施加氮肥,但施加了含有固氮基因簇的原始菌株DSM4166的阳性对照组以及施加固氮荧光假单胞菌株CHA0- $\Delta$ retS-NiF的试验组中,拟南芥的莲座叶直径均优于阴性对照。此外,施加了固氮荧光假单胞菌株CHA0- $\Delta$ retS-NiF的拟南芥莲座叶直径优于施加了含有固氮基因簇的原始菌株DSM4166的拟南芥莲座叶直径(图6B)。

[0069] 上述虽然结合附图对本发明的具体实施方式进行了描述,但并非对本发明保护范围的限制,在本发明的技术方案的基础上,本领域技术人员不需要付出创造性劳动即可做出的各种修改或变形仍在本发明的保护范围以内。

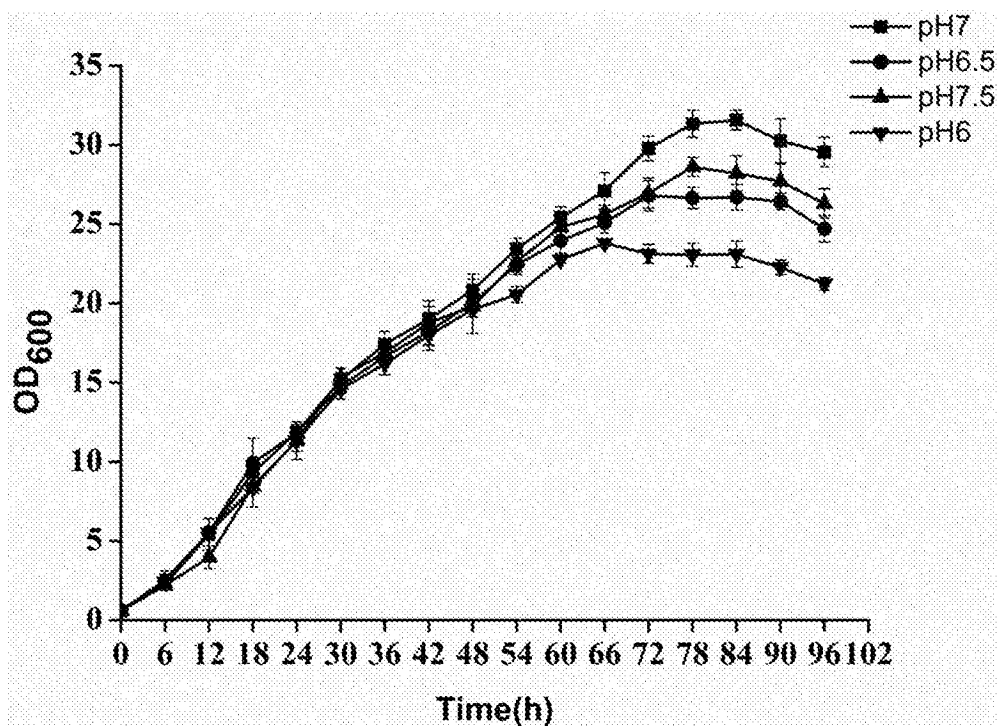


图1

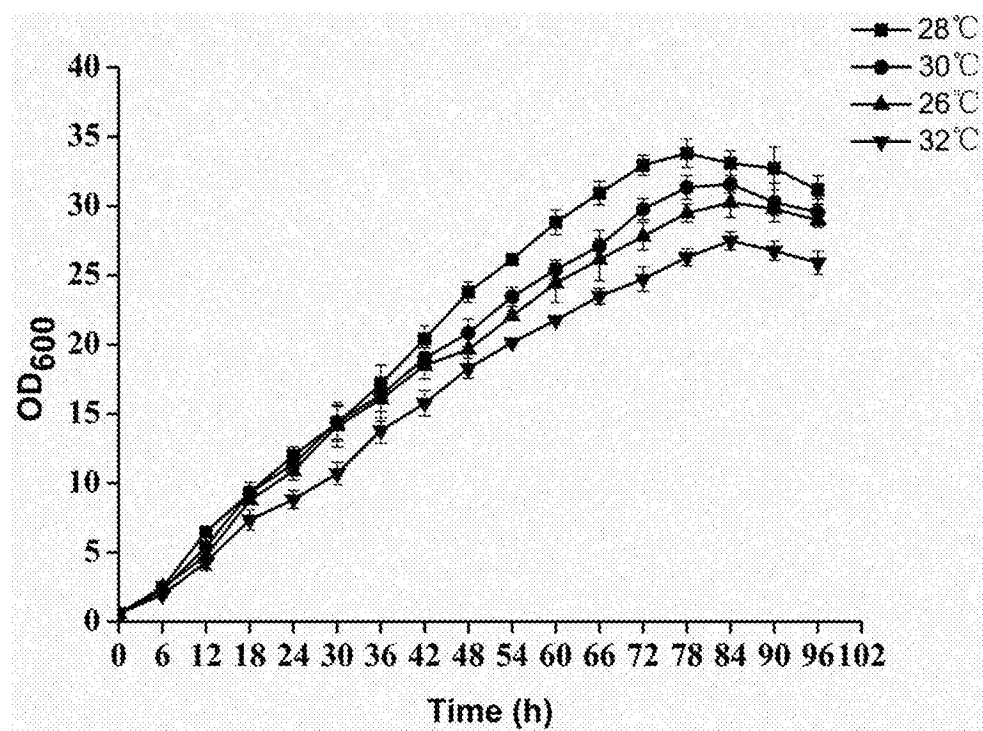


图2

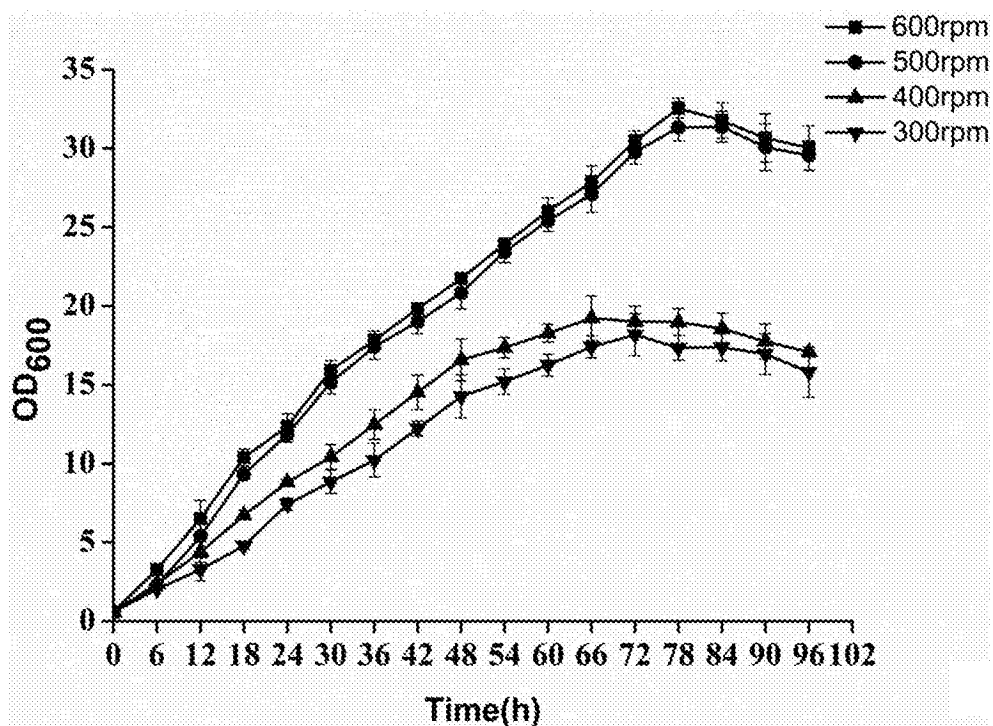


图3

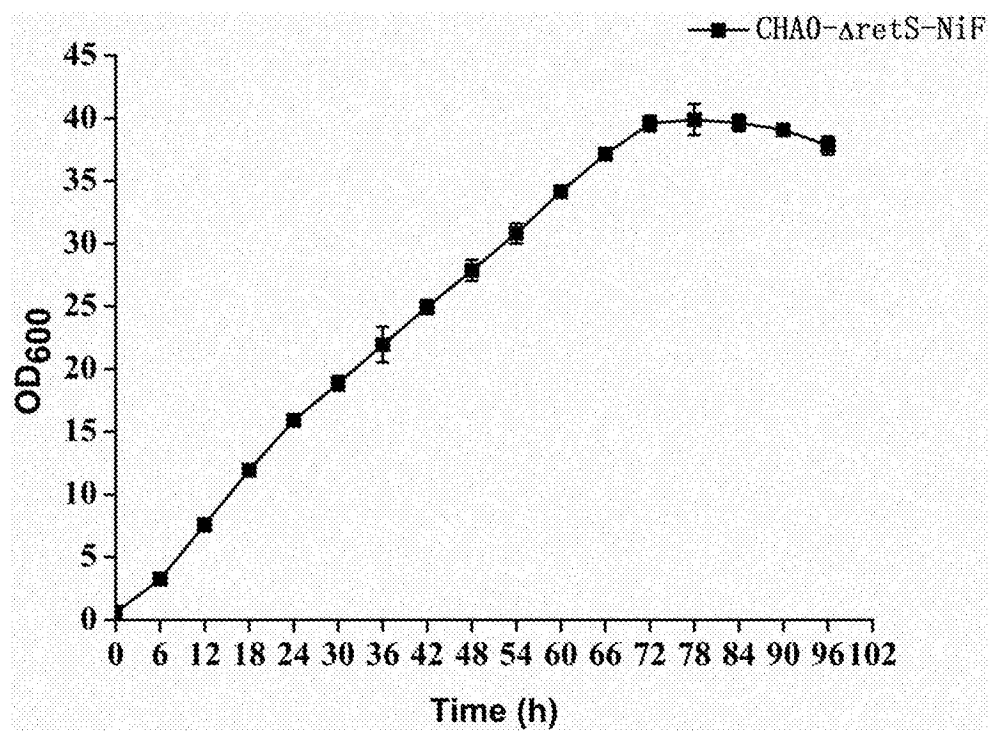


图4

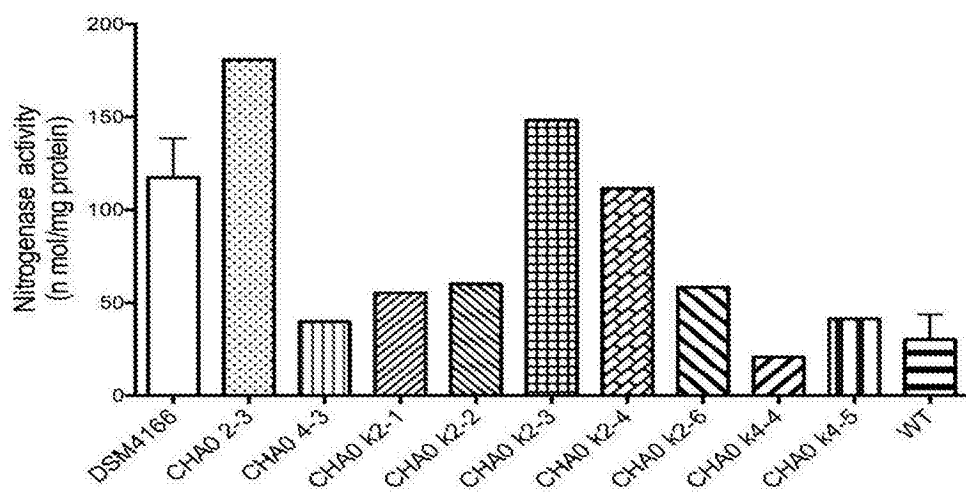


图5

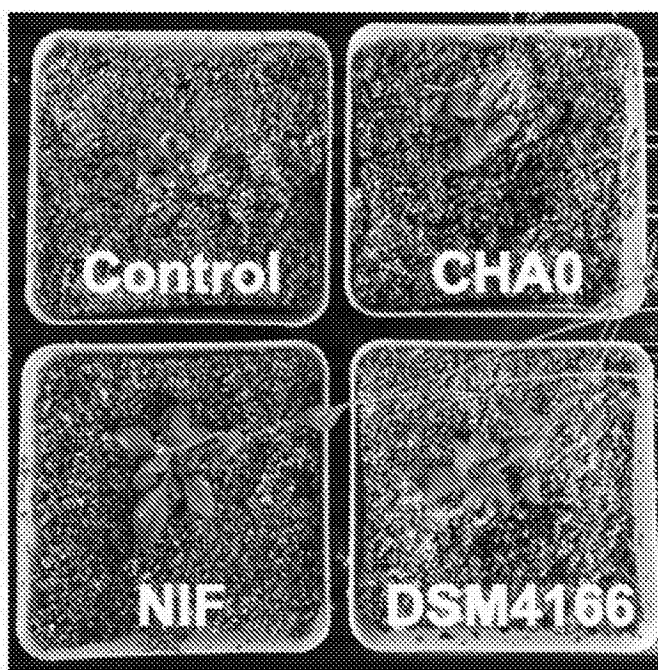


图6A

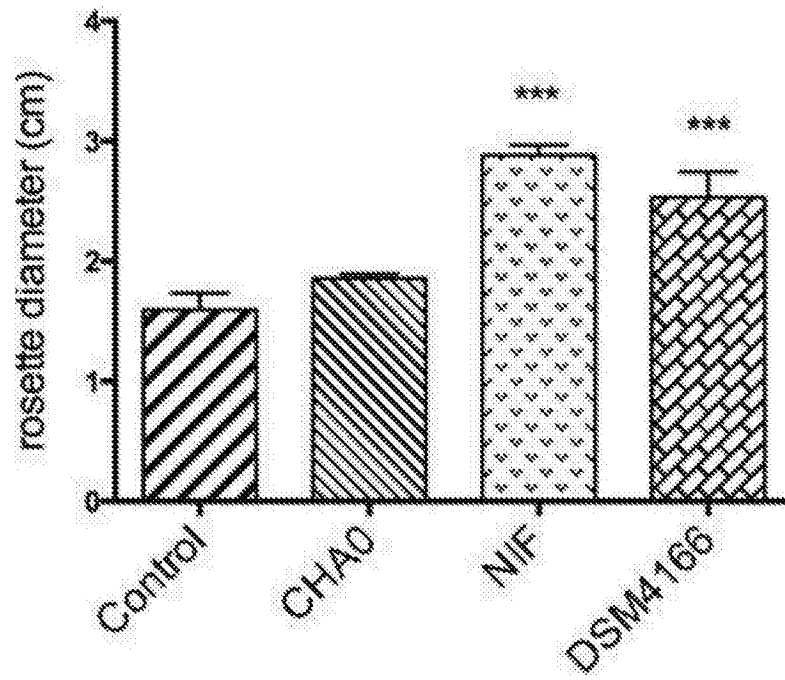


图6B