

内生枯草芽孢杆菌 CN181 发酵条件优化

康兴娇¹,贾招闪¹,申红妙¹,焦文哲¹,冉隆贤^{1,2*},甄志先^{1*}

1. 河北农业大学 林学院, 河北 保定 071001

2. 河北省林木种质资源与森林保护重点实验室, 河北 保定 071000

摘要: 为了提高枯草芽孢杆菌 CN181 菌株在发酵液中的数量, 本试验通过采用单因子试验和正交试验对枯草芽孢杆菌 CN181 的发酵培养基和发酵条件进行优化和筛选。通过单因子试验得出, 玉米粉为最适碳源, 豆粕为最适氮源, K^+ 和 Na^+ 为最适金属离子; 正交试验法得到了发酵液中各组分的最佳含量, 分别是: 玉米粉 $15.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、豆粕 $10.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 K_2HPO_4 $2.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $NaCl$ $2.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; 在确定了发酵培养基的含量后, 对 CN181 菌株的最适培养条件进行了优化, 其最佳条件为: 发酵培养基的初始 pH 值 8.0、250 mL 摇瓶装液量 30 mL、接种量 2% (体积分数)、培养温度 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 、转速 $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、培养时间 24 h。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 内生细菌; 发酵条件

中图分类号: S852.61+6

文献标识码: A

文章编号: 1000-2324(2016)05-0647-07

Optimization of Fermentation Conditions for Endophytic *Bacillus subtilis* CN181

KANG Xing-jiao¹, JIA Zhao-shan¹, SHEN Hong-miao¹, JIAO Wen-zhe¹, RAN Long-xian^{1,2*}, ZHEN Zhi-xian^{1*}

1. College of Forestry/Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China

2. Hebei Key Lab of Forest Germplasm Resources and Protection, Baoding 071000, China

Abstract: To increase the population density of *Bacillus subtilis* CN181 in the broth, fermentation media and fermentation conditions of *B. subtilis* CN181 were screened and optimized by single factor and orthogonal tests in this study. The results from single factor experiment showed that the optimum carbon, nitrogen sources and metal ions were corn flour, soybean dregs, K^+ and Na^+ . The best medium was composed of corn flour at $15.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, soybean dregs at $10.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 at $2.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, and $NaCl$ at $2.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ based on the orthogonal test. Finally, the culture conditions were optimized as the following: the initial pH of the fermentation medium at 8.0, the liquid medium volume at 30 mL in a 250 mL flask, the inoculation volume at 2% (v/v), the fermentation temperature at $30\text{ }^\circ\text{C}$, the rotation speed at $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ and the fermentation time for 24 h.

Keywords: *Bacillus subtilis*; endophytic bacteria; fermentation conditions

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) CN181 是河北农业大学林学院林木病理实验室从小麦感病品种 5389 的实生组培苗中分离得到的一株内生细菌^[1], 它不仅对小麦叶锈病和桉树青枯病有很好的防治效果^[1,2], 经研究发现, 该菌株对葡萄霜霉病也有防治效果^[3], 具有很好的生防开发潜力。目前生产上对葡萄霜霉病的防治多以化学药剂为主, 但化学药剂所产生的副作用是不可逆的^[4]。自 1921 年 Hartel^[5]利用真菌防治猝倒病开启了以菌治菌的历史以来, 植物病害生防微生物已涉及真菌、放线菌、细菌和病毒(噬菌体)等种群^[5]。随着科学技术的不断进步与发展, 芽孢杆菌类因其所具有的生长快、营养简单、极易分离培养等优点^[6-9], 已被越来越多的植病研究者用于防治植物病害^[7-11]。

发酵是生防菌进行推广应用的前提^[9,12]。影响枯草芽孢杆菌发酵液中细菌数量的因素除了遗传特性外, 主要有培养基的成分和发酵条件^[8,12,13]。玉米粉、葡萄糖、豆饼粉、鱼粉及其它一些微量元素是生产上培养枯草芽孢杆菌的主要原料。调整培养基中各组分的配比, 可以改善枯草芽孢杆菌的生长条件, 提高发酵液中的含菌量。因此, 本试验通过摇瓶发酵试验对该菌株的发酵培养基及发酵条件进行了优化筛选, 得出其最适发酵培养基及发酵条件, 为该菌株的工业生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

收稿日期: 2016-03-07

修回日期: 2016-06-06

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项:果树霜霉病防控技术与示范(201203035)

作者简介: 康兴娇(1988-),女,河北省石家庄人,在读硕士生,主要从事林木病理学研究。E-mail:956293374@qq.com

*通讯作者: Author for correspondence. E-mail:zhenzhixian@hebau.edu.cn; longxianran@163.com

枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*) CN181, 由河北农业大学林学院林木病理实验室保存提供。

1.2 培养基

液体种子培养基: 牛肉汁蛋白胨培养基(NA)^[14]。

优化发酵培养基原料: 碳源是蔗糖、玉米粉、可溶性淀粉和麦麸; 氮源是黄豆粉、豆粕、鱼粉和硝酸钾; 金属离子是 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 K_2HPO_4 、 $Ca(NO_3)_2$ 和 $NaCl$ 。

1.3 培养基组分的筛选与优化

种子培养液: 用牙签挑取于 NA 固体培养基上培养 48 h 的 CN181 菌株的单菌落, 接种于 NA 液体培养基中, 于 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下培养 8~10 h, 即为种子培养液。

最佳碳源的筛选^[15]: 碳源含量为 $15.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 将上述提到的 4 种碳源替换液体种子培养基中的葡萄糖, 对照培养基为液体种子培养基。调节培养基的 pH 值为 7.0, 摇瓶的装液量为 60 mL/250 mL, 0.1 MPa 、 $121 \text{ }^\circ\text{C}$ 灭菌 30 min。接种量为 0.6 mL(2%) 的 CN181 菌株的种子培养液, 于 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下培养 28 h。

最佳氮源的筛选^[15]: 氮源含量为 $15.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 将上述提到的 4 种氮源替换液体种子培养基中的蛋白胨、酵母浸膏和牛肉浸膏, 对照培养基为液体种子培养基。其他条件同上。

金属离子的筛选^[15]: 以筛选后的碳源、氮源为基础培养基, 在该基础培养基中添加 $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 K_2HPO_4 、 $Ca(NO_3)_2$ 和 $NaCl$, 对照为不加金属离子的培养基。其他条件同上。

培养基各组分比的优化: 通过上述试验得到的碳源-玉米粉、氮源-豆粕及无机盐- K_2HPO_4 和 $NaCl$ 进行 4 因素 5 水平的正交试验, 采用 $L_{25}(5^6)$ 正交设计确定各组分的最佳配比。选择的因素及水平见表 1。

表 1 培养基成分的正交试验因素与水平

Table 1 The factors and levels of the orthogonal test for components of culture medium

水平 Level	因素 Factor			
	A 玉米粉/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Corn flour	B 豆粕/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Soybean dregs	C K_2HPO_4 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ K_2HPO_4	D $NaCl$ / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ $NaCl$
1	10.0	10.0	1.0	1.0
2	15.0	15.0	1.5	1.5
3	20.0	20.0	2.0	2.0
4	25.0	25.0	2.5	2.5
5	30.0	30.0	3.0	3.0

1.4 最佳培养条件的优化

1.4.1 培养基初始 pH 值、接种量和装液量的优化 培养基初始 pH 值: 用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 和 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 调节优化培养基 pH 值为 6.5、7.0、7.5 和 8.0, 其他条件同 1.3。

装液量: 摇瓶的装液量为 30 mL/250 mL、60 mL/250 mL、90 mL/250 mL 和 120 mL/250 mL, 其他条件同 1.3。

接种量: 将接种量按 1%、2%、5% 和 10% 的体积分数接种在配好的培养基中, 其他条件同 1.3。

根据上述 3 个因素进行 3 因素 4 水平的正交试验, 采用 $L_{16}(4^5)$ 正交设计确定各发酵条件的水平。

1.4.2 培养温度的优化 在上述培养的基础上, 进行摇瓶发酵温度的优化, 将接种该菌株的摇瓶分别置于温度为 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 和 $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 的摇床中进行培养, 其他条件同 1.3。

1.4.3 发酵转速的优化 在上述培养条件优化的基础上, 进行摇瓶发酵转速的优化, 将该菌株分别放在 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $210 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 和 $240 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下培养, 其他条件同 1.3。

1.4.4 最适发酵时间的优化 在上述条件优化之后, 以优化的最佳配比与培养条件为发酵参数, 绘制该菌的生长曲线。自接菌开始, 在 0 h、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、16 h、24 h、28 h 和 32 h 时分别取样测定摇瓶发酵液的光密度 (OD_{600} 值)^[16], 同时用平板菌落计数法^[17]测定发酵液中的细菌数量, 试验重复 3 次。

1.5 数据处理

采用 SPSS 17.0 对单因素试验结果进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和 LSD 多重比较, 正交试验结果采用正交试验的直观分析法。

2 结果与分析

2.1 培养基组分对枯草芽孢杆菌 CN181 菌株生长的影响

2.1.1 不同碳源对枯草芽孢杆菌 CN181 菌株生长的影响 由图 1 可见, 从发酵液中 CN181 菌株的数量来看, 当玉米粉作为碳源时, 发酵液中的细菌数量最多, 可达 $11.803 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$; 当可溶性淀粉作为碳源时, 发酵液中的细菌数量较多, 可达 $10.685 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$; 而以其他原料作为碳源时, 细菌数量从大到小依次为蔗糖 > 对照 > 麦麸。综合分析, 玉米粉作为碳源时, 发酵液中的细菌数量最多, 而且生产成本低廉, 因此, 选择玉米粉作为枯草芽孢杆菌 CN181 菌株发酵培养基的最佳碳源。

2.1.2 不同氮源对枯草芽孢杆菌 CN181 菌株生长的影响 由图 2 可见, 从发酵液中 CN181 菌株的数量来看, 当豆粕作为氮源时, 发酵液中的细菌数量最多, 可达 $6.854 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$; 当 NA 培养基中的牛肉浸膏、蛋白胨和酵母浸膏同时作为氮源时, 发酵液中的细菌数量较多, 可达 $5.846 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$; 而以其他原料作为氮源时, 发酵液中的细菌数量从大到小依次为鱼粉 > 黄豆粉 > 硝酸钾。综合分析, 比较豆粕及 NA 培养基中的氮源对发酵液中 CN181 菌株的数量影响, 二者不存在显著差异, 但以豆粕为氮源的发酵液中的细菌数量较多, 而且豆粕的生产成本低廉, 因此选择豆粕作为枯草芽孢杆菌 CN181 菌株发酵培养基的最佳氮源。

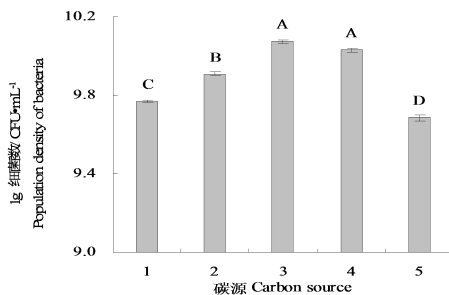


图 1 不同碳源对菌株 CN181 发酵的影响
Fig.1 Effects of different carbon sources on the fermentation of CN181 strain

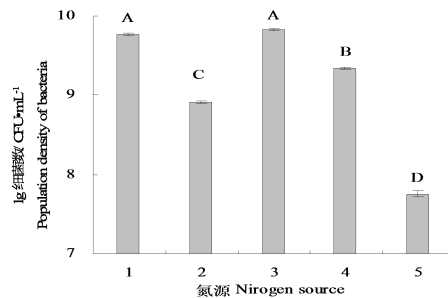


图 2 不同氮源对菌株 CN181 发酵的影响
Fig.2 Effects of different nitrogen sources on the fermentation of CN181 strain

注: a: 图 1 横坐标中的 1、2、3、4 和 5 分别表示对照、蔗糖、玉米粉、可溶性淀粉和麦麸; 图 2 横坐标中的 1、2、3、4 和 5 分别表示对照、黄豆粉、豆粕、鱼粉和硝酸钾。b: 不同大写字母表示差异显著($P < 0.01$)。下同。

Note: a: 1, 2, 3, 4 and 5 in X axis of Fig.1 indicate control, sucrose, corn flour, soluble starch and wheat bran. 1, 2, 3, 4 and 5 in X axis of Fig.2 indicate control, soybean meal, soybean dregs, fish meal and potassium nitrate.

b: Different uppercase letters indicate significant difference ($P < 0.01$). The same below.

2.1.3 不同金属离子对枯草芽孢杆菌 CN181 菌株生长的影响 由图 3 可见, 从发酵液中 CN181 菌株

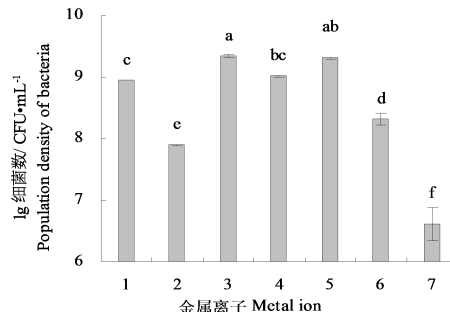


图 3 不同金属离子对菌株 CN181 发酵的影响

Fig.3 Effects of different metal ions on the fermentation of CN181 strain

注: a: 图 3 横坐标中的 1、2、3、4、5、6 和 7 分别表示对照、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 K_2HPO_4 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、 NaCl 、 MnCl_2 和 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。b: 不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Note: a: 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 in X axis of Fig.3 indicate Control, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, NaCl , MnCl_2 and $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. b: Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

的数量来看, K^+ 和 Na^+ 都能促进菌株繁殖, 菌株在含这两种金属离子的培养基中的数量显著高于含其他金属离子培养基中的数量; Ca^{2+} 对 CN181 菌株的繁殖影响不明显; Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Fe^{2+} 则对 CN181

菌株的繁殖有强烈的抑制作用。由于 K^+ 、 Na^+ 的生产成本相当，且 K_2HPO_4 有提高培养基 pH 值的作用，因此，选择 K_2HPO_4 、 $NaCl$ 作为枯草芽孢杆菌 CN181 菌株发酵培养基的复合无机盐。

2.2 正交试验法优化培养基各组分的配比

发酵培养基中 4 种成分配比正交试验直观分析结果见表 2。

表 2 培养基各组分优化配比的正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal test for every proportion of medium

试验号 No. of test	A 玉米粉/g·L ⁻¹ Corn flour	B 豆粕/g·L ⁻¹ Soybean dregs	C K_2HPO_4 /g·L ⁻¹ K_2HPO_4	D NaCl/g·L ⁻¹ NaCl	细菌数/ $\times 10^9$ CFU·mL ⁻¹ Population density of bacteria
1	10.0	10.0	1.0	1.0	8.252
2	10.0	15.0	2.0	1.5	6.548
3	10.0	20.0	3.0	2.0	8.531
4	10.0	25.0	1.5	2.5	6.773
5	10.0	30.0	2.5	3.0	2.410
6	15.0	10.0	3.0	2.5	6.186
7	15.0	15.0	1.5	3.0	4.946
8	15.0	20.0	2.5	1.0	10.562
9	15.0	25.0	1.0	1.5	5.961
10	15.0	30.0	2.0	2.0	5.375
11	20.0	10.0	2.5	1.5	8.272
12	20.0	15.0	1.0	2.0	7.822
13	20.0	20.0	2.0	2.5	7.788
14	20.0	25.0	3.0	3.0	4.141
15	20.0	30.0	1.5	1.0	4.782
16	25.0	10.0	2.0	3.0	7.447
17	25.0	15.0	3.0	1.0	6.589
18	25.0	20.0	1.5	1.5	3.521
19	25.0	25.0	2.5	2.0	4.039
20	25.0	30.0	1.0	2.5	4.060
21	30.0	10.0	1.5	2.0	5.886
22	30.0	15.0	2.5	2.5	3.099
23	30.0	20.0	1.0	3.0	4.012
24	30.0	25.0	2.0	1.5	2.955
25	30.0	30.0	3.0	1.0	1.108
k_1	6.503	7.209	6.021	6.259	
k_2	6.606	5.801	5.182	5.452	
k_3	6.561	6.883	6.023	6.331	
k_4	5.131	4.774	5.677	5.581	
k_5	3.412	3.547	5.311	4.591	
极差 R	3.194	3.662	0.841	1.740	
优水平	A ₂	B ₁	C ₃	D ₃	

注： k_1 、 k_2 、 k_3 、 k_4 、 k_5 分别代表玉米粉、豆粕、 K_2HPO_4 和 NaCl 的 5 个水平与其他因素组合时发酵液中的细菌数量。

Note: The population density of bacteria in broth at k_1 , k_2 , k_3 , k_4 and k_5 levels of corn flour, soybean dregs, K_2HPO_4 and NaCl combined with other factors, respectively.

由表 2 可知，在正交试验中，各因素极差的大小反映了发酵培养基中 4 种成分对 CN181 菌株繁殖的影响，极差越大，影响越显著。玉米粉、豆粕、 K_2HPO_4 和 NaCl 各水平的极差分别为 3.194、3.662、0.841 和 1.740，因此，这 4 种成分对 CN181 菌株发酵的影响因素依次为：豆粕 > 玉米粉 > NaCl > K_2HPO_4 。当发酵培养基中玉米粉的含量为 $15.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，细菌数量最多 ($6.606 \times 10^9 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$)，随着玉米粉含量的降低或升高，发酵液中的细菌数量均会降低；当发酵培养基中豆粕的含量为 $10.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，细菌数量最多 ($7.209 \times 10^9 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$)，随着豆粕含量的增加，细菌数量则降低；当发酵培养基中 K_2HPO_4 的含量为 $2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，细菌数量最多 ($6.023 \times 10^9 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$)，发酵培养基中 K_2HPO_4 的含量低于 $2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，细菌数量就会降低，高于 $2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，也会降低；当发酵培养基中 NaCl 的含量为 $2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，细菌数量达最大值 $6.331 \times 10^9 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，且变化趋势同 K_2HPO_4 。结果表明，该菌株最适生长的培养基组分配比为：玉米粉 $15.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、豆粕 $10.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 K_2HPO_4 $2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 及 NaCl $2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.3 正交试验法对枯草芽孢杆菌 CN181 发酵条件的优化

影响枯草芽孢杆菌 CN181 发酵的 3 个条件的正交试验直观分析结果见表 3。

表 3 培养条件优化的正交试验结果

Table 3 Results of orthogonal test for optimal culture conditions

试验号 No. of test	A 初始 pH 值 Initial pH value	B 装液量/mL Volume	C 接种量/% Inoculation volume	细菌数/ $\times 10^9$ CFU·mL ⁻¹ Population density of bacteria
1	6.5	30	1	9.179
2	6.5	60	2	3.153
3	6.5	90	5	5.409
4	6.5	120	10	2.894
5	7.0	30	2	11.905
6	7.0	60	1	5.750
7	7.0	90	10	4.973
8	7.0	120	5	4.148
9	7.5	30	5	11.599
10	7.5	60	10	7.461
11	7.5	90	1	6.125
12	7.5	120	2	9.370
13	8.0	30	10	13.950
14	8.0	60	5	9.683
15	8.0	90	2	8.415
16	8.0	120	1	3.064
k ₁	5.159	11.658	6.030	
k ₂	6.694	6.512	8.211	
k ₃	8.639	6.231	7.710	
k ₄	8.778	4.869	7.320	
极差 R	3.619	6.789	2.181	
优水平	A ₄	B ₁	C ₂	

注: k₁、k₂、k₃、k₄ 分别代表初始 pH 值、装液量和接种量的 4 个水平与其他因素组合时发酵液中的细菌数量。

Note: The population density of bacteria in broth at k₁, k₂, k₃ and k₄ levels of initial pH value, volume and inoculation volume respectively combined with other factors.

由表 3 可知, 在正交试验中, 各优化条件极差的大小反映了这 3 个条件对 CN181 菌株繁殖影响的主次, 极差越大, 影响越显著。初始 pH 值、装液量和接种量各水平的极差分别为 3.619、6.789 和 2.181, 因此, 这 3 个条件对 CN181 菌株发酵影响的主次因素依次为: 装液量 > 初始 pH 值 > 接种量。在所测 pH 值范围内, 当发酵培养基的初始 pH 值是 8.0 时, 细菌数量最多, 为 8.778×10^9 CFU·mL⁻¹, 初始 pH 值降低, 则细菌数量减少; 当 250 mL 三角瓶中发酵培养基的量为 30 mL 时, 细菌数量达最大值 11.658×10^9 CFU·mL⁻¹, 随着装液量的增加, 细菌数量的繁殖就会减少; 当在发酵培养基中的接种量为 2% 时, 细菌数量最多, 为 8.211×10^9 CFU·mL⁻¹, 高于 2% 的接种量, 发酵液中的细菌数量反而不会增加, 接种量减小, 同样也不利于该菌株的繁殖。由此表明, 最适该菌株繁殖的发酵条件是: 初始 pH 值 8.0、装液量 30 mL/250 mL 三角瓶和接种量 2%。

2.4 摇床发酵温度和转速的优化

2.4.1 培养温度的优化 不同培养温度对枯草芽孢杆菌 CN181 菌株繁殖的影响结果见图 4。由图 4 可知, 在所测温度范围内, 当培养温度为 30 °C 时发酵液中的细菌数量最多, 为 13.093×10^9 CFU·mL⁻¹, 培养温度高于 30 °C 或低于 30 °C, 发酵液中细菌数量均会减少。通过数据分析得出, 发酵液中该菌株的数量在 30 °C 和其余 3 个温度培养时在 0.01 水平上均具有极显著差异。因此, CN181 菌株发酵的最适温度为 30 °C。

2.4.2 摇床转速的优化 不同摇床转速对枯草芽孢杆菌 CN181 菌株繁殖的影响结果见图 5。由图 5 可

知,在所测摇床转速范围内,当摇床转速为 180 r·min⁻¹、210 r·min⁻¹和 240 r·min⁻¹时,发酵液中的细菌数量均较多,分别为 13.338×10⁹ CFU·mL⁻¹、14.408×10⁹ CFU·mL⁻¹和 12.684×10⁹ CFU·mL⁻¹,仅 150 r·min⁻¹的转速培养时,发酵液中菌株的细菌数量较少。通过数据分析得出,摇床转速为 180 r·min⁻¹、210 r·min⁻¹和 240 r·min⁻¹时,发酵液中细菌数量在 0.01 水平上不存在极显著差异,而与 150 r·min⁻¹的转速培养时在 0.01 水平上均存在极显著差异。因此,从菌量生长及节约能源的角度综合考虑,CN181 菌株发酵的最适摇床转速为 180 r·min⁻¹。

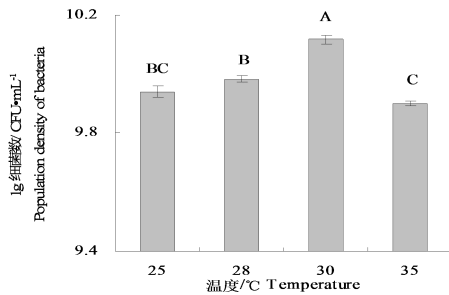


图 4 不同温度对菌株 CN181 发酵的影响
Fig.4 Effects of different temperatures on the fermentation of CN181 strain

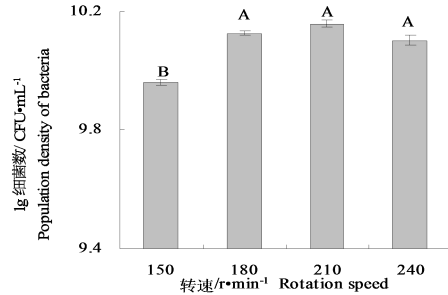


图 5 不同转速对菌株 CN181 发酵的影响
Fig.5 Effects of different rotation speed on the fermentation of CN181 strain

2.5 最适发酵时间的优化

通过对枯草芽孢杆菌 CN181 菌株培养时间的测定,绘制了该菌株在玉米粉豆粕培养基和 NA 培养基中的生长曲线,结果见图 6。通过图 6 可知,CN181 菌株在摇瓶发酵时,初期 NA 培养基中细菌数量大于玉米粉豆粕培养基中的细菌数量,在 16 h 时,两种培养基中的细菌数量接近一致,16 h 后,玉米粉豆粕培养基中的细菌数量继续增加,直至 24 h 时生长至最大值 8.858×10⁹ CFU·mL⁻¹,随后开始下降,进入衰亡期;而 NA 培养基中的细菌数量在 16 h 时已达最大值 5.995×10⁹ CFU·mL⁻¹,之后开始下降,进入衰亡期。综合发酵时间和发酵液中 CN181 菌株的繁殖数量来看,玉米粉豆粕培养基更适合枯草芽孢杆菌 CN181 菌株的生长,且最佳培养时间为 24 h。

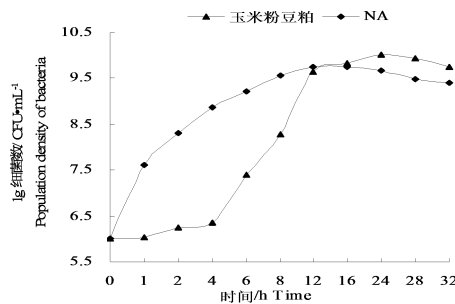


图 6 菌株 CN181 在两种培养基中的生长曲线
Fig. 6 The growth curve of CN181 strain in two media

3 结论与讨论

培养基的组成和培养条件对枯草芽孢杆菌 CN181 菌株的生长繁殖有重要影响,为了提高 CN181 菌株的产菌量,通过单因素试验和正交试验相结合的方法,初步得到了摇瓶条件下枯草芽孢杆菌 CN181 菌株发酵的最佳培养基配方为:玉米粉 15.0 g·L⁻¹、豆粕 10.0 g·L⁻¹、NaCl 2.0 g·L⁻¹、K₂HPO₄ 2.0 g·L⁻¹;最适发酵条件为:初始 pH 值 8.0、250 mL 摇瓶装液量 30 mL、接种量 2%、培养温度 30 °C、培养转速 180 r·min⁻¹、培养时间 24 h。

研究表明,优化培养基中的碳源玉米粉和氮源豆粕与大多数研究者对枯草芽孢杆菌发酵培养基中碳源、氮源的研究结果一致,但在玉米粉和豆粕的用量上有所不同^[12,15,18],这表明:不同枯草芽孢杆菌对发酵液中 C/N 的要求不同。CN181 菌株更适合在 C/N 较大的环境中繁殖。研究还发现,CN181 菌株生长的最适金属离子为 Na⁺和 K⁺,这与前人的研究存在一定差异,王佳佳等^[8]的研究仅

选用了 Na^+ ; 丁翠珍等^[19]的研究表明, 虽然 Na^+ 和 K^+ 都是其优化出的最佳金属离子, 但其所选用的无机盐是 KNO_3 , 这与本研究中的 K_2HPO_4 有所不同; 赵斌等^[9]的研究则选用了 KH_2PO_4 和 CaCl_2 等金属离子; 刘雪等^[20]的研究虽然选用了 K_2HPO_4 中的 K^+ 做为最适金属离子之一, 但其还选用了 Fe^{2+} 和 Mg^{2+} 等金属离子作为发酵培养基中的复合金属离子, 这表明: 不同枯草芽孢杆菌对无机盐的需求有所不同; 然而, 章四平^[15]、张丽霞等^[12,18]和李小俊等^[16]的研究发现, CaCO_3 在枯草芽孢杆菌的发酵中是必不可少的无机盐类, 张丽霞等还认为 CaCO_3 对芽孢杆菌芽孢的形成及发酵液 pH 值的调节有重要作用。然而发酵条件对枯草芽孢杆菌繁殖的影响因不同菌株而异, 通过与前人的研究相比发现: 不同的菌株对 pH 值的要求差异较大, 但多数菌株喜中性或偏碱的环境^[8,9,12,16,19], 少数菌株喜偏酸的环境^[15,21]; 枯草芽孢杆菌多喜欢通气良好的环境; 枯草芽孢杆菌对温度的要求多为 $28\text{ }^\circ\text{C}\sim 32\text{ }^\circ\text{C}$ ^[8,9,12,15,19,21], 转速多为 $200\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 左右^[12,15,19,20], 对这两个条件的要求并无显著差异; 而在培养时间的研究中发现, 不同菌株对培养时间的要求存在显著差异, 本研究的最佳培养时间为 24 h, 这与李小俊等^[16]的研究一致, 且在前人研究的最佳培养时间 16 h~72 h 范围内^[8,15,16,19,21]。

本试验只是在摇瓶条件下对枯草芽孢杆菌 CN181 菌株的基础发酵培养基及发酵条件进行了初步探索, 而对于该菌株的产芽孢量及其在发酵过程中所产生的抗菌物质 (如抗菌蛋白或酶的活性及产量等), 以及在发酵罐中的培养和实际生产中对发酵条件的控制方面尚待进一步探索, 这将为该菌株的生防作用及工业化生产奠定基础。

参考文献

- [1] 王玉凤. 小麦叶锈病的生物防治及水杨酸诱导抗病性研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2011
- [2] 张云龙. 抗生素处理对桉树和番茄内生菌群落及内生菌防治青枯病效果的影响[D]. 保定: 河北农业大学, 2014
- [3] 焦文哲. 生防细菌和植物提取物等防治葡萄霜霉病研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2015
- [4] 李宝燕, 王培松, 王英姿. 葡萄霜霉病的生物药剂防治[J]. 农药, 2014, 53(11): 853-855
- [5] 李晶, 杨谦. 生防枯草芽孢杆菌的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(1): 106-111, 132
- [6] 戈登, 海恩斯, 帕格. 芽孢杆菌属[M]. 蔡妙英, 刘聿太, 战立克, 译. 北京: 农业出版社, 1983: 41-45
- [7] Cavaglieri L, Orlando J, Rodríguez MI, et al. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level[J]. Research in Microbiology, 2005, 156(5-6): 748-754
- [8] 王佳佳, 曹克强, 王树桐. 枯草芽孢杆菌 Bs-0728 菌株发酵条件的优化[J]. 河北农业大学学报, 2012, 35(6): 64-68
- [9] 赵斌, 齐永志, 李海燕, 等. 枯草芽孢杆菌 B1514 菌株发酵条件的优化与片剂制作研究[J]. 河北农业大学学报, 2014, 37(3): 60-65
- [10] 黄曦, 许兰兰, 黄荣韶, 等. 枯草芽孢杆菌在抑制植物病原菌中的研究进展[J]. 生物技术通报, 2010(1): 24-29
- [11] 李明, 双宝, 李海涛, 等. 枯草芽孢杆菌的研究与应用[J]. 东北农业大学学报, 2009, 40(9): 111-114
- [12] 张丽霞. 枯草芽孢杆菌 B908 发酵工艺优化研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2006
- [13] Younis MAM, Hezayen FF, Nour-Eldein MA, et al. Optimization of cultivation medium and growth conditions for *Bacillus subtilis* KO strain isolated from sugar cane molasses[J]. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science, 2010, 7(1): 31-37
- [14] 许志刚. 普通植物病理学实验指导[M]. 北京: 农业出版社, 1993: 57
- [15] 章四平, 刘圣明, 王建新, 等. 枯草芽孢杆菌生防菌株 NJ-18 的发酵条件优化[J]. 南京农业大学学报, 2010, 33(2): 58-62
- [16] 李小俊, 陈颖, 贾宇, 等. 生防菌株 A 的摇瓶培养条件及发酵工艺[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(4): 1614-1617
- [17] 方中达. 植病研究法[M]. 第三版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 191
- [18] 张丽霞, 李荣禧, 王琦, 等. 枯草芽孢杆菌发酵培养基的优化[J]. 中国生物防治, 2006, 22(增刊): 82-88
- [19] 丁翠珍, 裘季燕, 刘伟成, 等. 枯草芽孢杆菌 B02 产生拮抗物质培养基及发酵条件优化[J]. 中国生物防治, 2008, 24(2): 159-163
- [20] Liu Xue, Ye Jing, Mu Changqing, et al. Research on the fermentation conditions of *Bacillus subtilis* B-332[J]. Agricultural Science & Technology, 2013, 14(1): 81-85, 106
- [21] 何红, 沈兆昌, 邱思鑫, 等. 内生拮抗枯草芽孢杆菌 BS-2 菌株的发酵条件[J]. 中国生物防治, 2004, 20(1): 38-41