

文章编号: 1003-8701(2015)02-0087-05

解淀粉芽孢杆菌 15-1-1 的摇瓶发酵条件优化

张 雷, 赵长山*, 何付丽

(东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030)

摘 要: 探讨解淀粉芽孢杆菌 15-1-1 菌株液体发酵条件, 为提高其活性次级代谢产物的产量提供支持。通过单因素试验和正交试验, 对该菌株的最适发酵培养基成分及发酵条件进行优化, 结果表明: 15-1-1 菌株培养基各组分的最佳配比为: 葡萄糖 2.0%、蛋白胨 0.5%、酵母浸膏 1.0%、氯化钠 0.5%。最佳发酵培养条件为: 初始 pH 值 7.0, 培养温度 32℃, 培养时间 36 h, 250 mL 三角瓶通气量 40 mL, 接种量体积分数 5%。

关键词: 解淀粉芽孢杆菌; 单因素试验; 正交试验; 发酵条件优化

中图分类号: S182

文献标识码: A

DOI: 10.16423/j.cnki.1003-8701.2015.02.023

Optimization of Fermentation Conditions for the Antagonistic *Bacillus amyloliquefacien* 15-1-1 Strain

ZHANG Lei, ZHAO Chang-shan*, HE Fu-li

(College of Agronomy, Northeast Agricultural University, 150030, China)

Abstract: The research was to investigate the best conditions for liquid fermentation of *Bacillus amyloliquefacien* 15-1-1 strain and increase the antagonistic substance productivity of strain 15-1-1. The single factor experiments and orthogonal experiments were adopted to optimize the liquid fermentation medium and conditions. The results showed that optimum medium formula was glucose 2.0%, peptone 0.5%, yeast extract 1.0%, NaCl 0.5%. The optimal fermentation conditionals were as follows: initial pH value of medium 7.0, fermentation temperature 32℃, 5% inoculation volume, 40mL ventilation, cultured in 250mL flask for 36 h.

Keywords: *Bacillus amyloliquefacien*; Single factor experiment; Orthogonal experiment; Optimization of fermentation conditions

解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefacien*) 是一种与枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 亲缘性很高的细菌, 具有广泛的抑制真菌和细菌的活性, 因此, 许多研究人员在菌株分离筛选和发酵条件的优化方面作了大量的研究, 通过提高发酵水平为活性产物的分离提取及结构鉴定等研究提供基础^[1-2]。本文对 1 株新发现的辣椒根腐病生防细菌 15-1-1 的摇瓶发酵条件进行优化, 以提高菌株的抗菌物质产量, 为抗菌物质的分离、纯化与结构鉴定奠定基础。

1 材料与方 法

收稿日期: 2014-10-12

作者简介: 张 雷 (1987-), 男, 在读硕士, 研究方向为植物病虫害生物防治。

通讯作者: 赵长山, 男, 教授, 博士生导师, E-mail: csz_hlj@sohu.com

1.1 材 料

腐皮镰孢菌 (*Fungi Imperfecti*) 由东北农业大学病理学实验室提供。解淀粉芽孢杆菌 15-1-1 由本实验室于黑龙江辣椒根际土壤中分离筛选得到, 对辣椒根腐病室内盆栽试验的防效达 70.86%。

1.2 种子液及发酵滤液的制备

菌株活化后接于 100 mL NA 液体培养基中, 28℃, 150 r/min, 摇床振荡培养 24 h 即为种子菌液。发酵液于 10 000 r/min 离心 20 min, 上清液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 即可得到含有抑菌活性物质的无菌发酵滤液^[3]。

1.3 含菌量与吸光度相关性的测定

将种子液按 10 倍稀释梯度依次稀释成 8 个浓度, 并用血球计数板测定每个梯度细菌的数量, 计数时用美蓝染色法区别死菌与活菌。以同等稀释倍数的 NA 培养基为对照, 检测各稀释液的

OD₆₀₀值,以发酵液活菌数为纵坐标,吸光度值为横坐标,建立标准曲线^[3-4]。

1.4 抑菌活性检测

利用混毒介质法^[5]测定抑菌活性。将病原菌的菌饼接种在含无菌发酵滤液 200 μ L 和 20 mL PDA 的培养基中间,以加无菌水 PDA 培养基为对照,重复 3 次。28 $^{\circ}$ C 培养 4 d,测量菌圈的直径,并计算抑菌直径。抑菌圈直径(mm)=空白对照菌落直径(mm)-处理菌落直径(mm)。

1.5 发酵培养基成分优化

1.5.1 单因素试验

(1)碳源:在 NA 培养液中,分别以 1% 的葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、可溶性淀粉、糊精、甘油、玉米淀粉取代培养液中的碳源;(2)氮源:分别以 1% 的蛋白胨、胰蛋白胨、牛肉膏、酵母粉、酵母浸膏、尿素、硫酸铵、硝酸铵、氯化铵和硝酸钾取代培养液中的氮源;(3)无机盐:在 NA 培养液中分别添加 0.5% 的氯化钠、硫酸锰、乙酸钠、磷酸氢二钾、碳酸钙、硫酸铜、硫酸锌,以不添加无机盐的培养基作为对照。培养条件:接种量 10%,装液量 50 mL,28 $^{\circ}$ C,150 r/min,摇床振荡培养 48 h。每处理 3 次重复^[3,6]。

1.5.2 多因素正交试验

以单因素试验筛选出的最佳碳源、氮源、无机盐为变异因素,采用 L₁₆(4³) 试验正交表进行培养基优化试验,从中选出菌株发酵液的最佳培养基配比。

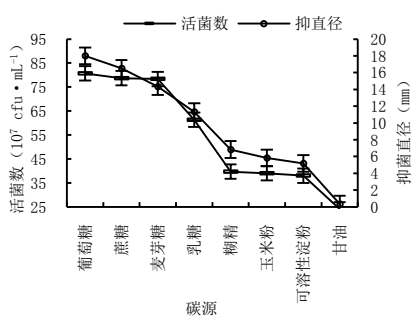


图1 不同碳源对15-1-1菌株的活菌量和抑菌活性的影响

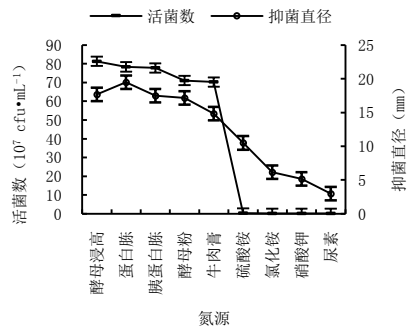


图2 不同氮源对15-1-1菌株的活菌量和抑菌活性的影响

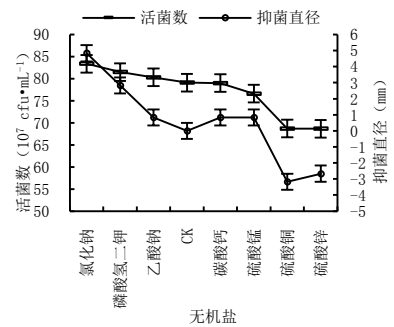


图3 不同无机盐对15-1-1菌株的活菌量和抑菌活性的影响

以葡萄糖为固定碳源,选择不同的氮源培养 15-1-1 菌株,结果表明(图2):不同氮源对菌株产生抑菌活性物质具有显著影响。以尿素为氮源的培养基中,菌株生长量最小且基本无抑菌活性,说明菌株不能利用尿素。以硝酸钾、氯化铵和硝酸铵为氮源的培养基中,菌株生长量虽不大,但菌株的发酵滤液活性较强,可见菌株不能有效利用无机氮源,可以很好的利用有机氮源。以酵母

1.5.3 菌株发酵条件的优化

对 15-1-1 菌株发酵温度、通气量、初始 pH 值、时间及接种量等发酵条件进行优化。温度: 20, 24, 28, 32, 36, 40 $^{\circ}$ C。通气量: 20, 40, 80, 100 mL。初始 pH 值: 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0; 发酵时间: 12, 18, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 h。接种量: 1%, 3%, 5%, 7%, 10%, 13%。每处理 3 次重复^[7-8]。

2 结果与分析

2.1 菌量与吸光度值的相关性关系

以发酵液活菌数为纵坐标,吸光度值为横坐标,建立标准曲线。15-1-1 菌株发酵液活菌数与 OD₆₀₀ 呈良好的线性相关,故可用液体培养基的 OD₆₀₀ 来计算活菌量,标准曲线为 $y=0.7813x+15.1972x$, $R^2=0.9861$ 。

2.2 碳源、氮源及无机盐的筛选

以蛋白胨为固定氮源,选择不同碳源培养 15-1-1 菌株。结果表明(图1),不同碳源的发酵滤液均具有抑菌活性。可溶性淀粉、糊精和玉米粉对菌株抑菌活性影响较小,说明菌株利用复合碳源的能力较差。甘油的产菌量最低而且发酵液几乎没有活性,说明甘油不能作为菌株的碳源。以葡萄糖为碳源的发酵液抑菌圈直径及活菌量均达到最大值 18.0 mm 和 8.07×10^8 cfu·mL⁻¹,效果明显优于其它碳源,因此选择葡萄糖为 15-1-1 菌株的最佳碳源。

浸膏为氮源的培养基中产菌量最高,为 8.13×10^8 cfu·mL⁻¹,其抑菌圈直径略低于蛋白胨;以蛋白胨为氮源的培养基中,菌株生长量虽略低,但菌株的发酵滤液抑菌活性最强,抑菌圈直径为 19.5 mm。因此,选择蛋白胨和酵母浸膏作为发酵培养的复合氮源。

由图3可见,不同无机盐对 15-1-1 菌株活菌数和抑菌作用的影响不同。氯化钠能显著提高菌

株产菌量和抑菌活性物质的产生,抑菌圈直径比对照大 4.8mm;碳酸钙和硫酸锰对抑菌物质的产生无显著影响;硫酸铜和硫酸锌的菌株产量明显低于对照,且抑菌效果也低于对照,可见硫酸铜和硫酸锌显著抑制菌株抑菌活性物质的产生。因此选用氯化钠作为无机盐。

2.3 正交试验

根据以上单因素试验对 15-1-1 菌株发酵的影响选定培养基成分,选用 $L_{16}(4^5)$ 正交表设计 5 因素 4 水平正交试验,以无菌发酵滤液的抑菌活性为指标,确定培养基中各组分的最佳用量。结果表明最佳配比为:葡萄糖 2.0%、蛋白胨 0.5%、酵母浸膏 1.0%、氯化钠 0.5%。

表 1 $L_{16}(4^5)$ 正交试验结果

处理	葡萄糖(%)A	蛋白胨(%)B	酵母浸膏(%)C	NaCl(%)D	空列 E	抑菌圈直径(mm)
1	10(0.5%)	1(0.3%)	1(0.3%)	1(0.3%)	1	10.50
2	1(0.5%)	2(0.5%)	2(0.5%)	2(0.5%)	2	11.50
3	1(0.5%)	3(1%)	3(1%)	3(1%)	3	12.17
4	1(0.5%)	4(2%)	4(2%)	4(2%)	4	11.60
5	2(1%)	1(0.3%)	2(0.5%)	3(1%)	4	16.50
6	2(1%)	2(0.5%)	1(0.3%)	4(2%)	3	16.00
7	2(1%)	3(1%)	4(2%)	1(0.3%)	2	15.23
8	2(1%)	4(2%)	3(1%)	2(0.5%)	1	18.33
9	3(2%)	1(0.3%)	3(1%)	4(2%)	2	17.70
10	3(2%)	2(0.5%)	4(2%)	3(1%)	1	19.33
11	3(2%)	3(1%)	1(0.3%)	2(0.5%)	4	16.20
12	3(2%)	4(2%)	2(0.5%)	1(0.3%)	3	18.33
13	4(3%)	1(0.3%)	4(2%)	2(0.5%)	3	16.80
14	4(3%)	2(0.5%)	3(1%)	1(0.3%)	4	15.50
15	4(3%)	3(1%)	2(0.5%)	4(2%)	1	14.83
16	4(3%)	4(2%)	1(0.3%)	3(1%)	2	13.33
K1	45.77	61.50	56.03	59.57		
K2	66.07	62.33	61.17	62.83		
K3	71.57	58.43	63.70	61.33		
K4	60.47	61.60	62.97	60.13		
k1	11.44	15.38	14.01	14.89		
k2	16.52	15.58	15.29	15.71		
k3	17.89	14.61	15.93	15.33		
k4	15.12	15.40	15.74	15.03		
Ri	6.45	0.97	1.92	0.82		
主次序				A>C>B>D		
优水平				A ₃ B ₂ C ₃ D ₂		

2.4 15-1-1 菌株发酵条件优化

从图 4 可以看出,不同培养温度对 15-1-1 菌株的活菌量和抑菌活性都有很大影响,在 20~32℃ 温度范围内,菌株产量和抑菌活性随着温度的提高而提高。当培养温度达到 32℃ 时,15-1-1

菌株的产量和抑菌活性均达到最大值,菌株生长量为 8.53×10^8 cfu · mL⁻¹,抑菌圈直径达 25.3 mm。随温度继续升高,菌株产量和抑菌活性开始下降,说明温度偏高不利于 15-1-1 菌株的生长,也不利于抑菌活性物质的产生。因此,选用 32℃ 作

为15-1-1菌株最佳发酵温度。

由图5可见,当pH值为7.0时,15-1-1菌株生长量和抑菌活性物质活性达到最大值,活菌量达 $8.66 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$,抑菌圈直径达25.2 mm,说明弱酸性和中性环境适宜菌株生长及抑菌活性物质的产生。因此,选择pH7.0为最佳初始pH。

由图6可见,接种量在1%~7%范围内15-1-1菌株所产生的抑菌活性物质均具有较高活性,且不存在显著差异。当接种量为5%时菌株产量和产抗菌物质能力达最大值,当接种量大于5%时产菌量随接种量的增大而减小,引起的原因可能是由于接种量增大而过度消耗培养基的营养成分。因此,选用5%接种量。

由图7可见,当通气量为40 mL时菌体活菌量最高,达 $8.26 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$,抑菌活性物质的抑菌圈直径最大达25.3 mm。当通气量达到60 mL时,活菌量有所下降,说明15-1-1菌株生长对通气量有一定的要求,装液量过少或过大,都不利

于菌株的发酵。当通气量在20~60 mL之间时,抑菌活性无显著性差异,但由于在温室和田间试验中,活菌的浓度越高越有利于菌株在植物上的定殖,而增强防治的效果。因此,宜选用40 mL为最佳通气量。

由图8可见,在12~36 h,随着培养时间的增加,培养基中的活菌量也逐步增加,36 h时活菌量达最大值;在36~60 h,随着培养时间的延长,生长量呈一定的下降趋势;在60~72 h,生长量增加;在72~96 h,活菌数再次下降;在96~108 h,生长量再次增加,符合细菌的生长周期规律。无菌发酵滤液抑菌活性测定结果表明,36~60 h内抑菌圈直径最大,彼此间不存在显著差异,抑菌物质产量在48 h达最大,比菌株生长高峰期略晚。随着培养时间的延长,抑菌物质活性也有所降低,这可能是由于培养过程中有其他抑制活性菌的物质产生。综合以上结果,以36 h为15-1-1菌株最佳发酵时间。

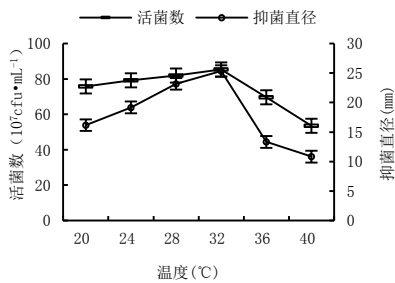


图4 不同温度对15-1-1菌株的活菌量和抑菌活性的影响

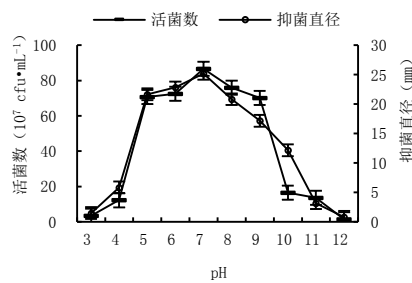


图5 不同pH对15-1-1菌株的活菌量和抑菌活性的影响

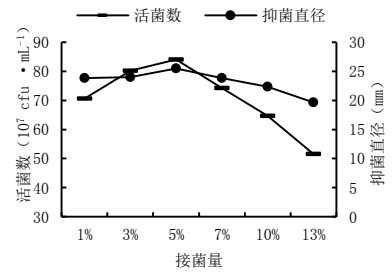


图6 不同接种量对15-1-1菌株的活菌量和抑菌活性的影响

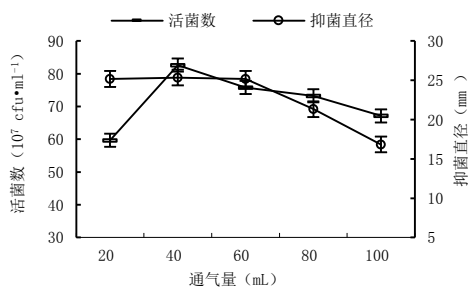


图7 不同通气量对15-1-1菌株的活菌量和抑菌活性的影响

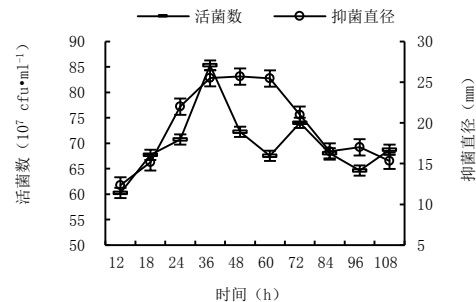


图8 不同培养时间对15-1-1菌株的活菌量和抑菌活性的影响

3 结论

本试验通过单因素试验和正交试验,对菌株15-1-1发酵培养基成分及发酵条件进行优化。确定其最佳发酵培养基配方和发酵培养条件为:葡萄糖2.0%、蛋白胨0.5%、酵母浸膏1.0%、氯化

钠0.5%;初始pH值7.0,培养温度32℃,培养时间36 h,250 mL三角瓶通气量40 mL,接种量体积分数5%。本试验通过对15-1-1菌株发酵条件的系统研究,提高了15-1-1菌株产生抗菌活性物质的能力,为其后续研究奠定基础。实验表明在不同的培养条件下菌株生长量与抑菌活性的变化也不

完全一致,说明微生物合成次级代谢产物是一个复杂多相的过程。

参考文献:

- [1] 洪 鹏,安国栋,胡美英,等.解淀粉芽孢杆菌防治果蔬采后病害研究进展[J].中国农学通报,2013,29(12):168-173.
- [2] 车晓曦,李校堃.解淀粉芽孢杆菌的研究进展[J].北京农业,2010(3):7-10.
- [3] 纪明山.地衣芽孢杆菌生防菌株 SDYT-79 发酵条件优化[J].沈阳农业大学学报,2011,42(2):164-169.
- [4] 章小洪,王 琨,朱廷恒,等.解淀粉芽孢杆菌 BW-13 培养基和培养条件优化[J].浙江工业大学学报,2013,41(1):

35-39.

- [5] Wizna H A, Rizal Y, Dharma A, et al. Improving the quality of tapioca by-products(onggok) as poultry feed through fermentation by *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. Pakistan Journal of Nutrition, 2009, 8(10): 1636-1640.
- [6] 张文芝,王云鹏,刘红霞,等.蜡质芽孢杆菌 AR156 发酵培养基及发酵条件的优化[J].微生物学通报,2010,37(6):803-810.
- [7] 陈 成,崔堂兵,于平儒.一株抗真菌的解淀粉芽孢杆菌的鉴定及其抗菌性研究[J].现代食品科技,2011,27(1):36-39.
- [8] 洪 鹏,安国栋,胡美英,等.解淀粉芽孢杆菌 HF-01 发酵条件优化[J].中国生物防治学报,2013,29(4):569-578.

(上接第 63 页)因此精异丙甲草胺、硝磺草酮、莠去津对白僵菌孢子萌发抑制机理及这 5 种除草剂对白僵菌菌丝生长影响还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 陈嘉恒,吴国杰,陈宗发,等.白僵菌及其在农业生产上的应用[J].仲恺农业工程学院学报,2012,25(12):66-69.
- [2] 何末军,周国英,李燕荣.环境条件及常见农药对球孢白僵菌生长的影响[J].福建林业科技,2009,36(2):31-35.
- [3] 汪敏捷,雷 玲,王建华,等.不同温湿度下白僵菌对红缘天牛幼虫致病力的研究[J].天津大学学报(自然科学版),2013,33(3):79-82.
- [4] 蔡 悦,张胜利,李增智.球孢白僵菌与几种化学杀虫剂

和除草剂的相容性[J].中国生物防治学报,2011,27(3):316-323.

- [5] 邝灼彬,吕利华,冯 夏,等.温度及常见农药对球孢白僵菌生物学特性的影响[J].华南农业大学学报,2005,26(3):26-29.
- [6] 孙佰平,杜 琴,赵思峰,等.球孢白僵菌 CXJ-1 与吡虫啉防治棉蚜配方筛选和田间防治效果[J].中国棉花,2013,40(5):8-12.
- [7] 赵 迪,刘 彬,李玲玉.白僵菌及其伴生菌发酵液对线虫的毒力研究[J].农药学报,2013,15(2):178-182.
- [8] 李丽莉,张思聪,练永国,等.杀菌剂对感染越冬桃小食心虫的白僵菌的抑制作用[J].微生物学通报,2013,40(6):999-1007.

(上接第 70 页)WP 差异显著,40%丙环唑 ME 与 30%醚菌酯 SC、43%戊唑醇 SC、25%烯唑醇 EC、25%三唑酮 WP 差异显著,30%醚菌酯 SC、43%戊唑醇 SC 与 25%烯唑醇 EC、25%三唑酮 WP 差异显著,25%烯唑醇 EC 差异显著好于 25%三唑酮 WP。40%氟硅唑 EC 与 10%苯醚甲环唑 WDG 间、30%醚菌酯 SC 与 43%戊唑醇 SC 间差异不显著。

杀菌剂对油梨溃疡病抑制效果及毒力测定尚未有研究报道,室内毒力测定试验只为油梨溃疡病防治提供参考依据。油梨溃疡病的绿色防控是一项系统工程,在油梨植株上的防治效果是否与试验结果一致,有待试验研究。

参考文献:

- [1] 何国祥,陈海红.我国油梨生产的现状及发展前景[J].厦

门大学学报,2001(4):229-234.

- [2] 钟思强.油梨的营养价值和保健作用[J].广西热带农业,2002(4):19-21.
- [3] 张慧坚,韦家少.国内外油梨生产及贸易概况[J].世界农业,2005(12):24-27.
- [4] 李 丽,李隆伟.中国油梨产业发展现状与建议[J].中国热带农业,2012(3):8-10.
- [5] 方中达.植物研究方法[M].北京:中国农业出版社,1998:122-125.
- [6] 曹志华,束庆龙,程义明,等.12种农药对油茶炭疽病的室内毒力测定[J].农药,2012(4):304-306.
- [7] 吴雪平,邓天福,项志锋,等.蓖麻籽水提物对玉米小斑病菌的毒力测定[J].吉林农业科学,2006,31(4):43-44.
- [8] 孙广宇,宗兆锋.植物病理学实验技术[M].北京:中国农业出版社,2002:206.
- [9] 韦文添.不同杀菌剂对油梨炭疽病菌的抑菌效果[J].贵州农业科学,2014,42(5):125-127.