

# 枯草芽胞杆菌 GB519 发酵液菌体数量和芽胞率检测方法的比较

朱峰<sup>1</sup>, 王继春<sup>1\*</sup>, 田成丽<sup>1</sup>, 向媛媛<sup>2</sup>, 张富浩<sup>2</sup>, 祁山颜<sup>1</sup>, 王东元<sup>3</sup>, 姜兆远<sup>1</sup>, 刘晓梅<sup>1</sup>, 李莉<sup>1</sup>, 任金平<sup>1</sup>, 窦忠玉<sup>4</sup>

(1. 吉林省农业科学院植物保护研究所/农业部东北作物有害生物综合治理重点实验室, 吉林 公主岭 136100; 2. 哈尔滨师范大学生命科学与技术学院, 哈尔滨 150025; 3. 沈阳农业大学植物保护学院, 沈阳 110866; 4. 吉林省农业科学院作物资源研究所, 吉林 公主岭 136100)

**摘要:** 为了提高枯草芽胞杆菌 GB519 发酵液菌体数量和芽胞率的统计效率, 本研究采用平板涂布法和平板倾注法进行活菌计数, 利用加热除菌法、结晶紫染色法和孔雀绿染色法开展芽胞率检测效率的比较研究。结果表明: 平板涂布法与倾注法的菌体计数数量差异不大, 误差率相对一致。枯草芽胞杆菌 GB519 利用结晶紫染色法与孔雀绿染色法检测芽胞率差异不显著。确定了枯草芽胞杆菌 GB519 加热除菌法菌体致死温度为 80℃、时间为 15 min, 其芽胞量为  $131.9 \times 10^8$  CFU/mL, 芽胞率为 50.1%, 与孔雀绿染色法 (54.8%) 差异不显著, 与结晶紫染色法芽胞率 (58.7%) 差异显著。本研究将为类似的芽胞检测研究提供方法和数据参考。

**关键词:** 枯草芽胞杆菌 GB519; 活菌计数; 芽胞; 芽胞率

中图分类号: Q93-3

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2019)06-0049-04

## Methods Comparison for Detecting Sporular Amount and Sporulation Efficiency of *Bacillus Subtilis* GB519

ZHU Feng<sup>1</sup>, WANG Jichun<sup>1\*</sup>, TIAN Chengli<sup>1</sup>, XIANG Yuanyuan<sup>2</sup>, ZHANG Fuhao<sup>2</sup>, QI Shanyan<sup>1</sup>, WANG Dongyuan<sup>3</sup>, JIANG Zhaoyuan<sup>1</sup>, LIU Xiaomei<sup>1</sup>, LI Li<sup>1</sup>, REN Jinping<sup>1</sup>, DOU Zhongyu<sup>4</sup>

(1. Institute of Plant Protection/Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Northeast, Ministry of Agriculture, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100; 2. College of Life Science & Technology, Harbin Normal University, Harbin 150025; 3. Plant Protection College, Shenyang Agricultural University, Liaoning Shenyang 110866; 4. Institute of Crop Resources, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100, China)

**Abstract:** In order to improve the statistical efficiency of the sporular amount and germination rate in the fermentation broth of *Bacillus subtilis* GB519, the methods both plate coating and plate pouring were used to count the viable bacteria. And the methods of heat sterilization, crystal violet and malachite green staining were used to compare with the germination rate. The results showed that there was little difference in sporular amount between plate coating and pouring method, and the error rate was relatively consistent. It was determined that the lethal temperature and time of heat sterilization method were at 80℃ for 15 min, and the sporular amount and germination rate of that were  $131.9 \times 10^8$  CFU/mL and 50.1%, respectively, which was no significantly different from malachite green staining (54.8%), and was significantly different from that of crystal violet staining (58.7%). This study could provide positive conferences from both parameters and methods for the similar research.

**Key words:** *Bacillus subtilis* GB519, Viable count, Sporular, Sporulation efficiency

收稿日期: 2019-04-17

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0200200、2018YFD0300200); 吉林省农业科技创新工程项目(CXGC2017TD010); 吉林省农业科学院博士后基金项目(188320)

作者简介: 朱峰(1985-), 男, 助理研究员, 博士, 从事水稻病害生物防治研究。

通讯作者: 王继春, 男, 博士, 副研究员, E-mail: wangjichun@cjaas.com

枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)是一种能产芽胞的革兰氏阳性杆状细菌,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。具有抑制植物病害的作用<sup>[1-2]</sup>,又是自然界中广泛存在的非致病细菌,对环境友好而备受青睐<sup>[3]</sup>。其芽胞具有抗逆性强、利于保藏,能在极端条件下存活,适合制成生物菌剂<sup>[4-5]</sup>。目前,一些枯草芽胞杆菌的生物农药已经应用于植物病害的生物防治中。迄今为止,已报道的枯草芽胞杆菌类生物农药产品基本为芽胞制剂<sup>[6-7]</sup>。微生物菌剂大都以活菌作为产品有效成分,有效活菌数是衡量其品质的重要指标,达到相当的活菌数才能具有较好的防治病害的效果<sup>[8-9]</sup>。

由于菌株间的差别、样本量大小和研究方法不同,枯草芽胞杆菌芽胞率统计结果有较大的差异<sup>[10]</sup>,这对生产和研究产生巨大的影响。本实验室针对能有效抑制水稻稻瘟病菌孢子萌发和菌丝生长,并能够促进水稻植株的生长发育作用的枯草芽胞杆菌 GB519(未发表数据),采用加热除菌法、结晶紫染色法和孔雀绿染色法对枯草芽胞杆菌 GB519的芽胞率进行了比较分析。期望进一步研究该菌株的生长规律,促进开发成一种新型的生物农药,同时推动本领域研究发展。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试菌种

枯草芽胞杆菌 GB519,本研究室保存。

### 1.2 仪器与试剂

仪器:灭菌锅、恒温摇床、生化培养箱、电子天平、移液枪。

试剂:蛋白胨、氯化钠、琼脂、酵母浸膏、结晶紫、孔雀绿、番红,均购买于北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 GB519 菌株种子液培养

从新活化的平板上,挑取单菌落至 50 mL LB 种子培养液的 250 mL 三角瓶中,在 120 r/min、37℃ 摇床中培养 12~16 h,达到 OD<sub>600</sub> 值为 0.5。

#### 1.3.2 摇瓶扩繁

以 5% 接种量接种种子液于 LB 培养液的三角瓶中,置于 120 r/min、30℃ 摇床中培养 48 h。

#### 1.3.3 活菌计数方法的比较,参考周德庆方法<sup>[11]</sup>

##### (1) 平板涂布法

采用梯度稀释法,将 48 h 的发酵液稀释至 10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup>、10<sup>-8</sup>、10<sup>-9</sup> 倍。每个 LB 琼脂平板涂

布发酵稀释液 100 μL,倒置于 30℃ 培养箱中培养 48 h 后计数。发酵液中活菌数(CFU/mL)=每皿平均菌体数×50×10×该发酵液的稀释倍数。

##### (2) 平板倾注法

取 1 mL 上述发酵稀释液,加入到 100 mL 50℃ 左右的 LB 琼脂培养基中,充分混匀,将每个稀释度倾倒入 5 个平板,待琼脂凝固后倒置,30℃ 恒温培养 48 h 后统计每一个稀释度的菌体总数。发酵液中活菌数(CFU/mL)=5 个皿的菌量总数×50×该发酵液的稀释倍数。

#### 1.3.4 加热除菌法—菌体致死温度与时间的确定

菌剂在生产过程中需要在一定温度、加热一定时间达到消灭杂菌的目的,同时还要保障对目标菌株活力影响相对较小,为此针对 GB519 发酵环节开展此研究。

##### (1) 加热除菌法—菌体致死温度的确定

参照杜连祥<sup>[12]</sup>和 Huo 等<sup>[13]</sup>方法并做修订。取 10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup>、10<sup>-8</sup>、10<sup>-9</sup> 各稀释倍数的 GB519 发酵液,分别于 70℃、75℃、80℃、85℃、90℃、95℃、100℃ 的水浴锅中恒温水浴 10 min 后统计活菌数,初步将此数目作为该条件下发酵液中的芽胞数目,比对该发酵液中菌体总数(25℃ 下)即为该处理下的芽胞率。芽胞率(%)=芽胞总数(CFU/mL)/菌体总数(CFU/mL)×100%

##### (2) 加热除菌法—菌体致死时间的确定

参照姚露燕等<sup>[14]</sup>和 Quintavalla 等<sup>[15]</sup>方法并做修订。取 10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup>、10<sup>-8</sup>、10<sup>-9</sup> 各稀释倍数的 GB519 发酵液,于最佳选择温度条件下在水浴锅中分别恒温水浴 5 min、10 min、15 min、20 min、25 min、30 min、45 min、60 min,分别统计活菌数,计算芽胞率。芽胞率统计方法同上。

#### 1.3.5 芽胞计数方法的比较

##### (1) 结晶紫染色法

将培养 48 h 的 GB519 发酵液涂片、干燥及加热固定后,滴加结晶紫染色剂,静置 0.5~1 min,水洗、干燥后在 100 倍显微镜下镜检 10 个视野,统计菌体数和芽胞数。

##### (2) 孔雀绿染色法

根据方中达<sup>[16]</sup>方法,将培养 48 h 的 GB519 发酵液涂片、干燥及加热固定后,滴加孔雀绿染剂在酒精灯外焰加热 1 min,勿使染液沸腾或蒸干。冷却后水洗再用番红水溶液复染 15 min,水洗、干燥后镜检 10 个视野,统计菌体数和芽胞数。

##### (3) 加热除菌法

参考 Huo 等<sup>[13]</sup>、Quintavalla 等<sup>[15]</sup>方法,采用 1.3.4

中确定的最佳菌体致死温度与时间处理GB519发酵液,统计芽胞量和芽胞率。

### 1.3.6 数据统计与分析

采用软件SPSS 19.0对数据进行差异显著性分析( $P<0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 活菌计数法的比较

将GB519发酵液采用不同的菌体计数法和不同的稀释倍数,菌体计数结果不同。采用平板涂布法,稀释 $10^6$ 和 $10^7$ 比 $10^5$ 倍的菌体数量分别提高了7.0%和23.7%,而平板倾注法在相同的情况下分别提高了5.1%和24.2%(表1)。随着稀释倍数的增大,菌体计数的误差也随着增大,平板涂布法与平板倾注法的菌体数误差率没有显著差异。当稀释倍数 $10^8$ 和 $10^9$ 倍时,两种菌体计数方法的计数结果均有较大的误差。

表1 平板涂布法与平板倾注法菌体数量的比较

稀释倍数	菌体数( $\times 10^{10}$ CFU/mL)		误差率(%)	
	平板涂布法	平板倾注法	平板涂布法	平板倾注法
$10^5$	2.59 $\pm$ 0.34	2.04 $\pm$ 0.09	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
$10^6$	2.78 $\pm$ 0.42	2.14 $\pm$ 0.21	7.0 $\pm$ 4.0	5.1 $\pm$ 7.5
$10^7$	3.20 $\pm$ 0.30	2.53 $\pm$ 0.25	23.7 $\pm$ 4.5	24.2 $\pm$ 9.3
$10^8$	4.00 $\pm$ 2.65	5.83 $\pm$ 0.29	47.3 $\pm$ 89.4	186.3 $\pm$ 11.4
$10^9$	0.33 $\pm$ 0.58	5.00 $\pm$ 0.00	-88.6 $\pm$ 19.7	145.6 $\pm$ 10.1

### 2.2 加热除菌法—菌体致死温度的确定

对菌体不同温度处理后,检测到的芽胞量和芽胞率均有较大的差异(图1)。处理温度低于75 $^{\circ}$ C时,芽胞率高于91.7%。特别是70 $^{\circ}$ C时,芽胞量和芽胞率分别为263.9 CFU/mL和112.8%,均高于对照处理。处理温度高于95 $^{\circ}$ C时,芽胞量和芽胞率分别低于33.0 CFU/mL和14.0%,显著地低于

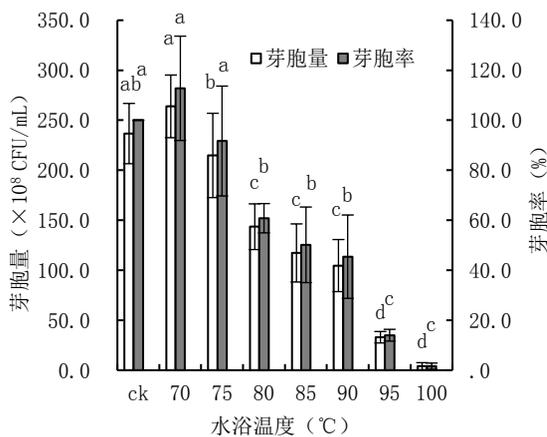


图1 不同水浴温度对芽胞量与芽胞率的影响

对照处理。80 $^{\circ}$ C、85 $^{\circ}$ C和90 $^{\circ}$ C三者处理时的芽胞量和芽胞率差异不显著,但与其他温度处理有显著差异。由于温度过低或过高都会影响芽胞率,所以菌液的处理适宜温度选择80 $^{\circ}$ C。

### 2.3 加热除菌法—菌体致死时间的确定

当80 $^{\circ}$ C处理时,随着处理时间的增加,芽胞量和芽胞率也随着降低(图2)。当处理时间为5 min时,芽胞量显著低于对照,但芽胞率与对照差异不显著。处理时间为10 min及以上时,芽胞量和芽胞率与对照和处理5 min时有显著差异。当15 min处理时,芽胞量和芽胞率分别为106.3 CFU/mL和51.0%,显著低于处理10 min,与20 min和25 min处理无显著差异,与30 min处理以上差异显著。30 min以上处理时,芽胞量和芽胞率无显著差异。由于处理时间过长会影响芽胞率,所以菌液的处理时间选择15 min。

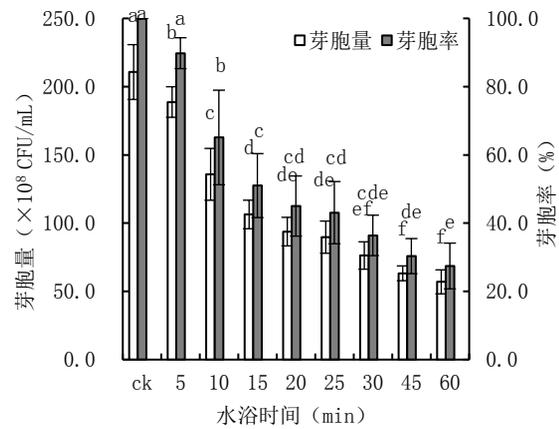


图2 不同水浴时间对芽胞量与芽胞率的影响

### 2.4 芽胞计数方法的比较

由于芽胞率统计方法不同,芽胞量和芽胞率的结果有所不同(图3)。用平板法检测芽胞率为50.1%,显著低于结晶紫染色法(58.7%),与孔雀

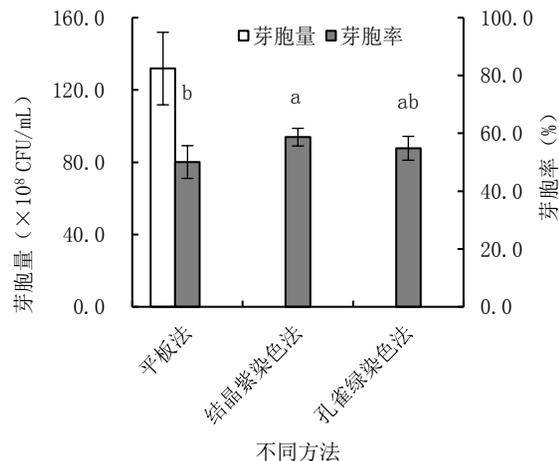


图3 不同测定方法对芽胞率的影响

绿染色法的芽胞率(54.8%)差异不显著。用平板法检测芽胞量为131.9 CFU/mL,而其他两种染色法均不能检测芽胞量。因此,枯草芽胞杆菌GB519芽胞量和芽胞率的检测方法选择平板检测法。

### 3 结论与讨论

细菌活体在农业生产尤其在生物农药和生物肥料研究中具有广泛的应用<sup>[17-18]</sup>,芽胞计数非常重要,其测定方法多种多样。目前,应用最广泛且最稳定的方法是平板稀释法,其又分为平板涂布法和平板倾注法,前者相对简便、快捷、准确率高和重复性较好,后者菌落容易黏连而降低准确性<sup>[19-20]</sup>。细菌在适宜条件下能够迅速完成分裂与繁殖。水浴温度在70℃和75℃时,不能有效地杀死菌体,可能随着水浴时间的增加,菌体的繁殖和芽胞的复苏导致测得芽胞率偏高。而水浴温度过高时,除了菌体被杀死,部分芽胞也可能被杀死,导致测得芽胞率偏低。本研究通过对水浴温度和时间试验,确定了菌株GB519最佳水浴处理温度为80℃,处理时间为15 min,与近年来的相关研究结果相近<sup>[13, 15]</sup>。

孔雀绿染色法是观察芽胞的方法之一,在加热条件下用孔雀绿染色剂进行染色,菌体和芽胞均被染成绿色。由于芽胞壁厚,进入芽胞的染料难以透出,仍然为绿色。再经番红染色后菌体为红色。由于染色困难,芽胞不易着色,且易与红色菌体混淆,分辨率较差。洗脱时间相对较长,不易充分洗掉染色剂而造成假阳性<sup>[21]</sup>。结晶紫染色法视野中杂质干扰较少,芽胞被染成淡紫色,菌体为深紫色,相比孔雀绿染色法区分较容易。两种染色方法只能检测芽胞率,不能统计菌体数量和芽胞量。加热除菌法、结晶紫染色法和孔雀绿染色法检测方法各有优缺点,应根据实际情况选择合适的检测方法检测发酵液的芽胞率。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Meng X K, Yu J J, Yu M N, et al. Dry flowable formulations of antagonistic *Bacillus subtilis* strain T429 by spray drying to control rice blast disease[J]. *Biological Control*, 2015, 85: 46-51.
- [ 2 ] Fan H Y, Ru J J, Zhang Y Y, et al. Fengycin produced by *Bacillus subtilis* 9407 plays a major role in the biocontrol of apple ring rot disease[J]. *Microbiological Research*, 2017, 199: 89-97.
- [ 3 ] 张丽霞,李荣禧,王琦,等.枯草芽胞杆菌发酵培养基的优化[J].*中国生物防治*,2006,22(增刊):82-88.
- [ 4 ] Sen R, Swaminathan T. Application of response surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1997, 47: 358-363.
- [ 5 ] 邓进超,关一鸣,吴连举,等.人参锈腐病菌拮抗菌的筛选、鉴定及发酵条件优化[J].*东北农业科学*,2017,42(3):31-38.
- [ 6 ] Liu Y Z, Chen Z Y, Liu Y F, et al. Enhancing bioefficacy of *Bacillus subtilis* with sodium bicarbonate for the control of ring rot in pear during storage[J]. *Biological Control*, 2011, 57: 110-117.
- [ 7 ] 冀瑞卿,冯冲,柏文博,等.两种生防制剂对食用菌杂菌的抑菌作用[J].*吉林农业科学*,2014,39(2):61-64,77.
- [ 8 ] 刘辉,魏祥法,井庆川,等.动物微生态制剂的最新研究进展[J].*家禽科学*,2008(7):46-48.
- [ 9 ] 中华人民共和国农业部.中华人民共和国农业行业标准—有机物料腐熟剂(NY609-2002)[S],中国标准出版社,2002:12-20.
- [ 10 ] 徐蓉,葛平,陈蓉,等.3种不同方法检测艰难梭菌芽胞率的比较[J].*检验医学*,2015,30(2):201-202,205.
- [ 11 ] 周德庆.微生物学实验手册[M].上海:上海科学技术出版社,1986:30-31,81-83.
- [ 12 ] 杜连祥.工业微生物学实验技术[M].天津:天津科学技术出版社,1992:104.
- [ 13 ] Huo Z H, Yang X M, Raza W, et al. Investigation of factors influencing spore germination of *paenibacillus polymyxa* ACCC10252 and SQR-21[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87: 527-536.
- [ 14 ] 姚露燕,张水华,曹昱,等.金属离子浓度对枯草芽胞杆菌芽胞率的影响[J].*现代食品科技*,2008,24(8):771-772.
- [ 15 ] Quintavalla S, Parolari G. Effects of temperature, aw and pH on the growth of *Bacillus cells* and spores: a response surface methodology study[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1993, 19: 207-216.
- [ 16 ] 方中达.植病研究方法[M].北京:农业出版社,1987:123-124.
- [ 17 ] 魏鸿刚,李元广,刘健,等.一种快速的活菌计数新方法研究[J].*微生物学通报*,2002,29(2):89-93.
- [ 18 ] Shan H Y, Zhao M M, Chen D X, et al. Biocontrol of rice blast by phenaminomethylacetic acid producer of *Bacillus methylotrophicus* strain BC79[J]. *Crop Protection*, 2013, 44: 29-37.
- [ 19 ] 刘宝生,余占桥.一株高度粘连的枯草芽胞杆菌的活菌计数[J].*黑龙江畜牧兽医*,2011(5):19-21.
- [ 20 ] 吴丽云.固态发酵生产芽胞杆菌活菌计数方法的改进[J].*饲料研究*,2005(11):57-60.
- [ 21 ] 戴佩佩,裴晓乐,徐克.降钙素原与C反应蛋白联合检测在细菌感染中的应用[J].*检验医学*,2010,25(11):858-860.