

解淀粉芽胞杆菌 Z17-2 的发酵条件优化

宋本超¹, 赵冬梅¹, 杨志辉¹, 赵志¹, 薛雪², 朱杰华^{1*}

(1. 河北农业大学植物保护学院, 河北保定 071001; 2. 新加坡利农私人有限公司北京代表处, 北京 100026)

摘要:以对马铃薯黑痣病菌具有拮抗效果的解淀粉芽胞杆菌 Z17-2 为供试生防菌, 采用单因素和正交试验相结合的方法对培养基及培养条件进行优化。结果表明最优培养基成分为: 麦芽糖 20 g/L, 豆饼粉 10 g/L, NaCl 1 g/L, CaCl₂ 1 g/L, MgSO₄·7H₂O 1 g/L; 最优培养条件为: 接种量 2%, 装液量 50 mL/250 mL, 初始 pH 6.0, 温度 35 °C, 摇床转速 220 r/min。在最优培养条件下, Z17-2 培养 30 h 后达到稳定期, 发酵液 OD 值达到 1.591, 较未优化前提高 120%, 抑菌活性提高 43.8%。

关键词:解淀粉芽胞杆菌; 培养条件优化; 正交试验; 黑痣病

中图分类号: Q815

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2021)02-0047-05

Optimization of Fermentation Conditions for *Bacillus Amyloliquefaciens* Z17-2

SONG Benchao¹, ZHAO Dongmei¹, YANG Zhihui¹, ZHAO Zhi¹, XUE Xue², ZHU Jiehua^{1*}

(1. College of Plant Protection, Hebei Agricultural University, Baoding 071001; 2. AGROLEX Private Limited Beijing Representative Office, Beijing 100026, China)

Abstract: Taking *Bacillus amyloliquefaciens* Z17-2, which has antagonistic effect on potato black scurf, as a test organism. The medium and culture conditions were optimized by single factor and orthogonal test. The results showed that the optimal medium composition was as follows: maltose 20 g/L, soybean meal 10 g/L, NaCl 1 g/L, CaCl₂ 1 g/L, MgSO₄·7H₂O 1 g/L. The optimal culture conditions were as follows: inoculation amount of 2%, liquid loading amount of 50 mL/250 mL, initial pH 6.0, temperature of 35 °C, shaking speed of 220 r/min. Under the optimal culture conditions, Z17-2 reached the stable stage after 30 h culture, and the OD value of fermentation broth reached 1.591, which was 120% higher than that before optimization, and the antibacterial activity increased by 43.8%.

Key words: *Bacillus amyloliquefaciens*; Optimization of culture conditions; Orthogonal test; Black scurf

马铃薯黑痣病是马铃薯生产上主要的土传病害之一, 主要致病菌是立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani* Kühn), 黑痣病的发生严重影响马铃薯的经济价值^[1-2]。目前对马铃薯黑痣病的防治主要是应用化学药剂进行种薯药剂消毒和药剂处理土壤等^[3]。然而, 多年来高毒农药的使用导致该病原菌产生严重的抗药性, 同时造成农药残留和环境污染, 直接危害人类的健康^[4]。近年来, 研究者致力于寻找具有对环境友好、无污染、见效快等优点的防治方法。因此, 有机改良剂^[5]、植物源农药^[6]和生防微生物^[7]等环境友好型生防措施发展成为综合防治土传病害的重要部分。

在土壤或者植物根际引入有益微生物能防治马铃薯黑痣病等多种土传病害。这些生防微生物通过分泌抑菌物质、促生物质等方式发挥作用^[8]。Brewer 等^[9]研究表明, 青霉菌 (*Penicillium* sp.)、绿色木霉 (*Trichoderma virens*)、木霉菌 (*Trichoderma* sp.) 能有效防治马铃薯黑痣病, 使发病率下降 54% ~ 60%。2006 年 Bautista 等^[10]发现, 荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 可以促进当地马铃薯 (*Solanum phureja*) 植株的生长, 并有效防治马铃薯黑痣病。彭振红^[11]筛选马铃薯黑痣病的生防菌并初步研究枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*) XC5 的抑菌机理。朱明明等^[12]从马铃薯根际土中筛选到 6 株对黑痣病菌抑制效果较好的菌株, 抑菌带宽度大于 6 mm。目前关于利用生防真菌如木霉菌防治马铃薯黑痣病的研究较多, 而对于生防细菌研究较少。芽胞杆菌是一种理想的生防菌筛选对象, 研究表明其能够产生抗逆性强的芽孢和多种生防抑菌物质^[13]。将芽胞杆菌运用到大规模生产

收稿日期: 2019-03-13

基金项目: 国家现代农业 (马铃薯) 产业体系 (CARS-09-P18); 国家重点研发计划 (2018YFD0200800); 河北省薯类产业技术体系创新团队专项基金 (HBCT2018080205)

作者简介: 宋本超 (1993-), 男, 在读硕士, 从事植物病理学研究。

通讯作者: 朱杰华, 女, 博士, 教授, E-mail: zhujiehua356@126.com

中首要解决的问题是如何提高发酵液中活体芽胞含量,研究表明合适的培养基和培养条件可以大幅度提高生防芽胞杆菌的发酵效率,降低生产成本^[14-15]。河北农业大学马铃薯病害实验室筛选得到一株对马铃薯黑痣病菌具有显著抑菌活性的拮抗细菌(Z17-2),经鉴定为解淀粉芽胞杆菌。本研究从提高发酵液浓度的角度出发,筛选出适合解淀粉芽胞杆菌Z17-2的培养基成分并进行正交优化,以期作为马铃薯黑痣病的优良生防菌剂和生物有机肥的研制和开发奠定基础。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

解淀粉芽胞杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) Z17-2、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*) ZB4。

1.2 培养基

LB培养基:酵母膏 5 g/L,蛋白胨 10 g/L, NaCl 10 g/L,琼脂 20 g/L。PDA培养基:马铃薯 200 g/L,葡萄糖 20 g/L,琼脂 20 g/L。初始发酵培养基:葡萄糖 15 g/L,蛋白胨 15 g/L, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 3 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, $CaCl_2$ 0.1 g/L。

1.3 培养基优化

1.3.1 种子液制备

挑取一环LB平板上培养24 h(37 °C)的Z17-2单菌落,接种于装有LB培养基(100 mL/250 mL)的三角瓶中,37 °C,200 r/min培养24 h备用。

1.3.2 初始培养条件

发酵培养基装液量100 mL/250 mL的三角瓶,接种量1%,温度37 °C,摇床转速200 r/min,培养48 h结束发酵。

1.3.3 检测方法

吸光值 OD_{600} 检测:用酶标分析仪检测发酵液在600 nm处的吸光值,以空白培养基为对照。

发酵液抑菌活性:培养基平皿中央放置直径6 mm的滤纸片,四周2.5 cm处放直径6 mm的立枯丝核菌菌饼,取待测发酵液5 μ L滴到滤纸片上,28 °C培养至对照长满全皿测定抑菌圈直径。

1.3.4 单因素筛选

碳源:以蔗糖、糊精、玉米粉、乳糖、葡萄糖和麦芽糖等量代替初始培养基中的葡萄糖,其他成分不变;氮源:以蛋白胨、酵母膏、豆饼粉、尿素、 NH_4NO_3 、 NH_4Cl 等量代替初始培养基中的蛋白胨,其他成分不变;无机盐:以碳氮源筛选结果作为培养基碳氮源,添加量同基础培养基,用 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $CaCl_2$ 、 $CaCO_3$ 、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 、NaCl、 $MnSO_4$ 、

H_2O 、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 作为培养基中的无机盐,添加比例4 g/L。分别按照初始培养条件进行培养后检测发酵液 OD_{600} 值和发酵液抑菌活性。

1.3.5 正交试验

根据碳源、氮源、无机盐筛选结果,进行五因素三水平正交试验,用SPSS 19.0软件设计(表1)。

表1 正交试验因素水平设计

水平	(A)麦芽糖	(B)豆饼粉	(C)NaCl	(D) $CaCl_2$	(E) $MgSO_4$
1	1.00	1.00	0.1	0.1	0.1
2	1.55	1.50	0.2	0.2	0.2
3	2.00	2.00	0.3	0.3	0.3

1.3.6 培养条件优化

采用优化后的培养基进行培养,每组实验设三个重复,以发酵液吸光度 OD_{600} 为指标优化菌株Z17-2培养条件。接种量:1%、2%、3%、5%、10%;装液量:250 mL三角瓶装液量分别为30、50、70、100 mL;初始pH:设置初始pH分别为5、6、7、8、9;温度:28、30、32、35、37 °C;转速:150、170、200、220、250 r/min,培养48 h后检测发酵液 OD_{600} 及抑菌活性。后一步实验在前期实验结果的基础上进行,未优化到的采用基础培养条件进行。

1.3.7 优化前后抑菌能力比较

分别以优化前后的培养基和培养条件进行解淀粉芽胞杆菌Z17-2的发酵培养,发酵结束后取发酵液10 000 r/min离心10 min,经0.22 μ m细菌过滤器过滤制备无菌发酵上清液,将无菌发酵上清液按照5%的添加量与PDA培养基混合均匀倒平板,以空白PDA为对照,在培养两天的*Rhizoctonia solani* ZB4菌落边缘打制6 mm的菌饼,将菌饼接种于带毒培养基平板和空白对照,25 °C倒置培养,待空白对照将要长满皿时测定带毒培养基上菌落大小,计算抑菌率。

1.3.8 生长曲线测定

利用最优培养基进行芽胞杆菌Z17-2的发酵培养,培养过程中按照不同时间点取样测定发酵液的 OD_{600} 值,至72 h取样结束,绘制生长曲线图。

1.4 数据分析

应用SPSS 19.0和Excel 2016对数据进行统计分析表格绘制。

2 结果与分析

2.1 培养基优化

2.1.1 碳源筛选

测定6种不同碳源对Z17-2生长和抑菌能力

的影响结果表明(图1),以麦芽糖和乳糖为唯一碳源时发酵液浓度显著高于其余被试碳源,二者之间没有显著性差异,OD₆₀₀分别为0.951和0.943。但以麦芽糖为碳源时,发酵液的抑菌圈直径为2.67 cm,以乳糖为碳源的发酵液抑菌圈直径为2.50 cm,因此选择麦芽糖为培养基最优碳源。

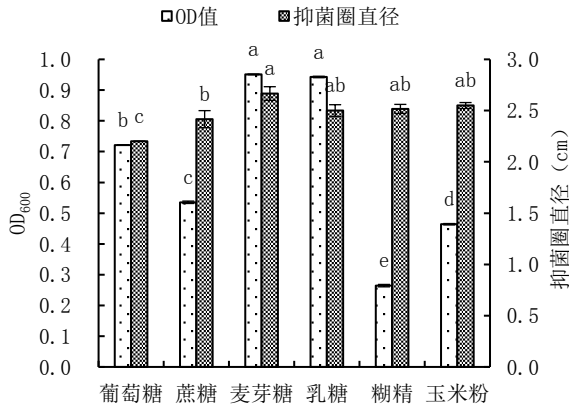


图1 碳源对菌体生长和抑菌活性的影响

2.1.2 氮源筛选

在对氮源的筛选中发现,尿素和两种无机氮源 NH₄NO₃、NH₄Cl 不适合该菌的生长,发酵液吸光值低于0.1,以豆饼粉为唯一氮源时发酵液的 OD₆₀₀为0.970、抑菌圈直径为2.82 cm,发酵液的浓度和抑菌活性均显著优于其余氮源(图2),所以选择豆饼粉作为培养基的氮源。

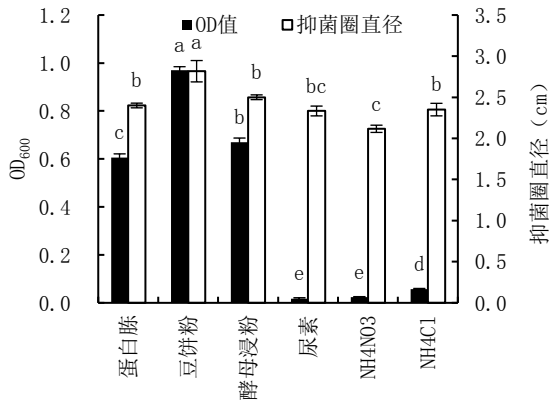


图2 氮源对菌体生长和抑菌活性的影响

2.1.3 无机盐筛选

7种不同无机盐对解淀粉芽胞杆菌 Z17-2 的影响不同(图3),其中 CaCl₂能显著提高发酵液浓度,NaCl、MgSO₄·7H₂O对菌株生长的促进效果仅次于CaCl₂,以三种物质作为培养基唯一无机盐时发酵液 OD 值分别是1.152、1.085和1.072。最终选择 NaCl、MgSO₄·7H₂O 和 CaCl₂为培养基中的无机盐组分进行后续实验。

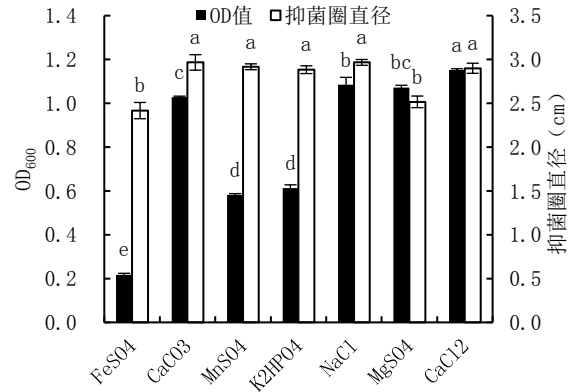


图3 无机盐对菌体生长和抑菌活性的影响

2.1.4 正交试验

正交试验结果(表2)的极差分析表明,五种因素对 Z17-2 生长的影响大小排序为:豆饼粉>NaCl>MgSO₄·7H₂O>麦芽糖>CaCl₂,其最优组合为 A₃B₁C₁D₁E₁,即麦芽糖 20 g/L,豆饼粉 10 g/L,NaCl 1 g/L,CaCl₂ 1 g/L,MgSO₄·7H₂O 1 g/L。

表2 正交试验结果分析

序号	A	B	C	D	E	OD ₆₀₀
1	3	1	2	3	1	1.463
2	1	2	3	1	1	1.137
3	1	1	1	1	1	1.487
4	1	2	1	3	3	1.250
5	1	3	2	1	1	1.101
6	1	1	1	1	1	1.542
7	2	1	3	3	1	1.359
8	1	1	2	2	3	1.384
9	3	3	3	1	3	0.961
10	3	2	1	2	1	1.439
11	2	3	1	2	1	1.001
12	3	1	1	1	2	1.458
13	2	2	2	1	2	1.311
14	2	1	1	1	3	1.416
15	1	1	3	2	2	1.371
16	1	3	1	3	2	1.050
k ₁	1.290	1.435	1.330	1.302	1.316	
k ₂	1.272	1.284	1.315	1.299	1.298	
k ₃	1.330	1.028	1.207	1.281	1.253	
R	0.058	0.407	0.123	0.021	0.063	

2.2 培养条件优化

2.2.1 接种量优化

接种量优化结果表明(图4a),不同接种量之间发酵液浓度没有显著性差异,由此可见,接种量的多少对 Z17-2 的影响较小。但是其接种量为 2%时发酵液的 OD₆₀₀值相对最大,为 1.491,所以选

择接种量2%为最佳接种量。

2.2.2 装液量优化

装液量优化结果表明(图4b),不同装液量之间发酵液浓度差异显著,其中装液量为50 mL时,发酵液浓度最大,OD₆₀₀值为1.554,与70 mL装液量时发酵液OD₆₀₀值1.544无显著性差异,但是显著高于装液量30 mL时的1.494和100 mL时的1.427。所以50 mL/250 mL是最优装液量。

2.2.3 初始pH优化

初始pH优化结果表明(图4c),培养基初始pH为6时,发酵液的浓度最大,OD₆₀₀值为1.583,显著高于初始pH为5时的发酵液浓度1.488。在发酵液初始pH 6~9,随着培养基初始pH的升高,发酵液OD₆₀₀值逐渐降低,不同处理之间无显

著性差异。发酵液初始pH 6为最佳初始pH。

2.2.4 培养温度优化

温度优化结果表明(图4d),培养温度在28~32℃,随着温度的升高发酵液浓度升高,在培养温度为28℃时发酵液OD₆₀₀值最低,为1.464,当温度为32℃时,发酵液OD₆₀₀值为1.571,在32~37℃温度范围内发酵液的OD₆₀₀之间无显著性差异,选择35℃为Z17-2的培养温度。

2.2.5 摇床转速优化

转速优化结果表明(图4e),在一定范围内随着摇床转速的增加发酵液的吸光值增加,当转速超过200 r/min时,发酵液吸光值增加不显著,转速250 r/min时发酵液吸光值较220 r/min略有下降,综合考虑将最优摇床转速定为220 r/min。

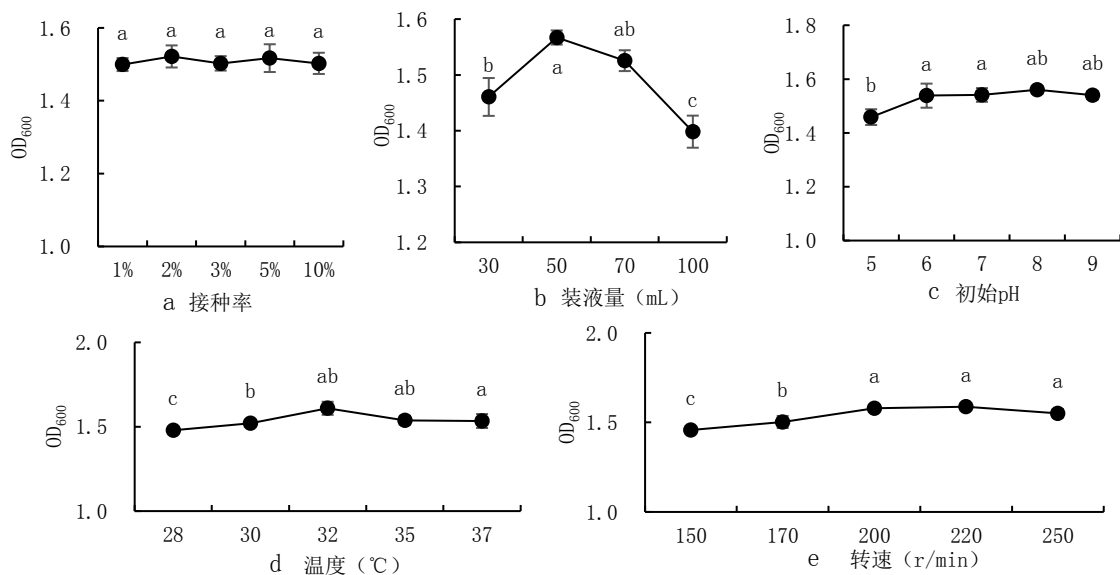


图4 发酵条件对解淀粉芽胞杆菌Z17-2生长的影响

2.2.6 优化前后抑菌能力比较

优化前用基础培养基培养Z17-2菌株的无菌发酵上清液制备带毒培养基的菌落直径为5.78 cm,抑菌率为25.2%,优化后的培养基和培养条件培养Z17-2菌株的无菌发酵上清液制备带毒培养基的菌落直径为4.27 cm,抑菌率为44.8%,较优化前抑菌率提升19.6%,抑菌活性提高43.8%。

2.2.7 生长曲线测定

利用优化得到的最优培养基对菌株Z17-2进行培养,生长曲线如图5所示。0~3 h是延迟期,30 h后进入稳定期。测定发酵液吸光值最高值达到1.591,而初始培养基发酵液的吸光度值0.722,优化后培养基发酵液浓度提高120%。

3 结论与讨论

由于近年来马铃薯种植面积及种植模式的转

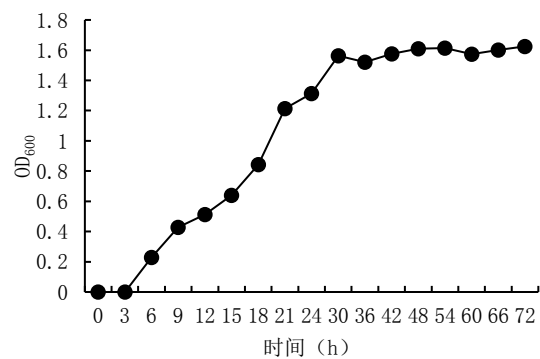


图5 菌株Z17-2的生长曲线

变,马铃薯黑痣病的发病面积及危害越来越大,生物防治是未来防治马铃薯黑痣病的发展趋势。解淀粉芽胞杆菌能够产生多种次级代谢产物,具有抗真菌、细菌活性,被广泛用于防治植物病害,王晓辉等^[16]优化解淀粉芽胞杆菌K1的发酵条件

后,其对灰霉病菌的抑菌圈直径达到 49 mm;李磊等^[17]研制出一种解淀粉芽胞杆菌可湿性粉剂对番茄灰霉病和叶霉病的防效分别为 77.1% 和 74.3%,目前为止防治马铃薯黑痣病的芽胞杆菌的研究鲜见报道,对黑痣病生防菌的分离筛选、发酵工艺以及菌剂制备工艺的优化可以为马铃薯黑痣病的防治提供更有效方法手段。

活菌含量是评价微生物菌剂产品质量的一项重要指标,通过培养基组成和发酵条件的优化可以有效提高发酵液活菌浓度。但是由于芽胞杆菌发酵时其黏液的大量分泌以及胞外酶导致自溶等自身的一些遗传特点都使其在生物活性物质的发酵生产方面有非常大的局限性。芽胞杆菌发酵条件的优化主要包括发酵温度、转速、时间、补料及通风等因素,这些因素通常都不是单一地影响菌株的发酵,而是通过各个因素各个水平之间的交互作用共同影响^[18]。正交试验设计是一种科学、合理的优化分析方法。刘春红等^[19]通过正交试验设计优化枯草芽胞杆菌 B201 的发酵培养基和培养条件,优化后芽胞量达到 8.8×10^9 CFU/mL。李达等^[20]通过单因子水平筛选和正交试验,对枯草芽胞杆菌 NKY1145 发酵培养基和培养条件进行优化,优化后发酵液含菌量提高 34 倍达到 6.3×10^9 CFU/mL。本研究应用正交试验设计对马铃薯黑痣病拮抗菌 Z17-2 进行发酵工艺的优化,最优发酵培养基配方为:麦芽糖 20 g/L,豆饼粉 10 g/L, NaCl 1 g/L, CaCl₂ 1 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 1 g/L;最优培养条件为:接种量 2%,装液量 50 mL/250 mL,初始 pH 6.0,温度 35 °C,摇床转速 220 r/min,优化后发酵液浓度提高 120%,为今后抗黑痣病菌活性物质的进一步提取、分离、纯化及鉴定提供基础数据,并对马铃薯黑痣病的优良生防菌剂以及拮抗菌生物有机肥的研制和开发奠定基础。

参考文献:

- [1] 田 萍,王爱军. 马铃薯黑痣病的发生及防治措施[J]. 现代农业科技, 2017(13): 126-132.
- [2] 马 龙,杨莉莉,马 兴,等. 马铃薯黑痣病生防菌的筛选鉴定及生长条件研究[J]. 中国马铃薯, 2017, 31(4): 227-233.
- [3] 贾 辉,吕和平,沈慧敏,等. 不同杀菌剂对立枯丝核菌的室内毒力测定[J]. 甘肃农业大学学报, 2007(6): 99-101.
- [4] 梁建根,施跃峰,竺利红,等. 植物病害生物防治的研究现状[J]. 现代农业科技, 2008(18): 158-159.
- [5] Akila R, Rajendran L, Harish S, et al. Combined application of botanical formulations and biocontrol agents for the management of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense (Foc) causing *Fusarium* wilt in banana[J]. Biological Control, 2011, 57(3): 175-183.
- [6] Janvier C, Villeneuve F, Alabouvette C, et al. Soil health through soil disease suppression: Which strategy from descriptors to indicators?[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2007, 39(1): 1-23.
- [7] Lemessa F, Zeller W. Screening rhizobacteria for biological control of *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia[J]. Biological Control, 2007, 42(3): 336-344.
- [8] 马 佳,李 颖,胡 栋,等. 芽胞杆菌生物防治作用机理与应用研究进展[J]. 中国生物防治学报, 2018, 34(4): 639-648.
- [9] Brewer M T, Larkin R P. Efficacy of several potential biocontrol organisms against *Rhizoctonia solani* on potato [J]. Crop Protection, 2005, 24(11): 939-950.
- [10] Bautista G, Mendoza H, Uribe D. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* in Native Potato (*Solanum phureja*) Plants Using Native *Pseudomonas fluorescens*[J]. Acta Biológica Colombiana, 2007(1): 19-32.
- [11] 彭振红. 马铃薯黑痣病生防菌的筛选及抑菌机理的初步研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学, 2012.
- [12] 朱明明,张 岱,赵冬梅,等. 马铃薯黑痣病生防芽胞杆菌的筛选与鉴定[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(14): 97-101.
- [13] Han J H, Shim H, Shin J H, et al. Antagonistic Activities of *Bacillus* spp. Strains Isolated from Tidal Flat Sediment Towards Anthracnose Pathogens *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in South Korea[J]. Plant Pathology Journal, 2015, 31(2): 165.
- [14] 杜 宾. 一株黄瓜枯萎病拮抗菌的鉴定及发酵培养基的优化[J]. 北方园艺, 2017(3): 132-137.
- [15] 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.
- [16] 王晓辉,王贵鹏,张庆芳,等. 抗灰霉病解淀粉芽胞杆菌的发酵条件优化[J]. 东北农业科学, 2015, 40(2): 71-77.
- [17] 李 磊,许 敏,王美琴. 生防菌解淀粉芽胞杆菌 Ht-q6 可湿性粉剂的研制及对番茄病害的田间防效[J]. 中国生物防治学报, 2018, 34(5): 738-745.
- [18] 张宜涛. 橙色黏球菌的分离鉴定及其抑菌活性研究[D]. 郑州:河南工业大学, 2011.
- [19] 刘春红,张丽霞,李 燕,等. 枯草芽胞杆菌 B201 产芽胞培养基优化[J]. 中国生物防治学报, 2016, 32(5): 650-656.
- [20] 李 达,姜媛媛,周 洋,等. 饲用枯草芽胞杆菌高密度发酵培养基的优化[J]. 东北农业科学, 2016, 41(2): 104-108.

(责任编辑:王 昱)