

生防菌株 Bs-0728 产芽孢条件的优化

王佳佳, 任洁, 曹克强, 王树桐*

(河北农业大学 植物保护学院, 河北 保定 071001)

摘要: 前期研究证明, 枯草芽孢杆菌 Bs-0728 对苹果再植病害具有良好的防治效果, 为了提高发酵液中 Bs-0728 的芽孢数量, 利用单因素试验和正交试验方法, 通过液体摇瓶培养对 Bs-0728 菌株的芽孢发酵培养基和培养条件进行了筛选和优化。结果表明, Bs-0728 菌株芽孢发酵的最适培养基为: 玉米粉 1%、花生饼粉 1%、磷酸二氢钠 0.4%+磷酸氢二钠 0.4%; 最适培养条件为: 初始 pH 值 7.5, Mn^{2+} 质量浓度 200 mg/L。在最优条件下发酵 7 d, Bs-0728 菌株发酵液中的芽孢数量达到 4.92×10^{14} cfu/mL, 比初始培养条件下的芽孢数量提高了 39.7 倍。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 生物防治; 芽孢; 发酵条件; 培养基

中图分类号: S436.611.1 S476 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2013)08-0075-04

Optimization of Fermentation Conditions for Endospores Production of Antagonistic Strain Bs-0728

WANG Jia-jia, REN Jie, CAO Ke-qiang, WANG Shu-tong*

(College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: *Bacillus subtilis* strain Bs-0728 has been proved to have significant control efficiency against apple replant disease previously. In order to improve the endospores yield of Bs-0728, the single factor test and orthogonal test were made to optimize the medium components and the fermentation conditions of Bs-0728. Results showed that the optimal medium composition for endospores production of Bs-0728 was 1% corn meal, 1% peanut meal and 0.4% NaH_2PO_3 + 0.4% Na_2HPO_3 , the optimal initial pH was 7.5, and the optimal concentration of Mn^{2+} was 200 mg/L. Under these conditions, the endospores yield of Bs-0728 achieved 4.92×10^{14} cfu/mL, which was 39.7 times more than that under the original fermentation condition.

Key words: *Bacillus subtilis*; biological control; endospores; fermentation conditions; medium

苹果再植病害(apple replant disease, ARD)分布极其广泛, 在世界各苹果产区均有发生, 它能导致果树树冠矮小, 树势衰弱, 甚至死亡, 造成了严重的经济损失^[1]。随着人们环境保护意识的提高, 生物农药逐步代替化学农药, 已成为我国农药产业的发展趋势^[2]。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是土壤中的优势种群, 在自然界分布极其广泛。大量研究表明, 枯草芽孢杆菌能分泌多种抗生物质从而抑制植物病原菌, 同时又能作为益生菌促进植物生长^[3-4]。因其营养要求简单, 易于存活, 繁殖速度快,

适合作为生物农药进行开发, 近年来受到国内外学者的广泛关注^[5-8]。

Bs-0728 菌株是河北农业大学植物病害与流行综合防治研究室在前期筛选中获得的对苹果再植病害病原菌具有良好抑制作用的拮抗细菌^[9], 对板蓝根根腐病也有较好的防治作用^[10]。芽孢耐热、耐酸碱, 比其他营养体易保存, 是制备生防制剂的理想形式, 但芽孢数量对制剂的防治效果有重要影响^[11]。由于芽孢的形成并非细菌生活史的必要过程, 往往是在生长后期因外援营养物质缺乏而形成,

收稿日期: 2012-12-13

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项经费资助项目(200903034); 国家苹果产业技术体系项目(nycytx-080401)

作者简介: 王佳佳(1988-), 女, 河北霸州人, 在读硕士研究生, 研究方向: 苹果再植病害生物防治。E-mail: 252333559@qq.com

* 通讯作者: 王树桐(1975-), 男, 河北保定人, 教授, 主要从事植物病害流行与综合防控研究。

在营养丰富的培养基中反而不容易生成^[12-13],因此,如何使芽孢杆菌在营养丰富的培养基中生长并获得较高的芽孢产量,是芽孢杆菌应用研究的重要内容。为此,采用单因素试验与正交试验相结合的方法,筛选适宜 Bs-0728 菌株芽孢产生的培养基及培养条件,为下一步生防菌剂的研发奠定基础。

1 材料和方法

1.1 菌种与培养基

菌种:枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) Bs-0728 由河北农业大学植物病害与流行综合防治研究室分离、鉴定并保存。

培养基:使用 LB 培养基作为种子液培养基;平板计数使用 NA 培养基;芽孢发酵基础培养基配方为葡萄糖 10 g、蛋白胨 10 g、氯化钠 10 g、蒸馏水 1 L。

1.2 菌株培养与测定方法

取一环活化的 Bs-0728 单菌落,接入装液量为 100 mL 的三角瓶(300 mL)中,32 ℃,180 r/min 培养 18 h,作为种子液。从种子液中吸取 3 mL 加入 100 mL 芽孢发酵培养基中,32 ℃,180 r/min 振荡培养 7 d,80 ℃水浴加热 60 min 后,采用平板菌落计数法检测芽孢数量。

1.3 营养因子和培养条件试验设计

1.3.1 碳源 分别以淀粉、玉米粉、蔗糖和麦芽糖作为碳源,等量替换基础培养基中的葡萄糖,以基础培养基作为对照。

1.3.2 氮源 选用 1.3.1 中筛选出的最佳碳源,分别以等量的豆粕、棉粕、酵母浸粉、花生饼粉和硝酸钾作为氮源,替换基础培养基中的蛋白胨,以不替换氮源的处理作为对照。

1.3.3 无机盐 选用以上试验筛选出的最佳结果作为碳源和氮源,分别用硫酸镁、硫酸亚铁、磷酸二氢钠和磷酸氢二钠组合(等量)和氯化钙等量替换基础培养基中的无机盐,另设不加无机盐的处理,以不替换无机盐的处理作为对照。

1.3.4 培养基配方优化 将筛选出的最优碳源、氮源、无机盐 3 个因素,选用 $L_9(3^4)$ 正交表,进行配方优化试验。选择的因素水平见表 1。

表 1 培养基配方优化正交试验因素水平

水平	因素		
	A(玉米粉)/%	B(花生饼粉)/%	C(钠盐组合)/%
1	0.5	0.5	0.2
2	1	1	0.4
3	2	2	0.8

1.3.5 初始 pH 值的优化 将 1.3.4 试验选择出的最适培养基,于灭菌前分别调节 pH 值为 6.0、6.5、7.0、7.5 和 8.0。

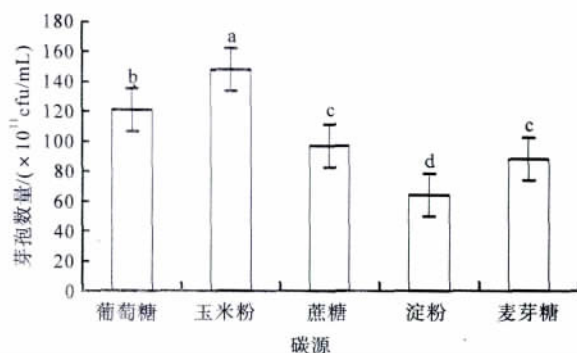
1.3.6 Mn^{2+} 添加量的优化 选用以上试验筛选出的最优培养基、最佳 pH 值,在培养基中添加不同浓度的 $MnSO_4$ 溶液使 Mn^{2+} 质量浓度分别为 0、50、100、150、200、250、300 mg/L。

以上各处理均按照 1.2 方法操作,采用平板菌落计数法检测芽孢数量。每个处理重复 3 次。试验数据使用 DPS 7.05 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同碳源对 Bs-0728 芽孢产量的影响

当选用玉米粉作为碳源时,发酵液产生的芽孢数量最多,达到 1.5×10^{13} cfu/mL,和其他处理之间有显著性差异(图 1)。同时,玉米粉价格低廉,适于大规模生产,因此,选择玉米粉作为最优碳源进行下一步试验。



不同字母表示处理间在 0.05 水平差异显著(Duncan 多重比较),下同

图 1 不同碳源对 Bs-0728 芽孢产量的影响

2.2 不同氮源对 Bs-0728 芽孢产量的影响

不同氮源对发酵液中细菌的生长影响差异很大,以无机氮硝酸钾作为氮源的发酵液中芽孢数量最少,仅为 8.0×10^8 cfu/mL。而以花生饼粉作为氮源时,发酵液中芽孢数量最多,达到 6.6×10^{13} cfu/mL,且和其他处理之间差异显著(图 2),因此,选择花生饼粉作为最优氮源进行下一步研究。

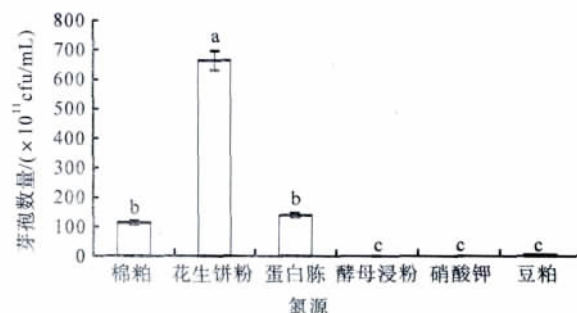


图 2 不同氮源对 Bs-0728 芽孢产量的影响

2.3 不同无机盐对 Bs-0728 芽孢产量的影响

以磷酸二氢钠和磷酸氢二钠组合作为无机盐时,发酵液中的芽孢数量最多,达到 8.9×10^{13} cfu/mL,和其他处理之间差异显著(图 3)。因此,选择磷酸二氢钠和磷酸氢二钠组合作为最优无机盐,进行下一步试验。

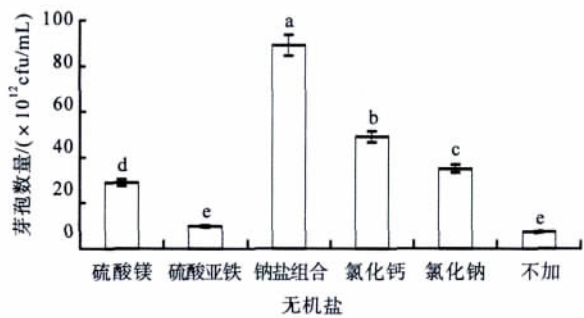


图 3 不同无机盐对 Bs-0728 芽孢产量的影响

2.4 正交优化试验结果

由表 2 的极差值可以看出,各因素对菌株芽孢产量的影响程度为碳源>无机盐>氮源,说明碳源是影响 Bs-0728 芽孢产量的主要因素,结合 k 值选出最优组合为 $A_2B_2C_3$ (5 号配方),此时菌株产孢量为 1.19×10^{14} cfu/mL,优于其他处理,因此选择 $A_2B_2C_3$ 作为最佳配方,即玉米粉 1%、花生饼粉 1%、 Na_2HPO_3 0.4%+ NaH_2PO_3 0.4%。

表 2 培养基各组分正交试验优化结果

试验号	A (玉米粉)	B(花生 饼粉)	C(钠盐 组合)	芽孢数量/ ($\times 10^{12}$ cfu/mL)
1	1	1	1	56.8
2	1	2	2	101.0
3	1	3	3	106.0
4	2	1	2	85.4
5	2	2	3	119.0
6	2	3	1	102.0
7	3	1	3	90.1
8	3	2	1	86.3
9	3	3	2	48.8
k_1	87.93	77.43	81.70	
k_2	102.13	102.10	78.40	
k_3	75.07	85.60	105.03	
R	27.06	24.67	26.63	
主次顺序	A>C>B			
最优组合	$A_2B_2C_3$			

2.5 初始 pH 值的优化结果

从图 4 可以看出,初始培养环境偏酸性不利于 Bs-0728 菌株产生芽孢,当初始 pH 值为 7.5 时,发酵液产生芽孢数量最高,达到 3.94×10^{14} cfu/mL。因此,最适初始 pH 值为 7.5。

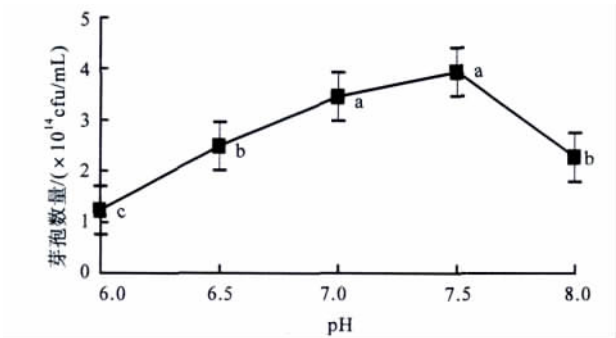


图 4 初始 pH 值对 Bs-0728 芽孢产量的影响

2.6 Mn^{2+} 添加量对 Bs-0728 芽孢产量的影响

Mn^{2+} 是微生物生长所需的微量元素,作为异构酶、歧化酶等许多酶的辅助因子,影响芽孢的形成^[14]。试验结果(表 5)表明:当 Mn^{2+} 质量浓度从 0 mg/L 增加到 200 mg/L 时,发酵液中的芽孢数量呈上升趋势,当 Mn^{2+} 质量浓度为 200 mg/L 时,芽孢产量最高,达到 4.61×10^{14} cfu/mL,此后随着 Mn^{2+} 质量浓度的增高,芽孢数量呈下降趋势。因此,选择 200 mg/L 作为最优 Mn^{2+} 质量浓度。

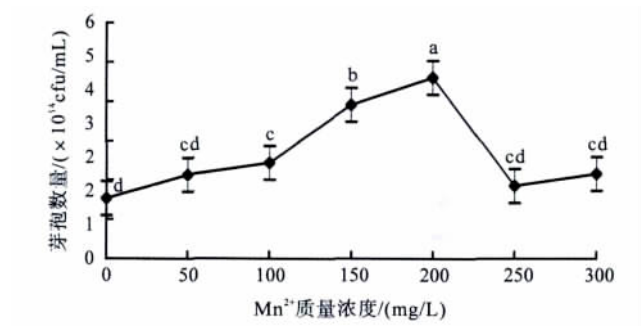


图 5 Mn^{2+} 质量浓度对 Bs-0728 芽孢产量的影响

选用以上试验筛选出的最佳条件培养 Bs-0728 菌株,芽孢数量达到 4.92×10^{14} cfu/mL,与原始培养条件下发酵所得芽孢数量(1.21×10^{13} cfu/mL)相比提高了 39.7 倍。

3 结论与讨论

芽孢具有极强的抗逆性,比菌体更有利于在生产上应用,因此,本试验以芽孢数量作为评价指标,研究了营养因子、初始 pH 值及 Mn^{2+} 质量浓度对生防菌株 Bs-0728 产芽孢数量的影响。经正交试验,得到了 Bs-0728 菌株产芽孢的最适培养基为:玉米粉 1%、花生饼粉 1%、 Na_2HPO_3 0.4%+ NaH_2PO_3 0.4%;进一步优化培养条件,发现其最适初始 pH 值为 7.5;最适 Mn^{2+} 质量浓度为 200 mg/L。通过优化,芽孢产量较初始培养条件下提高了 39.7 倍。Bs-0728 的最优碳源、氮源分别为玉米粉和花生饼粉,均为缓效营养物质,同时试验结果显示,无机氮

不利于 Bs-0728 芽孢的形成。而杨宇清等的试验结果显示,速效碳源有利于枯草芽孢杆菌 3-2 形成芽孢^[15]。刘雪等的试验表明,速效无机氮最利于枯草芽孢杆菌 B-332 菌株形成芽孢^[16]。Younis 等在研究中发现,枯草芽孢杆菌 KO 菌株最优初始培养环境偏酸性,pH 值为 6.5^[17],而本研究中偏酸性环境不利于 Bs-0728 的生长,最优初始 pH 值为 7.5。说明不同枯草芽孢杆菌产生芽孢的最佳营养因子和培养条件各不相同,对特定菌株的发酵条件需进行优化才能确定。

本试验仅对生防菌株 Bs-0728 室内摇瓶发酵产生芽孢的条件进行了初步研究,探讨了营养因子及部分培养条件对菌株芽孢产量的影响。而对具体的发酵时间,发酵动态,发酵过程中菌体的形态变化,产生抗菌物质的种类、性质及其变化等,均有待进一步研究。同时,要进行工业化生产还需经过罐上发酵确定相应的发酵条件。

参考文献:

- [1] 蒋汉林,李广华,易图永. 苹果再植病防治研究进展[J]. 安徽农学通报,2007,13(16):68-70.
- [2] 功能. 生物农药发展的机遇与挑战[J]. 中国生物防治,2001,17(4):184-185.
- [3] 杜立新,冯书亮,王容燕,等. 拮抗 BS-208 菌株对番茄灰霉病诱导抗性的初步研究[J]. 华北农学报,2005,20(6):84-87.
- [4] 孟立花,李社增,郭庆港,等. 枯草芽孢杆菌 NCD-2 菌株抗菌蛋白初步分析[J]. 华北农学报,2008,23(1):189-193.
- [5] Cavaglien L, Orlando J, Rodriguez M I, et al. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level[J]. Research in Microbiology, 2005, 156: 748-754.
- [6] Myresiotis C K, Karaoglanidis G S, Vryzas Z, et al. Evaluation of plant-growth-promoting rhizobacteria, acibenzolar-S-methyl and hymexazol for integrated control of *Fusarium* crown and root rot on tomato[J]. Pest Manag Sci, 2012, 68(3):404-411.
- [7] 岳东霞,张要武,刘玉凤. 黄瓜内生枯草芽孢杆菌 B10 抗菌活性物质稳定性研究[J]. 天津农业科学, 2012, 18(4):4-6.
- [8] 李亚玲,赵玉洁,谢凤行,等. 枯草芽孢杆菌 H4 培养条件的优化[J]. 天津农业科学, 2009, 15(4):20-23.
- [9] 高琳娜. 五株生防细菌对苹果再植病菌的拮抗作用及生防效果研究[D]. 保定:河北农业大学, 2011.
- [10] 高琳娜,曹克强,段英姿,等. 拮抗细菌 Bs-0728 对板蓝根根腐病的防治作用[J]. 植物保护, 2011, 37(5):97-100.
- [11] 崔京春,吴俊是,刘吉华,等. 枯草芽孢杆菌发酵过程的优化[J]. 饲料工业, 2004, 25(7):52-55.
- [12] 郭荣君,王步云,李世东. 营养对生防菌株 BH1 芽孢产量的影响研究[J]. 植物病理学报, 2005, 35(3):283-285.
- [13] 鹿秀云,李社增,马平,等. 棉花黄萎病生防细菌 NCD-2 抑菌物质提取研究[J]. 山东科学, 2005, 18(3):22-25.
- [14] Navaneeth S, Bhuvanesh S, Varun Bhaskar, et al. Optimization of medium for the production of subtilisin from *Bacillus subtilis* MTCC 441[J]. African Journal of Biotechnology, 2009, 8(22):6327-6331.
- [15] 杨宇清,郑一敏,胡杨. 枯草芽孢杆菌 3-2 产细菌素发酵条件的优化[J]. 重庆理工大学学报:自然科学版, 2011, 23(11):39-43.
- [16] 刘雪,叶靖,穆长青,等. 枯草芽孢杆菌 B-332 菌株发酵条件的研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(10):230-235.
- [17] Younis A M M, Hezayen F F, Nour-Eldein M A, 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.