

短小芽孢杆菌 HR10 产孢培养基及发酵条件优化

王朝恩, 刘婉慧, 陆蓝翔, 付欢欢, 石慧敏, 史纪武, 叶建仁*

(南京林业大学 南方现代林业协同创新中心 林学院 江苏 南京 210037)

摘要 短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*) HR10 是一株具有促生抗逆作用的优良菌株。探究菌株 HR10 产孢的最佳发酵培养条件,对于在更大规模上进行生产发酵具有重要的指导意义。以稀释涂布平板法计数活菌数和芽孢数并计算芽孢率;对菌株 HR10 产孢培养基的碳源、氮源和无机盐进行单因素分析及正交试验,并采用摇瓶发酵法对影响菌株 HR10 产孢的几种发酵因子进行单因素优化。结果显示,菌株 HR10 的产孢培养基最佳组成成分为葡萄糖 1%、糖蜜 1%、豆饼粉 2%、KCl 0.3%、MnSO₄ 0.4%。最佳发酵条件为温度 37℃、pH 7、250 mL 三角瓶装液量 50%、接种量 5%、转速 220 r/min、培养时间 52 h。芽孢数达到 2.37×10^{10} cfu/mL,芽孢率达 94.46%。相比初始培养基芽孢数提高了 60.77 倍,为其工业化生产提供参考。

关键词 短小芽孢杆菌; 菌株 HR10 芽孢; 培养基成分; 发酵条件; 正交试验

中图分类号 Q939.97 文献标识码 A 文章编号 1005-7021(2021)02-0037-09

doi: 10.3969/j.issn.1005-7021.2021.02.005

Optimization of Sporulation Medium and Fermentation Conditions for *Bacillus pumilus* HR10

WANG Chao-en, LIU Wan-hui, LU Lan-xiang, FU Huan-huan, SHI Hui-min, SHI Ji-wu, YE Jian-ren*

(Co-Innov'n Ctr. for Sustainable Forest. in S. China, Coll. of Forest., Nanjing Forest. Uni., Nanjing 210037)

Abstract *Bacillus pumilus* HR10 is an excellent strain with growth-promotion and anti-adversity effect. Exploring the optimal fermentation and culturing conditions for sporulation of HR10 strain has an important guiding significance for the production and fermentation on a larger scale. The number of bacterial cells and gemmae were counted by diluted spreading plate method and calculated the gemma rate. Carbon source, nitrogen source and inorganic salt for HR10 strain sporulation medium were analyzed by single factor and orthogonal test, and the single-factor optimization of several fermentation factors affecting HR10 strain sporulation was carried out by shake flask fermentation. The results showed that the best components of the sporulation medium of strain HR10 were: glucose 1%, molasses 1%, soybean cake powder 2%, KCl 0.3%, MnSO₄ 0.4%. The optimal fermentation conditions were: 37℃, pH 7, 250 mL flask filled 50% volume with liquid, inoculation volume 5%, rotation speed 220 r/min, cultured for 52 h. The number of gemmae can reach 2.37×10^{10} cfu/mL, and the gemma rate can reach 94.46%. As compared with initial medium, the number of gemmae increased by 60.77 times, and laid a foundation for its industrialized production.

Keywords *Bacillus pumilus*; HR10 strain gemmae; medium composition; fermentation conditions; orthogonal test

随着我国森林绿化面积地不断扩大,人工林栽植面积逐年增加^[1]。在人工林的培育过程中,简单追求高产出,长时间过度使用化学肥料,造成土

壤板结,破坏土壤结构,引起土壤养分失衡,进而引发树木生长不良,病害问题突出^[2-4]。寻找有效提高土壤肥力、促进林木生长的方法,成为近年来

基金项目: 国家林业公益项目(201304404)

作者简介: 王朝恩 男 硕士研究生。主要从事森林病理学研究。E-mail: 760178241@qq.com

* 通讯作者。男 教授。主要从事森林病理学研究。E-mail: jrye@njfu.edu.cn

收稿日期: 2020-07-10

研究的热点。陈延熙根据微生态学理论(Microecology)提出了“植物微生态学”的概念,即任何植物个体都是其组织细胞与其体内微生物组成的复合体^[5],其原理是利用菌株抢占生态位^[6],调节植物喜好的酸碱环境^[7],建立生物屏障阻止有害微生物入侵,并刺激植物或者自身产生有益物质促进植物生长^[8],提高植物抗病能力^[6-9]。近些年微生物菌剂的研究逐渐深入,大量有益微生物得到推广和应用并取得了良好效果,如唐旭^[10]在一年生黑松、马尾松和湿地松上施用解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) JK-AH7,促生效果明显。果树作为特种经济林具有较高的经济价值,常年单一树种种植,管理不当可能导致病原菌积累,在不利的环境下可能引起病害导致果树树势衰弱,果品质量下降,带来严重的生态危害和经济损失^[11-12],如由葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)引起的苹果轮纹病、叶斑病^[13],蓝莓的枯死病和溃疡病等^[14]。杨星^[15]在美国薄壳山核桃上施用多种有益微生物,表明合适的微生物菌剂可以有效提高植物光合作用,促进果树生长,增强树势。窦承阳等^[16]在梨树上施用水拉恩氏菌(*Rahnella aquatilis*) JZ-GX1显著增加了梨树的地径,提升了叶片生理指标,增加了土壤有效磷含量,平衡了土壤养分,提升了果实品质。大量研究表明有益微生物可以有效促进植物生长,提高植物抗病能力。传统的有益微生物的施用形式多为液体^[10,15-16],存在运输成本高、储存时间短、存活率低等缺点,而固体菌剂因其体积小、货期长、活性高等优点受到了广泛关注。固体菌剂在制备过程中过低的存活率一直是研究的一大难点,芽孢(endospore)因其含水量极低,抗逆性强,能经受高温、紫外线、电离辐射以及多种化学物质灭杀等特性^[17-18],在制备固体菌剂的研究中成为重要的一环^[19]。已经有大量学者使用优化的培养基提高产孢率,如吴海霞等^[20]对海洋解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) GM-4-1产孢培养基进行优化,细菌总数和芽孢率分别达 7.40×10^9 cfu/mL和89.42%,芽孢率的提高可以有效提升益生菌的生存能力及产品的稳定性,为其工业化生产提供广阔的前景。短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*) HR10是本重点实验室在黑松黄色须腹菌(*Rhizopogon luteous*, RI)菌根根际土壤中分离得

到的一株菌根辅助细菌(Mycorrhiza helper bacteria, MHB),属于芽孢杆菌属,革兰阳性,是一类严格需氧或者兼性厌氧、能够形成内生孢子的芽孢杆菌^[21]。盛江梅等^[22]对其离体互作试验结果表明,菌株HR10的菌体及胞外代谢产物均可有效提高RI菌丝的生长,其菌体对RI菌丝生长的增长率达到13.1%。盆栽试验表明,HR10菌株与RI双接种黑松幼苗后,对松苗生长有显著地促进作用,还有效提高了根系的菌根侵染率。单接种HR10实验表明对黑松也有良好地促生效果。侯亮亮等^[23]在将菌株HR10与苗木猝倒病病原丝核菌(*Rhizoctonia* sp.)离体平板对抗培养中发现其对病原菌有较为明显地抑制作用,抑菌率达85.58%。松苗活体实验中菌株HR10的发病率和病死率显著低于对照组,说明该菌株是一株优良的生防菌,应用潜力巨大。本研究通过对菌株HR10进行碳源、氮源、无机盐的筛选并研究其最佳的培养条件,以达到提高芽孢率,增加产品活性,降低成本的目的,为其日后的工业化提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*) HR10菌株由南京林业大学森林病理实验室提供,该菌株同时也保存于中国典型培养物保藏中心(CCTCC NO. M2010143)。

1.1.2 培养基(g/L) ①细菌活化培养基(NA):牛肉膏3,NaCl 5,蛋白胨10,琼脂18,蒸馏水定容至1 L,pH 7.2。②细菌种子液培养基(液体LB):酵母膏5,胰蛋白胨10,NaCl 10,蒸馏水定容至1 L,pH 7.2。③计数培养基(固体LB):酵母膏5,胰蛋白胨10,NaCl 10,琼脂18,蒸馏水定容至1 L,pH 7.2。

1.1.3 主要仪器与设备 光照恒温摇床(TS-211GZ,上海仪纯实业有限公司);超净工作台(SW-CJ-2D,上海旌派仪器有限公司);pH计(JB/T 7815,梅特勒-托利多仪器有限公司);水浴锅(JK-WB-20B,上海精学科学仪器有限公司);高压灭菌锅(HVE-50,南京博惠科学仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 菌种的活化 取出保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的菌种HR10,使用接种环采用平板划线法将原种液接种

在 LB 固体平板上, 28 °C 培养 24 h。然后挑取单菌落接种在装液量为 50/250 mL 的 NA 培养基中, 28 °C, 200 r/min 培养 18 h^[24]。

1.2.2 种子液的制备 取活化后的菌液以 1% (体积分数) 的接种量接种于 LB 液体培养基中, LB 培养基装液量 50/250 mL, 28 °C, 200 r/min 培养 18 h 后备用。

1.2.3 活菌与芽孢的计数 采用稀释涂布平板计数法测定活菌量。取待测发酵液按稀释 $10^{-1} \sim 10^{-8}$ 梯度, 最后分别吸取 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 稀释液 200 μ L 于已静置 24~48 h 的 LB 固体培养基上, 用无菌刮铲将稀释菌液涂抹均匀, 为防止在培养过程中被污染, 将培养皿用封口膜密封后, 28 °C 培养 24~48 h, 计数各培养皿菌落数。芽孢计数时, 先将待测菌液 80 °C 水浴 10 min, 只保留存活的芽孢, 然后进行芽孢计数, 其计数方法与活菌计数方法相同, 芽孢率(%) = 芽孢数/活菌数 $\times 100\%$ ^[25]。

1.2.4 发酵液中不同培养时期芽孢率变化曲线的测定 使用初始 LB 液体培养基, 在发酵培养的 0、8、16、28、40、52、64、76、88、100 h 分别测定发酵液中的活菌数和芽孢数。发酵培养液的接菌量为 2% (体积分数), 装液量 50/250 mL, 培养条件为 28 °C, 200 r/min。

1.2.5 培养基优化 ①单因素筛选: a. 最佳碳源及浓度的筛选: 用葡萄糖、糖蜜、玉米粉、麦芽糖、淀粉、蔗糖等相等质量分别代替 LB 培养基中的碳源, 250 mL 三角瓶装液量 40% (体积分数), 接种量 2% (体积分数), 200 r/min, 28 °C 摇床培养 64 h 计数。测定每毫升活菌数和芽孢数并计算芽孢率。并将糖蜜和葡萄糖分别以 0.3%、0.5%、0.8%、1%、2%、3%、4%、5%、8%、10% (质量分数) 混合配制培养基, 其他成分及培养条件不变, 确定碳源浓度添加范围。b. 最佳氮源及浓度的筛选: 生豆粉、豆粕粉、豆饼粉、鱼粉、大豆蛋白胨、尿素含有氨基酸、酰胺和胺等可以被细菌转化吸收合成蛋白质, 核酸及含氮的代谢产物等可以作为有机氮源, 硫酸铵、硝酸铵中的铵盐可以直接被利用作为无机氮源^[26]。将上述氮源等质量代替 LB 培养基中的氮源, 确定最佳氮源, 并将确定的氮源分别设置为 0.3%、0.5%、0.8%、1%、2%、3%、4%、5% (质量分数), 其他成分不变, 培养条件同 ①a, 确定氮源浓度范围。c. 最佳无机盐及浓度的

筛选: 林司曦等^[24] 研究结果表明, KCl 对菌种 HR10 生长具有明显促进作用, 选用 KCl 作为其中一种确定的无机盐并探索其最佳浓度, 再分别添加 0.1% (质量分数) 的 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 、 $MnSO_4$ 、NaCl、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $CaCO_3$ 、 KH_2PO_4 、 $FePO_4 \cdot 4H_2O$ 、 $ZnSO_4$ 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 等无机盐, 培养条件同 ①a, 确定最佳无机盐种类, 并将确定的无机盐分别设置为 0.3%、0.5%、0.8%、1%、2%、3%、4%、5% (质量分数), 添加 ①a、①b 筛选出的最佳碳氮源, 培养条件同 ①a, 确定无机盐浓度添加范围。以上每个处理均进行 3 次生物学重复。②培养基优化的正交试验: 根据单因素试验筛选出的培养基最佳碳源组合、氮源和无机盐的种类和浓度 (质量分数), 设计正交试验 $L_9(3^3)$ (表 1) 配制不同培养基进行菌株 HR10 摇床培养试验, 培养条件同 ①a, 每个处理 3 次生物学重复。

表 1 碳源、氮源和无机盐优化的正交试验因素与水平
Table 1 Orthogonal test factors and levels for optimization of carbon source, nitrogen source and salt inorganic salt

水平	因素		
	A	B	C
1	0.8	2	0.3
2	1	3	0.4
3	2	4	0.5

注: A: 葡萄糖、糖蜜等质量同浓度混合添加; B: 豆饼粉; C: 硫酸锰。表 2 同

1.2.6 培养条件优化 选择正交试验优化的培养基, 对温度、初始 pH 值、接种量、装液量、转速 5 个因素依次进行单因素试验, 确定最佳发酵条件。每个处理均进行 3 次生物学重复。

2 结果与分析

2.1 芽孢生长曲线的绘制

图 1 为在最佳培养基和最佳发酵条件确定之前进行的发酵试验数据, 从图 1 可以看出, 菌株 HR10 活菌数总体都不高, 且呈现先升高再下降的趋势, 可能因为营养物质逐步被消耗, 活菌数在发酵 28 h 时, 达到最大值为 3.9×10^9 cfu/mL, 最高芽孢率出现在 76 h, 但是, 最高芽孢数量则出现在 64 h, 为 3.9×10^8 cfu/mL, 说明营养体达到最大值后随时间推移逐步减少, 而芽孢则逐渐增多。因此, 选取芽孢数量最大的时刻即 64 h 作为后续试验的芽孢量测定时间点。

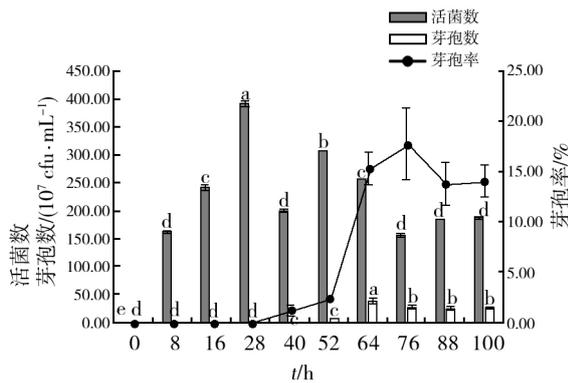


图1 不同时间的活菌数、芽孢数和芽孢率

Fig.1 The number of bacteria , spores and spore formation rate at different times

柱形图小写字母表示数据之间存在显著性差异,下图同
Lowercase letters in the column chart indicate significant differences between the data , the same as in the figure below

2.2 培养基单因素筛选结果

2.2.1 最佳碳源筛选 由图2可知 在不同的碳源培养基中 添加葡萄糖和糖蜜的培养基所获得的活菌数和芽孢数均显著高于其他碳源培养基 活菌数分别达 9.39×10^9 cfu/mL 和 9.26×10^9 cfu/mL ,芽孢数分别为 6.01×10^9 cfu/mL 和 61.3×10^9 cfu/mL。虽然蔗糖培养基的芽孢率最高 但因为其活菌数和芽孢数均较少 所以不宜作为目标碳源。玉米粉芽孢率低,也不作为目标碳源。葡萄糖和糖蜜两者差异不明显,且均具有较高的芽孢率。综合考虑 本研究将葡萄糖和糖蜜按质量比 1 : 1 添加 作为组合碳源。

2.2.2 最佳氮源筛选 由图3可知,在不同氮源培养基中 添加无机氮源的培养基中活菌数和芽孢数显著低于添加有机氮源的培养基,说明菌株HR10不能有效地利用无机氮源。添加豆制品氮源的培养基明显好于其他种类氮源的培养基,其中添加豆饼粉的培养基中活菌数和芽孢数最高,分别为 5.06×10^9 cfu/mL 和 4.05×10^9 cfu/mL,芽孢率可达 70.94%。因此,选择豆饼粉作为最佳氮源。

2.2.3 最佳碳源浓度筛选 由图4可知,在不同浓度糖蜜和葡萄糖培养基中,浓度 1% 时的活菌数和芽孢数最高,分别达到 9.89×10^9 cfu/mL 和 7.68×10^9 cfu/mL,但芽孢率则是在浓度为 0.8% 时达到最大,且随浓度增加呈现逐步递减的趋势。因此,选取组合碳源浓度 0.80%、1.00%、2.00%

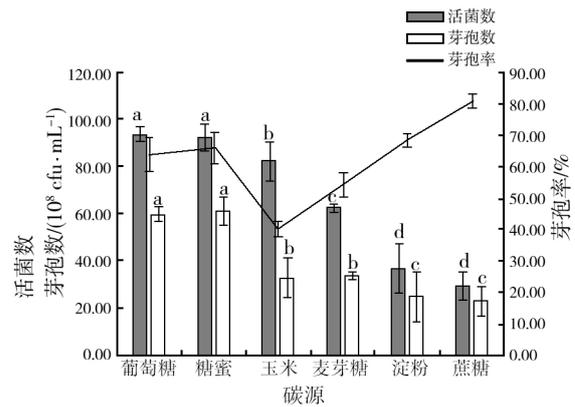


图2 不同碳源对菌株 HR10

活菌数、芽孢数和芽孢率的影响

Fig.2 The number of living bacterium , spores and spore formation rate of HR10 strains with different carbon source

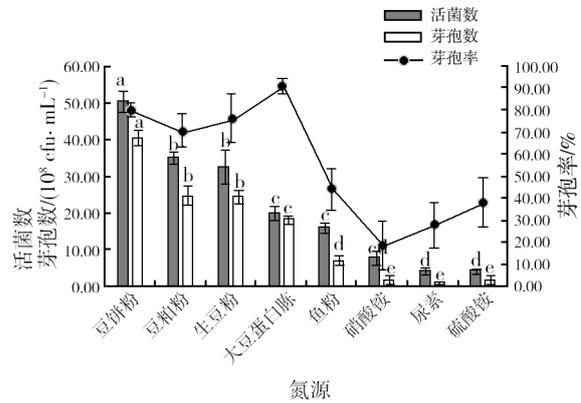


图3 不同氮源对菌株 HR10

活菌数、芽孢数和芽孢率的影响

Fig.3 Different nitrogen source medium HR10 strain number of living bacterium , the rate of spore number and spore

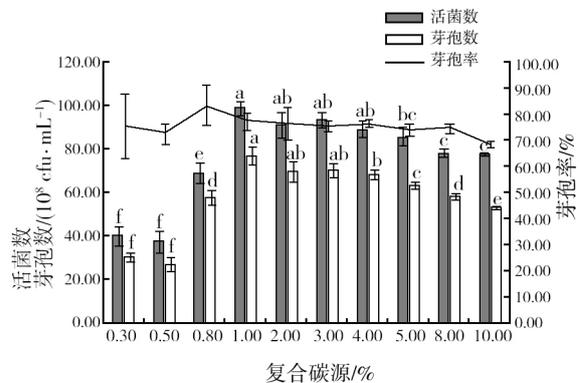


图4 不同浓度碳源对菌株 HR10

活菌数、芽孢数和芽孢率的影响

Fig.4 Viable bacterial count , spore count and spore rate of HR10 strains in different carbon source concentrations

做三个水平的正交试验。

2.2.4 最佳氮源浓度筛选 由图 5 可知,菌株 HR10 的活菌数和芽孢数随着培养基中豆饼粉浓度的增加逐渐增大,当豆饼粉浓度 3.00% 时最高,分别为 1.12×10^{10} cfu/mL 和 9.48×10^9 cfu/mL,随后逐渐下降。芽孢率变化不大,均在 80% 左右。因此,选取 2.00%、3.00%、4.00% 作为正交试验的三个水平。

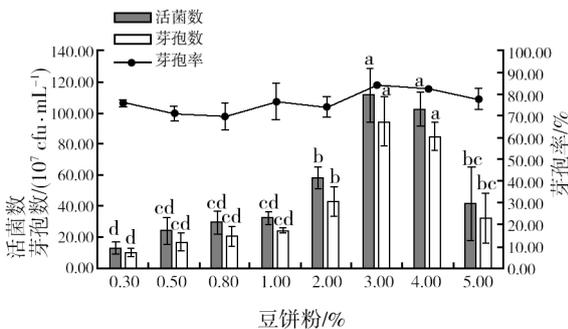


图 5 不同浓度氮源对菌株 HR10 活菌数、芽孢数和芽孢率的影响

Fig. 5 Viable bacterial count, spore count and spore rate of HR10 strains in different nitrogen source concentrations

2.2.5 最佳 KCl 浓度筛选 由图 6 可知,芽孢率随着 KCl 浓度升高而逐渐升高,当浓度为 0.3% 时,活菌数和芽孢数达到最大为 1.31×10^{10} cfu/mL 和 1.05×10^{10} cfu/mL,随后活菌数和芽孢数逐步下降,因此,选择浓度为 0.3% 的 KCl 作为一种固定无机盐进行添加。

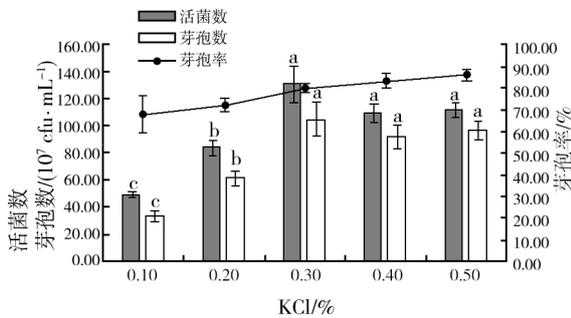


图 6 不同浓度 KCl 对菌株 HR10 活菌数、芽孢数和芽孢率的影响

Fig. 6 Viable bacterial count, spore count and spore rate of HR10 strain in different KCl inorganic salt concentration media

2.2.6 最佳无机盐种类的筛选 由图 7 可知,菌株 HR10 在聚乙烯醇培养基中的芽孢率仅为

37.55%,显著低于添加其他无机盐的培养基。在添加了不同种类无机盐的培养基中,以 $MnSO_4$ 的培养基所产生的活菌数、芽孢数和芽孢率均最大,分别为 2.71×10^{10} cfu/mL、 2.47×10^{10} cfu/mL 和 91.50%。在添加了 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 的培养基中,虽然其活菌数量最大,但因其芽孢率较低,仅为 4.01%,故不作为备选无机盐。综合分析,选择 $MnSO_4$ 作为菌株 HR10 的发酵培养基的无机盐。

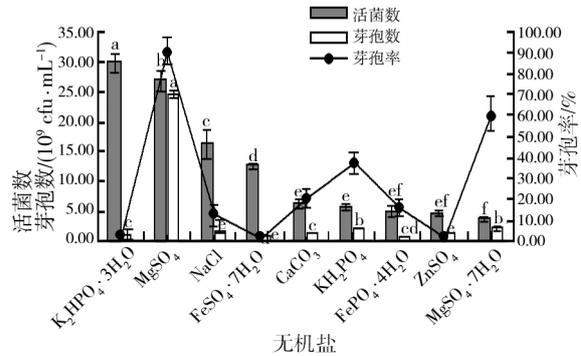


图 7 不同无机盐种类及聚乙烯醇对菌株 HR10 活菌数、芽孢数和芽孢率的影响

Fig. 7 Different types of inorganic salt and polyvinyl alcohol medium HR10 strain number of living bacterium, the spore number and the rate of spore

2.2.7 最佳无机盐浓度的筛选 由图 8 可知,当 $MnSO_4$ 浓度 0.2% ~ 0.5% 时,菌株 HR10 的芽孢数差异不显著,但 0.4% 时,活菌数最大,为 1.40×10^{10} cfu/mL,所以选择 $MnSO_4$ 浓度为 0.3%、0.4%、0.5% 作为后续正交试验的三个水平。

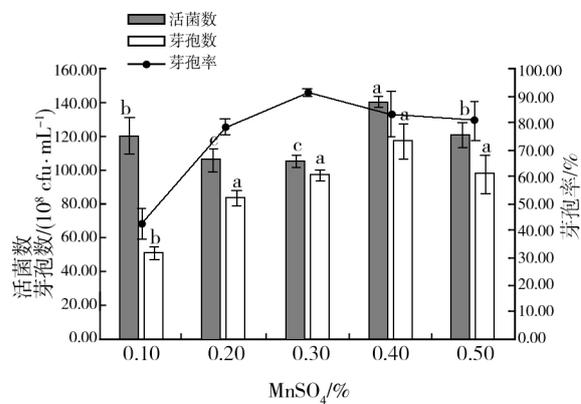


图 8 不同浓度 $MnSO_4$ 对菌株 HR10 活菌数、芽孢数和芽孢率的影响

Fig. 8 The viable count, spore count and spore rate of HR10 strain in different $MnSO_4$ concentration media

2.3 发酵培养基基质组成的正交试验结果

由正交试验结果(表2)可知,对菌株 HR10 芽孢产量影响最大的是葡萄糖和糖蜜等质量混合添加的组合碳源,其次是 $MnSO_4$,最后为豆饼粉,对应的最佳浓度组合为 A2B1C2,即葡萄糖 1%,糖蜜 1%,豆饼粉 2%,无机盐 $MnSO_4$ 0.4%,芽孢数可达 1.78×10^{10} cfu/mL。

表2 碳源、氮源和无机盐优化的 $L_9(3^3)$ 正交试验结果

Table 2 $L_9(3^3)$ orthogonal test results optimized for carbon source, nitrogen source and inorganic salt

试验号	因素水平			芽孢数/ (10^9 cfu · mL ⁻¹)
	A	B	C	
1	3	3	1	6.05
2	1	2	3	2.43
3	3	1	3	3.68
4	1	3	2	3.95
5	2	3	3	11.33
6	3	2	2	7.58
7	2	2	1	2.09
8	2	1	2	17.00
9	1	1	1	5.35
K_1	11.73	26.03	13.49	
K_2	30.42	12.1	28.53	
K_3	17.31	21.33	17.44	
极差 R	18.69	13.93	15.04	

2.4 培养条件单因素优化结果

2.4.1 最佳培养温度筛选 由图9可知,随着温度的升高,活菌数和芽孢数呈现先减少后增多的趋势。温度为 37 °C 时,活菌数和芽孢数均达到最大,分别为 1.48×10^{10} cfu/mL 和 1.43×10^{10} cfu/mL。因此,选择 37 °C 作为菌株 HR10 摇瓶培养的最佳发酵温度。

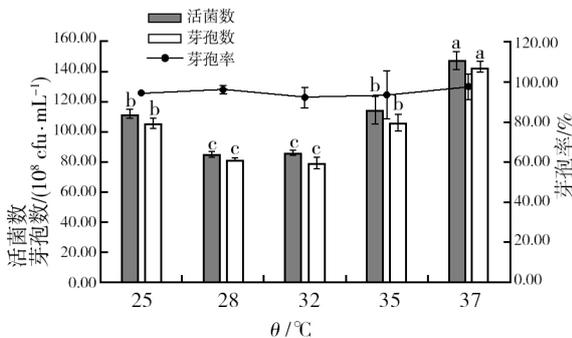


图9 不同温度对菌株 HR10 活菌数、芽孢数和芽孢率的影响

Fig. 9 Viable bacterial count, spore count and spore rate of HR10 strain in different temperature media

最佳发酵温度。

2.4.2 最佳 pH 的筛选 由图10可知,在不同的 pH 培养基中,菌株 HR10 产生的菌数和芽孢数明显有不同,pH 7 时,活菌数和芽孢数最高,分别为 1.74×10^{10} cfu/mL 和 1.64×10^{10} cfu/mL,芽孢率达到 94.22%。说明菌株 HR10 在中性的环境下更适合生长。因此,选用 pH 7 作为菌株 HR10 摇瓶培养的最佳 pH。

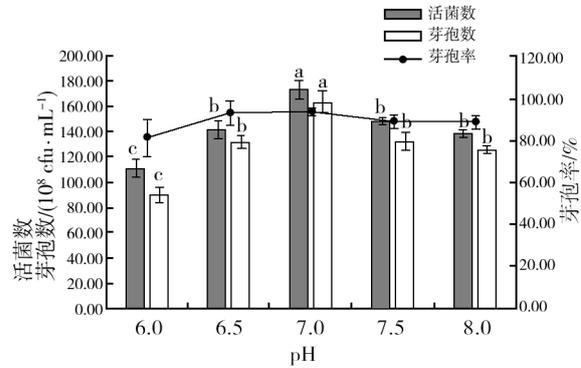


图10 不同 pH 对菌株 HR10 活菌数、芽孢数和芽孢率的影响

Fig. 10 Viable bacterial count, spore count and spore rate of HR10 strain in different pH media

2.4.3 发酵容器最佳装液量筛选 由图11可知,发酵容器不同的相对装液量对菌株 HR10 的活菌数有较大的影响,30% 装液量时,活菌数达到最大,为 3.79×10^{10} cfu/mL,50% 装液量时,芽孢率和芽孢数分别达到 89.59% 和 1.74×10^{10} cfu/mL,说明 50% 装液量时的氧气浓度更有利于芽孢形成。因此,选择菌株 HR10 摇瓶培养的最佳装液量为 50%。

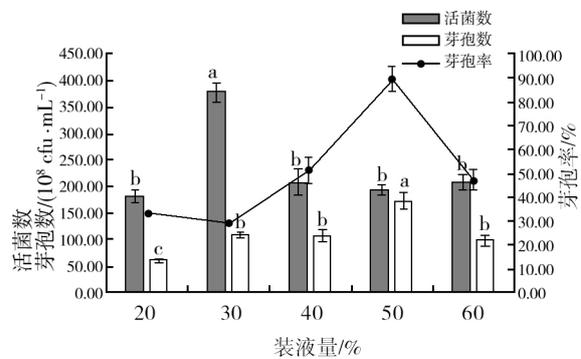


图11 培养基不同装液量对菌株 HR10 活菌数、芽孢数和芽孢率的影响

Fig. 11 Viable bacterial count, spore count and spore rate of HR10 strains in different media with different liquid volume

液量为 50%。

2.4.4 最佳接种量筛选 由图 12 可知,接种量 5% 时,芽孢数最高,为 1.99×10^{10} cfu/mL,但接种量超过 5% 时,芽孢数显著下降,活菌数随接种量增加而逐渐增高,接种量 15% 时,达到最高为 3.59×10^{10} cfu/mL。因为芽孢数是发酵产品的最重要指标,所以确定菌株 HR10 摇瓶培养的最佳接种量为 5%。

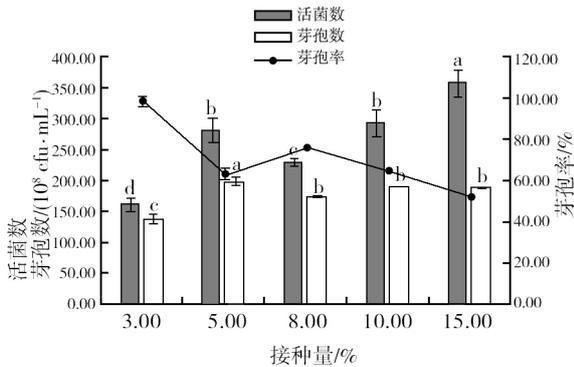


图 12 不同接种量对菌株 HR10 活菌数、芽孢数和芽孢率的影响

Fig. 12 Viable bacterial count, spore count and spore rate of HR10 strains in different inoculum media

2.4.5 最佳培养转速筛选 由图 13 可知,随着转速的增加,菌株 HR10 的活菌数、芽孢数和芽孢率均逐渐升高,当转速为 220 r/min 时,达到最大,分别为 2.47×10^{10} cfu/mL、 2.35×10^{10} cfu/mL 和 94.70%,超过 220 r/min,则呈现下降趋势,说明转速比较高时,菌体可能发生细胞自溶现象。因此,选取 220 r/min 作为菌株 HR10 液体发酵的最佳转速。

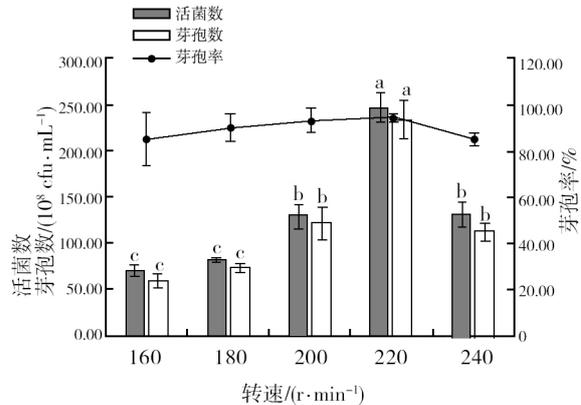


图 13 不同转速对菌株 HR10 活菌数、芽孢数和芽孢率的影响

Fig. 13 Viable bacterial count, spore number and spore rate of HR10 strain in different speed culture media

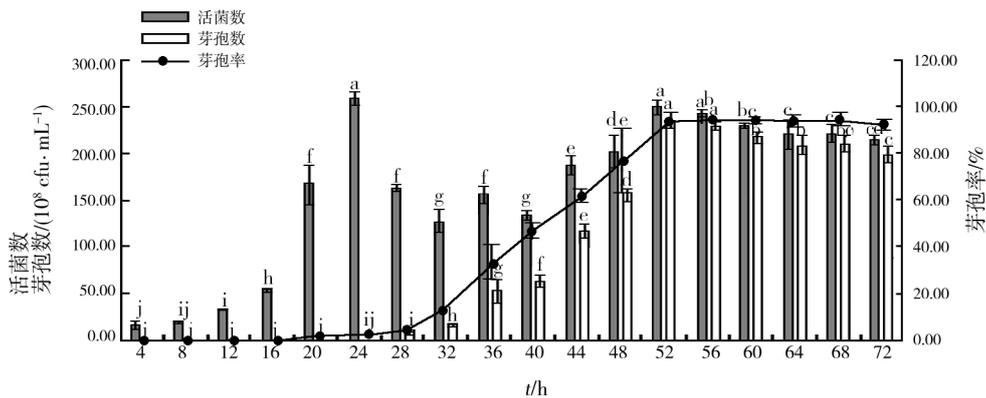


图 14 最适培养基和培养条件下不同时间菌株 HR10 的活菌数、芽孢数和芽孢率

Fig. 14 The number of viable bacteria, spore number and spore rate of HR10 strain at different time under the optimal medium and culture conditions

2.4.6 最佳发酵时间筛选 由图 14 可知,发酵液在培养 24 h 时,活菌数达到最大值,为 2.60×10^{10} cfu/mL,随后出现急剧下降,在 40 h 时又开始增加,最后在 52 h 达到顶峰,之后缓慢下降。

芽孢数随着时间推移逐步增加,在 52 h 时达到最大,为 2.37×10^{10} cfu/mL,之后开始下降,芽孢率在 52 h 达到最大,为 94.46%,所以选择最佳培养时间为 52 h。

3 讨论

本研究表明,短小芽孢杆菌 HR10 菌株的培养基最佳成分为葡萄糖 1%、糖蜜 1%、豆饼粉 2%、KCl 0.3%、MnSO₄ 0.4%。最佳发酵条件:温度 37 °C、pH 7、250 mL 三角瓶装液量 50%、接种量 5%、转速 220 r/min、培养时间 52 h。芽孢因其特殊结构具有极强的抗逆性,在活菌制剂工业中表现出极高的应用价值^[27]。芽孢的形成主要是菌体遇到了恶劣的生存环境,如营养条件、环境因素等。在培养过程中合理的碳氮用量可以有效地促进芽孢形成,缩短芽孢产生的时间。刘春红等^[28]对枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) B201 菌株的产孢培养基进行优化,确定了最佳培养基成分(g/L):米粉 3、糖蜜 10、豆粕粉 10、鱼粉 10、K₂HPO₄ 2、Na₂HPO₄ 2、MgSO₄ 0.5、MnSO₄ 0.5,大幅缩短了产孢培养时间,从而节省了能源,降低了成本。所以对有益微生物快速产孢培养基的研究以及微生物制剂的生产和应用都显得至关重要。

本研究通过对短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*) HR10 菌株的最佳产孢和发酵培养基进行研究,表明葡萄糖和糖蜜组合碳源可以有效提高菌株 HR10 的产孢率,葡萄糖作为速效碳源可以使菌体快速生长,缩短发酵时间,糖蜜可以使菌体维持较高的芽孢率并且作为工业副产品价格低廉,适合作为培养基成分。不同氮源的筛选结果表明,无机氮源不利于 HR10 菌体生长及产孢,这与王继雯等^[29]的研究结果相同。相对于生豆粉和豆粕粉而言,豆饼粉对菌体产孢促进效果最好,可能与发酵过程中生豆粉产生大量气泡从而使环境改变有关,而在豆粕粉作为氮源的培养基中,菌株 HR10 的活菌数和芽孢数低很可能是营养物质含量低所致。研究表明在培养基中添加适当的无机盐离子可以有效促进芽孢形成^[30],如 Mn²⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Fe²⁺ 和一些磷酸盐类等,这主要与芽孢中含有的特殊成分吡啶二羧酸有关,其可以整合不同的二价阳离子形成螯合物使芽孢核心高度矿化脱水,使其具有抵抗高温的能力^[31]。本研究表明,Mn²⁺对菌株 HR10 产芽孢具有非常显著的促进作用,Mn²⁺是多种酶的辅助因子^[24],Mn²⁺可以增加芽孢的产率,使其更加稳定,进一步改善芽孢的皮层结构,增加耐热性,在制备微生态制剂过

程中可以有效提高产品的质量,延长保存时间。同时,因本实验结果选用的碳氮源多是工业副产品,使用成本得以大幅降低,有利于菌株 HR10 的工业化生产。

发酵条件也对细菌芽孢的产生具有一定的影响^[32-33],本研究在进行温度单因素试验时发现,25 °C 相对于 28 °C 和 32 °C,可使菌株 HR10 具有更高的活菌数和芽孢数,这可能是因为 *B. pumilus* HR10 是一种植物根际促生细菌,相对的低温更加有利于其生长。35~37 °C 时又增高,37 °C 达到最大,说明温度对芽孢数和活菌数有一定的影响。初始 pH 在细菌培养的初始阶段则显得更加重要,合适的 pH 值可以使菌体在指数期更加快速的生长,活菌数量的峰值更高,如杜冰等^[34]研究发酵培养芽孢乳酸杆菌(*Lactobacillus sporogenes*) D-1 表明,pH 7 比 pH 2 时最终活菌数高出了 6 个数量级。过高的转速使自溶酶(autolysin)释放,溶解细菌胞壁质,造成细胞内容物释放,发生细胞的自溶现象,pH、温度也对细胞自溶有一定的影响^[27]。

固体菌剂常用的干燥方法有喷雾干燥、流化床干燥、真空干燥、真空冷冻干燥、喷雾冷冻干燥法等。由于冷冻干燥的高成本和能量消耗,使喷雾干燥制备固体菌剂的研究更为广泛^[35]。由于培养物在干燥期间存活率低,贮存期间稳定性低等缺点^[36-38],而芽孢因其极强的抗逆性,因此,提高培养物芽孢数量和芽孢率在固体菌剂的制备和储存过程中有极其重要的作用,对生防菌大面积推广具有深远意义。

参考文献:

- [1] 国家林业局. 第八次全国森林资源清查结果[J]. 林业资源管理, 2014, 46(1): 1-2.
- [2] 崔国发. 人工林地力衰退机理及其防止对策[J]. 世界林业研究, 1996, 9(5): 62-70.
- [3] Andivia E, Márquez-García B, Vázquez-Piqué J, et al. Autumn fertilization with nitrogen improves nutritional status, cold hardiness and the oxidative stress response of Holm oak (*Quercus ilex* ssp. *ballota* [Desf.] Samp) nursery seedlings[J]. *Trees*, 2012, 26(2): 311-320.
- [4] Blake L, Johnston AE, Goulding KWT. Mobilization of aluminium in soil by acid deposition and its uptake by grass cut for hay—a Chemical Time Bomb[J]. *Soil Use & Management*, 2007, 10(2): 51-55.

- [5] 蔡元呈. 植物微生态学与植物微生态制剂的应用[J]. 中国生态农业学报, 2002, 10(2): 106-108.
- [6] Mehrotra A, Mehrotra MD. leaf blight of some forest trees. [J]. Indian Journal of Forestry, 2000, 23(2): 142-148.
- [7] Matthews JW, Clay K. Influence of fungal endophyte infection on plant-soil feedback and community interactions [J]. Ecology, 2001, 82(2): 500-509.
- [8] Zou YN, Srivastava AK, Wu Q, et al. Glomalin-related soil protein and water relations in mycorrhizal citrus (*Citrus tangerina*) during soil water deficit [J]. Archives of Agronomy & Soil Science, 2014, 60(8): 1103-1114.
- [9] Tika B, Adhikari CMJG. Evaluation of bacteria isolated from rice for plant growth promotion and biological control of seedling disease of rice [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2001, 47(10): 916-924.
- [10] 唐旭. 松枯梢病拮抗细菌的筛选及其抗病机制初探[D]. 南京: 南京林业大学, 2017.
- [11] Beckman TG, Pusey PL, Bertrand PF. Impact of fungal gummosis on peach trees [J]. Hortscience, 2003, 38(6): 1141-1143.
- [12] Brown EA, Britton KO. Botryosphaeria diseases of apple and peach in the southeastern United States [J]. Plant Disease, 1986, 70(5): 480-484.
- [13] Venkatasubbaiah P. Effect of phytotoxins produced by *Botryosphaeria obtusa*, the cause of black rot of apple fruit and frog-eye leaf spot [J]. Phytopathology, 1991, 81(3): 243-247.
- [14] Wright AF, Harmon PF. Identification of species in the botryosphaeriaceae family causing stem blight on southern highbush blueberry in florida [J]. Plant Disease, 2010, 94(8): 966-971.
- [15] 杨星. 四种促生抗病微生物的推广应用研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2017.
- [16] 龚承阳, 王焱, 张岳峰, 等. 3 种促生有益微生物在上海梨树上的应用 [J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2017, 41(4): 186-190.
- [17] 郭何生. 荟萃古今中外农业生物学知识的宝库—《中国农业百科全书·生物学》卷 [J]. 世界农业, 1991, 1(18): 1-54.
- [18] 郭晓军, 李潞滨, 李术娜, 等. 毛竹枯梢病拮抗细菌巨大芽孢杆菌 6-59 菌株的产孢条件优化 [J]. 植物保护学报, 2008, 35(5): 443-447.
- [19] Spinosa MR, Braccini T, Ricca E, et al. On the fate of ingested *Bacillus* spores [J]. Research in Microbiology, 2000, 151(5): 361-368.
- [20] 吴海霞, 陈茹, 曹雪梅, 等. 海洋细菌 GM-4-1 产孢发酵培养基和摇瓶发酵条件优化 [J]. 南方农业学报, 2018, 49(12): 2454-2462.
- [21] 韩延平. 需氧芽孢杆菌分类学研究进展 [J]. 微生物学免疫学进展, 2001(4): 73-78.
- [22] 盛江梅, 吴小芹, 侯亮亮. 黑松-黄色须腹菌共生体根际菌根辅助细菌的筛选及鉴定 [J]. 东北林业大学学报, 2014, 42(5): 110-114.
- [23] 侯亮亮, 吴小芹, 盛江梅. 4 株菌根辅助细菌对苗木猝倒病菌的抑制作用 [J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2011, 35(1): 43-46.
- [24] 林司曦, 吴小芹, 丁晓磊, 等. 短小芽孢杆菌 *Bacillus pumilus* HR10 增殖扩繁培养基组分优化 [J]. 微生物学杂志, 2014, 34(6): 22-28.
- [25] 吴婷婷. 短小芽孢杆菌产孢培养技术的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
- [26] 沈萍等. 微生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2016: 85.
- [27] 徐世荣, 陈骥, 吴云鹏. 细菌芽孢形成机制在微生态制剂生产中的应用 [J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(4): 121-126.
- [28] 刘春红, 张丽霞, 李燕, 等. 枯草芽孢杆菌 B201 产孢培养基优化 [J]. 中国生物防治学报, 2016, 32(5): 650-656.
- [29] 王继雯, 刘莹莹, 李冠杰, 等. 巨大芽孢杆菌 C2 产孢培养基条件的优化 [J]. 中国农学通报, 2014, 30(36): 155-160.
- [30] Sandhu DK, Kalra MK. Effect of cultural conditions on production of cellulases in *Trichoderma longibrachiatum* [J]. Transactions of the British Mycological Society, 1985, 84(2): 251-258.
- [31] Daniel RA, Errington J. Cloning, DNA sequence, functional analysis and transcriptional regulation of the genes encoding dipicolinic acid synthetase required for sporulation in *Bacillus subtilis* [J]. Journal of molecular biology, 1993, 232(2): 1-483.
- [32] 时向哲, 杨可欣, 贾田惠, 等. 马铃薯疮痂病拮抗菌 *Bacillus amyloliquefaciens* 12-82 发酵条件优化 [J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 2019, 40(3): 52-60.
- [33] 刘虎军, 常晓娇, 王楠希, 等. 玉米赤霉烯酮降解菌 ASAGW-10 产孢条件研究 [J]. 粮油食品科技, 2018, 26(4): 50-54.
- [34] 杜冰, 刘长海. 液体深层发酵培养芽孢乳酸杆菌 D-1 的研究 [C]. 广东: 广州食品工业科技, 2004: 8-10.
- [35] Peighambardoust SH, Tafti AG, Hesari J. Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review [J]. Trends in Food Science & Technology, 2011, 22(5): 1-224.
- [36] Ananta E, Volkert M, Knorr D. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG [J]. International Dairy Journal, 2005, 15(4): 1-409.
- [37] Boza Y, Barbin D, Scamparini ARP. Effect of spray-drying on the quality of encapsulated cells of *Beijerinckia* sp. [J]. Process Biochemistry, 2004, 39(10): 1275-1284.
- [38] Chávez BE, Ledebor AM. Drying of probiotics: optimization of formulation and process to enhance storage survival [J]. Drying Technology, 2007, 25(7-8): 1193-1201.