

松树内生蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13 菌株发酵培养基及条件优化

尹艳楠, 吴佳雯, 谈家金, 郝德君

(南京林业大学, 江苏 南京 210037)

摘要: 为了进一步开发蜡样芽孢杆菌 *Bacillus cereus* NJSZ-13 菌株对松材线虫病的生物防治潜能, 提高该菌的利用率, 为后期蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13 粉剂的工艺生产做准备, 本研究通过单因素和正交试验对该菌株进行了发酵培养基和摇瓶发酵条件的优化。培养基优化单因素试验结果显示, 培养基最佳碳源为可溶性淀粉, 最佳氮源为大豆蛋白胨, 最佳无机盐为 CaCl_2 ; 将可溶性淀粉、大豆蛋白胨和 CaCl_2 (C) 三因素按 $L_9(3^3)$ 设计正交试验, 结果表明, 最佳配比为: 可溶性淀粉 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 大豆蛋白胨 $14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, CaCl_2 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。发酵条件优化结果表明, 最佳发酵温度为 28°C ; 最佳发酵初始 pH 值为 7.5; 最佳接种量为 2%; 最佳装液量为 30%。与优化前的培养条件相比, 在该优化条件下, 摇瓶发酵单位体积发酵液中的菌株活菌数量达到 $4.10 \times 10^9 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$, 是优化前单位体积发酵液中活菌数量的 4.1 倍, 达到了菌体富集的目的。

关键词: 蜡样芽孢杆菌; 碳源; 氮源; 无机盐; 培养基; 发酵条件; 优化

中图分类号: S763.13 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-3776 (2020) 06-0009-09

Optimization of Medium and Culture Conditions for *Bacillus cereus* NJSZ-13

YIN Yan-nan, WU Jia-wen, TAN Jia-jin, HAO De-jun

(Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: In order to research the biocontrol of *Bacillus cereus* NJSZ-13 strain against pine wilt disease, single factor and orthogonal experiments were conducted on optimization of medium and culture conditions. Single factor tests showed that the best carbon source in the medium was soluble starch, nitrogen source was soy peptone, and inorganic salt was calcium chloride. Orthogonal test demonstrated that the optimum proportion was: soluble starch 10 g/L , soy peptone 14 g/L , calcium chloride 6 g/L . The experiment resulted that the optimal culture conditions were: fermentation temperature at 28°C , initial pH of 7.5; inoculum size of 2% and liquid volume of 30%. Compared with the culture conditions before optimization, viable count of strain NJSZ-13 in fermentation broth under the optimized conditions reached $4.10 \times 10^9 \text{ cfu/mL}$, 4.1 times of that before one.

Key words: *Bacillus cereus*; carbon source; nitrogen source; inorganic salt; culture medium; fermentation conditions; optimization

松材线虫病 (pine wilt disease) 又称松树枯萎病, 是由松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 引起的植物病害。自从 1982 年于南京中山陵的黑松 *Pinus thunbergii* 上首次发现松材线虫病以后^[1], 30 多年来, 该病相继在江苏、安徽、浙江、广东、山东、台湾、香港、江西、湖南、云南、湖北、重庆和贵州等多个省、市暴发, 给农林业和国家经济带来了严重的损失^[2]。目前, 在松材线虫病防治方面主要采用对疫木进行砍伐、铁砂网罩等物理方法, 但是处理困难, 需要耗费大量人力和物力; 向感病疫木或林地喷洒化学农药的化学方法, 虽然方法简单有效, 但是长期使用化学农药对环境会造成不可逆的毁坏; 以及利用毒杀线虫的细菌、真菌或者植物性杀松材线

收稿日期: 2020-04-15; 修回日期: 2020-09-04

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFC1200400)

作者简介: 尹艳楠, 研究生, 从事森林微生物研究; E-mail: 1634999039@qq.com。通信作者: 谈家金, 教授, 从事森林病理学研究; E-mail: tanjiajin@njfu.edu.cn。

虫活性物质进行生物防治来实现^[3-5]。

在利用微生物防治松材线虫病方面，具有前景的细菌有芽孢杆菌 *Bacillus*，假单胞菌 *Pseudomonas*，巴氏杆菌 *Pasteurella* 等，特别是可以在不同的宿主快速定殖，被广泛应用于植物病害的生物防治方面的芽孢杆菌，包括解淀粉芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens*，枯草芽孢杆菌 *B. subtilis*，巴氏芽孢杆菌 *B. pasteurii*，侧孢芽孢杆菌 *B. lateralis*，蜡样芽孢杆菌 *B. cereus*，苏云金芽孢杆菌 *B. thuringiensis*，短小芽孢杆菌 *B. pumilus* 和球形芽孢杆菌 *B. sphaericus* 等^[6-9]。蜡样芽孢杆菌 *B. cereus* 是一种革兰氏阳性杆菌，主要分布于空气、土壤、水及植物中，能产生抗逆性内生芽孢，对高温、干燥、紫外线辐射等恶劣环境都具有很强的抵抗能力，在植物的表面容易存活、定殖，且其抑菌范围较广泛，能有效地防治许多植物病害^[10-12]。本文选用的蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13 菌株是一株从南京湿地松 *P. elliotii* 上筛选的并且可以在马尾松 *P. massoniana* 上定殖的具有杀松材线虫作用的松树内生细菌，前期研究表明该菌株菌体水悬液处理线虫 48 h 后，线虫死亡率达到 81.5%^[13]。若将蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13 菌株应用于生产，要通过发酵使细胞富集，制成活菌制剂。因此，将蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13 菌株发酵液单位体积活菌数提高是关键的一步。本试验通过对菌株发酵培养基和培养条件进行优化，进一步提高发酵液活菌数，从而为后期蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13 菌株的微生物制剂开发与生防应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

- 1.1.1 供试菌株 蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13 菌株由南京林业大学森林保护学病理实验室提供。
- 1.1.2 供试培养基 NJSZ-13 菌株种子培养基：蛋白胨 10 g·L⁻¹，牛肉膏 5 g·L⁻¹，氯化钠 5 g·L⁻¹，pH 值 7.2 ~ 7.4。

1.2 方法

- 1.2.1 NJSZ-13 菌株的活化 将实验室保存的 NJSZ-13 菌种移接到斜面试管培养基中，在恒温培养箱 28℃ 恒温培养 24 h 待用。
- 1.2.2 种子液的制备 取一环活化后的 NJSZ-13 菌株接种于盛有 40 mL 种子培养基的 100 mL 三角瓶中，28℃、200 r·min⁻¹ 条件下摇床振荡培养 24 h。
- 1.2.3 摇瓶发酵初始条件 按 5% 的接种量将 NJSZ-13 菌株的种子液接种到有 40 mL 发酵培养基的 100 mL 三角瓶里，在 28℃、200 r·min⁻¹ 的条件下摇床振荡培养 24 h。进行单因素试验、培养基正交优化试验和发酵条件的优化试验。
- 1.2.4 NJSZ-13 发酵液活菌计数 活菌数的测定采用稀释平板计数法^[14]。
- 1.2.5 基础培养基筛选 选择 4 种不同的培养基（见表 1），将 NJSZ-13 菌株在不同的基础培养基中进行摇瓶发酵，分别测定 NJSZ-13 菌株发酵液的活菌数。
- 1.2.6 单因素试验

表 1 供试培养基及其配方 Table 1 Basic medium and their formula	
序号	培养基成分
1	蛋白胨 10 g·L ⁻¹ ，牛肉浸膏 5 g·L ⁻¹ ，NaCl 5 g·L ⁻¹ ，pH 7.2
2	胰蛋白胨 10 g·L ⁻¹ ，酵母粉 5 g·L ⁻¹ ，NaCl 10 g·L ⁻¹ ，pH 7.2
3	葡萄糖 10 g·L ⁻¹ ，蛋白胨 10 g·L ⁻¹ ，Na ₂ HPO ₄ 2 g·L ⁻¹ ，NaH ₂ PO ₄ 2 g·L ⁻¹ ，NaCl 2 g·L ⁻¹ ，pH 7.2
4	玉米粉 10 g·L ⁻¹ ，蔗糖 5 g·L ⁻¹ ，CaCO ₃ 3 g·L ⁻¹ ，pH 7.0

（1）碳源种类及其浓度筛选

分别用等量的葡萄糖、玉米粉、麦芽糖、可溶性淀粉、蔗糖、甘露醇替代基础培养基中的碳源（C 源），以不加 C 源的基础培养基为对照（CK），其他发酵条件不变，进行摇瓶发酵，每处理重复 3 次。采用活菌计数法测定不同 C 源发酵液的活菌数，筛选最佳 C 源。在筛选出最佳 C 源种类的基础上，在相同条件下设置 0.4%，0.6%，0.8%，1.0%，1.2%，1.4% 即 4，6，8，10，12，14 g·L⁻¹ 6 种不同浓度 C 源的培养基进行摇瓶发酵，以筛选出最佳 C 源浓度。

（2）氮源种类及其浓度筛选

在 C 源筛选的基础上，分别用等量的蛋白胨、牛肉膏、尿素、硫酸铵、大豆蛋白胨、玉米浆干粉、酵母粉

代替发酵培养基中的氮源(N源),以不加N源的培养基为对照(CK),其他发酵条件不变,进行摇瓶发酵,每处理重复3次。用活菌计数法计算不同N源发酵液的活菌数,筛选最佳N源。在筛选出最佳N源的基础上,在相同条件下设置0.4%,0.6%,0.8%,1.0%,1.2%,1.4%即4,6,8,10,12,14 g·L⁻¹ 6种不同浓度N源的培养基进行摇瓶发酵,以筛选出最佳N源浓度。

(3) 无机盐种类及其浓度筛选

在C源、N源优化的基础上,分别添加0.6%的ZnSO₄, NaCl, CaCl₂, MnSO₄, MgSO₄, KCl代替发酵培养基中的无机盐,以不加无机盐的培养基作为对照(CK),其他发酵条件不变,每处理重复3次。采用活菌计数法计算不同无机盐发酵液的活菌数,筛选最佳无机盐。在筛选出最佳无机盐的基础上,在相同条件下考察在大量元素无机盐不同浓度(0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7% 即2, 3, 4, 5, 6, 7 g·L⁻¹)发酵液中的活菌数,筛选出最佳无机盐的浓度。

1.2.7 发酵培养基正交试验优化 筛选得到的培养基最佳C源为可溶性淀粉,最佳N源为大豆蛋白胨,最佳无机盐为CaCl₂。将可溶性淀粉(A)、大豆蛋白胨(B)和CaCl₂(C)三因素按L₉(3³)设计正交试验的因素与水平,见表2。按正交设计,在28℃、200 r·min⁻¹、pH 7.2的条件下振荡培养24 h,以发酵液的活菌数为优化指标,比较不同组合发酵液的活菌数,确定最佳培养基配方。

表2 正交试验的因素与水平
Table 2 Factors and levels of orthogonal test

水平	因素		
	A/(g·L ⁻¹)	B/(g·L ⁻¹)	C/(g·L ⁻¹)
1	12	14	7
2	10	12	6
3	8	10	5

1.2.8 摇瓶发酵条件优化 在培养基的优化基础上,对摇瓶发酵的发酵温度、初始pH、接种量、装液量进行优化。每个试验组设置3次重复,进行一个因素优化期间保证其他条件不变,计数不同条件下摇瓶发酵液的活菌数。

发酵温度:将NJSZ-13菌株接种后分别在25, 28, 31, 34, 37℃条件下摇床发酵;初始pH:用HCl和NaOH调节培养基的初始pH值分别为6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5;接种量:将NJSZ-13菌株按照体积分数分别为1%, 2%, 3%, 4%, 5%的接种量进行接种;装液量:将NJSZ-13菌株分别接种到按体积分数为10%, 20%, 30%, 40%, 50%装液量的培养基中(即100 mL三角瓶分别装入盛有10, 20, 30, 40, 50 mL培养基)摇瓶发酵。

1.2.9 蜡样芽孢杆菌NJSZ-13生长曲线的绘制 将活化好的蜡样芽孢杆菌接种于发酵培养基中,利用芬兰制造Bio Screener全自动微生物生长曲线分析仪FP-1100-C每间隔2 h测定发酵液的被检测物吸收掉的光密度OD₆₀₀值,绘制菌体生长曲线。

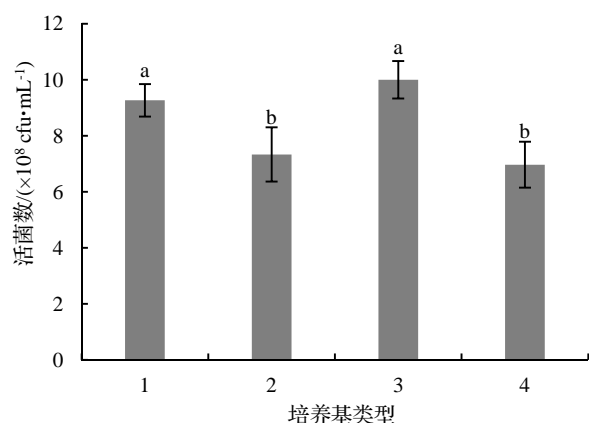
2 结果与分析

2.1 基础发酵培养基筛选

由图1可知,将蜡样芽孢杆菌菌株NJSZ-13接种到不同培养基上进行摇床震荡培养,不同培养基成份对发酵液活菌数量的影响差异显著($P<0.05$),其中,1号与3号培养基发酵液中蜡样芽孢杆菌菌株NJSZ-13的活菌数量之间没有显著差异($P>0.05$),但是菌株NJSZ-13在3号培养基中摇瓶发酵培养下,单位体积的活菌数量最高,为 10.00×10^8 cfu·mL⁻¹,1号培养基单位体积发酵液的活菌数量为 9.27×10^8 cfu·mL⁻¹,2号和4号培养基单位体积发酵液的活菌数量与1号、3号相比显著降低,其中,4号培养基发酵液对应的单位体积内活菌数量为 6.97×10^8 cfu·mL⁻¹。所以,选择3号培养基作为蜡样芽孢杆菌菌株NJSZ-13摇瓶发酵的基础培养基。

2.2 培养基优化的单因素试验

2.2.1 培养基C源的优化 由图2可知,不同C源对蜡样芽孢杆菌NJSZ-13的活菌数量有较大的影响,其中,以可溶性淀粉作为培养基C源时,单位体积的活菌数量达到最大值,为 16.17×10^8 cfu·mL⁻¹,其余C源对活菌数量的影响由大到小依次为玉米粉、蔗糖、麦芽糖、甘露醇和葡萄糖,CK最低,为 7.93×10^8 cfu·mL⁻¹。另外,还可以看出,蜡样芽孢杆菌NJSZ-13对多糖的利用高于单糖和二糖,所以选择可溶性淀粉作为蜡样芽孢杆菌NJSZ-13摇瓶发酵培养基的C源。



注：图柱上不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)，下同。

图1 不同培养基对菌株 NJSZ-13 发酵液活菌数量的影响

Figure 1 Effect of different culture media on viable count of strain NJSZ-13 in fermentation broth

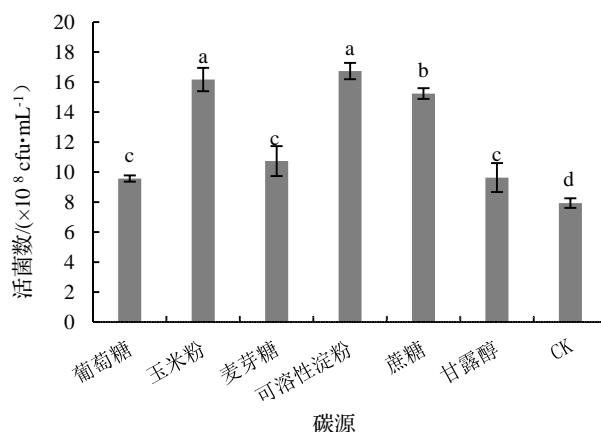


图2 不同C源培养基对菌株 NJSZ-13 活菌数量的影响

Figure 2 Effect of different carbon source in culture medium on viable count of strain NJSZ-13 in fermentation broth

2.2.2 C 源浓度的筛选 由图 3 可知，在一定浓度范围内，蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13 单位体积发酵液的活菌数量随着可溶性淀粉浓度的增加而增加，当可溶性淀粉的浓度增加到 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，单位体积发酵液中的活菌数量达到最高，为 $16.80 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。而当浓度超过 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，随着浓度的增加单位体积发酵液中的活菌数量随之减少，所以选择 8, 10, 12 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 这 3 个浓度作为正交试验 C 源浓度的三个水平。

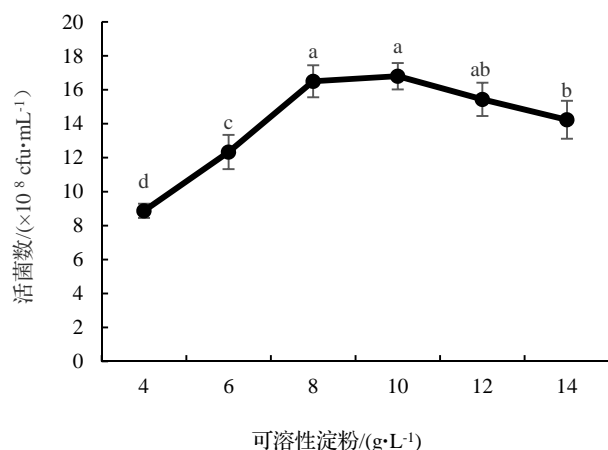


图3 不同浓度可溶性淀粉对菌株 NJSZ-13 活菌数量的影响

Figure 3 Effect of different concentrations of soluble starch in culture medium on viable count of strain NJSZ-13 in fermentation broth

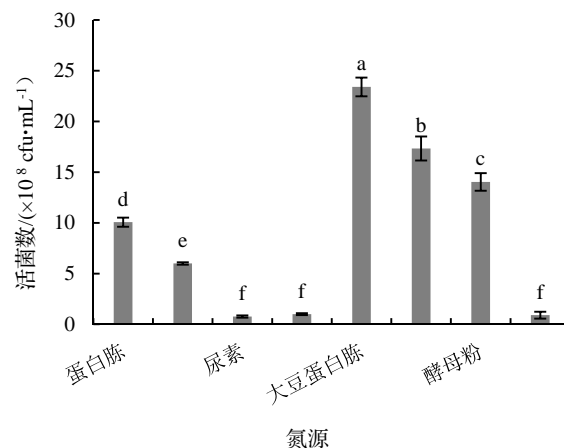


图4 不同N源培养基对菌株 NJSZ-13 活菌数量的影响

Figure 4 Effect of different nitrogen source in culture medium on viable count of strain NJSZ-13 in fermentation broth

2.2.3 培养基 N 源的优化 由图 4 可知，蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13 以不同的 N 源为培养基成分时，对单位体积的活菌数量影响显著 ($P < 0.05$)。其中，以大豆蛋白胨作为单一 N 源时活菌数量最大，为 $17.3 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，其余 N 源对单位体积的活菌数量的影响由大到小依次为玉米浆干粉、酵母粉、蛋白胨、牛肉浸膏、CK、硫酸铵和尿素，其中，大豆蛋白胨、玉米浆干粉、酵母粉、蛋白胨、牛肉浸膏是有机 N 源，硫酸铵是无机 N 源。从实验结果可看出，蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13 对大多数有机氮的利用远远超过对无机氮的利用，将无机氮作为单一 N 源的时候单位体积发酵液的活菌数量甚至比不加 N 源的 CK 还低。有机 N 源的成分相对丰富，不只是提供了 N 源，还包含了 C 源和无机盐，而无机 N 源的成分相对来说比较单一。因此，选择大豆蛋白胨作为蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13

摇瓶发酵培养基的 N 源。

2.2.4 N 源浓度的筛选 由图 5 可知, 大豆蛋白胨浓度对蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13 的活菌数量影响显著 ($P<0.05$)。在一定浓度范围内, NJSZ-13 单位体积发酵液的活菌数量随着大豆蛋白胨浓度的增加而增加, 当大豆蛋白胨的浓度为 $12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 单位体积发酵液中的活菌数量达到最高值, 为 $24.77 \times 10^8 \text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。当浓度超过 $12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 随着大豆蛋白胨浓度的增加, 单位体积发酵液中的活菌数量反而随之减少, 所以选择 10, 12, $14 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 这 3 个浓度作为正交试验 N 源浓度的三个水平。

2.2.5 培养基无机盐的优化 由图 6 可知, 无机盐种类对蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13 单位体积发酵液的活菌数量影响显著 ($P<0.05$), 以 CaCl_2 为无机盐时, NJSZ-13 对无机盐的利用最好, 单位体积发酵液的活菌数量达到最大值, 为 $26.67 \times 10^8 \text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$, 以 ZnSO_4 , MnSO_4 , MgSO_4 为无机盐时, 单位体积发酵液的活菌数量都小于不加无机盐的对照组。因此, 选择 CaCl_2 作为蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13 摇瓶发酵培养基的无机盐。

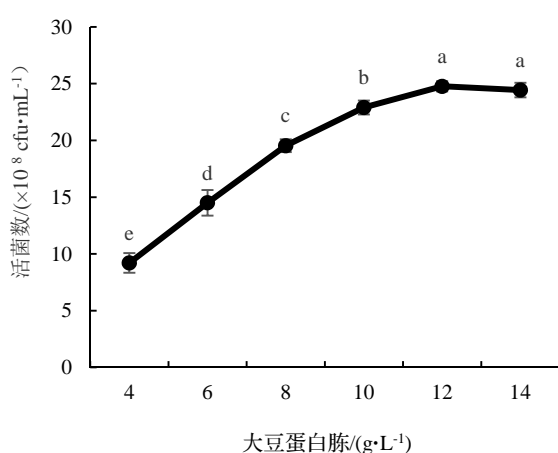


图 5 不同浓度大豆蛋白胨对菌株 NJSZ-13 活菌数量的影响

Figure 5 Effect of different concentrations of soy peptone in culture medium on viable count of strain NJSZ-13 in fermentation broth

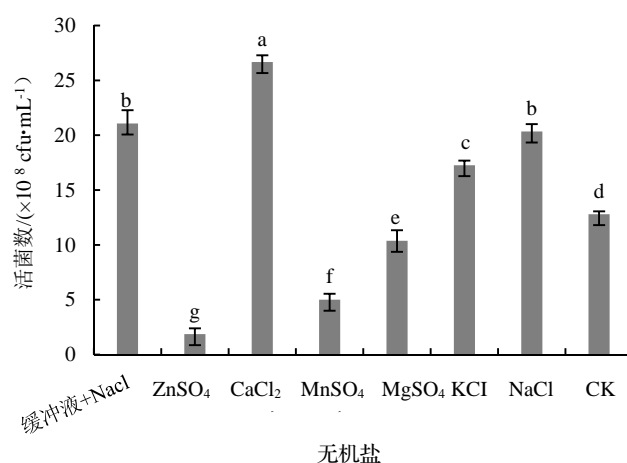


图 6 无机盐种类对菌株 NJSZ-13 活菌数量的影响

Figure 6 Effect of inorganic salt types in culture medium on viable count of strain NJSZ-13 in fermentation broth

2.2.6 无机盐浓度的筛选 不同浓度 CaCl_2 对菌株 NJSZ-13 活菌数量的影响见图 7。

由图 7 可知, 向培养基中加入不同浓度的 CaCl_2 对蜡样芽孢杆菌菌株 NJSZ-13 的活菌数量影响显著 ($P<0.05$), 培养基中添加的 CaCl_2 浓度越高, 菌株 NJSZ-13 在发酵液中的生长情况越好, 对 CaCl_2 的利用越好, 单位体积发酵液中的含菌量也越高, 在 CaCl_2 浓度为 $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 或者 $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 单位体积发酵液中的活菌数量之间没有显著性差异 ($P>0.05$), 但是浓度在 $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时的活菌数量最高, 为 $28.4 \times 10^8 \text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$, 因此, 选择 5, 6, $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 这 3 个浓度作为正交试验中 CaCl_2 浓度的三个水平。

2.3 培养基正交优化试验

由图 8 可知, 培养基 C 源可溶性淀粉、N 源大豆蛋白胨及无机盐 CaCl_2 不同浓度比对菌株 NJSZ-13 活菌数量影响差异显著 ($P<0.05$), 正交试验结果通过极差分析可知 (表 3), N 源大豆蛋白胨对蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13 单位体积发酵液中的的活菌数量影响最大,

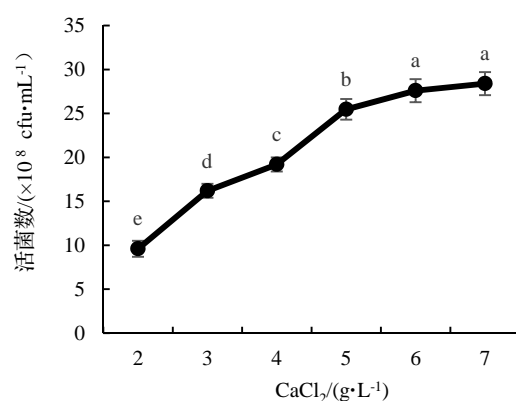


图 7 不同浓度 CaCl_2 对菌株 NJSZ-13 活菌数量的影响

Figure 7 Effect of different concentration of CaCl_2 in culture medium on viable count of strain NJSZ-13 in fermentation broth

其次是无机盐 CaCl_2 , C 源可溶性淀粉, 对应的组合为 4 号培养基 $\text{A}_2\text{B}_1\text{C}_2$, 其单位体积发酵液中的活菌数量为 $37.00 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。因此, 确定蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13 的发酵培养基配方为可溶性淀粉 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 大豆蛋白胨 $14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, CaCl_2 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.4 摇瓶发酵条件优化

2.4.1 发酵温度的优化 由图 9 可知, 不同温度下摇瓶发酵得到的单位体积蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13 活菌数量差异显著 ($P < 0.05$), 在 28°C 时摇瓶得到发酵液中最大单位体积的活菌数量, 为 $35.80 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$, 当温度超过 28°C 时, 随着温度的增加, 发酵液中单位体积活菌数量急剧减少, 特别是超过 34°C 以后, 单位体积活菌数量比在 28°C 时培养的减少了大半, 说明蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13 的发酵培养温度不适合超过 34°C , 其最适培养温度为 28°C 。

表 3 正交试验及结果
Table 3 Orthogonal test and results

序号	A	B	C	活菌数($\times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$)
1	2	2	3	18.60
2	3	3	2	17.40
3	3	2	1	24.67
4	2	1	2	37.00
5	1	1	1	35.40
6	1	2	2	29.27
7	3	1	3	28.07
8	1	3	3	13.67
9	2	3	1	19.93
K_1	26.11	33.49	26.67	
K_2	25.18	24.18	27.89	
K_3	23.38	17.00	20.11	
R^2	2.73	16.49	7.78	

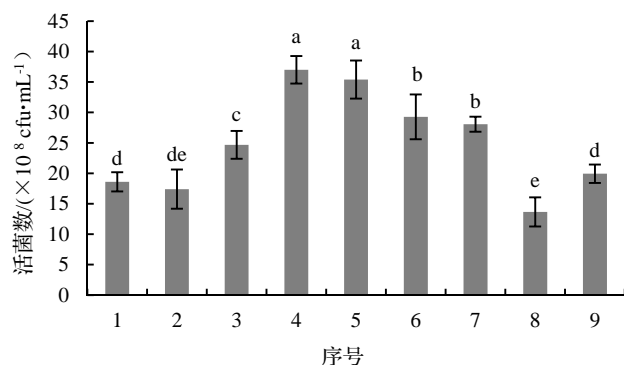


图 8 正交各组培养基对菌株 NJSZ-13 活菌数量的影响

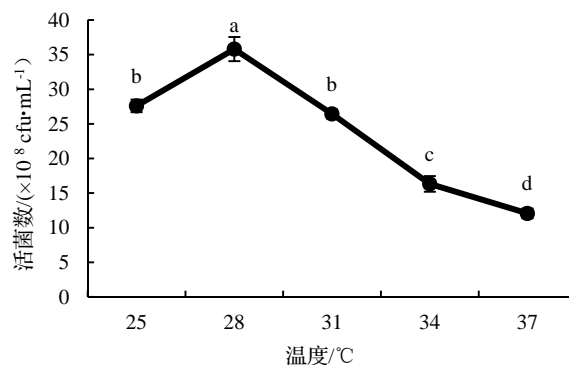


图 9 不同发酵温度对菌株 NJSZ-13 活菌数量的影响

Figure 8 Effect of orthogonal groups of medium on viable count of strain NJSZ-13 in fermentation broth

Figure 9 Effect of different fermentation temperature on viable count of strain NJSZ-13 in fermentation broth

2.4.2 发酵初始 pH 的优化 由图 10 可知, 培养基初始 pH 在 $6.5 \sim 8.5$, 蜡样芽孢杆菌菌株 NJSZ-13 单位体积发酵液中的含菌量差异显著 ($P < 0.05$), 在发酵初始 pH 7.5 时单位体积发酵液中的含菌量最高, 其活菌数量为 $37.67 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$, 但是 pH 在 $8.0 \sim 8.5$ 时, 菌株 NJSZ-13 单位体积发酵液中的活菌数量虽然有差异, 但活菌数量保持较高的水平, 说明蜡样芽孢杆菌菌株 NJSZ-13 对 pH 适应范围较宽且更偏向弱碱性的生活环境, 因此, 选择 pH 7.5 为菌株 NJSZ-13 摇瓶发酵的最佳初始 pH 值。

2.4.3 发酵接种量的优化 由图 11 表明, 不同接种量对发酵最终活菌数量的影响有显著差异 ($P < 0.05$), 在接种量为 1% 和 2% 时, 对菌株 NJSZ-13 单位体积发酵液中的活菌数量没有显著影响, 但是在 2% 接种量时单位体积发酵液中的活菌数量达到最大值, 为 $3.81 \times 10^9 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$, 接种量超过 2% 时, 随着接种量的增加单位体积发酵液中的活菌数量逐渐降低, 所以选择 2% 为摇瓶发酵的最佳接种量。

2.4.4 发酵装液量的优化 由图 12 表明, 发酵装液量对菌株 NJSZ-13 活菌数量的影响差异显著 ($P < 0.05$), 在培养基为 20% 的装液量时, 单位体积发酵液中的活菌数量显著高于其他装液量的活菌数, 其有效含菌量最高值为 $4.13 \times 10^9 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$, 当装液量超过 30% 时, 随装液量的增加单位体积发酵液中的活菌数量显著降低。但是考虑到发酵设备的空间充分利用, 选择 30% 作为摇瓶发酵的最佳装液量。

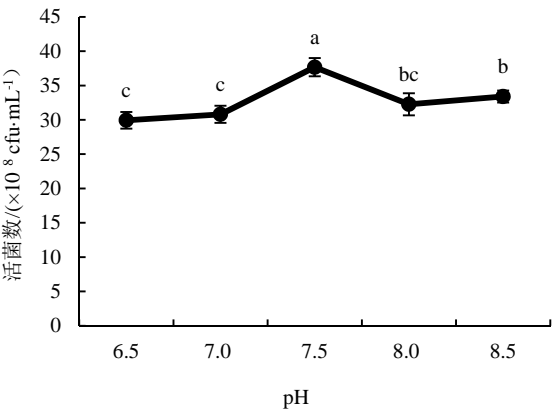


图 10 不同发酵初始 pH 对菌株 NJSZ-13 活菌数量的影响
Figure 10 Effect of different initial pH of fermentation on viable count of strain NJSZ-13 in fermentation broth

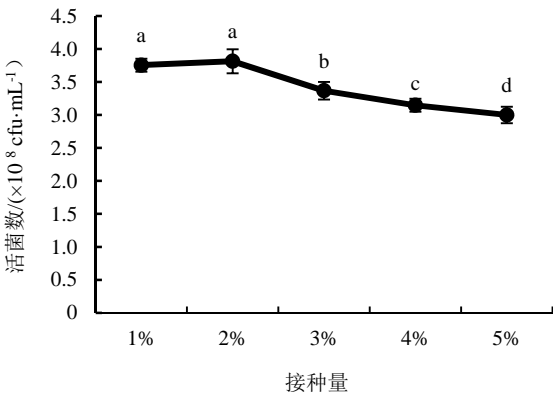


图 11 不同接种量对菌株 NJSZ-13 活菌数量的影响
Figure 11 Effect of different inoculum size on viable count of strain NJSZ-13 in fermentation broth

2.5 NJSZ-13 培养基优化前后的生长曲线与活菌数量对比

从图 13 可以看出, 在 0 ~ 4 h, 蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13 处于延缓期。在 4 h 以后开始进入指数期, 但是在指数期间, 使用优化前的培养基即 3 号培养基进行摇瓶培养的指数期为 4 ~ 24 h, 优化后的培养基培养指数期为 4 ~ 30 h, 相较优化前的条件指数期延长了 6 h, 使得菌体在这个阶段呈现了倍数增长, 在 30 h 以后才进入稳定期。使用优化后的培养基和培养条件进行摇瓶发酵, 24 h 后取样稀释涂布, 优化后单位体积发酵液中的活菌数量平均值为 4.10×10^9 cfu·mL $^{-1}$, 是原始发酵培养液的 4.1 倍(表 4)。

表 4 菌株 NJSZ-13 摇瓶发酵优化前后的活菌数量
Table 4 The viable count before and after optimization of culture

NJSZ-13 菌株	优化前	优化后
活菌数量/($\times 10^9$ cfu·mL $^{-1}$)	1.00 \pm 0.21	4.10 \pm 0.60

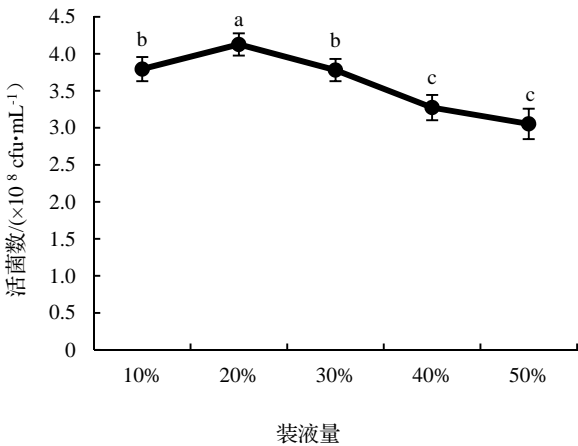


图 12 不同装液量对菌株 NJSZ-13 活菌数量的影响
Figure 12 Effect of different liquid volume on viable count of strain NJSZ-13 in fermentation broth

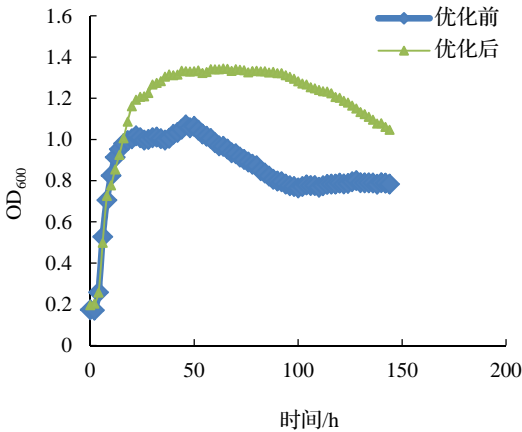


图 13 NJSZ-13 菌株的生长曲线
Figure 13 The growth curve of NJSZ-13 strain

3 结论与讨论

3.1 结论

本试验通过单因素试验筛选出了蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13 发酵培养基的最适 C 源为可溶性淀粉, 最适 N 源为

大豆蛋白胨, 最适无机盐为 CaCl_2 。应用正交试验确定了培养基的最佳配比: 可溶性淀粉 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 大豆蛋白胨 $14 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, CaCl_2 $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在此基础上, 单因素优化获得了最佳发酵条件: 发酵温度为 28°C , 发酵初始 pH 值为 7.5, 接种量为 2%, 装液量为 30%。使用优化后的培养基和培养条件进行摇瓶发酵, 延长了发酵过程的指数期, 使得菌体在这个阶段呈现了倍数增长, 单位体积发酵液中的活菌数量达到 $4.10 \times 10^9 \text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$, 是原始发酵培养液单位体积活菌数量的 4.1 倍。

3.2 讨论

对于在工业生产中具有开发潜力及利用价值的菌株, 通常要先对其发酵条件进行优化以达到菌体富集的目的。除了受到自身代谢调控的影响外, 芽孢杆菌的发酵液活菌数量还会受外界环境条件(主要是发酵培养基成分、浓度和发酵条件)的影响。在工业化发酵生产中, 温度是影响菌体生长繁殖的一个重要因素, 温度过低影响菌体的代谢从而影响它的生长, 温度升高可以增加菌体内酶的反应速率从而提高代谢, 但温度过高时又会抑制菌体生长甚至使菌体失活; 适度的酸碱环境及溶氧量是满足微生物生长、繁殖及产生次级代谢产物的基本要求; 较大的接种量可以使菌体快速进入生长指数期, 缩短发酵周期, 但是接种量过大容易造成营养消耗快, 菌体营养供应不上, 影响菌体的生长和芽孢的形成。因此对微生物进行富集培养通常对其发酵培养基成分和条件优化。

为了环境保护, 减少松材线虫病防治中对化学药品的依赖, 国内已有多名研究者从生物防治角度筛选获得对松材线虫有毒杀活性的芽孢杆菌菌株^[15-17]。在微生物发酵产品产业化中的首要环节就是发酵工艺的优化, 目前有很多实验技术和试验设计方法应用于发酵工艺的优化。已有研究表明, 张慧等^[18]对枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*) CS27 液体发酵条件进行优化后单位体积发酵液中的细胞生物量达到 $1.75 \times 10^9 \text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$, 广泽宇等^[19]对生防蜡样芽孢杆菌 BQ-4 发酵培养基优化后单位体积发酵液中的细胞生物量达到 $2.936 \times 10^9 \text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。本试验选用的蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13 已经证实了对松材线虫有杀线虫效果^[13]。为了将该菌株用于生产, 提高菌株的利用价值, 对该菌株进行了发酵参数优化。蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13 单位体积发酵液中的活菌数量除了受自身代谢的影响外, 外界环境条件(培养基成分, 发酵过程参数)也是重要因素。为了使蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13 尽快结束生长迟缓期进入对数期, 同时延长稳定期, 以提高单位体积发酵液中的菌体浓度, 对其培养基和发酵条件进行了优化。本试验先是通过单因素试验筛选培养基碳源、氮源和无机盐, 接着利用三因素三水平正交试验进行优化, 在保证准确性的前提下, 减少了试验次数, 缩短了周期。相比刘莹莹等^[20]对两株生防菌株芽孢杆菌 STW-2 和 STW-64 进行发酵条件优化和王勇等^[21]对解淀粉芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens* GZ-5 发酵条件中以 OD_{600} 为优化参数, 本文以单位体积发酵菌体的活菌数量为优化参数具有更直接更准确的效果。

参考文献:

- [1] 魏淑婷, 李涛, 林玉成. 基于 MaxEnt 模型预测四川省松材线虫的潜在适生区[J]. 四川动物, 2019, 38(01): 43-52.
- [2] 熊起明, 温小遂, 叶萌, 等. 庐山预防松材线虫病的形势与对策[J]. 江西林业科技, 2007(1): 36-37.
- [3] ZHU L H, YE J R, NEGI S, *et al.* Pathogenicity of aseptic *Bursaphelenchus xylophilus*[J]. PLoS ONE, 2012, 7(5): e38095.
- [4] 高芬, 马利平, 乔雄梧, 等. 蜡质芽孢杆菌 BC98-I 发酵液与抑菌粗提物对黄瓜枯萎病菌的抑菌特性研究[J]. 中国生态农业学报, 2006, 14(1): 189-192.
- [5] 俞晓平, 陈列忠, 申屠旭萍. 植物内生菌及其代谢物在生物农药创制中的应用[J]. 浙江农业学报, 2006, 18(5): 289-293.
- [6] GARDENER M S. Biocontrol of Plant Pathogens and Plant Growth Promotion by *Bacillus*[M]// Recent Developments in Management of Plant Diseases. Springer Netherlands, 2010: 71-79.
- [7] 李亮亮, 谈家金, 陈凤毛. GFP 标记短小芽孢杆菌 LYMC-3 在马尾松体内的定殖[J]. 华中农业大学学报, 2016, 35(6): 68-73.
- [8] LEELASUPHAKUL W, HEMMANEE P, CHUENCHITT S. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit[J]. Postharv Biol Technol, 2008, 48(1): 113-121.
- [9] SWAIN M R, RAY R C. Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus subtilis* isolated from cowdung microflora[J]. Microbiol Res, 2009, 164(2): 121.
- [10] 黄秋斌, 张颖, 刘凤英, 等. 蜡样芽孢杆菌 B3-7 在大田小麦根部的定殖动态及其对小麦纹枯病的防治效果[J]. 生态学报, 2014, 34(10):

