

# 地衣芽孢杆菌 YB15 发酵培养优化的研究

朱天辉, 李姝江, 向潇潇, 譙天敏

(四川农业大学林学院, 四川雅安 625014)

**摘要:** 采用单因素试验和正交试验对地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) YB15 发酵培养基的碳源、氮源、无机盐进行研究, 得出该菌的最适培养基组分为葡萄糖 5 g, 酵母浸膏 7.5 g, 蛋白胨 7.5 g, 硫酸铵 5.0 g。在此基础上运用正交试验对地衣芽孢杆菌 YB15 发酵的最适条件进行研究, 得到的最适培养条件为温度 25 ℃, pH 6.5, 瓶装量 100 mL, 接种量 4 mL; 地衣芽孢杆菌生长曲线的结果表明 12 h ~ 18 h 时为菌体收集的最佳时间。

**关键词:** 地衣芽孢杆菌; 发酵培养基; 组分优化; 生长曲线

中图分类号: S718.8

文献标识码: A

文章编号: 1003-5508(2013)01-0001-04

## A Study of Optimal Fermentation Culture of *Bacillus licheniformis* YB15

ZHU Tian-hui LI Shu-jiang XIANG Xiao-xiao QIAO Tian-min

(College of Forestry, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

**Abstract:** In this paper, by adopting the single-factor and orthogonal experiments the researches were conducted on the fermentation medium of *Bacillus licheniformis* YB15, and the results showed that its optimum components were glucose 5.0 g, yeast extract 7.5 g, peptone 7.5 g and ammonium sulphate 5.0 g. On this basis, its optimum fermentation conditions were also studied, which were temperature at 25 ℃, pH 6.5, culture broth quantity 100 mL • 300 mL<sup>-1</sup> flask and inoculation quantity of 4 mL. The result of the growth curve of *Bacillus licheniformis* showed that 12 ~ 18 hours were the best time to collect it.

**Key words:** *Bacillus licheniformis*, Fermentation medium, Optimal cultivated condition, Growth curve

地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)属于芽孢杆菌属(*Bacillus*),是一种革兰氏阳性细菌<sup>[1]</sup>,在自然界分布非常广泛,是土壤和植物微生态优势种群<sup>[2]</sup>。它对多种植物病原菌有很强的抑制作用,如对镰刀菌、核盘菌、稻瘟病菌和水稻纹枯病菌等具有较强的抑菌活性,表现出很好的生防潜力<sup>[3~8]</sup>。在对番茄灰霉病的田间防效试验中,地衣芽孢杆菌与化学药剂腐霉利效果相当,可达 60% 以上<sup>[9]</sup>;并且还具有在番茄植株体表定殖竞争能力<sup>[10]</sup>和诱导植株产生系统抗性的能力<sup>[11]</sup>;可以产生多种抗生物质,其抗菌蛋白对苹果轮纹病菌、炭疽病菌的抑制作用使其对轮纹病具有防治作用<sup>[12]</sup>。

地衣芽孢杆菌 YB15 是从健康的撑 × 绿杂交竹

上分离获得的一株对撑 × 绿杂交竹梢枯病病原菌(暗孢节菱孢菌)有很好的抑制作用的优势拮抗菌株。本试验旨在对地衣芽孢杆菌 YB15 的发酵培养基及其培养条件进行优化,为撑 × 绿杂交竹梢枯病生物防治奠定基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 供试菌种

拮抗菌: 地衣芽孢杆菌 YB15(*Bacillus licheniformis*)

病原菌: 暗孢节菱孢菌(*Arthrinium phaeosper-*

收稿日期: 2012-08-15

基金项目: 国家自然科学基金资源共享平台(2005DKA21207-43)

作者简介: 朱天辉(1963-),男,博士,教授,主要从事林木病害方面的研究, E-mail: zhutianhui@yahoo.cn。

mum) (森林保护实验室)

### 1.1.2 培养基

PDA培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 15 g ~ 20 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 ml, 0.1 MPa 灭菌 30 min。

牛肉膏蛋白胨培养基(基础培养基): 牛肉膏 3.0 g, 蛋白胨 10.0 g, 氯化钠 5.0 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 ml, pH 值 7.0, 0.1 MPa 灭菌 30 min。

## 1.2 方法

### 1.2.1 病原菌与拮抗菌的处理

将实验室保存的暗孢节菱孢菌接种到新鲜的 PDA 培养基上, 25 °C 培养, 直到病原菌长满, 取出, 用 5 mm 直径打孔器打孔得菌饼, 待用。

取培养 48 h 的地衣芽孢杆菌 YB15 斜面, 用 10 ml 无菌水将其洗下, 作为发酵种子液, 取其 3 ml 接入 100 ml 的牛肉膏蛋白胨基础培养基中, 25 °C, 140 r · min<sup>-1</sup> 旋转培养 72 h, 待用。

### 1.2.2 抑菌活性的测定

地衣芽孢杆菌 YB15 发酵无菌滤液的制备: 取 25 °C, 140 r · min<sup>-1</sup> 旋转培养 72 h 后的发酵液, 于 4 °C 下 6 000 rpm 离心 10 min, 取其上清液, 过 0.22 μl 的细菌过滤器, 得到无菌滤液。

抑菌活性测定采用孔洞法, 将暗孢节菱孢菌饼接种到 PDA 平板中央, 在距菌饼 1 cm 相互垂直的 4 个方向, 用 5 mm 打孔器打孔, 其中 3 个孔中加入 80 μl 地衣芽孢杆菌 YB15 发酵无菌滤液, 另外一个孔加入等量无菌水做对照, 然后进行恒温培养 4 d 后测定抑菌圈直径。

### 1.2.3 发酵培养基组分的单因素试验

碳源: 分别选择葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉、麦芽糖、乳糖、糊精等, 等量代替基础培养基中的碳源, 25 °C, 140 r · min<sup>-1</sup> 旋转培养 48 h, 测定不同碳源对地衣芽孢杆菌 YB15 抑菌活性的影响。

氮源: 分别以酵母浸膏、蛋白胨、牛肉膏、氯化铵、硫酸铵、牛肉膏 + 蛋白胨、酵母浸膏 + 蛋白胨、酵母浸膏 + 蛋白胨 + 氯化铵、酵母浸膏 + 蛋白胨 + 硫酸铵等, 等量代替基础培养基中的氮源, 25 °C, 140 r · min<sup>-1</sup> 旋转培养 48 h, 测定不同氮源对地衣芽孢杆菌 YB15 抑菌活性的影响。

无机盐: 分别以磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、硫酸镁、碳酸钙、硝酸钾等, 等量代替基础培养基中的氯化钠, 25 °C, 140 r · min<sup>-1</sup> 旋转培养 48 h, 测定不同无机盐对地衣芽孢杆菌 YB15 抑菌活性的影响。

### 1.2.4 发酵培养基组分优化

结合单因素试验结果, 设计正交试验进行培养

基组分的优化, 每种培养基 3 次重复, 测定不同培养基组分配比对地衣芽孢杆菌 YB15 抑菌活性的影响, 正交试验因素编码表设计如下(见表 1)。

表 1 地衣芽孢杆菌 YB15 发酵培养基组分正交试验因素编码表

	葡萄糖	酵母浸膏	蛋白胨	硫酸铵
水平 1	5.0	2.5	2.5	1.0
水平 2	10.0	5.0	5.0	3.0
水平 3	15.0	7.5	7.5	5.0

### 1.2.5 发酵培养基条件优化

结合发酵培养基组分正交试验的最优结果, 设计正交试验进行培养基条件的优化, 每种培养基 3 次重复, 测定不同发酵条件对地衣芽孢杆菌 YB15 抑菌活性的影响, 正交试验因素编码表设计如下(见表 2)。

表 2 地衣芽孢杆菌 YB15 发酵培养基条件正交试验因素编码表

	温度(°C)	pH	瓶装量(mL)	接种量(mL)
水平 1	20	6.0	50	1
水平 2	25	6.5	75	2
水平 3	30	7.0	100	3
水平 4	35	7.5	125	4
水平 5	40	8.0	150	5

### 1.2.6 生长曲线的测定

以培养基优化后的最优方案处理以下各培养基, 将 4 ml 发酵种子液转入 100 ml 最优培养基中(共 21 瓶)于 25 °C, 140 r · min<sup>-1</sup> 摇床培养。每 6 h 取出一瓶, 以分光光度法在波长 650 nm 处测出各发酵液 OD 值, 以培养 0 h 的发酵液 OD 值为对照, 测定时间为 0 ~ 102 h。最后以发酵时间(h)为横轴, 以各无菌发酵液的 OD 值为纵轴绘出生长曲线。

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵培养基组分的单因素试验

从图 1 可以看出, 当使用麦芽糖和葡萄糖作为碳源, 等量代替基础培养基中的碳源进行培养时, 地衣芽孢杆菌 YB15 的抑菌圈直径都较大, 抑菌活性都较强, 但效果相差不大, 而葡萄糖则更加经济易得。所以, 地衣芽孢杆菌 YB15 发酵培养基的最适碳源是葡萄糖。

从图 2 可以看出, 当使用酵母浸膏 + 蛋白胨 + 硫酸铵等作为氮源, 等量代替基础培养基中的氮源

进行培养时,地衣芽孢杆菌 YB15 的抑菌圈直径最大,抑菌活性最强。所以,地衣芽孢杆菌 YB15 发酵培养基的最适氮源是酵母浸膏 + 蛋白胨 + 硫酸铵。

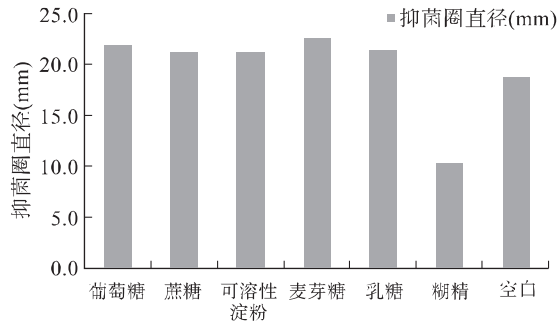


图1 不同碳源对地衣芽孢杆菌 YB15 抑菌活性的影响

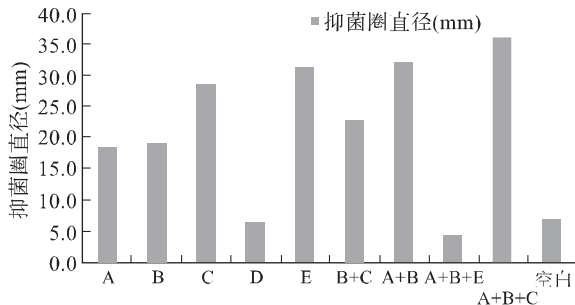


图2 不同氮源对地衣芽孢杆菌 YB15 抑菌活性的影响

注: A 为酵母浸膏, B 为蛋白胨, C 为牛肉膏, D 为氯化铵, E 为硫酸铵

从图 3 可以看出,当使用原基础培养基中的无机盐进行培养时,地衣芽孢杆菌 YB15 的抑菌圈直径最大,抑菌活性最强。所以,地衣芽孢杆菌 YB15 发酵培养基的最适无机盐仍为氯化钠。

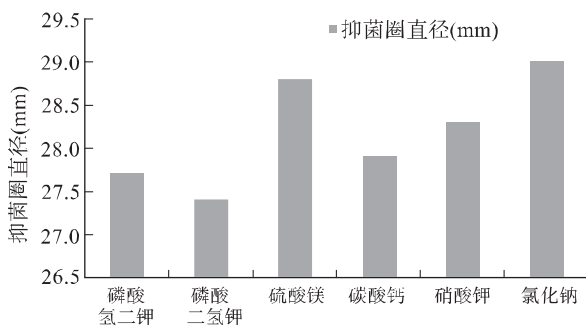


图3 不同无机盐对地衣芽孢杆菌 YB15 抑菌活性的影响

## 2.2 发酵培养基组分优化

正交试验培养基组分优化的方差分析显示(见表 3),以上各不同处理导致地衣芽孢杆菌 YB15 的抑菌圈直径差异极显著。SSR 法对各处理进行多重比较,结果表明(见表 4),9 种不同处理中以 3 号处理的抑菌圈直径最大,且显著大于其他处理,因此发酵培养基的最适配比为葡萄糖 5.0 g,酵母浸膏 7.5

g,蛋白胨 7.5 g,硫酸铵 5.0 g。

表3 地衣芽孢杆菌 YB15 发酵培养基组分正交试验方差分析

误差来源	SS	df	MS	F
组间	1882.502	8	235.313	28.293 **
组内	149.704	18	8.317	
总数	2032.2	26		

表4 地衣芽孢杆菌 YB15 发酵培养基组分多重比较

处理	平均数 ± 标准差(字母标记)
3	34.3 ± 5.2( Aa)
8	29.2 ± 3.1( Ab)
4	17.6 ± 1.3( Bc)
7	15.7 ± 3.3( BCc)
2	15.4 ± 1.2( BCc)
5	13.7 ± 0.4( BCdD)
9	13.4 ± 3.5( BCdD)
6	9.9 ± 2.3( CDde)
1	7.0 ± 2.5( De)

注:小写英文字母表示 5% 水平上的差异水平,大写英文字母表示 1% 水平上的差异水平

## 2.3 发酵培养基条件优化

正交试验的发酵培养条件优化方差分析(表 5)表明,以上各不同发酵条件导致地衣芽孢杆菌 YB15 的抑菌圈直径差异极显著。

各发酵条件因素进行单因素方差分析结果(表 6)显示,不同温度导致的地衣芽孢杆菌 YB15 抑菌圈直径差异极显著,而不同 pH、瓶装量和接种量之间差异不显著。

表5 地衣芽孢杆菌 YB15 发酵培养基条件正交试验方差分析

误差来源	SS	df	MS	F
组间	1230.613	24	51.276	7.797 **
组内	328.833	50	6.577	
总数	1559.447	74		

表6 发酵条件单因素方差分析

误差来源	SS	df	MS	F	
温度	组间	788.147	4	197.037	17.882 **
	组内	771.300	70	11.019	
pH 值	组间	133.213	4	33.303	1.635
	组内	1426.233	70	20.375	
瓶装量	组间	43.080	4	10.770	0.497
	组内	1516.367	70	21.662	
接种量	组间	86.947	4	21.737	1.033
	组内	1472.500	70	21.036	
总数	1559.447	74			

SSR 法对温度各不同处理进行多重比较(见表 7),显示 2 号处理的抑菌圈直径最大,因此地衣芽孢杆菌 YB15 的发酵培养的最适条件为 2 号处理,即 25 °C, pH 值为 6.5, 瓶装量为 100 ml, 接种量为 4 ml。

表7 不同温度处理的多重比较

处理	平均数 ± 标准差(字母标记)
2	21.7 ± 3.3( Aa)
1	16.4 ± 2.5( Bb)
3	14.8 ± 3.2( BbCc)
5	13.8 ± 3.5( BCc)
4	12.3 ± 3.9( Cc)

注:小写英文字母表示5%水平上的差异水平,大写英文字母表示1%水平上的差异水平

## 2.4 生长曲线的测定

由图4可知,在以上实验得出的发酵培养基最适组分和培养最适条件下,发酵种子液接入最优培

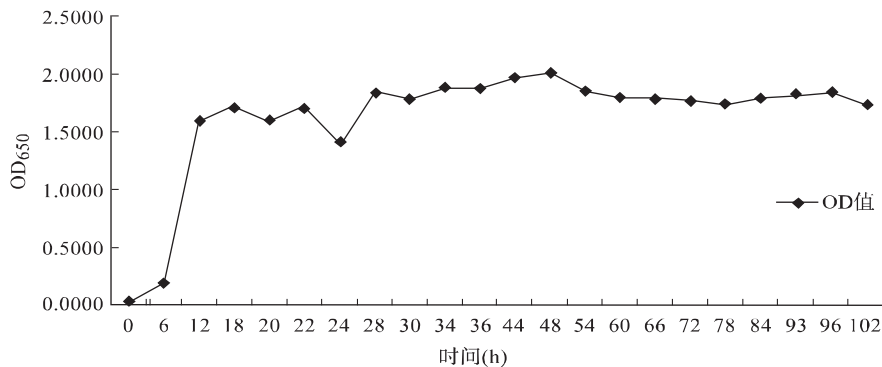


图4 地衣芽孢杆菌 YB15 生长曲线

## 3 结论与讨论

本试验采用单因素实验法确定了地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) YB15 发酵培养基的碳源、氮源、无机盐的最适组分,并通过正交试验得出发酵培养基组分的最适配比为葡萄糖 5.0 g,酵母浸膏 7.5 g,蛋白胨 7.5 g,硫酸铵 5.0 g。另外,最适培养条件为 25 °C, pH 值为 6.5, 瓶装量为 100 ml, 接种量为 4 ml。在此优化条件下,地衣芽孢杆菌 YB15 的生长对数期为 6 h ~ 18 h, 收集菌体的最佳时间为 12 h ~ 18 h。发酵周期为 18 h ~ 20 h, 与丰贵鹏和杨丽云<sup>[13]</sup>的实验结果,发酵周期为 22 h ~ 24 h 相比,缩短了 4 h, 比经验周期缩短了 14 h; 与刘莹等<sup>[14]</sup>的实验结果中从 21 h 开始进入衰亡期相比,大大延长了地衣芽孢杆菌的稳定期; 谷春涛<sup>[15]</sup>研究发现地衣芽孢杆菌 TS-01 的最适生长温度为 40 °C, 且微量 MnSO<sub>4</sub> 可促进其产孢量的增减。众多关于地衣芽孢杆菌发酵条件研究结果有所差异,可能是由于不同生理小种的特性不同,或者是环境条件各异,具体原因有待进一步的探讨。

### 参考文献:

[1] 王贺祥. 农业微生物学 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2003: 14 ~ 15.

培养基 0 ~ 6 h 为菌体生长延迟期, 镜检可见菌体小、数量极少; 从 6 h 以后进入对数生长期, 镜检结果菌体数量急剧增多, 菌体形态增大增长, 并开始形成芽孢; 在 18 h 以后, 地衣芽孢杆菌处于生长的稳定期, 菌体生长缓慢, 镜检可知菌体全部形成芽孢, 孢囊略为膨大。地衣芽孢杆菌 YB15 的发酵周期为 18 h ~ 20 h。所以应在 12 h ~ 18 h 时收集菌体, 因为这时地衣芽孢杆菌 YB15 处于对数生长末期, 此时收集菌体既可保持较高的细胞活性, 又可得到尽可能多的细胞数。

- [2] 赵国纬, 陆彬, 周义彬, 等. 地衣芽孢杆菌 L3 发酵培养基的响应面法优化 [J]. 湖北农业科学, 2009, 48(8): 1852 ~ 1855.
- [3] 郭贵海, 王崇文. 肠道菌群调节剂的研究进展 [J]. 临床内科杂志, 2002, 19(2): 88 ~ 90.
- [4] 王旭明, 陈宗泽, 袁毅. 益生菌作用机理的研究进展 [J]. 吉林农业科学, 2002, 27(1): 50 ~ 53.
- [5] 唐丽娟, 纪兆林, 徐敬友, 等. 地衣芽孢杆菌 W10 对灰葡萄孢的抑制作用及其抗菌物质 [J]. 中国生物防治, 2005, 21(3): 203 ~ 205.
- [6] 彭化贤, 刘波微, 陈小娟, 等. 水稻稻瘟病拮抗细菌的筛选与防治初探 [J]. 中国生物防治, 2002, 18(1): 25 ~ 27.
- [7] Ahmed SA, Ezziyani M, Sanchez PC et al. Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus* spp. and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annuum*) plants [J]. European Journal of Plant Pathology, 2003, 109: 633 ~ 637.
- [8] 周鸣, 刘云国, 李欣, 等. 地衣芽孢杆菌对 Cr<sup>6+</sup> 的吸附动力学研究 [J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(1): 84 ~ 87.
- [9] 童蕴慧, 徐敬友, 陈夕军. 番茄灰霉病菌拮抗细菌的筛选和应用 [J]. 江苏农业研究, 2001, 22(4): 275 ~ 281.
- [10] 童蕴慧, 纪兆林, 徐敬友, 等. 灰葡萄孢拮抗细菌在番茄植株体表的定殖 [J]. 中国生物防治, 2003, 19(2): 807 ~ 811.
- [11] 童蕴慧, 郭桂萍, 徐敬友, 等. 拮抗细菌对番茄植株抗灰霉病的诱导 [J]. 中国生物防治, 2004, 20(3): 187 ~ 189.
- [12] 纪兆林, 凌箐, 张清霞, 等. 地衣芽孢杆菌对苹果轮纹病菌和炭疽病菌的抑制及其对贮藏期苹果轮纹病的防治作用 [J]. 果树学报, 2008, 25(2): 209 ~ 214.
- [13] 丰贵鹏, 杨丽云. 地衣芽孢杆菌发酵培养基的优化 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(15): 6862 ~ 6864.
- [14] 刘莹, 孙荣丹, 杨翔华, 等. 衣芽孢杆菌 LNPU-1 发酵条件研究及培养基优化 [J]. 食品科技, 2008, 33(8): 28 ~ 31.
- [15] 谷春涛. 地衣芽孢杆菌 TS-01 培养条件的研究 [D]. 硕士学位论文, 中国农业大学, 2004.