

# 一株苹果内生枯草芽孢杆菌 BS10 的发酵条件优化研究

刘露<sup>1</sup> 李丽<sup>1</sup> 闫洪雪<sup>1</sup> 张鹏鹏<sup>1</sup> 梁文辉<sup>2</sup> 赵宏涛<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 青岛明月海藻集团海藻活性物质国家重点实验室, 山东青岛 266400; <sup>2</sup> 青岛明月蓝海生物科技有限公司)

**摘要** 以苹果内生枯草芽孢杆菌 BS10 为试验菌株进行发酵培养基的优化, 通过单因素试验选出最佳的碳源和氮源, 通过正交试验筛选出最佳 C/N 比, 对 pH 值、发酵温度和接种量进行了研究。结果表明, 碳源选用麦芽糊精, 氮源选择豆饼粉, 初始 pH 值 7.5, 温度 33 ℃、接种量为 4% 为最佳发酵条件, 发酵活菌数为  $1.03 \times 10^{10}$  cfu/mL, 比原始配方提高了 1.94 倍。

**关键词** 苹果腐烂病; 枯草芽孢杆菌; 配方优化; 正交试验

**中图分类号** Q939.96 **文献标识码** A **文章编号** 1007-5739(2015)23-0131-02

## Study on Optimization of Apple Endobacteria *Bacillus subtilis* BS10 Fermentation Medium

LIU Lu<sup>1</sup> LI Li<sup>1</sup> YAN Hong-xue<sup>1</sup> ZHANG Peng-peng<sup>1</sup> LIANG Wen-hui<sup>2</sup> ZHAO Hong-tao<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> State Key Laboratory of Bioactive Seaweed Substances, Qingdao Brightmoon Seaweed Group, Qingdao Shandong 266400; <sup>2</sup> Qingdao Mingyue BlueOcean Bio-technology Co. Ltd.)

**Abstract** Apple endobacteria *Bacillus subtilis* BS10 was studied to optimize fermentation medium. The best carbon source and nitrogen source were selected through single factor experiment, while the best C/N ratio was selected through orthogonal test. And the pH value, fermentation temperature and inoculation quantity were also studied. The results showed that maltodextrin was the best carbon source and soybean cake powder was the best nitrogen source. pH value 7.5, fermentation temperature 33 ℃, inoculation quantity 4% was the best fermentation condition. *Bacillus subtilis* BS10 could reach  $1.03 \times 10^{10}$  cfu/mL, which was 1.94 times higher than the control.

**Key words** apple canker; *Bacillus subtilis*; optimization; orthogonal test

苹果树腐烂病是由 *Valsa ceratosperma* 引起<sup>[1]</sup>, 1903 年在日本首次发现, 1916 年在我国发现苹果腐烂病, 20 世纪 70 年代后期开始, 该病在我国的发病区域逐年扩大, 发病率显著上升, 发病程度不断加重, 造成了重大经济损失<sup>[2]</sup>。

现在防治苹果腐烂病最常用的方法是化学防治法, 甲基托布津、多菌灵、苯来特和福美坤等, 化学法防治腐烂病能起到一定作用, 但是化学药剂一般具有毒性且农药残留严重, 已经不能满足生产绿色水果的要求<sup>[3]</sup>。本试验所用的枯草芽孢杆菌 BS10 为苹果内生菌, 对苹果腐烂病有一定的防治作用。BS10 具有一般植物内生细菌特有的优势, 避开了温度、紫外线等不利因素的影响, 营养来源丰富, 利于其发挥生物防治潜能<sup>[4]</sup>。

为了能让菌株的生防能力得以更好的表现, 所以对菌株的各项培养条件进行优化, 特别是培养基浓度的变化, 在摇瓶上通过发酵配方的优化, 单因素试验及正交试验, 来提高枯草芽孢杆菌 BS10 的活菌数。

## 1 材料与方

### 1.1 菌种

枯草芽孢杆菌 BS10 由实验室保藏。

### 1.2 仪器

超净工作台(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司, SW-CJ-2F)、紫外可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司, V-1800)、摇床(江苏太仓市实验设备厂, THZ-D)和培养箱(韶关市泰宏医疗器械有限公司, LRH-150B)。

### 1.3 培养基

种子培养基(g/L): 酵母粉 5 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 葡萄糖 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 值 7.0。

原始发酵培养基(g/L): 葡萄糖 5 g/L, 玉米粉 20 g/L, 脱

脂豆粉 10 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 g/L,  $\text{CaCO}_3$  1 g/L,  $\text{MnSO}_4$  0.2 g/L,  $\text{MgSO}_4$  0.2 g/L, pH 值 7.0。

## 1.4 试验方法

**1.4.1 不同碳源对菌数的影响。**以菌株原配方(葡萄糖 5 g/L, 玉米粉 20 g/L, 脱脂豆粉 10 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 g/L,  $\text{CaCO}_3$  1 g/L,  $\text{MnSO}_4$  0.2 g/L,  $\text{MgSO}_4$  0.2 g/L)作为发酵基础培养基, 分别选择浓度为 20 g/L 的糖蜜液、蔗糖、玉米淀粉、可溶性淀粉、麦芽糊精代替发酵培养基中玉米粉, 其余成分同原始发酵培养基, 摇床 32 ℃, 48 h, 180 r/min, 振荡培养, 250 mL 摇瓶, 装液量 50 mL, 接种量 2%。利用涂平板计数法对发酵液中菌数进行测定, 比较不同碳源对发酵液中菌数的影响。

**1.4.2 不同氮源对菌数的影响。**以菌株原配方(葡萄糖 5 g/L, 玉米粉 20 g/L, 脱脂豆粉 10 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 g/L,  $\text{CaCO}_3$  1 g/L,  $\text{MnSO}_4$  0.2 g/L,  $\text{MgSO}_4$  0.2 g/L)作为发酵基础培养基, 分别选择浓度为 20 g/L 的蛋白胨、豆饼粉、牛肉粉、酵母粉、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  代替发酵培养基中脱脂豆粉, 其余成分同原始发酵培养基, 培养条件不变。利用涂平板计数法对发酵液中菌数进行测定, 比较不同氮源对发酵液中菌数的影响。

**1.4.3 不同 C/N 比对菌数的影响。**以选出的碳、氮源麦芽糊精和豆饼粉作为试验因素, 每个因素设 3 个水平。进一步优化发酵培养基中碳、氮源的浓度。培养基的其他成分为葡萄糖 5 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 g/L,  $\text{CaCO}_3$  1 g/L,  $\text{MnSO}_4$  0.2 g/L,  $\text{MgSO}_4$  0.2 g/L, 培养条件不变, 数据分析选用软件 SPSS17.0。

**1.4.4 初始 pH 值对菌数的影响。**分别选择初始 pH 值 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0, 其他发酵条件: 温度 32 ℃, 接种量为 2%, 装液量为 250 mL, 三角瓶装 50 mL 培养基, 发酵时间 48 h。

**1.4.5 发酵温度对菌数的影响。**发酵温度选择 27、29、31、32、33、35、37 ℃, 初始 pH 值 7.0, 接种量为 2%, 装液量为 250 mL 三角瓶装 50 mL 培养基, 发酵时间 48 h。

**1.4.6 接种量对菌数的影响。**接种量选择 2%、4%、6%、8%

**作者简介** 刘露(1987-), 女, 山东济南人, 研发工程师, 硕士, 从事微生物的应用研究工作。

**收稿日期** 2015-09-02

和10%,发酵温度为32℃,初始pH值7.0,装液量为250 mL三角瓶装50 mL培养基,发酵时间48 h。

**1.4.7 新配方在发酵罐上的稳定性考察。**将筛选到的最优配方及发酵条件在10 L发酵罐中(装液量为6 L),进行生产水平评估,发酵时间48 h,考察优化配方的稳定性。

**2 结果与分析**

**2.1 不同碳源对菌数的影响**

比较不同碳源对菌数的影响,结果见图1,发现以麦芽糊精为碳源时,菌数明显比其他碳源高,因此选择麦芽糊精为碳源。

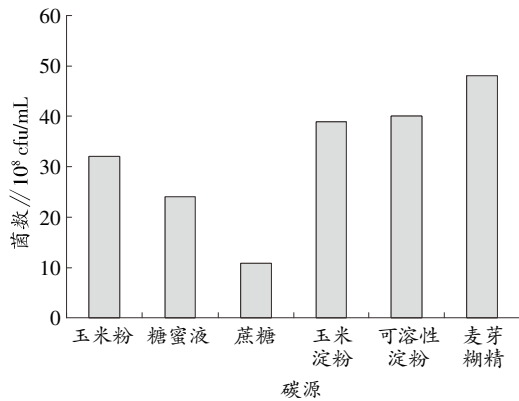


图1 不同碳源对菌数的影响

**2.2 不同氮源对菌数的影响**

比较不同氮源对菌数的影响,结果见图2,发现以豆饼粉为氮源时,菌数明显比其他氮源高,因此选择豆饼粉为氮源。

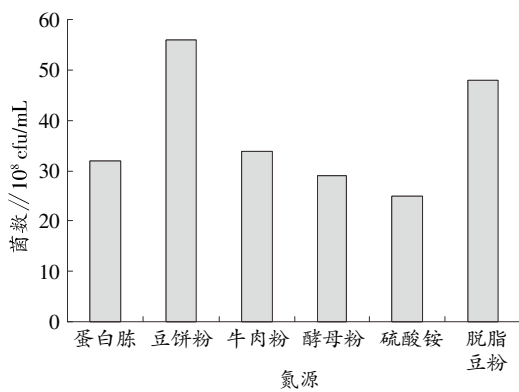


图2 不同氮源对菌数的影响

**2.3 不同 C/N 比对菌数的影响**

利用 SPSS17.0 设计正交试验,设计及结果如表1所示,对试验结果进行方差分析,结果如表2所示,得出豆饼粉对BS10菌数的影响显著,而麦芽糊精对菌数的影响并不显著。豆饼粉和麦芽糊精的最适浓度分别为10 g/L和20 g/L。

**2.4 初始 pH 值对菌数的影响**

比较不同 pH 值对菌数的影响,结果见图3,随着 pH 值的增高菌数呈现先增加后降低的趋势,pH 值为7.5时,菌数最高。

**2.5 发酵温度对菌数的影响**

比较不同发酵温度对菌数的影响,结果见图4,随着温度的提高菌数呈现先增加后降低的趋势,当温度为33℃时,菌数最高。

表1 不同 C/N 比对菌数影响的正交试验设计及试验结果

处理	豆饼粉 // g/L	麦芽糊精 // g/L	菌数 // 10 <sup>8</sup> cfu/mL
1	10	20	129
2	30	10	32
3	20	20	86
4	20	30	54
5	10	30	116
6	20	10	76
7	10	10	105
8	30	20	39
9	30	30	62

表2 不同 C/N 比对菌数影响的正交试验结果分析

因素	均方	F 值	P>F
豆饼粉	3 996	15.420	0.013
麦芽糊精	140	0.541	0.619

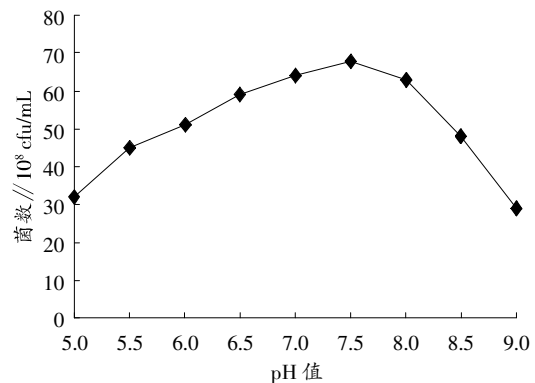


图3 不同 pH 值对菌数的影响

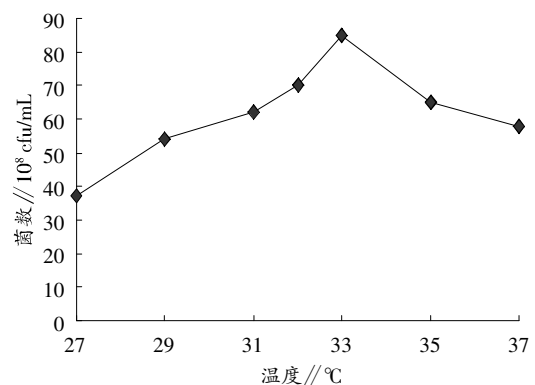


图4 不同温度对菌数的影响

**2.6 接种量对菌数的影响**

比较不同接种量对菌数的影响,结果见图5,发现在接种量为4%时,菌体生长状况最好。

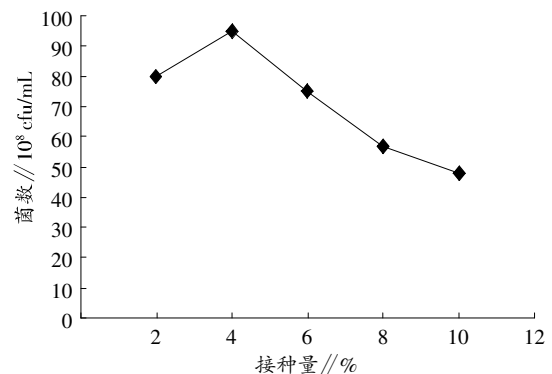


图5 不同接种量对菌数的影响

(下转第139页)

## 6 结语

通过本模型,利用气象部门 1~15 d 短期气象数据,可以建立基于 GIS 的短期马尾松毛虫发生量精细化预报系统<sup>[1-8]</sup>。

## 7 参考文献

- [1] 张国庆.基于神经网络的马尾松毛虫精细化预报 Matlab 建模试验[EB/OL].科学网.(2015-10-29)[2015-10-30].<http://blog.sciencenet.cn/home.php?mod=attachment&id=75626>,<http://blog.sciencenet.cn/home.php?mod=space&uid=3344&do=blog&id=931869>.
- [2] 张国庆.复杂系统生态论方法及其应用[J].现代农业科技,2013(11):190-193.
- [3] 张国庆.基于高分辨率遥感数据与 TSE 方法的生态系统精细化管理技术研究[J].现代农业科技,2015(16):154-157.
- [4] 张楨.潜山县松毛虫病调查分析及精细化预防对策[J].现代农业科技,2015(15):148-150.
- [5] 贺刚,操丙周,张国庆.马尾松毛虫精细化预报多层感知器建模试验研究[J].现代农业科技,2015(16):174.
- [6] 熊端元,朱汪兴,张国庆.马尾松毛虫精细化预报径向基函数建模试验研究[J].现代农业科技,2015(16):163.
- [7] 张国庆.基于 TSE 分析理论的林业生物灾害精细化预报技术研究[J].现代农业科技,2014(20):155-157.
- [8] 张国庆.森林健康与林业有害生物管理[J].四川林业科技,2008,29(上接第 132 页)

### 2.7 新配方在发酵罐上的稳定性考察

将原始配方和新配方在 10 L 发酵罐上发酵,比较活菌数。原始配方发酵 48 h 后,芽孢率 90%以上,菌数为  $3.5 \times 10^9$  cfu/mL,新配方发酵 48 h 后,芽孢率 95%以上,菌数为  $1.03 \times 10^{10}$  cfu/mL,提高了 1.94 倍。

## 3 结论与讨论

本研究通过对苹果内生枯草芽孢杆菌 BS10 的发酵配方进行优化,通过改进发酵配方及工艺条件,选用麦芽糊精为碳源,豆饼粉为氮源,初始 pH 值为 7.5,发酵温度 33 ℃,接种量为 4%,发酵菌数从原始配方  $3.5 \times 10^9$  cfu/mL 提高到了  $1.03 \times 10^{10}$  cfu/mL,提高了 1.94 倍。

本研究通过调节发酵配方的碳源、氮源和 C/N 比及对 pH 值、温度和装液量等发酵条件进行调节,使发酵活菌数(上接第 133 页)

表 4 各处理对花叶病的防治效果

处理	病情指数				平均	防治效果 %
	I	II	III	IV		
A	1.68	1.35	1.08	1.04	1.29	88.73
B	5.15	4.06	3.99	4.39	4.40	61.57
CK	12.17	11.28	10.36	11.98	11.45	-

寡糖素水剂 2 种生物农药对烟草病毒病均具有一定的防治效果,尤以 6%寡糖链蛋白可湿性粉剂防治效果最好,且烟草使用安全。施药时期是关键,要从移栽后 7 d 左右便开始用药,早用药,早预防。此次试验表明,6%寡糖链蛋白可湿性粉剂作为烟草病毒病的防治药剂具有比较明显的效果,今后可开展更大面积、不同区域的示范研究;防治效果的稳定(上接第 136 页)

和科学研究提供依据,但对杂草群落在季节间、年际间和胡麻各生育时期间的演替规律等尚未涉及,今后还应深入研究,力求为农业生产和科学研究提供更为全面的基础资料。

## 4 参考文献

- [1] 韩相鹏,魏周全,陈爱昌,等.定西市胡麻田杂草种类及群落调查[J].甘肃农业科技,2014(6):34-37.
- [2] 陈卫民,宋红梅,梁巧玲.新疆尼勒克县胡麻田杂草调查[J].杂草科

(6):77-80.

- [9] 张国庆.基于生态论的生物灾害精细化预报理论研究[J].现代农业科技,2014(20):148-152.
- [10] 张国庆.基于系统关键因子分析理论的林业有害生物防治关键期分析技术研究[J].现代农业科技,2014(19):200-202.
- [11] 张国庆.基于系统健康管理理论的林业生物灾害精细化预报管理研究[J].现代农业科技,2014(19):198-199.
- [12] 汪全兵,陈南松,张国庆.马尾松毛虫精细化预报回归建模试验研究[J].现代农业科技,2015(18):173.
- [13] 储江山,徐胜利,张国庆.生物灾害精细化预报算法试验研究:以潜山县马尾松毛虫为例[J].现代农业科技,2015(18):172.
- [14] 朱纯祥,张汪炎,胡德松,等.林业生物灾害精细化预报理论基础与技术集成:以潜山县马尾松毛虫为例[J].现代农业科技,2015(17):202-204.
- [15] 侯杰.玉米秸秆力学特性与理化指标及其关联性[D].哈尔滨:东北农业大学,2013.
- [16] 李斌.基于区域差别的燃煤电厂动态脱硝电价研究[D].北京:华北电力大学,2013.
- [17] 庞斌.基于 AVR 单片机的路基温度采集系统研究与设计[D].西安:长安大学,2013.
- [18] 葛彬彬.光伏发电量预测的实现及独立系统的优化设计[D].上海:上海交通大学,2013.

明显高于其他枯草芽孢杆菌<sup>[5-9]</sup>,为发酵生产奠定了基础,对于在发酵生产中的工艺的调节,有待进一步研究。

## 4 参考文献

- [1] SUZAKI K, YOSHIDA K, ITO T. Pathogenicity to apple branch and phloridzin degrading activity of *Valsa ceratosperma* isolated from some broad leaf trees including apple tree[J]. Annual report society plant protection northern Japan, 1997, 48:145-147.
  - [2] 高九思,代彦满,王安超,等.生物药剂剂型对苹果树腐烂病的防控效果[J].山西果树,2004,12(4):45-46.
  - [3] 马保松,王启亮,郑丽霞,等.防治梨树腐烂病的药效对比试验[J].河南农业科学,2004(3):43-45.
  - [4] CHO S J, PARK S R, KIM M K, et al. *Endophytic Bacillus* sp. Isolated from the interior of balloon flower root[J]. Biosc Biotechnol Biochem, 2002, 66(6):1270-1275.
  - [5] 柳慧丽,李园园,鞠瑞成,等.拮抗枯草芽孢杆菌 KC-5 的分离鉴定及其发酵优化[J].中国生物工程杂志,2014,34(3):96-102.
  - [6] 钟蔚,陆兆新,吕凤霞,等.枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* BS1 发酵培养基的优化[J].饲料工业,2013,34(12):43-45.
- 性,还需要做年际对比试验。6%寡糖链蛋白可湿性粉剂在水稻等其他农作物上的研究已经比较成熟,但在烟草上的应用还属于起步阶段,有待进一步的研究。

## 4 参考文献

- [1] 雷吕英.防治烟草花叶病的药剂试验[J].中国烟草科学,2002(1):28-29.
- [2] 白金铠.烟草病害防治图册[M].沈阳:辽宁科学技术出版社,1993.
- [3] 商文静,赵小明,杜昱光,等.壳寡糖诱导植物抗病毒病研究初报[J].西北农林科技大学学报,2005,33(5):73-75.
- [4] 赵小明,杜昱光,白雪芳.氨基寡糖素诱导作物抗病毒药效试验[J].中国农学通报,2004,20(4):245-247.
- [5] 郑庆伟.国内首个抗病毒蛋白质农药“阿泰灵”在水稻上示范成功[J].农药市场信息,2014(30):42.
- [6] 匡传富,李小一,李宏光,等.不同药剂防治烟草病毒病药效试验[J].现代农业科技,2013(23):147.
- [7] 张建成,张汇娟,赵春芝,等.灌溉条件下有机小麦田间杂草发生来源调查研究[J].内蒙古农业科技,2014(6):48-49.
- [8] 段春芳,沈绍斌,宋记明,等.云南省农科院热带亚热带经济作物研究所胡椒园杂草种类调查研究[J].热带作物学报,2014,35(11):2134-2138.
- [9] 张玉玉,田净净,刘志英,等.青岛苜蓿田杂草种类调查研究[J].山东农业科学,2013,45(7):102-105.