

# 枯草芽孢杆菌 B47 菌株高产抗菌物质的培养基及发酵条件优化

叶云峰<sup>1,2</sup> 黎起秦<sup>1\*</sup> 袁高庆<sup>1</sup> 付岗<sup>3</sup> 缪剑华<sup>2</sup> 林纬<sup>1</sup>

(1. 广西大学农学院 广西 南宁 530005)

(2. 广西壮族自治区药用植物园 广西 南宁 530023)

(3. 广西农业科学院微生物研究所 广西 南宁 530007)

**摘要:** 枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* B47 菌株为番茄内生细菌,也是玉米小斑病拮抗菌,能产生对玉米小斑病菌有强烈抑制作用的抗菌物质。以 B47 菌株发酵液的无菌滤液对玉米小斑病菌的抗菌活性为检测指标,测定 B47 菌株产抗菌物质培养所需的最佳碳、氮源和无机盐,并通过正交试验法对该菌株产抗菌物质的培养基配方和摇瓶发酵条件进行优化。研究结果表明,B47 菌株产抗菌物质最佳碳、氮源和无机盐分别为蔗糖、酵母浸膏和  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,最优培养基是 YSB (Yeast extract-sucrose-beef extract)培养基,其配方为:蔗糖 2%,酵母浸膏 2%,牛肉浸膏 1.5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.06%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.000 9%,最优发酵条件组合为:30 °C, pH 7.0, 170 r/min 摇床培养 6 d,接种量为 1%,装液量为 40 mL/200 mL。

**关键词:** 枯草芽孢杆菌, 抗菌物质, 正交试验, 发酵条件优化

## Optimization of culture medium and fermentation conditions for high production of antimicrobial substance by *Bacillus subtilis* strain B47

YE Yun-Feng<sup>1,2</sup> LI Qi-Qin<sup>1\*</sup> YUAN Gao-Qing<sup>1</sup> FU Gang<sup>3</sup> MIAO Jian-Hua<sup>2</sup>  
LIN Wei<sup>1</sup>

(1. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530005, China)

(2. Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plant, Nanning, Guangxi 530023, China)

(3. Microbiology Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, Guangxi 530007, China)

**Abstract:** *Bacillus subtilis* strain B47 is an endophytic bacterium of tomato and can produce substance to inhibit the growth of *Bipolaris maydis* which can cause southern corn leaf blight. The optimal nitro-

gen source, carbon source and salt for the production of antimicrobial substance by strain B47 were tested. The medium composition and fermentation conditions were optimized by orthogonal experiments. The results showed that the optimal nitrogen source, carbon source and salt were yeast extract, sucrose and  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , respectively. The best medium was YSB (Yeast extract-sucrose-beef extract). The composition of the medium was 2% (W/V) sucrose, 2% (W/V) yeast extract, 1.5% (W/V) beef extract, 0.06% (W/V)  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  and 0.000 9% (W/V)  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . The optimal fermentation conditions were the combination of temperature 30 °C, initial pH 7.0, incubation time 6 d, 1% inoculum volume percentage and medium volume 40 mL/200 mL.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*, Antimicrobial substance, Orthogonal experiment, Optimization of fermentation condition

由玉米小斑离蠕孢菌 *Bipolaris maydis* 引起的玉米小斑病曾于 1968 年在我国和 1970 年在美国大流行, 造成严重的经济损失<sup>[1-2]</sup>。该病的防治主要以种植抗病品种和施用化学药剂为主。然而, 玉米小斑病菌包括 3 个病原小种<sup>[3]</sup>, 抗病品种往往只能抗一个病原小种, 不能抗所有病原小种。而化学药剂的过量使用则易导致环境污染和引起病原菌的抗药性。因此, 有必要寻找对生态安全的有效防治方法, 利用有益微生物防治玉米小斑病逐渐引起人们的关注。王霞<sup>[4]</sup>等发现青霉 *Penicillium* sp. TS67 菌株的发酵液对玉米小斑病在盆栽条件下有一定的防治效果。鹿秀云<sup>[5]</sup>等的田间小区试验结果表明, 枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* ST-87-14 菌株对玉米小斑病的防效为 48.16%, 并证明该菌株的胞外代谢产物具有防病作用。此外, 玉米的根围细菌蜡状芽孢杆菌 *Bacillus cereus* C1L 菌株也被发现对玉米植株具有诱导系统抗病性的作用, 在温室和田间对玉米小斑病都有一定控制效果<sup>[6]</sup>。

枯草芽孢杆菌 B47 菌株分离自番茄植株体内, 已证明其对番茄青枯病有较好的控制效果<sup>[7-8]</sup>。同时, 前期研究中还发现该菌株对玉米小斑病有较好的控制作用, 在小区试验中, 先喷施 B47 菌液再接种病原菌的处理能取得 74.53% 的防治效果。此外, 菌株 B47 还对香蕉叶缘枯斑病菌 *Alternaria musae*、香蕉灰纹病菌 *Cercospora musae*、香蕉煤纹病菌 *Helminthosporium torulosum*、甘蓝黑斑病菌 *Alternaria brassicae*、香蕉炭疽病菌 *Colletotrichum musae*、西瓜枯萎病菌 *Fusarium oxysporum*、柑桔蒂

腐病菌 *Diplodia natalensis*、柑桔炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 等多种植物病原菌具有较强的抑制作用(另文发表)。初步研究发现, 分泌抗菌物质为 B47 菌株防治玉米小斑病的主要机制之一, 为了进一步提高抗菌物质的产量, 本文对该菌株高产抗菌物质的培养基配方和摇瓶发酵条件进行优化, 旨在为今后活性物质的提取、纯化和应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株

枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* B47 菌株, 由广西大学植病研究室提供; 玉米小斑病菌(玉米小斑离蠕孢菌 *Bipolaris maydis*) Bm3 菌株, 由广西农业科学院微生物研究所生物防治研究室提供。

### 1.2 培养基

氮源利用基础培养基(g/L):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.36,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2.13,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.000 5,  $\text{CaCl}_2$  0.005, 葡萄糖 10<sup>[9]</sup>。

碳源利用基础培养基参照文献[9]的描述, 并略作修改, 配方为(g/L): 酵母浸膏 10,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.5,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1。

### 1.3 B47 菌株种子液的制备

将保存于 4 °C 的 B47 菌株接种到 NA<sup>[10]</sup>平板上, 30 °C 下培养 48 h, 再接种于 NB<sup>[10]</sup>培养液, 30 °C、170 r/min 振荡培养 48 h, 备用。

### 1.4 B47 菌株发酵液的无菌滤液制备

B47 菌株的液体培养物于 5 000 r/min 离心

15 min, 上清液用细菌滤器(0.45  $\mu\text{m}$ )过滤, 得到发酵液的无菌滤液, 用于抗菌活性测定。

### 1.5 B47 菌株发酵液的无菌滤液抗菌活性测定

采用琼脂扩散-抑菌圈法对抗菌物质的活性进行测定。将保存于 4  $^{\circ}\text{C}$  的玉米小斑离蠕孢菌 *Bipolaris maydis* Bm3 菌株移植到 PDA<sup>[10]</sup>斜面, 28  $^{\circ}\text{C}$  培养 7 d, 加入灭菌水后刮取孢子, 配制成浓度为  $10^6$  个/mL 的孢子悬浮液。吸取 1 mL 孢子悬浮液至培养皿(直径为 90 mm)中, 倒入 20 mL 冷却到 45  $^{\circ}\text{C}$  的 PDA 培养基, 摇匀, 制成含菌平板。在距平板中心 2 cm 处打孔, 孔径 5 mm, 每皿打 3 个孔, 孔中加入 30  $\mu\text{L}$  无菌滤液, 置 28  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养, 48 h 后测量拮抗圈直径。以孔中加入空白培养液为对照, 每处理重复 3 次。

### 1.6 氮源对 B47 菌株发酵液的无菌滤液抗菌活性的影响

以 1.0% 的量分别将牛肉浸膏、酵母浸膏、大豆蛋白胨、胰蛋白胨和大豆粉加到氮源利用基础培养基中, 以基础培养基为对照。接种 1 mL B47 菌株种子液至装液量为 50 mL 的 200 mL 培养瓶中, 于 30  $^{\circ}\text{C}$ 、170 r/min 振荡培养 5 d。按 1.5 方法测定各处理的无菌滤液对玉米小斑病菌的抗菌活性, 每处理重复 3 次(以下所有试验均重复 3 次)。

### 1.7 碳源对 B47 菌株发酵液的无菌滤液抗菌活性的影响

以 1.0% 的量分别将葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、可溶性淀粉、甘油和玉米粉加入碳源利用基础培养基中, 以基础培养基为对照。按 1.6 方法培养菌株, 按 1.5 方法测定无菌滤液抗菌活性。

### 1.8 无机盐对 B47 菌株发酵液的无菌滤液抗菌活性的影响

以只含最佳碳、氮源(含量均为 1.0%)的培养基为对照培养基, 根据微生物对大量元素与微量元素的利用情况不同, 按 0.5% 的量分别加入 NaCl 和  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 按 0.05% 的量分别加入  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  和  $\text{CaCl}_2$ , 按 0.000 5% 的量分别加入  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2$ 、 $\text{ZnSO}_4$ 、 $\text{CoCl}_2$  和  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 。按 1.6 方法培养菌株, 按 1.5 方法测定无菌滤液抗菌活性。

### 1.9 培养基配方正交优化

在上述单因子筛选的基础上以蔗糖、酵母浸膏、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、牛肉浸膏和  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  为考察因素, 按正交设计表  $L_{16}(4^5)$  设计 5 个因素、4 个水平的正交试验, 比较各配方组合对 B47 菌株发酵液的无菌滤液抗菌活性的影响。按 1.6 方法培养菌株, 按 1.5 方法测定无菌滤液抗菌活性。

### 1.10 优化培养基与常用培养基比较

将 B47 菌株接种到正交优化得到的培养基(命名为 YSB)和适宜芽孢杆菌产抗菌物质的常用培养基 NB<sup>[10-11]</sup>、LB<sup>[10,12-13]</sup>、BPY<sup>[10,14]</sup>和 KMB<sup>[15-16]</sup>中, 比较不同培养基对 B47 菌株发酵液的无菌滤液抗菌活性的影响。按 1.6 方法培养菌株, 按 1.5 方法测定无菌滤液抗菌活性。

### 1.11 发酵条件正交优化

采用优化培养基, 以培养温度、初始 pH、培养时间、接种量和装液量为考察因素, 按正交设计表  $L_{16}(4^5)$  设计 5 个因素、4 个水平的正交试验, 比较各种发酵条件组合对 B47 菌株发酵液的无菌滤液抗菌活性的影响。按 1.5 测定各处理无菌滤液的抗菌活性。

### 1.12 数据统计

试验数据通过 DPS 数据处理系统, 采用 LSD 法进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 氮源对 B47 菌株发酵液的无菌滤液抗菌活性的影响

由图 1 可见, 不同氮源对 B47 菌株发酵液的无菌滤液的抗菌活性有显著影响。其中, 以酵母浸膏为氮源时, 无菌滤液的抗菌活性明显高于其它氮源, 拮抗圈直径达 16.00 mm; 其次为牛肉浸膏, 拮抗圈直径为 14.50 mm。供试的各种氮源分别加入后所获得的抗菌活性较基础培养基均有明显提高。理论上讲, 在同等条件下, 菌株发酵液的无菌滤液的抗菌活性越强, 表明菌株代谢产生的抗菌物质越多。因此, 在不同氮源中, 酵母浸膏最有利于 B47 菌株产抗菌物质。

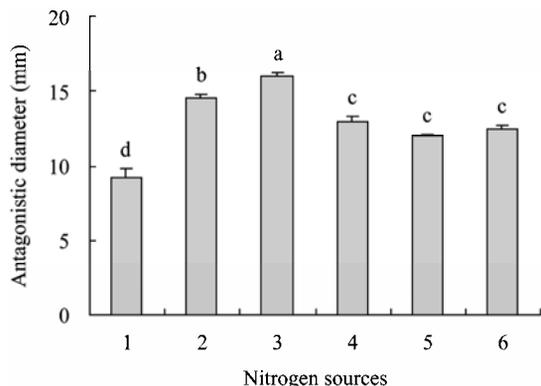


图 1 氮源对 B47 菌株发酵液的无菌滤液抗菌活性的影响

Fig. 1 Effects of nitrogen sources on the antimicrobial activity of cell-free broth of strain B47

注: 1: CK; 2: 牛肉浸膏; 3: 酵母浸膏; 4: 大豆蛋白胨; 5: 胰蛋白胨; 6: 大豆粉。柱状图上的不同字母表示差异显著,  $P < 0.05$ , 下同。  
Note: 1: CK; 2: Beef extract; 3: Yeast extract; 4: Soybean peptone; 5: Tryptone; 6: Soy flour. Columns with different letters are significantly different,  $P < 0.05$ , the same as follows.

## 2.2 碳源对 B47 菌株发酵液的无菌滤液抗菌活性的影响

由图 2 可知, 以不同营养成分作为碳源时, B47 菌株发酵液的无菌滤液抗菌活性强弱明显不同。其中, 以蔗糖为碳源时, 无菌滤液抗菌活性最强, 拮抗圈直径达 18.00 mm; 以葡萄糖为碳源时, 无菌滤液的抗菌活性仅次于蔗糖, 拮抗圈直径为 16.10 mm。在所有供试的碳源中, 玉米粉最不适于该菌株产生抗菌物质, 所得拮抗圈直径仅为 12.16 mm。可见, 选用蔗糖作为碳源最有利于 B47 菌株产生抗菌物质。

## 2.3 无机盐对 B47 菌株发酵液的无菌滤液抗菌活性的影响

在只含蔗糖和酵母浸膏的基础培养基中, 分别加入不同无机盐, 培养 B47 菌株, 所得发酵液的无菌滤液的抗菌活性因无机盐的种类不同而有明显差异。据数据统计结果, 与基础培养基相比, 加入无机盐后, 菌株 B47 发酵液的无菌滤液的抗菌活性出现升高、降低、无变化或活性丧失等几种情况。当加入  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  和  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  时, 其抗菌活性显著升高, 拮抗圈直径分别达 20.16 mm 和 18.50 mm。而当加入  $MnCl_2$  时, 其抗菌活性显著下降, 拮抗圈直

径仅为 10.00 mm; 更甚者, 当加入  $ZnSO_4$ 、 $CoCl_2$  和  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  时, 无菌滤液中完全检测不到抗菌活性。其余 3 种无机盐( $NaCl$ 、 $K_2HPO_4$  和  $CaCl_2$ ) 的加入, 对无菌滤液的抗菌活性均无明显影响(图 3)。可见,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  最有利于 B47 菌株产生抗菌物质,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  次之, 而  $MnCl_2$ 、 $ZnSO_4$ 、 $CoCl_2$  和  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  抑制 B47 菌株产抗菌物质。

## 2.4 培养基配方正交优化结果

正交优化试验结果(表 1)表明, 不同培养基配方组合对 B47 菌株发酵液的无菌滤液抗菌活性有显著

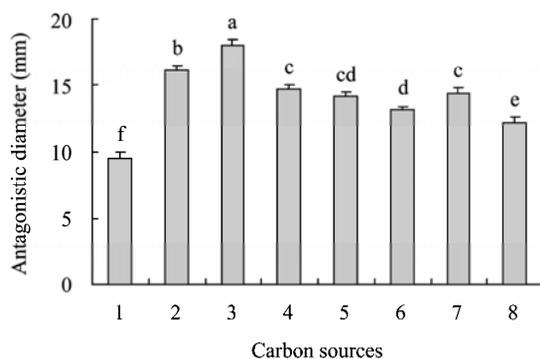


图 2 碳源对 B47 菌株发酵液的无菌滤液抗菌活性的影响

Fig. 2 Effects of carbon sources on the antimicrobial activity of cell-free broth of strain B47

注: 1: CK; 2: 葡萄糖; 3: 蔗糖; 4: 麦芽糖; 5: 乳糖; 6: 可溶性淀粉; 7: 甘油; 8: 玉米粉。

Note: 1: CK; 2: Dextrose; 3: Sucrose; 4: Maltose; 5: Lactose; 6: Soluble starch; 7: Glycerin; 8: Corn flour.

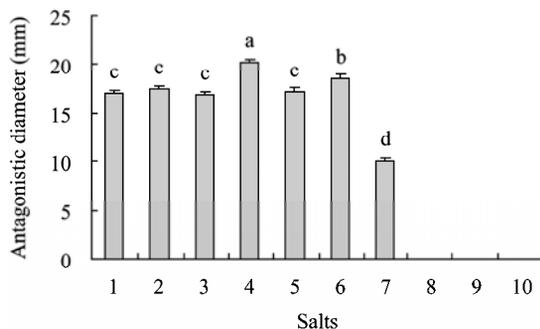


图 3 无机盐对 B47 菌株发酵液的无菌滤液抗菌活性的影响

Fig. 3 Effects of salt on the antimicrobial activity of cell-free broth of strain B47

Note: 1: CK; 2: NaCl; 3:  $K_2HPO_4$ ; 4:  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 5:  $CaCl_2$ ; 6:  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 7:  $MnCl_2$ ; 8:  $ZnSO_4$ ; 9:  $CoCl_2$ ; 10:  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ .

影响。表现抗菌活性最强的是 11 号培养基, 拮抗圈直径达 23.67 mm; 抗菌活性最弱的是 1 号培养基, 拮抗圈直径仅为 17.83 mm。其中 1 号培养基是各营养成分含量均为最少的配方, 说明营养成分含量太少不利于菌株产生抗菌物质。由极差  $R$  值的大小可以看出, 培养基配方中的 5 种组分对无菌滤液抗菌活性影响力的强弱顺序为: A (蔗糖) $>$ B (酵母浸膏) $>$ C ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) $>$ D (牛肉浸膏) $>$ E ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )。由各

列相应位级的拮抗圈直径之和( $K$  值)可以看出, 随着各营养成分含量的升高, 无菌滤液的抗菌活性呈先上升后下降的趋势, 说明并非营养物质含量越高越适宜菌株产抗菌物质。培养基配方的最佳组合为  $\text{A}_3\text{B}_3\text{C}_3\text{D}_3\text{E}_3$ , 即: 蔗糖 2%, 酵母浸膏 2%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.06%, 牛肉浸膏 1.5%,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.000 9%。将该优化培养基命名为 YSB (Yeast extract-sucrose-beef extract)培养基。

表 1 培养基配方正交试验结果  
Table 1 Results of the medium orthogonal experiment

处理号 Treatment	因素 Factor					平均拮抗圈直径 Average antagonistic diameter (mm)
	蔗糖 Sucrose (%)	酵母浸膏 Yeast extract (%)	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (%)	牛肉浸膏 Beef extract (%)	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (%)	
	A	B	C	D	E	
1	1 (0.5)	1 (0.5)	1 (0.01)	1 (0.5)	1 (0.000 3)	17.83
2	1 (0.5)	2 (1.0)	2 (0.03)	2 (1.0)	2 (0.000 6)	19.33
3	1 (0.5)	3(2.0)	3 (0.06)	3 (1.5)	3 (0.000 9)	23.33
4	1 (0.5)	4 (3.0)	4 (0.09)	4 (2.0)	4 (0.001 2)	19.00
5	2 (1.0)	1 (0.5)	2 (0.03)	3 (1.5)	4 (0.001 2)	20.33
6	2 (1.0)	2 (1.0)	1 (0.01)	4 (2.0)	3 (0.000 9)	20.00
7	2 (1.0)	3 (2.0)	4 (0.09)	1 (0.5)	2 (0.000 6)	22.83
8	2 (1.0)	4 (3.0)	3 (0.06)	2 (1.0)	1 (0.000 3)	23.00
9	3 (2.0)	1 (0.5)	3 (0.06)	4 (2.0)	2 (0.000 6)	22.00
10	3 (2.0)	2 (1.0)	4 (0.09)	3 (1.5)	1 (0.000 3)	23.00
11	3 (2.0)	3 (2.0)	1 (0.01)	2 (1.0)	4 (0.001 2)	23.67
12	3 (2.0)	4 (3.0)	2 (0.03)	1 (0.5)	3 (0.000 9)	22.00
13	4 (3.0)	1 (0.5)	4 (0.09)	2 (1.0)	3 (0.000 9)	20.67
14	4 (3.0)	2 (1.0)	3 (0.06)	1 (0.5)	4 (0.001 2)	21.00
15	4 (3.0)	3 (2.0)	2 (0.03)	4 (2.0)	1 (0.000 3)	22.00
16	4 (3.0)	4 (3.0)	1 (0.01)	3 (1.5)	2 (0.000 6)	21.33
$K_1^a$	79.49	80.83	82.83	83.66	85.83	
$K_2$	86.16	83.33	83.66	86.67	85.49	
$K_3$	90.67	91.83	89.33	87.99	86.00	
$K_4$	85.00	85.33	85.50	83.00	84.00	
$K'_1^b$	19.87	20.21	20.71	20.92	21.46	
$K'_2$	21.54	20.83	20.92	21.67	21.37	
$K'_3$	22.67	22.96	22.33	22.00	21.50	
$K'_4$	21.25	21.33	21.38	20.75	21.00	$\text{A}_3\text{B}_3\text{C}_3\text{D}_3\text{E}_3$
$R^c$	2.80	2.75	1.62	1.25	0.50	$R_A > R_B > R_C > R_D > R_E$

注: <sup>a</sup>:  $K_1$  表示各因素的第 1 水平 4 次试验结果之和,  $K_2$  表示各因素的第 2 水平 4 次试验结果之和,  $K_3$ 、 $K_4$  依次类推; <sup>b</sup>:  $K'_1$  表示各因素的第 1 水平 4 次试验结果之平均数,  $K'_2$  表示各因素的第 2 水平 4 次试验结果之平均数,  $K'_3$ 、 $K'_4$  依次类推; <sup>c</sup>:  $R$  表示各因素的最好水平与最差水平之差, 即  $K'_{\text{最大}} - K'_{\text{最小}}$  (下同)。

Note: <sup>a</sup>:  $K_1$  means the sum of 4 test results at level 1 of each factor.  $K_2$  means the sum of 4 test results at level 2 of each factor.  $K_3$ ,  $K_4$ , and so on; <sup>b</sup>:  $K'_1$  means the average of 4 test results at level 1 of each factor.  $K'_2$  means the average of 4 test results at level 2 of each factor.  $K'_3$ ,  $K'_4$  and so on; <sup>c</sup>:  $R$  means the difference between the best and worst levels of each factor (the same as follows).

## 2.5 优化培养基与常用培养基比较结果

用优化得到的 YSB 培养基与常用培养基 NB、LB、BPY 和 KMB 同时培养 B47 菌株, 比较不同培养基对 B47 菌株发酵液的无菌滤液抗菌活性的影响。结果表明, 表现抗菌活性最强的是 YSB 培养基, 拮抗圈直径达 25.00 mm, 显著高于其它常用培养基; 其次是 BPY 培养基, 拮抗圈直径为 21.50 mm; 抗菌活性最弱的是 LB 培养基, 拮抗圈直径仅为 17.50 mm。说明优化后的 YSB 培养基最利于 B47 菌株产抗菌物质。

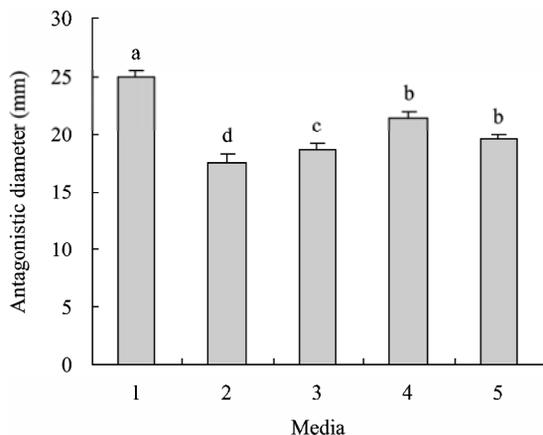


图 4 不同培养基对 B47 菌株发酵液的无菌滤液抗菌活性的影响

Fig. 4 Effects of different medium on antimicrobial activity of cell-free broth of strain B47

Note: 1: YSB; 2: LB; 3: NB; 4: BPY; 5: KMB.

## 2.6 发酵条件正交优化结果

从表 2 可以看出, 发酵条件对 B47 菌株发酵液的无菌滤液的抗菌活性有显著影响。表现抗菌活性最强的发酵条件组合是处理 10, 拮抗圈直径达 27.67 mm; 抗菌活性最弱的是处理 11, 拮抗圈直径仅为 15.23 mm。由极差  $R$  值分析可见, 5 种因素对无菌滤液抗菌活性影响力的强弱顺序为: E (装液量) > A (温度) > C (培养时间) > B (pH) > D (接种量)。装液量对无菌滤液活性的影响最为显著, 并与无菌滤液活性大小呈负相关。接种量对无菌滤液抗菌活性的影响最为微弱。由各列相应位级的拮抗圈直径之和可以看出, 最优发酵条件组合为  $A_3B_2C_3D_1E_1$ , 即: 30 °C, pH 7.0, 培养 6 d, 接种量为 1%, 装液量为 40 mL/200 mL。

## 3 讨论

芽孢杆菌可以产生多种抗菌物质, 主要包括表面活性素(Surfactin)<sup>[17]</sup>、伊枯草菌素(Iturin)<sup>[18]</sup>、丰原素(Fengycin)<sup>[19]</sup>等脂肽类抗菌素和抗菌蛋白<sup>[20]</sup>等。芽孢杆菌次生代谢物的产生主要受培养基营养成分(碳、氮源和无机盐)、发酵条件(温度、pH、发酵时间、接种量、通气量等)和高度复杂的代谢调节机制的影响<sup>[21-23]</sup>。不同培养基营养成分和发酵条件可显著影响不同代谢物质的产量。郭成栓<sup>[24]</sup>等报道葡萄糖 3%, 大豆粉 4%, pH 8.0, 温度 40 °C, 接种量体积分数 2%能显著提高枯草芽孢杆菌 B<sub>1</sub>®菌株蛋白酶的产量。Lin<sup>[25]</sup>等报道绵白糖 2%, FeSO<sub>4</sub> 2 mmol/L, pH 6.64, 30 °C, 培养 6 d 能显著提高淀粉液化芽孢杆菌 B128 菌株伊枯草菌素(Iturin A)的产量。易有金等报道 pH 7.0, 30 °C, 装液量 100 mL, 200 r/min 振荡培养 96 h 能提高枯草芽孢杆菌 B-001 菌株抗菌蛋白的产量<sup>[12]</sup>。

本研究在确定适宜枯草芽孢杆菌 B47 菌株高产抗菌物质的最佳碳(蔗糖)、氮源(酵母浸膏)和无机盐(MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)的基础上, 通过正交试验法得到 B47 菌株高产抗菌物质的最优培养基, 配方为蔗糖 2%, 酵母浸膏 2%, 牛肉浸膏 1.5%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.06%, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.000 9%。该培养基的成分和含量与现有的 100 多种培养基均不完全相同, 根据所含的主要成分将其命名为 YSB (Yeast extract-sucrose-beef extract) 培养基。从培养基配方的成分上来看, YSB 培养基所含的 5 种组分均是生产上容易获得并且价格相对低廉的化工原料, 这使得该培养基具备了在今后的大量工业发酵生产中应用的先决条件。

据报道, NB、LB、BPY 和 KMB 等培养基也是适宜芽孢杆菌产抗菌物质的常用培养基。本文比较了在 YSB 培养基和上述常用培养基中, B47 菌株产生抗菌物质的效果。结果发现, 在同等条件下, 菌株在 YSB 培养基中培养产生的抗菌活性显著高于其它培养基, 这说明 YSB 培养基中所含抗菌物质的浓度最大。一般来说, 抗菌物质的提取纯化过程, 是一个不断去除非活性物质和逐渐浓缩活性物质的过程。初始培养液中含有抗菌物质的浓度越大,

表 2 发酵条件正交试验结果  
Table 2 Results of the culture conditions orthogonal experiment

处理号 Treatment	因素 Factor					
	温度 Temperature (°C)	pH	培养时间 Culture time (d)	接种量 Inoculum volume percentage (%)	装液量 Medium volume (mL)	平均拮抗圈直径 Average antagonistic diameter (mm)
	A	B	C	D	E	
1	1 (24)	1 (6.5)	1 (4)	1 (1)	1 (40)	22.33
2	1 (24)	2 (7.0)	2 (5)	2 (2)	2 (60)	21.17
3	1 (24)	3 (7.5)	3 (6)	3 (3)	3 (80)	19.00
4	1 (24)	4 (8.0)	4 (7)	4 (4)	4 (100)	15.67
5	2 (27)	1 (6.5)	2 (5)	3 (3)	4 (100)	15.33
6	2 (27)	2 (7.0)	1 (4)	4 (4)	3 (80)	17.33
7	2 (27)	3 (7.5)	4 (7)	1 (1)	2 (60)	21.67
8	2 (27)	4 (8.0)	3 (6)	2 (2)	1 (40)	24.13
9	3 (30)	1 (6.5)	3 (6)	4 (4)	2 (60)	23.33
10	3 (30)	2 (7.0)	4 (7)	3 (3)	1 (40)	27.67
11	3 (30)	3 (7.5)	1 (4)	2 (2)	4 (100)	15.23
12	3 (30)	4 (8.0)	2 (5)	1 (1)	3 (80)	20.33
13	4 (33)	1 (6.5)	4 (7)	2 (2)	3 (80)	18.00
14	4 (33)	2 (7.0)	3 (6)	1 (1)	4 (100)	17.17
15	4 (33)	3 (7.5)	2 (5)	4 (4)	1 (40)	21.33
16	4 (33)	4 (8.0)	1 (4)	3 (3)	2 (60)	19.17
K1	78.17	78.99	74.06	82.10	95.46	
K2	78.46	83.34	78.16	78.53	85.34	
K3	86.56	77.23	83.63	81.17	74.66	
K4	75.67	79.50	83.01	77.66	63.40	
K'1	19.54	19.75	18.52	20.53	23.87	
K'2	19.62	20.84	19.54	19.63	21.34	
K'3	21.64	19.31	20.91	20.29	18.67	
K'4	18.92	19.88	20.75	19.42	15.85	A <sub>3</sub> B <sub>2</sub> C <sub>3</sub> D <sub>1</sub> E <sub>1</sub>
R	2.72	1.53	2.39	1.11	8.02	R <sub>E</sub> >R <sub>A</sub> >R <sub>C</sub> >R <sub>B</sub> >R <sub>D</sub>

越利于提高纯化物的得率和简化后期的提取环节。这有助于下一步抗菌物质的提纯研究。同时,有利于工业化发酵生产中提高活性产物得率,降低生产成本。

采用 YSB 培养基,通过正交试验法得到 B47 菌株高产抗菌物质的最优发酵条件组合为: 30 °C, pH 7.0, 170 r/min 振荡培养 6 d, 接种量为 1%, 装液量为 40 mL/200 mL。经测试发现, B47 菌株在最佳培养基与培养条件下培养,获得发酵液的无菌滤液的抗菌活性大于正交试验中所有处理的活性,拮抗

圈直径达 28.67 mm。在测试的各因素中,装液量对 B47 菌株产抗菌物质影响最大,并且具有负效应,即装液量越少,菌株产生的抗菌物质越多。装液量的多少直接反映通气量的多少,也就是说通气量是影响 B47 菌株产抗菌物质的重要因素。这一结果表明 B47 菌株属于好氧菌,氧气越充足越有利于其代谢产生抗菌物质。因此,在实际生产过程中,条件允许的情况下,应注意适当增加通气量,以获得更多的活性物质。

在前期研究工作中我们发现 B47 菌株在培养

36-96 h时的生长量最大, 96 h (4 d)以后进入衰退期, 生长量明显下降<sup>[8]</sup>; 而在本研究中, 发现该菌在培养至第 6 天时产生的抗菌物质最多。说明适于 B47 菌株生长与产抗菌物质的培养时间不同, 其产抗菌物质的峰值时间出现在生长衰退期。此外, B47 菌株生长的最适温度为 35 °C<sup>[8]</sup>, 和其产抗菌物质的最适温度(30 °C)也不相同。B47 菌株生长与产抗菌物质对发酵条件的要求不尽相同, 这对将来研究利用该菌的活性物质和活菌体具有一定指导意义。

## 参 考 文 献

- [1] 赖传雅. 农业植物病理学[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 72.
- [2] Ullstrup AJ. The impacts of the southern corn leaf blight epidemics of 1970-1971[J]. Annual Review of Phytopathology, 1972, 10(1): 37-50.
- [3] 刘克明, 王连生, 刘玉瑛, 等. 我国玉米小斑病病菌生理小种研究进展[J]. 玉米科学, 1995(增刊): 16-18.
- [4] 王霞, 王素英, 高朋辉. 青霉 TS67 菌株对大豆根腐病和玉米小斑病的防治效果评价[J]. 微生物学通报, 2008, 35(8): 1246-1250.
- [5] 鹿秀云, 李社增, 栗秋生, 等. 玉米叶斑病拮抗细菌的筛选及其发酵培养基优化[J]. 中国生物防治, 2006, 22(增刊): 47-53.
- [6] Huang CJ, Yang KH, Liu YH, et al. Suppression of southern corn leaf blight by a plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus cereus* C1L[J]. Annals of Applied Biology, 2010, 157(1): 45-53.
- [7] 叶云峰, 黎起秦, 何洪鸿, 等. 芽孢杆菌 B47 菌株对番茄青枯病的防治作用[J]. 广西植保, 2005, 18(3): 1-4.
- [8] 黎起秦, 叶云峰, 蒙显英, 等. 内生细菌 B<sub>47</sub> 菌株的鉴定及其对番茄青枯病的防效测定[J]. 中国生物防治, 2005, 21(3): 178-182.
- [9] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 365.
- [10] 中国微生物菌种保藏委员会. 中国菌种目录[M]. 北京: 轻工业出版社, 1983: 404-422.
- [11] 陈志谊, 陆凡, 刘春祥, 等. 水稻纹枯病拮抗细菌 B-916 培养条件与发酵配方的研究[J]. 西南农业学报, 1999, 12(1): 76-81.
- [12] 赵德立, 曾林子, 李晖, 等. 多粘芽孢杆菌 JW-725 抗菌活性物质及其发酵条件的初步研究[J]. 植物保护, 2006, 32(1): 47-50.
- [13] 何青芳, 陈卫良, 马志超. 枯草芽孢杆菌 A30 菌株产生的拮抗肽的分离纯化与理化性质研究[J]. 中国水稻科学, 2002, 16(4): 361-365.
- [14] 易有金, 罗坤, 罗宽, 等. 拮抗菌 B-001 抗菌蛋白产生的最佳发酵条件和特性及其室内防效[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2007, 33(1): 79-82.
- [15] 刘静, 王军, 姚建铭, 等. 枯草芽孢杆菌 JA 抗菌物特性的研究及抗菌肽的分离纯化[J]. 微生物学报, 2004, 44(4): 511-514.
- [16] 裴炎, 李先碧, 彭红卫, 等. 抗真菌多肽 APS-1 的分离纯化与特性[J]. 微生物学报, 1999, 39(4): 344-349.
- [17] Peypoux F, Bonmatin JM, Wallach J. Recent trends in the biochemistry of surfactin[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 51(5): 553-563.
- [18] Maget-Dana R, Peypoux F. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties[J]. Toxicology, 1994, 87(1/3): 151-174.
- [19] Ongena M, Jacques P, Touré Y, et al. Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 69(1): 29-38.
- [20] Stover AG, Driks A. Secretion, localization, and antibacterial activity of TasA, a *Bacillus subtilis* pore-associated protein[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(5): 1664-1672.
- [21] Ohno A, Ano T, Shoda M. Effect of temperature change and aeration on the production of antifungal peptide antibiotic iturin by *Bacillus subtilis* NB22 in liquid cultivation[J]. Journal of Fermentations and Bioengineering, 1993, 75(6): 463-465.
- [22] Akpa E, Jacques P, Wathelet B, et al. Influence of culture conditions on lipopeptide production by *Bacillus subtilis*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2001, 91/93(1/9): 551-561.
- [23] Rahman MS, Ano T, Shoda M. Second stage production of iturinA by induced germination of *Bacillus subtilis* RB14[J]. Journal of Biotechnology, 2006, 125(4): 513-515.
- [24] 郭成栓, 谢和. 枯草芽孢杆菌 B<sub>1</sub>® 菌株产蛋白酶液体发酵条件优化[J]. 山地农业生物学报, 2006, 25(6): 554-557.
- [25] Lin HY, Rao YK, Wu WS, et al. Ferrous ion enhanced lipopeptide antibiotic iturin A production from *Bacillus amyloliquefaciens* B128[J]. International Journal of Applied Science and Engineering, 2007, 5(2): 123-132.