

内生菌株 B16 发酵条件优化及其对人参锈腐病的防效

张正杰¹ 韩金秀² 刘学周³ 田义新^{1*} 张连学^{1*} 王泽¹ 林星辰¹

- (1. 吉林农业大学中药材学院 吉林 长春 130118)
(2. 长白县人参产业发展服务中心 吉林 长白 134000)
(3. 甘肃省经济作物技术推广站 甘肃 兰州 730030)

摘要:【目的】优化人参病害拮抗菌株 B16 的发酵条件,提高发酵液的活菌含量和抗菌活性,检测该菌对人参病害的防效。【方法】采用单因子试验、正交试验优化菌株 B16 的发酵培养基及发酵条件,于室内盆栽条件下研究其对人参锈腐病的防效。【结果】菌株 B16 发酵最适培养基为:蔗糖 1.00%、酵母膏 0.50%、MgSO₄·7H₂O 0.05%、FeSO₄·7H₂O 0.06%、NaCl 1.00%;最佳发酵条件: pH 7.5、温度 35 °C、接种量 5%、装液量 40 mL/250 mL、摇床转速 170 r/min、发酵周期 48 h。菌株 B16 发酵液对人参锈腐病的保护作用和治疗作用防效分别达到 64.8%和 58.6%。【结论】菌株 B16 具有很强的生防潜力。

关键词: 甲基营养型芽孢杆菌, 人参锈腐病, 发酵优化, 生防菌

Optimization of B16 endophytic strain culture for its control of ginseng *Cylindrocarpon destructans*

ZHANG Zheng-Jie¹ HAN Jin-Xiu² LIU Xue-Zhou³ TIAN Yi-Xin^{1*} ZHANG Lian-Xue^{1*}
WANG Ze¹ LIN Xing-Chen¹

- (1. College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China)
(2. Changbai County Ginseng Industry Service Center, Changbai, Jilin 134000, China)
(3. Gansu Economic Crop Extension Station, Lanzhou, Gansu 730030, China)

Abstract: [Objective] To study the optimal fermentation conditions of antagonistic strain B16 isolated from ginseng root for improving the quantity and antibacterial activity of the bacteria, and

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31201161); Science and Technology Research Project of Jilin Provincial Department of Education of China (No. 2014-61); Traditional Chinese Medicine Science and Technology Project of Jilin Provincial Administration of TCM of China (No. 2013-4); The Ministry of Agriculture Public Welfare Industry (Agriculture) Special Funds Scientific Research Project (No. 201303111)

*Corresponding authors: TIAN Yi-Xin: Tel: 86-431-84533087; E-mail: y.x.tian2003@163.com
ZHANG Lian-Xue: Tel: 86-431-84533171; E-mail: zlx863@163.com

Received: January 24, 2017; Accepted: April 07, 2017; Published online (www.cnki.net): May 05, 2017

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31201161); 吉林省教育厅科学技术研究项目(No. 2014-61); 吉林省中医药管理局中医药科技项目(No. 2013-4); 农业部公益性行业(农业)科研专项项目(No. 201303111)

*通讯作者: 田义新: Tel: 86-431-84533087; E-mail: y.x.tian2003@163.com
张连学: Tel: 86-431-84533171; E-mail: zlx863@163.com

收稿日期: 2017-01-24; 接受日期: 2017-04-07; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-05-05

test its control effect on ginseng disease. **[Methods]** The single factor test and orthogonal test were used in optimizing the fermentation media and the conditions, and the strain's antagonistic effects to ginseng pathogenic fungus *Cylindrocarpon destructans* were tested with pot trails. **[Results]** Optimum fermentation media for B16 was: sucrose 1.00%, yeast extract 0.50%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.06% and NaCl 1.00%; and the optimum conditions are: pH 7.5, 35 °C, 5% 10^8 CFU/mL bacterium suspension, 40 mL/250 mL, 170 r/min and 48 h fermentation. The B16 fermentation broth shows antagonistic effect to ginseng pathogenic fungus *C. destructans*, the protection effect and curation effect are 64.8% and 58.6%, respectively. **[Conclusion]** Strain B16 has potential for *C. destructans* biocotrol.

Keywords: *Bacillus methylotrophicus*, Ginseng *Cylindrocarpon destructans*, Fermentation condition optimization, Biocontrol bacterium

由毁灭柱孢菌(*Cylindrocarpon destructans*)引发的人参锈腐病, 是中国人参主产区最普遍、危害最大的土传病害, 发病率高达 30%, 严重影响人参品质和产量^[1-2]。目前, 该病的防治以化学防治措施为主, 而长期使用一些高效、内吸、专一性强的杀菌剂, 导致了病原菌的抗药性、防治效果下降^[3]。同时, 人参产品农药残留超标, 制约了人参生产产业现代化的发展之路^[4]。利用拮抗微生物及其代谢产物防治植物病害已成为当前的研究热点^[5-6]。芽孢杆菌是生物防治中常用的拮抗菌, 具有稳定性好、抗性强、耐高温、培养周期短、生产方便、储藏期相对较长、可抑制病原菌繁殖等特点, 日益显示出其作为生防菌的优势^[7-9]。因此, 利用拮抗细菌来防治人参锈腐病病害将是新的理想途径。

甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*)是 2010 年 Madhaiyan 等^[10]从水稻根围土壤中分离得到的芽孢杆菌属新种。2015 年底, 甲基营养型芽孢杆菌 9912 母药和制剂在我国首获登记, 多年田间试验证明, 甲基营养型芽孢杆菌对黄瓜和番茄灰霉病、晚疫病, 棉花黄枯萎病及苹果树腐烂病等防治效果显著^[11]。本实验室从人参的 10 个主产区分别采样, 采用平板对峙培养法和抑菌圈法筛选对几种人参常见病原菌具有拮抗活性的细菌, 最终获得一株对人参常见病原菌 *C. destructans* 具有显著抑菌效果的拮抗内生细菌 B16, 通过形态观察、生理生化试验、16S rRNA 基因相似性序列分析, 鉴定为甲基营养型芽孢杆菌^[12]。本试验对

B16 摇瓶发酵培养基及发酵条件进行了优化, 结果提高了培养液中的活菌含量和抗菌活性。使用优化后的 B16 菌株发酵液对人参锈腐病进行防效测定, 以期为该生防菌制剂的研发及人参锈腐病的生物防治提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试菌株: 拮抗菌株 B16 由课题组从人参植株根内部分离得到, 经鉴定为甲基营养型芽孢杆菌(*B. methylotrophicus*), 人参锈腐病病原菌 *C. destructans* 由吉林农业大学农学院植物病理教研室提供。

1.1.2 培养基: 供试细菌的保存和培养使用营养琼脂 NA (Nutrient agar)培养基^[13]; 供试细菌液体发酵培养使用营养肉汤 NB (Nutrient broth)基础培养基^[13]; 病原真菌的保存和培养使用马铃薯葡萄糖琼脂 PDA (Potato dextrose agar)培养基^[14]; 种子液培养基使用改进的 NA 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, 1×10^5 Pa 高压灭菌 30 min。

1.1.3 主要仪器和试剂: YXQ-LS-100A 立式压力蒸汽灭菌器, 上海博迅实业有限公司医疗器械厂; SW-CJ-2FD 型超净工作台, 苏州净水设备有限公司; DHP-9082 型恒培养箱, 宁波海曙赛福实验仪器厂; UVS-1 型振荡混匀器, 厦门亿晨科技有限公司; HH-6 型数显恒温水浴锅, 常州中捷实验室仪器制造有限公司; SHZ-82A 恒温振荡摇床, 上海智城分析仪器制造有限公司; 3K-30 高速

台式离心机, 德国 Sigma 公司。

酵母浸膏、牛肉浸膏、蛋白胨, 北京奥博星生物技术有限责任公司; 葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉、麦芽糖、乳糖等, 国药集团化学试剂公司; 琼脂粉和无机盐类, 北京化工厂。

1.2 方法

1.2.1 菌株 B16 种子液的制备: 将保存的拮抗菌株 B16 在 NA 培养基上进行活化, 取活化后的菌株一环于装有 50 mL 种子液培养基的 250 mL 三角瓶中, 30 °C、180 r/min 振荡培养 24 h, 调整菌液浓度为 10^8 CFU/mL, 即为备用种子液。

1.2.2 活菌数及抑菌活性的测定: 活菌数的测定采用平板计数法^[15]; 抑菌活性测试以人参锈腐病菌为指示菌, 采用纸片扩散-抑菌圈法进行发酵液抑菌活性测定。将 4 °C 保存的人参锈腐病菌转接到 PDA 培养基上, 25 °C 恒温培养 7 d 使其产生大量孢子, 用无菌水将孢子洗下, 孢子浓度调至 1×10^6 孢子/mL, 将 200 μ L 的孢子悬浮液均匀涂布于盛有 25 mL PDA 培养基上, 无菌条件下吹干后制成带菌平板。前 1 天将滤纸片($\phi=5$ mm)置于无菌发酵滤液(将发酵液 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min, 上清液经 0.45 μ m 滤膜过滤后即为无菌发酵滤液)中过夜, 使其充分吸收, 微风略吹干后平放于带菌平板的中央, 3 次重复, 以相应的无菌培养液处理为对照。28 °C 恒温培养 3 d 后用交叉法测量菌落直径大小, 并根据菌落直径大小计算抑菌率。

抑菌率(%)=(供试菌落直径-对照菌落直径)/供试菌落直径 \times 100。

1.2.3 发酵培养基单因素试验: 最佳碳源筛选: 选用可溶性淀粉、蔗糖、葡萄糖、玉米粉、麦芽糖和乳糖, 分别以 0.5% (质量体积比)的含量替代 NB 基础培养基中的葡萄糖。在接种量 10%、初始 pH 7.4、转速 180 r/min、温度 30 °C、30 mL/250 mL 装液量条件下培养。36 h 后测定发酵液中的活菌含量和抑菌率。

最佳氮源筛选: 选用牛肉浸膏、酵母膏、蛋白胨、 NH_4NO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为无机或有机单一氮

源, 以牛肉浸膏+蛋白胨、酵母膏+蛋白胨、蛋白胨+ NH_4NO_3 (2:1)为复合氮源, 分别以 1% (质量体积比)的含量替代 NB 基础培养基中的牛肉浸膏和蛋白胨。摇瓶发酵培养条件同最佳碳源筛选, 36 h 后测定发酵液中的活菌含量和抑菌率。

最佳无机盐筛选: 分别选用含量为 0.05% (质量体积比)的 CaCl_2 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 MnCl_2 , 含量为 0.1% (质量体积比)的 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 , 含量为 0.5% 的 NaCl , 及不加无机盐的空白配制培养基, 摇瓶发酵培养条件同最佳碳源筛选, 36 h 后测定发酵液中的活菌含量和抑菌率。

1.2.4 培养基配比正交优化: 通过单因素试验将筛选出的最优碳源、氮源和无机盐分别为蔗糖、酵母膏、硫酸镁、硫酸亚铁、氯化钠 5 个重要因素, 选用 5 因素 4 水平 $L_{16}(4^5)$ 正交表进行试验, 以做进一步优化。

1.2.5 发酵条件的优化: 采用优化培养基, 对菌株 B16 发酵时接种量、装液量、初始 pH、转速、温度及时间等发酵条件进行优化。先按照基础发酵条件, 每次将优化后结果应用于下一因素的优化中。接种量: 1%、2%、5%、10%、20%; 初始 pH 值: 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5; 装液量: 30、40、50、60、70、80、100 mL/250 mL; 温度: 28、32、35、40、45 °C; 转速: 110、130、150、170、200 r/min; 时间: 24、36、48、60、72、84 h。每个处理 3 次重复。检测发酵液中的活菌含量确定发酵条件。

1.2.6 拮抗菌株 B16 对人参锈腐病的室内防效: 拮抗菌株 B16 用盆栽试验对优化后的发酵培养基和培养条件进行防效检验。盆栽试验采用保护法和治疗法对人参锈腐病进行防效测定。将来自吉林省集安市清河镇二年生人参苗室内盆栽, 按照正常田间管理培养, 待其展叶期时, 采用灌根接种法接种生防菌发酵菌液和人参锈腐病菌孢子悬浮液, 发酵菌液用优化后的发酵培养基稀释配制。试验设保护作用测定处理: 先接种拮抗菌株 B16 发酵菌液, 3 d 后再接种 1×10^4 孢子/mL 病原菌孢子悬浮液; 治疗作用测定处理: 先接种 1×10^4 孢子/mL

病原菌孢子悬浮液, 3 d 后再接种拮抗菌株 B16 发酵菌液; 以接种无菌发酵液为对照。每个处理重复 6 盆, 每盆 4 株人参苗, 每株接种量为 50 mL。接菌 20 d 后随机挖取 6 株观察人参锈腐病病情指数, 人参根腐病发病程度参考马凤茹等^[16]分级方法。

病情指数 = $\sum(\text{病情等级株数} \times \text{代表数值}) / (\text{植株总数} \times \text{最高级代表值}) \times 100$;

防病效果 (%) = $(\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数}) / \text{对照病情指数} \times 100$ 。

1.3 数据分析

采用 Excel 2007 和 DPS (Data processing system) 7.05 软件进行数据统计, LSD (Least significant difference) 法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 不同碳源对菌株 B16 生长及发酵液抗菌活性的影响

选择不同的碳源培养菌株 B16, 结果显示, 当以蔗糖作为碳源时, 最有利于菌株的生长, 发酵液的活菌数达到 2.6×10^8 CFU/mL, 发酵滤液的抑制率最高, 为 86.7%, 与其他成分相比差异达到极显著水平 ($P < 0.01$)。可溶性淀粉次之, 玉米粉最不利于菌株 B16 的生长, 活菌数和抑菌率均最低, 仅为 3.7×10^7 CFU/mL 和 58.6% (图 1), 因此, 选择蔗糖作为碳源既能保证活菌产量, 又有利于产生抗菌活性物质。

2.2 不同氮源对菌株 B16 生长及发酵液抗菌活性的影响

有机氮源、无机氮源及其复合氮源对菌株 B16 生长及发酵液的抗菌活性影响不同。有机氮源优于无机氮源, 其中以酵母膏作为氮源的培养基最有利于菌株 B16 的生长, 发酵液活菌数达到 2.8×10^8 CFU/mL 时, 抑制率最高为 89.3%。无机氮源中, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为氮源时, 发酵液活菌数和抗菌活性最低, 复合氮源中, 牛肉浸膏+蛋白胨和酵母膏+牛肉浸膏作为氮源时, 活菌数和抗菌活性均低于有机氮源中的牛肉浸膏和酵母膏, 与酵母膏

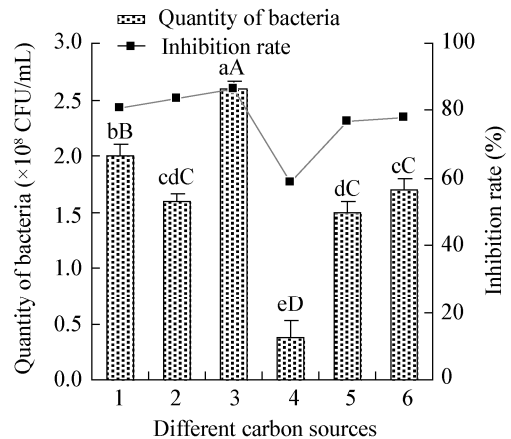


图 1 不同碳源对菌株 B16 生长及抗菌活性的影响

Figure 1 Effects of different carbon sources on the growth and antimicrobial activity of strain B16

注: 1: 可溶性淀粉; 2: 葡萄糖; 3: 蔗糖; 4: 玉米粉; 5: 麦芽糖; 6: 乳糖。图中小写和大写英文字母分别表示同水平下 5% 和 1% 水平的差异显著性, 下同。

Note: 1: Soluble starch; 2: Glucose; 3: Sucrose; 4: Corn flour; 5: Maltose; 6: Lactose. The normal and capital letters indicate the difference in 5% and 1% level, respectively, the same as follows.

的差异达到显著水平 ($P < 0.05$) (图 2), 表明菌株 B16 利用复合型氮源的能力较差, 对人参锈腐病菌的抑制作用也相对较弱。因此, 选择酵母膏作为菌株 B16 液体发酵培养基的氮源效果最佳。

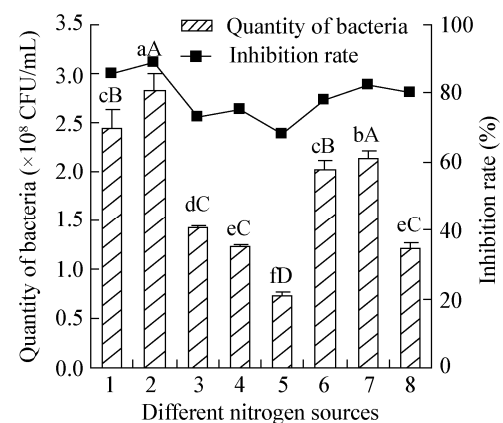


图 2 不同氮源对菌株 B16 生长及抗菌活性的影响

Figure 2 Effects of different nitrogen sources on the growth and antimicrobial activity of strain B16

注: 1: 牛肉浸膏; 2: 酵母膏; 3: 蛋白胨; 4: NH_4NO_3 ; 5: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 6: 牛肉浸膏+蛋白胨; 7: 酵母膏+牛肉浸膏; 8: 蛋白胨+ NH_4NO_3 。

Note: 1: Beef extract; 2: Yeast extract; 3: Peptone; 4: NH_4NO_3 ; 5: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 6: Beef extract+Peptone; 7: Yeast extract+Beef extract; 8: Peptone+ NH_4NO_3 .

2.3 不同无机盐对菌株 B16 生长及发酵液抗菌活性的影响

无机盐对菌株 B16 生长和发酵液抗菌活性的影响效果显著。分别以 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 NaCl 作为无机盐时，发酵液活菌数分别达到 1.9×10^9 、 2.1×10^9 和 1.8×10^9 CFU/mL，发酵液无菌滤液对人参锈腐病菌的抑制率分别为 88.3%、90.2% 和 91.4%，与其他无机盐以及空白对照相比差异达到极显著水平 ($P < 0.01$)。 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 NaCl 分别作为无机盐筛选时，发酵液活菌数差异不显著(图 3)。因此，选择 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 NaCl 作为无机盐进行正交试验确定最佳配比。

2.4 培养基配比正交试验优化

将筛选出的蔗糖、酵母膏、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 NaCl 5 个培养基重要组分通过正交试验设计进行配比优化，以发酵液的活菌数和无菌滤液的抗菌活性进行评价分析，最佳活菌数的培养基组合为 $\text{A}_3\text{B}_2\text{C}_3\text{D}_3\text{E}_2$ ，由调整后的极差 R' 值可知，5 个组分对发酵液活菌数的影响强弱为酵母膏 > 蔗糖 > NaCl > $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ > $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；最佳抑菌率的培养基组合为 $\text{A}_3\text{B}_2\text{C}_4\text{D}_3\text{E}_2$ ，由极差 R' 值可知，5 个组分对发酵液的无菌滤液的抗菌活性的影响强弱为酵母膏 > 蔗糖 > NaCl > $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ > $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。综合两个因素整体来看，酵母膏、

蔗糖、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 NaCl 的 $\text{A}_3\text{B}_2\text{D}_3\text{E}_2$ 为最佳水平(表 1)，各组试验中 Mg^{2+} 对发酵液活菌数和无菌滤液抗菌活性的影响在 C_3 水平优于 C_4 水平，且 Mg^{2+} 在两因素中的影响最小，为使其在两个因素中突出效果，因此选择 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的最佳水平为 C_3 。可以看出，无菌滤液的抗菌活性与发酵液的活菌数呈一定的相关性，培养基组分浓度过高或过低都不利于菌株 B16 的生长，对人参锈腐病菌的抑制效果也较差。最终确定优化后的菌株 B16 最佳发酵培养基组合为：1.00%蔗糖、0.50%酵母膏、0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.06% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1.00% NaCl 。

2.5 发酵培养条件的优化

2.5.1 接种量和初始 pH 对菌株 B16 发酵中活菌数的影响：菌株的生长周期与接种量的多少有关。一般情况，接种量越小延滞期越长，反之越短。但接种量过小，菌株的培养周期加长，不利于菌株生长。接种量为 5% 时，发酵液中活菌数量最多，为 3.9×10^9 CFU/mL，之后随接种量的增大活菌数量减少，因此，发酵液的种子液接种量选择 5%。发酵液的初始 pH 为 7.0–7.5 时，发酵液中菌株活菌数量呈明显上升的趋势，pH 在 7.5 时达到最大，活菌数达到 4.8×10^9 CFU/mL，此后随着 pH 的增大活菌数量减少(图 4)。因此菌株 B16 发酵液的初始 pH 控制在 7.0–7.5 时活菌数量最佳。

2.5.2 装液量和温度对菌株 B16 发酵中活菌数的影响：在 250 mL 三角瓶中，装液量在 30–40 mL 时，活菌数量增加，随着装液量的增加活菌数呈明显的递减趋势。可能装液量较低时，发酵液的蒸发量增加，无法满足菌体生长所需的营养条件；而当装液量较大时使得可溶解氧含量减少，影响到菌株的生长，因此发酵液的装液量选择 40 mL。温度是菌株发酵培养时的关键控制因素。发酵液的培养温度在 32–40 °C 时，发酵液的活菌数量维持在 4.6×10^9 – 6.2×10^9 CFU/mL 范围之内；最适温度为 35 °C，活菌数量为 6.4×10^9 CFU/mL(图 5)。发酵液培养温度过高或过低都不利于菌株的生长，因此选择菌株 B16 发酵液的培养温度为 35 °C。

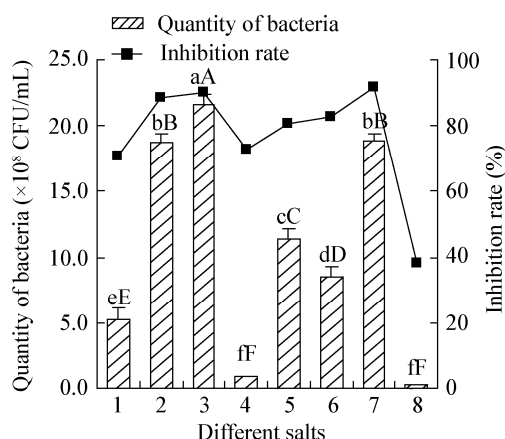


图 3 不同无机盐对菌株 B16 生长及抗菌活性的影响
Figure 3 Effects of different salts on the growth and antimicrobial activity of strain B16

Note: 1: CaCl_2 ; 2: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 3: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 4: MnCl_2 ; 5: K_2HPO_4 ; 6: KH_2PO_4 ; 7: NaCl ; 8: CK.

表 1 菌株 B16 发酵培养基优化正交设计及试验结果

Table 1 Optimization of orthogonal design and results of fermentation medium for strain B16

试验号 Test No.	A 蔗糖 Sucrose (%)	B 酵母膏 Yeast extract (%)	C 硫酸镁 MgSO ₄ ·7H ₂ O (%)	D 硫酸亚铁 FeSO ₄ ·7H ₂ O (%)	E 氯化钠 NaCl (%)	活菌数 Cell yield (×10 ⁷ CFU/mL)	抑菌率 Inhibition rate (%)
1	1(2.00)	1(0.80)	1(0.10)	1(0.12)	1(1.50)	28.1	46.8
2	1(2.00)	2(0.50)	2(0.08)	2(0.09)	2(1.00)	84.0	83.4
3	1(2.00)	3(0.30)	3(0.05)	3(0.06)	3(0.50)	121.3	82.2
4	1(2.00)	4(0.20)	4(0.02)	4(0.03)	4(0.10)	17.6	55.7
5	2(1.50)	1(0.80)	2(0.08)	3(0.06)	4(0.10)	93.7	82.6
6	2(1.50)	2(0.50)	1(0.10)	4(0.03)	3(0.50)	138.0	93.2
7	2(1.50)	3(0.30)	4(0.02)	1(0.12)	2(1.00)	117.7	96.5
8	2(1.50)	4(0.20)	3(0.05)	2(0.09)	1(1.50)	25.4	56.8
9	3(1.00)	1(0.80)	3(0.05)	4(0.03)	2(1.00)	186.3	97.3
10	3(1.00)	2(0.50)	4(0.02)	3(0.06)	1(1.50)	136.0	88.6
11	3(1.00)	3(0.30)	1(0.10)	2(0.09)	4(0.10)	103.7	89.2
12	3(1.00)	4(0.20)	2(0.08)	1(0.12)	3(0.50)	47.3	67.6
13	4(0.50)	1(0.80)	4(0.02)	2(0.09)	3(0.50)	125.0	90.2
14	4(0.50)	2(0.50)	3(0.05)	1(0.12)	4(0.10)	96.3	86.1
15	4(0.50)	3(0.30)	2(0.08)	4(0.03)	1(1.50)	52.7	78.5
16	4(0.50)	4(0.20)	1(0.10)	3(0.06)	2(1.00)	69.3	75.3
K ₁	62.75	108.27	84.77	72.35	60.55		
K ₂	93.70	113.57	69.42	84.52	114.32		
K ₃	118.32	98.85	107.32	105.07	107.90	B>A>E>C>D	
K ₄	85.82	39.90	99.07	98.65	77.82	A ₃ B ₂ C ₃ D ₃ E ₂	
R'	50.02	66.31	34.11	29.45	48.40		
T ₁	67.02	79.22	76.12	74.25	67.67		
T ₂	82.27	87.82	78.02	79.90	88.12		
T ₃	85.67	86.60	80.60	82.17	83.30	B>A>E>D>C	
T ₄	82.52	63.85	82.75	81.17	78.40	A ₃ B ₂ C ₄ D ₃ E ₂	
R'	16.78	21.58	5.96	7.13	18.40		

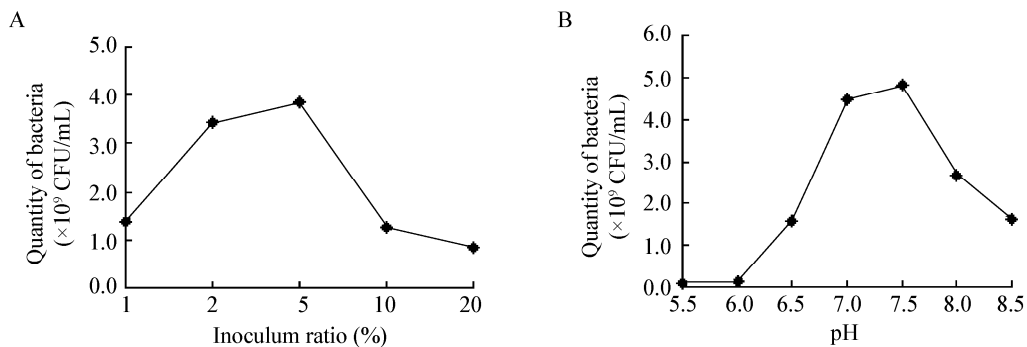


图 4 接种量(A)和初始 pH(B)对菌株 B16 发酵中活菌数的影响

Figure 4 Effects of inoculum ratio (A) and initial pH (B) on the number of viable bacteria in strain B16

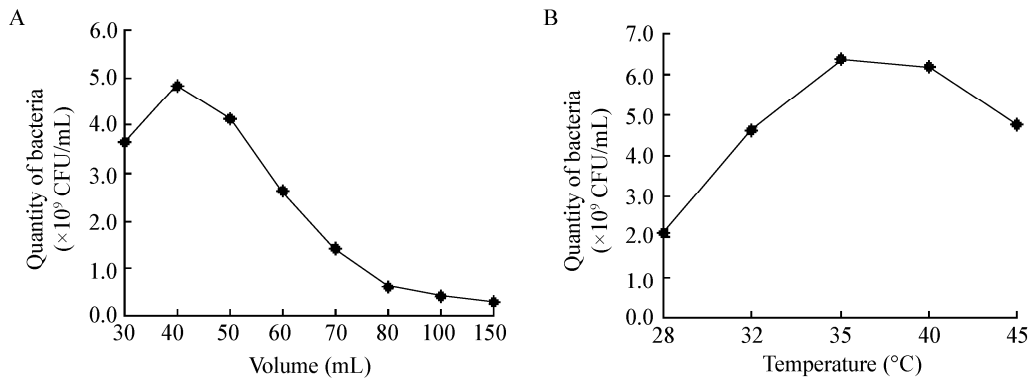


图5 装液量(A)和温度(B)对菌株 B16 发酵中活菌数的影响

Figure 5 Effects of medium volumes (A) and fermentation temperatures (B) on the number of viable bacteria in strain B16

2.5.3 转速和发酵培养时间对菌株 B16 发酵中活菌数的影响: 发酵液摇床培养时随着转速的增大, 发酵液活菌数的含量也随之增加。但当转速过大, 即 200 r/min 时, 菌株 B16 进入生长衰退期, 导致活菌数量呈减少的趋势。同时考虑摇床的实际运行速度, 选择 170 r/min 为摇床发酵的理想转速。菌株的液体发酵培养从迟缓期到衰退期是一个生长凋亡的过程, 对数生长期为菌株发酵培养的最佳阶段。发酵培养 48 h 后, 发酵液活菌数含量呈直线上升趋势, 60 h 后活菌数含量达到的最大值, 为 6.1×10^9 CFU/mL, 之后缓慢减少, 直至衰退(图 6)。为获得长势好的活性菌株, 菌株 B16 的发酵培养时间选择 48 h。

2.6 发酵液优化后的活菌含量及发酵液的无菌滤液抗菌活性

将 *B. methylophilus* B16 采用以上筛选后

培养基和优化后的发酵条件进行培养, 经检测发酵液的活菌数含量为 6.2×10^9 CFU/mL, 较优化前 1.7×10^9 CFU/mL 的活菌数含量有了大幅的增加, 此含量达到了农业部微生物肥料的技术标准(有效活菌数 ≥ 2.0 亿/mL)。发酵液的无菌滤液对人参锈腐病的抑菌率也由优化前的 55.2% 增加到 98.4%。

2.7 拮抗菌株 B16 发酵液对人参锈腐病的室内防效

施用优化后的拮抗菌株 B16 发酵液对人参锈腐病的防治效果显著。采用保护作用处理的防效优于治疗作用处理的防效, 分别达到 64.8% 和 58.6%, 表明菌株 B16 发酵液的预防作用效果较好。保护作用和治疗作用处理的病情指数分别为 46.32 和 57.11, 均低于对照处理的 76.83, 差异达到显著水平($P < 0.05$)(表 2)。

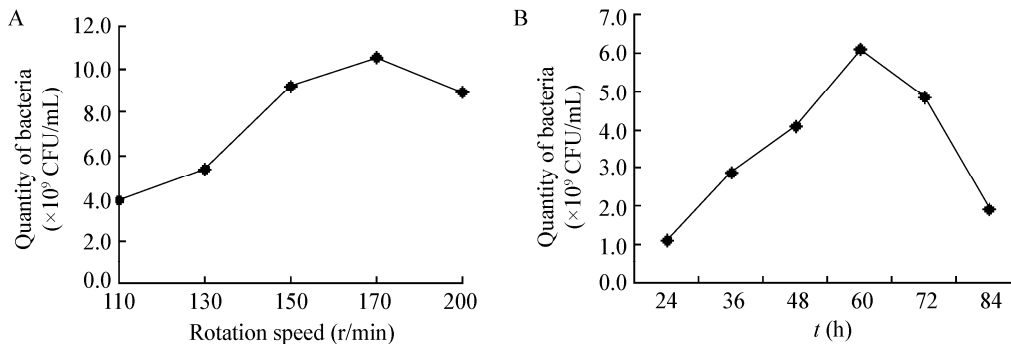


图6 转速(A)和培养时间(B)对菌株 B16 发酵中活菌数的影响

Figure 6 Effects of rotation speed (A) and fermentation time (B) on the number of viable bacteria in strain B16

表 2 菌株 B16 发酵液对人参锈腐病的防效
Table 2 Control effects of fermentation liquid on ginseng rust root rot

处理 Treatment	病情指数 Disease index	防病效果 Control effects (%)
保护作用处理 Prevention evaluate	46.32±1.45 c	64.8±0.75 a
治疗作用处理 Therapy evaluate	57.11±1.26 b	58.6±0.83 b
CK	76.83±1.18 a	—

3 结论与讨论

芽孢杆菌的液体发酵优化研究以枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)、短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*)、蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 等报道最多。从发酵培养基成分研究来看, 孙沙沙等^[17]报道 *B. subtilis* CG24 最优发酵培养基为葡萄糖 40 g/L、酵母膏 7.55 g/L、氯化钙 0.72 g/L, 抑菌圈直径比优化前提高了 25.72%; 左冰等^[18]报道 *B. amyloliquefaciens* FS6 最适摇瓶发酵培养基配方为葡萄糖 30 g, 酵母浸粉 40 g, MgSO₄·7H₂O 2 g, 甘油 10 mL, K₂HPO₄ 2 g, H₂O 1 000 mL。本研究通过不同碳源、氮源和无机盐筛选优化出的 *B. methylotrophicus* B16 最佳发酵培养基成分为蔗糖 1.00%、酵母膏 0.50%、MgSO₄·7H₂O 0.05%、FeSO₄·7H₂O 0.06%、NaCl 1.00%, 与多数芽孢杆菌属菌种生长所需营养成分基本相同。*B. methylotrophicus* 可利用大多数生物不能利用的单碳或非 C-C 键的多碳化合物进行生长, 菌株 B16 的液体发酵培养基所需的最佳碳源为蔗糖, 优于葡萄糖等其他碳源。B16 菌株对复合氮源和无机氮源利用能力较差, 利用有机氮源的能力较强, 以酵母膏为氮源的培养基中, 发酵液的活菌含量最高, 其抗菌活性也达到显著水平。同时, 菌株 B16 发酵培养基对无机盐的需求较高, 在 NB 基础培养基中加入 MgSO₄·7H₂O 和 FeSO₄·7H₂O, 发酵液的活菌含量显著增加, 其中 NaCl 对菌株 B16 的生长影响最大, 是控制其无菌发酵滤液抗菌效果的关键

成分, 可能与菌体盐浓度平衡或分泌抗菌物质的系统机制有关。

微生物发酵的优化除设计一个好的发酵培养基外, 其发酵条件也是必须考虑的因素。温度影响微生物细胞膜的蛋白质及液晶结构的合成与活性^[19], 温度过高或过低直接影响芽孢杆菌营养体的形成, 进而影响抗菌物质的产生。菌株 B16 最适发酵温度为 35 °C, 与向军等^[20]报道的甲基营养型芽孢杆菌 CC 发酵产氨肽酶的最适发酵温度 37 °C 存在一定差异, 可能是研究对象的不同导致同种菌株的最适发酵温度出现差异。pH 影响微生物的生长和抗菌物质的形成, *B. methylotrophicus* B16 的最适初始 pH 是 7.5, 该菌株适宜在偏碱性环境下生长。接种量和装液量影响菌体的生长周期和分泌抗菌物质的生物量, 李润静等^[21]研究甲基营养型芽孢杆菌 SK21.002 产果聚糖蔗糖酶的最佳接种量是 2%, 装液量是 30%, 接种量低于本研究的接种量 5%, 装液量高于本研究的装液量 40 mL/250 mL。过低的接种量可能使菌体的延迟期延长, 而甲基营养型芽孢杆菌是需氧型细菌, 较低的装液量更有利于菌体的生长。摇床转速影响菌体的可溶解氧浓度, 本研究优化的摇床转速为 170 r/min, 与向军等^[20]研究结果相一致。菌株 B16 的发酵周期为 48 h, 与多数芽孢杆菌的发酵周期相比差异较大, 考虑到实际生产和经济因素, 不同的试验方法可能也存在差异。通过以上发酵培养基和发酵条件的优化, 菌株 B16 发酵液的活菌数含量达到 6.2×10⁹ CFU/mL, 其发酵液的无菌滤液对人参锈腐病的抑菌率增加到 98.4%, 较优化前有了明显的提高。

近年来, 甲基营养型芽孢杆菌防病效果的研究被陆续报道。刘利强等^[22]的药效试验结果表明, 甲基营养型芽孢杆菌可湿性粉剂防治黄瓜灰霉病效果最好, 与使用化学药剂防效差异极显著; 黄霄等^[23]测定了甲基营养型芽孢杆菌 BM-24 菜籽饼发酵液及 BM-24LB 发酵液的生防效果, 结果表明, 各发酵液对粉蕉苗期枯萎病均有一定防治作用, 并

且对其植株的生长也有影响；孙卓^[24]通过拮抗活性筛选，从人参根际土壤中获得甲基营养型芽孢杆菌 SZ-3，通过盆栽试验发现其防效均优于对照，广谱性良好。甲基营养型芽孢杆菌在植物病害的生物防治方面具有很大的开发和应用价值。本研究采用温室盆栽药效试验检测发现 *B. methylotrophicus* B16 对人参锈腐病的防治效果显著，保护作用和治疗作用防效分别达到 64.8% 和 58.6%，较对照差异显著，表明菌株 B16 具有很强的生防潜力。本试验将 *B. methylotrophicus* B16 应用于人参锈腐病害的防治中，证明该菌对这一病害有显著的生防效果，有被研发成为人参锈腐病生防菌的潜质。

参 考 文 献

- [1] Seifert KA, McMullen CR, Yee D, et al. Molecular differentiation and detection of ginseng-adapted isolates of the root rot fungus *Cylindrocarpon destructans*[J]. *Phytopathology*, 2003, 93(12): 1533-1542
- [2] Bai RL, Wang ZQ. Some biochemical changes in ginseng root infected by *Cylindrocarpon destructans*[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1989, 19(2): 75-78 (in Chinese)
白容霖, 王子权. 人参锈腐病参根体内若干生物化学变化[J]. *植物病理学报*, 1989, 19(2): 75-78
- [3] Hayward DG, Wong JW. Organohalogen and organophosphorous pesticide method for ginseng root—a comparison of gas chromatography-single Quadrupole mass spectrometry with high resolution time-of-flight mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(14): 5716-5723
- [4] Wang SJ, Zhang AH, Chen XL, et al. Pesticides screening against ginseng root rust rot[J]. *Agrochemicals*, 2011, 50(6): 449-451 (in Chinese)
王士杰, 张爱华, 陈晓林, 等. 人参锈腐病新型药剂筛选试验[J]. *农药*, 2011, 50(6): 449-451
- [5] Wei JY, Feng L, Li YN, et al. Fermentation condition optimization of endogenous *Bacillus amyloliquefaciens* X-278[J]. *Northern Horticulture*, 2015(5): 106-110 (in Chinese)
魏娇洋, 冯龙, 李亚宁, 等. 内生解淀粉芽孢杆菌 X-278 发酵条件的优化[J]. *北方园艺*, 2015(5): 106-110
- [6] Zhang YQ, Lai HX, Wei XM, et al. Screening and identification and antagonism research of two biocontrol bacillus strains[J]. *Microbiology China*, 2014, 41(2): 281-289 (in Chinese)
张艳群, 来航线, 韦小敏, 等. 两株生防芽孢细菌筛选、鉴定及拮抗研究[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(2): 281-289
- [7] Luo Z, Chen CF, Bai XH, et al. Optimization of *Bacillus subtilis* BHI344 cultivation conditions[J]. *China Feed*, 2007(10): 41-43 (in Chinese)
罗璋, 陈昌福, 白晓慧, 等. 枯草芽孢杆菌 BHI344 培养条件的优化[J]. *中国饲料*, 2007(10): 41-43
- [8] Li YG, Song XS, Zhao XY, et al. Preliminary characterization of *Bacillus subtilis* strain L1[J]. *Plant Protection*, 2008, 34(1): 57-61 (in Chinese)
李永刚, 宋兴舜, 赵雪莹, 等. 生防枯草芽孢杆菌 L1 特性的初步研究[J]. *植物保护*, 2008, 34(1): 57-61
- [9] Ding CZ, Qiu JY, Liu WC, et al. Optimization of media components and cultural conditions for improving antagonistic activity of *Bacillus subtilis* B02[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2008, 24(2): 159-163 (in Chinese)
丁翠珍, 裘季燕, 刘伟成, 等. 枯草芽孢杆菌 B02 产生拮抗物质培养基及发酵条件优化[J]. *中国生物防治*, 2008, 24(2): 159-163
- [10] Madhaiyan M, Poonguzhali S, Kwon SW, et al. *Bacillus methylotrophicus* sp. nov., a methanol-utilizing, plant-growth-promoting bacterium isolated from rice rhizosphere soil[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(10): 2490-2495
- [11] New bacillus will be registered in our country first[J]. *Contemporary Chemical Industry*, 2016, 45(1): 47 (in Chinese)
新型芽孢杆菌将在我国首获登记[J]. *当代化工*, 2016, 45(1): 47
- [12] Zhao ZL, Liu XZ, Wei XY, et al. Screening and identification of available endophytes in roots of *Panax ginseng*[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2015, 46(14): 2143-2148 (in Chinese)
赵智灵, 刘学周, 魏晓雨, 等. 人参可利用内生菌株的筛选和鉴定[J]. *中草药*, 2015, 46(14): 2143-2148
- [13] Zhang JZ. *Microbiological Taxonomy*[M]. Shanghai: Fudan University Press, 1990: 67-69 (in Chinese)
张纪忠. *微生物分类学*[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1990: 67-69
- [14] Fu JF, Li YE, Zhou RJ, et al. Optimal fermentation condition of antagonistic bacteria strain HN01 against ginseng rust root rot[J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2012, 43(1): 12-17 (in Chinese)
傅俊范, 李玉娥, 周如军, 等. 人参锈腐病拮抗细菌 HN01 发酵条件优化[J]. *沈阳农业大学学报*, 2012, 43(1): 12-17
- [15] Zhou DQ. *Microbiology experimental tutorial*[M]. 3rd Edition. Beijing: Higher Education Press, 2011: 186-188 (in Chinese)
周德庆. *微生物学实验教程*[M]. 第3版. 北京: 高等教育出版社, 2011: 186-188
- [16] Ma FR, Xing YZ, Wang YQ. Preliminary study on investigation method of ginseng root rust rot[J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 1983(5): 9-10,15-16 (in Chinese)
马凤茹, 邢云章, 王韵秋. 人参锈腐病调查方法初探[J]. *中药材科技*, 1983(5): 9-10,15-16
- [17] Sun SS, Xia ZY, Wu DX. Optimizing fermentation condition for the *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 2013, 28(1): 36-43 (in Chinese)
孙沙沙, 夏振远, 吴德喜. 枯草芽孢杆菌 CG24 发酵条件优

- 化[J]. 云南农业大学学报, 2013, 28(1): 36-43
- [18] Zuo B, Wang Y, Wang R, et al. Optimization of shake flask fermentation condition for *Bacillus amyloliquefaciens* FS6[J]. Agrochemicals, 2016, 55(6): 408-411 (in Chinese)
左冰, 王燕, 王睿, 等. 解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) FS6 摇瓶发酵条件优化[J]. 农药, 2016, 55(6): 408-411
- [19] Karim MIA, Lucas RJ, Osborne KJ, et al. The effect of oxygen on the sporulation and toxicity of *Bacillus sphaericus* 2362[J]. Biotechnology Letters, 1993, 15(1): 47-50
- [20] Xiang J, Zhang JH, Chai HY, et al. Fermentation optimization for aminopeptidase production of *Bacillus methylotrophicus*[J]. China Brewing, 2012, 31(15): 45-50 (in Chinese)
向军, 张金虎, 柴海云, 等. 甲基营养型芽孢杆菌产氨肽酶的发酵优化[J]. 中国酿造, 2012, 31(15): 45-50
- [21] Li RJ, Zhang T, Jiang B, et al. Optimization of culture conditions for levansucrases by *Bacillus methylotrophicus* SK21.002[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(7): 157-161 (in Chinese)
李润静, 张涛, 江波, 等. 甲基营养芽孢杆菌 SK21.002 产果聚糖蔗糖酶的发酵条件优化[J]. 食品工业科技, 2013, 34(7): 157-161
- [22] Liu LQ, Yang SL, Chen Q, et al. Field efficacy test of 3 million/g *Bacillus methylotrophicus* strain wilt control cucumber botrytis cinerea[J]. Xiandai Nongye Keji, 2014(9): 130,133 (in Chinese)
刘利强, 杨士玲, 陈强, 等. 30 亿个/g 甲基营养型芽孢杆菌可湿性粉剂防治黄瓜灰霉病田间药效试验[J]. 现代农业科技, 2014(9): 130,133
- [23] Huang X, Zhou DB, Zhang XY, et al. Effects of *Bacillus methylotrophicus* BM-24 and rapeseed fermentation broths on dwarf banana fusarium wilt[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2014, 30(3): 361-369 (in Chinese)
黄霄, 周登博, 张锡炎, 等. 甲基营养型芽孢杆菌 BM-24 菜籽饼发酵液对粉蕉枯萎病防效研究[J]. 中国生物防治学报, 2014, 30(3): 361-369
- [24] Sun Z. Study on screening of bacteria for ginseng pathogenic fungal disease and effect of ginseng disease control[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin Agricultural University, 2014 (in Chinese)
孙卓. 人参病害生防细菌的筛选及其防病作用研究[D]. 长春: 吉林农业大学硕士学位论文, 2014

~~~~~

## 编辑部公告

### 邀请您关注《微生物学通报》公众微信号

为了更好地与读者、作者、审稿专家和编委朋友们及时沟通、方便服务,《微生物学通报》已开通公众微信服务号。作者通过微信能及时收到稿件各流程通知,第一时间了解稿件进程并及时处理;审稿专家和编委可通过微信及时收到审稿邀请,还可通过手机审稿;读者通过微信可了解《微生物学通报》文章目录,查找阅读感兴趣的文章。

#### 关注办法:

- 1、在微信公众号搜索“微生物学通报”或“wswxtb”;
- 2、用微信扫右边二维码:

