

蜡质芽孢杆菌 AR156 发酵培养基及 发酵条件的优化

张文芝 王云鹏 刘红霞 郭坚华*

(南京农业大学植物保护学院植物病理学系 江苏省生物源农药工程中心 农业部作物病虫害监测与防控重点开放
实验室 江苏 南京 210095)

摘要: 对前期筛选得到的在田间试验中防治根结线虫效果较好的蜡质芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) AR156, 通过单因素筛选及正交试验的方法进行了发酵培养基优化, 得到的最佳配比为: 麦芽糖 0.25%, 玉米粉 0.5%, 黄豆粉 0.5%, 胰蛋白胨 0.5%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.05%, K_2HPO_4 0.1%。同时对实验室摇瓶条件下液体发酵的主要影响因子温度、转速、初始 pH 值等进行实验探讨, 确定了最佳培养条件: 初始 pH 值 7.0, 装液量 200 mL/L, 接种量 5%, 发酵温度 28°C, 转速 200 r/min, 发酵时间 48 h。优化后芽孢产量为 1.03×10^9 CFU/mL, 芽孢生成率在 97%以上, 明显高于初始发酵培养基发酵结果。

关键词: 蜡质芽孢杆菌, 培养基优化, 单因素试验, 正交试验, 发酵条件优化

Optimization of Medium Components and Cultural Conditions of *Bacillus cereus* AR156

ZHANG Wen-Zhi WANG Yun-Peng LIU Hong-Xia GUO Jian-Hua*

(Key Laboratory of Monitoring and Management of Crop Diseases and Pest Insects, Ministry of Agriculture, Engineering Center of Bioresource Pesticide in Jiangsu Province, Department of Plant Pathology, College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: The single factor experiments and orthogonal experiments were adopted to optimize the liquid fermentation medium and conditions of the biocontrol agent of *Bacillus cereus* AR156. The results indicated that the constituents of medium, the filling volume of shaking flask, the rotation speed and the temperature were the major factors that affect the yield of AR156. The composition of maltose 0.25%, maizena 0.5%, soybean flour 0.5%, tryptone 0.5%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.05% and K_2HPO_4 0.1% were selected to be the medium formula, and the fermentation conditions were the filling volume 200 mL in 1L shaking flask, inoculum 5%, 28°C, shaking at 200 r/min for 48 h, and initial pH at

基金项目: 公益性行业科研专项项目(No. 200903052); 江苏省科技创新与成果转化专项引导资金项目(No. BY2009157); 江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室开放基金资助项目(No. HZHL0808); 北京市农委 2007 年度政府购买科技服务项目的子课题(No. BJNY2007-03-02)

* 通讯作者: Tel: 86-25-84395425; E: jhguo@njau.edu.cn

收稿日期: 2009-12-16; 接受日期: 2010-03-08

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

7.0. Under the optimized fermentation conditions the production of spores was up to 1.03×10^9 CFU/mL, and the rate of spores was more than 97%.

Keywords: *Bacillus cereus*, Medium optimization, Single factor experiment, Orthogonal experiment, Fermentation conditions optimization

生物农药因其符合环境保护、食品安全和人类健康的需要,已成为目前条件下化学杀菌剂的理想替代品,而获得高效拮抗菌是生物防治的基础^[1]。芽孢杆菌属(*Bacillus* spp.)是土壤和植物微生态的优势种群,作为植物根际有益微生物,通过分泌抗生物质和生长竞争在防治植物病害方面发挥多种有益作用^[2]。

对于芽孢杆菌类的生物制剂,要使在田间施用时可以较长时间地发挥抑菌作用,就要保证其能以利于在环境中存活、定殖与繁殖的耐热、抗逆性芽孢的形态存在,这也为活菌制剂的加工和延长货架期提供了有利的条件^[3-4]。生产上芽孢杆菌的发酵培养基配方的主要成分有玉米粉、葡萄糖、豆饼粉、鱼粉以及其它一些微量元素。但由于配比的不当使得发酵液含菌量不高。发酵培养基的成分对芽孢杆菌发酵后芽孢产量有很大的影响^[5]。

本试验以获得价廉高效的发酵培养基,提高AR156发酵后菌体及芽孢产量为目标,对在温室及大田条件下防治根结线虫效果较好的蜡质芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) AR156进行的摇瓶发酵培养基及其发酵条件的优化研究,以期为该菌株的进一步开发应用提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株: 蜡质芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) AR156, 从健康番茄植株根际土壤中分离获得,由南京农业大学植物保护学院生物源农药研发实验室鉴定保存。

1.1.2 培养基: LB (Luria-Bertani)培养基(1 L): 胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 10 g, 补足水至 1 L, 用 1 mol/L 的 NaOH 调节 pH 至 7.0-7.2, 固体培养基在以上成分基础上加入 12 g 琼脂粉, 分装后 1×10^5 Pa 灭菌 20 min, 备用。本实验所用到的种子培养液即 LB 培养液。

1号发酵培养基(1 L): 玉米粉 10 g, 大豆蛋白胨 5 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.39 g; 2号发酵培

养基(1 L): 在 1 号培养基基础上添加 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.22 g; 3号发酵培养基(1 L): 在 1 号培养基基础上添加 K_2HPO_4 1 g; 4号发酵培养基(1 L): 在 1 号培养基基础上添加 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.22 g, K_2HPO_4 1 g。

上述发酵培养基制作时先将玉米粉加水煮沸后过滤,去除滤渣,补足水至 1 L, 用 1 mol/L 的 NaOH 调节 pH 至 7.0, 按照 200 mL/L 的量分装后 1×10^5 Pa 灭菌 20 min, 备用。

1.2 方法

1.2.1 种子菌液制备: 挑取一个活化的 AR156 菌株单菌落于液体种子培养基中, 30°C、180 r/min 条件下培养 16-18 h, 此时菌量约为 10^8 CFU/mL, 作为种子菌液。

1.2.2 初始发酵培养基的筛选: 参照丁翠珍^[6], 张丽霞^[7], 李野^[8]等的芽孢杆菌发酵培养基配方进行尝试初筛后得到 4 种效果较好的作为待选的初始发酵培养基。将制备好的种子菌液按照 1% 的接种量分别接于各初始发酵培养基中, 于 30°C、180 r/min 条件下培养 48 h, 待其充分发酵产孢, 每个处理做 3 个重复。

1.2.3 发酵培养基组分的单因素筛选: 选取发酵后菌体及芽孢产量最高的发酵培养基作为初始发酵培养基, 进行培养基组分的单因素筛选试验。

最佳碳源筛选: 分别以含量为 1% (W/V) 的葡萄糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖、可溶性淀粉、玉米淀粉、山梨酸等 7 种碳源去替换初始发酵培养基中的玉米粉, 其他成份不变, 以玉米粉和不加碳源为对照。三角瓶中的装液量为 200 mL/1000 mL, 按 1% 的接种量接种培养 16-18 h 的摇培种子液, 于 180 r/min、30°C 条件下摇培 48 h。每个处理做 3 个重复。

最佳氮源筛选: 分别以含量为 1% (W/V) 的蛋白胨、酵母粉、胰蛋白胨、黄豆粉、麸皮、尿素、 NH_4NO_3 、 NH_4Cl 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 等 9 种氮源去替换初始发酵培养基中的大豆蛋白胨, 以大豆蛋白胨和不加氮源为对照。其它发酵条件同上。

1.2.4 正交试验优化培养基成分及配比: 对筛选得到的最佳碳源麦芽糖(A)、玉米粉(B)和最佳氮源黄

豆粉(C)、胰蛋白胨(D), 以及发酵培养基中无机盐 E ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), F ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), G (K_2HPO_4)进行 7 因素 3 水平的正交试验, 考虑到碳源与氮源之间的交互, 采用 $\text{L}_{27}(3^3)$ 正交表确定各组分的最佳配比, 共 27 个处理组合, 每个处理做 3 个重复。正交试验各因素及水平见表 1。

表 1 正交试验因素水平 Table 1 The factors and levels of the orthogonal experiment							
水平 Level	因子 Factor (%)						
	A	B	C	D	E	F	G
3	1.00	1.00	1.00	1.00	0.20	0.20	0.20
2	0.50	0.50	0.50	0.50	0.10	0.10	0.10
1	0.25	0.25	0.25	0.25	0.05	0.05	0.05

1.2.5 最佳培养条件的筛选: 初始 pH 分别设 5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、9.0; 装液量分别设为在 1000 mL 的三角瓶中装入体积为 50、100、200、250、300、350、400、500 和 600 mL 的优化培养基; 将接种量分别调节为 1%、2%、4%、5%、8%和 10%; 发酵温度分别设为 20℃、25℃、28℃、30℃、32℃、37℃ 和 42℃; 摇床转速分别调节为 100、150、180、200 和 220 r/min; 培养时间分别为 6、12、18、24、30、36、42、48、54 和 60 h, 每处理 3 个重复。

1.2.6 活菌数及芽孢数检测方法: 将上述发酵液稀释至 10^{-5} – 10^{-7} , 然后各取 10 μL 点于 LB 平板上, 每个浓度 4 个重复, 24 h 后计算活菌数。将所取发酵液用 80℃ 水浴 10 min 后按照活菌检测方法点板检测芽孢^[9–10]。

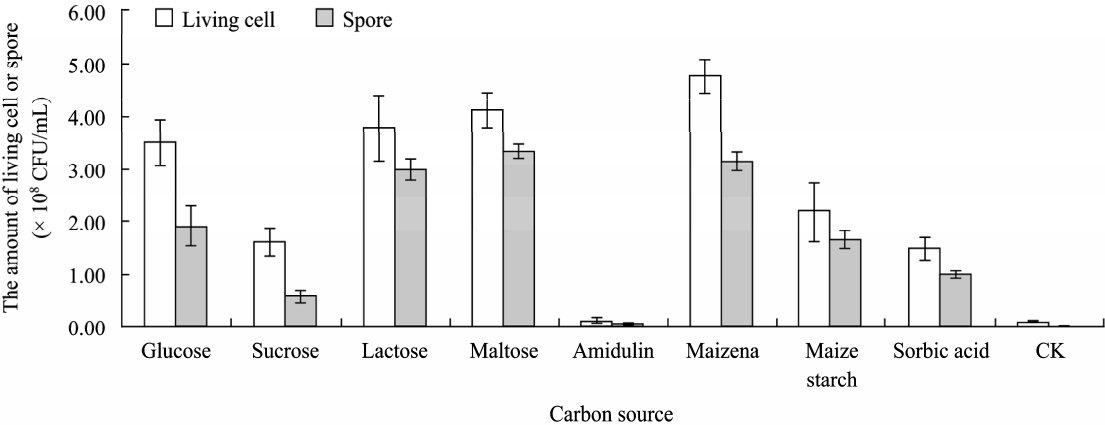


图 2 不同碳源对 AR156 发酵的影响
Fig. 2 Effects of different carbon source on the fermentation of AR156

2 结果与分析

2.1 初始发酵培养基的筛选

对所选的 4 种初始发酵培养基进行筛选, 结果表明 3 号培养基效果较好, 菌量及芽孢产量高于其他培养基, 菌量达到 4.16×10^8 CFU/mL, 芽孢生成量为 2.63×10^8 CFU/mL (图 1)。经计算芽孢生成率仅为 63.22%, 在接下来的试验中可以通过对发酵培养基及培养条件进行优化从而提高菌量, 尤其是芽孢的产量, 进而提高芽孢生成率。

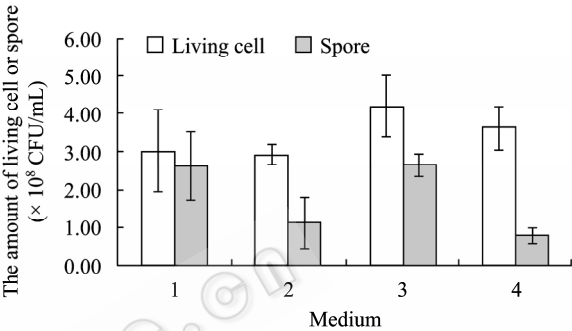


图 1 初始发酵培养基的筛选比较
Fig. 1 Comparison and selection of the initial fermentation medium

2.2 发酵培养基组分的单因素筛选

2.2.1 碳源的筛选: 碳源的单因素筛选结果如图 2 所示, 当玉米米粉作为碳源时, 发酵后菌量最大, 达到 4.76×10^8 CFU/mL, 其后菌量大小依次为麦芽糖 > 乳糖 > 葡萄糖 > 不加碳源 > 玉米淀粉 > 蔗糖、淀粉、山梨酸; 从芽孢生成量上来看, 麦芽糖作为碳源时, 发酵后芽孢产量最高, 达到 $3.34 \times$

10^8 CFU/mL, 其次分别是乳糖 > 玉米粉 > 不加碳源 > 玉米淀粉 > 葡萄糖 > 山梨酸、蔗糖、可溶性淀粉。

综合菌体产量、芽孢产量数据, 麦芽糖应为最佳碳源。同时发现以玉米粉作为碳源时, 芽孢生成率虽然表现中等, 但是菌量及芽孢生成量均较高, 且材料易得, 成本低廉, 因此选择麦芽糖与玉米粉作为复合碳源。

2.2.2 氮源的筛选: 对氮源进行单因素筛选, 当黄

豆粉作为氮源时, 发酵后菌量最大, 达到 4.56×10^8 CFU/mL, 其余菌量大小依次为胰蛋白胨 > 大豆蛋白胨 > 蛋白胨 > 麸皮 > $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ > NH_4NO_3 > 不加氮源 > NH_4Cl > 尿素 > 酵母粉; 从芽孢生成量上来看, 胰蛋白胨作为氮源时, 发酵后芽孢产量最高, 达到 3.50×10^8 CFU/mL, 其次分别是黄豆粉 > 大豆蛋白胨 > 麸皮 > 蛋白胨 > $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ > NH_4Cl > NH_4NO_3 > 不加氮源 > 酵母粉 > 尿素(图 3)。

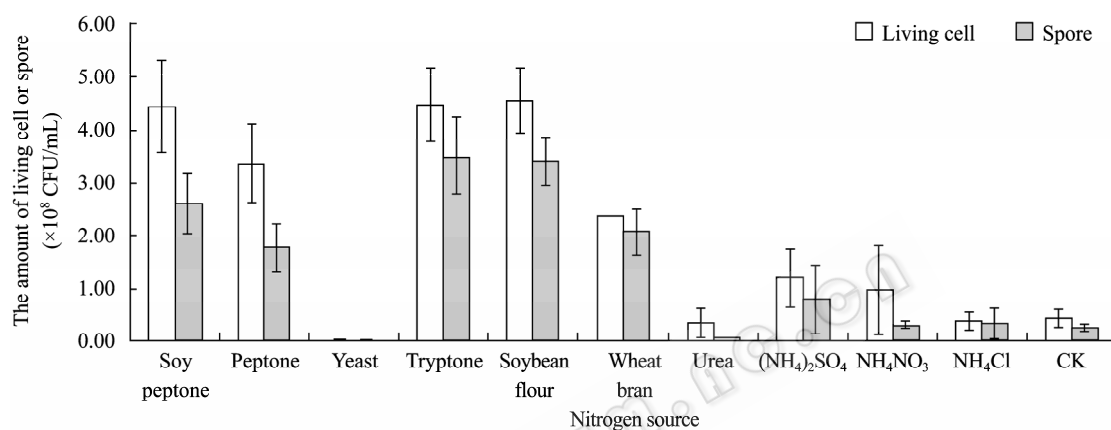


图 3 不同氮源对 AR156 发酵的影响

Fig. 3 Effects of different nitrogen sources on the fermentation of AR156

综合上述数据可以看出, 有机氮源如黄豆粉、大豆蛋白胨等在促进 AR156 发酵时活菌的增殖、芽孢的产生有较好的作用, 明显好于加入等量的无机氮源 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4NO_3 等。同时发现以黄豆粉和胰蛋白胨分别作氮源时, 其在促进菌量的增加、芽孢的产生作用基本相同, 考虑到原材料成本及其易得性, 选择黄豆粉和胰蛋白胨作为复合氮源更为经济。

2.3 正交试验优化培养基成分及配比

通过上述碳源和氮源单因素试验的研究, 确定了液体发酵培养基的最佳碳源和氮源的种类以及比较合适的碳源、氮源浓度。为进一步研究相关营养因子之间的相关性, 选取发酵培养基的主要成分麦芽糖(A)、玉米粉(B)、黄豆粉(C)、胰蛋白胨(D)、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (E)、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (F)、 K_2HPO_4 (G) 7 个因素, 进行正交实验。每个因素取 3 个水平, 考虑到麦芽糖(A)、玉米粉(B)、黄豆粉(C)以及胰蛋白胨(D)

之间的互作对发酵的影响, 按 $L_{27}(3^3)$ 设计试验。试验设计及研究结果由表 2、表 3 可知, 极差值 R 的大小分别为 $A > F > D > E > G > C > B$ 。碳源选麦芽糖优于玉米粉; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 对芽孢形成起重要作用, 影响甚至超过氮源; 玉米粉在液体发酵中的作用最小。在互作中麦芽糖(A)与黄豆粉(C)之间的互作影响因子排第 4 位, 说明了碳源和氮源配比对发酵后芽孢的生成有一定的影响。结合 K 值, 本研究中选出的最佳配比为 $A_1F_1D_2E_1G_2C_2B_2$, 同时也可由正交试验效应曲线图^[11](图 4)上直观的得到各因素最佳水平从而得到最佳配比。

2.4 最佳培养条件的筛选

2.4.1 最佳初始 pH 值: 测定了 5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、9.0, 7 个 pH 值对菌量及芽孢产量的影响。发酵培养基初始 pH 为 5.0–7.0 时, 与菌体及芽孢增殖呈正相关; 7.0–9.0 时呈负相关(图 5)。当 pH 值为 7.0 时最适于菌体及芽孢增殖。

表 2 液体发酵培养基正交试验 $L_{27}(3^{11})$ 加样表及实验结果
Table 2 $L_{27}(3^{11})$ orthogonal design and results for liquid medium optimization

试验号 Test No.	列号及效应 Array and efficiency							芽孢数量 The amount of spore ($\times 10^8$ CFU/mL)
	A	B	C	D	E	F	G	
1	1	1	1	1	1	1	1	5.008
2	1	1	2	2	2	2	2	6.500
3	1	1	3	3	3	3	3	0.588
4	1	2	1	2	2	3	3	4.725
5	1	2	2	3	3	1	1	3.667
6	1	2	3	1	1	2	2	8.425
7	1	3	1	3	3	2	2	0.505
8	1	3	2	1	1	3	3	6.633
9	1	3	3	2	2	1	1	8.763
10	2	1	1	2	3	2	3	3.908
11	2	1	2	3	1	3	1	0.003
12	2	1	3	1	2	1	2	3.592
13	2	2	1	3	1	1	2	4.638
14	2	2	2	1	2	2	3	6.250
15	2	2	3	2	3	3	1	0.006
16	2	3	1	1	2	3	1	0.655
17	2	3	2	2	3	1	2	5.913
18	2	3	3	3	1	2	3	0.006
19	3	1	1	3	2	3	2	0.005
20	3	1	2	1	3	1	3	3.108
21	3	1	3	2	1	2	1	0.004
22	3	2	1	1	3	2	1	0.768
23	3	2	2	2	1	3	2	0.016
24	3	2	3	3	2	1	3	0.004
25	3	3	1	2	1	1	3	3.313
26	3	3	2	3	2	2	1	0.026
27	3	3	3	1	3	3	2	0.455
K1	44.81	22.72	23.52	31.02	28.05	38.00	18.90	
K2	24.97	28.50	32.12	33.15	30.52	26.39	30.05	
K3	7.70	26.27	21.84	13.31	18.92	13.09	28.54	
M1	14.94	7.57	7.84	10.34	9.35	12.67	6.30	
M2	8.32	9.50	10.71	11.05	10.17	8.80	10.02	
M3	2.57	8.76	7.28	4.44	6.31	4.36	9.51	
R	12.37	1.93	3.42	6.61	3.87	8.31	3.72	

表 3 正交设计方差分析表
Table 3 Analysis of variance of orthogonal experimental design

变异来源 Variation	平方和 SS	自由度 DF	均方 MS	F 值 F value	显著水平 SL
A (%)	77.0731	2	42.1621	12.7510	0.0014
B (%)	1.9070	2	0.9525	0.3304	0.7486
A \times B	7.6374	2	3.7652		
A \times B	0.4543	2	0.2269		
C (%)	6.7841	2	3.7112	1.1224	0.4019
A \times C	16.3335	2	8.1579		
A \times C	3.2443	2	1.7748		
B \times C	9.5268	2	4.4301		
B \times C	1.9184	2	0.9571		
D (%)	28.9937	2	14.2939	4.3657	0.0414
E (%)	8.3620	2	4.1719	1.3702	0.3315
F (%)	37.4800	2	17.4287	5.8148	0.0200
G (%)	8.1716	2	4.4702	1.3519	0.3343
误差 Error	37.8269	13	3.1488		
总和 Total	219.8864				

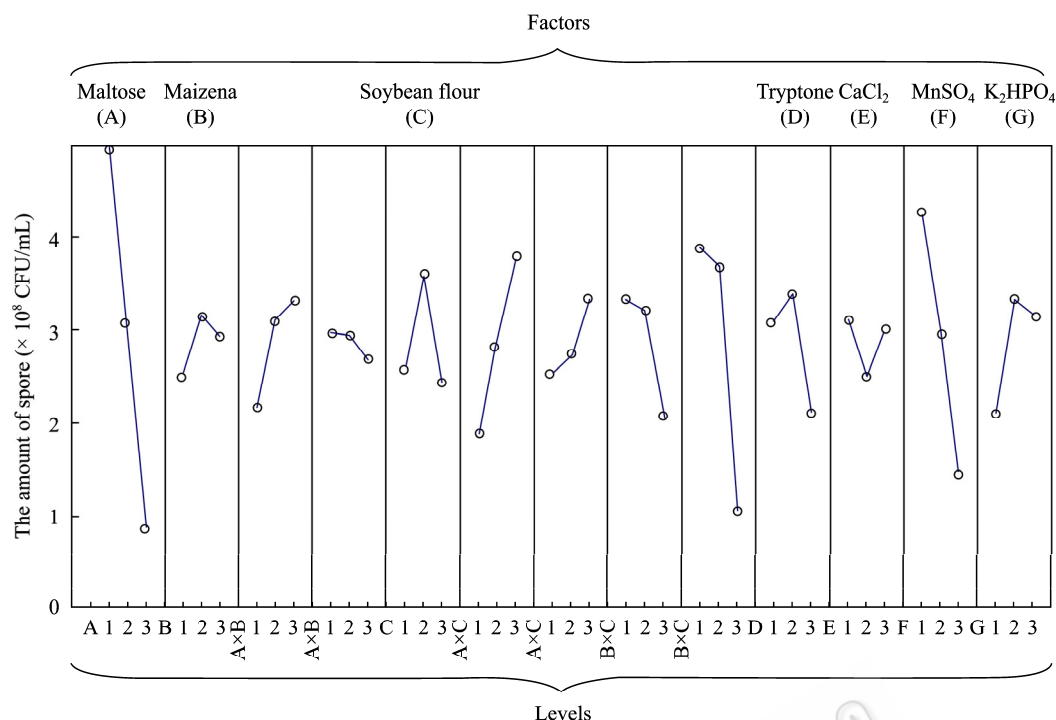


图4 正交效应曲线图

Fig. 4 Curve diagram of orthogonal experimental design effectiveness

注: 图中所示为培养基中各组分对芽孢产量的影响。每因素分为低、中、高3种水平(表1所描述), ○代表在各因素选取不同水平时发酵后芽孢的产量。

Note: Graphical analysis of the relationship between media formulation and spore production. The ○ represent the spore production of different factors at their different levels. The factors levels coded are: low, medium, and high as presented in Table 1.

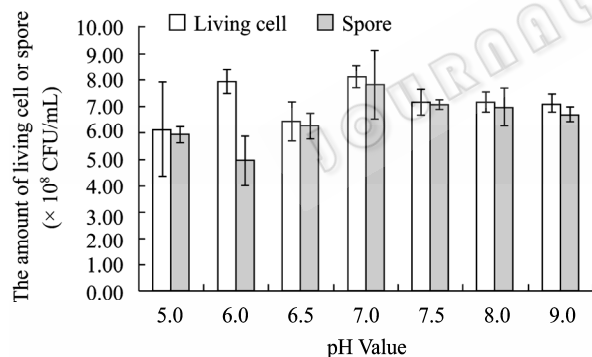


图5 初始 pH 值对菌体及芽孢产量的影响

Fig. 5 Effect of initial pH value of media on living cell and spore yield

2.4.2 最佳装液量: 对发酵时培养基装液量进行试验, 在装液量为 200 mL/L 时发酵后菌体及芽孢量达到最大。虽然装液量低于 200 mL 时活菌及芽孢产量较高, 即溶氧量充足时产量较高, 但若在 1000 mL 三角瓶内装液量过少, 可能由于发酵过程中的水分蒸发而使培养基中各组分的浓度发生改变, 产生一定的试验偏差, 另外因发酵液体积小而导致发酵规模缩小, 因此实际意义不大。随着装液量的增加, 发酵过程中溶氧量不足, 菌体及芽孢生长受到抑制,

菌体和芽孢的产量逐渐降低(图6)。因此对于本实验来说, 每三角瓶装液量 200 mL 较为合理, 可满足发酵过程中对溶氧的要求, 且发酵后菌体及芽孢产量较高。

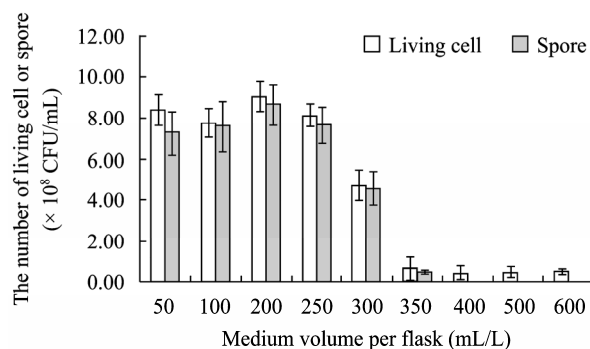


图6 装液量对菌体及芽孢产量的影响

Fig. 6 Effect of medium volume per flask on living cell and spore yield

2.4.3 最佳接种量: 接种量的试验结果表明, 接种量在1%–5%的范围内时其与菌体产量呈正相关, 在5%–10%的范围内呈负相关; 当接种量为5%时, 菌体产量最大(图7)。芽孢产量随接种量的不同, 其变

化趋势与菌体产量的变化趋势较为一致,也在接种量为5%时达到最大。综合考虑菌体产量及成本,选择5%接种量作为本实验的最佳接种量。

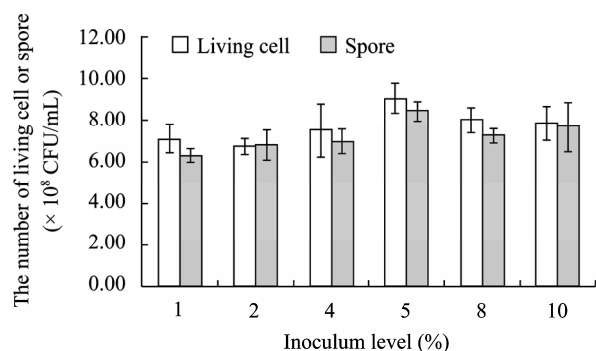


图7 接种量对菌体及芽孢产量的影响

Fig. 7 Effect of seed volume on living cell and spore yield

2.4.4 最佳发酵温度: 分别在不同温度下进行发酵,结果表明发酵温度为28℃最有利于菌体和芽孢的增殖,温度升高到37℃以上时芽孢产量显著降低。但在25℃–32℃范围内菌体及芽孢均可较好生长,在温度为20℃–28℃时与菌量及芽孢产量呈正相关,30℃–42℃时呈负相关(图8)。综合上述因素,选择28℃为本实验最佳发酵温度。

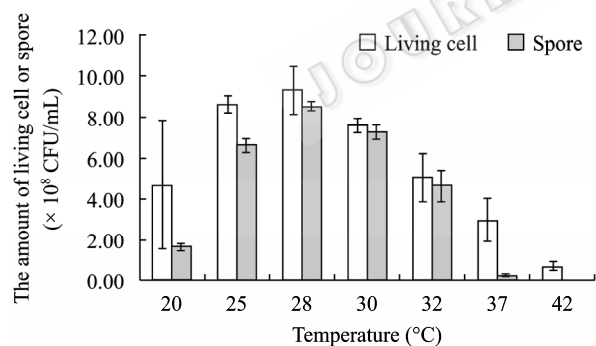


图8 发酵温度对菌体及芽孢产量的影响

Fig. 8 Effect of temperature on living cell and spore yield

2.4.5 最佳转速: 在所设的5个不同处理中,当摇床转速为200 r/min时,菌体及芽孢产量明显高于其他处理(图9)。而当转速为100 r/min时芽孢基本不生成。对好氧的芽孢杆菌来说,装液量与转速会影响发酵过程中的溶氧量,从而影响培养基中的溶氧水平,进而影响其芽孢的生成量。因此选择200 r/min作为本实验的最佳转速。

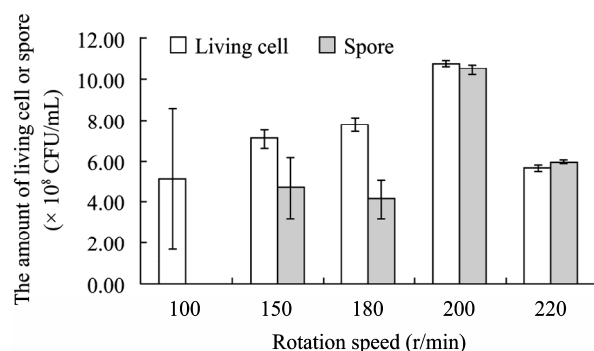


图9 转速对菌体及芽孢产量的影响

Fig. 9 Effect of shaking speed on living cell and spore yield

2.4.6 最佳发酵时间: 在发酵过程中,每隔6 h对发酵液中菌量及芽孢量进行测定,结果表明在0–48 h时随着时间的增加,菌体及芽孢产量呈对数增长,芽孢量略低于菌体量。在24 h时芽孢生成量较低,而在48 h时菌量及芽孢产量均达到最大。48–60 h菌量及芽孢产量趋于稳定即进入平台期(图10)。因此本实验所选择的最佳发酵时间为48 h。

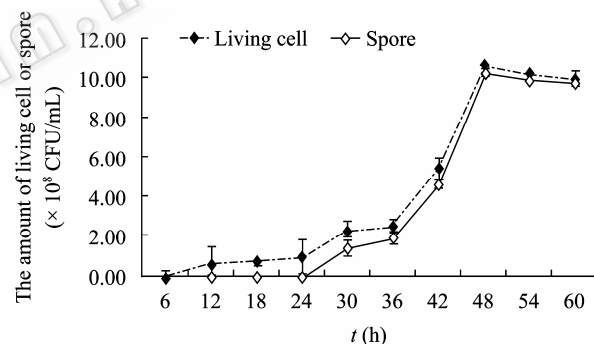


图10 发酵时间对菌体和芽孢产量的影响

Fig. 10 Effect of fermentation time on living cell and spore yield

2.5 优化验证试验

综合上述实验,得到优化后的发酵培养基配方为:麦芽糖 0.25%,玉米粉 0.5%,黄豆粉 0.5%,胰蛋白胨 0.5%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.05%, K_2HPO_4 0.1%。确定了最佳培养条件:初始 pH 值 7.0,装液量为200 mL/L,接种量为5%,发酵温度为28℃,转速为200 r/min,发酵时间为48 h。进行相关的验证试验,培养基及培养条件的优化后,AR156 发酵后菌量及芽孢量均有了显著的提高(图11),菌量达到 1.06×10^9 CFU/mL,芽孢量达到 1.03×10^9 CFU/mL,芽孢生成率达到97%以上。

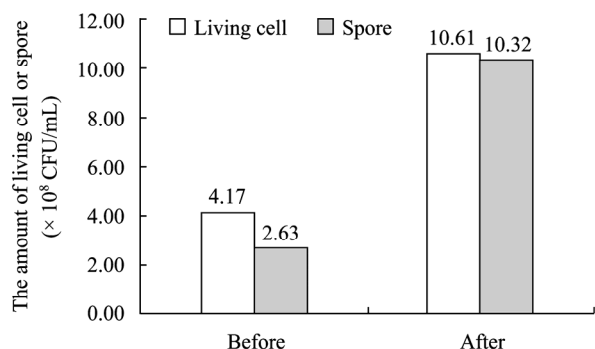


图 11 发酵优化前后菌体及芽孢产量的对比

Fig. 11 Comparison of the living cell and spore yield before and after the optimization

3 讨论

具有潜力的生防芽孢杆菌在批量生产过程中最为重要的是以芽孢作为主要成份,但芽孢的形成并不是细菌生活史中的一个必要过程,其形成与菌种本身有关,不同菌种形成条件不同,同时芽孢形成还受到营养物质及环境因素的影响^[12]。

在对 AR156 发酵培养基碳源的筛选中,结合菌体及芽孢产量,兼顾成本及材料易得性,最终选择了麦芽糖与玉米粉作为复合碳源,即速效碳源及长效碳源搭配。同样选择了速效氮源胰蛋白胨及长效氮源黄豆粉搭配作为复合氮源。对于发酵培养基各成分的配比浓度优化采用了正交试验法。该方法在工农业生产和其他科学研究领域中得到广泛的应用^[13-14]。

在培养条件的优化试验中,发现 AR156 对外界 pH 环境的适应性较强,在选择到的 7 个不同 pH 值环境下均可生长,这也解释了其在各种自然土壤中大量存在的情况^[15]。在进行装液量及转速试验中,发现不同转速、不同的装液量导致的不同溶氧条件对发酵后菌量及芽孢量的影响较大,说明蜡质芽孢杆菌 AR156 为好氧菌,其生长需要较好的溶氧条件,特别是在菌体对数生长期和芽孢形成时期,在其他发酵条件一定的情况下,培养基中的溶氧水平越高越有利于芽孢的产生,但通气量过大即溶氧过量时,反而会因菌体自溶使芽孢数下降。

优化后蜡质芽孢杆菌 AR156 菌体及芽孢的产量较优化前有了显著的提高,但本研究是在实验室摇瓶条件下进行,要实现产业化开发,还需进行发酵罐条件下的放大实验及相关剂型的开发研究,目前有关工作正在进行中。

参考文献

- [1] Cook RJ. Making greater use of introduced microorganism for biological control of plant pathogen. *Annual Review Phytopathology*, 1993(31): 53-58.
- [2] Xu J, Chen SW, Yu ZN. Optimization of process parameters for poly γ -glutamate production under solid state fermentation from *Bacillus subtilis* CCTCC202048. *Process Biochemistry*, 2005(40): 3075-3081.
- [3] 赵达, 刘伟成, 裴季燕, 等. 枯草芽孢杆菌 B03 液体发酵条件的优化. *中国生物防治*, 2008, **24**(2): 159-163.
- [4] 王健华. 枯草芽孢杆菌 DPG-01 发酵条件的优化. *安徽农业科学*, 2007(35): 8101-8106.
- [5] 储炬. 现代工业发酵调控学. 北京: 化学工业出版社, 2002: 251.
- [6] 丁翠珍, 裴季燕, 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. *中国生物防治*, 2008, **24**(2): 159-163.
- [7] 张丽霞, 李荣禧, 王琦, 等. 枯草芽孢杆菌发酵培养基的优化. *中国生物防治*, 2006, **22**(增刊): 82-88.
- [8] 李野, 张小平, 张克强, 等. 蜡质芽孢杆菌 DLSL22 发酵条件探讨及培养基优化. *微生物学通报*, 2005, **32**(2): 45-49.
- [9] 方中达. 植病研究方法. 第 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1999: 189-192.
- [10] Hoben HJ, Somasegaran P. Comparison of the pour, spread, and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. in inoculants made from Presterilized peat. *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, **44**(5): 1246-1247.
- [11] Parra R, Aldred D, Magan N. Medium optimization for the production of the secondary metabolite squalestatin S1 by a *Phoma* sp. combining orthogonal design and response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005(37): 704-711.
- [12] Kang BC, Lee SY, Chang HN. Enhanced spore production of *Bacillus thuringiensis* by fedbatch culture. *Biotechnology Letters*, 1992, **14**(8): 721-726.
- [13] 郝林华, 孙丕喜, 姜振波, 等. 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)液体发酵条件. *上海交通大学学报: 农业科学版*, 2006, **24**(4): 380-385.
- [14] 张根伟. 枯草芽孢杆菌 BS-6 液体发酵条件的研究. *河北省科学院学报*, 2005, **22**(1): 54-57.
- [15] 陈延熙, 陈璧, 潘贞德, 等. 增产菌的应用与研究. *生物防治通报*, 1985, **1**(2): 22-23.