

文章编号: 1674-7054(2013)03-0225-07

枯草芽孢杆菌 HAB-1 产生抗菌物质的 最优发酵条件

孙亮, 刘文波, 杨廷雅, 和虹宇, 邬国良, 张宇, 缪卫国, 郑服丛

(海南省热带生物资源可持续利用重点实验室/海南大学 环境与植物保护学院, 海口 570228)

摘 要: 为筛选适合 *Bacillus subtilis* HAB-1 生长和抑菌物质产生的最佳培养基和最佳培养条件, 采用摇瓶培养法和平板对峙法, 通过单因子试验筛选适合菌株 HAB-1 生长的碳源、氮源、金属离子及最佳培养条件。结果表明, 经摇瓶发酵培养筛选到适合菌株 HAB-1 生长及其拮抗物质产生的最佳碳源为蔗糖和玉米粉, 最佳氮源为酵母粉和麸皮, 最佳金属离子是 K^+ 。用正交试验法确定了使 HAB-1 具有较强抗菌活性的最优培养基为 ZY, 其各组分的质量浓度为: 蔗糖 $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 玉米粉 $30\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 酵母粉 $30\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 麸皮 $40\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, KH_2PO_4 $1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 在确定适合该菌株的培养基组分基础上, 对其培养条件进行优化试验, 结果表明, 初始 pH 为 6.0, 培养温度为 $37\text{ }^\circ\text{C}$, 250 mL 摇瓶装液量为 60 mL, 接种量的体积分数为 2%, 培养时间为 24 h, 转速为 $190\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 时为该菌株的最佳培养条件, 获得菌株 HAB-1 活菌数最多且对橡胶树炭疽菌的抑菌活性最强, 活菌数和抑菌直径分别为 $2.6 \times 10^{10} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 34.0 mm, 较 NB 培养的 HAB-1 提高了 123.81 倍和 1.10 倍。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 平板对峙; 摇瓶发酵; 优化

中图分类号: Q 936

文献标志码: A

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 对多种植物病害有明显的防治效果^[1-4]。发酵培养的优化改良涉及提高菌株生长繁殖速度及抗菌物质的分泌量 2 个方面, 可以通过发酵条件如 pH 值、温度、通气条件及发酵配方的优化来实现, 不同的菌株所需的条件也各异。张根伟对 *B. subtilis* BS-6 发酵培养基的组分和其他发酵条件进行研究, 使该菌的最后发酵水平为 $1.66 \times 10^9 \cdot \text{mL}^{-1}$, 较初始菌株有了很大提高^[5]; 郭小华等也在 *B. subtilis* MA139 增殖培养基的优化研究中, 使芽孢产量大幅度提高^[6]; 张丽霞等采用响应面分析法和 Plackett-Bruman 设计法, 在摇瓶发酵条件下, 使含菌量大大提高^[7]。菌株 HAB-1 是本实验室从植物根际土壤中分离获得的 1 株枯草芽孢杆菌。室内研究表明, 该生防菌对棉花立枯病菌 (*Rhizoctonia solani*)、棉花枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*)、棉花黄萎病菌 (*Verticillium dahliae*) 和橡胶炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 等植物病原真菌有较强的抑菌活性。笔者通过对菌株 HAB-1 产抗菌物质的发酵条件进行优化, 以期为该菌株在植物病害生物防治领域的实际应用提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料 枯草芽孢杆菌 HAB-1 (*Bacillus subtilis*) 和橡胶树炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 由本实验室分离、鉴定与保存。PDA, NB 和 NA 培养基配方见《植病研究方法》^[8]。基础发酵和种子培养基均为 NB 培养基。

收稿日期: 2013-04-23

基金项目: 国家重大基础研究计划项目 (2011CB111612); 国家自然科学基金项目 (31160359); 国家农业产业技术体系建设项目 (CARS-34-GW8); 教育部博士点基金项目 (20104601110004); 海南大学科研启动资金项目 (kyqd1006)

作者简介: 孙亮 (1988-), 男, 河南驻马店人, 海南大学环境与植物保护学院 2010 级硕士研究生。

通信作者: 缪卫国 (1969-), 男, 博士, 教授, 从事分子植物病理等研究。E-mail: weiguomiao1105@126.com;

郑服丛 (1956-), 男, 教授, 从事植物病理学研究。E-mail: zhengfucong@126.com

1.2 方法

1.2.1 种子菌液制备 将菌株 HAB-1 接种于 NA 培养基平板上, 37 °C 黑暗恒温培养 24 h, 得到活化的单菌落, 然后挑取单菌落接种于 NB 培养基中, 37 °C 200 r · min⁻¹ 条件下振荡培养 24 h, 得菌株 HAB-1 种子液。

1.2.2 抑菌活性测定 将直径 0.5 cm 橡胶树炭疽病菌菌饼接种于 PDA 平板的中央位置, 在距离中央 2.5 cm 的位置等距离接种菌株 HAB-1, 每个培养皿接种 4 次, 置于 28 °C 下暗培养至对照组病菌菌落直径长至整个培养皿的 2/3 时, 用十字交叉法测量病原菌菌落直径, 平板对峙法测定菌株 HAB-1 对供试病原菌的抑菌率^[8]。抑菌率计算公式:

$$\text{菌落直径/mm} = \frac{\text{水平直径} + \text{垂直直径}}{2}$$

$$\text{抑菌率} = \frac{\text{对照真菌菌落直径} - \text{处理真菌菌落直径}}{\text{对照真菌菌落直径}} \times 100\%$$

1.2.3 活菌数测定 将菌株 HAB-1 发酵液梯度稀释至 10⁻⁵ ~ 10⁻⁷, 采用平板计数法^[8], 分别取 100 μL 均匀涂布到 NA 培养基上, 24 h 后统计菌落数, 计算活菌数。

1.2.4 优化培养基的筛选 最佳碳源筛选: 分别用 $w = 2\%$ 的玉米粉、可溶性淀粉、甘露醇、山梨糖、木糖、麦芽糖、半乳糖、D-果糖、葡萄糖、蔗糖等 10 种碳源^[8], 替换基础培养基 NB 中的蔗糖, 调节培养基 pH 值至 7.0, 250 mL 三角瓶中装液量为 100 mL, 121 °C 灭菌 20 min。每个摇瓶中接种 1 mL 培养 24 h 的菌株 HAB-1 种子液, 于 37 °C 180 r · min⁻¹ 条件下培养 48 h。

最佳氮源筛选: 参照赵璐璐等^[14]的方法, 分别用 $w = 2\%$ 的麸皮、胰蛋白胨、牛肉膏、酵母粉、尿素、细菌学蛋白胨、硫酸铵、硝酸铵、 $m(\text{酵母粉}):m(\text{胰蛋白胨}) = 1:1$ 、 $m(\text{酵母粉}):m(\text{胰蛋白胨}):m(\text{硝酸铵}) = 2:2:1$ 等 10 种氮源, 替换基础培养基 NB 中的聚蛋白胨、牛肉膏和酵母粉, 其他条件同上。

最佳金属离子筛选: 用以上筛选出来的最佳碳源与氮源制成发酵培养基, 采用宋卡魏等^[11]报道的金属无机盐, 分别按 $w = 0.1\%$ 添加 KH₂PO₄, FeSO₄, ZnSO₄, NaCl, MnSO₄, MgSO₄, CaCO₃ 等 7 种无机盐, 对照为不添加无机盐离子的培养基, 其他条件同上。

培养基组分配比优化: 根据最佳碳源、氮源和金属离子的筛选结果, 通过正交实验设计, 选用 5 因素 4 水平 L₁₆(4⁵) 正交表确定各组分的最优配比, 以确定适宜菌株 HAB-1 生长和产生抗菌物质的优化培养基的最佳组合。

1.2.5 最佳培养条件的筛选 pH 值: 采用 0.1 mol · L⁻¹ 的 HCl 和 0.1 mol · L⁻¹ 的 NaOH 调节优化培养基 pH 值。分别将 pH 值为 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 9.0 的优化培养基 100 mL 装入 250 mL 三角瓶中, 121 °C 灭菌 20 min, 冷却后接种 1 mL 的 HAB-1 种子液, 37 °C 180 r · min⁻¹ 条件下培养 48 h。

培养温度: 在 250 mL 三角瓶中装优化培养基 100 mL, 121 °C 灭菌 20 min。每个摇瓶中接种 1 mL 的 HAB-1 种子液, 分别在 20, 25, 28, 32, 37, 42 °C, 180 r · min⁻¹ 条件下培养 48 h^[8]。

装液量: 在 250 mL 三角瓶中分别装入体积为 30, 60, 90, 120, 150 mL 的优化培养基, 121 °C 灭菌 20 min。每个摇瓶中接种 1 mL 的 HAB-1 种子液, 于 37 °C 180 r · min⁻¹ 条件下培养 48 h。

培养时间: 在 250 mL 三角瓶中装优化培养基 100 mL, 121 °C 灭菌 20 min。每个摇瓶中接种 1 mL 的 HAB-1 种子液, 于 37 °C 180 r · min⁻¹ 条件下将 HAB-1 菌株的培养时间分别调节为 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 120 h。

接种量: 在 250 mL 三角瓶中装优化培养基 100 mL, 121 °C 灭菌 20 min。将 HAB-1 种子液的接种量分别调节为 $\varphi = 1\%, 2\%, 4\%, 6\%, 8\%$, 于 37 °C 180 r · min⁻¹ 条件下培养 48 h。

转速: 在 250 mL 三角瓶中装优化培养基 100 mL, 121 °C 灭菌 20 min。每个摇瓶中接种 1 mL 的 HAB-1 种子液, 于 37 °C 下, 将摇床转速分别调为 120, 150, 180, 210, 240, 180 r · min⁻¹ 条件下培养 48 h。

1.2.6 培养基及培养条件优化前后 HAB-1 活菌数和抑菌活性比较 将菌株 HAB-1 种子液按 $\varphi = 1\%$ 的接种量接种于 NB 培养基中, 于 37 °C 180 r · min⁻¹ 条件下培养 48 h; 按 $\varphi = 2\%$ 的接种量接种于优化培养基 ZY 中, 于 37 °C 190 r · min⁻¹ 条件下培养 24 h。分别测定 HAB-1 的活菌数及抑菌活性。

1.3 数据分析 以上实验均重复 3 次以上, 数据采用 Excel 和 SAS 处理。

2 结果与分析

2.1 培养基的优化

2.1.1 碳源、氮源和金属离子对菌株 HAB-1 生长及活性的影响 最佳碳源筛选实验结果表明, 从菌株

HAB-1 的活菌数看,蔗糖作为碳源时,活菌数最多,达到 $4.63 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$,其他依次为玉米粉、半乳糖、可溶性淀粉、甘露醇、麦芽糖、D-果糖、葡萄糖、山梨糖;从抑菌活性看,玉米粉作为碳源时,菌株 HAB-1 的抑菌活性最强,抑菌圈平均直径为 29.67 mm,其他依次为 D-果糖、可溶性淀粉、甘露醇、蔗糖、麦芽糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、山梨糖(见图 1A)。因此,选用蔗糖和玉米粉作为优化培养基的复合碳源。

最佳氮源筛选实验结果表明,从菌株 HAB-1 的活菌数看,当酵母粉为氮源时,活菌数最多,达到 $7.77 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$,其他依次为 $m(\text{酵母粉}) : m(\text{胰蛋白胨}) = 1 : 1$ 、麸皮、 $m(\text{酵母粉}) : m(\text{胰蛋白胨}) : m(\text{硝酸铵}) = 2 : 2 : 1$ 、细菌学蛋白胨、胰蛋白胨、牛肉膏;从抑菌活性看,以麸皮为氮源时,抑菌活性最强,抑菌圈直径为 30.0 mm,其他依次为酵母粉、牛肉膏、胰蛋白胨、细菌学蛋白胨、 $m(\text{酵母粉}) : m(\text{胰蛋白胨}) : m(\text{硝酸铵}) = 2 : 2 : 1$ 、 $m(\text{酵母粉}) : m(\text{胰蛋白胨}) = 1 : 1$,尿素、硫酸铵、硝酸铵为氮源时 HAB-1 不生长(见图 1B)。因此,选用酵母粉和麸皮作为优化培养基的复合氮源。

金属离子的筛选实验结果表明,与不添加无机盐离子的培养基(对照)相比,只有添加 KH_2PO_4 的培养基显著增加菌株的活菌数,达到 $1.24 \times 10^9 \cdot \text{mL}^{-1}$,较对照高出 31.81%,说明 KH_2PO_4 能有效促进菌株 HAB-1 的生长,而且添加 KH_2PO_4 的 HAB-1 的抑菌活性最强,抑菌圈直径达到 34.7 mm;添加 NaCl , CaCO_3 , MgSO_4 的培养基,活菌数分别为 $7.53 \times 10^8 \cdot \text{mL}^{-1}$, $2.17 \times 10^8 \cdot \text{mL}^{-1}$, $4.30 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$,较对照分别减少 20.15%, 76.99%, 95.44%,但经这 3 种金属离子培养的菌株 HAB-1 的抑菌活性均比对照高。添加 FeSO_4 , MnSO_4 , ZnSO_4 的培养基,菌株 HAB-1 不生长,说明这 3 种金属离子均强烈抑制 HAB-1 的生长。因此,选用 K^+ 作为优化培养基的最佳金属离子(见图 1C)。

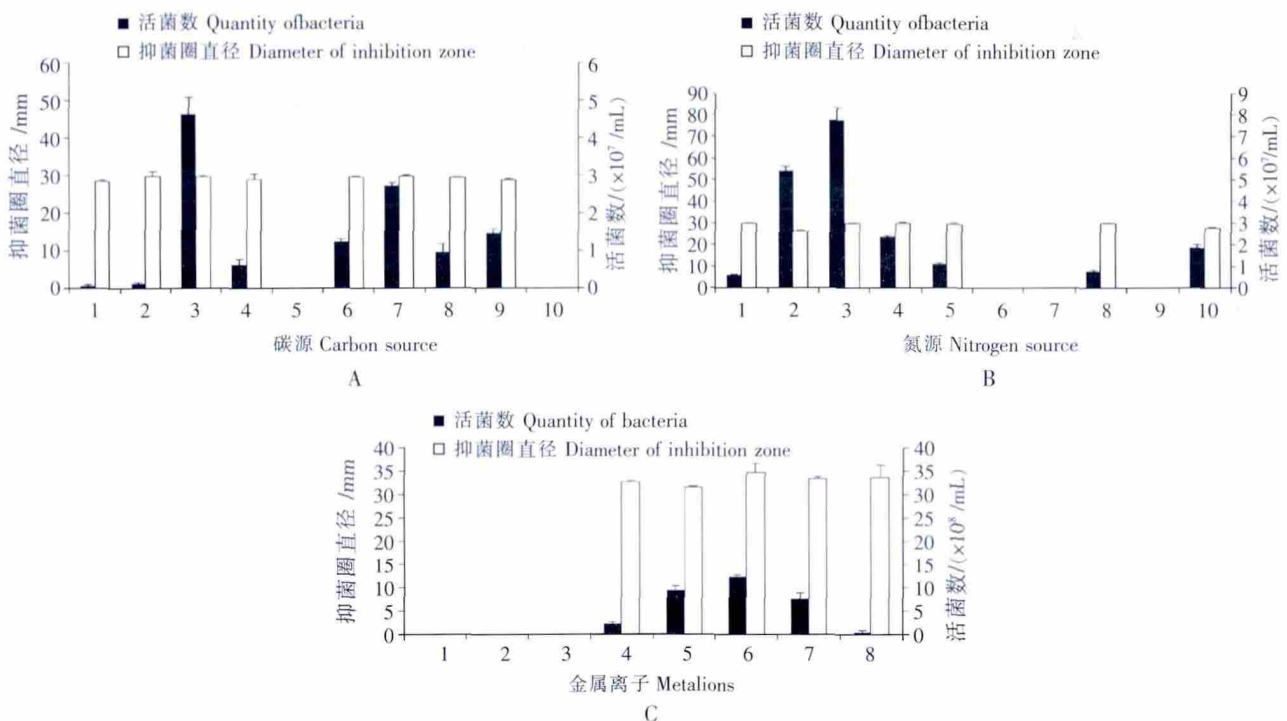


图1 碳源、氮源和金属离子对菌株 HAB-1 生长的影响

A: 1. 葡萄糖, 2. D-果糖, 3. 蔗糖, 4. 麦芽糖, 5. 木糖, 6. 可溶性淀粉, 7. 玉米粉, 8. 甘露醇, 9. 半乳糖, 10. 山梨糖; B: 1. 牛肉膏, 2. 酵母粉: 胰蛋白胨 = 1 : 1, 3. 酵母粉, 4. 麸皮, 5. 细菌学蛋白胨, 6. 尿素, 7. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 8. Tryptone, 9. NH_4NO_3 , 10. Yeast extract; Tryptone: $\text{NH}_4\text{NO}_3 = 2 : 2 : 1$; C: 1. FeSO_4 , 2. MnSO_4 , 3. ZnSO_4 , 4. CaCO_3 , 5. CK, 6. KH_2PO_4 , 7. NaCl , 8. MgSO_4

Fig. 1 Effects of carbon, nitrogen and metal ions on the growth of HAB-1 strain

A: 1. Glucose, 2. D-fructose, 3. Sucrose, 4. Maltose, 5. Xylose, 6. Soluble starch, 7. Corn flour, 8. Mannitol, 9. Galactose, 10. Sorbose; B: 1. Beef extract, 2. Yeast extract : Tryptone = 1 : 1, 3. Yeast extract, 4. Bran, 5. Bacterial peptone, 6. Urea, 7. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 8. Tryptone, 9. NH_4NO_3 , 10. Yeast extract : Tryptone : $\text{NH}_4\text{NO}_3 = 2 : 2 : 1$; C: 1. FeSO_4 , 2. MnSO_4 , 3. ZnSO_4 , 4. CaCO_3 , 5. CK, 6. KH_2PO_4 , 7. NaCl , 8. MgSO_4

2.2 产抗菌物质最优培养基的确定 通过正交实验设计对筛选到的最佳碳源、氮源和金属离子进行优化,结合 HAB-1 抑菌活性,最终确定菌株 HAB-1 的最优培养基,并命名为 ZY,其各组分质量浓度为: $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 玉米粉、 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖、 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 酵母粉、 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 麸皮、 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$ 。经 ZY 培养基培养, HAB-1 活菌数达到 $2.438 \times 10^{10} \cdot \text{mL}^{-1}$,抑菌圈直径为 34.97 mm (见表 1)。

表 1 培养基组分配比优化的正交试验设计结果

Tab. 1 Optimization of medium components using the orthogonal design

试验号 Code	玉米粉 Corn flour /($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	蔗糖 Sucrose /($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	酵母粉 Yeast extract /($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	麸皮 Bran /($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	KH_2PO_4 /($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	活菌数 Quantity of bacteria /($\times 10^8 \cdot \text{mL}^{-1}$)	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone /mm
1	10	10	10	10	0.5	20.6Egf	29.40Cd
2	10	20	20	20	1.0	81.7Ccd	32.60ABb
3	10	30	30	30	1.5	76.4Ccd	31.53BCbcd
4	10	40	40	40	2.0	209.2Bb	32.43ABbc
5	20	10	20	30	2.0	61.9CDde	31.67BCbc
6	20	20	10	40	1.5	30.5DEgf	32.00BCbc
7	20	30	40	10	1.0	194.7Bb	31.50BCbcd
8	20	40	30	20	0.5	22.8Egf	30.57BCbcd
9	30	10	30	40	1.0	243.8Aa	34.97Aa
10	30	20	40	30	0.5	212.2Bb	31.37BCbcd
11	30	30	10	20	2.0	7.0Eg	32.67ABb
12	30	40	20	10	1.5	20.4Egf	31.63BCbc
13	40	10	40	20	1.5	39.4DEef	30.77BCbcd
14	40	20	30	10	2.0	24.2Egf	30.27BCcd
15	40	30	20	40	0.5	87.9Cc	30.67BCbcd
16	40	40	10	30	1.0	9.9Eg	30.63BCbcd

注: 不同大写字母表示在 0.01 水平差异极显著,不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著

Note: Different capital letters mean extremely significant difference at 0.01 level, different small letters mean significant difference at 0.05 level

2.3 最佳培养条件的优化 在确定最优培养基 ZY 后,笔者从 pH、温度、装液量、时间、接种量和转速等方面进一步对 ZY 的最佳培养条件进行了筛选。

2.3.1 pH 值 在 pH 值为 5.0 ~ 6.0 时,菌株 HAB-1 活菌数由 $1.42 \times 10^{10} \cdot \text{mL}^{-1}$ 增长到 $2.05 \times 10^{10} \cdot \text{mL}^{-1}$,pH 值为 6.0 时,活菌数最大,达到 $2.05 \times 10^{10} \cdot \text{mL}^{-1}$,此时抑菌圈直径也达到最大,为 35.0 mm 。随着 pH 值的增大,HAB-1 抑菌活性没有增强,但活菌数呈下降趋势。因此,培养基的最佳 pH 值为 6.0 (见图 2A)。

2.3.2 培养温度 当培养温度为 37°C 时,菌株活菌数和抑菌圈直径都达到最大值,分别为 $1.83 \times 10^9 \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 32.2 mm 。因此选择 37°C 为最佳培养温度(见图 2B)。

2.3.3 装液量 在 250 mL 三角瓶中,装液量为 30 mL 和 60 mL,菌株 HAB-1 的活菌数及抑菌能力呈上升趋势,当装液量为 60 mL 时,活菌数最多,为 $2.31 \times 10^9 \cdot \text{mL}^{-1}$,此时抑菌活性也最强,抑菌圈直径为 32.3 mm ,当装液量高于 60 mL 时,菌株 HAB-1 的活菌数及抑菌能力均呈下降趋势(见图 2C)。因此,在摇瓶发酵时,装液量过多或者过少均不利于菌株的生长及抑菌物质的产生,在 250 mL 三角瓶中,最佳装液量应为 60 mL。

2.3.4 培养时间 在培养 12 ~ 24 h 内,HAB-1 的活菌数呈明显上升趋势,24 h 时达到最大值,活菌数为 $3.4 \times 10^{10} \cdot \text{mL}^{-1}$,此后一直到 72 h,HAB-1 菌株生长处在稳定期,72 h 后活菌数明显下降;从抑菌活性测定表明,随着培养时间的延长,抑菌圈大小一直保持平稳状态,在 24 h 时抑菌活性稍强,抑菌圈直径为 35.7 mm (见图 2D)。因此,在进行抑菌物质等其他研究时,菌株 HAB-1 以培养 24 h 较适合。

2.3.5 接种量 实验结果表明,当菌株 HAB-1 接种量的体积分数为 2% 时,菌株活菌数和抑菌圈直径同时达到最大,分别为 $3.3 \times 10^9 \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 32.8 mm 。因此,在摇瓶培养时菌株最佳接种量的体积分数为 2% (见图 2E)。

2.3.6 转速 研究表明,随着摇床转速的增加,菌株 HAB-1 活菌数先增加后稍微有所降低,在转速为 $190 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 时生长量达到最大,活菌数为 $2.2 \times 10^9 \cdot \text{mL}^{-1}$;而随着转速的增加,菌株的抑菌活性没有太大的变化,在 $190 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 时相对较强,抑菌圈直径为 33.3 mm (见图 2F)。因此,在菌株 HAB-1 发酵时选择最佳转速为 $190 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

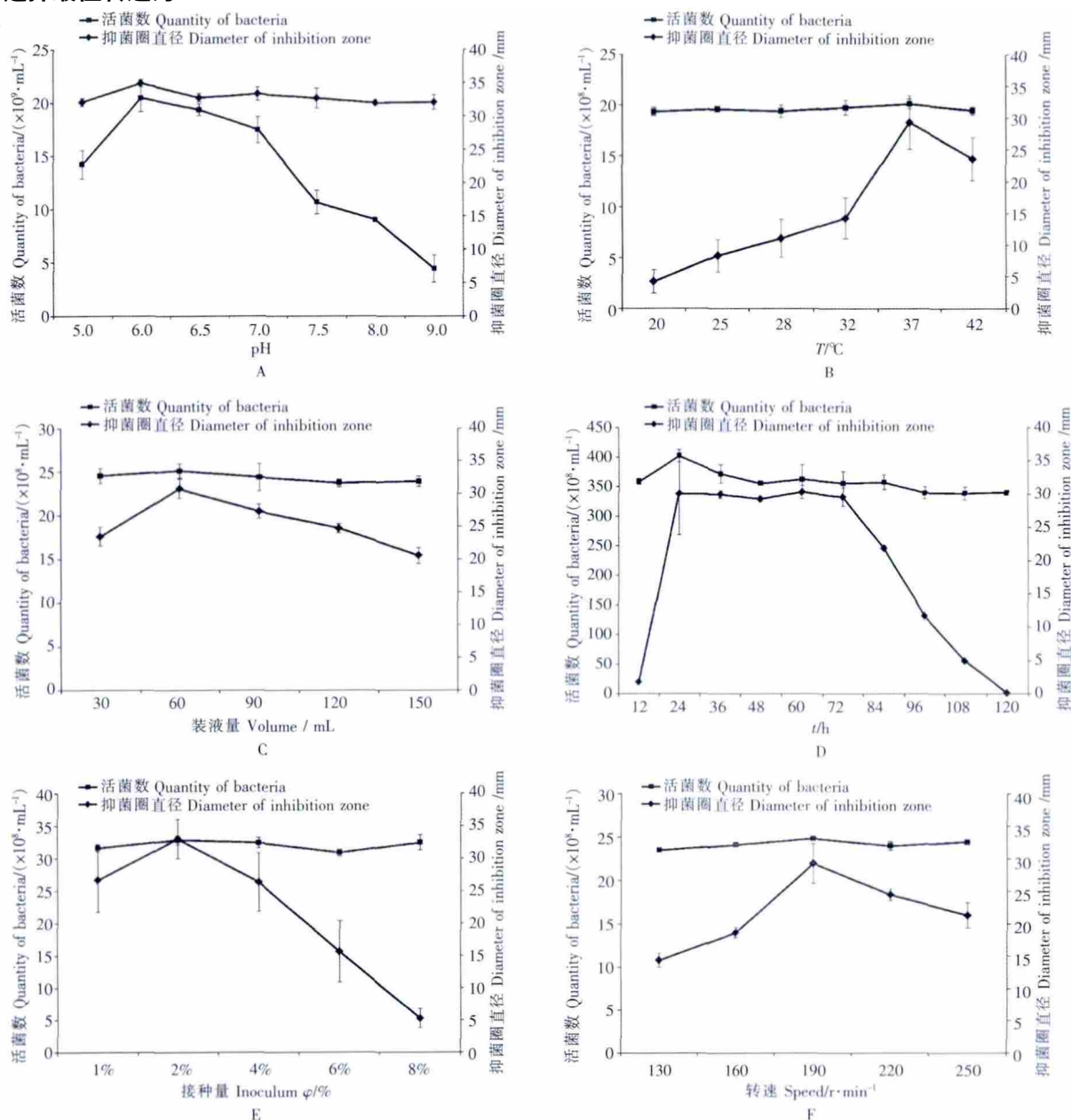


图2 不同培养条件对菌株 HAB-1 生长的影响

A: 不同 pH 值对 HAB-1 活菌数和抑菌活性的影响; B: 不同培养温度对 HAB-1 活菌数和抑菌活性的影响; C: 三角瓶不同装液量对 HAB-1 活菌数和抑菌活性的影响; D: 不同培养时间对 HAB-1 活菌数和抑菌活性的影响; E: 不同接种量对 HAB-1 活菌数和抑菌活性的影响; F: 不同转速对 HAB-1 活菌数和抑菌活性的影响

Fig. 2 Effects of different culture conditions on the growth of HAB-1 strain

A: Effects of different pH values on the viable count and antifungal activity of HAB-1 strain; B: Effects of different culture temperatures on the viable count and antifungal activity of HAB-1 strain; C: Effects of different liquid volume on the viable count and antifungal activity of HAB-1 strain; D: Effects of different culture time on the viable count and antifungal activity of HAB-1 strain; E: Effects of different inoculation amount on the viable count and antifungal activity of HAB-1 strain; F: Effects of different rpm on the viable count and antifungal activity of HAB-1 strain

2.4 培养基及培养条件优化前后 HAB-1 活菌数和抑菌活性比较 通过活菌计数法和平板对峙实验表明,优化前的活菌数和抑菌圈直径分别是 $2.1 \times 10^8 \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 30.9 mm,优化后的活菌数和抑菌圈直径分别为 $2.6 \times 10^{10} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 34.0 mm。

3 讨论

笔者在摇瓶条件下通过单因子试验和正交试验设计相结合,筛选得到了最适合菌株 HAB-1 生长及其抑菌物质产生的培养基 ZY,其各组分的质量浓度为:30 g · L⁻¹玉米粉、10 g · L⁻¹蔗糖、30 g · L⁻¹酵母粉、40 g · L⁻¹麸皮、1 g · L⁻¹KH₂PO₄; 最适培养条件为: pH 值 6.0,培养温度 37 °C,250 mL 摇瓶装液量 60 mL,接种量的体积分数为 2%,培养时间 24 h,转速 190 r · min⁻¹。此条件下,菌株 HAB-1 的活菌数及抑菌圈直径分别高达 $2.6 \times 10^{10} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 34.0 mm,比在 NB 培养基中 180 r · min⁻¹ 37 °C 条件下培养 48 h 时活菌数 $2.1 \times 10^8 \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 30.9 mm,提高了 122.81% 和 10.03%。

微生物的形态及其代谢产物的形成通常与环境因子有关,例如,与培养温度、培养基的成分与浓度、培养的时间有关^[12],因此,针对植物病原菌,筛选最优化的培养基或者发酵条件,是获得较强抑菌能力的微生物的重要步骤之一。目前,拮抗性细菌最佳培养基的筛选,主要开展培养基中碳源、氮源及金属离子对细菌生长或者产抑菌能力的影响研究,对于枯草芽孢杆菌也一样,其活菌数和抑菌物质产生也会因为碳氮源及金属离子的不同而异。在优化碳源方面,章四平等和王佳佳等报道玉米粉可以显著增加枯草芽孢杆菌的抑菌活性,蔗糖作为碳源时,抑菌活性稍差^[9,13],但叶云峰等认为玉米粉作为碳源时枯草芽孢杆菌的抑菌活性最差,蔗糖作为氮源时其抑菌活性最好^[14],刘雪等研究表明,蔗糖能有效促进枯草芽孢杆菌的芽孢数量,说明蔗糖可以促进枯草芽孢杆菌的生长^[15]。但以上研究结果大多是单一碳源,笔者对碳源的筛选结果表明,蔗糖可以增加菌株 HAB-1 的活菌数,而玉米粉则让其抑菌活性达到最强,因此,最终选择了蔗糖和玉米粉作为优化培养基的复合碳源;在优化氮源时,叶云峰等和王佳佳等研究表明酵母粉可以促进枯草芽孢杆菌的活菌数和抑菌活性^[13-14],而郝林华等认为无机氮硫酸铵是枯草芽孢杆菌的最优氮源^[14],马晓丹等认为蛋白胨和酵母粉作为复合氮源要比单一氮源更能促进枯草芽孢杆菌的生长及抑菌物质产生^[17]。笔者在研究中发现 HAB-1 对无机氮源的利用能力很差,甚至不能利用,当酵母粉作为氮源时,HAB-1 的活菌数最多,但抑菌活性次于麸皮,因此,笔者选用酵母粉和麸皮作为优化培养基的复合氮源,同样认为复合氮源更能促进 HAB-1 菌株的活菌数和抑菌能力。通过对碳-氮源的筛选及其相关研究,发现同为枯草芽孢杆菌,对不同的碳、氮源利用能力差异较大,这可能与菌株的来源不同有关,或者是由于枯草芽孢杆菌存在不同亚种或者变种,或者这些结果可以为枯草芽孢杆菌的分类提供证据,这还有待进一步实验验证。有研究表明,Na⁺,Ca²⁺,Mg²⁺,Fe²⁺,Mn²⁺,K⁺能促进枯草芽孢杆菌活菌数或者抑菌能力的提高^[9,13,18-22],在本研究中,Fe²⁺,Mn²⁺,Zn²⁺使菌株 HAB-1 停止生长,Na⁺,Ca²⁺,Mg²⁺对菌株的生长有一定抑制作用,但是与对照比较其抑菌活性增加了,而 K⁺能促进菌株生长,且菌株活菌数显著增加,这与以往报道的结果不尽相同。Na⁺,Ca²⁺,Mg²⁺和 K⁺在 HAB-1 产抑菌物质的过程中可能起到一些调节作用,但其具体的作用还需进一步研究。由于在进行金属离子筛选时加入的是无机盐,除了金属离子,还有一些其他离子的影响,如 KH₂PO₄,这里除 K⁺可能会促进菌生长外,还有可能是 H₂PO₄⁻起了作用,这一点还需要在以后的实验中进一步验证,关于金属离子筛选避免其他离子影响的实验方案,还有待在以后的实验设计中解决。在相同碳源、氮源或者金属离子条件下,发现菌株 HAB-1 的活菌数与其抑菌活性并不呈正相关,活菌数最多时,其抑菌活性并不一定最强。

在 ZY 培养基中进行培养条件筛选时,发现菌株 HAB-1 在 pH 值为 6.0 时生长最适宜,并且其抑菌物质产生也最多,说明该菌株对偏酸性的环境具有较强的适应能力。对于其培养温度的筛选,当温度为 37 °C 时活菌数显著提高,42 °C 时稍微下降,但并不明显,这也说明 HAB-1 可能有一定的耐高温特性。

因此,上述结果说明了菌株 HAB-1 较以往报道的枯草芽孢杆菌不一样,可能是枯草芽孢杆菌新的亚种或者变种,具有潜在的生防菌研究与应用价值。本实验获得 HAB-1 的最佳优化培养基 ZY,并根据抑菌能力及活菌数确定其最佳培养条件,使 HAB-1 菌株的活菌数以及抑菌物质的产量得到了显著提高。由于微生物个体微小,单个菌体次级代谢产物产量相对较少,通过优化培养基组分和培养条件使菌株次级代

谢产物产量增加,这为菌株 HAB-1 抗菌物质的分离与提纯奠定了基础。HAB-1 的抗菌物质产生机理和以往已报道的枯草芽孢杆菌存在一定差异,其更多的抑菌物质不是在有抑制作用的菌体中,而是表现在抑菌不很强的代谢产物中(数据未显示),经过萃取分离,其抗菌活性物质较其菌体表现出更强的抑菌能力(另文报道)。另外,笔者只是在 250 mL 三角瓶中对培养基组成及培养条件进行筛选,三角瓶的空间毕竟较小,环境条件有限,无法达到高密度发酵,因此,本实验仅为在发酵罐中发酵进行初步的条件探索。

参考文献:

- [1] HAYWARD A C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* [J]. Annual Review of Phytopathology, 1991, 29: 65–87.
- [2] KHOSRO I, SARA K R, SAEED Z et al. Antagonism of *Bacillus* species against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* [J]. African Journal of Microbiology Research, 2012, 6(7): 1615–1620.
- [3] MIZUMOTO S, HIRAI M, SHODA M. Enhanced iturin A production by *Bacillus subtilis* and its effect on suppression of the plant pathogen *Rhizoctonia solani* [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2007, 75(6): 1267–1274.
- [4] SCHISLER D A, BOEHM M J, SLININGER P J. Greenhouse and field evaluation of biological control of Fusarium head blight on durum wheat [J]. Plant Disease, 2002, 86(11): 1350–1356.
- [5] 张根伟. 枯草芽孢杆菌 BS-6 液体发酵条件的研究 [J]. 河北省科学院学报, 2005, 22(1): 54–57.
- [6] 郭小华, 陆文清, 邓萍, 等. 益生枯草芽孢杆菌 MA139 增殖培养基的优化 [J]. 中国农业大学学报, 2006, 11(3): 41–46.
- [7] 张丽霞, 李荣禧, 齐俊生, 等. 枯草芽孢杆菌发酵培养基的优化 [J]. 植物病理学报, 2005, 35(6): 209–210.
- [8] 方中达. 植病研究方法 [M]. 第3版. 北京: 中国农业出版社, 1999: 189–192.
- [9] 章四平, 刘圣明, 王建新, 等. 枯草芽孢杆菌生防菌株 NJ-18 的发酵条件优化 [J]. 南京农业大学学报, 2010, 33(2): 58–62.
- [10] 赵璐璐, 贺春萍, 钱飞燕, 等. 橡胶树内生拮抗细菌菌株 Czk1 的发酵条件优化 [J]. 热带作物学报, 2011, 32(5): 926–931.
- [11] 宋卡魏, 王星云, 张荣意. 培养条件对枯草芽孢杆菌 B68 芽孢产量的影响 [J]. 中国生物防治, 2007, 23(3): 255–259.
- [12] 何国庆, 贾英民. 食品微生物学 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002: 18.
- [13] 王佳佳, 曹克强, 王树桐. 枯草芽孢杆菌 Bs-0728 菌株发酵条件的优化 [J]. 河北农业大学学报, 2012, 35(6): 64–68.
- [14] 叶云峰, 黎起泰, 袁高庆, 等. 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 [J]. 微生物学通报, 2011, 38(9): 1339–1346.
- [15] 刘雪, 叶婧, 穆长青, 等. 枯草芽孢杆菌 B-332 菌株发酵条件的研究 [J]. 中国农学通报, 2012, 28(10): 230–235.
- [16] 郝林华, 孙丕喜, 姜振波, 等. 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 液体发酵条件 [J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2006, 24(4): 380–385.
- [17] 马晓丹, 张红星, 钟思琼, 等. 枯草芽孢杆菌 C3 产抗菌物质发酵培养基的优化 [J]. 中国酿造, 2012, 31(5): 10–14.
- [18] 秦艳, 李卫芬, 黄琴. 枯草芽孢杆菌发酵条件的研究 [J]. 饲料研究, 2007(12): 70–74.
- [19] COOPER D G, MACDONALD C R, DUFF S J B, et al. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1981, 42: 408–412.
- [20] WEI Y H, CHU I M. Enhancement of surfactant production in iron-enriched media by *Bacillus subtilis* ATCC21332 [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1998, 22: 724–728.
- [21] WEI Y H, CHU I M. Mn^{2+} improves surfactin production by *Bacillus subtilis* [J]. Biotechnology letters, 2002, 24: 479–482.
- [22] REUTER K, MOFID M R, MARAHIEL M A, et al. Crystal structure of the surfactin synthetase-activating enzyme Sfp: a prototype of the 40-phosphopantetheinyl transferase superfamily [J]. The EMBO Journal, 1999, 18: 6823–6831.

(下转第 235 页)

Comparative Trials of Different Pumpkin Cultivars for Fruit Quality

LIN Shisen, ZHAO Shuniu, CHENG Shanhan

(Key Laboratory of Protection and Development for Utilization of Tropical Crop Germplasm Resources, Ministry of Education;

College of Horticulture and Landscaping, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: Fruits of 8 desirable pumpkin cultivars were determined in quality traits such as firmness, water content, soluble solids content, vitamin C, protein content, fiber content and β -carotene content to assess their fruit quality. The results showed that these pumpkin cultivars were high in the contents of soluble solids and β -carotene, good in firmness and stored well. There are significant differences in nutritional composition among different pumpkin cultivars. Pumpkin Miben 41 and Changde Miben had a higher while Pumpkin Micheng had a lower nutritional quality.

Key words: pumpkin cultivars; nutritional quality; general traits

(上接第 231 页)

Optimization of Fermentation Conditions for *Bacillus subtilis* HAB-1 to Produce Antimicrobial Substances

SUN Liang, LIU Wenbo, YANG Tingya, HE Hongyu, WU Guoliang,

ZHANG Yu, MIAO Weiguo, ZHENG Fucong

(Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresource/College of Environment and

Plant Protection, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: An attempt was made to determine the optimal medium for *Bacillus subtilis* HAB-1 growth and the best fermentation conditions for *Bacillus subtilis* HAB-1 to produce anti-microbial substances. Suitable C source, N source and metal ions were screened for the medium and the cultural conditions determined for the strain HAB-1 through single factor test with the methods of shake flask culture and plate confrontation. The optimal carbon source was sucrose and corn flour, the optimal nitrogen was yeast extract and bran, and the optimal metal ions were K^+ . Orthogonal experiment showed that HAB-1 had the strong anti-microbial activity against pathogen when cultured in the medium ZY. This medium contained $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose, $30\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ corn flour, $30\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ yeast extract, $40\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ bran, and $1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 . The culture conditions for this medium were further optimized. The optimal cultural conditions of this medium were pH 6.0, the fermentation temperature $37\text{ }^\circ\text{C}$, the medium volume 60 mL in a 250 mL flask, the inoculation volume ratio 2% (V/V), the fermentation time 24 h, and the rpm $190\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$. Under these culturing conditions, the strain HAB-1 had the largest viable count and the highest antimicrobial activity against anthracnose pathogen in rubber tree. The viable count and inhibition zone diameter were $2.6 \times 10^{10}/\text{mL}$ and 34.0 mm, respectively, 123.81 times and 1.10 times higher than those of the strain HAB-1 cultured in NB.

Key words: *Bacillus subtilis*; plate confrontation; shake flask fermentation; optimization