

# 甲基营养型芽胞杆菌BMF 04固态发酵条件优化 及其对黄瓜幼苗生长的影响

陈新元, 陈 茹, 吴海霞, 马桂珍\*, 暴增海

(江苏海洋大学海洋科学与水产学院, 连云港 222005)

**摘要:** 甲基营养型芽胞杆菌 *Bacillus methylotrophicus* BMF 04 是本实验室从连云港海域分离纯化得到的对多种植物病原真菌有较强抗菌作用的优良生防菌株。为进一步开发应用该菌株, 以细菌总数和芽胞率为指标, 通过单因素和响应面试验设计, 优化固态发酵培养基配方和发酵条件, 采用室内盆栽试验, 测定发酵物对黄瓜幼苗生长的影响。结果表明, 优化后菌株 BMF 04 固态发酵培养基配方为豆粕 92.5%, 菌糠 6.7%, 硝酸铵 0.6%, 氯化钠 0.2%; 发酵条件为 pH 7, 温度 32 °C, 接种量 15% (浓度为  $10^8$  细胞/mL), 料水比 1:1, 培养时间 68 h。优化后, 细菌总数可达  $6.61 \times 10^{10}$  细胞/g, 芽胞率为 90.7%。发酵物与土壤以 1:250 质量比混和时, 能显著提高黄瓜幼苗的株高、茎粗、鲜重及根须数, 对黄瓜幼苗生长具有明显的促进作用。

**关 键 词:** 甲基营养型芽胞杆菌; 固态发酵; 发酵条件; 黄瓜; 促生

中图分类号: S476 文献标识码: A 文章编号: 1005-9261(2021)02-0276-11

## Optimization of Solid-state Fermentation Conditions of *Bacillus methylotrophicus* BMF 04 and Its Effect on the Growth of Cucumber Seedlings

CHEN Xinyuan, CHEN Ru, WU Haixia, MA Guizhen\*, BAO Zenghai

(School of Marine and Fisheries, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China)

**Abstract:** *Bacillus methylotrophicus* BMF 04 is an excellent antibacterial strain with strong antagonism against a variety of plant pathogenic fungi isolated and purified from the Lianyungang Sea. To further develop the application of this strain, using the total number of bacteria and budding cell rate as indicators, the solid-state fermentation medium formulation and fermentation conditions were optimized by designing single-factor and response surface tests, and the effect of the fermentate on the growth of cucumber seedlings was determined by indoor potting experiments. The optimized solid-state fermentation medium formulation of BMF 04 strain was 92.5% soybean meal, 6.7% bran, 0.6% ammonium nitrate, 0.2% sodium chloride. The optimal fermentation conditions were pH 7, temperature 32 °C, inoculation amount 15% (concentration  $10^8$  cells/mL), feed-water ratio 1:1 and culture time 68 h. After optimization, the total bacteria amount could reach  $6.61 \times 10^{10}$  cells/g, and the budding cell rate was 90.7%. When the fermentation was mixed with soil at 1:250 mass ratios, it significantly improved the height, stem thickness, fresh weight and number of root whiskers of cucumber seedlings, indicating the fermentation had an obvious effect on the growth of cucumber seedlings.

**Key words:** *Bacillus methylotrophicus*; solid state fermentation; fermentation conditions; cucumber; growth promotion

收稿日期: 2020-03-25

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金项目 (CX (20) 3133); 江苏省研究生科研创新计划 (SJCX19\_0999)

作者简介: 陈新元, 硕士研究生, E-mail: 3074104571@qq.com; \*通信作者, 博士, 教授, E-mail: guizhenma@sohu.com。

DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2020.05.020

甲基营养型芽胞杆菌 *Bacillus methyltrophicus* 是 2010 年报道的新种<sup>[1]</sup>, 因其代谢产物的多样性、对外界环境因子的多抗逆性和无污染无毒害等优点, 被越来越多地运用于农业领域<sup>[2-5]</sup>。许多学者从不同环境中分离得到多个对多种植物病害具有良好的防治效果并具有促生作用的甲基营养型芽胞杆菌。采俊香和李月梅<sup>[6]</sup>从抱紧苦蕒菜根部分离到对番茄早疫病病菌 *Alternaria solani* 等植物病原菌具有较好抑菌效果的甲基营养型芽胞杆菌 G-5。殷晓敏等<sup>[7]</sup>和谢学文等<sup>[8]</sup>分别从西瓜和黄瓜的根际土壤分离获得对西瓜枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* 和黄瓜炭疽病菌 *Colletotrichum lagenarium* 具有良好防治作用的甲基营养型芽胞杆菌 XG-1 和 WF-3。黎肇家等<sup>[9]</sup>从黄柏树皮分离到一株对黄柏苗有显著促生效果的甲基营养型芽胞杆菌 T50。一些菌株目前已经被开发成微生物制剂, 用于植物病害的防治<sup>[10]</sup>; 谢学文等<sup>[11]</sup>和胡江春等<sup>[12]</sup>把从黄瓜根际土壤和海泥中得到的两株甲基营养型芽胞杆菌 WF-3 和 9912 分别研制成了微粉剂和可湿性粉剂, 用于黄瓜炭疽病和黄瓜灰霉病的防治, 具有较好的防治效果。

目前, 有关芽胞杆菌大量制备的方法多为液态发酵, 与液态发酵相比, 固态发酵具有培养基原料来源广且价格低、能耗少、技术较简单、产物的产率较高、环境污染较小等优点, 在微生物肥料、微生物农药以及饲料的生产中使用愈加广泛<sup>[8,13]</sup>。如唐晓星等<sup>[14]</sup>利用甲基营养型芽胞杆菌 NCU507 固态发酵豆粕获得蛋白酶, 潘韵等<sup>[15]</sup>利用甲基营养型芽胞杆菌 2-3 固态发酵生产鸡饲料等, 而有关甲基营养型芽胞杆菌生防菌株固态发酵培养基及其发酵条件研究较少。

本实验室前期从连云港海域中分离得到一株对苹果腐烂病菌 *Valsa mali* Miyable et Yamada、小麦赤霉病菌 *Fusarium graminearum*、番茄早疫病病菌、稻瘟病菌 *Pyricularia oryzae* 等多种植物病原真菌有良好的抑制作用的甲基营养型芽胞杆菌 BMF 04, 为充分利用农产品下脚料, 降低生产成本, 提高生产效率, 进一步开发利用菌株研制微生物制剂, 采用单因素和响应面试验设计, 优化该菌株的固态发酵培养基配方和发酵条件, 通过室内盆栽试验测定发酵物对黄瓜幼苗生长的影响, 为该菌株的开发应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 甲基营养型芽胞杆菌 BMF 04 由本实验室在连云港海域中分离并保存。

1.1.2 培养基 菌株活化培养基为 PDA 培养基; 种子液培养基为 PD 培养基。

### 1.2 种子液的制备

菌株 BMF 04 活化后接种于装有 60 mL PD 培养基的 250 mL 三角瓶中, 28 °C、180 r/min 振荡培养 16 h, 调整菌液浓度为  $10^8$  细胞/mL, 作为发酵种子液。

### 1.3 固态发酵初始条件

250 mL 三角瓶装瓶量 20%, 接种量为培养基质量的 20%, pH 自然, 发酵温度 37 °C, 发酵时间 3 d。

### 1.4 细菌总数和芽胞率的测定

不同位置的菌株 BMF 04 发酵物混合均匀后, 随机取 10 g 加入到装有 90 mL 含有 0.5%吐温-80 的无菌水溶液和 10 个直径为 0.5 cm 的玻璃珠的 250 mL 三角瓶中, 180 r/min 充分振荡 30 min 为菌悬液, 菌悬液梯度稀释, 采用血球计数板法<sup>[16]</sup>测定稀释液中的细菌总数, 采用结晶紫染色法<sup>[17]</sup>测定芽胞率。

### 1.5 菌株 BMF 04 固态发酵培养基的优化

1.5.1 基础培养基筛选 将菌株 BMF 04 分别接种到 8 种不同的培养基 (表 1) 中, 按 1.3 条件进行发酵, 测定不同培养基发酵物中的细菌总数和芽胞率, 选择细菌总数和芽胞率高的培养基作为优化的基础培养基。每种培养基为一个处理, 每个处理接种 3 瓶为 3 次重复。

1.5.2 培养基优化的单因素试验 选择蔗糖、淀粉、麸皮、玉米粉、葡萄糖、玉米芯、菌糠、稻壳粉、米糠分别代替基础培养基中的碳源; 按 1%质量比在培养基中分别加入尿素、硫酸铵、硝酸铵、氯化氨、硝酸钠为补充氮源; 按 0.1%质量比在基础培养基中分别加入硫酸镁、碳酸钙、氯化钠、磷酸氢二钾、硫酸锰、硫酸锌、硫酸亚铁为补充无机盐; 每一因素变化时其他成分及含量固定不变, 配制不同发酵培养基, 在基础发酵条件下进行发酵, 每种培养基为一处理, 每处理接种 3 瓶, 为 3 次重复, 以基础培养基为对照, 测定不同培养基发酵物中的细菌总数和芽胞率, 筛选细菌总数和芽胞率高的碳源、氮源和无机盐种类。

表 1 不同固态发酵培养基的配方

Table 1 Formulation of different solid-state fermentation media

序号 No.	培养基成分 Medium composition	料水比 Material water ratio
1	豆粕 94.4%，麸皮 3.8%，葡萄糖 1.8%	1:1
2	玉米粉 28.3%，麸皮 65.9%，葡萄糖 4.7%，硝酸铵 1.1%	1:1.5
3	麸皮 74%，稻壳粉 18.3%，葡萄糖 4.5%，蛋白胨 1.8%，硝酸铵 1.4%，磷酸二氢钾 1%	1:1.4
4	菌糠 70.6%，麸皮 28.1%，硫酸锰 1.3%	1:1.5
5	麸皮 80.9%，豆粕 18.1%，氯化钠 1%	1:1.8
6	豆粕 85.3%，葡萄糖 14.7%	1:0.4
7	豆粕 97.2%，麸皮 2.8%	1:0.8
8	玉米粉 97.9%，硫酸铵 2.1%	1:0.4

注：试验所用所有固体基质均粉碎过 20 目筛。

Note: All solid substrates used in the test have been crushed to 20 mesh sieve.

将筛选出的碳源按培养基质量 2%、4%、6%、8%、10%；氮源按培养基质量 0.4%、0.8%、1.2%、1.6%、2%；无机盐按培养基质量 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%，分别加入到基础培养基中，每种因素试验其他成分及含量固定不变，以基础培养基为对照，在基础发酵条件下发酵，每个变量为一个处理，每个处理接种 3 瓶为 3 次重复，测定不同质量比碳源、氮源和无机盐发酵物的细菌总数和芽胞率，确定碳源、氮源、无机盐的添加质量比。

1.5.3 培养基优化的响应面试验 以单因素试验筛选出的培养基碳源、氮源、无机盐种类和浓度为基础，通过 Design-Expert 8.0.6 软件，利用 Box-Behnken 设计原理，以细菌总数为响应值，以碳源含量（A）、氮源含量（B）、无机盐含量（C）为自变量，进行响应面试验，测定不同组合发酵物中 BMF 04 菌株的细菌总数和芽胞率，分析不同因素和水平对菌株 BMF 04 固态发酵的影响及其显著性。

1.6 菌株 BMF 04 固态发酵条件的优化

以优化后的培养基为发酵培养基，对 BMF 04 菌株的发酵时间、温度、料水比、接种量、初始 pH 等发酵条件进行优化。发酵时间优化在 1.3 初始条件下发酵，接种后每 4 h 取样一次，测定确定最佳发酵时间；发酵温度设为 24 ℃、28 ℃、32 ℃、36 ℃、40 ℃；料水比设为 1:0.7、1:1、1:1.3、1:1.6、1:1.9；接种量设为质量比 5%、10%、15%、20%、25%；不同初始 pH 设为 5、6、7、8、9，以初始发酵条件为基础，每一因素的优化均在前一因素优化的基础上进行，测定不同条件下发酵物中的细菌总数及芽胞率。每个发酵条件为一处理，每个处理 3 次重复。

1.7 优化后培养基配方和发酵条件的细菌总数和芽胞产率

将菌株 BMF 04 分别接种到基础培养基和优化后的培养基中，分别按优化前和优化后的条件进行发酵，比较优化前后发酵物中的细菌总数和芽胞率。

1.8 菌株 BMF 04 固态发酵物对黄瓜幼苗生长的影响

1.8.1 黄瓜种子处理 黄瓜品种为新津研四号，购于连云港市种子站。用温汤浸种法对黄瓜种子进行消毒，取出种子置于垫有两层湿润滤纸片的培养皿中，28 ℃条件下恒温催芽 1 d 至种子露白。

1.8.2 土壤处理与播种 将发酵物与土壤分别按照质量比 1:100、1:150、1:200、1:250、1:300 混匀，装入 25 cm×14 cm 的花盆中（每盆 1.5 kg），以空白土壤为对照，每盆播种 15 粒催芽后的黄瓜种子，每个比例为一处理，每个处理播种 4 盆。分别于子叶期、一叶期、二叶期、三叶期随机取 5 株幼苗，测定黄瓜株高和茎粗，于三叶期时测定幼苗地上部分与地下部分的鲜重和干重以及须根数。

1.9 数据统计与分析

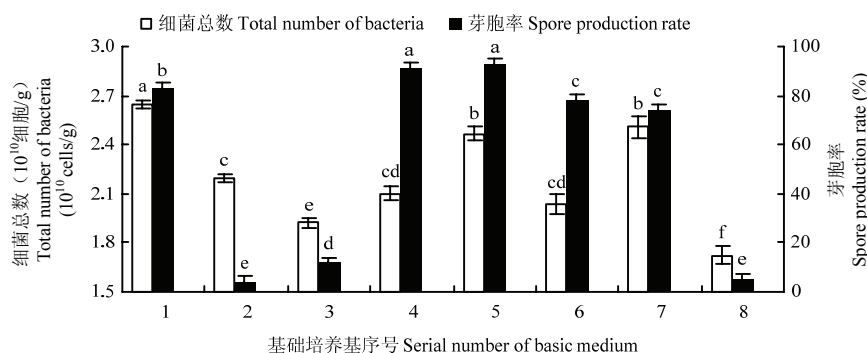
采用 SPSS 19.0 软件分析处理，响应面设计及数据分析由 Design-Expert 8.0.6 软件完成。

2 结果与分析

2.1 菌株 BMF 04 固态发酵培养基优化

2.1.1 基础培养基筛选 菌株 BMF 04 在供试的不同基础培养基中细菌总数和芽胞率不同，在培养基 1 中

的细菌总数最高, 为  $2.65 \times 10^{10}$  细胞/g; 而培养基 5 的芽胞率最高, 可达 93%。但培养基 5 的细菌总数为  $2.47 \times 10^{10}$  细胞/g, 显著低于培养基 1 ( $P < 0.05$ )。因此, 选择培养基 1 作为 BMF 04 菌株固态发酵培养基优化的基础培养基 (图 1)。



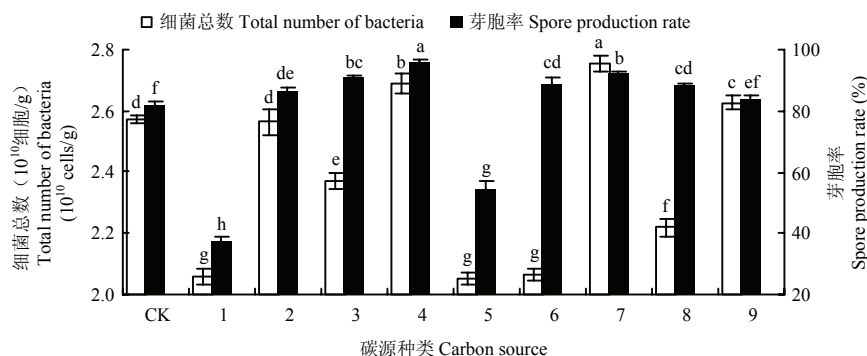
注: 同一指标不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 下同

Note: Different small letters in the same index showed significant difference ( $P < 0.05$ ), the same below.

图 1 菌株 BMF 04 在不同固态发酵培养基中的发酵情况

Fig. 1 Fermentation of BMF 04 in different solid-state fermentation media

2.1.2 最佳碳源种类及含量的确定 不同碳源对菌株 BMF 04 细菌总数和芽胞率有显著影响。以菌糠和玉米粉作为碳源的发酵物中的细菌总数最高, 分别为  $2.76 \times 10^{10}$  细胞/g 和  $2.69 \times 10^{10}$  细胞/g, 二者差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 芽胞率分别为 92% 和 96% (图 2)。考虑到菌糠成本低于玉米粉, 选择菌糠为 BMF 04 菌株固态发酵培养基的碳源。碳源浓度试验显示, 菌糠含量为 8% 时, 发酵物中的细菌总数最高, 为  $2.94 \times 10^{10}$  细胞/g, 与其他处理差异显著 ( $P < 0.05$ ), 芽胞率为 93%; 菌糠的浓度低于或高于 8%, 细菌总数均显著下降。因此, 选择菌糠含量为 8% 作为响应面试验中间值 (图 3)。



1: 蔗糖 Sucrose; 2: 淀粉 Starch; 3: 麸皮 Bran; 4: 玉米粉 Corn flour; 5: 葡萄糖 Glucose; 6: 玉米芯 Corncob; 7: 菌糠 Mushroom bran; 8: 稻壳粉 Rice hull flour; 9: 米糠 Rice bran

图 2 不同碳源对菌株 BMF 04 固态发酵细菌总量和芽胞产率的影响

Fig. 2 Effect of different carbon sources on solid state fermentation of BMF 04 strain

2.1.3 最佳氮源种类及含量的确定 以硝酸铵为氮源的发酵物中细菌总数最高, 为  $2.66 \times 10^{10}$  细胞/g, 显著高于其他氮源 ( $P < 0.05$ ), 芽胞率为 89.3%, 因此选择硝酸铵作为 BMF 04 菌株固态发酵培养基的氮源 (图 4); 氮源浓度试验显示, 硝酸铵含量为 0.8% 时, 发酵物中细菌总数最高, 为  $2.77 \times 10^{10}$  细胞/g, 与其他处理差异显著 ( $P < 0.05$ ), 且芽胞率较高, 为 85%; 硝酸铵含量低于或高于 0.8% 时, 细菌总数显著降低 ( $P < 0.05$ ), 因此, 将氮源含量 0.8% 作为响应面试验的中间值 (图 5)。

2.1.4 最佳无机盐种类及含量的确定 在培养基中分别加入 0.1% 的不同种类无机盐, 发酵物中细菌总数和芽胞率明显不同。添加碳酸钙和氯化钠发酵物中的细菌总数显著高于其他无机盐, 分别为  $2.75 \times 10^{10}$  细胞/g

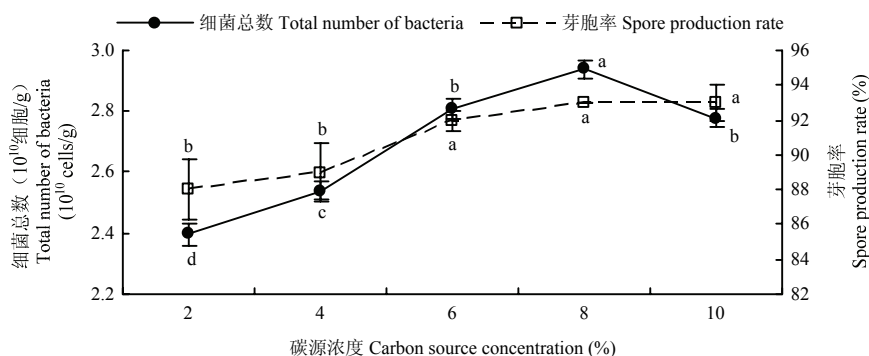
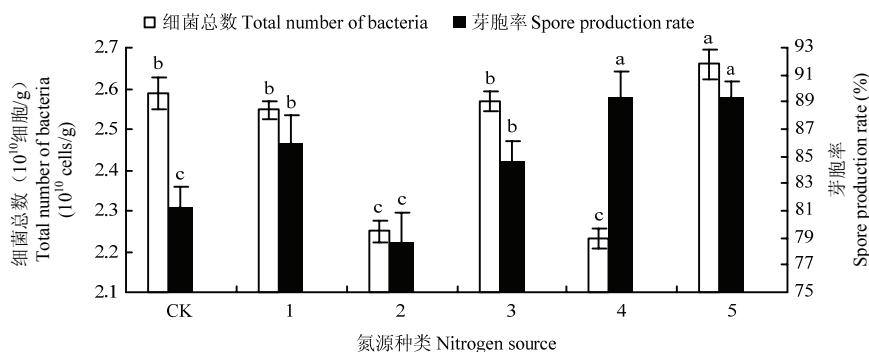


图 3 碳源浓度对菌株 BMF 04 固态发酵细菌总量和芽孢产率的影响

Fig. 3 Effect of carbon source concentration on solid state fermentation of BMF 04 strain



1: 尿素  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ ; 2: 硫酸铵  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 3: 硝酸钠  $\text{NaNO}_3$ ; 4: 氯化氨  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 5: 硝酸铵  $\text{NH}_4\text{NO}_3$

图 4 不同氮源对菌株 BMF 04 固态发酵细菌总量和芽孢产率的影响

Fig. 4 Effect of different nitrogen sources on solid state fermentation of BMF 04 strain

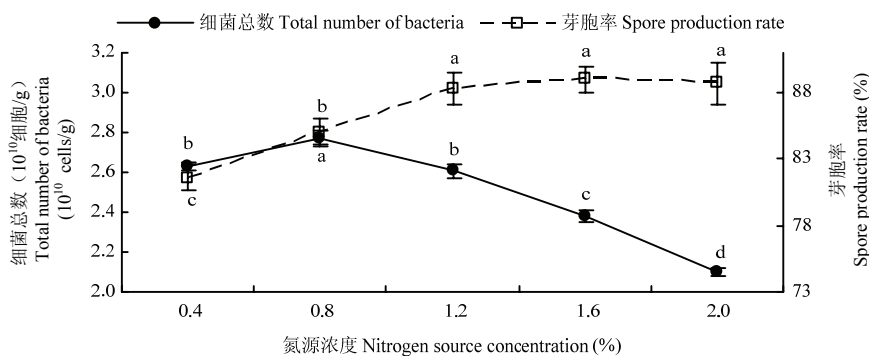


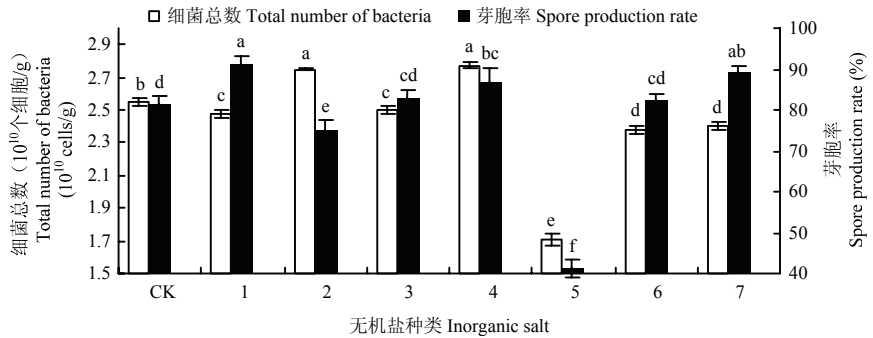
图 5 氮源浓度对菌株 BMF 04 固态发酵细菌总量和芽孢产率的影响

Fig. 5 Effect of nitrogen source concentration on solid state fermentation of BMF 04 strain

和  $2.74 \times 10^{10}$  细胞/g, 二者差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 但添加氯化钠的发酵物中的芽孢率较高, 为 87%, 因此选择氯化钠为培养基的无机盐 (图 6); 氯化钠含量试验显示, 氯化钠含量为 0.2% 时, 发酵物中细菌总数显著高于其他含量, 为  $2.98 \times 10^{10}$  细胞/g, 且芽孢率较高, 为 84%; 氯化钠浓度高于或低于 0.2%, 细菌总数均显著降低, 因此将氯化钠含量 0.2% 作为响应面试验的中间值 (图 7)。

2.1.5 培养基优化响应面试验结果分析 使用 Design-Expert 8.0.6 软件对 17 组试验结果进行分析, 对表中数据进行多元回归拟合, 得到 A、B、C 因素与细菌总数 Y 之间的模型回归方程为  $Y = -1.42 + 0.46A + 6.86B + 10.22C - 0.09AB - 0.03AC + 0.25BC - 0.03A^2 - 4.98B^2 - 25.68C^2$ 。

回归模型的  $P < 0.0001$ , 失拟项的  $P$  值为 0.55, 模型回归极显著, 失拟检验不显著, 说明未知因素对



1: 硫酸镁  $\text{MgSO}_4$ ; 2: 碳酸钙  $\text{CaCO}_3$ ; 3: 磷酸氢二钾  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 4: 氯化钠  $\text{NaCl}$ ; 5: 硫酸锰  $\text{MnSO}_4$ ; 6: 硫酸锌  $\text{ZnSO}_4$ ; 7: 硫酸亚铁  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

图 6 不同无机盐对菌株 BMF 04 固态发酵细菌总量和芽胞产率的影响

Fig. 6 Effect of different inorganic salts on solid state fermentation of strain BMF 04

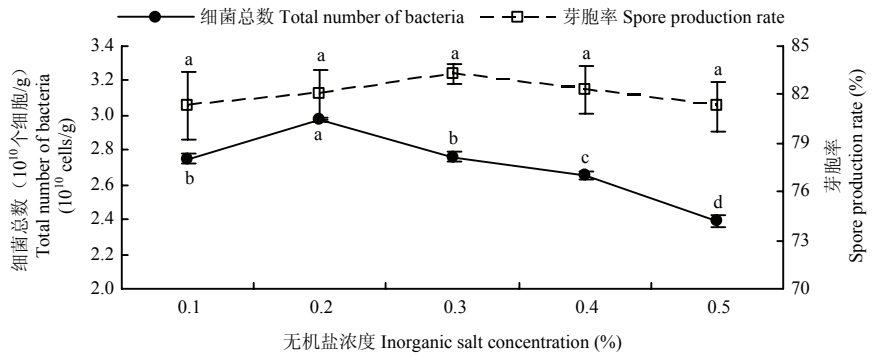


图 7 无机盐浓度对菌株 BMF 04 固态发酵细菌总量和芽胞产率的影响

Fig. 7 Effect of inorganic salt concentration on solid state fermentation of strain BMF 04

表 2 菌株 BMF 04 培养基优化响应面设计及试验结果

Table 2 Response surface design and test results of culture medium optimization of strain BMF 04

序号 No.	因素 Factors			细菌总数 Total number of bacteria ( $10^{10}$ cells/g)
	A:碳源含量 Carbon source concentration (%)	B:氮源含量 Nitrogen source concentration (%)	C:无机盐含量 Inorganic salt concentration (%)	
1	-1 (5.00)	1 (0.90)	0 (0.20)	2.87±0.13
2	1 (9.00)	0 (0.70)	1 (0.30)	2.78±0.09
3	-1	0	1	2.93±0.14
4	0 (7.00)	1	1	2.63±0.12
5	-1	-1 (0.50)	0	3.07± 0.16
6	0	0	0	3.23±0.12
7	-1	0	-1 (0.10)	2.93±0.08
8	0	0	0	3.27±0.14
9	1	-1	0	3.04±0.11
10	1	1	0	2.69±0.1
11	0	0	0	3.23±0.15
12	0	-1	1	2.92±0.05
13	0	0	0	3.22±0.09
14	0	0	0	3.23±0.11
15	0	1	-1	2.63±0.07
16	0	-1	-1	2.94±0.09
17	1	0	-1	2.80±0.13

试验结果干扰较小，模型稳定。回归方程的决定系数  $R^2=0.9890$ ，说明该方程与实际情况拟合较好。不同因素对细菌总数的影响大小不同，氮源>碳源>无机盐，碳源与氮源浓度两因素之间的交互作用较为显著。推测出的极值点为菌糠 6.7%，硝酸铵 0.6%，氯化钠 0.2%，细菌总数预测值为  $3.27\times 10^{10}$  细胞/g（表 2）。

为验证响应面试验的可靠性，采用 1.3 的发酵条件进行验证试验，按照优化后的培养基做 3 组平行试验，测得发酵物中细菌总数为  $3.31\times 10^{10}$  细胞/g，芽孢率为 90%，与预计值  $3.27\times 10^{10}$  细胞/g 差异不显著（ $P<0.05$ ），试验结果与模型预测拟合性较好，说明此优化结果有效，得到的优化组合可作为菌株固体发酵的最优培养基（表 3）。

表 3 回归方程的方差分析  
Table 3 Analysis of variance for the regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i>	<i>P</i>
Sources of variance	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square		
模型 Model	0.76	9	0.08	241.31	<0.0001**
A	0.03	1	0.03	85.93	<0.0001**
B	0.17	1	0.17	473.29	<0.0001**
C	0.0002	1	0.0002	0.57	0.4739
AB	0.01	1	0.01	16.1	0.0051*
AC	1.00E-04	1	1.00E-04	0.29	0.6092
BC	1.00E-04	1	1.00E-04	0.29	0.6092
A <sup>2</sup>	0.06	1	0.06	171.42	<0.0001**
B <sup>2</sup>	0.17	1	0.17	478.58	<0.0001**
C <sup>2</sup>	0.28	1	0.28	794.65	<0.0001**
残差 Residual	0.002	7	0.0003		
失拟项 Lack of fit	0.001	3	0.0003	0.81	0.55
纯误差 Pure error	0.002	4	0.0004		
总和 Total	0.76	16			

注：\*\*差异为极显著；\*差异为显著。  
Note: \*\* is extremely significant; \* is significant.

2.2 菌株 BMF 04 固态发酵条件优化

2.2.1 发酵时间对固态发酵的影响 在 8~44 h 时，细菌总数快速增加，44 h 时细菌总数为  $3.4\times 10^{10}$  细胞/g 为对数期，其后细菌总数增加缓慢，进入稳定期，72 h 细菌总数开始下降为  $3.32\times 10^{10}$  细胞/g，进入衰退期。36 h 时开始形成芽孢，44 h 芽孢率快速提高，44~68 h 时芽孢率由 3%增长至 92%，因此认为甲基营养型芽孢杆菌 BMF 04 固态发酵的时间为 68 h（图 8）。

2.2.2 发酵温度对固态发酵的影响 发酵温度对菌株 BMF 04 细胞总数和芽孢率有明显影响，温度为 32 ℃

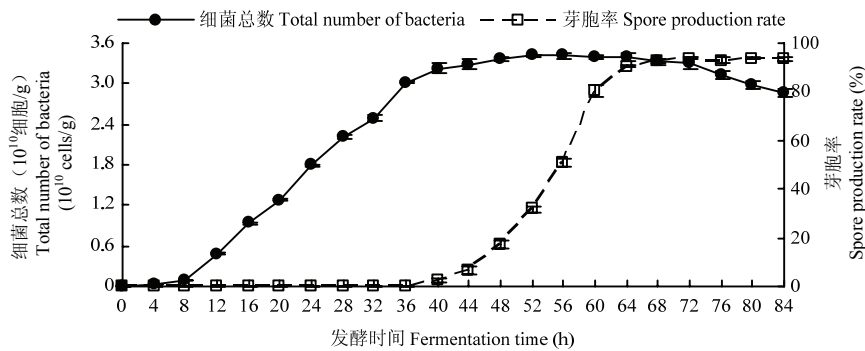


图 8 菌株 BMF 04 固态发酵的时效曲线

Fig. 8 Time effect curve of solid state fermentation of strain BMF 04



时, 细菌总数最高, 为  $4.16 \times 10^{10}$  细胞/g, 显著高于其他处理 ( $P < 0.05$ ), 温度高于或低于  $32\text{ }^{\circ}\text{C}$  时, 细菌总数明显下降。温度对芽胞率影响较小, 温度高于  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  时, 芽胞率变化较小, 因此选择  $32\text{ }^{\circ}\text{C}$  作为菌株 BMF 04 固态发酵温度 (图 9)。

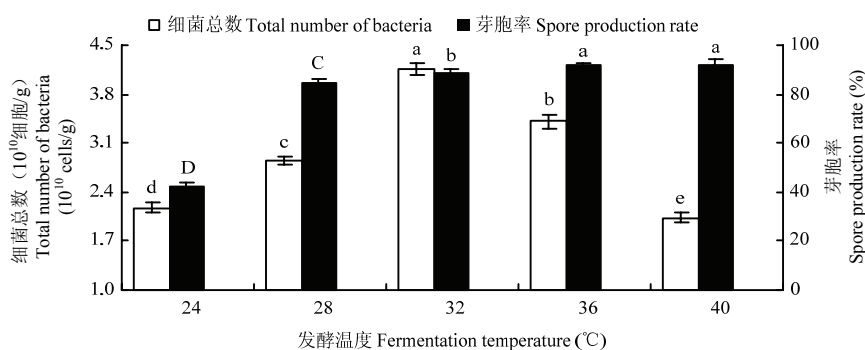


图 9 发酵温度对菌株 BMF 04 固态发酵细菌总量和芽胞产率的影响

Fig. 9 Effect of fermentation temperature on solid state fermentation of strain BMF 04

2.2.3 料水比对固态发酵的影响 当料水比为 1:1 时, 细菌总数显著高于其他处理 ( $P < 0.05$ ), 为  $4.13 \times 10^{10}$  细胞/g, 芽胞率为 89.7%, 料水比低于或高于 1:1 时, 细菌总数均显著下降。因此, 菌株 BMF 04 固态发酵培养基料水比为 1:1 (图 10)。

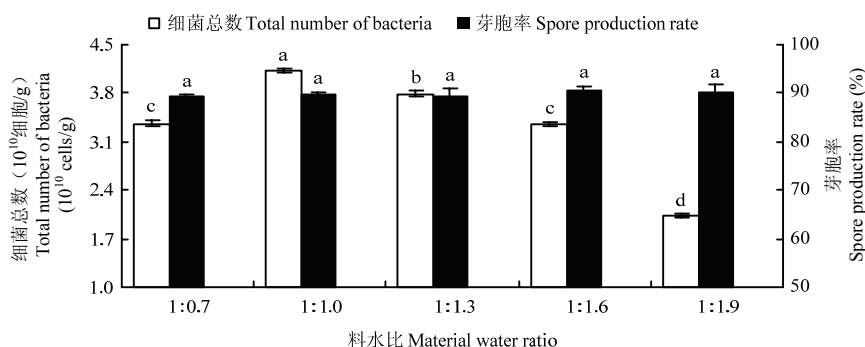


图 10 料水比对菌株 BMF 04 固态发酵细菌总量和芽胞产率的影响

Fig. 10 Effect of feed water ratio on solid state fermentation of strain BMF 04

2.2.4 接种量对固态发酵的影响 试验结果表明, 接种量对菌株 BMF 04 固态发酵的细菌总数有显著影响。接种量为 15% 时, 细菌总数显著高于其他处理, 为  $4.88 \times 10^{10}$  细胞/g; 接种量低于 15% 时, 芽胞率显著低于其他处理, 因此, 选择 15% 作为 BMF 04 菌株固态发酵最佳接种量 (图 11)。

2.2.5 初始 pH 值对固态发酵的影响 试验结果表明, pH 对菌株 BMF 04 细菌总数影响明显, 不同 pH 时发酵物中细菌总数差异显著, 而对芽胞率影响较小。pH 值为 7 时, 发酵物中的细菌总数最高, 为  $6.62 \times 10^{10}$  细胞/g, 芽胞率为 91.7%, pH 高于 7 或低于 7 时细菌总数均显著减少 (图 12)。因此, BMF 04 菌株固态发酵培养基初始 pH 为 7。

### 2.3 优化后培养基配方和发酵条件的细菌总数和芽胞产率确认

菌株 BMF 04 同时按优化前和优化后的条件进行固态发酵, 优化后细菌总数为  $6.61 \times 10^{10}$  细胞/g, 是优化前的细菌总数的 2.5 倍, 芽胞率达 90.7%。

### 2.4 菌株 BMF 04 固态发酵物对黄瓜幼苗生长的影响

菌株 BMF 04 固态发酵物对黄瓜幼苗的株高、茎粗、地上部和下部鲜重以及须根数有明显影响, 发酵物与土壤的比例不同, 影响大小不同。质量比为 1:250 时, 黄瓜幼苗株高为  $(100.13 \pm 3.15)$  mm, 较 CK 提高 39%; 地上鲜重为  $(4.77 \pm 0.21)$  g, 较 CK 提高 50%, 茎粗与须根数较 CK 均有显著增加 ( $P < 0.05$ ) (表 4)。



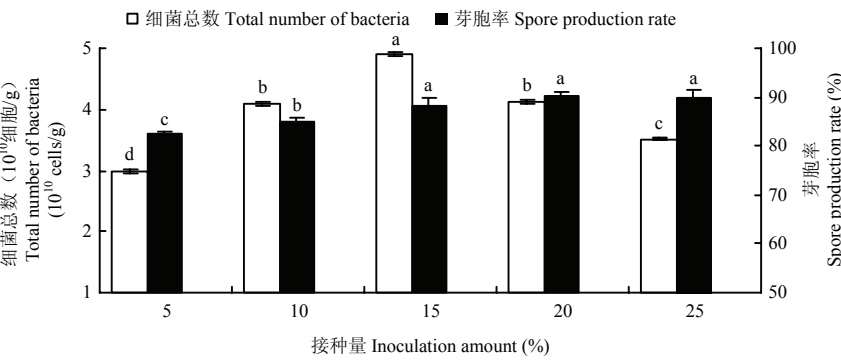


图 11 接种量对菌株 BMF 04 固态发酵细菌总量和芽胞产率的影响

Fig. 11 Effect of inoculation amount on solid state fermentation of strain BMF 04

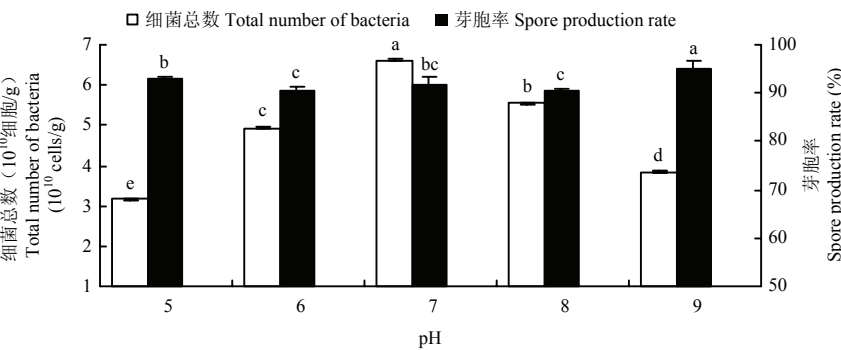


图 12 初始 pH 值对菌株 BMF 04 固态发酵细菌总量和芽胞产率的影响

Fig. 12 Effect of initial pH value on solid state fermentation of BMF 04 strain

表 4 菌株 BMF 04 固态发酵物对黄瓜幼苗生长影响

Table 4 Effect of solid fermentation of BMF 04 strain on cucumber seedling growth

质量比	株高	茎粗	地上鲜重	地下鲜重	须根数
Mass ratio	Plant height (mm)	Stem diameter (mm)	Fresh weight on the ground (g)	Underground fresh weight (g)	Number of roots (root)
1:100	73.23±1.99 e	2.90±0.10 c	2.97±0.21 c	0.33±0.02 d	47.67±3.06 c
1:150	78.70±4.00 d	2.93±0.06 c	3.27±0.23 c	0.40±0.02 c	52.67±4.62 c
1:200	88.00±2.26 c	3.27±0.06 b	3.94±0.06 b	0.45±0.02 b	73.00±4.36 b
1:250	100.13±3.15 a	3.60±0.10 a	4.77±0.21 a	0.51±0.03 a	83.33±7.23 a
1:300	94.93±2.44 b	3.47±0.06 ab	4.66±0.24 a	0.48±0.02 ab	79.00±5.57 ab
CK	72.03±3.71 e	2.97±0.15 c	3.18±0.26 c	0.35±0.02 d	48.33±3.21 c

3 讨论

为了提高生防甲基营养型芽胞杆菌 BMF 04 发酵细菌总数与芽胞率，提高试验效率，降低生产成本，本研究在单因素试验基础上，采用响应面优化法优化培养基配方<sup>[18]</sup>。结果表明，甲基营养型芽胞杆菌 BMF 04 固态发酵最佳培养基配方为：豆粕 92.5%，菌糠 6.7%，硝酸铵 0.6%，氯化钠 0.2%。通过单因素试验筛选出甲基营养型芽胞杆菌 BMF 04 最佳发酵条件为：pH 7，料水比 1:1，温度 32 ℃，培养时间 68 h，接种量为 15%（种子液浓度为 10<sup>8</sup> 细胞/mL），在此条件下，发酵物的细菌总数达 6.61×10<sup>10</sup> 细胞/g，芽胞率达到 90.7%。

优化后的培养基中主要成分为豆粕，该发酵基质不易结块，有利于菌株的生长繁殖<sup>[19,20]</sup>。添加蔗糖和葡萄糖 BMF 04 的细菌总数明显低于对照，秦宇轩等<sup>[21]</sup>研究结果表明，蔗糖和葡萄糖具有高渗透压，导致培养环境不利于细胞生长，引起微生物细胞脱水<sup>[22]</sup>；添加菌糠、玉米粉和米糠细菌总数较高，可能是由于

这些物质中除了含有菌株生长所需的碳源外还含有其他营养物质,如菌糠除含有大量的纤维素与半纤维素外,还含有丰富的食用菌菌体蛋白,能够为菌株生长提供营养<sup>[23]</sup>。

细菌的生长繁殖和芽胞的形成受到无机盐、培养温度、pH 等因素的影响<sup>[24-26]</sup>,本研究结果认为 BMF 04 的发酵适温为 32 ℃,明显低于唐晓星等<sup>[14]</sup>研究的甲基营养型芽胞杆菌 NCU507 固态发酵最佳温度 40 ℃,发酵温度越低,发酵耗能低,利于降低发酵成本,便于该菌株的开发应用;发酵时间相比于李玉洋等<sup>[24]</sup>报道的多粘类芽胞杆菌 SH15 最佳发酵时间 144 h 明显缩短;本研究接种量为 15%,远低于王卉等<sup>[27]</sup>研究的解淀粉芽胞杆菌 L-S60 30%的接种量。熊涛等<sup>[28]</sup>的研究认为甲基营养型芽胞杆菌 B-1 固态发酵最佳 pH 为 7,与本研究结果初始 pH 7 相一致。

芽胞杆菌作为重要的生防资源,促生防病作用显著,在植物病害防治上应用广泛。赵卫松等<sup>[29]</sup>报道解淀粉芽胞杆菌 PHODB35 对番茄幼苗有明显的促生作用,施用菌株后对株高、地上鲜重分别增加 28.21%和 22.59%;徐瑛等<sup>[30]</sup>报道解淀粉芽胞杆菌 GB03 对藜麦生长有促进作用,GB03 处理的藜麦根长与对照相比提高 31.19%,茎长与对照相比提高 6.26%。本试验利用甲基营养型芽胞杆菌 BMF 04 固态发酵物与土壤以 1:250 质量比混合施用,黄瓜幼苗株高和根长显著高于对照 ( $P<0.05$ ),增长率分别为 39%和 50%,对黄瓜幼苗具有显著的促生作用,具有广阔的开发应用前景。

与化学药剂和化学肥料相比,利用生防菌株研制生防菌剂具有无污染、对生态环境影响小等优点,已成为植物病害防治的研究热点,极具发展潜力。目前,本试验仅对甲基营养型芽胞杆菌 BMF 04 固态发酵培养基和发酵条件进行优化以及室内对黄瓜的促生方面的进行了研究,有关于相关菌株的制剂开发和田间应用效果有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] Shan H, Zhao M, Chen D, *et al.* Biocontrol of rice blast by the phenaminomethylacetic acid producer of *Bacillus methylotrophicus* strain BC79[J]. *Crop Protection*, 2013, 44(1): 29-37.
- [2] 王款, 陈泽田, 潘韵, 等. 甲基营养型芽胞杆菌在农业上的应用研究进展[J]. *农业与技术*, 2019, 39(14): 39-41.
- [3] Kalai-Grami L, Karkouch I, Naili O, *et al.* Production and identification of iturin A lipopeptide from *Bacillus methylotrophicus* TEB1 for control of *Phoma tracheiphila*[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2016, 56(8): 864-871.
- [4] Ge B, Liu B, Nwet T T, *et al.* *Bacillus methylotrophicus* strain NKG-1, isolated from Changbai Mountain, China, has potential applications as a biofertilizer or biocontrol agent[J]. *PLoS ONE*, 2016, 11(11): e0166079.
- [5] Madhaiyan M, Poonguzhali S, Kwon S W, *et al.* *Bacillus methylotrophicus* sp. nov. a methanol-utilizing, plant-growth-promoting bacterium isolated from rice rhizosphere soil[J]. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(10): 2490-2495.
- [6] 采俊香, 李月梅. 抱茎苦苣菜内生甲基营养型芽胞杆菌 G-5 抗菌蛋白抗真菌特性研究[J]. *中国植保导刊*, 2017, 37(4): 20-26.
- [7] 殷晓敏, 吴琼, 金志强, 等. 甲基营养型芽胞杆菌对西瓜枯萎病菌拮抗作用的研究[J]. *热带农业科学*, 2017, 37(11): 54-60.
- [8] 谢学文, 董瑞利, 石延霞, 等. 黄瓜炭疽病拮抗细菌的筛选及其抑制效果[J]. *中国生物防治学报*, 2016, 32(2): 215-220.
- [9] 黎肇家, 张焱链, 朱天辉, 等. 甲基营养型芽胞杆菌对黄柏苗的促生作用[J]. *湖南农业科学*, 2019(5): 63-66.
- [10] 赵文琨, 葛蓓宇, 刘炳花, 等. 甲基营养型芽胞杆菌 NKG-1 对番茄白粉病的防病促生作用研究[J]. *中国农学通报*, 2018, 34(23): 104-109.
- [11] 谢学文, 揣红运, 董瑞利, 等. 甲基营养型芽胞杆菌 WF-3 微粉剂的研制及对黄瓜炭疽病的防治效果[J]. *中国生物防治学报*, 2018, 34(5): 722-728.
- [12] 佚名. 我国首登新型生物杀菌剂甲基营养型芽胞杆菌 9912[J]. *河南化工*, 2016, 33(2): 32.
- [13] 刘治会, 杨成德, 金梦军, 等. 枯草芽胞杆菌 262XY2 固体发酵条件优化及对马铃薯炭疽病的防治效果[J]. *中国生物防治学报*, 2019, 35(4): 586-596.
- [14] 唐晓星. 兼性厌氧产蛋白酶菌株的筛选及其发酵豆粕工艺研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2014.
- [15] 潘韵. 一株甲基营养型芽胞杆菌及其培养物和应用[P]. 广东: CN108004181A, 2018-05-08.
- [16] 沈萍, 陈向东. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007.
- [17] 陈美娜, 谷平平, 罗丹, 等. 微量元素 Mn 离子对 DY 芽胞杆菌芽胞形成影响的研究[J]. *中国微生态学杂志*, 2013, 25(12): 1369-1372.
- [18] 李文哲, 王金秋, 范金霞, 等. 牛粪沼液对枯草芽胞杆菌产孢影响[J]. *东北农业大学学报*, 2017, 48(4): 53-60.
- [19] Wang J, Liu Z, Wang Y, *et al.* Production of a water-soluble fertilizer containing amino acids by solid-state fermentation of soybean meal and evaluation

- of its efficacy on the rapeseed growth[J]. *Journal of Biotechnology*, 2014, 187: 34-42.
- [20] Divite R D, Wang C C, Chou S T, *et al.* Using wheat bran and soybean meal as solid state fermentation substances for the production of *Xylaria nigripes* with bioactivities[J]. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2017, 70: 127-133.
- [21] 秦宇轩, 王卉, 张志刚, 等. 解淀粉芽胞杆菌 L-H15 固态发酵参数优化与试验[J]. *农业机械学报*, 2017, 48(5): 258-266.
- [22] Lignell R, Hoikkala L, Lahtinen T. Effects of inorganic nutrients, glucose and solar radiation on bacterial growth and exploitation of dissolved organic carbon and nitrogen in the northern Baltic Sea[J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 2008, 51(3): 209-221.
- [23] 王建忠, 王颖. 利用菌糠生产有机肥的可行性分析[J]. *安徽农业科学*, 2010(5): 370-372.
- [24] 李玉洋, 辛寒晓, 范学明, 等. 菌糠固态发酵法培养多粘类芽胞杆菌 SH15 的工艺[J]. *山东农业科学*, 2017, 49(12): 119-125.
- [25] Yao L, Zhang S, Cao Y, *et al.* Effect of metal ion concentration on sporulation efficiency of *Bacillus subtilis*[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2008, 24(8): 770-772.
- [26] Black E P, Wei J, Altur I, *et al.* Analysis of factors influencing the rate of germination of spores of *Bacillus subtilis* by very high pressure[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 102(7): 65-76.
- [27] 王卉, 游成真, 秦宇轩, 等. 解淀粉芽胞杆菌 L-S60 生物学特性及其固态发酵工艺研究[J]. *中国农业大学学报*, 2016, 21(9): 133-142.
- [28] 熊涛, 唐晓星, 黄涛, 等. 产蛋白酶兼性厌氧菌株的筛选, 酶学性质及发酵豆粕应用探究[J]. *食品科学*, 2014, 35(9): 162-167.
- [29] 赵卫松, 郭庆港, 于稳欠, 等. 解淀粉芽胞杆菌 PHODB35 的溶磷特性及其对番茄的促生作用[J]. *微生物学报*, 2020, 7: 1370-1383.
- [30] 徐瑛, 郭晓农, 蔡德育. 解淀粉芽胞杆菌 GB03 对藜麦生长影响的初探[J]. *大麦与谷类科学*, 2019, 36(5): 10-14.

(责任编辑: 吕平香)