

司云龙,任丽丽,李玉玺,等.一株巨大芽孢杆菌 J1 的生胞培养及优化[J].江苏农业科学,2014,42(10):359-361.

一株巨大芽孢杆菌 J1 的生胞培养及优化

司云龙¹,任丽丽^{1,2},李玉玺^{1,2},陈阳¹

(1. 滨州学院生命科学系,山东滨州 256603; 2. 山东省黄河三角洲野生植物资源开发利用工程技术研究中心/滨州学院,山东滨州 256603)

摘要:以巨大芽孢杆菌 J1 为材料,利用溶磷圈法测定了菌株的解磷能力,优化了菌株的最佳发酵条件、最适培养基。结果表明,此菌株溶磷效果明显;此菌株生长的最适培养时间为 28 h,最适接种量为 6.7%,最适 pH 值为 8.5;最佳碳源为玉米粉与葡萄糖的复合碳源,最佳氮源为大豆粉与硫酸铵的复合氮源。摇瓶培养的接种量为 6.7%,pH 值为 8.5,250 mL 三角瓶中 most 装液体积为 30 mL,培养温度为 30 ℃,培养时间为 28 h,最适宜转速为 180 r/min 的摇瓶培养条件下,巨大芽孢杆菌活菌数各影响因素最佳组合为:玉米粉 20 g/L,葡萄糖 5 g/L,大豆粉 7.5 g/L,硫酸铵 0.33 g/L,各因子对巨大芽孢杆菌活菌数的影响由大到小依次为:硫酸铵浓度 > 玉米粉浓度 > 葡萄糖浓度 > 大豆粉浓度。

关键词:巨大芽孢杆菌;培养基;芽孢率;氮源;碳源;培养条件

中图分类号: S144.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)10-0359-03

植物生长发育过程中,磷元素以多种方式参与生物体内的代谢过程,是植物不可缺少的大量元素之一^[1-2]。土壤中的磷元素主要以难溶磷酸盐的形式存在,可溶性磷含量很少。据统计,世界土壤的平均含磷量约为 0.04%,我国土壤的平均含磷量为 0.02%~0.1%,南方酸性土壤含磷量低于 0.04%^[3-4]。研究发现,土壤中存在解磷微生物,它们能够将磷酸盐转化为可溶性磷供植物吸收利用,解磷菌还可以产生有机酸、生长素、抗生素等物质,刺激作物生长,抑制病原菌生长,改善土壤微环境,从而更有利于植物生长发育^[5-9]。目前对磷细菌的研究仅局限于菌种分离选育及作用效果比较方面,对于影响磷细菌生长的因素研究较少^[10-13]。微生物种类多样,发酵过程中受各种因素的影响,导致菌株发酵水平相对较低^[14]。本试验探讨环境因素对巨大芽孢杆菌生长的影响,并在此基础上探讨该菌的最佳发酵条件,旨在为扩大巨大芽孢杆菌生产规模提供理论依据。

1 材料与方 法

收稿日期:2013-12-11

基金项目:国家级大学生创新创业训练计划(编号:201210449130)。

作者简介:司云龙(1990—),男,从事微生物肥料研究。E-mail: xiaosiwuqing@163.com。

通信作者:任丽丽,讲师,从事微生物肥料研究。E-mail: tutuya_001g@163.com。

1.1 材料

巨大芽孢杆菌 J1 由山东京博控股股份有限公司技术中心生物化工研究所提供。

1.2 培养基

摇瓶基础培养基:玉米粉 30 g,大豆粉 15 g, K₂HPO₄ 2.0 g, MgSO₄ 2.0 g, CaCO₃ 1.5 g, MnSO₄ 0.05 g, H₂O 1 000 mL, pH 值为 7。平板培养基:蛋白胨 10 g,氯化钠 5.0 g,牛肉膏粉 3.0 g,琼脂 15 g, H₂O 1 000 mL。蛋黄培养基:将 50% 的蛋黄液按照 6% 的比例加入平板培养基中。

1.3 方法

1.3.1 巨大芽孢杆菌 J1 解磷效能测定 根据巨大芽孢杆菌 J1 在蛋黄培养基上形成的透明圈直径判断其解磷效能。

1.3.2 培养条件对巨大芽孢杆菌 J1 生长的影响

1.3.2.1 pH 值对巨大芽孢杆菌 J1 生长的影响 采用摇瓶基础培养基培养,分别于 pH 值为 5.5、6.5、7.5、8.5 情况下 180 r/min、30 ℃ 振荡培养 28 h 后进行平板计数。

1.3.2.2 培养时间对巨大芽孢杆菌 J1 生长的影响 采用摇瓶基础培养基培养,在 pH 值为 8.5、转速为 175 r/min、30 ℃ 下分别振荡培养 24、28、32、36 h 后进行计数。

1.3.2.3 接种量对巨大芽孢杆菌 J1 生长的影响 采用摇瓶基础培养基,在 pH 值为 8.5、转速为 180 r/min 条件下将接种量分别为 3.3%、6.7%、10.0% 的摇瓶置于振荡培养箱中 30 ℃ 培养 28 h 后进行计数。

[17] 邵文鹏. 几种常绿阔叶植物抗寒性研究[D]. 泰安:山东农业大学,2009:9-12.

[18] Wang X N, Chen S X, Heng Z, et al. Desiccation tolerance mechanism in resurrection fern - ally *Selaginella tamariscina* revealed by physiological and proteomic analysis[J]. American Chemical Society, 2010, 9(12): 6561-6577.

[19] 何云,李贤伟,李西,等. 2 种野生岩生植物叶片可溶性蛋白含量对低温胁迫的响应[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(18): 7552-7553.

[20] 吴娜. 卫矛属 3 种常绿阔叶树木抗寒性研究[D]. 保定:河北农业大学,2006:12-20.

[21] 张守仁. 叶绿素荧光动力学参数的意义及讨论[J]. 植物学通报, 1999, 16(4): 444-448.

[22] Rhodes D, Hanson A D. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1993, 44(1): 357-384.

[23] Saneoka H, Nagasaka C, Hahn D T, et al. Salt tolerance of glycine-betaine - deficient and - containing maize lines[J]. Plant Physiology, 1995, 107(2): 631-638.

[24] 尹海龙,田长彦. 氮调控对盐环境下甜菜功能叶光系统 II 荧光特性的影响[J]. 植物生态学报, 2013, 37(2): 122-131.

1.3.3 最适培养条件下发酵培养基的优化 按照设计方案, 配制不同的培养基, 250 mL 三角瓶中每瓶装量 30 mL, 原始 pH 值为 8.5, 接种量为 6.7%, 180 r/min 培养 28 h 后平板计数, 采用正交试验法找出最适培养基及最佳碳源、氮源。

2 结果与分析

2.1 巨大芽孢杆菌 J1 解磷能力的测定

由图 1 可知, 巨大芽孢杆菌 J1 在蛋黄培养基上培养 2 d 可产生明显的溶磷圈, 溶磷圈直径与菌落直径比值高达 4.1, 初步判断巨大芽孢杆菌有解磷能力。

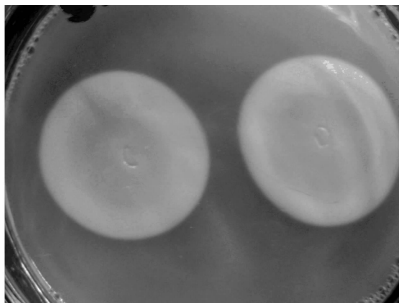


图 1 巨大芽孢杆菌 J1 在蛋黄培养基上形成的溶磷圈

2.2 pH 值对巨大芽孢杆菌 J1 菌株生长的影响

由图 2 可知, 巨大芽孢杆菌 J1 在各 pH 值下长势良好, 在 pH 值为 8.5 条件下生长最好, 活菌数达 35×10^7 CFU/mL。

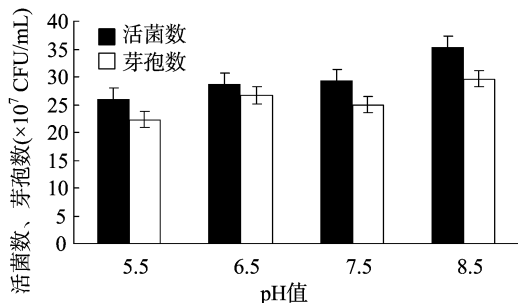


图 2 pH 值对巨大芽孢杆菌 J1 生长的影响

2.3 培养时间对巨大芽孢杆菌 J1 生长的影响

由图 3 可知, 培养 28 h 菌株生长最好, 活菌数为 35×10^7 CFU/mL, 芽孢率为 84%, 到达某一时间拐点后继续培养, 菌体会出现自溶现象。

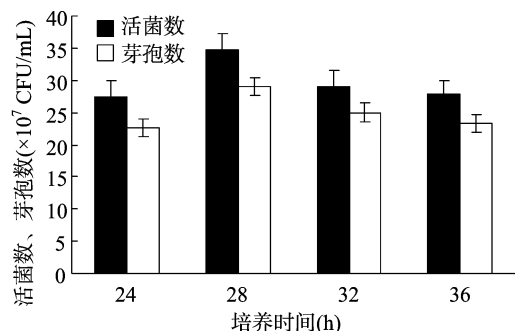


图 3 培养时间对巨大芽孢杆菌 J1 生长的影响

2.4 接种量对巨大芽孢杆菌 J1 生长的影响

接种量对菌体生长有影响, 所以接种量要适度, 接种量过低会导致延滞期过长, 菌体量不高; 接种量过高, 带入培养基内

的代谢产物过多, 反而不利于菌体生长。由图 4 可知, 当接种量为 6.7% 时, 菌株生长最好, 活菌数为 36×10^7 CFU/mL, 芽孢率为 86%。

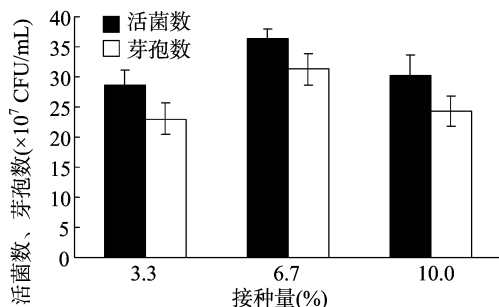


图 4 接种量对巨大芽孢杆菌 J1 生长的影响

2.5 碳源对巨大芽孢杆菌 J1 生长的影响

分别用 30 g/L 玉米粉、10 g/L 葡萄糖、复合碳源(玉米粉、葡萄糖各减半混合在一起)配制碳源培养基, 其他成分同摇瓶基础培养基。接种后按照上述最佳培养条件, 测定活菌总数及芽孢数, 结果表明, 采用玉米粉与葡萄糖的复合碳源作为培养基获得的活菌数、芽孢数较高, 活菌数达到 36×10^7 CFU/mL, 芽孢数达到 35×10^7 CFU/mL(图 5)。

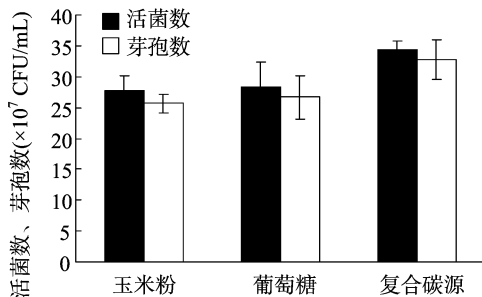


图 5 不同碳源对巨大芽孢杆菌 J1 生长的影响

2.6 氮源对巨大芽孢杆菌 J1 生长的影响

以玉米粉为碳源, 在摇瓶基础培养基中其他成分不变的情况下, 分别以 15.0 g/L 大豆粉、0.67 g/L 硫酸铵、复合氮源(大豆粉、硫酸铵各减半)配制氮源培养基, 接种后按照上述最佳培养条件, 测定活菌数及芽孢数, 结果表明, 采用复合氮源培养基获得的活菌数、芽孢数较高, 活菌数达 35×10^7 CFU/mL, 芽孢数达 33×10^7 CFU/mL, 芽孢率达 95.91%(图 6)。

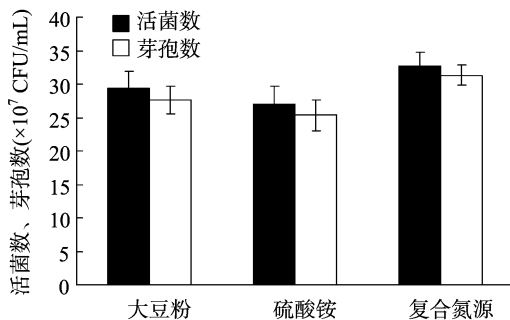


图 6 不同氮源对巨大芽孢杆菌 J1 生长的影响

2.7 正交试验结果

以玉米粉与葡萄糖混合物作为碳源,以大豆粉、硫酸铵混合物作为氮源,结果表明,最佳组合为玉米粉 20 g/L,葡萄糖 5.0 g/L,大豆粉 7.5 g/L,硫酸铵 0.33 g/L,各因子对巨大芽孢杆菌活菌数影响由大到小依次为:硫酸铵浓度 > 玉米粉浓度 > 葡萄糖浓度 > 大豆粉浓度。玉米粉、硫酸铵在 0.05 水平上对试验结果存在显著影响(表 1、表 2)。最适培养条件下在最佳培养基上的巨大芽孢杆菌芽孢生长情况见图 7。

表 1 巨大芽孢杆菌正交试验结果与极差分析

序号	因素水平				活菌数 ($\times 10^7$ CFU/mL)
	玉米粉浓度(g/L)	葡萄糖浓度(g/L)	硫酸铵浓度(g/L)	大豆粉浓度(g/L)	
1	10	3.3	0.17	5.0	22
2	10	5.0	0.25	7.5	25
3	10	6.7	0.33	10.0	26
4	15	3.3	0.25	10.0	17
5	15	5.0	0.33	5.0	38
6	15	6.7	0.17	7.5	37
7	20	3.3	0.33	7.5	34
8	20	5.0	0.17	10.0	33
9	20	6.7	0.25	5.0	30
k_1	24.333	24.333	30.667	30.000	
k_2	30.667	32.000	24.000	32.000	
k_3	32.333	31.000	32.667	25.333	
R	8.000	7.667	8.667	6.667	

表 2 正交试验结果的方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F 比值	显著性
玉米粉	106.889	2	1.056	*
葡萄糖	104.222	2	1.030	
硫酸铵	123.556	2	1.221	*
黄豆粉	70.222	2	0.694	
误差	4.040	8		

注:每种培养基重复 3 次,试验结果为 3 次重复试验的平均值。

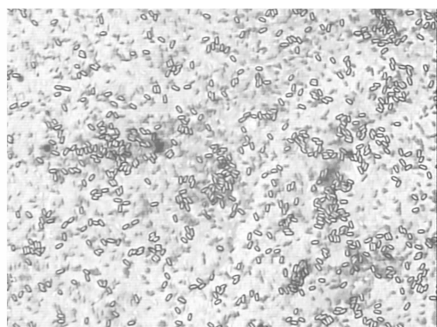


图7 最适培养条件下在最佳培养基上的巨大芽孢杆菌芽孢生长情况

3 结论与讨论

巨大芽孢杆菌 J1 具有较强的解磷能力,在蛋黄培养基上解磷圈明显。在培养基配方为玉米粉 30 g,大豆粉 15 g,磷酸氢二钾 2.0 g,硫酸镁 2.0 g,碳酸钙 1.5 g,硫酸锰 5.0 g,蒸馏水 1 000 mL,转速为 180 r/min,温度为 30 ℃ 的培养条件下,巨大

芽孢杆菌的最适 pH 值为 8.5,活菌数达 35×10^7 CFU/mL;最适培养时间为 28 h,活菌数达到 35×10^7 CFU/mL,芽孢率为 84%;最适接种量为 6.7%,活菌数达 36×10^7 CFU/mL,芽孢率为 86%。本研究表明,培养基成分是影响芽孢形成的重要因素。巨大芽孢杆菌对于碳源、氮源及 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 等离子反应较敏感^[15]。培养基配方不同直接导致发酵菌数存在巨大差异。摇瓶培养的接种量为 6.7%,pH 值为 8.5,250 mL 三角瓶中最适装液体积为 30 mL,培养温度为 30 ℃,培养时间为 28 h,最适宜转速为 180 r/min 的摇瓶培养条件下,巨大芽孢杆菌活菌数各影响因素最佳组合为:玉米粉 20 g/L,葡萄糖 5.0 g/L,黄豆粉 7.5 g/L,硫酸铵 0.33 g/L,各因子对巨大芽孢杆菌活菌数的影响由大到小依次为:硫酸铵浓度 > 玉米粉浓度 > 葡萄糖浓度 > 大豆粉浓度。芽孢的形成是一个极其复杂的过程,受形态结构、化学成分等多方面因素的影响。巨大芽孢杆菌培养成功关键在于获得较高活菌数的同时提高芽孢转化率。本研究表明,巨大芽孢杆菌 J1 营养要求比较低,所需原料来源广、成本低、芽孢率较高。本试验获得的最佳培养条件可以进一步应用于大规模工业化生产中。

参考文献:

- [1] Wallander H. Uptake of P from apatite by *Pinus sylvestris* seedlings colonised by different ectomycorrhizal fungi [J]. Plant and Soil, 2000,218(1/2):249-256.
- [2] 庞欣,李春俭,张福锁. 缺磷胁迫对黄瓜体内磷运输及再分配的影响[J]. 植物营养与肥料学报,1999,5(2):42-48.
- [3] 蒋柏藩. 根据作物、土壤和磷矿条件来看我国磷肥发展的前景[J]. 土壤,1982,14(4):121-127.
- [4] 孙波,张桃林,赵其国. 南方红壤丘陵区土壤养分贫瘠化的综合评价[J]. 土壤,1995(3):119-128.
- [5] 梁锦锋. 解磷细菌(*Bacillus megaterium* var. *phosphaticum*)生长条件及解磷机理的研究[D]. 杭州:浙江大学,2001.
- [6] 臧威,孙剑秋,王鹏,等. 东北地区四种农作物根际解磷细菌的分布[J]. 中国生态农业学报,2009,17(6):1206-1210.
- [7] 林宝英,谭志琼,张容意. 枯草芽孢杆菌 B25 抗菌物质初步研究[J]. 广东农业科学,2013(1):82-84.
- [8] 尹瑞龄. 我国旱地土壤的溶磷微生物[J]. 土壤,1988(5):243-246.
- [9] 林启美,赵小蓉,孙炎鑫,等. 四种不同生态系统的土壤解磷细菌数量及种群分布[J]. 土壤与环境,2000,9(1):34-37.
- [10] 李福后,王伟霞,潘建梅. 有机磷分解细菌的选育及其发酵条件的研究[J]. 中国土壤与肥料,2007(6):74-77.
- [11] 陈凯,李纪顺,杨合同,等. 巨大芽孢杆菌 P1 的解磷效果与发酵条件研究[J]. 中国土壤与肥料,2010(4):73-76.
- [12] 叶云峰,黎起秦,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.
- [13] 郭夏丽,狄源宁,王岩. 枯草芽孢杆菌产芽孢条件的优化[J]. 中国土壤与肥料,2012(3):99-103.
- [14] 梁锦锋,陈欣,唐建军. 1 株解磷细菌基本培养条件的研究[J]. 浙江林学院学报,2002,19(4):8-11.
- [15] 张文芝,郭坚华. 微生物发酵工艺优化研究进展[J]. 广东农业科学,2013(6):114-117.