

秦艳梅,张爱民. 微生态发酵床功能菌株产孢条件的优化[J]. 江苏农业科学,2017,45(4):235-238.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.04.069

微生态发酵床功能菌株产孢条件的优化

秦艳梅¹, 张爱民²

(1. 河北省微生物研究所, 河北保定 071051; 2. 河北大学生物技术中心, 河北保定 071000)

摘要:发酵床养殖技术是依据微生物学、营养学、生态学、空气动力学等原理,利用特有活性的功能微生物复合菌群,持续、稳定地将动物的粪尿废弃物转化为多种营养物质与能量,实现粪尿完全降解的无污染、零排放目标的一种新环保型养殖模式。其中高转化率微生物菌株起着重要作用。对猪排泄物具有除臭功能的枯草芽孢杆菌 N43 进行发酵条件研究,通过单因素试验对培养基成分进行筛选,利用响应面分析法(response surface methodology,简称 RSM)和 Box-Behnken 中心组合试验建立数学模型,确定该菌株最佳培养基浓度为玉米粉 0.5%、大豆饼粉 2.5%、FeSO₄ 0.5%、MgSO₄ 0.05%,最佳培养条件为 pH 值 7.5、种龄 20 h、装量 30 mL/250 mL,芽孢生成率为 95%。

关键词:微生态发酵床;功能菌株;产孢条件;发酵工艺;培养基;培养条件;芽孢形成率;优化

中图分类号: S188+.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)04-0235-04

我国是一个农牧业大国,随着养殖业的迅猛发展和人们对环境保护的重视,在养殖过程中产生的粪便污染问题严重制约了该行业的可持续发展。禽畜粪便的污染也成为绿色农业发展中不可忽视的问题^[1]。发酵床养猪技术运用垫料中

的微生物迅速降解、消化猪的排泄物,从源头实现免冲洗猪栏、无臭味、零污染的养殖目的^[2]。新型微生物发酵床养殖技术可以有效地解决畜禽生产中的粪便处理和环境污染问题,缓解养猪业对环境带来的压力。

本研究通过对具有除臭功能的枯草芽孢杆菌 N43 进行发酵工艺的优化,从而为研制出高效的适宜产业化发展的微生态制剂提供种质资源和理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

枯草芽孢杆菌 N43 菌株,由河北省微生物研究所提供。

收稿日期:2016-04-13

基金项目:河北省科技支撑课题(编号:06207125D-2)。

作者简介:秦艳梅(1970—),女,河北保定人,副研究员,主要从事微生物发酵工程及应用研究。E-mail:qyanmei2004@126.com。

通信作者:张爱民,博士,副研究员,主要从事微生物肥料及工农业废弃物的无害化处理研究。E-mail:13803269908@139.com。

[13] 李京文,李剑玲. 京津冀协同创新发展比较研究[J]. 经济与管理,2015,29(2):13-17.

[14] 刘薇. 京津冀大气污染市场化生态补偿模式建立研究[J]. 管理现代化,2015,19(2):64-65,120.

[15] 杨春河,刘爱秋,白兰,等. 京津冀农业协调发展的历史沿革[J]. 天津农业科学,2014,20(8):72-74.

[16] 杜云飞,连建新,张爱国,等. 京津冀区域一体化视阈下的农业产业协同创新研究[J]. 河北工业大学学报(社会科学版),2014,6(4):9-13,38.

[17] 孙芳,刘明河,刘立波. 京津冀农业协同发展区域比较优势分析[J]. 中国农业资源与区划,2015,36(1):63-70.

[18] 何玲,王军,董谦. 基于京津冀区域经济一体化的农业发展模式[J]. 江苏农业科学,2011,39(2):526-528.

[19] 王克柱,文庆,赵英杰. 保定市休闲农业对接京津发展的优势和机遇及战略重点研究[J]. 农业现代化研究,2011,32(1):69-72.

[20] 张敏,苗润莲,卢凤君,等. 基于产业链升级的京津冀农业协作模式探析[J]. 农业现代化研究,2015,36(3):407-411.

[21] 侯景新,尹卫红. 区域经济分析方法[M]. 北京:商务印书馆,2004:70-71.

[22] Odum H T, Odum E C. Ecology and economy: "Emergy" analysis and public policy in Texas[R]. The Office of Natural Resources and Texas Department of Agriculture, University of Florida, Gainesville, 1987:163-171.

[23] Odum H T. Environmental accounting emergy and decision making [M]. New York: John Wiley & Sons. 1996:320-370.

[24] 孟伟庆,郝翠,李洪远,等. 天津市生态经济系统能值分析及其可持续性评价[J]. 经济地理,2009,29(9):1541-1551.

[25] 李加林,许继琴,张正龙. 基于能值分析的江苏生态经济系统发展态势及持续发展对策[J]. 经济地理,2003,23(5):615-620.

[26] 王建源,薛德强,田晓萍. 山东省农业生态系统能值分析[J]. 生态学杂志,2007,26(5):718-722.

[27] 李双江,胡亚妮. 石家庄市农业生态系统能值演变趋势分析[J]. 湖北农业科学,2013,52(6):1469-1473.

[28] 张月丛. 基于能值方法的承德市农业生态系统分析[J]. 河北师范大学学报(自然科学版),2009,33(4):551-556.

[29] 杜博洋. 河北省耕地系统能值分析[D]. 保定:河北农业大学,2008.

[30] 熊晓波,代力民,邵国凡,等. 生态经济系统的能值分析与可持续发展:以吉林省延边地区为例[J]. 生态学杂志,2004,23(5):206-211.

[31] 薄文广,陈飞. 京津冀协同发展:挑战与困境[J]. 南开学报(哲学社会科学版),2015(1):110-118.

[32] 李卫芳. 北京都市型现代农业发展评价及对策研究[D]. 北京:北京林业大学,2012.

[33] 马同斌,王有年,李华,等. 京津冀都市圈农业合作战略研究[J]. 中国农学通报,2008,24(1):539-544.

葡萄糖、NaCl、(NH₄)₂SO₄、KH₂PO₄·2H₂O、NaH₂PO₄·2H₂O、MnSO₄·H₂O、CuSO₄·5H₂O、MgSO₄·7H₂O、CaCl₂·2H₂O、ZnCl₂·FeSO₄·5H₂O、蔗糖、乳糖、甘油、麦芽糖、可溶性淀粉、麦芽糊精、胰蛋白胍、酵母浸粉、牛肉浸膏、大豆蛋白胍、蛋白胍均为分析纯,玉米粉、大豆饼粉、豆粕为市售。

1.2 试验方法

1.2.1 种子培养及发酵 将试管斜面上活化的菌株接种于装有种子培养基的三角瓶中,振荡后制成均匀的菌悬液。装量为 50 mL/250 mL,200 r/min 37 ℃ 摇床振荡培养 20 h。将种子液按 10% 接种量接种于发酵培养基中。200 r/min 37 ℃ 摇床振荡培养。

1.2.2 培养基单因素试验 单因素试验是通过研究碳源、氮源和无机盐种类,对培养基浓度进行响应面分析。

以玉米粉、可溶性淀粉、葡萄糖、蔗糖、乳糖、甘油、麦芽糖、麦芽糊精代替基础发酵培养基的葡萄糖作为碳源,以胰蛋白胍、蛋白胍、大豆蛋白胍、大豆饼粉、豆粕、牛肉浸膏、酵母浸粉、硫酸铵作为氮源,以 0.05% 的 KH₂PO₄·2H₂O、NaH₂PO₄·2H₂O、MnSO₄·H₂O、FeSO₄·5H₂O、MgSO₄·7H₂O、CuSO₄·5H₂O、CaCl₂·2H₂O、ZnCl₂ 作为发酵培养基的无机盐,进行单因素试验。

1.2.3 培养条件单因素试验 分别从 pH 值、种龄、装量 3 个方面进行单因素试验。

2 结果与分析

2.1 不同碳源对菌株芽孢形成的影响

分别以玉米粉、可溶性淀粉、葡萄糖、蔗糖、乳糖、甘油、麦芽糖、麦芽糊精代替基础发酵培养基的葡萄糖作为碳源,基础培养基中其他成分不变,200 r/min 37 ℃ 摇床培养,取样观察芽孢生成情况。

从表 1 可以看出,培养 72 h 时,N43 菌株在以玉米粉为碳源的培养基中芽孢形成率达到 75.35%,故以玉米粉为最佳碳源。

表 1 不同碳源对 N43 菌株芽孢形成率的影响

碳源	芽孢形成率(%)
葡萄糖	61.07
玉米粉	75.35
可溶性淀粉	24.79
蔗糖	64.32
乳糖	41.32
甘油	27.52
麦芽糖	38.84
麦芽糊精	25.93

2.2 不同氮源对芽孢形成的影响

分别以胰蛋白胍、蛋白胍、大豆蛋白胍、大豆饼粉、豆粕、牛肉浸膏、酵母浸粉、硫酸铵作为氮源,其他成分不变。在 37 ℃、200 r/min 摇床上振荡培养,取样观察,从表 2 可得出,培养 72 h 时,大豆饼粉作氮源时 N43 菌株的芽孢形成率达到 87.73%,故以大豆饼粉为最佳氮源。

2.3 不同无机盐对芽孢形成的影响

分别以 0.05% 的 KH₂PO₄·2H₂O、NaH₂PO₄·2H₂O、MnSO₄·H₂O、FeSO₄·5H₂O、MgSO₄·7H₂O、CuSO₄·5H₂O、

表 2 不同氮源对 N43 菌株芽孢形成率的影响

氮源	芽孢形成率(%)
胰蛋白胍	58.77
蛋白胍	78.84
大豆蛋白胍	82.27
大豆饼粉	87.73
豆粕	78.68
牛肉浸膏	71.69
酵母浸粉	69.67
硫酸铵	75.85

CaCl₂·2H₂O、ZnCl₂ 作为发酵培养基的无机盐,摇振荡床培养。取样观察,计算芽孢形成率。从表 3 中可以看出,MnSO₄·H₂O 和 FeSO₄·5H₂O 为 N43 菌株的最佳无机盐。

表 3 不同无机盐对 N43 菌株芽孢形成率的影响

无机盐	芽孢形成率(%)
KH ₂ PO ₄	45.36
NaH ₂ PO ₄	57.18
MnSO ₄ ·H ₂ O	90.50
FeSO ₄ ·5H ₂ O	85.19
MgSO ₄ ·7H ₂ O	81.17
CuSO ₄ ·5H ₂ O	57.84
CaCl ₂ ·2H ₂ O	54.25
ZnCl ₂	76.19

2.4 培养基浓度响应面法分析

在单因素试验基础上,根据中心组合试验设计原理,以芽孢形成率为指标,选取玉米粉、大豆饼粉、FeSO₄·5H₂O、MgSO₄·7H₂O 4 个因素,分别以 A、B、C、D 表示,每个自变量 3 水平分别以 -1、0、1 进行编码,试验因素及水平编码见表 4,数据用 Design-Expert 软件统计,确定最优发酵培养基浓度。

由表 5 可知,根据回归方差的分析显著性检验,该模型的 P 值<0.05,说明模型是显著的。失拟项误差为 0.399 9,不显著,r²=90.75,说明该模型与实际试验有良好的拟合性,交互项 AC 的偏回归系数最小,说明玉米粉和 FeSO₄ 交互项对产芽孢率影响显著。

基于回归模型方差分析,用软件做出 AC 交互作用对产芽孢率的影响的等高线及响应面图(图 1)。

由上述分析可知,适当浓度的玉米粉、大豆饼粉、FeSO₄ 和 MgSO₄ 等试验因素有利于芽孢的形成,因此可以采用软件优化功能得到最佳试验条件,优化出的最终结果为玉米粉 0.5%、大豆饼粉 2.5%、FeSO₄ 0.5%、MgSO₄ 0.05% 时产芽孢率可达最高。

为检验响应面分析法的可靠性,采用上述最优条件进行验证,实际测得产芽孢率达到 95%。因此,基于响应面法所得到的最佳配方准确可靠。

2.5 培养条件分析

分别对 pH 值、种龄、装量对该菌芽孢形成的影响进行分析,结果如图 2、图 3、图 4 所示。

由图 2、图 3、图 4 可以看出,在培养基 pH 值 7.5、种龄 20 h、装量 30 mL/250 mL 时 N43 菌株的芽孢形成率最高,因此培养基的最佳培养条件是 pH 值 7.5、种龄 20 h、装量

表 4 响应面分析试验结果

试验号	A:玉 米粉	B:大豆 饼粉	C: FeSO ₄	D: MgSO ₄	产芽孢率 (%)
1	0.000	1.000	-1.000	0.000	88.2
2	0.000	0.000	0.000	0.000	94.9
3	0.000	1.000	1.000	0.000	80.8
4	0.000	-1.000	0.000	-1.000	78.3
5	0.000	0.000	0.000	0.000	89.7
6	0.000	0.000	-1.000	1.000	84.7
7	1.000	1.000	0.000	0.000	83.3
8	0.000	0.000	0.000	0.000	88.9
9	0.000	0.000	-1.000	-1.000	76.4
10	-1.000	-1.000	0.000	0.000	83.3
11	0.000	0.000	0.000	0.000	91.4
12	0.000	-1.000	1.000	0.000	92.7
13	1.000	-1.000	0.000	0.000	88.9
14	0.000	-1.000	0.000	1.000	86.5
15	1.000	0.000	0.000	1.000	84.9
16	0.000	-1.000	-1.000	0.000	88.6
17	1.000	0.000	1.000	0.000	82.6
18	-1.000	0.000	0.000	-1.000	75.6
19	-1.000	0.000	0.000	1.000	79.1
20	-1.000	0.000	1.000	0.000	88.7
21	0.000	1.000	0.000	1.000	83.5
22	0.000	0.000	1.000	-1.000	81.1
23	0.000	0.000	0.000	0.000	89.7
24	1.000	0.000	0.000	-1.000	72.6
25	0.000	0.000	1.000	1.000	94.5
26	-1.000	0.000	-1.000	0.000	72.4
27	0.000	1.000	0.000	-1.000	75.8
28	1.000	0.000	-1.000	0.000	87.3
29	-1.000	1.000	0.000	0.000	78.1

30 mL/250 mL 时芽孢形成率最高。

3 讨论与结论

生物除臭技术是通过微生物的生理代谢活动利用恶臭物质,将其氧化成无臭、无害终产物,达到除臭的目的^[3]。发酵床养猪技术利用具有生物除臭功能的微生物菌株,资源合理配置,有利于绿色农业发展。芽孢杆菌具有抗逆性强、营养需求简单、繁殖快、易存活,生长过程中产生抗菌活性物质增强对病害的抵抗能力等诸多优点^[4],成为微生态制剂的首选菌种。

芽孢的形成受营养物质和环境因素双重影响^[5-6]。本研究表明,影响芽孢形成的主要因素是培养基成分和培养条件。甄静等对枯草芽孢杆菌 XK-1 产芽孢条件的优化试验结果表明,培养基的氮源、碳源和无机盐的配比均对芽孢形成有影响^[7],这与本研究结果一致。孙梅等对纳豆芽孢杆菌芽孢形成的研究表明,葡萄糖浓度对菌体生长和芽孢形成均有影响,浓度低时,提高葡萄糖浓度能提高菌体量,但是芽孢形成几乎不受影响;过高的葡萄糖浓度抑制菌体生长,且芽孢形成率降低^[8]。液体装量直接影响通气量即溶氧,装量小即通气量大,可促进菌体的生长,提高芽孢形成率。Karim 等对球形芽孢杆菌(*B. sphericus*)溶解氧与芽孢形成关系进行了研究,结果表明随着溶解氧浓度升高,芽孢形成率也随之上升^[9]。这与本研究结果不完全一致,可能与菌株有关。宋卡魏等报道 pH 值 7.0 时芽孢产量最大^[10];路程等的研究表明,中性或偏酸的培养基起始 pH 值会促进芽孢的形成,而偏碱性会抑制芽孢的形成^[11]。本研究在 pH 值 7.5 时,产芽孢率最大,可能与菌体本身的特性有关。本研究对枯草芽孢杆菌 N43 的发酵产芽孢条件进行了优化,达到了较高的芽孢浓度,为进一步的小试及中试生产奠定了基础。

表 5 产芽孢率的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	1 019.68	14	72.83	9.81	<0.000 1	显著
A:玉米粉	41.81	1	41.81	5.63	0.032 5	
B:大豆饼粉	68.16	1	68.16	9.18	0.009 0	
C:FeSO ₄	43.32	1	43.32	5.84	0.030 0	
D:MgSO ₄	237.63	1	237.63	32.01	<0.000 1	
AB	0.040	1	0.040	5.388 × 10 ⁻³	0.942 5	
AC	110.25	1	110.25	14.85	0.001 8	
AD	19.36	1	19.36	2.61	0.128 6	
BC	33.06	1	33.06	4.45	0.053 3	
BD	0.063	1	0.063	8.419 × 10 ⁻³	0.928 2	
CD	6.50	1	6.50	0.88	0.365 2	
A ²	248.47	1	248.47	33.47	<0.000 1	
B ²	33.99	1	33.99	4.58	0.050 5	
C ²	7.00	1	7.00	0.94	0.347 8	
D ²	288.07	1	288.07	38.81	<0.000 1	
残差	103.93	14	7.42			
失拟误差	80.80	10	8.08	1.40	0.399 9	不显著
纯误差	23.13	4	5.78			
误差总和	1 123.61	28				

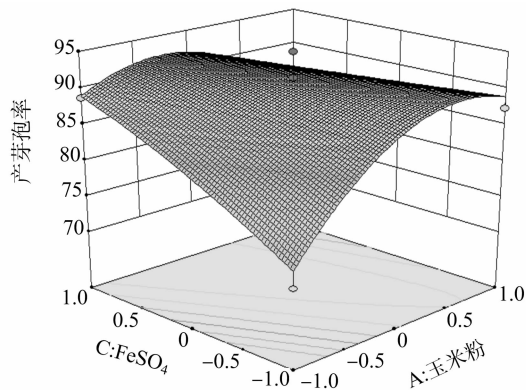


图1 玉米粉与 FeSO₄ 交互项的等高线与响应面图

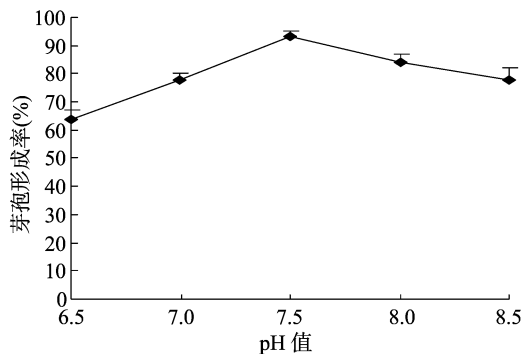
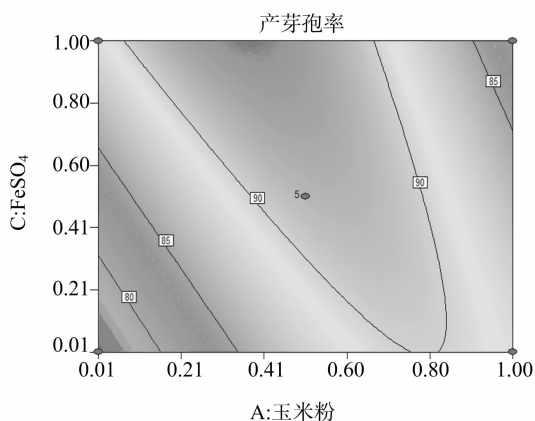


图2 pH 值对芽孢形成率的影响

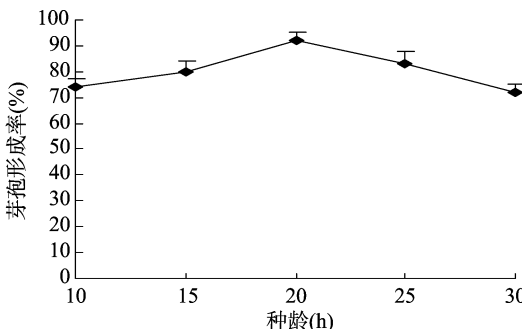


图3 种龄对芽孢形成率的影响

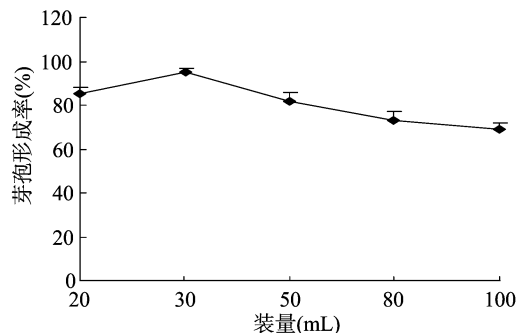


图4 装量对芽孢形成率的影响

参考文献:

[1]仇焕广,廖绍攀,井月,等.我国畜禽粪便污染的区域差异与发展趋势分析[J].环境科学,2013,34(7):2766-2774.
[2]蒋建明,闫俊书,白建勇,等.微生物发酵床养猪模式的关键技术研究与应用[J].江苏农业科学,2013,41(9):173-176.
[3]刘胜洪,程驹,郭长江,等.微生物除臭菌对改善畜禽养殖场环境的应用初探[J].天津农业科学,2011,17(4):25-27.

[4]张保全,朱年华.芽孢杆菌在畜牧业中应用的研究进展[J].江西畜牧兽医杂志,2007(1):2-3.
[5]郭荣君,王步云,李世东.营养对生防菌株 BH1 芽孢产量的影响研究[J].植物病理学报,2005,35(3):283-285.
[6]Lu X Y,Li S Z,Ma P,et al. Isolation and partial purification of an extracellular metabolite from a *Bacillus subtilis* strain NCD-2 active against *Verticillium dahliae* [J]. Shandong Science, 2005, 18(3): 22-25.
[7]甄静,郭直岳,谢宝恩,等.枯草芽孢杆菌 XK-1 产芽孢条件的优化[J].中国农学通报,2012,28(27):146-151.
[8]孙梅,匡群,施大林,等.培养条件对纳豆芽孢杆菌芽孢形成的影响[J].饲料工业,2006,27(8):19-24.
[9]Karim M,Lucas R J,Osborne K J,et al. The effect of oxygen on the sporulation and toxicity of *Bacillus sphaericus* 2362 [J]. Biotechnology Letters,1993,15(1):47-50.
[10]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.
[11]路程,周长海,于红梅,等.凝结芽孢杆菌 T50 产芽孢条件优化的研究[J].中国酿造,2009(7):93-95.