

假单胞菌菌株 ZL8 发酵培养基及发酵条件的优化

张敏, 郑媛, 赵玉洋, 周骏辉, 南铁贵*, 袁媛*

(中国中医科学院 中药资源中心, 北京 100700)

[摘要] **目的:**课题组前期从猪苓菌核中分离得到对丹参枯萎病等植物病原真菌具有广谱抑制作用且对植物生长有促进作用的假单胞菌菌株 ZL8, 该研究在此基础上对假单胞菌菌株 ZL8 的发酵培养基和发酵条件进行优化, 以提高单位体积发酵液中菌体数量, 为此菌株的开发和应用提供基础。**方法:**测定 ZL8 菌株在 LB 培养基中的生长曲线, 明确其在液体培养基中的生长规律; 以 ZL8 菌株发酵液中活菌数、菌体干重和菌悬液 A_{600} 值为检测指标, 对不同种类的氮源、碳源及无机盐进行单因素考察以确定最适培养基组分, 并进行正交试验优化培养基配比, 以筛选最优发酵培养基; 对 ZL8 菌株的接种量、培养温度、时间和转速等 4 个方面进行单因素和正交试验考察以确定最优培养条件。**结果:**假单胞菌菌株 ZL8 的液体发酵最佳培养基为蛋白胨 $15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、葡萄糖 $7.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、氯化钾 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 发酵 48 h 后, 发酵液活菌数可达 $8.93\times 10^9\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$, 为 LB 液体培养基的 3.93 倍 ($P<0.01$); 最佳发酵条件为接种量 3%、温度 $28\text{ }^\circ\text{C}$ 、时间 72 h、转速 $220\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 发酵液中活菌数可达 $6.37\times 10^{10}\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。**结论:**优化后的培养基配方和发酵条件相对 LB 培养基和初始发酵条件, 不仅可有效提高单位体积中假单胞菌 ZL8 菌株的菌体量及延长菌株生长的稳定期, 而且可降低培养基成本, 为假单胞菌 ZL8 的高效发酵和应用提供理论基础。

[关键词] 假单胞菌 ZL8; 猪苓内生菌; 生防菌; 培养基优化; 发酵条件优化

[中图分类号] R284.2; R289; R22; R2-031; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)22-0174-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221318

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220816.0846.001.html>

[网络出版日期] 2022-08-16 10:31

Optimization of Culture Medium and Fermentation Condition of *Pseudomonas* ZL8

ZHANG Min, ZHENG Yuan, ZHAO Yuyang, ZHOU Junhui, NAN Tiegui*, YUAN Yuan*

(National Resource Center for Chinese Material Media, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** In the previous stage, our research group isolated *Pseudomonas* ZL8 from *Polyporus umbellatus*, which has a broad-spectrum inhibitory effect on plant pathogenic fungi such as *Fusarium oxysporum* of *Salvia miltiorrhiza* and promotes plant growth. On this basis, this study optimized the fermentation medium and conditions of *Pseudomonas* ZL8, to improve the number of bacteria in the fermentation broth per unit volume, and provide a basis for the development and application of this strain. **Method:** The growth curve of strain ZL8 in LB culture medium was determined and its growth law in liquid medium was clarified. With the number of live bacteria in the fermentation broth of strain ZL8, the dry weight of the bacteria and the A_{600} value of the broth as detection indicators, single factor investigation was carried out on different nitrogen sources, carbon sources and inorganic salts to determine the optimal medium components. Additionally, orthogonal test was conducted to optimize the component ratio to screen the optimal fermentation medium. Similarly, single

[收稿日期] 2022-07-18

[基金项目] “科技助力经济 2020”重点专项; 中国中医科学院科技创新工程项目(CI2021A041/CI2021B041); 中央本级重大增减支项目(2060302)

[第一作者] 张敏, 在读硕士, 从事中药资源与分子生药学研究, E-mail: adazbd@163.com

[通信作者] * 袁媛, 研究员, 博士生导师, 从事中药鉴定与分子生药学研究, Tel: 010-64087649, E-mail: y_yuan0732@163.com;

* 南铁贵, 副研究员, 硕士生导师, 从事中药质量评价研究, Tel: 010-64087649, E-mail: nantiegui@163.com

factor investigation and orthogonal test were also carried out in four aspects: inoculation amount, culture temperature, time and rotating speed to obtain the optimal culture conditions. **Result:** The optimal medium for liquid fermentation of strain ZL8 was peptone $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, glucose $7.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, and potassium chloride $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. After 48 h of fermentation, the number of viable bacteria in the fermentation liquid could reach $8.93\times 10^9 \text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$, 3.93 times that of LB liquid medium ($P<0.01$). The optimal fermentation conditions were as follows: inoculation amount 3%, temperature $28 \text{ }^\circ\text{C}$, time 72 h, and rotating speed $220 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, and the number of viable bacteria in the fermentation broth could reach $6.37\times 10^{10} \text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$. **Conclusion:** Compared with LB culture medium and the initial fermentation conditions, the optimized culture medium and conditions could effectively increase the bacterial volume of strain ZL8 per unit volume and prolong the stable growth of the strain, with low medium cost, which provided a theoretical basis for the efficient fermentation and application of *Pseudomonas* ZL8.

[Keywords] *Pseudomonas* ZL8; endophytic fungus of *Polyporus umbellatus*; biocontrol bacteria; optimization of culture medium; optimization of fermentation conditions

微生物与植物在长期协同进化过程中形成了复杂又密切的关系,植物为微生物的生长繁殖提供适宜的环境,同时微生物直接或间接参与植物的生长发育、营养吸收、抵抗生物及非生物胁迫等生命活动^[1-3]。早在20世纪20年代已有研究报道土壤中常见的腐生真菌和细菌具有防治植物根腐病的作用,通过添加外源微生物调整植物的微生态环境,减少病原菌所致病害发生,达到防治病害的目的^[4]。与化学防治相比,微生物防治因绿色环保、安全可持续性的特点,显现出巨大的开发应用潜力^[5-6]。研究表明,微生物可通过多种机制防治植物病害,部分生防菌与病原菌竞争生存空间或碳水化合物、无机元素等营养物质抑制病原菌微生物生长;部分生防菌可诱导改变植物内源激素平衡状况影响植物抗逆性;部分生防菌可提高宿主植物防御酶活性以抑制病原菌生长;部分生防菌诱导植物产生次生代谢产物增强其抗病能力;部分生防菌可在生境产生抗生素阻止其他病原菌定殖等等^[7-9]。目前,生防菌主要来自植物根际土壤微生物和植物内生菌。

药用植物因特殊的内环境与微环境,蕴含着丰富而独特的内生菌资源,在提高植物抗逆能力、促进植物生长、修复土壤等方面具有极大的应用价值^[10-12]。陆洁森等^[13]从西红花中筛选得到内生真菌CS05,对西红花球茎腐烂病病原菌尖孢镰刀菌有明显抑制作用;吴启婷等^[14]从白术中筛选得到内生真菌AM569,对3种白术根腐病病原菌有显著抑制作用;黄贻杰等^[15]从三七中分离得到一株内生菌,对人参根腐病原菌尖孢镰刀菌有显著抑制作用,同时可促进人参幼苗生长;赵疆等^[16]从甘肃贝母中分离到多株内生细菌并制成复合菌剂作用于宿主,可明显提高贝母内源激素水平及抗氧化能力;高红等^[17]

在浑源黄芪中分离得到85株内生菌,大多数菌株可通过生成吡啶乙酸促进植株生长。本课题组前期在猪苓菌核中分离得到一株假单胞菌ZL8,其对桃褐腐病菌、番茄灰霉病菌、丹参枯萎病菌等病原真菌生长有抑制作用,有较强的溶磷作用、产铁载体能力和产吡啶-3-乙酸能力,且促生效果明显,具备开发发生防菌剂的潜力^[18]。

有效活菌数是衡量生防菌剂品质的关键指标,通过优化培养基和发酵条件可提高单位体积发酵液中的生物量,为开发应用菌株提供基础。本研究以发酵液中菌体数、菌体干重及菌悬液 A_{600} 值为评价指标,采用单因素和正交试验设计,对假单胞菌ZL8的发酵培养基和发酵条件进行优化,为该菌株的进一步开发利用奠定基础。

1 材料

1.1 供试菌种 供试菌种假单胞菌(*Pseudomonas agarici*)ZL8由本课题组前期分离自健康状态猪苓(*Polyporus umbellatus*)菌核^[18],为中国中医科学院中药资源中心实验室鉴定并保藏。

1.2 试剂与培养基 葡萄糖、麦芽糖、甘露醇、磷酸氢二钠、硫酸镁(天津市津科精细化工研究所,批号分别为20210510、20210125、20210108、20210112、20200915);酵母提取物、胰蛋白胨(美国Oxoid公司,批号分别为2819455-02、2927172);可溶性淀粉、牛肉浸出粉(北京奥博星生物技术有限责任公司,批号分别为20200512、20220614);碳酸钙(天津市大茂化学试剂厂,批号20170103);蔗糖(国药集团化学试剂有限公司,批号20211118);大豆蛋白胨(上海麦克林公司,批号C11475368);硫酸铵(北京索莱宝科技有限公司,批号3011033);氯化钾(国药集团试剂有限公司,批号F20110601);氯化钠(天津

奥普生化工有限公司,批号20200616);磷酸氢二钾(北京化工厂,批号20151109);所有试剂均为分析纯。

LB培养基:蛋白胨 10 g·L⁻¹,酵母提取物 5 g·L⁻¹,氯化钠 10 g·L⁻¹,121 °C 高温高压灭菌 15 min;固体培养基中另加琼脂 15 g·L⁻¹。基础发酵培养基:蛋白胨 15 g·L⁻¹,葡萄糖 7.5 g·L⁻¹,氯化钾 10 g·L⁻¹,调 pH 至 9.0±0.2,121 °C 高温高压灭菌 15 min。

1.3 仪器 Excella E24R 型恒温摇床(德国 Eppendorf 公司);SX-700 型高压蒸汽灭菌锅(中国香港 GENE 有限公司);WFJ7200 型紫外分光光度计(尤尼柯上海仪器有限公司);Thermo Scientific 型超低温冰箱;DL-CJ-2ND I 型洁净工作台(北京市东联哈尔仪器制造有限公司);WS2-134-75 型电热恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 菌株生长曲线测定 在无菌环境中,将 2×10⁷ cfu·mL⁻¹浓度的菌液以 1% 接种量接种至种子培养液,30 °C、200 r·min⁻¹ 条件下培养。自接种起,间隔 4 h 取发酵液,测定相应的菌悬液 A₆₀₀ 值,根据数据绘制菌株 ZL8 生长曲线。

2.2 种子液制备 取假单胞菌 ZL8 在 LB 平板上三区划线活化,30 °C 培养箱中过夜培养。将单菌落接种于 50 mL LB 液体培养基中,于 30 °C、200 r·min⁻¹ 震荡培养 24 h。

2.3 菌株发酵培养基条件的优化

2.3.1 不同氮源对 ZL8 生长的影响 分别选取牛肉浸出粉、大豆蛋白胨、硫酸铵、硝酸钾、蛋白胨、氯化铵为培养基氮源,以 1% 接种量,28 °C、200 r·min⁻¹ 条件下发酵培养 48 h,测定发酵液活菌数、菌悬液 A₆₀₀ 及菌体干重。

2.3.2 不同碳源对 ZL8 生长的影响 分别选取葡萄糖、甘露醇、麦芽糖、酵母粉、淀粉、蔗糖为培养基碳源,以 1% 接种量,28 °C、200 r·min⁻¹ 条件下发酵培养 48 h,测定发酵液活菌数、菌悬液 A₆₀₀ 及菌体干重。

2.3.3 无机盐对 ZL8 生长的影响 分别选取磷酸氢二钠、氯化钾、硫酸镁、氯化钠、磷酸氢二钾、碳酸钙为培养基无机盐,以 1% 接种量,28 °C、200 r·min⁻¹ 条件下发酵培养 48 h,测定发酵液活菌数、菌悬液 A₆₀₀ 及菌体干重。

2.3.4 培养基配方的正交试验 在单因素试验的基础上,选取蛋白胨为氮源,葡萄糖为碳源,氯化钾

为无机盐进行正交试验。以发酵液活菌数、菌悬液 A₆₀₀ 及菌体干重为检测指标,采用 L₉(3⁴) 正交表考察培养基最佳配比工艺,因素水平见表 1。

表 1 培养基配方的正交试验因素水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	A 蛋白胨/g·L ⁻¹	B 葡萄糖/g·L ⁻¹	C 氯化钾/g·L ⁻¹	D 空白
1	5	2.5	5	1
2	10	5	10	2
3	15	7.5	15	3

2.4 菌株培养条件的优化

2.4.1 接种量 在上述优化的基础上,分别以 1%、2%、3%、5%、7%、9% 的接种量进行接种,28 °C、200 r·min⁻¹ 条件下发酵培养 48 h,测定发酵液活菌数、菌悬液 A₆₀₀ 及菌体干重。

2.4.2 培养温度 在上述优化的基础上,分别在 25、28、30、32、34、37 °C 条件下,以 5% 接种量,28 °C、200 r·min⁻¹ 条件下发酵培养 48 h,测定发酵液活菌数、菌悬液 A₆₀₀ 及菌体干重。

2.4.3 培养时间 在上述优化的基础上,发酵培养 24、36、48、60、72、84、96 h,以 5% 接种量,于 28 °C、200 r·min⁻¹ 条件下分别测定活菌数、菌悬液 A₆₀₀ 和菌体干重。

2.4.4 转速 在上述优化的基础上,分别将转速调整为 140、160、180、200、220、240 r·min⁻¹,以 5% 接种量,于 28 °C 条件下发酵培养 72 h,测定活菌数、菌悬液 A₆₀₀ 和菌体干重。

2.4.5 发酵条件的正交试验 在单因素试验的基础上,参考最佳培养温度 28 °C、最佳发酵时间 72 h、最佳接种量 5%、最佳转速 220 r·min⁻¹,以发酵液活菌数、菌悬液 A₆₀₀ 及菌体干重为检测指标,采用 L₉(3⁴) 正交表考察各培养条件间的相互作用,因素水平见表 2。

表 2 发酵条件的正交试验因素水平

Table 2 Factors and levels of orthogonal test

水平	A 温度/°C	B 时间/h	C 接种量/%	D 转速/r·min ⁻¹
1	28	60	1	200
2	30	72	3	220
3	32	84	5	240

2.5 数据统计分析 方差分析和差异显著性分析采用软件 SPSS 23.0 进行,数据统计与图片处理采用软件 Graphpad Prism 7 进行。

3 结果与分析

3.1 菌株 ZL8 生长曲线 菌株 ZL8 在 4~24 h 为对数生长期,此时菌体呈快速增长状态;24~38 h 时,菌体生长进入平台期,此时菌体量最大;随着发酵时间延长,生物量开始减少,细菌进入衰亡期。见图 1。

3.2 菌株发酵培养基条件的优化

3.2.1 氮源 以蛋白胨为培养基氮源时,假单胞菌 ZL8 的活菌数和菌体干重明显高于其他 5 种氮源 ($P < 0.05$),其中菌体数量可达 3.5×10^9 cfu·mL⁻¹;其菌悬液 A_{600} 值显著高于氯化铵、硝酸钾、大豆蛋白胨和硫酸铵等 4 种碳源 ($P < 0.05$),发酵效率高;同时蛋白胨价格较牛肉粉经济,综合比较,选用蛋白胨为

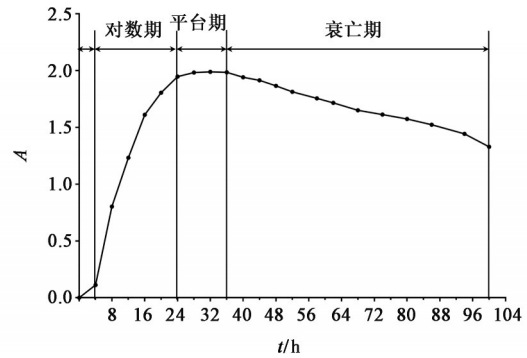
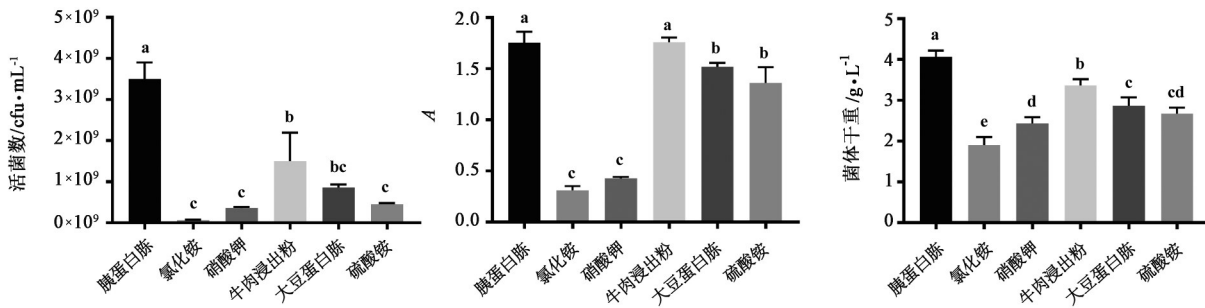


图1 假单胞菌 ZL8 生长曲线

Fig. 1 Growth curve of *Pseudomonas* ZL8

培养基最佳氮源。见图 2。



注:不同小写字母表示 $P < 0.05$ (表 3-表 8 同)

图2 不同氮源对假单胞菌 ZL8 菌体生长量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Effect of different nitrogen sources on growth of *Pseudomonas* ZL8 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.2.2 碳源对菌株生长的影响 以葡萄糖为培养基碳源时,假单胞菌 ZL8 的活菌数和菌体干重均显著高于其他碳源 ($P < 0.05$),其中菌体数量可达 2.3×10^9 cfu·mL⁻¹;其菌悬液 A_{600} 值显著高于可溶性

淀粉、酵母粉、麦芽糖和蔗糖等 4 种碳源 ($P < 0.05$),发酵效率高;同时葡萄糖价格较甘露醇经济,综合比较,选用葡萄糖作为培养基最佳碳源。不同碳源对假单胞菌 ZL8 菌体生长量的影响见图 3。

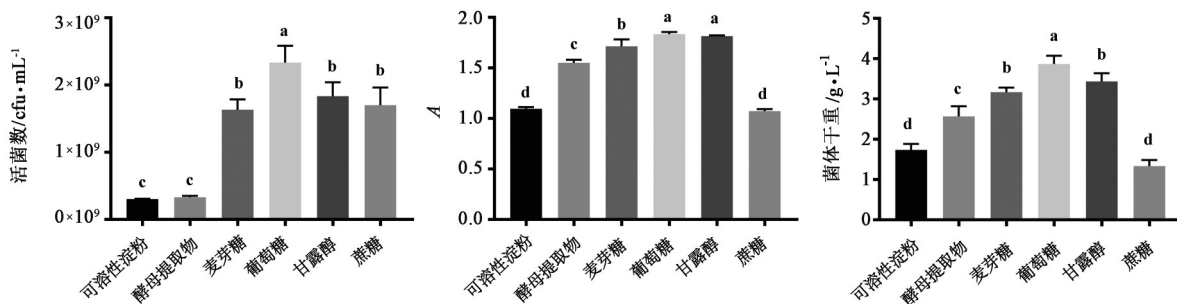


图3 不同碳源对假单胞菌 ZL8 菌体生长量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Effect of different carbon sources on growth of *Pseudomonas* ZL8 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.2.3 无机盐 当氯化钾为培养基无机盐时,假单胞菌 ZL8 的活菌数显著高于其他 5 种无机盐 ($P < 0.05$),其中菌体数量可达 2.9×10^9 cfu·mL⁻¹;菌体干重及菌悬液 A_{600} 值显著高于氯化钠、磷酸氢二钾和碳酸钙等 3 种无机盐 ($P < 0.05$),发酵效率高;综合比较,选用氯化钾为培养基最佳无机盐。见图 4。

3.2.4 培养基条件的正交优化 根据上述氮源、碳

源和无机盐的单因素试验结果,选择蛋白胨(A)、葡萄糖(B)、氯化钾(C)进行 3 因素 3 水平的正交实验,以确定最适合 ZL8 菌株生长的培养基。正交试验结果表明,3 个因素对假单胞菌 ZL8 生长的影响顺序为蛋白胨>葡萄糖>氯化钾;最佳培养基组合为 $A_3B_3C_2$,即蛋白胨 $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、葡萄糖 $7.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、氯化钾 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。经试验验证,在最优组合下发酵液中活菌

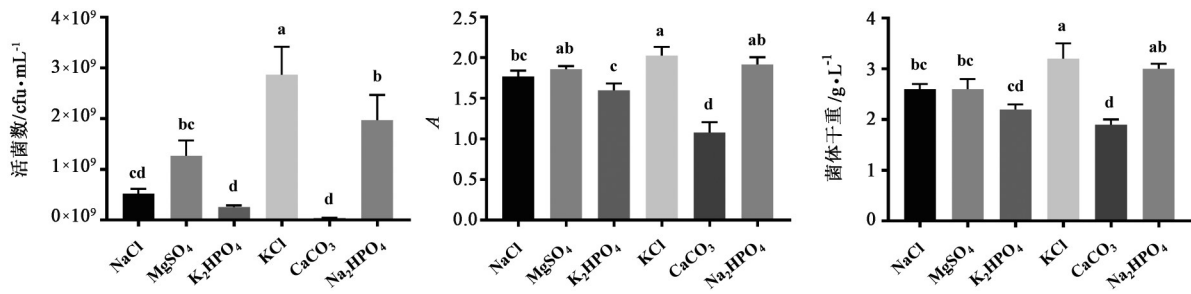


图4 不同无机盐对假单胞菌 ZL8 菌体生长量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 4 Effect of different organic salts on growth of *Pseudomonas ZL8* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

数可达 8.93×10^9 cfu·mL⁻¹, 为同期对照 LB 液体培养基的 3.93 倍 ($P < 0.01$)。见表 3。

表3 培养基组分正交实验结果与分析

Table 3 Results and analysis of orthogonal experiments of medium components

实验号	因素				细菌总数 $\times 10^9$ /cfu·mL ⁻¹	菌悬液 A_{600}	菌体干重/g·L ⁻¹
	A	B	C	D			
1	1	1	1	1	0.54	1.139	1.450
2	1	2	2	2	1.03	1.412	1.619
3	1	3	3	3	3.73	1.638	2.113
4	2	1	2	3	1.73	1.525	1.893
5	2	2	3	1	13.67	1.815	2.709
6	2	3	1	2	4.90	1.736	2.489
7	3	1	3	2	1.30	1.533	1.773
8	3	2	1	3	24.33	1.841	3.275
9	3	3	2	1	40.67	2.090	3.640

注:因素水平同表1

3.3 菌株培养条件的优化

3.3.1 接种量 以5%为接种量时,假单胞菌 ZL8 的菌体干重和菌悬液 A_{600} 显著高于其他5种接种量 ($P < 0.05$); 活菌数显著高于2%、3%、7%、9% 4种接

种量,为 2.3×10^9 cfu·mL⁻¹。结果表明,当接种量低于5%时,菌体生长较慢,当接种量高于5%时,短时间内菌体大量增殖,会发生菌体自溶。因此,确定5%为最佳接种量。见图5。

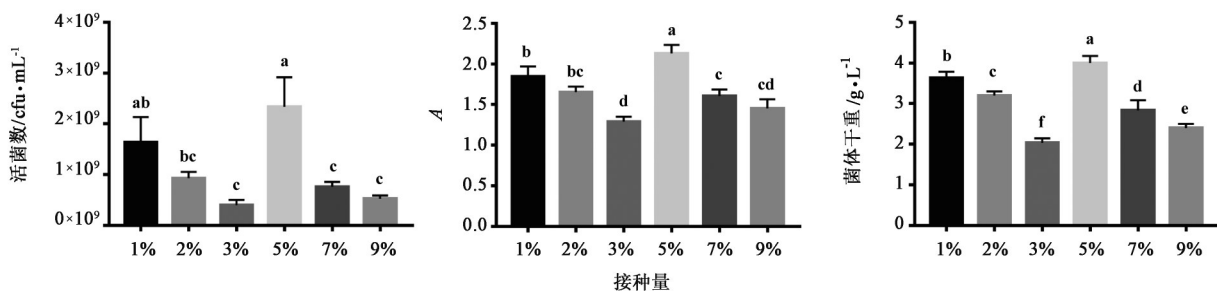


图5 不同接种量对假单胞菌 ZL8 菌体生长量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 5 Effect of different inoculation amount on growth of *Pseudomonas ZL8* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.3.2 培养温度 当培养温度为28℃时,假单胞菌 ZL8 的活菌数和菌体干重均显著高于其他5种培养温度 ($P < 0.05$), 菌体数可达 8.3×10^9 cfu·mL⁻¹; 菌悬液 A_{600} 值显著高于30、32、34、37℃温度培养。结果表明,菌体在28℃生长效率最高,随着温度升高,菌体生长状况受到影响。因此,确定28℃为最佳培养

温度。见图6。

3.3.3 培养时间 当发酵时间为72h时,假单胞菌 ZL8 的活菌数、菌体干重及菌悬液 A_{600} 均明显高于其他时间点 ($P < 0.05$), 菌体数可达 5.4×10^9 cfu·mL⁻¹。结果表明,在优化后的培养基中发酵72h时活菌量最多,随着发酵时间的增加,活菌数下降。因此,确

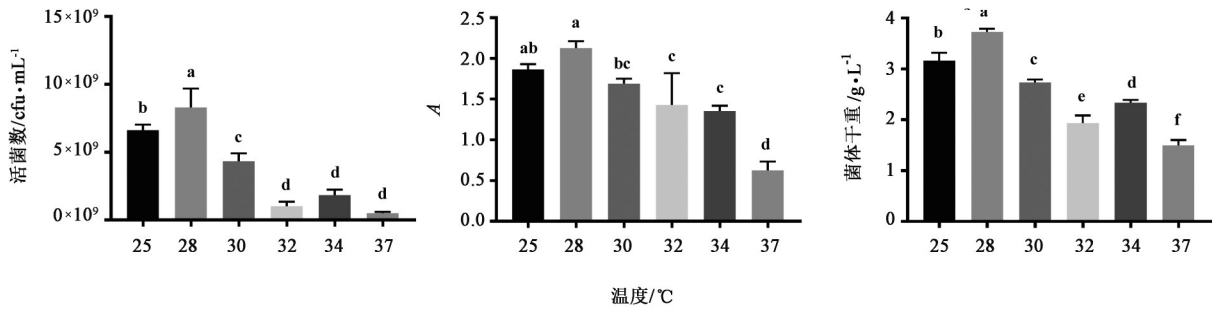


图6 不同温度对假单胞菌ZL8菌体生长量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 Effect of different temperature on growth of *Pseudomonas ZL8* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

定72 h为最佳发酵时间。不同时间对假单胞菌ZL8 菌体生长量的影响见图7。

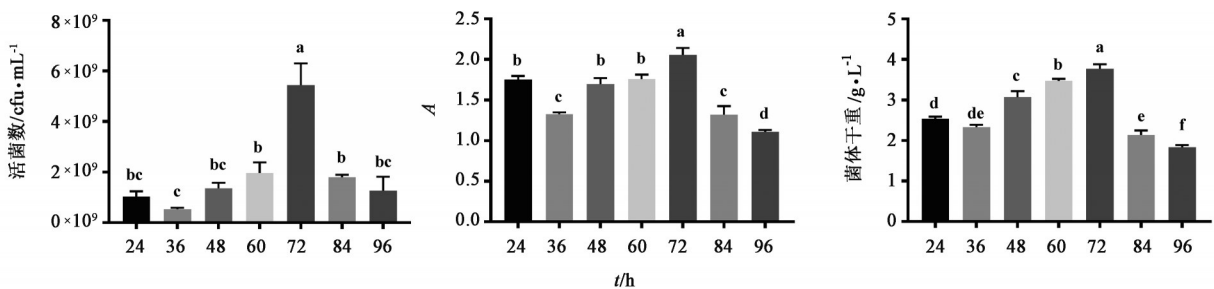


图7 不同时间对假单胞菌ZL8菌体生长量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 Effect of different time on growth of *Pseudomonas ZL8* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.3.4 转速 当转速为220 r·min⁻¹时,假单胞菌ZL8的活菌数、菌体干重及菌悬液A₆₀₀均明显高于其他转速 ($P < 0.05$),菌体数可达10.7 × 10⁹ cfu·mL⁻¹。

结果表明,在220 r·min⁻¹转速下的培养基的溶氧量最适合ZL8菌株生长。因此,确定220 r·min⁻¹为培养最佳转速。见图8。

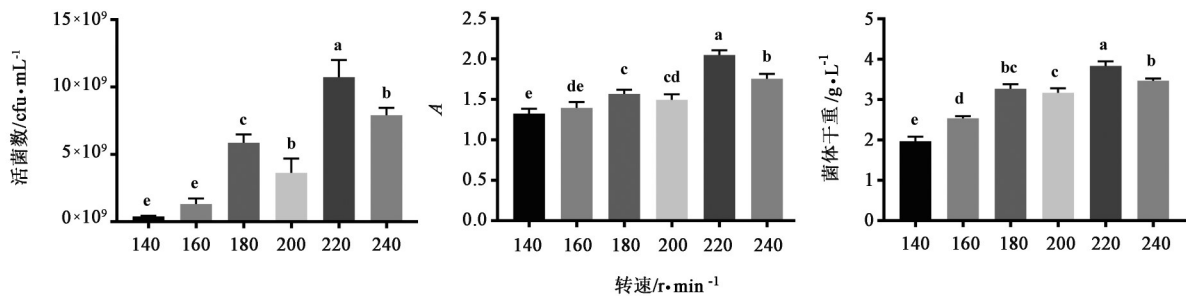


图8 不同转速对假单胞菌ZL8菌体生长量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 8 Effect of different speeds on growth of *Pseudomonas ZL8* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.3.5 培养条件的正交优化 各因素对假单胞菌ZL8菌体生物量影响的大小顺序为温度>时间>接种量>转速,最佳水平为A₁B₁C₂D₂。ZL8的最优发酵条件为接种量3%,温度28 °C,时间为72 h,转速为220 r·min⁻¹。经试验验证,在最优发酵条件下发酵液中活菌数可达6.367 × 10¹⁰ cfu·mL⁻¹。见表3。

4 讨论

在微生物发酵生产过程中,菌体生物量与发酵条件密切相关。一般生防菌均可在基础培养基上生长,但它们生长状况与碳源、氮源的种类有很大关系,碳氮源种类恰当、比例及浓度合适,更有利于

菌株生长。发酵条件的优化主要包括两部分:①培养基组成的优化,包括培养基氮源、碳源和无机盐离子种类的选择及浓度的确定;②培养条件的优化,包括接种量、初始pH、培养温度、摇床转速等。乔俊卿等^[19]研究发现经培养基优化后,B9BD产生脂肽抗生素的量高达934.25 mg·L⁻¹,是其在LB培养基中产量的5.6倍;张红艳等^[20]优化地衣芽孢杆菌的发酵培养基后,发酵液菌体量和芽孢率均有提高;MIRI等^[21]优化了一株漳州芽孢杆菌bz16的培养基,使其EPS的产率为12.37 g·L⁻¹,是未优化条件下的6倍。

表4 发酵条件正交实验结果与分析

Table 4 Results and analysis of orthogonal experiments of fermentation conditions

实验号	因素				活菌数 ($\times 10^9$ cfu·mL ⁻¹)	菌悬液 A_{600}	菌体干重 (g·L ⁻¹)
	A	B	C	D			
1	1	1	1	1	13.33	1.305	1.457
2	1	2	2	2	63.67	2.190	3.636
3	1	3	3	3	14.03	1.371	1.643
4	2	1	2	3	17.67	1.472	2.146
5	2	2	3	1	40.33	1.648	2.809
6	2	3	1	2	17.00	1.411	1.889
7	3	1	3	2	10.00	1.266	1.380
8	3	2	1	3	43.00	1.848	3.265
9	3	3	2	1	20.67	1.586	2.553

注:因素水平同表2

菌株的生长不仅与碳源、氮源种类有关,还受到其配比的影响,通过对碳源、氮源、无机盐种类和配比的优化,筛选菌株的最佳生长培养基是提高抑菌活性及发酵效率的重要措施。目前,优化方法主要有单因素法、正交试验法及响应面法。单因素法方法简便,适用于对单一变量进行考量;正交试验法和响应面法可在有限试验量下较全面地分析单因素之间的相互作用。大多数研究将单因素法和正交试验法或响应面法联合起来优化发酵条件。张志焱等^[22]通过单因素实验筛选枯草芽孢杆菌最适培养基后,菌株产生抗菌肽的效价是优化前的3.51倍;宋健等^[23]通过单因素法和响应面法,对苏云金芽孢杆菌的培养基组分和发酵条件进行优化,相比于初始培养基,其优化后的工艺发酵水平提高了138.8%;吴海霞等^[24]利用单因素和正交实验法,对海洋解淀粉芽孢杆菌 GM-1-1 的发酵条件进行优化,使发酵液的芽孢产量达到82.06%;陈燕萍等^[25]利用单因素法和正交试验法对疫苗菌 FJAT-1458 的液固2种培养基进行优化,进一步降低了生产成本;赵龙妹等^[26]用单因素法与正交试验法对菌株 XC70 进行发酵条件优化,使木聚糖酶活力达到1489.33 U·mL⁻¹,提高了3倍多;何明川等^[27]通过单因素法与正交试验法对菌株 D5-8 进行发酵优化,使其对烟草黑胫病的保护防效和治疗防效可达66.89%和53.72%。

本研究通过单因素和正交设计试验,确定假单胞菌 ZL8 的最佳发酵培养基蛋白胨 15 g·L⁻¹、葡萄糖 7.5 g·L⁻¹、氯化钾 10 g·L⁻¹。通过平板计数法得到优化培养基中活菌数为 8.93×10^9 cfu·mL⁻¹,为 LB 液体培养基中的 3.93 倍($P < 0.01$);菌株 ZL8 的最优发酵条

件为接种量 3%,温度为 28 °C,时间为 72 h,转速为 220 r·min⁻¹,发酵液中活菌数可达 6.37×10^{10} cfu·mL⁻¹。优化后的发酵条件,不仅能有效提高菌液中的菌体数量及延长菌株生长的稳定期,而且可进一步降低培养成本,为假单胞菌 ZL8 生防菌剂的进一步开发应用奠定基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] HASSANI M A, DURÁN P, HACQUARD S. Microbial interactions within the plant holobiont[J]. Microbiome, 2018, 6(1):58.
- [2] TRIVEDI P, LEACH J E, TRINGE S G, et al. Plant-microbiome interactions: From community assembly to plant health[J]. Nat Rev Microbiol, 2020, 18(11): 607-621.
- [3] 王红阳,康传志,王月枫,等. 药用植物微生物组的研究现状及展望[J]. 中国中药杂志, 2022, doi: 10.19540/j.cnki.cjmm.20220615.102.
- [4] 杨立,陈美兰,邵爱娟,等. 生防菌对药用植物土传病害的抗病机制及应用探讨[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(21):3188-3192.
- [5] KUMAR J, RAMLAL A, MALLICK D, et al. An overview of some biopesticides and their importance in plant protection for commercial acceptance[J]. Plants (Basel), 2021, 10(6):1185.
- [6] SYED AB RAHMAN S F, SINGH E, PIETERSE C, et al. Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens[J]. Plant Sci, 2018, 267:102-111.
- [7] 韩长志. 植物病害生防菌的研究现状及发展趋势[J]. 中国森林病虫, 2015, 34(1):33-37, 25.
- [8] 周冬宇,李杨,邢咏梅,等. 药用植物微生物组及其与

- 药用植物次生代谢产物的关系[J]. 微生物学通报, 2022;1-17.
- [9] 吴晓青,周方园,张新建. 微生物组学对植物病害微生物防治研究的启示[J]. 微生物学报, 2017, 57(6): 867-875.
- [10] 宋瑞琦,南铁贵,杨健,等. 内生细菌资源及其次级代谢产物研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(19):1-9.
- [11] GOPANE B, KAPTCHOUANG TCHATCHOUANG C D, REGNIER T, et al. Community diversity and stress tolerance of culturable endophytic fungi from black seed (*Nigella sativa* L.) [J]. S Afr J Bot, 2021, 137:272-277.
- [12] 崔晋龙,郭顺星,肖培根. 内生菌与植物的互作关系及对药用植物的影响[J]. 药学学报, 2017, 52(2): 214-221.
- [13] 陆洁森,张家豪,明乾良,等. 西红花球茎腐烂病拮抗真菌的筛选、鉴定及抑菌机制[J]. 中草药, 2022, 53(10):3165-3170.
- [14] 吴启婷,任航洁,秦晔,等. 白术内生真菌 AM569 对 3 种镰刀菌的拮抗作用及其 ITS 分子鉴定[J]. 浙江农业科学, 2022, 63(6):1257-1261.
- [15] 黄贻杰,董林林,尉广飞,等. 抗人参根腐病生防菌剂的研发与评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(2):182-190.
- [16] 赵疆,梁世军,杨涛,等. 促生细菌的分离及复配菌剂对甘肃贝母产量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(24):163-170.
- [17] 高红,盛剑,白旭,等. 浑源黄芪内生细菌的菌群组成及其功能[J]. 微生物学报, 2020, 60(8):1638-1647.
- [18] HAN P, LIU T, ZHENG Y, et al. A mycorrhizal bacteria strain isolated from *Polyporus umbellatus* exhibits broad-spectrum antifungal activity [J]. Front Plant Sci, 2022, 13:954160.
- [19] 乔俊卿,孙凯,刘永锋,等. 芽胞杆菌工程菌株 B9BD 产表面活性素发酵培养基优化[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(2):383-392.
- [20] 张红艳,李忠玲,张强,等. 地衣芽孢杆菌 MYS68 的鉴定及发酵培养基优化[J]. 粮食与饲料工业, 2018(2):50-53.
- [21] MIRI M, BERGAYOU H, BELMOUDEN A, et al. Medium optimization for exopolysaccharides production by *Bacillus Zhangzhouensis* BZ 16 strain isolated from khnifiss lagoon [J]. E3S Web of Conferences, 2021, 234:p00099.
- [22] 张志焱,赵倩,于佳民,等. 一株枯草芽孢杆菌产抗菌肽培养基筛选及发酵工艺优化的研究[J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(4):1217-1226.
- [23] 宋健,张海剑,丰硕,等. 对韭菜迟眼蕈蚊高活性的苏云金芽胞杆菌 JQD117 发酵培养基及摇瓶发酵条件优化[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(2):333-341.
- [24] 吴海霞,陈茹,曹雪梅,等. 海洋细菌 GM-1-1 产芽孢发酵培养基和摇瓶发酵条件优化[J]. 南方农业学报, 2018, 49(12):2454-2462.
- [25] 陈燕萍,肖荣凤,刘波,等. 青枯病植物疫苗生产菌 FJAT-1458 发酵工艺的优化[J]. 中国生物防治学报, 2019, 35(1):81-88.
- [26] 赵龙妹,张兰,曹慧,等. 土壤中产木聚糖酶菌株的筛选及发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2021, 48(10):3506-3519.
- [27] 何明川,王志江,谢永辉,等. 烟草黑胫病拮抗菌的筛选、鉴定及发酵条件优化[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(2):428-439.

[责任编辑 顾雪竹]