



论著 • Article

枯草芽孢杆菌液体发酵及其对水稻苗期生长性能影响

朱新录 钟金兰 牛春宇 赖晓君 李小龙

(贺州学院 食品与生物工程学院 广西 贺州 542899)

摘要 目的: 探究枯草芽孢杆菌发酵条件优化, 及其发酵液各组分对水稻的促生长作用。方法: 用单因素条件筛选和正交优化确定最佳培养基进行枯草芽孢杆菌的液体发酵。将枯草芽孢杆菌发酵液作用水稻, 对比枯草芽孢杆菌发酵液各组分会对水稻生长的影响。**结果:** 枯草芽孢杆菌的最适的发酵培养基为糖蜜 7.5 g/L、蛋白胨 10 g/L、KH₂PO₄ 10 g/L, 枯草芽孢杆菌发酵液小麦的生长都有促进作用, 且枯草芽孢杆菌发酵液的不同成分及不同浓度对小麦的作用不同。从枯草芽孢杆菌发酵液提取的脂肽类物质对水稻的生长起到了促进作用。**结论:** 枯草芽孢杆菌发酵液产的脂肽类物质对植物生长有一定的促生作用, 但枯草芽孢杆菌发酵液对植物的生长起促进作用的其它物质, 以及其作用的机理等有待进一步的探究。

关键词 枯草芽孢杆菌; 液体发酵; 水稻

文章编号 019-2024-0120

Liquid Fermentation of *Bacillus Subtilis* and its Effect on Rice Seedling Growth Performance

Zhu Xinlu, Zhong Jinlan, Niu Chunyu, Lai Xiaojun, Li Xiaolong

(School of Food and Biological Engineering, Hezhou University, Hezhou 542899, China)

Abstract **Objective:** To investigate the optimization of *Bacillus subtilis* fermentation conditions and the growth-promoting effects of various components in the fermentation broth on rice. **Methods:** Single-factor condition screening and orthogonal optimization were used to determine the optimal medium for liquid fermentation of *Bacillus subtilis*. The fermentation broth was applied to rice, and the effects of different components of the *Bacillus subtilis* fermentation broth on rice growth were compared. **Results:** The optimal medium for *Bacillus subtilis* fermentation is 7.5 g/L molasses, 10 g/L peptone, and KH₂PO₄ 10 g/L. The fermentation broth from *Bacillus subtilis* promotes the growth of wheat, and different

收稿日期: 2023-10-04 录用日期: 2023-10-23

通讯作者: 李小龙; 单位: 贺州学院 食品与生物工程学院 广西 贺州

引用格式: 朱新录, 钟金兰, 牛春宇, 等. 枯草芽孢杆菌液体发酵及其对水稻苗期生长性能影响[J]. 现代精准农业快报, 2023, 1(1): 21-28.

components and concentrations of the fermentation broth have varying effects on wheat. Lipopeptides extracted from the *Bacillus subtilis* fermentation broth also promote rice growth. **Conclusion:** Lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* fermentation broth have a certain promoting effect on plant growth, but further research is needed to identify other substances that promote plant growth and their mechanisms of action.

Keywords *Bacillus subtilis*; Liquid fermentation; Rice

1 前言

植物与微生物之间存在非常复杂的相互关系。一方面它们相互依存, 给彼此提供所需元素, 另一方面, 它们又互相竞争土壤里的养分。微生物与植物的互相作用受到许多科研工作者的关注^[1]。研究表明植物根际促生菌 (plant growth promoting rhizobacteria, PGPR) 可以对土壤内部营养进行分解、分泌的代谢产物可抑制有害菌的生长, 对植物的生长起到促进作用^[2]。枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 作为植物根际促生菌之一, 自然界中广泛分布, 对人畜无害, 易于培养, 应用于畜禽养殖、医药、农业等多个领域^[3]。枯草芽孢杆菌在农业中有着重要的作用, 包括防治病虫害、促进植物生长、提升作物产量和品质、改良土壤等^[4]。近年来, 通过在枯草芽孢杆菌对植物促生机制上进行的研究, 研究者们认为机制和方式是多样的。枯草芽孢杆菌对植物的促生机制有直接作用, 如固氮、溶磷、解钾、产生嗜铁素和促进植物生长物质^[5], 还有通过抑制病原物和诱导抗性来间接地促进植物生长。枯草芽孢杆菌发酵可以分泌多种代谢产物, 产生的不同代谢产物对植物有的作用需要去进一步的研究。脂肽作为其中一种代谢产物, 一类由亲水性肽链和亲脂性脂肪烃链组成的两亲性表面活性剂, 主要包括表面活性素 (Surfactin)、丰原素 (Fengycin) 以及伊枯草菌素 (Iturin) 三大类^[6]。产脂肽的微生物分支有芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、类芽孢杆菌属 (*Paeni bacillus*)、乳酸杆菌属 (*Lacto bacillus*)、链霉菌属 (*Streptomyces*)、假单胞

菌属 (*Pseudomonas*)、沙雷菌属 (*Serratia*) 和伯克菌属 (*Burkholderia*) 等^[7]。目前为止, 发现产脂肽最多的属类是芽孢杆菌, 而且最早发现的抗菌脂肽也是由芽孢杆菌产生的^[8]。脂肽的同系物种类繁多, 其发酵液成分复杂, 在不同种类的微生物中, 所产生的代谢物的种类根据生长培养基的组成和培养条件而变化, 所涉及酶的底物特异性的变化导致最终产品性质的改变^[9], 产生的脂肽的种类有很大的差异, 对应的生物学功能也会不同^[10]。枯草芽孢杆菌产生的脂肽类物质在农业上的发现和应用有: 枯草芽孢杆菌产生的脂肽类物质对烟草病毒及辣椒病毒有防治效果^[11], 能用于控制柑橘绿色和蓝色霉菌^[12], 可以防治辣椒病害、黄瓜病害及油菜菌核病^[13]。对水稻纹枯病和水稻白叶枯病都有一定的防治作用^[14]。国内外对于枯草芽孢杆菌对植物病原菌的研究很多^[15], 应用生物防治来控制植物病害、促进农作物生长和对环境友好的可持续发展的微生物菌种的研究备受国际生物学和农学界的高度关注和重视, 成为诸多学者关注的热点, 亦可见到枯草芽孢杆菌在农业方面的重要性。本文探究了枯草芽孢杆菌发酵条件优化, 及其发酵液各组分对水稻的促生长作用, 以期对枯草芽孢杆菌在水稻生产上的应用提供参考。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 菌种 贺州学院食品与生物工程学院康养食品工程与技术省重点实验室保存。

2.1.2 培养基 LB 液体培养基：胰蛋白胨 10 g/L、酵母提取物 5 g/L、氯化钠 10 g/L、用 1 mol/L 的 NaOH 调 pH 到 7.0 左右。

LB 固体培养基：在 LB 液体培养基中加入 2.0% 的琼脂。

种子培养基与基础培养基均为 LB 培养基，pH7.0 左右。

2.1.3 主要仪器 天平、摇床、冰箱、高压蒸汽灭菌锅、无菌操作台、pH 试纸、紫外分光光度计、移液枪、高速离心机、高效液相色谱仪、有机过滤膜。

2.1.4 主要试剂 葡萄糖、蔗糖、糖蜜、淀粉、蛋白胨、牛肉膏、尿素、硫酸铵、磷酸二氢钾、氯化钠、氯化镁、氯化钙、甲醇、超纯水（含 0.1% ATF）、三氯甲烷、乙腈（含 0.1% ATF），其中甲醇、三氟乙酸和乙腈等试剂均为分析纯或色谱纯。

2.2 方法

2.2.1 基础培养方法 菌种活化：将保存在冰箱里的菌种转接到 LB 固体培养基中，培养箱内 37℃ 恒温培养 24 h。

种子液制备：将冰箱保存的菌株用无菌水适当稀释后在 LB 平板上划线，并置于培养箱内 37℃ 恒温培养 24 h。用接种环挑取平板上的单菌落菌株于装配 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶里，160 rpm/min，37℃ 摇床培养

12 ~ 18 h 后待用。

摇瓶培养：将培养好的种子液以 1% 的接种量接种到装液量 100 mL 基础培养基中，于 37℃ 摇床培养 24 h，转速 160 rpm/min。进行单因素发酵条件的研究。

2.2.2 培养基单因素条件的筛选 碳源：选用葡萄糖、蔗糖、糖蜜、淀粉四种不同的碳源进行最佳碳源因素影响实验。在基础培养基中用上述碳源替换基础培养基的碳源。每个因素设置三个平行，摇瓶培养 24 h 后测定发酵液的菌体浓度，以此确定最佳碳源。

氮源：选用蛋白胨、牛肉膏、尿素、硫酸铵四种不同的氮源进行最佳氮源因素影响实验。在基础培养基中用上述氮源替换基础培养基的氮源。每个因素设置三个平行，摇瓶培养 24 h 后测定发酵液的菌体浓度，以此确定最佳氮源。

微量元素：分别用磷酸二氢钾、氯化钠、氯化镁、氯化钙四组不同的微量元素进行最佳微量元素种类影响实验。在基础培养基中用上述微量元素替换基础培养基的微量元素。每个因素设置三个平行，摇瓶培养，24 h 后测定发酵液的菌体浓度，以此确定最佳微量元素。

2.2.3 正交优化试验 在单因素优化基础上，选择糖蜜、蛋白胨、 KH_2PO_4 3 个因素，设计 L 9 (34) 正交试验优化，L 9 (34) 正交试

表 1 L 9 (34) 正交试验设计因素及水平
Table 1 L9(34) Orthogonal experimental design factors and levels

水平	因素		
	A	B	C
	糖蜜 (g/L)	蛋白胨 (g/L)	KH_2PO_4 (g/L)
1	2.5	5	5
2	5	10	10
3	7.5	15	15

验设计因素及水平见表 1。

2.2.4 活菌计数方法 将种子液以 1% 的接种量接种到装液量 100 mL 基础培养基与优化后的培养基中, 于转速 160 rpm/min, 37℃ 摇床培养, 24 h 后分别取 1 mL 培养液, 加入 9 mL 无菌水, 摇匀, 按 10 倍的比例稀释为 7 个浓度梯度, 取 10^{-7} 稀释后的菌液 0.2 mL 涂布到固体培养基上, 进行标记后放入恒温培养箱培养 18 h, 观察固体培养基上的菌落生长情况和进行菌落计数。

2.2.5 枯草芽孢杆菌对水稻生长情况的影响 观察枯草芽孢杆菌发酵液中不同物质对植物生长的影响, 将枯草芽孢杆菌高速离心 8000 rpm/min, 15 min 后, 取沉淀物加蒸馏水为菌液、发酵液离心后的上清液、枯草芽孢杆菌发酵液原液和清水一起喷施于水稻叶面, 观察并记录植物的生长情况。将发酵液提取的物质喷施于水稻叶面并观察植物的状况。

2.3 发酵液产物的提取和检测

2.3.1 脂肽粗提物的制备 在灭完菌的培养基

里按照 3% 接种量接种, 160 r/min, 37℃ 发酵 48 h, 发酵液 8000 r/min, 离心 15 min, 取上层清液备用。用 6 mol/L HCl 调节上层清液 pH 至 4.0, 冰箱过夜沉淀, 高速离心机 8000 r/min 离心 15 min。弃去上层清液, 收集沉淀, 将得到的沉淀加入过量甲醇溶解。将溶解后的液体过有机膜抽滤除去杂质, 45℃ 旋转蒸发浓缩, 得到甲醇粗提液。将粗提液用 65℃ 烘箱烘干, 收集黄色沉淀, 即为脂肽粗提物^[16]。

2.3.2 薄层色谱分析 将培养 24 h 后的发酵液用高速离心机 8000 r/min 离心 20 min, 取上清液用氯仿: 甲醇=2:1 抽提后得到液体进行下一步的薄层层析。用毛细管吸取液体, 在准备好的硅胶薄板上, 距底边 1.0 cm 用铅笔化一条直线, 在直线处点样。待样品自然干燥后, 将薄板置于有氯仿: 甲醇: 水=65:15:2 展开剂的层析缸中, 当展开剂在薄板上充分展开时, 取出薄板, 待干燥后在层析板上喷显色剂^[17]。根据显色剂与层析板中化合物的显色反应, 可初步分析发酵液中的化学物质。

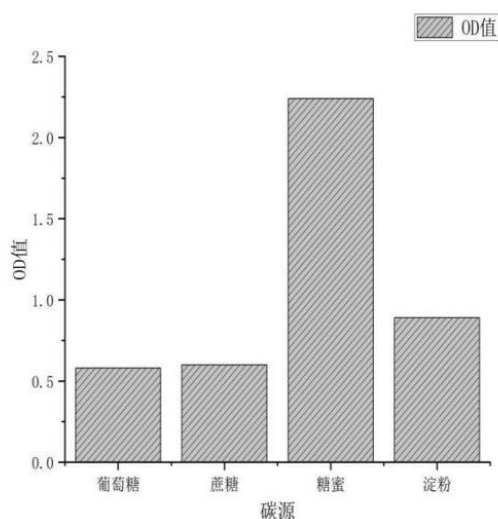


图 1 不同碳源对枯草芽孢杆菌生长的影响

Fig. 1 Effects of different carbon sources on the growth of *Bacillus subtilis*

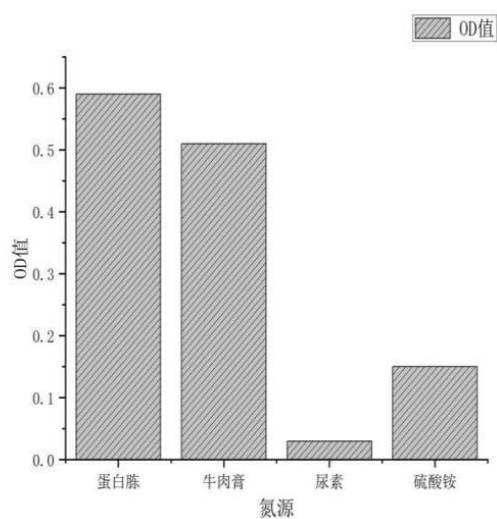


图 2 不同氮源对枯草芽孢杆菌生长的影响

Fig. 2 Effects of different nitrogen sources on the growth of *Bacillus subtilis*

3 结果与讨论

3.1 基础培养基优化 碳源：用四组不同碳源进行筛选试验，其他组分都相同进行发酵。用紫外分光光度计测定其发酵液的 OD600 mm 值。碳源对枯草芽孢杆菌的菌体数影响结果如图 1 所示，可以看出同样条件 OD 值最高的为糖蜜，其次是淀粉，最后是蔗糖和葡萄糖，糖蜜作为碳源时枯草芽孢杆菌的生长明显优于其他碳源。说明该优化培养基应用糖蜜作为最佳碳源。

氮源：选用 4 种不同的氮源培养基，试验结果如图 2 所示，由图可以得出，以蛋白胨为氮源时其发酵菌液 OD 值最高，其次是牛肉膏，而后是硫酸铵，最后是尿素。说明枯草芽孢杆菌生长可选用蛋白胨作为蛋源。

微量元素：由图 3 可以看出在四种微量元素中，对枯草芽孢杆菌的有积极作用的顺序为 $\text{KH}_2\text{PO}_4 > \text{NaCl} > \text{MgCl}_2 > \text{CaCl}_2$ ，所以试验选用

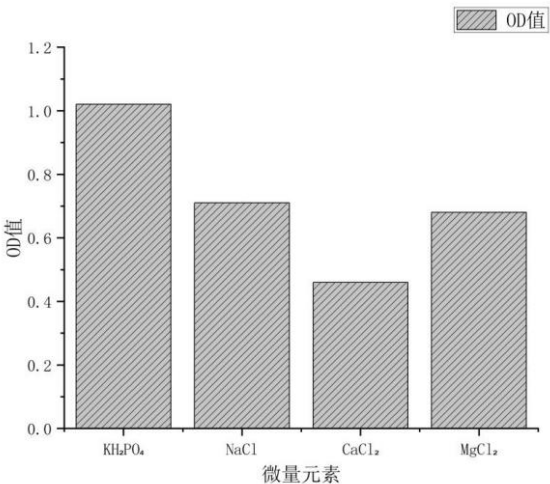


图 3 不同微量元素对枯草芽孢杆菌生长的影响

Fig. 3 The impact of various trace elements on the growth of *Bacillus subtilis*

KH_2PO_4 作为枯草芽孢杆菌基础培养基的微量元素。

3.2 正交实验结果 在单因素优化基础上，选择糖蜜、蛋白胨、 KH_2PO_4 3 个因素，设计 L 9

表 2 正交试验结果

Table 2 Orthogonal experiment results

试验号	因素				OD 值
	A 糖蜜 (g/L)	B 蛋白胨 (g/L)	C KH_2PO_4 (g/L)	D 空列	
1	1	1	1	1	0.324
2	1	2	2	2	0.541
3	1	3	3	3	0.302
4	2	1	2	3	0.238
5	2	2	3	1	0.543
6	2	3	1	2	0.555
7	3	1	3	2	0.387
8	3	2	1	3	0.436
9	3	3	2	1	0.562
K1	0.398	0.331	0.438	0.476	
K2	0.460	0.507	0.462	0.492	
K3	0.462	0.473	0.411	0.340	
R	0.073	0.176	0.051	0.154	
最优方案	A3B2C2				

表 3 不同培养基菌落数计数结果 (个)

Table 3 Colony count results on different media (in number)

序号	基础培养基 (10^{-7})	优化培养基 (10^{-7})
1	22	65
2	20	64
3	19	55
4	22	58
5	22	62

(34) 正交试验优化来确定枯草芽孢杆菌的最佳单因素发酵培养基的组成, 正交试验结果见表 2。由表 2 可以看出, 正交试验的最优方案为 A3B2C2, 既最佳培养基为糖蜜 7.5 g/L、蛋

白胨 10 g/L、 KH_2PO_4 10 g/L。

3.3 活菌计数结果 基础培养基与优化培养基摇瓶培养下的菌落数见表 3, 可以得出, 优化培养基比基础培养基所培养的菌落要多, 更有利于枯草芽孢杆菌的生长。

3.4 枯草芽孢杆菌对水稻生长的影响

3.4.1 枯草芽孢杆菌对水稻种子出芽的影响
表 4 为枯草芽孢杆菌各组分对水稻发芽的影响。将水稻浸泡在清水里 24 h 后平均分配到相同浓度的菌液、上清液、原液中, 和清水一起再浸泡 24 h 后, 观察并记录它们的发芽情况。从表 4 可以看出, 枯草芽孢杆菌的上清液对水稻的发芽有明显的促进作用。从促进作用大小的排序为上清液 > 原液 > 菌液 > 清水。相对清水组

表 4 不同液体浸泡水稻的发芽率

Table 4 Germination rate of rice soaked in different liquids

	清水	菌液	原液	上清液
24 h 后的发芽率	60.7%	64.3%	78.6%	82.1%
72 h 后的发芽率	75%	92.3%	92.9%	100%

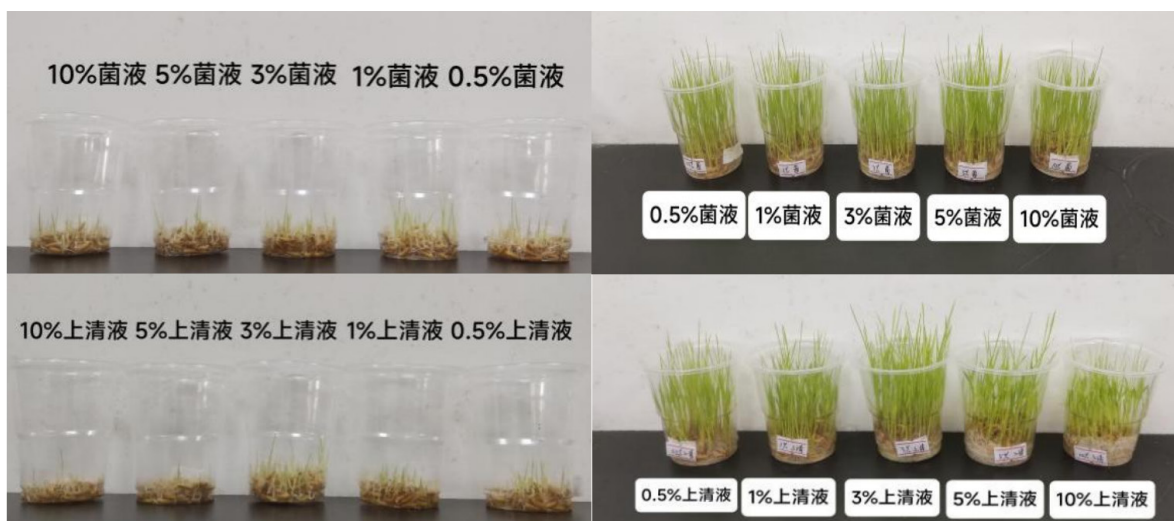


图 4 枯草芽孢杆菌发酵不同组分, 不同浓度对水稻苗期 (7, 14 天) 生长的影响

Fig. 4 The impact of different components and concentrations of *Bacillus subtilis* fermentation on the growth of rice seedlings at 7 and 14 days old

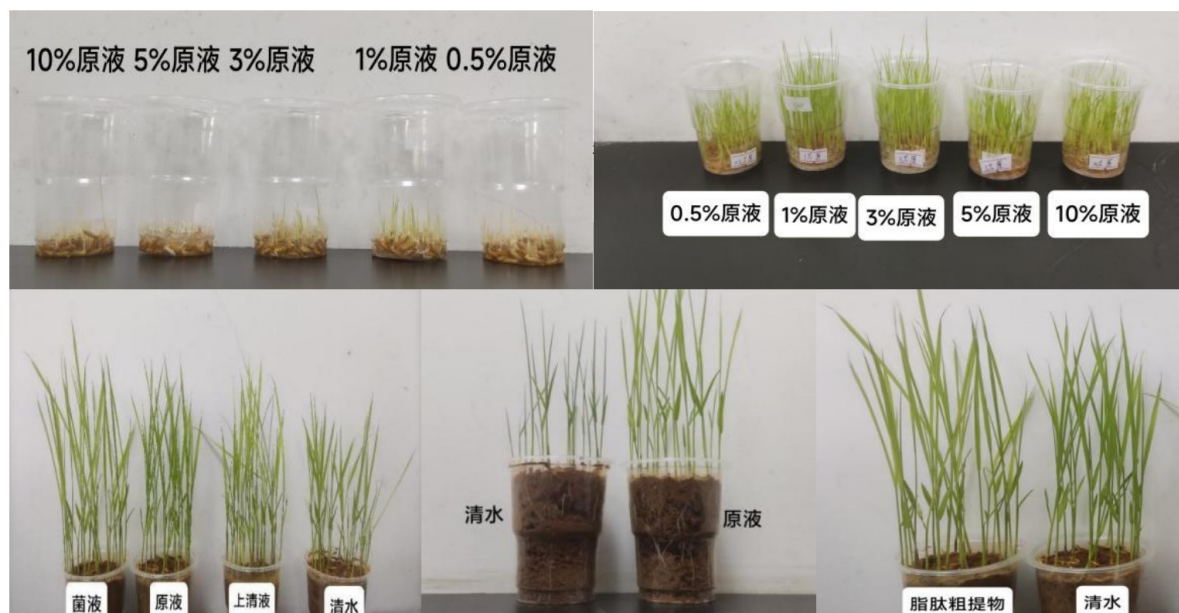


图 5 优化条件下发酵不同组分以及脂肽提取物对水稻苗期生长影响 (21 天)

Fig. 5 The impact of fermentation products from different components and lipopeptide extracts under optimized conditions on the growth of rice seedlings (21 days)

上清液处理后水稻 24 小时发芽率由 60.7% 上升到 82.1%，水稻 72 小时发芽率由 75% 上升到 100%。

3.4.2 枯草芽孢杆菌对水稻秧苗期生长的影响

图 4 为枯草芽孢杆菌发酵不同组分在不同浓度下对水稻苗期生长性能的影响。由图可以看到枯草芽孢杆菌，以及其发酵液对水稻生长均有促进作用，添加了枯草芽孢杆菌的水稻根系更加发达，茎秆粗壮，在菌液、上清液、原液和清水中，菌液对水稻的生长的作用最大。说明枯草芽孢杆菌可能分泌了一些胞外物质对水稻苗期的生长有一定促进作用。水稻的发芽时期 (7 天)，不同浓度的菌液、上清液、原液对水稻的影响分别为：1% 浓度的菌液、1% 浓度的原液和 3% 浓度的上清液对水稻的促进作用最佳。在发芽两周后 (14 天)，5% 浓度的菌液、1% 浓度的原液和 3% 浓度的上清液对水稻的促进作用最佳。图 5 为优化条件下，各组分以及脂

肽提取物对水稻苗期生长的影响。脂肽粗提取物对水稻生长有一定的影响，但作用效果差异并不显著，说明枯草芽孢杆菌胞外分泌多种物质对水稻苗期生长起到了促进作用。具体分泌何种物质以及其作用机制有待进一步研究。

4 结论

本文通过单因素试验及正交优化，确定了枯草芽孢杆菌的最佳培养基为糖蜜 7.5 g/L、蛋白胨 10 g/L、 KH_2PO_4 10 g/L。探索了枯草芽孢杆菌发酵液对水稻生长的促进作用，枯草芽孢杆菌发酵液对水稻的发芽率有显著影响，对水稻的株高和根系发展起到了促进作用，在水稻的不同生长时期，枯草芽孢杆菌发酵液不同成分和不同浓度对水稻的影响也不相同，其中对水稻的发芽时期最适生长为 1% 浓度的菌液、1% 浓度的原液和 3% 浓度的上清液，在水稻的生长时期，5% 浓度的菌液、1% 浓度的原液

和 3% 浓度的上清液对水稻的促进作用最佳。提取枯草芽孢杆菌发酵液中的物质经过检测和分析可以确定为脂肽类物质, 根据脂肽粗提物对水稻的影响, 可以得到脂肽类物质对水稻的生长有一定促进作用, 但作用效果并不比发酵液显著, 推测枯草芽孢杆菌对植物生长还有其他物质共同作用, 关于发酵液中促进水稻生长的其它物质有待下一步研究。

利益冲突声明: 本文不存在任何利益冲突。

参考文献

- [1] 李哲. 芽孢杆菌促生作用及具有促生作用的挥发物质研究 [C]. 南京农业大学, 2013.
- [2] 袁玉娟. *Bacillus subtilis* SQR9 的黄瓜促生和枯萎病生防效果及其作用机制研究 [C]. 南京农业大学, 2011.
- [3] 李庆荣, 邢东旭, 肖阳等. 枯草芽孢杆菌生防菌株 SEM-9 根际定植及对根际土壤微生物多样性的影响 [J]. 华南农业大学学报, 2022, (04): 82-88.
- [4] 邱月. 枯草芽孢杆菌在现代农业中的应用 [J]. 园艺与种苗, 2022, (07): 81-85.
- [5] 李哲. 芽孢杆菌促生作用及具有促生作用的挥发物质研究 [C]. 南京农业大学, 2013.
- [6] 罗晓娇, 孙静, 陆颖健. 解淀粉芽孢杆菌中脂肽的生物合成、抑菌机理及应用的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2022, (19): 462-470.
- [7] 侯正杰, 孙慧中, 白松等. 环脂肽生物合成的研究进展 [J]. 合成生物学, 2021, (04): 577-597.
- [8] 陶雪菊, 苟兴华, 何成霞. 脂肽微生物的研究进展 [J]. 成都大学学报 (自然科学版), 2021, 40 (02): 119-127.
- [9] SHAHEEN M, LI J, ROSS A C, et al. *Paenibacillus polymyxa* PKB1 produces variants of poly myxin B-type antibiotics [J]. Chemistry & Biology, 2011, 18(12) 1640-1648.
- [10] 伊艳杰, 王康, 周广舟等. 芽孢杆菌合成环脂肽的研究进展 [J]. 河南工业大学学报 (自然科学版), 2018, 39(03): 127-134.
- [11] 王帅, 高圣风, 高学文等. 枯草芽孢杆菌脂肽类抗生素发酵和提取条件 [J]. 中国生物防治, 2007, 23(4): 342-347.
- [12] Waewthongrak W, Leelasuphakul W, Mccollum G. Cyclic Lipopeptides from *Bacillus subtilis* ABS-S14 Elicit Defense-Related Gene Expression in Citrus Fruit [J]. Plos One, 2014, 9(10): 109-138.
- [13] 王帅. 芽孢杆菌及其脂肽类化合物防治植物病害和促进植物生长的研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2009.
- [14] 孙凯. 芽孢杆菌表面活性素高效发酵培养基优化及其对水稻病害的防治效果研究 [C]. 扬州大学, 2021.
- [15] 刘阳. 益生芽孢杆菌机理探究及应用研究进展 [J]. 四川农业科技, 2020, (03): 64-67.
- [16] 钱荣, 续晓琪, 许宗奇等. 枯草芽孢杆菌 KC-WQ 发酵液中抗菌脂肽的分离鉴定及发酵条件优化 [J]. 食品工业科技, 2022, 43 (15) : 123-131. doi: 10.13386/j.issn1002-0306. 2021100269
- [17] 辛中尧, 陈秀蓉, 杨成德等. 枯草芽孢杆菌 B_1、B_2 发酵液生物表面活性剂初探 [J]. 甘肃农业大学学报, 2005, (04): 501-506.