好氧堆肥用枯草芽孢杆菌 GX2 产芽孢工艺优化

李月月[1,2,3]，李秀芬[*1,2,3]，齐希光[4]，李 健[1,2,3]，任月萍[1,2,3]，王新华[1,2,3]，夏琼琼[5]

（1. 江南大学 环境科学与工程学院，江苏 无锡 214122；2. 江苏省厌氧生物技术重点实验室，江苏 无锡 214122；3. 江苏省水处理技术与材料协同创新中心，江苏 苏州 215009；4. 江南大学 食品学院，江苏 无锡 214122；5. 中国市政工程华北设计研究总院有限公司，天津 300074）

摘要：芽孢杆菌是好氧堆肥微生物菌剂的重要组成部分，为降低菌剂生产成本、改善其品质及应用效果，对芽孢杆菌产芽孢工艺进行研究。首先，在摇瓶上进行枯草芽孢杆菌 GX2 的培养基及培养条件优化，在此基础上，在 3 L 发酵罐中进行分批补料优化研究，进一步提高细胞浓度，最后，通过单因素及正交试验研究，在 3 L 发酵罐中对产芽孢工艺进行了优化。结果表明，当 pH 为 6.8、温度为 50 ℃和搅拌转速为 150 r/min 时，发酵液中的活菌数达 1.57×10^{10} CFU/mL，芽孢数达 1.32×10^{10} CFU/mL，芽孢率为 84.1%。堆肥用枯草芽孢杆菌 GX2 的发酵及产芽孢工艺优化可有效提高发酵液中的活菌数及芽孢率，降低菌剂的发酵及生产成本，为后续工业化生产及应用奠定基础。

关键词：微生物菌剂；枯草芽孢杆菌；芽孢率；工艺优化

中图分类号：Q 815　**文章编号：**1673-1689(2021)01-0091-09　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.01.012

Optimization of Sporulation Parameters for Aerobic Composting *Bacillus subtilis* GX2 Strains

LI Yueyue[1,2,3]，*LI Xiufen*[*1,2,3]，*QI Xiguang*[4]，*LI Jian*[1,2,3]，*REN Yueping*[1,2,3]，*WANG Xinhua*[1,2,3]，*XIA Qiongqiong*[5]

(1. School of Environmental and Civil Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Anaerobic Biotechnology, Wuxi 214122, China; 3. Jiangsu Cooperative Innovation Center of Technology and Material of Water Treatment, Suzhou 215009, China; 4. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 5. North China Municipal Engineering Design & Research Institute Co. Ltd., Tianjin 300074, China)

Abstract: *Bacillus subtilis* is an important microbial agent during the aerobic composting. To reduce the production cost and improve the quality and applicability of bacteria, the spore production process of *Bacillus subtilis* was studied. Firstly, the culture medium and environmental conditions of *Bacillus subtilis* GX2 were optimized using shaking flasks. Cell concentration was further increased by a batch feed optimization method in a 3 L fermenter. Finally, single-factor and orthogonal experiments were applied to optimize the spore-forming process. The results showed that the number of viable cells and spores in the fermentation broth reached 1.57×10^{10} CFU/mL and

收稿日期：2019-06-11

基金项目：国家“十三五”重点研发计划项目(2016YFC0400707)。

*** 通信作者：**李秀芬(1968—)，女，博士，教授，博士研究生导师，主要从事环境生物技术研究。E-mail：xfli@jiangnan.edu.cn

1.32×10[10] CFU/mL, respectively, and the spore rate was 84.1% when rotating under 150 r/min at pH 6.8 and 50 ℃. To conclude, the optimization of fermentation and spore production for *Bacillus subtilis* GX2 effectively increased the number of viable cells and spores in the fermentation broth, and reduced the cost of microbial agents. This work provides guidance for *Bacillus subtilis* culture and lays the foundation for subsequent industrial production and application of aerobic composting.
Keywords: microbial agents, *Bacillus subtilis*, spore rate, optimization

好氧堆肥化是有机固体废弃物减量化、无害化及资源化的有效途径之一,是在微生物作用下通过高温发酵使有机物变成腐熟肥料的过程。好氧堆肥不仅含有大量可被植物吸收利用的有效态氮、磷、钾及其化合物,而且含有构成土壤肥力的重要活性物质腐殖质[1],既解决了有机固体废弃物的环境污染问题,又起到改良土壤和增加肥效的作用[2]。在好氧堆肥过程中添加外源微生物菌剂可有效提高堆体中功能微生物的数量,加快有机物转化及堆肥进程,提高肥效[3]。Xi 等[4]通过接种复合菌剂增加堆肥过程中细菌的多样性,可有效提高堆肥效率。Zhao 等[5]发现在堆肥过程中接种放线菌可显著提高纤维素酶活性,加速纤维素降解,提高腐殖质含量,减少温室气体排放。微生物菌剂的应用效果与活菌数密切相关,有效活菌数是衡量微生物菌剂品质的重要指标[6],然而,随着微生物菌剂保存时间的延长,活菌数不断减少,降低菌剂的使用效果[7],同时,微生物菌剂的制备成本较高,影响了其工业化应用。

芽孢杆菌具有较强的抗逆性,能耐热、酸和碱等不良环境,可有效保持菌剂中的微生物活性,提高菌剂质量及应用效果[8-9]。王雪莲等[10]采用响应面法对影响枯草芽孢杆菌 B579 的培养基进行了优化,为进一步提高细胞浓度和后续放大培养提供参考,同时,对其产芽孢条件进行了优化。王法国等[11]通过单因素试验、Plackett-Burman 试验设计和响应面法对解淀粉芽孢杆菌 JT84 的培养基成分和发酵条件进行了优化,所得发酵液的芽孢含量为 1.67×10[9] CFU/mL,与基础培养基相比,提高了 159%。郭晓军等[8]通过对堆肥用产蛋白酶菌株的单因素、正交试验产芽孢条件优化,芽孢产率达95.0%,为解决以芽孢杆菌为主的微生物菌剂产业化生产过程中存在的活性低等问题提供了重要参考。

作者采集污泥与秸秆混合好氧堆肥样品,进行微生物初筛、复筛及分离纯化,分子鉴定后获得一株用于好氧堆肥的枯草芽孢杆菌 GX2,具有耐高温、耐酸等特点,将其应用于堆肥过程能有效缩短堆肥周期,提高堆肥品质。针对上述枯草芽孢杆菌 GX2,通过摇瓶培养条件优化,在 3 L 发酵罐中通过分批补料技术进一步提高细胞浓度,并通过单因素和正交试验优化产芽孢工艺条件,可为降低其发酵及菌剂制备成本提供有益参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

堆肥用菌株:好氧堆肥用枯草芽孢杆菌 GX2 为实验室保存菌株;种子培养基:蛋白胨 10 g/L,牛肉浸膏 3 g/L,氯化钠 5 g/L,pH 为 7.2±0.2;

计数培养基:蛋白胨 10 g/L,牛肉浸膏 3 g/L,氯化钠 5 g/L,琼脂 15 g/L,pH 为 7.0~7.2;摇瓶及 3L 发酵罐的基础培养基:酪蛋白胨 15 g/L,大豆蛋白胨 5 g/L,NaCl 5 g/L,pH 7.3,消泡剂 0.2%(体积分数);补料培养基:50 g/L 的蔗糖溶液;营养肉汤、营养琼脂、胰蛋白胨、牛肉浸膏、硫酸锰、蔗糖和硝酸钠:上海国药集团产品。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株活化及种子液制备 将 4 ℃冰箱内保藏的菌株接入已灭菌的液体肉汤培养基中,摇床上 45 ℃、160 r/min 活化 12 h 后,在固体营养琼脂培养基上三区平板划线,置于 45 ℃培养箱中培养 24 h,挑选三区单菌落传代两次后,作为发酵菌株使用。

挑取已活化的发酵菌株单菌落,接种于装有 100 mL 已灭菌的肉汤培养基 250 mL 三角瓶中,置于摇床振荡培养,在温度为 45 ℃,转速为 160 r/min 培养 12 h 作为种子液。

1.2.2 摇瓶培养基及培养条件优化 在摇床发酵培养基的基础上,以 OD 值为指标,对菌株 GX2 进行碳源种类(葡萄糖、蔗糖、淀粉)、最佳碳源质量浓度(5、10、20、30、40 g/L)、氮源种类(酵母粉、氯化

铵、硝酸钠）、最佳氮源质量浓度（5、10、15、20、25 g/L）、装液量（50、100、150、200 mL）的单因素优化。摇床培养的初始条件为温度 45 ℃，转速 160 r/min，装液量 100 mL（250 mL），pH 7.3。实验在同一时间取样测定 OD 值来优化培养基及其培养条件，优化后的培养基用于发酵罐培养。每组试验 3 次重复，结果取平均值。

1.2.3 发酵罐分批补料培养 发酵罐型号为 BIOTECH-3JG-3JG-9000D，上海保光公司产品。在前期摇床培养基和培养条件优化的基础上，将发酵罐初始条件设置为工作体积 1.5 L、压力 0.05 MPa、搅拌转速 300 r/min、温度 45 ℃、接种量为 1×10^7 CFU/mL，通过流加 3 mol/L 的 NaOH 和 HCl 将 pH 值自动控制在 7.3。将 3 L 发酵罐进行灭菌，然后装入 1.5 L 发酵培养基于 121 ℃灭菌 30 min，取出后将温度、pH、转速、溶氧设置在初始条件，以 1×10^7 CFU/mL 的接入量接种新鲜活化的 GX2 种子液。

分批发酵是在上述条件下上罐进行菌株发酵，测定发酵过程中 OD 值、残糖浓度、活菌数，获得菌株在发酵罐上的补料时间和补料量。分批补料发酵是在分批发酵的基础上，当总糖量消耗一半时[12-13]，加入碳源至原浓度，继续发酵培养，当细胞浓度达到稳定时停止补料发酵。以最大 OD 值和最大活细胞数作为参考值，来分析分批发酵和分批补料发酵的效果。

在分批补料发酵的基础上，取样测定活菌数和芽孢数，绘制芽孢曲线图。在产芽孢时开始控制条件来优化芽孢率，并在芽孢率最大时取样测定。

1.2.4 发酵罐培养条件优化

1）单因素优化芽孢率 在发酵罐分批补料优化的基础上，分别研究培养温度、搅拌转速和 pH 值对芽孢杆菌产芽孢的影响。

2）正交试验优化芽孢率 根据单因素实验结果得到的 pH（A），温度（B）、转速（C）的基础上，设计 3 因素 3 水平正交试验，并根据正交试验数据的极差分析，得到菌株产芽孢的最佳发酵条件。

3）追加验证实验 根据正交试验分析的最佳发酵培养条件，进行追加验证实验。

1.3 分析测试项目与方法

细胞浓度：采用比色法，以空白培养基作参比，在 600 nm 处测定发酵液 OD 值[13-16]。

活细胞数：采用稀释平板培养计数法，发酵液进行 10 倍稀释后，涂布平板进行活菌计数[17]。

芽孢数：将发酵液在 70 ℃下处理 15 min 后，冷却，采用稀释梯度平皿计数法统计活菌数[18]。

芽孢率：芽孢数占活菌数的百分数[18]。

总糖含量：采用 3,5-二硝基水杨酸（DNS）比色法[19]。

2 结果与分析

2.1 摇瓶培养条件优化

2.1.1 生长曲线绘制 微生物菌株生长一般经历延滞期、对数生长期、稳定期和衰亡期 4 个阶段[20]。首先是菌体生长的迟滞期，生长缓慢，细胞浓度基本不会增加；适应新环境后，微生物生长繁殖速度加快，细胞浓度快速提高，进入对数生长期；此后，随着底物不断被消耗，细胞浓度进入稳定期；底物进一步消耗殆尽，微生物生长进入衰亡期，细胞浓度明显下降。绘制微生物菌株的生长曲线可为其培养条件优化提供重要参考，图 1 给出了枯草芽孢杆菌 GX2 的发酵液 OD 值随培养时间的变化情况。

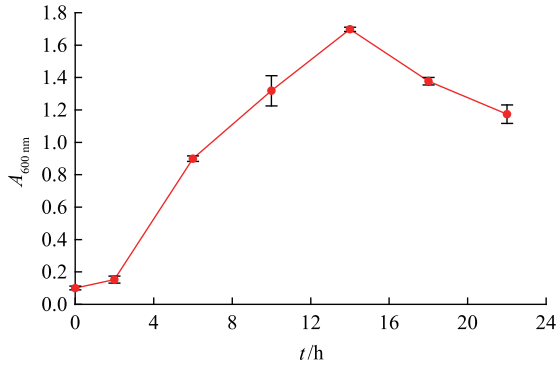


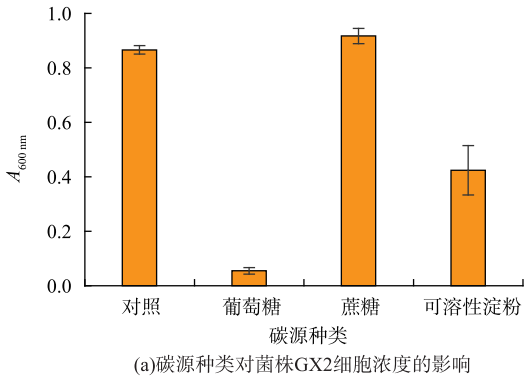
图 1 菌株 GX2 生长曲线

Fig. 1 Growth curve of strain GX2

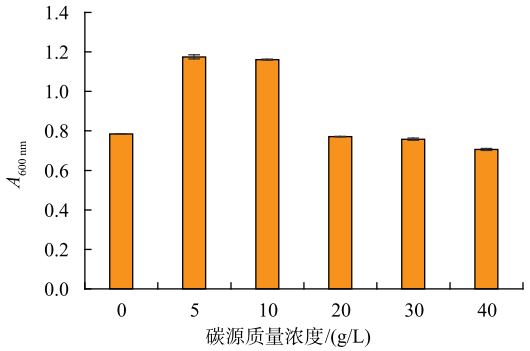
由图 1 可知，细胞浓度在前期有短暂的生长停滞期，之后发酵液在波长 600 nm 处的吸光度呈直线上升趋势，至 14 h 时，细胞浓度达到最大，$A_{600\ nm}$ 为 1.698，之后开始下降。通常情况下，处于对数生长期的菌株活力最强[21]，细胞浓度也最高，因此，确定 14 h 为枯草芽孢杆菌 GX2 的最佳培养时间，并用作后续摇瓶培养条件优化研究的发酵终止时间。

2.1.2 碳源种类及其质量浓度的优化 培养基是富含多种营养物质的混合物，碳源是组成培养基的主要成分之一，其主要作用是构成菌体细胞成分并

为生命活动提供所需能量[22],葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖和可溶性淀粉均是易被微生物利用的碳源[23]。作者选择价廉易得的葡萄糖、蔗糖和可溶性淀粉为碳源，进行碳源筛选及质量浓度优化，结果如图 2 所示。



(a)碳源种类对菌株GX2细胞浓度的影响



(b)碳源质量浓度对菌株GX2细胞浓度的影响

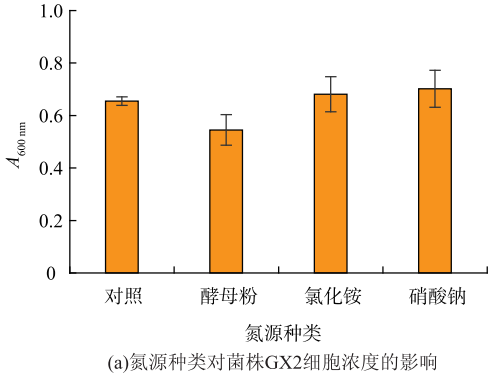
图 2　碳源对菌株 GX2 细胞浓度的影响

Fig. 2　Effect of carbon source on cell concentration of strain GX2

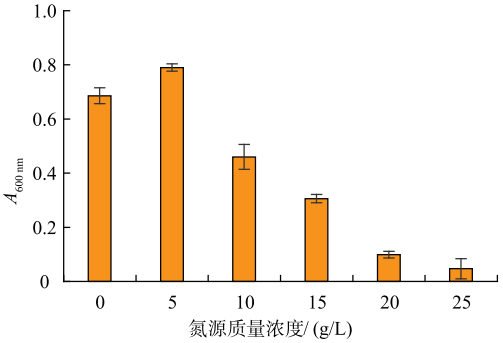
由图 2(a)可知,与对照不添加碳源相比,添加蔗糖的细胞浓度略高,$A_{600\ nm}$ 达 0.917，而其他两种碳源的细胞浓度均低于对照,说明蔗糖有利于 GX2 的快速繁殖。其中,葡萄糖的 A 值显著低于对照,其可能是因为灭菌时会与其他物质反应生成抑制菌株生长的有毒物质,即“美拉德反应”产物[19]。此外,随着蔗糖浓度的升高,细胞浓度先增加后降低(图 2(b)),蔗糖添加量为 5 g/L 时,细胞浓度最大,发酵液的 $A_{600\ nm}$ 为 1.175。故确定 GX2 的最佳碳源为蔗糖,添加质量浓度为 5 g/L。

2.1.3　氮源种类及其质量浓度优化　氮源主要用来构成微生物细胞和代谢产物的营养物质[22],常用的氮源有无机氮源和有机氮源。无机氮源成分单一,吸收利用较快;有机氮源含有丰富的蛋白质和游离的氨基酸,可以被生物缓慢利用[23]。氮源种类及质量浓度优化结果如图 3(a)和图 3(b)所示。

由图 3(a)可知,与不添加氮源相比,氯化铵和硝酸钠的添加更有利于 GX2 细胞浓度的增加,A 值均高于对照,其中硝酸钠的细胞浓度最大,而酵母粉的添加不利于 GX2 生长。在此基础上,对硝酸钠的浓度进行了优化,结果如图 3(b)所示。可见,硝酸钠质量浓度为 5 g/L 时，细胞浓度最大,$A_{600\ nm}$ 为 0.79,故芽孢杆菌 GX2 的最佳氮源为硝酸钠,最佳添加质量浓度为 5 g/L。



(a)氮源种类对菌株GX2细胞浓度的影响



(b)氮源质量浓度对菌株GX2细胞浓度的影响

图 3　氮源对菌株 GX2 细胞浓度的影响

Fig. 3　Effect of nitrogen source on cell concentration of strain GX2

2.1.4　装液量优化　溶解氧为好氧微生物生长所必需,是进行能量代谢的重要物质,供氧条件直接影响菌体生长繁殖以及细胞代谢[24]。摇瓶培养的溶解氧浓度主要通过转速和装液量进行控制,相同搅拌转速条件下,装液量越大,溶解氧浓度越低,装液量直接影响菌体在生长过程[22]。250 mL 摇瓶中装液量分别为 50、100、150、200 mL 时,研究溶解氧对细胞浓度的影响，结果如图 4 所示。当装液量为 100 mL 时,枯草芽孢杆菌 GX2 的细胞浓度最大,OD 值达 1.554,比未优化前提高了 44.3%。

综上,好氧堆肥用芽孢杆菌 GX2 的摇瓶培养条件优化结果表明:GX2 的最佳培养基为摇瓶基础培养基,5 g/L 蔗糖和 5 g/L $NaNO_3$,装液量为 250 mL 摇瓶装液 100 mL。通过摇床培养基及培养条件优化,可有效提高枯草芽孢杆菌 GX2 的细胞浓度。

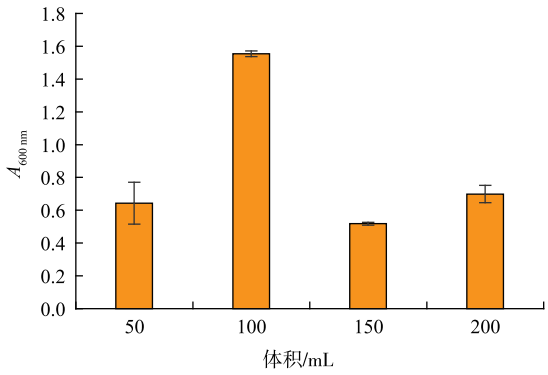


图 4　装液量对菌株 GX2 的细胞浓度的影响

Fig. 4　Effect of liquid loading on cell concentration of strain GX2

2.2　发酵罐分批补料技术研究

在实际的分批发酵过程中,连续或间隔补加限制性营养物质或新鲜培养基,称为分批补料发酵[25],可延长微生物的对数生长期和稳定期的持续时间,提高细胞浓度。分批发酵过程在细胞浓度不断增加进而耗尽可利用底物时,细胞浓度不再增加,而分批补料发酵可有效解决这一问题[26],提高发酵效率。

2.2.1　发酵罐分批补料对细胞浓度的影响

在摇瓶培养条件优化的基础上,以 3 L 发酵罐进行扩大培养,当蔗糖质量浓度低于初始质量浓度的一半以下时,补加质量质量浓度 50 g/L 的蔗糖溶液至初始质量浓度,研究发酵罐分批补料对枯草芽孢杆菌 GX2 细胞浓度的影响,结果如图 5 所示。

可见,与摇瓶培养不同,由于发酵罐可实现发酵条件特别是 pH 的在线实时控制,为枯草芽孢杆菌 GX2 提供了良好的生长环境,细胞繁殖速度加快,发酵至 4 h 后即进入对数生长期,碳源(蔗糖)也快速被消耗,在第 8 小时时蔗糖质浓度由起始的 5.0 g/L 左右降低至 1.8 g/L,成为制约菌体生长的关键因素,此时,补加 50 g/L 的蔗糖溶液至 4.5 g/L 左右,细胞浓度再次呈快速增长趋势,在第 9 小时时完成第二次补料,最终分批补料的发酵液最大 $A_{600\,nm}$ 达 2.250,而分批发酵的 $A_{600\,nm}$ 为 1.900,对应的活菌数分别为 1.8×10^{10}、1.2×10^{10} CFU/mL,由此可见,分批补料操作可有效提高发酵液的营养细胞浓度。

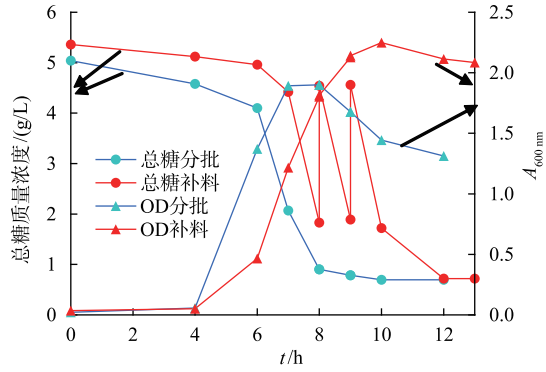


图 5　菌株 GX2 分批和分批补料发酵的细胞浓度及碳源消耗

Fig. 5　Cell concentration and carbon source consumption of batch and batch fed fermentation of strain GX2

2.2.2　发酵罐分批补料对芽孢率的影响

图 6 显示了枯草芽孢杆菌 GX2 的芽孢发酵曲线,同时给出了活菌数和芽孢率随发酵时间的变化情况。可见,随着发酵时间的延长,活菌和芽孢浓度和芽孢率均呈先增加后降低的变化趋势,发酵至 10 h 和 11 h 时,活菌和芽孢浓度达最大,分别为 1.1×10^{10} 和 7.2×10^{9} CFU/mL,此时,芽孢率也达最大,为 66.6%。此后,活菌数开始下降,芽孢数也相应降低,说明发酵过程进入衰亡期。在这个基础上,发酵至 9 h 时改变发酵条件,开展后续产芽孢条件优化研究。

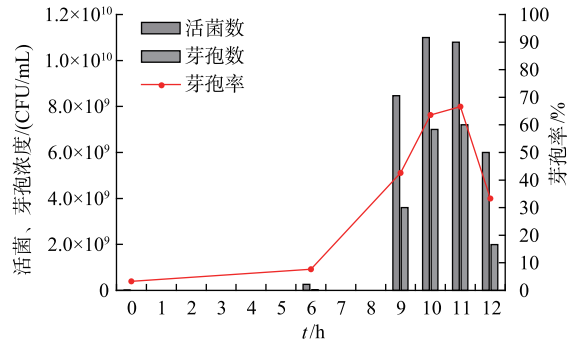


图 6　菌株 GX2 的芽孢发酵曲线

Fig. 6　Spore fermentation curve of strain GX2

2.3　发酵罐产芽孢条件优化

芽孢是产芽孢细菌在生长过程中形成的一种抗逆休眠体[27],因其具有耐热、抗辐射、耐酸碱及抗化学药物等特殊性质[28],可有效抵抗外界环境条件的变化,提高存活率,优化芽孢形成条件对微生物菌剂的制备具有一定的实践价值。与菌体的生长繁

殖相似,芽孢的形成同样受营养物质及环境条件等多因素的影响,在分批补料发酵培养提高细胞浓度的基础上,对影响枯草芽孢杆菌 GX2 产芽孢的关键环境条件进行优化,进一步提高芽孢数及芽孢率,可为提高好氧堆肥用微生物菌剂的品质及其实际应用效果奠定技术基础。

2.3.1 培养温度对枯草芽孢杆菌 GX2 芽孢率的影响 培养温度是影响微生物生长繁殖和芽孢形成的重要环境条件之一,它主要通过影响细胞内生物大分子酶和蛋白质的合成与活性来促进芽孢形成[14]。作者在摇瓶实验优化的最佳培养基条件下进行培养,并采用分批补料技术,使得细胞浓度在培养 9 h 时达到最大,然后调整培养温度,研究温度对芽孢杆菌 GX2 芽孢率的影响,结果如图 7 所示。可见,培养温度可在一定程度上影响微生物的生长繁殖及芽孢的形成,随温度升高,活菌及芽孢浓度均呈大致增加的趋势,而芽孢率先升高后降低。当培养温度为 35 ℃时,活菌和芽孢浓度均较低,分别为 9.2×10^9、5.5×10^9 CFU/mL,芽孢率为 59.8%。此后,随着培养温度升高,活菌浓度和芽孢数逐步提高,50 ℃时,芽孢数和芽孢率均最大,分别为 7.55×10^9 CFU/mL 和 70.6%。当温度进一步升高至 55 ℃时,尽管活菌数和芽孢数略有升高,但芽孢率开始下降,因此,后续产芽孢研究的培养温度采用 50 ℃。

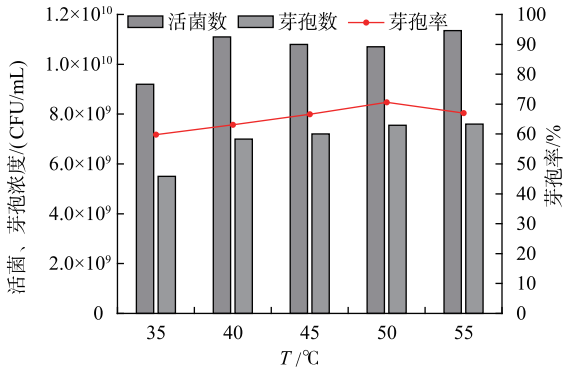


图 7 培养温度对芽孢杆菌 GX2 产芽孢的影响

Fig. 7 Effect of temperature on spore production of *Bacillus* GX2

2.3.2 搅拌转速对枯草芽孢杆菌 GX2 芽孢率的影响 好氧堆肥用枯草芽孢杆菌 GX2 为好氧菌,氧气是其生长繁殖和芽孢生成的重要影响因素[29]。同时,溶解氧对发酵生产的稳定性和生产成本也具有较大影响[24]。发酵罐培养时,发酵液中的溶解氧与通气量和搅拌转速有关,当通气量一定时,可通过调整搅拌转速改变发酵液中的溶解氧浓度,进而优化发酵及产芽孢过程。搅拌转速对枯草芽孢杆菌 GX2 产芽孢的影响如图 8 所示。可见,随搅拌转速的升高,活菌浓度不断下降,而芽孢浓度和芽孢率却呈先升高后降低的变化趋势。由于发酵液中的细胞(活菌)浓度较高,约 1.2×10^{10} CFU/mL,较高的搅拌转速带来较大的剪切力,不利于细胞存活,因此,随搅拌转速升高活菌数不断下降,这与文献报道一致[30]。同时,随搅拌转速升高,较高的剪切力使得更多营养细胞转化为芽孢,当搅拌转速为 100 r/min 时,芽孢浓度和芽孢率均最大,分别为 9.7×10^9 CFU/mL 和 82.9%,进一步提高搅拌转速,芽孢率开始下降,这与较高转速下活菌数较低有关。

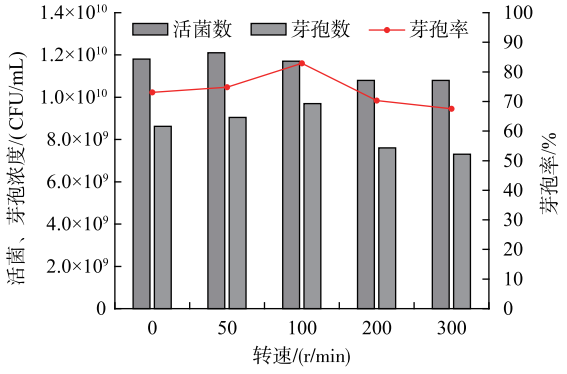


图 8 搅拌转速对芽孢杆菌 GX2 产芽孢的影响

Fig. 8 Effect of rotation speed on spore production by *Bacillus* GX2

2.3.3 pH 对枯草芽孢杆菌 GX2 芽孢率的影响 不同微生物菌株适宜的 pH 条件不同,酸碱度影响微生物细胞膜的通透性、膜结构的稳定性以及物质的溶解性或电离性,致使微生物对营养物质的吸收和利用呈现差异[23],进而影响微生物的生长繁殖,并对芽孢杆菌的芽孢率产生影响。由图 9 可知,随 pH 升高,活菌数、芽孢数和芽孢率均呈先升高后降低的变化趋势。当 pH 为 6.8 时,活菌浓度最大,为 1.25×10^{10} CFU/mL。当 pH 升高至 7.3 时,尽管活菌数开始降低,但芽孢浓度和芽孢率达最大,分别为 9.7×10^9 CFU/mL 和 82.9%。进一步升高 pH,活菌数、芽孢浓度以及芽孢率均明显降低。

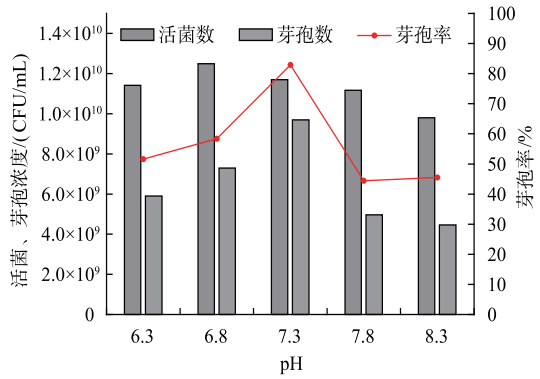


图 9　pH 对芽孢杆菌 GX2 产芽孢的影响

Fig. 9　Effect of pH on the spore production of *Bacillus* GX2

2.3.4　正交试验优化及验证　正交试验是考察关键影响因素综合效应及进行多条件优化的研究方法之一。这里,在单因素优化的基础上,以培养温度、搅拌转速和 pH 为关键影响因素,选用正交表进行 3 因素 3 水平的正交试验研究,以活菌数和芽孢数为评价指标,研究关键影响因素对芽孢杆菌 GX2 产芽孢的综合效应,因素水平设计如表 1 所示,实验方案设计及结果如表 2 所示,正交试验极差分析结果如表 3 所示。结果表明,3 个影响因素对活菌数的影响主次顺序为 pH>搅拌转速>培养温度,由均值 k 得出最优组合为 $A_2B_2C_2$,即 pH 为 7.3,培养温度为45℃,搅拌转速为 100 r/min。从芽孢率角度,3 个影响因素的主次顺序与活菌数相似,但其最优组合不同,为 $A_1B_3C_3$,即 pH 为 6.8,培养温度为 50 ℃,搅拌转速为 150 r/min。

表 1　正交试验因素水平

Table 1　Orthogonal optimization experimental factors

编号	A(pH)	B(温度/℃)	C(转速/(r/min))
1	6.8	40	50
2	7.3	45	100
3	7.8	50	150

表 2　正交优化设计及结果

Table 2　Orthogonal optimization design and results

实验号	A	B	C	活菌浓度 /(×10⁸ CFU/mL)	芽孢浓度 /(×10⁸ CFU/mL)	芽孢率/%
1	1	1	1	103.0	86.5	83.9
2	1	2	2	137.0	70.0	51.1
3	1	3	3	116.5	70.0	60.1
4	2	1	2	128.0	52.0	40.6
5	2	2	3	117.0	86.0	73.5
6	2	3	1	126.0	84.0	66.6
7	3	1	3	107.0	58.2	54.4
8	3	2	1	89.0	34.0	38.2
9	3	3	2	79.0	43.0	54.4

表 3　极差分析

Table 3　Range analysis

指标	因素	k_1	k_2	k_3	R	优化组合
活菌数	A	118.83	123.67	91.67	32.00	A_2
	B	112.67	114.33	107.17	7.16	B_2
	C	106.00	114.67	113.50	8.67	C_2
芽孢数	A	75.50	74.00	45.07	30.43	A_1
	B	65.56	63.33	65.67	2.34	B_3
	C	68.17	55.00	71.40	16.4	C_3

较高的活菌数是提高芽孢率的前提,因此,从优化菌株生产性能,提高芽孢率的角度,选择枯草芽孢杆菌 GX2 的活菌数和芽孢数均较高的培养条件和方案,确定最优方案为 $A_1B_3C_3$,即 pH 为 6.8,培养温度为 50 ℃,搅拌转速为 150 r/min,在此条件下进行 3 L 发酵罐试验验证,结果表明,活菌数可达 1.57×10^{10} CFU/mL,芽孢数达 1.32×10^{10} CFU/mL,芽孢率为 84.1%。与单因素优化相比,正交试验优化可进一步提高芽孢杆菌 GX2 的芽孢率,是其工业化生产应用的重要参考。

3 讨 论

好氧堆肥过程中添加微生物菌剂已成为促进堆肥腐熟、缩短堆肥周期的重要方法之一[1]。微生物菌剂的作用效果与活菌数密切相关,随着保存时间的延长,活菌数逐渐减少,影响堆肥效果[7]。芽孢杆菌因其具有较强的抗逆性,能耐热、酸、碱等不良环境,有利于微生物菌剂活性的保持,提高产品质量及应用效果[31]。Huo 等[32]通过研究多粘芽孢杆菌孢子和营养细胞在生物有机肥贮藏过程中的活性,发现纯孢子可提高储存期间的存活率和孢子形成。优化芽孢杆菌的产芽孢条件,促进更多营养细胞转化为芽孢。

培养条件优化是产芽孢条件优化的重要前提。作者以实验室保存的堆肥用枯草芽孢杆菌 GX2 为研究对象,首先进行了摇瓶培养条件及培养基优化,在此基础上,采用分批补料策略在 3 L 发酵罐上进行发酵培养,所得发酵液的 OD 值和营养细胞浓度可达 2.250 和 1.8×10^{10} CFU/mL。汪晶晶等[33]通过对淀粉芽孢杆菌的培养基及条件优化,发现菌体生长量有明显提高,$A_{600\,nm}$ 由 1.228 增加至 1.6727。

目前,关于芽孢杆菌芽孢率的优化研究多是在摇床上完成的,郭晓军等[8]对堆肥用产蛋白酶的产芽孢条件进行了优化,芽孢率达 95%。刘虎军等[32]对枯草芽孢杆菌进行了 pH 和温度的产芽孢条件优化,生物量和芽孢数分别为 5.7×10^{10}、5.2×10^{10} CFU/mL,芽孢率达 91%。为实现工业化应用,发酵罐规模的产芽孢条件优化更具参考价值,为此,作者在摇瓶培养条件优化的基础上,结合分批补料发酵技术,在 3 L 发酵罐上进行了产芽孢条件优化,经单因素及正交试验研究,获得了堆肥用枯草芽孢杆菌 GX2 的最佳产芽孢条件,即 pH 为 6.8,培养温度为 50 ℃,搅拌转速为 150 r/min,此时,芽孢浓度为 1.32×10^{10} CFU/mL,芽孢率为 84.1%,研究结果可为芽孢杆菌在微生物菌剂中的工业化应用提供重要参考。

4 结 语

摇瓶培养条件优化结果表明,枯草芽孢杆菌 GX2 的最佳培养基为酪蛋白胨 15 g/L、大豆蛋白胨 5 g/L、NaCl 5g/L、蔗糖 5 g/L 和 $NaNO_3$ 5 g/L,最佳培养条件为 pH 值 7.3,250 mL 摇瓶的装液量为 100 mL,培养温度为 45 ℃。

在摇床培养条件优化的基础上,在 3 L 发酵罐上进行分批补料技术研究,以进一步提高细胞浓度,结果表明,当发酵液中总糖浓度降低至起始值的一半以下时,开始补料,共补料两次,发酵液中的细胞浓度可达 1.8×10^{10} CFU/mL。

在获得较高细胞浓度后,通过单因素和正交试验,在 3 L 发酵罐上对枯草芽孢杆菌 GX2 的产芽孢条件进行了优化,结果表明,当 pH 为 6.8、培养温度为 50 ℃和搅拌转速为 150 r/min 时,芽孢率可达84.1%。

参考文献:

[1] 李国学,李玉春,李彦富. 固体废物堆肥化及堆肥添加剂研究进展[J]. 农业环境科学学报,2003,22(2):252-256.
[2] 张晓倩,许修宏,王晶,等. 添加木质素降解菌对堆肥中酶活性的影响[J]. 农业环境科学学报,2012,31(4):843-847.
[3] 李思琦,许修宏. 外源菌剂对堆肥中放线菌菌群的影响[J]. 农业生物技术学报,2015,23(5):652-660.
[4] XI B D,HE X S,DANG Q L,et al. Effect of multi-stage inoculation on the bacterial and fungal community structure during organic municipal solid wastes composting[J]. **Bioresource Technology**,2015,196:399-405.
[5] ZHAO Y,ZHANG Z C. Effect of thermo-tolerant actinomycetes inoculation on cellulose degradation and the formation of humic substances during composting[J]. **Waste Management**,2017,68:64-73.
[6] 林陈强,谢廼鸿,邱宏端,等. 地衣芽孢杆菌 CHB6 高芽孢形成率发酵条件的研究[J]. 热带作物学报,2011,32(9):1746-1749.
[7] 范建龙. 嗜气芽孢杆菌 ZDXC-01 产芽孢培养条件的优化[J]. 现代农业科技,2019,4:91-93.
[8] 郭晓军,郭威,杨继业,等. 堆肥用产蛋白酶菌株的筛选、鉴定及产芽孢条件优化[J]. 黑龙江畜牧兽医,2017,16(8):61-64.
[9] 张莉力,许云贺,肖海蒂,等. 地衣芽孢杆菌 BL-5 产孢发酵条件优化[J]. 食品工业科技,2017,38(3):108-113.
[10] 王雪莲,王敏,骆健美,等. 枯草芽孢杆菌生防菌 B579 最佳培养基响应面法优化[J]. 江苏农业学报,2009,25(1):212-215.
[11] 王法国,张荣胜,刘永锋,等. 生防菌解淀粉芽孢杆菌 JT84 发酵工艺优化[J]. 江苏农业学报,2017,33(1):73-80.

[12] YANG X，HAN S C，JU H L，et al. Improved production of 1，3-propanediol from biodiesel-derived crude glycerol by *Klebsiella pneumonia*，in fed-batch fermentation[J]. **Chemical Engineering Journal**，2018，349：25-36.

[13] SOUZA E A D，ROSSI D M，MARCO A Z A，et al. Bioconversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1，3-propanediol using immobilized cells of *Klebsiella pneumoniae* BLh-1[J]. **Renewable Energy**，2014，72(4)：253-257.

[14] SUJATA V S，DHANARAJ N，SNEHA S，et al. Optimization of high cell density fermentation process for recombinant nitrilase production in *E. coli*[J]. **Bioresource Technology**，2015，188：202-208.

[15] SHORGANI，KALIL，YUSOFF，et al. Impact of pH and butyric acid on butanol production during batch fermentation using a new local isolate of，*Clostridium acetobutylicum*，YM1[J]. **Saudi Journal of Biological Sciences**，2018，25：339-348.

[16] WANG Z，JIN Y，YANG S T，et al. High cell density propionic acid fermentation with an acid tolerant strain of *Propionibacterium acidipropionici*[J]. **Biotechnology and Bioengineering**，2015，112(3)：502-511.

[17] 左肖肖，陆利霞，李壹，等. 驱油枯草芽孢杆菌产芽孢条件优化[J]. 科学技术与工程，2017，17(16)：33-39.

[18] 吴婷婷. 短小芽孢杆菌产孢培养技术的研究[D]. 武汉：华中农业大学，2013.

[19] 徐岩. 发酵工程[M]. 北京：高等教育出版社，2001.

[20] 牟筱. 基因工程重组大肠杆菌 BL21-FMDV-B4 高密度发酵的优化研究[D]. 兰州：甘肃农业大学，2018.

[21] 张璐璐，吴圣勇，王帅宇，等. 防治蓟马的球孢白僵菌 SDDZ-9 菌株液体发酵工艺优化 [J]. 中国农业科学，2015，48(15)：2985-2994.

[22] 赵亚慧. 抗花生连作微生物菌剂的制备与应用[D]. 青岛：青岛农业大学，2016.

[23] 陈羽. 枯草芽孢杆菌高密度培养及保护剂的优化研究[D]. 哈尔滨：东北农业大学，2011.

[24] 蔡文，曾伟主，周景文. 氧化葡萄糖酸杆菌产 2- 酮基 -D 葡萄糖酸的发酵过程优化[J]. 食品与发酵工业，2019，45(11)：40-45.

[25] 赵燕霞. 嗜酸乳杆菌 IMAU30067 高密度培养工艺研究[D]. 呼和浩特：内蒙古农业大学，2018.

[26] QU L，REN L J，SUN G N，et al. Batch，fed-batch and repeated fed-batch fermentation processes of the marine thraustochytrid *Schizochytrium* sp. for producing docosahexaenoic acid[J]. **Bioprocess & Biosystems Engineering**，2013，36(12)：1905-1912.

[27] 陈秋红，孙梅，匡群，等. 培养条件对凝结芽孢杆菌芽孢形成的影响[J]. 生物技术，2009，19(1)：77-81.

[28] 杜志琳，李雪平，尹望，等. 枯草芽孢杆菌益生菌剂发酵工艺及其稳定性研究[J]. 饲料研究，2015，11：13-15.

[29] 周勇. 枯草芽孢杆菌 ACCC-10619 产芽孢工艺条件及其发酵猪粪研究[D]. 长沙：湖南农业大学，2013.

[30] 李艾黎，高学军，刘丽波，等. 酸奶菌株分批发酵放大研究 - 从 2.5L 到 15L 发酵罐[J]. 食品科学，2009，30(11)：147-150.

[31] 刘虎军，常晓娇，王楠希，等. 玉米赤霉烯酮降解菌 ASAGW-10 产芽孢条件研究[J]. 粮油食品科技，2018，26(4)：50-54.

[32] HUO Z H，ZHANG N，XU Z H，et al. Optimization of survival and spore formation of *Paenibacillus polymyxa* SQR-21 during bioorganic fertilizer storage[J]. **Bioresource Technology**，2012，108：190-195.

[33] 汪晶晶，曹雪梅，李欢，等. 抗菌海洋解淀粉芽孢杆菌 GM-1-2 菌株摇瓶发酵培养基和发酵条件优化 [J]. 江苏农业科学，2018，46(8)：299-303.