

# 内生解淀粉芽孢杆菌 X-278 发酵条件的优化

魏 娇 洋, 冯 龙, 李 亚 宁, 刘 大 群, 赤 国 彤

(河北农业大学 植物保护学院, 河北省农作物病虫害生物防治工程技术研究中心,  
国家北方山区农业工程技术研究中心, 河北 保定 071001)

**摘 要:**以内生解淀粉芽孢杆菌为试材, 采用单因素和正交实验, 通过比较发酵液的生物量及其对棉花黄萎病菌的抑菌活性, 对内生解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) X-278 液体发酵条件进行了优化。结果表明: 内生解淀粉芽孢杆菌 X-278 培养基各组分的最优配比为葡萄糖 1.5%、花生饼粉 2%、硫酸铵 0.5%、碳酸钙 0.1%、硫酸镁 0.5%、氯化钠 0.5%; 最佳发酵培养条件为初始 pH 7, 培养温度 34℃, 转速 180 r/min, 种龄为 24 h, 装液量 150 mL/500mL 三角瓶, 接种量 2%, 发酵时间为 72 h。优化后的发酵液中活菌数量达到  $1.5 \times 10^{10}$  CFU/mL, 对棉花黄萎病菌的抑菌圈直径为 33.4 mm。

**关键词:**内生解淀粉芽孢杆菌 X-278; 发酵; 单因素; 正交实验

**中图分类号:**S 476+.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)05-0106-05

为了克服化学农药对生态环境的污染、降低农副产品的农药残留, 微生物农药的应用越来越广泛<sup>[1-2]</sup>。同时微生物农药是 21 世纪农药工业的新产业, 代表着植物保护的发展方向<sup>[3-4]</sup>。生物防治具有对环境无污染, 对人畜无毒, 对植物无副作用等优点, 尤其适用于土传病害的防治。棉花黄萎病是棉花生产中危害很严重的一种土传真菌病害, 常造成严重的产量损失。利用棉花黄萎病菌的拮抗微生物来防治该病害是目前较有效的方法之一<sup>[5]</sup>。

X-278 分离自河北省辛集市棉田健康棉株, 通过形态观察、生理生化试验、16S rDNA 同源性序列分析以及特异性菌株系列分析, 鉴定为解淀粉芽孢杆菌。X-278 的室内和田间药效试验均已证明, 该菌对棉花黄萎病有很好的防治效果并且对棉花具有很好的促生效果<sup>[6]</sup>。该试验对 X-278 摇瓶发酵培养基及发酵条件进行了优化, 增加菌含量及提高菌的生物活性, 以期为其商品化生产奠定基础。

**第一作者简介:**魏娇洋(1987-), 女, 河北石家庄人, 硕士研究生, 研究方向为天然产物农药。

**责任作者:**赤国彤(1957-), 男, 硕士, 教授, 硕士生导师, 现主要从事农药合成及制剂加工与生物农药等教学与科研工作。E-mail: chiguotong@126.com。

**基金项目:**国家“863”计划资助项目(2011AA10A205); 国家自然科学基金资助项目(31171894); 河北省自然科学基金资助项目(C2011204114)。

**收稿日期:**2013-11-22

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试菌株为解淀粉芽孢杆菌 X-278, 效价指示菌为棉花黄萎病菌, 均由河北农业大学植物保护学院生防室提供。所用培养基为 BPY 培养基、PDA 培养基、NA 培养基。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 X-278 种子液的制备** 将 4℃ 保存的菌种转接到 NA 平板培养基, 28℃ 培养 24 h, 配制菌悬液, 取 2 mL 菌悬液(菌悬液的浓度为  $2 \times 10^7$  CFU/mL)。接入含有 100 mL BPY 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中。30℃, 200 r/min 培养 48 h, 即得到种子液。

**1.2.2 培养基的单因素筛选试验** 以 BPY 培养基为基本培养基, 在此基础上通过对碳源、氮源、无机盐的筛选研究 X-278 的最适培养基。碳源: 分别用蔗糖、玉米淀粉、乳糖、果糖、可溶性淀粉、麦芽糖、葡萄糖替代 BPY 培养基中的碳源, 设置 7 个处理, 以不加碳源为空白对照, 重复 3 次。氮源: 分别用硫酸铵、硝酸钠、氯化铵、硝酸钾、酵母粉、豆粉、花生饼粉、蛋白胨、牛肉膏、酵母膏替代 BPY 培养基中的氮源, 设置 10 个处理, 以不加氮源为空白对照, 重复 3 次。无机盐的筛选: 分别用硫酸铵、碳酸钙、硝酸铅、硫酸锌、硫酸镁、硝酸铜、硫酸亚铁、硫酸锰、氯化钠、磷酸二氢钾替代 BPY 培养基中的无机盐, 设置 9 个处理, 以不加无机盐为空白对照, 重复 3 次。以上试验温度 30℃, 200 r/min 培养 48 h。检测发酵液的生物量及抑菌活性<sup>[7]</sup>。

**1.2.3 正交实验设计** 通过上面碳源、氮源、无机盐的选择试验, 以发酵效果较好的 1 个碳源、1 个氮源和 4 个

无机盐为正交因素,选用正交表  $L_{25}(5^6)$ ,进行 6 因素 5 水平的正交实验(表 1),以确定最适配比。

表 1 正交实验因素与水平

Table 1 The orthogonal experimental factors and levels %

水平 Level	因素 Factor					
	A 葡萄糖 Glucose	B 花生饼粉 Peanut meal	C 硫酸铵 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	D 碳酸钙 CaCO <sub>3</sub>	E 硫酸镁 MgSO <sub>4</sub>	F 氯化钠 NaCl
1	0.5	0.5	0.1	0.05	0.05	0.05
2	1.0	1.0	0.5	0.1	0.1	0.1
3	1.5	1.5	1.0	0.5	0.5	0.5
4	2.0	2.0	2.0	1.0	1.0	1.0
5	5.0	5.0	5.0	2.0	2.0	2.0

1.2.4 发酵培养条件的优化 采用最适培养基配方,依次进行以下条件的优化,每次都上一优化结果应用于下一因素的优化。温度分别为 26、28、30、32、34、36、38℃;转速为 140、160、180、200、220 r/min;初始 pH 值分

别为 5、6、7、8、9;种龄分别为 12、24、36、48 h;装液量分别为 50、100、150、200、250 mL;接种量分别为 2%、4%、6%、8%、10%;发酵培养时间分别为 24、48、72、96、120 h。每个处理重复 3 次。检测发酵液生物量。

### 1.3 项目测定

发酵液生物量测定采用紫外吸收比浊法,8 000 r/min 离心 3 min 收集上清液,测定 OD<sub>600</sub><sup>[8]</sup>;抑菌活性的测定采用牛津杯定量扩散法<sup>[9]</sup>,以抑菌圈大小为指标。

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵培养基的优化

2.1.1 碳源的筛选结果 由图 1 可知,以葡萄糖作为碳源,发酵液的 OD<sub>600</sub> 最高,为 0.088,发酵液对棉花黄萎病菌的抑制活性最强,其抑菌圈直径达到 17.67 mm,故最适碳源为葡萄糖。

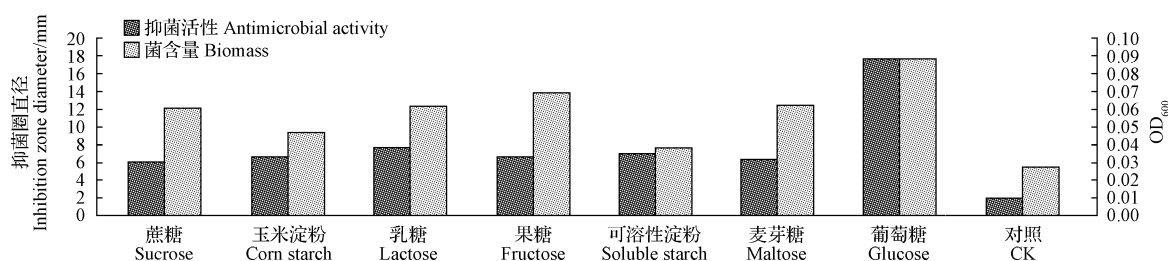


图 1 不同碳源发酵液生物量及抑菌活性

Fig. 1 The biomass and antimicrobial activity of fermentation broth using different carbon source

2.1.2 氮源的筛选结果 由图 2 可知,花生饼粉作为氮源时,OD<sub>600</sub> 为 0.097,明显高于其它氮源和对照,而发酵

液对棉花黄萎病菌的抑菌圈直径也达到最高,为 22.33 mm,故最佳氮源为花生饼粉。

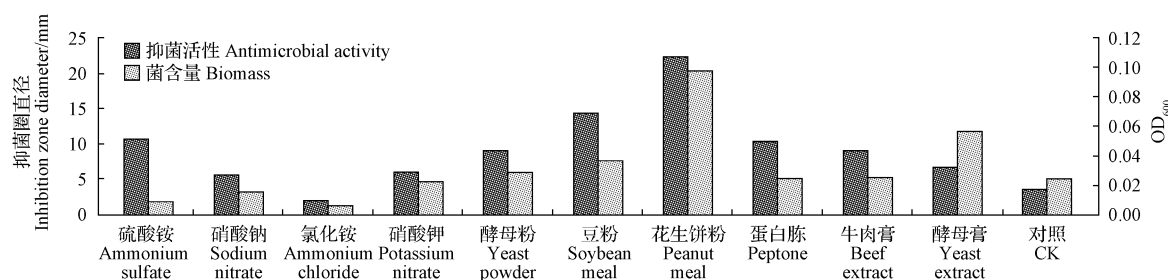


图 2 不同氮源发酵液生物量及抑菌活性

Fig. 2 The biomass and antimicrobial activity of fermentation broth using different nitrogen source

2.1.3 无机盐的筛选 无机盐或矿质元素主要为微生物提供除碳、氮以外的各种重要元素。在筛选试验中,分别以硫酸铵、碳酸钙、硫酸镁、氯化钠代替原培养基中的无机盐,由图 3 可知,获得的发酵液对棉花黄萎病菌的抑菌活性以及发酵液生物量均大于空白对照;抑菌圈直径分别为 23.00、14.67、14.33、14.00 mm,发酵液 OD<sub>600</sub> 分别为 0.082、0.067、0.065、0.090。因此选择这 4 种无机盐进行正交实验,以确定最佳配比。

2.1.4 正交实验 用筛选出来的碳源、氮源和无机盐进行正交实验,得到各水平下发酵液生物量和抑菌

活性(表 2)并进行了评价分析(表 3)。由表 3 可知,OD 值的主次顺序为 B>A>C>F>E>D,最佳组合为 B<sub>4</sub>A<sub>3</sub>C<sub>2</sub>F<sub>3</sub>E<sub>1</sub>D<sub>3</sub>;抑菌圈的主次顺序为 A>B>F>D=E>C,最佳组合为 A<sub>3</sub>B<sub>4</sub>F<sub>2</sub>D<sub>2</sub>E<sub>5</sub>C<sub>1</sub>。综合这 2 个因素考虑,在培养基中,葡萄糖和花生饼粉的 A<sub>3</sub> 和 B<sub>4</sub> 均为最佳水平;硫酸铵对生物量的影响较大,对抑菌活性的影响最小,所以取值 C<sub>2</sub>;碳酸钙对抑菌活性的影响比生物量的影响大,因此取 D<sub>2</sub>;硫酸镁在 OD 值中的优水平 E<sub>1</sub> 在抑菌圈中直径为 8.2 mm,距抑菌圈的优水平 E<sub>5</sub> 的抑菌圈直径 10.2 mm 相差很多,而抑菌圈中的优水平

$E_5$  的 OD 值为 0.1468, 距离 OD 值的优水平  $E_1$  的 0.2546 同样不理想, 并且硫酸铵在 2 因素中影响不是很大, 所以选择  $E_3$  使其在生物量和抑菌活性中效果居中; 氯化钠在抑菌圈中影响较大, 在抑菌圈中  $F_2$  和  $F_3$  相差

不大, 但是在 OD 值中几乎相差 1 倍, 因此选择其最佳水平  $F_3$ 。最终确定培养基的最佳组合为: 葡萄糖 1.5%、花生饼粉 2%、硫酸铵 0.5%、碳酸钙 0.1%、硫酸镁 0.5%、氯化钠 0.5%。

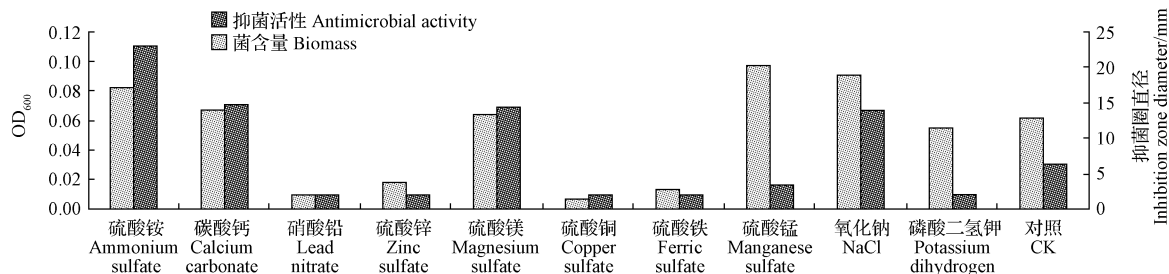


图 3 不同无机盐发酵液生物量及抑菌活性

Fig. 3 The biomass and antimicrobial activity of fermentation broth using different inorganic salt

表 2 正交实验统计结果

Table 2 The statistic of the result of orthogonal experiment

试验号 No. of test	A	B	C	D	E	F	OD <sub>600</sub>	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter/mm
1	1	1	1	1	1	1	0.040	2
2	1	2	2	2	2	2	0.052	2
3	1	3	3	3	3	3	0.034	2
4	1	4	4	4	4	4	0.054	2
5	1	5	5	5	5	5	0.249	2
6	2	1	2	3	4	5	0.052	2
7	2	2	3	4	5	1	0.014	9
8	2	3	4	5	1	2	0.033	9
9	2	4	5	1	2	3	0.235	9
10	2	5	1	2	3	4	0.740	14
11	3	1	3	5	2	4	0.033	2
12	3	2	4	1	3	5	0.032	6
13	3	3	5	2	4	1	0.108	11
14	3	4	1	3	5	2	0.331	18
15	3	5	2	4	1	3	0.921	11
16	4	1	4	2	5	3	0.102	16
17	4	2	5	3	1	4	0.194	2
18	4	3	1	4	2	5	0.067	2
19	4	4	2	5	3	1	0.303	14
20	4	5	3	1	4	2	0.23	13
21	5	1	5	4	3	2	0.025	13
22	5	2	1	5	4	3	0.061	11
23	5	3	2	1	5	4	0.038	6
24	5	4	3	2	1	5	0.085	17
25	5	5	4	3	2	1	0.505	11

## 2.2 发酵培养条件的优化

2.2.1 温度 解淀粉芽孢杆菌 X-278 在 26~38℃ 均可生长, 由图 4 可知, 34℃ 以下, 发酵液中活菌数量随着温度的升高而增加, 在 34℃ 时生物量达到峰值, OD<sub>600</sub> 为 0.189, 之后随着温度的升高而下降。因此该试验选择 34℃ 为最适温度, 继续进行以下的优化。

2.2.2 转速 由图 5 可知, 当摇床转速在 140~220 r/min 时, X-278 发酵液生物量随着转速的增加呈先升高后下降的趋势, 在转速为 180 r/min 时, 达到最高, 发酵液 OD<sub>600</sub> 为 0.218, 因此该试验选择 180 r/min 为最佳转速, 继续进行以下的优化。

表 3 正交实验评价结果

Table 3 The evaluation result of orthogonal experiment

		A	B	C	D	E	F	
OD <sub>600</sub>	K1	0.4290	0.2520	1.2390	0.5750	1.2730	0.9700	
	K2	1.0740	0.3530	1.3660	1.0870	0.8920	0.6710	
	K3	1.0425	0.2800	0.3960	1.0116	1.1340	1.3530	
	K4	0.8960	1.0080	0.7260	1.0810	0.5050	1.0590	
	K5	0.7140	2.6450	0.8110	0.6790	0.7340	0.4850	
	k1	0.0858	0.0504	0.2478	0.1150	0.2546	0.1940	
	k2	0.2148	0.0706	0.2732	0.2174	0.1784	0.1342	
	k3	0.2850	0.0560	0.0792	0.2232	0.2268	0.2706	
	k4	0.1792	0.2016	0.1452	0.2162	0.1010	0.2118	
	k5	0.1428	0.5290	0.1622	0.1358	0.1468	0.0970	
R	0.1992	0.4786	0.194	0.1082	0.1258	0.1736		
抑菌圈直径 Inhibition zone diameter	K1	10	35	47	36	41	47	
	K2	43	30	35	60	25	55	
	K3	48	30	43	35	49	49	
	K4	47	60	44	37	39	26	
	K5	45	51	37	38	51	29	
	k1	2.0	7.0	9.4	7.2	8.2	9.4	
	k2	8.6	6.0	7.0	12.0	5.2	11.0	
	k3	9.6	6.0	8.6	7.0	9.8	9.8	
	k4	9.4	12.0	8.8	7.4	7.8	5.2	
	k5	9.0	10.2	7.4	7.6	10.2	5.8	
R	7.6	6.0	2.4	5.0	5.0	5.8		
结果分析 Analysis	OD <sub>600</sub>	B>A>C>F>E>D						
	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter	A>B>F>D=E>C						
最终结果 Result	葡萄糖(Glucose)1.5%    花生饼粉(Peanut meal)2%							
	硫酸铵((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )0.5%    碳酸钙(CaCO <sub>3</sub> )0.1%							
		硫酸镁(MgSO <sub>4</sub> )0.5%    氯化钠(NaCl)0.5%						

2.2.3 初始 pH 值 环境的酸碱度强烈影响微生物的生长速率, 因为介质 pH 值在很大程度上会改变蛋白质的性质。由图 6 可知, X-278 对 pH 值的适应性较宽, 在 pH 为 5~9 时, 发酵液生物量变化不大, 但在 pH 为 7 时, 生物量最高, OD<sub>600</sub> 为 0.222, 因此选择培养基的初始 pH 为 7。

2.2.4 种龄 延滞期指少量单细胞微生物接种到新鲜培养液中后, 在开始培养的一段时间内, 因代谢系统适应新环境的需要, 细胞数目没有增加的一段时期。如果

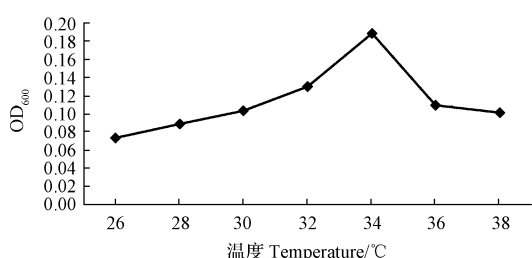


图4 温度对发酵液中活菌数量的影响

Fig. 4 Effect of temperature to the number of viable bacteria

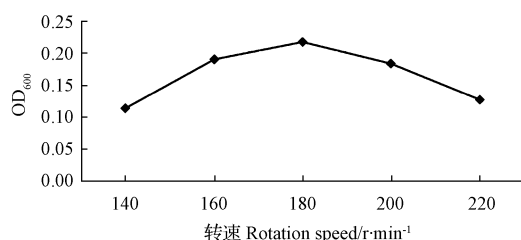


图5 转速对发酵液中活菌数量的影响

Fig. 5 Effect of rotation speed to the number of viable bacteria

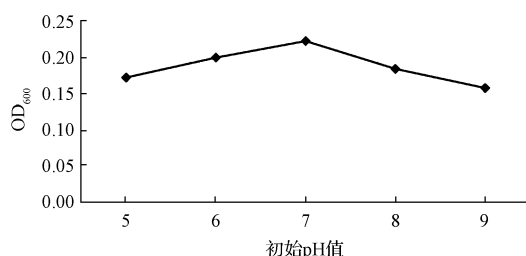


图6 初始 pH 值对发酵液中活菌数量的影响

Fig. 6 Effect of pH to the number of viable bacteria

以对数期接种龄的种子接种,则子代培养物的延滞期就短;反之,如以延滞期或衰亡期的种子接种,则子代培养物的延滞期就长<sup>[10]</sup>。由图7可知,接种24 h的种子液,得到的发酵液的OD<sub>600</sub>最高,为0.367;此后,随种子液培养时间的延长,发酵液生物量降低。因此选择接种发酵24 h的种子液进行以下的优化。

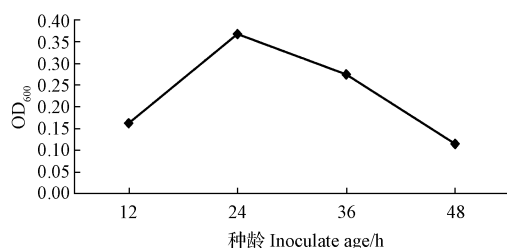


图7 种龄对发酵液中活菌数量的影响

Fig. 7 Effect of inoculate age to the number of viable bacteria

2.2.5 装液量 装液量太少水分蒸发会影响菌体生长,装液量太多会导致溶氧量不够。由图8可知,当装液量少于150 mL时,发酵液生物量随着装液量的增加而增加;当装液量为150 mL时发酵液生物量达到最高,其OD<sub>600</sub>为0.577。因此选取500 mL三角瓶装液量150 mL为最优条件。

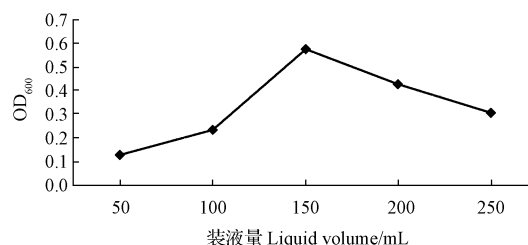


图8 装液量对发酵液中活菌数量的影响

Fig. 8 Effect of liquid volume to the number of viable bacteria

2.2.6 接种量 接种量的多少明显影响延滞期的长短。一般来说,接种量大,延滞期短,反之则长。由图9可知,接种量为4%时发酵液生物量最大,OD<sub>600</sub>达到0.541,随着接种量的增加,生长量逐渐减少。接种量为2%时,OD<sub>600</sub>为0.520,与接种量4%时相差不大。考虑到实验的经济性,选择最适接种量为2%。

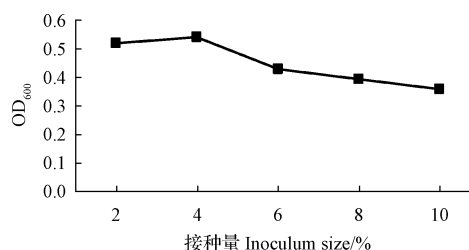


图9 接种量对发酵液中活菌数量的影响

Fig. 9 Effect of inoculum size to the number of viable bacteria

2.2.7 发酵培养时间 由图10可知,X-278在发酵培养72 h之前,发酵液生物量持续增加,在培养72 h时达到高峰,检测生物量OD<sub>600</sub>为1.603,为了得到较高含菌

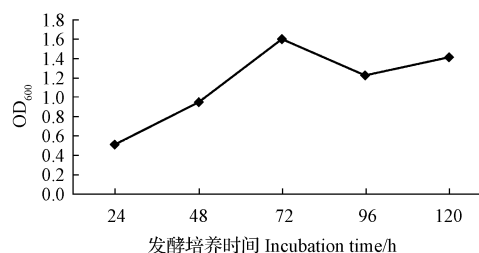


图10 发酵培养时间对发酵液中活菌数量的影响

Fig. 10 Effect of incubation time to the number of viable bacteria



量的发酵液,发酵培养时间确定为 72 h。

### 2.3 发酵液的活菌含量及抑菌活性

采用以上优化条件进行内生解淀粉芽孢杆菌 X-278 的发酵培养,采用平板稀释法检测发酵液的含菌量为  $1.5 \times 10^{10}$  CFU/mL,较 BPY 培养基发酵得到的菌量  $2 \times 10^7$  CFU/mL 有相当大程度的增加,发酵液对棉花黄萎病菌的抑菌圈直径也由 22.0 mm 增加到 33.4 mm。

### 3 结论与讨论

不同培养基组分对生防微生物的生长繁殖和抑菌活性物质的产生影响较大,该试验通过单因素试验和正交实验方法,对内生解淀粉芽孢杆菌 X-278 的发酵条件进行了优化,获得的最佳发酵培养基为葡萄糖 1.5%、花生饼粉 2%、硫酸铵 0.5%、碳酸钙 0.1%、硫酸镁 0.5%、氯化钠 0.5%。最适发酵培养条件为初始 pH 7,培养温度 34℃,转速 180 r/min,种龄 24 h,装液量 150 mL/500mL,接种量 2%,培养时间 72 h。筛选后的培养基活菌数由  $2 \times 10^7$  CFU/mL 增到  $1.5 \times 10^{10}$  CFU/mL,抑菌圈直径由 22.0 mm 增加到 33.4 mm。

韩绍辉等<sup>[11]</sup>采用单因素和正交实验对棉花黄萎病拮抗细菌 12-47 菌株发酵条件进行优化,并从抑菌活性单一因素分析确定其发酵培养基和培养条件;张艳<sup>[12]</sup>采用正交实验,并用抑菌活性进行评价分析,对生防链霉菌 Men-myc-93-63 的发酵条件进行了优化。该试验采用了单因素和正交实验,不仅利用抑菌活性进行评价分析,还加入了发酵液生物量的因素,进行了这 2 个因素的综合评价与分析,得到最佳优化培养基及条件。

优化发酵条件时发现,装液量和转速对 X-278 菌体生长量的影响较大,这 2 种因素直接影响菌体生长过程中获取氧气的的能力;种龄、接种量和发酵时间均与菌株的生长规律有关。而温度、pH 值影响相对较小,说明此菌株有极好的适应性。

近年来,人们对环境保护的意识日益增强,生物防治病虫害的研究速度明显加快<sup>[2]</sup>。微生物及其制剂的

研究成为热点,而其中芽孢杆菌的发酵培养基及其发酵条件的研究很多<sup>[13]</sup>。但在生产和应用中也存在不少问题,其中之一就是活菌数量不够,因此,发酵培养基和发酵条件的优化是研究开发生防微生物菌剂的关键所在<sup>[14-15]</sup>。该试验对内生解淀粉芽孢杆菌 X-278 发酵培养基和培养条件进行了优化,筛选到发酵成本较低的培养基,且较同类产品活菌数和菌的生物活性都较高,较陈明丽等<sup>[5]</sup>、杨宇清等<sup>[9]</sup>优化效果较高。为今后研究 X-278 的生物制剂奠定了一定的基础。

### 参考文献

- [1] 胡庆堂. 微生物农药生产技术进展[J]. 生物工程进展, 1995, 15(4): 29-31.
- [2] 刘萍萍, 闫艳春. 微生物农药研究进展[J]. 山东农业科学, 2005(2): 78-80.
- [3] 赵继红, 李建. 农用微生物杀菌剂研究进展[J]. 农药, 2003, 42(5): 6-8.
- [4] 朱昌雄, 蒋细良, 姬军红, 等. 我国生物农药的研究进展及对未来发展建议[J]. 现代化工, 2003, 23(7): 1-4.
- [5] 陈明丽, 高虹, 谢丽华, 等. 枯草芽孢杆菌 SW-08 和 SW-11 液体发酵条件的优化[J]. 现代化农业, 2011(12): 8-10.
- [6] 陈英化. 棉花内生拮抗菌对其黄萎病防治作用的研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2012.
- [7] 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.
- [8] 郭龙涛, 邱思鑫. 内生解淀粉芽孢杆菌 TB2 液体发酵条件的研究[J]. 热带作物学报, 2010, 31(2): 259-264.
- [9] 杨宇清, 郑一敏, 胡杨, 等. 枯草芽孢杆菌 3-2 产细胞素发酵条件的优化[J]. 重庆理工大学学报, 2011(11): 39-43.
- [10] 何建勇. 发酵工艺学[M]. 2 版. 北京: 中国医药科技出版社, 2009.
- [11] 韩绍辉, 李术娜. 棉花黄萎病拮抗细菌 12-47 菌株发酵条件的优化[J]. 中国农学通报, 2008, 24(12): 68-73.
- [12] 张艳. 生防菌株 Men-myc-93-63 发酵培养基优化条件的研究[J]. 河北农业大学学报, 2006, 29(2): 77-81.
- [13] 魏红, 刘素花, 刘庆丰, 等. 解淀粉芽孢杆菌产抗菌物质发酵工艺研究[J]. 中国农学通报, 2009, 25(11): 151-155.
- [14] 孙笑非, 孙鸣. 一株枯草芽孢杆菌发酵培养基的优化[J]. 饲料研究, 2009(2): 68-69.
- [15] 车晓曦, 李校堃. 解淀粉芽孢杆菌的研究进展[J]. 北京农业, 2010(1): 7-10.

## Fermentation Condition Optimization of Endogenous *Bacillus amyloliquefaciens* X-278

WEI Jiao-yang, FENG Long, LI Ya-ning, LIU Da-qun, CHI Guo-tong

(College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Biological Control Center of Plant Diseases and Plant Pests of Hebei Province, National Engineering Research Center for Agriculture in Northern Mountainous Areas, Baoding, Hebei 071001)

**Abstract:** Taking *Bacillus amyloliquefaciens* as test material, using single factor and orthogonal experiments, and through comparing biomass of fermentation broth and bacteriostatic activity against *Verticillium dahliae* Kleb, the fermentation conditions of endogenous *Bacillus amyloliquefaciens* X-278 were optimized. The results showed that the final optimization of the medium and conditions: 1.5% glucose, 2% peanut power, 0.5%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.1%  $\text{CaCO}_3$ , 0.5%  $\text{MgSO}_4$ , 0.5% NaCl, pH 7, culture temperature 34℃, rotation speed 180 r/min, seed liquid age was 24 h, liquid volume was 150 mL/500mL of triangular flask, inoculum size was 2%, incubation time was 72 h. After optimizing, the number of viable bacteria was to  $1.5 \times 10^{10}$  CFU/mL in the fermentation broth, and the diameter of inhabiting circle against *Verticillium dahliae* was 33.4 mm.

**Key words:** endogenous *Bacillus amyloliquefaciens* X-278; fermentation; single factor; orthogonal experiment