

黄瓜内生枯草芽孢杆菌 B504 发酵配方优化研究

苗则彦¹, 赵奎华¹, 刘长远¹, 梁春浩¹, 王 辉¹, 吕国忠²

(1. 辽宁省农业科学院 辽宁 沈阳 110161; 2. 大连民族学院, 辽宁 大连 116600)

摘 要: 利用 SAS 软件对黄瓜内生枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) B504 发酵培养基进行优化。首先用 Plackett-Burman 法筛选出 3 个重要因素, 通过最陡爬坡试验逼近最佳响应面区域, 最后采用 Box-Behnken 设计及响应面分析确定主要影响因子的最佳浓度。结果表明: 当葡萄糖、KH₂PO₄、玉米粉、黄豆粉、MnSO₄、K₂HPO₄ 的最佳用量分别为 0.72、1.07、3.67、3.0、2.0、3.0 g 时, 发酵培养基产生的芽孢数量达到最大值 2.22×10⁹ cfu/mL, 较优化前的 1.81×10⁹ cfu/mL 提高了 22.7%。

关键词: 黄瓜内生枯草芽孢杆菌; 响应面法; 优化
中图分类号: S 642.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)04-0157-04

植物内生枯草芽孢杆菌具有一般植物内生细菌特有的生存优势, 它避开了温度、紫外线、营养贫乏等不利因素的影响, 具有相对安全稳定的生存环境, 营养来源丰富, 因而更利于其发挥生物防治潜能^[1]。试验所用的枯草芽孢杆菌 B504 为黄瓜内生细菌, 通过催芽过程在植物发育早期进入胚根, 并随着植株的生长发育在根、茎、叶中定殖, 在催芽及苗期阶段对植株促生作用明显。催芽时生防菌进入植株体内, 通过吸收植物中的营养完成定殖、转移过程, 显现出内生细菌独特的优势, 对黄瓜枯萎病具有一定的防治作用^[2]。

SAS (Statistical Analysis System) 软件可方便地定量分析各因素对试验结果的影响, 使优化后的工艺科学性强、重现性好、可信度高。Plackett-Burman 设计法可在众多的考察因素中快速有效地筛选出最为重要的几个因素。响应面分析法(RSA)是综合试验分析和数学建模最经济合理的试验设计, 是近年来应用最多的一种优化技术。Plackett-Burman 法和响应面分析法已被成功地运用于微生物发酵条件的优化研究中。Ismail A^[3]、Ramana Murthy M V^[4]、张丽霞^[5]、曹小红^[6]、周波^[7]、牛芳方^[8]等在研究发酵生产中成功地应用了 Plackett-Burman 设计法及 RSA, 高效快速地获得了优化工艺。

试验利用 SAS 软件进行发酵培养基配方优化, 提高发酵液中的菌体数量, 降低生产成本, 为提高生产效

率为大规模工业化生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* B504 由实验室保存。B504 经过 LB 平板活化后, 挑取单菌落, 接种于液体 LB 培养基中, 29℃、140 rpm 培养 16 h。在前期工作的基础上, 从 11 种培养基(略)中根据芽孢形成的数量和时间, 综合考虑培养基成分的来源、价格、取材等因素, 本着节约发酵成本和提高发酵产量的原则, 选取经济、实用、高效的发酵基础培养基作为进一步优化的初始培养基, 确定基础发酵培养基为玉米粉 3 g, 黄豆粉 3 g, 葡萄糖 0.5 g, MnSO₄ 2 g, K₂HPO₄ 3 g, KH₂PO₄ 1.5 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 8.0。

1.2 含菌量测定

将已培养 42 h 的发酵培养基梯度稀释, 取 100 μL 在 LB 平板培养基上涂板, 24 h 后记录菌落数量, 计算 cfu/mL。

1.3 发酵条件

250 mL 三角瓶中按 100 mL 培养基的装液量, pH 值为 8.0, 以 6% 的接菌量接种种子培养液, 29℃, 140 rpm 振荡培养。

2 结果与分析

2.1 Plackett-Burman 设计法筛选培养基中重要因子

应用 Plackett-Burman 设计法全面考察初始发酵基础培养液中 6 个成分的影响效应, 筛选培养基中影响发酵液含菌量的重要因子。各因子设置高低 2 水平, 低水平为初始发酵基础培养基各成分的浓度, 高水平为低水平的 1.5 倍。Plackett-Burman 试验因素及水平见表 1。

第一作者简介: 苗则彦(1968-)女, 博士, 研究员, 现从事蔬菜病害方向研究工作。E-mail: endobacteria@yahoo.com.cn.
通讯作者: 赵奎华(1955-), 男, 博士, 研究员, 现主要从事园艺病害方向研究工作。E-mail: zkh@laas.net.cn.
基金项目: 辽宁省自然科学基金资助项目(20062123).
收稿日期: 2009-11-20

表 1 Plackett-Burman 试验因素及水平列表

符号	因素 /g ° L ⁻¹	水平	
		-1	+1
X1	玉米粉	3	4.5
X2	黄豆粉	3	4.5
X3	葡萄糖	0.5	0.75
X4	MnSO ₄	2	3
X5	K ₂ HPO ₄	3	4.5
X6	KH ₂ PO ₄	1.5	2.25

2.2 最陡爬坡试验

由 Plackett-Burman 实验回归分析确定重要因素, 见表 2。对数据进行回归分析获得各因素的 t 值和可信度, 见表 3。选择可信度大于 90% 以上的因素作为重要因素。

表 2 Plackett-Burman 试验设计及响应值表

Run	X1	X2	X3	X4	X5	X6	菌量 / × 10 ⁹ cfu ° mL ⁻¹
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1.17
2	1	-1	-1	-1	1	-1	1.32
3	-1	1	-1	-1	1	1	1.13
4	1	1	-1	-1	-1	1	1.00
5	-1	-1	1	-1	1	1	1.92
6	1	-1	1	-1	-1	1	1.96
7	-1	1	1	-1	-1	-1	2.00
8	1	1	1	-1	1	-1	2.20
9	-1	-1	-1	1	-1	1	1.22
10	1	-1	-1	1	1	1	1.19
11	-1	1	-1	1	1	-1	1.40
12	1	1	-1	1	-1	-1	1.51
13	-1	-1	1	1	1	-1	1.77
14	1	-1	1	1	-1	-1	2.10
15	-1	1	1	1	-1	1	1.37
16	1	1	1	1	1	1	1.67

由表 3 可以看出, 在初始发酵培养基的 6 个因素中, 玉米粉、葡萄糖、K₂HPO₄ 对发酵液的含菌量的影响表现为正效应, 黄豆粉、MnSO₄ ° H₂O、KH₂PO₄ 对发酵液的含菌量的影响表现为负效应。各因素对发酵液含菌量影响的重要性顺序为: 葡萄糖、KH₂PO₄、玉米粉、MnSO₄ ° H₂O、黄豆粉、K₂HPO₄。其中葡萄糖 (P = 0.00304)、KH₂PO₄ (P = 0.018414)、玉米粉 (P = 0.078785) 的可信度大于 90%, 这 3 个因素对发酵液含菌量有极显著的影响, 可进行下一步试验。

表 3 Plackett-Burman 试验因素水平及其主效应分析

符号	因素	t 值	大于 t 的概率	重要性排序
X1	玉米粉	3.348611	0.078785	3
X2	黄豆粉	-1.42494	0.290227	5
X3	葡萄糖	18.09675	0.00304	1
X4	MnSO ₄ · H ₂ O	-1.31171	0.257536	4
X5	K ₂ HPO ₄	0.288576	0.397099	6
X6	KH ₂ PO ₄	-4.87955	0.018414	2

2.3 最陡爬坡路径试验确定重要因素的最适浓度范围

根据 Plackett-Burman 试验设计结果确定葡萄糖、

KH₂PO₄、玉米粉为 3 个显著影响因素。玉米粉、葡萄糖对发酵液的含菌量的影响表现为正效应, KH₂PO₄ 对发酵液的含菌量的影响表现为负效应。由此设计最陡爬坡路径试验, 其中 MnSO₄ ° H₂O、黄豆粉、K₂HPO₄ 3 个因素均取低水平浓度, 按一定浓度增加玉米粉、葡萄糖在培养基中的浓度, 减少 KH₂PO₄ 在培养基中的浓度, 考察发酵液含菌量的变化。最陡爬坡路径试验设计及结果见表 4。从试验结果可以看出, 第 3 组试验数据为最高值, 因此以此组条件为后续试验的中心点进行响应面分析。

表 4 最陡爬坡路径试验设计及结果

编号	葡萄糖 /g ° L ⁻¹	KH ₂ PO ₄ /g ° L ⁻¹	玉米粉/g ° L ⁻¹	菌量 / × 10 ⁹ cfu ° mL ⁻¹
1	0.5	1.5	3	1.54
2	0.6	1.3	3.4	1.67
3	0.7	1.1	3.8	2.23
4	0.8	0.9	4.2	1.68
5	0.9	0.7	4.6	1.67
6	1.0	0.5	5.0	1.42

2.4 响应面分析试验设计筛选重要因素的最优浓度水平

Box-Behnken 试验因素水平见表 5, 试验设计表及结果见表 6。利用 SAS 软件对其结果进行二次回归分析, 回归方程为 Y1 = 2.26 + 0.01125X₁ - 0.015X₂ - 0.01375X₃ - 0.04875X₁X₁ - 0.025X₁X₂ - 0.0075X₁X₃ - 0.08625X₂X₂ + 0.015X₂X₃ - 0.02875X₃X₃, 回归方程的方差分析见表 7, 模型可信度分析结果见表 8。

表 5 Box-Behnken 试验因素水平

符号	变量名称	水平		
		-1	0	1
X1	葡萄糖/g ° L ⁻¹	0.6	0.7	0.8
X2	KH ₂ PO ₄ /g ° L ⁻¹	0.9	1.1	1.3
X3	玉米粉/g ° L ⁻¹	3.4	3.8	4.2

表 6 Box-Behnken 试验设计表及结果

Run	因素			菌量 / × 10 ⁹ cfu ° mL ⁻¹
	X1	X2	X3	
1	-1	-1	0	2.09
2	-1	1	0	2.14
3	1	-1	0	2.16
4	1	1	0	2.11
5	0	-1	-1	2.21
6	0	-1	1	2.14
7	0	1	-1	2.12
8	0	1	1	2.11
9	-1	0	-1	2.17
10	1	0	-1	2.21
11	-1	0	1	2.17
12	1	0	1	2.18
13	0	0	0	2.24
14	0	0	0	2.28
15	0	0	0	2.26

表 7 回归方程的方差分析

方差来源	自由度	总偏差平方和	平均偏差平方和	F 值	大于 F 值的概率
X_1	1	0. 001012	0. 001012	1. 730769	0. 245405
X_2	1	0. 0018	0. 0018	3. 076923	0. 139779
X_3	1	0. 001512	0. 001512	2. 58547	0. 16876
X_1X_1	1	0. 008775	0. 008775	15	0. 011725
X_1X_2	1	0. 0025	0. 0025	4. 273504	0. 093567
X_1X_3	1	0. 000225	0. 000225	0. 384615	0. 562312
X_2X_2	1	0. 027467	0. 027467	46. 95266	0. 001011
X_2X_3	1	0. 0009	0. 0009	1. 538462	0. 269875
X_3X_3	1	0. 003052	0. 003052	5. 216963	0. 071175
模型	9	0. 043368	0. 043368	8. 2371	0. 015915
(一次项)	3	0. 004325	0. 004325	2. 464387	0. 177386
(二次项)	3	0. 0354. 8	0. 0354. 8	20. 18139	0. 003184
(交叉乘积项)	3	0. 003625	0. 003625	2. 065527	0. 223513
误差项	5	0. 002925	0. 002925		
(失拟项)	3	0. 002125	0. 002125	1. 770833	0. 380773
(纯误差)	2	0. 0008	0. 0008		
所有项	14	0. 046293	0. 046293		

表 8 模型的可信度分析

平均值	2. 172667
复相关系数 R^2	93. 68%
校正后的 R^2	82. 31%
模型误差的平方根	0. 02418677
Y 的变异系数 CV	1. 11323

$P=0.380773>0.1$, 失拟不显著, 模型选择正确。一次项、平方项、交叉项均对响应值有显著性影响。模型可信度分析见表 8, 其中复相关系数的平方 $R^2=0.9368$, 说明模型可以解释 93.68%菌量的变化, 表明方程拟合较好。 CV (r 的变异系数)表示试验的精确度, 该试验中 CV 较低($CV=1.11323\%$), 试验操作可信。

回归方程中的稳定点为极大值点, 通过岭峭分析(ridge analysis)得到极大值所对应的各主要因素(X_1, X_2, X_3)的编码值分别为 0.18505, -0.14525, -0.32351, 葡萄糖、 KH_2PO_4 、玉米粉的最佳用量分别为 0.72、1.07、3.67 g/L 此时预测的最大响应值为 2.26404×10^9 cfu/mL。

2.5 模型验证

以 2.4 确定的主要因素用量配制发酵培养基, 所得试验值为 2.22×10^9 cfu/mL 与预测值接近。两者的拟合性好证实了模型的有效性。优化后培养基产生的菌量为 2.22×10^9 cfu/mL 与优化前培养基产生的菌量为 1.81×10^9 cfu/mL 相比提高了 22.7%, 见表 9。

表 9 模型验证试验

处 理	菌量/ 1×10^9 cfu * mL ⁻¹			平均值 / 1×10^9 cfu * mL ⁻¹
	I	II	III	
优化前发酵培养基	1. 81	1. 83	1. 80	1. 81
优化后发酵培养基	2. 23	2. 23	2. 21	2. 22

3 结论与讨论

试验运用 Plackett-Burman 设计和响应面分析相结合的统计分析方法对 *Bacillus subtilis* 504 发酵培养基配方进行了优化。首先运用 Plackett-Burman 设计确定葡萄糖、 KH_2PO_4 、玉米粉为 3 个显著影响因子, 通过最陡爬坡试验逐步改变三者的浓度, 逼近最佳响应面区域, 最后采用 Box-Behnken 设计和二次回归分析确定出主要因素的最优用量。优化后的发酵培养基产生的菌量比优化前培养基的相比提高了 22.7%。另外, 回归方程所得到的最大预测值与验证值拟合性好, 证实了模型的可靠性, 所建立的模型与实际情况吻合性较好。

参考文献

[1] Cho S J, Park S R, Kim M K, et al. Endophytic *Bacillus* sp. isolated from the interior of balloon flower root [J]. Biosci. Biotechnol. Biochem., 2002, 66(6): 1270-1275.

[2] 苗则彦, 赵奎华, 刘长远, 等. 黄瓜内生防菌 B504 在黄瓜体内的定殖[J]. 农药, 2009, 48(7): 535-537.

[3] Ismail A. Optimization of butylgalactoside synthesis by β -galactosidase from *Aspergillusoryzae*[J]. Enzymeand Microbial Technology, 1999(25): 208-213.

[4] Ramana Murthy M. V. Cyclosporin -Aproduction by *Tolypocladium inflatum* using solid state fermentation[J]. Process Biochemistry, 1999(34): 269-280.

[5] 张丽霞, 李荣禧, 王琦, 等. 枯草芽孢杆菌发酵培养基的优化[J]. 中国生物防治, 2006 22(增刊): 82-88.

[6] 曹小红, 蔡萍, 李凡, 等. 利用响应面法优化 *Bacillus natto* TK-1 产脂肪发酵培养基[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(4): 59-65.

[7] 周波, 杨玲, 崔思颖, 等. 响应面法优化培养基提高红曲黄色素的色调[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2008, 36(11): 91-100.

[8] 牛芳方, 刘长虹, 曹宪周. 响应面法优化玉米生产酵母培养基[J]. 粮油加工, 2009(2): 84-86.

苹果轮纹病菌拮抗细菌筛选及田间应用初步研究

杨 华, 刘 志, 石 强

(辽宁省果树科学研究所, 辽宁 营口 115214)

摘 要: 在辽宁省果树科学研究所的育种园、优质果园及树木园采集土壤, 用稀释法分离纯化并用平板对峙法筛选出了对苹果轮纹病菌(*B. berengeriana* f. sp. *piricola*)有较强抑制作用的菌株。离体果菌株控果试验表明: 先喷菌液后刺伤接种轮纹病菌的防治效果为 73.5%, 相对较好; 田间试验表明: 菌剂 100 倍与 1:3:240 波尔多液交替使用采收期与贮藏期防治果实轮纹病效果均较好; 套袋果实轮纹病防效达 100%。

关键词: 苹果轮纹病菌; 拮抗细菌; 筛选; 田间应用

中图分类号: S 436.611.1⁺9 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2010)04-0160-04

苹果轮纹病菌(*Botryosphaeria berengeriana* f. sp. *piricola*)属于子囊菌纲, 座囊菌目, 囊孢菌属^[1]。苹果轮纹病俗称水烂病、烂果病, 该病在美国、加拿大、日本和我国均有发生, 我国尤以辽宁、山东、河北发病严重。轮纹病寄主范围很广, 除苹果外还能为害梨、桃、李、杏等多种果树。

苹果轮纹病菌主要为害果实^[2]。发病初期在果面部分出现圆形、黑至黑褐色小斑, 逐渐扩大成轮纹状。随着症状的进一步发展, 病斑呈淡褐至黑褐色, 整个果实即变为水渍状软化腐烂。发病后期在病斑表面形成黑色小粒点状的分生孢子器, 偶尔从孢子器中溢出白色线头状孢子角。苹果轮纹病菌不仅侵染田间生长的苹

果, 引起 20%~30% 的烂果, 由于其潜伏侵染特性, 还可引起苹果采后腐烂, 成为贮藏期的重要病害, 严重影响果实的产质量, 给果农造成了很大的经济损失。

目前苹果轮纹病在生产上主要以化学药剂防治为主^[3], 采用化学药剂防治容易造成农药在土壤和作物上的残留, 对土壤、地下水、河流、湖泊造成污染, 尤其是给人类的生存、发展和健康带来危害。化学农药的广泛应用使公众越来越担心其安全性和对环境造成的污染问题; 同时, 化学农药的大量使用也使病菌对常用药剂产生了一定的抗药性, 使其防效不断下降。

生物防治对环境安全, 无残留无污染, 不杀伤天敌, 成为目前研究和开发的热点, 其中利用病原菌的拮抗细菌进行生物防治, 控制病害的危害是值得深入研究的一条新途径^[4]。无论是自然发生的生物防治现象还是用于生物防治的生物类型中, 细菌的作用是非常明显的。其主要优势在于: 细菌的种类和数量众多, 在果蔬根际和地上部大量存在; 细菌对病原菌的作用方式较广, 可以通过竞争、拮抗和寄生, 诱导果蔬产生抗性等方式对

第一作者简介: 杨华(1974-), 女, 硕士, 助理研究员, 现主要从事果树植保工作。E-mail: yanghua007@yahoo.com.cn.

基金项目: 农业科技跨越计划资助项目(农财发(2009)50); 公益性行业(农业)科研专项资助项目(nyhyzx07-055)。

收稿日期: 2009-11-20

Optimization of Cucumber Endobacteria *Bacillus subtilis* 504 Fermentation Medium

MIAO Ze-yan¹, ZHAO Kui-hua¹, LIU Chang-yuan¹, LIANG Chun-hao¹, WANG Hui¹, LV Guo-zhong²

(1. Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang, Liaoning 110161; 2. Dalian Nationalities University, Dalian, Liaoning 116600)

Abstract: SAS system was used to optimize the medium components for *Bacillus subtilis* 504. Firstly, the prime factors affecting yield of *Bacillus subtilis* 504 were selected by means of Plackett-Burman design; Then, a central composite design was used to optimize the prime factors and the results were shown in response surface plots. When the medium comprised glucose, KH₂PO₄, corn powder, soy bean powder, MnSO₄, K₂HPO₄, yield of *Bacillus subtilis* 504 could reach 2.22 10⁹ cfu/mL, which was 22.7% higher than the control.

Key words: cucumber endobacteria *Bacillus subtilis*; response surface method; optimization