

吕 黎,王 蕾,周 艳,等. 响应面法优化紫云英根瘤菌发酵条件[J]. 江苏农业科学,2014,42(4):323-326.

响应面法优化紫云英根瘤菌发酵条件

吕 黎,王 蕾,周 艳,罗志威,丰 来

(湖南泰谷生物肥料有限公司,湖南长沙 410205)

摘要:在摇瓶培养条件下,采用响应面对紫云英根瘤菌的发酵条件进行优化。以单因素试验确定的蔗糖浓度、酵母膏浓度、初始 pH 值为自变量,以根瘤菌活菌数为响应值,利用 Box - Behnken 试验设计原理及 Design Expert 8.0 软件进行回归分析,得到紫云英根瘤菌最佳发酵条件,即蔗糖浓度 2.19%,酵母膏浓度 0.9%,初始 pH 值 6.89,该条件下,根瘤菌活菌数为 20.533 亿 CFU/mL。通过 3 次平行试验验证表明,在优化后的发酵条件下根瘤菌活菌数实测值为 20.497 亿 CFU/mL,与预测值相对误差为 0.2%,表明模型拟合效果良好。

关键词:响应面法;紫云英根瘤菌;发酵条件

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)04-0323-03

紫云英别称翹摇、红花草等,是一种能形成共生固氮体系的豆科植物^[1]。在我国水稻种植区,紫云英作为稻田绿肥,具有改善土壤理化性状、平衡土壤生态环境、促进土壤有机碳积累、提高作物产量和品质等重要作用^[2-3]。此外,紫云英还具有较高的食用、饲用价值。美国、日本、韩国等发达国家正在大力发展紫云英产业^[4]。近年来随着耕地质量下降,肥料利用率降低,土壤、水源污染严重,农产品品质下降,紫云英种植在我国逐渐引起重视^[5]。与大豆、花生等豆科植物一样,种植紫云英时须要根瘤菌形成共生固氮体系,以促进生产和保证产量。经研究发现,接种根瘤菌可显著提高紫云英结瘤率,提高紫云英总苗数、株高、单株分枝数、单株鲜重等生长指标,使其产量增加 11%~17%,效果显著^[6-7]。在初次种植紫云英的土壤中接种有效根瘤菌是决定其产量的重要因素,在多年连作地区接种优良菌株也能促进增产^[8]。目前,市场上紫云英根瘤菌菌剂产品类型和有效活菌数少,不能有效满足当前紫云英产业的发展。本研究采用响应曲面法对紫云英根瘤菌发酵条件进行优化,以确定最佳发酵组合,以期紫云英根瘤菌菌剂的高密度、大规模发酵生产提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 紫云英根瘤菌 (*Rhizobium astragali*) 菌株 ACCC 13004。

1.1.2 培养基 YMA 液体培养基:10 g/L 甘露醇、3 g/L 酵母膏、0.5 g/L K_2HPO_4 、0.2 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.1 g/L NaCl、0.2 g/L $CaSO_4$ 、4 mL/L Rh 微量元素液(5 g/L H_3BO_3 、5 g/L $NaMnO_4$)、余量为水,pH 值 6.8~7.0。YMA 斜面培养基:

YMA 液体培养基加入 1.8% 琼脂。

1.1.3 主要仪器和设备 1102C 型恒温振荡培养箱(上海知楚仪器有限公司),SW-CJ-1G 型超净工作台(苏州净化有限公司),LRH-150 型生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司),LDZX-50KB 型立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂),Labnet P3960 移液枪(美国莱伯特公司),YP-B10002 型电子天平(上海光正医疗仪器有限公司),PHS-25 型 pH 计(上海盛磁仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 种子液培养 斜面菌种 28℃ 活化 24 h 后,取 2 环接入装有 200 mL YMA 液体培养基的 500 mL 三角瓶中,28℃ 振荡培养 48 h 后,按照 5% 接种量接入单因素试验及 Box - Behnken 试验培养基中。

1.2.2 活菌数测定方法 采用平板菌落计数法测定活菌数。

1.2.3 单因素分析法

1.2.3.1 碳源浓度对活菌数的影响 陈海荣等研究发现,紫云英根瘤菌在甘露醇、蔗糖中生长较好^[8],但因甘露醇生产成本较高,所以选定蔗糖作为碳源。试验条件为 0.9% 酵母膏、0.05% K_2HPO_4 、0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.01% NaCl、0.02% $CaSO_4$ 、4 mL/L Rh 微量元素液,初始 pH 值 7.0,蔗糖浓度分别为 1%、1.5%、2%、2.5%、3%,28℃ 摇瓶培养 48 h,测定活菌数以确定最佳蔗糖浓度。

1.2.3.2 氮源浓度对活菌数的影响 确定最佳蔗糖浓度后,将酵母膏浓度分别设为 0.1%、0.5%、0.9%、1.3%、1.7%,培养基其他组分不变,初始 pH 值 7.0,28℃ 摇瓶培养 48 h,测定活菌数以确定最佳酵母膏浓度。

1.2.3.3 初始 pH 值对活菌数的影响 将碳源、氮源设定为上述试验确定的最佳浓度,培养基其他组分不变,将初始 pH 值分别设为 6.5、7、7.5、8、8.5,28℃ 摇瓶培养 48 h,测定活菌数以确定最佳初始 pH 值。

1.2.4 响应面法优化紫云英根瘤菌发酵条件 根据 Box - Behnken 试验设计原理,将单因素试验确定的最佳蔗糖浓度、酵母膏浓度、初始 pH 值作为自变量,以活菌数为响应值,设计 3 因素 3 水平的响应面分析试验,进一步对紫云英根瘤菌发酵条件进行优化。

收稿日期:2013-08-27

基金项目:湖南省长沙市科技计划(编号:K1308090-21)。

作者简介:吕 黎(1985—),女,河南信阳人,硕士,实习工程师,从事微生物工程和菌株遗传改良研究。Tel:(0731)83285950;E-mail:ll-137@163.com。

通信作者:丰 来,硕士,助理工程师,从事微生物工程与酶制剂研究。E-mail:fenglai@taigubio.com。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 最佳蔗糖浓度的确定 由图 1 可知,当蔗糖浓度较低时,紫云英根瘤菌活菌数随着蔗糖浓度的增大而增加;当蔗糖浓度为 2% 时,活菌数达到最大值;之后,紫云英根瘤菌活菌数略有下降。因此确定最佳蔗糖浓度为 2%。

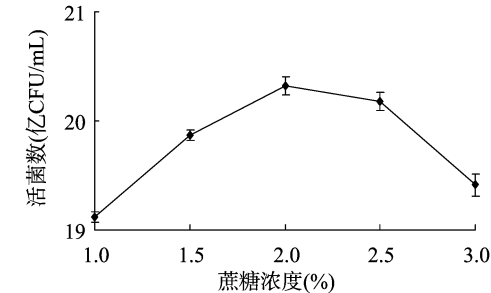


图1 蔗糖浓度对紫云英根瘤菌活菌数的影响

2.1.2 最佳酵母膏浓度的确定 由图 2 可知,在一定范围内,紫云英活菌数随着酵母膏浓度增大而增加,当酵母膏浓度为 0.9%、1.3% 时活菌数较高,但两者差异较小,考虑到生产成本问题,所以确定最佳酵母膏浓度为 0.9%。

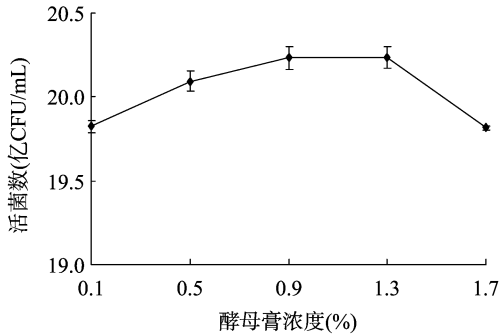


图2 酵母膏浓度对紫云英根瘤菌活菌数的影响

2.1.3 最佳初始 pH 值的确定 微生物在生长过程中机体内的绝大多数反应是酶促反应,而酶促反应需要一个最适初始 pH 值范围,在该范围内只要条件适合,酶促反应速率最高,微生物生长速率最大^[9]。由图 3 可知,随着初始 pH 值增加,紫云英根瘤菌活菌数呈先升高后降低的趋势,当 pH 值为 7.0 时,活菌数最大,所以确定最佳初始 pH 值为 7.0。

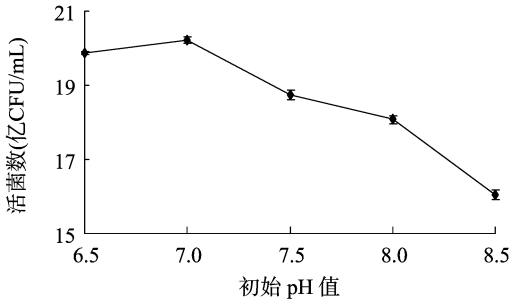


图3 初始 pH 值对紫云英根瘤菌活菌数的影响

2.2 响应面法优化紫云英根瘤菌发酵条件

2.2.1 Box - Behnken 试验设计 根据单因素试验结果,确定中心点为蔗糖浓度 2%、酵母膏浓度 0.9%、pH 值 7.0。表

1 是响应面法优化紫云英根瘤菌发酵条件试验的因素及水平,表 2 是试验设计和结果。采用 Design - Expert 8 软件对试验结果进行二次回归方程预测及方差分析,结果见表 3。

表 1 响应面法优化紫云英根瘤菌发酵条件试验的因素水平

水平	因素		
	X ₁ :蔗糖浓度 (%)	X ₂ :酵母膏浓度 (%)	X ₃ :初始 pH 值
-1	1.5	0.7	6.5
0	2.0	0.9	7.0
1	2.5	1.1	7.5

表 2 响应面试验设计及结果

序号	蔗糖浓度 (%)	初始 pH 值	酵母膏浓度 (%)	活菌数 (10 ⁸ CFU/mL)
1	0	0	0	20.324
2	1	0	1	17.586
3	-1	0	1	16.982
4	1	0	-1	20.006
5	0	1	1	16.967
6	-1	-1	0	17.347
7	0	-1	-1	19.974
8	0	1	-1	17.798
9	-1	0	-1	17.445
10	1	1	0	17.684
11	0	-1	1	17.657
12	1	-1	0	19.964
13	0	0	0	20.297
14	0	0	0	20.306
15	0	0	0	20.318
16	-1	1	0	16.786
17	0	0	0	19.987

表 3 拟合二次方程的方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	34.04	9	3.78	243.56	<0.000 1	极显著
A	5.58	1	5.58	359.14	<0.000 1	极显著
B	4.07	1	4.07	262.13	<0.000 1	极显著
C	4.55	1	4.55	292.74	<0.000 1	极显著
AB	0.74	1	0.74	47.57	0.000 2	极显著
AC	0.96	1	0.96	61.65	0.000 1	极显著
BC	0.55	1	0.55	35.54	0.000 6	极显著
A ²	6.04	1	6.04	388.89	<0.000 1	极显著
B ²	5.13	1	5.13	330.09	<0.000 1	极显著
C ²	4.59	1	4.59	295.46	<0.000 1	极显著
残差	0.11	7	0.016			
失拟项	0.024	3	0.008 1	0.38	0.772 9	
纯误差	0.085	4	0.021			
总误差	34.15	16				

注:R²=0.996 8,R_{Adj}²=0.992 7。

2.2.2 二次回归拟合及方差分析 以活菌数为响应值,采用 Design Expert 8 软件对表 2 数据进行多元回归分析,得到回归方程式:活菌数=20.25+0.84A-0.71B-0.75C-0.43AB-0.49AC+0.37BC-1.20A²-1.10B²-1.04C²。式中:A 为蔗糖浓度;B 为酵母膏浓度;C 为初始 pH 值。

对所得模型进行方差分析可知(表 3),模型 $P < 0.000 1$,说明二次回归模型极显著;失拟项 P 为 $0.772 9 > 0.05$,没有显著意义,不必引入更高次项,模型适当;模型 $R^2 = 0.996 8$,说明二次回归模型能够较好反映响应值的变化,模型预测值和实测值之间具有较高的相关性,模型可以应用于紫云英根瘤菌发酵的理论预测。

蔗糖浓度、酵母膏浓度、初始 pH 值的一次项和二次项即蔗糖浓度和酵母膏浓度、蔗糖浓度和初始 pH 值、酵母膏浓度和初始 pH 值之间的交互作用对活菌数的影响达到极显著水平($P < 0.01$)。各因素对活菌数影响的大小顺序为: $A^2 > A > B^2 > C^2 > C > B > AC > AB > BC$ 。

2.2.3 各因素之间的交互作用 根据该回归方程在考察区域内,利用 Design Expert 8 软件对以上 3 个因素绘制响应面图及等高线图。图 4 至图 6 表示蔗糖浓度、酵母膏浓度、初始 pH 值等 3 个因素中 1 个因素取零点时其他 2 个因素对活菌数的影响。由图 4 至图 6 可知,3 个响应面均为开口向下的凸形曲面,说明响应值存在极高值。3 个响应曲面的等高线中心均为 $-1 \sim 1$,说明提取的最优条件存在于所设计的因素水平范围内。对回归方程求解得到紫云英根瘤菌发酵最佳培养基组成为:蔗糖浓度 2.19%,酵母膏浓度 0.9%,初始 pH 值 6.89,模型预测的根瘤菌活菌数最大值为 20.533 亿 CFU/mL。

2.2.4 模型验证 为了验证模型准确性,根据响应面试验优化的最佳培养基进行试验,共进行 3 次平行试验,所得根瘤菌活菌数分别为 20.498 亿、20.486 亿、20.508 亿 CFU/mL,平均活菌数为 20.497 亿 CFU/mL。实测值与模型预测值相对误差为 0.2%,说明模型模拟效果良好。

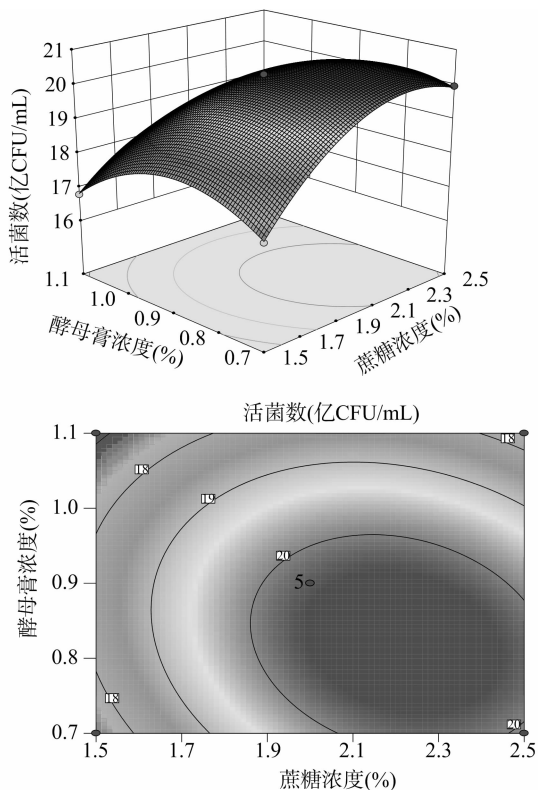


图4 酵母膏浓度、蔗糖浓度对活菌数量影响的响应面和等高线

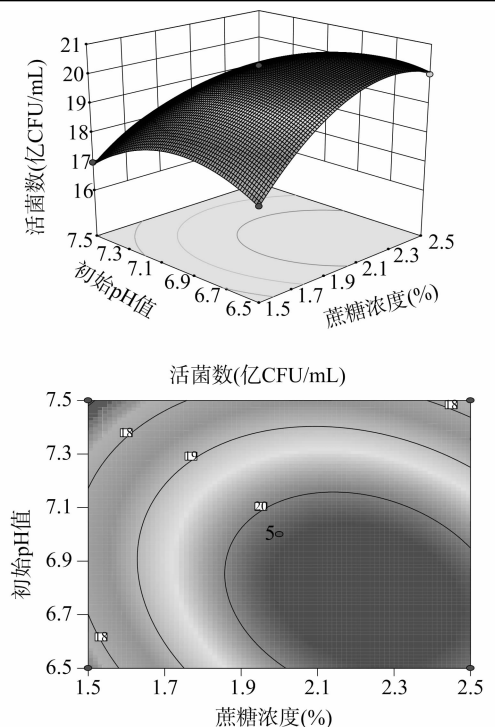


图5 蔗糖浓度和初始pH值对活菌数量影响的响应面和等高线

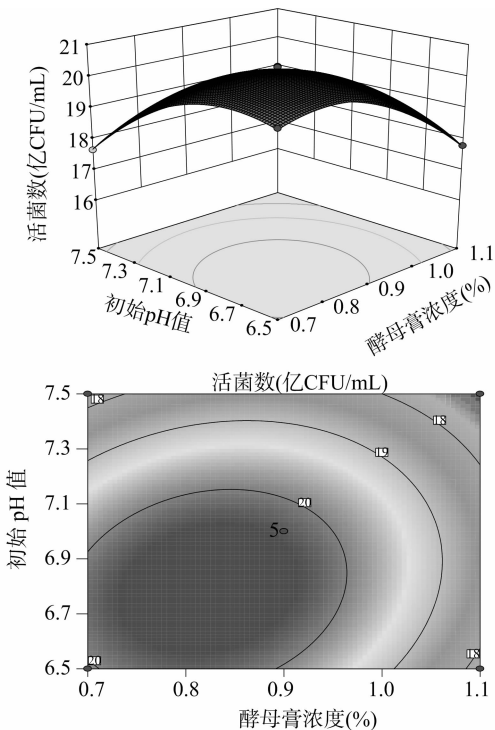


图6 酵母膏浓度和初始pH值对活菌数量影响的响应面和等高线

3 结论与讨论

许多学者开展了关于根瘤菌培养基优化的研究^[10],但主要集中在大豆、花生等经济作物上,而有关紫云英根瘤菌发酵的研究鲜有报道。紫云英根瘤菌的常用培养基是 YMA 培养基,由于 YMA 培养基是半合成培养基,在被用于大规模发酵生产时成本较高^[11]。本研究从降低发酵成本角度,以蔗糖、

白晓龙,杨春和,顾卫兵,等. 不同植物人工湿地净化模拟生活污水效果[J]. 江苏农业科学,2014,42(4):326-328.

不同植物人工湿地净化模拟生活污水效果

白晓龙^{1,2},杨春和¹,顾卫兵¹,邹永平³,唐 晔¹,郑沁沁¹

(1. 南通农业职业技术学院环境与资源系,江苏南通 226007; 2. 中国矿业大学环境与测绘学院,江苏徐州 221116;

3. 南通环境工程设计院有限公司,江苏南通 226008)

摘要:研究鸢尾、吊兰、马蹄莲 3 种不同植物模拟人工湿地系统对模拟生活污水的净化效果。结果表明:3 种植物湿地系统对模拟生活污水中 COD、NH₄⁺-N、TP 去除效果均较好,其中鸢尾湿地系统对模拟生活污水的净化效果最好。

关键词:植物;人工湿地;生活污水;净化效果

中图分类号: X703 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)04-0326-03

人工湿地是由基质、植物、微生物组成的通过物理、化学、生物作用对污水进行处理的人工生态系统。湿地植物是人工湿地的重要组成部分,湿地植物的筛选对湿地系统除污效果起着非常重要的作用^[1]。目前,众多学者对人工湿地植物的筛选及除污机理等方面开展了深入细致的研究,筛选出诸如芦苇、菖蒲、美人蕉、水葫芦等一系列湿地植物^[2-4]。湿地植

物通过吸收、吸附、富集、拦截等方式实现污水处理^[5-6]。湿地植物的筛选除了要考虑其污水处理能效外,还要综合考虑其地域性、环境适应性、经济性、生态安全性等^[7]。本研究选取了马蹄莲、吊兰、鸢尾等 3 种植物,监测这几种植物对模拟生活污水中污染物的去除效果,旨在为选出合适的湿地植物提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验装置

模拟人工湿地试验装置如图 1 所示,装置为 PVC 材质,直径为 40 cm,高 60 cm,该装置的底层铺设厚 5 cm 的碎石,中层铺设厚 50 cm 的沙子,上层铺设厚 5 cm 的土壤,装置底部有出水检测口。

收稿日期:2013-08-09

基金资助:江苏省农村环境污染防治工程技术研究开发中心项目(编号:HJZX2012003);江苏省南通市社会事业科技创新与示范项目(编号:HS2013034)。

作者简介:白晓龙(1980—),男,山东莒县人,博士研究生,讲师,从事水处理技术及环境化学教学与科研工作。E-mail:waitting2001@163.com。

酵母膏为主要原料优化紫云英根瘤菌发酵培养基。微生物生长受多种外界因素的影响,如营养条件、pH 值等,其中碳源、氮源是微生物生长需要最多的营养成分。在微生物发酵生产时,提供适量碳源、氮源,既能达到生长量,又不造成资源浪费。pH 值是影响微生物生长的主要因素之一,发酵生产时,对初始 pH 值的控制尤为重要。本研究通过单因素试验确定碳源(蔗糖)浓度、氮源(酵母膏)浓度、初始 pH 值后,进一步采用响应曲面设计法进行优化。

响应曲面设计法是一种寻找多因子系统中最佳条件的数学统计方法,通过对函数响应面图和等高线的分析,能够精确研究各因子之间的关系,从而获得最优工艺参数^[12]。本研究借助 Design Expert 8 软件进行响应面试验的设计和数据分析,在紫云英根瘤菌发酵培养基优化过程中取得良好的效果,并获得二次回归模型,得到最佳培养基为:蔗糖浓度 2.19%,酵母膏浓度 0.9%,初始 pH 值 6.89,该条件下根瘤菌活菌数为 20.533 亿 CFU/mL。通过 3 次平行试验验证表明,该模型合理可靠,能够较好地预测紫云英根瘤菌实际发酵情况,为紫云英根瘤菌工业化发酵生产提供了技术支持。

参考文献:

[1]陈 坚,张 辉,朱炳耀,等. 紫云英 SSR 分子标记的开发及在品种鉴别中的应用[J]. 作物学报,2011,37(9):1592-1596.

- [2]沈生元,莫美英,赵洪祥,等. 氮磷肥单施和配施对紫云英产量及耕地质量的影响[J]. 江苏农业科学,2010(5):131-132.
- [3]王 华,黄 宇,阳柏苏,等. 中亚热带红壤地区稻-稻-草轮作系统稻田土壤质量评价[J]. 生态学报,2005,25(12):3271-3281.
- [4]林新坚,曹卫东,吴一群,等. 紫云英研究进展[J]. 草业科学,2011,28(1):135-140.
- [5]陈海荣,郭照辉,魏小武,等. 根瘤菌肥对紫云英生长的影响研究[J]. 现代农业科技,2012(10):260-261,264.
- [6]李青盛. 紫云英接种根瘤菌剂的效果[J]. 农技服务,2010,27(7):856.
- [7]刘 英,郭熙盛,王允青,等. 紫云英根瘤菌应用效果研究[J]. 安徽农业科学,2012,40(24):12046-12047.
- [8]陈海荣,郭照辉,刘前刚,等. 紫云英根瘤菌培养基的选择与优化[J]. 湖南农业科学,2011(1):13-15.
- [9]曾晓希,周洪波,柳建设,等. 脱氮细菌 *B. mucilaginosus* Lv1-2 的培养条件研究[J]. 现代生物医学进展,2006,6(9):5-7.
- [10]迟玉成,Fan T Q,樊堂群,等. 慢生型花生根瘤菌培养基优化研究[J]. 花生学报,2007,36(4):25-28.
- [11]刘保平,周俊初. 根瘤菌菌剂研究[J]. 湖北农业科学,2006,45(1):57-61.
- [12]Vadde K K,Syrotiuk V R,Montgomery D C. Optimizing protocol interaction using response surface methodology[J]. IEEE Transactions on Mobile Computing,2006,5(6):627-639.