

金京京,齐永志,常娜,等. 响应面分析法优化多功能菌 B1514 的产孢工艺[J]. 江苏农业科学,2016,44(8):184-187,194.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.050

# 响应面分析法优化多功能菌 B1514 的产孢工艺

金京京,齐永志,常娜,张雪娇,甄文超

(河北农业大学植物保护学院,河北保定 071001)

**摘要:**为研究多功能菌 B1514 的最佳产孢工艺,为其扩培、制剂的储存及使用提供参考,首先测定多功能菌 B1514 的生长曲线以初步确定其培养时间,然后采用单因素试验对影响多功能菌 B1514 产孢的接种量、初始 pH 值、装液量、转速、发酵温度和接种种龄 6 个因素进行筛选,筛选出具有显著性影响的主效应因素,再通过中心组合设计和响应面分析试验,以芽孢数量为响应值确定各显著影响因子的最佳水平,最后利用自动玻璃发酵罐对优化所得最佳培养条件进行验证。结果表明,最佳产孢工艺为接种量 6%,初始 pH 值 7.6,三角瓶装液量 80 mL/500 mL,转速 235 r/min,发酵温度 36.5 ℃,接种种龄 24 h,培养时间 36 h,经验证芽孢数量达  $8.19 \times 10^9$  CFU/mL,较优化前增加 49%。

**关键词:**响应面分析;多功能菌;产孢工艺;优化

**中图分类号:**S435.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)08-0184-04

近年来,在中国北方秸秆还田地区小麦土传病害呈逐年加重发生趋势,已成为制约小麦高产、优产的重要因素之一<sup>[1]</sup>。目前一般采用化学药剂拌种或喷雾进行防治,但化学农药存在污染环境、降低粮食安全性和易导致病原菌产生抗药性等不足。因此,以绿色木霉、芽孢杆菌和假单胞菌等为功能菌的生物制剂应用越来越受到人们的重视<sup>[2-3]</sup>。

为解决资源利用和病害防控问题,笔者所在研究室从多年秸秆还田土壤中分离到 1 株多功能枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* B1514。该菌株不仅对小麦土传病害有较好防治效果,还能快速腐解玉米秸秆,并能通过腐解秸秆获得营养而快速繁殖<sup>[4-5]</sup>。梁春启等前期已明确该菌株的发酵条件并研制出土壤添加剂 AD-1、AD-5 和 B1514 片剂 3 种剂型,虽然田间应用效果较好<sup>[6-9]</sup>,但是在工业生产过程中仍存在芽孢形成率不高、生产成本过高等不足,给生产应用造成了许多不便。为此,本试验在前期研究基础上对其产孢条件进行了优化,以提高 B1514 发酵过程中的芽孢数量,降低生产成本。本研究对多功能菌 B1514 的扩培、制剂的储存及使用,具有一定的指导意义。

## 1 材料与与方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试菌种 多功能枯草芽孢杆菌 B1514,由河北农业大学植物病害生物防治与分子植物病理学实验室保存。

1.1.2 供试培养基 LB 培养基:酵母浸膏 5 g、胰蛋白胨

10 g、氯化钠 10 g,加蒸馏水补足至 1 000 mL。发酵培养基<sup>[8]</sup>:葡萄糖 3 g、淀粉 5 g、豆粉 15 g、玉米粉 20 g、酵母浸膏 4 g、硫酸铵 1 g、硫酸镁 0.2 g、硫酸锰 0.2 g、磷酸氢二钾 5.4 g、磷酸二氢钾 2.0 g、碳酸钙 1.0 g,加蒸馏水补足至 1 000 mL。

### 1.2 方法

1.2.1 测定生长曲线初步确定培养时间 用自动玻璃发酵罐进行培养,装料系数 0.6(12 L),培养温度 32 ℃,通气量 0.5 m<sup>3</sup>/h,搅拌转速 200 r/min,溶氧(DO)量保持在 75%左右,每隔 3 h 取样染色观察芽孢形成情况<sup>[10]</sup>,用无菌水分别配制成稀释 10、10<sup>2</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>6</sup> 倍菌悬液,无菌条件下吸取 20 μL 菌悬液,采用稀释平板法在 LB 培养基上测定菌体数量<sup>[11]</sup>,初步确定培养时间。

1.2.2 发酵产孢条件的单因素试验 对 6 种影响产孢的主要条件分别进行单因素试验。(1)接种量。在含有最适培养基 100 mL/500 mL 的三角瓶中分别接种 2、4、6、8、10 mL 种子液。(2)初始 pH 值。将培养基 pH 值分别调节为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0。(3)温度。分别置于 30、32、34、36、38 ℃培养。(4)装液量。500 mL 三角瓶分别装液 60、80、100、120、140 mL。(5)转速。170、190、210、230、250 r/min。(6)接种种龄。接种 16、20、24、28、32 h 种子液。按以上试验单因素改变培养条件并在适宜条件下培养 34 h 后,采用稀释平板计数法测定 1 mL 发酵液中的芽孢数<sup>[12]</sup>。测定前发酵液先在 80 ℃ 水浴中加热 30 min。每个处理重复 3 次,相同试验重复 2 次。

1.2.3 响应面法优化芽孢杆菌的产孢条件 根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理<sup>[13]</sup>,综合“1.2.2”节单因素试验结果,选取初始 pH 值 7.5、产孢温度 36 ℃、摇床转速 230 r/min 为设计中心,采用响应面分析方法进行试验设计。共设 12 个分析因子、5 个中心点,试验因素及水平设置见表 1。采用统计分析软件 Design-Expert 7.1.3 进行数据分析。

1.2.4 发酵产孢条件验证 在优化所得最佳培养条件下,在自动玻璃发酵罐中加食用豆油消泡进行发酵,每隔 3 h 取样,

收稿日期:2016-02-19

基金项目:“十二五”国家科技支撑计划粮食丰产科技工程(编号:2011BAD16B08,2012BAD04B06,2013BAD07B05);河北省科技计划(编号:15226501D);河北省现代农业产业技术体系小麦创新团队建设项目的。

作者简介:金京京(1991—),女,河北保定人,硕士研究生,研究方向为植物生态病理学。E-mail:jingjing1809@yeah.net。

通信作者:甄文超,教授,主要从事植物生态病理学和农业生态学研究。E-mail:wenchao@hebau.edu.cn。

表 1 响应面分析因素水平

水平	试验因素		
	A:初始 pH 值	B:温度(℃)	C:摇床转速(r/min)
-1	7.3	35	220
0	7.5	36	230
1	7.7	37	240

测定生长曲线(稀释平板法测芽孢数),进行验证并获得最佳培养时间,验证试验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 B1514 菌体生长曲线

由图 1 可知,0~9 h 为迟缓期,菌体繁殖很少;9~24 h 为对数期,菌体生长速率常数最大,菌体平衡生长代谢旺盛;24~33 h 为稳定期,此时菌体产量达最高值;33 h 后为衰亡期,出现负生长现象。因此,根据生长繁殖规律,确定 21~24 h 是种子液移种的适宜时间。

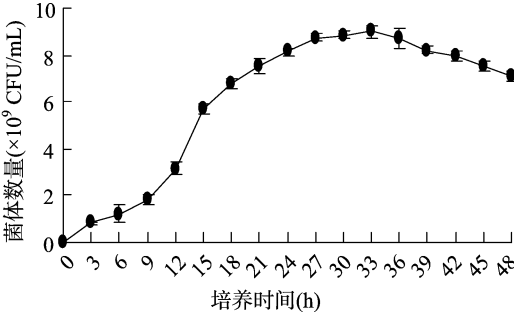


图1 发酵过程中B1514菌体生长曲线

2.2 产孢条件的单因素试验结果

2.2.1 接种量对 B1514 芽孢数量的影响 由图 2 可见,随着接种量的增加,产孢量先增加后减少;相同发酵时间内接种量为 6% 时产孢量最多,为  $6.43 \times 10^9$  CFU/mL,故以 6% 接种量为初始最优接种量。

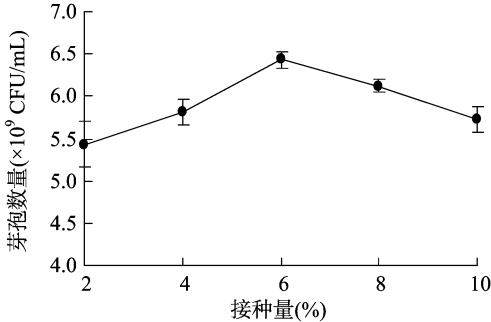


图2 不同接种量对 B1514 芽孢数量的影响

2.2.2 初始 pH 值对 B1514 芽孢数量的影响 枯草芽孢杆菌液态发酵过程中的 pH 值不易控制,虽然在发酵培养基中加入  $\text{CaCO}_3$  及磷酸盐起到一定的缓冲作用,但一般只控制发酵初始 pH 值。由图 3 可见,初始 pH 值为 7.5 时产孢量最大,为  $6.72 \times 10^9$  CFU/mL,可以确定 7.5 为最优初始 pH 值。

2.2.3 温度对 B1514 芽孢数量的影响 由图 4 可见,随着培养温度的升高,产孢量呈先升高后降低的趋势,36℃ 培养温度下产孢量最多,为  $7.54 \times 10^9$  CFU/mL,36℃ 培养条件下生长周期最短。

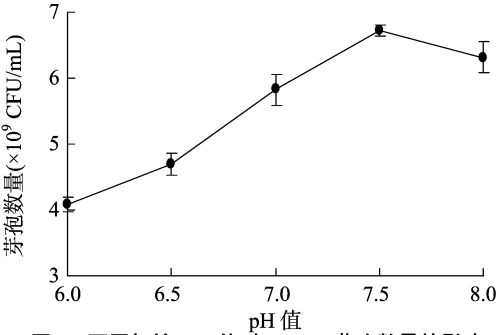


图3 不同初始 pH 值对 B1514 芽孢数量的影响

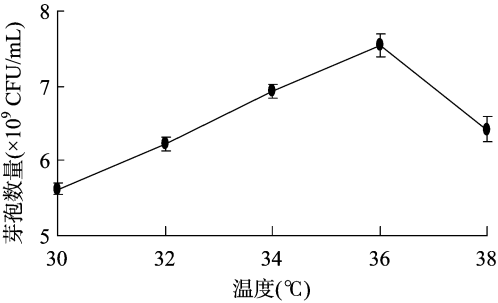


图4 不同温度对 B1514 芽孢数量的影响

2.2.4 装液量对 B1514 芽孢数量的影响 由图 5 可见,当装液量为 80 mL/500 mL 时,芽孢数量达到最大值,为  $6.52 \times 10^9$  CFU/mL;以后随着装液量的增加,通气量递减,芽孢数量也呈递减趋势。故选择 80 mL/500 mL 为最佳装液量。

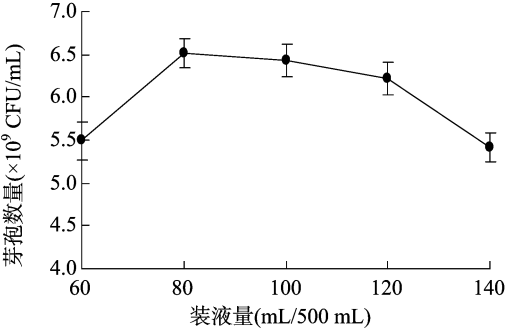


图5 装液量对 B1514 芽孢数量的影响

2.2.5 不同摇床转速对 B1514 芽孢数量的影响 由图 6 可见,随着转速的增加,产孢量先升高再降低,转速为 230 r/min 时产孢量最大,为  $6.77 \times 10^9$  CFU/mL,故取 230 r/min 为摇床的最优转速。

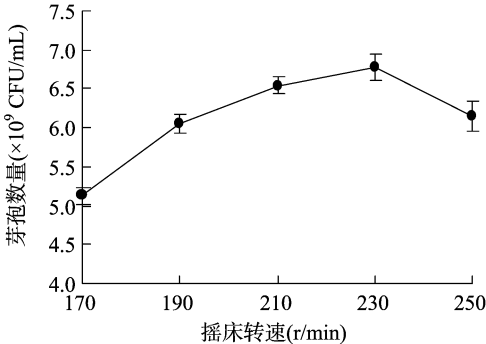


图6 不同摇床转速对 B1514 芽孢数量的影响

2.2.6 不同种龄接种对 B1514 芽孢数量的影响 由图 7 可见,在一定范围内,随着种龄时间延长,菌种趋于老化,生产能力逐渐下降,芽孢数量明显降低;种龄太短,造成发酵前期生长缓慢;24 h 时芽孢数量最大,为  $6.46 \times 10^9$  CFU/mL,最终确定接种种龄为 24 h。

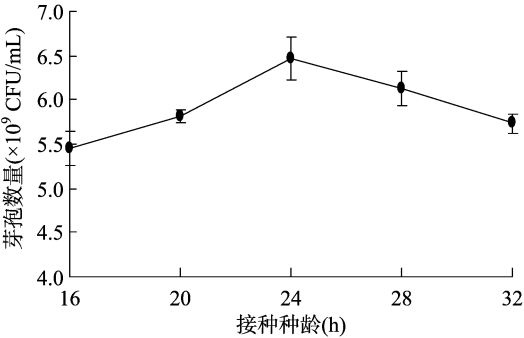


图7 不同种龄接种对 B1514 芽孢数量的影响

2.3 响应面法优化 B1514 的最佳产孢条件

Design - Expert 7.1.3 试验设计见表 2。对试验结果进行回归拟合得到响应面分析结果见图 8 至图 10,得到回归方程: $Y = 8.06 + 0.21A + 0.34B + 0.082C + 0.042AB + 0.11AC + 0.08BC - 0.2A^2 - 0.44B^2 - 0.3C^2$ ,回归方程中各变量对响应值影响的显著性,由  $F$  检验来判定, $P$  值( $F > F_\alpha$ )越小,则相应变量的显著程度越高。从回归分析结果(表 3)可以看出,各因素中  $A$ 、 $B$ 、 $C$ 、 $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$ 、 $BC$ 、 $AC$  也是极显著的,而且  $F(B) > F(A) > F(C)$ ,表明各因素的影响程度大小为  $B > A > C$ 。回归方程也是极显著的, $R^2 = 2.92/2.93 = 0.9965$ ,说明响应值的变化 99.65% 来源于所选变量。因此,回归方程能较好地描述各因素与响应值之间的真实关系,可以利用该

回归方程确定最佳发酵工艺条件。对回归方程取一阶偏导数等于零,整理如下:

$$0.21 - 0.4A + 0.042B + 0.11C = 0;$$

$$0.34 + 0.042A - 0.88B + 0.08C = 0;$$

$$0.082 + 0.11A + 0.08B - 0.6C = 0。$$

式(1)(2)(3)联立方程组,解得  $A = 0.64$ ,  $B = 0.31$ ,  $C = 0.30$ ,将  $A$ 、 $B$ 、 $C$  带回回归方程得试验理论结果,为  $8.21 \times 10^9$  CFU/mL,变换影响因素得到 pH 值 = 7.62,温度 = 36.31  $^{\circ}\text{C}$ ,转速 = 233 r/min。为生产实际方便,采用 pH 值 = 7.6,温度 = 36.5  $^{\circ}\text{C}$ ,转速 = 235 r/min。

表 2 菌株 B1514 产孢工艺响应面试验设计与结果

试验号	A	B	C	Y:产芽孢量 ( $\times 10^9$ CFU/mL)
1	-1	-1	0	6.91
2	1	-1	0	7.24
3	-1	1	0	7.51
4	1	1	0	8.01
5	1	0	1	7.95
6	1	0	-1	7.62
7	-1	0	1	7.29
8	-1	0	-1	7.40
9	0	1	1	7.84
10	0	1	-1	7.46
11	0	-1	1	7.02
12	0	-1	-1	6.96
13	0	0	0	8.06
14	0	0	0	8.06
15	0	0	0	8.12
16	0	0	0	8.06
17	0	0	0	8.01

表 3 菌株 B1514 产孢工艺回归分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
A	0.370 0	1.000 0	0.370 0	200.590 0	< 0.000 1	**
B	0.900 0	1.000 0	0.900 0	496.400 0	< 0.000 1	**
C	0.054 0	1.000 0	0.054 0	29.880 0	0.000 9	**
AB	0.007 2	1.000 0	0.007 2	3.970 0	0.086 7	
AC	0.048 0	1.000 0	0.048 0	26.560 0	0.001 3	**
BC	0.026 0	1.000 0	0.026 0	14.050 0	0.007 2	**
A <sup>2</sup>	0.170 0	1.000 0	0.170 0	92.200 0	< 0.000 1	**
B <sup>2</sup>	0.830 0	1.000 0	0.830 0	457.070 0	< 0.000 1	**
C <sup>2</sup>	0.370 0	1.000 0	0.370 0	204.170 0	< 0.000 1	**
回归	2.920 0	9.000 0	0.320 0	177.970 0	< 0.000 1	**
误差	0.013 0	7.000 0	0.001 8			
总和	2.93	16				

注:“\*\*”表示差异极显著( $P < 0.01$ )。

2.4 发酵培养基利用率验证结果

经验证,培养 36 h 芽孢数量最大,为  $8.19 \times 10^9$  CFU/mL,培养 39 h 芽孢数量为  $8.01 \times 10^9$  CFU/mL(图 11),所得结果与响应面法预测结果  $8.21 \times 10^9$  CFU/mL 相符。说明响应面优化回归模型对实际工艺操作具有一定的指导意义。

3 结论与讨论

正交设计存在无法找出整个区域上所有因素最佳组合的

缺陷<sup>[14-15]</sup>,而响应面法试验设计不仅能克服正交设计的缺陷,还能减少试验次数,分析多种因素间的交互作用,能较全面地反映各因素水平的效果<sup>[16]</sup>。本研究通过优化多功能枯草芽孢杆菌 B1514 的发酵条件,使芽孢数量达到最大值。首先通过单因素试验设计确定影响产孢的关键因素,并在此基础上通过 3 因素 3 水平响应面试验,建立芽孢数量与各因素之间的数学模型,以此模型预测理论芽孢数量为  $8.21 \times 10^9$  CFU/mL,最终得到最优产孢工艺参数:接种量 6%,初始 pH 值 7.6,三角瓶装液量 80 mL/500 mL,转速 235 r/min,发酵

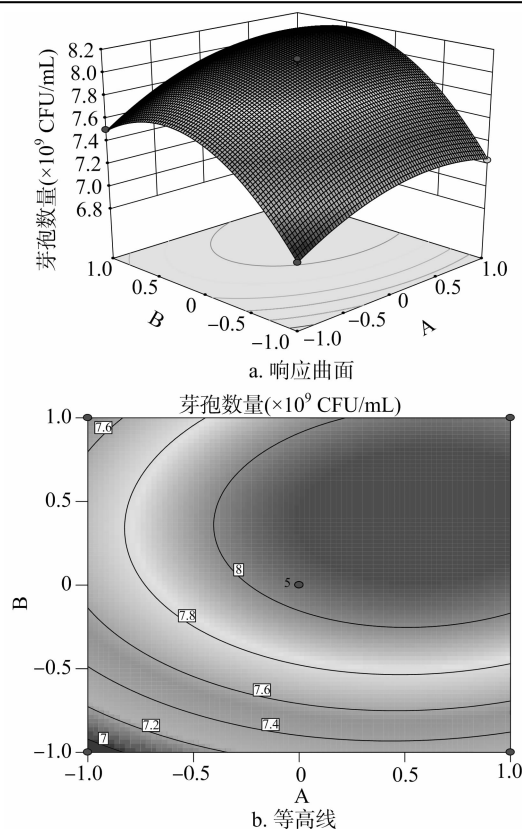
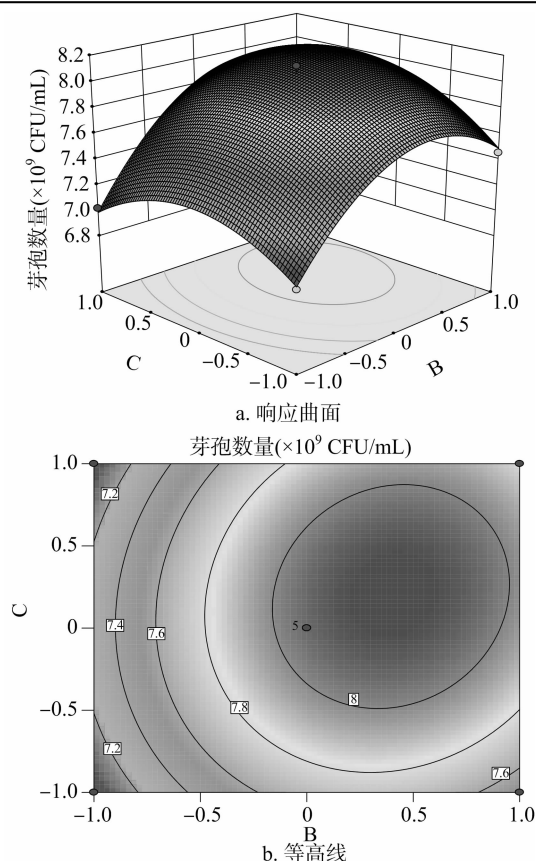
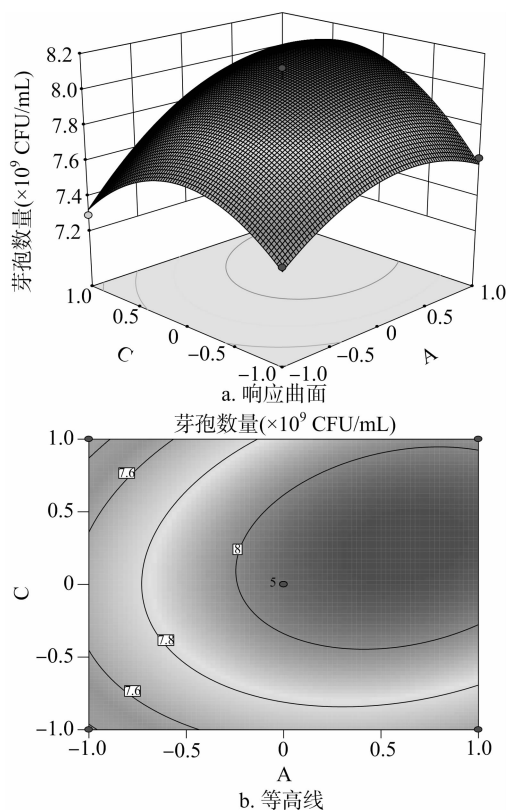
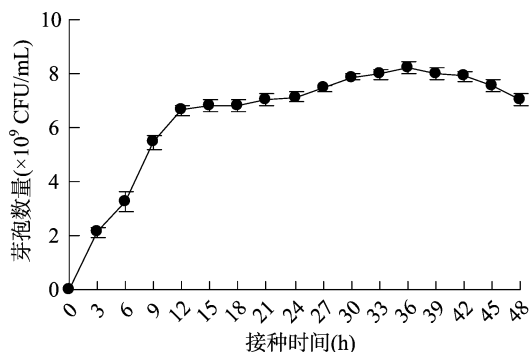
图8  $Z=f(A,B)$ 的响应曲面和等高线图10  $Z=f(B,C)$ 的响应曲面和等高线图9  $Z=f(A,C)$ 的响应曲面和等高线

图11 B1514 发酵过产芽孢曲线

pH 值为 7.5, 转速为 250 r/min<sup>[17]</sup>; 郭夏丽等研究枯草芽孢杆菌产孢条件得出最佳装液量为 250 mL 三角瓶装 50 mL 培养液<sup>[18]</sup>。本研究结果与前人研究结论一致。

本试验对枯草芽孢杆菌 B1514 的发酵研究是在实验室摇瓶发酵条件下进行的, 该研究结果可为工业化生产提供部分参考; 但此发酵工艺在生产中应用时还需要对大型发酵罐生产条件作进一步研究。另外, 在实际生产过程中, 静置、突然降温、添加固体介质等某些条件的刺激也可能会影响芽孢的生成。因此, 今后需要进行此方面研究, 完善试验结果, 以缩短发酵生产周期, 为 B1514 菌株的生产应用奠定基础。

#### 参考文献:

- [1] 张爱红, 路银贵, 邸垫平, 等. 河北省小麦土传病害的发生现状及防治措施[J]. 河北农业科学, 2010, 14(8): 95-98.

(下转第 194 页)

温度为 36.5℃, 培养 36 h; 以此工艺经验证芽孢数量达  $8.19 \times 10^9$  CFU/mL, 达到试验预期效果, 较优化前增加 49%。李忠等表明, 枯草芽孢杆菌生防菌的最优产孢温度为 37℃,

### 3 结论与讨论

内生菌发酵液各萃取相在 50 mg/mL 浓度下对供试的 8 种植物病原菌都有一定的抑制作用,其中石油醚相对辣椒疫霉菌的抑制率最高,为 68.27%;乙酸乙酯相对番茄灰霉菌的抑制率最高,为 98.26%;正丁醇相对番茄灰霉菌的抑制率最高,为 95.65%;水相对马铃薯晚疫病菌的抑制率最高,为 69.52%。乙酸乙酯相的抑制作用最明显,对这 8 种植物病原菌的抑制率都超过 50%,正丁醇相对 5 种植物病原菌的抑制率均超过 50%。

菌丝体各萃取相在 50 mg/mL 浓度下对供试的 8 种植物病原菌的抑制作用都相对弱于发酵液各萃取相。石油醚相对这 8 种植物病原菌抑制率作用均小于 50%;乙酸乙酯相对辣椒疫霉菌的抑制作用最强,抑制率为 96.52%;正丁醇相对马铃薯晚疫病菌的抑制作用最强,抑制率为 79.38%,而对梨黑斑病菌和苹果炭疽菌有微弱的促进生长的作用;水相对马铃薯晚疫病菌有一定的抑制作用,对梨黑斑病菌和苹果炭疽菌有微弱的促进生长的作用。菌丝体各萃取相中乙酸乙酯相的抑制植物病原菌的作用最明显,对其中的 6 种病原菌的抑制率大于 50%,而其他各萃取相的抑菌作用都弱于发酵液各萃取相。

植物体内广泛存在着具有抗菌活性的菌株,它们对病原真菌、细菌等引起的植物病害有着不同程度的防治作用<sup>[7]</sup>,通过不同的生防机制,使植物免受或减轻危害,有的还对植物生长有促进作用。植物内生菌生长在植物组织细胞间隙,其中部分内生菌能够产生与宿主相关的活性成分<sup>[2]</sup>。高雯芳等研究发现四合木提取物对部分病菌的生长表现出较强的抑制作用<sup>[4,8]</sup>。胡佳续等从四合木茎叶石油醚提取物中分离出了抗虫活性成分<sup>[9]</sup>。试验结果表明,四合木内生菌发酵产物对植物病原菌有一定的抑制作用,在发酵液中乙酸乙酯相和

正丁醇相的抑菌效果最佳,菌丝体中乙酸乙酯相抑菌效果最佳,说明抑菌活性代谢产物主要在发酵液中乙酸乙酯相和正丁醇相及菌丝体的乙酸乙酯相中,因此,进一步的研究可以集中在这些部分,从中分离纯化获得单体化合物,研究各个单体化合物的抑菌活性,寻找具有抗植物病原真菌活性的次生代谢产物,可将内生真菌用于生物防治或作为对环境无害农药的一个新来源,同时对四合木这一濒危植物的保护具有重要意义。

### 参考文献:

- [1] Azevedo J L, Maccheroni J W, Pereira J O, et al. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2000, 3(1): 40-65.
  - [2] 孙力军, 陆兆新. 植物内生菌抗菌活性物质研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(2): 78-82.
  - [3] 甄江红, 刘果厚. 珍稀特有植物四合木研究进展[J]. 应用生态学报, 2008, 19(2): 433-440.
  - [4] 高雯芳, 贾长红, 刘 强, 等. 四合木提取物对 14 种植物病原菌生物活性的研究[J]. 天津师范大学学报: 自然科学版, 2007, 27(1): 35-38.
  - [5] Poulev A, O'Neal J M, Logendra S, et al. Elicitation, a new window into plant chemodiversity and phytochemical drug discovery [J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2003, 46(12): 2542-2547.
  - [6] 沈瑞清, 商鸿生, 查仙芳. 链格孢属一新种[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(3): 217-218.
  - [7] 李志英, 田岳娟, 徐惠娟, 等. 小叶锦鸡儿内生拮抗菌株的筛选与分子鉴定[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(6): 105-107.
  - [8] 高雯芳. 中国特有植物四合木杀虫抑菌活性的初步研究[D]. 天津: 天津师范大学, 2007: 29-38.
  - [9] 胡佳续, 刘 强. 四合木茎叶石油醚提取物化学成分分析[J]. 广西植物, 2010, 30(3): 426-428.
- (上接第 187 页)
- [2] 李纪顺, 陈 凯, 李红梅, 等. 通过染色体整合  $\beta$ -1,4-葡聚糖酶基因 *glu14* 提高绿色木霉对小麦纹枯病的防治效果[J]. 植物病理学报, 2013, 43(4): 393-400.
  - [3] 管怀骥, 陈 莉. 哈茨木霉 TH-1 菌株对小麦纹枯病的控制效果研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(16): 9664-9665.
  - [4] 张承胤, 邢彦峰, 代 丽, 等. 适应玉米秸秆还田的小麦根病拮抗细菌的筛选[J]. 中国农学通报, 2009, 25(3): 206-209.
  - [5] Zhen W C, Wang S T, Zhang C Y, et al. Influence of maize straw amendment on soil-borne diseases of winter wheat[J]. Frontiers of Agriculture in China, 2009, 3(1): 7-12.
  - [6] 梁春启. 兼具分解玉米秸秆和防治小麦土传病害作用的微生物土壤添加剂研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2009.
  - [7] 赵 斌, 齐永志, 李海燕, 等. 枯草芽孢杆菌 B1514 菌株发酵条件的优化与片剂制作研究[J]. 河北农业大学学报, 2014, 37(3): 60-65.
  - [8] 李海燕, 苏 媛, 齐永志, 等. 多功能土壤添加剂对小麦土传病害的防效及对玉米秸秆的腐解作用[J]. 河南农业科学, 2015, 44(6): 84-89.
  - [9] 甄文超, 马峙英, 梁春启, 等. 适应小麦玉米秸秆还田的土传病害生防菌剂及其制备方法: 中国, 200810180290.7 [P]. 2011-03-16.
  - [10] 李冠楠, 夏雪娟, 何石宝, 等. 蚕用益生芽孢杆菌 SWL-19 的筛选鉴定及其对肠道菌群多样性的影响[J]. 中国农业科学, 2015, 48(9): 1845-1853.
  - [11] 尹艳宁, 方志翔, 沈文静, 等. 转 *cry1Ac* + *cry2Ab* 基因棉对土壤细菌群落结构和功能多样性的影响[J]. 生态与农村环境学报, 2014, 30(2): 206-213.
  - [12] 罗泰来, 申亮亮, 柏银兰, 等. 分枝杆菌计数方法的比较研究[J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(4): 373-375.
  - [13] 吴有炜. 试验设计与数据处理[M]. 苏州: 苏州大学出版社, 2002: 115-154.
  - [14] 黄 静, 张超腾, 郑 燕. 应用正交测验法优选巨菌草诱导培养基[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(9): 74-76.
  - [15] 徐 君, 刘凤军, 张国芹, 等. 香稻不育系 1SSR 正交体系优化及验证[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(4): 21-24.
  - [16] 赵 强, 余四九, 王廷璞, 等. 响应面法优化秃疮花中生物碱提取工艺及抑菌活性研究[J]. 草业学报, 2012, 21(4): 206-214.
  - [17] 李 忠, 乐峰松, 殷红福, 等. 枯草芽孢杆菌生防菌产孢条件的优化[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(5): 1937-1938.
  - [18] 郭夏丽, 狄源宁, 王 岩. 枯草芽孢杆菌产芽孢条件的优化[J]. 中国土壤与肥料, 2012(3): 99-103.