

丁志雯,胡永红,杨文革.木霉菌发酵培养基响应面优化[J].江苏农业科学,2017,45(23):275-279.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.23.075

木霉菌发酵培养基响应面优化

丁志雯,胡永红,杨文革

(南京工业大学生物与制药工程学院,江苏南京 211816)

摘要:为了优化木霉菌 YHWG5102 发酵培养基,以对水稻纹枯病的抑菌圈直径大小为优化的指标,在单因素试验的基础上进行 Plackett-Burman 试验和中心组合试验设计,采用响应面法建立发酵培养基的优化模型。结果表明,得到最优培养基配方:23.44 g/L 葡萄糖、26.07 g/L 玉米浆、0.81 g/L K_2HPO_4 。经试验验证,在此培养基条件下,木霉菌 YHWG5102 抑菌圈直径达 27.19 mm,比优化前提高约 42%。

关键词:木霉菌;发酵培养基;最优培养基配方;水稻纹枯病;响应面法

中图分类号: S188⁺.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)23-0275-04

2016 年中央一号文件《关于落实发展新理念加快农业现代化 实现全面小康目标的若干意见》提出“加强资源保护和生态修复,推动农业绿色发展。”因此,加强安全高效、靶向性强、环境友好的新型生物农药的研究是现代农业发展的必然趋势。木霉菌是一类普遍存在于土壤中的半知菌类,它作为生防制剂具有安全无毒、不易使病原菌产生抗药性等特点^[1]。近几十年来,国内外对于木霉菌的研究还主要集中在其生防机制方面^[2-3],市场上木霉菌制剂多以其分生孢子、厚垣孢子及菌丝体为制剂,采用活菌制剂具有以下缺点:(1)施用后受环境影响大、效果不稳定;(2)货架期短、运输难;(3)培养条件严格、成本高^[4-6]。所以,本研究从木霉菌培养基优化出发,旨在尽可能提高次级代谢产物中抑菌物质的含量,利于后续的分离纯化,以期得到更稳定、高效的新型木霉菌制剂。

1 材料与方法

1.1 菌种

木霉菌 YHWG5102、水稻纹枯病病菌,均由笔者所在课题组保藏。

1.2 培养基

活化培养基:200 g/L 马铃薯,20 g/L 蔗糖,15~20 g/L 琼脂,pH 值自然。

种子培养基:20 g/L 蔗糖,11.16 g/L 酵母浸粉,0.5 g/L K_2HPO_4 ,1 g/L $MgSO_4$,pH 值 6.5。

发酵培养基:20 g/L 蔗糖,11.16 g/L 酵母浸粉,0.5 g/L K_2HPO_4 ,1 g/L $MgSO_4$,pH 值 6.5。

1.3 主要试剂与仪器

琼脂粉、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、肌醇、蛋白胨、酵母

浸粉、尿素,购自国药集团化学试剂有限公司; $(NH_4)_2SO_4$ 、NaCl、CaCl₂、FeSO₄、MgSO₄、 K_2HPO_4 ,购自广东省汕头市西陇化工厂;工业用玉米浆与马铃薯,市售。

电热恒温培养箱,上海跃进医疗器械厂;灭菌锅,广州市华粤行仪器有限公司;医用净化工作台,苏州净化设备有限公司;鼓风电热恒温干燥箱,上海试验仪器厂有限公司;真空抽滤机,河南省予华仪器有限公司;电子天平,瑞士梅特勒-托利多仪器(中国)有限公司;基础分析型纯水机,青岛富勒姆科技有限公司。

1.4 试验方法

1.4.1 菌种培养 (1)平板活化:从甘油管中将菌种接到活化培养基上,26℃恒温培养,培养6~7d;(2)种子液培养:在500 mL 锥形瓶中装100 mL 种子培养基,从平板上挑取菌落接种于摇瓶中,培养温度26℃,摇床转速120 r/min,培养3d后进行接种发酵;(3)摇瓶发酵培养:在500 mL 锥形瓶中装100 mL 发酵培养基,向培养基中接种2 mL 种子液,培养温度26℃,摇床转速120 r/min。

1.4.2 木霉菌抑菌圈直径的测定 采用牛津杯法进行抑菌试验,将发酵液经抽滤、微滤(0.45 μm)后取滤液,对水稻纹枯病进行抑菌试验,根据抑菌圈直径确定抑菌能力。

1.4.3 单因素试验设计 分别对不同种类的碳源、氮源、无机盐进行优化,配制发酵培养基,26℃发酵培养4.5d,测定每种因素对抑菌圈直径的影响,选择最佳培养基成分。

1.4.4 响应面试验设计 (1)Plackett-Burman (PB) 设计试验:利用 Plackett-Burman 试验从多个单因素中筛选出对抑菌直径影响最显著的几个因素,使用 Design Expert 软件设计试验方案,包括11个变量($n=11$),其中9个为主要变量(葡萄糖含量、麦芽糖含量、蔗糖含量、蛋白胨含量、玉米浆含量、酵母浸粉含量、 K_2HPO_4 含量、 $MgSO_4$ 含量、FeSO₄ 含量),2个为虚拟变量,分别用 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K 代表以上变量,每个变量有高(+)、低(-)2个水平(表1)。

(2)最陡爬坡试验:最陡爬坡试验在 PB 试验中得到影响较为显著的3类因素,并且根据 PB 设计得出的一次项拟合方程中相应变量的系数,从而确定变化梯度、爬坡方向。若变量系数为负,则该变量水平以梯度递减的方向进行爬坡试验。

收稿日期:2016-09-06

基金项目:国家自然科学基金(编号:31471692);高等学校博士学科点专项科研基金(编号:20133221110010)。

作者简介:丁志雯(1992—),女,江苏东台人,硕士研究生,主要从事生物发酵分离技术的研究。E-mail:18260037906@163.com。

通信作者:胡永红,博士,教授,主要从事生物发酵分离、绿色农用生物制品的研究。E-mail:yonghonghu11@126.com。

表 1 Plackett – Burman 试验因素及水平

水平	A:葡萄糖 含量(g/L)	B:麦芽糖 含量(g/L)	C:蔗糖 含量(g/L)	D:蛋白胨 含量(g/L)	E:玉米浆 含量(g/L)	F:酵母浸粉 含量(g/L)	G:K ₂ HPO ₄ 含量(g/L)	H:MgSO ₄ 含量(g/L)	J:FeSO ₄ 含量(g/L)	K,L:虚 拟变量
低水平(-1)	10	15	15	5	15	5	0.4	0.4	0.01	
高水平(+1)	20	25	25	10	25	10	0.6	0.6	0.03	

若变量系数为正,则该变量水平以梯度递增的方向进行爬坡试验,这样就能够经济、快速地逼近最佳区域。将最陡爬坡试验中得到的抑菌圈直径最大点作为中心组合设计的中心点来设计试验方案。

(3)响应面法分析:经过最陡爬坡试验,逼近抑菌圈直径最大化区域,根据 Box – Bellken 原理,对经过 PB 和爬坡试验的变量进行 5 水平试验(-1.68、-1.0、+1、-1.68),共 20 组试验,使用 Design – Expert 软件对试验结果进行分析,研究木霉菌 YHWG5102 次级代谢产物中抑菌物质质量含量最高的发酵培养基配方。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 不同种类的碳源对抑菌圈大小的影响 碳源是构成菌体的基本骨架,是菌体生长的能量来源,通过影响菌体的呼吸、能量供给、生长及相关代谢最终影响抗生素等次级代谢产物的产量^[7]。由图 1 可知,在选择 的 5 种碳源中,葡萄糖、蔗糖和麦芽糖对木霉菌抑菌效果的影响较为明显,其中葡萄糖效果最好。因此,在下个阶段的 PB 设计中,将葡萄糖、蔗糖及麦芽糖作为考察因素。

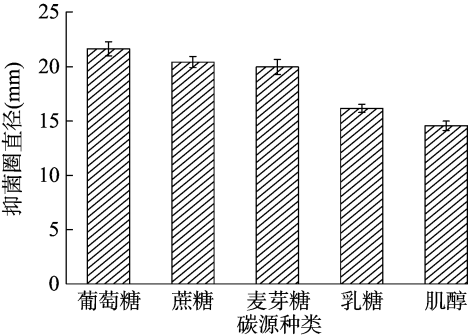


图 1 不同种类碳源对抑菌圈大小的影响

2.1.2 不同种类的氮源对抑菌圈大小的影响 氮源在合成菌体各种初级、次级代谢产物等含氮物质的过程中发挥着重要作用,同时在发酵生产中氮源起着调节菌体的生长及生物量的作用^[8]。以上一步试验得出的最优碳源葡萄糖作为本步试验的初始碳源。由图 2 可知,木霉菌不仅可以利用有机氮源,也可利用无机氮源,玉米浆、蛋白胨和 (NH₄)₂SO₄ 对抑菌圈直径影响较大,其中玉米浆效果最佳。

2.1.3 不同种类的无机盐对抑菌圈大小的影响 无机盐是微生物生命活动中必不可少的一类营养物质,它们在机体中的生理功能主要是作为酶的活性中心的组成部分、维持细胞结构的稳定性等。以上述试验得出的最优碳源葡萄糖及最优氮源玉米浆作为本步试验的初始碳源与氮源。由图 3 可知, K₂HPO₄ 对抑菌圈直径影响最为明显,这可能由于钾是合成次级代谢产物中具有抑菌活性物质的关键元素, MgSO₄、FeSO₄ 的抑菌圈直径次之。

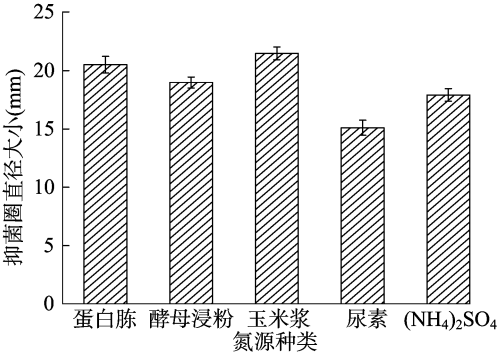


图 2 不同种类氮源对抑菌圈大小的影响

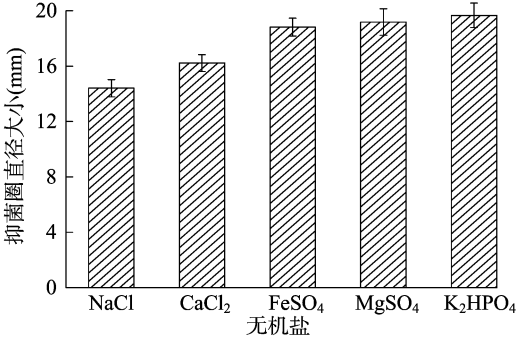


图 3 不同种类无机盐对抑菌圈大小的影响

2.2 响应面设计

2.2.1 Plackett – Burman 设计试验 通过单因素试验表明,在木霉菌抑菌试验中,对其影响较大的 9 个变量为葡萄糖含量、蔗糖含量、麦芽糖含量、玉米浆含量、蛋白胨含量、(NH₄)₂SO₄ 含量、K₂HPO₄ 含量、MgSO₄ 含量和 FeSO₄ 含量,再加上 2 个虚拟变量,每个变量有 高(+)、低(-) 2 个水平,采用 Design – Expert 软件设计试验,共计 12 组试验(表 2)。使用 Design – Expert 对表 2 进行分析,得到 Plackett – Burman 设计方差分析结果。由表 3 可知,上述 9 个因素对抑菌圈大小的影响程度排序为葡萄糖含量 > 蔗糖含量 > 麦芽糖含量 > 玉米浆含量 > K₂HPO₄ 含量 > MgSO₄ 含量 > FeSO₄ 含量 > 蛋白胨含量 > 酵母浸粉含量,其中葡萄糖含量为显著因素。该模型 R² = 0.999 7,表示 99.97% 的试验数据可用该模型来解释;从 9 个因素中选出对抑菌圈直径影响显著(P < 0.05)的 3 类因素(葡萄糖含量、玉米浆含量、K₂HPO₄ 含量)进行下一步优化。

2.2.2 最陡爬坡试验 根据 PB 试验结果,葡萄糖含量、玉米浆含量、K₂HPO₄ 含量的模型方程系数为正值,进行正爬坡。由表 4 可知,第 4 组试验方案对应的抑菌圈直径达到最大值,以此值为中心进行响应面试验,这样响应面方程才能充分逼近真实值。

2.2.3 响应面法分析 经过 Plackett – Burman 试验和爬坡试验,确定葡萄糖含量、玉米浆含量、K₂HPO₄ 含量的水平(表 5),利用 Design – Expert 软件设计响应面试验,结果见表 6。

表2 木霉菌 YHWG5102 发酵培养基 Plackett – Burman 试验设计与结果

编号	变量											抑菌直径 (mm)
	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	
1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	18.45
2	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	21.03
3	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	18.76
4	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	20.37
5	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	14.33
6	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	18.93
7	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	20.57
8	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	20.03
9	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	15.84
10	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	19.92
11	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	24.54
12	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	20.29

表3 木霉菌 YHWG5102 发酵培养基 Plackett – Burman 设计方差分析结果

方差来源	F 值	P 值	影响程度排序
葡萄糖含量	845.97	0.021 9	1
麦芽糖含量	645.02	0.025 1	3
蔗糖含量	826.80	0.022 1	2
蛋白胨含量	76.63	0.072 4	8
玉米浆含量	498.97	0.028 5	4
酵母浸粉含量	2.76	0.344 7	9
K ₂ HPO ₄ 含量	275.09	0.038 3	5
MgSO ₄ 含量	161.54	0.050 0	6
FeSO ₄ 含量	80.98	0.070 5	7

表4 木霉菌 YHWG5102 发酵培养基最陡爬坡试验设计

编号	A:葡萄糖 含量(g/L)	B:玉米浆 含量(g/L)	C:K ₂ HPO ₄ 含量(g/L)	抑菌直径 (mm)
1	15	20	0.5	19.32
2	18	23	0.6	21.18
3	21	26	0.7	23.64
4	24	29	0.8	26.93
5	27	32	0.9	22.03
6	30	35	1.0	19.04
7	33	38	1.1	16.52

表5 木霉菌 YHWG5102 发酵培养基中心组合设计试验因素与水平

编码水平	因素		
	A:葡萄糖 含量(g/L)	B:玉米浆 含量(g/L)	C:K ₂ HPO ₄ 含量(g/L)
-1.68	15.59	20.59	0.46
-1	19.00	24.00	0.60
0	24.00	29.00	0.80
+1	29.00	34.00	1.00
+1.68	32.41	37.41	1.14

根据表6的数据,使用 Design – Expert 软件进行拟合,得到3元2次回归方程: $Y = -7.343\,24 + 0.213\,78A + 0.444\,16B + 10.351\,38C + 2.505\,21 \times 10^{-3}AB - 0.011\,718AC + 0.072\,842BC - 6.238\,10 \times 10^{-3}A^2 - 0.010\,245B^2 - 7.421\,53C^2$ 。式中:Y代表抑菌圈直径,mm;A、B、C 分别代表

葡萄糖、玉米浆、K₂HPO₄ 含量,g/L。根据表6的结果,运用 Design – Expert 软件对其进行方差分析和模型的显著性分析。由表7可知:该模型的 $P < 0.000\,1$,表明该模型极显著。通过 R^2 来判断该模型的拟合度, $R^2 = 0.952\,7$,表明有95.27%的试验数据可用此模型进行解释,进一步说明回归方程的拟合程度较好。

表6 木霉菌 YHWG5102 发酵培养基响应面分析设计及试验结果

编号	A:葡萄糖 含量	B:玉米浆 含量	C:K ₂ HPO ₄ 含量	抑菌圈直径 (mm)
1	0	0	0	27.01
2	0	0	0	27.16
3	-1.68	0	0	23.72
4	0	0	+1.68	19.29
5	1	1	-1	16.40
6	1	-1	-1	19.36
7	-1	1	-1	17.02
8	0	0	0	26.95
9	-1	-1	-1	24.06
10	0	0	0	27.05
11	0	-1.68	0	21.62
12	0	0	0	26.92
13	-1	1	1	20.97
14	-1	-1	1	23.90
15	1	1	1	18.30
16	0	0	-1.68	18.94
17	0	+1.68	0	19.03
18	1	-1	1	20.39
19	+1.68	0	0	22.17
20	0	0	0	26.99

2.3 响应面优化结果的分析

由二元回归方程所得到的响应面与相应的等高线见图4至图6。各因素交互作用对响应值抑菌圈直径(R_1 ,单位mm)的影响都可以由图4至图6直观地反映出来。

为求出培养基最佳配方,对回归方程各个变量求一阶偏导数,解得: $A = 23.44$ 、 $B = 26.07$ 、 $C = 0.81$,此时木霉菌 YHWG5102 对水稻纹枯病的抑菌圈直径达到最大值27.233 7 mm。同时进行试验验证,在模拟得到的最适发酵培养基条件下,重复进行3次试验,抑菌圈直径实测平均值为27.19 mm,与预测值基本符合,说明响应面法对木霉菌发酵培养基优化具有较强可靠性。因此,得到最佳培养基配方:23.44 g/L 葡萄糖、26.07 g/L 玉米浆、0.81 g/L K₂HPO₄。

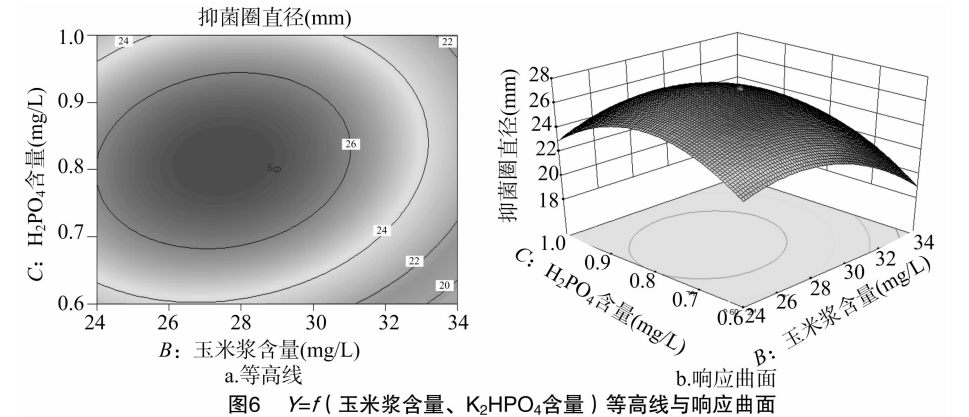
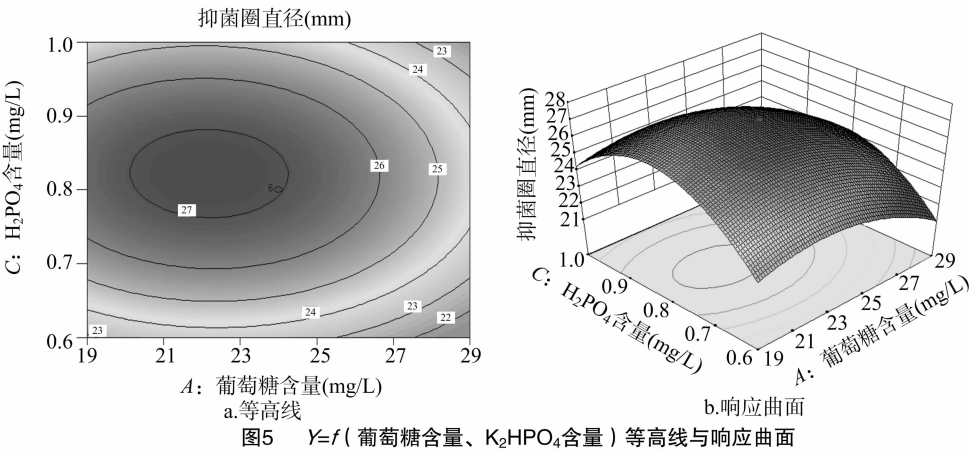
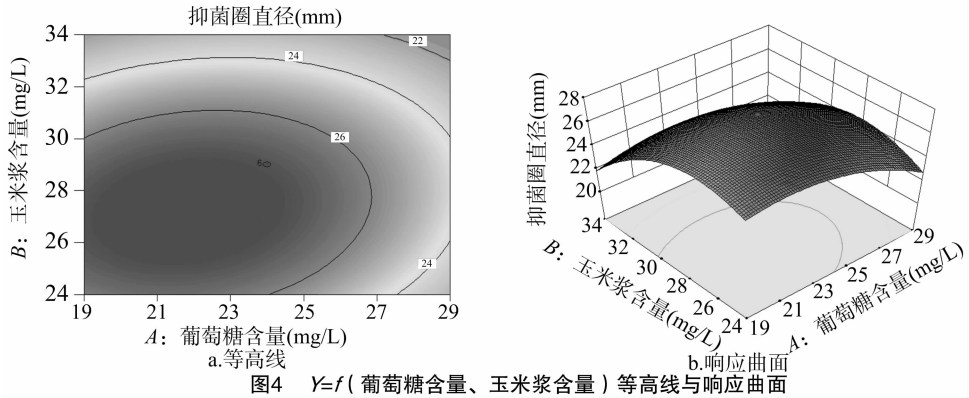
3 结论与展望

在单因素试验的基础上,经 Plackett – Burman 试验确定了葡萄糖、玉米浆和 K₂HPO₄ 为主要影响因素,在此基础上,进行最陡爬坡试验,确定最佳响应面区域,然后采用中心组合试验设计和 Design Expert 软件分析计算,得到这3种因素的最佳添加量:23.44 g/L 葡萄糖、26.07 g/L 玉米浆、0.81 g/L K₂HPO₄。在此发酵培养基下重复进行3次验证试验,结果表明,木霉菌 YHWG5102 对水稻纹枯病的抑菌圈直径实测平均值为27.19 mm,与未优化的培养基初始抑菌圈直径(约为19.1 mm)相比增加约42%。

然而此研究仅限于摇瓶发酵,很多因素(如溶氧、通气量

表 7 回归方程方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
模型	2.85	9	0.32	22.39	<0.000 1
<i>A</i> : 葡萄糖含量	0.17	1	0.17	12.09	0.006 0
<i>B</i> : 玉米浆含量	0.34	1	0.34	24.17	0.000 6
<i>C</i> : K_2HPO_4 含量	0.052	1	0.052	3.70	0.083 3
<i>AB</i>	0.031	1	0.031	2.22	0.167 1
<i>AC</i>	1.099×10^{-3}	1	1.099×10^{-3}	0.078	0.768 1
<i>BC</i>	0.042	1	0.042	3.00	0.113 8
A^2	0.35	1	0.35	24.78	0.000 6
B^2	0.94	1	0.94	66.84	<0.000 1
C^2	1.31	1	1.31	92.96	<0.000 1
残差	0.14	10	0.014		
失拟项	0.14	5	0.028	422.19	<0.000 1
误差	3.340×10^{-4}	5	6.681×10^{-5}		
合计	2.99	19			



于莉,李贝,崔海宁,等. 区域关键性生态用地空间划定研究——以河北省青龙满族自治县为例[J]. 江苏农业科学,2017,45(23):279-283.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.23.076

区域关键性生态用地空间划定研究 ——以河北省青龙满族自治县为例

于莉¹,李贝¹,崔海宁²,周智¹,张蓬涛¹

(1. 河北农业大学国土资源学院,河北保定 071001; 2. 河北瑞嘉土地规划咨询有限公司,河北廊坊 065000)

摘要:由人类高强度的建设活动对生态系统的结构、功能所造成的改变大多是不可逆转的。因此,在经济飞速发展和人地矛盾日益突出的压力下,应注重识别和保护具有重要生态服务功能的土地单元及空间,从而维护区域的生态安全。以河北省青龙满族自治县为例,借助 ArcGIS 软件,采用净初级生产力(net primary productivity,简称 NPP)定量指标评价方法,从土壤保持、水源涵养、生物多样性保护等 3 大方面,评价研究区 2013 年土地利用现状的生态系统服务功能重要性,并在此基础上,划定其关键性生态用地空间。结果表明,研究区关键性生态用地面积为 113 481.96 hm²,占全区总面积的 33.18%,主要分布在县域东部的凤凰山乡、祖山林场、祖山镇以及县域西北部的都山林场,它们是高强度的人类建设活动不应逾越的底线。该研究有利于区域基本生态屏障的建立,从而为建立生态保护关键区提供依据。

关键词:生态用地;生态系统;服务功能;空间结构;青龙满族自治县

中图分类号: F323.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)23-0279-05

长期以来,我国的土地利用偏重于社会经济目的导向下的生产、生活价值,而忽视土地的生态价值,城镇扩张将许多具有重要生态功能的土地转化为建设用地;为满足耕地占补平衡的要求,大量的生态用地面临农业开发的威胁^[1-4],生态用地的过度开发导致生态调节能力下降、生态退化等严重后果。关键性生态用地是指具有重要的生态系统服务功能,对维护关键性生态过程具有重要意义的土地单元及空间^[5],它

是维护区域生态安全最高效的、不可替代的空间,是区域可持续发展的基本生态保障。由人类高强度的建设活动对生态系统的结构、功能所造成的改变大多是不可逆转的^[6-8],因此,在经济飞速发展和人地矛盾日益突出的背景下,划分维护区域生态安全的关键性生态用地空间,并对其进行有效保护具有深远的现实意义。

关于关键性生态用地空间的划定,很多学者提出了各自的方案。周锐等通过构建最小累积阻力模型,识别了平顶山新区的生态用地格局^[5];俞孔坚等通过对地质灾害、水文、文化遗产等进行模拟,判別了北京市关键性生态用地空间^[9];张林波等将景观生态模型应用到生态系统服务功能价值评估中,划定了深圳市最小生态用地空间^[10]。目前,对于维护区域生态安全的关键性生态用地空间的研究处于初级阶段,而

收稿日期:2016-07-20

基金项目:河北省社会科学基金 2016 年度项目(编号:HB16GL048)。

作者简介:于莉(1989—),女,河北承德人,硕士研究生,研究方向为土地经济与评价。E-mail:xiangxuehai6623@163.com。

通信作者:张蓬涛,博士,教授,研究方向为土地经济与评价。E-mail:zhangpt@hebau.edu.cn。

等)难以有效控制,下一步可以上罐分批发酵,进一步优化木霉菌的培养条件,尽可能提高木霉菌次级代谢产物中具有抑菌作用的物质含量,然后通过硫酸铵分级沉淀、凝胶过滤层析以及十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)初步确定具有抑菌作用的物质^[9-10],以期得到更稳定、高效的新型木霉菌制剂。

参考文献:

- [1]彭可为,李婵. 木霉菌的生物防治研究进展[J]. 安徽农业科学,2010,38(2):780-782.
- [2]Harman G E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. [J]. Phytopathology,2006,96(2):190-194.
- [3]陈捷,朱洁伟,张婷,等. 木霉菌生防作用机理与应用研究进展[J]. 中国生物防治学报,2011,27(2):145-151.
- [4]潘玮,穆常青,蒋细良,等. 木霉菌厚垣孢子与分生孢子研究进

展及其商品化制剂[M]//成卓敏. 农业生物灾害预防与控制研究. 北京:中国农业科技出版社,2005:652-655.

- [5]杨春平,张晋康,陈华保,等. 绿色木霉 L24 菌株分生孢子可湿性粉剂的研制[J]. 西北农业学报,2010,19(9):43-47.
- [6]杨谦. 木霉菌和毛壳菌生物防治分子生物学[M]. 北京:科学出版社,2014.
- [7]王芊. 不同条件对木霉菌菌丝体生长的影响[J]. 中国农学通报,2002,18(5):57-59.
- [8]Voelker F,Altam S. Nitrogen source governs the patterns of growth and pristnamycin production in '*Streptomyces pristinaespiralis*' [J]. Microbiology,2001,147(9):2447-2459.
- [9]张量,张敬泽. 渐绿木霉抑菌物质的分离纯化及其对植物病原菌的抑制作用[J]. 中国农业科学,2015,48(5):882-888.
- [10]宋晓妍,张玉忠,王元秀. 木霉 peptaibols 抗菌肽的研究进展[J]. 微生物学报,2011,51(4):438-444.