收稿日期:1003-8701(2015)02-0071-07

抗灰霉病解淀粉芽孢杆菌的发酵条件优化

王晓辉,王贵鹏,张庆芳,窦少华,迟乃玉*

(大连大学辽宁省海洋微生物工程技术研究中心,辽宁 大连 116622)

摘　要:【目的】研究灰霉病拮抗菌K1的发酵条件。【方法】以OD_{600}值为指标采用响应面法对其发酵培养基、发酵条件进行优化。通过Plackett-Burman实验确定酵母膏、pH、接种量为其最显著的3个因素。经过Box-Behnken实验和响应面实验得到最优发酵条件。【结果】最优发酵培养基为:淀粉1%,酵母膏1.8%,硫酸钾1.5%。最优发酵条件:pH6.8,接种量为2.8%,温度25℃,转速130 r/min,装液量100 mL/250 mL。【结论】K1发酵16 h后的OD_{600}值可达到1.490,远高于优化前0.864,明显提高了K1的生长速率。优化后发酵液抑菌直径为49 mm,高于优化前的43 mm。

关键词:响应面;拮抗菌;灰霉菌;抑菌直径

中图分类号:Q936　　**文献标识码**:A

DOI:10.16423/j.cnki.1003-8701.2015.02.020

Optimization of Fermentation Conditions of an Anti-Botrytis cinerea *Bacillus amyloliquefaciens*

WANG Xiao-hui, WANG Gui-peng, ZHANG Qing-fang, DOU Shao-hua, CHI Nai-yu*

(*Liaoning Center of Marine Microbial Engineering and Technology, Dalian University, Dalian* 116622, China)

Abstract: [Objective] Research on the fermentation conditions to K1, the antagonistic bacteria inhibiting *Botrytis cinerea*. [Methods] Fermentation medium and fermentation conditions were optimized in OD_{600} index using response surface methodology. By the Plackett-Burman experiment the most significant three factors were yeast extract, pH, inoculum. After Box-Behnken experiment and response surface methodology, the optimum fermentation was determined. [Results] The optimum fermentation medium was 1% starch, 1.8% yeast extract, 1.5% K_2SO_4. The optimal fermentation conditions were as follow: pH 6.8, inoculation amount 2.8%, temperature 25 ℃, rotation speed 130 r/min, liquid volume of 100 mL/250 mL. [Conclusion] The OD_{600} of K1 was 1.490 after 16 h fermentation. It was much higher than 0.864, the OD_{600} before optimization. The grow rate of K1 was increased significantly. Inhibition zone diameter was 49 mm. It was higher than 43mm, the inhibition zone diameter before optimization.

Keywords: Response surface methodology; Antagonistic bacteria; *Botrytis cinerea*; Antibacterial diameter

番茄灰霉病(*Botrytis cinerea*)是由真菌灰葡萄孢菌侵染所致,该霉菌菌丝粗大,孢子密集,农作物染病后,病部呈现灰褐色[1]。灰霉病是一种世界性的农业病害,每年造成严重的经济损失。目前,抗灰霉病药物主要是化学农药,带来环境污染的同时,随灰霉病菌抗药性的增加,抑菌效果逐年下降[2]。生物农药具有高效、低毒的特性,且因生物农药往往是多种抑菌物质同时作用,抑菌效果好,致病菌不产生抗药性,因此引起了广泛的关注。目前关于灰霉病拮抗菌的研究主要有田间防治[3-4],发酵条件优化[5-6],拮抗菌株的定殖[7-8],拮抗菌代谢产物分析[9]等。因灰霉菌菌丝可在2℃的低温环境生长[10],且致病机理十分复杂,病原菌可产生降解酶、真菌毒素等[11]。破坏植物的超微结构,并发生病理变化。而生防菌株可产生多种抑菌代谢产物抑制菌丝生长和孢子萌发[12],同时空间上发挥营养上的竞争作用[13],从而达到良好的抑菌效果。目前研究较多的木霉菌(*Trichoderma spp.*)是一种有效的拮抗真菌[14-15],对多种植物病原真菌都有防治作用。而研究较多的生防细菌主要有芽孢杆菌(*Bacillus spp.*)、土壤放射杆菌

收稿日期:2014-10-22

基金项目:863计划子课题(2007AAOL1306)

作者简介:王晓辉(1981-),女,讲师,博士,研究方向:海洋低温酶制剂。

通讯作者:迟乃玉,男,教授,E-amil: Cny7566@126.com

(*Agrobacterium radiobacter*)、假单胞杆菌(*Pseudomonas spp.*)等[16]。其中与枯草芽孢杆菌亲缘较近的解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefacien*)得到广泛的重视。

实验室筛选得到的抗灰霉病解淀粉芽孢杆菌K1有较好的抑菌效果。利用Plackett-Burman (PB)法对菌株K1的发酵条件进行优化。将所选出的因素以响应面法建立数学模型,能有效地优化响应因子,提高发酵效率,为后续生产提供重要的实验依据,也为该菌株的进一步应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株及培养基

菌株:拮抗菌K1(*Bacillus amyloliquefacien*),灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)。

斜面保藏培养基:20 g马铃薯;2 g葡萄糖;100 mL水;pH自然。种子培养基:0.3 g牛肉膏;1 g蛋白胨;0.5 gNaCl;pH 7.0;100 mL蒸馏水。初始发酵培养基:1 g葡萄糖;1 g蛋白胨;1 g NaCl;pH 7.0;100 mL蒸馏水。

1.2 菌株的分子生物学鉴定

采用酚氯仿抽提法提取拮抗菌K1的DNA。以16 SrDNA引物进行PCR扩增。Forward primer P_1(5′-CAGAGTTTGATCCTGGT-3′);Reverse primer P_2(5′- AGGAGGTGATCCAGCCGCA- 3′)进行PCR扩增[16]。扩增反应体系Ex *Taq*(5U/μL) 0.25μL,Buffer5.0μL,dNTP mixture 5.0μL,Forward primer 0.5μL,Reverse primer 0.5μL,补加ddH_2O到50 μL。扩增程序为:94 ℃预变性5 min;94℃变性1 min,55 ℃复性1 min,72 ℃延伸1.5 min,30个循环;72℃延伸5 min。PCR产物测序,NCBI进行BLAST比对,并以MEGA5软件进行系统发育树的构建。

1.3 单因素法优化

将斜面保藏的菌株K1活化后,接种于种子培养基中。以1%(V/V)的接种量将对数期的种子培养基接种于100 mL的初始发酵培养基中,于30℃,130 r/min下摇床培养16 h。从中取3 mL测OD_{600}。以相同的未接种的发酵培养基调零。

通过单因素法分别确定最适碳源及碳源浓度,最适氮源及氮源浓度,最适无机盐及无机盐浓度。进而初步确定发酵培养基。

将菌株K1接种于初步确定的发酵培养基上,以单因素法优化温度、pH、转速、装液量、接种量。初步确定发酵条件。根据单因素实验结果选6个因素进行PB实验。

1.4 发酵条件的实验设计

1.4.1 发酵条件Plackett-Burman(PB)设计

以表1设计Plackett-Burman(PB)实验,以发酵液的OD_{600}值作为指标,通过Minitab软件设计6因素两水平的N=12次的Plackett-Burman实验设计。并根据显著性分析结果,设计最陡爬坡实验。

1.4.2 中心组合实验设计

根据Box-Behnken中心组合设计原理和PB结果、最陡爬坡试验的结果确定3个重要因素,完成三因素,三水平的N=15的响应面实验设计。

表1 Plackett-Burman(PB)实验设计的因素和水平

	A	B	C	D	E	F
因素	淀粉(%)	酵母膏(%)	硫酸钾(%)	温度(℃)	pH	接种量(%)
-1	1.0	1.0	1.0	25	5	1
+1	1.5	1.5	1.5	30	6	2

1.5 抑菌实验

用优化前后的发酵培养基做抑菌实验。用打孔器在PDA培养基中心打洞,将孢子悬液均匀涂布到培养基上,并将0.1 mL待测发酵液滴加到洞内,27℃培养96 h,测其抑菌直径。抑菌直径=(最大直径+最小直径)/2。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定

实验室于土壤中筛选一株灰霉病拮抗菌K1,对灰霉病有较强的抑菌效果。抑菌直径在40mm以上。经16S rDNA鉴定拮抗菌K1为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefacien*)。将其命名为*Bacillus* K1。

2.2 单因素实验结果

通过单因素实验,得出最优发酵培养基为:淀粉1%、酵母膏1%、硫酸钾1.5%。最优发酵条件:pH 6.0、接种量为2%、温度25℃、转速130 r/min,装液量100 mL/250 mL。

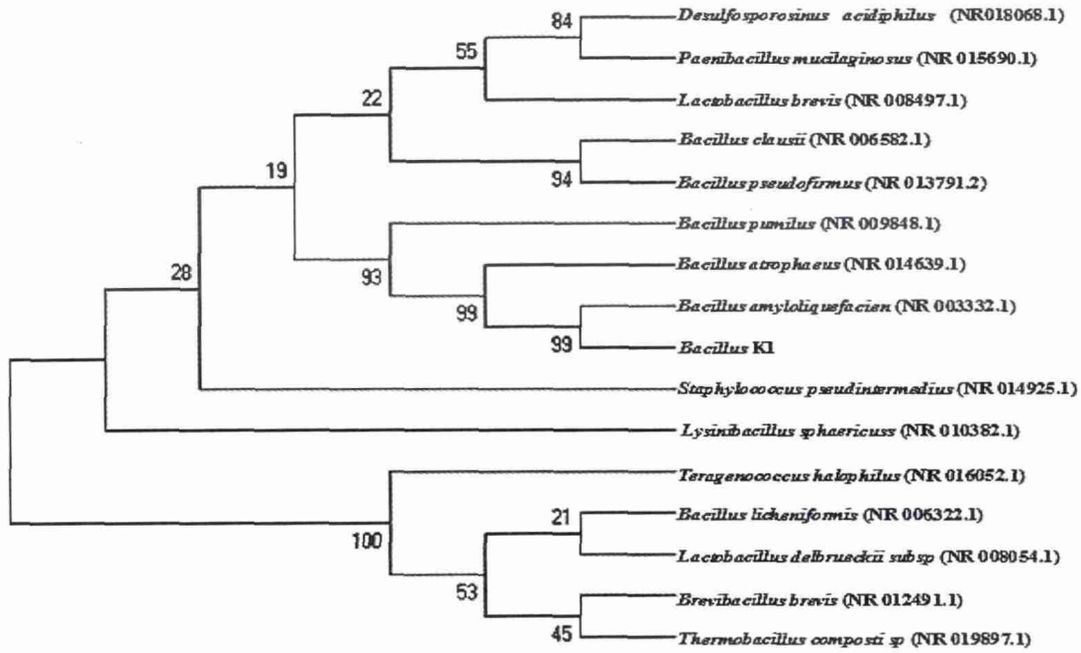

图1　菌株K1的16Sr DNA进化树

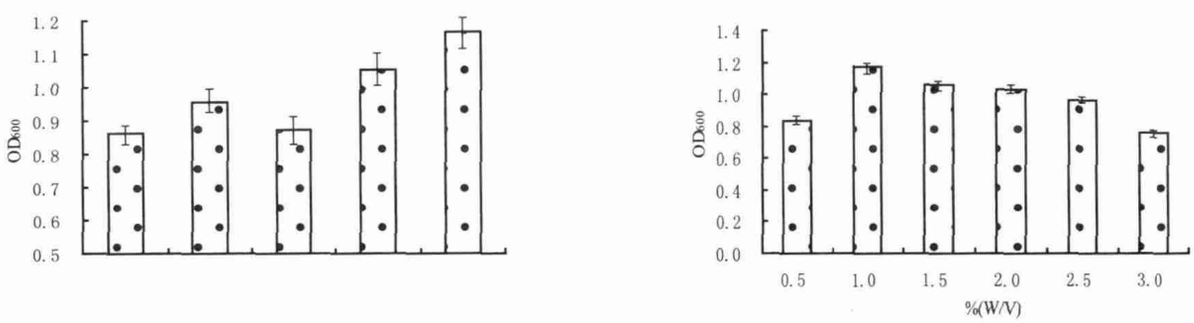

图2　拮抗菌K1的最适碳源

图3　拮抗菌K1的最适氮源

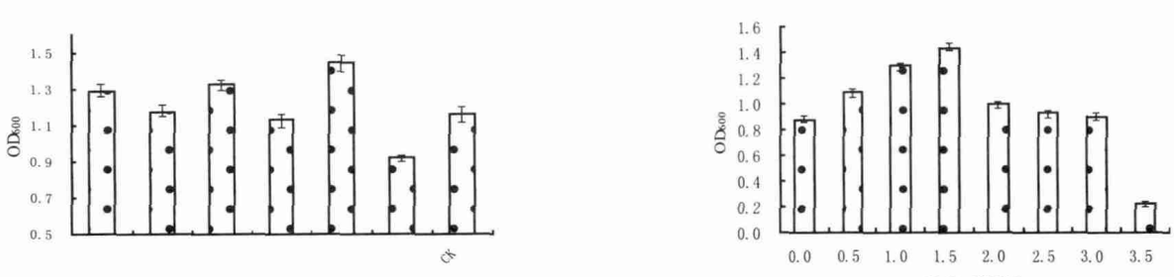

图4　拮抗菌K1的最适无机盐

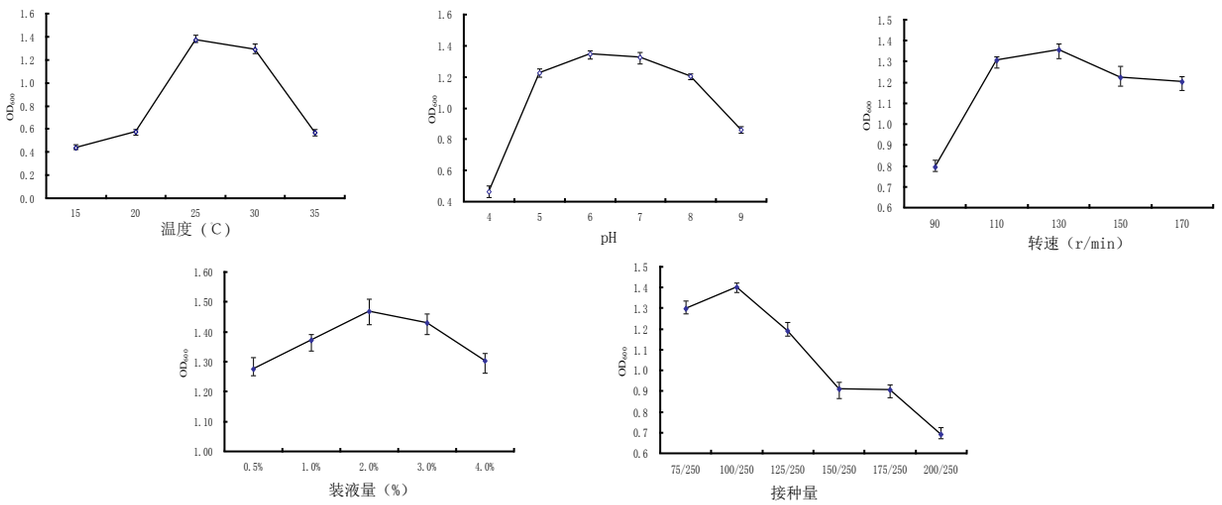

图5 拮抗菌K1的最适发酵条件

2.3 PB实验设计筛选显著性影响因素

在单因素实验基础上选择对发酵结果影响明显的6个因素，进行N=12次的Plackett-Burman实验设计。PB实验设计如表2，筛选出3个影响较

表2 Plackett-Burman(PB)实验设计与响应值表

代码	A	B	C	D	E	F	OD_{600}
1	+1	−1	−1	−1	+1	+1	1.391±0.029
2	−1	+1	+1	+1	−1	+1	1.402±0.032
3	+1	−1	+1	+1	−1	+1	1.381±0.023
4	+1	+1	+1	−1	+1	+1	1.451±0.017
5	−1	+1	+1	−1	+1	−1	1.423±0.022
6	−1	+1	−1	−1	−1	+1	1.427±0.028
7	+1	+1	−1	+1	+1	−1	1.437±0.017
8	−1	−1	−1	+1	+1	+1	1.415±0.034
9	−1	−1	+1	+1	+1	−1	1.359±0.058
10	+1	+1	−1	+1	−1	−1	1.374±0.026
11	−1	−1	−1	−1	−1	−1	1.307±0.019
12	+1	−1	+1	−1	−1	−1	1.336±0.021

注：表中的数据为平均值±标准差

表3 Plackett-Burman实验设计的各因素水平及显著性分析

代码	因素	−1	+1	t值	Prob>t	显著性
A	淀粉(m/V)	1.0%	1.5%	0.60	0.576	4
B	酵母膏浓度(m/V)	1.0%	1.5%	5.25	0.003	1
C	K_2SO_4(m/V)	1.0%	1.5%	0.02	0.988	6
D	温度	25℃	30℃	0.53	0.617	5
E	pH	5	6	4.02	0.010	2
F	接种量(V/V)	1%	2%	3.73	0.014	3

大的因素。Minitab显著性分析结果如表3。

2.4　最陡爬坡实验

根据Plackett-Burman实验得出:酵母膏、pH、接种量为影响发酵的最显著的3个因素,根据Minitab设计最陡爬坡实验如表4。寻找最大响应值及最佳因子组。酵母膏浓度为1.7%(m/V),pH为6.5,接种量为2.5%(V/V)时为最佳因子组,以最佳因子组作BB实验的中心点。

表4　最陡爬坡实验设计及实验结果

代码	酵母膏	pH	接种量	OD_{600}
1	1.5	6.0	2.0%	1.280±0.040
2	1.7	6.5	2.5%	1.342±0.024
3	1.9	7.0	3.0%	1.151±0.012
4	2.1	7.5	3.5%	0.895±0.026

2.5　响应面实验设计

2.5.1　BB(Box-Behnken)中心组合实验设计

以最陡爬坡实验的结果为中心点,由Plackett-Burman实验确定的3个显著性因素进行Box-Behnken实验的中心组合设计。每个因素设置3个水平,即N=15组实验。如表5,表6。每组实验进行3次重复,结果取3次实验的平均值。

表5　因素水平设计代码表

因素	-1	0	+1
X_1 酵母膏浓度(m/V)	1.5%	1.7%	1.9 %
X_2 pH	6.0	6.5	7.0
X_3 接种量(V/V)	2.0%	2.5%	3.0%

2.5.2　二次回归拟合与方差分析

根据Minitab软件对试验结果分析得二次回归方程:

$$Y=1.4803+0.0096X_1+0.0169X_2+0.0135X_3-0.0160X_1^2-0.0235X_2^2-0.0098X_3^2+0.0168X_1X_2+0.0000X_1X_3+0.0010X_2X_3$$

回归方程中,响应值Y为拮抗菌发酵液的OD_{600}值;变量X_1为酵母膏,X_2为pH,X_3为接种量。对方程进行方差分析(表7)。

表6　Box-Behnken实验设计与结果

编号	X_1	X_2	X_3	OD_{600}
1	-	0	-	1.432±0.027
2	-	-	0	1.425±0.030
3	+	0	-	1.452±0.038
4	-	+	0	1.438±0.021
5	0	0	0	1.480±0.019
6	0	+	-	1.442±0.018
7	0	+	+	1.473±0.018
8	0	-	+	1.450±0.022
9	+	-	0	1.410±0.026
10	-	0	+	1.457±0.028
11	+	0	+	1.477±0.017
12	0	0	0	1.483±0.031
13	0	-	-	1.423±0.025
14	0	0	0	1.478±0.021
15	+	+	0	1.490±0.038

注:表中数据为 平均值±标准差

根据响应面方差分析结果,模型失拟项

表7　回归方程的方差分析

方差来源	自由度	调节平方和	调节均方	F 值	P 值
回归	9	0.008 583	0.000 954	13.75	0.005
线性	3	0.004 477	0.001 492	21.51	0.003
方差	3	0.002 980	0.000 993	14.31	0.007
交互作用	3	0.001 126	0.000 375	5.41	0.050
剩余误差	5	0.000 347	0.000 069		
模型失拟	3	0.000 334	0.000 111	17.59	0.054
模型失拟	2	0.000 013	0.000 006		
总计	14	0.008 930			

(Lack of Fit):0.054,模型失拟项不显著,说明模型选择比较合适。回归系数R^2=96.12%>90%,说明模型相关度很好。

2.5.3 响应面分析

根据响应面分析数据,绘出响应面及其等高线图,反映出酵母膏、pH、接种量之间的交互影响。图6,图7,图8分别显示了以OD_{600}值为响应值的趋势图,等高线图可直观反应两变量间的交互影响。响应面分析最高的OD_{600}值为1.493。而优化前,K1在初始发酵培养基中发酵16 h后,所得发酵液的OD_{600}值仅为0.864。优化后菌株生长速率远高于优化前。

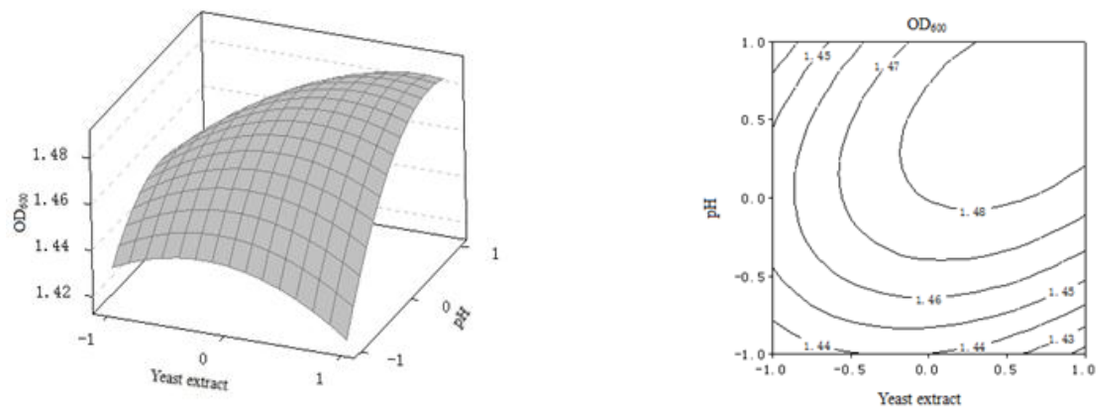

图6 酵母膏(X_1)与pH(X_2)交互影响的曲面图和等值线图

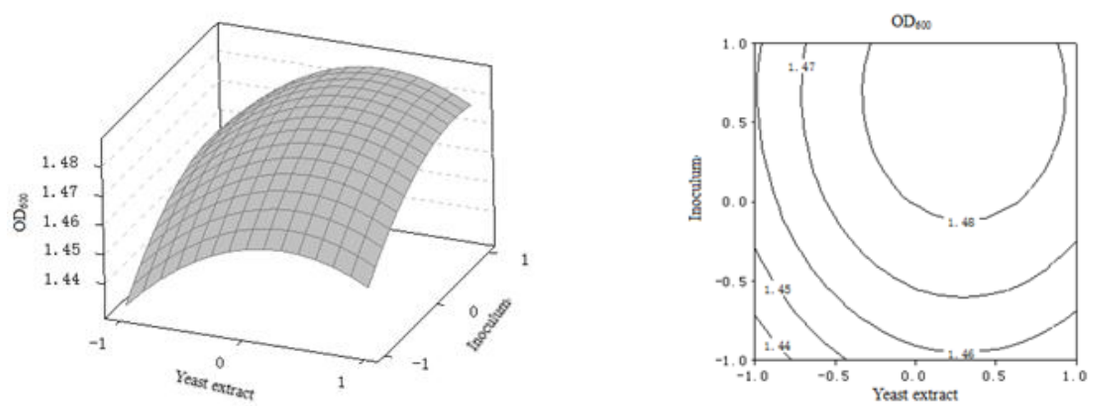

图7 酵母膏(X_1)与接种量(X_3)交互影响的曲面图和等值线图

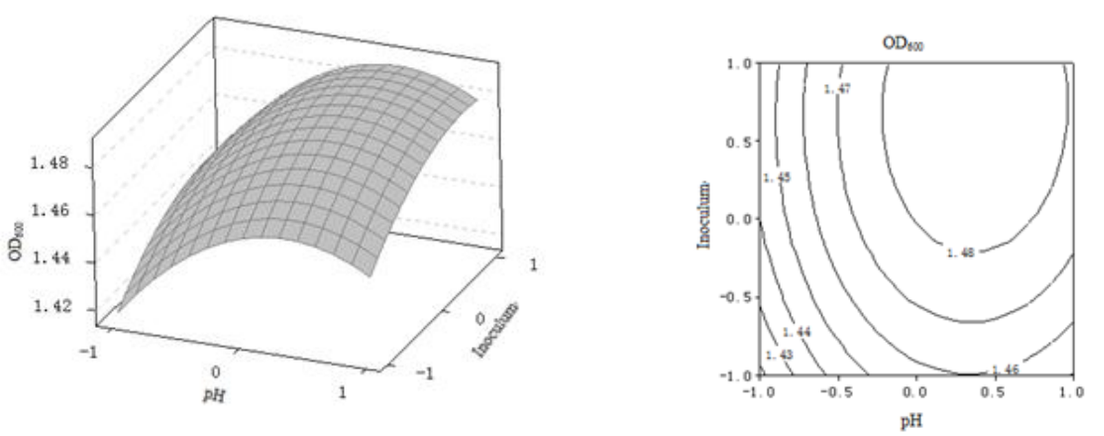

图8 pH(X_2)与接种量(X_3)交互影响的曲面图和等值线图

2.6 优化前后抑菌效果

优化后的抑菌效果如图9B,抑菌直径达到49 mm,远高于优化前的43 mm(图9A)。

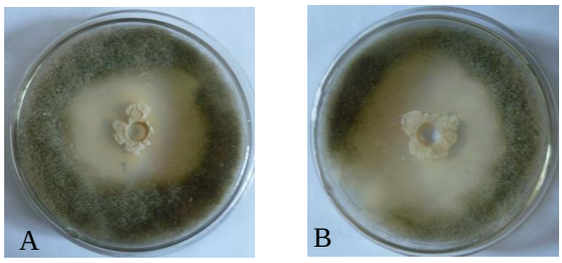

图9　优化前后抑菌效果

注:A:优化前抑菌效果;B优化后抑菌效果

3　结论与讨论

番茄灰霉菌菌丝粗大,孢子在较低温度下便可以萌发,使农作物染病,造成严重的经济损失。实验室于土壤中筛选出一株抗灰霉病拮抗菌,16S rDNA鉴定为解淀粉芽孢杆菌。解淀粉芽孢杆菌K1具有很强的抑菌效果。对灰霉病的抑菌直径40 mm以上。在以往的报道中,拮抗菌发酵条件的研究往往以抑菌圈直径作为指标。但在实验前期工作发现,条件优化各实验组之间抑菌直径相差不明显,故采用OD_{600}值为指标。

本实验利用 Box-Behnken 模型对解淀粉芽孢杆菌发酵条件进行优化,方差分析表明模型拟合度良好。得出最优发酵培养基为淀粉1%,酵母膏1.8%,硫酸钾1.5%。最优发酵条件pH6.8,接种量为2.8%,温度25℃,转速130 r/min,装液量100 mL/250 mL。通过响应面法对发酵条件进行优化,即提高菌株K1生长速率,又增强了抑菌效果,并建立解淀粉芽孢杆菌发酵条件的数学模型,对拮抗菌的防病研究有重要意义。为进一步扩大生产提供实验依据。

与枯草芽孢杆菌亲缘性较近的解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)抑菌广谱性强,对炭疽病(*Anthracnose*)[17]、灰霉病(*Botrytis cinerea*)[18]、青霉病(*Penicillium italicum*)[19]、梨轮纹病(*Physalospora piricola*)[20]等都有抑制作用,早已得到广泛的重视。2010年邓建良分离得到的解淀粉芽孢杆菌YN-1对灰霉病等多种真菌病害都有抑制效果[21]。全鑫等研究拮抗菌YB-81对灰霉病菌抑制率达80.5%,且具有良好的广谱性[22]。2009年,Sharma R等研究的解淀粉芽孢杆菌对蔬菜和水果有良好的抑菌效果,已经进行了半商业化的实验,有的拮抗菌已经制成商品投放市场[23]。

参考文献:

[1] 韩斯琴,徐　梅,白　震,等. 抗番茄灰霉病菌农用抗生素D2-4发酵条件的研究[J]. 沈阳农业大学学报,2003,34(4):259-262.

[2] 周明国. 中国植物病害化学防治研究(第1卷)[M]. 北京:中国农业科技出版社,1998:21-27.

[3] 韦发才,田在山,杨再豪,等. 葡萄灰霉病防治药剂试验[J]. 农药科学与管理,2005,26(10):23-24.

[4] 沈建生,滕元文,王华新,等. 施佳乐、扑海因、速克灵单用及混用防治葡萄灰霉病田间药效试验[J]. 中国南方果树,2005,34(6):66-67.

[5] 黄明媛,顾文杰,张发宝,等. 番茄青枯病筛选鉴定及其发酵条件初探[J]. 微生物通报,2011,38(2):214-220.

[6] 孙长江,张建新,汪　璇,等. 响应面法优化黄粉虫抗菌肽酶解工艺[J]. 食品科学,2013,34(7):234-239.

[7] 谷祖敏,王　芳. 拮抗细菌B9对灰霉病菌的影响及在番茄叶表的定殖[J]. 云南农业大学学报,2006,21(6):842-844.

[8] 郭继平,马　光. 内生拮抗菌株AC8在甘蓝体内的定殖及其促生效果[J]. 湖北农业科学,2012,51(10):2020-2022.

[9] Lu XY, Li SZ, Ma P, et al. Isolation and partial purification of an extracellular metabolite from a *Bacillus subtilis* strain NCD-2 active against *Verticillium dahlia*[J]. Shandong Science, 2005, 18(3): 22-25.

[10] 李风云,李宝聚,许淑艳. 番茄灰霉病病原菌的生物学特性[J]. 辽宁农业科学,1992(4):34-36.

[11] 郑晓莲,薛金阜,齐秋锁. 灰葡萄孢毒素的组分分析和生物测定[J]. 植物病理学报,1998,28(3):269-274.

[12] 钱兰娟,李　倩,张清霞,等. 生防细菌L5生防相关因子的初步分析及其种类鉴定[J]. 植物病理学报,2011,41(3):295-300.

[13] 童蕴慧,纪兆林,徐敬友,等. 灰葡萄孢拮抗细菌在番茄植物体表的定殖[J]. 中国生物防治,2003,19(2):78-81.

[14] 咸洪泉,李雅华,郭立忠,等. 木霉菌Td31菌株产生的拮抗物质性质研究[J]. 青岛农业大学学报,2008,25(4):294-297.

[15] 赵亚玲,惠有为,赵　健,等. 低温木霉对灰霉的拮抗作用[J]. 应用化工,2010,39(9):1303-1308.

[16] 程　亮,游春平,肖爱萍. 拮抗细菌的研究进展[J]. 江西农业大学学报,2003,25(5):732-737.

[17] 罗　萍,区建发,杨炜钊,等. 香蕉炭疽菌拮抗生防菌株的筛选及鉴定[J]. 现代食品科技,2011,27(3):275-278.

[18] 王奕文,胡文兵. 许玲甜瓜果实表面生防芽孢杆菌的类群与鉴别[J]. 植物病理学报,2008,38(3):317-324.

[19] Sun L J, Lu Z X, Bie X M, et al. Isolation and characterization of a co-producer of fengycins and surfactins, endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2 from Scutellaria baicalensis Georgi [J]. World Journal of Microbiology Biotechnology, 2006(12): 1259-1266.

[20] 罗　萍. 梨储藏期病害生防菌及防腐保鲜的研究[D]. 成都:四川农业大学,2009.

[21] 邓建良,刘红彦,刘玉霞,等. 解淀粉芽孢杆菌YN-1抑制植物病原真菌活性物质鉴定[J]. 植物病理学报,2010,40(2):202-209.

[22] 全　鑫,薛保国,杨丽荣,等. 生防菌株YB-81的鉴定及其对番茄灰霉病的防效[J]. 植物保护,2010,36(5):57-60.

[23] Sharma R R, Singh D, Singh R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review[J]. Bilogical Control. 2009, 50(3): 205-221.