

王法国,张荣胜,刘永锋,等. 生防菌解淀粉芽胞杆菌 JT84 发酵工艺优化[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(1): 73-80.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.01.012

生防菌解淀粉芽胞杆菌 JT84 发酵工艺优化

王法国^{1,2}, 张荣胜¹, 刘永锋¹, 陆凡³

(1.江苏省农业科学院植物保护研究所,江苏 南京 210014; 2.南京农业大学植物保护学院,江苏 南京 210095; 3.江苏省苏科农化有限公司,江苏 南京 210014)

摘要: 为探明解淀粉芽胞杆菌菌株 JT84 的使用前景,对其发酵工艺进行了研究。通过单因素试验和 Plackett-Burman 试验设计及 Box-Behnken 试验设计的响应曲面法,对 JT84 菌株的发酵培养基和培养条件进行了优化。确定培养基 3 个主要因子的质量浓度分别为:葡萄糖 3.59 g/L、大豆蛋白胨 21.89 g/L 和 K_2HPO_4 0.49 g/L; 培养条件 3 个主要因子为:培养温度、装液量和发酵时间,根据响应曲面方程预测结果并结合生产实际,这 3 个主要培养条件因子分别设定为 30.6 °C、68 ml (250 ml 三角瓶) 和 65.5 h。在初始 pH 为 6.7、转速 180 r/min、接种量 3% 的条件下,发酵液芽胞含量为 1.67×10^9 CFU/ml,较基础培养基(YPG)芽胞含量提高 159%,无菌滤液对稻瘟病菌的抑菌带宽增加 18.2%。

关键词: 解淀粉芽胞杆菌; Plackett-Burman 试验设计; 响应曲面法

中图分类号: S482.2⁺92 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2017)01-0073-08

Optimization of fermentation process of biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* JT84

WANG Fa-guo^{1,2}, ZHANG Rong-sheng¹, LIU Yong-feng¹, LU Fan³

(1. Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 3. Suke Agro-chemical Limited Liability Company, Nanjing 210014, China)

Abstract: The single factor test, Plackett-Burman experiments and Box-Behnken response surface methodology were adopted to optimize the liquid fermentation medium and conditions of *Bacillus amyloliquefaciens* JT84 for application. According to the evaluation by the response surface model established in this study, the optimum mass concentrations of the three components, glucose, soya peptone and K_2HPO_4 , in fermentation medium were 3.59 g/L, 21.89 g/L and 0.49 g/L respectively. The fermentation condition determination tests indicated that temperature, filling volume and shaking time were the major factors affecting JT84 yield. The optimized fermentation conditions were 30.7 °C, the filling volume 68 ml in 250 ml, shaking flask for 65.5 h, at 180 r/min, and initial pH 6.7 and inoculum volume 3%. Under the conditions spore production was up to 1.67×10^9 CFU/ml, spore increased by 159% and the width of antifungal activity increased by 18.2% compared with the basal medium (YPG).

Key words: *Bacillus amyloliquefaciens*; Plackett-Burman experiments; response surface methodology

收稿日期: 2016-09-07

基金项目: 江苏省科技支撑项目(BE2014386); 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(13)3024]

作者简介: 王法国(1990-), 男, 山东邹城人, 硕士研究生, 研究方向为生物防治。(E-mail) 2015802155@njau.edu.cn

通讯作者: 陆凡, (E-mail) 13705181875@163.com

稻瘟病是由 *Magnaporthe* 引起的一种世界性分布水稻病害^[1-3]。目前, 生产中主要依赖三唑类杀菌剂防治水稻稻瘟病, 然而化学污染导致的环境问题和食品安全问题引起人们的担忧, 选择高效的绿色防控药剂变得尤为重要^[4]。芽胞作为芽胞杆菌抵抗逆境的休眠体, 能够经受住高盐、高渗等试剂的处

理。芽胞杆菌可以产生多种次生代谢物,其中脂肽类物质具有较强的抗真菌、细菌、卵菌和病毒活性,在医药、农药上具有广泛的应用价值,因此芽胞杆菌作为生防菌被广泛地用于防治多种植物病害^[5-8]。乔俊卿等^[9]使用枯草芽胞杆菌 B1619 对番茄青枯病进行防治,防效达 55.6%。张荣胜等^[10]报道解淀粉芽胞杆菌 Lx-11 能够有效防治水稻细菌性条斑病,防效为 60.2%~75.8%。

明亮等^[11]对生防菌剂解淀粉芽胞杆菌 B1619 水分散粒剂配方及助剂进行筛选,所得产品活芽胞含量为 $1\text{ g } 1.2 \times 10^8$ 个。周莹等^[12]研发的芽胞杆菌海藻菌剂有效活菌数为 2.32×10^9 CFU/g,对丹参根腐病的防效为 37.6%。张岭^[13]报道的解淀粉芽胞杆菌 B7900 可湿性粉剂活芽胞含量为 $1\text{ g } 1.0 \times 10^9$ 个。现有的微生物杀菌剂产品存在活菌含量低、效价不高的产业化技术瓶颈。江苏省农业科学院植物保护研究所稻病与生防研究室分离得到多株芽胞杆菌,并研发了芽胞杆菌 T429 干悬浮剂^[14-15]。前期试验结果表明,解淀粉芽胞杆菌 JT84 对水稻纹枯病菌、稻瘟病菌的抑菌带宽分别为 6.50 mm、10.33 mm。JT84 菌株完全具有加工成生物农药的价值。芽胞杆菌干悬浮剂中芽胞和脂肽类物质含量,对防治植物病害起着重要作用。本研究以芽胞和脂肽类物质含量为指标,通过单一因子筛选、Plackett-Burman 试验设计及 Box-Behnken 设计的响应曲面法对解淀粉芽胞杆菌 JT84 的发酵培养基和培养条件进行优化,为解淀粉芽胞杆菌 JT84 干悬浮剂的产业化生产提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与培养基

生防菌株:解淀粉芽胞杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) JT84 由江苏省农业科学院植物保护研究所稻病与生防研究室保存。

病原菌菌株:水稻稻瘟病菌 (*Magnaporthe grisea*) 由江苏省农业科学院植物保护研究所稻病与生防实验室提供。

种子液培养基 (YPG):葡萄糖 5 g,胰蛋白胨 5 g,酵母膏 5 g,定容至 1 000 ml,调节 pH=7,固体培养基 (YPGA)在上述成分的基础上加入 15 g 琼脂粉。

PSA 培养基:马铃薯 200 g,蔗糖 20 g,琼脂粉 15 g,定容至 1 000 ml,pH=7。

1.2 种子液制备

从保存菌株 JT84 的试管中挑取一环菌体,于 YPGA 斜面上划线,28 ℃ 培养箱中培养 24 h。挑取菌落于 YPG (250 ml 三角瓶装 YPG 培养液 70 ml) 中,30 ℃、180 r/min 培养 12 h。

1.3 基础培养基筛选

选择常用培养基 NA、LB、YPG、Landy 对解淀粉芽胞杆菌 JT84 进行摇瓶发酵培养,30 ℃、180 r/min、培养 60 h,以芽胞数和抑菌活性为指标,筛选基础发酵培养基。在基础发酵培养基的基础上,通过单因素试验改变碳源、氮源、无机盐种类,以芽胞含量和抑菌物质含量为指标,进一步优化培养基。碳源:蔗糖、果糖、葡萄糖、乳糖、甘露醇、山梨醇、可溶性淀粉各 5 g。有机氮源:牛肉浸膏、胰蛋白胨、大豆蛋白、蛋白胨、酵母膏、酵母浸粉各 10 g。无机氮源: KNO_3 、 NH_4NO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 各 1 g。无机盐: KH_2PO_4 、NaCl、 NaH_2PO_4 、 K_2HPO_4 、 Na_2SO_4 、 Na_2HPO_4 、苯甲酸钠、 MgSO_4 、柠檬酸钠各 1 g。微量元素: FeSO_4 、 MnCl_2 、 CaCO_3 各 0.01 g。将配制的培养基 pH 调至 7.0,60 h 后采用稀释平板法涂板,计算芽胞数。以基础发酵培养基 (YPG) 为对照。

1.4 发酵培养基组分关键因子筛选

对方法 1.3 中筛选出的基础发酵培养基成分,通过 Plackett-Burman (PB) 试验进行下一步优化。选择 10 个因素:葡萄糖 (5~10 g/L) (X_1)、可溶性淀粉 (5~10 g/L) (X_2)、大豆蛋白胨 (5~10 g/L) (X_3)、酵母粉 (5~10 g/L) (X_4)、柠檬酸钠 (0.02~1.00 g/L) (X_5)、NaCl (0.02~1.00 g/L) (X_6)、 K_2HPO_4 (0.02~1.00 g/L) (X_7)、 MnCl_2 (0.01~0.02 g/L) (X_8)、 FeSO_4 (0.01~0.02 g/L) (X_9)、 CaCO_3 (0.01~0.02 g/L) (X_{10}),从中筛选关键因子。试验中每个因素取 2 水平,即高水平“1”(范围区间最大值)和低水平“-1”(范围区间最小值)。设计 1 个冗余变量: X_{11} 。每组试验 3 次重复,结果取平均值。

1.5 发酵条件关键因子筛选

采用 Plackett-Burman 试验设计。从温度 (28~36 ℃) (A)、装液量 (250 ml 三角瓶装液 40~100 ml) (B)、发酵时间 (54~72 h) (C)、pH 值 (6.5~7.5) (D)、接种量 (1%~5%) (E)、接种菌龄 (14~20 h) (F)、转速 (150~200 r/min) (G) 等 7 个因素中筛选对菌株 JT84 生长具有显著影响的因子。每个因素取 2 水平,即高水平“1”和低水平“-1”。设计 4 个

冗余变量:H、I、J、K。每组试验3次重复,结果取平均值。

1.6 最陡爬坡试验设计

以 Plackett-Burman 试验设计得到的一次拟合方程设计最陡爬坡试验,根据方程中各变量的系数确定关键因子的爬坡方向和步长。根据效应系数的正负确定其他因子以及关键因子的最优范围。

1.7 Box-Behnken 响应曲面法试验设计

采用3因子2水平的 Box-Behnken 响应曲面法,对 PB 试验设计筛选出的关键因子进行进一步优化,中心点重复3次。非关键因子根据其效应取1或-1水平值,按试验所得数据进行二次多项回归拟合,预测发酵芽胞数和抑菌活性最大值所对应的关键因子范围。

1.8 发酵液芽胞含量和无菌滤液抑菌活性的测定

发酵液芽胞含量检测:取1 ml 发酵液放在80 °C 金属浴上15 min,待冷却后采用稀释涂板法,将发酵液稀释至 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^9$ CFU/ml,取0.33 ml 均匀涂布到 YPGA 平板上,28 °C 培养24 h,统计每皿菌落数。

无菌滤液的制备:取各处理发酵液1 ml,12 000 r/min 离心5 min,使用0.22 μm 细菌过滤器过滤,滤液放于4 °C 冰箱备用。

抑菌活性的测定:将稻瘟病菌菌饼放在 PSA 培养基上活化,26 °C 培养3 d,使用直径为7 mm 的打孔器打一个菌饼,放在 PSA 平板中央培养3 d,然后

在每个带菌平板上放置3个直径6 mm 的无菌滤纸片,在滤纸片上滴入10 μl 无菌滤液,吹干,放于26 °C 恒温箱中培养72 h,测量抑菌带宽。

1.9 数据统计分析

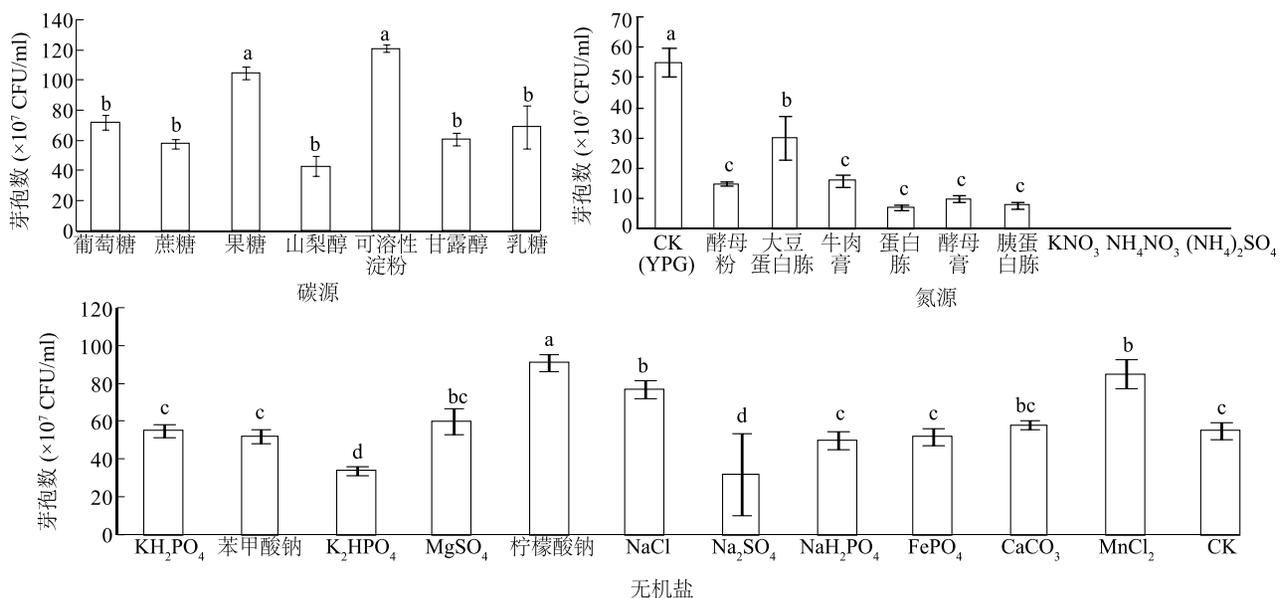
PB 试验设计和 Box-Behnken 响应曲面法试验设计采用 Design-Expert 8.0.6 软件设计。试验数据使用 SPSS.22 软件 Duncan's 新复极差法进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 解淀粉芽胞杆菌 JT84 培养基基因素筛选

常用培养基 LB 处理的发酵液芽胞含量为 8×10^8 CFU/ml,其无菌滤液对稻瘟病菌的抑菌带宽为5 mm;NB、Landy 培养基处理的芽胞含量分别为 4×10^8 CFU/ml 和 3×10^8 CFU/ml。最终选择芽胞数为 6×10^8 CFU/ml、抑菌带宽为8 mm 的 YPG 培养基作为基础培养基进行下一步优化。

单因素试验结果(图1)表明,选择可溶性淀粉、果糖和葡萄糖作为碳源,都有利于芽胞形成,考虑到干悬浮剂加工成本,选择葡萄糖、可溶性淀粉作为碳源,选择大豆蛋白胨、酵母粉作为氮源;柠檬酸钠、NaCl、 K_2HPO_4 作为大量元素。前期研究结果表明,培养基中添加 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 有利于芽胞稳定形成,同时解淀粉芽胞杆菌 JT84 具有嗜铁特性,结合单因素试验结果选择 MnCl_2 、 FeSO_4 、 CaCO_3 做为微量元素进一步优化。



不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

图1 培养基中不同碳源、氮源、无机盐对解淀粉芽胞杆菌 JT84 芽胞含量的影响

Fig.1 Effects of different carbon sources, nitrogen sources, inorganic salts in medium on content of spores of *Bacillus amyloliquefaciens* JT84

2.2 菌株 JT84 培养基成分中显著影响因子

部分因子试验结果见表1。对表1数据进行回归分析,得到回归方程: $Y_1 = 8.30 - 0.15X_1 + 0.26X_3 + 9.34 \times 10^{-3}X_4 - 0.51X_5 + 0.28X_6 - 0.39X_7 - 0.21X_8 + 0.08X_9 - 0.10X_{10}$, $R_1^2 = 0.9988$, 校正 $R_1^2 = 0.9933$, 式中 Y_1 为芽胞数的预测值; $Y_2 = 3.23 + 0.06X_1 - 0.07X_2 + 0.12X_3 + 0.07X_4 - 0.04X_5 - 0.13X_7 - 6.33 \times 10^{-3}X_8 + 0.07X_{11}$, $R_2^2 = 0.9975$, 校正 $R_2^2 = 0.9175$, Y_2 为抑菌带宽的预测值。由校正系数可知, Y_1 的变化中 99.33% 能被回归方程解释, Y_2 的变化中 91.75% 能

被回归方程解释, 方差分析结果表明两回归方程均显著 ($P_1 = 0.0055$, $P_2 = 0.0213$)。10 个因素中在 0.05 水平上对芽胞含量影响显著的因子有葡萄糖、大豆蛋白胨、 $(NH_4)_2SO_4$ 、柠檬酸钠、NaCl、 K_2HPO_4 、 $MnCl_2$ 、 $CaCO_3$, 对抑菌活性影响显著的因子有可溶性淀粉、大豆蛋白胨、酵母粉、 K_2HPO_4 。综合考虑, 选择葡萄糖作为碳源, 大豆蛋白胨作为氮源, K_2HPO_4 作为无机盐, 同时选择影响显著的柠檬酸钠和 $MnCl_2$ (根据其效应选择低水平), 进行进一步优化。

表1 部分因子 Plackett-Burman 试验设计及试验结果

Table 1 Experimental design of Plackett-Burman and corresponding results

| 处理 | 葡萄糖 (X_1) (g/L) | 可溶性 淀粉(X_2) (g/L) | 大豆蛋白 胨(X_3) (g/L) | 酵母粉 (X_4) (g/L) | 柠檬酸钠 (X_5) (g/L) | NaCl (X_6) (g/L) | K_2HPO_4 (X_7) (g/L) | $MnCl_2$ (X_8) (g/L) | $FeSO_4$ (X_9) (g/L) | $CaCO_3$ (X_{10}) (g/L) | 冗余变量 X_{11} 水平 | 芽胞数 (CFU/ml) | 抑菌 带宽 (mm) |
|----|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|---------------------|--------------------|------------------|
| 1 | 10 | 5 | 5 | 5 | 1.0 | 0.2 | 1.0 | 0.02 | 0.01 | 0.02 | 1 | 2.00×10^6 | 7.2 |
| 2 | 5 | 5 | 10 | 5 | 1.0 | 1.0 | 0.2 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | -1 | 4.70×10^8 | 8.8 |
| 3 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | -1 | 1.14×10^9 | 8.0 |
| 4 | 5 | 10 | 5 | 10 | 1.0 | 0.2 | 1.0 | 0.02 | 0.02 | 0.01 | -1 | 1.00×10^7 | 6.4 |
| 5 | 10 | 10 | 10 | 5 | 0.2 | 0.2 | 1.0 | 0.01 | 0.02 | 0.02 | -1 | 2.80×10^8 | 7.6 |
| 6 | 10 | 5 | 10 | 10 | 1.0 | 0.2 | 0.2 | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 1 | 2.50×10^8 | 11.2 |
| 7 | 10 | 10 | 5 | 10 | 1.0 | 1.0 | 0.2 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | -1 | 1.30×10^8 | 8.0 |
| 8 | 5 | 10 | 10 | 5 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 1 | 1.90×10^8 | 7.6 |
| 9 | 5 | 5 | 5 | 10 | 0.2 | 1.0 | 1.0 | 0.01 | 0.02 | 0.02 | 1 | 5.70×10^8 | 8.0 |
| 10 | 10 | 10 | 5 | 5 | 0.2 | 1.0 | 0.2 | 0.02 | 0.02 | 0.01 | 1 | 1.00×10^9 | 8.8 |
| 11 | 5 | 10 | 10 | 10 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.02 | 0.01 | 0.02 | 1 | 8.30×10^8 | 9.6 |
| 12 | 10 | 5 | 10 | 10 | 0.2 | 1.0 | 1.0 | 0.02 | 0.01 | 0.01 | -1 | 4.80×10^8 | 9.2 |

2.3 菌株 JT84 培养基成分最陡爬坡试验结果

对通过 Plackett-Burman 试验所选择的 3 个主要影响因子进行爬坡试验, 结果 (表 2) 表明, 产芽胞量在处理 2 和处理 4 之间 (最优培养基组合) 出现一个最大值。

表2 最陡爬坡试验设计及结果

Table 2 Experimental design of steepest ascent and corresponding results

| 处理 | 葡萄糖 (g/L) | 大豆蛋白胨 (g/L) | K_2HPO_4 (g/L) | 芽胞数 (CFU/ml) |
|----|--------------|----------------|---------------------|--------------------|
| 1 | 8.5 | 11 | 1.00 | 6.30×10^8 |
| 2 | 6.0 | 15 | 0.75 | 8.20×10^8 |
| 3 | 3.5 | 19 | 0.50 | 1.08×10^9 |
| 4 | 1.0 | 23 | 0.25 | 9.40×10^8 |

2.4 菌株 JT84 培养基成分响应面分析

通过 Box-Behnken 响应曲面法分析芽胞含量的测定结果 (表 3)。采用 Design-Expert 软件对优化试验数据进行二次多项回归拟合, 获得芽胞含量对葡萄糖、大豆蛋白胨和 K_2HPO_4 含量的二次多项式回归方程: $Y_1 = 9.030 - 0.032X_1 + 0.050X_2 + 5.531 \times 10^{-3}X_3 + 0.014X_1X_2 - 1.200 \times 10^{-3}X_1X_3 - 9.976 \times 10^{-4}X_2X_3 - 0.063X_1^2 - 0.035X_2^2 - 0.050X_3^2$, 式中 Y_1 为芽胞含量预测值, $R_1^2 = 0.9813$, 校正 $R_1^2 = 0.9393$, 由校正系数可知 Y_1 的变化中 93.93% 能被回归方程解释; $Y_2 = 1.070 - 0.012X_1 + 0.068X_2 - 0.015X_3 + 0.020X_1X_2 - 0.015X_1X_3 + 0.014X_2X_3 - 0.044X_1^2 - 0.047X_2^2 - 0.075X_3^2$, 式中 Y_2 为抑菌带宽预测值, $R_2^2 = 0.9867$, 校正 $R_2^2 = 0.9568$, 由校正系数可知 Y_2 的变化

中 95.68% 能被回归方程解释。方差分析结果表明两回归方程都是显著的 ($P_1=0.0041$, $P_2=0.0021$)。对回归模型进行响应曲面分析得到极点值,当葡萄糖、大豆蛋白胨、 K_2HPO_4 含量分别为 3.59 g/L、21.89 g/L 和 0.49 g/L 时响应值最大。培养基成分最优配比为:葡萄糖 3.59 g/L、大豆蛋白胨 21.89 g/L、 K_2HPO_4 0.49 g/L、柠檬酸钠 0.20 g/L、 $MnCl_2$ 0.01 g/L, pH 7.0。以此为基础进行后续的发酵培养条件优化试验。

2.5 菌株 JT84 培养条件中显著影响因子

Plackett-Burman 设计的部分因子试验结果见表 4。对表 4 数据进行回归分析,得到主要因子的回归方程为 $Y = 27\,049.77 + 2\,871.30A - 6\,773.76B + 4\,258.04C - 304.85D - 670.78E + 133.81F - 245.54G$, Y 为芽胞含量预测值,校正 $R^2 = 0.9022$,回归方程显著 ($P=0.0398$)。7 个因素中在 0.05 水平上显著的因子有温度、发酵时间和通气量,其显著水平分别为 0.0357、0.0300、0.0063,说明这 3 个因子的变化显著影响芽胞含量。

表 4 部分因子 Plackett-Burman 试验设计及试验结果

Table 4 Experimental design of Plackett-Burman and corresponding results

| 处理 | 温度(A) (°C) | pH 值 (B) | 接种量 (C) (%) | 装液量 (D) (ml) | 接种菌龄 (E) (h) | 发酵时间 (F) (h) | 转速(G) (r/min) | 冗余变量水平 | | | | 芽胞数 (CFU/ml) | 抑菌带宽 (mm) |
|----|---------------|-------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|--------|----|----|----|--------------------|--------------|
| | | | | | | | | H | I | J | K | | |
| 1 | 35 | 8.0 | 1 | 100 | 20 | 72 | 150 | -1 | -1 | 1 | -1 | 7.30×10^8 | 10.0 |
| 2 | 28 | 8.0 | 3 | 40 | 20 | 72 | 200 | -1 | -1 | -1 | 1 | 1.05×10^9 | 10.5 |
| 3 | 35 | 6.5 | 1 | 40 | 20 | 54 | 200 | 1 | -1 | 1 | 1 | 8.80×10^8 | 5.0 |
| 4 | 35 | 8.0 | 1 | 40 | 14 | 72 | 150 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1.66×10^9 | 9.5 |
| 5 | 28 | 6.5 | 1 | 100 | 14 | 72 | 200 | -1 | 1 | 1 | 1 | 2.00×10^8 | 12.0 |
| 6 | 35 | 6.5 | 3 | 100 | 20 | 54 | 150 | -1 | 1 | -1 | 1 | 3.70×10^8 | 7.3 |
| 7 | 28 | 6.5 | 3 | 40 | 20 | 72 | 150 | 1 | 1 | 1 | -1 | 1.22×10^9 | 11.0 |
| 8 | 35 | 6.5 | 3 | 100 | 14 | 72 | 200 | 1 | -1 | -1 | -1 | 1.09×10^9 | 10.0 |
| 9 | 28 | 8.0 | 3 | 100 | 14 | 54 | 150 | 1 | -1 | 1 | 1 | 1.00×10^8 | 10.5 |
| 10 | 35 | 8.0 | 3 | 40 | 14 | 54 | 200 | -1 | 1 | 1 | -1 | 9.70×10^8 | 6.3 |
| 11 | 28 | 8.0 | 1 | 100 | 20 | 54 | 200 | 1 | 1 | -1 | -1 | 1.60×10^8 | 10.5 |
| 12 | 28 | 6.5 | 1 | 40 | 14 | 54 | 150 | -1 | -1 | -1 | -1 | 8.10×10^8 | 9.0 |

2.6 菌株 JT84 培养条件中主要影响因子最陡爬坡试验结果

对通过 Plackett-Burman 试验所选择的 3 个主要影响因子进行爬坡试验,结果(表 5)表明产芽胞量的最优发酵条件在处理 1 和处理 3 之间。

2.7 菌株 JT84 培养条件的响应曲面分析

通过 Box-Behnken 设计法对芽胞含量进行响应面分析(表 6)。通过 Design-Expert 软件对优化试验

表 3 Box-Behnken 试验设计及试验结果

Table 3 Experimental design of Box-Behnken and corresponding results

| 处理 | 葡萄糖 含量(X_1) 水平 | 大豆蛋白 胨含量 (X_2)水平 | K_2HPO_4 含量(X_3) 水平 | 芽胞数 (CFU/ml) | 抑菌带宽 (mm) |
|----|--------------------------|----------------------------|---------------------------------|--------------------|--------------|
| 1 | 0 | 0 | 0 | 1.10×10^9 | 9.6 |
| 2 | 0 | 1 | 1 | 1.00×10^9 | 8.4 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 1.05×10^9 | 9.2 |
| 4 | -1 | 0 | -1 | 9.00×10^8 | 7.2 |
| 5 | -1 | 0 | 1 | 9.10×10^8 | 7.2 |
| 6 | -1 | 1 | 0 | 1.00×10^8 | 8.8 |
| 7 | -1 | -1 | 0 | 8.30×10^8 | 7.2 |
| 8 | 0 | 1 | -1 | 9.00×10^8 | 8.4 |
| 9 | 1 | 0 | 1 | 7.60×10^8 | 6.6 |
| 10 | 0 | -1 | 1 | 8.20×10^8 | 5.6 |
| 11 | 1 | 0 | -1 | 7.60×10^8 | 7.6 |
| 12 | 1 | 1 | 0 | 9.50×10^8 | 8.8 |
| 13 | 0 | -1 | -1 | 6.40×10^8 | 7.3 |
| 14 | 1 | -1 | 0 | 6.90×10^8 | 6.5 |

数据进行二次多项回归拟合,得到发酵条件模型回归方程为: $Y = 38\,835.10 + 121.05A - 346.84B + 161.55C - 125.82AB - 439.86AC + 2\,761.58BC - 584.39A^2 - 13\,56.37B^2 - 1\,838.17C^2$, $R^2 = 91.29\%$ 。经回归方程的方差分析,温度和装液量 2 因素间对芽胞含量的 P 值为 0.7890,在 0.05 水平上交互作用不显著;温度和发酵时间 2 因素间对芽胞含量的 P 值为 0.3656,同样在 0.05 水平上交互作用不显

著;装液量和发酵时间 2 因素间对芽胞含量的 P 值为 0.000 9,对芽胞含量的影响在 0.05 水平上交相互作用显著,装液量和发酵时间的二次项对芽胞含量的影响是十分显著的,试验因子与响应值之间不是线性关系。根据响应曲面方程预测结果(图 2~图 4)并结合生产实际,这 3 个主要因子(温度、装液量和发酵时间)分别设定为 30.6 °C、68 ml(250 ml 三角瓶)和 65.5 h,其余因子分别为 pH 6.7、接种菌龄 18 h、接种量 3%、转速 180 r/min。在此条件下发酵液芽胞含量为 1.67×10^9 CFU/ml,芽胞含量较基础培养基提高 159%,无菌滤液对稻瘟病菌的抑菌带宽提高 18.2%,发酵条件优化效果明显。

表 5 主要影响因子最陡爬坡试验设计及结果

Table 5 Experimental design of steepest ascent and corresponding results

| 处理 | 温度 (°C) | 装液量 (ml) | 发酵时间 (h) | 芽胞数 (CFU/ml) |
|----|---------|----------|----------|--------------------|
| 1 | 20 | 100 | 64 | 4.55×10^8 |
| 2 | 30 | 80 | 66 | 1.25×10^9 |
| 3 | 32 | 60 | 68 | 1.06×10^9 |
| 4 | 34 | 40 | 70 | 8.00×10^8 |
| 5 | 36 | 20 | 72 | 7.65×10^8 |

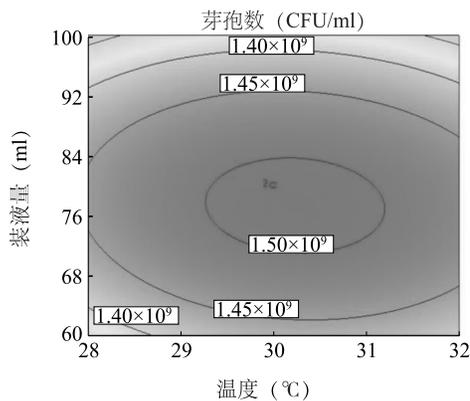


图 2 温度和装液量交互作用对芽胞含量影响的等高线图和响应曲面图

Fig.2 Isoresponse contour plots and response surface stereogram of the effect of temperature and the liquid volume of shaking flask mutual interaction on the amount of spore

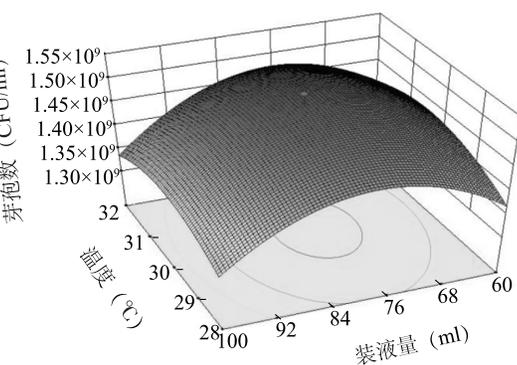
3 讨论

现有微生物杀菌剂产品活菌含量低、效价不高,其产业化技术瓶颈亟待解决。Plackett-Burman 试验设计和 Box-Behnken 试验设计响应曲面法是广泛应用于培养基发酵工艺优化的有效方法。张荣胜

表 6 菌株 JT84 发酵条件的 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 6 Experimental design of Box-Behnken of liquid fermentation conditions of *Bacillus amyloliquefaciens* JT84 and corresponding results

| 处理 | 温度(A) (°C) | 装液量(B) (ml) | 发酵时间(C) (h) | 芽胞数 (CFU/ml) | 抑菌带宽 (mm) |
|----|------------|-------------|-------------|--------------------|-----------|
| 1 | 32.0 | 100 | 64 | 1.00×10^9 | 11.0 |
| 2 | 28.0 | 60 | 64 | 1.36×10^9 | 9.5 |
| 3 | 30.0 | 80 | 69 | 1.25×10^9 | 10.0 |
| 4 | 28.0 | 60 | 68 | 1.07×10^9 | 7.5 |
| 5 | 30.0 | 46 | 66 | 1.34×10^9 | 10.0 |
| 6 | 28.0 | 100 | 68 | 1.39×10^9 | 10.5 |
| 7 | 30.0 | 80 | 62 | 1.10×10^9 | 8.5 |
| 8 | 33.4 | 80 | 66 | 1.49×10^9 | 6.0 |
| 9 | 30.0 | 113 | 66 | 1.20×10^9 | 6.5 |
| 10 | 32.0 | 60 | 64 | 1.49×10^9 | 11.5 |
| 11 | 26.7 | 80 | 66 | 1.37×10^9 | 10.5 |
| 12 | 32.0 | 100 | 68 | 1.35×10^9 | 12.0 |
| 13 | 28.0 | 100 | 64 | 1.03×10^9 | 10.5 |
| 14 | 30.0 | 80 | 66 | 1.47×10^9 | 8.0 |
| 15 | 30.0 | 80 | 66 | 1.53×10^9 | 9.0 |
| 16 | 32.0 | 60 | 68 | 9.60×10^6 | 8.0 |



等^[16]对解淀粉芽胞杆菌 Lx-11 发酵工艺进行优化,使活菌产量增加 184%,抑菌带宽增加 30.2%。张冬冬等^[17]对小麦全蚀生防芽胞杆菌发酵工艺进行优化,优化后芽胞产量为 1.85×10^9 CFU/ml。张雯等^[18]通过响应面法优化木醋杆菌发酵细菌纤维素培养基,细菌纤维素产量较优化前提高 42.5%。目前培养基的优化主要以活菌含量或抑菌活性物质含

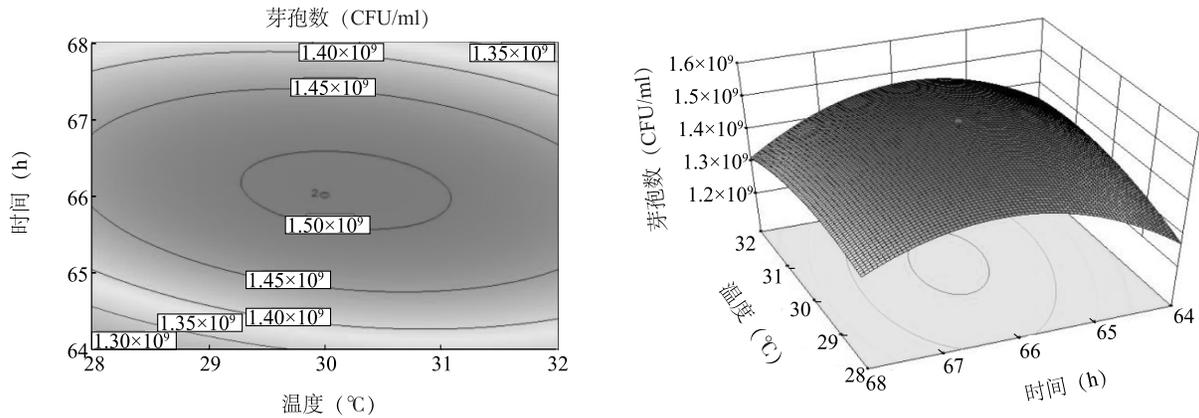


图3 温度和时间交互作用对芽胞含量影响的等高线图和响应曲面图

Fig.3 Isoresponse contour plots and response surface stereogram of the effect of temperature and the time of shaking flask mutual interaction on the amount of spore

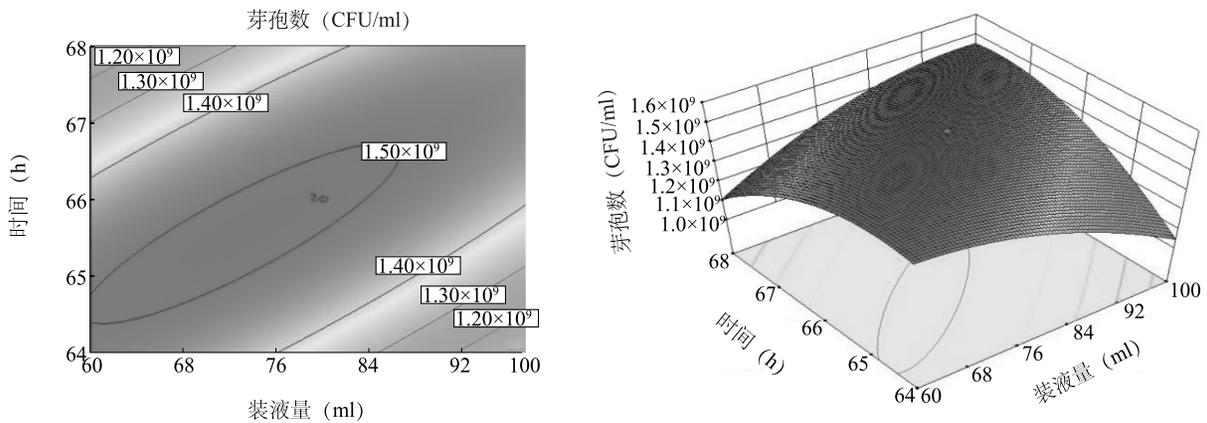


图4 时间和装液量交互作用对芽胞含量影响的等高线图和响应曲面图

Fig.4 Isoresponse contour plots and response surface stereogram of the effect of the time and the liquid volume of shaking flask mutual interaction on the amount of spore

量为单一指标。本研究通过单因素试验、Plackett-Burman 试验设计和 Box-Behnken 试验设计响应曲面法对解淀粉芽胞杆菌 JT84 的培养基成分和发酵条件进行优化,得到兼顾芽胞含量和抑菌活性的优化发酵培养基及发酵条件。优化后发酵液芽胞含量为 1.67×10^9 CFU/ml,较基础培养基提高 159%,无菌滤液对稻瘟病菌和纹枯病菌的抑菌带宽分别增加 18.2%和 30.0%。

近年来干悬浮剂逐渐替代水剂、可湿性粉剂和悬浮剂,成为快速发展且受欢迎的微生物杀菌剂产品剂型之一。Meng 等^[19]使用枯草芽胞杆菌 T429 干悬浮剂防治水稻稻瘟病,防效达到 77.6%~77.8%。在干悬浮剂喷雾干燥过程中,进风温度一般为 110~130 °C,芽胞杆菌营养菌体不能承受此高

温,但是芽胞和发酵液中抑菌活性物质可以承受。因此以发酵液中芽胞含量和抑菌活性物质含量作为指标优化发酵工艺,解决了以芽胞杆菌为主的生物杀菌剂产业化生产过程中存在的效价低的问题。本研究为高芽胞含量、高效价解淀粉芽胞杆菌干悬浮剂的生产提供了理论基础,但需在实际生产过程中进一步验证。

参考文献:

- [1] DEAN R, VAN KAN J A, PRETORIUS Z A, et al. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology [J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13 (4) : 414-430.
- [2] 徐建第,张全芳,姜明松,等. 2013 年山东省部分稻区稻瘟病菌生理小种的鉴定及分析[J].山东农业科学,2015,47(4): 110-111,116.

- [3] 王伟舵,刘永锋.中国稻瘟病菌遗传多样性研究进展[J].江苏农业科学,2016,44(6):196-198.
- [4] 张金花,赫百令,韩润亭,等.75%三环唑可湿性粉剂防治水稻稻瘟病药效评价[J].吉林农业科学,2010,35(4):41-42.
- [5] 唐文,梁艳琼,许沛冬,等.枯草芽孢杆菌 Czkl 诱导橡胶树抗病性相关防御酶系研究[J].南方农业学报,2016,47(4):576-582.
- [6] ONGENA M, JACQUES P. Bacillus lipopeptides versatile weapons for plant disease biocontrol[J].Trends in Microbiology,2008,16:115-125.
- [7] 乔俊卿,陈志谊,梁雪杰,等.枯草芽孢杆菌 Bs916 在番茄根部的定殖[J].江苏农业学报,2015,31(6):1278-1283.
- [8] 陈志谊.芽孢杆菌类生物杀菌剂的研发与应用[J].中国生物防治学报,2015,31(5):723-732.
- [9] 乔俊卿,陈志谊,梁雪杰,等.枯草芽孢杆菌 Bs916 防治番茄青枯病[J].生物防治学报,2016,32(2):229-234.
- [10] 张荣胜,陈思宇,王晓宇,等.解淀粉芽孢杆菌 Lx-11 防治水稻细菌性条斑病应用技术研究[J].中国生物防治学报,2013,29(4):595-600.
- [11] 明亮,刘程程,杨晓云,等.生物杀菌剂解淀粉芽孢杆菌 B1619 水分散剂配方及助剂筛选[J].中国生物防治学报,2015,31(4):529-535.
- [12] 周莹,袁梦娟,韩军,等.丹参根腐病生防芽孢杆菌 2-1 海藻菌剂的研制[J].生物技术通报,2015,31(1):167-172.
- [13] 张岭.10 亿芽胞/克解淀粉芽孢杆菌 B7900 可湿性粉剂对水稻稻瘟病的防效研究[J].科技/药效试验,2016(12):28.
- [14] 王亚会,孟祥坤,刘永锋,等.八株芽孢杆菌的鉴定及其生物活性差异比较[J].中国生物防治学报,2014,30(3):376-384.
- [15] MENG X K, YU J J, YU M N, et al. Dry flowable formulations of antagonistic *Bacillus subtilis* strain T429 by spray drying to control rice blast disease [J]. Biological Control, 2015, 85: 46-51.
- [16] 张荣胜,梁雪杰,刘永锋,等.解淀粉芽孢杆菌 Lx-11 生物发酵工艺优化[J].生物防治学报,2013,29(2):254-262.
- [17] 张冬冬,高同国,朱宝成.小麦全蚀病生防芽孢杆菌产芽胞培养基的响应面优化[J].麦类作物学报,2014,34(3):418-424.
- [18] 张雯,刘康,罗霏霏,等.响应面法优化木醋杆菌发酵酿酒糟水解液产细菌纤维素培养基及其产物性能[J].食品科学,2015,36(13):160-166.
- [19] MENG X K, YU J J, YU M N, et al. Dry flowable formulations of antagonistic *Bacillus subtilis* strain T429 by spray drying to control rice blast disease[J]. Biological Control, 2015, 85: 46-51.

(责任编辑:张震林)