

# 利用响应面分析法优化贝莱斯芽孢杆菌 TCS001 的发酵条件

杨可<sup>1</sup>, 司文<sup>2</sup>, 林海<sup>1</sup>, 林方锐<sup>1</sup>, 袁静<sup>1</sup>, 陈杰<sup>\*1</sup>

(1. 浙江农林大学绿色农药 2011 协同创新中心, 杭州 311300; 2. 浙江钱江生物化学股份有限公司, 浙江海宁 314400)

**摘要:** 贝莱斯芽孢杆菌 *Bacillus velezensis* TCS001 是一种新型生防细菌, 为了提高其生防作用, 本文开展了培养基发酵条件优化研究。以 TCS001 发酵滤液对黄瓜灰霉病菌 *Botrytis cinerea* 的抑制率为因变量, 先从 NB、BPY、YT、BP、LB 和 SOB 6 种基础发酵培养基中筛选最佳基础培养基, 再利用 Plackett-Burman (PB) 试验筛选出影响发酵滤液抑菌率的关键因素; 通过最陡爬坡路径法确定主要影响因素的响应中心点, 利用 Box-Behnken 设计和响应面分析法获得最优发酵条件; 通过活体植株喷雾法测定发酵液对黄瓜灰霉病菌的抑制活性, 进一步明确其优化效果。最终获得最佳基础培养基为 NB 培养基, 发酵条件为: 蛋白胨 10.0 g, 葡萄糖 12.5 g, 牛肉浸膏 4.0 g, 酵母粉 1.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, 装液量 (体积分数) 40%, 种子培养时间 16 h, 接种量 (体积分数) 3%, 转速 164 r/min, 温度 25 °C, pH 7.0, 发酵培养时间 36 h。离体抑菌活性试验验证发现, 优化培养的发酵滤液抑菌活性最强, 抑制率达 90.9%; 活体盆栽抑菌试验表明, 优化培养的发酵液对黄瓜灰霉病的病斑抑制率为 74.7%, 比优化前提高了 36.9%。该结果为贝莱斯芽孢杆菌有效的活性产物分离提取及结构鉴定等后续研究提供了理论基础。

**关键词:** 生物防治; 响应面分析法; 贝莱斯芽孢杆菌; 发酵条件; 抑菌活性

中图分类号: S482.292; TQ458.1 文献标志码: A 文章编号: 1008-7303(2019)04-0444-09

## Fermentation condition optimization of *Bacillus velezensis* TCS001 using response surface methodology

YANG Ke<sup>1</sup>, SI Wen<sup>2</sup>, LIN Hai<sup>1</sup>, LIN Fangrui<sup>1</sup>, YUAN Jing<sup>1</sup>, CHEN Jie<sup>\*1</sup>

(1. Collaborative Innovation Center of Green Pesticide, Zhejiang A & F University, Hangzhou 311300, China; 2. Zhejiang Qianjiang Biochemical Co., Ltd, Haining 314400, Zhejiang Province, China)

**Abstract:** *Bacillus velezensis* (TCS001) is a new biocontrol bacterium. The fermentation condition optimization of TCS001 was conducted to improve its biocontrol effect. To obtain the best inhibitory rate of TCS001 fermentation filtrate against pathogenic fungus *Botrytis cinerea*, six media, including NB, BPY, YT, BP, LB, and SOB medium, were screened. The key factors of fermentation filtrate inhibition rate were investigated using Plackett-Burman (PB) design. Moreover, the central axes of

收稿日期: 2019-04-27; 录用日期: 2019-07-10.

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFD0200507).

作者简介: 杨可, 女, 硕士研究生, E-mail: qg.yang@qq.com; \*陈杰, 通信作者 (Author for correspondence), 女, 博士, 研究员, 主要从事农药学研究, E-mail: chenjie@zafu.edu.cn

these factors were determined using steepest-ascent method. Optimal fermentation conditions were determined by Box-Behnken design (BBD) and Response Surface Methodology (RSM). Besides, the inhibitory activity of the fermentation broth against *B. cinerea* was evaluated via artificial spray. The NB medium was found as the best initial fermentation medium for TCS001. And its optimal fermentation parameters were as follows: 10.0 g of peptone, 12.5 g of glucose, 4.0 g of beef extract, 1.0 g of yeast extract, 1 000 mL of distilled water, loading volume of liquid 40%(*V/V*), inoculum amount 3%(*V/V*), 164 r/min of shaking speed at 25 °C, initial pH 7.0, 16 h of strain age, and 36 h of fermentation incubation. The *in vitro* antibacterial activity test showed that the optimized fermentation broth had the strongest inhibition rate of 90.9%. The disease control experiment showed that the inhibition rate on the disease lesions of *B. cinerea* was 74.7%, which was 36.9% higher than that before the optimization. The results have provided a theoretical basis for the subsequent research on the separation and extraction of active products and structural identification of TCS001.

**Keywords:** biological control; response surface method; *Bacillus velezensis*; fermentation conditions; antibacillus activity

随着研究的深入, 微生物(真菌、细菌、放线菌、酵母和病毒) 农药及其相关产品以其选择性强、对人畜无害、对自然环境污染小以及不易产生抗药性等特点成为替代化学农药的首选, 同时也是目前发展最快速、推广应用最成功的生物农药产品<sup>[1]</sup>。在微生物农药中, 以生防细菌为主, 而芽孢杆菌是目前应用最广的生防细菌<sup>[2]</sup>, 其中贝莱斯芽孢杆菌 *Bacillus velezensis* 是一种新型生防细菌, 近几年研究发现, 该菌对促植物生长、抗病虫害和诱导系统抗病性等具有明显效果<sup>[3]</sup>。本研究所用的 *B. velezensis* TCS001 菌株分离自渤海海泥, 已被证明有广谱的抑菌活性, 其发酵滤液对黄瓜灰霉病菌 *Botrytis cinerea* 菌丝生长和孢子萌发均存在显著的抑制效果<sup>[4]</sup>。而发酵滤液中除了含有微量的代谢活性物质外, 还含有大量杂质, 其抑菌活性受到培养基中化合物的种类及比例, 以及发酵培养的各种条件参数的影响<sup>[5]</sup>。因此, 对生防菌的发酵条件进行研究, 通过提高发酵滤液的抑菌活性而间接提高活性物质的浓度, 可为其活性产物的分离提取及结构鉴定等后续研究提供基础<sup>[6]</sup>。

目前已有较多关于发酵培养基及培养条件优化的报道, 常用的试验方法包括单因素法、全因素法、正交试验法、均匀设计法和响应面分析法等<sup>[7]</sup>, 这些方法均可获得良好效果。单因素试验是保持其他因子不变, 研究单个因子的影响, 试验设计无法说明所涉及的所有因素的交互作用; 而且单因素试验需要多次试验才能找到最佳水平,

既耗时间又耗材料<sup>[8]</sup>。响应面分析法 (Response Surface Methodology, RSM) 可通过较少的试验次数研究多个影响因素的作用, 推算出目标值的优化条件, 被广泛应用于培养基和培养条件的优化中<sup>[9]</sup>。目前, 国内外利用响应面分析法优化 *B. velezensis* 的发酵条件鲜有报道, 多数研究是直接挑选影响因素进行优化<sup>[10-13]</sup>, 因素选择存在一定主观性, 研究结果科学依据不足。鉴于此, 本研究以 *B. velezensis* TCS001 为研究对象, 结合 Plackett-Burman(PB) 设计筛选出关键影响因子, 再利用响应面分析法, 以其发酵滤液的抑菌活性为响应值优化 TCS001 的发酵条件, 旨在为其工业化生产提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 贝莱斯芽孢杆菌 *Bacillus velezensis* TCS001, 菌株分离自中国渤海海泥, 由本实验室筛选、保存及鉴定。黄瓜灰霉病菌 *Botrytis cinerea*, 由本实验室提供。

#### 1.1.2 培养基

NA 培养基: 蛋白胨 10.0 g/L, 牛肉浸膏 3.0 g/L, 葡萄糖 10.0 g/L, 酵母粉 1.0 g/L, 琼脂粉 18.0 g/L, pH 7.0~7.2;

种子培养基: 胰蛋白胨 7.0 g/L, 酵母粉 2.0 g/L, 葡萄糖 2.0 g/L, NaCl 6.0 g/L, KCl 0.06 g/L, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.5 g/L, pH 7.0~7.2;

6 种基础发酵培养基: NB 培养基: 蛋白胨

10.0 g/L, 牛肉浸膏 3.0 g/L, 葡萄糖 10.0 g/L, 酵母粉 1.0 g/L, pH 7.0~7.2; LB 培养基: 酵母粉 5.0 g/L, 胰蛋白胨 10.0 g/L, NaCl 10.0 g/L, pH 7.0~7.2; BP 培养基: 牛肉浸膏 5.0 g/L, 蛋白胨 10.0 g/L, NaCl 5.0 g/L, pH 7.0~7.2; SOB 培养基: 蛋白胨 20.0 g/L, 酵母粉 5.0 g/L, NaCl 0.5 g/L, KCl 0.18 g/L,  $MgCl_2 \cdot H_2O$  0.95 g/L, pH 7.0~7.2; BPY 培养基: 牛肉浸膏 5.0 g/L, 蛋白胨 10.0 g/L, 酵母粉 5.0 g/L, 葡萄糖 5.0 g/L, pH 7.0~7.2; YT 培养基: 蛋白胨 10.0 g/L, 酵母粉 5.0 g/L, 葡萄糖 1.0 g/L, NaCl 5.0 g/L, pH 7.0~7.2。

1.1.3 供试黄瓜 黄瓜 *Cucumis sativus* L. 宝扬 5 号, 上海市宝山区蔬菜科学技术推广站。

## 1.2 试验方法

1.2.1 TCS001 发酵滤液离体抑菌活性测定 采用菌丝生长速率法<sup>[14]</sup>。将 TCS001 发酵液于 4 °C、12 000 r/min 条件下离心 20 min, 取上清液经 22 μm 微孔滤膜过滤 3 次, 得到发酵滤液。按体积分数为 20% 的比例, 将发酵滤液与 50 °C 左右的 PDA 培养基混匀, 倒平板, 凝固后, 在 PDA 平板中心接入直径 7 mm 生长旺盛的黄瓜灰霉病原菌菌饼, 菌丝面朝下。每个处理设 3 个重复。于植物生长培养箱中, 在 (25 ± 0.1) °C 条件下暗培养, 待对照组病原菌直径长至培养皿直径的 3/4 时, 采用十字交叉法测量病原菌直径, 对照组直径为  $d_1$ (mm), 处理组直径为  $d_2$ (mm), 按 (1) 式计算抑菌率 ( $I_a$ ), 利用 SPSS 22.0 软件对抑菌率进行单因素方差分析。

$$I_a\% = \frac{d_1 - d_2}{d_1 - 7} \times 100 \quad (1)$$

1.2.2 TCS001 基础发酵培养基筛选 制备 TCS001 种子液<sup>[4]</sup>。以体积分数 4% 种子液的接种量分别接种于含有供试 6 种基础发酵培养基的摇瓶中, 以温度 (27 ± 0.1) °C、转速 140 r/min 和发酵培养时间 36 h 为初始发酵条件进行发酵培养, 每处理设 3 组重复。取出发酵液, 按照 1.2.1 节的方法制备发酵滤液, 测定其对黄瓜灰霉病菌的抑菌活性。

1.2.3 响应面法优化 TCS001 发酵条件

1.2.3.1 Plackett-Burman 设计法确定发酵主要影响因素 采用 Minitab 17 软件的 Plackett-Burman (PB) 设计法进行试验设计, 设置 1.2.2 节最佳基础培养基和初始发酵条件中各个因素的高低两个水平, 低水平 (-1) 为初始值, 高水平 (1) 为低水平

的 1.25 倍值, 每组处理重复 3 次。采用 1.2.1 节的方法获得不同处理下 TCS001 发酵滤液的抑菌率, 试验结果利用 Minitab 17 软件分析, 确定影响发酵结果的主要影响因素。

1.2.3.2 最陡爬坡法确定发酵条件响应中心点 根据 PB 试验得出的一次拟合方程, 确定主要影响因素; 再根据拟合方程中各变量的系数确定主要因素的爬坡方向和变化步长。在主要影响因素中, 正效应因子设置各水平值时在原始基础上依次增加, 负效应因子条件值在原始基础上依次降低, 其他非主要影响因素根据效应因子的正负, 选择相应的高或低值保持不变, 以此设置最陡爬坡试验<sup>[15]</sup>。

1.2.3.3 响应面分析法确定主要影响因素最优水平

根据最陡爬坡试验结果, 确定主要影响因素的响应中心点。以 TCS001 发酵滤液的抑制率为响应值, 采用 Box-Behnken 设计法进行因素优化试验, 建立最佳发酵条件, 并以 1.2.1 节的方法验证其响应面法获得的预测值。

1.2.4 TCS001 发酵液对盆栽黄瓜灰霉病菌病斑抑制效果 选取长势一致的、两片真叶期黄瓜苗, 用喉头喷雾器分别将 3 mL TCS001 优化发酵液和基础发酵液均匀喷施于黄瓜苗。以喷施等量清水为对照组, 每组处理重复 10 盆, 每盆 3 株。自然晾干 24 h 后接种病原菌。取在 PDA 平板培养 6 d、生长旺盛的黄瓜灰霉病菌, 用直径为 7 mm 的打孔器, 打取获得灰霉病菌菌饼, 菌丝朝下贴于黄瓜第一片展开的真叶上<sup>[16]</sup>。处理后将黄瓜苗置于 (28 ± 1) °C、相对湿度 80%~90% 和光照 (L/D) = 16 h/8 h 的植物培养室中, 恒温保湿培养 7 d, 用游标卡尺以十字交叉垂直法测量病斑直径各 1 次, 取平均值,  $D_1$  代表对照组病斑直径 (mm),  $D_2$  代表药剂处理组病斑直径 (mm), 按公式 (2) 计算病斑抑制率 ( $I_b$ )。

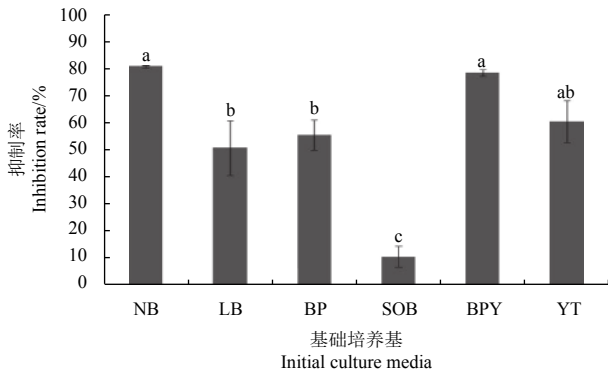
$$I_b\% = \frac{D_1 - D_2}{D_1} \times 100 \quad (2)$$

## 2 结果与分析

### 2.1 基础发酵培养基筛选

图 1 显示: 菌株 TCS001 在 6 种不同基础培养基中发酵培养, 其发酵滤液的抑菌活性明显不同, 其中, 以 NB 和 BPY 作基础培养基时, TCS001 发酵滤液的抑菌效果显著优于其他培养基 ( $P < 0.05$ ), 抑制率分别为 80.9% 和 78.6%, 两者无显

著差异, 综合考虑成本等多方面因素, 最终选择 NB 为基础培养基进行下一步试验。



注: 图中不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。

Note: The different letters indicate the significant differences at  $P = 0.05$  level.

图 1 不同基础培养基对 TCS001 发酵滤液对黄瓜灰霉菌菌抑制活性的影响

Fig. 1 Effects of different initial culture media on the inhibition activity of strain TCS001 fermentation filtrate against *B. cinerea*

## 2.2 影响发酵结果的主要因素确定

PB 试验设计及结果见表 1, 结果回归分析见表 2。由表 2 可知, 因素 B 牛肉浸膏 ( $P = 0.001$ )、E 转速 ( $P = 0.003$ ) 和 I 温度 ( $P = 0.012$ ) 的可信度水平均高于 95% ( $P < 0.05$ ), 说明这 3 个因素对发酵滤液的抑菌率有显著影响, 而其他因素的可信度水平均低于 95% ( $P > 0.05$ ), 说明在测试范围内, 这些因素对发酵滤液的抑菌率无显著影响<sup>[17]</sup>。

在有显著影响的 3 个因素中, 影响作用由大到小依次是牛肉浸膏、转速和温度, 故选择这 3 个因素进行下一步试验。

## 2.3 响应中心点及发酵条件确定

由最陡爬坡路径试验的结果 (表 3) 可知: 当牛肉浸膏质量 4.5 g、转速 160 r/min 和温度 25 °C 时, TCS001 菌株发酵滤液对黄瓜灰霉菌的抑制率最高, 为 87.2%, 因此选择此点作为响应中心点, 进一步进行 Box-Behnken 试验设计 (表 4)。

## 2.4 Box-Behnken 试验设计结果与分析

Box-Behnken 试验设计与结果见表 5。利用 DX-8 软件对表 5 中的数据进行拟合, 得到 TCS001 发酵滤液抑菌率 ( $Y$ ) 对牛肉浸膏质量 ( $A$ , g)、转速 ( $B$ , r/min) 和温度 ( $C$ , °C) 的二次多项回归方程模型为:

$$Y = 89.76 - 3.16A + 1.73B - 1.00C - 0.36AB + 0.079AC + 1.77BC - 3.29A^2 - 2.27B^2 - 3.24C^2 \quad (3)$$

对该模型进行方差分析和差异显著性检验, 结果见表 6。

由表 6 可知: 该模型回归极显著 ( $P < 0.0001$ ), 说明该模型可用于对 TCS001 发酵滤液抑菌率的预测。 $F$  值分析结果表明, 3 个要素对抑菌率均有显著影响, 且 BC 之间存在一定的交互作用; 方程失拟项为  $1.98 > 0.05$ , 表明其失拟不显著, 模型较稳定, 能很好地进行预测; 决定系数  $R^2 = 0.9874$ , 说明该模型拟合度较好, 能较好地反映

表 1 Plackett-Burman 试验设计及结果

Table 1 Design and results of Plackett-Burman experimental

序号 Run numbers	蛋白胨 Peptone/g	牛肉浸膏 Beef extract/g	葡萄糖 Glucose/g	转速 Shaking speed/(r/min)	接种量 Inoculum amount/%	装液量 Loading volume/%	温度 Temperature/°C	初始 pH 值 Initial pH value	种龄 Strain age/h	抑制率 Inhibition rate/%
1	10.0	3.00	10.0	175	3.75	40	27	7	20	89.8
2	12.5	3.75	10.0	140	3.00	40	30	8	16	75.8
3	10.0	3.75	10.0	140	3.75	50	27	8	20	80.6
4	10.0	3.00	10.0	140	3.0	40	27	7	16	81.5
5	10.0	3.75	12.5	140	3.75	50	30	7	16	85.6
6	12.5	3.00	10.0	150	3.75	50	30	8	16	72.9
7	12.5	3.75	12.5	150	3.75	40	27	7	16	86.2
8	10.0	3.75	12.5	150	3.00	40	30	8	20	88.9
9	12.5	3.00	12.5	140	3.00	50	30	7	20	85.9
10	12.5	3.75	10.0	150	3.00	50	27	7	20	90.0
11	12.5	3.00	12.5	140	3.75	40	27	8	20	85.7
12	10.0	3.00	12.5	150	3.00	50	27	8	16	88.7

表 2 Plackett-Burman 试验设计的回归分析

Table 2 Regression analysis of experimental results based on Plackett-Burman design

编号 Symbols	因素 Factors	水平 Level		<i>t</i> 检验 <i>t</i> -value	$P_i >  t $	重要性排序 Importance ranking
		低 Low(-)	高 High(+)			
A	蛋白胨 Peptone/g	10.0	12.5	-0.94	0.354	7
B	牛肉浸膏 Beef extract/g	3.00	3.75	3.75	0.001	1
C	葡萄糖 Glucose/g	10.0	12.5	1.49	0.149	5
E	转速 Shaking speed/(r/min)	140	15	3.37	0.003	2
F	接种量 Inoculum amount/%	3.00	3.75	-0.78	0.444	8
G	装液量 Loading volume/%	40	50	-1.38	0.181	6
I	温度 Temperature/°C	27	30	-2.70	0.012	3
J	pH值 pH value	7	8	-1.57	0.129	4
K	种龄 Strain age/h	16	20	-0.00	0.999	9

表 3 最陡爬坡路径试验设计及结果

Table 3 Design and results of the experiments using steepest-ascent method

序号 Run numbers	牛肉浸膏 Beef extract/ g	转速 Shaking speed/ (r/min)	温度 Temperature/ °C	抑制率 Inhibition rate/ %
1	3.00	140	27	79.3
2	3.75	150	26	83.8
3	4.50	160	25	87.2
4	5.25	170	24	80.9

表 4 Box-Behnken 设计编码水平表

Table 4 Values of coded levels used for the Box-Behnken design

因素 Factors	编号 Symbols	编码水平 Coded values		
		-1	0	+1
牛肉浸膏 Beef extract/g	A	3.75	4.5	5.25
转速 Shaking speed/(r/min)	B	150	160	170
温度 Temperature/°C	C	24	25	26

预测<sup>[18]</sup>。

## 2.5 响应面分析

根据方程模拟结果, 采用 Dx-8 软件绘制响应面曲线图和等高线图(图 2、3 和 4)。三幅曲面图都为凸面图, 说明抑菌率有最大值。通过求解回归方程, 得到 TCS001 发酵滤液抑菌率最大时的发酵条件为: 牛肉浸膏 4 g、转速 164 r/min、温度 25 °C, 在此条件下抑菌率预测值为 90.9%。

## 2.6 响应面最优条件验证

按照 1.2.1 节发酵滤液抑菌率的试验方法对模型优化后的培养基进行符合度验证。采用优化后

表 5 Box-Behnken 试验设计方案及结果

Table 5 The design scheme and test results of the Box-Behnken design

序号 Run numbers	A(牛肉浸膏/g) A(Beef extract/g)	B(转速/(r/min)) B(Shaking speed/(r/min))	C(温度/°C) C(Temperature/°C)	Y(抑制率/%) Y(Inhibition rate/%)
1	-1	-1	0	84.9
2	-1	1	0	88.8
3	1	1	0	82.7
4	0	0	0	89.8
5	1	-1	0	80.3
6	0	-1	1	79.7
7	0	-1	-1	85.1
8	1	0	1	78.6
9	0	0	0	90.4
10	0	1	1	86.9
11	-1	0	1	88.0
12	0	0	0	89.6
13	-1	0	1	85.8
14	1	0	-1	80.5
15	0	0	0	90.0
16	0	0	0	88.9
17	0	1	-1	85.3

的最佳发酵条件制备 TCS001 发酵液, 即蛋白胨 10.0 g, 葡萄糖 12.5 g, 牛肉浸膏 4.0 g, 酵母粉 1.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, 装液量(体积分数)40%, 种子培养时间 16 h, 接种量(体积分数)3%、转速 164 r/min, 温度 25 °C, pH 值 7.0、发酵培养时间 36 h。试验重复 3 次, 3 次实际测试抑菌率结果分别为 91.4%(图 5-A)、89.2%(图 5-B)、87.3%(图 5-C), 平均值为 89.3% ± 2.1%, 与预测值 91.0% 吻合良

表 6 Box-Behnken 试验设计回归分析结果

Table 6 Regression analysis of experimental results based on Box-Behnken design

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 DF	均方 Mean square	F 值 F-value	P 值 P-value
Model	249.10	9	27.68	60.83	<0.000 1
A	80.00	1	80.00	175.80	<0.000 1
B	23.86	1	23.86	52.44	0.000 2
C	7.93	1	7.93	17.42	0.004 2
AB	0.50	1	0.50	1.11	0.327 3
AC	0.025	1	0.025	0.055	0.821 5
BC	12.57	1	12.57	27.63	0.001 2
A2	45.68	1	45.68	100.40	<0.000 1
B2	21.74	1	21.74	47.77	0.000 2
C2	44.14	1	44.14	96.99	<0.000 1
残差 Residual error	3.19	7	0.46		
失拟项 Lack of fit	1.98	3	0.66	2.20	0.230 2
纯误差 Pure error	1.20	4	0.30		
总和 Total	252.29	16			
决定系数 R <sup>2</sup>	0.987 4				

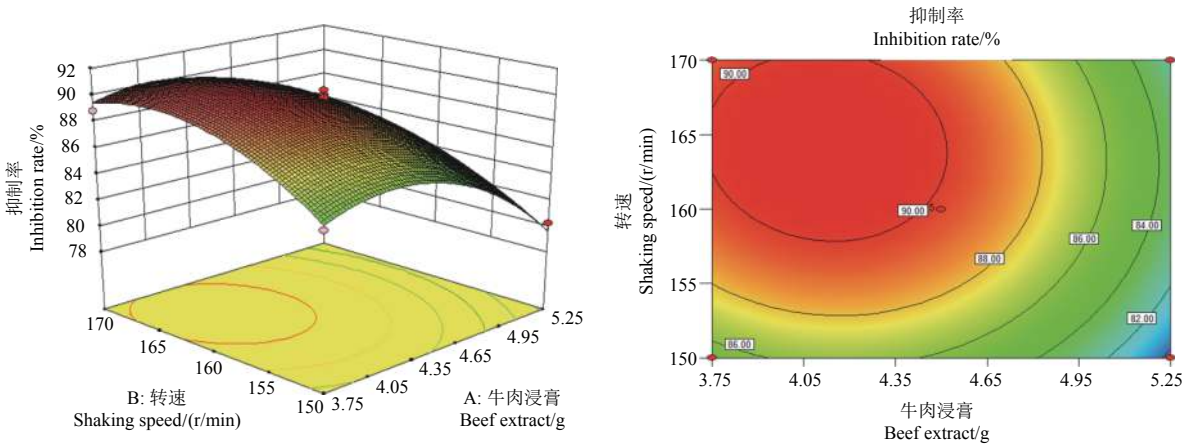


图 2 转速和牛肉浸膏含量交互作用对 TCS001 发酵滤液抑菌活性的影响

Fig. 2 The influence of interaction between the shaking speed and the beef extract on the activity of the strain TCS001 fermentation filtrate

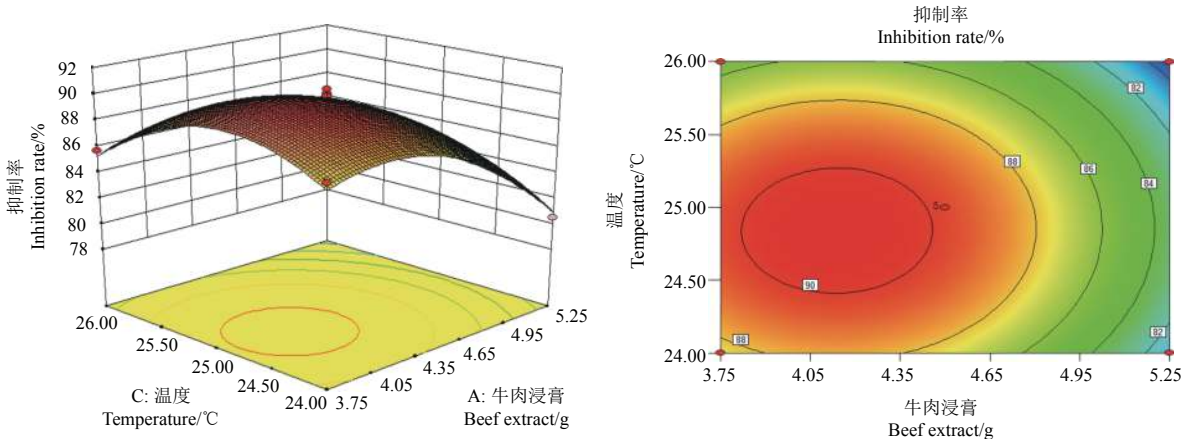


图 3 温度和牛肉浸膏含量交互作用对 TCS001 发酵滤液抑菌活性的影响

Fig. 3 The influence of interaction between the temperature and the beef extract on the activity of the strain TCS001 fermentation filtrate

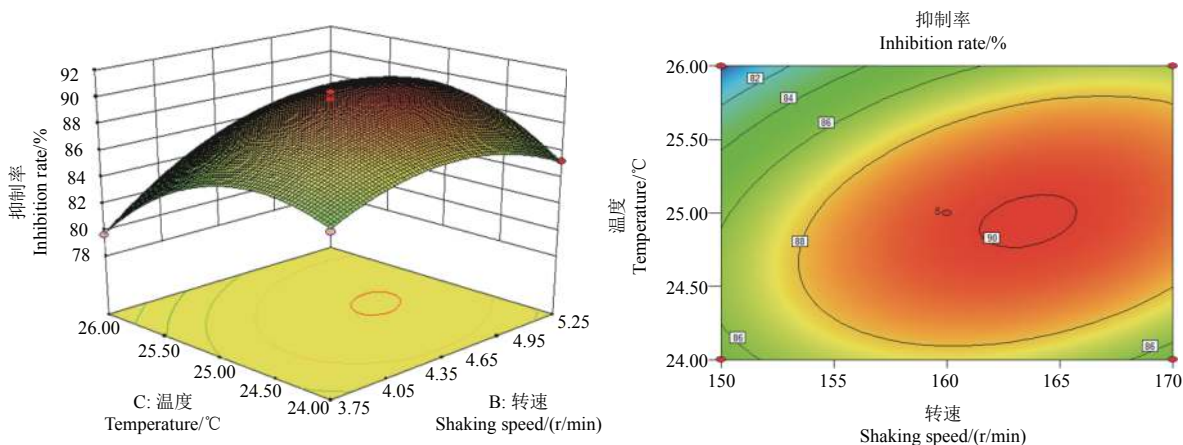
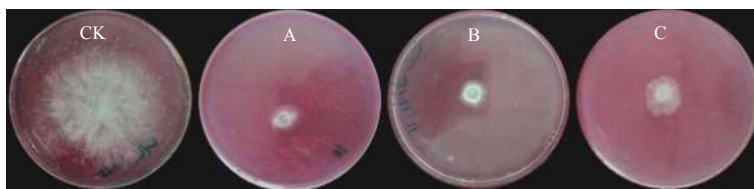


图 4 转速和温度交互作用对 TCS001 发酵滤液抑菌活性的影响

Fig. 4 The influence of interaction between the shaking speed and the temperature on the activity of the strain TCS001 fermentation filtrate



CK: 对照组; A、B、C: 处理组的 3 个重复。

CK: Control group. A, B, C: Three repeats of treatment group.

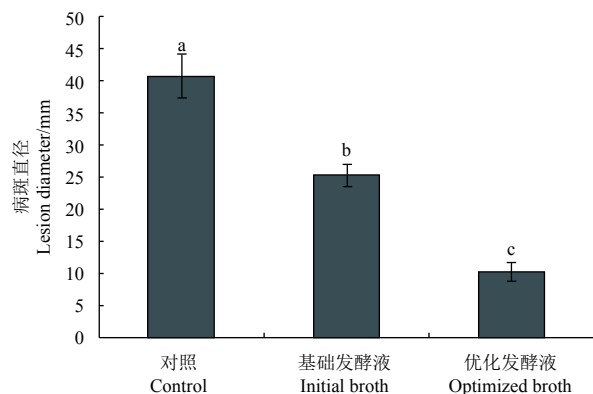
图 5 在最佳发酵条件下 TCS001 发酵滤液对黄瓜灰霉菌的抑制率

Fig. 5 Inhibition rates of TCS001 under the optimized fermentation conditions against *B. cinerea*

好, 说明建立的模型有效。

## 2.7 优化后 TCS001 发酵液对活体盆栽黄瓜灰霉病的病斑抑制效果

由图 6 和图 7 看出, 用优化前后的发酵条件培养的发酵液喷雾处理黄瓜苗后, 黄瓜叶片灰霉病的病斑直径分别为 25.33 和 10.29 mm, 可见,



注: 图中不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。

Note: The different letters indicate the significant differences at  $P = 0.05$  level.

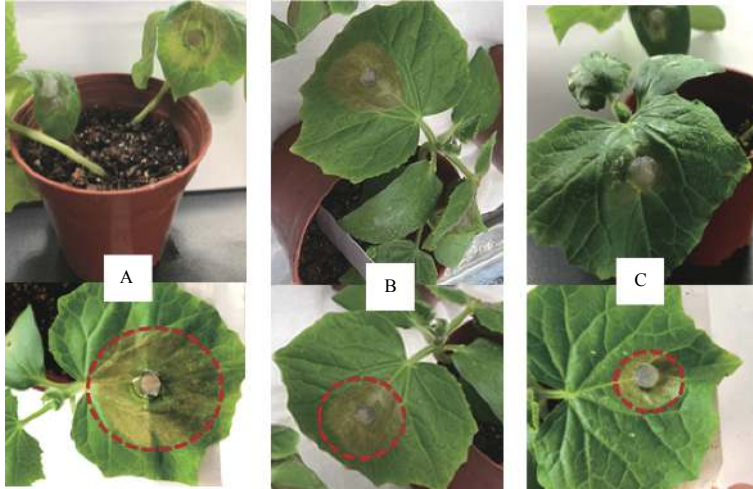
图 6 优化前后 TCS001 发酵液对黄瓜灰霉菌的病斑抑制效果

Fig. 6 Inhibitory effect on the disease lesions of *B. cinerea* treated by TCS001 fermentation broth

采用优化后的发酵条件得到 TCS001 发酵液对黄瓜叶片的灰霉病菌病斑抑制率提高了 36.9%。

## 3 讨论

抑菌活性物质的生成是生防菌株发挥防病功能的重要机制之一, 而活性物质的生成效率不仅与菌株自身遗传特性相关, 亦受菌株培养条件的影响<sup>[19]</sup>。不同生防菌株对培养基营养及发酵条件的需求不同, 因此需要对特定的菌株筛选适宜的培养基配方及发酵条件。如张雯等<sup>[20]</sup>利用响应面法对 *Bacillus subtilis* BS08 进行发酵条件优化, 筛选出温度、接种量和 pH 值为主要影响因素, 最适发酵条件为: 酵母浸膏 14 g/L, 无水葡萄糖 14 g/L, 硫酸镁 1 g/L, 接种量 7.0%, pH 值 8.2, 培养温度 38 °C, 转速 200 r/min, 发酵时间 24 h。优化后发酵液中抑菌类活性物质含量达 450 mg/L, 比已有报道提高 48%; 方翔等<sup>[21]</sup>采用单因素试验结合正交试验优化 *Bacillus velezensis* XP-27 的发酵条件, 得到最适发酵条件为: 牛肉膏 1.0%, 淀粉 1.5%,  $K_2HPO_4$  0.05%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1%, 初始 pH 值 8.0, 培养温度 30 °C, 接种量 7%, 发酵时间 120 h。



注: A: 清水处理; B: 初始发酵液处理; C: 优化后的发酵液处理。

Note: A: Water treatment; B: Initial fermentation broth treatment; C: Optimized fermentation broth treatment.

图 7 优化前后 TCS001 发酵液对黄瓜灰霉病的病斑抑制效果照片

Fig. 7 The inhibitory effect on the disease lesions of *B. cinerea* treated by different fermentation broth

优化后抑菌效果提高 78.18%。

可见, 在人工发酵过程中根据生防菌株的生长特性以及产生抑菌活性物质的营养需求, 对菌株发酵培养基和发酵条件进行优化可有效提高菌株产生抑菌活性物质的水平, 同时降低生产成本, 获得最佳的生产效率和经济效益。本研究以发酵滤液抑制黄瓜灰霉病菌的活性为指标, 在摇瓶发酵条件下对 *B. velezensis* TCS001 进行初始发酵培养基筛选, 对培养基组分比例及发酵条件进行优化。结果表明: 菌株 TCS001 最适初始发酵培养基为 NB 培养基, 与产生次生抑菌活性物质相关的主要影响因素为牛肉浸膏含量、转速和温度。当牛肉浸膏含量为 4.0 g/L、转速为 164 r/min 和温度为 25 °C 时, TCS001 发酵滤液离体抑菌活性最高, 达 91.0%, 活体盆栽抑菌活性提高 36.9%。上述研究结果表明, *B. velezensis* TCS001 与其他生防菌株的发酵培养基组分和培养条件相差很大, 而造成这种差异的可能机制尚需做进一步深入探讨。

发酵培养基的组成和发酵条件会对生防菌株发酵产生次生抑菌活性物质的产量和种类产生影响。如 Khan 等<sup>[22]</sup>研究了 49 种不同碳源对 *B. subtilis* DK1-SA11 抑菌活性的影响, 发现以 *D*-甘露糖为碳源时, 抑菌活性提高 33.3%, 以 *D*-阿拉伯醇为碳源时, 抑菌活性降低 44.4%。Arokiyaraj 等<sup>[23]</sup>研究发现, 培养基中加入适量的氯化锰能显著提高 *Bacillus cereus* 角蛋白酶产量 (102.6 U/g), 而加入硫酸锌和硫酸铜则会降低角蛋白酶产量。

本研究优化后得到的培养基组成和培养条件能够显著提高菌株 TCS001 等量发酵液的抑菌活性, 根据相关文献报道可知, *B. velezensis* 发酵液中可能含有伊枯草菌素、表面活性素、泛草素和大环内酯类化合物等抑菌活性物质<sup>[24-26]</sup>, 后续研究将在本文研究基础上, 分离纯化 *B. velezensis* TCS001 发酵液中的主要抑菌活性成分, 深入探究该菌株对灰霉菌具有抑制作用的相关机理, 并评估其用于田间防治效果, 为在生产中利用该菌株进行黄瓜灰霉病的生物防治奠定坚实的研究基础。

## 参考文献 (References):

- [1] 胡霞, 苑艳辉, 姚卫容, 等. 微生物农药发展概况[J]. *农药*, 2005, 44(2): 49-52.  
HU X, YUAN Y H, YAO W R, et al. Status of microbial pesticide development[J]. *Pesticides*, 2005, 44(2): 49-52.
- [2] BHATTACHARYYA P N, JHA D K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2012, 28(4): 1327-1350.
- [3] NAM M H. Biological control of strawberry *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* using *Bacillus velezensis* BS87 and RK1 formulation[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2009, 19(5): 520-524.
- [4] 杨可, 郑柯斌, 黄晓慧, 等. 海洋生境贝莱斯芽孢杆菌 TCS001 的鉴定及抑真菌活性[J]. *农药学报*, 2018, 20(3): 333-339.  
YANG K, ZHENG K B, HUANG X H, et al. Identification and antifungal activity of marine *Bacillus velezensis* strain TCS001[J]. *Chin J Pestic Sci*, 2018, 20(3): 333-339.
- [5] SANCHEZ S, DEMAÏN A L. Metabolic regulation of fermentation processes[J]. *Enzym Microb Technol*, 2002, 31(7): 895-906.
- [6] 纪明山, 王毅婧. 地衣芽孢杆菌生防菌株 SDYT-79 发酵条件优化[J]. *沈阳农业大学学报*, 2011, 42(2): 164-169.



- JI M S, WANG Y J. Optimizing fermentation condition for the antagonistic *Bacillus licheniformis* SDYT-79 strain[J]. *Shenyang Agric Univ*, 2011, 42(2): 164-169.
- [7] 王永宏, 张强, 张兴, 等. 响应面法优化 *Xenorhabdus nematophila* 发酵培养基的研究[J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2009, 37(7): 140-146.
- WANG Y H, ZHANG Q, ZHANG X, et al. Enhanced antibiotic activity of *Xenorhabdus nematophila* by fermentation medium optimization with response surface methodology[J]. *J Northwest A&F Univ (Nat Sci Ed)*, 2009, 37(7): 140-146.
- [8] KIM K K, KANG J G, MOON S S, et al. Isolation and identification of antifungal *N*-butylbenzenesulphonamide produced by *Pseudomonas* sp. AB2[J]. *J Antibiot*, 2000, 53(2): 131-136.
- [9] GRAHOVAC J, GRAHOVAC M, DODIĆ J, et al. Optimization of cultivation medium for enhanced production of antifungal metabolites by *Streptomyces hygroscopicus*[J]. *Crop Prot*, 2014, 65: 143-152.
- [10] MOGHANNEM S A M, FARAG M M S, SHEHAB A M, et al. Exopolysaccharide production from *Bacillus velezensis* KY471306 using statistical experimental design[J]. *Braz J Microbiol*, 2018, 49(3): 452-462.
- [11] KIM M, KANG DUK-UN, LEE J. Construction of a recombinant *Escherichia coli* JM109/A-68 for production of carboxymethyl-cellulase and comparison of its production with its wild type, *Bacillus velezensis* A-68 in a pilot-scale bioreactor[J]. *Biotechnol Bioproc E*, 2016, 21(5): 601-611.
- [12] 李妹江, 王淋敏, 谯天敏, 等. 利用响应面法优化贝莱斯芽孢杆菌 ZJ20 发酵参数[J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2019, 47(2): 88-96.
- LI S J, WANG L M, QIAO T M, et al. Optimization of *Bacillus velezensis* ZJ20 fermentation parameters by response surface methodology[J]. *J Northwest A&F Univ (Nat Sci Ed)*, 2019, 47(2): 88-96.
- [13] 黄铭慧. 大豆尖镰孢根腐病拮抗菌 X2 生防菌剂的研制与应用[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2017.
- HUANG M H. Research and application on antagonistic *Bacteria* (X2) powder for suppressing soybean root rot induced by *Fusarium oxysporum*[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2017.
- [14] 杨胜清, 张帆, 马贵龙. 贝莱斯芽孢杆菌 S6 拮抗物质分离纯化及抑菌机理[J]. 农药, 2017, 56(9): 645-648, 660.
- YANG S Q, ZHANG F, MA G L. Purification and inhibitive mechanism of antagonist substances from *Bacillus velezensis* S6 strain[J]. *Agrochemicals*, 2017, 56(9): 645-648, 660.
- [15] 邓志平, 陈浩, 陈三凤. 利用响应面法优化固氮类芽孢杆菌 *Paenibacillus* sp.1-49 的发酵培养基[J]. 微生物学报, 2016, 56(9): 1415-1425.
- DENG Z P, CHEN H, CHEN S F. Medium optimization for nitrogen fixer *Paenibacillus* sp.1-49[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(9): 1415-1425.
- [16] 陈艳光. 枯草芽孢杆菌 BSD-2 诱导黄瓜抗灰霉病作用机理研究[D]. 石家庄: 河北师范大学, 2015.
- CHEN Y G. Mechanisms of induced systemic resistance (ISR) in cucumber against *Botrytis cinerea* by *Bacillus subtilis* BSD-2[D]. Shijiazhuang: Hebei Normal University, 2015.
- [17] SHAFI J, SUN Z H, JI M S, et al. ANN and RSM based modelling for optimization of cell dry mass of *Bacillus* sp. strain B67 and its antifungal activity against *Botrytis cinerea*[J]. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 2018, 32(1): 58-68.
- [18] MORAIS E S, MENDONÇA P V, COELHO J F J, et al. Deep eutectic solvent aqueous solutions as efficient media for the solubilization of hardwood xylans[J]. *ChemSusChem*, 2018, 11(4): 753-762.
- [19] JOSE PA, SIVAKALA KK, et al. Formulation and statistical optimization of culture medium for improved production of antimicrobial compound by *Streptomyces* sp. JAJ06[J]. *Int J Microbiol*, 2013, 2019: 1-9.
- [20] 张雯, 卞丹, 沈燕秋, 等. 枯草芽孢杆菌抑菌活性物质鉴定、抑菌特性及发酵条件优化[J]. 中国食品学报, 2017, 12: 105-115.
- ZHANG W, BIAN D, SHEN Y Q, et al. Identification and characterization of antibacterial metabolites and optimization of cultural conditions for *Bacillus subtilis*[J]. *J Chin Institute Food Sci Technol*, 2017, 12: 105-115.
- [21] 方翔, 徐伟芳, 牛娜, 等. 一株桑树内生拮抗菌的分离、鉴定及发酵条件优化[J]. 微生物学报, 2018, 58(12): 103-116.
- FANG X, XU W F, NIU N, et al. Screening, identification and optimization of fermentation conditions of an antagonistic endophytic bacterium from mulberry[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(12): 103-116.
- [22] KHAN M N, LIN H, LI M, et al. Identification and growth optimization of a Marine *Bacillus* DK1-SA11 having potential of producing broad spectrum antimicrobial compounds[J]. *Pak J Pharm Sci*, 2017, 30(3): 839-853.
- [23] AROKIYARAJ S, VARGHESE R, ALI AHMED B, et al. Optimizing the fermentation conditions and enhanced production of keratinase from *Bacillus cereus* isolated from halophilic environment[J]. *Saudi J Biol Sci*, 2019, 26(2): 378-381.
- [24] 曾欣, 张亚惠, 等. 温郁金内生拮抗细菌 B-11 的分离及其抑菌活性[J]. 微生物学通报, 2019, 46(5): 1018-1029.
- ZENG X, ZHANG Y H, et al. Antimicrobial activity of endophytic bacterium strain B-11 isolated from *Curcuma wenyujin*[J]. *Microbiol China*, 2019, 46(5): 1018-1029.
- [25] 冯语嫣, 刘晓凡, 等. 葡萄抑菌附生细菌筛选鉴定及其结构表征[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(5): 31-37.
- FENG Y Y, LIU X F, et al. Screening, identification, and structure characterization of grape epiphytic bacteria[J]. *Food Ferment Ind*, 2019, 45(5): 31-37.
- [26] PAN H Q, LI Q L, HU J C. The complete genome sequence of *Bacillus velezensis* 9912D reveals its biocontrol mechanism as a novel commercial biological fungicide agent[J]. *J Biotechnol*, 2017, 247: 25-28.

(责任编辑: 金淑惠)