



普城沙雷氏菌 MM 产酶条件优化及对西瓜枯萎病的防治效果

马金秀,张锦锋,王江来,李佳佳,李昭煜,刘璐,田永强

(兰州交通大学 生物与制药工程学院,兰州 730070)

摘要 为提高普城沙雷氏菌 MM 几丁质酶产量,增强拮抗西瓜枯萎病原菌的能力,通过 Plackett-Burman 设计和响应面法对其培养基成分进行优化,并测定优化后菌株 MM 发酵滤液对西瓜种子萌发及西瓜枯萎病防治效果的影响。结果显示,在初始 pH 7.0、接种量 3%、温度 30℃、摇床转速 180 r/min、培养时间 72 h 的基础上获得最佳产酶培养基:葡萄糖 12.748 g/L,牛肉膏 2.086 g/L,酵母粉 3.091 g/L;优化后菌株 MM 几丁质酶活为 0.485 U/mL,比优化前提高 1.14 倍,对西瓜枯萎病原菌的抑菌率提高 6.42%。菌株 MM 发酵滤液不同稀释倍数对西瓜种子的萌发具有促进作用,当发酵滤液稀释浓度为 150 倍时对种子萌发的促进作用最为显著,为 98.53%。盆栽试验显示,菌株 MM 发酵滤液处理西瓜植株后,其株高、鲜质量、干质量分别增加 78.82%、126.90%、82.00%,对西瓜枯萎病防效高达 74.55%。

关键词 普城沙雷氏菌;几丁质酶;响应面优化;西瓜枯萎病防治

中图分类号 Q939.95

文献标志码 A

文章编号 1004-1389(2022)12-1635-11

普城沙雷氏菌(*Serratia plymuthica*)属于肠杆菌科, G^- 杆状兼性厌氧菌。作为一种重要的生防菌剂,既通过产生胞外酶和代谢产物等抑制植物病原真菌,还能够促进植物生长^[1]。沙雷氏菌能分泌多种抗生素代谢产物,如碳青霉烯、几丁质酶、异硫霉素、硝吡咯菌素、水解酶、大环内酯类抗生素、嗜铁素等,从而抑制不同植物病原真菌的生长^[2]。Saraswoti 等^[3]研究表明,普城沙雷氏菌通过分泌几丁质酶降解病原真菌细胞壁中的几丁质来抑制真菌。几丁质酶(Chitinase)是一种专一性催化几丁质中 β -1,4 糖苷键水解,能够将几丁质降解为几丁寡糖或单糖的一类酶的总称^[4]。几丁质酶广泛分布于自然界,存在于真菌、细菌及放线菌等微生物^[5]。现已陆续发现沙雷氏菌属(*Serratia* sp.)、芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)、链霉菌属(*Streptomyces* sp.)、淡紫拟青霉(*Paecilomyces lilacinus*)均可分泌几丁质酶^[6]。但目前因几丁质酶结构的多样性、调控机理的复杂性、以及菌株产酶能力低下、发酵工艺不成熟等原因,优化菌株的最佳产酶条件是酶工艺生产中的首要

任务。

在发酵工艺生产优化中,多采用 Plackett-Burman 试验结合 Box-Behnken 响应面法(RSM)设计试验对菌株产酶条件进行优化,以期获得高效高产几丁质酶的发酵条件。袁淑博等^[7]通过响应面法优化 MEW06 产几丁质酶的培养基后酶活达 197.32 U/mL,相比于初始培养基酶活提高 2.58 倍。Pramesti 等^[8]采用响应面法研究链霉菌 PB2 产几丁质酶的最佳质量浓度。Roohi 等^[9]采用 RSM 优化高产几丁质酶菌株 CUVGA6 的产酶条件,为工业生产应用提供理论支持。Rachmawaty 等^[10]利用两水平筛选因子首次对绿色木霉产几丁质酶条件进行优化,响应面分析预测几丁质酶活为 0.487 38 U/g,试验验证为 0.488 64 U/g,预测结果非常理想。大多数文献是研究粘质沙雷氏菌通过几丁质酶防治植物病原真菌^[11],关于普城沙雷氏菌通过几丁质酶防治植物病原菌及产酶条件的优化方面未见文献报道。

本研究基于对兰州交通大学生物农药工程中心微生物实验室筛选的生防菌株普城沙雷氏菌

收稿日期:2021-09-23 修回日期:2021-10-26

基金项目:国家自然科学基金(21967015);甘肃省重点研发计划(20YF3FA038);嘉峪关市重点研发计划(21-19)。

第一作者:马金秀,女,硕士研究生,研究方向为生物防治。E-mail:781351389@qq.com

通信作者:田永强,男,博士,教授,研究方向为微生物工程。E-mail:tianyq@mail.lzjtu.cn

MM 在开展单因素试验的基础上,利用 Plackett-Burman 设计和 RSM 对几丁质酶的最佳培养条件进行优化,明确菌株 MM 对西瓜枯萎病的防治效果,为普城沙雷氏菌发酵生产工艺提供理论依据,也为该菌株进一步开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 兰州交通大学生物农药工程中心分离筛选的普城沙雷氏菌菌株 MM, ACCC 编号为 61749。

1.1.2 培养基 斜面培养基。LB 培养基:酵母粉 5 g/L,蛋白胨 10 g/L,氯化钠 10 g/L,琼脂 15~20 g/L, pH 7.0; PDA 培养基:马铃薯 200 g/L,葡萄糖 20 g/L,琼脂 20 g/L, pH 7.0; MS 培养基(购自杭州百思生物):硝酸钾 1 900 mg/L,硝酸铵 1 650 mg/L,磷酸二氢钾 170 mg/L,硫酸镁 370 mg/L,氯化钙 440 mg/L,碘化钾 0.83 mg/L,硼酸 6.2 mg/L,硫酸锰 22.3 mg/L,硫酸锌 8.6 mg/L,钼酸钠 0.25 mg/L,硫酸铜 0.025 mg/L,氯化钴 0.025 mg/L,乙二胺四乙酸二钠 37.3 mg/L,硫酸亚铁 27.8 mg/L,肌醇 1 000 mg/L,甘氨酸 2 mg/L,盐酸硫胺素 0.1 mg/L,盐酸吡哆醇 0.5 mg/L,烟酸 0.5 mg/L,蔗糖 10 g/L,琼脂 7 g/L,取 MS 培养基 4.74 g,加入 1 L 蒸馏水,搅拌加热至完全溶解, pH 5.8。

基础发酵培养基。酵母粉 5 g/L,蛋白胨 10 g/L,氯化钠 10 g/L, pH 7.0。

培养基灭菌条件均为高压灭菌, 121 °C, 30 min。

1.2 方法

1.2.1 种子培养 将菌株 MM 转接至 LB 斜面培养基上, 30 °C 培养 16 h, 活化后再挑取一环斜面培养基上的菌株接种于 100 mL LB 液体培养基, 30 °C、180 r/min 恒温振荡培养过夜, 制成种子液。

1.2.2 发酵培养 将菌株 MM 种子液以 3% 的接种量接种至装有 100 mL 基础发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 30 °C、180 r/min 培养 72 h。

1.2.3 酶活力测定 几丁质酶活性测定^[12-14]: 采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法测定。根据 N-乙酰氨基葡萄糖(NAG)标准曲线^[15]定量几丁质酶活(图 1)。几丁质酶活的定义: 一个单位的几丁质酶活(U)定义为 37 °C 下每 1 min 产生 1 μmol

NAG 所需要几丁质酶的酶量^[16]。

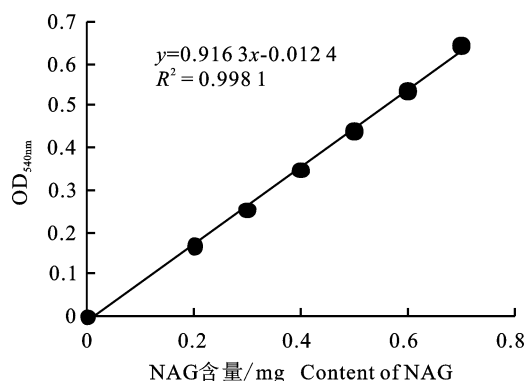


图 1 几丁质酶标准曲线

Fig. 1 Standard curve of chitinase

1.2.4 菌体生物量测定 利用混菌法测定菌体生物量(活菌数)。取菌悬液适当稀释后将菌液与温度冷却至 50 °C 左右的培养基混匀倒平板, 24 h 后平板计数。

1.2.5 抑菌活性测定 以西瓜枯萎病菌为靶标菌, 活化培养后, 用打孔器打取直径为 8 mm 的菌碟, 置于 PDA 琼脂培养基中央, 再用无菌牙签将培养 24 h 的普城沙雷氏菌 MM 用十字交叉法点接于该菌碟四周等距离 25 mm 处, 以不接种菌株 MM 的平板为对照, 每个试验 3 个重复, 27 °C 培养 5 d 后测量菌落直径, 并通过以下公式计算抑菌率。

抑菌率 = (对照组菌落直径 - 处理组菌落直径) / 对照组菌落直径 × 100%

1.2.6 菌株 MM 对西瓜种子的影响 将待测西瓜种子用无菌水冲洗 3 次, 每次 5 min, 再分别在 70% 乙醇溶液和 2% 次氯酸钠溶液中清洗 3 min 与 10 min, 再用无菌水冲洗 3 次后, 置于无菌纱布中风干。将滤液分别稀释至 10、50、100、150、200 倍的梯度加入 MS 培养基中, 以不加菌株 MM 滤液的 MS 培养基为对照, 将已消毒的种子置于 MS 培养基中, 每瓶 5 粒, 各 3 个重复, 25 °C, 空气相对湿度要求 80% 左右, 光照与黑暗交替培养 7 d 后, 测定种子生长情况。

1.2.7 菌株 MM 对西瓜枯萎病的盆栽防治效果及叶绿素含量 采用灌根法将长势均匀的西瓜幼苗移栽至盆中, 试验设计 4 个处理, 每个处理 5 盆, 分别以接种无菌发酵培养基为对照组 CK; 接种西瓜枯萎病菌孢子悬液 (10⁷ mL⁻¹) 的记为 FON; 先接种西瓜枯萎病菌孢子悬液, 24 h 后再接种菌株 MM 发酵滤液的记为 FON+MM; 只接

种菌株 MM 发酵滤液的记为 MM；以 7 d 为周期，每株每次接种 20 mL，42 d 后统计各处理植株生长情况，调查枯萎病的病株率及病级，计算菌株 MM 的防治效果并测定各处理叶绿素含量。西瓜幼苗期枯萎病分级标准^[17]：0 级为茎内维管束正常，外部无症状；1 级为茎内维管束 25% 以下变色；3 级为茎内维管束 25%~50% 变色；5 级为茎内维管束 51%~75% 变色；7 级为茎内维管束 75% 以上变色，部分叶片萎蔫；9 级为整株枯死。

1.3 试验设计

1.3.1 不同碳、氮源、无机盐对 MM 产几丁质酶活及活菌数的评价 将 MM 菌株接种至基础发酵培养基中，以培养基初始 pH 7.0、接种量 3%、培养温度 30 ℃、转速 180 r/min 及培养时间 72 h 为初始条件。以几丁质酶活及菌株 MM 活菌数为指标，对菌株 MM 培养基碳源(5 g/L)、氮源(10 g/L)、无机盐(10 g/L)进行优化，每次将优化后的结果用于下一因素的优化中。碳源：乳糖、麦芽糖、蔗糖、葡萄糖、可溶性淀粉；氮源：硝酸铵、碳酸铵、硫酸铵、尿素、牛肉膏、蛋白胨；无机盐：氯化钙、硫酸锰、七水合硫酸镁、磷酸二氢钾、氯化钠。

1.3.2 Plackett-Burman 试验设计筛选重要影响因素 在单因素试验的基础上，选取 7 种成分(麦芽糖、葡萄糖、牛肉膏、酵母粉、蛋白胨、氯化钠、硫酸锰)作为 7 个因子，即 X1、X2、X3、X4、X5、X6、X7，选用试验次数为 $N=12$ 的试验方法进行 PB 试验设计，对每个因子分别选取高水平(+1)和低水平(-1)，且高水平是低水平的 1.5 倍。试验因子和水平见表 1，以几丁质酶活作为响应值 R_1 。

表 1 Plackett-Burman 试验因子及水平
Table 1 Plackett-Burman test factors and levels

序号 No.	因素 Factor	低水平 (-1) Low level (-1)	高水平 (+1) High level (+1)
X1	麦芽糖/(g/L) Maltose	10.00	15.00
X2	葡萄糖/(g/L) Glucose	15.00	22.50
X3	牛肉膏/(g/L) Beef extract	3.00	4.50
X4	酵母粉/(g/L) Yeast extract	5.00	7.50
X5	蛋白胨/(g/L) Peptone	10.00	15.00
X6	氯化钠/(g/L) Sodium chloride	10.00	15.00
X7	硫酸锰/(g/L) Manganese sulfate	5.00	7.50

1.3.3 最陡爬坡路径试验 利用 Minitab 19 统计分析软件对 Plackett-Burman 设计分析，根据

PB 试验结果选取 3 个影响最大因子进行最陡爬坡路径试验，如表 2 所示。

表 2 3 个影响最大因子最陡爬坡路径试验条件

Table 2 Test conditions for steepest climbing path of three most influential factors

序号 No.	因子 Factors			R^2
	X2/(g/L)	X3/(g/L)	X4/(g/L)	
1	15	3.0	5	0.328
2	14	2.5	4	0.315
3	13	2.0	3	0.370
4	12	1.5	2	0.347
5	11	1.0	1	0.339
6	10	0.5	0	0.345

1.3.4 响应面 Box-Behnken 试验设计优化 通过 Plackett-Burman 设计获得的 3 个重要影响因子并从最陡爬坡路径试验的结果选取 3 个水平，设计 3 因子 3 水平的 Box-Behnken 试验，各因子及水平如表 3 所示。

表 3 Box-Behnken 试验条件

Table 3 Box-Behnken test conditions

因子 Factor	水平 Level		
	低 Low(-1)	中 Medium(0)	高 High(+1)
X2	12.0	13.0	14.0
X3	1.5	2.0	2.5
X4	2.0	3.0	4.0

1.3.5 数据处理 每个处理设计 3 组重复试验，取 3 个重复试验均值。利用 origin 8.5 和 SPSS 26.0 对单因素试验数据进行统计分析；以 Minitab 19 进行 Plackett-Burman 试验和 RSM 数据处理。

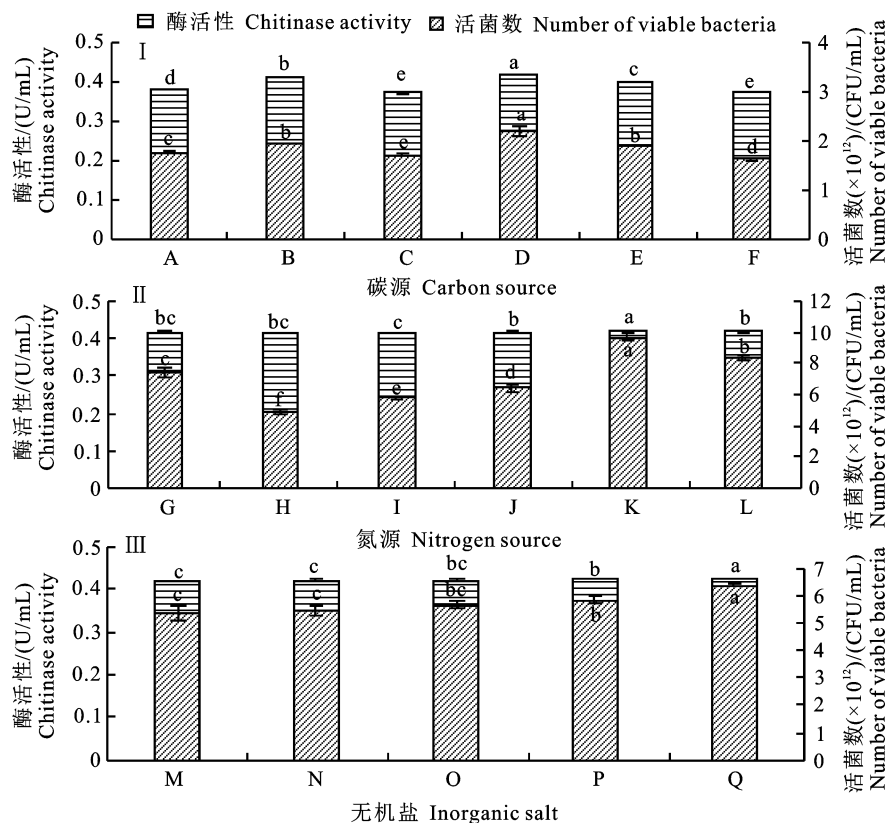
2 结果与分析

2.1 不同碳源、氮源、无机盐对菌株 MM 产几丁质酶及活菌数的影响

碳源、氮源和无机盐对菌株 MM 产几丁质酶活性和活菌数的影响结果如图 2 所示。以葡萄糖为碳源(图 2-I)时对酶活性和活菌数的影响最显著，分别为 0.417 U/mL、 2.2×10^{12} CFU/mL，其次为麦芽糖、可溶性淀粉、乳糖、蔗糖及酵母粉(LB)；在碳源的优化基础上，6 种氮源(图 2-II)对酶活性和活菌数影响依次为牛肉膏>蛋白胨>硝酸铵>尿素>硫酸铵>碳酸铵，牛肉膏为氮源时影响最显著，酶活性和活菌数分别为 0.421 U/mL、 9.7×10^{12} CFU/mL；在氮源

的优化基础上,以氯化钠为无机盐(图 2-Ⅲ)时影响最显著,酶活性和活菌数分别为 0.425 U/mL,

6.36×10^{13} CFU/mL。因此,选择最优碳氮源、无机盐分别为葡萄糖、牛肉膏和氯化钠。



I. 碳源; II. 氮源; III. 无机盐; A. 乳糖; B. 麦芽糖; C. 蔗糖; D. 葡萄糖; E. 可溶性淀粉; F. LB; G. 硝酸铵; H. 碳酸铵; I. 硫酸铵; J. 尿素; K. 牛肉膏; L. 蛋白胨; M. 氯化钙; N. 硫酸锰; O. 七水合硫酸镁; P. 磷酸二氢钾; Q. 氯化钠。不同字母表示各处理在 $P < 0.05$ 水平差异显著。下同

I. Carbon source; II. Nitrogen source; III. Inorganic salt; A. Lactose; B. Maltose; C. Sucrose; D. Glucose; E. Soluble starch; F. Lb; G. Ammonium nitrate; H. Ammonium carbonate; I. Ammonium sulfate; J. Urea; K. Beef extract; L. Peptone; M. Calcium chloride; N. Manganese sulfate; O. Magnesium sulfate heptahydrate; P. Potassium dihydrogen phosphate; Q. Sodium chloride. Different letters indicate significant differences among treatments at $P < 0.05$ level. The same below

图 2 培养基成分对菌株 MM 几丁质酶活性及活菌数的影响

Fig. 2 Effect of medium composition on strain MM chitinase activity and number of viable bacteria

2.2 Plackett-Bueman 试验设计

在单因素试验的基础上,以培养基的 7 种成分(麦芽糖、葡萄糖、牛肉膏、酵母粉、蛋白胨、氯化钠、硫酸锰)进行 7 因子两水平的 Plackett-Bueman 试验,筛选对菌株 MM 培养条件影响最显著的 3 个因素。Plackett-Bueman 试验设计结果如表 4 所示,酶活性最高响应值达 0.399。采用 Minitab 19 进行统计分析,结果见表 5, t 检验显示对响应结果产生正效应的因子为 X_6 和 X_7 ,说明 X_6 和 X_7 在高水平时有利于菌株 MM 产酶,其质量浓度分别选择 15 g/L 和 7.5 g/L;产生负效应的因素为 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 和 X_5 ,说明这 5 个因素在低水平时更有利于菌株 MM 的产酶,其质量浓度分别选择 10 g/L、15 g/L、3 g/L、5 g/L

和 10 g/L。这 7 个因子对响应值影响的显著顺序为 $X_2 > X_3 > X_4 > X_1 > X_6 > X_7 > X_5$ 。根据 P 值可得, X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 具有高度显著效应 ($P < 0.05$)。因此后续选取 X_2 、 X_3 、 X_4 作为响应面试验的研究对象。

2.3 最陡爬坡路径试验

利用 Plackett-Burman 试验设计筛选出影响产酶的 3 个主要因素: X_2 、 X_3 、 X_4 ,运用最陡爬坡路径法逼近最大响应值区域(表 6),菌株 MM 酶活性随着 X_2 、 X_3 、 X_4 的添加量减少而增大。结果显示,第 3 组试验响应值最大,即 X_2 为 13 g/L, X_3 为 2 g/L, X_4 为 3 g/L 时酶活最高,因此,选择第 3 组试验条件为响应面 Box-Behnken 试验设计的中心点。由预测模型得 X_2 、 X_3 和

表 4 Plackett-Burman 试验设计及响应值

Table 4 Plackett-Burman experimental design and response values

序号 No.	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	R1
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0.397
2	-1	-1	-1	1	1	1	-1	0.372
3	1	-1	-1	-1	1	1	1	0.389
4	-1	1	1	-1	1	-1	-1	0.317
5	-1	1	1	1	-1	1	1	0.313
6	1	-1	1	-1	-1	-1	1	0.357
7	-1	1	-1	-1	-1	1	1	0.399
8	1	1	-1	1	1	-1	1	0.302
9	1	-1	1	1	-1	1	-1	0.338
10	-1	-1	1	1	1	-1	1	0.356
11	1	1	1	-1	1	1	-1	0.306
12	1	1	-1	1	-1	-1	-1	0.312

表 5 Plackett-Burman 试验各因素的影响效果

Table 5 Effects of various factors in Plackett-Burman test

项 Term	系数 Coefficient	系数标准误 Coefficient standard error	<i>t</i> 值 <i>t</i> value	<i>P</i> 值 <i>P</i> value	方差膨胀因子 Variance inflation factor	重要性排序 Importance ranking
常量 Constant	0.346 9	0.003 68	94.29	0		
X1	-0.012 6	0.003 68	-3.43	0.027	1	4
X2	-0.0217 5	0.003 68	-5.91	0.004	1	1
X3	-0.0154 4	0.003 68	-4.2	0.014	1	2
X4	-0.0142 3	0.003 68	-3.87	0.018	1	3
X5	-0.0061 6	0.003 68	-1.67	0.169	1	7
X6	0.0064 2	0.003 68	1.74	0.156	1	5
X7	0.0062 4	0.003 68	1.69	0.165	1	6

X4 的变化梯度是逐步递减的,即 X2 在 13 g/L, X3 在 2 g/L, X4 在 3 g/L 的基础上继续递减,其余因子的质量浓度水平均按上述浓度寻找最大响应区域。

表 6 3 个影响最大因子最陡爬坡路径试验条件

Table 6 Test conditions for steepest climbing path of three most influential factors

序号 No.	因子 Factor			<i>R</i> ²
	X2/(g/L)	X3/(g/L)	X4/(g/L)	
1	15	3.0	5	0.366
2	14	2.5	4	0.352
3	13	2.0	3	0.411
4	12	1.5	2	0.370
5	11	1.0	1	0.339
6	10	0.5	0	0.345

2.4 响应面 Box-Behnken 试验设计

根据 Plackett-Burman 设计获得的 3 个重要影响因子即 X2、X3 和 X4,最陡爬坡路径试验得到的质量浓度即 X2 为 13 g/L, X3 为 2 g/L, X4 为 3 g/L。以酶活为响应值 R3,设计 3 因子 3 水平的 Box-Behnken 试验,每个处理 3 个重复,试验结果如表 7 所示。

2.4.1 二次回归模型与方差分析 利用 Minitab 19 进行方差分析(表 8),该模型失拟项 $P = 0.379 > 0.05$,说明回归效果显著,失拟不显著,模型稳定,能很好的进行预测。决定系数 $R^2 = 0.993 7$,说明该模型达到了较好的拟合度。经 Minitab 19 分析回归拟合得到该模型的回归方程: $R^3 = -6.688 + 0.882 7X_2 + 0.564X_3 + 0.620 9X_4 - 0.033 19X_2X_2 - 0.183 3X_3X_3 - 0.073 11X_4X_4 - 0.009 00X_2X_3 - 0.017 69X_2X_4 +$

0.027 74X₃X₄。

2.4.2 响应面分析 根据拟合回归方程,为更直观地反映 3 个影响因素 X₂、X₃ 和 X₄ 之间交互作用对菌株 MM 产酶活性的影响,通过二阶优化,绘出 X₂、X₃ 和 X₄ 之间的响应面分析图(图 3、4、5),每个响应面可反映出两个主要因素之间的相互作用,随着另外两个因素的逐渐变化,响应值呈先增大后减小的趋势,而曲面的顶点即为响应值的最大值点。根据二阶回归方程计算可得 X₂、X₃ 和 X₄ 的最佳质量浓度组合 X₂ 为 12.748 g/L,X₃ 为 2.086 g/L,X₄ 为 3.091 g/L,MM 酶活理论值达 0.492 U/mL。为验证理论值的正确性,采用此优化组合测得 MM 酶活性为 0.485 U/mL,与理论值相对误差为 1.27%。优化后培养条件下,几丁质酶活比优化前提高 1.14 倍左右,表明 Plackett-Burman 试验设计优化 MM 产酶培养条件是可行的。

表 7 Box-Behnken 试验设计结果

Table 7 Box-Behnken test design results

序号 No.	X ₂	X ₃	X ₄	R ₃
1	1	0	1	0.359
2	1	-1	0	0.367
3	-1	0	1	0.420
4	-1	0	-1	0.368
5	0	0	0	0.483
6	-1	-1	0	0.412
7	0	1	-1	0.359
8	1	1	0	0.414
9	1	0	-1	0.378
10	0	0	0	0.486
11	0	-1	1	0.350
12	0	-1	-1	0.363
13	-1	1	0	0.441
14	0	0	0	0.494
15	0	1	1	0.402

表 8 方差分析模型

Table 8 Analysis of variance model

来源 Source	自由度 Degree of freedom	Adj SS	Adj MS	F 值 F value	P 值 P value
模型 Model	9	0.034 371	0.003 819	87.540	0.000
线性 Linear	3	0.004 252	0.001 417	32.490	0.001
X ₂	1	0.001 868	0.001 868	42.810	0.001
X ₃	1	0.001 901	0.001 901	43.580	0.001
X ₄	1	0.000 484	0.000 484	11.090	0.021
平方 Square	3	0.028 017	0.009 339	214.070	0.000
X ₂ ×X ₂	1	0.004 067	0.004 067	93.220	0.000
X ₃ ×X ₃	1	0.007 755	0.007 755	177.760	0.000
X ₄ ×X ₄	1	0.019 737	0.019 737	452.410	0.000
双因子交互作用 Two-factors interaction	3	0.002 102	0.000 701	16.060	0.005
X ₂ ×X ₃	1	0.000 081	0.000 081	1.860	0.231
X ₂ ×X ₄	1	0.001 252	0.001 252	28.690	0.003
X ₃ ×X ₄	1	0.000 769	0.00 0769	17.640	0.008
误差 Error	5	0.000 218	0.000 044		
失拟 Lack of fit	3	0.000 159	0.000 053	1.780	0.379
纯误差 Pure error	2	0.000 059	0.000 030		
合计 Total	14	0.034 590			

2.4.3 试验验证 根据优化前后,进行试验验证,优化之前菌落直径为 34.2 mm,优化后菌落直径为 31.3 mm,抑菌率提高 6.42%。此外,优化后还观察到菌落色素分泌减少,边缘菌丝生长明显较为稀疏(图 6)。

2.4.4 菌株 MM 对西瓜种子萌发的影响 菌株 MM 发酵滤液稀释倍数为 100、150、200 倍时,对

西瓜种子的萌发有显著的促进作用,发芽率分别为 95.90%、98.53%、96.13%。在 150 倍时发芽率、株高、根长、鲜质量、干质量较对照差异最显著,且分别较对照增加 11.33%、63.38%、35.55%、87.80%、125.00%,表明菌株 MM 发酵滤液稀释 150 倍时对西瓜种子的萌发促进作用最强(表 9)。

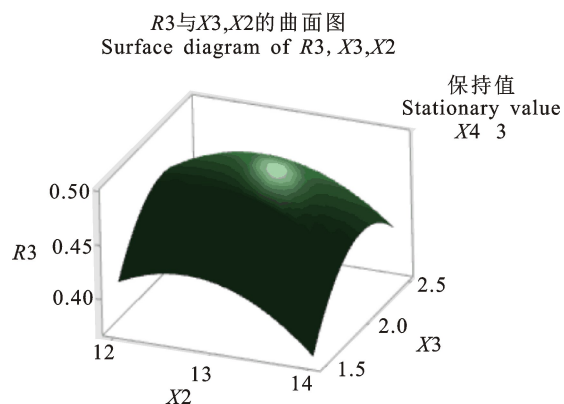


图 3 X2 和 X3 交互作用对酶活性影响的响应面
Fig. 3 Response surface of interaction
of X2 and X3 on enzyme activity

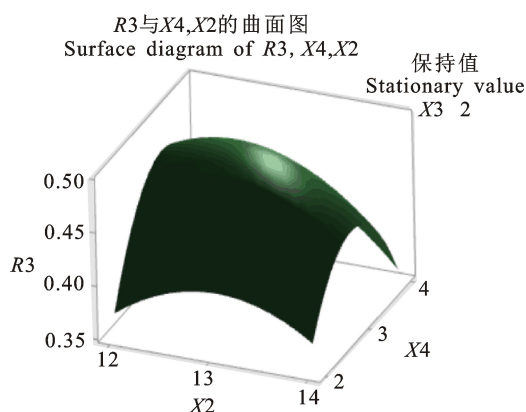


图 4 X2 和 X4 交互作用对酶活性影响的响应面
Fig. 4 Response surface of interaction
of X2 and X4 on enzyme activity

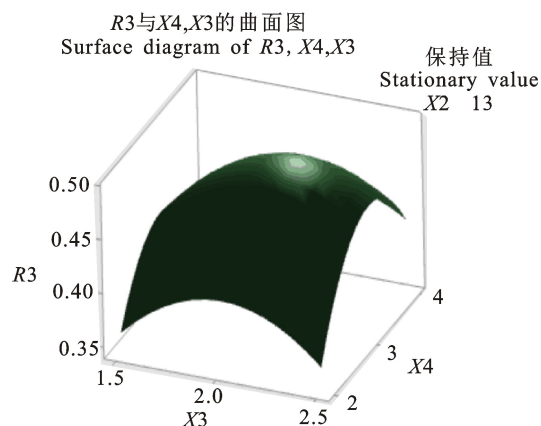
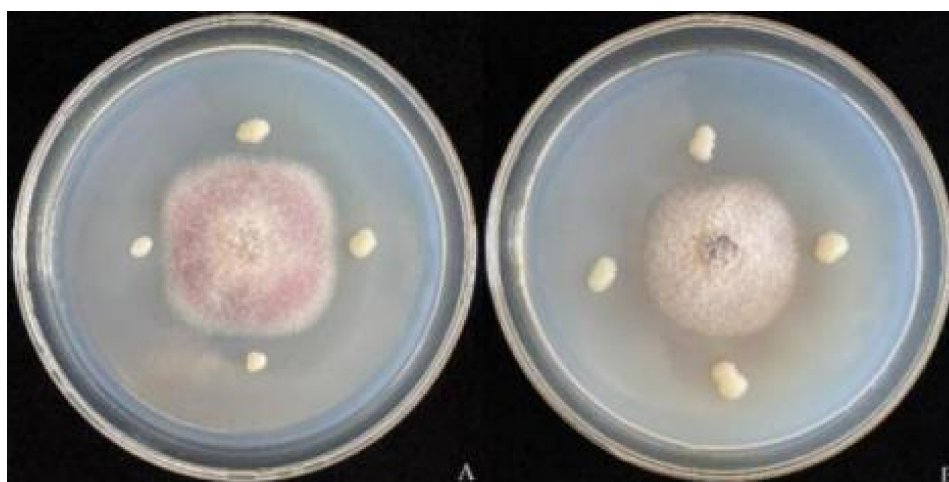


图 5 X3 和 X4 交互作用对酶活性影响的响应面
Fig. 5 Response surface of interaction
of X3 and X4 on enzyme activity

2. 4. 5 菌株 MM 对西瓜枯萎病的盆栽防治效果

西瓜植株经 FON、FON+MM、MM 处理后,与 CK 相比,西瓜植株的生长情况发生了较大变化。如表 10 和图 7 所示,经 MM 处理后较 CK 差异最显著,株高、鲜质量、干质量分别增加 78.82%、126.90%、82.00%,植株长势最好,表明菌株 MM 能很大程度促进植株生长;经 FON 处理后,植株病情指数达 93.00,植株的生长显著地受到抑制;经 FON+MM 处理后较 FON 处理的植株株高、鲜质量、干质量分别增加 56.06%、40.16%、47.62%,病情指数为 23.67,防效达 74.55%,表明菌株 MM 对西瓜枯萎病有较好的防治作用。



A. 优化前;B. 优化后

A. Before optimization; B. After optimization

图 6 菌株 MM 与西瓜枯萎病菌对峙

Fig. 6 Confrontation between strain MM and *F. oxysporum* f. sp. *niveum*

表 9 菌株 MM 对西瓜种子萌发的影响

Table 9 Effect of strain MM on watermelon seeds germination

处理浓度 Treatment concentration	发芽率/% Germination percentage	株高/cm Plant height	根长/cm Root length	鲜质量/g Fresh mass	干质量/g Dry mass
原液 Stock solution	25.17±0.31 e	2.07±0.20 f	0 g	0.18±0.01 f	0.11±0.01 a
10×	74.87±0.58 d	6.10±0.20 e	4.13±0.21 f	0.36±0.01 e	0.03±0.00 d
50×	88.57±0.70 c	7.90±0.10 d	5.43±0.25 e	0.39±0.01 d	0.05±0.00 cd
100×	95.90±0.10 b	11.67±0.41 b	7.03±0.15 c	0.61±0.02 b	0.06±0.00 c
150×	98.53±0.42 a	15.57±0.32 a	8.77±0.25 a	0.77±0.01 a	0.09±0.01 b
200×	96.13±0.35 b	11.67±0.57 b	7.47±0.30 b	0.53±0.01 c	0.06±0.00 c
CK	88.50±0.70 c	9.53±0.35 c	6.47±0.25 d	0.41±0.01 d	0.04±0.00 d

注:数据为“平均数±标准误”;同列不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平差异显著。下同。
Note: Data in the table are “mean±SE”;different lowercase letters within the same columns indicate significant differences at $P<0.05$ level. The same below.

表 10 西瓜植株生物量及菌株 MM 对枯萎病的防效

Table 10 Watermelon plants biomass and control effect

处理 Treatment	株高/cm Plant height	鲜质量/g Fresh mass	干质量/g Dry mass	病情指数 Disease index	相对防效/% Average control effect
FON	19.71±0.60 d	3.76±0.19 c	1.89±0.08 d	93.00±5.20 a	—
FON+MM	30.76±0.65 b	5.27±0.15 b	2.79±0.04 b	23.67±4.73 b	74.55
MM	50.68±0.74 a	12.82±0.49 a	4.55±0.26 a	0 c	—
CK	28.34±1.10 c	5.65±0.35 b	2.50±0.11 c	0 c	—

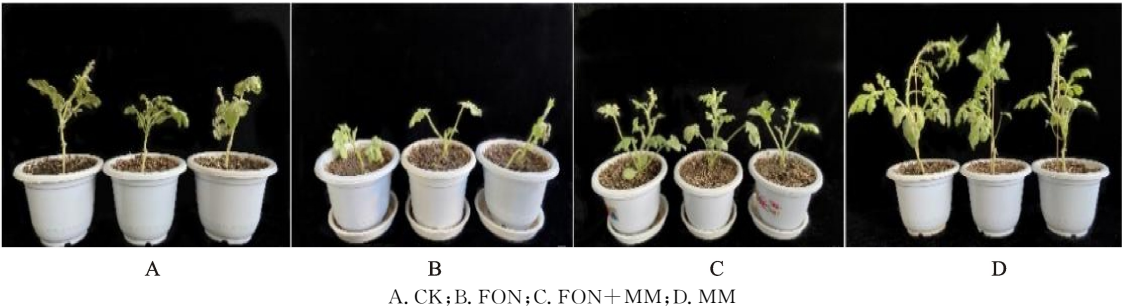


图 7 菌株 MM 对西瓜枯萎病的盆栽防治效果

Fig. 7 Pot control effect of strain MM on *Fusarium* wilt of watermelon

2.4.6 菌株 MM 对西瓜植株叶绿素含量的影响

与对照 CK 相比,FON 处理的西瓜植株叶绿素 a、叶绿素 b 和叶绿素总含量均降低,FON 处理后再经 MM 处理能增强叶绿素 a、叶绿素 b 和叶绿素总含量,MM 处理后,西瓜植株叶绿素 a、叶绿素 b 和叶绿素总含量分别达到 23.543、19.255 和 42.807 mg/g,分别较对照组提高 1.15、1.73 和 1.36 倍。表明菌株 MM 能够较好地抑制 FON 对西瓜植株叶绿素的影响(图 8)。

3 讨论

20 世纪 80 年代,已经有沙雷氏菌(*Serratia* spp.)防治植物病害研究的报道。沙雷氏菌抗植

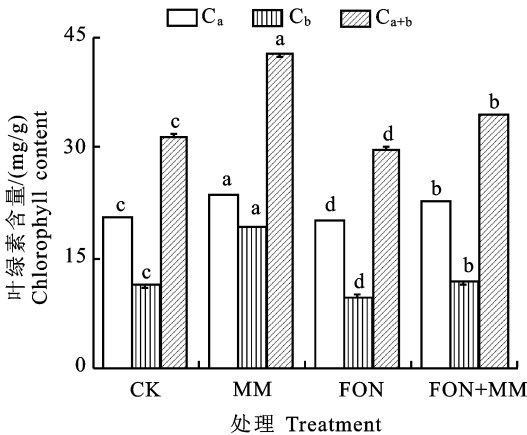


图 8 菌株 MM 处理后西瓜植株叶绿素含量
Fig. 8 Chlorophyll content of watermelon plant under strain MM treatment

物真菌作用机理在于分泌抗菌次生代谢物质硝吡咯菌素^[18]、几丁质酶^[19]、挥发性化合物^[20]等。许多研究通过优化生防菌株的培养基和培养条件提高次生代谢物产量,从而有效提高菌株的生防效果^[21]。Patidar 等^[22]认为,通过提高几丁质酶活可提高白僵菌的抗真菌杀虫活性。基于上述研究结果,本研究开展菌株 MM 的产几丁质酶条件优化及菌株 MM 对西瓜枯萎病的防治效果评价。

培养条件优化在工业生产中是重要的基础条件,培养基组分又是影响微生物发酵的重要因素之一^[23]。袁淑博等^[7]在对沙雷氏菌 MEW06 产酶条件优化中,筛选出的最佳碳源和氮源分别为可溶性淀粉和蛋白胨,使几丁质酶活较优化前提高 2.58 倍。沙雷氏菌培养条件要求较低,培养基组分简单,对碳、氮源、无机盐等利用比较广泛,单糖、双糖、多糖、醇类均可利用,但利用效果有所不同^[24]。本研究通过响应面法优化筛选出葡萄糖 12.748 g/L、牛肉膏 2.086 g/L 可作为普城沙雷氏菌 MM 产几丁质酶的最优碳氮源。这与于平等^[25]的报道相一致。

几丁质酶因具有广谱抗细菌和真菌特性,主要应用于医疗、制药和食品防腐领域,近年来在废水处理和生物肥料行业也广泛应用^[26]。Patidar 等^[22]优化了白僵菌 RD-101 产几丁质酶的发酵条件,为工业化生产几丁质酶提供潜在候选菌株。RSM 在生物学中的应用相当广泛,主要用于研究反应混合物中各成分所占比例与其生物学活性之间的关系^[27]。王晓辉等^[28]为提高假交替单胞菌产几丁质酶活,采用 RSM 优化产几丁质酶培养基,酶活提高 23.77%。赵祥杰等^[29]利用单因素和 RSM 对单胞菌 G-254 产几丁质酶发酵条件优化后,酶活达 6.86 U/mL,提高了抗菌活性。本研究对菌株 MM 优化后产几丁质酶活达 0.485 U/mL,几丁质酶活性提高 1.14 倍,抑菌率提高 6.42%。大量研究证实生防菌具有防病和促进作物生长双重功能,普城沙雷氏菌也具有防病和促生长作用。申顺善等^[30]研究表明,普城沙雷氏菌 A21-4 使叶绿素含量和根活力分别提高 86.1%、481.8%,在辣椒成株期显著提高了株高、茎粗等生育指标。杨淑君等^[31]研究表明,普城沙雷氏菌 Z10 对马铃薯晚疫病和当归麻口病有很好的防治效果,使作物分别增产 16.63%、14.35%。研究表明,菌株 MM 能促进种子萌发,提高植株株高、鲜质量和干质量,并且对西瓜枯萎病有较理想

的防治效果,防效高达 74.55%。因此,有必要对普城沙雷氏菌 MM 的其他生物防治机理开展深入探究,为普城沙雷氏菌 MM 在农作物生物防治上的更广泛应用提供理论基础。

参考文献 Reference:

- [1] TERESA W, ANDREA T, SILJA B, *et al.* VOC emission of various *Serratia* species and isolates and genome analysis of *Serratia plymuthica* 4Rx13 [J]. *Fems Microbiology Letters*, 2014(1):45-53.
- [2] 白腾飞, 刘月芹. 沙雷氏菌抗性次级代谢产物合成机制 [J]. 微生物学杂志, 2017, 37(4):115-119.
BAI T F, LIU Y Q. A survey of synthesis mechanism of antibiotic secondary metabolites by *Serratia* spp. [J]. *Journal of Microbiology*, 2017, 37(4):115-119.
- [3] SARASWOTI, NEUPANE, ROGER, *et al.* Transcriptional responses of the bacterial antagonist *Serratia plymuthica* to the fungal phytopathogen *Rhizoctonia solani* [J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2015, 7(1):123-127.
- [4] 周玉玲, 蒋思婧, 贺妮莎, 等. 微生物几丁质酶研究进展及其在 N-乙酰氨基葡萄糖制备中的应用 [J]. 微生物学报, 2021, 61(8):2192-2204.
ZHOU Y L, JIANG S J, HE N S H, *et al.* Research progress of microbial chitinase and its application in the preparation of N-acetylglucosamine [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(8):2192-2204.
- [5] 龚福明, 何彩梅, 唐小艳, 等. 微生物几丁质酶的研究进展及应用现状 [J]. 中国酿造, 2017, 36(8):20-25.
GONG F M, HE C M, TANG X Y, *et al.* Research progress and application status of microbial chitinase [J]. *China Brewing*, 2017, 36(8):20-25.
- [6] 刘力睿, 潘杰, 李猛. 微生物几丁质酶的研究进展、应用及展望 [J]. 生物资源, 2020, 42(5):494-504.
LIU L R, PAN J, LI M. Recent research progress, application and future perspectives on microbial chitinases [J]. *Biotic Resources*, 2020, 42(5):494-504.
- [7] 袁淑博, 陈晓通, 余梦林, 等. MEW06 产几丁质酶响应面发酵条件优化研究 [J]. 绿色科技, 2018(12):156-160.
YUAN S H, CHEN X T, SHE M L, *et al.* Study on optimization of fermentation conditions for MEW06 chitinase production by response surface [J]. *Journal of Green Science and Technology*, 2018(12):156-160.
- [8] PRAMESTI E, PUSPITA I D. Optimization of colloidal chitin and inoculum concentration in chitinase production by *Streptomyces* sp. PB2 using response surface methodology [J]. *E3S Web of Conferences*, 2020, 147:03011.
- [9] ROOHI, KUDDUS M. Statistical optimization of cold-active chitinase production by mutagenized cells of multi-enzyme producing *Bacillus cereus* GA6 [J]. *Rendiconti Lincei*, 2015, 26(3):271-280.
- [10] RACHMAWATY, HALIFAH P, HARTATI, *et al.* Optimization of chitinase production by *Trichoderma virens* in solid state fermentation using response surface methodology [J]. *Materials Science Forum*, 2019, 967:132-142.
- [11] DZAKIYYA N U, PUSPITA I D, PUDJIRAHARTI S. Chitinase activity of *Serratia marcescens* PT-6 cultured in

- bioreactor with various aeration rate[J]. *E3S Web of Conferences*, 2020, 147(4): 03010.
- [12] 张宇, 贺丹, 周鑫, 等. 产几丁质酶真菌菌株的筛选及产酶抑菌活性的检测[J]. 吉林大学学报(医学版), 2010, 36(1): 67-70.
- ZHANG Y, HE D, ZHOU X, *et al.* Screening of fungal chitinase-producing strains and determination of enzymatic activity[J]. *Journal of Jilin University (Medicine Edition)*, 2010, 36(1): 67-70.
- [13] 陈明, 孙昌魁, 程剑锋, 等. 黏质沙雷氏菌 L15-2 几丁质酶的分离纯化与性质研究[J]. 生物加工过程, 2006, 4(2): 15-19.
- CHEN M, SUN CH K, CHENG J F, *et al.* Research on isolation and purification of chitinase produced by bacterium L15-2 and its properties[J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2006, 4(2): 15-19.
- [14] 时杰, 杨勋, 刘平怀. 高产几丁质降解酶菌株的分离鉴定及其酶学性质研究[J]. 广东农业科学, 2012, 39(23): 190-194.
- SHI J, YANG X, LIU P H. Isolation and identification of chitin-degrading bacterium and the properties of its chitinases [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2012, 39(23): 190-194.
- [15] 陶刚, 刘杏忠, 王革, 等. 产几丁质酶木霉生防菌株的生化测定[J]. 西南农业学报, 2005, 18(4): 452-455.
- TAO G, LIU X ZH, WANG G, *et al.* Determination of biocontrol strain THS-1 of *Trichoderma harzianum* producing chitinase by biochemical methods [J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2005, 18(4): 452-455.
- [16] 刘蒲临, 程德勇, 缪礼鸿. 产几丁质酶侧孢短芽孢杆菌的筛选及其酶学性质研究[J]. 生物技术通报, 2016, 32(6): 174-180.
- LIU P L, CHENG D Y, MIAO L H. Isolation of a chitinase-producing strain *Brevibacillus laterosporus* and its enzymatic properties [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32(6): 174-180.
- [17] 王亚娇, 栗秋生, 纪莉景, 等. 一株西瓜枯萎病生防菌的鉴定与田间防效[J]. 微生物学通报, 2021, 48(6): 1976-1984.
- WANG Y J, LI Q SH, JI L J, *et al.* Identification and field control effect of an antagonistic bacterium against watermelon *Fusarium* wilt [J]. *Microbiology China*, 2021, 48(6): 1976-1984.
- [18] KAMENSKY M, OVADIS M, CHET I, *et al.* Soil-borne strain IC14 of *Serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* diseases[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2003, 35(2): 323-331.
- [19] REBECCA J. Isolation and screening of chitinase producing *Serratia marcescens* [J]. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2013, 5(2): 192-195.
- [20] SCHMIDT R, JAGER V D, ZUHLKE D, *et al.* Fungal volatile compounds induce production of the secondary metabolite sorodifen in *Serratia plymuthica* PRI-2C[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 1-14.
- [21] APRIDIANA I, AISYAH S N, OKTAVIONI M, *et al.* The culture medium optimization of *Serratia plymuthica* UBCF_13 to produce antifungal compounds[J]. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2021, 741(1): 012062.
- [22] PATIDAR P, AGRAWA D, BANERJEE T, *et al.* Chitinase production by *Beauveria felina* RD 101; Optimization of parameters under solid substrate fermentation conditions[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2005, 21(1): 93-95.
- [23] 满永博, 范季瀛, 苏刚, 等. 培养条件及培养基组分对粘质沙雷氏菌生长及产 D-乳酸的影响[J]. 化学与生物工程, 2013, 30(7): 56-60.
- MAN Y B, FAN J Y, SU G, *et al.* Effects of culture conditions and medium components on the growth and yielding D-Lactic acid of *Serratia marcescens* [J]. *Chemistry & Bioengineering*, 2013, 30(7): 56-60.
- [24] 刘思航, 邹宜均, 常菲菲, 等. 一株高产灵菌红素粘质沙雷氏菌的分离鉴定及发酵条件优化[J]. 应用与环境生物学报, 2018, 24(1): 26-32.
- LIU S H, ZOU Y J, CHANG F F, *et al.* Isolation and identification of *Serratia marcescens* producing high levels of prodigiosin and its fermentation optimization [J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2018, 24(1): 26-32.
- [25] 于平, 励建荣. 绿色木霉 HZ012 发酵生产几丁质酶的研究[J]. 中国食品学报, 2006, 6(3): 26-30.
- YU P, LI J R. Studies on the production of chitinase by fermentation using *Trichoderma viride* HZ012 [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2006, 6(3): 26-30.
- [26] BEYGMORADI A, HOMAEI A, HEMMATI R, *et al.* Identification of a novel tailor-made chitinase from white shrimp *Fenneropenaeus merguensis* [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2021, 203: 111747.
- [27] 王永菲, 王成国. 响应面法的理论与应用[J]. 中央民族大学学报(自然科学版), 2005, 14(3): 236-240.
- WANG Y F, WANG CH G. The application of response surface methodology [J]. *Journal of Minzu University of China (Natural Sciences Edition)*, 2005, 14(3): 236-240.
- [28] 王晓辉, 岳敏. 交替假单胞菌产几丁质酶的响应面优化[J]. 食品工业科技, 2014, 35(12): 312-315, 329.
- WANG X H, YUE M. Optimization of fermentation conditions for chitinase production by the *Pseudoalteromonas* sp. DL-6 using the response surface methodology [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 35(12): 312-315, 329.
- [29] 赵祥杰, 邝哲师, 叶明强, 等. 蚕蛹壳几丁质降解菌的分离筛选及其产酶条件优化[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(5): 2807-2809, 2812.
- ZHAO X J, KUANG ZH SH, YE M Q, *et al.* Isolation and screening of silkworm puparium chitin degradation strains and the optimization of chitinase produce conditions [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39(5): 2807-2809, 2812.
- [30] 申顺善, 常淑娴, 朱宏业, 等. 普城沙雷菌 A21-4 根际定殖能力及其对辣椒生长和诱导抗病性的影响[J]. 植物病理学报, 2013, 43(6): 636-642.

SHEN SH SH, CHANG SH X, ZHU H Y, *et al.* Growth promoting and root colonization ability of *Serratia plymuthica* A21-4 and its effect on induced resistance in pepper against phytophthora blight[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2013, 43(6): 636-642.

[31] 杨淑君, 陈秀蓉. 普城沙雷氏菌 Z10 发酵工艺参数的研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2010, 45(5): 100-103.
YANG SH J, CHEN X R. Studies on fermentation technical parameters of *Serratia plymuthica* Z10[J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2010, 45(5): 100-103.

Optimization of Enzyme Production Conditions of *Serratia plymuthica* MM and Its Control Effect on Watermelon *Fusarium* Wilt

MA Jinxiu, ZHANG Jinfeng, WANG Jianglai, LI Jiajia,
LI Zhaoyu, LIU Lu and TIAN Yongqiang

(School of Biological and Pharmaceutical Engineering, Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou 730070, China)

Abstract In order to improve the chitinase production of *Serratia plymuthica* MM and enhance the ability to antagonize *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, the medium composition was optimized by Plackett Burman design and response surface methodology, and the effect of the optimized fermentation filtrate of strain MM on watermelon seeds germination and control of the watermelon *Fusarium* wilt were determined. The results showed that the best enzyme producing medium was glucose 12.748 g/L, beef extract 2.086 g/L and yeast powder 3.091 g/L on the basis of initial pH 7.0, inoculation amount 3%, temperature 30 °C, shaking speed 180 r/min and fermentation time 72 h; the chitinase activity of the optimized strain MM was 0.485 U/mL, which was about 1.14 times higher than that before optimization, and the inhibition rate was increased by 6.42%. Different dilution times of the fermentation filtrate of strain MM could promote the germination of watermelon seeds, the most significant improvement reached to 98.53% when the dilution concentration of MM fermentation filtrate was 150 times; the pot experiment showed that the plant height, fresh mass and dry mass of watermelon plants treated with strain MM fermentation filtrate increased by 78.82%, 126.90% and 82.00%, respectively, the control effect on watermelon *Fusarium* wilt was 74.55%; this study provides a theoretical basis for the production and application of chitinase of strain MM and the control of watermelon *Fusarium* wilt.

Key words *Serratia plymuthica*; Chitinase; Response surface optimization; Control of watermelon *Fusarium* wilt

Received 2021-09-23

Returned 2021-10-26

Foundation item The National Natural Science Foundation of China (No. 21967015); the Key Research and Development Program of Gansu Province (No. 20YF3FA038); Key Research and Development Plan of Jiayuguan City (No. 21-19).

First author MA Jinxiu, female, master student. Research area: biological control. E-mail: 781351389@qq.com

Corresponding author TIAN Yongqiang, male, Ph D, professor. Research area: microbial engineering. E-mail: tianyq@mail.lzjtu.cn

(责任编辑: 郭柏寿 Responsible editor: GUO Baishou)