网络出版时间:2025-12-05 DOI:10.13207/j.jnwafu.2026.06.008

贝莱斯芽孢杆菌N4菌株摇瓶发酵条件的响应面法优化

董迎雪[1],李治彤[1],邱莉童[1],高歌农[2],杨丽娜[1],卢宝慧[1],王雪[1],高洁[1]
(1 吉林农业大学 植物保护学院,吉林 长春 130118;2 中国烟草总公司 吉林省公司,吉林 长春 130033)

[摘 要] 【目的】优化对烟草根腐病菌(*Fusarium tobaccum*)LH156101具有明显抑制作用的生防细菌贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)N4发酵培养基配方和环境条件,为更好地将该菌株应用于烟草根腐病的防治提供参考。【方法】采用单因素试验和响应面试验,分析不同发酵培养基配方(碳源、氮源和无机盐)以及环境条件(温度、初始pH、转速、接种量、装液量和发酵时间)下,贝莱斯芽孢杆菌N4菌体生物量的变化以及其对烟草根腐病菌LH156101的抑菌活性,确定贝莱斯芽孢杆菌N4液体发酵的最佳培养基配方和环境条件。【结果】在不同发酵培养基组分和环境条件下,贝莱斯芽孢杆菌N4菌体生物量及其对烟草根腐病菌LH156101的抑菌活性均受到明显影响。确定贝莱斯芽孢杆菌N4发酵培养基中的最优碳源、氮源和无机盐分别为酵母提取物、大豆蛋白胨和NaCl,其最佳质量浓度分别为20,15和3.0 g/L;最适环境条件为:初始pH 6.0,装液量60 mL,种子液接种量1%,培养温度30 ℃,转速180 r/min,培养时间24 h。在最优发酵培养基配方和环境条件下,贝莱斯芽孢杆菌N4发酵液中菌体数量达到2.39×10^{10} CFU/mL,相比优化前菌体生物量提高了13.66倍,抑菌活性为78.60%。【结论】明确了贝莱斯芽孢杆菌N4菌株的最佳发酵培养基配方和环境条件,为该菌株的开发利用及烟草根腐病的科学防控提供了技术支持。

[关键词] 贝莱斯芽孢杆菌;发酵条件;烟草根腐病;响应面法
[中图分类号] S435.72 [文献标志码] A [文章编号] 1671-9387(2026)06-0072-12

Optimization of fermentation conditions of *Bacillus velezensis* N4 strain by Box-Behnken

DONG Yingxue[1], LI Zhitong[1], QIU Litong[1], GAO Genong[2], YANG Lina[1], LU Baohui[1], WANG Xue[1], GAO Jie[1]
(1 *College of Plant Protection, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin* 130118, *China*; 2 *Jilin Tobacco company, China National Tobacco Corporation, Changchun, Jilin* 130033, *China*)

Abstract: 【Objective】 This research aims to optimize the fermentation medium formulations and shake-flask fermentation conditions of the biocontrol bacterium *Bacillus velezensis* N4, which exhibits significant inhibitory activity against *Fusarium tobaccum* LH156101, to provide a reference for the application of *B. velezensis* N4 in controlling *Fusarium wilt* disease of tobacco. 【Method】 Single-factor experiments and Box-Behnken design were carried out to analyze the effects of different fermentation medium formulations (carbon sources, nitrogen sources and inorganic salts) and environmental conditions (temperature, initial pH, rotationl speed, inoculation volume, liquid volume and fermentation time) on the bacterial biomass of *B. velezensis* N4 and N4 strain inhibitory activity against *F. tobaccum* LH156101, to determine the optimal liquid fermentation medium formulations

[收稿日期] 2025-03-28 [修回日期] 2025-07-10
[基金项目] 吉林省烟草绿色防控重大专项(2022220000200135)
[作者简介] 董迎雪(1999—),女,河北保定人,在读硕士,主要从事烟草病害绿色防控研究。E-mail:Yingxue9925@163.com
[通信作者] 王雪(1981—),女,辽宁沈阳人,副教授,硕士生导师,主要从事植物病害生物防治研究。E-mail:wangxue813@126.com
高洁(1964—),女,吉林梨树人,教授,博士生导师,主要从事植物病害综合治理研究。E-mail:jiegao115@126.com

and environmental conditions for the *B. velezensis* N4.【Result】The fermentation medium components and environmental conditions significantly affected the bacterial biomass accumulation of *B. velezensis* N4 and N4 strain inhibitory activity against *F. tobaccum*. The optimal carbon source, nitrogen source, and inorganic salt in the fermentation medium were yeast extract (optimal concentration 20 g/L), soybean peptone (15 g/L) and NaCl (3.0 g/L). The optimal shake-flask fermentation conditions were as follows: initial pH of 6.0, liquid volume of 60 mL, inoculum amount of 1%, fermentation temperature of 30 ℃, rotationl speed of 180 r/min, and fermentation time of 24 h. Under the above-mentioned conditions, bacteria cell biomass reached 2.39×10^{10} CFU/mL, representing a 13.66 times increase in bacterial biomass compared with that before optimization, with an inhibitory activity rate of 78.60%.【Conclusion】The optimal fermentation medium formulations and shake-flask fermentation conditions for *Bacillus velezensis* N4 were established. This study provides technical support for the development and utilization of *B. velezensis* N4 and offers a scientific basis for the effective control of *Fusarium wilt* disease of tobacco.

Key words: *Bacillus velezensis*; fermentation conditions; tobacco wilt disease; Box-Behnken

烟草是我国重要的经济作物，在国民经济中占有重要地位，烟草行业更是我国税收的重要来源之一[1]。近年来随着连作烟田增多，导致烟草根部病害发生日趋严重，其中由镰孢菌(*Fusarium* spp.)引起的根腐病是烟草生产中的一种重要根部病害，在我国多地烟草种植区均有不同程度的发生[2]，感染植株地上部烟叶变黄、根及根茎基部皮层腐烂变黑，发病植株基本失去烘烤价值，给烟叶生产造成了严重的经济损失[3]。目前对于烟草根腐病的防治主要采取应用抗病品种、生物防治和化学防治等手段。应用抗病品种和轮作等农业防治措施虽然在一定程度上可以控制病害的发生，但历时久且周期长[4]；而长期大量使用化学农药又极易造成烟草农药残留过高的风险，且病原菌在产生抗药性的同时又破坏了土壤微生态环境，加重了对环境的污染[5]。生物防治因其环境友好和无残留等优点已成为当前国内外防治植物土传病害的研究热点，具有广阔的应用前景[6-9]。目前我国正式登记用于烟草根腐病防治的生物药剂仅有福美双一种，药剂种类少且防治效果不理想，生产上亟需开发新的生物菌剂。

贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)N4是本课题组分离自烟草根茎部的一株对烟草根腐病菌具有高效拮抗活性的生防细菌，经前期筛选试验发现其与化学杀菌剂丙环唑联合应用对烟草尖镰孢菌具有显著的抑制作用，且田间也表现出较好的防治效果。为了更好地开发利用该菌株，加速菌株的产业化进程，本研究将单因素试验与响应面试验结合，以菌体生物量和对烟草根腐病菌(*F. tobaccum*)抑菌活性为响应值，对贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*)N4发酵培养基配方和摇瓶发酵条件进行了优化，以期为烟草根腐病新型防治药剂的开发提供技术支持。

1　材料与方法

1.1　供试材料

1.1.1　供试菌株　贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*)N4，由吉林农业大学药用植物有害生物绿色防控实验室自主分离鉴定，并保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC No. 32040)；烟草根腐病菌(*F. tobaccum*)LH156101，由吉林农业大学药用植物有害生物绿色防控实验室分离鉴定并保存，已于2024年正式发表于《Microbiology Spectrum》[10]。

1.1.2　供试培养基　LB(Luria-Bertani)固体培养基：蛋白胨10 g，酵母粉5 g，NaCl 10 g，琼脂15 g，蒸馏水1 000 mL；LB(Luria-Bertani)液体培养基：蛋白胨10 g，酵母粉5 g，NaCl 10 g，蒸馏水1 000 mL；马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基：马铃薯200 g，葡萄糖20 g，琼脂18 g，蒸馏水1 000 mL；基础液体发酵培养基：葡萄糖10 g，蛋白胨10 g，磷酸氢二钾2 g，七水合硫酸镁2 g，蒸馏水1 000 mL。

1.2　试验方法

1.2.1　种子液制备及生长曲线的测定　将贝莱斯芽孢杆菌N4在LB固体培养基上活化后，挑取单菌落接种至100 mL LB液体培养基中，于28 ℃、180 r/min振荡培养24 h，制得种子液。将种子液以2%接种量(体积分数，下同)接种至LB液体培养基中，在上述培养条件下振荡培养，每隔1 h取样1次，采用比浊法测定菌液600 nm波长处的吸光值(OD_{600}，以其表征贝莱斯芽孢杆菌N4的生物量)，直到OD_{600}达到峰值趋于平稳后停止取样，以培养时间为

横坐标、OD_{600}为纵坐标,根据不同培养时间下菌株生物量的变化绘制菌株生长曲线。

1.2.2 贝莱斯芽孢杆菌N4发酵培养基组分优化的单因素试验 采用单因素试验对贝莱斯芽孢杆菌N4发酵培养基组分进行优化。(1)最适碳源及其质量浓度筛选。以2%接种量将种子液分别接入含不同碳源(葡萄糖、可溶性淀粉、乳糖、玉米淀粉、麦芽糖、山梨醇、果糖、酵母提取物)的基础液体发酵培养基中,确定最适碳源种类;在此基础上,调整最适碳源质量浓度,使其终质量浓度分别为0,10,15,20,25和30 g/L,确定最适碳源的质量浓度。(2)最适氮源及其质量浓度筛选。以2%接种量将种子液分别接入含不同氮源(蛋白胨、胰蛋白胨、大豆蛋白胨、酵母提取物、麦芽浸粉、尿素、大豆粉、KNO_3、NH_4Cl、酵母膏)的基础液体发酵培养基中,确定最适氮源种类;在此基础上,调整最适氮源质量浓度,使其终质量浓度分别为0,10,15,20,25和30 g/L,确定最适氮源的质量浓度。(3)最适无机盐及其质量浓度筛选。以2%接种量将种子液分别接入含不同无机盐($ZnSO_4$、NaCl、$MgSO_4$、K_2HPO_4、$FeSO_4$、$MnSO_4$、Na_2HPO_4)的基础液体发酵培养基中,确定最适无机盐种类;在此基础上,调整最适无机盐质量浓度,使其在基础液体发酵培养基中的终质量浓度分别为0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0和3.5 g/L,确定最适无机盐的质量浓度。以上单因素试验中250 mL锥形瓶的装液量为100 mL,于28 ℃、180 r/min振荡培养24 h,测定菌液OD_{600},以其表征贝莱斯芽孢杆菌N4生物量。通过平板对峙试验测量抑菌圈直径,以其表征贝莱斯芽孢杆菌N4菌株对烟草根腐病菌LH156101的抑菌活性,具体测定方法为:在PDA培养基中央放置病原真菌烟草根腐病菌LH156101菌饼,在两侧打孔,每孔中加入10 μL贝莱斯芽孢杆菌N4菌株菌液,并设置空白对照组(无菌水),25 ℃培养5~7 d后观察记录对照组和处理组菌落直径(mm),计算抑菌圈直径:抑菌圈直径=对照组菌落直径-处理组菌落直径。以贝莱斯芽孢杆菌N4菌体生物量以及其对烟草根腐病菌LH156101的抑菌活性作为评价标准,确定最适碳氮源和无机盐种类及其质量浓度。

1.2.3 贝莱斯芽孢杆菌N4发酵培养基组分优化的响应面试验 在单因素试验的基础上,依据Box-Behnken试验设计原理[11],选择酵母提取物质量浓度(A)、大豆蛋白胨质量浓度(B)和NaCl质量浓度(C)3个因素为考察因素,以贝莱斯芽孢杆菌N4的生物量(OD_{600})以及其对烟草根腐病菌LH156101的抑菌圈直径为响应值,采用软件Design Expert 13.0设计3因素3水平的Box-Behnken中心组合试验,试验因素与水平见表1。

表1 贝莱斯芽孢杆菌N4培养基组分优化的Box-Behnken试验的因素与水平

Table 1 Experimental factors and levels for Box-Behnken design in medium component optimization of *Bacillus velezensis* N4

编号 No	因素 Factor	水平 Level		
		−1	0	1
A	酵母提取物质量浓度/(g·L^{-1}) Yeast extract concentration	15	20	25
B	大豆蛋白胨质量浓度/(g·L^{-1}) Soy peptone concentration	10	15	20
C	NaCl质量浓度/(g·L^{-1}) NaCl concentration	2.5	3.0	3.5

1.2.4 贝莱斯芽孢杆菌N4发酵环境条件优化的单因素试验 采用单因素试验,分别考察发酵初始pH(5.2,6.2,7.2,8.2和9.2)、转速(150,180,210和240 r/min)、接种量(1%,2%,3%,4%,5%和6%)、装液量(50,75,100,125和150 mL,以上均是在250 mL锥形瓶中添加的体积,下同)和温度(24,26,28,30和32 ℃)、发酵时间(18,24,30,36,42和48 h)对贝莱斯芽孢杆菌N4菌体生物量以及其对烟草根腐病菌LH156101抑菌圈直径的影响,确定最适发酵环境条件。

1.2.5 贝莱斯芽孢杆菌N4发酵环境条件优化的响应面试验 在1.2.4单因素试验结果的基础上,选择初始pH(A)、转速(B)、温度(C)、接种量(D)、装瓶量(E)和培养时间(F)6个因素,采用Design-Expert 13.0软件进行试验设计与分析,Plackett-Burman试验的因素与水平设计见表2,以菌体生物量为响应值进行Plackett-Burman主效应分析,以确定对贝莱斯芽孢杆菌N4菌体生物量影响显著的因素。依据Box-Behnken试验设计原理,基于Plackett-Burman试验分析结果最终确定pH(A)、接种量(B)和装瓶量(C)3个因素为关键参数,以菌体生物量为响应值,采用软件Design-Expert 13.0设计3因素3水平的Box-Behnken中心组合试验,试验因素与水平见表3,以进一步优化贝莱斯芽孢杆菌N4菌株发酵的环境条件。

表 2　贝莱斯芽孢杆菌 N4 发酵环境条件优化的 Plackett-Burman 试验因素与水平

Table 2　Experimental factors and levels for Plackett-Burman design for fermentation condition optimization of *Bacillus velezensis* N4

编号 No	因素 Factor	水平 Level	
		−1	1
A	pH	5.2	6.2
B	转速/(r·min^{-1})Rotational speed	180	210
C	温度/℃ Temperature	28	30
D	接种量/% Inoculation	1	2
E	装液量/mL Liquid volume	50	100
F	时间/h Time	24	30

表 3　贝莱斯芽孢杆菌 N4 发酵环境条件优化的 Box-Behnken 试验因素与水平

Table 3　Experimental factors and levels for Box-Behnken design in fermentation condition optimization of *Bacillus velezensis* N4

编号 No	因素 Factor	水平 Level		
		−1	0	1
A	pH	5.2	6.2	7.2
D	接种量/% Inoculation	0.5	1.0	1.5
E	装液量/mL Liquid volume	50	75	100

2　结果与分析

2.1　贝莱斯芽孢杆菌 N4 生长曲线

培养过程中发现，贝莱斯芽孢杆菌 N4 在培养前 3 h 菌体生长十分缓慢，3 h 后菌体快速生长进入对数生长期，在接种后 14 h 菌体生物量达到最大值，之后菌体生长趋于平稳（图 1）。故将接种 14 h 时的菌液作为种子液。

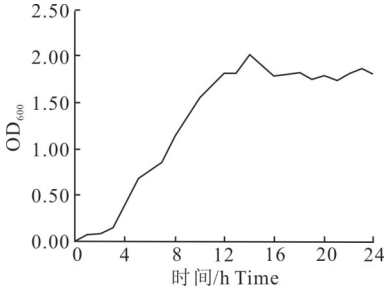
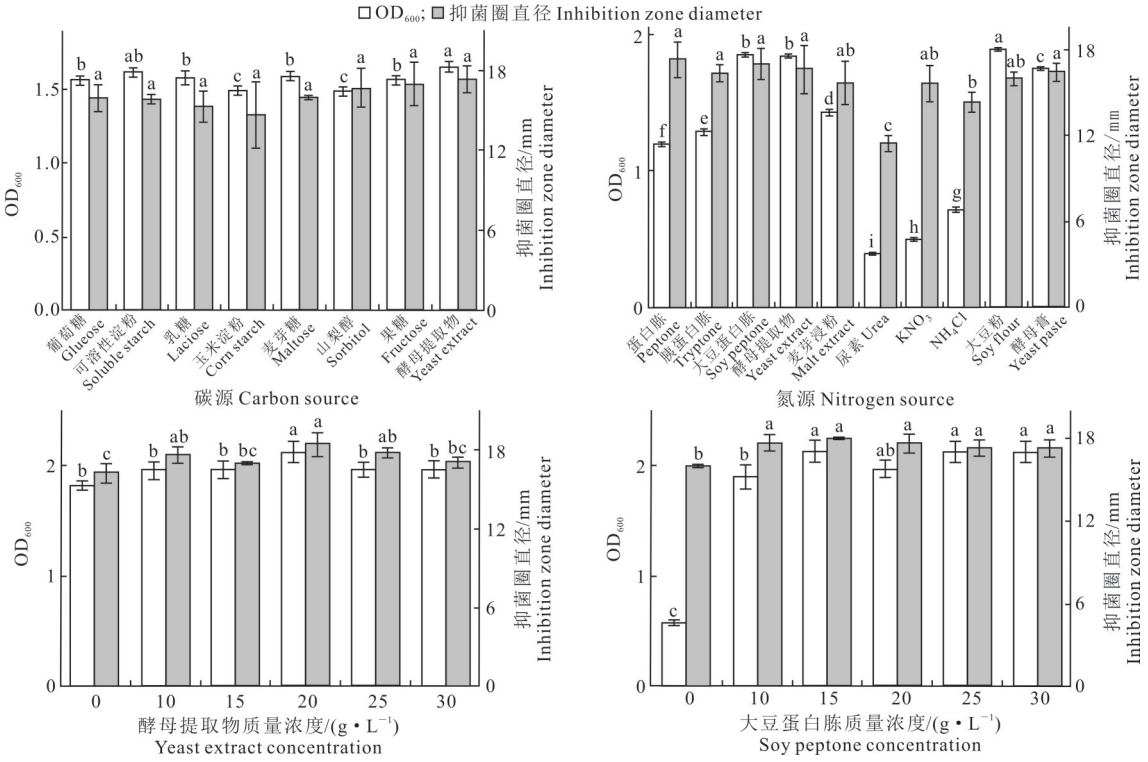


图 1　贝莱斯芽孢杆菌 N4 的生长曲线

Fig. 1　Growth curve of *Bacillus velezensis* N4

2.2　贝莱斯芽孢杆菌 N4 发酵培养基组分优化

2.2.1　单因素试验结果　碳源、氮源和无机盐对贝莱斯芽孢杆菌 N4 菌体生物量和抑菌活性的影响见图 2。

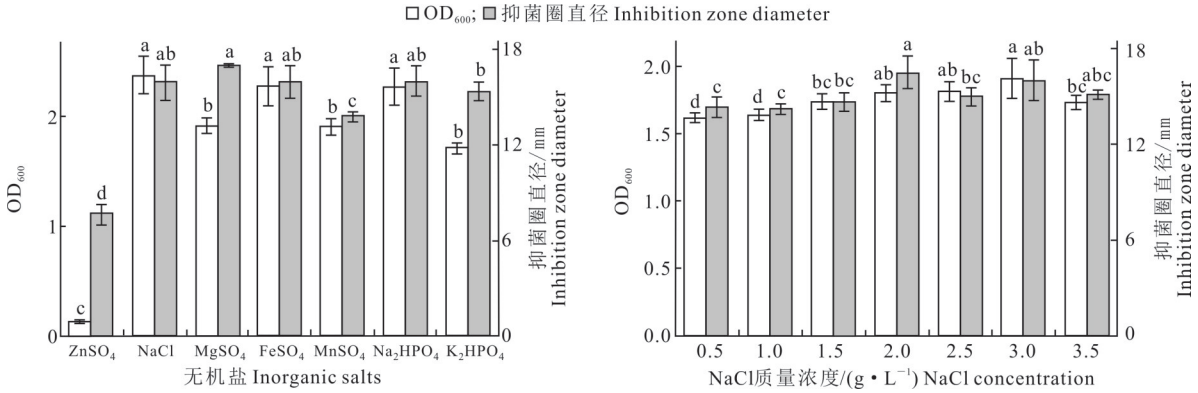


图柱上标不同小写字母表示不同处理间差异显著（$P<0.05$）。下同。

Different lowercase letters marked on the bars indicate significant differences among treatments ($P<0.05$). The same below.

图 2　不同碳源、氮源和无机盐及其质量浓度对贝莱斯芽孢杆菌 N4 菌体生物量和抑菌活性的影响

Fig. 2　Effects of different carbon sources, nitrogen sources, inorganic salts and their concentrations on biomass and inhibitory activity of *Bacillus velezensis* N4



图柱上标不同小写字母表示不同处理间差异显著($P<0.05$)。下同。

Different lowercase letters marked on the bars indicate statistically significant differences among treatments ($P<0.05$). The same below.

图2 不同碳源、氮源和无机盐及其质量浓度对贝莱斯芽孢杆菌N4菌体生物量和抑菌活性的影响(续)

Fig. 2 Effects of different carbon sources, nitrogen sources, inorganic salts and their concentrations on biomass and inhibitory activity of *Bacillus velezensis* N4 (continued)

通过单因素试验发现,不同碳源、氮源和无机盐种类及其质量浓度对菌株生物量及抑菌活性有明显影响,当分别添加20 g/L酵母提取物、15 g/L大豆蛋白胨、3.0 g/L NaCl时,贝莱斯芽孢杆菌N4发酵液的菌体生物量均最大,且对烟草根腐病菌LH156101的抑菌效果较优(图2)。

2.2.2 响应面试验结果 培养基组分对贝莱斯芽孢杆菌N4菌体生物量及抑菌活性的影响及其方差分析结果见表4~6,等高线图和响应面图见图3和图4。图3和图4显示,酵母提取物、大豆蛋白胨和NaCl 3个因素间交互作用对贝莱斯芽孢杆菌N4菌体生物量和抑菌活性影响的等高线图呈椭圆形,3D曲面陡峭,交互作用较强,OD_{600}均随以上3个因素质量浓度增加先上升后下降,以上3个因素交互作用所得到的响应面都存在一个极大值点,其交互作用明显。

利用Design Expert 13.0统计软件对表4结果进行二次多元回归拟合,得到酵母提取物(A)、大豆蛋白胨(B)和NaCl(C) 3个因素对贝莱斯芽孢杆菌N4 OD_{600}(Y)影响的拟合二次多项回归方程:$Y=1.94-0.029\ 4A-0.007\ 5B-0.015\ 9C-0.024\ 0AB-0.033\ 8AC-0.034\ 5BC-0.178\ 3A^2-0.191\ 6B^2-0.202\ 8C^2$,该回归方程$P<0.01$,达到极显著水平;失拟项$P>0.05$;$R^2=0.966\ 9$,表明该模型拟合程度较高,误差小,接近真实水平。

基于回归模型预测的贝莱斯芽孢杆菌N4最优培养基中酵母提取物质量浓度为19.60 g/L,大豆蛋白胨质量浓度为14.96 g/L、NaCl质量浓度为2.985 g/L,此条件下OD_{600}预测值为1.942,验证试验结果显示OD_{600}为1.963,根据实际情况,最终确定培养基中酵母提取物、大豆蛋白胨和NaCl的质量浓度分别为20,15和3.0 g/L。

表4 贝莱斯芽孢杆菌N4培养基组分优化的Box-Behnken试验结果

Table 4 Box-Behnken test results for *Bacillus velezensis* N4 medium composition optimization

组别 Group	酵母提取物/(g·L⁻¹) Yeast extract	大豆蛋白胨/(g·L⁻¹) Soy peptone	NaCl/(g·L⁻¹)	OD_{600}	抑菌圈直径/mm Inhibition zone diameter	组别 Group	酵母提取物/(g·L⁻¹) Yeast extract	大豆蛋白胨/(g·L⁻¹) Soy peptone	NaCl/(g·L⁻¹)	OD_{600}	抑菌圈直径/mm Inhibition zone diameter
1	15	10	3.0	1.605	15.67	10	20	20	2.5	1.620	14.30
2	25	10	3.0	1.529	14.50	11	20	10	3.5	1.641	15.00
3	15	20	3.0	1.660	13.50	12	20	20	3.5	1.435	14.50
4	25	20	3.0	1.488	14.33	13	20	15	3.0	2.016	16.50
5	15	15	2.5	1.546	13.50	14	20	15	3.0	1.896	16.33
6	25	15	2.5	1.620	14.33	15	20	15	3.0	1.910	17.33
7	15	15	3.5	1.566	14.50	16	20	15	3.0	1.957	17.67
8	25	15	3.5	1.505	15.16	17	20	15	3.0	1.923	17.67
9	20	10	2.5	1.488	14.50						

表5　培养基组分对贝莱斯芽孢杆菌N4菌体生物量影响的Box-Behnken试验结果方差分析

Table 5　Variance analysis of Box-Behnken test results for the influence of medium composition on the biomass of *Bacillus velezensis* N4

方差来源 Source of variance	平方和 Sum of squares	自由度 Degrees of freedom	均方 Mean square	*F*值 *F*-value	*P*值 *P*-value	显著性 Significance
模型 Model	0.560 5	9	0.062 3	22.740 0	0.000 2	**
酵母提取物(*A*) Yeast extract	0.006 9	1	0.006 9	2.520 0	0.156 4	
大豆蛋白胨(*B*) Soy peptone	0.000 5	1	0.000 5	0.164 3	0.697 3	
NaCl(*C*)	0.002 0	1	0.002 0	0.736 3	0.419 3	
AB	0.002 3	1	0.002 3	0.841 4	0.389 5	
AC	0.004 6	1	0.004 6	1.660 0	0.238 1	
BC	0.028 6	1	0.028 6	10.430 0	0.014 5	*
A^2	0.133 9	1	0.133 9	48.900 0	0.000 2	**
B^2	0.154 5	1	0.154 5	56.430 0	0.000 1	**
C^2	0.173 2	1	0.173 2	63.250 0	<0.000 1	**
残差 Residual	0.019 2	7	0.002 7			
失拟项 Lack of Fit	0.010 0	3	0.003 3	1.450 0	0.354 2	
纯误差 Pure Error	0.009 2	4	0.002 3			
总计 Total	0.579 7	16				

注：*表示有显著影响($P<0.05$)，**表示有极显著影响($P<0.01$)。下同。

Note: *indicates significant differences in the results ($P<0.05$) and ** indicates extremely significant differences in the results ($P<0.01$). The same below.

表6　培养基组分对贝莱斯芽孢杆菌N4抑菌活性影响的Box-Behnken试验结果方差分析

Table 6　Variance analysis of Box-Behnken test results for the influence of medium composition on the inhibitory activity of *Bacillus velezensis* N4

方差来源 Source of variance	平方和 Sum of squares	自由度 Degrees of freedom	均方 Mean square	*F*值 *F*-value	*P*值 *P*-value	显著性 Significance
模型 Model	27.420 0	9	3.050 0	8.300 0	0.005 4	**
酵母提取物(*A*) Yeast extract	0.165 3	1	0.165 3	0.450 3	0.523 7	
大豆蛋白胨(*B*) Soy peptone	1.160 0	1	1.160 0	3.150 0	0.119 4	
NaCl(*C*)	0.800 1	1	0.800 1	2.180 0	0.183 4	
AB	1.000 0	1	1.000 0	2.720 0	0.142 9	
AC	0.007 2	1	0.007 2	0.019 7	0.892 4	
BC	0.022 5	1	0.022 5	0.061 3	0.811 6	
A^2	8.270 0	1	8.270 0	22.520 0	0.002 1	**
B^2	6.050 0	1	6.050 0	16.480 0	0.004 8	**
C^2	7.410 0	1	7.410 0	20.170 0	0.002 8	**
残差 Residual	2.570 0	7	0.367 1			
失拟项 Lack of fit	0.914 4	3	0.304 8	0.736 4	0.582 7	
纯误差 Pure error	1.660 0	4	0.413 9			
总计 Total	29.990 0	16				

利用Design Expert 13.0统计软件对表4结果进行分析，得到酵母提取物(*A*)、大豆蛋白胨(*B*)和NaCl(*C*)3个因素对贝莱斯芽孢杆菌N4抑菌圈直径(*Y*)影响的拟合二次多项方程：$Y=17.10+0.143\ 7A-0.380\ 0B+0.316\ 3C+0.500\ 0AB-0.042\ 5AC-0.075\ 0BC-1.40A^2-1.20B^2-1.33C^2$，该回归方程$P<0.01$，说明该模型极显著；失拟项$P>0.05$，差异不显著；$R^2=0.914\ 3$，拟合程度较高，表明模型可靠。

根据拟合模型预测贝莱斯芽孢杆菌N4抑菌活性最优时的培养基中酵母提取物质量浓度为20.108 2 g/L，大豆蛋白胨质量浓度为14.213 5 g/L，NaCl质量浓度为3.061 69 g/L，此条件下抑菌圈直径预测值为17.10 mm，验证试验结果显示为17.17 mm，最终确定培养基中酵母提取物、大豆蛋白胨和NaCl的质量浓度分别为20，15和3.0 g/L。

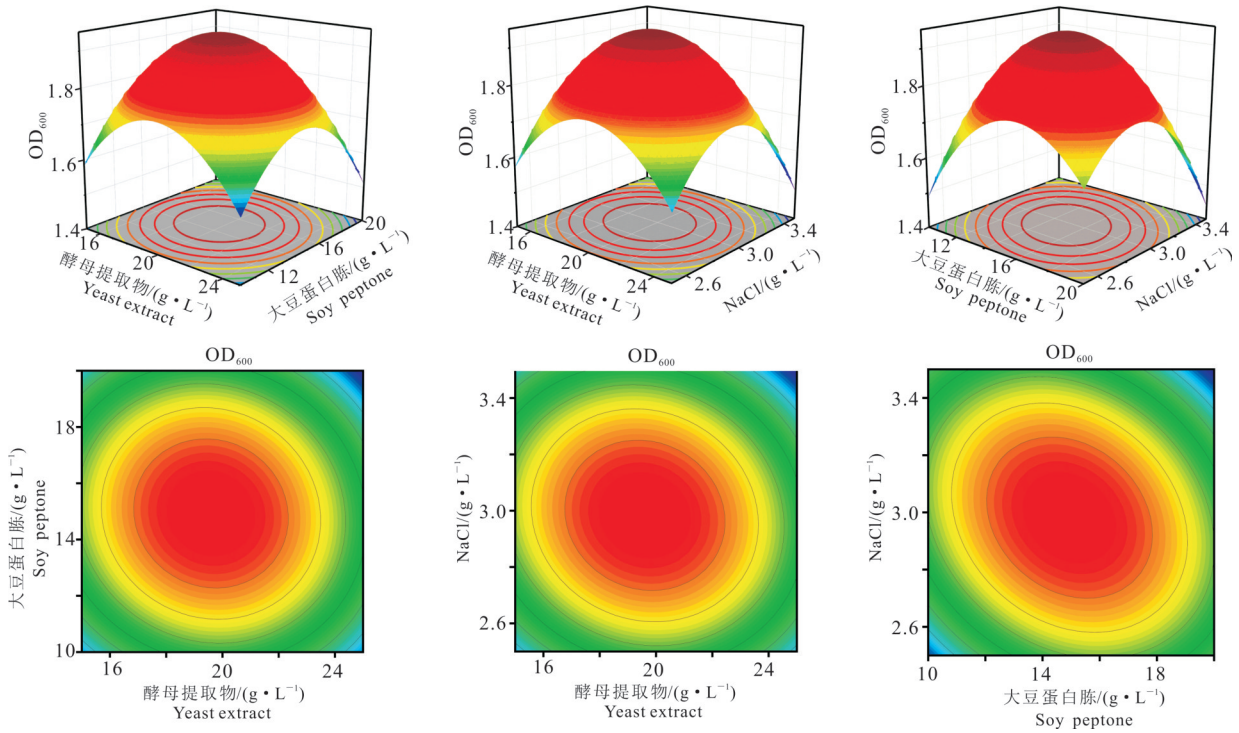


图 3 不同培养基组分交互作用对贝莱斯芽孢杆菌 N4 菌体生物量影响的等高线图及响应面图

Fig. 3 Response diagram and contour diagram of the influence of different nutritional factors on the biomass of *Bacillus velezensis* N4

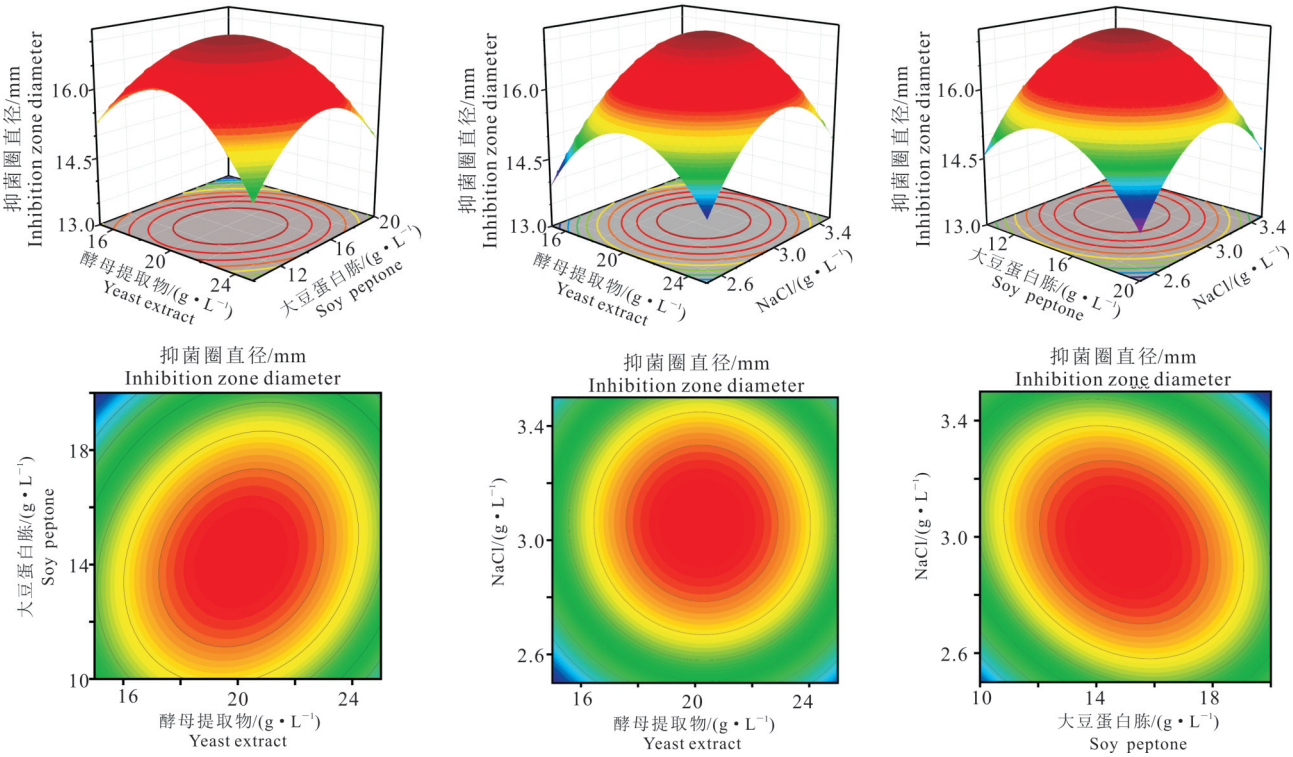


图 4 不同培养基组分交互作用对贝莱斯芽孢杆菌 N4 抑菌效果影响的等高线图及响应面图

Fig. 4 Response diagram and contour diagram of the influence of different nutritional factors on the inhibitory activity of *Bacillus velezensis* N4

2.3 贝莱斯芽孢杆菌 N4 发酵环境条件的优化

2.3.1 单因素试验结果 单因素试验结果(图 5)显示,以贝莱斯芽孢杆菌 N4 菌体生物量及对烟草根腐病菌 LH156101 的抑菌活性为评价标准,可知

当环境条件 pH 为 6.2、接种量为 1%、装液量为 50 mL、转速为 180 r/min、发酵时间为 24 h、发酵温度为 30 ℃时，贝莱斯芽孢杆菌 N4 发酵液的菌体生物量和抑菌圈直径均较高。

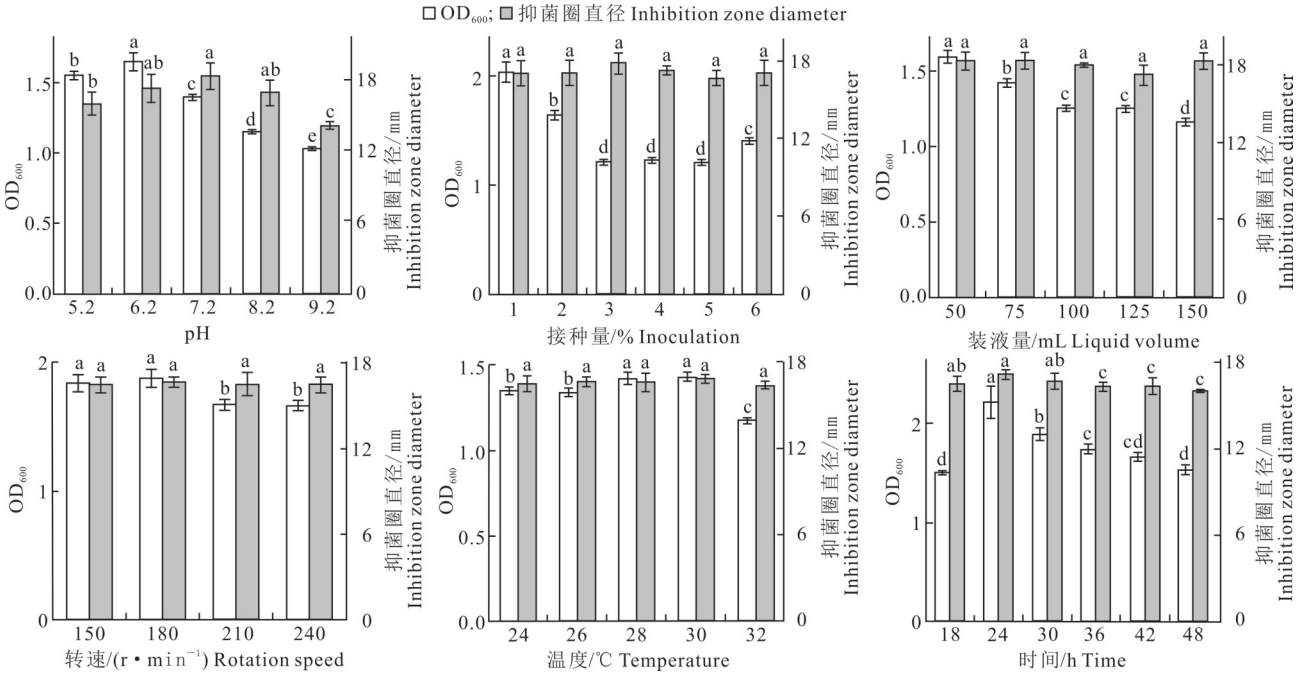


图 5　不同环境条件对贝莱斯芽孢杆菌 N4 菌体生物量和抑菌活性的影响

Fig. 5　Effects of different environmental conditions on the growth and inhibitory activity of *Baillus velezensis* N4

2.3.2　响应面试验结果　由图 5 可知，不同环境条件下贝莱斯芽孢杆菌 N4 菌体生物量总体有显著差异；但除 pH 外，其余环境条件下对其抑菌活性均无显著差异，因此在确定 Plackett-Burman 主效应试验时，以贝莱斯芽孢杆菌 N4 菌体生物量为响应值来确定其主要影响因素。Plackett-Burman 试验结果如表 7 所示。

表 7　不同环境条件对贝莱斯芽孢杆菌 N4 菌体生物量影响的 Plackett-Burman 试验结果

Table 7　Plackett-Burman design analysis for screening significant environmental factors affecting biomass production of *Baillus velezensis* N4

组别 Group	pH	转速/(r·min⁻¹) Rotational speed	温度/℃ Temperature	接种量/% Inoculation	装液量/mL Liquid volume	时间/h Time	OD_{600}
1	6.2	210	28	2	100	30	1.625
2	5.2	210	30	1	100	30	1.565
3	6.2	180	30	2	50	30	1.422
4	5.2	210	28	2	100	24	0.765
5	5.2	180	30	1	100	30	1.565
6	5.2	180	28	2	50	30	1.280
7	6.2	180	28	1	100	24	1.975
8	6.2	210	28	1	50	30	2.325
9	6.2	210	30	1	50	24	2.322
10	5.2	210	30	2	50	24	1.532
11	6.2	180	30	2	100	24	1.657
12	5.2	180	28	1	50	24	1.725

Plackett-Burman 试验主效应分析结果（表 8）显示，6 个环境条件对 OD_{600} 影响由大到小顺序为接种量＞pH＞装液量＞转速＞温度＞时间，其中 pH、接种量 2 个因素对 OD_{600} 有显著影响（$P<0.05$），故选择接种量、pH 和装液量 3 个因素进行后续的响应面试验。

2.3.3　响应面试验　根据 Plackett-Burman 试验结果，确定装液量、pH 以及接种量为主要因素，利用 Design Expert 13.0 统计软件设计环境条件优化的响应面试验，结果如表 9 所示，并对试验结果进行方

差分析,结果见表10。

表8 不同环境条件对贝莱斯芽孢杆菌N4菌体生物量影响的Plackett-Burman试验主效应分析

Table 8 Main effect analysis of Plackett-Burman design of different environmental conditions on the biomass of *Bacillus velezensis* N4

方差来源 Source of variance	平方和 Sum of squares	自由度 Degrees of freedom	均方 Mean square	*F*值 *F*-value	*P*值 *P*-value	响应顺序 Response sequence
模型Model	1.760 0	6	0.293 6	5.690 0	0.038 0	
pH	0.697 9	1	0.697 9	13.520 0	0.014 3	2
转速 Rotationl speed	0.021 7	1	0.021 7	0.420 0	0.545 5	4
温度Temperature	0.011 3	1	0.011 3	0.218 7	0.659 7	5
接种量Inoculation	0.851 2	1	0.851 2	16.490 0	0.009 7	1
装液量 Liquid volume	0.176 2	1	0.176 2	3.410 0	0.123 9	3
时间Time	0.003 1	1	0.003 1	0.060 8	0.815 1	6
残差Residual	0.258 1	5	0.051 6			
合计Total	2.060 0	11				

表9 贝莱斯芽孢杆菌N4菌体生物量环境条件优化的Box-Behnken试验结果

Table 9 Results of Box-Behnken analysis for optimizing environmental conditions affecting *Bacillus velezensis* N4 biomass

组别 Group	pH	装液量/mL Liquid volume	接种量/% Inoculation	OD_{600}	组别 Group	pH	装液量/mL Liquid volume	接种量/% Inoculation	OD_{600}
1	5.2	50	1.0	1.410	10	6.2	100	0.5	0.714
2	7.2	50	1.0	1.280	11	6.2	50	1.5	1.507
3	5.2	100	1.0	1.293	12	6.2	100	1.5	0.682
4	7.2	100	1.0	0.810	13	6.2	75	1.0	1.874
5	5.2	75	0.5	1.058	14	6.2	75	1.0	2.032
6	7.2	75	0.5	0.741	15	6.2	75	1.0	1.817
7	5.2	75	1.5	1.024	16	6.2	75	1.0	2.200
8	7.2	75	1.5	0.807	17	6.2	75	1.0	1.638
9	6.2	50	0.5	1.638					

表10 环境条件对贝莱斯芽孢杆菌N4菌体生物量影响的Box-Behnken试验结果的方差分析

Table 10 Variance analysis of Box-Behnken for the influence of environmental conditions on the biomass of *Bacillus velezensis* N4

方差来源 Source of variance	平方和 Sum of squares	自由度 Degrees of freedom	均方 Mean square	*F*值 *F* value	*P*值 *P* value	显著性 Significance
模型Model	3.510 0	9	0.390 5	7.650 0	0.006 9	**
pH(A)	0.164 5	1	0.164 5	3.220 0	0.115 7	
装液量(B)Liquid volume	0.682 1	1	0.682 1	13.370 0	0.008 1	**
接种量(C)Inoculation	0.002 1	1	0.002 1	0.042 0	0.843 4	
AB	0.031 2	1	0.031 2	0.610 5	0.460 2	
AC	0.002 5	1	0.002 5	0.049 0	0.831 1	
BC	0.002 5	1	0.002 5	0.048 0	0.832 8	
A^2	0.933 5	1	0.933 5	18.290 0	0.003 7	**
B^2	0.248 8	1	0.248 8	4.880 0	0.063 0	
C^2	1.200 0	1	1.200 0	23.520 0	0.001 9	**
残差Residual	0.357 2	7	0.051 0			
失拟项Lack of fit	0.174 3	3	0.058 1	1.270 0	0.397 3	
纯误差Pure error	0.182 9	4	0.045 7			
总计 Total	3.870 0	16				

根据试验结果,得到pH(A)、装液量(B)、接种量(C)3个因素对贝莱斯芽孢杆菌N4的OD_{600}(Y)影响的拟合二次多项方程为:$Y=1.91-0.143\ 4A-0.292\ 0B-0.016\ 4C-0.088\ 3AB+0.025\ 0AC+0.024\ 8BC-0.470\ 9A^2-0.243\ 1B^2-0.533\ 8C^2$,可知,该回归方程$P<0.01$,达到极显著水平;失拟

项 $P>0.05$，差异不显著；$R^2=0.907\ 7$，表明该模型拟合程度较高，方程回归模型拟合结果接近真实水平。

pH、装液量、接种量 3 个因素间交互作用对贝莱斯芽孢杆菌 N4 抑菌效果影响的等高线图呈椭圆形，3D 曲面陡峭，交互作用较强（图 6）。根据回归模型预测贝莱斯芽孢杆菌 N4 菌体生物量的最佳培养条件为：pH 5.90、装液量 60.410 mL、接种量 0.985%，OD_{600} 预测值为 2.005，验证结果显示 OD_{600} 为 2.131，根据实际情况，最终确定环境条件为：pH 6.0，装液量 60 mL，接种量 1%。

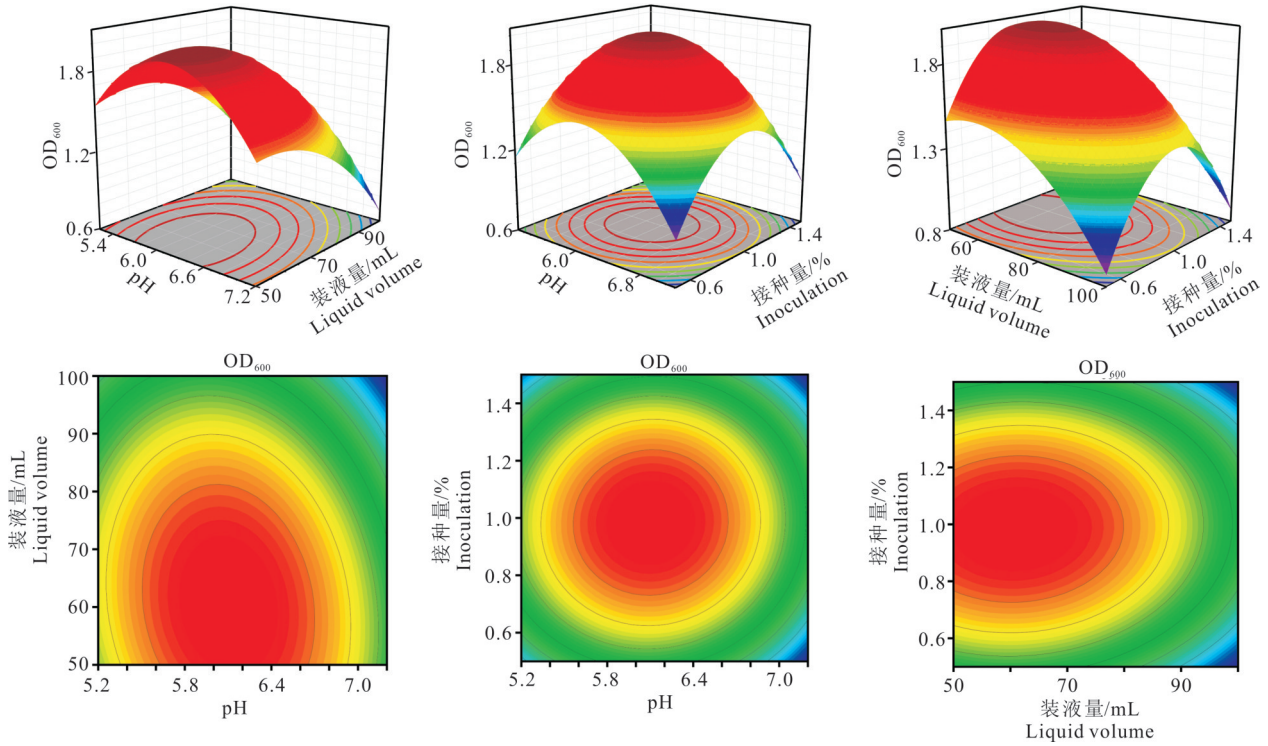


图 6　环境因素交互作用对贝莱斯芽孢杆菌 N4 菌体生物量影响的等高线图及响应面图

Fig. 6　Response diagram and contour diagram of the influence of different environmental factors on the biomass of *Bacillus velezensis* N4

2.4　贝莱斯芽孢杆菌 N4 发酵条件优化前后生防活性比较

在最优培养基和环境条件下的测定结果显示，优化后贝莱斯芽孢杆菌 N4 发酵液中的菌体数量达到 2.39×10^{10} CFU/mL，是优化前（1.75×10^{9} CFU/mL）的 13.66 倍；优化后对烟草根腐病菌 LH156101 的抑菌活性稳定在 78.6%，较优化之前的 77.8% 略有提高。

3　讨　论

近年来，随着连作年限的增加，烟草根腐病的发生愈发严重，化学药剂防治效果不理想，且易造成农药残留超标，将具有高效生防活性的微生物菌剂与化学药剂联合应用防治植物病害，既可以弥补微生物菌剂与化学药剂单独使用时的不足，又能有效提高防治效果，而微生物菌剂与化学药剂联用的关键前提就是开发微生物资源。微生物的开发利用离不开其发酵工艺的优化[12-13]，菌株的生防活性与其生物量、活性物质产量以及定殖能力强弱等因素相关[14]，而这又受到发酵培养基中化合物的种类、比例及发酵环境条件等参数的影响[15]。贝莱斯芽孢杆菌作为一种重要生防资源，在其发酵生长过程中可以产生多种次级代谢产物抑制病原真菌[16-17]，而发酵培养基中的营养成分和环境条件尤为关键[18-20]。响应面法是一种结合数学、统计和试验设计的优化方法，在生防菌株培养条件优化过程中采用该方法可精准确定最优参数组合，在化学和生物学研究领域已得到了广泛应用。本研究结合单因素试验和响应面法，以贝莱斯芽孢杆菌 N4 菌体生物量和抑菌活性为响应值，优化了其最优培养基组分和摇瓶发酵条件。单因素试验显示，以酵母提取物作为碳源可明显提升贝莱斯芽孢杆菌 N4 菌体生物量，而玉米淀粉和山梨醇则显著降低其生物

量,但不同碳源对其抑菌活性无显著影响。大豆蛋白胨和大豆粉作为氮源可明显提高贝莱斯芽孢杆菌N4菌体生物量和抑菌活性,相比尿素、硝酸钾和氯化铵无机氮源,贝莱斯芽孢杆菌N4菌株更趋向于直接利用有机氮源,推测该菌株可能无法直接利用无机氮源[21-22]。无机盐NaCl和Na_2HPO_4处理的贝莱斯芽孢杆菌N4菌体生物量和抑菌活性均较高,这是因为Na^+作为微生物生理调节功能的重要元素之一,有利于微生物在复杂的发酵环境中维护自身正常的生理状态[23]。本研究发现,不同环境条件对贝莱斯芽孢杆菌N4菌株菌体生物量影响较为显著,而对其抑菌活性的影响总体并不明显,因此在进行环境条件优化响应面试验时,仅以菌体生物量作为响应值进行了评价。环境条件中,接种量和pH对贝莱斯芽孢杆菌N4菌株生物量有显著影响,其中当pH为5.2~6.2时其生物量呈升高趋势;之后随着pH的升高,生物量逐渐减少,表明贝莱斯芽孢杆菌N4菌株更适合生长于弱酸性环境中,这可能与该菌体生长过快、耗氧量增加、溶氧不足等有关。

本研究最终确定贝莱斯芽孢杆菌N4菌株的最适发酵环境条件为:装液量60 mL,接种量1%,转速180 r/min,培养温度30 ℃,初始pH 6.0,发酵时间24 h,这与已有贝莱斯芽孢杆菌发酵条件的报道也存在一定差异[24-27],这说明即使同为芽孢杆菌属,因其生境和特性不同,不同菌株适生条件也存在一定差异。

4 结 论

本研究优化的贝莱斯芽孢杆菌N4菌株的发酵培养基组分为:酵母提取物20 g/L,大豆蛋白胨15 g/L,NaCl 3.0 g/L;最适环境条件为:初始pH 6.0,装液量60 mL,种子液接种量1%,培养温度30 ℃,转速180 r/min,培养时间24 h,优化后贝莱斯芽孢杆菌N4发酵液中菌体数量为2.39×10^{10} CFU/mL,相较于优化前提高了13.66倍,且其抑菌活性稳定,本研究结果对贝莱斯芽孢杆菌N4菌株的开发及利用具有重要意义。

[参考文献]

[1] 王戈,刘威,李善莲,等. 我国烟草行业质量追溯体系建设的现状与展望[J]. 中国烟草学报,2021,27(5):90-99.
WANG G,LIU W,LI S L,et al. Present situation and prospect on the construction of quality traceability system in China's tobacco industry[J]. Acta Tabacaria Sinica,2021,27(5):90-99.

[2] 于庆涛,姚廷山. 烟草镰刀菌根腐病研究进展[J]. 安徽农业科学,2018,46(17):34-36.
YU Q T,YAO T S. Advances in tobacco root rot caused by *Fusarium*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences,2018,46(17):34-36.

[3] 黄玉凤. 烟草镰刀菌根腐病病原及防控药剂筛选[D]. 贵阳:贵州师范大学,2024.
HUANG Y F. Screening of pathogens and control agents for tobacco root rot disease[D]. Guiyang: Guizhou Normal University,2024.

[4] 赵亚南,黎妍妍,曹春霞,等. 烟草镰刀菌根腐病研究进展[J]. 中国植保导刊,2023,43(11):20-25,59.
ZHAOY N,LI Y Y,CAO C X,et al. Research progress of tobacco *Fusarium* root rot[J]. China Plant Protection,2023,43(11):20-25,59.

[5] 钟杰,邱泽澜,刘仕达,等. 湖南烟草镰刀菌根腐病病原鉴定及防治药剂筛选[J]. 中国烟草科学,2024,45(3):51-59,67.
ZHONG J,QIU Z L,LIU S D,et al. Pathogen identification of tobacco root rot disease in Hunan Province and screening of control fungicides[J]. Chinese Tobacco Science,2024,45(3):51-59,67.

[6] 李博. 烟草镰刀菌根腐病发生相关根际微生物分析及生防菌筛选[D]. 郑州:河南农业大学,2020.
LI B. Analysis of rhizosphere microorganisms associated with Tobacco *Fusarium* fungal rot and screening of biocontrol microorganism[D]. Zhengzhou:Henan Agricultural University,2020.

[7] 姚晨虓. 烟草镰刀菌根腐病生防细菌与真菌的筛选鉴定[D]. 河南 洛阳:河南科技大学,2022.
YAO C X. Screening and identification of biocontrol bacteria and fungi antagonizing *Fusarium* root rot of tobacco[D]. Luoyang, Henan: Henan University of Science and Technology, 2022.

[8] 陈长卿,褚逸轩,谢昭,等. 生物杀菌剂对烟草镰刀菌根腐病的防治效果及农艺性状的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2019,47(6):41-46.
CHEN C Q,CHU Y X,XIE Z,et al. Control effect of biological fungicides on tobacco *Fusarium* root rot and influence on agronomic traits of tobacco[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition),2019,47(6):41-46.

[9] 邱睿,李小杰,白静科,等. 烟草镰刀菌根腐病生防假单胞菌的筛选与鉴定[J]. 中国烟草学报,2023,29(3):84-93.
QIU R,LI X J,BAI J K,et al. Screening and identification of *Pseudomonas* against *Fusarium* root rot of tobacco[J]. Acta Tabacaria Sinica,2023,29(3):84-93.

[10] XIE Z,GAO C,ZHANG X Y,et al. Identification and biological characteristics of *Fusarium tobaccum* sp. nov.,a novel species causing tobacco root rot in Jilin Province,China[J]. Microbiology Spectrum,2024,12(12):1-21.

[11] 李姝江,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]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2019, 47(2): 88-96.

[12] 杨可. 贝莱斯芽孢杆菌TCS001发酵条件优化及其生防作用研究[D]. 杭州：浙江农林大学，2019.
YANG K. Optimization of fermentation conditions of *Bacillus velezensis* strain TCS001 and its bio-control effect[D]. Hangzhou: Zhejiang A & F University, 2019.

[13] KIM S, JIN Y H, MAH J H. Inhibitory effects of garlic, cinnamon, and rosemary on viability, heat resistance, and biofilm formation of *Bacillus cereus* spores in the broth of a fermented soybean paste stew, Cheonggukjang jjigae[J]. Food Research International, 2025, 206: 116078.

[14] 刘瑾，张朝正，赵华. 抗尖孢镰刀菌贝莱斯芽孢杆菌P9培养基及发酵条件优化[J]. 中国酿造，2023，42(2)：157-162.
LIU J, ZHANG C Z, ZHAO H. Optimization of medium and fermentation conditions of *Bacillus velezensis* P9 resistant to *Fusarium oxysporum*[J]. China Brewing, 2023, 42(2): 157-162.

[15] 姚巧儿，张英，王永红. 产碱性蛋白酶地衣芽孢杆菌合成培养基筛选与优化[J]. 食品与发酵工业，2024，50(16)：30-39.
YAO Q E, ZHANG Y, WANG Y H. Screening and optimization of chemically defined medium for alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*[J]. Food and Fermentation Industries, 2024, 50(16): 30-39.

[16] 王春玲，黄钰婷，刘星，等. 一株贝莱斯芽孢杆菌鉴定、全基因组学分析及其抗病促生特性[J]. 微生物学报，2025，65(2)：745-757.
WANG C L, HUANG Y T, LIU X, et al. Identification, genomic analysis, and disease-resistant and plant growth-promoting characterization of a *Bacillus velezensis*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(2): 745-757.

[17] DHANABALAN S, MUTHUSAMY K, IRUTHAYASAMY J, et al. Unleashing *Bacillus* species as versatile antagonists: Harnessing the biocontrol potentials of the plant growth-promoting rhizobacteria to combat *Macrophomina phaseolina* infection in *Gloriosa superba*[J]. Microbiological Research, 2024, 283: 127678.

[18] LIU Q Y, ZHAO W Y, LI W Y, et al. Lipopeptides from *Bacillus velezensis* ZLP-101 and their mode of action against bean aphids *Acyrthosiphon pisum* Harris[J]. BMC Microbiology, 2024, 24(1): 231.

[19] ZENG J S, TUNG H H, WANG G S. Effects of temperature and microorganism densities on disinfection by-product formation[J]. Science of The Total Environment, 2021, 794: 148627.

[20] LI L, WEI X T, YU W P, et al. Enhancement of acetoin production from *Bacillus licheniformis* by 2, 3-butanediol conversion strategy: metabolic engineering and fermentation control[J]. Process Biochemistry, 2017, 57: 35-42.

[21] KONGSINKAEW C, HONGPHANKUL K, SOONTORNKITLERT T, et al. Large-scale production of paraprobiotic soy milk in stirred tank bioreactor: a dual-step fermentation approach[J]. Applied Food Research, 2024, 4(2): 100446.

[22] LIANG C Z, WANG J H, LIU J, et al. Phylogenetic analysis, metabolic profiling, and environmental adaptation of strain LCG007: a novel Rhodobacteraceae isolated from the East China Sea intertidal zone[J]. Frontiers in Microbiology, 2025, 15: 1533195.

[23] 李雪萍，刘志东，宁喜斌. 南极磷虾粉中产蛋白酶菌株的筛选、鉴定及其应用研究[J]. 海洋湖沼通报，2025，47(1)：173-180.
LI X P, LIU Z D, NING X B. Screening, identification and application of protease-producing strains in Antarctic krill meal[J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2025, 47(1): 173-180.

[24] 王冲，李倩，肖红英，等. 贝莱斯芽孢杆菌Vel-HNGD-F2产抗菌物质发酵条件优化及抗菌特性研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版)，2024，45(1)：73-80.
WANG C, LI Q, XIAO H Y, et al. Optimization of fermentation conditions and antifungal properties of *Bacillus velezensis* Vel-HNGD-F2[J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2024, 45(1): 73-80.

[25] 沈佳慧，乔俊卿，左杨，等. 贝莱斯芽胞杆菌YL2021高产嗜铁素的摇瓶发酵工艺优化[J]. 中国生物防治学报，2023，39(4)：861-874.
SHEN J H, QIAO J Q, ZUO Y, et al. Optimization of shake-flask fermentation condition for siderophore production of *Bacillus velezensis* YL2021[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2023, 39(4): 861-874.

[26] 申云鑫，施竹凤，李铭刚，等. 贝莱斯芽孢杆菌SH-1471发酵条件优化及其番茄枯萎病的防治效果[J]. 微生物学报，2024，64(1)：220-237.
SHEN Y X, SHI Z F, LI M G, et al. *Bacillus velezensis* SH-1471: optimization of fermentation conditions and evaluation of the biocontrol effect on tomato *Fusarium* wilt[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(1): 220-237.

[27] CAO H, CHEN Z L, LI X S, et al. Optimization of fermentation conditions for *Bacillus velezensis* TCS001 and evaluation of its growth promotion and disease prevention effects on strawberries[J]. Biological Control, 2024, 198: 105632.

（责任编辑：李小平）