

海洋杀藻细菌 *Vibrio* sp. DHQ25 高密度生长的培养基优化

吕静琳¹, 郑伟¹, 王宾香¹, 田蕴¹, 郑天凌^{1,2*}

(1. 厦门大学 生命科学学院, 滨海湿地生态系统教育部重点实验室, 2. 厦门大学 海洋与环境学院, 近海海洋环境科学国家重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 以能够有效抑制塔玛亚历山大藻生长的海洋细菌 *Vibrio* sp. DHQ25 为对象, 考察了培养基成分对其发酵生长的影响. 研究中顺序利用了 Plackett-Burman (PB) 设计法、最速上升法以及中心组合响应曲面方法对培养基组成成分进行优化, 获得最适培养基配方 (g/L): 蛋白胨 13.24, 酵母粉 4.31, 葡萄糖 0.1, NaCl 25, MgSO₄ · 7H₂O 0.2, CaCl₂ · 2H₂O 0.5, KCl 0.06, K₂HPO₄ 0.05, KH₂PO₄ 0.05, Fe₂(SO₄)₃ 0.002. 由最适配方发酵得到的 DHQ25 培养液的菌液浓度 (OD₆₀₀) 平均可达 1.984, 较原先 2216E 培养基中培养的 1.359 提高了 46%, 杀藻效果与生长密度间存在着特定的相关性, 这为今后分离杀藻活性物质提供了基础. 结果表明, PB 设计法与响应曲面法的结合使用能经济有效地对该杀藻细菌的高密度生长培养基成分进行优化.

关键词: 杀藻菌; Plackett-Burman 设计; 响应曲面法; 培养基

中图分类号: Q 935

文献标志码: A

文章编号: 0438-0479(2011)03-0617-07

近年来, 海洋赤潮发生频繁且涉及面广, 对人类经济及自然环境危害极大, 赤潮显然已成为一个全球问题, 赤潮的治理也是热门研究方向之一^[1-4]. 在生物治理途径中, “以菌治藻”理念的出现逐步为杀藻菌的分离鉴定提供理论指导, 杀藻菌可通过直接或间接方式抑制或杀灭有毒藻类, 因此在赤潮防治中应用前景广阔. 为了使杀藻菌更优越地发挥生物效应, 通过其培养基及培养条件优化来实现生长密度的提高、特殊活性物质的增产是很有意义的. *Vibrio* sp. DHQ25 分离自赤潮区, 该菌生长速度快, 但生长密度并不高, 研究表明该菌株是通过分泌胞外蛋白发挥杀藻作用的, 但在活性物质分离中发现其量很少, 可能是由于菌株生长代谢量不足造成的, 而杀藻活性物质尚未获得完整分离, 没有直接有效的检测方法. 在微生物培养基优化研究中, 王颖等^[5]以酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 菌液浓度 (OD₆₀₀) 为指标采用正交设计法优化其培养基组成. 因此, 本文也采用菌液浓度 (OD₆₀₀) 作为评

价指标对菌株 DHQ25 进行培养基成分优化.

然而, 培养基优化过程非常繁琐, 同时成分的设计也甚为重要. 如今, 关于培养基筛选优化的方法有很多, 包括单因素法、正交设计、Plackett-Burman (PB) 设计法、均匀设计及响应曲面方法等. PB 设计法是多因子两水平实验, 它虽不能考察各因子之间的交互作用, 但它利用软件设计最少实验数, 从众多因素中快速有效筛出对评价指标影响显著的若干因子^[6]. Vipul 等^[7]通过 PB 设计法从产几丁质酶的海洋泛生菌 *Pantoea dispersa* 的 19 种培养基成分中筛选出主要影响因子进行优化, 最终使得内切几丁质酶和壳二糖酶活性分别提高了 3.95 倍和 2.31 倍. 响应面法 (response surface methodology) 是数学方法和统计方法结合的综合技术, 它利用合理的实验设计及结果建立连续变量曲面模型, 采用多元二次回归方程来考察因子间相互作用关系, 最终目的是优化响应值^[8]. 该方法具备实验次数少、周期短与精度高等优点, 可弥补以前微生物培养优化中的一些不足, 因而近年来广泛应用在加工工艺、生物技术及化学工程等领域中^[9-10]. 顾骏等^[11]利用响应曲面法对他克莫司的发酵培养基进行优化, 使得他克莫司的产量提高了 55%.

本文首先通过 PB 设计法筛选主要影响因子, 之后利用最速上升法和中心组合设计建立起寻求最优点的二阶模型, 最终获得杀藻菌 DHQ25 高密度培养的

收稿日期: 2010-07-20

基金项目: 国家自然科学基金重点项目、主任基金项目 and 面上项目 (40930087, 31070442, 30940002, 40876061); 国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (2008A A09Z408); 长江学者和创新团队发展计划项目 (40821063); 近海海洋环境科学国家重点实验室资助项目

* 通信作者: microzh@xmu.edu.cn

培养基, 以期为后续的杀藻活性物质分离鉴定及实际应用打下坚实基础。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

菌株 *Vibrio* sp. DHQ25, 从长江口赤潮区分离, 本实验室保存。

1.2 试剂与培养基

蛋白胨、酵母粉购自 Difco 公司, 其他常用药品均达化学纯。

斜面培养基(g/L): 蛋白胨 5, 酵母粉 1, 磷酸高铁 0.01, 琼脂粉 10, 陈海水定容, pH 7.6~7.8。

2216E 培养基(g/L): 蛋白胨 5, 酵母粉 1, 磷酸高铁 0.01, 陈海水定容, pH 7.6~7.8。

1.3 培养方法

从斜面保存的菌株 DHQ25 中挑取一接种环接入装有 3.5 mL 2216E 培养基的试管中, 摇床培养 12~16 h 后按 2%(体积分数, 下同) 接种量接入含 50 mL 液体种子培养基的 250 mL 锥形瓶中, 在 28 °C 培养 10~12 h, 再以 1% 接种量接种于含 50 mL 待优化培养基的 250 mL 锥形瓶中, 在转速为 150 r/min 的摇床中培养 12 h。

1.4 响应曲面培养基优化方法

1.4.1 PB 设计法

PB 法是一种基于非完全平衡块原理的近饱和两水平实验设计方法, 其优越性是用较少实验次数检测各因子的效应, 得到尽可能精确的估计。在 PB 设计中, 对于 N 次实验至多可研究 $(N-1)$ 个因子, 一般设置不大于 $(N-4)$ 个的实际因子, 其余为虚构变量用以估计误差^[12]。每个因子取低水平和高水平, 一般高水平值约取较低水平值的 1.25~1.5 倍, 高低水平差值过大可能会掩盖了其他因子的重要性, 但也应依实际情况灵活设计^[13-14]。因此 PB 设计中因素及其水平的选择是关键。本文根据海洋细菌生长一般规律和前期单因素实验, 选用含 10 个实际影响因子的 $N=16$ 的 PB 设计表, 预留 5 个空项(Dummy) 作误差分析。

1.4.2 最速上升法

响应面拟合方程只在考察的紧接邻域里才充分近似真实情形, 所以应先逼近最佳值区域后才能建立有效的响应面拟合方程^[15]。该方法最希望上升时能沿着

具有最大增量的方向逐步移动, 从而最快达到最高区域附近^[16]。本研究的最速上升实验就是根据 PB 设计法筛选出的主要影响因子及各因素效应值的大小确定变化步长, 以快速经济地逼近最佳值区域。

1.4.3 中心复合设计

中心组合设计(central composite design) 是一种国际上较为常用的响应面法, 是一种 5 水平的二阶设计法。该法能在有限的实验次数下, 对主要影响因子及其交互作用进行评价, 还能对各因子优化, 以获得最佳条件^[13]。逼近最优区域后, 进行响应面中心复合设计, 以实验结果拟合响应量(OD_{600}) 与自变量(PB 筛选出的显著因素) 关系的多项式回归模型为

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ij} x_{ij} + \sum \beta_k x_{ij}^2,$$

式中, Y 为预测响应值, β 为回归系数, x 为自变量。运用统计学软件对实验数据进行回归拟合, 寻找回归模型的稳定点, 得出最优培养基成分。

1.5 响应值测定分析方法

利用比浊法测定菌液浓度: 将取样的培养液于 722 型分光光度计测定 OD_{600} , 以不接菌的培养基进行调零, 每个样品做 3 个平行, 取平均值后用 Minitab 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 PB 设计

本次 PB 设计的蛋白胨(X_1)、酵母粉(X_2)、葡萄糖(X_3)、NaCl(X_4)、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (X_5)、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (X_6)、KCl(X_7)、 K_2HPO_4 (X_8)、 KH_2PO_4 (X_9)、 $Fe_2(SO_4)_3$ (X_{10}) 所选因子及其水平见表 1。PB 设计及实验结果见表 2, 对此结果进行的方差分析见表 3, 蛋白胨及酵母粉为主要影响因素, 它们均在 0.05 水平上显著, 且显著性顺序: 蛋白胨 > 酵母粉。其余因素不显著, 故在后续研究中浓度值控制在中心点(表 1) 作为恒量, 重点考察蛋白胨与酵母粉对响应值的影响效果。

2.2 确定一阶模型方向的实验

为了探索并确定蛋白胨与酵母粉两因子的爬坡方向, 进行含有 5 个中心点 2^2 析因设计实验, 中心点的重复用来估计实验误差, 其他成分浓度固定在中心点。 2^2 全因子设计的数据见表 4, 表 5 对一阶模型实验结果进行方差分析, 从中可看出线性回归的 F 检测是显著的, 交互作用不显著, 同时失拟系数不显著说明该模

表 1 水平与因子的实际浓度的对应关系

Tab.1 Variables showing medium components used in Plackett-Burman design

变量	因子	实际因子浓度/(g · L ⁻¹)		
		- 1	0	+ 1
X ₁	蛋白胨	2	3	4
X ₂	酵母粉	0.5	1.0	1.5
X ₃	葡萄糖	0.05	0.1	0.15
X ₄	NaCl	20	25	30
X ₅	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1	0.2	0.3
X ₆	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.4	0.5	0.6
X ₇	KCl	0.03	0.06	0.09
X ₈	K ₂ HPO ₄	0.04	0.05	0.06
X ₉	KH ₂ PO ₄	0.04	0.05	0.06
X ₁₀	Fe ₂ (SO ₄) ₃	0.0015	0.002	0.0025

注: - 1 代表低水平, + 1 代表高水平, 0 代表中间水平.

型能很好地拟合实验数据.

拟合的一阶模型:

$$Y(OD_{600}) = 1.10144 + 0.166X_1 + 0.1045X_2.$$

2.3 最速上升实验

由拟合的一阶模型可知蛋白胨与酵母粉的系数都是正的, 说明它们的量增加将有利于菌液浓度增加, 所以若要沿最速上升路径移动, 就要沿蛋白胨与酵母粉均增大的方向进行爬坡实验. 实验设计与结果见表 6, 设计中规定蛋白胨规范变量基本步长 $\lambda = 1$, 则酵母粉规范变量的基本步长 λ 及它们与蛋白胨和酵母粉实际步长 $\Delta\xi_1, \Delta\xi_2$ 的换算如下:

$$\lambda = (0.1045/0.166) \times \lambda = 0.63,$$

$$\Delta\xi_1 = \lambda \times 1 = 1,$$

$$\Delta\xi_2 = \lambda \times 0.5 = 0.315.$$

从表 6 可以看出蛋白胨与酵母粉的浓度分别增加到第 10 点的 13 与 4.150 g/L 的过程中, Y 值一直是在升高的, 之后 Y 在减少, 这表明实验范围内的最优

表 2 PB 实验设计及结果

Tab.2 Experimental design and results of Plackett-Burman

实验号	实际变量水平										空项水平					响应值 Y(OD ₆₀₀)
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	D ₅	
1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1.386
2	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0.681
3	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	1.032
4	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	0.910
5	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1.248
6	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1.431
7	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1.316
8	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1.098
9	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	0.981
10	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1.170
11	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	0.736
12	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1.054
13	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1.299
14	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	1.035
15	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1.243
16	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1.299

表 3 PB 设计方差分析表
Tab. 3 ANOVA of Plackett-Burman design

变差来源	自由度	效应	系数	F_0	$p_r > F$
常数			1. 11994	29. 02	0. 000
蛋白胨	1	0. 27337	0. 13669	3. 54	0. 017
酵母粉	1	0. 21187	0. 10594	2. 75	0. 041
葡萄糖	1	0. 02887	0. 01444	0. 37	0. 724
NaCl	1	- 0. 10788	- 0. 05394	- 1. 40	0. 221
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1	0. 07513	0. 03756	0. 97	0. 375
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1	0. 02613	0. 01306	0. 34	0. 749
KCl	1	- 0. 01913	- 0. 00956	- 0. 25	0. 814
K ₂ HPO ₄	1	0. 06512	0. 03256	0. 84	0. 437
KH ₂ PO ₄	1	0. 08763	0. 04381	1. 14	0. 308
F ₂ (SO ₄) ₃	1	0. 03688	0. 01844	0. 48	0. 653

表 4 确定方向的第一批因子实验结果
Tab. 4 Experimental design of the 1st model

实际变量/(g · L ⁻¹)		规范变量水平		响应值
蛋白胨	酵母粉	蛋白胨	酵母粉	$Y(OD_{600})$
2	0. 5	- 1	- 1	0. 833
2	1. 5	- 1	1	1. 029
4	0. 5	1	- 1	1. 152
4	1. 5	1	1	1. 374
3	1. 0	0	0	1. 108
3	1. 0	0	0	1. 097
3	1. 0	0	0	1. 099
3	1. 0	0	0	1. 107
3	1. 0	0	0	1. 114

表 5 一阶模型的方差分析表
Tab. 5 ANOVA of the 1st model

变差来源	自由度	平方和	F_0	$p_r > F$
一次项	2	0. 153905	10 ³	0. 000
交互作用	1	0. 000169	2. 51	0. 174
失拟	1	0. 000142	2. 93	0. 162
残差	4	0. 000194		
总和	8	0. 154410		

点很可能在该点附近.

2. 4 中心组合实验

根据最速上升实验结果,以原点+ 10ξ为中心点,以最速上升实验中的两倍步长作为中心组合设计步长,选择中心实验次数为 5,星号臂长为 1. 414,除了酵母粉与蛋白胨的量变化,其他因素固定在中心点进行实验.中心组合设计及结果如表 7 所示.

表 7 的前 9 组实验是带有 5 个中心点的 2² 实验,进行的方差分析(表 8)可知,一次项和交互作用均非显著,说明一阶模型已不合适,纯二次项显著,实验结果已接近最优点,结合表 7 的后 4 组实验构成带有 4 个轴向点的 5 水平中心组合设计.中心组合设计的方差分析见表 9,从表中可以看出拟合不足不显著,回归显著,可以证明此二阶模型近似于真实曲面.

Minitab 软件拟合的二次方程为

$$Y(OD_{600}) = 1. 972 80 + 0. 016 53X_1 + 0. 013 61X_2 - 0. 059 30X_1^2 - 0. 040 30X_2^2.$$

回归的相关系数 R² 为 86. 3%,可能由于交互作用不显著省去该项,使得该系数小于 90%,也说明在考察范围内大部分实验数据(86. 3%)能用该模型解释.

图 1 为主要影响因子对响应值的响应曲面及等高线图.在等高线图平面图中,曲线越陡峭表示因子的效应越大,蛋白胨对响应值的贡献较大,即响应值对蛋白胨的变化更加敏感.

表6 最速上升实验设计表及结果

Tab.6 Experimental design of steepest ascent and corresponding response

	规范变量		实际变量/(g·L ⁻¹)		响应值
	蛋白胨	酵母粉	ξ_1	ξ_2	$Y(OD_{600})$
原点	0	0	3	1.0	1.130
ξ	1	0.315	1	0.315	
原点+ ξ	1	0.315	4	1.315	1.319
原点+ 2 ξ	2	0.63	5	1.630	1.499
原点+ 3 ξ	3	0.945	6	1.945	1.683
原点+ 4 ξ	4	1.26	7	2.260	1.793
原点+ 5 ξ	5	1.575	8	2.575	1.846
原点+ 6 ξ	6	1.89	9	2.890	1.878
原点+ 7 ξ	7	2.205	10	3.205	1.891
原点+ 8 ξ	8	2.52	11	3.520	1.901
原点+ 9 ξ	9	2.835	12	3.835	1.926
原点+ 10 ξ	10	3.15	13	4.150	1.985
原点+ 11 ξ	11	3.465	14	4.465	1.951
原点+ 12 ξ	12	3.78	15	4.780	1.937

表7 中心组合设计

Tab.7 Experimental design and result of central composite design

规范变量水平		实际变量/(g·L ⁻¹)		响应值
蛋白胨	酵母粉	蛋白胨	酵母粉	$Y(OD_{600})$
-1	-1	11	3.52	1.902
-1	1	11	4.78	1.916
1	-1	15	3.52	1.920
1	1	15	4.78	1.942
0	0	13	4.15	2.000
0	0	13	4.15	1.961
0	0	13	4.15	1.985
0	0	13	4.15	1.958
0	0	13	4.15	1.962
-1.414	0	15.828	4.15	1.899
1.414	0	10.172	4.15	1.934
0	1.414	13	5.04	1.950
0	-1.414	13	3.26	1.921

表8 带有5个中心点的2²设计的方差分析表Tab.8 ANOVA of experimental design of 2² with 5 central points

变差来源	自由度	平方和	F_0	$p_r > F$
模型	4	0.007113	5.22	0.069
一次项	2	0.000808	1.19	0.394
纯二次	1	0.006289	18.46	0.013
交互作用	1	0.000016	0.05	0.839
纯误差	4	0.001363		
总和	8	0.008476		

从响应曲面图及回归的方程可看出,该模型存在极值,且为最大值.根据软件估计的极值,转换到未编码值 $X_1=13.24$ g/L, $X_2=4.31$ g/L.再从方程中任取两点进行模型验证,结果见表10.

验证结果最高点的菌液浓度(OD_{600})平均可达到1.984,与预测值比较表明,该模型能够较好地预测菌株DHQ25的发酵菌液浓度值,数值的出入可能是由于菌种活化过程中存在的偏差所致,但总的来说,回归

表9 二阶模型的方差分析
Tab.9 ANOVA of the 2nd model

变差来源	自由度	平方和	F ₀	p _r > F
回归	5	0.009842	9.22	0.005
线性	2	0.001834	9.22	0.066
交互作用	1	0.00001600	0.07	0.792
平方	2	0.007992	18.73	0.002
拟合不足	3	0.000079	0.07	0.971
残差	7	0.001494		
总和	12	0.011336		

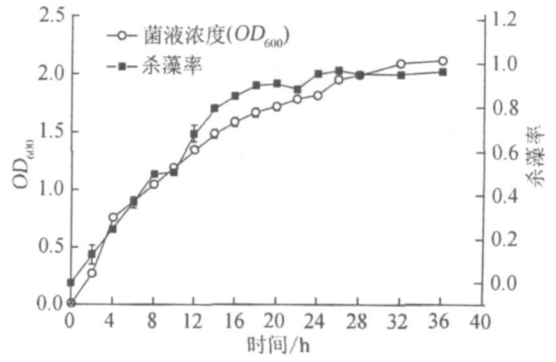


图2 菌株 DHQ25 优化后的生长曲线与杀藻率
Fig.2 Growth curve and algicidal activity of DHQ25 from the final medium

研究指标(OD₆₀₀)与细菌的杀藻率之间存在某些特定可循的相关性.在菌株 DHQ25 指数增长时期,它的杀藻效率也相应提高.

3 讨论与结论

响应面法作为一种过程优化的综合技术有许多优点,但它仍有一定的局限性,比如所选因素不全或水平过宽会导致响应面出现吊兜和鞍点;回归的结果都只是在所限定的范围内进行的估计预测^[17].尽管如此,在解决多因素问题中响应面法仍是有效工具,通过响应面法技术能高效地解决相关的设计与数据处理问题.

在实验设计中,选择蒸馏水作为培养基用水是考虑到陈海水成分不明确,且批次间存在不明显差异.海水中含有 Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Cl⁻, SO₄²⁻, Br⁻ 等常量元素,同时也含有其他微量元素.基于海洋细菌 2216E 培养基,本研究以蒸馏水为水质,进行人工海水主成分及碳氮源成分的选择与优化.研究发现作为基本碳源的葡萄糖,在 1 L 培养基中 0.05~0.15 g 的含量波动,对菌株的生长影响不显著,故对其未进行进一步的优化.

从本研究的结果可以看出, PB 设计与响应曲面法的结合使用能经济有效地对杀藻菌 DHQ25 的高密度生长培养基成分进行优化,获得了最优培养基配方 (g/L): 蛋白胨 13.24, 酵母粉 4.31, 葡萄糖 0.1, NaCl 25, MgSO₄·7H₂O 0.2, CaCl₂·2H₂O 0.5, KCl 0.06, K₂HPO₄ 0.05, KH₂PO₄ 0.05, Fe₂(SO₄)₃ 0.002. 相比于原先的海洋细菌 2216E 培养基的培养,发酵后菌株菌液浓度 (OD₆₀₀) 由 1.359 提高到 1.984, 提高了 46%, 同时该菌株的生长密度与杀藻效果间存在良好的相关性,且在优化后的培养基中生长的菌株杀藻效

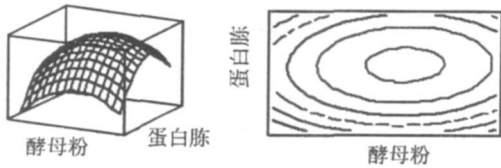


图1 中心组合设计的响应曲面与等高线
Fig.1 Response surfaces and contour line of central composite design

表10 中心组合设计验证结果
Tab.10 Verification of central composite design

序号	X ₁ / (g·L ⁻¹)	X ₂ / (g·L ⁻¹)	实测值	平均	预测值
1	10	3.735	1.903		
2	10	3.735	1.910	1.910	1.880
3	10	3.735	1.915		
4	13.24	4.310	1.986		
5	13.24	4.310	1.997	1.984	1.973
6	13.24	4.310	1.969		
7	14	4.465	1.912		
8	14	4.465	1.929	1.930	1.924
9	14	4.465	1.950		

方程在考察浓度范围内能够进行有效预估.

2.5 最优培养基培养条件下的菌液浓度与杀藻效率

从图2可以看出,菌液浓度(OD₆₀₀)与杀藻率基本相互对应,14 h后杀藻率可达到80%以上,24 h后杀藻活性持久稳定,基本达到100%.这也间接验证了本

果稳定有效.

致谢:本研究由厦门大学生命科学学院 2006 级本科生郭子义协助完成, 谨致感谢!

参考文献:

- [1] 郑天凌, 吕静琳, 吕艳艳, 等. 海洋有害赤潮调控功能菌的发现与研究[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2011, 50(2): 445-454.
- [2] 王新, 周艳艳, 郑天凌. 海洋细菌生态学的若干重要领域及其研究新进展[J]. 微生物学报, 2010, 50(3): 291-297.
- [3] 王新, 李志江, 郑天凌. 海洋浮游细菌在东海赤潮高发区的分布与活性[J]. 环境科学, 2010, 31(2): 287-295.
- [4] Wang X, Li Z J, Su J Q, et al. Lysis of a red-tide causing alga, *Alexandrium tamarense*, caused by bacteria from its phycosphere[J]. Biological Control, 2010(52): 123-130.
- [5] 王颖, 何宁, 李清彪, 等. 酿酒酵母 *S. cerevisiae* 高密度培养条件优化研究[J]. 工业微生物, 2007, 37(1): 34-38.
- [6] Ambati P, Ayyanna C. Optimizing medium constituents and fermentation conditions for citric acid production from palmyra jaggery using response surface method[J]. World Journal of Microbiol Biotechnol, 2001, 17(4): 331-335.
- [7] Vipul Gohel, Tejas Chaudhary, Pranav Vyas, et al. Statistical screenings of medium components for the production

of chitinase by the marine isolate *Pantoea dispersa* [J]. Biochemical Engineering Journal, 2006, 28(1): 50-56.

- [8] 吴春海, 郝玉有, 王永红, 等. 统计学法优化必特螺旋霉素发酵培养基[J]. 中国抗生素杂志, 2008, 33(7): 446-450.
- [9] 王庆玲, 罗小玲, 董娟, 等. 花生红衣中原花色素超声提取工艺的优化[J]. 现代食品科技, 2008, 24(12): 1284-1287.
- [10] 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): 236-239.
- [11] 顾骏, 叶蕊芳, 郑黎. 他克莫司发酵培养基的响应面优化设计[J]. 工业微生物, 2008, 38(2): 60-63.
- [12] 褚以文. 微生物培养基优化方法及其 OPTI 优化软件[J]. 国外医药抗生素分册, 1999, 20(2): 58-61.
- [13] 刘建中, 熊亚红, 翁丽萍, 等. 生物过程的优化[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2002, 41(Sup. 1): 134.
- [14] 梅乐和, 胡升, 许静, 等. 纳豆枯草杆菌的筛选和纳豆激酶发酵条件优化[J]. 浙江大学学报: 工学版, 2004, 38(10): 1355-1360.
- [15] Montgomery D C. Design and analysis of experiments [M]. New York: John Wiley & Sons, 1991: 35-40.
- [16] 代志凯, 张翠, 阮征. 试验设计和优化及其在发酵培养基优化中的应用[J]. 微生物学通报, 2010, 37(6): 894-903.
- [17] 郝学财, 余晓斌, 刘志钰, 等. 响应面方法在优化微生物培养基中的应用[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(1): 38-41.

Optimization of High Cell Density Medium Compositions of Marine Algicidal Bacteria *Vibrio* sp. DHQ25

LÜ Jing-lin¹, ZHENG Wei¹, WANG Bin-xiang¹, TIAN Yun¹, ZHENG Tian-ling^{1,2*}

(1. Key Laboratory of the Ministry of Education for Coastal and Wetland Ecosystems, School of Life Sciences, Xiamen University,

2. State Key Laboratory of Marine Environmental Science, College of Oceanography and Environmental Science,

Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: The influence of medium compositions on the growth of marine algicidal bacteria *Vibrio* sp. DHQ25 was investigated. Plackett-Burman (PB) design, steepest ascent design and central composite design were orderly employed to obtain the optimized medium in this study. The chemical defined medium per liter contains (g/L): 13.24 peptone, 4.31 yeast extract, 0.1 glucose, 25 NaCl, 0.2 MgSO₄ · 7H₂O, 0.5 CaCl₂ · 2H₂O, 0.06 KCl, 0.05 K₂HPO₄, 0.05 KH₂PO₄, 0.002 Fe₂(SO₄)₃. The optical cell density at 600 nm (OD₆₀₀) could reach 1.984, which was increased by 46% compared with 1.359 of that in 2216E medium, the algicidal activity was related to cell density to some extent. This will be beneficial to the further study on the isolation of algicidal compound. It indicated that the combination of Plackett-Burman design with response surface methodology could effectively optimize the high cell density medium compositions of this marine algicidal bacteria.

Key words: algicidal bacteria; Plackett-Burman design; response surface methodology; medium