

响应面分析法优化啉虫脒高效降解菌 D-2 原生质体再生培养基组成*

熊明华 张谐天 杨建伟 吴加一 王光利[#]

(淮北师范大学生命科学学院,资源植物学安徽省重点实验室,安徽 淮北 235000)

摘要 通过单因素分析,确定适于啉虫脒高效降解菌——嗜染料菌 D-2(*Pigmentiphaga* sp. D-2)原生质体再生的培养基成分,并用 Design-Expert 软件进行响应面分析,优化 *Pigmentiphaga* sp. D-2 原生质体再生培养基 3 种成分的最佳浓度模型,并取得模型最优值时各因素的水平。结果表明:(1)单因素分析确定 *Pigmentiphaga* sp. D-2 原生质体再生培养基最佳组成为二水氯化钙 1.0 mmol/L、水解酪蛋白 3.0 g/L、聚乙烯吡咯烷酮 1.5 g/L。(2)响应面分析优化 *Pigmentiphaga* sp. D-2 原生质体再生培养基最佳组成为二水氯化钙 0.8 mmol/L、水解酪蛋白 3.0 g/L、聚乙烯吡咯烷酮 1.4 g/L,此时最大再生率的理论预测值为 35.35%。(3)实验验证表明,以响应面分析得到的 *Pigmentiphaga* sp. D-2 原生质体再生的最佳培养基组成为基础,得到 *Pigmentiphaga* sp. D-2 原生质体再生率为 35.02%,与理论预测值基本吻合。

关键词 嗜染料菌 D-2(*Pigmentiphaga* sp. D-2) 原生质体 再生 响应面分析法

Optimization of protoplast regeneration medium for acetamiprid-degrading strain D-2 via response surface method XIONG Minghua, ZHANG Xietian, YANG Jianwei, WU Jiayi, WANG Guangli. (Anhui Key Laboratory of Plant Resources, College of Life Sciences, HuaiBei Normal University, HuaiBei Anhui 235000)

Abstract: In this paper, the optimum concentration of calcium chloride, casein and polyvinylpyrrolidone for the regeneration of protoplast prepared from acetamiprid-degrading strain D-2 were determined through single-factor analysis. Base on the Design-Expert software, the response surface methodology (RSM) was performed to investigate the interactions of three components on protoplast regeneration, and the levels of each factors under the optimum regeneration condition was consequently achieved. The single factor analysis showed that the optimum concentration of medium components for protoplast regeneration were calcium chloride 1.0 mmol/L, casein 3.0 g/L and polyvinylpyrrolidone 1.5 g/L. While the optimum medium composition obtained from RSM analysis were calcium chloride 0.8 mmol/L, casein 3.0 g/L and polyvinylpyrrolidone 1.4 g/L, under these conditions, the theory protoplast regeneration rate was calculated as 35.35%. The verification test was carried out under the optimal conditions, and the experimental protoplast regeneration value (35.02%) was in accords with the model predictive value, indicating the proposed model can be used for describing and predicting the regeneration feature of protoplast.

Keywords: *Pigmentiphaga* sp. D-2; protoplast; regeneration; response surface methodology

啉虫脒又名莫比朗、吡虫清、NI-25,是日本曹达株式会社开发的第3个氯代烟碱类杀虫剂^[1]。该杀虫剂杀虫谱广、活性高、用量少、持效期长且作用迅速,对害虫具有触杀和胃毒作用,并且具有卓越的内吸活性,是世界范围内广泛使用的有机磷杀虫剂的理想替代品,目前已被广泛应用于果园、菜地、棉田等经济作物种植中^[2-3]。有研究报道,啉虫脒在田间的降解半衰期为 2.8~14.0 d^[4],对土壤和水环境存在着污染风险^[5-6],并且体外实验表明,啉虫脒对人淋巴细胞基因产生毒性^[7]。啉虫脒的大量使用,给生态环境、农业的可持续发展带来很大的压力,也严

重威胁着人类的健康和生态平衡。因此,有必要减少或清除土壤中残留的啉虫脒。在灭菌和未灭菌土壤中,啉虫脒的降解半衰期分别为 29.37、8.12 d,表明微生物降解是啉虫脒在土壤汇总的主要形式^[8]。目前,国内外科研工作者已分离筛选到一些啉虫脒的降解菌,并研究了其在实验室环境下的生物修复^[9-11]。然而,自然环境下农药污染情况较复杂,降解单一啉虫脒的微生物菌株已经不能满足生物修复的需求,为了消除啉虫脒等多重复合污染物,通过原生质体融合技术获取具有多功能的农药降解菌株不失为一种有效的手段。原生质体融合过程中细胞再

第一作者:熊明华,男,1983年生,博士,讲师,主要从事环境微生物学与环境生物工程的研究。[#]通讯作者。

* 国家自然科学基金资助项目(No. 31100083);淮北师范大学生青年科研基金资助项目(No. 700697)。

生情况是影响原生质体融合效果的一个重要瓶颈。

响应面分析法(RSM)是一种实验条件寻优算法,可以建立连续变量曲面模型^[12],通过对过程的回归拟合和响应曲面、等高线的绘制,可方便地求出相应于各因素水平的响应值。在各因素水平的响应值基础上,找出预测的最优响应值以及相应的实验条件。目前,该法已被广泛用于培养基、降解条件优化及生物分离等领域^[13-15]。笔者在研究影响啮虫脲降解菌株——嗜染料菌 D-2 (*Pigmentiphaga* sp. D-2)原生质体再生的培养基组分(二水氯化钙、水解酪蛋白和聚乙烯吡咯烷酮)单因素初步实验的基础上,应用 RSM,以二水氯化钙、水解酪蛋白和聚乙烯吡咯烷酮为响应因子,以原生质体再生率为响应值,用 Design-Expert 6.0 的 Box-Behnken 设计建立响应曲面模型,来优化 *Pigmentiphaga* sp. D-2 原生质体再生培养基成分。

1 材料和方法

1.1 菌株、培养基与溶液

Pigmentiphaga sp. D-2 菌株由本实验室从长期受啮虫脲污染的土壤中分离得到,能利用啮虫脲为唯一碳源、氮源和能源进行生长,能在 72 h 内几乎完全转化 50 mg/L 的啮虫脲^[16]。

基础培养基:酵母粉 5 g、氯化钠 5 g、蛋白胨 10 g,补充蒸馏水至 1.0 L,调节 pH 为 7.0,121 °C 灭菌 20 min。根据实验需要,在基础培养基中添加 2.0% (质量分数)琼脂即为固体基础培养基。

再生培养基:酵母粉 5 g、氯化钠 5 g、蛋白胨 10 g、蔗糖 0.5 mol、MgCl₂ · 6H₂O 0.02 mol、磷酸二氢钾 1 g、磷酸氢二钾 1 g、琼脂 20 g、蒸馏水定容至 1.0 L,调节 pH 为 7.2,110 °C 灭菌 20 min。

SMM 稳定液:蔗糖 0.5 mol、MgCl₂ · 6H₂O 0.02 mol、马来酸 0.02 mol、去离子水定容至 1.0 L、调节 pH 为 7.0,由 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌。

溶菌酶溶液:由 SMM 稳定液配制,溶菌酶质量浓度为 60 mg/mL。

以上试剂除了溶菌酶为 Sigma 公司生产(进口分装),其他试剂均为国产分析纯。

1.2 原生质体的制备与再生

挑取一环固体基础培养基上的 *Pigmentiphaga* sp. D-2 菌株接入含有 5 mL 基础培养基的试管中,30 °C、150 r/min 过夜培养,然后按 1% (体积分数)的接种量转接入含有 50 mL 基础培养基的 250 mL 锥形瓶中,30 °C、150 r/min 摇床培养至对数期中期

(约 13 h)。取 20 mL 菌液 5 000 r/min 离心 5 min,无菌水洗涤 2 次并调整 600 nm 处的吸光度 (OD₆₀₀) ≈ 1.5,即得到菌体悬液。

取其中一部分菌体悬液 10 倍稀释后涂布于固体基础培养基,30 °C 培养 3 d 后计数菌落数(即总菌数)。取另一部分菌体悬液,加入一定量溶菌酶溶液至溶菌酶终质量浓度为 1 mg/mL,37 °C 恒温水浴 3 h,每 10 min 轻轻振荡混匀。酶解结束后,3 000 r/min 离心 10 min, SMM 稳定液洗涤 2 次并悬浮于 SMM 稳定液中,得到原生质体悬液。然后分别用无菌水和 SMM 稳定液 10 倍稀释原生质体悬液并涂布于再生培养基,30 °C 恒温培养 3 d 后,分别计算无菌水和 SMM 稳定液稀释再生培养基上的菌落数(即未破壁菌数和再生菌数),并计算原生质体再生率(见式(1))。

$$\text{再生率} = \frac{\text{再生菌数} - \text{未破壁菌数}}{\text{总菌数} - \text{未破壁菌数}} \times 100\% \quad (1)$$

1.3 单因子实验

1.3.1 二水氯化钙

再生培养基中分别加入 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mmol/L 二水氯化钙,原生质体悬液经无菌水、SMM 稳定液 10 倍稀释后涂布于上述培养基中,30 °C 细菌培养箱培养 3 d 计数菌落数,计算原生质体再生率。

1.3.2 水解酪蛋白

再生培养基中分别加入 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 g/L 水解酪蛋白,原生质体悬液经无菌水、SMM 稳定液 10 倍稀释后涂布于上述培养基中,30 °C 细菌培养箱培养 3 d 计数菌落数,计算原生质体再生率。

1.3.3 聚乙烯吡咯烷酮

再生培养基中分别加入 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 g/L 聚乙烯吡咯烷酮,原生质体悬液经无菌水、SMM 稳定液 10 倍稀释后涂布于上述培养基中,30 °C 细菌培养箱培养 3 d 计数菌落数,计算原生质体再生率。

1.4 响应面与验证实验

通过对影响 *Pigmentiphaga* sp. D-2 原生质体再生率的单因素分析,确定在单因素条件下适合原生质体再生的二水氯化钙、水解酪蛋白和聚乙烯吡咯烷酮的浓度范围,再用 Design-Expert 软件进行响应面分析,优化 D-2 原生质体再生的最佳组合条件,并且在 RSM 得到的原生质体再生最佳浓度培养基成分条件下,平行做 3 次验证实验,证实响应面分析方法可靠性。

2 结果与分析

2.1 二水氯化钙对原生质体再生的影响

由图1可知,二水氯化钙从0 mmol/L增加到2.5 mmol/L时,原生质体再生率先由10.3%增加到16.5%,再降低到12.2%。因此,再生培养基中二水氯化钙最佳摩尔浓度为1.0 mmol/L。钙离子主要是通过维系膜结构的完整性来实现原生质体的稳定性和活性,所以适当浓度的二水氯化钙有利于原生质体的再生。

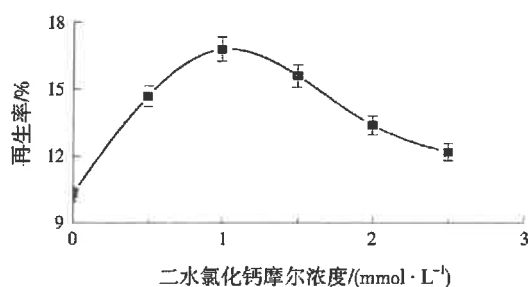


图1 二水氯化钙对原生质体再生的影响

Fig. 1 Effect of $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ on protoplast regeneration

2.2 水解酪蛋白对原生质体再生的影响

由图2可知,水解酪蛋白对细菌细胞壁的再生起到了先促进后抑制的作用,再生培养基中其最佳质量浓度为3.0 g/L。水解酪蛋白促进原生质体再生可能与其含有丰富的氨基酸及细胞壁合成中的多种原料有关,它们可以提高微生物快速繁殖能力及产酶能力,从而促进细胞壁的合成。

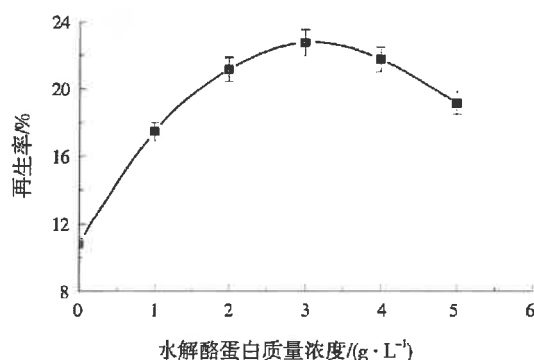


图2 水解酪蛋白对原生质体再生的影响

Fig. 2 Effect of casein on protoplast regeneration

2.3 聚乙烯吡咯烷酮对原生质体再生的影响

由图3可知,聚乙烯吡咯烷酮可以显著提高原生质体的再生率,再生培养基中其最佳质量浓度为1.5 g/L。聚乙烯吡咯烷酮作为静态细胞培养基体可以有效刺激细胞壁的再生,具有强极性、惰性、低黏度等特点,是原生质体良好的保护剂、扩张剂,可以为原生质体提供更好的生长代谢环境。

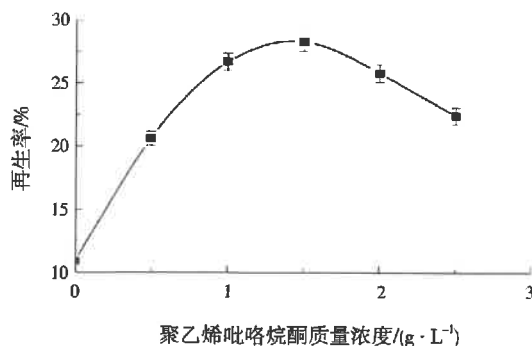


图3 聚乙烯吡咯烷酮对原生质体再生的影响

Fig. 3 Effect of polyvinylpyrrolidone on protoplast regeneration

2.4 响应面实验结果分析

根据 Box-Behnken 的中心组合实验设计原理,综合单因素影响实验结果,对影响 *Pigmentiphaga* sp. D-2 原生质体再生的培养基成分二水氯化钙(A)、水解酪蛋白(B)和聚乙烯吡咯烷酮(C)浓度进行了3因素3水平响应面分析实验,实验设计与结果见表1和表2。利用 Design-Exper 软件对表2数据进行二次多元回归拟合,得到再生率预测值(Y,%)对3因素的二次多项回归方程:

$$Y = 33.82 - 2.88A - 2.46B - 3.66C + 0.6AB + 1.45AC + 0.13BC - 4.12A^2 - 4.00B^2 - 7.90C^2 \quad (2)$$

表1 响应面3因素3水平实验设计
Table 1 The experiment design of 3 factors and 3 levels of response surface method

水平	A/(mmol · L ⁻¹)	B/(g · L ⁻¹)	C/(g · L ⁻¹)
-1	0.5	2.0	1.0
0	1.0	3.0	1.5
1	1.5	5.0	2.0

对回归模型进行方差分析,结果见表3。模型 $P < 0.0001$,表明该模型影响高度显著。在选择的实验范围内,模型中的参数A、B、C、AB、AC、 A^2 、 B^2 、 C^2 都是影响显著($P < 0.05$)。模型失拟项表示模型预测值与实际值不拟合的概率,失拟项的P为0.1142,影响不显著,模型选择合适。则可用该回归方程代替实验真实点对实验结果进行分析。同时,软件分析得到的模型的相关系数 $R^2 = 0.998$,进一步说明模型拟合效果良好。所以,可以使用该模型来分析和预测 *Pigmentiphaga* sp. D-2 原生质体在不同再生培养基成分下的再生率。

为了进一步研究相关变量之间的交互作用以及确定最优点,通过 Design-Expert 软件绘制响应面曲线图来进行可视化的分析,图4至图6分别显示了3组以 *Pigmentiphaga* sp. D-2 原生质体再生率为响

表 2 Box-Behnken 设计表及结果
Table 2 Experimental result of Box-Behnken design list

序号	水平			再生率%	
	A	B	C	预测值	实际值
1	-1	-1	0	31.64	31.40
2	-1	1	0	25.51	25.30
3	1	-1	0	24.69	24.90
4	1	1	0	20.96	21.20
5	0	-1	-1	28.17	28.40
6	0	-1	1	20.60	20.40
7	0	1	-1	23.00	23.20
8	0	1	1	15.92	15.70
9	-1	0	-1	29.79	29.80
10	1	0	-1	21.14	20.70
11	-1	0	1	19.56	20.00
12	1	0	1	16.71	16.70
13	0	0	0	33.82	34.10
14	0	0	0	33.82	33.90
15	0	0	0	33.82	34.00
16	0	0	0	33.82	33.60
17	0	0	0	33.82	33.50

表 3 方差分析
Table 3 Analysis of variance

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	P ¹⁾
模型	9	673.61	74.85	505.96	<0.000 1
A	1	66.13	66.13	447.01	<0.000 1
B	1	48.51	48.51	327.94	<0.000 1
C	1	107.31	107.31	725.43	<0.000 1
AB	1	1.44	1.44	9.73	0.016 8
AC	1	8.41	8.41	56.85	0.000 1
BC	1	0.06	0.06	0.42	0.536 4
A ²	1	71.56	71.56	483.73	<0.000 1
B ²	1	67.28	67.28	454.84	<0.000 1
C ²	1	262.61	262.61	1 775.27	<0.000 1
残差	7	1.04	0.15		
失拟项	3	0.77	0.26	3.82	0.114 2

注：¹⁾ P<0.05 表示影响显著；P<0.01 表示影响高度显著。

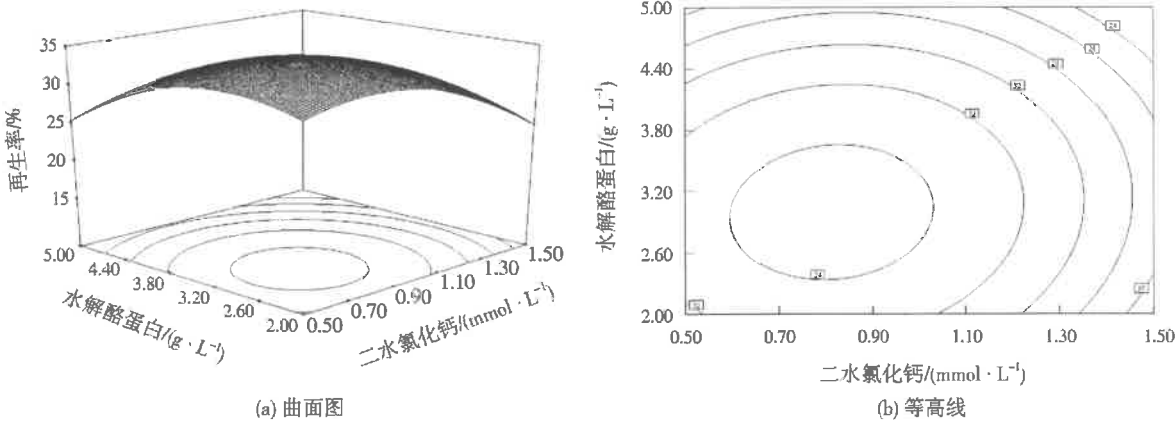


图 4 二水氯化钙与水解酪蛋白交互影响 *Pigmentiphaga* sp. D-2 原生质体再生的曲面图和等高线
Fig. 4 Effect of interaction between $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ and casein hydrolysate on *Pigmentiphaga* sp. D-2 protoplast regeneration
应值的曲面图和等高线图,从等高线图可以直观地反映出两变量交互作用的显著程度,圆形表示两因素交互作用不显著,椭圆形表示两因素交互作用显著。从图 4 至图 6 可以看出,二水氯化钙与水解

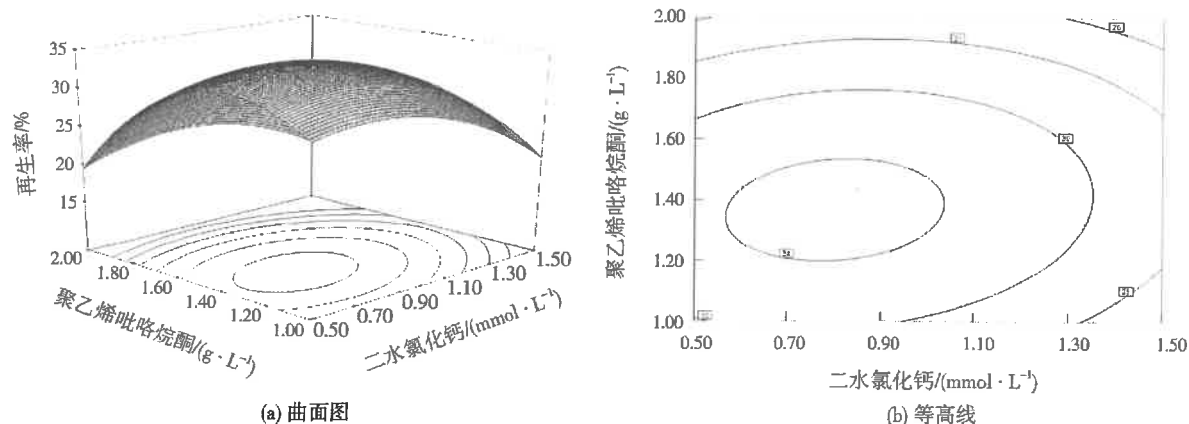


图5 二水氯化钙与聚乙烯吡咯烷酮交互影响 *Pigmentiphaga* sp. D-2 原生质体再生的曲面图和等高线
Fig. 5 Effect of interaction between $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ and polyvinylpyrrolidone on *Pigmentiphaga* sp. D-2 protoplast regeneration

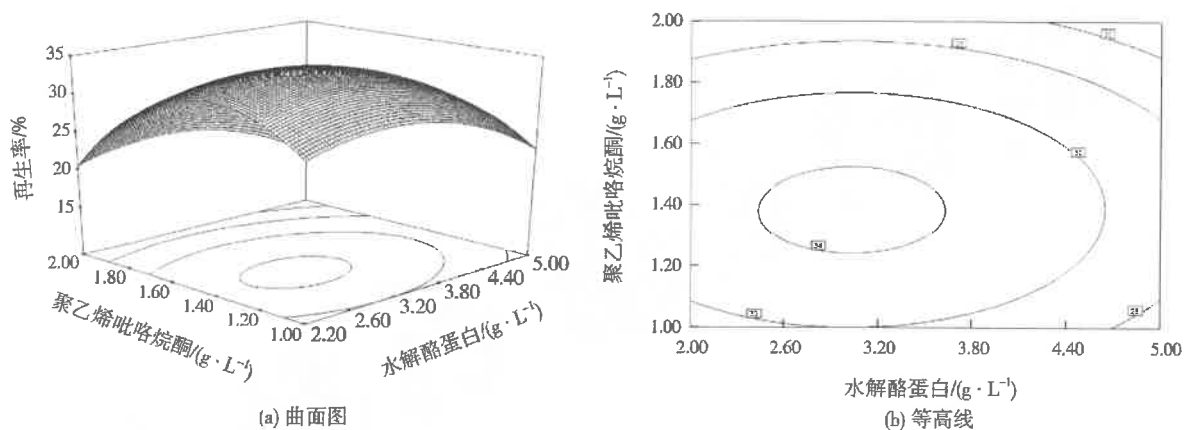


图6 水解酪蛋白与聚乙烯吡咯烷酮交互影响 *Pigmentiphaga* sp. D-2 原生质体再生的曲面图和等高线
Fig. 6 Effect of interaction between casein and polyvinylpyrrolidone on *Pigmentiphaga* sp. D-2 protoplast regeneration

酪蛋白、二水氯化钙与聚乙烯吡咯烷酮、水解酪蛋白与聚乙烯吡咯烷酮对 *Pigmentiphaga* sp. D-2 原生质体再生的交互作用均显著。

由图4至图6还可以看出,响应值存在最大值,进一步通过软件分析计算,得到 *Pigmentiphaga* sp. D-2 原生质体再生率最高时的培养基最佳组成为二水氯化钙 0.8 mmol/L、水解酪蛋白 3.0 g/L、聚乙烯吡咯烷酮 1.4 g/L,此时最大再生率的理论预测值为35.35%。

2.5 验证实验结果分析

以响应面分析得到的 *Pigmentiphaga* sp. D-2 原生质体再生的最佳培养基组成为基础,做3次平行实验,得到 *Pigmentiphaga* sp. D-2 原生质体再生率为35.02%,与理论预测值基本吻合,这表明响应面分析方法可靠。

3 结论

(1) 单因素分析确定蛭虫脲高效降解菌 *Pigmentiphaga* sp. D-2 原生质体再生培养基最佳组成

为二水氯化钙 1.0 mmol/L、水解酪蛋白 3.0 g/L、聚乙烯吡咯烷酮 1.5 g/L。

(2) 响应面分析优化 *Pigmentiphaga* sp. D-2 原生质体再生培养基最佳组成为二水氯化钙 0.8 mmol/L、水解酪蛋白 3.0 g/L、聚乙烯吡咯烷酮 1.4 g/L,此时最大再生率的理论预测值为35.35%。

(3) 实验验证表明,以响应面分析得到的 *Pigmentiphaga* sp. D-2 原生质体再生的最佳培养基组成为基础,得到 *Pigmentiphaga* sp. D-2 原生质体再生率为35.02%,与理论预测值基本吻合。

参考文献:

- [1] 周育,庾琴,侯慧峰,等.新型烟碱类杀虫剂啶虫脒研究进展[J].植物保护,2006,32(3):16-20.
- [2] 姚晓华,闵航,袁海平.杀虫剂啶虫脒对旱地土壤酶活性及呼吸强度的影响[J].土壤学报,2005,42(6):1012-1016.
- [3] 唐振华.新烟碱类杀虫剂的结构与活性及其药效基团[J].现代农药,2002(1):1-6.

(下转第29页)

