

红树林植物促生菌 SZ7-1 菌株的培养基优化

袁辉林 康丽华* 王胜坤

(中国林业科学研究院热带林业研究所 广东 广州 510520)

摘要: 采用响应面分析法对红树林植物促生菌 SZ7-1 菌株发酵培养基进行了优化。首先利用 Plackett-Burman (PB)设计对影响 SZ7-1 生长的 11 个营养因素进行评价,并筛选出显著影响因子:玉米糖浆、酵母膏和 K_2HPO_4 ;其次用最陡爬坡实验逼近以上三因素最优水平;最后采用响应面法对该 3 个显著因素的最佳水平范围进行研究,得到的最佳浓度为:玉米浆 28 g/L、酵母膏 14 g/L 和 K_2HPO_4 2.2 g/L。在此条件下,培养 20 h 后 SZ7-1 菌数达到 2.6×10^{10} CFU/mL,与优化前基础培养基、LB 和牛肉膏蛋白胨培养基中生长的菌数相比,分别提高了 12.4、2.4 和 5.5 倍。

关键词: SZ7-1, Plackett-Burman 设计, Box-Behnken 设计, Minitab 软件, 响应面法

Optimization of growth medium for a PGPR strain (SZ7-1) from mangrove rhizosphere

YUAN Hui-Lin KANG Li-Hua* WANG Sheng-Kun

(Research Institute of Tropical Forestry, CAF, Guangzhou, Guangdong 510520, China)

Abstract: A plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) strain, SZ7-1, was obtained from mangrove rhizosphere and tested previously for potential applications. To develop an economical and practical fermentation medium for the growth of SZ7-1, response surface method was used in this study. Plackett-Burman factorial design was used to examine the significance of 11 different media on the growth of SZ7-1. Experimental result demonstrated that media consisting of corn syrup, yeast extract and K_2HPO_4 significantly improved the growth process. The effect of different combinations of the three nutrients on the growth of SZ7-1 were further explored in a Box-Behnken design. The optimal concentration of each nutrient for maximum growth were corn syrup 28 g/L, yeast extract 14 g/L and K_2HPO_4 2.2 g/L. The optimized medium enhanced the growth of SZ7-1 by 12.4, 2.4 and 5.5 times more than the original medium, LB and cow meat extract protein peptone medium, respectively. This research indicates that it is possible to increase bacterial yield and reduce its costs using optimized growth medium.

基金项目: 广东省科技创新课题(No. 2009KJCX004-03); 国家级林业成果推广项目(No. [2010]10 号); 国家级星火计划项目(No. 2005EA169010); 林业公益性行业科研专项(No. 201004075)

* 通讯作者: Tel: 86-20-87029270; E-mail: klh@ritf.ac.cn

收稿日期: 2010-09-07; 接受日期: 2010-12-07

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

Keywords: SZ7-1, Plackett–Burman design, Box–Behnken design, Minitab software, Response surface methodology

红树林作为热带、亚热带潮间带的木本植物群落,是海滩上特有的森林类型。在固岸护堤、维持生物多样性、净化环境、提取海洋药物以及维持海岸带生态平衡等方面具有重大的价值,有着陆地森林不可取代的生态、经济和社会效益^[1]。然而,由于人类不合理的开发和利用,全球红树林面积锐减、种质衰退,红树林造林保护和恢复已受到广泛关注^[2],但红树林造林成活率和保存率低一直制约着红树林的恢复与发展。

红树林通常被认为是营养较缺乏(尤其是 N、P 元素)的生态系统^[3],然而几乎所有红树林都生长茂盛,并不表现出明显的营养匮乏现象。有研究指出,红树林植物促生菌(Plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR^[4])的生命活动对红树林系统内的营养转化和循环发挥着很大的作用,利用 PGPR 菌接种能有效促进红树林幼苗和胚轴的生长,可成为人工恢复红树林的一种有潜力的手段^[5–6]。

然而,较高的生产成本和较低的产量限制了 PGPR 的发展和应用,因此寻找能够降低生产成本、提高产量的方法是目前迫切需要解决的问题。发酵培养基的优化作为提高菌体产量、缩短发酵时间和降低生产成本的重要途径之一,是 PGPR 进行产业化生产的基础。本实验室从红树林植物根系中首次分离筛选到了一株兼有溶磷和固氮能力的 PGPR 菌株 SZ7-1 (克雷伯氏菌 *Klebsiella* sp.),具有良好的促生能力^[7],对于红树林的恢复及农林业的生产具有良好的潜力。为了解决 SZ7-1 在原分离培养基(改良的 SRSM 培养基^[8])上培养成本高、生长慢和产量低等问题,亟需找到一种新的优化培养基配方。响应面法(Response surface methodology, RSM)作为一种简易、迅速、可靠的统计学优化方法,已广泛应用于微生物培养基优化工作中^[9–11],但利用该法来优化 PGPR 培养基的研究报道极少。本研究在前期试验和原培养基的基础上,采用 Plackett–Burman (PB)设计结合 RSM 方法对红树林植物促生菌 SZ7-1 菌株培养基进行了优化,以期通过合理的实验设计来降

低生产成本、提高菌体产量和发酵效率,为红树林人工接种促生菌的生产和应用奠定基础,也为其他 PGPR 培养基优化提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株: 促生菌 SZ7-1 菌株,由本实验室从红树林植物根系中分离筛选并保存^[7]。

1.1.2 培养基: 基础培养基: 用 K_2HPO_4 替换改良的 SRSM 培养基的原有磷源做为基础培养基。斜面及平板培养基: 采用 LB (Luria–Bertani) 固体培养基^[12]。摇瓶种子培养基: 采用 LB 液体培养基。其他培养基: 采用牛肉膏蛋白胨液体培养基^[13]。

1.2 方法

1.2.1 菌种活化: SZ7-1 在斜面培养基上 30 °C 培养 18 h 后,接一环到种子培养液(150 mL 的三角瓶装 50 mL 培养液)中,然后在 30 °C 温度下,150 r/min 转速的摇床中振荡培养 18 h。

1.2.2 发酵培养: 将培养好的种子培养液,按照 1% (V/V) 接种量接入发酵培养液(250 mL 三角瓶装 50 mL 培养液)中,摇床培养的条件为: 温度 30 °C, 转速 150 r/min, 时间 24 h。

1.2.3 菌体数量测定: (1) 吸光值的测定法。利用 Spectronic 601 分光光度计,在波长为 600 nm 条件下测定菌液的吸光值(*OD* 值),菌液用无菌水稀释 10 倍。(2) 平板菌落计数法^[14]。菌液采用 10 倍梯度稀释,选取适当稀释度倾注平板,使其均匀分布于培养基中,30 °C 恒温培养。

1.2.4 不同培养基比较: 通过对模型求导,得到最佳配方后,对优化前后培养基以及 2 种常规培养基 (LB 和牛肉膏蛋白胨培养基) 进行比较,并绘制 SZ7-1 菌株的生长曲线,分析优化前后 SZ7-1 在这 4 种不同培养基上的生长情况。培养方法见 1.2.2。

1.3 实验设计

1.3.1 Plackett–Burman (PB) 设计: 根据细菌生长所需营养要素的一般原则以及微生物发酵影响因素

的一般规律, 结合之前有关 SZ7-1 的前期实验, 在单因子试验的基础上进行设计。所选取的响应值为波长 600 nm 下发酵液的 OD 值(稀释 10 倍), 数据分析及模型建立均采用 Minitab 15.0 进行, 自变量及其代号、编码和水平见表 1。各个变量按照公式(1)进行编码:

$$x_i=(X_i-X_0)/\Delta X_i \tag{1}$$

其中 x_i 是变量 X_i 的编码值, X_0 是变量 X_i 中心点的值, ΔX_i 是变量 X_i 的变化间隔值即步长值。

表 1 Plackett-Burman 试验设计水平及编码 Table 1 Level and code of variables chosen for Plackett-Burman design			
变量 Variable (g/L)	代号 Symbol	编码水平 Coded levels	
		-1	1
Corn syrup	A	15	25
Yeast extract	B	10	15
Beef extract	C	10	15
Glucose	D	10	20
NaCl	E	1	10
MgSO ₄	F	0.2	0.4
KCl	G	0.1	0.3
(NH ₄) ₂ SO ₄	H	0.5	1.5
K ₂ HPO ₄	J	1	2
MnSO ₄	K	0.002	0.006
FeSO ₄	L	0.001	0.003

1.3.2 最陡爬坡试验: 找出显著因素后, 根据部分因素试验得出的一次拟合方程, 安排最陡爬坡试验。一次拟合方程中显著因子的系数决定爬坡方向和变化步长, 从而逼近最大响应区域。

1.3.3 响应面设计: 逼近最大响应区域后, 应用 Box-Behnken 设计对显著因素进行优化并构建模型, 寻找促生菌 SZ7-1 发酵的最大菌体数量(OD 值)和最优条件。表 2 给出了研究中使用的因素水平和编码。该模型通过最小二乘法拟合的二次多项方程为:

$$Y=b_0+\sum b_{ij}x_i+\sum b_{ij}x_ix_j+\sum b_{iik}x_i^2 \tag{2}$$

其中 Y 是被预测的相应值, b_0 是常数, b_i 是线性系数, b_{ij} 是交互项系数, b_{ii} 是二次项系数。本试验试验设计、数据分析及模型建立均采用 Minitab 15.0 软件辅助进行。

表 2 Box-Behnken 设计因素及水平表 Table 2 Factors and levels in Box-Behnken central composite design				
因素 Factors (g/L)	编码 Encode	水平 Levels		
		-1	0	1
Corn syrup	X_1	20.0	25.0	30.0
Yeast extract	X_2	12.0	14.0	16.0
K ₂ HPO ₄	X_3	1.4	1.8	2.2

Note: $x_1=(X_1-25)/5$; $x_2=(X_2-14)/2$; $x_3=(X_3-1.8)/0.4$.

2 结果与分析

2.1 关键因素的确定

以单因素实验的最佳水平区间作为基点, 进行 Plackett-Burman (PB)设计, Plackett-Burman (PB)设计回归方差分析结果见表 3。实验数据进行 3 次平行取均值。

表 3 SZ7-1 在 Plackett-Burman 设计中回归方程方差分析表 Table 3 ANOVA for the regression equation of SZ7-1 in Plackett-Burman design					
来源 Source	自由度 DF	SS	MS	F value	P value
模型 Model	11	0.025 732 7	0.002 339 3	10.09	0.041
残差 Residual	3	0.000 695 3	0.000 231 8		
总计 Total	14	0.026 428 0			
				$R^2=0.974$	Adj $R^2=0.877$

通过对回归系数的归纳发现, 表 1 的 11 个变量中只有玉米浆($P=0.009$)、酵母膏($P=0.036$)和 K_2HPO_4 ($P=0.021$)这 3 个因子在 95%概率水平上差异显著, 其他因子差异不显著, 因此下面的研究选择玉米浆、酵母膏和 K_2HPO_4 作为影响 SZ7-1 的关键因素, 其他因子对实验结果影响不显著, 所以采用逐步回归的方法。EFGHKL 水平选定见表 4, 总效应为正的取高水平值, 负的取低水平值。故由表 4 可以得出 E、G、K 因素取低水平, 分别取 1、0.1 和 0.002 g/L; F、H、L 因素取高水平, 分别取 0.4、1.5 和 0.003 g/L。由表 3 可知, 该模型显著。证明该方程模型在 $\alpha=0.05$ 水平上足够地拟合了试验数据即该

模型显著, 确定系数 $R^2=0.974$, 表明 97.4% 的试验数据可以用此方程解释。由回归分析结果拟合的一次回归方程为:

$$Y=1.03+0.0262A+0.0160B+0.0197J \tag{3}$$

(3) 式中 Y 为吸光值, A 为玉米浆(g/L), B 为酵母膏(g/L), J 为 K_2HPO_4 (g/L)。

表 4 各因素的总效应表 Table 4 The total effect of each factor						
因素 Factor	E	F	G	H	K	L
总效应 The total effect	-0.14	0.102	-0.158	0.034	-0.096	0.166

注: 总效应为 Plackett-Burman 试验设计结果各因素高低水平之和。
Note: The total effect is the sum of each factor high and low level of Plackett-Burman design.

2.2 最佳爬陡坡实验

由 Plackett-Burman 实验可知, 在促生菌 SZ7-1 发酵中, 玉米浆、酵母膏和 K_2HPO_4 这 3 个因素对该菌的生长有重要的影响, 且三因素均为显著正效应, 量应增加。其他因素对实验结果影响不大, 下一步不予考虑, 维持原水平。根据这 3 个因素效应大小的比例设定它们的变化方向及步长进行爬坡实验, 试验设计及结果见表 5。由表 5 可知, 最优条件在实验 3 附近出现, 因此选择实验 3 作为响应面分析的中心点。

表 5 爬坡试验梯度设计与结果 Table 5 Design of steepest ascent tests and corresponding results					
试验号 Test No.	步长 Steep	变量水平 Variable levels			OD_{600}
		Corn syrup (g/L)	Yeast extract (g/L)	K_2HPO_4 (g/L)	
	Δ	5	2	0.4	
1	Origin	15	10	1.0	0.539
2	Origin + Δ	20	12	1.4	0.685
3	Origin +2 Δ	25	14	1.8	0.781
4	Origin +3 Δ	30	16	2.2	0.759
5	Origin +4 Δ	35	18	2.6	0.756
6	Origin +5 Δ	40	20	3.0	0.702

注: Δ : 移动步长。
Note: Δ : Mobile steps.

2.3 响应面的培养基优化及分析结果

以玉米浆、酵母膏、 K_2HPO_4 三因素为自变量, 以固氮菌发酵液的 OD_{600} 值为响应值。对固氮菌的发酵培养基组成进行优化。采用 Box-Behnken 试验设计, 以表 5 中第 3 组实验为中心点。实验设计及实验结果见表 2 和表 6。

表 6 中实验数据用 Minitab15.0 软件拟合, 得到多项式回归模型为:

$$Y=0.775+0.0184X_1+0.0105X_2+0.0119X_3-0.027X_1^2-0.0193X_2^2-0.007X_3^2-0.00125X_1X_2+0.0135X_1X_3-0.0113X_2X_3。$$

回归方程系数差异显著性检验结果见表 7。由表 7 可知, 参数 X_1 ($P=0.002$)、 X_2 ($P=0.023$)、 X_3 ($P=0.015$)、 X_1^2 ($P=0.002$)、 X_2^2 ($P=0.010$)、 X_1 与 X_3 之间的交互作用($P=0.032$)对响应值影响显著。而 X_3^2 、 X_1 与 X_2 的交互作用、 X_2 与 X_3 的交互作用对响应值的影响不显著。

由表 8 可以看出, 回归模型 P 检验显著, 表明用回归拟合方程描述各因子与响应值之间的关系时, 其因变量与全体自变量之间的回归关系显著, 同时相关系数 $R^2=0.9586$, 说明 95.86% 的实验结果可由此模型解释, 该方程为培养基优化提供了一个合适的模型。利用 Minitab15.0 软件对表 6 的数据进

表 6 Box-Behnken 试验设计及结果 Table 6 Design and results of Box-Behnken central composite tests					
试验号 Test No.	Corn syrup X_1 (g/L)	Yeast extract X_2 (g/L)	K_2HPO_4 X_3 (g/L)	OD_{600}	拟合值 Fitted values
1	25	14	1.8	0.780	0.775
2	30	16	1.8	0.753	0.756
3	30	14	1.4	0.740	0.734
4	20	16	1.8	0.731	0.722
5	20	14	1.4	0.718	0.724
6	25	16	1.4	0.756	0.758
7	25	16	2.2	0.757	0.759
8	25	14	1.8	0.776	0.775
9	25	12	1.4	0.718	0.715
10	30	14	2.2	0.791	0.784
11	25	14	1.8	0.769	0.775
12	30	12	1.8	0.729	0.737
13	20	12	1.8	0.702	0.698
14	20	14	2.2	0.715	0.721
15	25	12	2.2	0.764	0.761

表 7 各因素的回归系数及影响因子的显著性
Table 7 Regression coefficients, impact factors and their significances

项 No.	系数 Coefficient	系数标准误差 Coefficient standard error	F	P
常量 Constant	0.775 000	0.005 309	145.984	0.000
X_1	0.018 375	0.003 251	5.652	0.002
X_2	0.010 500	0.003 251	3.230	0.023
X_3	0.011 875	0.003 251	3.653	0.015
X_1^2	-0.027 000	0.004 785	-5.642	0.002
X_2^2	-0.019 250	0.004 785	-4.023	0.010
X_3^2	-0.007 000	0.004 785	-1.463	0.203
X_1X_2	-0.001 250	0.004 598	-0.272	0.797
X_1X_3	0.013 500	0.004 598	2.936	0.032
X_2X_3	-0.011 250	0.004 598	-2.447	0.058

行二次多元回归拟合, 所得到的二次回归方程的响应面及其等高线见图 1-3。这些图简单、直观的反应了两种营养成分之间的相互作用效果以及他们的最优水平。因为等高线的形状反映交互效应的强弱大小, 圆形表示两个因素交互作用不显著, 椭圆形表示两个因素交互作用显著。由图 1 可知, 随着玉米浆和酵母膏浓度的增加, OD 值先增加后减少。从图 2 中可以看出, 在 K_2HPO_4 2.2 g/L、玉米浆 26-30 g/L 时 OD 值最大。同时, 图 2 中 2D 图形轮廓以及较小的 P (0.032) 值显示两者的交互作用影响显著。而图 3 则反映了在酵母膏 14.5 g/L, K_2HPO_4 2.1-2.2 g/L 时, OD 值最大。利用 Minitab15.0 软件对菌体浓度的二次多项式数学模型进行求导, 可得到该模型的极值点, 即玉米浆 28 g/L、酵母膏 14 g/L、 K_2HPO_4 2.2 g/L。而此时响应值 OD 最大值为 0.789。

表 8 回归模型的方差分析
Table 8 ANOVA analysis of model equation

来源 Source	自由度 DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
回归 Regression	9	0.009 791	0.009 791	0.001 088	12.87	0.006
线性 Linear	3	0.004 711	0.004 711	0.001 570	18.57	0.004
平方 Square	3	0.003 838	0.003 838	0.001 279	15.13	0.006
交互作用 Interaction	3	0.001 242	0.001 242	0.000 414	4.89	0.060
残差误差 Residual error	5	0.000 423	0.000 423	0.000 085		
失拟 Lack-of-fit	3	0.000 361	0.000 361	0.000 120	3.88	0.212
纯误差 Pure error	2	0.000 062	0.000 062	0.000 031		
合计 Total	14	0.010 214				
					$R^2=95.86\%$	$AdjR^2=88.41\%$

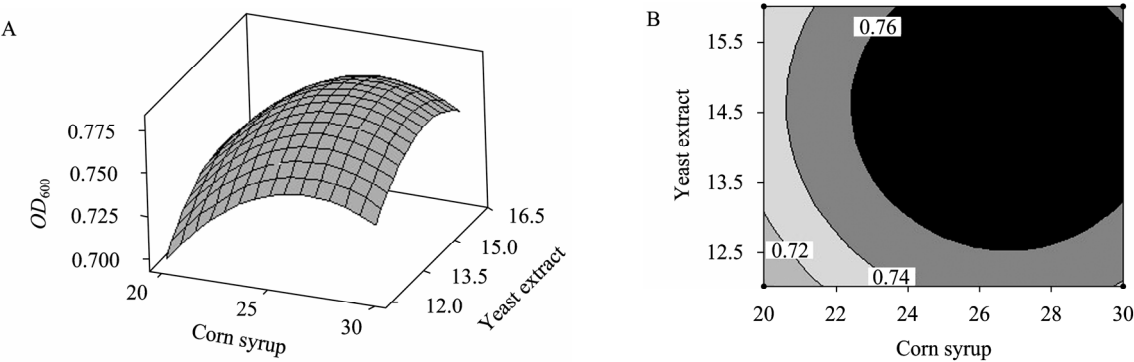


图 1 玉米浆与酵母膏交互影响 SZ7-1 菌株 OD 值的曲面图(A)和等高线图(B)

Fig. 1 Response surface plot (A) and corresponding contour plot (B) on the growth of SZ7-1 versus corn syrup and yeast extract

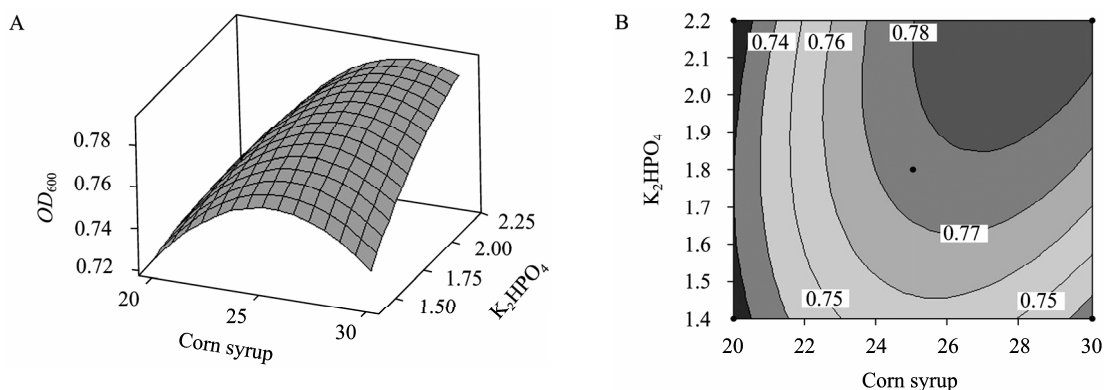


图2 玉米浆与 K_2HPO_4 交互影响 SZ7-1 菌株 OD 值的曲面图(A)和等高线图(B)

Fig. 2 Response surface plot (A) and corresponding contour plot (B) on the growth of SZ7-1 versus corn syrup and K_2HPO_4

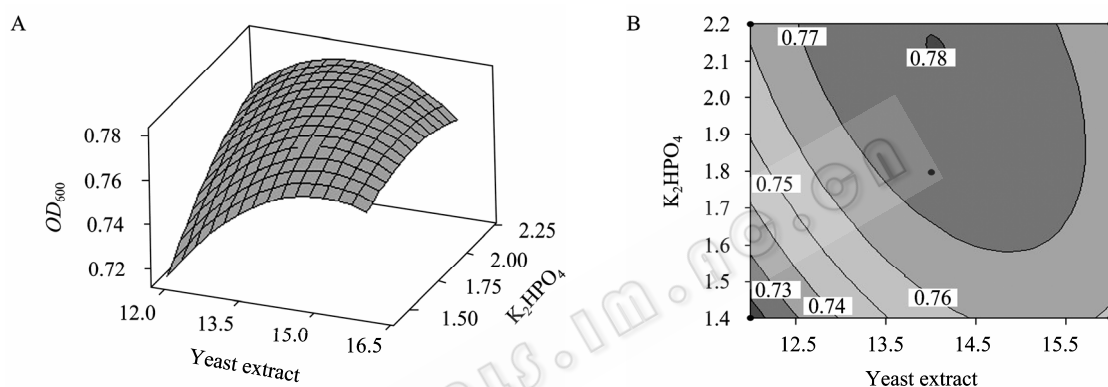


图3 酵母膏与 K_2HPO_4 交互影响 SZ7-1 菌株 OD 值的曲面图(A)和等高线图(B)

Fig. 3 Response surface plot (A) and corresponding contour plot (B) on the growth of SZ7-1 versus yeast extract and K_2HPO_4

2.4 模型的验证

以响应面试验优化得到的培养基组成条件进行发酵试验, 3 批摇瓶培养实验测得的 OD 值分别为 0.798、0.772、0.786, 平均值为 0.785, 与模拟值 0.789 相差 0.005, 可见该模型能较好地预测实际发酵情况。

2.5 SZ7-1 菌株在优化培养基与常规培养基生长的比较

把试验优化的培养基与优化前基础培养基以及其他两种常规培养基(LB 和牛肉膏蛋白胨培养基)进行比较, 并做生长曲线, 通过生长的活菌量进一步验证优化培养基的可靠性。结果见图 4。由图可知, SZ7-1 菌株在 4 种培养基中的生长速度为: 优化培养基>LB>牛肉膏蛋白胨>优化前基础培养基, 且在优化培养基中菌体生长的稳定期明显延长。SZ7-1 在优化培养基、优化前基础培养基中培养 20 h、在

LB 培养基中培养 16 h 和在牛肉膏蛋白胨培养基中培养 24 h 时菌体数量达到最大值, 分别为: 2.6×10^{10} 、 2.1×10^9 、 1.1×10^{10} 和 4.7×10^9 CFU/mL。优化培养基的菌数与其他 3 种培养基的最大菌体数量相比, 分别提高了 12.4、2.4 和 5.5 倍。

3 讨论

微生物发酵过程机理复杂, 影响因素众多, 对微生物发酵培养条件进行优化显得尤为重要, 已成为发酵水平高低的决定因素, 以往优化 PGPR 培养基多采用单次单因子试验或在逐因子实验基础上使用正交试验设计方法^[15-16], 但传统的优化试验方法在考察的因子较多以及因素之间存在交互作用时, 实验次数会大增, 甚至会导致实验结果的不准确^[17]。而利用 Plackett-Burman 设计结合响应曲面法能有效弥补传统方法的一些不足^[18-20]。

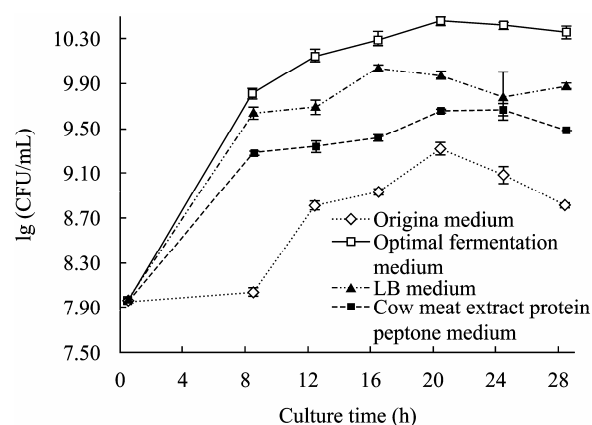


图4 不同培养基中 SZ7-1 的生长曲线

Fig. 4 The growth curves of SZ7-1 in various medium

为了提高菌体产量和降低生产成本, 研究中以 OD 值作为反映菌体数量的目标值, 在前期试验的基础上, 首先运用 Plackett-Burman 实验从 11 个因素中选出玉米浆、酵母膏和 K_2HPO_4 这 3 个因素为重要影响因子。然后进行最陡爬坡试验以接近三因素的最优点。再采用 Box-Behnken 设计, 找到回归模型, 并对回归模型求导确定这 3 个因素极大值点为玉米浆 28 g/L、酵母膏 14 g/L 和 K_2HPO_4 2.2 g/L, 最后通过验证试验证明了该回归模型能很好的预测结果。在此条件下, 实际活菌数能达到 2.6×10^{10} CFU/mL, 与优化前培养基上 2.1×10^9 CFU/mL 和其他两种常规培养(LB 培养基 1.1×10^{10} CFU/mL 和牛肉膏蛋白胨培养基 4.7×10^9 CFU/mL)相比, 分别提高了 12.4、2.4 和 5.5 倍。可见, 利用 PB 设计结合 RSM 方法不仅很好地对优化前培养基以及 LB 和牛肉膏蛋白胨培养基中的每个因素进行了全面考察, 还有效的对各因素可能存在的交互作用进行了评价, 与以往传统方法优化 PGPR 培养基相比更加全面、科学和合理, 这也再次证明了优化培养基的可靠性。同时, 优化培养基中用粗糙易得的玉米浆取代精细的葡萄糖作为碳源。玉米浆是制玉米淀粉的副产物, 含有丰富的可溶性蛋白、生长素和一些前体物质等, 有利于微生物的生长繁殖。我国作为玉米生产大国, 玉米浆很容易获得, 成本也仅是葡萄糖的 40%^[21], 这不仅降低了原料成本, 也提供了充足的营养, 使菌体生长的稳定期延长。

总之, 对促生菌 SZ7-1 的生长来说, 利用 PB 设计结合 RSM 方法被证明是一种经济而有效的发酵培养基优化技术。它通过合理的实验设计, 以最经济的方式, 很少的实验数量和时间对实验进行全面研究, 以一种高效的方式筛选出了微生物生长的必须元素及其浓度。在提高了菌体数量的同时, 降低了生产的原料成本, 为将来接菌剂的大量培养与推广提供了重要的理论依据。

参考文献

- [1] 张乔民, 隋淑珍. 中国红树林湿地资源及其保护[J]. 自然资源学报, 2001, 16(1): 28-36.
- [2] 王伯荪, 廖宝文, 王勇军, 等. 深圳湾红树林生态系统及其持续发展[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 3.
- [3] Alongi DM, Christoffersen P, Tirendi F. The influence of forest type on microbial-nutrient relationships in tropical mangrove sediments[J]. J Exp Mar Biol Ecol, 1993, 171(2): 201-223.
- [4] Bashan Y, de-Bashan LE. Bacteria/plant growth-promotion[C]/Hillel D. Encyclopedia of soils in the environment. UK.: Elsevier, 2005: 103-115.
- [5] Rojas A, Holguin G, Glick BR, et al. Synergism between *Phyllobacterium* sp. (N_2 -fixer) and *Bacillus licheniformis* (P-solubilizer), both from a semiarid mangrove rhizosphere[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2001, 35(2): 181-187.
- [6] Bashan Y, Holguin G. Plant growth-promoting bacteria: a potential tool for arid mangrove reforestation[J]. Trees, 2002, 16(2/3): 159-166.
- [7] 陆俊钊, 陈俊, 康丽华. 四株红树林促生菌的遗传分析鉴定及其促生能力[J]. 微生物学报, 2010, 50(10): 1358-1365.
- [8] Vazquez P, Holguin G, Puente ME, et al. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon[J]. Biology Fertility of Soils, 2000, 30(5/6): 460-468.
- [9] Adinarayana K, Ellaiah P. Response surface optimization of the critical medium components for the production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus* sp.[J]. J Pharm Pharm Sci, 2002, 5(3): 272-278.
- [10] Dhandhukia PC, Thakkar VR. Response surface methodology to optimize the nutritional parameters for enhanced production of jasmonic acid by *Lasiodiplodia theobromae*[J]. J Appl Microbiol, 2008, 105(3): 636-643.
- [11] Liu CQ, Ruan H, Shen HF, et al. Optimization of the fermentation medium for alpha-galactosidase production from

- Aspergillus foetidus* ZU-G1 using response surface methodology[J]. J Food Sci, 2007, 72(4): 120–125.
- [12] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 第3版. 北京: 高等教育出版社, 1999: 221.
- [13] Toledo G, Bashan Y, Soeldner A. *In vitro* colonization and increase in nitrogen fixation of seedling roots of black mangrove inoculated by a filamentous cyanobacteria[J]. Can J Microbiol, 1995, 41(11): 1012–1020.
- [14] 范秀容, 李广武, 沈萍. 微生物学实验[M]. 第2版. 北京: 高等教育出版社, 1989: 138–141.
- [15] 尚军红, 康丽华, 罗玉萍, 等. 相思根瘤菌和解磷菌培养基优化及解磷能力研究[J]. 林业科学研究, 2005, 18(2): 177–182.
- [16] 吴红慧, 周俊初. 大豆根瘤菌培养基的优化和剂型的比较研究[J]. 微生物学通报, 2004, 31(2): 14–19.
- [17] Elibol M, Ozer D. Response surface analysis of lipase production by freely suspended *Rhizopus arrhizus*[J]. Process Biochemistry, 2002, 38(3): 367–372.
- [18] 高鹏飞, 李妍, 赵文静, 等. 益生菌 *Lactobacillus casei* Zhang 增殖培养基的优化[J]. 微生物学通报, 2008, 35(4): 623–628.
- [19] 刘代新, 宁喜斌, 张继伦. 响应面分析法优化副溶血性弧菌生长条件[J]. 微生物学通报, 2008, 35(2): 306–310.
- [20] 郑媛, 王跃军, 孙溢. 海洋侧孢短芽孢杆菌 *Brevibacillus laterosporus* Lh-1 产抗菌肽 R-1 的培养条件优化[J]. 微生物学通报, 2009, 36(3): 398–403.
- [21] Gao X, Qiao SY, Lu WQ. Determination of an economical medium for growth of *Lactobacillus fermentum* using response surface methodology[J]. Lett Appl Microbiol, 2009, 49(5): 556–561.

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于 1974 年, 是中国微生物学会和中国科学院微生物研究所主办, 国内外公开发行人, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 基础微生物学研究; 农业微生物学研究; 工业微生物学研究; 医学微生物学研究; 食品微生物学研究; 环境微生物学研究; 微生物功能基因组研究; 微生物蛋白组学研究; 微生物模式菌株研究; 微生物工程与药物研究; 微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中国生物科学类核心期刊。曾获国家级优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 北京优秀科技期刊奖, 被选入新闻出版署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

自 2008 年本刊已经全新改版, 由双月刊改为月刊, 发表周期缩短, 内容更加丰富详实。欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买, 2011 年的每册定价为 48 元, 全年 576 元, 我们将按期免费邮寄。

另, 本刊编辑部现存有少量过期期刊, 如有需要者可直接与编辑部联系, 款到即免费寄上。(请事先与编辑部联系, 获悉每册售价。敬请在汇款单上注明所购刊物的年代、卷、期和数量)

邮购地址: (100101)北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn, bjb@im.ac.cn; 网址: <http://journals.im.ac.cn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: BM413