

网络优先数字出版时间: 2015-11-26

网络优先数字出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/45.1075.N.20151126.1018.024.html>

# 一株具有降解性能的巨大芽孢杆菌的鉴定与发酵条件优化<sup>\*</sup>

## Identification and Optimization of Fermentation Condition for *Bacillus megaterium* from Sea Cucumber Ponds

辛美丽<sup>1,2</sup>, 吕芳<sup>1,2</sup>, 孙福新<sup>1\*\*</sup>

XIN Mei-li<sup>1,2</sup>, LV Fang<sup>1,2</sup>, SUN Fu-xin<sup>1</sup>

(1. 山东省海洋生物研究院, 山东青岛 266104; 2. 青岛市大型海藻工程技术研究中心, 山东青岛 266104)

(1. Marine Biology Institute of Shandong Province, Qingdao, Shandong, 266104, China; 2. Macroalgae Engineering Technology Center of Qingdao, Qingdao, Shandong, 266104, China)

**摘要:**【目的】对从刺参养殖池塘中分离得到的降解菌株 B11 进行菌种鉴定, 并对其发酵条件进行优化。【方法】经生化及 16S rDNA 鉴定该菌种的种属; 利用单因素筛选和正交试验设计对其发酵条件进行研究。【结果】经鉴定该菌株为一株巨大芽孢杆菌, 最优发酵条件是装液量为 70 mL/250 mL, 转速为 180 r/min, 培养温度为 28℃, pH 值为 8。【结论】菌株 B11 在最优发酵条件下生长良好, 满足工业化大规模扩大培养所需条件, 有较好的应用前景。

**关键词:** 巨大芽孢杆菌 刺参 正交实验 发酵条件

中图分类号: S917.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-7378(2015)04-0247-06

**Abstract:** 【Objective】A bacterium named B11 capable of organic-pollutants degradation, isolated from sea cucumber external culturing ponds, was identified and the liquid fermentation condition of B11 was optimized. 【Methods】The genus of B11 was studied through physiological and bio-chemical tests and 16S rDNA sequence similarity analysis. The condition of liquid fermentation for bacterium B11 were optimized by mono-factor experiment and uniform design. 【Results】B11 was preliminarily identified *Bacillus megaterium*. The optimized fermentation condition was at pH 8 with 70 mL production medium inoculated with 5% seed culture and incubated at 28℃, 180 r/min. 【Conclusion】B11 grew well under optimal fermentation conditions and it could satisfy the requirement for industrial large-scale cultivation, which

shows a good prospect for industrial application in future.

**Key words:** *Bacillus megaterium*, sea cucumber, orthogonal experiment, fermentation conditions

收稿日期: 2015-07-20

作者简介: 辛美丽(1985-), 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事海藻生物学相关研究。

\* 海洋公益性行业科研专项经费项目(201305005), 海洋经济创新发展区域示范项目 and 青岛市市南区科技发展资金项目(2013-12-005-SW)资助。

\*\* 通信作者: 孙福新(1960-), 男, 研究员, 主要从事藻类生态学, E-mail: sunfx817@163.com。

## 0 引言

**【研究意义】**近年来刺参的养殖规模增长迅速,到2012年养殖面积已达6.7万 $\text{hm}^2$ ,产量达9万t,总产值达180亿元。刺参主要以集约化养殖为主,该养殖方式会造成残饵与粪便大量积累,使得养殖水体的氨氮与有机质的含量升高,影响刺参的正常生长<sup>[1]</sup>,故研究能有效降解水质的微生态制剂有一定的意义。**【前人研究进展】**微生态制剂因其绿色环保、无残留等特点得到研究者的关注<sup>[2,3]</sup>。暴增海等<sup>[4]</sup>与李斌等<sup>[5]</sup>通过往养殖水体中添加菌株,发现可明显改善养殖水质,不仅如此,Rengpipat等<sup>[6]</sup>和Panigrahi等<sup>[7]</sup>研究表明,日粮中添加芽孢杆菌具有促进饵料蛋白降解,鱼类生长,降低饵料用量以及改善鱼肉品质的作用。在众多研究中,芽孢杆菌因其会产生大量的胞外酶、耐受性强,成为水产养殖行业常用的菌株<sup>[8,9]</sup>。**【本研究切入点】**现阶段养殖过程中所施用的菌株多为外来菌株,在施用过程中难以形成优势菌株,需重复施用。为解决此问题,我们从刺参养殖池塘筛选得到一株菌株B11,该菌株对饵料培养基的降解效果比较好。**【拟解决的关键问题】**对菌株B11进行生理生化及系统发育树分析,鉴定该菌株的种属,并对其发酵条件进行研究,为菌株B11的扩大培养及应用提供数据支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

实验用菌株为从青岛即墨刺参养殖池塘中分离得到的菌株。

### 1.2 培养基

种子培养基:蛋白胨10g,牛肉膏5g,NaCl5g,蒸馏水1L,121℃下灭菌15min。

液体培养基:称取25g刺参饵料培养基,溶于1L海水中,浸泡过夜,24h后抽滤得浸出液。将浸出液稀释至1L,用5mol/L的NaOH溶液调节pH值至7.0,于121℃下灭菌15min。

固体培养基:1L液体培养基在灭菌前加20g琼脂,加热至琼脂溶解,将培养基于121℃下灭菌15min。

### 1.3 菌株生理生化指标的测定

采用北京陆桥技术有限责任公司生产的细菌微量生化鉴定管对菌株的生理生化指标进行测定,具体操作方法参照其说明书;按照《伯杰细菌鉴定手册》<sup>[10]</sup>对菌株B11进行鉴定。

### 1.4 菌株B11系统发育树的构建

采用水煮法<sup>[11]</sup>提取细菌基因组DNA后,再进行扩增,所用正向引物:5'-AGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3'(E.coli 27F),反向引物:5'-TACG-GCTACCTTGTTACGACTT-3'(E.coli 1492R)。PCR产物(大小在1.5kb左右)送至上海生工生物工程股份有限公司进行测序。将测序结果在NCBI库中进行Blast,得到与目标菌株相似性高的序列,再用CLUSTAL X程序进行比对,最后采用MEGA 4.1工具构建Neighbor-Joining树<sup>[12]</sup>。

### 1.5 菌株发酵条件的研究

#### 1.5.1 单因素实验

分别考察温度、pH值、接种量、装液量和转速对菌株发酵降解饵料培养基的影响。采用固定其它3个变量,变化考察变量。种子液的培养如下:用接种针在保种管内蘸取保种液,划线接种于平板培养基上,于28℃培养箱中培养48h;然后用接种针挑取平板上清晰可见的单菌株再接种于液体培养基内(100mL液体培养基装于200mL容量瓶内),培养48h后即得种子液备用。接种量为所接种子液体积占培养液体积的百分比。

#### (1) 装液量

装液量分别为20mL/250mL,40mL/250mL,60mL/250mL,80mL/250mL,100mL/250mL;培养温度为28℃,pH值为7,接种量为2%,转速为160r/min,

#### (2) 接种量

接种量分别为1%,3%,6%,9%,12%;培养温度为28℃,pH值为7,装液量为实验(1)中得到的较优值,转速160r/min。

#### (3) pH值

pH值分别为4,6,8,10,12,培养温度为28℃,接种量与装液量分别采用实验(1)(2)中所得到的较优值,转速160r/min。

#### (4) 温度

培养温度分别为15℃,20℃,25℃,30℃,35℃,pH值、接种量与装液量分别采用实验(1)~(3)中得到的最优值,转速160r/min。

#### (5) 转速

转速分别为70r/min,110r/min,150r/min,190r/min,230r/min;其它培养条件采用实验(1)~(4)中得到的最优值。

#### 1.5.2 正交试验

通过单因素寻找到最优点,在最优点左右各取

一个点,加上最优点,分别得到单因素的3个水平,并据此设计四因素三水平的正交试验。

## 2 结果

### 2.1 菌株的鉴定

#### 2.1.1 菌株的生理生化指标

菌株 B11 的菌落形态为乳白色,圆菌落,边缘整齐,表面光滑,隆起,菌体呈杆状;革兰氏染色阳性,吡啶试验阴性,V-P 测定阴性,可利用柠檬酸盐,可水解淀粉,可在 7.5% (W/V) NaCl 培养基上生长,其他生理生化指标如表 1 所示。

表 1 菌株 B11 的生理生化指标

Table 1 Physiological and bio-chemical characteristics of strain B11

测定项目 Determination item	测定结果 Determination result
革兰氏染色 Gram stain	+
乳糖发酵实验 Lactose Fermentation Experiment	-
甲基红实验 Methyl-red test	-
V-P	-
靛基质实验 Indole test	-
H <sub>2</sub> S	+
柠檬酸盐利用实验 Citrate test	+
明胶液化 Gelaune liquefaction	-
淀粉水解试验 Starch hydrolysis test	+
吡啶试验 Indole test	-
酪蛋白水解实验 Casein hydrolysis experiments	+
7.5% NaCl	+
接触酶实验 Catalase test	+

#### 2.1.2 菌株的 16S rDNA 系统发育树

将 B11 的 16S rDNA 基因在 NCBI 中进行 BLAST。从中选取 30 个菌株的 16S rDNA 基因序列, B11 与巨大芽孢杆菌 *B. megaterium* (AY553118.1) 聚成一分支,遗传距离为 0.01,表明 B11 与巨大芽孢杆菌的亲缘关系最近。菌株 B11 的系统发育树如图 1 所示。综合考虑菌株的生理生化指标以及系统发育树的结果判断该菌为巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)。

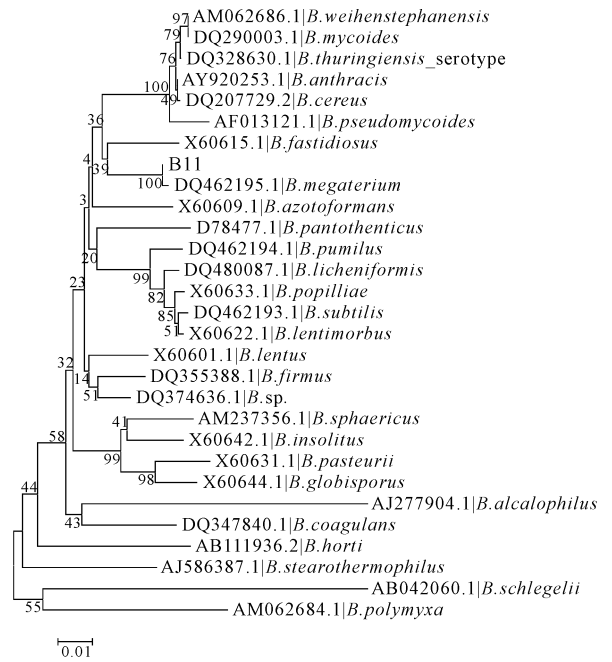


图 1 菌株 B11 的系统发育树

Fig. 1 The phylogenetic tree of B11

### 2.2 菌株发酵条件优化

#### 2.2.1 单因素实验结果

实验结果以菌体浓度的高低来评价。菌株在 600 nm 时的光密度值 (OD 值) 与菌体浓度线性相关,故实验表征菌浓度所采用指标为 OD 值。图 2~6 分别为装液量,接种量, pH 值,温度,转速变化对菌株 OD 值的影响(图中不同字母 a、b、c、d、e 表示数据相互之间差异显著,  $P < 0.05$ )。如图 2 所示,装液量为 60 mL/250 mL 时菌体浓度最高。由图 3 可得,当接种量大于 3% 后, OD 值的变化较小,故后期正交试验时不考察接种量,定接种量为 3%。从图 4 可以看出当培养基 pH 值变化时, OD 值呈现先增高后降低,再升高的趋势,菌株浓度波动最大;而从图 5 可知 OD 值随着温度的变化呈现先升高后降低的趋势,在 28℃ 时菌体 OD 值最高;另外,菌体 OD 值随着转速的升高逐渐升高,但超过 190

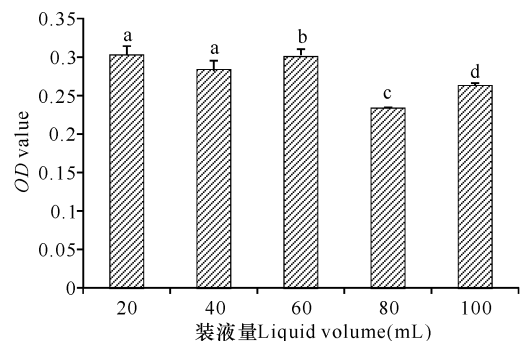


图 2 装液量对 OD 值的影响

Fig. 2 Effect of liquid volume on OD value

r/min时,转速继续升高,OD值的变化不太明显(图6),考虑到工业化的经济效益,正交试验选定转速为160 r/min左右。

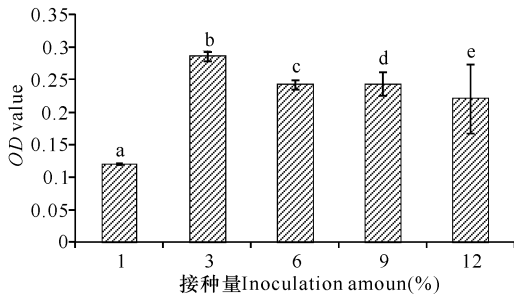


图3 接种量对OD值的影响

Fig. 3 Effect of inoculation amount on OD value

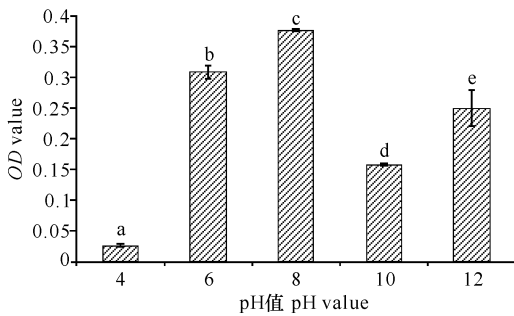


图4 pH值对OD值的影响

Fig. 4 Effect of pH on OD value

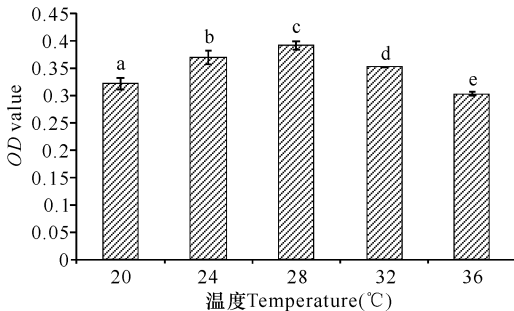


图5 温度对OD值的影响

Fig. 5 Effect of temperature on OD value

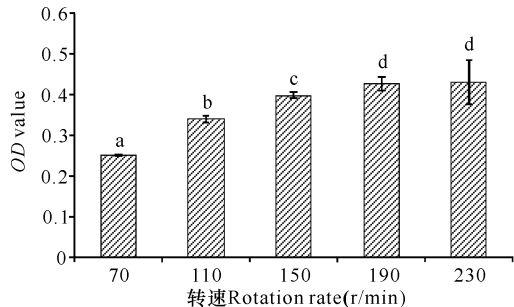


图6 转速对OD值的影响

Fig. 6 Effect of rotation rate on OD value

## 2.2.2 正交试验结果

根据单因素实验结果,确定正交试验考察因素为装液量,转速,pH与温度,各因素各取3个水平,

建立 $L_9(3^4)$ 正交试验表,实验设计如表2所示,试验结果如表3所示。

表2 正交试验设计

Table 2 The design of orthogonal experiment

水平 Level	因素 Factor			
	装液量 Liquid volume (mL/250 mL)	转速 Rotation rate (r/min)	pH值 pH value	温度 Temperature (°C)
1	50	140	7	28
2	60	160	8	30
3	70	180	9	32

由表3可知,4个因素的主次顺序为装液量>转速>pH>温度,即装液量对菌株发酵影响最大。计算各因素不同水平下试验指标的平均值( $k_1, k_2, k_3$ )可以看出,装液量越高均值越大,转速越高均值越大,均值随着pH值的升高而呈现先升高后降低的趋势,当pH值为8时均值最大;均值随着培养温度的逐渐升高而逐渐降低。故最终确定最优发酵条件:装液量为70 mL/250 mL,转速为180 r/min,培养温度为28°C,pH值为8,在此条件下菌体OD值为 $0.4766 \pm 0.0227$ 。

## 3 结论

随着养殖业的迅猛发展,养殖密度的逐渐增大,养殖水环境日益恶化,而通过投放抗生素、药物等传统方式保证养殖生物成活会造成有毒物质残留、环境污染,人工换水或者建立循环水养殖方式资金投入过大。而投放益生菌无有毒物质残留,且投资小,因而得到广泛的关注<sup>[13,14]</sup>。我们对前期研究得到的降解性菌株B11的16S rDNA基因进行分析,并建立菌株B11系统发育树,可以看出菌株B11与巨大芽孢杆菌聚成一个分支,亲缘关系最近,结合菌株的生理生化指标,最终确定菌株B11为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)。

前期对于菌株的研究工作表明,菌株B11的降解性能良好,故在工业上大规模使用需要对菌株B11扩大培养的条件进行优化。本研究先通过单因素实验选定对于菌株发酵OD值影响较大的因素——温度、转速、pH值与装液量,再通过正交试验对菌株的培养条件温度、转速、pH值与装液量的水平进行优化,最终确定最优发酵条件:装液量为70 mL/250 mL,转速为180 r/min,培养温度为28°C,pH值为8。在此条件下菌株B11生长良好,为菌株B11在工业上大规模使用提供技术支持。

表3 正交试验结果

Table 3 The result of orthogonal experiment

试验号 Test number	因素 Factor				OD 值 OD value
	(A)装液量 Liquid volume (mL/250mL)	(B)转速 Rotation rate(r/min)	(C)pH 值 pH value	(D)温度 Temperature (℃)	
1	50	140	7	28	0.2704±0.0173
2	50	160	8	30	0.3162±0.0078
3	50	180	9	32	0.2942±0.0104
4	60	140	8	32	0.3678±0.0134
5	60	160	9	28	0.4302±0.0354
6	60	180	7	30	0.4234±0.0565
7	70	140	9	30	0.3814±0.0130
8	70	160	7	32	0.3962±0.0067
9	70	180	8	28	0.4766±0.0227
K1	0.881	1.020	1.089	1.176	
K2	1.221	1.143	1.161	1.122	
K3	1.254	1.194	1.107	1.059	
k1	0.294	0.340	0.363	0.392	
k2	0.407	0.381	0.387	0.374	
k3	0.418	0.398	0.369	0.353	
R	0.124	0.058	0.024	0.039	
主次顺序 Important order	A>B>C>D				
优水平 Optimization levels	A <sub>3</sub>	B <sub>3</sub>	C <sub>2</sub>	D <sub>1</sub>	
优组合 Optimal combination	A <sub>3</sub> B <sub>3</sub> C <sub>2</sub> D <sub>1</sub>				

## 参考文献:

- [1] Funge-Smith S, Briggs M R P. Nutrient budgets in intensive shrimp ponds: Implications for sustainability [J]. Aquaculture, 1998, 164(1): 117-133.
- [2] 乔志刚, 张卫芳, 马龙. 2种微生态制剂对淇河鲫鱼摄食生长和体成分的影响[J]. 水产科学, 2015, 34(1): 27-30.  
Qiao Z G, Zhang W F, Ma L. Effects of two probiotics on feeding, growth and body composition of juvenile Qihe crucian carp *Carassius auratus* [J]. Fisheries Science, 2015, 34(1): 27-30.
- [3] 冯俊荣, 陈营, 李秉钧. 微生态制剂对牙鲆幼鱼脂肪酶的影响[J]. 水产科学, 2008, 27(2): 64-66.  
Feng J R, Chen Y, Li B J. Influence of probiotics on lipase activity in juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. Fisheries Science, 2008, 27(2): 64-66.
- [4] 暴增海, 马桂珍, 王淑芳, 等. 海洋细菌 L<sub>1</sub>-9 菌株在日本囊对虾养殖池中的定殖及其抑菌和水质净化作用[J]. 水产科学, 2013, 32(11): 671-673.  
Bao Z H, Ma G Z, Wang S F, et al. The colonization, bacteriostasis and purification water of marine *Paenibacillus polymyxa* strain L<sub>1</sub>-9 in a Japanese

shrimp culture pond [J]. Fisheries Science, 2013, 32(11): 671-673.

- [5] 李斌, 张秀珍, 马元庆, 等. 生物絮团对水质的调控作用及仿刺参幼参生长的影响[J]. 渔业科学进展, 2014, 35(4): 87-89.  
Li B, Zhang X Z, Ma Y Q, et al. Effects of bioflocs on the water quality control and the growth of *Apostichopus japonicas* [J]. Progress in Fishery Sciences, 2014, 35(4): 87-89.
- [6] Rengpipat S, Rukpratanporn S, Piyatiratitivorakul S, et al. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11) [J]. Aquaculture, 2000, 191(4): 271-288.
- [7] Panigrahi A, Kiron V, Satoh S, et al. Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* upon probiotic feeding [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2007, 31(4): 372-382.
- [8] 姚东林, 邹青, 刘文斌. 地衣芽孢杆菌和低聚木糖对草鱼生长性能肠道菌群和消化酶活性的影响[J]. 大连海洋大学学报, 2014, 29(2): 136-139.  
Yao D L, Zou Q, Liu W B. Effects of *Bacillus*

- licheniformis* and xylo-oligosaccharide on growth performance, intestinal microflora and enzyme activities in grass carp *Ctenopharyngodon idella* [J]. Journal of Dalian Ocean University, 2014, 29(2): 136-139.
- [9] 王嘉妮, 熊焰, 胡敏. 高效降解蛋白枯草芽孢杆菌的筛选及促建鲤生长的研究[J]. 微生物学通报, 2014, 41(10): 2043-2051.
- Wang J N, Xiong Y, Hu M. Screening of high effective protein-degrading *Bacillus subtilis* and study on promotion to Jian carp growth[J]. Microbiology China, 2014, 41(10): 2043-2051.
- [10] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所(译). 北京: 科学出版社, 1984: 729-794.
- Buchanan R E, Gibbons N E. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences (ed.). Beijing: Science Press, 1984: 729-794.
- [11] 赵伟伟, 王秀华, 孙振, 等. 一株产絮凝剂芽孢杆菌的分离鉴定及絮凝剂特性分析[J]. 中国水产科学, 2012, 19(4): 647-653.
- Zhao W W, Wang X H, Sun Z, et al. Isolation and identification of a flocculant producing *Bacillus* sp. and analysis of the properties of the bioflocculant [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(4): 647-653.
- [12] 陶天申, 杨瑞馥, 东秀珠. 原核生物系统学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 63.
- Tao T S, Yang R F, Dong X Z. Systematics of Prokaryotes[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007: 63.
- [13] 武鹏, 赵大千, 蔡欢欢, 等. 3种微生态制剂对水质及刺参幼参生长的影响[J]. 大连海洋大学学报, 2013, 28(1): 21-26.
- Wu P, Zhao D Q, Cai H H, et al. Effects of three probiotics on water quality and growth in sea cucumber *Apostichopus japonicus* [J]. Journal of Dalian Ocean University, 2013, 28(1): 21-26.
- [14] 吴保承, 沈国强, 杨春霞, 等. 微生态制剂在水质净化中的应用现状及展望[J]. 环境科学与技术, 2010, 33(12): 408-410.
- Wu B C, Shen G Q, Yang C X, et al. The application status and prospects about the probiotics used in water purification[J]. Environmental Science and Technology, 2010, 33(12): 408-410.

(责任编辑: 米慧芝)

(上接第 246 页 Continue from page 246)

- [10] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 海洋监测规范第 4 部分: 海水分析 GB 17378.4—2007[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China (AQSIQ), Standardization Administration of the People's Republic of China, SAC. The specification for marine monitoring—Part 4: Seawater analysis GB 17378.4—2007[S]. Beijing: Standards Press of China, 2007.
- [11] McGlathery K J, Pedersen M F, Borum J. Changes in intracellular nitrogen pools and feedback controls on nitrogen uptake in *Chaetomorpha phalinum* (Chlorophyta)[J]. J Phycol, 1996, 32(3): 393-401.
- [12] Kim J H, Kang E J, Park M G, et al. Effects of temperature and irradiance on photosynthesis and growth of a green-tide-forming species (*Ulva linza*) in the Yellow Sea[J]. Journal of Applied Phycology, 2011, 23(3): 421-432.
- [13] 姜红霞, 王云霞, 徐璞. 江苏海域沿岸不同居群浒苔生长特性比较[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(6): 315-317.
- Jiang H X, Wang Y X, Xu Y. The growth characteristics of different populations of *Enteromorpha prolifera* in the coastal waters of Jiangsu[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2012, 40(6): 315-317.

(责任编辑: 米慧芝)