

邓加聪,郑虹,陈美铤. 1 株章鱼肠道黏细菌的筛选及发酵工艺优化[J]. 江苏农业科学,2013,41(10):216-218.

# 1 株章鱼肠道黏细菌的筛选及发酵工艺优化

邓加聪,郑虹,陈美铤

(福建师范大学福清分校,福建福清 350300)

**摘要:**从章鱼肠道菌落中分离纯化得到 1 株海洋黏细菌,采用传统微生物纯培养技术,对其进行了细菌分类学鉴定、摇瓶培养发酵等。结果表明:该海洋黏细菌的最佳发酵工艺条件为:葡萄糖 15 g/L,蛋白胨 1.0 g/L,酵母膏 1.5 g/L,NaCl 溶液浓度 4 g/L,pH 值 7.0,接种量 7%,发酵时间 46 h。

**关键词:**章鱼肠道菌;筛选;培养基优化

**中图分类号:** S917.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)10-0216-03

海洋表面积占地球表面积的近 3/4,是地球生命的发源地,海水具有高盐、高压、高辐射、低温、低营养等特点<sup>[1]</sup>。一般认为,海洋微生物可产生不同于陆地微生物的新型生物活性物质<sup>[2]</sup>,特别是海洋生物附生微生物,由于空间、营养、光照等方面的竞争关系,能产生多种具有工业和药用价值的天然产物<sup>[3-4]</sup>。章鱼别称石居、八爪鱼、坐蛸、石吸、望潮、死牛,属于软体动物门、头足纲、八腕目(Octopoda)。章鱼有 8 个腕足,腕足上有许多吸盘;有时会喷出黑色墨汁,帮助其逃跑。有些章鱼的大脑相当发达,可以分辨镜中的自己,也可以走出

研究者设计的迷宫<sup>[5-6]</sup>。目前对章鱼肠道中细菌的研究相对较少。本研究对章鱼肠道细菌进行分离纯化以及发酵培养基的优化,旨在为其活性研究开辟更广阔的研究领域。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试章鱼 供试章鱼购自福建省福清市东壁岛。

1.1.2 培养基 分离培养基:牛肉膏 3 g,蛋白胨 10 g,NaCl 5 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 L,pH 值 7.0~7.2。试管斜面培养基<sup>[7]</sup>:牛肉膏 3 g,蛋白胨 10 g,葡萄糖 10 g,NaCl 5 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 L,pH 值 7.0~7.2。种子培养基:同试管斜面培养基,不加琼脂。发酵基础培养基<sup>[8]</sup>:葡萄糖 15 g,蛋白胨 1 g,酵母膏 1.5 g,蒸馏水 1 L。

1.1.3 仪器 THZ-25 大容量恒温振荡器:江苏省太仓市华美生化仪器厂;BCD-201B/HC 容声冰箱:海信容声(广东)

收稿日期:2013-04-02

基金项目:福建师范大学福清分校校级重点学科建设基金(编号:20110346);福建省教育厅 A 类项目(编号:JA12358)。

作者简介:邓加聪(1981—),男,福建安溪人,硕士,讲师,主要从事微生物菌种筛选分离纯化等工作。E-mail: dengjiacong@hotmail.com。

[15] 闫咏,马家海,许璞,等. 1 株引起条斑紫菜绿斑病的柠檬假交替单胞菌[J]. 中国水产科学,2002,9(4):353-358.

[16] 陈丽,张晓君,秦蕾,等. 条斑紫菜褐斑病原褐藻酸降解菌的筛选与鉴定[J]. 湖北农业科学,2012(13):2728-2731.

[17] 张庆萍,黄晓辉,谢海棠. 计算 LD<sub>50</sub> 的查表法和经验估算法[J]. 中国临床药理学和治疗学,2000,5(2):162-163.

[18] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001:370-399.

[19] Brenner D J, Krieg N R, Staley J T. Bergeys manual of systematic bacteriology[M]. Williams & Wolkins,2008:467-477.

[20] Polz M F, Cavanaugh C M. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR[J]. Applied and Environment Microbiology, 1998,64(10):3724-3730.

[21] 叶应妩,王毓三. 全国临床检验操作规程[M]. 2 版. 南京:东南大学出版社,1997:553-562.

[22] Xu X W, Wu Y H, Wang C S, et al. *Pseudoalteromonas lipolytica* sp. nov., isolated from the Yangtze River estuary[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010,60(9):2176-2181.

[23] 房海,陈翠珍,张晓君,等. 日本对虾(*Penaeus japonicus*) 虾苗杀虾微杆菌(*Microbacterium shrimpcida* sp. nov.) 感染及病原菌检验[J]. 海洋与湖沼,2007,38(2):151-156.

[24] Saulnier D, Avarre J C, Le Moullac G, et al. Rapid and sensitive PCR detection of *Vibrio penaeicida*, the putative etiological agent of syndrome 93 in New Caledonia[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2000,40(2):109-115.

[25] 邓欢,王年斌,安育新. 日本对虾 *Penaeus japonicus* 受弧菌感染的发病情况与感染剂量、温度条件的关系[J]. 水产科学, 1998,17(2):4-8.

[26] Liu P C, Lee K K, Yii K C, et al. Isolation of *Vibrio harveyi* from diseased kuruma prawns *Penaeus japonicus*[J]. Current Microbiology, 1996,33(2):129-132.

[27] Lee K K, Yu S R, Chen F R, et al. Virulence of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased tiger prawn, *Penaeus monodon*[J]. Current Microbiology, 1996,32(4):229-231.

[28] Anderson I G, Shamsudin M N, Shariff M, et al. Bacterial septicemia in juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*, cultured in Malaysian brackish-water ponds[J]. Asian Fisheries Science, 1988,2(1):93-108.

[29] Alapide - Tendencia E V, Dureza L A. Isolation of *Vibrio* spp. from *Penaeus monodon* Fabricius with red disease syndrome[J]. Aquaculture, 1997,154(2):107-114.

[30] De L P, D L, Takahiro T, et al. Characteristics of the causative bacterium of *Vibrio* spp. in the Kuruma prawn *Penaeus japonicus*[J]. Aquaculture, 1993,115(1/2):1-12.

冰箱有限公司;DHG-9070A 型电热恒温鼓风干燥箱:上海精宏实验设备有限公司;LDZX-50KB 立式压力蒸汽灭菌器:上海申安医疗器械厂;SW-CJ-IFD 紫外无菌操作台:苏州安泰空气技术有限公司;SPX-150B-Z 型生化培养箱:上海博讯实业有限公司医疗设备厂;PTHW 型普通恒温电热套:河南省巩义市予华仪器有限责任公司;WFJ7200 型可见分光光度计:尤尼柯仪器有限公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 海洋肠道细菌的筛选** 在新鲜章鱼表面用 75% 乙醇溶液消毒,在超净工作台上进行解剖,取其肠道不同部位作为分离样品,并将所取样品剪碎、混匀。用无菌电子天平称取 1 g 分离样品于装有 9 mL 无菌水的试管,稀释度即为  $10^{-1}$ 。按 10 倍稀释法进行稀释,稀释度分别为  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 。吸取稀释度分别为  $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  梯度的样品 0.2 mL,涂布于分离平板,28 ℃ 培养 1 周。挑取不同菌落形态、颜色的菌落进行划线纯化培养,挑取纯化后的单菌落接种于斜面试管,28 ℃ 培养 3 d 后,4 ℃ 冰箱保存、备用<sup>[9]</sup>。

**1.2.2 种子液的制备** 肠道细菌试管活化后,接入装有 100 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中,28 ℃、150 r/min 振荡培养 24 h<sup>[10]</sup>。

**1.2.3 菌体生物量的测定方法** 取适量发酵培养液,稀释一定倍数后,在波长 600 nm 处测定吸光度值( $D$ ),以空白培养基作对照<sup>[11]</sup>。

**1.2.4 单因素试验对海洋肠道菌的影响** 将培养好的种子液按 5% ( $V:V$ ) 的接种量接种于装有 100 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中,28 ℃、150 r/min 振荡一定时间,在波长 600 nm 处测定菌体生物量<sup>[12]</sup>。

**1.2.5 正交试验** 根据单因素试验结果,以 NaCl 溶液浓度、发酵培养基的初始 pH 值、发酵培养时间、接种量为考察因素,每个因素选择 3 个水平,采用  $L_9(3^4)$  正交表进行试验,考察培养条件对肠道细菌生长的影响。正交试验因素水平见表 1。

表 1 章鱼肠道细菌培养条件正交试验因素水平

| 水平 | 因素        |        |          |                |
|----|-----------|--------|----------|----------------|
|    | A:发酵时间(h) | B:pH 值 | C:接种量(%) | D:NaCl 浓度(g/L) |
| 1  | 44        | 6.8    | 6        | 2              |
| 2  | 46        | 7.0    | 7        | 3              |
| 3  | 48        | 7.2    | 8        | 4              |

## 2 结果与分析

### 2.1 章鱼肠道中海洋黏细菌的筛选

通过分离平板从章鱼肠道中分离筛选到 1 株细菌菌株。经肉眼观察,该菌株菌落呈圆形,菌层密,呈乳白色,周边光滑(图 1)。菌体在显微镜检下呈杆状,无芽胞(图 2),初步判断是黏细菌。

### 2.2 单因素试验对肠道中海洋黏细菌生长的影响

**2.2.1 发酵时间对海洋黏细菌生长的影响** 将培养好的种子液接种于发酵基础培养基,28 ℃、150 r/min 振荡培养,培养时间分别为 16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60 h,测定不同发酵时间下的菌体生物量,结果见图 3。



图 1 细菌菌落



图 2 细菌镜检

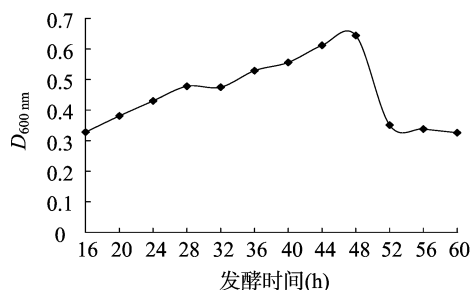


图 3 发酵时间对海洋黏细菌生长的影响

由图 3 可见,在一定范围内,随着发酵时间延长,海洋黏细菌生物量逐渐增加,发酵时间在 40~48 h 时海洋黏细菌均可良好生长。随着发酵时间的进一步延长,菌体生长明显受到抑制。在发酵基础培养基中,发酵时间为 48 h 时,海洋黏细菌达到最大生物量( $D_{600\text{ nm}}$  为 0.644)。

**2.2.2 初始 pH 值对海洋黏细菌生长的影响** 将发酵基础培养基的初始 pH 值调至 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0,以自然 pH 值为对照。测定不同初始 pH 值对海洋黏细菌生物量的影响,结果见图 4。

各种微生物生长的最适条件各不相同,必须将培养基初始 pH 值控制在一定范围内,才能满足不同微生物生长繁殖或代谢产物的需要。由图 4 可以看出,章鱼肠道细菌在初始 pH 值为 6.5~7.5 时生长较好。在基础发酵培养基初始 pH 值为 7.0 时海洋黏细菌生长达到高峰。

**2.2.3 接种量对海洋黏细菌生长的影响** 将种子液按接种量分别为 2.5%、5.0%、7.5%、10.0%、12.5% 接种于基础发酵培养基,28 ℃、150 r/min 振荡培养 48 h,测定菌体生物量,结果见图 5。

由图 5 可得,在一定范围内,随着接种量的增加,海洋黏细菌的生物量也增加,当接种量为 5%~10% 时海洋黏细菌生长良好,当接种量为 7.5% 时菌体生物量达到最大值;之后

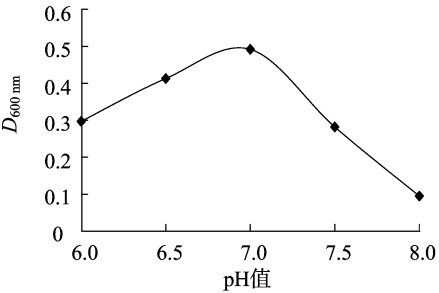


图4 培养基初始pH值对海洋黏细菌生长的影响

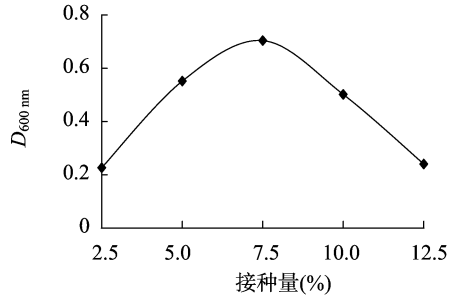


图5 接种量对海洋黏细菌生长的影响

随着接种量的增加,菌体生长反而受到抑制,海洋黏细菌生物量呈下降趋势。

2.2.4 NaCl 溶液浓度对海洋黏细菌生长的影响 150 r/min 28 ℃ 振荡培养 48 h,在 NaCl 溶液浓度分别为 1、3、5、7、9 g/L 下测定其生物量,结果见图 6。

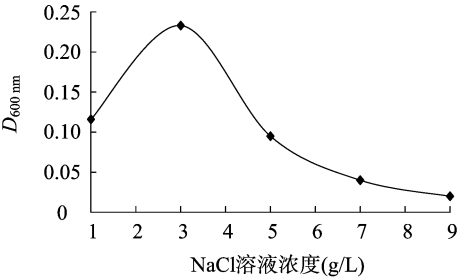


图6 NaCl溶液浓度对海洋黏细菌生长的影响

由图 6 可见,在一定范围内,随着 NaCl 溶液浓度的增加,肠道细菌生物量逐渐增加,NaCl 溶液浓度为 1~5 g/L 时海洋黏细菌均可正常生长。当 NaCl 溶液浓度为 3 g/L 时,海洋黏细菌达到最大生物量。NaCl 溶液浓度继续增加,菌体生长明显受到抑制。

2.3 正交试验结果

由表 2 中的极差(R)值可知:章鱼肠道中海洋黏细菌的最优培养条件组合为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>,即发酵时间为 46 h,pH 值为 7.0,接种量为 7%,NaCl 溶液浓度为 4 g/L。各因素的影响主次顺序为:发酵时间>初始 pH 值>接种量>NaCl 溶液浓度。

根据正交试验所获的最优组合进行验证试验,即 NaCl 溶液浓度为 4 g/L,初始 pH 值为 7.0 的发酵培养基中,按 7% 接种量接入种子液,28 ℃、150 r/min 振荡培养 46 h 后,结果表明,测定的 D<sub>600 nm</sub> 为 0.707,与优化前的吸光度值(0.422)相比明显升高,说明采用优化后的培养条件进行发酵培养,肠道黏细菌生物量得到明显提高。

表 2 章鱼肠道细菌培养条件正交试验结果与极差分析

| 编号             | A:发酵时间  | B:pH 值  | C:接种量   | D:NaCl 浓度 | D <sub>600 nm</sub> |
|----------------|---------|---------|---------|-----------|---------------------|
| 1              | 1       | 1       | 1       | 1         | 0.416               |
| 2              | 1       | 2       | 2       | 2         | 0.526               |
| 3              | 1       | 3       | 3       | 3         | 0.576               |
| 4              | 2       | 1       | 2       | 3         | 0.585               |
| 5              | 2       | 2       | 3       | 1         | 0.607               |
| 6              | 2       | 3       | 1       | 2         | 0.584               |
| 7              | 3       | 1       | 3       | 2         | 0.452               |
| 8              | 3       | 2       | 1       | 3         | 0.613               |
| 9              | 3       | 3       | 2       | 1         | 0.551               |
| k <sub>1</sub> | 0.506 0 | 0.484 3 | 0.537 7 | 0.524 7   |                     |
| k <sub>2</sub> | 0.592 0 | 0.582 0 | 0.554 0 | 0.520 7   |                     |
| k <sub>3</sub> | 0.538 7 | 0.570 3 | 0.545 0 | 0.591 3   |                     |
| R              | 0.086 0 | 0.097 7 | 0.016 3 | 0.070 6   |                     |

3 结论

通过平板分离方法,从海洋生物章鱼肠道中分离出 1 株细菌,该细菌菌落圆形,菌层密,呈乳白色,周边光滑。经镜检发现该菌株无芽孢,杆状,初步鉴定为黏细菌。对该菌株进行单因素试验及正交试验,确定该菌株的最佳培养条件为:发酵时间为 46 h,pH 值为 7.0,接种量为 7%,NaCl 溶液浓度为 4 g/L。本研究为章鱼肠道细菌活性物质的研究奠定了基础。

参考文献:

[1]王淑军,刘红飞,李华钟,等. 海洋细菌 *Pseudoalteromonas* sp. G23 产低温淀粉酶发酵条件的研究[J]. 中国酿造,2008(3):9-11.

[2]聂亚锋,刘永锋,李德全,等. 海洋细菌 PY-sw-1 产生的抗菌物质及其抑菌活性[J]. 植物保护学报,2008,35(4):373-374.

[3]Burgess J G, Jordan E M, Bregu M, et al. Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research[J]. Journal of Biotechnology, 1999, 70(1/2/3):27-32.

[4]Holmstrom C. Marine pseudoalteromonas species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents [J]. FEMS Microbiology Ecology, 1999, 30(4):285-293.

[5]Proksch P, Edrada R A, Ebel R. Drugs from the seas - current status and microbiological implications [J]. Appl Microbiol Biot, 2002, 59(2/3):125-134.

[6]吴荣荣,张 良,王 倩. 产细菌素乳酸菌的选育及其抑菌特性的研究[J]. 中国酿造,2009(6):20-22.

[7]林永成. 海洋微生物及其代谢产物[M]. 北京:化学工业出版社,2003.

[8]祖国仁,闫 磊,孔繁东,等 产抗菌物质海洋细菌 B105 生长特性及培养条件[J]. 中国酿造,2010,220(7):114-117.

[9]尹 璐,祖国仁,孙 浩,等. 一株海洋细菌产几丁质酶培养条件研究[J]. 中国酿造,2010,222(9):101-105.

[10]吕家森,黄惠琴,丛 明,等. 一株海洋细菌的鉴定及其活性物质的初步研究[J]. 海洋学报:中文版,2006,28(5):173-178.

[11]张 璐,齐希猛,刘婷婷,等. 一株拮抗芒果炭疽菌海洋细菌的鉴定和发酵培养基优化[J]. 广东海洋大学学报,2011,31(4):75-80.

[12]程鹏飞,梁绍康,程国军,等. 一株南海珊瑚附生细菌的鉴定及其产活性物质的培养条件优化[J]. 水产科学,2011,30(11):702-707.