

吴美儒,周毅峰,唐巧玉. 1 株耐硒凝结芽孢杆菌的分离鉴定及其培养条件的优化[J]. 江苏农业科学,2019,47(4):256-259.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.04.058

1 株耐硒凝结芽孢杆菌的分离鉴定 及其培养条件的优化

吴美儒¹, 周毅峰², 唐巧玉¹

(1. 湖北民族学院生物资源保护与利用湖北省重点实验室,湖北恩施 445000; 2. 湖北民族学院生物科学与技术学院,湖北恩施 445000)

摘要:用含硒培养基,采用平板稀释分离法,从湖北恩施渔塘坝高硒环境中分离鉴定 1 株凝结芽孢杆菌。为确定该凝结芽孢杆菌培养基及培养条件,采用单因素和正交试验法对凝结芽孢杆菌的摇瓶发酵培养条件(碳源、氮源、温度和转速)进行了优化,为确定其培养时间作出了生长曲线。结果表明,温度对凝结芽孢杆菌生长的影响最大,其后依次为氮源、碳源和转速;最适培养基为:葡萄糖 11 g/L,牛肉浸膏 11 g/L,氯化钠 5 g/L;最适培养条件为:温度 35 ℃,转速 160 r/min;(2)从生长曲线可看出,0~1.5 h 为停滞期,1.5~10 h 为对数生长期,10~20 h 为稳定期,最佳培养时间为 10 h。

关键词:硒;凝结芽孢杆菌;分离;培养条件;生长曲线

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)04-0256-04

硒是人体和动物所必需的微量元素^[1],湖北省恩施州是世界著名的典型高硒区,蕴藏十分丰富的硒资源^[2]。对硒资

收稿日期:2017-10-24

基金项目:国家自然科学基金(编号:31360498);湖北省教育厅重点项目(编号:D20131902)。

作者简介:吴美儒(1993—),女,湖北恩施人,硕士研究生,主要从事植物硒代谢的研究;E-mail:1060198820@qq.com。

通信作者:唐巧玉,硕士,副教授,主要从事微量元素硒的研究。E-mail:2004039@hbmjy.edu.cn。

源的开发利用目前主要依靠植物对硒的富集作用,得到富硒农产品和含硒提取物如硒蛋白、硒多糖等。微生物作为生物界与人类密切相关的一大类生物群体,利用微生物开发利用硒资源具有广阔的前景。含硒酵母能抑制某些肿瘤细胞的生长^[3-4],提高生物有机体的抗氧化能力^[5]。Siddique 等分离的细菌能还原矿山尾矿中的硒,从而改变硒的有效性^[6]。Zhang 等将具有硒还原能力的细菌用于废水处理^[7-8]。对于高硒地区土壤微生物,研究比较少。Burton 等发现,硒污染地区土壤微生物具有比普通土壤微生物更强的耐受硒的能

[11] 严云. 炭化柚子皮对苯酚的吸附性能[J]. 江苏农业科学, 2016,44(8):481-483.

[12] Luo J, Li X, Ge C, et al. Sorption of norfloxacin, sulfamerazine and oxytetracycline by KOH-modified biochar under single and ternary systems[J]. Bioresource Technology, 2018, 263:385.

[13] Chen B L, Zhou D D, Zhu L Z, et al. Transitional adsorption and partition of nonpolar and polar aromatic contaminants by biochars of pine needles with different pyrolytic temperatures [J]. Environmental Science & Technology, 2008, 42(14):5137-5143.

[14] Zhang X Y, Gao B, Zheng Y L, et al. Biochar for volatile organic compound (VOC) removal: Sorption performance and governing mechanisms[J]. Bioresource Technology, 2017, 245:606-614.

[15] Ving N V, Zafar M, Behera S K, et al. Arsenic (Ⅲ) removal from aqueous solution by raw and zinc-loaded pine cone biochar: equilibrium, kinetics and thermodynamics studies[J]. International Journal of Environmental Science & Technology, 2014, 12(4):1283-1294.

[16] Wang Y, Hu Y T, Zhao X, et al. Comparisons of biochar properties from wood material and crop residues at different temperatures and residence times[J]. Energy & Fuels, 2013, 27(10):5890-5899.

[17] 翁诗普. 傅立叶变换红外光谱分析[M]. 2 版. 北京:化学工业出版社, 2010:296-297.

[18] Inyang M, Gao B, Zimmerman A, et al. Sorption and cosorption of lead and sulfapyridine on carbon nanotube-modified biochars[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2015, 22(3):1868-1876.

[19] Keiluewei M, Nico P S, Johnson M G, et al. Dynamic molecular structure of plant biomass-derived black carbon (biochar) [J]. Environmental Science & Technology, 2010, 44(4):1247-1253.

[20] 鲍晓磊, 强志民, 贾伟伟, 等. 磁性纳米复合材料 CoFeM48 对水中磺胺类抗生素的吸附去除研究[J]. 环境科学学报, 2013, 33(2):401-407.

[21] 段伦超, 王凤贺, 纪营雪, 等. 火力发电厂飞灰对抗生素磺胺的吸附性能[J]. 环境工程学报, 2014, 8(6):2231-2236.

[22] 赵涛, 蒋成爱, 丘锦荣, 等. 皇竹草生物炭对水中磺胺类抗生素吸附性能研究[J]. 水处理技术, 2017, 43(4):56-61.

[23] 孟玲蝶, 王凤奇, 李金培, 等. 多乙烯多胺改性纤维素及其对水中砷、氟、铬吸附性能研究[J]. 高分子学报, 2014(8):1070-1077.

[24] 安娜, 谢茵茵, 高乃云, 等. 粉末活性炭对水中嗅味物质 IPMP 和 IBMP 的吸附特性[J]. 中南大学学报(自然科学版), 2012, 43(9):3718-3726.

[25] 李坤权, 李艳博, 刘平, 等. 微波蔗渣中孔生物炭对水中对氯苯酚的吸附特性研究[J]. 环境工程学报, 2016, 10(9):4684-4690.

力^[9]。本研究的主要内容是分离筛选高硒环境中的微生物,并通过优化培养基组成和培养条件来提高该耐硒微生物生物量,旨在为进一步对其进行开发利用创造良好的基础条件。

1 材料与方法

1.1 高硒环境中微生物的分离

用取自恩施双河富硒土壤(硒含量为 36.8 μg/g)来分离细菌。细菌的分离在含有 50 mg/mL 的固体细菌培养基上进行,37 ℃ 培养 12 h,选择单菌落进行进一步研究。

1.2 菌株耐硒能力测定

将选择的单菌落菌株分别接种到含 0、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1 000 mg/L 硒的细菌培养基中,在 37 ℃、150 r/min 条件下培养 24 h,测定 $D_{600\text{ nm}}$,选择 1 株耐硒能力强的菌株进一步研究。

1.3 耐硒菌种的鉴定

选取 1 株耐硒能力强的菌种进行革兰氏染色、芽孢染色、荚膜染色、接触酶试验、V-P 试验、葡萄糖发酵试验、明胶液化试验、淀粉水解试验、柠檬酸盐试验、吲哚试验、菌种的耐盐试验等生理生化鉴定试验。根据实验室结果,检索常用细菌鉴定手册^[10],确定该耐硒菌种的种属。

1.4 耐硒菌种培养条件的优化

1.4.1 选定发酵培养基成分 选用葡萄糖、蔗糖和可溶性淀粉作为碳源,浓度为 10 g/L,氮源用酵母浸出物 10 g/L,氯化钠 5 g/L,调节 pH 值为 7.0,在 37 ℃、转速 150 r/min 条件下培养 14 h 后测 $D_{600\text{ nm}}$ 。

选用酵母浸出物、胰蛋白胨和牛肉浸膏作为氮源,浓度为 10 g/L,碳源用葡萄糖 10 g/L,氯化钠 5 g/L,调节 pH 值为 7.0,在 37 ℃、转速 150 r/min 条件下培养 14 h 后测 $D_{600\text{ nm}}$ 。

1.4.2 确定碳源和氮源浓度 对选定的碳源做浓度梯度单因素试验,浓度分别为 3、7、11、15、19 g/L,氮源酵母浸出物 10 g/L,氯化钠 5 g/L,调节 pH 值为 7.0,在 37 ℃、转速 150 r/min 条件下培养 14 h 后测 $D_{600\text{ nm}}$ 。

对选定的氮源做浓度梯度单因素试验,浓度分别为 3、7、11、15、19 g/L,碳源葡萄糖 10 g/L,氯化钠 5 g/L, pH 值为 7.0,在 37 ℃、转速 150 r/min 条件下培养 14 h 后测 $D_{600\text{ nm}}$ 。

1.4.3 温度和转速单因素实验 以碳源葡萄糖 10 g/L,氮源酵母浸出物 10 g/L,氯化钠 5 g/L 配培养基, pH 值 7.0,接种后分别在 25、30、35、40、45 ℃,转速 150 r/min 培养 14 h 后测 $D_{600\text{ nm}}$ 。

以碳源葡萄糖 10 g/L、氮源酵母浸出物 10 g/L、氯化钠 5 g/L 配培养基, pH 值 7.0,接种后分别以 100、120、140、160、180、200 r/min, 37 ℃ 培养 14 h 后测 $D_{600\text{ nm}}$ 。

1.4.4 正交试验 根据碳源浓度、氮源浓度、温度和转速的单因素试验结果进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,进一步优化培养条件。试验因素和水平见表 1,培养 14 h 后测 $D_{600\text{ nm}}$ 。

| 表 1 试验因素水平 | | | | |
|------------|----------------|-----------------|-----------|---------------|
| 水平 | 因素 | | | |
| | 葡萄糖浓度 (g/L) | 牛肉浸膏浓度 (g/L) | 温度 (℃) | 转速 (r/min) |
| 1 | 3 | 3 | 25 | 160 |
| 2 | 7 | 7 | 30 | 180 |
| 3 | 11 | 11 | 35 | 200 |

将菌株在正交试验得出的最优组合条件下进行培养,14 h 后测 $D_{600\text{ nm}}$,以验证正交试验结果。

1.5 生长曲线的测定

以碳源葡萄糖 10 g/L、氮源酵母浸出物 10 g/L、氯化钠 5 g/L 配培养基, pH 值 7.0,在 37 ℃、转速 150 r/min 下分别培养 1.5、3、4、6、8、10、12、14、16、18、20 h 后测 $D_{600\text{ nm}}$ 。

1.6 数据统计与分析

对测定结果的原始数据通过 Excel、SPSS 软件进行数据的误差分析和 t 值检验,进行平行组的平均值校正和显著性差异分析。

2 结果与分析

2.1 分离菌株的耐硒能力

从图 1 可见,选择的 8 个菌株 M3、M7、M9、M12、M13、M18、M20 和 M22 均有一定的耐硒能力。特别是 M22 菌株,在硒浓度 500 mg/L 以下时,随着硒浓度的增加,其 $D_{600\text{ nm}}$ 升高;且在硒浓度 500 mg/L 以上时, $D_{600\text{ nm}}$ 均高于其他菌株。故本试验选取菌种 M22 进行菌种鉴定和培养条件优化等研究。

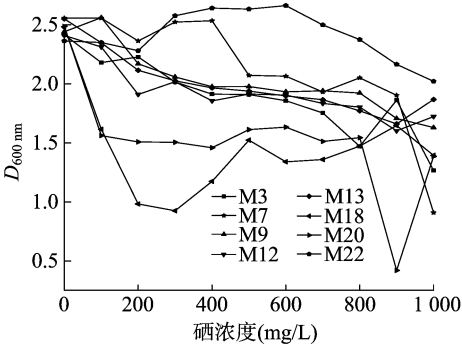


图1 菌种的耐硒能力

2.2 耐硒菌株鉴定结果

选取菌种 M22 进行染色和生理生化鉴定试验,根据表 2 试验结果,检索常用细菌鉴定手册^[10],鉴定该耐硒菌株为凝结芽孢杆菌。

表 2 染色及生化鉴定结果

| 试验种类 | 试验结果 |
|---------|-----------------------------|
| 革兰氏染色 | 阳性,杆状 |
| 芽孢染色 | 有芽孢,孢囊膨大 |
| 荚膜染色 | 有荚膜 |
| 接触酶试验 | 有气泡产生,产过氧化氢酶,为阳性 |
| V-P 试验 | 阳性,终产物 pH 值 <6 |
| 葡萄糖发酵试验 | 培养物颜色变黄,产酸 |
| 明胶液化试验 | 阴性 |
| 淀粉水解试验 | 阳性 |
| 柠檬酸盐试验 | 阴性 |
| 吲哚试验 | 阴性 |
| 耐盐试验 | 在含 10% NaCl 的牛肉膏蛋白胨培养基中,不生长 |

2.3 耐硒菌种培养条件的优化

2.3.1 碳源和氮源对菌株生长的影响 如图 2 所示,对于碳源的影响,葡萄糖与蔗糖无明显差异,而它们与可溶性淀粉相比对菌体浓度增加有一定的作用,故可选葡萄糖或蔗糖来做单因素试验。但考虑到蔗糖没有葡萄糖好利用,且须要产生蔗糖酶,因此选葡萄糖来做单因素试验。对于氮源的影响,从

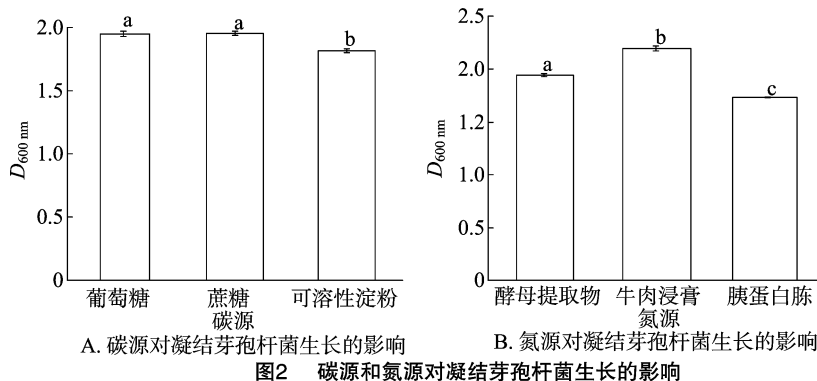


图2 碳源和氮源对凝结芽孢杆菌生长的影响

胰蛋白胨、酵母浸出物到牛肉浸膏,它们依次对菌体浓度增加有明显的促进作用,因此选牛肉浸膏来做单因素试验。

2.3.2 单因素试验结果 图3-A为碳源浓度对凝结芽孢杆菌生长的影响,当葡萄糖浓度为7 g/L时,细菌的 $D_{600\text{ nm}}$ 最大,相比于3、11 g/L对 $D_{600\text{ nm}}$ 有显著增加,故选3、7、11 g/L 3个水平来做正交试验。图3-B为氮源浓度的影响,当牛肉浸膏浓度为7 g/L时,细菌的 $D_{600\text{ nm}}$ 最大,相比于3、11 g/L对

$D_{600\text{ nm}}$ 有极显著增加,故选3、7、11 g/L 3个水平来做正交试验。图3-C为温度的影响,当温度为30℃时,细菌的 $D_{600\text{ nm}}$ 最大,相比于35℃对 $D_{600\text{ nm}}$ 有极显著增加,故选25、30、35℃ 3个水平来做正交试验。图3-D为转速的影响,当转速为200 r/min时,细菌的 $D_{600\text{ nm}}$ 最大,故选160、180、200 r/min 3个水平来做正交试验。

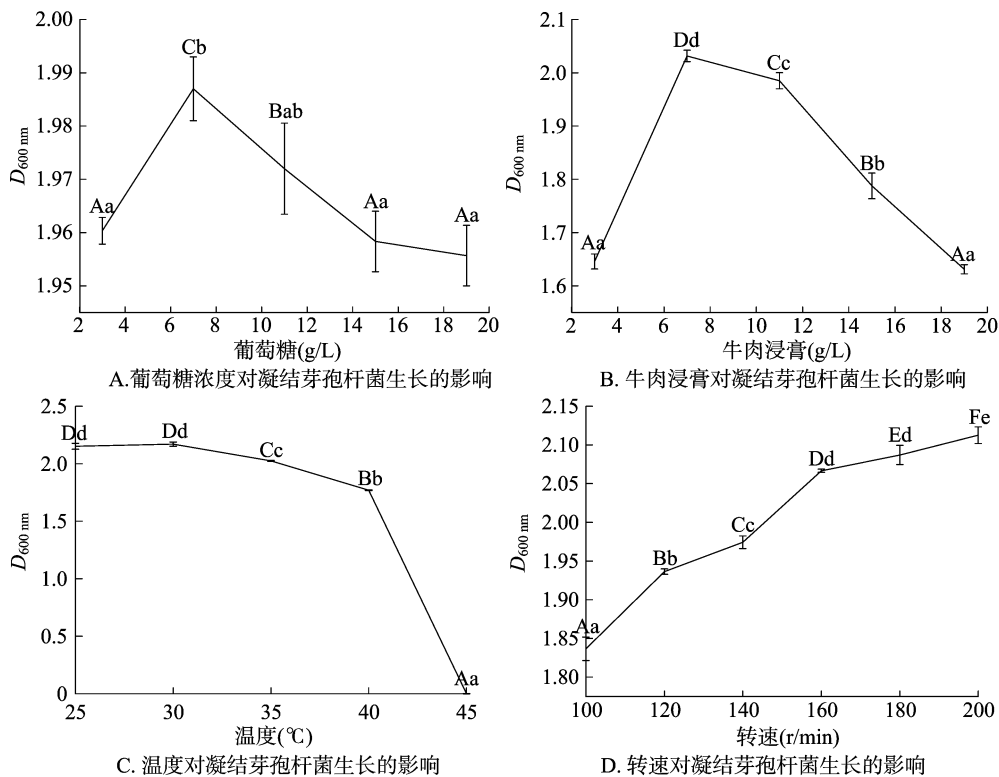


图3 单因素对凝结芽孢杆菌生长的影响

2.3.3 正交试验 由表3可知,通过极差分析,温度对凝结芽孢杆菌的生长影响最大,其次依次是氮源牛肉浸膏浓度、碳源葡萄糖浓度、转速。本试验条件下优化水平的最佳组合为 $A_3B_3C_3D_1$,即凝结芽孢杆菌的最佳培养条件为葡萄糖11 g/L、牛肉浸膏11 g/L、温度35℃、转速160 r/min。在此条件下培养菌株,其培养液 $D_{600\text{ nm}}$ 为 (2.210 ± 0.010) ,与第9组正交试验相比稍低,这可能与接种的种子液的生长状态和接种量有关。

2.4 生长曲线的测定

从图4可知,0~1.5 h为停滞期,1.5~10 h为对数生长

期,当培养时间达到10 h时菌体生长进入稳定期。通过测定生长曲线,了解分离得到的凝结芽孢杆菌在不同时期的生长特征,可以根据不同的实际需要如获得大量细菌个体、获得细菌的初级代谢产物或次级代谢产物来选择不同的培养时间。

3 讨论

从恩施富硒区富硒淤泥中分离鉴定了1株耐硒凝结芽孢杆菌。在基础研究方面,这些菌种的筛选丰富了利用微生物进行生物富硒的研究基础,为硒资源的开发和利用提供了微生物的研究基本材料,从而进一步对耐硒相关基因做出研究

表 3 发酵条件正交实验结果

| 试验号 | 因素 | | | | $D_{600\text{ nm}}$ |
|--------------|------------------|-------------------|----------------|-----------------|---------------------|
| | A:葡萄糖 浓度(g/L) | B:牛肉浸膏 浓度(g/L) | C:温度 (℃) | D:转速 (r/min) | |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0.923 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 0.995 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 1.995 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 0.755 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 1.627 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 1.212 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 1.748 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 1.136 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 2.235 |
| k_1 | 1.304 | 1.142 | 1.090 | 1.595 | |
| k_2 | 1.198 | 1.253 | 1.328 | 1.318 | |
| k_3 | 1.706 | 1.814 | 1.790 | 1.295 | |
| R | 0.508 | 0.672 | 0.700 | 0.300 | |
| 主次顺序 C>B>A>D | | | | | |
| 优水平 | A ₃ | B ₃ | C ₃ | D ₁ | |

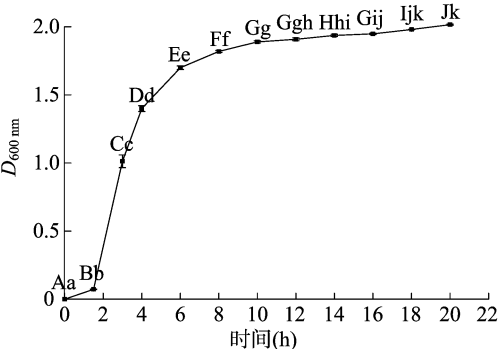


图4 凝结芽孢杆菌的生长曲线

和硒代谢分子机制的研究。在应用研究方面,凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)为革兰氏阳性杆菌,具有耐热性好、耐受胃酸和胆汁等优点^[11-12]。芽孢杆菌类益生菌为好氧繁殖,进入人和动物肠道内能消耗大量的游离氧,降低氧化还原电势。对厌氧微生物乳酸菌和双歧杆菌的生长起到促进作用,从而调节肠道内微生物的菌群平衡,提高机体免疫和抗病能力减少肠道疾病的发生;凝结芽孢杆菌在肠道内繁殖的同时分泌消化酶,有助于营养物质的消化和吸收,促进动物生长;其产生的维生素、氨基酸、短链脂肪酸等物质能增加小肠蠕动速度,改善肠道消化功能;产生抑菌物质能对肠道不同诱因的炎症有一定治疗作用^[13-18],可以进一步研究耐硒凝结芽孢杆菌的富硒能力,开发含硒益生菌。

参考文献:

[1] Yu Y, Zhang S, Wen B, et al. Accumulation and speciation of selenium in plants as affected by arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* [J]. Biological Trace Element Research, 2011, 143 (3): 1789 - 1798.

[2] Zhu J, Zuo W, Liang X, et al. Occurrence of native selenium in Yutangba and its environmental implications [J]. Applied

Geochemistry, 2004, 19 (3): 0 - 467.

[3] Guo C H, Hsia S, Shih M Y, et al. Effects of selenium yeast on oxidative stress, growth inhibition, and apoptosis in human breast cancer cells [J]. International Journal of Medical Sciences, 2015, 12 (9): 748 - 758.

[4] Guo C H, Hsia S, Hsiung D Y, et al. Supplementation with selenium yeast on the prooxidant - antioxidant activities and anti - tumor effects in breast tumor xenograft - bearing mice [J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2015, 26 (12): 1568 - 1579.

[5] 李小霞, 陈 锋, 潘 庆, 等. 酵母硒对凡纳滨对虾生长和抗氧化性能的影响 [J]. 华南农业大学学报, 2014, 35 (6): 108 - 112.

[6] Siddique T, Arocena J M, Thring R W, et al. Bacterial reduction of selenium in coal mine tailings pond sediment [J]. Journal of Environmental Quality, 2007, 36 (3): 621 - 627.

[7] Zhang Y, Okeke B C, Frankenberger W T. Bacterial reduction of selenate to elemental selenium utilizing molasses as a carbon source [J]. Bioresour Technol, 2008, 99 (5): 1267 - 1273.

[8] Morita M, Uemoto H, Watanabe A. Reduction of selenium oxyanions in Wastewater using two bacterial strains [J]. Engineering in Life Sciences, 2007, 7 (3): 235 - 240.

[9] Burton G A, Giddings T H, de Brine P, et al. High incidence of selenite - resistant bacteria from a site polluted with selenium [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1987, 53 (1): 185 - 188.

[10] 东秀珠, 蔡妙英. 常用细菌鉴定手册 [M]. 科学出版社, 2001: 62 - 65.

[11] 董惠钧, 姜俊云, 郑立军, 等. 新型微生态益生菌凝结芽孢杆菌研究进展 [J]. 食品科学, 2010, 31 (1): 292 - 294.

[12] Hyronimus B, Le Marrec C, Hadj S A, et al. Acid and bile tolerance of spore - forming lactic acid bacteria [J]. International Journal of Food Microbiology, 2000, 61 (2): 193 - 197.

[13] 丁 贤, 李卓佳, 陈永青, 等. 芽孢杆菌对凡纳对虾生长和消化酶活性的影响 [J]. 中国水产科学, 2004, (6): 580 - 584.

[14] Alkan H, Baysal Z, Uyar F, et al. Production of lipase by a newly isolated *Bacillus coagulans* under solid - state fermentation using melon wastes [J]. Applied Biochemistry & Biotechnology, 2007, 136 (2): 183.

[15] Lin S, Mao S, Guan Y, et al. Effects of dietary chitosan oligosaccharides and *Bacillus coagulans* on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio* Koi) [J]. Aquaculture, 2012, 342/343: 36 - 41.

[16] 王 霖, 王文杰, 刘 洋, 等. 凝结芽孢杆菌 TBC - 169 菌株治疗抗原诱导大鼠结肠炎的实验研究 [J]. 胃肠病学, 2008, 13 (6): 349 - 353.

[17] Dolin B J. Effects of a proprietary *Bacillus coagulans* preparation on symptoms of diarrhea - predominant irritable bowel syndrome [J]. Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 2009, 31 (10): 655 - 659.

[18] Mohapatra S, Chakraborty T, Prusty A K, et al. Use of different microbial probiotics in the diet of rohu, *Labeo rohita* fingerlings: effects on growth, nutrient digestibility and retention, digestive enzyme activities and intestinal microflora [J]. Aquaculture Nutrition, 2012, 18 (1): 1 - 11.