

# 潜在的水体修复菌 *Bacillus subtilis* H001 的筛选及其高密度培养

刘冬梅, 罗彤晖, 李昕睿, 吴晖, 李理, 肖性龙, 袁琨, 赖富饶

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 在水产养殖规模日益扩大和集约化程度不断提高时, 带来了养殖水体富营养化、亚硝酸盐超标、致病微生物等问题, 在其中引入益生菌, 可起到预防和控制的作用。从 10 株枯草芽孢杆菌中, 筛选出菌株 H001 具有较高淀粉酶和蛋白酶酶活, 分别为 36.7 U/mL 和 35.6 U/mL。当麸皮浸汁为 40 g/L, 玉米浸汁为 15 g/L, 豆粕为 20 g/L, H001 菌落总数 (TCN) 对数值分别为 12.1, 12.1 和 14.0。当玉米浸汁与豆粕粉质量比为 2:1 时, 麸皮浸汁与豆粕粉的质量比为 2:1 时, H001 的 TCN 对数值都约为 15.0。在模拟水体中, 当亚硝酸盐含量分别为 5.0 mg/L、10.0 mg/L、20.0 mg/L、30.0 mg/L、40.0 mg/L 和 50.0 mg/L 时, 菌株 H001 对其降解率分别为 95.0%、95.0%、84.1%、68.6%、48.5% 和 44.4%。综上所述, 具有较高淀粉酶和蛋白酶酶活的枯草芽孢杆菌 H001, 其培养基经优化后 TCN 提高到  $1.6 \times 10^{15}$  CFU/mL, 优化后培养基组合经济且适合于 H001 的高密度培养, H001 是一种潜在的养殖水体修复菌。

**关键词:** 枯草芽孢杆菌; 蛋白酶; 淀粉酶; 高密度培养; 养殖水体; 亚硝酸盐

文章编号: 1673-9078(2015)3-151-157

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.3.026

## High-density Culture and Potential Aquatic Remediation Activity of *Bacillus subtilis* H001

LIU Dong-mei, LUO Tong-hui, LI Xin-rui, WU Hui, LI Li, XIAO Xing-long, YUAN Kun, LAI Fu-rao

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** The increase in scale and degree of intensification of aquaculture has led to several environmental issues, such as eutrophication, excessive nitrite content, and presence of pathogenic microorganisms, in the water bodies used for aquaculture. Introduction of probiotics into such water bodies can help prevent and control these critical issues. *Bacillus subtilis* strain H001 was selected from among ten screened strains as it showed higher amylase (36.7 U/mL) and protease (35.6 U/mL) activities. The medium components were varied in order to optimize the medium for H001 growth, and the effect was investigated in terms of the logarithm of total colony number [log(TCN)]. Highest log(TCN) values for H001 were obtained for 40 g/L bran-based broth, 15 g/L corn-based broth, and 20 g/L soybean meal, at 12.1, 12.1, and 14.0, respectively. The log(TCN) was approximately 15 when the mass ratio of corn-based broth (or bran-based broth) to soybean meal was 2:1. The rate of nitrite degradation by H001 in the simulated water body was 94.5%, 95.0%, 84.1%, 68.6%, 48.5%, and 44.4% when the initial nitrite concentration was 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, and 50.0 mg/L, respectively. In summary, the TCN of *Bacillus subtilis* H001 with higher amylase and protease activities increased to  $1.6 \times 10^{15}$  CFU/mL after the medium was optimized. This optimized medium was economical and suitable for high-density culture of H001. Strain H001 is presented as a potential aquatic bioremediation agent for water bodies used in aquaculture.

**Key words:** *Bacillus subtilis*; amylase; protease; high-density culture; water body in aquaculture; nitrite

水产养殖水体污染是食品安全要解决的重要课题之一。我国水产养殖业因大量投放人工饵料引起水质

收稿日期: 2014-07-21

基金项目: 粤港关键领域重点突破项目 (2007A020903002); 国家自然科学基金资助项目 (31101254)

作者简介: 刘冬梅 (1972-), 女, 博士, 高级工程师, 主要从事食品微生物的利用与控制的研究工作

通讯作者: 吴晖 (1967-), 男, 博士, 教授, 主要从事食品微生物的利用与控制的研究工作

恶化已成为制约水产养殖业可持续发展的关键。现行集约化的水产养殖系统中, 通常投放大量人工配制饲料为满足水产品生长需要, 大量剩余饲料 (约占总投放量 10~20%) 与水产品排泄物残存在养殖水体中<sup>[1]</sup>。水体中的异养菌无法很好处理如此大量的“营养物质”, 从而导致养殖水体积累各种有机物和有毒有害物质, 因此, 在水产养殖规模日益扩大和集约化养殖程度不断提高时, 随之而来的养殖水体富营养化、亚硝酸盐超标、致病微生物及有害藻类大量滋生等问题突出<sup>[2]</sup>,

目前用于养殖水体修复的微生物主要有芽孢杆菌、光合细菌、硝化细菌复合菌、酵母菌和乳酸菌等,其中枯草芽孢杆菌是对人畜无毒无害的细菌,在自然界分布广泛,是美国 FDA 规定可作为微生态制剂的菌株之一,中国饲料工业协会也规定枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、腊样芽孢杆菌等 12 种有益微生物可以作为饲料级微生物添加剂<sup>[1]</sup>。枯草芽孢杆菌产生的许多胞外酶(淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶)不仅能分解饲料残饵和底泥中的淀粉、蛋白质和脂肪等有机质,以达到降低养殖水体富营养化和减少底泥生成的作用,还可以拮抗多种肠道致病菌,达到防病治病的效果<sup>[4]</sup>。除此外,枯草芽孢杆菌还能降解水体中的亚硝酸盐和氨氮的含量,减少其对水体的污染<sup>[5]</sup>。现有商品中水体修复菌的活力普遍存在低下,降亚硝酸盐的活力低,活菌数低( $10^5\sim 10^6$  CFU/g)等问题。本研究以淀粉酶和蛋白酶两种酶的酶活作为筛选指标,从 10 株(H001-H010)枯草芽孢杆菌中筛选作为水质改良的菌株,优化了该菌的高密度培养条件,以期得到最适合该菌株生长经济的培养基,并研究了该菌在模拟水体中降解亚硝酸盐的效果,为今后工业化生产和应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验菌株

枯草芽孢杆菌 H001-H006 株由华南理工大学轻工与食品学院食品质量与安全教研室提供,其余 H007-H010 菌株均系从湖北省荆州市不同养殖水体中采集的水样和底泥中分离、筛选、纯化得到。

### 1.2 仪器设备

LRH-250 A-II 型生化培养箱,韶关市泰宏医疗器械有限公司; pH S-3 C 型精密 pH 计,上海日岛科学仪器有限公司; SW-CJ-1R 型超净工作台,上海博讯实业有限公司医疗设备厂; 5804 R 台式高速冷冻离心机, Eppendorf AG 22331 Hamburg Germany; 高压灭菌锅,上海博讯实业有限公司医疗设备厂; 分光光度计。

### 1.3 实验材料与试剂

葡萄糖、硫酸铵(分析纯),天津市福晨化学试剂厂; 氯化钠(分析纯),广州化学试剂厂; 磷酸氢二钾、硫酸铵、柠檬酸(分析纯),广州市化学试剂厂; 硫酸镁(分析纯),天津市北联精细化学品开发有限公司; 营养琼脂、营养肉汤,广东环凯微生物科技有限公司;

酵母粉浸汁等

## 1.4 培养基及其它营养成分

### 1.4.1 种子培养基

按照配方蛋白胨 10 g/L,牛肉膏粉 3 g/L,氯化钠 5 g/L,最终 pH 7.4±0.2,灭菌冷却后备用。

### 1.4.2 麸皮浸汁的制备

麸皮浸汁为将干麸皮与浓盐酸和水按比例干麸皮:水:浓盐酸=4.6:26:1(质量比)混合后,于 0.07~0.08 MPa 的压力下水解 70~80 min,离心过滤得到上清液待用。

### 1.4.3 玉米浸汁的制备

玉米浸汁为将玉米粉与浓盐酸和水按比例玉米粉:水:浓盐酸=4.6:26:1(质量比)混合后,于 0.07~0.08 MPa 的压力下水解 70~80 min,离心过滤得到上清液待用。

### 1.4.4 豆粕粉的制备

取适量豆粕,于粉碎机中粉碎约 3 min 后,过 80 目筛备用。

### 1.4.5 模拟水体的制备

按照氯化钠浓度为 10.0 g/L,葡萄糖浓度为 1.0 g/L 的配方,用蒸馏水定容后灭菌,冷却后备用。

## 1.5 酶活力测定

### 1.5.1 淀粉酶活力测定

本文采用 Yoo 改良法<sup>[6]</sup>,取 5 mL 的 0.5% 可溶性淀粉溶液,在 37 °C 水浴中预热 10 min,加入适度稀释后粗酶液 0.5 mL,37 °C 水浴震荡,准确反应 5 min 后,加入 5 mL 的 0.1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应。取 0.5 mL 反应液与 5 mL 稀碘液显色,在 620 nm 处测光密度。以 0.5 mL 水代替 0.5 mL 反应液为空白,以不加酶液(加同体积的缓冲液)的管为对照。酶活力根据以下公式计算:酶活力(U)=(Ro-R)×50×D/Ro。

### 1.5.2 蛋白酶活力测定

根据参考文献<sup>[7]</sup>的方法测定菌株蛋白酶的酶活,略有修改,具体如下:取 15×100 mm 试管 3 支,编号 1、2、3,每管内加入样品稀释液 1 mL,置于 40 °C 水浴中预热 2 min,再各加入经同样预热的酪蛋白溶液 1 mL,精确保温 10 min,时间到后,立即再各加入 0.4 mol/L 三氯乙酸 2 mL,以终止反应,继续置于水浴中保温 20 min,使残余蛋白质沉淀后离心或过滤,然后另取 15×150 mm 试管 3 支,编号 1、2、3,每管内加入滤液 1 mL,再加 0.4 mol/L 碳酸钠 5 mL,已稀释的福林试剂 1 mL,摇匀,40 °C 保温发色 20 min,冷却后,用紫外可见分光光度计于 660 nm 波长处

测定样品光密度。空白实验方法同上,只是在添加酪蛋白前先加三氯乙酸溶液使酶失活。酶活力根据以下公式计算:蛋白酶活力(U/mL) =  $\Delta OD_{660nm} \times K \times 4/t$ ,上式中 $\Delta OD_{660nm}$ 表示样品测定与空白试验光密度值之差;K表示吸光常数,即每1个 $OD_{660nm}$ 值相当的酪氨酸量( $\mu\text{g}$ ),本实验中K是根据国标方法配制酪氨酸标准溶液,绘制标准曲线,据标准曲线查得结果为100;4表示本实验参加福林试剂反应的实际的酪氨酸的量仅是水解产生酪氨酸量的1/4,故计算酶活时应乘以4;t表示反应时间(min),本实验为10 min。

## 1.6 培养基的优化研究

从碳源、氮源和无机盐3方面分别优化枯草芽孢杆菌的培养基配方。单因素实验确定最佳碳源、氮源后,通过碳氮源组合实验确定最佳碳氮源配比;根据文献资料,选择对枯草芽孢杆菌生长影响最大的4种无机盐,通过正交实验确定最终组合。

### 1.6.1 种子液制备

于新鲜的培养斜面挑取少许菌落,接种于装有50 mL种子培养基的250 mL锥形瓶内,于30℃、150 r/min的摇床速度下培养24 h,菌浓度约为 $10^9$  CFU/mL,为种子液。

### 1.6.2 菌落总数的测定

按配方称取各培养基成分置于250 mL锥形瓶中,加入蒸馏水定容至50 mL,调整pH 7.2,在0.1 MPa压力下灭菌20 min后冷却成培养基,以体积百分比2%(V/V)将1.6.1的种子液接种于培养基中,于30℃下,以150 r/min摇床速度培养24 h后,为培养液,用平板计数法测定其中的菌落总数(Total Colonies Number,简称TCN),单位为CFU/mL,分别做3个平行,取平均值。

### 1.6.3 碳源的筛选

在酵母粉10 g/L,  $\text{MgSO}_4$  0.5 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.3 g/L, NaCl 0.5 g/L, 柠檬酸三钠2.5 g/L中,分别加入20 g/L的葡萄糖、麸皮浸汁和玉米浸汁等3种碳源,按照1.6.2的方法测定3种碳源的菌液的TCN;葡萄糖15 g/L,麸皮浸汁分别为20 g/L、30 g/L、40 g/L、50 g/L和60 g/L等5个浓度,按照1.6.2的方法测定菌液的TCN;葡萄糖15 g/L,玉米浸汁分别为5 g/L、10 g/L、15 g/L、20 g/L和25 g/L等5个浓度,按照1.6.2的方法测定菌液的TCN;

### 1.6.4 氮源的筛选

在葡萄糖15 g/L,  $\text{MgSO}_4$  0.5 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.3 g/L, NaCl 0.5 g/L, 柠檬酸三钠2.5 g/L中,分别加入10 g/L的酵母粉、豆粕和硫酸铵等3种氮源,按照1.6.2的方

法测定3种氮源的菌液的TCN;酵母粉10 g/L,豆粕分别为10 g/L、15 g/L、20 g/L、25 g/L、30 g/L等5个浓度,按照1.6.2的方法测定菌液的TCN;酵母粉10 g/L,硫酸铵分别为2.5 g/L、5.0 g/L、7.5 g/L、10 g/L、12.5 g/L等5个浓度,按照1.6.2的方法测定菌液的TCN。

### 1.6.5 最佳碳氮比的确定

确定最佳碳源、氮源后,采用4种无机盐的含量分别为 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.1 g/L, NaCl 0.3 g/L, 二水合柠檬酸三钠( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) 1.0 g/L,选取不同水平筛选最佳碳氮比,按照1.6.2的方法测定菌液的TCN,由此确定枯草芽孢杆菌的最佳培养基配方。

## 1.7 在模拟水体中枯草芽孢杆菌 H001 降解亚硝酸盐

### 1.7.1 亚硝酸盐的检测

参考国标GB/T5009.33-2010《食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定》中盐酸萘乙二胺法测定亚硝酸盐含量的方法进行测定,稍有修改,为不经过沉淀蛋白质的步骤,直接加2 mL对氨基苯磺酸溶液,混匀,静置3~5 min后各加入1 mL盐酸萘乙二胺溶液(2 g/L),加水至刻度,混匀,静置15 min测定反应液的吸光度。

### 1.7.2 在模拟水体中 H001 降解亚硝酸盐的能力

将按1.4(5)配好的模拟水体分装于50 mL的宽口锥形瓶中,分别添加100  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{L}$ 、400  $\mu\text{L}$ 、600  $\mu\text{L}$ 、800  $\mu\text{L}$ 、1000  $\mu\text{L}$ 的1.00 g/L的亚硝酸钠溶液,使模拟水体的亚硝酸盐浓度分别约为5 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、30 mg/L、40 mg/L、50 mg/L。按照最佳的培养基配方,将枯草芽孢杆菌H001进行高密度培养,培养后的菌液TCN达 $10^{14}$ ~ $10^{15}$  CFU/mL,稀释菌液至合适浓度,再将稀释后菌液按体积百分比为1.0~5.0%接入至20 mL模拟水体中,使其中的H001的细胞数量为 $10^{10}$  CFU/mL,于30℃下,以150 r/min速度培养24 h后,按照1.7.1的方法测定亚硝酸盐含量,不加菌的组为空白对照组。亚硝酸盐降解率=(实验组亚硝酸盐含量/空白对照组亚硝酸盐含量)×100%。每个组做3个平行,并分析显著性。

## 1.8 数据分析

实验数据和绘图均采用Origin 8.0数据分析软件。

## 2 结果与讨论

## 2.1 蛋白酶和淀粉酶活力测定

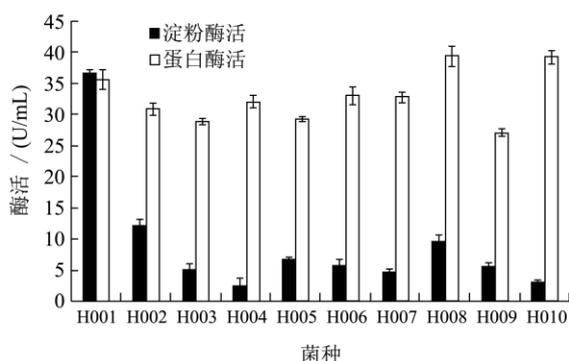


图1 各菌株淀粉酶和蛋白酶活力

Fig.1 Amylase and protease activity of different strains screened

菌株 H001-H010 的淀粉酶酶活和蛋白酶酶活见图 1 所示,从图中可以看出, H001 菌株产的淀粉酶酶活最高为 36.7 U/mL,与其它菌株相比,存在显著性差异( $p \leq 0.01$ ),而其余菌株相差不大,较优的有 H002、H008、H005 菌株,它们的酶活分别为 12.3 U/mL、9.6 U/mL、6.7 U/mL。枯草芽孢杆菌是常见的淀粉酶产生菌,产生的淀粉酶的最适 pH 迥异<sup>[8]</sup>。由于养殖水体的 pH 为中性偏弱碱性<sup>[8]</sup>,温度为常温,因此本研究中筛选得到的菌株应符合这个要求。由图还可以得知, H001-H010 中各菌株产蛋白酶活力相差不大 ( $p > 0.05$ ),以 H008 菌株产蛋白酶酶活最高,为 39.4 U/mL,其余菌株中相对较优的还有 H010、H001、H006 菌株,它们的酶活分别为 39.2 U/mL、35.6 U/mL、33.0 U/mL。综合考虑淀粉酶和蛋白酶酶活,选择淀粉酶活力最高的 H001 作为目标菌株进行后续的研究。利用 DNSA 的方法,枯草芽孢杆菌 WBS 的淀粉酶酶活为 18.7 U/mL<sup>[9]</sup>;采用二硝基酸的方法,枯草芽孢杆菌 IP 5832 最适条件下产淀粉酶的酶活为 2.5 IU/mL<sup>[10]</sup>;上述淀粉酶的酶活均比 H001 稍低,是由于酶活测定方法和培养条件不同所造成。孙妍等人筛选出了蛋白酶高产菌株 NB1,其蛋白酶酶活为 19.41 U/mL<sup>[11]</sup>; Rakesh 等人用载体固定枯草芽孢杆菌细胞以生产蛋白酶,其蛋白酶酶活最高为 10.8 U/mL<sup>[12]</sup>。枯草芽孢杆菌由于具有生长条件简单,能同时产生淀粉酶和蛋白酶的特点,在水产养殖等方面得到了应用。但是,目前市场中流通的以枯草芽孢杆菌为主的水体净化菌普遍存在活菌数低,淀粉酶和蛋白酶的酶活不足,降亚硝酸盐的活力低等问题,使其应用范围受到了限制。

## 2.2 碳源的确定

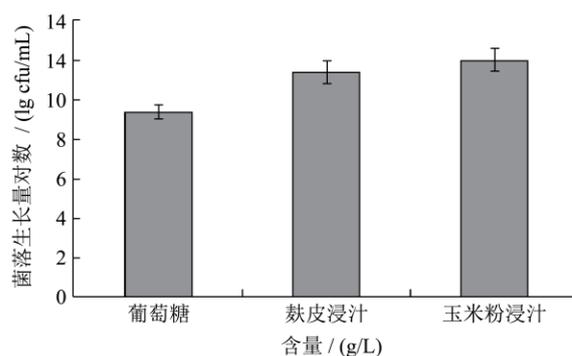


图2 碳源对枯草芽孢杆菌生长的影响

Fig.2 Effect of the varying carbon source on the growth of *Bacillus subtilis* H001

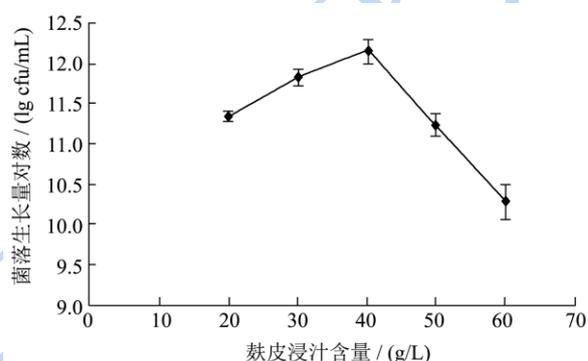


图3 麸皮浸汁含量对枯草芽孢杆菌生长的影响

Fig.3 Effect of bran-based broth concentration on the growth of *Bacillus subtilis* H001

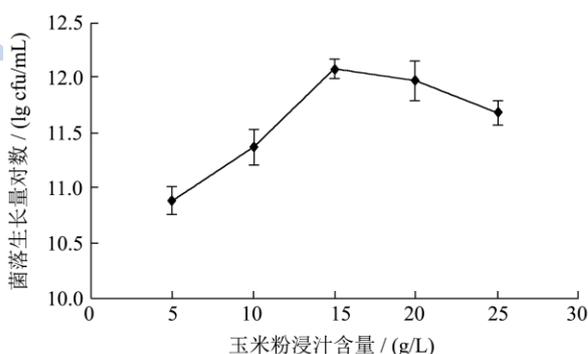


图4 玉米浸汁含量对枯草芽孢杆菌生长的影响

Fig.4 Effect of corn-based broth concentration on the growth of *Bacillus subtilis* H001

H001 利用葡萄糖、麸皮浸汁和玉米浸汁的情况见图 2,从图中可以看出 3 种碳源以 20 g/L 的相同含量进行培养,得到不同的培养结果,麸皮浸汁与玉米浸汁结果相近, H001 的 TCN 对数值分别为 11.3 和 12.0,而以葡萄糖为碳源 H001 的 TCN 对数值为 9.3,可知麸皮浸汁、玉米浸汁为碳源其 TCN 均比葡萄糖高出 2 个数量级,并存在显著性差异 ( $p \leq 0.01$ )。可见,菌株 H001 能利用单糖和多糖等碳源,玉米粉和麸皮中

含有丰富的淀粉,从2.1的结果知H001能产生淀粉酶,所以可利用淀粉获得碳源,除碳源外玉米浸汁和麸皮浸汁中还含有蛋白质、生长因子等营养成分,因此比营养成分单一的葡萄糖更优,为菌株H001提供了更丰富的营养要素。当葡萄糖浓度为45 g/L 其的TCN对数值仅为8.5<sup>[13]</sup>。图3为H001利用麸皮浸汁的情况,当麸皮浸汁含量为20~40 g/L时,H001的TCN对数值不断升高,之后逐步下降,因此,麸皮浸汁含量为40 g/L时,H001的TCN对数值达到12.1,与麸皮浸汁含量40 g/L以外的点相比,存在显著性差异( $p \leq 0.05$ ),还比赫林华等人的研究( $6 \times 10^9$  CFU/mL)高9倍多<sup>[4]</sup>,这个较大的差异可能与菌株不同和麸皮浸汁的制作工艺不同有关。图4为H001利用玉米浸汁的情况,当玉米浸汁含量为5~15 g/L时,H001的TCN对数值不断升高,之后逐步下降,与玉米浸汁含量15 g/L以外的点相比,存在显著性差异( $p \leq 0.05$ ),因此,当玉米浸汁含量为15 g/L时,H001的TCN对数值为12.1。综上所述,菌株H001能较好地利用麸皮浸汁和玉米浸汁中营养物质进行生长繁殖,所得菌落总数均远高于文献中的结果。

### 2.3 氮源的确定

H001利用酵母粉、豆粕合硫酸铵的情况见图5,从图中可看出3种氮源以相同含量为10 g/L进行培养后,H001的TCN对数值分别为10.7、11.4、10.6,从中还可知,以豆粕为氮源培养H001更合适,其TCN分别比酵母粉和硫酸铵的高1个数量级,并存在显著性差异( $p \leq 0.05$ )。硫酸铵是一种无机氮源,若作为唯一氮源可能会导致细胞渗透压不适的问题<sup>[15]</sup>,因而对细胞生长不利,其用量非常关键。图6为豆粕含量对H001生长的影响规律,当豆粕含量为10 g/L~20 g/L时,H001的TCN对数值不断升高,之后逐步下降,因此,豆粕含量为20 g/L时,H001的TCN对数值达到14.0,与豆粕含量20 g/L以外的点相比,存在显著性差异( $p \leq 0.01$ ),H001能产生蛋白酶,可以降解豆粕中的蛋白质为较小分子量的蛋白肽<sup>[16-17]</sup>以满足自身生长繁殖的需要,这比文献<sup>[17-18]</sup>的结果高3~6个数量级。图7为硫酸铵含量对H001生长的影响规律,当硫酸铵含量为2.5 g/L时,H001的TCN对数值最高为11.7,之后急剧下降,直至平稳,与硫酸铵2.5 g/L以外的点相比,存在显著性差异( $p \leq 0.01$ ),硫酸铵是一种无机氮源,当其含量较低时,H001可较好利用,但当硫酸铵含量进一步升高,H001无法更好利用。与豆粕用量为20 g/L的结果差2个数量级。综上所述,经济价廉的豆粕最适合于H001的生长繁殖,可替代

昂贵的酵母粉,为进一步降低成本,可将豆粕和硫酸铵进行优化组合加以利用。

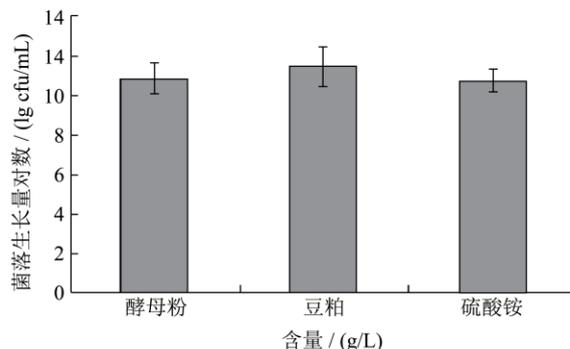


图5 氮源对枯草芽孢杆菌H001生长的影响

Fig.5 Effect of the varying nitrogen source on the growth of *Bacillus subtilis* H001

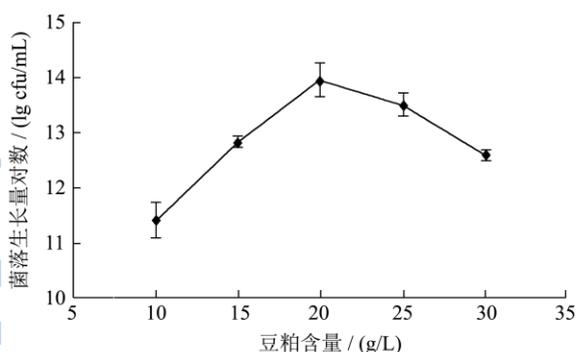


图6 豆粕含量对枯草芽孢杆菌生长的影响

Fig.6 Effect of soybean meal concentration on the growth of *Bacillus subtilis* H001

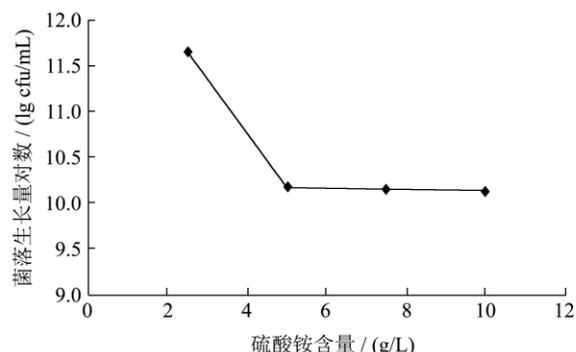


图7 硫酸铵含量对枯草芽孢杆菌生长的影响

Fig.7 Effect of ammonium sulfate concentration on the growth of *Bacillus subtilis* H001

### 2.4 最佳碳氮比的确定

碳源单因素结果表明麸皮浸汁与玉米浸汁均能显著提高菌体生长量,且两者对枯草芽孢杆菌生长的影响效果相近,无法通过单因素实验明确区分二者的差异。以麸皮浸汁与玉米浸汁为碳源均可得到较好的培养效果,现分别考虑两者与豆粕作用的效果。麸皮浸

汁, 玉米浸汁与豆粕质量比分别为 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 和 3.0。经不同碳氮比的培养基培养后枯草芽孢杆菌生长情况见图 8, 麸皮浸汁与玉米浸汁分别与豆粕按不同比例混合后菌株的生长趋势相同, 在质量比为 1.0~2.0 时, 其菌体量逐渐增大, 在质量比为 2.0 时菌体得率最大, H001 的 TCN 对数值分别为 15.1 和 15.0, 与质量比 2.0 以外的点相比, 存在显著性差异 ( $p \leq 0.01$ ), 在质量比为 2.0~3.0 时, H001 的 TCN 对数值逐渐降低。总之, 麸皮浸汁还是玉米浸汁与豆粕混合, H001 的 TCN 对数值相差很小, 差异不明显 ( $p > 0.05$ ), 但因麸皮与玉米粉相比, 成本更低, 故选择麸皮浸汁为枯草芽孢杆菌 H001 培养基中碳源。通过单因素及正交实验, 确定了 H001 最佳培养基分别为葡萄糖 15 g/L, 麸皮浸汁 40 g/L, 豆粕粉 20 g/L, 使用该培养基培养枯草芽孢杆菌 H001 的 TCN 对数值为 15.2 (TCN 为  $1.6 \times 10^{15}$  CFU/mL)。

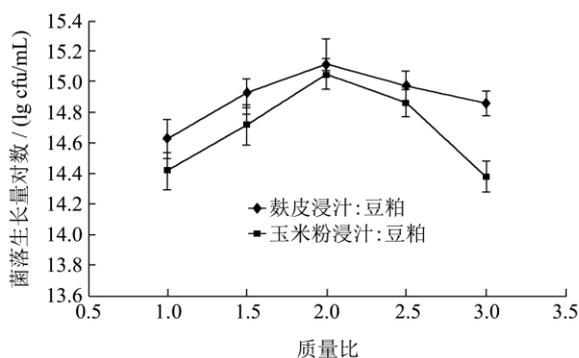


图 8 麸皮浸汁和玉米浸汁分别与豆粕组合对枯草芽孢杆菌生长的影响

Fig.8 Effect of the mass ratio of bran- or corn-based broth to soybean meal on the growth of *Bacillus subtilis* H001

### 2.5 亚硝酸钠浓度对降解效果的影响

在模拟水体中, 调节其中亚硝酸盐含量分别为 5.0 mg/L、10.0 mg/L、20.0 mg/L、30.0 mg/L、40.0 mg/L 和 50.0 mg/L, 在其中接入 H001 菌液进行降解, 降解效果见图 9, 从图中可以看出, 在亚硝酸钠初始浓度为 5.0 mg/L、10.0 mg/L 时, H001 对亚硝酸盐降解率均为 95.0%。亚硝酸钠浓度为 5.0 mg/L、10.0 mg/L 与浓度 20.0 mg/L、30.0 mg/L、40.0 mg/L、50.0 mg/L 分别相比较, 亚硝酸盐降解率存在显著性差异 ( $p < 0.01$ )。从图 9 中还可知, 当亚硝酸钠初始浓度在 10.0 mg/L 到 50.0 mg/L 这一范围内时, 其对亚硝酸盐降解率随亚硝酸钠浓度增加而显著性降低 ( $p < 0.01$ ), 模拟水体中亚硝酸钠浓度过高对枯草芽孢杆菌的生长存在着抑制作用。高密度养殖水体中亚硝酸盐的含量一般为 0.5~2.0 mg/L<sup>[19-20]</sup>, 这远比本研究设定的浓度低, 本

研究中当亚硝酸盐浓度为 5.0~10.0 mg/L 时, 枯草芽孢杆菌 H001 对亚硝酸盐的降解率达到 95.0%, 可见枯草芽孢杆菌 H001 完全有能力将水体中亚硝酸盐含量降解到最低, 这个与专利的结果吻合<sup>[21]</sup>。

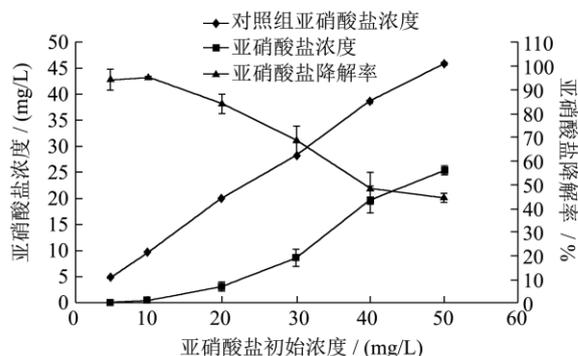


图 9 不同亚硝酸盐浓度对枯草芽孢杆菌降解亚硝酸盐的影响

Fig.9 Effect of nitrite concentration on the rate of nitrite degradation by *Bacillus subtilis* H001

### 3 结论

本研究通过测定淀粉酶和蛋白酶的活力, 从 10 株菌种中筛选出一株高淀粉酶和高蛋白酶活力的菌株 H001, 并通过单因素确定了 H001 的最佳培养基为葡萄糖 15 g/L, 麸皮浸汁 40 g/L, 豆粕粉 20 g/L, 该培养基配方价格低廉, 适合枯草芽孢杆菌的大规模工业化生产, 使用该培养基后枯草芽孢杆菌 H001 的 TCN 提高到  $1.6 \times 10^{15}$  CFU/mL, 为枯草芽孢杆菌的高密度培养提供了一个切实可行的方法。在模拟水体中, H001 能很好降解其中 5.0 mg/L~10.0 mg/L 的亚硝酸盐。利用枯草芽孢杆菌菌株在养殖水体中增殖后产生的大量胞外酶 (淀粉酶、蛋白酶) 不仅能将饲料残饵和底泥中的淀粉、蛋白质等有机质分解, 以达到降低养殖水体中富营养化作用, 还可以拮抗多种肠道致病菌, 达到防病治病的效果, 此外枯草芽孢杆菌还能降解水体中的亚硝酸盐和氨氮的含量, 进一步减少其对水体的污染。笔者研究组还发现模拟水体中亚硝酸盐的降解是源于枯草芽孢杆菌 H001 中的亚硝酸盐还原酶的作用, 已经从该菌株中分离纯化到具有降解亚硝酸盐降解能力的酶 (数据未展出), 还需要对该酶性质进行表征。因此, 筛选出来的枯草芽孢杆菌 H001 可作为一种潜在的养殖水体修复菌。

### 参考文献

[1] 刘道玉, 吴伟. 水产养殖水体污染及微生物修复的研究[J]. 现代农业科技, 2011, (17): 253-256  
LIU Dao-Yu, WU Wei. Research on water pollution and microbial remediation of aquaculture [J]. 2011, (17): 253-256

- [2] Bhaskar N, Sachindra NM. Bacteria of public health significance associated with cultured tropical shrimp and related safety issues: a review [J]. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 2006, 43 (3): 228-238
- [3] Schallmeyer M, Singh A, Ward OP. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2004, 50(1): 1-17
- [4] Amua-Awua WKA, Jakobsen M. The role of *Bacillus* species in the fermentation of cassava [J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1995, 79(3): 250-256
- [5] Zübeyde B, Fikret U, Çetin A. Solid state fermentation for production of  $\alpha$ -amylase by a thermo tolerant *Bacillus subtilis* from hot-spring water [J]. *Process Biochemistry*, 2003, 38: 1665-1668
- [6] Yoo YJ, Hong J, Hatch RT. Comparison of alpha-amylase activities from different assay methods [J]. *Biotechnology Bioengineering*, 1987, 30(1): 147-151
- [7] Vadehra DV, Wallace DL, Harmon LG. Comparison of methods of extracting intracellular proteases from bacteria [J]. *Applied Microbiology*, 1965, 13(6): 1010-1013
- [8] 沈智华,沈锦玉,尹文林,等.枯草芽孢杆菌B115优化培养及其对气单胞菌的抗菌效果的研究[J].*微生物学通报*,2005, 32(4):79-84  
SHEN Zhi-Hua, SHEN Jin-Yu, YIN Wen-Lin, et al. Study on the optimum culture for growth of *Bacillus Subtilis* B115 and the antibacterial effect of B115 on *aeromonas* [J]. *Microbiology China*, 2005, 32(4): 79-84
- [9] Ajayi, Adedayo O, Fagade, et al. Heat activation and stability of amylases from *Bacillus* species [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2007, 6(10): 1181-1184
- [10] Natasa B, Jordi R, Josep L, et al. Optimization of the growth and  $\alpha$ -amylase production of *bacillus subtilis* ip 5832 in shake flask and laboratory fermented batch cultures [J]. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 2011, 76(7): 965-972
- [11] 孙妍,王加启,奚晓琦,等.高产蛋白酶纳豆芽孢杆菌的分离筛选与鉴定[J].*沈阳农业大学学报*,2010,41(2):175-180  
SUN Yan, WANG Jia-Qi, XI Xiao-Qi, et al. Screening and identification with high protease producing *Bacillus subtilis* Natto Stain [J]. *Shenyang Agricultural University*, 2010, 41(2): 175-180
- [12] Rakesh K, Ritika V. Protease production by *bacillus subtilis* immobilized on different matrices [J]. *New York Science Journal*, 2010, 3(7): 20-24
- [13] Eliana OS, Meire LLM. Effect of the medium composition on formation of amylase by *Bacillus* sp [J]. *Brazilian archives of Biology and Technology*, 2003, 6: 129-134
- [14] 郝林华,孙丕喜,姜振波,等.枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)液体发酵条件[J].*上海交通大学学报*,2006(4):380-38  
HAO Lin-Hua, SUN Pei-Xi, JIANG Zhen-Bo, et al. Liquid fermentation conditions of *Bacillus subtilis* [J]. *Shanghai Jiaotong University*, 2006(4): 380-38
- [15] Magdi AMY, Francis FH, Moustafa ANE, et al. Optimization of cultivation medium and growth conditions for *bacillus subtilis* ko strain isolated from sugar cane molasses [J]. *American-Eurasian Journal of Food Agriculture and Environment*, 2010, 7(1): 31-37
- [16] 吴晖,卓林霞,解检清,等.发酵条件对枯草芽孢杆菌发酵豆粕中的蛋白酶活力的影响[J].*现代食品科技*, 2008, 24(10): 973-976  
WU Hui, ZHUO Lin-Xia, XIE Jian-Qing, et al. Effect of fermentation conditions on the protease activity of a *bacillus subtilis* on fermented soybean meal [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2008, 24(10): 973-976
- [17] Bijoy M, Jayati S, Prabir KS. Antioxidant activities of soybean as affected by *bacillus*-fermentation to kinema [J]. *Food Research International*, 2008, 41: 586-593
- [18] Hamid M, Ikramul H. Comparative evaluation of agroindustrial byproducts for the production of alkaline protease by wild and mutant strains of *bacillus subtilis* in submerged and solid state fermentation [J]. *The Scientific World Journal*, 2013, (2013): 1-6
- [19] Salam MA, Sadujjaman MA, Rahman MS. Aquaponics for improving high density fish pond water quality through raft and rack vegetable production [J].*World Journal of Fish and Marine Sciences*, 2013, 5(3): 251-256
- [20] Shaari AL, Surif M, Latiff FA, et al. Monitoring of water quality and microalgae species composition of penaeus monodon ponds in Pulau Pinang, Malaysia [J]. *Tropical Life Sciences Research*, 2011, 22(1), 51-69
- [21] 刘冬梅,吴晖.降解养殖水体中亚硝酸盐和氨态氮的净水剂的制备方法:中国,ZL 200910213687.6[P].2009-12-08/2011-07-20  
LIU Dong-Mei, WU Hui. The preparation of water-purification agent with activity of nitrite and ammonia nitrogen degradation in aquaculture water body: China, ZL 200910213687.6 [P]. 2009-12-08/2011-07-20