

文章编号:1674-7054(2010)03-0210-05

# 高蛋白酶活性的地衣芽孢杆菌热带菌种的筛选与鉴定

陈圣丰<sup>1</sup>, 林 钦<sup>2</sup>, 周永灿<sup>1</sup>, 欧阳吉隆<sup>1</sup>, 王世锋<sup>1</sup>, 谢珍玉<sup>1</sup>

(1. 海南大学 海洋学院, 海南省热带水生生物技术重点实验室, 海南 海口 570228;

2. 中国水产科学院 南海水产研究所, 广东 广州 510300)

**摘 要:** 从海南省文昌市、海口市的海水养殖池和天然海域中采集的海水与底泥样品中分离和筛选出 13 株具有高蛋白酶活性的地衣芽孢杆菌菌株, 经菌落形态观察、标准生理生化分析和 16S rDNA 测序, 确定获得的菌株均为野生型热带种地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)。

**关键词:** 地衣芽孢杆菌; 高蛋白酶活性; 热带种; 筛选

**中图分类号:** Q 93-331

**文献标志码:** A

地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 能产生高效的胞外蛋白酶<sup>[1]</sup>、脂肪酶<sup>[2]</sup>和淀粉酶<sup>[3]</sup>等生物活性物质。近年来, 地衣芽孢杆菌作为一种生态制剂广泛应用于水产养殖业中, 它和其他种类的芽孢杆菌、光合细菌等有益微生物共同作用, 可有效地改善养殖水质, 促进水产养殖生物的生长和发育<sup>[4, 5]</sup>。地衣芽孢杆菌为多种污水和有机物无害化处理的常用菌种, 也是重要的蛋白改性和助消化的有益微生物, 受到国内学者的广泛关注。如杜珍辉等将地衣芽孢杆菌工业菌株应用于猪粪液的无害化处理<sup>[9]</sup>; 李红梅等研究了丹麦的地衣芽孢杆菌菌株的碱性蛋白酶对玉米蛋白改性的作用<sup>[10]</sup>; 刘波等人研究了美国的地衣芽孢杆菌菌株对鱼类消化功能的影响<sup>[11]</sup>; 谢航等人研究了从福建土壤中分离的地衣芽孢杆菌对养殖水体中残余饵料的降解特性<sup>[12]</sup>。但国内学者的研究均未涉及地衣芽孢杆菌的热带地理种群的应用研究。笔者采用脱脂牛奶平板法, 从海南省文昌市、海口市的水产养殖池和天然海域中采集的海水与底泥样品中分离和筛选出具有高蛋白酶活性的菌株, 并用表型鉴定和 16S rDNA 序列分析等方法对分离的菌株进行鉴定, 为热带海水养殖的水质净化提供高效的土著菌种参考菌株。

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

1.1.1 样品 用于分离筛选芽孢杆菌的样品为笔者于 2008 年 12 月和 2009 年 5 月从海南省文昌市、海口市的水产养殖池和天然海域中采集的海水和底泥样品。对照菌株为目前海南水产养殖中 2 种常见的有益微生物制剂分离的菌株。

1.1.2 培养基 芽孢杆菌选择性培养基配比: 胰蛋白胨 5 g · L<sup>-1</sup>, 酵母浸膏 2.5 g · L<sup>-1</sup>, 葡萄糖 1 g · L<sup>-1</sup>, 琼脂 13 g · L<sup>-1</sup>, NaCl 70 g · L<sup>-1</sup>, pH7.5。普通海水液体培养基配比: 酵母浸膏 1 g · L<sup>-1</sup>, 牛肉膏 3 g · L<sup>-1</sup>, 蛋白胨 5 g · L<sup>-1</sup>, NaCl 30 g · L<sup>-1</sup>, pH7.5。普通海水固体培养基配比: 在普通海水液体培养基基础上加入琼脂 13 g · L<sup>-1</sup>, pH7.5。

1.1.3 试剂 固定液: φ = 10% 的三氯乙酸。染色液: 乙醇 45 mL, 冰乙酸 10 mL, 考马斯亮兰 G-250

收稿日期: 2010-04-08

基金项目: 农业科技成果转化项目(2009GB2E200302); 科技人员服务企业项目(2009GJE20024); 海南省重点科技项目(090501); 农业部渔业生态环境重点开放实验室和广东省渔业生态环境重点实验室开放基金(2007-10)。

作者简介: 陈圣丰(1983-), 男, 海南万宁人, 海南大学海洋学院水产养殖专业 2007 级硕士研究生。

通信作者: 谢珍玉(1974-), 男, 江西吉安人, 海南大学海洋学院副教授, 博士。E-mail: xiezyscuta@163.com

0.25 g, 蒸馏水 45 mL。脱色液:乙醇 50 mL, 冰乙酸 75 mL, 蒸馏水 875 mL。

## 1.2 方法

1.2.1 菌种分离 以参考文献[6]的方法制备芽孢杆菌选择性培养基。海水样品经摇匀后,取 100  $\mu\text{L}$  均匀涂布于芽孢杆菌选择性培养基上,  $(50 \pm 1)^\circ\text{C}$  培养 24 h, 挑取表面粗糙、皱褶的乳白色单菌落为初筛的目标菌株。对底泥样品和市售的有益微生物制剂产品分别加适量灭菌海水充分均匀后进行分离, 分离方法同上。

1.2.2 菌种保藏 分别将初筛的 326 株目标单菌落接种于普通海水液体培养基,  $37^\circ\text{C}$  培养 24 h, 按 1:1 比例分别将菌液和  $\omega = 80\%$  的无菌甘油加入保种管,  $-80^\circ\text{C}$  长期保存备用, 每株 4 管。

1.2.3 高蛋白酶活性菌株的筛选 目标菌株培养液的制备:用接种环挑取初筛的 326 株目标菌株, 分别接种于普通海水液体培养基中,  $30^\circ\text{C}$   $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  振荡培养 24 h,  $6000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 收集上清液各 10 mL, 并用  $0.20 \mu\text{m}$  滤膜过滤除菌, 获得目标菌株培养液,  $-20^\circ\text{C}$  保存备用。

脱脂奶平板法测定蛋白酶活性:配制含  $\varphi = 5\%$  的无菌脱脂牛奶的灭菌海水琼脂平板, 用直径 4 mm 的打孔器在平板上均匀打孔, 孔间距为 25 mm。在孔内加入 20  $\mu\text{L}$  目标菌株培养液。以等量的  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  蛋白酶 K 和从市售有益微生物制剂产品中分离获得菌株的培养液为阳性对照, 无菌海水为阴性对照。 $30^\circ\text{C}$  下孵育 24 h,  $\varphi = 10\%$  的三氯乙酸固定 2 h, 去除固定液后用染色液染色, 直至平板培养基充分着色, 去除染色液后用脱色液充分脱色, 使平板背景呈蓝色而水解圈为无色。用游标卡尺测量水解圈直径。每个样品设 2 个重复。

继代培养:将经筛选的具有高蛋白酶活性(菌株培养液的水解圈较大)的菌株 Pb-WC09005, 在高温  $(50 \pm 1)^\circ\text{C}$ , 高盐  $\text{NaCl } 70 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的选择条件下进行 20 代继代培养, 测定第 20 代菌株培养液的水解圈直径。每个样品设 2 个重复。

1.2.4 数据处理 采用统计软件 SPSS(Statistical Program for Social Sciences)的方差分析法对实验数据进行差异显著性分析。

1.2.5 高蛋白酶活性菌株的鉴定 表型鉴定:以广东省微生物研究所生产的地衣芽孢杆菌 ATCC11091 和 ATCC11946 共 2 株标准菌株作对照, 测定各分离的高蛋白酶活性菌株的形态与生理生化特征, 按文献[7]的方法进行鉴定, 并参阅文献[8]确定属或种。

16S rDNA 序列测定:利用细菌 16S rDNA 通用引物 Pf:  $5' - \text{AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG} - 3'$  和 Pr:  $5' - \text{GGT TAC CTT GTT ACG ACT} - 3'$ (由上海生物工程公司合成)对高蛋白酶活性菌株进行 PCR 扩增, 获得大小约为 1 500 bp 的片段。PCR 反应体系为:Ex Taq DNA 聚合酶  $5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (含  $\text{Mg}^{2+} 0.3 \mu\text{L}$ ), dNTP  $4 \mu\text{L}$ ,  $10 \times \text{PCR}$  缓冲液  $5 \mu\text{L}$ , 正向引物 Pf( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $5 \mu\text{L}$ , 反向引物 Pr( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $5 \mu\text{L}$ , DNA 模板  $2 \mu\text{L}$ , 加超纯水至总体积  $50 \mu\text{L}$ 。样品送至 invitrogen 广州分公司测序。将获得的序列提交到 Genbank, 利用在线软件 Blastn 2.0 与该文库中的序列比对, 同时采用 DNASTar 7.0 软件与从 GenBank 中获得的同源性最高的 24 株细菌和地衣芽孢杆菌标准菌株 ATCC14580 16S DNA 序列进行多序列匹配排列, 构建系统进化树。

## 2 结果

2.1 菌种分离 从采集的样品中分离获得目标菌株 326 株, 从 2 种市售有益微生物制剂产品中共分离获得阳性对照菌株 2 株。

2.2 高蛋白酶活性菌株的筛选 经蛋白酶活测定, 确定高蛋白酶活性菌株共 13 株, 各菌株的编号和来源以及其蛋白酶活性见表 1, 各菌株蛋白酶活性由高到低依次为: Pb-WC09005 > Pb-WC09002 > Pb-WC09009 > Pb-WC09008 > Pb-WC09006 > Pb-WC090010 > Pb-HK09001 > Pb-SP09001 > Pb-WC09003 > Pb-WC09001 > Pb-WC09004 > Pb-HK09002。对 13 株目标菌株蛋白酶活性差异显著性分析结果表明, 除 Pb-HK09002 外, 其他 10 株菌株均极显著高于  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的蛋白酶 K 的活性 ( $P < 0.01$ ); Pb-WC09002, Pb-WC09005, Pb-WC09009 蛋白酶活性均极显著高于 Pb-SP09001 ( $P < 0.01$ ); 蛋白酶活性最高的 Pb-WC09005 菌株分离于海南文昌某对虾养殖池, 其蛋白酶活性极显著高于从市售有益微生物制剂产品中分

离的2株菌株( $P < 0.01$ )。将蛋白酶活性最高的 Pb-WC09005 菌株传代20代后,第20代菌株的蛋白酶活性与第1代菌株相当,没有显著性差异( $P > 0.05$ )。

表1 13株高蛋白酶活性菌株的来源及其蛋白酶活性分析

菌株编号	来源	水解圈直径/mm
Pb-WC09001	文昌某对虾养殖池水体	10.24 ± 0.08 <sup>cc</sup>
Pb-WC09002	文昌某对虾养殖场排水口底泥	12.32 ± 0.03 <sup>aa, cc</sup>
Pb-WC09003	文昌某对虾养殖场周边海域水体	10.30 ± 0.21 <sup>cc</sup>
Pb-WC09004	文昌某对虾养殖池水体	10.18 ± 0.06 <sup>cc</sup>
Pb-WC09005	文昌某对虾养殖池水体	14.16 ± 0.04 <sup>aa, bb, cc</sup>
Pb-WC09006	文昌某对虾养殖池水体	11.54 ± 0.16 <sup>cc</sup>
Pb-WC09008	文昌某对虾养殖池水体	11.64 ± 0.14 <sup>cc</sup>
Pb-WC09009	文昌某对虾养殖池水体	12.24 ± 0.02 <sup>aa, cc</sup>
Pb-WC09010	文昌某对虾养殖池水体	11.50 ± 0.06 <sup>cc</sup>
Pb-HK09001	海口白沙门海域自然海水	11.44 ± 0.06 <sup>cc</sup>
Pb-HK09002	海口白沙门海域自然海水	9.46 ± 0.14
Pb-SP09001	某品牌超级底改(阳性对照)	11.32 ± 0.04
Pb-SP09003	某品牌产酶利生素粉剂(阳性对照)	12.72 ± 0.16
蛋白酶 K	阳性对照	9.12 ± 0.02
灭菌海水	阴性对照	0

注:a表示水解圈直径与 Pb-SP09001 存在显著差异( $P < 0.05$ );aa表示水解圈直径与 Pb-SP09001 存在极显著差异( $P < 0.01$ );b表示水解圈直径与 Pb-SP09003 存在显著差异( $P < 0.05$ );bb表示水解圈直径与 Pb-SP09003 存在极显著差异( $P < 0.01$ );c表示水解圈直径与 10 mg · L<sup>-1</sup>蛋白酶 K 存在显著差异( $P < 0.05$ );cc表示水解圈直径与 10 mg · L<sup>-1</sup>蛋白酶 K 存在极显著差异( $P < 0.01$ )。

## 2.3 高蛋白酶活性菌株的鉴定

2.3.1 菌落特征和生理生化特征 笔者分离的13株目标菌株的菌落特征均为乳白色,扁平,表面粗糙、皱褶,边缘不整齐,培养24h的菌落直径为3~5mm。革兰氏染色结果表明,所有菌株均为革兰氏阳性。生理生化特征分析表明,除淀粉水解、明胶液化和对 $\rho(\text{NaCl}) = 100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的耐受性3指标因菌株不同而存在一定差异外,其他检测指标均与地衣芽孢杆菌标准菌株一致(见表2)。

表2 13株高蛋白酶活性菌株的生理生化特征

菌株编号	淀粉水解	明胶液化	硝酸盐还原	柠檬酸盐	葡萄糖	果糖	甘露醇	D-核糖	对 NaCl 的耐受性/(g · L <sup>-1</sup> )			
									30	60	70	100
Pb-SP09001	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
Pb-SP09003	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
Pb-WC09001	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
Pb-WC09002	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
Pb-WC09003	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
Pb-WC09004	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
Pb-WC09005	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
Pb-WC09006	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
Pb-WC09008	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
Pb-WC09009	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
Pb-WC090010	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
Pb-HK09001	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-
Pb-HK09002	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
ATCC11946	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
ATCC 11091	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+

注:“+”表示阳性;“-”表示阴性。ATCC11091和ATCC11946为地衣芽孢杆菌标准菌株。

2.3.2 菌株16S rDNA序列的系统进化分析 分别以各目标菌株的基因组总DNA为模板,经标准PCR扩增,除Pb-HK09001, Pb-WC09008和Pb-WC09009分别产生1510, 1512, 1512bp的扩增片段外,其余

10 株目标菌株都产生了 1 511 bp 的 16S rDNA 产物。测序后, 将所得序列提交至 Genbank 中, 登录号分别为 HM006899, HM006900, HM006901, HM006902, HM006903, HM006904, HM006905, HM006906, HM006907, HM006908, HM006909, HM006897, HM006898。将获得的 16S rDNA 序列在 Genbank 中进行比对, 所有菌株都与地衣芽孢杆菌具有极高的同源性; 下载与 Pb-WC09001 的相似度极高的 25 株细菌和地衣芽孢杆菌标准菌株 ATCC14580 的 16S rDNA 序列, 并将其与笔者获得的 13 株细菌的同源基因序列作多序列匹配排列和系统进化树构建, 结果表明, 除 Pb-WC09001 与 ATCC14580 的 16S rDNA 的同源性为 99.3% 外, 其他 12 株菌株均为 99.4% ~ 99.8%, 从 Genbank 中获得的其他序列与 ATCC14580 的 16S rDNA 的同源性为 98.7% ~ 99.4%, 普遍低于笔者获得的 13 株细菌与 ATCC14580 的同源性; 在系统进化树中, 笔者获得的 13 株细菌也明显与 ATCC14580 单独聚为一类, 其他 24 株细菌聚为数目不等的 7 支 (见图 1)。

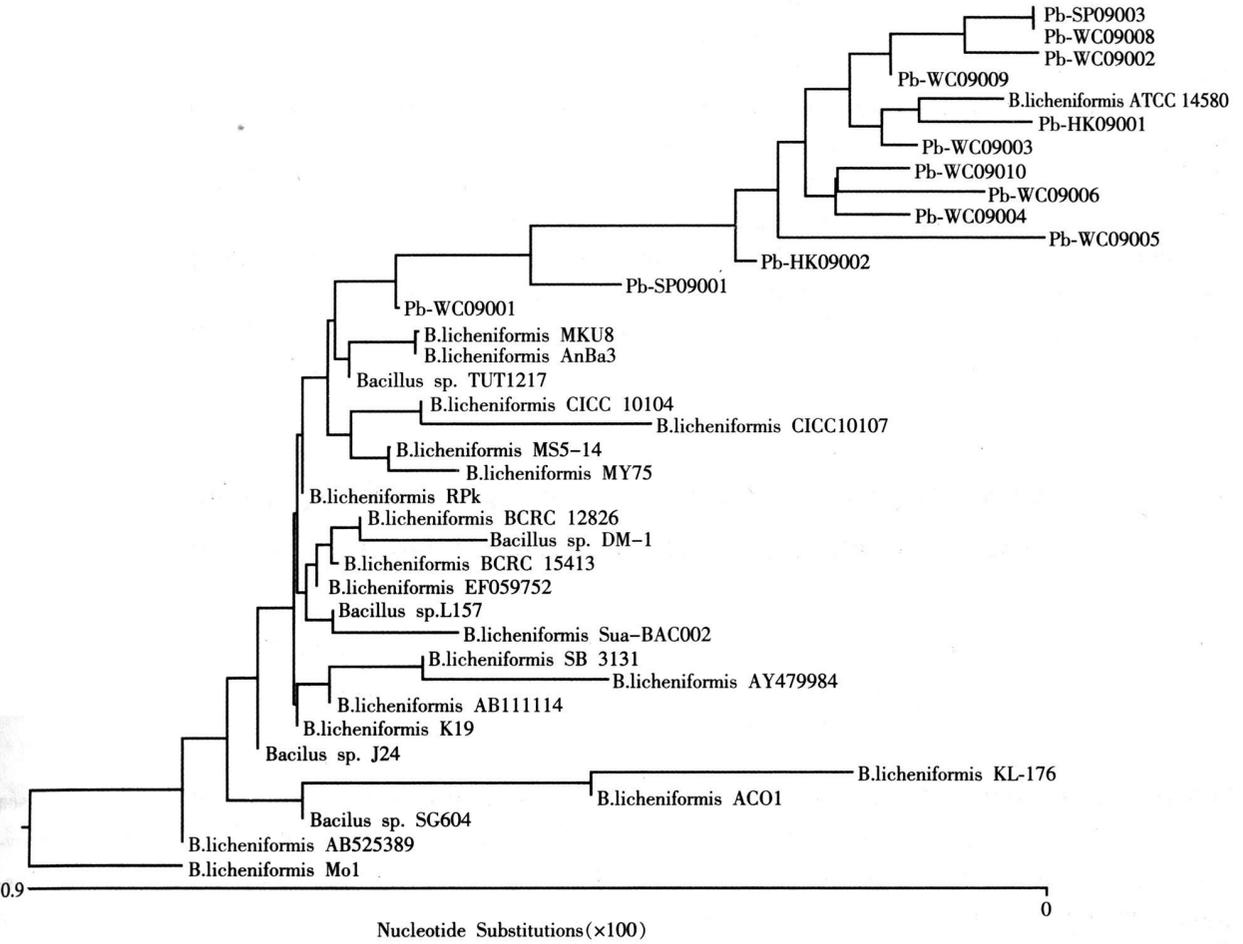


图 1 13 株高蛋白酶活性菌株 16S rDNA 序列的系统进化树

### 3 讨论

笔者从热带海水养殖环境中分离获得的 13 株具有高蛋白酶活性的菌株均为革兰氏阳性细菌, 除了淀粉水解、明胶液化和  $\rho(\text{NaCl}) = 100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的耐受性 3 指标外, 硝酸盐还原、柠檬酸盐反应、碳源需求和  $\rho(\text{NaCl}) = 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\rho(\text{NaCl}) = 60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\rho(\text{NaCl}) = 70 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的耐受性的生理生化指标与芽孢杆菌一致, 根据《一般细菌常用鉴定方法》<sup>[7]</sup> 和《伯杰氏细菌鉴定手册》<sup>[8]</sup> 对芽孢杆菌的描述, 初步确定这 13 株细菌为芽孢杆菌属的细菌。16S rDNA 的序列比对结果表明, 所有菌株都与地衣芽孢杆菌具有极高的同源性。因此, 笔者分离获得的所有菌株都被鉴定为地衣芽孢杆菌。笔者从海南省海口市和文昌市的海水养殖池和自然海域的水体和底泥中分离获得的高蛋白酶活性的地衣芽孢杆菌属于该菌种的热带地理种群, 所分离菌株不仅对海南独特的热带海水环境有较好的适应性, 部分菌株的蛋白酶活性也显著高于目前海南常用的有益微生物制剂菌株, 具有开发地方特色有益微生物制剂的良好前景。其中, 蛋白酶活性

最强的菌株在高温高盐条件下继代培养 20 代后,其蛋白酶活性没有发生显著变化,这表明该地衣芽孢杆菌的产酶基因和酶的活性稳定,为开发特别适合海南等热带地区生态养殖和养殖污水无害化处理的有益微生物制剂奠定了良好基础。

## 参考文献:

- [1] PINAR C, ESRA B, GÜZIDE C, et al. Influence of pH conditions on metabolic regulations in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, 31: 685 – 697.
- [2] MAITIN V, KAVITHA R, UMESH-KUMAR S. Properties of an extracellular amylase purified from a *Bacillus* species [J]. *World Journal of Micro-biology and Biotechnology*, 2001, 17: 823 – 826.
- [3] MULALO B N, HUGH-GEORGE P, ANDRÉVAN T, et al. Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase; a comparative report on *Bacillus* lipase [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2001, 28: 705 – 712.
- [4] 张庆, 李卓佳, 陈康德. 复合微生物对水体生态因子的影响 [J]. *上海水产大学学报*, 1999(1): 43 – 47.
- [5] GATESOUBE F J. The use of probiotics in aquaculture [J]. *Aquaculture*, 1999, 160: 177 – 203.
- [6] 陈天寿. 微生物培养基的制造与应用 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1995: 326 – 328.
- [7] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法 [M]. 北京: 科学出版社, 1978: 242 – 398.
- [8] 布坎南 R E. 伯杰氏细菌鉴定手册 [M]. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984: 677 – 830.
- [9] 杜珍辉. 芽孢杆菌 10182 对猪粪液的无害化处理与利用的初步研究 [J]. *渝西学院学报: 自然科学版*, 2005, 4(2): 50 – 53.
- [10] 李红梅, 李琳, 侯立琪, 等. 地衣芽孢杆菌碱性蛋白酶酶改性玉米蛋白的研究 [J]. *粮食与饲料工业*, 2008(3): 21 – 23.
- [11] 刘波, 刘文斌, 王恬. 地衣芽孢杆菌对异育银鲫消化机能和生长的影响 [J]. *南京农业大学学报*, 2005, 28(4): 80 – 84.
- [12] 谢航, 邱宏端, 王秀彬, 等. 地衣芽孢杆菌降解水产养殖中残余饵料特性研究 [J]. *福建水产*, 2008, 118(3): 31 – 35.

## Screening and Identification of the Tropical Strains of *Bacillus licheniformis* with High Protease Activity

CHEN Sheng-feng<sup>1</sup>, LIN Qin<sup>2</sup>, ZHOU Yong-can<sup>1</sup>, OUYANG Ji-long<sup>1</sup>, WANG Shi-feng<sup>1</sup>, XIE Zhen-yu<sup>1</sup>

(1. Ocean College, Hainan University, Haikou 570228, China;

2. South China Sea Fisheries Institute, Guangzhou 510300, China)

**Abstract:** After selection, 13 strain *Bacillus licheniformis* with high protease activity were obtained from the sea water and sediments of the aquaculture systems and the natural sea area in Wenchang and Haikou, Hainan province, which were identified to be the wild tropic strains of *Bacillus licheniformis* by morphological analysis, physiological and biochemical analysis and 16S rDNA sequencing.

**Key words:** *Bacillus licheniformis*; high protease activity; tropic strain; screening