

碳氮营养和培养条件对芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) A4 生长的影响*

李莎莎¹ 曹煜成^{1,2} 李卓佳^{2,3} 胡晓娟^{2,4} 徐煜²
徐武杰² 杨铿² 苏浩昌² 文国樑^{1,2①}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院南海水产研究所
广东省渔业生态环境重点实验室 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室 广州 510300;
3. 南海生物资源开发与利用协同创新中心 广州 510275; 4. 中国水产科学研究院南海水产研
究所热带水产研究开发中心 三亚 572018)

摘要 芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) A4 是一株具有溶甲藻能力的菌株, 为探究营养条件与培养条件对 A4 生长的影响, 明确在多因素共同作用下菌株的生长特性, 先以单因素方法比较不同碳、氮营养因子对其生长的影响, 再以 Plackett-Burman 方法综合比较碳源、氮源、pH、接种菌量、温度、转速、装液量等因子对其生长的协同影响效应。结果显示, A4 菌对有机碳源玉米浆和有机氮源大豆蛋白利用效果最好, 培养 24 h 后菌量分别达到 3.58×10^8 、 3.19×10^8 CFU/ml。各因子的重要性排序依次为大豆蛋白、温度、玉米浆、转速、接种菌量、pH、装液量, 且大豆蛋白和温度对 A4 菌的生长影响显著($P < 0.05$)。研究表明, 培养条件对菌株生长调控也有重要意义, 在评估相关因素对菌株生长或生态功能的影响时, 须将营养条件和培养条件协同分析。

关键词 芽孢杆菌; 碳源; 氮源; 培养条件

中图分类号 Q939.96 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2017)06-0119-08

池塘中有害甲藻频繁暴发, 对养殖水产动物的健康生长造成严重威胁(周进等, 2014; 龚良玉等, 2010; 程玲等, 2016)。目前, 防控有害甲藻暴发主要通过向水体中投入 CuSO_4 、 KMnO_4 和漂白粉等化学药物抑制或杀灭有害甲藻(刘征宇等, 2016; 李京等, 2009; Kuzminov *et al.*, 2013)。该方式虽操作简单、起效快, 但易造成二次污染, 不利于水体生态环境的恢复(骆灵喜等, 2015)。随着生态系统稳定性和生物安全等问题日益受

到重视, 生态法控藻逐渐成为新趋势, 其中, 溶藻菌更是生物控藻领域的一个研究热点(王寿兵等, 2016)。

溶藻菌是指能够通过直接或间接方式抑制藻类生长或杀死藻类、溶解藻细胞的细菌(Lupette *et al.*, 2016)。已发现的溶藻菌属主要有芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)(Hou *et al.*, 2016)、假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)(陈庆丽等, 2015)、交替假单胞菌属(*Pseudoalteromonas* sp.)(Cai *et al.*, 2011)、红细菌属(*Rhodobacte-*

* 广东省海洋渔业科技发展专项(A201401B03)、海南省自然科学基金(20163148)、现代农业(虾蟹)产业技术体系专项(CARS-48)、国家自然科学基金项目(41501529)、广东省科技计划(2014B040404056)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2015TS24)共同资助[This work was supported by Development Planning Project on Fishery Science and Technology of Guangdong Province(A201401B03), Natural Science Foundation of Hainan Province (20163148), China Agriculture Research System (CARS-48), National Natural Science Foundation of China (41501529), Science and Technology Project of Guangzhou Province (2014B040404056), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund (2015TS24)]. 李莎莎, E-mail: lisa99889988@163.com

① 通讯作者: 文国樑, 副研究员, E-mail: guowen66@163.com

收稿日期: 2016-09-23, 收修改稿日期: 2016-11-14

raceae sp.)(Chen *et al.*, 2014)、海杆菌属(*Marinobacter* sp.)(郗建云等, 2016)等。在自然水环境中存在可溶解有害甲藻的藻际溶藻菌,但其物种数量有限,群落结构简单,菌体生物量相对较低(Grossart *et al.*, 2005),加之当环境营养和生态条件改变时,菌-藻动态失衡,有害甲藻易在短时间内暴发成为优势种,致使菌群结构发生改变,有效溶藻菌浓度降低,其溶藻效应受到抑制(史荣君等, 2013; 李东等, 2013)。因此,设法强化溶藻菌的生态优势、提高有效溶藻菌浓度、维护菌藻间的生态平衡是有效防控甲藻暴发的重要途径之一。Yang 等(2013)和苗祯等(2015)指出,菌群结构的改变往往体现在能源物质利用效能的变化。溶藻菌的能源物质来源主要为碳、氮营养物质(张俊等, 2010)。另外,能对菌群结构产生影响的还包括温度、溶氧、pH 值等生态因素。王金霞等(2012)分析了环境因子对溶藻菌 S7 的影响,指出在不同环境因素下,菌-藻动态平衡会发生不同的变动,进而造成微藻暴发式增长或溶藻菌抑藻的不同结果。因此,科学探究营养和生态因子对溶藻菌生长的影响,对调控和促进溶藻菌生物量的增长,强化其溶藻效应具有重要意义。

目前的研究大多只是以单因素实验方法分析营养或生态因子对溶藻菌的影响(赵鹏超等, 2012; 张家顺等, 2015),该法虽然操作简单,但不能进行横向比较,无法判断出主效因素。Plackett-Burman 实验是一种能估计出各个因素的效应值并筛选出显著影响因素的实验方法。该方法不仅实验次数少、实验结果精确,而且可以横向比较各因素的效应值(Maneeboon *et al.*, 2010)。在自然生态环境中,营养和生态因素于同一时空维度对溶藻菌产生协同影响(谢凤行等, 2013; 费聿涛等, 2016; 魏南等, 2016)。为此,本研究选择一株具有良好甲藻溶藻专一性的芽孢杆菌 A4,在分析不同碳源和氮源对菌株生长影响的基础上,再以 Plackett-Burman 方法综合比较碳、氮、pH、接种菌量、温度、转速、装液量等因子对菌株生长的协同影响,明确在多因素共同作用下各因素对菌株生长影响的贡献,为进一步优化芽孢杆菌 A4 的培养条件及菌剂研发与应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株

芽孢杆菌 A4 由中国水产科学研究院南海水产研

究所提供,该菌株从甲藻暴发海域的滩涂池塘中分离获得,具有良好的甲藻溶藻专一性,能高效溶解锥状斯氏藻(*Scrippsiella trochoidea*)、海洋原甲藻(*Prorocentrum micans*)、楯形多甲藻(*Peridinium umbonatum*)等有害甲藻,而对蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)、条纹小环藻(*Cyclotella striata*)、四尾栅藻(*Scenedesmus quadricauda*)等有益微藻无不良影响(郗建云, 2016)¹⁾。

1.2 培养基

基础培养基:葡萄糖 10.00 g/L,蛋白胨 3.00 g/L, NaCl 1.00 g/L, KH₂PO₄ 0.20 g/L, MgSO₄ 0.20 g/L, MnSO₄ 0.03 g/L, CaCl₂ 0.10 g/L。参考杨莺莺等(2005)和 Rao 等(2007)的方法配制。种子培养基为营养肉汤培养基,培养平板为营养琼脂培养基。

1.3 种子液的制备

取斜面菌种,接种至种子培养基,200 r/min 30℃恒温摇床振荡培养 12 h。

1.4 不同碳源、氮源对菌株生长的影响

碳源分别用蔗糖(Su)、葡萄糖-蔗糖(G-Su)、可溶性淀粉(St)、糖蜜(M)、玉米浆(C)、麸皮-糖蜜(B-M)及可溶性淀粉-玉米浆(St-C)等量替代基础培养基中的葡萄糖(G),配制成不同碳源的培养基。氮源分别用酵母膏(Y)、蛋白胨-酵母膏(P-Y)、硫酸铵(A)、豆粕(Sm)、大豆蛋白(Sp)及豆粕-大豆蛋白(Sm-Sp)等量替代基础培养基中的氮源蛋白胨(P),配制成不同氮源的培养基。将 A4 菌种子液以 1%的量分别接种至不同的培养基,30℃、200 r/min 摇床培养 24 h,以平板计数法测定菌浓度(沈萍等, 1996),分析不同碳源和氮源对 A4 菌生长的影响。

1.5 影响菌株生长的多因素分析

根据 1.4 的测定结果,参考 Venil 等(2015)的方法,以 Plackett-Burman 实验设计法,选取玉米浆、大豆蛋白、pH、接种菌量、温度、转速、装液量 7 个因子作为测试变量。各变量分别取高、低值 2 个水平,测试次数设定为 12,并增设 4 个虚拟变量以减少系统误差(表 1)。再以菌浓度作为响应值对比分析以上各因子对 A4 菌生长影响的贡献。

1.6 数据分析

以单因素方差分析(One-Way ANOVA)比较各因

1) Xi JY. Algicidal effects of algicidal bacteria against dinoflagellate from shrimp ponds. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2016, 37 [郗建云. 虾池甲藻溶藻细菌的溶藻特性分析. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2016, 37]

表 1 Plackett-Burman 实验设计的因素及水平编码
Tab.1 Factors and levels designed by Plackett-Burman method

序号 Number	因素 Factors	水平 Level	
		-1	1
X ₁	玉米浆 Corn steep liquor(g/L)	10.0	20.0
X ₂	大豆蛋白 Soybean protein(g/L)	3.0	6.0
X ₃	pH 值 pH value	7.0	8.0
X ₄	温度 Temperature(°C)	15.0	30.0
X ₅	转速 Rotation speed(r/min)	150.0	225.0
X ₆	接种菌量 Inoculation amount(%)	1.0	3.0
X ₇	装液量 Liquid volume in flask(%)	40.0	60.0

素的差异性,显著性水平设定为 $P < 0.05$; 通过 Design-Expert(8.0.6.1)软件对 Plackett-Burman 实验结果进行方差分析, 比较各因素贡献率。

2 结果与分析

2.1 不同碳源对菌株生长的影响

不同碳源的培养基中, A4 菌的终菌量依次为玉米浆组(C)>麸皮-糖蜜组(B-M)>可溶性淀粉-玉米浆组(St-C)>糖蜜组(M)>可溶性淀粉组(St)>葡萄糖-蔗糖组(G-Su)>蔗糖组(Su)>葡萄糖组(G)。单因素方差分析结果显示, 不同碳源对 A4 菌生长的影响有显著差异(图 1)。其中, 玉米浆组(C)菌浓度最高(3.58×10^8 CFU/ml), 与麸皮-糖蜜组(B-M)差异不显著($P > 0.05$), 但显著高于其他碳源实验组($P < 0.05$)。因玉米浆(C)组的菌量最佳, 将其作为培养基碳源进行后续研究。

2.2 不同氮源对菌株生长的影响

不同氮源培养基中, A4 菌的终菌量依次为大豆蛋白组(Sp)>豆粕-大豆蛋白组(Sm-Sp)>豆粕组(Sm)>蛋白胨组(P)>酵母膏组(Y)>蛋白胨-酵母膏组(P-Y)>硫酸铵组(A)(图 2)。单因素方差分析结果显示, 不同氮源组菌株的生长状况不同。其中, 大豆蛋白组(Sp)和豆粕-大豆蛋白组(Sm-Sp)的菌量差异不显著($P > 0.05$), 但显著高于其他实验组($P < 0.05$), 分别达到 3.19×10^8 、 1.85×10^8 CFU/ml。因大豆蛋白组(Sp)的菌量最佳, 将其作为培养基氮源进行后续研究。

2.3 影响菌株生长的多因素分析

根据 Plackett-Burman 实验结果建立多元拟合方程, 分析各因素对 A4 菌的影响贡献, 数学模型方程如下:

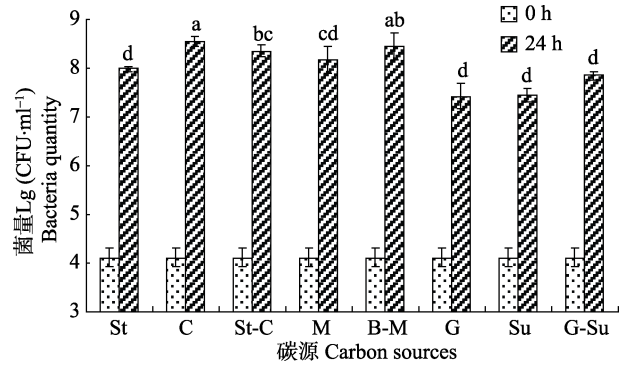


图 1 不同碳源条件下 A4 菌的菌量
Fig.1 Quantity of *Bacillus* A4 cultured with different carbon sources

字母完全相同或部分相同表示差异不显著($P > 0.05$), 反之表示差异显著($P < 0.05$); 后图同此。St: 可溶性淀粉; C: 玉米浆; St-C: 可溶性淀粉-玉米浆; M: 糖蜜; B-M: 麸皮-糖蜜; G: 葡萄糖; Su: 蔗糖; G-Su: 葡萄糖-蔗糖
The same letters or partially same letters indicated no significant difference ($P > 0.05$), while different letters indicated significant difference ($P < 0.05$); the same applied as followings. St: Starch; C: Corn steep liquor; St-C: Starch-Corn steep liquor; M: Molasses; B-M: Bran-Molasses; G: Glucose; Su: Sucrose; G-Su: Glucose-Sucrose

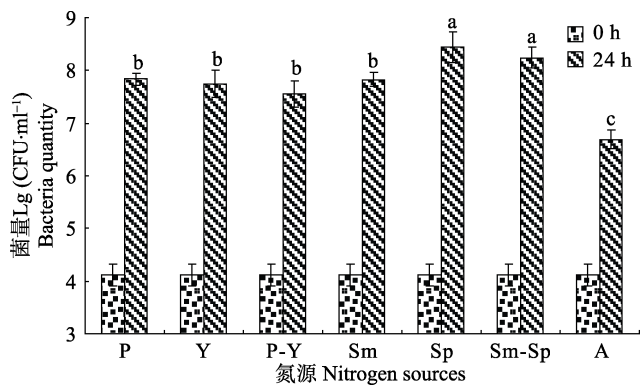


图 2 不同氮源条件下 A4 菌的菌量
Fig.2 Quantity of *Bacillus* A4 cultured with different nitrogen sources

P: 蛋白胨; Y: 酵母膏; P-Y: 蛋白胨-酵母膏; Sm: 豆粕; Sp: 大豆蛋白; Sm-Sp: 豆粕-大豆蛋白; A: 硫酸铵
P: Peptone; Y: Yeast; P-Y: Peptone-Yeast; Sm: Soybean meal; Sp: Soybean protein; Sm-Sp: Soybean meal-Soybean protein; A: Ammonium sulfate

$$Y = 0.65X_1 + 2.04X_2 + 0.27X_3 + 1.22X_4 + 0.45X_5 - 0.19X_6 - 0.37X_7 + 6.30$$

式中, Y 为菌浓度, X_1 - X_7 分别为玉米浆、大豆蛋白、pH、接种菌量、转速、温度、装液量 7 个因素的编码值。该方程决定系数为 0.9630, 校正系数为 0.8982, 表明该模型方程可靠性良好(表 3)。方差分析结果显示, 各因素的重要性排序依次为大豆蛋白>温

度>玉米浆>转速>接种菌量>pH>装液量。各因素对菌株生长影响的贡献差别明显。其中,大豆蛋白、温度对菌浓度影响显著($P<0.05$)。可见,除了温度之外,碳、氮营养因素对菌株生长影响贡献明显大于其他培养条件。

3 讨论

3.1 营养因子对 A4 菌生长的影响

碳、氮是微生物生长过程中主要的营养物质。碳源作为微生物生长所需的基础营养物质,既能为菌体成分合成提供原材料,又是微生物生长的能量来源;氮源主要用于菌体细胞物质(氨基酸、蛋白质、核酸等)和含氮代谢物的合成(徐洪伟等, 2011; 朱永真等, 2011)。不同的微生物可利用不同的碳、氮源(付维来

等, 2012)。实验室及工业化生产中常用的碳、氮源主要分为有机和无机两类(王丽娜, 2014; 马勇等, 2011)。在本研究中, A4 菌对天然有机碳源玉米浆和天然有机氮源大豆蛋白利用效果最好, 培养 24 h 后菌量分别达到 3.58×10^8 、 3.19×10^8 CFU/ml。这与张文芝等(2010)的报道存在差别, 他们认为蜡质芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)AR156 的最佳碳、氮源分别为麦芽糖和黄豆粉, 培养 24 h 后菌量分别达到 4.76×10^8 、 4.56×10^8 CFU/ml。以上 2 株菌均为芽孢杆菌属, 但最佳碳、氮营养物质存在差别, 原因可能是微生物之间存在菌种和菌株的差异性, 不同种菌株所产生的酶系不同, 造成其对营养物质的利用存在差异。本研究, 对碳源、氮源的单因素实验分析表明, A4 菌对天然有机物的利用效果明显优于单一有机物和无机物。

表 2 Plackett-Burman 实验设计与结果
Tab.2 The design and results of Plackett-Burman test

序号 Number	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}	菌浓度 Cell concentration ($\times 10^8$ CFU/ml)
1	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	10.31
2	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	7.23
3	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	4.92
4	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	8.22
5	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	2.67
6	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	4.02
7	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	4.27
8	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	7.52
9	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	6.92
10	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	9.88
11	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	7.80
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.87

注: +代表高水平, -代表低水平

Note: The "+" indicated high level, the "-" indicated low level

表 3 不同因素对 A4 菌生长影响的重要性
Tab.3 The effects of different factors on the growth of *Bacillus* A4

因素 Factors	相关系数 Coefficient estimate	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F-Value	Pr>F	重要性排序 Importance principle order
X_1 玉米浆 Corn steep liquor (g/L)	0.65	1	5.14	6.80	0.0595	3
X_2 大豆蛋白 Soybean protein (g/L)	2.04	1	50.14	66.43	0.0012	1
X_3 pH 值 pH value	0.27	1	0.86	1.14	0.3463	6
X_4 温度 Temperature ($^{\circ}$ C)	1.22	1	17.93	17.93	0.0082	2
X_5 转速 Rotation speed(r/min)	0.45	1	2.40	2.40	0.1490	4
X_6 接种菌量 Inoculation amount (%)	-0.37	1	1.67	1.67	0.2117	5
X_7 装液量 Liquid volume in flask (%)	-0.19	1	0.44	0.44	0.4891	7

注: 决定系数 $R^2=0.9630$; 校正系数 Adj $R^2=0.8982$

Note: Coefficient of determination R^2 was 0.9630; Adjusted R^2 was 0.8982

3.2 培养条件对 A4 菌生长的影响

温度、溶氧、pH 等因子往往与营养因子协同影响微生物生长(高灯州等, 2016; 全汉锋等, 2015; 王欣等, 2014)。温度对微生物的影响主要体现在微生物体内的生化反应, 当温度适宜时, 微生物体内的酶活相对较高, 这会刺激微生物加快代谢促进生长, 不适宜的温度则会抑制体内代谢直至死亡(黄思明等, 2013)。pH 会影响微生物细胞膜电荷的变化以及代谢过程中酶的活性, 进而影响其吸收利用营养物质(李楠等, 2013)。溶氧对微生物的影响主要表现在代谢活动中, 一般好氧微生物对溶氧的需求量较大(钱骅等, 2015)。在本研究中, 溶氧含量主要通过装液量和转速来调节。装液量是通过控制气液比调节溶氧, 转速则是通过水流速度控制气液接触时间调节溶氧(冯玉枚等, 2015; 董淑浩等, 2015)。培养条件对微生物生长的影响作用体现在两个方面, 一是溶藻菌的产业化培养过程; 二是溶藻菌在池塘的应用过程(刘萍等, 2015)。本研究结果显示, 除温度外, pH、溶氧、接种菌量对 A4 菌生长的影响均不显著, 表明 A4 菌对 pH 及溶氧的波动不敏感, 生理功能相对稳定, 有利于产业化生产。在池塘应用过程中, 养殖水体理化条件会随着季节及昼夜变化处于波动状态(祁萍等, 2013)。朱浩等(2012)于 2009–2010 年对上海松江鱼塘的水质进行监测, pH 波动范围为 7.4–8.2, 溶氧波动范围为 4–14 mg/L; 李卓佳等(2010)对广东汕尾对虾养殖池塘水质进行监测, pH 波动范围为 7.21–9.37, 溶氧波动范围为 4–15 mg/L。A4 菌对溶氧及 pH 波动的耐受力较强, 可适应上述养殖水体环境, 有利于推广与应用。

3.3 多因素的协同影响

在对菌株生长条件的探索中, 目前研究多关注于营养物质中碳、氮源的筛选及优化(刘金玲等, 2016), 对营养因素和培养条件的协同效应关注不多(胡建恩等, 2012; 石飞虹等, 2009)。另外, 目前研究多限于利用单因素实验分析, 在其他因子恒定的情况下纵向比较某一因子的影响, 虽然操作简单, 但不能进行横向比较, 无法判断出主效因素(代志凯等, 2010)。Plackett-Burman 实验是一种能估计出各个因素的主效应并筛选出显著影响因素的实验方法(Maneeboon *et al.*, 2010)。因此, 本研究利用 Plackett-Burman 实验分析法, 对营养条件及培养条件的 7 个因子进行综合对比分析。研究表明, 大豆蛋白和温度对 A4 菌的生长影响最显著, 其余依次是玉米浆、转速、接种量、

pH 值、装液量。一方面, 说明 A4 菌的生长对氮源的选择性更高; 另一方面说明温度对 A4 菌生长的重要性显著高于碳源, 表明培养条件对菌株生长调控也有重要意义。因此, 在评估相关因素对菌株生长的影响时, 须将营养和培养条件共同加以考虑和对比分析。同时, 水体生态环境是复杂的, 在没有探清各因素对 A4 菌生长的综合影响时, 将其投放到不适宜生长的水体中, 可能难以达到溶藻效果。对此, 应综合考虑环境中各种生物因素和非生物因素的影响, 从多层面、多角度进行整体性研究分析, 建立有效的培养方案。

参 考 文 献

- Cai WW, Wang H, Tian Y, *et al.* Influence of a bacteriophage on the population dynamics of toxic dinoflagellates by lysis of algicidal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(21): 7837–7840
- Chen QL, Jing CM, Fu YX, *et al.* Isolation and characteristics of algicidal *Pseudomonas aeruginosa* from water body in cold region. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2015, 35(3): 692–698 [陈庆丽, 景澄茗, 付韵馨, 等. 寒区水体中溶藻铜绿假单胞菌的分离和性质研究. *环境科学学报*, 2015, 35(3): 692–698]
- Chen ZR, Zhang JY, Lei XQ, *et al.* Influence of plaque-forming bacterium, *Rhodobacteraceae* sp. on the growth of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 2014, 169(1): 784–788
- Cheng L, Wang YX, Ma YQ, *et al.* The structure of the phytoplankton community in the Laizhou Bay after the oil spills in Penglai 19-3 oilfield. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(4): 67–73 [程玲, 王月霞, 马元庆, 等. 蓬莱 19-3 溢油后莱州湾浮游植物群落结构. *渔业科学进展*, 2016, 37(4): 67–73]
- Dai ZK, Zhang C, Ruan Z. The application of experimental design and optimization techniques in optimization of microbial medium. *Microbiology China*, 2010, 37(6): 894–903 [代志凯, 张翠, 阮征. 试验设计和优化及其在发酵培养基优化中的应用. *微生物学通报*, 2010, 37(6): 894–903]
- Dong SH, Zhu P, Xu XY, *et al.* Computational fluid dynamics simulation of different impeller combinations in high viscosity fermentation and its application. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2015, 31(7): 1099–1107 [董淑浩, 朱萍, 徐晓滢, 等. 高粘发酵体系不同搅拌桨的 CFD 模拟及发酵验证. *生物工程学报*, 2015, 31(7): 1099–1107]
- Fei YT, Li QF, Zhang Y, *et al.* Environmental factors causing skin ulcer syndrome occurrence in pond-cultured *Apostichopus japonicas*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(3): 682–692 [费聿涛, 李秋芬, 张艳, 等. 池塘养殖刺参腐皮综合征发病环境因素分析. *中国水产科学*, 2016, 23(3): 682–692]

- Feng YM, Xiao LL, Guo JL, *et al.* Study on the effect of dissolved oxygen control on xylanase fermentation process. *Science and Technology of Food Industry*, 2015, 36(24): 198–201 [冯玉枚, 肖玲玲, 郭金玲, 等. 溶氧控制对木聚糖酶发酵过程影响的研究. *食品工业科技*, 2015, 36(24): 198–201]
- Fu WL, Du JT, Liu P, *et al.* Optimization of culture medium and fermentation conditions of *Bacillus licheniformis* M109. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2012, 39(11): 215–219 [付维来, 杜建涛, 刘鹏, 等. 地衣芽孢杆菌 M109 高密度发酵条件的优化. *中国畜牧兽医*, 2012, 39(11): 215–219]
- Gao DZ, Zhang WL, Zeng CS, *et al.* Relationship between biotic factors, abiotic factors and flood frequency in Min River estuarine wetlands. *Wetland Science*, 2016, 14(1): 27–36 [高灯州, 章文龙, 曾从盛, 等. 闽江河口湿地土壤生物和非生物因子与水淹频率的关系. *湿地科学*, 2016, 14(1): 27–36]
- Gong LY, Li YB, Zhu CJ, *et al.* Research progress on biological control of HABs. *Marine Environmental Science*, 2010, 29(1): 152–158 [龚良玉, 李雁宾, 祝陈坚, 等. 生物法治理赤潮的研究进展. *海洋环境科学*, 2010, 29(1): 152–158]
- Grossart HP, Levold F, Allgaier M, *et al.* Marine diatom species harbour distinct bacterial communities. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(6): 860–873
- Hou SL, Shu WJ, Tan S, *et al.* Exploration of the antioxidant system and photosynthetic system of a marine algicidal *Bacillus* and its effect on four harmful algal bloom species. *Canadian Journal of Microbiology*, 2016, 62(1): 49–59
- Hu JE, Cao Q, Yang F, *et al.* Optimization of fermentation conditions for high cell density cultivation and high hyperthermophilic α -amylase expression in recombinant *E. coli*. *Food Science*, 2012, 33(1): 219–225 [胡建恩, 曹茜, 杨帆, 等. 耐高温 α -淀粉酶高密度高表达发酵条件的优化. *食品科学*, 2012, 33(1): 219–225]
- Huang S M, Yin P H, Zhao L. Algae-lytic effect of a *Bacillus* sp. on *Phaeocystis globosa*. *Journal of Jinan University (Natural Science)*, 2013, 34(3): 337–342 [黄思明, 尹平河, 赵玲. 一株芽孢杆菌对球形棕囊藻的溶藻效果. *暨南大学学报(自然科学版)*, 2013, 34(3): 337–342]
- Kuzminov FI, Brown CM, Fadeev VV, *et al.* Effects of metal toxicity on photosynthetic processes in coral symbionts, *Symbiodinium* spp. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2013, 446(5): 216–227
- Li D, An XL, Fu LJ, *et al.* Isolation, identification and characterization of algicidal bacterium BS03 against *Alexandrium tamarense*. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2013, 33(1): 44–52 [李东, 安新丽, 傅丽君, 等. 溶藻细菌 BS03 分离、鉴定及其对塔玛亚历山大藻生长的影响. *环境科学学报*, 2013, 33(1): 44–52]
- Li J, Shi XY, Zhang CS, *et al.* Preliminary study on variation and supply of nutrients in typical sections of the East China Sea before and after *Dinoflagellate* blooms. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(2): 94–99 [李京, 石晓勇, 张传松, 等. 东海甲藻赤潮前后典型断面营养盐变化及其补充初探. *渔业科学进展*, 2009, 30(2): 94–99]
- Li N, Wang XH, Kang H, *et al.* Influence of pH on microbial community structure and metabolic characteristics of PAOs in biological phosphorus removal at low temperature. *Environmental Science and Technology*, 2013, 36(3): 9–11 [李楠, 王秀衡, 亢涵, 等. pH 对低温除磷微生物种群与聚磷菌代谢的影响. *环境科学与技术*, 2013, 36(3): 9–11]
- Li ZJ, Li SH, Yang YY, *et al.* Bacteria variation in *Litopenaeus vannamei* high level ponds and its relation with physical-chemical factors. *South China Fisheries Science*, 2010, 6(4): 6–12 [李卓佳, 李烁寒, 杨莺莺, 等. 凡纳滨对虾高位池养殖水体细菌变动及其与理化因子的关系. *南方水产*, 2010, 6(4): 6–12]
- Liu JL, Li JW, Zhang HX, *et al.* Optimization of carbon and nitrogen sources of enrichment culture medium for *Lactobacillus reuteri*. *Chinese Journal of Microecology*, 2016, 28(5): 533–537 [刘金玲, 李嘉文, 张含雪, 等. 罗伊乳杆菌增殖培养基中碳源氮源的优化. *中国微生态学杂志*, 2016, 28(5): 533–537]
- Liu P, Li JL. Study on an alkaline resistant algae-bacteria: Its environmental tolerance and lytic characteristics. *Environmental Science and Technology*, 2015, 38(12): 11–15 [刘萍, 李甲亮. 一株耐碱溶藻菌耐受力及其溶藻特性研究. *环境科学与技术*, 2015, 38(12): 11–15]
- Liu ZY, Ning XB, Li WL, *et al.* Isolation and primary study of three algicidal bacteria strains of Tai lake. *Food and Fermentation Industries*, 2016, 42(2): 59–64 [刘征宇, 宁喜斌, 李文利, 等. 3 株太湖溶藻细菌的分离及溶藻特性的初步研究. *食品与发酵工业*, 2016, 42(2): 59–64]
- Luo LX, Liu H, Lin QY, *et al.* Research on removal of marine red tide algae by chitosan-sepiolite composite flocculants. *Guangdong Chemical Industry*, 2015, 42(24): 49–50 [骆灵喜, 刘欢, 林秋月, 等. 壳聚糖-粘土复合絮凝剂去除海洋赤潮藻研究. *广东化工*, 2015, 42(24): 49–50]
- Lupette J, Lami R, Krasovec M, *et al.* *Marinobacter* dominates the bacterial community of the *Ostreococcus tauri* phycosphere in culture. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1414
- Ma Y, Men ZH. Selection of carbon source and nitrogen source for high-yield medium of one oleaginous yeast. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39(13): 8039–8041 [马勇, 门中华. 一株产油酵母菌高产培养基的碳源和氮源选择. *安徽农业科学*, 2011, 39(13): 8039–8041]
- Maneeboon T, Vanichsriratanana W, Pomchaitaward C, *et al.* Optimization of lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* in 3-L airlift bioreactor using response surface methodology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010, 161(1–8): 137–146
- Miao Z, Du ZJ, Li HR, *et al.* Analysis of bacterial diversity in the phycosphere of five Arctic microalgae. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, 35(5): 1587–1600 [苗楨, 杜宗军, 李会荣, 等. 5 株北极微藻藻际环境的细菌多样性. *生态学报*, 2015, 35(5): 1587–1600]
- Qi P, Wang M, Wu NE, *et al.* Assessment of water quality in main aquaculture ponds in Ningxia. *Chinese Fishery Quality*

- and Standards, 2013, 3(3): 106–109 [祁萍, 王梅, 吴尼尔, 等. 宁夏主要养殖池塘水质评价. 中国渔业质量与标准, 2013, 3(3): 106–109]
- Qian H, Wang Y, Zhou LF, *et al.* Liquid fermentation conditions and bioactivities of the strain isolated from *Shiraia bambusicola*. *China Brewing*, 2015, 34(12): 38–43 [钱骅, 王媛, 周林芳, 等. 竹黄分离菌液态发酵条件及生物学活性研究. 中国酿造, 2015, 34(12): 38–43]
- Quan HF, Shan XJ, Dai FQ. The community structure of the phytoplankton in the Funing Bay. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(3): 1–7 [全汉锋, 单秀娟, 戴芳群. 福宁湾浮游植物的群落结构特征. 渔业科学进展, 2015, 36(3): 1–7]
- Rao YK, Tsay KJ, Wu WS, *et al.* Medium optimization of carbon and nitrogen sources for the production of spores from *Bacillus amyloliquefaciens* B128 using response surface methodology. *Process Biochemistry*, 2007, 42(4): 535–541
- Shen P, Fan XR, Li GW. *Microbiology experiment III*. Beijing: Higher Education Press, 1996, 90–97 [沈萍, 范秀荣, 李广武. 微生物学实验第 3 版. 北京: 高等教育出版社, 1996, 90–97]
- Shi FH, Zhou YC, Guo C, *et al.* Studies on medium optimization of thermostable α -amylases. *Food and Machinery*, 2009, 25(5): 54–56 [石飞虹, 周友超, 郭翠, 等. 工业生产中耐高温 α -淀粉酶发酵培养基的优化研究. 食品与机械, 2009, 25(5): 54–56]
- Shi RJ, Huang HH, Qi ZH, *et al.* Algicidal activity against red-tide algae by marine bacterial strain N3 isolated from a HABs area, southern China. *Environmental Science*, 2013, 34(5): 1922–1929 [史荣君, 黄洪辉, 齐占会, 等. 海洋细菌 N3 对几种赤潮藻的溶藻效应. 环境科学, 2013, 34(5): 1922–1929]
- Venil CK, Zakaria ZA, Ahmad WA. Optimization of culture conditions for flexirubin production by *Chryseobacterium artocarpi* CECT 8497 using response surface methodology. *Acta Biochimica Polonica*, 2015, 62(2): 185–190
- Wang JX, Luo GY, Xu XY, *et al.* Lytic effect of environmental factors on algae-lysing bacteria strain S7 by fluorescence spectroscopy. *Journal of Shanghai Jiaotong University*, 2012, 46(5): 780–784 [王金霞, 罗固源, 许晓毅, 等. 荧光光谱法分析环境因素对溶藻细菌 S7 溶藻作用的影响. 上海交通大学学报, 2012, 46(5): 780–784]
- Wang LN. Optimization of liquid fermentation conditions of *Bacillus natto*. *China Condiment*, 2014, 39(9): 28–30 [王丽娜. 纳豆芽孢杆菌液体发酵条件的优化. 中国调味品, 2014, 39(9): 28–30]
- Wang SB, Xu ZR, Zhang J. A review of technologies for prevention and control of cyanobacteria blooms in large-scale eutrophicated lakes and reservoirs. *Water Resources Protection*, 2016, 32(4): 88–99 [王寿兵, 徐紫然, 张洁. 大型湖泊富营养化蓝藻水华防控技术发展述评. 水资源保护, 2016, 32(4): 88–99]
- Wang X, Sheng HX, Tang YL, *et al.* Relationships between the structure of phytoplankton community and environmental factors in three artificial reef areas of Laoshan Bay. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(4): 7–12 [王欣, 盛化香, 唐衍力, 等. 崂山湾人工鱼礁区浮游植物群落结构与环境因子的关系. 渔业科学进展, 2014, 35(4): 7–12]
- Wei N, Lu B, Yu DG, *et al.* Vertical characteristics of microbial community structures and the relationship with environmental factors in sediments of hybrid snakehead aquaculture enclosures. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(2): 207–217 [魏南, 路斌, 余德光, 等. 高密度杂交鳢养殖围隔沉积物微生物群落结构垂直变化规律及其与理化因子的关系. 水产学报, 2016, 40(2): 207–217]
- Xi JY, Cao YC, Li ZJ, *et al.* Specificity of algicidal activity against four species of microalgae by algicidal bacterium A2. *South China Fisheries Science*, 2016, 12(5): 34–42 [郝建云, 曹煜成, 李卓佳, 等. 溶藻菌 A2 对 4 种微藻的溶藻效果分析. 南方水产科学, 2016, 12(5): 34–42]
- Xie FX, Zhang FF, Zhou K, *et al.* Optimization of fermentation parameters for *Bacillus amyloliquefaciens* HN with water purification. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2013, 28(2): 225–230 [谢凤行, 张峰峰, 周可, 等. 一株水质净化解淀粉芽孢杆菌 HN 发酵参数的优化. 华北农学报, 2013, 28(2): 225–230]
- Xu HW, Ju HM, Sun Q, *et al.* Optimization of carbon sources and nitrogen sources in ferment culture medium of bacterium producing small molecular antibacterial peptides. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2011, 21(8): 1931–1932, 1935 [徐洪伟, 鞠红梅, 孙琪, 等. 小分子肽产生菌培养基碳源与氮源的优化. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(8): 1931–1932, 1935]
- Yang YF, Hu XJ, Zhang J, *et al.* Community level physiological study of algicidal bacteria in the phycospheres of *Skeletonema costatum* and *Scrippsiella trochoidea*. *Harmful Algae*, 2013, 28(3): 88–96
- Yang YY, Li ZJ, Chen YQ, *et al.* Fermentation technology of probiotic strain D-1. *South China Fisheries Science*, 2005, 1(6): 44–49 [杨莺莺, 李卓佳, 陈永青, 等. 益生菌 D-1 液体发酵工艺的研究. 南方水产, 2005, 1(6): 44–49]
- Zhang JS, Su ZZ, Xue FF, *et al.* Screening and identification of two bacteria strains degrading ammonia-nitrogen and factors of degradation ammonia analysis. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(10): 1549–1557 [张家顺, 苏真真, 薛菲菲, 等. 2 株氨氮去除菌的分离鉴定及去除率影响因素分析. 水产学报, 2015, 39(10): 1549–1557]
- Zhang J, Yang YF, Gong YY, *et al.* The lytic effect of bacteria in the phycosphere of *Skeletonema costatum* and *Scrippsiella trochoidea*. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2010, 30(6): 1271–1279 [张俊, 杨宇峰, 龚映雪, 等. 中肋骨条藻与锥状斯氏藻藻际细菌溶藻效应研究. 环境科学学报, 2010, 30(6): 1271–1279]
- Zhang WZ, Wang YP, Liu HX, *et al.* Optimization of medium components and cultural conditions of *Bacillus cereus* AR156. *Microbiology China*, 2010, 37(6): 803–810 [张文芝, 王云鹏, 刘红霞, 等. 蜡质芽孢杆菌 AR156 发酵培养基及发酵条件的优化. 微生物学通报, 2010, 37(6): 803–810]
- Zhao PC, Quan CS, Jin LM, *et al.* Effects of different nitrogen and carbon sources on the production of antifungal

- lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426. China Biotechnology, 2012, 32(10): 50–56 [赵朋超, 权春善, 金黎明, 等. 氮源和碳源对解淀粉芽孢杆菌 Q-426 抗菌脂肽合成的影响. 中国生物工程杂志, 2012, 32(10): 50–56]
- Zhou J, Chen GF, Zhu XS, *et al.* A review of the relationship between algae and bacteria in harmful algal blooms. Acta Ecologica Sinica, 2014, 34(2): 269–281 [周进, 陈国福, 朱小山, 等. 赤潮过程中“藻-菌”关系研究进展. 生态学报, 2014, 34(2): 269–281]
- Zhu H, Liu XG, Wang J, *et al.* Study on characteristics of the vertical variation in aquaculture pond water. Fishery Modernization, 2012, 39(4): 12–15 [朱浩, 刘兴国, 王健, 等. 池塘养殖水体不同水层水质变化研究. 渔业现代化, 2012, 39(4): 12–15]
- Zhu YZ, Du ST, Che J, *et al.* Effect of different carbon sources and nitrogen sources on the growth of *Morchella esculenta* mycelia. Journal of Northwest A & F University, 2011, 39(3): 113–118 [朱永真, 杜双田, 车进, 等. 不同碳源及氮源对羊肚菌菌丝生长的影响. 西北农林科技大学学报, 2011, 39(3): 113–118]

(编辑 马璀璨)

The Effects of Different Carbon and Nitrogen Nutrients and Culture Conditions on the Growth of *Bacillus* sp. Strain A4

LI Shasha¹, CAO Yucheng^{1,2}, LI Zhuojia^{2,3}, HU Xiaojuan^{2,4}, XU Yu², XU Wujie²,
YANG Keng², SU Haochang², WEN Guoliang^{1,2①}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture; Key Laboratory of Fishery Ecology and Environment, Guangdong Province; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300; 3. South China Sea Bio-Resource Exploitation and Utilization Collaborative Innovation Center, Guangzhou 510275; 4. Tropical Aquaculture Research and Development Center of South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Sanya 572018)

Abstract In this study, we explored how the nutritional and culture conditions affected the growth of a *Bacillus* sp. strain A4 and identified the growth characteristics of this strain during the multi-factor interaction. We first applied the single factor test to study the effects of different carbon and nitrogen sources, and then employed Plackett-Burman (PB) test to evaluate the effects of seven factors including carbon source, nitrogen source, pH value, inoculation amount, temperature, rotation speed and liquid volume in the flask. The results showed that the absorption efficiencies of strain A4 for different carbon and nitrogen sources were different. We found that the corn steep liquor was the best carbon source for strain A4, and that the soybean protein was the best nitrogen source. When cultured with the corn steep liquor or the soybean protein for 24 h, the amounts of bacteria reached 3.58×10^8 CFU/ml and 3.19×10^8 CFU/ml respectively. The results of Plackett-Burman (PB) test showed that the order of factors affecting the growth of strain A4 as soybean protein > temperature > corn steep liquor > rotation speed > inoculation amount > pH value > liquid volume in the flask. Moreover, the soybean protein as the nutritional factor and the temperature as the culture condition both had significant effects on the growth of strain A4 ($P < 0.05$). Temperature had a greater effect on the growth of strain A4 than the corn liquid factor. The results above indicated that the culture conditions played a vital role in the growth regulation of the bacteria. We also recommend that it should be essential to associate the nutritional factors with the culture conditions when evaluating the effects of related factors on the growth or ecological function of bacteria.

Key words *Bacillus* sp.; Carbon source; Nitrogen source; Culture conditions

① Corresponding author: WEN Guoliang, E-mail: guowen66@163.com