

## 假单胞菌增殖培养基中碳源氮源的优化

宫达非<sup>1,2</sup>, 廖静云<sup>1,2</sup>, 曾慧帆<sup>1,2</sup>, 尚常花<sup>1,2\*</sup>

(1. 广西师范大学生命科学学院, 广西桂林 541006; 2. 珍稀濒危动植物生态与环境保护教育部重点实验室, 广西桂林 541006)

**摘要** [目的] 提高假单胞菌的增殖, 降低生产成本。[方法] 采用光电比浊法, 通过单因素试验对假单胞菌增殖培养基的碳源和氮源进行优化。[结果] 假单胞菌增殖培养基中最佳的碳源、氮源种类与浓度分别为蔗糖 0.5 g/L、鱼蛋白胨 1.2 g/L。[结论] 通过对增殖培养基的优化, 降低了生产成本。

**关键词** 假单胞菌; 碳源; 氮源; 优化

中图分类号 Q93-33 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)07-0083-02

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2020.07.025



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

### Optimization of Carbon and Nitrogen Sources of Enrichment Medium for *Pseudomonas*

GONG Da-fei<sup>1,2</sup>, LIAO Jing-yun<sup>1,2</sup>, ZENG Hui-fan<sup>1,2</sup> et al (1. College of Life Science, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541006; 2. Key Laboratory of Ecology and Environmental Protection of Rare and Endangered Animals and Plants, Ministry of Education, Guilin, Guangxi 541006)

**Abstract** [Objective] To improve the proliferation of *Pseudomonas* and reduce the production cost. [Method] The photoelectric turbidimetry method was used to optimize the carbon and nitrogen sources of *Pseudomonas* enrichment medium by single factor test. [Result] The optimal carbon source and nitrogen source species and concentration in *Pseudomonas* enrichment medium were sucrose 0.5 g/L and fish protein 1.2 g/L, respectively. [Conclusion] By optimizing the enrichment medium, the production cost was reduced.

**Key words** *Pseudomonas*; Carbon source; Nitrogen source; Optimization

假单胞菌属(*Pseudomonas*)隶属于薄壁菌门假单胞菌科, 该属由 Migula 在 1894 年创立, 包括 200 余种细菌<sup>[1]</sup>。它们大多为革兰氏阴性杆菌, 形态上有直的和弯曲的, 非常细小, 有单鞭毛或多鞭毛, 并以鞭毛运动, 没有芽孢<sup>[2]</sup>。只能在有氧环境中生存, 多分布于土壤、水体及植物体内, 在 pH 7.0~8.5 的范围内生长。能在 4~43 °C 下生长, 生长温度范围广泛, 但大部分菌的生长温度是 30 °C, 分解有机物的能力很强, 而且可将多种有机物作为能量来源<sup>[3-4]</sup>。

假单胞菌对紫外线、消毒剂等杀菌手段, 都有较强的抵御能力。研究发现, 在人体的皮肤、呼吸道和肠道等部位假单胞菌也普遍存在<sup>[5]</sup>。此外, 假单胞菌在生物防治等方面起着非常重要的作用。它能产生植物生长所需要的调节物质和抗生素, 降解有毒物质, 促进植物进行营养生长; 它可通过杀掉害虫而起到生物防治的作用; 其模式种的耐药机制研究对医学发展有重要的指导意义<sup>[6]</sup>。

该研究选用的假单胞菌 Cr13 由该实验室对从河池市南丹县大厂镇矿区获得的重金属污染土壤进行平板筛选后获得, 该菌株可以耐受高浓度的六价铬。为了降低假单胞菌的培养成本, 促进该菌种的产业化生产, 笔者通过单因素试验对菌株 Cr13 增殖培养基的碳源和氮源进行优化。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料 假单胞菌 Cr13 由珍稀濒危动植物生态与环

保护教育部重点实验室提供。培养假单胞菌所用的碳源(牛肉膏、葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉、麦芽糖、半乳糖和甘露糖)、氮源(蛋白胨、胰蛋白胨、酪蛋白胨、鱼蛋白胨、酵母粉、L-色氨酸、酪蛋白氨基酸、硝酸铵、硝酸钾、脲)、NaCl 及琼脂等均从广西卓一生物技术有限公司购买。

**1.2 仪器** 722 型光栅分光光度计(上海市第三分析仪器厂); LYZ-1102 恒温摇床(上海龙跃仪器设备有限公司); ZHJH-C1106B 超净工作台(上海智城分析仪器制造有限公司); MLS-3750 高压蒸汽灭菌锅(三洋电机株式会社); PH-18-FA1104 分析天平(北京精测电子科技有限公司)。

### 1.3 方法

**1.3.1 培养基。**牛肉膏蛋白胨培养基: 牛肉膏 3.0 g、蛋白胨 10.0 g、NaCl 5.0 g、蒸馏水 1 000 mL, pH 7.4~7.6, 115 °C 灭菌 30 min 备用。牛肉膏蛋白胨琼脂培养基: 在牛肉膏蛋白胨培养基的基础上加入 2% 琼脂。

**1.3.2 菌种活化。**取 -70 °C 保存的菌种在牛肉膏蛋白胨琼脂培养基上划线, 挑取单菌落接种于牛肉膏蛋白胨培养基中, 28 °C 培养 24 h, 作为种子液备用。

**1.3.3 假单胞菌增殖培养基的优化。**以牛肉膏蛋白胨培养基作为基础培养基, 1% 接种量, 28 °C 恒温培养, 测定吸光度值。通过单因素试验对培养基中的碳源、氮源进行优化, 确定最佳碳源、氮源的种类以及浓度。

(1) 碳源优化。以牛肉膏蛋白胨培养基作为基础培养基, 分别以相同浓度(0.3%)的葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉、麦芽糖、半乳糖和甘露糖替换牛肉膏, 其他成分及含量保持不变, 考察不同种类碳源对假单胞菌增殖的影响。再依据试验结果筛选最适宜的碳源种类, 并对其碳源浓度进行优化试验。

(2) 氮源优化。以牛肉膏蛋白胨培养基作为基础培养

**基金项目** 广西高校中青年骨干教师基础能力提升项目(2018KY0086); 广西师范大学博士科研启动基金项目(2017BQ015); 广西研究生教育创新计划项目(JGY2019009)。

**作者简介** 宫达非(1996—), 女, 吉林四平人, 硕士研究生, 研究方向: 微生物学与分子生物学; 廖静云(1994—), 女, 广西来宾人, 本科, 专业: 生物科学; 曾慧帆(1997—), 女, 海南澄迈人, 本科, 专业: 生物科学。宫达非、廖静云、曾慧帆为共同第一作者。\* 通信作者, 副教授, 博士, 硕士生导师, 从事微生物学与分子生物学研究。

**收稿日期** 2019-08-15; **修回日期** 2019-09-20

基,分别以相同浓度(1%)的6种有机氮源(胰蛋白胨、酪蛋白胨、鱼蛋白胨、酵母粉、L-色氨酸、酪蛋白氨基酸)和3种无机氮源(硝酸铵、硝酸钾、脲)替换蛋白胨进行试验,其他成分及含量保持不变,考察相同浓度、不同种类的蛋白胨对假单胞菌增殖的影响。然后再依据试验结果筛选最适宜的氮源种类,考察氮源的不同浓度对假单胞菌增殖的影响。

**1.3.4 光电比浊法测定生物量。**接种后的增殖培养基于28℃恒温培养。到稳定期后菌液用培养基适当稀释,以相应的空白培养基(不接种菌)作为对照,利用分光光度计测定OD<sub>600</sub>值。以进入稳定期后的3个平行组求平均值,以此确定生物量。

## 2 结果与分析

**2.1 不同种类碳源对假单胞菌的影响** 碳源是一类可以影响假单胞菌生长繁殖及胞外多糖和抗生素等代谢产物合成的营养物质<sup>[7-8]</sup>,因此适宜的碳源种类有利于假单胞菌的生长繁殖。该研究表明,以蔗糖作为假单胞菌增殖培养基的碳源时,吸光度值最高,其次是牛肉膏和半乳糖(图1)。说明蔗糖对假单胞菌的生长繁殖有良好的效果,而且蔗糖的价格也很低。综合考虑,该研究将进一步考察不同蔗糖浓度对假单胞菌增殖的影响。

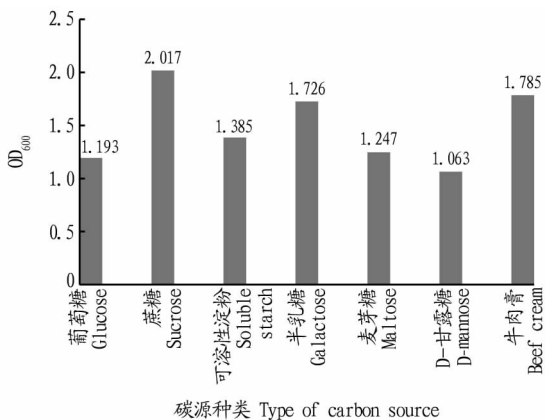


图1 不同碳源对假单胞菌生长的影响

Fig. 1 Effects of different carbon sources on the proliferation of *Pseudomonas*

**2.2 不同种类氮源对假单胞菌的影响** 图2表明,除了L-色氨酸作为有机氮源时菌株生长较慢,其他有机氮源促进菌株生长的效果都优于无机氮源。其中,鱼蛋白胨作为氮源时培养假单胞菌的效果最好,吸光度值最高。其次是酵母粉与酪蛋白胨,而且鱼蛋白胨的价格也很低。综合考虑,该研究将进一步考察鱼蛋白胨的不同浓度对假单胞菌增殖的影响。

**2.3 不同浓度的碳源对假单胞菌的影响** 采用单因素试验考察碳源蔗糖的最佳浓度。结果表明,当蔗糖浓度在0.5~3.5 g/L的范围内变动时,蔗糖浓度的增大对假单胞菌生长的影响并不显著(图3)。综合考虑成本因素,选择0.5 g/L为蔗糖最适浓度。

**2.4 不同浓度的氮源对假单胞菌的影响** 采用单因素试验考察氮源与蛋白胨的最佳浓度。结果表明,不同浓度鱼蛋白胨对假单胞菌生长的影响比较显著,但当鱼蛋白胨浓度达到

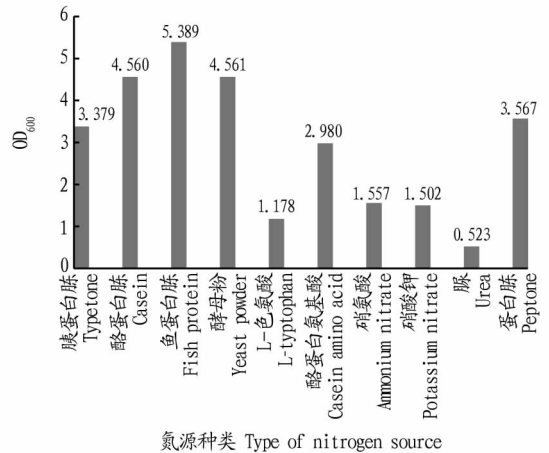


图2 不同氮源对假单胞菌生长的影响

Fig. 2 Effects of different nitrogen sources on the proliferation of *Pseudomonas*

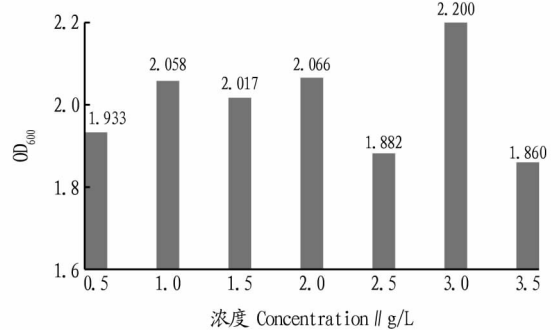


图3 不同浓度蔗糖对假单胞菌生长的影响

Fig. 3 Effects of different concentrations of sucrose on the proliferation of *Pseudomonas*

1.2 g/L后,浓度继续增大对假单胞菌生长的影响并不显著(图4)。综合考虑成本因素,选择1.2 g/L为鱼蛋白胨最适浓度。

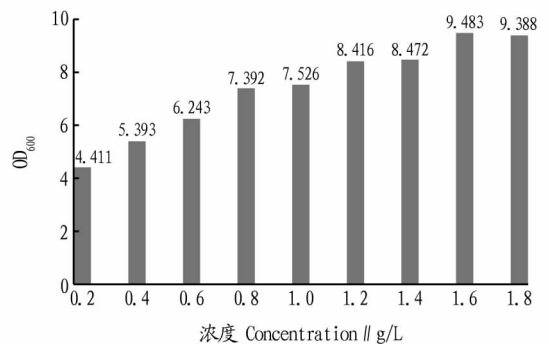


图4 不同浓度的鱼蛋白胨对假单胞菌生长的影响

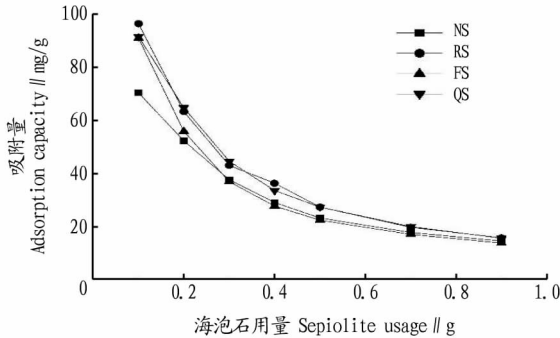
Fig. 4 Effect of different concentrations of fish peptone on the proliferation of *Pseudomonas*

## 3 讨论

该研究发现,用蔗糖作为碳源时,培养假单胞菌 Cr13 的效果最为明显,其次是半乳糖和可溶性淀粉。但是葡萄糖对假单胞菌 Cr13 生长的效果就较差,这与孙承文等<sup>[9]</sup>、郭丛等<sup>[10]</sup>的研究中以葡萄糖作为碳源时对假单胞菌生长影响显

(下转第88页)

**2.4 不同海泡石用量对吸附  $Pb^{2+}$  的影响** 从图 4 可看出,  $Pb^{2+}$  的吸附总量变化随海泡石用量的增加而增加, 但吸附速率在下降, 天然海泡石(NS)下降的趋势最快, 热处理改性海泡石(RS)下降趋势相对较缓, 下降趋势由缓到快依次为 RS、QS、FS、NS。



注: NS. 天然海泡石; RS. 热处理海泡石; FS. 硫酸亚铁处理海泡石; QS. 巯基乙酸处理海泡石

Note: NS. Natural sepiolite; RS. Heat treated sepiolite; FS. Sulphuric acid treatment of sepiolite; QS. Thiol acetic acid treatment of sepiolite

图 4 不同海泡石用量对  $Pb^{2+}$  吸附的影响

Fig. 4 The effect of the sepiolite usage on  $Pb^{2+}$  adsorption

随着海泡石用量的增加, 吸附量在逐渐减少, 这是因为随着海泡石用量的增加, 吸附活性点位增加, 但量增加到一定程度时吸附速率会降低, 这是由于海泡石颗粒的聚集, 降低了单位质量的活性数, 从而影响了对于  $Pb^{2+}$  的吸附<sup>[19]</sup>。

### 3 结论

(1)  $Pb^{2+}$  浓度、振荡时间、pH、海泡石使用量的变化均会引起天然与改性海泡石吸附量的变化。

(2) 海泡石经过热、有机、无机盐改性后可很大程度上增加对  $Pb^{2+}$  的吸附。

(3) 天然海泡石和改性海泡石对  $Pb^{2+}$  的等温吸附方程拟合较好的是 Langmuir 方程。

(4) 随着初始 pH 的增加, 热、有机和无机改性海泡石和

(上接第 84 页)

著的试验结果不同, 该研究确定的最适碳源蔗糖与王宇等<sup>[11]</sup>、焦天敏等<sup>[12]</sup>等所得的最适碳源一致, 表明不同的假单胞菌菌株其最适碳源种类差别较大。

该研究表明, 假单胞菌 Cr13 对不同种类氮源具有偏好性, 有机氮源明显优于无机氮源, 这可能是因为有有机氮源除了可以提供氮源外, 还含有丰富的氨基酸和维生素等物质, 为假单胞菌 Cr13 的繁殖提供了有利的条件<sup>[13]</sup>。

### 参考文献

- [1] 海碧. 甘蔗根际假单胞菌的分离鉴定及其对甘蔗的促生作用[D]. 南宁: 广西大学, 2017.
- [2] 吉振兴. ESBR 反应器中耐冷菌的分离鉴定和低温生物强化运行研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2006.
- [3] 查大明, 张炳火, 李汉全, 等. 假单胞菌属脂肪酶的分子生物学研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2015, 35(9): 114-121.
- [4] 向照举, 李小璐, 李治. 假单胞菌属合成环脂肽分子的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2014, 27(7): 974-980.

未改性海泡石对  $Pb^{2+}$  的吸附能力逐渐增大, 吸附量逐渐增大, 在初始 pH=6 时几种海泡石的吸附量均达到最大, 后吸附速率下降, 其中吸附量的最大为 QS 改性海泡石。

### 参考文献

- [1] 宋伟, 陈百明, 刘琳. 中国耕地土壤重金属污染概况[J]. 水土保持研究, 2013, 20(2): 293-298.
- [2] 刘勇, 王成军, 冯涛. 土壤中铅污染源解析研究[J]. 西北大学学报(自然科学版), 2015, 45(1): 147-151.
- [3] 王立群, 罗磊, 马义兵, 等. 重金属污染土壤原位钝化修复研究进展[J]. 应用生态学报, 2009, 20(5): 1214-1222.
- [4] 周莹莹, 任伯帆. 改性海泡石吸附重金属废水的研究进展[J]. 环境保护前沿, 2017, 7(2): 74-78.
- [5] MERCIER L, DETELLIER C. Preparation, characterization, and applications as heavy metals sorbents of covalently grafted thiol functionalities on the interlamellar surface of montmorillonite [J]. Environmental science & technology, 1995, 29(5): 1318-1323.
- [6] RUSMIN R, SARKAR B, BISWAS B, et al. Structural, electrokinetic and surface properties of activated palygorskite for environmental application [J]. Applied clay science, 2016, 134(2): 95-102.
- [7] 于凤娥, 叶志平, 郭杏妹, 等. 沸石的改性及其在废水处理中的应用[J]. 广东化工, 2007, 34(2): 48-50.
- [8] BISWAS B, SARKAR B, NAIDU R. Influence of thermally modified palygorskite on the viability of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria [J]. Applied clay science, 2016, 134: 153-160.
- [10] 刘玉芬, 蒋名乐, 轿华, 等. 酸、热联合改性海泡石处理多金属废水[J]. 广州化工, 2011, 39(21): 137-139.
- [11] 陈理想. 有机粘土矿物的制备与表征及其对重金属吸附性能的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2015.
- [12] 顾继光, 林秋奇, 胡韧, 等. 土壤-植物系统中重金属污染的治理途径及其研究展望[J]. 土壤通报, 2005, 36(1): 128-133.
- [13] VALENTIN J L, LÓPEZ-MANCHADO M A, RODRÍGUEZ A, et al. Novel anhydrous unfolded structure by heating of acid pre-treated sepiolite [J]. Applied clay science, 2007, 36(4): 245-255.
- [14] 王斌, 阎宏永. 非金属吸附性矿物改性方法综述[J]. 科技信息, 2011(31): 1-13.
- [15] 左勤勇, 高玉杰, 李静. 海泡石的热活化与酸活化实验[J]. 中华纸业, 2005, 26(4): 60-61.
- [16] 李松军, 罗来涛. 海泡石的改性研究[J]. 江西科学, 2001, 19(1): 61-66.
- [17] LAZAREVIĆ S, JANKOVIĆ-ČASTVAN I, JOVANOVIĆ D, et al. Adsorption of  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ , and  $Sr^{2+}$  ions onto natural and acid-activated sepiolites [J]. Applied clay science, 2007, 37(1): 47-57.
- [18] CURKOVIC L, CERJAN S, FILIPAN T. Metal ion exchange by natural and modified zeolites [J]. Croatica chemica acta, 1996, 31(1): 281-290.
- [19] 张才灵, 牛成, 潘勤鹤, 等. 海泡石改性及对  $Pb^{2+}$  吸附性能研究[J]. 广州化工, 2016, 44(23): 73-74.
- [5] 周如玉, 平逸帆, 张元, 等. 口腔综合治疗台水路系统中假单胞菌属污染状况的检测[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2017, 37(4): 452-457.
- [6] 杨光富, 魏玉林. 假单胞菌研究现状及应用前景[J]. 生物技术通报, 2011(1): 37-39, 49.
- [7] 张佳佳, 屈菲, 万慧萍, 等. 不同碳源对海洋假单胞菌 PT-8 合成胞外多糖的抗氧化性的影响[J]. 大连工业大学学报, 2013, 32(6): 413-416.
- [8] 张燕, 张阳, 张博, 等. 不同碳源对生防荧光假单胞菌 2P24 产抗生素 2, 4-二乙酰基间苯三酚的影响[J]. 微生物学报, 2018, 58(7): 1202-1212.
- [9] 孙承文, 赖迎超, 任小波, 等. 草鱼铜绿假单胞菌灭活疫苗发酵培养基的优化及其在发酵罐的生长试验[J]. 大连海洋大学学报, 2019, 34(1): 15-20.
- [10] 郭丛, 杨金广, 翟熙伦, 等. 恶臭假单胞菌发酵条件的研究[J]. 中国烟草科学, 2013, 34(4): 50-54, 59.
- [11] 王宇, 吴洪滨, 刘松鑫, 等. 降解胆固醇的假单胞菌 DGC-2 的发酵培养基和培养条件[J]. 信阳师范学院学报(自然科学版), 2012, 25(4): 465-468.
- [12] 焦天敏, 张静, 赵芳, 等. 铜绿假单胞菌发酵条件优化及抗菌物质研究[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2014, 38(5): 45-50.
- [13] 朱丹凤, 王园园, 崔树茂, 等. 罗伊氏乳杆菌氮源利用的选择性与特征分析[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(11): 35-41.