



水质净化乳酸菌的分离鉴定及发酵参数优化

谢凤行, 张峰峰, 周可, 赵玉洁*, 赵琼, 孙海波

天津市农业生物技术研究中心, 天津 300384

摘要:【目的】从水产养殖环境和养殖生物体中选育具有水质净化功能的乳酸菌, 以期为水产养殖提供专用高效的菌种资源。【方法】在低温和常温条件下从皮皮虾、南美白对虾肠道及养殖池底质活性污泥中分离具有水质净化功能的乳酸菌, 对筛选的优良菌株采用形态、生理生化实验及 16S rRNA 序列分析进行鉴定, 并对菌株的发酵参数进行了研究。【结果】低温和常温条件下从 3 种介质中共分离到乳酸菌 136 株, 经水质净化能力筛选, 发现常温分离的 r13 对模拟水体中亚硝态氮去除效果较强, 72 h 能将 11.5 mg/L 的亚硝态氮彻底去除, 且对 13.0 mg/L 氨氮的去除率达到 29.1%。经形态特征、生理生化特性及 16S rRNA 基因序列分析, 鉴定菌株 r13 为植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum*。发酵参数研究结果表明, 该菌最适培养基组成为: 酵母膏 6.0 g/L, 葡萄糖 20.0 g/L, 乙酸钠 4.0 g/L, 柠檬酸氢二铵 2.0 g/L, K_2HPO_4 2.0 g/L, 番茄汁 50 mL/L; 培养条件为: 初始 pH 6.0, 接种量 5%, 装液量 45/50, 培养温度为 34 °C, 在上述优化培养条件下发酵 72 h, 菌液的生物量达 28.4 g/L 湿重, 有效活菌浓度达 4.4×10^9 CFU/mL。

关键词: 乳酸菌, 水质净化, 分离鉴定, 发酵参数

乳酸菌是可发酵碳水化合物产生乳酸的革兰氏阳性细菌的统称, 主要存在于植物表面、人和动物肠道等。目前发现的乳酸菌至少有 43 属, 210 多个种及亚种, 广泛应用于乳制品^[1]、肉制品^[2]、泡菜^[3-4]和青贮饲料^[5-7]发酵中以及益生菌^[8]制品。近年来的研究表明, 乳酸菌能有效去除食品发酵过程中产生的亚硝酸盐^[9-13], 从而降低因亚硝酸盐累积而产生的食品安全问题, 而将乳酸菌用

于去除养殖水体中亚硝酸盐的研究相对较少。吴伟等研究表明在 pH 6.0, 含葡萄糖的水体中, 短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*, A1.558) 30 °C 恒温处理 48 h, 对 1.0 mg/L 亚硝酸盐的去除率为 94%, 但对养殖水体中 0.38 mg/L 亚硝酸盐的去除率仅为 60.5%^[14]; 李卓佳等研究发现乳酸杆菌 (*Lactobacillus* spp.) LH 能有效地降低养殖废水和饲料中的亚硝酸盐, 但会使氨氮含量升高^[15]。已

基金项目: 天津市科技支撑重点项目(16YFZCNC00670); 天津市自然科学基金项目(16JCQNJC15100); 天津市农业科学院院长基金项目(16015)

*通信作者。Tel: +86-22-27950956; Fax: +86-22-27950828; E-mail: yujiezh@126.com

收稿日期: 2016-08-21; 修回日期: 2016-10-13; 网络出版日期: 2016-10-27

有的研究表明, 乳酸菌在去除养殖水体中的亚硝酸盐同时存在累积氨氮的风险, 且亚硝酸盐去除效率不理想。本研究拟从养殖环境和养殖生物体内选育亚硝酸盐去除效率高同时对氨氮有一定去除效果的水质净化高效乳酸菌, 并对菌株的发酵参数进行研究, 以期为水产养殖水质净化高效微生物生态制剂的研制和开发提供优良的菌种资源。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 培养基: (1) 富集培养基(改良 TJA): 番茄汁 50 mL, 酵母膏 5 g, 牛肉膏 10 g, 葡萄糖 20 g, Tween80 1 mL, 乙酸钠 5 g, pH 6.8, 蒸馏水 950 mL, 121 °C 灭菌 20 min。 (2) 分离培养基: 碳酸钙单独灭菌, 灭菌后与富集固体培养基混合后倒平板, 添加量为 8 g/L。 (3) 水琼脂培养基: 琼脂粉 12–15 g, 水 1000 mL, 灭菌待用。

1.1.2 材料: (1) 分离介质: 养殖池底泥、皮皮虾和南美白对虾肠道。 (2) 筛选水体: 1/2 改良 TJA+0.05 g/L 亚硝酸钠。 (3) 模拟污水配制: 参照陈尚智等的方法^[16]略有改进。葡萄糖 0.5 g、氯化钠 0.25 g、K₂HPO₄ 0.075 g、养殖池水 1000 mL, 试验时加入 11.5 mg/L 亚硝态氮和 13.0 mg/L 氨氮。

1.1.3 主要仪器和试剂: Allegra X-22R 离心机(Beckman), 灭菌锅(Sanyo), PCR (MJ Research PTC-100), 电泳仪(Bio-RAD), 凝胶成像系统(SIM Bio-Best), 水质快速测定系统(北京普析通用仪器有限责任公司), UV-2550 紫外可见分光光度计(岛津), 恒温培养箱、摇床(上海智诚分析仪器制造有限公司)。DNA 提取试剂盒(TaKaRa), Taq 酶、dNTPs (北京鼎国生物技术有限责任公司), 回收试剂盒[宝生物(大连)有限公司], 半胱氨酸(北京鼎国

生物技术有限责任公司)、胰蛋白胍、酵母膏、蛋白胍(北京奥博星生物技术有限责任公司), 其它试剂均为国产分析试剂。

1.2 常温条件下乳酸菌的分离纯化

1.2.1 取样: 采集养殖池底 5–15 cm 处污泥, 用烧杯带回室内。取健康皮皮虾和南美白对虾, 在无菌条件下剪下肠道, 将肠道加入少许蒸馏水研磨, 以研磨后的样品为原液。

1.2.2 富集: 取 1 g 泥或 1 mL 原液于 50 mL 富集培养基中, 37 °C 静置培养 48 h。

1.2.3 分离纯化: 将富集的样品梯度稀释, 取 0.1 mL 10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷ 稀释液于冷却至 45 °C 左右的分离培养基中, 混匀倒平板, 在平板上覆盖一薄层水琼脂培养基以造成厌氧环境, 37 °C 培养, 培养过程中观察平板上是否有水解圈产生。挑取产生水解圈的菌落在新的分离培养基上进行纯化。

1.3 低温条件下乳酸菌分离纯化

低温分离与纯化的方法同常温, 只是将培养温度设为 15 °C, 时间适当延长。

1.4 菌株水质净化能力筛选

1.4.1 菌株产酸能力筛选: 将纯化的乳酸菌接种到改良的 TJA 液体培养基中, 常温分离的菌株置于 37 °C 静置培养 2 d, 低温的菌株置于 15 °C 下静置培养 6 d 后测菌液的 pH 值。

1.4.2 菌株对亚硝态氮转化能力初筛: 将筛选水体分装, 每瓶装水 50 mL, 灭菌后按 3% 接种量接种初筛优良菌株, 30 °C 厌氧培养 4 d 后取水, 8000 r/min 离心 10 min, 取上清液测亚硝态氮含量和 pH 值。

1.4.3 菌株对亚硝态氮转化能力复筛: 方法同上, 分别在接菌后的第 24、48、72、96 h 取样, 8000 r/min

离心 10 min, 取上清, 测亚硝态氮含量, 根据测定结果计算转化率。

1.4.4 菌株在模拟污水中水质净化能力比较: 在 250 mL 的三角瓶中装模拟污水 100 mL 灭菌, 取 3 mL 菌液离心, 将菌泥接入瓶中, 30 °C 静置处理, 3 d 后取水离心, 测上清液中的氨氮及亚硝态氮含量。

氨氮测定采用纳氏试剂光度法(GB747987), 亚硝态氮测定采用 N-(1-萘基)-乙二胺光度法(《水和废水监测分析方法》(第 4 版))。

1.5 r13 形态观察及生理生化实验

形态观察包括菌落形态、革兰氏染色观察、芽孢染色观察, 生理生化实验包括接触酶实验、硫化氢产生实验、pH 生长实验、葡萄糖产酸产气实验、氯化钠生长实验、温度生长实验等。

1.6 分子鉴定

1.6.1 DNA 提取: 采用 SDS-CTAB 结合法提取菌株基因组 DNA。

1.6.2 PCR 扩增: 16S rDNA 扩增引物采用通用引物, 正向引物为 27f 5'-AGAGTTTGATCCTGGC TCAG-3', 反向引物为 1492R :5'-GGTTACCTTGT TACGACTT-3', PCR 扩增片段约为 1500 bp。扩增体系: 10×PCR 缓冲液 5.0 μL, dNTPs 4.0 μL, 27f 2.0 μL, 1492R 2.0 μL, DNA 模板 2.0 μL, TaKaRa *rTaq* 酶 0.5 μL, ddH₂O₂ 4.5 μL。循环参数如下: 94 °C 5 min; 94 °C 45 s, 58 °C 45 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物保存于 -20 °C 备用。

1.6.3 16S rDNA 的序列测定: 扩增的 PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳后, 在凝胶成像系统紫外灯照射下将目的条带迅速切下, 使用宝生物(大连)有限公司的 Agarose Gel DNA Fragment Recovery

Kit Ver.2.0 PCR 产物回收试剂盒进行回收, 测序工作由北京三博远志生物技术有限公司完成。

1.7 r13 发酵参数研究

1.7.1 碳源筛选: 基础培养基成分为酵母膏 5 g, 牛肉膏 10 g, 乙酸钠 5 g, K₂HPO₄ 2 g, 柠檬酸氢二铵 2 g, 番茄汁 50 mL, 蒸馏水 950 mL, 处理 1: 葡萄糖 20 g; 处理 2: 蔗糖 20 g; 处理 3: 乳糖 20 g; 处理 4: 麦芽糖 20 g, 用 10% 的碳酸钠调 pH 6.0, 接种量 5%, 34 °C 静置培养 3 d 后测 pH 及干重。

1.7.2 氮源筛选: 基础培养基成分为葡萄糖 20 g, 乙酸钠 5 g, K₂HPO₄ 2 g, 柠檬酸铵 2 g, 番茄汁 50 mL, 蒸馏水 950 mL, 处理 1: 牛肉膏 10 g, 处理 2: 蛋白胨 10 g, 处理 3: 胰蛋白胨 10 g, 处理 4: 酵母膏 10 g, 处理 5: 牛肉膏 5 g, 酵母膏 5 g, 用 10% 的碳酸钠调 pH 6.0, 接种量 5%, 34 °C 静置培养 3 d 后测 pH 及干重。

1.7.3 培养条件优化: 温度设 30、34、38 °C, 初始设 pH 5.0、6.0、7.0, 装液量设 25/50、35/50、45/50, 采用 L₉(3³) 正交设计表进行 3 因素 3 水平正交试验, 接种量 5%, 静置培养 3 d 后离心, 测菌体生物量。

1.7.4 培养基成分优化: 酵母膏(6.0、8.0、10.0 g/L), 葡萄糖(15.0、20.0、25.0 g/L), 乙酸钠(3.0、4.0、5.0 g/L) 和柠檬酸氢二铵(0.5、1.0、2.0 g/L) 各设 3 个水平, 采用 L₉(3⁴) 正交设计表进行 4 因素 3 水平正交试验, 装液量 45 mL/50 mL, 初始 pH 6.0, 接种量 5%, 34 °C 静置培养 3 d 后离心, 测菌体生物量。

1.7.5 验证试验: 由于优化的培养基成分和培养条件组合均不在所设的试验中, 对优化的培养基成分(酵母膏 6.0 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 乙酸钠 4.0 g/L, 柠檬酸氢二铵 2.0 g/L, K₂HPO₄ 2 g/L, 番

茄汁 50 mL/L), 和培养条件(初始 pH 6.0, 装液量 45/50, 培养温度 34 °C, 接种量 5%)进行验证试验, 72 h 取样测菌体生物量和有效活菌浓度。

2 结果和分析

2.1 菌株的分离筛选

常温下共分离到乳酸菌 73 株, 其中 23 株产酸能力较强(混养池底泥中 4 株, 编号为 CN11、CN12、CN13、CN15, 皮皮虾中 4 株, 编号 CP30、CP32、CP33、CP34, 对虾精养池底泥 15 株, 编号 r1-r15), 低温下共分离到乳酸菌 63 株, 其中产酸能力较强的 7 株(混养池底泥中 1 株, 编号为 DN6, 对虾中 6 株, 编号 DD9、DD10、DD11、DD13、DD16、DD18), 将此 30 株产酸能力较强的菌进行亚硝态氮转化能力筛选。

2.2 菌株对亚硝态氮转化能力初筛

从表 1 可知, 筛选的 30 株菌对亚硝态氮的转化能力都较强, 去除率均在 85%以上, 除 DD9、

DD10 和 DD18 外的其他 27 个分离株, 对亚硝态氮的去除能力在 95%以上, 其最终的 pH 也都在 3.80 以下, 说明其产酸能力也较强, 选择此 27 个分离株进行复筛。

2.3 菌株对亚硝态氮转化能力复筛

从表 2 可知, 所有菌株对亚硝态氮的去除率随试验的进行逐渐升高, 说明筛选菌株对亚硝态氮的去除与菌体的生长繁殖活动有关。24 h 菌株对亚硝态氮的去除率为 24.56%–59.58%, 48 h 多数菌株的去除率达到 70%以上, 而到 72 h 所有菌株的去除率都达 90%以上。菌株之间比较发现 CN15、CP30、CP32、CP33、CP34、DD11、DN6、r10、r13、r15(表内黑体)的对亚硝态氮的去除能力相对较强, 48 h 去除率达 70%以上, 72 h 达 95%以上。由于 CP30、CP32、CP33 和 CP34 均为皮皮虾中分离, 且 4 个分离株特征特性比较接近, 因此选 CP30 进行后续试验, r10、r13、r15 均为对虾精养池底泥中分离, 选 r13 进行后续试验。

表 1. 分离菌株对亚硝态氮的去除及 pH 值

Table 1. The nitrite-N removal rate and pH of different isolated strains

Strain number	Removal rate	pH	Strain number	Removal rate	pH
CK	/	6.59	r1	95.87	3.72
DD9	85.19	4.55	r2	95.95	3.70
DD10	88.63	4.35	r3	95.92	3.65
DD11	99.12	3.68	r4	96.17	3.78
DD13	98.24	3.76	r5	96.10	3.74
DD16	98.64	3.76	r6	96.07	3.68
DD18	88.88	4.41	r7	96.09	3.72
DN6	99.12	3.65	r8	95.63	3.80
CN11	99.04	3.72	r9	95.89	3.75
CN12	98.60	3.69	r10	96.01	3.79
CN13	95.98	3.68	r11	96.17	3.65
CN15	95.54	3.77	r12	95.86	3.68
CP30	95.23	3.66	r13	95.64	3.70
CP32	95.37	3.77	r14	96.02	3.69
CP33	96.53	3.70	r15	95.93	3.66
CP34	98.79	3.66			

表 2. 乳酸菌对亚硝态氮去除速率

Table 2. The nitrite -N removal speed of isolated strains/%

Strains	t/h			Strains	t/h		
	24	48	72		24	48	72
CK	2.42	6.89	9.94	r1	24.56	45.59	90.53
CN11	35.77	65.14	91.88	r2	57.87	83.33	90.26
CN12	49.33	68.50	93.90	r3	43.31	78.66	91.68
CN13	48.72	70.46	93.10	r4	53.68	84.33	93.64
CN15	40.38	71.55	95.43	r5	54.63	83.66	90.22
CP30	56.11	77.38	95.24	r6	48.02	80.95	93.32
CP32	50.11	71.38	95.04	r7	52.02	79.47	90.96
CP33	55.09	79.44	96.15	r8	41.98	52.16	90.49
CP34	55.03	77.99	95.14	r9	55.21	84.52	93.80
DD11	57.70	76.63	95.29	r10	52.72	79.04	95.27
DD13	40.99	62.60	93.20	r12	28.75	47.60	90.34
DD16	39.23	63.75	93.31	r13	59.58	76.76	95.81
DD18	27.64	60.94	93.36	r14	59.15	84.66	93.26
DN6	58.31	74.16	95.17	r15	54.01	83.37	95.60

2.4 模拟污水中筛选结果

从表 3 知, 所有菌株对亚硝态氮都有很强的去除效果, 去除率在 90% 以上。其中 CN15、CP30 和 DN6 的去除率达到 99%, 但氨氮含量出现了累积, 可能是部分的亚硝态氮转化成了氨氮, 这与李卓佳等研究结果一致^[15]; 而 r13 和 DD11 处理在去除亚硝态氮的同时, 对氨氮有一定的去除效果, 去除率为 29.12% 和 33.56%。综合分析得知, r13 的水质净化能力最强, 处理 72 h 能将 11.5 mg/L

的亚硝态氮彻底去除, 且对 13.0 mg/L 的氨氮去除率达到 29.1%。

2.5 r13 的鉴定

2.5.1 r13 的形态及生理生化实验结果: r13 为杆状, 革兰氏染色阳性, 芽孢染色阴性, 兼性厌氧, 接触酶阴性, 不产生 H₂S, pH 4.5 生长, 初步确定为乳杆菌属 (*Lactobacillus*)。

2.5.2 分子鉴定: PCR 扩增电泳后发现 r13 在 1000 bp 到 2000 bp 之间有目标条带 (图 1-A), 对

表 3. 模拟污水中筛选结果

Table 3. The water purification result under the simulated wastewater

	Nitrite-N		Ammonia-N	
	Concentration/(mg/L)	Removal rate/%	Concentration/(mg/L)	Removal rate/%
CK	11.50	0.00	13.00	0.00
CN15	0.03	99.74	13.83	-6.17
CP30	0.10	99.13	21.39	-64.16
r13	0.04	99.65	9.24	29.12
DN6	0.07	99.39	14.09	-8.14
DD11	0.91	92.08	8.66	33.56

r13 的 PCR 产物进行测序。序列与 GenBank 数据库中已收录乳酸菌的 16S rRNA 进行 BLAST 分析, r13 核酸序列长度为 1462 bp, NCBI 数据库 BLAST 搜索结果表明, r13 为植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum*, 将得到的序列采用 MEGA 7.0 建立系统发育树, 从图 1 可知, 菌株 r13 与模式菌株 JCM1149 (GenBank: NR117813.1) 同处一个分支中, 说明 r13 为 *Lactobacillus plantarum* 与 BLAST 数据结果一致。

2.6 r13 发酵参数研究

2.6.1 碳源筛选结果: 从图 2 可知, r13 在以葡萄

糖和麦芽糖为碳源的培养基上生长较好, 其生物量干重显著高于其它处理, 而在以乳糖为碳源的培养基上生长最差, 生物量干重显著低于其它处理。葡萄糖价格低于麦芽糖, 因此在今后生产中选择葡萄糖作为碳源。

从图 2 还可以看出菌液的 pH 值与生物量呈负相关关系, 生物量高的处理其菌液 pH 相应较低, 说明 r13 在培养过程中的产酸能力与菌体细胞的增殖有关。

2.6.2 氮源筛选: 从图 3 可知 r13 在以酵母膏为氮源的培养基上生长最好, 其生物量干重显著高

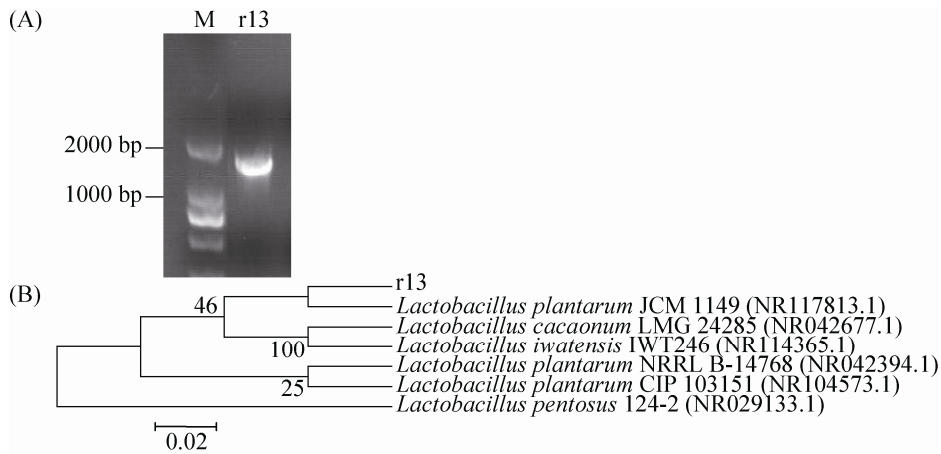


图 1. r13 PCR 电泳图(A)和聚类分析图(B)

Figure 1. PCR electrophoretogram (A) and phylogenetic tree (B) drawn based on 16S rDNA of r13. Number in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank, the number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 0.02 sequence divergence.

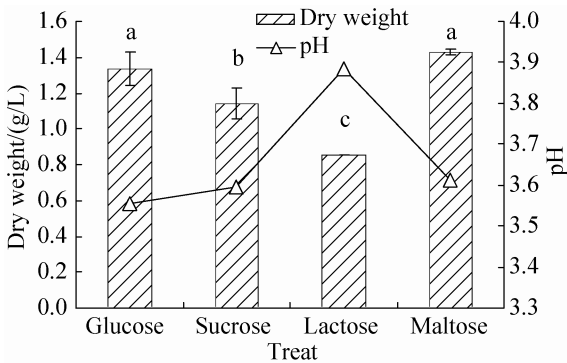


图 2. 碳源筛选结果

Figure 2. The screening result of carbon source.

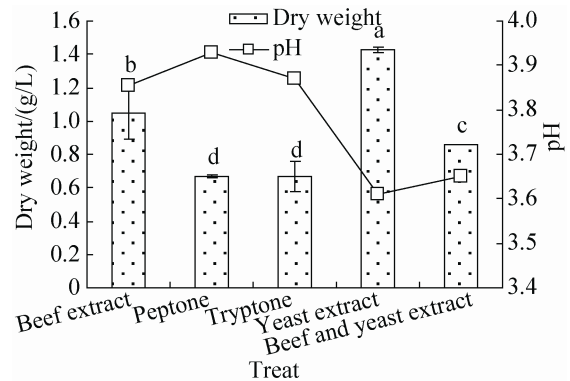


图 3. 氮源筛选结果

Figure 3. The screening result of nitrogen source.

于其它处理,而在以蛋白胨和胰蛋白胨为氮源的培养基上的生物量最低,显著低于其它处理,因此,适宜 r13 生长的有机氮源为酵母膏。

生物量高的处理其 pH 值相应较低,这与碳源筛选结果一致,因此,菌液的 pH 可作为衡量菌体生长繁殖状况的一个指标。

2.6.3 培养条件优化:从菌体生物量分析得知(表 4),利于 r13 生长的组合是 A2B3C2,即初始 pH 6.0,装液量 45/50,培养温度为 34 °C。从极差大小分析,初始 pH>温度>装液量。

从表 5 方差分析可知,培养基初始 pH 和温度对菌体生物量有显著影响,装液量在所设试验范围内对菌体生物量影响不显著。

2.6.4 培养基成分优化结果:从表 6 菌体生物量分析得知,利于 r13 生长的组合是 a1b2c2d3,即酵母膏 6.0 g/L,葡萄糖 20 g/L,乙酸钠 4.0 g/L,柠檬酸氢二铵 2.0 g/L。从极差大小分析,乙酸钠>葡萄糖>酵母膏>柠檬酸氢二铵。方差分析可知,葡萄糖和乙酸钠对菌体生物量有显著影响,其他 2 个因素在所设试验范围内对菌体生物量影响不显著(表 7)。

验证试验结果表明,菌体发酵 72 h 生物量为 28.4 g/L 湿重,有效活菌浓度达 4.4×10^9 CFU/mL。

表 4. 培养基条件的正交表及试验结果

Table 4. The results of the fermentation conditions orthogonal test

Test number	Factors			Results
	A	B	C/°C	Wet weight
1	5.0	25	30	8.80
2	5.0	35	34	11.57
3	5.0	45	38	9.62
4	6.0	25	34	12.33
5	6.0	35	38	11.63
6	6.0	45	30	12.53
7	7.0	35	38	8.67
8	7.0	35	30	9.67
9	7.0	45	34	12.41
K1	9.99	9.93	10.33	
K2	12.16	10.96	12.10	
K3	10.25	11.52	9.97	
R	2.17	1.59	2.13	

A, B, C indicate pH, medium volume, temperature, respectively, K1, K2, K3 indicate the means of the corresponding list, respectively, R indicates range, the same as following.

表 5. 方差分析结果

Table 5. Variance analysis results

Factors	Sum of deviation square	Freedom	F ratio	Critical value	Significance
A	8.419	2	26.898	19.000	*
B	3.382	2	12.403	19.000	
C	7.799	2	24.917	19.000	*
Error	0.310	2			

3 讨论

乳酸菌是常用的益生菌,在水产养殖上的应用主要用于饲料添加,可提高鱼虾的生长性能和消化酶活性,改善其非特异性免疫力^[17-21],用于养殖水质净化的研究相对较少,而在现代化的高

密度养殖模式中,大量残饵、粪便和生物残体沉入水体,在溶氧不足的情况下,有机质腐烂产生大量亚硝态氮、氨氮、硫化氢等有害物质,水质恶化,给养殖业造成巨大经济损失。乳酸菌在发酵过程中可产生亚硝酸盐还原酶和有机酸,通过酸降解和酶降解作用,去除水体中亚硝酸盐^[22]。

表 6. 培养基优化的正交试验结果
Table 6. The results of the medium composition orthogonal test

Test number	Factors				Results
	a	b	c	d	Wet weight
1	6.00	15	3.00	0.50	20.67
2	6.00	20	4.00	1.00	26.13
3	6.00	25	5.00	2.00	22.53
4	8.00	15	4.00	2.00	23.47
5	8.00	20	5.00	0.50	23.20
6	8.00	25	3.00	1.00	25.07
7	10.0	15	5.00	1.00	19.33
8	10.0	20	3.00	2.00	25.20
9	10.0	25	4.00	0.50	26.93
<i>K1</i>	23.11	21.16	23.65	23.60	
<i>K2</i>	23.91	24.84	25.51	23.51	
<i>K3</i>	23.82	24.64	21.69	23.73	
<i>R</i>	0.80	3.68	3.82	0.22	

a、b、c、d indicate yeast extract, glucose, sodium acetate, diammonium hydrogen citrate respectively, the same as following.

表 7. 方差分析结果
Table 7. Variance analysis results

Factors	Sum of deviation square	Freedom	<i>F</i> ratio	Critical value	Significance
a	1.158	2	15.237	19.000	
b	21.783	2	357.671	19.000	*
c	21.931	2	288.566	19.000	*
d	0.076	2	1.000	19.000	
Error	0.080	2			

李卓佳的研究表明, 乳酸杆菌 LH 在不同条件下对养殖废水、饲料中的亚硝态氮去除率从 24.57% 到 78.07% 不等, 但各处理氨氮出现了上升趋势^[15]; 施大林的研究结果表明在乳酸菌的添加量为 1.5×10^7 g/mL 条件下, 处理模拟废水 5 d 对 1.2 mg/L 氨氮去除率达 28.7%, 对 0.25 mg/L 亚硝态氮去除率为 48.3%^[23]。本研究选育的优良乳酸菌 r13 不仅对模拟水体中亚硝态氮有很强的去除效果, 72 h 能将 11.5 mg/L 的亚硝态氮彻底转化, 且对 13.0 mg/L 氨氮的去除率达到 29.1%, 水质净

化效果优于已有的研究报道。经形态特征、生理生化特性及 16S rRNA 基因序列分析, 鉴定菌株 r13 为植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum*。经过培养基和培养条件优化, r13 发酵 72 h 的生物量达 28.4 g/L 湿重, 有效活菌浓度达 4.4×10^9 CFU/mL。

植物乳杆菌是饲料添加剂品种目录中允许添加的菌种, 且菌株的产酸能力强, 可用饲料添加, 同时菌株对水体中亚硝态氮有很强的去除效果, 对氨氮也有一定的去除效果, 且菌株发酵的有效活菌浓度高, 具有很好的市场前景。

参 考 文 献

- [1] Han X, Lei P, Qiao F, Wu XF, Hao JK, Liu L, Hu T, Liu CY. Research progress on symbiotic between yeasts and lactic acid bacteria in fermented dairy products. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 35(7): 388–391. (in Chinese)
韩雪, 雷鹏, 樵飞, 吴先帆, 赫佳康, 刘蕾, 胡彤, 刘彩云. 发酵乳制品中乳酸菌与酵母菌相互作用研究进展. *食品工业科技*, 2014, 35(7): 388–391.
- [2] Esmailzadeh P, Darvishi S, Assadi MM, Mirahmadi F, Arashrad F. Effect of lactic acid bacteria inoculation on nitrite concentration of fermented sausage in fermentation and ripening periods. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 2013, 13(11): 1455–1464.
- [3] Xu DP, Pu B, Ao XL, Chen AJ, Zhuo ZH. Research states of lactic acid bacteria in Chinese traditional pickles. *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 34(19): 369–372, 377. (in Chinese)
徐丹萍, 蒲彪, 敖晓琳, 陈安均, 卓志航. 传统泡菜中乳酸菌的研究现状. *食品工业科技*, 2013, 34(19): 369–372, 377.
- [4] Zhang XJ, Xia S. Research and development of Chinese traditional pickles lactic acid bacteria resources. *China Condiment*, 2016, 41(1): 147–151. (in Chinese)
张晓娟, 夏珊. 我国传统泡菜乳酸菌资源研究与开发. *中国调味品*, 2016, 41(1): 147–151.
- [5] Xue YL, Sun QZ, Zhao HP, Yu Z, Yin GM, Bai CS, Sun JJ. Effects of mixing ratio of *Artemisia desterorum* Spreng and corn straw and lactic acid bacteria on quality of mixed silage. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, 26(5): 1310–1319. (in Chinese)
薛艳林, 孙启忠, 赵和平, 玉柱, 殷国梅, 白春生, 孙娟娟. 沙蒿与玉米秸秆混合比例和乳酸菌制剂对混合青贮饲料品质的影响. *动物营养学报*, 2014, 26(5): 1310–1319.
- [6] Liu JJ, Yang YY, Wang XF, Liu JH, Yuan XF, Cui ZJ. Composition diversity and metabolic characters of lactic acid bacteria community SGL. *Acta Microbiologica Sinica*, 2015, 55(11): 1475–1484. (in Chinese)
刘晶晶, 杨富裕, 王小芬, 刘晋欢, 袁旭峰, 崔宗均. 柳枝稷青贮用乳酸菌复合系的组成多样性及其代谢特性. *微生物学报*, 2015, 55(11): 1475–1484.
- [7] Zhang HM, Ke WC, Jing PX, Zhang J, Chen M, Yu YW, Guo XS. Effect of lactic acid bacteria isolated from Tibetan Plateau on silage fermentation quality of *Elms nutans*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2015, 55(10): 1291–1297. (in Chinese)
张红梅, 柯文灿, 荆佩欣, 张娟, 陈明, 于应文, 郭旭生. 青藏高原乳酸菌对垂穗披碱草青贮饲料发酵品质的影响. *微生物学报*, 2015, 55(10): 1291–1297.
- [8] Zhang WY, Bai M, Zhang HP. Genetic stability of probiotic lactic acid bacteria -a review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(4): 361–366. (in Chinese)
张文羿, 白梅, 张和平. 益生乳酸菌遗传稳定性研究进展. *微生物学报*, 2014, 54(4): 361–366.
- [9] Pei HL, Jiang H, Min ZM. Screening and identification of lactic acid bacteria degrading nitrite. *China Brewing*, 2013, 32(3): 98–101. (in Chinese)
裴洪丽, 姜韩, 闵钟熯. 降解亚硝酸盐乳酸菌的筛选及鉴定. *中国酿造*, 2013, 32(3): 98–101.
- [10] Du XH, Liu SL, Pu B, Chen G, Yan ZC. Screening, identification and application of nitrite-degenerating lactic acid bacteria from Sichuan pickles. *Food and Fermentation Industries*, 2013, 39(4): 48–52. (in Chinese)
杜晓华, 刘书亮, 蒲彪, 陈功, 颜正财. 四川泡菜中降解亚硝酸盐乳酸菌的筛选鉴定及其应用. *食品与发酵工业*, 2013, 39(4): 48–52.
- [11] Fan LP, Lin T, Zhang HS, Zhang Q. Study on identification and growth character of lactic acid bacteria strains degrading nitrite. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(18): 221–223, 235. (in Chinese)
范丽平, 林婷, 张海松, 张倩. 降亚硝酸盐乳酸菌的鉴定及生长特性的研究. *食品工业科技*, 2012, 33(18): 221–223, 235.
- [12] Liu ZW, Yuan WJ, Zhang SY, Luo J, Chen ZL, Li KT, Guo XY, Xu B. Screening and preliminary identification of a lactic acid bacterium strain with the capacity of nitrite degradation from Sanjiang pickled potherb mustard. *Food Science*, 2012, 33(1): 166–169. (in Chinese)
刘志文, 袁伟静, 张三燕, 罗静, 陈忠良, 李昆太, 郭晓燕, 徐波. 三江镇腌菜中降解亚硝酸盐乳酸菌的筛选和初步鉴定. *食品科学*, 2012, 33(1): 166–169.
- [13] Zhang XM, Zeng SD, Tang SY, Gao FH, Zhang L. Study on capability of degradation nitrite of different lactic acid bacteria strains in pickling radish. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2014, 27(1): 450–452. (in Chinese)

- 张雪梅, 曾顺德, 唐德雨, 高飞虎, 张玲. 不同乳酸菌株对萝卜泡菜中亚硝酸盐降解能力的研究. 西南农业学报, 2014, 27(1): 450–452.
- [14] Wu W, Hu GD, Qu JH, Chen JZ. Removal of nitrite from aquacultural water with *Lactobacillus brevis*. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2007, 23(4): 37–40. (in Chinese)
- 吴伟, 胡庚东, 瞿建宏, 陈家长. 应用短乳杆菌去除养殖水体中亚硝酸盐. 生态与农村环境学报, 2007, 23(4): 37–40.
- [15] Li ZJ, Zhou HP, Yang YY, Hong MN, Liang XH. The degradation of aquaculture contaminants by LH (*Lactobacillus* spp.). *Journal of Agro-Environment Science*, 2008, 27(1): 342–349. (in Chinese)
- 李卓佳, 周海平, 杨莺莺, 洪敏娜, 梁晓华. 乳酸杆菌 (*Lactobacillus* spp.)LH 对水产养殖污染物的降解研究. 农业环境科学学报, 2008, 27(1): 342–349.
- [16] Chen SZ, Hu YY. Use of *Bacillus subtilis* in purification of slightly-polluted water. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2011, 31(8): 1594–1601. (in Chinese)
- 陈尚智, 胡勇有. 枯草芽孢杆菌对微污染水体的净化作用. 环境科学学报, 2011, 31(8): 1594–1601.
- [17] Wang GX, Huang YH, Zhou Y, Dong SZ, Huang WQ, Yan Q. Effects of *Lactobacillus* on growth performance, digestive enzyme activities and non-specific immunity of *Litopenaeus vannamei*. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2010, 22(1): 228–234. (in Chinese)
- 王国霞, 黄燕华, 周晔, 董尚智, 黄文庆, 严琴. 乳酸菌对凡纳滨对虾幼虾生长性能、消化酶活性和非特异性免疫的影响. 动物营养学报, 2010, 22(1): 228–234.
- [18] Son VM, Chang CC, Wu MC, Guu YK, Chiu CH, Cheng W. Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 26(5): 691–698.
- [19] Ke YY, Lai QM, Su SY, Lin ZY. Application of lactic acid bacteria in shrimp farming. *Journal of Tropical Biology*, 2015, 6(1): 18–24. (in Chinese)
- 柯杨勇, 赖秋明, 苏树叶, 林治宇. 1 株乳酸菌在凡纳滨对虾养殖中的应用效果. 热带生物学报, 2015, 6(1): 18–24.
- [20] Huang YH, Zhou XB, Wang GX, Kuang ZS, Zhao HX, Mo WY, Cao JM. Effects of *Lactobacillus* on immunity and disease resistance of *Tilapia (Oreochromis niloticus × O. aureus)*. *Fisheries Science*, 2014, 33(10): 601–605. (in Chinese)
- 黄燕华, 周晓波, 王国霞, 邝哲师, 赵红霞, 莫文艳, 曹俊明. 5 种乳酸菌对奥尼罗非鱼免疫和抗病力的影响. 水产科学, 2014, 33(10): 601–605.
- [21] Dawood MAO, Koshio S, Ishikawa M, Yokoyama S, Basuini MFE, Hossain MS, Nhu TH, Dossou S, Moss AS. Effects of dietary supplementation of *Lactobacillus rhamnosus*, or/and *Lactococcus lactis* on the growth, gut microbiota and immune responses of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 49: 275–285.
- [22] Song R. The study of nitrite degradation mechanism by lactic acid bacteria in aquaculture water. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2012. (in Chinese)
- 宋蓉. 乳酸菌对养殖水体亚硝酸盐控制机理的研究. 华中农业大学硕士学位论文, 2012.
- [23] Shi DL, He YJ, Sun M, Pan LK, Liu H, Hu L, Zhou QL, Chen QH, Zhang WN, Xu P, Kuang Q. Tetrigenus active bacterial agent for degradation of ammonia nitrogen and nitrite. *Fisheries Science*, 2009, 28(11): 663–666. (in Chinese)
- 施大林, 何义进, 孙梅, 潘良坤, 刘淮, 胡凌, 周群兰, 陈秋红, 张维娜, 徐跑, 匡群. 四联活菌制剂对养殖水体中氨氮及亚硝酸盐的降解. 水产科学, 2009, 28(11): 663–666.

Isolation, identification and fermentation optimization of lactic acid bacteria for aquaculture water purification

Fengxing Xie, Fengfeng Zhang, Ke Zhou, Yujie Zhao^{*}, Qiong Zhao, Haibo Sun

Tianjin Research Center of Agricultural Biotechnology, Tianjin 300384, China

Abstract: [Objective] In order to get excellent strains for aquaculture water purification, we screened lactic acid bacteria from the aquaculture environment and intestinal tract of shrimp. [Methods] The potential water purification ability of lactic acid bacteria at normal and low temperature was evaluated in the simulated wastewater. Morphological physio-biochemical characteristics, 16S rRNA gene sequence analysis were used to identify strain r13. Single factor test and orthogonal-design experiment were applied to optimize fermentation for r13. [Results] In total 136 lactic acid bacteria strains were isolated from 3 samples. The results of water purification test suggested r13 had higher removal ability of nitrite and ammonia from water. After 72 h treatment by r13, nitrite with 11.5 mg/L in the water was completely removed and ammonia degradation rate was 29.1% with 13.0 mg/L original concentration. According to morphological, physio-biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequence analysis, r13 was identified as *Lactobacillus plantarum*. The optimal fermentation condition for r13 was 6.0 g/L yeast extract, 20.0 g/L glucose, 4.0 g/L sodium acetate, 2.0 g/L diammonium hydrogen citrate, 2.0 g/L monopotassium phosphate, 50 mL tomato juice, with inoculation rate 5% (V/V), at pH 6.0 and 34 °C. Under this condition cultured for 72 h, the bacterial biomass reached 28.4 g/L wet weight and cell counting reached 4.4×10^9 CFU/mL. [Conclusion] Considering high nitrite removal ability, we suggested that r13 would be promising microorganism for water purification in aquaculture.

Keywords: lactic acid bacteria, water purification, isolation and identification, fermentation parameters

(本文责编: 李磊)

Supported by the Major Projects in Science and Technology Support Program of Tianjin (16YFZCNC00670), by the Project of Natural Science Foundation of Tianjin (16JCQNJC15100) and by the Dean Fund Project of Tianjin Academy of Agricultural Sciences (16015)

^{*}Corresponding author. Tel: +86-22-27950956; Fax: +86-22-27950828; E-mail: yujiezh@126.com

Received: 21 August 2016; Revised: 13 October 2016; Published online: 27 October 2016