



亮斑扁角水虻卵共生菌 *Bacillus velezensis* 的鉴定和产酶特征及其对幼虫分解餐厨垃圾效率的影响

陈想, 赵思捷, 梁婷婷, 张继冉, 陈红歌, 杨森*

河南农业大学生命科学学院, 农业部农业微生物酶工程重点实验室, 河南 郑州 450002

摘要: 【目的】从亮斑扁角水虻(*Hermetia illucens* L.)卵表筛选得到一株产多种酶的卵表共生菌, 对该菌进行鉴定, 并探究其最适生长条件、产酶特性及其对幼虫分解餐厨垃圾效率的影响。【方法】通过多种选择性培养基筛选得到产多种酶的菌株。通过单因素实验方法确定其最适生长条件、产酶特性及其对幼虫分解餐厨垃圾效率的影响。【结果】经过形态学观察、生理生化鉴定和16S rDNA序列分析, 将该株亮斑扁角水虻卵表共生菌命名为贝莱斯芽胞杆菌(*Bacillus velezensis* EEAM 10B)。最适摇瓶培养条件为: 40 °C, 200 r/min, pH 7.0, 酵母浸粉10 g/L, 葡萄糖10 g/L, 培养16 h活菌数达 3.1×10^9 CFU/mL。进入稳定期后开始形成单端生芽胞, 24 h后芽胞形成率95.8%。使用产酶筛选培养基培养结果表明: *B. velezensis* EEAM 10B菌株产木聚糖酶活性最强, 其次是蛋白酶、纤维素酶、果胶酶、淀粉酶和植酸酶。按照 1×10^6 CFU/g用量添加*B. velezensis* EEAM 10B芽胞制剂到餐厨垃圾中饲养亮斑扁角水虻, *B. velezensis* EEAM 10B芽胞菌剂能够显著($P < 0.05$)提高亮斑扁角水虻幼虫对灭菌和非灭菌餐厨垃圾的转化效率, 分别为13.4%和13.54%, 但物料减少率没有显著差异($P > 0.05$); 显著提高灭菌餐厨垃圾中幼虫存活率至95%, 提高非灭菌餐厨垃圾饲养幼虫的预蛹单重0.1437 g/只, 化蛹率92.57%。【结论】*B. velezensis* EEAM 10B菌株能够产多种酶, 且在亮斑扁角水虻处理餐厨废弃物中有潜在应用价值。

关键词: 亮斑扁角水虻, 卵表共生微生物, 贝莱斯芽胞杆菌, 产酶特征, 餐厨垃圾

亮斑扁角水虻(*Hermetia illucens* L.), 属于双翅目水虻科昆虫(*Diptera: Stratiomyidae*), 又称黑水虻。幼虫能够以畜禽粪便、餐厨垃圾和动物尸

体等多种有机固体废弃物为食, 并将之生物转化为价值较高的昆虫生物资源^[1-3]。干燥亮斑扁角水虻幼虫含有近40%蛋白质和约30%油脂, 是

基金项目: 河南省重点研发与推广专项(科技攻关 192102310240)

*通信作者。E-mail: yangsen7676@126.com

收稿日期: 2020-11-06; 修回日期: 2021-02-08; 网络出版日期: 2021-05-07

一种新型替代性饲料原料, 已经被应用于水产动物、家禽和宠物等全价饲料中^[4]。2017年, 欧盟官方授权亮斑扁角水虻可以作为水产动物饲料使用; 2018年美国FDA也提倡亮斑扁角水虻虫干在蛋鸡和肉鸡饲料中使用, 上述措施有力地促进了亮斑扁角水虻幼虫终端市场的形成, 也为亮斑扁角水虻行业发展奠定了经济基础^[5]。亮斑扁角水虻处理有机固体废弃物技术具有速度快、彻底性强和高附加值等特点, 兼有环保和经济两大特征, 所以近年来得到快速发展。其中, 如何工业化实现亮斑扁角水虻幼虫对各种成分复杂的有机固体废弃物的快速分解和生物转化成为研究关键。而解决这个问题的有效途径之一在于对亮斑扁角水虻降解废弃物功能相关共生微生物的开发和研究, 实现固体有机废弃物的亮斑扁角水虻“虫-菌”互作生物转化。

亮斑扁角水虻共生微生物对促进有机废弃物分解利用和亮斑扁角水虻幼虫生长发育具有重要的作用。亮斑扁角水虻幼虫分解食物的主要酶类如淀粉酶、蛋白酶和脂肪酶等活性调查研究中, 来自幼虫唾液腺分泌酶活性不到10%, 主要是靠幼虫肠道中产生酶的活性, 这与肠道中的共生功能微生物种群具有密切联系^[6]。借助宏基因组学等技术手段, 一些新的由亮斑扁角水虻共生微生物产生的酶类也在近期的研究中不断地被发掘出来。如亮斑扁角水虻肠道微生物区系中发现新型的纤维素酶CS10, 与现有常见纤维素酶相比具有更宽范围的温度耐受性(20–50 °C)、pH范围(4.0–10.0)和化学溶剂耐受性, 具有一定的工业应用潜力; 发现的新型碱性普鲁兰酶PulSS4, 最适反应温度为40 °C, 最适pH为9.0, 基因序列与已知普鲁兰酶的相似性仅为51%^[7–8]。另外,

在亮斑扁角水虻肠道不可培养的微生物区系中, 还发现了一种能够抗抑制剂的1,4-β甘露聚糖内切酶ManEM17, 对蛋白质变性剂和有机溶剂都有很好的耐受性^[9]。上述酶类对于亮斑扁角水虻幼虫的杂食性适应特征和对食物的快速降解利用具有关键作用, 也是协助昆虫利用食物的重要补充工具。但是, 对于亮斑扁角水虻共生微生物分解利用食物相关功能区系的研究和种群变化调控研究, 绝大部分仍处于调查描述阶段。

虽然不同生长阶段或取食不同种类废弃物的亮斑扁角水虻共生微生物区系变化差异较大, 但是仍能发现一些具有促使食物分解功能的微生物种群。有研究通过分析比较采食餐厨垃圾、鸡粪、牛粪和猪粪四种食物的亮斑扁角水虻幼虫中肠的微生物区系, 发现厚壁菌门(*Firmicutes*)为优势种群, 并且在促进食物的分解利用、抵抗粪便等废弃物中致病微生物方面具有重要的功能。进一步研究表明, 厚壁菌门中的芽胞杆菌属*Bacillus*和梭菌属*Clostridia*又占据主导地位^[10]。这预示着上述两个属中存在某种有益于亮斑扁角水虻分解食物和生长发育的细菌种类。除了亮斑扁角水虻肠道, 喻国辉等使用纯培养的手段也在亮斑扁角水虻幼虫的体表或卵表面分别筛选到了大量的芽胞杆菌属微生物, 具体包括枯草芽胞杆菌*Bacillus subtilis*、巨大芽胞杆菌*Bacillus megaterium*、甲基营养型芽胞杆菌*Bacillus methylotrophic*等^[11–13]。其中, 枯草芽胞杆菌*B. subtilis*既可以在亮斑扁角水虻肠道中共生, 也可以在卵表面共生。文献曾明确报道枯草芽胞杆菌可以有效促进亮斑扁角水虻幼虫对鸡粪和猪粪的分解效率, 同时能够分泌纤维素酶、蛋白酶和抗病原微生物物质^[14–15]。值得关注的

是, 多篇文献报道亮斑扁角水虻虫卵共生的芽胞杆菌不仅对亮斑扁角水虻成虫的产卵行为有一引诱作用, 而且具有促进亮斑扁角水虻幼虫生长发育的功能; 甚至来源于亮斑扁角水虻幼虫食物猪粪中的芽胞杆菌也有促进猪粪分解和幼虫生长的作用^[16-17]。此外, 作为厚壁菌门的芽胞杆菌具有生物学背景清楚, 具有较强的抗逆性, 可以通过喷雾干燥等工艺制成高活性菌剂, 便于运输和保存等优点。所以, 芽胞杆菌属在亮斑扁角水虻“虫-菌互作”生物转化固体有机废弃物技术体系中具有潜在应用价值。

本课题组在前期研究中发现并初步鉴定一株共生于亮斑扁角水虻卵表面的甲基营养型芽胞杆菌 *B. methylotrophicus*, 也是贝莱斯芽胞杆菌 *B. velezensis* 的同物异名菌, 已经证实其具有引诱成虫产卵的生物学作用^[13,18]。本研究对上述菌株进行进一步详细的研究, 主要包括详细鉴定、生长发酵特征和产酶特征, 为下一步芽胞杆菌在亮斑扁角水虻“虫-菌互作”生物转化固体有机废弃物中的应用提供资源菌种和基础数据。

1 材料和方法

1.1 菌株与培养基

B. velezensis EEAM 10B 菌株^[13], 由河南农业大学生命科学学院实验室保存, 菌种保藏编号 CGMCC No.14202。LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0、酵母浸粉 5.0、氯化钠 10.0、蒸馏水补充至 1 L, pH 7.0, 固体培养基添加 1.5%的琼脂粉; 基本培养基(g/L): 干酪素 4.0、CaCl₂ 0.002、FeSO₄·6H₂O 0.002、MgSO₄·7H₂O 0.5、KH₂PO₄ 0.36、Na₂HPO₄·10H₂O 1.07、ZnCl₂ 0.014、NaCl 0.16、pH 7.0-7.2^[19]。

1.2 菌株鉴定

1.2.1 菌株形态及生理生化鉴定: 使用固体的 LB 培养基对 *B. velezensis* EEAM 10B 菌株进行划线纯培养, 观察菌落生长特征并记录。挑取具有代表性的单菌落, 接种于不同的培养基中, 观察培养基颜色的变化。生理生化指标包括革兰氏染色、VP 试验、淀粉水解试验和甲基红试验等^[20]。

1.2.2 菌株 16S rDNA 和 *gyrA* 分子鉴定: 取 200 μL 对数生长期 *B. velezensis* EEAM 10B 菌液, 12000 r/min 离心 5 min, 弃上清; 加入 100 μL Tris-HCl (10 mmol/L, pH 7.5), 和 0.1 mg/mL 溶菌酶, 室温静置 30 min, 100 °C 水浴 5 min, 12000 r/min 离心 5 min, 取上清液做模板。16S rDNA 引物如下: 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGG CTCAG-3', 1492R: 5'-TACGGYTACCTTGTTACG ACTT-3'。PCR 条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min^[21]。*gyrA* 基因引物如下: *gyrA*-F: 5'-CAGTCAGGAA ATGCGTACGTCCTT-3'; *gyrA*-R: 5'-CAAGGTAA TGCTCCAGGCATTGCT-3'。PCR 条件: 94 °C 10 min; 94 °C 30 s, 62 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min^[22]。将 PCR 产物测序获得 16S rDNA 序列上传至 NCBI 中与已知菌株的 16S rDNA 比对, 使用 MEGA 7 软件构建系统进化树。

1.3 最适生长条件确定

挑取菌株 *B. velezensis* EEAM 10B 单菌落, 接种于 100 mL LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 12 h。将菌液于 6000 r/min 离心 10 min, 用无菌水洗涤菌体, 再用无菌水重悬至菌液 OD₆₀₀ 值为 1。该溶液作为菌株 *B. velezensis* EEAM 10B 种子菌液备用, 并统一采取 1%的接种量应用于

后续实验中。

1.3.1 氮源对菌株 *B. velezensis* EEAM 10B 生长

影响: 分别将胰蛋白胨、酵母浸粉、 NaNO_2 、 KNO_3 、 NH_4Cl 、尿素和 NH_4NO_3 按 1% (*W/V*) 加到基础培养基里。将菌株 *B. velezensis* EEAM 10B 接种于上述 7 种培养基(pH 7.0)中, 于 30 °C、200 r/min 培养 24 h 后测定 OD_{600} 。

1.3.2 碳源对菌株 *B. velezensis* EEAM 10B 生长

影响: 选用确定的最佳氮源, 加至基础培养基中以替代干酪素。分别将葡萄糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖、海藻糖、D-木糖和 D-纤维二糖按 1% (*W/V*) 加到基础培养基里。将菌株 *B. velezensis* EEAM 10B 接种于上述 8 种培养基(pH 7.0)中, 于 30 °C、200 r/min 培养 24 h 后测定 OD_{600} 。

1.3.3 温度和培养基起始 pH 对菌株 *B. velezensis*

EEAM 10B 生长影响: 选用最适氮源和碳源, 加至基础培养基(pH 7.0)中, 将菌株 *B. velezensis* EEAM 10B 接种至培养基中, 分别于 25、30、35、40、45、50 °C, 200 r/min 培养 24 h 后测定 OD_{600} 。使用最佳氮源和碳源添加的基础培养基, 调节培养基初始 pH 值为 4、5、6、7、8、9 和 10, 于最适温度、200 r/min 培养 24 h 后测定 OD_{600} 。

1.3.4 菌株生长曲线测定:

按 1% 接种率, 将菌株 *B. velezensis* EEAM 10B 种子菌液接种于含最佳氮源、最佳碳源、最佳 pH 的基础培养基里, 于 200 r/min、最适温度下培养 48 h, 每 4 h 取样测定菌液的 OD_{600} 。

1.4 产酶特征

1.4.1 淀粉酶:

淀粉酶筛选培养基(g/L): 淀粉 20.0、酵母提取物 5.0、蛋白胨 10.0、 Na_2HPO_4 5.0、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1、 NaCl 0.1、琼脂 20.0、pH 7.0–7.4, 1.0×10^2 Pa 灭菌 20 min^[23]。初筛方法:

将活化后菌株用灭过菌的牙签点种于相应的筛选培养基上(平板均分 3 个区域, 每个区域点 3 个点), 37 °C, 倒置培养 48 h。在菌落周围滴加卢戈氏碘液(先在容量瓶中加入 10 mL 蒸馏水, 加入 10 g 碘化钾并用搅拌棒使之溶解, 然后再加入 5 g 碘并搅拌一段时间使之完全溶解(不易溶解)。加蒸馏水至容量瓶中 100 mL 刻度处并搅拌混匀, 移至洁净瓶中并贴上标签), 显色反应之后, 使用游标卡尺分别测定透明圈直径(H)和菌落直径(C), 计算 H/C 值, 并对平板进行拍照记录^[20]。

1.4.2 蛋白酶:

蛋白酶筛选培养基(g/L): 酵母提取物 10.0、 NaCl 5.0、蛋白胨 5.0、干酪素 5.0、 KH_2PO_4 1.0、 K_2HPO_4 1.0、琼脂 17.0、pH 7.2–7.4^[24]。初筛方法: 将活化后菌株用灭过菌的牙签点种于相应的筛选培养基上(平板均分 3 个区域, 每个区域点 3 个点), 37 °C 倒置培养 48 h。在菌落周围滴加 5% 的三氯乙酸(5 g TCA 加入到 100 mL 水中), 显色反应之后, 使用游标卡尺分别测定透明圈直径(H)和菌落直径(C), 计算 H/C 值, 并对平板进行拍照记录。

1.4.3 纤维素酶:

羧甲基纤维素钠培养基(CMC-Na, g/L): CMC-Na 10.0、酵母提取物 10.0、 NaCl 5.0、胰蛋白胨 5.0、 KH_2PO_4 1.0、琼脂 17.0、pH 7.0。初筛方法: 将活化后菌株用灭过菌的牙签点种于相应的筛选培养基上(平板均分 3 个区域, 每个区域点 3 个点), 30 °C 倒置培养 3–4 d。在平板中加入适量 1 mg/mL 的刚果红染液, 染色 10 min, 弃去染液, 加入适量的 1 mol/L 的 NaCl 溶液, 洗涤 10 min, 观察并测量使用游标卡尺分别测定透明圈直径(H)和菌落直径(C), 计算 H/C 值, 并对平板进行拍照记录。

1.4.4 木聚糖酶:

木聚糖酶筛选培养基(g/L): 木

聚糖 4.0、酵母提取物 5.0、NaCl 3.0、 NH_4NO_3 2.0、 K_2HPO_4 1.0、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5、琼脂 17.0、pH 7.0。初筛方法：将活化后菌株用灭过菌的牙签点种于相应的筛选培养基上(平板均分 3 个区域, 每个区域点 3 个点), 37 °C 倒置培养 48 h。在平板中加入无水乙醇, 静止 2–3 h, 观察并测量使用游标卡尺分别测定透明圈直径(H)和菌落直径(C), 计算 H/C 值, 并对平板进行拍照记录。

1.4.5 果胶酶：果胶酶筛选培养基(g/L)：果胶 10.0、酵母提取物 10.0、NaCl 5.0、蛋白胨 10.0、琼脂 17.0、pH 7.0。初筛方法：将活化后菌株用灭过菌的牙签点种于相应的筛选培养基上(平板均分 3 个区域, 每个区域点 3 个点), 30 °C 倒置培养 48 h。在平板上滴加 0.5%刚果红染色液染色 0.5 h, 然后将染液倾掉, 并加入 1 mol/L 的氯化钠脱色液脱 10 min, 脱色 2–3 次。观察并测量使用游标卡尺分别测定透明圈直径(H)和菌落直径(C), 计算 H/C 值, 并对平板进行拍照记录。

1.4.6 植酸酶：初筛植酸钙选择培养基(g/L)：植酸钙 5.0、葡萄糖 10.0、 NH_4SO_4 0.3、 MgSO_4 0.5、CaCl 0.1、 MnSO_4 0.01、 FeSO_4 0.01、琼脂 18.0、pH 7.0。初筛方法：将活化后菌株用灭过菌的牙签点种于相应的筛选培养基上(平板均分 3 个区域, 每个区域点 3 个点), 37 °C 倒置培养 48 h。观察菌落周围的植酸钙是否被分解而形成透明圈。并使用游标卡尺分别测定透明圈直径(H)和菌落直径(C), 计算 H/C 值, 并对平板进行拍照记录。

1.5 *B. velezensis* EEAM 10B 菌株对亮斑扁角水虻幼虫生长的影响

餐厨垃圾由河南省郑州市新密市餐厨废弃物处理中心提供, 经过三相分离处理以后的浆料

物质(细渣), 含水率大约 90%。将含水量约 90%的新鲜餐厨垃圾和花生壳粉按质量比 1:3 的比例混匀后配制成含水量约 70%的幼虫饲料, 每 150 g 分装到 500 mL 大小的组培瓶中, 盖子具有透气性, 覆盖灭菌纱布, 具体分组为: 对照 1 (121 °C 灭菌 30 min); S1 组, 对照 1+芽胞菌剂(接种量 1×10^8 CFU/g); 对照 2 (不灭菌); S2 组, 对照 2+芽胞菌剂(接种量 1×10^8 CFU/g), 一共 4 组, 每组 6 个重复。在各处理组中接入 150 头大小一致的 4 日龄水虻幼虫, 30 °C 饲养 12 d, 观察到 50% 以上幼虫变为预蛹后, 将幼虫与基质残渣分离, 统计并记录不同处理的水虻转化率、餐厨垃圾减少率、幼虫存活率, 一部分幼虫进行随机抽样, 继续在 30 °C 条件下避光放置 10 d, 统计化蛹率; 另一部分幼虫和虫粪 80 °C 烘干后, 统计虫体总干重以及基质残渣总干重。相关指标计算方式如下: 水虻转化率(%)=(转化后水虻干重-转化前水虻干重)/转化前餐厨垃圾干重 $\times 100\%$; 餐厨垃圾减少率(%)=(转化前餐厨垃圾干重-转化后餐厨垃圾干重)/转化前餐厨垃圾干重 $\times 100\%$; 水虻幼虫存活率(%)=转化后水虻数量/转化前加入的水虻数量 $\times 100\%$; 化蛹率(%)=水虻蛹的数量/转化后水虻幼虫数量^[14]。

2 结果和分析

2.1 菌株鉴定结果

由图 1-A 可知, *B. velezensis* EEAM 10B 单个菌体为杆状, 属于革兰氏阳性菌, 常见单个或链状排列, 单端可形成芽胞; 在 LB 固体培养基上生长 24 h 之后, 形成白色不透明水滴样菌落, 中间突起, 起初边缘整齐, 24 h 后菌落向四周呈云雾状扩散, 再继续培养至 48 h 之后, 形成扁平状,

边缘不规则，且表面有褶皱的较大菌落(图 1-B)。由图 1-C 可知，我们采用 Sporgon 消毒剂对卵表除菌后，进行 16S rDNA PCR 验证，发现无 16S rDNA 条带(泳道 5-7)，而未除菌组显示 16S rDNA 条带(泳道 3)，表明 *B. velezensis* EEAM

10B 是其卵表共生菌。生理生化实验如表 1 所示，在已经鉴定的 14 项实验指标内，*B. velezensis* EEAM 10B 菌株除了过氧化氢酶反应、淀粉水解反应、硝酸盐还原反应和明胶液化 4 项反应阳性之外，其余 10 项均为阴性，这与文献已报到的

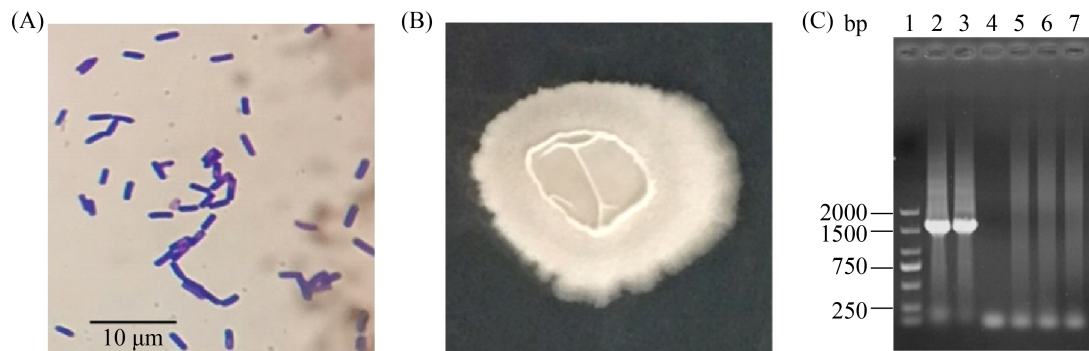


图 1. *B. velezensis* EEAM 10B 菌体形态和卵表除菌前后 16S rDNA PCR 扩增结果

Figure 1. *B. velezensis* EEAM 10B mycelial morphology and 16S rDNA PCR products of the sterilized and unsterilized egg surface groups. A: Morphology of *B. velezensis* EEAM 10B by gram staining (LB broth, 37 °C, 150 r/min, culturing 24 h); B: Colony morphology (LB solid medium, culturing 24 h); C: 16S rDNA PCR products of unsterilized and sterilized egg surface groups. Lane 1: DL2000 DNA marker; lane 2: 16S rDNA products of *E. coli*; lane 3: 16S rDNA PCR product of unsterilized egg surface group; lane 4: Control (without template); lane 5-7: 16S rDNA PCR products of sterilized egg surface group.

表 1. *B. velezensis* EEAM 10B 菌株与已报道芽胞杆菌生化特征比较结果

Table 1. Comparison of the biochemical characteristics of *B. velezensis* EEAM 10B with previously reported *Bacillus* species

Characteristic	<i>B. velezensis</i> EEAM 10B	<i>B. velezensis</i> FJAT-8788*	<i>B. amyloliquefaciens</i> FJAT-8754*	<i>B. Clausii</i> FJAT-8762*
Catalase reaction	+	+	+	+
Oxydase reaction	-	+	+	+
Starch hydrolysis reaction	+	+	+	+
Nitrate reduction reaction	+	-	+	+
Indole reaction	-	-	-	-
Citric acid reaction	-	-	-	-
Gelatin Liquefaction reaction	+	+	+	+
Arginine dihydrolase	-	+	+	-
Sucrose fermentation reaction	-	+	+	-
Glucose fermentation	-	+	-	-
M.R reaction	-	+	-	+
V.P reaction	-	+	+	-
Hydrogen sulfide reaction	-	-	-	-
Urease reaction	-	-	+	-

+: positive reaction; -: negative reaction. *: data were cited from the reference book *Biology of Bacillus*^[20].

B. velezensis FJAT-8788 菌株差异较大, 指标相似度仅为 50%; 与它的近亲 *B. amyloliquefaciens* FJAT-8754 相比, 指标相似度为 64.3%, 但是与 *B. Clausii* FJAT-8762 的生化特征表型相比, 指标相似度为 85.7%, 只有氧化酶反应和 M.R 反应 2 项结果不同, 其余完全一致。细菌生化特征是细菌经典分类学的典型特征, 检测的数量越多, 聚类分析也具有一定的参考意义, 但因为偏重于细菌表型的分类, 不同菌株之间仍有可能存在较大差异。

B. velezensis EEAM 10B 菌株的 16S rDNA 和 *gyrA* 基因测序后与现在已经公布的芽胞杆菌序列进行聚类分析结果如图 2 和图 3 所示。依据 16S rDNA 比对结果, 与 *B. velezensis* EEAM 10B 亲缘关系最近的菌株为 *B. siamensis* KCTC 13613 和 *B. velezensis* UCMB 5036; 依据 *gyrA* 基因^[25]序列比对结果, 与 *B. velezensis* EEAM 10B 亲缘关系

最近的菌株为 *B. velezensis* UCMB 5036。且通过使用 DNAMAN 比对 *B. velezensis* EEAM 10B *gyrA* 基因序列与 *B.velezensis* SBG9、*B. velezensis* UCMB5036、*B. velezensis* WLYS23、*B. velezensis* UB2017、*B. velezensis* FJAT 52631 序列一致性, 结果分别为 99.47%、92.96%、99.58%、99.58% 和 99.58%; 最终确定 EEAM 10B 为贝莱斯芽胞杆菌 *B. velezensis* 种。

2.2 *B. velezensis* EEAM 10B 菌株最适生长条件

如图 4-A 所示, 菌株 *B. velezensis* EEAM 10B 在含有酵母浸出物为氮源的培养基中生长极显著优于其他 6 种氮源培养基($P < 0.0001$)。菌株 *B. velezensis* EEAM 10B 在这 7 种培养基里的生长顺序如下: 酵母浸粉 > 胰蛋白胨 > NH_4Cl > NH_4NO_3 > 干酪素 > KNO_3 > 尿素。菌株 *B. velezensis* EEAM 10B 在含尿素和 KNO_3 培养基中几乎不生长, 但可以利用 NH_4Cl 或 NH_4NO_3 无机氮源。菌

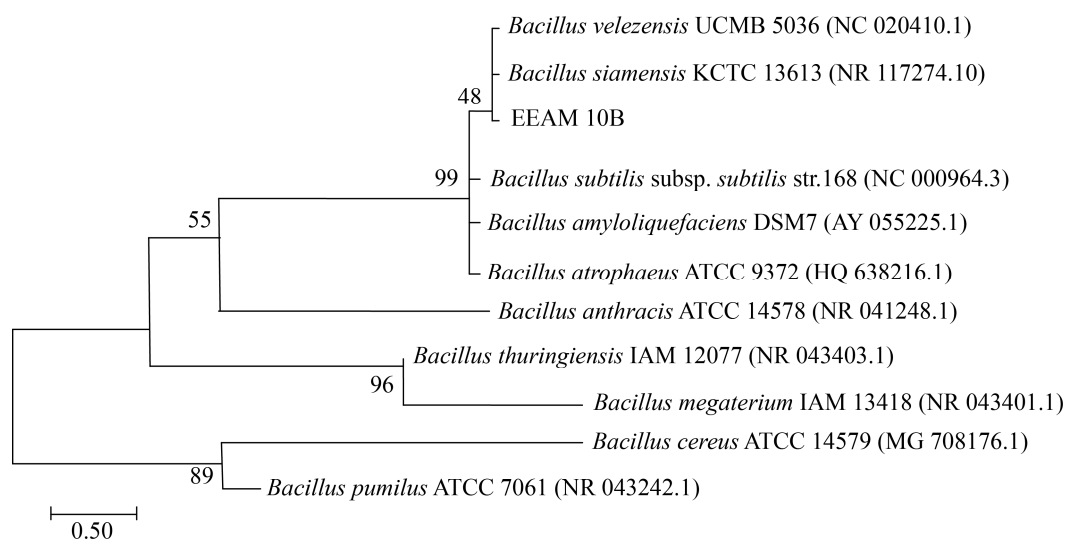


图 2. *B. velezensis* EEAM 10B 菌株 16S rDNA 基因序列最大似然法分子进化树

Figure 2. Phylogenetic tree of *B. velezensis* EEAM 10B and 10 *Bacillus* strains using maximum likelihood analysis based on 16S rRNA. Numbers at nodes represent the percentages of occurrence of nodes in 1000 bootstrap trials. The scale bar represents 0.50 substitution per nucleotide position.

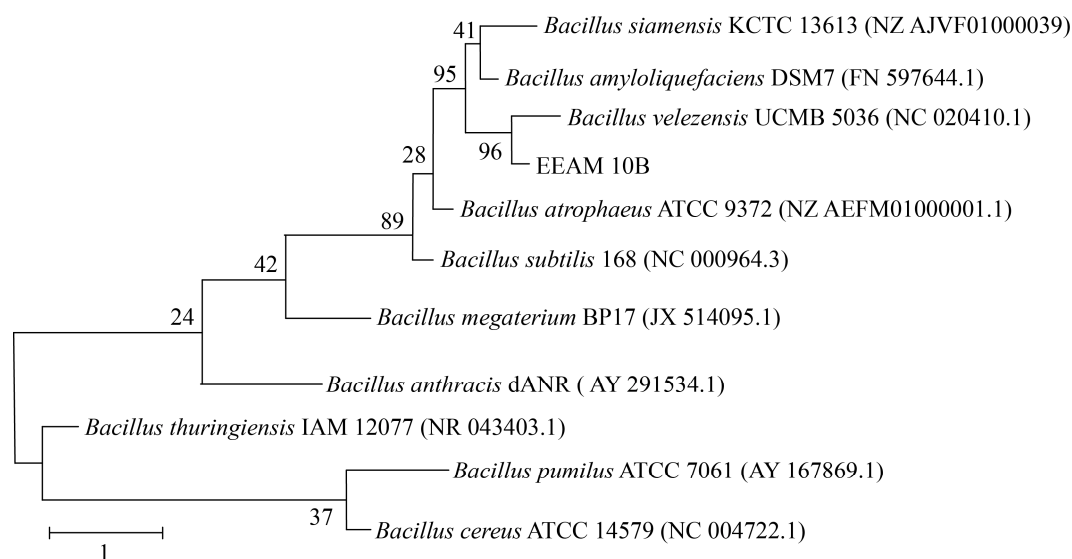


图 3. *B. velezensis* EEAM 10B 菌株 *gyrA* 基因序列最大似然法分子进化树

Figure 3. Phylogenetic tree of *B. velezensis* EEAM 10B and 10 *Bacillus* strains using maximum likelihood analysis based on *gyrA*. Numbers at nodes represent the percentages of occurrence of nodes in 1000 bootstrap trials. The scale bar represents 1 substitution per nucleotide position.

株 *B. velezensis* EEAM 10B 利用有机氮源的能力大于无机氮源, 在这 7 种氮源中, 酵母浸粉最适合菌株 *B. velezensis* EEAM 10B 菌体的生长。如图 4-B 所示, 菌株 *B. velezensis* EEAM 10B 在含葡萄糖、乳糖、木糖和海藻糖培养基中的生长显著高于在含麦芽糖、纤维二糖和蔗糖培养基中的生长 ($P < 0.01$)。并且, 含葡萄糖培养基中的生长量最高, 但是与乳糖、木糖和海藻糖相比无显著差异 ($P > 0.05$), 葡萄糖是菌株 *B. velezensis* EEAM 10B 生长的最佳碳源。由图 4-C 可知, 菌株 *B. velezensis* EEAM 10B 在 pH 6、7 和 8 生长得较好, 在 pH 5、9 和 10 的生长明显较差 ($P < 0.01$), 在 pH 4 条件下不生长。因此, pH 7 为菌株 *B. velezensis* EEAM 10B 培养基最佳生长的 pH 值。由图 4-D 可知, 菌株 *B. velezensis* EEAM 10B 能够在较宽温度范围内生长且呈现出不同的生物量。菌株在

40 °C 培养条件下生长得最好, 明显优于在 35 °C 或 45 °C ($P < 0.01$), 25 °C 或 30 °C 菌株能够生长, 但生物量不稳定, 当培养温度为 50 °C, 菌株几乎不生长。由此可见, 菌株 *B. velezensis* EEAM 10B 是一种嗜中温的细菌, 40 °C 可作为其生长的最佳温度。

菌株 *B. velezensis* EEAM 10B 在含酵母浸粉和葡萄糖的基础培养基 (pH 7.0) 中 40 °C 的生长曲线如图 5 所示, 菌株 *B. velezensis* EEAM 10B 经过 4 h 迟缓期后, 其逐渐进入对数生长期 (4–16 h), 随后菌株的生长速率降低而进入稳定期。而根据显微镜检查结果发现, 在培养 12 h 之后, 已经有菌体开始少量形成芽胞, 24 h 之后培养基中芽胞形成率在 90% 以上, 所以根据菌株 *B. velezensis* EEAM 10B 的生长曲线和镜检结果, 建议培养 12 h 后的菌株可以作为起始菌株进行扩大培养。

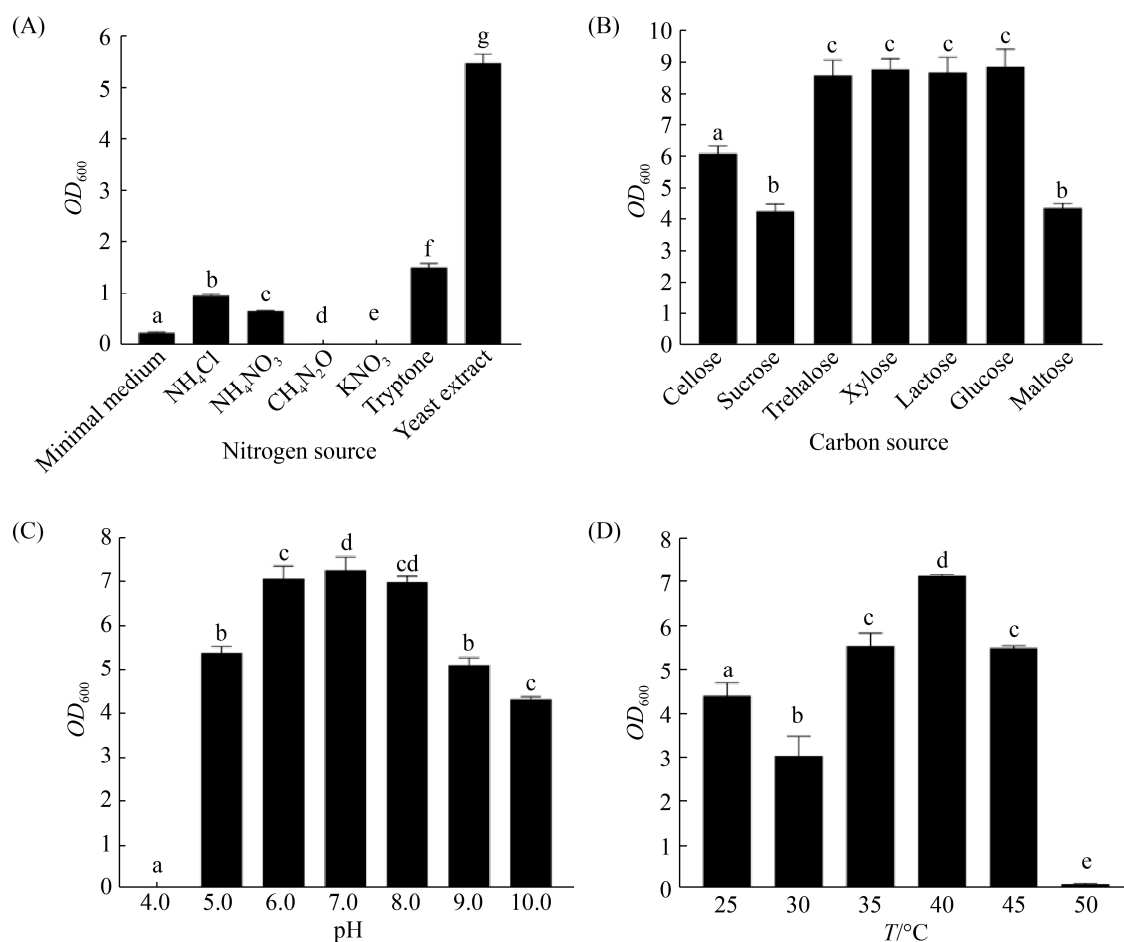


图 4. 菌株 *B. velezensis* EEAM 10B 在不同培养条件下的生物量

Figure 4. Biomass of *B. velezensis* EEAM 10B in different conditions. A: The effect of nitrogen source on the growth of *B. velezensis* EEAM 10B; B: The effect of carbon source on the growth of *B. velezensis* EEAM 10B; C: The effect of pH on the growth of *B. velezensis* EEAM 10B; D: The effect of temperature on the growth of *B. velezensis* EEAM 10B. Values with different letters mean significant differences at $P < 0.05$ ($n=3$), as determined by Tukey's test.

2.3 产酶特征分析

菌株 *B. velezensis* EEAM 10B 在鉴别培养基上的产酶特征分析初步鉴定结果如表 2 所示。*B. velezensis* EEAM 10B 能够产生淀粉酶、纤维素酶、木聚糖酶、果胶酶、蛋白酶和植酸酶 6 种常见酶。从 H/C 比较结果可知, 这几种酶的活性依次为木聚糖酶 > 蛋白酶 > 纤维素酶 > 果胶酶 > 淀粉酶 > 植酸酶; 与已知的菌株 *B. velezensis* FJAT-8788

产酶种类和活性比较结果表明, 除了 *B. velezensis* EEAM 10B 菌株产生的淀粉酶活性稍低之外, 木聚糖酶和果胶酶都明显高于已报到的菌株。而值得注意的是, *B. velezensis* EEAM 10B 菌株产生的纤维素酶、蛋白酶和植酸酶是菌株 *B. velezensis* FJAT-8788 所没有的。综上所述, *B. velezensis* EEAM 10B 菌株能够产多种常见酶类, 特别是木聚糖酶、蛋白酶和纤维素酶, 并且这几种酶都是

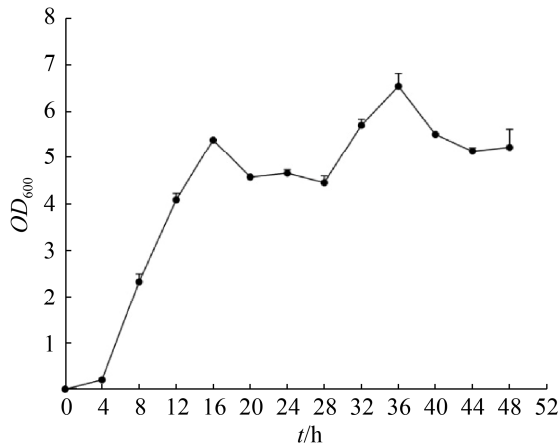


图 5. *B. velezensis* EEAM 10B 菌株在最适培养条件下的生长曲线

Figure 5. The growth curve of *B. velezensis* EEAM 10B under the optimal culture conditions.

表 2. 菌株 *B. velezensis* EEAM 10B 与菌株 *B. velezensis* FJAT-8788 产酶种类和活性比较

Table 2. Comparisons of enzyme species and activities by *B. velezensis* EEAM 10B and *B. velezensis* FJAT-8788

Enzyme profiles	<i>B. velezensis</i> EEAM 10B, H/C	<i>B. velezensis</i> FJAT-8788, H/C*
Amylase	2.26±0.23	3.20
Cellulase	2.72±0.76	0
Xylanase	5.75±0.71	3.10
Pectinase	2.61±0.16	1.67
Protease	3.64±0.09	0
Phytase	1.46±0.08	0

Results are all indicated as means±SEM ($n=3$). *: data were cited from the reference book *Biology of Bacillus*^[20].

表 3. *B. velezensis* EEAM 10B 芽孢制剂对亮斑扁角水虻生物转化餐厨垃圾的影响

Table 3. Effects of *B. velezensis* EEAM 10B spore preparation on BSFL converting food waste

Groups	Conversion rate of BSFL/%	Incremental rate/% ^a	Material reduction rate/%	Incremental rate/% ^b
Control 1 (Sterilization)	12.18±0.43 ^a	—	39.54±0.18 ^a	—
S1 (Sterilization+Spore)	13.40±0.05 ^b	10.02±0.07	41.38±2.80 ^a	4.65±0.10
Control 2 (Unsterilization)	12.11±0.57 ^a	—	46.12±0.34 ^b	—
S2 (Unsterilization+Spore)	13.54±0.60 ^b	10.56±0.03	47.15±1.30 ^b	2.23±0.96

Results are all indicated as means±SEM ($n=3$). The values with different superscript letters in the same column are significantly different ($P<0.05$). ^a: conversion rate of BSFL group compared with the control; ^b: material reduction rate of BSFL group compared with the control.

胞外分泌型,在亮斑扁角水虻“虫-菌互作”生物转化固体有机废弃物的过程中具有一定的潜在应用价值。

2.4 *B. velezensis* EEAM 10B 对亮斑扁角水虻幼虫分解餐厨垃圾效率的影响

将 *B. velezensis* EEAM 10B 的芽孢粉制剂和水虻幼虫同时接入以餐厨垃圾为主的固体有机废弃物,进行 10 d 处理之后,结果如表 3 和表 4 所述。从表 3 中得出, S1 和 S2 的幼虫转化率有明显提高,其增长率分别为 10.02%和 10.56%,而物料减少率并无显著性差异,但是整体来说,添加菌剂,其物料减少率都要高于对照组。从表 4 中得出, S1 和 S2 的幼虫存活率和化蛹率均高于各自的 Control 1 和 Control 2。且 S1 幼虫存活率和化蛹率最高,分别为 95%和 93.28%。S1 处理对其幼虫转化率有明显提高, S2 处理作用并不明显,但均高于对照组,可能是餐厨垃圾里有一些有害微生物,灭菌杀死以后,添加菌剂,作用明显。添加菌剂对其蛹重并没有明显影响,对其预蛹重来说,除 Control 2 外,其他处理并无明显差异。综上所述, *B. velezensis* EEAM 10B 的芽孢粉制剂作为一种微生物制剂添加,对于提高亮斑扁角水虻幼虫转化率和幼虫存活率均有显著性作用,对蛹重的增加没有明显的效果。

表 4. *B. velezensis* EEAM 10B 芽胞制剂对亮斑扁角水虻幼虫生长特征的影响
Table 4. Effects of *B. velezensis* EEAM 10B spore preparation BSFL growth characteristics

Groups	Larvae survival/%	Prepupae weight/(g/piece)	Pupation rate/%	Pupae weight/(g/piece)
Control 1 (Sterilization)	82.20±3.11 ^a	0.13±0.01 ^a	92.65±0.01 ^a	0.12±0.00 ^a
S1 (Sterilization+Spore)	95.00±2.55 ^b	0.13±0.00 ^a	93.28±0.03 ^a	0.12±0.01 ^a
Control 2 (Unsterilization)	85.50±1.41 ^a	0.10±0.00 ^b	84.28±0.02 ^b	0.13±0.01 ^a
S2 (Unsterilization+Spore)	89.00±0.47 ^{ab}	0.14±0.00 ^a	92.57±0.02 ^a	0.11±0.01 ^a

Results are all indicated as means±SEM ($n=3$). The values with different superscript letters in the same column are significantly different ($P<0.05$).

3 讨论

3.1 菌株鉴定与生长特征

贝莱斯芽胞杆菌 *B. velezensis* 是芽胞杆菌属一个新种,将 *B. methylotrophicus*、*B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* 和 *B. oryzicola* 都归类为 *B. velezensis*。虽然与枯草芽胞杆菌(*B. subtilis*)和解淀粉芽胞杆菌(*B. amyloliquefaciens*)亲缘关系非常近,但其生化特性差别明显^[26]。本文分离获得的 *B. velezensis* EEAM 10B 菌株从菌体形态、芽胞形成位置和营养肉汤平板上菌落生长形态等基本特征与最初发现的 *B. velezensis* 具有较高的一致性,但生化特征中的氧化酶、蔗糖发酵反应、葡萄糖发酵、M.R 反应、V.P 反应和硫化氢反应等结果均为阴性,与已报道的菌株指标差异明显,如 UIZ-GARCIA 等鉴定的 *B. velezensis* 能产生氧化酶,可以发酵蔗糖和葡萄糖产酸;连彩等分离的 *B. velezensis* 可以产生 H₂S 和吡啶;但王伟等分离的 *B. velezensis* 不产生 H₂S;刘程程等分离的菌株 M.R 反应和 V.P 反应均为阴性,由此可见,*B. velezensis* 不同菌株生理和生化反应不尽相同^[24,26-27]。*B. velezensis* EEAM 10B 菌株的 16S rDNA 和 *gryA* 进化树分析结果一致,表明亲缘关系最近的是 *B. velezensis* UCMB 5036 菌株。

据报道,最初被命名为 *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* UCMB 5036 的菌,分离自一种棉花植物的组织内生菌(*Gossypium barbadense*),进一步研究表明此菌株具有促进植物生长和防止多种植物病害的功能^[28]。*B. velezensis* EEAM 10B 菌株是否有植物促生和防止病害的功能有待进一步研究,如果被证实将会明显提升亮斑扁角水虻“虫菌互作”生物转化固体有机废弃物的潜在价值,因为该菌株的使用会增加亮斑扁角水虻虫粪作为有机肥使用的功能性价值。

B. velezensis EEAM 10B 菌株对培养基中的 N 源有较强的选择性,对尿素和 KNO₃ 几乎不利用,而在有机氮源特别是酵母浸粉中生长良好,这一结果与前人研究结果一致,使用有机氮源对 *B. velezensis* 进行培养还能够增加其抑真菌物质的产生量^[29]。值得注意的是 *B. velezensis* EEAM 10B 菌株对不同来源碳源都有着较强的利用能力,其中特别是对海藻糖的利用。

3.2 产酶特征

B. velezensis EEAM 10B 能够产生淀粉酶、纤维素酶、木聚糖酶、果胶酶、蛋白酶和植酸酶 6 种常见酶。这几种酶的活性依次为木聚糖酶>蛋白酶>纤维素酶>果胶酶>淀粉酶>植酸酶;与已知的菌株 *B. velezensis* FJAT-8788 产酶种类和

活性比较结果表明^[20], *B. velezensis* EEAM 10B 菌株产生的木聚糖酶和果胶酶都明显高于 *B. velezensis* FJAT-8788 菌株。而且 *B. velezensis* EEAM 10B 菌株产生的纤维素酶、蛋白酶和植酸酶是菌株 *B. velezensis* FJAT-8788 所没有的。*B. velezensis* EEAM 10B 可以作为一株产多种酶菌株使用。有研究表明, 在肉雏鸡日粮基础饲料中添加 1‰的木聚糖酶, 平均日增重提高 4.81% ($P<0.01$), 料重比下降 5.00% ($P<0.05$)^[30]。果胶酶和纤维素酶对桃果实成熟和败絮起重要作用^[31], 这对于 *B. velezensis* EEAM 10B 来说, 也许可用于肉雏鸡增重和桃果成熟。

3.3 *B. velezensis* EEAM 10B 对亮斑扁角水虻幼虫分解餐厨垃圾效率的影响

添加 *B. velezensis* EEAM 10B 菌粉制剂, 能明显提高幼虫转化率, 与曹露^[32]添加肠道微生物 HNB-3 处理猪粪结果一致, 均能提高其转化率, 而且添加 *B. velezensis* EEAM 10B 能提高其存活率, 这对于工厂规模化饲养有很大意义。对其物料减少率来说, 非灭菌处理组明显高于灭菌处理组, 说明影响物料的消耗并不是一种微生物的作用, 而是多种微生物的共同作用。从灭菌和非灭菌处理来看, 非灭菌处理其化蛹率和预蛹重明显低于灭菌处理, 说明 *B. velezensis* EEAM 10B 需要和其他微生物共同作用才能提高亮斑扁角水虻的化蛹率和预蛹重, 且餐厨垃圾某些有害微生物可能不利于其化蛹, 对于这些微生物有待进一步研究。在我们后续的单菌培养(同时对除菌幼虫和经灭菌的底物中添加 *B. velezensis* EEAM 10B) 研究发现, 在培养 10 d 后, 其肠道活菌数能达到 2.5×10^6 CFU/g, 确定 *B. velezensis* EEAM 10B 能在其肠道内定殖, 说明该菌对亮斑扁角水虻有很

重要的作用。芽胞杆菌还可以提高动物的生产性能^[33-34], *B. velezensis* EEAM 10B 在此方面有很大的应用潜力。

4 结论

确定亮斑扁角水虻卵表共生菌为贝莱斯芽胞杆菌, 命名为 *B. velezensis* EEAM 10B, 能够产生芽胞和多种酶类, 通过培养条件优化, 证实本菌株能够通过液体发酵的方式进行规模化生产; 添加餐厨垃圾培养亮斑扁角水虻结果显示, *B. velezensis* EEAM 10B 有效促进可亮斑扁角水虻幼虫对餐厨垃圾的转化效率, 具有在亮斑扁角水虻处理餐厨废弃物领域的潜在应用价值。

参考文献

- [1] Beskin KV, Holcomb CD, Cammack JA, Crippen TL, Knap AH, Sweet ST, Tomberlin JK. Larval digestion of different manure types by the black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) impacts associated volatile emissions. *Waste Management: New York, N Y*, 2018(74): 213–220.
- [2] Nguyen TTX, Tomberlin JK, Vanlaerhoven S. Ability of black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) larvae to recycle food waste. *Environmental Entomology*, 2015, 44(2): 406–410.
- [3] Gunawan A, Erlina S, Samudera R, Syarif DM, Noor MY, Lantu AX. Effect of supplement Maggot Black Soldier Fly live on the percentage of carcass and weight of carcass of male Alabio ducks. *IOP Conference Series Earth and Environmental Science*, 2018, 207(1): 12–21.
- [4] Wang YS, Matan S. Review of Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) as Animal Feed and Human Food. *Foods (Basel, Switzerland)*, 2017, 6(10): 91.
- [5] Yang BR, Vivek, Nemane, Nicole, Grmelova, Zhao A, Anu LU, Louise HE, Deschamps MH, Vandenberg GW, Zhang YM. Insects as Food and Feed: Laws of the European Union, United States, Canada, Mexico, Australia, and China. *European Food and Feed Law Review*, 2017, 12(1): 22–36.

- [6] Kim W, Bae S, Park K, Lee S, Choi Y, Han S, Koh Y. Biochemical characterization of digestive enzymes in the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 2011, 14(1): 11–14.
- [7] Lee CM, Lee YS, Seo SH, Yoon SH, Kim SJ, Hahn BS, Sim JS, Koo BS. Screening and characterization of a novel cellulase gene from the gut microflora of *Hermetia illucens* using metagenomic library. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2014, 24(9): 1196–1206.
- [8] Lee YS, Seo SH, Yoon SH, Kim SY, Hahn BS, Sim JS, Koo BS, Lee CM. Identification of a novel alkaline amylopullulanase from a gut metagenome of *Hermetia illucens*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016(82): 514–521.
- [9] Song J, Kim SY, Kim DH, Lee YS, Sim JS, Hahn BS, Lee CM. Characterization of an inhibitor-resistant endo-1, 4- β -mannanase from the gut microflora metagenome of *Hermetia illucens*. *Biotechnology Letters*, 2018, 40(9/10): 1377–1387.
- [10] Zhan S, Fang GQ, Cai MM, Kou ZQ, Xu J, Cao YH, Bai L, Zhang YX, Jiang YG, Luo XY, Xu J, Xu X, Zheng LY, Yu ZN, Yang H, Zhang ZJ, Wang SB, Tomberlin JK, Zhang JB, Huang YP. Genomic landscape and genetic manipulation of the black soldier fly *Hermetia illucens*, a natural waste recycler. *Cell Research*, 2020, 30(1): 50–60.
- [11] Yu GH, Yang ZH, Xia Q, Chen YF, Cheng P. Effect of chicken manure treated by gut symbiotic bacteria on the growth and development of black soldier fly *Hermetia illucens*. *Chinese Bulletin of Entomology*, 2010, 47(6): 1123–1127. (in Chinese)
喻国辉, 杨紫红, 夏婧, 陈远凤, 程萍. 肠道共生细菌预发酵鸡粪对黑水虻生长发育的影响. *昆虫知识*, 2010, 47(6): 1123–1127.
- [12] 郭凤达. 亮斑扁角水虻生物学及其幼虫肠道细菌的研究. 山东农业大学硕士学位论文, 2012.
- [13] Yang S, Li Y, Mai YN, Ruan RT, Song AD, Wang FQ, Chen HG. Isolation and identification of egg-associated bacteria of *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) and their effects on its adult oviposition behavior. *Acta Entomologica Sinica*, 2017, 60(2): 163–172. (in Chinese)
杨森, 李严, 麦艳娜, 阮润田, 宋安东, 王凤芹, 陈红歌. 亮斑扁角水虻卵携带细菌的分离鉴定及其对成虫产卵行为影响. *昆虫学报*, 2017, 60(2): 163–172.
- [14] Xiao XP, Jin P, Cai MM, Zheng LY, Li W, Yu ZN, Zhang JB. Chicken manure co-conversion by *Hermetia illucens* larvae with non-associated microorganism. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(6): 1116–1125. (in Chinese)
肖小鹏, 靳鹏, 蔡珉敏, 郑龙玉, 李武, 喻子牛, 张吉斌. 非水虻源微生物与武汉亮斑水虻幼虫联合转化鸡粪的研究. *微生物学报*, 2018, 58(6): 1116–1125.
- [15] 谢久凤. 亮斑扁角水虻(*Hermetia illucens* L.)幼虫肠道内纤维素酶活性菌株的筛选与鉴定. 华中农业大学硕士学位论文, 2010.
- [16] 郑龙玉. 卵携带的微生物对亮斑扁角水虻产卵行为和生长发育的影响. 华中农业大学博士学位论文, 2012.
- [17] Rehman KU, Rehman RU, Somroo AA, Cai MM, Zheng LY, Xiao XP, Rehman AU, Rehman A, Tomberlin JK, Yu ZN, Zhang JB. Enhanced bioconversion of dairy and chicken manure by the interaction of exogenous bacteria and black soldier fly larvae. *Journal of Environmental Management*, 2019, 237: 75–83.
- [18] Zhang CW, Cheng K, Zhang X, Liu B, Du HB, Yao S. Taxonomy and functions of *Bacillus velezensis* a review. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(17): 258–265. (in Chinese)
张彩文, 程坤, 张欣, 刘波, 都海渤, 姚粟. 贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)分类学及功能研究进展. *食品与发酵工业*, 2019, 45(17): 258–265.
- [19] Wan WJ, Xue ZY, Zhang ZW, Li XH, Cheng GJ, He DL. Isolation and identification of an alkaline protease producing strain and study on enzymatic properties. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(5): 737–747. (in Chinese)
万文结, 薛芷筠, 张泽文, 李晓华, 程国军, 何冬兰. 一株产碱性蛋白酶菌株的筛选鉴定及酶学特性研究. *微生物学报*, 2017, 57(5): 737–747.
- [20] 刘波. 芽孢杆菌 第三卷 芽孢杆菌生物学. 北京: 科学出版社, 2016.
- [21] Yu J, Zhou XF, Yang SJ, Liu WH, Hu XF. Design and application of specific 16S rDNA-targeted primers for assessing endophytic diversity in *Dendrobium officinale* using nested PCR-DGGE. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(22): 9825–9836.

- [22] Roberts MS, Nakamura LK, Cohan FM. *Bacillus mojavensis* sp. nov. Distinguishable from *Bacillus subtilis* by Sexual Isolation, Divergence in DNA Sequence, and Differences in Fatty Acid Composition. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1994, 44(2): 256–264.
- [23] Wang L, Chen YF, Yang L. Isolation and identification of amylase-producing *Bacillus*. *Food Research and Development*, 2017, 38(6): 175–178. (in Chinese)
王磊, 陈宇飞, 杨柳. 产淀粉酶芽胞杆菌的分离和鉴定. *食品研究与开发*, 2017, 38(6): 175–178.
- [24] 刘程程. 芽胞杆菌几种重要酶的酶学特性分析. 福建农林大学硕士学位论文, 2014.
- [25] Zhang DF, Gao YX, Wang YJ, Liu C, Shi CB. Advances in taxonomy, antagonistic function and application of *Bacillus velezensis*. *Microbiology China*, 2020, 47(11): 3634–3649. (in Chinese)
张德锋, 高艳侠, 王亚军, 刘春, 石存斌. 贝莱斯芽胞杆菌的分类、拮抗功能及其应用研究进展. *微生物学通报*, 2020, 47(11): 3634–3649.
- [26] Cai GL, Zhang F, Ouyang YX, Zhao CS, Peng XH, Jiang AM. Research progress on *Bacillus velezensis*. *Northern Horticulture*, 2018(12): 162–167. (in Chinese)
蔡高磊, 张凡, 欧阳友香, 赵昌松, 彭宣和, 江爱明. 贝莱斯芽胞杆菌(*Bacillus velezensis*)研究进展. *北方园艺*, 2018(12): 162–167.
- [27] Ruiz GC. *Bacillus velezensis* sp. nov. a surfactant-producing bacterium isolated from the river Velez in Malaga, southern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(1): 191–195.
- [28] Shahid M, Adnan N, Sarosh B, Johan M, Erik BR. Genome sequence of a plant-associated bacterium, *Bacillus amyloliquefaciens* strain UCMB5036. *Genome Announcements*, 2013, 1(2): 111–113.
- [29] Yang K, Si W, Lin H, Lin FR, Yuan J, Chen J. Fermentation condition optimization of *Bacillus velezensis* TCS001 using response surface methodology. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2019, 21(4): 444–452. (in Chinese)
杨可, 司文, 林海, 林方锐, 袁静, 陈杰. 利用响应面分析法优化贝莱斯芽胞杆菌 TCS001 发酵条件. *农药学报*, 2019, 21(4): 444–452.
- [30] 王修启. 木聚糖酶作用的分子营养及内分泌机理初探. 第五届饲料安全与生物技术委员会大会暨第二届全国酶制剂在饲料工业中应用学术与技术研讨会. 2005.
- [31] Mao LC, Zhang SL. Role of pectolytic enzymes and cellulase during ripening and woolly breakdown in peaches. *Acta Horticulturae Sinica*, 2001, 28(2): 107–111. (in Chinese)
茅林春, 张上隆. 果胶酶和纤维素酶在桃果实成熟和絮败中的作用. *园艺学报*, 2001, 28(2): 107–111.
- [32] 曹露. 利用亮斑扁角水虻和微生物联合转化处理畜禽粪便的研究. 华中农业大学硕士学位论文, 2011.
- [33] Chen XD, Ma QG, Ji C, Li MJ. Effect of *Bacillus* preparation on performance of piglets. *China Feed*, 2003(16): 12–13. (in Chinese)
陈旭东, 马秋刚, 计成, 李敏俊. 芽胞杆菌制剂对仔猪生产性能的影响. *中国饲料*, 2003(16): 12–13.
- [34] Li JB, Cheng TS, Lü WX, Peng P. Effect of dried *Bacillus subtilis* culture on production performance, egg quality and nutrient digestibility of layers. *China Poultry*, 2009, 31(4): 15–17. (in Chinese)
李俊波, 成廷水, 吕武兴, 彭鹏. 枯草芽胞杆菌制剂对蛋鸡生产性能、蛋品质和养分消化率的影响. *中国家禽*, 2009, 31(4): 15–17.

Identification and enzyme profiling of black soldier fly egg commensal *Bacillus velezensis* and its effect on food waste bioconversion

Xiang Chen, Sijie Zhao, Tingting Liang, Jiran Zhang, Hongge Chen, Sen Yang*

Key Laboratory of Microbial Engineering, Ministry of Agriculture, College of Life Sciences of Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan Province, China

Abstract: [Objective] A strain producing multiple enzymes was isolated from the egg surface of *Hermetia illucens* L. Further, the optimal growth conditions, enzyme-producing characteristics, and the effects of the strain on the food waste decomposition efficiency of *Hermetia illucens* L. were explored. [Methods] Enzyme-producing strains were obtained from various selective media. The optimal growth conditions, enzyme-producing characteristics, and the effects of it on the food waste treatment decomposition efficiency of *Hermetia illucens* L. were determined by the single-factor experiment. [Results] In this study, a *Hermetia illucens* L. egg-surface commensal bacterium was named as *Bacillus velezensis* EEAM 10B by morphological observation, biophysiological and biochemical tests, and 16S rDNA sequence analysis. The bacteria number was 3.1×10^9 CFU/mL under the optimum growth conditions: 40 °C, 200 r/min, pH 7.0, 10 g/L yeast extract, 10 g/L glucose for 16 h. Approximately 95.8% single-terminal spores were formed after 24 h cultivation. Enzymes producing results are as follows: xylanase activity was the highest, followed by the protease, cellulase, pectinase, amylase, and phytase. Adding the *Bacillus velezensis* EEAM 10B spores to the food waste at a dosage of 1×10^6 CFU/g significantly ($P < 0.05$) improved the food conversion efficiency of black soldier fly larvae in both sterilized and non-sterilized food waste groups, reaching 13.4% and 13.54%, respectively, whereas the mass reduction rates did not present differences ($P > 0.05$). Furthermore, in the sterilized food waste group, the survival rate of larvae and the prepupae weight were significantly increased to 95% and 0.1437 g per one, while the pupation rate reached 92.57% in the non-sterilized food waste group. [Conclusion] *B. velezensis* EEAM 10B strain can produce a variety of enzymes, and it has potential application value in the treatment of food waste with the black soldier fly.

Keywords: black soldier fly, egg-surface commensal bacteria, *Bacillus velezensis*, enzyme profiling, food waste

(本文责编: 李磊)

Supported by the Key Research and Promotion Special of Henan Province (Scientific and Technological 192102310240)

*Corresponding author. E-mail: yangsen7676@126.com

Received: 6 November 2020; Revised: 8 February 2021; Published online: 7 May 2021