

Medium (CM0847) Optimization of *Shewanella putrefaciens*

Juan Cheng, Lei Wang, Yuwei Tao, Wenjuan Yuan, Jian Zhao, Su Feng*

Key Laboratory of Bio-Resource and Eco-Environment of Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu Sichuan
Email: 1347291364@qq.com, lei_wonder@163.com, taoyuweiscu@163.com, yuanwenjuanzr@163.com, zj804@163.com, *fengsu_fs@163.com

Received: Mar. 22nd, 2018; accepted: Apr. 10th, 2018; published: Apr. 18th, 2018

Abstract

Aim: The culture medium of *Shewanella putrefaciens* was optimized and its growth was promoted. **Methods:** Single factor and orthogonal design experiment were conducted to determine the optimal medium of *Shewanella putrefaciens* by measured cell density (under 600 nm) and cell weight. **Results:** Compared with medium CM0847, when the initial pH was 7.5, the glucose, beef extract and sodium chloride added at 10%, 30% and 30%, respectively, the cell density and cell weight were the highest. **Conclusion:** Cultivated *Shewanella putrefaciens* in the optimum medium and CM0847 culture medium, the cells weight was improved by 11.1168 g/L.

Keywords

Shewanella putrefaciens, Optimization, Medium, Orthogonal

一株腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)培养基优化

成娟, 王磊, 陶榆伟, 袁文娟, 赵建, 冯甦*

四川大学生命科学学院资源微生物及生物技术重点实验室, 四川 成都
Email: 1347291364@qq.com, lei_wonder@163.com, taoyuweiscu@163.com, yuanwenjuanzr@163.com, zj804@163.com, *fengsu_fs@163.com

收稿日期: 2018年3月22日; 录用日期: 2018年4月10日; 发布日期: 2018年4月18日

*通讯作者。

文章引用: 成娟, 王磊, 陶榆伟, 袁文娟, 赵建, 冯甦. 一株腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)培养基优化[J]. 水污染及处理, 2018, 6(2): 103-109. DOI: 10.12677/wpt.2018.62013

摘要

目的：对发酵培养基(CM0847)进行优化促进腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)生长。方法：通过测定菌体在600 nm处的吸光值和菌体干重，采用单因子试验结合正交试验对培养基(CM0847)进行优化。结果：当pH为7.5，在原培养基的基础上葡萄糖、牛肉膏、氯化钠分别以10%、30%及30%的添加量，菌体密度及菌体干重最高。结论：腐败希瓦氏菌在优化后的培养基中培养，其菌体干重较原培养基(CM0847)增加了11.1168 g/L。

关键词

Shewanella putrefaciens, 优化, 培养基, 正交

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

在 21 世纪这个科技发展迅速的时代，居民生活和工业发展都会造成一定的环境污染，其中包括一些生产生活中带来的水质金属污染，特别是重金属污染。这些广泛存在的重金属污染物可通过皮肤、呼吸、消化道等多种途径进入人体，从而严重威胁人类健康和生态环境。目前，重金属污染的污水治理困难，且需要的费用普遍偏高，生物方法因其经济、安全、有效，是一种效率极高的治理办法[1] [2]，由微生物菌体所分泌的胞外聚合物(Extracellular polymeric substance, EPS)因具有生物活性、结构疏松等特点，能够与环境中的重金属结合，有效去除水体及土壤环境中的重金属，减轻环境污染，从而间接降低重金属对人体的危害。希瓦氏菌属(*Shewanellasp*)属于弧菌科(Vibrionaceae)，由 MacDonell 和 Colwell 于 1985 年正式命名。腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)作为希瓦氏菌属的模式菌种于 1931 年由 Derby 和 Hammer 首次分离得到，属于革兰氏阴性杆菌，呈弯曲的短杆状，菌落酪黄色、较小，边缘规整，略凸起，是一种好氧细菌[3] [4]。菌体对于重金属污染的生物治理主要通过吸附、还原等机制[5] [6]，由希瓦氏菌生物合成的一种纳米材料可以催化罗丹明的降解[7]，EPS 具有还原污水中重金属离子的能力，在自然界 EPS 对重金属具有良好的富集作用[8]，因此运用 EPS 处理重金属污染是一个更加新颖的生物治理方案，本文首次对腐败希瓦氏菌发酵培养基(成分：胰蛋白胨 15.0 g，大豆蛋白胨 5.0 g，氯化钠 5.0 g，蒸馏水 1.0 L，pH 7.3 ± 0.2，35℃，转速 150 rpm/min)进行优化，主要通过添加不同浓度梯度的营养物质至培养基 CM0847 中来考察碳源、氮源、无机盐对腐败希瓦氏菌生长的影响，以期对腐败希瓦氏菌的发酵培养和 EPS 的生产奠定基础。

2. 材料与方法

在腐败希瓦氏菌培养过程中，培养方法及装置设备流程图如图 1 所示。

2.1. 材料

2.1.1. 供试菌种

腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)，购买于中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC)，菌种编号：

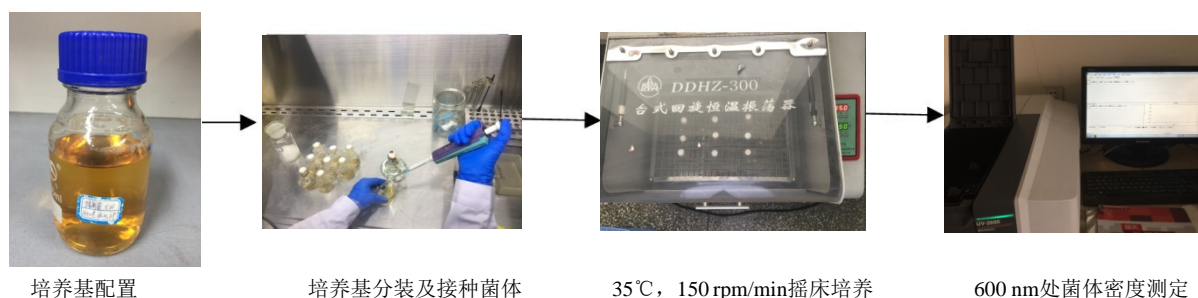


Figure 1. Cultivating flowchart of *Shewanella putrefaciens*
图 1. 腐败希瓦氏菌培养流程图

CICC 22940。

2.1.2. 仪器

台式回旋恒温振荡器(DDHZ-300, 苏州市培英实验设备有限公司); 高速冷冻离心机(Thermo 赛默飞世尔, Biofuge Primo R); 岛津 UV-2450 紫外分光光度计; 石英比色皿等。

2.1.3. 试剂

胰蛋白胨、大豆蛋白胨(北京奥博星生物技术有限公司)、葡萄糖、半乳糖、鼠李糖、乳糖、麦芽糖、D-山梨醇、酵母提取物、牛肉膏、硫氨酸、尿素、醋酸铵、七水合硫酸、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、氯化钠、氯化钾、氯化钙、盐酸、氢氧化钠、无水乙醇, 以上试剂均为化学分析纯。

2.1.4. 培养基

以 CM0847 培养基为基础发酵培养基。成分: 胰蛋白胨 15.0 g, 大豆蛋白胨 5.0 g, 氯化钠 5.0 g, 琼脂 13.0 g, 蒸馏水 1.0 L, pH 7.3 ± 0.2 。

2.2. 方法

2.2.1. 腐败希瓦氏菌的活化

取 -20°C 甘油保存菌种接种到 CM0847 液体培养基上, 按预实验条件(温度为 35°C , 摇床转速 150 r/min, 接种量 4%)培养 45 h 后连续转接 2 次, 所得活化菌种作为实验用菌种。菌种经鉴定确定为腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)。

2.2.2. 腐败希瓦氏菌生长最适 pH 值的确定

以 CM0847 培养基为空白对照, 配制 pH 值分别为 6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 的 CM0847 液体培养基, 按预实验条件培养后测定菌体密度, 每组设置 3 个平行。

2.2.3. 培养基组分的优化

以 CM0847 培养基为空白对照, 分别以 10% (w/v) 的含量替代 CM0847 培养基中的碳源、氮源、无机盐。碳源: 葡萄糖、乳糖、半乳糖、麦芽糖、鼠李糖、D-山梨醇。氮源: 酵母提取物、牛肉膏、硫氨酸、尿素、醋酸铵。无机盐: 七水合硫酸、氯化钾、磷酸氢二钾、氯化钙、磷酸二氢钾。按预实验条件培养后测定菌体密度, 每组设置 3 个平行。

2.2.4. 培养基各组分浓度梯度的筛选

以 CM0847 培养基为空白对照, 用筛选出来的最优碳源、氮源、无机盐分别以 10%、20%、30%、40%、50% 的浓度梯度添加至 CM0847 培养基中。按预实验条件培养后测定菌体密度, 每组设置 3 个平行。

2.2.5. 发酵培养基的正交优化

以筛选出的三个最优浓度梯度替代 CM0847 培养基中的碳源、氮源、无机盐, 确定正交试验时的浓度。设置 3 因素 3 水平 L₉ (3³) 正交实验, 按预实验条件培养后测定菌体密度(*OD*₆₀₀)和菌体干重[9]研究腐败希瓦氏菌的最适生长条件[10], 每组设置 3 个平行。

3. 结果与分析

3.1. 培养基 pH 值对腐败希瓦氏菌生长的影响

由图 2 可看出, 随着 pH 的升高菌体密度呈现先升高后降低的趋势, 在 pH 值为 7.5 时最高。说明腐败希瓦氏菌适宜在弱碱性条件下生长, 而不适宜在过酸或过碱性的环境中生长。因此在后期实验中, 在 pH 值为 7.5 的条件下培养腐败希瓦氏菌。

3.2. 不同种类的碳源对腐败希瓦氏菌生长的影响

如图 3, 与对照组相比 L-鼠李糖组的菌体密度显著降低, 而麦芽糖、D-山梨醇、D-乳糖组与对照组相比菌体密度差异不大, 葡萄糖、D-半乳糖组与对照组相比菌体密度显著提高, 且葡萄糖组菌体密度最高, 说明葡萄糖最有利于腐败希瓦氏菌的生长。在日常生活中, 由于葡萄糖应用广泛, 且经济易得, 所以后期实验选定葡萄糖作为碳源添加物。

3.3. 不同种类的氮源对腐败希瓦氏菌生长的影响

由图 4 可知, 与对照组相比牛肉膏、醋酸铵、硫氨酸对菌体密度的提高显著, 牛肉膏组菌体密度相对于其他组最高, 因此后期正交实验选用牛肉膏作为氮源添加物。酵母提取物、尿素组与对照组相比在菌体密度上差异不明显, 其中尿素组菌体密度低于对照组说明腐败希瓦氏菌不适宜在此环境中生长。

3.4. 不同无机盐对腐败希瓦氏菌生长的影响

最优无机盐筛选结果由图 5 可知, 七水合硫酸、氯化钾、磷酸氢二钾、氯化钙、磷酸二氢钾组菌体密度均低于对照组, 其中磷酸二氢钾组的菌体密度显著低于对照组, 说明腐败希瓦氏菌不擅于利用此种无机盐, 而氯化钠组菌体密度显著高于其他各组, 说明氯化钠最有利于腐败希瓦氏菌的生长。因此后期正交实验选用氯化钠作为无机盐添加物。

3.5. 不同葡萄糖浓度对腐败希瓦氏菌生长的影响

由图 6 可知, 菌体密度随着葡萄糖浓度梯度的升高而呈现先升高后降低的趋势, 说明低浓度梯度的葡萄糖有利于腐败希瓦氏菌的生长, 因此选用 10%、20%、30% 的低浓度梯度葡萄糖添加量作为正交试验的三个水平。对牛肉膏浓度梯度的筛选, 由图可知菌体密度随着牛肉膏浓度梯度的升高而逐渐升高, 说明腐败希瓦氏菌适于在高浓度梯度的牛肉膏环境中生长, 因此选用 30%、40%、50% 的高浓度梯度牛肉膏添加量作为正交试验的三个水平。菌体密度随着氯化钠浓度梯度的升高而逐渐升高, 高浓度梯度的氯化钠组与对照组之间相比菌体密度显著提高。而低浓度梯度组菌体密度提高不显著。因此, 选用 30%、40%、50% 的高浓度梯度氯化钠添加量作为正交试验的三个水平。

3.6. 培养基优化实验结果

以菌体干重作为评价指标, 由表 1 正交结果分析表明各营养成分最优组合为 A1B1C1, 表明在 CM0847 培养基的基础上添加 10% 的葡萄糖、30% 的牛肉膏以及 30% 的氯化钠, 即添加葡萄糖 2 g, 牛肉膏 6 g, 氯化钠 1.5 g 时最有利于腐败希瓦氏菌的生长。由本实验结果可得出碳源对菌体生长影响最显著、氮源次

之、无机盐影响最小，即葡萄糖对腐败希瓦氏菌生长影响最显著，牛肉膏次之、氯化钠影响最小。

3.7. 正交实验验证

在相同的条件下采用 CM0847 培养基与优化的培养基培养腐败希瓦氏菌，优化后的培养基菌体干重增加了 11.1168 g/L (见表 2)。

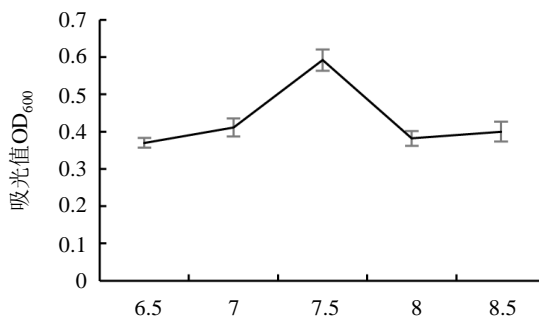


Figure 2. Effect of pH on the growth of *Shewanella putrefaciens*

图 2. pH 对腐败希瓦氏菌生长的影响

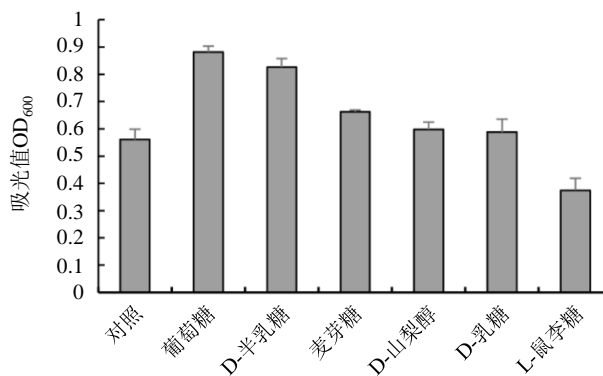


Figure 3. Effect of different Carbon Sources on the growth of *Shewanella putrefaciens*

图 3. 碳源对腐败希瓦氏菌生长的影响

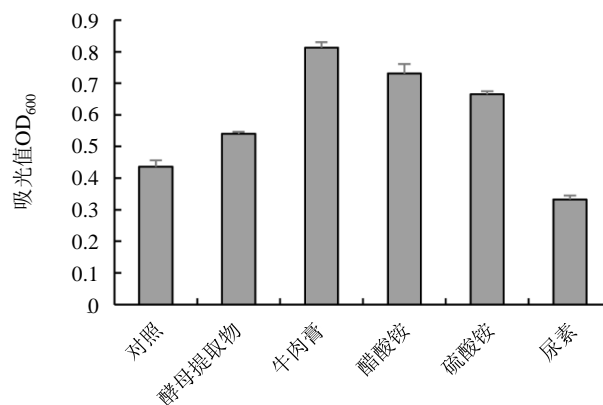


Figure 4. Effect of different Nitrogen Sources on the growth of *Shewanella putrefaciens*

图 4. 不同氮源对腐败希瓦氏菌生长的影响

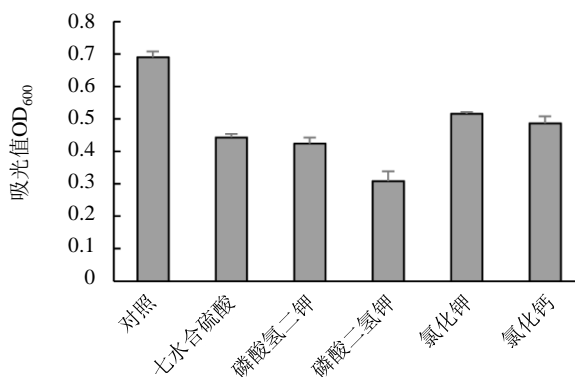


Figure 5. Effect of different Inorganic Salts on the growth of *Shewanella putrefaciens*

图 5. 不同无机盐对腐败希瓦氏菌生长的影响

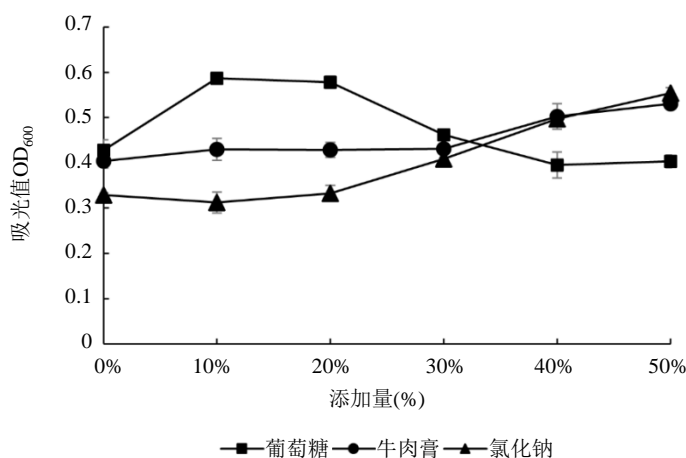


Figure 6. Effect of different concentrations of Glucose, beef extract and Sodium Chloride on the growth of *Shewanella putrefaciens*

图 6. 不同浓度葡萄糖, 牛肉膏及氯化钠对腐败希瓦氏菌生长的影响

Table 1. Orthogonal design and the results of orthogonal experiment

表 1. 发酵培养基正交试验结果

实验号	(A)	(B)	(C)	菌体干重(g/L)
1	1 (10%)	1 (30%)	1 (30%)	19.29
2	1 (10%)	2 (40%)	2 (40%)	13.29
3	1 (10%)	3 (50%)	3 (50%)	11.29
4	2 (20%)	1 (30%)	2 (40%)	13.76
5	2 (20%)	2 (40%)	3 (50%)	13.05
6	2 (20%)	3 (50%)	1 (30%)	8.232
7	3 (30%)	1 (30%)	3 (50%)	10.11
8	3 (30%)	2 (40%)	1 (30%)	8.408
9	3 (30%)	3 (50%)	2 (40%)	8.110
K1	14.623	14.387	11.977	
K2	11.681	11.583	11.72	
K3	8.876	9.211	11.483	
R	5.747	5.176	0.494	

Table 2. Verification of orthogonal test results**表 2.** 正交试验结果验证

培养基类型	菌体吸光值(OD_{600})	菌体干重(g/L)
CM0847 培养基	0.608	8.173
优化培养基	0.769	19.29

4. 结果

由本实验结果得出优化后的培养基成分为：胰蛋白胨 15.0 g，大豆蛋白胨 5.0 g，氯化钠 6.5 g，葡萄糖 2 g，牛肉膏 6 g，琼脂 13.0 g，蒸馏水 1.0 L，pH 7.5。

5. 讨论

以正交实验菌体在 OD_{600} 的吸光值及菌体干重计算得出的结果均可得出在原培养基的基础上当葡萄糖以 10%、牛肉膏以 30%，氯化钠以 30% 的添加量时菌体密度及菌体干重达到最高。作为机体生长的主要能源物质，微生物对碳源的利用效率将直接影响自身生长与代谢作用[11]。同时，由本实验结果得出碳源对菌体生长影响最显著、氮源次之、无机盐影响最小。此外，在优化后的培养条件中，培养腐败希瓦氏菌菌体干重较 CM0847 培养基提高了 136.02%。优化后的培养基使用葡萄糖、牛肉膏这两种成分经济易得，并且对腐败希瓦氏菌菌体生长具有显著提高的效果，为以后大批量生产希瓦氏菌及胞外聚合物(EPS)提供了基础。

参考文献

- [1] 纪小凤, 郑娜, 王洋, 等. 中国城市土壤重金属污染研究现状及展望[J]. 土壤与作物, 2016, 5(1): 42-47.
- [2] 李玲, 谭力, 段丽萍, 等. 食品重金属污染来源的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(4): 238-243.
- [3] 商宝娣, 杨星, 李正友, 等. 希瓦氏菌的研究进展[J]. 福建农业, 2015(7): 152-154.
- [4] Kim, D., Baik, K.S., Kim, M.S., et al. (2007) *Shewanella putrefaciens* sp. nov. Isolated from the Gut Microflora of Abalone, *Haliotis discus hannai*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **57**, 2926-2931. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65257-0>
- [5] Zacharoff, L.A., Morrone, D.J. and Bond, D.R. (2017) *Geobacter sulfurreducens* Extracellular Multiheme Cytochrome PgcA Facilitates Respiration to Fe(III) Oxides But Not Electrodes. *Frontiers in Microbiology*, **8**. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02481>
- [6] Liu, S.H., Zeng, G.M., Niu, Q.Y., et al. (2016) Bioremediation Mechanisms of Combined Pollution of PAHs and Heavy Metals by Bacteria and Fungi: A Mini Review. *Bioresource Technology*, **224**, 25-33.
- [7] Xiao, X., Ma, X.B., Yuan, H., et al. (2015) Photocatalytic Properties of Zinc Sulfide Nanocrystals Biofabricated by Metal-Reducing Bacterium *Shewanella oneidensis* MR-1. *Journal of Hazardous Materials*, **288**, 134-139. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.02.009>
- [8] Liu, H.L., Liu, Y.W., Shen, T.L., et al. (2016) Characterization and Application of a Common Epitope Recognized by a Broad-Spectrum C4 Monoclonal Antibody against Capsid Proteins of Plant Potyviruses. *Applied Microbiology & Biotechnology*, **100**, 1853-1869. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7116-x>
- [9] 唐雪鹭. 一株产糖脂假单胞菌的优化培养及其产物组成和表面活性的研究[D]: [硕士学位论文]. 广州: 华南理工大学, 2016.
- [10] 张洪玉, 唐夏, 夏磊, 等. 鲍鱼希瓦氏菌发酵条件的优化[J]. 上海海洋大学学报, 2017, 26(2): 301-306.
- [11] 王希睿, 余萍, 鲁安怀. 不同碳源下粪产碱杆菌的生长代谢及碳氮比对其反硝化能力的影响[J]. 化学通报, 2014, 77(4): 370-374.

知网检索的两种方式：

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2332-8010，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：wpt@hanspub.org