一株胶冻样芽胞杆菌的分离鉴定及其培养条件优化

王亚东[1], 陈玉杰[1], 孙起浩强[2], 刘 斌[3], 张超波[1,2,*]
1. 山东农满谊农业科技有限公司, 山东 聊城, 252100
2. 聊城大学, 药学与食品工程学院, 山东 聊城, 252000
3. 聊城市政务服务综合受理中心, 山东 聊城, 252000

摘要: 胶冻样芽孢杆菌（*Paenibacillus mucilaginosus*）是一种能分解硅酸盐矿物的细菌，具有溶磷解钾作用，是一种重要的微生物菌肥产品，其市场经济效益高。本研究首先从农田土壤中分离得到一株形态学观察疑似胶冻样芽孢杆菌的菌株，通过 16S rDNA 序列分析方法，确定其为胶冻样芽孢杆菌。同时对其培养基各组分用量进行单因素实验，进一步设计正交实验，最终确定最佳发酵条件。实验结果表明：（1）筛选菌株确定为胶冻样芽孢杆菌；（2）该菌株最佳发酵条件为 2.0 g/L 麦芽浸粉、2.5 g/L 可溶性淀粉、0.25 g/L 碳酸钙、2.5 g/L 脯氨酸、0.02 g/L 硫酸锰、0.02 g/L 氯化锰以及 1.25 g/L 硫酸镁。该研究将为胶冻样芽孢杆菌的工业化应用提供理论依据以及数据支撑。

关键词: 分离；鉴定；培养条件优化；胶冻样芽胞杆菌

Isolation, Identification, and Fermentation Condition Optimization of *Paenibacillus mucilaginosus* Strain

WANG Ya-dong[1]，Chen Yu-jie[1]，SUNQI Hao-qiang[2]，LIU Bin[4]，ZHANG Chao-bo[1,2,*]
1. Shandong Nongmanyi Agricultural Technology Co., Ltd, Liaocheng 252100, China
2. School of Pharmaceutical Sciences and Food Engineering, Liaocheng University, Liaocheng 252000, China
3. Liaocheng Government Affairs Service Comprehensive Service Center, Liaocheng 252100, China

Abstract: *Paenibacillus mucilaginosus* is a bacterium capable of decomposing silicate minerals, exhibiting phosphate-dissolving and potassium-releasing abilities. It serves as an important microbial fertilizer product with significant market economic benefits. This study initially isolated a strain from farmland soil that was morphologically suspected to be *Paenibacillus mucilaginosus*. Through 16S rDNA sequence analysis, it was confirmed as *Paenibacillus mucilaginosus*. Simultaneously, single-factor experiments were conducted to optimize the concentrations of various medium components, followed by an orthogonal experimental design to determine the optimal culture conditions. The experimental results showed that: (1) The screened strain was identified as *Paenibacillus mucilaginosus*; (2) The optimal culture conditions for this strain were 2.0 g/L malt extract, 2.5 g/L soluble starch, 0.25 g/L calcium carbonate, 2.5 g/L L-proline, 0.02 g/L manganese sulfate, 0.02 g/L manganese chloride, and 1.25 g/L magnesium sulfate. This study will provide a theoretical basis and data support for the industrial application of *Paenibacillus mucilaginosus*.

Keywords: Isolation; Identification; Fermentation Condition Optimization; *Paenibacillus mucilaginosus*

钾是高等植物生长发育过程中不可或缺的营养元素，通常以离子态或可溶性盐的形式吸附于原生质表面，在促进蛋白质合成、参与光合作用以及催化多种酶促反应等关键生理过程中发挥重要作用[1]。我国耕地土壤中钾元素总储量较为丰富，然而约 95%的钾以钾长石、云母等矿物形态存在，无法以钾离子形态溶于土壤溶液中，因而难以被植物根系直接吸收利用[2]。近年来，受土壤养分失衡的影响，耕地中可溶性钾含量持续降低，已成为限制作物正常生长的主要因素之一。因此，如何将土壤中的含钾硅酸盐矿物高效转化为作物可吸收的速效钾，从而提升土壤有效钾水平，已成为农业科技领域的重要研究课题。

解钾微生物是指能够通过自身代谢活动将土壤中难溶性含钾矿物（如长石、云母等）中的钾转化为可溶态，从而释放出水溶性钾的一类功能微生物[3]。该类微生物在纯培养条件及自然土壤环境中均表现出解钾能力。胶冻样芽孢杆菌（*Paenibacillus mucilaginosus*），亦称胶质芽孢杆菌或硅酸盐细

菌，是常见的解钾微生物，具备解钾、溶磷以及分泌植物生长激素等多种功能。该菌能够通过分泌有机酸、多糖等代谢产物，分解土壤中的硅酸盐矿物，释放出可被植物吸收利用的钾、磷等营养元素，从而提升土壤肥力并促进作物生长[4]。此外，胶冻样芽孢杆菌还可分泌植物生长激素，并在土壤中形成优势菌群，抑制病原菌的生长[5]。目前，该菌株主要作为微生物肥料使用，具有应用范围广、增产效果显著等特点[6]。

目前，已有大量研究围绕胶冻样芽孢杆菌的分离筛选、分类鉴定、发酵工艺优化及田间应用效果评价等方面展开。例如，叶伟伟等通过优化培养基和培养条件，显著提高了菌株的解钾率[1]；雷晶晶等从烟草根际土壤中分离得到解钾能力较强的菌株[7]；李华等通过诱变育种获得了抗逆性和解钾能力均有所提升的突变株[8]。然而，由于菌株来源、生态适应性及代谢特性存在差异，不同菌株的最佳培养条件和功能活性往往具有较大变异。因此，持续分离筛选具有优良农艺性状的新菌株，并优化其培养条件，对推动微生物肥料产业化具有重要意义。本研究从农田土壤中筛选获得一株胶冻样芽孢杆菌，采用单因素试验与正交设计方法优化其发酵培养基条件，以提升菌体生物量，为该菌株在微生物肥料开发中的应用提供优良菌种资源与理论支撑。

1 材料与方法

1.1 溶液配置

胶冻样类液体培养基：蔗糖 30.0 g/L、硝酸钠 1.5 g/L、磷酸氢二钾 0.5 g/L、硫酸镁 0.5 g/L、氯化钾 0.5 g/L、硫酸亚铁 0.01 g/L、麦芽浸粉 2.0 g/L、可溶性淀粉 3.0 g/L、碳酸钙 0.5 g/L、脯氨酸 2.5 g/L、硫酸猛 0.02 g/L、氯化锰 0.02 g/L、碳酸镁 1.25 g/L。

胶冻样类固体培养基：在液体培养基基础上添加琼脂粉（15.0 g/L）。

1.2 菌株分离

本研究所使用的土壤样本来自聊城大学东湖水系周边农田土壤。准确称量 10.0 g 农田土样，溶解于已灭菌的 100.0 mL 蒸馏水中，充分震荡 10.0 min，获得菌悬液。静置分层以后，吸取 1.0 mL 上清液，加入 9.0 mL 水，制作成 10^{-1} 的土壤稀释液。根据以上方法，分别制成 10^{-5}，10^{-6}，10^{-7} 的菌悬液。取一定量的菌液，涂布于胶冻样类培养基固体平板上，30℃培养 1 至 2 d，观察平板上菌落生长情况。挑取单菌落划线分离，获得纯培养。取分离纯化后的菌种，接种于含有胶冻样类液体培养基的三角瓶中，于 30℃生化培养箱培养活化 24 h 备用。

1.3 菌株鉴定

菌株形态学鉴定：对筛选出的菌株进行形态学观察，包括菌落形态、颜色、质地等宏观特征，以及显微镜下的细胞形态等微观特征。

分子生物学鉴定：使用接种环将纯化后的菌株接种到含有 25.0 mL 胶冻样类液体培养基的三角瓶中，并在 30℃，200 rpm 摇床上培养 24 h；利用基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株的基因组；以菌株的基因组为模板，利用通用引物（27F/1492R）扩增 16S rDNA 序列；经电泳验证后，切胶回收，送至生工生物技术有限公司测序。测序结果用 BLAST 软件对比，然后将对比结果从 NCBI 核酸数据库以 FASTA 格式下载，通过 MEGA 6.0 软件制作系统发育树。

1.4 单因素实验设计

以胶冻样类培养基作为基础培养基，选取代表性的 8 种营养组分作为考察要素（表 1）。设置系列浓度梯度，考察相关要素对菌株生物量积累的影响。对于每个设定的浓度，均设置 3 个平行样本，按照 10%接种量将种子液接种于胶冻样类培养基，于 30℃，180 rpm 下进行培养，分别在不同时间点取样，借助吸光度值（OD_{600}）来表征菌株的生物量积累状况。

表 1 单因素实验表

Table 1 Single-factor experiments

成 分	浓度梯度（g/L）
麦芽浸粉	1.0、1.5、2.0、2.5、3.0
可溶性淀粉	1.0、2.5、5.0、7.5、10.0
碳酸钙	0.10、0.25、0.50、0.75、1.00
脯氨酸	1.00、2.00、3.00、4.00、5.00
硫酸锰	0.005、0.010、0.015、0.020、0.025
氯化锰	0.005、0.010、0.015、0.020、0.025
硫酸亚铁	0.010、0.015、0.020、0.025、0.030
硫酸镁	0.50、0.75、1.00、1.25、1.50

1.5 正交实验设计

在上述单因素实验的基础上，通过正交实验设计 $L_{18}(3^7)$，考察各因素之间的交互作用，分析影响菌株生物量积累的关键影响要素（表 2）。

表 2 正交试验因素与水平

Table 2 Factors and levels of orthogonal design

因素	水平		
	1	2	3
麦芽浸粉	2.00	2.50	3.00
可溶性淀粉	2.00	2.50	3.00
碳酸钙	0.25	0.50	0.75
脯氨酸	2.50	3.00	3.50
硫酸锰	0.010	0.015	0.020
氯化锰	0.010	0.015	0.020
硫酸镁	1.00	1.25	1.50

1.6 数据处理

所有实验数据均采用平均值±标准差（means±SD）表示，利用 GraphPad Prism 9.0 进行数据的可视化分析。

2 结果与分析

2.1 菌株分离与鉴定

2.1.1 形态学特征

如图 1 所示，菌落呈现出圆形的形态，其颜色为乳白色，边缘较为整齐，表面处于湿润的状态且带有黏液。通过 1×100 倍镜检照片可以看出胶冻样芽孢杆菌菌体呈杆状，两端钝圆，菌体外具大粘液状荚膜，使菌体看起来粗长且包有肥大荚膜。此外，在培养后期菌体中多形成芽孢，芽孢中生

或近端生，呈椭圆形。

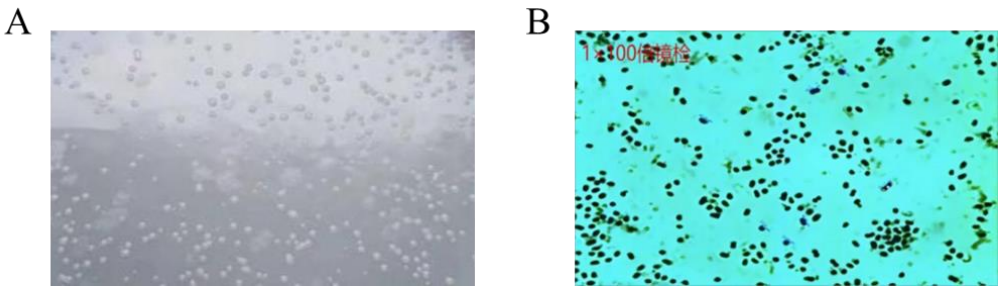

图 1 胶冻样芽孢杆菌菌落形态（A）和显微镜镜检观察结果(B,100×)

Fig. 1 Colonial morphology of *Paenibacillus mucilaginosus* (A) and microscopic examination results (B, 100X)

2.1.2 分子生物学鉴定

将 PCR 扩增产物送至北京擎科生物科技股份有限公司进行测序，将测序结果提交至美国国立生物技术信息中心（National center for biotechnologyinformation，NCBI）的数据库中，利用 BLAST 工具进行对比分析，收集相关菌株的 16S rDNA 序列，并将这些序列导入 MEGA 12.0 软件中，构建系统发育树。

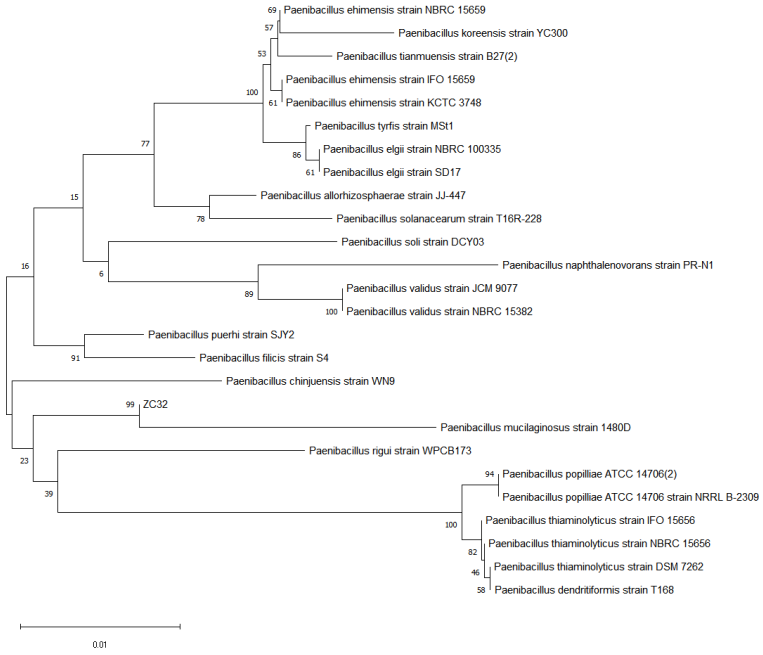

图 2 基于 16SrDNA 序列构建的系统发育树

Fig. 2 The phylogenetic tree constructed based on 16S rDNA sequence

2.2 单因素实验

2.2.1 麦芽浸粉对菌株生长形成的影响

麦芽浸粉是芽孢杆菌培养基优化中常用的氮源，其能够提供易于吸收的有机氮化合物和生长因子，从而有效促进菌株的生长与繁殖。因此，本研究选择麦芽浸粉作为胶冻样芽胞杆菌培养基的氮源。如图 3 所示，不同浓度的麦芽浸粉对胶冻样芽胞杆菌的生长影响存在显著差异。当麦芽浸

粉浓度为 2.5 g/L 时，OD_{600} 值最高。结果表明，菌株生长的最佳麦芽浸粉浓度为 2.5 g/L。

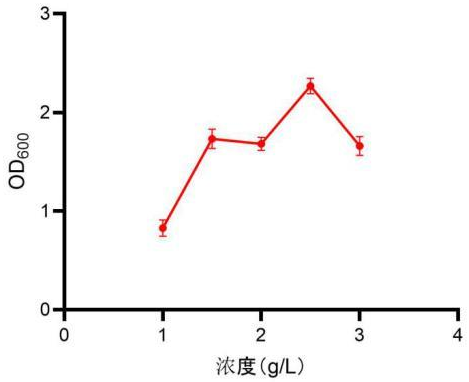

图 3 麦芽浸粉对菌株生长的影响

Fig. 3 Effect of Malt Extract Powder on Bacterial Growth

2.2.2 可溶性淀粉对菌株生长形成的影响

可溶性淀粉作为一种重要的碳源，易于被微生物直接利用，为菌体生长提供持续稳定的能源和碳架，其提供的营养物质促使菌体量不断增加。如图 4 所示，随着可溶性淀粉添加浓度的不断增加，菌株的生长出现先增后降的总体趋势。当可溶性淀粉浓度为 2.5 g/L 时，菌株 OD_{600} 值达到峰值。结果表明，菌株生长的最佳可溶性淀粉浓度为 2.5 g/L。

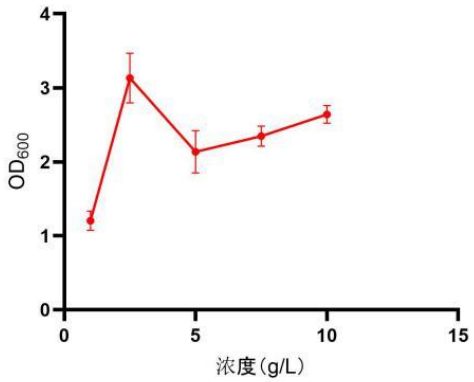

图 4 可溶性淀粉对菌株生长的影响

Fig. 4 Effect of Soluble Starch on Bacterial Growth

2.2.3 碳酸钙对菌株生长形成的影响

先前的研究证实碳酸钙可以促进菌株的生长。本研究选取碳酸钙为胶冻样芽胞杆菌液体发酵的最佳无机盐。如图 5 所示，不同浓度的碳酸钙对胶冻样芽胞杆菌的生长影响存在显著差异。当碳酸钙浓度为 0.5 g/L 时，菌株 OD_{600} 值最高。结果表明，菌株生长的最佳碳酸钙浓度为 0.5 g/L。

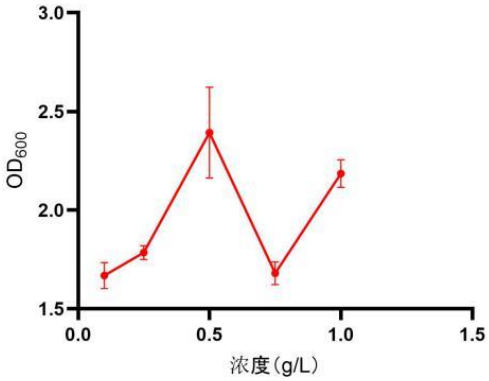

图 5 碳酸钙对菌株生长的影响

Fig. 5 Effect of Calcium Carbonate on Bacterial Growth

2.2.4 脯氨酸对菌株生长形成的影响

脯氨酸可以维持细胞的渗透压平衡，本研究考察了脯氨酸添加量对胶冻样芽胞杆菌液体发酵的影响。如图 6 所示，随着脯氨酸添加浓度的不断增加，菌株的生长出现先增后降的总体趋势。当脯氨酸浓度为 3.0 g/L 时，菌株 OD_{600} 值达到峰值。结果表明，菌株生长的最佳脯氨酸浓度为 3.0 g/L。

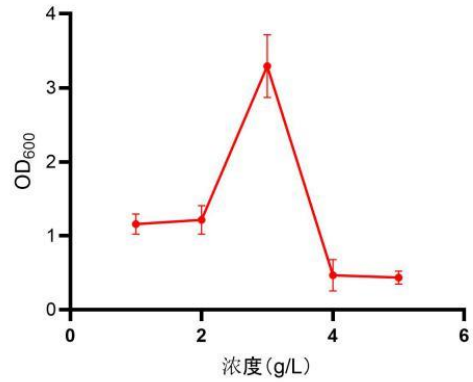

图 6 脯氨酸对菌株生长的影响

Fig. 6 Effect of Proline on Bacterial Growth

2.2.5 金属离子对菌株生长形成的影响

金属离子为菌体生长提供了必需的微量元素，这些离子作为酶的辅助因子、抗氧化剂、结构稳定剂等，参与调控细菌的能量代谢、蛋白质合成等多种核心生理过程。本研究考察了硫酸亚铁、硫酸镁、硫酸锰与氯化锰添加量对胶冻样芽胞杆菌液体发酵的影响。结果表明，硫酸亚铁浓度改变对菌株生长影响不明显（图 7A）。然而，不同浓度的硫酸镁对胶冻样芽胞杆菌的生长影响存在显著差异。当硫酸镁浓度为 1.25 g/L 时，菌株 OD_{600} 值最高。结果表明，菌株生长的最佳硫酸镁浓度为 1.25 g/L（图 7B）。与此同时，随着硫酸锰与氯化锰添加浓度的不断增加，菌株的生长出现先增后降的总体趋势（图 7C&D）。当硫酸锰与氯化锰浓度为 0.015 g/L 时，菌株 OD_{600} 值达到峰值。结果表明，菌株生长的最佳硫酸锰与氯化锰浓度为 0.015 g/L。

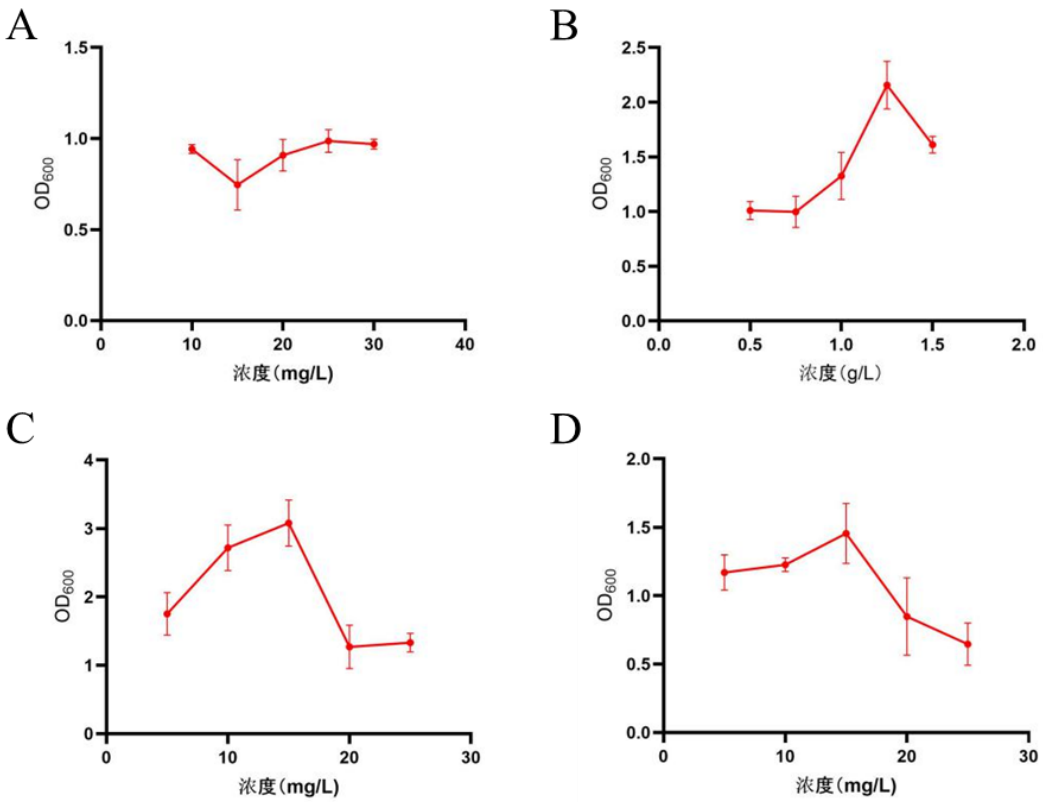

图 7 金属离子对菌株生长形成的影响

Fig. 7 Effect of Metal Ions on Bacterial Growth

2.3 正交试验设计

基于单因素实验结果，硫酸亚铁添加量对菌株生长的影响不显著。因此，本研究选取麦芽浸粉、可溶性淀粉、碳酸钙、脯氨酸、硫酸锰、硫酸镁以及氯化锰 7 个营养要素设计正交实验（表 3）。结果表明，菌株生长的的最佳组合为 2.0 g/L 麦芽浸粉、2.5 g/L 可溶性淀粉、0.25 g/L 碳酸钙、2.5 g/L 脯氨酸、0.02 g/L 硫酸锰、0.02 g/L 氯化锰以及 1.25 g/L 硫酸镁。极差分析表明，7 个因素中氯化锰对菌株生长的影响最大，其次是麦芽浸粉、碳酸钙、硫酸锰、硫酸镁、脯氨酸，可溶性淀粉对菌株生长的影响最小。在最优条件下，菌株的 OD_{600} 值达到 4.22。

表 3 正交试验结果

Table 3 Results of orthogonal design

因素	麦芽浸粉	可溶性淀粉	碳酸钙	脯氨酸	硫酸锰	氯化锰	硫酸镁	OD_{600}
试验 1	2.00	2.00	0.25	2.50	0.010	0.010	1.00	1.98
试验 2	2.00	2.50	0.50	3.00	0.015	0.015	1.25	0.75
试验 3	2.00	3.00	0.75	3.50	0.020	0.020	1.50	2.08
试验 4	2.50	2.00	0.25	3.00	0.015	0.020	1.50	1.87
试验 5	2.50	2.50	0.50	3.50	0.020	0.010	1.00	1.53
试验 6	2.50	3.00	0.75	2.50	0.010	0.015	1.25	1.72

试验 7	3.00	2.00	0.50	2.50	0.020	0.015	1.50	1.67
试验 8	3.00	2.50	0.75	3.00	0.010	0.020	1.00	1.27
试验 9	3.00	3.00	0.25	3.50	0.015	0.010	1.25	1.58
试验 10	2.00	2.00	0.75	3.50	0.015	0.015	1.00	1.86
试验 11	2.00	2.50	0.25	2.50	0.020	0.020	1.25	4.22
试验 12	2.00	3.00	0.50	3.00	0.010	0.010	1.50	2.20
试验 13	2.50	2.00	0.50	3.50	0.010	0.020	1.25	1.91
试验 14	2.50	2.50	0.75	2.50	0.015	0.010	1.50	1.76
试验 15	2.50	3.00	0.25	3.00	0.020	0.015	1.00	1.57
试验 16	3.00	2.00	0.75	3.00	0.020	0.010	1.25	1.57
试验 17	3.00	2.50	0.25	3.50	0.010	0.015	1.50	1.71
试验 18	3.00	3.00	0.50	2.50	0.015	0.020	1.00	1.47
K1	8.85	7.73	8.70	8.53	7.99	7.83	6.70	
K2	7.25	7.57	6.75	7.00	6.55	6.22	7.75	
K3	6.86	7.66	7.51	7.43	8.42	8.91	8.51	
极差	0.33	0.03	0.32	0.25	0.31	0.45	0.30	

3 结论

（1）从农田土壤中分离得到一株形态学观察疑似胶冻样芽孢杆菌的菌株，通过 16S rDNA 序列分析方法，确定其为胶冻样芽孢杆菌；

（2）该菌株最佳发酵条件为 2.0 g/L 麦芽浸粉、2.5 g/L 可溶性淀粉、0.25 g/L 碳酸钙、2.5 g/L 脯氨酸、0.02 g/L 硫酸锰、0.02 g/L 氯化锰以及 1.25 g/L 硫酸镁；

（3）本研究为开发胶冻样芽孢杆菌生物菌肥提供优良菌种资源和理论依据。

参考文献

[1] 叶伟伟, 杨晓燕, 魏善强, 等.一株胶冻样芽孢杆菌培养条件的优化及其解钾活性[J].安徽农业科学, 2022(012): 050.

[2] 赵志浩, 徐银荣, 邱龙. 胶质芽胞杆菌的发酵工艺研究和田间应用[J].湖南农业科学, 2004(5): 4.

[3] 张爱民, 李乃康, 赵钢勇, 等. 土壤中解磷、解钾微生物研究进展[J]. 河北大学学报（自然科学版）, 2015, 35(4): 442.

[4] 吴向华, 刘五星. 胶冻样芽孢杆菌培养条件及发酵工艺的优化[J].江苏农业科学, 2006, (04): 155.

[5]吴小琴.硅酸盐细菌的应用概况[J].江西科学, 1997, (01): 60.

[6] 王鸿磊, 王红艳, 刘鹏丽, 等. 响应面法优化胶冻样芽孢杆菌发酵条件的研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(08): 63.

[7] 雷晶晶, 高可, 康业斌, 赵世民, 苗 圃. 烟株根围土壤中胶冻样芽孢杆菌解钾能力研究[J]. 西南农业学报, 2022, 35(9): 2124.

[8] 李华, 陈万仁, 王光龙. 新型胶冻样芽孢杆菌及其突变株的诱变选育[J]. 土壤, 2003, 35(1): 3.

基金项目: 校企合作项目——合成生物学产品开发（K23LD81）。

第 1 作者简介: 王亚东（1990-），女，研究方向：微生物种质资源开发。E-mail: 15206642957@163.com。

*** 通讯作者简介:** 张超波（1982-），男，博士研究生，副教授，硕士生导师，研究方向：微生物种质资源开发。E-mail: zhangchaobo@lcu.edu.cn。