

# 一株海洋几丁质酶产生菌的筛选及其产酶条件的初步研究

孙菽蔚<sup>1</sup>, 王子峰<sup>1,2</sup>, 岳海东<sup>1</sup>, 肖天<sup>1</sup>

(1.中国科学院 海洋研究所 海洋生态与环境科学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2.中国科学院 研究生院, 北京 100049)

**摘要:** 从胶州湾的海泥中分离到一株几丁质酶高产菌株。经 16S rDNA 序列分析, 认为该菌属于假交替单胞菌 (*Pseudoaltermonas*), 并将其命名为 SS01。对该菌产几丁质酶的最佳培养条件进行了研究, 发现与其它几丁质酶产生菌相比, SS01 菌株的最适产酶温度较低, 酶活较高。在 Zobell 2216E 培养基中, SS01 菌株培养 9 h 进入稳定期。胶体几丁质可诱导该菌几丁质酶的产生。在几丁质培养基中, SS01 菌株产酶的适宜条件是: 培养温度 24 ℃, 培养基起始 pH 7.0 左右, 蛋白胨为 N 源(5 g/L), 胶体几丁质为 C 源(5 g/L), 170 r/min 振荡培养 130 h, 酶活可达 116.2 U/mL。

**关键词:** 海洋细菌; 假交替单胞菌 (*Pseudoaltermonas*); 几丁质酶; 培养条件

**中图分类号:** Q93      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-3096(2007)05-0010-07

几丁质是自然界中含量最丰富的有机聚合物之一。几丁质的降解产物用途广泛: 几丁寡糖具有抗菌活性, 可作为食品和化妆品的添加剂, 也可作为防止土壤污染的净化剂等<sup>[1]</sup>。传统的几丁质降解方法主要依靠化学方法, 这类方法存在着严重的问题: 获得的壳聚寡糖乙酰化程度不均匀、理化性质不一致、环境污染严重等<sup>[2]</sup>。自然界中几丁质的降解主要是靠几丁质酶的作用。几丁质酶除降解几丁质外, 还可应用在化工、医学、环保等方面<sup>[3]</sup>。

目前人们已经对几丁质酶进行了较多的研究。自 Benecke<sup>[4]</sup>首次发现 *Bacillus chitinovorus* 能利用几丁质作为营养物以来, 几丁质酶已在许多微生物中被发现<sup>[5-7]</sup>。邱立友等<sup>[8]</sup>分离到一株几丁质酶活性较高的链霉菌菌株 (*Streptomyces* sp.)。吴根福等<sup>[9]</sup>从土壤中分离到降解几丁质的假单胞菌 (*Pseudomonas* sp. ww) 和短杆菌 (*Brevibacterium* sp. yy)。尹鸿翔等<sup>[10]</sup>对一株降解几丁质的粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) 的灭蝗作用进行了研究。目前对于可降解几丁质的细菌, 研究较多的有: 粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)<sup>[11,12]</sup>、环状芽孢杆菌 (*Bacillus circulans*)<sup>[13-15]</sup>、交替单胞菌 (*Alteromonas*)<sup>[16,17]</sup> 等。

海洋占地球表面积的 2/3, 在海洋环境中, 几丁质是最重要的营养源和能源<sup>[18,19]</sup>。海洋几丁质的降解主要靠海洋细菌产生的几丁质酶完成。对降解几丁质的海洋细菌的研究国外报道较多<sup>[20-22]</sup>。国内学者杨承勇等<sup>[23]</sup>从南海海水中分离到降解几丁质的弧菌 11211 (*Vibrio* sp.)。肖湘等<sup>[24]</sup>对海洋几丁质降解菌豚鼠气单胞菌 CB101 (*Aeromonas caviae*) 产生的几丁质酶系作了研究。作者报道了从胶州湾海泥中筛选、分离到降解几丁质的细菌, 并对酶活性较高的 SS01 菌株的生长特性、产酶条件等进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

几丁质由青岛东风化工厂生产, 胶体几丁质自制<sup>[25]</sup>,

收稿日期: 2005-09-19; 修回日期: 2006-01-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (40376048); 中国科学院知识创新项目 (KZCX3-SW-214)

作者简介: 孙菽蔚 (1982-), 女, 山东烟台人, 学士, 研究方向: 海洋微生物生态, 电话: 0532-82898586, E-mail: shuwei1130@yahoo.com.cn; 肖天, 通讯作者, E-mail: txiao@ms.qdio.ac.cn

其它试剂均为国产分析纯。

## 1.2 培养基

### 1.2.1 Zobell 2216E 培养基

酵母膏 1 g, 蛋白胨 5 g,  $\text{FePO}_4$  0.1 g, 陈海水 1 000 mL, pH 7.2 左右, 琼脂 20 g。

### 1.2.2 菌株筛选培养基

酵母膏 1 g,  $\text{FePO}_4$  0.1 g, 胶体几丁质 5 g, 陈海水 1 000 mL, pH 7.2 左右。

### 1.2.3 发酵培养基

以 Zobell 2216E 液体培养基为基础, 加入胶体几丁质 (5 g/L)。

## 1.3 泥样

取胶州湾不同站位的底泥样品。

## 1.4 几丁质降解菌的筛选、纯化

将胶州湾不同站位的海底泥样 (1 g) 用无菌海水稀释 ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ), 涂布于几丁质平板培养基上, 24 培养 7 d。选取透明圈明显的菌落, 将菌落在相同条件下划线分离 3 次以上。

## 1.5 几丁质降解菌的鉴定

### 1.5.1 电镜观察

挑选在平板上纯化好的单菌落接种于装有 10 mL Zobell 2216E 液体培养基的大试管中培养 16 h, 取 1 mL 离心, 弃上清。加无菌海水至 1 mL, 振荡摇匀后取 10  $\mu\text{L}$  菌液滴铜网, 干燥 24 h 后进行电镜 (日立 H8100) 观察。

### 1.5.2 革兰氏染色

参考《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[26]</sup>。

### 1.5.3 16S rDNA 序列测定与分析

取纯化后的 SS01 菌株, 对其进行 16S rDNA 序列的测定、分析, 以此为依据进行菌属的鉴定。用于 16S rDNA 序列扩增的上游引物 PF: 5' -AGAGTT-TGATCATGGCTC-3', 下游引物 PR: 5' -TAAGGAG-GTGATCCAACCGC-3' <sup>[27]</sup>。细菌基因组 DNA 的提取方法参照《精编分子生物学实验指南》<sup>[28]</sup>。PCR 扩增的条件为: 首先 94 预变性 3 min, 然后 94 1 min, 52 1 min, 72 1 min, 30 个循环, 最后 72 延伸 10 min。PCR 产物经电泳后切胶回收, 纯化后直接进行测序。提交的序列在 GenBank 中的登录号为 AY787763。序列用 BLASTN 软件在 GenBank 中进行同源性序列比较, 将遗传距离接近的菌株和分类地位清楚的标准对照菌株的 16S rDNA 序列用 Clustal X(1.8) 软件进行多序列比对 (Multiple

Alignment), 用系统发生推断软件包 MEGA (3.0) 进行系统发生树的构建。用 Kimura 双参数模型计算各序列间的分化距离, 采用邻接法 (Neighbor-joining Method) 获得系统树, 并通过自举分析 (Bootstrap) 进行置信度检测, 自举数据集为 1 000 次。

## 1.6 生长曲线的测定

种液培养 6 h 后按 1/100 的接种量接入装有 100 mL Zobell 2216E 的液体培养基中, 做 3 瓶, 每隔 1 h 取样测 OD<sub>600</sub>, 取平均值, 绘制生长曲线。

## 1.7 几丁质酶活性的测定

取发酵液 1.5 mL, 4 000 r/min 离心 10 min, 取 1 mL 上清, 加 1% 的几丁质溶液 1 mL, 40 反应 30 min 后, 10 000 r/min 离心 5 min。用 Somogi Bisefa 法测定还原糖含量<sup>[29]</sup>, 设置 3 个重复。1 U 的酶活定义为在最适条件下 30 min 内转化生成相当于 1  $\mu\text{g}$  葡萄糖的还原糖量的酶量。

## 2 结果

### 2.1 几丁质降解菌的筛选与鉴定

细菌用几丁质平板培养基分离、筛选、纯化, 从海泥样品中得到多株具有明显透明圈的菌株。对其中 5 株进行摇瓶复筛, 发现 SS01 菌株酶活最高, 以此菌株作为进一步试验的菌株。SS01 菌株在电镜下呈杆状 (图 1), 革兰氏染色阴性。

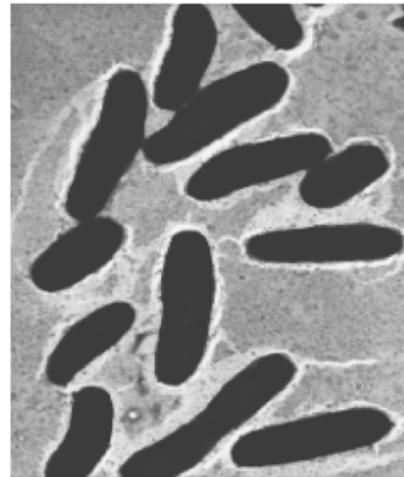


图 1 电镜下 SS01 菌株的形态

Fig. 1 Transmission electronic micrograph of strain SS01

SS01 菌株的 16S rDNA PCR 扩增片段长 1 472

bp。与 Genbank 中假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas*)，交替单胞菌和假单胞菌属的细菌较为接近。在构建的系统发生树上，SS01 与假交替单胞菌属的细菌同属一个分支，序列相似性最高，达 99% 以上 (图 2)。初步认为该菌属于假交替单胞菌。

## 2.2 SS01 菌株的生长特性及产酶条件的优化

### 2.2.1 SS01 菌株的生长特性

SS01 的生长曲线如图 3。以 Zobell 2216E 培养基为起始培养基，SS01 菌株在 3 h 左右进入指数期，9 h 左右进入稳定期。最高 OD<sub>600</sub> 值可达到 2.2。

### 2.2.2 温度对菌株 SS01 产酶的影响

表 1 显示了温度对菌体生长及几丁质酶产生的影响。在 4~24 范围内，SS01 菌株生长速度随温度升高而增加。当温度达到 24 时，平板上 24 h 内可见到明显的菌落，同时对几丁质的降解作用也非常明显。温度升高到 37 时，平板上没有明显的菌落，也没有出现透明圈。温度较低时，SS01 菌株生长缓慢，透明圈产生的时间也相应的延迟。以下试验选取 24 作为该菌培养和产酶的最适温度。

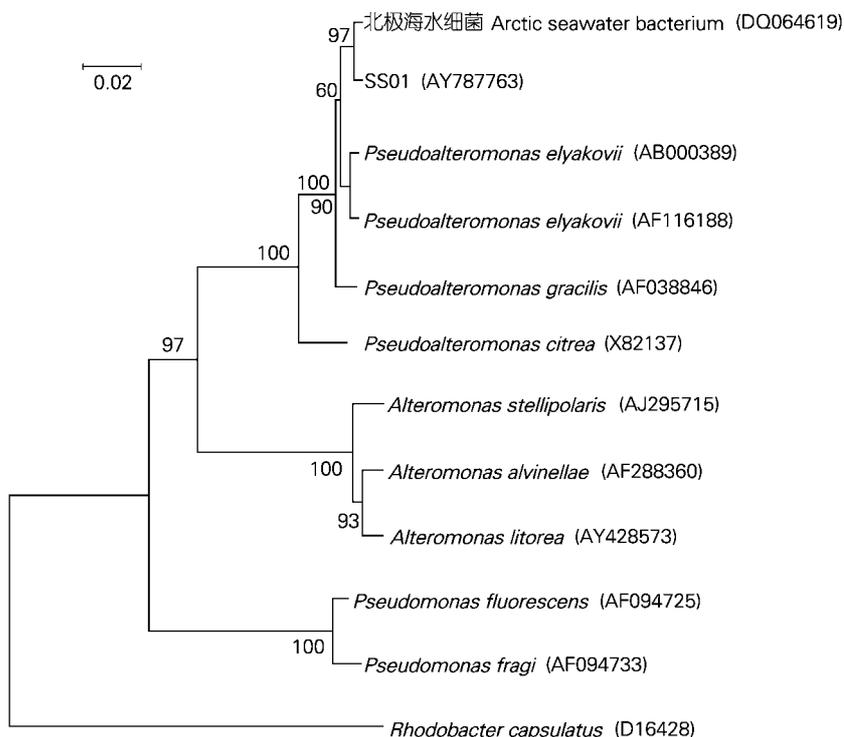


图 2 SS01 菌株的系统发育学地位

Fig. 2 The phylogenetic position of strain SS01

### 2.2.3 培养时间对产酶量的影响

SS01 菌株在发酵培养基中培养发酵，由图 4 可知，在开始培养的 2 d (48 h)，该菌产酶量较低，从第 3 天 (72 h) 开始，产酶量迅速增加，第 5 天 (120 h) 时，产酶量达到高峰。

SS01 菌株的生长曲线表明，该菌在适宜的条件下 9 h 左右可达到稳定期。这说明几丁质酶的产生是

SS01 菌株生长到一定时期后才产生的。这一结果显示 SS01 菌株产生的几丁质酶可能是一种诱导酶。

### 2.2.4 起始 pH 对产酶的影响

用 HCl 和 NaOH 溶液将 SS01 菌株产酶培养基的起始 pH 值分别调成 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0。培养至第 5 天时，测定发酵液的酶活力。结果见图 5。

由图 5 可以看出，当该菌生长到第 5 天 (120 h)，

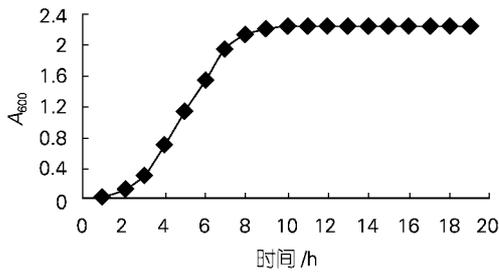


图3 SS01 菌株的生长曲线

Fig. 3 Growth curve of strain SS01

表1 温度对SS01 菌株产酶的影响

Tab.1 Effect of temperature on chitinase production

温度 ( )	时间 (h)				
	24	48	72	96	100
4	- , 0	- , 0	+ , 0	+ , 0	+ , 1
10	- , 0	- , 0	+ , 0	+ , 1	+ , 1
24	+ , 1	+ , 1	+ , 1	+ , 1	+ , 1
37	- , 0	- , 0	- , 0	- , 0	- , 0

注: + 表示有菌落生长, - 表示无菌落生长, 1 表示有透明圈, 0 表示无透明圈

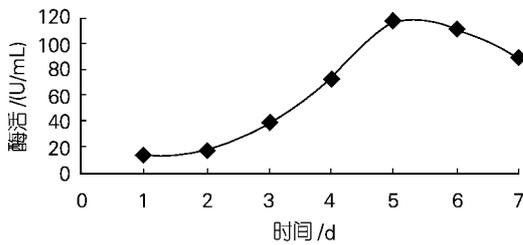


图4 培养时间对产酶量的影响

Fig. 4 Effect of cultivation time on chitinase production

培养基起始 pH 值为 5 时, 发酵液酶活较低, pH 在 6~8 之间时, 酶活较高。当 pH 为 7 时, 第 5 天 (120 h) 溶液的酶活最高。

2.2.5 N 源和 C 源对产酶的影响

分别以不同的 N 源和 C 源代替产酶培养基中的 N 源和 C 源进行产酶试验 (表 2)。结果表明: 有机 N 优于无机 N, 有机 N 中又以蛋白胨为好, 酶活较高。在 C 源比较中发现, 如果以葡萄糖、乳糖、蔗糖为 C 源, 则溶液检测不到几丁质酶酶活, 说明该菌株分泌

的几丁质酶是诱导酶。已有的文献表明, 不同的细菌对 N 源和 C 源的要求有所不同。邱立友等<sup>[8]</sup>在试验中发现, 链酶菌 A048 用无机 N 作为 N 源, 产酶效果优于用有机 N, 用几丁质的产酶效果优于用胶体几丁质。在对海洋细菌 11211 的产酶试验中, 杨承勇等<sup>[23]</sup>发现用酵母膏为 N 源 11211 菌株的产酶效果优于用蛋白胨。由此看来不同细菌产几丁质酶对 N 源和 C 源的要求不同。

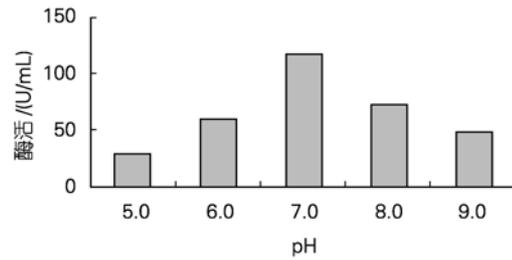


图5 培养基起始 pH 对产酶的影响

Fig. 5 Effect of initial pH on chitinase production

表2 不同 N 源和 C 源对产酶的影响

Tab.2 Effects of different nitrogen and carbon sources on chitinase production

S 源	酶活 (U/mL)	C 源	酶活 (U/mL)
蛋白胨	116.198	胶体几丁质	116.198
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	55.372	甲壳胺	64.959
KNO <sub>3</sub>	31.818	葡萄糖	0.000
酵母膏	56.612	乳糖	0.000
		蔗糖	0.000

2.2.6 培养基中胶体几丁质含量对产酶的影响

产几丁质酶试验发现, SS01 菌株发酵液中胶体几丁质的最佳质量浓度是 5 g/L (图 6)。开始时, 随着培养基中胶体几丁质质量浓度的增加, 产酶量也会随之增加, 但是当胶体几丁质的质量浓度达到一定值后, 发酵液的酶活降低, 产酶量减少。可能是由于胶体几丁质的分解产物对 SS01 菌株产几丁质酶有阻遏作用。

2.2.7 装瓶量对产酶的影响

在 200 mL 三角瓶中, 分别装入不同体积的产酶培养基, 24 h, 170 r/min 振荡培养 130 h, 取样测定

发酵液的酶活,发现装瓶量超过 50 mL 时,发酵液酶活降低。已知装瓶量的多少与体系的溶氧有关,这说明 SS01 菌株产几丁质酶需要适宜的溶氧。在 200 mL 三角瓶中装入 50 mL 液体培养基,振荡培养后测得的酶活最高。装瓶量太多或太少都不利于产酶。

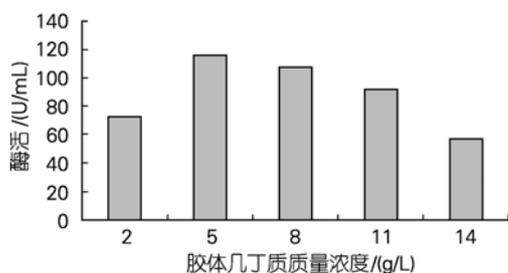


图 6 培养基中胶体几丁质的含量对产酶的影响

Fig. 6 Effect of colloid chitin concentration on chitinase production

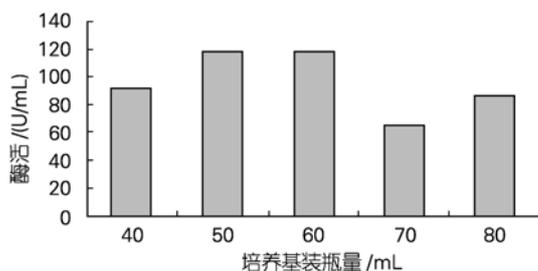


图 7 不同装瓶量对产酶的影响

Fig. 7 Effect of amount of medium on chitinase production

### 3 讨论

对分离到的一株高效几丁质酶产生菌 SS01 菌株进行了 16S rDNA 序列分析,初步判断该菌属于假交替单胞菌。目前该菌属中能产生几丁质酶的细菌国内还未见分离报道。从胶州湾不同站位的海泥中分离到多株可降解几丁质的细菌,对 2004 年 3 月各站位底泥样品的处理过程中发现,多数泥样中存在几丁质酶产生菌,数量最高可达  $10^3$  个/g。经 16S rDNA 序列分析发现这类细菌多数属于假交替单胞菌。这说明在胶州湾底泥中,可培养的几丁质酶产生菌中,假交替单胞菌是重要的优势菌群。

与已报道的几丁质酶产生菌相比,SS01 菌株的最适产酶温度较低。邱立友等<sup>[8]</sup>分离到的链霉菌 A048,产几丁质酶的最适温度为 30。尹鸿翔等<sup>[10]</sup>分离到的粘质沙雷氏菌,产酶的最适温度为 37。目前报

道的多数细菌产几丁质酶的最适温度都在 30 左右<sup>[9,23,24]</sup>。而 SS01 菌株的产酶最适温度为 24。对该菌进行系统发育学分析表明,该菌与几个属于低温菌属的细菌在系统发生树上位置比较靠近(图 2)。

试验定义在最适条件下 30 min 内转化生成相当于 1  $\mu$ g 葡萄糖的还原糖的酶量为 1 U 的酶活,SS01 菌株发酵液的几丁质酶酶活最高为 116.2 U/mL。目前对几丁质酶活的定义比较混乱,如果以最适条件下每分钟内转换 1  $\mu$ mol 的还原糖的酶量为 1U 作为标准,则 SS01 菌株发酵液的几丁质酶酶活最高为 26 U/L。该数值高于海洋细菌 11211 的几丁质酶活(19U/L)<sup>[23]</sup>,也高于尹鸿翔等<sup>[10]</sup>报道的产几丁质酶高效菌株 *Serratia marcescens* ssp. 的几丁质酶活(12U/L)。

#### 参考文献:

- [1] Gomes R C, Semedo L T A S, Soares R M A, *et al.* Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potential in biocontrol [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2000, 30: 146-150.
- [2] Synowiecki J, AL-Khateeb N A. Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2003, 43: 145-171.
- [3] 夏文水, 吴炎楠. 甲壳素/壳聚糖水解酶的研究进展 [J]. *中国海洋药物*, 1997, 16(2): 31-35.
- [4] Benecke U. *Bacillus chitinovor*, ein chitin zersetzenden spaltpilz [J]. *Bot Ztg*, 1905, 63: 227-231.
- [5] Yabuki M, Mizushima K, Amatatsu T, *et al.* Purification and characterization of chitinase and chitobiase produced by *Aeromonas hydrophilla* subsp. *Anaerogenes* A 523 [J]. *J Gen Appl Microbiol*, 1986, 2: 25-38.
- [6] Watanabe T, Oyanagi W, Suzuki K, *et al.* Chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12 and importance of chitinase A1 in chitin degradation [J]. *J Bacteriol*, 1990, 172: 4 017-4 022.
- [7] Pisano M A, Sommer M J, Taras L. Bioactivity of chitinolytic actinomycetes of marine origin [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1992, 36: 553-555.
- [8] 邱立友, 汪世山, 余功德, 等. 几丁质酶产生菌的筛选及产酶条件的研究 [J]. *微生物学通报*, 2000, 27(4): 270-272.
- [9] 吴根福, 杨志坚. 几丁质降解酶产生菌的分离及其产酶条件的初步研究 [J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*,

- 2002, **28**(6) : 641-645.
- [10] 尹鸿翔, 张杰, 候若彤, 等. 一株几丁质酶产生菌的分离鉴定及其灭蝗增效作用 [J]. 植物保护, 2004, **30**(2): 37-41.
- [11] Jones J D G, Grady K L, Suslow V, *et al.* Isolation and characterization of genes encoding two chitinase enzymes from *Sverratia marcescens*[J]. **J EMBO**, 1986, 5: 467-473.
- [12] Brurberg M B, Evijsink V G H, Hvaandrikman A J, *et al.* Chitinase B from *Serratia marcescens* B JL200 is exported to the periplasm without processing [J]. **Microbiol**, 1995, 144: 123-131.
- [13] Watanabe T, Yamada Y T, Hashimoto M, *et al.* The roles of the C-terminal domain and type III domain and Type III domains of chitinase A1 from *Bacillus circulans* W1-12 in chitin degradation[J]. **J Bacteriol**, 1994, 176: 4 465-4 472.
- [14] Watanabe T, Suzuki K, Oyanagi W, *et al.* Gene cloning of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 revealed its evolutionary relationship to *Serratia* chitinase and to the type III homology units fibronectin [J]. **J Biol Chem**, 1990, 15: 15 659-15 665.
- [15] Watanabe T, Oyanagi W, Suzuki K, *et al.* Chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12 and importance of chitin degradation[J]. **J Bacteriol**, 1990, 174: 408-414.
- [16] Tsujibo H, Yoshida Y, Miyamoto K. Purification, properties and partial amino acid sequence of chitinase from a marine *Alteromonas* sp. Strain O-7 [J]. **Can J Microbiol**, 1992, 38: 891-897.
- [17] Tsujibo H, Yoshida Y, Imada C, *et al.* Isolation and characterization of a chitin degrading marine bacterium belonging to the genus *Alteromonas*[J]. **Nippon Suisan Gakkaishi**, 1991, 57: 2127-2131.
- [18] Gooday G W. The ecology of chitin degradation[J]. **Adv Microb Ecol**, 1990, 11: 387-430.
- [19] Takeshi T, Shinsuke F, Shingo N, *et al.* A unique chitinase with dual active sites and triple substrate binding sites from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1 [J]. **Appl Environ Microbiol**, 1999, **65**(12): 5 338-5 344.
- [20] Hiraga K, Shou L, Kitazawa M, *et al.* Isolation and characterization of chitinase from a flake-chitin degrading marine bacterium, *Aeromonas hydrophila* H-2330 [J]. **Biosci Biotech Biochem**, 1997, 61: 174-176.
- [21] Tsujibo H, Orikoshi H, Shiotani K, *et al.* Characterization of chitinase C from a marine bacterium, *Alteromonas* sp. Strain O-7, and its corresponding gene and domain structure [J]. **Appl Environ Microbiol**, 1998, 64: 472-478.
- [22] Techkarnjanaruk S, Amanda E, Goodman. Multiple genes involved in chitin degradation from the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. Strain S91 [J]. **Microbiology**, 1999, 145: 925-934.
- [23] 杨承勇, 周世宁, 周毅频, 等. 海洋细菌 11211 的生长条件及其几丁质酶研究 [J]. 中山大学学报(自然科学版), 2000, **39**(6) 91-94.
- [24] 肖湘, 周樱, 王风平. 高效几丁质降解菌 CB101 的分离、鉴定及其几丁质酶系的研究 [J]. 海洋学报, 2003, **25**(1) 138-142.
- [25] 倪健英, 田承权, 蒋光藻. 几丁质细菌的分离和抗病虫研究 [J]. 西南农业大学学报, 1999, **21**(1): 84-86.
- [26] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 353-354.
- [27] Kawaguchi R, Burgess G J, *et al.* Phylogenetic analysis of a novel sulfate-reducing magnetic bacterium, RS-1, demonstrates its membership of the-Proteobacteria [J]. **FEMS Microbiolgy Letters**, 1995, 126: 277-282.
- [28] 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 39-40.
- [29] 北京大学生物系生物化学教研室. 生物化学实验指导 [M]. 北京: 人民教育出版社, 1982. 36-39.

## Screening of chitinase-producing marine bacterial strains and preliminary studies on chitinase-producing conditions

SUN Shu-wei<sup>1</sup>, WANG Zi-feng<sup>1,2</sup>, YUE Hai-dong<sup>1</sup>, XIAO Tian<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Received: Sep., 19, 2005

**Key words** : marine bacteria; *Pseudoaltermonas* sp.; chitinase; cultivation condition

**Abstract:** A marine bacterial strain exhibited high chitinase throughput was newly isolated from sea mud samples in Jiaozhou Bay. Based on its 16S rRNA gene sequence analysis, the bacterial strain was identified as *Pseudoaltermonas* sp. and named SS01. Culture conditions for the bacterial strain to produce chitinase were investigated. In Zobell 2216E medium, strain SS01 reached its stationary phase within 9 hours. The optimal temperature for strain SS01 to produce chitinase was lower than that for other bacteria. The optimal conditions for strain SS01 to produce chitinase were as follows: initial pH, 7.0; temperature, 24 °C; C source, colloid chitin (5 g/L); N source, pepton (5 g/L) and shaking speed of 170 r/min in 200 mL flask with 50 mL of the liquid medium. Under the optimal culture condition, chitinase activity reached 116.2 U/mL within 5 days.

(本文编辑：张培新)

---

(上接第 3 页)

## A primary study on using medicine to exterminate *Brachionu plicatilis* in the cultivation liquid of *Spirulina maxima*

ZHAO Su-fen, HUANG Yi-san, GUAN Wu-lin

(Fisheries College of Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Received : Oct., 20, 2004

**Key words:** medicine; *Spirulina maxima*; *Brachionu plicatilis*

**Abstract :**By the test of having added “*Brachionu plicatilis*’ invincible opponent 1#” to the cultivation liquid of *Spirulina maxima*, it indicated that the medicine was an effective cure for *B. plicatilis*. Both death time and death rate of *B. plicatilis* were related with the densities of *B. plicatilis*’ invincible opponent 1#, and the recovery situation of *S. maxima* after *B. plicatilis* having been killed was also the same *sa idem*. During the experimental range the 1.25% was the best density which could not only kill *B. plicatilis* but impact on *S. maxima* the least.

(本文编辑：张培新)