

文章编号: 1674-5566(2015)03-0465-07

## 几株共同发酵水产下脚料菌株的筛选及鉴定

赵玉谨, 刘 为, 刘海军, 赵泉健, 罗红宇

(浙江海洋学院 食品与医药学院, 浙江 舟山 316022)

**摘要:** 目前水产下脚料不能得到合理利用, 被大量废弃。本研究筛选几株能高效发酵水产下脚料的菌株, 分解下脚料产生游离态氮、磷、钾等植物所需营养素。从市售微生物肥料、土壤、腐败鱼体中的微生物分离出 44 株菌, 分别进行单一发酵水产下脚料实验、解磷解钾固氮实验、协同拮抗实验以确定能较好共同发酵水产下脚料的菌株; 并通过建立聚类树, 结合菌株形态学、生理生化特点, 推断菌株的生物属性。最终筛选得到的 4 株菌分别为, GP2 食酸菌、GS4 假单胞菌、ZP1 黑曲霉和 ZP3 酵母菌。筛选确定的 4 株菌, 具有较好的发酵水产下脚料产生氮、磷、钾等植物所需营养素的能力, 且 4 株菌作用的发酵液中氮、磷、有机质含量均超过国家微生物肥料标准, 这 4 株菌可以用于水产下脚料发酵。

**研究亮点:** 本研究对适合发酵水产下脚料的微生物菌种进行了筛选, 并对发酵液的功能进行初步探索, 发现食酸菌、假单胞菌、霉菌、酵母菌具有较好发酵水产下脚料的能力, 可以分解下脚料产生氮、磷、钾等植物所需营养素, 为水产下脚料的进一步利用等相关研究提供参考。

**关键词:** 下脚料; 食酸菌; 假单胞菌; 黑曲霉; 酵母菌; 鉴定; 发酵

**中图分类号:** Q93-3

**文献标志码:** A

随着生活水平的提高, 人们对水产品的消费逐年增加, 水产品加工产生的下脚料也越来越多, 包括鱼头、鱼皮、鱼鳍、鱼尾、鱼内脏、鱼骨、鱼胆、鱼鳔等, 其重量约占原料鱼的 40% ~ 55%。这类下脚料大部分仅作为饲料原料被低值利用, 甚至被废弃, 不仅污染环境, 还造成了资源的浪费<sup>[1-3]</sup>。其实这类下脚料仍含有丰富的蛋白质、脂类、无机盐等成分, 营养价值较高<sup>[4-5]</sup>, 经过发酵之后可以将营养物质分解为植物可以吸收利用的小分子氮、碳、磷、钾等物质。

目前, 用于发酵动物废弃物的菌种主要有霉菌、酵母菌、细菌 3 大类, 常用菌种有曲霉、酵母菌、乳酸菌和芽孢菌等<sup>[6]</sup>。在生物有机肥中, 肥料中含有的功能菌会促进土壤中矿物营养元素的吸收, 从而促进植物生长。目前, 研究比较多的功能菌主要是固氮菌、解磷菌和解钾菌。固氮菌包括共生固氮菌、联合固氮菌和自生固氮菌; 解磷菌研究比较多的是假单胞菌和巨大芽孢杆

菌; 解钾菌有扭脱芽胞杆菌、胶质芽胞杆菌、环状芽胞杆菌等<sup>[7-9]</sup>。这 3 种菌相互之间没有抑制作用或只有微弱的抑制作用<sup>[10]</sup>。本文从已分离到的 44 株菌中, 通过单一发酵、拮抗协同和解磷解钾固氮实验, 筛选出能较好分解水产下脚料营养的菌株, 并对其进行生理生化及分子生物学鉴定。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 菌种来源

从市售微生物肥料、土壤、腐败的鱼体中分离到 44 株菌, 保存于本实验室。

##### 1.1.2 试验材料

试验过程中需要的培养基有, 营养肉汤培养基、PDA 培养基、高氏一号培养基、营养琼脂培养基、有机磷培养基、无机磷培养基、阿须贝培养基和硅酸盐培养基。

收稿日期: 2014-09-24 修回日期: 2015-03-23

基金项目: 海洋公益性行业科研专项(201305016)

作者简介: 赵玉谨(1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产品加工与贮藏。E-mail: 1006155498@qq.com

通信作者: 罗红宇, E-mail: lisa8919@163.com

发酵所用水产下脚料由岱山绿康源海洋生物技术有限公司提供。

### 1.1.3 主要试剂、仪器

主要试剂包括:API 条带(API20NE 用于假单胞菌、食酸菌,API20AUX 用于酵母菌)、浓硫酸、硫酸铜、硫酸钾、17% 硫酸溶液、酒石酸锶钾和钼酸铵溶液。

主要仪器有:Kjeltec 8400 全自动凯氏定氮仪、722G 可见分光光度计和光学显微镜。

## 1.2 菌种筛选

### 1.2.1 单一发酵实验

将块状下脚料与水按 1:4 比例装入 250 mL 的锥形瓶中,每瓶 10 g 下脚料。121 °C 灭菌 20 min。同时,将筛选得到的 44 株菌分别接种到相应的液体培养基,于 30 °C、140 r/min 条件下活化 24 h,将活化后的菌液按 5% (体积比) 分别接种到相应的液体培养基中进行扩大培养,30 °C、140 r/min、培养 18 h 制成发酵种子液。后将发酵种子液均以 5% 的比例分别接入各发酵底物中,于 30 °C 静止发酵 7 d (自然 pH)。每天观察下脚料分解情况,发酵周期结束后对发酵效果显著的发酵液进行氮、磷、碳含量测定。

发酵液氮含量的测定方法为,将发酵液过真空泵得滤液,取 5 mL 滤液、15 mL 浓硫酸、0.5 g 硫酸铜、3.5 g 硫酸钾,经 240 °C 碳化、420 °C 消化、冷却得到待测样品,经全自动凯氏定氮仪直接得出总氮含量。

总磷、有机碳(有机质)的测定方法按照文献[11-12]进行测定。

### 1.2.2 解磷解钾固氮实验

将 44 种菌分别接种至有机磷、无机磷、阿须贝、硅酸盐培养基中,于 30 °C 下培养 5 d,观察菌种生长情况。

### 1.2.3 拮抗协同实验

将上述发酵效果良好及具备解磷解钾固氮能力的菌株两两交叉划线至营养琼脂培养基,于 30 °C 下培养 5 d,观察交叉处菌种生长情况。

## 1.3 菌种鉴定

### 1.3.1 形态学鉴定

细菌进行革兰氏染色观察,真菌、放线菌进行插片法观察<sup>[13]</sup>。

### 1.3.2 生理生化鉴定

将筛选得到的菌种进行 API 生理生化实验,细菌、放线菌置于 30 °C 条件下分别于 24 h、48 h 观察 API 条带反应情况。真菌置于 30 °C 条件下分别于 48 h、72 h 观察 API 条带反应情况。

### 1.3.3 分子生物学鉴定

细菌扩增引物为 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492R: 5' - GGTTACCTTGTTACGACTT-3', 反应体系(25 μL): 10 × Tap Buffer with KCl 2.5 μL, MgCl<sub>2</sub> (25 μmol/L) 2.5 μL, dNTP (25 μmol/L) 2.0 μL, *Tap*DNA 聚合酶(5 U/mL) 0.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 14.5 μL, 引物各 1 μL。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min, 94 °C 高温变性 1 min, 58.5 °C 退火 0.5 min, 72 °C 延伸 2 min, 共 35 个循环, 72 °C 延伸 10 min。

真菌扩增引物为 Seq Forward Primer: 5'-CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC-3', Seq Reverse Primer: 5'-GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG-3', 反应体系(25 μL): 10 × Tap Buffer with KCl 2.5 μL, MgCl<sub>2</sub> (25 μmol/L) 2.5 μL, dNTP (25 μmol/L) 2.0 μL, *Tap*DNA 聚合酶(5 U/mL) 0.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 16.5 μL, 引物各 0.5 μL。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 高温变性 1 min, 58.5 °C 退火 0.5 min, 72 °C 延伸 1 min, 共 38 个循环, 72 °C 延伸 7 min。

## 1.4 发酵小试

将筛选得到的菌株接种至水产下脚料中,发酵周期为 7 d。发酵结束后,测定发酵液中的总氮、总磷、有机碳的含量;另将发酵液分别划线接种于有机磷、无机磷、阿须贝、硅酸盐培养基中,30 °C 培养 3~5 d 后观察菌种生长情况,初步判断复合菌株发酵液有无解磷解钾固氮能力。

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵能力菌种的筛选

单一菌株发酵结束后,观察各菌株对下脚料的分解效果,发现菌株 ZP3 (PDA 培养基于 30 °C 分离得到),在发酵周期内将下脚料分解完全,相对于其他菌株,具有良好的发酵效果。菌株 ZP3 发酵液与初始液组分分析结果见表 1。

表 1 ZP3 发酵液组分分析  
Tab. 1 Components of ZP3 fermented solution

	总氮/(mg/mL) total nitrogen	有机碳/(mg/mL) organic carbon	总磷/(mg/mL) total phosphorus	有机质/(mg/mL) organic material
初始液 initial solution	9.36	$7.4 \times 10^5$	$5.05 \times 10^{-4}$	$1.28 \times 10^6$
发酵液 fermented solution	236.22	$1.3 \times 10^8$	102.53	$2.2 \times 10^8$

## 2.2 解磷解钾固氮能力菌种的筛选

对各菌株进行解磷解钾固氮实验发现, GP2 (高氏一号培养基于 30 ℃ 分离得到)、GS4 (高氏一号培养基于 50 ℃ 分离得到)、ZP1 (PDA 培养

基于 30 ℃ 分离得到)、ZP2 (PDA 培养基于 30 ℃ 分离得到) 4 株菌显示了良好的特性, 结果见表 2。

表 2 菌株解磷解钾固氮能力  
Tab. 2 The capacity of nitrogen fixation, insoluble-potassium solubilization and insoluble-phosphate solubilization simultaneously of microbes

序号 sequence number	菌株编号 number of microbes	解有机磷 insoluble-phosphate solubilization	解无机磷 insoluble-phosphate solubilization	解钾 insoluble-potassium solubilization	固氮 nitrogen fixation
1	GP2	+	+	+	+
2	GS4	+	+	+	+
3	ZP1	+	+	+	-
4	ZP2	+	+	+	-

注: + 表示有能力; - 表示无能力。

Note: + means positive result ; - means negative result.

由表 2 可知, GP2、GS4 同时具有解磷解钾固氮能力, ZP1、ZP2 具有解磷解钾能力。

## 2.3 拮抗协同实验结果

将上述 5 株菌两两交叉划线, 观察菌株交叉处发现 ZP2 对其他菌株有明显抑制作用, 而其他菌株间无明显拮抗或协同效果, 可以共生, 最终确定 ZP1、ZP3、GP2、GS4 4 株菌适合于共同发酵水产下脚料。

## 2.4 菌种鉴定

### 2.4.1 形态学鉴定结果

GP2 的适宜生长温度范围为 20 ~ 42 ℃, GS4 的适宜生长温度为 20 ~ 60 ℃, 最适温度均为 30 ℃。

GP2 在高氏一号培养基培养 72 h 后, 颜色为黄色、表面光滑、边缘规则、菌落为圆形, 菌落易挑起, 推测为假单胞菌。

GS4 在高氏一号培养基中培养 72 h 后, 颜色为乳白色, 中心处产生黄色色素, 菌落不易挑起, 推测为假单胞菌。

ZP1、ZP3 的适宜生长温度为 20 ~ 40 ℃, 最适

生长温度为 28 ℃。

ZP1 在 PDA 培养基中培养 72 h 后, 产生黑色孢子, 显微镜下观察菌丝透明, 有顶囊, 可见初生小梗, 推测为黑曲霉。

ZP3 在 PDA 培养基中培养 72 h 后, 菌落为白色, 表面光滑, 边缘规则, 推测为酵母菌。

### 2.4.2 生理生化实验结果

GP2 生理生化实验结果与少动鞘氨醇单胞菌的相似性达到 98.4%; GS4 生理生化实验结果与少动鞘氨醇单胞菌的相似性达到 99%; ZP3 生理生化实验与罗伦隐球酵母的相似性达到 97% (表 3)。(ZP1 为霉菌, 目前市场暂无霉菌的 API 检测条带产品, 故 ZP1 无生理生化结果。)

### 2.4.3 分子鉴定实验结果

PCR 扩增菌株 GP2、GS4 的 16S rDNA 基因, 得到 1 500 bp 序列, BLAST 结果表明 GP2 的 16S rDNA 序列与食酸菌的相似性达到 95%。BLAST 结果表明 GS4 的 16S rDNA 序列与假单胞菌的相似性达到 99%, 16S rDNA 基因序列分析可以确定 GS4 为假单胞菌属。

表 3 菌株生理生化结果  
Tab.3 The result of physiological and biochemical experiments

	菌株 (microbes)		菌株 (microbes)	
	GP2	GS4	ZP3	
硝酸钾 KNO <sub>3</sub>	-	-	D-葡萄糖 GLU	+
左旋色氨酸 TRP	-	-	甘油 GLY	+
右旋糖 GLU	-	-	2-酮基-葡萄糖酸盐 AKG	+
左旋精氨酸 ADH	-	+	L-阿拉伯糖 ARA	+
尿素 VRE	-	-	D-木糖 XYL	+
七叶苷柠檬酸铁 ESC	+	+	侧金盏花醇 ADO	-
凝胶(牛源) GEL	+	-	木糖醇 XLT	-
4-硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷 PNPG	-	-	D-半乳糖 GAL	+
右旋糖 GLU	+	+	肌醇 INO	+
左旋阿拉伯糖 ARA	+	+	山梨醇 SOR	-
右旋甘露糖 MNE	+	+	α-甲基-D-葡萄糖 MDG	+
右旋甘露醇 MAN	+	+	N-乙酰-葡萄糖甙 NAG	+
N-乙酰基葡萄糖胺 NAG	+	+	纤维二糖 CEL	-
D-麦芽糖 MAL	+	+	D-乳糖(牛源) LAC	+
葡萄糖酸钾 GNT	+	+	D-麦芽糖 MAL	-
羊蜡酸 CAP	-	-	D-蔗糖 SAC	+
己二酸 ADI	-	-	海藻糖 TRE	+
苹果酸 MLT	-	-	D-松叁糖 MLZ	+
枸橼酸钠 CIT	-	-	D-棉籽糖 RAF	+
苯乙酸 PAC	-	+		

注: + 表示阳性结果; - 表示阴性结果。

Note: + means positive result; - means negative result.

PCR 扩增菌株 ZP1、ZP3 的 18S rDNA 基因, 得到 1 500 bp 序列, BLAST 结果表明 ZP1 的 18S rDNA 序列与黑曲霉的相似性达到 100%, 18S rDNA 基因序列分析可以确定 ZP1 为黑曲霉属。BLAST 结果表明 ZP3 的 18S rDNA 序列与驹型酵母的相似性达到 99%, 18S rDNA 基因序列分析可以确定 ZP3 为酵母属。4 株菌的聚类树见图 1 ~ 图 4。

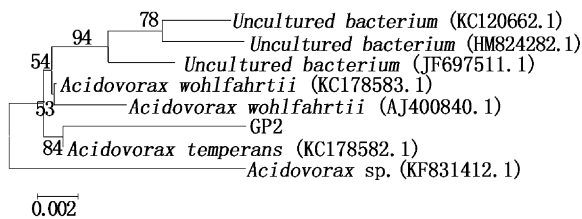


图 1 菌株 GP2 基于 16S rDNA 序列的基因同源性的聚类树  
Fig.1 The cluster tree on 16S rDNA sequence data of the strains GP2

用于聚类树分析的序列全部来自于基因数据库(括号内为相应编号),分支节点处的数字是基于 1 000 个重新取样数据集的邻接分析法得出的自展支持度百分比。(图 2 至图 4 同)。The sequences used in the analysis were obtained from the GenBank Database (accession numbers is given parentheses). The number at branch nodes are the percentage bootstrap support based on Neighbor-Joining analysis of 1 000 resample data sets.

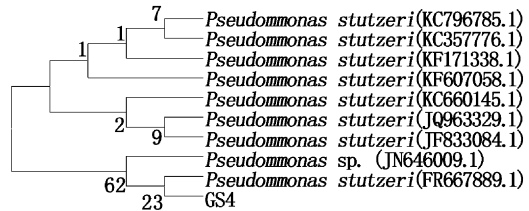


图 2 菌株 GS4 基于 16S rDNA 序列的基因同源性的聚类树

Fig.2 The cluster tree on 16S rDNA sequence data of the strains GS4

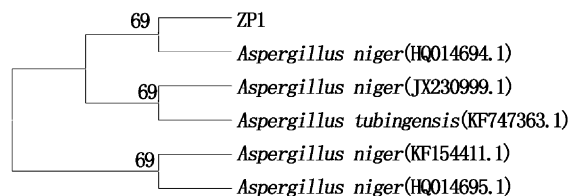


图 3 菌株 ZP1 基于 18S rDNA 序列的基因同源性的聚类树

Fig.3 The cluster tree on 18S rDNA sequence data of the strains ZP1

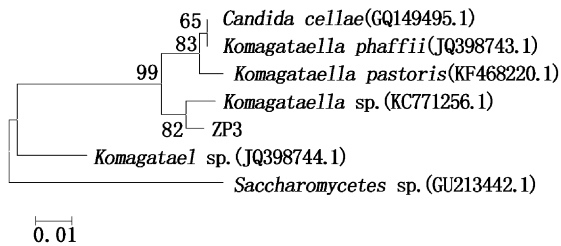


图4 菌株 ZP3 基于 18S rDNA 序列的基因同源性的聚类树

Fig.4 The cluster tree on 18S rDNA sequence data of the strains ZP3

## 2.5 发酵小试结果

发酵液在 4 种培养基中菌落生长良好,如图 5 所示,说明此发酵液具有良好的解磷解钾固氮功能。菌株混合发酵液的组分分析结果如表 4 所

表 4 混合发酵液组分分析

Tab.4 Components of mixed fermented solution

	总氮 total nitrogen	有机碳 organic carbon	总磷 total phosphorus	有机质 organic material
初始液 intinal solution	8.57	$5.8 \times 10^5$	$4.82 \times 10^{-4}$	$1.0 \times 10^6$
混合发酵液 mixed fermented solution	326.22	$6.4 \times 10^8$	717.18	$1.1 \times 10^{11}$

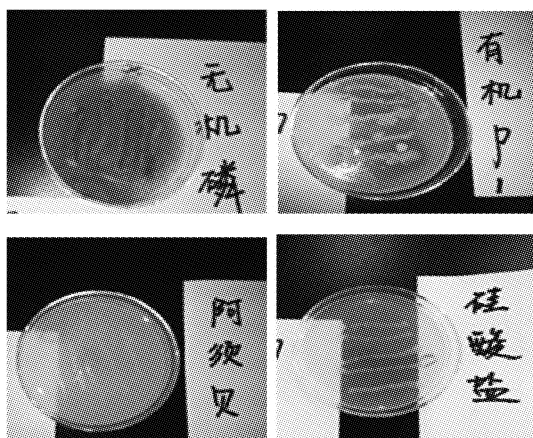


图5 发酵液解磷解钾固氮效果图

Fig.5 The result of nitrogen fixation, insoluble-potassium solubilization and insoluble-phosphate solubilization simultaneously

本实验通过对下脚料的单一发酵实验、解磷解钾固氮实验筛选得到的食酸菌 (*Acidovorax*) GP2、假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*) GS4 同时具备良好的解磷、解钾、固氮能力,霉菌 (*Aspergillus niger*) ZP1、酵母菌 (*Komagataella* sp.) ZP3 同时具备良好的解磷、解钾能力,并且酵母菌 (*Komagataella* sp.) ZP3 具备较强的分解水产下

示,与表 1 结果比较可见,4 株菌混合发酵产物的各组分含量均有所上升。

## 3 讨论

长期以来鱼类下脚料的利用极为简单和粗犷,主要将其制作成鱼粉等经济价值较低的产品。鱼类下脚料中含有丰富的营养物质,但是由于无先进的工艺合理利用,使得产品经济附加值极低,造成资源的极大浪费和环境污染<sup>[14]</sup>。而目前研究较多的微生物肥料的发酵底物主要为人畜粪、植物秸秆,对微生物发酵水产下脚料的研究几乎为零,本试验着重于筛选对水产下脚料具有发酵作用的菌株。

脚料能力。这 4 株菌具有发酵水产下脚料产生植物所需的氮、磷、钾等营养素的功能,且发酵液中的组分物质含量均已超过国家复合微生物肥料的标准。对于高脂高蛋白的水产下脚料,生理生化实验表明 4 株菌在利用碳源、氮源、脂肪的能力上具有互补的作用,可以充分将下脚料中的营养物质分解为可供植物直接吸收利用的无机营养盐,故本实验分离筛选得到的这 4 株菌可以很好地作用于水产下脚料产生植物所需的营养物质。目前报道的解磷菌分为细菌和真菌类,其中细菌包括芽孢杆菌 (*Bacillus*)、埃希氏菌 (*Escherichia*)、欧文氏菌 (*Erwinia*)、假单胞杆菌 (*Pseudomonas* sp.) 等,真菌类包括青霉菌属 (*Penicillium*)、曲霉菌属 (*Aspergillus*)、酵母菌属 (*Pichia*) 等;解钾菌多为芽孢杆菌;具有固氮能力的主要为固氮菌<sup>[15]</sup>。本试验得到的菌株与上述已报道的菌种相对比,在已有的曲霉菌属 (*Aspergillus*)、酵母菌属 (*Pichia*) 的基础上,又探索出适用于解磷解钾固氮的新菌种,食酸菌 (*Acidovorax*)、假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*)。有资料表明,解磷解钾固氮菌可以产生多种生理活性物质,增强植物抗病性、抗逆性<sup>[16-17]</sup>;酵母

菌可以降解底物中的营养物质<sup>[18]</sup>。这些菌对于分解水产下脚料具有积极作用,因此我们将进一步开展利用4株菌来发酵水产下脚料制备液体肥料的研究。

### 参考文献:

- [1] 刘峰,刘春娥,郑昭君,等. 鱼类下脚料微生物发酵饲料的初步研究[J]. 饲料工程,2012,33(20):37-40.  
LIU F, LIU C E, ZHENG Z J, et al. Studies on the processing waste of fish fermented by microbe[J]. Fodder Industry, 2012,33(20):37-40.
- [2] 龚钢明,顾慧,蔡宝国. 鱼类加工下脚料的资源化与利用途径[J]. 中国资源综合利用,2003,(7):23-24.  
GONG G M, GU H, CAI B G. Resource recovery and utilization way for by-product of fish[J]. China Resources Comprehensive Utilization, 2003,(7):23-24.
- [3] 苑艳辉. 水产品下脚料综合利用研究之进展[J]. 水产科技情报,2004,31(1):44-48.  
YUAN Y H. Comprehensive utilization for residues of aquatic products research progress[J]. Fisheries Science & Technology Information, 2004,31(1):44-48.
- [4] 赖海涛,黄志勇,涂开生,等. 酶法提取烤鳗下脚料水解动物蛋白的研究[J]. 集美大学学报:自然科学版,2002,7(1):11-15.  
LAI H T, HUANG Z Y, TU K S, et al. The research of enzymatic extraction the hydrolyzed animal protein of roasted eel scraps[J]. Journal of Jimei University: Natural Science, 2002,7(1):11-15.
- [5] 辛建美. 酶解金枪鱼碎肉制备活性肽及其分离的研究[D]. 舟山:浙江海洋学院,2011.  
XIN J M. Enzyme Hydrolysis of Tuna meat for preparation and isolation peptide [D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University,2011.
- [6] 张金玉,霍光明,张李阳. 微生物发酵饲料发展现状及展望[J]. 南京晓庄学院学报,2009(3):68-71.  
ZHANG J Y, HUO G M, ZHANG L Y. Research status and development of direct-fed microbial [J]. Journal of Nanjing Xiaozhuang University, 2009(3):68-71.
- [7] 许光辉,郑洪元. 土壤微生物分析方法手册[M]. 北京:农业出版社,1986:135-136.  
XU G H, ZHENG H Y. Manual of soil microbial analysis methods[M]. Beijing: Agriculture Press,1986:135-136.
- [8] 刘荣昌. 生物钾肥在农业生产中的作用[C]//葛诚. 微生物肥料的生产应用及其发展. 北京:中国农业科技出版社,1996:66-74.  
LIU R C. The role of biological potassium fertilizer in agricultural production[C]// GE C. Production application and development of microbial fertilizer. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press,1996:66-74.
- [9] 吕学斌. 微生物发酵菌群的组合及其应用研究[D]. 天津:天津大学,2005.  
LÜ X B. The combination of a microbial fermentation community and the study of its application [D]. Tianjin: Tianjin University,2005.
- [10] 饶正华,林启美,孙焱鑫,等. 解钾菌与解磷菌及固氮菌的相互作用[J]. 生态学杂志,2002,21(2):71-73.  
RAO Z H, LIN Q M, SUN Y X, et al. Interactions between a *Bacillus mucilaginosus*, Phosphobacteria and a nitrogen fixing bacterium[J]. Journal of Ecology,2002,21(2):71-73.
- [11] 祝陈坚. 海水分析化学实验[M]. 青岛:中国海洋大学出版社,2008:92-96.  
ZHU C J. Experiment of analytical chemistry for seawater [M]. Qingdao:China Ocean University Press,2008:92-96.
- [12] NY525-2011 有机肥料[S]. 北京:中国农业出版社,2011:2-4.  
NY525-2011 Organic fertilizer [S]. Beijing: China Agriculture Press,2011:2-4.
- [13] 朱旭芬. 现代微生物学实验技术[M]. 杭州:浙江大学出版社,2011:39-41,51-60.  
ZHU X F. Modern microbiology experiment technology[M]. Hangzhou: Zhejiang University Press, 2011:39-41,51-60.
- [14] 霍健聪. 带鱼下脚料蛋白酶水解物亚铁螯合修饰及其抑菌机理研究[D]. 重庆:西南大学,2009.  
HUO J C. Study on ferrous chelating modification of trichiurus haumela offal hydrolysate by enzymolysis and research for antibacterial mechanism[D]. Chongqing: South-Western University,2009.
- [15] 孙丽范. 利用耐盐碱解磷、解钾、固氮菌发酵菌糠制备菌肥的研究[D]. 天津:天津大学,2012.  
SUN L F. Conversion of spent mushroom substrate to biofertilizer using co-inoculation of salt and alkaline-tolerant phosphate-solubilizing fungus potassium solubilizing and nitrogen fixing bacteria [D]. Tianjin: Tianjin University, 2012.
- [16] 刘健,李俊,葛诚. 微生物肥料作用机理的研究新进展[J]. 微生物学杂志,2001,21(1):33-36.  
LIU J, LI J, GE C. The new progress of the mechanism of microbial fertilizer [J]. Journal of Microbiology, 2001,21(1):33-36.
- [17] 袁田,熊格生,刘志,等. 微生物肥料的研究进展[J]. 湖南农业科学,2009(7):44-47.  
YUAN T, XIONG G S, LIU Z, et al. Study on microbiological fertilizer[J]. Hunan Agricultural Sciences, 2009(7):44-47.
- [18] 王进. 利用复合微生物菌剂制备浒苔生物有机肥及其对作物生长影响的研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2013.  
WANG J. Studies on the production of *Enteromorpha prolifera* bio-organic fertilizer by complex microbial inoculant and its effect on the growth of crop [D]. Qingdao: China Ocean University Press,2013.

## Screening and identification of several microbes fermenting by-product of fish processing

ZHAO Yujin, LIU Wei, LIU Haijun, ZHAO Xiaojian, LUO Hongyu

(Food and Pharmacy&Medical School, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, Zhejiang, China)

**Abstract:** Screening a few microbes that can ferment by-product of fish processing into useful nutrients for plant. We selected 44 microbes from fertilizer of microbes, soil and corrupted fish, then we chose microbes by some experiments, such as, single fermented experiment, the experiment of nitrogen fixation, insoluble-potassium solubilization and insoluble-phosphate solubilization simultaneously and collaborative antagonism experiment. Then microbes were identified by morphological observation, physiological and biochemical experiments and building the cluster trees based on 16S rDNA or 18S rDNA sequence data of the strains. Finally, GP2 is *Acidovorax*, GS4 is *Pseudomonas* sp., ZP1 is *Aspergillus niger*, ZP3 is *Saccharomyces*. GP2, GS4, ZP1, ZP3 can ferment by-product of fish processing into useful nutrients for plant, and they can be used to ferment by-product of fish processing.

**Key words:** by-product of fish processing; *Acidovorax*; *Pseudomonas* sp.; *Aspergillus niger*; *Saccharomyces*; identification; fermentation