

产细菌素苏云金芽孢杆菌的鉴定及其所产抗菌物质性质

李 云, 杨胜远*, 林晓东, 钟瑜红, 苏 婷, 刘湘嘉
(韩山师范学院生物系食品与发酵工程研究所, 广东 潮州 521041)

摘 要: 从腌制蔬菜表面分离到一株产细菌素的菌株 K2, 其中和后的无细胞发酵液主要抑制革兰氏阳性细菌, 特别是对芽孢杆菌有强烈的抑制作用。发酵上清液经硫酸铵盐析和透析后, 仍然有很强的抗菌活性, 并对多种蛋白酶敏感, 表明抗菌活性物质为蛋白类物质。通过形态培养特征、生理生化特征、16S rDNA 序列比对及系统发育分析, 鉴定菌株 K2 是苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)。菌株 K2 产生的抗菌物质在 pH6~9 条件下 80℃ 处理 30min 仍保持稳定的抗菌活性, 其对敏感菌的作用主要是杀菌, 而且对芽孢萌发有很好的抑制作用。该抗菌物质在菌体生长对数中期产生, 在稳定期中期抗菌活性达到最大。

关键词: 苏云金芽孢杆菌; 细菌素; 鉴定; 抗菌物质

Identification of Bacteriocin-producing *Bacillus thuringiensis* and Properties of Its Antibacterial Substances

LI Yun, YANG Sheng-yuan*, LIN Xiao-dong, ZHONG Yu-hong, SU Ting, LIU Xiang-jia
(Food and Fermentation Engineering Institute, Department of Biology, Hanshan Normal University, Chaozhou 521041, China)

Abstract: Strain K2 having the ability to produce bacteriocin was isolated from the surface of pickled vegetables. The neutralized cell-free fermentation supernatant exhibited an inhibition effect against Gram-positive bacteria, especially strong inhibition effect against *Bacillus* strains. The inhibition activity of the fermentation supernatant still kept high after ammonium sulphate precipitation and dialysis, and the activity of the dialysis retentate was sensitive to a variety of proteases. These results indicated the protein nature of antibacterial substances contained in the dialysis retentate. Base on morphological, physiological and biochemical characteristics, 16S rDNA sequence and phylogenetic analysis, the strain K2 was classified as *Bacillus thuringiensis*. The antibacterial substance from strain K2 remained strong antibacterial activity after heating treatment at 80 °C and pH 6—9 for 30 min, suggesting its excellent thermostable property and pH resistance. The antibacterial activity was generated from mid-logarithmic growth phase and reached the maximum activity at mid-stationary phase.

Key words: *Bacillus thuringiensis*; bacteriocin; identification; antibacterial substance

中图分类号: Q939.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)11-0147-06

细菌素是某些细菌在代谢过程中通过核糖体合成机制产生的一类具有生物活性的蛋白质或多肽, 主要抑制其他相近种类的细菌, 一般产生菌自身对其细菌素具有免疫性^[1]。大多数细菌能产生至少一种细菌素^[2]。食源性细菌所产细菌素由于其安全、无毒和高效抗菌作用, 具有替代化学合成防腐剂的应用潜力, 而被广泛研究与开发^[3]。

食品应用细菌素的研究集中在乳酸菌(lactic acid bacterium, LAB)细菌素, 目前已报道的许多种 LAB

细菌素中, Nisin 是已被商品化生产并广泛使用的细菌素^[4]。Nisin 的生物活性、稳定性受到许多物理和化学因素的影响, 在一定程度上限制了它的应用。因此, 寻找稳定、安全、高效、具备应用潜力的新型细菌素具有十分重要的意义。芽孢杆菌(*Bacillus*)在自然界分布非常广泛, 生理特性丰富多样, 能够代谢产生脂肽类、磷脂类、细菌素等多种拮抗性物质, 其中细菌素资源非常丰富。本实验对腌制蔬菜表面分离到的一株产细菌

收稿日期: 2009-09-25

基金项目: 广东省自然科学基金项目(8452104101001546); 国家星火计划项目(2008GA780032); 韩山师范学院科研基金项目

作者简介: 李云(1977—), 男, 讲师, 硕士, 研究方向为应用微生物学和发酵工程。E-mail: fgtmyself@yahoo.com.cn

*通信作者: 杨胜远(1972—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品微生物与生物技术。E-mail: yshengyuan2004@yahoo.com.cn

素的芽孢杆菌进行鉴定,并研究其所产抗菌物质的部分性质。

1 材料与方法

1.1 菌株

菌株 K2 分离自腌制蔬菜。用 TSB 琼脂斜面于 35℃ 培养 24 h 后,于 4℃ 冰箱保藏。

大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*, ATCC 8099)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, ATCC 6538)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 15442)、白假丝酵母(*Candida albicans*, ATCC 10231)和黑曲霉(*Aspergillus niger*, ATCC 16404)由广东省微生物所提供;枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*, CMCC 63501)、大肠杆菌(*Escherichia coli*, ATCC 35218)由中国医学细菌保藏管理中心提供;藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*, STL3101)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*, STL 3301)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, STL 3302)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*, STL 3303)由河南农业大学黄现青博士馈赠;酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*, STL 3401)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*, STL 3102)、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*, STL 3103)分离自发酵食品;痢疾志贺氏菌(*Shigella dysenteriae*, STL 3201)、弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*, STL 3202)分离自污染食品;巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*, STL 3304)、灰绿青霉(*Penicillium glaucum*, STL 3501)、康宁木霉(*Trichoderma koningii*, STL 3502)由韩山师范学院生物系食品与发酵工程研究所保藏。

1.2 培养基

TSB 培养基^[5]用于菌株 K2 培养,牛肉膏蛋白胨培养基用于培养指示细菌, MRS 培养基^[6]用于培养乳酸菌, PDA 培养基用于培养酵母及霉菌。

1.3 试剂与仪器

胰蛋白酶、蛋白酶 K Sigma 公司;中性蛋白酶 上海生工生物工程技术有限公司;酸性蛋白酶、木瓜蛋白酶 广西南宁庞博生物工程有限公司;DNA 纯化试剂盒 北京天为时代科技有限公司;其他试剂为分析纯。

PTC-100™ PCR 仪 MJ Research 公司; VITEK32 全自动微生物分析仪 法国生物梅里埃公司; Hermle Z36HK 冷冻离心机 Hermle 公司; Sigma2-16 离心机 美国 Sigma 公司; UV-2100 分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司; FD-1D-50 冷冻干燥机 北京博医康实验仪器有限公司; Olympus CX41 生物显微镜 奥林巴斯公司。

1.4 PCR 引物

采用细菌 16S rDNA 的通用引物: 27F: 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1541R: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3', 由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.5 方法

1.5.1 细菌素产生菌的分离筛选

采集发酵食品(泡菜、腌菜、发酵豆制品等)样品,经适当梯度稀释后进行平板涂布分离,挑取单菌落于 TSB 平板上划线纯化。取纯化后菌落,涂片革兰氏染色,镜检,保留革兰氏阳性的菌株。将分离获得的菌株点种于平板(MRS、TSB 培养基)中,于 35℃ 培养 12 h,然后在菌落上平铺一层含指示菌的培养基,适温培养后根据抗菌圈的大小和清晰程度来判断受试菌对指示菌的抗菌能力。将初筛后有活性的菌株接种于液体培养基,培养 24 h,于 4℃ 以 8000 × g 离心 15 min,收集上清液,用 1 mol/L NaOH 溶液调 pH 值到 6.5,采用牛津杯法点样复筛。

1.5.2 菌株 K2 发酵液抗菌活性的测定

菌株 K2 发酵液的处理:活化后的 K2 菌株以 2% 接种量接种于 TSB 液体培养基中,32℃ 静置培养 24 h,于 4℃ 以 8000 × g 离心 15 min,收集上清液,用 1 mol/L NaOH 溶液调 pH 值到 6.5,排除产酸的干扰。上清液用 0.22 μm 滤膜过滤,除去菌体及其他杂质,即为碱中和后的无细胞发酵液,放入 -20℃ 冰箱中备用。

采用牛津杯法测定抗菌活性:将指示菌分别接种于各种培养基中适温活化培养 12 h,经传代两次使各菌株达到良好生长状态,然后涂布接种于各种固体培养基中(厌氧菌与熔化固体培养基混匀倾倒在平板),均匀放置牛津杯,每杯中点样 200 μL 碱中和后无细胞发酵液,适温培养 24 h 后,检测产细菌素菌株对各种指示菌的抑制作用,测量抑菌圈直径,每组实验重复测定 3 次。

1.5.3 形态培养特征及生理生化特征实验

形态、培养及基本生理特征实验参照文献[7]。生化特征实验采用 Vitek32 微生物自动鉴定系统鉴定。

1.5.4 16S rDNA 序列比对及系统发育分析

按文献[8]方法提取细菌基因组 DNA,采用细菌 16S rDNA 的通用引物 27F 和 1541R 进行扩增。扩增体系为 10 mmol/mL MgCl₂ 3 μL, 10 × PCR buffer 5 μL, dNTP (2.5 μmol/L) 4 μL, Taq 酶 (5U/μL) 0.25 μL, 上游引物和下游引物 (2.5 μmol/L) 各 1 μL, 模板 DNA 1 μL, 最后加双蒸水至 50 μL, 混合后瞬间离心,置于 PCR 仪上 95℃ 变性 5 min, 然后 94℃ 变性 30 s, 52℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min 反应结束。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,于凝胶成像系统下观察并拍照记录结果。PCR 产物通过电泳,利用北京天为时代科技有限公司凝胶回收试剂盒割胶回收纯化。

委托上海生工生物工程技术有限公司进行测序。

将 16S rDNA 序列与 GenBank + EMBL + DDBJ + PDB 数据库中的核苷酸序列进行同源性分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), 利用 BioEdit7.0.0 软件的 Clustal W 程序进行多重比对, 然后利用 Clustal X1.8 软件采用 Neighbour-joining 方法构建系统发育树, 并进行 Bootstrap 分析, 重复次数为 1000 次。

1.5.5 菌株 K2 产细菌素的鉴定

在 200mL 发酵上清液中缓慢加入硫酸铵至终饱和度为 80%, 置 4℃ 冰箱中静置沉淀 24h, 在 4℃ 于 8000 × g 离心 15min, 将沉淀溶于 30mL 磷酸盐缓冲液(0.6mmol/L, pH6.5), 于 3500D 透析袋中脱盐, 以相同浓度磷酸盐缓冲液作为膜外透析液, 透析 24h, 得到蛋白粗提液。

将各蛋白酶配成合适质量浓度母液, 分别加入蛋白粗提液中至终质量浓度 1mg/mL, 调节 pH 值至各酶最适作用 pH 值, 以不加酶的蛋白粗提液作空白对照, 37℃ 水浴中保温 3h, 回调各酶解液 pH 值至 6.5。以蜡样芽孢杆菌作为指示菌, 按 1.5.2 节的方法测定各酶解液抗菌活性。

1.5.6 抗菌活性物质对温度和 pH 值的敏感性

分别取 1mL 无细胞发酵液, 在 60、80、100、121℃ 保持 10min 和 30min, 等冷却后以蜡样芽孢杆菌为指示菌, 按 1.5.2 节的方法测定处理液的抗菌活性, 并用空白未接种的 TSB 培养基做对照。

分别用 1mol/L HCl 溶液和 1mol/L NaOH 溶液调无细胞发酵液 pH 值至 3~10, 35℃ 保温 2h, 以蜡样芽孢杆菌为指示菌, 按 1.5.2 节的方法测定处理液抗菌活性, 用空白未接种 TSB 培养基调至相应 pH3~10 作对照。

1.5.7 抗菌活性物质的抗菌作用方式

对营养细胞的作用: 以 2% 接种量接种蜡样芽孢杆菌于 100mL 肉汤培养基, 在 37℃ 于 150r/min 摇床培养 8h, 加入碱中和后的无细胞菌种 K2 发酵液 20mL, 继续培养。间隔 2h 取样, 采用分光光度计和平板菌落计数法测定细胞的生长情况。以不加无细胞发酵液作对照。每组实验重复测定 3 次。

对芽孢的作用: 接种指示菌蜡样芽孢杆菌于牛肉膏蛋白胨斜面, 37℃ 培养 3~4d, 加入 10mL 无菌生理盐水, 刮下斜面菌苔制成菌悬液。取菌悬液 5mL, 于 80℃ 水浴中保温 20min, 8000 × g 离心 15min, 取沉淀加无菌 pH 7.0 磷酸盐缓冲液制成孢子悬液。接种孢子悬液于 100mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基, 并调整孢子浓度约为 10⁵CFU/mL。加入碱中和后的无细胞菌种 K2 发酵液 20mL, 37℃, 150r/min 培养。间隔 2h 取样, 采用分光光度计和平板菌落计数法测定细胞的生长情况。以不加无细胞发酵液作对照。每组实验重复测定 3 次。

1.5.8 菌株 K2 产抗菌活性物质的发酵曲线

以 2% 接种量, 35℃, 于 TSB 培养基 120r/min 摇床培养 K2, 间隔 2h 取样, 采用分光光度计和平板菌落计数法测定细胞的生长情况, 以蜡样芽孢杆菌为指示菌, 按 1.5.2 节的方法测定无细胞发酵液抗菌活性。每组实验重复测定 3 次。

2 结果与分析

2.1 菌株 K2 发酵液的抗菌作用

从样品中初筛有抗菌作用的菌株 59 株, 复筛后有 9 株菌仍有抗菌活性, 其中菌株 K2 抗菌活性最强, 且抗菌活性稳定。菌株 K2 碱中和后的无细胞发酵液对供试的革兰氏阳性细菌有抑制作用(表 1), 对芽孢菌抑制作用较强, 对非产芽孢革兰氏阳性菌作用较弱。对革兰氏阴性菌(除大肠杆菌外)无抗菌活性。对供试真菌都无抗菌活性。

表 1 菌株 K2 碱中和后的无细胞发酵液的抗菌作用

Table 1 Antibacterial activity of neutralized cell-free fermentation supernatant from strain K2

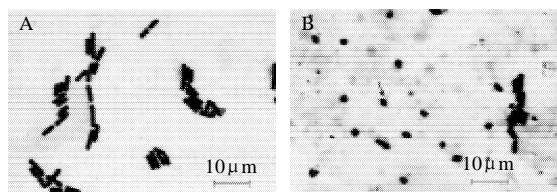
	指示菌	抑菌圈直径/mm
革兰氏阳性细菌	金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i> , ATCC 6538)	9.2 ± 0.2
	藤黄微球菌(<i>Micrococcus luteus</i> , STL 3101)	9.8 ± 0.2
	巨大芽孢杆菌(<i>Bacillus megaterium</i> , STL 3304)	17.0 ± 0.8
	蜡样芽孢杆菌(<i>Bacillus cereus</i> , STL 3301)	16.3 ± 0.5
	苏云金芽孢杆菌(<i>Bacillus thuringiensis</i> , STL 3302)	—
	枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus subtilis</i> , STL 3303)	14.7 ± 1.2
	枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus subtilis</i> , CMCC 63501)	15.0 ± 0.8
	屎肠球菌(<i>Enterococcus faecium</i> , STL 3103)	9.5 ± 0.4
	乳酸乳球菌(<i>Lactococcus lactis</i> , STL 3102)	9.7 ± 0.5
	大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i> , ATCC 8099)	11.0 ± 0.8
革兰氏阴性细菌	大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i> , ATCC 35218)	8.7 ± 0.9
	弗氏柠檬酸杆菌(<i>Citrobacter freundii</i> , STL 3202)	—
	铜绿假单胞菌(<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , ATCC 15442)	—
	痢疾志贺氏菌(<i>Shigella dysenteriae</i> , STL 3201)	—
真菌	酿酒酵母(<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , STL 3401)	—
	白假丝酵母(<i>Candida albicans</i> , ATCC 10231)	—
	黑曲霉(<i>Aspergillus niger</i> , ATCC 16404)	—
	灰绿青霉(<i>Penicillium glaucum</i> , STL 3501)	—
	康宁木霉(<i>Trichoderma koningii</i> , STL 3502)	—

注: —. 无抑菌活性。

2.2 菌株 K2 的鉴定

2.2.1 形态特征

菌株 K2 在 TSB 平板上生长呈扁平、灰色、不透明、边缘不整齐, 48~72h 培养菌落不形成皱褶。稀释石碳酸-复红染色观察(图 1), 16h 培养物菌体细胞呈直杆状, 两端较圆, 成链状或对状排列, 细胞大小(4~6)μm × (1~2)μm。革兰氏染色呈阳性。36h 培养物芽孢呈卵圆形, 芽孢形成后菌体不膨大, 多偏生于细胞一侧, 清晰可见菱形或无规则状伴孢晶体。



A.TSB 培养 16h; B.TSB 培养 36h。

图1 菌株 K2 菌体形态(× 1000)

Fig.1 Mycelial morphology of strain K2 (× 1000)

2.2.2 培养及生理生化特征

参照文献[7]进行培养及生理特征实验, 生化特征由 VITEK 32 鉴定系统鉴定, 结果如表 2 所示, 各项特征符合文献[7]关于 *Bacillus thuringiensis* 的描述。

表 2 菌株 K2 的培养及生理生化特征

Table 2 Physio-biochemical characteristics of strain K2

实验项目	结果	实验项目	结果
接触酶	+	脲酶	—
运动性	+	利用菊糖产酸	—
厌氧生长	+	利用乳糖产酸	—
6.5% NaCl 生长	—	利用甘露醇产酸	—
10℃ 生长	—	利用水杨素产酸	+
40℃ 生长	+	利用山梨醇产酸	—
V-P 实验	+	利用棉子糖产酸	—
淀粉水解	+	利用海藻糖产酸	+
七叶灵水解	+	利用阿拉伯糖产酸	—
精氨酸水解	+	利用蜜二糖产酸	—
硝酸盐还原	+	利用纤维二糖产酸	+
柠檬酸盐利用	+	利用木糖产酸	—

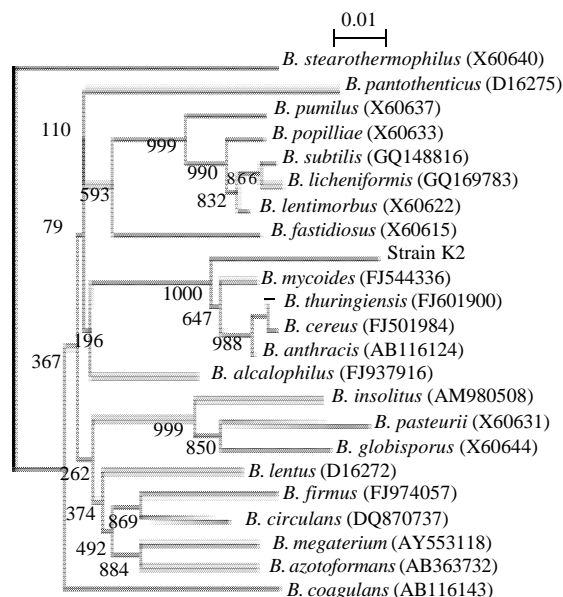
注: +, 阳性; —, 阴性。

2.2.3 16S rDNA 序列比对及系统发育分析

提取菌株 K2 总 DNA 模版, 利用细菌 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增, 扩增产物大小在 1.5kb 左右。经上海生工生物工程技术有限公司测序, 菌株 K2 的 16S rDNA 序列为 1513bp, 已在 GenBank 中登记, 登记号为: GQ288716。将菌株 K2 的 16S rDNA 序列与 GenBank + EMBL + DDBJ + PDB 数据库中报道的 16S rDNA 核苷酸序列进行比对, 结果表明: 菌株 K2 16S rDNA 序列与 *Bacillus* sp. (EU584544/EU584539/EU584534) 和 *Bacillus cereus* (FJ501984) 的相似度达 96%, 与 *Bacillus thuringiensis* (FJ601900) 相似度达 95%, 说明菌株 K2 属于芽孢杆菌属。

根据菌株 K2 16S rDNA 核苷酸序列的比对结果, 选择芽孢杆菌属下各个种与菌株 K2 以 16S rDNA 核苷酸序列为基础构建系统发育树。从图 2 可见, 菌株 K2 与

B.mycoides(FJ544336)、*B.thuringiensis*(FJ601900)、*B.cereus*(FJ501984)和 *B.anthraxis*(AB116124)亲缘关系最近。



分枝节点数值表示 1000 次 Boot-strap 分析所支持次数; 线段(0.01)表示 0.01 序列差异的分枝长度。

图2 以 16S rDNA 序列为基础的系统发育树

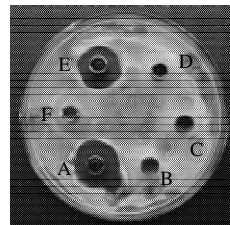
Fig.2 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence

根据形态特征、生长特性、生理生化特征、16S rDNA 序列比对及系统发育分析, 参照文献[7], 将菌株 K2 鉴定为 *Bacillus thuringiensis*。

2.3 菌株 K2 产抗菌物质性质

2.3.1 菌株 K2 产细菌素的鉴定

碱中和后的无细胞发酵液的制备已排除产酸对抗菌作用的干扰, 为验证其抗菌物质是蛋白类物质, 将发酵上清液经硫酸铵盐析及透析处理后, 发现其抗菌活性仍然存在。抗菌活性有显著增强, 牛津杯中点样 50 μL, 抑制蜡样芽孢杆菌抑菌圈直径达(21.7 ± 0.5)mm。



A.空白; B.胰蛋白酶; C.蛋白酶 K; D.木瓜蛋白酶; E.酸性蛋白酶; F.中性蛋白酶。

图3 发酵上清液的蛋白粗提液经蛋白酶处理后的抗菌活性

Fig.3 Antibacterial activity after protease treatment of crude protein extract from neutralized cell-free fermentation supernatant

发酵上清液的蛋白粗提液用不同蛋白酶处理后,检测其抗菌活性。结果如图3所示,经胰蛋白酶、蛋白酶K、木瓜蛋白酶和中性蛋白酶处理后,菌株K2无细胞发酵液的抗菌活性消失,而酸性蛋白酶处理对抗菌活性影响不大,证明发酵上清液中所含的抗菌物质是一类蛋白类物质。

2.3.2 菌株K2所产抗菌物质对温度和pH值的敏感性

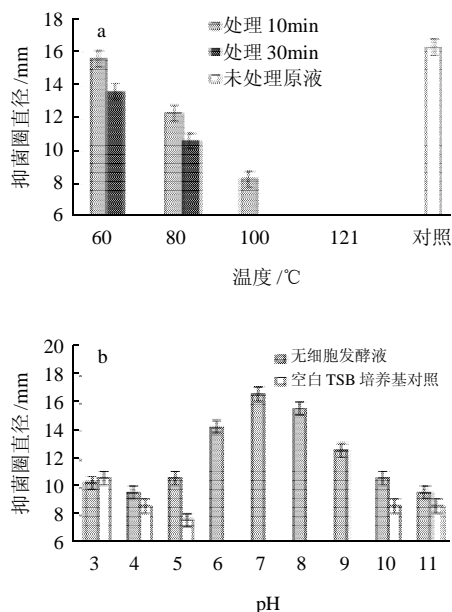


图4 温度和pH值对无细胞发酵液抗菌活性的影响

Fig.4 Effect of temperature and pH value on antibacterial activity of cell-free fermentation supernatant

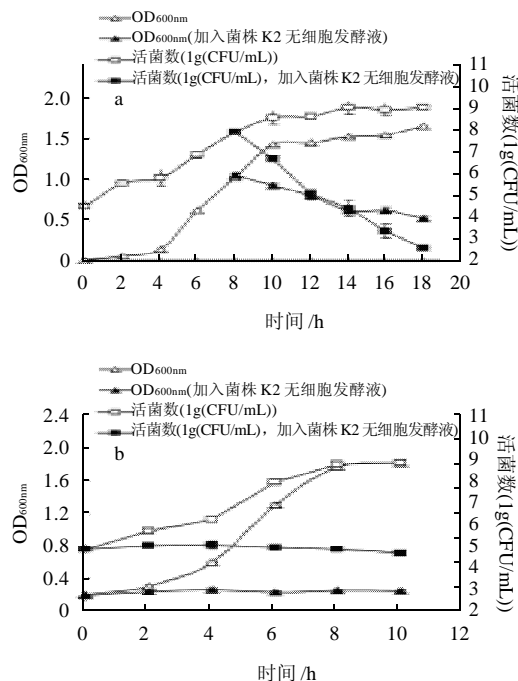
如图4a所示,和未经温度处理的对照相比,60℃处理10min和30min其抗菌活性变化不大,80℃处理10min和30min后活性有所下降,100℃处理10min活性下降明显,处理30min活性消失,并有蛋白沉淀析出,121℃处理后无活性。以上结果表明,菌株K2的抗菌物质有较好的热稳定性。

由图4b可知,K2所产抗菌物质在pH6~9范围内,抗菌活性较好。pH值低于5和高于10抗菌活性下降显著,此时虽可见有抗菌活性,未接种TSB培养基对照样也有一定抗菌活性,说明抗菌作用是由于过低和过高pH值对敏感菌的抑制引起。结果表明,菌株K2所产抗菌物质在pH6~9稳定性较好,pH值低于5和超过10对其抗菌活性影响较大。

2.3.3 菌株K2所产抗菌物质的作用方式

于培养至对数中后期(8h)的*Bacillus cereus*培养液中加入菌株K2无细胞发酵液,每2h测定波长600nm处光密度值和活菌数,结果如图5a所示。加入抗菌物质后,活菌数显著下降,前4h平均每2h下降两个数量级,8h

后活菌数(lg(CFU/mL))下降至2.58,表明K2所产抗菌物质对敏感菌的作用主要是杀菌。随着加入后培养时间的增加,发酵液OD_{600nm}值逐渐降低,可能因为其对敏感菌存在溶菌作用。



a.对菌体的作用;b.对芽孢的作用。

图5 菌株K2无细胞发酵液对蜡样芽孢杆菌菌体和芽孢的作用方式

Fig.5 Inhibition effect of cell-free fermentation supernatant from strain K2 on cells and spores of *Bacillus cereus*

由图5b可知,加入菌株K2无细胞发酵液后,10h内活菌数和OD_{600nm}值都未见明显增加,表明菌株K2所产抗菌物质对*Bacillus cereus*芽孢的萌发有很好的抑制作用。10h内芽孢数量未见显著减少,可知抗菌物质对芽孢没有杀灭作用。

2.3.4 菌株K2产抗菌物质的发酵曲线

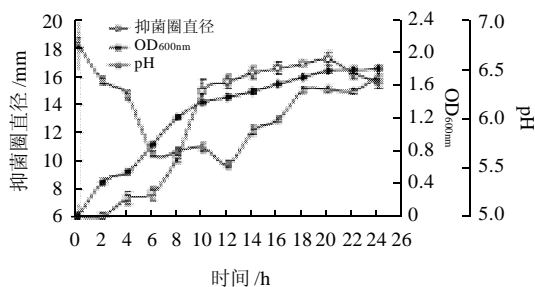


图6 菌株K2产抗菌物质的发酵曲线

Fig.6 Fermentation curve of strain K2 for antibacterial substance production

如图6所示,培养2~4h菌株K2进入对数生长期,发酵上清液的抗菌活性在4~6h能够检测到。随着培养时间的延长,发酵上清液的抑菌效果逐渐增强。至菌体生长进入稳定期10h时,其抗菌活性变化相对稳定,当培养到稳定期中期20h时,抗菌活性达到最大。20h以后抗菌活性逐渐下降。可能是发酵后期本身产生的蛋白酶对细菌素有降解作用,引起发酵液的抑菌活性下降。

3 讨论

芽孢杆菌(*Bacillus*)能够产生多种抗菌物质,主要是多肽类物质,以及一些非肽类物质(如聚酮类、氨基糖类和磷脂类)。这些具有抗菌作用的多肽类物质,按照其生物合成途径分为核糖体途径合成类和非核糖体途径合成类^[9]。由核糖体途径合成的细菌素^[10],其前体肽要经过转录后修饰才能形成有活性的抗菌物质,如羊毛硫细菌素类(lantibiotics)的枯草菌素 Subtilin 和 Ericin 等^[11]。非核糖体途径合成的抗菌肽(NRPs)类,需要由多酶机制合成,目前报道较多的是脂肽类(lipopeptides),由脂肪酸链和肽链两部分组成,小分子的环状或线状,有较广的抗菌谱,一般不被蛋白酶失活^[12],如表面活性素(surfactin)、伊枯草菌素(iturins)和 Fengycin 等。本实验分离到菌株 K2 所产抗菌物质经盐析和透析处理后,仍然有抗菌活性,并能被多种蛋白酶失活,主要抑制相近种的芽孢杆菌,符合细菌素的一般特征^[13]。

对细菌的 16S rRNA 序列进行同源性比较分析是鉴定细菌分类地位的一个常用方法。一般来讲,在种这个分类等级上,如果两个分类单位间的 16S rRNA 序列同源性大于 97.5%,则认为属于同一个种。尽管 16S rDNA 高度保守,但对亲缘关系较近的种分辨率不够高。一些新分离到的菌株因其他基因序列的数据很少,无与之相似的序列比较,而且一些已经发表的核酸序列菌株的具体分类地位还值得探讨。因此,实际菌种鉴定时需结合其他多种指标。本实验通过对菌株 K2 16S rDNA 序列比对及系统发育分析,确定其为芽孢杆菌属,并结合形态培养特征及生理生化特征,鉴定菌株 K2 为苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)。

文献[14]已报道芽孢杆菌属(*Bacillus*)的许多成员能够产生细菌素,如 *B. subtilis* 产生的 Subtilin、*B. cereus* 产生的 Cerein、*B. coagulans* 产生的 Coagulin^[13]、*B. megaterium* 产生的 Megacin^[13]等。其中枯草菌素 Subtilin 的研究较早,在生化、遗传特征以及作用方式上与 Nisin 相似^[15]。苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*)在芽孢形成过程中产生的 δ -内毒素伴胞晶体蛋白,具有很高的杀虫活性,已被制成商品杀虫剂广泛使用。本研究报道苏云金芽孢杆菌 K2 所产的抗菌物质主要抑制革兰氏

阳性细菌,特别对芽孢杆菌有强烈的作用,对热稳定性好,有较宽的 pH 值适用范围,具有良好的开发应用前景。

4 结论

从发酵蔬菜表面分离到菌株 K2,其无细胞发酵液经碱中和后对革兰氏阳性细菌有抑制作用,特别对芽孢杆菌抑制作用较强。将发酵上清液经硫酸铵盐析及透析处理后,发现其抗菌活性仍然存在,并且有显著增强,在蛋白酶处理后其抑菌活性消失,证明该抑菌活性物质为蛋白质类物质。K2 所产抗菌物质有较好的热稳定性,60℃处理 30min 其抗菌活性变化不大;在 pH6~9 范围内维持较高活性;其对敏感菌的作用主要是杀菌,而且对芽孢萌发有很好的抑制作用。该抗菌物质在菌体生长对数中期产生,在稳定期中期抗菌活性达到最大。菌株 K2 16S rDNA 序列比对及系统发育分析表明其与芽孢杆菌属亲缘关系最近,结合形态培养特征及生理生化特征,鉴定菌株 K2 为苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)。

参考文献:

- [1] DEEGAN L H, COTTERA P D, HILL C, et al. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension[J]. International Dairy Journal, 2006, 16(9): 1058-1071.
- [2] RILEY M A, WERTZ J E. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives[J]. Biochimie, 2002, 84(5/6): 357-364.
- [3] SETTANNI L, CORSETTI A. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation[J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 121(2): 123-138.
- [4] CLEVELAND J, MONTVILLE T J, NES I F, et al. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation[J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 71(4): 1-20.
- [5] 纪邵梅. 微生物培养基质控与图解[M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2006: 48-49.
- [6] 杜鹏. 乳品微生物学实验技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2008: 226.
- [7] 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: 62-65; 349-398.
- [8] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔著 D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2002: 8.
- [9] STEIN T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions[J]. Molecular Microbiology, 2005, 56(4): 845-857.
- [10] PAPAGIANNI M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications[J]. Biotechnology Advances, 2003, 21(6): 465-499.
- [11] ASADUZZAMAN S M, SONOMOTO K. Lantibiotics: Diverse activities and unique modes of action[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2009, 107(5): 475-487.
- [12] ONGENA M, JACQUES P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol[J]. Trends in Microbiology, 2007, 16(3): 115-125.
- [13] JACK R W, TAGG J R, RAY B. Bacteriocin of gram-positive bacteria [J]. Microbiological Reviews, 1995, 59(2): 171-200.
- [14] OSCÁRIZ J C, LASA I, PISABARRO A G. Detection and characterization of cerein 7, a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* with a broad spectrum of activity[J]. FEMS Microbiology Letters, 1999, 178(2): 337-341.
- [15] KLEEREBEZEM M. Quorum sensing control of lantibiotic production, nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis[J]. Peptides, 2004, 25(9): 1405-1414.