



研究报告

一株真菌拮抗细菌 Z21 的筛选与鉴定及其发酵条件优化

詹艺舒¹ 李婕¹ 褚秀丹¹ 蔡志英² 纪鹏伟³ 陈炳智^{1,4} 江玉姬^{*1,4}

1 福建农林大学食品科学学院 福建 福州 350002

2 福建省龙海市农业局 福建 龙海 363101

3 漳州市新发生物科技有限公司 福建 漳州 363107

4 福建农林大学生命科学学院菌物研究中心 福建 福州 350002

摘要:【背景】芽孢杆菌属的许多细菌具有抗逆性强、安全等特点,一直以来都是开发新型活性物质的研究热点。【目的】筛选对食品腐败真菌有抑制作用的细菌,将其开发为天然食品防腐剂。【方法】采用平板分离法、平板对峙法、抑制菌丝生长速率法从空气、竹子内生细菌中筛选真菌拮抗菌,通过形态、生理生化特征及 16S rRNA 基因序列分析等方法对其进行鉴定,利用正交试验确定其最优生长条件。【结果】筛选到一株对 6 种常见霉菌均有较强抑制作用的细菌 Z21。Z21 与甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus* strain CBMB205^T)的相似性最高,且形态特征和生理生化特征与 CBMB205^T 菌株基本相符。Z21 最佳发酵培养基配方和培养条件分别为:葡萄糖 20.0 g/L、NaNO₃ 20.0 g/L、MgSO₄ 3.0 g/L,培养温度为 32 °C,培养时间为 48 h。【结论】Z21 为甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*),对黑曲霉、康氏木霉、绿色木霉、少根根霉、易脆毛霉、赭绿青霉的生长具有较强的抑制作用且抑菌效果稳定,为广谱真菌拮抗菌。

关键词: 甲基营养型芽孢杆菌, 真菌, 拮抗细菌, 鉴定, 培养优化

Screen, identification and fermentation optimization of an antifungal bacterium Z21

ZHAN Yi-Shu¹ LI Jie¹ CHU Xiu-Dan¹ CAI Zhi-Ying² JI Peng-Wei³
CHEN Bing-Zhi^{1,4} JIANG Yu-Ji^{*1,4}

1 College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China

2 Longhai Agricultural Bureau of Fujian Province, Longhai, Fujian 363101, China

3 Zhangzhou XinFa Biotechnology Company Limited, Zhangzhou, Fujian 363107, China

4 Center for Fungi Research, College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China

Abstract: [Background] Many species of *Bacillus* with the merits of strong stress resistance and safety for human become a research hotspot in exploiting new active substances. [Objective] To isolate and screen antifungal bacteria and develop its active ingredients as a natural bio-antifungal agent of food.

Foundation items: Innovation Fund of Fujian Agriculture and Forestry University (KFA17588A, KF2015050)

***Corresponding author:** E-mail: jyj1209@163.com

Received: 29-07-2019; **Accepted:** 18-12-2019; **Published online:** 06-01-2020

基金项目: 福建农林大学创新基金(KFA17588A, KF2015050)

***通信作者:** E-mail: jyj1209@163.com

收稿日期: 2019-07-29; **接受日期:** 2019-12-18; **网络首发日期:** 2020-01-06

[Methods] These methods of plate culture, plate-confrontation and mycelia growth inhibition were used to isolate and screen antifungal bacteria from air and bamboo endophytic bacteria. Z21 was identified based on morphological, physiological, biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequence. The growth conditions of Z21 were through orthogonal experiment. **[Results]** Z21 showed strong antifungal activity to 6 kinds of fungi. The 16S rRNA gene sequence of Z21 was consistent with that of *Bacillus methylotrophicus* CBMB205^T, and the morphological characteristics and physiological and biochemical characteristics of Z21 were consistent with the CBMB205^T strain. The optimum culture conditions for Z21 were 32 °C for 48 h with a medium of glucose 20.0 g/L, NaNO₃ 20.0 g/L and MgSO₄ 3.0 g/L. **[Conclusion]** The Z21 was identified as *B. methylotrophicus*, it showed strongly and stalely inhibitory activities against *Aspergillus niger*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma viride*, *Rhizopus arrhizus*, *Mucor fragilis*, and *Penicillium ochrochloron*. So it was an abroad-spectrum antifungal bacterium.

Keywords: *Bacillus methylotrophic*, Fungus, Antifungal bacterium, Identification, Fermentation optimization

大量使用的化学农药和抗生素给食品安全和环境保护带来了巨大的压力, 开发新型肽类、脂肽类抗生素在农业生产以及食品防腐保鲜中的应用越来越重要^[1]。1945年Johnson等^[2]首次发现枯草芽孢杆菌代谢产物具有抗菌功能, 之后陆续有专家学者从芽孢杆菌属的细菌中分离出抗菌蛋白、抗菌肽等代谢产物^[3]。芽孢杆菌属(*Bacillus*)具有高效、广谱、安全等特性, 是目前研究较为成熟且应用较为广泛的重要生防微生物^[4], 其中以枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)、地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)以及短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)的研究和应用最多^[5-6]。

2010年, Madhaiyan等^[7]首次从韩国传统种植的水稻根际土壤中分离得到一株新的芽孢杆菌, 经过鉴定命名为甲基营养型芽孢杆菌(*B. methylotrophicus*)。在分类学上, 甲基营养型芽孢杆菌属于厚壁菌门芽孢杆菌纲芽孢杆菌目芽孢杆菌科芽孢杆菌属, 广泛分布于自然界中^[8]。杨德昌等^[9]从渤海海域海泥中分离到一株甲基营养型芽孢杆菌, 证明其对于防治黄瓜、番茄、烟草的灰霉、苹果树腐烂病等多种真菌病害有很好的效果。魏新燕等^[10]从沧州渤海海域分离得到一株甲基营养型芽孢杆菌BH21, 研究表明该菌株的无菌发酵液对葡萄灰霉病菌有较强的抑制作用。吕倩等^[11]从南海深海中分离得到一株具有较强抗真菌活性的细菌, 鉴定为甲基营养型芽孢杆菌。尹向田等^[12]在山东省葡萄研究院的实验室葡萄园根际土壤中

分离得到一株菌, 试验表明该菌株为甲基营养型芽孢杆菌。王松等^[13]从浓香型白酒发酵糟培中分离到一株产细菌素的甲基营养型芽孢杆菌J2B-74, 并对其产细菌素的发酵条件进行了优化。

本试验从空气中分离到一株对多种霉菌具有较强抑制作用的细菌Z21, 通过16S rRNA基因序列分析、形态学特征、生理生化特征进行鉴定, 确定其为甲基营养型芽孢杆菌; 并对其抑菌效果进行探究, 对其发酵条件进行了优化, 为该菌株开发成天然的食品防腐剂提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌种

供试真菌为康氏木霉(*Trichoderma koningii*)、绿色木霉(*Trichoderma atroviride*) ATCC 30153、赭绿青霉(*Penicillium ochrochloron*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、易脆毛霉(*Mucor fragilis*) ATCC 3093、少根根霉(*Rhizopus arrhizus*), 均为福建农林大学食品微生物实验室保藏。

1.1.2 培养基

牛肉膏蛋白胨琼脂培养基(BPAD) (g/L): 牛肉膏 3.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, 琼脂 15.0, pH 7.4-7.6; 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA) (g/L): 马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂 15.0, pH 7.2-7.4; 马铃薯液体培养基(PDL): 马铃薯 200.0 g/L, pH 7.2-7.4; 缓冲蛋白胨水: 蛋白胨 10.0 g/L, pH 7.2-7.4。所有培养基 1×10⁵ Pa 灭菌 30 min, 备用。

1.1.3 主要试剂和仪器

可溶性淀粉、蔗糖、葡萄糖、果糖等分析纯试剂, 国药化学试剂有限公司; PCR 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 仪, Bio-Rad 公司; 恒温生化培养箱, 上海一恒实业有限公司。

1.2 方法

1.2.1 拮抗细菌的初筛

拮抗菌的分离: 将凝固好的 BPDA 培养基分别放置在室内和室外空气中暴露 30 min, 盖上盖子, 28 °C 培养 24 h。挑取不同菌落形态的细菌用平板划线法进行分离纯化, 并保存于牛肉膏蛋白胨试管斜面供筛选。竹子内生菌由福建农林大学生命科学学院微生物实验室提供。

拮抗菌的初筛: 采用平板对峙法, 取一环细菌, 在距离平板中央圆心左右各 3 cm 处分别划线接种细菌, 28 °C 培养 72 h, 让细菌产生代谢产物并扩散, 用无菌打孔器(直径 8 mm)在已活化好的康氏木霉平板上打孔, 菌块接入含有细菌的 PDA 平板中央点, 28 °C 培养 4 d 后用游标卡尺分别测量细菌对康氏木霉的抑菌带宽度, 筛选拮抗效果强的细菌, 每个处理重复 3 皿。抑菌带宽度为霉菌菌落边缘到细菌菌苔边缘之间的距离(mm)。

1.2.2 拮抗细菌的复筛

从初筛结果中选取一株抑制效果最好的细菌进行复筛, 接种一环该细菌于 PDL 培养基中, 28 °C、130 r/min 培养 72 h 后, 4 500 r/min 离心 20 min, 上清液过无菌滤膜(孔径 0.22 μm), 取其中 0.2 mL 滤液均匀涂布于 PDA 平板培养基, 以等体积无菌水作为对照, 在平板中央分别接入 8 mm 康氏木霉菌块, 28 °C 培养 4 d 后测定菌丝的生长直径, 每个处理重复 3 皿。霉菌菌落直径采用交叉法进行测量, 并计算菌丝生长抑制率, 其中抑制率(%)=[(对照霉菌菌落直径-处理霉菌菌落直径)/(对照霉菌菌落直径-菌块直径)]×100。

1.2.3 拮抗菌 Z21 的抑菌谱测定

抑菌实验参照 1.2.1 步骤中方法, 每种指示霉菌重复 3 皿, 确定 Z21 的抑菌谱。

1.2.4 Z21 的鉴定

16S rRNA 基因序列分析: 利用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGTATCATGGCTCAG-3')和 1492F (5'-AAGGAGGTGATCCAACCGCA-3')进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(30 μL): DNA 模板 1 μL, 10×Buffer 3 μL, dNTPs (10 mmol/L) 2 μL, 27F 和 1492R (10 μmol/L)各 1 μL, *rTaq* 酶(5 U/μL) 0.3 μL, ddH₂O 补足至 30 μL。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 1.5 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 测序后的拼接结果在 NCBI 上进行 BLAST 相似序列检索比对, 采用 Clustal 软件和 MEGA 软件进行多序列同源性分析, 并构建系统进化树。

形态学和生理生化实验: 取 0.1 mL 菌液用 100 mL 无菌水稀释后涂布于 BPDA 培养基, 37 °C 培养 18 h, 观察菌落形态、大小、边缘、表面、凹凸度、透明度等, 并进行革兰氏染色、简单染色和芽孢染色, 具体方法参考《常见细菌鉴定手册》^[14]。生理生化实验步骤参照参考文献[14-15]。部分理化指标委托中国工业菌种保藏中心测定(Vitek 上机测定)。

透射电镜观察: 收集在 BPDA 培养基中培养 18 h 的拮抗菌进行固定、脱水, 后用 1%磷钨酸负染 1 min 前处理后上镜进行观察。

1.2.5 发酵条件优化

(1) 种子液制备: 挑取一环 Z21 接种于装有 100 mL PDL 培养基的三角瓶中, 28 °C、130 r/min 培养 18 h。

(2) 不同碳、氮源、金属离子对 Z21 发酵液抑菌活性的影响: 以 PDL 培养基为对照, 采用单因素试验法分别研究添加量为 2% (质量体积比)的不同碳源(蔗糖, 葡萄糖, 可溶性淀粉, 甘露醇, 乳糖, 果糖)、添加量为 2% (质量体积比)的不同氮源(大豆蛋白胨, 牛肉膏, 酵母膏, 硫酸铵, 柠檬酸铵, NaNO₃)、添加量为 0.2% (质量体积比)的不同

无机盐(NaCl, CaCl, FeSO₄, MgSO₄, K₂HPO₄, ZnSO₄), 以 3%接种量接入各培养基, 28 °C、130 r/min 培养 72 h, 按照 1.2.2 复筛中的方法计算菌丝生长抑制率。采用缓冲蛋白胨水将发酵液进行 10 倍系列稀释法计算细菌数, 确定最佳碳、氮源和无机盐。

(3) 正交试验: 根据上述结果, 设计 3 因素 4 水平的正交试验(表 1)。

(4) 发酵条件优化: 采用最佳培养基, 测定不同发酵条件对 Z21 生长以及发酵滤液对康氏木霉菌丝生长的抑菌效果。培养温度分别设计为 20、28、32、40 °C; 培养时间分别为 24、36、48、60、72、84、96 h, 以确定最佳培养温度和时间。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌的初筛结果

空气中分离的细菌和竹子内生菌一共 38 株细菌经过多次的分离纯化后编号为 Z1–Z38。其中有 9 株细菌对康氏木霉有很强的抑制作用, 这些细菌对康氏木霉的拮抗实验结果见表 2。其中菌株 Z21 具有很强的抑制康氏木霉菌丝生长的作用, 抑菌带宽度达到 25.82±0.66 mm, 比另外 8 株细菌的抑制效果强, 差异显著, 并且经过连续多次传代后抑菌效果依然稳定, 所以对菌株 Z21 进行进一步的研究。

2.2 拮抗菌的复筛

从表 3 和图 1 可以看出, Z21 的发酵滤液对康氏木霉具有很强的抑制作用, 菌丝生长抑制率达到 42.83%。说明 Z21 在发酵过程中产生具有抑菌效果的活性物质, 并分泌至发酵液中, 而且抑菌效果稳定。

表 1 正交试验的因素及水平设计
Table 1 The factors and levels of orthogonal test

水平	因素 Factors		
Levels	A Glucose (%)	B NaNO ₃ (%)	C MgSO ₄ (%)
1	1	2	0.20
2	2	3	0.30
3	3	4	0.40

表 2 9 株细菌对康氏木霉的抑制效果(抑菌带宽度, mm)

Table 2 The inhibitory effect of 9 strains bacteria on *T. koningii* (inhibition zone width, mm)

供试菌株	重复 1	重复 2	重复 3	平均值
Test strains	Repeat 1	Repeat 2	Repeat 3	Average value
CK	0	0	0	0.00±0.00
Z21	25.05	25.55	26.85	25.82±0.66a
Z20	21.25	22.45	23.89	22.53±0.93b
Z34	20.34	22.44	22.38	21.72±0.85c
Z32	17.55	18.31	17.88	17.91±0.27d
Z13	17.76	15.00	15.95	16.24±0.99de
Z15	14.55	15.95	16.35	15.62±0.67e
Z3	6.05	7.09	7.99	7.04±0.69f
Z4	6.78	8.05	7.56	7.46±0.45f
Z8	5.55	6.75	6.88	6.39±0.52f

注: 数据后不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平差异显著。
Note: Significant difference at $P<0.05$ level was reflected in different lowercase letters following the figures.

表 3 Z21 发酵滤液对康氏木霉的抑菌效果(菌丝生长直径, mm)

Table 3 The inhibition effect of sterile fermented filtrates of Z21 on *T. koningii* (mycelial growth diameter, mm)

试验号 Test No.	CK	Z21
1	76.96	48.43
2	78.07	47.23
3	80.28	49.16
平均值 Average value (mm)	78.44±1.69	48.27±0.98
抑制率 Inhibition rate (%)	—	42.83

注: —: 没有抑制。
Note: —: No inhibition.

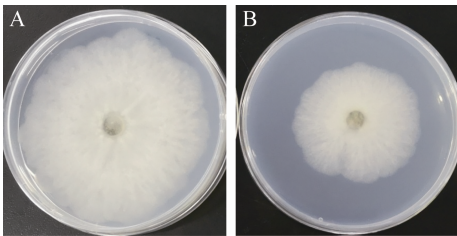


图 1 Z21 发酵滤液对康氏木霉的抑菌效果
Figure 1 Inhibition effect of Z21 fermentation filtrate on *T. koningii*

注: A: 对照组; B: 处理组。
Note: A: Control group; B: Treatment group.

2.3 Z21 的抑菌谱

从图 2 可以看出, Z21 除了对康氏木霉具有很强的抑制效果外, 对食品中常见的黑曲霉、少根根霉、赭绿青霉、易脆毛霉、绿色木霉均具有一定的抑制效果。与对照组相比, 康氏木霉在含有 Z21 的平板上其菌丝生长明显受到抑制, 在 Z21 和康氏木霉之间有一条明显的透明带, 即抑菌带。从表 4 可以看出, Z21 的抑菌谱较广、抑菌能力较强, 对食品中常见的少根根霉、赭绿青霉、易脆毛霉、绿色木霉、康氏木霉、黑曲霉都具有很好的菌抑制效果。其中, 对康氏木霉和黑曲霉抑制

效果最好, 抑菌带宽度分别达到了 24.13 ± 1.06 mm 和 18.80 ± 0.23 mm, 对绿色木霉和易脆毛霉的抑制效果次之, 抑菌带宽度为 16.39 ± 0.55 mm 和 14.39 ± 0.69 mm, 对少根根霉、赭绿青霉也有一定的抑制效果。从图 2 和表 4 可知: Z21 对许多真菌生长具有较强的抑制作用, 可开发成食品天然防腐剂, 具有潜在的应用价值。

2.4 Z21 的 16S rRNA 基因序列分析

16S rRNA 基因 PCR 产物电泳结果(图 3)显示, PCR 产物约为 1.8 kb, 符合常规的 16S rRNA 基因序列长度。

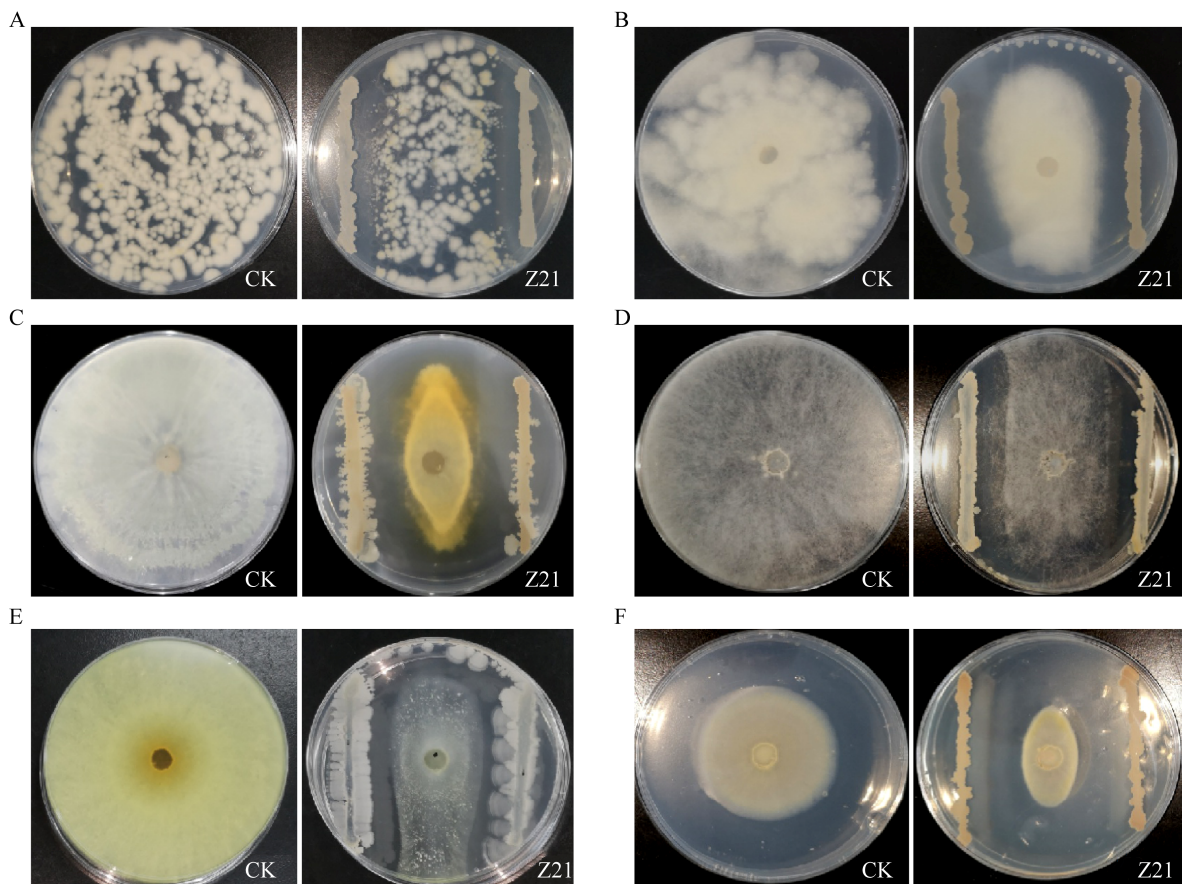


图 2 Z21 的抑菌谱

Figure 2 Antibacterial spectrum of Z21

注: A-F: 赭绿青霉、易脆毛霉、康氏木霉、少根根霉、绿色木霉、黑曲霉。

Note: A-F: *Penicillium versicolor*, *Mucor fragile*, *Trichoderma koningii*, *Rhizopus fuligineus*, *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger*.

表 4 Z21 抑菌谱(抑菌带宽度, mm)
Table 4 Inhibition spectrum of Z21 (inhibition zone width, mm)

指示霉菌	重复 1	重复 2	重复 3	平均值
Indicating mold	Repeat 1	Repeat 2	Repeat 3	Average value
<i>Trichoderma koningii</i>	24.67	22.91	24.82	24.13±1.06a
<i>Aspergillus niger</i>	18.58	18.79	19.04	18.80±0.23b
<i>Penicillium ochrochloron</i>	6.33	6.35	6.05	6.24±0.17e
<i>Trichoderma atroviride</i>	16.49	16.88	15.80	16.39±0.55c
<i>Mucor fragilis</i>	13.59	14.80	14.78	14.39±0.69d
<i>Rhizopus arrhizus</i>	2.02	2.21	2.02	2.08±0.11f

注: 数据后不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平差异显著。
Note: Significant difference at $P<0.05$ level was reflected in different lowercase letters following the figures.

测序所得 16S rRNA 基因碱基序列已提交 GenBank (登录号: MN 240443), 并在 NCBI 数据库上进行 BLAST 比对, 发现 Z21 与 *Bacillus methylotrophicus* strain CBMB205^T (NR16240.1)相似性最高, 为 99.69%。分析显示 Z21 与 *B. methylotrophicus* strain CBMB205^T (NR16240.1)聚在同一系统分支上(图 4)。因此, 初步鉴定 Z21 为甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*)。

2.5 Z21 的形态学特性

由图 5 可以看出, Z21 在 PDBA 培养基上于

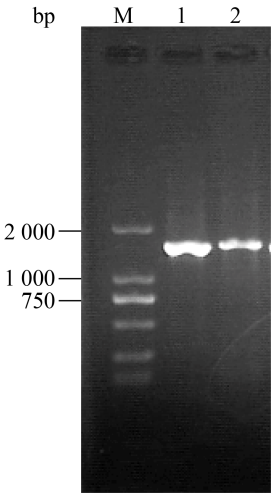


图 3 Z21 16S rRNA 基因 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳
Figure 3 Agarose gel electrophoresis of 16S rRNA gene PCR product of Z21

Note: M: DL2000 DNA Marker; 1, 2: Z21.

37 °C 培养 18 h 后, 菌落直径约 3.1–3.9 mm, 呈淡黄色, 圆形, 微微隆起, 不透明, 边缘整齐, 质地粘稠, 3 d 后菌落表面会出现皱褶。Z21 革兰氏染色阳性, 有荚膜和芽孢, 芽孢圆形。透射电镜观察显示 Z21 体呈杆状(图 5), 两端钝圆, 大小为 (0.8–1.0)×(1.8–2.4) μm, 周生鞭毛。

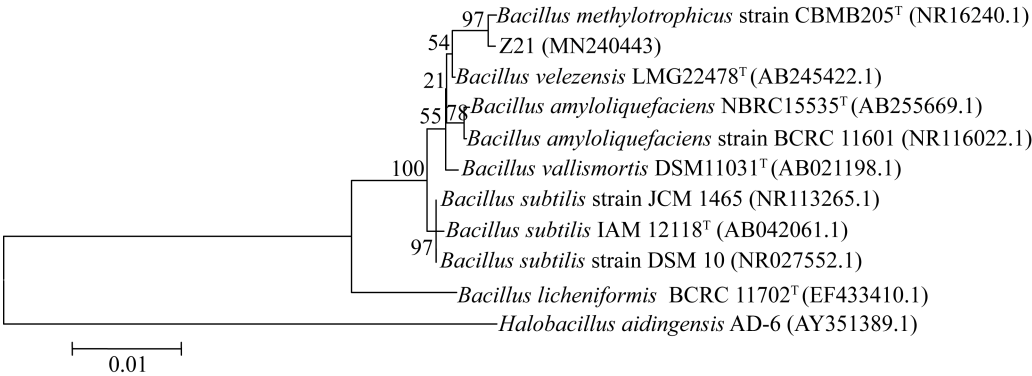


图 4 基于 16S rRNA 基因序列构建的 Z21 及相关菌株系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree of Z21 and other related strains based on 16S rRNA gene sequence

注: Bootstrap 次数设置为 1 000, 邻接法构建系统发育树; 括号内代表序列 GenBank 登录号; 分支处的数字表示 Bootstrap 支持率; 标尺表示 0.5% 的序列进化差异。

Note: The number at branch nodes are the percentage bootstrap support based on neighbor-joining analysis of 1 000 resample data sets. Numbers in parentheses are GenBank accession number. The numbers in each branch point denote the percentages supported by bootstrap. The scale presents 0.5% sequence variance.

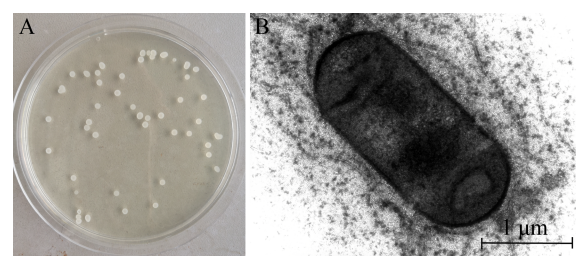


图 5 Z21 的菌落(A)及扫描电镜形态(B)
Figure 5 Colony (A) and scanning electron morphology (B) of Z21

2.6 Z21 的生理生化特征

Z21 的主要生理生化特征见表 5。由表 5 可知, Z21 好氧, 接触酶、明胶水解、脲酶、吲哚产生、淀粉水解、硝酸盐还原、β-木糖苷酶、苯丙氨酸芳胺酶、丙酮酸盐、L-吡咯烷酮芳胺酶、

α-葡萄糖苷酶、β-葡萄糖苷酶、竹桃霉素耐药、七叶苷水解、多粘菌素 B 耐药、α-半乳糖苷酶、丙氨酸芳胺酶、丙氨酸-苯丙氨酸-脯氨酸芳胺酶、甲基-α-D-吡喃葡萄糖苷酸化和甘氨酸芳胺酶均为阳性, 能利用较多种糖类进行发酵。从表 5 中可以看出, 当 pH 低于 3.0 时 Z21 不生长, 生长的 pH 范围为 5.0–9.0; 当温度低于 4 °C 和高于 55 °C 时, Z21 不生长, 生长温度范围为 20–45 °C; 盐耐受范围小于 7% (质量体积比)。与参考文献[4,7,11]对比, Z21 的这些生理生化特征与甲基营养型芽孢杆菌的生理生化特征和生物学特性相符。综合形态特征、生理生化特征以及 16S rRNA 基因序列分析, 基本确定 Z21 属于甲基营养型芽孢杆菌(*B. methylotrophicus*)。

表 5 Z21 的生理生化特征
Table 5 Physiological and biochemical characteristics of Z21

项目 Items	结果 Results	项目 Items	结果 Results	项目 Items	结果 Results
Oxygen	+	α-galactosidase	+	β-mannosidase	–
Glucose	+	Alanine arylaminase	+	L-pyrrolidone arylamine enzyme	+
Lactose	+	Tyrosine arylase	–	Phosphorylcholine	–
Methyl red	–	β-N-acetylglucosidase	–	Pyruvate	+
Voges-Proskauer test	–	Alanine-phenylalanine-proline arylamine enzyme	+	α-glucosidase	+
Nitrate utilization	+	Cyclodextrin	–	D-tagatose	–
Indole production	–	D-galactose	–	Inulin	–
H ₂ S	–	Glycogen	+	D-ribose	–
Gelatin	+	Inositol	+	Putrescine assimilation	–
Citrate utilization	–	Methyl-α-D-glucopyranylation	+	L-rhamnose	–
Oxidase	+	Ellman	–	β-glucosidase	+
Catalase	+	Methyl-D-xylosin	–	D-trehalose	+
Urease	+	α-mannosidase	–	Ambomycin resistance	+
Starch	+	Maltotriose	+	Aescin hydrolysis	+
β-xylosidase	+	Glycine arylaminase	+	Red tetrazolium	+
L-lysine arylamine enzyme	–	D-mannitol	+	Polymyxin B resistance	+
L-aspartate arylamine enzyme	–	D-mannose	+	Kanamycin resistance	–
Leucine arylaminase	–	D-melose	–	Temperature (°C)	20–45
Phenylalanine arylaminase	+	N-acetyl-D-glucosamine	–	pH	5.0–9.0
L-proline arylamine enzyme	–	Ancient sugar	+	NaCl concentration	<7%

注: +: 阳性; -: 阴性。
Note: +: Positive; -: Negative.

2.7 Z21 培养条件的优化

2.7.1 不同碳源、氮源和无机盐对 Z21 生长及发酵液抑菌活性的影响

Z21 利用 6 种不同碳源发酵获得的发酵液(无菌)对康氏木霉有一定的抑制作用(图 6), 其中葡萄糖作为碳源的发酵液抑菌率最高为 58.56%, 显著高于其他碳源。乳糖、蔗糖稍差, 果糖、甘露醇、可溶性淀粉和对照组无显著性差异, 抑菌效果不理想。葡萄糖作为碳源时 Z21 数量为 8.35 lgCFU/mL, 高于其他碳源。从图 6 中可以看出, 添加不同碳源对细菌生长的数量影响较小, 只有乳糖为碳源时, Z21 的生长数量明显较少。但碳源对抑菌率的影响较大, 可能是抑菌物质的合成与碳源物质有关系, 因此葡萄糖是液体发酵培养基的最佳碳源。

6 种氮源发酵液均对木霉菌丝生长有一定的抑制作用(图 7), 其中抑菌效果较好的是无机氮源 NaNO_3 , 抑菌率为 69.31%, 显著高于其他氮源。在 NaNO_3 中 Z21 数量不是最高, 比不添加氮源组低, 为 7.77 lgCFU/mL, 添加牛肉膏和大豆蛋白胨对 Z21 的生长有一定的抑制, 说明 Z21 生长不必外加氮源。从图 7 可知, 不同的氮源对抑菌效果有明显的差异, 说明添加不同氮源对抑菌物质的产生会有较大影响。

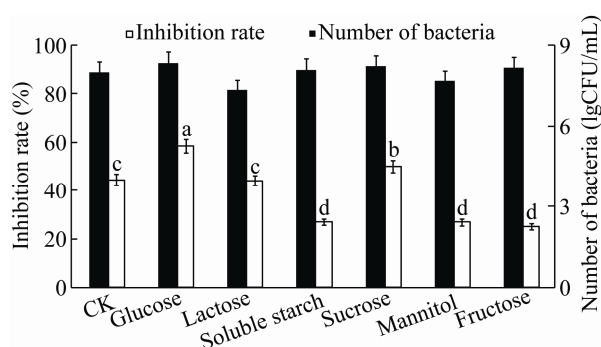


图 6 不同碳源对 Z21 的生长和发酵液抑菌活性的影响
Figure 6 Effects of different carbon sources on the growth and inhibition activity of submerged cultured of Z21

注: 不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平差异显著。

Note: Significant difference at $P<0.05$ level was reflected in different lowercase.

6 种不同无机盐发酵液对康氏木霉的抑制作用差异较大(图 8), 其中添加了 MgSO_4 的发酵液抑菌率最高, 为 62.12%, 显著高于其他无机盐。拮抗菌 Z21 在几种无机盐的培养基中生长有显著差异, 在 FeSO_4 和 ZnSO_4 的发酵培养基上 Z21 无法生长, 并且对康氏木霉完全没有抑制作用。 NaCl 、 CaCl_2 、 MgSO_4 、 K_2HPO_4 对细菌的生长没有很大的影响, 但是对康氏木霉的抑制效果有很明显的差异, 这可能与抑菌物质的结构或代谢途径有关, 有待进一步深入研究。

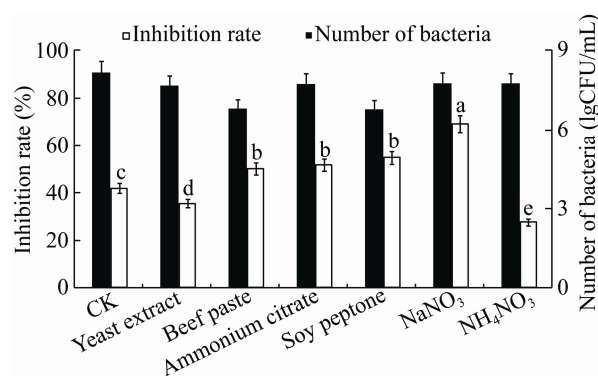


图 7 不同氮源对 Z21 的生长和发酵液抑菌活性的影响
Figure 7 Effects of different nitrogen sources on the growth and inhibition activity of submerged cultured of Z21

注: 不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平差异显著。

Note: Significant difference at $P<0.05$ level was reflected in different lowercase letters.

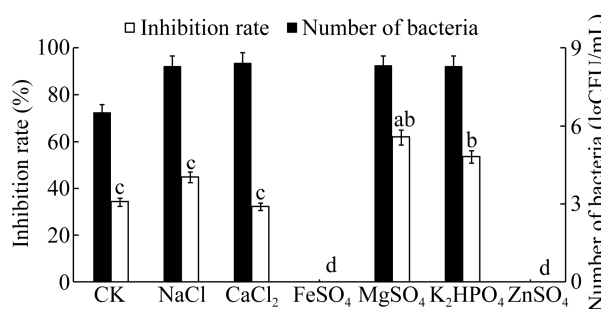


图 8 不同无机盐对 Z21 的生长和发酵液抑菌活性的影响
Figure 8 Effects of different inorganic salt on the growth and inhibition activity of submerged cultured of Z21

注: 不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平差异显著。

Note: Significant difference at $P<0.05$ level was reflected in different lowercase letters.

2.7.2 培养基配方的正交试验

根据碳源、氮源以及无机盐的单因素试验结果, 选择葡萄糖(A)、NaNO₃ (B)、MgSO₄ (C) 3 个因素进行 3 因素 4 水平正交试验(表 6)。因为之前的实验结果显示, 在添加不同碳源、氮源和无机盐的培养基中 Z21 生长无显著性差异, 因此正交试验只以抑菌活性为指标, 确定最优发酵培养基的配方。正交试验结果表明, 3 个因素对康氏木霉抑制率的影响顺序为 B>C>A, 最佳水平组合为 A₂B₁C₂, 方差分析表明 B 因素对康氏木霉抑制率的影响显著高于其他几个因素, 验证实验证明此组合的抑菌率高于其他组, 达到 74.06%。综合结果, 最佳组合为 A₂B₁C₂, 即 1 L 发酵培养基中含葡萄糖 20.0 g、NaNO₃ 20.0 g、MgSO₄ 3.0 g。

表 6 Z21 发酵培养基配方正交试验结果
Table 6 Orthogonal test results of fermentation medium formula of Z21

试验号 Test No.	Glucose (A)	NaNO ₃ (B)	MgSO ₄ (C)	Empty column (D)	抑菌率 Inhibition rate (%)
1	1	1	1	1	62.40
2	1	2	2	2	67.91
3	1	3	3	3	56.83
4	2	1	2	3	74.06
5	2	2	3	1	66.44
6	2	3	1	2	58.56
7	3	1	3	2	68.15
8	3	2	1	3	65.11
9	3	3	2	1	61.34
K _{1j}	187.14	204.6	186.06	190.17	
K _{2j}	199.05	199.47	203.31	194.61	
K _{3j}	194.61	176.73	191.43	195.99	
K _{1J}	62.38	68.2	62.02	63.39	
K _{2J}	66.35	66.49	67.77	64.87	
K _{3J}	64.87	58.91	63.81	65.33	
R _j	3.97	9.29	5.75	1.94	
最优方案 Optimum parameters	A ₂ B ₁ C ₂				

2.7.3 不同培养温度和时间对 Z21 生长及发酵液抑菌活性的影响

采用上述最佳发酵培养基配方, 对发酵条件进行优化。从图 9 可以看出温度对抑菌效果的影响很大, 随着温度升高, 抑菌率先增大后减小, 其中 32 °C 的发酵液抑菌率最高, 达到 78.13%; 当温度为 20 °C 时抑菌效果最差, 可能是因为此时细菌生长缓慢, 代谢产物生产少; 28 °C 时, 虽然细菌数量较多, 但产生的代谢物较少; 36 °C 时, 细菌生长受到影响, 抑菌活性也较弱, 说明温度对抑菌物质的产生有较大的影响。在最佳发酵温度的基础上对发酵时间进行研究, 从图 10 可以看出, 抑菌率随培养时间的延长先增大后减小, 发酵 48 h 时达到最高, 为 86.21%, 随后抑菌率开始下降。从细菌数量分析, 24 h 时细菌数最高但抑菌率最低, 可能是因为此时抑菌物质产生较少, 随后细菌的数量呈现稳定, 但抑菌率明显下降了, 可能后期培养液环境会影响细菌抑菌物质的活性, 或抑菌物质在后期被分解。以 Z21 抑菌率为指标, 参考 Z21 的生长速度, 确定最优的发酵条件为培养温度为 32 °C、培养时间为 48 h, 此条件下抑菌活性最高, 比优化前抑菌率提高了 43.38%。

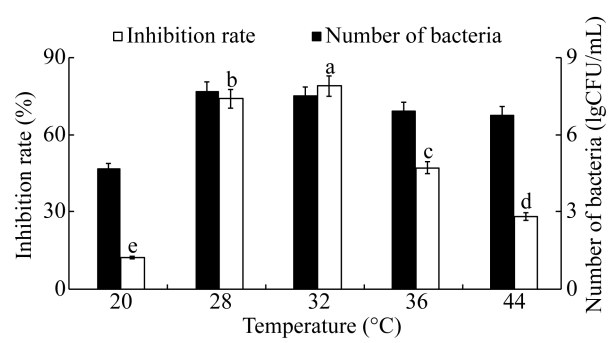


图 9 不同温度对 Z21 的生长和发酵液抑菌活性的影响
Figure 9 Effect of different temperature on growth and inhibition activity of submerged cultured of Z21

注: 不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平差异显著。
Note: Significant difference at $P<0.05$ level was reflected in different lowercase letters.

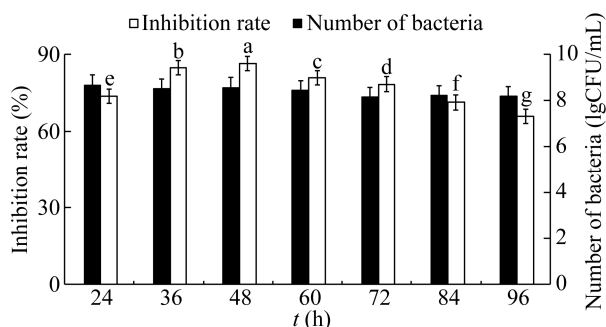


图 10 不同时间对 Z21 的生长和发酵液抑菌活性的影响
Figure 10 Effect of different time on growth and inhibition activity of submerged cultured of Z21

注：不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著。

Note: Significant difference at $P < 0.05$ level was reflected in different lowercase letters.

3 讨论与结论

甲基营养型芽孢杆菌是芽孢杆菌属的一个新种，对人、畜及环境安全，因此，其作为芽孢杆菌属的“后起之秀”，被应用于环境保护、植保、园艺、食品防腐等各行业[16]。本试验综合了细菌的 16S rRNA 基因序列、生理生化特征和形态学特征，确定 Z21 为甲基营养型芽孢杆菌(*B. methylotrophicus*)。随后对培养基和发酵条件进行优化，经过优化的无菌发酵液其抑菌率比未优化前提高了 43.38%，对康氏木霉生长的抑菌率达到了 86.21%，优化效果非常明显，对甲基营养型芽孢杆菌在抑菌条件优化方面提供了一定的借鉴。

木霉、黑曲霉、青霉、根霉以及毛霉是粮食贮藏中主要的风险因素，产生发热霉变，加快粮食有机物的消耗，造成粮食腐败发霉。吴红萍等[17]和李新社等[18]针对海南和湖南等地的粮库调查发现根霉、青霉、木霉、毛霉和曲霉等真菌为优势菌。本实验筛选得到的甲基营养型芽孢杆菌 Z21 具有广谱的抑菌效果，尤其对木霉、黑曲霉和毛霉的抑菌效果非常好，抑菌带清晰，最大宽度达到 24.13 ± 1.06 mm (细菌与真菌接种位置距离为 30 mm)。同时，甲基营养型芽孢杆菌在抑制植物病原菌方面的研究比较多[4,10]且已经应用于生产[9]，广泛用于田间治理黄瓜灰霉病等植物病害，

是安全的菌种，但是该菌应用在粮食储藏方面的研究比较少[19]。王燕等[20]筛选得到一株具有降解黄曲霉毒素 AFB1 的甲基芽孢杆菌 WZ-4，有望开发成新的微生物新型饲料和食品添加剂。本文研究结果为甲基营养型芽孢杆菌开发成食品防腐剂等方面利用提供一定的参考。

芽孢杆菌属细菌的抑菌机理主要是通过分泌一些次生代谢产物来抑制病原菌的生长[21]。Babad 等首次从枯草芽孢杆菌培养液中分离出抗真菌肽[22]。吴燕燕等[23]研究发现，使用甲基营养型芽孢杆菌中抗菌肽对罗非鱼片进行保鲜，结果表明抗菌肽具有很好的保鲜防腐效果，明显延长了罗非鱼片的保鲜时间。Sharma 等[24]从孟加拉拉杰沙希大学土壤中分离得到一株甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*-SCS2012)，并发现其粗提物对痢疾志贺氏菌、大肠杆菌、蜡状芽孢杆菌、无乳链球菌等食品中常见的细菌具有很好的抑制效果。因此，甲基营养型芽孢杆菌不仅具有广谱的杀菌抑菌效果，而且对人、环境较安全，是开发新活性物质的一类有益菌[4]。本文的研究结果为 Z21 活性物质的分离鉴定以及开发为天然品防腐剂应用提供了参考。

REFERENCES

- [1] Bale JS, van Lenteren JC, Bigler F. Biological control and sustainable food production[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2008, 363(1492): 761-776
- [2] Johnson BA, Anker HS, Meleney FL. Bacitracin: a new antibiotic produced by a member of the *B. subtilis* group[J]. Science, 1945, 102(2650): 376-377
- [3] Hu YH, Chen W, Liu YZ, et al. Production and Application of Probiotic Bacillus[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2015: 176-191 (in Chinese)
胡永红, 陈卫, 刘邰洲, 等. 益生菌芽孢杆菌生产与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2015: 176-191
- [4] Zhou DB, Chen YF, Jing T, et al. Identification and colonization of *Bacillus methylotrophicus* against banana *Fusarium* wilt disease[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2017, 33(36): 145-151 (in Chinese)
周登博, 陈宇丰, 井涛, 等. 抗香蕉枯萎病甲基营养型芽

- 孢杆菌的鉴定及定殖[J]. 中国农学通报, 2017, 33(36): 145-151
- [5] Zhang B. Purification, identification and mechanism of action of lipopeptide antibiotic bacillomycin L produced by *Bacillus amyloliquefaciens*[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of China Agricultural University, 2014 (in Chinese)
- 张宝. 解淀粉芽孢杆菌抗菌脂肽 bacillomycin L 的纯化鉴定及抑菌机理研究[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2014
- [6] Wang J, Cao JM, Chen DX, et al. Antimicrobial effect and components analysis of volatile organic compounds from *Bacillus pumilus* AR03[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2018, 51(10): 1908-1919 (in Chinese)
- 王静, 曹建敏, 陈德鑫, 等. 短小芽孢杆菌 AR03 挥发性有机物的抑菌活性及其组分分析[J]. 中国农业科学, 2018, 51(10): 1908-1919
- [7] Madhaiyan M, Poonguzhali S, Kwon SW, et al. *Bacillus methylotrophicus* sp. nov., a methanol-utilizing, plant-growth-promoting bacterium isolated from rice rhizosphere soil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60(10): 2490-2495
- [8] Liu B, Tao TS, Wang JP, et al. Bacillus (Volume II): Taxonomy of Bacillus[M]. Beijing: Science Press, 2016: 383-384 (in Chinese)
- 刘波, 陶天申, 王阶平, 等. 芽孢杆菌(第2卷): 芽孢杆菌分类学[M]. 北京: 科学出版社, 2016: 380-384
- [9] Yang DC, Li XH, Hu JC, et al. A methylotrophic *Bacillus* wettable powder and its preparation method and application: CN, CN104222076A[P]. 2014-12-24 (in Chinese)
- 杨德昌, 李学红, 胡江春, 等. 一种甲基营养型芽孢杆菌可湿性粉剂及其制备方法和应用: 中国, CN104222076A[P]. 2014-12-24
- [10] Wei XY, Huang YY, Huang YL, et al. Antagonism of *Bacillus methylotrophicus* strain BH21 to *Botrytis cinerea*[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2018, 51(5): 883-892 (in Chinese)
- 魏新燕, 黄媛媛, 黄亚丽, 等. 甲基营养型芽孢杆菌 BH21 对葡萄灰霉病菌的拮抗作用[J]. 中国农业科学, 2018, 51(5): 883-892
- [11] Lü Q, Hu JC, Wang N, et al. Anti-fungal Lipopeptides produced by *Bacillus methylotrophicus* SHB114 isolated from south China sea[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2014, 30(1): 113-120 (in Chinese)
- 吕倩, 胡江春, 王楠, 等. 南海深海甲基营养型芽孢杆菌 SHB114 抗真菌脂肽活性产物的研究[J]. 中国生物防治学
- 报, 2014, 30(1): 113-120
- [12] Yin XT, Yang Y. Optimization of fermentation conditions for antibacterial active substances produced by *Bacillus methylotrophicus* GSBM05[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2018, 46(20): 89-93 (in Chinese)
- 尹向田, 杨阳. 甲基营养型芽孢杆菌 GSBM05 产抗菌活性物质发酵条件优化[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(20): 89-93
- [13] Wang S, You L, Chen J, et al. Optimization of fermentation conditions of *Bacillus methylotrophicus* J2B-74 for bacteriocin production by response surface methodology[J]. China Brewing, 2017, 36(6): 42-46 (in Chinese)
- 王松, 游玲, 陈杰, 等. 响应面法优化甲基营养型芽孢杆菌 J2B-74 代谢产细菌素的发酵条件[J]. 中国酿造, 2017, 36(6): 42-46
- [14] Dong XZ, Cai MY. Common Bacterial System Identification Manual[M]. Beijing: Science Press, 2001: 166-171 (in Chinese)
- 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: 166-171
- [15] Zhao B, He SJ. Microbiology Experiment[M]. Beijing: Science Press, 2002: 26-120 (in Chinese)
- 赵斌, 何绍江. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 26-120
- [16] Zhang MY, Yun TY, Zhou DB, et al. Research advances on *Bacillus methylotrophicus*[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2017, 37(9): 66-71 (in Chinese)
- 张妙宜, 云天艳, 周登博, 等. 甲基营养型芽孢杆菌的研究进展[J]. 热带农业科学, 2017, 37(9): 66-71
- [17] Wu HP, Zhai SB, Du CH, et al. Diversity of fungi in stored rice in Hainan province[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2015, 43(4): 138-141 (in Chinese)
- 吴红萍, 翟世博, 杜晨辉, 等. 海南省储粮稻谷的霉菌多样性分析[J]. 贵州农业科学, 2015, 43(4): 138-141
- [18] Li XS, Lu BS. Study on the contamination of mould in paddy stored in barn[J]. Journal of Changde Teachers University (Natural Science Edition), 2000, 12(2): 75-77 (in Chinese)
- 李新社, 陆步诗. 仓储稻谷霉菌污染情况调查[J]. 常德师范学院学报: 自然科学版, 2000, 12(2): 75-77
- [19] Wang K. Research on screening and identification of biological control bacteria against aflatoxins and mechanism of strain JPP1 for biocontrol[D]. Harbin: Doctoral Dissertation of Harbin Institute of Technology, 2013 (in Chinese)

- 王凯. 黄曲霉生防菌的筛选鉴定及高效菌株 JPP1 的生防机制[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学博士学位论文, 2013
- [20] Wang Y, Zhang ML, Mao Y, et al. Isolation and identification of an aflatoxin B1 degradation bacterial strain and optimization of its culture conditions[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2015, 44(4): 139-143 (in Chinese)
- 王燕, 张美丽, 毛勇, 等. 黄曲霉毒素 B1 降解菌的分离鉴定及培养条件优化[J]. 河南农业科学, 2015, 44(4): 139-143
- [21] Leclère V, Marti R, Béchet M, et al. The lipopeptides mycosubtilin and surfactin enhance spreading of *Bacillus subtilis* strains by their surface-active properties[J]. Archives of Microbiology, 2006, 186(6): 475-483
- [22] Babad J, Pinsky A, Turner-Graff R, et al. An antifungal polypeptide produced by *Bacillus subtilis*[J]. Nature, 1952, 170(4328): 618-619
- [23] Wu YY, Zhang Y, Li LH, et al. Study on fresh-keeping effect of antimicrobial peptides from *Bacillus methylotrophicus* in Tilapia fillet preservation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(2): 315-318 (in Chinese)
- 吴燕燕, 张岩, 李来好, 等. 甲基营养型芽孢杆菌抗菌肽对罗非鱼片保鲜效果的研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(2): 315-318
- [24] Sharma SCD, Shovon MS, Jahan MGS, et al. Antibacterial and cytotoxic activity of *Bacillus methylotrophicus*-Scs2012 isolated from soil[J]. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 2013, 2(4): 2293-2307

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: (1) 本刊要求作者投稿时在正文前写上主要作者专业和研究背景的简介, 并指出自己的工作(已发表的文章)在综述中的体现, 同时请在稿件中用不同颜色标出来。(2) 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。