

广谱高效抑菌物质产生菌的筛选及鉴定

剧建格 于宏伟 韩 军 贾英民*

(河北农业大学食品科技学院 河北 保定 071001)

摘 要: 本实验从营养丰富的土壤中经初筛分离到 60 株具有抑菌活性的细菌, 在此基础上通过琼脂打孔扩散法进行复筛, 获得一株具有广谱抑菌活性的菌株, 经理化指标及 16S rDNA 序列测定和同源分析鉴定为侧孢短芽孢杆菌, 命名为 S62-9.

关键词: 侧孢短芽孢杆菌, 抑菌物质, 16S rDNA

Identification and Screening of Broad-spectrum Antibiotics-producing Strains

JU Jian-Ge YU Hong-Wei HAN Jun JIA Ying-Min*

(College of Food Science, Agriculture University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China)

Abstract: 60 strains which have antimicrobial activity had been isolated from nutritious soil in China in the study. We have further selected 1 strain which product broad-spectrum antibiotics using agar well-diffusion method. The strain was identified *Brevibacillus laterosporus* after physiological biochemical characteristic experiments, sequencing of 16S rDNA and cluster analysis, named S62-9.

Keywords: *Brevibacillus laterosporus*, Antibiotics, 16S rDNA

近年来, 天然防腐剂的研究和开发利用成为食品工业的一个热点。在各种微生物天然食品防腐剂中, 对乳酸菌细菌素的研究最多, 也比较成熟。其中乳酸链球菌分泌的短肽分子Nisin是目前应用最广泛且已经得到商业化生产的纯天然防腐剂^[1]。但是由于Nisin的抑菌谱相对较窄, 稳定性受到许多物理和化学因素如pH值、盐和温度等的影响, 在一定程度上限制了它的应用^[2]。因此, 寻找一种新型、高效的天然防腐剂具有十分重要的意义。

目前国内已有多篇文献报道芽孢杆菌可以产生多种具有抑菌活性的物质, 而且多数芽孢杆菌的抑菌物质具有抑菌谱广, 对酸碱度要求不高, 热稳定

性好等优点^[3-5], 这些都为开发新型天然防腐剂以及生防制剂提供了很好的条件。本实验筛选出的侧孢短芽孢杆菌S62-9 所产抑菌物质具有广谱拮抗性, 对多种革兰氏阳性、革兰氏阴性细菌、霉菌均表现出不同程度的抑制作用, 特别是食品中常见病原菌和腐败菌如金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌、大肠杆菌、沙门氏菌、志贺氏菌等有明显的抑菌效果, 显示了较好的开发前景。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品: 分别从全国 16 个省市自治区采集

各类土壤样品,并按采集顺序编号。

1.1.2 指示菌:金黄色葡萄球菌 14458、大肠杆菌、福氏志贺 51107、福氏志贺 51571、鼠伤寒沙门氏菌 50115、蜡样芽孢杆菌 63302、李斯特氏菌、假单胞杆菌、黑曲霉、克鲁维酵母均由本实验室保存。

1.1.3 培养基:1) 筛选培养基:营养肉汤培养基(NB)^[6]。2) 指示细菌培养基:营养琼脂培养基(NA)^[6];李斯特氏菌培养基为胰酪胨大豆酵母浸膏琼脂(TSA-YE)(购于北京陆桥技术有限责任公司)。3) 指示真菌培养基:黑曲霉、PDA培养基^[6]。

1.2 方法

1.2.1 样品的采集:采用多点采集的方法^[7],分别从全国 16 个省市自治区采集各类土壤样品 156 个,并将各地采集的土壤样品编号。

1.2.2 初筛:初筛采用双层平板法^[8],将适当稀释的土壤悬液加入上层培养基中,下层培养基中混有金黄色葡萄球菌。用灭菌牙签挑取在初筛双层平板上产生透明圈的菌落,进行复筛。

1.2.3 复筛:将初筛所得的具有抑菌活性的细菌采用琼脂打孔扩散法^[9]进行二级复筛,一级复筛以金黄色葡萄球菌 14458 和大肠杆菌为指示菌进行抑菌活性测定,选择对两种指示菌均有抑菌作用且抑菌圈较大的菌株进行二级复筛。二级复筛分别测定筛选所得菌株对不同指示菌的抑菌活性,筛选出抑菌谱较广的菌株作为试验菌株。

1.2.4 抑菌物质的初步鉴定:(1) 发酵液中有有机碱作用的排除:测定培养 24 h 后发酵液 pH 值,与发酵前 NB 的初始 pH 值(pH 7.2~7.4)做比较,判断该菌株在发酵过程中是否产生有机酸或碱。

(2) 将所筛选菌株的 5 mL 发酵液用终浓度为 65%的硫酸铵进行盐析,将沉淀溶于 500 μ L 的磷酸盐缓冲液(25 mmol/L pH 7)中,进行抑菌活性测定。同时用 65%的硫酸铵和磷酸盐缓冲溶液作对照。

(3) 将 5 mL 发酵液用透析袋(8000 D~140000 D)进行透析,将其保留液用 PEG2000 浓缩,并用磷酸盐缓冲液调节其体积到 5 mL,进行抑菌活性测定。

(4) 将蛋白酶 K 和胃蛋白酶配成 5 mg/mL 的溶液,分别取 0.1 mL 于离心管中,分别加入发酵液 0.4 mL,使酶的终浓度为 1 mg/mL,蛋白酶 K 调 pH 至 7.0 左右,胃蛋白酶 pH 值调至 2~3,同时以 0.1 mL 双蒸水加入 0.4 mL 发酵液作为对照,37°C 温育 4 h,观察抑菌活性的变化。

1.2.5 菌株形态鉴定及生理生化特性鉴定:挑取培养 24 h 的纯培养物做革兰氏染色,显微镜下观察其菌体形态;将该菌在 NA 平板上划线培养,观察其菌落形态。各项生理生化指标的鉴定均参照文献^[10,11]。

1.2.6 菌株 16S rDNA 序列分析:菌株 S62-9 基因组的提取、PCR 扩增、产物回收、重组连接、转化及阳性克隆筛选均参照文献^[12,13],引物:27f: 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1541r: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'。测序交由上海生工完成。所得 16S rDNA 序列在 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)数据库中已与有细菌 16S rDNA 序列进行同源性比对,利用 DNAMAN 软件构建系统进化树,并将该菌株 16S rDNA 序列提交 GenBank 进行注册。

2 结果与分析

2.1 菌种筛选

2.1.1 菌株的初筛:从不同地区采集 156 个土样,采用双层平板法进行筛选,得到 97 株产明显透明圈的菌株,经初步鉴定,细菌 60 株,放线菌 37 株。

2.1.2 菌株的复筛:(1)一级复筛。通过初筛得到的 60 株细菌进行抑菌活性测定,得到 12 株高产抑菌物质的产生菌。部分菌株活性测定如图 1 所示。

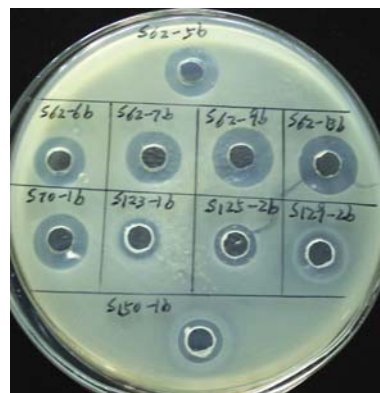


图 1 部分菌株抑菌活性比较

Fig. 1 Inhibitory activity compared of some strains

(2)将 12 株高产抑菌物质的菌株进行二级复筛,获得一株具有广谱抗性的菌株,将此菌株编号为 S62-9。该菌株对 10 株指示菌中的多种革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、霉菌均表现出不同程度的抑菌效果,特别是对革兰氏阳性菌如金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌的作用显著。S62-9 的抗菌谱见表 1。

表 1 S62-9 的抗菌谱
Table 1 Antibiotic-spectrum of S62-9

指示菌 Indicator	抑菌直径 (mm) Antibiotic-diameter (mm)
金黄色葡萄球菌 14458 <i>Staphylococcus aureus</i> 14458	20.62 ± 0.24
蜡样芽孢杆菌 63302 <i>Bacillus cereus</i> 63302	20.42 ± 0.18
单核增生李斯特氏菌 <i>Listeria monocytogenes</i>	—
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	12.67 ± 0.03
福氏志贺菌 51575 <i>Shigella flexneri</i> 51575	12.17 ± 0.07
福氏志贺菌 51571 <i>Shigella flexneri</i> 51571	11.54 ± 0.14
假单胞菌 <i>Pseudomonas</i> spp.	—
鼠伤寒沙门氏菌 50115 <i>Salmonella typhimurium</i> 50115	10.06 ± 0.08
黑曲霉 <i>Aspergillus niger</i>	11.42 ± 0.22

注: 孔直径: 6 mm; —: 不产抑菌圈。
Note: The well diameter: 6mm; —: No antimicrobial activity.

2.2 抑菌物质的初步鉴定

S62-9 经发酵培养后的发酵上清液 pH 值为 7.5 左右, 与发酵前初始 pH 值(7.2~7.4)相比没有明显改变, 故可以排除该菌在发酵过程中产生有机酸或碱对抑菌效果的影响。S62-9 发酵液经盐析、透析以及蛋白酶处理后抑菌活性变化如表 2 所示, 由表 2 可知发酵液经硫酸铵盐析后的蛋白粗提液明显高于盐析前发酵液的抗菌活性。发酵液经透析袋处理后抑菌活性无明显变化, 说明该抑菌物质不能透过透析袋(8 kD~140 kD), 分子量较大。此外该抑菌物质对蛋白酶 K 不敏感, 但对胃蛋白酶具有部分敏感性, 活性下降 28.9%, 由以上试验结果综合分析, 初步判定该抑菌物质可能为蛋白质或多肽类物质, 对于其结构、性质的进一步鉴定, 有待于分离纯化后, 对其纯品做深入分析。

2.3 菌种鉴定

S62-9 的菌学特征: 24 h 培养物经革兰氏染色后

用显微镜观察如图 2 所示, 该菌呈G⁺、杆状, 部分菌体已出现芽孢, 其芽孢侧生, 大多数为椎形或椭圆形。单菌落形态如图 3 所示, 为乳白色, 圆形, 隆起, 不透明。其理化鉴定特征见表 3。

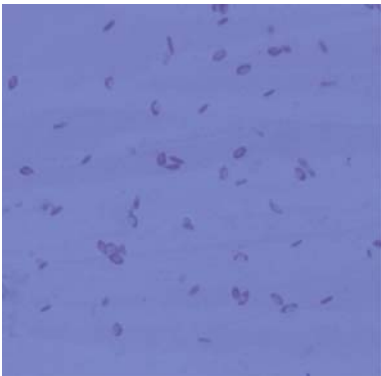


图 2 S62-9 革兰氏染色形态(x1000)
Fig. 2 Morphology of S62-9 by gram staining (x1000)



图 3 S62-9 的菌落形态
Fig. 3 Morphology of the colony of S62-9

菌株 S62-9 的 16S rDNA 序列在 GenBank 中比对, 与 *Brevibacillus laterosporus* strain BPM3 (EU159585) 同源性为 99%。利用 DNAMAN 软件构建系统进化树, 如图 1 所示。该菌株 16S rDNA 序列已在 GenBank 进行注册, 注册序列号为 EU709016。结合该菌株生理生化特性, 将菌株 S62-9 初步鉴定为短芽孢杆菌属侧孢短芽孢杆菌。

表 2 不同处理对抑菌活性的影响
Table 2 Antimicrobial activity after different treatment

不同处理 Different treatment	对照(发酵液) CK(Culture supernatant)	盐析 Salt out	透析 Dialysis	蛋白酶处理对照 CK(Proteinase hydrolyze)	蛋白酶 K Proteinase K	胃蛋白酶 Pepsin
抑菌直径 (mm) Antibiotic-diameter (mm)	18.82 ± 0.12	28.42 ± 0.24	18.59 ± 0.23	18.64 ± 0.08	18.57 ± 0.11	13.26 ± 0.16

表 3 生理生化实验结果
Table 3 Result of physiological and biochemistry experiments

生理生化试验 Physiological and biochemistry experiments	结果 Result
Anaerobic growth	+
Catalase production	+
V-P reaction	-
Nitrate reduction	+
Citrate utilization	-
Hydrolyze: casein	+
Glutin	+
Starch	-
Growth in/at: pH 5.5	-
pH 9.0	+
15°C	-
55°C	-
Acid from: glucose	+
Arabinose	-
Mannitol	+
Xylose	-

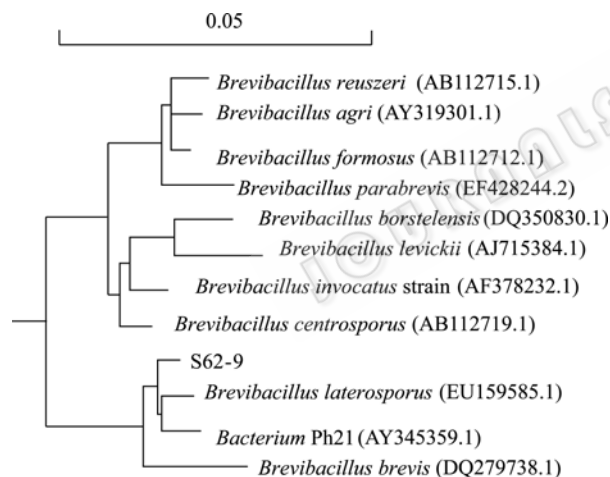


图 4 菌株 S62-9 系统进化树

Fig. 4 Phyletic evolution tree of S62-9

3 讨论

芽孢杆菌在自然界分布非常广泛, 芽孢杆菌产生的拮抗物质主要有肽类抗生素、细菌素、细胞壁降解酶类和其它抗菌蛋白及挥发性抗菌物质^[14]。短芽孢杆菌属是近年来刚刚从芽孢杆菌属独立出来的一个新属, 短芽孢杆菌(*Bacillus brevis*)产生的肽类抗生素如短杆菌肽 (Gramicidin) 和短杆菌肽 S (Gramicidin S) 已应用于临床, 主要治疗由革兰氏阳

性细菌引起的疾病^[15,16]。本实验筛选出的菌株 S62-9 经理化鉴定及 16S rDNA 序列分析鉴定为侧孢短芽孢杆菌, 属于短芽孢杆菌属。目前国内关于侧孢短芽孢杆菌抑菌作用的研究普遍集中在植物病害防治, 如张楹(2006 年)研究了侧孢芽孢杆菌产生的抑真菌蛋白酶对尖孢镰刀菌和立枯丝核菌菌丝的抑制作用, 黎定军、陈武等(2007 年)研究了侧孢芽孢杆菌 2-Q-9 分泌的抑菌物质对青枯病菌抑制, 而对常见病原菌及腐败菌抑制作用报道较少。S62-9 所产抑菌物质具有广谱拮抗性, 不仅对多种革兰氏阳性细菌具有明显的抑菌作用, 而且对部分革兰氏阴性细菌、霉菌也表现出不同程度的抑制作用, 可见侧孢短芽孢杆菌 S62-9 所产抑菌物质作为广谱防腐剂具有广阔的发展潜力。本实验室将进一步对该菌株所产抑菌物质的纯化及性质进行深入研究。

参考文献

- [1] 周志江, 韩 烨. 细菌素及其在食品安全中的应用. 农产品加工·学刊, 2005, 9: 159-162.
- [2] 何李黎. 地衣芽孢杆菌 ZJU12 所产细菌素的分离纯化及其理化性质和基因克隆的研究. 浙大生物技术研究所以硕士学位论文, 2006.
- [3] 郝华昆, 贾 洁, 韩俊华, 等. 产抗菌蛋白芽孢杆菌 R21-4 的鉴定及其抑菌谱研究. 食品与发酵工业 2006, 32 (10): 54-58.
- [4] 陈 凯, 王智文, 刘训理, 等. 圆孢芽孢杆菌 A95 的分离与鉴定. 蚕业科学, 2006, 32(2): 211-214.
- [5] 黎定军, 陈 武, 罗 宽, 等. 侧孢芽孢杆菌 2-Q-9 外泌抑菌物质性质. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2007, 33(4): 471-474.
- [6] 谢正旸, 吴挹芳. 现代微生物培养基和试剂手册. 福州: 福建科学技术出版社, 1994, pp.123-142.
- [7] 潘玉荣, 张惠涛, 张淑玲. 土壤样品的采集及制备方法. 吉林农业, 2005, 3: 29.
- [8] Yoshimoto T, Nakanishi T, Fukumoto J, et al. Studies on bacteriolytic enzymes-*Staphylococcus aureus*-lytic enzyme from *Streptomyces*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1971, 35 (11): 1775-1782.
- [9] Tudor-Nelson SM, Minsavage GV, Stall RE, et al. Bacteriocin-like substances from tomato race 3 strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology*, 2003, 93 (11): 1415.

- [10] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, pp.349-387.
- [11] 布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰氏细菌鉴定手册. 第八版, 北京: 科学出版社, 1984, pp.729-795.
- [12] 别小妹, 陆兆新, 吕凤霞, 等. *Bacillus subtilis* fmbR 抗菌物质的分离和鉴定. 中国农业科学 2006, 39(11): 2327-2334.
- [13] 李如亮. 生物化学实验. 武昌: 武汉大学出版社, 1998, pp.9-10.
- [14] 陈中义, 张 杰. 植物病害生防芽孢杆菌抗菌机制与遗传改良研究. 植物病理学报, 2003, 33(2): 97-103.
- [15] Elmar J, Prenner, Ruthven NAH, *et al.* The interaction of the antimicrobial peptide gramicidin S with the lipid bilayer model and biological membrane. *Biochem Biophys Acta*, 1999, 1462: 201-221.
- [16] 张致平, 姚天爵. 抗生素与微生物产生的生物活性物质. 北京: 化学工业出版社, 2005, p.62.

(上接 p.657)

征 稿 简 则

3.4 摘要写作注意事项

3.4.1 英文摘要:

1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免好多长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.4.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

4 特别说明

4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲) 或 GenBank (美国) 或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.) 后再投来。

4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的) 版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。凡被录用的稿件将及时发出录用通知, 对不录用的稿件, 一般在收稿 1 个月之内通过 E-mail 说明原因, 打印稿不退。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊网址上传电子版修改稿, 待编辑部复审后将给作者发送稿件录用通知单, 请作者将修改稿纸稿和签字盖章后的承诺书一并寄回编辑部, 按照稿号顺序进入排队发表阶段。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。如作者要求提前发表, 请在投稿的同时提出书面报告, 说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性, 经过我刊的严格审查并通过后, 可予提前刊出。

5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊及单行本。

6 联系我们

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部 (100101)

Tel: 010-64807511

E-mail: tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>