

一株蜂粮源拮抗细菌的分离鉴定及其抑菌物质特性

申光辉* 冯孟 张志清 黎杉珊 秦文 刘书亮

(四川农业大学食品学院 四川 雅安 625014)

摘要:【目的】为发掘和利用蜂粮中拮抗菌资源,对分离获得的拮抗细菌菌株 PC2 进行分类鉴定,并测定其发酵液抑菌物质基本特性。【方法】采用改良牛津杯双层平板法测定菌株发酵液抑菌谱及温度、pH、紫外线和蛋白酶对其抑菌活性稳定性的影响,菌株鉴定结合形态学、生理生化特征和 16S rRNA 基因序列分析,硫酸铵沉淀法和盐酸沉淀有机溶剂提取法进行抑菌活性物质的初步分离。【结果】从 3 种蜂粮中分离筛选得到 17 株拮抗菌株,其中 1 株细菌 PC2 以马铃薯葡萄糖液体培养基发酵制备的无菌发酵液对 7 种供试菌株具有较强抑制作用,经形态、生理生化特征及 16S rRNA 基因序列分析,将其初步鉴定为解淀粉芽胞杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。菌株发酵液抑菌活性对温度、酸和紫外线具有较强的稳定性,对蛋白酶 K、胃蛋白酶、碱性蛋白酶处理敏感。菌株发酵液存在抑菌蛋白和脂肽类物质。【结论】菌株 PC2 在食品保鲜和农业生防中具有潜在的开发应用价值。

关键词: 蜂粮, 解淀粉芽胞杆菌, 抑菌活性, 稳定性

Isolation, identification of an antagonistic bacteria from bee bread and characteristics of antimicrobial substances

SHEN Guang-Hui* FENG Meng ZHANG Zhi-Qing LI Shan-Shan QIN Wen
LIU Shu-Liang

(College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China)

Abstract: [Objective] To explore potent antagonistic microorganisms in bee bread, an antagonistic strain PC2 isolated from bee bread was identified, and its antimicrobial characteristics were evaluated. [Methods] Antagonistic spectrum and effect of thermal, pH, UV irradiation and protease on fermentation broth inhibitory activity were assessed by Oxford cup plate assay; strain identification was based on morphology, physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequence analysis. The antimicrobial protein and lipopeptide compounds were separated by ammonium sulfate precipitation and acid-precipitate organic solvent extraction method, respectively. [Results] A total of 17 antagonistic microorganisms were isolated from 3 different bee

Foundation item: Youth Foundation of Educational Commission of Sichuan Province, China (No. 13ZB0288); Science and Technology Planning Project of Sichuan Province (No. 2014NZ0004)

*Corresponding author: Tel: 86-835-2882281; E-mail: shenghuishen@163.com

Received: November 01, 2015; Accepted: March 22, 2016; Published online (www.cnki.net): April 08, 2016
基金项目: 四川省教育厅青年基金项目(No. 13ZB0288); 四川省科技支撑计划项目(No. 2014NZ0004)

*通讯作者: Tel: 86-835-2882281; E-mail: shenghuishen@163.com

收稿日期: 2015-11-01; 接受日期: 2016-03-22; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-04-08

bread samples. Strain PC2 fermentation broth cultured in Potato Dextrose Broth showed excellent antimicrobial activity against 7 tested microorganisms. Strain PC2 was preliminary identified as *Bacillus amyloliquefaciens* by morphological, physiological and biochemical characteristics combined with 16S rRNA gene sequence analysis. The antimicrobial activity of fermentation broth was not sensitive to temperature, acidity and UV irradiation. However, fermentation broth treated with pepsin, alkaline proteinase and protease K lost antimicrobial activity. Proteins and lipopeptides were the main antimicrobial compounds. **[Conclusion]** Strain PC2 isolated from bee bread has potent applications in food preservation and agricultural biological control.

Keywords: Bee bread, *Bacillus amyloliquefaciens*, Antimicrobial activity, Stability

蜂粮, 也称蜂面包、蜂巢花粉, 是采粉蜂将腺体分泌物混入花粉团进行初步加工后, 在多种有益微生物的作用下, 经过复杂的生理生化过程自然发酵而成的蜂花粉酿制产物^[1]。蜂粮作为幼蜂的全价营养源^[2], 较新鲜蜂花粉具有良好的耐储藏性。已有研究发现蜂粮中的微生物种类丰富, 其代谢产物有机酸、蛋白水解酶、碳水化合物分解酶类能有效抑制蜂粮中杂菌的生长繁殖, 在蜂粮的贮藏过程中具有十分重要的防腐作用^[3-4]。蜂粮作为多种微生物参与的自然发酵产物, 其耐储藏性与其中的微生物密切相关, 但目前对蜂粮中拮抗性微生物的研究较少。因此, 分离研究其中的抑菌活性菌株对揭示蜂粮的抑菌作用机理及拮抗微生物资源开发利用均具有重要意义。

本研究对益母草花、荷花及油菜花天然成熟老巢脾蜂粮中的拮抗性微生物进行分离筛选, 获得 17 株抑菌活性微生物, 其中 1 株细菌 PC2 具有抑菌活性较强、抑菌谱广、发酵培养基成分简单的特点。本文主要通过形态学特征、生理生化特性和 16S rRNA 基因序列对菌株 PC2 进行分类鉴定, 并测定无菌发酵液中抑菌活性物质对温度、pH、紫外线、蛋白酶的稳定性, 初步分析其抑菌活性成分, 旨在为菌株 PC2 发酵液抑菌活性成分分离鉴定及菌株资源的开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 蜂粮: 益母草花、荷花及油菜花天然成熟老巢脾蜂粮, 由湖南省益阳市南县蜂农梦蜜蜂园养蜂场提供。

1.1.2 供试菌株: 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)、红酵母(*Rhodotorula* sp.)、番茄镰刀果腐病菌(*Fusarium oxysporum*)、番茄绵腐病菌(*Pythium aphanidermatum*)、番茄青霉果腐病菌(*Penicillium expansum*), 均保存于四川省农产品贮藏与加工重点实验室。

1.1.3 培养基: 分离培养基: 营养琼脂培养基(NA)、马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、MRS 培养基^[5]。发酵培养基: 其中马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB)、营养肉汤培养基(NB)、MRS 液体培养基、牛肉膏酵母葡萄糖液体培养基(NYDB)参照文献^[5]配制, 发酵培养基 1 (Culture media 1, g/L)^[6]: 可溶性淀粉 18.8, 牛肉膏 17.6, 酵母膏 7.4, KH₂PO₄ 2.5, K₂HPO₄ 1.0, (NH₄)₂SO₄ 0.8; 发酵培养基 2 (Culture media 2, g/L)^[7]: 玉米粉 32.0, 蛋白胨 9.0, MnCl₂ 0.005, 初始发酵 pH 5.0。其他培养基: LB 液体培养基^[5]。所有培养基均 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min。

1.1.4 主要试剂和仪器: 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(DP302)、PCR 试剂盒及蛋白酶 K, 天根生化科技(北京)有限公司; 胃蛋白酶、碱性蛋白酶, 上海源叶生物科技有限公司。MyCycler™ Thermal Cycler PCR 仪和 Gel Doc XR⁺凝胶成像分析仪, 美国 Bio-Rad 公司; S-4800 型冷场发射扫描电镜, 日本 Hitachi 公司。

1.2 方法

1.2.1 蜂粮拮抗菌株的分离筛选: 取蜂粮分别用 NB、PDB、MRS 液体培养基于 30 °C、120 r/min

进行增菌培养 24 h, 采用稀释平板法分别在 NA、PDA、MRS 固体平板上 28 °C 培养 2–3 d, 根据菌落的形态、颜色、透明度等特征, 挑取不同形态单菌落进行划线纯化 3–4 次, 相应斜面 4 °C 保存备用。

将待筛菌株分别接种于 NB、PDB、MRS 液体培养基, 于 37、28、32 °C 条件下 180 r/min 摇瓶发酵培养 24 h, 取发酵液于 4 °C 条件下 8 000 r/min 冷冻离心 20 min, 收集上清液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤得无菌发酵液, 4 °C 保存备用。改良牛津杯双层平板法进行抗菌活性初筛, 以金黄色葡萄球菌作指示菌, 以 15 mL NA 培养基作下层培养基, 凝固后距离平板中央 2.5 cm 处均匀放置 4 个灭菌牛津杯, 最后倒入 10 mL 混有金黄色葡萄球菌的 LB 培养基作上层培养基。牛津杯中加入 150 μL 无菌发酵液, 置 37 °C 培养 24 h, 观察抑菌圈的有无并测量其直径大小。

将初筛得到的菌株分别用大肠杆菌、酿酒酵母、藤黄微球菌为指示菌进行抑菌活性复筛, 选择抑菌谱最广、抑菌圈最大的菌株进一步研究。

1.2.2 拮抗菌株 PC2 抑菌谱测定: 将筛选得到的拮抗作用最强的菌株 PC2 用 PDB 培养基 37 °C 发酵 24 h, 按 1.2.1 方法获得无菌发酵液并测定其对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、藤黄微球菌、枯草芽孢杆菌、酿酒酵母、红酵母、番茄镰刀菌果腐病菌、番茄绵腐病菌、番茄青霉果腐病菌等菌株的抑菌效果。其中细菌 37 °C 恒温培养, 真菌 28 °C 恒温培养, 24–48 h 后观察抑菌圈的有无, 并采用交叉法测量抑菌圈直径大小, 各处理重复 3 次。

1.2.3 拮抗菌株 PC2 发酵培养基的筛选: 将菌株 PC2 分别用 PDB、NB、MRS 液体、NYDB、发酵培养基 1、发酵培养基 2 于 37 °C 条件下 180 r/min 摇瓶发酵培养 24 h。按 1.2.1 方法获得无菌发酵液对酿酒酵母的抑菌活性, 观察抑菌圈的有无并测量其直径大小, 每个处理重复 3 次。

1.2.4 拮抗菌株 PC2 分类鉴定: 参照《常见细菌系统鉴定手册》^[8]对拮抗菌株进行形态特征观察和生

理生化试验, 参考张艳群等^[9]方法制备样品, 用日立 S-4800 扫描电镜观察菌体和芽胞形态。

菌株 PC2 的 16S rRNA 基因序列测定: 采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株基因组 DNA, 以 16S rRNA 基因通用引物 27F 和 1492R 扩增。25 μL PCR 反应体系: 2×Taq Plus PCR Master Mix 12.5 μL, 引物(10 μmol/L)各 1 μL, 基因组 DNA 1 μL, 加 ddH₂O 补至 25 μL。PCR 反应程序: 94 °C 4 min; 94 °C 1 min, 57 °C 55 s, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物交由上海立菲生物技术有限公司进行纯化测序。将测序结果提交到 NCBI 数据库进行基因序列相似性搜索比对, 选择相似度较高的模式菌株序列, 用 ClustalX 1.83 与 MEGA 5.1 软件, 采用 NJ 法(Neighbor-Joining method)构建系统发育树。

1.2.5 无菌发酵液抑菌活性稳定性测定: 按照 1.2.1 制备菌株无菌发酵液。热稳定性: 取无菌发酵液 10 mL 于无菌具塞试管, 分别在 40、60、80、100、121 °C 下处理 30 min。

酸碱稳定性: 取无菌发酵液 10 mL 于无菌具塞试管, 分别用 1 mol/L HCl 或 1 mol/L NaOH 溶液调至不同 pH (1.0、3.0、5.0、8.0、10.0、12.0、14.0)。25 °C 静置 2 h 后调回发酵液初始 pH 7.0, 以无菌水定量各处理至同一体积, 保证各处理抑菌物质浓度相同。

紫外线稳定性: 取无菌发酵液 10 mL 于 90 mm 灭菌培养皿, 分别在 15 W 紫外灯下 30 cm 处开盖照射 10、20、30、40、50、60 min。

蛋白酶稳定性: 取无菌发酵液 2 mL 分别加入蛋白酶 K、胃蛋白酶、碱性蛋白酶, 酶最终质量浓度为 0.01 g/mL, 37 °C 处理 1 h, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤。

以番茄绵腐病菌为指示菌, 按 1.2.2 方法检测上述不同处理无菌发酵液的抑菌活性, 以未处理发酵液为对照, 37 °C 培养 48 h, 测定抑菌圈直径, 各处理重复 3 次。

1.2.6 无菌发酵液抑菌活性物粗提取分离: 采用

2种方法对发酵液抑菌活性物质进行粗提取分离。硫酸铵沉淀法提取抑菌粗蛋白：取 10 mL 无菌发酵液，缓慢加入硫酸铵，分别调节饱和度至 30%、40%、50%、60%、70%、80%和 90%，4 °C 静置 12 h 后 10 000 r/min、4 °C 离心 20 min，收集沉淀，加入 0.02 mol/L pH 7.0 磷酸盐缓冲液 5 mL 溶解，透析 12 h 除盐，获得不同饱和度抑菌粗蛋白提取物，同时将上清液透析 12 h 除盐，获得相应除盐上清液。

盐酸沉淀有机溶剂抽提法提取抑菌粗脂肽：取 10 mL 无菌发酵液，用 6 mol/L 盐酸调 pH 值至 2.0，4 °C 静置 12 h 后 10 000 r/min、4 °C 离心 20 min，取上清液用 2 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0 得盐酸沉淀上清液，沉淀分别加入 2 mL 甲醇、乙醇、正丁醇、丙酮、乙酸乙酯、石油醚抽提 3 次，合并抽提液，冻干后用 5 mL 0.02 mol/L pH 7.0 磷酸盐缓冲液溶解，0.22 μm 微孔滤膜过滤，得不同有机溶剂提取物。

分别以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和酿酒酵母为指示菌，按 1.2.2 方法检测抑菌粗蛋白提取物和对应除盐上清液的抑菌活性，及不同溶剂提取物和盐酸沉淀上清液抑菌活性。

1.2.7 数据统计分析：实验数据以平均值±标准偏差表示，采用 DPS 7.5 软件，用 Duncan 法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 蜂粮拮抗菌株分离筛选

从 3 种蜂粮中共分离得到 85 株菌，其中 NA 平板上 28 株，PDA 平板上 28 株，MRS 平板上 29 株。通过菌落形态和细胞形态，初步确定从 3 种培养基上分离到的微生物主要是细菌、酵母菌和放线菌。采用牛津杯双层平板法筛选出 17 株对金黄色葡萄球菌具有较明显抑菌圈的菌株，其中分离自 PDA 平板的一株细菌菌株 PC2 对金黄色葡萄球菌的抑菌圈最大，直径达 27.04 mm，且抑菌圈透明(图 1)。

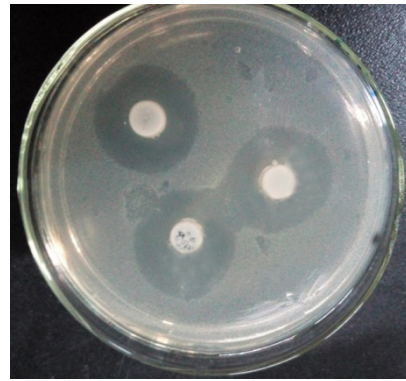


图 1 菌株 PC2 无菌发酵液对金黄色葡萄球菌的抑菌圈
Figure 1 Inhibitory zone of cell-free fermentation broth of strain PC2 against *S. aureus*

2.2 菌株 PC2 抑菌谱

采用摇瓶发酵法，将菌株 PC2 接种于 PDB 液体培养基，于 37 °C 条件下 180 r/min 发酵 24 h，进行抑菌试验，由表 1 可见菌株 PC2 无菌发酵液对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、酿酒酵母、藤黄微球菌、番茄镰刀果腐病菌、番茄绵腐病菌、番茄青霉果腐病菌有抑菌效果，其中对酿酒酵母抑菌作用最强，抑菌圈直径达 40.44 mm (图 2B)，但对枯草芽胞杆菌和红酵母无抑菌作用。菌株 PC2 产生的抑菌物质对革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌及丝状真菌均有抑菌效果，表明菌株 PC2 无菌发酵液具有较宽的抑菌谱。

表 1 菌株 PC2 的抑菌活性	
Table 1 Inhibitory effect of strain PC2	
指示菌株	抑菌圈直径
Tested strains	Inhibition zone diameter (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	27.04±0.98
<i>Escherichia coli</i>	23.04±0.99
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40.44±0.26
<i>Micrococcus luteus</i>	15.74±0.50
<i>Bacillus subtilis</i>	—
<i>Rhodotorula</i> sp.	—
<i>Fusarium oxysporum</i>	17.54±0.68
<i>Pythium aphanidermatum</i>	21.51±0.62
<i>Penicillium expansum</i>	17.33±0.62

注：—：无拮抗作用。

Note: —: No inhibitory effect.

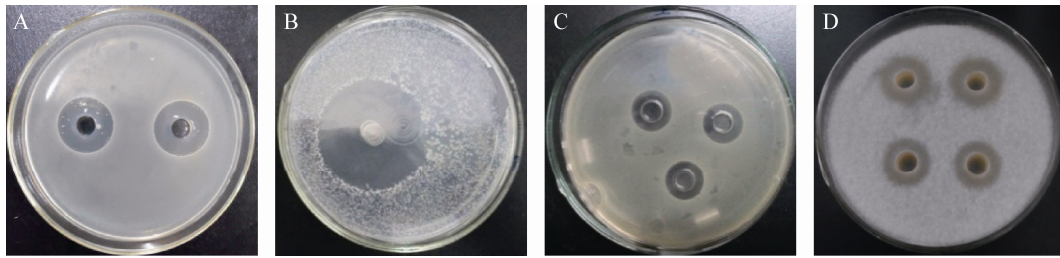


图2 菌株 PC2 无菌发酵液的抑菌作用效果

Figure 2 Inhibitory effect of cell-free fermentation broth of strain PC2 against four test strains

注: A: 大肠杆菌; B: 酿酒酵母; C: 藤黄微球菌; D: 番茄镰刀果腐病菌。

Note: A: *Escherichia coli*; B: *Saccharomyces cerevisiae*; C: *Micrococcus luteus*; D: *Fusarium oxysporum*.

2.3 菌株 PC2 发酵培养基的选择

通过比较 6 种不同培养基发酵液抑菌活性试验发现, PDB 发酵培养基获得菌株 PC2 发酵液对酿酒酵母的抑菌活性最强, 达 40.44 mm (表 2)。

2.4 菌株 PC2 分类鉴定

2.4.1 形态特征: 拮抗菌 PC2 在 PDA 平板上 37 °C 培养 36 h 后, 菌落呈圆形或椭圆形, 边缘不规则, 乳白色不透明, 表面粗糙(图 3A); 液体静置培养有菌膜产生。菌体细胞呈杆状, 革兰氏染色阳性, 芽胞椭圆形, 中生或次端生(图 3B)。扫描电镜观察可见菌体(图 3C)表面光滑, 两端钝圆。

2.4.2 生理生化特性: 菌株 PC2 能发酵葡萄糖、蔗糖、甘露糖产酸, 不发酵麦芽糖、半乳糖、乳糖;

硫化氢试验呈阴性; 能够水解明胶、淀粉; 赖氨酸脱羧酶试验阳性; 不能形成吲哚; 不能分解尿素。根据形态及生理生化特征初步鉴定菌株 PC2 属于芽胞杆菌属 *Bacillus*。

表 2 菌株不同培养基发酵液对酿酒酵母的抑菌活性
Table 2 Inhibitory activity of cell-free fermentation broth of strain PC2 cultured in different media against *Saccharomyces cerevisiae*

发酵培养基 Culture media	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter (mm)
PDB	40.44±0.26
NB	17.04±0.30
MRS	—
NYDB	—
Culture media 1	—
Culture media 2	—

注: —: 无拮抗作用。下同。

Note: —: No inhibitory effect. The same below.

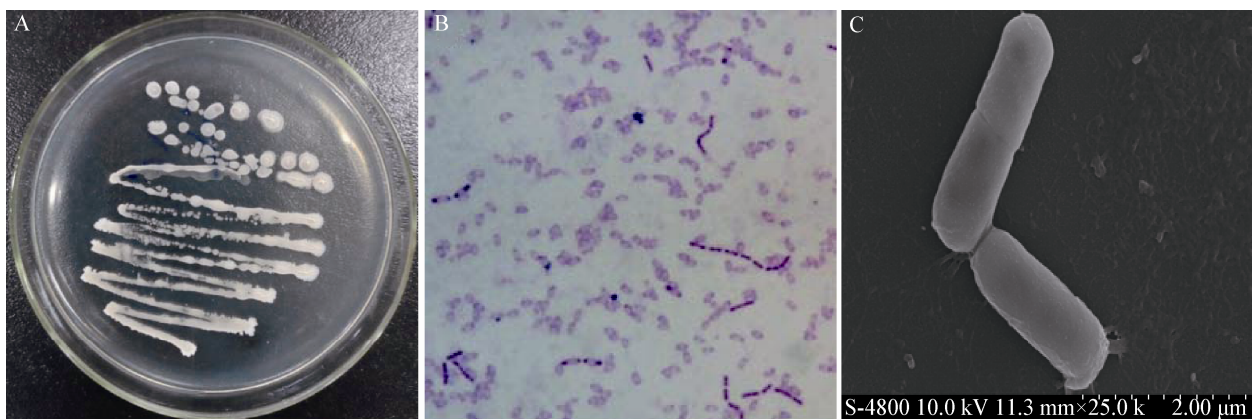


图3 菌株 PC2 形态特征

Figure 3 Morphology of strain PC2

注: A: PDA 平板上菌落形态; B: 革兰氏染色菌体和芽胞形态(1 000×); C: 菌体扫描电镜照片(2 500×)。

Note: A: Colony morphology on PDA plate; B: Gram staining thalli and spore (1 000×); C: Thalli scanning electron microscope (2 500×).

2.4.3 16S rRNA 基因同源性鉴定: 对菌株 PC2 提取基因组 DNA 后, 利用 16S rRNA 基因通用引物 PCR 扩增 16S rRNA 基因, 将回收的 16S rRNA 基因片段进行序列测定, 得到全长 1 437 bp 序列 (GenBank 登录号: KP219718)。将测得的 16S rRNA 基因序列用 BLAST 程序比对, 对其进行同源分类鉴定, 发现与 NCBI 数据库中芽胞杆菌属多个种的序列相似性均 >99%, 进一步选择相关模式菌株序列构建系统发育树(图 4), 发现 PC2 菌株与 *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 (GenBank 登录号: CP000560) 聚在同一分支, 且分支支持率为 91%, 同时与解淀粉芽胞杆菌的另外 3 株标准菌株亲缘关系较近。综合菌株形态学特征、生理生化特性及 16S rRNA 基因序列分析, 将菌株 PC2 鉴定为解淀粉芽胞杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。

2.5 PC2 无菌发酵液抑菌活性物质稳定性

2.5.1 热稳定性: 由图 5 可知, 菌株 PC2 无菌发酵液分别在经不同温度处理后对番茄绵腐病菌仍具有较强的抑菌活性, 其抑菌活性随着热处理时间的延长和处理温度的升高而下降, 经 121 °C 处理 30 min 其抑菌圈直径仍有 13.54 mm, 是未处理发酵液抑菌圈直径的 71.19%, 表明菌株 PC2 发酵液中

抑菌物质成分具有较强的热稳定性。

2.5.2 酸碱稳定性: 由图 6 可知, 菌株 PC2 发酵液在 pH 1.0–7.0 范围内, 对番茄绵腐病菌的抑菌圈直径在 21.19 mm 左右, 抑菌活性与对照相比无显著性差异($P>0.05$), 表明其对酸稳定性好; 随着 pH 增大, 其抑菌活性快速显著下降($P<0.01$), 当 $pH\geq 12.0$ 时, 抑菌活性完全丧失, 可能是碱性环境改变了发酵液中活性物质结构导致抑菌活性下降。表明菌株 PC2 发酵液抑菌物质成分对碱性环境比较敏感, 但能适应较强的酸性环境。

2.5.3 紫外线稳定性: 由图 7 可知, 与对照样品相比, 菌株发酵液在紫外光下照射 10 min 内对番茄绵腐病菌的抑菌活性无显著差异, 照射 20–60 min 抑菌圈直径明显降低($P<0.01$), 但仍有 19.13 mm, 是未处理发酵液抑菌圈直径的 88.89%, 表明菌株 PC2 发酵液抑菌物质成分具有较好的紫外线照射稳定性。

2.5.4 蛋白酶稳定性: 试验结果发现, 对照组的抑菌圈直径为 19.02 mm, 而经蛋白酶处理后的无菌发酵液对番茄绵腐病菌无明显的抑菌圈, 表明 PC2 发酵液抑菌活性物质对蛋白酶 K、胃蛋白酶、碱性蛋白酶敏感, 初步判断抑菌物质可能为抑菌蛋白质成分。

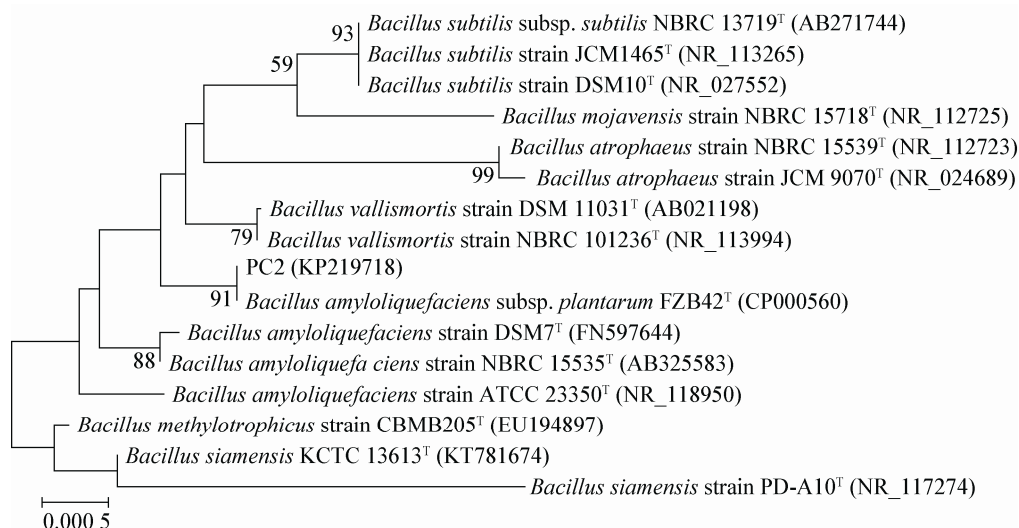


图 4 基于 16S rRNA 基因序列的 PC2 菌株系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree based on the partial 16S rRNA gene sequence of PC2 and type strains

注: 分支处数值表示 Bootstrap 值; 括号内数字表示序列 GenBank 登录号; 标尺为进化距离。

Note: Numbers at branch nodes present bootstrap value; The GenBank accession number of aligned sequences are shown in the brackets; Bar: Nucleotide divergence.

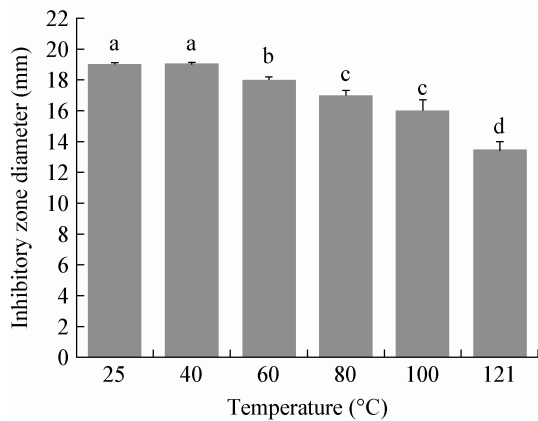


图 5 不同温度处理无菌发酵液对番茄绵腐病菌的抑菌活性

Figure 5 Inhibitory activity of cell-free fermentation broth of strain PC2 treated with different temperature against *Pythium aphanidermatum*

注: 图中不同小写字母表示 0.05 水平上差异显著, 下同。

Note: The different letter means significant difference ($P < 0.05$). The same below.

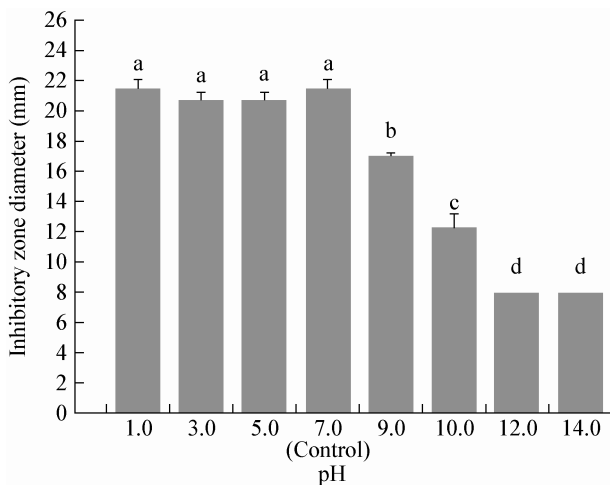


图 6 酸碱处理无菌发酵液对番茄绵腐病菌的抑菌活性

Figure 6 Inhibitory activity of cell-free fermentation broth of strain PC2 treated with different pH against *Pythium aphanidermatum*

2.6 无菌发酵液抑菌活性粗提取物抑菌活性

2.6.1 抑菌粗蛋白抑菌活性: 对菌株发酵液不同饱和度硫酸铵获得的沉淀粗蛋白及上清液的抑菌活性进行检测。由表 3 可见, 50%–70%饱和度硫酸铵沉淀蛋白对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌及酿酒酵母均有较强的抑菌活性, 其中饱和度为 60%对金黄色

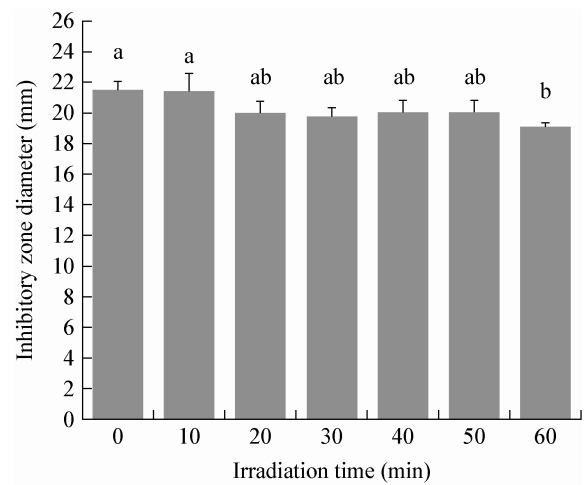


图 7 紫外照射处理无菌发酵液对番茄绵腐病菌的抑菌活性

Figure 7 Inhibitory activity of cell-free fermentation broth of strain PC2 treated with ultraviolet irradiation against *Pythium aphanidermatum*

葡萄球菌和酿酒酵母的抑菌圈直径最大, 分别为 32.45 mm 和 35.14 mm; 而 70%饱和度对大肠杆菌抑菌活性最强, 抑菌圈达 26.82 mm, 但与 60%饱和度差异不大。表明 60%硫酸铵饱和度可较完全沉淀抑菌蛋白, 为最佳的饱和度。

为了更加全面地了解菌株发酵液抑菌活性物质的组成, 对硫酸铵沉淀后的上清液抑菌活性进行检测。由表 4 可知, 30%–70%饱和度硫酸铵处理后上清液仍有一定的抑菌活性, 饱和度 30%–50%硫酸铵处理后上清液对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和酿酒酵母均有抑菌活性, 但其抑菌活性较未处理无菌发酵液(表 1)的抑菌活性弱, 同时也低于粗蛋白的抑菌活性。表明菌株 PC2 抑菌活性成分较为复杂, 抑菌蛋白是菌株发酵液中主要的抑菌活性成分, 还存在其他类型抑菌成分。

2.6.2 抑菌粗脂肽抑菌活性: 芽胞杆菌抑菌活性物质种类丰富, 脂肽类化合物是芽胞杆菌中一类重要的抑菌活性成分, 实验采用盐酸沉淀有机溶剂提取法获得抑菌脂肽的粗提物, 并检测其抑菌活性。由表 5 可知, 甲醇、乙醇、丙酮和乙酸乙酯提取物对 3 株指示菌均有抑菌活性, 其中甲醇和乙醇提取物

表3 不同饱和度硫酸铵沉淀蛋白的抑菌活性

Table 3 Inhibitory zone diameter of the precipitation by ammonium sulphate precipitation method (mm)

指示菌株 Tested strains	硫酸铵饱和度 Ammonium sulfate saturation (%)						
	30	40	50	60	70	80	90
<i>Staphylococcus aureus</i>	22.31±0.90	25.56±0.89	28.91±0.72	32.45±0.86	20.08±0.47	—	—
<i>Escherichia coli</i>	—	—	23.87±0.64	25.12±0.85	26.82±1.03	20.43±0.80	—
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36.33±0.95	41.54±0.76	43.53±0.91	35.14±0.73	26.70±0.65	—	—

表4 不同饱和度硫酸铵上清液的抑菌活性

Table 4 Inhibitory zone diameter of the supernatant by ammonium sulphate precipitation method (mm)

指示菌株 Tested strains	硫酸铵饱和度 Ammonium sulfate saturation (%)						
	30	40	50	60	70	80	90
<i>Staphylococcus aureus</i>	16.50±1.01	15.44±0.94	12.56±0.59	18.53±0.84	16.78±0.69	—	—
<i>Escherichia coli</i>	18.23±0.96	16.80±0.82	10.45±0.93	—	—	—	—
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18.18±0.57	12.63±0.84	12.82±0.77	19.33±0.64	10.21±0.88	—	—

表5 不同有机溶剂提取物和盐酸上清液的抑菌活性

Table 5 Inhibitory zone diameter of different solvent extracts from precipitation and supernatant by hydrochloric acid precipitation method (mm)

指示菌株 Tested strains	有机溶剂 Organic solvent						盐酸上清液 Supernatant
	甲醇	乙醇	正丁醇	丙酮	乙酸乙酯	石油醚	
	Methanol	Ethanol	N-butyl alcohol	Acetone	Ethyl acetate	Petroleum ether	
<i>Staphylococcus aureus</i>	18.59±0.73	20.33±0.68	—	16.28±0.90	12.88±0.84	—	20.58±0.59
<i>Escherichia coli</i>	12.51±0.87	10.76±0.74	—	9.22±0.94	16.78±0.72	—	16.47±0.76
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23.54±0.55	26.38±0.83	—	18.19±0.73	16.23±0.80	—	35.20±0.81

抑菌活性较强,对发酵液抑菌脂肽提取作用最强。同时发现,盐酸沉淀后的上清液仍具有较强的抑菌活性,且高于有机溶剂提取物的抑菌活性。表明菌株发酵液抑菌活性物质中存在脂肽类化合物,可能还存在其他抑菌化合物,进一步表明了该菌株抑菌活性物质组成的复杂性。

3 讨论

蜂粮是蜂花粉的发酵产物,较蜂花粉具有良好的耐储藏性。已有研究表明,蜂粮耐储藏性主要与其中的乳酸菌发酵成熟后蜂粮呈现较强的酸性有关^[10-11]。此外,贺春玲等^[12]发现从长木蜂蜂粮中分离的68株菌株中有12株具有较强抑菌活性。本实验从3种蜂粮中也分离获得了17株抑菌活性菌株。

因此,蜂粮的防腐能力与其中的抑菌活性微生物也有一定关系,本研究结果也为蜂粮中拮抗功能菌株资源的筛选利用提供了依据。

芽胞杆菌是植物病害生物防治研究中较多的一大类细菌,其中解淀粉芽胞杆菌具有较强次生代谢能力,能产生种类繁多的抑菌活性物质,且繁殖速度快、抗逆性强、易保存、有利于工业化生产、且对人畜无害、不污染环境,是近年来生物拮抗菌研究利用的热点^[13-16]。蜂粮作为蜂花粉自然发酵产物,含有丰富的微生物。目前对其研究较多的是其中的乳酸细菌^[4,12],而对其中的拮抗细菌资源研究较少。本实验从荷花蜂粮中筛选获得1株广谱拮抗解淀粉芽胞杆菌PC2菌株,其无菌发酵液对

常见的金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、酿酒酵母及番茄采后腐败真菌也表现出较强的抑菌活性, 在生物防治和食品抑菌保鲜方面具有潜在的开发利用价值。

解淀粉芽胞杆菌在自然界中分布广泛, 代谢产物种类丰富, 不同来源的菌株发酵培养条件各异。发酵培养基一定程度上限制了不同来源分离株在生产中的应用推广。本实验分离的解淀粉芽胞杆菌 PC2 菌株产抑菌活性物质培养基比较特殊, 其在马铃薯葡萄糖液体培养发酵 24 h 即可产生较强的胞外抑菌活性代谢产物, 而利用已报道的拮抗解淀粉芽胞杆菌发酵培养基^[6-7,15]获得的发酵液抑菌活性较低, 甚至无抑菌活性代谢产物产生。这可能与本菌株独特的抑菌物质合成代谢途径及其所需底物有关, 有待进一步研究。实验筛选获得的 PC2 菌株产抑菌活性物质速度快, 营养要求简单, 可利用马铃薯废弃渣、液一类成本低廉的原料, 在规模化工业生产上具有潜在的成本优势。而本研究仅选用了 6 种发酵培养基进行初步筛选, 为进一步提高发酵液抑菌物质的活性和产量, 还需在马铃薯葡萄糖液体培养基的基础上对 PC2 菌株的最适发酵培养基及发酵条件进一步优化。

解淀粉芽胞杆菌代谢产物具有广泛的抑菌活性, 包括对革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌、酵母菌和植物病原真菌。抑菌蛋白^[15,17-19]和抑菌多肽^[20-22]是芽胞杆菌代谢产物中很重要的抑菌活性物质。本研究通过对发酵液抑菌物质的高温、强酸(碱)及蛋白酶敏感性实验及抑菌活性物质初步分离实验结果, 推测菌株发酵液可能存在抑菌蛋白和抑菌脂肽类化合物。对于这两类化合物的进一步分离纯化及抑菌机理有待进一步研究。

本实验所获菌株 PC2 发酵液抑菌物质具有较强的热稳定性, 经 121 °C 处理 30 min 仍保持 71.19% 的抑菌活性; 发酵液酸稳定性很好, 在 pH 1.0-7.0 范围内抑菌活性基本不变; 紫外照射稳定性较好, 紫外照射时间 1 h 后抑菌活性仍保持原来的 88.89%。上述结果表明, 该菌株发酵代谢产物稳定

性好, 具有很好的应用潜力, 同时该结果也为发酵液抑菌活性代谢物质的进一步分离、纯化鉴定及在生产中选择适宜的应用方式提供了依据。

参 考 文 献

- [1] Nagai T, Nagashima T, Myoda T, et al. Preparation and functional properties of extracts from bee bread[J]. Food/Nahrung, 2004, 48(3): 226-229
- [2] Baltrušaitytė V, Venskutonis PR, Čeksterytė V. Radical scavenging activity of different floral origin honey and bee bread phenolic extracts[J]. Food Chemistry, 2007, 101(2): 502-514
- [3] Gilliam M. Microbiology of pollen and bee bread: the genus *Bacillus*[J]. Apidologie, 1979, 10(3): 269-274
- [4] Duan CR, Bao JF, Shi YS, et al. Isolation and identification of microbe in loquat flower and rape flower bee bread[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(5): 175-180 (in Chinese)
段传人, 暴佳芳, 石轶松, 等. 枇杷花和油菜花蜂粮中微生物的分离与鉴定[J]. 食品工业科技, 2015, 36(5): 175-180
- [5] Li PL, He ZF. Experimental Principles and Techniques of Food Microbiology[M]. 2nd Edition. Beijing: China Agriculture Press, 2011: 222-224 (in Chinese)
李平兰, 贺稚非. 食品微生物学实验原理与技术[M]. 第 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2011: 222-224
- [6] Lü Z, Zhang LP, Cheng HC, et al. Optimization of fermentation for production conditions of antibiotic by *Bacillus amylolique faciens* D1[J]. Northern Horticulture, 2013(5): 94-97 (in Chinese)
吕钊, 张丽萍, 程辉彩, 等. 响应面法优化解淀粉芽胞杆菌 D1 产抗菌素培养基研究[J]. 北方园艺, 2013(5): 94-97
- [7] Zhang XH, Wang K, Zhu TH, et al. Optimization of medium and fermentation conditions for the production of antifungal substance by *Bacillus amyloliquefaciens* BW-13[J]. Journal of Zhejiang University of Technology, 2013, 41(1): 35-39 (in Chinese)
章小洪, 汪琨, 朱廷恒, 等. 解淀粉芽胞杆菌 BW-13 培养基和培养条件优化[J]. 浙江工业大学学报, 2013, 41(1): 35-39
- [8] Dong XZ, Cai MY. Manual of Systematic Determinative General Bacteriology[M]. Beijing: Science Press, 2001: 9-42 (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: 9-42
- [9] Zhang YQ, Lai HX, Wei XM, et al. Screening and identification and antagonism research of two biocontrol bacillus strains[J]. Microbiology China, 2014, 41(2): 281-289 (in Chinese)
张艳群, 来航线, 韦小敏, 等. 两株生防芽胞细菌筛选、鉴定及拮抗研究[J]. 微生物学通报, 2014, 41(2): 281-289
- [10] He CL, Ji BZ, Liu SW. Determination of pH and the pollen germination ability during the process from pollen to bee bread of *Xylocopa tranquebarorum* (Swederus)[J]. Journal of Environmental Entomology, 2010, 32(1): 78-84 (in Chinese)
贺春玲, 嵇保中, 刘曙雯. 长木蜂蜂粮酿制过程中 pH 值和花粉活力的测定[J]. 环境昆虫学报, 2010, 32(1): 78-84
- [11] de Grandi-Hoffman G, Eckholm BJ, Huang MH. A comparison of bee bread made by Africanized and European honey bees (*Apis mellifera*) and its effects on hemolymph protein titers[J]. Apidologie, 2013, 44(1): 52-63
- [12] He CL, Zhang SX, Ji BZ, et al. Screening on the abundance and antibacterial activity of microbial strains in the bee bread of *Xylocopa tranquebarorum*[J]. Journal of Environmental Entomology, 2012, 34(3): 302-309 (in Chinese)
贺春玲, 张淑霞, 嵇保中, 等. 长木蜂蜂粮中微生物丰度及抑菌活性菌株的筛选[J]. 环境昆虫学报, 2012, 34(3): 302-309

- [13] Li B, Wei XJ, Li YN, et al. Primary analysis of antifungal proteins produced by *Bacillus amylolique faciens* X-278 against *Verticillium dahlia*[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2013, 42(7): 68-71,83 (in Chinese)
黎波, 魏学军, 李亚宁, 等. 解淀粉芽孢杆菌 X-278 菌株抗菌蛋白初步分析[J]. 河南农业科学, 2013, 42(7): 68-71,83
- [14] Qiu BS. Endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* CC09[J]. Microbiology China, 2015, 42(7): 1418 (in Chinese)
邱并生. 内生解淀粉芽孢杆菌 CC09[J]. 微生物学通报, 2015, 42(7): 1418
- [15] Qin N, Hao L, Li X. Isolation, purification and inhibitive effect of antifungal protein of *Bacillus amyloliquefaciens* HRH317[J]. Journal of Plant Protection, 2015, 42(5): 813-819 (in Chinese)
秦楠, 郝林, 李鑫. 解淀粉芽孢杆菌 HRH317 抗菌蛋白的分离纯化及其抗菌作用[J]. 植物保护学报, 2015, 42(5): 813-819
- [16] Kaewklom S, Lumlert S, Kraikul W, et al. Control of *Listeria monocytogenes* on sliced bologna sausage using a novel bacteriocin, amysin, produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from Thai shrimp paste (Kapi)[J]. Food Control, 2013, 32(2): 552-557
- [17] Meng LQ, Li J, Zhao XY, et al. Isolation, purification and characterization of antifungal protein from antagonistic bacterium TF28 strain[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2014, 45(2): 83-88 (in Chinese)
孟利强, 李晶, 赵晓宇, 等. 生防细菌 TF28 抗菌蛋白的分离纯化及理化特性[J]. 东北农业大学学报, 2014, 45(2): 83-88
- [18] Yang LR, Wang ZJ, Xue BG, et al. Cloning of antagonistic protein TasA gene in *Bacillus amyloliquefaciens* YN-1 and its prokaryotic expression[J]. Genomics and Applied Biology, 2010, 29(5): 823-828 (in Chinese)
杨丽荣, 王正军, 薛保国, 等. 解淀粉芽孢杆菌 YN-1 抑菌蛋白 TasA 基因的克隆及原核表达[J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(5): 823-828
- [19] Hu HQ, Li XS, He H. Characterization of an antimicrobial material from a newly isolated *Bacillus amyloliquefaciens* from mangrove for biocontrol of Capsicum bacterial wilt[J]. Biological Control, 2010, 54(3): 359-365
- [20] Zhu XF, Zhang XX, Niu YC, et al. Isolation and identification of a *Bacillus amyloliquefaciens* YB-3 against *Rhizoctonia solani*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(8): 1128-1133 (in Chinese)
朱晓飞, 张晓霞, 牛永春, 等. 一株抗水稻纹枯病菌的解淀粉芽孢杆菌分离与鉴定[J]. 微生物学报, 2011, 51(8): 1128-1133
- [21] He H, Zhu YL, Chi LQ, et al. Screening and antibacterial function of *Bacillus amyloliquefaciens* X030[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2015, 55(9): 1133-1143 (in Chinese)
何浩, 朱颖龄, 迟立庆, 等. 解淀粉芽孢杆菌 BaX030 的分离鉴定及抗菌功能[J]. 微生物学报, 2015, 55(9): 1133-1143
- [22] Yang RX, Ji JH, Wang ZH, et al. Isolation, identification and inhibitory activity of lipopeptides of endophytic bacteria from the root of *Paonia suffruticosa*[J]. Microbiology China, 2015, 42(6): 1081-1088 (in Chinese)
杨瑞先, 姬俊华, 王祖华, 等. 牡丹根部内生细菌的分离鉴定及脂肽类物质的拮抗活性研究[J]. 微生物学通报, 2015, 42(6): 1081-1088