

一株抑制产气荚膜梭菌的枯草芽孢杆菌 BS-2 特性

黄金秀^{1,2}, 陈利¹, 苏国旗^{1,2}, 官小凤¹, 王瑞生^{*1}

1 重庆市畜牧科学院, 重庆 402460

2 农业农村部养猪科学重点实验室, 重庆 402460

黄金秀, 陈利, 苏国旗, 官小凤, 王瑞生. 一株抑制产气荚膜梭菌的枯草芽孢杆菌 BS-2 特性[J]. 微生物学通报, 2022, 49(7): 2638-2647

Huang Jinxiu, Chen Li, Su Guoqi, Guan Xiaofeng, Wang Ruisheng. Characteristics of *Bacillus subtilis* BS-2 against *Clostridium perfringens*[J]. Microbiology China, 2022, 49(7): 2638-2647

摘要:【背景】感染产气荚膜梭菌会引起动物坏死性肠炎, 通常使用抗生素进行预防和治疗。随着我国饲料禁抗、养殖减抗的实施, 寻找绿色微生态制剂及其代谢产物成为当前研究的热点。【目的】旨在研究前期筛选的一株抑制产气荚膜梭菌的枯草芽孢杆菌 BS-2 特性。【方法】检测了菌株生长曲线、代谢物质的抑菌特性及细菌素基因簇 mRNA 表达。【结果】枯草芽孢杆菌 BS-2 代谢物质对革兰氏阴性菌无抑制作用, 而对革兰氏阳性菌具有较强的抑菌性能, 并且对产气荚膜梭菌的抑菌性能在 2–12 h 内迅速增长, 在 12–24 h 内抑菌性能较稳定; 该抑菌性能不受胃蛋白酶、胰蛋白酶、蛋白酶 K 的影响, 具有良好的热稳定性; 进一步分析抑菌物质基因簇 mRNA 表达, 发现枯草芽孢杆菌 BS-2 抑制产气荚膜梭菌的活性可能与表面活性素(surfactin)和美杀菌素(mersacidin)表达有关。【结论】枯草芽孢杆菌 BS-2 对产气荚膜梭菌具有较强的抑制作用, 可能通过抑菌物质 surfactin 和 mersacidin 表达发挥作用。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 产气荚膜梭菌; 代谢物质; 表面活性素; 美杀菌素

基金项目: 重庆荣昌农牧高新技术产业研发专项(cstc2020ngzx0003); 重庆英才计划“包干制”项目(21201)

Supported by: Chongqing Rongchang Agriculture and Animal Husbandry High-Tech Industry Research and Development Project (cstc2020ngzx0003); Project of Chongqing Talent Program (21201)

*Corresponding author: E-mail: short00@163.com

Received: 2021-11-06; Accepted: 2022-02-09; Published online: 2022-02-25

Characteristics of *Bacillus subtilis* BS-2 against *Clostridium perfringens*

HUANG Jinxiu^{1,2}, CHEN Li¹, SU Guoqi^{1,2}, GUAN Xiaofeng¹, WANG Ruisheng^{*1}

1 Chongqing Academy of Animal Sciences, Chongqing 402460, China

2 Key Laboratory of Pig Industry Sciences, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chongqing 402460, China

Abstract: [Background] Infection with *Clostridium perfringens* causes necrotizing enteritis in animals, which is commonly treated by antibiotics. With the limitation of antibiotics in feed and husbandry in China, probiotics and its metabolites have become the focus of current research. [Objective] This study was conducted to reveal the properties of *B. subtilis* BS-2 against *Clostridium perfringens*. [Methods] The growth curve of *B. subtilis* BS-2, the antimicrobial properties of its metabolites and the mRNA levels of bacteriocin gene cluster were detected. [Results] The metabolites of *B. subtilis* BS-2 had no inhibitory effect on Gram-negative bacteria, whereas they had strong activity against Gram-positive bacteria. The activity of the strain against *C. perfringens* increased rapidly within 2–12 h and remained stable within 12–24 h. The antibacterial properties of the metabolites were not affected by pepsin, trypsin or protease K, which demonstrated good thermal stability. The mRNA levels of bacteriocin gene cluster showed that the inhibitory activity of *B. subtilis* BS-2 against *C. perfringens* was related to the expression of surfactin and mersacidin. [Conclusion] *B. subtilis* BS-2 may inhibit *C. perfringens* by regulating the expression of surfactin and mersacidin.

Keywords: *Bacillus subtilis*; *Clostridium perfringens*; metabolites; surfactin; mersacidin

产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)属厌氧型革兰氏阳性菌,是一种典型的条件性致病菌,广泛存在于自然界,包括人和动物胃肠道。在正常生理状态下,产气荚膜梭菌与肠道其他微生物群落保持生态平衡;但当环境恶劣或宿主免疫力低下时,肠道微生态平衡受到破坏,产气荚膜梭菌就会大量繁殖,分泌致病性毒素,进而诱发多种疾病甚至死亡^[1]。产气荚膜梭菌作为一种人畜共患病原菌,是导致人类气性坏疽和食物中毒的主要病原菌之一,同时也会引起畜禽坏死性肠炎的发生,严重威胁畜禽养殖业的健康发展^[2-3]。据统计,每年因坏死性肠炎造成的全球畜禽业经济损失超过 20 亿美元^[4]。随着世界各国先后禁止在饲料中使用抗生素,产气荚膜梭菌诱发的疾病发生率呈现增加趋势,特别是肉鸡坏死性肠炎的流行率增

加明显,因此迫切需要研发新型安全、有效的抗生素替代产品来防控产气荚膜梭菌的危害。

研究发现,枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是一种耐酸碱的好氧性益生菌,过胃酸进入肠道后以孢子形式迅速萌芽繁殖,能以消耗肠内氧气的方式竞争性抑制好氧病原菌的增殖,也可通过产生抑菌物质来抑制或杀死产气荚膜梭菌等病原菌,进而调控畜禽肠道菌群平衡,降低宿主机会性病原体感染的风险^[5-6]。其中,surfactin 和 mersacidin 是枯草芽孢杆菌产生的 2 种抑菌物质,对产气荚膜梭菌具有较强的抑制作用^[7-8]。surfactin 通过非核糖体多肽合成酶(non-ribosomal peptide synthetases, NRPS)以多载体巯基化模板机制合成,NRPS 基因的开放阅读框包含 *srfAA*、*srfAB*、*srfAC* 和 *srfAD*,其中 *srfAA*、*srfAB* 和 *srfAC* 负责单个氨基酸底物的识

别与装载^[9]。编码 mersacidin 基因簇由 10 个开放阅读框组成, *mrsA* 是 mersacidin 前肽的结构基因, *mrsM* 和 *mrsD* 是修饰基因, *mrsT* 是转运基因, *mrsF*、*mrsE* 和 *mrsG* 是免疫基因, *mrsR1*、*mrsR2* 和 *mrsK2* 是转录调控基因^[10]。本实验室前期筛选到一株可有效抑制产气荚膜梭菌的枯草芽孢杆菌 BS-2, 通过观测生长曲线、对不同指示菌的抑制能力、不同培养时间的代谢产物对产气荚膜梭菌的抑制能力、代谢产物的抗逆性及细菌素基因簇 mRNA 表达水平, 探究该菌株所产抑菌物质的特性, 为新型抗生素替代品开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株

金黄色葡萄球菌(ATCC 29213、ATCC 25923)、链球菌(ATCC 35666、ATCC 700407)、粪肠球菌(ATCC 29212)、荚膜梭菌(CVCC 66、CVCC 2027)、大肠杆菌(CVCC 1515、ATCC 25922)、鸡伤寒沙门氏菌(CVCC 534)和绿脓杆菌(ATCC 27853)来自中国兽医微生物菌种保藏管理中心(CVCC); 枯草芽孢杆菌 BS-2 来自本实验室。

1.2 培养基、主要试剂

NB 培养基, 杭州微生物试剂有限公司; TSC 固体培养基, 青岛海博生物技术有限公司; 液体石蜡, 上海麦克林生化科技有限公司; 过氧化氢酶, 北京索莱宝科技有限公司; 胃蛋白酶、胰蛋白酶和细菌 RNA 快速抽提试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 蛋白酶 K, 默克生物科技有限公司; 其他常用试剂均为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 枯草芽孢杆菌 BS-2 生长曲线的绘制

挑选斜面培养基上生长良好的枯草芽孢杆菌 BS-2 菌落于 NB 液体培养基中, 33 °C、180 r/min

条件下培养至浑浊, 再以 1% 的接种量转接于 NB 液体培养基培养 26 h, 每 2 h 取样一次, 测定 OD_{600} 值。以培养时间为横坐标, OD_{600} 值为纵坐标, 绘制枯草芽孢杆菌 BS-2 生长曲线。

1.3.2 枯草芽孢杆菌 BS-2 对不同指示菌的抑菌特性

按购买说明将各类指示菌活化, 制备成菌悬液, 用无菌生理盐水将菌悬液稀释至 OD_{600} 为 0.1 (活菌数约 10^8 CFU/mL), 制成指示菌悬液稀释液。将产气荚膜梭菌悬液稀释液按 0.2% 的比例加入到 TSC 固体培养基(高温高压灭菌后冷却到 45 °C 左右, 下同)中, 链球菌悬液稀释液按 0.2% 的比例加入到 NB 固体培养基中, 金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、大肠杆菌、鸡伤寒沙门氏菌、绿脓杆菌悬液稀释液按 0.02% 的比例加入到 NB 固体培养基中。迅速将未凝固的固体培养基和指示菌悬液稀释液混合均匀后倒平板, 待平板冷却凝固后用打孔器在平板上打上直径为 0.78 cm 的样孔, 得到指示菌平板。

挑取斜面培养基上生长良好的枯草芽孢杆菌 BS-2 菌落于 NB 液体培养基中, 33 °C、180 r/min 培养 16 h 后, 以 1% 的接种量转接种于 50 mL 的 NB 液体培养基中培养 24 h, 得到枯草芽孢杆菌 BS-2 菌悬液。菌悬液 5 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 0.1 mL 至各指示菌平板样孔内, 待上清液被完全吸收后, 37 °C 倒置培养 16 h, 观察有无抑菌圈的产生, 并用游标卡尺测量抑菌圈直径。以无菌 NB 液体培养基为对照。

1.3.3 不同培养时间的枯草芽孢杆菌 BS-2 对产气荚膜梭菌的抑菌性能研究

枯草芽孢杆菌 BS-2 以 1% 接种量转接种于 50 mL 的 NB 液体培养基中, 33 °C、180 r/min 培养, 每 2 h 取样一次, 5 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 50 μ L 到以产气荚膜梭菌为指示菌的平板样孔内, 以等量 NB 液体培养基为对照。待液体被平

板完全吸收后, 37 °C倒置培养 16 h, 观察有无抑菌圈的产生, 并用游标卡尺测量抑菌圈直径。

1.3.4 枯草芽孢杆菌 BS-2 代谢产物的稳定性研究

待测液的制备: 吸取枯草芽孢杆菌 BS-2, 以 1%接种量转接种于 NB 液体培养基中培养 24 h, 5 000 r/min 离心 5 min, 取适量上清用蒸馏水稀释, 得到上清稀释液(A液), 用 5 mol/L NaOH 或 5 mol/L HCl 将上清稀释液 pH 值调整为 7.3 (B液)或 2.0 (C液), 并使待测液体积为上清液的 1.25 倍。

枯草芽孢杆菌 BS-2 代谢产物对过氧化氢酶的耐受性研究。吸取 B 液 1 mL 于离心管内, 加入过氧化氢酶并使酶终浓度为 1 mg/mL, 以上清稀释液和 B 液为对照。37 °C温浴 3 h 后, 沸水浴 5 min 使酶灭活, 以产气荚膜梭菌为指示菌, 研究 BS-2 代谢产物的抑菌性能是否受过氧化氢酶影响。

枯草芽孢杆菌 BS-2 代谢产物对蛋白酶的耐受性研究。称取适量胃蛋白酶溶解于 Tris-HCl 缓冲液(pH 2.0)制成胃蛋白酶溶液。吸取 C 液 1 mL 于离心管内, 加入适量胃蛋白酶溶液, 使胃蛋白酶的终浓度为 1 mg/mL, 以等量 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.3)的缓冲液代替酶溶液加入 B 液作为对照。称取适量的胰蛋白酶、蛋白酶 K 溶解于 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.3)分别制成胰蛋白酶溶液、蛋白酶 K 溶液。吸取 B 液 1 mL 于离心管内, 分别加入胰蛋白酶溶液、蛋白酶 K 溶液, 使酶的终浓度为 1 mg/mL, 以等量 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.3)的缓冲液代替酶溶液加入 B 液作为对照。37 °C温浴 3 h 后, 沸水浴 5 min 使酶灭活, 以产气荚膜梭菌为指示菌, 探究蛋白酶对枯草芽孢杆菌 BS-2 代谢产物抑菌性能的影响。

枯草芽孢杆菌 BS-2 代谢产物对高温的耐受性研究。吸取 B 液 1 mL 于离心管内, 80 °C 处理 2 h, 以 B 液为对照, 以产气荚膜梭菌为指

示菌, 探究高温对枯草芽孢杆菌 BS-2 代谢产物抑菌性能的影响。

1.3.5 枯草芽孢杆菌 BS-2 抑菌物质基因簇 mRNA 表达分析

为了进一步探析枯草芽孢杆菌 BS-2 抑菌物质, 选择有较强抑杀产气荚膜梭菌功能的 2 种物质 surfactin 和 mersacidin 进行基因簇表达分析。从 NB 固体培养板上挑取枯草芽孢杆菌单菌落, 接种于 50 mL 装有 5 mL NB 培养液的锥形培养瓶中, 37 °C、200 r/min 培养 7、16、26 h 时取样。用细菌总 RNA 快速抽提试剂盒提取总 RNA, 用反转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (RR047A, TaKaRa)反转录获得 cDNA, 然后用 TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 按照说明书推荐体系和 PCR 反应条件上机 QuantStudio 6 Flex 检测基因表达量。以 surfactin 基因簇 AJ575642.1 为模板设计 *srfAA*、*srfAB* 和 *srfAC* 基因的引物, 以 mersacidin 基因簇 AJ250862.2 为模板设计 *mrsA*、*mrsM1*、*mrsM2*、*mrsM3*、*mrsM4*、*mrsD*、*mrsT*、*mrsE*、*mrsG*、*mrsF*、*mrsR1*、*mrsR2* 和 *mrsK2* 基因的引物, 引物见表 1。

1.4 数据统计分析

数据采用 Excel 2016 分析软件进行统计和初步处理, SPSS19.0 软件中的 one-way ANOVA 进行方差分析, 图表采用 Excel 2016 绘制, 结果以平均值±标准差表示。

2 结果与分析

2.1 枯草芽孢杆菌 BS-2 的生长曲线

如图 1 所示, 枯草芽孢杆菌 BS-2 在 0–2 h 菌体繁殖速度较慢, OD_{600} 值无明显变化; 2–16 h 菌体生长繁殖速度快, OD_{600} 值明显增大, 16 h 时 OD_{600} 达到最大; 16–26 h 菌体繁殖速度下降, 培养液中菌体增殖数量与凋亡数量渐趋平衡, OD_{600} 值变化幅度小, 趋于稳定。

表 1 引物序列

Table 1 Sequence of primers

Primer	Sequence (5'→3')	Product size (bp)
<i>16S-F</i>	GGGAGGGTCATTGGAAACTGG	113
<i>16S-R</i>	TCATCGTTTACGGCGTGGACTA	
<i>srfAC-F</i>	GCAGGAGAAATGTCAATGTCATGTTT	144
<i>srfAC-R</i>	CCCTCAGTCGGTCCGTACA	
<i>srfAB-F</i>	GCGAGACACCTTGTGAAGAGCG	102
<i>srfAB-R</i>	GAACTGTCAGCACGAGCCGAAT	
<i>srfAA-F</i>	GGAAGTTCTCGGAATGGACAAGG	125
<i>srfAA-R</i>	CGCAATCGTCGGATGCTCAAA	
<i>mrsA-F</i>	CAGTGAGCTGAAAGAAGCACAAATGG	86
<i>mrsA-R</i>	CGCCACCAGGCAATGTAAAAGTAC	
<i>mrsM1-F</i>	GGATGAACTAACAAACAGACGCTTCG	90
<i>mrsM1-R</i>	ATGCGGAGATACTTGTCTTCTTGTG	
<i>mrsM2-F</i>	ATTGAACGGTCAGTTTTACGAATTGGG	117
<i>mrsM2-R</i>	ATGCGGAGATACTTGTCTTCTTGTG	
<i>mrsM3-F</i>	TTTCTTGCTAGTAGGGCGATTGAAGG	82
<i>mrsM3-R</i>	GATTGTCAACAAACGATCCGATCCAAG	
<i>mrsM4-F</i>	GGATGAACTAACAAACAGACGCTTCG	90
<i>mrsM4-R</i>	TGGGTGGCTAATACATCCTCAATTCG	
<i>mrsD-F</i>	CAGTTGAAATTATGGCGTTTGAGATTGC	132
<i>mrsD-R</i>	ATGTTAGTGAGGGGTGTTTTGTTCTTTC	
<i>mrsT-F</i>	AACACTCGGAGGCTTATTAGGGTTTAG	114
<i>mrsT-R</i>	TCGGGCTCAGTTTCCATAACATCTTG	
<i>mrsE-F</i>	ACACAGCCTATGTTAGCAATGTCACC	109
<i>mrsE-R</i>	TTCCGTAAACCAGGAGACCGAGAC	
<i>mrsF-F</i>	AGTCCTCGTAACCTCCTAACAGCTTC	89
<i>mrsF-R</i>	AGAATCGGGTCACTGGTAGAATCTCC	
<i>mrsG-F</i>	CAAGCAAACGGATGGAAGCAAACC	128
<i>mrsG-R</i>	AGTACCATGCCGAGCAAGAAGATTG	
<i>mrsR1-F</i>	GCCACCCTAATGACTTAGTGTTGC	104
<i>mrsR1-R</i>	TGGACCAGGGTTATAATCTGAAACGT	
<i>mrsR2-F</i>	AACGACTCAACTCTCTTCTTCTTACCC	120
<i>mrsR2-R</i>	TGAGCAGGGCAATCTATTCTTGCC	
<i>mrsK2-F</i>	ACATTGTTATACTTAGATGGCGGACTCG	137
<i>mrsK2-R</i>	GGGACTGGATTAGGAATGGCTATTGC	

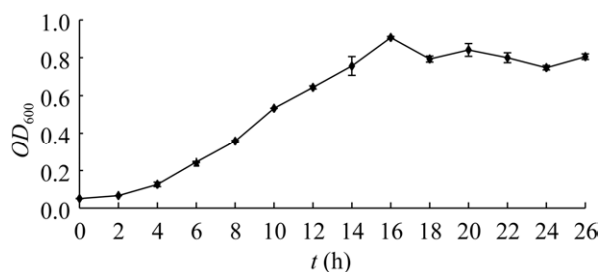


图1 枯草芽孢杆菌 BS-2 生长曲线
Figure 1 The growth curve of *Bacillus subtilis* BS-2.

2.2 枯草芽孢杆菌 BS-2 对不同指示菌的抑菌效果

枯草芽孢杆菌 BS-2 培养液上清对 9 株指示菌中的 5 株革兰氏阳性菌均有抑菌圈产生, 而对大肠杆菌(CVCC 1515 和 ATCC 25922)、鸡伤寒沙门氏菌(CVCC 534)、绿脓杆菌(ATCC 27853) 等 4 株革兰氏阴性指示菌无抑菌圈产生(表 2)。其中, 对 2 株产气荚膜梭菌(CVCC 66 和 CVCC 2027)的抑制作用最强, 抑菌圈直径分别为 23.4 mm 和 20.8 mm; 对粪肠球菌的抑制作用次之, 抑菌圈直径为 17.8 mm; 对 2 株金黄色葡萄球菌(ATCC 29213 和 ATCC 25923)抑菌圈直径均在 10–15 mm 之间。综上, 后续试验以产气荚膜梭菌(CVCC 66 和 CVCC 2027)为指示菌研究枯草芽孢杆菌 BS-2 代谢产物抑菌性能。

2.3 不同培养时间的枯草芽孢杆菌 BS-2 对产气荚膜梭菌的抑制效果

不同培养时间的枯草芽孢杆菌 BS-2 对 2 株产气荚膜梭菌 CVCC 66 和 CVCC 2027 的抑菌圈直径的整体变化趋势较为一致(图 2)。0–2 h, 其培养上清液对 2 株产气荚膜梭菌的抑菌圈直径基本无变化, 2–12 h, 抑菌圈直径迅速增大, 12–24 h 抑菌圈直径无明显变化, 趋于平稳, 未出现降低。

表2 枯草芽孢杆菌 BS-2 对不同指示菌的抑菌效果
Table 2 The antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* BS-2 on various indicator bacteria

指示菌 Indicator bacteria	革兰氏染色 Gram stain	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	+	12.6±0.4
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	+	14.8±0.5
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	+	17.8±0.3
<i>Clostridium perfringens</i> CVCC 66	+	23.4±1.0
<i>Clostridium perfringens</i> CVCC 2027	+	20.8±1.4
<i>Escherichia coli</i> CVCC 1515	-	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	0
<i>Salmonella gallinarum</i> CVCC 534	-	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	0

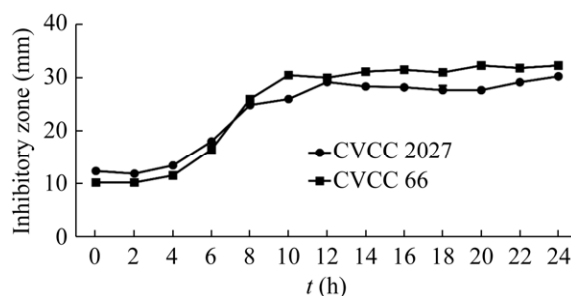


图2 不同培养时间的 BS-2 发酵上清液对产气荚膜梭菌的抑菌活性
Figure 2 The antimicrobial activities of *Bacillus subtilis* BS-2 supernatant to *Clostridium perfringens* at different culture time.

2.4 枯草芽孢杆菌 BS-2 代谢产物耐受性结果

将枯草芽孢杆菌 BS-2 上清液制备为 pH 7.3 的 B 液, 用过氧化氢酶处理后的抑菌圈直径较 A 液、B 液无明显变化(图 3A), 说明该菌产生的抑菌物质非过氧化氢类, 对过氧化氢酶具有耐受性, 且将 pH 值调整为 7.3 不影响其抑菌性能。A 液、C 液+Tris-HCL 缓冲液、C 液+胃蛋白酶溶液 3 组

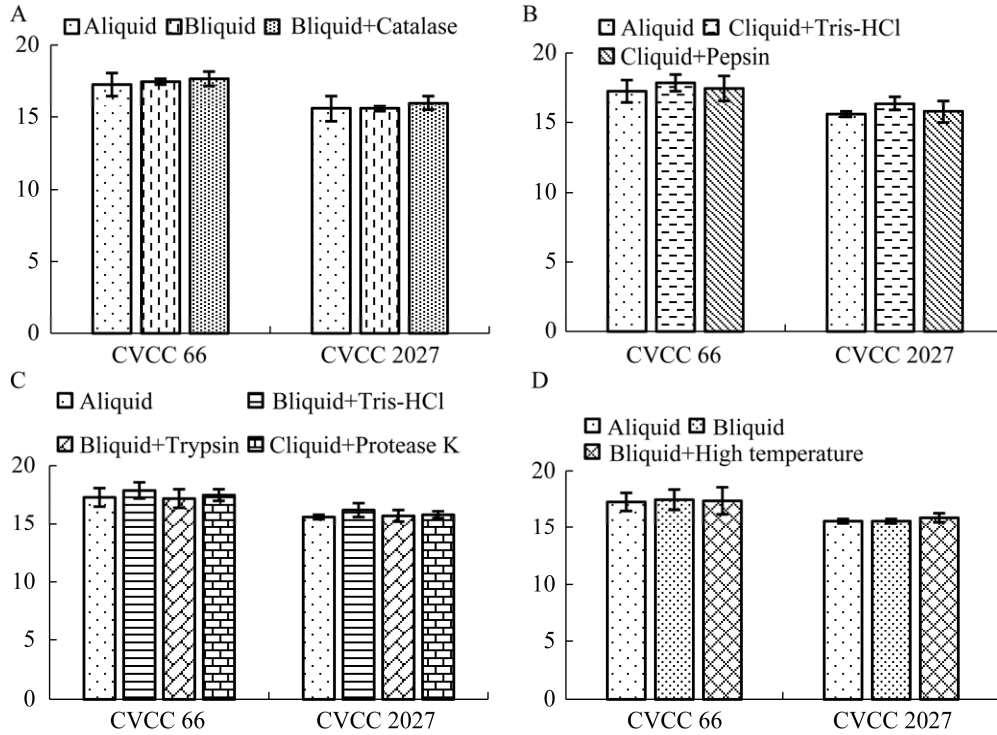


图3 枯草芽孢杆菌 BS-2 代谢产物耐受性结果 A: 过氧化氢酶的耐受性; B: 对胃蛋白酶的耐受性; C: 胰蛋白酶、蛋白酶 K 的耐受性; D: 高温的耐受性

Figure 3 Tolerance of metabolites of *Bacillus subtilis* BS-2. A: Catalase tolerance; B: Pepsin tolerance; C: Trypsin and protease K tolerance; D: High temperature tolerance.

的抑菌圈直径无明显差异(图 3B), 说明该菌产生的抑菌物质对酸(pH 2.0)、胃蛋白酶具有耐受性。B液经胰蛋白酶(图 3C)、蛋白酶 K (图 3C)、80 °C加热 2 h 处理(图 3D)后, 抑菌圈直径均无明显差异, 说明该菌产生的抑菌产物对胰蛋白酶、蛋白酶 K 也具有耐受性, 同时热稳定性较好。

2.5 枯草芽孢杆菌 BS-2 抑菌物质基因簇 mRNA 表达结果

枯草芽孢杆菌 BS-2 培养 7、16 和 26 h 时, 细菌素 surfactin 基因簇的核心基因 *srfAA*、*srfAB* 和 *srfAC* 均有表达, 且 3 个核心基因在同一时间的表达量丰度相当, 而不同时间的比较发现以 16 h 的表达丰度最高, C_T 值分别是 18.19、17.65 和 19.14 (图 4)。细菌素 mersacidin 基因簇的基因 *mrsM*、*mrsR*、*mrsA*、*mrsT*、*mrsG*、*mrsE*、*mrsK2*、*mrsF* 和 *mrsD* 在各时间点也都有表达,

但与 surfactin 基因簇相比, mersacidin 基因簇的基因表达丰度要低些, 表达丰度最高的 *mrsA* 基因 C_T 值在 7、16 和 26 h 分别是 24.19、23.94 和 25.64, 而表达丰度最低的 *mrsD* 基因 C_T 值达 36.76 (图 5)。以上结果推测, 枯草芽孢杆菌

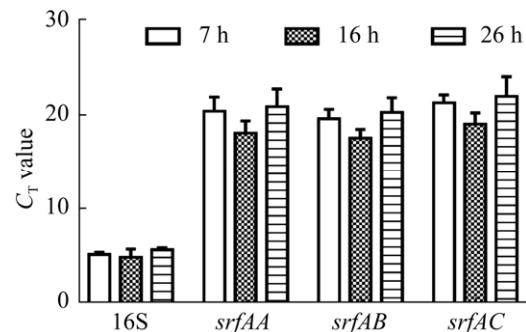


图4 枯草芽孢杆菌在不同培养时间的 surfactin 基因簇基因 mRNA 水平

Figure 4 The mRNA levels of surfactin gene cluster in *Bacillus subtilis* at different culture time.

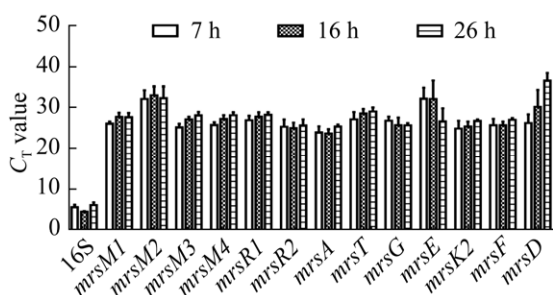


图 5 枯草芽孢杆菌不同培养时间的 mersacidin 基因簇基因 mRNA 水平

Figure 5 The mRNA levels of mersacidin gene cluster in *Bacillus subtilis* at different culture time.

BS-2 培养液中 surfactin 表达量可能要高于 mersacidin。

3 讨论

3.1 枯草芽孢杆菌 BS-2 生长规律

根据微生物的生长速率常数, 即每小时分裂代数的不同, 一般将微生物生长典型曲线粗分为延滞期、对数期、稳定期和衰亡期 4 个时期。在对数生长期内, 微生物的生长速度与抗不良环境的能力达到最大, 细胞数量呈指数递增, 细胞群体的形态与生理特性最为一致, 酶系发达, 代谢旺盛, 有利于菌株的迅速活化与生产利用^[11]。本试验以培养时间为横坐标, OD_{600} 值为纵坐标绘制了枯草芽孢杆菌 BS-2 在 NB 液体培养基中的生长曲线。结果表明, 该菌在 NB 液体培养基中 2–16 h 为对数生长期, 16 h 为对数生长期末期并开始进入稳定期, 因此后续试验的 BS-2 培养时间选择 16 h。

3.2 枯草芽孢杆菌 BS-2 的抑菌特性

枯草芽孢杆菌 BS-2 对试验观测的革兰氏阳性指示菌均有抑制作用, 而对革兰氏阴性菌无抑制作用, 这与 Li 等^[12]的研究结果一致。但张媛媛等^[13]试验发现, 枯草芽孢杆菌 P86 不仅对产气荚膜梭菌等革兰氏阳性菌有抑制作用,

对大肠杆菌、鼠伤寒沙门菌等革兰氏阴性菌同样具有抑制作用。曹丁等^[14]也发现, 枯草芽孢杆菌 GL08 培养上清液对大肠杆菌 $K_{12}D_{31}$ 、大肠杆菌标准株、绿脓杆菌、沙门氏菌等革兰氏阴性菌有一定的抑制作用。试验还发现, 枯草芽孢杆菌株 (ATCC 6633) 对产气荚膜梭菌 (ATCC 13124 和 UNE 72) 无抑制作用^[15]。然而, 本试验观测的枯草芽孢杆菌 BS-2 对产气荚膜梭菌的抑菌能力较强, 究其原因可能与指示菌来源不同及不同菌株所产生的抑菌物质不同有关。枯草芽孢杆菌分泌的抗菌物质主要包括有机酸、核糖体抗菌肽、非核糖体抗菌肽、聚酮、氨基糖和磷脂等, 不同的抗菌物质会形成不同的抑菌效果^[9]。

3.3 不同培养时间的枯草芽孢杆菌 BS-2 对产气荚膜梭菌抑菌性能的影响

不同培养时间的菌株产物对指示菌的抑菌圈直径变化, 可反映该菌株代谢抑菌物质的分泌、积累、降解失活等变化过程。本试验结果表明, 枯草芽孢杆菌 BS-2 培养液上清对产气荚膜梭菌的抑制能力在 0–2 h 无明显变化, 2–12 h 迅速增大, 12–24 h 稳定, 说明该菌代谢抑菌物质约在培养 2 h 时分泌、积累, 约在 12 h 达到峰值, 12–24 h 后期其抑菌活性较稳定, 这与 Li 等^[12]试验结果一致。枯草芽孢杆菌 SLYY-3 上清液对金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 的抑菌圈在 14–24 h 稳定^[12]。细菌素类物质的合成和分泌于对数期早期开始, 稳定期或稳定期早期抑菌活性达最大, 随后抑菌活性缓慢降低^[16-17], 这与该菌的生长规律基本一致, 但本试验中抑菌活性未出现降低现象, 可能与该菌产生的抗菌物质比较稳定有关。另外, 本试验结果显示, 在 0 h 时, 该菌株培养液上清对产气荚膜梭菌就有一定的抑制作用, 可能与添加了培养 16 h 的种子液有关。

3.4 枯草芽孢杆菌 BS-2 代谢产物的耐受性分析

前面试验已证实枯草芽孢杆菌 BS-2 所产生的代谢物质对产气荚膜梭菌具有良好的抑菌效果。为了筛查枯草芽孢杆菌 BS-2 抑菌物质的种类,本试验检测了 BS-2 代谢物质对过氧化氢酶的耐受性,发现其对产气荚膜梭菌的抑菌圈直径未见明显变化,提示枯草芽孢杆菌 BS-2 所产生的抑菌物质非过氧化氢类物质。抑菌物质经口进入动物消化道后的稳定性会直接影响其抑菌效果,为进一步分析枯草芽孢杆菌 BS-2 代谢抑菌物质在胃肠道环境中的稳定性,本试验还检测了 BS-2 培养上清液对胃蛋白酶(pH 2.0)、胰蛋白酶和蛋白酶 K (pH 7.3)的耐受性,发现其对产气荚膜梭菌的抑菌圈直径也未出现显著变化,提示 BS-2 代谢抑菌物质能在动物消化道内保持良好的抑菌活性。本实验还研究了枯草芽孢杆菌 BS-2 代谢抑菌物质对热的稳定性,在高温 80 °C加热 2 h 后不影响其抑菌活性,表明 BS-2 代谢抑菌物质具有热稳定性,添加到动物饲料中不会受到制粒高温的影响。

3.5 枯草芽孢杆菌 BS-2 抑菌物质基因簇 mRNA 表达结果

枯草芽孢杆菌可以产生多种具有抑菌活性和免疫调节功能的代谢产物,如 surfactin 是由次级代谢产物基因簇 AJ575642.1 核心基因 *srfAA*、*srfAB* 和 *srfAC* 等修饰合成的两亲性环状脂七肽,属于非核糖体肽家族的天然产物^[9],具有抑杀金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、产气荚膜梭菌和鼠伤寒沙门氏菌的活性^[18]。本试验中枯草芽孢杆菌 BS-2 的 surfactin 基因簇基因 *srfAA*、*srfAB* 和 *srfAC* 的表达丰度较高,推测枯草芽孢杆菌 BS-2 培养液上清具有的抑制产气荚膜梭菌活性可能与较高水平的 surfactin 分泌有关。mersacidin 是枯草芽孢杆菌产生的一种羊毛硫

脂肽,对革兰氏阴性菌或真菌无抑制活性,但能抑制革兰氏阳性菌^[19],对产气荚膜梭菌的 MIC 值可达 4 µg/mL^[8]。mersacidin 生物合成基因簇包含 10 个基因,由 *mrsA* 编码 68 个残基的前肽,前肽 *mrsA* 被 *mrsD* 脱羧和氧化,在 C 端半胱氨酸产生 2-硫代乙胺功能。修饰的 *mrsA* 作为 *mrsM* 产生四环结构的底物,经 *mrsT* 加工后分泌成为最终的生物活性化合物。其中有一个调控基因 *mrsR1*,负责控制 *mrsA* 的合成,还有一个双组分系统 *mrsR2/mrsK2*,其编码参与诱导免疫基因 *mrsE*、*mrsF* 和 *mrsG* 的传感器和激酶^[20]。本试验中,枯草芽孢杆菌 BS-2 的 mersacidin 基因簇基因 *mrsA*、*mrsD*、*mrsM*、*mrsT*、*mrsR1*、*mrsR2*、*mrsK2*、*mrsE*、*mrsF* 和 *mrsG* 在各生长阶段均有表达,推测 mersacidin 可能在枯草芽孢杆菌 BS-2 抑制产气荚膜梭菌中也发挥了一定的作用。

4 结论

枯草芽孢杆菌 BS-2 的代谢物质对产气荚膜梭菌具有良好的抑菌活性,且在酸性条件(pH 2.0)下对胃蛋白酶不敏感,在碱性条件(pH 7.3)下对胰蛋白酶、蛋白酶 K 不敏感,同时具有良好的热稳定性。枯草芽孢杆菌 BS-2 抑制产气荚膜梭菌的活性可能通过表达分泌 surfactin 和 mersacidin 发挥作用。

REFERENCES

- [1] Shrestha A, Uzal FA, McClane BA. Enterotoxigenic clostridia: *Clostridium perfringens* enteric diseases[J]. Microbiology Spectrum, 2018, 6(5): 1-27
- [2] Mehdizadeh Gohari I, A Navarro M, Li JH, Shrestha A, Uzal F, A McClane B. Pathogenicity and virulence of *Clostridium perfringens*[J]. Virulence, 2021, 12(1): 723-753
- [3] 任宏荣,李苗云,朱瑶迪,赵改名,赵莉君,吴慧琳,肖康,崔文明. 产气荚膜梭菌在食品中的危害及其控

- 制研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(7): 352-359
- Ren HR, Li MY, Zhu YD, Zhao GM, Zhao LJ, Wu HL, Xiao K, Cui WM. Recent progress in hazards and control of *Clostridium perfringens* in foods[J]. Food Science, 2021, 42(7): 352-359 (in Chinese)
- [4] Jour Sluis W. Clostridial enteritis is an often underestimated problem[J]. World Poultry, 2000, 16: 42-43
- [5] 胡均, 张克英, 白世平, 王建萍, 曾秋风, 彭焕伟, 梁超, 丁雪梅. 枯草芽孢杆菌对产气荚膜梭菌攻毒肉鸡生长性能和肠道健康的影响[J]. 动物营养学报, 2019, 31(5): 2127-2135
- Hu J, Zhang KY, Bai SP, Wang JP, Zeng QF, Peng HW, Luan C, Ding XM. Effects of *Bacillus subtilis* on growth performance and intestinal health of broilers challenged by *Clostridium perfringens*[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2019, 31(5): 2127-2135 (in Chinese)
- [6] Cheng YH, Zhang N, Han JC, Chang CW, Hsiao FSH, Yu YH. Optimization of surfactin production from *Bacillus subtilis* in fermentation and its effects on *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis and growth performance in broilers[J]. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2018, 102(5): 1232-1244
- [7] Horng YB, Yu YH, Dybus A, Hsiao FSH, Cheng YH. Antibacterial activity of *Bacillus* species-derived surfactin on *Brachyspira hyodysenteriae* and *Clostridium perfringens*[J]. AMB Express, 2019, 9(1): 188
- [8] Niu WW, Neu HC. Activity of mersacidin, a novel peptide, compared with that of vancomycin, teicoplanin, and daptomycin[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1991, 35(5): 998-1000
- [9] Harwood CR, Mouillon JM, Pohl S, Arnau J. Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2018, 42(6): 721-738
- [10] He PF, Hao K, Blom J, Rückert C, Vater J, Mao ZC, Wu YX, Hou MS, He PB, He YQ, et al. Genome sequence of the plant growth promoting strain *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* B9601-Y2 and expression of mersacidin and other secondary metabolites[J]. Journal of Biotechnology, 2013, 164(2): 281-291
- [11] 沈萍, 陈向东. 微生物学[M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 2006
- Shen P, Chen XD. Microbiology[M]. 2nd ed. Beijing: Higher Education Press, 2006 (in Chinese)
- [12] Li JF, Li HF, Zhang YY, Duan XH, Liu J. Characterization of a bacteriocin-like substance produced from a novel isolated strain of *Bacillus subtilis* SLYY-3[J]. Journal of Ocean University of China, 2014, 13(6): 995-999
- [13] 张媛媛, 黄广明, 劳晔. 益生菌枯草芽孢杆菌 PB6 菌株对动物肠道病原菌的抑菌谱研究[J]. 饲料研究, 2014(13): 46-48
- Zhang YY, Huang GM, Lao Y. Study on bacteriostatic spectrum of probiotics *Bacillus subtilis* PB6 strain against animal intestinal pathogens[J]. Feed Research, 2014(13): 46-48 (in Chinese)
- [14] 曹丁, 明飞平, 夏枫耿, 张高贤, 黄乐天, 张玲华. 抗菌肽产生菌的推理选育及抑菌特性分析[J]. 广东农业科学, 2015, 42(18): 122-126
- Cao D, Ming FP, Xia FG, Zhang GX, Huang LT, Zhang LH. Rational selection and antibacterial properties analysis of antimicrobial peptides producing bacteria[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2015, 42(18): 122-126 (in Chinese)
- [15] 肖建根. PB6 活性菌株对产气荚膜梭菌和弧形杆菌的抑制能力的研究[J]. 中国畜牧杂志, 2011, 47(6): 76-78
- Xiao JG. Inhibition of active PB6 strains against *Clostridium perfringens* and *Arctobacter*[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2011, 47(6): 76-78 (in Chinese)
- [16] Awais M, Shah AA, Hameed A, Hasan F. Isolation, identification and optimization of bacitracin produced by *Bacillus* sp.[J]. Pakistan Journal of Botany, 2007, 39(4): 1303-1312
- [17] 滕坤玲, 钟瑾. 益生菌产生的细菌素及其功能机制[J]. 微生物学报, 2021, 62(3): 858-868
- Teng KL, Zhong J. Functions and mechanisms of bacteriocins produced by probiotics[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 62(3): 858-868 (in Chinese)
- [18] Meena KR, Sharma A, Kanwar SS. Antitumoral and antimicrobial activity of surfactin extracted from *Bacillus subtilis* KLP2015[J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2020, 26(1): 423-433
- [19] Appleyard AN, Choi S, Read DM, Lightfoot A, Boakes S, Hoffmann A, Chopra I, Bierbaum G, Rudd BAM, Dawson MJ, et al. Dissecting structural and functional diversity of the lantibiotic mersacidin[J]. Chemistry & Biology, 2009, 16(5): 490-498
- [20] Viel JH, Van Tilburg AY, Kuipers OP. Characterization of leader processing shows that partially processed mersacidin is activated by AprE after export[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 765659