

胶胨状芽孢杆菌拮抗菌株活性物质形成 条件及其性质初步研究

刘光烨 林 洋

(中国科学院成都生物研究所 成都 610041)

摘要: 探索了培养基组分和培养条件对胶胨状芽孢杆菌拮抗菌株抗菌活性形成的影响。确定了菌株的最适发酵条件: 即以 1% 麦芽糖为碳源, 以 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮源, 32℃ ~ 37℃ 摇瓶培养, 在培养过程中保持 pH 近中性有利于菌株生长和积累活性产物。从发酵液中获得抗物质粗品, 该物质对 G^+ 的蜡样芽孢杆菌, 金黄色葡萄球菌和 G^- 的大肠杆菌等均有较强抗菌活性。经热处理、酶处理和生化定性分析, 表明此活性产物为肽类化合物。

关键词: 胶胨状芽孢杆菌, 抗菌代谢产物, 发酵条件

中图分类号: Q939.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 01-0022-05

PRODUCTION AND CHARACTERISTICS OF ANTIBIOTICS FROM ANTAGONISTIC STRAIN OF *BACILLUS MUCILAGINOSUS*

LIU Guang-Ye LIN Yang

(Chengdu Institute of Biology, Academia Sinica, Chengdu 610041)

Abstract: Ingredients of medium and fermentational conditions of antagonistic strain of *B. mucilaginosus* were studied. The optimal medium composed of 2% maltose and 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. The optimal temperature was from 32℃ to 37℃ under 150 r/min shake condition and neutral pH kept was necessary for growth and antibiotic activity. The antibiotic metabolite isolated from the fermentation liquid showed strong activity in inhibiting the growth of G^+ bacteria such as *B.*

收稿日期: 2001-11-29, 修回日期: 2002-02-10

cereus, *Staphylococcus aureus* and G^- bacteria as *Escherichia coli*. The isolate was determined as peptide compound because it rapidly lost activity over 60°C or treated with pancreatic protease and according to its biochemical reaction.

Key words: *Bacillus mucilaginosus*, Antibiotic metabolite, Fermentational conditions

硅酸盐细菌研究历史悠久, 1912 年, 巴散立克发现了可以分解正长石和磷灰石的芽孢杆菌; 50 年代前苏联学者获得了硅酸盐细菌代表种-胶胨状芽孢杆菌的纯培养, 但未得到国际细菌学界认可。直到 1986 年, 前苏联学者再次分离到一株胶胨状芽孢杆菌 1480 菌株, 并作了详细的生理生化性质鉴定^[1], 于 1997 年得到国际细菌分类学界的承认^[2]。

硅酸盐细菌可促进钾离子和磷离子溶解, 有利于矿质元素从难溶态转为可溶态, 丰富土壤中可给态的磷和钾。硅酸盐细菌作为植物根际微生物, 还可以产生生长素、细胞分裂素等生物活性物质刺激植物生长, 因此长期以来被作为微生物肥料的重要菌源^[3~4]。

硅酸盐细菌降低作物病害的作用也受到关注^[5], 但作用机制尚不清楚, 也未见有硅酸盐细菌生成抗生素类产物的报道。一般认为硅酸盐细菌在作物根际形成优势种群时可抑制病原菌的生长。近来我们分离到具有拮抗活性的胶胨状芽孢杆菌菌株^[6], 该菌株可生成抗生素类活性代谢产物。进一步深入研究, 有助于了解硅酸盐细菌抗病作用的本质并可拓展其传统意义上的应用领域。本文就此对该菌株抗生产物形成条件和性质作了初步研究, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌种

试验菌株 CS₁ 分离自成都龙泉丘陵紫色土壤, 由本所鉴定为胶胨状芽孢杆菌。

1.2 培养基

菌种保存采用 Ashby 斜面, 发酵基础培养基组成为: K₂HPO₄ 1g, MgSO₄ 0.2g, NaCl 0.2g, CaCO₃ 5g, NaMoO₄ 4mg, 蒸馏水定容至 1L, pH 自然。

1.3 碳源和氮源对菌株活性形成的影响

碳源试验时, 在基础培养基中加入 0.1% (NH₄)₂SO₄, 并按 1% 的比例分别加入碳源物质 (见表 1), 分装三角瓶, 0.11MPa 灭菌 20min。氮源试验时, 在基础培养基中加入 1% 麦芽糖, 并按 0.1% 的比例分别加入氮源物质 (见表 2)。接种后于 30°C 振荡培养 60h, 测定菌液浓度, 并于离心后取培养液上清测定抗菌活性。

1.4 抗生物质的提取

取 CS₁ 菌株发酵液, 8,000 r/min 冷冻离心 20min, 在上清液中加入饱和度为 80% (NH₄)₂SO₄ 盐析, 离心后收集沉淀, 冻干, 用蒸馏水透析 24h, 再用 80% 甲醇抽提, 抽提液过滤, 滤液冷冻干燥所得白色粉末, 用于活性产物性质研究。

1.5 抗生活性测定

采用孔穴法, 以蜡样芽孢杆菌 (*B. cereus*, 菌号 1.304, 抗生素低敏菌株) 为指示菌测定发酵液及分离物质的抗菌活性。

2 结果与讨论

2.1 抗生活性的形成条件

2.1.1 碳源的影响：碳源试验结果如表 1 所示。由表知 CS₁ 菌株能够利用常见的碳源物质作为唯一碳源生长和形成抗菌活性物质。在以半乳糖作碳源时可得到最大的菌体生长量，但菌株利用麦芽糖时抑菌活性最高，且生长也较好，因此可选择麦芽糖作为培养基碳源。

表 1 培养基碳源对菌株生长和活性形成的影响

碳源	菌液浓度 (OD ₆₆₀)	抑菌圈 (dic/mm)
半乳糖	2.84	18.2
D-木糖	1.91	16.5
D-果糖	2.41	16.8
D-甘露糖	2.54	18.5
葡萄糖	2.34	17.5
乳糖	2.64	16.2
蔗糖	2.41	15.5
麦芽糖	2.54	20.5
可溶性淀粉	2.34	16.2

表 2 培养基氮源对菌株生长和活性形成的影响

氮源物质	菌液浓度 (OD ₆₆₀)	抑菌圈 (dic/mm)
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.58	19.8
KNO ₃	3.14	18.5
NH ₄ Cl	2.36	18.0
NaNO ₃	2.44	16.8
NH ₄ NO ₃	2.38	16.8
蛋白胨	0.03	-
胰蛋白胨	0.36	13.5

2.1.2 氮源的影响：在试验选择的 5 种无机氮源中，最低的菌体生长浓度 OD₆₆₀ 达 2.36，对蜡样芽孢杆菌的最小 d_{ic} 达到了 16.8mm，均超过有机氮源所表现出的最大 d_{ic}。因此，无机氮对 CS₁ 菌株的菌体生长及拮抗菌活性物质形成优于有机氮源。而在试验的 5 种无机氮源中，又以 (NH₄)₂SO₄ 效果最好，说明 CS₁ 菌株对成分和结构较为简单的氮源物质有较高的利用率，如表 2 所示。

2.1.3 通气量的影响：为确定通气量对 CS₁ 菌株生长和活性形成的影响，用 500mL 三角瓶装入数量不等的培养液以控制通气量。培养结果说明通气状况对 CS₁ 菌株有一定影响。装瓶量为 30% 左右，摇床转速 150r/min 时，菌体生长和抗菌活性都

较高，同时可获得较多菌体生物量。

2.1.4 培养温度的影响：结果见图 1。从图中可以看出，在 10℃ ~ 37℃ 范围内，培养温度越高，CS₁ 菌株生长情况越好，并表现出较强的抗菌活性；32℃ ~ 37℃ 为最适培养温度，超过 37℃ 后，菌体生长开始受到抑制。

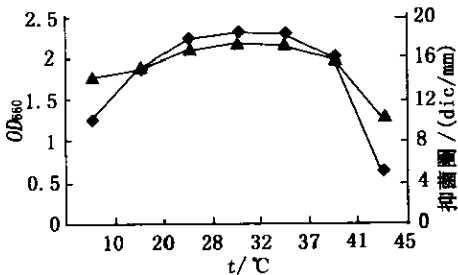


图 1 培养温度对菌株活性的影响
◆ 菌液浓度， ▲ 抑菌圈直径

2.1.5 起始 pH 的影响：在起始 pH 低于 6.0 的环境下，CS₁ 菌株生长受到抑制，也不积累抗菌活性代谢产物；当 pH 在 7.0 ~ 10.0 时，发酵液抗菌活性较为稳定，但菌株生长过程中产酸使培养液 pH 显著降低，降低的 pH 环境同时抑制了菌体继续生长，因此菌液浓度较低，抗菌活性也较弱，如图 2 所示。发酵环境始终保持在近中性的条件下则有利于菌株生长和抗菌活性代谢产物的积累，如表 2 实验结果所示。

2.1.6 培养时间的影响：在优化发酵条件下进

行摇瓶培养, 菌体生长迟滞期约为 18h, 60h 后即完成对数期生长, 最大菌液浓度 OD_{660} 可达 3.6, 对蜡样芽孢杆菌的抑菌圈直径超过 20 mm。另外, CS_1 菌株一般在菌体开始对数生长后 12h 左右 (培养液 OD_{660} 达到 0.5 左右时) 开始积累具有抗菌活性代谢产物。说明这类代谢产物为菌体的次生代谢产物, 其产生滞后于菌体生长。

2.2 抗生活性产物的性质

2.2.1 酸性末端产物作用的排除: 由

于 CS_1 菌株发酵过程中产酸, 其抗菌活性可能是有机酸的作用^[7], 为排除菌体产酸对试验结果的干扰, 用 HCl 将菌株发酵液上清 pH 值分别调节为 4, 5, 6 和 7, 并设相同 pH 的乳酸为对照。结果各 pH 值发酵液抑菌圈直径均达 18mm 以上, 而各种 pH 值的乳酸对指示菌无抑菌作用, 说明抗菌活性不是酸性末端产物作用的结果。

2.2.2 耐热性试验: 将菌株活性产物溶液分别在不同温度下处理 30min, 测定抗菌活性, 结果见图 4。该抗菌产物在热处理条件下不稳定, 处理温度高于 60℃后逐渐失活, 至 90℃时抑菌活性完全丧失。

2.2.3 蛋白酶处理试验: 从表 3 可知, CS_1 菌株产生的抗菌活性物质对胰蛋白酶敏感, 处理 10min 后抗菌活性即迅速减弱, 30min 后完全丧失活性; 但此成分对中性蛋白酶不敏感, 即使处理 60min, 抗菌活性仍保留 80% 以上。

此外, 该物质对茚三酮和双缩脲的显色反应均为阳性。结合其不耐热, 对胰蛋白酶敏感的特点, 表明 CS_1 菌株产生的抗生活性产物可能为肽类化合物。进一步的生物活性检测证实分离的 CS_1 菌株发酵产物具有强烈的抑菌活性, 除蜡样芽孢杆菌外, 还可抑制枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌等 G^+ 和 G^- 细菌。近年来, 我国对高产, 优质, 无化肥、无农药污染的绿色农产品的要求迅速增加, 发展微生物肥料和生物农药日

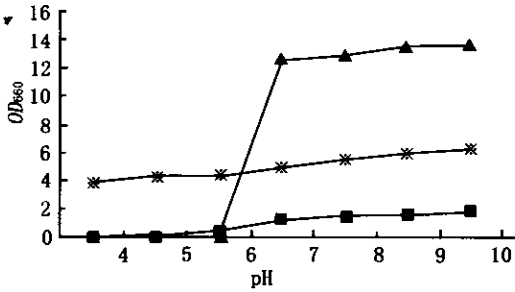


图 2 起始 pH 对菌株抗菌活性形成的影响

■ 菌液浓度 (OD_{660}), ▲ 抑菌圈 (dic/mm),
* 培养液终 pH

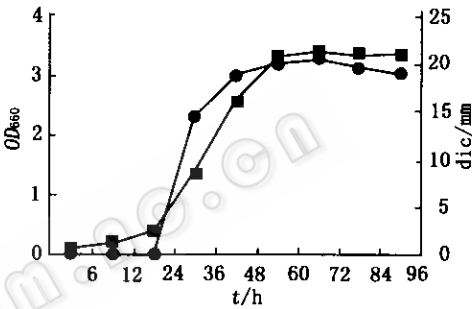


图 3 CS_1 菌株抗菌活性形成的时间进程

■ 菌液浓度, ● 抑菌圈

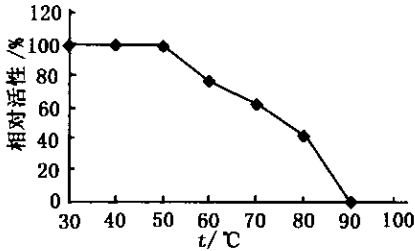


图 4 抗菌产物的温度曲线

表 3 CS_1 菌株抗菌活性产物对蛋白酶的敏感性

处理时间 (min)	抑菌圈 (dic/mm)	
	胰蛋白酶处理	中性蛋白酶处理
0	17.3	16.8
10	13.4	16.5
20	9.8	16.1
30	0	15.4
40	0	15.4
50	0	14.8
60	0	14.4

益受到重视。我们分离到的胶胨状芽孢杆菌 CS₁ 菌株兼具较高的解钾活性和广谱抗菌性。因此有可能在开发兼具生物肥料和生物农药功能的微生物菌肥上得到应用。目前对菌株抗菌活性产物的纯化和对植物病原菌作用的进一步试验仍在进行之中。

参 考 文 献

- [1] Avakyan Z A, Pivavrova T A, Karavaiko G I. Mikrobiologiya, 1986, 55: 477 ~ 482.
- [2] Validation List No.66. Inter J Syst Bacteriol, 1998, 48: 631 ~ 632.
- [3] 李凤汀, 赫正然, 杨则瑗, 等. 微生物学报, 1997, 37 (10): 79 ~ 81.
- [4] 吴衍庸, 刘大江. 土壤通报, 1964 (1): 57 ~ 59.
- [5] 葛 诚. 土壤肥料, 1993, (6): 43 ~ 47.
- [6] 刘光烨, 林 洋, 黄昭贤. 应用与环境生物学报, 2001, 7 (1): 66 ~ 68.
- [7] 李平兰, 张 饒, 江汉湖. 食品与发酵工业, 1998, 25 (1): 1 ~ 4.