

## 生物技术

# 一株产细菌素物质芽孢杆菌的筛选和鉴定

李俊峰<sup>1</sup> 李红芳<sup>1</sup> 段孝辉<sup>2</sup> 宿 烽<sup>1</sup> 田智刚<sup>3</sup>

(青岛科技大学化工学院<sup>1</sup>, 青岛 266042; 烟台出入境检验检疫局<sup>2</sup>, 烟台 264000; 晋中市环保局榆次区分局<sup>3</sup>, 晋中 030600)

**摘要** 从石油污染的土壤中筛选出一株能产生细菌素类物质的芽孢杆菌, 命名为 SLY—3。该菌株分泌的活性物质抑菌活性好, 对细菌主要是革兰氏阳性菌、霉菌都有抑制作用。从表型、生理生化反应及 16S rDNA 序列比对方面进行分析, 最终确定菌株 SLY—3 为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。培养基初始 pH 为 7.0, 28℃振荡培养 24 h 后, 发酵产物抑菌活性最高。

**关键词** 细菌素 枯草芽孢杆菌 鉴定 抑菌活性

**中图法分类号** Q939.124; **文献标志码** B

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 在生长代谢过程中能够产生两类抗菌物质, 一类是非核糖体合成的脂肽类抗生素(lipopeptide antibiotics), 例如 surfactin、iturin、plipastatin 等<sup>[1,2]</sup>, 对植物病原真菌具有显著的抑菌活性, 对细菌、病毒和寄生虫也有一定抑制效果; 另一类为核糖体合成的细菌素(bacteriocin), 例如 subtilosin、sublancin、subtilin<sup>[3,4]</sup>, 能够有效地杀死近缘细菌。细菌素是一类具有抑制某些微生物生长活性的类蛋白质或多肽类物质, 可以被蛋白酶所降解, 因此具有较高的安全性, 目前为止被普遍认为是抗生素最有效的替代物<sup>[5]</sup>。细菌素因具有高效抗菌活性, 能被人体降解, 不产生耐药性等优点而受到人们的关注。枯草芽孢杆菌抗菌物质具有抗菌谱广、稳定性高、安全性好、易于进行分子加工的优势, 在医学、农业和食品上具有广阔的应用前景。

本文从石油污染的土壤中筛选得到一株对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、曲霉及青霉均有明显抑制作用的菌株 SLY—3, 通过生理生化反应及 16SrDNA 序列比对分析鉴定为枯草芽孢杆菌, 并以

金黄色葡萄球菌为指示菌, 对其抗菌性质进行了初步研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品来源

从东营地区不同地点采集土壤样品, 包括花生地土壤、盐碱地土壤、稻草地土壤、石油污染的土壤。

#### 1.1.2 指示菌

金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、李斯特菌、大肠杆菌、沙门氏菌、产气杆菌; 酿酒酵母; 黑曲霉、青霉、黄曲霉。

#### 1.1.3 LB 培养基

蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, 氯化钠 10 g, 水 1 000 mL, pH 7.0 ~ 7.2, 121℃灭菌 20 min。固体斜面培养基在液体培养基的基础上添加 2% 的琼脂。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 芽孢杆菌的分离和纯化

每个样品取样约 5 g, 加入到 45 mL 带有玻璃珠的无菌水中, 充分振荡后于 70℃的水浴中保温 30 min, 杀死营养细胞<sup>[6]</sup>, 梯度稀释后分别选取 10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup> 三个稀释度涂布平板, 挑取产芽孢的革兰氏阳性菌落保存备用。

### 1.2.2 产活性物质芽孢杆菌的筛选

通过十字划线法将具有抑菌活性的菌株筛选出来保存备用,拮抗活力测定采用牛津杯法<sup>[7]</sup>。将分离出的菌株接种于液体培养基中,28℃振荡培养36 h。4 000 r/min 离心 20 min,上清液过无菌的0.22 μm滤膜,滤液作为拮抗液。取指示菌稀释后均匀涂布于倒好的平板上,放上牛津杯,每杯中加入200 μL 拮抗液,培养24 h,观察拮抗作用,记录抑菌圈直径(包括牛津杯直径)。

### 1.2.3 菌株的鉴定

形态观察:在LB平板上28℃培养24 h后观察菌落形态、色泽、边缘、表面、凹凸度、透明度等;进行革兰氏染色和芽孢染色;显微镜观察菌体形态和芽孢形状。生理生化性质的测定见参考文献[8]。

### 1.2.4 细菌16SrDNA基因序列测定

(1) 基因组DNA的提取:在180×18 mm 试管中装入3 mL液体培养基(1 000 mL水,0.5 g葡萄糖,0.5 g蛋白胨,0.5 g酵母浸粉,1 g氯化钠,pH7.0~7.2),121℃灭菌20 min。接种后28℃、150 r/min 振荡培养(12~18) h。根据曾晓希等<sup>[9]</sup>的方法提取基因组DNA。

(2) 16S rDNA基因序列的PCR引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。引物:F:5'-GAGAGTTGATCCTGGCTCAG-3'; R: 5'-AAGGAG-GTGATC CAGCC-3'。PCR反应体系(50 μL):10 × buffer 5 μL, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 3 μL, dNTP (2.5 mmol/L)4 μL,模板DNA 5 μL,上下游引物各1 μL, ddH<sub>2</sub>O 30 μL。PCR反应条件:94℃ 4 min; 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 2 min, 30个循环; 72℃ 10 min, 4℃ pause。PCR产物用1.0%琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察结果。然后由上海生工生物工程技术服务有限公司纯化、克隆和测序。

(3) 序列的数据处理:测序结果在NCBI中采用BLAST比对初步确定菌株的种属,从GenBank数据库中获得有关种的公认标准序列数据,使用Clustal X 1.8对齐后,使用MEGA 4.0进行序列同源性分析并制作系统发育树,算法为Neighbor-Joining。

### 1.2.5 培养温度对菌株SLY-3产活性物质的影响

菌悬液以5%的接种量接入到50 mL LB培养基中,分别在14℃、22℃、28℃、37℃、45℃振荡培养,转速150 r/min,观察菌体生长状况。振荡培养24 h后,取样,按照1.2.2的方法进行样品处理和抑菌实验。

### 1.2.6 初始pH值对菌株SLY-3产活性物质的影响

以LB培养液为基础,设置6个pH梯度:5.5、6.0、6.5、7.0、7.5和8.0,以5%的接种量接入菌悬液,28℃,150 r/min振荡培养,观察菌体生长状况。振荡培养24 h后,按照1.2.2的方法进行样品处理和抑菌实验。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌株筛选

从各种样品中分离出芽孢杆菌20株,进行抗菌活性和产细菌素的鉴定,最后得到1株对指示菌抑制活性最好的菌株,编号为SLY-3。

### 2.2 菌株鉴定

#### 2.2.3 形态特征

菌株SLY-3经平板划线培养出的菌落形态特征:形状不规则、菌落乳白色、质地润泽、边缘缺刻状、不透明。经革兰氏染色法菌体呈直杆状,以链状排列,具圆端,呈革兰氏阳性、产芽孢、芽孢形状呈椭圆形,如图1所示。

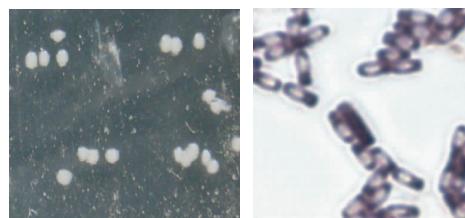


图1 菌株SLY-3的形态特征

#### 2.2.4 生理生化特征

菌株的生理生化鉴定结果如表1所示,根据《伯杰氏系统细菌学手册》芽孢杆菌属的菌体呈直

杆状,常以成对或链状排列,具圆端或方端。细胞染色大多数在幼龄培养时呈现革兰氏阳性,以周生鞭毛运动。芽孢椭圆、卵圆、柱状、圆形、能抗许多不良环境。每个细胞产1个芽孢且不被氧所抑制。好氧或兼性厌氧。化能异养菌,具发酵或呼吸代谢类型。通过图1结果可初步确定所分离菌株为芽孢杆菌属,而进一步的生理生化试验结果(表1),可以初步鉴定菌株 SLY—3 为枯草芽孢杆菌。

表1 菌株 SLY—3 的生理生化特征

项目	菌株		
	SLY—3	枯草芽孢杆菌	
革兰氏染色	+	+	
需氧生长	+	+	
酪蛋白水解	+	+	
明胶液化	+	+	
淀粉水解	+	+	
硝酸盐还原	+	+	
柠檬酸利用	+	+	
过氧化氢酶试验	+	+	
石蕊牛奶还原	+	+	
V-P 测定	+	+	
M-R 试验	-	-	
尿素利用	-	-	
糖发酵试验	葡萄糖 果糖 麦芽糖 蔗糖 乳糖 棉子糖 甘露醇	+	+
渗透压试验	2% NaCl 5% NaCl 8% NaCl 12% NaCl 15% NaCl	+	+

### 2.3 细菌 16S rRNA 基因序列测定结果

菌株 SLY—3 测序结果在 NCBI 使用 blast n 比对,从 GenBank 数据库中获得有关种的公认标准序

列数据,使用 Clustal X 1.8 对齐后使用 MEGA 4.0 计算序列相似性并作系统发育分析,结果见图2,图2也显示菌株 SLY—3 为枯草芽孢杆菌。

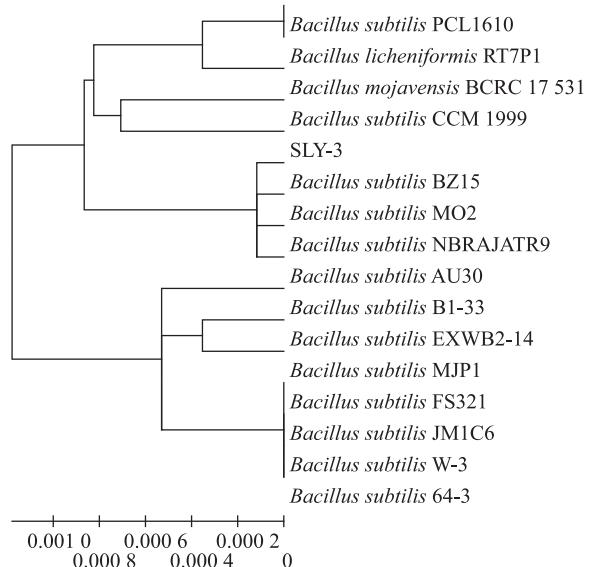


图2 菌株 SLY—3 的 16S rDNA 序列系统发育树

### 2.4 抗菌谱试验

抗菌谱的测定,共选取指示菌 10 株,其中细菌 6 株、酵母 1 株、霉菌 3 株。在所选的 6 株细菌中,金黄色葡萄球菌、李斯特菌和枯草芽孢杆菌为革兰氏阳性菌,大肠杆菌、沙门氏菌和产气杆菌为革兰氏阴性菌,抑菌情况见表 2。

表2 菌株 SLY—3 的抗菌谱

指示菌	抑菌圈直径/mm
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	23
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	15
<i>Listeria monocytogenes</i> TCC 19114	17
<i>Penicillium citrinum</i> ATCC 9849	15
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	16
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 200026	14
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	-
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9080	-

## 2.5 培养温度对菌株 SLY—3 产活性物质的影响

在不同温度下测定了菌株 SLY—3 分泌活性物质的情况,结果见表3。由表3可知,在14℃及45℃时菌株的抑菌活性比较低,因为该温度条件下不利于菌株 SLY—3 的菌体生长,产生的胞外产物也少,而在28℃、37℃时菌株 SLY—3 的抑菌活性较高并且相差不大,由于37℃培养消耗能量过多,因此选择28℃进行培养。

表3 不同温度对菌株 SLY—3 抑菌活性的影响

培养温度/℃	14	22	28	37	45
抑菌圈直径/mm	8	14	18	18.5	10

## 2.6 起始 pH 对菌株 SLY—3 产活性物质的影响

考察了培养基初始 pH 对菌株 SLY—3 产细菌素物质的影响,结果见表4。初始 pH 为 5.5 时抑菌活性最弱,几乎没有;这是由于在过酸的环境下,菌株不易生长,导致活性物质产生也少。从表4 中可以看出,起始 pH 为 7.0 时抑菌活性最强,因此,本研究选择 pH7.0 为培养基的起始 pH 值。

表4 不同起始 pH 值对 SLY—3 抑菌活性的影响

起始 pH 值	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0
抑菌圈直径/mm	无	18	19	20	17	15

## 3 结论

(1) 从石油污染的土壤中筛选出一株抑菌活性较高的菌株 SLY—3,所产的活性物质可抑制革兰氏阳性菌和霉菌,对革兰氏阴性菌及酿酒酵母没有作用,抑菌结果排除了酸及过氧化氢的作用,因此可以初步认为该菌株产生的是细菌素物质;

(2) 根据菌株 SLY—3 的表型、生理生化特性

及 16S rDNA 序列比对等结果,将其鉴定为枯草芽孢杆菌;

(3) 通过对培养条件的初步研究,发现利用 LB 液体培养基培养菌株 SLY—3 时,初始 pH7.0,28 ℃ 振荡培养 24 h 后,发酵产物抑菌活性最高;

(4) 分离的菌株 SLY—3 对 G<sup>+</sup> 菌具有较强的抑制作用,具有重要的研究和应用价值。本研究组正在对 SLY—3 菌株细菌素的生物学特性、分离纯化及其分子方向进行深入研究,以期具有较好的应用前景。

## 参 考 文 献

- Nakayama S, Takahashi M, Hirai M, et al. Isolation of new variants of surfactin by a recombinant *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiol Biotechnol*, 1997; 48: 80—82
- Gluliano B, Andres H, Luigi C. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus* sp. with antibiotic activity against plant pathogenic agents. *Journal of Biotechnology*, 2002; 5: 1—8
- Hansen J N. Antibiotics synthesized by post translational modification. *Annu Rev Microbiol*, 1993; 47: 535—564
- 别小妹,吕凤霞,陆兆新,等. 枯草芽孢杆菌 fmb R 抗菌物质稳定性研究. *食品科学*, 2006;27(6):104—108
- 周冰,张惟才. 枯草芽孢杆菌蛋白质分泌机制研究进展. *生物技术通讯*, 2004;15(3):281—285
- Cal Y, Ng L K, Farber J M. Isolation and characterization of nisin producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from beansprouts. *J Appl Microb*, 1997; 83: 499—507
- Li Junfeng, Chi Zhenming, Li Hongfang, et al. Characterization of a Mutant of *Alteromonas aurantia* A18 and Its Application in Mariculture. *Journal of Ocean University of China*, 2008; 7(1): 55—59
- 希坎南 R E. 伯杰氏细菌鉴定手册. 北京:科学出版社,1989: 23—46
- 曾晓希,周洪波,刘飞飞,等. 一株胶质芽孢杆菌的筛选和鉴定. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2006;32(3):269—272

## Screening and Identification of Bacteriocin-like Substance Producing *Bacillus*

LI Jun-feng<sup>1</sup>, LI Hong-fang<sup>1</sup>, DUAN Xiao-hui<sup>2</sup>, SU Feng<sup>1</sup>, TIAN Zhi-gang<sup>3</sup>

(College of Chemical Engineering, Qingdao University of Science & Technology<sup>1</sup>, Qingdao 266042, R. P. China;  
Yantai Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau<sup>2</sup>, Yantai 264000, R. P. China;  
Yuci Substation of Jinzhong Environmental Protection Bureau<sup>3</sup>, Jinzhong 030600, R. P. China)

**[Abstract]** One *Bacillus* strain named SLY—3 producing bacteriocin-like substance (BLS) was screened from the soil polluted by oil. The G<sup>+</sup> bacteria and molds were effectively inhibited by BLS produced by strain SLY—3. With the analysis of colony morphology, physiological and biochemistry experiments and 16S rDNA gene sequence, the strain SLY—3 was identified as *Bacillus subtilis*. The BLS secreted by *Bacillus subtilis* SLY—3 has the highest inhibitory activity when it is cultured for 24 h at initial pH 7.0 and 28 °C.

**[Key words]** bacteriocin    *Bacillus subtilis*    identification    anti-microbial activity

(上接第 2643 页)

### 参 考 文 献

- 1 Merletti G D, Torres-Verdín C. Detection and spatial delineation of thin-sand sedimentary sequences with joint stochastic inversion of well logs and 3D prestack seismic amplitude data. SPE 102444-PA, 2010
- 2 Guerreiro L, Caetano H. Global seismic inversion-a new approach to integrate seismic information in the stochastic models. SPE111305-MS, 2007

- 3 李方明, 计智锋, 赵国良, 等. 地质统计反演之随机地震反演方法——以苏丹 M 盆地 P 油田为例. 石油勘探与开发, 2007; 34(4): 451—455
- 4 李国良, 蔡佳, 甘华军, 等. 南阳凹陷边界断裂带砂体反演及预测. 岩性油气藏, 2010; 22(2): 99—102
- 5 韩涛, 彭仕宓, 黄述旺, 等. 南阳凹陷东部地区核二段储层“四性”关系研究. 石油天然气学报, 2007; 29(01): 69—73

## An Application of Seismic Stochastic Inversion to Lithologic Reservoir Prediction

WANG Jian<sup>1</sup>, XIE Hua-feng<sup>1</sup>, DONG Hong-kui<sup>2</sup>

(Sinopec Exploration & Production Research Institute<sup>1</sup>, Beijing 100083, P. R. China; GNT International Inc<sup>2</sup>, Beijing 100029, P. R. China)

**[Abstract]** High vertical resolution impedance can be obtained by seismic stochastic inversion which is not limited by the bandwidth of seismic data. Through stochastic inversion, not only the high resolution impedance, but also the gamma ray, porosity and other lithologic parameters with physical properties of rock can be inverted. Real case application indicated that reservoir prediction results with higher precision could be acquired using the approach of seismic stochastic inversion.

**[Key words]** stochastic inversion    well-controlled    high resolution processing    lithologic trap