

副溶血性弧菌拮抗菌的筛选鉴定及抑菌物质特性研究

Isolation and identification of antagonistic bacteria against *Vibrio parahaemolyticus* and its characteristics of antibacterial substances

郝彦利¹ 汪立平^{1,2} 黄宇良¹ 薛美翠¹

HAO Yan-li¹ WANG Li-ping^{1,2} HUANG Yu-liang¹ XUE Mei-cui¹

崔云云¹ 赵勇^{1,3} 李立¹ 王正全¹

CUI Yun-yun¹ ZHAO Yong^{1,3} LI Li¹ WANG Zheng-quan¹

(1. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306; 2. 上海海洋大学食品热加工工程技术研究中心, 上海 201306;
3. 农业部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室〔上海〕, 上海 201306)

(1. College of Food Science and Technology in Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Engineering Research Center of Food Thermal-Processing Technology, Shanghai 201306, China;

3. Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Aquatic Products on Storage and Preservation [Shanghai], Ministry of Agriculture, Shanghai 201306, China)

摘要:为获取既可抑制食源性致病菌又可抑制水产致病菌的益生菌株,以人畜共患致病菌副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus* ATCC17802)为指示菌,采用点种法初筛以及打孔扩散法复筛,得到1株来源于上海东海海水的H19菌株,其抑菌物抑菌圈直径达(17.16±0.28) mm。通过形态观察及16S rDNA序列分析可知,菌株H19为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* H19, GenBank登录号:MG383451)。将菌株H19进行抑菌谱试验,探究菌株H19抑菌物的理化性质,并且抑菌物通过硫酸铵沉淀及不同孔径透析袋截留粗提,粗提物经蛋白酶处理及Tricine-SDS-PAGE蛋白质凝胶电泳可知,该抑菌物具有广谱抑菌活性,既可抑制革兰氏阳性菌又可抑制大部分革兰氏阴性菌,且具有较好的热、pH以及紫外线性稳定性,该抑菌物可能为2种新型抗菌肽,分子量分别在6.5~9.5 kDa以及27.0~35.0 kDa。由此可见,枯草芽孢杆菌H19所产抗菌肽具有防治食源性疾病以及水产疾病的应用潜力。

关键词:副溶血性弧菌 ATCC17802; 枯草芽孢杆菌; 鉴定; 新型抗菌肽; 特性

Abstract: In order to screen a probiotic strain against foodborne

pathogens and aquatic pathogens, the main zoonotic pathogenic bacteria of mariculture *Vibrio parahaemolyticus* ATCC17802 was used as indicator bacterium. The target probiotics was screened using the spot-on-lawn method and rescreened by the agar diffusion method, and the diameter of inhibition zone of antibacterial substances reached (17.16±0.28) mm. Through the combination of morphology and 16S rDNA sequence analysis, strain H19 was identified as *Bacillus subtilis* (GenBank accession number: MG383451). Antimicrobial spectrum of *B. subtilis* H19 was tested, meanwhile the physical and chemical properties of antimicrobial substances produced by H19 was studied. The supernatant of the H19 fermentation broth was subjected to ammonium sulfate precipitation and dialysis against several different pore-size membranes, and two novel kinds of antibacterial peptides with molecular weight of 6.5~9.5 kDa and 27.0~35.0 kDa respectively were obtained based on Tricine-SDS-PAGE protein gel electrophoresis and protease treatment. It had broad-spectrum antimicrobial activity, which could inhibit both Gram-positive bacteria and most of Gram-negative bacteria, and showed good heat, pH and UV stability. Consequently, the antibacterial peptide produced by *B. subtilis* H19 had the potential to antagonize the pathogenic bacteria for the prevention and control of foodborne and aquatic diseases.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus* ATCC17802; *Bacillus subtilis*; identification; novel antibacterial peptide; characteristics

作者简介:郝彦利,女,上海海洋大学在读硕士研究生。
通信作者:汪立平(1968—),女,上海海洋大学副教授,博士。
E-mail: lpwang@shou.edu.cn

收稿日期:2018-01-24

副溶血性弧菌既是水产养殖动物细菌性疾病的主要致

病菌,又是引起细菌性食物中毒的首要食源性致病菌^[1]。水产养殖业中副溶血性弧菌病的防治主要是利用抗生素,但抗生素的滥用不仅产生耐药菌株^[2],破坏水产养殖环境生态平衡,而且抗生素类药物在水产品中的残留也给人类健康带来威胁。利用益生菌所产抗菌肽来控制副溶血性弧菌病害的发生,投放益生菌所产抗菌肽既可以维持水产动物肠道菌群平衡,提高水产养殖动物免疫力,又可改善养殖水体环境^[3]。抗菌肽(antimicrobial peptides,AMPs)是指生物体内能抵御外界微生物侵害的一类小分子多肽,是生物天然免疫防御系统的重要组成部分。目前研究最多使用最广的微生物抗菌肽是乳酸菌抗菌肽以及芽孢杆菌抗菌肽^[4],但乳酸菌所产抗菌肽抑菌谱比较窄,芽孢杆菌抗菌肽在应用于水产养殖方面更具优势,是因为芽孢杆菌可产芽孢,抗逆性强,而且芽孢杆菌可产生多种抗菌肽,抑菌谱广,使其与其他非芽孢类的抗菌肽相比更具开发价值。

1986 年,Kozasa 等^[5]将分离自土壤中的东洋芽孢杆菌应用于水产养殖中,用该菌株处理日本鳎鲷,结果显示,与对照组相比,处理组的鳎鲷死亡率明显降低。而后陆续有研究人员将枯草芽孢抗菌肽应用于副溶血性弧菌病的防治中,例如,Xu 等^[6]从纳豆中筛选出 1 株产抗菌肽的枯草芽孢杆菌 NT-6,在饲料中添加适量的 NT-6 抗菌脂肽不仅可以促进凡纳滨对虾的生长,还可以抑制副溶血性弧菌的生长^[7];王娇等^[8]从养殖环境中筛选出 1 株可抑制副溶血性弧菌的枯草芽孢杆菌 A4,并改善了南美白对虾的生长状态;Nath 等^[9]从凝乳中筛选出 1 株枯草芽孢杆菌 FPTB23,对副溶血性弧菌有较好的抑制作用。但是,目前报道的从海洋环境中分离的枯草芽孢杆菌比较少,其中阮乾坤^[10]从大连海域中筛选到 1 株海洋枯草芽孢杆菌 HS-A38,可抑制副溶血性弧菌。此外,对枯草芽孢杆菌产生的抑菌物质的性质研究也不够深入。本试验拟从海水中筛选对副溶血性弧菌有较好抑制作用的枯草芽孢杆菌,并对其产生的抑菌物质的性质进行研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 样品

海水:上海浦东新区临港海域(30°42′5.8″N,121°53′31.6″E)。

1.1.2 指示菌及培养条件

指示菌及培养条件详见表 2。

1.1.3 培养基

分离、纯化及形态观察培养基:营养琼脂培养基^[11];

种子培养基:Landy 液体培养基^[12];

发酵培养基:Landy 液体培养基^[12];

指示菌培养基:LB 培养基^[13]、TSB-YE 培养基^[13]、MRS 培养基^[13]、YPD 培养基^[14]。

1.1.4 主要试剂

胰蛋白酶(Trypsin)、胃蛋白酶(Pepsin)、木瓜蛋白酶(Papain)、蛋白酶 K(Proteinase K)、中性蛋白酶(Neutral protease):生化试剂,国药集团化学试剂有限公司;

Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒、通用引物 27F(5′-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3′)及 1492R(5′-GGT-TACCTTGTTACGACTT-3′):生工生物工程(上海)股份有限公司;

Tricine-SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒:康为世纪生物科技有限公司。

1.1.5 主要仪器

可见分光光度计:7200 型,尤尼柯(上海)仪器有限公司;

冷冻离心机:H2050R 型,湖南湘仪离心机仪器有限公司;

立式压力蒸汽灭菌锅:LDZX-30FA 型,上海申安医疗器械厂;

梯度 PCR 仪:A300 型,杭州朗基科学仪器有限公司;

洁净工作台:SW-CJ-1F 型,上海博迅实业有限公司;

pH 计:PHS-3C 型,上海雷磁仪器有限公司;

恒温调速回转式摇床:DKY-II 型,上海杜科自动化设备有限公司;

电泳仪:DYY-6C 型,北京市六一仪器厂;

垂直电泳槽:JY-SCZ2⁺型,北京君意东方电泳设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 抗副溶血性弧菌枯草芽孢杆菌的筛选

(1)菌株的分离:准确量取 25 mL 海水样品,放入含有 225 mL 的 0.85% 无菌生理盐水的锥形瓶中,均质 10 min(10 次/s),90 ℃水浴 10 min^[15],10 倍系列稀释至 10⁻⁴,取各梯度稀释液 100 μL 涂布营养琼脂分离培养基,37 ℃培养 12 h,挑取具有芽孢杆菌典型形态的菌落进行划线纯化,纯化 3 次。

(2)菌株的初筛:采用点种法^[16]。将副溶血性弧菌(*Vbrio parahaemolyticus*, ATCC17802)接种于 LB 培养基中,37 ℃条件下 150 r/min 培养 12 h,制备菌悬液使其菌浓度达到 10⁶ CFU/mL。将纯化得到的具有芽孢杆菌典型形态的菌株点种在混有副溶血性弧菌(*Vbrio parahaemolyticus*, ATCC17802)的 LB 培养基平板上,37 ℃培养 12 h。试验重复 3 次。对具有抑菌效果的菌株进行下一步复筛。

(3)菌株的复筛:采用打孔法^[17]。将初筛得到的菌株在 LB 平板上 37 ℃活化培养 18 h,并转接 2 次,接种到 Landy 种子培养基中,37 ℃、150 r/min 震荡培养 24 h,再以 3% 的接种量接种到 Landy 发酵培养基中,37 ℃、150 r/min 震荡培养 24 h。10 000 r/min、4 ℃离心 15 min,取其上清液用无菌 0.22 μm 滤膜过滤,得到无细胞发酵上清液。以副溶血性弧菌(*Vbrio parahaemolyticus*, ATCC17802)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, R11)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, BYK00516)、单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, ATCC19114)为指示菌,菌浓度均为 10⁶ CFU/mL,通过打孔扩散法(50 μL/孔)进行复筛,参照 Liu 等^[17]的方法进行改进,37 ℃培养 24 h,测量抑菌圈的直

径。试验重复 3 次。选择对这 4 种指示菌均有抑制作用且抑菌效果比较好的菌株进行下一步抑菌谱的测定。

1.2.2 菌株 H19 产抑菌物质的抑菌谱测定 将筛选获得有抑菌效果的 H19 菌株制备无细胞发酵上清液,分别取 50 μ L 无细胞发酵上清液采用打孔扩散法^[17]测定其对 19 种指示菌(水产致病菌,食源性致病菌、真菌及其培养条件见表 2)抑菌圈的直径,试验重复 3 次。

1.2.3 抗副溶血性弧菌枯草芽孢杆菌菌株的鉴定 根据枯草芽孢杆菌菌落形态进行初步鉴定,再通过革兰氏染色法在光学显微镜下观察枯草芽孢杆菌菌株的形态,之后进一步进行 16S rDNA 分子鉴定^[18],所得测序结果利用 NCBI 中 BLAST 软件比对,并在 EZBioCloud 网站中查找与其同源性较近菌株的序列,最后利用 MAGE 5.0 软件构建系统发育树。

1.2.4 菌株 H19 产抑菌物质的理化性质

(1) 菌株 H19 产抗菌物质的温度稳定性测定:分别取 10 mL 无细胞发酵上清液,置于-20,0,20,40,60,80,100,121 $^{\circ}$ C 条件下处理 10 min 和 30 min,然后立即在 25 $^{\circ}$ C 条件下水浴 2 h 达室温后,以副溶血性弧菌(*Vbrio parahaemolyticus*, ATCC17802)为指示菌,以抑菌活性为指标,抑菌活性的计算方法详见参考文献[13],试验重复 3 次。

(2) 菌株 H19 产抗菌物质的酸碱稳定性测定:分别取 10 mL 无细胞发酵上清液,用 2 mol/L 的 HCl 溶液和 2 mol/L 的 NaOH 溶液调节菌株 H19 的无细胞发酵上清液的 pH,使其 pH 值为 2.0,3.0,4.0,5.0,6.0,7.0,8.0,9.0,10.0,11.0,12.0,37 $^{\circ}$ C 温浴保存 2 h,再调回其初始 pH 7.0,以副溶血性弧菌(*Vbrio parahaemolyticus*, ATCC17802)为指示菌,以未处理组作为对照,以抑菌活性为指标^[19],抑菌活性的计算方法同 1.2.4(1)。试验重复 3 次。

(3) 菌株 H19 产抗菌物质的紫外线稳定性测定:分别取 10 mL 无细胞发酵上清液,并置于 10 mL 离心管中距 30 W 紫外灯 90 cm 处照射处理 10,20,30,40,50,60 min,以副溶血性弧菌(*Vbrio parahaemolyticus*, ATCC17802)为指示菌,以未处理组作为对照,以抑菌活性为指标^[20],抑菌活性的计算方法同 1.2.4(1)。试验重复 3 次。

1.2.5 菌株 H19 产抗菌物质的初步鉴定

(1) 抑菌物质的粗提及分子量的测定:在 200 mL 无细胞发酵上清液中缓慢加入硫酸铵至终饱和度为 60%^[21],用磁力搅拌器在 4 $^{\circ}$ C 冰浴条件下缓慢搅拌约 4 h 后,置 4 $^{\circ}$ C 冰箱中静置沉淀 12 h^[22],在 4 $^{\circ}$ C 于 10 000 r/min 离心 30 min,得到沉淀物和离心液,沉淀以原菌液 1/10 体积的 25 mmol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 7.0)悬浮。将所得悬浮液分别选取孔径为 1,3.5,7,8~14 kDa 的透析袋进行透析,4 $^{\circ}$ C 条件下透析 48 h,聚乙二醇 20000 浓缩至原体积^[23],得到蛋白粗提液。以相同量的磷酸盐缓冲液为对照 1,以未透析的悬浮液为对照 2,测定粗提液的抑菌效果以及初步判断 H19 所产抑菌物质的分子量。试验重复 3 次。

利用低分子质量 Marker(4.1~66.0 kDa 共 9 条带),取 1 kDa 透析袋处理的蛋白粗提液于垂直电泳槽中进行 Tricine-SDS-PAGE 蛋白质电泳^[24]。电泳结束后,将胶切成两半,将带有 Marker 的一半胶进行考马斯亮蓝快速染色,另一半用灭菌的去离子水漂洗 12 h 后,小心铺在接有副溶血性弧菌(*Vbrio parahaemolyticus*, ATCC17802)的 LB 固体培养基上(1.0%琼脂),37 $^{\circ}$ C 培养 12 h,与染色的一半作对比,判定抑菌物质的分子质量。试验重复 3 次。

(2) 粗提液对蛋白酶的敏感性:分别将胰蛋白酶、中性蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶以及蛋白酶 K 配制成质量浓度均为 4 mg/mL 的母液,分别加入 3.5 kDa 透析袋处理的蛋白粗提液使各酶的终质量浓度为 2 mg/mL^[25],调节 pH 值至各酶最适作用 pH 值,以不加酶的 3.5 kDa 透析袋处理所得蛋白粗提液作为空白对照,37 $^{\circ}$ C 温浴保存 2 h,再调节各酶解液 pH 值至 7.0。以副溶血性弧菌(*Vbrio parahaemolyticus*, ATCC17802)为指示菌,采用打孔扩散法测定各酶解液抑菌活性。试验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 抗副溶血性弧菌枯草芽孢杆菌的筛选

从上海市东海采集的海水样品中分离得到菌株 50 株,并分别命名为 H1~H50,初筛后有 7 株对副溶血性弧菌(*Vbrio parahaemolyticus*, ATCC17802)有抑菌活性,分别为菌株 H1、H3、H4、H6、H12、H19、H21,将初筛得到的 7 株菌株进行复筛,并测定抑菌效果,结果见表 1。结果显示,菌株 H1 和 H12 仅可抑制 ATCC17802,菌株 H4 可抑制 ATCC17802 及 R11,菌株 H6 和 H21 可抑制 R11、ATCC17802 以及 ATCC19114,菌株 H3 和 H19 对这 4 种指示菌均有抑菌活性,但菌株 H19 的抑菌效果最强,且抑菌效果稳定。因此,选择菌株 H19 进行后续的试验。

2.2 菌株 H19 发酵液的抑菌谱测定

通过 19 株指示菌进行菌株 H19 抑菌物质的抑菌谱测定,其中包括常见的水产致病菌、主要的食源性致病菌以及酵母菌,由表 2 可以看出,菌株 H19 可抑制 7 株革兰氏阳性菌,9 株革兰氏阴性菌,2 株酵母菌,即既可抑制革兰氏阳性菌又可抑制大部分革兰氏阴性菌,且对革兰氏阳性菌抑菌效果强于革兰氏阴性菌,7 株革兰氏阳性菌抑菌直径为(16.16 $\pm$ 0.09)~(28.53 $\pm$ 0.15) mm,9 株革兰氏阴性菌的抑菌直径为(11.17 $\pm$ 0.05)~(22.00 $\pm$ 0.10) mm;仅对革兰氏阴性菌副溶血性弧菌(*Vbrio parahaemolyticus*, ATCC 33847)以及酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*, H-1)无抑制作用。

2.3 菌株 H19 的鉴定

2.3.1 菌株 H19 的菌落形态 由图 1 可知,菌株 H19 经培养后,菌落形态为圆形,污白色,褶皱不透明,凸起,边缘不整齐;经革兰氏染色后,通过光学显微镜观察呈蓝色,菌株 H19 为革兰氏阳性菌,菌体呈杆状,符合枯草芽孢杆菌的形态特征。

表 1 海洋抑菌枯草芽孢杆菌对 4 种致病菌的抑菌情况[†]

Table 1 Inhibition effect of marine antimicrobial *Bacillus subtilis* against four pathogenic bacteria

菌号	抑菌效力			
	副溶血性弧菌 (<i>Vbrio parahaemolyticus</i> , ATCC17802)	金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i> , R11)	单核细胞增生李斯特菌 (<i>Listeria monocytogenes</i> , ATCC19114)	嗜水气单胞菌 (<i>Aeromonas hydrophila</i> , BYK00516)
H1	++	—	—	—
H3	++	++	++++	++
H4	+	++	—	—
H6	++	++	++++	—
H12	++	—	—	—
H19	+++	+++	++++	+++
H21	+++	++	++++	—

[†] ++++代表抑菌圈直径>20 mm;+++代表抑菌圈直径 15~20 mm;++代表抑菌圈直径 10~15 mm;+代表抑菌圈直径<10 mm;—代表抑菌圈直径≤7 mm。

表 2 枯草芽孢杆菌 H19 的抑菌谱[†]

Table 2 Antimicrobial spectrum of *Bacillus subtilis* H19

指示菌名称	来源	培养基	培养条件	抑菌圈直径/mm
副溶血性弧菌 (<i>Vbrio parahaemolyticus</i> , ATCC17802)/G ⁻	ATCC	LB	37 ℃,150 r/min,12 h	17.16±0.28
副溶血性弧菌 (<i>Vbrio parahaemolyticus</i> , ATCC33847)/G ⁻	ATCC	LB	37 ℃150 r/min,12 h	0.00±0.00
副溶血性弧菌 (<i>Vbrio parahaemolyticus</i> , BYK00036)/G ⁻	虾	LB	37 ℃,150 r/min,12 h	12.17±0.29
嗜水气单胞菌 (<i>Aeromonas hydrophila</i> , BYK00962)/G ⁻	虾	LB	37 ℃,150 r/min,12 h	18.16±0.28
嗜水气单胞菌 (<i>Aeromonas hydrophila</i> , BYK00516)/G ⁻	蟹	LB	37 ℃,150 r/min,12 h	17.15±0.28
腐生葡萄球菌 (<i>Staphylococcus saprophyticus</i> , B1)/G ⁺	验室分离保藏	LB	37 ℃,150 r/min,12 h	28.53±0.15
金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i> , R11)/G ⁺	猪肉	LB	37 ℃,150 r/min,12 h	19.40±0.26
大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i> ,F4)/G ⁻	实验室分离保藏	LB	37 ℃,150 r/min,12 h	20.33±0.20
大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i> ,BL21)/G ⁻	工程菌	LB	37 ℃,150 r/min,12 h	22.00±0.10
沙门氏菌(<i>Salmonella</i> ,Y3)/G ⁻	实验室分离保藏	LB	37 ℃,150 r/min,12 h	11.17±0.05
柠檬酸杆菌(<i>Citrobacter</i> ,X6)/G ⁻	实验室分离保藏	LB	37 ℃,150 r/min,12 h	14.00±0.10
单核细胞增生李斯特菌 (<i>Listeria monocytogenes</i> ,ATCC19112)/G ⁺	ATCC	TSB-YE	37 ℃,150 r/min,12 h	19.10±0.10
单核细胞增生李斯特菌 (<i>Listeria monocytogenes</i> ,ATCC19114)/G ⁺	ATCC	TSB-YE	37 ℃,150 r/min,12 h	20.06±0.05
单核细胞增生李斯特菌 (<i>Listeria monocytogenes</i> ,ATCC19117)/G ⁺	ATCC	TSB-YE	37 ℃,150 r/min,12 h	16.16±0.09
单核细胞增生李斯特菌 (<i>Listeria monocytogenes</i> ,ATCC113932)/G ⁺	ATCC	TSB-YE	37 ℃,150 r/min,12 h	17.17±0.15
单核细胞增生李斯特菌 (<i>Listeria monocytogenes</i> ,ATCC191116)/G ⁺	ATCC	TSB-YE	37 ℃,150 r/min,12 h	19.16±0.28
酿酒酵母(<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ,H-1)	实验室分离保藏	YPD	30 ℃,150 r/min,16 h	0.00±0.00
汉逊德巴利酵母(<i>Debaryomyces hansenii</i> ,Y-3)	实验室分离保藏	YPD	30 ℃,150 r/min,16 h	10.16±0.28
近平滑假丝酵母(<i>Candida albicans</i> ,Y-5)	实验室分离保藏	YPD	30 ℃,150 r/min,16 h	11.17±0.19

[†] “G⁺”代表革兰氏阳性菌,“G⁻”代表革兰氏阴性菌。

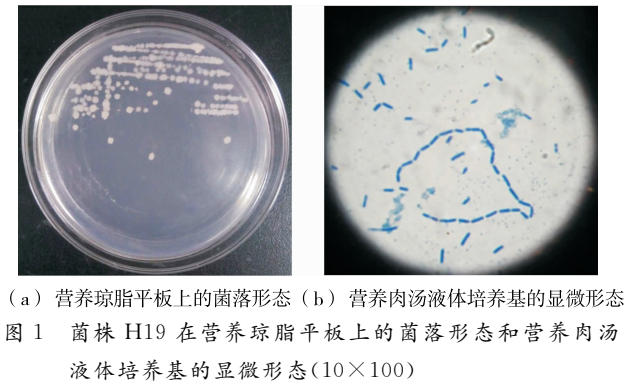
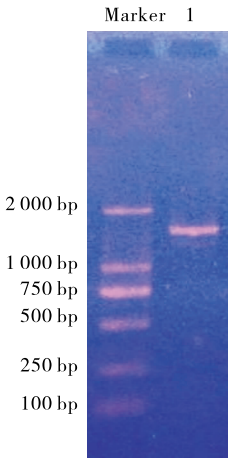


Figure 1 Colonial morphology on NA plate and microscopic morphology (10×100) in NB culture medium of H19 strain

2.3.2 菌株 H19 的分子鉴定 提取菌株 H19 的总 DNA,以菌株 H19 的基因组 DNA 为模板,采用细菌 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增,得到特异性扩增产物长度为 1 000~2 000 bp (图 2),经生工生物工程(上海)股份有限公司测序,菌株 H19 的 16S rDNA 序列大小为 1 172 bp,菌株 H19 的基因序列在 GenBank 上利用 BLAST 软件进行序列比对,结果显示,菌株 H19 与枯草芽孢杆菌 KCTC 13429 的相似度高达 99%;结合菌株形态学特征、菌落形态学特征以及 16S rDNA 序列,结果该菌被鉴定为枯草芽孢杆菌,命名为 *Bacillus subtilis* H19,简称 H19。将 H19 在 EZBioCloud 网站中进行比对,获得的相似度较高的基因序列利用 MEGA 5.0 软件构建菌株 H19 的系统发育树(Neighbor-Joining 法),见图 3。将得到的测序结果提交到 GenBank 数据库中,获得登陆号为:MG383451。

2.4 抑菌物质的理化性质

2.4.1 温度稳定性 由图 4 可以看出,菌株 H19 抑菌物质在-20~80 ℃时具有良好的稳定性,100 ℃处理 10 min 抑菌活性下降为 320 AU/mL,仍保留 50% 的抑菌活性,因此,



Marker. DL2000 1. 菌株 H19 的 PCR 产物

Figure 2 Agarose gel electrophoresis of PCR product from H19 strain

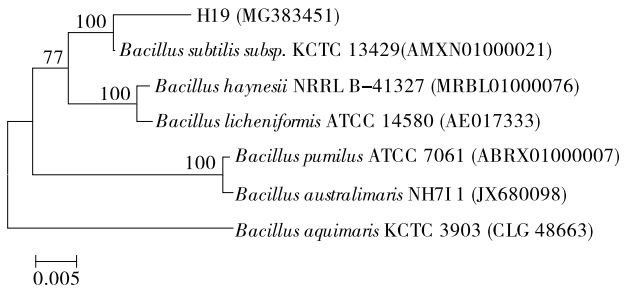


Figure 3 基于 16S rDNA 基因序列构建的枯草芽孢杆菌 H19 系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree of *Bacillus subtilis* H19 constructed based on 16S rDNA gene sequence

H19 抑菌物质在中低温条件下具有良好的稳定性,但不耐高温,此温度特性为后续试验研究提供了数据支撑。

2.4.2 酸碱稳定性 如图 5 所示,相对于对照组,菌株 H19 抑菌活性物质在 pH 2.0~9.0 时保持比较稳定的抑菌活性,但在 pH 10.0~12.0 时抑菌活性明显下降,仅保留微弱的活性,由此可见 H19 抑菌在酸性、中性以及弱碱性条件下稳定性较好且较稳定,而在强碱性条件下稳定性是极差的。因此为后续 H19 抑菌物质的分离纯化试验中所需 pH 条件提供了依据^[26]。

2.4.3 紫外线稳定性 由图 6 可以看出,紫外线将菌株 H19 抑菌物质处理 10~60 min 对其抑菌活性均无影响,表明 H19 抑菌活性物质具有良好的紫外线稳定性。

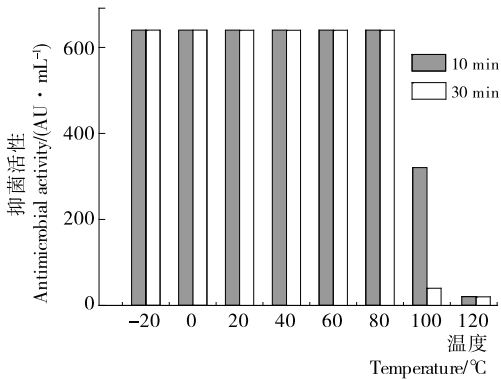


Figure 4 温度对 H19 抑菌活性的影响

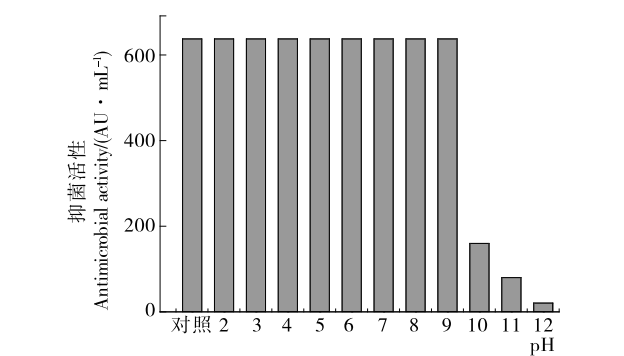


Figure 5 pH 对 H19 抑菌活性的影响

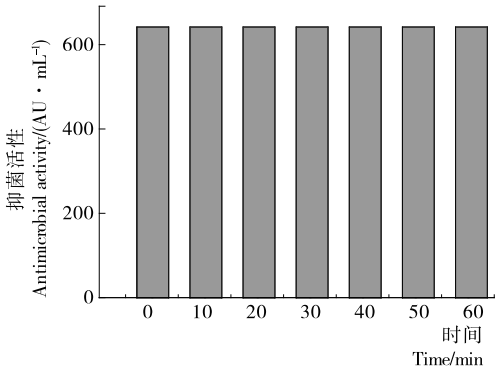


图6 紫外线对H19抑菌活性的影响

Figure 6 Effect of UV on antimicrobial activity of H19

2.5 抑菌物质的初步鉴定

2.5.1 抑菌物质的粗提 为了验证枯草芽孢杆菌所产抑菌物质是否为抗菌肽,以及确定其分子量,抑菌物质经1,3.5,7,8~10 kDa透析袋处理后,得到4种粗提液,其抑菌活性分别为1 280,1 280,1 280,320 AU/mL(图7)。与未透析的悬浮液相比,用1,3.5,7 kDa透析袋处理抑菌活性均略有提高,但3组之间不存在明显差异,而当透析袋孔径增大至8~14 kDa时,抑菌活性略有降低。表明前3种透析袋都能将主要抑菌成分有效截流,最后1种透析袋只能部分截留,初步判断抑菌物质的分子量在7~8 kDa以及大于8 kDa。为防止粗提液中抗菌成分的遗漏,后续用1 kDa透析袋处理所得透析液进行下一步的Tricine-SDS-PAGE蛋白电泳原位抑菌试验。

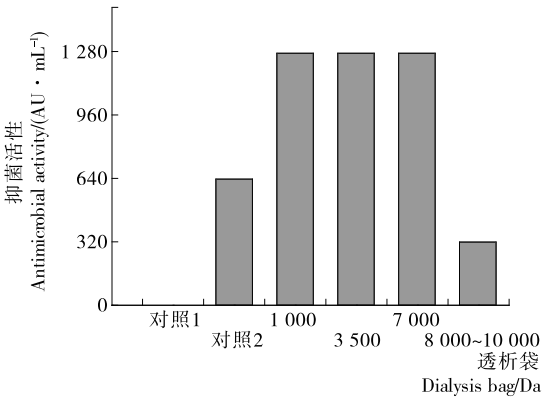
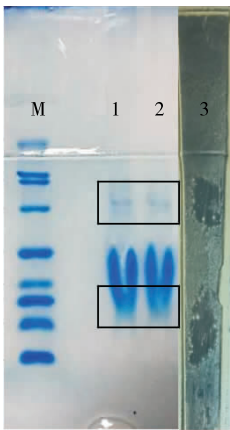


图7 不同孔径透析袋处理对Bacillus subtilis H19粗提液抑菌活性的影响

Figure 7 Effect of dialysis treatment on antibacterial activity of crude extract from fermentation supernatant of Bacillus subtilis H19 strain

2.5.2 H19 抑菌物质分子量的测定 1 kDa透析袋处理的蛋白粗提液经过Tricine-SDS-PAGE分析,结果见图8。在考马斯亮蓝染色后的电泳胶中可以看出有5条蛋白条带,通过在Vbrio parahaemolyticus ATCC17802的LB固体培养基得到的2条抑菌条带位置与这5条蛋白条带进行对比可知,H19粗提物中有抑菌活性的蛋白质分子量在6.5~9.5 kDa以及27.0~35.0 kDa,同时验证了2.5.1的结论。



M. 蛋白质分子质量标准 1,2. 经过考马斯亮蓝染色的2条平行样品条带 3. 副溶血性弧菌(Vbrio parahaemolyticus, ATCC17802)平板上的抑菌活性条带

图8 Tricine-SDS-PAGE分析及电泳后抑菌活性的测定
Figure 8 Tricine-SDS-PAGE analysis and detection of antibacterial activity after Tricine-SDS-PAGE

枯草芽孢杆菌所产抗菌肽主要分为两大类:核糖体途径肽和非核糖体途径肽,核糖体途径肽主要包括 subtilin、ericin、mersacidin、sublancin、bacillocin、subtilisin 和 TasA等,非核糖体途径肽主要包括 surfacrin、iturin 和 fengycin 三大抗菌脂肽^[27],其中细菌素 mersacidin^[28]、subtilinUK4^[29]、ericinA^[30]、sublancin168^[31]、bacillocin22^[32]、subtilisinA^[33]等的分子量为1.8~3.8 kDa,大分子抗菌蛋白 TasA 分子量为31.0 kDa^[34],3大抗菌脂肽分子量为1.0~1.5 kDa^[35],说明细菌素 H19 不在报道的枯草芽孢杆菌产生的抗菌肽范围之内。因此,初步判断菌株 H19 产生的抑菌物质可能为2种新型抗菌肽。

2.5.3 粗提液对蛋白酶的敏感性 由2.5.2可知H19抑菌物质的分子量在6.5 kDa以上,因此选择经3.5 kDa透析袋处理所得的粗提液进行蛋白酶敏感性试验,将此粗提液用5种不同蛋白酶处理,检测其抑菌活性。如图9所示,经木瓜蛋白酶、蛋白酶K处理后,菌株H19粗提液的抑菌活性完全消失,而用胰蛋白酶处理剩余64.61%的活性,用胃蛋白酶处

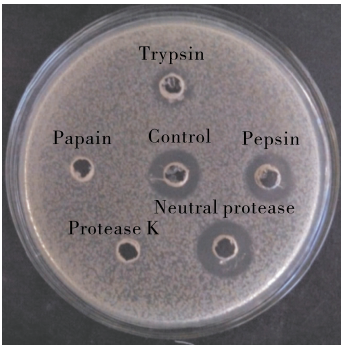


图9 蛋白酶处理对Bacillus subtilis H19粗提液抑菌活性的影响

Figure 9 Effect of protease treatment on antibacterial activity of crude extract from fermentation supernatant of Bacillus subtilis H19 strain

理剩余 83.07% 的活性,对中性蛋白酶不敏感,表明 H19 抑菌物质为蛋白质性质。

3 结论

本研究从上海市东海海水样品中筛选出既可抑制水产致病菌又对食源性致病菌有抑制作用、产抑菌物质的枯草芽孢杆菌。菌株 H19 对绝大多数指示菌具有较好的抑菌作用,相比于 Stein 等^[31]和孙珊等^[37]报道的枯草芽孢杆菌产抑菌物质的抑菌谱,菌株 H19 抑菌物质的抑菌谱更广,对供试的所有革兰氏阳性菌株均具有较好的抑菌活性,对除副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, ATCC33847)以外的所有供试革兰氏阴性菌株也都具有较好的抑菌活性,且对革兰氏阳性菌抑菌效果强于革兰氏阴性菌,可见,H19 产生的抑菌活性物质具有广谱的抑菌作用。H19 所产抑菌物质具有较好的热稳定性,在 100 ℃处理 10 min 后仍保留 50% 的抑菌活性,在 pH 2.0~9.0 时仍保持较强的抑菌活性,H19 抑菌活性物质具有良好的紫外线稳定性,在紫外线下照射 10~60 min 对抑菌活性物质的抑菌效果均无影响。通过将 H19 抑菌物质粗提得粗提液,将粗提液进行 5 种蛋白酶处理以及 Tricine-SDS-PAGE 电泳原位抑菌试验,初步鉴定此粗提液为蛋白质性质,分子量在 6.5~9.5 kDa 以及 27.0~35.0 kDa,由于该抑菌物质有别于已报道的抗菌肽分子量,推断可能为 2 种新型细菌素。

本研究将会继续对 H19 抑菌活性物质进行分离、纯化和结构鉴定,进一步确定 H19 所产细菌素的种类以及氨基酸成分等。

参考文献

[1] 胡连花. 对虾中副溶血性弧菌产毒株的分离识别及抗菌肽的控制效应[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2012: 1-3.

[2] 储卫华, 朱卫, 康春涛. 海洋蛭弧菌的分离鉴定及其对副溶血弧菌的作用[J]. 微生物学通报, 2009, 36(1): 20-24.

[3] ALEXANDRE Y, LE B G, BOISRAMÉ-GASTRIN S, et al. Probiotics: a new way to fight bacterial pulmonary infections? [J]. *Medecine Et Maladies Infectieuses*, 2014, 44(1): 9-17.

[4] 孙力军, 王雅玲, 陈宏. 芽孢杆菌抗菌肽应用于海产品食源性病原菌控制研究展望[J]. 食品与发酵工业, 2010(10): 127-130.

[5] KOZASA M. Toyocerin (*Bacillus toyoi*) as growth promotor for animal feeding [J]. *Microbiologie Aliments Nutrition*, 1986, 4(2): 121-135.

[6] XU De-feng, WANG Ya-ling, SUN Li-jun, et al. Inhibitory activity of a novel antibacterial peptide AMPNT-6 from *Bacillus subtilis*, against *Vibrio parahaemolyticus*, in shrimp[J]. *Food Control*, 2013, 30(1): 58-61.

[7] 石广举, 孙力军, 王雅玲, 等. NT-6 抗菌脂肽对凡纳滨对虾生长性能及养殖源头弧菌数的影响[J]. 广东农业科学, 2014, 41(12): 119-122.

[8] 王娇, 曲朋, 孙飞, 等. 弧菌颞颞菌的筛选及其在对虾养殖中的初步应用[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(6): 203-206.

[9] NATH S, CHOWDHURY S, SARKAR S, et al. Detection and characterisation of antimicrobial peptide produced by *Bacillus*

subtilis FPTB23 isolated from curd[J]. *Asian Journal of Animal Science*, 2015, 10(2): 115-123.

[10] 阮乾坤. 产海洋生物活性物质的微生物筛选及鉴定[D]. 大连: 大连工业大学, 2012: 11-22.

[11] 中国微生物菌种保藏委员会. 中国菌种目录[M]. 北京: 轻工业出版社, 1983: 404-422.

[12] 赵延存, 李鹏霞, 黄开红, 等. 适于解淀粉芽孢杆菌 BGP20 菌体生长的培养基响应面优化[J]. 食品科学, 2014, 35(3): 157-162.

[13] 张孟, 王艳婷, 汪立平, 等. 海洋抑菌放线菌 Y15 的筛选、鉴定及其代谢产物理化性质[J]. 微生物学通报, 2017, 44(3): 513-524.

[14] 郑苗, 邓泽元, 任志青, 等. 东方伊萨酵母高密度培养的研究[J]. 中国食品学报, 2016(4): 96-103.

[15] 汪攀, 易敢峰, 孙自博, 等. 一株凝结芽孢杆菌的分离鉴定及益生性研究[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(4): 1 195-1 202.

[16] CHAHAD O B, BOUR M E, CALO-MATA P, et al. Discovery of novel biopreservation agents with inhibitory effects on growth of food-borne pathogens and their application to seafood products[J]. *Research in Microbiology*, 2012, 163(1): 44-54.

[17] LIU Xue-fei, LI Ya, LI Jian-rong, et al. Isolation and characterisation of *Bacillus*, spp. antagonistic to *Vibrio parahaemolyticus*, for use as probiotics in aquaculture[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2015, 31(5): 795-803.

[18] 张梅梅, 索化夷, 赵欣, 等. 传统发酵牦牛酸乳中细菌素产生菌的筛选与鉴定[J]. 食品与机械, 2017, 33(3): 21-26.

[19] SABATÉ D C, AUDISIO M C. Inhibitory activity of surfactin, produced by different *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strains, against *Listeria monocytogenes* sensitive and bacteriocin-resistant strains[J]. *Microbiological Research*, 2013, 168(3): 125-129.

[20] 陈夕军, 李娟, 孙启利, 等. 水稻内生枯草芽孢杆菌 G87 抗菌蛋白的分离纯化及理化特性[J]. 微生物学报, 2010, 50(10): 1 353-1 357.

[21] 贾洁. 枯草芽孢杆菌 R21-4 抗菌蛋白的分离提取与应用[D]. 北京: 中国农业大学, 2005: 20-24.

[22] 王艳婷, 汪立平, 唐潮, 等. 蒙古干酪中产细菌素戊糖片球菌的筛选及其细菌素理化特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(10): 14-19.

[23] 孔维嘉, 王洋, 尚楠, 等. 扩展青霉拮抗菌的筛选鉴定及抗菌物质分析[J]. 食品科学, 2011, 32(15): 153-157.

[24] XIE Jian-hua, ZHANG Ri-jun, SHANG Chang-jiang, et al. Isolation and characterization of a bacteriocin produced by an isolated *Bacillus subtilis* LFB112 that exhibits antimicrobial activity against domestic animal pathogens[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2009, 8(20): 283-288.

[25] 李云, 杨胜远, 林晓东, 等. 产细菌素苏云金芽孢杆菌的鉴定及其所产抗菌物质性质[J]. 食品科学, 2010, 31(11): 147-152.

[26] 孙苗苗, 赵昆, 武志芳, 等. 枯草芽孢杆菌 LL18-4 产类细菌素的分离纯化及特性研究[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2009, 46(6): 1 862-1 866.

[27] SUMI C D, YANG B W, YEO I C, et al. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics[J]. *Revue Canadienne De Microbiologie*, 2015, 61(2): 93-103.

(下转第 191 页)

[21] VINZE R, CHANDEL S, LIMAYE M D, et al. Influence of jet temperature and nozzle shape on the heat transfer distribution between a smooth plate and impinging air jets[J]. International Journal of Thermal Sciences, 2016, 99: 136-151.

[22] SANG J L, JUNG H L, DAE H L. Local heat transfer measurements from an elliptic jet impinging on a flat plate using liquid crystal[J]. International Journal of Heat & Mass Transfer, 1994, 37(6): 967-976.

[23] LEE J, LEE S J. The effect of nozzle aspect ratio on stagnation region heat transfer characteristics of elliptic impinging jet[J]. International Journal of Heat & Mass Transfer, 2000, 43(4): 555-575.

[24] CALISKAN S. Flow and heat transfer characteristics of transverse perforated ribs under impingement jets[J]. International Journal of Heat & Mass Transfer, 2013, 66(6): 244-260.

[25] CALISKAN S, BASKAYA S. Velocity field and turbulence effects on heat transfer characteristics from surfaces with V-shaped ribs [J]. International Journal of Heat & Mass Transfer, 2012, 55(21/22): 6 260-6 277.

[26] LYTLE D, WEBB B W. Air jet impingement heat transfer at low nozzle-plate spacings[J]. International Journal of Heat & Mass Transfer, 1994, 37(12): 1 687-1 697.

[27] CHOO K S, KIMS J. Air jet impingement heat transfer at low nozzle-to-plate spacings under a fixed pumping power condition[C]// ASME 2009 Heat Transfer Summer Conference Collocated with the Interpack09 and, Energy Sustainability Conferences. [S.l.]: Journal of Heat Transfer, 2009: 459-465.

[28] DAE H L, JEONGHOON S, MYEONG C J. The effects of nozzle diameter on impinging jet heat transfer and fluid flow[J]. Journal of Heat Transfer, 2004, 126(4): 554-557.

[29] 耿铁, 李德群, 周华民, 等. 冲击射流及其强化换热的研究进展[J]. 机械设计与制造, 2006(6): 154-156.

[30] 王超, 王昭东, 李广阔, 等. 超宽狭缝式喷嘴流场数值模拟和射流速度凸度控制[J]. 轧钢, 2013, 30(2): 6-9.

[31] SARKAR A, NITIN N, KARWE M V, et al. Fluid Flow and Heat Transfer in Air Jet Impingement in Food Processing[J]. Journal of Food Science, 2004, 69(4): CRH113-CRH122.

[32] SARKAR A, SINGH R P. Spatial variation of convective heat transfer coefficient in air impingement applications[J]. Journal of Food Science, 2010, 68(3): 910-916.

[33] SARKAR A, SINGH R P. Air impingement technology for food processing: visualization studies[J]. LWT-Food Science and Technology, 2004, 37(8): 873-879.

[34] ADAMS T M, ABDEL-KHALIK S I, JETER S M, et al. An experimental investigation of single-phase forced convection in microchannels [J]. International Journal of Heat & Mass Transfer, 1998, 41(6/7): 851-857.

[35] OWHAIB W, PALM B. Experimental investigation of single-phase convective heat transfer in circular microchannels[J]. Experimental Thermal & Fluid Science, 2004, 28(2): 105-110.

[36] NA-POMPET K, BOONSUPTHIP W. Effect of a narrow channel on heat transfer enhancement of a slot-jet impingement system[J]. Journal of Food Engineering, 2011, 103 (4): 366-376.

[37] 陆蓓蕾. CFD 在低温流场中的应用[J]. 发电与空调, 2005, 26 (4): 21-24.

[38] 陆蓓蕾, 陈瑞球, 黄建昌, 等. 低温流场气流组织的数值分析[J]. 流体机械, 2006, 34(10): 84-86.

[39] GHAFARI O, IKHLAQ M, ARIK M. An Experimental Study of Impinging Synthetic Jets for Heat Transfer Augmentation[J]. International Journal of Air-Conditioning and Refrigeration, 2015, 23(3): 83-94.

[40] GHAFARI O, SOLOVITZ S A, ARIK M. An investigation into flow and heat transfer for a slot impinging synthetic jet[J]. International Journal of Heat & Mass Transfer, 2016, 100: 634-645.

(上接第 45 页)

[28] CHATTERJEE S, CHATTERJEE S, LAD S J, et al. Mersacidin, a new antibiotic from Bacillus. Fermentation, isolation, purification and chemical characterization[J]. Journal of Antibiotics, 1992, 45(6): 832-838.

[29] KIMS Y, LEE N K, HAN E J, et al. Characterization of subtilin KU43 Produced by *Bacillus subtilis*, KU43 isolated from traditional Korean fermented foods[J]. Food Science & Biotechnology, 2012, 21(5): 1 433-1 438.

[30] STEIN T, BORCHERT S, CONRAD B, et al. Two different lantibiotic-like peptides originate from the ericin gene cluster of *Bacillus subtilis* A1/3[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184 (6): 1 703-1 711.

[31] PAIK S H, CHAKICHERLA A, HANSEN J N. Identification and characterization of the structural and transporter genes for, and the chemical and biological properties of, sublancin 168, a novel lantibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168[J]. Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(36): 23-34.

[32] ZHENG Guo-lu, SLAVIK M F. Isolation, partial purification and characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain[J]. Letters in Applied Microbiology, 1999, 28(5): 363-367.

[33] MARX R, STEIN T, ENTIAN K D, et al. Structure of the *Bacillus subtilis* peptide antibiotic subtilosin A determined by 1H-NMR and matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. Journal of Protein Chemistry, 2001, 20(6): 501-506.

[34] 赵朋超, 王建华, 权春善, 等. 枯草芽孢杆菌抗菌肽生物合成的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(10): 108-113.

[35] IL P, RYU J, KIM Y H, et al. Production of Biosurfactant Lipopeptides Iturin A, Fengycin, and SurfactinA from *Bacillus subtilis* CMB32 for Control of Colletotrichum gloeosporioides[J]. Journal of Microbiology & Biotechnology, 2010, 20 (1): 138-145.

[36] 孙珊, 郝林, 王倩. 枯草芽孢杆菌 W321 产抑菌物质的理化性质及抑菌谱研究[J]. 食品工业, 2012(11): 110-112.