

文章编号:1001-6880(2014)1-0123-05

# Bacillus amyloliquefaciens C-1 胞外发酵产物对食源性致病菌抑菌活性的初步研究

周文杰<sup>1,2</sup>, 杨 建<sup>1,2</sup>, 张瑞娟<sup>1,2</sup>, 万 苗<sup>3</sup>, 韩 哲<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>西安交通大学医学部公共卫生学院; <sup>2</sup>陕西省营养与食品安全工程研究中心, 西安 710061;<sup>3</sup>南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 南昌 330047

**摘要:**对本实验室自行分离的解淀粉芽孢杆菌 C-1 进行发酵, 离心得到其上清液, 平板抑菌实验结果显示该菌上清液对蜡样芽孢杆菌 MS10362R、大肠杆菌 ATCC 25922 及厌氧梭菌 (*Clostridium difficile* QB21) 有较强的抑菌活性; 在生长曲线测定中, 4 mL C-1 上清液可显著延长 *B. cereus* MS10362R 细胞的迟缓期, 抑制细菌生长, 且可排除 pH 等物理因素的影响, 确定了 C-1 发酵上清液的抑菌活性; 同时发现其对于 MS10362R 次生代谢产物-黑色素的产生和产量具有明显的抑制作用, 初步推测可能与抑制细菌的群体感应有关; 而从 C-1 上清中提纯的胞外多糖被证明不具有抑菌活性。

**关键词:**解淀粉芽孢杆菌 C-1; 抑菌活性; 胞外多糖; 食源性致病菌

中图分类号:Q939.9

文献标识码:A

## Antimicrobial Activity on Food-Borne Pathogens of Extracellular Fermented Products from *Bacillus amyloliquefaciens* C-1

ZHOU Wen-jie<sup>1,2</sup>, YANG Jian<sup>1,2</sup>, ZHANG Rui-juan<sup>1,2</sup>, WAN Yin<sup>3</sup>, HAN Bei<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>School of Public Health, Medical College of Xi'an Jiaotong University;<sup>2</sup>Nutrition and Food Safety Engineering Research Center of Shaanxi Province, Xi'an 710061, China;<sup>3</sup>State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China

**Abstract:** *Bacillus amyloliquefaciens* C-1 was a newly isolated strain. C-1 supernatant was collected from the 72h fermentation culture. It showed high antimicrobial activity against *Bacillus cereus* MS10362R, *Clostridium difficile* QB21 and *Escherichia coli* ATCC25922 by culture dish assay. In growth curve analysis, 4 mL of C-1 supernatant in 150mL medium inhibited the growth of *B. cereus* MS10362R at the lag phase, and the pH changing of culture medium by the addition of 4 mL C-1 supernatant were excluded. At the same time, the production of melanin, secondary metabolite of MS10362R, was reduced, which might be the effect of QS (quorum sensing) system. Meanwhile, exopolysaccharides extracted and purified from C-1 supernatant failed to show any antimicrobial activity.

**Key words:** *Bacillus amyloliquefaciens* C-1; antifungal activity; exopolysaccharides; food-borne pathogens

解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 生长条件宽泛, 在宽谱的 pH 和温度范围内都能很好的生长, 具有潜在的经济价值<sup>[1]</sup>。目前的研究表明解淀粉芽孢杆菌具有广谱的抑菌活性, 包括细菌和真菌, 其主要的抑菌成分是抑菌蛋白<sup>[2]</sup>, 也有抑菌成分为肽脂类、聚酮化合物<sup>[3-5]</sup>等的报道, 以往有的研究以蛋白酶处理的方法证明其抑菌成分的多肽性

质, 而蛋白酶处理不能使其抑菌活性完全丧失<sup>[6]</sup>, 也有一些研究尝试提取抑菌成分后鉴定其化学成分, 但由于所用不同的分离株<sup>[2,7]</sup>, 因此不能排除其它性质抑菌成分存在的可能。

本实验室从即食水果果盘上分离出一株解淀粉芽孢杆菌, 命名为 C-1, 其在发酵过程中能产生大量的胞外多糖 (Exopolysaccharides, EPS), 该菌现保存于中国典型培养物保藏中 (编号 M 2012177)。胞外多糖是细菌的次级代谢产物, 由细菌分泌到胞外并溶解于环境的水中, 由于其分子致密交联的原因, 可以在细菌周围形成屏障阻碍细菌同环境的物质能量交换, 从而保护细菌免受毒物、噬菌体、高渗透压、高

收稿日期:2013-08-05 接受日期:2013-12-10

基金项目:中央高校基本科研业务经费专项(xjj2012125);食品科学与技术国家重点实验室开放基金(SKLF-KF-201201)

\*通讯作者 Tel:86-29-82655107; E-mail:hanbei@mail.xjtu.edu.cn

温、pH 等恶劣环境的影响<sup>[8-10]</sup>,但同时也可能因此而阻碍其他细菌对于环境营养物质的摄取进而抑制细菌的生长繁殖,具体机制仍是目前国内外的一个研究热点。研究发现胞外多糖还有很多的生物活性,比如抗氧化、抗辐射、降血糖、刺激免疫、抑制肿瘤细胞生长等<sup>[11-13]</sup>,因而胞外多糖在生物膜制造,医药保健品开发方面具有很大的潜力<sup>[14,15]</sup>。

食源性致病菌是导致微生物性食物中毒的一类病原菌,根据中国疾病预防控制中心《卫生部办公厅关于 2012 年全国食物中毒事件情况的通报》的统计数据:微生物性食物中毒事件中毒人数最多,占总数的 56.1%。与 2011 年相比,报告起数和中毒人数分别减少 28.2% 和 27.0%,但死亡人数增加 2 人;主要是由沙门氏菌 (*Salmonella* spp.)、蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、副溶血性弧菌 (*Vibrio Parahemolyticus*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、肉毒梭菌 (*Clostridium botulinum*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、变形杆菌 (*Proteusbacillus vulgaris*)、志贺氏菌 (*Shigella* spp.)、椰毒假单胞菌 (*Pseudomonas cocovenenans*) 等引起的细菌性食物中毒<sup>[16]</sup>。对食源性致病菌的控制是食品工业防腐方向的一个重点,针对食源性致病菌的高效生物防腐剂研究成为了当前的热点之一。

本实验基于解淀粉芽孢杆菌的抑菌活性和 C-1 高产量的胞外多糖的性质,初步推测其胞外多糖可能为其抑菌成分之一。通过生长曲线试验验证了 C-1 发酵液对 9 株高致病率的食源性致病菌的抑菌活性,同时发现其对蜡样芽孢杆菌产黑色素具有明显的抑制作用,之后提纯其胞外多糖,并通过平板抑菌活性实验,证明不具有显著的抑菌活性。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株及培养基

本实验以 *Bacillus amyloliquefaciens* C-1(本实验室自行分离保藏)为生产菌株。蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus* MS10362R) 和枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168) 为中国科学院武汉病毒研究所袁志明研究员惠赠;梭状芽孢杆菌 (*Clostridium difficile* QB21) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* S251) 为本实验室自行分离保藏;福氏痢疾杆菌 (*Shigella flexneri* CDC1) 和宋内痢疾杆菌 (*Shigella sonnei* CDC2) 来源于西安市疾控中心;大肠杆菌 (*E. coli* ATCC25922, 本实验室保存菌株), 这 7 株

细菌为抑菌试验的检测菌株。

液体培养基采用 LB 培养基,配方为:蛋白胨 10 g/L、氯化钠 10 g/L、酵母粉 5 g/L;固体平板采用 LB 固体培养基和厌氧培养基 RCM(强化梭菌厌氧培养基,青岛海博生物技术有限公司);LB 固体培养基配方为:蛋白胨 10 g/L、氯化钠 10 g/L、酵母粉 5 g/L,琼脂 1.5%。除厌氧梭菌需在厌氧培养箱(Coy, Ann Arbor, MI, USA) 内进行培养,其余细菌均无特殊要求,通气培养。

### 1.2 试剂

考马斯亮蓝 G250 染料、Whatman4057050、Tris、EDTA、浓硫酸,1.0 mol/L NaCl、95% 乙醇、0.5 mol/L NaOH、0.5 mol/L HCl、Sevage 试剂:(氯仿:正丁醇 = 4:1, V/V) 等试剂均为分析纯。

### 1.3 *B. amyloliquefaciens* C-1 发酵液提取

接种环取 C-1 单菌落至 3 mL LB 液体培养基,37 °C、200 rpm 恒温摇床中培养过夜;次日按 1% 量转接至 50 mL LB 培养基中,30 °C、200 rpm 恒温摇床中培养 5 h,按 1% 量转接至多份 150 mL LB 培养基中,30 °C、200 rpm 恒温箱中培养 96 h。4 °C, 10000 rpm 离心取上清液,分为两份,一份 4 °C 下留置作为全发酵液上清(测定该上清的 EPS 浓度),一份用于提取胞外多糖。

### 1.4 C-1 发酵液抑菌试验

#### 1.4.1 平板法抑菌试验

在直径约 15 cm 平板倾倒固体培养基厚约 6 mm,冷却后均匀打孔 5 个,孔径 6 mm,其中包含阳性对照孔一个(敏感抗生素),阴性对照孔一个(等体积的 LB 液体培养基),实验组孔 3 个,分别加入 100 μL C-1 全发酵上清液(其 EPS 浓度为 1.0 mg/mL),抑菌活性以抑菌圈直径表示。

#### 1.4.2 生长曲线法抑菌试验

通过上述实验选择 1~2 株对上清液敏感的菌株进行实验,分为高剂量组、低剂量组、对照组三组,均为培养基 150 mL,根据预实验结果,分别加入上清液 4 mL、0.6 mL、0 mL 并用培养基补足使三者液体总量一致。最适宜温度下(芽孢杆菌 30 °C,其余细菌为 37 °C),200 rpm 下培养,每 2~3 h 取样用全自动多功能酶标仪(Tecan, Infinite 200) 测量 OD600,并绘制生长曲线图,每个样品做 3 个重复。

### 1.5 C-1 胞外多糖提取

将 1.4 中上清液按照 1:3 比例加入无水乙醇,4 °C 下过夜沉淀多糖,次日 4 °C 离心收集多糖,并用

Sevage 试剂充分出去杂蛋白, 离心, 取上层 EPS 溶液。用灭菌去离子水透析 60 h, 然后用聚乙二醇将透析过的胞外多糖浓缩, 其间每 3 h 用苯酚-硫酸法测 EPS 的浓度直到其浓度  $\geq C-1$  全发酵上清液内 EPS 浓度为止。将收集到的 EPS 溶液 4 ℃下保存待用。

用考马斯亮蓝 G250 处理标准蛋白溶液, 得到蛋白质标准曲线, 并最终得到粗胞外多糖中蛋白质含量定量测定结果。

## 1.6 C-1 胞外多糖抑菌试验

平板及分组情况同 1.4.1, 差别仅为实验组加

表 1 C-1 上清液的平板抑菌试验结果( $n=3$ )

Table 1 Result of antimicrobial activity of C-1 supernatant ( $n=3$ )

受试菌 Tested strains	抑菌圈 Diameter of inhibition zone (D/mm)		
	阳性对照 Positive control	实验组(上清) Supernatant group	阴性对照 Negative control
枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168	16 ± 1.1	0	0
蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i> MS10362R	28 ± 1.6	18 ± 1.0	0
梭状芽孢杆菌 <i>C. difficile</i> QB21	32 ± 2.3	16 ± 1.1	0
宋内痢疾杆菌 <i>S. sonnei</i> CDC2	30 ± 1.5	0	0
福氏痢疾杆菌 <i>S. flexneri</i> CDC1	30 ± 1.6	0	0
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i> S251	28 ± 1.4	0	0
大肠杆菌 <i>E. coli</i> ATCC25922	29 ± 1.8	17 ± 1.3	0
大肠杆菌 <i>E. coli</i> ATCC8739	32 ± 1.8	0	0

由该表数据得知, C-1 上清液对蜡样芽孢杆菌 MS10362R, 梭状芽孢杆菌 QB21, 大肠杆菌 ATCC 25922 的抑菌效果比较显著。

### 2.1.2 *B. cereus* MS10362R 在 C-1 发酵液作用下的生长曲线

选取上述敏感菌株蜡样芽孢杆菌 MS10362R 进

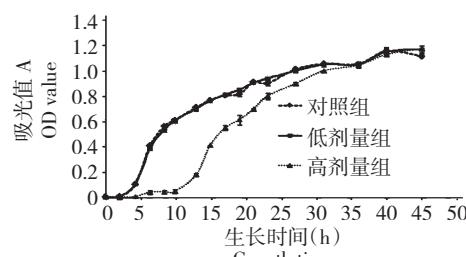


图 1 *B. cereus* MS10362R 在 C-1 上清液抑制作用下的生长曲线图

Fig. 1 Growth curve of *B. cereus* MS10362R treated by C-1 supernatant

入 100  $\mu$ L EPS 浓度为 1.0 mg/mL 的 C-1 胞外多糖液, 抑菌活性同样以抑菌圈直径表示。

## 2 实验结果

### 2.1 C-1 全发酵液上清抑菌活性

#### 2.1.1 C-1 发酵液上清的平板抑菌试验

根据 1.4.1 的设计进行平板抑菌试验, 得到如表 1 的抑菌结果。阳性对照为敏感抗生素, 浓度为 25  $\mu$ g/mL, 阴性对照为灭菌蒸馏水, 上清液和胞外多糖液含胞外多糖浓度均为 1.0 mg/mL, 加样量均为 100  $\mu$ L。

行生长曲线试验。分为高剂量、低剂量和对照组三组, 均为培养基 150 mL, 根据预实验结果, 分别加入上清液 4、0.6、0 mL 并用培养基补足使三者液体总量一致, 结果如图 1。

图 1 中对照组和低剂量组曲线基本重合, 在接种 2 h 后即进入对数期, 而高剂量组则在接种 10 h 后进入对数期, 表明高剂量 *B. amyloliquefaciens* C-1 发酵上清液对于该细菌的生长具有抑制作用, 三组在对数期曲线斜率没有明显差异。由于三组差异在适应期, 需排除因 C-1 发酵上清液量不一致导致的物理因素影响, 三组唯一可能差别为 pH。为了排除由于 C-1 发酵上清液的引入导致 *B. cereus* MS10362R 培养基起始 pH 的差异而出现的生长受抑制的情况, 对接种前, 加入不同体积 C-1 发酵上清液后的三组培养基的 pH 做了测定, 结果如表 1。

表 2 C-1 发酵液上清加入后对 *B. cereus* MS10362R 培养基起始 pH 的改变

Table 2 pH variation of *B. cereus* MS10362R culture medium with addition of C-1-supernatant

培养基 Medium (mL)		混合液 pH pH value of mixture
LB 培养基 LB medium	C-1 上清液 C-1 supernatant	
0	150	8.40
150	0	7.75(对照组)
150	0.6	7.84(低剂量组)
150	4	7.86(高剂量组)

表 2 中三组培养基的 pH 差别不明显, 高剂量组和低剂量组的起始 pH 非常接近, 对照组与其他两组略有差别, 因此若以 pH 差异为由解释图 1 明显不合理, 固可排除 pH 等物理因素的影响, 确认 C-1 发酵上清液中确实存在某种具有抑菌活性的物质。

生长曲线试验中还发现 C-1 发酵上清液对于蜡样芽孢杆菌产黑色素具有明显的抑制作用。如图 2。

可见在 84 h 时对照组颜色深、产色素量大, 明显区别于低剂量和高剂量组, 后两者颜色相差不大产黑色素量基本一致, 直到 120 h, 三组产黑色素量

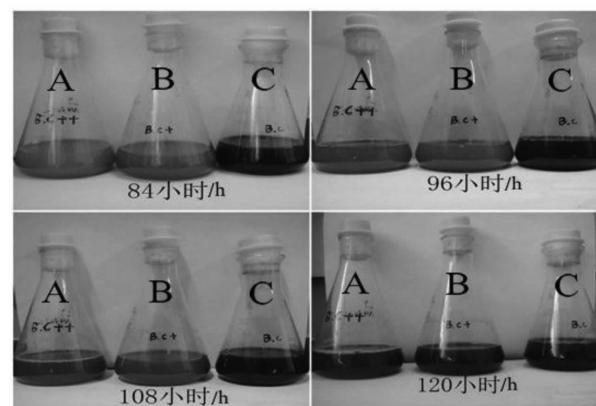


图 2 蜡样芽孢杆菌 MS10362R 在 C-1 发酵上清液作用下的黑色素产量变化

Fig. 2 The melanin production of *B. cereus* MS10362R treated by C-1-supernatant

注: 图中 A、B、C 分别代表高剂量组、低剂量组、对照组

Note: A, B and C were high dose group, low dose group and control group, respectively

才基本相等。同时在 *B. cereus* MS10362R 培养至 48 h 以后各组间的细胞数 ( $OD_{600}$ ) 基本一致, 所以黑色素的产量差异与细胞数量无关联。

## 2.2 C-1 胞外多糖抑菌活性

表 2 结果显示 C-1 粗提胞外多糖对于所用 9 株受试菌均不敏感, 可以初步确定单纯的胞外多糖液 (EPS 液) 不具有抑菌活性。

表 2 C-1 上清液及胞外多糖的平板抑菌试验结果 ( $n=3$ )

Table 2 Result of antimicrobial activity of C-1supernatant and EPS ( $n=3$ )

受试菌 Tested strains	阳性对照 Positive control	抑菌圈 Diameter of inhibitory zone (D/mm)	
		实验组 (EPS) EPS group	阴性对照 Negative control
枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168	16 ± 1.1	0	0
蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i> MS10362R	28 ± 1.6	0	0
梭状芽孢杆菌 <i>C. difficile</i> QB21	32 ± 2.3	0	0
宋内痢疾杆菌 <i>S. sonnei</i> CDC2	30 ± 1.5	0	0
福氏痢疾杆菌 <i>S. flexneri</i> CDC1	30 ± 1.6	0	0
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i> S251	28 ± 1.4	0	0
大肠杆菌 <i>E. coli</i> ATCC25922	29 ± 1.8	0	0
大肠杆菌 <i>E. coli</i> ATCC8739	32 ± 1.8	0	0

## 3 讨论和展望

解淀粉芽孢杆菌分布广泛, 菌种资源丰富, 培养较简单, 在较宽谱的 pH 和温度范围内都能很好的

生长, 且代谢产物种类繁多, 具有广泛的细菌真菌抑菌活性, 但由于分离株众多, 抑菌谱不一, 发酵效率一般, 某些代谢产物低毒性<sup>[17]</sup> (尚无致病性报道) 等原因, 在生产生活实践中还没有得到广泛的应用, 随

着分子生物学的发展,解淀粉芽孢杆菌的发酵效率,毒性产物与抑菌活性等能得到很好的调和,其在生物防治方面的应用可行性将得到很好的提升。

本实验发现 100  $\mu\text{L}$  解淀粉芽孢杆菌 C-1 发酵液能抑制蜡样芽孢杆菌 MS10362R, 梭状芽孢杆菌 QB21, 大肠杆菌 ATCC 25922 的生长, 与 100  $\mu\text{L}$  25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的相应敏感抗生素阳性对照比较, 其抑菌效率可达到 50% ~ 60% (表 1)。对 *B. cereus* MS10362R 来讲, 4 mL 的解淀粉芽孢杆菌 C-1 发酵液可以显著的延长其生长迟缓期, 将 MS10362R 到达对数期的时间由原来的 2 h 推迟至 10 h(图 1), 如果将该物质分离用于食品防腐剂上, 可以在一定程度上延长食品货架期; 同时结果显示 C-1 上清液可以抑制 *B. cereus* MS10362R 黑色素的产生。由于细菌色素属于次级代谢产物, 往往在细菌细胞密度达到一定时才产生, 提示 C-1 发酵液抑制 *B. cereus* MS10362R 黑色素产生可能与阻碍细菌的群体感应 (quorum sensing, QS) 和自诱导物质 (auto-inducer, AI) 有一定的关系<sup>[18]</sup>。初步推断 C-1 发酵液抑制色素产生可能与抑制 AI 释放有关。那么 C-1 发酵液是否能通过同样的机制抑制毒素等其他细菌的次级代谢产物产生呢? 目前还没有相关的报道, 这对于新型抗生素靶点的研究开发具有显著地意义。比如对于甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌 (MARS) 感染的患者, 病人脓毒血症十分严重, 由于耐药, 没有抗生素能杀灭细菌, 但是如果能通过抑制 AI 的产生及其浓度, 或许可以抑制细菌毒素释放, 病人的症状必将得到缓解, 细菌也因为不能产生次级代谢产物而抑制自身的生长繁殖<sup>[19]</sup>。

本实验证明从解淀粉芽孢杆菌 C-1 发酵液上清中分离出的胞外多糖不具有抑菌效果, 因此可以初步确定发酵液上清中具有抑菌活性的物质可能是蛋白类或多肽类等物质, 仍需要进一步分离, 并进行功能研究。

## 参考文献

- Cao H, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* G1: A Potential Antagonistic Bacterium against Eel-Pathogenic *Aeromonas hydrophila*. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2011, 2011:824104.
- Wang YG(王英国), Wang JH(王军华), Quan CS(权春善), et al. Purification and Antifungal Characterization of an Antifungal Substance from *Bacillus amyloliquefaciens*. *China Biotechnol*(中国生物工程杂志), 2007, 27(12):41-45.
- Caldeira AT, Santos Arteiro JM, Coelho AV, et al. Combined use of LC - ESI-MS and antifungal tests for rapid identification of bioactive lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CCM1 1051. *Process Biochem*, 2011, 46:1738-1746.
- Yu GY, Sinclair JB, Hartman GL, et al. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biol Biochem*, 2002, 34:955-963.
- Chen XH, Koumoutsi A, Scholz R, et al. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *J Biotechnol*, 2009, 140:27-37.
- Wang JH(王军华), Quan CS(权春善), et al. Antifungal Characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* Q-12. *Food Fermentation Ind*(食品与发酵工业), 2006, 32(6):47-50.
- Yoshida S, Hiradate S, et al. Antimicrobial Activity of Culture Filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 Isolated from Mulberry Leaves. *Phytopathol*, 2001, 91:181-187.
- Laurienzo P. Marine polysaccharides in pharmaceutical applications: an overview. *Mar Drugs*, 2010, 8:2435-2465.
- Poli A, Anzelmo G, Nicolaus B. Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: production, characterization and biological activities. *Mar Drugs*, 2010, 8:1779-1802.
- Poli A, Di Donato P, et al. Synthesis, production, and biotechnological applications of exopolysaccharides and polyhydroxyalkanoates by archaea. *Archaea*, 2011, 2011:693253.
- De Roos NM. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *Am J Clin Nutr*, 2000, 71:405-411.
- Vandamme TF, et al. The use of polysaccharides to target drugs to the colon. *Carbohydr Polym*, 2002, 48:219-231.
- Kitazawa H, et al. Augmentation of macrophage functions by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Food Microbiol*, 2000, 17:109-118.
- Senni K, Pereira J, Gueniche F, et al. Marine polysaccharides: a source of bioactive molecules for cell therapy and tissue engineering. *Mar Drugs*, 2011, 9:1664-1681.
- Sutherland I. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiol*, 2001, 147:3-9.
- China CDC(中国CDC). Poisoning incidents report in 2012 from General office of China's Ministry of Health. www.cdc.gov.cn/main/shownew.php?tblName = A0015\_10&storepk = 36MYMnewsid = 31148.
- Huang XH(黄虎翔), Zhang WM(张万民). Prevalence and toxic effect of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Int J Lab Med*(国际检验医学杂志), 2010, 31:243-244, 247.
- Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 2001, 55:165-199.
- Walsh C. Where will new antibiotics come from? *Nat Rev Microbiol*, 2003, 1:65-69.