

苏云金芽孢杆菌发酵上清液抑菌谱及稳定性

贾淑颖, 郝再彬, 陈圣怡, 韩兵兵, 李霞*

(桂林理工大学 化学与生物工程学院, 广西 桂林 541004)

摘要: 对苏云金芽孢杆菌 Bt185 和 HD-1 菌株发酵上清液中生物活性物质抑菌作用和稳定性进行了初步研究。采用牛津杯法测定发酵上清液中活性物质的抑菌活性, 供试菌为草生欧文氏杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、普通变形杆菌、谷氨酸棒状杆菌、乙型副伤寒杆菌、绿脓杆菌等 9 种细菌。结果表明, 发酵上清液对 9 种细菌均具有不同程度的抑制作用, 其对草生欧文氏杆菌的抑制性最强。发酵上清液对热、酸、紫外线照射和连续超声波刺激均较稳定; 发酵上清液在 50 ℃以上抑菌活性开始下降, 在 pH 3.0~9.0 条件下抑菌活性稳定, 紫外光照射 2.5 h 之内抑菌活性稳定, 在连续 360 W 超声波条件下 2 h 之内抑菌活性稳定。

关键词: 苏云金芽孢杆菌; 抑菌活性; 稳定性

中图分类号: Q 74 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2018)06-0661-05

Study on *Bacillus thuringiensis* Fermentation Supernatant Antimicrobial Spectrum and Stability

JIA Shuying, HAO Zaibin, CHEN Shengyi, HAN Bingbing, LI Xia*

(College of Chemistry and Bioengineering, Guilin University of Technology, Guilin 541004, China)

Abstract: Antibiotic effects and stability of bioactive substance from fermentation broth of *Bacillus thuringiensis* (BT) Bt185 and HD-1 were initially studied. Oxford plate was used to study the bacteriostatic effect of fermentation broth, tested for the bacteria *Erwinia herbicola*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Proteus bacteria*, *Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus paratyphosus* B, *Bacillus aeruginosus* nine kinds of bacteria. The results showed that, the antimicrobial activity of *Erwinia herbicola* was better than other eight kinds of bacteria. Fermentation broth to heat, acid, ultraviolet radiation and continuous ultrasound stimulation were stable; the fermentation broth above 50 ℃ antibacterial activity began to decline, at a pH of 3.0~9.0 conditions antibacterial activity stability, within 2.5 h of UV irradiation stable antibacterial activity, within the continuous 360 W of ultrasonic condition 2 h antibacterial activity stability.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, antimicrobial spectrum, stability

收稿日期: 2015-10-22

基金项目: 广西自然科学基金项目(2014GXNSFBA118134); 植物病虫害生物学国家重点实验室开放基金项目(SKLOF201404)。

* 通信作者: 李霞(1981—), 女, 黑龙江肇东人, 理学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事天然化学产物活性方面的研究。

E-mail: biology754@163.com

引用本文: 贾淑颖, 郝再彬, 陈圣怡, 等. 苏云金芽孢杆菌发酵上清液抑菌谱及稳定性[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(06): 661-665.

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) 是一种天然革兰氏阳性昆虫病原细菌, 生长代谢过程中产生的晶体蛋白对多种害虫有特异毒杀作用, 是目前最广泛的微生物杀虫剂^[1]。Bt 的抗菌防病机制是通过产生抗菌物质抑制病原生长或直接杀灭病原。Bt 产生的拮抗物质主要有抗生素、细胞壁降解酶类、细菌素和其它抗菌蛋白及挥发性抗菌物质等, 其中抗生素包括多肽抗生素、脂肽抗生素和次生代谢产生的其它抗菌活性物质等。近几年, 国内研究多数是在杀虫方面, Bt 以色列亚种开发的灭蚊制剂、防治储粮害虫的 Bt 杀虫剂已投放市场^[2], 对仓储烟草害虫、松材线虫病的研究也在进行^[7-8]。也有研究表明, 该抑菌物质对苹果轮纹菌 (*Dothiorella gregaria*)、苹果褐斑病菌 (*Marssonin mali*)、尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*)、白菜黑斑菌 (*Alternaria brassicae*) 等植物病害微生物有明显的抑菌作用^[3]。

作者选取 Bt185 和 HD-1 菌株对它们的发酵液抑菌谱和稳定性进行研究, 为发酵液的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) Bt185、HD-1 以及草生欧文氏杆菌 LS005 (*Erwinia herbicol*) 供试菌; 由中国农业科学院植物保护研究所提供; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、普通变形球菌 (*Proteus vulgaris* Hauser)、谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)、乙型副伤寒杆菌 (*Bacillus paratyphosus* B)、绿脓杆菌 (*Bacillus aeruginosus*): 由桂林医学院提供。

1.1.2 试剂 石油醚、正丁醇、三氯甲烷、四氯化碳、乙酸乙酯、异戊醇、葡萄糖、NaCl、MnSO₄·H₂O、K₂HPO₄、MgSO₄ 等试剂: 均为分析纯; 蛋白胨、酵母粉: 英国 OXOID 公司; 琼脂: 北京索莱宝科技有限公司; 牛肉膏: 上海蓝季生物。

1.1.3 主要设备 RE-52A I 型旋转蒸发器: 上海亚荣生化仪器厂; KQ-400 型高功率数控声波清洗机: 昆山市超声仪器有限公司; CL-5-B 离心机: 上海安亭科学仪器厂; LRH-150-Z 振荡培养箱: 珠江医疗器械。

1.1.4 培养基 1/2 LB 固体培养基 (g/L): 蛋白胨

5, 酵母粉 2.5, 氯化钠 5, 琼脂粉 15。发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 20, 无水氯化钙 0.8, K₂HPO₄ 1.3, MgSO₄ 0.2, MnSO₄·H₂O 0.8。调节 pH 至 7.0~7.2, 封口灭菌备用。

抑菌培养基 (g/L): 牛肉膏 3、蛋白胨 10、氯化钠 5、琼脂 15。

1.2 方法

1.2.1 发酵液预处理 将甘油管保存的 Bt185、HD-1 菌株分别接入灭好菌的 1/2 LB 液体培养基中 (约 10 μL), 30 °C 下培养 8~12 h (OD₆₀₀>0.8), 为种子液。

将上述种子液分别按体积分数 5% 接入灭好菌的发酵培养基中, 30 °C 振荡发酵 48~50 h。

发酵液 4 500 r/min 离心 15 min, 取上清液, 浓缩 10 倍。

1.2.2 抗菌谱 采用牛津杯法测定发酵液对供试菌的抑菌活性。将供试菌种子液按 5 % 的接种体积分数加入抑菌培养基中, 将处理后的发酵液 150 μL 加入到牛津杯孔中, 按供试菌的适宜温度放入相应温度的培养箱中培养 12 h, 测量抑菌圈直径。牛津杯: 内径 (6±0.1) mm、外径 (8±0.1) mm、高 (10±0.1) mm 的圆筒形小管。

1.2.3 发酵液稳定性测定

1) 发酵液热处理: 取适量处理后的发酵液分成 10 等分, 分别在 4 °C 冰箱、室温约 20 °C (对照)、30、40、50、60、70、80、90、100 °C 温度梯度下恒温 2 h, 分别测定抑菌圈 (草生欧文氏杆菌) 大小。

2) 发酵液酸碱处理: 取适量处理后的发酵液分成 9 等分, 分别调 pH 3、4、5、6、自然 pH 约为 7 (对照)、8、9、10、11, 2 h 后调回自然 pH, 分别测定抑菌圈 (草生欧文氏杆菌) 大小。

3) 发酵液超声处理: 取适量处理后的发酵液分成 10 等分, 在温度 40 °C, 功率 360 W 超声条件下, 分别超声 0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5 h, 分别测定抑菌圈 (草生欧文氏杆菌) 大小。

4) 发酵液紫外处理: 取适量处理后的发酵液分成 10 等分, 放在 20 W 紫外灯下 15、30、45、60、75、90、105、120、135、150 min, 分别测定抑菌圈 (草生欧文氏杆菌) 大小。

1.2.4 有机试剂萃取 将发酵液浓缩液分成 6 等分 (对照为原液), 分别加入等量的萃取剂, 反复振荡混合, 于 4 °C 冰箱静置分层或离心分层, 分别测

定水相、有机相、原有机试剂及原液的抑菌圈大小。以草生欧文氏杆菌为供试菌。

选用的萃取剂(极性大小顺序):异戊醇>三氯甲烷>乙酸乙酯>正丁醇>四氯化碳>石油醚。

2 结果与分析

2.1 抗菌谱的测定

通过比较发酵上清液对 9 种供试菌抑菌性发现,草生欧文氏杆菌抑菌最明显,其次是普通变形球菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌,对比发酵液稳定性时,采用草生欧文氏杆菌,见表 1。

表 1 供试菌的最适温度及发酵上清液对 9 种指示菌抑菌圈直径测定

Table 1 Optimal temperature for test bacteria and the diameter of inhibition zone of 9 kinds of indicator bacteria concentration of fermentation broth

供试菌	最适温度/℃	HD-1/mm	Bt185/mm
草生欧文氏杆菌	30	15.70±0.26	16.08±0.18
大肠杆菌	37	11.34±0.22	12.32±0.16
金黄色葡萄球菌	37	13.04±0.20	12.56±0.16
枯草芽孢杆菌	30	11.32±0.18	12.18±0.20
蜡状芽孢杆菌	30	10.26±0.14	14.08±0.12
普通变形球菌	30	14.68±0.08	12.56±0.14
谷氨酸棒状杆菌	30	11.94±0.16	11.80±0.10
乙型副伤寒杆菌	30	10.38±0.12	8.68±0.10
绿脓芽孢杆菌	35	11.50±0.16	13.22±0.12

注:数据是 6 次试验的平均值。

2.2 不同浓度发酵上清液的抑菌效果

由表 2 可看出:发酵液的浓度越高,抑菌能力越强。

表 2 不同浓度发酵液的抑菌圈直径

Table 2 Diameter of inhibition zone of different concentration of fermentation liquid

稀释倍数/n	Bt185 发酵上清液/mm	HD-1 发酵上清液/mm
0*	15.26±0.12	14.86±0.10
1	14.49±0.18	13.48±0.14
2	13.95±0.16	13.43±0.22
3	12.95±0.20	11.33±0.28
4	13.01±0.18	12.60±0.16
5	10.04±0.20	9.54±0.24
6	10.17±0.26	9.46±0.30
7	9.09±0.12	9.16±0.18
8	—	—
9	—	—
10	—	—

注:* 指发酵液是浓缩 10 倍的样品,指示菌为草生欧文氏杆菌。

2.3 发酵上清液稳定性

2.3.1 温度对发酵上清液稳定性的影响 由图 1 可知,Bt185 和 HD-1 发酵上清液均具有较高的热稳定性,50℃以上,抑菌圈明显变小,即抑菌物质逐渐失活,80℃以上,几乎没有抑菌。以上实验结果说明,Bt185 和 HD-1 发酵上清液在低于 50℃时,热稳定性较好。

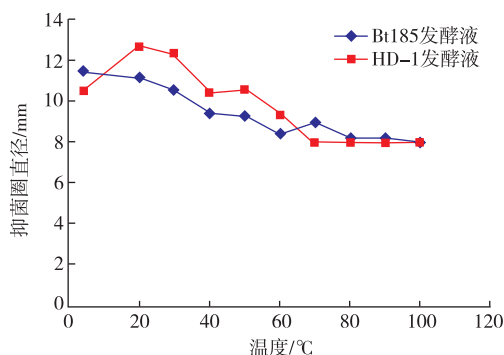


图 1 发酵液温度稳定性

Fig. 1 Fermentation liquid temperature stability

2.3.2 pH 对发酵上清液稳定性的影响 由图 2 可见,在酸性环境中,发酵上清液的抑菌活性较稳定;在碱性环境中,抑菌活性有明显下降,当发酵上清液 pH=10 时,几乎没有抑菌活性,将发酵上清液调回 pH<9 时,抑菌物质失活,没有抑菌性。由此可以得出在发酵上清液处理时,应该保持在 pH 3~9 的条件。

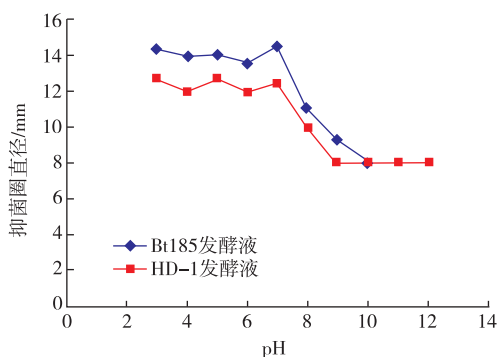


图 2 发酵液酸碱稳定性

Fig. 2 Fermentation liquid acid-base stability

2.3.3 超声作用对发酵上清液的影响 由图 3 可见,在超声波不断刺激的条件下,Bt185 菌株和 HD-1 菌株发酵上清液的抑菌活性下降,说明 Bt185 和 HD-1 发酵上清液在超声波的条件下稳定性较差,在连续超声 3.5 h 后,发酵上清液对草生欧文氏杆

菌几乎没有抑制性。

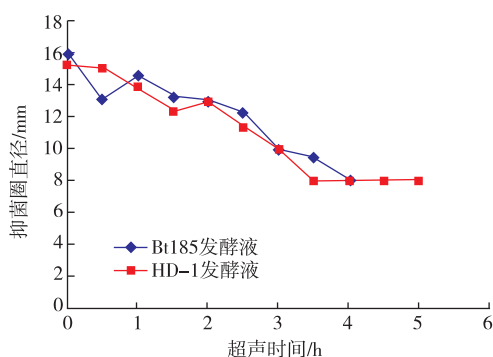


图3 发酵液超声稳定性

Fig. 3 Fermentation liquid ultrasonic stability

2.3.4 紫外光照对发酵上清液稳定性的影响 由图4可见,Bt185和HD-1发酵上清液对紫外光具有较好的稳定性,经过紫外光连续照射150 min,发酵上清液仍有较高的抑菌活性。

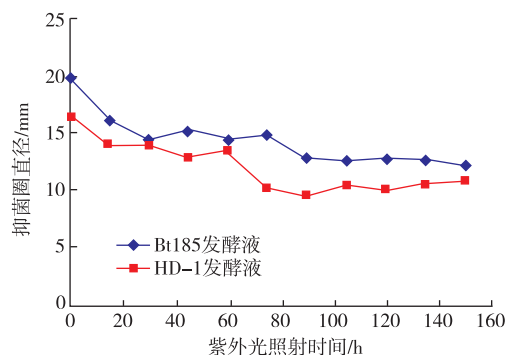


图4 发酵液紫外光照射稳定性

Fig. 4 Fermentation liquid UV irradiation stability

2.4 有机试剂萃取

由表3可看出,Bt185发酵上清原液石油醚、正丁醇、乙酸乙酯、三氯甲烷的萃取相的抑制圈直径明显比萃取相都大,与原液相比就不是很明显。原液的抑菌圈直径比四氯化碳和异戊醇萃取相及萃取相都明显大。因此可得知Bt185发酵液的大多数抑菌活性物质为弱极性物质。

表3 发酵上清液萃取后各相的抑菌圈直径

Table 3 Inhibition zone diameter of each phase after extraction of fermentation broth

	原液		有机试剂		萃取相		萃取相	
	Bt185	HD-1	Bt185	HD-1	Bt185	HD-1	Bt185	HD-1
石油醚	16.74±0.22	21.55±0.16	——	——	14.08±0.24	16.48±0.12	17.12±0.18	16.82±0.08
四氯化碳	15.76±0.20	21.48±0.24	——	——	14.17±0.14	14.96±0.18	14.32±0.18	18.56±0.16
正丁醇	17.16±0.12	20.68±0.20	+++	+++	12.23±0.26	15.40±0.12	17.34±0.20	20.72±0.12
乙酸乙酯	16.65±0.08	21.18±0.24	——	——	13.64±0.20	19.34±0.14	16.86±0.14	17.42±0.20
三氯甲烷	17.86±0.14	21.18±0.20	——	——	16.36±0.18	16.18±0.16	18.34±0.12	18.30±0.10
异戊醇	17.16±0.10	21.26±0.24	+++	+++	11.15±0.08	19.68±0.20	15.18±0.14	21.46±0.12

注:——为没有抑菌圈;+++为抑菌圈为大面积。

HD-1发酵液原液的抑菌性明显比萃取相和萃取相的抑菌性大,其中石油醚、四氯化碳、正丁醇、三氯甲烷和异戊醇的萃取相的抑制圈直径比萃取相都大,而乙酸乙酯的萃取相的抑制圈明显比萃取相大。因此可得知HD-1发酵液的大多数抑菌活性物质为极性物质。

3 结 语

通过本研究发现,Bt185、HD-1菌株发酵上清液抑菌活性均具有进一步研究开发的价值。发酵上清液对种供试细菌均有不同程度的抑制作用,对草生欧文氏杆菌的抑制作用最强。为了得到高浓度的

抑菌活性物质,应该浓缩更高的倍数,然后进一步纯化得到纯品。

Bt185、HD-1菌株发酵液稳定性研究表明,避免高温处理;适宜的pH范围较广但不耐碱;连续超声的条件下,时间要控制在2 h内,抑菌物质才不易被破坏;紫外照射条件下影响不大,活性成分较为稳定。Bt185菌株发酵液的抑菌性物质为弱极性物质,可以随着萃取试剂萃取出来,而HD-1菌株发酵液的抑菌性物质为极性物质,不易萃取,下一步需验证不同菌株产生的抑菌物质是否为同一种结构。Bt185菌株的各项稳定性都要优于HD-1菌株,工业化生产中有一定的优势。

参考文献:

- [1] LIU Gangyi. Plant protection research institute[J]. **Journal of Shaoyang University**, 2003, 2(2): 21-23. (in Chinese)
- [2] QIU Dewen. Research progress and prospect of bio-pesticides[J]. **Plant Protection**, 2013, 39(5): 81-89. (in Chinese)
- [3] YU Xiulian, LIU Xin, WAN Zhongyi, et al. Bioactive substance from fermentation supernatant of *Bacillus thuringiensis* [J]. **Journal of Microbiology**, 2007, 27(3): 69-72. (in Chinese)
- [4] ROSS M, LIU Y H, DEBBIE G. Purification of Vip3Aa from *Bacillus thuringiensis* HD-1 and it's contribution to toxicity of HD-1 to spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) and gypsy moth (*Lymantria dispar*) (Lepidoptera) [J]. **Journal of Invertebrate Pathology**, 2008, 2: 166-172.
- [5] 宋晟. 苏云金杆菌 4.0718 新菌株与库斯塔克亚种 HD-1 菌株杀虫晶体蛋白的蛋白质组研究[D]. 长沙: 湖南大学, 2005.
- [6] 郭丽清. 苏云金芽孢杆菌中脂肽类抗生素 Iturin 的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2010.
- [7] QI Xufeng, SONG Jizhen, JE YEON HO, et al. Tobacco pest control with *Bacillus thuringiensis* [J]. **Tobacco Science & Technology**, 2006(4): 58-61. (in Chinese)
- [8] 吴佳. 苏云金芽孢杆菌毒杀松材线虫活性研究及线虫冷冻保存[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2001.
- [9] DONOVAN E, JOHNSON B O, MCGAUGHEY W H. Spore coat protein synergizes *Bacillus thuringiensis* crystal toxicity for the indianmeal moth (*Plodia interpunctella*) [J]. **Current Microbiology**, 1998, 36(5): 27-31.
- [10] SHOJI A, KATSUTOSHI O, LESLIE S I, et al. Synergism of the spore on insecticidal activity of δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* against the diamond back moth, (Lepidoptera: Yponomeutidae) is not observed at late stage in bioassay [J]. **Appl Entomol Zool**, 2000, 35(4): 589-591.
- [11] BISHOP A H, ROBINSON C V. *Bacillus thuringiensis* HD-1 Cry (-): development of a safe, non-insecticidal simulant for *Bacillus anthracis* [J]. **Journal of Applied Microbiology**, 2014: 654-662.
- [12] FENG Shuliang, WANG Rongyan, FAN Xiuhua, et al. A specific insecticidal activity against *Scarabaeoidae* larvae of *Bacillus thuringiensis* isolates [J]. **Chinese Journal of Biological Control**, 2000, 16(2): 74-77. (in Chinese)
- [13] JIAO Rui, FENG Shuliang, DONG Jianzhen, et al. Synergism between live spores of strain HBF-1 and HD-1 against *Helicoverpa armigera* and *Plutella xylostella* [J]. **Chinese Journal of Biological Control**, 2005, 21(4): 242-246. (in Chinese)
- [14] 刘心. 苏云金杆菌发酵上清液中生物活性物质的研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [15] QI Pingyan, FENG Wenzheng, MIAO Yong, et al. Technological characteristics in pretreatment of fermentation broth [J]. **Journal of Chemical Industry and Engineering**, 2000, 51(2): 198-202. (in Chinese)
- [16] HUANG Jian, LI Tianhua, CUI Yijiu, et al. Antimicrobial activity and stability of fermentation liquid from actinomycete H50 strain [J]. **Journal of Shenyang Agricultural University**, 2012, 43(3): 311-315. (in Chinese)
- [17] LIU Ruyun. Evaluation and comparison of several commonly used antibacterial test methods [J]. **Modern Enterprise Education**, 2013(7): 341-342. (in Chinese)
- [18] FENG Juntao, ZHANG Jintian, HAN Lirong, et al. Study of antimicrobial spectrum and stability of the fermentation broths produced by actinomycete strain HJ1-2 [J]. **Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica**, 2009, 18(6): 280-284. (in Chinese)
- [19] LIU Jiali, YANG Lan, CUI Jie, et al. Preliminary study on serum pharmacology of petroleum ether fraction in ethanol extract from Xiaoyao Powder based on UPLC-PDA [J]. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, 2013, 44(20): 2816-2822. (in Chinese)
- [20] SHEN Yehua, SUN Jun, ZHOU Mao lin, et al. A study on fermentation process of Bt-HD-1 in annulus-aifl reactor [J]. **Journal of Northwest University: Natural Science Edition**, 2001, 31(5): 396-398. (in Chinese)
- [21] ZHANG Hui, WU Daru, YOU Xiaojuan, et al. Evaluation of the antimicrobial properties of grape seed extract and its polyphenol components against oral pathogenic bacteria [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2013, 32(5): 551-555. (in Chinese)
- [22] HE Liang, MA Suyun, CHENG Junwen, et al. Review on bioactive components from medicinal fungus of *Paecilomyces cicadae* [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2012, 31(1): 8-16. (in Chinese)