

贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) MCCC 1A15695 抑菌蛋白分离纯化及应用研究

付欢¹, 李亚婷¹, 肖贵谦², 彭磊磊², 夏金梅², 邵宗泽², 曹军伟¹, 赖其良^{2*}

(1. 上海海洋大学海洋科学学院, 上海 201306;

2. 自然资源部第三海洋研究所、自然资源部海洋生物遗传资源重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 对虾“玻璃苗”病的暴发, 会导致对虾幼苗大批死亡, 给水产养殖带来巨大损失。利用本实验室最近鉴定的“玻璃苗”致病菌副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) vp-HL, 从海洋来源芽孢杆菌中筛选拮抗菌, 获得一株能够高效抑制 vp-HL 菌株的贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) MCCC 1A15695。经分离鉴定与活性测定, 其有效抑菌物质为蛋白类, 该蛋白抑菌谱较广, 对包括多种弧菌病原在内的 17 种病原微生物有抑制作用。经 Q Seharose Fast Flow 阴离子柱层析、聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 及液相色谱-质谱联用技术 (LC-MS) 分离纯化鉴定, 确定活性蛋白组分中的有效抑菌物质为枯草杆菌素 (subtilisin)、未知蛋白 (hypothetical protein) 及 α -淀粉酶 (Alpha-amylase)。蛋白类物质具有高生物安全性, 本研究为后续益生菌的开发利用提供了理论基础。

关键词: 海洋生物学; 贝莱斯芽孢杆菌; 抗菌蛋白; 抑菌谱; 弧菌; 玻璃苗

DOI: 10.3969/J.ISSN.2095-4972.20230531002

中图分类号: P735

文献标识码: A

文章编号: 2095-4972(2024)02-0217-09

随着我国水产养殖业的快速发展, 高密度的水产养殖模式带来巨大经济效益的同时也带来严重的病害问题^[1-2]。对虾养殖业的发展伴随着传染病的周期性暴发, 除已知病原体流行外, 新的病原体不断出现, 造成严重的生产损失^[3-4]。自 2019 年底以来, 我国多地虾场发生了一种新的对虾致死疾病, 通常被称为“玻璃苗”病。该病影响凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 6~12 日龄幼苗, 在出现异常个体后 24~48 h 内死亡率超过 90%^[1]。典型的临床体征包括消化道空, 肝胰脏苍白或无色, 病变动物呈半透明外观^[5]。2022 年 Yang 等确定该病致病病原菌为一种特殊的副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)^[1]。

海水无抗养殖是健康无公害养殖的重要内容。通过益生菌调控水质、抑制病原菌, 是无抗养殖的重要途径。亟待发掘海洋微生物资源, 用来缓解海水养殖业频繁面临的病害难题。为此, 在前期海洋微

生物资源研究基础上, 针对致“玻璃苗”弧菌新病原, 从实验室筛选获得的一批海洋来源芽孢杆菌 (*Bacillus* spp.)^[6-8] 中, 发现一株对“玻璃苗”病原弧菌具有高效拮抗作用, 经鉴定属于贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) MCCC 1A15695。

芽孢杆菌作为生防细菌, 被广泛应用于农作物、畜、禽、水产动物的病害防控^[9-10]。贝莱斯芽孢杆菌是芽孢杆菌属的一个种, 能够产生多种次级代谢产物, 具有广谱抑菌活性和促生长作用, 自发现以来已有不少文章报道其能够防治多种弧菌, 被广泛应用于动植物病害的生物防治^[11-12], 有良好的发展前景。研究发现, 贝莱斯芽孢杆菌在抑制副溶血弧菌、改善水质、提高对虾自身抵抗力方面具有良好效用^[13]。贝莱斯芽孢杆菌通过其分泌的多种抑菌活性物质, 如脂肽类物质、抗菌蛋白、聚酮化合物等拮抗病原微生物^[14]。王青华等从深海分离获得一株贝莱斯芽孢杆菌, 产生的活性物

收稿日期: 2023-05-31

资助项目: 科技部 2021 年科技基础资源调查专项 (2021FY100903)

作者简介: 付欢 (1998—), 女, 硕士研究生; E-mail: 1626458033@qq.com

* 通讯作者: 赖其良 (1981—), 男, 博士, 研究员; E-mail: laiqliang@tio.org.cn

质主要是抗菌蛋白,可以抑制多种水产来源病原菌^[15]。

为进一步评价海洋来源贝莱斯芽孢杆菌在抗“玻璃苗”弧菌病原方面的应用开发潜力,有必要研究其抑菌机制。为此,本研究对菌株 MCCC 1A15695 的抑菌物质进行了分离、鉴定,研究结果将为后续益生菌剂的开发利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

供试菌株:MCCC 1A15695,分离自福建省龙海市九龙江口红树林保护区,通过基因组测序鉴定为贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*),并保藏于中国海洋微生物菌种保藏管理中心(Marine Culture Collection of China, MCCC)。供试病原菌:副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*) vp-HL,分离自凡纳滨对虾幼苗;副溶血弧菌 MCCC 1A02609,分离自银鱼(*shirasu/whitebait*)食品中毒者;创伤弧菌(*V. vulnificus*) MCCC 1H00066 分离自人体血液;哈氏弧菌(*V. harveyi*) MCCC 1A00232 分离自浅水贝类;费氏弧菌(*V. furnissii*) MCCC 1K02662 分离自底层海水;河流弧菌(*V. fluvialis*) MCCC 1A02761 分离于底表水;拟态弧菌(*V. mimicry*) MCCC 1H00078 分离自人耳;非 I 型霍乱弧菌 [*V. cholerae* (Non-1)] MCCC 1A02608 和费氏另类弧菌(*Aliivibrio fischeri*) MCCC 1H00020 分离自海水;迟缓爱德华菌(*Edwardsiella tarda*) MCCC 1K00246 分离自大菱鲂(*Scophthalmus maximus*);大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) CICC 10302、铜绿假单胞杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*) CICC 10351、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*) CICC 10275、肠炎沙门氏菌(*Samomella enteritidis*) CICC 21482、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) CICC 10384 和白色假丝酵母菌(*Candida albicans*) CICC 1943 购自中国工业微生物菌种保藏管理中心;单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*) ATCC 19111 购自美国 ATCC 菌种保藏中心。

1.1.2 培养基

2216E 液体培养基(1 L):酵母膏 5.0 g、蛋白胨 10.0 g、牛肉膏 1.0 g、过滤海水, pH 7.0; TCBS 培养基(1 L):酵母浸粉 5.0 g、蛋白胨 10.0 g、硫代硫酸钠 10.0 g、枸橼酸钠 10.0 g、牛胆粉 5.0 g、牛胆酸钠 3.0 g、蔗糖 20.0 g、氯化钠 10.0 g、柠檬酸铁 1.0 g、溴麝香草酚兰 0.04 g、麝香草酚兰 0.04 g, pH 8.6。

1.2 方法

1.2.1 菌株发酵液制备及药敏实验测定

将贝莱斯芽孢杆菌 MCCC 1A15695 从 70% 甘油保存管中取出,划线于 2216E 琼脂平板上,28 ℃ 恒温培养箱培养 24 h;待菌落发育良好,用灭菌牙签挑取菌落转接于 2216E 液体培养基,后于摇床 28 ℃、150 r/min 震荡培养 72 h 得到发酵液。药敏实验测定:取活化的培养液制成 OD_{600} 为 0.4 的菌悬液,取 100 μ L 均匀涂布于 2216E 固体培养基上,无菌镊子取卡那霉素等 21 种浓度为 30 μ g/片的抗生素圆片均匀置于琼脂平板上,5 个为一组,28 ℃ 培养 24 h 后取出观察、记录药敏实验结果。

1.2.2 菌株发酵液抑菌物质提取

①抗菌粗蛋白提取:菌株发酵液 4 ℃、10 000 r/min 高速离心 10 min,取上清;4 ℃ 环境下加入硫酸铵,沉淀并过夜;上清 4 ℃、10 000 r/min 离心 20 min,弃上清,收集沉淀;蒸馏水复溶沉淀,4 ℃ 环境下于 3 000 Da 透析袋中除盐;透析完成后冻干。②脂肽提取:发酵液于 4 ℃、8 000 r/min 高速离心 15 min,收集上清;上清调至 pH 为 2,静置过夜;过夜上清 10 000 r/min 高速离心 10 min,收集沉淀;甲醇复溶,超声处理 15 min;上清旋蒸至干即得脂肽粗提物。③乙酸乙酯提取物:发酵液 4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min,取上清;上清调至 pH 为 2,加入等体积乙酸乙酯超声 20 min,分液漏斗分离水相、有机相,取上部分有机相,4 ℃ 环境静置 10 h;上清旋蒸至干即得粗提物。④多糖提取:取无水乙醇 1:1 比例缓慢添加到发酵液中,搅拌均匀,4 ℃ 环境静置过夜,后取出在 4 ℃ 环境、6 300 r/min 条件下离心 15 min,收集沉淀,即为多糖粗提物。

1.2.3 抗菌粗蛋白相关性测定

①硫酸铵分级沉淀:菌株发酵液高速离心取上清,后分别进行 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 饱和度的硫酸铵沉淀,经离心取沉淀得到不同饱和度的抗菌粗蛋白。②抗菌粗蛋白最小抑菌浓度测定:将制得的抗菌粗蛋白配制成浓度分别为 5、10、30、50、80、100 mg/mL 的蛋白溶液,以菌株 vp-HL 为指示病原菌,打孔法(孔径均为 9 mm)检测抑菌效果、确定最小抑菌浓度。③抗菌粗蛋白稳定性测定:配制浓度为 80 mg/mL 的抗菌粗蛋白溶液,并做以下 4 个方面的处理。抗菌粗蛋白溶液分别在 15、28、37、45、60、80、100 ℃ 环境下处理 60 min;将抗菌粗蛋白溶液调至 pH 分别为 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0 及 13.0;抗菌粗蛋白溶液

用紫外分别照射 0.0、0.5、1.0、2.0、3.0 h;取 100 μL 抗菌粗蛋白溶液用 20 mol/L 的蛋白酶 K 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 环境下孵育 60 min,将未处理的抗菌粗蛋白溶液作为对照。以副溶血弧菌 vp-HL 为指示病原菌,将上述经过处理的抗菌粗蛋白溶液各取 100 μL 进行抑菌活性检测。④抗菌粗蛋白抑菌谱测定:选取“1.1.1”所列的 17 株不同病原菌作为指示菌,分别制成 OD_{600} 为 0.4 的菌悬液,取 100 μL 均匀涂布于 2216E 固体培养基上,各取 100 μL 菌株发酵液及 80 mg/mL 的粗蛋白溶液,打孔法分别检测其对不同病原菌的拮抗作用。

1.2.4 抗菌蛋白分离纯化及鉴定

①弱阴离子交换层析:Q Seharose Fast Flow 柱装柱、上样^[15],上样量为 1 g/7 mL,蒸馏水洗脱,流速为 2 mL/min。用蒸馏水及分别含 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mol/L NaCl 的 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液梯度洗脱,流速为 2 mL/min。分别收集 7 个组分,旋蒸浓缩,超纯水复溶后透析脱盐、冻干。②抗菌蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE):将活性组分经浓缩处理后离心取上清进行 SDS-PAGE,选用 10%分离胶和 5%浓缩胶,电泳结束后用考马斯亮蓝染色液将蛋白胶染色 30 min,后用脱色液在脱色摇床上脱色,直至蛋白条带清晰可见。③考染条带质谱鉴定:考染条带反复脱色,加入胰蛋白酶酶解,水浴过夜。酶解后取上清加萃取液后离心浓缩干燥,待做质谱分析。配制流动相 A(0.1%甲酸/水)及流动相 B(80%乙腈,0.1%甲酸)并进行 LC-MS 分析。溶解后的样品上样 2 μL 到预柱上,冲洗脱盐,再经反相色谱柱分离。④SDS-PAGE 回收抑菌蛋白及抑菌活性检测:首先进行 SDS-PAGE 检测抗菌蛋白,而后用无菌刀片切下目的蛋白所在的凝胶条带,蒸馏水水析蛋白,反复抽提后冻干。回收冻干蛋白用蒸馏水配制成浓度为 30 mg/mL 的蛋白溶液,以 vp-HL 为指示病原菌,每组设置 3 个重复,分别进行抑菌活性检测。

2 结果与分析

2.1 药敏试验结果

将培养处理后的药敏试验平板取出,观察菌株拮抗抗生素的活性,并及时测量、记录抑菌圈大小(表 1)。结果表明,菌株 MCCC 1A15695 只对甲硝唑、四环素和多粘菌素 B 不敏感,对大多数抗生素如氨卡西林、万古霉素、卡那霉素及多西环素等敏感,不存在耐药性。

表 1 菌株 MCCC 1A15695 药敏试验结果

Tab. 1 Susceptibility test results of strain MCCC 1A15695 to various antibiotics

抗生素	抑菌圈直径/mm	抗生素	抑菌圈直径/mm
氨卡西林	26.3 \pm 1.5	头孢氨苄	29.7 \pm 1.5
万古霉素	23.3 \pm 1.5	多粘菌素 B	0.0 \pm 0.0
卡那霉素	19.3 \pm 1.2	甲硝唑	0.0 \pm 0.0
多西环素	15.3 \pm 1.5	环丙沙星	21.3 \pm 1.5
青霉素	26.7 \pm 1.5	苯唑西林	22.3 \pm 1.2
新霉素	19.7 \pm 1.5	红霉素	28.0 \pm 1.0
头孢曲松	30.3 \pm 1.5	四环素	0.0 \pm 0.0
利福平	19.3 \pm 1.2	丁胺卡那	17.7 \pm 1.5
链霉素	11.7 \pm 1.5	庆大霉素	20.0 \pm 1.0
氯霉素	27.3 \pm 1.2	新生霉素	27.0 \pm 1.0
米诺环素	20.7 \pm 2.1		

2.2 粗蛋白、脂肽、小分子化合物、多糖的抑菌活性分析

研究发现,不同菌株所产的有效抑菌代谢产物包括抗菌蛋白、脂肽、小分子化合物、多糖等多种不同类型。本研究将菌株 MCCC 1A15695 的 2216E 液体培养基发酵液分别制备粗蛋白、脂肽、小分子化合物和多糖。经打孔法检测其抑制副溶血弧菌 vp-HL 的活性,并与菌株发酵液的抑菌效果进行对比。结果发现制备的粗蛋白具有抑制副溶血弧菌 vp-HL 作用,抑菌圈直径达到了(31.0 \pm 3.6) mm,发酵液抑菌圈直径则稳定在(28.3 \pm 1.5) mm。而制备的脂肽、小分子化合物和多糖则均未检测到抑菌活性。

2.3 菌株抗菌粗蛋白相关特性分析

2.3.1 最佳硫酸铵饱和度确定

将菌株 MCCC 1A15695 发酵液进行不同饱和度和硫酸铵沉淀,获得的蛋白用打孔法检测其抑制副溶血弧菌 vp-HL 的活性。各级硫酸铵饱和度获得的粗蛋白具体的抑菌圈大小如图 1 所示,经 70% 饱和度的硫酸铵沉淀得到的粗蛋白抑菌效果最好,其他不同饱和度的硫酸铵沉淀制得的粗蛋白抑菌效果相对较弱。

2.3.2 抗菌粗蛋白最小抑菌浓度测定

经抑菌检测发现,在一定的浓度范围内,粗蛋白的抑菌活性呈现浓度依赖的特点(图 2)。当粗蛋白浓度为 5 mg/mL 时,已经具有抑制副溶血弧菌 vp-

HL 的微弱效果,当浓度达到 30 mg/mL 以上时,已具有较好的抑菌活性,而当粗蛋白浓度达到 80 mg/mL 时,粗蛋白抑菌活性达到最大。

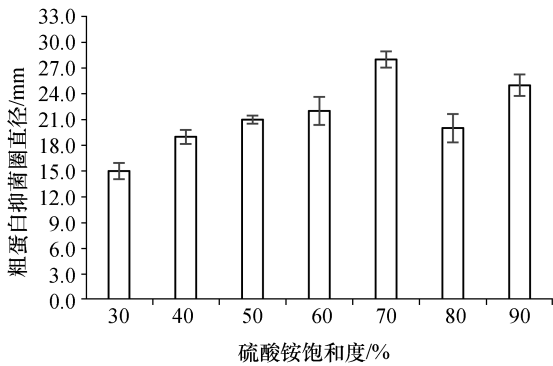


图 1 不同硫酸铵饱和度获得的菌株 MCCC 1A15695 抗菌蛋白的抑菌圈

Fig. 1 Antibacterial protein inhibition zone obtained from strain MCCC 1A15695 with different ammonium sulfate saturation

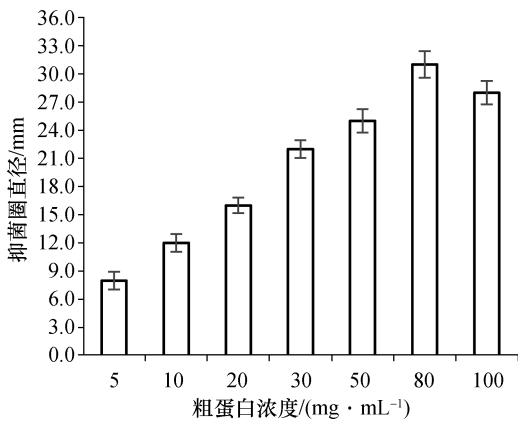


图 2 菌株 MCCC 1A15695 不同浓度抗菌粗蛋白的抑菌圈

Fig. 2 Antibacterial protein inhibition zone obtained from strain MCCC 1A15695 with different concentration

2.3.3 抗菌粗蛋白稳定性实验结果分析

图 3 为抗菌粗蛋白分别经不同温度、pH 及紫外光照射处理后的抑菌圈大小。根据粗蛋白稳定性实验结果,粗蛋白溶液在分别经 15~100 °C 不同温度处理后仍有较好的抑菌活性[图 3(a)]。粗蛋白在 pH 值为 3~12 的条件下均有较好的抑菌活性,其中 pH 值为 8 的条件下抑菌活性最好,pH 值为 2 的情况下抑菌活性有所下降,当 pH 值达到 13 的时候,粗蛋白丧失其抑菌活性[图 3(b)]。粗蛋白在经紫外光分别照射不同时长后仍具有稳定的抑菌活性[图 3(c)]。抗菌粗蛋白在经蛋白酶 K 孵育后,粗蛋白抑菌圈直径(30.3±2.0)mm 与未经处理的粗蛋白抑菌圈直径(29.0±1.0)mm 相当。

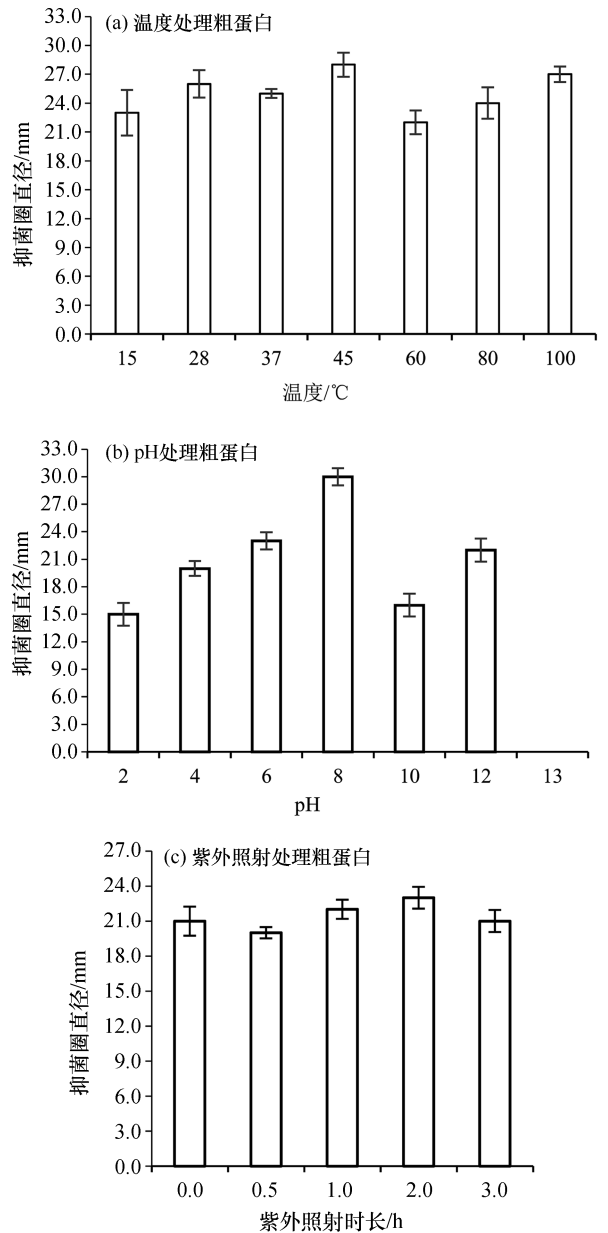


图 3 温度、pH、紫外照射对 MCCC 1A15695 抗菌粗蛋白抑菌活性的影响

Fig. 3 Inhibition zone for strain MCCC 1A15695 crude protein under the treatments of different temperatures, different pH and different duration of ultraviolet irradiation

2.3.4 抗菌粗蛋白抑菌谱

用打孔法检测菌株 MCCC 1A15695 发酵液及粗蛋白对 17 株不同病原菌的拮抗效果。发酵液和粗蛋白对不同病原菌的具体抑菌圈数据如表 2 所示,菌株粗蛋白具有广泛的抑菌谱,对 17 种病原菌都具有一定程度的抑菌活性,与发酵液抑菌活性也基本一致。其中,对副溶血弧菌 vp-HL、河流弧菌及迟缓爱德华菌的抑制效果比较好,抑菌圈直径都达到 25.0 mm 以上;对费氏另类弧菌、拟态弧菌及铜绿假

单胞杆菌的抑制效果相对其他 14 种病原菌较差,抑菌圈直径基本都在 18.0 mm 以下。

表 2 菌株 MCCC 1A15695 发酵液及粗蛋白抑菌谱

Tab. 2 Fermentation broth and crude protein inhibitory spectra of strain MCCC 1A15695

病原菌	发酵液抑菌圈直径/mm	粗蛋白抑菌圈直径/mm
副溶血弧菌 MCCC 1A02609	26.3±1.5	13.3±1.5
创伤弧菌 MCCC 1H00066	26.3±1.5	26.3±1.5
哈氏弧菌 MCCC 1A00232	19.3±1.5	17.3±1.5
副溶血弧菌 vp-HL	27.7±1.5	29.0±1.0
费氏弧菌 MCCC 1K02662	17.7±0.6	14.7±1.5
河流弧菌 MCCC 1A02761	28.3±1.5	26.3±1.5
拟态弧菌 MCCC 1H00078	10.7±1.5	9.7±1.5
非 I 型霍乱弧菌 MCCC 1A02608	16.0±1.0	15.3±0.6
费氏另类弧菌 MCCC 1H00020	12.0±1.0	15.3±1.5
大肠埃希氏菌 CICC 10302	17.7±1.5	16.0±1.0
铜绿假单胞杆菌 CICC 10351	12.0±1.0	16.7±1.5
枯草芽孢杆菌 CICC 10275	20.0±1.0	13.3±1.5
肠炎沙门氏菌 CICC 21482	16.7±1.5	20.0±1.0
单核细胞增生李斯特菌 ATCC 19111	20.0±1.0	16.3±1.5
金黄色葡萄球菌 CICC 10384	21.3±1.5	26.3±1.5
迟缓爱德华菌 MCCC 1K00246	30.3±1.5	25.7±1.2
白色假丝酵母菌 CICC 1943	21.3±1.5	17.3±0.6

2.4 抗菌蛋白的分离、纯化及鉴定

2.4.1 抗菌蛋白阴离子柱层析结果分析

将缓冲液梯度洗脱下来的 7 个组分旋蒸、脱盐、冻干的粉末配制置成浓度为 50 mg/mL 的溶液,以菌株 vp-HL 为指示病原菌,打孔法检测抑菌活性。实验结果表明用超纯水(DDW)及含 0.2 mol/L NaCl 的 10 mmol/L 的 Tris-HCl 洗脱组分抑菌活性最好,其抑菌圈直径分别达到了(15.3±1.5)、(26.7±1.2)、(27.3±1.5) mm,即为目标抑菌物质所在组分;而含 0.4、0.6、0.8、1.0 mol/L NaCl 的 10 mmol/L 的 Tris-HCl 洗脱组分均没有抑菌活性,即不含抑菌物质。

2.4.2 抗菌活性粗蛋白 SDS-PAGE 分析

将具有抑菌活性的 DDW 和含 0.2 mol/L NaCl 的 10 mmol/L Tris-HCl 3 个洗脱组分进行 SDS-PAGE 检测,共检测到 5 条不同的条带,其分子大小分别约为 27、30、35、38、40 kDa。

2.4.3 粗蛋白主要组分的液质联用质谱鉴定

将电泳条带回收后进行质谱鉴定,回收蛋白胶条返回的氨基酸序列与基因组数据检索比对,初步推测其为 3 种抑菌物质,其中条带 1 和条带 2 检测为 α -淀粉酶(Alpha-amylase),条带 3 检测为未知蛋白(hypothetical protein),条带 4 和条带 5 检测为枯草杆菌素(subtilisin),且此 3 种物质成分检测出的分子量大小分别为 54 077、44 038、39 117 Da。

2.4.4 抗菌活性粗蛋白主要组分的抑菌活性测定

将回收的蛋白与电泳胶条作对照,根据抑菌检测结果,回收的 3 种蛋白即枯草杆菌素、未知蛋白及 α -淀粉酶均具有较好的拮抗副溶血弧菌 vp-HL 效果,其抑菌圈直径分别达到了(27.0±1.0)、(25.7±0.6)、(28.3±0.6) mm,而不含蛋白成分的空白对照电泳胶条均没有抑菌活性(图 4)。说明该 3 种蛋白对 MCCC 1A15695 的副溶血弧菌拮抗活性有贡献,甚至可能有协同增效作用。

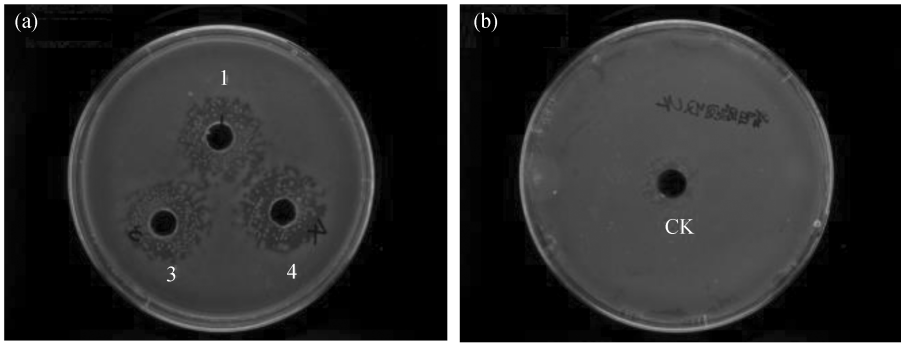


图 4 MCCC 1A15695 抗菌活性粗蛋白 3 个主要组分的抑菌活性测定

Fig. 4 Antibacterial inhibition zone of the substances recovered from the electrophoresis adhesive band

(a) 1, 3, 4 为条带 1, 3, 4 回收的蛋白组分抑菌圈, (b) CK 为不含蛋白成分的空白对照电泳胶条抑菌圈。

3 讨论

畜牧业及水产养殖业的抗生素滥用对健康养殖构成巨大危害^[16-18]。益生菌因其能够产生有效抑菌物质,且生态、经济和社会效益优异,受到诸多学者关注^[19-21]。芽孢杆菌因其发酵生产性能好等优点被广泛关注与开发利用。例如,在水产养殖应用方面,一些芽孢杆菌被开发为益生菌制剂应用于对虾养殖,以提高对虾的存活率,前人将芽孢杆菌作为益生菌投喂给对虾后,发现对虾存活率显著提高^[22-23]。

贝莱斯芽孢杆菌总体研究报道不多,抑菌机制有待深入研究。Trinh 等曾报道,贝莱斯芽孢杆菌可拮抗疫霉菌(*Phytophthora*)^[24]。Yi 等则发现该菌可拮抗嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)^[25]。此外,Zhang 等发现该菌可抑制哈氏弧菌^[26],Li 等也发现该菌可有效抑制溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)^[27]。本研究中贝莱斯芽孢杆菌 MCCC 1A15695 也展现了优异的拮抗多种病原菌的能力,且能够显著提高感染病原菌的对虾存活率。抑菌活性分析发现,菌株产的粗蛋白能抑制多种病原菌,除“玻璃苗”病原外,还包括哈氏弧菌、创伤弧菌、河流弧菌、迟缓爱德华菌、非 I 型霍乱弧菌、铜绿假单胞杆菌及白色假丝酵母菌等病原菌。相关研究将为水产养殖行业对虾“玻璃苗”疾病控制提供抗生素替代方案。

采用酸沉淀、硫酸铵沉淀及有机溶剂萃取等方法,对贝莱斯芽孢杆菌 MCCC 1A15695 进行不同抑菌物质提取,经“玻璃苗”病原抑菌活性检测,确定

其有效抑菌物质为蛋白类。抑菌谱检测显示,可有效抑制副溶血弧菌、创伤弧菌、哈氏弧菌及河流弧菌等多种病原。经硫酸铵分级沉淀后发现粗蛋白的最佳硫酸铵饱和度为 70%,这与姜威等研究的芽孢杆菌 Hg18 盐析粗蛋白最佳硫酸铵饱和度 50%^[28]有一定差异,与王青华等研究的贝莱斯芽孢杆菌 DH82 盐析粗蛋白所需的硫酸铵最佳饱和度^[15]一致。经过分离纯化及数据比对,初步推测 MCCC 1A15695 具体的抑菌物质成分为枯草杆菌素、未知蛋白及 α -淀粉酶。李津津等经系统分离纯化及全基因组数据比对,发现芽孢杆菌 DH8403 产生的有效抑菌物质为 subtilisin L,且能有效抑制蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)^[29]。Fakhoury 等发现一种分子量为 36 kDa 的 α -淀粉酶竞争性抑制剂,能抑制包括黄曲霉(*Aspergillus flavus*)在内的几种真菌^[30]。这些与本研究发现的贝莱斯芽孢杆菌 MCCC 1A15695 有效抑菌蛋白成分枯草杆菌素及 α -淀粉酶相一致。此外,本研究还分离得到一种未知活性蛋白,对其抑菌机制等相关研究还有待进一步深入。

4 结论

经抑菌物质分离鉴定与抑菌活性测定,发现贝莱斯芽孢杆菌 MCCC 1A15695 的有效抑菌物质为抗菌蛋白。该活性粗蛋白抑菌谱广、对 17 株不同的病原菌均具有拮抗能力。经质谱鉴定,分离纯化的抑菌物质为枯草杆菌素、未知蛋白、 α -淀粉酶。研究结果为贝莱斯芽孢杆菌作为“玻璃苗”病原等对虾病害防控的益生菌开发利用提供了参考。

参考文献:

- [1] YANG F, XU L M, HUANG W Z, et al. Highly lethal *Vibrio parahaemolyticus* strains cause acute mortality in *Penaeus vannamei* post-larvae [J]. *Aquaculture*, 2022, 548: 737605.
- [2] JIAO L F, DAI T M, ZHONG S Q, et al. *Vibrio parahaemolyticus* infection influenced trace element homeostasis, impaired antioxidant function,

- and induced inflammation response in *Litopenaeus vannamei*[J]. Biological Trace Element Research, 2021, 199(1): 329-337.
- [3] 孙美超,曹梅,王兴强,等. 凡纳滨对虾病毒性疾病及其防治措施[J]. 现代农业科技, 2022(3): 205-210.
SUN M C, CAO M, WANG X Q, et al. Viral diseases of *Litopenaeus vannamei* and its prevention and control measures[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2022(3): 205-210.
- [4] 翁祖凤. 益生菌对南美白对虾生长性能的影响研究[J]. 河南水产, 2022(1): 21-22.
WENG Z F. Effects of probiotics on the growth performance of *Penaeus vannamei*[J]. Henan Fisheries, 2022(1): 21-22.
- [5] JIAO L F, DAI T M, ZHONG S Q, et al. *Vibrio parahaemolyticus* infection impaired intestinal barrier function and nutrient absorption in *Litopenaeus vannamei*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 99: 184-189.
- [6] 郑娜,黄典,邵宗泽,等. 深海独岛枝芽孢杆菌 1A00493 杀根结线虫活性物质研究[J]. 化学与生物工程, 2017, 34(5): 21-27.
ZHENG N, HUANG D, SHAO Z Z, et al. Nematicidal active substance produced by deep-sea *Virgibacillus dokdonensis* 1A00493[J]. Chemistry & Bioengineering, 2017, 34(5): 21-27.
- [7] 邵宗泽,王丽萍. 高空芽孢杆菌在对虾养殖中的应用: CN103497907A[P]. 2014-01-08.
SHAO Z Z, WANG L P. Application of *Bacillus altitudinis* in prawn culture: CN103497907A[P]. 2014-01-08.
- [8] 邵宗泽,王丽萍,单大鹏,等. 短小芽孢杆菌在对虾养殖中的应用: CN103602608A[P]. 2014-02-26.
SHAO Z Z, WANG L P, SHAN D P, et al. Application of *Bacillus pumilus* in prawn culture: CN103602608A[P]. 2014-02-26.
- [9] 江宇琪,李仲玄,温雪瓶,等. 贝莱斯芽孢杆菌在畜禽养殖中的应用研究进展[J]. 饲料研究, 2022, 45(24): 142-146.
JIANG Y Q, LI Z X, WEN X P, et al. Research progress on application of *Bacillus velezensis* in livestock and poultry breeding[J]. Feed Research, 2022, 45(24): 142-146.
- [10] 郝爽,张振国,尤宏争,等. 复合益生菌对凡纳滨对虾肠道菌群结构的影响[J]. 水产科学, 2022, 41(4): 597-604.
HAO S, ZHANG Z G, YOU H Z, et al. Effects of compound probiotics on intestinal microflora of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Fisheries Science, 2022, 41(4): 597-604.
- [11] 迟惠荣. 多花黄精叶枯病病原菌鉴定及贝莱斯芽孢杆菌防病促生效果研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2019.
CHI H R. The study on the pathogen identification of the leaf blight of *Polygonatum cyrtoneuma* Hua and the plant growth promotion and biocontrol effect of *Bacillus velezensis*[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2019.
- [12] 赵宇,安陈宛玉,马艾佳,等. 新型有益菌贝莱斯芽孢杆菌的特性及其在养殖业中的应用研究进展[J]. 饲料研究, 2023, 46(4): 138-142.
ZHAO Y, AN C W Y, MA A J, et al. Research progress on characteristics of new beneficial bacteria *Bacillus velezensis* and its application in aquaculture[J]. Feed Research, 2023, 46(4): 138-142.
- [13] 樊英,王晓璐,王友红,等. 益生菌制剂和抗生素对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)非特异性免疫及肠道微生物的影响比较[J]. 中国农学通报, 2020, 36(33): 138-146.
FAN Y, WANG X L, WANG Y H, et al. Probiotics and antibiotic: effects on non-specific immune and intestinal microbe in *Litopenaeus vannamei*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2020, 36(33): 138-146.
- [14] 张德锋,高艳侠,王亚军,等. 贝莱斯芽孢杆菌的分类、拮抗功能及其应用研究进展[J]. 微生物学通报, 2020, 47(11): 3 634-3 649.
ZHANG D F, GAO Y X, WANG Y J, et al. Advances in taxonomy, antagonistic function and application of *Bacillus velezensis*[J]. Microbiology China, 2020, 47(11): 3 634-3 649.
- [15] 王青华,唐旭,孙晓晖,等. 深海贝莱斯芽孢杆菌 DH82 的抑菌活性物质初步分离纯化及其抑菌谱检测[J]. 应用海洋学学报, 2020, 39(1): 20-26.
WANG Q H, TANG X, SUN X H, et al. Purification of antimicrobial substance produced by deep sea *Bacillus velezensis* strain DH82 and its inhibition spectrum[J]. Journal of Applied Oceanography, 2020, 39(1): 20-26.
- [16] 李佳骏,张秀霞,冼健安,等. 芽孢杆菌在水产养殖中的应用研究进展[J]. 现代畜牧科技, 2023(4): 63-66.
LI J J, ZHANG X X, XIAN J A, et al. Research progress of application of *Bacillus* in aquaculture[J]. Modern Animal Husbandry Science & Technology, 2023(4): 63-66.
- [17] 尉婧,王碧香,李诗瑶,等. 贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)的研究进展[J]. 天津农学院学报, 2022, 29(4): 86-91.
YU J, WANG B X, LI S Y, et al. Advances in the study of *Bacillus velezensis*[J]. Journal of Tianjin Agricultural University, 2022, 29(4): 86-91.
- [18] 赵雅. 贝莱斯芽孢杆菌 HN-Q-8 抑制马铃薯黑痣病菌活性物质研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2020.
ZHAO Y. Antifungal substances produced by *Bacillus velezensis* HN-Q-8 inhibiting *Rhizoctonia solani* in potato[D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2020.
- [19] YAN X, ZHOU Y X, TANG X X, et al. Macrolactins from marine-derived *Bacillus subtilis* B5 bacteria as inhibitors of inducible nitric oxide and cytokines expression[J]. Marine Drugs, 2016, 14(11): 195.
- [20] 张婷婷,马贵龙,谢晓宝,等. 贝莱斯芽孢杆菌 SX-45 提取物对人参根腐病菌抑菌机理研究[J]. 中国农学通报, 2022, 38(33): 124-131.
ZHANG T T, MA G L, XIE X B, et al. Extract of *Bacillus velezensis* SX-45: the antifungal mechanism against *Fusarium oxysporum* of ginseng [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2022, 38(33): 124-131.
- [21] RABBE E M F, ALI M S, CHOI J, et al. *Bacillus velezensis*: a valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes[J]. Molecules, 2019, 24(6): 1046.
- [22] 练小军,朱开玲,张庆起,等. 饲料添加益生菌对多病原阳性的凡纳滨对虾生长与存活的影响[J]. 渔业科学进展, 2020, 41(2): 121-

130.

LIAN X J, ZHU K L, ZHANG Q Q, et al. Effects of probiotics-supplemented diets on the growth and survival of *Litopenaeus vannamei* carrying multiple pathogens[J]. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(2): 121-130.

[23] 王春迪. 凡纳滨对虾防病益生菌的筛选和效果评价[D]. 上海: 上海海洋大学, 2016.

WANG C D. Screening and evaluation of potential probiotics against disease in *Litopenaeus vannamei*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016.

[24] TRINH T H T, WANG S L, NGUYEN V B, et al. A potent antifungal rhizobacteria *Bacillus velezensis* RB.DS29 isolated from black pepper (*Piper nigrum* L.)[J]. Research on Chemical Intermediates, 2019, 45(11): 5 309-5 323.

[25] YI Y L, ZHANG Z H, ZHAO F, et al. Probiotic potential of *Bacillus velezensis* JW: antimicrobial activity against fish pathogenic bacteria and immune enhancement effects on *Carassius auratus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 78: 322-330.

[26] ZHANG D F, GAO Y X, KE X L, et al. *Bacillus velezensis* LF01: *in vitro* antimicrobial activity against fish pathogens, growth performance enhancement, and disease resistance against streptococcosis in *Nile tilapia* (*Oreochromis niloticus*)[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(21/22): 9 023-9 035.

[27] LI J, WU Z B, ZHANG Z, et al. Effects of potential probiotic *Bacillus velezensis* K2 on growth, immunity and resistance to *Vibrio harveyi* infection of hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus* ♂ × *E. fuscoguttatus* ♀)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 93: 1 047-1 055.

[28] 姜威, 马银鹏, 陆佳, 等. 生防甲基营养型芽孢杆菌 Hg18 抗菌蛋白的分离纯化及性质研究[J]. 化学与生物工程, 2021, 38(6): 35-39. JIANG W, MA Y P, LU J, et al. Separation, purification and characteristics of antibacterial protein produced by biocontrol *Bacillus methylotrophicus* Hg18[J]. Chemistry & Bioengineering, 2021, 38(6): 35-39.

[29] 李津津, 王伟, 陶乐仁, 等. 枯草杆菌素 Subtillicin L 的纯化鉴定及抑菌性质[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(18): 8-12.

LI J J, WANG W, TAO L R, et al. Purification, identification and antimicrobial characteristics of Subtillicin L produced by *Bacillus subtilis* DH8043[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(18): 8-12.

[30] FAKHOURY A M, WOLOSHUK C P. Inhibition of growth of *Aspergillus flavus* and fungal alpha-amylases by a lectin-like protein from *Lablab purpureus*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2001, 14(8): 955-961.

Isolation and purification of bacteriostatic protein from *Bacillus velezensis* MCCC 1A15695 and its application

FU Huan¹, LI Yating¹, XIAO Guiqian², PENG Leilei², XIA Jinmei²,
SHAO Zongze², CAO Junwei¹, LAI Qiliang^{2*}

(1. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of Marine Genetic Resources, Third Institute of Oceanography, MNR, Xiamen 361005, China)

Abstract: The outbreak of shrimp “glass post-larval disease” has led to a large number of diseases of shrimp larvae, bringing huge losses to aquaculture. Using the recently identified *Vibrio parahaemolyticus* vp-HL of the “glass post-larval disease” pathogen *Vibrio parahaemolyticus*, the antagonistic antibacterial screening of *Bacillus* of marine origin was carried out to obtain a strain of *Bacillus velezensis* MCCC 1A15695 that can effectively inhibit the strains MCCC 1A15695. After isolation and activity determination, the effective bacteriostatic substances were proteins, with a wide inhibitory spectrum, and had inhibitory effects on 17 pathogenic microorganisms, including a variety of *Vibrio* pathogens. After Q Seharose Fast Flow anion column chromatography, polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), the effective bacteriostatic substances in the active protein components were subtilisin, hypothetical protein and Alpha-amylase. In view of the high biosafety of proteins, the results provide a theoretical basis for the subsequent development and utilization of probiotics.

Key words: marine biology; *Bacillus velezensis*; antimicrobial protein; antibacterial spectrum; *Vibrio*; glass post-larval disease

DOI: 10.3969/J.ISSN.2095-4972.20230531002

* Corresponding author (E-mail: laiqiliang@tio.org.cn)

(责任编辑:肖 静)