

土壤芽孢杆菌及其资源的持续利用^①

张华勇 李振高

(中国科学院南京土壤研究所 南京 210008)

摘 要 本文简介了芽孢杆菌属的主要特征及其分类系统的发展历程;分析了土壤中芽孢杆菌资源的研究和利用现状并论述了芽孢杆菌属细菌在农业、科研、工业、医药等领域的研究、应用近况。

关键词 芽孢杆菌;资源;持续利用

芽孢杆菌属(*Bacillus*)是一类好氧和兼性厌氧、产生抗逆性内生孢子的杆状细菌。由于能够产生对热、紫外线、电磁辐射和某些化学药品有很强抗性的芽孢,可忍受各种不良环境,如可以在pH为2~3的地方生存,也可以在温度高达80℃甚至以上的地方生长,南极寒冷的冰雪中也能见到他们的踪迹^[1],在自然界分布较为广泛。芽孢杆菌属与人类关系极为密切,是越来越引起人们重视和研究的一个重要的微生物类群。

1 芽孢杆菌属的主要特征

Ford和他的合作者第一次尝试对好氧有芽孢细菌进行分类^[2]。1921年,Topley和Wilson在第一版的“Principes of Bacterigly and Immunity”把芽孢杆菌属定义为“好氧,产芽孢的杆菌,通常革兰氏染色反应为阳性”,此标准逐渐为后来者所接受。Gibson和Topping在1938年进一步明确了内生芽孢的形状、大小、位置作为不同分类单位的指标^[3]。

芽孢杆菌属的一个重要特征是好氧生长。最早在1907年就有人提出将此特性作为一个分类依据,但相当一段时间里仍然有部分检索表未采用“好氧生长”作为分类标准。事实上,本标准并非可有可无,因为不是所有产芽孢的杆状细菌都属于芽孢杆菌属;微好氧、不产生过氧化氢酶的产芽孢细菌被归入芽孢乳杆菌属(*Sporolactobacillus*);厌氧的产芽孢细菌则有可能为梭状芽孢杆菌属(*Clostridium*)中的一种^[4]。

能够产生芽孢是芽孢杆菌定属的首要特征。芽孢的发现和研究的历史迄今已有百余年。但早期的许多分类学家在判断细菌是否属于芽孢杆菌时没有把“内生孢子”作为划分标准。包括Cohn的检索表在内,有19个早期检索表用“形成芽孢”来描述本属;3个分类检索表在属内鉴定种时用到是否形成芽孢;也有13个分类检索表未提及芽孢的形成^[5]。到现在,有关芽孢的生理性质、生化组成以及生孢形态学和遗传学研究已经成为一个非常重要的领域,其中枯草芽孢杆菌的生孢研究已经成为原核生物分化的最好范例。目前有关生孢遗传学的热点是进一步弄清芽孢形成的连续事件过程中的信息传导及遗传控制之间的关系,导致对数生长结束的环境信号、外界信号的刺激和内部反应(包括细胞的营养水平、细胞密度和细胞周期信号)。对芽孢形成的诱生是通过双组分磷酸化途径完成的。到目前为止,尚

^① 中国科学院资环局重点基金资助项目(KZ952-S1-224)和中国科学院生物分类区系学科发展特别支持费资助课题(9723)

不清楚起到作用的那些环境因子的本质,更不清楚这些信号在传递过程中所发生的具体化学反应的细节^[6]。

2 芽孢杆菌属分类系统的发展

芽孢杆菌属的属名创建于1872年,命名人为德国 Breslau 大学植物生理研究所的 Ferdiand Cohn。此前,Ehrenberg 虽早在1835年已发现和描述枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*, 芽孢杆菌属的模式种),却把它归为纤毛虫纲的弧菌^[7]。

芽孢杆菌属中各种细菌有较大的生理生化差异:无论是细胞壁的结构和组成、生长温度、营养要求、代谢产物还是现代遗传分析所得结果都有差别。 $G+C$ mol%测定是典型的基因指征之一,并且通常被认为属于细菌、真菌分类群的标准描述不可或缺的部分^[8]。一般认为, $G+C$ mol%含量在种内不超过3%,在属内不同种间不超过10%^[4]。而在芽孢杆菌属内各种细菌DNA的 $G+C$ mol%为32~62%之间,这些差异让分类学家头疼,早期曾被归入芽孢杆菌属多达200种,所以历史上不同学者甚至是同一学者在不同时期的分类系统都不尽相同。

早期芽孢杆菌分类学上重要的著作是 Smith 等人在1946年完成的^[9],6年后,他们又出版了一个新版本^[10]。他们对当时的158种1134株菌株研究后,依据孢子和孢子囊的形态将其归并为19个种和5个亚种、变种。在1973年,Gordon 等人主编的《The Genus *Bacillus*》有较大的影响。在这本书中不仅描述了芽孢杆菌属中的18个种,3个变种和5个未定位的种,而且对芽孢杆菌鉴定给出了详尽的生理生化方法。表1是微生物分类领域著名的分类系统《伯杰氏细菌鉴定手册》(*Bergey's Manual of Determinative bacteriology*)不同版本中芽孢杆菌属中种的数量情况。

表1 伯杰氏细菌手册不同版本的出版年份及芽孢杆菌属中包含的种数

版 本	出版年份	种的数量
细菌鉴定手册第一版	1923	75
细菌鉴定手册第二版	1925	75
细菌鉴定手册第三版	1930	93
细菌鉴定手册第四版	1934	95
细菌鉴定手册第五版	1939	146
细菌鉴定手册第六版	1948	33
细菌鉴定手册第七版	1957	25
细菌鉴定手册第八版	1974	22+26*
细菌系统学手册第二卷	1986	34+26*
细菌鉴定手册第九版	1994	22

*表中“+”号后面的数字为未定位的种的数目。

3 芽孢杆菌的研究现状

尽管芽孢杆菌被发现至今已经有100多年的历史,但目前对芽孢杆菌的研究仍然方兴未艾。其中很大一部分工作是集中在特定功能基因的寻找并克隆到需要的物种中^[11~13]或者是通过诱变、基因工程等手段对属于芽孢杆菌属的生产菌进行改造^[13]。然而,分子生物学手段在芽孢杆菌领域的应用并不意味着可以忽视自然界天然野生菌株资源的探查工作。如果没有优良的出发菌株和多样的原始基因,分子生物学、细胞学等方法、手段就成为无本之木、无源之水。调查特定区域内芽孢杆菌的资源,分离和描述具不同生理特性的菌株,分离、保藏新的菌种、变种可以不断补充现有的微生物资源库。近期国内黄洋等神农架林区和自然保护区进行的调查研究工作^[14],李荣森等在1987~1989年对云南、贵州、四川、陕西等西南4省的26个县土样中的苏芸金芽孢杆菌和球形芽孢杆菌资源进行了调查,共获得90株苏芸金芽孢杆菌和87株球形芽孢杆菌,并初步探讨了不同土壤条件下的检出率^[15];戴顺

英等则于1992~1994年开展12个省土壤中苏芸金芽孢杆菌的资源研究,从1491个土样中分离出了221株苏芸金芽孢杆菌,并且分析了土壤pH、土壤植被对苏芸金芽孢杆菌分布的影响^[16]。

红壤中芽孢杆菌的资源 and 分布研究也有过一些报道,郝文英、曹正邦提及不同耕作利用方式对芽孢杆菌的组成有影响^[17],尹瑞龄等分析了低丘红壤区域农田中微生物分布的各种生态影响因子,揭示了水分、温度、土壤的施肥作用以及利用年限对土壤微生物的影响^[18]。杨风等研究了亚热带赤红壤中不同人工林地的微生物组成情况,认为林地中蕈状芽孢杆菌有一定的优势。李振高等研究了红壤地区8种植被下芽孢杆菌组成的季节性差异,并认为水分和植被是两个重要的生态因子^[19]。

随着经济的发展,对在工、农、医等方面有重大应用价值的芽孢杆菌资源的开发利用更具有重要意义。通过对芽孢杆菌属细菌的研究,一方面可积累其分布规律资料,为正确制定相应的保护措施提供理论依据;另一方面也可了解芽孢杆菌与生态环境间的相互关系,为芽孢杆菌资源的持续利用奠定基础。

4 芽孢杆菌的实际应用

4.1 农业应用

4.1.1 生物肥料 巨大芽孢杆菌等可降解土壤中难溶的含磷化合物,使之成为作物易吸收的可溶形态。40、50年代,前苏联P. A. 蒙金娜就曾经使用过以巨大芽孢杆菌为主的混合菌制剂来分解土壤中的有机磷化合物,并取得一定效果。我国北方土壤中存在一种在无氮或硅酸盐培养基上产生大量黏液的芽孢杆菌菌株,由于其能够解磷解钾而将其命名为钾细菌。在我国菌种目录上为胶冻样芽孢杆菌硅酸盐亚种(*Bacillus Mucilaginosus* subsp. *Nova siliceus*)^[20]。

长期以来,我国微生物肥料所用的固氮菌种(包括根瘤菌和自生固氮菌等)皆为不能产生芽孢的细菌类,虽有较强固氮能力但抗逆性低,只能制成液体菌剂使用,易受污染变质或失水干燥而失效,不耐贮存,影响到菌肥的商品化和推广使用。自1958年Hino首次从日本土壤中分离到一株具有高固氮活性的芽孢杆菌固氮菌株后,土壤中新发现的芽孢杆菌固氮菌株越来越多^[21],国际上承认的固氮能力较高的需氧芽孢杆菌为多粘芽孢杆菌的一个变种(亦称为固氮芽孢杆菌 *Bacillus azotofixans*)。此外,也有一些巨大芽孢杆菌、球形芽孢杆菌的部分菌株有一定固氮能力的报道^[22]。这意味着此类菌在自然界氮素供应上起着重要作用。

4.1.2 生物农药 苏芸金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)最早在1905年日本死于猝倒病的家蚕体内发现,并于1938年在法国首次成为商品^[23]。截止1996年,共确定了55个血清型^[24]。在其芽孢形成过程中可以产生一种对鳞翅目、双翅目和鞘目幼虫有高毒力的蛋白质伴胞晶体。后经实验发现它对包括植物寄生线虫在内的无脊椎动物的4个门、节肢动物门的9个目都具有生物毒性,现已成为芽孢杆菌属的第二大研究对象^[25]。苏芸金芽孢杆菌制剂已成为世界上产量最大的微生物杀虫剂。

真菌属于真核生物,大多数抗生素对真菌没有效果,而使用剧毒药品却易造成环境污染。因而,筛选能够产生抑制真菌生长的菌株方面的工作一直没有停止过。国内外有许多关于枯草芽孢杆菌对植物病原真菌的抑制作用及防治实验的报道^[26~28],若能够深入了解抗真菌蛋白对真菌病害的抑制机理,并通过基因工程将此类蛋白基因转入相应作物基因组,

可获得新的抗病品种。

4.2 科学研究

在芽孢杆菌属中,有许多天然菌株可提供不同的高生物活性的基因。枯草芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌也可作为基因工程受体菌,仅枯草芽孢杆菌就表达出了近200种原核和真核生物来源的蛋白基因。枯草芽孢杆菌无论是在生产上还是对基因组及物理图谱的研究都处于中心位置。它的研究涉及到各个方面:与芽孢形成和萌发有关的生化和形态学变化的基因的定位、转化和转导过程中遗传交换机制;细胞壁合成与细胞生长及细胞分裂、中间代谢过程酶的基因定位;感受态等基因的分析与定位等^[6]。目前国际上用作遗传工程的有芽孢宿主菌几乎全部来自 *Spizizen* 及其学生建立的枯草芽孢杆菌 169 菌株转化系统,它同另一种常用有大肠杆菌表达系统相比有着独特的优势:它可以将转入目的基因表达出的产物分泌到细胞体外^[6]。这就为基因表达产物的进一步收集、分离、纯化工作降低了成本和工作量。与其他微生物相比,芽孢杆菌属中绝大多数种类能够在生长过程中产生有用代谢产物,而且相当一部分是直接分泌到培养基中。这就简化了生产工艺,从而大大降低了生产成本;绝大多数芽孢杆菌具有很好的安全性,不会产生环境污染问题。但是此系统也存在菌株自身产生并且向胞外分泌的降解性蛋白酶会影响表达产物的稳定性甚至会对所表达的产物的破坏的缺点。近年来 Doi 等构建的双蛋白酶和三蛋白酶缺陷的枯草芽孢杆菌 DB104 和 DB403 菌株有助于提高分泌蛋白的稳定性^[11]。

4.3 工业生产

利用芽孢杆菌发酵获得在工业生产上需要的高活性、高纯度的淀粉酶、蛋白酶方法在本世纪30年代就开始应用。

蛋白酶可用于制革、丝绸工业、蛋白胨、牛肉膏和加酶洗涤剂的制造。生产菌以地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和短小芽孢杆菌为主,一般地衣芽孢杆菌和短小芽孢杆菌所生产的蛋白酶组成洗涤剂时去污效果好^[29]。目前,酶制剂厂和洗涤工业迫切需求一种耐高温且热稳定性强的碱性蛋白酶。如嗜热脂肪芽孢杆菌等嗜热细菌都能产生高温蛋白酶^[30]。因此该酶制剂也是当前国内外研究的热点^[9]。

淀粉酶的生产和应用在产量上和用途上都占各种酶制剂的首位。大多数的芽孢杆菌都能够产生胞外淀粉酶。1908年和1917年德国的 Boiden 和 Effront 先后从枯草芽孢杆菌培养液中分离出淀粉酶并于1923年设厂制造,70年代后生产 β -淀粉酶菌株常用的有巨大芽孢杆菌、多粘芽孢杆菌和蜡质芽孢杆菌等^[31]。后来,又发现嗜热脂肪芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和凝结芽孢杆菌等生产的 α -淀粉酶有更高的耐热性,最高可达110℃^[32]。

纤维素酶早先的生产、研究以木霉、曲霉产生和酸性纤维素酶为主,目的是将木质纤维素降解为葡萄糖。1970年,UNLIVER公司的研究人员首先发现嗜碱性的芽孢杆菌产生的碱性纤维素酶可加入洗涤剂中增强洗涤效果。近年报道的生产碱性纤维素酶的微生物大多数是属于芽孢杆菌的耐碱菌如 *Bacillus* sp. K-522, *Bacillus* sp. K-588, *Bacillus* sp. K-580, *Bacillus* sp. K-539, *Bacillus* sp. K-577, *Bacillus* sp. K-635 等或嗜碱菌如 *Bacillus* sp. K-19, *Bacillus* sp. 64, *Bacillus* sp. 520, *Bacillus* sp. N-4, *Bacillus* sp. NO.113 等^[33]。

4.4 医药卫生

活菌制剂是根据微生态学原理,利用对人体无害甚至有益的活菌来拮抗外籍菌或过盛菌,通过生物拮抗作用,来达到防治疾病和提高健康水平目的的生物制剂^[34]。活菌制剂在国外30年前就已经进入实际应用阶段^[35],我国的活菌制剂研究起步较晚,基本上是近十几

年发展起来的。目前用于活菌制剂的细菌,主要有乳杆菌、双歧杆菌、肠球菌、大肠杆菌、蜡质芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、棒状杆菌等。枯草芽孢杆菌活菌剂作为口服液用于治疗肠炎、支气管炎等多种疾病^[36],也用来预防和治疗烧伤创面的感染^[37]。

我国自80年代开展了高毒力杀蚊球形芽孢杆菌的分离,先后分离出3株高毒力菌株并将其中两种研制成杀蚊制剂用于蚊子幼虫的控制,取得了良好的效果。但目前资源调查和发掘方面只开展了一些分离、筛选工作^[38,39]。目前球形芽孢杆菌已经被世界卫生组织列为最有开发前途的生物杀虫剂之一^[40]。

参 考 文 献

- 1 Slepecky, R. A. In: Spores VI (Eds. P. Gerhardt, H. L. Sandoff and R. N. Costilow). Washington: American Society for Microbiology. 1975, 297~313
- 2 Ford W. W., Lawrence, J. S. and Laubach, C. A. Studies on aerobic spore-bearing, non-pathogenic Bacteria. Journal of Bacteriology, 1916, 1:273~316
- 3 Gibson, T. And Topping, L. E. Further studies of the aerobic spore-forming Bactilli. proceedings. Society of Agricultural Bacteriologists. 1938, 43~44
- 4 张纪忠. 微生物分类学. 上海: 复旦大学出版社, 1990, 44~45
- 5 R. E. Gordon. In: The Aerobic Endospore-forming Bacteria: Classification and Identification (Eds. R. C. W. Berkeley and M. Goodfellow). London: Academic Press Inc. 1981, 1~16
- 6 潘学峰, 汤懋斌. 芽孢杆菌遗传学研究动态. 见: 盛祖嘉, 陈永清主编 微生物遗传学综述文集. 上海: 复旦大学出版社, 1993, 91~102
- 7 Lechevalier, N. A. and Solotorovsky, M. Three centuries of microbiology. New York: McGraw-Hill Book Co. 1965, 1~24
- 8 Stackebandt, E. and W. Liesack. In: Handbook of New Bacterial systematics (Eds. Goodfellow, M. and A. G. O'Donnell). London: Press Ltd. 1993, 63~78
- 9 Smith, N. R., Gordon, R. E. and Clark F. E. Aerobic Mesophilic Sporeforming Bacteria. Washington, D. C. : United States Department of Agr. 1946, 1~359
- 10 Smith, N. R., Gordon, R. E. and Clark F. E. Aerobic Spore-forming Bacteria. Washington, D. C. : United States Department of Agriculture, Monograph No. 16, 1952, 1~371
- 11 王红革等. 地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶基因在枯草芽孢杆菌中的诱导表达. 微生物学报, 1997, 37(2): 101~106
- 12 陈玮等. 短芽孢杆菌 α -乙酶乳酸脱羧酶基因在大肠杆菌中的克隆和表达. 微生物学报, 1997, 37(4): 270~275
- 13 冯清平, 薛林贵. 复合诱变原生质体选育耐热碱性蛋白酶高产菌. 微生物学报, 1996, 36(6): 453~459
- 14 黄洋, 陶天申. 神农架林区和自然保护区芽孢杆菌资源的调查研究. 微生物学杂志, 1996, 16(3): 32~40
- 15 李荣森等. 我国部分地区土壤中苏芸金芽孢杆菌和球形芽孢杆菌. 微生物学报, 1990, 30(5): 380~388
- 16 戴顺英等. 我国南北方土壤中苏芸金芽孢杆菌的分布及杀虫特性. 微生物学报, 1996, 36(4): 195~302
- 17 郝文英, 曹正邦. 红壤中的微生物. 见: 李庆远主编. 中国红壤. 北京: 科学出版社, 1983, 128~134
- 18 尹瑞龄, 王明珠, 何园球. 低丘红壤区农田的微生物. 见: 中国科学院红壤生态实验站编. 红壤生态系统研究(第三集). 北京: 中国农业科技出版社, 1995, 179~185
- 19 李振高等. 红壤生态系统的芽孢杆菌资源. 见: 中国科学院红壤生态实验站编. 红壤生态系统研究(第三集). 北京: 中国农业科技出版社, 1995, 165~171

- 20 中国微生物菌种保藏委员会编著. 中国菌种目录. 北京: 轻工业出版社, 1983, 57
- 21 许齐放, 黄秀梨, 陈廷伟. 八株芽孢杆菌菌株的分类及固氮活性的测定. 微生物学通报, 1998, 25(5): 253~258
- 22 顾宗藻等译. E. A. 波尔, F. E. 克拉克(美)编著. 土壤微生物学与生物化学. 北京: 科学技术文献出版社, 1993, 62~64
- 23 Feng T-Y et al. *Bacillus thuringiensis* Biotechnology and Environmental benefits Vol I. Taipei: Hua Shiang Yuan Publishing Co., 1995, 11~17
- 24 曾林、任改新. 苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白 cry 基因研究的现状. 微生物学通报, 1998, 25(1): 49~51
- 25 孙明, 喻子牛. 苏芸金芽孢杆菌中华亚种 CT-43 菌株伴胞晶体蛋白的特征. 微生物学报, 1996, 36(4): 303~306
- 26 Ferreira, J. H. S., F. N. Matthee and A. C. Thomas. Biological control of *Eutypa lata* on grapevine by an antagonistic strain on *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*, 1991, 81(3): 283~287
- 27 王雅平等. 枯草芽孢杆菌 A014 菌株防治小麦赤霉病的初步研究. 生物防治通报, 1992, 82(2): 54~57
- 28 胡剑等. 拮抗菌 BS-98 分泌抗菌蛋白的条件及其发酵液特性. 微生物学通报, 1996, 23(6): 326
- 29 邱秀宝等. 嗜碱性芽孢杆菌碱性蛋白酶的研究 III. 酶的性质及应用. 微生物学报, 1990, 30(6): 445~449
- 30 戴玄等. 产高温蛋白酶微生物菌种资源的研究. 微生物学杂志, 1997, 17(3): 25~29
- 31 陈 声编著. 近代工业微生物学(下册). 上海: 上海科学技术出版社, 1982, 1~132
- 32 胡学智等. 高温 α -淀粉酶生产菌种选育的研究. 微生物学报, 1991, 31(4): 267~273
- 33 宋桂经. 碱性纤维素酶及其去污机理. 微生物学通报, 1997, 24(6): 364~367
- 34 解志刚, 刘江秋. 枯草杆菌与活菌制剂. 微生物学杂志, 1996, 16(2): 48~50
- 35 陈梅婷. 微生态制剂—活菌制剂现状. 中国微生态学杂志, 1992, 4(1): 36~40
- 36 陈延祚. 口服非致病性活菌制剂概述. 中国微生态学杂志, 1993, 5(3): 51~59
- 37 齐涵等. 抑菌生的研究总结报告. 中国微生态学杂志, 1991, 3(4): 1~11
- 38 张用梅, 刘娥英, 袁志明. 两株高毒力球形芽孢杆菌的分离. 见: 杀虫微生物(一). 北京: 北京农业大学出版社, 1987, 98~101
- 39 袁志明等. 我国海南省杀蚊球形芽孢菌的分离和分布. 微生物学通报, 1997, 24(4): 203~205
- 40 World Health Organization. TDR/BCV/sphaericus. World Health Organization Geneva. 1985, 3

(上接第 69 页)

- 36 何绪生, 李素霞, 李旭辉等. 控效肥料的研究进展. 植物营养与肥科学报, 1998, 4(2): 97~106
- 37 唐建阳, 翁伯琦, 何萍等. 提高稻田尿素利用率若干方法与机理探讨. 植物营养与肥科学报, 1998, 4(3): 242~248
- 38 孙德芳, 霍现英, 车受萍等. 冬小麦应用长效尿素的增产效果及施用技术. 山东农业科学, 1993, (6): 42~46
- 39 戴廷波, 曹卫星, 李存东. 作物增铵营养的生理效应. 植物生理学通讯, 1998, 34(6): 488~493
- 40 张维理, 林荷, 李家康. 西欧发达国家提高化肥利用率的途径. 土壤肥料, 1998, (5): 3~9
- 41 曹志洪. 科学施肥与我国粮食安全保障. 土壤, 1998, 30(2): 57~69
- 42 陈振德, 邹琦, 程丙嵩等. 小麦耐肥性本质的探讨. 土壤, 1994, 26(6): 284~288
- 43 陈清, 温贤芳, 郑兴耘等. 适宜的氮素投入与农业的持续发展. 核农学通报, 1996, 17(4): 193~197
- 44 武志杰. 化学肥料与生物圈. 农业环境保护, 1994, 13(6): 279~282