

胡永红 陈 卫 欧阳平凯 著

高效有益微生物制剂 开发与利用 ——蜡样芽孢杆菌



化学工业出版社

胡永红 陈 卫 欧阳平凯 著

高效有益微生物制剂 开发与利用 ——蜡样芽孢杆菌



化学工业出版社

· 北 京 ·

该书将基础理论与实用技术、科学研究与工程应用相结合,撰写并分析大量的研究实例,侧重于实用性,以技术发展为主线向读者呈现益生蜡样芽孢杆菌的研究现状与发展,新颖性和系统性很强。共分七章介绍,分别为:绪论;蜡样芽孢杆菌的分类与生理学;蜡样芽孢杆菌遗传学与代谢;蜡样芽孢杆菌的发酵培养;以及蜡样芽孢杆菌在医药工业、饲料工业、农业上的应用。

本书适用于微生物制剂生产相关领域的技术人员,也适用于大专院校相关专业的师生学习和参考。

图书在版编目(CIP)数据

高效有益微生物制剂开发与利用——蜡样芽孢杆菌/胡永红,陈卫,欧阳平凯著. —北京:化学工业出版社, 2013. 1

ISBN 978-7-122-16276-2

I. ①高… II. ①胡…②陈…③欧… III. ①蜡样芽孢杆菌-生物制品-应用开发②蜡样芽孢杆菌-生物制品-综合利用 IV. ①TQ464

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 003654 号

责任编辑:赵玉清

文字编辑:张春娥

责任校对:洪雅姝

装帧设计:关 飞

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)

印 装:三河市延风印装厂

710mm×1000mm 1/16 印张13½ 字数235千字 2013年4月北京第1版第1次印刷

购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686) 售后服务:010-64518899

网 址:<http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价:50.00 元

版权所有 违者必究

序

近年来微生态制剂的研究、开发和应用均取得重大发展，正成为发展迅速的学术前沿方向和朝气蓬勃的新兴产业。作为微生态制剂的有益蜡样芽孢杆菌是我国农业部正式批准的生产生物制品的菌种，具有调节宿主微生态平衡的功能，广泛应用于饲料、农业、医药保健、食品等领域。近年来，国内外在其研究、开发和应用等方面取得显著进展。进一步开发益生蜡样芽孢杆菌相关产品，能提高我国微生态制剂技术的创新水平和产业竞争力，增强新产品研发能力及自主核心技术的开发能力，给我国带来巨大的经济效益和社会效益。

胡永红教授、陈卫教授、欧阳平凯院士从事微生态制剂研究已有十余年。由他们带领的团队主持了多项微生态制剂的国家重大科研项目，特别是在益生蜡样芽孢杆菌的培养及应用研究方面，取得了卓越的学术成果，也积累了大量的宝贵数据和实践经验。当发现国内目前尚没有一本系统地总结近几十年来益生蜡样芽孢杆菌生产技术所取得的进步与成就的书籍，他们便萌生了编撰一本专著的想法，以便与国内外的同行进行学术交流并作为生产企业参考书，并请我作序。该团队结合自己的科研、实验和实际生产经验，撰写《高效有益微生态制剂开发与利用——蜡样芽孢杆菌》这本书，与广大科研工作者分享自己的经验，希望相关领域的研究人员读后能受到启发。

该书将基础理论与实用技术相结合，科学研究与工程应用相结合，撰写并分析大量的研究实例，侧重于实用性，以技术发展为主线向读者呈现益生蜡样芽孢杆菌的研究现状与发展，新颖性和系统性很强。不仅适用于微生态制剂生产相关领域的技术人员，也适用于大专院校相关专业的师生学习和参考。

我非常乐意为此书作序。作为一本学术专著，该书起到学术资源共享的作用，并为我国微生态制剂产业的发展作出了贡献。我坚信，本书的出版必将推动我国微生物制剂学术研究和微生态制剂生产水平的提高。



前言

近年来,国内外在研究、开发和应用微生态制剂方面均取得重大发展,作为微生态制剂的益生菌在各领域的应用正成为一个朝气蓬勃的新兴产业。蜡样芽孢杆菌是一种革兰阳性大杆菌,有益蜡样芽孢杆菌在其生长繁殖过程中具有分泌产生以 g/L 为单位计的大量酶类(如蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、超氧化物歧化酶)、抗生素及多种氨基酸、维生素等营养物质的能力,因此被广泛应用于医药工业、饲料工业、农业等领域。蜡样芽孢杆菌具有调节宿主微生态平衡的功能,在临床上常用于治疗腹泻、急慢性肠炎、痢疾等疾病,并可缓解由抗菌药物导致的菌群失调、消化不良、食欲不振及肝炎病人腹胀等症状。将其添加在饲料中,能提高仔猪、鸡、鱼、贝、虾等的机体免疫能力,降低其发病率,并能促进其生长。此外,蜡样芽孢杆菌是集抗菌、杀虫、促生于一体的益生菌,其活菌制剂是我国农业部正式批准生产的微生态制剂,作为生物农药,能促进植物生长、减少病虫害,提高植物抵御不良环境的能力,减少化肥使用量,具有很高的经济和社会价值。然而,目前国内尚没有一本书籍来系统地总结有益蜡样芽孢杆菌的生产、应用和理论基础,这也是作者着手撰写这本《高效有益微生态制剂开发与利用——蜡样芽孢杆菌》的出发点。

为全面系统地介绍蜡样芽孢杆菌及其先进生产工艺和应用研究成果,加强本书的学术性和实用性,我们参照国内外近几十年来的理论研究成果、先进工艺和实用技术,结合自己在蜡样芽孢杆菌生产方面的理论研究、实验成果和实践体会,撰写成书。以供从事蜡样芽孢杆菌乃至微生态制剂生产、科研和教学的同行们参考,为我国微生态制剂生产、应用的发展尽绵薄之力。

本书共分七章,分别为:绪论;蜡样芽孢杆菌的分类与生理学;蜡样芽孢杆菌遗传学与代谢;蜡样芽孢杆菌的发酵培养;以及蜡样芽孢杆菌在医药工业、饲料工业、农业上的应用。本书不仅介绍了蜡样芽孢杆菌制剂生产路线的发展历程、产业化概况及各领域的应用研究,还通过理论分析和研究实例分别介绍了蜡样芽孢杆菌多阶段培养技术、图像采集、处理系统自动检测等方法在蜡样芽孢杆菌发酵领域的应用研究,内容丰富翔实。

在本书的成书过程中,感谢国家 863 项目(项目编号:2011AA100901)、江苏省科技支撑计划(项目编号:BE2011354、BE2012373)、国家自然科学基金

委员会资助项目（项目编号：31171644）以及江苏省农业科技自主创新基金项目〔项目编号：CX(12)3063、CX(12)3060〕的支持。感谢杨文革、沈飞、管珺、殷晶晶、雷子瑜、李玲、唐容容、孟小琴、王瑞荣、万文倩、王瑶函、梁萌萌、江心敏、李佼佼、王田曼等人为此书收集资料，协助绘图、排版等，谨此致谢。

由于蜡样芽孢杆菌等微生态制剂领域的发展非常迅速，许多新理论、新技术、新成果尚未及时吸收编入本书，加上水平有限，疏漏及不妥之处在所难免，恳请读者批评指正，不胜感激！愿这本书能对从事这项工作的实践者们起到抛砖引玉的作用。

作者

2011年9月于南京工业大学

目 录

第 1 章 绪论	1
1.1 蜡样芽孢杆菌概述	2
1.2 蜡样芽孢杆菌的应用	4
1.2.1 蜡样芽孢杆菌在医药工业上的应用	5
1.2.2 蜡样芽孢杆菌在饲料工业上的应用	5
1.2.3 蜡样芽孢杆菌在酶制剂工业上的应用	6
1.2.4 蜡样芽孢杆菌在农业上的应用	7
1.3 蜡样芽孢杆菌研究与应用的发展动向	9
1.3.1 国外微生态制剂市场	9
1.3.2 国内微生态制剂市场	10
1.4 蜡样芽孢杆菌工业化存在的难题	11
1.5 扩大蜡样芽孢杆菌产品应用范围的必要性	12
参考文献	14
第 2 章 蜡样芽孢杆菌的分类与生理学	16
2.1 蜡样芽孢杆菌的分类	16
2.1.1 蜡样芽孢杆菌的分类地位	16
2.1.2 蜡样芽孢杆菌与类似菌的生化特性比较	20
2.1.3 蜡样芽孢杆菌及其类似菌株在生物体和环境中的循环	22
2.2 蜡样芽孢杆菌的形态结构及染色	24
2.3 蜡样芽孢杆菌的培养特性	25
2.3.1 在常用培养基上的生长及菌落特征	25
2.3.2 在普通营养肉汤中的生长表现	26
2.3.3 在半固体培养基中的生长表现	26
2.4 蜡样芽孢杆菌的生化特性及其检验方法	27
2.4.1 蜡样芽孢杆菌的生化特性	27
2.4.2 蜡样芽孢杆菌生化特性检验方法	27
2.4.3 蜡样芽孢杆菌生化特性鉴定标准	30
2.5 蜡样芽孢杆菌的检定	30

2.5.1	蜡样芽孢杆菌与类似菌的鉴别试验	31
2.5.2	国标法检验蜡样芽孢杆菌	31
2.5.3	DNA 重组试验	34
2.5.4	噬菌体试验	34
2.5.5	分子鉴定	35
2.6	蜡样芽孢杆菌的生长繁殖	36
2.6.1	蜡样芽孢杆菌生长繁殖的营养条件	36
2.6.2	蜡样芽孢杆菌的生长条件	37
2.6.3	蜡样芽孢杆菌的芽孢	38
2.6.4	蜡样芽孢杆菌的运动性	41
2.7	蜡样芽孢杆菌菌种的筛选	44
2.7.1	蜡样芽孢杆菌的自然筛选	44
2.7.2	蜡样芽孢杆菌菌种的诱变育种	45
2.8	菌种的退化预防、复壮与活化	46
2.8.1	退化预防	46
2.8.2	复壮	46
2.8.3	菌种活化	47
	参考文献	47

第3章 蜡样芽孢杆菌遗传学与代谢 51

3.1	蜡样芽孢杆菌基因组的一般特征	51
3.2	蜡样芽孢杆菌基因组的多态性	54
3.3	蜡样芽孢杆菌代谢途径与主要代谢产物	56
3.3.1	蜡样芽孢杆菌糖代谢途径	56
3.3.2	蜡样芽孢杆菌呼吸作用	61
3.3.3	蜡样芽孢杆菌蛋白质代谢	62
3.3.4	蜡样芽孢杆菌次生代谢与次级代谢产物	64
3.4	蜡样芽孢杆菌质粒	68
3.4.1	pBc10987	70
3.4.2	pBCXO1 和 pBC218	71
3.4.3	pBclin15	73
3.4.4	蜡样芽孢杆菌斑马杀手质粒	73
3.5	蜡样芽孢杆菌芽孢形成与萌发	73
3.5.1	蜡样芽孢杆菌芽孢形成与初级代谢	73
3.5.2	蜡样芽孢杆菌芽孢形成的分子机制	75

3.5.3 芽孢的萌发	76
参考文献	79

第4章 蜡样芽孢杆菌的发酵培养 81

4.1 蜡样芽孢杆菌种子制备	81
4.1.1 工业对蜡样芽孢杆菌菌种的要求	81
4.1.2 菌种的活化	82
4.1.3 种子制备	82
4.1.4 种子质量的控制措施	83
4.2 蜡样芽孢杆菌发酵培养方法	83
4.2.1 分批发酵	84
4.2.2 连续发酵	85
4.2.3 补料分批发酵	85
4.2.4 固态发酵	86
4.3 发酵培养基	88
4.3.1 碳源	88
4.3.2 氮源	88
4.3.3 无机盐	89
4.3.4 生长因子	90
4.4 蜡样芽孢杆菌的发酵条件及其控制与优化	91
4.4.1 种龄与接种量	92
4.4.2 温度	92
4.4.3 pH 值	94
4.4.4 溶解氧	95
4.4.5 泡沫	97
4.4.6 蜡样芽孢杆菌工业发酵过程参数的检测技术	100
4.4.7 蜡样芽孢杆菌发酵过程优化方法	101
4.5 蜡样芽孢杆菌发酵过程中的芽孢	102
4.5.1 影响芽孢形成的主要因素	102
4.5.2 生产中获得较高芽孢率的措施	103
4.6 蜡样芽孢杆菌发酵动力学	105
4.6.1 生长动力学	105
4.6.2 产物合成动力学	107
4.7 蜡样芽孢杆菌发酵过程与活性保护	108
4.8 蜡样芽孢杆菌菌体收集	112

4.8.1	离心力和离心时间对离心存活率的影响	112
4.8.2	离心力与离心时间对冻干存活率的影响	113
4.8.3	离心温度对离心存活率的影响	113
4.9	真空冷冻干燥及活性保护	114
4.9.1	真空冷冻干燥技术	114
4.9.2	影响冻干菌剂活性及贮藏稳定性的主要因素	116
4.9.3	蜡样芽孢杆菌冷冻干燥工艺的确定	117
4.9.4	蜡样芽孢杆菌冻干保护剂	118
4.9.5	保护剂与菌体混合条件对细胞冻干存活率的影响	123
4.10	工业发酵设备	124
4.10.1	机械搅拌通风发酵罐	124
4.10.2	气升式发酵罐	127
4.10.3	自吸式发酵罐	129
4.11	工业发酵污染的防治	130
4.11.1	染菌的检查、分析	131
4.11.2	灭菌	133
4.11.3	空气除菌	135
4.11.4	蜡样芽孢杆菌噬菌体的污染与防治	137
	参考文献	137

第5章 蜡样芽孢杆菌在医药工业中的应用 142

5.1	蜡样芽孢杆菌制剂预防和治疗疾病的机理	142
5.1.1	优势种群学说	143
5.1.2	菌群屏障学说	143
5.1.3	生物夺氧学说	144
5.1.4	代谢产物和生理活性物质杀害病原微生物	144
5.1.5	加速损伤上皮的修复	145
5.2	蜡样芽孢杆菌在治疗不同疾病中的作用	146
5.2.1	治疗抗生素性肠炎	146
5.2.2	治疗溃疡性结肠炎	147
5.2.3	治疗腹泻	147
5.2.4	结肠易激综合征的治疗	148
5.2.5	蜡样芽孢杆菌的抗血栓作用	149
5.3	医用蜡样芽孢杆菌制剂剂型	150
5.3.1	蜡样芽孢杆菌活菌胶囊	150

5.3.2	蜡样芽孢杆菌活菌片	150
5.3.3	蜡样芽孢杆菌活菌散剂	151
5.4	蜡样芽孢杆菌制剂的使用宜忌	152
5.4.1	有益蜡样芽孢杆菌与抗生素的配合使用	152
5.4.2	蜡样芽孢杆菌与其他药物或益生菌的合用	153
5.5	蜡样芽孢杆菌在医药工业应用的发展趋势	154
	参考文献	155

第6章 蜡样芽孢杆菌在饲料工业中的应用 157

6.1	一种新型有益的饲料添加剂——蜡样芽孢杆菌制剂	158
6.2	饲用蜡样芽孢杆菌制剂的生理作用机制	159
6.2.1	调节动物肠道菌群平衡	160
6.2.2	增强动物营养代谢功能	161
6.2.3	增强动物免疫功能	161
6.2.4	产生多种酶类，提高消化酶活性	162
6.2.5	改善动物体内外生态环境	165
6.2.6	促进动物肠道等器官生长发育	166
6.2.7	提高动物生产性能	166
6.3	蜡样芽孢杆菌制剂的使用	167
6.3.1	蜡样芽孢杆菌的应用条件与环境	167
6.3.2	蜡样芽孢杆菌制剂的使用方式	167
6.3.3	芽孢杆菌制剂的选择	168
6.4	饲用蜡样芽孢杆菌制剂的发展趋势	169
	参考文献	171

第7章 蜡样芽孢杆菌在农业上的应用 175

7.1	一种新型高效的生物农药——蜡样芽孢杆菌制剂	176
7.2	蜡样芽孢杆菌生物防治作用机理	178
7.2.1	促生长作用	178
7.2.2	竞争作用	179
7.2.3	拮抗作用	181
7.2.4	诱导植物抗性	181
7.3	蜡样芽孢杆菌活性拮抗物质	184
7.3.1	抗生素类	184
7.3.2	酶类	186

7.4 蜡样芽孢杆菌制剂的应用效果 188

7.4.1 蜡样芽孢杆菌对番茄灰霉病的抑制作用 188

7.4.2 蜡样芽孢杆菌促生作用 193

7.4.3 蜡样芽孢杆菌杀虫作用 194

7.5 蜡样芽孢杆菌制剂剂型 196

7.6 蜡样芽孢杆菌制剂的使用注意点 196

7.7 农业用微生态菌剂产品技术指标 197

7.8 有益蜡样芽孢杆菌制剂的发展趋势 198

参考文献 200

第 1 章

绪 论

微生态制剂是从自然界本来就存在的有益（有效）微生物中筛选出那些功能性强、共生性好、互补拮抗的多种微生物，通过适当的组配和科学的发酵工艺组合成能广泛应用于种植、养殖、环境保护和人体保健方面，调整微生态失调以及保护微生态平衡的活菌制剂。

关于微生态制剂的概念，早期研究可追溯到 1908 年，E. Met Chikoff 在他的《延长生命》一书中就提出了增殖细菌具有治疗作用的观点^[1]。1974 年，R. E. Parker 首次用“Probiotics”一词来描述“有助于肠道微生物达到平衡的微生物和物质”。1989 年，Fuller 又提出一个新的定义，即“一种可通过改善肠道菌群平衡，而对宿主施加有利影响的活微生态制剂”。在我国，“Probiotics”一词被译为生菌素、增生素、促菌生、益生素、促生素、活菌制剂、生菌制剂、微生态制剂等。1990 年，在全国微生态学会学术研讨会上，“微生态制剂”一词被正式提出，其定义是“根据微生态学原理而制成的含有大量有益菌的活菌制剂，有的还含有它们的代谢产物或（和）添加的有益生长促进因子，具有维持动、植物体和人类及其内、外环境的微生态平衡（或调整其微生态失调），提高他们的健康水平和保护环境的功能”^[2]。微生态制剂是把微生态科学的理论转化为现实生产力的纽带和桥梁，它实现了微生态学理论和微生态工程技术在种植业、养殖业、环境保护和人体保健等领域的直接应用。近年来，随着微生态学的迅猛发展，以微生态制剂为主的新一类药品（包括人体保健品、动物饲料添加剂、植物生长促进剂等方面）正在形成产业化，创造出可观的经济效益和社会效益。

微生态制剂的菌种或菌株决定了微生态制剂的活力。芽孢杆菌是常用的微生态制剂菌种，1989 年，美国食品及药物管理局（FDA）与饲料控制官员协会发布可以直接饲喂动物的安全菌株 41 种中芽孢杆菌类占 5 株^[3]。随着微生态学的快速发展，蜡样芽孢杆菌作为一种新型高效的微生态制剂进入

人们的视野。1996年,我国农业部正式批准生产生物兽药的菌种有:蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、乳酸杆菌(*Lactobacillus*)、粪链球菌(*Streptococcus faecium*)、酵母(*Candida*)、噬菌蛭弧菌(*Boleilovibrio bacfiriovors*)等。

由于蜡样芽孢杆菌具有诸多优点,已开发了多种微生态制剂广泛应用于医药、畜牧、农业等多个领域。此外,蜡样芽孢杆菌还是常见的污水处理微生物,在金属探矿等领域也有应用。

1.1 蜡样芽孢杆菌概述

蜡样芽孢杆菌是一类在自然界中广泛存在的需氧有柱状内芽孢的 G^+ 杆菌,天然存在于土壤或无脊椎动物的肠道菌群中,大多对人畜无害,不污染环境。蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*, 简称 *B. cereus*)属于需氧芽孢杆菌,根据 Bergey 的细菌鉴定手册(1974年第8版),蜡样芽孢杆菌属于需氧芽孢杆菌属第Ⅰ群,且包括蜡样芽孢杆菌荧光变种(产黄绿色荧光色素)和蜡样芽孢杆菌白乳变种^[4]。蜡样芽孢杆菌的近缘菌有炭疽芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、蕈状芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌,其中以苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称 *B. thuringiensis*)与蜡样芽孢杆菌的相似性最大。两者在形态、菌落及生理生化特征中,除了 *B. thuringiensis* 能产生伴孢晶体不同于 *B. cereus* 外,其他性状区别较小。不同的芽孢杆菌所含不饱和脂肪酸的种类、比例及链的长度范围是不相同的,然而 *B. thuringiensis* 和 *B. cereus* 二者的脂肪酸非常相似。DNA 同源性、(G+C)含量以及 16S rRNA 序列测定都证实了两者的高度相似性。

蜡样芽孢杆菌在自然界分布广泛,常存在于空气、尘埃、土壤、水及植物中,有时正常人的粪便中也能检出。研究显示,蜡样芽孢杆菌一般无致病性,但有的菌株能产生多种有害毒素,诸如腹泻型肠毒素、呕吐型肠毒素、溶血素等,临床上可致败血症等疾病。通过研究发现,14%的成年人体内存在蜡样芽孢杆菌^[5],在人体内的存在情况还会随着季节变化而变化,冬天在 1/4 的人体内有蜡样芽孢杆菌,夏天时增长到 43%。也即蜡样芽孢杆菌在人体内很常见,常形成临时的肠道菌群^[6]。

2003年, Natalia Ivanova 等报道了第一个 *Bacillus cereus* ATCC 14579 菌株基因组的全序列测定分析工作,为了解蜡样芽孢杆菌的遗传学改变以及适应性突变特征形成的分子机制提供了新的理论资料^[7]。继蜡样芽孢杆菌 ATCC 14579 基因组的全序列测定分析工作完成后,2004年 David A. Rasko

等完成并报道了 *Bacillus cereus* ATCC 10987 的基因组测定分析工作^[8]。之后, *B. cereus* E33L、*B. cereus* AH187、*B. cereus* B4264、*B. cereus* AH820、*B. cereus* G9842、*B. cereus* Q1、*B. cereus* 03BB102 基因组的测序工作相继完成。蜡样芽孢杆菌基因组全序列的获得, 为其代谢、适应性、应激行为等的深入研究带来了极大的便利。

根据不同蜡样芽孢杆菌的基因组, 可从分子水平推断出这些菌株的代谢途径。经比较发现, 不同的蜡样芽孢杆菌的代谢途径亦不同, 如蜡样芽孢杆菌 NVH 391-98 缺乏次级胆酸合成途径、青霉素和头孢菌素合成途径、氯基环己烷和氯苯降解途径、二噁英降解途径、甲苯降解途径、苯乙烯降解途径、二甲苯降解途径和硝基甲苯降解途径。蜡样芽孢杆菌代谢网络还因环境的不同而呈现不同模式, 从而对外部刺激做出灵活而快速的响应。研究发现, 不同的蜡样芽孢杆菌其碳源利用有所差异, 如 *B. cereus* ATCC 14579 可以利用果糖以及衍生的碳水化合物, 而 ATCC 10987 不能利用这些物质。目前已发现多种蜡样芽孢杆菌调控系统, 其中厌氧呼吸及糖酵解调控系统研究较为充分, 特别是 ResDE 双组分调节系统和 Fnr 蛋白即环 AMP 受体蛋白/延胡索酸和硝酸盐还原调控因子 (Fnr 蛋白), 这两种调控因子对不同糖代谢途径的调控力度不一样, 如 Fnr 蛋白对果糖代谢更为关键^[9]。

与糖代谢相反的是, 蜡样芽孢杆菌蛋白质水解酶十分的丰富, 多肽和氨基酸转运子众多, 氨基酸降解途径丰富, 蛋白质、多肽和氨基酸是蜡样芽孢杆菌偏好的营养来源。如在蜡样芽孢杆菌约有 51 个编码蛋白酶的 CDSs, 相比之下枯草芽孢杆菌只有 30 个左右。由此可见, 蛋白质与氨基酸的代谢在蜡样芽孢杆菌生命活动的维持与繁殖方面具有非常重要的地位。尽管不同的蜡样芽孢杆菌对氮源的利用也有偏好, 但是不同的氨基酸代谢途径之间存在着紧密的联系, 以至于蜡样芽孢杆菌可在以某些氨基酸或二肽为单一氮源的培养基上生长, 如 *B. cereus* ATCC 10987 菌株可以在以含酪氨酸的二肽为单一氮源的培养基上生长^[10]。对于蜡样芽孢杆菌而言, 特别是在厌氧条件下, 对氨基酸的需求量比较大。氨基酸的代谢与碳源代谢息息相关, 如谷氨酸在以蔗糖或果糖为单一碳源的培养基中作为营养物质, 在含有葡萄糖的培养基中却为发酵产物。即蜡样芽孢杆菌的氨基酸代谢随着环境条件的不同而呈现出较大差异。蜡样芽孢杆菌存在多种代谢途径, 能对环境刺激做出快速响应, 这为蜡样芽孢杆菌在土壤、昆虫肠道等多种环境中生存繁殖提供了基础。

蜡样芽孢杆菌在一定的生长期会合成非常多的次级代谢产物, 这些产物中有些是对其生命活动无明确功能的物质, 而有些则对其具有重要的意义。这些物质包括抗生素、生物碱、维生素等。蜡样芽孢杆菌可以合成多种维生

素,在维生素发酵工业中具有较为重要的地位。两步发酵法生产维生素 C 中,蜡样芽孢杆菌是产酸菌氧化葡萄糖酸杆菌的一种常见伴生菌,这样不仅便于观察两种菌株在形态上的差异,也有利于生产控制。蜡样芽孢杆菌也可以合成多种抗生素,包括青霉素、头孢菌素、链霉素、新生霉素、zwitermicin A 等抗生素。根据蜡样芽孢杆菌基因组全测序结果分析可知,合成抗生素相关的酶有聚酮物合酶(PKS)和非核糖体肽合成酶(NRPS),用以合成聚酮类抗生素和多肽类抗生素。蜡样芽孢杆菌还可合成多种小分子蛋白,这些蛋白具有抑菌或促生作用,在农业上具有重要应用。

由于芽孢在蜡样芽孢杆菌生活史中的重要地位,对其芽孢形成与萌发研究是其研究热点与重点。芽孢形成前后,蜡样芽孢杆菌的代谢有着明显的不同。如蜡样芽孢杆菌在丝状、颗粒状、前孢子以及转化阶段,98%的葡萄糖经由糖酵解途径分解掉,其余的主要经由磷酸戊糖途径分解。在芽孢休眠时期,约有20%的葡萄糖经由磷酸戊糖途径代谢,在芽孢的萌发以及后续变长的阶段约有10%的葡萄糖由磷酸戊糖途径降解掉。当细胞开始分裂时,只有2%的葡萄糖经过磷酸戊糖途径分解,这与后续的营养生长代谢处于相似的水平^[11]。蜡样芽孢杆菌的氨基酸代谢与芽孢形成和萌发均有非常密切的关系,特别是谷氨酸的浓度,对芽孢的形成及性质有着非常大的影响^[12]。芽孢对外界环境甚为敏感,一旦其探测到外部存在有某些氨基酸、糖类、嘌呤核苷或一些化学混合物时,这些物质就会快速跨过芽孢衣和皮层到达芽孢内膜的表面,与位于芽孢内膜上的受体蛋白相互作用,将传导萌发的信号传导至芽孢内核,激发芽孢进入萌发状态。蜡样芽孢杆菌芽孢在不同的环境萌发,其萌发与形成新的营养细胞的过程中其转录谱有较大差别。

1.2 蜡样芽孢杆菌的应用

蜡样芽孢杆菌的芽孢对热及其他致死因子有较强的抵抗能力^[13,14]。如芽孢对热的抗性较营养体细胞高105倍或更高,对紫外线和离子辐射的抗性较之高100多倍,对抗生素及其他化学药品的抗性较之也高^[15]。当环境条件适宜时芽孢萌发,芽孢壳迅速溶解,随即形成营养体细胞;而在遇到恶劣条件时蜡样芽孢杆菌能形成芽孢处于休眠状态以度过困难时期^[16]。正是由于这个特性再加上有益蜡样芽孢杆菌在其生长繁殖过程中还具有分泌产生以g/L为单位计的大量酶类(如蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、超氧化物歧化酶)、抗生素^[17]及多种氨基酸、维生素等营养物质的能力,因此被广泛应用于饲

料、农业、医药保健和食品等领域,使蜡样芽孢杆菌及其亲缘性家族成员成为工业化酶类生产中的重要来源,也是蛋白质分泌及宿主菌产生异源性蛋白研究中的重要研究对象。此外,蜡样芽孢杆菌能吸附金属离子,不仅在生物矿化作用的研究方面起着举足轻重的作用^[18],在处理含重金属及放射性金属的工业废液中也具有重要的实用价值^[19]。

1.2.1 蜡样芽孢杆菌在医药工业上的应用

蜡样芽孢杆菌在医药工业上主要被制成生态制剂,用于降血脂、抗衰老、抗肿瘤、防止细菌移位以及胃肠道疾病及自身免疫性疾病防治^[20],能起到“已病治病,未病防病,无病保健”以及延缓衰老、延年益寿作用^[21]。

目前市场上常见的有大连医学院研制的“促菌生”(蜡样芽孢杆菌DM423),利用生物夺氧作用在人体肠道内制造厌氧环境,促进优势菌群的生长,抑制病原菌等其他细菌的繁殖。临床上用于婴幼儿腹泻,秋季轮状病毒所致腹泻、急慢性肠炎、痢疾等,也可用于抗菌药物所致的菌群失调、消化不良、食欲不振及肝炎病人腹胀等^[20,22]。另外一种商品名为“蓉生乐腹康”的蜡样芽孢杆菌活菌制剂,其作用机理和“促菌生”一样,当它繁殖时吸收肠腔内的氧气造成厌氧环境,促进正常菌群中厌氧菌的生长,调节菌群失调,发挥屏障作用和调节生态平衡。临床上主要用于婴幼儿腹泻、轮状病毒胃肠炎、婴幼儿菌痢、成人急性肠炎、慢性肝炎、肝硬化引起的腹胀及其他原因所致肠道菌群失调;对老年人食欲不振、胃纳差、胃脘胀满、大便稀溏、腹泻与便秘交替出现且经久不愈者有保健预防作用^[23]。

1.2.2 蜡样芽孢杆菌在饲料工业上的应用

抗生素添加于饲料中用以促进畜禽生长发育已有近60年的历史,由于抗生素的大量使用,加之监督管理又落后于生产,给细菌性疾病的控制和治疗带来了极大的麻烦和困难,同时也给人类的健康带来潜在的威胁,此外,还关系到出口创汇和国际形象。由于饲料污染和药物残留等原因,我国每年畜产品的出口量仅为生产量的1%,且每年约有上百亿美元的畜产品出口受阻,严重制约了我国资源优化、高效的进程^[24]。

在饲用抗生素的使用方法、种类、配伍和剂量等方面,世界各国,尤其是欧洲等发达国家已纷纷对其采取官方强硬措施进行严加限制。由此,从20世纪70年代开始,微生物学者在现代微生物理论的基础上,兼顾“控制”和“利用”,进行生态制剂的研究和实际应用,对有利于可持续发展以及人类、动植物的生态制剂进行逐步开发,从而将人们的注意力从过