

吴晓晖,谢永丽,陈 兰,等. 耐盐、低温适生芽孢杆菌 TS1、TS3 的拮抗及降解纤维素活性分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(19):277-281.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.19.072

# 耐盐、低温适生芽孢杆菌 TS1、TS3 的拮抗及降解纤维素活性分析

吴晓晖<sup>1,2</sup>, 谢永丽<sup>1,2</sup>, 陈 兰<sup>1,2</sup>, 柴树芳<sup>1,2</sup>, 赵继丽<sup>2</sup>

(1. 青海大学省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室,青海西宁 810016;

2. 青海大学农牧学院高原草地资源与生态省部共建重点实验室,青海西宁 810016)

**摘要:**为获得在高原生态农牧业中具有研究应用潜力的根围促生菌,从极端环境生境筛选出具有耐盐、耐低温适性的菌株,并对其进行生理生化及分子鉴定。通过 *gyrB* 及 16S rDNA 基因序列分析,将菌株 TS1 鉴定为萎缩芽孢杆菌(*Bacillus atrophaeus*),菌株 TS3 鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*);平板对峙试验发现,菌株 TS1、TS3 均具有拮抗植物病原真菌及细菌的活性(抑菌圈直径 $\geq 8$  mm);经 Landy 培养基发酵提取的菌株脂肽类化合物可在血平板上形成直径 $\geq 11$  cm 的透明圈;通过基质辅助激光解吸-离子化飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)分析所产生的脂肽类化合物,菌株 TS1 可产生表面活性素(Surfactin)、泛革素(Fengycin),菌株 TS3 可产生表面活性素、伊枯草菌素(IturinA),推测菌株的拮抗活性与脂肽类化合物合成有关;羧甲基纤维素钠(CMC-Na)法检测发现,菌株具有降解纤维素活性;3,5-二硝基水杨酸(DNS)法测定菌株解纤维素酶活性分别为 116.76、150.12 U/mL;菌株 TS1 可在含 NaCl 浓度为 13% 的 LB 培养基平板上及 4、10 °C 低温条件下正常生长,表现出良好的耐低温及耐盐性。2 株耐盐、耐低温适生芽孢杆菌兼具多种功能特性,在高原生态农牧业中具有一定的研究应用潜力,有望进一步研究并开发成为微生物肥料生产菌种。

**关键词:**芽孢杆菌;分子鉴定;拮抗活性;耐盐及低温适生;解纤维素活性

**中图分类号:** S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)19-0277-05

芽孢杆菌是一类重要的植物生长促生菌,因其能产生抑

制病原菌生长的化合物而成为生防菌研究的热点,芽孢杆菌拮抗活性常被作为筛选生防芽孢杆菌的重要指标,生防菌分泌的胞外代谢产物可直接抑制病原物的生长、杀死病原物或形成不利于病原物的环境条件,间接抑制病原物的生长,从而促进植物生长<sup>[1-2]</sup>。同时,芽孢杆菌可通过抑制病原菌的滋生,提高饲料的卫生品质。因此,芽孢杆菌在生态农业及生态畜牧业发展中具有很好的研究意义和应用潜力。产生抗生素是芽孢杆菌具有拮抗作用的重要原因之一,芽孢杆菌产生的

收稿日期:2017-11-22

基金项目:国家自然科学基金(编号:31660543);青海省科技厅应用(基础)研究项目(编号:2015-ZJ-732)。

作者简介:吴晓晖(1994—),女,青海西宁市人,硕士研究生,主要从事资源微生物研究。E-mail:377890164@qq.com。

通信作者:谢永丽,博士,副教授,主要从事资源微生物研究。E-mail:986237342@qq.com。

(24):302,305.

[19]王才林,仲维功. 高温对水稻结实率的影响及其防御对策[J]. 江苏农业科学,2004(1):15-18.

[20]潘敖大,高 苹,刘 梅,等. 基于海温的江苏省水稻高温热害预测[J]. 应用生态学报,2010,21(1):136-144.

[21]谢晓金,李秉柏,申双和,等. 抽穗期高温胁迫对水稻花粉活力与结实率的影响[J]. 江苏农业学报,2009,25(2):238-241.

[22]柳新伟,孟亚利,周治国,等. 水稻颖花与籽粒发育模拟的初步研究[J]. 中国水稻科学,2004,18(3):249-254.

[23]Cao Y Y, Duan H, Yang L N, et al. Effect of high temperature during heading and early filling on grain yield and physiological characteristics in indica rice[J]. Acta Agronomica Sinica, 2009, 35(3):512-521.

[24]Kim J, Shon J, Lee C K, et al. Relationship between grain filling duration and leaf senescence of temperate rice under high temperature[J]. Field Crops Research, 2011, 122(3):207-213.

[25]谢志清,杜 银,高 苹,等. 江淮流域水稻高温热害灾损变化

及应对策略[J]. 气象,2013,39(6):774-781.

[26]于 堃,宋 静,高 苹. 江苏水稻高温热害的发生规律与特征[J]. 气象科学,2010,30(4):530-533.

[27]刘伟昌,张雪芬,余卫东,等. 水稻高温热害风险评估方法研究[J]. 气象与环境科学,2009,32(1):33-38.

[28]谢晓金,李秉柏,李映雪,等. 抽穗期高温胁迫对水稻产量构成要素和品质的影响[J]. 中国农业气象,2010,31(3):411-415.

[29]高素华,王培娟,万素琴. 长江中下游高温热害及对水稻的影响[M]. 北京:气象出版社,2009.

[30]Lanzante J R. Resistant robust and nonparametric techniques for the analysis of climate data: theory and examples, including applications to historical radiosonde station data[J]. International Journal of Climatology, 1996, 16:1197-1226.

[31]温克刚,卞光辉. 中国气象灾害大典(江苏卷)[M]. 北京:气象出版社,2008.

[32]汤志成,孙 涵. 最优化因子处理及加权多重回归模型[J]. 气象学报,1992,50(4):514-517.

抗生素包括由核糖体合成的小分子细菌素<sup>[3]</sup>、非核糖体合成的肽类物质及其他一些抗菌活性物质。非核糖体合成的抗生素中,伊枯草菌素(Iturin)<sup>[4]</sup>、表面活性素(Surfactin)<sup>[5]</sup>及泛草素(Fengycin)<sup>[6]</sup>为主要的脂肽类化合物,其中 Iturin 主要抑制真菌生长, Surfactin 能够抑制细菌、病毒和支原体生长, Fengycin 可抑制丝状真菌生长并降低作物病害的发生。部分芽孢杆菌还可产生内切葡聚糖酶(endo-1,4- $\beta$ -D-glucanohydrolase)、外切葡聚糖酶(exoglucanase)、木聚糖酶(xylan)、甘露聚糖酶( $\beta$ -mannanase)等纤维素活性酶,可有效降解纤维素,将纤维转化为糖类或其他营养产物<sup>[7]</sup>。

青海省秸秆纤维素资源丰富,利用却十分有限,若应用芽孢杆菌分泌的纤维素酶加速对草料、秸秆木质纤维素的降解,可使养分有效释放,不仅能缓解家畜饲草料短缺,还能通过秸秆还田改善土壤的结构、提高土壤肥力、降低环境污染<sup>[8]</sup>。本研究在青海省托素湖畔骆驼蓬(*Peganum harmala* L.)根围土壤中分离筛选出 2 株耐盐及低温适生芽孢杆菌菌株,通过 16S rDNA 及 *gyrB* 基因序列分析鉴定菌株,测定菌株拮抗病原细菌、病原真菌活性及菌株降解纤维素活性,利用基质辅助激光解吸附-离子化飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)分析菌株产生脂肽类化合物的种类以期为适用高原生态环境的生物菌肥研发提供耐逆性生防芽孢杆菌菌源,为生态农业和生态畜牧业研究提供优质的研发菌源。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料及供试菌株

试验于 2016 年在青海大学高原草地资源与生态省部共建重点实验室进行。菌株分离自青海省海西州托素湖边骆驼蓬根围土壤。由青海大学高原草地资源与生态省部共建重点实验室保存。细菌 NA 固体培养基、LB 固体培养基参考 Wu 等方法<sup>[9]</sup>配制;真菌 PDA 培养基参考薛鹏琦等方法<sup>[10]</sup>配制;低温 1C 培养基参考刘芳等方法<sup>[11]</sup>配制;CMC 培养基参考张楠等方法<sup>[12]</sup>配制。扩增引物由南京金斯瑞生物技术有限公司合成;PCR 扩增反应试剂购自宝生物工程(大连)有限公司;PCR 产物纯化试剂盒购自爱思进生物技术(杭州)有限公司。

### 1.2 菌株分子鉴定

1.2.1 16S rDNA 序列分析鉴定 16S rDNA 序列扩增引物为正向引物 27F:5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3',反向引物 1492R:5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 扩增条件为 95 ℃ 4 min;94 ℃ 1 min,50 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min,34 个循环;72 ℃ 10 min<sup>[13]</sup>。将 16S rDNA 扩增产物回收纯化后测序,测序所得序列通过 NCBI 数据库进行 Blast 比对,并采用 MEGA 3.1 软件<sup>[14]</sup>对分离芽孢杆菌及模式菌进行系统发育分析。

1.2.2 *gyrB* 基因序列分析鉴定 *gyrB* 基因扩增引物序列为正向引物 UP1:5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNGNGGNAARTTYGA-3',反向引物 UP2r:5'-AGCAGGTACGGATGTGCCAGCCRTCNACRTCNGCRTCNGTCAT-3'。PCR 扩增条件为 95 ℃ 4 min;98 ℃ 10 s,62 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min,30 个循环;72 ℃ 8 min<sup>[15]</sup>。将 *gyrB* 基因扩增产物纯化测序,所测序列通过 NCBI 数据库进行 Blast 比对,并采用 MEGA

3.1 软件<sup>[14]</sup>对分离芽孢杆菌及模式菌进行系统发育分析。

### 1.3 菌株耐逆性测定

1.3.1 耐盐性测定 将供试菌株分别接种到含 NaCl 浓度梯度分别为 3%、5%、7%、9%、11%、13%、15% 的 LB 培养基中过夜培养 12 h,吸取 50  $\mu$ L 菌液涂布于相应的固体 LB 培养基上,置于 37 ℃ 下培养,每个处理 3 次重复,培养 5 d 后,每天观察菌落生长情况并记录菌株的耐盐特性<sup>[15]</sup>。

1.3.2 耐低温测定 用灭菌牙签挑取供试菌株长势优良的单菌落接种到低温 1C 液体培养基中过夜培养 12 h,吸取 10  $\mu$ L 菌液接种于 1C 固体培养基平板上,设置 18、14、10、4 ℃ 等 4 个温度梯度进行培养,每个处理 3 次重复。每天观察菌落生长情况,测定菌株的耐低温特性<sup>[15]</sup>。

### 1.4 菌株拮抗活性测定

1.4.1 拮抗病原真菌活性 分别在油菜菌核菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、小麦赤霉菌(*Fusarium graminearum* Schw.)、瓜类枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)的 PDA 平板边缘打取直径为 0.7 cm 的菌碟,接种在新的 PDA 平板中央。在距离菌块 2.5 cm 处,呈“十”字形分布的 4 个接种点上放置直径为 4 mm 的滤纸小圆片,将供试芽孢杆菌在 37 ℃、200 r/min 条件下培养 14 h 后,吸取 5  $\mu$ L 菌液接种于滤纸片上,每个处理重复 3 次,放入 26 ℃ 恒温培养箱中培养 2~3 d 后取出,观察并记录供试芽孢杆菌抑制病原真菌生长的结果<sup>[16]</sup>。

1.4.2 拮抗病原细菌活性 将大白菜软腐病菌(*Pectobacterium carotovorum*)菌悬液与冷却到 50 ℃ 左右的 NA 培养基按体积比 1:30 混匀,制成含菌平板,在距离平板中心 2.5 cm 处,呈“十”字形分布的 4 个接种点上分别放置直径为 4 mm 的滤纸小圆片。将供试菌株接种于 LB 液体培养基中,37 ℃、200 r/min 过夜振荡培养 14 h 后,吸取 5  $\mu$ L 菌液接种于滤纸片上,每个处理重复 3 次。置于 28 ℃ 培养箱中培养 2~3 d,观察并记录供试芽孢杆菌抑制病原细菌生长的结果<sup>[16]</sup>。

### 1.5 脂肽类化合物的测定及分析

1.5.1 脂肽类化合物粗提 将供试菌株 TS1、TS3 单菌落接种于 LB 液体培养基中过夜振荡活化,将菌液以 3% 的接菌量转接于 Landy 培养基中,30 ℃ 发酵 38 h,发酵条件参见王帅等方法<sup>[17]</sup>。发酵培养结束后,将培养物在 200 r/min 的条件下离心 2 min 取上清,在上清液中加入 6 mol/L HCl 调 pH 值至 2.0,轻微搅动,置于 4 ℃ 冰箱中过夜培养。离心收集沉淀,加入甲醇,用 1 mol/L NaOH 调节 pH 值至 7.0,再次用甲醇抽提并混合抽提液,获得脂肽类化合物粗提物<sup>[17]</sup>。

1.5.2 脂肽类化合物活性测定 在血(羊血)平板距中央 2.5 cm 处,呈“十”字形分布的 4 个接种点上,放上直径为 4 mm 的滤纸小圆片,取待测脂肽类化合物粗提物 5  $\mu$ L 点在滤纸片中央,试验以甲醇点在滤纸片中央为对照,每个处理重复 3 次。将血平板放入 26 ℃ 恒温培养箱中过夜培养,观察透明圈大小并记录透明圈直径<sup>[14]</sup>。

1.5.3 MALDI-TOF-MS 质谱分析 利用基质辅助激光解吸附-离子化飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)分析菌株 Landy 发酵产生的脂肽类化合物种类,基质为  $\alpha$ -氰-4-羟肉桂酸。

## 1.6 解纤维索活性分析

在 CMC - Na 筛选培养基平板呈“十”字形分布的 4 个接种点上,放置直径为 4 mm 的滤纸小圆片。将供试菌株置于 LB 液体培养基中,37 ℃、200 r/min 过夜培养 12 h 后,取待测菌液 5 μL 点在滤纸片中央,每个处理重复 3 次,将平板倒置于 37 ℃ 恒温培养箱中培养 2 d 后,将革兰氏碘液注入并淹没平板表面,静置 4 min 倒去染液,观测并记录试验结果。若菌株将培养基中的纤维素大分子降解为小分子糖类,即可在滤纸片周围观察到圆形的透明圈。测定并记录透明圈直径、菌落直径,并计算两者比值  $A^{[15]}$ 。

## 1.7 木聚糖酶活性测定

将芽孢杆菌菌液以 2% 的接菌量转接至 CMC 诱导产酶培养基中,37 ℃ 200 r/min 培养 48 h;将培养液在 4 000 r/min、4 ℃ 下离心 10 min,上清液即为粗酶液<sup>[17]</sup>。取灭菌的 2 mL 离心管,加入 200 μL 1% 木聚糖(均溶于 pH 值 7.0 PBS)作为反应底物(测定各菌株的木聚糖酶活性),将各反应底物在 37 ℃ 金属浴上保温。吸取 200 μL 上述稀释至合适浓度的粗酶液与底物涡旋混合,37 ℃ 金属浴 30 min;加入 500 μL 3,5 - 二硝基水杨酸(DNS)试剂终止反应,并于沸水中煮沸 5 min,冷却后,加入 1 mL ddH<sub>2</sub>O;吸取反应液至分光光度计中测定吸光度  $D_{540\text{ nm}}$ ;按照绘制的木糖标准曲线,计算反应液中对应还原糖的含量,扣除粗酶液和底物中所含的还

原糖含量,计算得出各菌株木聚酶活性<sup>[18]</sup>。1 min 催化生成 1 μmol 还原糖为 1 个酶活性单位,记作 1 U。每个样品测定 3 次,取平均值<sup>[19]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株分子鉴定

以菌株 TS1、TS3 基因组 DNA 为模板扩增 16S rDNA 片段,扩增到大小约 1 500 bp 的特征性条带。将测序结果在 NCBI 中与 Gen Bank 中的已知序列进行 Blast 比对,比对结果见表 1。菌株 TS1 与萎缩芽孢杆菌(*B. atrophaeus*) BKS1 - 45 的 16S rDNA 序列相同(或一致)性为 99%;菌株 TS3 与解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*) JS 的 16S rDNA 序列相同(或一致)性为 100%。

以菌株 TS1、TS3 基因组 DNA 为模板扩增 *gyrB* 基因片段,扩增到大小约 1 300 bp 的 PCR 特征性条带。将 PCR 产物纯化后测序,将测序结果在 NCBI 中用 Blast 软件与 Gen Bank 中已知序列进行比较,比对结果表明,菌株 TS1 与萎缩芽孢杆菌 LSSC3 的 *gyrB* 基因序列相同(或一致)性为 99%;菌株 TS3 与解淀粉芽孢杆菌 FZB42 的 *gyrB* 基因序列相同(或一致)性为 100%。

通过 16S rDNA 及 *gyrB* 基因测序分析,最终将菌株 TS1 鉴定为萎缩芽孢杆菌,菌株 TS3 鉴定为解淀粉芽孢杆菌。

表 1 菌株的 16S rDNA 及 *gyrB* 序列比对结果

菌株	16S rDNA 序列比对	<i>gyrB</i> 序列比对	鉴定结果
TS1	萎缩芽孢杆菌 BKS1 - 45 (99%)	萎缩芽孢杆菌 LSSC3 (99%)	萎缩芽孢杆菌
TS3	解淀粉芽孢杆菌 JS (100%)	解淀粉芽孢杆菌 FZB42 (100%)	解淀粉芽孢杆菌

### 2.2 菌株的抗逆性

2.2.1 菌株抗盐性 菌株 TS1、TS3 耐盐性测定结果见表 2,菌株 TS1、TS3 均可在添加 3%、5%、7%、9% NaCl 的 LB 培养基上生长良好,在含 NaCl 浓度为 13% 的培养基上,菌株 TS1 可缓慢生长,菌株 TS3 无法生长;在含 NaCl 浓度为 15% 的培养基上,菌株 TS1、TS3 均不能生长,2 株菌株显示出良好的耐盐性,菌株 TS1 耐盐性略高于菌株 TS3。

2.2.2 菌株低温适生性 分别测定菌株 TS1、TS3 在 18、14、

10、4 ℃ 低温条件下的生长情况。结果(表 2)显示,在 18、14 ℃ 条件下,菌株 TS1、TS3 生长良好,在培养 1 d 后均长出菌苔;在 10 ℃ 条件下,菌株 TS1 生长良好、菌株 TS3 缓慢生长,菌株 TS1 表现出更强的扩展性,培养 1 d 后即可出现明显的菌苔,菌株 TS3 培养 2 d 后长出菌苔;在 4 ℃ 低温条件下,菌株 TS1 可缓慢生长,在培养 3 ~ 4 d 后出现菌苔,菌株 TS3 无法生长。2 株菌株均表现出良好的低温适生性,菌株 TS1 表现出更好的低温适生性。

表 2 菌株的耐盐性及低温适生性

菌株	菌株耐盐性							菌株	菌株低温适生性			
	3%	5%	7%	9%	11%	13%	15%		18 ℃	14 ℃	10 ℃	4 ℃
TS1	+++	+++	+++	+++	++	+	-	TS1	+++	+++	+++	+
TS3	+++	+++	+++	+++	+	-	-	TS3	+++	+++	+	-

注:+++ 表示生长良好;++ 表示正常生长;+ 表示缓慢生长;- 表示不能生长。

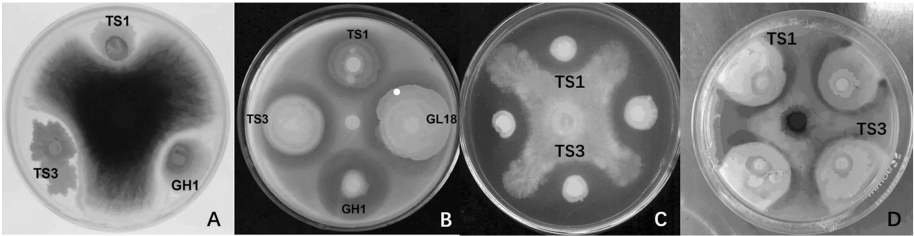
### 2.3 菌株的拮抗活性

2.3.1 抑病原真菌活性 以油菜菌核菌、瓜类枯萎病菌及小麦赤霉菌为指示菌来检测菌株拮抗病原真菌活性。结果(图 1、表 3)表明,菌株 TS1、TS3 对油菜菌核病菌抑菌圈直径 ≥ 13 mm,对瓜类枯萎病菌抑菌圈直径 ≥ 10 mm,对小麦赤霉菌抑菌圈直径 ≥ 15 mm,表现出良好的拮抗活。

2.3.2 抑病原细菌活性 以大白菜软腐病菌为指示菌检测菌株拮抗病原细菌的活性。检测结果(图 1、表 3)表明,菌株 TS3 对病原细菌的拮抗活性较为明显,其拮抗大白菜软腐病菌的抑菌圈直径为 13 mm;而菌株 TS1 拮抗大白菜软腐病病原细菌的抑菌圈直径为 8 mm,菌株 TS3 表现出更高的拮抗活性。

### 2.4 脂肽类化合物的鉴定

脂肽类化合物是芽孢杆菌产生的最主要的抗菌物质<sup>[20-21]</sup>,芽孢杆菌产生的脂肽类化合物分子量在 900 ~ 2 000 bp 中范围内<sup>[22]</sup>。选择菌株 TS1、TS3 通过 Landy 发酵获得脂肽类化合物,对脂肽类化合物粗提物进行 MALDI - TOF - MS 分析。MALDI - TOF - MS 图谱显示,菌株 TS1 在质荷比( $m/z$ )为 1 030.92、1 044.83、1 058.92 处有离子峰出现,这 3 个离子峰均对应于 Surfactin 的分子质量;在  $m/z$  为 1 435.17、1 513.67 处有离子峰出现,这 2 个离子峰均对应于 Fengycin 的分子质量。菌株 TS3 在  $m/z$  为 1 030.75、1 044.75、1 058.83 处有离子峰出现,这 3 个离子峰均对应于



A—拈抗瓜菜枯萎病菌；B—拈抗大白菜软腐病菌；C—拈抗油菜菌核病菌；D—拈抗小麦赤霉病菌；GH1—*B. malacitensis*，该菌在本试验中未进行研究；GL18—解淀粉芽孢杆菌

图1 菌株对病原真菌及病原细菌的拈抗活性

表 3 芽孢杆菌抑菌活性特征

菌株	油菜菌核病菌		小麦赤霉菌		瓜菜枯萎病菌		大白菜软腐病菌	
	抑菌圈直径(mm)	抑菌活性	抑菌圈直径(mm)	抑菌活性	抑菌圈直径(mm)	抑菌活性	抑菌圈半直径(mm)	抑菌活性
TS1	13	+++	15	+++	10	+++	8	++
TS3	14	+++	17	++++	10	+++	13	+++

注：+ 表示抑菌圈直径大于等于 0 mm 小于等于 5 mm；++ 表示抑菌圈直径大于 5 mm 小于等于 10 mm；+++ 表示抑菌圈直径大于 10 mm 小于等于 15 mm；++++ 表示抑菌圈直径大于 15 mm。表 4 同。

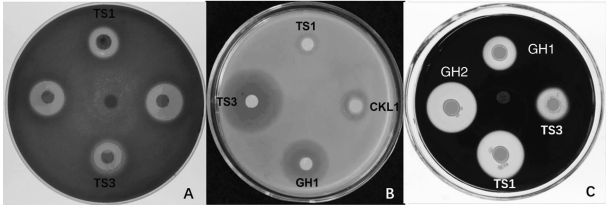
Surfactin 的分子质量；在  $m/z$  为 1 133.42 处有离子峰出现，这个离子峰对应于 IturinA 的分子质量。MALDI-TOF-MS 质谱分析结果表明，菌株 TS1 能产生脂肽类化合物 Surfactin、Fengycin，菌株 TS3 能产生脂肽类化合物 Surfactin、IturinA。推断拈抗菌株抑制病原真菌及病原细菌生长可能与其产生抗菌作用的脂肽类化合物有关。

2.5 脂肽类化合物抗生活性分析

2.5.1 血平板试验 通过血平板检测菌株 TS1、TS3 产生的脂肽类化合物的抗生活性。结果(图 2-A、表 4)显示，2 株菌株提取的脂肽类化合物粗提物可在血平板上形成透明圈，其中菌株 TS1 形成的透明圈直径为 11.5 mm，菌株 TS3 形成的透明圈直径为 14.0 mm，表明菌株 TS1、TS3 产生的脂肽类化合物具有抗生活性，可通过与红细胞膜上的磷脂双分子层相互作用形成离子通道，破坏膜结构，使细胞内容物释放，引起血细胞死亡。

2.5.2 抑病原细菌活性 测定菌株 TS1、TS3 产生的脂肽类

化合物对病原细菌大白菜软腐病的拈抗活性。结果(图 2-B、表 4)显示，脂肽类化合物在含菌平板上产生抑菌圈，其中菌株 TS3 产生的脂肽类化合物粗提物对病原细菌的抑菌效果非常明显，抑菌圈直径为 16 mm，表明脂肽类化合物具有明显的抑制病原细菌的活性，推测菌株的拈抗活性与其产生的脂肽类化合物有关。



A—脂肽类化合物血平板检测；B—脂肽类化合物抑制病原细菌活性；C—芽孢杆菌降解纤维素形成的透明圈；CKIL1—萎缩芽孢杆菌

图2 脂肽类化合物活性检测及解纤维素活性测定

表 4 生防菌株产生的脂肽类化合物活性检测

菌株	产生的脂肽类化合物	血平板活性		抑病原细菌活性	
		透明圈直径(mm)	抑菌活性	透明圈直径(mm)	抑菌活性
TS1	Surfactin、Fengycin	11.5	+++	10	++
TS3	Surfactin、IturinA	14.0	+++	16	++++

2.6 降解纤维素活性

2.6.1 降解纤维素活性 检测菌株 TS1、TS3 降解纤维素活性。结果(图 2-C、表 5)显示，在 CMC-Na 固体培养基上，菌株 TS1、TS3 均可产生透明圈，表明菌株可利用培养基中的唯一碳源 CMC-Na，并将其降解形成降解透明圈，更确切的说菌株可产生纤维素活性酶，将 CMC 培养基中的 CMC-Na 进行酶促降解，使其革兰氏碘液染色后无法附着染料而形成透明圈，通过透明圈直径的大小可以初步反映降解纤维素活性的大小。菌株 TS1、TS3 产生的降解纤维素透明圈直径分别为 23、17 mm，A 值分别为 3.15、2.33，表现为明显的降解纤维素活性。

2.6.2 菌株产木聚糖酶活性的测定 酶活性计算公式为酶活性(U/mg) = (葡萄糖含量 × 稀释倍数 × 5.56) / 反应液中

表 5 菌株解纤维素活性测定及酶活性测定

菌株	透明圈直径(mm)	菌落直径(mm)	A 值	CMC 酶活性	
				$D_{540\text{ nm}}$	酶活性值(U/mL)
TS1	23	0.73	3.15	0.036	116.76
TS3	17	0.73	2.33	0.065	150.12

酶加入量 × 时间)。酶活性测定结果(表 5)表明，菌株 TS1 酶活性值为 116.76 U/mL，菌株 TS3 的酶活性值为 150.12 U/mL。

3 结论与讨论

青藏高原极地环境微生物资源具有十分广阔的研究和开发前景。芽孢杆菌是一类重要的植物根围促生菌及生防菌，与植物之间存在有益的互作关系。芽孢杆菌通过多途径机制

与植物相互作用,刺激植物产生诱导系统抗病性,抑制植物病害发生、促进植物生长,是生物农药和生物肥料研发和应用的理想菌源<sup>[23]</sup>。芽孢杆菌可通过非核糖体肽途径合成具有抑真菌、细菌、病毒、菌原体等生物活性的脂肽类化合物和聚酮化合物,在农牧业生产中具有良好的应用潜力<sup>[24]</sup>。与营养细胞相比,芽孢杆菌的抗逆芽孢壁中有皮质层,对高温、紫外线及抗菌素等具有很强的抗性,可以耐受饲料加工、饲料储藏和牲畜胃的酸性环境,饲用后在肠道酸性环境中具有高度的稳定性,在畜牧业及饲料产业中同样具有重要的应用价值<sup>[25-28]</sup>。

本研究从青海省托素湖畔骆驼蓬根围土壤中分离筛选到耐盐耐低温芽孢杆菌 TS1、TS3,具有明显的拮抗植物病原细菌和病原真菌活性,Landy 发酵法提取到菌株 TS1、TS3 的脂肽类化合物;MALDI-TOF-MS 分析结果表明,菌株 TS1 可产生脂肽类化合物 Surfactin、Fengycin,菌株 TS3 可产生脂肽类化合物 Surfactin、IturinA,推测芽孢杆菌的拮抗活性与其产生的脂肽类化合物有关。CMC 法测定结果表明,菌株 TS1、TS3 具有降解纤维素活性,2 株菌株可在以 CMC-Na 为唯一碳源的培养基上形成降解透明圈,具有解纤维素活性,其酶活性分别达到 116.76、150.12 U/mL。菌株 TS1 可在 4℃低温条件下生长,菌株 TS3 在 10℃温度条件下和含 NaCl 浓度为 11%的 LB 平板上生长,表明 2 株菌株具有明显的耐盐、耐低温适生特性。目前,耐盐菌是具有重要研究开发价值的微生物资源,耐盐菌的耐盐基因分离及耐盐机制研究,在农业生产、环境修复等方面均有应用潜力;同时,也可研发耐盐生物菌肥,改良盐碱地土壤。本研究分离筛选的菌株 TS1、TS3 具有拮抗病原真菌和病原细菌活性及纤维素降解活性,具有一定的耐盐及低温适生特性,适应高原生态环境,可作为适应高原气候条件的耐盐耐低温生物菌肥和生物农药的研发菌源,此外,在饲料加工生产及作物秸秆还田领域具有一定的研究潜力。

#### 参考文献:

- [1] 赵新林,赵思峰. 枯草芽孢杆菌对植物病害生物防治的作用机理[J]. 湖北农业科学,2011,50(15):3025-3028.
- [2] Liu Y F, Chen Z Y, Ng T B, et al. Bacisubin, an antifungal protein with ribonuclease and hemagglutinating activities from *Bacillus subtilis* strain B-916[J]. Peptides, 2007, 28(3):553-559.
- [3] Ongena M, Jacques P. *Bacillus lipopeptides*: versatile weapons for plant disease biocontrol[J]. Trends in Microbiology, 2008, 16(3):115-125.
- [4] Maget-Dana R, Peypoux F. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties[J]. Toxicology, 1994, 87(1/2/3):151-174.
- [5] Peypoux F, Bonmatin J M, Wallach J. Recent trends in the biochemistry of surfactin[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 51(5):553-563.
- [6] 王青云,林亲录,彭宽,等. 纳豆芽孢杆菌 Bna05 菌株产抗霉脂肽的鉴定[J]. 微生物学通报,2017,44(11):2660-2668.
- [7] 崔海洋,程仕伟,黄田红,等. 产纤维素酶的解淀粉芽孢杆菌分离鉴定及酶学性质研究[J]. 食品科学技术学报,2014,32(3):43-47.
- [8] 李红亚,李文,李术娜,等. 解淀粉芽孢杆菌复合菌剂对玉米秸秆的降解作用及表征[J]. 草业学报,2017,26(6):153-167.
- [9] Wu H J, Wang S, Qiao J Q, et al. Expression of HpaGXooc protein in *Bacillus subtilis* and its biological functions[J]. J Microbiol Biotechnol, 2009, 19(2):194-203.
- [10] 薛鹏琦,刘芳,乔俊卿,等. 油菜菌核病生防芽孢杆菌的分离鉴定及其脂肽化合物分析[J]. 植物保护学报,2011,38(20):127-132.
- [11] 刘芳,薛鹏琦,乔俊卿,等. 西藏低温适生芽孢杆菌的分离鉴定及其抗菌和促生作用[J]. 中国生物防治,2010,26(4):453-460.
- [12] 张楠,杨兴明,徐阳春,等. 高温纤维素降解菌的筛选和酶活性测定及鉴定[J]. 南京农业大学学报,2010,33(3):82-87.
- [13] 谢永丽,高学文. 高寒草甸根围拮抗芽孢杆菌筛选鉴定及脂肽化合物分析[J]. 中国生物防治学报,2012,28(3):367-374.
- [14] 谢永丽,马莉贞,徐志伟,等. 柴达木极端干旱沙地分离芽孢杆菌的分子鉴定及拮抗活性分析[J]. 微生物学通报,2012,39(8):1079-1086.
- [15] 谢永丽,范晶,李云龙. 几株解纤维素的生防芽孢杆菌的分子鉴定及其抗逆促生特性分析[J]. 微生物学通报,2017,44(2):348-357.
- [16] 谢永丽,马莉贞,徐志伟,等. 冻土荒漠区分离低温适生 PGPR 菌的鉴定及其抗菌促生特性[J]. 中国生物防治学报,2014,30(1):94-100.
- [17] 王帅,高圣风,高学文. 枯草芽孢杆菌脂肽类抗生素发酵和提取条件[J]. 中国生物防治,2007,23(4):342-347.
- [18] 王毅,刘云国,习兴梅,等. 枯草芽孢杆菌降解木质纤维素能力及产酶研究[J]. 微生物学杂志,2008,28(4):1-6.
- [19] Guo Y, Zhang J L, Wang H P, et al. Isolation, screening and identification of cellulose decomposing strains in straw-amended soil[J]. Agricultural Science & Technology-Hunan, 2010, 11(4):134-147.
- [20] 杨琦瑶,索雅丽,郭荣君,等. 枯草芽孢杆菌 B006 对黄瓜枯萎病菌和辣椒疫霉病菌的抑制作用及其抗菌组分分析[J]. 中国生物防治学报,2012,28(2):235-242.
- [21] Liu Y S, Feng J X, Duan C J, et al. Isolation and identification of a natural cellulose degrading *Bacillus licheniformis* strain GXN151 and cloning and sequencing of a cellulase gene *cel5A* from the bacterium[J]. Journal of Agricultural And biological Science, 2003, 22(2):132-138.
- [22] 王毅,刘云国,习兴梅,等. 枯草芽孢杆菌降解木质纤维素能力及产酶研究[J]. 微生物学杂志,2008,28(4):1-6.
- [23] Cho S J, Lee S K, Cha B J, et al. Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin A from *Bacillus subtilis* strain KS03[J]. Fems Microbiology Letters, 2010, 223(1):47-51.
- [24] 刘鄯州,陈夕军,梁雪杰,等. 一株萎缩芽孢杆菌 YL3 的鉴定及其脂肽类化合物分析[J]. 中国生物防治学报,2017,33(1):142-150.
- [25] 蒋盼盼,陈志谊,甘颖,等. 解淀粉芽孢杆菌 B1619 对设施蔬菜根结线虫病的防治效果[J]. 江苏农业科学,2017,45(12):81-84.
- [26] 朱弘元,康健,范昕,等. 解淀粉芽孢杆菌 B15 产脂肽的分离鉴定及抑菌机理[J]. 江苏农业科学,2016,44(5):186-189.
- [27] 张新雄,彭锋,毛光平,等. 饲用芽孢杆菌研究与应用进展[J]. 应用与环境生物学报,2013,19(5):891-897.
- [28] 王利宾,孙利娜. 枯草芽孢杆菌作用机制及其在养殖业中的应用研究进展[J]. 饲料博览,2015(1):35-38.