

研究报告

几株解纤维素生防芽孢杆菌的分子鉴定及其抗逆
促生特性分析谢永丽^{1*} Renato D'Ovidio² Stefania Masci² 范晶¹ 李云龙¹

(1. 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)

(2. Faculty of Agriculture, University of Tuscia, Laboratory of Agricultural biology and Agricultural chemistry,
Viterbo, Italy 01100, Italy)

摘要:【目的】探究青藏高原解纤维素生防芽孢杆菌资源。【方法】采用 BOX-PCR 指纹图谱分析、*gyrB* 基因及 16S rRNA 基因序列分析, 对分离自青海互助北山桦树根围的 5 株芽孢杆菌进行分子鉴定; 通过 CMC 法检测菌株降解纤维素活性; 平板对峙法检测菌株拮抗病原真菌及病原细菌活性; 检测菌株的耐盐性、低温适生性; 测定菌株促种子萌发及幼苗生长特性。【结果】5 株菌均鉴定为解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens*; 具有显著降解纤维素的特性, 在 CMC 平板上形成纤维素降解透明圈直径 ≥ 20 mm; 对油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、瓜类枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)、水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)及植物梨火疫病病菌(*Erwinia amylovora*)均有显著拮抗活性; 菌株可在含 NaCl 浓度为 11% 的 LB 平板上正常生长, 在 10 °C 低温条件下生长良好; 菌株 BS11、BS12 菌悬液(细胞浓度 10^6 CFU/mL)可促进水稻种子萌发及幼苗生长。【结论】5 株 *B. amyloliquefaciens* 菌株为抗逆性强的、具有降解纤维素活性的生防芽孢杆菌, 在青藏高原生态农业及畜牧产业中具有应用潜力。

关键词: 解纤维素活性, 芽孢杆菌, 拮抗活性, 分子鉴定, 促生及抗逆性

Molecular identification of cellulose-degrading bio-control *Bacillus*
strains and their stress-resistance and growth-promoting
characteristicsXIE Yong-Li^{1*} Renato D'Ovidio² Stefania Masci² FAN Jing¹ LI Yun-Long¹

(1. College of Agricultural and Animal Husbandry, Qinghai University, Key Laboratory of Altiplano Grassland Resource and Ecology, Province and Education Ministry, Xining, Qinghai 810016, China)

(2. Faculty of Agriculture, University of Tuscia, Laboratory of Agricultural biology and Agricultural chemistry,
Viterbo, Italy 01100, Italy)

Abstract: [Objective] Bio-control *Bacillus* resource with cellulose-degrading research in special

Foundation item: International Sci-Technology Cooperation Project of Qinghai Province (No. 2013-H-805);
Application and Fundamental Research Project of Qinghai Province (No. 2015-ZJ-732)

*Corresponding author: Tel: 86-971-5315462; E-mail: qhdxyl@163.com

Received: January 27, 2016; Accepted: March 21, 2016; Published online (www.cnki.net): May 24, 2016

基金项目: 青海省国际科技合作计划项目(No. 2013-H-805); 青海省(应用)基础研究计划项目(No. 2015-ZJ-732)

*通讯作者: Tel: 86-971-5315462; E-mail: qhdxyl@163.com

收稿日期: 2016-01-27; 接受日期: 2016-03-21; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-05-24

ecological environment of Qinghai-Tibetan Plateau was explored in this research. **[Methods]** Five *Bacillus* strains isolated from rhizosphere of birch in Huzhu Northern Mountain of Qinghai Province, were identified by molecular taxonomy methods including BOX-PCR fingerprints, as well as *gyrB* and 16S rRNA gene partial sequence analysis. Cellulose-degrading activity of these isolates were detected by CMC plate screening method, and antagonistic activity to pathogenic fungi and bacteria were checked by plate confrontation method. Furthermore, growth-promoting and stress-resistance activity of isolates including salt-resistance and low-temperature adaptability were tested. **[Results]** Five isolates were identified as *Bacillus amyloliquefaciens* and all of isolates presented distinguished cellulose-degrading activity and could form transparent zone (diameter ≥ 20 mm) of cellulose-degrading on CMC medium. Isolates presented distinct antagonistic activity and bio-control efficacy to *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *Erwinia amylovora*. Strains could grow under the condition of 10 °C low-temperature as well as LB medium with 11% NaCl concentration, and bacterial cell suspension (concentration of 10^6 CFU/mL) of strains BS11 and BS12 could promote seed germination and seedling-growth of rice. **[Conclusion]** Five *B. amyloliquefaciens* strains own advantage with stress-resistance, cellulose-degrading and bio-control characteristic, thus possess application potential in ecological agriculture and animal husbandry field in Qinghai Province.

Keywords: Cellulose-degrading activity, *Bacillus* spp., Antagonistic activity, Molecular identification, Growth-promoting and stress-resistance

农牧业是青海省重要的经济支柱产业, 青藏高原海拔高, 温度低, 秋冬季节草场枯黄, 干草或加工饲料是家畜的重要饲料来源; 利用有益微生物提高牧草养分的释放效率, 提高牲畜对饲料的消化吸收效率, 是农牧业发展中重要的研究课题。因此, 筛选适合高原生态环境的纤维素降解菌至关重要。芽孢杆菌属(*Bacillus* spp.) 细菌能产生对热、紫外、干旱、盐碱等有抗性的芽孢, 具有很强的环境适应性, 在农业、畜牧业、工业、食品业、医学等方面都扮演着极其重要的角色, 是越来越引起人们重视和研究的微生物资源^[1]。

芽孢杆菌的抗逆芽孢壁中有皮质层, 与营养细胞相比, 芽孢对热、紫外及抗菌素等具有很强的抗性, 可以耐受饲料加工、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。芽孢杆菌制剂以内孢子形式存在, 当孢子进入肠道后可迅速复活, 产生有益代谢产物, 提高动物机体免疫力, 因此, 芽孢杆菌在饲料加工业具有研究和应用潜力^[2]。大量研究表明: 芽孢杆菌可产生内切纤维素酶、外切纤维素酶、葡萄糖苷酶、甘露聚糖酶等纤维素活性酶, 可以有效降解牧草及饲料中的

纤维素成分^[3]。此外, 芽孢杆菌可通过非核糖体肽途径(Nonribosomal)合成具有抑真菌、细菌、病毒、菌原体、抗肿瘤等生物活性的脂肽化合物(Lipopeptide)和聚酮化合物(Polyketide), 对环境友好、对人畜安全^[4-6]。利用可产生降解纤维素酶类的生防芽孢杆菌, 应用于饲料加工生产或作物秸秆还田, 通过芽孢杆菌产生的纤维素降解酶来加速草料或秸秆纤维素的分解, 使养分得到最有效的释放; 同时, 作为生防菌的芽孢杆菌还兼具对病原微生物的拮抗活性, 可有效预防牲畜疾病^[7-8]和控制植物病害发生风险, 有益于生态畜牧业及生态农业。

本研究自青海互助北山桦树根围分离筛选到几株芽孢杆菌菌株, 均表现出显著的纤维素降解活性及拮抗病原真菌及病原细菌的活性。通过BOX-PCR 指纹图谱分析、16S rRNA 基因及 *gyrB* 基因序列分析鉴定其种属。测定菌株抗盐性、耐低温性、促生特性, 为高原生态农业及畜牧业生产筛选优质抗逆性解纤维素生防芽孢杆菌资源。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

芽孢杆菌菌株 BS11、BS12、BS13、BS14、BS15

分离自青海互助北山红桦(*Betula albo-sinensis* Burk)根围;油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、瓜类枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)、水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)、植物梨火疫病病菌(*Erwinia amylovora*)由青海大学高原草地资源与生态省部共建实验室保存。

1.2 培养基

细菌 LB 培养基、NA 培养基参考 Wu 等^[9]方法配制;真菌 PDA 培养基参考薛鹏琦等^[10]方法配制;低温 1C 培养基参考刘芳等^[11]方法配制;CMC 培养基配制参考张楠等^[12]方法配制。

1.3 主要试剂和仪器

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, TaKaRa 公司;PCR 产物纯化试剂盒(Axygen DNA 凝胶回收试剂盒 AP-GX-50), 爱思进生物技术(杭州)有限公司。Applied Biosystems® PCR 仪(2720 型), 美国 Applied Biosystems 公司。

1.4 芽孢杆菌分子鉴定

1.4.1 BOX-PCR 指纹图谱: 基因组 DNA 提取方法参照 Wu 等^[9]方法。BOX-PCR 扩增引物为 BOXA1R: 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'。反应体系(25 μ L): 10 \times rTaq buffer 2.5 μ L, dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) 2 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 2.5 μ L, DNA 模板 1.5 μ L, 引物(20 μ mol/L) 2.5 μ L, TaKaRa rTaq 酶(5 U/ μ L) 0.5 μ L, ddH₂O 13.5 μ L。扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 7 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 53 $^{\circ}$ C 1 min, 65 $^{\circ}$ C 8 min, 34 个循环; 65 $^{\circ}$ C 16 min。对 BOX-PCR 扩增产物进行电泳检测, 在 2.0% (质量体积比)的 LE-琼脂糖凝胶中, 85 V 电泳 4 h, 检测扩增效果, 获得凝胶成像图谱^[13]。

1.4.2 16S rRNA 基因序列鉴定: 16S rRNA 基因扩增正向引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', 反向引物 1492R: 5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3'。反应体系(25 μ L): 10 \times ExTaq buffer 2.5 μ L, dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) 2 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 2 μ L, DNA 模板 0.5 μ L, 正向引物

(20 μ mol/L) 0.5 μ L, 反向引物(20 μ mol/L) 0.5 μ L, TaKaRa ExTaq 酶(5 U/ μ L) 0.25 μ L, ddH₂O 16.75 μ L。PCR 扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 50 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 34 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min^[14]。将 16S rRNA 基因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, 通过 MEGA 3.1 软件^[15]对分离的芽孢杆菌及模式菌(*B. pumilus* ATCC7061、*B. licheniformis* ATCC14580、*B. thuringiensis* HD868、*B. licheniformis* ATCC8480、*B. cereus* GP、*B. atrophaeus* BCRC17530、*B. subtilis* 168 及 *B. amyloliquefaciens* FZB42)序列进行系统发育分析。

1.4.3 gyrB 基因序列鉴定: *gyrB* 基因扩增引物序列, 正向引物 UP1: 5'-GAAGTCATCATGACCGT TCTGCAYGCNCGGNGGNAARTTYGA-3', 反向引物 UP2r: 5'-AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCC RTCNACRTCNGCRTCNGTCAT-3'。反应体系(25 μ L): 10 \times ExTaq buffer 2.5 μ L, dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) 2 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 2 μ L, DNA 模板 0.5 μ L, 正向引物(20 μ mol/L) 0.5 μ L, 反向引物(20 μ mol/L) 0.5 μ L, TaKaRa ExTaq 酶(5 U/ μ L) 0.25 μ L, ddH₂O 16.75 μ L。PCR 扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 4 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 62 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 8 min^[16]。将 *gyrB* 基因扩增产物纯化测序, 测序所得序列通过 NCBI 数据库进行 BLAST 比对, 通过 MEGA 3.1 软件^[15]对分离的芽孢杆菌及模式菌序列进行系统发育分析。

1.5 降解纤维素活性测定

在 CMC 筛选培养基平板上, 呈“十”字形分布的 4 个接种点, 放置直径 4 mm 滤纸小圆片。将供试菌株在 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 12 h 后, 取待测菌液 5 μ L 点于滤纸片中央, 每个处理重复 3 次, 将平板倒置于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 2 d 后, 将革兰氏碘染液(Gram iodine)注入并淹没平板表面, 盖上平皿盖, 静置 4 min 后, 倒去染液, 观测并记录实验结果。测定并记录透明圈直径, 菌落直径, 并计算两者比值 A ^[17]。

1.6 拮抗活性测定

1.6.1 拮抗病原真菌活性: 分别将在 26 °C 培养箱中活化的油菜菌核菌 PDA 平板、瓜类枯萎病菌 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, 放置直径 4 mm 的滤纸小圆片。将供试菌株接种于 LB 液体培养基, 37 °C、200 r/min 培养 14 h 后, 吸取菌液 5 μ L, 接种于滤纸片, 每个处理重复 3 次, 放入 26 °C 恒温培养箱中培养 2–3 d 后, 取出观测并记录抑菌结果^[18]。

1.6.2 拮抗病原细菌活性: 将水稻白叶枯病菌、植物梨火疫病菌按比例(1:30)加入冷却到 50 °C 左右的 NA 液体培养基中混匀, 制成含菌平板, 在距离平板中心呈“十”字形分布的 4 个接种点, 放置直径 4 mm 滤纸小圆片。将供试菌株接种于 LB 液体培养基, 37 °C、200 r/min 条件下培养 14 h 后, 吸取菌液 5 μ L, 接种于滤纸片, 每个处理重复 3 次。置于 28 °C 培养箱培养 2–3 d, 观察并记录结果^[18]。

1.7 芽孢杆菌耐逆性测定

1.7.1 耐盐性测定: 将供试菌株分别接种到含 NaCl 浓度为 3%、5%、7%、9%、11%、13%、15% 的 LB 培养基中培养过夜达 12 h, 吸取 50 μ L 菌液涂平板于含 NaCl 浓度分别为 3%、5%、7%、9%、11%、13%、15% 的 LB 培养基平板上, 37 °C 培养, 每个处理 3 个重复, 5 d 时间为限, 每天观察并记录菌株生长情况。

1.7.2 低温适生性测定: 将供试菌株接种到低温 1C 液体培养基中培养过夜达 12 h, 取 10 μ L 菌液点于 1C 固体培养基平板上, 设置 4 个温度梯度 4、10、14、18 °C 进行培养, 每个处理 3 次重复。每天观察并记录生长情况, 5 d 时间为限, 测定菌株的耐低温特性。

1.8 芽孢杆菌促生实验

1.8.1 芽孢杆菌菌悬液制备: 挑取芽孢杆菌单菌落接种到 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 12 h, 将培养好的菌液在 4 °C、8 000 r/min 离心

5 min, 弃上清, 用无菌水洗菌体 1–2 次, 后用无菌水悬浮菌体, 将菌悬液细胞浓度调整至 10^6 CFU/mL, 制备成芽孢杆菌菌悬液。

1.8.2 促水稻种子萌发: 选择种皮完好的水稻种子, 在 20% 次氯酸钠溶液中处理 20 min, 无菌水冲洗 3–4 次。将水稻种子在芽孢杆菌菌悬液(细胞浓度 10^6 CFU/mL)中浸种 24 h, 无菌水处理作对照。将浸种后的种子播于铺有滤纸的培养皿中, 置于光照培养箱中培养(28 °C, 光期 16 h/暗期 8 h) 5 d 后, 测定种子萌发后的平均芽长、根长、鲜重(每个处理 3 次重复, 每个重复 8 枚种子)。

1.8.3 水稻促生: 同上所述, 将消毒并清洗好的水稻种子于无菌水浸种 48 h, 以芽孢杆菌菌悬液(细胞浓度 10^6 CFU/mL)浸种 2 h, 无菌水处理作对照。将种子包裹于直径 15 cm 定性滤纸中, 每张滤纸包裹 8 枚种子。滤纸卷竖直放入盛有水的塑料杯中, 水面不超过种子所在位置, 在光照培养箱中培养(28 °C, 光期 16 h/暗期 8 h) 10 d 后, 测定水稻幼苗平均株高、根长及鲜重, 每个处理 3 次重复, 每个重复以 8 株幼苗为测定单位。

2 结果与分析

2.1 菌株分子鉴定

2.1.1 BOX-PCR 指纹图谱分析: 分别提取菌株 BS11、BS12、BS13、BS14、BS15 的基因组 DNA, 进行 BOX-PCR 扩增, 扩增到大小在 200–5 000 bp 之间的连续条带, 得到 BOX-PCR 指纹图谱。扩增结果表明(图 1): 菌株 BS11、BS12、BS13、BS14、BS15 具有完全相同的 BOX-PCR 指纹图谱, 为同种芽孢杆菌。

2.1.2 *gyrB* 基因及 16S rRNA 基因序列分析: 以菌株 BS11、BS12 的基因组 DNA 为模板扩增 16S rRNA 基因, 扩增到大小约 1 500 bp 的 PCR 特征性条带, 与芽孢杆菌 16S rRNA 基因的理论值基本相符, 将测序结果在 NCBI 中与已知序列进行 BLAST 比对, 比对结果表明: 菌株 BS11 与解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* M34 (GenBank 登录

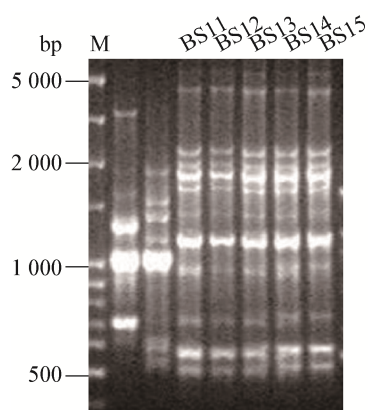


图1 分离菌株的 BOX-PCR 指纹图谱

Figure 1 BOX-PCR fingerprints of isolates

注：菌株 BS11、BS12、BS13、BS14、BS15 具有完全相同的 BOX-PCR 指纹图谱。

Note: Isolates BS11, BS12, BS13, BS14, BS15 presented identical BOX-PCR fingerprint.

号 :GQ340497.1)、菌株 BS12 与 *B. amyloliquefaciens* EA1-10 (GenBank 登录号 :JF496398.1)的 16S rRNA 基因的序列相似(或一致)性均为 99%。以菌株 BS11、BS12 基因组 DNA 为模板扩增 *gyrB* 基因, 扩增到大小约 1 300 bp 的 PCR 特征性条带,与芽孢杆菌 *gyrB* 基因的理论值基本相符,将测序结果在 NCBI 中,用 BLAST 软件将所测菌株序列与 GenBank 中已知序列进行比较,比对结果表明:菌株 BS11、BS12 与 *B. amyloliquefaciens* FZB42 (GenBank 登录号 :JN575339.1)的 *gyrB* 基因序列相似(或一致)分别为 99%和 97%。

通过 BOX-PCR 指纹图谱分析、16S rRNA 基因

及 *gyrB* 基因序列比对分析结果,菌株 BS11、BS12、BS13、BS14、BS15 鉴定为解淀粉芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens* (表 1)。

2.2 解纤维素活性测定

通过 CMC 法检测菌株 BS11、BS12、BS13、BS14、BS15 降解纤维素的活性,结果表明:5 株菌株均可在 CMC 培养基上产生透明圈,表明菌株可产生纤维素酶降解 CMC-Na,使其在革兰氏碘液 (Gram iodine)染色后无法附着染料而被洗脱形成透明圈。透明圈直径大小可初步反映菌株降解纤维素活性(图 2),测定结果:菌株 BS11、BS12、BS13、BS14、BS15 形成的透明圈直径分别为 26、25、26、25、26 mm, *A* 值分别为 3.13、3.08、3.51、3.20、3.20,表明 5 株菌株均具有显著的降解纤维素活性(图 2,表 1)。

2.3 菌株的拮抗活性测定

2.3.1 拮抗病原真菌活性: 分别以油菜菌核菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*)及瓜类枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum*)为病原真菌指示菌,测定菌株拮抗病原真菌活性。实验结果表明:5 株菌株拮抗油菜菌核菌的抑菌圈半径 ≥ 13 mm;拮抗瓜类枯萎病菌抑菌圈半径 ≥ 12 mm;均具有显著的拮抗病原真菌活性(图 3,表 2)。

2.3.2 拮抗病原细菌活性: 以水稻白叶枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)和植物梨火疫病病菌 (*Erwinia amylovora*)为病原细菌指示菌,检测菌株 BS11、BS12、BS13、BS14、BS15 拮抗病原细菌活

表 1 菌株降解纤维素活性及菌株鉴定结果

Table 1 Cellulose degradation activity and identification result of *Bacillus* strain

菌株 Strains	透明圈直径 Transparent zone diameter (<i>D</i> , mm)	菌落直径 Colony diameter (<i>d</i> , mm)	<i>A</i> 值 <i>A</i> value (<i>D/d</i>)	菌株鉴定结果 Identification result
BS11	26	8.3	3.13	<i>B. amyloliquefaciens</i>
BS12	25	8.1	3.08	<i>B. amyloliquefaciens</i>
BS13	26	7.4	3.51	<i>B. amyloliquefaciens</i>
BS14	25	7.8	3.20	<i>B. amyloliquefaciens</i>
BS15	26	8.1	3.20	<i>B. amyloliquefaciens</i>

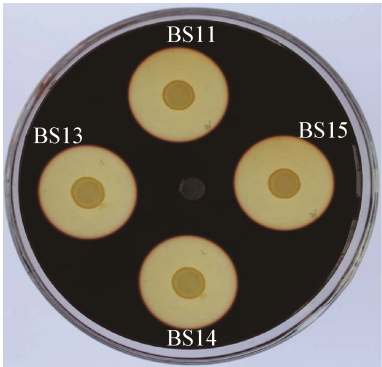


图 2 芽孢杆菌降解纤维素形成的透明圈
Figure 2 Transparent zone of cellulose degradation produced by *Bacillus* strain

性。实验结果表明：5 株菌株拮抗水稻白叶枯病菌的抑菌圈半径 ≥ 10 mm,拮抗植物梨火疫病病菌抑菌圈半径 ≥ 10 mm，均表现显著拮抗病原细菌活性(图 3，表 2)。

2.4 芽孢杆菌抗逆性

2.4.1 芽孢杆菌低温适生性：测定菌株 BS11、BS12、BS13、BS14、BS15 分别在 4、10、14、18℃ 低温条件下生长情况。结果显示：在 14、18℃ 条件下，5 株菌株培养 1 d 后均长出菌圈；10℃ 低温条件下，5 株菌株正常生长，培养 2 d 后即出现明显的菌苔；4℃ 低温条件，5 株菌株均无法生长。5 株分离菌株可在 10℃ 低温条件下正常生长(表 3)。

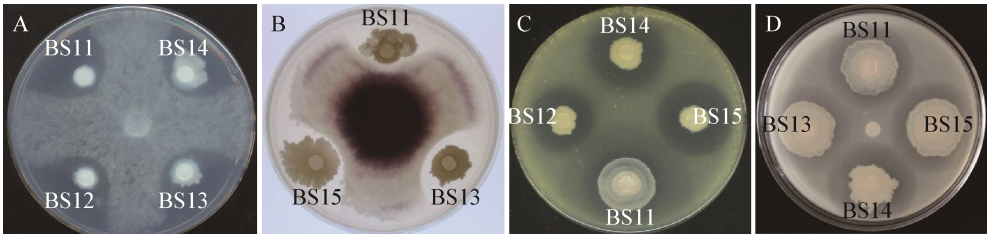


图 3 菌株拮抗病原真菌及病原细菌活性

Figure 3 Antagonistic activity of *Bacillus* strains to pathogenic fungus and bacteria

注：A：拮抗油菜菌核菌；B：拮抗瓜类枯萎病菌；C：拮抗水稻白叶枯病菌；D：拮抗植物梨火疫病病菌。
Note: A: Antagonistic activity to *Sclerotinia sclerotiorum*; B: Antagonistic activity to *Fusarium oxysporum*; C: Antagonistic activity to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*; D: Antagonistic activity to *Erwinia amylovora*.

表 2 芽孢杆菌拮抗活性测定								
Table 2 Characterization of antagonistic properties of isolates								
菌株 Strains	抑油菜菌核病菌		抑瓜类枯萎病菌		抑水稻白叶枯病菌		抑植物梨火疫病病菌	
	Antagonistic towards <i>S. s</i>		Antagonistic towards <i>F. o</i>		Antagonistic towards <i>X. oo</i>		Antagonistic towards <i>E. a</i>	
	抑菌圈半径 Inhibition zone radius (mm)	抑菌活性 Antagonistic activity	抑菌圈半径 Inhibition zone radius (mm)	抑菌活性 Antagonistic activity	抑菌圈半径 Inhibition zone radius (mm)	抑菌活性 Antagonistic activity	抑菌圈半径 Inhibition zone radius (mm)	抑菌活性 Antagonistic activity
BS11	14	+++	14	+++	10	+++	11	+++
BS12	14	+++	14	+++	10	+++	11	+++
BS13	15	++++	14	+++	12	+++	10	+++
BS14	13	+++	14	+++	11	+++	10	+++
BS15	13	+++	12	+++	12	+++	11	+++

注：+：抑菌圈直径 0-5 mm；++：抑菌圈直径 5-10 mm；+++：抑菌圈直径 10-15 mm；++++：抑菌圈直径 ≥ 15 mm。
Note: +: Inhibition zone radius 0-5 mm; ++: Inhibition zone radius 5-10 mm; +++: Inhibition zone radius 10-15 mm; ++++: Inhibition zone radius ≥ 15 mm.

2.4.2 芽孢杆菌耐盐性: 测定菌株的耐盐性, 将 5 株菌株的菌液分别涂板于含 NaCl 浓度为 3%、5%、7%、9%、11%、13%、15% 的 LB 固体培养基上, 置于 37 °C 条件下培养。结果显示: 5 株菌株均可在含 NaCl 浓度为 3%、5%、7%、9% 的 LB 培养基上生长良好, 在含 NaCl 浓度 11% 的 LB 培养基上可以生长, 在含 NaCl 浓度为 13%、15% 的培养基上不能生长。5 株菌株可耐受的盐浓度为 11% (表 3)。

2.5 芽孢杆菌促生作用

2.5.1 促水稻种子萌发: 以菌株 BS11、BS12 菌悬液(细胞浓度 10^6 CFU/mL)浸种 24 h 后播种, 测定菌株促水稻种子萌发效果。结果表明: 菌株 BS11 处理种子萌发后的平均芽长、根长分别为 2.525、2.725 cm, 与对照相比分别增加了 48.5% 和 30.5%,

主根增长, 侧根明显增多, 平均鲜重增加了 27.4%。菌株 BS12 处理水稻种子, 萌发后幼苗的平均芽长、根长分别为 2.288 cm 和 2.633 cm, 与对照相比分别增加 34.6% 和 27%, 平均鲜重增加了 23.3%; 菌株 BS11、BS12 表现出显著的催芽效果(表 4)。

2.5.2 促水稻幼苗生长: 测定菌株 BS11、BS12 对水稻幼苗促生效果。结果显示: 与对照相比, 芽孢杆菌菌悬液浸种后的水稻幼苗的株高、根长均显著性提高(图 4, 表 5)。其中, BS11 菌液浸种处理后, 水稻幼苗的平均株高、根长分别达到 8.76 cm 和 10.32 cm, 与对照相比分别增加 41.3% 和 18.6%, 平均鲜重增加 34.9%。BS12 菌液处理的水稻幼苗平均株高和根长分别为 9.10 cm 和 9.77 cm, 与对照相比分别增加了 46.7% 和 12.3%, 平均鲜重增加 31.5%; 菌株 BS11、BS12 表现出显著的促生效果。

表 3 生防菌株的耐盐性及低温适生性
Table 3 Salt-resistance character and low temperature adaptability of *Bacillus* strains

菌株 Strains	菌株耐盐性 Salt-resistance character							菌株低温适生性 Low-temperature adaptability			
	3%	5%	7%	9%	11%	13%	15%	18 °C	14 °C	10 °C	4 °C
BS11	+++	+++	+++	+++	++	-	-	+++	+++	++	-
BS12	+++	+++	+++	+++	++	-	-	+++	+++	++	-
BS13	+++	+++	+++	+++	++	-	-	+++	+++	++	-
BS14	+++	+++	+++	+++	++	-	-	+++	+++	++	-
BS15	+++	+++	+++	+++	++	-	-	+++	+++	++	-

注: +++: 生长良好; ++: 正常生长; +: 缓慢生长; -: 不能生长。

Note: +++: Growth well; ++: Growth normal; +: Growth slowly; -: Nonviable.

表 4 芽孢杆菌促水稻种子萌发效率
Table 4 The germination effect of rice seeds promoted by biocontrol *Bacillus* spp.

菌株 Strains	地上部分 Aboveground part		地下部分 Underground part		鲜重 Fresh weight (g)	鲜重增加 Fresh weight increased (%)
	芽长 Sprout length (cm)	催芽效果 Accelerating germination effect (%)	根长 Root length (cm)	催芽效果 Accelerating germination effect (%)		
BS11	2.525±0.054	48.5	2.725±0.018	30.5	0.432±0.009	27.4
BS12	2.288±0.046	34.6	2.633±0.028	27.0	0.414±0.011	23.3
CK	1.700±0.036	0.0	2.088±0.022	0.0	0.339±0.005	0.0

注: CK 为未经处理的水稻种子。

Note: CK means control.

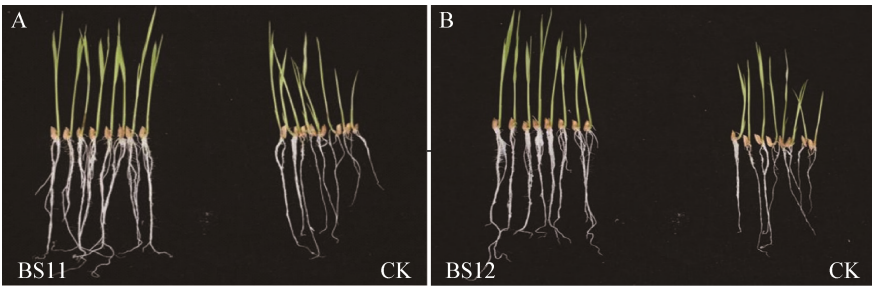


图 4 芽孢杆菌促水稻幼苗生长
Figure 4 Effect of *Bacillus* strains on rice growth

注：A：菌株 BS11 促水稻幼苗生长；B：菌株 BS12 促水稻幼苗生长。
Note: A: Effect of strain BS11 on rice growth; B: Effect of strain BS12 on rice growth.

表 5 生防芽孢杆菌对水稻幼苗的促生效果 Table 5 Effect of <i>Bacillus</i> strains on rice growth						
菌株 Strains	地上部分 Aboveground part		地下部分 Underground part		幼苗鲜重(8 株) Fresh weight of seedling (g)	增重效果 Weight increased effect (%)
	平均株高 Average plant height (cm)	促生效果 Growth promoting effect (%)	平均根长 Average root length (cm)	促生效果 Growth promoting effect (%)		
BS11	8.76±0.041	41.3	10.32±0.051	18.6	3.98±0.028	34.9
BS12	9.10±0.033	46.7	9.77±0.037	12.3	3.88±0.033	31.5
CK	6.20±0.024	0.0	8.70±0.031	0.0	2.95±0.022	0.0

注：CK：未经菌液处理的水稻。
Note: CK: Untreated rice seeds.

3 结论与讨论

芽孢杆菌在畜牧业中具有重要的研究和应用价值。芽孢杆菌可通过非核糖体肽途径合成具有抑菌、病毒、真菌效果的脂肽化合物和聚酮化合物，芽孢杆菌抗逆性强、耐高温高压、耐酸碱盐、易贮存等优良特性，被认为是理想的微生态制剂和微生物饲料添加剂。现在许多国家已大量使用芽孢杆菌作为饲料添加剂，并取得了丰硕的成果，Deng 等^[7]研究发现分离自青藏高原的 *B. subtilis* RJGP16 具有促进新生仔猪小肠细胞免疫和体液免疫作用，菌株可通过胞外成分激活小肠 TLR9 的表达，诱导细胞因子 IL-6 的分泌，促进 IgA 分泌细胞数量增加来提高仔猪免疫力^[7]。芽孢杆菌对环境友好、对人畜安全，是理想的饲料添加剂和微生态制剂的研发菌源，在畜牧业生产中极具研究和应用潜力。

在青藏高原，农作物秸秆常作为牲畜秋冬季

节的饲料来源，传统农业中秸秆资源不经过处理直接用作饲料，利用效率低。通过有益微生物作为饲料添加剂去分解秸秆中的纤维素等多糖，使之降解为容易被动物机体吸收和利用的单糖、寡糖成分，可有效增强秸秆营养成分的释放效率，提高牲畜对养分的吸收。此外，秸秆还田也是目前青海省积极推广的生态农业实施方法，秸秆还田可有效改善土壤物理性状，增加土壤养分含量。研究表明，作物秸秆还田会对农田土壤环境及农田小气候产生影响，要求秸秆中的添加菌株具有良好的环境适应能力^[19]，芽孢杆菌本身良好的抗逆特性及可分泌胞外纤维素酶的特性，具备纤维素降解菌的先天优势。

高原特殊生境孕育适应高原生境的芽孢杆菌资源，本研究自青海互助桦树根围分离筛选到几株芽孢杆菌菌株，在 CMC 平板上形成纤维素降解透明圈直径≥20 mm，具有显著的纤维素降解活性；

BOX-PCR 指纹图谱分析、*gyrB* 基因及 16S rRNA 基因序列分析将几株芽孢杆菌鉴定为解淀粉芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens*；几株菌株对油菜菌核病原真菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、瓜类枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)、水稻白叶枯病原细菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)及植物梨火疫病病原菌(*Erwinia amylovora*)均有显著拮抗活性；可在含 NaCl 浓度为 11% 的 LB 平板上正常生长，在 10 °C 低温条件下生长，具备一定的耐盐性和低温适生性。几株解纤维素芽孢杆菌兼具对病原菌的拮抗活性，同时具有耐低温、耐盐的抗逆特性，适应高原特殊生态环境，如应用于饲料加工或秸秆还田，既可降低植物病害发生，又可提高饲料的卫生品质，在高原生态农业及畜牧业中具有很好的研究意义和应用潜力。

目前，芽孢杆菌的防病及促生特性在农业生产中得到了广泛的应用，诸多学者研究芽孢杆菌的抗病促生机制，筛选抗病促生效果显著的芽孢杆菌应用于农业生产及生物防治，如 Hu 等^[20]利用枯草芽孢杆菌防治油菜菌核病并对油菜种子进行催芽，陈志谊等^[21]利用枯草芽孢杆菌 B-916 防治水稻纹枯病，张霞等^[22]利用枯草芽孢杆菌 B931 防治植物病害并促进植物生长，取得了一定的成效。本研究中分离筛选的纤维素降解菌株 *B. amyloliquefaciens* BS11、BS12 具备显著催芽、促生及拮抗病原菌活性，并适应高原特殊生态环境，作为生物菌肥和生物农药研发菌源在高原农业生产及生态植被恢复中同样具有一定的应用潜力。

参 考 文 献

- [1] Xie YL, Gao XW. Screening and identification of low temperature-adapted antagonistic *Bacillus* isolated from Kekexili region of West China and the analysis of the isolates lipopeptide compounds[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2013, 24(1): 149-155 (in Chinese)
谢永丽, 高学文. 可可西里低温适生拮抗芽孢杆菌的筛选鉴定及脂肽化合物分析[J]. 应用生态学报, 2013, 24(1): 149-155
- [2] Wang W, Qin Y, Li S, et al. Research progress on microecological preparation of *Bacillus subtilis*[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2013, 40(11): 217-220 (in Chinese)
王伟, 秦瑶, 李爽, 等. 枯草芽孢杆菌微生态制剂的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2013, 40(11): 217-220
- [3] Wang Y, Liu YG, Xi XM, et al. Lignocellulose degrading ability of *Bacillus subtilis* and its enzyme production[J]. Journal of Microbiology, 2008, 28(4): 1-6 (in Chinese)
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
- [4] Gao XW, Yao SY, Huang P, et al. Lipopeptide antibiotics produced by the engineered strain *Bacillus subtilis* GEB3 and detection of its bioactivity[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2003, 36(12): 1496-1501 (in Chinese)
高学文, 姚仕义, Huang P, 等. 基因工程菌枯草芽孢杆菌 GEB3 产生的脂肽类抗生素及其生物活性研究[J]. 中国农业科学, 2003, 36(12): 1496-1501
- [5] Romero D, de Vicente A, Rakotoaly RH, et al. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*[J]. Molecular Plant-microbe Interactions, 2007, 20(4): 430-440
- [6] Xie YL, Gao XW. Screening and identification of bio-control *Bacillus* strains isolated from rhizosphere of altiplano meadow and its lipopeptide compounds[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2012, 28(3): 367-374 (in Chinese)
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
- [7] Deng J, Li YF, Zhang JH, et al. Co-administration of *Bacillus subtilis* RJGP16 and *Lactobacillus salivarius* B1 strongly enhances the intestinal mucosal immunity of piglets[J]. Research in Veterinary Science, 2013, 94(1): 62-68
- [8] Wu CB, Qiu JJ, Guan X. *Bacillus thuringiensis* and its applications in animal diseases control[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2008, 24(7): 17-21 (in Chinese)
吴昌标, 邱津津, 关雄. 苏云金芽孢杆菌及其在动物疾病防治上的应用[J]. 中国农学通报, 2008, 24(7): 17-21
- [9] Wu HJ, Wang S, Qiao JQ, et al. Expression of HpaGXooc protein in *Bacillus subtilis* and its biological functions[J]. Journal of Microbiology & Biotechnology, 2009, 19(2): 194-203
- [10] Xue PQ, Liu F, Qiao JQ, et al. Screening of *Bacillus* strains with high inhibition on rape *Sclerotinia* disease and its lipopeptide compounds detection[J]. Journal of Plant Protection, 2011, 38(2): 127-132 (in Chinese)
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(2): 127-132
- [11] Liu F, Xue PQ, Qiao JQ, et al. Isolation and identification of a low-temperature-adapted *Bacillus* in Tibet and its antagonistic and growth-promoting effect[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2010, 26(4): 453-460 (in Chinese)
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] Zhang N, Yang XM, Xu YC, et al. Screening, cellulase activity measurement and identification of cellulose-decomposing bacteria[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2010, 33(3): 82-87 (in Chinese)
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] Xie YL, Ma LZ, Xu ZW, et al. Identification of low-temperature adapting PGPR strains isolated from frozen desert area and their antimicrobial and growth-promoting activity[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2014, 30(1): 94-100 (in Chinese)
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
- [14] Bavykin SG, Lysov YP, Zakhariev V, et al. Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and *gyrB* gene sequence analysis to determine phylogenetic relationships of *Bacillus cereus* group

- microorganisms[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(8): 3711-3730
- [15] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. Briefings in Bioinformatics, 2004, 5(2): 150-163
- [16] Yamamoto S, Harayama S. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61: 1104-1109
- [17] Cui HY, Cheng SW, Huang TH, et al. Screening and identifying of *Bacillus amyloliquefaciens* for cellulase production and its enzymatic characters[J]. Journal of Food Science and Technology, 2014, 32(3): 43-47, 53 (in Chinese)
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, 53
- [18] Xie YL, Ma LZ, Xu ZW, et al. Molecular identification of *Bacillus* strains isolated from extreme dry-sand environment in Qinghai Chaidamu region and its lipopeptide compound analysis[J]. Microbiology China, 2012, 39(8): 1079-1086 (in Chinese)
- 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
- [19] Trivedi N, Gupta V, Kumar M, et al. An alkali-halotolerant cellulase from *Bacillus flexus* isolated from green seaweed *Ulva lactuca*[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 83(2): 891-897
- [20] Hu XJ, Roberts DP, Jiang ML, et al. Decreased incidence of disease caused by *Sclerotinia sclerotiorum* and improved plant vigor of oilseed rape with *Bacillus subtilis* Tu-100[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 68(6): 802-807
- [21] Chen ZY, Gao TD, Yan DF, et al. Result of controlling sheath blight of rice with antagonistic bacteria (*Bacillus subtilis* 916) under field conditions[J]. Chinese Journal of Biological Control, 1997, 13(2): 75-78 (in Chinese)
陈志谊, 高太东, 严大富, 等. 枯草芽孢杆菌 B-916 防治水稻纹枯病的田间试验[J]. 中国生物防治, 1997, 13(2): 75-78
- [22] Zhang X, Tang WH, Zhang LQ, et al. Biological control of plant diseases and plant growth promotion by *Bacillus subtilis* B931[J]. Acta Agronomica Sinica, 2007, 33(2): 236-241 (in Chinese)
张鑫, 唐文华, 张力群. 枯草芽孢杆菌 B931 防治植物病害和促进植物生长的作用[J]. 作物学报, 2007, 33(2): 236-241

编辑部公告**邀请您关注《微生物学通报》公众微信号**

为了更好地与读者、作者、审稿专家和编委朋友们及时沟通、方便服务,《微生物学通报》已开通公众微信服务号。作者通过微信能及时收到稿件各流程通知,第一时间了解稿件进程并及时处理;审稿专家和编委可通过微信及时收到审稿邀请,还可通过手机审稿;读者通过微信可了解《微生物学通报》文章目录,查找阅读感兴趣的文章。

关注办法:

- 1、在微信公众号搜索“微生物学通报”或“wswxtb”;
- 2、用微信扫右边二维码:

