

研究报告

吐鲁番戈壁滩耐热微生物及产酶能力

李丽霞, 文凤, 罗丹, 刘琴, 夏占峰*

塔里木大学 生命科学与技术学院 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室,
新疆 阿拉尔 843300

李丽霞, 文凤, 罗丹, 刘琴, 夏占峰. 吐鲁番戈壁滩耐热微生物及产酶能力[J]. 微生物学通报, 2024, 51(9): 3438-3453.

LI Lixia, WEN Feng, LUO Dan, LIU Qin, XIA Zhanfeng. Resources and enzyme production of thermotolerant microorganisms in the Gobi Desert of Turpan[J]. Microbiology China, 2024, 51(9): 3438-3453.

摘要: 【背景】吐鲁番盆地干燥少雨、夏季气温高、紫外线辐射强, 普通微生物难以存活, 是发掘耐热微生物资源的宝地。【目的】获得吐鲁番盆地耐热微生物资源, 探索其产耐热酶能力, 促进新疆耐热微生物资源的开发和应用。【方法】以吐鲁番戈壁滩表层沙土样品为实验对象, 利用不同营养水平的 6 种培养基, 经 50 °C 培养分离耐热菌株, 揭示吐鲁番戈壁滩表层耐热微生物的种类, 并检测菌株在高温下产淀粉酶、纤维素酶、木聚糖酶、葡聚糖酶及蛋白酶的能力。【结果】共分离获得 41 株耐热细菌, 分布在芽孢杆菌科(*Bacillaceae*)的 6 个属, 分别是芽孢杆菌属(*Bacillus*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、短短芽孢杆菌属(*Brevibacillus*)、厌氧芽孢杆菌属(*Anoxybacillus*)、好氧芽孢杆菌属(*Aeribacillus*)和热芽孢杆菌属(*Caldibacillus*)。分离到的 41 株耐热菌中有 29 株产淀粉酶, 29 株产纤维素酶, 33 株产木聚糖酶, 37 株产葡聚糖酶, 37 株产蛋白酶。菌株 TRM81951、TRM81961、TRM81969 具有同时产多种酶的能力; 菌株 TRM81953、TRM81988、TRM81972 和 TRM81957 分别具有较强的产淀粉酶、木聚糖酶、葡聚糖酶和蛋白酶能力。【结论】吐鲁番戈壁滩生存着多种耐热芽孢杆菌, 通过酶活性筛选发现吐鲁番戈壁滩耐热菌株具有很强的产水解酶能力, 有利于在低营养环境中获取营养物质。

关键词: 吐鲁番戈壁滩; 耐热微生物; 分离鉴定; 产酶能力

资助项目: 第三次新疆综合科学考察项目(2022xjkk150307); 塔里木大学校长基金(TDZKBS202103); 兵团财政科技计划(2021BC009); 微生物代谢国家重点实验室开放课题(MMLKF22-01)

This work was supported by the Third Xinjiang Scientific Expedition Program (2022xjkk150307), the Principal Foundation of Tarim University (TDZKBS202103), the Bingtuan Science and Technology Program (2021BC009), and the Open Project of State Key Laboratory of Microbial Metabolism (MMLKF22-01).

*Corresponding author. E-mail: fenge3721@163.com

Received: 2023-12-17; Accepted: 2024-02-29; Published online: 2024-04-09

Resources and enzyme production of thermotolerant microorganisms in the Gobi Desert of Turpan

LI Lixia, WEN Feng, LUO Dan, LIU Qin, XIA Zhanfeng*

Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resources in Tarim Basin, Xinjiang Production & Construction Corps, College of Life Sciences and Technology, Tarim University, Alar 843300, Xinjiang, China

Abstract: [Background] Turpan Basin presents a dry climate with little rain, high temperatures in summer, and strong ultraviolet radiation, which make it difficult for common microorganisms to survive. Therefore, it is a precious place to explore thermophilic microbial resources. **[Objective]** To obtain thermophilic microbial resources in Turpan Basin, explore their ability to produce thermostable enzymes, and promote the development and application of thermophilic microbial resources in Xinjiang. **[Methods]** Six medium with different nutrient levels were used to isolate thermophilic strains from the surface sand samples of the Gobi Desert in Turpan at 50 °C. After the isolates were identified, the capacity of the isolates in producing amylase, cellulase, xylanase, glucanase, and protease at high temperatures was measured. **[Results]** A total of 41 strains of thermophilic bacteria were isolated, belonging to 6 genera (*Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Anoxybacillus*, *Aeribacillus*, and *Caldibacillus*) of *Bacillaceae*. Among the 41 strains, 29, 29, 33, 37, and 37 strains produced amylase, cellulase, xylanase, glucanase, and protease, respectively. Strains TRM81951, TRM81961, and TRM81969 were capable of producing multiple enzymes. Strains TRM81953, TRM81988, TRM81972, and TRM81957 had strong capacity to produce amylase, xylanase, glucanase, and protease, respectively. **[Conclusion]** The Gobi Desert in Turpan harbors multiple thermophilic strains of *Bacillaceae*, and most of these strains have strong capacity to produce hydrolases, which are conducive to the utilization of nutrients in the barren environment.

Keywords: Gobi Desert in Turpan; thermophilic microorganism; isolation and identification; enzyme-producing capacity

吐鲁番盆地位于新疆维吾尔自治区东部，周围群山环绕，中部大片戈壁滩，盆地的底部低于海平面，是我国内陆海拔最低点，形成了较为封闭和独立的地理和气候条件，夏季中午地表温度一般在 70 °C 以上，最高温度达 82.3 °C^[1-2]。高温干旱的生态环境为耐热微生物的生长创造了条件，有研究表明吐鲁番盆地潜藏着大量耐热、耐干旱微生物^[3]。根据微生物的耐热程度，可以分为 5 个类群：耐热菌、兼性嗜热菌、专性嗜热菌、极端嗜热菌和超嗜热

菌。耐热菌的最高生长温度在 45–55 °C，低于 30 °C 也能生长；兼性嗜热菌的最高生长温度在 55–65 °C；专性嗜热菌最适生长温度在 65–70 °C，不能在 40–42 °C 条件下生长；极端嗜热菌最高生长温度高于 70 °C，最适生长温度高于 65 °C，最低生长温度高于 40 °C；超嗜热菌最高生长温度在 80–110 °C，最低生长温度在 55 °C 左右^[4]。耐热和嗜热微生物是重要的极端微生物资源，在生物修复、生物能源、生物制药等方面都有重要应用^[5]。

耐热微生物产生的酶系不仅催化效率高、热稳定性强,而且在高温催化过程中具有优势^[6]。Darwesh 等^[7]利用耐热菌株产生的耐热蛋白酶对线虫进行生物防治;詹亚斌等^[8]运用耐热油脂降解菌株降解厨余垃圾,加快堆肥腐熟的过程;Vaikundamoorthy 等^[9]发现一株海洋来源的蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)产生的耐热淀粉酶对铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)表现出良好的抗生物膜活性;耐热微生物或耐热酶具有广阔的应用前景。本研究以吐鲁番典型高温干旱环境为研究对象,开展耐热微生物的分离与种类鉴定,评估耐热微生物的产酶能力,以期新疆特殊环境微生物资源的开发和利用提供支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

2023 年 7 月,采用标准五点采样法采集新疆吐鲁番盆地戈壁滩表层样品。将样品混合均匀后放入无菌封口袋中,带回实验室保存。将吐鲁番戈壁滩表层样品研磨粉碎,以海拔梯度为标准,同一海拔区间内的样品每份取 5 g,混为一份样品,最终得到 4 份混合样品,命名为:TLF①(≤ 0 m)、TLF②(0–500 m)、TLF③(500–1 000 m)、TLF④(1 000–1 500 m)。

1.1.2 主要试剂和仪器

2×EasyTaq PCR SuperMix, 北京全式金生物技术有限公司;引物 27F 和 1492R, 生工生物工程(上海)股份有限公司;DL2000 DNA Marker、Goldview 型核酸染料,北京索莱宝科技有限公司。

土壤环境监测仪,山东恒美电子科技有限公司;超净工作台和恒温培养振荡器,上海智

城分析仪器制造有限公司;高速冷冻离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;PCR 仪,伯乐生命医学产品有限公司;电泳仪和凝胶成像分析仪,北京六一生物科技有限公司;超低温冰箱,中科美菱低温科技股份有限公司。

1.1.3 培养基

耐热微生物分离培养基 NOM-1 琼脂培养基、R2A 培养基、TSA 培养基、NA 培养基、LB 培养基和 F6 培养基均参考文献[10]配制。

微生物纯化培养基:LB 培养基。

产酶能力初筛培养基:淀粉酶固体初筛培养基、纤维素酶固体初筛培养基、木聚糖酶固体初筛培养基、葡聚糖酶固体初筛培养基、蛋白酶固体初筛培养基均参考文献[11]配制。

酶活测定培养基:淀粉酶液体发酵复筛培养基、纤维素酶液体发酵产酶培养基、木聚糖酶液体发酵复筛培养基、葡聚糖酶液体发酵产酶培养基和蛋白酶液体发酵复筛培养基均参考文献[11–13]配制。

培养基配制完成后,pH 值调整为 7.5,含糖培养基 115 °C 灭菌 30 min,不含糖培养基 121 °C 灭菌 20 min。

1.2 土壤样品 pH 及电导率的测定

土壤 pH 值的测定采用电位法,土壤电导率的测定采用电极法^[14]。

1.3 微生物的分离培养及纯化

将 4 份混合样品各称取 2 g,分别放入装有 18 mL 无菌液体 LB 培养基的聚酰胺(polyamid, PA)瓶中,混合均匀后置于 50 °C 的恒温水浴锅中富集 48 h,梯度稀释制成浓度为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} g/mL 的土壤悬液。根据土壤理化性质测定结果,配制适宜 pH 及含盐量的 NOM-1、R2A、TSA、NA、LB、F6 共 6 种培养基,将培养基进行梯度稀释,设置 5 个稀释浓度梯度(1、1/2、1/4、1/8、1/16)。分别吸取 100 μ L 经

过 50 °C、120 r/min 条件下富集 4 h 后的不同浓度的土壤稀释液,涂布在固体分离培养基上,50 °C 生化培养箱中倒置培养,记录菌落的种类和数量,挑取培养基表面生成的单菌落,采用三区划线法于 LB 固体培养基上进行纯化培养,纯化 2–3 次得到纯培养物。

1.4 分离菌株的鉴定

利用酚抽提法提取菌株基因组 DNA^[15],具体步骤如下:在菌板上刮取火柴头大小的菌体置于离心管中,往离心管中加入 480 μ L 的 1 \times TE 缓冲液、20 μ L 50 mg/mL 的溶菌酶,振荡离心管混匀,然后将离心管放入 37 °C、120 r/min 摇床培养 6–8 h。将离心管从摇床取出,加入 50 μ L 20% 的 SDS 和 5 μ L 20 mg/mL 的蛋白酶 K,60 °C 水浴锅中孵育 1–2 h;加入 550 μ L 酚:氯仿:异戊醇(体积比为 25:24:1),12 000 r/min 离心 10 min,取上清液至另一离心管中,此步骤反复 2–3 次,取上清液,加 800 μ L 无水乙醇、80 μ L 3 mol/L 的乙酸钠,放入 4 °C 冰箱中沉淀 DNA 约 1 h。12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,用 200 μ L 70%乙醇清洗离心产物 1–2 次,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,将乙醇完全挥发。用 50 μ L 无菌超纯水溶解底部 DNA,电泳检测 DNA 提取质量,合格样品放入–20 °C。

细菌 16S rRNA 基因扩增引物为 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')^[16]。PCR 反应体系(25 μ L): 2 \times EasyTaq PCR SuperMix 12.5 μ L,引物 27F 和 1492R (10 μ mol/L)各 0.5 μ L, DNA (100 ng/ μ L) 0.5 μ L, 无菌水补足 25 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 1 min 30 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。采用 1%的琼脂糖凝胶检测 PCR 扩增产物,选取含目的条带(1 500 bp)的 PCR 扩增产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行双向测序。序列

采用 SeqMan Pro v7.1.0 软件进行裁剪和拼接,拼接完成的 16S rRNA 基因序列用 EZBioCloud 数据库进行相似度比对^[17],判断微生物的种类。

1.5 菌株产酶能力的检测

采用平板透明圈法对菌株的产酶能力进行初筛。分别接种耐热菌株于各筛选培养基上,50 °C 倒置培养 48 h,测定所产生透明圈的直径与菌落直径的比值 D/d (D : 透明圈直径; d : 菌落直径)。淀粉酶培养基透明圈的观察采用碘液染色法^[18]; 直接观察蛋白酶培养基透明圈^[19]; 纤维素酶、木聚糖酶和葡聚糖酶培养基透明圈的观察采用刚果红染色法^[12]。

初筛有产酶活性的菌株进行摇瓶发酵,在 50 °C、120 r/min 的条件下发酵 24 h,然后在波长为 600 nm 的条件下采用吸光度法检测菌株产淀粉酶、纤维素酶、木聚糖酶、葡聚糖酶和蛋白酶的能力。

1.5.1 产淀粉酶的定量检测

种子液制备: 将初筛具有较强产酶活性的菌株接种于液体 LB 培养基中,50 °C、120 r/min 振荡培养,用分光光度计测定菌液 OD_{600} ,待其吸光度为 0.8–1.0 时停止培养,4 °C 保存。

粗酶液的制备: 用血球计数板对种子液进行计数,调整细胞浓度至 1×10^7 个/mL,然后以 1%的接种量接种于液体发酵产酶培养基中,50 °C、120 r/min 振荡培养 24 h 后 8 000 r/min 离心 5 min,取上清即为粗酶液^[20]。

葡萄糖标准曲线的绘制: 取 20 mL 具塞试管并编号,按表 1 所示的量加入浓度为 1 mg/mL 的葡萄糖标准溶液、蒸馏水及 DNS 试剂,摇匀后将试管沸水浴加热 5 min 显色。取出冷却至室温,用去离子水定容至 10 mL,摇匀,以 1 号管作为空白调零,紫外分光光度计 680 nm 波长下测定 2–8 号管的吸光度值。每个梯度 3 个平行,取平均值。以葡萄糖浓度为横坐标,吸光

表 1 葡萄糖标准曲线的制作

Table 1 Fabrication of glucose standard curves

试管编号 Test tube number	葡萄糖标准溶液 Glucose standard solution (mL)	蒸馏水 Distilled water (mL)	DNS 试剂 DNS reagent (mL)
1	0.0	2.0	2
2	0.2	1.8	2
3	0.4	1.6	2
4	0.6	1.4	2
5	0.8	1.2	2
6	1.0	1.0	2
7	1.2	0.8	2
8	1.4	0.6	2

度值为纵坐标作图, 建立葡萄糖浓度与吸光度值间的标准曲线^[21]。

淀粉酶活力的测定采用 3,5-二硝基水杨酸法(DNS 显色法)^[22-23]。用柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液配制 pH 值为 6.0 的 1%可溶性淀粉溶液作为底物。取 0.9 mL 底物预热 10 min, 加入 0.1 mL 酶液, 反应 10 min, 加入 1.5 mL DNS 溶液终止反应。沸水浴 5 min, 于冷水中迅速降温后, 用分光光度计测定 OD_{540} 值。根据葡萄糖标准曲线, 计算释放的还原糖量, 从而计算淀粉酶活力。反应重复 3 次, 取平均值, 最终数据以平均值 \pm 标准差报告, 并进行显著性分析, 确定差异显著性, $P<0.05$ 为显著性差异。

淀粉酶活力单位(U): 在上述反应体系下, 每分钟释放出 1 μmol 的还原糖所需要的酶量为 1 个酶活单位^[24]。

1.5.2 产纤维素酶的定量检测

种子液的制备、粗酶液的制备、葡萄糖标准曲线的绘制同 1.5.1。

纤维素酶活力采用滤纸酶活(filter paper activity, FPA)测定法^[13]。向 20 mL 具塞试管中分别加入粗酶液 0.5 mL 和 pH 6.0 的柠檬酸缓冲溶液 1.5 mL, 向 1 号试管中加入 1.5 mL DNS

试剂, 作为空白对照。将试管放入 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中预热, 10 min 后加入滤纸(50 mg), 保温 1 h 后取出立即向其他试管中加入 1.5 mL DNS 试剂, 将试管放入沸水浴中, 5 min 后取出。冷却定容至 20 mL, 用 1 号试管调零, 测溶液的 OD_{540} 吸光度。

纤维素酶活力单位: 在 50 $^{\circ}\text{C}$, pH 6.0 的条件下, 每小时从底物中分解产生 1 μmol 葡萄糖所需酶量为 1 个酶活力单位(U)^[25]。

纤维素酶活计算公式:

$$\text{FPA} = M \times V \times 5.56 / (A \times B \times T) \quad (1)$$

式中: M 为葡萄糖含量(mg); V 为定容体积(mL); T 为反应时间(h); A 为加酶量(mL); B 为底物质量(mg); 5.56 为 1 mg 葡萄糖底物物质的量(μmol)。

1.5.3 产木聚糖酶的定量检测

种子液的制备及粗酶液的制备同 1.5.1。

木糖标准曲线的绘制: 按表 2 吸取不同体积标准木糖溶液(1 mg/mL)和蒸馏水置于试管中, 再分别加入 1 mL DNS 试剂, 煮沸 5 min, 冷却后加入 8 mL 蒸馏水, 混匀, 用紫外分光光度计测定 OD_{540} 吸光度。每个梯度设置 3 个平行, 取平均值。以吸光度值为纵坐标, 木糖浓度为横坐标, 绘制木糖标准曲线。

表 2 木糖标准曲线的制作

Table 2 Fabrication of xylose standard curves

试管编号 Test tube number	木糖标准溶液 Xylose standard solution (mL)	蒸馏水 Distilled water (mL)	DNS 试剂 DNS reagent (mL)
1	0.0	1.0	1
2	0.2	0.8	1
3	0.4	0.6	1
4	0.6	0.4	1
5	0.8	0.2	1
6	1.0	0.0	1

木聚糖酶活力的测定采用 DNS 显色法^[26]。粗酶液 1 mL 加入到 4 mL 用 pH 7.0 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制的 1% 木聚糖底物溶液中, 60 °C 水浴反应 5 min, 加入 1 mL DNS, 沸水浴加热 10 min, 定容至 10 mL, 以灭活的酶液作为对照, 用紫外分光光度计测定 OD_{540} 吸光度。

木聚糖酶活力单位: 在合适的条件下, 单位时间(min)内水解木聚糖释放 1 μ mol 还原糖(以木糖表示)所需的酶量为 1 个酶活力单位^[27]。

木聚糖酶活计算公式:

$$\text{酶活力}(U) = 1\,000 \times M \times N / (T \times L) \quad (2)$$

式中: M 为还原糖(木糖)的质量(mg); N 为酶液稀释倍数; T 为反应时间(min); L 为反应酶液的体积(mL)。

1.5.4 产葡聚糖酶的定量检测

种子液的制备、粗酶液的制备、葡萄糖标准曲线的绘制同 1.5.1。

葡聚糖酶活力的测定: 待测粗酶液用 pH 6.0 的乙酸钠缓冲液稀释一倍, 取经 50 °C 预热的稀释酶液 1.0 mL, 加入经 50 °C 预热的 1.0% β -葡聚糖溶液 1.0 mL, 50 °C 恒温反应 10 min, 立即加入 DNS 试剂 3 mL, 混匀, 立即用 DNS 法测定还原糖含量。

葡聚糖酶活定义: 在上述反应条件下, 每分钟释放出 1 μ mol 还原糖所需的酶量为 1 个酶活力单位, 以 U 表示^[28]。

葡聚糖酶活计算公式:

$$\text{酶活力} = M \times N \times 1\,000 / (T \times L \times 180) \quad (3)$$

式中: M 为还原糖的量(mg); N 为酶液稀释的倍数; T 为反应的时间(min); L 为所测酶液的体积(mL); 180 为葡萄糖相对分子质量。

1.5.5 产蛋白酶的定量检测

种子液的制备及粗酶液的制备同 1.5.1。

参照文献[29]建立 L-酪氨酸标准曲线。取 6 支试管并编号, 根据表 3 依次加入 0–50 μ g/mL 浓

度梯度酪氨酸标准工作溶液 1 mL, 每管分别加入 0.4 mol/L 碳酸钠溶液 5 mL、福林酚试剂 1 mL, 置于 37 °C 水浴中显色 15 min, 取出后冷却至室温, 680 nm 波长下测定其吸光度值。测量 3 次, 取平均值。根据吸光度值制作线性回归方程, 吸光度是 1 时对应的 L-酪氨酸含量(μ g)就是所求的吸光常数 K 的值^[30]。

采用福林酚法检测蛋白酶活力^[31]。样品管: 粗酶液 1 mL, 40 °C 预热 5 min。1% 酪蛋白溶液 1 mL, 40 °C 预热 5 min。二者混合, 40 °C 水浴 10 min, 加入 2 mL 0.4 mol/L 三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA), 摇匀; 空白管先加 2 mL 0.4 mol/L TCA, 其他步骤与样品管相同。将样品管和空白管取出后 4 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 1 mL, 先加 0.4 mol/L Na_2CO_3 溶液 5 mL 混匀, 后加福林酚溶液 1 mL 混匀, 40 °C 保温发色 20 min。以去离子水调零, 使用 10 mm 比色皿测定样品管和空白管的吸光度 OD_{680} 。

蛋白酶活力单位: 最适条件下(50 °C 和 pH 7.0), 1 min 内粗酶液水解底物酪蛋白产生 1 μ g 酪氨酸产物所需的酶量定义为 1 个酶活力单位^[27]。

表 3 酪氨酸标准曲线的制作

Table 3 Fabrication of tyrosine standard curves

试管编号 Test tube number	酪氨酸标准液 Tyrosine standard solution (mL)	0.4 mol/L 碳酸 钠溶液 0.4 mol/L sodium carbonate solution (mL)	福林酚试剂 Folinol reagent (mL)
1	1 (0 μ g/mL)	5	1
2	1 (10 μ g/mL)	5	1
3	1 (20 μ g/mL)	5	1
4	1 (30 μ g/mL)	5	1
5	1 (40 μ g/mL)	5	1
6	1 (50 μ g/mL)	5	1

蛋白酶活计算公式:

$$X = OD_{680} \times K \times V \times N / T \quad (4)$$

式中: X 为酶活力(U/mL); OD_{680} 为以空白管调零后样品管的吸光度; K 为酪氨酸标准曲线吸光常数; V 为反应体积(mL); T 为反应时间(min); N 为稀释倍数。

2 结果与分析

2.1 耐热菌株的分离纯化结果

共分离纯化得到 41 株耐热菌, 多数菌株的菌落紧贴培养基生长, 扁平状, 表面湿润或粗糙, 不透明, 呈灰白色或微黄色, 多数菌落边缘不整齐。

2.2 耐热菌株的鉴定结果

从吐鲁番土壤分离获得的耐热菌株经 16S rRNA 基因测序和相似度比对, 判断微生物的种类(表 4)。

2.3 耐热菌株的系统发育分析

将本实验分离得到的菌株用 MEGA 软件的邻接(neighbor-joining)法对 16S rRNA 基因序列进行系统发育树的构建(图 1)。

从吐鲁番地区土样中分离获得 41 株耐热菌, 经鉴定分属于 6 个属, 包括芽孢杆菌属(*Bacillus*) 9 株、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*) 1 株、短短芽孢杆菌属(*Brevibacillus*) 7 株、厌氧芽孢杆菌属(*Anoxybacillus*) 2 株、好氧芽孢杆菌属(*Aeribacillus*) 11 株、热芽孢杆菌属(*Caldibacillus*) 11 株。这 6 个属都分布在芽孢杆菌科(*Bacillaceae*), 芽孢杆菌科最典型的特征是形成芽孢, 芽孢具有耐热、耐干旱和耐辐射的特点, 能够耐受吐鲁番戈壁滩表层高温干旱的极端环境, 成为该环境中的主要微生物类群。

2.4 吐鲁番地区不同海拔微生物的分布

本实验按海拔高度对样品进行了划分, 各菌属在各个海拔的比例见图 2。

本实验分离出的菌株中, 超低海拔

TLF①(≤ 0 m)所包含的菌属最为丰富, 其中 *Caldibacillus* 为优势菌属; 低海拔 TLF②(0–500 m)的菌属丰富度最低, 只有 *Brevibacillus* 和 *Bacillus*; 中低海拔 TLF③(500–1 000 m)样品中 *Caldibacillus*、*Brevibacillus* 和 *Bacillus* 各占三分之一; 中海拔 TLF④(1 000–1 500 m)样品中 *Aeribacillus* 占优势。*Bacillus* 在每个海拔高度样品中都有出现, 分布范围最广; *Paenibacillus* 只分布于 1 000–1 500 m 的海拔高度样品中。

吐鲁番盆地底部是我国海拔最低处, 周围群山环绕, 海拔落差大。不同海拔土壤温度、营养成分和含水量有明显差异, 微生物的种类和数量也有明显变化。吐鲁番盆地底部超低海拔(≤ 0 m)的土壤营养物质含量较高、温度高, 耐热微生物数量多, 种类丰富; 低海拔(0–500 m)和中低海拔(500–1 000 m)温度高、营养水平低、含水量低, 微生物种类和数量少; 中海拔(1 000–1 500 m)样品温度降低, 含水量增加, 微生物数量增加。

2.5 培养基种类对吐鲁番耐热微生物分离的影响

采用 NOM-1、R2A、TSA、NA、LB、F6 共 6 种培养基分离吐鲁番样品中的微生物, 不同培养基分离到的各菌属占比见图 3。

由图 3 可见, 不同种类的培养基分离获得的可培养微生物种类和数量有明显差别。TSA 和 NOM-1 培养基分离效果最佳, 明显多于其他培养基, TSA 培养基中除了 *Anoxybacillus*, NOM-1 培养基中除了 *Paenibacillus* 外, 其余 5 个属都已分离得到。F6 培养基只分离得到了 *Brevibacillus*, R2A 培养基只分离得到了 *Bacillus*, F6 和 R2A 培养基的营养物质浓度相对较低, 说明低营养浓度的培养基不适合用于耐热微生物的分离。LB 和 NA 培养基营养丰富, 分离获得的耐热微生物种类较多。

表 4 吐鲁番土样分离的菌株信息

Table 4 Information of strains isolated from Turpan soil

序号 Serial No.	菌株编号 Strain No.	培养基 Medium	相似菌株 Similar strain	最大相似度 Maximum similarity (%)
1	TRM81951	1TSA	<i>Aeribacillus pallidus</i>	96.75
2	TRM81952	1TSA	<i>Aeribacillus pallidus</i>	99.93
3	TRM81953	1/2TSA	<i>Bacillus haynesii</i>	99.93
4	TRM81954	1/8TSA	<i>Caldibacillus hisashii</i>	99.36
5	TRM81955	1/4LB	<i>Aeribacillus pallidus</i>	98.57
6	TRM81956	1/4TSA	<i>Bacillus manuseus</i>	99.79
7	TRM81957	1/8LB	<i>Caldibacillus hisashii</i>	99.36
8	TRM81958	1/2LB	<i>Aeribacillus pallidus</i>	99.14
9	TRM81959	1/2LB	<i>Aeribacillus pallidus</i>	98.42
10	TRM81960	1NOM-1	<i>Aeribacillus pallidus</i>	98.85
11	TRM81961	1/2NOM-1	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	99.79
12	TRM81962	1/4NOM-1	<i>Brevibacillus limnophilus</i>	99.43
13	TRM81963	1NA	<i>Caldibacillus thermolactis</i>	99.79
14	TRM81964	1/2NA	<i>Caldibacillus hisashii</i>	99.36
15	TRM81965	1/2TSA	<i>Brevibacillus limnophilus</i>	99.71
16	TRM81966	1NOM-1	<i>Aeribacillus pallidus</i>	99.21
17	TRM81967	1/16LB	<i>Caldibacillus hisashii</i>	99.50
18	TRM81968	1/8NA	<i>Anoxybacillus calidus</i>	98.71
19	TRM81969	1/8NA	<i>Bacillus licheniformis</i>	99.50
20	TRM81970	1/2NOM-1	<i>Anoxybacillus vitaminophilus</i>	98.01
21	TRM81971	1/2NA	<i>Caldibacillus hisashii</i>	99.35
22	TRM81972	1/4NOM-1	<i>Brevibacillus thermoruber</i>	99.56
23	TRM81973	1/16NOM-1	<i>Caldibacillus hisashii</i>	99.92
24	TRM81974	1/4F6	<i>Brevibacillus limnophilus</i>	98.07
25	TRM81975	1/4F6	<i>Brevibacillus thermoruber</i>	99.64
26	TRM81976	1/16F6	<i>Brevibacillus thermoruber</i>	99.57
27	TRM81977	1NOM-1	<i>Aeribacillus pallidus</i>	100.00
28	TRM81978	1F6	<i>Brevibacillus borstelensis</i>	98.16
29	TRM81979	1/2NA	<i>Bacillus tequilensis</i>	99.93
30	TRM81980	1R2A	<i>Bacillus licheniformis</i>	95.53
31	TRM81981	1/2TSA	<i>Aeribacillus pallidus</i>	99.23
32	TRM81982	1TSA	<i>Paenibacillus phoenicis</i>	99.93
33	TRM81983	1LB	<i>Bacillus licheniformis</i>	99.57
34	TRM81984	1NA	<i>Bacillus licheniformis</i>	99.78
35	TRM81985	1/2NOM-1	<i>Aeribacillus pallidus</i>	99.64
36	TRM81986	1TSA	<i>Caldibacillus hisashii</i>	99.01
37	TRM81987	1/2LB	<i>Aeribacillus pallidus</i>	99.44
38	TRM81988	1/4LB	<i>Caldibacillus hisashii</i>	99.29
39	TRM81989	1NOM-1	<i>Caldibacillus hisashii</i>	99.36
40	TRM81990	1/4NOM-1	<i>Caldibacillus hisashii</i>	99.79
41	TRM81991	1LB	<i>Bacillus licheniformis</i>	98.00

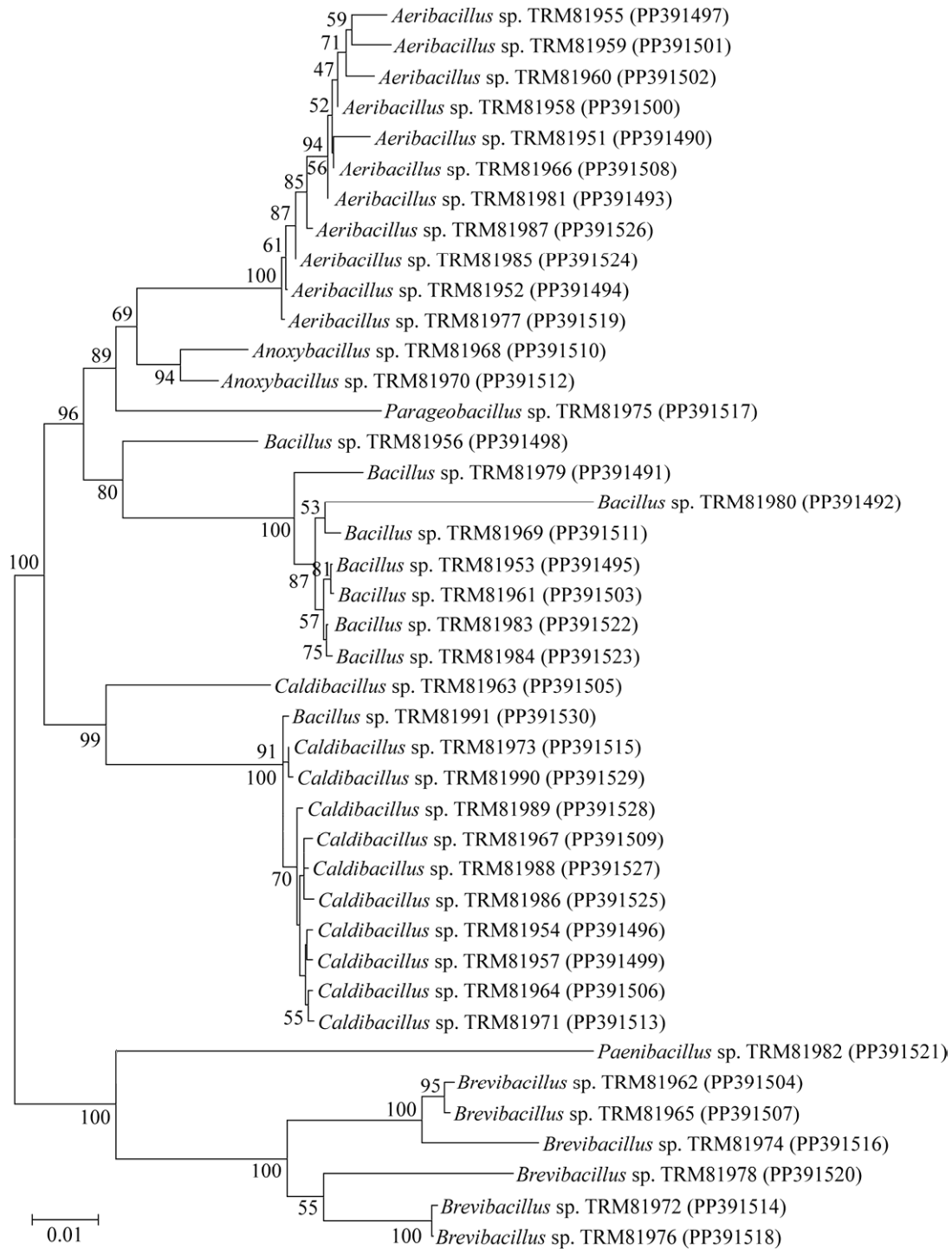


图 1 基于分离的耐热菌株的 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 标尺为序列差异的分支长度；节点处的数字为 bootstrap 值；括号内的数字为 GenBank 登录号

Figure 1 Phylogenetic tree constructed based on 16S rRNA gene sequence of isolated heat-resistant bacterial strains. The ruler is the branch length of the sequence difference Degree; Numbers at the branch points indicated the bootstrap values; Numbers in parentheses represent GenBank accession number.

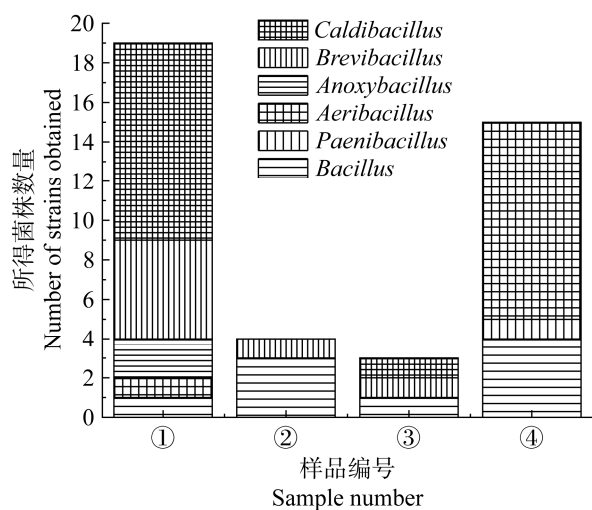


图2 不同海拔土壤中分离的耐热菌株 ①: 超低海拔; ②: 低海拔; ③: 中低海拔; ④: 中海拔
Figure 2 Heat tolerant bacterial strains isolated from soils at different altitudes. ①: Ultra-low altitude; ②: Low altitude; ③: Medium-low altitude; ④: Medium altitude.

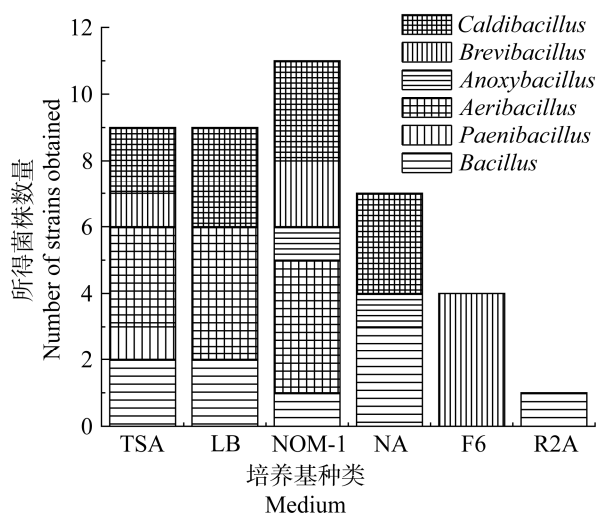


图3 不同培养基分离的耐热菌株
Figure 3 Heat resistant strains isolated from different culture medium.

通过对比上述 6 种培养基成分及营养物质含量, 可见成分丰富且营养物质含量较高的培养基更有利于吐鲁番土壤样品中耐热微生物的分离, 如 NOM-1 培养基与其他培养基最大差异

在于营养物质种类丰富且含量高, 还添加了微量元素和维生素。此外还发现, 含有植物蛋白胨的培养基形成的菌落数量更多, 菌落体积大, 如 TSA 培养基与其他培养基主要差异在于用大豆蛋白胨代替了常规的蛋白胨和胰蛋白胨等动物来源的蛋白胨。有研究表明, 相较于胰蛋白胨, 植物性蛋白胨相对分子质量较小, 易被细菌生长吸收, 并且其碳水化合物总含量较高, 能在细菌生长后期提供更多的营养物质来源, 更易于细菌数量的积累及其后期荚膜的形成^[32]。

2.6 培养基浓度对吐鲁番耐热微生物分离的影响

将培养基营养成分进行梯度稀释, 用营养浓度分别为 1、1/2、1/4、1/8、1/16 的 5 种培养基分离耐热微生物, 不同营养浓度培养基分离获得的微生物各菌属占比见图 4。

由图 4 可知, 培养基浓度为 1 和 1/2 时各分离获得 5 个属的耐热微生物, 而浓度为 1/16 时只获得 2 个属的耐热微生物。浓度为 1 时分离获得的菌株分布在 *Caldibacillus*、*Brevibacillus*、*Aeribacillus*、*Paenibacillus* 和 *Bacillus*, 依次占

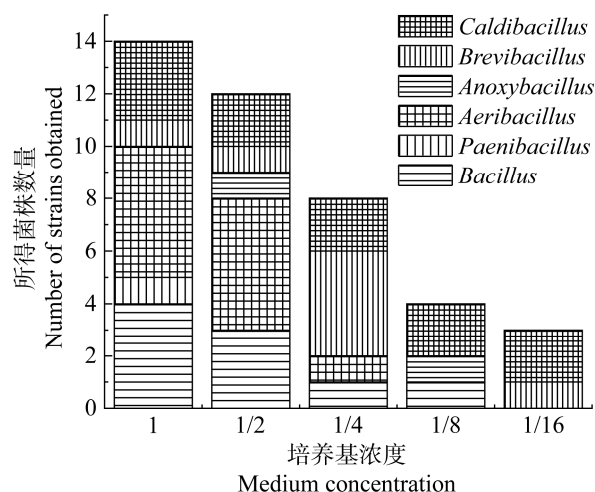


图4 不同浓度培养基分离的耐热菌株
Figure 4 Heat resistant strains isolated from different concentrations of culture medium.

比为 22%、7%、35.5%、7%、28.5%；浓度为 1/2 时所含菌属包括 *Caldibacillus*、*Brevibacillus*、*Anoxybacillus*、*Aeribacillus* 和 *Bacillus*，依次占比 17%、8.5%、8.5%、41%、25%；浓度为 1/4 时所含菌属有 4 个，其中包括 *Caldibacillus*、*Brevibacillus*、*Aeribacillus* 和 *Bacillus*，依次占比 25%、50%、12.5%、12.5%；浓度为 1/8 时所含菌属 3 个，分别是 *Caldibacillus*、*Anoxybacillus* 和 *Bacillus*，依次占比 50%、25%、25%；浓度为 1/16 时所含菌属分别是 *Caldibacillus* 和 *Brevibacillus*，依次占比 66%、34%。*Caldibacillus* 每个浓度都能生长，而 *Paenibacillus* 只分布于浓度为 1 的培养基。

培养基的营养浓度是影响微生物生长的主要因素，比较不同营养浓度培养基分离获得的耐热微生物，发现随着培养基营养浓度的降低耐热微生物种类和数量明显减少。高浓度的培养基为耐热菌的生长提供了丰富的营养物质，分离获得的微生物种类和数量多；低营养培养基限制了耐热微生物的生长。

2.7 吐鲁番耐热微生物的产酶能力

2.7.1 产淀粉酶能力

经过初筛，41 株耐热菌中可产淀粉酶的共有 29 株，计算其 D/d 值，选出比值 >1.35 的 8 株菌进行发酵培养，计算淀粉酶活力。经过复筛，菌株 TRM81953 的产淀粉酶能力最高，为 131.156 U/mL，其次为菌株 TRM81969 和菌株 TRM81951，其淀粉酶活力分别为 92.221 U/mL 和 76.062 U/mL。

2.7.2 产纤维素酶能力

经过初筛，41 株耐热菌中可产纤维素酶的共有 29 株，计算其 D/d 值，选出比值 >1.8 的 10 株菌进行液体发酵，检测其纤维素酶活性。经过复筛，TRM81951 产纤维素酶能力最高，达到了 89.005 U/mL。

2.7.3 产木聚糖酶能力

41 株耐热菌中可产木聚糖酶的共有 33 株，计算其 D/d 值，选出比值 >1.35 的 8 株菌进行液体发酵产酶计算酶活。复筛结果中 TRM81961 产木聚糖酶能力最高，达到了 99.426 U/mL，其次为 TRM81968 和 TRM81951，所产木聚糖酶活力分别达到了 92.430 U/mL 和 88.559 U/mL。

2.7.4 产葡聚糖酶能力

41 株耐热菌中可产葡聚糖酶的共有 37 株，计算其 D/d 值，选出比值 >3.50 的 9 株菌进行液体发酵来检测酶活。由复筛结果可知，TRM81972 产葡聚糖酶活性最强，达到了 100.117 U/mL，其次为 TRM81951，所产葡聚糖酶活力为 62.156 U/mL。

2.7.5 产蛋白酶能力

41 株耐热菌中可产蛋白酶的共有 37 株，计算其 D/d 值，然后选出比值 >1.6 的 9 株菌进行液体发酵计算酶活。复筛结果中 TRM81957 产蛋白酶能力最高，达到了 168.210 U/mL，其次为 TRM81989 和 TRM81961，所产蛋白酶活力分别为 150.100 U/mL 和 127.014 U/mL。

吐鲁番耐热微生物产 5 种酶的能力检测结果见表 5。本研究得到了产酶能力较为突出的菌株，如 TRM81953 产淀粉酶活力、TRM81961 产木聚糖酶活力、TRM81972 产葡聚糖酶活力以及 TRM81957 产蛋白酶的活力。此外，菌株 TRM81951、TRM81961 和 TRM81969 具有同时产多种酶的能力，所以选择这 3 株菌进行生长温度范围及在不同温度下产淀粉酶、纤维素酶、木聚糖酶、葡聚糖酶及蛋白酶能力的探究。

2.8 耐热菌的最适生长温度和最适产酶温度

2.8.1 菌株 TRM81951、TRM81961 和 TRM81969 的最适生长温度

以产酶种类最为丰富的菌株 TRM81951、TRM81961、TRM81969 这 3 株菌为基础，检测

表 5 吐鲁番土样中耐热菌株产 5 种酶的能力
Table 5 The ability of heat-resistant strains in Turpan soil samples to produce five enzymes

菌株编号 Strain No.	淀粉酶 Amylase		纤维素酶 Cellulase		木聚糖酶 Xylanase		葡聚糖酶 Dextranase		蛋白酶活性 Protease	
	<i>D/d</i>	酶活 Enzyme activity (U/mL)	<i>D/d</i>	酶活 Enzyme activity (U/mL)	<i>D/d</i>	酶活 Enzyme activity (U/mL)	<i>D/d</i>	酶活 Enzyme activity (U/mL)	<i>D/d</i>	酶活 Enzyme activity (U/mL)
TRM81951	1.672	76.062±0.462 0c	1.813	89.005±1.485 7a	1.526	88.559±0.427 3c	16.150	62.156±0.388 0b	3.556	83.697±0.423 8i
TRM81953	1.629	131.156±1.333 1a	1.803	27.056±0.740 2ef	1.247	NT	2.856	NT	1.480	NT
TRM81955	1.502	15.12±0.400 1h	1.870	19.560±0.641 2h	1.219	NT	3.590	16.946±0.953 0g	1.474	NT
TRM81956	—	—	—	—	—	—	—	—	2.513	96.831±0.616 0h
TRM81957	1.829	22.969±0g	1.574	NT	1.135	NT	9.576	35.823±1.796 3d	2.466	168.210±0.747 5a
TRM81958	1.322	NT	1.630	NT	1.281	NT	1.564	NT	2.543	106.375±0.927 0g
TRM81961	1.617	26.662±0.461 0f	2.670	30.307±1.99 2d	1.697	99.426±0.609 7a	5.642	35.788±0.428 0d	2.074	127.014±1.121 3c
TRM81966	—	—	1.969	24.523±1.038 8g	2.607	34.737±1.086 5d	1.881	NT	1.593	NT
TRM81967	1.349	NT	1.746	NT	2.126	32.739±1.308 5e	2.349	NT	1.429	NT
TRM81968	1.285	NT	4.560	44.716±0.912 8b	1.771	92.430±0.609 7b	4.446	24.469±0.718 1f	1.383	NT
TRM81969	1.485	92.221±0.461 0b	2.038	29.246±0.213 9de	1.459	34.271±0.565 8d	5.532	40.918±0.565 2c	1.618	112.982±0.615 6f
TRM81972	—	—	—	—	—	—	11.95	100.117±0.156 9a	—	—
TRM81974	—	—	2.667	41.602±1.126 3c	1.350	24.197±0.352 3f	7.425	28.471±0.571 0e	1.058	NT
TRM81975	1.221	NT	2.733	27.569±1.923 5ef	1.179	NT	5.299	27.136±0.718 0e	1.773	118.040±0.373 7e
TRM81982	1.362	32.972±0.266 7e	1.847	25.994±1.544 6fg	1.305	NT	1.937	NT	1.630	122.854±1.066 8d
TRM81989	1.486	34.203±0.265 6d	1.275	NT	1.359	32.918±0.427 7e	1.960	NT	1.675	150.100±1.433 9b

NT: 未检测; —: 无酶活

NT: Not detected; —: No enzyme activity.

菌株的温度生长范围和最适生长温度。将 3 株菌接种在 LB 固体培养基上, 分别置于 20、30、40、45、50、55、60、65、70 °C 条件下培养 12 h, 结果如图 5 所示。

由图 5 可知, 菌株 TRM81951 生长的温度范围为 40–65 °C, 菌株 TRM81961 和菌株 TRM81969 生长的温度范围为 40–55 °C, 3 株菌最佳生长温度均为 50 °C。

2.8.2 菌株 TRM81951、TRM81961 和 TRM81969 的最适产酶温度

取 3 株菌的种子液, 以 1% 的接种量将其接入液体发酵产酶培养基中, 在摇床转速为 120 r/min 的条件下, 分别将其置于 30、40、45、50、55、60、65 °C 条件下培养 24 h, 测定相应的酶活性。结果如图 6 所示。

从图 6 中可以看出, 菌株 TRM81951、TRM81961、TRM81969 的 5 种酶活力随着培养温度的增加呈现先上升后下降的趋势。除蛋白酶之外, 基本都在 40–55 °C 呈现较高酶活力, 在 50 °C 时达到最高活力, 均显著高于相同酶类其他温度实验组 ($P < 0.05$)。3 株菌所产蛋白酶呈现较高酶活力的温度范围为 40–60 °C, 在 55 °C

时达到最高活力, 在 40 °C 之前和 60 °C 之后的蛋白酶活力均显著降低 ($P < 0.05$)。

微生物的生长与水解酶的活性密切相关。由前期菌株最适生长温度实验结果可知, 培养温度低于 40 °C 或高于 55 °C 时微生物生长缓慢。分析原因, 水解酶活性决定了微生物吸收营养物质能力, 在温度偏低和偏高时, 产生的淀粉酶、纤维素酶等水解酶活较低, 微生物分解营养物质能力低, 导致微生物生长较慢。当培养温度升高至 40–55 °C 时, 微生物产生水解酶活性强, 获取的营养物质充足, 微生物能够较快地生长。

3 讨论与结论

从吐鲁番戈壁滩表层样品中共分离获得 41 株耐热菌, 分布于芽孢杆菌科的 6 个属, 其中最多的是 *Aeribacillus* 和 *Caldibacillus*, 其次为 *Bacillus*、*Brevibacillus*、*Anoxybacillus* 和 *Paenibacillus*。不同海拔样品微生物种类分布有明显差异, 超低海拔丰富度最高, 中低海拔和中海拔次之, 低海拔丰富度最低。芽孢杆菌属分布范围最广, 在每个海拔高度样品中都有出现, 类芽孢杆菌属仅分布于中海拔范围。不同营养水平的培养

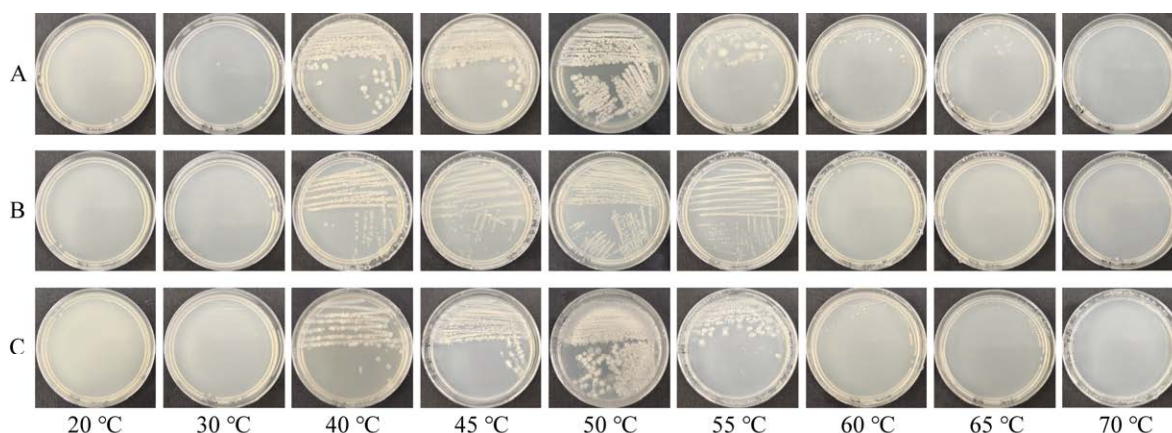


图 5 菌株温度耐受及最适生长温度

Figure 5 Strains temperature tolerance and optimum growth temperature. A: TRM81951. B: TRM81961. C: TRM81969.

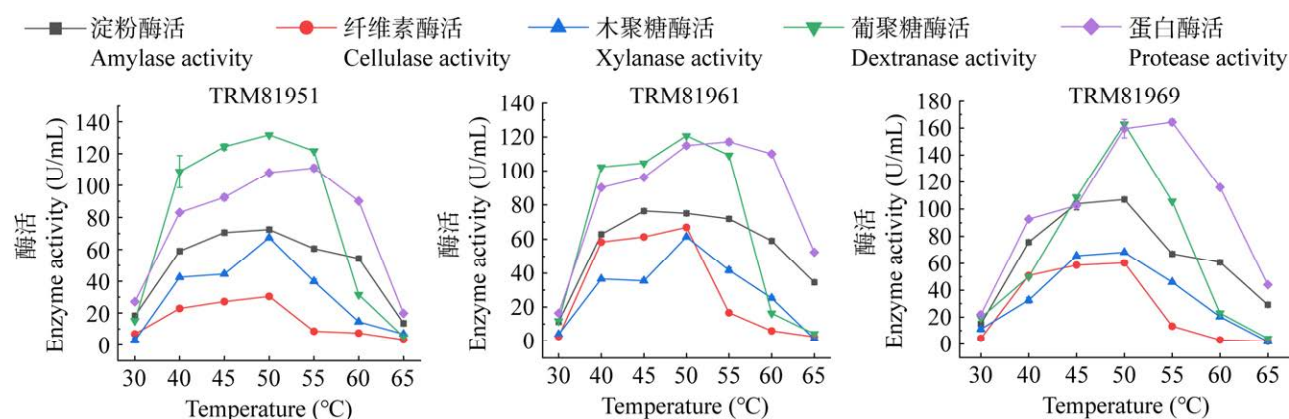


图 6 菌株产酶活力随温度的变化

Figure 6 The variation of enzyme production activity of strain with temperature.

基分离耐热菌有明显差异, 营养丰富的 TSA 和 NOM-1 培养基分离效果最佳, 营养水平较低的 F6 和 R2A 培养基分离获得的耐热菌种类较少, 低营养培养基不适合用于耐热微生物的广泛分离和多样性研究。

吐鲁番耐热菌株普遍具有较强的产水解酶能力, 超过 70% 的菌株能够产淀粉酶、纤维素酶、木聚糖酶、葡聚糖酶和蛋白酶。菌株苍白空气芽孢杆菌(*Aeribacillus pallidus*) TRM81951、副地衣芽孢杆菌(*Bacillus paralicheniformis*) TRM81961 和地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) TRM81969 具有同时产多种酶的能力。吐鲁番耐热菌株产酶活性较高的温度为 40–55 °C, 其中产淀粉酶、纤维素酶、木聚糖酶和葡聚糖酶的最适温度为 50 °C, 产蛋白酶的最适温度为 55 °C。吐鲁番耐热菌株生长繁殖速度快, 产酶种类多, 酶活性高, 可用于规模化发酵生产耐热酶。

吐鲁番戈壁滩夏季高温干旱、植被覆盖少, 土壤营养物质含量少, 推测吐鲁番耐热微生物通过加强其产水解酶的能力促进其在低营养环境中摄取有限的营养物质, 有助于微生物在低营养环境中生存。本研究获得的耐热菌株皆分布于芽孢杆菌科, 芽孢杆菌在生长的后期形成抗性极强的休眠结构——芽孢, 具有在戈壁滩

高温低营养环境生存的天然优势, 因此在高温干旱环境中芽孢杆菌是最主要的微生物类群^[33]。本研究发现了吐鲁番戈壁滩微生物的种类特征, 获得了多种耐热菌株, 发现的耐热菌具有广泛的产水解酶能力, 为耐热酶的生产提供了很好的菌种资源, 也为后期吐鲁番盆地极端微生物资源的开发提供了参考。

REFERENCES

- [1] 冶永新, 杜丽娟, 张宝忠, 刘钰, 王欢. 吐鲁番及周边地区气候及径流演变特征分析[J]. 水资源与水工程学报, 2014, 25(6): 61-67.
YE YX, DU LJ, ZHANG BZ, LIU Y, WANG H. Analysis on feature of climate and runoff evolution in Turpan and its surrounding areas[J]. Journal of Water Resources and Water Engineering, 2014, 25(6): 61-67 (in Chinese).
- [2] 袁军. “火洲”: 吐鲁番[J]. 地理教育, 2002(5): 31.
YUAN J. “Fire Island”: Turpan[J]. Education of Geography, 2002(5): 31 (in Chinese).
- [3] 刘森. 新疆特殊地貌微生物多样性研究[D]. 石河子: 石河子大学硕士学位论文, 2011.
LIU M. Research of microbial diversity of special landscape in Xinjiang[D]. Shihezi: Master's Thesis of Shihezi University, 2011 (in Chinese).
- [4] 周德庆. 微生物学教程[M]. 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2020.
ZHOU DQ. Essential Microbiology[M]. 4th ed. Beijing: Higher Education Press, 2020 (in Chinese).
- [5] RANAWAT P, RAWAT S. Radiation resistance in thermophiles: mechanisms and applications[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2017, 33(6): 112.

- [6] 赖崇熙, 刘唤明, 唐金燕. 湖光岩风景区耐热微生物多样性分析及产酶特性研究[J]. 安徽农业科学, 2022, 50(18): 1-4.
LAI CX, LIU HM, TANG JY. Diversity analysis and enzyme production characteristics of high-temperature resistant microorganisms in Huguangyan scenic area[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2022, 50(18): 1-4 (in Chinese).
- [7] DARWESH OM, EL-HAWARY AS, EL KELANY US, EL-SHERBINY GM. Nematicidal activity of thermostable alkaline protease produced by *Saccharomonospora viridis* strain Hw G550[J]. Biotechnology Reports, 2019, 24: e00386.
- [8] 詹亚斌, 魏雨泉, 陶兴玲, 张阿克, 林永锋, 丁晓艳, 范鑫祺, 李季. 耐热油脂降解菌株的筛选、鉴定及其在好氧堆肥中的应用[J]. 环境污染与防治, 2021, 43(7): 812-818.
ZHAN YB, WEI YQ, TAO XL, ZHANG AK, LIN YF, DING XY, FAN XQ, LI J. Screening and identification of high temperature resistant oil degrading strain and its application in aerobic composting[J]. Environmental Pollution & Control, 2021, 43(7): 812-818 (in Chinese).
- [9] VAIKUNDAMOORTHY R, RAJENDRAN R, SELVARAJU A, MOORTHY K, PERUMAL S. Development of thermostable amylase enzyme from *Bacillus cereus* for potential antibiofilm activity[J]. Bioorganic Chemistry, 2018, 77: 494-506.
- [10] 凯西·巴克. 分子生物学实验室工作手册[M]. 王维荣, 黄伟达等译. 北京: 科学出版社, 2005.
K BARKER. At the Bench a Laboratory Navigator[M]. Translated by WANG WR, HUANG WD. Beijing: Science Press, 2005 (in Chinese).
- [11] 张艳, 冯万字, 刘雪松, 薛沾枚, 尹珺伊, 王岩, 秦平伟, 史同瑞. 两株益生芽孢杆菌的安全性及酶学性质研究[J]. 饲料研究, 2022, 45(18): 69-75.
ZHANG Y, FENG WY, LIU XS, XUE ZM, YIN JY, WANG Y, QIN PW, SHI TR. Study on safety and enzymatic properties of two probiotic *Bacillus* strains[J]. Feed Research, 2022, 45(18): 69-75 (in Chinese).
- [12] 雅男. 纤维素降解菌的筛选及酶学性质的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学硕士学位论文, 2017.
YA N. Screening of cellulose degrading bacteria and studies on cellulase characteristics[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Forestry University, 2017 (in Chinese).
- [13] 温冬灼, 张智, 魏罡, 张晓彤. 纤维素降解芽孢杆菌筛选及产酶条件优化[J]. 中南林业科技大学学报, 2022, 42(2): 169-180.
WEN DZ, ZHANG Z, WEI G, ZHANG XT. Screening of cellulose-degrading bacillus and optimization of enzyme production conditions[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2022, 42(2): 169-180 (in Chinese).
- [14] 国家环境保护总局. 土壤环境监测技术规范 HJ/T 166—2004[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
State Environmental Protection Administration. The technical specification for soil environmental monitoring HJ/T 166—2004[S]. Beijing: Standards Press of China, 2004 (in Chinese).
- [15] 郭佳婧. 非发酵豆制品中耐热细菌的分离鉴定及耐热性能研究[D]. 长沙: 湖南农业大学硕士学位论文, 2012.
GUO JJ. Isolation and identification of thermotolerant bacteria in non-fermenting soybean products and study on its thermotolerant mechanism[D]. Changsha: Master's Thesis of Hunan Agricultural University, 2012 (in Chinese).
- [16] 陈莉, 赵艺, 周雨洁, 李伟光. 一株耐热硫氧化菌爱媛类芽孢杆菌的分离鉴定及其发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2022, 49(1): 25-38.
CHEN L, ZHAO Y, ZHOU YJ, LI WG. Isolation, identification and fermentation optimization of a thermophilic sulfide-oxidizing strain *Paenibacillus ehimensis*[J]. Microbiology China, 2022, 49(1): 25-38 (in Chinese).
- [17] 卜旭莹, 任敏, 万传星, 张利莉. 帕米尔高原可培养需氧冷适应细菌及古菌多样性[J]. 微生物学报, 2022, 62(7): 2568-2581.
BU XY, REN M, WAN CX, ZHANG LL. Diversity of aerobic cold-adapted bacteria and Archaea isolated from the Pamir Plateau[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(7): 2568-2581 (in Chinese).
- [18] 田瑞杰. 中温大曲原核微生物群落解析及高产淀粉酶菌株的筛选与应用探究[D]. 郑州: 郑州轻工业大学硕士学位论文, 2022.
TIAN RJ. Analysis of prokaryotic microbial community and screening and application of high amylase producing strain in medium-temperature daqu[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Zhengzhou University of Light Industry, 2022 (in Chinese).
- [19] 杨磊, 陈良. 浓香型酒醅中一株耐热地衣芽孢杆菌产淀粉酶和蛋白酶培养条件的优化[J]. 酿酒, 2021, 48(2): 49-53.
YANG L, CHEN L. Optimization of conditions for amylase and protease production of a thermotolerant *Bacillus licheniformis* strain[J]. Liquor Making, 2021, 48(2): 49-53 (in Chinese).
- [20] 唐丽江, 王振华, 王迪. 高产淀粉酶芽孢杆菌菌株的筛选[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(12): 5362-5363, 5371.
TANG LJ, WANG ZH, WANG D. Research on the screening of *Bacillus* strain producing high-yielding amylase[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2009, 37(12): 5362-5363, 5371 (in Chinese).

- [21] 胡荣, 方琳琳, 付朦, 黄玉珠, 刘凤先, 张佳丽, 赵喜华. 淀粉酶高产菌的筛选、鉴定、诱变及生产优化[J]. 江西师范大学学报(自然科学版), 2019, 43(5): 496-500.
HU R, FANG LL, FU M, HUANG YZ, LIU FX, ZHANG JL, ZHAO XH. The screening, identification, mutagenesis and production optimization of a bacteria with a high-level production of amylase[J]. Journal of Jiangxi Normal University (Natural Science Edition), 2019, 43(5): 496-500 (in Chinese).
- [22] 肖颖, 姚霓红, 解泽峰, 宋琪, 黄多, 谢佳燕, 吴菁, 闫达中, 晁红军. 一株产淀粉酶的嗜热地衣芽孢杆菌的筛选及鉴定[J]. 武汉轻工大学学报, 2023, 42(2): 61-67.
XIAO Y, YAO NH, XIE ZF, SONG Q, HUANG D, XIE JY, WU J, YAN DZ, CHAO HJ. Screening and identification of a thermophilic *Bacillus licheniformis* strain producing amylase[J]. Journal of Wuhan Polytechnic University, 2023, 42(2): 61-67 (in Chinese).
- [23] 赵海燕, 梁军, 刘凯文, 宋晨斌, 刘正亚, 关现军, 王双山, 王建设. 一株中温淀粉酶菌株的分离鉴定及其产酶条件分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2021, 40(3): 1156-1162.
ZHAO HY, LIANG J, LIU KW, SONG CB, LIU ZY, GUAN XJ, WANG SS, WANG JS. Isolation, identification and analysis on enzyme producing condition of a strain of medium-temperature amylase[J]. Genomics and Applied Biology, 2021, 40(3): 1156-1162 (in Chinese).
- [24] 张运祺, 郑自强, 邢浩博, 应超, 兰茂华, 任志强, 卫春会. 一株嗜热脂肪芽孢杆菌的筛选及其产酶特性研究[J]. 酿酒科技, 2023(5): 78-84.
ZHANG YQ, ZHENG ZQ, XING HB, YING C, LAN MH, REN ZQ, WEI CH. Screening of a *Geobacillus stearothermophilus* strain and study on its enzyme-producing characteristics[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2023(5): 78-84 (in Chinese).
- [25] 毛婷, 朱瑞清, 牛永艳, 杜津昊, 郑群, 王治业. 纤维素降解芽孢菌的筛选及产酶条件优化[J]. 中国酿造, 2020, 39(1): 71-76.
MAO T, ZHU RQ, NIU YY, DU JH, ZHENG Q, WANG ZY. Screening and enzyme production conditions optimization of cellulose-degrading *Bacillus*[J]. China Brewing, 2020, 39(1): 71-76 (in Chinese).
- [26] 王瑞君, 袁欣. 响应面法优化产木聚糖酶耐热菌株的发酵条件[J]. 宜春学院学报, 2022, 44(3): 83-89.
WANG RJ, YUAN X. Response surface optimization of fermentation conditions for xylanase production by a thermotolerant strain[J]. Journal of Yichun University, 2022, 44(3): 83-89 (in Chinese).
- [27] 张晓元, 郝荣华, 刘飞, 陈勉, 朱希强, 凌沛学. 一株产耐热耐碱木聚糖酶菌株的筛选及酶学性质研究[J]. 食品与药品, 2017, 19(2): 77-83.
ZHANG XY, HAO RH, LIU F, CHEN M, ZHU XQ, LING PX. Screening and enzymatic characterization of a thermoalkaliphilic xylanase producing strain[J]. Food and Drug, 2017, 19(2): 77-83 (in Chinese).
- [28] 韩晶, 李宝坤, 李开雄. 嗜热 β -葡聚糖酶产生菌的筛选及其培养基优化研究[J]. 中国酿造, 2008, 27(21): 33-36.
HAN J, LI BK, LI KX. Studies on the screening of thermostable β -glucanase producing strains and the optimization of related culture medium[J]. China Brewing, 2008, 27(21): 33-36 (in Chinese).
- [29] 全国饲料工业标准化技术委员会. 饲料添加剂酸性、中性蛋白酶活力的测定 分光光度法 GB/T28715—2012[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
National Feed Industry Standardization Technical Committee. Determination of acidic and neutral protease activity of feed additives spectrophotometry GB/T28715—2012[S]. Beijing: Standards Press of China, 2012 (in Chinese).
- [30] 于德涛, 李纪元, 刘烁, 任建炜, 徐航, 温建新. 水貂源高产蛋白酶枯草芽孢杆菌的分离筛选及酶学性质[J]. 微生物学通报, 2023, 50(9): 4078-4089.
YU DT, LI JY, LIU S, REN JW, XU H, WEN JX. Isolation, identification, and enzymatic characterization of *Bacillus subtilis* from mink[J]. Microbiology China, 2023, 50(9): 4078-4089 (in Chinese).
- [31] 吴赞婷. 耐热中性蛋白酶生产菌株的筛选鉴定、发酵过程优化及其酶学性质研究[D]. 杭州: 浙江工商大学硕士学位论文, 2018.
WU YT. Study on screening, identification, fermentation process optimization and enzymatic characterization of thermostable neutral protease producing strains[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang Gongshang University, 2018 (in Chinese).
- [32] 罗勇, 于荣清, 兰芳, 田继钊, 张锐. 植物蛋白胨培养基在 23 价肺炎球菌多糖疫苗生产中的应用[J]. 中国生物制品学杂志, 2016, 29(12): 1271-1273, 1279.
LUO Y, YU RQ, LAN F, TIAN JZ, ZHANG R. Application of plant peptone medium in the production of 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine[J]. Chinese Journal of Bioproducts, 2016, 29(12): 1271-1273, 1279 (in Chinese).
- [33] 张振清, 张景林, 张威, 刘光琇, 陈拓, 刘阳, 陈警伟, 田茂. 河西走廊黑戈壁生态系统中可培养细菌分布特征及抗辐射活性[J]. 中国沙漠, 2020, 40(4): 52-62.
ZHANG ZQ, ZHANG BL, ZHANG W, LIU GX, CHEN T, LIU Y, CHEN JW, TIAN M. Distribution characteristics and anti-radiation activity of culturable bacteria in black gobi ecosystem of the Hexi Corridor[J]. Journal of Desert Research, 2020, 40(4): 52-62 (in Chinese).