

贝莱斯芽胞杆菌 NSZ-YBGJ001 的鉴定及其生物学特性

陶永梅¹ 潘洪吉² 张小利² 黄健³ 李鹏⁴ 卢志军^{2*}

(1. 中国农业大学植物保护学院, 北京 100193; 2. 北京市植物保护站, 北京 100029;

3. 北京市农产品优质产销服务站, 北京 102220; 4. 海南省农业厅, 海口 570204)

摘要: 为明确分离自海南省三亚市陵水县土壤中的菌株 NSZ-YBGJ001 的分类地位和生物学特性, 利用形态特征观察、生理生化特性测定、16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列比对及系统进化分析对其进行分类鉴定, 测定并绘制其生长曲线, 对该菌株在不同 pH、NaCl 浓度和温度下的生长繁殖进行研究, 评价其抗逆性。结果表明: 结合菌株 NSZ-YBGJ001 的形态特征、生理生化特性以及 16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列分析, 将该菌株鉴定为贝莱斯芽胞杆菌 *Bacillus velezensis*。菌株 NSZ-YBGJ001 生长较快, 繁殖量大, 接种后 4 h 即进入对数生长期, 16~24 h 为稳定生长期, 24 h 时菌液浓度最高, 达到 1.89×10^9 CFU/mL, 然后进入衰退期, 一直到 44 h 菌液浓度维持在 1.79×10^8 CFU/mL 左右。该菌在 pH 5~9、2%~10% NaCl 和 20~45℃ 条件下均可以正常生长; 在 pH 低于 4 或高于 10、NaCl 浓度高于 15%、温度超过 50℃ 的条件下菌株 NSZ-YBGJ001 生长受到严重抑制, 菌液浓度随生长条件极端化而显著降低; 当 pH 超过 13, NaCl 浓度超过 20% 时菌株死亡。

关键词: 贝莱斯芽胞杆菌; 种类鉴定; 生物学特性; 抗逆性

Identification and biological characteristics of *Bacillus velezensis* NSZ-YBGJ001

TAO Yongmei¹ PAN Hongji² ZHANG Xiaoli² HUANG Jian³ LI Peng⁴ LU Zhijun^{2*}

(1. College of Plant Protection, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 2. Beijing Plant Protection Station, Beijing 100029, China; 3. Beijing Agricultural Products Quality Production and Marketing Service Station, Beijing 102220, China; 4. Hainan Agricultural Department, Haikou 570204, Hainan Province, China)

Abstract: In order to clarify the taxonomic status and biological characteristics of strain NSZ-YBGJ001 isolated from the soil of Lingshui County, Sanya City, Hainan Province, the colony characteristics, morphological characteristics, physiological and biochemical characteristics, 16S rRNA and *gyrB* gene sequences and phylogenetics were analyzed. The growth curve of strain NSZ-YBGJ001 was determined and drawn, and the growth and reproduction of strain NSZ-YBGJ001 were studied under different pH values, NaCl concentrations and temperatures to evaluate its stress resistance. The results showed that the strain NSZ-YBGJ001 was identified as *Bacillus velezensis* according to its morphological characteristics, physiological and biochemical characteristics, 16S rRNA and *gyrB* gene sequence analysis. The strain NSZ-YBGJ001 grew rapidly and had a high reproductive capacity. It entered the logarithmic phase at 4 h after inoculation and the stable phase at 16–24 h; the highest concentration (1.89×10^9 CFU/mL) was observed at 24 h, followed by the decline phase, lasting until 44 hours when the concentration of bacterial solution maintained at about 1.79×10^8 CFU/mL. Under the conditions of pH 5–9, 2%–10% Na-

基金项目: 北京市财政项目(PXM2019_036203_000040)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: lerrylyu@126.com

收稿日期: 2019-06-19

Cl and 20–45 °C, the strain could grow normally; under the conditions of pH lower than 4 or higher than 10, NaCl concentration higher than 15%, and temperature higher than 50 °C, the growth of the strain was severely inhibited, and the concentration of bacterial solution significantly decreased under the extreme growth conditions; when pH exceeded 13 and the concentration of NaCl exceeded 20%, the strain died.

Key words: *Bacillus velezensis*; species identification; biological characteristics; stress resistance

植物病害造成的农业产量损失,一直是农业生产面临的重要问题,长期以来植物病害的防治主要依赖于化学农药,但长期施用化学农药带来环境污染、抗药菌群产生、农产品质量安全隐患等严重问题,亟需安全、环境友好、可替代化学农药的植物病害防治新方法(杨玉萍和李艾莲,2006;柯杨等,2012)。生物防治对生态环境友好且对人类健康安全,在病虫害防治中发挥着重要作用(朱玥妍等,2012),其中拮抗微生物及其代谢产物是生物防治中最重要的一类(郭春艳,2010)。芽胞杆菌 *Bacillus* spp. 具有生长快、易培养、抗逆、抑菌等特点,在自然界广泛分布,绝大多数菌株对人畜无害且不会污染环境,是开发生防菌的主要来源之一(柯杨等,2012)。

芽胞杆菌属已经鉴定的种有 225 个(刘波等,2016),其中在植物病害防治中报道应用的有枯草芽胞杆菌 *B. subtilis* (Li et al., 2012)、短小芽胞杆菌 *B. pumilus* (Huang et al., 2012)、解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens* (Alvindia & Natsuaki, 2008)、蜡样芽胞杆菌 *B. cereus* (潘晓梅等,2019)、地衣芽胞杆菌 *B. licheniformis* (Lee et al., 2006) 等少数种,因此开发新的芽胞杆菌类生物农药,仍有很大的空间。贝莱斯芽胞杆菌 *B. velezensis* 因其形态、理化特性和系统发育与其它芽胞杆菌存在差异,因此将其命名为独立的新种(Ruiz-García et al., 2005; 蔡高磊等,2018)。贝莱斯芽胞杆菌抑菌谱广,对稻瘟病菌 *Magnaporthe oryzae*、水稻纹枯病菌 *Rhizoctonia solani*、辣椒炭疽病菌 *Colletotrichum coccodes* 和番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea* 等植物病原真菌均具有显著的拮抗作用(Lim et al., 2017),对草莓枯萎病和小麦赤霉病等植物病害有较好的防效(Nam et al., 2009; Palazzinia et al., 2016),因此贝莱斯芽胞杆菌极具开发为微生物农药的潜能。

本课题组前期分离到 1 株菌株 NSZ-YBGJ001,对峙培养试验发现该菌株对棉花枯萎病菌 *Verticillium dahliae*、生霉菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum* 和桃褐腐病菌 *Monilinia fructicola* 等 20 多种植物病原真菌均有较好的抑制作用。本研究拟通过菌株 NSZ-YBGJ001 的形态特征观察、生理生化特性测

定、16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列测定明确其分类地位;通过测定该菌株的生长曲线,对酸、碱、盐及温度的耐受性,进一步明确该菌株的最适培养条件和抗逆性,以期菌株 NSZ-YBGJ001 的工厂化发酵和规模化应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株:菌株 NSZ-YBGJ001 分离自海南省三亚市陵水县田间土壤,划线接种于 LB 固体平板上,置于 30 °C 恒温箱中培养出单菌落,挑取单菌落于 LB 液体培养基中,于 30 °C、180 r/min 条件下振荡培养 24 h 获得菌悬液,将菌悬液与石蜡油等体积混合于冻存管中,–80 °C 保存备用。

培养基:LB (Luria-Bertani) 液体培养基:酵母提取物 10 g、胰蛋白胨 10 g、NaCl 5 g,蒸馏水定容至 1 L; LB 固体培养基:酵母提取物 10 g、胰蛋白胨 10 g、NaCl 5 g、琼脂粉 15 g,蒸馏水定容至 1 L。

试剂及仪器:细菌基因组 DNA 提取试剂盒和 2×Taq PCR Master Mix,天根生化科技(北京)有限公司;其余试剂均为国产分析纯。T100 PCR 仪、Gel Doc XR+凝胶成像仪,伯乐生命医学产品(上海)有限公司;5424R 低温离心机,德国 Eppendorf 公司;DYY-GC 电泳仪,北京六一仪器厂;GXZ 型智能光照培养箱,宁波江南仪器厂;WFZ UV-2100 型紫外可见分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司;VHX-200 数码显微镜,基恩士(中国)有限公司;Zeiss EVO25 扫描电子显微镜,德国卡尔蔡司公司。

1.2 方法

1.2.1 供试菌株的形态特征观察

将–80 °C 保存的菌株 NSZ-YBGJ001 解冻后,划线接种于 LB 固体平板上活化,挑取平板上的单菌落于 LB 液体培养基中,于 30 °C、180 r/min 条件下振荡培养 24 h 获得菌悬液,并用无菌水进行 10 倍梯度稀释,吸取 10^{-5} 浓度梯度的稀释液 100 μL 于 LB 固体平板上涂布,置于 30 °C 培养箱中黑暗条件下培养 48 h,利用数码显微镜观察菌株 NSZ-YBGJ001 的菌落形态。另外将上述菌悬液在室温下以 12 000 r/min 离

心2 min,弃上清液,收集菌体沉淀,取0.5 g于扫描电子显微镜下观察其菌丝形态。

1.2.2 供试菌株的生理生化特性测定

参照《伯杰氏细菌鉴定手册(第8版)》(布坎南和吉本斯,1984)和《常见细菌系统鉴定手册》(东秀珠和蔡妙英,2001)检索表对菌株NSZ-YBGJ001的103项生理生化特性进行测定,包括革兰氏染色、 β -半乳糖苷酶活性、氧化酶、接触酶、V-P试验、精氨酸双水解酶活性、吡啶产生、明胶液化、碳源利用、不同浓度NaCl和不同pH下的生长等。另外还测定了菌株NSZ-YBGJ001对利福霉素、二甲胺四环素、林可霉素、万古霉素、醋竹桃霉素、夫西地酸等的敏感性。

1.2.3 供试菌株的16S rRNA和gyrB基因序列分析

挑取菌株NSZ-YBGJ001单菌落于LB液体培养基中,于30℃、180 r/min条件下振荡培养16 h获得菌悬液,利用细菌基因组DNA提取试剂盒提取供试菌株基因组DNA,提取方法参照说明书进行,以提取的DNA作为PCR扩增模板。本研究所用扩增引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

采用通用引物27F(5'-AGAGTTTGATCMTG-GCTCAG-3')和1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACCTT-3')对供试菌株的16S rRNA基因序列进行PCR扩增。50 μ L反应体系:2 $\times$ Taq PCR Master Mix 25 μ L、DNA模板2 μ L、10 μ mol/L上下游引物各1 μ L、ddH₂O 21 μ L。反应条件:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸90 s,35个循环;72℃再延伸5 min。PCR扩增产物由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,测序所得序列经NCBI的BLAST检索系统进行同源性分析,选取GenBank中相似性较高的芽胞杆菌属菌株,利用MEGA 6.0软件通过邻接法进行1 000次相似度重复计算并构建系统发育树。

采用引物gyrB-F(5'-TTGRCGGHRGYGGHT-ATAAAGT-3')和gyrB-R(5'-CCDCCSTCAGARTC-WCCCTC-3')(Sharga & Lyon, 1998)对供试菌株的gyrB基因序列进行PCR扩增。50 μ L反应体系:2 $\times$ Taq PCR Master Mix 25 μ L、DNA 2 μ L、10 μ mol/L上下游引物各1 μ L、ddH₂O 21 μ L。反应条件:95℃预变性3 min;94℃变性30 s,55℃退火45 s,72℃延伸1 min,35个循环;72℃再延伸10 min。PCR扩增产物由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,测序所得序列经NCBI的BLAST检索系统进行同源性分析,选取GenBank中相似性较高的芽胞杆菌属菌株,利用MEGA 6.0软件通过邻接法进行1 000次

相似度重复计算并构建系统发育树。

1.2.4 供试菌株的生长曲线绘制

挑取LB平板上的菌株NSZ-YBGJ001单菌落于LB液体培养基中,于30℃、180 r/min条件下振荡培养24 h后获得菌悬液,按体积比1:20的量接种于LB液体培养基中,于上述条件下振荡培养,从接种后2、4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44 h各取1次样,共取样12次。每次所取样品用分光光度计测定OD_{600 nm}值,每次测定重复3次,计算菌液浓度并绘制生长曲线。

1.2.5 供试菌株的适宜培养条件测定

将1.2.4获得的菌株NSZ-YBGJ001菌悬液,按体积比1:20的量分别接种到不同pH(2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12和13)、NaCl浓度(2%、5%、7%、10%、15%、20%)和温度(20、25、30、35、40、45、50、55℃)的LB液体培养基中,在30℃(除温度处理组外)、180 r/min条件下振荡培养24 h,将所得培养液分别用无菌水进行10倍梯度稀释,吸取10⁻⁵和10⁻⁶浓度梯度的稀释液100 μ L涂布于LB固体平板上,30℃恒温黑暗培养24 h,通过肉眼对平板上菌落数进行统计,每个浓度重复3次,比较不同pH、NaCl浓度和温度对菌株NSZ-YBGJ001生长的影响,评价该菌株的抗逆性。

1.3 数据分析

采用SPSS 18.0软件对数据进行单因素方差分析,应用最小显著差数(LSD)法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

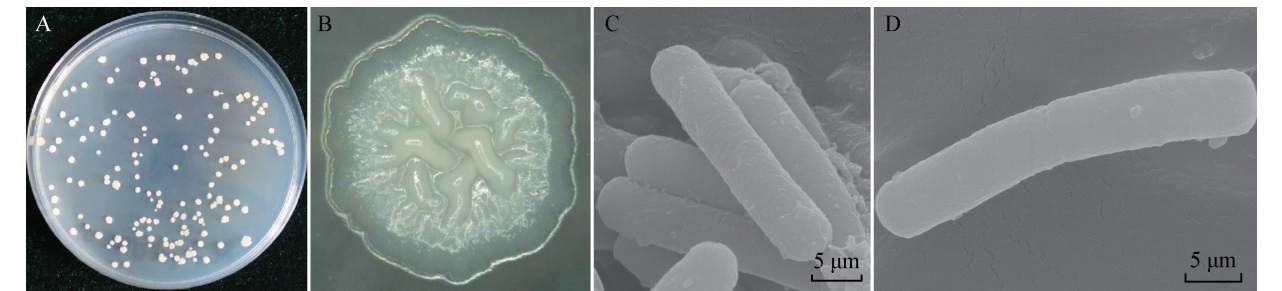
2.1 菌株NSZ-YBGJ001的形态特征

菌株NSZ-YBGJ001在LB平板上30℃培养48 h后菌落中等大小,乳白色不透明,扁平,边缘不整齐,表面干燥、无光泽、皱缩,随着培养时间的增加,菌落颜色变为浅褐色。扫描电子显微镜观察菌体细胞呈短杆状,大小为0.5~0.7 μ m $\times$ 2.0~3.0 μ m,芽胞中生或偏中生,无伴胞晶体。符合芽胞杆菌属细菌的一般形态特征(图1)。

2.2 菌株NSZ-YBGJ001的生理生化特性

菌株NSZ-YBGJ001细胞呈杆状,可形成芽胞,孢囊不膨大,其革兰氏染色、氧化酶、接触酶和V-P试验呈阳性; β -半乳糖苷酶、精氨酸双水解酶和吡啶产生试验呈阴性;可使明胶液化;70种生长利用测试中能够利用 α -D-葡萄糖、蔗糖、果胶、糊精、D-甘露糖、D-果糖、甘油等28种,其余42种不可被利用;22种化学敏感试验中菌株NSZ-YBGJ001对四唑

紫、醋竹桃霉素、四唑蓝、林可霉素、利福霉素等11个检测项目不敏感,对1%乳酸钠、盐酸胍、亚碲酸钾等6个检测项目敏感,在浓度为1%、4%、8%的NaCl和pH 5、6条件下均能生长(表1)。通过形态特征观察和生理生化特性分析,菌株NSZ-YBGJ001被进一步鉴定为芽胞杆菌属细菌。



A: 菌落形态; B: 单菌落形态(50×); C: 菌体群形态(30 000×); D: 单个菌体形态(35 000×)。A: Colony morphology; B: single colony morphology (50×); C: morphology of bacterial flora (30 000×); D: morphology of a single bacterium (35 000×).

图1 菌株NSZ-YBGJ001在LB培养基上的菌落和菌体形态

Fig. 1 Colonies on the LB medium and morphology of NSZ-YBGJ001

表1 菌株NSZ-YBGJ001的生理生化特性

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of NSZ-YBGJ001 strain

试验项目 Tested item	结果 Result	试验项目 Tested item	结果 Result	试验项目 Tested item	结果 Result	试验项目 Tested item	结果 Result
细胞形态 Cell morphology	杆状 Bacillar	L-岩藻糖 L-fucose	-	γ-氨基丁酸 γ-aminobutyric acid	-	吐温 40 Tween 40	-
革兰氏染色 Gram staining	+	L-鼠李糖 L-rhamnose	-	α-羟丁酸 α-hydroxybutyrate	-	D-水杨苷 D-salicin	+
形成芽胞 Spore forming	+	糊精 Dextrin	+	D-苹果酸 D-malate	-	甘油 Glycerin	+
孢囊膨大 Cyst enlargement	-	D-麦芽糖 D-maltose	-	L-苹果酸 L-Malate	+	萘啶酸 Nalidixic acid	-
β-半乳糖苷酶 β-galactosidase	-	蔗糖 Sucrose	+	α-丁酮酸 α-ketobutyrate	-	四唑紫 Tetrazolium violet	-
氧化酶 Oxidase	+	D-山梨醇 D-sorbitol	+	α-酮戊二酸 α-ketoglutarate	-	1% 乳酸钠 1% sodium lactate	+
接触酶 Catalase	+	D-甘露醇 D-mannitol	+	乙酰乙酸 Acetoacetic acid	-	醋竹桃霉素 Troleandomycin	-
V-P 试验 V-P test	+	D-阿糖醇 D-arabinol	-	丙酸 Propionic acid	-	四唑蓝 Methyl thiazolyl tetrazolium	-
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	-	肌醇 Inositol	+	乙酸 Acetic acid	-	氯化锂 Lithium chloride	+
吡啶产生 Acetyl methanol	-	水苏糖 Stachyose	-	甲酸 Formic acid	+	亚碲酸钾 Potassium tellurite	+
明胶 Gelatin	+	D-棉子糖 D-raffinose	-	粘酸 Sticky acid	-	林可霉素 Lincomycin	-
柠檬酸 Citric acid	+	果胶 Pectin	-	奎宁酸 Quinic acid	-	盐酸胍 Guanidine hydrochloride	+
D-纤维二糖 D-cellobiose	+	D-海藻糖 D-trehalose	+	糖质酸 Glucaric acid	-	丁酸钠 Sodium butyrate	+
α-D-乳糖 α-D-lactose	-	D-蜜二糖 D-melibiose	-	D-葡萄糖酸 D-gluconic acid	+	利福霉素 SV Rifamycin SV	-
松二糖 Turanose	-	β-甲基-D-葡萄糖苷 β-methyl-D-glucoside	+	N-乙酰神经氨酸 N-acetylneuraminic acid	-	二甲胺四环素 Dimethylaminotetra- cycline	-

续表 1 Continued

试验项目 Tested item	结果 Result	试验项目 Tested item	结果 Result	试验项目 Tested item	结果 Result	试验项目 Tested item	结果 Result
葡萄糖醛酰胺 Glucoaldehyde amide	+	L-丙氨酸 L-alanine	+	<i>p</i> -羟基苯乙酸 <i>p</i> -hydroxyphenylacetic acid	-	十四烷硫酸钠 Sodium tetradecane sulfate	-
3-甲基-D-葡萄糖 3-methyl-D-glucose	-	L-精氨酸 L-arginine	-	D-葡萄糖-6-磷酸 D-glucose-6-phosphate	-	氨曲南 Aztreonam	+
<i>N</i> -乙酰-D-葡萄糖胺 <i>N</i> -acetyl-D-glucosamine	+	L-天冬氨酸 L-aspartic acid	+	D-果糖-6-磷酸 D-gructose-6-phosphate	+	溴酸钠 Sodium bromate	-
<i>N</i> -乙酰-β-D-甘露糖胺 <i>N</i> -acetyl-β-D-mannosamine	-	L-谷氨酸 L-glutamate	+	溴代丁二酸 Bromosuccinic acid	-	万古霉素 Vancomycin	-
<i>N</i> -乙酰-D-半乳糖胺 <i>N</i> -acetyl-D-galactosamine	-	L-组氨酸 L-histidine	-	β-羟基-D,L-丁酸 β-hydroxy-D,L-butyric acid	+	夫西地酸 Fusidic acid	-
α-D-葡萄糖 α-D-glucose	+	L-焦谷氨酸 L-pyroglutamate	-	D-半乳糖醛酸 D-galacturonic acid	+	1% NaCl	+
D-甘露糖 D-mannose	+	L-丝氨酸 L-serine	-	D-葡萄糖醛酸 D-glucuronic acid	-	4% NaCl	+
D-果糖 D-fructose	+	L-乳酸 L-lactic acid	+	L-半乳糖酸内酯 L-galactose lactone	+	8% NaCl	+
D-半乳糖 D-galactose	-	D-丝氨酸 D-serine	-	丙酮酸甲酯 Methyl pyruvate	-	pH 5.0	+
龙胆二糖 Gentiobiose	+	D-天冬氨酸 D-aspartic acid	-	D-乳酸甲酯 D-methyl lactate	-	pH 6.0	+
D-岩藻糖 D-fucose	-	甘氨酸-L-脯氨酸 Glycine-L-proline	-	肌苷 Inosine	-		

+: 阳性反应; -: 阴性反应。+: Positive; -: negative.

2.3 菌株NSZ-YBGJ001的16SrRNA和gyrB序列分析

菌株NSZ-YBGJ001的16S rRNA基因序列长度为1 421 bp, GenBank 登录号为MT225590。BLAST 同源性比对发现, 菌株NSZ-YBGJ001的16S rRNA基因序列与贝莱斯芽胞杆菌菌株SRCM101368的16S rRNA基因序列(CP031694.1)相似性最高, 达到100%。系统发育树显示, 菌株NSZ-YBGJ001与贝莱斯芽胞杆菌菌株CR-502^T(AY603658.1)聚在一个分支(图2-A)。

菌株NSZ-YBGJ001的gyrB基因序列长度为1 109 bp, GenBank 登录号为MT300194。BLAST同源性比对发现, 菌株NSZ-YBGJ001的gyrB基因序列与贝莱斯芽胞杆菌菌株SRCM101368的gyrB基因序列(CP031694.1)相似性最高, 达到100%。系统发育树显示, 菌株NSZ-YBGJ001与贝莱斯芽胞杆菌菌株Y2(LC191187.1)聚在一个分支(图2-B)。

结合形态特征、生理生化特性以及16S rRNA和gyrB基因序列分析结果, 将菌株NSZ-YBGJ001鉴定为贝莱斯芽胞杆菌。

2.4 菌株NSZ-YBGJ001的生长曲线

接种菌株NSZ-YBGJ001后0~4 h为生长迟缓期; 4 h之后生长量快速上升, 进入对数生长期; 接种

后16~24 h, 增殖速度变慢, 进入稳定期, 24 h时菌液浓度达到最高, 菌液OD_{600 nm}和菌体量分别为1.90和1.89×10⁹ CFU/mL; 之后菌液浓度开始下降, 进入衰退期; 接种后28~44 h菌液浓度达到动态平衡, 菌液OD_{600 nm}和菌体量平均分别为1.04和3.09×10⁸ CFU/mL, 接种44 h时菌液浓度仍为1.79×10⁸ CFU/mL(图3)。

2.5 菌株NSZ-YBGJ001的抗逆性

菌株NSZ-YBGJ001在pH 5~9范围内生长良好, 菌液浓度平均为1.47×10⁸ CFU/mL。随着pH的升高或降低菌液浓度显著降低, pH 2~4时, 菌液浓度维持在极低水平, 仅为126 CFU/mL; pH 10~13时, 菌体繁殖亦受较大影响, pH越高影响越大, pH 13时菌株死亡(图4-A)。

NaCl浓度在2%~10%条件下, 菌株NSZ-YBGJ001均可正常生长繁殖, 菌液浓度平均可达4.02×10⁷ CFU/mL。NaCl浓度在15%~20%条件下, 菌体仍可增殖, NaCl浓度超过20%时菌株死亡(图4-B)。

温度为20~45℃时, 菌株NSZ-YBGJ001均可生长, 最适生长温度为30~40℃, 30℃时生长达到峰值, 菌液OD_{600 nm}为2.15, 菌液浓度为2.01×10⁸ CFU/mL。超过50℃不利于菌株生长, 菌液浓度显著下降, 且温度越高影响越大(图4-C)。

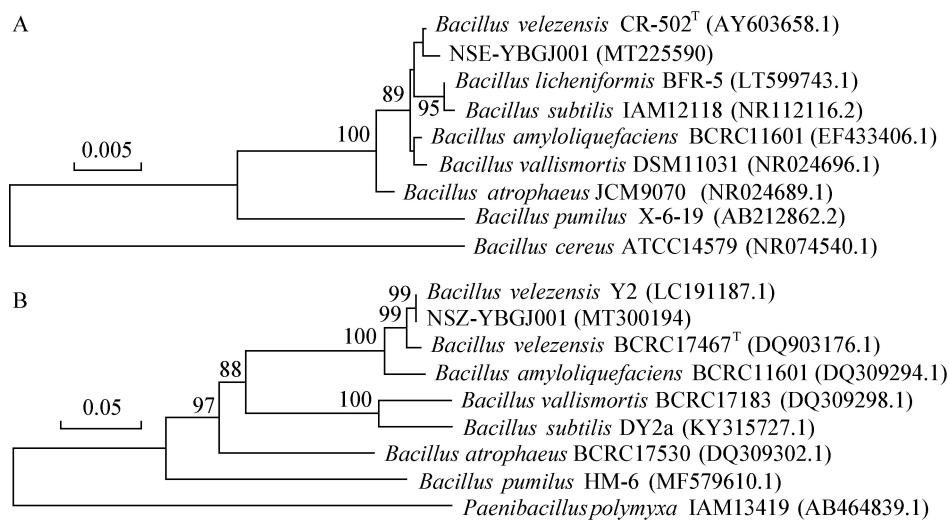


图2 基于16S rRNA(A)和*gyrB*(B)基因序列以邻接法构建菌株NSZ-YBGJ001和其它相关菌株的系统发育树
Fig. 2 Phylogenetic tree of strain NSZ-YBGJ001 and other related strains based on 16S rRNA (A) and *gyrB* (B) gene sequences by using neighbor-joining method

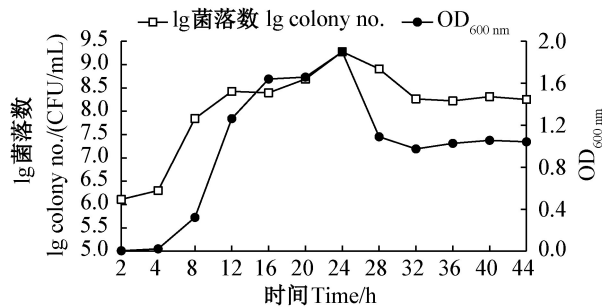


图3 菌株NSZ-YBGJ001的生长曲线
Fig. 3 Growth curve of NSZ-YBGJ001 strain

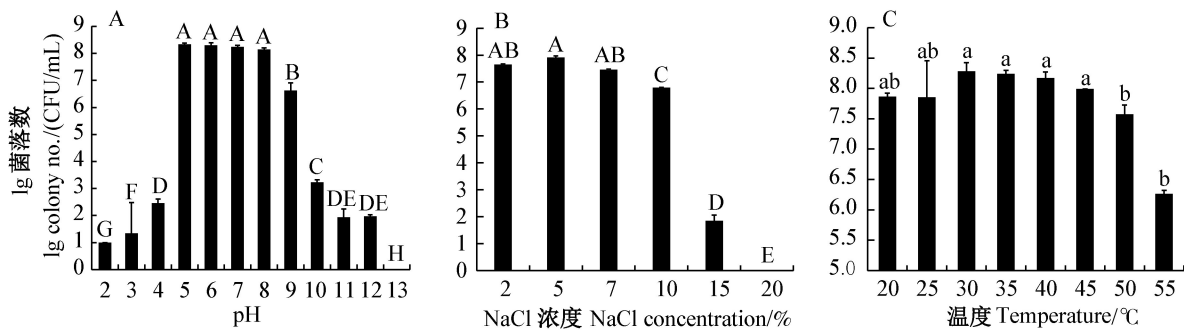


图4 不同pH(A)、NaCl浓度(B)和温度(C)对菌株NSZ-YBGJ001生长的影响

Fig. 4 Effects of different pH values (A), NaCl concentrations (B) and temperatures (C) on the growth of NSZ-YBGJ001 strain
图中数据为平均数±标准差。不同大、小写字母分别表示经LSD法检验在P<0.01和P<0.05水平差异显著。Data are mean±SD. Different uppercase or lowercase letters indicate significant difference at P<0.01 or P<0.05 level by LSD test.

3 讨论

芽胞杆菌细菌的分类鉴定是基于形态特征、生理生化特性、化学组分及分子生物学特征等一系列性状的比较,采用数值分类法、分子分类法、化学分类法、多项分类法和基因组分类法等多种方法进而

得出准确的鉴定结果。传统的分类鉴定方法主要是根据形态特征、生理生化特性以及16S rRNA基因序列分析。目前,芽胞杆菌属已经鉴定的种有225个(刘波等,2016),传统的分类鉴定方法很难对一些近似种进行区分。如严婉荣等(2017)比较了10种芽胞杆菌的基本特性和70条芽胞杆菌16S rRNA基因

序列,发现这些菌株相似性较高,难以鉴定到种。随着测序技术的发展,细菌基因组序列的相似性分析已被广泛应用,建立基因组核心基因平均核苷酸一致性将成为芽胞杆菌分类鉴定的黄金标准(刘国红等,2008;刘波等,2016)。本研究通过形态特征、生理生化特征以及16S rRNA和*gyrB*基因序列比对,将菌株NSZ-YBGJ001鉴定为贝莱斯芽胞杆菌。

贝莱斯芽胞杆菌是近年来命名的芽胞杆菌新种(Ruiz-García et al., 2005),国内外研究者对其分类地位仍存在争议。Ruiz-García et al. (2005)自西班牙南部马拉加市一条名叫贝莱斯的河流分离到革兰氏阳性细菌CR-502^T和CR-14b,二者在温度15~45℃和pH 5~10条件下均可以生长,其16S rRNA基因序列与解淀粉芽胞杆菌的相似性达99%,进一步基于表型分析结果、化学分类特性差异及DNA-DNA杂交值,将这2株菌株鉴定为芽胞杆菌属的新种,命名为贝莱斯芽胞杆菌。Wang et al. (2008)依据*gyrB*基因序列相似性和DNA-DNA杂交相关性,提出标准菌株BCRC 17467^T(CR-502^T)是解淀粉芽胞杆菌的后期同物异名种。Dunlap et al. (2016)研究发现贝莱斯芽胞杆菌菌株NRRL B-41580^T和解淀粉芽胞杆菌植物乳杆菌亚种*B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* 菌株FZB42^T的基因组学差异较小,根据表型和基因型的一致性,随后将*B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* 重新分类为*B. velezensis*的异名种。Fan et al. (2017)通过比较分析解淀粉芽胞杆菌与菌株FZB42^T、甲基营养型芽胞杆菌*B. methylotrophicus*和贝莱斯芽胞杆菌等同种菌群在四核苷酸、平均核苷酸一致性、平均氨基酸一致性和DNA-DNA杂交值上的差异,证明菌株FZB42^T不是解淀粉芽胞杆菌,而应分类为贝莱斯芽胞杆菌。

贝莱斯芽胞杆菌在自然界中广泛分布,很容易分离和人工培养,生长快且稳定,对人和动物无害,并且对环境无污染,该菌代谢产物丰富,抑菌谱广且抗逆性强(Ye et al., 2018),在农业生物防治领域的应用前景广泛。杨可(2019)研究结果显示贝莱斯芽胞杆菌菌株TCS001在27℃、145 r/min恒温摇床培养条件下,在0~8 h为调整生长期,10 h后进入对数生长期,38~52 h为平稳生长期。郭伟强(2019)发现贝莱斯芽胞杆菌在pH 5.0、2% NaCl、37~40℃环境中均可以生长,而在pH 3.0~4.0、8% NaCl、45~50℃环境中不能生长。本试验结果表明,贝莱斯芽胞杆菌菌株NSZ-YBGJ001生长快,在LB液体培养基中接种4 h后即进入对数生长期,菌液浓度高,稳定生

长期的最高菌量达 1.89×10^9 CFU/mL,接种24 h后进入衰退期,28~44 h时菌量达到动态平衡,菌液浓度平均维持在 3.09×10^8 CFU/mL;且抗逆性好,pH 5~9、2%~10% NaCl、30~40℃条件下均可生长,当pH低于4或高于10,菌株生长缓慢,pH超过13菌株死亡;当NaCl浓度高于15%时菌株生长繁殖变慢,浓度超过20%时菌株死亡;当温度超过50℃时菌株生长受到严重抑制,但仍可以生长,说明该菌株比较耐高温,可能与其分离自海南省有关,该地区地温比较高,这一特点降低了该菌株后期大规模发酵工艺和剂型生产的难度。

本试验发现菌株NSZ-YBGJ001培养条件简单、生长繁殖量大且抗逆性较好,前期试验表明该菌株对20多种植物病原真菌表现出不同程度的抑制作用(数据未发表),具有开发为微生物农药的巨大潜力,尤其在土传真菌病害危害严重地块的土壤修复方面应用潜力巨大。后期将对菌株NSZ-YBGJ001的抑菌物质进行鉴定,探索其抑菌机制;通过优化培养条件,摸索大规模发酵条件,以期实现工厂化发酵,为该菌株生防制剂的开放奠定基础。

参考文献 (References)

- ALVINDIA DG, NATSUAKI KT. 2008. Biocontrol activities of *Bacillus amyloliquefaciens* DGA14 isolated from banana fruit surface against banana crown rot-causing pathogens. *Crop Protection*, 28 (3): 236–242
- BUCHANAN RE, GIBBONS NE. 1984. *Bergey's bacterial identification manual*. 8th edition. Beijing: Science Press (in Chinese) [布坎南 RE, 吉本斯 NE. 1984. 伯杰氏细菌鉴定手册. 8版. 北京: 科学出版社]
- CAI GL, ZHANG F, OUYANG YX, ZHAO CS, PENG XH, JIANG AM. 2018. Research progress on *Bacillus velezensis*. *Northern Horticulture*, (12): 162–167 (in Chinese) [蔡高磊, 张凡, 欧阳友香, 赵昌松, 彭宣和, 江爱明. 2018. 贝莱斯芽胞杆菌(*Bacillus velezensis*)研究进展. 北方园艺, (12): 162–167]
- DONG XZ, CAI MY. 2001. *Handbook of identification of common bacterial systems*. Beijing: Science Press, pp. 349–388 (in Chinese) [东秀珠, 蔡妙英. 2001. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, pp. 349–388]
- DUNLAP CA, KIM SJ, KWON SW, ROONEY AP. 2016. *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and '*Bacillus oryzicola*' are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(3): 1212–1217
- FAN B, BLOM J, KLENK HP, BORRIS R. 2017. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* form an

- “operational group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* species complex. *Frontiers in Microbiology*, 8: 22
- GUO CY. 2010. Colonization in oilseed rape of marine bacterium *Bacillus velezensis* DM09 and biological control on *Sclerotinia* stem rot. Master Thesis. Wuhan: Huazhong Agricultural University (in Chinese) [郭春艳. 2010. 海洋细菌 *Bacillus velezensis* DM09 在油菜中的定殖及对油菜菌核病的防治研究. 硕士学位论文. 武汉: 华中农业大学]
- GUO WQ. 2019. Isolation, identification of strains from processing organic waste samples and strain's characterization. Master Thesis. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University (in Chinese) [郭伟强. 2019. 处理有机废弃物样品的菌株分离鉴定及菌株特性的研究. 硕士学位论文. 呼和浩特: 内蒙古农业大学]
- HUANG XQ, ZHANG N, YONG XY, YANG XM, SHEN QR. 2012. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber with *Bacillus pumilus* SQR-N43. *Microbiological Research*, 167(3): 135–143
- KE Y, LI B, QI F. 2012. Application of *Bacillus* on plant fungal diseases prevention. *Storage and Process*, 12(5): 39–43, 47 (in Chinese) [柯杨, 李勃, 齐凡. 2012. 芽胞杆菌在植物真菌病害防治中的应用. 保鲜与加工, 12(5): 39–43, 47]
- LEE JP, LEE SW, KIM CS, SON JH, SONG JH, LEE KY, KIM HJ, JUNG SJ, MOON BJ. 2006. Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* for the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Biological Control*, 37(3): 329–337
- LI LH, MA JC, LI Y, WANG ZY, GAO TT, WANG Q. 2012. Screening and partial characterization of *Bacillus* with potential applications in biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt. *Crop Protection*, 35: 29–35
- LIM SM, YOON MY, CHOI GJ, CHOI YH, JANG KS, SHIN TS, PARK HW, YU NH, KIM YH, KIM GC. 2017. Diffusible and volatile antifungal compounds produced by an antagonistic *Bacillus velezensis* G341 against various phytopathogenic fungi. *The Plant Pathology Journal*, 33(5): 488–498
- LIU B, TAO TS, WANG JP, LIU GH, XIAO RF, CHEN MC. 2016. *Bacillus* Vol. 2: taxonomy of *Bacillus*. Beijing: Science Press (in Chinese) [刘波, 陶天申, 王阶平, 刘国红, 肖荣凤, 陈梅春. 2016. 芽胞杆菌第2卷: 芽胞杆菌分类学. 北京: 科学出版社]
- LIU GH, LIU P, LIN NQ, LIN YZ. 2008. Phyletic evolution and taxonomic characteristics of *Bacillus*. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 23(4): 436–449 (in Chinese) [刘国红, 刘波, 林乃铨, 林营志. 2008. 芽胞杆菌的系统进化及其属分类学特征. 福建农业学报, 23(4): 436–449]
- NAM MH, PARK MS, KIM HG, YOO SJ. 2009. Biological control of strawberry *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* using *Bacillus velezensis* BS87 and RK1 formulation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(5): 520–524
- PALAZZINIA JM, DUNLAP CA, BOWMANC MJ, CHULZE SN. 2016. *Bacillus velezensis* RC 218 as a biocontrol agent to reduce *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation: genome sequencing and secondary metabolite cluster profiles. *Microbiological Research*, 192: 30–36
- PAN XM, LI ZY, SHI XL, LIN SH, LI JJ, TIAN YQ. 2019. Screening, identification and biocontrol effects of antagonistic bacterial strain XF and preliminary exploration of biocontrol factors. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 28(11): 1888–1895 (in Chinese) [潘晓梅, 李昭煜, 石晓玲, 林胜红, 李佳佳, 田永强. 2019. 番茄灰霉生防菌XF的筛选、鉴定及生防因子的初步探索. 西北农业学报, 28(11): 1888–1895]
- RUIZ-GARCÍA C, BEJAR V, MARTINEZ-CHECA F, LLAMAS I, QUESADA E. 2005. *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1): 191–195
- SHARGA BM, LYON GD. 1998. *Bacillus subtilis* BS 107 as an antagonist of potato blackleg and soft rot bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 44(8): 777–783
- WANG LT, LEE FL, TAI CJ, KUO HP. 2008. *Bacillus velezensis* is a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(3): 671–675
- YAN WR, XIAO M, CHEN Y, ZENG XP, ZHAO ZX. 2017. Comparative analysis between basic characteristics and 16S rRNA, and specific gene discovery of *Bacillus*. *Genomics and Applied Biology*, 36(11): 4686–4692 (in Chinese) [严婉荣, 肖敏, 陈圆, 曾向萍, 赵志祥. 2017. 芽胞杆菌基本特征、16S rRNA 对比分析及特异性基因挖掘. 基因组学与应用生物学, 36(11): 4686–4692]
- YANG K. 2019. Optimization of fermentation conditions of *Bacillus velezensis* strain TCS001 and its bio-control effect. Master Thesis. Hangzhou: Zhejiang A&F University (in Chinese) [杨可. 2019. 贝莱斯芽胞杆菌TCS001发酵条件优化及其生防作用研究. 硕士学位论文. 杭州: 浙江农林大学]
- YANG YP, LI AL. 2006. Research advances on botanical fungicides. *Review of China Agricultural Science and Technology*, 8(1): 49–53 (in Chinese) [杨玉萍, 李艾莲. 2006. 植物源杀菌剂研究进展. 中国农业科技导报, 8(1): 49–53]
- YE M, TANG X, YANG R, ZHANG HF, LI FS, TAO FZ, LI F, WANG ZG. 2018. Characteristic and application of a novel species of *Bacillus*: *Bacillus velezensis*. *ACS Chemical Biology*, 13(3): 500–505
- ZHU YY, LIU J, DU CM. 2012. Research progress of biological control in plant diseases by *Bacillus* spp. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 40(34): 16635–16658 (in Chinese) [朱玥妍, 刘娇, 杜春梅. 2012. 芽胞杆菌生物防治植物病害研究进展. 安徽农业科学, 40(34): 16635–16658]

(责任编辑:李美娟)