

内生枯草芽孢杆菌 JL-B16 生物学特性研究

袁宗胜^{1,2}, 刘芳³, 谢宝贵^{3*}

(1. 闽江学院海洋研究院, 福建福州 350108; 2. 人工林可持续经营福建省高校工程研究中心, 福建福州 350002; 3. 福建农林大学生命科学学院, 福建福州 350002)

摘要 对枯草芽孢杆菌 JL-B16 进行平板培养, 并对菌体进行革兰氏染色、芽孢染色和荚膜染色, 获得枯草芽孢杆菌 JL-B16 的培养特征和形态特征; 采用温度梯度和 pH 梯度法测定枯草芽孢杆菌 JL-B16 的最适培养条件, 绘制其 40 h 内的生长曲线, 并对其生理生化指标进行测定, 结果表明, 枯草芽孢杆菌 JL-B16 菌落为黄色, 菌落边缘不平整, 菌体呈杆状, 革兰氏阳性, 有芽孢, 无荚膜; 枯草芽孢杆菌 JL-B16 最适培养温度为 25 °C, 最佳生长 pH 为 7.0, 适宜生长 pH 6.0~8.0。对枯草芽孢杆菌 JL-B16 进行生物学特性及生理生化指标的测定, 为后续系统研究枯草芽孢杆菌 JL-B16 奠定了基础。

关键词 枯草芽孢杆菌; 生物学特性; 最适培养条件

中图分类号 S476 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)04-0005-02

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.04.002



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

The Biological Characteristics of Endophytic *Bacillus subtilis* JL-B16

YUAN Zong-sheng^{1,2}, LIU Fang³, XIE Bao-gui³ (1. Institute of Oceanography, Minjiang University, Fuzhou, Fujian 350108; 2. Fujian Provincial Colleges and University Engineering Research Center of Plantation Sustainable Management, Fuzhou, Fujian 350002; 3. College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002)

Abstract The culture characteristics and morphology characteristics of *Bacillus subtilis* JL-B16 were obtained by plate culture, Gram staining, spore staining and capsule staining. The optimum culture conditions of *B. subtilis* JL-B16 were determined by temperature gradient and pH gradient method, the growth curves of *B. subtilis* JL-B16 were plotted within 40 hours, and their physiological and biochemical indexes were determined. The result showed that the colony color of *B. subtilis* JL-B16 was yellow, the colony edge was uneven, the bacteria were rod-shaped, Gram-positive, there were spores and no capsule; the optimum culture temperature of *B. subtilis* JL-B16 was 25 °C, the optimum growth pH was 7.0, and the growth range pH was 6.0-8.0. The biological characteristics and physiological and biochemical indexes of *B. subtilis* JL-B16 were determined, which laid the foundation for the subsequent systematic study of *B. subtilis* JL-B16.

Key words *Bacillus subtilis*; Biological characteristics; Optimal culture conditions

植物内生细菌生活史的一定阶段或全部阶段生活在健康植物的各种组织和器官内部, 并且与植物建立了和谐联合关系^[1], 它是植物-内生菌系统的一个重要组成部分^[2]。内生细菌通过自身产生代谢产物或借助信号转导对宿主植物生长发育产生重要影响, 主要在促进宿主植物生长、增强宿主植物抗性 & 提高植物修复能力等方面^[3-4], 例如 *Microbacterium* 具有促进植物生长的作用^[5], *Bacillus* 具有良好的生防潜力^[6], *Sphingomonas* 具有促进植物自我修复功能^[7]等。

笔者选用从毛竹体内分离并筛选出的具有促生、拮抗功能内生枯草芽孢杆菌 JL-B16^[8], 主要研究其生物学特性, 即最适生长温度、最适 pH、生长曲线及生理生化指标, 为内生枯草芽孢杆菌 JL-B16 的应用及其复合微生物菌剂的开发和利用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株 枯草芽孢杆菌 JL-B16 是由福建农林大学生物菌物研究中心筛选出的具有较好拮抗效果的内生细菌。

1.2 培养基及主要试剂 内生菌培养采用 NA 培养基: 牛肉膏 3 g、蛋白胨 10 g、NaCl 5 g、琼脂 18 g、水 1 000 mL, pH 7.0~7.2 (液体培养基则不加琼脂)。

淀粉水解培养基: 蛋白胨 5 g、NaCl 5 g、牛肉膏 3 g、可溶性淀粉 2 g、琼脂 15 g、蒸馏水 1 000 mL, pH 7.2。

产 H₂S 试验培养基: 蛋白胨 10.0 g、酵母浸膏 3.0 g、牛肉膏 3.0 g、FeSO₄ 0.2 g、硫代硫酸钠 0.3 g、NaCl 5.0 g、蒸馏水 1 000 mL, pH 7.4。

葡萄糖发酵试验培养基: 牛肉膏 5 g、蛋白胨 10 g、NaCl 3 g、K₂HPO₄ 2 g、2.0% 溴麝香草酚蓝溶液 12 mL、葡萄糖 5 g、蒸馏水 1 000 mL, pH 7.4。

硝酸盐还原试验培养基: 蛋白胨 10 g、NaNO₃ 1 g、蒸馏水 1 000 mL, pH 7.6。

柠檬酸盐试验培养基: 柠檬酸钠 5 g、NaCl 5 g、MgSO₄ 2 g、K₂HPO₄ 1 g、(NH₄)₂PO₄ 1 g、琼脂 20 g、1% 溴百里酚兰液 8 mL、蒸馏水 1 000 mL, pH 6.8。

丙二酸利用试验培养基: 酵母浸膏 1.0 g、(NH₄)₂SO₄ 2.0 g、K₂HPO₄ 0.6 g、KH₂PO₄ 0.4 g、NaCl 2.0 g、丙二酸钠 3.0 g、1% 溴百里酚兰液 3 mL、蒸馏水 1 000 mL, pH 6.8。

V-P 试验及甲基红培养基: 蛋白胨 5 g、葡萄糖 5 g、磷酸二氢钾 5 g、蒸馏水 1 000 mL, pH 7.2。

硝酸盐还原试验培养基: 蛋白胨 5 g、酵母膏 3 g、硝酸钾 1 g、琼脂粉 7 g、蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0~7.2。

吡啶试验培养基: 胰蛋白胨 10 g、酵母膏 5 g、蒸馏水 1 000 mL。

石蕊牛乳培养基: 新鲜的脱脂牛乳 100 mL 加入 2.5% 石蕊水溶液至淡紫色(约 4 mL)。

主要试剂: HCl 溶液、NaOH 溶液、碘液、95% 乙醇、番红

基金项目 福州市科技计划项目(2019-G-61); 闽江学院校级科研项目(MYK19027); 人工林可持续经营福建省高校工程研究中心开放课题(PSM-2019001)。

作者简介 袁宗胜(1976—), 男, 山东高唐人, 高级工程师, 博士, 从事微生物相关领域研究。* 通信作者, 教授, 博士, 博士生导师, 从事食用菌的遗传育种与分子生物学研究。

收稿日期 2020-07-08

液、草酸结晶紫、5%孔雀绿染色液、1%的醋酸结晶紫、20% CuSO₄ 水溶液。

所用试剂均为国产分析纯。

1.3 枯草芽孢杆菌 JL-B16 生物学特性研究

1.3.1 枯草芽孢杆菌 JL-B16 的培养特征和形态特征。取供试枯草芽孢杆菌 JL-B16 接种于 NA 平板培养基上,28 ℃ 培养 2~3 d,观察菌落颜色和形态,包括菌体形状和芽孢形态等重要鉴别特征。对菌体进行革兰氏染色、芽孢染色、荚膜染色,在显微镜下观察染色结果,细菌形态观察方法参考^[9-10]。

1.3.2 枯草芽孢杆菌 JL-B16 最适温度的测定。在洁净试管中加入 10 mL NA 液体培养基,灭菌冷却后将枯草芽孢杆菌 JL-B16 按 1% 接种量接种于液体培养基试管中,分别置于 15、20、25、30、35、40 ℃ 这 6 个温度梯度下,180 r/min 振荡培养 24 h,以不接种枯草芽孢杆菌 JL-B16 的 NA 液体培养基作为对照,每个处理 3 个重复,测定 OD₆₀₀,以确定其生长的最适温度。

1.3.3 枯草芽孢杆菌 JL-B16 最适 pH 的测定。在洁净试管中加入 10 mL NA 液体培养基,用 1 mol/L HCl 或 1 mol/L NaOH 调整液体培养基的初始 pH,使培养基 pH 梯度为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0,并且每个处理 3 个重复,接种枯草芽孢杆菌 JL-B16,30 ℃ 下 180 r/min,振荡培养 24 h,测定 OD₆₀₀,以确定其生长的最适 pH。

1.3.4 枯草芽孢杆菌 JL-B16 生长曲线的测定。在洁净试管中加入 10 mL NA 液体培养基,灭菌冷却后,按 1% 的接种量接种枯草芽孢杆菌 JL-B16,30 ℃ 下 180 r/min 振荡培养。月开始放摇床振荡培养时进行第一次取样(0 h 取样),测量其 OD₆₀₀。以后每 2 h 定时取样,测定菌液的 OD₆₀₀。

1.4 枯草芽孢杆菌 JL-B16 生理生化指标的测定 枯草芽孢杆菌 JL-B16 生理生化指标测定项目主要有接触酶测定、V-P 测定、甲基红测定、利用葡萄糖产酸、利用葡萄糖产气、利用柠檬酸盐、硝酸盐还原、淀粉水解、需氧性测定、吡啶试验、丙二酸产 H₂S 试验等。测定方法参照东秀珠等^[8]。

2 结果与分析

2.1 枯草芽孢杆菌 JL-B16 生物学特性测定

2.1.1 枯草芽孢杆菌 JL-B16 培养特征和形态特征。取供试枯草芽孢杆菌 JL-B16 接种于 NA 平板培养基上,28 ℃ 培养 2~3 d,观察菌落颜色为黄色,菌落边缘不平整,通过显微镜观察,菌体呈杆状。对菌体进行革兰氏染色、芽孢染色、荚膜染色,结果显示枯草芽孢杆菌 JL-B16 为革兰氏阳性菌,有芽孢,无荚膜。

2.1.2 枯草芽孢杆菌 JL-B16 最适温度的测定。由图 1 可知,枯草芽孢杆菌 JL-B16 随着培养温度的逐步升高 OD₆₀₀ 也逐步升高,培养温度到达 25 ℃ 时 OD₆₀₀ 最大。在 25~30 ℃ 时,随着培养温度的增加 OD₆₀₀ 呈下降趋势,在 30~40 ℃ 时 OD₆₀₀ 呈稳定并逐步下降的趋势。从以上数据可以看出,枯草芽孢杆菌 JL-B16 的最适生长温度为 25 ℃。

2.2 枯草芽孢杆菌 JL-B16 最适 pH 的测定 由图 2 可知,随着 pH 的升高,枯草芽孢杆菌 JL-B16 菌液的 OD₆₀₀ 逐步升

高,待 pH 为 7.0 时达到最高值,随后 OD₆₀₀ 随 pH 的增加呈下降趋势。即最佳生长 pH 为 7.0,适宜生长 pH 为 6.0~8.0。

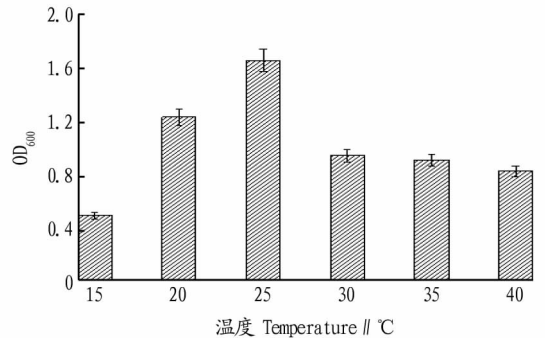


图 1 不同温度对枯草芽孢杆菌 JL-B16 的影响

Fig.1 Effects of different temperatures on *Bacillus subtilis* JL-B16

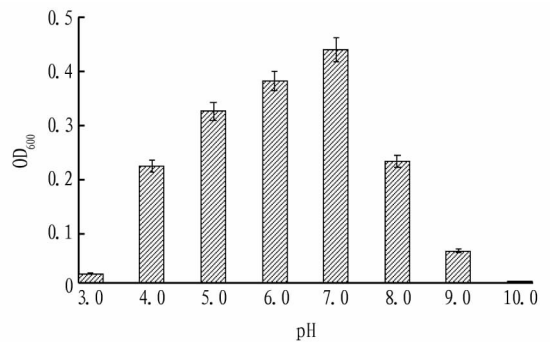


图 2 不同 pH 对枯草芽孢杆菌 JL-B16 的影响

Fig.2 Effects of different pH on *Bacillus subtilis* JL-B16

2.3 枯草芽孢杆菌 JL-B16 生长曲线的测定 从图 3 可以看出,由枯草芽孢杆菌 JL-B16 不同时段内的 OD₆₀₀ 所反映出的生长曲线呈现出阶段性变化。第一阶段迟滞期:生长 16 h 内,OD₆₀₀ 呈现逐步增长的趋势,增长速度非常缓慢。第二阶段对数生长期:生长 16~32 h 内,OD₆₀₀ 呈现快速增长趋势,38 h 时 OD₆₀₀ 达到峰值。随后进入稳定期:生长 32~40 h 内 OD₆₀₀ 不再增加并出现降低趋势。综上所述,在测定时间内枯草芽孢杆菌 JL-B16 的生长阶段为第一阶段迟滞期(生长 16 h 内)细菌接种至培养基后,对新环境有一个短暂适应过程。第二阶段对数生长期(16~32 h)细菌几乎已完成营养生长,开始快速的繁殖增长,菌数显著增多,此时期活菌数直

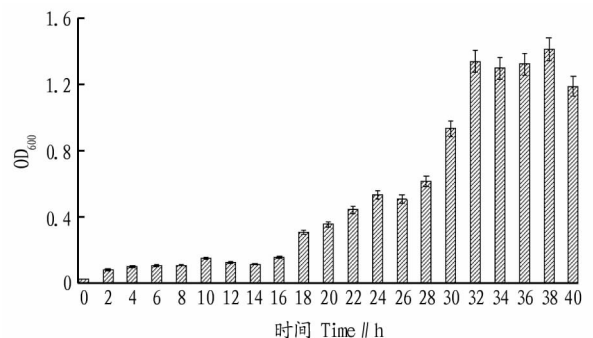


图 3 枯草芽孢杆菌 JL-B16 的生长曲线

Fig.3 Growth curve of *Bacillus subtilis* JL-B16

(4) 紫薇属植物蕴藏着治疗糖尿病和咳血等病症的潜力,今后应加大药用价值的研究。

参考文献

- [1] 许桂芳,吴铁明,吴哲,等.紫薇属植物研究进展[J].林业调查规划,2005,30(5):50-53.
- [2] 黄珂,吴铁明,许桂芳,等.紫薇繁殖技术研究进展[C]//湖南省园艺学会.园艺学文集——湖南省园艺学会第八次会员代表大会暨学术年会论文集.长沙:湖南科学技术出版社,2005:4.
- [3] 李振芳,马林江,黄国伟,等.紫薇新品种‘绚紫’[J/OL].园艺学报,2020-06-10[2020-07-15].https://doi.org/10.16420/j.issn.0513-353x.2020-0074.
- [4] 王金凤,柳新红,陈卓梅.紫薇属植物育种研究进展[J].园艺学报,2013,40(9):1795-1804.
- [5] 王献.我国紫薇种质资源及其亲缘关系的研究[D].北京:北京林业大学,2004.
- [6] 施修杰.紫薇种质资源的研究[D].北京:中国科学院植物研究所,1996.
- [7] 田苗.我国紫薇新品种 DUS 测试指南及已知品种数据库的研究[D].北京:北京林业大学,2008.
- [8] 顾翠花.中国紫薇属种质资源及紫薇-南紫薇核心种质构建[D].北京:北京林业大学,2008.
- [9] 张鸽香,宋桃.南京和常州地区紫薇品种资源分类研究[J].中国野生植物资源,2015,34(6):51-55,60.
- [10] 乔中全,王晓明,蔡能,等.紫薇新品种‘丹霞’[J].园艺学报,2019,46(10):2069-2070.
- [11] 杨如同,王鹏,王淑安,等.紫薇新品种‘紫金’[J].园艺学报,2019,46(2):401-402.
- [12] 李栋梁,吕德任,翁春雨,等.海南省紫薇种质资源调查分类与应用分析[J].安徽农业科学,2020,48(9):137-140.
- [13] 汤行昊,范辉华,李乾振,等.紫薇嫩枝扦插技术研究[J].河北林业科技,2016(4):30-33.
- [14] 王莹,李玉娟,李敏,等.不同生根剂对美国紫叶紫薇扦插的影响[J].浙江农业科学,2017,58(4):705-708.
- [15] 孙宜,孙猛,石青松.紫薇新品种扦插繁殖试验[J].浙江农业科学,2019,60(10):1729-1731.

(上接第6页)

线上升。第三阶段稳定期(32~40 h)生长菌群总数处于平坦阶段,但细菌群体活力变化较大。从测定时间来看,培养40 h 时内生细菌基本上处于稳定期的阶段,尚未进入衰退阶段。

2.4 枯草芽孢杆菌 JL-B16 生理生化的测定 对枯草芽孢杆菌菌株 JL-B16 生理生化特征的鉴定结果见表 1。

表 1 枯草芽孢杆菌菌株 JL-B16 的生理生化特征

Table 1 Physiological and biochemical characters of *Bacillus subtilis* JL-B16

序号 No.	项目 Item	结果 Result
1	接触酶	-
2	V-P 测定	+
3	甲基红测定	-
4	利用葡萄糖产酸	-
5	利用葡萄糖产气	-
6	利用柠檬酸盐	-
7	硝酸盐还原	+
8	淀粉水解	+
9	需氧性测定	+
10	吲哚试验	-
11	丙二酸	-
12	产 H ₂ S 试验	+

注: + 表示反应呈阳性或者可以生长、利用; - 表示反应呈阴性或者不可以生长、利用

Note: + indicated that the reaction is positive or can be grown and utilized; - indicated negative reaction or can not be grown or utilized

3 结论与讨论

研究了枯草芽孢杆菌 JL-B16 的生物学特性,测定结果表明枯草芽孢杆菌 JL-B16 菌落颜色为黄色,菌落边缘不平

- [16] 胡国华.赤霉素对紫薇种子萌发和幼苗生长影响的研究[J].安徽林业科技,2019,45(4):24-27,43.
- [17] 宋平.紫薇再生体系的建立及多倍体诱导研究[D].北京:北京林业大学,2009.
- [18] 蒙真诚,罗冠勇,宋希强,等.毛萼紫薇种子的储存及萌发特性[J].热带生物学报,2014,5(4):348-351.
- [19] 彭梦婕,刘丹,牛贺雨,等.⁶⁰Co- γ 辐射对紫薇种子萌发、幼苗生长和生理的影响[J].安徽农业大学学报,2020,47(4):530-537.
- [20] 曹受金,刘辉华,田英翠.紫薇的组织培养与快速繁殖[J].北方园艺,2010(8):149-151.
- [21] 陈怡佳,崔媛媛,张晓明,等.美国红叶紫薇的组织培养与快速繁殖[J].植物生理学报,2015,51(6):882-886.
- [22] 杨彦伶,杨柳,张亚东.紫薇组织培养技术[J].林业科技开发,2005,19(2):50-52.
- [23] 王珂.四种紫薇属植物快繁与再生体系的建立[D].北京:北京林业大学,2015.
- [24] 王献,柴永生,职永普.紫薇叶片 DNA 的提取及 AFLP 反应体系的建立[J].河南农业大学学报,2004,38(2):189-192,230.
- [25] 张启翔.紫薇品种分类及其在园林中的应用(英文)[J].北京林业大学学报,1991,13(4):57-66.
- [26] 张亚东,杨彦伶.湖北保康不同花色野生紫薇的 RAPD 分析[J].分子植物育种,2004,2(5):683-688.
- [27] 乔中全,王晓明,李永欣,等.38 个紫薇品种亲缘关系的 ISSR 分析[J].浙江农业学报,2019,31(4):565-571.
- [28] 秦蓉,宓文佳,苏洁,等.基于转录组的紫薇 SSR 分子标记开发[C]//张启翔.中国观赏园艺研究进展 2018.北京:中国林业出版社,2018.
- [29] QIAO Z Q, LIU S S, ZENG H J, et al. Exploring the molecular mechanism underlying the stable purple-red leaf phenotype in *Lagerstroemia indica* cv. eburny embers[J]. International journal of molecular sciences, 2019, 20(22):1-16.
- [30] 王燕,詹勤,席志新,等.紫薇属植物的化学成分和药理作用研究进展[J].药学实践杂志,2010,28(2):88-93.
- [31] 陈蓉,宓文佳,苏洁,等.大花紫薇提取物对 STZ 致 II 型糖尿病小鼠的降糖作用研究[J].浙江中医药大学学报,2014,38(5):517-520,530.
- [32] 王燕,孙连娜,楼永明.大花紫薇化学成分与药理作用研究进展[J].福建分析测试,2014,23(5):20-24.

整,菌体呈杆状。对菌体进行革兰氏染色、芽孢染色、荚膜染色,结果显示枯草芽孢杆菌 JL-B16 为革兰氏阳性菌,有芽孢,无荚膜。采用温度梯度和 pH 梯度法对枯草芽孢杆菌 JL-B16 进行最适培养条件及生理生化指标的测定,为后续系统研究枯草芽孢杆菌 JL-B16 提供了条件,并为枯草芽孢杆菌 JL-B16 的综合利用奠定了基础。

参考文献

- [1] CLAY K. Fungal endophytes of grasses; A defensive mutualism between plants and fungi[J]. Ecology, 1988, 69(1):10-16.
- [2] 张伟,贾倩,王丽,等.3 种沙生药用植物内生真菌的分离鉴定及其拮抗菌株筛选[J].农业科学研究,2012,33(3):35-40.
- [3] 朱艳蕾.银砂槐内生细菌分离、生理特性及促生抗逆作用研究[D].西安:陕西师范大学,2018:10-11.
- [4] 国辉,毛志泉,刘训理.植物与微生物互作的研究进展[J].中国农学通报,2011,27(9):28-33.
- [5] SHENG X F, XIA J, JIANG C Y, et al. Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape[J]. Environmental pollution, 2008, 156(3):1164-1170.
- [6] BERG G, HALLMANN J. Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophytes[M]//SCHULZ B J E, BOYLE C J C, SIEBER T N, et al. Microbial root endophytes. Berlin, Germany: Springer Verlag, 2006:53-69.
- [7] ULRICH K, ULRICH A, EWALD D. Diversity of endophytic bacterial communities in poplar grown under field conditions[J]. PEMS Microbiology Ecology, 2008, 63(2):169-180.
- [8] YUAN Z S, LIU F, ZHANG G F. Characteristics and biodiversity of endophytic phosphorus- and potassium-solubilizing bacteria in Moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J]. Acta biologica of hungarica, 2015, 66(4):449-459.
- [9] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001.
- [10] 方中达.植病研究方法[M].3版.北京:中国农业出版社,1998.