

解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 生物学特性及生理生化指标测定

袁宗胜^{1,2}, 刘芳³, 穆景利¹, 周丽丽¹, 黄贞胜⁴, 林静⁴, 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. 福建农林大学菌物研究中心, 福建福州 350002; 4. 福建大昌生物科技实业有限公司, 福建福州 350015)

摘要 [目的]研究解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 的生物学特性及生理生化指标。[方法]对解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 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, 获得解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 的培养特征和形态特征; 采用温度梯度和 pH 梯度法测定解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 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]解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 菌落颜色为白色, 菌落边缘不平整, 菌体呈杆状, 革兰氏阳性, 有芽孢, 无荚膜; 解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 最适培养温度为 25 ℃, 最佳生长 pH 为 7。[结论]对解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 进行生物学特性及生理生化指标的测定, 为后续系统研究解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 及生产复合微生物菌剂奠定基础。

关键词 解淀粉芽孢杆菌; 生物学特性; 最适培养条件; 生理生化指标

中图分类号 Q 93 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2020)14-0001-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.14.001

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Determination of the Biological Characteristics and Physiological & Biochemical Indexes of *Bacillus amyloliquefaciens* JL-B05

YUAN Zong-sheng^{1,2}, LIU Fang³, MU Jing-li¹ et al (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. Mycological Research Center, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002)

Abstract [Objective] To study the biological characteristics and physiological & biochemical indexes of *Bacillus amyloliquefaciens* JL-B05. [Method] The culture characteristics and morphology characteristics of *Bacillus amyloliquefaciens* JL-B05 were obtained by plate culture, Gram staining, spore staining and capsule staining, and the optimum culture conditions of *Bacillus amyloliquefaciens* JL-B05 were determined by temperature gradient and pH gradient method, the growth curves of *Bacillus amyloliquefaciens* JL-B05 were plotted within 40 hours, and their physiological & biochemical indexes were determined. [Result] The colony color of *Bacillus amyloliquefaciens* JL-B05 was white, the colony edge was uneven, the bacteria were rod-shaped, Gram-positive, there were spores and no capsule. The optimum culture temperature of *Bacillus amyloliquefaciens* JL-B05 was 25 ℃, the optimum growth pH was 7. [Conclusion] The biological characteristics and physiological & biochemical indexes of *Bacillus amyloliquefaciens* JL-B05 were determined, which laid the foundation for the subsequent systematic study of *Bacillus amyloliquefaciens* JL-B05 and the production of compound microbial agents.

Key words *Bacillus amyloliquefaciens*; Biological characteristics; Optimal culture conditions; Physiological & biochemical indexes

植物内生细菌指其生活史的一定阶段或全部阶段均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的细菌^[1]。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^[2-6], 如 *Microbacterium* 具有促进植物生长的作用^[7], *Bacillus* 具有良好的生防潜力^[8], *Sphingomonas* 对植物自我修复功能^[9]等。笔者选用从毛竹体内分离并筛选出的具有促生、拮抗功能的解淀粉芽孢杆菌 JL-B05^[10], 研究其生物学特性, 即最适生长温度、最适 pH、生长曲线及其生理生化指标, 为内生解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 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 解淀粉芽孢杆菌 JL-B05, 由福建农业大学菌物研究中心筛选出的具有较好促生、拮抗效果的内生细菌。

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 2020-02-05

1.2 培养基

1.2.1 NA 培养基。 内生菌培养采用 NA 培养基。牛肉膏 3.0 g, 蛋白胨 10.0 g, NaCl 5.0 g, 琼脂 18.0 g, 水 1 000 mL, pH 7.0~7.2 (液体培养基则不加琼脂)。

1.2.2 淀粉水解培养基。 蛋白胨 5.0 g, NaCl 5.0 g, 牛肉膏 3.0 g, 可溶性淀粉 2.0 g, 琼脂 15.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.2。

1.2.3 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。

1.2.4 葡萄糖发酵试验培养基。 牛肉膏 5.0 g, 蛋白胨 10.0 g, NaCl 3.0 g, K₂HPO₄ 2.0 g, 2.0% 溴麝香草酚蓝溶液 12.0 mL, 葡萄糖 5.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.4。

1.2.5 硝酸盐还原试验培养基。 蛋白胨 10.0 g, NaNO₃ 1.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.6。

1.2.6 柠檬酸盐试验培养基。 柠檬酸钠 5.0 g, NaCl 5.0 g, MgSO₄ 2.0 g, K₂HPO₄ 1.0 g, (NH₄)₂HPO₄ 1.0 g, 琼脂 20.0 g, 1% 溴百里酚兰液 8 mL, 蒸馏水 1 000 mL, pH 6.8。

1.2.7 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。

1.2.8 V-P 试验及甲基红培养基。 蛋白胨 5.0 g, 葡萄糖 5.0 g, 磷酸二氢钾 5.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.2。

1.2.9 硝酸盐还原试验培养基。蛋白胨 5.0 g, 酵母膏 3.0 g, 硝酸钾 1.0 g, 琼脂粉 7.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0~7.2;

1.2.10 吡啶试验培养基。胰蛋白胨 10.0 g, 酵母膏 5.0 g, 蒸馏水 1 000 mL。

1.2.11 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)。

1.3 主要试剂 HCl 溶液、NaOH 溶液、碘液、95% 乙醇、番红液、草酸结晶紫、5% 孔雀绿染色液、1% 醋酸结晶紫、20% CuSO₄ 水溶液。所用试剂均为国产分析纯。

1.4 解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 生物学特性研究

1.4.1 解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 的培养特征和形态特征。取供试解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 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照东秀珠等^[11]、方中达^[12]。

1.4.2 温度对解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 生长的影响。在洁净试管中加入 10 mL NB 液体培养基, 灭菌冷却后将解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 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 ℃ 6 个温度梯度下、180 r/min 振荡培养 24 h, 以不接种解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 的 NB 液体培养基作为对照, 每个处理 3 个重复, 测定 OD₆₀₀ 值, 以确定其生长的最适温度。

1.4.3 pH 对解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 生长的影响。在洁净试管中加入 10 mL NB 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、4、5、6、7、8、9、10, 并且每个处理 3 个重复, 接种解淀粉芽孢杆菌 JL-B05, 30 ℃ 下 180 r/min, 振荡培养 24 h, 测定 OD₆₀₀, 以确定其生长的最适 pH。

1.4.4 培养时间对解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 生长的影响。在洁净试管中加入 10 mL NB 液体培养基, 灭菌冷却后, 按 1% 的接种量接种解淀粉芽孢杆菌 JL-B05, 30 ℃ 下 180 r/min, 振荡培养。以开始放摇床振荡培养进行第一次取样, 测量其 OD₆₀₀ 值。以后按每 2 h 定时取样, 测定菌液的 OD₆₀₀ 值。

1.5 解淀粉芽孢杆菌 JL-B16 生理生化指标的测定 解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 生理生化指标测定的项目主要有接触酶、氧化酶、厌氧生长、V-P、明胶液化、甲基红、柠檬酸盐、硝酸盐还原、7% NaCl 生长、淀粉水解等。测定方法参照东秀珠等^[11]。

2 结果与分析

2.1 解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 生物学特性分析

2.1.1 解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 培养特征和形态特征。取供试解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 接种于 NA 平板培养基上, 28 ℃ 培养 3 d, 观察菌落颜色为白色, 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, 结果显示解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 为革兰氏染色阳性, 有芽孢, 无荚膜。

2.1.2 温度对解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 生长的影响。从图 1 可以看出, 解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 随着培养温度的逐步升

高 OD₆₀₀ 值也逐步升高, 培养温度达 25 ℃ 时 OD₆₀₀ 值最大。在 25~30 ℃ 时, 随着培养温度的增加 OD₆₀₀ 值呈下降趋势, 在 35~40 ℃ 时 OD₆₀₀ 值呈稳定并逐步下降的趋势。由此可见, 解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 的最适生长温度为 25 ℃。

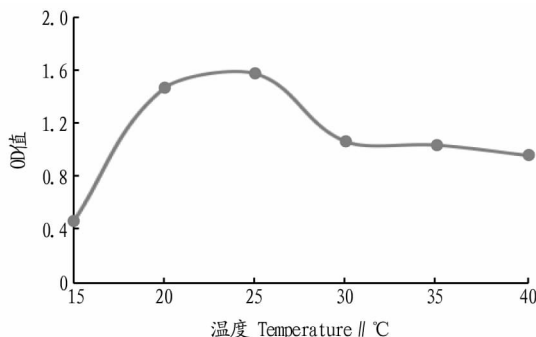


图 1 不同温度对解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 的影响

Fig.1 Effects of different temperatures on *Bacillus amyloliquefaciens* JL-B05

2.1.3 pH 对解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 生长的影响。从图 2 可以看出, 随着 pH 的升高, 解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 菌液的 OD₆₀₀ 值逐步升高, 待 pH 为 7 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。

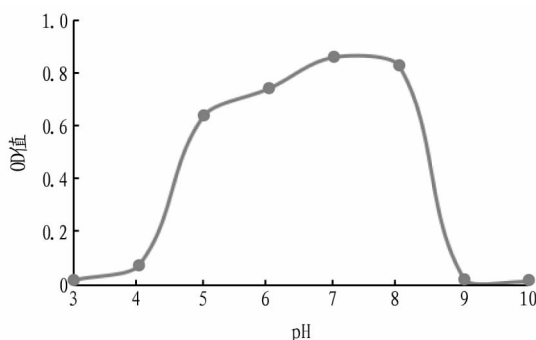


图 2 不同 pH 对解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 的影响

Fig.2 Effects of different pH on *Bacillus amyloliquefaciens* JL-B05

2.1.4 培养时间对解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 生长的影响。从图 3 可以看出, 由解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 不同时段内的 OD₆₀₀ 值所反映出的生长曲线呈现出阶段性变化: ①迟滞期, 生长 16 h 内, OD₆₀₀ 值呈现逐步增长的趋势, 增长速度非常缓慢; ②对数生长期, 生长 16~36 h, OD₆₀₀ 值呈现快速增长趋势, 36 h 时 OD₆₀₀ 值达到峰值; ③稳定期, 生长 36~40 h, OD₆₀₀ 值不再增加并出现降低现象。综上所述, 在测定时间内解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 的生长阶段: ①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; 此期曲线平坦稳定, 因为细菌繁殖极少。同时细菌从周围环境中吸收营养完成自身营养生长, 为繁殖增长做准备。②对数期(16~36 h), 细菌几乎均已完成营养生长, 开始快速地繁殖增长, 菌数显著增多; 此时期活菌数直线上升, 细菌以稳定的几何级数极快增长; 此期细菌形态、染色、生物活性都很典型, 对外界环境因素的作用敏感, 因此研究细菌性状以此期细菌最好。③稳定期(36~40 h 及以后), 该期的生长菌群总数处

于平坦阶段,但细菌群体活力变化较大;由于培养基中营养物质消耗、毒性产物积累、pH 下降等不利因素的影响,细菌繁殖速度渐趋下降,相对细菌死亡数开始逐渐增加,此期细菌增殖数与死亡数渐趋平衡;细菌形态、染色、生物活性可出现改变,并产生相应的代谢产物等。从测定时间来看,培养 40 h 时内生细菌基本上是处于稳定期的阶段,尚未达到衰退阶段。

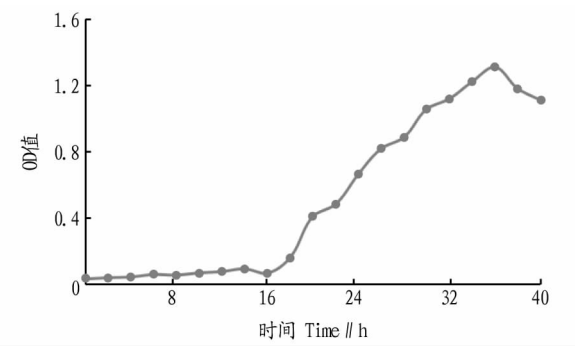


图 3 解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 的生长曲线

Fig.3 Growth curve of *Bacillus amyloliquefaciens* JL-B05

2.2 解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 生理生化指标的测定 对解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 的生理生化特征进行鉴定,结果发现,在各项指标测定中,接触酶反应呈阳性,V-P 测定呈阳性,甲基红测定呈阴性,葡萄糖产酸试验阴性,葡萄糖产气试验阴性,柠檬酸盐试验阴性,硝酸盐还原反应呈阳性,淀粉水解呈阴性,需氧性测定呈阳性,吡嗪试验呈阴性,丙二酸呈阴性,产 H₂S 试验呈阳性。

3 结论与讨论

该试验研究了解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 的生物学特性,并进行了生理生化指标的测定。解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 培养特征和形态特征测定结果显示,解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 菌落颜色为白色,菌落边缘不平整,菌体呈杆状。对菌体进

行革兰氏染色、芽孢染色、荚膜染色,结果显示解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 为革兰氏染色阳性,有芽孢,无荚膜。

采用温度梯度和 pH 梯度法对解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 进行最适温度和最适 pH 的测定,绘制其 40 h 内的生长曲线,并对生理生化指标的测定,为后续系统研究解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 提供了条件,也为下一步深度探讨解淀粉芽孢杆菌 JL-B05 发酵条件、发酵液干燥方式、与其他菌种复配并生产复合微生物菌剂奠定基础。

参考文献

[1] 胡桂萍,郑雪芳,尤民生,等.植物内生菌的研究进展[J].福建农业学报,2010,25(2):226-234.

[2] 徐亚军.植物内生菌资源多样性研究进展[J].广东农业科学,2011(24):149-152.

[3] 国辉,毛志泉,刘训理.植物与微生物互作研究进展[J].中国农学通报,2011,27(9):28-33.

[4] 卢镇岳,杨新芳,冯永君.植物内生细菌的分离、分类、定殖与应用[J].生命科学,2006,18(1):90-94.

[5] RYAN R P, GERRMAINE K, FRANKS A, et al. Bacterial endophytes: Recent developments and applications [J]. FEMS Microbiol Lett, 2008, 278 (1): 1-9.

[6] MELNICK R L, ZIDACK N K, BAILEY B A, et al. Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. from annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao [J]. Biol Cont, 2008, 46(1):46-56.

[7] SHENG X F, XIA J 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.

[8] 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.

[9] ULRICH K, ULRICH A, EWALD D. Diversity of endophytic bacterial communities in poplar grown under field conditions [J]. PEMS Microbiol Ecol, 2008, 63(2):169-180.

[10] 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 hungaria, 2015, 66(4):449-459.

[11] 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.

[12] 方中达. 植病研究方法 [M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998.