



产胞外多糖菌株的分离鉴定及其功能研究

茹素龙¹, 赵永龙^{2,3}, 王紫薇⁴, 曹晶晶^{2,3}, 汪志琴^{2,3}, 赵盼^{2,3,5}, 仲乃琴^{2,3,5*}

- 1 宁夏大学农学院, 宁夏 银川 750021
- 2 中国科学院微生物研究所, 北京 100101
- 3 中国科学院农业微生物先进技术工程实验室, 北京 100101
- 4 山西农业大学植物保护学院, 山西 晋中 030600
- 5 内蒙古自治区产业融合发展企业重点实验室, 内蒙古 呼伦贝尔 021000

茹素龙, 赵永龙, 王紫薇, 曹晶晶, 汪志琴, 赵盼, 仲乃琴. 产胞外多糖菌株的分离鉴定及其功能研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(11): 4315-4329.

RU Sulong, ZHAO Yonglong, WANG Ziwei, CAO Jingjing, WANG Zhiqin, ZHAO Pan, ZHONG Naiqin. Isolation, identification, and functional characterization of exopolysaccharide-producing strains[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(11): 4315-4329.

摘要: 微生物产生的胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)可促进大粒径土壤团聚体形成, 高产 EPS 的菌株在土壤改良、促进作物生长方面具有较好的应用前景。【目的】从土壤样品中筛选高产胞外多糖的细菌, 研究其在土壤改良、环境适应性、广谱抗病等方面的功能, 为制备土壤改良型功能菌剂提供候选菌株。【方法】采用蒽酮硫酸法测定菌株胞外多糖的产量, 通过形态学观察、生理生化试验及 16S rRNA 基因序列测定确定其分类地位, 结合土壤培养试验研究菌株对土壤团聚体形成的影响。【结果】获得 3 株胞外多糖产量大于 500 mg/L 的细菌, 经鉴定 A-5 为地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*), XJ-3 为萎缩芽孢杆菌(*Bacillus atrophaeus*), KW3-10 为耐盐芽孢杆菌(*Bacillus halotolerans*)。菌株 A-5、XJ-3、KW3-10 处理后, 土壤大团聚体(>0.25 mm)含量较对照分别提高了 4.07、2.14 和 3.16 倍。3 株菌株对疮痂链霉菌(*Streptomyces scabies*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、茄链格孢菌(*Alternaria solani*)和立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)等多种植物病原菌具有明显的抑制效果, 可耐受 pH 为 5–9 和 NaCl 含量 1%–9% 的盐碱环境, 促进植物生长, 其中 KW3-10 的代谢产物中 IAA 含量为 25.58 mg/L。【结论】菌株 A-5、XJ-3、KW3-10 可显著促

资助项目: 中国科学院战略性先导科技专项(XDA13020601, XDA28030202); 广东省重点领域研发计划(2020B0202010005); 内蒙古自治区关键技术攻关计划(2021GG0300)

This work was supported by the Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (XDA13020601, XDA28030202), the Guangdong Province Key Field Research and Development Program Project (2020B0202010005), and the Inner Mongolia Autonomous Region Key Technology Tackling Plan Project (2021GG0300).

*Corresponding author. E-mail: nqzhong@im.ac.cn

Received: 2023-03-24; Accepted: 2023-05-23; Published online: 2023-06-02

进土壤团粒结构形成, 具有较好的广谱抗病性和促生长特性, 可作为高效复合功能菌剂的候选菌株。

关键词: 胞外多糖; 土壤团聚体; 芽孢杆菌; 土壤改良

Isolation, identification, and functional characterization of exopolysaccharide-producing strains

RU Sulong¹, ZHAO Yonglong^{2,3}, WANG Ziwei⁴, CAO Jingjing^{2,3}, WANG Zhiqin^{2,3}, ZHAO Pan^{2,3,5}, ZHONG Naiqin^{2,3,5*}

1 School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, Ningxia, China

2 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

3 Engineering Laboratory for Advanced Technology of Agricultural Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

4 College of Plant Protection, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030600, Shanxi, China

5 The Enterprise Key Laboratory of Potato Industry Integration Development, Hulunbuir 021000, Inner Mongolia, China

Abstract: Exopolysaccharides (EPS) produced by microorganisms can promote the formation of large soil aggregates. EPS-producing strains have good application prospects in improving soil and promoting crop growth. **[Objective]** We isolated the bacteria with high yields of exopolysaccharides from soil samples and studied their soil-improving function, environmental adaptability, and broad-spectrum disease resistance, aiming to provide candidate strains for the preparation of soil-improving microbial agents. **[Methods]** The yield of EPS was determined by anthrone-sulfuric acid method. The taxonomic status of the strain was determined by morphological observation, physiological and biochemical tests, and 16S rRNA gene sequencing. Soil culture experiments were carried out to evaluate the effect of the strain on the formation of soil aggregates. **[Results]** Three strains of bacteria with EPS yields greater than 500 mg/L were obtained. A-5 was identified as *Bacillus licheniformis*, XJ-3 as *B. atrophaeus*, and KW3-10 as *B. halotolerans*. After treatment with these strains, the content of soil macroaggregates (>0.25 mm) increased by 4.07, 2.14, and 3.16 times, respectively. The three strains exerted significant inhibitory effects on plant pathogens such as *Streptomyces scabies*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani*, and *Rhizoctonia solani*. They could tolerate the saline-alkali environment with pH 5–9 and NaCl content of 1%–9% and promoted plant growth. The content of indole acetic acid in the metabolites of KW3-10 was 25.58 mg/L. **[Conclusion]** Strains A-5, XJ-3, and KW3-10 can significantly promote the formation of soil aggregates and demonstrate broad-spectrum disease resistance and remarkable growth-promoting performance, serving as candidates for the preparation of efficient compound microbial agents.

Keywords: exopolysaccharides; soil aggregate; *Bacillus*; soil improvement

土壤团聚体是土壤结构的基本单元, 其数量和粒径分布决定土壤的肥沃程度, 稳定性决

定土壤承受被破坏的能力^[1]。多糖是土壤有机质的组成成分之一, 占总有机质的 5%–30%,

可通过游离羟基的离子键和氢键与土壤颗粒结合, 形成稳定的团聚体^[2]。胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)是一些微生物生长代谢过程中分泌到细胞壁外的水溶性多糖, 对土壤大团聚体(>0.25 mm)的形成及植物生长发育具有显著的促进作用^[3]。Chenu等^[4]和Vadakattu等^[5]的研究发现, EPS可促进边际土壤颗粒的聚集, 形成有效团聚体, 从而提高土壤结构的稳定性和持水能力。EPS不仅能提高植物根部土壤团聚体的稳定性, 还能增加土壤孔隙度, 改善透气性, 利于植物根系生长和营养吸收, 从而提高土壤养分的利用效率^[6-8], 并可将有碳封闭在团聚体中, 增强其迟效性^[9]。邓照亮^[10]的研究结果表明, 抑病型土壤的水稳定性大团聚体含量明显高于导病型土壤, 砖红壤和砂壤的抑病型土壤中粒径大于2 mm的团聚体是导病型土壤的1.87倍和2.38倍; 康贻军等^[11]用2种产胞外多糖的细菌浸种, 有效提高了土壤水稳性团聚体(>0.25 mm)比例, 促进番茄幼苗生长, 降低青枯病危害程度。可见, 产胞外多糖细菌对于改良土壤结构, 调节土壤生态、促进作物增产具有重要作用。但是目前应用于土壤改良的菌种资源十分有限, 加之EPS的形成对环境温度、土壤pH和盐度的变化十分敏感^[12-13], 迫切需要筛选胞外多糖产量高、兼具抗病、耐盐碱, 且环境稳定性强的菌株, 为复合功能菌剂的研发和产业化应用提供候选菌种资源。

本研究从土壤样品中定向分离和筛选高产EPS的细菌, 明确其分类地位, 研究菌株对土壤水稳定性大粒径团聚体形成的促进作用, 探究其环境适应性和对土壤的改良作用, 测定其对致病性链霉菌 *Streptomyces scabies* 等多种病原菌的广谱拮抗效果, 以期获得具有推广应用前景的功能菌株。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 病原菌样品

疮痂链霉菌(*Streptomyces scabies*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)和立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)购自中国科学院微生物研究所菌种保藏管理中心, 馆藏编号分别为CGMCC4.1765、CGMCC3.18025和CGMCC3.2888; 盆栽基质采用 1×10^5 Pa灭菌30 min的营养土和蛭石。

1.1.2 供试土壤样品

土壤培养试验供试土样采自黑龙江省三江平原北大荒集团友谊农场(46°13'N-46°47'N, 131°21'E-131°21'E), pH值8.16, 总磷0.77 g/kg, 全氮0.761 g/kg, 全钾2.17%, 有机质29.7 g/kg。

1.1.3 主要培养基与试剂

LB培养基(g/L): 蛋白胨10, 酵母提取物5, NaCl 10, 用去离子水定容至1 L, pH值调整至7.0-7.2, 121 °C灭菌20 min。

含氮培养基(g/L): 蔗糖10, (NH₄)₂SO₄ 1, MgSO₄·7H₂O 0.5, NaCl 0.1, K₂HPO₄ 2, 酵母提取物0.5, 用去离子水定容至1 L, 调pH值为7, 固体培养基添加20琼脂, 113 °C灭菌30 min。

PDA固体培养基(g/L): 马铃薯块茎200 g切碎, 沸水煮20 min, 用纱布过滤除渣, 加入葡萄糖20, 琼脂15, 用去离子水定容至1 L, 调pH值至7.0-7.2, 113 °C灭菌20 min。

King氏培养基(g/L): 蛋白胨20, K₂HPO₄ 1.725, 丙三醇15 mL, MgSO₄·7H₂O 1.5, 色氨酸0.1, 用去离子水定容至1 L, 调pH值至7.2, 121 °C灭菌20 min。

比色液: 将20 mL 0.025 mol/L的FeCl₃缓缓加入30 mL浓硫酸中, 搅拌均匀。

B5营养液(g/L): KNO₃ 2.5, MgSO₄·7H₂O 0.25, NaH₂PO₄·H₂O 0.15, CaCl₂·2H₂O 0.15,

(NH₄)₂SO₄ 0.135, FeSO₄·7H₂O 0.028, EDTA·Na₂ 0.037, MnSO₄·4H₂O 0.004, ZnSO₄·7H₂O 0.000 8, 去离子水定容至 1 L。

PKO 培养基(g/L): 葡萄糖 10, (NH₄)₂SO₄ 0.5, NaCl 0.3, KCl 0.3, MgSO₄·7H₂O 0.1, MgSO₄·H₂O 0.03, FeSO₄ 0.03, Ca₃(PO₄)₂ 5, 酵母提取物 0.5, 琼脂 20, 用去离子水定容至 1 L, 调 pH 值至 7.0, 113 °C 灭菌 20 min。

蒽酮溶液(g/mL): 称取 0.2 g 蒽酮, 定容至 100 mL 浓硫酸中, 临用前配制。

1.1.4 供试作物

由本实验室培育 30 d 的马铃薯脱毒试管苗(品种: 夏波蒂)。

1.2 目标菌株的分离

采集上海松江区、广西环江县严重板结的农田土壤样品, 和宁夏西吉县板结土壤中马铃薯病薯表面土壤样品, 取 1 g 置于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 无菌水充分震荡。吸取 100 μL 上述悬浮液均匀涂布于 LB 固体培养基上, 28 °C 培养 24 h; 挑选细菌单菌落进行划线纯化, 并将所得菌株接种于液体 LB 培养基中, 37 °C 振荡培养备用。

1.3 产 EPS 菌的初筛

将分离所得的菌株涂布于固体有氮培养基中, 37 °C 培养 48 h。用灭菌牙签挑取菌落, 挑选黏度较大的菌株。

1.4 多糖含量的测定

将初筛获得的菌株分别于 37 °C 振荡(200 r/min)培养 48 h, 采用乙醇沉淀法提取发酵液粗多糖, 并采用硫酸-蒽酮法测定多糖含量。

葡萄糖标准曲线制作: 分别吸取 50 μg/mL 的葡萄糖溶液 0、0.5、1.0、1.5、2.0 和 2.5 mL 于 25 mL 比色管中, 加去离子水至 2.5 mL, 分别加入 5 mL 的蒽酮溶液, 置于沸水浴中保温 10 min。采用分光光度计测定 OD₆₂₀ 值。以葡萄

糖浓度为横坐标, OD 值为纵坐标绘制葡萄糖标准曲线。

样品多糖含量的测定: 待测菌株培养液 8 000 r/min 离心 10 min, 用 Sevag 法^[14]提取 EPS, 分别取 EPS 溶液 0.1 mL 于比色管中, 加入去离子水 2.4 mL, 混匀, 采用硫酸-蒽酮法测定多糖含量。

1.5 菌株形态观察

将待测菌液均匀涂布于 LB 固体培养基上, 37 °C 培养 24 h 后镜检观察菌落形态, 分别采用日立冷场发射扫描电子显微镜 SU8010 和蔡司荧光倒置显微镜 Observer Z1 观察菌体形态。

1.6 菌株革兰氏染色

将待测菌液滴至载玻片上, 自然晾干后轻微烘烤, 用草酸铵结晶紫染色 1 min, 自来水冲洗 30 s, 加碘液于涂面约 1 min, 再次水洗, 用吸水纸吸干水分, 加 95%酒精数滴, 轻轻摇动进行脱色, 20 s 后水洗, 吸去水分, 番红染色液(稀)染 2 min, 自来水冲洗, 干燥后镜检。

1.7 菌株生理生化特性分析

采用 API 50 CHB G+芽胞杆菌鉴定试剂盒测定菌株理化性质, 依据 API 50CH 试验条说明书判读测试结果。

将待测菌种分别接种于 pH 值为 3.0、5.0、7.0、9.0 和 11.0, NaCl 浓度分别为 1%、3%、5%、7%、9%和 11%的液体 LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养 12 h 后测定其 OD₆₀₀ 值, 分析菌株耐盐碱特性^[15]。

1.8 分子系统学分析

采用 16S rRNA 基因片段通用引物(27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492R: 5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3')进行测序(北京博迈德生物工程股份有限公司), PCR 反应体系(20 μL): 2×T5 Super PCR Mix 10 μL, 菌株基因组 DNA (200 ng/μL) 2 μL, 正、反向引物

(10 μmol/L)各 1 μL, ddH₂O 6 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 2 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。测序结果在 National Center for Biotechnology Information (NCBI)上进行比对, 采用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树。

1.9 土壤培养试验

挖取 0–15 cm 土层土壤, 自然风干后, 碾碎过孔径为 0.25 mm 的筛。在容积为 1 300 mL 的组培瓶底部垫 150 g 石英砂(约 1 cm 厚), 称取 500 g 过筛土样装入组培瓶中, 用纱网将土壤与石英砂隔开, 121 °C 灭菌 45 min。将参试菌株接种于 500 mL LB 液体培养中培养 4–5 d, 至芽孢形成, 离心弃上清, 将菌体用无菌水洗涤 2 次, 分别取 10⁷ CFU/mL 菌体均匀接入土壤中, 加无菌水至土壤饱和含水量 60%, 室温培养箱 37 °C 培养 120 d, 样品送至青岛斯坦德衡立环境技术研究院有限公司测定不同粒径水稳性土壤团聚体含量。

试验设置 4 个处理, CK (过筛土样+无菌水)、处理 1 (过筛土样+A-5)、处理 2 (过筛土样+XJ-3)和处理 3 (过筛土样+ KW3-10), 每个处理重复 3 次。

1.10 菌株溶磷及促生长特性分析

菌株在 PKO 固体培养基上 28 °C 培养 7 d, 观察菌株溶磷效果。

吸取 100 μL 菌液接种于 King 氏液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 48 h, 离心收集上清液, 用 SalKowski 比色法定性检测菌液中的生长素(IAA), 参照李振东等^[16]的方法测算 IAA 浓度。

1.11 广谱抑菌效果测定

吸取 100 μL 疮痂链霉菌(*S. scabies*)孢子悬浮液均匀涂布于 PDA 固体培养基, 吸取上述细菌培养液 6 μL 滴于其上, 28 °C 培养 7 d 后测量抑菌圈直径。

在 PDA 培养基上接种大丽轮枝菌、立枯丝核菌和尖孢镰刀菌, 在其两侧间隔 1 cm 处分别接种 6 μL 目标菌株培养液, 并以单独接种病原菌的处理为对照, 28 °C 培养 4 d 观察抑菌效果。

1.12 马铃薯疮痂病盆栽防控效果验证

在高 10 cm、直径为 17 cm 的花盆中装满蛭石与营养土(蛭石:营养土=4:1), 将 2 L B5 营养液均匀浇入花盆, 移栽培养 30 d 的马铃薯夏波蒂脱毒组培苗, 每盆 3 株, 置于相同环境培养, 10 d 后每株幼苗根部接种 100 mL 1×10⁷ CFU/mL 的 *S. scabies* 孢子悬浮液, 间隔 15 d 后接种目标菌悬浮液(30 mL/盆, 1×10⁸ CFU/mL), 不接种任何菌株的处理为 CK1, 仅接种 *S. scabies* 的处理为 CK2。每个处理重复 3 次, 每周浇水 1 次, 每次浇 2 L。马铃薯收获以后, 依据疮痂病分级标准统计发病率、病情指数, 计算防治效果。

病害分级标准^[17]: 0 级为薯皮健康, 无病斑; 1 级为病斑面积占块茎总表面积的 0–1/6; 2 级为病斑面积占块茎总表面积的 1/6–1/3; 3 级为病斑面积占块茎总表面积的 1/3–1/2; 4 级为病斑面积占块茎总表面积的 1/2 以上。

发病率(%)=发病块茎数/总块茎数×100;

病情指数=Σ(各病级块茎数×该病级数代表值)/(调查个体总和×最高病级数)×100;

相对防效(%)=(对照组病情指数–处理组病情指数)/对照组病情指数×100。

参照 Wanner 等^[18]的方法, 以基质环境为模板, 依据 *S. scabies* 的关键致病基因 *TxtA* 序列设计引物, 正向引物: 5'-CACGTACGCGCAGTTCAATG-3'; 反向引物: 5'-AGATGATGTAGGCGGGA C-3'。采用 ABI 7500Real-Time PCR System 仪扩增土壤中 *TxtA* 的生物量, 试验重复 3 次。

1.13 数据处理

采用 Excel 和 Origin 2021b 软件处理相关数据, 运用 MEGA 7.0 软件构建菌株系统发育树。

2 结果与分析

2.1 高产 EPS 菌株筛选

分别从采自上海松江区、广西环江县、宁夏西吉县的严重板结土壤样品中,分离获得 3 株表面湿润、黏度较大、产胞外多糖高的细菌,编号分别为 A-5、XJ-3 和 KW3-10。采用硫酸-蒽酮法制作葡萄糖标准曲线,葡萄糖浓度和吸光度之间的线性方程为 $Y=0.0125X+0.0424$, $R^2=0.9983$,标准曲线满足分析测试要求。测定结果如图 1 所示,培养 72 h 时, A-5 培养液中 EPS 产量最高,达 1 439.23 mg/L, XJ-3 与 KW3-10 菌株 EPS 产量分别为 735.34 mg/L 和 838.77 mg/L。

2.2 菌株形态学观察

如图 2 所示,扫描电镜下观察发现,3 株菌

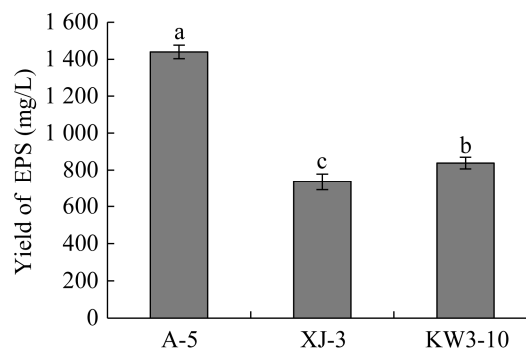


图 1 菌株胞外多糖(EPS)产量

Figure 1 EPS yield of strain. The presented values are the means of three determinations, with standard deviations indicated; Means with different letters are significantly different at $P<0.05$.

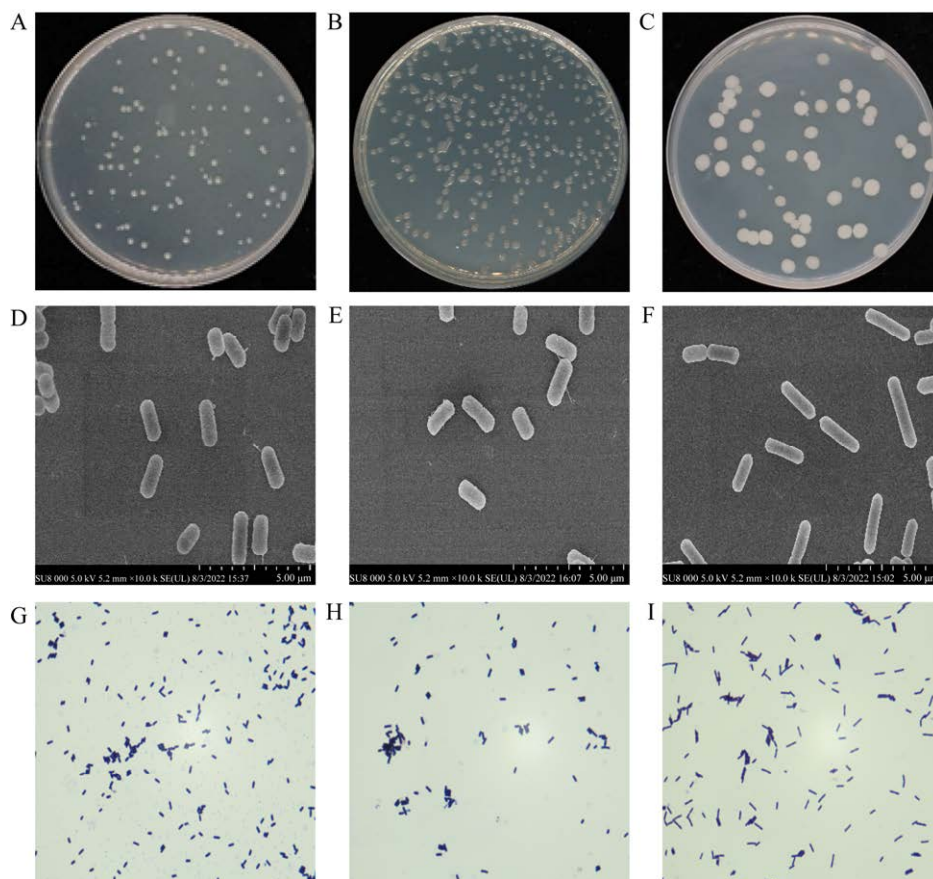


图 2 菌株 A-5、XJ-3 和 KW3-10 的形态特征

Figure 2 Morphological characteristics of A-5, XJ-3, and KW3-10. A: A-5 colonies. B: XJ-3 colonies. C: KW3-10 colonies. D: A-5 bacteria. E: XJ-3 bacteria. F: KW3-10 bacteria. G: A-5 Gram staining. H: XJ-3 Gram staining. I: KW3-10 Gram staining.

均为杆状细菌, 菌体两端钝圆, 边缘整齐, 表面湿润, 革兰氏染色呈阳性, 且周围有丝状分泌物。其中 A-5 菌落白色圆形, 半透明, 宽度 0.60–0.95 μm , 长度 1.5–2.4 μm ; XJ-3 菌落乳白色圆形, 半透明, 有荚膜, 宽度约为 0.55–1.00 μm , 长度为 1.6–2.4 μm ; 菌株 KW3-10 菌落乳白色圆形, 不透明, 宽度 0.50–0.95 μm , 长度 1.5–3.5 μm 。

2.3 菌株生理生化特性分析

由表 1 所示, 菌株 A-5、XJ-3 和 KW3-10 均可利用 D-核糖、D-葡萄糖、D-果糖、D-甘露

糖、山梨醇、D-蔗糖、D-纤维二糖、肌醇、水杨苷、D-麦芽糖、D-海藻糖、淀粉作为唯一碳源, 代谢产物可降解苦杏仁苷; 不能利用 D-阿拉伯糖、赤藻糖醇、L-木糖、D-核糖醇、L-山梨糖、卫矛醇、D-乳糖、D-松三糖、木糖醇、葡萄糖酸钾。API 50CH 鉴定结果显示, 3 株待测菌株均为芽胞杆菌, 其中 A-5 初步鉴定为地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*), 鉴定率为 99.5%; XJ-3 与 KW3-10 初步鉴定为枯草、解淀粉芽孢杆菌, 鉴定率分别为 77.4%和 89.9%。

表 1 菌株的生理生化特性

Table 1 Physiological and biochemical characters of strains

Test items	Results			Test items	Results		
	A-5	XJ-3	KW3-10		A-5	XJ-3	KW3-10
Negative control	–	–	–	Esculin ferric citrate	+	+	+
Glycerol	+	+	+	Salicin	+	+	+
Erythritol	–	–	–	Cellobiose	+	+	+
D-arabinose	–	–	–	D-maltose	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	D-lactose	–	–	–
D-ribose	+	+	+	D-disaccharide	–	–	+
D-xylose	+	–	+	D-sucrose	+	+	+
L-xylose	–	–	–	D-trehalose dihydrate	+	+	+
D-ribitol	–	–	–	Synanthrin	+	–	+
D-galactose	+	–	–	D-raffinose	+	–	+
D-glucose	+	+	+	Amylum	+	+	+
D-fructose	+	+	+	Glycogen	+	+	+
D-mannose	+	+	+	Xylitol	–	–	–
L-sorbose	–	–	–	D-gentiobiose	+	–	–
L-rhamnose	+	–	–	Melezitose	–	–	–
Dulcitol	–	–	–	D-lyxose	–	–	–
Inositol	+	+	+	D-tagatose	+	+	+
D-mannitol	+	+	+	D-fucose	–	–	–
Sorbitol	+	+	+	L-fucose	–	–	–
Methyl	–	–	–	D-arabinitol	–	–	–
Alpha-D-mannopyranoside				L-arabitol	–	–	–
Methyl-a-D-glucopyranoside	+	+	+	Potassium gluconate	–	–	–
N-acetyl glucosamine	–	–	–	2-keto-potassium gluconate	–	–	–
Nitrosides	+	+	+	5-keto-potassium gluconate	–	–	–
Hydroquinone	+	+	+				
O- β -D-glucopyranoside							

+: Positive; -: Negative.

2.4 基于 16S rRNA 基因分子生物学鉴定

将菌株 A-5、XJ-3 和 KW3-10 的 16S rRNA 序列在 NCBI 中进行比对,发现三者分别与地衣芽孢杆菌、萎缩芽孢杆菌 (*Bacillus atrophaeus*) 与耐盐芽孢杆菌 (*Bacillus halotolerans*) 的同源性达到 99.9% 以上,运用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树。结果如图 3 所示, A-5 与 *Bacillus paralicheniformis* QT391^T 在同一分支, XJ-3 与 *Bacillus atrophaeus* B-1^T 在同一分支, KW3-10 与 *Bacillus halotolerans* NOK83^T 在同一分支,结合形态学和生理生化特性分析结果,将 A-5、XJ-3 和 KW3-10 分别鉴定为地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)、萎缩芽孢杆菌 (*Bacillus atrophaeus*)、耐盐芽孢杆菌 (*Bacillus halotolerans*)。

2.5 土壤培养试验

菌株处理土壤样品 120 d 后,不同粒径的土壤团聚体分布如图 4A 所示,接种 A-5、XJ-3 和 KW3-10 的处理组,粒径大于 2 mm 的土壤团聚体比例分别较 CK 提高了 1.97%、0.53%、

1.60%, 差异均达到极显著水平 ($P < 0.01$); 粒径大于 0.25 mm 的土壤团聚体比例分别较 CK 提高了 4.07、2.14 和 3.16 倍,其中 XJ-3 和 KW3-10 处理达到显著水平 ($P < 0.05$); 粒径大于 0.053 mm 的土壤团聚体比例均较 CK 略有增加,其中 XJ-3 差异达到显著水平。与 CK 相比,各处理粒径小于 0.053 mm 的土壤团聚体比例均有所下降,其中 XJ-3 和 KW3-10 差异达到显著水平。结果表明,胞外多糖具有较好的胶结能力,可以将小团聚体聚集形成稳定的大团聚体。

土壤多糖含量测定结果如图 4B 所示。3 组处理的土壤多糖含量均有所增加,分别较 CK 提高 28.87%、21.09% 和 12.93%,其中菌株 A-5 处理的差异达显著水平, XJ-3 处理的差异达极显著水平。

各处理对土壤 pH 变化的影响如图 4C 所示。与 CK 相比,接种 A-5、XJ-3 和 KW3-10 的土壤 pH 值分别下降 0.49、0.84 和 0.85,差异均达到极显著水平。推测参试细菌能通过代谢产生有机酸,利用质子置换盐碱土壤中的阳离子,从而降低土壤的 pH。

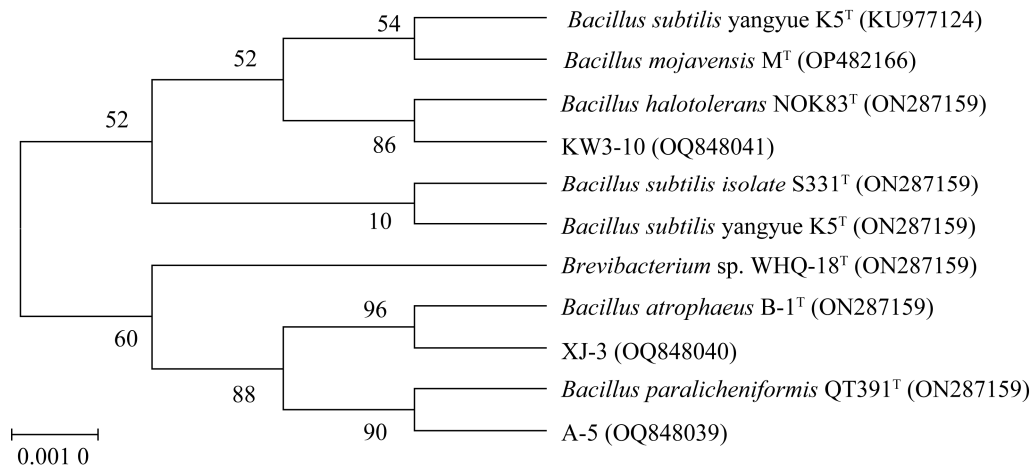


图 3 基于 16S rRNA 基因序列构建菌株的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree of strains constructed based on the 16S rRNA gene sequences. Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; The bootstrap values are shown at the node; The scale bar indicates 0.050 substitutions per nucleotide position.

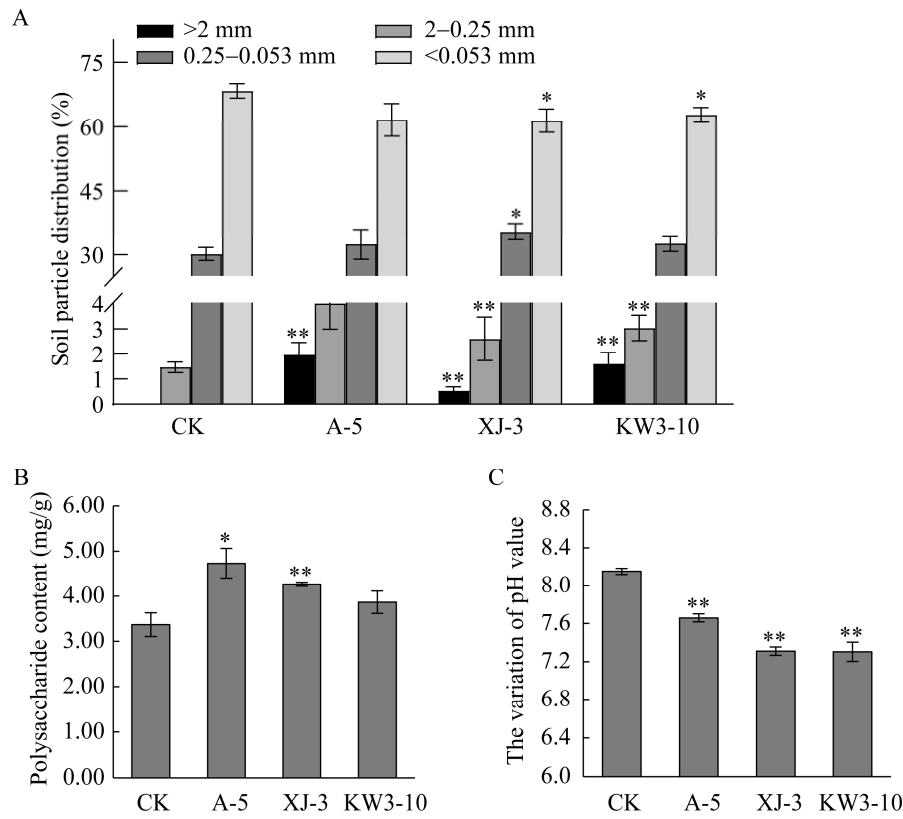


图 4 土壤培养试验结果

Figure 4 Soil culture test results. A: Effects of different strains on soil aggregates distribution in the soil culture experiment. B: The Effect of Strains on the content of soil polysaccharides. C: The effect of strains on soil pH. The presented values are the means of three determinations, with standard deviations indicated; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

2.6 菌株耐盐碱特性分析

为探究参试菌株对盐碱环境的适应性, 分别将其接种于 NaCl 含量 1%–11%、pH 值 1.0–13.0 的 LB 液体培养基中, 28 °C 培养 24 h 后观察发现(图 5), 3 株菌对极端盐碱环境均具有较强的耐受性, 其中菌株 A-5 和 KW3-10, 在 NaCl 浓度为 1%–3% 的条件下可正常生长, 在 NaCl 浓度为 7%–9% 的条件下可较好生长; XJ-3 和 KW3-10 最高可耐受 NaCl 浓度 11% 的高盐环境(培养 24 h 后, KW3-10 菌液的 OD_{600} 值可达 0.896)。在 pH 值 5.0–7.0 的环境中, 3 株菌均可正常生长, KW3-10 可耐受 pH 值

11.0 的极端高碱环境。

2.7 参试菌株产 IAA 能力与溶解磷能力比较

将 3 株目标菌在 King 氏液体培养基中培养 24 h, 将上清液与比色液进行混合, 3 株菌的混合液均呈显粉红色, 对照标准曲线 $Y = 8.8218X$, $R^2 = 0.9918$ 计算, 菌株 IAA 的产量(图 6A)分别为 2.68、8.09 和 25.58 mg/L。

在 KPO 培养基上培养发现, A-5 菌落周围形成明显的透明圈, 表明其具有较好的溶磷能力(图 6B); KW3-10 菌落周围虽没有形成透明圈, 但其生长繁殖明显好于 XJ-3。

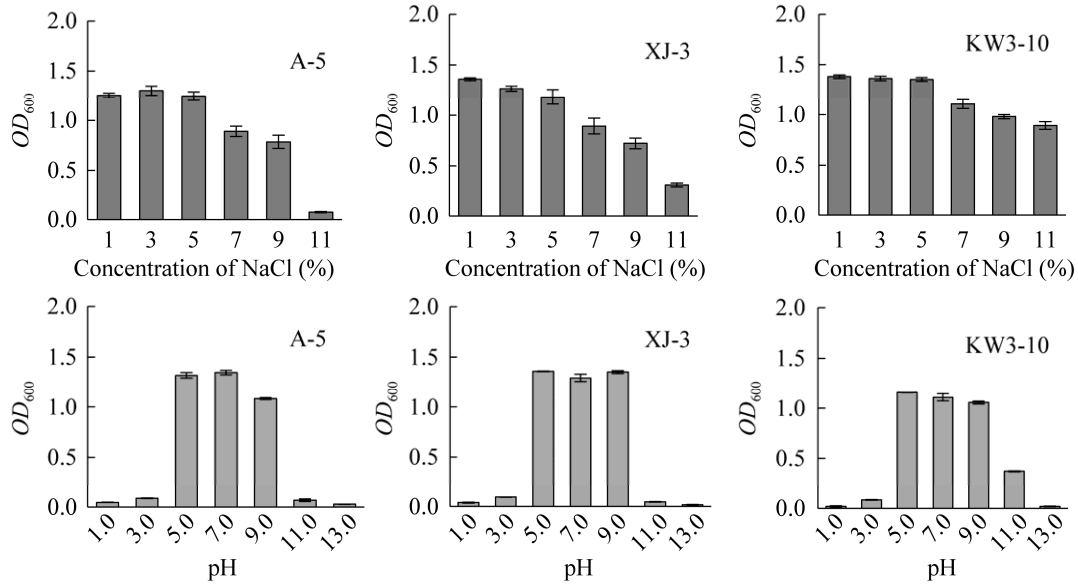


图5 菌株 A-5、XJ-3 和 KW3-10 的耐盐碱范围

Figure 5 Salt-alkali tolerance range of A-5, XJ-3 and KW3-10. The presented values are the means of three determinations, with standard deviations indicated.

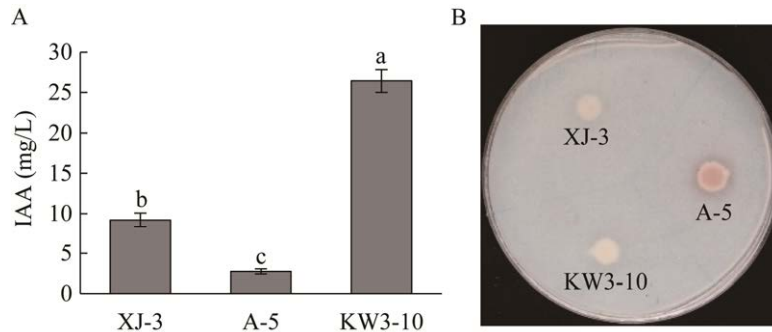


图6 菌株 A-5、XJ-3 和 KW3-10 代谢产物中生长素测定与溶解磷能力

Figure 6 Determination of auxin in metabolites of strains A-5, XJ-3, KW3-10 and their ability to phosphate solubilizing. A: Auxin assay in strain A-5, XJ-3, KW3-10 metabolites. B: Phosphate solubilizing ability of strains. The presented values are the means of three determinations, with standard deviations indicated; Means with different letters are significantly different at $P < 0.05$.

2.8 菌株促生长效果测定

菌体浇施马铃薯幼苗, 培养 60 d 后统计叶绿素的相对含量(soil and plant analyzer development, SPAD)、株高、茎径, 数据汇总如图 7 所示。3 菌株处理的植株长势均优于对照, 其中, A-5 处理后的 SPAD 值、株高、茎径较对照分别增加了 23.42%、21.35%和 20.73%, 差异均达到极显著水平; XJ-3 的株高与茎径较对照分别增加了 28.83%和 36.96%, 差异达到显著水平, SPAD 值

增加了 17.00%, 但差异不显著; KW3-10 处理的 SPAD 值、株高与茎径分别较对照增加了 29.15%、34.81%和 56.54%, 差异均达到显著水平。可见, 3 菌株均对植株具有良好的促生长效果(图 7A–7D)。

2.9 菌株广谱抗性分析

为了进一步挖掘被试菌株的广谱生防功能, 通过平板对峙试验测试了其对 4 种植物病原菌的拮抗效果。结果如图 8 所示, A-5、XJ-3 和

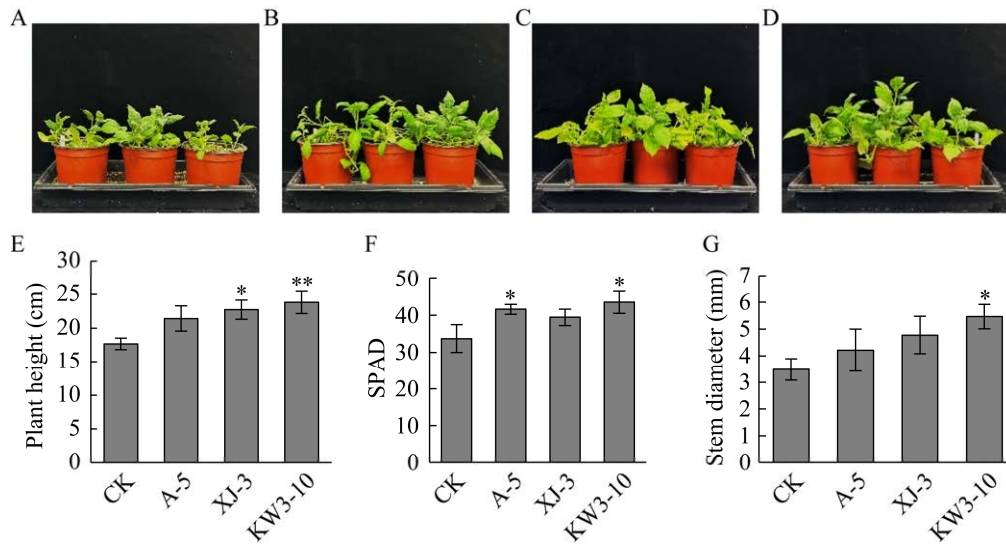


图 7 菌株 A-5、XJ-3 和 KW3-10 促生能力分析

Figure 7 Analysis of growth-promoting ability of strains. A: Water treatment. B–D: The order of pouring A-5, XJ-3, and KW3-10 bacterial liquid. E: Plant height after 60 d. F: SPAD after 60 d. G: Stem diameter after 60 d. The presented values are the means of three determinations, with standard deviations indicated; *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$.

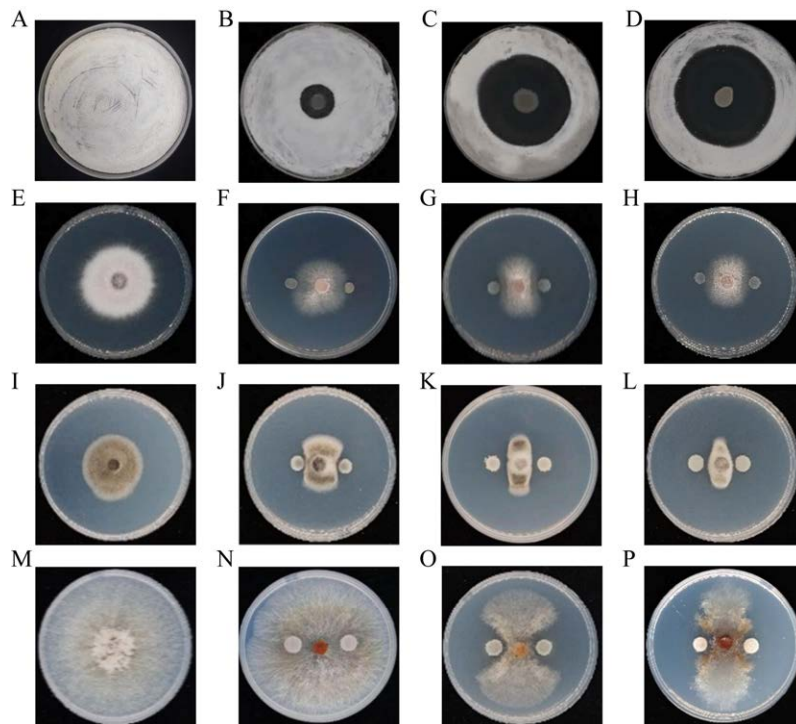


图 8 菌株 A-5、XJ-3 和 KW3-10 的广谱抗性

Figure 8 Broad-spectrum resistance of A-5, XJ-3 and KW3-10. A: Blank control of *Streptomyces scabiae*. B–D: A-5, XJ-3 and KW3-10 antagonize *Streptomyces scabiae*. E: Blank control of *Fusarium oxysporum*. F–H: A-5, XJ-3 and KW3-10 antagonize *Fusarium oxysporum*. I: Blank control of *Alternaria solani*. J–L: A-5, XJ-3 and KW3-10 antagonize *Alternaria solani*. M: Blank control of *Rhizoctonia solani*. N–P: A-5, XJ-3 and KW3-10 antagonize *Rhizoctonia solani*.

KW3-10 的 72 h 培养液对疮痂链霉菌(*S. scabies*) 的抑菌圈直径分别约为 20、49 和 56 mm; A-5 对尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、茄链格孢菌(*Alternaria solani*)和立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)均具有的抑菌率分别约为 50.97%、25.66% 和 2.44%, XJ-3 的抑菌率分别约为 37.65%、46.9% 和 63.41%, KW3-10 的抑菌率分别为 48.05%、64.91% 和 60.98%, 推测 3 株芽孢杆菌均具有较好的广谱抗性。

2.10 盆栽防病试验

为了验证平板试验结果的准确性, 本研究采

用高感马铃薯疮痂病品种夏波蒂作为参试植物, 通过盆栽试验, 人为分别接种致病链霉菌 *S. scabies*、致病链霉菌 *S. scabies*+产胞外多糖细菌, 结果如表 2 和图 9 所示, 水处理组(CK1)的微薯均未发病; 病原菌 *S. scabies* 处理组(CK2)发病率为 100%, 病情指数为 55.88; *S. scabies* 与 A-5 共处理组发病率为 50%, 病情指数 17.5, 相对防效达 68.68%; *S. scabies* 和 XJ-3 共处理组发病率为 55.56%, 病情指数为 20.83, 相对防效为 62.72%; *S. scabies* 和 KW3-10 共处理组发病率为 61.11%, 病情指数为 22.22, 相对防效达 60.24%。

表 2 马铃薯疮痂病情统计

Table 2 Statistics of potato scab

Treatment	Number of grains	Sickness					Occurrence rate (%)	Disease index	Relative control effects (%)
		0	1	2	3	4			
CK1	16	16	0	0	0	0	0	0	—
CK2	17	0	6	4	4	3	100.00	55.88	—
A-5	20	10	7	2	1	0	50.00	17.50	68.68
XJ-3	18	8	8	0	1	1	55.56	20.83	62.72
KW3-10	18	7	8	2	0	1	61.11	22.22	60.24

—: Indicates no numerical value.

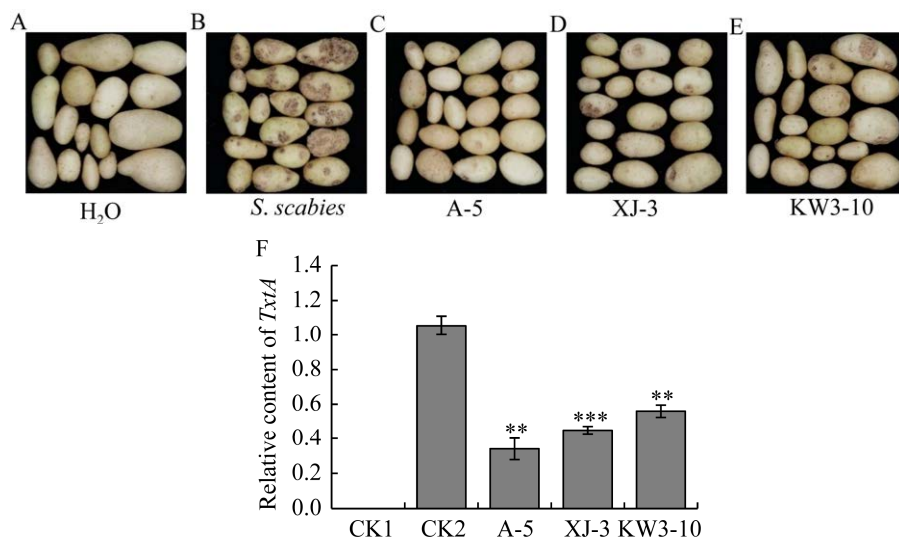


图 9 盆栽防病试验结果

Figure 9 Pot disease inhibition test results. A: Control. B: Pathogen treatment. C, D and E: Pathogen+target bacteria treatment. F: Detection of pathogenic gene *TxtA*. The presented values are the means of three determinations, with standard deviations indicated; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

TxtA 是致病性链霉菌 *S. scabies* 的主要致病基因, *TxtA* 在基质中的相对丰度反映了基质中疮痂链霉菌的数量。图 9F 所示, 菌株 A-5、XJ-3 和 KW3-10 处理组中致病菌的相对丰度显著低于 CK2, 与上述结果一致, 表明 3 个目标菌对 *S. scabies* 均有较好的抑制效果。

3 讨论与结论

一些产胞外多糖、生态适应性强、对环境友好的芽孢杆菌, 能通过竞争、拮抗和提高植物抗病性等方式抵御病原菌的入侵, 促进农作物增产, 具有潜在的产业化应用可能性^[19]。Vardharajula 等^[20]在土壤中接种高产 EPS 的解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) HYD-B17、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) HYTAPB18 及枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) RMPB44 后, 土壤中小团聚体的胶结性提高, 水稳定性大团聚体数量显著增多。张文平等^[21]通过优化蜡样芽孢杆菌 DT-10 的发酵条件, 获得较高产量的 EPS。枯草芽孢杆菌沙漠亚种 GBW HF-98 在盐碱胁迫下, 可以通过产胞外多糖改善土壤团粒结构, 调整土壤的盐碱性, 从而促进番茄生长^[22]。

近年来, 随着化肥农药的大量施用和养分的不平衡富集, 土壤生态环境持续恶化, 农作物土传病害加剧危害, 尤其由致病性链霉菌 (*Streptomyces scabies*) 引起的块根块茎类作物的疮痂病在世界范围普遍发生, 危害程度逐年加重^[23-26]。我国马铃薯疮痂病年发病面积超过 40 万 hm^2 , 平均病株率约 30%, 导致块茎商品性和耐储性大幅下降, 病原菌土传和种传, 难以防控, 已严重威胁到产业的可持续发展^[27]。微生物制剂具有对环境友好、促进作物生长、广谱抗病等多种功能, 越来越受到人们的重视, 可能

是未来实现马铃薯疮痂病等主要土传病害有效防控的重要途径。虽然有一些学者分离鉴定了疮痂链霉菌的拮抗菌, 并在盆栽或田间试验中取得了一定的防效, 但真正用于生产的菌株非常有限, 且防治效果并不理想。

2022 年农业部颁布的微生物肥料行业标准 GB/T 41728—2022 明确规定, 地衣芽孢杆菌对人畜和环境友好, 可免作毒理学试验, 直接添加在肥料中应用于农业生产。本研究从严重板结的土壤样品中分离获得的地衣芽孢杆菌 A-5, 培养液胞外多糖含量高达 1 439.23 mg/L , 在土壤中定殖力强, 处理后土壤多糖为 4.73 mg/g , 粒径 $>0.25 \text{ mm}$ 的团聚体数量比对照提高 4.07 倍, 不仅具有很好的耐盐碱特性和调节土壤 pH 的作用, 还具有较好的广谱抗病功能, 尤其对马铃薯疮痂病的盆栽防效达到 68.68%, 可作为土壤改良型抑病功能菌剂的候选菌株, 具有较好的应用前景。值得一提的是, A-5 虽然在平板对峙试验中抑菌圈直径最小 (20 mm), 但其解磷和产 EPS 能力显著优于其他 2 株菌, 盆栽试验对疮痂链霉菌的抑制效果最佳, 相对防效达 68.68%, 我们推测菌株对疮痂病抑制效果可能与其解磷或产胞外多糖性能相关, 其相关性和作用机理有待进一步研究和验证。

参考文献

- [1] AZIZI A, GILANDEH YA, MESRI-GUNDOSMIAN T, SALEH-BIGDELI AA, MOGHADDAM HA. Classification of soil aggregates: a novel approach based on deep learning[J]. Soil and Tillage Research, 2020, 199: 104586.
- [2] 刘艳, 马茂华, 吴胜军, 冉义国, 王小晓, 黄平. 干湿交替下土壤团聚体稳定性研究进展与展望[J]. 土壤, 2018, 50(5): 853-865.
LIU Y, MA MH, WU SJ, RAN YG, WANG XX, HUANG P. Soil aggregates as affected by

- wetting-drying cycle: a review[J]. *Soils*, 2018, 50(5): 853-865 (in Chinese).
- [3] CHANTIGNY MH, ANGERS DA, PRÉVOST D, VÉZINA LP, CHALIFOUR FP. Soil aggregation and fungal and bacterial biomass under annual and perennial cropping systems[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1997, 61(1): 262-267.
- [4] CHENU C, ROBERSON EB. Diffusion of glucose in microbial extracellular polysaccharide as affected by water potential[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1996, 28(7): 877-884.
- [5] VADAKATTU VSR, JAMES J, GUPTA. Soil aggregation: influence on microbial biomass and implications for biological processes[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 80: A3-A9.
- [6] OADES JM. Soil organic matter and structural stability: mechanisms and implications for management[J]. *Plant and Soil*, 1984, 76(1): 319-337.
- [7] SIX J, ELLIOTT ET, PAUSTIAN K. Soil macroaggregate turnover and microaggregate formation: a mechanism for C sequestration under no-tillage agriculture[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32(14): 2099-2103.
- [8] ALAMI Y, ACHOUAK W, MAROL C, HEULIN T. Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide-producing *Rhizobium* sp. strain isolated from sunflower roots[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(8): 3393-3398.
- [9] SANDHYA V, ALI SZ. The production of exopolysaccharide by *Pseudomonas putida* GAP-P45 under various abiotic stress conditions and its role in soil aggregation[J]. *Microbiology*, 2015, 84(4): 512-519.
- [10] 邓照亮. 海南连作香蕉抑病型和导病型土壤团聚体组成及生物学特性研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2017.
- DENG ZL. Study on composition of soil aggregates and biological characteristics of suppressive and conducive soils of continuous cropping bananas in hainan[D]. Nanjing: Master thesis of Nanjing Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [11] 康贻军, 沈敏, 王欢莉, 赵庆新, 殷士学. 两株植物根际促生菌对番茄青枯病的生物防治效果评价[J]. *中国生物防治学报*, 2012, 28(2): 255-261.
- KANG YJ, SHEN M, WANG HL, ZHAO QX, YIN TX. Biological control of tomato bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* with *Erwinia persicinus* RA2 and *Bacillus pumilus* WP8[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2012, 28(2): 255-261 (in Chinese).
- [12] JIAO YQ, CODY GD, HARDING AK, WILMES P, SCHRENK M, WHEELER KE, BANFIELD JF, THELEN MP. Characterization of extracellular polymeric substances from acidophilic microbial biofilms[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(9): 2916-2922.
- [13] UPADHYAY SK, SINGH JS, SINGH DP. Exopolysaccharide-producing plant growth-promoting rhizobacteria under salinity condition[J]. *Pedosphere*, 2011, 21(2): 214-222.
- [14] CHENG R, WANG L, LI J, FU R, WANG S, ZHANG J. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory activity of a succinoglycan riclin from *Agrobacterium* sp. ZCC3656[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2019, 127(6): 1716-1726.
- [15] 曹晶晶, 熊桐梓, 钞亚鹏, 赵盼, 汪志琴, 仲乃琴. 极耐盐碱固氮菌的分离鉴定及固氮特性研究[J]. *微生物学报*, 2021, 61(11): 3483-3495.
- CAO JJ, XIONG MZ, CHAO YP, ZHAO P, WANG ZQ, ZHONG NQ. Isolation and identification of extremely salt-tolerant azotobacter and its nitrogen-fixing characteristics[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(11): 3483-3495 (in Chinese).
- [16] 李振东, 陈秀蓉, 李鹏, 满百膺. 珠芽蓼内生菌 Z5 产 IAA 和抑菌能力测定及其鉴定[J]. *草业学报*, 2010, 19(2): 61-68.
- LI ZD, CHEN XR, LI P, MAN BY. Identification of *Polygonum viviparum* endophytic bacteria Z5 and determination of the capacity to secrete IAA and antagonistic capacity towards pathogenic fungi[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2010, 19(2): 61-68 (in Chinese).
- [17] 石莹莹, 赵盼, 宋双伟, 熊桐梓, 莫乘宝, 仲乃琴. 马铃薯疮痂病拮抗菌 YN-2-2 的分离与鉴定[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(8): 2425-2435.
- SHI YY, ZHAO P, SONG SW, XIONG MZ, MO CB, ZHONG NQ. Isolation and characterization of the antagonistic bacterium YN-2-2 against potato common scab[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(8): 2425-2435 (in Chinese).
- [18] WANNER LA, KIRK WW. *Streptomyces*-from basic microbiology to role as a plant pathogen[J]. *American Journal of Potato Research*, 2015, 92(2): 236-242.
- [19] 马佳, 李颖, 胡栋, 彭杰丽, 贾楠, 张翠绵, 王旭, 王占武. 芽胞杆菌生物防治作用机理与应用研究进展[J]. *中国生物防治学报*, 2018, 34(4): 639-648.

- MA J, LI Y, HU D, PENG JL, JIA N, ZHANG CM, WANG X, WANG ZW. Progress on mechanism and applications of *Bacillus* as a biocontrol microbe[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2018, 34(4): 639-648 (in Chinese).
- [20] VARDHARAJULA S, ALISK Z. Exopolysaccharide production by drought tolerant *Bacillus* spp. and effect on soil aggregation under drought stress[J]. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 2014, 4(1): 51-57.
- [21] 张文平, 李昆太, 黄林, 魏赛金, 程新. 产胞外多糖菌株的筛选及其对土壤团聚体的影响[J]. 江西农业大学学报(自然科学版), 2017, 39(4): 772-779.
- ZHANG WP, LI KT, HUANG L, WEI SJ, CHENG X. Screening of exopolysaccharide-producing bacteria and their effects on aggregation in soil[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis (Natural Sciences Edition), 2017, 39(4): 772-779 (in Chinese).
- [22] 李慧芬, 方安然, 冯海霞, 黄剑, 赵明珠, 周波. 胞外多糖产生菌的筛选鉴定及其促生改土作用[J]. 微生物学通报, 2023, 50(5): 1941-1957.
- LI HF, FANG AR, FENG HX, HUANG J, ZHAO MZ, ZHOU B. Screening and identification of extracellular polysaccharide-producing strain and the influence on soil quality and crop growth[J]. Microbiology China, 2023, 50(5): 1941-1957 (in Chinese).
- [23] ZHAO P, LIU L, CAO JJ, WANG ZQ, ZHAO YL, ZHONG NQ. Transcriptome analysis of tryptophan-induced resistance against potato common scab[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(15): 8420.
- [24] 陈文轩, 李茜, 王珍, 孙兆军. 中国农田土壤重金属空间分布特征及污染评价[J]. 环境科学, 2020, 41(6): 2822-2833.
- CHEN WX, LI Q, WANG Z, SUN ZJ. Spatial distribution characteristics and pollution evaluation of heavy metals in arable land soil of China[J]. Environmental Science, 2020, 41(6): 2822-2833 (in Chinese).
- [25] 张晓云, 丛蓉, 赵卫松, 曲远航, 苏振贺, 郭庆港, 鹿秀云, 李社增, 马平. 30亿 CFU/g 芽胞杆菌可湿性粉剂的研制及其对马铃薯黄萎病和疮痂病的防治效果[J]. 农药学报, 2023, 25(1): 140-149.
- ZHANG XY, CONG R, ZHAO WS, QU YH, SU ZH, GUO QG, LU XY, LI SZ, MA P. Development of 3 billion CFU/g *Bacillus wettable powder* and its control efficacy on potato *Verticillium* wilt and scab[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2023, 25(1): 140-149 (in Chinese).
- [26] 赵永龙, 赵盼, 曹晶晶, 汪志琴, 刘璐, 仲乃琴. 疮痂链霉菌拮抗菌定向筛选及其功能评价[J]. 微生物学报, 2022, 62(7): 2624-2641.
- ZHAO YL, ZHAO P, CAO JJ, WANG ZQ, LIU L, ZHONG NQ. Targeted screening and functional evaluation of the bacterial antagonistics to *Streptomyces scabies*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(7): 2624-2641 (in Chinese).
- [27] 王敏, 吕和平, 高彦萍, 吴雁斌, 张武, 梁宏杰. 微生物菌肥在马铃薯疮痂病防治上的应用效果[J]. 甘肃农业科技, 2021, 52(10): 27-31.
- WANG M, LÜ HP, GAO YP, WU YB, ZHANG W, LIANG HJ. Application effect of microbial fertilizer on potato scab control[J]. Gansu Agricultural Science and Technology, 2021, 52(10): 27-31 (in Chinese).