

### 技术领域

本发明属于植物内生细菌的提取与开发技术领域，具体涉及一株贝莱斯芽孢杆菌及其应用。

### 背景技术

近年来，由于抗生素类药物的滥用，导致具有耐药性的病原菌产生，从而严重威胁动物及人类的健康。因此，寻找新型有效的天然抗生素成为保障人类健康的重要手段之一。天然抗生素的来源主要有天然动植物药和微生物药，天然动植物资源的有限性和局限性限制了抗生素的开发，微生物则成为抗生素来源的理想材料。

研究表明，植物内生细菌普遍存在于各种植物体内，种类丰富，它在寄主体内或者离体条件下培养可以产生很多结构新颖的次生代谢物，且具有生物活性，如具有抗菌性、抗肿瘤活性、增强植物抗逆性、抗病虫害、修复环境污染等，为医药、农业、生态等行业提供新的资源。地球上约有 30 万种植物中存在内生菌。因此，植物内生菌是筛选抑菌化合物的重要资源。

紫茎泽兰作为一种入侵性杂草，具有极强的环境适应力、滋生能力，它分泌的化感物质进入到土壤中可影响其他植物的增长，导致原著植物退化，形成单一优势群落，改变并减少植物菌落结构，破坏生态结构，造成严重的生态灾难。同时还会导致土壤肥力下降，引起动物中毒，影响农林牧业的生产，威胁人畜健康，造成巨大的经济损失。近年来紫茎泽兰在防除方面未达到理想的效果，加上紫茎泽兰的不断蔓延，经济损失不断地增加，研究方向逐步向开发利用上转移，发现紫茎泽兰在杀虫、抗菌、抗肿瘤、抗病毒、抗氧化等方面均有一定效果。因此，筛选紫茎泽兰中具有抑菌活性的内生细菌，一方面可以了解

到紫茎泽兰内生细菌所含代谢产物的生物学活性，为紫茎泽兰的防除及开发利用奠定了基础。另一方面为寻求新型天然药物提供良好的菌种资源。

### 发明内容

针对现有技术存在的问题，本发明提供一株贝莱斯芽孢杆菌及其应用，该贝莱斯芽孢杆菌是从紫茎泽兰内生菌中分离获得，具有较强抑菌活性，且遗传稳定。本发明的技术方案为：

第一方面，本发明提供一株贝莱斯芽孢杆菌，保藏编号为 CCTCC NO: M20211139，已于 2021 年 9 月 6 日在中国典型培养物保藏中心提交保藏，分类命名为贝莱斯芽孢杆菌 Ea 73(*Bacillus velezensis* Ea 73)。

抑菌实验表明该菌株对 5 种病原菌：大肠杆菌(*Escherichia coli* 35218)、沙门氏菌(*Salmonella tropina* H9812)、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853)、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae* CMCC 46109)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* CPCC 140594)具有普遍抑菌活性，且对金黄色葡萄球菌具有强烈抑菌活性。基于此技术效果，第二方面，本发明提出保藏编号为 CCTCC NO: M20211139 的贝莱斯芽孢杆菌在防治细菌性病原菌中的应用或者在制备细菌性病原菌的抑菌剂中的应用。

进一步地，所述细菌性病原菌为如下病原菌的一种或两种以上：大肠杆菌、沙门氏菌、绿脓杆菌、肺炎克雷伯氏菌、金黄色葡萄球菌。

优选地，所述细菌性病原菌为金黄色葡萄球菌。

为了提高该菌株中抑菌物质的产量，本发明还对该菌株的发酵方法进行了优化，结果发现经发酵后的菌株对金黄色葡萄球菌的抑菌活性进一步增强。因此，第三方面，本发明提供一种强化保藏编号为 CCTCC NO: M20211139 的贝莱斯芽孢杆菌抑菌活性的发酵方法，包括：将所述贝莱斯芽孢杆菌加入至发酵

## 说明书

培养基中，于 27~28℃ 发酵 48~52h；所述发酵培养基以酵母浸粉为碳源，以蛋白胨为氮源，以 NaCl 为无机盐。

进一步地，所述发酵培养基按照终浓度的组成为：酵母浸粉 2~10g/L，蛋白胨 5~15g/L，NaCl 10~20g/L，溶剂为蒸馏水。

优选地，所述发酵培养基按照终浓度的组成为：酵母浸粉 6.55 g/L，蛋白胨 6.61 g/L，NaCl 20.00 g/L。

优选地，所述发酵过程的参数控制为：接种量 2%，培养基初始 pH7.95，发酵时间 51.04h，发酵温度 27.97℃，转速为 180r/min。

进一步地，第四方面，本发明提供一种微生物菌剂，包括保藏编号为 CCTCC NO: M20211139 的贝莱斯芽孢杆菌或者通过上述发酵方法获得的贝莱斯芽孢杆菌。

综上，本发明从入侵性毒草紫茎泽兰中分离出天然植物内生细菌，通过两道拮抗筛选，选出了一株具有较强抑菌活性且遗传稳定的内生细菌 Ea73，经形态学和分子生物学鉴定确定其为贝莱斯芽孢杆菌。菌株 Ea73 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、绿脓杆菌、肺炎克雷伯氏菌和沙门氏菌等病原菌具有普遍抑菌活性，其中对金黄色葡萄球菌具有强烈抑菌活性，为天然抗生素的获取提供了一种来源。此外，为了提高菌株 Ea73 抑菌物质的产量，本发明优化了菌株 Ea73 的发酵方法，极大提高了抑菌物质的产量，为抑菌物质的量产提供了依据。

### 附图说明

图 1 为本发明实施例 1 中 Ea73 菌株对金黄色葡萄球菌的抑菌圈。

图 2 为本发明实施例 2 中菌株 Ea 73 菌落形态及革兰氏染色图，其中，图 a 和图 b 为菌株 Ea 73 菌落形态的原始图和放大图，图 c 为菌株 Ea 73 菌落革兰氏染色图。

## 说明书

图 3 为本发明实施例 2 中菌株 Ea 73 的系统发育进化树。

图 4 为本发明实施例 3 中菌株 Ea 73 发酵的最佳碳源及浓度对比图，其中，图 a 为酵母浸粉、葡萄糖、可溶性淀粉、蔗糖、甘露醇的考察结果；图 b 为不同浓度酵母浸粉的考察结果。

图 5 为本发明实施例 3 中菌株 Ea 73 发酵的最佳氮源及浓度对比图，其中，图 a 为胰蛋白胨、蛋白胨、牛肉膏、硫酸铵、尿素的考察结果；图 b 为不同浓度蛋白胨的考察结果。

图 6 为本发明实施例 3 中菌株 Ea 73 发酵的最佳无机盐及浓度对比图，其中，图 a 为 NaCl、MgSO<sub>4</sub>、KCl、CuSO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub> 的考察结果；图 b 为不同浓度 NaCl 的考察结果。

图 7 为本发明实施例 3 中培养基优化后菌株 Ea73 对金黄色葡萄球菌的抑菌圈。

图 8 为本发明实施例 3 中菌株 Ea 73 最佳发酵时间对比图。

图 9 为本发明实施例 3 中菌株 Ea 73 最佳发酵温度对比图。

图 10 为本发明实施例 3 中菌株 Ea 73 最佳发酵 pH 对比图。

图 11 为本发明实施例 3 中发酵条件优化后菌株 Ea73 对金黄色葡萄球菌的抑菌圈。

### 具体实施方式

本发明菌种 Ea73，分类命名：贝莱斯芽孢杆菌 Ea 73(*Bacillus velezensis* Ea 73)，于 2021 年 9 月 6 日在中国典型培养物保藏中心(CCTCC)提交保藏，地址为湖北省武汉市武昌区八一路 299 号，保藏号为：CCTCC NO: M20211139。

本发明实施例采用的紫茎泽兰采集自四川省凉山彝族自治州德昌县苍州街道办王所村。

在本发明的描述中，需要说明的是，实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可

以通过市售购买获得的常规产品。

下面结合附图和具体实施方式对本发明作进一步详细的说明，以帮助本领域的技术人员对本发明的发明构思、技术方案有更完整、准确和深入的理解，本发明的保护范围包括但不限于以下实施例，在不偏离本申请的精神和范围的前提下任何对本发明的技术方案的细节和形式所做出的修改均落入本发明的保护范围内。

### 实施例 1

本实施例提供一株贝莱斯芽孢杆菌 Ea73 株的分离过程，具体如下：

(1) 取无菌水冲洗紫茎泽兰根、茎、叶、花组织后，用无菌滤纸吸干水分，先用 3% NaClO 浸泡 3 min，然后用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 浸泡 3 min，接着用 75%乙醇浸泡 3 min，无菌水冲洗 5 次后，用无菌滤纸吸干水分。

(2) 取最后一次清洗组织的无菌水 0.2 mL，涂布于 PDA 培养基上，28 °C 培养，检验样品表面消毒是否彻底。

(3) 将表面消毒后的植物样本，用无菌刀片切割成 1 cm×1 cm 大小的片段，接种到 LB 琼脂培养基上。在 30 °C 培养箱内培养 2-3 d，逐日观察，待其切口边缘长出菌落后，将组织块周围生长的细菌菌斑用接种环挑取到 LB 琼脂培养基上，采用四区划线法反复纯化直至获得纯净菌株。分离出共计 95 株内生细菌。

(4) 以金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、肺炎克雷伯氏菌、沙门氏菌和大肠杆菌为指示菌。采用打孔法筛选具有抑菌活性的内生细菌。将病原菌活化后，分别接种于 50 mL LB 液体培养基中，在 37°C、150 r/min 恒温摇床中培养至对数期（约 14 h）后，4000 r/min 离心，收集菌体沉淀。

(5) 将菌体用无菌生理盐水调节至浓度  $1 \times 10^6$  CFU/mL，即制得指示菌菌悬液，放置于 4°C 备用。将活化后的内生细菌接种于 LB 液体培养基中（接种量 2%，装液量 50%），30°C 培养 48h 以获得发酵液。取指示菌菌悬液 100 μL 涂

## 说明书

布于 LB 琼脂培养基的平板上，待晾干后用直径 6mm 的打孔器在平板上打孔，每个孔内滴加内生菌发酵液 60 $\mu$  L。以只加生理盐水的孔作为空白对照，每个处理重复 3 次。置于 30℃细菌培养箱中培养 24h 后，观察、测量抑菌圈直径（mm）。

共计筛选出 21 株对一种或多种病原菌有抑制作用的菌株（如表 1），经复筛选出抑菌效果较强的 3 株菌，其中 Ea73 菌株对 5 种病原菌具有普遍抑菌活性，且对金黄色葡萄球菌具有强烈抑菌活性。抑菌圈达到了  $32.16 \pm 2.04$ mm，如图 1 所示。

表 1 紫茎泽兰 21 株内生细菌的抑菌效果

病原菌	抑菌活性菌株数		
	+	++	+++
大肠杆菌	10	4	0
沙门氏菌	11	2	0
绿脓杆菌	10	4	0
肺炎克雷伯氏菌	8	6	0
金黄色葡萄球菌	5	5	2

注：“+++”表示内生菌发酵液抑菌活性较强，抑菌圈直径>20mm；“++”表示内生菌发酵液抑菌活性适中，抑菌圈直径 11~20mm；“+”表示内生菌发酵液抑菌活性较弱，抑菌圈直径<11 mm。

### 实施例 2

本实施例对实施例 1 获得的一株菌株 Ea 73 进行形态学和分子生物学鉴定，具体过程如下：

1) 形态学鉴定：将筛选出的抑菌活性最强的菌株于 LB 平板上四区划线接种，置于 37℃培养 1d 后，观察菌落形态；并进行革兰氏染色，在显微镜下观察

## 说明书

其菌体形态。菌株 Ea 73 在 LB 平板上培养，可观察到呈乳白色、圆形或椭圆形、不透明、中等大小、表面粗糙、边缘整齐、光滑的黏液样菌落；染色镜检分离菌为革兰氏阳性短小杆菌，如图 2 所示。

2) 分子生物学的鉴定：扩增该菌株的 16S rDNA 序列，所采用的的引物为：

引物 27F：5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' ；

引物 1492R：5' -GCTTACCTTGTTACGACTT-3' ；

PCR 扩增体系(25  $\mu$  L)：模板 DNA 2  $\mu$  L，2 $\times$ Taq PCR Master Mix 12.5 $\mu$  L，引物 27F (10  $\mu$  mol/L) 1  $\mu$  L，引物 1492R ( $\mu$  mol/L) 1  $\mu$  L，dd H<sub>2</sub>O 8.5  $\mu$  L。

PCR 反应条件：95 $^{\circ}$ C 10 min；95 $^{\circ}$ C 1 min，56 $^{\circ}$ C 30 s，72 $^{\circ}$ C 2 min，72 $^{\circ}$ C 10 min，共 35 个循环。

扩增后的产物送去有康生物(成都)股份有限公司进行测序并做拼接处理。将测定的 16S rDNA 序列与 GenBank 中已知核酸序列进行 BLAST 分析，从中获得与菌株同源的序列，利用 MEGA7.0 软件构建系统发育树，如图 3 所示。根据前述结果分析，并结合菌株形态特征，鉴定菌株 Ea73 为贝莱斯芽孢杆菌。该菌株对大肠杆菌、沙门氏菌、绿脓杆菌、肺炎克雷伯氏菌和金黄色葡萄球菌具有较强的广谱抑菌活性，且对金黄色葡萄球菌具有强烈抑菌活性。显然，该菌株有望开发成相应的抑菌剂、微生物制剂等，充当天然抗生素的角色。

### 实施例 3

本实施例提供强化实施例 1 获得的菌株 Ea 73 抑菌活性的发酵方法，具体包括以下步骤：将所述贝莱斯芽孢杆菌加入至发酵培养基中，所述发酵培养基以酵母浸粉为碳源，以蛋白胨为氮源，以 NaCl 为无机盐，于 27~28 $^{\circ}$ C 发酵 48~52h。所述发酵过程最优参数控制为：装液量 50%，接种量 2%，培养基初始 pH7.95，发酵时间 51.04h，发酵温度 27.97 $^{\circ}$ C，转速为 180r/min。

上述发酵方法最优条件优化过程如下：

### 一、培养基组成优化

#### 1) 最佳碳源及浓度的筛选

以对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径大小为指标，采用单因素试验选取最佳的碳源、氮源和无机盐及其最适浓度：

最佳碳源及浓度的筛选：用等质量酵母浸粉、葡萄糖、可溶性淀粉、蔗糖和甘露醇分别代替 LB 培养基中的碳源，浓度为 5g/L，其他成分不变。装液量 50%，接种量 2%，以 180r/min 的转速在 30℃恒温摇床里发酵 48h，测定抑菌圈直径，每组重复 3 次，确定碳源。根据考察结果添加不同浓度梯度 2g/L、5.0 g/L、10.0 g/L、15.0 g/L、20.0 g/L、25.0 g/L 的最佳碳源，确定最佳碳源浓度。

结果显示酵母浸粉为最佳碳源，其最佳浓度是 5g/L，按此条件其抑菌圈直径可达  $34.67\pm0.53\text{mm}$ ，如图 4 所示。

#### 2) 最佳氮源及浓度的筛选

用等质量胰蛋白胨、蛋白胨、牛肉膏、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  和尿素分别代替 LB 培养基中的氮源，浓度为 10g/L，其他成分不变。装液量 50%，接种量 2%，以 180r/min 的转速在 30℃恒温摇床里发酵 48h，测定抑菌圈直径，每组重复 3 次，确定氮源。根据考察结果添加不同浓度梯度 5.0 g/L、10.0 g/L、15.0 g/L、20.0 g/L、25.0 g/L、30g/L 的最佳氮源，确定最佳氮源浓度。

结果显示蛋白胨为最佳氮源，其最佳浓度为 10g/L，按此条件其抑菌圈直径可达  $34.52\pm0.50\text{mm}$ ，如图 5 所示。

#### 3) 最佳无机盐及浓度的筛选

用等质量 NaCl、 $\text{MgSO}_4$ 、KCl、 $\text{CuSO}_4$  和  $\text{CaCl}_2$  分别代替 LB 培养基中的无机盐，浓度为 10g/L，其他成分不变。装液量 50%，接种量 2%，以 180r/min 的转速在 30℃恒温摇床里发酵 48h，测定抑菌圈直径，每组重复 3 次，确定无机盐。根据考察结果添加不同浓度梯度 5.0 g/L、10.0 g/L、15.0 g/L、20.0 g/L、25.0 g/L、30g/L 的最佳无机盐，确定最佳无机盐浓度。



## 说明书

结果显示 NaCl 为最佳无机盐，其最佳浓度为 15g/L，按此条件其抑菌圈直径可达  $34.50\pm 1.25\text{mm}$ ，如图 6 所示。

根据单因素结果，从中选取对菌株抑菌活性影响显著的因素，采用 Box-Behnken 中心组合设计原理，以碳源(X1)、氮源(X2)和无机盐(X3)为自变量，以抑菌圈直径大小为响应值，进行三因素三水平响应曲面试验设计，采用 Design Expert 7.0 统计软件对试验结果进行统计分析，从而得出菌株的最佳培养基组成。根据统计分析结果，最佳培养基组成为：酵母浸粉 6.55g/L，蛋白胨 6.61g/L，NaCl20g/L，在最佳培养基组成下，对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径可达  $34.74\pm 0.28\text{mm}$ ，如图 7 所示。

### 二、发酵条件优化

以抑菌圈直径大小为指标，采用单因素试验确定发酵时间、温度和培养基初始 pH 的最适参数。

#### 1) 发酵时间考察

以本实施例一小节中考察得到的最佳培养基组成为发酵培养基，pH 调节为 7，装液量 50%，接种量 2%，温度 30℃，转速为 180r/min，考察发酵时间在 24 h、48 h、72 h、96 h 和 120 h 五个水平下菌株抑菌活性的大小，确定最佳发酵时间。

结果显示最佳发酵时间为 48h，按此培养条件抑菌圈直径可达  $35.33\pm 0.82\text{mm}$ ，如图 8 所示。

#### 2) 发酵温度考察

分别以 24℃、27℃、30℃、33℃、36℃、39℃为不同培养温度，以最佳培养基为发酵培养基，pH 调节为 7，装液量 50%，接种量 2%，转速为 180r/min，培养 48h。考察在六个水平下菌株抑菌活性的大小，确定最佳发酵温度。

结果显示最佳发酵温度为 27℃，按此培养条件抑菌圈直径可达  $37.84\pm 0.51\text{mm}$ ，如图 9 所示。

#### 2) 发酵 pH 考察

## 说明书

以最佳培养基为发酵培养基,分别用 NaOH 和 HCl 溶液调节培养基初始 pH 至 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0。装液量 50%, 接种量 2%, 温度 30℃, 转速为 180r/min, 培养 48h。考察七个水平下菌株抑菌活性的大小, 确定最佳培养基初始 pH。

结果显示最佳培养基初始 pH 为 8, 按此培养条件抑菌圈直径可达  $34.64 \pm 0.94\text{mm}$ , 如图 10 所示。

根据单因素结果, 从中选取对菌株抑菌活性影响显著的因素, 采用 Box-Behnken 中心组合设计原理, 以初始 pH(X1)、温度(X2)和发酵时间(X3)为自变量, 以抑菌圈直径大小为响应值, 进行三因素三水平响应曲面试验设计, 采用 Design Expert 7.0 统计软件对试验结果进行统计分析, 从而得出菌株的最佳发酵条件。

根据统计分析结果, 最佳发酵条件为: 发酵时间 51.04h, 发酵温度 27.97℃, 培养基初始 pH 7.95, 在最佳发酵条件下, 抑菌圈直径可达 40.76mm, 如图 11 所示。显然, 经过特殊发酵后的菌株对金黄色葡萄球菌的抑菌活性进一步增强, 故该发酵后的菌株也有望开发成相应的抑菌剂、微生物制剂等, 充当天然抗生素的角色。

综上, 本发明从入侵性毒草紫茎泽兰中分离出天然植物内生细菌, 通过两道拮抗筛选, 选出了一株具有较强抑菌活性且遗传稳定的内生细菌 Ea73, 经形态学和分子生物学鉴定确定其为贝莱斯芽孢杆菌。菌株 Ea73 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、绿脓杆菌、肺炎克雷伯氏菌和沙门氏菌等病原菌具有普遍抑菌活性, 其中对金黄色葡萄球菌具有强烈抑菌活性, 抑菌圈直径可达 32.16mm。本发明为天然抗生素的获取提供了新的来源。此外, 为了进一步提高菌株 Ea73 抑菌物质的产量, 本发明还从培养基组成(碳源、氮源、无机盐)和发酵参数(发酵时间、发酵温度、培养基初始 pH)两方面优化菌株 Ea73 的发酵条件, 使其抑菌圈直径达到 40.76mm, 极大提高了抑菌物质的产量, 为抑菌物质的量产提供

了依据。

以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式，其描述较为具体和详细，但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是，对于本领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干变形和改进，这些都属于本发明的保护范围。因此，本发明的保护范围应以所附权利要求为准。