

网络出版时间:2018-05-25 09:43
网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20180525.0939.014.html>

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2018.11.007

渗透压对嗜线虫致病杆菌 YL001 生长及抑菌活性的影响

李 忝¹, 张淑静¹, 刘 启¹, 王 茜¹, 王永宏^{1,2}, 张 兴^{1,2}

(1 西北农林科技大学 无公害农药研究服务中心, 陕西 杨凌 712100;
2 陕西省生物农药工程技术研究中心, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】研究渗透压对嗜线虫致病杆菌(*Xenorhabdus nematophila*) YL001 菌体生长、抑菌活性的影响,为进一步提高 YL001 抑菌活性及开发利用奠定基础。【方法】以 NaCl 为渗透压调节剂,分别测定其质量浓度为 0,5,10,20,30 和 40 g/L 条件下,嗜线虫致病杆菌 YL001 不同时间段细胞生长量、pH、还原糖变化;采用琼脂扩散法、生长速率法及活体组织法测定了 YL001 发酵液的抑菌活性;同时采用 HPLC 及 LC-MS 分析了甲醇提取物中酰胺类化合物(Nematophin)与水溶性苯并芪类化合物(Xenocoumacins,包括 XCN1 和 XCN2)含量差异。【结果】在 NaCl 质量浓度为 0,5 g/L 时,YL001 细胞生长最适且无显著差异,吸光值分别达 0.63,0.62,随着 NaCl 质量浓度的进一步增大细胞生长量显著下降;在 NaCl 质量浓度为 0,5,10 g/L 时,YL001 发酵液对苏云金芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、猕猴桃溃瘍病菌、金黄色葡萄球菌的抑菌作用较好且无显著差异,随着 NaCl 质量浓度的进一步增大抑菌作用显著降低;在 NaCl 质量浓度为 0,5 g/L 时,YL001 发酵液对水稻稻瘟病菌、番茄灰霉病菌、苹果树腐烂病菌、苹果轮纹病菌、苹果炭疽病菌、水稻纹枯病菌、油菜菌核病菌的抑制率均高于 80%且均无显著差异,明显优于其他较高 NaCl 质量浓度的处理;在 NaCl 质量浓度为 0,5,10 g/L 时,YL001 发酵液对番茄灰霉病的治疗作用较好且无显著差异,在 NaCl 质量浓度为 0,5 g/L 时,对番茄灰霉病的保护作用较好且无显著差异,治疗作用和保护作用均随着 NaCl 质量浓度的进一步增大而显著下降;甲醇提取物中抑菌活性物质 Nematophin 含量、XCN1 的相对含量随 NaCl 质量浓度的增大显著下降,如 NaCl 质量浓度为 0 g/L 时,甲醇提取物中抑菌活性物质 Nematophin 含量、XCN1 的相对含量较 NaCl 质量浓度为 40 g/L 时分别提高 7.82 和 27.55 倍;XCN2 的相对含量在 NaCl 质量浓度为 5 g/L 时最高,显著高于其他处理。【结论】低渗透压有利于 *X. nematophila* YL001 菌体生长、抑菌活性提高及抑菌活性代谢产物 Nematophin、Xenocoumacins 的产生。

【关键词】 嗜线虫致病杆菌;渗透压;生长规律;抑菌活性;Nematophin;Xenocoumacins
【中图分类号】 Q936 【文献标志码】 A 【文章编号】 1671-9387(2018)11-0046-09

Effect of osmotic stress on *in vitro* growth and antimicrobial active constituents of *Xenorhabdus nematophila* YL001

LI Tianzhen¹, ZHANG Shujing¹, LIU Qi¹, WANG Xi¹,
WANG Yonghong^{1,2}, ZHANG Xing^{1,2}

(1 Research and Development Center of Biorational Pesticides, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;
2 Biopesticide Technology & Engineering Center of Shaanxi Province, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 This study investigated the effects of osmotic stress on growth, antimicrobial ac-

【收稿日期】 2017-04-28
【基金项目】 公益性行业(农业)科研专项(200903052);国家自然科学基金项目(31171910);陕西省自然科学基金重点项目(2014JZ004);中央高校基本科研创新重点项目(Z109021304)
【作者简介】 李忝珍(1990—),女,河南南阳人,在读硕士,主要从事农药毒理学和微生物代谢研究。E-mail: tianzhen512@126.com
【通信作者】 王永宏(1968—),男,陕西凤翔人,研究员,博士,博士生导师,主要从事微生物制药及发酵技术研究。
E-mail: yhwang@nwsuaf.edu.cn

tivity and active secondary metabolites of *Xenorhabdus nematophila* YL001 to provide foundation for improving antimicrobial activity and utilization of YL001. 【Method】 The growth, pH and glucose residue of *X. nematophila* YL001 were measured at different periods under different salt concentrations (0, 5, 10, 20, 30 and 40 g/L). Antimicrobial activities of fermented liquid of *X. nematophila* YL001 were measured using growth rate, agar diffusion method, and biopsy method. The differences of metabolites Nematophin and Xenocoumacins (including XCN1 and XCN2) in methanol extract were detected by HPLC and LC-MS, respectively. 【Result】 At the NaCl concentrations of 0 and 5 g/L, YL001 cells had the best growth without significant difference, and the absorbance values reached 0.63 and 0.62, respectively. With the further increase of NaCl, the growth decreased significantly. The inhibitory effects of YL001 against *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas syringae* and *Staphylococcus aureus* at NaCl concentrations of 0, 5 and 10 g/L were best without significant difference, and the antibacterial activity gradually decreased with the increase of NaCl concentration. The inhibitory rates against *Magnaporthe grisea*, *Botryti cinerea*, *Valsa mali* Miyabe et Yamada, *Physalospora piricola*, *Clomerela cinyulate*, *Thanatephorus cumeris*, and *Sclerotinia sclerotiorum* were higher than 80% without significant difference under the concentrations of 0 and 5 g/L, and the effects were better than that of higher NaCl concentrations. Protective effect against *Botryti cinerea* was best at NaCl concentrations of 0, 5 and 10 g/L without significant difference, while the therapeutic effect was best at the concentrations of 0 and 5 g/L without significant difference. Both effects decreased significantly with the further increase of NaCl concentration. The content of Nematophin and the relative content of XCN1 in methanol extract decreased drastically with the increase of NaCl concentration. Their concentrations at 0 g/L NaCl were 7.82 and 27.55 times of that at 40 g/L NaCl. The highest relative content of XCN2 was obtained at 5 g/L NaCl, and was significantly higher than other treatments. 【Conclusion】 Low osmotic pressure is more conducive to cell growth and improves antimicrobial activity and accumulation of Nematophin and Xenocoumacins of *X. nematophila* YL001.

Key words: *Xenorhabdus neamatophila*; osmotic pressure; *in vitro* growth; antimicrobial activity; Nematophin; Xenocoumacins

嗜线虫致病杆菌(*Xenorhabdus nematophila*)是寄生于小卷蛾线虫(*Steinernema carpocapsae*)肠道内的一种革兰氏阴性细菌,随线虫进入昆虫体内,在血淋巴中大量繁殖,产生毒素并分解昆虫的营养物质,使其患败血症死亡^[1-2],同时产生活性物质抑制其他杂菌的生长^[3]。嗜线虫致病杆菌能产生多种次生代谢产物,这些次生代谢产物具有多种化学结构,在医药和农业上具有广泛的生物活性^[4]。水溶性苯并茚类化合物(Xenocoumacins, XCN)和酰胺类化合物(Nematophin)是*X. nematophila*产生的主要抑菌活性物质^[5-6]。其中Xenocoumacins包括Xenocoumacin 1和Xenocoumacin 2(以下简称XCN1和XCN2),XCN1具有较高的抑菌活性,XCN2无抑菌活性,在一定条件下XCN1可以向XCN2转化,XCN1对疫霉病菌及细菌都表现出较好的抑制作用^[7-8]。Nematophin不仅对枯草芽孢杆菌等病原细菌有较强的抑制作用,而且还对临床上耐药性高的金黄色葡萄球菌也表现出较高的活

性^[9-10]。

嗜线虫致病杆菌次生代谢产物的产生与外界环境条件(温度、pH等)密切相关^[11]。环境渗透压作为一种重要的环境因子,其变化会改变胞内水活度及细胞膜透性,影响胞内大分子物质的结构,从而造成细胞在结构和生理上的损伤^[12-13],甚至导致细胞死亡。当环境渗透压发生变化,微生物往往会启动多种渗透压响应机制来避免或减轻细胞受到的伤害,如自身合成或胞外转运相容性溶质^[14-15]、改变代谢途径^[16]或细胞膜的特性^[17]等,从而影响菌体生长及次级代谢产物的产生。Delgado等^[18]研究发现,适当的渗透压不利于乳酸菌B96菌体生长,但更有利于刺激细菌素的产生。张甲庆等^[19]研究发现,在渗透压胁迫后植物乳杆菌KLDS1.0391活菌数量、葡萄糖代谢及细菌素合成能力均下降。嗜线虫致病杆菌由侵染期的斯氏线虫携带进入昆虫寄主体内,主要在昆虫血淋巴中繁殖^[1],昆虫血淋巴不仅营养丰富,而且具有较高浓度的无机盐^[20],这就迫使菌

体的生长、毒素和抑菌活性物质产生必然处于较高的渗透压环境中。此外,在发酵过程中,随着培养基营养成分的消耗,高浓度的底物、产物及有害物质的积累,也会带来较高的渗透胁迫^[21],进而影响嗜线虫致病杆菌的生长及次生代谢产物的产生。Crawford 等^[9]研究发现,渗透压能调控嗜线虫致病杆菌的代谢,菌体通过转运 L-脯氨酸可激发隐藏代谢产物的产生,但是关于渗透压对嗜线虫致病杆菌的生长、抑菌活性及抑菌活性物质产生的影响仍鲜有报道。

本课题组早期研究发现,嗜线虫致病杆菌 YL001 具有广泛的抑菌活性^[22]。为了明确渗透压对嗜线虫致病杆菌 YL001 生长及抑菌活性物质产生的影响,本研究以 NaCl 为渗透压调节物质,考察嗜线虫致病杆菌 YL001 在不同渗透压条件下生长、抑菌活性变化及抑菌活性物质酰胺类化合物和 XCN 产生的变化,以期为进一步提高 YL001 菌株抑菌活性及其开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试菌株 嗜线虫致病杆菌嗜线虫致病杆菌 YL001 菌株(以下简称 YL001),从采自陕西杨凌的斯氏线虫(*Steinernema* sp.) YL001 中分离鉴定获得,由西北农林科技大学无公害农药研究服务中心提供。

1.1.2 供试病原菌 供试病原细菌枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、猕猴桃溃疡病菌(*Pseudomonas syringae*)、水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas campestris*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)及供试病原真菌水稻稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)、棉花黄萎病菌(*Verticillium dahliae*)、苹果轮纹病菌(*Phylospora piricola*)、苹果炭疽病菌(*Clomerela cinyulate*)、油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、玉米弯孢病菌(*Curvularia lunata* (Wakker) Boed)、黄瓜炭疽病菌(*Colletotrichum orbiculare*)、水稻纹枯病菌(*Thanatephorus cucumeris*)、苹果树腐烂病菌(*Valsa mali* Miyabe et Yamada),均由西北农林科技大学无公害农药研究服务中心提供。

1.1.3 培养基 种子活化 NB 液体培养基:牛肉膏

3 g,蛋白胨 5 g,超纯水 1 000 mL。共生菌鉴别培养基 NBTA^[23]:牛肉膏 3 g,蛋白胨 5 g,氯化三苯基四氮唑 0.040 g,溴麝香百里酚蓝 0.025 g,琼脂 18 g,超纯水 1 000 mL。病原细菌培养基为 NA 培养基:牛肉膏 3 g,蛋白胨 5 g,琼脂 18 g,超纯水 1 000 mL;发酵培养基 TSB^[24]:胰蛋白胨 17 g,大豆胨 3 g, K_2HPO_4 2.5 g,葡萄糖 2.5 g, NaCl 5 g,超纯水 1 000 mL。各培养基初始 pH 用 0.1 mol/L NaOH 和 0.1 mol/L HCl 调节至 7.0~7.2,在 121 ℃灭菌 30 min 后备用。

1.2 发酵培养

挑取种管保存的 YL001 单菌落接种于 NB 培养基,于 28 ℃、180 r/min 活化 24 h 后划线接种于 NBTA 平板,25 ℃培养 48 h,用接种环挑取初生型单菌落,再次接种于 NB 培养基中,28 ℃、180 r/min 振荡培养至 OD_{600} 为 1.00,作为种子按体积分数 10% 的接种量接种于 NaCl 质量浓度分别为 0,5,10,20,30,40 g/L 的 TSB 发酵培养基中,于 28 ℃、180 r/min 培养 72 h。

1.2.1 发酵液上清液制备 将 YL001 进行批量发酵获得共生菌发酵液,于 4 ℃、9 000 r/min 离心 15 min,得发酵液上清液,用于抑菌活性测定。

1.2.2 发酵液甲醇提取物制备 将发酵液上清液用 D101 大孔吸附树脂柱吸附 24 h,去离子水冲洗 3 次后用甲醇进行洗脱,洗脱液减压浓缩去甲醇后,冷冻干燥得发酵液甲醇提取粗制品。

1.3 发酵过程中参数测定方法

1.3.1 OD_{600} 测定 采用比浊法^[25]测定。将不同培养时间的发酵液稀释 10 倍后,用紫外分光光度计测定 600 nm 波长下的吸光值。本研究用 OD_{600} 表征细胞生物量,以培养时间为横坐标,以吸光值为纵坐标绘制生长曲线。

1.3.2 pH 测定 采用 pH 计测定不同培养时间发酵液的 pH 值。

1.3.3 还原糖含量测定 采用 3,5-二硝基水杨酸法^[26]测定不同培养时间发酵液中残余还原糖含量,检测波长为 520 nm。

1.4 不同 NaCl 质量浓度下 YL001 发酵液抑菌活性的测定

1.4.1 对细菌抑菌活性的测定 采用琼脂扩散法^[27]测定病原细菌对不同渗透压条件下嗜线虫致病杆菌 YL001 发酵液上清液的敏感性。待测发酵液上清液用量为 75 μ L,以 TSB 培养基为对照,以 100 μ g/mL 链霉素为药剂对照,28 ℃培养 24 h,采

用十字交叉法测量抑菌圈直径。

1.4.2 对真菌抑菌活性的测定 采用生长速率法^[28]测定不同渗透压条件下嗜线虫致病杆菌 YL001 发酵液上清液对植物病原真菌菌丝生长的抑制作用。以相同质量浓度 NaCl 培养基作为空白对照,在 25 ℃ 黑暗条件下培养 5 d,采用十字交叉法测量各菌落直径,计算抑制率。

菌落生长直径(mm)=菌落直径-4.0(菌饼直径);

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}}{\text{对照菌落直径}} \times 100\%。$$

1.4.3 对番茄灰霉病的防治作用 采用活体组织法^[29],在番茄果实上测定不同渗透压条件下嗜线虫致病杆菌 YL001 发酵液上清液对番茄灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*) 的抑制效果。采摘健康新鲜、大小均一的番茄果实(带蒂),表面用体积分数 75% 酒精擦拭消毒后晾干。保护作用测定方法为,先将发酵上清液喷施于番茄表面,25 ℃ 保湿培养 24 h 后接种番茄灰霉病菌菌饼;治疗作用测定方法为,先在保湿条件下接种番茄灰霉病菌菌饼,24 h 后再喷施发酵上清液。每处理 3 次重复,以 1 000 mg/L 的多菌灵作为药剂对照,无菌水为空白对照,5 d 后检查结果,计算相对防效。

$$\text{病斑直径(mm)} = \text{测量直径} - 4.0(\text{菌饼直径});$$

$$\text{相对防效} = \frac{\text{对照病斑直径} - \text{处理病斑直径}}{\text{对照病斑直径}} \times 100\%。$$

1.5 不同 NaCl 质量浓度下抑菌物质 Nematophin 和 Xenocoumacins 含量分析

1.5.1 Nematophin 含量 采用 HPLC 定量分析不同渗透压条件下 YL001 甲醇提取物中抑菌活性物质 Nematophin 的含量。按照 1.2.2 节方法,各处理使用 100 mL 发酵液上清液制备获得甲醇粗提物,将其溶于 10 mL 50% 甲醇/水(体积比)制成样品,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后进行液相分析。色谱条件:色谱柱 Thermo C18 column (250 mm×4.6 mm×3.5 μm) HPLC 柱;色谱流速 1 mL/min;流动相为 45% 甲醇/水(体积比),20 min。检测波长 254 nm;液相进样量 10 μL;柱温 30 ℃。

精确称量标准品 Nematophin,加 50% 甲醇/水(体积比)制成质量浓度分别为 7.812 5,15.625,31.25,62.5,125,250 μg/mL 的标准溶液,按照上述色谱条件分别吸取 6 个标准品溶液 10 μL 进样,以标准品质量浓度为横坐标(x),色谱峰面积为纵坐标(y)绘制标准曲线,拟合回归方程并确定相关系数。

1.5.2 Xenocoumacins 含量 采用 API2000 LC-MS 系统测定 Xenocoumacins 的相对含量(样品处理参照 1.5.1 节)。色谱条件:色谱柱 Agilent C18 column(150 mm×4.6 mm×3.5 μm);流动相 0~22 min 5%~95%(0.1% 甲酸)乙腈,22~24 min 95%~5% 乙腈,24~30 min 5% 乙腈,流速 0.5 mL/min;检测波长 280 nm;进样体积 1 μL;ESI 喷雾电压^[8]。物质相对含量计算如下:

$$\text{物质相对含量} = \frac{\text{物质质谱峰面积}}{\text{参照处理质谱峰面积}} \times 100。$$

1.6 数据处理

本研究中所有数据均为 3 次重复试验的平均值,试验数据用 SPSS 20.0 和 Excel 2013 进行分析,采用 Origin 2016 进行图形处理。

2 结果与分析

2.1 不同 NaCl 质量浓度对 YL001 菌株生长代谢的影响

2.1.1 菌株的生长动态 渗透压对嗜线虫致病杆菌 YL001 菌株细胞生长的影响如表 1 所示。由表 1 可以看出,不同 NaCl 质量浓度条件下 YL001 菌株呈现出相同的生长趋势,培养 0~36 h 过程中 YL001 菌体大量生长,培养 36 h 后达到稳定期;同时 YL001 菌株的生长量随着培养基中 NaCl 质量浓度的增大逐渐下降。NaCl 质量浓度分别为 0,5 g/L 时,YL001 菌体生长旺盛,显著优于其他处理;NaCl 质量浓度为 40 g/L 时,YL001 菌株生长最慢。发酵 72 h 后,NaCl 质量浓度为 0 g/L 时菌体生物量最大,吸光值达到 0.63,分别是 5,10,20,30,40 g/L NaCl 处理的 1.01,1.13,1.50,1.85,3.00 倍。这说明 YL001 菌体生物量随渗透压的增大而下降,低渗透压条件有利于 YL001 菌株生长。

2.1.2 pH 值的变化 由表 2 可知,不同渗透压条件下 YL001 发酵液 pH 变化呈现相同趋势。培养 0~12 h,pH 下降;培养 12 h 后,pH 开始上升。培养 12 h 后,0,5,10,20,30,40 g/L NaCl 条件下 YL001 菌株发酵液的 pH 值分别降低至 6.74,6.05,5.91,5.55,6.25,6.69,此后 pH 值逐渐上升,发酵结束时不同处理 YL001 菌株发酵液 pH 值分别为 8.84,8.69,8.53,7.92,7.61,7.07。培养前期,YL001 菌株大量利用碳源,使发酵液中有有机酸含量升高,导致 pH 值下降;随着菌体量的迅速增加,氮源分解速度加快,氨基氮含量升高,致使 pH 值迅速上升。NaCl 质量浓度为 0,5,10 g/L 时,发

醇前后 pH 值变化较大,说明低渗透压条件下 g/L条件下 pH 变化幅度较小,说明高渗透压条件下 YL001 菌株生长代谢旺盛,细胞生长较快;而 40 YL001 生长较慢。

表 1 渗透压对嗜线虫致病杆菌 YL001 菌株细胞生长的影响

Table 1 Effect of osmotic pressure on growth of YL001

NaCl 质量浓度/(g·L ⁻¹) Concentration of NaCl	OD ₆₀₀			
	0 h	6 h	12 h	24 h
0	0.00±0.00 a	0.18±0.08 a	0.25±0.03 a	0.25±0.02 ab
5	0.00±0.00 a	0.15±0.01 a	0.20±0.01 b	0.26±0.01 a
10	0.00±0.00 a	0.16±0.00 a	0.21±0.00 b	0.22±0.02 bc
20	0.00±0.00 a	0.15±0.01 a	0.21±0.00 b	0.23±0.01 bc
30	0.00±0.00 a	0.10±0.00 b	0.19±0.01 c	0.21±0.02 bc
40	0.00±0.00 a	0.06±0.00 c	0.12±0.01 d	0.19±0.02 c

NaCl 质量浓度/(g·L ⁻¹) Concentration of NaCl	OD ₆₀₀			
	36 h	48 h	60 h	72 h
0	0.61±0.02 a	0.61±0.02 a	0.63±0.04 a	0.63±0.03 a
5	0.63±0.01 a	0.63±0.02 a	0.62±0.02 a	0.62±0.01 a
10	0.51±0.03 b	0.53±0.03 b	0.55±0.02 b	0.56±0.02 b
20	0.40±0.01 c	0.41±0.02 c	0.42±0.00 c	0.42±0.02 c
30	0.31±0.00 d	0.32±0.02 d	0.33±0.01 d	0.34±0.03 d
40	0.18±0.01 e	0.19±0.02 e	0.20±0.01 e	0.21±0.01 e

注:同列数据后标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下表同。
Note:Different lowercase letters in each row mean significant difference ($P<0.05$). The same below.

表 2 渗透压对嗜线虫致病杆菌 YL001 菌株发酵液 pH 值的影响

Table 2 Effect of osmotic pressure on pH of YL001 fermentation liquid

NaCl 质量浓度/(g·L ⁻¹) Concentration of NaCl	pH 值 pH value			
	0 h	6 h	12 h	24 h
0	7.20±0.00 a	6.95±0.02 a	6.74±0.04 a	7.46±0.07 a
5	7.20±0.00 a	6.27±0.03 e	6.05±0.04 c	7.44±0.04 a
10	7.20±0.00 a	6.63±0.00 d	5.91±0.02 d	7.36±0.03 b
20	7.20±0.00 a	6.67±0.02 c	5.55±0.07 e	7.36±0.03 b
30	7.20±0.00 a	6.69±0.03 c	6.25±0.07 b	6.87±0.05 c
40	7.20±0.00 a	6.75±0.05 b	6.69±0.09 a	6.45±0.07 d

NaCl 质量浓度/(g·L ⁻¹) Concentration of NaCl	pH 值 pH value			
	36 h	48 h	60 h	72 h
0	8.15±0.09 a	8.47±0.10 a	8.75±0.03 a	8.84±0.06 a
5	8.04±0.03 b	8.36±0.02 b	8.56±0.02 b	8.69±0.07 b
10	7.86±0.05 c	8.23±0.08 c	8.36±0.05 c	8.53±0.03 c
20	7.60±0.02 d	7.83±0.03 d	7.88±0.04 d	7.92±0.02 d
30	7.18±0.06 e	7.51±0.09 e	7.59±0.03 e	7.61±0.09 e
40	6.54±0.04 f	6.97±0.03 f	7.04±0.04 f	7.07±0.07 f

2.1.3 还原糖的变化 由表 3 可以看出,在发酵培养期间,不同 NaCl 质量浓度下 YL001 生长代谢所消耗还原糖的速率存在差异,随着培养基中 NaCl 质量浓度的增大,培养基残糖含量增加,40 g/L NaCl 处理残糖含量显著高于其他处理。残糖含量均在 0~36 h 迅速降低,36 h 后缓慢降低并逐渐趋于稳定。发酵结束时,发酵液中的残糖含量存在显著差异,NaCl 质量浓度为 0,5,10,20,30,40 g/L 条件下发酵液中残糖含量分别为 0.31,0.30,0.30,0.35,0.40,0.60 g/L,其中 NaCl 质量浓度为 0,5,10 g/L 时,残糖含量无显著差异,随着 NaCl 质量浓度的进一步增大,残糖含量增加且差异越来越显著。

这表明,低渗透压下 YL001 对还原糖的利用率较高,高渗透压条件下,YL001 对还原糖的利用率显著降低。

2.2 不同 NaCl 质量浓度对 YL001 菌株抑菌活性的影响

2.2.1 对细菌的抑菌活性 由表 4 可知,不同渗透压条件下,YL001 菌株发酵液对 6 种细菌均有一定的抑制作用,尤其对枯草芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌 and 金黄色葡萄球菌存在较好的抑菌效果,如 NaCl 质量浓度为 0 g/L 时,抑菌圈直径分别达到 21.83,20.67 和 21.00 mm,但随着渗透压的增大,抑菌圈直径逐渐减小,抑菌作用减弱。在 NaCl 质量浓度

为 0,5,10 g/L 时,YL001 菌株发酵液对苏云金芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、猕猴桃溃疡病菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径无明显差异,当培养基中 NaCl 质量浓度增大到 20,30,40 g/L 时,抑菌圈直径随渗透压的增大显著降低,特别是对蜡状芽孢杆菌,由 0,5,10 g/L NaCl 的 20.67,20.00,19.00 mm 下降到 20,30,40 g/L NaCl 时的 15.33,12.00,10.00 mm。这表明 YL001 发酵上清液对细菌的抑菌活性随着渗透压的增大而逐渐降低。

表 3 渗透压对嗜线虫致病杆菌 YL001 菌株还原糖含量变化的影响
Table 3 Effect of osmotic pressure on glucose residues of YL001

NaCl 质量浓度/(g·L ⁻¹) Concentration of NaCl	残糖含量/(g·L ⁻¹) Glucose residues			
	0 h	6 h	12 h	24 h
0	2.5±0.00 a	2.30±0.11 b	0.70±0.04 d	0.50±0.03 b
5	2.5±0.00 a	1.93±0.10 c	0.69±0.02 d	0.36±0.04 d
10	2.5±0.00 a	1.51±0.02 d	0.67±0.02 d	0.38±0.04 c
20	2.5±0.00 a	2.04±0.19 bc	0.76±0.01 c	0.40±0.01 c
30	2.5±0.00 a	2.37±0.12 ab	1.90±0.08 b	0.43±0.07 bc
40	2.5±0.00 a	2.46±0.04 a	2.41±0.01 a	1.50±0.16 a

NaCl 质量浓度/(g·L ⁻¹) Concentration of NaCl	残糖含量/(g·L ⁻¹) Glucose residues			
	36 h	48 h	60 h	72 h
0	0.39±0.01 b	0.34±0.02 d	0.32±0.01 d	0.31±0.01 d
5	0.32±0.02 c	0.30±0.01 e	0.31±0.00 d	0.30±0.01 d
10	0.33±0.01 c	0.33±0.01 d	0.32±0.02 d	0.30±0.01 d
20	0.36±0.07 bc	0.36±0.00 c	0.35±0.00 c	0.35±0.02 c
30	0.41±0.02 b	0.40±0.03 b	0.40±0.02 b	0.40±0.02 b
40	0.67±0.03 a	0.64±0.02 a	0.61±0.02 a	0.60±0.01 a

表 4 渗透压对嗜线虫致病杆菌 YL001 菌株发酵上清液抗细菌活性的影响
Table 4 Effects of osmotic pressure on antibacterial activity of YL001

NaCl 质量浓度/(g·L ⁻¹) Concentration of NaCl	抑菌圈直径/mm Inhibition zone					
	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	苏云金芽孢杆菌 <i>Bacillus thuringiensis</i>	蜡状芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	猕猴桃溃疡病菌 <i>Pseudomonas syringae</i>	水稻白叶枯病菌 <i>Xanthomonas campestris</i>	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>
0	21.83±1.26 a	8.00±0.00 a	20.67±0.58 a	8.67±1.15 a	19.00±0.00 a	21.00±0.00 a
5	19.67±1.04 b	7.33±0.58 a	20.00±1.00 a	8.33±0.58 a	18.00±0.00 b	20.33±0.58 a
10	18.17±0.58 c	6.00±2.00 a	19.00±1.00 a	7.67±0.58 a	16.67±0.58 c	20.33±0.58 a
20	16.67±0.29 d	3.33±0.58 b	15.33±0.58 b	5.33±1.15 b	15.00±0.00 d	15.33±0.58 b
30	14.17±0.29 e	3.33±0.58 b	12.00±0.00 c	4.00±1.00 b	12.67±0.58 e	12.68±0.58 c
40	11.00±0.00 f	3.67±0.58 b	10.00±1.00 d	3.33±0.58 c	11.33±0.58 f	11.00±1.00 d

2.2.2 对真菌的抑菌活性 从表 5 可以看出,不同渗透压条件下,YL001 菌株发酵液对不同植物病原真菌的抑制作用有一定的差异,其中对水稻稻瘟病菌、番茄灰霉病菌、苹果树腐烂病菌、苹果轮纹病菌、苹果炭疽病菌、水稻纹枯病菌、油菜菌核病菌具有较好的抑菌效果,在 NaCl 质量浓度为 0 g/L 时,抑制率均在 80% 以上,同 5 g/L 时相比并无显著差异,但随着 NaCl 质量浓度的进一步增大,YL001 菌株发酵液对真菌的抑制作用呈逐渐减弱的趋势,特别是对油菜菌核病菌,由 0,5 g/L 时的 88.36%,82.69% 下降到 10,20,30,40 g/L 时的 71.94%,59.10%,42.69%,11.64%。这表明 YL001 发酵上清液对病原真菌的抑菌活性随着渗透压的增大而逐渐降低。

表 5 渗透压对嗜线虫致病杆菌 YL001 菌株发酵上清液抗真菌活性的影响
Table 5 Effects of osmotic pressure on antifungal activity of YL001

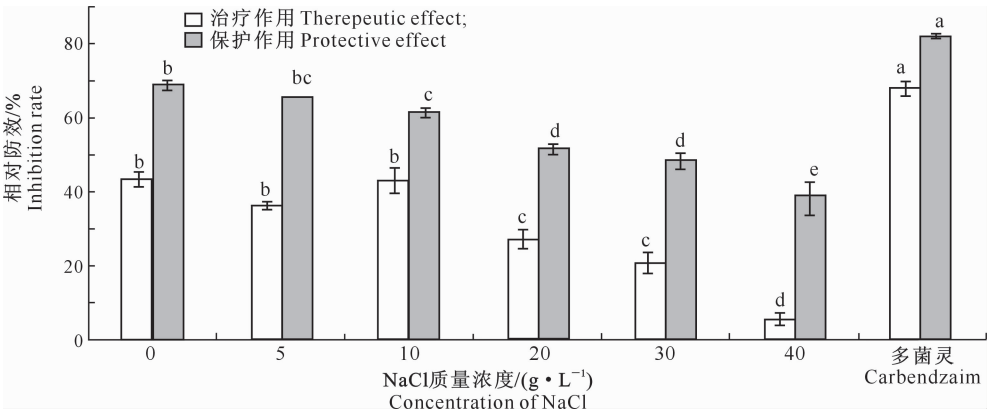
NaCl 质量浓度/(g·L ⁻¹) Concentration of NaCl	抑制率/% Inhibition rate					
	水稻稻瘟病菌 <i>Magnaporthe grisea</i>	番茄灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i>	黄瓜炭疽病菌 <i>Colletotrichum orbiculare</i>	棉花黄萎病菌 <i>Verticilium dahliae</i>	苹果树腐烂病菌 <i>Valsa mali</i> Miyabe et Yamada	苹果轮纹病菌 <i>Phylospora piricola</i>
0	85.63±2.78 a	93.81±1.35 a	73.87±1.46 a	44.77±0.77 a	100.00±0.00 a	85.05±0.49 a
5	83.87±2.11 ab	95.58±0.51 a	50.84±2.19 b	33.43±0.77 b	100.00±0.00 a	83.09±0.85 a
10	80.52±0.88 c	90.04±1.02 b	42.98±2.77 c	33.43±0.77 b	100.00±0.00 a	70.39±0.25 b
20	77.13±0.88 c	86.43±1.18 c	40.73±2.40 c	24.71±2.03 c	100.00±0.00 a	43.87±1.30 c
30	75.37±2.33 d	69.91±1.02 d	34.83±1.49 c	11.63±0.50 e	100.00±0.00 a	33.58±2.73 d
40	67.77±2.64 e	34.22±0.59 e	2.53±3.24 d	3.78±1.01 d	88.94±3.90 b	28.19±2.14 e

表 5(续) Continued table 5

NaCl 质量 浓度/(g·L ⁻¹) Concentration of NaCl	抑制率/% Inhibition rate				
	苹果炭疽病菌 <i>Clomereia cinyulate</i>	水稻纹枯病菌 <i>Thanatephorus cumeris</i>	小麦赤霉病菌 <i>Fusarium graminearum</i>	油菜菌核病菌 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	玉米弯孢病菌 <i>Curvularia lunata (Wakker) Boed</i>
0	85.05±0.49 a	94.65±0.27 a	33.98±0.05 a	88.36±0.90 a	73.30±0.91 a
5	83.09±0.85 a	93.85±1.07 a	26.02±0.08 b	82.69±4.78 ab	64.92±1.83 b
10	70.39±0.25 b	90.98±1.23 b	24.95±2.07 b	71.94±3.74 c	47.64±1.39 c
20	43.87±1.30 c	83.69±2.33 c	18.06±0.03 c	59.10±6.55 d	45.81±1.98 c
30	33.58±2.73 d	62.35±0.05 d	14.19±0.15 d	42.69±2.25 e	40.58±2.33 d
40	28.19±2.14 e	45.99±0.71 e	10.75±0.11 e	11.64±2.39 f	24.61±6.71 e

2.2.3 对番茄灰霉病的防治效果 由图 1 可知,不同渗透压条件下,YL001 发酵液对番茄灰霉病有一定的室内药效,且随着渗透压的逐渐增大,YL001 发酵上清液对番茄灰霉病的保护作用和治疗作用逐渐减小。治疗作用在 NaCl 质量浓度为 0,5,10 g/L 时差异不显著,但显著高于 20,30,40 g/L NaCl 处理的防效;保护作用在 NaCl 质量浓度为 0,5 g/L 时

差异不显著,但显著优于 10,20,30,40 g/L NaCl 处理的防效。其中,0 g/L 条件下对番茄灰霉病的保护效果为 68.98%,是 40 g/L 时(39.18%)的 1.8 倍,显著低于对照药剂的防效(80.04%);0 g/L 条件下对番茄灰霉病的治疗效果为 43.37%,是 40 g/L 时(6.62%)的 6.6 倍,显著低于对照药剂的防效(67.87%)。



同种作用标不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。下图同

Different lowercase letters mean significant difference (P<0.05). The same below

图 1 不同渗透压下嗜线虫致病杆菌 YL001 菌株发酵液对番茄灰霉病的室内药效

Fig.1 Inhibitory effect of YL001 on Botrytis cintrea under different osmotic pressures

2.3 不同 NaCl 质量浓度对 YL001 抑菌活性物质产生的影响

2.3.1 对 Nematophin 产生的影响 经回归分析,Nematophin 标准品质量浓度(x)与色谱峰面积(y)的回归方程为 y=11 892x(R=0.999 6),说明色谱峰面积与标准品质量浓度呈现良好的线性关系,可以满足定量分析要求。由图 2 可知,不同 NaCl 质量浓度条件下,YL001 发酵液代谢产物中抑菌活性物质 Nematophin 含量有较大差异。NaCl 质量浓度为 0 g/L 时,Nematophin 含量为 13.84 μg/mL,分别是 5 g/L(10.03 μg/mL)、10 g/L(8.49 μg/mL)、20 g/L(5.34 μg/mL)、30 g/L(2.53 μg/mL)、40 g/L(1.57 μg/mL)的 1.37,1.63,2.59,5.47,8.82 倍。表明渗透压对 YL001 抑菌活性物质 Nematophin 的

产生表现出较强的抑制作用,渗透压越低 Nematophin 产量越高,反之越低。

2.3.2 对 Xenocoumacins 产生的影响 Xenocoumacins 包括 XCN1 和 XCN2,其中 XCN1 具有较高的抑菌活性,XCN2 无抑菌活性,在一定条件下 XCN1 可以向 XCN2 转化。如图 3 所示,随 NaCl 质量浓度的升高,XCN1 的相对含量呈现出显著下降趋势,XCN2 的相对含量则先升高后降低。其中抑菌活性物质 XCN1 在 NaCl 质量浓度为 0 g/L 时相对含量最高,分别是 NaCl 质量浓度为 5,10,20,30,40 g/L 时的 1.26,1.98,3.84,7.69,28.55 倍;XCN2 的相对含量在 NaCl 质量浓度为 5 g/L 条件下达到最大值,显著高于其他处理。说明渗透压对 Xenocoumacins 的产生有较大影响,低渗透压条件

更有利于代谢产物 Xenocoumacins 的积累,高渗透

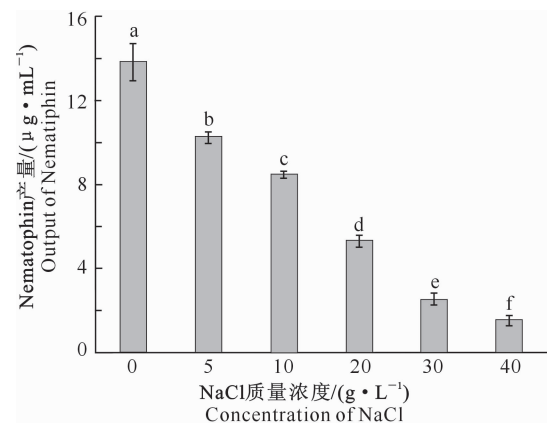


图 2 渗透压对嗜线虫致病杆菌 YL001 菌株产 Nematophin 的影响

Fig. 2 Effect of osmotic pressure on Nematophin accumulation of YL001 strains

3 讨论与结论

渗透压作为一种重要的物理参数,影响多种病原细菌的生长与致病力^[30]。徐莹等^[31]通过研究植物乳杆菌 T102 发现,培养基中添加质量分数为 1% 的 NaCl 时,菌体生长量较添加 5% 的 NaCl 时提高 16.23%,细菌素合成能力提高 59.60%。Crawford 等^[9]研究发现,适当的渗透压能刺激嗜线虫致病杆菌 ATCC19061 次级代谢产物中异腈类化合物及吡啶类化合物的产生,但不利于 Nematophin 的产生。本研究发现,以 NaCl 为渗透压调节剂时,低渗透压有利于嗜线虫致病杆菌 YL001 菌体生长、抑菌活性提高及抑菌活性物质 Nematophin、Xenocoumacins 的产生,而高渗透压不利于 YL001 菌体生长及抑菌活性物质的产生。低渗透压条件下 YL001 菌体生长代谢旺盛,菌体生长量在 NaCl 质量浓度为 0, 5 g/L 时与 40 g/L 时相比分别提高了 2.00, 1.95 倍,甲醇提取物中 Nematophin 的含量分别提高 7.82, 5.39 倍,XCN1 相对含量则分别提高 27.55, 21.66 倍,因此推测,低渗透压条件下发酵液抑菌活性较高可能与菌体生长旺盛引起抑菌活性物质 Nematophin 及 XCN1 的产量增加有关,高渗透压条件下则相反。

在昆虫血淋巴高渗透压环境中除含有较高的盐度外,还含有较高的溶质浓度,如醇类、氨基酸类、糖类等,菌体可能通过在胞内大量积累这些物质,调节其对高渗透压的适应性与耐受性^[14]。有研究表明,嗜线虫致病杆菌能在胞内积累 L-脯氨酸来缓解高渗透压带来的不适,并能增强菌体代谢产物产生,从

压条件不利于 Xenocoumacins 的积累。

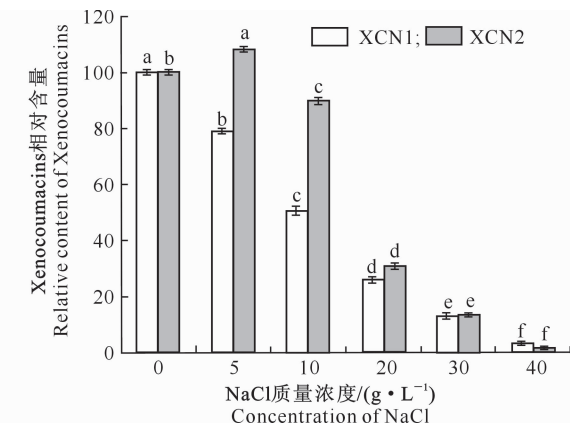


图 3 渗透压对嗜线虫致病杆菌 YL001 菌株产 Xenocoumacins 的影响

Fig. 3 Effect of osmotic pressure of YL001 on Xenocoumacins relative content

而使菌体保持较高的致病力^[9]。对嗜线虫致病杆菌 YL001 来讲,其是否能通过利用上述高浓度的溶质来应对高渗透压环境及提高代谢物的产生仍需进一步研究。

【参考文献】

[1] Martens E C, Heyngens K, Goodrich B H. Early colonization events in the mutualistic association between *Steinernema carpocapsae* nematodes and *Xenorhabdus nematophila* bacteria [J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(10): 3147-3154.

[2] Waterfield N R, Bowen D J, Fetherston J D, et al. The tgenes of *Photorhabdus*: a growing family [J]. Trends in Microbiology, 2001, 9(4): 185-191.

[3] Gualtieri M, Aumelas A, Thaler J O. Identification of a new antimicrobial lysine-rich cyclolipopeptide family from *Xenorhabdus nematophila* [J]. The Journal of Antibiotics, 2009, 62(6): 295-302.

[4] Chen G, Maxwell P, Dunhy G B, et al. Culture conditions for *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* symbionts of Entomopathogenic Nematodes [J]. Nematologica, 1996, 42(1): 124-130.

[5] 黄武仁, 朱昌雄, 杨秀芬, 等. 嗜线虫致病杆菌代谢产物 CB6-1 的分离、纯化与结构鉴定 [J]. 中国抗生素杂志, 2005, 30(9): 5-7.

Huang W R, Zhu C X, Yang X F, et al. Isolation and structural identification of main component CB6-1 produced by *Xenorhabdus nematophilu* var. Pekingensis [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2005, 30(9): 5-7.

[6] Li J, Chen G, Webster J M. Nematophin, a novel antimicrobial substance produced by *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae) [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1997, 43(8): 770-773.

[7] 黄武仁, 杨秀芬, 杨怀文, 等. 嗜线虫致病杆菌的抑菌物质及抑菌活性 [J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(1): 25-28.

- Huang W R, Yang X F, Yang H W, et al. Identification and activity of antibacterial substance from *Xenorhabdus nematophila* var. Pekingense [J]. Natural Product Research and Development, 2006, 18(1): 25-28.
- [8] Reimer D, Luxenburger E, Brachmann A O, et al. A new type of pyrrolidine biosynthesis is involved in the late steps of xenocoumacin production in *Xenorhabdus nematophila* [J]. Chem-biochem, 2009, 10(12): 1997-2001.
- [9] Crawford J M, Kontnik R, Clardy J. Regulating alternative lifestyles in entomopathogenic bacteria [J]. Current Biology, 2010, 20(1): 69-74.
- [10] Himmler T, Pirro F, Schmeer N. Synthesis and antibacterial *in vitro* activity of novel analogues of nematophin [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1998, 8(15): 2045-2050.
- [11] Fang X L, Han L R, Cao X Q, et al. Statistical optimization of process variables for antibiotic activity of *Xenorhabdus bovienii* [J]. PLoS One, 2012, 7(6): e38421.
- [12] Tymczyszyn E E, Gómez-Zavaglia A, Disalvo E A. Influence of the growth at high osmolality on the lipid composition, water permeability and osmotic response of *Lactobacillus bulgaricus* [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2005, 443(1): 66-73.
- [13] Zhang Y, Zhang Y, Zhu Y, et al. Proteomic analyses to reveal the protective role of glutathione in resistance of *Lactococcus lactis* to osmotic stress [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(10): 3177-3186.
- [14] Schubert T, Maskow T, Benndorf D, et al. Continuous synthesis and excretion of the compatible solute ectoine by a transgenic, nonhalophilic bacterium [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(10): 3343-3347.
- [15] Smits S H J, Höing M, Lecher J, et al. The compatible-solute-binding protein OpuAC from *Bacillus subtilis*: ligand binding, site-directed mutagenesis, and crystallographic studies [J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(16): 5663-5671.
- [16] Varela C, Agosin E, Baez M, et al. Metabolic flux redistribution in *Corynebacterium glutamicum* in response to osmotic stress [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 60(5): 547-555.
- [17] 郝艳华, 张 维, 陈 明. 细菌双组分系统的研究进展 [J]. 中国农业科技导报, 2012, 14(2): 67-72.
- Hao Y H, Zhang W, Chen M. Research progress on two component system of bacteria [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2012, 14(2): 67-72.
- [18] Delgado A, Brito D, Peres C, et al. Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* B96 can be expressed as a function of temperature and NaCl concentration [J]. Food Microbiology, 2005, 22(6): 521-528.
- [19] 张甲庆, 朱德全, 刘 欢, 等. 胆盐胁迫对植物乳杆菌 KLDS1.0391 葡萄糖代谢和细菌素合成的影响 [J]. 中国食品学报, 2015, 15(10): 52-57.
- Zhang J Q, Zhu D Q, Liu H, et al. Influence of bile stress on the glucose metabolism and bacteriocin synthesis of *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391 [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2015, 15(10): 52-57.
- [20] Wyatt G R. The biochemistry of insect hemolymph [J]. Annual Review of Entomology, 1961, 6(1): 75-102.
- [21] 徐 沙. 光滑球拟酵母耐受高渗透压胁迫的生理机制研究 [D]. 江苏无锡: 江南大学, 2011.
- Xu S. Analysis of the physiological mechanisms of osmotic stress tolerance in *Torulopsis giabarta* [D]. Wuxi, Jiangsu: Jiangnan University, 2011.
- [22] 方香玲, 张武岗, 易晓华, 等. 三株昆虫病原线虫共生菌胞外产物的抑菌活性 [J]. 中国生物防治, 2008, 24(4): 354-358.
- Fang X L, Zhang W G, Yi X H, et al. Antimicrobial activity of extracellular metabolites from three symbiotic bacteria of *Entomopathogenic nematode* [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2008, 24(4): 354-358.
- [23] Akhurst R J. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoplectana* and *Heterorhabditis* [J]. Microbiology, 1980, 121(2): 303-309.
- [24] 许 鹏, 李珍珍, 张淑静, 等. 嗜线虫致病杆菌 YL001 抑菌活性成分及其产量影响因素的研究 [J]. 西北农业学报, 2017, 26(2): 317-322.
- Xu P, Li T Z, Zhang S J, et al. Antimicrobial active constituents and its yield influencing factors of *Xenorhabdus nematophilus* YL001 [J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2017, 26(2): 317-322.
- [25] 张 宁, 田锡炜, 王永红, 等. 渗透压对于拟干酪乳杆菌发酵生产 L-乳酸的影响 [J]. 食品工业科技, 2014, 35(10): 98-102.
- Zhang N, Tian X W, Wang Y H, et al. Influence of osmotic stress on fermentative production of L-lactic acid by *Lactobacillus paracasei* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(10): 98-102.
- [26] 陈毓荃. 生物化学实验方法和技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- Chen Y Q. Biochemical experimental methods and techniques [M]. Beijing: Science Press, 2002.
- [27] 王永宏, 张 兴. 2 株昆虫病原线虫共生菌的分离与初步分类鉴定 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2006, 34(12): 174-180.
- Wang Y H, Zhang X. Isolate and identify 2 *Entomopathogenic nematodes* symbiotic bacteria strains [J]. Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed), 2006, 34(12): 174-180.
- [28] 许 贤, 王永宏, 刘 霞, 等. 昆虫病原线虫共生菌筛选及其发酵液抑菌活性初步研究 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2006, 34(7): 50-54.
- Xu X, Wang Y H, Liu X, et al. *Entomopathogenic* nematodes symbiotic bacteria screening and preliminary study of the fermented liquid antibacterial activity [J]. Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed), 2006, 34(7): 50-54.

Geng X S,Tang Q F,Xing M Y,et al. Research progress of aerobic composting of urban sludge [J]. Anhui Agricultural Science,2016(18):107-110.

[20] 左易灵,贺学礼,王少杰,等. 磷脂脂肪酸(PLFA)法检测蒙古沙冬青根围土壤微生物群落结构 [J]. 环境科学,2016,37(7):2705-2713.

Zuo Y L,He X L,Wang S J,et al. Characteristics of soil microbial community structure in the rhizospheric soil of *Ammodendron mongolicum* by phospholipid fatty acid (PLFA) [J]. Environmental Science,2016,37(7):2705-2713.

[21] 张秋芳,刘 波,林营志,等. 土壤微生物群落磷脂脂肪酸 PLFA 生物标记多样性 [J]. 生态学报,2009(8):4127-4137.

Zhang Q F,Liu B,Lin Y Z,et al. The diversity of phospholipid fatty acid (PLFA) biomarker for the microbial community in soil [J]. Acta Ecologica Sinica,2009(8):4127-4137.

[22] 武晓森,杜广红,穆春雷,等. 不同施肥处理对农田土壤微生物区系和功能的影响 [J]. 植物营养与肥料学报,2014,20(1):99-109.

Wu X S,Du G H,Mu C L,et al. Effects of different fertilization on structure and function of soil bacterial community [J]. Journal of Plant Nutrition & Fertilizer,2014,20(1):99-109.

[23] 李晨华,张彩霞,唐立松,等. 长期施肥土壤微生物群落的剖面变化及其与土壤性质的关系 [J]. 微生物学报,2014,54(3):319-329.

Li C H,Zhang C X,Tang L S,et al. Effect of long-term fertilizing regime on soil microbial diversity and soil property. [J]. Acta Microbiologica Sinica,2014,54(3):319-329.

[24] 陶 磊. 有机肥替代部分无机肥对滴灌棉田土壤生物活性及微生物多样性的影响 [D]. 新疆石河子:石河子大学,2013.

Tao L. The soil microbial activity and microbial functional diversity of cotton field in northern Xinjiang response to organic fertilizer partial substitution for chemical fertilizer [D]. Shihezi,Xijiang:Shihezi University,2013.

[25] 胡 可,李华兴,卢维盛,等. 生物有机肥对土壤微生物活性的影响 [J]. 中国生态农业学报,2010,18(2):303-306.

Hu K,Li H X,Lu W S,et al. Effect of microbial organic fertilizer application on soil microbial activity [J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture,2010,18(2):303-306.

[26] 姜丽娜,敬 岩,符建荣,等. 有机肥提升高产稻田生产力及土壤生物活性作用研究 [J]. 土壤通报,2010,41(4):892-897.

Jiang L N,Jing Y,Fu J R,et al. Contribution of manure to enhancements of productivity and biological activity in high-yielding rice fields [J]. Chinese Journal of Soil Science,2010,41(4):892-897.

(上接第 54 页)

[29] 方香玲. 昆虫病原线虫共生菌的鉴定,培养及其抑菌活性研究 [D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学,2008.

Fang X L. Study on identification, culture and antimicrobial activity of *Entomopathogenic* nematodes [D]. Yangling, Shaanxi;Northwest A&F University,2008.

[30] Sleator R D,Hill C. Bacterial osmoadaptation;the role of osmolytes in bacterial stress and virulence [J]. FEMS Microbiology Reviews,2002,26(1):49-71.

[31] 徐 莹,梁红敏. 影响植物乳杆菌 T102 生长与产细菌素能力的因素 [J]. 中国乳品工业,2014,42(9):22-25.

Xu Y,Liang H M. Factors affecting the growth and bacteriocin production of *Lactobacillus plantarum* T102 [J]. China Dairy Industry,2014,42(9):22-25.