

文章编号: 1001-8689(2022)05-0453-10

# 茅尾海桐花树根际土壤来源几丁质降解菌株多样性及 抗植物真菌活性的研究

王巧贞<sup>1</sup> 李锋<sup>2</sup> 易淑琼<sup>1</sup> 杨玲<sup>1</sup> 潘信利<sup>1</sup> 黄媛林<sup>1</sup> 李喆<sup>1</sup> 李菲<sup>3</sup> 廖思明<sup>4</sup> 黄庶识<sup>1,\*</sup>  
(1 广西科学院 广西海洋天然产物与组合生物合成化学重点实验室, 南宁 530007; 2 黔南民族师范学院 化学化工学院, 都匀558000; 3 广西科学院 广西近海海洋环境科学重点实验室, 南宁 530007; 4 广西科学院 国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 南宁 530007)

**摘要:** **目的** 以胶体几丁质为唯一碳源的培养基, 从广西茅尾海红树林桐花树根际土壤中分离几丁质降解菌株, 并应用复筛培养基筛选产几丁质酶菌株, 结合平板对峙法挖掘能高效抑制植物病原真菌生长的活性菌株, 为红树林来源微生物农用生物防治药物的研发奠定基础。**方法** 采用平板稀释涂布法和划线法分离纯化菌株, 并应用复筛培养基通过透明圈观察法检测菌株几丁质酶活; 采用Chelex-100法提取菌株基因组DNA, 通过PCR扩增菌株的16S rRNA基因序列, 上传至EzBioCloud数据库进行在线比对; 采用平板对峙法筛选抗植物病原真菌的活性菌株; 采用PKS和NRPS基因的扩增引物分别检测基因组聚酮合酶基因与非核糖体肽合成酶基因。**结果** 从桐花树根际土壤中分离获得28株几丁质降解菌, 隶属于10目10科17属; 其中5株几丁质降解菌对4种植物病原真菌均显示出抑菌活性, 抑菌活性阳性率为17.86%; 并在17株几丁质降解菌中检测到抗生素生物合成基因。**结论** 广西茅尾海红树林桐花树根际土壤来源的细菌及放线菌是重要的几丁质酶菌种资源, 它们在抗植物病原真菌方面表现出良好的应用潜力, 在新型绿色海洋生物农药、新颖结构海洋药物及其他高附加值产品开发和利用方面具有应用前景。

**关键词:** 桐花树根际土壤; 几丁质降解菌; 多样性; 抗菌活性; 抗生素生物合成基因  
**中图分类号:** Q939.1      **文献标志码:** A

## Diversity and antifungal activity of chitin-degrading bacteria isolated from *Aegiceras corniculatum* rhizosphere mud in Maowei sea

Wang Qiao-zhen<sup>1</sup>, Li Feng<sup>2</sup>, Yi Shu-qiong<sup>1</sup>, Yang Ling<sup>1</sup>, Pan Xin-li<sup>1</sup>, Huang Yuan-lin<sup>1</sup>,  
Li Zhe<sup>1</sup>, Li Fei<sup>3</sup>, Liao Si-ming<sup>4</sup>, Huang Shu-shi<sup>1,\*</sup>

收稿日期: 2022-02-21

**基金项目:** 广西海洋天然产物与组合生物合成化学重点实验室运行补助项目(No.20-065-63); 广西科学院科研发展基金项目(No. 2021YFJ1206); 贵州省基础研究计划项目(No. 黔科合基础-ZK[2022]一般545); 广西科技计划重点研发项目(No. 桂科AB16380071); 广西科技计划科技基地和人才专项(No.桂科AD17129019); 广西自然科学基金项目(No.2017GXNSFAA198167)

**作者简介:** 王巧贞, 女, 生于1987年, 硕士, 助理研究员, E-mail: wqzhen@gxas.cn

\*通讯作者, E-mail: hshushi@gxas.cn



第一作者: 王巧贞, 女, 生于1987年, 2014年获得广西师范大学硕士学位, 现在广西科学院就职, 从事海洋多糖降解微生物资源挖掘与微生物发酵。



通讯作者: 黄庶识, 男, 生于1964年, 现就职于广西科学院, 研究员, 从事海洋微生物资源挖掘及其活性成分研究。

(1 Guangxi Key Laboratory of Marine Natural Products and Combinatorial Biosynthesis Chemistry, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530007; 2 School of Chemistry and Chemical Engineering, Qiannan Normal College for Nationalities, Duyun 558000; 3 Guangxi Key Laboratory of Marine Environmental Science, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530007; 4 National Engineering Research Center for Non-Food Biorefinery, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530007)

**Abstract Objective** The chitinolytic microorganisms isolated from *Aegiceras corniculatum* rhizosphere mud in Maowei sea Mangrove Reserve of Guangxi Zhuang Autonomous Region were screened by using colloid chitin as the sole carbon source in medium. The chitinase producing strains were screened by the secondary screening medium, and the strains with high efficiency antifungal activity were excavated by the method of plate confrontation, to establish the foundation on the research and development of agricultural biological control drugs from mangrove microorganisms. **Methods** The chitinolytic microorganisms were isolated by the dilution plating procedure, and purified by the streak method. Chelex-100 was used to extract genomic DNA, the 16S rRNA gene sequences were amplified by PCR, and the sequences were uploaded to the EzBioCloud database for online alignment. Chitinase activities were tested by observing transparent zones, and the plate confrontation method was used to screen inhibitory activity against plant pathogenetic fungi. To further verify the biosynthetic potential of the 28 strains, the polyketide synthases (PKS) and non-ribosomal peptide synthetases (NRPS) genes were amplified. **Results** Twenty-eight chitinase producing strains in 10 orders, 10 families, and 17 genera were obtained from *Aegiceras corniculatum* rhizosphere mud. Among them, five chitin-degrading strains showed inhibitory activity against four plant pathogenetic fungi. The positive rate was 17.86%, and antibiotic biosynthetic genes were detected in 17 strains. **Conclusion** The chitinase-producing bacteria and actinomycetes strains from *Aegiceras corniculatum* rhizosphere mud collected in the Maowei sea Mangrove Reserve of Guangxi are regarded as an important source of chitinase. Their antifungal activity shows a promising potential as marine pesticides and novel marine medicine.

**Key words** *Aegiceras corniculatum*; Rhizosphere; Chitinolytic microorganism; Antimicrobial activity; Biosynthetic gene

几丁质是地球上含量仅次于纤维素的多糖,是一种很好的医用生物材料<sup>[1-2]</sup>。全球每年大约有 $10^{12} \sim 10^{14}$ 吨的几丁质废弃物产生,如何处理这些废弃物是水产养殖与加工业面临的主要问题<sup>[3]</sup>。水产养殖业中的虾蟹壳废弃物是生产高效益产品的原料,可用于生产各种具有生物活性的产品<sup>[4]</sup>,例如,具有抗菌活性的几丁质降解产物(几丁质寡糖),可用作食品防腐剂<sup>[5]</sup>,也被用作水果和蔬菜的保鲜剂涂料,以降低呼吸率达到保鲜的目的<sup>[6]</sup>。目前,几丁质酶的研究备受关注,它可将几丁质降解成低聚物,低聚物被N-乙酰氨基己糖苷酶(HEX, EC 3.2.1.52)进一步降解成单体,广泛应用于食品、农业、医药、化学品和生物燃料等领域<sup>[7]</sup>。细菌和放线菌是几丁质酶的重要来源,已被鉴别的几丁质酶产生菌主要包括*Aeromonas*、*Serratia*、*Vibrio*、*Streptomyces*和*Bacillus*等<sup>[8]</sup>。

几丁质酶(EC 3.2.1.14)属于糖苷水解酶,通过催化N-乙酰氨基葡萄糖长链之间的 $\beta$ -(1,4)糖苷键断裂来发挥作用<sup>[9-10]</sup>。几丁质酶可以通过直接降解真菌细胞壁中的几丁质或释放多糖寡聚物刺激植物的防御体系来抵御病原生物的攻击<sup>[11]</sup>,因此几丁质酶产生菌也是潜在的农用生物防治菌剂。从多种细菌中被分

离出来的各类几丁质酶,对引起病害的多种病原菌与害虫有明显的抑制作用<sup>[12-13]</sup>。

红树林生境独特,微生物多样性丰富,这些微生物可以产生新颖性的活性成分<sup>[14-16]</sup>,包括来源于几丁质降解菌的几丁质酶。在红树林生态系统中,底栖生物丰富,多样性的几丁质降解菌促进了贝类和甲壳类等几丁质生物体的分解,为红树林生态系统内动植物以及微生物提供必要养分,是红树林生态系统食物链重要节点之一,在促进红树林生态系统内物能流动有重要作用。本文以防城港茅尾海红树林桐花树群落中桐花树根际土壤为研究对象,探讨桐花树根际土壤中可培养几丁质降解菌的多样性,从中筛选出拮抗植物病原真菌的活性菌株,以期丰富红树林土壤来源的农业生防菌资源,为新的生物菌肥开发奠定基础。同时,通过检测微生物基因组中聚酮合酶(polyketide synthetases,简称PKSs)基因和非核糖体肽合成酶(nonribosomal peptide synthetases, NRPSs)基因,进一步评价所分离菌株潜在的合成活性次级代谢产物的能力,为研究红树林根际土壤来源的几丁质降解菌的生物多样性及潜在功能提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 培养基

(1)分离和纯化培养基

胶体几丁质的制备，参照文献[17]：5 g几丁质粉末用30 mL浓盐酸(35.5%)于4℃浸泡过夜，并在4℃条件下，边搅拌几丁质胶体边缓慢加入250 mL预冷的50%乙醇，充分拌匀，静置过夜，10000 g离心20 min，收集几丁质胶体，并用无菌水洗涤至几丁质胶体pH为中性。

分离培养基，参照文献[18]稍做修改：胶体几丁质0.5%，蛋白胨0.1%，NH<sub>4</sub>Cl 0.01%，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.03%，K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.07%，NaCl 0.01%，FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.001%，MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.05%，海盐2.4%，蒸馏水定容至1 L，pH值7.2~7.4，琼脂1.7%。

(2)复筛培养基，参照文献[18]稍做修改：胶体几丁质0.5%，NH<sub>4</sub>Cl 0.01%，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.03%，K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.07%，NaCl 0.01%，FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.001%，MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.05%，海盐2.4%，蒸馏水定容至1 L，pH值7.2~7.4，琼脂1.7%。

(3)植物病原真菌培养基：马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)。

1.1.2 植物病原菌

*Boeremia exigua*代号C1；芬芳镰刀菌*Fusarium redolens*代号C2；藤黑镰孢菌*Fusarium fujikuroi*代号C3；腐皮镰刀菌*Fusarium solani*代号C4。由广西科学院海洋中心李菲提供。

1.2 方法

1.2.1 样品采集

在广西茅尾海红树林保护区相距10 km的两个桐花树群落采集样品，样品信息见表1。

1.2.2 几丁质降解菌的分离纯化

采用梯度稀释法和划线法分离纯化几丁质降解

菌。称取2 g土壤样品，装于50 mL的无菌离心管中，加入18 mL无菌水混匀，于30℃，180 r/min摇床中震荡30 min，10倍梯度稀释，制备成原液的10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>稀释样液，并涂布于几丁质筛选培养基上，置于30℃恒温培养箱中培养，观察菌落形态、颜色，挑取形态、颜色不同的菌落，用连续平板划线的方法纯化。

1.2.3 PCR扩增和16S rRNA序列系统发育分析

Chelex-100法<sup>[19-20]</sup>提取细菌基因组DNA，并以细菌基因组DNA为模板，利用通用引物对27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3')和1492R(5'-ACGGCTACCTTGTACGACT-3')进行16S rRNA基因扩增，电泳检测后，将含有目的条带的PCR产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。结果序列经过软件BioEdit Sequence Alignment Editor编辑整理，在EzBioCloud数据库([https:// www.ezbiocloud.net/](https://www.ezbiocloud.net/))上在线比对，应用MEGA7.0软件，选取同源性最高的有效菌株的16S rRNA序列，采用邻接法(neighbor-joining)构建系统发育树。

1.3 几丁质酶活性筛选

用无菌牙签挑取少量菌体，通过点值法接种在筛选培养基上，28℃恒温培养3~7 d。按丁志雯等<sup>[18]</sup>的方法，通过透明圈观察法筛选产几丁质酶菌株。

1.4 抗植物病原菌活性试验

抗植物病原菌活性实验采用平板对峙法，将待试菌株接种在距离PDA平板中心两侧2.5 cm处，每板接1株细菌，28℃恒温培养1 d。使用无菌打孔器制备植物病原真菌菌饼(直径6 mm)，用无菌牙签挑取菌饼，接种在上述PDA平板的中心位置。空白对照组设置为只接种植物病原菌的PDA平板，28℃恒温箱中培养5~7 d，拍照，测量抑菌圈直径。

1.5 PKS和NRPS基因的扩增及检测

按照上述方法“1.2.3”提取供试菌株的基因组DNA，在表2中列出了PKS和NRPS基因的扩增引物序列，按照王海强等<sup>[21]</sup>的方法设置扩增参数。经1%

表1 茅尾海红树林桐花树根际土壤样品信息  
Tab. 1 Information of *Aegiceras corniculatum* rhizosphere mud in Maowei sea

样品	样品名称	采集地点
1	采样点1桐花树根际表层土壤	N21°51'32",
2	采样点1桐花树根际15cm深度土壤	E108°35'60"
3	采样点1桐花树根际30cm深度土壤	
4	采样点2桐花树根际表层土壤	N21°44'26",
5	采样点2桐花树根际15cm深度土壤	E108°35'42"
6	采样点2桐花树根际30cm深度土壤	

表2 PKS与NRPS的扩增引物  
Tab. 2 Information of amplification primer of PKS and NRPS genes

基因	引物名称	引物序列(5'-3')	目的片段长度/bp
PKS I	K1F	TSAAGTCSAACATCGGBCA	1200~1500 <sup>[22]</sup>
	M6R	CGCAGGTTSCSGTACCAGTA	
PKS II	KSαF	TSGCSTGCTTGGAYGCSATC	500~750 <sup>[23]</sup>
	KSβR	TGGAANCCGCCGAABCCTCT	
NRPS	A3F	GCSTACSYSATSTACACSTCSGG	700~800 <sup>[22]</sup>
	A7R	SASGTCVCCSGTSCGGTAS	



琼脂糖凝胶电泳检测有无符合条件的目的条带，记录结果。

2 结果与分析

2.1 桐花树根际土壤中几丁质降解菌的筛选，鉴定与多样性分析

6份采自茅尾海红树林的桐花树根际土壤样品，用几丁质分离培养基进行培养分离，并应用复筛培养基通过透明圈观察法<sup>[18]</sup>筛选几丁质酶产生菌，产酶菌株在复筛培养基上生长，其菌落周围能观察到如图1所示的透明圈。经统计，共获得73株产酶菌株，根据菌落形态和颜色等特征去除重复菌株，获得41株菌，经16S rRNA基因扩增后进行测序鉴定，与其近缘菌种相似性及其16S rRNA序列构建的系统发育树见表3和图2，共鉴定出28个种的细菌及放线菌，隶属于10目10科的17个属(表4)，分别为： $\gamma$ -变形菌纲的产微

球茎菌属(*Microbulbifer*)、希瓦菌属(*Shewanella*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、埃希菌属(*Escherichia*)、柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)、*Rheinheimera*、克雷伯菌属(*Klebsiella*)、弧菌属(*Vibrio*)；芽胞杆菌纲的微小杆菌属(*Exiguobacterium*)、

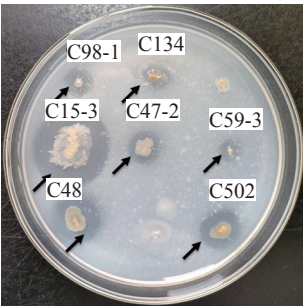
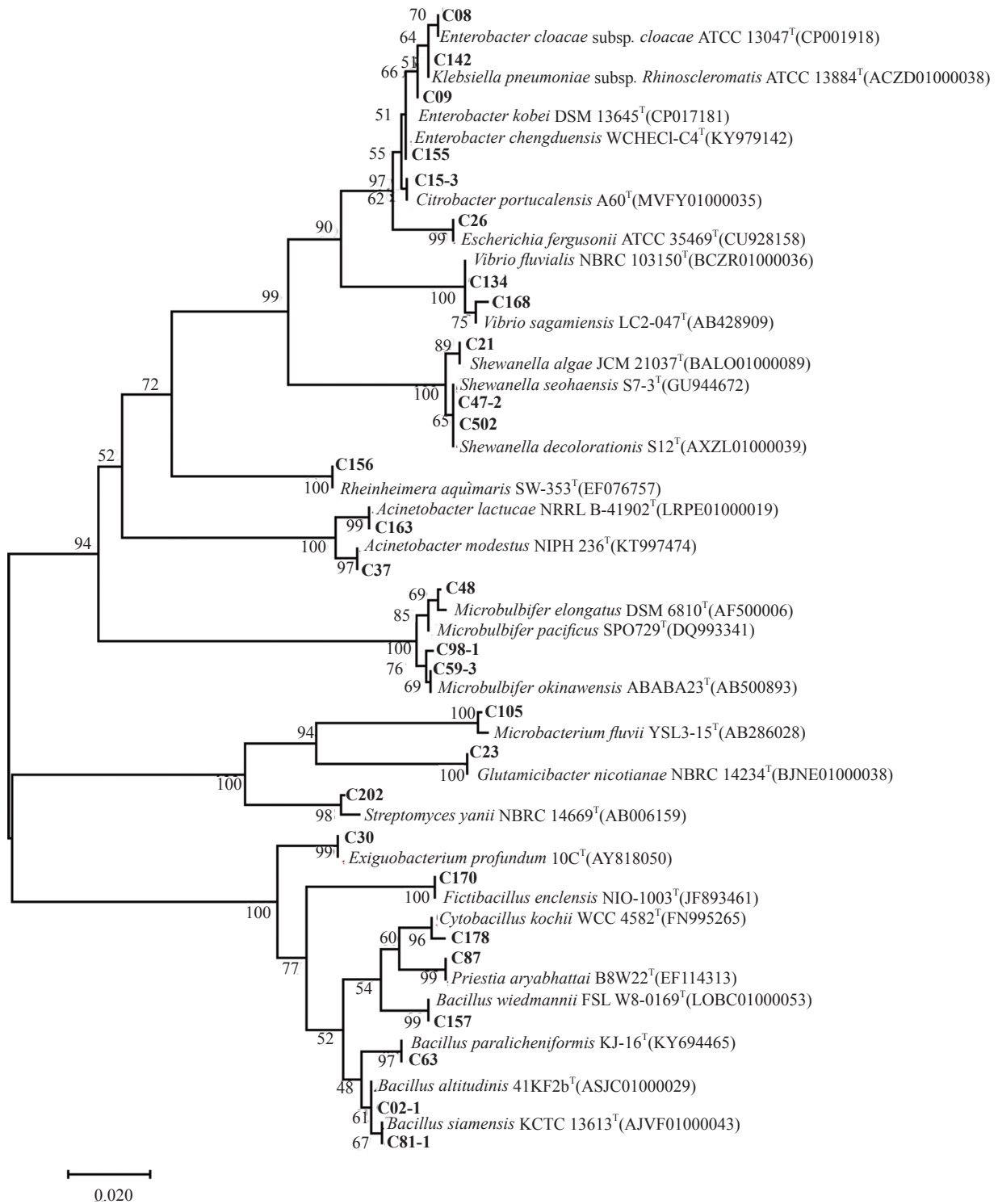


图1 部分几丁质降解菌酶活性  
Fig. 1 Screening results of partial chitinase-producing strains

表3 28株几丁质降解菌与近缘菌种相似性  
Tab. 3 28 strains of chitin-degrading bacteria similarity with the closely related strains

菌株编号	属	近缘菌种	16S rRNA基因相似度/%
C98-1	<i>Microbulbifer</i>	<i>Microbulbifer pacificus</i> SPO72 <sup>(T)</sup>	98.44
C59-3		<i>Microbulbifer okinawensis</i> ABABA23 <sup>(T)</sup>	99.08
C48		<i>Microbulbifer elongatus</i> DSM 6810 <sup>(T)</sup>	99.16
C21	<i>Shewanella</i>	<i>Shewanella algae</i> JCM 2103 <sup>(T)</sup>	99.64
C47-2		<i>Shewanella seohaensis</i> S7-3 <sup>(T)</sup>	100
C502		<i>Shewanella decolorationis</i> S12 <sup>(T)</sup>	99.4
C37	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter modestus</i> NIPH 236 <sup>(T)</sup>	98.56
C163		<i>Acinetobacter lactucae</i> NRRL B-41902 <sup>(T)</sup>	99.88
C09		<i>Enterobacter chengduensis</i> WCHECI-C4 <sup>(T)</sup>	99.52
C08	<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>Cloacae</i> ATCC 13047 <sup>(T)</sup>	99.88
C155		<i>Enterobacter kobei</i> DSM 13645 <sup>(T)</sup>	100
C26		<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 <sup>(T)</sup>	99.05
C15-3	<i>Citrobacter</i>	<i>Citrobacter portucalensis</i> A60 <sup>(T)</sup>	99.44
C142	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp.	99.64
		<i>Rhinoscleromatis</i> ATCC 13884 <sup>(T)</sup>	
C156	<i>Rheinheimera</i>	<i>Rheinheimera aquimaris</i> SW-353 <sup>(T)</sup>	99.76
C134	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio fluvialis</i> NBRC 103150 <sup>(T)</sup>	99.88
C168		<i>Vibrio sagamiensis</i> LC2-047 <sup>(T)</sup>	98.21
C30		<i>Exiguobacterium profundum</i> 10C <sup>(T)</sup>	99.76
C157	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus wiedmannii</i> FSL W8-0169 <sup>(T)</sup>	100
C63		<i>Bacillus paralicheniformis</i> KJ-16 <sup>(T)</sup>	99.65
C02-1		<i>Bacillus altitudinis</i> 41KF2b <sup>(T)</sup>	100
C81-1	<i>Cytobacillus</i>	<i>Bacillus siamensis</i> KCTC 13613 <sup>(T)</sup>	100
C178		<i>Cytobacillus kochii</i> WCC 4582 <sup>(T)</sup>	99.52
C87		<i>Priestia aryabhattai</i> B8W22 <sup>(T)</sup>	100
C170	<i>Fictibacillus</i>	<i>Fictibacillus enclensis</i> NIO-1003 <sup>(T)</sup>	99.14
C105	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacterium fluvii</i> YSL3-15 <sup>(T)</sup>	98.81
C23	<i>Glutamicibacter</i>	<i>Glutamicibacter nicotianae</i> NBRC 14234 <sup>(T)</sup>	99.88
C202	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces yanii</i> NBRC 14669 <sup>(T)</sup>	99.48



分支点上的数值为1000次Bootstrap分析所得值, 仅显示大于50%的值; 标尺0.02为进化距离

图2 基于 16S rRNA 基因序列构建的neighbor-joining 系统进化树

Fig. 2 Neighbor-joining phylogenetic tree based on sequences of 16S rRNA gene

芽胞杆菌属(*Bacillus*)、*Priestia*、虚构芽胞杆菌属(*Fictibacillus*)、*Cytobacillus*；放线菌纲的微杆菌属(*Microbacterium*)、谷氨酸棒杆菌属(*Glutamicibacter*)及链霉菌属(*Streptomyces*)。其中26株希瓦菌属菌株，占所分离菌株的35.62%；13株弧菌属菌株，占所分离菌株的17.81%，希瓦菌属为优势菌属，弧菌属次之。

此外，C98-1与其近缘菌种*Microbulbifer pacificus*

SPO729<sup>(T)</sup>的相似性为98.44%(表3)；C168与其近缘菌种*Vibrio sagamiensis* LC2-047<sup>(T)</sup>的相似性为98.21%，相似性均低于98.65%，可能是潜在新种。

**2.2 不同采样点几丁质降解菌种多样性分析**

在茅尾海红树林保护区相距大约10 km的两个桐花树群落采集根际土壤，分离获得的几丁质降解菌多样性存在一定差异(表5~6)。1号采样点表层土壤几

表4 28株几丁质降解菌的菌属分布  
Tab. 4 Preliminary screening result of enzyme-producing activities in 28 strains

纲	目		科	属	株数	种数
γ-变形菌纲 ( <i>Gammaproteobacteria</i> )	<i>Cellvibrionales</i>		<i>Microbulbiferaceae</i>	产微球茎菌属( <i>Microbulbifer</i> )	5	3
	交替单胞菌目( <i>Alteromonadales</i> )	希瓦菌科( <i>Shewanellaceae</i> )	希瓦菌属( <i>Shewanella</i> )	26	3	
	假单胞菌目( <i>Pseudomonadales</i> )	莫拉菌科( <i>Moraxellaceae</i> )	不动杆菌属( <i>Acinetobacter</i> )	2	2	
	肠杆菌目( <i>Enterobacterales</i> )	肠杆菌科( <i>Enterobacteriaceae</i> )	肠杆菌属( <i>Enterobacter</i> )	7	3	
			埃希菌属( <i>Escherichia</i> )	1	1	
			柠檬酸杆菌属( <i>Citrobacter</i> )	1	1	
			克雷伯菌属( <i>Klebsiella</i> )	1	1	
	<i>Chromatiales</i>		<i>Chromatiaceae</i>	<i>Rheinheimera</i>	1	1
	弧菌目( <i>Vibrionales</i> )	弧菌科( <i>Vibrionaceae</i> )	弧菌属( <i>Vibrio</i> )	13	2	
	芽胞杆菌纲 ( <i>Bacilli</i> )	显核菌目( <i>Caryophanales</i> )	芽胞杆菌科( <i>Bacillaceae</i> )	微小杆菌属( <i>Exiguobacterium</i> )	2	1
			芽胞杆菌属( <i>Bacillus</i> )	5	4	
			<i>Priestia</i>	1	1	
			虚构芽胞杆菌属( <i>Fictibacillus</i> )	1	1	
			<i>Cytobacillus</i>	3	1	
放线菌纲( <i>Actinomycetia</i> )	微杆菌目( <i>Microbacteriales</i> )	微杆菌科( <i>Microbacteriaceae</i> )	微杆菌属( <i>Microbacterium</i> )	2	1	
	微球菌目( <i>Micrococcales</i> )	微球菌科( <i>Micrococcaceae</i> )	谷氨酸棒杆菌属( <i>Glutamicibacter</i> )	1	1	
	链霉菌目( <i>Streptomycetales</i> )	链霉菌科( <i>Streptomycetaceae</i> )	链霉菌属( <i>Streptomyces</i> )	1	1	

表5 两个采样点桐花树根际土壤几丁质降解菌的分布  
Tab. 5 Distribution of chitin-degrading bacteria from *Aegiceras corniculatum* rhizosphere mud of two sampling sites

采样点	菌株	近缘菌种	土壤深度	采样点	菌株	近缘菌种	土壤深度
1号	C98-1	<i>Microbulbifer pacificus</i>	表层	2号	C59-3	<i>Microbulbifer okinawensis</i>	表层
	C21	<i>Shewanella algae</i>	15 cm		C48	<i>Microbulbifer elongatus</i>	15 cm
	C30	<i>Exiguobacterium profundum</i>	表层		C47-2	<i>Shewanella seohaensis</i>	30cm
	C09	<i>Enterobacter chengduensis</i>	表层		C502	<i>Shewanella decolorationis</i>	15 cm
	C08	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i>	表层		C02-1	<i>Bacillus altitudinis</i>	表层
	C155	<i>Enterobacter kobei</i>	表层		C63	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	15 cm
	C26	<i>Escherichia fergusonii</i>	30 cm		C37	<i>Acinetobacter modestus</i>	30 cm
	C15-3	<i>Citrobacter portucalensis</i>	表层		C163	<i>Acinetobacter lactucae</i>	15 cm
	C142	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i>	表层		C87	<i>Priestia aryabhattai</i>	30 cm
	C81-1	<i>Bacillus siamensis</i>	表层		C178	<i>Cytobacillus kochii</i>	30 cm
	C157	<i>Bacillus wiedmannii</i>	表层		C23	<i>Glutamicibacter nicotianae</i>	30 cm
	C170	<i>Fictibacillus enclensis</i>	30 cm		C168	<i>Vibrio sagamiensis</i>	15 cm
	C156	<i>Rheinheimera aquimaris</i>	15 cm		C134	<i>Vibrio fluvialis</i>	表层
	C105	<i>Microbacterium fluvii</i>	30 cm				
	C202	<i>Streptomyces yanii</i>	表层				

表6 两个采样点几丁质降解菌的种属差异情况  
Tab. 6 Differences of the chitin-degrading bacteria on species and genus from two sampling sites

采样点	土壤深度	属数目	种数目
1号	表层	8	10
	15 cm	2	2
	30 cm	3	3
2号	表层	3	3
	15 cm	5	5
	30 cm	5	5

丁质降解菌种类最多，包括8个属10个种，在土壤深度为15和30 cm处的几丁质降解菌种类相对较少；2号采样点表层土壤的几丁质降解菌种类相对较少，而在15和30 cm深度的土壤分离获得的几丁质降解菌种类相对较多，均包括5个属5个种，与1号采样点种类的分布特征存在差异，推测与两个采样点的桐花树群落的微环境差异及周围人类的生活及生产活动相关。1号采样点比较远离人类活动区域，受干扰相对较少，生物群落结构由于受到扰动少而相对稳定，表层土壤自然堆积落叶以及贝类、虾蟹等含有几丁质的躯壳残体流失较少，根际土壤几丁质含量相对较高，整个小环境更有利于几丁质降解菌的生长，这可能是1号采样点表层土壤的几丁质降解菌种类明显多于2号采样点的原因。2号采样点在逸仙公园附近，该处表层土壤的几丁质降解菌种类相对较少，推测其原因可能是表层土壤的微环境受到频繁的人类活动，排水口处生活废水的冲刷等干扰，造成利于几丁质降解菌生长的营养成分减少，而15和30 cm处土壤受到干扰的程度相对较少，其中的几丁质降解菌种类相对较多。

2.3 抑菌活性筛选

28株几丁质降解菌分别与4种植物病原真菌进行对峙培养，抑菌结果显示，3株*Bacillus*、1株*Cytobacillus*和1株*Streptomyces*表现出不同程度的抑菌效果(图3和表7)，具体表现为植物病原真菌菌丝无法在几丁质降解菌菌落周围生长，从而形成大小不一的抑菌圈，抑菌总阳性率为17.86%。其中菌株C157对植物病原真菌C1(*Boeremia exigua*)和C4(腐皮镰刀菌, *Fusarium solani*)均表现出显著的抑制活性(抑菌圈直径>10.00 mm)，对其余2种植物病原真菌也表现出一定的抑制活性(抑菌圈直径<10.00 mm)；菌株C81-1对植物病原真菌C1(*Boeremia exigua*)表现出显著的抑制活性，对其余3种植物病原真菌也具有一定的抑制活性；菌株C202对4种植物病原真菌均表现

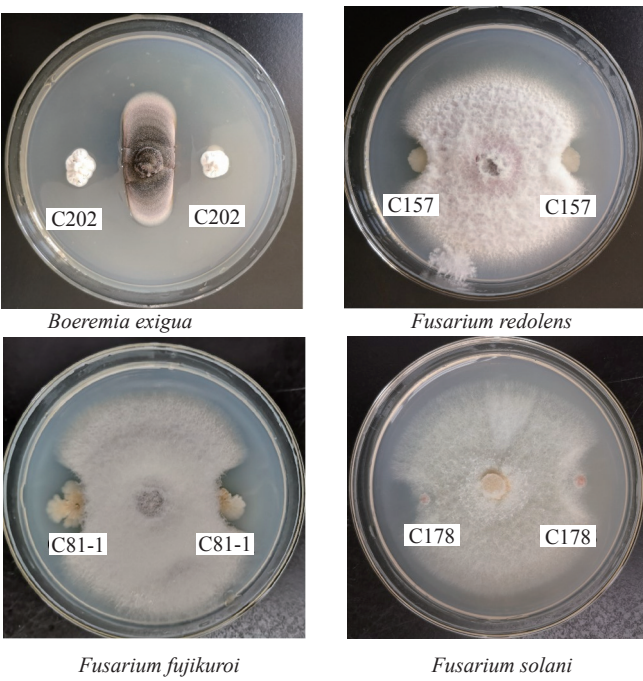


图3 部分几丁质降解菌对植物病原真菌的抑制效果  
Fig. 3 Inhibitory effect of the chitin-degrading strains against the plant-pathogenic fungi

表7 5株抑菌活性菌株初筛结果  
Tab. 7 Preliminary screening result of antifungal activity of the 5 strains

菌株	近缘菌种	植物病原真菌			
		C1	C2	C3	C4
C63	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	+	+	+	+
C81-1	<i>Bacillus siamensis</i>	++	+	+	+
C157	<i>Bacillus wiedmannii</i>	++	+	+	++
C178	<i>Cytobacillus kochii</i>	+	+	+	+
C202	<i>Streptomyces yanii</i>	+++	++	++	++

C1: *Boeremia exigua*; C2: 芬芳镰刀菌*Fusarium redolens*; C3: 藤黑镰孢菌*Fusarium fujikuroi*; C4: 腐皮镰刀菌*Fusarium solani*。抑菌圈直径(mm)表示抑菌活性，+：<10mm；++：10~20mm；+++：20~30mm；-：无抑菌作用

出显著的抑制活性；菌株C63和C178对4种植物病原真菌均具有抑制活性，但抑制作用稍弱。

2.4 PKS和NRPS基因的检测结果

聚酮化合物和非核糖体肽是微生物产生的重要次级代谢产物，具有抗氧化、抗肿瘤、抗菌活性等功效<sup>[24-25]</sup>。抑菌活性结果表明仅有5株几丁质降解菌对植物病原真菌有抑制活性，为进一步评价28株几丁质降解菌的次级代谢产物生物合成潜能，开展了次级代谢产物聚酮化合物合成酶(PKS)基因和非核糖体肽合成酶(NRPS)基因的PCR检测。PKS和NPRS基因扩增及电泳检测结果显示，17株几丁质降解菌扩增出了1条以上目的条带，其中，3株检测到PKS I



基因, 15株检测到PSK II 基因, 1株检测到NRPS基因。5株具有抗植物病原真菌活性的菌株中只有C202检测到PKS I 和PSK II 基因, 其余菌株未检测到次级代谢产物生物合成基因, 研究结果见表8。

表8 PKS 和NRPS生物合成基因在17株细菌中的分布  
Tab. 8 Distributions of PKS I, PKSII and NRPS genes in 17 strains

供试菌株	次级代谢产物生物合成基因			供试菌株	次级代谢产物生物合成基因		
	PKS I	PSK II	NRPS		PKS I	PSK II	NRPS
C07	+	+	-	C59-3	-	+	-
C30	-	-	-	C15-3	-	+	-
C02-1	-	+	-	C502	-	+	-
C202	+	+	-	C47-2	-	+	-
C26	-	+	-	C142	-	+	-
C37	-	+	-	C87	-	+	-
C21	-	+	-	C170	-	+	-
C09	+	-	+	C08	-	+	-
C48	-	+	-				

“+”：检测出目的条带；“-”：未检测出目的条带

3 结果与讨论

在自然界中存在大量的几丁质酶产生菌, 已报道的降解几丁质的海洋微生物主要为细菌和放线菌, 包括弧菌属 (*Vibrio*)<sup>[8]</sup>、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)<sup>[26-27]</sup>, 链霉菌属(*Streptomyces*)<sup>[28]</sup>, 微球菌属(*Micrococcus*)<sup>[29]</sup>, 假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)<sup>[30-31]</sup>, 希瓦菌属(*Shewanella*)<sup>[32-33]</sup>, 不动杆菌属(*Acinetobacter*)<sup>[34]</sup>, 芽胞杆菌属 (*Bacillus*)<sup>[35]</sup>, 产微球茎菌属(*Microbulbifer*)<sup>[36-37]</sup>等。目前, 普遍采用透明圈观察法<sup>[38]</sup>筛选几丁质酶产生菌, 胶体几丁质平板呈乳白色半透明状态, 微生物产生的几丁质酶催化几丁质的 $\beta$ -(1,4)糖苷键断裂, 变成水溶性的几丁质寡糖, 菌落周围形成透明圈(图1)。本研究应用几丁质分离培养基对广西茅尾海红树林桐花树根际土壤来源的细菌进行筛选分离, 共获得28株几丁质降解菌, 隶属于10目10科的17个属, 部分菌属与前人已经研究的几丁质降解微生物重合。人类活动会对土壤中的微生物微生态环境产生影响, 刘光荣<sup>[39]</sup>的研究结果表明, 受到长期人类频繁活动的干扰, 会造成土壤微生物群落结构不稳定, 群落代谢活性减弱。本文的研究结果显示, 相距大约10公里的两个桐花树群落根际土壤的几丁质降解菌种类的分布特征存在差异, 靠近人类活动区的桐花树群落根际表层土壤的几丁质降解菌种类相对较少, 相反, 另一个采样点离人类活动区

域较远, 其表层土壤的几丁质降解菌种类相对较多, 推测与两个采样点的桐花树群落的微环境差异及周围人类的生活及生产活动相关。

本文通过平板对峙法筛选抗植物病原真菌的活性菌株, 共有5株几丁质降解菌表现出拮抗作用。其中有4株归属于芽胞杆菌科(*Bacillaceae*), 包括3株芽胞杆菌属(*Bacillus*), 1株*Cytobacillus*属, 也是主要的几丁质降解菌类群。芽胞杆菌是重要的生防菌资源微生物, 被广泛应用于土壤难溶化合物降解、植物病虫害防治等方面<sup>[40]</sup>, Essghaier等<sup>[8]</sup>发现的1株产几丁质酶的耐盐地衣芽胞杆菌能显著抑制镰刀菌属病原真菌。海洋放线菌被认为是具有巨大应用前景的生物酶资源库, 其产生的几丁质酶具有显著的抗菌活性<sup>[41]</sup>, Chenyin等<sup>[25]</sup>从链霉菌*Streptomyces alfalfae*中克隆并在大肠杆菌中表达的几丁质酶SaChiB对灰葡萄孢菌和禾谷镰刀菌等6种病原真菌具有强抑制活性, 可作为防治植物病原真菌的生物防治剂。其他细菌如弧菌属<sup>[42]</sup>和假单胞菌属(*Pseudomonas*)<sup>[43]</sup>等微生物产生的几丁质酶也被报道具有拮抗致病性真菌的作用。一方面, 微生物来源的几丁质酶可以削弱和降解许多害虫和病原体的细胞壁, 从而表现出抗细菌、抗真菌、杀虫或杀线虫的活性<sup>[44-45]</sup>, 在农业生物防治方面具备应用潜力; 另一方面, 经过几丁质酶处理制备获得的几丁寡糖、N-乙酰氨基葡萄糖及其各类衍生物, 具有抗真菌、降血脂、抗肿瘤等多种功能, 在农业、医药等行业应用广泛<sup>[46]</sup>。

微生物PKS型和NRPS型生物合成基因编码的聚酮化合物合成酶(polyketide synthetases, 简称PKSs)和非核糖体肽合成酶(nonribosomal peptide synthetases, 简称NRPSs)分别催化合成聚酮化合物和非核糖体肽, 这两大类次级代谢产物具有抗氧化、抗肿瘤、抗菌等生物活性<sup>[24-25]</sup>, 常被用作抗生素、抗癌制剂和免疫抑制剂等<sup>[47]</sup>。17株几丁质降解菌检测到PKS型和/或NRPS型生物合成基因, 但只有菌株C202表现出显著的抗植物病原真菌活性, C202的抗菌活性可能是PKS型生物合成基因表达并合成的聚酮化合物的作用, 也可能是其所分泌几丁质酶的降解作用, 还有可能是两种因素的协同作用, 其抗菌机理有待进一步深入研究。其余16株未表现出抗菌活性, 究其原因, 可能是菌株在植物病原真菌培养基(PDA)上培养, 大部分细菌的基因簇是沉默的, 也可能是这些细菌产生的活性物质产物产量太低无



法达到抑制效果,抑或是这些微生物合成的活性物质无法抑制文中所述的4种植物病原真菌的生长。此外,菌株C63、C81-1、C157和C178对4种植物病原真菌均具有拮抗作用,但未检测到上述的3类生物合成基因,推测其抑菌活性可能与其菌株产生的几丁质酶有关。

红树林特殊的生态环境,蕴藏着丰富的微生物资源,栖息其中的微生物物种、遗传和功能多样性有待挖掘,本论文不仅对红树林根际土壤产几丁质酶的微生物资源进行探索,也开展了抗植物病原真菌生物农业的研究,相关研究结果对几丁质的资源化利用和新型生物农药发现提供了参考,也为今后实现海洋微生物资源的高赋值开发利用提供了研究基础。

### 参考文献

- [1] Hou F, Ma X, Fan L, *et al.* Activation and conformational changes of chitinase induced by ultrasound[J]. *Food Chem*, 2019, 285: 355-362.
- [2] Nagpure A, Bharti C, Gupta R K. Chitinases: In agriculture and human healthcare[J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2013, 34(3): 215-232.
- [3] Dhillon G S, Kaur S, Brar S K, *et al.* Green synthesis approach: Extraction of chitosan from fungus mycelia[J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2013, 33(4): 379-403.
- [4] Santos V P, Marques N S S, Maia P, *et al.* Seafood waste as attractive source of chitin and chitosan production and their applications[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(12): 1-17.
- [5] Reyhan I, Ozlem K E. Novel food packaging systems with natural antimicrobial agents[J]. *J Food Sci Technol*, 2015, 52(10): 6095-6111.
- [6] Romanazzi G, Feliziani E, Banos S B, *et al.* Shelf life extension of fresh fruit and vegetables by chitosan treatment[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2017, 57(3): 579-601.
- [7] Chen J K, Shen C R, Liu C L. N-acetylglucosamine: Production and applications[J]. *Mar Drugs*, 2010, 8(9): 2493-2516.
- [8] Essghaier B, Zouaoui O M, Najjari A, *et al.* Potentialities and characterization of an antifungal chitinase produced by a halotolerant *Bacillus licheniformis*[J]. *Curr Microbiol*, 2021, 78(2): 513-521.
- [9] Zhang J Z, Kopparapu N K, Yan Q J, *et al.* Purification and characterisation of a novel chitinase from persimmon (*Diospyros kaki*) with antifungal activity[J]. *Food Chem*, 138 (2-3):1225-1232.
- [10] Singh A, Kirubakaran S I, Sakthivel N. Heterologous expression of new antifungal chitinase from wheat[J]. *Protein Expr Purif*, 2007, 56(1): 100-109.
- [11] Dehestani A, Kazemitabar K, Ahmadian G, *et al.* Chitinolytic and antifungal activity of a *Bacillus pumilus* chitinase expressed in *Arabidopsis*[J]. *Biotechnol Lett*, 2010, 32(4): 539-546.
- [12] Gomaa E Z. Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: Their potential in antifungal biocontrol[J]. *J Microbiol*, 2012, 50(1): 103-111.
- [13] Suganthi M, Senthilkumar P, Arvinth S, *et al.* Chitinase from *Pseudomonas fluorescens* and its insecticidal activity against *helopeltis theivora*[J]. *J Gen Appl Microbiol*, 2017, 63(4): 222-227.
- [14] 姜明国, 甘光华, 杨立芳, 等. 广西红树林根际土壤放线菌的原位培养分离及其活性筛选[J]. *海洋学报*, 2015, 37 (2): 55-64.
- [15] 吴家法, 吴思婷, 李智鸣, 等. 茅尾海红树林土壤可培养放线菌多样性及其抗尖孢镰刀菌活性分析[J]. *中国抗生素杂志*, 2017, 42 (4): 294-301.
- [16] 郑红芸, 吴越, 叶景静, 等. 广西茅尾海红树林根围淤泥放线菌多样性及抗菌活性[J]. *中国抗生素杂志*, 2019, 44 (9): 1020-1028.
- [17] Subramanian K, Sadiappan B, Aruni W, *et al.* Bioconversion of chitin and concomitant production of chitinase and N-acetylglucosamine by novel *Achromobacter xylosoxidans* isolated from shrimp waste disposal area[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 11898.
- [18] 丁志雯, 刘耀东, 黄志发, 等. 产几丁质酶海洋细菌 *Dyadobacter* sp. CZW019的筛选、鉴定及酶学性质研究[J]. *江苏海洋大学学报(自然科学版)*, 2021, 30 (2): 22-29.
- [19] 张玉琴, 李文均, 陈国忠, 等. PCR法快速识别 *Actinobacteria* 的五种模板制备方法的比较[J]. *生物技术*, 2004, (5): 37-39.
- [20] 周双清, 黄小龙, 黄东益, 等. Chelex-100快速提取放线菌DNA作为PCR扩增模板[J]. *生物技术通报*, 2010, (2): 123-125.
- [21] 王海强, 安向向, 侯淑芬, 等. 39株内生放线菌次级代谢产物的合成潜能[J]. *河北大学学报(自然科学版)*, 2017, 37 (3): 254-261.
- [22] Ayuso-Sacido A, Genilloud O. New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in Actinomycetes: Detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups[J]. *Microb Ecol*, 2005, 49(1): 10-24.
- [23] Mikko M K, Virpi S, Laura H, *et al.* An efficient approach for screening minimal PKS genes from *Streptomyces*[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1999, 180(1): 1-6.
- [24] 毛馨, 张桂真, 曲劲尧, 等. 芽孢杆菌中新型非核糖体肽类抗菌活性物质的发掘、分离鉴定及特性研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2020, 47(12): 4093-4102.
- [25] 庞子萱, 吴季恒, 严豪, 等. 聚酮类化合物研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(6): 316-326.

- [26] Vaidya R, Roy S, Macmil S, *et al.* Purification and characterization of chitinase from *Alcaligenes xylosoxydans* [J]. *Biotechnol Lett*, 2003, 25(9): 715-717.
- [27] 张瑶心, 王亮节, 郑文, 等. 产几丁质酶的无色杆菌ZWW8的发酵产酶及酶学性质研究[J]. *生物技术通报*, 2021, 37(4): 96-106.
- [28] Lv C Y, Gu T Y, Ma R, *et al.* Biochemical characterization of a GH19 chitinase from *Streptomyces alfalfae* and its applications in crystalline chitin conversion and biocontrol[J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 167: 193-201.
- [29] Annamalai N, Giji S, Arumugam M, *et al.* Purification and characterization of chitinase from *Micrococcus* sp. AG84 isolated from marine environment[J]. *Afr J Microbiol Res*, 2010, 4(24): 2822-2827.
- [30] 王艳君. 海洋假交替单胞菌属细菌降解几丁质的特性及新型几丁质酶的表征[D]. 济南: 山东大学, 2020.
- [31] Wang X H, Zhao Y, Tan H D, *et al.* Characterisation of a chitinase from *Pseudoalteromonas* sp. DL-6, a marine psychrophilic bacterium[J]. *Int J Biol Macromol*, 2014, 70: 455-462.
- [32] Raimundo I, Silva R, Meunier L, *et al.* Functional metagenomics reveals differential chitin degradation and utilization features across free-living and host-associated marine microbiomes[J]. *Microbiome*, 2021, 9(1): 1-20.
- [33] Zou Y, Robbens J, Heyndrickx M, *et al.* Quantification of extracellular proteases and chitinases from marine bacteria[J]. *Curr Microbiol*, 2020, 77(12): 3927-3936.
- [34] Krithika S, Chinnachamy C. Isolation, screening, and characterization of chitinase producing bacteria from marine wastes[J]. *Int J Pharm Pharm Sci*, 2016, 8(5): 34-36.
- [35] Wang D, Li A J, Han H Y, *et al.* A potent chitinase from *Bacillus subtilis* for the efficient bioconversion of chitin-containing wastes[J]. *Int J of Biolomol*, 2018, 116: 863-868.
- [36] Lee H J, Lee Y S, Choi Y L. Cloning, purification, and characterization of an organic solvent-tolerant chitinase, MtCh509, from *Microbulbifer* thermotolerans DAU221[J]. *Biotechnol Biofuels*, 2018, 11: 303.
- [37] Li R K, Hu Y J, He Y J, *et al.* A thermophilic chitinase 1602 from the marine bacterium *Microbulbifer* sp. BN3 and its high-level expression in *Pichia pastoris*[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2021, 68(5): 1076-1085.
- [38] 金香. 几丁质降解菌的筛选、鉴定及酶学特性的研究[D]. 哈尔滨, 哈尔滨工业大学, 2007.
- [39] 刘光荣. 旅游干扰对庐山风景区微生物多样性的影响[J]. *山东农业大学学报(自然科学版)*, 2015, 46(2): 274-279.
- [40] 王海琪, 潘文, 项炯华. 厦门凤林红树林区土壤可培养微生物数量及细菌类群初探[J]. *集美大学学报(自然科学版)*, 2011, 16(5): 352-358.
- [41] Karthik N, Biond P, Pandey A. Purification and characterisation of an acidic and antifungal chitinase produced by a *Streptomyces* sp[J]. *Bioresour Technol*, 2015, 188: 195-201.
- [42] 刘英. 霍乱弧菌几丁质酶VC1073、VCA0027与VC1952的功能研究[D]. 山东大学, 2018.
- [43] Liu K Z, Ding H T, Yu Y, *et al.* A cold-adapted chitinase-producing bacterium from antarctica and its potential in biocontrol of plant pathogenic fungi[J]. *Mar Drugs*, 2019, 17(12): 695.
- [44] Edreva A. Pathogenesis-related proteins: Research progress in the last 15 years[J]. *Gen Appl Plant Physiol*, 2005, 31(1-2), 105-124.
- [45] Konno K, Mitsunashi W. The peritrophic membrane as a target of proteins that play important roles in plant defense and microbial attack[J]. *J Insect Physiol*, 2019, 117: 103912.
- [46] 张新月, 张月琪, 王凤彪, 等. 海洋细菌来源几丁质酶的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(22): 383-389.
- [47] Walsh C T. Polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: Modularity and versatility[J]. *Science*, 2004, 303(5665): 1805-1810.