

3 株芽孢杆菌的分离鉴定及其促生效果研究

郭真, 陈倩倩, 陆星, 田江, 彭桂香*, 梁翠月 (华南农业大学资源环境学院/根系生物学研究中心, 广东广州 510642)

摘要 [目的]获得安全高效的微生物肥料备用菌种。[方法]分别从贵州石漠化土壤和广东水稻土中分离得到3株芽孢杆菌, 对其进行16S rRNA序列分析鉴定种属, 分析其形态学和其他生理生化特性, 采用大豆盆栽试验进行促生功能研究。[结果]16S rRNA基因序列分析结果显示, 菌株RL1和Y26与沙佛芽孢杆菌(*Bacillus safensis*)、P90与阿氏芽孢杆菌(*Bacillus aryabhattai*)的系统发育相似性最高。生理生化特征显示, 3株芽孢杆菌均具有不同程度地解磷、泌氢以及产吲哚-3-乙酸的能力。其中, RL1的解磷能力和泌氢能力均显著高于其他2个菌株。在盆栽试验中接种这3株菌株均提高了大豆植株的生物量和磷含量。在正常磷条件下, 促生效果RL1>P90>Y26。其中, 与不接种处理相比, RL1处理条件下大豆地上部干重、根系干重、地上部磷含量和根系磷含量分别增加了68.32%、40.38%、48.29%和57.33%。钙磷处理条件下, 促生效果P90>Y26>RL1。其中, 与不接种处理相比, 接种菌株P90条件下, 大豆植株的地上部干重、根系干重、地上部磷含量和根系磷含量分别提高了64.2%、48.21%、39.77%和73.62%。[结论]该研究所分离的3株菌株在促进作物生长方面均具有一定的应用潜力, 可为微生物肥料的研制提供优质的菌种资源。

关键词 芽孢杆菌; 解磷; 吲哚-3-乙酸; 促生; 大豆

中图分类号 S154.3 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)18-0126-06

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.18.032



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Isolation, Identification and Growth Promoting Effect of Three *Bacillus* Strains

GUO Zhen, CHEN Qian-qian, LU Xing et al (Root Biology Center/College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642)

Abstract [Objective] To obtain safe and efficient microbes for microbial fertilizers production. [Method] Three *Bacillus* strains, which isolated from rocky desert soil in Guizhou and paddy soil in Guangdong, were characterized at morphological, physiological, biochemical and molecular biological level. Their growth-promotion effects were investigated. [Result] The 16S rRNA sequence analysis showed that RL1 and Y26 belonged to *Bacillus safensis*, while P90 belonged to *Bacillus aryabhattai*. All the three *Bacillus* strains were able to remobilize sparingly soluble phosphorus, secrete H⁺, and produce indole-3-acetic acid. Among them, RL1 had the strongest capacity for phosphate remobilization and H⁺ secretion. The pot experiment showed that inoculation of all the three strains could increase the biomass and phosphorus content of soybean plants. Moreover, the growth-promotion effect of RL1 on soybeans was the strongest under normal phosphorus condition. Compared to the non-inoculation control, inoculation of RL1 increased the soybean shoot dry weight, root dry weight, shoot phosphorus content and root phosphorus content by 68.32%, 40.38%, 48.29% and 57.33%, respectively. However, under tricalcium phosphorus condition, the growth-promotion effect of P90 was the strongest. Compared to the non-inoculation control, inoculation of P90 increased the shoot dry weight, root dry weight, shoot phosphorus content and root phosphorus content by 64.2%, 48.21%, 39.77% and 73.62%, respectively. [Conclusion] The three strains all had application potential in plant growth promotion and they could provide high-quality microbes resources for the development of microbial fertilizers.

Key words *Bacillus*; Phosphate solubilization; Indole-3-acetic acid; Promoting growth; Soybean

随着人口的增加,人们对农产品安全及产量的需求也逐渐加大。化肥作为农业生产的基础,在促进粮食增产方面起着至关重要的作用,但近几十年来肥料的过量施用已导致我国农业投入产出比明显降低,甚至造成农业生态环境的严重污染^[1]。为了维持农业的可持续发展,人们对新型农用肥料的需求呈上升趋势。而微生物在土壤改良和农作物增产等方面的重要作用已逐渐为人们所认识。目前,利用促生菌、根瘤菌、菌根真菌等有益微生物作为主体的新兴微生物肥料,已在农业生产上得到广泛应用,在推动我国绿色农业方面发挥不可估量的作用^[2]。

其中,促生菌(plant growth-promoting bacteria, PGPB)是一类通过复杂的直接或间接机制促进植物生长发育、防治病虫害的一类微生物^[3],促生菌在农业生产上能够活化土壤养分,帮助作物抵御疾病,促进作物的生长繁殖,其作用机理主要包括调节植物激素(如产ACC脱氨酶、分泌吲哚乙酸、赤

霉素等),活化土壤养分(溶磷、解钾以及固氮),调控次生代谢物的释放以及病原体的防治等^[4-6]。目前发现芽孢杆菌、青霉菌、假单胞菌及根瘤菌属等均有促进植物生长的作用^[7-9]。其中芽孢杆菌在农业生产上是利用较多的一类促生菌^[10]。Azaroual等^[11]研究发现,在小麦根际接种2种不同的芽孢杆菌,均能有效溶解土壤中的难溶性磷,提高了小麦对磷的利用,从而促进其生长发育。刘鲁峰等^[12]发现在根际接种内生枯草芽孢杆菌后,甘蔗的根系长度、活力和生物量等指标均显著高于不接种对照。这些研究表明,某些芽孢杆菌能够显著促进植物生长,且其对植物的促生作用机理不同。因此,解析芽孢杆菌促进植物生长的机理对于充分利用芽孢杆菌资源具有重要指导意义。

20世纪80年代以来,我国微生物肥料产业发展迅速,规模逐渐增加,工业化及生产水平不断提高,推广应用范围也在逐步扩大^[13],但也存在如微生物资源保存数量不足、机理研究工作不充分、有益微生物开发利用率低等问题^[14-15]。因此,笔者从不同土壤筛选出3株芽孢杆菌,研究这3株菌株的促生和解磷功能,为农用微生物肥料的开发提供重要的菌种资源。

基金项目 广东省自然科学基金项目(2021A1515010826)。

作者简介 郭真(1995—),女,河南驻马店人,硕士研究生,研究方向:土壤微生物。*通信作者,副教授,从事土壤学研究。

收稿日期 2021-11-14

1 材料与方法

1.1 供试菌株的分离 从广东省湛江市(32°98′48.46″E、114°35′44.05″N)水稻土中分离了一株芽孢杆菌,将其命名为 RL1;从贵州省兴义市(104°54′13.02″E、24°58′17.44″N)^[16]大豆根际土壤中分离了2株芽孢杆菌,分别命名为 Y26 和 P90。

1.2 菌株的形态特征鉴定 挑取单克隆于装有液体 LB 培养基的 2 mL 离心管中,在摇床中 28 °C 180 r/min 培养至对数生长期,吸取 2 L 菌液于 LB 固体培养基,培养箱中 28 °C 下培养,并分别在 24、48、72 h 对其拍照。

将目标菌株活化后,挑取单克隆,用无菌水将其稀释成菌悬液备用。吸取 10 L 菌悬液滴将其固定在洁净的载玻片中央,在干燥后的菌膜上滴加结晶紫染色液,染色 1 min 后,用无菌水清洗多余的染色液;然后滴加碘液染色 1 min,再用清水清洗多余染色液;加 95% 乙醇,摇动玻片脱色 20~60 s,吸去多余水分,滴加番红染液复染 1 min,用水清洗,吸去多余水分,用油镜观察菌体颜色及形态。

1.3 菌株 16S rRNA 分子鉴定 微生物 DNA 的提取按照细菌 DNA 提取试剂盒所示方法提取(Omega D3350 Bacterial DNA Kit)。以上述步骤提取的 DNA 为模板,用 PCR 反应引物进行扩增。上游引物序列:5′-GTTTGATCMTGGCTCAG-3′;下游引物序列:5′-TACGGYTACCTT GTT ACGACTT -3′。PCR 反应条件:94 °C 保持 3 min;94 °C 0.5 min,54 °C 0.5 min,72 °C 2 min,35 个循环;72 °C 保持 7 min。

取 5 μL PCR 产物到 1% 琼脂糖凝胶上电泳约 20 min,将清晰条带送至天一辉远生物科技有限公司(广州)测序,所得序列在 NCBI blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 和 LPSN 基因库(<https://bacterio.net/>) 数据库中进行核苷酸序列比对,获得其同源性较高的序列,然后用 MEGA 5.2 软件对这些序列进行分析,并构建系统发育树。

1.4 微生物解磷能力测定 对菌株的解磷能力进行了定性和定量测定。定性试验:活化目标菌株后,挑取单克隆于 1 mL 液体 LB 培养基,在摇床中 28 °C、180 r/min 培养至对数生长期,用移液枪吸取 2 μL 不同浓度(1、10⁻¹、10⁻¹⁰ 和 10⁻¹⁰⁰) 菌液于无机磷固体培养基,在 28 °C 培养 21 d 后拍照观察溶磷圈。定量试验:吸取 1% 的菌液在 50 mL 无机磷培养基中,28 °C、180 r/min 培养 21 d,每 3 d 吸取 2 mL 含菌液的液体培养基,5 000 r/min 离心 3 min,取上清液用钼蓝比色法测定可溶性磷含量。对照试验 CK 为不加菌液的处理,每个处理设 4 个重复。

1.5 微生物泌氢能力测定 对菌株的产酸能力进行了定性和定量测定。在定性试验中,取单克隆接种于 1 mL 液体 LB 培养基中,28 °C、180 r/min 培养至对数生长期,将其稀释 4 个倍数(1、10⁻¹、10⁻¹⁰、10⁻¹⁰⁰),并吸取 2 μL 不同浓度的菌液于固体 PVK 改良培养基表面,在 28 °C 中培养 4、5 和 6 d 后拍照。定量试验中,取单克隆接种于 1 mL 液体 LB 培养基,28 °C、180 r/min 培养至对数生长期,吸取 1% 的菌液接种于 50 mL 无机磷培养基,28 °C、180 r/min 培养 15 d,每 3 d 吸取

2 mL 的上清液,测定 pH。对照试验 CK 为不加菌液的处理,每个处理 4 个重复。

1.6 微生物产吡啶-3-乙酸能力鉴定 挑取单克隆接种于 1 mL 液体 LB 培养基,在摇床中 28 °C、180 r/min 培养至对数生长期后,吸取 1% 的菌液接种至 50 mL King 液体培养基中,28 °C、180 r/min 培养 9 d,吸取菌液,5 000 r/min 离心 3 min,取 1 mL 上清液于 2 mL 离心管,并加入 1 mL 的 salkowski 比色液,在黑暗中静置 30 min,在 530 nm 波长下测定吸光值。以纯吡啶-3-乙酸制作标准曲线,计算培养基中的吡啶-3-乙酸含量。对照试验 CK 为不加菌液的处理,每个处理 4 个重复。

1.7 微生物其他生理生化能力鉴定 对菌株进行淀粉水解能力和 3-酮基乳糖反应等性质的鉴定。在淀粉水解能力鉴定试验中,吸取 2 μL 菌液接种于可溶性淀粉固体培养基,28 °C 恒温培养箱中培养 3 d,在培养基平板上滴加 2 mL 碘液,观察菌落周围颜色。3-酮基乳糖反应试验中,吸取 2 μL 菌液接种于乳糖酵母固体培养基,28 °C 恒温培养箱中培养 3 d 后加入本尼迪克特试剂,于室温下放置 1 h,观察菌株周围的黄色或砖红色氧化亚铜沉淀。

1.8 不同菌株对大豆生长及难溶性磷利用的影响 采用泥炭土培养方法,以大豆基因型 YC03-3 为植物材料,在正常磷和钙磷条件下设置促生菌添加试验和对照试验,每个处理设置 5 个重复。其中,正常磷处理以磷酸二氢钾为磷源,钙磷处理以磷酸三钙为磷源,磷浓度均为 0.03 mg/g(磷酸二氢钾和磷酸三钙以基肥施入)。

将基质和蛭石按照 3:1 重量混匀,添加 Hogland's 无磷营养液(pH 5.8)至湿润状态,充分混匀,装盆。挑选大小一致的大豆种子,氯气熏蒸法灭菌后,每盆播种 3 颗种子,播种 7 d 后间苗,每盆保证 1 棵植株,种植期间依据基质干湿程度定量浇蒸馏水,每 3 d 等量浇一次 Hogland's 无磷营养液。将目标芽孢杆菌接种于液体 LB 培养基中,28 °C、180 r/min 培养至 OD₆₀₀ 值 0.6,5 000 r/min 离心 5 min 后,用无菌 Hogland's 无磷营养液重悬制成菌剂。种子萌发 3、7 和 10 d 后,每盆接种 100 mL 菌剂,种子萌发 30 d 后收样。测定大豆干重、根表面积、总根长和磷含量。

1.9 数据分析 试验数据由 Microsoft Excel 2019 录入,采用 SPSS、Original 8.0 等软件对所有数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 菌株的形态鉴定 将 3 株芽孢杆菌接种于固体 LB 培养基上,于 24、48 和 72 h 对菌株形态进行观察(图 1)和鉴定(表 1)发现,3 株菌的菌落形态和菌落扩张速度不同。其中,RL1 菌落表面粗糙干燥,扁平,为乳白色;Y26 菌落表面粗糙干燥,凸起,淡黄色;P90 菌落表面平滑黏稠,凸起,浅黄色。通过革兰氏染色法染色及光学显微镜观察菌体形态,各菌株染色结果均为紫色,形状均为杆状,具有运动性,能够产生芽孢。

2.2 菌株的分子鉴定及系统发育树构建 对 3 株芽孢杆菌 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增并测序,根据 16S rRNA 核苷酸序列在 NCBI blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

和 LPSN (<https://bacterio.net/>) 数据库中进行比对分析, RL1 (登录号: MW836813) 和 Y26 (登录号: MW836139) 菌株与沙佛芽孢杆菌 (*Bacillus safensis*) 的相似性为 100%, P90 (登录号: MW836683) 与阿氏芽孢杆菌 (*Bacillus aryabhatai*) 的相似性为 100% (表 2)。

将 4 株芽孢杆菌的 16S rRNA 基因序列比对分析结果使用 MEGA 软件构建系统发育树, 结果见图 2。

2.3 芽孢杆菌的解磷能力 3 株芽孢杆菌分别接种在 PKO 固体和液体培养基上生长至 21 d。固体培养试验结果显示, 这 3 个菌株均能够分解 PKO 固体培养基中的磷酸三钙, 并形成透明的溶磷圈 (图 3A)。液体培养结果显示, 与不接种对照中的可溶性磷浓度无明显变化相比, 接种 3 株菌株的培养液中的可溶性磷含量随培养时间的延长而持续升高, 且培养 21 d 后, 菌株 RL1 培养液中的可溶性磷浓度显著高于 P90 和 Y26 (图 3B)。

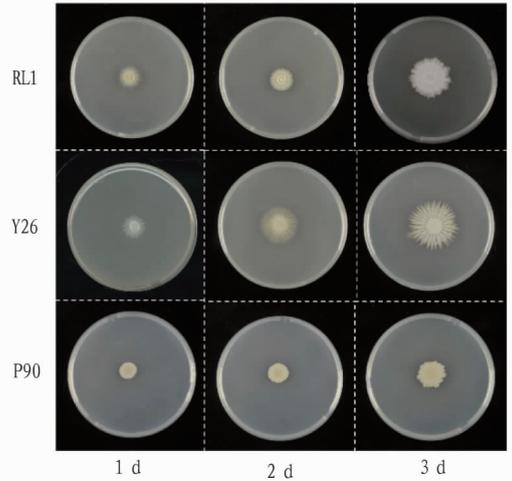


图 1 3 株芽孢杆菌菌落形态

Fig.1 Colony morphology of the three *Bacillus* strains

表 1 3 株芽孢杆菌菌落形态特征及菌体特征

Table 1 Colony morphology and bacterial characteristics of three *Bacillus* strains

菌株 Strain	菌落形状 Colony shape	表面 Surface	边缘 Edge	凸起情况 Protuberance	颜色 Colour	革兰氏染色 Gram stain	细胞形状 Cell shape	运动性 Motility	有无芽孢 Spores
RL1	不规则	粗糙干燥	放射状	扁平	乳白色	+	杆状	+	+
Y26	不规则	粗糙干燥	放射状	凸起	淡黄色	+	杆状	+	+
P90	圆形	平滑黏稠	放射状	凸起	淡黄色	+	杆状	+	+

注: “+”表示阳性反应, “-”表示阴性反应

Note: “+” stands for positive reaction, and “-” stands for negative reaction

表 2 3 株芽孢杆菌 16S rRNA 序列比对结果

Table 2 Blast assay of 16S rRNA sequences in three *Bacillus* strains

代表菌株 Representative strain	相似性最高的已知种 Known species with high similarity	相似性百分比 Similarity percentage// %
RL1	<i>Bacillus safensis</i> FO-036b	100
Y26	<i>Bacillus safensis</i> FO-036b	100
P90	<i>Bacillus aryabhatai</i> B8W22	100

2.4 芽孢杆菌的泌氢能力 通过固体和液体培养 2 种方法检测了 3 个菌株的泌氢能力。其中, 将菌株接种在 PVK 改良固体培养基上 1 d 后, 菌株周围呈明显黄色, 且随时间推移, 菌落周围的黄色逐渐加深, 说明 3 株菌株均能分泌质子酸化周围环境 (图 4A)。在 PKO 培养液中接种 3 株菌株, 其 pH 检测结果显示, 接种 3 d 后培养基的 pH 由 7.0 下降至

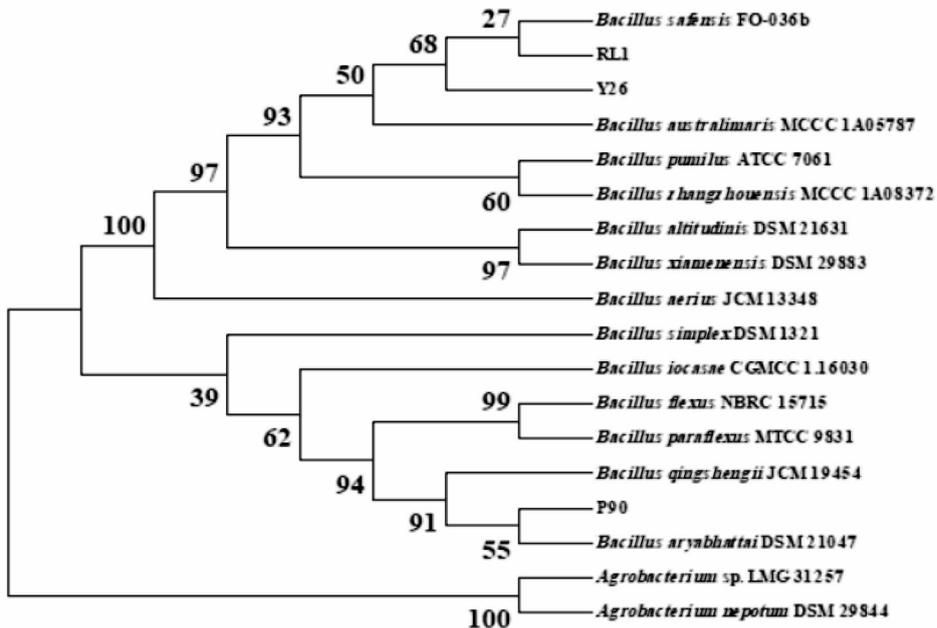
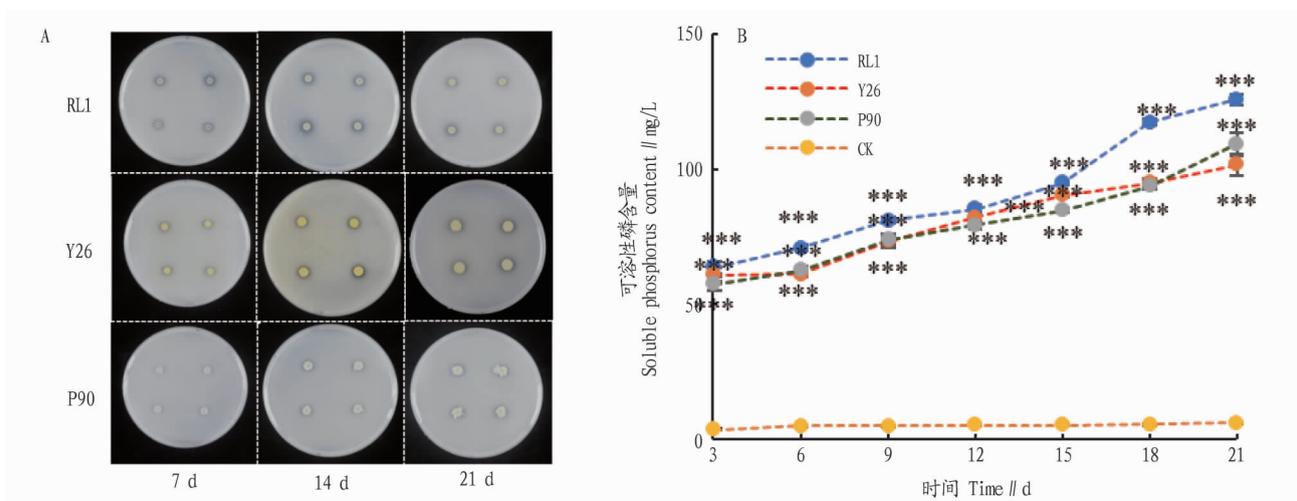


图 2 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences

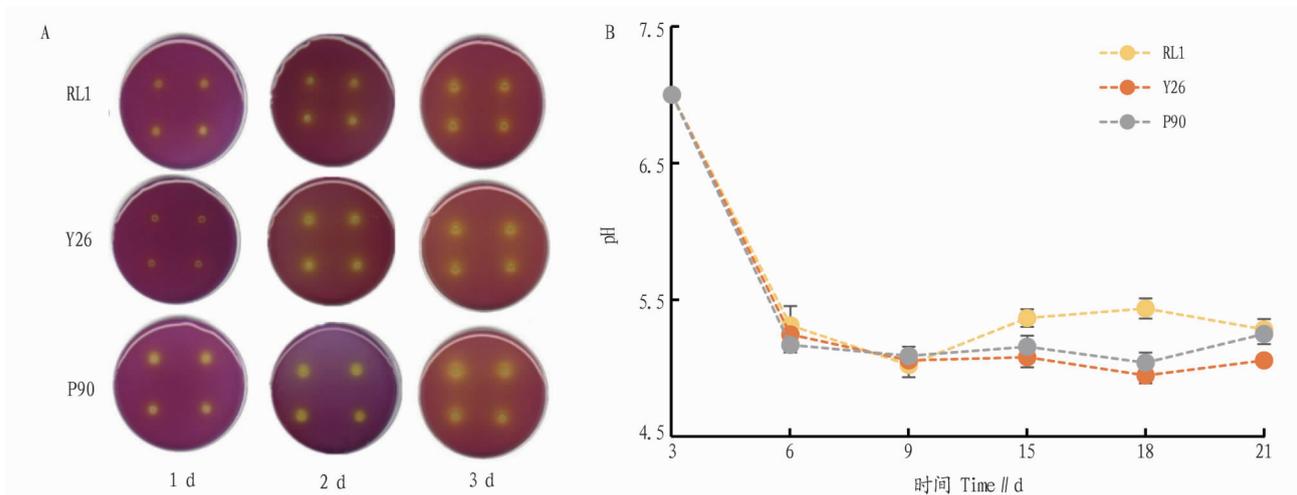


注:A.芽孢杆菌的解磷效果,4个菌斑为该微生物的4种浓度,左上、右上、左下、右下浓度依次为1、 10^{-1} 、 10^{-10} 、 10^{-100} ;B.芽孢杆菌的解磷量,“***”表示芽孢杆菌溶解磷酸三钙的量与对照组相比差异极显著($P < 0.001$)

Note:A.Determination of phosphorus solubility.The four plaque concentrations in the figure are 1, 10^{-1} , 10^{-10} and 10^{-100} (similarly hereinafter);B.Phosphate solubilization capacity of the three *Bacillus* strains,“***” indicates significant statistical differences($P < 0.001$)

图3 3株解磷菌株对难溶性钙磷的溶解能力

Fig.3 Capacity of three *Bacillus* strains in the mobilization of sparingly soluble $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Ca-P)



注:A.3株芽孢杆菌的泌 H^+ 效果;B.接种3株芽孢杆菌对培养液pH的影响

Note: A.Ability of H^+ secretion of the three *Bacillus* strains;B.The effects of three *Bacillus* strains on pH value in the growth medium

图4 3株芽孢杆菌泌氢能力

Fig.4 Capability of three *Bacillus* strains in H^+ secretion

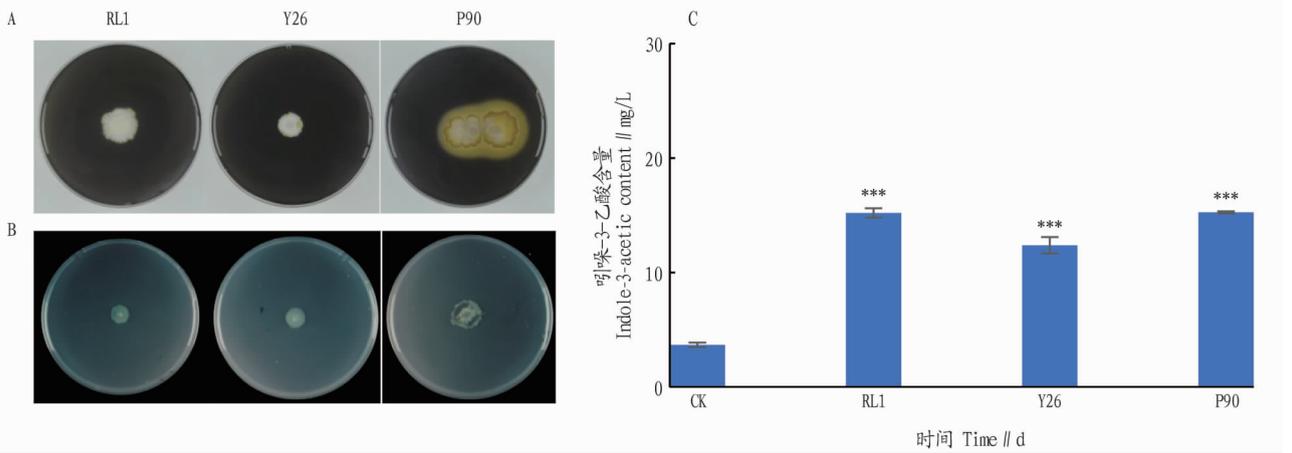
4.5~5.5,但3个菌株培养液的pH无明显差异,且3d后培养液的pH无明显变化(图4B)。

2.5 3株芽孢杆菌的其他生理生化特性 进一步分析了这3株芽孢杆菌的淀粉水解、3-酮基乳糖氧化及产吲哚-3-乙酸能力。其中,在含可溶性淀粉的固体培养基中P90菌落周围为明显黄色,说明P90具有淀粉水解能力,而RL1和Y26菌落周围无明显黄色,说明这2个菌株不具备淀粉水解能力(图5A)。在含有3-酮基乳糖的固体培养基中,3株芽孢杆菌均不能将培养基氧化成红色,说明这3个菌株均不具有氧化乳糖的能力(图5B)。

在液体King培养基中培养这3株促生菌,9d后测定培养基中的吲哚-3-乙酸含量,菌株RL1、Y26和P90均具有分

泌吲哚-3-乙酸的能力,且分泌量分别为15.21、12.40和15.40 mg/L(图5C)。

2.6 3株芽孢杆菌对大豆利用难溶性磷的影响 接种3株芽孢杆菌均显著促进了大豆植株的生长(图6A)。与不接种对照相比,正常磷条件下(HP)接种RL1、Y26和P90的大豆植株地上部干重分别增加了68.32%、50.14%和32.39%(图6B),根系干重分别增加了40.38%、19.23%和27.89%(图6C),总根长分别提高了43.78%、24.55%和43.94%(图6D),根表面积分别提高了42.28%、28.76%和57.05%(图6E),地上部磷含量分别增加了48.29%、9.50%和18.30%(图6F),而根系磷含量分别增加了57.33%、26.56%和37.51%(图6G)。

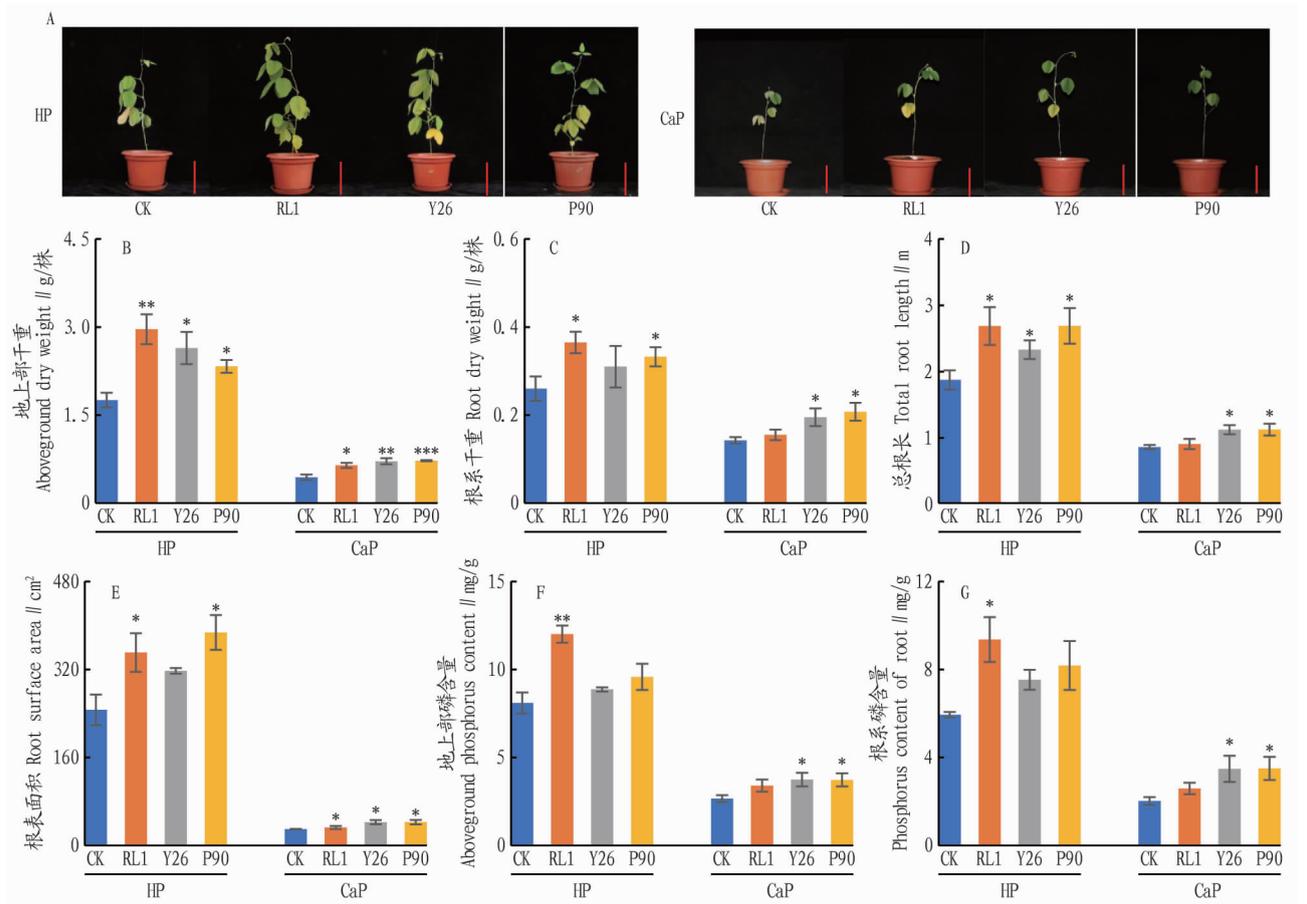


注:A.3株芽孢杆菌的淀粉水解效果;B.3株芽孢杆菌的3-酮基乳糖氧化效果;C.3株芽孢杆菌培养9 d后,培养液中吲哚-3-乙酸含量。“***”表示芽孢杆菌分泌吲哚-3-乙酸量与对照相比差异极显著($P < 0.001$)

Note:A.Starch hydrolysis ability of the three *Bacillus* strains;B.3-keto lactose oxidation of the three *Bacillus* strains;C.The concentration of IAA produced by the three *Bacillus* strains for 9 days,“***” indicates significant statistical difference($P < 0.001$)

图5 3株芽孢杆菌的淀粉水解、3-酮基乳糖氧化及产吲哚-3-乙酸能力

Fig.5 The ability of starch hydrolysis,3-keto-lactose oxidation and indole-3-acetic acid production of three *Bacillus* strains



注:A.大豆植株表型;B.植株地上部干重;C.植株根系干重;D.植株根系总根长;E.植株根表面积;F.植株地上部磷含量;G.植株根系磷含量。*表示接种芽孢杆菌与不接种对照处理相比差异显著(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)。标尺为20 cm

Note:A.Soybean phenotypes;B.Shoot dry weight;C.Root dry weight;D.Total root length;E.Root surface area;F.Phosphorus content of shoot;F. Phosphorus content of root.* indicated significant difference between inoculation and non-inoculation(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).Bar = 20 cm

图6 3株芽孢杆菌对大豆生长发育的影响

Fig.6 Effects of three *Bacillus* strains on soybean growth

与高磷处理相似,泥炭土中添加磷酸三钙(CaP)作为唯一磷源时,接种 RL1、Y26 和 P90 的大豆植株与不接种对照相比,其地上部干重分别提高了 46.02%、61.93% 和 64.2%(图 7B),根系干重分别提高了 10.71%、39.29% 和 48.21%(图 7C),总根长分别提高了 5.56%、31.08% 和 31.35%(图 7D),根表面积分别提高了 10.05%、42.02% 和 42.52%(图 7E),地上部磷含量分别增加了 27.49%、40.39% 和 39.77%(图 7F),而根系磷含量分别增加了 28.34%、72.56% 和 73.62%(图 7G)。

3 结论与讨论

微生物肥料能够活化土壤养分、改善土壤理化性质、防治土壤有害微生物、促进作物生长及改善作物品质等,因此其越来越广泛地应用于农业生产^[17-18]。微生物肥料的重要组成成分是有功功能菌。其中,促生菌定植于植物根部,通过一系列生理生化活动,提高植物对生物及非生物胁迫的耐受性,改善植物对土壤养分的吸收利用,促进作物的生长发育^[19]。鉴于微生物在农业生产上独特的社会和经济价值,加强对微生物资源的开发利用与保护,具有极其重要的意义。

微生物种群结构的变化受多种因素的驱动,其中包括气候、土壤理化性质、海拔、生态类型和人为活动等^[20-22]。我国西南喀斯特地区石漠化较为严重,植物种类、植被盖度和土壤肥力均受石漠化的制约。而土壤微生物可直接参与土壤的物质循环和能量转化,促进石漠化地区植物养分的吸收。此外,广东省湛江市位于亚热带沿海地区,土壤类型以滨海盐土和酸性土壤为主,是华南地区主要的粮食产地之一。但在酸性土壤中,磷极易被固定,导致土壤的磷有效性降低。这些特殊的地理环境,很可能孕育出具有特殊性质或新基因的微生物。因此,分离适应当地土壤及气候条件的优良菌株将对菌肥的开发和利用、维持当地农业生产的可持续发展具有重要意义。因此,该研究选取贵州省兴义市石漠化土壤,及广东省湛江市水稻土作为研究对象,从中分别筛选出 3 株不同种类的芽孢杆菌。通过 16S rRNA 基因序列比对分析发现 RL1 和 Y26 属于沙佛芽孢杆菌(*Bacillus safensis*);P90 属于阿氏芽孢杆菌(*Bacillus aryabhatai*)。这 3 株菌株虽然来自不同类型的土壤,但均具有溶解磷酸三钙、泌氢和产生吡啶-3-乙酸的能力,而 P90 还具有水解淀粉的能力。这与其他已报道的芽孢杆菌的生理生化特性类似。如柴晓虹等^[23]对 12 株不同种属的促生菌进行评价,其中蜡状芽孢杆菌和短小芽孢杆菌具有不同程度的产酸、产吡啶-3-乙酸、淀粉水解以及其他功能。烟草植株根围土壤中筛选出的巨大芽孢杆菌也具有较强的解磷和淀粉水解能力等^[23-24]。

芽孢杆菌所具有的分泌吡啶-3-乙酸和水解难溶磷的能力在农业生产中具有重要应用价值。郑文波等^[25]在江西红壤花生地中发现 1 株巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*),该菌株具有分泌吡啶-3-乙酸和解磷能力,接种该菌株后,花生植株全磷含量、根长、根尖数、根表面积及根体积均显著增加。另外,河北冀微生物肥料有限公司研发的冀微菌肥以枯草芽孢杆菌为主体,其具有分泌吡啶-3-乙酸、解磷及解钾等能力,该菌肥应用于结球白菜能够显著改善作物产量和品

质^[26]。为了验证该研究所分离的 3 株芽孢杆菌的解磷和分泌吡啶-3-乙酸的特性是否能够促进植物生长,设计了正常磷处理和钙磷 2 种处理,比较了接种和不接种条件下,大豆的生物量、根系性状和磷含量。结果显示,接种 3 株芽孢杆菌后,大豆的干重、总根长、根表面积及全磷含量与对照相比均显著提高。这说明该研究所筛选的 3 株芽孢杆菌均能够改变大豆的根系构型,提高植株利用外源难溶磷的能力。

综上所述,该研究筛选的 3 株芽孢杆菌具有解磷、泌氢和产吡啶-3-乙酸的能力。在大豆盆栽试验中,接种这 3 个菌株均能够不同程度提高大豆的干重、总根长、根表面积和磷含量。虽然这 3 个菌株在离体培养条件下其解磷、泌氢和产吡啶-3-乙酸的能力无明显差别,但接种不同菌种对大豆植株的促生效果不同,原因可能与其在植物根部的定殖效果、温度、营养来源及作物种类等有关^[27-28]。虽然这 3 个菌株的具体促生机制还有待进一步研究,但大豆盆栽试验结果表明,所筛选的菌株可作为一种高效的备选菌株,为微生物肥料的发展提供菌种资源。

参考文献

- [1] 付浩然,李婷玉,曹寒冰,等.我国化肥减量增效的驱动因素探究[J].植物营养与肥料学报,2020,26(3):561-580.
- [2] 李俊,姜昕,马鸣超,等.我国微生物肥料产业需求与技术创新[J].中国土壤与肥料,2019(2):1-5.
- [3] OLANREWAJU O S, GLICK B R, BABALOLA O O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria[J]. World journal of microbiology and biotechnology, 2017, 33(11): 197.
- [4] BUKHAT S, IMRAN A, JAVAID S, et al. Communication of plants with microbial world: Exploring the regulatory networks for PGPR mediated defense signaling[J/OL]. Microbiological research, 2020, 238[2021-04-17]. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126486>.
- [5] YOU M, FANG S M, MACDONALD J, et al. Isolation and characterization of *Burkholderia cenocepacia* CR318, a phosphate solubilizing bacterium promoting corn growth[J/OL]. Microbiological research, 2020, 233[2021-04-17]. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126395>.
- [6] LIU X X, JIANG X X, HE X Y, et al. Phosphate-solubilizing *Pseudomonas* sp. strain P34-L promotes wheat growth by colonizing the wheat rhizosphere and improving the wheat root system and soil phosphorus nutritional status[J]. Journal of plant growth regulation, 2019, 38(4): 1314-1324.
- [7] 李永斌,李云龙,美国华,等.植物根际促生菌的筛选、鉴定及其对小麦的减肥增产效果[J].农业生物技术学报,2020,28(8):1471-1476.
- [8] BANO A, UMMAT-UL-HABIB. Interactive effects of Ag-nanoparticles, salicylic acid, and plant growth promoting rhizobacteria on the physiology of wheat infected with yellow rust[J]. Journal of plant pathology, 2020, 102(4): 1215-1225.
- [9] BENIDIRE L, MADLINE A, PEREIRA S I A, et al. Synergistic effect of organo-mineral amendments and plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on the establishment of vegetation cover and amelioration of mine tailings[J/OL]. Chemosphere, 2021, 262[2021-04-17]. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127803>.
- [10] 张华勇,李振高.土壤芽孢杆菌及其资源的持续利用[J].土壤,2001,33(2):92-97.
- [11] AZAROUAL S E, HAZZOUMI Z, EL MERNISSI N, et al. Role of inorganic phosphate solubilizing bacilli isolated from Moroccan phosphate rock mine and rhizosphere soils in wheat (*Triticum aestivum* L.) phosphorus uptake[J]. Current microbiology, 2020, 77(9): 2391-2404.
- [12] 刘鲁峰,狄义宁,何丽莲,等.内生枯草芽孢杆菌 B9 促生长效果及产吡啶-3-乙酸(IAA)能力研究[J].云南农业大学学报(自然科学),2020,35(2):227-234,275.
- [13] 张瑞福.根际微生物:农业绿色发展中大有所为的植物第二基因组[J].生物技术通报,2020,36(9):1-2.
- [14] 周璇,沈欣,辛景树.我国微生物肥料行业发展状况[J].中国土壤与肥料,2020(6):293-298.

多植物种子的种子发芽率和发芽势,说明激素在促进种子萌发时有很重要的作用^[5-12]。经过低温处理的五脉绿绒蒿种子,再用 IAA、GA₃ 和 6-BA 处理,其发芽率和发芽势均比对照组有明显的提高,IAA、GA₃、6-BA 最适的处理浓度分别为 100、200、20 mg/L,其中,GA₃ 的促进作用最为明显,其发芽率可达 85%。由此可见,3 种激素对五脉绿绒蒿种子发芽有一定的促进作用,但所需浓度不同及处理后的发芽率存在一定的差异,说明他们对促进种子萌发的作用机理不同,IAA 通过调节 ATP 酶的活性来调控细胞的伸长;GA₃ 的主要作用是提高淀粉酶的活性,有利于种子萌发时所需有机物的供应;6-BA 主要是促进细胞的分裂;从这 3 种促进效率来看,GA₃ 的效果为最好,处理种子时,应该用 GA₃ 处理为主。

参考文献

- [1] 周海艺,张旭,徐畅隆,等.中国绿绒蒿属新资料[J].西北植物学报,2021,41(10):1781-1784.
[2] 张旭,周海艺,徐畅隆,等.绿绒蒿属—中国新记录种——尼东绿绒蒿

(上接第 131 页)

- [15] 曹桂林.植物根际促生菌和微生物肥料研究进展浅析[J].南方农业,2020,14(27):209-210.
[16] TIAN J H, LU X, CHEN Q Q, et al. Phosphorus fertilization affects soybean rhizosphere phosphorus dynamics and the bacterial community in karst soils[J]. Plant and soil, 2022, 475(1/2): 137-152.
[17] 郑立伟,闫洪波,张丽,等.微生物肥料发展及作用机理综述[J].河北省科学院学报,2020,37(1):61-67.
[18] 郑茗月,李海梅,赵金山,等.微生物肥料的研究现状及发展趋势[J].江西农业学报,2018,30(11):52-56.
[19] BASU A, PRASAD P, DAS S N, et al. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: Recent developments, constraints, and prospects[J]. Sustainability, 2021, 13(3): 1-20.
[20] 汪焱,张英,苏贝贝,等.高寒区不同地域燕麦根际土壤微生物多样性研究[J].草地学报,2020,28(2):358-366.

(上接第 139 页)

- [10] 刘芳舒,张瑜,罗昱,等.无籽刺梨复合果酱配方工艺技术研究[J].食品科技,2015,40(1):107-111.
[11] 尤丽新,胡楠楠,陈海燕,等.猕猴桃香蕉复合果酱的制作[J].现代食品,2017(13):89-90.
[12] 李自强,刘琴,张斌,等.低糖金雀花复合果酱的研制[J].农学学报,2016,6(4):76-79.
[13] 郭长江,杨继军.蔬菜、水果抗氧化作用的研究进展[J].中国公共卫生,2001,17(1):87-88.
[14] 孟方方.赣南六个脐橙品种果皮体外抗氧化性研究[D].南昌:江西农业大学,2012.
[15] 焦岩.大果沙棘黄酮分离纯化及生物活性研究[D].哈尔滨:东北林业大学,2010.
[16] 韩灵芝,黄军海,孟庆艳,等.大花罗布麻不同部位酚类物质含量及其抗氧化活性比较研究[J].食品科学,2014,35(13):127-131.
[17] LI W, LIANG H, ZHANG M W, et al. Phenolic profiles and antioxidant ac-

- [J/OL]. 广西植物, 2022-03-10 [2022-04-15]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1134.Q.20220309.0919.002.html>.
[3] 龚宇,周惠祯,陈胡兰.近十年绿绒蒿属药用植物的研究进展[J].中药材,2020,43(3):758-763.
[4] 周立华,黄荣福.青海植物志[M].西宁:青海人民出版社,1995:387.
[5] 韦荣昌,白隆华,董青松,等.外源激素对药用植物黑草种子萌发的影响[J].种子,2012,30(1):92-94.
[6] 刘建,王艺融,刘珂宇,等.贝利叶绿绒蒿及其两个栽培种种子萌发比较[J].北方园艺,2021(9):74-79.
[7] 左杰,张国栋,李紫倩,等.高山植物威氏绿绒蒿种子表型及萌发特性研究[J].种子,2021,40(9):8-14,149.
[8] 潘春柳,吕惠珍,彭玉德,等.外源激素处理对线叶唇柱苣苔种子萌发的影响[J].种子,2011,30(1):24-27.
[9] 李海彬,吴维,刘玉花,等.外源激素对结球芥菜种子萌发的影响[J].北方园艺,2010(10):24-27.
[10] 肖杰,薛欢,苑景洪,等.外源激素对紫薇种子萌发的影响[J].浙江农业科学,2020,61(6):1119-1122.
[11] 胡进耀,杨敬天,贺静,等.赤霉素浸种与层积时间对距瓣尾囊草种子萌发的影响[J].四川林业科技,2015,36(3):88-90.
[12] 翁春雨,任军方,符瑞侃.外源激素对紫玉盘种子萌发的影响[J].安徽农业科学,2014,42(3):10462-10463,10530.

- [21] 刘台萱,曹鹏熙,马红梅,等.青藏高原土壤微生物多样性及其影响因素研究进展[J].环境生态学,2019,1(6):1-7.
[22] WALTERS K E, MARTINY J B H. Alpha-, beta-, and gamma-diversity of bacteria varies across habitats[J]. PLoS One, 2020, 15(9): 1-17.
[23] 柴晓虹,姚佑,李录山,等.12 株植物根际促生菌促生功能稳定性评价及鉴定[J].草原与草坪,2020,40(5):68-75.
[24] 梁留阳,赵一通,张琳琳,等.烟株根围土壤解磷巨大芽孢杆菌的鉴定及其解磷能力研究[J].土壤通报,2020,51(6):1461-1466.
[25] 郑文波,申飞,闫小梅,等.红壤中产吡啶乙酸并具解磷作用的促生菌筛选鉴定及促生效果研究[J].土壤,2015,47(2):361-368.
[26] 刘虹波,乔志刚,王永铭,等.不同微生物菌肥对结球白菜产量和品质的影响[J].北方农业学报,2020,48(6):45-49.
[27] 李涛,张朝辉,郭雅雯,等.国内外微生物肥料研究进展及展望[J].江苏农业科学,2019,47(10):37-41.
[28] 孙成成,丁伟,潘兴兵,等.影响微生物菌剂应用稳定性的因素分析[J].植物医生,2019,32(4):19-23.

- itivity of Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit pericarp from different commercially available cultivars[J]. Molecules, 2012, 17(12): 14954-14967.
[18] 马力,徐楚鸿,黄煜,等.硫酸苯酚法测定金菊花中多糖的含量[J].医药导报,2008,27(12):1511.
[19] 高蓓.广陈皮黄酮类化合物和挥发油成分及其活性研究[D].武汉:华中农业大学,2011.
[20] 白海娜,王振宇,刘瑞海,等.白藜芦醇与黑木耳多糖协同清除 ABTS 自由基活性的研究[J].现代食品科技,2014,30(3):64-68.
[21] RE R, PELLEGRINI N, PROTEGGENTE A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay[J]. Free radical biology and medicine, 1999, 26(9/10): 1231-1237.
[22] 陈树俊,苏静,刘诚,等.老陈醋生产过程中总多酚、总黄酮含量及清除 DPPH 自由基能力的分析[J].食品科学,2009,30(17):158-162.
[23] 徐清萍,敖宗华,陶文沂.恒顺香醋 DPPH 自由基清除活性成分研究[J].中国调味品,2004,29(7):19-23.
[24] 王恩花,杨礼寿,逯凤肖,等.二氢杨梅素体外抗氧化活性研究[J].山地农业生物学报,2016,35(3):86-90.