

邢芳芳,高明夫,胡兆平,等. 1株高产 IAA 菌株的筛选、鉴定及对白菜的促生作用[J]. 江苏农业科学,2016,44(10):458-460.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.10.132

1 株高产 IAA 菌株的筛选、鉴定及对白菜的促生作用

邢芳芳,高明夫,胡兆平,李新柱

(金正大生态工程集团股份有限公司/农业部植物营养与新型肥料创制重点实验室,山东临沂 276700)

摘要:从番茄根际采集的土壤中分离筛选得到 12 株产 IAA 的菌株,经复筛获得 1 株具有较好 IAA 生产能力的细菌,其发酵 24 h 产 IAA 水平达到 48 mg/L 以上,将其命名为 HB-1。通过对菌株 HB-1 的 16S rDNA 序列分析对该菌进行鉴定,并将菌株 HB-1 进行液体发酵扩繁,将得到的发酵液冲施白菜,试验其促生作用。结果表明,该高产 IAA 菌株为枯草芽孢杆菌。盆栽试验结果表明,菌株 HB-1 对白菜生长具有明显的促生作用,施加 HB-1 发酵液处理的叶绿素含量、叶片数均高于对照(CK);HB-1 发酵液处理的鲜质量、干质量与冲施清水的 CK 相比都增加,鲜质量增加 1.54~17.98 g,增幅达 1.16%~13.55%,差异达到显著水平,干质量增加 0.26~1.32 g,增幅达到 2.97%~14.92%。其中添加发酵液 1.0 mL/盆的处理组效果较好,叶绿素含量比 CK 高 5.02%,叶片数比 CK 高 15.78%,鲜质量较空白处理增加 17.98 g,增幅达 13.55%,差异达极显著水平,干质量平均增加 1.32 g,增幅达到 14.92%。

关键词:IAA;筛选;鉴定;枯草芽孢杆菌;促生作用

中图分类号:S144 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)09-0458-03

植物根际促生菌(plant growth promoting rhizobacteria,简称 PGPR)是指能够通过分泌有益物质直接或间接促进植物生长的细菌^[1]。产生植物激素是根际促生细菌与植物相互作用的主要机制之一。吲哚乙酸(indole 3 acetic acid,简称 IAA)是产生调节植物生长素的信号物质,是在植物体内普遍存在的生长素物质^[2]。自 1977 年科学家发现巴西固氮螺菌能合成 IAA 后,更多研究发现,土壤中约 50% 以上的细菌可

以产生 IAA^[3]。筛选具有产生 IAA 的微生物可为促生生物肥料的研究等提供出发菌株。

本研究对番茄根际产 IAA 菌株进行分离、鉴定及盆栽促生效果研究,以期对开发高效根际促生菌剂、生物肥料资源提供生物学支撑。

1 材料与方法

1.1 土壤样品

在山东省寿光市采集同一区域内生长情况良好的番茄根际范围的土壤。采样过程中,首先剥离土壤表面覆盖的凋落物,然后剔除石块等杂物,最后使用灭菌采样铲采集 10~20 cm 深的土壤样品装于灭菌袋中,带回实验室后置于 4℃ 冰箱保存,及时分离。

1.2 培养基

牛肉膏蛋白胨培养基:5.0 g 牛肉膏,10.0 g 蛋白胨,

收稿日期:2015-09-14

基金项目:山东省科技重大专项(新兴产业)(编号:2015ZDX0502B02)。

作者简介:邢芳芳(1982—),女,山东临沂人,硕士研究生,工程师,主要从事新型肥料研发及其施肥研究。Tel:(0539)7198803;E-mail:xingfangfang@kingenta.com。

通信作者:李新柱,博士研究生,工程师,主要从事新型肥料研发及其施肥研究。Tel:(0539)7198803;E-mail:lixinzu@kingenta.com。

[6] Venil C K, Zakaria Z A, Ahmad W A. Bacterial pigments and their applications[J]. Process Biochemistry, 2013, 48(7):1065-1079.

[7] Bae J, Moon H, Oh K K, et al. A novel bioreactor with an internal adsorbent for integrated fermentation and recovery of prodigiosin-like pigment produced from *Serratia* sp. KH-95[J]. Biotechnology Letters, 2001, 23(16):1315-1319.

[8] 张爱梅,牛世全,达文燕,等. 一株产绿色素放线菌的初步鉴定及其色素稳定性的检测[J]. 西北师范大学学报:自然科学版, 2010, 46(3):89-93.

[9] Velmurugan P, Kamala-Kannan S, Balachandrar V, et al. Natural pigment extraction from five filamentous fungi for industrial applications and dyeing of leather[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 79(2):262-268.

[10] Moselio S. Encyclopedia of microbiology[M]. Third edition. San Diego California: Academic Press, 2009:457.

[11] 张和春,季文明,王武. 天蓝色链霉菌产蓝色素的工业化培养基优化[J]. 无锡轻工大学学报, 2000, 19(2):138-141.

[12] 李一苇. 产蓝色素链霉菌的鉴定和蓝色素发酵条件及性质的研究[D]. 合肥:安徽农业大学, 2008.

[13] 沈萍,陈向东. 微生物学实验[M]. 4版. 北京:科学出版社, 2007:15-20.

[14] 全桂静,孙海娟. 蓝色素的发酵条件和特性的研究[J]. 中国食品添加剂, 2012(6):128-133.

[15] 姚汝华,周世水. 微生物工程工艺原理[M]. 2版. 广州:华南理工大学出版社, 2005:204-206.

[16] 范维,韦默池,徐建静,等. 产蓝色素细菌发酵条件的优化[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(11):346-348.

[17] 陆玲,孙延涛,唐勇,等. 一种放线菌发酵产天然蓝色素的研究[J]. 微生物学通报, 2001, 28(4):149-155.

[18] 李云雁,胡传荣. 试验设计与数据处理[M]. 2版. 北京:化学工业出版社, 2008:124-159.

5.0 g NaCl, 20.0 g 琼脂, 加蒸馏水定容至 1 000 mL, 调节 pH 值为 7.0~7.2, 10 000 Pa 灭菌 30 min。

LB 液体培养基^[4]: 10.0 g 胰蛋白胨, 5.0 g 酵母提取物, 10.0 g NaCl, pH 值 7.4, 灭菌后用细菌过滤器加入 L-色氨酸至浓度 100 mg/L。

1.3 仪器和试剂

主要仪器: Ultimate 3000 高效液相色谱仪(美国 Thermo Fisher)、紫外检测器 VWD-3100(美国 Thermo Fisher)、恒温振荡摇床 ZHTY-70(上海知楚仪器有限公司)、电热恒温培养箱 BPX-272(上海博迅医疗生物仪器股份有限公司)。

主要试剂: Salkowski 显色液^[5], 50 mL 35% HClO₄ + 1 mL 0.5 mol/L FeCl₃; IAA 标准品; Sigma 公司提供的 HPLC 试剂。

1.4 菌株的分离

称取土壤样品 10 g, 加入带玻璃珠并装有 100 mL 无菌水的 250 mL 锥形瓶中, 振荡 20 min, 静置 10 min 形成浓度为 0.1 g/mL 菌悬液, 对此菌悬液进行稀释, 依次得到 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴ g/mL 等浓度的菌悬液。用稀释平板法在牛肉膏蛋白胨培养基中分离其中的细菌, 将分离所得菌株经过纯化转接到牛肉膏蛋白胨培养基的试管斜面, 保存于 4 ℃ 冰箱中。

1.5 产 IAA 菌株的筛选

1.5.1 产 IAA 菌株的初筛 将分离纯化后的菌株接种于 L-色氨酸浓度为 100 mg/L 的 LB 液体培养基中, 30 ℃、180 r/min 条件下摇床培养 24 h。取 50 μL 菌悬液滴于白色陶瓷板上, 同时加入等量 Salkowski 显色液进行显色反应, 以加入 50 μL 培养基作为阴性对照。白色陶瓷板于室温、避光条件下放置 30 min 后观察, 颜色变红者表示能够产 IAA。颜色越深, 表示分泌的量越大, 不变色为阴性, 表示不能分泌 IAA。

1.5.2 定量复筛

1.5.2.1 IAA 标准液及标准曲线的制备 标准液的制备: 准确称取 IAA (精确至 0.001 mg) 用流动相定容, 并进行超声处理数秒钟使其充分溶解, 转移到棕色试剂瓶中, 置于 4 ℃ 冰箱备用。

制备具有一定浓度梯度的不同 IAA 溶液, 按照所选择的色谱条件进样 20 μL, 获得不同浓度时 IAA 的峰面积。根据峰面积(y)和对应的 IAA 标准品浓度(x, mg/kg)绘制标准曲线, 并得出线性方程、相关系数。

1.5.2.2 菌液中 IAA 浓度的测定 活化待测菌株, 接种于 LB 液体培养基中, 培养 24 h 后取出, 8 000 r/min 离心 15 min, 然后取各上清液过微孔滤膜, 待仪器稳定后, 用微量进样器进样, 进样量为 20 μL。根据标样中各组分的保留时间确定样品中的 IAA 组分, 并根据峰面积计算 IAA 含量。

1.6 产 IAA 菌株白菜盆栽试验

1.6.1 试验时间、地点 试验于 2015 年 1—3 月在山东金正大生态工程集团股份有限公司研发中心的智能玻璃温室中进行。

1.6.2 试验材料 供试白菜 (*Brassica campestris* L.) 品种为苏州青, 种子由山东昌邑市蔬菜研究所提供; 供试底肥为氮: 磷: 钾 = 15: 15: 15 的硝基复混肥; 供试土壤为棕壤, 有机质含量 12.3 g/kg。

1.6.3 试验设计 试验共 5 个处理(表 1), 每个处理 4 盆,

每盆装土 5 kg, 硝基复混肥作为底肥 1 次性施入土壤, 每盆施入 1.33 g。白菜 2 叶 1 心时间苗, 每盆保留生长一致、均匀分布的 4 株作为试验株, 管理措施一致。空白组接种清水为对照(CK₁), 处理组接种菌株的发酵液(10⁸ CFU/mL)。处理 1 在盆栽中接种 0.5 mL 灭活菌株发酵液(T₁), 处理 2 接种 0.5 mL 未灭活菌株发酵液(T₂), 处理 3 在盆栽中接种 1.0 mL 灭活菌株发酵液(T₃), 处理 4 接种 1.0 mL 未灭活菌株发酵液(T₄)。每组设 4 个重复试验, 重复接种 2 次, 间隔为 15 d, 其间适时定量浇水, 试验周期 58 d。收获时测定叶片 SPAD 值、叶片数和鲜质量、干质量^[6-7]。

表 1 试验处理编号及用量

处理号	施加物类别	施用量 (mL/盆)
CK	清水	
T ₁	灭活发酵液	0.5
T ₂	发酵液	0.5
T ₃	灭活发酵液	1.0
T ₄	发酵液	1.0

1.6.4 叶片数、生理指标测定 叶片数的统计只选择绿色可食用部分; SPAD 值测定采用 SPAD-502Plus 型叶绿素仪; 干质量测定按常规方法进行^[8]。

1.6.5 数据分析 试验数据采用 Excel 进行处理, 利用 SPSS 16.0 软件进行数据统计及差异显著性分析。

1.7 16SrDNA 序列分析鉴定

IAA 产生细菌 16S rDNA PCR 扩增参考谢永丽等的方法^[9]。将 16S rDNA 扩增产物回收纯化后测序, 测序所得序列通过 NCBI 数据库进行 BLAST 比对。

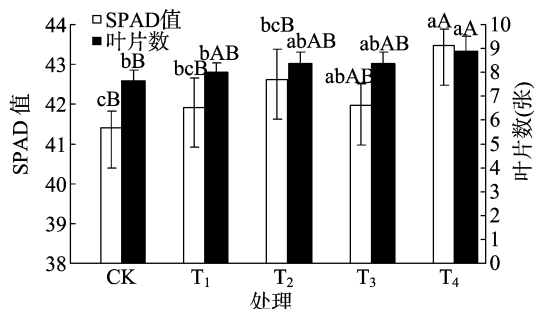
2 结果与分析

2.1 产 IAA 细菌的分离和筛选

分离纯化得到细菌共计 38 株, 初筛 12 株产 IAA 的菌株, 经过定性初筛和定量复筛, 获得 1 株具有较好的产 IAA 能力的细菌, 其发酵 24 h 产 IAA 水平达到 48 mg/L 以上, 将其命名为 HB-1。

2.2 菌株 HB-1 的室内促生试验

2.2.1 菌株 HB-1 对白菜叶绿素含量、叶片数的影响 从图 1 看出, 在 SPAD 值上, 各菌剂处理均高于 CK, 最高的是 T₄ 处理, 比 CK 高 5.02%, 且差异极显著 ($P < 0.01$), 其次是 T₂ 处理, 比 CK 高 2.97%, 差异明显。从叶片数来看, 各处理均高于 CK, 且差异明显, 其中 T₄ 处理比 CK 高 15.78%, 且差异极显著 ($P < 0.01$)。



同一指标不同处理间标有不同小写、大写字母分别表示差异显著 ($P < 0.05$)、极显著 ($P < 0.01$)。图 2 同图 1 菌株 HB-1 对油菜叶绿素和叶片数的影响

2.2.2 菌株 HB-1 对白菜鲜质量、干质量的影响 图 2 显示,所有菌剂处理的鲜质量、干质量较冲施清水的对照(CK)相比都增加,与 CK 相比,添加 HB-1 发酵液的各个处理鲜质量增加 1.54 ~ 17.98 g,增幅达到 1.16% ~ 13.55%,差异达到显著水平,其中施加 1.0 mL/盆等体积发酵液较灭活发酵液鲜质量增加 11%;添加 HB-1 发酵液的各个处理干质量增加 0.26 ~ 1.32 g,增幅达到 2.97% ~ 14.92%,其中未灭活的 T₄ 处理干质量、鲜质量增幅最高,与 CK 相比鲜质量平均增加 17.98 g,增幅达到 13.55%,差异达到极显著水平,干质量平均增加 1.32 g,增幅达到 14.92%,差异达到极显著水平。灭活的发酵液处理 T₁、T₃ 较清水对照也有不同程度的增产,分析原因,可能是发酵液中残留养分促进了白菜生长。结果表明,在施加底肥的基础上施用 HB-1 发酵液,可以显著提高白菜的生物产量。

2.3 16S rDNA 测定结果

对菌株 HB-1 的 16S rDNA 基因部分序列进行 BLAST

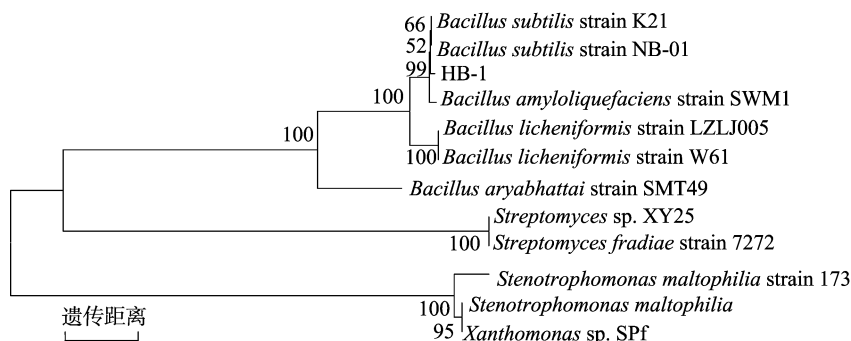


图3 菌株 HB-1 的进化树

3 讨论与结论

从番茄根际土壤中分离筛选获得 1 株具有较好产 IAA 能力的革兰氏阳性菌株 HB-1,其发酵 24 h 产 IAA 水平达到 48 mg/L 以上。通过将其培养后的发酵液进行白菜的促生试验表明,与冲施清水的处理相比,冲施灭活 HB-1 发酵液与未灭活发酵液对白菜均有促生作用,施加 HB-1 发酵液的处理叶绿素含量、叶片数均高于对照(CK);鲜质量、干质量较 CK 相比都增加,鲜质量增加 1.54 ~ 17.98 g,增幅达到 1.16% ~ 13.55%,差异达到显著水平;干质量增加 0.26 ~ 1.32 g,增幅达到 2.97% ~ 14.92%。冲施 1.0 mL 未灭活发酵液处理较空白处理鲜质量可提高 13.55%,差异达到极显著水平;冲施 0.5 mL 未灭活发酵液处理较空白处理鲜质量可提高 6.48%,差异达到显著水平。试验结果表明,菌株 HB-1 具有较强的促生作用。通过对菌株的 16S rDNA 序列的测定和分析,鉴定菌株 HB-1 为枯草芽孢杆菌。

枯草芽孢杆菌 HB-1 具有较好的产 IAA 能力,因为枯草芽孢杆菌具有非常好的生产性能及抗逆、定植能力,因此该菌株筛选为功能微生物肥料的研发提供了较好的选择。

参考文献:

[1] 吴翔,甘炳成,黄忠乾,等.一株产 IAA 菌株的筛选,鉴定及培

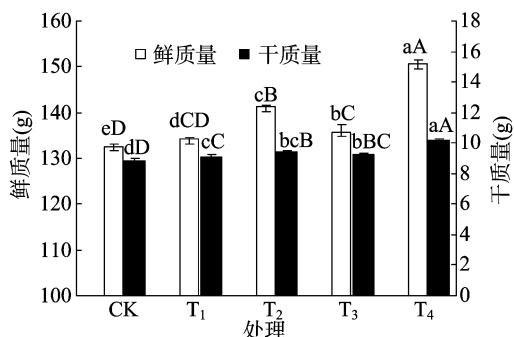


图2 菌株 HB-1 对油菜干鲜质量的影响

比对,利用 MEGA 4.1 的 Neighbor-Joining 软件进行系统发育树构建。由图 3 遗传距离可知,菌株 HB-1 与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的同源性最高(99.7%),与其他菌株的遗传距离相对较远,可以确定菌株 HB-1 是 1 株枯草芽孢杆菌。

养条件优化[J]. 四川农业大学学报,2014,32(4):432-435.

- [2] Spaepen S, Versees W, Gocke D, et al. Characterization of phenylpyruvate decarboxylase, involved in auxin production of *Azospirillum brasilense* [J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189 (21): 7626-7633.
- [3] Pothier J F, Wisniewski dyé F, Weissgayet M, et al. Promoter-trap identification of wheat seed extract-induced genes in the plant-growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 [J]. Microbiology-SGM, 2007, 153 (10): 3608-3622.
- [4] Sambrook J, Russell D W. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. 3rd ed. New York: Cold Springharbor Laboratory Press, 2001: 636-648.
- [5] 吴瑛,席琳乔.燕麦根际固氮菌分泌 IAA 的动态变化研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35 (15): 4424-4425.
- [6] 何俊龙,刘强,宋海星,等.包膜复混肥对油菜产量与生物量的影响[J]. 江苏农业科学, 2014, 42 (8): 103-106.
- [7] 王静,赵廷昌,孔凡玉,等.拮抗细菌对烟草青枯病的温室防病及促生效果[J]. 植物保护, 2007, 33 (5): 108-111.
- [8] 鲍士旦.土壤农化分析[M]. 北京:中国农业出版社, 1999: 431-440.
- [9] 谢永丽,王自章,刘强,等.草坪草狗牙根中抗逆基因 *BeDREB* 的克隆及功能鉴定[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2005, 21 (4): 521-527.