

钱兰华,钱玮,沈雪林,等. 耐盐促生菌的筛选、鉴定及其对黄瓜的促生作用[J]. 江苏农业科学,2019,47(18):160-163.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.18.034

耐盐促生菌的筛选、鉴定及其对黄瓜的促生作用

钱兰华¹, 钱玮², 沈雪林³, 胡翠英², 刘乾², 蒋晨威², 朱昀颺², 王桃云²

(1. 苏州农业职业技术学院, 江苏苏州 215008; 2. 苏州科技学院化学生物与材料工程学院, 江苏苏州 215009;

3. 苏州市种子管理站, 江苏苏州 215011)

摘要:为获得耐盐促生菌株并明确其促生特性,通过耐盐试验和 ACC 脱氨酶活性对沿海滩涂盐碱地土壤中的微生物进行分离筛选,得到 5 株耐盐菌株,其中 B7 的耐盐活性最强。接着采用平皿法和盆栽法研究了盐胁迫下黄瓜种子发芽及盆栽试验中 B7 对黄瓜的耐盐促生作用。同时对 B7 的多种促生能力进行测定,最后通过菌株形态、生理生化特征测定及其 16S rDNA 序列鉴定出 B7 菌株为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)。研究结果表明,该菌株能明显提高黄瓜耐盐促生能力,同时具有产吲哚乙酸(IAA)、产氨、固氮及解磷等多种促生能力,因而具有广泛的应用前景。

关键词:耐盐;分离筛选;鉴定;巨大芽孢杆菌;黄瓜;促生作用

中图分类号: S154.39 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)18-0160-04

土壤盐渍化是一个全球性的农业问题,是当前威胁全球农业生产和农作物产量的主要非生物胁迫因子,目前全球有 50% 的灌溉土地受到不同程度的盐害^[1]。中国盐渍土壤的分布范围广、类型多,总面积约 1 亿 hm^2 ,而且盐碱地面积正逐年增加^[2]。如何改良和利用大面积盐渍化土地,以及保护并提高重要的经济作物抵抗盐胁迫的能力是当前国际社会亟待解决的重要农业科技问题。目前,主要生物改良方法是培育并种植耐盐碱作物,如种植柃柳、水稻、向日葵以及耐盐植物田菁、紫穗槐等,此外还有耐盐转基因植物的研究,但该方法往往周期长、花费大,同时,植物转基因方法还未被社会广泛接受和认可^[3]。

根际微生物是指在植物根系土壤范围内生长繁殖细菌、放线菌、真菌等微生物。大多数根际微生物对植物无害且对植物生长有促进作用。这些根际微生物具有固氮、溶磷、产生植物生长激素、铁载体以及诱导植物抗性的功能。利用根际微生物提高盐碱地作物耐盐促生能力的方法具有投资少、见效快、效益高等特点。因此有关根际微生物耐盐促生的功能活性研究已经受到相关研究者的广泛关注^[4]。

本研究拟对沿海滩涂植物根系周围土壤中耐盐微生物进行筛选,并对筛选出的优势耐盐菌株耐盐特性、多种促生能力及其对盐胁迫下黄瓜种子发芽及盆栽试验中的耐盐促生作用进行研究。最后通过菌株形态、生理生化特征测定及其 16S rDNA 序列初步鉴定出耐盐优势菌株的种属,以期为提高农作物抗盐能力提供新策略。

1 材料与方法

1.1 样品采集

土样采自江苏省南通市启东吕四镇的海边滩涂,土壤采样深度为 5~20 cm,采回的土壤经风干、粉碎后过 100 目筛待用。

1.2 主要仪器

超净工作台(SW-CJ-1FD),上海新苗医疗器械公司;高速冷冻离心机(Fresco 17),美国 Thermo 公司;高压蒸汽灭菌锅(LDZX-50FB),上海博迅实业有限公司;数显 pH 计(PS-3TC),上海天达仪器有限公司;紫外可见分光光度计(UV-2450),日本岛津公司;恒温摇床(TS-2102),上海天呈实验仪器制造有限公司;光学显微镜(CX21),日本奥林巴斯公司。

1.3 主要试剂与培养基

2-羟基丁二酸,2-甲基-3-羟基-4,5-二羟甲基吡啶盐酸盐,哌嗪-1,4-二乙磺酸,吲哚-3-乙酸,三氧化钼,乙二胺四乙酸铁钠等购于上海阿拉丁生化科技有限公司;胰蛋白胨,酵母粉,琼脂粉,氯化钠, α -氨基吲哚基丙酸,维生素 H,考马斯亮蓝,奈斯勒试剂和钼酸钠等购于上海国药集团化学试剂有限公司。

LB 培养基,无机磷和有机磷培养基,CAS 检测平板,AF 培养基,DF 培养基和 ADF 培养基,无色氨酸 King 培养基,WA 培养基,NA 培养基等^[5-7]。

1.4 耐盐菌株的分离筛选

1.4.1 土壤菌株分离纯化 取处理好的土样 1 g 悬浮于装有 100 mL 无菌水的 250 mL 三角锥形瓶中,在 30℃、180 r/min 摇床中振荡 30 min,静置 10 min,得到土壤悬浮液。然后将此悬浮液稀释为原始浓度的 10^{-1} ~ 10^{-5} 倍,涂布于 LB 培养基平板上,于 30℃ 在恒温培养箱中培养 24 h 后,挑取各种不同类型的单菌落,经过多次平板纯化后,接种于 LB 斜面并在 4℃ 冰箱中保存备用。

1.4.2 菌株耐盐能力测定^[8] 利用含一定 NaCl 浓度的 NA

收稿日期:2018-05-31

基金项目:江苏省苏州市科技计划项目-应用基础研究计划(编号:SYN201525)。

作者简介:钱兰华(1976—),女,江苏兴化人,副教授,主要从事植物病虫害综合防治研究。E-mail:lanhuaqian@126.com。

通信作者:王桃云,博士,副教授,主要从事植物、微生物资源研究。

E-mail:wangtaoyun@usts.edu.cn。

培养基筛选耐盐菌株。用移液器分别取土壤稀释液 0.1 mL 涂布于盐浓度为 6% 的培养基平板上, 30 °C 培养 3 d, 以相同条件下各平板中菌落数量多少来筛选耐盐优势菌株。

1.4.3 耐盐菌株 ACC 脱氨酶活性测定 通过制作 α -丁酮酸标准曲线来测定 α -丁酮酸含量: 按照赵龙飞等所述方法^[9], 测定菌株粗酶液在 540 nm 波长下的吸光度, 并以 α -丁酮酸标准品的浓度 (mmol/L) 为横坐标, 以吸光度 ($D_{540\text{nm}}$) 为纵坐标, 绘制 α -丁酮酸标准曲线, 计算粗酶液中的 α -丁酮酸含量。

ACC 脱氨酶比活力测定: 参照 Bradford 的方法^[10] 比色测定细胞提取液中总蛋白质含量, 以牛血清白蛋白作为标准物, 绘制牛血清白蛋白标准曲线。参考 Saleh 等的方法^[11], 以反应体系中每毫克菌体蛋白酶每小时催化 ACC 脱氨生成 α -丁酮酸的微摩尔量表示 ACC 脱氨酶活性, 其单位为 $\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{h})$, 设置空白对照。测定结果为 3 次重复值。

1.5 优势耐盐菌株 B7 的各种促生能力测试

1.5.1 B7 固氮能力的测定^[12] 活化细菌, 挑取单菌落于 LB 培养液中培养 18 h, 分别吸取 10 μL 菌液到固氮培养基 (NFb) 平板上, 菌株能在 NFb 中生长, 且能使培养基变蓝者视为有固氮活性, 记录为“+”, 不变色记录为“-”。

1.5.2 B7 菌株解磷能力测定 参照 Ribeiro 等所述方法^[13-14], 活化 B7 菌株, 挑取单菌落于 2 mL LB 培养液中培养 18 h, 分别吸取 10 μL 菌液到有机磷培养基 (OPA) 和无机磷培养基 (NPA) 平板上, 28 ~ 30 °C 培养 96 h。观察方法: NPA 平板上有无透明圈, 有透明圈者记录为“+”, 无透明圈者记录为“-”; OPA 平板上有浑浊斑记为“+”, 无浑浊斑则记录为“-”;

1.5.3 B7 菌株产嗜铁素活性的检测 通过 CAS 检测平板法进行细菌产嗜铁素活性检测^[15]。根据检测平板中是否产生橘黄色晕圈来判断菌株是否能产生嗜铁素。观察方法: CAS 平板上有橘黄色晕圈者记录为“+”, 无橘黄色晕圈者记录为“-”。

1.5.4 B7 菌株产 IAA 能力测定 参照 Wichner 等的方法^[16-17], 将分离纯化后的菌株接种于具有 L-色氨酸的 LB 液体培养基中, 摇床培养 24 h。取 50 μL 菌悬液滴于白色陶瓷板上, 加入等量 Salkowski 显色液进行显色反应, 同时以加入等量 IAA 标准液作为阳性对照, 在室温、避光条件下放置显色 0.5 h, 颜色变红者表示能够产生 IAA。

1.5.5 B7 菌株产氨能力测定 产氨能力的测定参照康哈军等的方法^[5]。将菌株转接到含 10 mL 蛋白胨水 (10 g/L) 试管中, 28 °C 培养 48 h, 每管加入 0.5 mL Nessler's 试剂, 颜色由褐色转为黄色的表明有氨产生。试管中溶液由褐色转为黄色者记录为“+”, 试管中溶液不变色者记录为“-”。

1.5.6 菌株赋值评估 根据以上促生能力测试结果, 对耐盐优势菌 B7 的促生潜力进行赋值评估, 具有某种促生能力时赋 1 分, 没有该促生能力时赋 0 分。

1.5.7 B7 菌株产酸产碱能力测定 取 B7 菌悬液 200 μL 加到 NFM 培养基 (50 mL) 中, 在摇床上以 180 r/min, 30 °C 条件下培养 3 d。观察颜色, 若培养液变成黄色则说明此菌株是产酸菌株; 若变成蓝色则说明此菌株是产碱菌株。

1.6 耐盐生长曲线的测定

配制不同氯化钠浓度 (2%、4%、6%、8%、10%) 的 LB 液体培养基, 将 B7 接种至不同盐浓度的培养基中, 在摇床上以 180 r/min, 30 °C 条件下培养 24 h 后取出, 在 600 nm 波长下测定其吸光度, 以盐浓度为横坐标, D 值为纵坐标, 制作耐盐生长曲线。

1.7 菌株理化性质检测

参照《常见细菌系统鉴定手册》^[18] 和《伯杰细菌鉴定手册》(第 8 版)^[19] 进行耐盐优势菌株 B7 的形态和生理生化鉴定。

1.8 菌株 B7 分子学鉴定

将菌株用 LB 液体培养基培养至对数生长期, 离心收集菌体, 采用 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒, 提取总基因组 DNA, 采用通用引物 27F/1492R (正向引物 5' - AGTTTGA TCMTGGCTCAG - 3', 反向引物: 5' - GGTACCTTGTTACGACTT - 3') 进行 16S rDNA 基因扩增。产物测序后, 将测序的结果输入 NCBI 网站上的 BLAST 程序进行比对, 构建系统发育树以确定菌株的分类。

1.9 菌株 B7 对黄瓜发芽的促生试验

取黄瓜种子适量放入烧杯中进行消毒灭菌, 然后用无菌水清洗 3 次; 把上述已清洗好的黄瓜种子放入耐盐菌株 B7 菌液中浸泡 6 h, 备用。准备适量的培养皿, 将脱脂棉平铺在培养皿底层, 盖好后灭菌待用; 配置不同盐浓度的氯化钠溶液, 灭菌后倒入培养皿中并没过脱脂棉, 做好标记; 将已经浸泡过菌液的黄瓜种子放入不同盐浓度的培养皿中, 每个培养皿中放 40 个种子 (以加蒸馏水的培养皿作为空白对照), 放入光照培养箱中 25 °C 培养 7 d (前 3 d 暗培养, 后 4 d 12 h 光照培养, 12 h 暗培养); 试验结束后记录黄瓜种子发芽率、鲜质量和干质量 (每组 3 个重复)。

1.10 菌株 B7 对盆栽黄瓜的促生试验

取黄瓜种子适量放入烧杯中进行消毒灭菌, 然后用无菌水清洗 3 次; 把上述已清洗好的黄瓜种子放入耐盐菌株 B7 菌液中浸泡 6 h, 备用。采用营养土与蛭石 (体积比 4 : 1) 混合得到盆栽基质, 然后在 121 °C 灭菌 1 h, 冷却后装至穴盆中 (长 10 cm \times 宽 10 cm \times 高 10 cm), 每盆装入 200 g。分别设置空白对照组 (无盐胁迫)、盐胁迫组和盐胁迫加菌组, 每组做 5 个重复。每盆种入处理好的黄瓜种子 3 粒 (盐加菌组的种子先用菌株 B7 菌液浸泡 6 h, 空白组和盐胁迫组用灭菌水浸泡 6 h), 接着用不同溶液浇灌 (空白组用无菌水浇灌, 盐加菌组用菌株 B7 菌液混合 200 mmol/L NaCl 溶液浇灌, 盐胁迫组用 200 mmol/L NaCl 溶液浇灌), 每周浇灌处理 1 次, 其余时间都浇灌无菌水, 出苗后, 算出发芽率和出苗率, 然后每盆保留 1 株幼苗, 1 个月后测定总根长、总投影面积、总根表面积、平均根系直径和根尖数等生长指标及可溶性糖、赖氨酸含量等生理指标。

1.11 数据分析

采用 Excel 2010 作图, SPASS 19.0 进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 耐盐细菌的分离筛选

采用平板稀释法共分离出 27 株菌株, 经过耐盐试验的定

性筛选,共有5株耐盐菌株。耐盐菌株命名分别为B1、B3、B5、B6和B7,其余22个菌株都没有在6%盐浓度的平板上长出来。5个菌株耐盐试验结果(表1)显示,B7菌株的耐盐活性最强。同时,菌株ACC脱氨酶活性试验结果(表2)显示,菌株B7的ACC脱氨酶活性最强,达到0.852 U/(mg·h)。由耐盐试验和各菌株ACC脱氨酶活性试验结果可知,B7菌株的耐盐能力和ACC脱氨酶活性都优于其他几个耐盐菌株,因此选择B7菌株进行进一步研究。

表1 不同菌株在6%盐浓度下的菌落数

菌株种类	菌落数
B1	152
B3	80
B5	126
B6	18
B7	1 216

表2 不同菌株的ACC脱氨酶活性

菌株种类	ACC脱氨酶活性 [U/(mg·h)]
B1	0.020
B3	0.032
B5	0.525
B6	0.277
B7	0.852

2.2 B7菌株促生能力测试结果

通过对B7菌株的ACC脱氨酶活性、固氮、解磷、产嗜铁素、产IAA、产氨等促生能力测试,对耐盐优势菌B7的促生潜力进行赋值评估。结果表明,B7菌株具有ACC脱氨酶活性、产IAA、产氨、固氮、解磷(表3),因此,B7菌株具有很好的促生潜力。

表3 B7菌株促生潜力赋值评估

促生能力种类	促生效果	得分
ACC脱氨酶	+	1
产IAA	+	1
固氮(NFb)	+	1
解磷(NPA)	+	0
解磷(OPA)	+	1
嗜铁素活性	-	0
产氨	+	1
总分	5	

注:NPA代表用于筛选无机磷细菌的培养基;OPA代表用于筛选有机磷细菌的培养基;NFb代表用于筛选有固氮活性细菌的培养基。“+”表示阳性,“-”表示阴性,表4同。

2.3 B7菌株对盐的耐受结果

B7菌株在不同盐浓度下的生长情况如图1所示,由图1可知,B7菌株对氯化钠有较宽的适应范围,在盐浓度达到6%的情况下仍然可保持较高的菌体浓度,0~8%的盐浓度下均可生长,最适盐浓度为4%~6%。

2.4 B7菌株理化性质检测

经平板划线观察菌株B7形态特征。结果显示,B7菌落较小,白色,边缘整齐,表面光滑湿润,不透明,幼龄菌体为不规则杆状,端圆。菌株B7的生理生化特性为革兰染色阳性,

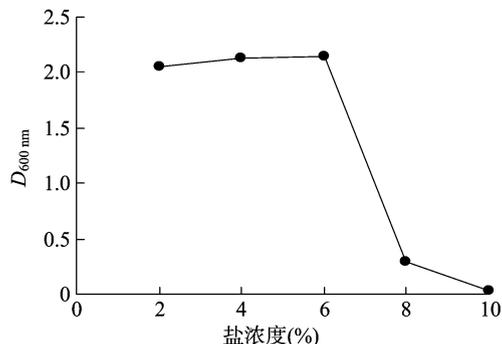


图1 B7菌株在不同盐浓度下的生长情况

好氧,化能异养,淀粉水解、明胶液化、葡萄糖发酵、伏-普(V-P)试验和靛基质(吲哚)试验试验均为阳性(表4)。

表4 B7菌株的生理生化特性

试验项目	试验结果	试验项目	试验结果
革兰氏染色	+	明胶液化	+
甲基红测定	-	淀粉水解	+
好氧性	好氧	葡萄糖发酵	+
V-P测定	+	硫化氢试验	-
靛基质(吲哚)试验	+	柠檬酸盐利用	-

2.5 株B7分子学鉴定

通过对菌株B7提取DNA,并以该DNA为模板,16S rDNA通用引物为引物,对16S rDNA片段进行扩增,将扩增的片段直接进行序列测定,将测序的结果输入NCBI网站上的BLAST程序进行比对,结果(图2)显示,该菌株16S rDNA序列与GenBank基因库中芽孢杆菌属中*Bacillus megaterium*的16S rDNA序列同源度最高,同源率达到100%。通过DNAMAN 6.0对GenBank中已有的芽孢杆菌属的16S rDNA序列进行遗传进化分析,结果显示,菌株B7的16S rDNA与*Bacillus megaterium*同源性最高,结合该菌株的生理生化特性,鉴定菌株为芽孢杆菌属的巨大芽孢杆菌。

2.6 菌株B7对黄瓜发芽的促生试验结果

由表5可知,B7菌株菌液加盐胁迫处理组的发芽率是盐胁迫组的1.25倍,鲜质量是其1.23倍,说明耐盐促生菌菌株B7对黄瓜种子具有明显的耐盐促生作用。

2.7 菌株B7对黄瓜盆栽的促生试验结果

由表6、表7可知,B7菌株加盐胁迫组比盐胁迫组黄瓜种苗的总根长、总投影面积、总根表面积、平均根系直径和根尖数分别提高10.6%、14.3%、13.1%、32.7%、7.1%,葡萄糖、脯氨酸含量分别提高了893%、155%,因此,B7菌株对黄瓜具有明显的耐盐促生作用。

3 结论

从沿海滩涂土壤中筛选到的菌株B7具有较强的耐盐促生能力,运用分子生物学鉴定方法及生理生化试验鉴定出菌株B7为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)。黄瓜平皿发芽试验和盆栽试验结果表明,B7菌株对黄瓜在盐胁迫下的生长具有明显促进作用。同时,B7菌株具有产吲哚乙酸(IAA)、产氨、固氮及解磷等多种促生能力,因此该菌株在植物促生尤其是作物耐盐促生方面具有广泛的应用前景。

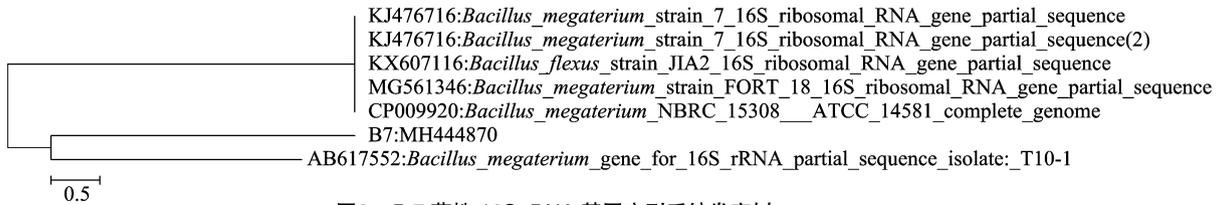


图2 B7菌株16S rDNA基因序列系统发育树

表5 B7菌株对黄瓜种子发芽的影响

处理	平均发芽率 (%)	平均鲜质量 (mg)	平均干质量 (mg)
空白对照(加水)	71.67 ± 4.16	66.22 ± 4.22	21.28 ± 1.11
盐胁迫(200 mmol/L NaCl)	47.50 ± 2.50	43.71 ± 0.56	21.90 ± 0.26
B7菌株 + 盐胁迫(200 mmol/L NaCl)	59.33 ± 3.06	53.97 ± 0.90	20.51 ± 0.18

表6 耐盐菌株B7在盆栽试验中对黄瓜种苗生长指标的影响

处理	总根长 (mm)	总投影面积 (cm ²)	总根表面积 (cm ²)	平均根系直径 (mm)	根尖数 (个)
空白对照	227.40 ± 34.50	16.95 ± 2.53	14.34 ± 0.49	184.00 ± 14.10	57.00 ± 3.0
B7菌株 + 盐胁迫	61.77 ± 3.70	9.03 ± 2.56	12.04 ± 0.97	88.00 ± 8.66	55.33 ± 1.52
盐胁迫	55.84 ± 1.67	7.90 ± 0.14	10.65 ± 2.63	66.33 ± 10.07	51.67 ± 0.58

表7 B7在盆栽试验中对黄瓜种苗生理指标的影响

处理	可溶性糖含量 (μg/g)	脯氨酸含量 (mg/g)
空白对照	2.51 ± 0.22	0.61 ± 0.13
B7菌株 + 盐胁迫	15.10 ± 0.56	1.89 ± 0.25
盐胁迫	1.52 ± 0.35	0.74 ± 0.22

参考文献:

- [1] 钮旭光, 韩梅, 宋立超, 等. 翅碱蓬内生细菌鉴定及耐盐促生作用研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2011, 42(6): 698-702.
- [2] 张兆林. 浅谈曹妃甸区盐碱地的开发与利用[J]. 中国科技博览, 2014(32): 325-325.
- [3] 马晨, 马履一, 刘太祥, 等. 盐碱地改良利用技术研究进展[J]. 世界林业研究, 2010, 23(2): 28-32.
- [4] Singh J S. Plant growth promoting rhizobacteria[J]. Resonance, 2013, 18(3): 275-281.
- [5] 康贻军, 程洁, 梅丽娟, 等. 植物根际促生菌的筛选及鉴定[J]. 微生物学报, 2010, 50(7): 853-861.
- [6] 曾庆飞, 王茜, 陆瑞霞, 等. 大豆根际促生菌的分离筛选及其对大豆和百脉根生长与品质的影响[J]. 草业学报, 2017, 26(1): 99-111.
- [7] 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.
- [8] Patel V R, Bhatt N. Isolation, development and identification of salt-tolerant bacterial consortium from crude-oil-contaminated soil for degradation of di-azo dye Reactive Blue 220[J]. Water Science and Technology, 2015, 72(2): 311-321.
- [9] 赵飞龙, 徐亚军, 常佳丽, 等. 具ACC脱氨酶活性大豆根瘤内生菌的筛选、抗性及其促生作用[J]. 微生物学报, 2016, 56(6): 1009-1021.
- [10] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of

microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248-254.

- [11] Saleh S S, Glick B R. Involvement of gacS and rpoS in enhancement of the plant growth-promoting capabilities of *Enterobacter cloacae* CAL2 and UW4[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2001, 47(8): 698-705.
- [12] 杨敬辉, 文平兰, 庄义庆. 颞颥细菌的筛选及生防潜能评估[J]. 西南农业学报, 2013, 26(2): 565-571.
- [13] Ribeiro C M, Cardoso E J. Isolation, selection and characterization of root-associated growth promoting bacteria in Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*)[J]. Microbiological Research, 2012, 167(2): 69-78.
- [14] Piromyop P, Buranabanyat B, Tantasawat P A, et al. Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizosphere of forage corn cultivated in Thailand[J]. European Journal of Soil Biology, 2011, 47(1): 44-54.
- [15] Machuca A, Milagres A M. Use of CAS-agar plate modified to study the effect of different variables on the siderophore production by *Aspergillus*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2003, 36(3): 177-181.
- [16] Wichner S, Libbert E. Interactions between plants and epiphytic bacteria regarding their auxin metabolism. I. Detection of IAA-producing epiphytic bacteria and their role in long duration experiments on tryptophan metabolism in plant homogenates[J]. Physiologia Plantarum, 2010, 21(1): 227-241.
- [17] 吴翔, 甘炳成, 黄忠乾, 等. 一株产IAA菌株的筛选、鉴定及培养条件优化[J]. 四川农业大学学报, 2014, 32(4): 432-435, 461.
- [18] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 353-412.
- [19] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1984: 195-196.