

张文韬,杨皓,毛国豪,等.一株高地芽孢杆菌的鉴定与促生能力研究[J].江苏农业科学,2022,50(5):225-229.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.05.036

一株高地芽孢杆菌的鉴定与促生能力研究

张文韬¹,杨皓¹,毛国豪¹,庄家尧¹,陈新峰²

(1.南京林业大学林学院,江苏南京 210037; 2.江苏省无锡市锡山区水利局,江苏无锡 214101)

摘要:从野生大豆根瘤内分离出菌株 Y1 并对其进行分子生物学鉴定,观察其特性以及对大豆的促生作用。16S rDNA 鉴定表明,菌株 Y1 为高地芽孢杆菌(*Bacillus altitudinis*);采用 Salkowski 法验证该菌株产生生长素(IAA)的能力,发现其产 IAA 的量为 38.49 mg/L。同时该内生菌具有解有机磷和无机磷的能力,溶磷量分别为 71.48、152.36 mg/L。将菌剂接种到大豆幼苗后观察其促生能力,结果显示,接种该菌株可显著增加大豆的株高和根长,同时,大豆叶片光合参数也有所提升。该结果可为研发新型微生物肥料提供优质菌种,为进一步研究芽孢杆菌属促生潜力提供理论依据。

关键词:高地芽孢杆菌;16S rDNA;鉴定;促生潜力

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2022)05-0225-04

近代以来人口急剧增加,随之而来的粮食短缺这一问题日益严峻,而粮食作物生长过程中农药化肥的使用不可避免。同时,农药化肥过度使用也带来了环境污染、土壤板结盐渍化等许多问题。近年来,微生物菌肥因其高效、绿色的特点走进了大众视线。微生物菌肥是以微生物的生命活动导致作物得到特定肥料效应的一种制品^[1],通过微生物自身分解作用,可以起到增加土壤肥力、供给植物养分等作用。相较于传统化肥,微生物菌肥有以下明显优势:(1)促进植物生长,提高产量品质。可以通过促进营养获取或改变植物激素水平来直接促进生长,也可以通过减少各种病原体对植物生长的抑制作用来间接促进生长发育,根瘤菌、巨大芽孢杆菌、多黏芽孢杆菌等是非常常见的植物生长促进细菌,有助于大幅提高作物产量和整个植物的生长^[2]。(2)减少连作障碍,防范病虫害。微生物菌肥能够对土壤中的病原菌分泌物进行分解和抑制,来帮助土壤中有益微生物进行繁殖^[3],起到生物防治的效果。(3)改良土壤,增加土壤肥力。施用微生物菌肥可以增加土壤中的有益菌数

量,提高土壤的保水保温能力。同时部分菌肥可以起到固氮作用,一些微生物可以活化土壤里磷钾矿物,帮助植物溶解磷钾元素,从而增加土壤肥力^[4]。

在我国已经登记在册的有 7 608 种微生物菌肥商品,应用最广泛的为链霉菌属(*Streptomyces*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和乳酸杆菌属(*Lacto bacillus*)的菌种,其中又以芽孢杆菌属应用率最高。李铭东等研究了多黏类芽孢杆菌菌剂对于玉米生长的影响,发现在施用多黏类芽孢杆菌菌剂和正常化学肥料混合的处理比单独施用正常化学肥料的处理,玉米的出苗率和苗高更高,同时发现使用菌剂的处理比没有添加菌剂的处理根腐病发病率更低,玉米的产量更高^[5]。高加明等从土壤中分离筛选 1 种高效解钾菌菌株 NGW1 并应用于烟草栽培,发现添加菌种的植株其有效叶数、株高、最大叶宽、茎围指标均高于对照组^[6]。钟松等通过在土壤施加胶质芽孢杆菌菌肥,发现该菌肥可有效提升高寒草原土速效养分,促进高寒草原牧草的根系生长^[7]。

试验菌株 Y1 是笔者所在课题组前期从野生大豆(*Glycine soja*)瘤内分离纯化得到的。首先对其进行 16S rDNA 测序鉴定其菌种,分析该菌种的生物学地位。随后分别对其产生生长素能力、溶磷能力指标进行测定,最后将其接种到大豆植株上观察其促生效应,以期发掘优良的植物促生菌种资源,为芽孢杆菌菌肥的开发和广泛利用提供理论依据。

收稿日期:2021-09-29

基金项目:国家重点研发计划(编号:2017YFC0505500);江苏省教育厅资助项目(编号:2019JSJC247);江苏省高等学校林学优势学科建设项目(编号:164010641)。

作者简介:张文韬(1998—),女,山东济南人,硕士研究生,研究方向为水土保持与荒漠化防治。E-mail:szdl123456@sina.cn。

通信作者:庄家尧,博士,副教授,研究方向为水土保持与荒漠化防治。E-mail:nlzjiayao@njfu.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 培养材料

酵母甘露醇琼脂(YMA)培养基:甘露醇 10 g、七水硫酸镁 0.2 g、氯化钠 0.1 g、酵母粉 3 g、磷酸氢二钾 0.25 g、磷酸二氢钾 0.25 g、碳酸钙 3 g、琼脂 20 g,蒸馏水定容至 1 000 mL,pH 值 7.0(液体培养基内不放琼脂)。

Salkowski 比色液:1 mL 0.5 mol/L FeCl_3 溶于 49 mL 35% 浓 H_2SO_4 。

无机磷培养基:葡萄糖 10 g、硫酸铵 0.5 g、酵母粉 0.5 g、氯化钠 0.3 g、氯化钾 0.3 g、硫酸镁 0.3 g、硫酸亚铁 0.03 g、硫酸锰 0.03 g;磷酸钙 5 g、琼脂 15 g,蒸馏水定容至 1 000 mL,pH 值 7.0。

有机磷培养基:葡萄糖 10 g、硫酸铵 0.5 g、酵母粉 0.5 g、氯化钠 0.3 g、氯化钾 0.3 g、硫酸镁 0.3 g、硫酸亚铁 0.03 g、硫酸锰 0.03 g、卵磷脂 0.2 g、碳酸钙 1 g、琼脂 15 g,蒸馏水定容至 1 000 mL,pH 值 7.0。

1.2 菌种 16S rDNA 序列鉴定

提取 Y1 的 DNA 后,进行 16S DNA 的扩增,将 PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶检测,观察条带性状。利用 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0 纯化试剂盒对产物进行纯化。将纯化后产物送至广州基迪奥生物科技有限公司进行测序。将测序结果在 NCBI 数据库上进行比对,获知与该细菌的 16S DNA 序列同源性最高的已知序列。细菌测序所用的引物为通用引物 515F/907R,引物序列 515F :5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3'; 907R :5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3'。

1.3 供试菌株分泌生长素(IAA)测定

在灭菌的 YMA 液体培养液中加入 200 mg/L 的 L-色氨酸,接种 Y1 菌株后置于 28 ℃、160 r/min 恒温振荡培养箱中,7 d 后,取 50 μL 菌悬液滴于白色塑料比色板上,同时加 50 μL Salkowski 比色液。将白色陶瓷板放在室温下避光 30 min,若颜色变红表示 Y1 具有分泌生长素的能力^[8]。菌株 Y1 产生 IAA 的浓度参考刘玉珍等的计算方法^[9]。本试验进行 3 次生物学重复。

1.4 供试菌株溶磷能力测定

1.4.1 定性测定 将制备的单一菌株活化后,用牙签点至无机磷和有机磷培养基平板中,置于 28 ℃ 恒温培养箱中 7 d,在平板中菌落周围出现透明圈的即

为解磷菌。

1.4.2 定量测定 将菌株 Y1 接种于新鲜牛肉膏蛋白胨液体培养基中培养 1 d 制成菌液,取 1 mL 加入无机磷液体培养基中,用钼锑抗比色法来测定上清液中有效磷含量。具体步骤参照文献[10]。

1.5 大豆促生试验

试验于 2021 年 4 月在南京林业大学林学院简易大棚内进行。大豆促生试验参照舒健虹等的方法^[11],并作修改:将花土:蛭石按体积比 3:1 混合灭菌后放入花盆中,每个花盆放 6 L 混合土。把发芽程度相似的大豆种子播于盆中,放置在气候箱内,在长出第 1 张真叶时,每株植物根部各接种 1 mL 菌悬液,以接种 1 mL 灭菌培养液为对照。每 3 d 喷洒 1 次营养液保持湿润。45 d 后,测其地上部分与地下部分生长情况。并使用 LI-6400 便携式光合仪(Li-Cor Inc. USA)测定大豆叶片的光合数据。

1.6 数据处理

采用 Excel 2016 进行数据统计和计算,利用 SPSS 26.0 进行显著性差异分析,使用 Origin 2018 软件制图。利用生物信息平台提供软件 MEGA 6.0 构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 Y1 的分子鉴定

Y1 的 16S 区序列在 GenBank 对比后发现该菌株为 *Bacillus altitudinis*(高地芽孢杆菌),将菌株 Y1 的 16S rDNA 测序结果进行同源性比较后利用 MEGA 6.0 构建系统发育树,发现其与 *Bacillus pumilus*(AY456263)的同源性最近(图 1)。

2.2 Y1 分泌植物生长素能力鉴定

由图 2 可知,室温避光 30 min 后,白色瓷板上的液体明显变成粉红色,说明菌株 Y1 具有产生长素能力。用 3-吲哚乙酸制作标准曲线为 $y = 0.046\,978x$ ($r^2 = 0.99$),经计算,菌株 Y1 产 IAA 量为 38.49 mg/L。

2.3 Y1 解磷能力

2.3.1 定性测定 由图 3 可知,Y1 在无机磷和有机磷培养基上均有明显透明溶磷圈出现。

2.3.2 定量测定 由图 4 可知,菌株 Y1 在无机磷和有机磷液体培养基中的溶磷量随时间变化呈增加趋势,且溶解无机磷的能力高于溶解有机磷。7 d 时,菌株 Y1 无机磷和有机磷中的溶磷量分别为 152.36、71.48 mg/L。

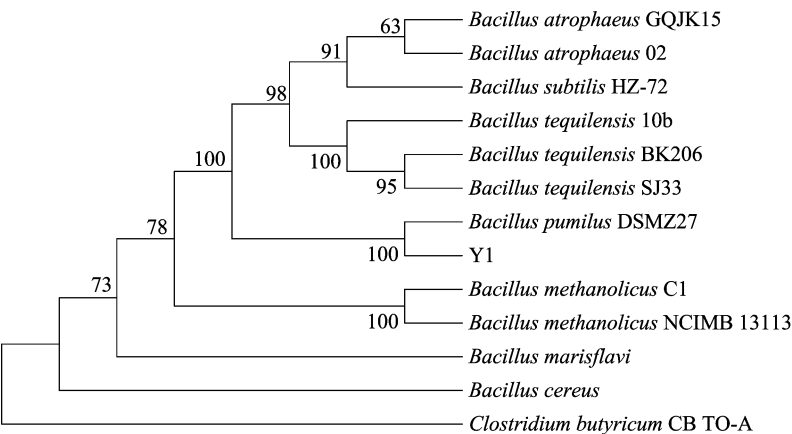
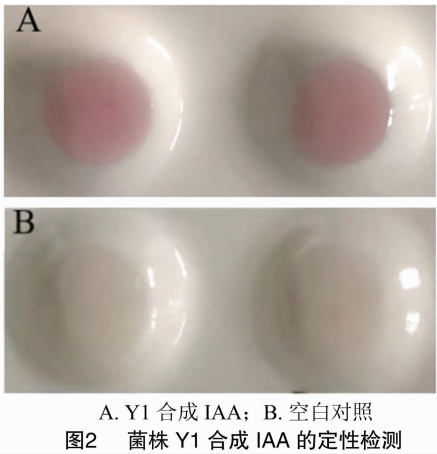
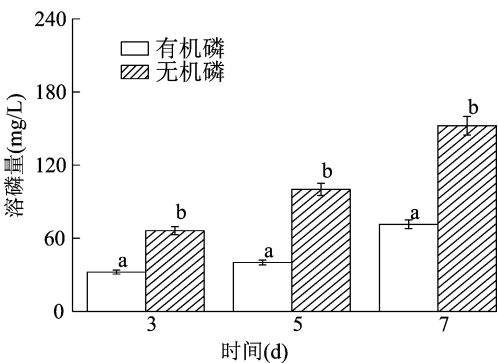


图1 菌株 Y1 16S rDNA 序列 NJ 系统发育树



A. Y1 合成 IAA; B. 空白对照
图2 菌株 Y1 合成 IAA 的定性检测



柱上不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)
图4 菌株 Y1 溶解无机磷和有机磷的量

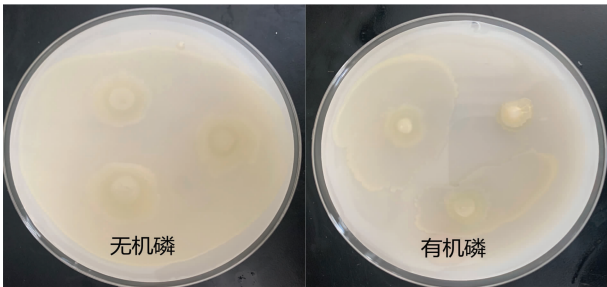


图3 菌株 Y1 解磷能力测定

2.4 接种菌株 Y1 对大豆叶片光合作用的影响

由表 1 可见,加菌组净光合速率与对照相比显著增加 136.73%,气孔导度与对照组相比显著增加 120.69%,胞间 CO₂ 浓度比对照组显著提升 28.95%,蒸腾速率与对照组相比显著增加 168.57%,达 0.94 mmol/(m²·s),水分利用效率相比对照增加不显著。

表 1 菌剂 Y1 对大豆光合参数的影响

处理	净光合速率 [$\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$]	气孔导度 [$\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$]	胞间 CO ₂ 浓度 ($\mu\text{mol}/\text{mol}$)	蒸腾速率 [$\text{mmol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$]	水分利用效率 ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$)
CK	3.43 ± 0.22a	0.029 ± 0.006a	190 ± 7.55a	0.35 ± 0.03a	6.73 ± 0.98a
Y1	8.12 ± 0.05b	0.064 ± 0.001b	245 ± 12.12b	0.94 ± 0.04b	6.90 ± 0.25a

2.5 接种菌株 Y1 对大豆植株生长指标的影响

由表 2 可见,接种 Y1 菌株 45 d 后,株高显著增加 23.82%,根长显著增加 26.98%,地上部分鲜质量、地上部分干质量、茎粗均有所增加但并不显著。这可能是由于植株之间这类指标的差异本身就小,

所以无显著变化。

3 讨论与结论

吲哚乙酸(IAA)是植物存活过程中不可缺少的生长调节物质,植物根部对 IAA 非常敏感,多数植

表 2 接种 Y1 对大豆植株生长指标的影响

处理	株高 (cm)	根长 (cm)	地上部分鲜质量 (g)	地上部分干质量 (g)	茎粗 (mm)
CK	24.35 ± 0.63a	6.56 ± 0.31a	7.45 ± 0.35a	1.37 ± 0.09a	2.39 ± 0.08a
Y1	30.15 ± 0.55b	8.33 ± 0.11b	9.66 ± 0.47a	1.88 ± 0.11a	3.66 ± 0.04a

物内生菌都有产 IAA 的能力^[12]。陈迪等从槟榔根际土壤和槟榔叶柄中分离细菌,测量它们对槟榔盆栽苗的促生能力,得到了有明显促生作用的菌株 DC-7,测得吡啶乙酸(IAA)含量为 35.78 mg/L,说明菌株 DC-7 的促生长作用可能来源于它的产 IAA 能力^[13]。姜云等从人参中分离出菌株苏云金芽孢杆菌 JJ5-2 的产 IAA 能力为 10.2 mg/L^[14]。本试验中,菌株 Y1 的产 IAA 量为 38.49 mg/L,说明该菌株有较高的产 IAA 能力。

土壤库中存在着大量磷素,但能够直接被植物吸收利用的可溶性磷的含量很低,为实现环境友好型的可持续发展战略目标,应在增加作物产量的基础上减少化学肥料的使用。溶磷菌可以促进土壤中有效磷的释放,提供植物生长发育所必需的磷元素,促进植物的生长发育^[15]。芽孢杆菌属是目前报道的溶磷能力较强的菌种之一^[16]。Hameeda 等将筛选得到的 5 株解磷菌进行了盆栽和大田试验,结果均表明接菌后能够促进玉米的生长^[17]。宋娟等从枫香根际土壤中筛选出 4 株解磷菌,并将其接种于枫香幼苗,发现该菌能够显著提高枫香的株高和地径^[18]。本试验发现菌株 Y1 在无机磷和有机磷培养基板上可以产生透明溶磷圈,具有解磷能力。同时,该菌株在无机磷和有机磷培养基中的溶磷量分别为 152.36、71.48 mg/L。韦宜慧等从杉木林中筛选出溶磷能力最强的 3 株菌株,其溶解无机磷量分别为 195.61、109.20、78.86 mg/L^[19]。Irawan 等从油棕(*Elaeis guineensis*)根际土壤筛选出的溶磷菌溶解无机磷量为 58.6 mg/L^[20]。说明 Y1 菌株的溶磷能力在溶解无机磷能力中属于偏上水平,且兼具溶解有机磷的能力,是一株可以用作微生物肥料的菌株。

光合作用是植物生长发育最基本的生理活动之一,能够为自身提供所需要的物质和能量^[21]。其中净光合速率是指植物通过叶绿素吸收固定光能辐射,在光合作用过程中积累有机物质,通常用于表征植物的光合效率。蒸腾速率能够反映植物体内矿物质和水分运输的强弱以及叶片在强光下降

温的效果。气孔导度通常表现为植物叶片细胞的开合程度,在很大程度上决定了植物对二氧化碳的吸收作用、植被的光合效率以及呼吸速率。水分利用效率能够反映植物在生长过程中的能量转化效率^[22]。本试验中大豆接种菌株 Y1 后光合参数提升,能够提升大豆对光的利用效率,从而促进光合作用。

参考文献:

- [1] 武兴友. 微生物菌肥对农业生产的影响及研究趋势分析[J]. 中国果菜, 2018, 38(4): 9-11, 15.
- [2] Mahanty T, Bhattacharjee S, Goswami M, et al. Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2017, 24(4): 3315-3335.
- [3] 刘 晓. 微生物菌肥在农业生产中的应用研究[J]. 河南农业, 2021(17): 14-15.
- [4] 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.
- [5] 李铭东, 吴成生, 沈 彤, 等. 多黏类芽孢杆菌菌剂在玉米上的应用效果[J]. 安徽农业科学, 2021, 49(3): 141-143.
- [6] 高加明, 张健行, 余梦林, 等. 土壤高效解钾菌的筛选鉴定及烟草栽培应用效果评价[J]. 湖北农业科学, 2021, 60(7): 34-39, 46.
- [7] 钟 松, 高俊程, 董世魁, 等. 黄河源区高寒草原土壤对不同 PGPR 菌肥的响应[J]. 兰州大学学报(自然科学版), 2021, 57(3): 294-301.
- [8] Glickmann E, Dessaux Y. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(2): 793-796.
- [9] 刘玉珍, 邓振山, 高 飞, 等. 一株巨菌草内生细菌的鉴定及其促生特性初步分析[J]. 广东农业科学, 2018, 45(3): 88-93, 173.
- [10] 伍善东, 刘冬华, 郭照辉, 等. 1 株高效解无机磷细菌 JP-7 的分离、鉴定及溶磷能力分析[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(12): 374-376.
- [11] 舒健虹, 王子苑, 刘晓霞, 等. 牧草促生菌分离鉴定及对大豆促生性能的研究[J]. 中国土壤与肥料, 2020(4): 215-222.
- [12] 马骢毓, 张 英, 马文彬, 等. 黄芩根际促生菌(PGPR)筛选与特性研究[J]. 草业学报, 2017, 26(1): 149-159.
- [13] 陈 迪, 芮 凯, 曾 涛, 等. 一株具有产 IAA 能力的解淀粉芽孢杆菌的分离鉴定及功能评价[J]. 中国热带农业, 2021(3): 50-58.

谢志扬. 非洲猪瘟背景下政策性保险对于江苏省养殖户生产恢复的影响[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(5): 229–233.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.05.037

非洲猪瘟背景下政策性保险对于江苏省养殖户生产恢复的影响

谢志扬

(南京农业大学经济管理学院, 江苏南京 210000)

摘要:我国的生猪养殖业受到了非洲猪瘟的巨大影响, 2019 年非洲猪瘟传播至江苏省, 当年的生猪出栏量环比下降 62.4%。江苏省生猪产业在这次疫情中受到了巨大的冲击。因此大量的生猪养殖户依旧处于生产恢复的过程中, 面临着缺乏资金、生产资料等困境。政策性保险作为国家对农业生产户的保护和补偿措施, 对生猪养殖户生产恢复应当会产生一定的影响。基于生猪产业经济岗在 2020 年调研的 360 户养殖户的数据, 探讨农业政策性保险对养殖户生产恢复的影响, 结果表明, 本研究提出的假说成立, 政府的农业政策性保险对于生猪养殖户的生产恢复决策有着显著的正向关系, 推动政策性保险对江苏生猪产业恢复有着积极的影响。

关键词:非洲猪瘟; 农业政策性保险; 生产恢复; 生猪养殖户; probit 模型

中图分类号:F840.66 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)05-0229-05

近年来, 我国居民的消费结构在不断改变, 肉类消费水平不断提升, 生猪作为我国居民肉类消费中绝对的主力, 其综合产能也在不断提高。我国是世界第一的生猪生产国以及生猪消费国, 根据联合国粮食及农业组织 (FAO) 的数据, 2017 年我国猪肉总产量为 5 451.8 万 t, 猪肉总需求量为 5 568.35 万 t, 均为全球第一。然而, 自 2018 年 8 月开始的非洲猪瘟从我国辽宁省爆发并迅速席卷全国, 大量的生猪被扑杀, 全国生猪存栏明显同时持

续下滑, 导致猪肉产量大幅下降的同时猪肉的价格大幅提高。由于非洲猪瘟的传染性高, 养殖场生猪极易感染, 容易出现一传十传百, 且在感染后发病致死率高, 使得损失扩大。目前缺乏可靠的疫苗使得上述 2 个特点变得更加恐怖。为了解决这种窘境, 政府出台了一系列相应的政策。其中《关于稳定生猪生产保障市场供给的意见》的目标是支持种猪场以及规模猪场的生产恢复; 《关于稳定生猪生产促进转型升级的意见》的目标是促进生猪养殖业转型规模化, 加快构建现代化养殖体系; 《加快生猪生产恢复发展 3 年行动方案》则是在 3 年内分期分目标地规划生猪产能恢复, 优化生猪产业生产。尽管政府采取了许多相应的措施, 目前生猪养殖业相

收稿日期: 2021-06-07

作者简介: 谢志扬 (1997—), 男, 山东东阳人, 硕士研究生, 主要从事生猪养殖相关的问题研究。E-mail: 1076747057@qq.com。

[14] 姜云, 田磊, 陈长卿, 等. 一株人参内生产吡啶乙酸细菌的筛选及鉴定[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(2): 213–217.

[15] 杨海霞, 刘希旻, 潘奕臣, 等. 耐盐碱溶磷菌 Y2R2 的分离鉴定及溶磷特性[J]. 生物技术通报, 2020, 36(10): 127–134.

[16] Liu F P, Liu H Q, Zhou H L, et al. Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from betel nut (*Areca catechu*) and their effects on plant growth and phosphorus mobilization in tropical soils[J]. Biology and Fertility of Soils, 2014, 50(6): 927–937.

[17] Hameeda B, Harini G, Rupela O P, et al. Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna[J]. Microbiological Research, 2008, 163(2): 234–242.

[18] 宋娟, 徐国芳, 赵邢, 等. 枫香根际解有机磷细菌筛选及其

促生效应[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2020, 44(3): 95–104.

[19] 韦宜慧, 陈嘉琪, 赵光宇, 等. 杉木林土壤和苗木内生溶磷细菌的筛选及其溶磷特性[J]. 林业科学, 2020, 56(12): 1–9.

[20] Irawan A F, Baskara G, Wandri R, et al. Isolation and solubilisation of inorganic phosphate by *Burkholderia* spp. from the rhizosphere of oil palm[J]. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2020, 23(5): 667–673.

[21] 康伟健. 强光照时间影响玉米光合作用适应的机制[D]. 泰安: 山东农业大学, 2017.

[22] 冯玉龙, 曹坤芳, 冯志立. 生长光强对 4 种热带雨林树苗光合机构的影响[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2002, 28(2): 153–160.