

莴笋根部促生菌筛选与促生特性测定

撤冬荣¹, 侯 栋², 姚 拓¹, 兰晓君¹, 朱瑞婷¹

(1. 甘肃农业大学草业学院草业生态系统教育部重点实验室, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃省农业科学院蔬菜研究所, 甘肃 兰州 730070)

摘 要:为获得莴笋(*Lactuca sativa*)根部优良促生菌株,为后续研制微生物接种剂(菌肥)提供优良菌种,以莴笋根系为对象,利用选择性培养基分离、筛选莴笋根系溶解有机溶磷、无机溶磷细菌和固氮细菌,测定其溶磷能力、固氮能力、分泌植物生长激素能力以及对植物病原菌的拮抗能力;对性能优良的菌株进行16S rDNA分子生物学鉴定。研究表明:莴笋根部分离到25株溶磷菌株,其溶解无机磷能力为60.83~290.66 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (菌株PGBA2溶磷量最高,为290.66 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),溶解有机磷的能力普遍较低,为8.12~71.87 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;分离出固氮菌株20株,固氮酶活性为8.37~371.54 $\text{nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ (GNB6固氮酶活性最强,为371.54 $\text{nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$);分离筛选分泌植物生长激素(IAA)菌株14株,分泌量为0.78~5.29 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (MGBD1分泌IAA的能力最强,为5.29 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$);菌株MGNB4、MGBC3、PGBA2对黄瓜枯萎病(*Fusarium oxysporum*)有抑菌作用,抑菌率达到了50%以上。对9株优良PGPR菌株进行分子生物学鉴定,菌株MGBC2、MGBC3、PGBA2为醋酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*),菌株MGNB3、MGNB4为华夏氏肠杆菌(*Enterobacter huaxiensis*),菌株MGBD1为铜绿假单胞菌(*Pseudomonas brassicacearum*),菌株GND5为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),菌株GNA6为气泡微细菌(*Microbacterium aerolatum*),菌株GNB6为放射型根瘤菌(*Rhizobium radiobacter*)。

关键词:莴笋;植物根际促生菌;溶磷细菌;固氮细菌;植物生长激素(IAA)

中图分类号:S636.2;S144 **文献标志码:**A

Lettuce root growth promoting bacteria screening and determination of growth promoting properties

HAN Dongrong¹, HOU Dong², YAO Tuo¹, LAN Xiaojun¹, ZHU Ruiting¹

(1. Key Laboratory of Grassland Ecosystem, Pratacultural College, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China;

2. Vegetable Research Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract: In order to obtain excellent strains of lettuce (*Lactuca sativa*) root growth-promoting bacteria and provide excellent strains for the subsequent development of microbial inoculants (bacterial fertilizers), we took the root system of lettuce as the research object and used selective incubation culture medium to separate and screen the ability of lettuce roots in dissolving organic phosphorus (P), inorganic phosphate solubilizing bacteria, and nitrogen(N)-fixing bacteria, and determine their ability to dissolve P, N fixation, plant growth hormone secretion, and antagonistic ability against plant pathogenic. We also tried to identify excellent strains by 16S rDNA molecular biology technology. The results shown that 25 strains of P-dissolving strains were isolated from the roots of lettuce, and their ability to dissolve inorganic P was 60.83~290.66 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (the highest amount of P in PGBA2 was 290.66 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); The ability to dissolve organic P was generally low, ranging from 8.12 to 71.87 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. The 20 strains of N-fixing strains were isolated, and the nitrogenase activity was 8.37~371.54 $\text{nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ (the most active nitrogenase activity of GNB6 was 371.54 $\text{nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$). Fourteen strains of secreted plant growth hormone (IAA) strains were isolated and screened, and the secretion amount was 0.78~5.29 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (MGBD1

收稿日期:2019-09-16

修回日期:2020-02-29

基金项目:甘肃省委组织部重点人才项目“微生物肥料关键技术及新产品研发”(LYRC2019-113);国家重点研发计划“露地蔬菜化肥农药减施技术集成研究与示范”(2018YFD0201204-5)

作者简介:撤冬荣(1994-),女,甘肃兰州人,硕士,研究方向为农业微生物肥料制剂研发与应用。E-mail:dongrong1107@163.com

通信作者:姚拓(1968-),男,教授,主要从事草业科学(草地保护和草地微生物)、农业应用微生物及其制剂研发、农业废弃物的循环利用等研究。E-mail: yaotuo@gsau.edu.cn

had the strongest ability to secrete IAA at $5.29 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). The strains MGNB4, MGBC3, and PGBA2 had antibacterial activity against *Fusarium oxysporum*, and the inhibition rate was over 50%. After the molecular biological identification of 9 excellent PGPR strains, the strains MGBC2, MGBC3, and PGBA2 were *Acinetobacter calcoaceticus*; the strains MGNB3 and MGNB4 were *Enterobacter huaxiensis*; the strain MGBD1 was *Pseudomonas brassicacearum*; the strain GND5 was *Bacillus subtilis*; the strain GNA6 was *Microbacterium aerolatum*, and the strain GNB6 was *Rhizobium radiobacter*. The excellent root-growth promoting bacteria selected in this study can provide excellent strains for the future development of lettuce microbial fertilizer, also enriched the PGPR strain resource bank.

Keywords: lettuce; plant growth-promoting rhizobacteria; phosphorus-dissolving bacteria; nitrogen-fixing bacteria; plant growth hormone (IAA)

为了获得优质高产的农产品,我国农业生产中不存在不合理施肥现象,不仅是对资源的严重浪费,且会导致土壤养分失衡,破坏土壤团粒结构^[2],影响土壤酸碱度,继而导致农产品品质下降,生态环境被破坏。因此,从绿色农业以及生态环境保护等多方面综合考虑,科学家们建议以微生物肥料代替部分化肥,以改良土壤,增加土壤微生物多样性、透气性和保水保肥能力等,同时这也是提高农产品产量和品质、保护生态环境的主要途径^[3]。

根际促生菌(plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)是指能够在植物根际(根际土壤、根系表面、根内组织)定殖、促进植物生长、矿质营养的吸收和利用、抑制有害生物危害的有益菌类^[4]。通过从不同植物分离筛选出的 PGPR,利用其固氮、溶磷、分泌植物生长激素等优良特性及提高植物抗病抗逆性研制微生物菌肥,与化肥合理配比可以减少化肥施用量^[5]。目前已有研究证明 PGPR 对于植物生长和作物产量具有积极的促进作用,有研究报道 PGPR 能够促进马铃薯、辣椒、番茄、茄子、黄瓜、甘蓝和萝卜的生长并能提高产量^[6-7];王明友等^[8]、刘军辉等^[9]研究发现微生物肥料对黄瓜的生长发育有促进作用,其显著提高黄瓜净光合速率、坐果率、产量,并降低硝酸盐含量,因此,筛选出优良菌株为研制微生物菌肥提供菌种资源。

莴笋(*Lactuca sativa*)又称莴苣,其茎、叶均可食用。莴笋含有多种维生素、蛋白质及人体所需的多种微量元素,具有显著的抗氧化、抗肿瘤和抗癌等保健功能,营养价值丰富,是人们喜食的蔬菜^[10-11]。其在甘肃地区种植广泛,随着人们对绿色无公害蔬菜的要求以及莴笋市场需求的扩大,提高莴笋产量和品质,种植无公害蔬菜已成为关注热点。但其根际促生菌资源筛选及微生物接种剂(菌肥)尚少见报道。

本研究从来自不同地点的莴笋根部分离 PGPR 菌株,通过定性、定量测试,筛选获得具有溶磷、固

氮、分泌 IAA 并具有生物防治作用的有益菌株,并利用分子生物学结合部分形态学特征对其进行分类鉴定,以期作为莴笋微生物接种剂(菌肥)研制提供优良菌株,并为研发微生物菌肥提供菌种,同时丰富我国 PGPR 菌种资源库。

1 材料与方法

1.1 材料

样品为 2018 年 10 月分别采自甘肃省天水市武山洛门镇文家寺 2 株、武山洛门镇冶拂村 1 株、武山洛门镇林家寨 1 株长势均较好的莴笋,完整采集根系,放入采样箱(保温 4℃),迅速带回实验室进行菌株分离,初步获得 PGPR 菌株。

供试病原菌:黄瓜枯萎病(*Fusarium oxysporum*)、番茄早疫病(*Alternaria solani*)均由甘肃农业大学草业学院提供。

1.2 培养基

培养基:无机磷培养基(Pikovaskaia's,简称 PKO)^[12];有机磷培养基(蒙金娜培养基,简称 MJN)^[13];LB 固体培养基(Luria-Bertani,简称 LB);LB 液体培养基:LB 固体培养基不添加琼脂^[14];金氏(King)培养基^[15];马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基^[16];固氮培养基(nitrogen free medium, NFM)培养基^[17];多碳源低氮(CCM)培养基^[18]。

1.3 根际促生菌分离筛选及测定方法

1.3.1 溶磷菌分离筛选 将莴笋根系分为 2 个部分,即根系表面(surface of roots, RP)和根内组织(interior of roots, HP)。利用稀释梯度法将上述 2 部分分别依次制备成浓度为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 的稀释液。利用平板涂布法,设置 3 个重复,置于 28℃ 培养箱培养 5~7 d,选取 PKO 和 MJN 培养基中生长较快、菌落形态较大,菌落周围出现溶磷圈(透明圈)的不同单菌落,用接种环挑取具有溶磷圈的单菌落,进行平板四区划线法重复操作,直至菌株纯化,即为

溶磷菌株。

1.3.2 溶磷菌溶磷特性测定 (1)定性测定:将25株PGPR菌株分别接种于有机磷培养基(MJN)和无机磷培养基(PKO)上,每个菌株设置3个重复,以十字交叉划线的方法将溶磷菌在每个培养基上接种4个对称区域,接种后置于培养箱培养(28℃,7 d),每天记录溶磷圈大小(D 代表溶磷圈直径, d 代表菌落直径)进行初步筛选^[19-20]。(2)定量测定:选取培养后 $D/d>1.5$ 的溶磷菌株,将筛选出的菌株接种于装有50 mL已灭菌(121℃,30 min)LB液体培养基中于28℃,180 r·min⁻¹条件下培养7~10 d。取培养液8 mL于4℃ 9 000 r·min⁻¹条件下,离心15 min,取上清液5 mL于100 mL三角瓶中,同时加入0.5 mol·L⁻¹NaHCO₃溶液45 mL和2 g无磷活性炭摇匀,置于摇床(180 r·min⁻¹,30 min)摇动,30 min后用无磷滤纸过滤,准确吸取滤液10 mL于50 mL容量瓶中,采用钼蓝比色法对菌株溶磷量进行测定^[21]。

1.3.3 分泌IAA特性测定 (1)定性测定:将23株PGPR菌株接种于盛有已灭菌(121℃,30 min)的50 mL King液体培养基(冷却至室温)的150 mL细口三角瓶中,每菌株3次重复,以不接菌培养基为对照,在28℃,180 r·min⁻¹条件下振荡培养10~12 d。吸取各菌液50 μL于白瓷板上,加50 μL Spot比色液,其中对照加50 μL浓度为0.01%的3-吲哚乙酸,每处理3次重复,将白瓷板放置于室温黑暗条件下,20 min内观察并记录颜色变化。如变粉红色即能分泌IAA,颜色深浅与分泌IAA能力呈正相关,没有颜色变化即为不能分泌IAA^[22]。(2)定量测定:取上述筛选出菌株的培养液于4℃,10 000 r·min⁻¹条件下,离心10 min,取上清液5 mL加等体积S2比色液,在黑暗下静置30 min后迅速用分光光度计在波长530 nm下测定各待测液的吸光值,在标准曲线上查出待测液的IAA浓度(μg·mL⁻¹)^[23-24]。

1.3.4 固氮菌分离筛选 利用平板涂布法^[25]将制备好的各浓度(10⁻¹、10⁻²、10⁻³)稀释液分别接种到NFM培养基和CCM培养基中,设置3个重复,置于28℃培养箱中培养5~7 d后,进行平板四区划线法重复操作,直至菌株纯化,即为固氮菌株。利用试管斜面保存法将筛选纯化的固氮菌株置于4℃冰箱保存,备用^[26]。

1.3.5 固氮菌固氮能力测定 采用乙炔还原法对初步筛选的固氮菌株进行定量测定^[27-28]。用接种环分别将20株PGPR菌株接种于盛有5 mL半固体NFM培养基的10 mL血清瓶中,每株菌3次重复,以不接菌培养基为对照,培养结束之后用50 μL平

口微量进样器从血清瓶中分别抽取混合气体50 μL快速注入到气相色谱仪气体进样柱内^[29],记录并观察C₂H₄出峰时间及峰面积百分比,计算出菌株固氮酶活性。

1.3.6 菌株生防能力测定 利用平板对峙法筛选溶磷能力较好的10株优良PGPR菌株对黄瓜枯萎病(*Fusarium oxysporum*)、番茄早疫病菌(*Alternaria-solani*)的拮抗作用。将10株PGPR菌株接种到LB液体培养基中,于28℃、150 r·min⁻¹条件下培养7 d。采用十字交叉法在PDA培养基中心位置分别接种病原菌,在十字两端距中心位置22 mm处接种供试菌株,每个处理3次重复,并设置对照组(平板中央只接种病原菌),置于培养箱在28℃下培养5~10 d,当对照长满整个平板时,采用十字交叉法测量菌落直径,计算抑菌率,以确定10株PGPR菌株对2种病原菌的生防能力^[30-31]。

$$\text{抑菌率}(\%) = [(D-d)/D] \times 100$$

式中, D 为对照菌落直径, d 为处理菌落直径。

1.3.7 优良PGPR菌株鉴定 将上述分离筛选得到溶磷能力较高菌株PGBA2、MGBC2,分泌IAA能力较高菌株MGBD1、NGNB3,固氮酶活性较高菌株GND5、GNA6、GNB6,生防能力较强菌株MGBC3、MGNB4共9种优良PGPR菌株接种于LB固体培养基中,在28℃培养48 h,挑取单菌落于离心管中,按照细菌基因组DNA提取试剂盒说明书提取细菌总DNA并进行PCR扩增,将PCR产物进行1%凝胶琼脂糖电泳检测,观察扩增片段的纯度并测定DNA浓度^[32]。将测序结果在EZBioCloud的16S-basedID中进行同源序列比较分析,采用Mega 7.0软件以邻接法构建所测菌株的系统发育树,自展值为1 000次。

1.4 数据分析

利用Microsoft Excel 2010整理数据,采用SPSS 24.0进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 优良根部促生菌筛选结果

通过PKO、MJN、NFM、CCM选择性培养基从不同地点莴笋根部分离、筛选出溶磷菌株25株(溶解有机磷菌株19株,溶解无机磷菌株6株),分泌植物生长激素(IAA)菌株14株,固氮菌株20株,抑制病原菌株10株(见表1)。

2.2 溶磷菌株筛选及其溶磷能力

通过PKO无机磷培养基和MJN有机磷培养基分离筛选出具溶磷能力的PGPR菌株25株,其中溶解无机磷菌株6株,溶解有机磷菌株19株(表2、表

3)。6 株溶解无机磷菌株溶磷量在 55.28~291.99 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间,各菌株培养液 pH 值在 4.42~5.87 之间,其中以 PGBA2 菌株的溶磷量最大,为 291.99 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。另外,19 株溶解有机磷菌株溶磷量在 6.49~76.11 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间,各菌株培养液 pH 值在 6.83~8.27 之间,其中以 MGBD2 菌株的溶磷量最大,为 76.11 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

表 1 优良根部促生菌筛选结果

Table 1 Screening results of excellent root-growth promoting bacteria

菌株来源 Source	菌株编号 Strains code			
	溶磷菌株 Phospholytic strain	分泌 IAA 菌株 IAA-secreting strain	固氮菌株 Nitrogen-fixing strain	生防菌株 Biocontrol strain
天水市武山洛门镇文家寺 Wenjia Temple, Luomen Town, Wushan, Tianshui City	PGBA1、PGBA2、PGNB5、 MGBA1、MGBA2、MGBB1、 MGNB1、MGNB2、MGNB3、 MGNB4,MGNB5	MGBA1、MGBA2、PGBA1、 MGNB2、MGNB3、MGNB4、 MGNB5	GBA1、GBA2、GNA5、GNA6、 GBB2、GNB1、GNB2、GNB6	PGBA1、PGBA2、MGNB2、 MGNB4
天水市武山洛门镇冶拂村 Yefu Village, Luomen Town, Wushan, Tianshui City	PGBC3、MGBC1、MGBC2、 MGBC3、MGBC4、MGNC1、 MGNC2	MGNC2,MGBC3	GBC1、GBC2、GBC3、GNC1、 GNC2,GNC3	MGBC2,MGBC3,MGNC1
天水市武山洛门镇林家莊 Linjiazhuang, Luomen Town, Wushan, Tianshui City	PGND2、PGND3、MGBD1、 MGBD2、MGBD3、MGBD4、 MGBD5	PGND1,PGND2 PGND3,MGBD1,MGBD3	GBD1,GBD2,GND1,GND2、 GND3,GND5	MGBD1,MGBD3

表 2 优良 PGPR 菌株溶解有机磷能力

Table 2 The ability of excellent PGPR strain in
dissolving organic P

菌株 Strain	溶磷圈直径/ 菌落直径 <i>D/d</i>	溶解有机磷能力 Ability to dissolveorganic P/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	pH
MGBA1	2.3±0ede	21.73±1.09ef	7.67±0.1cd
MGBA2	2.67±0.13abc	10.76±2.6gh	8.14±0.07a
MGBB1	0.87±0.43h	—	
MGNB1	2.4±0.35bcde	8.12±0.52h	7.17±0.05f
MGNB2	2.63±0.12abcd	—	
MGNB3	2.53±0.18abcd	—	
MGNB4	2.8±0.1abc	64.72±2.16b	7.89±0.05b
MGNB5	2.47±0.09abcd	22.58±2.08ef	7.28±0.04f
MGBC1	1.57±0.03gh	17.83±5.39fg	7.9±0.05b
MGBC2	2.03±0.03defg	71.87±2.53a	7.56±0.06de
MGBC3	3±0.12ab	31.24±1.83cd	7.19±0.06f
MGBC4	1.23±0.03h	—	
MGNC1	1.67±0.03fgh	15.78±2.96fg	7.55±0.05de
MGNC2	2.43±0.23abcde	26.23±2.2de	7.77±0.11bc
MGBD1	1.83±0.12efg	29.3±2.34cde	7.68±0.03cd
MGBD2	2.6±0.06abcd	64.35±6.06b	7.51±0de
MGBD3	3.03±0.35a	36.59±0.74c	7.9±0.01b
MGBD4	2.2±0.25cdef	17.14±1.9fg	7.49±0.01de
MGBD5	1.83±0.09efg	—	

注:表中数据为平均值±标准误,“—”表示无溶解有机磷能力。同列数据后不同字母表示差异显著($P<0.05$),下同。

Note: The data in the table is the average ± standard error. “—” means no dissolved organic phosphorus. Different letters in the same column indicate significant difference ($P<0.05$). The same below.

2.3 优良 PGPR 分泌生长激素(IAA)的能力

通过测定上述筛选出的 14 株优良菌株其分泌植物生长激素(IAA)的能力发现,7 株菌株具有分泌 IAA 的能力,分泌量在 0.78~5.29 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间,其中以 MGBD1 菌株分泌生长激素的能力最大,为 5.29 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,菌株 MGNB2 分泌植物生长激素的能力最小,为 2.12 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (表 4)。

表 3 优良 PGPR 菌株溶解无机磷能力

Table 3 The ability of excellent PGPR strain
in dissolving inorganic P

菌株 Strain	溶磷圈直径/ 菌落直径 <i>D/d</i>	溶解无机磷能力 Ability to dissolveinorganic P/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	pH
PGBA1	1.30±0.06b	123.59±2.36d	5.56±0.06a
PGBA2	1.93±0.07a	290.66±0.91a	4.53±0.07d
PGNB5	1.30±0.06b	125.96±4.92d	4.88±0.03c
MGBC3	1.50±0.06b	240.40±2.02b	4.68±0.01cd
PGND2	1.30±0.10b	60.83±3.63e	5.22±0.20b
PGND3	1.40±0.15b	150.90±5.07c	5.80±0.04a

表 4 PGPR 菌株分泌 IAA 能力

Table 4 IAA secreting ability of PGPR strains

菌株 Strain	IAA 显色 反应 IAA color reaction	分泌生 长激素 Growth hormone /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	菌株 Strain	IAA 显色 反应 IAA color reaction	分泌生 长激素 Growth hormone /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
MGBA1	+		MGNC2	—	
MGBA2	+	3.49±0.18b	MGBC3	—	
PGBA1	—		PGND1	—	
MGNB2	+	2.12±0.05c	PGND2	+	
MGNB3	+	3.98±0.19b	PGND3	+	
MGNB4	+	3.16±0.62b	MGBD1	+	5.29±0.22a
MGNB5	+	3.07±0.18b	MGBD3	+	3.14±0.05b

注:IAA 显色反应中,“+”表示浅红色;“—”表示无浅红色。

Note: In the IAA color reaction, “+” means light red; “—” means no light red.

2.4 优良 PGPR 固氮能力

利用选择性培养基 NFM 和 CCM,从莴笋根内组织和根表组织分离出 20 株固氮菌株,观察菌落形态特征,菌落颜色以白色和乳白色为主,菌落形状大部分为规则圆形且边缘光滑,根据菌落形态特征及生长速度,初步判断菌株固氮能力。进一步对其固氮酶活性进行测定,其固氮能力如表 5 所示。20 株菌株固氮酶活性范围为 8.37~371.54 nmol·h⁻¹·ml⁻¹,GNB6 固氮酶活性最高,其中固氮酶活性大于 100 nmol·h⁻¹·ml⁻¹的菌株共 3 株,且均分离自莴笋根内组织。

2.5 优良 PGPR 抑制病原菌的能力

通过研究 10 株 PGPR 对黄瓜枯萎病(*Fusarium oxysporium*)、番茄早疫病(*Alternariasolani*)的抑菌能力,发现 10 株 PGPR 对病原菌的抑制效果差异显著,其中仅有 PGBA2、MGBC3、MGNB4 菌株对黄瓜枯萎病的抑菌率达到 50%以上,且对番茄早疫病无抑菌作用(表 6)。

2.6 优良 PGPR 菌株的鉴定

综合评价各菌株促生特性,筛选出 9 株优良 PGPR,对其进行 16S rDNA 鉴定,通过分子同源序列比对,确定 9 株菌中 MGBC2、MGBC3、PGBA2 为醋酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*),菌株 MGNB3、MGNB4 为华夏氏肠杆菌(*Enterobacter huaxiensis*),菌株 MGBD1 为假单胞菌(*Pseudomonas brassicacearum*),菌株 GND5 为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),菌株 GNA6 为气泡微细菌(*Microbacterium aerolatum*),菌株 GNB6 为放射型根瘤菌(*Rhizobium radiobacter*),并构建菌株系统发育树(图 1)。

3 讨 论

本研究通过初筛和复筛发现,溶解有机磷能力普遍比溶解无机磷能力弱,且溶磷圈大小与溶磷能力不完全呈正相关关系,这一结果与赵小蓉等^[33]、马骢毓等^[34]的研究结果相一致。出现这一结果的原因可能是由于溶磷过程十分复杂所导致,微生物溶磷机制包括质子作用、有机酸作用、或二者共同作用,有些细菌培养过程中不分泌酸性物质,而有些细菌在代谢过程中分泌草酸、酒石酸、丙二酸、乳酸和乙酸等有机酸,部分会与金属离子结合,这部分溶磷能力未被测定出来^[35],因此测定结果有所偏低;此研究也发现大多数有机磷培养液 pH 值偏碱性,而无机磷培养液 pH 值均偏酸性。其次,分离筛选出的溶解有机磷菌株溶磷量较小,可能是菌株将难溶性磷一部分转化为中间物质,未转化成植物可

表 5 优良 PGPR 菌株固氮酶活性

Table 5 Nitrogenase activity of elite PGPR strain

菌株 Strain	固氮酶活性 Nitrogenase activity (C ₂ H ₄) /(nmol·h ⁻¹ ·ml ⁻¹)	菌株 Strain	固氮酶活性 Nitrogenase activity (C ₂ H ₄) /(nmol·h ⁻¹ ·ml ⁻¹)
GBA1	86.23±1.62d	GBC3	—
GBA2	—	GNC1	10.08±0.3f
GNA5	80.1±15.69d	GNC2	—
GNA6	122.88±1.24c	GNC3	—
GBB2	9.34±0.41f	GBD1	8.37±0.11f
GNB1	53.63±1.68e	GBD2	10.28±0.1f
GNB2	9.12±0.01f	GND1	10.21±0.73f
GNB6	371.54±1.7a	GND2	8.85±0.23f
GBC1	—	GND3	—
GBC2	—	GND5	177.2±3.37b

注:“—”表示无固氮能力。
Note: “—” indicates no nitrogen fixation capacity.

表 6 PGPR 对病原菌的拮抗效果

Table 6 Antagonistic effect of PGPR on pathogenic bacteria

生防菌 Biocontrol bacteria	病原菌 Pathogenic fungus	处理菌落半径 Handling colony radius/mm	对照菌落半径 Control colony radius/mm	抑菌率 Inhibition rate/%
PGBA1	黄瓜枯萎菌 <i>Fusarium oxysporium</i>	—	—	—
PGBA2		15.43±0.03i	38.2±0	59.6±0.09a
PGBC3		—	—	—
MGBC2		—	—	—
MGBC3		17.43±0.12h	38.2±0	54.36±0.31b
MGBD1		—	—	—
MGBD3		—	—	—
MGNB2		—	—	—
MGNB4		18.13±0.03g	38.2±0	52.53±0.09c
MGNC1		—	—	—
PGBA1	番茄早疫病菌 <i>Alternariasolani</i>	—	—	—
PGBA2		—	—	—
PGBC3		—	—	—
MGBC2		—	—	—
MGBC3		—	—	—
MGBD1		—	—	—
MGBD3		—	—	—
MGNC1		—	—	—

注:“—”表示抑菌率<50%。
Note: “—” indicates inhibition rate <50%.

直接吸收利用的磷元素,这种中间产物会被其他微生物分解为植物可直接吸收利用的磷元素,对植物吸收磷元素起到了间接作用,本实验方法未将这部分溶磷量检测出来,故测定的菌株溶磷能力有所降低。

生物固氮为植物生长提供氮素,在生态系统中是极为重要的氮来源之一。甘肃位于我国西北部,属于干旱半干旱地区,土壤贫瘠,固氮微生物对于提高氮素做出了很大贡献。本研究分离筛选出固氮菌株固氮酶活性较高的 3 株为气泡微细菌(*Microbacterium aerolatum*)、放射型根瘤菌(*Rhizobium radiobacter*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),固氮能力(C₂H₄)达到

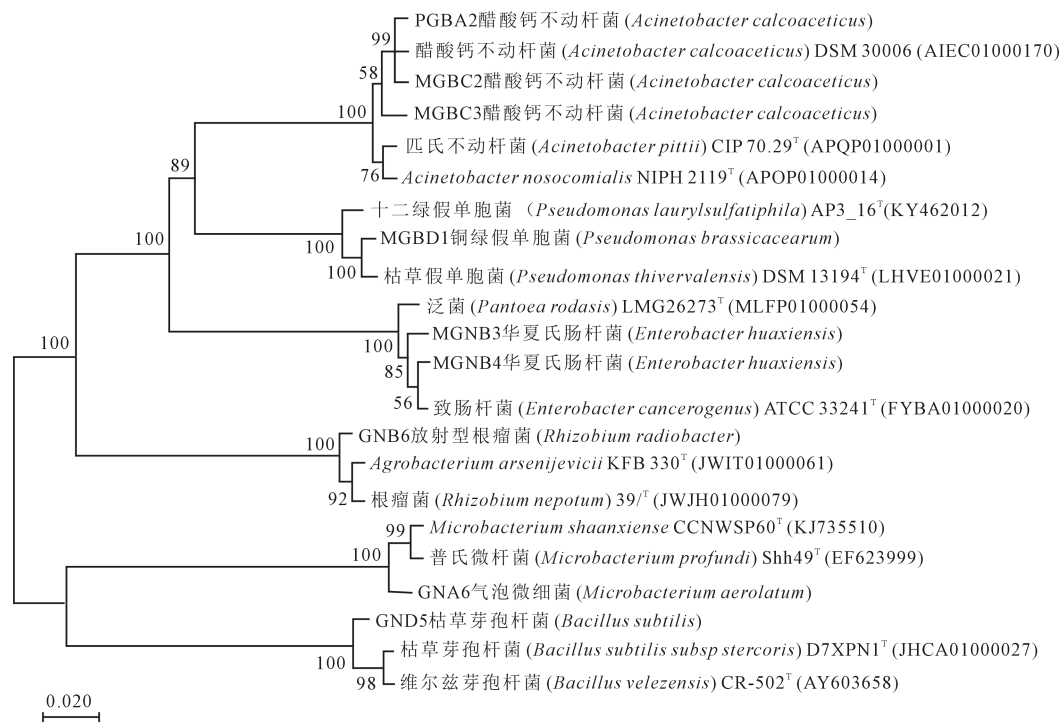


图 1 代表菌株 16SrDNA 基因序列同源性构建的系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree constructed by homology of 16SrDNA gene sequence

371.54 nmol · h⁻¹ · ml⁻¹,最低为 (C₂H₄) 8.37 nmol · h⁻¹ · ml⁻¹,差异极显著。目前报道的具有固氮能力的类芽孢杆菌有 18 个种^[36],这些研究发现不同种之间的固氮酶活性不同,种的不同菌株之间固氮酶活性也不同^[37],而且这些联合固氮菌及自身固氮菌不受宿主范围的限制,因此以该类固氮菌制备的生物肥料在农业生产中具有广泛的应用前景。杨鸿儒等^[38]在西鄂尔多斯高原荒漠干旱半干旱地区不同植物上发现具有高酶活的固氮菌株且该地区是高酶活固氮作用发生的重要场所;刘彩霞等^[39]在碱性土壤中分离出 10 株具有固氮功能的细菌均属于芽孢杆菌属。本研究筛选出的 20 株固氮菌其固氮能力较高的有 3 株且差异显著,可能原因是固氮菌株受植物种类与土壤性质影响^[40]。

获得 9 株促生特性优良菌株,其中醋酸钙不动杆菌 (*Acinetobacter calcoaceticus*) 3 株,是较为常见的促生菌种类,主要存在于水体和土壤中,其不仅具有溶磷能力,还具有生防能力。齐永志等^[41]筛选获得 1 株不动杆菌 B3521,缓解了草莓连作障碍;蔺经等^[42-43]从樟树中分离的鲍曼不动杆菌,抑制了梨黑斑病、轮纹病和炭疽病等真菌性病害,起到了较好的防治作用。华夏氏肠杆菌 (*Enterobacter huaxiensis*) 安全性尚不明确,其与 *Pantoea* 菌株和生癌肠杆菌 (*Enterobacter cancerogenus*) 极为相似,且这两株菌对人体有害,易引起肺炎,抗药性强^[44],因此,MGNB4 与 MGNB3 菌株暂且不宜成为制作微生物接种剂的菌种资源。枯草芽孢杆菌 (*Bacillus*

subtilis) 是国际上认可的优良根际促生菌,其繁殖能力强、易存活且具有多种促生功能,成为优良菌种的可能性极大,后期将对其进行验证。本研究筛选出的菌株 MGBC3 同时具有抗病和溶磷能力,菌株 MGBD1 具有分泌植物生长激素、溶磷能力,且分泌植物生长激素能力较好,诸如此类以 1 种功能为主,兼具多种功能的 PGPR 是研究者重点寻找的宝贵资源。张梦琦等^[45]研究发现 1 株多功能根际促生菌 DD3,其兼具溶磷、产铁载体、产 HCN 等能力,对大蒜株高、抗病能力等均有所提高。因此,筛选多功能菌株在农业生产中具有重要意义,多功能 PGPR 是珍贵的生物资源。

4 结 论

本研究筛选出溶解有机磷菌株 19 株,溶解无机磷菌株 6 株,固氮菌株 20 株,不同 PGPR 菌株的溶磷能力和固氮能力存在较大差异。菌株溶解无机磷的能力普遍高于溶解有机磷的能力,溶解无机磷能力最高为 290.66 μg · mL⁻¹,溶解有机磷能力最高为 71.87 μg · mL⁻¹;菌株固氮酶活性 (C₂H₄) 最高为 371.54 nmol · h⁻¹ · mL⁻¹;分泌植物生长激素 IAA 菌株 14 株,菌株 MGBD1 分泌 IAA 能力最强,为 5.29 μg · mL⁻¹;抑制病原菌菌株 3 株,且抑菌率均在 50% 以上。9 株优良 PGPR 菌株鉴定为:3 株醋酸钙不动杆菌 (*Acinetobacter calcoaceticus*),2 株华夏氏肠杆菌 (*Enterobacter huaxiensis*),1 株假单胞菌 (*Pseudo-*

monas brassicacearum), 1株枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*), 1株气泡微细菌(*Microbacterium aerolatum*), 1株放射型根瘤菌(*Rhizobium radiobacter*), 其可为后续研制微生物制剂提供菌种资源。

参考文献:

- [1] 位国建, 荐世春, 崔荣江, 等. 水稻机插秧同步侧深施肥技术分析及试验[J]. 农机化研究, 2017, 39(9): 190-194.
- [2] 赵青松, 唐爱丽. 化肥对土壤的危害及解决方法[J]. 养殖技术顾问, 2011, (3): 73.
- [3] 樊军, 郝明德. 长期轮作与施肥对土壤主要微生物类群的影响[J]. 水土保持研究, 2003, 10(1): 88-89.
- [4] 李海云, 蒋永梅, 姚拓, 等. 蔬菜作物根际促生菌分离筛选、鉴定及促生特性测定[J]. 植物保护学报, 2018, 45(04): 836-845.
- [5] 姚拓. 饲用燕麦和小麦根际促生菌特性研究及其生物菌肥的初步研制[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2002.
- [6] 田婧, 李邵, 连青龙, 等. 植物根际促生菌在蔬菜种植中的应用进展[J]. 北方园艺, 2016, (6): 181-185.
- [7] 张典利, 孟臻, 元文哲, 等. 植物根际促生菌的研究与应用现状[J]. 世界农药, 2018, 40(6): 37-43.
- [8] 王明友, 李光忠, 杨秀凤, 等. 微生物菌肥对保护地黄瓜生育及产量、品质的影响研究初报[J]. 土壤肥料, 2003, (3): 38-41.
- [9] 刘军辉, 李利. 我国微生物肥的应用研究进展[J]. 河北果树, 2018, (5): 5-6.
- [10] 杨晓哲, 胡文忠, 姜爱丽, 等. 鲜切莴苣生理生化变化及其保鲜技术的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(2): 278-283.
- [11] 卢立明, 郭向运, 蒋学杰. 莴笋种植技术[J]. 特种经济动植物, 2019, 22(2): 41-42.
- [12] Jiao Ruzhen, Peng Yuhong, Gilkes R J, et al. Preliminary study on phosphate solubilization and K-releasing abilities of *Rhizobium tropici* Martinez-Romero et al. strains from woody legumes [C] // Proceedings of the 19th World Congress of Soil Science: Soil solutions for a changing world. Brisbane, Australia: International Union of Soil Science (IUSS), 2010: 104-107.
- [13] 刘婷. 高寒草甸优势植物根际促生菌资源评价及菌种鉴定[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2016.
- [14] 陆超. 固氮施氏假单胞菌铁吸收调节蛋白 Fur 参与铁转运和固氮调控的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2016.
- [15] 李振东. 东祁连山高寒草地优势植物内生细菌多样性研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2010.
- [16] 杨焕玲, 查磊, 赵旭, 等. 培养基中添加海藻糖对大蒜盖菇、斑玉蕈菌丝生长的影响[J]. 微生物学通报, 2019, 46(5): 1108-1114.
- [17] 李建宏, 李雪萍, 马文文, 等. 东祁连山高寒草地几种禾本科牧草根际促生菌研究[J]. 草业学报, 2016, 25(11): 173-177.
- [18] 李庆洋. 剑麻根际联合固氮菌的分离、筛选及鉴定[D]. 海口: 海南大学, 2010.
- [19] 刘泽平, 王志刚, 徐伟慧, 等. 水稻根际促生菌的筛选鉴定及促生能力分析[J]. 农业资源与环境学报, 2018, 35(2): 119-125.
- [20] 萧龙珍, 崔俊涛, 刘淑霞, 等. 玉米根际溶磷菌 *Bucillus megaterium* XS2 的筛选鉴定与溶磷特性分析[J]. 吉林农业大学学报, 2018, 40(1): 71-79.
- [21] 田宏, 姚拓, 张德罡. 兰州地区草坪草根际溶磷菌分离及溶磷能力初步测定[J]. 草原与草坪, 2004, (4): 39-41.
- [22] 张英. 西藏阿里高寒草原四种牧草根际促生菌资源筛选及促生机理研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2013.
- [23] Liu Xiaoxia, Lu Ruixia, Wang Xiaoli, et al. Screening identification and growth-promoting effects of inorganic phosphorus-resolving strains of white clover rhizosphere [J]. Agricultural Science & Technology, 2012, 13(10): 2058-2064.
- [24] 王欢, 韩丽珍. 4株茶树根际促生菌菌株的鉴定及促生作用[J]. 微生物学通报, 2019, 46(3): 548-562.
- [25] 李海云, 姚拓, 张榕, 等. 红三叶根际溶磷菌的筛选与培养基优化[J]. 草业学报, 2019, 28(1): 170-179.
- [26] 李琼洁, 程杰杰, 孙帅欣, 等. 玉米联合固氮菌 *Kosakonia radicina* GXGL-4A 的分离鉴定与固氮特性研究[J]. 微生物学通报, 2016, 43(11): 2456-2463.
- [27] Ernesto S, Fotis S, Falko P, et al. Biological nitrogen fixation in peatlands: Comparison between acetylene reduction assay and $15\text{ N } 2$ assimilation methods [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2019, 131: 157-165.
- [28] Fan Jun, Hao Mingde. Effects of Long-term rotation and fertilization on main microbial groups in soil [J]. Soil and Water Conservation Research, 2003, 114(1): 88-89.
- [29] 张颖, 杨清松, 张燕英, 等. 造礁石珊瑚共生固氮微生物的固氮活性[J]. 生态杂志, 2018, 37(7): 2122-2129.
- [30] 李勇, 赵东岳, 丁万隆, 等. 人参内生细菌的分离及拮抗菌株的筛选[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(11): 1532-1535.
- [31] 荣良燕. 岷山红三叶根际促生菌及有益特性研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2015.
- [32] 马懿毓, 姚拓. 黑果枸杞根际促生菌筛选与特性研究[J]. 草原与草坪, 2018, 38(2): 73-79.
- [33] 赵小蓉, 林启美, 李保国. 溶磷菌对4种难溶性磷酸盐溶解能力的初步研究[J]. 微生物学报, 2002, (2): 236-241.
- [34] 马懿毓, 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.
- [35] 赵小蓉, 林启美, 李保国. 微生物溶解磷矿粉能力与pH及分泌有机酸的关系[J]. 微生物学杂志, 2003(3): 5-7.
- [36] 王楠, 李刚强, 李云龙, 等. 固氮类芽孢杆菌的分离鉴定及其促生、抑菌活性的测定[J]. 中国农业科技导报, 2019, 21(5): 95-103.
- [37] Xie J B, Shi H W, Du Z L, et al. Comparative genomic and functional analysis reveal conservation of plant growth promoting traits in *Paenibacillus polymyxa* and its closely related species [J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 2-10.
- [38] 杨鸿儒, 袁博, 赵霞. 三种荒漠灌木根际可培养固氮细菌类群及其固氮和产铁载体能力[J]. 微生物学通报, 2016, 43(11): 2366-2373.
- [39] 刘彩霞, 赵京京, 焦如珍. 杉木林土壤中固氮功能细菌的生长特性研究[J]. 林业科学研究, 2018, 31(4): 98-103.
- [40] Garbeva P, van Elsas J D, van Veen J A. Rhizosphere microbial community and its response to plant species and soil history [J]. Plant and Soil, 2008, 302(1/2): 19-32.
- [41] 齐永志, 甄文超, 代丽, 等. 连作条件下不同品种草莓生长发育和根部病害发生状况的研究[J]. 中国农学通报, 2008(6): 374-378.
- [42] 蔺经, 杨青松, 李晓刚. 一株不动杆菌次生代谢活性产物的抑菌作用及对果树病害的防治效果[J]. 江西农业学报, 2010, 22(10): 78-79.
- [43] 蔺经, 杨青松, 李晓刚, 等. 鲍曼菌素对梨轮纹病菌的毒力及其药效评价[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2011, 37(1): 52-54.
- [44] Tülin D, Gamze B, Tuncay B, et al. Pneumonia due to *Enterobacter cancerogenus* infection [J]. Folia Microbiologica, 2014, 59(6): 527-530.
- [45] 张梦琦, 陈云云, 张熙, 等. 多功能植物根际促生菌 DD3 的功能特性及对大蒜幼苗的促生效果[J]. 植物营养与肥料学报, 2017, 23(3): 748-756.