

研究报告

水稻促生菌的筛选、鉴定及其促生效果

杨华, 胡展, 郭照辉, 肖蓉, 罗容琚, 付祖姣*, 魏小武, 蔡长平, 王玉双

湖南省微生物研究院, 湖南 长沙 410009

杨华, 胡展, 郭照辉, 肖蓉, 罗容琚, 付祖姣, 魏小武, 蔡长平, 王玉双. 水稻促生菌的筛选、鉴定及其促生效果[J]. 微生物学通报, 2022, 49(6): 2088-2099

Yang Hua, Hu Zhan, Guo Zhaohui, Xiao Rong, Luo Rongju, Fu Zujiao, Wei Xiaowu, Cai Changping, Wang Yushuang. Screening and identification of rice growth-promoting strains and their effects on rice growth[J]. Microbiology China, 2022, 49(6): 2088-2099

摘要:【背景】微生物在促进水稻生长上潜力巨大, 利用水稻促生微生物是减少水田化肥施用、保障水稻安全高效生产的有效途径之一。【目的】筛选并获得能显著促进水稻生长的微生物, 为水稻微生物肥料提供优质菌种资源。【方法】从水稻根围微生物中筛选具有高效固氮、溶磷、解钾、产铁载体和吲哚乙酸(indole acetic acid, IAA)的微生物菌株, 并对其进行初步鉴定, 分析其对水稻种子萌发和植株生长的影响。【结果】从 394 株水稻根围细菌中筛选并获得了 6 株在固氮或溶解有机和无机磷、钾或产铁载体和 IAA 综合水平较高的菌株, 分别为菌株 C7-1、L26、C10-19、S11-11、GYM_bt5 和 20-10, 根据 16S rRNA 基因序列初步鉴定这些菌株为嗜线虫沙雷氏菌(*Serratia nematodiphila*)、阿耶波多氏芽孢杆菌(*Bacillus aryabhattai*)、别氏不动杆菌(*Acinetobacter bereziniae*)、蒙氏假单胞菌(*Pseudomonas monteilii*)和贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)。促生试验结果表明, 除别氏不动杆菌 C10-19 外, 其他 5 株菌处理‘晶两优华占’水稻种子后均能显著促进水稻种子萌发和根系发育, 种子萌发率可提高 25%–43%, 水稻幼苗在培养的第 14 天根长增长最显著, 比对照增加了 18%–42%。溶有机磷水平最高的菌株 C7-1 对根长的影响最显著, 其次为菌株 20-10, 而菌株 S11-11 对茎的生长和分蘖促进作用最显著。【结论】菌株 C7-1、20-10 和 S11-11 对水稻促生作用显著, 可用于水稻微生物肥料的研制。

关键词: 水稻; 促生微生物; 根围; 促生因子

基金项目: 湖南省自然科学基金(2021JJ30411); 湖南省科技计划(2020NK2006); 长沙市自然科学基金(Kq2202330, 2014172)

Supported by: Hunan Provincial Natural Science Foundation (2021JJ30411); Science and Technology Project of Hunan Province (2020NK2006); Changsha Natural Science Foundation (Kq2202330, 2014172)

*Corresponding author: E-mail: fzjp2004@hotmail.com

Received: 2021-10-08; Accepted: 2022-01-15; Published online: 2022-04-01

Screening and identification of rice growth-promoting strains and their effects on rice growth

YANG Hua, HU Zhan, GUO Zhaohui, XIAO Rong, LUO Rongjun, FU Zujiao*,
WEI Xiaowu, CAI Changping, WANG Yushuang

Hunan Institute of Microbiology, Changsha 410009, Hunan, China

Abstract: [Background] Microorganisms have great potential in promoting rice growth. It is one of the effective ways for reducing the application rate of chemical fertilizers and ensuring safe and efficient rice production to apply rice growth-promoting microorganisms. [Objective] To screen rice growth-promoting microorganisms for the preparation of microbial fertilizers for rice production. [Methods] Strains with high efficiency in fixing nitrogen, solubilizing phosphate and potassium, or producing siderophore and indole acetic acid (IAA) were screened from rice rhizosphere and identified and their effects on seed germination and plant growth of rice were analyzed. [Results] A total of 6 strains (C7-1, L26, C10-19, S11-11, GYM_bt5 and 20-10) with high efficiency in fixing nitrogen, solubilizing organic and inorganic phosphate or potassium, or producing siderophores and IAA, were screened out from the 394 bacterial strains in rice rhizosphere, which were identified as *Serratia nematodiphila*, *Bacillus aryabhattai*, *Acinetobacter bereziniae*, *Pseudomonas monteilii*, and *Bacillus velezensis* by their 16S rRNA gene sequences, respectively. The strains, except C10-19, all can significantly promote the seed germination and root development of 'Jingliangyouhuazhan'. With the help of the 5 strains, the seed germination rate was 25%–43% higher and the root length (14th day of seedling culture) was 18%–42% larger than that of the control, respectively. Particularly, strain C7-1 with the highest level of solubilizing organic phosphate, had the most significant effect on root length, followed by strain 20-10, while strain S11-11 had the most significant effect on the growth and tillering of stems. [Conclusion] Strains C7-1, 20-10 and S11-11 significantly promotes rice growth, which can be used for the preparation of rice microbial fertilizers.

Keywords: rice; growth-promoting microorganisms; rhizosphere; growth-promoting factors

目前,促进植物生长主要依赖化学肥料的施用,但由于化学农药和肥料的滥用或者过度施用对环境造成了严重的污染,并且化肥价格高涨、能源紧缺,所以迫切需要利用对环境更为友好的资源来替代或部分替代化学肥料。微生物菌剂作为植物生长促进剂和病虫害抑制剂,替代化学农药及肥料无疑是一条行之有效的路径^[1]。近几年的研究表明,微生物菌剂在促进植物生长和病虫害防治上表现出了巨大的潜力^[2-3],它们可利用其分泌的促生因子刺激植物产生生长素,协助植

物对营养元素的吸收,调节植物生长;还可利用其产生的抗菌活性成分或通过生态位和营养竞争等方式控制病原生物的生长繁殖,从而间接促进植物增产^[4-6]。

目前已有大量微生物被报道具有促生性能,包括芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、伯克氏菌属(*Burkholderia*)、固氮菌属(*Azotobacter*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)、农杆菌属(*Agrobacterium*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)和固氮螺菌属(*Azospirillum*)等^[7-9]。利用促生微

生物研制的微生物菌剂在 70 多个国家得到了广泛应用,特别是大豆种植大国,如美国、俄罗斯、巴西等,根瘤菌剂的接种率达到 90%以上^[10]。近些年来,国外许多大型生物科技公司均在积极开发微生物肥料产品,部分产品实现了规模化生产和大面积推广应用。

随着我国对生态环境和可持续农业发展的重视,促生微生物也得到了广泛的研究,具有促生性能的芽孢杆菌和荧光假单胞菌被不断发现,部分菌株已经被成功开发为微生物肥料^[11-12]。虽然我国的微生物肥料产业近 20 年得到了迅速的发展,但是与欧美发达国家相比差距仍然很大。目前,我国的微生物肥料使用量在肥料总用量中占比很低^[10],特别是对于我国的主要粮食作物——水稻,微生物肥料的使用比例更低。在化肥利用率逐年下降、稻田土壤微生态结构失衡的情况下,开发高效、稳定、多功能的微生物肥料,是改善水田土壤生态结构、保障水稻高质高效绿色生产的有效途径。有研究人员尝试从水稻根围和组织内挖掘促生长微生物,已发现多种具有促生性能的微生物,包括固氮菌属、芽孢杆菌属、假单胞菌属、伯克霍尔德氏菌属和草螺菌属(*Herbaspirillum*)等^[13-16]。靳海洋等^[15]从稻田土壤中分离的固氮菌 P208 兼具固氮、溶磷活性、吲哚乙酸(indole acetic acid, IAA)和铁载体合成能力。Shahzad 等^[16]从水稻种子中分离的解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) RWL-1 能分泌植物激素并促进水稻幼苗生长。然而,利用水稻促生微生物研制的水稻微生物肥料在市场上依然少见,而且仅有的少数肥料产品中微生物功能单一,稳定性有待提升。继续从水稻根围挖掘高效、多功能且效果稳定的促生微生物,是开发高效、稳定、多功能微生物肥料的前提和基础。

本研究主要以本课题组筛选获得的水稻内生和根围细菌为试验材料,通过平板活性测试筛

选出具有固氮、溶磷、解钾、产铁载体活性以及分泌 IAA 功能的微生物,并通过种子萌发实验和水稻幼苗促生实验对分离获得的微生物进行促生性能分析,评价其促生效果,以期找到能促进水稻生长的优势菌株,为水稻微生物肥料的研制提供菌种资源,同时为根围和内生微生物的进一步开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株

实验菌株由本实验室从水稻根围土和根组织中分离获得。根围土壤细菌的分离采用土壤稀释涂布法,用 NB 固体培养基(蛋白胨 10.0 g,牛肉膏 3.0 g,氯化钠 5.0 g,琼脂 20.0 g,蒸馏水 1.0 L, pH 7.2±0.2)在 28 °C 培养 48 h,进行分离纯化;根组织微生物是通过采集的根组织进行表面清洗和消毒后,研磨稀释并涂布 NB 培养基平板而获得。

1.2 水稻种子

水稻品种为‘晶两优华占’,是袁隆平农业高科技股份有限公司、湖南亚华种业科学研究院和中国水稻研究所选育的籼型两系杂交水稻品种。保存于 4 °C 冰箱中。

1.3 培养基

LB 培养基用于细菌的培养;阿须贝无氮固体培养基^[17]用于固氮菌的筛选;PKO 培养基^[18]和蒙金娜培养基^[19]分别用于溶无机磷和有机磷微生物的筛选;亚历山鲍罗夫培养基^[20]用于解钾菌的筛选;铬天青(chrome azurol S, CAS)检测培养基和改良金氏(modified King B, MKB)培养基参考陈伟等^[21]的方法配制,用于铁载体生产菌株的筛选。

1.4 促生菌株初筛

采用 LB 固体培养基活化菌株,28 °C 培养 48 h,然后用无菌牙签挑取菌落分别点接于 PKO

培养基、蒙金娜培养基、亚历山鲍罗夫培养基、阿须贝培养基和 CAS 检测培养基平板上, 置于 28 °C 培养箱中培养 3 d, 观察能否在选择培养基上生长或有无透明圈的出现。若菌株产生铁载体, CAS 平板应由蓝色变为橙色(橙色铁螯合圈), 根据橙色铁载体晕圈的大小初步确定菌株分泌铁载体的能力。菌株溶钾和固氮水平根据菌落直径进行初步判断; 菌株溶磷和产铁载体水平根据透明圈与菌落直径的比值判断。此外, 菌株分泌 IAA 的水平采用 Salkowski 比色法^[21], 通过肉眼观察白瓷板上反应液颜色变化进行判断: 颜色变粉红者为 IAA 分泌阳性, 颜色越深表示分泌水平越高, 不变色为阴性, 表示不能分泌 IAA。每个处理设置 3 个平行。

1.5 促生菌株复筛

1.5.1 菌株固氮能力检测

选择初筛在阿须贝无氮固体培养基上生长直径 10.0 mm 以上的菌株, 接种至新的阿须贝培养基上进行传代培养, 28 °C 培养 7 d, 连续传代 5 次, 观察菌株的生长情况。

1.5.2 菌株溶磷水平检测

将初筛中有透明圈出现的菌株接种于装有 50 mL 液体 PKO 和蒙金娜培养基的 500 mL 三角瓶中, 以不接菌的 PKO 和蒙金娜培养液作空白对照, 28 °C、180 r/min 振荡培养 7 d。发酵液在 4 °C、6 000 r/min 离心 15 min, 取 1 mL 上清液稀释 2–10 倍, 用钼锑抗比色法^[22]测定发酵上清液中的有效磷含量。

1.5.3 菌株解不溶性钾水平检测

挑取初筛时解钾菌落直径 10.0 mm 以上的菌株接种至 50 mL 亚历山鲍罗夫液体培养基中, 以未接种的培养基作为空白对照, 28 °C、180 r/min 振荡培养 7 d 和 10 d。发酵液 4 °C、6 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液, 利用火焰分光光度计测定发酵上清液中的有效钾含量^[23]。

1.5.4 菌株产铁载体水平检测

选择初筛实验中 CAS 平板上透明圈/菌落直径比 3.0 以上的菌株, 接种于 MKB 液体培养基中, 28 °C、180 r/min 振荡培养, 分别培养 2、3 和 7 d。发酵液于 6 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液。分别取 3 mL 上清液与 3 mL CAS 检测液充分混匀, 静置 1 h 后, 以超纯水作为对照调零, 采用分光光度计测定溶液在 630 nm 处的吸光值(A_s), 以未接种 MKB 液体培养基代替样品获得的吸光值作为参比值(A_r), 以铁载体相对表达量和 A_s/A_r 比值来评估菌株产铁载体水平。菌株铁载体的相对表达量 $=[(A_r-A_s)/A_r]\times 100^{[21]}$ 。

1.5.5 菌株分泌 IAA 水平检测

选择初筛试验中 IAA 分泌阳性的菌株接种至 0.6 mL LB 培养液/1.5 mL EP 管中, 30 °C、900 r/min 振荡培养 24 h。取上述培养液 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液。采用植物 IAA 试剂盒(上海酶联生物有限公司), 按试剂盒说明处理上清液, 并使用酶标仪(Multiskan SkyHigh, Thermo Fisher Scientific)检测其在 450 nm 处的吸光值。根据标准 IAA 的浓度和吸光度值绘制标准曲线, 获得线性方程, 根据线性方程计算不同菌株上清液中的 IAA 含量。

1.6 菌株初步鉴定

选取初、复筛中获得的具有三项及以上促生性状的优良菌株, 接种至 LB 液体培养基中, 28 °C、180 r/min 振荡培养 24 h, 提取其基因组 DNA, 进行 16S rRNA 基因 PCR 扩增, PCR 体系、引物及反应条件参照许丽宁^[12]的方法。PCR 产物经电泳纯化后送上海擎科生物有限公司长沙分公司进行测序, 测序结果在 GenBank 数据库中进行 BLAST 序列比对, 并运用软件 ClustalW 2 和 MEGA 7.0, 采用邻接法(neighbor-joining method)构建系统发育树。

1.7 促生菌株对水稻的效果研究

1.7.1 促生微生物菌悬液的制备

将筛选出的具有高效固氮、溶磷、解钾、产

铁载体和分泌 IAA 的细菌菌株接入 50 mL 的 LB 液体培养基中, 28 °C、180 r/min 振荡培养过夜, 用无菌水将培养液稀释至菌体浓度为 10^8 CFU/mL, 作为菌悬液备用。

1.7.2 水稻种子的消毒与催芽

挑选完整饱满的水稻种子, 在小烧杯中加入纯水将种子浸没并保持 30 min。剔除空秕粒后, 用 75% 的乙醇表面消毒 5 min, 1% NaClO 浸泡 5 min, 再用无菌水清洗 3–5 次。装入烧杯中加入无菌水浸没水稻种子, 于 30 °C 催芽 1 d。

1.7.3 水稻种子的促萌发试验

以无菌水为对照, 将催芽 1 d 的水稻种子在菌悬液中浸泡 1 h 后置于装有湿润滤纸的无菌培养皿中, 于人工气候培养箱中 30 °C、相对湿度 70%、光暗比为 16 h:8 h 条件下培养, 注意补充水分, 保持滤纸湿润。每个培养皿 30 粒种子, 重复 3 次, 培养 5 d 后观察并统计种子萌发率。发芽率=发芽的种子数/供试的种子数 \times 100%。

1.7.4 水稻植株促生试验

采用水培和盆栽 2 种方式检测能促进水稻种子萌发的菌株对水稻植株的促生效果。水稻种子的浸种和催芽按上述方法进行, 待芽长至 0.5–1.0 cm 后, 移栽至水培盒或盆栽盆中。水培试验采用 Hoagland 营养液进行培养^[24], 每个处理 40 个重复, 于人工气候培养箱中 25 °C、相对湿度 70%、光暗比 16 h:8 h 条件下培养, 13 d 和 21 d 后分别测定各处理水稻幼苗的根长、株高和侧根数。盆栽试验在装有 4.5 kg 灭菌土(蛭石:土质量比为 1:2)的盆栽盆(外径 30 cm, 底径 18 cm, 高 20 cm)中进行, 每盆播种 6 棵水稻幼苗, 每个处理重复 3 次, 以无菌水浸种的水稻幼苗作空白对照。自然状态培养, 分别在 30 d 和 60 d 统计水稻植株根长、株高、分蘖数, 以及地上、地下部分的干湿重。

1.8 数据统计和分析

采用 Excel 软件对数据进行处理和统计, 采

用 SPSS 19.0 软件(Duncan 法)对不同处理间的差异进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 水稻促生菌株的筛选

从水稻根围和组织中分离获得 394 株细菌, 对各菌株开展固氮、水解有机磷、无机磷、钾、产铁载体和 IAA 水平的定性检测, 初步获得 46 株功能各不相同的细菌菌株。

对 46 株初筛细菌分别进行固氮平板传代、溶磷、解钾和产铁载体、IAA 水平定量检测, 最终获得 6 株单一或综合促生因子水平较高的菌株(表 1)。6 株菌中, 所有菌株在固氮平板上传代 5 代均能良好生长。其中, 菌株 C7-1 还具有最高的溶有机磷能力; 7 d 发酵液中有有机磷溶解水平达 (32.15 ± 0.15) mg/L, 同时兼具 IAA 分泌和解钾能力; 菌株 L26 具有最强的溶无机磷、IAA 分泌水平和一定的解钾能力, 7 d 发酵液中无机磷溶解水平达 (150.15 ± 0.17) mg/L, IAA 分泌浓度达到 (32.17 ± 0.09) μ g/mL; 而菌株 GYM_bt5 则兼具有较强的溶无机磷、IAA 分泌和解钾水平; 另有 3 株菌 C10-19、20-10 和 S11-11 同时具有一定的产铁载体、IAA 和解钾能力, 其中 C10-19 产铁载体水平最高, 铁载体相对表达量为 $(93.46 \pm 2.54)\%$, As/Ar 值仅为 (0.07 ± 0.03) 。

2.2 水稻促生菌株的分子分类

对 6 株菌的 16S rRNA 基因序列进行 BLAST 比对, 采用 MEGA 7.0 构建系统发育树(图 1 和图 2)。结果显示, 菌株 C7-1、L26、C10-19 和 S11-11 分别与标准菌株嗜线虫沙雷氏菌(*Serratia nematodiphila*) DZ0503SBS1、阿耶波多氏芽孢杆菌(*Bacillus aryabhattai*) B8W22、别氏不动杆菌(*Acinetobacter bereziniae*) ATCC 17924、蒙氏假单胞菌(*Pseudomonas monteilii*) CIP 104883 处

表 1 水稻根围菌株的促生水平检测

Table 1 The growth-promoting level of the rice rhizosphere strains

菌株 Strains	固氮 Nitrogen fixation	有机 P Organophosphorus dissolution (mg/L)	无机 P Inorganic phosphorus dissolution (mg/L)	K Potassium dissolution (mg/L)	铁载体 Iron carrier As/Ar	Indole acetic acid (μg/mL)
C7-1	生长良好 Growing well	32.15±0.15	—	0.66±0.09	—	12.22±0.12
L26	生长良好 Growing well	—	150.15±0.17	0.31±0.13	—	32.17±0.09
GYM_bt5	生长良好 Growing well	—	139.24±0.36	0.96±0.04	—	25.24±0.15
20-10	生长良好 Growing well	—	—	1.29±0.11	0.34±0.07	4.99±0.26
C10-19	生长良好 Growing well	—	—	1.34±0.66	0.07±0.03	22.18±0.04
S11-11	生长良好 Growing well	—	—	0.16±0.03	0.18±0.06	17.94±0.04

注: —: 未检测到

Note: —: Not detected.

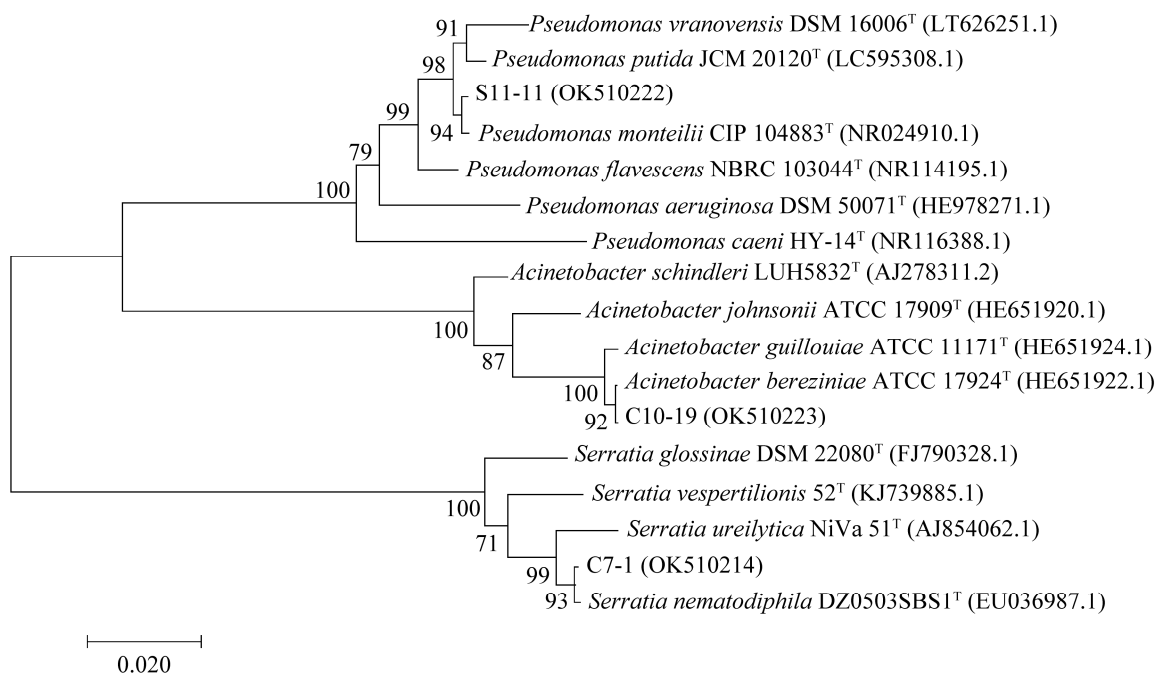


图 1 细菌菌株基于 16S rRNA 基因序列的邻接法系统发育树 括号中数字表示在 GenBank 中的登录号; 自举值大于 70% 的在分支上显示; 标尺的数据代表进化距离

Figure 1 Molecular phylogenetic tree of bacteria based on the sequence of 16S rRNA gene by the neighbor-joining method. Numbers in bracket represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar (0.020) represents sequence divergence.

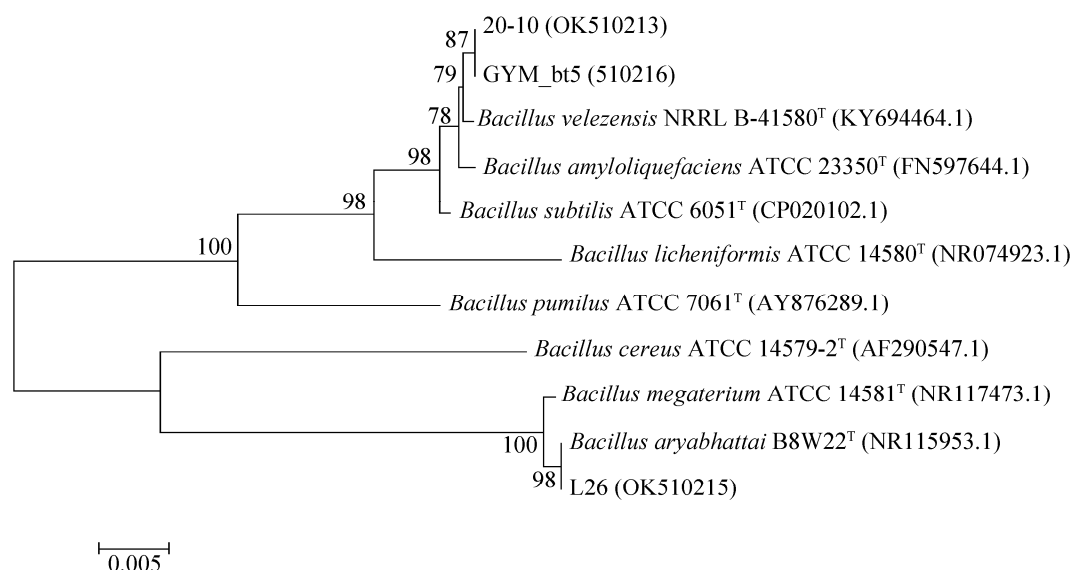


图 2 细菌菌株基于 16S rRNA 基因序列的邻接法系统发育树 括号中数字表示在 GenBank 中的登录号；自举值大于 70% 的在分支上显示；标尺的数据代表进化距离

Figure 2 Molecular phylogenetic tree of bacteria based on the sequence of 16s rRNA gene by the neighbor-joining method. Numbers in bracket represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar (0.005) represents sequence divergence.

于同一分支，序列相似性分别达到 99.85%、99.93%、99.85%和 99.78%，而菌株 GYM_bt5 和 20-10 相似性很高，并与贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) 标准菌株 NRRL B-41582 同处一个分支，相似性均达到 99.86%。6 个菌株与标准菌株之间的同源距离均低于亚种间距，因此初步鉴定 C7-1、L26、C10-19、S11-11、GYM_bt5 和 20-10 为嗜线虫沙雷氏菌、阿耶波多氏芽孢杆菌、别氏不动杆菌、蒙氏假单胞菌和贝莱斯芽孢杆菌。

2.3 促生菌株对水稻种子萌发的影响

6 株促生微生物处理‘晶两优华占’水稻种子后，除了菌株 C10-19 外，其他菌株均能在一定程度上促进水稻种子的萌发，种子萌发率可提高 25%–43%，其中菌株 S11-11 对种子萌发的促进水平最显著(表 2)。别氏不动杆菌 C10-19 虽然解钾和产铁载体水平最高，但该菌株培养液处理种

子后导致种子萌发延迟、萌发率下降，可能因为该菌株在分泌促生因子的同时还分泌了其他抑制种子萌发的物质。

2.4 促生菌株对水培水稻幼苗生长的影响

水培条件下，水稻‘晶两优华占’种子经促生菌株处理后，幼苗生长情况如表 3 所示。5 个菌株的浸种处理均能在早期显著提高水稻幼苗根的生长，培养 14 d 的处理根长比对照根长提高了 17.94%–42.19%，培养 21 d 的处理根长比对照根长提高了 10.40%–42.20%。5 个菌株中，菌株 20-10 和 C7-1 对根长的影响最显著，S11-11 在水培早期对根长影响显著，但随着培养时间的延长，显著性逐渐降低。部分菌株处理除了能显著影响根的生长外，还能显著促进茎的生长，如 20-10、C7-1 和 S11-11。部分菌株能促进侧根的发生，如 20-10、L26、GYM_bt5 和 S11-11，但这种显著性随着培养时间的延长而逐渐降低。

表 2 促生菌株处理对水稻种子萌发的影响

Table 2 Effects of growth-promoting strains on the germination of rice seeds

处理 Treatments	种子总数 1 Total number of seeds 1	萌发数 1 Seed germination number 1	种子总数 2 Total number of seeds 2	萌发数 2 Seed germination number 2	种子总数 3 Total number of seeds 3	萌发数 3 Seed germination number 3	平均萌发率 Average germination rate (%)
C7-1	31	20	32	18	32	21	62.13±5.85bc
L26	28	16	24	14	26	13	55.16±0.84b
GYM_bt5	31	16	28	16	30	17	55.14±3.91b
C10-19	25	9	30	12	26	11	39.44±3.19a
20-10	26	15	31	17	30	18	57.27±2.59bc
S11-11	26	18	26	15	35	22	63.26±8.16c
CK	28	12	28	13	30	13	44.21±2.53a

注: 表中同一列相同小写字母表示 0.05 水平差异不显著

Note: Values in the same columns that contain the same letters are not significantly different at 0.05 level.

表 3 不同菌株处理对水稻幼苗根茎生长的影响

Table 3 Effect of strains on the growth of rices root and stems

处理 Treatments	14 d			21 d		
	平均根长 Average root length (cm)	平均茎长 Average stem length (cm)	平均侧根数 Average number of lateral roots (each)	平均根长 Average root length (cm)	平均茎长 Average stem length (cm)	平均侧根数 Average number of lateral roots (each)
20-10	7.61±0.51d	20.58±1.95c	10.35±1.56cde	14.76±1.17d	23.31±1.34c	16.15±1.72a
C7-1	8.56±0.84c	19.94±1.61bc	9.85±1.38abc	14.07±1.39d	23.14±2.89c	16.05±2.35a
GYM_bt5	7.10±0.36c	18.23±1.17a	9.25±1.29ab	12.94±1.34a	21.96±1.80bc	14.90±2.75c
L26	7.03±0.71bc	18.55±2.02a	11.31±1.35c	13.17±1.93a	21.78±3.51bc	15.90±2.78c
S11-11	7.61±0.37d	20.18±2.95c	11.05±1.70de	11.46±1.21b	21.08±1.97ab	15.75±2.88ab
CK	6.02±0.42a	17.59±2.56a	8.85±1.98a	10.38±0.72a	19.80±2.00a	14.30±2.25a

注: 表中同一列相同小写字母表示 0.05 水平差异不显著

Note: Values in the same columns that contain the same letters are not significantly different at 0.05 level.

2.5 促生菌株对盆栽水稻植株生长的影响

在水培试验的基础上, 选择了 3 株促生效果显著的菌株 20-10, C7-1 和 S11-11 进行盆栽试验。通过对盆栽培养 30 d 和 60 d 水稻植株生长指标的统计发现, 3 株促生菌株处理后, 水稻植株在培养的第 30-60 天根长均显著高于对照, 30 d 时, 各处理后的水稻根长比对照增加 11.84%~22.02%; 60 d 时, 各处理后的水稻根长比对照增加 4.02%~7.29% (表 4)。该结果说明, 3 个促生菌株的处理能显著促

进水稻根的生长。其中嗜线虫沙雷氏菌 C7-1 对根的促生效果最显著。3 株菌中, 20-10 在 30 d 时对茎长的影响最显著, 而 S11-11 在分蘖期对茎的生长和分蘖促进效果更为显著。通过对水稻不同部位干湿重的统计分析发现, 微生物处理后的水稻地下部分的湿重数据远高于对照, 但经统计学分析发现该差异并不显著, 可能与植株样品数少、平行间标准差较大有关。微生物处理后的植株干重与对照未见显著性差异(数据未展示)。

表 4 菌株处理对盆栽水稻生长的影响

Table 4 Effect of microbial treatment on the growth of potted rice

培养时间	处理	根长	茎长	根茎比	分蘖数	地下部分湿重	地上部分湿重
The time of growth	Treatment	Root length (cm)	Stem length (cm)	Root length/stem length	Tiller number (each)	Wet weight of root (g)	Wet weight of stem (g)
30 d	20-10	12.85±0.35b	56.16±0.60b	0.22±0b	2.78±0.25a	1.79±0.24a	13.03±2.26a
	C7-1	14.02±0.52d	55.82±0.88ab	0.25±0c	3.22±0.09bc	2.29±0.42a	15.82±2.21a
	S11-11	13.19±0.20bc	55.01±0.04a	0.24±0c	2.89±0.19ab	2.01±1.06a	13.07±1.91a
	CK	11.49±0.35a	54.92±0.22a	0.16±0.09a	2.61±0.09a	1.22±0.04a	15.51±1.17a
60 d	20-10	27.23±0.88bc	66.17±0.97a	0.41±0.01bc	11.55±0.50abc	—	—
	C7-1	27.59±0.51bc	67.22±0.68b	0.41±0bc	11.77±0.38bc	—	—
	S11-11	26.88±0.39b	68.39±0.85c	0.39±0.01ab	12.77±0.19c	—	—
	CK	25.39±0.96a	65.60±0.69a	0.38±0.01a	10.44±0.69ab	—	—

注：表中同一列相同小写字母表示 0.05 水平差异不显著

Note: Values in the same columns that contain the same letters are not significantly different at 0.05 level.

3 讨论与结论

微生物肥料是化学肥料的重要替代资源,对于我国实施化学肥料减量前提下保障农作物产量、质量提升至关重要。植物根围促生菌是微生物肥料的主要活性成分,其可以利用自身的生理代谢固定空气中的氮,或溶解土壤中难以被植物直接利用的磷、钾,或螯合自然界中的铁,为其宿主生命活动提供丰富的 N、P、K 和 Fe 等营养元素^[25]。此外,微生物还可分泌吡啶乙酸等多种生长调节剂,促进植物生根、发芽并影响植物器官的发育^[26]。这些微生物来源于农作物组织或周边环境,容易在相似的环境下生存、定殖并发挥营养供体作用;同时它们的施入还能改善土壤微生态环境、促进作物生长并协助作物抵抗病原体的侵入^[27-28]。因此,筛选对植物生长有显著促进作用的根围促生细菌(plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR),对于如何利用有限的土地资源种植农作物并保障农产品质量具有非常重要的理论和应用价值。

该文以固氮、降解有机磷、无机磷、钾、产铁载体和 IAA 这 6 项指标作为综合考察菌株促生能力的评判标准,从分离的 394 株水稻根围细

菌中经过多轮筛选最终获得了 6 株多功能促生菌株,分别属于沙雷氏菌属、假单胞菌属、不动杆菌属和芽孢杆菌属,其中嗜线虫沙雷氏菌和别氏不动杆菌在促进植物生长方面鲜有报道。

为了获得准确的促生因子分泌水平,试验中分别在相应选择培养基中对待检菌株进行了 2–10 d 的培养,并对不同时间发酵液中促生因子的分泌水平分别进行了检测。研究结果显示,除了 C10-19 在第 7 天测得的溶钾水平最高外,其他所有菌株在第 10 天的溶钾水平最高;不同细菌分泌铁载体的特点不同,部分菌株在培养的第 2 天即达到峰值,此后随着培养时间的延长铁载体含量下降,部分菌株在培养第 3 天达到峰值,如菌株 S11-11 和 C10-19 等,还有部分菌株在第 7 天达到峰值,如菌株 20-10 (结果未显示)。根据赵翔等^[29]研究发现,菌株分泌铁载体并不是简单的累积效应,其合成和分泌可能与菌株的生长状态相关。该文作者后续也将继续研究促生菌株的生长状态与其促生因子水平之间的对应关系和影响因素。

为了系统评估促生微生物的促生效果,本文结合促生能力定性定量检测、水稻种子萌发、水稻幼苗和植株培养等手段,从细菌、水稻种子和

水稻幼苗3个层次综合评估了6株微生物的促生性能,获得了较全面的促水稻生长微生物特征。6株菌在促生性能上各有特点,所有菌株均对水稻种子萌发、根的生长有显著促进作用。其中,溶有机磷水平最高的嗜线虫沙雷氏菌 C7-1 在培养早期对水稻苗根的促生效果最显著,在盆栽试验中也有良好表现。Yarzabal 等^[30]研究发现,大多溶磷菌具有促作物生长的能力,但有的溶磷菌株只在室内培养基中具有溶磷功能,当把它们接入土壤后溶磷作用会减弱甚至消失。也有研究认为,在水稻移栽后2周内对磷素的需求量最多,而4周后磷素对水稻的增产效果明显下降^[31]。C7-1 的溶有机磷特性确实促进了水稻早期根的发育,而且该菌株在盆栽中依然有效,推测该菌株在土壤中依然具有较好的定殖能力,能在较长时间内发挥促生作用。具有较强溶无机磷和产 IAA 水平兼具一定解钾能力的阿耶波多氏芽孢杆菌 L26 和贝莱斯芽孢杆菌 GYM_bt5,在培养早期表现出一定的促生根作用,主要是促进侧根的发生。相似的实验结果在恶臭假单胞菌 GR12-2 中也有报道^[32]。已有研究表明,细菌分泌的 IAA 在一定浓度下能增加植物初生根和次生根的数目和长度,但是高浓度的 IAA 会抑制初生根的生长,这可能与 IAA 诱导合成的乙烯有关^[33-34]。然而 IAA 产量中等且具有较强的铁载体合成能力兼具一定解钾能力的蒙氏假单胞菌 S11-11,在水稻早期培养和盆栽试验中对根、茎生长和分蘖数上都表现出显著促进作用,并且该菌在促进水稻种子萌发以及分蘖期对茎的生长和分蘖促进效果最显著。推测该菌株分泌的 IAA 在刺激根系生长的浓度范围内,结合较强的产铁能力和一定的解钾能力,从而表现出较好的促生效果。解钾水平较高且兼具一定铁载体和 IAA 合成能力的贝莱斯芽孢杆菌 20-10 在水稻培养早期对根、茎的促生作用也非常显著,但在盆

栽中对水稻的促生显著性有所下降。本研究筛选出的多功能菌株解钾量普遍不高,相较于前人研究解钾菌的解钾量,造成这种差异的原因可能是菌株解钾能力存在差异及培养条件不同^[25]。另外,20-10 与 GYM_bt5 虽然都与贝莱斯芽孢杆菌相似度最高,但两者在促生性能上的差异导致了它们在促进水稻种子萌发和植株生长上的表现也不同。此外,虽然在别氏不动杆菌 C10-19 中检测出三项促生因子,但该菌株并未表现出促进水稻种子萌发的作用,推测该菌株发酵液中可能产生了某些代谢产物,其抑制了水稻种子的萌发,后续将考虑使用该菌株的纯菌体来进行进一步的促生研究,以期获得铁载体合成和溶钾水平与水稻促生效果之间的关系。

综上所述,本文获得的6株促生菌株其促生特性差异较大,其促生效果可能是各自产生的促生因子及其各促生因子之间协同发挥的作用,具体的促生机理还有待进一步探究。此外,将不同功能的微生物有机组合成微生物菌群,使其协同增效以达到更好的作物促生效果,也是将来促生微生物的发展趋势^[35-36]。本研究后续也将进一步研究如何有机复配具有不同功能的微生物,以期水稻微生物肥料提供优异的微生物菌群。

REFERENCES

- [1] Chouhan GK, Verma JP, Jaiswal DK, Mukherjee A, Singh S, De Araujo Pereira AP, Liu HW, Abd Allah EF, Singh BK. Phytomicrobiome for promoting sustainable agriculture and food security: opportunities, challenges, and solutions[J]. *Microbiological Research*, 2021, 248: 126763
- [2] Xu WF, Wang F, Zhang M, Ou T, Wang RL, Strobel G, Xiang ZH, Zhou ZY, Xie J. Diversity of cultivable endophytic bacteria in mulberry and their potential for antimicrobial and plant growth-promoting activities[J]. *Microbiological Research*, 2019, 229: 126328
- [3] Orozco-Mosqueda MDC, Rocha-Granados MDC, Glick BR, Santoyo G. Microbiome engineering to improve biocontrol and plant growth-promoting mechanisms[J].

- Microbiological Research, 2018, 208: 25-31
- [4] Santoyo G, Moreno-Hagelsieb G, Del Carmen Orozco-Mosqueda M, Glick BR. Plant growth-promoting bacterial endophytes[J]. Microbiological Research, 2016, 183: 92-99
- [5] Vurukonda SSKP, Giovanardi D, Stefani E. Plant growth promoting and biocontrol activity of *Streptomyces* spp. as endophytes[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(4): 952
- [6] Zeng JR, Xu T, Cao LD, Tong CY, Zhang X, Luo DY, Han SP, Pang P, Fu WB, Yan JD, et al. The role of iron competition in the antagonistic action of the rice endophyte *Streptomyces sporocinereus* OsiSh-2 against the pathogen *Magnaporthe oryzae*[J]. Microbial Ecology, 2018, 76(4): 1021-1029
- [7] Vurukonda SSKP, Giovanardi D, Stefani E. Plant growth promoting and biocontrol activity of *Streptomyces* spp. as endophytes[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(4): 952
- [8] Han H, Cai H, Wang XY, Hu XM, Chen ZJ, Yao LG. Heavy metal-immobilizing bacteria increase the biomass and reduce the Cd and Pb uptake by pakchoi (*Brassica chinensis* L.) in heavy metal-contaminated soil[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2020, 195: 110375
- [9] Guo JK, Lv X, Jia HL, Hua L, Ren XH, Muhammad H, Wei T, Ding YZ. Effects of EDTA and plant growth-promoting rhizobacteria on plant growth and heavy metal uptake of hyperaccumulator *Sedum alfredii* Hance[J]. Journal of Environmental Sciences, 2020, 88: 361-369
- [10] 杨鹤同, 徐超, 赵桂华, 席刚俊, 史俊. 微生物肥料在农林业上的应用[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(29): 10078-10080, 10082
Yang HT, Xu C, Zhao GH, Xi GJ, Shi J. The application of microbial fertilizer in agriculture and forestry[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2014, 42(29): 10078-10080, 10082 (in Chinese)
- [11] 范丙全. 我国生物肥料研究与应用进展[J]. 植物营养与肥料学报, 2017, 23(6): 1602-1613
Fan BQ. Advances in biofertilizer research and development in China[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizer, 2017, 23(6): 1602-1613 (in Chinese)
- [12] 许丽宁, 徐敬棋, 邵彩虹, 吴文革, 陈鸿飞, 林文雄. 再生稻根际促生菌的分离、筛选与鉴定[J]. 南方农业学报, 2020, 51(4): 814-821
Xu LN, Xu JQ, Shao CH, Wu WG, Chen HF, Lin WX. Isolation, screening and identification of plant growthpromoting rhizobacteria from ratooning rice[J]. Journal of Southern Agriculture, 2020, 51(4): 814-821 (in Chinese)
- [13] 戚秀秀, 魏畅, 刘晓丹, 张林利, 姜瑛, 张登晓. 根际促生菌应用于基质对水稻幼苗生长的影响[J]. 土壤, 2020, 52(5): 1025-1032
Qi XX, Wei C, Liu XD, Zhang LL, Jiang Y, Zhang DX. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria added in seedling substrate on rice growth[J]. Soils, 2020, 52(5): 1025-1032 (in Chinese)
- [14] 王志山, 黎妮, 王伟平, 刘洋. 水稻种子内生细菌研究进展[J]. 生物技术通报, 2022, 38(1): 236-246
Wang ZS, Li N, Wang WP, Liu Y. Research progress in endophytic bacteria in rice seeds[J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(1): 236-246 (in Chinese)
- [15] 靳海洋, 王慧, 张燕辉, 胡天龙, 林志斌, 刘本娟, 蔺兴武, 谢祖彬. 稻田土壤固氮菌株的分离筛选及促生潜力[J]. 生物技术通报, 2020, 36(6): 73-82
Jin HY, Wang H, Zhang YH, Hu TL, Lin ZB, Liu BJ, Lin XW, Xie ZB. Isolation, screening and plant growth-promoting potential of nitrogen-fixing strains from paddy soils[J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(6): 73-82 (in Chinese)
- [16] Shahzad R, Bilal S, Imran M, Khan AL, Alosaimi AA, Al-Shwyeh HA, Almahasheer H, Rehman S, Lee IJ. Amelioration of heavy metal stress by endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 in rice by regulating metabolic changes: Potential for bacterial bioremediation[J]. The Biochemical Journal, 2019, 476(21): 3385-3400
- [17] Ben Abdallah D, Frikha-Gargouri O, Tounsi S. Rizhospheric competence, plant growth promotion and biocontrol efficacy of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. plantarum strain 32a[J]. Biological Control, 2018, 124: 61-67
- [18] Pikovskaya RI. Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species[J]. Microbiologiya, 1948, 17: 362-370
- [19] 王欢, 王敬敬, 徐松, 赵维, 韩一凡, 王兴彪, 黄志勇. 有机磷降解菌的筛选及其促生特性[J]. 微生物学报, 2017, 57(5): 667-680
Wang H, Wang JJ, Xu S, Zhao W, Han YF, Wang XB, Huang ZY. Screening and growth promoting characteristics of efficient organophosphate-degradation bacteria[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2017, 57(5): 667-680 (in Chinese)
- [20] 李凤汀, 郝正然, 杨则瑗, 张春莉. 硅酸盐细菌 HM8841 菌株解钾作用的研究[J]. 微生物学报, 1997, 37(1): 79-81
Li FT, Hao ZR, Yang ZY, Zhang CL. Studies on the ability of silicate bacteria hm8841 strain dissolving potassium[J]. Acta Microbiologica Sinica, 1997, 37(1): 79-81 (in Chinese)

- [21] 陈伟, 舒健虹, 陈莹, 曾庆飞, 王小利, 陆瑞霞, 付薇. 黑麦草根际铁载体产生菌 WN-H3 的分离鉴定及其产铁载体培养条件的优化[J]. 生物技术通报, 2016, 32(10): 219-226
- Chen W, Shu JH, Chen Y, Zeng QF, Wang XL, Lu RX, Fu W. Screening, identification and fermentation condition optimum of a siderophore-producing bacteria WN-H3 from rhizosphere of ryegrass[J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(10): 219-226 (in Chinese)
- [22] 杨顺, 杨婷, 林斌, 刘杏忠, 向梅春. 两株溶磷真菌的筛选、鉴定及溶磷效果的评价[J]. 微生物学报, 2018, 58(2): 264-273
- Yang S, Yang T, Lin B, Liu XZ, Xiang MC. Isolation and evaluation of two phosphate-dissolving fungi[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, 58(2): 264-273 (in Chinese)
- [23] 闫雅楠, 叶小齐, 吴明, 闫明, 张昕丽. 入侵植物加拿大一枝黄花根际解钾菌多样性及解钾活性[J]. 植物生态学报, 2019, 43(6): 543-556
- Yan YN, Ye XQ, Wu M, Yan M, Zhang XL. Diversity and potassium-solubilizing activity of rhizosphere potassium-solubilizing bacteria of invasive *Solidago canadensis*[J]. Chinese Journal of Plant Ecology, 2019, 43(6): 543-556 (in Chinese)
- [24] 胡展, 雷平, 郭照辉, 杨华, 肖蓉, 罗璐君, 黄军, 付祖姣. 生防放线菌 Ahn75 的荧光标记及其在水稻中的定殖[J]. 微生物学通报, 2019, 46(10): 2612-2619
- Hu Z, Lei P, Guo ZH, Yang H, Xiao R, Luo RJ, Huang J, Fu ZJ. Fluorescent marker of biocontrol actinomycetes Ahn75 and its colonization in rice[J]. Microbiology China, 2019, 46(10): 2612-2619 (in Chinese)
- [25] 刘娜. 解磷解钾促生微生物肥料用菌株的分离[D]. 沈阳: 沈阳农业大学硕士学位论文, 2020
- Liu N. The separation of microbial fertilizer strains was promoted by the hydrolysis of phosphorus and potassium[D]. Shenyang: Master's Thesis of Shenyang Agricultural University, 2020 (in Chinese)
- [26] 张建. 小麦高效 PGPR 菌的筛选鉴定及多色 FISH 检测促生菌在根部的定殖[D]. 合肥: 安徽农业大学博士学位论文, 2012
- Zhang J. Isolation and identification of high efficient wheat PGRPs and detection of colonization of PGPR in wheat rhizosphere by multiplex-FISH[D]. Hefei: Doctoral Dissertation of Anhui Agricultural University, 2012 (in Chinese)
- [27] Zeng JR, Xu T, Cao LD, Tong CY, Zhang X, Luo DY, Han SP, Pang P, Fu WB, Yan JD, et al. The role of iron competition in the antagonistic action of the rice endophyte *Streptomyces sporocinereus* OsiSh-2 against the pathogen *Magnaporthe oryzae*[J]. Microbial Ecology, 2018, 76(4): 1021-1029
- [28] 陈慧. 连作白术根际土壤变化及 PGPR 菌肥缓解白术连作障碍研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院硕士学位论文, 2014
- Chen H. Variation of rhizosphere soil on continues cropping atractylodes macrocephala and alleviation for a macrocephala cropping obstacles through different kinds of PGPR fertilizer[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Forestry, 2014 (in Chinese)
- [29] 赵翔, 陈绍兴, 谢志雄, 沈萍. 高产铁载体荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* sp. F 的筛选鉴定及其铁载体特性研究[J]. 微生物学报, 2006, 46(5): 691-695
- Zhao X, Chen SX, Xie ZX, Shen P. Isolation, identification and over-siderophores production of *Pseudomonas fluorescens* sp. F[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2006, 46(5): 691-695 (in Chinese)
- [30] Yarzabal LA. Agricultural Development in Tropical Acidic Soils: Potential and Limits of Phosphate-Solubilizing Bacteria Soil Biology and Agriculture in the Tropics, 2010, 21: 209-233
- [31] 苏阳, 刘德琳. 控释氮肥对杂交水稻磷的吸收、残留和土壤固定磷的影响[J]. 湖南农业科学, 2006(6): 59-62
- Su Y, Liu DL. Effect of controlled release nitrogen fertilizer on phosphorus absorption and residuum in hybrid rice and soil-fixed P[J]. Hunan Agricultural Sciences, 2006(6): 59-62 (in Chinese)
- [32] Patten CL, Glick BR. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(8): 3795-3801
- [33] Pilet PE, Saugy M. Effect on root growth of endogenous and applied IAA and ABA: A critical reexamination[J]. Plant Physiology, 1987, 83(1): 33-38
- [34] Barbieri P, Galli E. Effect on wheat root development of inoculation with an *Azospirillum brasilense* mutant with altered indole-3-acetic acid production[J]. Research in Microbiology, 1993, 144(1): 69-75
- [35] 吕博, 孟庆忠, 张成, 曹阳, 韩光明, 张胜昔, 房健, 易先达. 复合微生物肥对棉花生长与产量的影响[J]. 新疆农业科学, 2021, 58(6): 1006-1011
- Lü B, Meng QZ, Zhang C, Cao Y, Han GM, Zhang SX, Fang J, Yi XD. Effects of compound microbial fertilizer on growth and yield of cotton[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2021, 58(6): 1006-1011 (in Chinese)
- [36] Yang WL, Gong T, Wang JW, Li GJ, Liu YY, Zhen J, Ning M, Yue DD, Du ZM, Chen GC. Effects of compound microbial fertilizer on soil characteristics and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 2020, 20(4): 2740-2748