

研究报告

产铁载体菌株的分离、培养条件优化及初步应用

许佳露^{1,2}, 张平^{*1,2}, 李美芳^{1,2}, 廖柏寒^{1,2}, 彭佩钦^{1,2}, 李靖^{1,2}, 梅金星^{1,2}

1 中南林业科技大学环境科学与工程学院, 湖南 长沙 410004

2 中南林业科技大学稻米品质安全控制湖南省工程实验室, 湖南 长沙 410004

许佳露, 张平, 李美芳, 廖柏寒, 彭佩钦, 李靖, 梅金星. 产铁载体菌株的分离、培养条件优化及初步应用[J]. 微生物学通报, 2022, 49(3): 1004-1016

Xu Jialu, Zhang Ping, Li Meifang, Liao Bohan, Peng Peiqin, Li Jing, Mei Jinxing. Isolation, culture condition optimization, and preliminary application of siderophore-producing strains[J]. Microbiology China, 2022, 49(3): 1004-1016

摘 要:【背景】微生物菌肥是推动绿色农业发展的关键。铁载体是由植物根际微生物产生的一类低分子量金属离子螯合物, 可通过螯合 Fe^{3+} 促进植物生长, 因此, 筛选具有高产铁载体功能的菌种意义重大。【目的】从植株根际土壤中分离高产铁载体微生物, 为开发植物根际促生菌提供种质资源。【方法】采用 chrome azurol sulfonate (CAS) 平板覆盖法分离、纯化获得高产铁载体真菌菌株, 通过形态观察及 18S rRNA 基因序列分析对菌株进行鉴定, 在此基础上, 采用单因素实验法优化其产铁载体条件, 并通过上海青水培试验, 初步考察菌株的促生效应。【结果】分离获得 4 株产铁载体真菌菌株, 其中一株菌产铁载体能力相对较强, 编号为 RL1, 初步鉴定为黑曲霉 (*Aspergillus niger*)。RL1 的最佳产铁载体培养条件为: 初始 pH 5.0, 碳源葡萄糖含量 5 g/L, 温度 20 °C, 培养时间 5 d, 转速 60 r/min。随着 RL1 菌悬液浓度的增加, 上海青植株的鲜重和叶片光合色素含量均逐渐增大。当施加最大浓度孢子菌悬液 (3.2×10^8 CFU/mL) 时, 植株的总鲜重量和茎叶鲜重量增幅分别为 75.0% 和 74.4%, 叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素含量增幅分别为 49.8%、70.9% 和 26.7%。【结论】本研究分离获得一株高产铁载体真菌菌株 RL1, 优化后的培养条件更利于菌株铁载体的合成, 而且该菌株能够有效促进上海青幼苗的生长。

关键词: 微生物; 铁载体; 条件优化; 水培试验; 鲜重; 光合色素

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0801105); 农业部与财政部科研专项(农办财函[2016] 6 号); 湖南省重点学科建设项目(2006180)

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2017YFD0801105); Special Funds for Scientific Research of Ministry of Agriculture and Ministry of Finance of China ([2016] 6); Key Discipline Construction Project in Hunan Province (2006180)

*Corresponding author: E-mail: zhyp2008@163.com

Received: 2021-08-10; Accepted: 2021-10-24; Published online: 2021-12-16

Isolation, culture condition optimization, and preliminary application of siderophore-producing strains

XU Jialu^{1,2}, ZHANG Ping^{*1,2}, LI Meifang^{1,2}, LIAO Bohan^{1,2}, PENG Peiqin^{1,2}, LI Jing^{1,2}, MEI Jinxing^{1,2}

1 College of Environmental Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, Hunan, China

2 Hunan Engineering Laboratory for Control of Rice Quality and Safety, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, Hunan, China

Abstract: [Background] The key to promoting green agriculture is microbial fertilizer. Siderophore is a low molecular iron chelate produced by rhizosphere microorganisms, which can promote plant growth by chelating Fe^{3+} . Therefore, it is of great significance to screen out the strains with high-yield siderophore. [Objective] In order to provide germplasm resources for the development of plant growth-promoting bacteria, we isolated high-yielding siderophore microorganisms from rhizosphere soil. [Methods] A fungal strain with high yield of siderophore was isolated and purified by chrome azurol sulfonate (CAS) overlay plate method. The strain was identified based on morphological observation and 18S rRNA gene analysis. The culture conditions for siderophore production were optimized by single factor experiment, and the growth-promoting effect of the strain was preliminarily investigated by hydroponic experiment of Chinese cabbage. [Results] Four strains of siderophore-producing fungi were isolated, one of which with strong siderophores-producing ability was numbered RL1 and preliminarily identified as *Aspergillus niger*. The optimal culture conditions for siderophore production of strain RL1 were as follows: initial pH 5.0, carbon source of glucose at 5 g/L, temperature at 20 °C, culture time of 5 days, and rotational speed of 60 r/min. The fresh weight and photosynthetic pigment content of Chinese cabbage increased with the increase in the concentration of RL1 suspension. When the maximum concentration (3.2×10^8 CFU/mL) of suspension was applied, the total fresh weight and the aboveground weight of Chinese cabbage increased by 75.0% and 74.4%, respectively, and the content of chlorophyll a, chlorophyll b, and carotenoid increased by 49.8%, 70.9% and 26.7%, respectively. [Conclusion] In this study, a fungal strain RL1 with high-yield siderophore was isolated. High siderophore production of the strain was achieved at optimized culture conditions, and the strain could effectively promote the growth of Chinese cabbage seedlings.

Keywords: microorganism; siderophore; condition optimization; hydroponic experiment; fresh weight; photosynthetic pigments

我国是人口大国,也是粮食消费大国,近几十年来,农业生产中常施用化肥以达到增产的目的。化肥的普遍使用保障了我国粮食基本需求的同时,却对土壤环境的质量造成了威胁,使农产品品质下降,未被利用的氮、磷、钾等养分随降雨进入到江河与地下水等生态环境

中,导致江河水体富营养化,引起环境污染和区域生态失衡。因此,研制出可降低化肥用量并符合农业可持续发展的新型肥料十分必要^[1]。植物根系土壤中生存着大量有益菌,具有促进植物生长、增加作物产量和防治病害等重要作用,这种微生物称为植物根际促生菌(plant growth

promoting rhizobacteria, PGPR)^[2-3]。自 Burr 等在 1978 年报道了 2 株对马铃薯生长具有促生作用的 PGPR 以来,其在生物圈运作中的作用变得越来越重要^[4]。目前有关 PGPR 对作物的促生作用已有大量报道。Cavite 等^[5]研究分离出的根际菌 IBBw_{1a} 接种到早稻幼苗后,早稻根长比未接种对照显著提高了 60%;李福艳等^[6]从植物根际土壤中筛选了 3 株芽孢杆菌(YC9L、YC3172 和 YC5064),这 3 株菌在玉米种子发芽试验、生菜和玉米盆栽试验上均表现出明显的促生能力;邓振山等^[7]分离了 4 株促生菌,通过多菌混合接种小麦盆栽试验的结果显示,经 SX-30、SX-12 和 XJ-4 混合菌液处理的小麦叶绿素含量显著增加了 129.94%,经 SX-12 和 XJ-4 混合菌液处理的小麦幼苗鲜重显著增加了 182.12%。

PGPR 的促生功能主要分为 3 个方面:(1) 通过生物产生铁载体、释磷、解钾和固定氮素等作用促进植物营养吸收;(2) 通过产生生长素(indole-3-acetic acid, IAA)、赤霉素(gibberellin)、细胞分裂素(cytokinin, CTK)或 ACC 脱氨酶等调节植物生长;(3) 通过分泌的抗生素、脂多糖和酶类等防治植物病害^[8-9]。PGPR 可通过一种或多种机制来促进植物生长和增加农作物产量,从而降低农药化肥的使用量,降低生产成本,促进生态农业绿色发展等^[10-12]。铁元素是植物和微生物生长不可或缺的重要元素,其在生理条件下溶解度很低,难以被生物吸收^[13]。农业生产普遍面临着植物缺铁的问题,微生物为适应低铁环境进化出了几种高亲和力铁摄取系统来解决环境中微生物可利用铁含量过低的问题,其中铁载体是微生物铁吸收的一种重要方式^[14]。大多数有益菌可在铁元素匮乏时分泌低分子量、强螯合能力的铁载体,改善微生物对铁离子的吸收运输,增加环境中铁离子移动

性,由此大幅增加植物生产的生物量^[15]。与细菌产铁载体的研究相比,真菌产铁载体的相关知识相对较少。已有文献详细阐述了真菌铁载体的生物合成机制^[16-17],其所产铁载体类型主要为羟肟酸型(hydroxamates)和羧酸盐型(carboxylates),张孝龙等^[18]研究的 4 株铁载体高产真菌证实了这点。胡琦鹏^[19]分离了 8 株真菌,它们均有分泌铁载体的能力,实验表明,其中产铁载体能力最强的真菌 P8 对蓝莓和笃斯越桔组培苗的株高、地径、地上部分鲜重、根系长度和表面积均有显著的促进作用。真菌铁载体的合成除了在植物营养方面发挥重要作用,研究显示其在植物保护^[20]、环境保护^[21]和医疗^[22]等方面都有着重要的影响。因此,开展高产铁载体真菌资源的收集和处理具有重要的意义。基于此,本研究主要考察 PGPR 的产铁载体能力。

在微生物代谢过程中,培养基和培养环境对菌体的生长、产物的合成及代谢产量均有重要的影响,因此,对高产铁载体菌株培养条件的优化至关重要。吴岭等^[23]研究发现,菌株 WJ-3 在优化碳源、温度、转速以及初始培养基 pH 等条件后,微生物产生的铁载体螯合剂的合成率可达 64.42%;李韵雅^[24]分离出一株特基拉芽孢杆菌 CD36,通过单因素试验对其发酵条件进行优化,所产铁载体的当量浓度为 1.17 mmol/L,是未优化前的 2.6 倍。

随着人们饮食生活习惯的改变,蔬菜需求量逐年增加,目前根际促生真菌对蔬菜作物作用的研究较少。本文通过 chrome azurol sulfonate (CAS)平板覆盖法分离筛选得到一株高产铁载体的真菌菌株,并研究菌株产铁载体的最佳培养条件;在此基础上,通过水培试验初步探讨菌株对上海青的促生效应,以期能为开发植物根际促生菌提供种质资源。

1 材料与方 法

1.1 材 料

(1) 菌株来源: 从中南林业科技大学生命科学楼旁的一株紫叶李的根际土壤中分离得到菌株。

(2) 供试植物: 上海青, 购自长沙县北山镇农贸市场。

(3) PDA 培养基: 马铃薯 200.0 g, 葡萄糖 20.0 g, 琼脂 18.0 g, 去离子水 1 L。PDB 培养基为不添加琼脂的 PDA 培养基。

(4) CAS 检测培养基^[25]: CAS 60.5 mg, 十六烷基三甲基溴化铵(HDTMA) 72.9 mg, 1 mmol/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10 mmol/L HCl 配制) 10 mL, 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 50 mL, 琼脂 9.0 g, 去离子水 940 mL。

(5) 磷酸盐缓冲液^[26]: 磷酸二氢钠 5.91 g, 磷酸氢二钠 24.27 g, 氯化铵 2.50 g, 磷酸二氢钾 0.75 g, 氯化钠 1.25 g, 去离子水 1 L。

(6) 铁载体 CAS 检测液^[27]: 溶液 A: 称取 0.079 g CAS 溶于 50 mL 去离子水中, 再加入 10 mL 1 mmol/L FeCl_3 溶液(HCl 配制); 溶液 B: 将 0.069 g 十六烷基三甲基溴化铵(HDTMA)溶于 40 mL 的去离子水中; 将 A 溶液沿烧杯壁缓缓加入 B 溶液中, 搅拌混匀即得 100 mL CAS 蓝色检测液。

(7) 营养液配制^[28]: 硝酸钙 0.85 g, 硝酸钾 0.40 g, 硫酸镁 0.30 g, 磷酸二氢氨 0.15 g, 去离子水 1 L。

1.2 方 法

1.2.1 产铁载体菌株的分离与鉴定

(1) 菌株的分离与纯化

称取土样 10 g 放入 90 mL 无菌水制成土壤菌液, 取 5 管含有 9 mL 无菌水的试管, 按 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 依次编号。在无菌操作

条件下, 用 1 mL 无菌移液管吸取 1 mL 10^{-1} 浓度的菌液于 9 mL 无菌水中, 吹洗移液管 3 次, 摇匀, 此菌液浓度为 10^{-2} 。按此方法依次稀释到 10^{-5} 。取 10^{-4} 、 10^{-5} 两管稀释液各 0.2 mL 涂布接种到 PDA 培养基上, 每个稀释度接种 2 个平皿。将接种了土壤悬液的平板置于生化培养箱中, 28 °C 条件下培养 5–6 d。从平板中挑取长势良好的不同单菌落, 划线接种至 PDA 培养基, 28 °C 恒温培养箱培养 3–6 d。培养后观察是否为纯菌, 若不纯则分别挑取形态不同的菌落分别在 PDA 培养基平板划线, 重复挑取和纯化步骤。将纯化菌株用固体斜面培养基 28 °C 培养 3–6 d 后于 4 °C 保存。

(2) 菌株的分子生物学鉴定

真菌 DNA 的提取使用 TSINGKE DNA 凝胶回收试剂盒, 以菌株 DNA 为模板, 采用真菌通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAAGGTGAACCTGGG-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')进行 18S rRNA 基因的 PCR 扩增并测序^[29], 由基源(长沙)生物科技有限公司完成菌株的分子生物学鉴定。PCR 反应体系(50 μL): PCR Mix 25 μL , 模板 1 μL , ITS1、ITS4 引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)各 2 μL , ddH_2O 20 μL 。PCR 反应条件: 98 °C 2 min; 98 °C 10 s, 54 °C 10 s, 72 °C 10 s, 35 个循环; 72 °C 5 min。PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测后进行基因测序, 测序结果利用 BLAST 在 GenBank 数据库中进行相似性比较并鉴定。利用 MEGA 7.0 进行基因序列的比对与系统发育树的构建(采取 neighbor-joining 法, bootstrap 值为 1 000)。

1.2.2 菌株的产铁载体能力检测

(1) 定性检测^[30]

用 CAS 平板覆盖法确定菌株的产铁载体能力, 即 CAS 溶于水后与十六烷基三甲基溴化铵(HDTMA)形成蓝色络合物溶液, 当样品中含有

铁载体时,铁载体能与铁离子高效络合,络合物被破坏,游离出红色的CAS,在固体检测中形成黄色或橙红色晕圈。

将纯化得到的单菌落点接种在PDA培养基上,在生化培养箱中于28℃条件下培养5 d。待灭菌后的CAS检测培养基冷却至40℃左右时,将其按照每个平板10 mL倒入PDA培养基平板中,放置1 h观察每个平板的颜色变化。

(2) 定量检测^[31]

将4℃保存的菌株接种于PDA培养基平板上,于28℃生化培养箱下培养3~5 d,再挑取菌丝至100 mL的PDB培养基中,于28℃、120 r/min条件下持续培养5 d,四层擦镜纸过滤后在5 000 r/min的条件下离心10 min,弃去上清液,无菌水洗涤菌体,5 000 r/min离心10 min,再次弃去上清液,如此重复洗涤3次,收集菌体,制成孢子菌悬液。

将菌液以5% (体积分数)的接种量接种于PDB培养基中,于28℃、120 r/min培养5 d后,8 000 r/min离心15 min得到上清液。准备数根PC管,每根PC管中各加入3 mL的CAS检测液,再分别加入待测上清液,混匀静置1 h后,在630 nm处检测其吸光度 A_1 。另取3 mL未接种的PDB培养基与3 mL的CAS检测液充分混匀,采用同样的方法测定其吸光度作为参比值 A_0 。铁载体合成率的计算公式为:铁载体合成率(%)= $\frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100$ 。

1.2.3 菌株产铁载体的培养条件优化

(1) 培养基初始pH对菌株产铁载体的影响

培养基的自然pH值为6.0,因此,将各组PDB液体培养液初始pH值分别调节为4.0、5.0、7.0和8.0,以自然pH(未调节pH)的一组作为对照组,用CK表示。将培养好的菌液按5% (体

积分数)的接种量接种(下同),于28℃、120 r/min条件下培养5 d。然后计算菌株铁载体合成率,实验设3个重复(下同)。

(2) 培养基中葡萄糖用量对菌株产铁载体的影响

碳源是合成菌体和铁载体的能量来源,在PDB培养基中,马铃薯和葡萄糖是最常用的碳源,考虑到马铃薯廉价易得,所以只考察了作为碳源的葡萄糖用量对菌株产铁载体的影响。将各组葡萄糖用量分别设定为0、5、10、15、20 g/L,用0.1 mol/L的HCl或NaOH将各组培养液的初始pH值调为6.0(若pH值在5.0~6.0之间,则可不调节pH值,下同),于28℃、120 r/min条件下培养5 d。

(3) 培养温度对菌株产铁载体的影响

设置转速为120 r/min,分别于20、30、40℃条件下培养5 d。

(4) 培养时间对菌株产铁载体的影响

设置转速为120 r/min,于28℃分别培养2、3、4、5、6、7 d。

(5) 转速对菌株产铁载体的影响

在28℃条件下,分别于0、60、120、200 r/min转速条件下培养5 d。

1.2.4 上海青幼苗水培试验

将大致均匀的上青幼苗(长到第5片叶子)移至含有20 mL营养液的无盖育苗盒中(长30 mm,宽30 mm,高50 mm),一盒2株。将育苗盒置于人工气候箱中(日间24℃、16 h,晚上18℃、8 h)。试验设4个处理,均接种8 mL的RL1孢子菌悬液(菌浓度分别为0、 0.8×10^8 、 1.6×10^8 、 3.2×10^8 CFU/mL,分别以CK、T1、T2、T3表示),每个处理重复3次。种植过程中各育苗盒随机放置,每3 d更换一次营养液和菌液(菌浓度同上),培养20 d后测定。

将培养20 d的上青用自来水和去离子水

洗净,于通风处风干 24 h,分离根系和茎叶部,称重并分别记录其鲜重量。取一部分叶片鲜样,分别于 663、645 和 470 nm 波长下测定叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素含量^[32]。

1.2.5 样品分析与数据处理

文中数据均取 3 次重复的平均值,用 Microsoft Excel 2010 和 SPSS 24 软件进行数据分析。采用 Duncan 多重比较法($P<0.05$)分析各处理间差异,制图采用 Origin 9.0 软件。

2 结果与分析

2.1 菌株分离结果及促生能力检测

经过分离和纯化获得 4 株真菌,编号分别为 RL1、H4、SB3、ZR1。用 CAS 平板覆盖法确定菌株的产铁载体能力(图 1、表 1),4 株真菌都有黄色或橙红色晕圈,其中 RL1 长势最好,培养基已无蓝色络合物,说明菌株 RL1 产铁载体能力最强。因此,后续试验以 RL1 为对象开展研究。

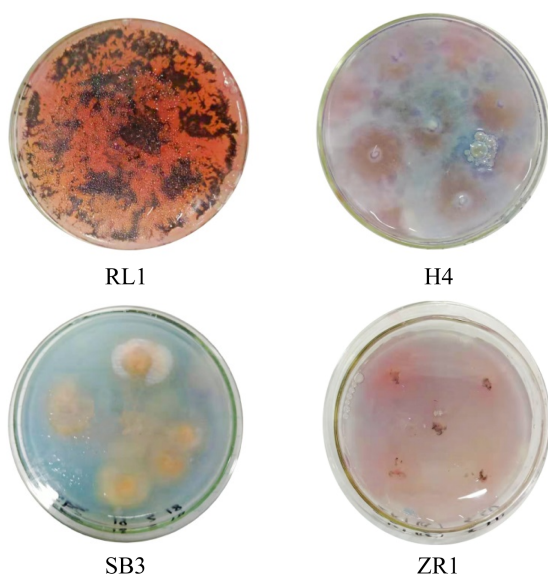


图 1 菌株的产铁载体能力定性结果

Figure 1 Qualitative results of siderophore produced by strains.

表 1 菌株的产铁载体能力定量结果

Table 1 Quantitative results of siderophore produced by strains

菌株	铁载体合成率
Strain	Siderophore synthesis rate (%)
SB3	16
H4	44
ZR1	63
RL1	89

2.2 产铁载体菌株的鉴定

通过上述筛选(图 1、表 1)获得一株高产铁载体真菌菌株 RL1。菌落 RL1 繁殖能力强,开始为白色,然后变成鲜黄色直至黑色厚绒状,背面中央略带黄褐色;分生孢子梗壁平滑,孢子顶囊呈近球形,小梗上长有成串褐黑色的球状分生孢子,产孢结构单层(图 2A-2D)。

菌株 RL1 测序结果在 NCBI (NCBI 登录号为 MZ769138)中与已知核酸序列进行 BLAST

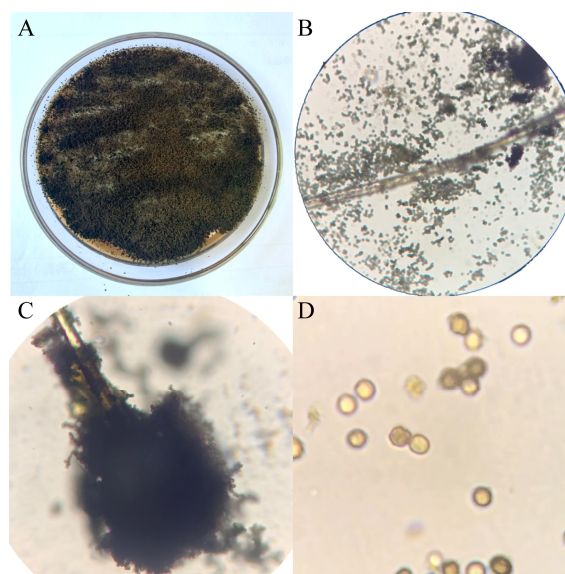


图 2 菌株 RL1 菌落形态和微观结构 A: 菌落形态; B: 分子孢子梗; C: 孢子顶囊; D: 分生孢子

Figure 2 Colony morphology and microstructure of strain RL1. A: Colony morphology; B: Conidiophore; C: Sporangium; D: Conidia.

相似性比对,结果表明,菌株 RL1 与 *Aspergillus niger* 的相似性达到 99%以上。选取与菌株 RL1 相似性相近的菌株,用软件 MEGA 7.0 采用邻接法(neighbour-joining method)构建菌株 RL1 的系统进化发育树,初步鉴定 RL1 为黑曲霉(*Aspergillus niger*),见图 3。

2.3 菌株产铁载体的培养条件优化结果

微生物在代谢过程中,培养条件对其产铁载体合成率有较大的影响。为进一步挖掘 RL1 菌株的产铁载体潜力,采用单因素试验法对其培养条件进行了较为系统的研究,主要考察了

培养基的不同初始 pH、碳源(葡萄糖)含量、培养温度、培养时间及摇床转速对其产铁载体能力的影响^[33]。

2.3.1 培养基初始 pH 对菌株产铁载体影响的结果

如图 4 所示,该菌株产铁载体能力受培养液初始 pH 的影响较大。当培养液初始 pH 值为 4.0、8.0 时,与自然培养液初始 pH 相比,菌株 RL1 的铁载体合成率显著下降(其中自然培养液初始 pH 的菌株铁载体合成率为 58.8%),分别下降了 31.9%和 27.8%;当培养液初始 pH

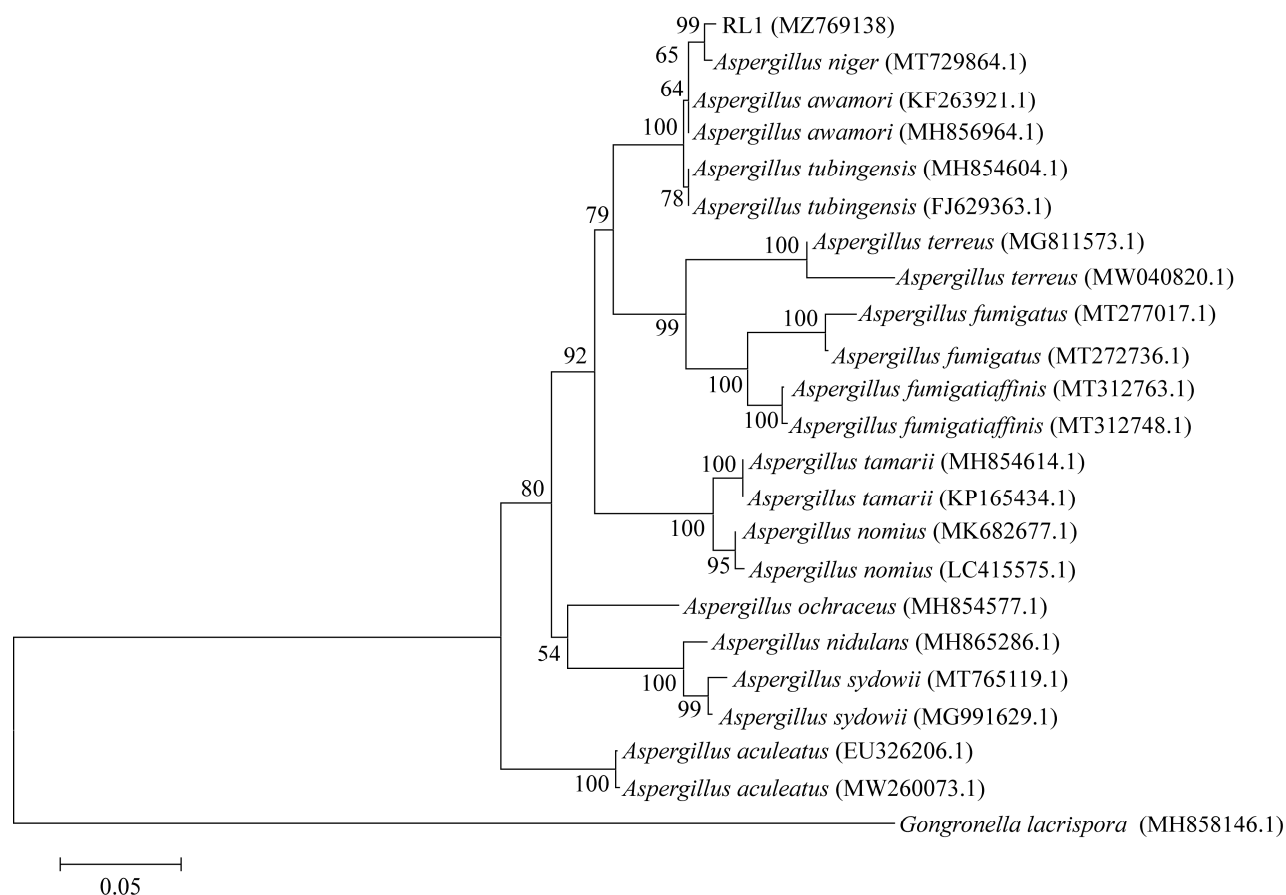


图 3 基于 18S rRNA 基因序列构建的菌株 RL1 系统发育树 括号内为 GenBank 登录号;分支点上数字代表自展值;标尺 0.05 代表核苷酸置换率

Figure 3 Phylogenetic tree on 18S rRNA gene sequence of strain RL1. The serial numbers in parentheses are GenBank accession numbers. The numbers on the nodes show bootstrap values. The scale bar represents 0.05 substitutions per nucleotide position.

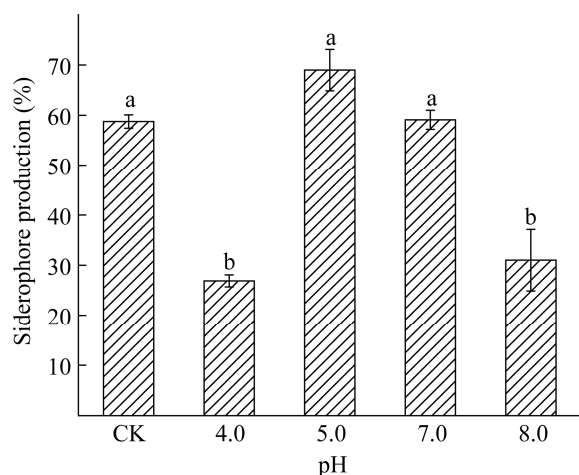


图4 培养基初始 pH 对菌株 RL1 产铁载体的影响 不同小写字母表示不同处理间差异显著 ($P<0.05$), 下同

Figure 4 Effects of initial pH in culture medium on siderophore productions by strain RL1. Different lowercase letters represent significant differences among different treatments ($P<0.05$), the same as below.

值为 5.0、7.0 时, 与自然培养液初始 pH 相比, 菌株 RL1 的铁载体合成率分别上升了 10.2% 和 0.3%。因此, 确定培养液初始 pH 值为 5.0 时最有利于菌株 RL1 产生铁载体。

2.3.2 培养基中葡萄糖含量对菌株产铁载体影响的结果

如图 5 中菌株合成铁载体的优化结果所示, 当葡萄糖含量为 0–20 g/L 时, 随着葡萄糖含量的增大, 菌株 RL1 的铁载体合成率先增大然后逐渐减小; 葡萄糖含量为 5 g/L 时菌株铁载体合成率最高, 与未加葡萄糖相比提高了 13.3% 且差异显著 ($P<0.05$)。因此, 菌株 RL1 产铁载体的 PDA 培养基中的最佳葡萄糖用量为 5 g/L。

2.3.3 培养温度对菌株产铁载体影响的结果

如图 6 所示, 当温度为 20–30 °C 时, 菌体 RL1 铁载体合成率变化不大(从 73.0% 降至 72.6%); 当温度自 30 °C 升至 40 °C 时, 菌株铁

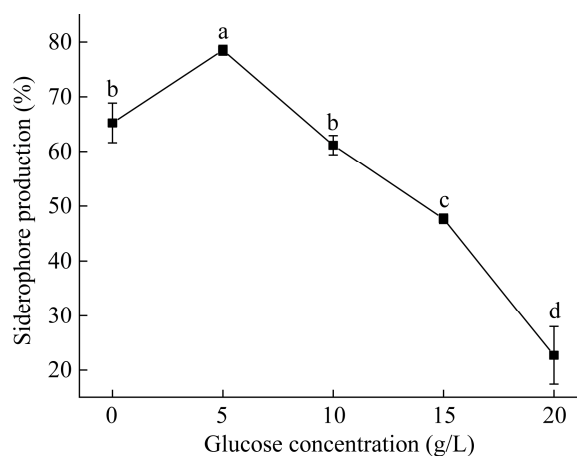


图5 培养基中葡萄糖含量对菌株 RL1 产铁载体的影响

Figure 5 Effects of glucose in culture medium on siderophore productions by strain RL1.

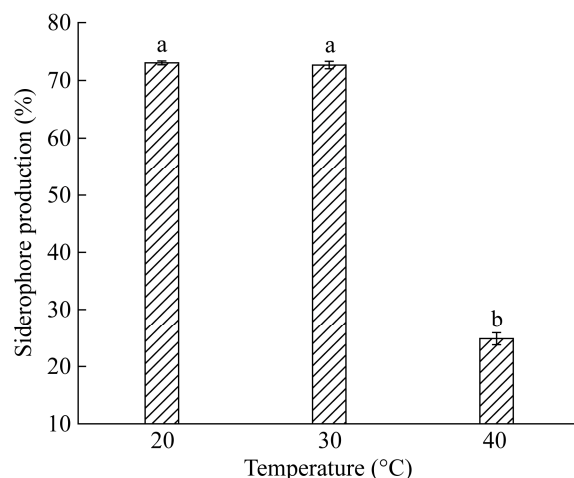


图6 不同温度对菌株 RL1 产铁载体的影响

Figure 6 Effects of different temperature on siderophore productions by strain RL1.

载体合成率明显减小 ($P<0.05$)。因此, 菌株 RL1 产铁载体的最佳培养温度为 20 °C。

2.3.4 培养时间对菌株产铁载体影响的结果

图 7 为菌株培养 2、3、4、5、6、7 d 后产铁载体合成率的测定结果。结果显示, 菌株 RL1 在 2–4 d 时铁载体合成率逐渐增加, 在 4–5 d 时, 铁载体合成率急剧增大, 在培养 5 d 时达

到最大值,其铁载体合成率达到 88.79%,与培养时间为 4 d 时相比提高了 68.02%;其后,培养时间为 5–7 d 时铁载体合成率都在 88.79%以下。因此,菌株 RL1 产铁载体的最佳培养时间为 5 d。

2.3.5 转速对菌株产铁载体影响的结果

图 8 是摇床转速为 0、60、120、200 r/min 条件下菌株 RL1 产铁载体合成率的测定结果。

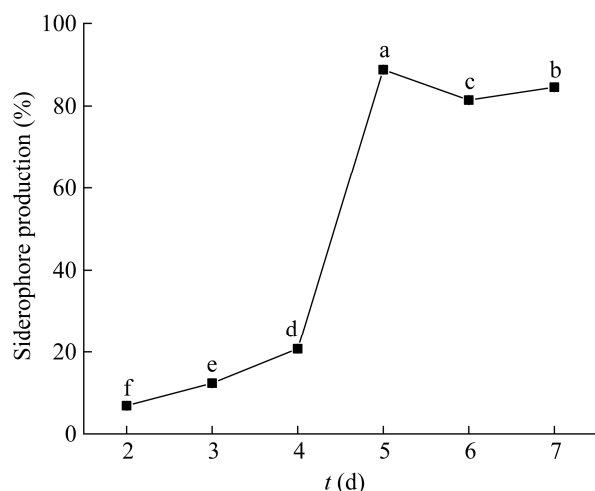


图 7 培养时间对菌株 RL1 产铁载体的影响

Figure 7 Effects of incubation time on siderophore productions by strain RL1.

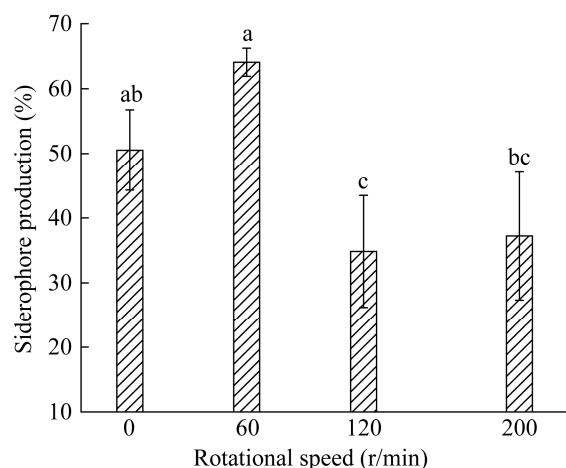


图 8 摇床转速对菌株 RL1 产铁载体的影响

Figure 8 Effects of rotational speed on siderophore productions by strain RL1.

结果显示,转速自 0 r/min 升至 60 r/min 时,菌株 RL1 的铁载体合成率略有增加,自 50.5%升至 64.1%,两者间差异不显著($P>0.05$);当转速由 60 r/min 升至 120 r/min 时,菌株 RL1 的铁载体合成率明显减小($P<0.05$);当转速大于 120 r/min 时,菌株的铁载体合成率无明显差异($P>0.05$)。因此,菌株 RL1 产铁载体的最佳转速为 60 r/min。

2.4 菌株 RL1 对上海青的促生效果

上海青水培试验结果如图 9 所示,施用 RL1 菌株的上海青植株大小显著高于对照,且随着 RL1 菌悬液浓度的增加,上海青植株大小逐渐增大。

表 2 为各处理对上海青生物量(以鲜重量计)的影响。结果显示,与 CK 相比, T1 处理的植株茎叶鲜重量、植株鲜重量增幅分别为 13.0%和 12.9%,而且处理间无明显差异;而 T2 和 T3 处理的植株生物量明显增加,植株茎叶鲜重量增幅分别为 55.0%和 74.4%,植株鲜重量增幅分别为 53.0%和 75.0%,均有显著影响($P<0.05$)。这说明高产铁载体菌株 RL1 能促进植物的生长。

表 3 为各处理对上海青光合色素的影响。结果显示, T1 处理的植株叶绿素 a、类胡萝卜素与 CK 相比无明显差异;与 CK 相比, T2 和 T3 处理植株叶片中的叶绿素 a 含量分别增加 43.0%和 49.8% ($P<0.05$), 叶绿素 b 含量分别增



图 9 菌株 RL1 对上海青的促生作用

Figure 9 Growth promoting effects of strain RL1 on Chinese cabbage seedlings.

表 2 各处理对上海青幼苗生物量的影响

Table 2 Effects of different treatments on the biomass of Chinese cabbage seedlings

处理	茎叶鲜重量	植株鲜重量
Treatment	Stem and leaf fresh weight (g)	Total fresh weight (g)
CK	1.43±0.03c	1.50±0.03c
T1	1.61±0.03bc	1.69±0.05bc
T2	2.21±0.11ab	2.30±0.03ab
T3	2.49±0.30a	2.63±0.32a

表 3 各处理对上海青幼苗光合色素含量的影响

Table 3 Effects of different treatments on the photosynthetic pigment content of Chinese cabbage seedlings

处理	叶绿素 a	叶绿素 b	类胡萝卜素
Treatment	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Carotenoid
CK	16.74±1.04b	4.77±0.68b	3.49±0.24a
T1	16.63±1.55b	7.79±0.99a	3.21±0.57a
T2	23.94±1.09a	9.04±0.73a	3.62±0.69a
T3	25.07±0.61a	8.15±0.24a	4.42±0.38a

加 89.5%和 70.9% ($P<0.05$), 类胡萝卜素含量分别增加 3.7%和 26.7%。这说明高产铁载体菌株 RL1 能促进植物光合色素的合成。

3 讨论

近年来, 有关产铁载体根际菌的研究很多, 但菌种不同, 其生长代谢特性不同。例如, 吴岭等^[23]从苎麻体内分离出的芽孢杆菌 WJ-3, 在碳源为葡萄糖、氮源为酵母菌粉、初始 pH 7.0、温度 30 °C、摇床转速 180 r/min 时生长良好, 铁载体合成量最高。李韵雅等^[24]分离得到一株特基拉芽孢杆菌 CD36, 其最佳产铁载体培养温度为 26 °C, 初始 pH 值为 7.2。本研究中, 当 PDB 培养基的初始 pH 值为 5.0–7.0 时, 菌株 RL1 合成铁载体能力较强, 与上述研究相比, 该菌株产铁载体的适宜 pH 范围更广, 在偏酸性和中性环境下均能大量产生铁载体; 而当初

始 pH<5.0 或>7.0 时, 其合成铁载体明显受到抑制, 这可能是 pH 的改变影响了菌体对营养物质的吸收, 从而对菌体细胞壁的带电荷性质和稳定性、细胞内酶的活性产生影响, 过酸和过碱都会影响菌体的生长(图 4)。图 5 分析表明, 在 PDB 培养基中, 适当提高培养基中葡萄糖含量(<5 g/L)能够提高菌株 RL1 的产铁载体合成率, 但葡萄糖浓度过高(>5 g/L)可能会产生较高的渗透压, 影响细胞质水分, 从而影响菌体的铁载体合成率; 也可能在高浓度葡萄糖条件下产生的代谢产物对一些关键酶产生抑制, 或使细胞结构成分发生变化。由图 6 可见, 菌株 RL1 在温度为 20、30 °C 时均大量产生铁载体, 40 °C 时菌株铁载体合成率明显降低。可能是在此设定的温度范围内, 温度过高时菌体生长不良, 可能影响菌株 RL1 与铁载体表达相关酶的活性, 或抑制营养物质的吸收与代谢产物的分泌, 不利于菌株的生长和铁载体的合成。同时可以发现, 与上述其他研究相比, 该菌株对温度变化(20–30 °C)的适应能力更强, 这有利于菌株 RL1 在实际作物中的应用。图 7 分析表明, 当菌株产铁载体合成率达到最大后, 随着培养时间的增加, 培养基营养物质被吸收而减少, 从而影响菌体铁载体的合成。图 8 显示, 摇床转速较低(0–60 r/min)时, 菌体 RL1 产铁载体能力均较好, 表明 RL1 可能为兼性菌, 与上述其他研究相比, 菌株 RL1 可能更适用于土壤环境。

黑曲霉(*Aspergillus niger*)是一类常见的产铁载体真菌, 属于半知菌类曲霉属, 是丛梗孢科中的一个常见种^[34]。目前, 国内外黑曲霉真菌作用于农作物的报道较为少见。本研究确定了黑曲霉 RL1 具有高产铁载体的能力, 可以提高上海青植物对铁的利用率, 表现出明显的促生潜力。Kaur 等^[35]从旁遮普获得的 *Streptomyces badius* 菌株具有良好的产铁载体能力, 可以促

进小麦生长, 提高小麦产量。郝莎莎等^[36]发现菌株 XSB5 有较强的产铁载体能力, 其菌液处理的文冠果植株地上部分干重和地下部分干重分别增加 26.1%和 64.5%, 本研究与该结果相似。表 3 显示, RL1 孢子菌液处理上海青植物可提高光合色素含量。这可能是因为菌株 RL1 可通过提高净光合速率以及影响气体张开的程度来显著促进植物光合色素的合成^[37]。

综上所述, RL1 具有良好的促生作用, 在农业生产领域具有良好的应用前景。考虑到该菌株的巨大潜力, 今后可进一步对菌株 RL1 产生的铁载体进行分离纯化及生物学功能研究; 进一步系统研究菌株的其他促生作用特性及其制剂的开发; 科学合理地组合菌株, 使 RL1 在促生方面发挥最佳效应。

4 结论

(1) 本研究从植物根际土壤中分离、筛选得到一株高产铁载体真菌菌株, 编号为 RL1, 初步鉴定为黑曲霉(*Aspergillus niger*)。

(2) 通过单因素试验法, 得到菌株 RL1 的最佳产铁载体培养条件为: 初始 pH 值 5.0, 碳源葡萄糖含量 5 g/L, 温度 20 °C, 培养时间 5 d, 培养摇床转速 60 r/min。

(3) 上海青水培试验显示, 随着 RL1 菌悬液体积的增加, 上海青植物的鲜重和叶片光合色素(叶绿素 a 和叶绿素 b)含量均有明显的提高, 表明菌株对上海青有良好的促生效果。

REFERENCES

- [1] 曹桂林. 植物根际促生菌和微生物肥料研究进展浅析[J]. 南方农业, 2020, 14(27): 209-210
Cao GL. Research progress on plant growth promoting rhizobacteria and microbial fertilizers[J]. South China Agriculture, 2020, 14(27): 209-210 (in Chinese)
- [2] Chen X, Liu XY, Zhang XY, Cao LY, Hu XX. Phytoremediation effect of *Scirpus triqueter* inoculated plant-growth-promoting bacteria (PGPB) on different fractions of pyrene and Ni in co-contaminated soils[J]. Journal of Hazardous Materials, 2017, 325: 319-326
- [3] 陈腊, 米国华, 李可可, 邵慧, 胡栋, 杨俊鹏, 隋新华, 陈文新. 多功能植物根际促生菌对东北黑土区玉米的促生效果[J]. 应用生态学报, 2020, 31(8): 2759-2766
Chen L, Mi GH, Li KK, Shao H, Hu D, Yang JP, Sui XH, Chen WX. Effects of multifunctional plant rhizosphere promoting bacteria on maize growth in black soil areas in Northeast China[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2020, 31(8): 2759-2766 (in Chinese)
- [4] Burr TJ, Schroth MN, Suslow T. Increased potato yields by treatment of seed pieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*[J]. Phytopathology, 1978, 68(9): 1377-1383
- [5] Cavite HJM, Mactal AG, Evangelista EV, Cruz JA. Biochemical characteristics and inoculation effects of multi-trait plant growth-promoting rhizobacteria on upland rice (*Oryza sativa* L. cv PSB Rc23) seedling growth[J]. Archives of Microbiology, 2021, 203(6): 3533-3540
- [6] 李福艳, 刘晓玉, 颜静婷, 蔡燕飞. 三株产吲哚乙酸根际促生芽孢杆菌的筛选鉴定及其促生作用[J]. 浙江农业学报, 2021, 33(5): 873-884
Li FY, Liu XY, Yan JT, Cai YF. Isolation and identification of three indole-3-acetic acid producing plant-growth-promoting rhizosphere *Bacillus* sp. and their growth-promoting effects[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2021, 33(5): 873-884 (in Chinese)
- [7] 邓振山, 李静, 刘玉珍, 高飞, 魏婷婷, 陈凯凯. 巨菌草促生菌的筛选及其促生效应[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2019, 45(1): 50-54
Deng ZS, Li J, Liu YZ, Gao F, Wei TT, Chen KK. Screening of growth promoting bacteria associated with *Pennisetum sinense* and their growth-promoting effect[J]. Journal of Hunan Agricultural University: Natural Sciences, 2019, 45(1): 50-54 (in Chinese)
- [8] Goswami D, Thakker JN, Dhandhukia PC. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review[J]. Cogent Food & Agriculture, 2016, 2(1): 1127500
- [9] Martínez-Viveros O, Jorquera MA, Crowley DE, Gajardo G, Mora ML. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by

- rhizobacteria[J]. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 2010, 10(3): 293-319
- [10] Santoyo G, Guzmán-Guzmán P, Parra-Cota FI, De Los Santos-Villalobos S, Orozco-Mosqueda MDC, Glick BR. Plant growth stimulation by microbial consortia[J]. Agronomy, 2021, 11(2): 219
- [11] Tapia-Vázquez I, Sánchez-Cruz R, Arroyo-Domínguez M, Lira-Ruan V, Sánchez-Reyes A, Del Rayo Sánchez-Carbente M, Padilla-Chacón D, Batista-García RA, Folch-Mallol JL. Isolation and characterization of psychrophilic and psychrotolerant plant-growth promoting microorganisms from a high-altitude volcano crater in Mexico[J]. Microbiological Research, 2020, 232: 126394
- [12] Zúñiga A, Fuente FDL, Federici F, Lionne C, Bônnet J, de Lorenzo V, González B. An engineered device for indoleacetic acid production under quorum sensing signals enables *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 to stimulate plant growth[J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(6): 1519-1527
- [13] 金杰人, 鲁凯珩, 肖明. 荧光假单胞菌的应用与展望[J]. 上海师范大学学报(自然科学版), 2019, 48(5): 526-535
- Jin JR, Lu KH, Xiao M. Application and prospect of *Pseudomonas fluorescens*[J]. Journal of Shanghai Normal University: Natural Sciences, 2019, 48(5): 526-535 (in Chinese)
- [14] Hafezi Ghehestani MM, Azari A, Rahimi A, Maddah-Hosseini S, Ahmadi-Lahijani MJ. Bacterial siderophore improves nutrient uptake, leaf physiochemical characteristics, and grain yield of cumin (*Cuminum cyminum* L.) ecotypes[J]. Journal of Plant Nutrition, 2021, 44(12): 1794-1806
- [15] 李倩, 张平, 廖柏寒, 彭佩钦, 梅金星, 徐继敏. 一株耐 Cd 菌株的分离、鉴定及基本特性[J]. 微生物学报, 2019, 59(1): 11-24
- Li Q, Zhang P, Liao BH, Peng PQ, Mei JX, Xu JM. Isolation, identification and characterization of a Cd resistant bacterium[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2019, 59(1): 11-24 (in Chinese)
- [16] Baakza A, Vala AK, Dave BP, Dube HC. A comparative study of siderophore production by fungi from marine and terrestrial habitats[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2004, 311(1): 1-9
- [17] Martin Del Campo JS, Eckshtain-Levi M, Vogelaar NJ, Sobrado P. Author correction: identification of *Aspergillus fumigatus* UDP-galactopyranose mutase inhibitors[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 4723
- [18] 张孝龙, 王永霞, 赵江源, 丁章贵, 文孟良, 李铭刚. 四株碱性环境真菌铁载体活性筛选[J]. 微生物学报, 2016, 56(6): 1022-1033
- Zhang XL, Wang YX, Zhao JY, Ding ZG, Wen ML, Li MG. Screening siderophore activity of four strains from alkaline environment[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(6): 1022-1033 (in Chinese)
- [19] 胡琦鹏. 8 株 *Phialocephala* 真菌特性及其中 2 株接种蓝莓效应分析[D]. 北京: 北京林业大学硕士学位论文, 2019
- Hu QP. Analysis on the characteristics of eight *Phialocephala* and the inoculation effect of the two in blueberry seedling[D]. Beijing: Master's Thesis of Beijing Forestry University, 2019 (in Chinese)
- [20] Koulman A, Lee TV, Fraser K, Johnson L, Arcus V, Lott JS, Rasmussen S, Lane G. Identification of extracellular siderophores and a related peptide from the endophytic fungus *Epichloë festucae* in culture and endophyte-infected *Lolium perenne*[J]. Phytochemistry, 2012, 75: 128-139
- [21] Haselwandter K, Winkelman G. Siderophores of Symbiotic Fungi[M]//Soil Biology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007, 12: 91-103
- [22] Raymond-Bouchard I, Carroll CS, Nesbitt JR, Henry KA, Pinto LJ, Moinzadeh M, Scott JK, Moore MM. Structural requirements for the activity of the MirB ferrisiderophore transporter of *Aspergillus fumigatus*[J]. Eukaryotic Cell, 2012, 11(11): 1333-1344
- [23] 吴岭, 汤建新, 李文, 戴慧康, 曾晓希. 微生物螯合剂的合成及其条件优化研究[J]. 包装学报, 2017, 9(5): 28-34
- Wu L, Tang JX, Li W, Dai HK, Zeng XX. Study on synthesis of microorganisms chelator and optimization of fermentation conditions[J]. Packaging Journal, 2017, 9(5): 28-34 (in Chinese)
- [24] 李韵雅. 高产铁载体根际促生菌的筛选及其在土壤修复方面的潜在应用[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2018
- Li YY. Screening of siderophore-high-yield plant growth promoting rhizobacteria and its potential application in soil remediation[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2018 (in Chinese)
- [25] 王卫星, 周晓伦, 李忠玲, 王明鹏, 王卫卫. CAS 平板覆盖法检测氢氧化细菌铁载体[J]. 微生物学通报, 2014, 41(8): 1692-1697
- Wang WX, Zhou XL, Li ZL, Wang MP, Wang WW. Detection of siderophore production from

- hydrogen-oxidizing bacteria with CAS overlay plate method[J]. *Microbiology China*, 2014, 41(8): 1692-1697 (in Chinese)
- [26] 晋银佳, 刘文, 朱跃, 王丰吉. 荧光假单胞菌产铁载体对油麦菜吸收砂基和水基中镉的影响[J]. *环境工程学报*, 2016, 10(1): 415-420
- Jin YJ, Liu W, Zhu Y, Wang FJ. Effects of siderophore produced by *Pseudomonas fluorescens* on cadmium uptake from sand-base and water-base systems by lettuces[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2016, 10(1): 415-420 (in Chinese)
- [27] Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores[J]. *Analytical Biochemistry*, 1987, 160(1): 47-56
- [28] 张庆芳. 不同配方营养液对小白菜生长的影响[J]. *农业科技与装备*, 2020(2): 7-9
- Zhang QF. Effects of different nutrient solution on growth of pakchoi[J]. *Agricultural Science & Technology and Equipment*, 2020(2): 7-9 (in Chinese)
- [29] 陈文艳, 耿庆芬, 王燕, 李廷山, 王小娟. 重金属污染土壤的植物修复及植物联合修复研究进展[J]. *广东化工*, 2020, 47(2): 87-88, 95
- Chen WY, Geng QF, Wang Y, Li TS, Wang XJ. Review in phytoremediation and phytoremediation of heavy metal contaminated soils[J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2020, 47(2): 87-88, 95 (in Chinese)
- [30] 彭云, 李舒馨, 俞泽, 汤曼利, 吴海霞, 陈莹莹, 王亚楠, 马桂珍, 暴增海. 一株海洋放线菌的鉴定及其促生作用机理[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(11): 3515-3526
- Peng Y, Li SX, Yu Z, Tang ML, Wu HX, Chen YY, Wang YN, Ma GZ, Bao ZH. Identification and growth promoting effect of a marine actinomycete[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(11): 3515-3526 (in Chinese)
- [31] 王东升, 王立立, 李取生, 周婷, 周雪芳, 高琼. 产铁载体菌对龙葵修复土壤 Cd 污染的促进效应[J]. *环境工程学报*, 2018, 12(8): 2311-2319
- Wang DS, Wang LL, Li QS, Zhou T, Zhou XF, Gao Q. Enhancing effect of siderophore-producing bacteria on remediation of cadmium-contaminated soil by *Solanum nigrum* L.[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2018, 12(8): 2311-2319 (in Chinese)
- [32] 李春, 王胜威, 张磊, 王永忠. 膜生物反应器中小球藻生物膜生长与代谢的光调控特性[J]. *环境工程学报*, 2018, 12(2): 670-676
- Li C, Wang SW, Zhang L, Wang YZ. Regulation of light intensity on characteristics of growth and metabolism of *Chlorella* biofilm in a membrane bioreactor[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2018, 12(2): 670-676 (in Chinese)
- [33] 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)
- [34] 吴升山, 倪辉, 肖安风, 李利君, 蔡慧农, 苏文金. 黑曲霉 DB056 产柚苷酶发酵条件初步优化[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(9): 1305-1311
- Wu SS, Ni H, Xiao AF, Li LJ, Cai HN, Su WJ. Preliminary optimization of fermentation conditions for production of naringinase by *Aspergillus niger* DB056[J]. *Microbiology China*, 2010, 37(9): 1305-1311 (in Chinese)
- [35] Kaur J, Pandove G, Gangwar M, Brar SK. Development of liquid inoculants: an innovative agronomic practice for sustainable agriculture[J]. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 2018, 6(3): 472-481
- [36] 郝莎莎, 卫旭芳, 侯智霞, 李守科. 文冠果根系瘤状物可培养内生细菌的特性[J]. *应用与环境生物学报*, 2018, 24(4): 766-774
- Hao SS, Wei XF, Hou ZX, Li SK. Characteristics of culturable endophytic bacteria of *Xanthoceras sorbifolia* Bunge with tumor roots[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2018, 24(4): 766-774 (in Chinese)
- [37] 李英楠. 设施黄瓜促生耐盐菌的筛选及其应用效果[D]. 郑州: 河南农业大学硕士学位论文, 2020
- Li YN. Screening and application effect of growth promoting and salt tolerant bacteria in greenhouse cucumber[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Henan Agricultural University, 2020 (in Chinese)