



研究报告

一株耐盐甲基杆菌 *Methylobacterium* sp. W-1 的分离及促生潜能研究

王改萍 祝长青 王茹*

新疆师范大学生命科学学院 干旱区植物逆境生物学实验室 新疆 乌鲁木齐 830054

摘要:【背景】多种甲基杆菌属细菌对寄主植物有促生作用,其分布区域较广。筛选具有耐盐与促生特性的甲基杆菌属菌株可为微生物菌肥的开发提供依据。【目的】从新疆乌鲁木齐地区盐渍土壤中筛选耐盐促生菌,对其培养基成分进行优化及促生能力进行研究,为微生物菌肥的开发提供依据。【方法】采用阿须贝无氮培养基筛选耐盐菌株,对菌株进行基因序列分析及生理生化测定,采用平板试验法初步研究该菌对拟南芥的生长影响。【结果】筛选出中度耐盐菌株 W-1,经鉴定为甲基杆菌属(*Methylobacterium* sp.)。菌株生长最佳无机盐为 NaCl,最适浓度为 1%–3%,最高耐受浓度达 7%。最佳氮源为酸水解酪蛋白,产生生长素最高达 33.53 mg/L。溶磷能力达 28.71 mg/L。菌株 W-1 接种拟南芥幼苗后叶绿素 a 和叶绿素 b 含量均高于对照组,同时对其根系发育有显著的促进作用。【结论】菌株 W-1 促生性能显著,可为生物肥料制备提供菌种资源。

关键词: 菌株筛选,耐盐,促生,培养基优化,拟南芥

Isolation and growth-promoting potential of a salt tolerant strain of *Methylobacterium* sp. W-1

WANG Gaiping ZHU Changqing WANG Ru*

Laboratory of Plant Stress Biology in Arid Land, College of Life Science, Xinjiang Normal University, Urumqi, Xinjiang 830054, China

Abstract: [Background] Many *Methylobacterium* can promote the growth of host plants, which is widely distributed. Screening *Methylobacterium* strains with salt tolerance and growth promoting characteristics can provide basis for the development of microbial fertilizer, which can provide a basis for the development of microbial fertilizer. [Objective] Salt tolerant and plant growth-promoting bacteria were isolated from the saline soil of Wuerhe area in Xinjiang, and the culture medium were optimized after identification, the performance of growth-promoting was preliminarily studied. [Methods] The salt tolerant strains were screened by Ashby medium. The gene sequence analysis, physiological and

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (30960047); Key Laboratory Project of Department of Education of Xinjiang Uygur Autonomous Region (XJTSWZ-2017-03); Research and Innovation Project of Postgraduates in Xinjiang Normal University (XSY201902012)

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

Received: 10-02-2021; Accepted: 13-04-2021; Published online: 08-05-2021

基金项目: 国家自然科学基金(30960047); 新疆维吾尔自治区教育厅重点实验室项目(XJTSWZ-2017-03); 新疆师范大学硕士研究生科研创新项目(XSY201902012)

*通信作者: E-mail: wangruavon@163.com

收稿日期: 2021-02-10; 接受日期: 2021-04-13; 网络首发日期: 2021-05-08

biochemical determination were carried out on the strains. The effects on the growth of *Arabidopsis thaliana* were preliminarily studied by plate test. **[Results]** Moderate salt tolerant strains W-1 screened were identified as *Methylobacterium* sp. The best inorganic salt for the growth of strain was NaCl, and the optimum concentration was 1%–3%, and the maximum tolerance concentration was 7%. The best nitrogen source was organic nitrogen (acid hydrolyzed casein), with the highest yield of auxin (IAA) up to 33.53 mg/L. The dissolved phosphorus capacity was 28.71 mg/L. Inoculating *Arabidopsis thaliana* seedlings with the *Methylobacterium* sp. W-1, The contents of chlorophyll a and chlorophyll b of the *Arabidopsis* seedlings were higher than control group, the root structure of *Arabidopsis thaliana* was promoted significantly. **[Conclusion]** This study provided strain resources for the preparation of biofertilizer candidates.

Keywords: strain screening, salt tolerance, growth promotion, medium optimization, *Arabidopsis thaliana*

共生微生物可通过多种机制促进植物生长,如增加营养物质的可用性、分泌植物激素、抑制病原菌、对植物代谢产生积极影响^[1-2]。固氮生物甲基杆菌严格需氧,产粉色色素,广泛分布于自然环境和人为环境,将简单的甲基化合物如甲醇作为唯一碳源,同时菌株可以利用 N₂ 作为氮源,将空气中的氮还原为氨,促进植物生长^[3]。甲基杆菌属可定殖于寄生植物地上和地下部分,并可以合成植物激素(生长素、细胞分裂素)、铁载体和维生素 B12,这些能力被认为与促进植物生长有关^[4]。将 *Methylobacterium oryzae* CBMB20 菌株接种于红辣椒后种植,对其株高、果实干重和总生物量均有显著提高^[5]。接种甲基杆菌 *Methylobacterium* sp. PPFM-Os-07 促进了水稻种子萌发和植株生长^[6]。*Methylobacterium populi* VP2 菌株可以减轻苯丙氨酸对西红柿种子的植物毒性作用,同时促进其种子萌芽率^[7]。研究者报道了甲基杆菌能促进植物发育、提高种子的发芽量、种子活力的研究指标、植株产量和植株的抗逆性^[8]。甲基杆菌属(*Methylobacterium*)是生物肥料制备菌属之一,其通过土壤或植被根际的活动产生氮和磷等植物生长所需的营养物质,并供给植被使用^[9]。

新疆北部乌尔禾地区土壤含盐量高达 239.675 g/kg,盐渍化较严重,属于盐渍土壤。本研究从该土壤样品中分离 1 株中度耐盐菌株 W-1,对其进行生理生化、耐盐特性、培养条件、促生性

能等研究,W-1 可作为一种潜在的微生物肥料候选菌株,应用于农业绿色可持续发展。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品

2018 年 4 月至 2019 年 10 月在新疆北部乌尔禾地区(87°43'5.0"E, 46°23'56"N)海拔 443.0 m 采集盐渍土壤。取样采取五点取样法,深度 0–10 cm。土壤含盐量 239.675 g/kg,有机质含量 13.211 g/kg,土壤 pH 在 7.81 左右,属于盐渍土壤,同时土壤盐分主要是氯化物为主。

1.1.2 培养基

初步筛选及富集培养基^[10]为阿须贝无氮培养基(g/L):葡萄糖 10.0, NaCl 0.2, KH₂PO₄ 0.4, CaSO₄·2H₂O 0.1, MgSO₄·7H₂O 0.2, CaCO₃ 5.0, 琼脂 16.0, pH 7.0, 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min; R₂A 培养基(g/L):酸水解酪蛋白 0.5, 蛋白胨 0.5, 葡萄糖 0.5, 酵母浸粉 0.5, 淀粉 0.5, 丙酮酸钠 0.3, K₂HPO₄ 0.3, MgSO₄·7H₂O 0.05, 琼脂 16.0, pH 7.0, 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min; 唯一碳源培养基(g/L): CaCl₂·2H₂O 0.1, (NH₄)₂SO₄ 2.0, K₂HPO₄ 0.5, NaH₂PO₄·2H₂O 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.2, pH 自然, 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min; 金氏培养基 B (KMB, g/L): 胰蛋白胨 20.0, K₂HPO₄ 1.5, MgSO₄·7H₂O 1.5, 甘油 10 mL, 色氨酸 0.5, pH 7.0, 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min; 无机磷培养基(NBRIP, g/L): Ca₃(PO₄)₂

10.0, 葡萄糖 10.0, NaCl 10.0, KCl 10.0, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03, 琼脂 12.0, pH 7.2, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。MS 合成培养基北京酷来搏科技有限公司。

1.1.3 主要试剂和仪器

Salkowski 比色液: 浓 H_2SO_4 150 mL, 7.5 mL 浓度为 0.5 mol/L 的 FeCl_3 , 无菌水 250 mL。化学试剂均为分析纯。

可见分光光度计, 龙尼柯(上海)仪器有限公司; 恒温培养箱, 上海-恒科技有限公司; 恒温摇床, 江苏金怡仪器科技有限公司; 超净工作台, 苏州净化设备有限公司; 细菌 DNA 提取试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离筛选

富集: 称取土壤样品 5 g 加入含有 45 mL 无菌水的锥形瓶中, 于 37 °C、200 r/min 振荡 20 min。静置取上清液按 1:10 梯度稀释(10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5}), 分别吸取 200 μL 涂布于阿须贝无氮固体培养基, 30 °C 倒置培养 120 h。分离纯化: 挑取培养皿中长势较好的单菌落进行纯化, 直至获得单一菌落, 同时进行斜面保存菌种。

1.2.2 菌株的鉴定

将筛选的优势菌株分离纯化至 R_2A 固体培养基上, 30 °C 倒置培养 72 h, 观察单菌落的颜色、大小、形状和透明度。参照《常见细菌系统鉴定手册》进行生理生化测定^[11]。将待测菌株按照 1% 接种量接种于唯一碳源培养基中(乳糖、蔗糖、葡萄糖、麦芽糖、果糖、淀粉、半乳糖、甲醛、甲醇), 于 30 °C、180 r/min 振荡培养 2–3 d 后观察菌株生长情况。

菌株 16S rRNA 基因序列系统发育分析: 按照细菌 DNA 提取试剂盒提示步骤对菌株进行富集培养提取总 DNA。细菌总 DNA 经过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后进行 16S rRNA 基因序列扩增, 引物为 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACGAA CGCT-3') 和 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTTACG

ACTTCATCACCC-3')。PCR 反应体系(25 μL): 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL , DNA 模板 2 μL , 2 \times PCR Mix 12.5 μL , 用无菌水补充至 25 μL 。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 57 °C 60 s, 72 °C 30 s, 30 次循环; 72 °C 10 min。获得扩增片段经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 目的条带清晰明亮, 测检平台由生工生物工程(上海)股份有限公司提供。序列比对通过 NCBI 基因库网站完成, 选取参照菌株的 16S rRNA 基因序列与菌株 W-1 通过 BioEdit 软件进行比对, 构建系统进化树, 其中: 矩阵根据 Kimura-2 模型^[12]估算, 聚类分析采用 MEGA 6.0 软件^[13]中的邻接(Neighbor-Joining)法^[14], 重复取样 1 000 次进行自展值(Bootstrap)分析来评估系统进化树拓扑结构的稳定性^[15]。

1.2.3 菌株生长条件优化

无机盐金属离子及其添加量对菌株生长的影响: 以 R_2A 液体培养基作为菌株基础生长培养基, 以 10 g/L 的 NaCl、KCl、 Na_2SO_4 、 MgCl_2 为无机盐金属离子, 含量梯度为 0%、1%、3%、5%。将处于生长对数期的菌株 W-1 发酵液按照 2% 的接种量接种于上述培养基, 独立重复试验 3 次。30 °C、180 r/min 振荡培养 48 h, 可见分光光度计测定菌株发酵液 OD_{600} 值作为菌株生长量的指标, 筛选出菌株最佳生长无机盐及浓度。不同氮源对菌株生长的影响: 以阿须贝无氮液体培养基作为菌株生长培养基, 分别加入 1% 的硝态氮(KNO_3)、亚硝态氮(NaNO_2)、铵态氮(NH_4Cl)、硝铵混合氮(NH_4NO_3)、有机氮(酸水解酪蛋白), 将处于对数生长期(1×10^8 CFU/mL)的菌株 W-1 发酵液按照 2% 的接种量接种于上述培养基, 独立重复试验 3 次。30 °C、180 r/min 振荡培养 48 h, 采用可见分光光度计测定菌株发酵液 OD_{600} 值作为菌株生长量的指标, 筛选出菌株最佳生长氮源。

1.2.4 拟南芥幼苗促生试验

菌株产生长素(Indole Acetic Acid, IAA)测定: 将分离纯化后的菌株接种于含有 L-色氨酸(0.5 g/L)的 KMB 液体培养基, 同时添加最佳氮源与无机

盐, 在 30 °C、180 r/min 条件下摇床培养 48 h 后, 8 000 r/min 离心 1 min, 取 3 mL 上清液与等量的显色液混合, 在黑暗环境下反应 30 min, 颜色变化为粉红色则表明阳性结果, 以未接菌培养基为对照, 在 OD_{530} 测定发酵液中 IAA 含量^[16]。菌株解磷测定: 采用打孔法在 NBRIP 固体培养基中打 5 个直径为 6 mm 的孔, 每个孔中分别加入 50 μ L 处于对数生长期(1×10^8 CFU/mL)的菌悬浮液, 在 30 °C 培养箱中培养 15 d 后, 有透明圈出现则表明阳性结果, 无透明圈则表明阴性结果; 取处于对数生长期(1×10^8 CFU/mL)的发酵液, 8 000 r/min 离心 1 min, 取 3 mL 上清液, 采用钼锑抗比色法测定上清中磷含量^[17]。

拟南芥种子消毒: 种子用 95%乙醇表面酯化 5 min, 20%乙醇漂白 7 min。在蒸馏水中洗涤 5 次后, 将种子均匀铺撒在含有 1/2 MS 培养基的培养皿中, 4 °C 低温春化 2 d 后将其倾斜 65°放置在光周期为 16 h、黑暗 8 h、光强度为 200 μ mol/(m²·s)、温度为 24 °C 的植物生长室中^[18]。设置 3 个处理, A 组处理: 将生长 7 d 的拟南芥幼苗接种约 1×10^8 CFU/mL 的菌株 W-1 悬浮菌液, 对拟南芥幼苗全株浸染 5 min 后将幼苗移至新的 1/2 MS 培养基中。B 组处理: 将生长 7 d 的拟南芥幼苗移至新的 1/2 MS 培养基后, 距离幼苗根部 3 cm 处, 滴加菌株 W-1 悬浮菌液 200 μ L (1×10^8 CFU/mL)。CK 组: 将生长 7 d 的拟南芥幼苗移至新的 1/2 MS 培养基中, 不做处理。将处理后的拟南芥幼苗在光周期 16 h、黑暗 8 h、光强度 200 μ mol/(m²·s)、温度 24 °C 的培养条件下连续生长 4 d。在这一时期结束时, 立即在分析天平上测量鲜重, 用直尺测量根的长度, 在解剖显微镜下计数和测量侧根数, 提取拟南芥幼苗叶绿素^[19]。每次处理重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定

2.1.1 菌株形态观察

菌株 W-1 在阿须贝固体培养基培养 7 d 后, 菌

落呈现圆形且较小, 边缘规整微凸呈粉色、表面光滑湿润不透明。菌株 W-1 在 R₂A 培养基上培养 3 d 后, 菌落呈现圆形且较小, 边缘规整微凸呈浅粉色、表面光滑湿润不透明(图 1)。

2.1.2 菌株生理生化测定

对待测菌株进行多项生理生化测定, 结果如表 1 所示, 革兰氏染色阴性; 吡啶试验阳性; 过氧化氢酶反应阳性; 硝酸盐还原反应阳性; 不能水解明胶, 不能水解淀粉; 菌株产粉红色素; 测试菌株能利用葡萄糖、甲醇作为碳源和能量来源。待测菌株 W-1 甲基红试验阴性, 乙酰甲基甲醇试验阴性。

2.1.3 菌株 W-1 的 16S rRNA 基因序列分析

对菌株 W-1 进行 16S rRNA 基因扩增后获得的片段进行测序, 克隆结果显示获得的片段长度为 1 395 bp (GenBank 登录号: MW356240; NMDC 登录号: NMDCN0000HUI)。将获得的序列与 NCBI 中已有的序列进行 BLAST 比对, 结果显示菌株 W-1 与 *Methylobacterium* sp. Evap S01 (DQ132876.1)的 16S rRNA 基因相似性为 99.42%, 菌株 W-1 与 *Methylobacterium* sp. MG-2011-78-DC (FR872486.1)相似性为 98.84%, 使用 MEGA 6.0 软件中的邻位相连法构建系统发育树(图 2), 结果显示, 菌株 W-1 与甲基杆菌(*Methylobacterium* sp.)的亲缘关系最近, 结合菌株的生理生化特征, 初步确定菌株 W-1 是甲基杆菌属菌株。



图 1 菌株 W-1 在 R₂A 固体培养基的菌落形态

Figure 1 Colony morphology of strain W-1 in R₂A solid medium

表 1 生理生化结果
Table 1 Physiological and biochemical analysis

项目 Item	结果 Results	项目 Item	结果 Results
革兰氏染色 Gram stain	—	乳糖 Lactose	—
好氧性试验 Aerobic test	+	蔗糖 Saccharose	—
甲基红反应 Methylred reaction	—	葡萄糖 Glucose	+
细菌运动性检测 Bacterial motility test	—	麦芽糖 Maltose	—
乙酰甲基甲醇试验 Voges-Proskauer reaction	—	果糖 Fructose	—
淀粉水解 Starch hydrolyze	—	可溶性淀粉 Starch soluble	—
明胶液化 Gelatin liquefaction	—	甘露醇 Mannitol	—
硝酸盐还原反应 Nitrate reduction test	+	半乳糖 Galactose	—
过氧化氢酶反应 Catalase test	+	甲醛 Formaldehyde	—
氧化酶反应 Oxidase test	+	甲醇 Methanol	+
吲哚试验 Indole test	+		
溶磷 Phosphate solubilization	+		
色素 Pigment	粉色 Pink		

注：+：阳性反应；—：阴性反应
Note: +: Positive reaction; -: Negative reaction

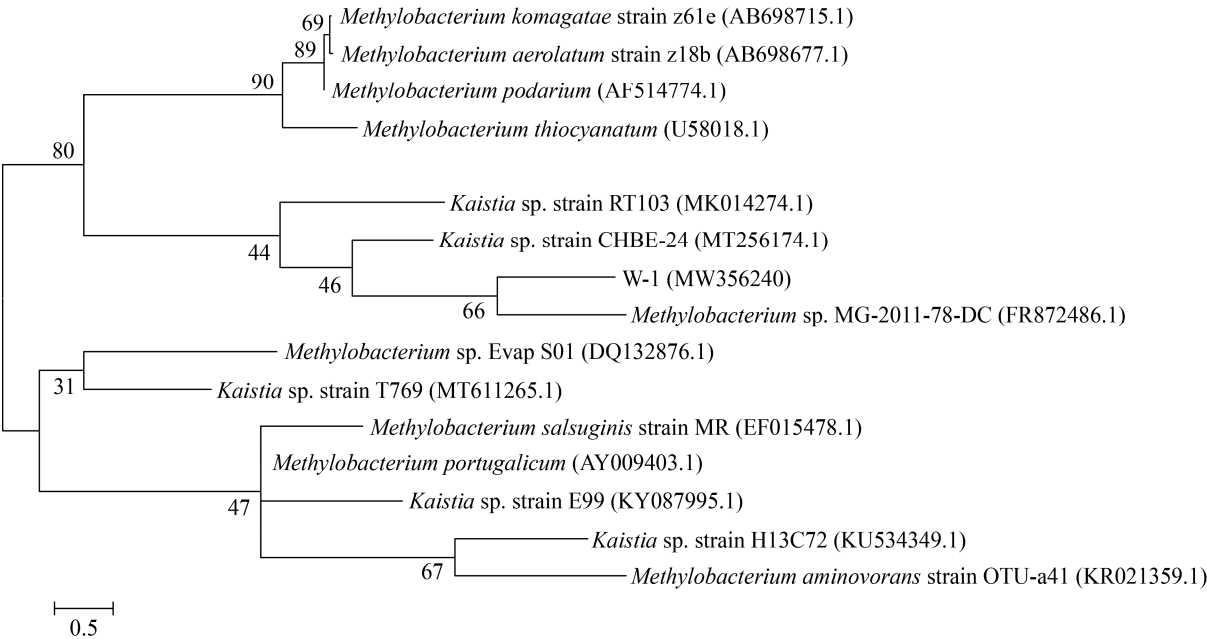


图 2 菌株 W-1 及其他相似菌株基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育进化树
Figure 2 Phylogenetic tree of strain W-1 and other similar strains based on the 16S rRNA gene sequences
注：用最大似然法建树，分支节点处显示 1 000 次重复检验的置信值；W-1 (MW356240)为筛选菌株的代表序列；其他序列在 NCBI 的登录号显示在括号中；标尺 0.5 表示 1 000 个核苷酸中有 5 个被替换
Note: The phylogenetic tree was constructed using the maximum likelihood method. Bootstrap values for 1 000 replicates were given in the branch nodes; W-1 (MW356240) was representative sequence of the selected strain; The GenBank accession numbers for other sequences were present in the parentheses; The scale bar, 0.5, represented five out of 1 000 nucleotides were replaced

2.2 菌株生长条件优化

2.2.1 菌株耐盐特性研究

以 R₂A 液体培养基为基础培养基, 按照不同含量梯度 0%、1%、3%、5% 分别加入 4 种不同无机盐金属离子(NaCl、KCl、Na₂SO₄、MgCl₂), 将菌株接入, 30 °C、180 r/min 培养, 每隔 6 h 测定菌株 OD₆₀₀, 生长曲线如图 3 所示, 菌株 W-1 在 0%、1% 盐浓度下, 在 4 种无机盐金属离子菌株长势较好, 在 3%、5% 盐浓度下, 菌株 W-1 无机盐利用产生差异: NaCl>KCl>MgCl₂>Na₂SO₄。将菌株 W-1 接种于含有 5 个盐浓度梯度的 R₂A 培养基, 30 °C、180 r/min 培养 48 h 后测定 OD₆₀₀, 随着盐浓度的逐渐提高, 菌株 W-1 生长速率有所减低。

2.2.2 氮源对菌株生长影响

将菌株 W-1 接种于含有 1% 硝态氮、亚硝态氮、

铵态氮、硝铵混合氮、有机氮的阿须贝无氮液体培养基中, 以不加任何氮源作为对照, 在 30 °C、180 r/min 培养 5 d, 每隔 12 h 测定菌株 OD₆₀₀, 生长曲线如图 4 所示。菌株 W-1 对于氮源的利用快慢: 有机氮>硝铵混合氮>硝态氮>铵态氮>亚硝态氮, 菌株 W-1 不能利用亚硝态氮作为氮源使其生长。

2.3 拟南芥幼苗促生试验

待测菌株促生性质初步研究, 菌株 W-1 接种于含有色氨酸的 KMB 液体培养基培养 24 h, 取 2 mL 菌液离心取上清与 Salkowski 显色剂反应呈现粉红色, 表明菌株产生生长素, 产量为 33.53 mg/L。菌株 W-1 在 NBRIP 固体培养基上没有形成显著的溶磷圈, 对其进行定量测定, 菌株发酵液中可溶性磷含量为 28.71 mg/L。通过对菌株 W-1 促生性质

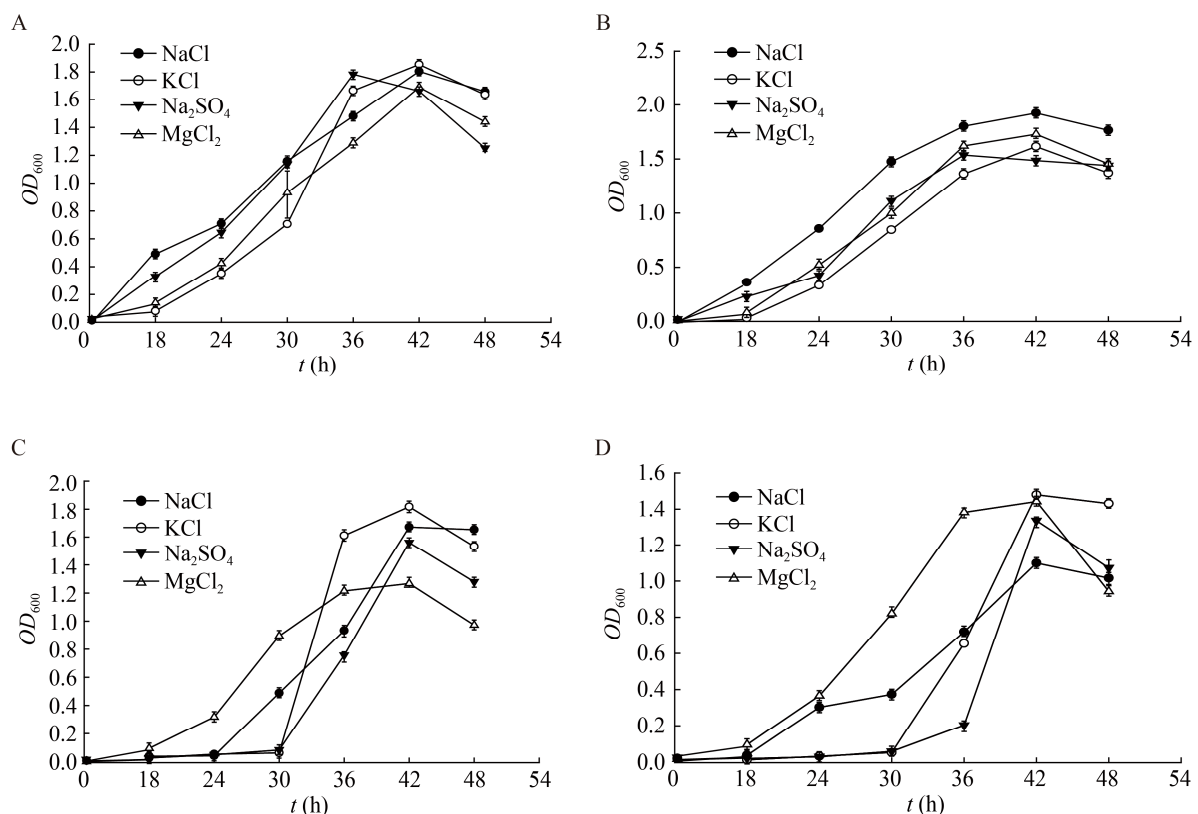


图 3 菌株 W-1 对无机盐金属的利用

Figure 3 Utilization of inorganic salt metals by strain W-1

Note: A: 0% (W/V); B: 1% (W/V); C: 3% (W/V); D: 5% (W/V)

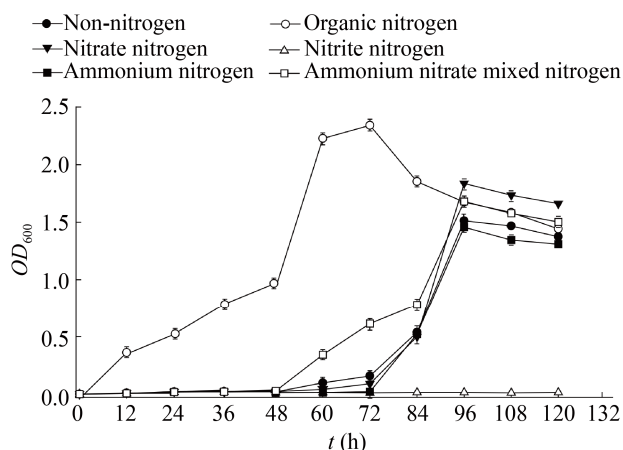


图4 菌株 W-1 对氮源的利用

Figure 4 Utilization of nitrogen source by strain W-1

初步研究后,以模式植物拟南芥为研究对象,选用菌株 W-1 对拟南芥幼苗生长促生作用试验,将培养 7 d 的拟南芥幼苗移至 12 孔板中,12 孔板中加入 800 μL 的 1/2 MS 液体培养基,对照组加 200 μL 的 1/2 MS 液体培养基,处理组加入 200 μL 的 1×10^8 CFU/mL 的 W-1 菌悬液,继续培养 7 d,结果(图 5)所示,与对照组相比,处理组拟南芥幼苗根系较对照组发达,借助倒置显微镜(放大倍数 $10\times$, $40\times$)进一步观察拟南芥根系,发现经处理的拟南芥幼苗根系发达,侧根数目较多,并且根毛较发达。

将生长 7 d 的拟南芥幼苗接种约 1×10^8 CFU/mL 的 W-1 菌悬液,浸染 5 min 后将幼苗移至新的含有 1/2 MS 固体培养基中,设置为 A 组。将生长 7 d 的拟南芥幼苗移至新的 1/2 MS 固体培养基后,距离幼苗根部 3 cm 处,滴加 200 μL W-1 菌悬液设置为 B 组。培养 4 d 后,结果如图 6 所示。分别对拟南芥幼苗的生长指标及其叶绿素含量进行了测定。其中生长指标包含拟南芥幼苗主根根长、侧根数、鲜重、干重,叶绿素测定包含叶绿素 a、叶绿素 b、类胡萝卜素。对拟南芥幼苗的叶片叶绿素进行测定,结果如图 7 所示,处理 A 组的拟南芥幼苗叶片中叶绿素 a 含量 0.38 mg/g、叶绿素 b 含量 0.51 mg/g、类胡萝卜素含量 0.22 mg/g 显著高于未

处理组的拟南芥幼苗叶片中叶绿素 a 含量 0.21 mg/g、叶绿素 b 含量 0.26 mg/g、类胡萝卜素含量 0.082 mg/g,而处理 B 组和对照组拟南芥幼苗叶片中叶绿素含量无明显差异。从图 8 可以看出,接种菌株 W-1 对拟南芥幼苗主根和侧根数的发育有促生作用,对侧根的发育促生效果较为显著。接种菌株 W-1 对拟南芥幼苗鲜重无明显差异,对其干重却有较大的差异。

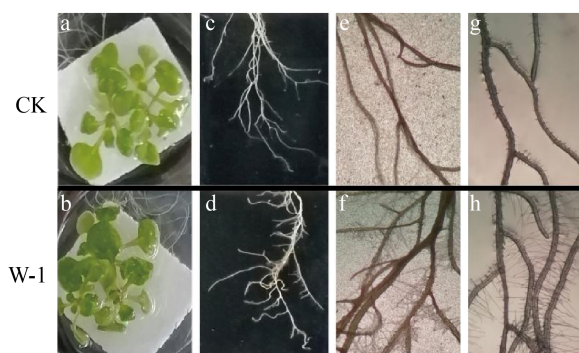


图5 接种菌株 W-1 对拟南芥幼苗根系结构的影响

Figure 5 The root structure of *Arabidopsis thaliana* seedlings was affected by strain W-1

注: a、c、e、g 对照组拟南芥幼苗根系结构; b、d、f、h 接种 W-1 菌悬液后拟南芥幼苗根系结构

Note: a, c, e, g: Root structure of *Arabidopsis thaliana* seedlings in control; b, d, f, h: Root structure of *Arabidopsis thaliana* seedlings inoculated with W-1

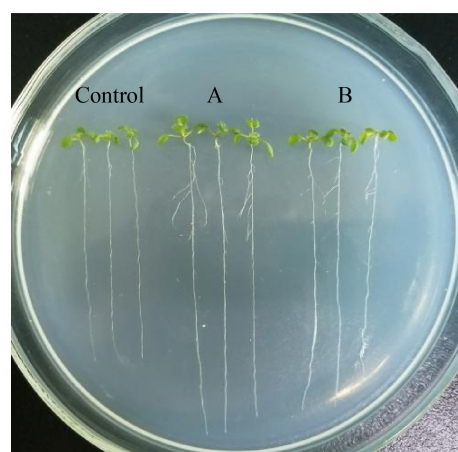


图6 接种菌株 W-1 对拟南芥幼苗的生长影响

Figure 6 The growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings was affected by strain W-1

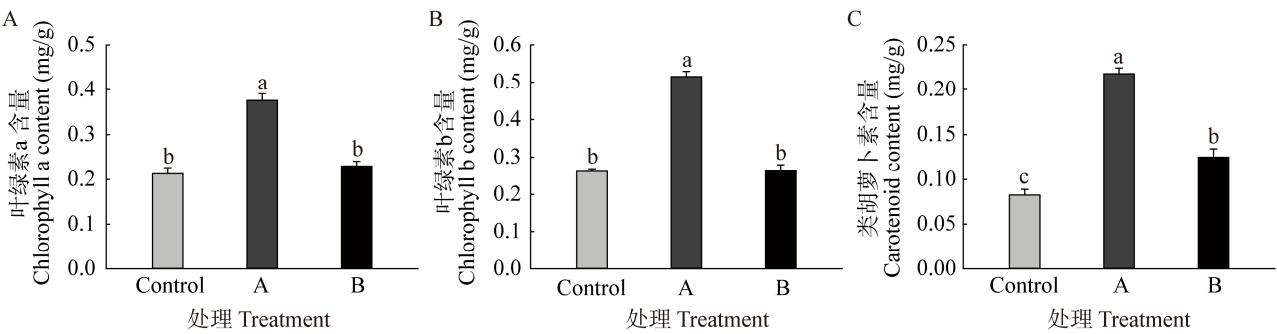


图 7 接种菌株 W-1 对拟南芥幼苗叶绿素的影响
Figure 7 Chlorophyll of *Arabidopsis thaliana* seedlings was affected by strain W-1

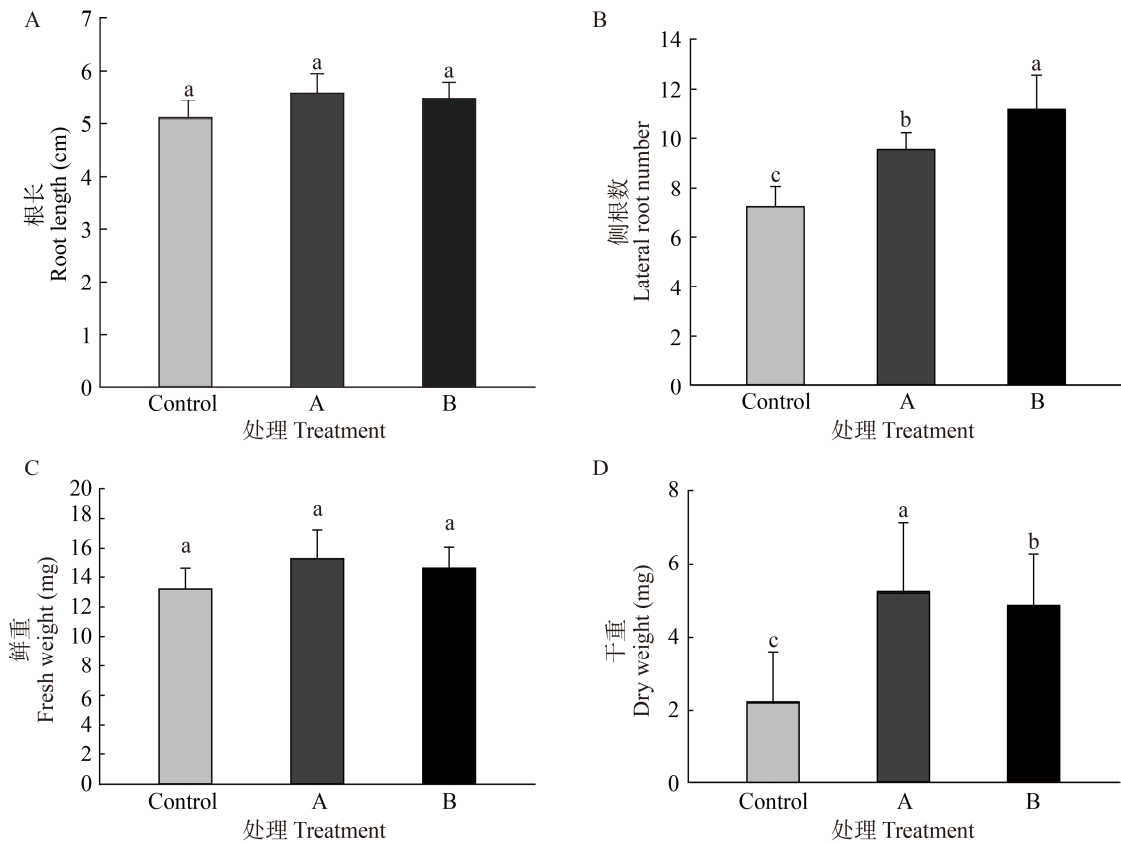


图 8 接种菌株 W-1 对拟南芥幼苗生长指标的影响
Figure 8 The growth indexes of *Arabidopsis thaliana* seedlings was affected by strain W-1

3 讨论与结论

粉红色兼甲基营养型菌是高度多样化的微生物类群,大量存在于寄生植物的叶面区域及地下根部区域,通过生产多种多样的植物激素来促进植物生长^[20]。在本研究中,从新疆北部乌尔禾地区

盐渍土壤中筛选到 1 株促生能力较强的中度耐盐菌株 W-1。菌株 W-1 在阿须贝无氮固体培养基中呈现浅粉色,在 R₂A 固体培养基中呈现浅粉色到粉色,对分离株 W-1 的 16S rRNA 基因序列扩增、测序并鉴定为甲基杆菌属(*Methylobacterium*)菌株。

甲基杆菌属是一类产色素的特异性甲基氧化细菌^[21],根据甲基杆菌属的性质,对分离菌株 W-1 进行了理化性质研究及培养基无机盐、氮源对其生长的影响。

结果表明菌株 W-1 是一株中度耐盐菌株,最高耐盐 7%,最适生长盐浓度 1%–3%,在含有 4 种不同无机盐的 R₂A 培养基中,菌株 W-1 长势在 NaCl 盐离子优于其他 3 种盐离子,对其他无机盐离子利用产生差异:KCl>MgCl₂>Na₂SO₄。这和该菌株生存的土壤环境有关,前期对新疆北部乌尔禾地区盐渍土壤盐分中的 8 种离子测定,主要阳离子集中于 Na⁺,而阴离子集中于 Cl⁻^[22]。

甲基杆菌属可利用空气中的氮源,用于其自身的生长繁殖,Gómez-Godínez 等^[23]和 Malik 等^[24]研究发现有些自生固氮菌没有复合氮在自养的条件下,生长非常缓慢。固氮菌株常以一定浓度的 NH₄⁺与 NO₃⁻为氮源使其生长,当氮源浓度在 0.5–1.0 mol/L 的条件下,菌株 W12 具有较强的固氮能力^[25],刘天增等研究发现当 NO₃⁻浓度为 10 mmol/L 时,菌株 BM13 生长量最大^[26]。同样菌株 W-1 在阿须贝无氮固体培养基中生长周期长达 7 d,生长较为缓慢,因此以阿须贝无氮培养基为基础培养基,加入 5 种不同氮源,检测菌株对不同氮源的利用情况,筛选出最适氮源。有研究者发现以亚硝酸盐为唯一氮源的好氧反硝化菌较少^[27],张艳萍等研究发现菌株 X₁ 不能利用亚硝态氮,可利用硝态氮^[28]。本研究显示出相近的结果,菌株 W-1 除亚硝态氮以外,均可以不同程度利用硝态氮、铵态氮、硝铵混合氮、有机氮。菌株 W-1 最适生长氮源是复合有机氮,在最适氮源下,菌株 W-1 促生性能表现在发酵 24 h 后培养基中含有 IAA (33.53 mg/L)。

一些甲基杆菌属具有溶磷的作用,Jayashree 等^[29]从印度的金奈库姆河和泰米尔纳德邦森林根际土壤中分离到 13 株甲基杆菌,均具有不同程度

的溶磷性能。溶磷微生物与植物相互协作,溶磷细菌有能力将土壤中不溶态磷转化为可溶性磷最终被植物吸收利用^[30]。马骢毓等从披碱草根际土壤中分离的菌株 PWXZ10 溶磷能力达 40.89 mg/L^[31],而菌株 W-1 在 NBRIP 固体培养基上可以生长,却没有形成显著的溶磷圈,通过定量测定菌株 W-1 发酵液中可溶性磷为 28.71 mg/L,推测这与土壤样品中磷元素含量(0.69 g/kg)较低有关。

除此,Klikno 等^[32]研究发现接种了 5 种甲基杆菌(*Methylobacterium mesophilicum*、*Methylobacterium extorquens*、*Methylobacterium oryzae*、*Methylobacterium podarium*、*Methylobacterium radiotolerans*)对拟南芥根部结构及根毛生长有不同程度的促生作用。因此本研究以拟南芥模式植物进行菌株 W-1 促生性能的初步研究,平板促生试验以拟南芥幼苗的根长、侧根数、幼苗干鲜重、幼苗叶绿素为依据讨论了菌株 W-1 的促生指标,测量这些生长指标能够直观看出拟南芥幼苗的长势。根系及根系结构的发展会影响植株的生长^[33]。结果显示,接种菌株 W-1 处理的拟南芥幼苗长势与根系结构明显优于对照组,主要体现在拟南芥幼苗侧根与根毛的发育。菌株 W-1 同样显著促生拟南芥的根系结构的发展,这有助于拟南芥对营养物质的吸收。

综上,菌株 W-1 对拟南芥幼苗具有一定的促生长作用。具有促生作用的微生物菌株作为微生物肥料的条件是在土壤中的定殖生存能力,同时作为生物肥料配方的菌株选择标准,评估菌株对植物生长促进特性是一项非常重要的前提^[34]。从新疆北部乌尔禾地区盐渍土壤分离筛选出菌株 W-1 中度耐盐促生菌株,能较好地适应盐渍土壤,该菌对拟南芥幼苗根部的发育有显著的促生作用。在盐胁迫环境中菌株 W-1 是否可以促生拟南芥,还需进一步研究。本研究对生物肥料配方中甲基杆菌属菌株的选择提供技术基础,这将有助于甲基杆菌属在微生物菌剂方面开发潜能。

REFERENCES

- [1] Pérez-Montaña F, Alías-Villegas C, Bellogín RA, Del Cerro P, Espuny MR, Jiménez-Guerrero I, López-Baena FJ, Ollero FJ, Cubo T. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production[J]. Microbiological Research, 2014, 169(5/6): 325-336
- [2] Zhou DM, Huang XF, Chaparro JM, Badri DV, Manter DK, Vivanco JM, Guo JH. Root and bacterial secretions regulate the interaction between plants and PGPR leading to distinct plant growth promotion effects[J]. Plant and Soil, 2016, 401(1/2): 259-272
- [3] Jha CK, Maheshwari DK, Saraf M. Emergence of *Methylobacterium* spp. as Potential Organism in Agroecosystems[A]//Bacterial Metabolites in Sustainable Agroecosystem[M]. Cham: Springer International Publishing, 2015: 53-68
- [4] Holland M. *Methylobacterium* and plants[J]. Recent Research Development in Plant Physiology, 1997, 1: 207-213
- [5] Lee MK, Chauhan PS, Yim WJ, Lee GJ, Kim YS, Park KW, Sa TM. Foliar colonization and growth promotion of red pepper (*Capsicum annuum* L.) by *Methylobacterium oryzae* CBMB20[J]. Journal of Applied Biological Chemistry, 2011, 54(2): 120-125
- [6] Madhaiyan M, Poonguzhali S, Senthilkumar M, Seshadri S, Chung H, Yang J, Sundaram S, Tongmin SA. Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar Co-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* spp.[J]. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 2004, 45(4): 315-324
- [7] Ventorino V, Sannino F, Piccolo A, Cafaro V, Carotenuto R, Pepe O. *Methylobacterium populi* VP2: plant growth-promoting bacterium isolated from a highly polluted environment for polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) biodegradation[J]. The Scientific World Journal, 2014: 931793
- [8] Tani A, Sahin N, Fujitani Y, Kato A, Sato K, Kimbara K. *Methylobacterium* species promoting rice and barley growth and interaction specificity revealed with whole-cell matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) analysis[J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0129509
- [9] Omer ZS, Tombolini R, Gerhardson B. Plant colonization by pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria (PPFMs)[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 47(3): 319-326
- [10] Shen P. Microbiology Experiment (Second Edition)[M]. Beijing: Higher Education Press, 1999 (in Chinese)
沈萍. 微生物学实验[M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 1999
- [11] Dong XZ, Cai MY. A Handbook for Systematic Identification of Common Bacteria[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese)
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
- [12] Kimura M. The Neutral Theory of Molecular Evolution[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1983
- [13] Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(12): 2725-2729
- [14] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425
- [15] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap[J]. Evolution; International Journal of Organic Evolution, 1985, 39(4): 783-791
- [16] 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
- [17] Rao WVBS, Sinha MK. Phosphate dissolving microorganisms in the soil and rhizosphere[EB/OL]. 1963
- [18] Knief C, Frances L, Vorholt JA. Competitiveness of diverse *Methylobacterium* strains in the phyllosphere of *Arabidopsis thaliana* and identification of representative models, including *M. extorquens* PA1[J]. Microbial Ecology, 2010, 60(2): 440-452
- [19] Zhang ZL, Qu WJ, Li XF. Experimental Guidance of Plant Physiology[M]. 4 ed. Beijing: Higher Education Press, 2009 (in Chinese)
张志良, 瞿伟菁, 李小方. 植物生理学实验指导[M]. 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2009
- [20] Dourado MN, Camargo Neves AA, Santos DS, Araújo WL. Biotechnological and agronomic potential of endophytic pink-pigmented methylotrophic *Methylobacterium* spp.[J]. BioMed Research International, 2015, 2015: 909016
- [21] Andrews M, Andrews ME. Specificity in legume-rhizobia symbioses[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(4): E705
- [22] Wang GP, Ayiguli·Tht, Wang R, Zhu CQ. Study on the diversity and community structure of salt tolerant bacteria in saline alkali soil in Wuerhe, Xinjiang[J]. Journal of Microbiology, 2021, 41(2): 17-26 (in Chinese)
王改萍, 阿依古丽·托乎提, 王茹, 祝长青. 新疆乌尔禾地区盐渍土壤耐盐细菌多样性与群落结构研究[J]. 微生物学杂志, 2021, 41(2): 17-26
- [23] Gómez-Godínez LJ, Fernandez-Valverde SL, Martínez Romero JC, Martínez-Romero E. Metatranscriptomics and nitrogen fixation from the rhizoplane of maize plantlets inoculated with a group of PGPRs[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2019, 42(4): 517-525
- [24] Malik KA, Schlegel HG. Chemolithoautotrophic growth of

- bacteria able to grow under N₂-fixing conditions[J]. FEMS Microbiology Letters, 1981, 11(1): 63-67
- [25] Zhang LM. Selection and identification of an associative nitrogen-fixing bacterium strain with high efficiency and investigation of its physiological characteristics and of its inoculation effects[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2002 (in Chinese)
张丽梅. 高效联合固氮菌的筛选、鉴定及其生理生化特征和接种效应研究[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2002
- [26] Liu TZ, Mao ZW, Zhang JM. Growth conditions of endophytic diazotroph isolated from *Cynodon dactylon*[J]. Pratacultural Science, 2016, 33(5): 835-842 (in Chinese)
刘天增, 毛中伟, 张巨明. 狗牙根内生固氮菌生长条件[J]. 草业科学, 2016, 33(5): 835-842
- [27] Wan CL, Yang X, Lee DJ, Du MA, Wan F, Chen C. Aerobic denitrification by novel isolated strain using NO₂⁻-N as nitrogen source[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(15): 7244-7248
- [28] Zhang YP, Wang P. Denitrification characteristics of aerobic denitrifiers and N₂O emission[J]. Transactions of Beijing Institute of Technology, 2010, 30(8): 995-999 (in Chinese)
张艳萍, 汪苹. 好氧反硝化菌的脱氮性能及 N₂O 逸出量研究[J]. 北京理工大学学报, 2010, 30(8): 995-999
- [29] Jayashree S, Vadivukkarasi P, Anand K, Kato Y, Seshadri S. Evaluation of pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria for phosphate solubilization[J]. Archives of Microbiology, 2011, 193(8): 543-552
- [30] Kumar A, Rai LC. Soil organic carbon and phosphorus availability regulate abundance of culturable phosphate-solubilizing bacteria in paddy fields[J]. Pedosphere, 2020, 30(3): 405-413
- [31] Ma CY, Zhang Y, Sun GZ, Liu T, Yao T. Identification of plant growth promoting rhizobacteria *Elmus dahuricus* and their effectiveness[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizer, 2016, 22(4): 1039-1048 (in Chinese)
马骢毓, 张英, 孙广正, 刘婷, 姚拓. 披碱草根际促生菌筛选及其接种剂的促生作用[J]. 植物营养与肥料学报, 2016, 22(4): 1039-1048
- [32] Klikno J, Kutschera U. Regulation of root development in *Arabidopsis thaliana* by phytohormone-secreting epiphytic methylobacteria[J]. Protoplasma, 2017, 254(5): 1867-1877
- [33] Grover M, Bodhankar S, Sharma A, Sharma P, Singh J, Nain L. PGPR mediated alterations in root traits: way toward sustainable crop production[J]. Frontiers in Sustainable Food Systems, 2021, 4: 618230
- [34] Zhao SQ, Wang JJ, Yang ZZ, Li QQ, Yang R, Zhao W, Xu S, Zhu D, Huang ZY. Preparation of microbial compound agents[J]. Microbiology China, 2020, 47(5): 1492-1502 (in Chinese)
赵思崎, 王敬敬, 杨宗政, 李晴晴, 杨榕, 赵维, 徐松, 朱丹, 黄志勇. 微生物复合菌剂的制备[J]. 微生物学通报, 2020, 47(5): 1492-1502