

## 研究报告

## 白术中一株植物促生细菌的分离鉴定及培养条件优化

何勇<sup>1</sup>, 许淑雅<sup>1</sup>, 胡贤君<sup>2</sup>, 卢云亮<sup>1</sup>, 刘幸<sup>1</sup>, 梁倩文<sup>1</sup>, 齐永霞<sup>1</sup>, 陈方新<sup>\*1</sup>

1 安徽农业大学植物保护学院 作物有害生物综合治理安徽省重点实验室 植物病虫害生物学与绿色防控  
安徽普通高校重点实验室, 安徽 合肥 230031

2 安徽农业大学农学院, 安徽 合肥 230031

何勇, 许淑雅, 胡贤君, 卢云亮, 刘幸, 梁倩文, 齐永霞, 陈方新. 白术中一株植物促生细菌的分离鉴定及培养条件优化[J]. 微生物学通报, 2023, 50(9): 3983-3996.

HE Yong, XU Shuya, HU Xianjun, LU Yunliang, LIU Xing, LIANG Qianwen, QI Yongxia, CHEN Fangxin. A plant growth-promoting bacterium in *Atractylodes macrocephala* Koidz: isolation, identification, and optimization of culture conditions[J]. Microbiology China, 2023, 50(9): 3983-3996.

**摘要:** 【背景】白术是十分重要的大宗药材之一, 在其种植过程中一直受到土壤肥力不足导致农药化肥大量施用的困扰。【目的】从白术中分离纯化出对白术生长发育具有促进作用的微生物, 为白术生物肥料的制备提供材料基础。【方法】采用钼锑抗比色法和 Salkowski 比色法等测定菌株溶解无机磷和产吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)的能力; 使用灌根法测定供试菌株对植株生长发育的影响; 通过形态学和生理生化的方法, 结合 16S rRNA 基因测序技术对供试菌株进行分类鉴定; 使用响应面法优化菌株的培养条件。【结果】分离获得一株对白术具有促生作用的菌株 BZ-8, 解磷能力和产 IAA 能力可达到 4.89 mol/L 和 45.52  $\mu\text{g/mL}$ , 16S rRNA 基因测序长度 1 363 bp, 系统发育树分析确定菌株 BZ-8 为粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*); 菌株发酵液对白术苗期的生长有明显的促进作用; 优化后的发酵培养条件为(g/L): 麦芽糖 5.0, 牛肉膏 3.0, 酵母提取物 5.0, 胰蛋白胨 10.0, 柠檬酸钠 5.0, 培养基初始 pH 7.01, 培养温度 30.4  $^{\circ}\text{C}$ , 摇床转速 180 r/min。【结论】白术内生菌粘质沙雷氏菌 BZ-8 能够解磷和产 IAA, 对白术具有明显的促生作用, 本研究确定了菌株 BZ-8 的培养条件。

**关键词:** 植物内生细菌; 粘质沙雷氏菌; 促生作用; 系统发育分析; 培养条件优化

资助项目: 中国烟草总公司贵州省公司科技项目(110202202014)

This work was supported by the Science and Technology Project of China Tobacco Guizhou Company Bureau (110202202014).

\*Corresponding author. E-mail: superpowercfx@163.com

Received: 2023-01-30; Accepted: 2023-04-21; Published online: 2023-05-26

# A plant growth-promoting bacterium in *Atractylodes macrocephala* Koidz: isolation, identification, and optimization of culture conditions

HE Yong<sup>1</sup>, XU Shuya<sup>1</sup>, HU Xianjun<sup>2</sup>, LU Yunliang<sup>1</sup>, LIU Xing<sup>1</sup>, LIANG Qianwen<sup>1</sup>,  
QI Yongxia<sup>1</sup>, CHEN Fangxin<sup>\*1</sup>

1 Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops of Anhui Province, Key Laboratory of Biology and Sustainable Management of Plant Diseases and Pests of Anhui Higher Education Institutes, School of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230031, Anhui, China

2 College of Agronomy, Anhui Agricultural University, Hefei 230031, Anhui, China

**Abstract:** [Background] *Atractylodes macrocephala* Koidz is an important and widely used Chinese medicinal plant, while its cultivation suffers from poor soil fertility which is often dealt with the heavy application of pesticides and fertilizers. [Objective] To provide a material basis for the preparation of a biofertilizer for *A. macrocephala* with the plant growth-promoting microorganisms isolated from the plant. [Methods] Mo-Sb colorimetry and Salkowski's method were employed to determine the abilities of the bacterial strain to solubilize inorganic phosphorus and synthesize indole-3-acetic acid (IAA). The effects of the tested strain on plant growth were assessed with the root irrigation method. The strain was identified based on the morphological and physiological characteristics and the 16S rRNA gene sequence. Response surface methodology was employed to optimize the culture conditions of the strain. [Results] The capabilities of the isolate BZ-8 to solubilize inorganic phosphorus and produce IAA reached 4.89 mol/L and 45.52 µg/mL, respectively. Its genome was 1 363 bp long, and phylogenetic analysis identified the strain as *Serratia marcescens*. The fermentation broth of the strain significantly promoted the growth of *A. macrocephala* seedlings. The optimized culture conditions of BZ-8 were 5.0 g/L maltose, 3.0 g/L beef extract, 5.0 g/L yeast extract, 10.0 g/L tryptone, 5.0 g/L sodium citrate, initial pH 7.01, and incubation at 30.4 °C and 180 r/min. [Conclusion] *S. marcescens* BZ-8, an endophytic bacterium of *A. macrocephala*, is capable of solubilizing phosphorus and producing IAA, demonstrating a significant promoting effect on the growth of *A. macrocephala*. The optimal culture conditions of strain BZ-8 were determined via response surface test.

**Keywords:** plant endophyte; *Serratia marcescens*; growth-promoting effect; phylogenetic analysis; optimization of culture conditions

白术, 菊科苍术属植物, 是常见的大宗药材之一, 以根状茎入药, 具有健脾益气、燥湿利水之效, 是“浙八味”之一, 素有“十药九术”之说, 现主要种植于浙江于潜、新昌、河北安国、安徽亳州和湖北等地区<sup>[1-2]</sup>。内源微生物具

有对寄主普遍友好的特点, 研究发现内源微生物种类繁多、功能多样, 在自然界中广泛存在, 可以将土壤中磷的存在形式进行转化, 能够利用色氨酸合成生长素(indole-3-acetic acid, IAA)弥补人工无法合成的不足<sup>[3]</sup>。合理开发利用此类

微生物资源, 有利于促进农业生产中化学肥料的减量增效, 改善土壤板结、有害元素积累等现象<sup>[4]</sup>。另外, 许多植物内生菌还能够固氮、产铁载体、产氨基酸等其他营养物质, 并有效抑制植物病原微生物的生长, 帮助植物抵抗病虫害和逆境胁迫的影响<sup>[5]</sup>。

解磷和产 IAA 的能力是植物促生菌的重要考察指标。本试验旨在以药用植物白术为材料, 分离并探索具有高效促生潜力的白术内生细菌, 探究内生菌的解磷、产 IAA 能力和发酵液促生效果, 并对该菌株进行形态学分类、生理生化特性比较、基于 16S rRNA 基因序列构建系统发育树进行分析鉴定; 同时, 对该菌株的培养条件进行响应面优化, 以获得具有促生潜力的白术内源微生物以及菌株生长适宜培养条件, 为白术生物肥料的开发提供材料基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

白术采集自安徽省安庆市岳西县头陀镇西美村白术种植地。

钼锑抗检测液、LB 培养基、NB 培养基和 NBRIP 培养基参考文献[6]配制, BPY 培养基和 NYD 培养基参考文献[7]配制;

IAA 显色剂<sup>[7]</sup>: 0.45 g FeCl<sub>3</sub> 溶解于 30 mL 蒸馏水中, 再缓慢添加 587.40 mL 98% 的浓硫酸, 用纯水定容至 1 L, 4 °C 贮存于棕色瓶中备用。

钼酸铵-硫酸混合溶液: 0.14 g/mL 钼酸铵溶液、6.00 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液和 0.03 g/mL 酒石酸锑钾溶液按照 9:40:1 的体积比混合(现用现配)。

紫外可见分光光度计, 赛默飞世尔科技有限公司; 恒温培养振荡器, 上海智城分析仪器制造有限公司; 冷场发射扫描电子显微镜, HITACHI 公司。

### 1.2 白术内生细菌的分离

白术根状茎洗净去须根, 切块, 75% 酒精浸泡 10 min, 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液浸泡 30 s, 无菌水清洗 3 次, 置于 LB 培养基中, 用最后一次清洗的无菌水涂板, 作为对照; 待细菌长出后, 挑取单菌落至新的 LB 固体培养基上, 划线法纯化得到稳定生长的单菌落, -20 °C 贮存于 30% 甘油溶液中<sup>[8-10]</sup>。

### 1.3 菌株解磷能力的测定

将分离得到的菌株 BZ-8 单菌落点于 NBRIP 固体培养基上, 于 28 °C 恒温黑暗条件下培养 2 d, 测定菌落周围透明解磷圈直径和菌落直径。

钼锑抗比色法测定菌株 BZ-8 的解磷量: 将菌株 BZ-8 的种子液以 1% 的接种量转接至 NBRIP 液体培养基中, 28 °C、180 r/min 培养 7 d, 取发酵菌液于 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 100 μL, 用蒸馏水定容至 10 mL, 依次加入 0.1 g/mL 抗坏血酸溶液和钼酸铵-硫酸混合溶液各 200 μL, 充分振荡混匀后静置 5 min, 采用分光光度计测定 822 nm 波长处吸光值(*OD*<sub>822</sub>), 测前调零<sup>[11]</sup>。用 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (使用前置于 105 °C 烘至重量不变) 配制 1、2、3、4 和 5 mg/L 标准液(现用现配), 并采用上述方法测定标准液 822 nm 处吸光值, 以吸光值为纵坐标, 绘制磷标准曲线。

### 1.4 产 IAA 能力测定

Salkowski 比色法测定菌株 BZ-8 的产 IAA 能力: 挑取单菌落至 0.5 g/L 色氨酸的 NB 液体培养基中, 于 28 °C、180 r/min 黑暗条件下培养 72 h, 吸取 1 mL 菌液, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 加入约 2 倍体积的 IAA 指示剂, 遮光显色 30 min, 测定显色液 *OD*<sub>530</sub> 值, 配制 IAA 标准样, 绘制标准曲线计算菌液中 IAA 浓度<sup>[12]</sup>。

## 1.5 菌株发酵液对白术的促生作用

使用 0.1% 的高锰酸钾溶液浸泡白术种子 15 min 进行表面消毒, 然后用无菌水冲洗种子数次, 放在铺上无菌滤纸的育苗盘上, 于 25 °C 黑暗条件下催芽 3–5 d, 期间保持一定湿度, 待露白后即可取出, 种植于提前湿润的土壤之中, 覆土厚度约 2 cm。

将供试菌株划线接种于 LB 固体平板培养基上培养 12–24 h, 待长出单菌落后, 挑取单菌落于 LB 液体培养基中, 28 °C、160 r/min 发酵 5 d, 挑选露白至同一程度的白术种子, 在其附近土壤中添加 1 mL 发酵液, 以添加不接菌的 LB 液体培养基作为 CK 对照组, 试验设置 3 组, 每组 3 株重复, 15 d 后从土中取出观察萌发情况, 测量茎高、根长、鲜重和干重<sup>[13–14]</sup>。

## 1.6 菌株鉴定

### 1.6.1 形态学鉴定

将菌株 BZ-8 接种于 LB 固体培养基上培养 18 h, 观察菌落形态特征; 制备菌株 BZ-8 的扫描电镜样品, 使用扫描电镜观察该菌的细胞形态。

### 1.6.2 生理生化特征鉴定

参照伯杰细菌鉴定手册(第 8 版)并稍作调整对菌株 BZ-8 进行部分生理生化特性的测定, 包括革兰氏染色、发酵葡萄糖、V-P、M-R、明胶液化、柠檬酸盐利用、发酵肌醇、发酵甘油、分解尿素、产生过氧化氢酶和产铁载体的特性<sup>[15]</sup>。

### 1.6.3 分子生物学鉴定

通过 16S rRNA 基因测序方法进行分子生物学鉴定<sup>[16]</sup>。采用 CTAB-SDS 法提取细菌 DNA<sup>[17]</sup>, 在基因扩增仪上进行 PCR 扩增, 引物为 27F (5'-AGAGTTTGTACCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3')。PCR 反应体系(50 µL): 2×Rapid Taq Master Mix 25 µL, 上、下游引物(10 µmol/L)各 2 µL, 模板 DNA (80 ng/µL) 5 µL, ddH<sub>2</sub>O 16 µL。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 15 s, 51 °C 15 s, 72 °C

30 s, 35 个循环; 72 °C 5 min。将扩增的 PCR 原液送至南京擎科生物科技有限公司进行双向测序。将测序结果序列在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上进行同源序列比对, 通过 MEGA 11 软件用邻接法(neighbor-joining method)对 1 000 个重采样数据进行邻接分析, 构建菌株 BZ-8 的系统发育树。

## 1.7 培养条件优化

### 1.7.1 单因素试验

分别在 LB、NB、BPY 和 NYD 液体培养基中分别加入 1% 的供试菌株种子液, 其他条件保持一致, 28 °C、180 r/min 条件下培养 24 h, 测定发酵液的  $OD_{600}$  (后续试验均以培养 24 h 菌株 BZ-8 发酵液的  $OD_{600}$  值为筛选标准), 试验重复 3 次, 筛选得到的基础培养基进行后续试验<sup>[18]</sup>。

考察培养基组分中不同碳源(葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、可溶性淀粉、玉米粉和甘露醇)、不同无机盐(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、MnSO<sub>4</sub>、CaCO<sub>3</sub>、NaCl 和柠檬酸钠)、培养温度、摇床转速、培养基初始 pH、培养基装液量、菌株种子液添加量对菌株 BZ-8 生长量的影响<sup>[19]</sup>。

### 1.7.2 Plackett-Burman 试验

以 1.7.1 试验结果为基础, 使用 Design-Expert 13.0 软件设计 Plackett-Burman 试验分析培养基各组分的添加量及部分培养条件对菌株生长量的影响<sup>[20]</sup>。

### 1.7.3 Box-Behnken 试验

根据 Plackett-Burman 试验结果, 使用 design-expert 13.0 软件选择三因素三水平进行响应面中心组合试验设计。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株 BZ-8 的分离鉴定

#### 2.1.1 菌株 BZ-8 的分离及形态学鉴定

选取生长在白术组织块周围的单菌落采用

划线法于 LB 培养基上反复纯化, 最终获得一株白术内生菌, 命名为 BZ-8。通过划线法将菌株 BZ-8 接种至 LB 培养基上, 置于 28 °C 条件下培养, 发现在 LB 培养基上, 该菌株菌落红色微泛白, 能够产生红色素, 菌落形态呈圆形, 直径 1–2 mm, 有隆起, 有光泽, 不透明, 质地稍黏稠, 边缘光滑完整, 见图 1A; 扫描电镜下菌株 BZ-8 呈不规则短杆状, 表面褶皱不光滑, 菌体外部常具凹陷, 见图 1B。

### 2.1.2 菌株 BZ-8 的生理生化特性鉴定

菌株 BZ-8 革兰氏染色为阴性, 能够发酵葡萄糖、肌醇和甘油, 能够产生明胶酶、利用柠檬酸盐、产生过氧化氢酶, 不能分解尿素、不能产铁载体(表 1)。生理生化特征对比发现, 菌株 BZ-8 与已报道的粘质沙雷氏菌的生理生化特征<sup>[15]</sup>一致。

### 2.1.3 菌株 BZ-8 的分子生物学鉴定

测得菌株 BZ-8 的 16S rRNA 基因序列长度为 1 363 bp, 提交 GenBank 数据库, 获得登录号为 OP036430, BLAST 比对结果显示与粘质沙雷氏菌具有高度的相似性, 选取模式菌种构建菌

株 BZ-8 的系统发育树<sup>[21]</sup>。菌株 BZ-8 与沙雷氏菌属位属于同一簇, 并与 *Serratia marcescens* KRED 具有极高的亲缘关系, 序列一致性为 99.05%, 同 *Serratia odorifera* DSM 4582 序列相似性为 97.66%。因此, 将菌株 BZ-8 鉴定为沙雷氏菌属(*Serratia*)粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)<sup>[22]</sup>(图 2)。

## 2.2 菌株 BZ-8 的促生效能测定

### 2.2.1 菌株 BZ-8 的产 IAA 和解磷能力

菌株 BZ-8 在进行 IAA 显色反应后可看到明显变红(图 3A), 在 NBRIP 固体培养基上可产生明显的解磷圈(图 3B), 表明菌株 BZ-8 能溶解无机磷并产生 IAA。绘制 IAA 浓度和磷溶解标准曲线, 得到回归方程分别为: IAA 浓度 =  $23.781 \times OD_{530} + 0.111$  2 ( $R^2 = 0.970$  3), 解磷量 =  $75.718 \times OD_{822} - 182.2$  ( $R^2 = 0.980$ )。经定量检测, 菌株 BZ-8 解磷能力可达到 4.89 mol/L, 产 IAA 能力为 45.52 mg/L, 对比当前解磷能力较为显著的假单胞菌、芽孢杆菌和欧文氏菌属等<sup>[23–26]</sup>, 菌株 BZ-8 具有极高的解磷能力和较高的产 IAA 能力。

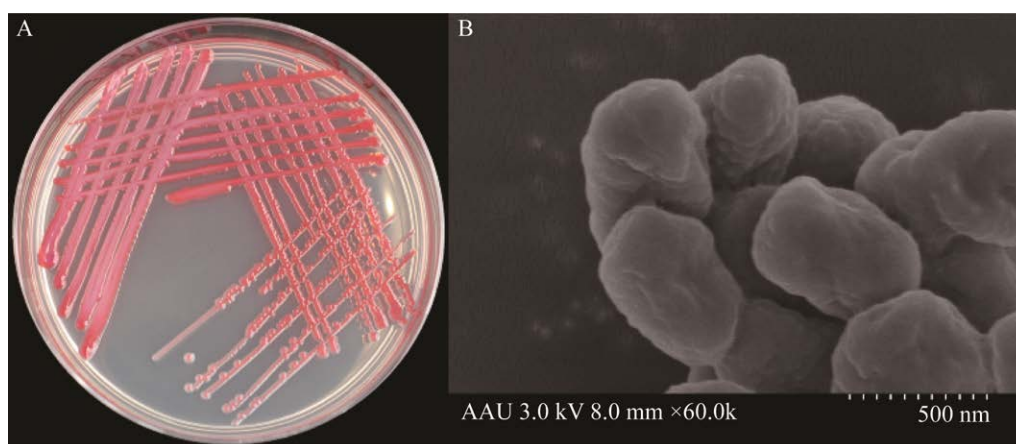


图 1 菌株 BZ-8 培养基上菌落形态(A)和扫描电镜下的形态(B)

Figure 1 Colony morphology on medium (A) and morphology under scanning electron microscopy (B) of strain BZ-8.

表 1 菌株 BZ-8 的生理生化特性

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain BZ-8

编号 No.	类别 Type	结果 Result
1	革兰氏染色 Gram staining	-
2	葡萄糖发酵 Glucose fermentation	+
3	乙酰甲基甲醇(V-P) Acetyl methanol	+
4	甲基红试验(M-R) Methyl red	+
5	明胶液化 Gelatin liquefaction	+
6	柠檬酸盐 Citrate	+
7	肌醇发酵 Inositol fermentation	+
8	甘油发酵 Glycerol fermentation	+
9	尿素分解 Urea decomposition	-
10	过氧化氢酶 Catalase	+
11	铁载体 Siderophore	-

+: 阳性反应; -: 阴性反应

+: Positive; -: Negative.

## 2.2.2 发酵液对植物生长的影响

菌株 BZ-8 发酵液对白术的促生效果如图 4 所示,在第 15 天时观察可以明显看出茎和根的生长均显著高于空白对照组。经过测定,CK 组茎长平均 7.78 mm,根长平均 17.01 mm,添加 BZ-8 发酵液白术茎长平均 31.41 mm,根长平均 27.6 mm,相较于对照组分别增长了 404%和 162%,菌株 BZ-8 发酵液对白术苗期的促生效果十分显著<sup>[27]</sup>。

## 2.3 菌株 BZ-8 的培养条件优化

## 2.3.1 单因素试验结果

相较于 LB、NB 和 NYD 培养基而言,菌株 BZ-8 在 BPY 液体培养基中生长量增加最显著(图 5A)。

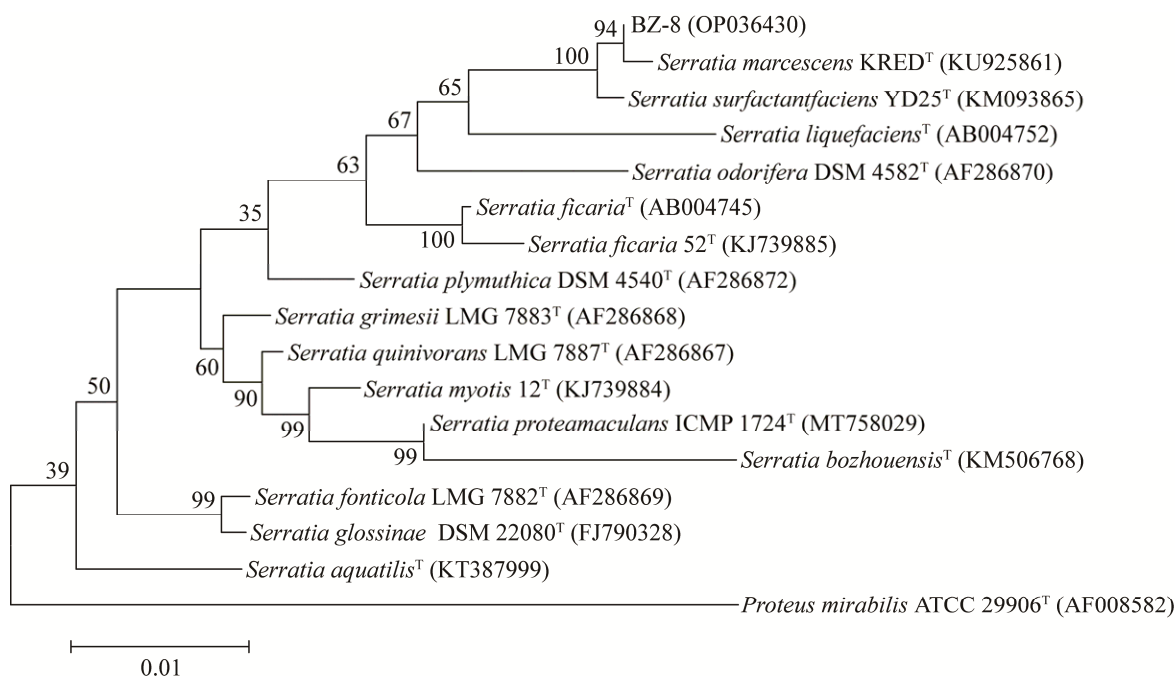
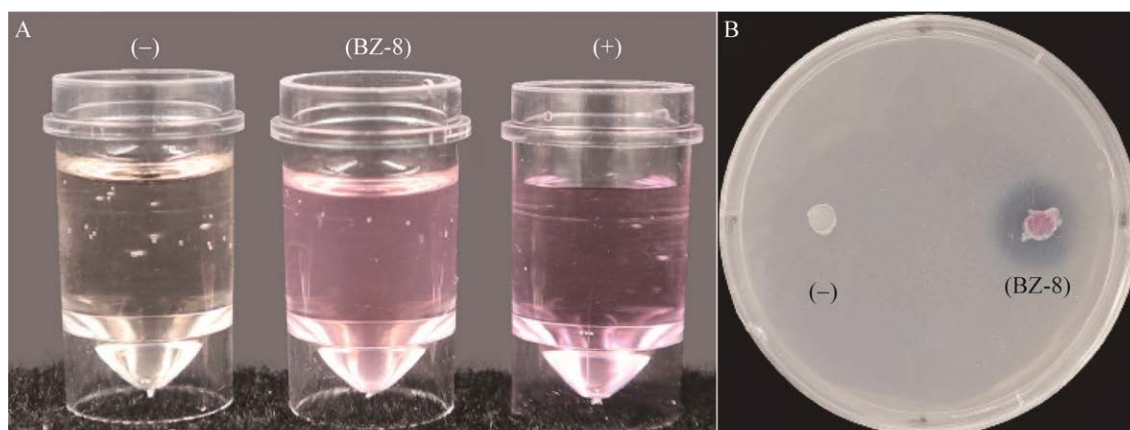


图 2 菌株 BZ-8 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号中序号为 GenBank 登录号;分支处数值表示基于 1 000 次重采样数据的 bootstrap 值;标尺 0.01 表示进化距离

Figure 2 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequence of strain BZ-8. The serial number in brackets is the login number of GenBank; The value at the branch represents the bootstrap value based on 1 000 resampling data sets; Scale 0.01 represents nucleotide divergence.





**图3 菌株 BZ-8 产 IAA 能力(A)和解磷能力(B)的定性检测** 图 A 阳性对照(+)是浓度为 50 mg/L 的 IAA 标准溶液; 图 A 阴性对照(-)为含有 0.5 g/L 色氨酸的 LB 培养基. 图 B 阴性对照(-)为 LB 培养基  
Figure 3 Qualitative determination of IAA production (A) and phosphorus solubilization (B) by strain BZ-8. Figure A positive control (+) is a standard solution of IAA with a concentration of 50 mg/L; Figure A negative control (-) is LB medium containing 0.5 g/L tryptophan. Figure B negative control (-) is LB medium only.

分别以葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、可溶性淀粉、玉米粉和甘露醇作为碳源, 考察 6 种碳源对 BZ-8 生长量的影响。结果显示, 以麦芽糖作为碳源最有利于菌株 BZ-8 的生长(图 5B)。之后

以麦芽糖作为碳源, 考察了  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{MnSO}_4$ 、 $\text{CaCO}_3$ 、 $\text{NaCl}$  和柠檬酸钠等无机盐对菌株 BZ-8 生长的影响, 发现以柠檬酸钠作为无机盐时菌株 BZ-8 生长最好(图 5C)。



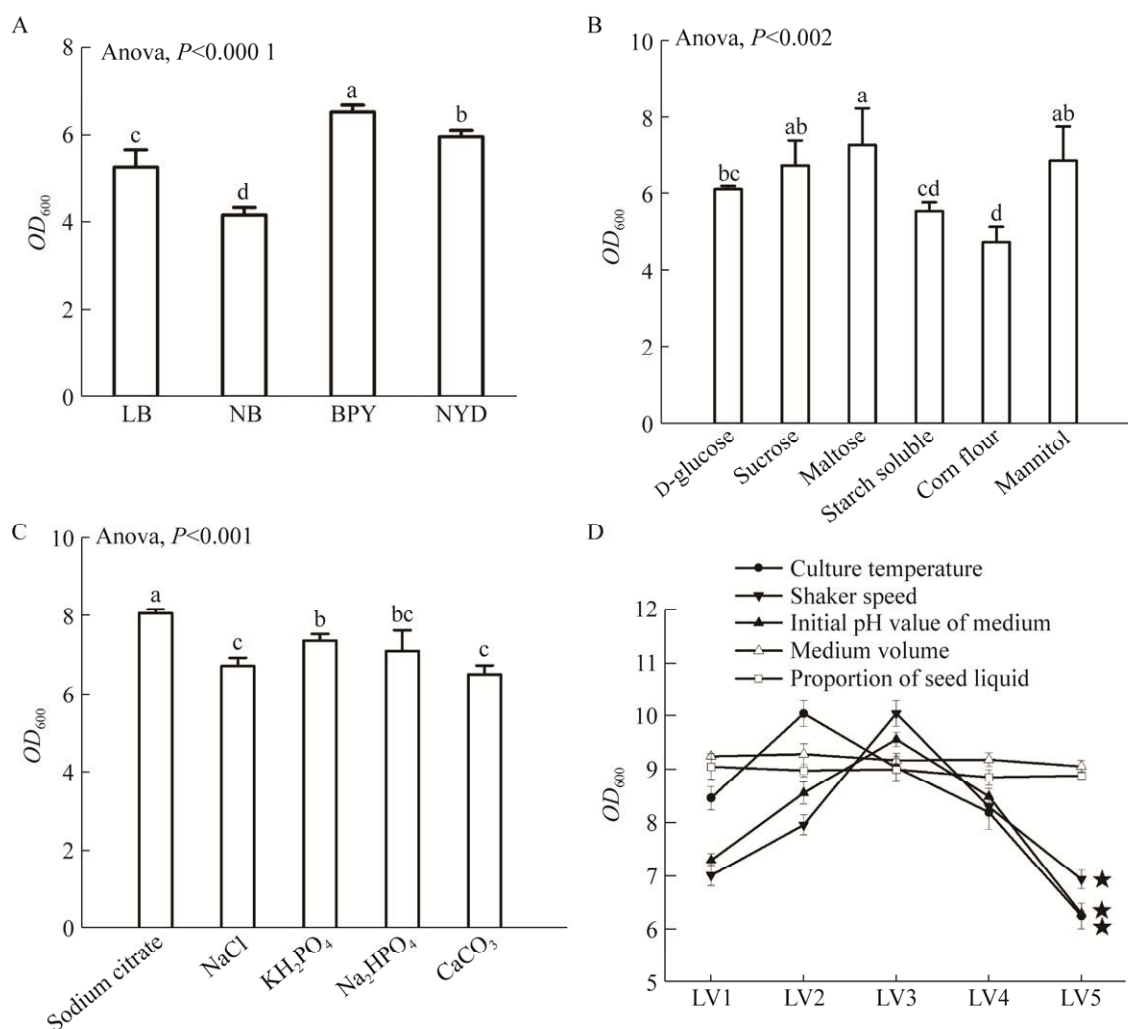
**图4 LB 培养基与菌株 BZ-8 接种处理白术幼苗农艺性状的差异**

Figure 4 Differences in agronomic traits of *Atractylodes macrocephala* seedlings with LB medium and strain BZ-8 inoculation treatment.

比较了培养基装液量、菌株种子液添加量、培养温度、培养基初始 pH、摇床转速的变化对菌株 BZ-8 生长量的影响, 结果表明, 培养基装液量和菌株种子液添加量对菌株 BZ-8 的生长影响极小, 而培养温度、培养基初始 pH、摇床转速的变化对菌株 BZ-8 生长量的影响较为显著(图 5D), 菌株 BZ-8 的适宜培养温度、摇床转速、初始 pH 值应分别在 25–31 °C、160–200 r/min、6.5–7.5 之间。因此, 在后续的 Plackett-Burman 试验中, 将以培养基各组分、培养温度、摇床转速和培养基初始 pH 共 8 个影响因子进行试验设计。

### 2.3.2 Plackett-Burman 试验设计和结果

试验筛选摇床转速(speed)、培养基 pH、柠檬酸钠( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ )添加量、胰蛋白胍(tryptone)添加量、牛肉膏(beef extract)添加量、培养温度



**图5 菌株 BZ-8 培养基优化单因素试验结果** A: 不同培养基对菌株 BZ-8 生长量的影响. B: 不同碳源对菌株 BZ-8 生长量的影响. C: 不同无机盐对菌株 BZ-8 生长量的影响. D: 不同培养条件对菌株 BZ-8 生长量的影响. 通过 Tukey 检验( $P<0.05$ )对单因素方差分析结果进行事后比较, 数字后同一字母表示无差异. ★: 菌株生长量受到各因素水平变化影响的显著性. LV1–LV5 表示各因素的不同水平, 包括培养温度 25、28、31、34 和 37 °C, 摇床转速 140、160、180、200 和 220 r/min, pH 6.0、6.5、7.0、7.5 和 8.0, 培养基装液量 25、50、75、100 和 125 mL, 菌株种子液添加量 1、2、3、4 和 5 mL

Figure 5 Single factor trial results for optimizing the medium of strain BZ-8. A: The effect of different culture media on the growth of BZ-8. B: The effect of different carbon sources on the growth of BZ-8. C: The effect of different inorganic salts on the growth of BZ-8. D: Differences in the effects of different culture conditions on BZ-8. Results were analyzed using one-way ANOVA with Tukey test ( $P<0.05$ ), and the same letter after the number indicates no significant difference. ★: The significance of the influence of various factors on the growth of bacterial strains. LV1–LV5 represents the different levels of each factor, including the cultivation temperature ranging 25, 28, 31, 34, and 37 °C, shaking speed 140, 160, 180, 200, and 220 r/min, pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, and 8.0, liquid volume of the medium 25, 50, 75, 100, and 125 mL, and the amount of inoculated seed liquid ranging 1, 2, 3, 4, and 5 mL.



(temperature)、酵母提取物(yeast extract)添加量、麦芽糖(maltose)添加量 8 个因子, 以进行 Box-Behnken 试验, 其中  $C$ 、 $F$  和  $J$  为虚构变量(表 2); 方差显著性分析结果显示, 该模型  $P$  值

小于 0.05, 摇床转速、培养基初始 pH 和培养温度  $F$  值分别为 51.79、51.90 和 55.40, 表示其显著性最高(表 3)。因此, 以摇床转速、培养基初始 pH 和培养温度进行 Box-Behnken 试验设计<sup>[28]</sup>。

表 2 中心组合设计试验及结果

Table 2 Center combination design test and results

编号 No.	转速 Speed	pH	$C$	柠檬酸钠 $C_6H_5Na_3O_7$	胰蛋白胨 Tryptone	$F$	牛肉膏 Beef extract	温度 Temperature	$J$	酵母提取物 Yeast extract	麦芽糖 Maltose	$OD_{600}$
1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	8.99
2	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1.21
3	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	9.13
4	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	1.03
5	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	6.42
6	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	4.31
7	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	5.12
8	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	3.03
9	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	8.01
10	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	3.41
11	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	10.62
12	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	3.01

$C$ 、 $F$  和  $J$  为虚构变量

$C$ ,  $F$  and  $J$  are fictional variables.

表 3 Plackett-Burman 试验方差显著性分析

Table 3 Analysis of variance significance of Plackett-Burman test

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 $df$	均方 Mean square	$F$ 值 $F$ value	$P$ 值 $P$ value	显著性 Significance
模型 Model	114.040 0	9	12.670 0	24.060 0	0.040 5	Significant
Speed	27.270 0	1	27.270 0	51.790 0	0.018 8	★
pH	27.330 0	1	27.330 0	51.900 0	0.018 7	★
$C_6H_5Na_3O_7$	0.508 4	1	0.508 4	0.965 4	0.429 4	
Tryptone	1.370 0	1	1.370 0	2.600 0	0.248 5	
Beef extract	0.371 0	1	0.371 0	0.704 5	0.489 6	
Temperature	29.170 0	1	29.170 0	55.400 0	0.017 6	★
Yeast extract	0.304 0	1	0.304 0	0.577 3	0.526 7	
Maltose	5.160 0	1	5.160 0	9.800 0	0.088 7	
残差 Residual	1.050 0	2	0.526 6			
总和 Cor total	115.090 0	11				

★: 对菌株生长量影响显著性最高的 3 个因子

★: The three factors with the highest significant impact on the growth of the strain.

### 2.3.3 Box-Behnken 试验设计和结果

共设置 Box-Behnken 中心组合试验 17 组, 试验验证培养温度、培养基初始 pH 和摇床转速三者之间对菌株 BZ-8 生长量的影响(表 4)。中心组合试验结果统计分析显示, 该数据模型的值  $F$  值为 95.39,  $P < 0.05$  (表 5), 表明该模型可靠<sup>[29]</sup>, 图 6 为培养基初始 pH 和摇床转速之间、培养基初始 pH 和培养温度之间、培养温度和摇床转速之间的响应面图。使用 design expert 13.0 软件对 Box-Behnken 试验结果分析得出, 该模型推荐菌株 BZ-8 的生长条件为培养温度 30.4 °C, 培养基初始 pH 7.01, 摇床转速 180 r/min, 经验证, 在此条件下, 菌株 BZ-8 生长量  $OD_{600}$  可达到 13.5, 相较于优化前的 6.5 提升了 208%, 有着显著的提升<sup>[30]</sup>。

表 4 中心组合设计试验及结果

Table 4 Center combination design test and results

组别 Group	温度 Temperature (°C)	pH	摇床转速 Shaking speed (r/min)	$OD_{600}$
1	31	7.0	180	10.31
2	31	8.0	140	7.10
3	31	7.0	180	10.51
4	25	6.0	180	7.43
5	31	7.0	180	10.59
6	37	7.0	220	6.41
7	31	6.0	140	5.90
8	31	8.0	220	6.12
9	31	7.0	180	10.61
10	37	8.0	180	5.03
11	31	7.0	180	10.24
12	25	8.0	180	7.25
13	37	6.0	180	5.93
14	25	7.0	220	8.58
15	31	6.0	220	8.70
16	25	7.0	140	6.90
17	37	7.0	140	6.90

表 5 中心组合设计试验统计分析

Table 5 Statistical analysis of the center combination design test

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	$F$ 值 $F$ value	$P$ 值 $P$ value
模型 Model	58.090 0	9	6.450 0	95.39	<0.000 1
A: Temperature	4.340 0	1	4.340 0	64.09	<0.000 1
B: pH	0.756 4	1	0.756 4	11.18	0.012 4
C: Speed	1.130 0	1	1.130 0	16.74	0.004 6
AB	0.129 6	1	0.129 6	1.92	0.208 9
AC	1.180 0	1	1.180 0	17.40	0.004 2
BC	3.570 0	1	3.570 0	52.79	0.000 2
$A^2$	15.200 0	1	15.200 0	224.58	<0.000 1
$B^2$	19.320 0	1	19.320 0	285.57	<0.000 1
$C^2$	7.730 0	1	7.730 0	114.21	<0.000 1
残差	0.473 7	7	0.067 7		
Residual					
失拟项 Lack of fit	0.361 2	3	0.120 4	4.28	0.097 0
纯误差 Pure error	0.112 5	4	0.028 1		
总和 Cor total	58.570 0	16			

## 3 讨论与结论

目前, 研究者对促生细菌的获取多数来自土壤, 对植物内源微生物的研究存在很大的探索空间<sup>[31]</sup>, 对于植物而言, 内源微生物多数源于非遗传因素, 更多是在生长过程中从环境中获取对自身生长发育不具有消极影响的微生物, 因此, 在对内源微生物的开发中, 可充分利用地理环境的优势, 这对于开发更广泛的促生细菌和促生途径有着重要作用<sup>[32]</sup>。中草药体内常具有对植物有积极作用的微生物。Ye 等<sup>[33]</sup>从鱼腥草内分离获得桔青霉等微生物, 这些微生物可以通过多种方式影响宿主植物的生长发育及次生代谢物的产生。阳湖荣等<sup>[13]</sup>发现白术体内富含芽孢杆菌属和假单胞菌属等微生物, 且大多具备植物促生潜力。本研究从白术体内

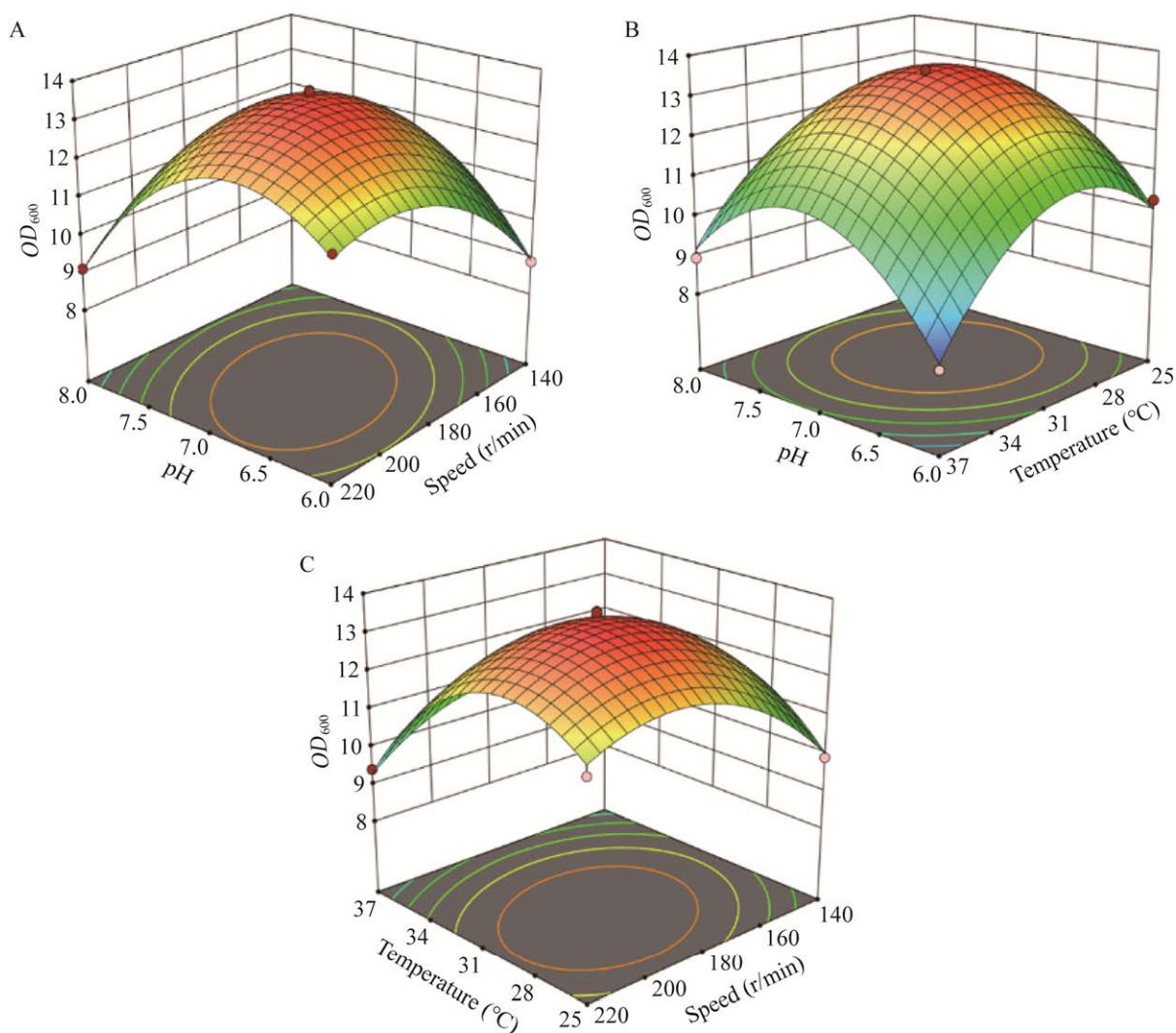


图 6 培养基初始 pH、摇床转速和培养温度对菌株 BZ-8 生长影响的响应面图 A: 培养基初始 pH 与摇床转速对菌株 BZ-8 生长量的影响. B: 培养基初始 pH 与培养温度对菌株 BZ-8 生长量的影响. C: 培养温度与摇床转速对菌株 BZ-8 生长量的影响

Figure 6 Response surface diagram of the effects of initial pH of the medium, shaking speed, and cultivation temperature on strain BZ-8 growth. A: The effects of initial pH of the medium and shaking speed on the growth of strain BZ-8. B: The effects of initial pH of the medium and cultivation temperature on the growth of strain BZ-8. C: The effects of cultivation temperature and shaking speed on the growth of strain BZ-8.

分离获得一株内生菌 BZ-8, 经过形态学对比、生理生化特性分析、16S rRNA 基因序列分析, 将该菌株鉴定为粘质沙雷氏菌。结果与 Li 等<sup>[34]</sup>报道的从白术体内分离获得粘质沙雷氏菌一致, 但 Li 等未曾探究粘质沙雷氏菌对白术的促

生潜力, 而 BZ-8 具有较好的解磷和产 IAA 能力, 对白术幼苗具有显著的促生作用。对比 Tan 等<sup>[35]</sup>报道的解磷能力较为显著的假单胞菌, 以及常见的芽孢杆菌和欧文氏菌属等, 菌株 BZ-8 具有极高的解磷能力和植物促生能力。

发酵培养基的优化是实现菌株高密度培养的关键<sup>[36]</sup>。本研究以  $OD_{600}$  为指标, 通过单因素试验及响应面试验, 对菌株 BZ-8 的发酵培养基及培养条件进行了优化, 优化后的培养基成分及发酵条件为(g/L): 麦芽糖 5.0, 牛肉膏 3.0, 酵母提取物 5.0, 胰蛋白胨 10.0, 柠檬酸钠 5.0, 培养基初始 pH 7.01, 培养温度 30.4 °C, 摇床转速 180 r/min。相较于优化前, 菌株 BZ-8 的生长量增长了 208%。对白术内源微生物促生效能的初步研究丰富了当前白术在内源微生物研究方面的资源, 同时也为进一步开发药用植物生产中的生物肥料提供了一定的理论和材料基础。

## REFERENCES

- [1] 王宁. 白术古今产地考[J]. 现代中药研究与实践, 2008, 22(6): 39-41, 61.  
WANG N. Textual research of geographical origin from *Atractylodes macrocephala*[J]. Research and Practice on Chinese Medicines, 2008, 22(6): 39-41, 61 (in Chinese).
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部): 2020 年版[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.  
Chinese Pharmacopoeia Commission. People's Republic of China (PRC) Pharmacopoeia-part I: 2020 edition[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020 (in Chinese).
- [3] DUCA DR, GLICK BR. Indole-3-acetic acid biosynthesis and its regulation in plant-associated bacteria[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(20): 8607-8619.
- [4] 池景良, 郝敏, 王志学, 李杨. 解磷微生物研究及应用进展[J]. 微生物学杂志, 2021, 41(1): 1-7.  
CHI JL, HAO M, WANG ZX, LI Y. Advances in research and application of phosphorus-solubilizing microorganism[J]. Journal of Microbiology, 2021, 41(1): 1-7 (in Chinese).
- [5] SANTOYO G, MORENO-HAGELSIEB G, DELC OROZCO-MOSQUEDA M, GLICK BR. Plant growth-promoting bacterial endophytes[J]. Microbiological Research, 2016, 183: 92-99.
- [6] 马粒雅. 南极企鹅岛土壤中低温解磷菌的筛选及其解磷机制的初步探究[D]. 青岛: 青岛大学硕士学位论文, 2021.
- MA LY. Study on the screening and mechanism of low-temperature phosphorus-releasing bacteria in the soil of penguin island, antarctica[D]. Qingdao: Master's Thesis of Qingdao University, 2021 (in Chinese).
- [7] 吴菊艳. 沙棘根瘤内生细菌中促生菌的筛选及促生性能研究[D]. 兰州: 西北师范大学硕士学位论文, 2019.  
WU JY. Study of Screening and Plant-Growth Promoting Function of Endophytic Bacteria from *Hippophae rhamnoides* Root Nodules[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Northwest Normal University, 2019 (in Chinese).
- [8] 王丹丹, 殷志秋, 孙丽, 刘鑫蓓, 刘佳凝, 庞诗琪, 解志红. 缓解花生连作障碍的根际促生菌分离及功能鉴定[J]. 微生物学报, 2021, 61(12): 4086-4096.  
WANG DD, YIN ZQ, SUN L, LIU XB, LIU JN, PANG SQ, XIE ZH. Isolation and identification of peanut plant-growth promoting rhizobacteria with the potential to alleviate continuous cropping obstacle[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(12): 4086-4096 (in Chinese).
- [9] ZHAO LX, XU LH, JIANG CL. Methods for the study of endophytic microorganisms from traditional Chinese medicine plants[M]//Methods in Enzymology. Amsterdam: Elsevier, 2012: 3-21.
- [10] 骆焱平, 王兰英. 内生菌研究方法[M]. 北京: 化学工业出版社, 2019.  
LUO YP, WANG LY. Research Methods of Endophyte[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2019 (in Chinese).
- [11] 陈丹阳, 李汉全, 张炳火, 查代明, 杨建远. 两株解磷细菌的解磷活性及作用机制研究[J]. 中国生态农业学报, 2017, 25(3): 410-418.  
CHEN DY, LI HQ, ZHANG BH, ZHA DM, YANG JY. Phosphate solubilization activities and action mechanisms of two phosphate-solubilizing bacteria[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2017, 25(3): 410-418 (in Chinese).
- [12] NUTARATAT P, SRISUK N, ARUNRATTIYAKORN P, LIMTONG S. Plant growth-promoting traits of epiphytic and endophytic yeasts isolated from rice and sugar cane leaves in Thailand[J]. Fungal Biology, 2014, 118(8): 683-694.
- [13] 阳湖荣, 陈飘雪, 戴传超. 白术内生细菌分离与促生活性[J]. 生态学杂志, 2019, 38(12): 3680-3688.  
YANG HR, CHEN PX, DAI CC. Isolation and plant-growth-promoting ability of endophytic bacteria

- in *Atractylodes macrocephala* Koidz[J]. Chinese Journal of Ecology, 2019, 38(12): 3680-3688 (in Chinese).
- [14] 许世洋, 范雨轩, 汪学苗, 张怡忻, 柴继宽, 李建军, 李敏权, 漆永红, 李雪萍. 辣椒镰孢根腐病防病促生细菌的筛选及其效应[J]. 微生物学报, 2022, 62(7): 2735-2750.
- XU SY, FAN YX, WANG XM, ZHANG YX, CHAI JK, LI JJ, LI MQ, QI YH, LI XP. The *Fusarium* root rot-controlling effect and growth-promoting effect of the bacteria in the rhizosphere of *Capsicum annuum*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(7): 2735-2750 (in Chinese).
- [15] 布坎南 RE, 吉布斯 NE. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组译. 伯杰细菌鉴定手册: 第八版[M]. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984.
- BUCHANAN RE, GIBBONS NE. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. 8th ed. Beijing: Science Press, 1984 (in Chinese).
- [16] WEISBURG WG, BARNES SM, PELLETIER DA, LANE DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(2): 697-703.
- [17] 穰杰, 李莉, 唐琼, 杨琦, 何恋, 丁学知, 夏立秋. 第三代测序细菌基因组 DNA 提取方法的比较[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2015, 38(6): 14-20.
- RANG J, LI L, TANG Q, YANG Q, HE L, DING XZ, XIA LQ. Comparative study of bacterial DNA extraction methods for the third generation sequencing technology[J]. Journal of Natural Science of Hunan Normal University, 2015, 38(6): 14-20 (in Chinese).
- [18] 王赛风, 石玉星, 马东丽, 张宝俊, 任璐, 赵晓军. 植物内生细菌 MY1 的发酵条件优化及其抑菌物质稳定性分析[J]. 山西农业科学, 2021, 49(9): 1119-1126.
- WANG SF, SHI YX, MA DL, ZHANG BJ, REN L, ZHAO XJ. Analysis on optimization of fermentation conditions and stability of antimicrobial substances of endophytic bacterial strain MY1[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2021, 49(9): 1119-1126 (in Chinese).
- [19] 满永博, 范季瀛, 苏刚, 饶犇, 沈亚领. 培养条件及培养基组分对粘质沙雷氏菌生长及产 D-乳酸的影响[J]. 化学与生物工程, 2013, 30(7): 56-60, 70.
- MAN YB, FAN JY, SU G, RAO B, SHEN YL. Effects of culture conditions and medium components on the growth and yielding D-lactic acid of *Serratia marcescens*[J]. Chemistry & Bioengineering, 2013, 30(7): 56-60, 70 (in Chinese).
- [20] 郭建军, 曾静, 袁林, 熊大维. 响应面法优化多粘类芽孢杆菌 LY1 的产芽孢条件[J]. 湖南农业科学, 2022(4): 6-11.
- GUO JJ, ZENG J, YUAN L, XIONG DW. Optimization of spore production conditions of *Paenibacillus polymyxa* LY1 by response surface methodology[J]. Hunan Agricultural Sciences, 2022(4): 6-11 (in Chinese).
- [21] PASALARI A, HOMAEI A. Isolation and molecular identification of xylanase-producing bacteria from *Ulva flexuosa* of the Persian Gulf[J]. Processes, 2022, 10(9): 1834.
- [22] 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.
- [23] KHALID A, ARSHAD M, ZAHIR ZA. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat[J]. Journal of Applied Microbiology, 2004, 96(3): 473-480.
- [24] 陈迪, 芮凯, 曾涛, 田威, 马瑞, 谢圣华, 罗诗彤. 一株具有产 IAA 能力的解淀粉芽孢杆菌的分离鉴定及功能评价[J]. 中国热带农业, 2021(3): 50-58.
- CHEN D, RUI K, ZENG T, TIAN W, MA R, XIE SH, LUO ST. Isolation, identification and functional evaluation of an IAA producing *Bacillus amyloliquefaciens* strain[J]. China Tropical Agriculture, 2021(3): 50-58 (in Chinese).
- [25] 邓振山, 党军龙, 张海州, 李军, 韦革宏. 植物根际促生菌的筛选及其对玉米的促生效应[J]. 微生物学通报, 2012, 39(7): 980-988.
- DENG ZS, DANG JL, ZHANG HZ, LI J, WEI GH. Screening of plant growth-promoting rhizobacteria and their promoting effects on maize[J]. Microbiology China, 2012, 39(7): 980-988 (in Chinese).
- [26] 吴建峰, 林先贵. 土壤微生物在促进植物生长方面的作用[J]. 土壤, 2003, 35(1): 18-21.
- WU JF, LIN XG. Effects of soil microbes on plant growth[J]. Soils, 2003, 35(1): 18-21 (in Chinese).
- [27] LEYSER O. Auxin signaling[J]. Plant Physiology, 2018, 176(1): 465-479.
- [28] HE YH, XU JP, WANG SJ, ZHOU GY, LIU JN. Optimization of medium components for production of chitin deacetylase by *Bacillus amyloliquefaciens* Z7, using response surface methodology[J]. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2014, 28(2): 242-247.
- [29] GUO WQ, REN NQ, WANG XJ, XIANG WS, DING J, YOU Y, LIU BF. Optimization of culture conditions for hydrogen production by *Ethanoligenens harbinense*

- B49 using response surface methodology[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(3): 1192-1196.
- [30] 张泽志, 韩春亮, 李成未. 响应面法在试验设计与优化中的应用[J]. 河南教育学院学报(自然科学版), 2011, 20(4): 34-37.
- ZHANG ZZ, HAN CL, LI CW. Application of response surface method in experimental design and optimization[J]. Journal of Henan Institute of Education (Natural Science Edition), 2011, 20(4): 34-37 (in Chinese).
- [31] COMPANT S, CLEMENT C, SESSITSCH A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2010, 42(5): 669-678.
- [32] COMPANT S, CAMBON MC, VACHER C, MITTER B, SAMAD A, SESSITSCH A. The plant endosphere world-bacterial life within plants[J]. Environmental Microbiology, 2021, 23(4): 1812-1829.
- [33] YE HT, LUO SQ, YANG ZN, WANG YS, DING Q, WANG KF, YANG SX, WANG Y. Endophytic fungi stimulate the concentration of medicinal secondary metabolites in *Houttuynia cordata* thunb[J]. Plant Signaling & Behavior, 2021, 16(9): 1929731.
- [34] LI PP, KWOK AHY, JIANG JW, RAN TT, XU DQ, WANG WW, LEUNG FC. Comparative genome analyses of *Serratia marcescens* FS14 reveals its high antagonistic potential[J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0123061.
- [35] TAN ZW, YANG XY, GAO JP, LI YT, GONG BN. The mechanism of phosphate solubilizing of *Pseudomonas* sp. TC952 and its solubilizing process on TC removal[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2023, 30(10): 26234-26243.
- [36] 秦雅莉, 于福田, 赵笑颖, 沈圆圆, 董诗瑜, 刘小玲. 发酵乳杆菌 SS-31 培养基及发酵条件的优化[J]. 食品与生物技术学报, 2022, 41(12): 48-57.
- QIN YL, YU FT, ZHAO XY, SHEN YY, DONG SY, LIU XL. Optimization of *Lactobacillus fermentum* SS-31 culture medium and fermentation conditions[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2022, 41(12): 48-57 (in Chinese).