

粪便中产吲哚乙酸的解磷菌筛选及对番茄的促生作用研究

赵岩, 杨路路

(赤峰学院生命科学院, 内蒙古 赤峰 024000)

摘要:从家畜粪便中筛选6株具有吲哚乙酸(IAA)的解磷菌,其中菌株2C具有较强的解磷和产IAA能力,培养10 d的发酵液中有效磷含量为138.71 mg/mL,培养24 h IAA产量达20.21 mg/L。利用菌株2C进行番茄促生试验。结果表明经菌株2C处理的番茄叶片叶绿素含量比对照提高8%,净光合速率(Pn)比对照提高27倍,胞间CO₂浓度(CO₂In)比对照提高25%;果实蛋白质含量比对照提高53.5%,果实硬度比对照提高77.2%,果实糖度比对照提高9.5%,根际土壤中铵态氮比对照提高29.45%,有效磷提高26.28%,速效钾提高23.15%。

关键词:动物粪便;解磷;IAA;促生

中图分类号:S641.2

文献标识码:A

文章编号:2096-5877(2022)05-0079-04

Screening of Indole Acetic Acid-Producing Phosphate-Solubilizing Bacteria from Livestock Manure and Their Growth-Promoting Effects on Tomatoes

ZHAO Yan, YANG Lulu

(Department of Life Sciences, Chifeng University, Chifeng 024000, China)

Abstract: Six strains of indoleacetic acid (IAA) producing phosphate solubilizing bacteria were screened out from the feces of domestic animals. Strain 2C had strong ability of Phosphorus-dissolving and IAA producing. The content of available phosphorus in the fermentation broth cultured for 10 days was 138.71 mg/mL, and the yield of IAA reached 20.21 mg/L at 24 hours. The growth promoting experiment of tomato was carried out by strain 2C. The results showed that the chlorophyll content of tomato leaves treated with strain 2C was 8% higher than that of the control group, the net photosynthetic rate (Pn) was 27 times higher than that of the control group, the intercellular CO₂ concentration (CO₂In) was 25% higher than that of the control group, the protein content of fruit quality was 53.5% higher than that of the control group, the hardness of fruit was 77.2% higher than that of the control group, the sugar content of fruit was 9.5% higher than that of the control group, the ammonium nitrogen in rhizosphere soil was 29.45% higher than that of the control group, the available phosphorus increased 26.28% and the available potassium increased 21.78%.

Key words: Livestock manure; Phosphate solubilizing; IAA; Growth promotion

磷是植物生长发育必需营养元素之一,缺磷直接影响植物生长和作物产量。土壤中难溶磷占全磷含量的98%,仅有2%的磷源是以植物能直接吸收利用的可溶性磷盐形式存在。接种解磷菌有利于植物对土壤中磷源的利用,提高作物产量,增加植株抗病能力^[1],解磷菌还可以改善土壤结构,提高有机质含量,改良盐碱地,在培育和充分

发挥土壤生态肥力和保持农业生态环境的平衡等方面均具有极其重要的作用^[2]。

吲哚乙酸(IAA)是一种存在于植物体内的生长激素,能够促进细胞生长,使细胞体积和重量增加,还具有促进细胞分裂和分化、调节生根等生理功能^[3]。1979年首次发现巴西固氮螺菌能合成IAA^[4],土壤中约一半以上的细菌可产生IAA^[5]。

实验室中筛选出的功能菌株,由于受到土著微生物、土壤环境等因素的影响,土壤中难以成功定殖,导致其应用效果不稳定。为解决这一问题,搜集在内蒙古东部常用作农家肥的家畜粪便,筛选解磷菌,对菌株促生作用进行研究,为找

收稿日期:2019-12-23

基金项目:赤峰学院服务地方项目(cfxyfd201811)

作者简介:赵岩(1970-),女,副教授,主要从事功能微生物的筛选及应用研究。

到适于内蒙古东部农村微生物菌剂提供理论依据和试验基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

本试验微生物分离自内蒙古东部地区家畜粪便(猪粪、鸡粪、驴粪、兔粪、羊粪和鸭粪)。培养基:PKO培养基^[6]、LB培养基^[7]、牛肉膏蛋白胨液体培养基^[8]。

1.2 方 法

1.2.1 菌株的筛选

富集:取各动物粪便 2.5 g 接种于牛肉膏蛋白胨液体培养基上,摇床培养 48 h。

初筛:将各菌液经 10 倍稀释,将不同梯度菌液接种到 PKO 固体培养基上倒置培养,28 °C 培养 7 d,观察菌落产生解磷圈的大小,根据解磷圈法(解磷圈直径 D 与菌落直径 d 的比值)初步确定解磷能力较强的菌株,用于液体培养复筛。

纯化:挑取初筛所得菌落,接种于 PKO 固体培养基上,划线分离纯化后的菌种,接种于牛肉膏蛋白胨斜面培养基上,冰箱保存备用^[9]。

1.2.2 菌株解磷能力的测定

将供试菌株接种于盛有 PKO 液体培养基的三角瓶(50 mL),28 °C,180 r/min 培养 10 d,发酵液 4 °C 1 000 r/min 离心 10 min,取上清液,用钼锑抗比色法测定有效磷含量,筛选最优解磷菌株^[10]。

1.2.3 菌株分泌 IAA 能力的测定

定性初筛:将筛选出的解磷菌株接种于含有 L-色氨酸的 LB 液体培养基中,30 °C 180 r/min 摇床培养 24 h;取菌悬液滴于白色陶瓷板上,加 Salkowski 比色液于室温避光放置 30 min,颜色变红者表示能够分泌 IAA^[6]。

定量复筛:采用 Salkowski 比色法,将在液体培养基中培养 1 d 的菌悬液 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液 1 mL 加等体积 Salkowski 比色液在黑暗中静置 30 min,用分光光度计在 530 nm 波长下测定吸光度,以未接菌的液体培养基与 Salkowski 比色液等体积混合液为对照组。最后根据标准曲线计算相应的 IAA 含量。

1.2.4 菌株对番茄促生作用试验

菌液制备:将经上述测定解磷量和分泌 IAA 浓度较高的菌株(2C)接种到 LB 液体培养液中,28 °C 180 r/min 恒温摇床培育 1 d;菌悬液 4 000 r/min 离心 15 min,弃上清液将菌株用无菌水稀释菌液至活菌密度为 1×10^8 cfu/mL,备用。

盆栽试验:在赤峰学院实验室中进行,番茄品种选用由赤峰市和润农业高新科技产业开发有限公司生产的“汉姆一号”。设对照组(不施菌液施无菌水)和试验组(施菌液)两个处理,每种处理 3 个重复。每盆 1 株,花盆上直径 45 cm,下直径 30 cm,高 40 cm,取田间耕作层土壤(0~20 cm),混匀过 2 mm 筛后装于栽培盆中。幼苗定植后,把 100 mL 的菌液浇到番茄幼苗根际,对照组浇等量的无菌水,30 d 后再次浇入菌液同时对照组浇无菌水。盛果期利用 SPAD-502Plus 叶绿素仪测量番茄从上往下的第三片叶子的叶绿素含量。拉秧后取番茄根际土壤,用钼锑抗比色法测土壤中有有效磷的含量^[10]。

大田试验:试验地位于赤峰市宁城县小城子镇的益康农业专业合作社内,番茄品种选用由赤峰市和润农业高新科技产业开发有限公司生产“汉姆一号”。促生作用试验采用完全随机区组设计,设对照组(不施菌液施无菌水)和试验组(施菌液)两个处理。番茄幼苗定植后,按照试验设计浇灌相应的处理液,接种量为每株 100 mL (1×10^8 cfu/mL),每次每株浇灌 100 mL,每隔 14 d 浇灌 1 次,在整个试验期间,各组处理的其他管理措施均一致。在番茄盛果期用 LI-6400 光合测定系统(美国 COR 公司)测定番茄叶片光合速率和胞间 CO₂ 浓度,利用 SPAD-502Plus 叶绿素仪测量番茄从上往下第三片叶子叶绿素含量^[11]。用考马斯亮蓝比色法测定番茄果实的可溶性蛋白质含量,用硬度计(GT-4 浙江托普仪器有限公司)测量硬度,用糖度计(TD-45 浙江托普仪器有限公司)测量糖度。在盛果期后每个区组选取 3 株番茄根际土壤进行土壤养分测定,测定方法参照 NY/T 1848-2010。

1.3 数据分 析

采用 SPSS 18 和 Excel 2019 软件对数据进行分析处理。

2 结果与分 析

2.1 解磷菌株初筛结果

经过初次筛选,得到 6 株解磷能力稳定菌株,结果见表 1。

表 1 解磷菌在 PKO 培养基的 D/d

菌株	D/d	菌株	D/d
Ash	1.2390±0.0940	11sh	1.1993±0.0544
7R	1.5000±0.1135	1D	1.3043±0.1168
2C	1.2583±0.0643	15P	1.2070±0.0485

2.2 菌株解磷能力的测定结果

将筛选出的解磷菌接入PKO液体培养基中培养7 d,用钼锑抗比色法测发酵液中可溶磷含量,结果如图1所示。菌株7R的发酵液中有效磷含量最高,为252.76 mg/L,菌株11sh发酵液中有效磷含量最小,为27.56 mg/L。各菌株的解磷能力与解磷圈法的结果大致一致。

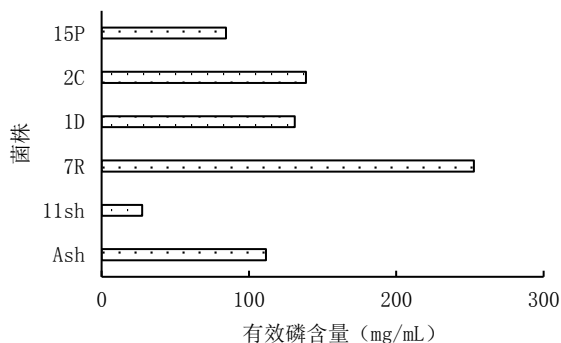


图1 解磷菌发酵液中有效磷含量

2.3 菌株分泌 IAA 能力的测定结果

由图2可知,筛选得到的6株解磷菌都具有分泌 IAA 的能力,其中菌株 2C 分泌量最高,达到 20.21 mg/L,其次是菌株 1D 和菌株 Ash,最终选取分泌 IAA 和解磷能力都表现较好的菌株 2C 进行盆栽试验和大田试验。

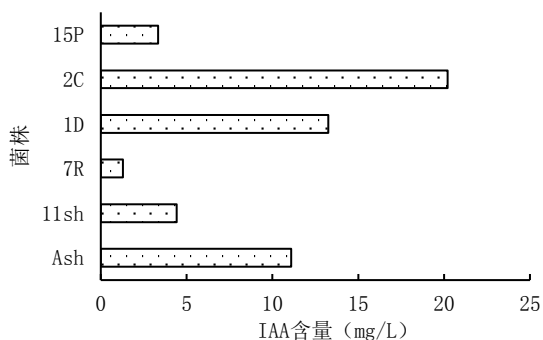


图2 菌株分泌 IAA 能力

2.4 菌株 2C 对番茄的促生试验结果

2.4.1 盆栽试验结果

菌株 2C 的盆栽试验结果见表 2。试验组叶片叶绿素含量和土壤有效磷含量都与对照组存在极

表2 菌株 2C 对番茄叶绿素和土壤有效磷含量的影响

试验处理	叶绿素含量	有效磷含量(mg/kg)
CK	35.73±0.91	88.85±1.38
2C	39.66±1.22**	122.16±5.61**

注:“*”表示在 0.05 水平差异显著,“**”表示在 0.01 水平差异显著,下同

显著差异($P<0.01$)。说明菌株 2C 不仅能提高土壤中有有效磷的含量,还能提高植物叶片叶绿素的含量。

对试验组的叶片叶绿素含量和土壤中有有效磷含量进行相关性分析,结果见表 3。土壤中有有效磷含量与叶绿素含量相关系数 $r>0.533$,差异极显著($P<0.01$),即叶绿素含量随土壤有效磷含量增加而增加,这与张富仓等研究相符合^[12]。叶绿素含量影响叶绿体对光能的利用,进而影响植株光合作用效率,影响有机物生产与积累,在一定范围内,土壤有效磷含量增高,会提高番茄叶片叶绿素含量,对番茄生长有促进作用^[13]。

表3 盆栽试验土壤有效磷含量与叶片叶绿素含量的相关系数

	有效磷含量	叶绿素含量
有效磷含量 Pearson 相关性	1	
显著性(双侧)		
叶绿素含量 Pearson 相关性	0.533**	1
显著性(双侧)	0.001	

2.4.2 大田试验结果

2.4.2.1 菌株 2C 对番茄叶片光合作用的影响

采用美国 COR 公司生产的 LI-6400 光合测定系统测量净光合速率(Pn)和胞间 CO₂ 浓度(Ci)。测定时间为晴朗天气 9:00~11:00,结果如表 4 所示。

表4 菌株 2C 对番茄叶片光合作用的影响

试验处理	叶绿素含量	CO ₂ In (ppm)	Pn[mmolH ₂ O/(m ² ·s)]
CK	33.65±1.70	88.13±0.22	0.1±0.0
2C	36.35±2.41**	110.20±13.42*	2.77±0.40**

接种菌株 2C 处理的番茄叶片光合作用效率极显著高于对照组($P<0.01$),尤其是叶片的净光合速率是对照组 27 倍,可见菌株 2C 可提高作物光合作用速率,有利于作物光合作用,进而促进植物生长。

2.4.2.2 菌株 2C 对番茄果实品质的影响

利用考马斯亮蓝 G-250 法制作的牛血清蛋白标准曲线回归方程为: $y=0.0073x-0.0381$, $R^2=0.9998$ 。

如表 5 所示,菌株 2C 可提高番茄果实的蛋白质含量和硬度,蛋白质含量试验组比对照组提高

表5 菌株 2C 对番茄果实品质的影响

试验处理	蛋白质含量(mg/L)	糖度	硬度
CK	7.68±0.17	5.25±0.031	6.80±1.89
2C	11.79±1.00**	5.75±0.191	12.05±4.45*

53.5%;果实硬度试验组比对照组提高77.2%;对果实糖度影响不大,试验组仅比对照组提高9.5%,可见菌株2C还可在一定程度上提高产品品质。

2.4.2.3 菌株2C对土壤养分的影响

如表6所示,接种菌株2C试验组与对照组相比,土壤中的铵态氮、有效磷和速效钾含量都有

表6 菌株2C对土壤养分的影响 mg/kg

试验处理	铵态氮	有效磷	速效钾
CK	83.33±3.46	2 163.17±41.91	277.25±30.48
2C	107.87±8.09**	2 731.70±91.95**	341.42±7.25**

表7 大田试验土壤有效磷、速效钾、铵态氮与叶片叶绿素含量的相关系数

		铵态氮	有效磷	速效钾	叶绿素含量
铵态氮	Pearson 相关性	1			
	显著性(双侧)				
有效磷	Pearson 相关性	0.860*	1		
	显著性(双侧)	0.028			
速效钾	Pearson 相关性	0.833*	0.900*	1	
	显著性(双侧)	0.040	0.014		
叶绿素含量	Pearson 相关性	0.574	0.850*	0.557	1
	显著性(双侧)	0.233	0.032	0.251	

3 结 论

本试验从家畜粪便中筛选兼具产 IAA 的解磷菌 6 株,得到 1 株解磷能力和产 IAA 能力较均衡的菌株 2C。经过盆栽试验和大田试验,探究对番茄生长的影响,发现此菌株不仅能提高叶片叶绿素含量、叶片净光合速率,提高番茄叶片的光合作用效率;还可提高番茄果实蛋白质含量、硬度和糖度;施入一个生长期后根际土壤中有效磷、铵态氮和速效钾含量都比对照组有显著提高。可见在土壤中接入菌株 2C 可提高土壤肥力、提高作物光合作用效率和果实品质,节约成本,能做到经济效益和环境效益的最大化,有望将该菌株应用于后续微生物菌肥与有机肥配施技术的研究中。

参考文献:

- [1] 金荣德,范作伟,高星爱,等.高效溶磷微生物菌株的筛选、鉴定及其对磷素效率的影响[J].吉林农业科学,2016,41(1):13-16.
- [2] 张东艳,刘 晔,吴 越,等.花生根际产 IAA 菌的筛选鉴定及其效应研究[J].中国油料作物学报,2016,38(1):104-110.
- [3] 尹瑞龄.我国旱地土壤的溶磷微生物[J].土壤,1988,20

提高,其中铵态氮提高 29.45%,有效磷提高 26.28%,速效钾提高 23.15%。可见菌株 2C 还可改善土壤的营养结构。

对番茄根际土壤中有效磷、铵态氮和速效钾含量以及叶片叶绿素含量进行相关性分析,结果见表 7。有效磷与叶片叶绿素含量、速效钾和铵态氮相关系数 $r>0.8$,说明土壤中施入菌株 2C 随土壤有效磷含量的增加,可使土壤中速效氮、速效钾和叶片叶绿素含量增加,表明接入此菌株可对提高土壤氮磷钾含量,改善土壤营养成分,进而对番茄生长起促进作用。

- (5):243-246.
- [4] Tien T M, Gaskins M H, Hubbell D H. Plant growth substances produced by *Azospirillum braasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.) [J]. Applied microbiology, 1979, 37(5): 1016-1024.
- [5] 黄晓东,季尚宁, Bernard Glick, 等.滑铁卢大学植物促生菌技术的研究与开发[J].现代化农业,2002(10):19-21.
- [6] 席琳乔,姚 拓,杨俊基,等.联合固氮菌株分泌能力及其对燕麦的促生效应测定[J].草原与草坪,2005(4):25-29.
- [7] 朱培森,杨兴明,徐阳春,等.高效解磷细菌的筛选及其对玉米苗期生长的促进作用[J].应用生态学报,2007,18(1):107-112.
- [8] 沈 萍,陈向东.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社,2007:241.
- [9] 李阜棣,喻子牛,何绍江.农业微生物学实验技术[M].北京:中国农业出版社,1996:37-55.
- [10] 鲁如坤.土壤农业化学分析方法[M].北京:中国农业出版社,1999:260-513.
- [11] 张媛华. Cd 胁迫对绿豆幼苗生长、光合作用及微量元素代谢的影响[J].东北农业科学,2016,41(1):35-37.
- [12] 张富仓,康绍忠,龚道枝,等.不同磷浓度对玉米生长及磷、锌吸收的影响[J].应用生态学报,2005,16(5):903-906.
- [13] 吴一群.高磷对蔬菜生长的影响及其环境效应[D].福州:福建农林大学,2008.

(责任编辑:王 昱)