



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109337844 B

(45) 授权公告日 2021.03.16

(21) 申请号 201811381568.7

(22) 申请日 2018.11.20

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 109337844 A

(43) 申请公布日 2019.02.15

(83) 生物保藏信息  
CGMCC No.12312 2016.03.28

(73) 专利权人 河南农业大学  
地址 450000 河南省郑州市文化路95号

(72) 发明人 姜瑛 闫亚宇 宋晓爽 高嵩  
魏义敏 王祎 汪强 刘戈

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569  
代理人 刘奇

(51) Int.Cl.

*C12N 1/20* (2006.01)

*G05F 11/08* (2006.01)

*C12R 1/38* (2006.01)

(56) 对比文件

CN 104254611 A, 2014.12.31

WO 2013130680 A1, 2013.09.06

US 2015080261 A1, 2015.03.19

赵辉. 小麦根际解磷菌的筛选及其解磷效果的研究.《中国优秀硕士学位论文全文库》.2018, (第10期),

审查员 刘新蕾

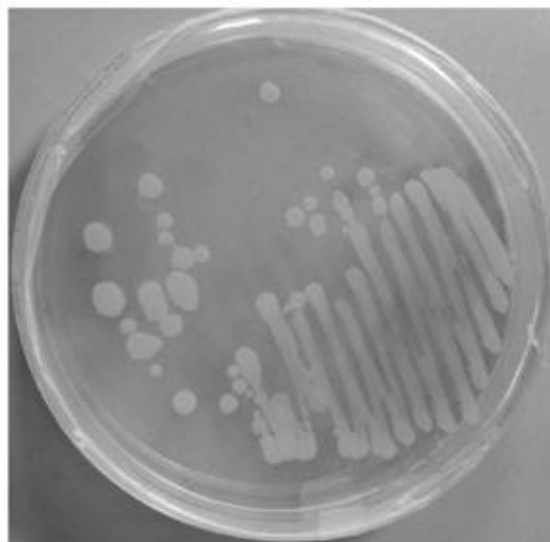
权利要求书1页 说明书10页 附图6页

(54) 发明名称

一种摩拉维亚假单胞菌株X2及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种摩拉维亚假单胞菌株X2及其应用,属于微生物的新用途技术领域。所述菌株X2具有解磷能力,降解磷的浓度达401.25mg/L以上,将难以利用的磷转化为可利用的磷,增加土壤有效磷的含量,提高肥料的利用率,促进植物的生长发育和对肥料的吸收;同时所述菌株X2产生吡啶乙酸的浓度达40.42  $\mu$ g/mL以上。所述的摩拉维亚假单胞菌株X2在植物种植中的应用,对粮食作物小麦和玉米、油料作物花生、经济作物烟草的产量和品质都有较好的提高。



1. 一种摩拉维亚假单胞菌 (*Pseudomonas moraviensis*) 菌株X2, 其特征在于, 所述菌株X2的保藏编号为CGMCC No .12312。
2. 权利要求1所述的摩拉维亚假单胞菌菌株X2在植物种植中的应用。
3. 根据权利要求2所述的应用, 其特征在于, 所述植物种植的方法, 包括以下步骤:
  - (1) 将所述摩拉维亚假单胞菌菌株X2扩大培养, 得到扩大培养的菌株X2;
  - (2) 将所述扩大培养的菌株X2接种入定植有植物的土壤中, 保持土壤含水量至田间最大持水量的50%~60%。
4. 根据权利要求3所述的应用, 其特征在于, 所述步骤(1)中扩大培养用培养基, 每1000ml PK0培养基中包括以下质量百分含量的组分: 1%碳源和0.05%~0.1%氮源; 所述扩大培养用培养基的pH值为6~9。
5. 根据权利要求4所述的应用, 其特征在于, 所述步骤(1)中所述碳源包括葡萄糖、麦芽糖和木糖中的一种或多种;  
所述氮源包括硝酸钾、蛋白胨、谷氨酸、酵母粉和硫酸铵中的一种或多种;  
所述无机盐包括氯化钠、氯化钾、磷酸三钙、硫酸铵、七水合硫酸镁、硫酸锰和七水合硫酸亚铁中的一种或多种。
6. 根据权利要求3所述的应用, 其特征在于, 所述步骤(1)中扩大培养的时间为36~60h。
7. 根据权利要求3~6任意一项所述的应用, 其特征在于, 所述步骤(1)中扩大培养期进行振荡培养; 所述振荡培养的转速为180~220rpm;  
所述振荡培养时培养基的盛装体积为50~150ml/250ml锥形瓶。
8. 根据权利要求3所述的应用, 其特征在于, 所述步骤(2)中扩大培养的菌株X2的菌剂类型包括微生物菌剂。
9. 根据权利要求8所述的应用, 其特征在于, 所述微生物菌剂为菌水剂;  
所述菌水剂的接种量为 $1\sim 9\times 10^8$  CFU/g土壤。
10. 根据权利要求8所述的应用, 其特征在于, 所述微生物菌剂中扩大培养的菌株X2的浓度为 $1\sim 9\times 10^{11}$ CFU/g; 所述微生物菌剂的施用量为35~45kg/hm<sup>2</sup>。
11. 根据权利要求2~6和8~10中任意一项所述的应用, 其特征在于, 所述植物为农作物; 所述农作物为粮食作物、经济作物或油料作物。

## 一种摩拉维亚假单胞菌株X2及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于微生物的新用途技术领域,具体涉及一种摩拉维亚假单胞菌株X2及其应用。

### 背景技术

[0002] 砂质潮土通透性强,通气良好,好气性微生物活动占优势,可以促进有机质分解,有机质矿质化加快。且土壤疏松,易耕作。土壤毛管作用强,水分运行快,有“夜潮”现象。适耕期也长,易立苗;但养分含量低,保肥性能差,作物后期易脱肥早衰。目前,该土已大部分作耕地利用,其利用率达92.3%,一年两熟,一般年亩产粮600kg左右。今后针对性的改良措施:因土种植,合理施用化肥,实行配方施肥;多途径增施有机肥;实行农田林网化,在保证粮食生产稳步上升的前提下,发展山药、西瓜等经济作物。

[0003] 根际促生菌(Plant Growth Promoting Bacteria,简称PGPB)被界定为在一定条件下有利于植物生长的自由生活在土壤、根际、根表、叶际的细菌。这些细菌能够固氮、溶磷、溶铁,并产生植物激素,如生长素、赤霉素、细胞分裂素和乙烯。此外,它们还能提高植物的抗逆性,包括干旱、高盐、重金属毒害和农药。土壤中存在大量的解磷微生物,它们对磷的循环和植物生长发育有重要作用,解磷微生物能提高土壤中的可溶性磷含量,进而增加作物的产量。解磷菌也能增加植物根系对一些微量营养元素(例如锌、铜等)的吸收,增强植物对病害的抵御能力。基于能使土壤中难溶性无机磷溶解,解磷菌被广泛用于接种剂,以增加磷的吸收量和作物的产量。

[0004] 植物激素是植物细胞接受特定环境信号诱导产生的、低浓度时可调节植物生理反应的活性物质。在细胞分裂与伸长、组织与器官分化、开花与结实、成熟与衰老、休眠与萌发以及离体组织培养等方面,分别或相互协调地调控植物的生长发育与分化。植物激素的种类有很多,生长素(auxin)、赤霉素(GA)、细胞分裂素(CTK)、脱落酸(abscisic acid,ABA)、乙烯(ethylene,ETH)和油菜素甾醇(brassinosteroid,BR)。为了促进植物生长,有些植物激素则依赖植物自身分泌,有些植物激素能够通过人工合成,例如吲哚乙酸。虽然人工合成吲哚乙酸扩大了其来源,但是喷施的方式,含量等需要严格控制,应用较为繁琐,限制了吲哚乙酸的应用范围。虽然与植物共生作用的根际菌能够解决该问题,但是目前还没有关于既具有解磷功能又具有产植物激素的根际菌的报道。

### 发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种摩拉维亚假单胞菌株X2及其应用,所述菌株X2不仅具有较强的解磷功能,还能产生吲哚乙酸。所述菌株X2应用在农作物种植中不仅能促进植物的生长,还能较大程度提高农作物产量和品质。

[0006] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0007] 本发明提供了一种摩拉维亚假单胞菌株X2,*Pseudomonas moraviensis*,所述菌株X2的保藏编号为CGMCC No.12312。

- [0008] 本发明提供了所述的摩拉维亚假单胞菌株X2在植物种植中的应用。
- [0009] 优选的,所述植物种植的方法,包括以下步骤:
- [0010] (1) 将所述摩拉维亚假单胞菌株X2扩大培养,得到扩大培养的菌株X2;
- [0011] (2) 将所述扩大培养的菌株X2接种入定植有植物的土壤中,保持土壤含水量至田间最大持水量的50%~60%。
- [0012] 优选的,所述步骤(1)中扩大培养用培养基,每1000ml PK0培养基中包括以下质量百分含量的组分:1%碳源和0.05%~0.1%氮源;所述扩大培养用培养基的pH值为6~9。
- [0013] 优选的,所述步骤(1)中所述碳源包括葡萄糖、麦芽糖和木糖中的一种或多种;
- [0014] 所述氮源包括硝酸钾、蛋白胨、谷氨酸、酵母粉和硫酸铵中的一种或多种;
- [0015] 所述无机盐包括氯化钠、氯化钾、磷酸三钙、硫酸铵、七水合硫酸镁、硫酸锰和七水合硫酸亚铁中的一种或多种。
- [0016] 优选的,所述步骤(1)中扩大培养的时间为36~60h。
- [0017] 优选的,所述扩大培养包括振荡培养;所述振荡培养的转速为180~220rpm;
- [0018] 所述振荡培养时培养基的盛装体积为50~150ml/250ml锥形瓶。
- [0019] 优选的,所述步骤(2)中扩大培养的菌株X2的菌剂类型包括菌水剂或微生物菌剂;
- [0020] 所述菌水剂的接种量为 $1\sim 9\times 10^8$ CFU/g土壤。
- [0021] 优选的,所述微生物菌剂中扩大培养的菌株X2的浓度为 $1\sim 9\times 10^{11}$ CFU/g;
- [0022] 所述微生物菌剂的施用量为35~45kg/hm<sup>2</sup>。
- [0023] 优选的,所述植物包括农作物;所述农作物包括粮食作物、经济作物或油料作物。
- [0024] 本发明提供了一种摩拉维亚假单胞菌株X2,*Pseudomonas moraviensis*,所述菌株X2的保藏编号为CGMCC No.12312。所述菌株X2具有解磷能力,降解磷的浓度达401.25mg/L以上,将难以利用的磷转化为可利用的磷,增加土壤有效磷的含量,提高肥料的利用率,促进植物的生长发育和对肥料的吸收;同时所述菌株X2产生吲哚乙酸的浓度达40.42μg/mL以上,直接促进植物根系伸长,从而增大了与土壤中营养物质的接触的机会;可提高植物体内源IAA的含量;诱导植物防卫基因的表达,提高植物体抗病,抗旱等抗逆性。
- [0025] 本发明提供的所述摩拉维亚假单胞菌株X2在植物种植中的应用。将所述菌株X2应用于大田植物种植中,对粮食作物小麦和玉米、油料作物花生、经济作物烟草的产量和品质都有较好的提高。实验证明:将菌株X2施用于小麦盆栽中,可使小麦的根系更粗更长具有更大的表面积,有利于小麦根系对水分以及养分的吸收,使得小麦地上部株高以及氮磷钾含量均高于对照处理。农作物产量实验中,与对照相比,菌株X2处理使小麦增产87.85%,使玉米增产16.55%,使花生增产10.89%。烟草中上等烟比例达到了65.1%,与对照相比,提高了11.86%。表征烟草品质的指标钾氯比低于对照,而糖碱比与两糖比均高于对照。
- [0026] 生物材料保藏信息
- [0027] 摩拉维亚假单胞菌(*Pseudomonas moraviensis*),在2016年3月28日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,单位简称CGMCC,地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所,保藏号为CGMCC No.12312,菌株编号为X2。

## 附图说明

- [0028] 图1为本发明菌株X2的菌落图;

- [0029] 图2是基于X2和相关菌株的16SrDNA序列采用邻接法建立的系统发育树；
- [0030] 图3是基于X11和相关菌株的16S rDNA序列采用邻接法建立的系统发育树；
- [0031] 图4为菌株X2和菌株X11解磷能力的柱形图；
- [0032] 图5表示不同培养时间对菌株X2解磷能力的影响；
- [0033] 图6表示不同pH值对X2菌株解磷能力的影响；
- [0034] 图7表示不同通气量对X2菌株解磷能力的影响；
- [0035] 图8表示不同碳源对X2菌株解磷能力的影响；
- [0036] 图9表示不同氮源对X2菌株解磷能力的影响。

### 具体实施方式

[0037] 本发明提供了一种摩拉维亚假单胞菌株X2, *Pseudomonas moraviensis*, 所述菌株X2的保藏编号为CGMCC No.12312。

[0038] 在本发明中, 所述菌株X2的菌落形态如下: 白色, 隆起, 边缘完整, 表面光滑, 菌落不透明。所述菌株X2的的生理生化特性是: 革兰氏阳性, 兼性厌氧, 化能异养, 淀粉水解阳性, 明胶液化阳性, 接触酶试验阳性, 硝酸盐还原阳性, V-P试验阳性, 甲基红 (M.R) 阴性, 柠檬酸盐利用阴性。

[0039] 在本发明中, 所述菌株X2经过形态和16S rDNA分子鉴定, 结果显示所述菌株X2为摩拉维亚假单胞菌 *Pseudomonas moraviensis*。

[0040] 在本发明中, 所述的解磷菌X2分解无机磷的能力强, 达401.25mg/L以上。同时所述的解磷菌X2有分泌吲哚乙酸 (IAA) 的能力, 达40.42 $\mu$ g/mL以上。

[0041] 本发明提供了所述的摩拉维亚假单胞菌株X2在植物种植中的应用。

[0042] 在本发明中, 所述植物种植的方法, 优选包括以下步骤:

[0043] (1) 将所述摩拉维亚假单胞菌株X2扩大培养, 得到扩大培养的菌株X2; 接种入定植有植物的土壤中, 保持土壤含水量至田间最大持水量的50%~60%。

[0044] 在本发明中, 所述扩大培养用培养基, 优选每1000ml PK0培养基中包括以下质量百分含量的组分: 1%碳源和0.05%~0.1%氮源; 所述扩大培养用培养基的pH值优选为6~9, 更优选为7~8。

[0045] 在本发明中, 所述步骤(1)中所述碳源优选包括葡萄糖、麦芽糖和木糖中的一种或多种, 更优选为葡萄糖和/或麦芽糖; 所述氮源优选包括硝酸钾、蛋白胨、谷氨酸、酵母粉和硫酸铵中的一种或多种, 更优选为蛋白胨。所述无机盐优选包括氯化钠、氯化钾、磷酸三钙、硫酸铵、七水合硫酸镁、硫酸锰和七水合硫酸亚铁中的一种或多种。本发明对所述碳源、氮源和无机盐的来源没有特殊限制, 采用本领域技术人员所熟知的上述碳源、氮源和无机盐的来源即可。

[0046] 在本发明中, 所述扩大培养的时间优选为36~60h。所述扩大培养的温度优选为28~33 $^{\circ}$ C, 更优选为30 $^{\circ}$ C。所述扩大培养期间优选进行振荡培养; 所述振荡培养时培养基的盛装体积优选为50~150ml/250ml锥形瓶, 更优选为100ml/250ml锥形瓶。

[0047] 在本发明中, 所述扩大培养的菌株X2的菌剂类型包括菌水剂或微生物菌剂。所述菌水剂的接种量优选为1~9 $\times 10^8$ CFU/g土壤, 更优选为5 $\times 10^8$ CFU/g土壤。所述微生物菌剂包括扩大培养的菌株X2菌体和载体。所述微生物菌剂中扩大培养的菌株X2的浓度优选为1

~ $9 \times 10^{11}$ CFU/g,更优选为 $5 \times 10^{11}$ CFU/g。本发明对所述载体的种类没有特殊限制,采用本领域所熟知的微生物菌剂的载体即可。在本发明实施例中,所述载体的种类为骨粉。本发明对所述微生物菌剂的制备方法没有特殊限制,采用本领域所熟知的微生物菌剂的制备方法即可。所述微生物菌剂的施用量优选为 $35 \sim 45 \text{kg}/\text{hm}^2$ ,更优选为 $40 \text{kg}/\text{hm}^2$ 。

[0048] 在本发明中,所述植物优选包括农作物。所述农作物优选包括粮食作物、经济作物或油料作物。所述粮食作物包括小麦、谷子、玉米或高粱等。所述经济作物包括烟草、棉花、蔬菜或果树等。油料作物包括花生或油菜等。

[0049] 下面结合实施例对本发明提供的一种摩拉维亚假单胞菌株X2及其应用进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0050] 实施例1

[0051] 1、培养基的配置

[0052] 配制以下几种培养基:

[0053] (1) PK0液体培养基(无机磷细菌培养基)

[0054] 氯化钠0.3g,葡萄糖10g,氯化钾0.3g,磷酸三钙5g,硫酸铵0.5g,七水合硫酸镁0.3g,硫酸锰0.03g,七水合硫酸亚铁0.03g,蒸馏水1000mL,调节pH值至7.0~7.2,115℃灭菌30min。在培养液中加入15g琼脂粉即为PK0固体培养基。

[0055] (2) LB液体培养基

[0056] 胰蛋白胨10g,酵母粉5g,氯化钠10g,水1000mL,调节pH值至7.0,121℃灭菌20min。在培养液中加入15g琼脂粉即为LB固体培养基。

[0057] 下面再通过定性测定和定量测定筛选出可分泌吲哚乙酸的植物促生细菌。

[0058] 表1供试土壤基本性质

土壤	有机碳 (g/kg)	全磷 (g/kg)	速效磷 (mg/kg)	全钾 (g/kg)	速效钾 (mg/kg)	pH(H <sub>2</sub> O)
[0059] 砂质潮土	1.91	0.29	3.44	19.56	20.42	7.39

[0060] 2、定性测定

[0061] 将从上述砂质潮土(表1)中分离纯化后的细菌接种于采用含有L-色氨酸(100mg/L)的LB液体培养基,30℃,180r·min<sup>-1</sup>摇床培养1d。取50μL菌水剂滴于白色陶瓷板上,同时加50μL Salkowski比色液(50mL35%HC10<sub>4</sub>+1mL 0.5M FeCl<sub>3</sub>)。将加入50μL 50mg/L吲哚乙酸的比色液作为阳性对照。白色陶瓷板于室温避光放置30min后观察,颜色变红者表示能够分泌吲哚乙酸。

[0062] 3、定量测定

[0063] 对初筛获得的分泌IAA的细菌进行定量测定,培养条件同上。首先用分光光度法测定菌水剂的OD<sub>600</sub>值,然后将菌水剂以10000r·min<sup>-1</sup>离心10min取上清液加入等体积Salkowski比色液,避光静置30min,测定其OD<sub>530</sub>值。计算菌浓度OD<sub>600</sub>值为1时,单位体积发酵液中吲哚乙酸的含量。标准曲线的绘制采用分析纯的吲哚乙酸梯度稀释制备。结果表明所述分离的菌株具有分泌IAA能力,达到 $40.42 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

[0064] 把得到的产IAA菌进行解磷情况的筛选测定,将供试菌株接种于盛有50mL难溶性无机磷液体培养基的250mL三角瓶,30℃,200r·min<sup>-1</sup>培养72h后,取培养72h的培养液10mL,

6000r/min离心20min,取上清液用紫外分光光度计测定其中磷的含量。结果所述菌株分解无机磷的能力强,达401.25mg/L。

[0065] 将上述方法筛选分离出的菌株命名为X2,按照万兵兵(万兵兵.2016年,一株玉米根际多功能促生菌的筛选鉴定及效应研究)等人的报道进行16SrDNA分子鉴定,经北京美亿美生物工程有限公司测序,根据16SrDNA的测序结果,在<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>在线查询分析,利用Blast软件在GenBank中与其它的16S rDNA序列进行同源性比较,选择相近的序列与X2的序列用MEGAversion 3软件构建X2的16S rDNA系统进化树(图2)。

[0066] 实施例2

[0067] 好氧性试验

[0068] 把灭过菌的LB培养基倒入3个已灭菌的试管中,大约在2/3处,在无菌操作台上,用接种针挑取斜面培养的菌株X2,穿刺接种到上述培养基中(必须穿刺到管底)。30℃培养,分别在3天至7天观察结果。在琼脂柱表面上生长者为好氧菌,如沿穿刺线生长者为厌氧菌或兼性厌氧菌。

[0069] 试验结果表现,菌株X2菌落沿琼脂柱表面生长,穿刺线内也有菌落生长,为兼性厌氧(见表2)。

[0070] 实施例3

[0071] 过氧化氢酶的测定

[0072] 在干净载玻片上滴1滴3% $H_2O_2$ 溶液,取18~24h培养的菌株X2LB斜面培养物1环,在 $H_2O_2$ 中涂抹,若有气泡产生则为阳性,否则为阴性。

[0073] 试验结果显示菌株X2为接触酶阳性(见表2)。

[0074] 实施例4

[0075] 甲基红试验(M.R试验)

[0076] a.培养基及试剂:蛋白胨5g,葡萄糖5g,氯化钠5g,蒸馏水1000mL,调节pH值至7.0~7.2,分装试管,每管装4~5mL,121℃灭菌20min。试剂:甲基红0.1g,95%酒精300mL,蒸馏水200mL。

[0077] b.菌种培养及结果观察接种菌株X2于上述培养液中,30℃培养1-2天。在培养液中加入几滴甲基红试剂,如培养液呈现红色,为甲基红阳性,黄色为阴性(甲基红变色范围4.4红色-6.0黄色)。

[0078] 试验结果显示菌株X2为M.R阴性(见表2)。

[0079] 实施例5

[0080] 乙酞甲基甲醇试验(VP试验)

[0081] a.培养基培养基同甲基红试验。

[0082] b.菌种培养及结果观察接种与培养同甲基红试验。做VP试验时,取培养液(约2mL)和等量的40%NaOH溶液相混合,加少量肌酸,充分振荡2~5min后,如培养液出现红色,即为VP阳性。

[0083] 试验结果显示菌株X2为VP阳性(见表2)。

[0084] 实施例6

[0085] 淀粉水解试验

[0086] a.培养基及试剂在肉汤蛋白胨琼脂中添加0.2%的可溶性淀粉,分装三角瓶,121

℃灭菌20min备用。路哥氏碘液：碘片1g，碘化钾2g，先用少量(3~5mL)蒸馏水溶解碘化钾，现加入碘片，待碘完全溶解后，加水稀释至300mL。

[0087] b. 菌种培养及结果观察取X2菌种点接于平板上，30℃培养2~4天，形成菌落后，在平板上滴加路哥氏碘液，以铺满菌落周围为度，平板呈蓝色，而菌落周围如有无色透明圈出现，说明淀粉已被水解。透明圈的大小一般说明水解淀粉能力的大小。

[0088] 试验结果显示菌株X2为淀粉水解阳性(见表2)。

[0089] 实施例7

[0090] 明胶水解试验

[0091] a. 培养基及试剂蛋白胨5g，明胶120g，蒸馏水1000mL。调节pH值至7.2~7.4，分装试管，培养基高度约为4~5cm，121℃灭菌20min。

[0092] b. 菌种培养及结果观察用穿刺法接种菌株X2在试管中央。在30℃温箱中培养一个月，观察明胶是否液化。

[0093] 试验结果显示菌株X2为明胶水解阳性(见表2)。

[0094] 实施例8

[0095] 硝酸盐还原试验

[0096] a. 培养基及试剂硝酸盐液体培养基：蛋白胨10g，KNO<sub>3</sub>1g，蒸馏水1000mL，pH值为7.0~7.4。格里斯氏(Gries)试剂：A液：对氨基苯磺酸0.5g，稀醋酸(10%左右)150mL；B液：a-萘酚0.1g，蒸馏水20mL，稀醋酸(10%左右)150mL。二苯胺试剂：二苯胺0.5g溶于100mL浓硫酸中，用20mL蒸馏水稀释。

[0097] b. 菌种培养及结果观察将菌株X2接种于硝酸盐液体培养基中，30℃培养1、3、5天。在白色瓷盘小孔中倒入少许培养液，然后在其中分别滴1滴试剂A和B液，当培养液变为粉红色、玫瑰红色、橙色或棕色等时，表示有亚硝酸盐存在，为硝酸盐还原阳性，否则为阴性。

[0098] 试验结果菌株显示X2为硝酸盐还原阳性(见表2)。

[0099] 实施例9

[0100] 柠檬酸盐的利用

[0101] a. 培养基及试剂柠檬酸钠2g，NaCl 5g，MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2g，(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·HPO<sub>4</sub>1g，1%溴百里香酚蓝水溶液10mL，琼脂20g，蒸馏水1000mL，pH6.8-7.0，121℃灭菌20min。

[0102] b. 菌种培养及结果观察取幼龄(培养18~24h)X2菌种接种于斜面上，30℃培养3~7天，培养基呈碱性(蓝色)者为阳性反应，不变者则为阴性。

[0103] 柠檬酸盐利用的试验结果显示菌株X2为阴性(见表2)。

[0104] 表2 X2菌株的生理生化特性

	项目	结果	项目	结果
[0105]	革兰氏染色	+	淀粉水解	+

好氧性试验	兼性厌氧	明胶液化	+
接触酶试验	+	硝酸盐还原	+
[0106] 甲基红 (M.R) 反应	-	柠檬酸盐利用	-
V-P 试验	+		

[0107] 由上述可知,分离的X2菌株呈革兰氏阳性,菌落白色,隆起,边缘完整,表面光滑,菌落不透明,兼性厌氧,最适pH为7,硝酸盐还原阳性。根据该菌株的生理生化特征,鉴定为摩拉维亚假单胞菌(*Pseudomonas moraviensis*)。将该菌株于2016年3月28日在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏,保藏号CGMCC No.12312。

[0108] 实施例10

[0109] 对菌株X2进行定性筛选和定量测定可获得具有解磷功能的解磷菌

[0110] (1) 定性测定:将菌株X2用无菌水梯度稀释后取合适梯度涂于PK0平板上,置于30℃培养箱培养,待出现透明圈菌落即为解磷菌,将解磷菌纯化后保存。

[0111] (2) 定量测定:将菌株X2接种于盛有50mL的PK0液体培养基的三角瓶中,置于30℃摇床,180r/min培养96h后,将培养液转移至离心管中,4℃下10000r/min离心15min,将上清液收集,用钼蓝比色法测定发酵液中有效磷的含量。可将难以利用的无机磷转化为可利用的磷,具有解无机磷的能力。结果所述菌株分解无机磷的能力强,达401.25mg/L。

[0112] 对比例1

[0113] 按照实施例1中筛选分离方法得到菌株X11,经过分子鉴定(系统进化树见图3)和菌落形态鉴定,菌株X11鉴定为摩拉维亚假单胞菌(*Pseudomonas moraviensis*)。采用实施例10的方法测定菌株X11的解磷能力。解磷能力与菌株X2的解磷能力作图,结果见图4。由图4可知,本发明提供的菌株X2比菌株X11在解磷能力方面具有显著的优势。

[0114] 实施例11

[0115] 为了进一步验证实施例10得到的解磷菌X2解磷能力和最适条件,下面针对不同碳源、不同氮源、不同通气量、不同pH、不同培养时间探索对解磷能力的影响。

[0116] (1) 不同培养时间对菌株X2生长及解磷能力的影响

[0117] 将菌株X2接入到PK0培养基中在30℃条件下进行振荡培养,对各时间点的菌株取样测定对磷的分解能力。

[0118] 由图5可知,菌株X2在0~10h内菌株处于生长阶段因此菌株的解磷能力不强,磷含量较低且增长缓慢。15~20h进入对数期,对磷的分解能力逐渐增强,在20~36h的时间段内磷含量进入平台期,单位增加量减少,在36h后磷含量继续增加。

[0119] (2) 不同pH对菌株X2生长及解磷能力的影响

[0120] 将PK0培养基初始值调至pH 4、5、6、7、8、9、10,以不接菌的培养基作为对照,每个处理设置3个重复,置于30℃摇床培养96h后,取样检测有效磷含量。

[0121] 由图6可知,强酸条件下,该菌株的解磷能力较低,随着pH的升高,培养基内的磷含量呈现先增高后降低的变化趋势,并且在pH为7时其解磷能力最强,其值为510.90mg/ml。pH

值为7~9时培养液中的磷浓度降低,在pH为9时菌的解磷能力比pH为5时高,可见该菌株在强碱环境中也具有解磷能力。因此,由以上分析可知pH值为7是该菌株的最适生长pH。

[0122] (3) 不同通气量对菌株X2生长及解磷能力的影响

[0123] 在250mL锥形瓶中加入不同体积的培养液,培养液体积分别为25、50、75、100、150mL,以不接菌的培养基作为对照,每个处理设置3个重复,置于30℃摇床培养96h后,取样检测有效磷含量。

[0124] 由图7可知,当培养液的装液量为25~50mL时,培养液中的磷含量逐渐增加并在50~100mL的装液量时培养液中的磷浓度变化趋势进入平台期,并在装液量100mL时达到最大为477.08mg/L,但是随着装液量的增加,三角瓶中的供氧量减少,菌株X2的解磷量下降,这可能是由于菌株X2是好氧或兼性厌氧的,培养基中供氧量的减少会影响菌株X2的生长、繁殖和解磷能力。由此可以看出,当装液量为100mL时细菌的解磷效果最好。

[0125] (4) 不同碳源对菌株X2生长及解磷能力的影响

[0126] 在PK0培养基(不含葡萄糖)中分别加入1% (w/v) 的碳源,碳源包括葡萄糖、蔗糖、甘露糖、乳糖、木糖、麦芽糖,以不接菌的培养基作为对照,每个处理设置3个重复,置于30℃摇床培养96h后,取样检测有效磷含量。

[0127] 由图8可知,不同碳源条件下,菌株X2的解磷效果具有显著性差异,在本实验所给的7种碳源培养基中,菌株X2的解磷效果从大到小依次为:葡萄糖>木糖>麦芽糖>蔗糖>果糖>甘露醇>乳糖。当葡萄糖和木糖作为培养基的碳源时,菌株的解磷量最大,分别为503.27mg/L、502.60mg/L,解磷量显著高于另外5种碳源( $P<0.05$ );而以乳糖作为碳源时,菌株的解磷量显著低于其他碳源,由此可以看出葡萄糖是最佳碳源。

[0128] (5) 不同氮源对菌株X2生长及解磷能力的影响

[0129] 在PK0培养基(不包括硫酸铵)中分别加入0.1% (w/v) 的氮源,氮源包括蛋白胨、谷氨酸、酵母粉、硫酸铵、硝酸钾、硝酸铵以不接菌的培养基作为对照,每个处理设置3个重复,置于30℃摇床培养96h后,取样检测有效磷含量。

[0130] 由图9可知,不同氮源条件下,菌株X2的解磷能力也具有显著差异,试验所用的蛋白胨、谷氨酸、酵母粉、硫酸铵、硝酸钾、硝酸铵几种氮源中,当以蛋白胨为氮源时,X2解磷效果最强分别为476.60mg/L,显著高于其他碳源( $P<0.05$ )。但当以硝酸铵作为氮源时,解磷效果显著低于其他5种氮源( $P<0.05$ ),因此最适合菌株X2生长和解磷的氮源为蛋白胨。

[0131] 实施例12

[0132] 本发明菌株X2对小麦具有明显促生长作用,下面通过盆栽试验进行说明。

[0133] 取供试土壤约200g装于盆钵中,试验所用的小麦品种为郑麦9023,将小麦表面消毒,然后用无菌水反复冲洗多次,催芽2天,选取发芽一致的种子按每盆4粒小麦种在盆中,一星期后定苗至3棵。将供试菌株X2培养后制成菌水剂,按照 $10^8$ CFU/g的接种量接种到土壤中,以不接种菌株为对照,每个处理4个重复,保持含水量至田间最大持水量的60%,将盆栽置于光照培养室。30天后采样,小麦根系用根系扫描仪(LA1600+scanner,Canada)获得图像后,用根系分析软件(Winrhizo2003b,Canada)对相关根系指标进行分析,并测定土壤基本理化性质和植株氮磷钾含量。结果表明,将菌株X2施用于小麦盆栽中,可使小麦的根系更粗更长具有更大的表面积(表3),有利于小麦根系对水分以及养分的吸收,使得小麦地上部株高以及氮磷钾含量均高于对照处理(表4)。

[0134] 表3菌株X2对小麦盆栽根系的影响

处理	根长 (cm)	根表面积 (cm <sup>2</sup> )	根体积 (cm <sup>3</sup> )	根尖数 (个)
[0135] CK	548.50±77.30	42.54±6.28	0.22±0.03	2475.00±528.28
X2	803.77±53.22**	57.47±5.11**	0.33±0.04**	3288.40±417.23*

[0136] 表4菌株X2对小麦盆栽植株的影响

处理	千重 (g)	株高 (cm)	全氮 (g/kg)	全磷 (g/kg)	全钾 (g/kg)
[0137] CK	1.46±0.07	16.19±1.68	1.86±0.17	1.71±0.56	6.68±0.58
X2	2.37±1.72**	24.03±1.01**	2.21±0.18*	4.73±1.51**	9.75±1.34**

## [0138] 实施例13

[0139] 将菌株X2以骨粉为载体制成菌剂,其含有有效活菌数为 $10^{11}$ CFU/g,进行大田试验验证X2的功效,分别于各种作物适宜的栽种时间种植粮食作物小麦与玉米,油料作物花生,经济作物烟草。试验均设置3次重复,随机区组排列,小区面积 $6 \times 3\text{m}^2$ 。所有处理均施用15-15-15的复合肥作基肥,施用量为 $600\text{kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ ,同时施用X2微生物菌剂 $40\text{kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ ,对照处理施用等量骨粉,于收获期测定产量与相应品质指标。

[0140] 结果表明,与对照相比,菌株X2处理使小麦增产87.85%(表5),使玉米增产16.55%(表6),使花生增产10.89%(表7)。烟草中上等烟比例达到了65.1%,与对照相比,提高了11.86%(表8)。表征烟草品质的指标钾氯比低于对照,而糖碱比与两糖比均高于对照(表9)。

[0141] 表5 X2对小麦产量性状的影响

处理	成熟期地上部生物量(kg·hm <sup>-2</sup> )	有效穗数(×10 <sup>5</sup> ·hm <sup>-2</sup> )	穗粒数(个)	千粒重(g)	产量(kg·hm <sup>-2</sup> )	增产率%
[0142] CK	7959.91	27.4	35.00	40.87	3919.43	0
[0143] X2	16021.15**	48.1**	35.02	43.98*	7362.69**	87.85

[0144] 表6 X2对玉米产量及其构成因子的影响

处理	穗长(cm)	穗粗(cm)	穗行数(行)	行粒数(粒)	百粒重(g)	单棒重(g)	穗秃项长(cm)	产量(kg·hm <sup>-2</sup> )	增产率%
[0145] CK	17.8	4.3	14.0	29.8	26.02	160	3.70	6300.0	0
X2	19.0*	4.3	14.0	37.5*	26.96	182**	2.71	7342.5*	16.55

[0146] 表7 X2对花生产量及其构成因子的影响

	处理	单株饱果 数(个)	单株秕果 数(个)	单株饱果 重(g)	单株秕果 重(g)	密度 ( $\times 10^{-5}$ 株 $\cdot$ hm $^{-2}$ )	产量 (kg $\cdot$ hm $^{-2}$ )	增产 率%
[0147]	CK	18.4	9.4**	47.78	5.24**	1.2	5733.6	0
	X2	20.1	3.8	53.04	2.59	1.2	6357.8*	10.89

[0148] 表8 X2处理对烤烟产量性状的影响

处理	单叶重 (g)			产量	上等烟比例	
	X2F	C3F	B2F			
[0149]	CK	7.2	10.7	12.5	2015.0	58.2%
	X2	7.8	11.6	13.0	2272.6	65.1%

[0150] 表9 X2对烟草中部叶常规化学成分的影响

处理	总糖/%	还原糖/%	烟碱/%	K $^{+}$ /%	Cl $^{-}$ /%	钾氯比	糖碱比	两糖比	
[0151]	CK	30.06	21.96	2.85	1.70	0.09	18.78	10.54	0.73
	X2	40.12	30.50	2.84	1.99	0.12	16.58	14.13	0.76

[0152] 由上述实施例可知,本发明提供的菌株X2在植物种植中的应用,能够显著提高植物的生长速度,提高农作物产量和产品的品质。

[0153] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

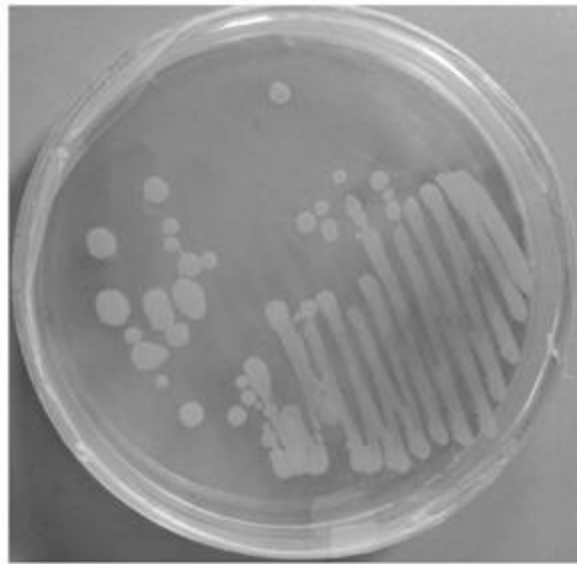


图1

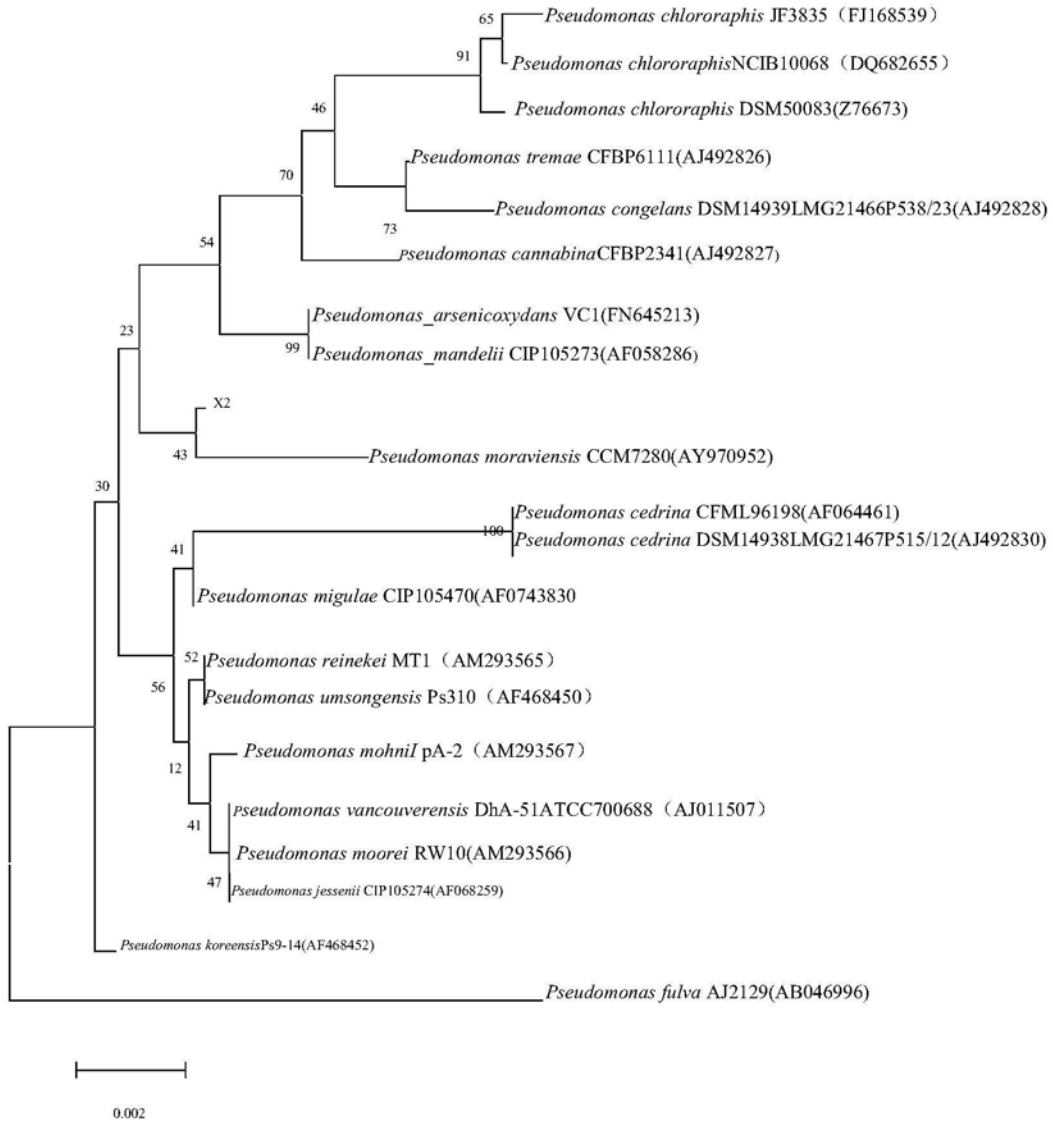


图2

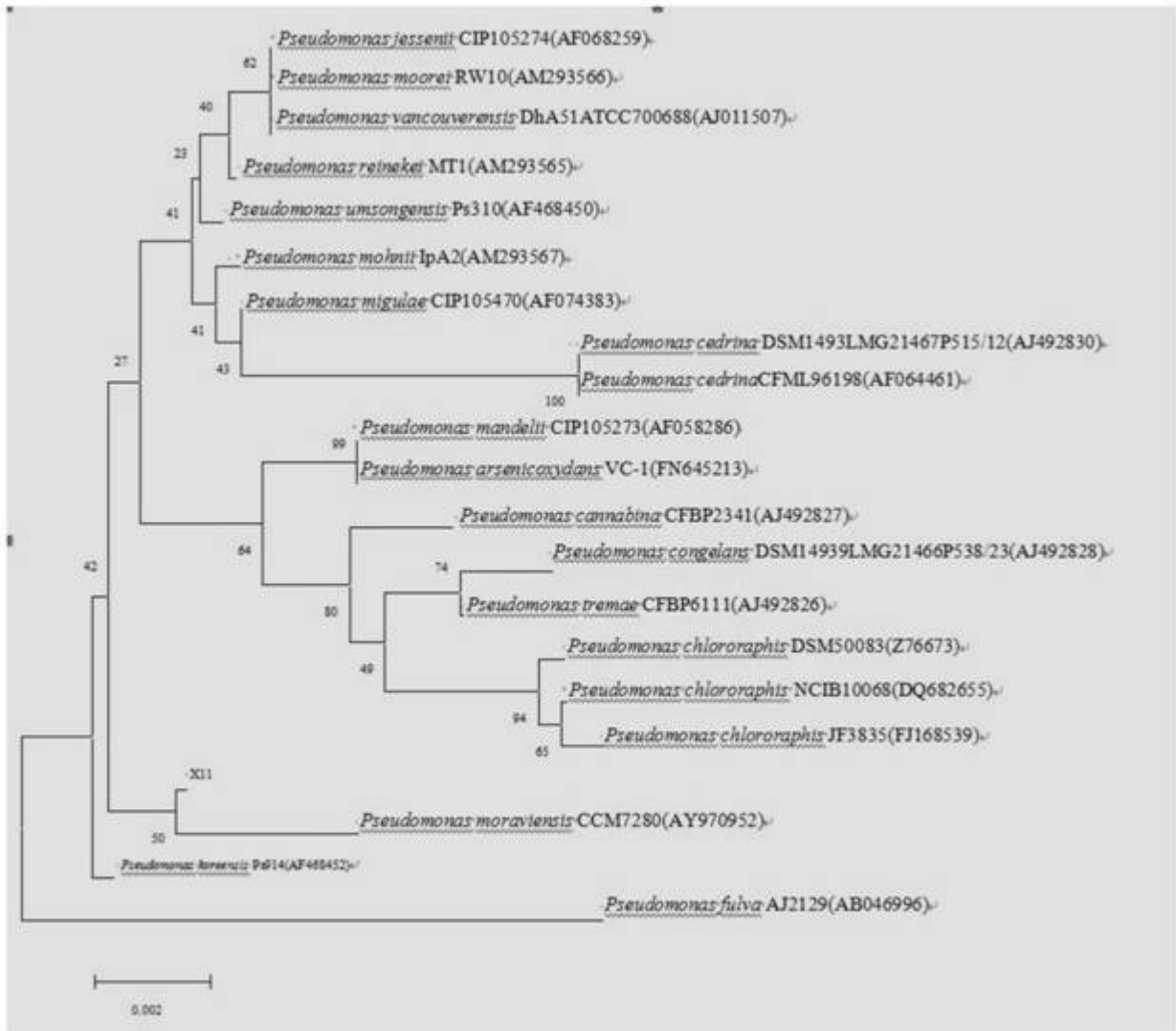


图3

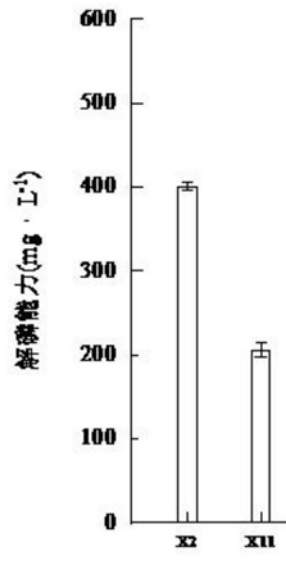


图4

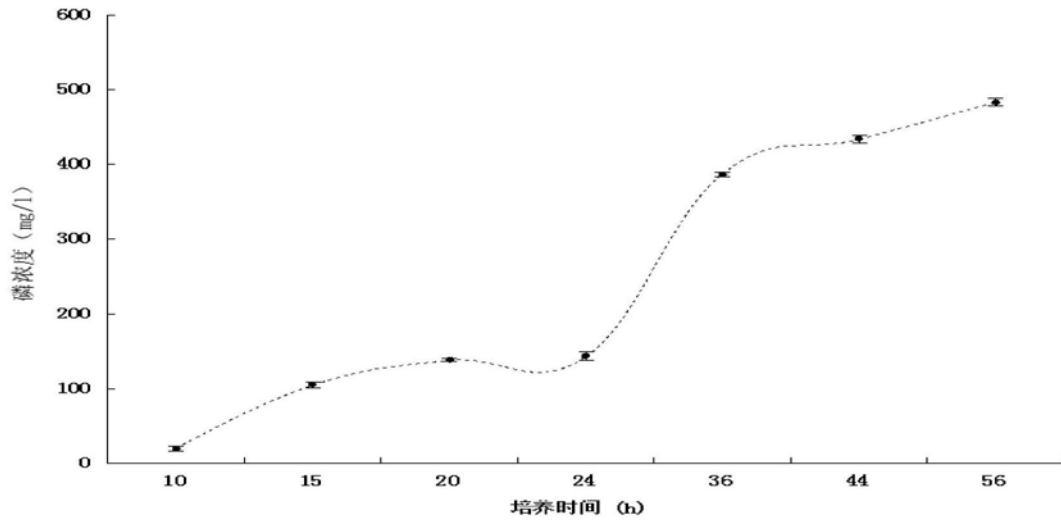


图5

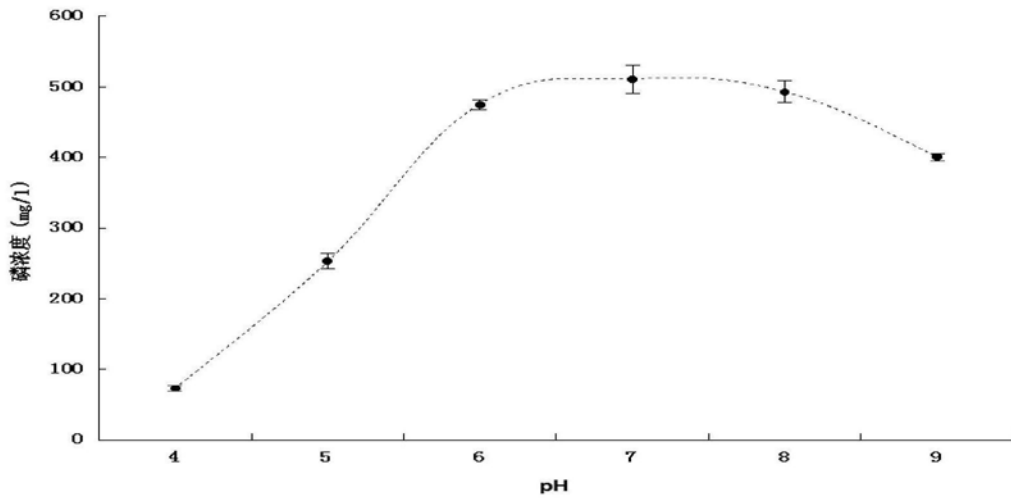


图6

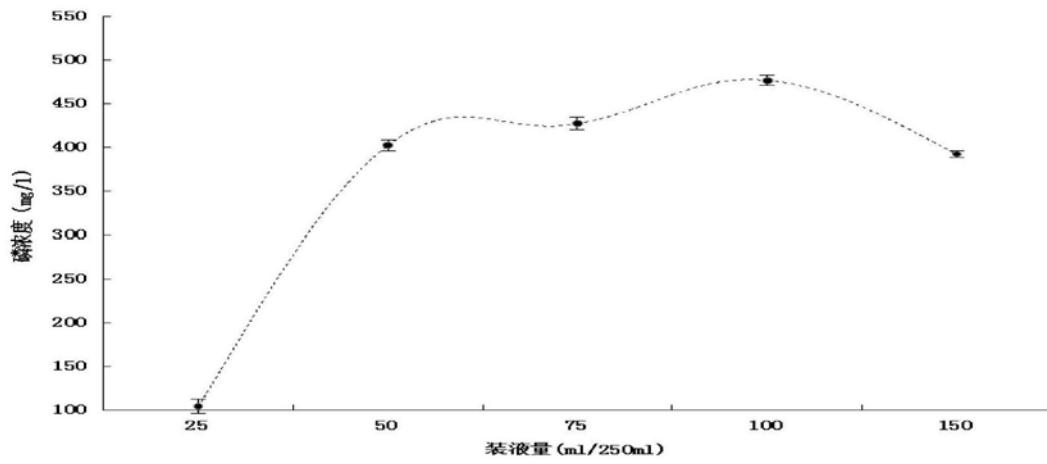


图7

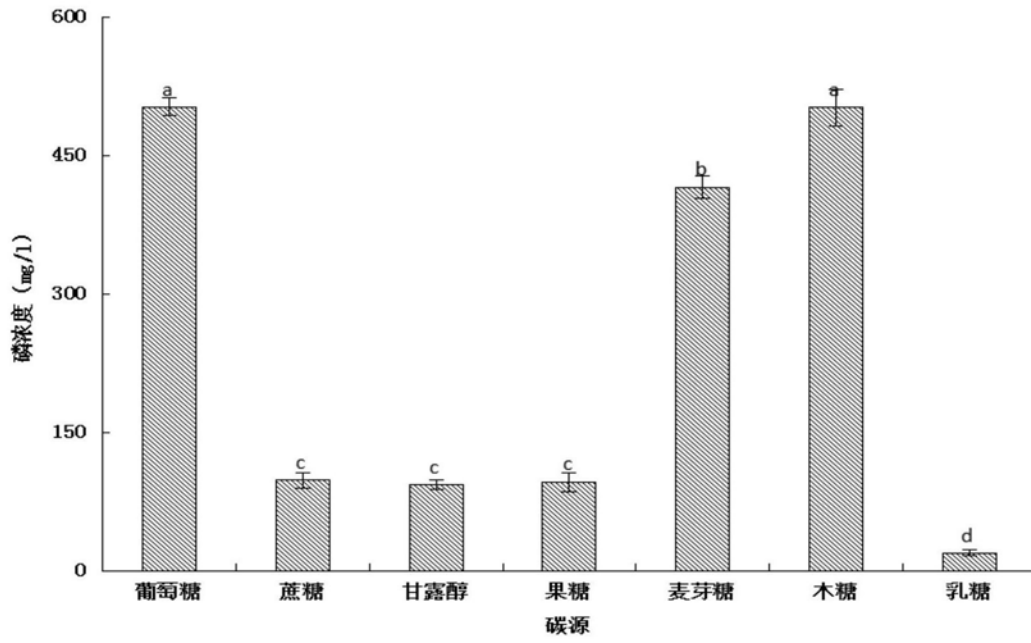


图8

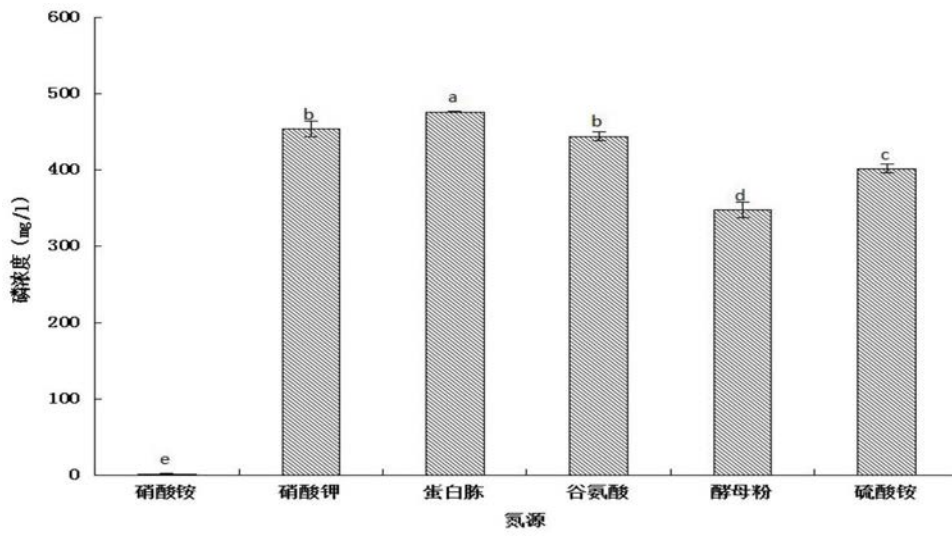


图9