



國立嘉義大學

生物農業科技學系

陽田枯草桿菌委託研究計畫報告



實驗室主持人：_____莊慧文 Ph.D_____

聯絡電話：_____05-2717756_____

電子郵件: hwchuang@mail.ncyu.edu.tw

委託研究計畫書報告

陽田枯草桿菌 1 號菌種及促進植物生長功能分析

一、研究背景分析

安全農業是現今農業科技發展的重要方向，安全農業著重在生產無毒農業產品及永續的生態環境。實行農業操作依賴化學肥料及化學殺菌殺蟲劑的應用以達穩定作物生產產量的目的。根際促生菌

(Plant growth promoting rhizobacterium ; PGPR) 是一存在土壤根際微生物，這群微生物藉由不同的機制可促進植物生長及抗病性。根際促生菌可藉由直接抑制病原菌活性，或藉由誘發植物系統性抗病反應，增加接種植株的抗病能力 (Russo et al. 2008)。根際促生菌可以產生固氮活性增加有機氮源，增加土壤中無機鹽份的溶解度，增加土壤中鐵離子的利用效率，或可分泌植物賀爾蒙，因此在加強植物抵抗病原菌同時亦可對植株生長產生影響 (Khan et al. 2009)。根際促生菌可以幫助分解土壤中重金屬成份 (Ma et al. 2011)，增加作物對土壤中累積農藥的抗性 (Ahemad and Khan 2012a)，或分解耕地累積農藥 (Ahemad and Khan 2012b)。目前發現的根際促生菌種類大概可以分為以下幾類：固氮螺菌 (*Azospirillum*)，固氮菌屬 (*Azotobacter*)，節桿菌屬 (*Arthrobacter*)，芽孢桿菌屬 (*Bacillus*)，伯克氏菌 (*Burkholderia*)，柄細菌屬 (*Caulobacter*)，色素桿菌屬 (*Chromobacterium*)，歐文氏菌屬 (*Erwinia*)，黃桿菌屬 (*Flavobacterium*)，微球菌屬 (*Micrococcus*)，假單胞菌屬 (*Pseudomonas*) 以及沙雷氏菌屬 (*Serratia*) (Bhattacharyya and Jha 2012)。其中芽孢桿菌屬及假單胞菌屬最為被廣泛研究，現今農業生產中根際促生菌已實際被應用於番茄、馬鈴薯、花生等 (Almaghrabi et al. 2013; Dey et al. 2004; Kim and Jeun 2006)。農業生產系統中以肥料之使用為最大量，肥料可概略分為化學肥料、有機質肥料及生物性肥料等三大類。化學肥料一般效果直接且快速，價格上也較生物性肥料及有機質肥料來得便宜許多，故較容易被使用者接受和採用。但化學肥料常因使用便利性，造成超施、致

植物抵抗力變弱、土壤酸化劣化、農產品含高濃度硝酸鹽等問題，長期不當施用化學肥料造成的環境污染更難以估計。農業生產若以有機質肥料或微生物肥料來取代部分化學肥料，將可以降低污染、改善土壤化學及物理特性的優點。

二、研究內容大綱

本實驗內容為分析陽田枯草桿菌 1 號 (*Bacillus subtilis* YT No.1) (陽田生物科技有限公司) 菌株生理特性及菌株對植物生長促進的效果。研究內容包括：(一) 以核酸序列分析確認菌株，(二) 菌株生長生理特性分析，(三) 菌株促進植物生長分析。

三、研究方法與步驟

(一) 以核酸序列分析確認菌株

取少量陽田枯草桿菌 1 號肥料溶於無菌水中，將菌液塗抹於固態培養基中，於室溫下培養 3 天，分離單一菌落，萃取細菌核酸。以 16S rDNA 引子對使用 PCR 方法增殖細菌基因中的 16S rDNA 核酸片段，PCR 增殖片段以 sephadex G-50 管柱純化後進行核酸序列分析 (DNA sequencing)。所獲得的核酸序列以 BLASTN 軟體進行序列比對。

(二) 菌株生長生理特性分析

1. 菌株非生物性逆境耐受性

將分離菌株培養於 LB 液態培養基 24 小時，取 1×10^8 cpu/mL 菌液培養於不同試驗環境 7 小時，以吸收光值 O.D.600 決定細菌量。測試環境因子包括 pH 值 (pH 4.0 - 9.0)、鹽分 (0.1- 0.5 mM NaCl)、滲透壓 (10-40% polyethylene glycol) 及高溫耐受性 (45 及 55°C)。

2. 菌株 indole acetic acid (IAA) 生成

測試菌株 IAA 生成量是根據已發表實驗方法 (Patten and Glick 2002)。將分離菌株培養於含 0.2 mM tryptophan (L-Trp) 液態培養基中，室溫下培養 48 小時。菌液以 10,000 rpm 離心 15 分鐘，取 2 mL 上清液與

等體積的 Salkowski's reagent (36% H₂SO₄, FeCl₃·6H₂O 0.5 M) 混合，室溫下反應 30 分鐘，測得 O.D.520 吸收光值。IAA 濃度由已知濃度 IAA 製作的標準曲線計算得知。

3. 溶磷性測試

- (i) 定性分析：溶磷性定性分析是根據 Nautiyal (1999) 已發表文獻 (Nautiyal 1999)。分離菌株培養於 modified Pikovskaya (PVK) 固態培養基 5 天，溶磷性由菌落周圍產生透明菌圈判斷。Modified Pikovskaya (PVK) 成份為 1% glucose, 0.05 % (NH₄)₂SO₄, 3% NaCl, 0.03% KCl, 0.003% FeSO₄·7H₂O, 0.003% MnSO₄·4H₂O, 0.03% MgSO₄·7H₂O, 0.5 Ca₃(PO₄)₂ lecithin, 0.5% CaCO₃, 0.04% yeast extract, pH 7.0–7.5。
- (ii) 溶磷活菌數測試：將 1 g 陽田枯草桿菌溶於 10 mL 去離子水，取上清液作連續稀釋，稀釋倍數 10X 至 100000X。取每個稀釋液 50 μL 塗抹於??? 培養基，培養 4-7 天，計算有 clear zone 的菌落數。
- (iii) 鉬黃溶磷定量分析：將 108-109 cpu/mL 菌量培養於 LCM 液態培養基中，於室溫下震盪培養 12 天，菌液以 Whatman 濾紙過濾後，濾液以溶磷性定量分析是根據實驗方法 Vanadomolybdophosphoric acid colorimetric method (Sawsan et al. 2009)。
- (iv) 鉬藍溶磷定量分析: Molybdenum Blue

(三) 菌株促進植物生長分析

- (i) 阿拉伯芥生長試驗：阿拉伯芥種子播於 MS 固態培養基中發芽 4 天，阿拉伯芥小苗移至新的 MS 固態培養基中，再將分離菌株接種於小苗根部下方，小苗與分離菌中共培養 6 天後調查根生長性狀。
- (ii) 阿拉伯芥非生物性逆境抗性：阿拉伯芥種子於 MS 固態培養基中發芽 4 天，將小苗移至含不同鹽份 (50, 75 及 125 mM NaCl)，不同滲透壓逆境 (100, 200 and 300 mM mannitol) 培養基，將分離菌中接種於幼苗根部下方，共培養 6 天後調查根部性狀。高溫試驗，4 天大幼苗移至新的 MS 固態培養基後，接種分離菌株，將幼苗與分離菌株於 37°C 下共培養 24 小

時後移至23°C培養5天，調查根部生長性狀。

- (iii) 青江菜、小白菜、小果番茄田間試驗：青江菜、小白菜種子播種於田間，發芽2週後幼苗每周施用500稀釋倍數陽田枯草桿菌1號肥料，6週後調查生長性狀。番茄稼接苗由苗圃購得，每周施用500稀釋倍數陽田枯草桿菌1號肥料，調查番茄花朵數及果實產量。
- (iv) 青江菜耐熱性試驗：青江菜種子播種於MS固態培養基中，等至發芽4天後移至新培養基，接種分離菌株，共培養於37°C溫度下24小時，移至23°C下生長3天，調查幼苗生長性狀。

四、結果

1. 菌株序列鑑定

分離陽田枯草桿菌1號單一菌落，萃取細菌核酸，使用PCR方法以16S rDNA引子對使用增殖細菌16S rDNA核酸片段，獲得之PCR核酸片段進行核酸序列分析（DNA sequencing）。所獲得的核酸序列以BLASTN軟體進行序列比對，陽田枯草桿菌1號與多數Bacillus sp. 菌株有高度之序列相似度。由圖1. 顯示陽田枯草桿菌是一新的枯草桿菌菌株。

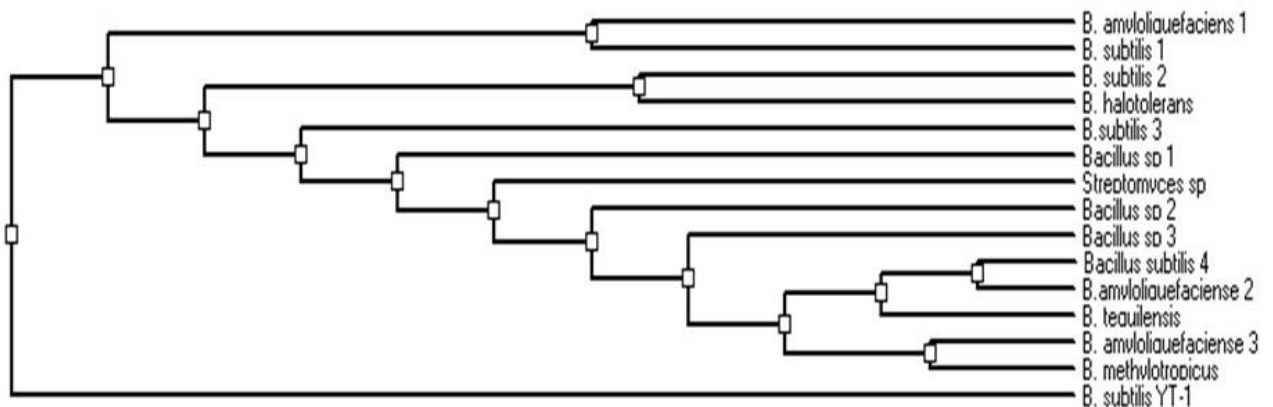


圖 1. 陽田枯草桿菌 1 號與枯草桿菌菌株之種源比較

2. 菌株生長生理測試

培養陽田枯草桿菌1號分離菌株於LB培養基外加不同濃度的NaCl，

陽田枯草桿菌 1 號在外加 100 mM NaCl 培養基生長不受影響，外加 200 mM 以上之 NaCl 逐漸加強對菌株生長的抑制 (Fig. 2A)。而在不同 pH 值得培養基，陽田枯草桿菌 1 號可適應的 pH 值範圍為 pH 5-8 (Fig. 2B)。

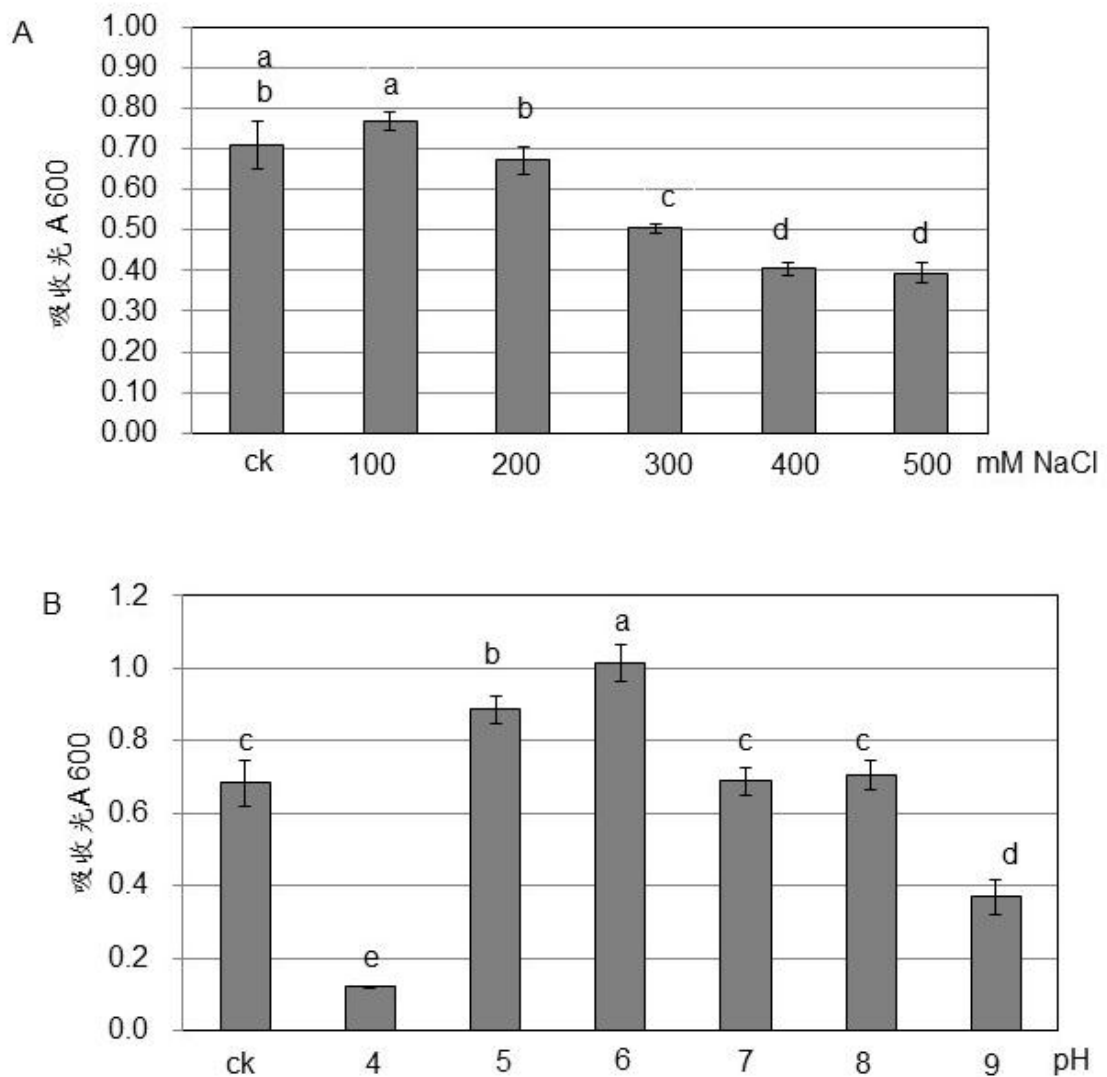


圖 2. 陽田枯草桿菌 1 號在不同鹽濃度及 pH 值培養基之生長活性

3. 溶磷性及 IAA 生合成測試

陽田枯草桿菌 1 號在含有機磷 0.02 % lecithin 培養基進行定性分析，結果顯示陽田枯草桿菌 1 可分解少量 lecithin 而產生微量 clear zone (圖 3A)。接著以含 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 無機態磷進行定量分析，以

Vanadomolybdo phosphoric acid colorimetric method (鉬黃) 定量分解的磷濃度，結果顯示陽田枯草桿菌 1 可分解 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (圖 3B)，另以 Molybdenum Blue Method (鉬藍) 法分析溶磷效果 (圖 3C)。取 1 克陽田枯草桿菌肥料分析具溶磷活性之菌量，圖 3D 顯示溶磷活菌數為 2.9×10^8 CFU/g，高於 70% 的菌量有溶磷活性。培養陽田枯草桿菌 1 號分離菌株於含 tryptophan 培養基，以 Salkowski's reagent 試劑檢測 IAA 的生合成，圖 3E 顯示陽田枯草桿菌 1 號分離菌株可分泌 IAA 於培養基中。

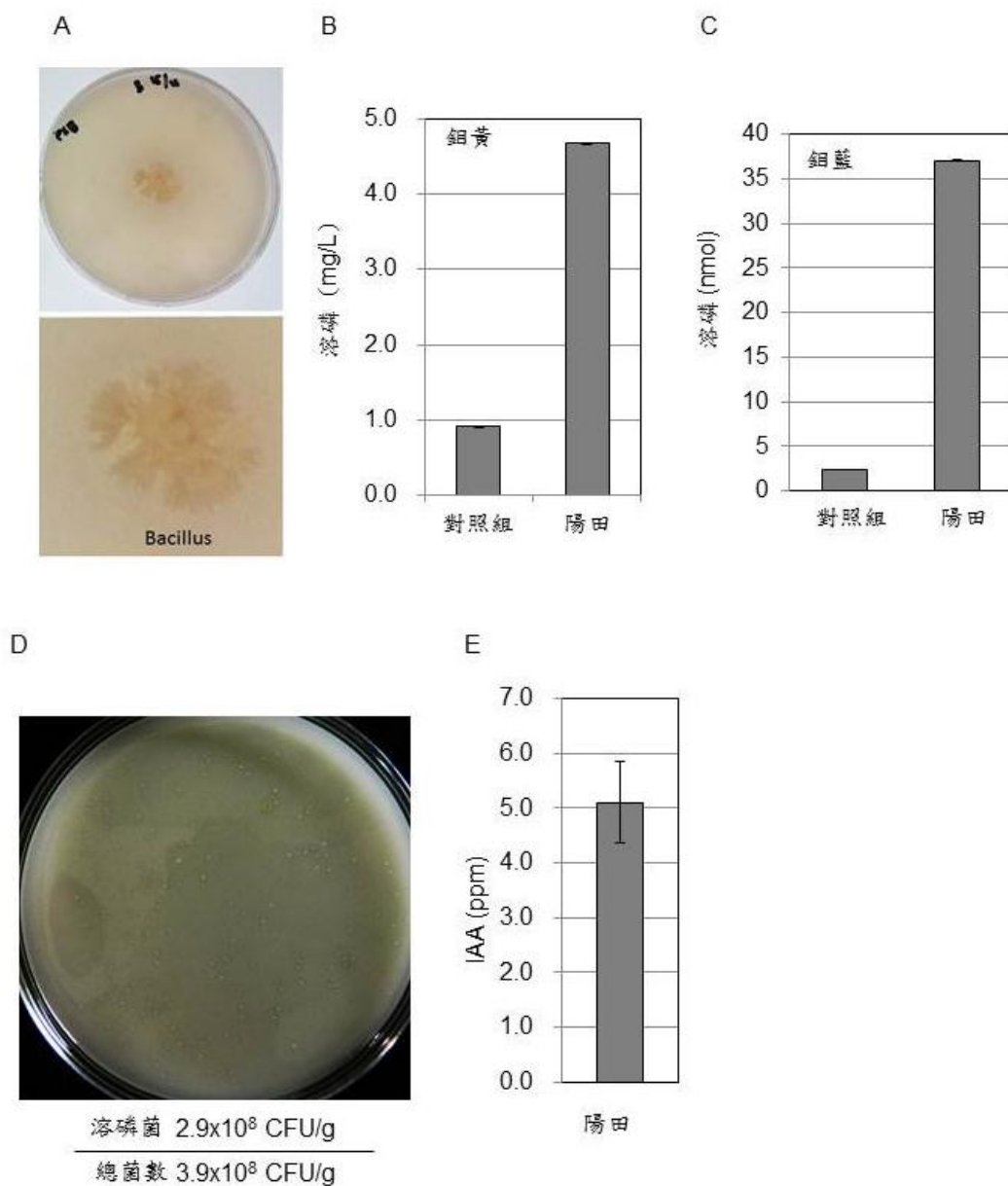
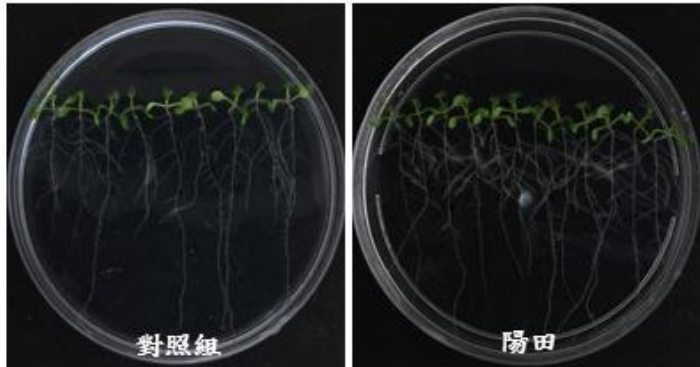


圖 3. 陽田枯草桿菌 1 號溶磷性及 IAA 生合成

4. 陽田枯草桿菌 1 號植物生長試驗

陽田枯草桿菌 1 號與阿拉伯界幼苗共培養可以促進植株側根生長數量 (圖 4)。

A



B

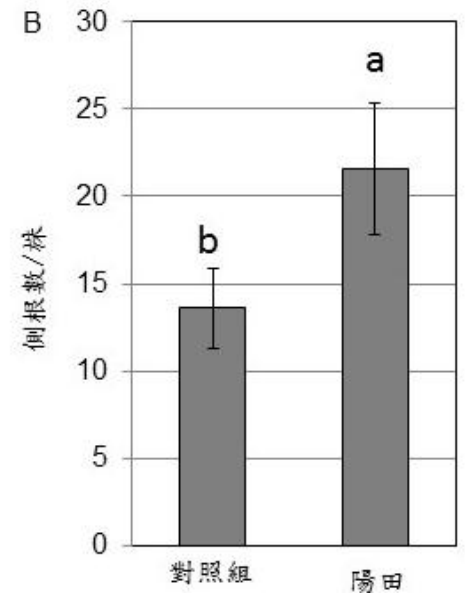


圖 4. 陽田枯草桿菌促進幼苗側根生長

施用陽田枯草桿菌 1 於田間蔬菜，青江菜及小白菜，可促進植株生長 (圖 5)。

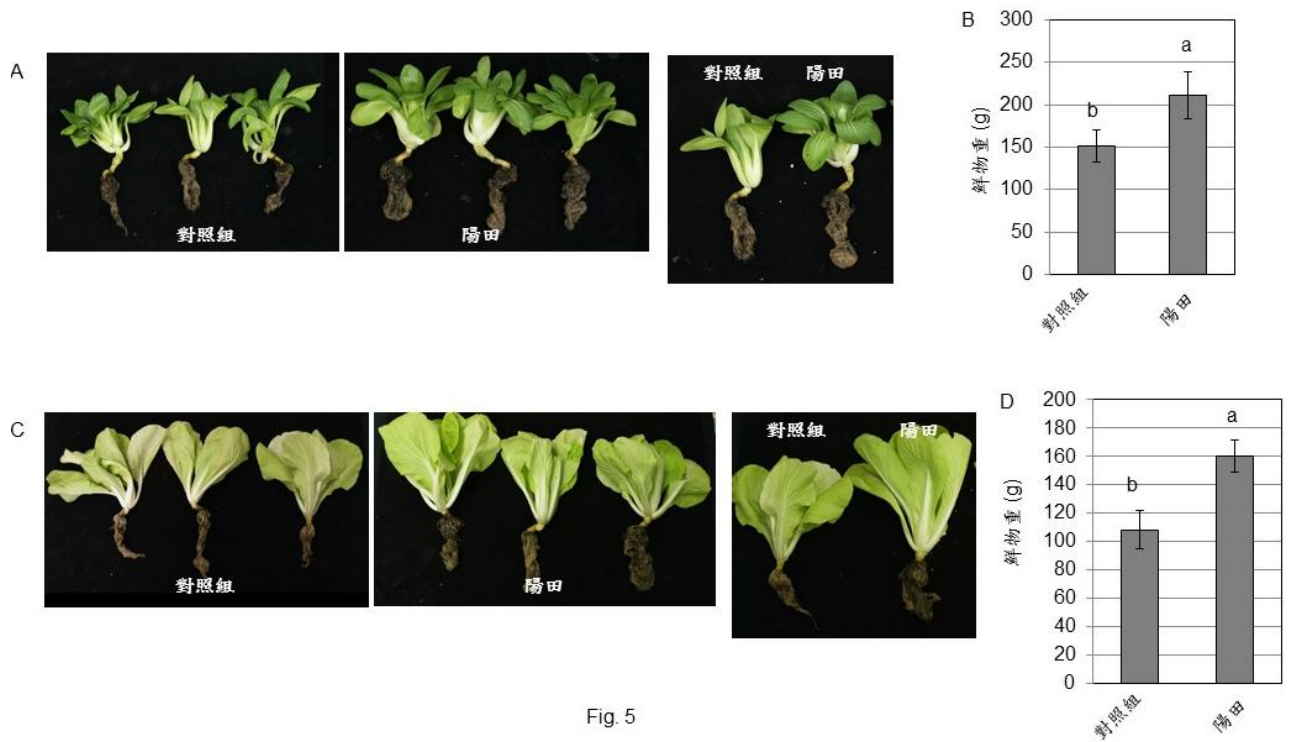
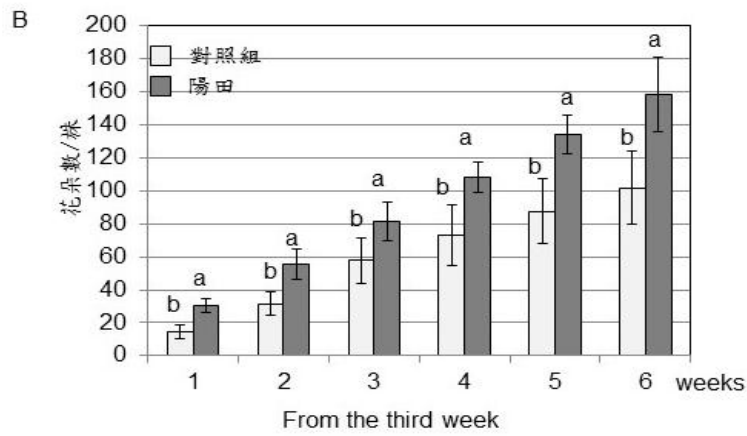
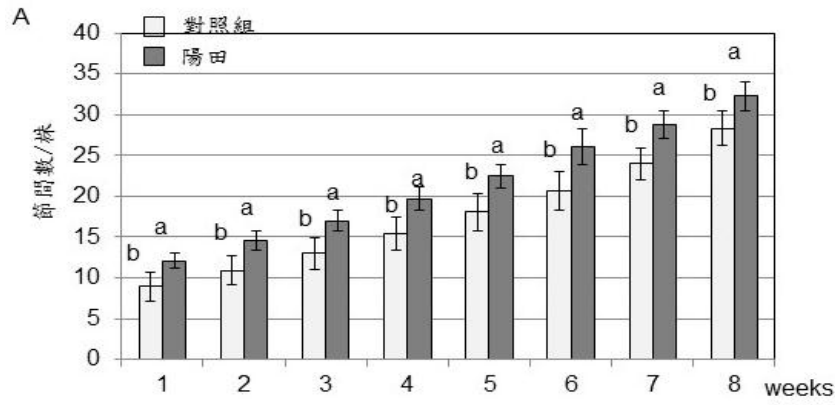


Fig. 5

圖 5. 陽田枯草桿菌促進青江菜及小白菜植株生長及增加鮮物重

施用陽田枯草桿菌 1 號於田間番茄栽培，可增加番茄營養生長，增加節數 (圖 6A)。同時影響開花，處理陽田枯草桿菌 1 號之植株有較多的花朵數 (圖 6B)，並有較高的結果量 (圖 6CD)，並產生較大的果實 (圖 6E)。



D

	株數	總果數
對照組	10	174
陽田	10	310

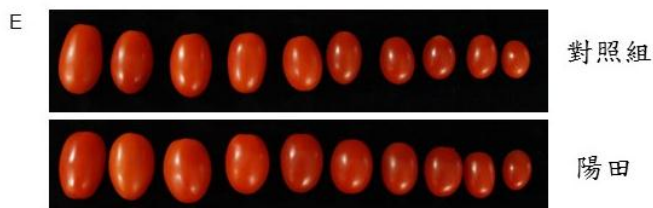


圖 6. 陽田枯草桿菌增加番茄節數、開花數及結果量

陽田枯草桿菌促阿拉伯芥幼苗在鹽份及水分逆境下側根之生長 (圖 7 及圖 8)

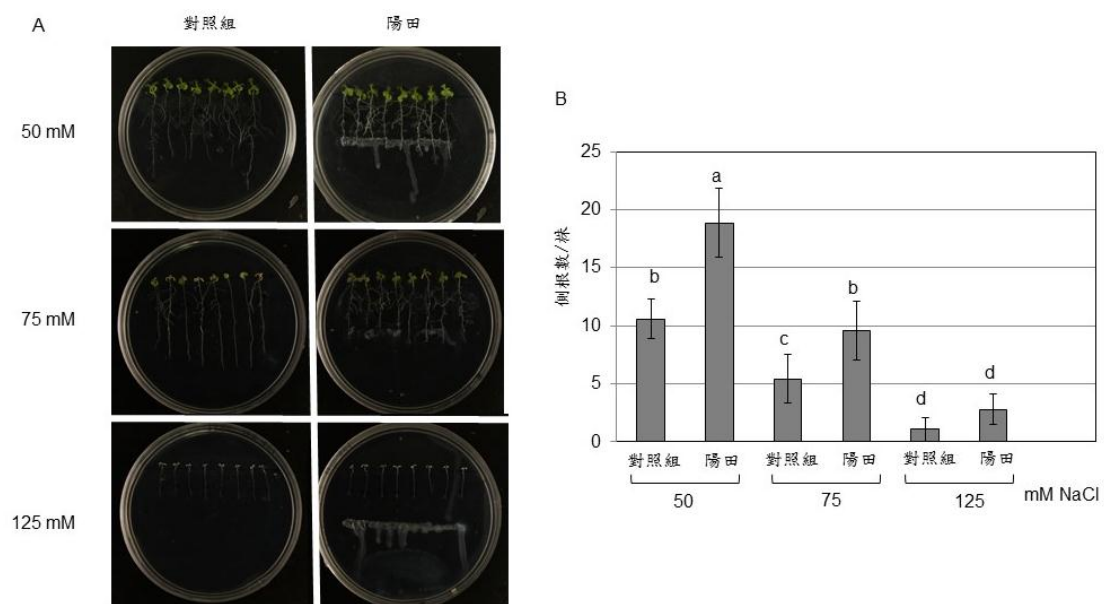
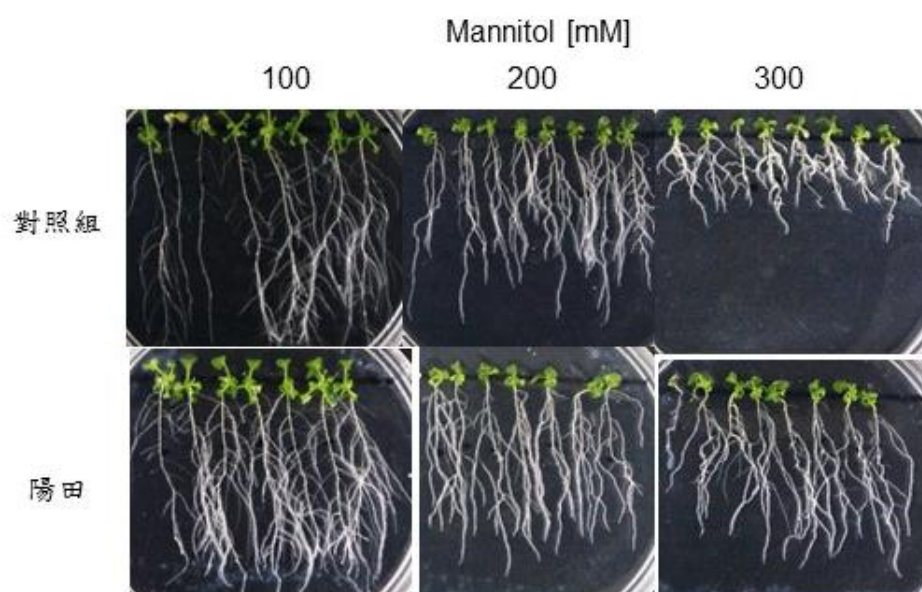


圖 7. 鹽份逆境下陽田枯草桿菌促阿拉伯芥幼苗側根生長



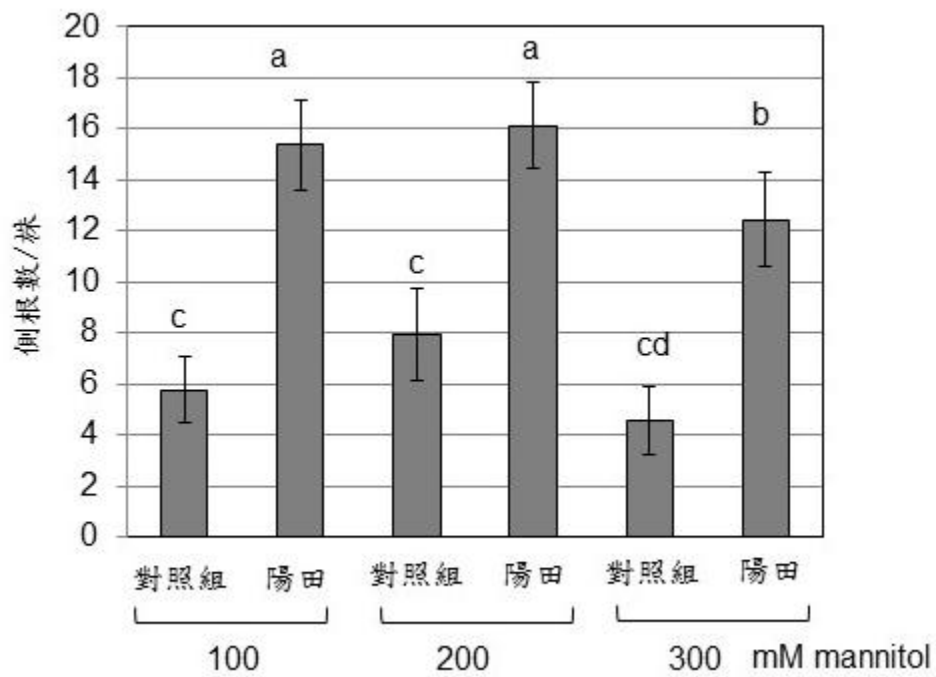


圖 8. 在高 mannitol 濃度產生的水份逆境下陽田枯草桿菌促阿拉伯芥幼苗側根生長

與陽田枯草桿菌 1 共培養亦可增加阿拉伯芥幼苗及小白菜幼苗在高溫逆境(37°C)下側根的生長 (圖 9 及 10)。

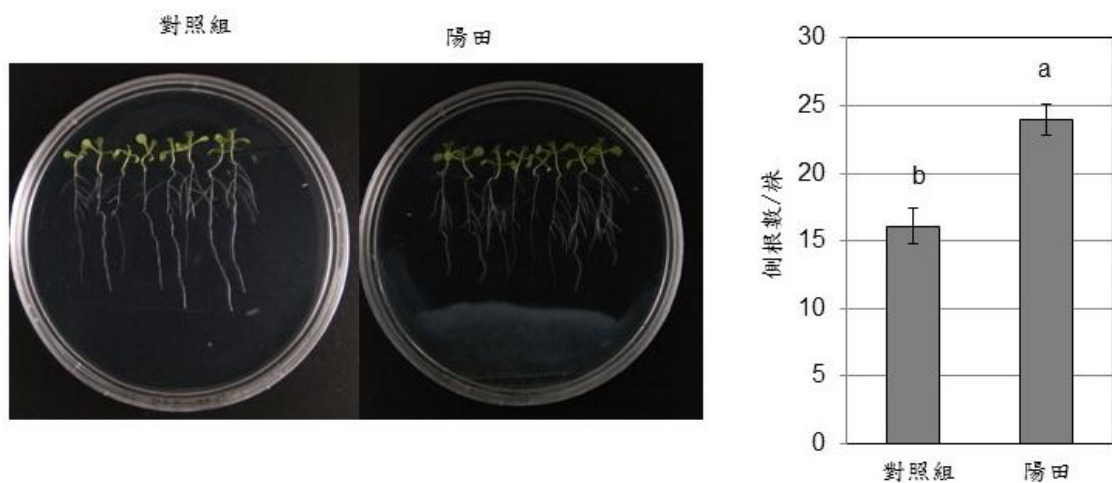


圖 9. 陽田枯草桿菌 1 號在高溫逆境下對阿拉伯芥側根生長的影響



圖 10. 陽田枯草桿菌 1 號在高溫逆境下對小白菜側根生長的影響

陽田枯草桿菌處理鳳梨冠芽發根的根毛發育 (圖 11)

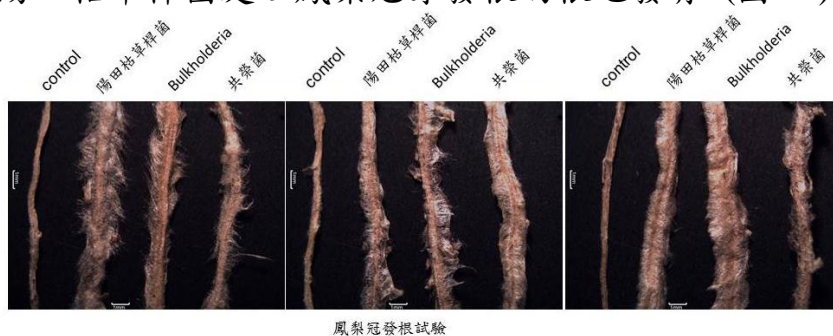


圖 11. 陽田枯草桿菌可促進鳳梨發根的根毛發育

五、結論

1. DNA 序列鑑定陽田枯草桿菌 1 號為一新的枯草桿菌菌株。
2. 陽田枯草桿菌 1 號有溶磷效果。
3. 陽田枯草桿菌 1 號可分泌 IAA。
4. 陽田枯草桿菌 1 號可促進植物側根生長。
5. 在環境逆境下，如鹽分、水分及高溫逆境，陽田枯草桿菌 1 號可促進植株側根生長。
6. 陽田枯草桿菌 1 號可增加田間栽培作物生長及鮮物重。
7. 陽田枯草桿菌 1 號可增加田間栽培番茄之開花數及著果量。
8. 促進根毛生長。

五、相關參考資料

- Ahemad M, Khan MS (2012a) Alleviation of fungicide-induced phytotoxicity in greengram [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] using fungicide-tolerant and plant growth promoting *Pseudomonas* strain. *Saudi J. Biol. Sci.* 19: 451–459
- Ahemad M, Khan MS (2012b) Ecological assessment of biotoxicity of pesticides towards plant growth promoting activities of pea (*Pisum sativum*)-specific *Rhizobium* sp. strain MRP1 Emirates. *J. Food Agric.* 24: 334–343
- Almaghrabi OA, Massoud SI, Abdelmoneim TS (2013) Influence of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on tomato plant growth and nematode reproduction under greenhouse conditions. *Saudi J Biol Sci* 20: 57-61
- Bhattacharyya PN, Jha DK (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 1327–1350
- Dey R, Pal KK, Bhatt DM, Chauhan SM (2004) Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiol Res* 159: 371-394
- Khan MS, Zaidi A, Wani PA, Oves M (2009) Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. *Environ. Chem. Lett.* 7: 1–19
- Kim HJ, Jeun YC (2006) Resistance Induction and Enhanced Tuber Production by Pre-inoculation with Bacterial Strains in Potato Plants against *Phytophthora infestans*. *Mycobiology* 34: 67-72
- Ma Y, Rajkumar M, Luo Y, Freitas H (2011) Inoculation of endophytic bacteria on host and non-host plants-effects on plant growth and Ni uptake. *J. Hazard. Mater.* 195: 230–237
- Nautiyal CS (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170: 265–270

Patten CL, Glick BR (2002) Role of *Pseudomonas putida* indole-acetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3795-3801

Russo A, Vettori L, Felici C, Fiaschi G, Morini S, Toffanin A (2008) Enhanced micropropagation response and biocontrol effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 on *Prunus cerasifera* L. clone Mr.S 2/5 plants. *J. Biotechnol.* 134: 312–319

Sawsan A, Mohammed M, Shanshool HA (2009) Phosphorus Removal from Water and Waste Water by Chemical Precipitation Using Alum and Calcium Chloride. *Iraqi Journal of Chemical and Petroleum Engineering* 10: 35-42