浙 江 农 林 大 学 学 报, 2025, **42**(3): 477−485 https://zlxb.zafu.edu.cn
Journal of Zhejiang A&F University DOI: 10.11833/j.issn.2095-0756.20240426

引用格式: 郭畅健, 余克非, 郑展望. 源自蚯蚓堆肥的吲哚乙酸高产菌株筛选、代谢途径 解析及发酵条件优化[J]. 浙江农林大学学报, 2025, **42**(3): 477−485. GUO Changjian, YU Kefei, ZHENG Zhanwang. Screening, metabolic pathway analysis and fermentation condition optimization of a high-yielding strain of indoleacetic acid from earthworm compost[J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2025, **42**(3): 477−485.

源自蚯蚓堆肥的吲哚乙酸高产菌株筛选、代谢途径解析及发酵条件优化

郭畅健[1]，余克非[1]，郑展望[1,2]

（1. 浙江农林大学 环境与资源学院，浙江 杭州 311300；2. 浙江农林大学 农村环境研究所，浙江 杭州 311300）

摘要：【目的】从蚯蚓堆肥中筛选分离吲哚乙酸高产菌，优化其发酵参数以提升吲哚乙酸产量，为丰富产吲哚乙酸菌种资源库及制备优质菌肥提供参考。**【方法】**采用 Salkowski 显色法结合高效液相色谱法筛选吲哚乙酸高产菌株，通过 16S rRNA 序列分析鉴定目标菌株属种，液质联用仪解析目标菌株的代谢产物，基于代谢组学分析探究目标菌株的吲哚乙酸合成途径；采取单因素实验优化目标菌株产吲哚乙酸的发酵参数，种子发芽实验评估目标菌株促进种子萌发的效果。**【结果】**从蚯蚓堆肥中分离出 1 株吲哚乙酸高产菌，其初始吲哚乙酸产量为 39.99 mg·L^{-1}，经 16S rRNA 测序分析鉴定为芽孢杆菌 *Bacillus* sp.，并将其命名为 GA2022。菌株 GA2022 产吲哚乙酸的最适发酵参数为培养时间 36 h、接种量为 2% (体积比)、氯化钠质量浓度为 20.0 g·L^{-1}、初始 pH 为 8、L-色氨酸质量浓度为 3.0 g·L^{-1}、培养温度为 40 ℃。在此最佳条件下，菌株 GA2022 的吲哚乙酸产量可达 204.25 mg·L^{-1}，较优化前提升了 410.75%。质谱分析结果显示：该菌株可能同时具备 3 种吲哚乙酸合成途径，即吲哚-3-乙酰胺途径、吲哚-3-丙酮酸途径以及吲哚-3-乙醇途径。该菌株对小白菜 *Brassica rapa* var. *chinensis* 种子萌发具有一定促进作用。**【结论】**从蚯蚓堆肥中获得了 1 株吲哚乙酸高产菌 GA2022。该菌株可能同时存在的 3 种吲哚乙酸合成路径，使它具备较高的吲哚乙酸生产能力及耐盐碱能力。图 7 表 1 参 31

关键词：蚯蚓堆肥；吲哚乙酸；高效液相色谱；芽孢杆菌

中图分类号：S141.1 **文献标志码：**A **文章编号：**2095-0756(2025)03-0477-09

Screening, metabolic pathway analysis and fermentation condition optimization of a high-yielding strain of indoleacetic acid from earthworm compost

GUO Changjian[1]，YU Kefei[1]，ZHENG Zhanwang[1,2]

（1. College of Environment and Resources, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 2. Institute for Rural Environment, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China）

Abstract: ［**Objective**］ This study aims to screen a high-yielding indoleacetic acid strain from earthworm compost, and optimize its fermentation parameters to increase indoleacetic acid yield, so as to provide reference for enriching indoleacetic acid producing resource pool and preparing high-quality bacterial fertilizers. ［**Method**］ Salkowski colorimetric method combined with high-performance liquid chromatography was used to screen high-yielding strains of indoleacetic acid, and the target strains were identified through 16S rRNA sequence analysis. The metabolites of the target strains were analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry, and the synthesis pathway of indoleacetic acid was explored based on metabolomics analysis.

收稿日期：2024-07-04；修回日期：2024-11-27

基金项目：浙江省科技重大专项 (2020C02009)

作者简介：郭畅健 (ORCID: 0000-0001-6405-1964)，从事固体废弃物资源化利用研究。E-mail: 2021103011037@zafu.edu.cn。通信作者：郑展望 (ORCID: 0000-0001-8261-680X)，教授，博士生导师，从事乡村环境治理和生态产业研究。E-mail: zhengzw@zafu.edu.cn

Single factor experiments were performed to optimize the fermentation parameters of the target strains for producing indoleacetic acid. The effect of the target strains on promoting seed germination was evaluated through seed germination experiments. [**Result**] A new strain with high indoleacetic acid yield of 39.99 mg·L^{-1} was isolated from earthworm compost. It was identified as *Bacillus* sp. by 16S rRNA sequencing analysis and named GA2022. The optimum fermentation parameters for producing indoleacetic acid from strain GA2022 were incubation time 36 h, inoculum amount 2% (*v*/*v*), NaCl concentration 20.0 g·L^{-1}, initial pH 8, L-tryptophan concentration 3.0 g·L^{-1}, and incubation temperature 40 ℃. Under these optimal conditions, the indoleacetic acid yield of strain GA2022 could reach 204.25 mg·L^{-1}, which was 410.75% higher than that before optimization. The results of mass spectrometry showed that this strain might possess 3 indoleacetic acid synthesis pathways, namely indole-3-acetamide pathway, indole-3-pyruvate pathway, and indole-3-ethanol pathway. The strain could promote the seed germination of *Brassica rapa* var. *chinensis*. [**Conclusion**] A high-yielding indoleacetic acid strain GA2022 is obtained from earthworm compost. The simultaneous coexistence of 3 indoleacetic acid synthesis pathways endows it with high indoleacetic acid production capacity and saline-alkali tolerance. [Ch, 7 fig. 1 tab. 31 ref.]

Key words: earthworm compost; indoleacetic acid; high performance liquid chromatography; *Bacillus*

吲哚乙酸是一种重要的植物激素，在植物叶片形成、根系生长发育、叶片脱落等一系列植物生命活动中起着重要作用[1]。除植物自身合成的少量吲哚乙酸外，根际微生物也是植物获取吲哚乙酸的重要来源之一，微生物以植物根际分泌物为营养物质合成并分泌吲哚乙酸等植物激素[2]。目前常见的吲哚乙酸产生菌有芽孢杆菌 *Bacillus* sp.、普罗维登斯菌 *Providencia* sp.、假单胞菌 *Pseudomonas* sp.等，这类微生物常存在于根际土壤和植物体内[3]。它们在进行生理活动的过程中能够分泌吲哚乙酸，提高土壤或植物中吲哚乙酸含量，促进植物生长；同时部分吲哚乙酸产生菌能够分泌抗菌肽类物质，帮助植物抵御病原微生物的入侵[4]。因此，筛选并合理利用吲哚乙酸产生菌能够促进作物生长，是实现农业可持续发展的有效方法。

目前，研究者们主要从植物根际或农田土壤等环境中获取吲哚乙酸产生菌，如 CHANDRA 等[5] 从甜菊 *Stevia rebaudiana* 根际筛选到 1 株吲哚乙酸产生菌并进行了发酵条件优化，该菌株的吲哚乙酸产量最高可达 104 mg·L^{-1}；CHAIHARN 等[6] 从水稻 *Oryza sativa* 根际分离得到了 1 株吲哚乙酸产生菌并与有机肥配施提升了作物产量；SHOKRI 等[7] 从农田土壤中获取吲哚乙酸产生菌并验证了它们之间存在的协同作用可以提高吲哚乙酸的产量。蚯蚓堆肥是目前公认的优质有机肥料[8]，拥有丰富的微生物种群和多种植物激素。蔡琳琳等[9] 研究表明：蚯蚓堆肥可以提高土壤肥力并刺激植物生长。由蚯蚓堆肥中分离出高产的吲哚乙酸产生菌并进行优化，可以进一步提升蚯蚓堆肥的应用价值，并且利用蚯蚓堆肥及吲哚乙酸产生菌制备微生物肥料时，筛选的微生物具备更高的适应性。然而，目前鲜有从蚯蚓堆肥中分离吲哚乙酸产生菌的报道，因此从蚯蚓堆肥中筛选吲哚乙酸产生菌对利用蚯蚓堆肥制备微生物肥料具有重要意义。

本研究以蚯蚓堆肥中的微生物为研究对象，通过 Salkowski 显色法、高效液相色谱法筛选吲哚乙酸高产菌株并鉴定其菌属。分析供试菌株的吲哚乙酸代谢通路，深入探究其最适发酵参数，获取较高的吲哚乙酸产量，为合理利用该菌株及蚯蚓堆肥提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

蚯蚓堆肥采自浙江省杭州市临安区研口村餐厨垃圾处理基地 (30.24°N，119.83°E)，储存在无菌密封袋中置于 4 ℃ 冰箱备用。

1.2 培养基及显色剂的配置

Luria-Bertani(LB) 液体培养基：酵母提取物 ($C_{15}H_{31}N_3O_{13}P_2$) 5.0 g·L^{-1}，氯化钠 (NaCl) 10.0 g·L^{-1}，胰

蛋白胨 ($C_{18}H_{16}O_5$) 10.0 g·L^{-1}，pH 7.0 ± 0.2，121 ℃ 高压灭菌 30 min。

LB 固体培养基：酵母提取物 5.0 g·L^{-1}，氯化钠 10.0 g·L^{-1}，胰蛋白胨 10.0 g·L^{-1}，琼脂粉 ($C_{14}H_{24}O_9$) 15.0 g·L^{-1}，pH 7.0 ± 0.2，121 ℃ 高压灭菌 30 min。

Salkowski 试剂：500.0 mL 质量分数为 35% 的高氯酸 ($HClO_4$)，10.0 mL 0.5 mol·L^{-1} 氯化铁 ($FeCl_3$)，混合摇匀。

1.3　菌株的分离及筛选

取 10.0 g 蚯蚓堆肥添加到 100.0 mL 无菌水中，搅拌 30 min 后静置 10 min，取上层清液用无菌水稀释至 10^{-3}~10^{-7} 梯度浓度。取各稀释液 100.0 μL 分别涂布于 LB 固体培养基，30 ℃ 培养 24 h。随后挑选形态不同的单菌落在 LB 固体培养基上划线纯化。将纯化的单菌落分别接种至 LB 液体培养基，30 ℃、120 r·min^{-1} 培养 24 h。取不同菌株的菌悬液各 10.0 mL 在 10 000 r·min^{-1} 离心 15 min，各取 2.0 mL 上清液加入等体积 Salkowski 试剂混匀，避光处静置 20 min 进行显色，混合液变为粉红色说明菌株具备吲哚乙酸生产能力[10]。取变为粉红色的菌悬液与无菌甘油按 1∶1(体积比) 混合后储存于−80 ℃ 冰箱备用。

1.4　吲哚乙酸产量测定

1.4.1　吲哚乙酸标准曲线绘制　以 LB 液体培养基为溶剂分别配置 5、10、50、100、200、1 000 mg·L^{-1} 的吲哚乙酸标准品溶液，取标准品溶液各 5.0 mL，加入等体积乙酸乙酯混匀后静置 1 h，上层溶液移入干净离心管，下层溶液中再加入等体积乙酸乙酯，混匀后静置 1 h，再次将上层溶液移入同一离心管。上述过程重复 3 次。将上层萃取液在氮气流中吹干，用 1.0 mL 色谱纯甲醇溶解残留在试管中的固体物质，溶液通过 0.45 μm 有机相滤膜后，通过高效液相色谱仪 (Agilent 1 220 Infinity Ⅱ) 测定并制作标准曲线。液相色谱条件为甲醇∶超纯水 (体积分数为 0.1% 的乙酸)= 60∶40，进样量 10.0 μL，流速 1.0 mL·min^{-1}，柱温 35 ℃，紫外吸收波长 279 nm，Poroshell 120 EC-C18 (4.6 mm × 150 mm, 4 μm) 色谱柱。重复 3 次。

1.4.2　菌株吲哚乙酸产量测定　取菌悬液各 2.0 mL 接种于 100.0 mL LB 液体培养基，30 ℃、120 r·min^{-1} 培养 24 h，取 10.0 mL 培养液 10 000 r·min^{-1} 离心 15 min，取 5.0 mL 上清液按照上述标准溶液处理方法进行预处理后，使用高效液相色谱仪分析测定吲哚乙酸质量浓度。每个处理重复 3 次。

1.5　菌株鉴定

采用 16S rRNA 双向 (通用引物 27F/1492R) 聚合酶链式反应 (PCR) 扩增和测序分析鉴定菌株。将获得的 16S rRNA 测序结果与美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 数据库中具有高亲缘关系的菌株序列进行比对，并采用 Neighbor-Joining 方法构建各菌株的系统发育进化树，分析鉴定菌株种属[11]。

1.6　吲哚乙酸合成途径探究

取 10.0 mL 目标菌株培养液 10 000 r·min^{-1} 离心 15 min，取上清液储存于−80 ℃ 冰箱过夜备用，采用液质联用仪 (LC-MS, LC: Shimadzu LC-30A, MS: SCIEX Triple TOF 6600+) 分析上清液中的物质组成。液质联用参数为超纯水 (体积分数为 0.1% 的甲酸)∶乙腈 (体积分数为 0.1% 的甲酸)= 10∶90，进样量 2.0 μL，流速 0.40 mL·min^{-1}，柱温 40 ℃，Water ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) 色谱柱。通过液质数据分析上清液中的物质组成推断菌株的吲哚乙酸合成途径。

1.7　产吲哚乙酸发酵条件优化

通过单因素实验，以每次优化后的最优变量为前提，依次对下述发酵条件进行优化：发酵时间 (6、12、24、30、36、48 h)、接种量 (1%、2%、3%、4%、5%, 体积比)、氯化钠质量浓度 (5.0、10.0、20.0、30.0、40.0、50.0 g·L^{-1})、初始 pH (4、5、6、7、8、9)、L-色氨酸质量浓度 (0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 g·L^{-1}) 以培养及温度 (15、20、25、30、35、40、45、50 ℃)。分别通过高效液相色谱仪及紫外分光光度计测定目标菌株的吲哚乙酸产量和菌浓度 [600 nm 处吸光度 D(600)]，获得最佳的菌株发酵参数。每个处理重复 3 次。

1.8　菌株影响种子萌发效果评估

取适量小白菜 *Brassica rapa* var. *chinensis* 种子晒种 6 h，用清水筛选健康且饱满的种子，用体积分数为 1% 次氯酸钠 (NaClO) 溶液消毒 20 min，使用无菌水冲洗干净，于避光处静置泡种 24 h。

将目标菌株按照最佳发酵参数进行培养。取菌株发酵液 15.0 mL，5 000 r·min^{-1} 离心 15 min，分离菌株和发酵上清液，使用体积分数为 0.85% 的生理盐水洗净菌株后重悬于 15.0 mL 无菌水中。将滤纸裁剪至合适大小并平铺于培养皿底部，分别加入 4.0 mL 菌悬液、发酵上清液、无菌水及 LB 液体培养基。每个处理均匀布置 20 颗小白菜种子并置于 30 ℃ 避光处静置，设置 3 组重复。隔 24 h 记录种子萌发情况并补充适量溶液以保持滤纸湿润。所有操作均在无菌条件下进行。

1.9 数据分析

用 Excel 2017 统计数据；用 SPSS 22.0 进行显著性分析；用 Origin 2024 和 MEGA 11 绘制图表并构建系统发育进化树。

2 结果与分析

2.1 吲哚乙酸产生菌的分离及筛选

从蚯蚓堆肥中共分离出 6 株与 Salkowski 试剂发生显著显色反应的菌株，表明它们具有较强吲哚乙酸生产能力 (图 1)。菌株 vm12 和 vm29 的吲哚乙酸产量相对较高，分别为 41.27 和 39.99 mg·L^{-1}，高于 TSAVKELOVA 等[12] 筛选的根瘤菌 *Rhizobium* sp. (4.50 mg·L^{-1}) 和鞘氨醇单胞菌 *Sphingomonas* sp. (10.10 mg·L^{-1}) 的产量。

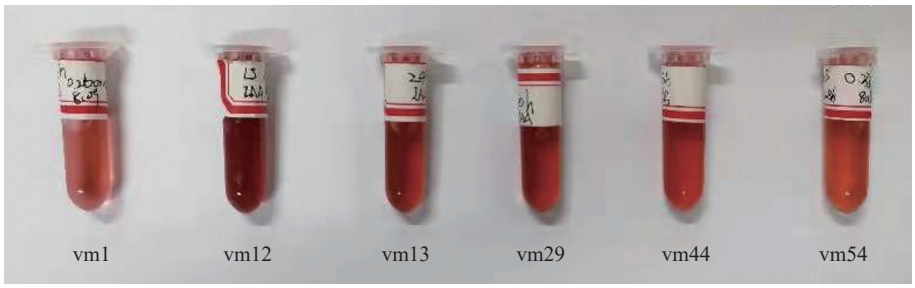


图 1 分离菌株的 Salkowski 显色反应

Figure 1 Salkowski chromogenic reaction of the isolated microorganisms

2.2 吲哚乙酸产生菌的鉴定

NCBI 数据库比对结果显示：vm12 和 vm29 分别与克雷伯氏菌属 *Klebsiella* sp.和芽孢杆菌属具有较高的同源性。克雷伯氏菌是一类寄生于人和动物的呼吸道及肠道的致病菌[13−14]，而芽孢杆菌大多无致病性，广泛地应用于工农业及医药生产[15−16]。因此，本研究选择 vm29 作为供试菌株，并命名为 GA2022。形态学分析表明：菌株 GA2022 的菌落个体较大，近似圆形且个体差异显著，菌落边缘不规则并有隆起和褶皱，呈黄色 (图 2A)。菌株 GA2022 的系统发育树如图 2B 所示。

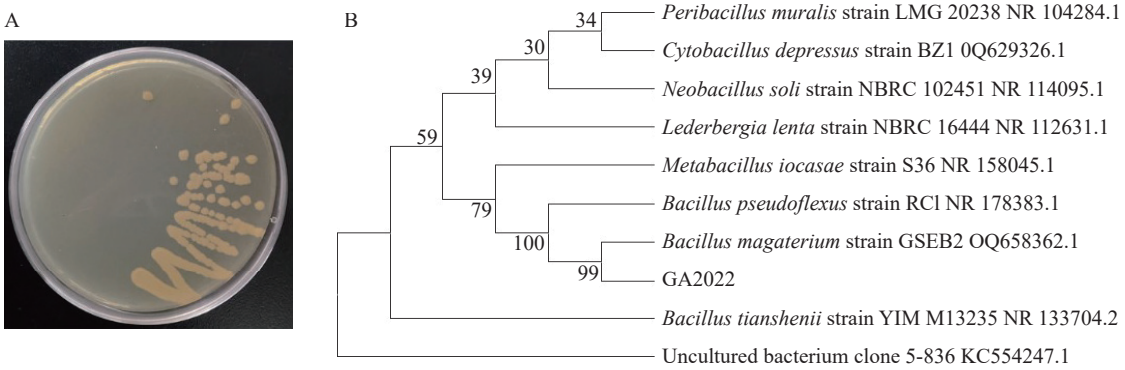


图 2 菌株 GA2022 的菌落形态 (A) 和基于 16S rRNA 序列的系统发育树 (B)

Figure 2 Colony morphology of strain GA2022 (A) and its phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences (B)

2.3 菌株 GA2022 的吲哚乙酸合成代谢途径

液质联用仪分析表明：菌株 GA2022 的培养液中存在 L-色氨酸、吲哚-3-乙酰胺、吲哚-3-丙酮酸、吲哚-3-乙醛、吲哚-3-乙醇以及吲哚乙酸。据此推测，菌株 GA2022 可能同时存在 3 条吲哚乙酸合成途

径 (图 3)。第 1 条途径是吲哚-3-乙酰胺途径 (IAM 途径)。L-色氨酸由 *aux*1/*iaaM* 基因编码的色氨酸单加氧酶转化为吲哚-3-乙酰胺后，被 *aux*2/*iaaH* 编码的吲哚乙酰胺水解酶转化为吲哚乙酸。细菌能否通过 IAM 途径合成吲哚乙酸主要取决于该细菌是否拥有编码色氨酸单加氧酶和吲哚乙酰胺水解酶的基因 *iaaM* 和 *iaaH* [17]。IAM 途径同时存在于微生物和植物体内。第 2 条途径是吲哚-3-丙酮酸途径 (IPyA 途径)。L-色氨酸在氨基转移酶 (AT) 的作用下脱去氨基转化为吲哚-3-丙酮酸，再被脱羧酶 (IPDC) 转化为吲哚-3-乙醛，吲哚-3-乙醛被醛脱氢酶 (IAO) 氧化为吲哚乙酸[18]。该路径在植物和细菌中广泛存在，编码醛脱氢酶的基因是 IPyA 途径的关键基因，该途径广泛存在于植物和细菌体内。第 3 条途径是 L-色氨酸受酶催化脱羧、脱氨、水解得到吲哚-3-乙醇，吲哚-3-乙醇中的醇羟基经酶氧化后得到吲哚-3-乙醛，再经醛脱氢酶将氧化为吲哚乙酸。该路径与 IPyA 途径具有共同的中间产物吲哚-3-乙醛，并已在荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens*、羽扇豆根瘤菌 *Rhizobium lupini* 中发现，但该途径的基因转录机制尚不完全清楚[19]。

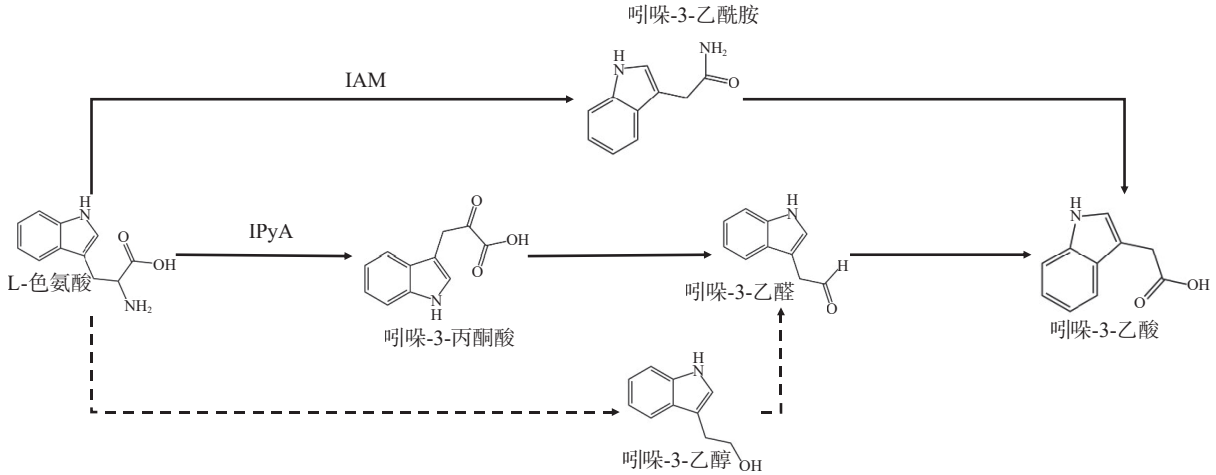


图 3　菌株 GA2022 的吲哚乙酸合成代谢途径

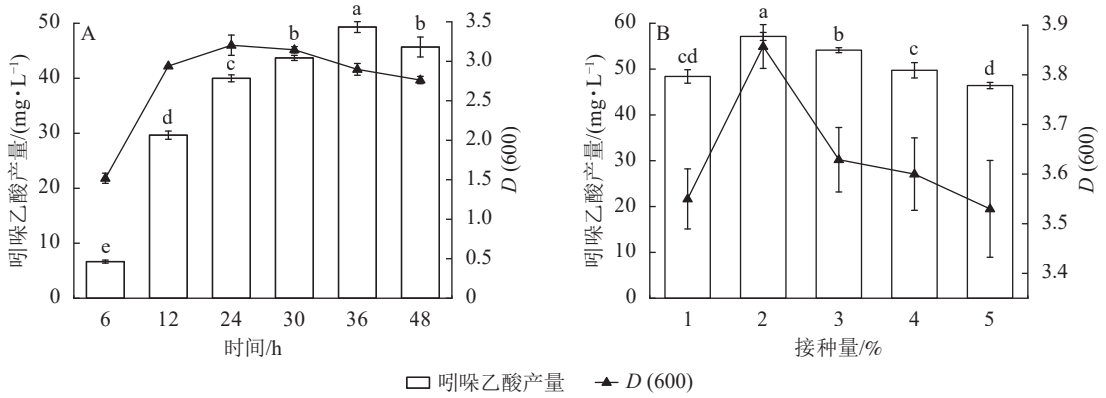
Figure 3　Metabolic pathways of indoleacetic acid synthesis in strain GA2022

2.4　菌株 GA2022 的最适发酵条件

2.4.1　培养时间对菌株 GA2022 生长及吲哚乙酸产量的影响　吲哚乙酸产量和菌浓度 [*D*(600)] 均随时间先上升后下降，吲哚乙酸产量在培养时间为 36 h 时达最大值 (49.32 mg·L^{-1})，显著高于其他处理，*D*(600) 于 24 h 时达最大值 (3.20，图 4A)。吲哚乙酸产量和 *D*(600) 在培养初期快速上升，可能是因为初期培养基内养分及生长空间充足，细胞得以快速增殖和代谢。随着培养时间延长，培养基内生存空间和营养物质快速消耗，种内竞争不断加剧，限制了菌株 GA2022 的生长速率和代谢强度[20]。随着养分逐渐耗尽，菌株 GA2022 进入生长衰退期，吲哚乙酸的合成速率逐渐低于分解速率，造成吲哚乙酸产量在培养后期显著下降 ($P<0.05$)。由于吲哚乙酸产量在 36 h 时达到峰值，菌株 GA2022 的最适培养时间为 36 h。

2.4.2　接种量对菌株 GA2022 生长及吲哚乙酸产量的影响　随着接种量上升，吲哚乙酸产量和 *D*(600) 均先上升后下降，两者均在接种量为 2%(体积比) 时达到峰值，分别为 57.12 mg·L^{-1} 和 3.86，显著高于其他接种量 (图 4B)。接种量偏低时吲哚乙酸产量和 *D*(600) 均较低，可能是因为较低的初始细胞数量限制了细胞增殖速率 ($P<0.05$)，延缓了吲哚乙酸的积累。此外，接种量偏高时吲哚乙酸产量和 *D*(600) 同样较低，这可能是由于较高的初始细胞数量加剧了种内竞争，加速了有毒代谢产物 (如酸性物质) 的累积，从而限制了细胞增殖和吲哚乙酸合成[21]。因此，菌株 GA2022 的最适接种量为 2%。

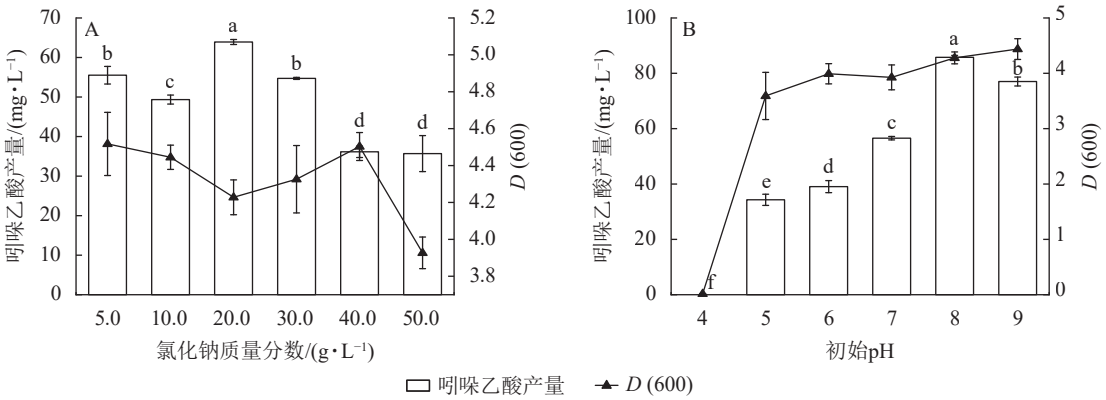
2.4.3　氯化钠质量浓度对菌株 GA2022 生长及吲哚乙酸产量的影响　氯化钠质量浓度对吲哚乙酸产量和 *D*(600) 的影响无线性规律。氯化钠质量浓度为 20.0 g·L^{-1} 时，吲哚乙酸产量达到峰值 (63.92 mg·L^{-1})，这可能是因为菌株 GA2022 在盐胁迫环境下通过合成吲哚乙酸来调节自身生理功能[22−23]。氯化钠质量浓度为 5 g·L^{-1} 时，*D*(600) 达到峰值 (4.52，图 5A)。因此，菌株 GA2022 的最适氯化钠质量浓度为 20.0 g·L^{-1}，该质量浓度下菌株 GA2022 的吲哚乙酸产量显著高于其他处理 ($P<0.05$)。



不同小写字母表示不同培养条件下菌株GA2022的吲哚乙酸产量差异显著(P<0.05)。

图 4 不同培养时间和接种量菌株 GA2022 吲哚乙酸产量和菌浓度 [D(600)]

Figure 4 Indoleacetic acid production and D(600) of strain GA2022 at different cultivation times and inoculation levels



不同小写字母表示不同培养条件下菌株GA2022的吲哚乙酸产量差异显著(P<0.05)。

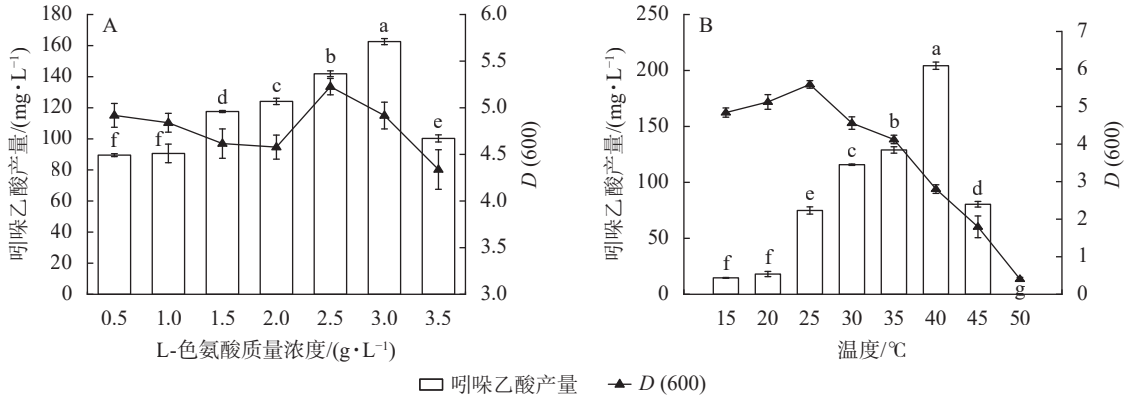
图 5 不同氯化钠质量浓度和初始 pH 菌株 GA2022 吲哚乙酸产量和菌浓度 [D(600)]

Figure 5 Indoleacetic acid production and D(600) of strain GA2022 with different NaCl concentrations and initial pH

2.4.4 初始 pH 对菌株 GA2022 生长及吲哚乙酸产量的影响 吲哚乙酸产量和 D(600) 均随 pH 增加呈上升趋势，初始 pH 为 8 时，吲哚乙酸产量达到峰值 (85.77 mg·L^{-1})，显著高于其他处理组 (P<0.05)，初始 pH 为 9 时，D(600) 达到峰值 (4.44)，初始 pH 偏低时吲哚乙酸产量和 D(600) 均较低 (图 5B)，这可能与调节细胞生命周期的酶和参与吲哚乙酸合成代谢的酶的最适 pH 有关[24]。D(600) 在碱性环境下相对较高，这可能是因为弱碱性环境有利于维持细胞壁的稳定性和通透性，促进了细胞对营养物质的吸收和利用[25]。由于吲哚乙酸产量在初始 pH 为 8 时达到峰值，所以菌株 GA2022 的最适初始 pH 为 8。

2.4.5 L-色氨酸质量浓度对菌株 GA2022 生长及吲哚乙酸产量的影响 L-色氨酸质量浓度与吲哚乙酸产量大致呈线性正相关，但与 D(600) 无线性规律。L-色氨酸质量浓度为 3.0 g·L^{-1} 时，吲哚乙酸产量达到峰值 (162.57 mg·L^{-1})，L-色氨酸质量浓度 2.5 g·L^{-1} 时，D(600) 达到峰值 (5.2，图 6A)。可能因为 L-色氨酸是吲哚乙酸的合成底物，提升底物质量浓度有利于产物的合成，但底物质量浓度过高加剧了环境中的盐胁迫，造成 L-色氨酸质量浓度为 3.5 g·L^{-1} 时，吲哚乙酸产量显著下降[26](图 6A)。由于吲哚乙酸产量在 L-色氨酸质量浓度为 3.0 g·L^{-1} 时达到峰值，所以菌株 GA2022 的最适 L-色氨酸质量浓度为 3.0 g·L^{-1}。

2.4.6 培养温度对菌株 GA2022 生长及吲哚乙酸产量的影响 吲哚乙酸产量和 D(600) 均随培养温度升高先上升后下降，40 ℃ 时吲哚乙酸产量达到峰值 (204.25 mg·L^{-1})。25 ℃ 时 D(600) 达到峰值 (5.59，图 6B)。吲哚乙酸产量达到峰值时培养温度较高，可能是因为参与吲哚乙酸合成的关键酶如色氨酸侧链氧化酶 (TMO)、氨基转移酶等在高温下活性较强，促进了吲哚乙酸的生产[27]。吲哚乙酸产量达到峰值时的培养温度和 D(600) 达到峰值时的培养温度并不一致，可能是因为主导吲哚乙酸合成的酶系和主导细胞增殖的酶系对培养温度的适应性不同。由于吲哚乙酸产量在 40 ℃ 时达到峰值，所以菌株 GA2022 的最适培养温度为 40 ℃。



不同小写字母表示不同培养条件下菌株GA2022的吲哚乙酸产量差异显著(P<0.05)。

图 6　不同 L-色氨酸质量浓度和培养温度菌株 GA2022 吲哚乙酸产量和菌浓度 [D(600)]

Figure 6　Indoleacetic acid production and D(600) of strain GA2022 with different L-tryptophan concentrations and temperature

2.5　不同来源吲哚乙酸产生菌性能对比

表 1 对比了不同来源的吲哚乙酸产生菌在最适条件下的吲哚乙酸产量。由表 1 可见：源自蚯蚓堆肥的菌株 GA2022 的吲哚乙酸产量高于其他常见来源的菌株 (根际土壤等)。菌株 GA2022 培养 36 h 后获得最大吲哚乙酸产量，优于菌株 TPK5b2 的 72 h 和 FP6 的 96 h，这可能与菌株 GA2022 同时存在 3 条吲哚乙酸代谢通路有关。同枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* A7 相比，菌株 GA2022 具有较好的耐高温及耐盐碱性能。菌株 A7 在高于 25 ℃ 的温度下，吲哚乙酸产量仅为 20 mg·L^{-1}，而菌株 GA2022 在 45 ℃ 时仍能保持产量在 75 mg·L^{-1} 以上；此外菌株 A7 仅在 pH 为 7 时展示出较好的吲哚乙酸生产能力，菌株 GA2022 在中性和弱碱条件下均具备较好的吲哚乙酸生产能力。

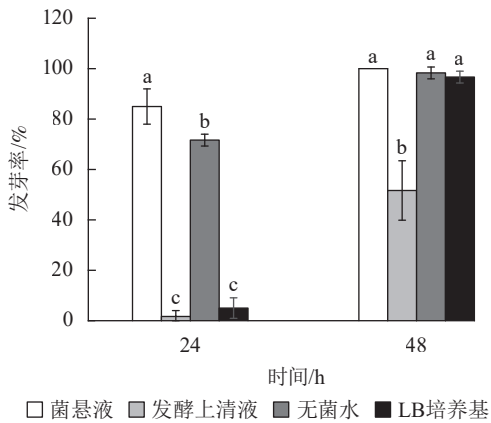
表 1　不同来源吲哚乙酸产生菌的产量

Table 1　Yield of indoleacetic acid-producing bacteria from different sources

编号	优化后吲哚乙酸产量/(mg·L^{-1})	菌属	来源	参考文献
TPK5b2	17.49		水稻*Oryza sativa*根际	[28]
CA2004	36.00		甜菊*Stevia rebaudiana*根际	[5]
A7	134.56	*Bacillus* sp.	阿尔及利亚农田	[29]
FP6	132.00	*Pseudomonas* sp.	蔬菜根际	[30]
GA2022	204.25	*Bacillus* sp.	蚯蚓堆肥	

2.6　菌株 GA2022 对小白菜种子萌发的影响

菌悬液处理组的小白菜种子，24 h 发芽率为 85.00%，显著高于其他 3 组 (P<0.05，图 7)。这表明菌株 GA2022 可能产生了促进小白菜种子萌发的生物活性物质，如吲哚乙酸等植物生长激素或其他有益代谢物；发酵上清液处理组的小白菜种子，48 h 发芽率仅为 51.67%，显著低于其他 3 组 (P<0.05，图 7)。结果表明：菌株 GA2022 对小白菜种子萌发具有显著促进作用，但其发酵上清液会抑制种子萌发，可能是因为菌株代谢产生的有害物质积累(如酚类化合物、挥发性脂肪酸等) 或过高的吲哚乙酸质量浓度[31]。



不同小写字母表示不同处理下小白菜种子萌发率差异显著(P<0.05)。

图 7　不同处理小白菜种子发芽率

Figure 7　Germination of *Brassica rapa* var. *chinensis* seeds in different treatments

3　结论

本研究筛选到 1 株源自蚯蚓堆肥的吲哚乙酸高

产芽孢杆菌 GA2022，该菌株在最适发酵条件下的吲哚乙酸产量可达 204.25 mg·L^{-1}；该菌株同时具备吲哚-3-乙酰胺途径、吲哚-3-丙酮酸途径以及吲哚乙醇途径 3 种吲哚乙酸合成途径，对小白菜种子的萌发具有显著促进作用。该菌株的吲哚乙酸产量显著高于其他源自根际土壤等常规环境菌的吲哚乙酸产量。该菌株扩充了菌肥用微生物的种质资源，在培养时间 36 h、接种量 2%(体积比)、氯化钠质量浓度为 20.0 g·L^{-1}、初始 pH 为 8、L-色氨酸质量浓度为 3.0 g·L^{-1}、培养温度为 40 ℃ 条件下显示出最佳的吲哚乙酸生产能力，吲哚乙酸产量较优化前提升 410.75%。

4 参考文献

[1] LUO Jie, ZHOU Jingjing, ZHANG Jinzhi. Aux/IAA gene family in plants: molecular structure, regulation, and function [J/OL]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, **19**(1): 259[2024-06-04]. DOI: 10.3390/ijms19010259.

[2] DONG Wei, LIU Hongyu, NING Zhoushen, *et al*. Inoculation with *Bacillus cereus* DW019 modulates growth, yield and rhizospheric microbial community of cherry tomato [J/OL]. *Agronomy*, 2023, **13**(6): 1458[2024-06-04]. DOI: 10.3390/agronomy13061458.

[3] ETESAMI H, ALIKHANI H A, HOSSEINI H M. Indole-3-acetic acid (IAA) production trait, a useful screening to select endophytic and rhizosphere competent bacteria for rice growth promoting agents [J]. *MethodsX*, 2015, **2**: 72−78.

[4] van DINH M, DO T Q, NGUYEN T T. Screening and identification of IAA-capable and cellulose-degrading bacteria with the potential for plant growth-promoting traits [J]. *Acta Agriculturae Slovenica*, 2024, **120**(2): 1−10.

[5] CHANDRA S, ASKARI K, KUMARI M. Optimization of indole acetic acid production by isolated bacteria from *Stevia rebaudiana* rhizosphere and its effects on plant growth [J]. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 2018, **16**(2): 581−586.

[6] CHAIHARN M, LUMYONG S. Screening and optimization of indole-3-acetic acid production and phosphate solubilization from *Rhizobacteria* aimed at improving plant growth [J]. *Current Microbiology*, 2011, **62**(1): 173−181.

[7] SHOKRI D, EMTIAZI G. Indole-3-acetic acid (IAA) production in symbiotic and non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria and its optimization by Taguchi design [J]. *Current Microbiology*, 2010, **61**(3): 217−225.

[8] WANG Fangli, WANG Xuexia, SONG Ningning. Biochar and vermicompost improve the soil properties and the yield and quality of cucumber (*Cucumis sativus* L.) grown in plastic shed soil continuously cropped for different years [J/OL]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2021, **315**: 107425[2024-06-04]. DOI: 10.1016/j.agee.2021.107425.

[9] 蔡琳琳, 李素艳, 龚小强, 等. 好氧堆肥-蚯蚓堆肥结合法处理绿化废弃物与牛粪[J]. 浙江农林大学学报, 2018, **35**(2): 261−267.
CAI Linlin, LI Suyan, GONG Xiaoqiang, *et al*. Composting-vermicomposting of green waste processing spiked with cow dung [J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2018, **35**(2): 261−267.

[10] GUARDADO-FIERROS B G, TUESTA-POPOLIZIO D A, LORENZO-SANTIAGO M A, *et al*. Comparative study between Salkowski reagent and chromatographic method for auxins quantification from bacterial production [J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, 2024, **15**: 1378079[2024-06-04]. DOI: 10.3389/fpls.2024.1378079.

[11] KAPLI P, YANG Ziheng, TELFORD M J. Phylogenetic tree building in the genomic age [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2020, **21**(7): 428−444.

[12] TSAVKELOVA E A, CHERDYNTSEVA T A, KLIMOVA S Y, *et al*. Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin [J]. *Archives of Microbiology*, 2007, **188**(6): 655−664.

[13] JIANG Huanhuan, QI Peishi, WANG Tong, *et al*. Role of halotolerant phosphate-solubilising bacteria on growth promotion of peanut (*Arachis hypogaea*) under saline soil [J]. *Annals of Applied Biology*, 2019, **174**(1): 20−30.

[14] LI Bei, ZHAO Yuling, LIU Changting, *et al*. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Future Microbiology*, 2014, **9**(9): 1071−1081.

[15] WHITMAN W B, RAINEY F, KäMPFER P, *et al. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* [M]. Hoboken: Wiley Online Library, 2015.

[16] LI Zhen, ZHENG Mengzhuo, ZHENG Jinshui, *et al. Bacillus* species in food fermentations: an underappreciated group of organisms for safe use in food fermentations [J/OL]. *Current Opinion in Food Science*, 2023, **50**: 101007[2024-04-05].

DOI: 10.1016/j.cofs.2023.101007.

[17] 司马晓娇, 郑炳松. 植物生长素原初响应基因 Aux/IAA 研究进展[J]. 浙江农林大学学报, 2015, **32**(2): 313−318. SIMA Xiaojiao, ZHENG Bingsong. Advances in primary auxin-responsive Aux/IAA gene family: a review [J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2015, **32**(2): 313−318.

[18] SATO A, SOENO K, KIKUCHI R, *et al*. Indole-3-pyruvic acid regulates TAA1 activity, which plays a key role in coordinating the two steps of auxin biosynthesis [J/OL]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, **119**(25): e2203633119[2024-04-05]. DOI: 10.1073/pnas.2203633119.

[19] FAN Yueqin, YU Kefei, ZHENG Huabao, *et al*. A high-yielding strain of indole-3-acetic acid isolated from food waste compost: metabolic pathways, optimization of fermentation conditions, and application [J]. *Environmental Technology*, 2023, **44**(27): 4199−4209.

[20] KELLER L, SURETTE M G. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, **4**(4): 249−258.

[21] CHORAZYCZEWSKI A M, HUANG I S, ABDULLA H, *et al*. The influence of bacteria on the growth, lipid production, and extracellular metabolite accumulation by *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) [J]. *Journal of Phycology*, 2021, **57**(3): 931−940.

[22] BREMER E, KRÄMER R. Responses of microorganisms to osmotic stress [J]. *Annual Review of Microbiology*, 2019, **73**(1): 313−334.

[23] GIULIODORI A M, GUALERZI C O, SOTO S, *et al*. Review on bacterial stress topics [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2007, **1113**(1): 95−104.

[24] ADAMBERG K, KASK S, LAHT T M, *et al*. The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, **85**(1/2): 171−183.

[25] YOUSEF N M H. Capability of Plant Growth-Promoting rhizobacteria (PGPR) for producing indole acetic acid (IAA) under extreme conditions [J]. *European Journal of Biological Research*, 2018, **8**(4): 174−182.

[26] AHMAD F, AHMAD I, KHAN M S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities [J]. *Microbiological Research*, 2008, **163**(2): 173−181.

[27] WAGI S, AHMED A. *Bacillus* spp. : potent microfactories of bacterial IAA [J/OL]. *PeerJ*, 2019, **7**: e7258[2024-06-04]. DOI: 10.7717/peerj.7258.

[28] WURYANTO S, ANTONIUS S, MANGUNWARDOYO W. Production of Indole-3-acetic acid (IAA) by isolate bacteria of TPK5b2: various of pH medium conditions [C]// SUPARMI A, NUGRAHA D A. *International Conference on Science and Applied Science* (*ICSAS*) 2018. Surakarta: [s.n.], 2018.

[29] BESSAI S A, BENSIDHOUM L, NABTI E H. Optimization of IAA production by telluric bacteria isolated from northern Algeria [J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2022, **41**: 102319[2024-06-04]. DOI: 10.1016/j.bcab.2022.102319.

[30] SASIREKHA B, SHIVAKUMAR S. Statistical optimization for improved indole-3-acetic acid (IAA) production by *Pseudomonas aeruginosa* and demonstration of enhanced plant growth promotion [J]. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 2012, **12**(4): 863−873.

[31] PENG Chenyin, WU Yu, SHI Fenghou, *et al*. Review of the current research progress of seed germination inhibitors [J/OL]. *Horticulturae*, 2023, **9**(4): 462[2024-06-04]. DOI: 10.3390/horticulturae9040462.