

篩選具促進葉菜類作物生長微生物及其抗逆境初步評估¹

張世杰²、郭建志^{2*}

摘 要

為緩解極端氣候對農作物生長所造成之影響，除了研發耐候農作物品種外，應用有益微生物調適作物抵抗環境逆境，可提供農友另一新選擇。本研究由土壤中採集分離出 80 株菌株，分別進行 IAA 生合成、ACC deaminase 活性、固氮活性、嵌鐵蛋白活性、溶磷能力及 5 種分解酵素活性測定，以篩選具耐候潛力之微生物菌株。本研究初步篩選出 7 株具有耐候潛力之微生物菌株，可產生 IAA 之 TC2-10 及 TC2-11 菌株及具固氮活性之 TC2-12 及 TC_LDR17 皆可促進葉菜類作物(半結球萵苣、不結球萵苣、不結球白菜、青梗白菜、莧菜及蕹菜) 之生長，其中 TC2-10 及 TC2-11 菌株施用最高可增加 38%葉片數、37%株高及 134%地上部重量，而 TC2-12 及 TC_LDR17 菌株可促進結球白菜之生長(最高可增加 41%株高及 88%地上部重量)；TC_LDR14 及 TC_LTF4 菌株可提高不結球白菜在淹水環境下之生長(最高可增加 25%株高及 34%地上部重量)，而 TCSF7-6 菌株具促進葉菜類作物生長及提高作物耐淹水逆境之能力，並可提高不結球白菜幼苗之發育(增加 25%株高及 79%地上部重量) 及植株在淹水環境下之生長(增加 15%株高及 17%地上部重量)，且對半結球萵苣、不結球萵苣、不結球白菜、青梗白菜、莧菜及蕹菜等 6 種作物皆有促進生長之能力(最高可增加 35%葉片數、27%株高及 98%地上部重量)。經評估本研究分離所得之 7 株微生物菌株皆具有開發為功能性微生物製劑之潛力，後續將進行培養條件之改良，以提升其促進作物生長及幫助植物耐淹水之能力。

關鍵字：耐候微生物、肥效、耐淹水、功能性微生物製劑

前 言

聯合國 The Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC)分析全球溫度上升趨勢，提出全球氣溫較工業化前上升 1.5°C 已成趨勢，全球氣候變遷已成不可逆之狀態，極端天氣與日漸衰敗的自然環境成為本世紀人類最大之課題(IPCC, 2023)。臺灣四面環海，地處亞熱帶與熱帶之間，全年降

¹ 農業部臺中區農業改良場研究報告第 1076 號。

² 農業部臺中區農業改良場計畫助理、副研究員。

*通訊作者：郭建志，電子郵件 kuocc@tcdares.gov.tw

雨不均，氣溫炎熱，加之近年來聖嬰現象加劇，使得乾溼季更加明顯，而極端高溫及強降雨導致農業生產遭受極大挑戰，氣候變遷儼然已成為農業生產重要限制因子，環境逆境問題亦成為農業栽種必須面臨之困境。

促進植物生長之根棲細菌(plant growth-promoting rhizobacteria，簡稱 PGPR) 已普遍用於多種作物栽培(Gray & Smith, 2005)，其主要目的為促進植物生長及幫助植物抵抗病蟲害與逆境，提升農作物產量，影響模式可分為直接及間接 2 種(Compant *et al.*, 2005; Gray & Smith, 2005; Glick, 2012; Ahemad & Kibret, 2014; Gouda *et al.*, 2018)，直接模式包括：(1) 產生或調節植物激素，如生長素(Spaepen *et al.*, 2007)、細胞分裂素(De Garcia Salamone *et al.*, 2005)、乙烯(Glick *et al.*, 2007)、激勃素(Kang *et al.*, 2008) 及離層酸(Shi *et al.*, 2017) 等；(2) 增加環境中養分的使用，如共生或非共生固氮作用(Bashan & Levanony, 1990; Rosbrook & Reddell, 1995; Ma *et al.*, 2003; Shridhar, 2012)、產生嵌鐵蛋白(Kloepper *et al.*, 1980a)、溶解礦物磷酸鹽(Oteino *et al.*, 2015) 和其他營養物質(Liu *et al.*, 2012; Setiawati & Mutmainnah, 2016) 等；(3) 分解碳氫化合物污染物及重金屬等物質(Burd *et al.*, 2000; Belimov *et al.*, 2005; Reed *et al.*, 2005; Braud *et al.*, 2006)；(4) 幫助植物耐受生物或非生物逆境(Siddikee *et al.*, 2011; Ngumbi & Kloepper, 2016; Ravanbakhsh *et al.*, 2017)。間接模式包括：(1) 產生抗生物質，如抗生素(Raaijmakers *et al.*, 2002; Beneduzi *et al.*, 2012)、分解酵素(Kamensky *et al.*, 2003; Islam *et al.*, 2016)、毒素(Prieto-Samsónov *et al.*, 1997) 或複合性揮發物質(Santoro *et al.*, 2016) 等抑制植物病原微生物或害蟲的生長；(2) 與植物病原微生物競爭養分或生長區位(Kloepper *et al.*, 1980b)；(3) 誘導系統性抗病性的產生(Van Loon *et al.*, 1998; Beneduzi *et al.*, 2012)；(4) 分解病原微生物所分泌之毒素或致病因子(Toyoda *et al.*, 1988; Zhang & Birch, 1996)。以往 PGPR 多著眼於其抗病蟲害能力及肥效，近年來隨氣候變遷議題日漸重要，其於幫助植物抵抗逆境能力的重要性亦趨顯著(Gul *et al.*, 2023)。

為緩解極端氣候對農作物生長所造成之影響，本研究自採集來之土壤分離具耐候潛力之微生物菌株，分別進行 IAA 生合成、ACC deaminase 活性、固氮能力、嵌鐵蛋白活性及溶磷能力分析，篩選可促進葉菜類作物生長且可增進作物抵抗淹水逆境能力之微生物。

材料與方法

一、具耐候潛力微生物菌株之篩選

本研究微生物菌株係自南投縣信義鄉及臺東縣蘭嶼鄉採集土壤及空白處理進行比較，將每批樣本均勻混拌後，取 10 g 土壤樣本加入 90 ml 無菌水中，混合攪拌後置於室溫下 30 min，後續取 1 ml 土壤稀釋液加入 9 ml 無菌水中，依序列稀釋至 10^{-4} 次方，最後自 10^{-4} 次方取樣 100 μ l，均勻塗抹於 nutrient agar (NA) 培養基(Difco)上，於 30°C 定溫箱中、無光照環境下培養 3 天，共分離出 80 株菌株並進行純化培養及保存於 -30°C 甘油保存管中，所得菌株供後續實驗用。

二、具耐候潛力微生物菌株之分子鑑定

將供試菌株自-30℃甘油保存管中，以劃線培養於 NA 培養基上，於 30℃、無光照環境下經 2 次繼代培養後，挑取單一菌落置於 5 ml 之 Luria-Bertani (LB) 培養基(Difco)中，於 30℃、無光照環境下，以 150 rpm 轉速震盪培養 24 hr 後，利用 Tissue & cell Genomic DNA Purification Kit (GeneMark, Taiwan) 抽取其核酸 DNA。參考 Weisburg *et al.*(1991)之實驗流程進行，方法如下：將供試菌株之 DNA 利用引子對 fD1 (5'- CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3') / rD1(5'- CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC -3') 於 SensoQuest LbCycler 96 (SensoQuest GmbH, Germany)中進行 PCR 增幅，反應條件為：樣品總體積為 20 μ l，內含 DNA 模版、1X PCR Hot-Start Master Mix II (GeneMark, Taiwan)、250 nM 引子對及無菌水，混合後先以 95℃反應 10 min，接著依序以 95℃反應 30 sec、55℃反應 40 sec 及 72℃反應 2 min，上述 3 步驟共重覆 30 個循環，最後以 72℃反應 10 min，增幅所得之核酸片段以 0.5 X TAE buffer 製備之 1%瓊脂凝膠於 Mini pro150V power supply (Major Science Co., Ltd., Taiwan) 以 100 V 的電壓進行電泳分析，並利用 Bioman 100 bp DNA Ladder (Bioman Scientific Co., Ltd., Taiwan) 標註分子大小，膠體經 SafeView DNA stain (GeneMark, Taiwan) 染色後，以 E-BOX CX5 Edge Gel Documentation Imaging (Vilber Lourmat Co., Ltd., France) 記錄及影像分析，確認目標核酸片段後委由源資國際生物科技公司 (Tri-I Biotech, Taiwan) 以引子對 fD1/rD1 利用核酸自動定序儀(ABI 3730 DNA Analyzer)進行定序，所得核酸序列送至 National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)，以 BLAST 2.0 (Tatusova & Madden, 1999)之程式進行網路基因庫之查詢與比對。

三、3-indoleacetic acid (IAA)生合成活性分析測試

試驗參考 Chen *et al.*(2010)之步驟進行，將供試菌株利用移殖環接種於含 1 mg/ml tryptophan 之 nutrient broth 液態培養基中，於 30℃、無光照環境下，以 150 rpm 轉速震盪培養 24 hr 後，以 8,000xg 離心 15 min，取 1 ml 上清液加入 4 ml 之 Salkowski reagent (57% (w/v) H₂SO₄, 9 mM FeCl₃•7H₂O)，混合均勻後於室溫暗室中反應 30 min，並分析 540 nm 之吸光值，對照組為 1 ml 未接菌培養基加 4 ml 之 Salkowski reagent，每菌株 3 重覆；另以 IAA 配製 0 mg/l、20 mg/l、40 mg/l、60 mg/l、80 mg/l 及 100 mg/l 之 IAA 溶液，並製作標準曲線以轉換 540 nm 吸光值為 IAA 濃度。

四、1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase 活性分析測試

試驗參考 Li *et al.*(2011)之步驟進行，將供試菌株利用移殖環接種於 LB 培養基中，置於 30℃、無光照環境下，以 150 rpm 轉速震盪培養 24 hr 後，取 2 ml 菌液以 10,000xg 離心後收集沉澱物，並以 1 ml 之 DF 培養基(Gupta & Pandey, 2019)清洗 2 次後，以 2 ml 含 3 mmol l⁻¹ ACC 之 DF 培養基懸浮後置於 30℃、無光照環境下，以 150 rpm 轉速震盪培養 24 hr，取 1 ml 菌液以 10,000xg 離心後，吸取 100 μ l 上清液以 DF 培養基 10 倍稀釋，取 60 μ l 稀釋液至 96 孔盤中，再加入 120 μ l 之 ninhydrin 溶液 (0.42% (w/v) ninhydrin, 0.0125% (w/v) ascorbate, 50% (v/v) ethylene glycol, 0.5 M citrate buffer,

pH 6.0)，至於沸水上煮 30 min 後，待液溫冷卻至室溫，觀察反應液之顏色變化，反應液之顏色由深紫色轉為淡褐色者即具 ACC deaminase 活性，每菌株 3 重覆。

五、固氮活性分析測試

將供試菌株利用移殖環接種於 modified Jensen's medium (Sulistiyana & Meliaha, 2017) 上，於 30°C、無光照環境下培養 5 天後，觀察菌落周圍培養基的顏色變化情形，若由綠色轉為藍色則為正反應，每菌株 3 重覆；此外，將供試菌株之 DNA 以引子對 *nif*H^F (5'- GGCAAGGGCGGTATCGGCAA GTC -3') / *nif*H^R (5'- CCATCGTGATCGGGTCGGGATG -3') 針對 *nif*H 基因進行 PCR 增幅，反應條件為：樣品總體積為 20 µl，內含 DNA 模版、1X PCR Hot-Start Master Mix II、250 nM 引子對及無菌水，先以 95°C 反應 10 min，接著依序以 94°C 反應 60 sec、57°C 反應 60 sec 及 72°C 反應 60 sec，上述 3 步驟共重覆 30 個循環，最後以 72°C 反應 10 min；增幅所得之核酸片段以 0.5 X TAE buffer 製備之 1.5%瓊脂凝膠進行電泳分析，觀察是否產生 270 bp 之條帶。

六、嵌鐵蛋白(siderophore)活性分析測試

將供試菌株利用移殖環接種於 CASA 培養基(Schwyn & Neilands, 1987)上，於 30°C、無光照環境下培養 5 天後，具嵌鐵蛋白活性之菌株可於菌落周圍產生黃色暈環，分別測量菌落周圍黃色暈環之直徑及菌落直徑，計算相對擴散值(relative diffusion, Rd)， $Rd = (\text{菌落周圍黃色暈環之直徑} - \text{菌落之直徑}) / \text{菌落之直徑}$ ，每菌株 3 重覆。

七、溶磷活性分析測試

將供試菌株利用移殖環接種於 modified NBRIP 培養基(Nautiyal, 1999)上，於 30°C、無光照環境下培養 7 天後，具溶磷活性之菌株可於菌落周圍產生透化情形，分別測量透化圈之直徑及菌落直徑，計算相對透化值(relative clearance, Rc)， $Rc = (\text{菌落周圍透化圈之直徑} - \text{菌落之直徑}) / \text{菌落之直徑}$ ，每菌株 3 重覆。

八、分解酵素能力分析測定

配製測試澱粉分解酵素(Cheng & Yang, 1995)、蛋白質分解酵素(Sacherer *et al.*, 1994)、纖維素分解酵素(Magnelli *et al.*, 1997)、幾丁質分解酵素(De Boer *et al.*, 1998) 及脂肪分解酵素(Suzuki *et al.*, 2001) 之培養基，將供試菌株利用移殖環接種於上述各培養基上，於 0°C、無光照環境下，依照測試條件，蛋白質分解酵素測試培養 5 天，而脂肪分解酵素及幾丁質分解酵素測試培養 7 天後，分別測量分解作用圈之直徑及菌落直徑；澱粉分解酵素測試培養 5 天後，滴入 2 ml 之 0.3%碘液染劑，靜置 5 min 後分別測量分解作用圈之直徑及菌落直徑；纖維素分解酵素測試培養 5 天後，滴入 5 ml 之 0.1%剛果紅染劑，靜置 5 min 後以 1 M 之 NaCl 溶液洗去未結合之剛果紅染劑，最後分別測量分解作用圈之直徑及菌落直徑。上述測試每菌株 3 重覆且計算相對透化值(relative clearance, Rc)。

九、具耐候潛力微生物菌株促進蔬菜生長試驗及耐淹水逆境試驗

(一)微生物菌株促進不結球白菜幼苗發育試驗

將具 IAA 生合成能力之 TC2-10、TC2-11、TC_LDR14、TC_LTF4 及 TCSF7-6 等 5 株菌株利用移殖環接種於 LB 培養基中，置於 30℃、無光照環境下，以 150 rpm 轉速震盪培養 48 hr 後收集備用。將不結球白菜種子播種於穴盤後開始澆灌上述 5 株菌株所製備之 100 倍稀釋液，每株植物澆灌 10ml，每處理 3 重覆，每重覆 20 株，對照組則是以水澆灌處理，每隔 7 天澆灌 1 次，共澆灌 3 次，期間分別調查發芽率(播種後 7 天)、株高(播種後 7 天、14 天與 21 天)、存活率(播種後 21 天) 及地上部重量(播種後 21 天)。

(二)微生物菌株促進葉菜類作物生長試驗

將具 IAA 生合成能力之 TC2-10、TC2-11、TC_LDR14、TC_LTF4 及 TCSF7-6 等 5 株菌株利用移殖環接種於 LB 培養基中，置於 30℃、無光照環境下，以 150 rpm 轉速震盪培養 48 hr 後收集備用。本試驗之作物為半結球萵苣、不結球萵苣、不結球白菜、青梗白菜、莧菜及蕹菜等 6 種作物，於幼苗移盆後 7 天開始澆灌上述 5 株菌株所製備之 100 倍稀釋液，每株植物澆灌 100ml，每處理 3 重覆，每重覆 5 株，對照組則是以水澆灌處理，每隔 7 天澆灌 1 次，共澆灌 3 次，待第 3 次澆灌 7 天後分別調查葉片數、株高及地上部植株重量。

(三)微生物菌株促進不結球白菜耐淹水逆境試驗

將 TC_LDR14、TC_LTF4 及 TCSF7-6 等 3 株菌株利用移殖環接種於 LB 培養基中，置於 30℃、無光照環境下，以 150 rpm 轉速震盪培養 48 hr 後收集備用。本試驗之作物為不結球白菜，於幼苗移盆後 7 天開始澆灌上述 3 株菌株所製備之 100 倍稀釋液，每株植物澆灌 100ml，每處理 3 重覆，每重覆 9 株，對照組則是以水澆灌處理，每隔 7 天澆灌 1 次，共澆灌 3 次，於第 3 次澆灌 7 天後淹水 3 天，水面需高過生長點，待放水後 7 天分別調查葉片數、株高及地上部植株重量。

(四)具固氮能力微生物菌株促進結球白菜生長試驗

將具固氮能力之 TC2-12 及 TC_LDR17 菌株利用移殖環接種於 LB 培養基中，置於 30℃、無光照環境下，以 150 rpm 轉速震盪培養 48 hr 後收集備用。本試驗之作物為結球白菜，於幼苗移盆後 7 天開始澆灌上述 2 株菌株所製備之 10 倍、50 倍及 100 倍稀釋液，每株植物澆灌 100ml，每處理 3 重覆，每重覆 5 株，對照組則是以水澆灌處理，每隔 7 天澆灌 1 次，共澆灌 3 次，待第 3 次澆灌 7 天後分別調查葉片數、株高及地上部植株重量。

十、統計分析

實驗數據利用 SPSS12.0 軟體進行 one-way ANOVA analysis，利用 least significant difference (LSD) test 進行數據比較，統計上以 $p < 0.05$ 為具顯著差異。

結 果

一、具耐候潛力微生物菌株之篩選與鑑定

本試驗從土壤中分離出 80 株菌株，分別進行 IAA 生合成活性、ACC deaminase 活性及固氮活性等測試，篩選出 7 株具耐候潛力菌株，分別為 TC2-10、TC2-11、TC2-12、TC_LDR14、TC_LDR17、TC_LTF4 及 TCSF7-6 (表一)。其中 6 株具 IAA 生合成活性，分別為 TC2-10 (19.38 ± 2.36 mg/L)、TC2-11 (17.05 ± 1.32 mg/L)、TC2-12 (1.55 ± 0.32 mg/L)、TC_LDR14 (48.64 ± 3.51 mg/L)、TC_LTF4 (53.00 ± 0.48 mg/L) 及 TCSF7-6 (5.33 ± 0.46 mg/L)；4 株具 ACC deaminase 活性，可使反應液之顏色由深紫色轉為淡褐色，分別為 TC_LDR14、TC_LDR17、TC_LTF4 及 TCSF7-6；2 株具固氮活性，可使菌落周圍培養基之顏色由綠色轉為藍色，且可增幅出 270 bp 之 *nifH* 片段，分別為 TC2-12 及 TC_LDR17(表二)。以 16S rDNA 核酸片段鑑定其分類地位，鑑定結果為 TC2-10 及 TC2-11 為 *Gottfriedia luciferensis*、TC2-12 為 *Massilia* sp.、TC_LDR14 及 TC_LTF4 為 *Brevibacterium iodinum*、TC_LDR17 為 *Achromobacter xylosoxidans*、TCSF7-6 為 *Streptomyces thermoviolaceus* (表一)。

表一、本研究使用之微生物菌株及 16S rDNA 基因序列鑑定結果

Table 1. Strains used in this study and the results of 16S rDNA sequences analysis

Strains	Sources	16S rDNA	
		Identification	Identity(%)
TC2-10	Soil sample from Xinyi	<i>Gottfriedia luciferensis</i>	99.79
TC2-11	Soil sample from Xinyi	<i>Gottfriedia luciferensis</i>	99.79
TC2-12	Soil sample from Xinyi	<i>Massilia</i> sp.	99.93
TC_LDR14	Soil sample from Lanyu	<i>Brevibacterium iodinum</i>	99.58
TC_LDR17	Soil sample from Lanyu	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	99.86
TC_LTF4	Soil sample from Lanyu	<i>Brevibacterium iodinum</i>	99.24
TCSF7-6	Fertilizer sample	<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	97.82

表二、7 株具耐候潛力菌株之 IAA 生合成、ACC deaminase、固氮活性、嵌鐵蛋白活性及溶磷活性分析

Table 2. 3-Indoleacetic acid (IAA) production, ACC deaminase, nitrogen fixing activity, siderophore production and phosphate solubilization of seven strains with potential for stress tolerance

Strain	IAA production (mg/L)	ACC deaminase	Nitrogen fixing	Siderophore production	Phosphate solubilization
TC2-10	19.38 c ¹	— ²	—	0.68 c	0
TC2-11	17.05 c	—	—	0.71 c	0
TC2-12	1.55 e	—	+	0.18 e	0
TC_LDR14	48.64 b	+	—	0.44 cd	0
TC_LDR17	0	+	+	2.31 b	0.75
TC_LTF4	53.00 a	+	—	0.57 c	0
TCSF7-6	5.33 d	+	—	5.31 a	0

¹ Statistical analysis by LSD ($p < 0.05$) was applied to compare the column followed by the same letter.

² +, positive for ACC deaminase or nitrogen fixing, —, negative for ACC deaminase or nitrogen fixing.

二、嵌鐵蛋白活性分析測試

將具耐候潛力之 7 株菌株以 CASA 培養基測試嵌鐵蛋白活性，具嵌鐵蛋白活性之菌株可於菌落周圍產生黃色暈環；結果顯示，6 株菌株皆具嵌鐵蛋白活性，Rd 值範圍為 0.44-5.31，其中以 TCSF7-6 活性最佳，Rd 值為 5.31(表二)。

三、溶磷活性分析測試

將具耐候潛力之 7 株菌株以 modified NBRIP 培養基測試溶磷活性，具溶磷活性之菌株可於菌落周圍產生透化圈；結果顯示，僅 TC_LDR17 具溶磷活性，Rc 值為 0.75(表二)。

四、分解酵素能力分析測定

將具耐候潛力之 7 株菌株分別進行澱粉、蛋白質、纖維素、幾丁質及脂肪分解酵素能力測試，經培養適當天數後觀察透化情形。結果顯示，澱粉分解酵素之活性以 TC2-12 最高，Rc 值為 2.58；蛋白質分解酵素之活性以 TC2-12 最高，Rc 值為 0.83；僅 TCSF7-6 具纖維素分解酵素，Rc 值為 3.31；脂肪分解酵素之活性以 TC2-10 最高，Rc 值為 3.07；供試 6 株菌株皆不具幾丁質分解酵素(表三)。

表三、7 株具耐候潛力菌株之 5 種分解酵素之分解能力分析

Table 3. The degradation activity of 5 enzymes of 7 strains with potential for stress-tolerance

Strains	Relative clearance ¹				
	Amylase	Protease	Cellulase	Chitinase	Lipase
TC2-10	0.40 c ²	— ³	—	—	3.07 a
TC2-11	0.36 c	—	—	—	2.98 a
TC2-12	2.58 a	0.83 a	—	—	0.66 b
TC_LDR14	—	—	—	—	—
TC_LDR17	—	—	—	—	—
TC_LTF4	—	—	—	—	—
TCSF7-6	1.23 b	0.29 b	3.31 a	—	—

¹ Relative clearance = (Diameter of hydrolysis zone – diameter of colony) / diameter of colony.

² Statistical analysis by LSD ($p < 0.05$) was applied to compare the column followed by the same letter.

³ Indicated no hydrolysis zone production.

五、具耐候潛力微生物菌株促進蔬菜生長試驗及耐淹水逆境試驗

(一)微生物菌株促進不結球白菜幼苗發育試驗

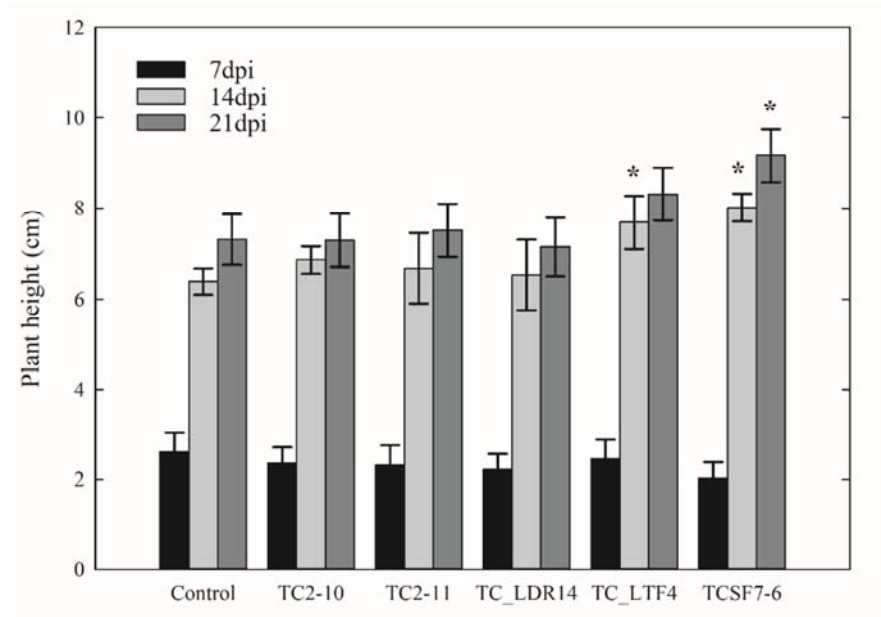
應用具 IAA 生合成能力之 TC2-10、TC2-11、TC_LDR14、TC_LTF4 及 TCSF7-6 等 5 株菌株所製備之微生物製劑分別處理不結球白菜種子，於播種後開始澆灌微生物製劑，每週澆灌 1 次，共 3 次，並於處理期間調查發芽率(播種後 7 天)、株高(播種後 7 天、14 天與 21 天)、存活率(播種後 21 天)及地上部重量(播種後 21 天)，結果顯示，各處理組於發芽率及存活率相較對照組皆無顯著差異，僅 TCSF7-6 於株高及地上部植株重量相較對照組顯著增長，處理於 21 天分別為 9.08 cm 及 0.61 g，相較對照組分別增加 25%及 79% (表四、圖一)。

表四、5 株具 IAA 生合成能力菌株處理不結球白菜之幼苗發育試驗結果

Table 4. Results of 5 strains with IAA production activity treatment on bok choy in seedling growth experiment

Treatments	Seed germination (%)	Seedling survival (%)	Weight of above-ground (g)
Control	97 a ¹	100 a	0.34 c
TC2-10	100 a	100 a	0.38 bc
TC2-11	100 a	98 a	0.39 bc
TC_LDR14	98 a	100 a	0.36 bc
TC_LTF4	100 a	100 a	0.46 b
TCSF7-6	100 a	100 a	0.61 a

¹ Statistical analysis by LSD ($p < 0.05$) was applied to compare the column followed by the same letter.



圖一、5株具IAA生成能力菌株處理不結球白菜之幼苗發育試驗。於播種後開始澆灌微生物製劑，每週澆灌1次，共3次，並於處理期間每隔7天調查株高之結果。

Fig. 1. Results of 5 strains with IAA production activity treatment on bok choy in seedling growth experiment. The microbial agents inoculated after sowing by once a week for a total of 3 times, and the plant height was recorded at 7-day intervals post inoculation (dpi). The values represent the mean of three replications and error bars represent standard deviation. Statistical analysis by LSD ($p < 0.05$) was applied to compare the plant height between the treatments at the same dpi.

(二)微生物菌株促進葉菜類作物生長試驗

應用具 IAA 生合成能力之 TC2-10、TC2-11、TC_LDR14、TC_LTF4 及 TCSF7-6 等 5 株菌株所製備之微生物製劑分別處理半結球萵苣、不結球萵苣、不結球白菜、青梗白菜、莧菜及薺菜等 6 種作物盆栽試驗，經 3 次澆灌後，分別調查葉片數、株高及地上部植株重量，結果顯示，TC2-10、TC2-11 及 TCSF7-6 等 3 處理於 6 種葉菜盆栽試驗中可促進生長，詳述如下：(1) 半結球萵苣：TC2-10、TC2-11 及 TCSF7-6 處理之葉片數及地上部植株重量相較對照組具有顯著差異，以 TC2-10 處理分別為 13.67 片葉及 20.60 g，相較對照組分別增加 12%及 52%、TC2-11 處理分別為 14.11 片葉及 18.71 g，相較對照組分別增加 15%及 38%、TCSF7-6 處理分別為 13.56 片葉及 18.23 g，相較對照組分別增加 11%及 35% (表五)。

表五、5 株具 IAA 生合成能力菌株處理半結球萵苣之盆栽試驗結果

Table 5. Results of 5 strains with IAA production activity treatment on Fushan lettuce in pot experiment

Treatments	No. of leaves	Plant height (cm)	Weight of above-ground (g)
Control	12.22 b ¹	11.48 a	13.54 b
TC2-10	13.67 a	12.06 a	20.60 a
TC2-11	14.11 a	11.46 a	18.71 a
TC_LDR14	12.44 b	11.13 a	13.87 b
TC_LTF4	12.11 b	10.21 b	12.15 b
TCSF7-6	13.56 a	11.12 a	18.23 a

¹ Statistical analysis by LSD ($p < 0.05$) was applied to compare the column followed by the same letter.

(2)不結球萵苣：TC2-10、TC2-11、TC_LDR14、TC_LTF4 及 TCSF7-6 處理之葉片數、株高及地上部植株重量相較對照組具有顯著差異，以 TC2-11 處理較佳，分別為 9.11 片葉、27.13 cm 及 11.56 g，相較對照組分別增加 14%、37%及 134% (表六)。

表六、5 株具 IAA 生合成能力菌株處理不結球萵苣之盆栽試驗結果

Table 6. Results of 5 strains with IAA production activity treatment on lettuce in pot experiment

Treatments	No. of leaves	Plant height (cm)	Weight of above-ground (g)
Control	8.00 b ¹	19.86 b	4.94 c
TC2-10	9.00 a	27.03 a	9.28 ab
TC2-11	9.11 a	27.13 a	11.56 a
TC_LDR14	8.78 a	26.50 a	9.80 b
TC_LTF4	8.78 a	26.11 a	8.77 b
TCSF7-6	8.56 a	25.19 a	8.45 b

¹ Statistical analysis by LSD ($p < 0.05$) was applied to compare the column followed by the same letter.

(3)不結球白菜：TC2-10、TC2-11 及 TCSF7-6 處理之葉片數、株高及地上部植株重量相較對照組具有顯著差異，以 TC2-10 處理分別為 9.44 片葉、12.28 cm 及 9.22 g，相較對照組分別增加 16%、16%及 52%、TC2-11 處理分別為 9.39 片葉、11.18 cm 及 9.70 g，相較對照組分別增加 16%、5%及 60%、TCSF7-6 處理分別為 9.40 片葉、12.08 cm 及 9.32 g，相較對照組分別增加 16%、14%及 53% (表七)。

表七、5 株具 IAA 生合成能力菌株處理不結球白菜之盆栽試驗結果

Table 7. Results of 5 strains with IAA production activity treatment on bok choy in pot experiment

Treatments	No. of leaves	Plant height (cm)	Weight of above-ground (g)
Control	8.11 b ¹	10.62 b	6.08 c
TC2-10	9.44 a	12.28 a	9.22 a
TC2-11	9.39 a	11.18 ab	9.70 a
TC_LDR14	8.11 b	11.15 ab	6.92 b
TC_LTF4	9.11 a	10.97 b	8.08 ab
TCSF7-6	9.40 a	12.08 a	9.32 a

¹ Statistical analysis by LSD ($p < 0.05$) was applied to compare the column followed by the same letter.

(4)青梗白菜：TC2-10、TC2-11 及 TCSF7-6 處理之葉片數、株高及地上部植株重量相較對照組具有顯著差異，以 TC2-10 處理分別為 7.44 片葉、12.59cm 及 10.21g，相較對照組分別增加 10%、13%及 74%、TC2-11 處理分別為 7.00 片葉、12.44 cm 及 8.32 g，相較對照組分別增加 3%、11%及 42%、TCSF7-6 處理分別為 7.44 片葉、12.44 cm 及 9.12 g，相較對照組分別增加 10%、11%及 56% (表八)。

表八、5 株具 IAA 生合成能力菌株處理青梗白菜之盆栽試驗結果

Table 8. Results of 5 strains with IAA production activity treatment on spoon cabbage in pot experiment

Treatments	No. of leaves	Plant height (cm)	Weight of above-ground (g)
Control	6.78 b ¹	11.19 b	5.86 d
TC2-10	7.44 a	12.59 a	10.21 a
TC2-11	7.00 a	12.44 a	8.32 b
TC_LDR14	7.11 a	11.73 ab	7.52 bc
TC_LTF4	6.67 b	11.21 b	6.51 c
TCSF7-6	7.44 a	12.44 a	9.12 ab

¹ Statistical analysis by LSD ($p < 0.05$) was applied to compare the column followed by the same letter.

(5)莧菜：TC2-10、TC2-11 及 TCSF7-6 處理之葉片數、株高及地上部植株重量相較對照組具有顯著差異，以 TC2-10 處理分別為 9.07 片葉、8.13 cm 及 0.95 g，相較對照組分別增加 34%、19%及 102%、TC2-11 處理分別為 9.31 片葉、8.86 cm 及 1.03 g，相較對照組分別增加 38%、30%及 119%、TCSF7-6 處理分別為 9.11 片葉、8.07 cm 及 0.93 g，相較對照組分別增加 35%、18%及 98% (表九)。

表九、5 株具 IAA 生合成能力菌株處理莧菜之盆栽試驗結果

Table 9. Results of 5 strains with IAA production activity treatment on amaranth in pot experiment

Treatments	No. of leaves	Plant height (cm)	Weight of above-ground (g)
Control	6.76 c ¹	6.82 c	0.47 c
TC2-10	9.07 a	8.13 a	0.95 a
TC2-11	9.31 a	8.86 a	1.03 a
TC_LDR14	8.27 b	7.87 ab	0.82 b
TC_LTF4	8.13 b	7.37 b	0.71 b
TCSF7-6	9.11 a	8.07 a	0.93 a

¹ Statistical analysis by LSD ($p < 0.05$) was applied to compare the column followed by the same letter.

(6)蕓菜：TC2-10、TC2-11 及 TCSF7-6 處理之株高及地上部植株重量相較對照組具有顯著差異，以 TC2-10 處理分別為 26.56 cm 及 2.77 g，相較對照組分別增加 10%及 25%、TC2-11 處理分別為 27.16 cm 及 2.84 g，相較對照組分別增加 13%及 28%、TCSF7-6 處理分別為 26.35 cm 及 2.65 g，相較對照組分別增加 9%及 19% (表十)。

表十、5 株具 IAA 生合成能力菌株處理薺菜之盆栽試驗結果

Table 10. Results of 5 strains with IAA production activity treatment on water spinach in pot experiment

Treatments	No. of leaves	Plant height (cm)	Weight of above-ground (g)
Control	7.22 a ¹	24.09 b	2.22 b
TC2-10	7.48 a	26.56 a	2.77 a
TC2-11	7.04 a	27.16 a	2.84 a
TC_LDR14	6.85 a	23.13 b	2.04 c
TC_LTF4	6.96 a	23.71 b	2.24 b
TCSF7-6	7.14 a	26.35 a	2.65a

¹ Statistical analysis by LSD ($p < 0.05$) was applied to compare the column followed by the same letter.

(三)微生物菌株促進植物耐淹水逆境試驗

應用 TC_LDR14、TC_LTF4 及 TCSF7-6 等 3 株菌株所製備之微生物製劑分別處理不結球白菜盆栽試驗，經 3 次澆灌並淹水 3 天後，分別調查葉片數、株高及地上部植株重量，結果顯示，TC_LDR14、TC_LTF4 及 TCSF7-6 處理之株高及地上部植株重量相較對照組皆有顯著差異，以 TC_LDR14 處理分別為 24.54 cm 及 27.21 g，相較對照組分別增加 17%及 18%、以 TC_LTF4 處理分別為 26.11 cm 及 30.85 g，相較對照組分別增加 25%及 34%、以 TCSF7-6 處理分別為 24.01 cm 及 27.07 g，相較對照組分別增加 15%及 17% (表十一)。

表十一、5 株菌株微生物製劑處理不結球白菜之盆栽淹水試驗結果

Table 11. Results of 5 microbial strains treatment on bok choy in pot flooding experiment

Treatments	No. of leaves	Plant height (cm)	Weight of above-ground (g)
Control	9.70 a ¹	20.92 b	23.05 c
TC_LDR14	9.93 a	24.54 a	27.21 b
TC_LTF4	10.48 a	26.11 a	30.85 a
TCSF7-6	9.67 a	24.01 a	27.07b

¹ Statistical analysis by LSD ($p < 0.05$) was applied to compare the column followed by the same letter.

(四)具固氮能力微生物菌株促進結球白菜生長試驗

應用具固氮能力之 TC2-12 及 TC_LDR17 菌株所製備之微生物製劑處理結球白菜盆栽試驗，經 3 次澆灌後，分別調查葉片數、株高及地上部植株重量，結果顯示，TC2-12 及 TC_LDR17 處理於株高及地上部植株重量相較對照組皆具有顯著差異，TC2-12 分別增加 25%-41%及 41%-88%，而 TC_LDR17 分別增加 17%-32%及 19%-54%，且 TC2-12 之 10 倍、50 倍與 100 倍稀釋之處理相較與 TC_LDR17 同倍率稀釋之處理效果較佳，其中以 TC2-12 之 10 倍與 50 倍稀釋之處理最佳(表十二)。

表十二、2 株具固氮能力菌株處理結球白菜之盆栽試驗結果

Table 12. Results of 2 strains with nitrogen fixing activity treatment on Chinese cabbage in pot experiment

Treatments	No. of leaves	Plant height (cm)	Weight of above-ground (g)
Control	11.00 a ¹	12.71 c	15.42 c
TC2-12-10X	11.13 a	17.37 a	28.59 a
TC2-12-50X	10.87 ab	17.86 a	29.01 a
TC2-12-100X	10.40 ab	15.83 ab	21.72 ab
TC_LDR17-10X	10.00 ab	16.25 ab	23.73 ab
TC_LDR17-50X	9.00 b	16.77 ab	20.91 b
TC_LDR17-100X	9.00 b	14.90 bc	18.36 b

¹ Statistical analysis by LSD ($p < 0.05$) was applied to compare the column followed by the same letter.

討 論

本研究自南投縣信義鄉及臺東縣蘭嶼鄉採集之土壤分離出 80 株微生物菌株，經 IAA 生合成、ACC deaminase 及固氮活性分析後，篩選出 7 株具耐候潛力微生物菌株，分別為 TC2-10、TC2-11、TC2-12、TC_LDR14、TC_LDR17、TC_LTF4 及 TCSF7-6。其中 TC2-10、TC2-11、TC2-12、TC_LDR14、TC_LTF4 及 TCSF7-6 等 6 株菌株具可產生 IAA，TC_LDR14、TC_LDR17、TC_LTF4 及 TCSF7-6 等 4 株菌株具 ACC deaminase 活性，而 TC2-12 及 TC_LDR17 具固氮活性；利用 16S rDNA 核酸片段進行網路基因庫比對，鑑定結果 TC2-10 及 TC2-11 為 *Gottfriedia luciferensis*、TC2-12 為 *Massilia sp.*、TC_LDR14 及 TC_LTF4 為 *Brevibacterium iodinum*、TC_LDR17 為 *Achromobacter xylosoxidans*、TCSF7-6 為 *Streptomyces thermoviolaceus*。

3-indoleacetic acid (IAA) 為普遍存在於植物體內之天然生長素，具促進細胞生長與組織分化之功能，幫助根組織的伸長及增加側根與根毛的數量，提高養分的吸收(Datta & Basu, 2000)，某些土壤微生物如 *Pseudomonas spp.*、*Azotobacter spp.*、*Azospirillum spp.*、*Bacillus spp.* 及 *Enterobacter spp.* 等可產生 IAA (Spaepen *et al.*, 2007; Damam *et al.*, 2016)。本研究篩選之 TC2-10 及 TC2-11 菌株可產生 IAA 及嵌鐵蛋白，可促進半結球萵苣、不結球萵苣、不結球白菜、青梗白菜、莧菜及薺菜等 6 種作物之生長，相較對照組最高可增加 38%葉片數、37%株高及 134%地上部重量，具有發展成為生物肥料的潛力；TC_LDR14 及 TC_LTF4 菌株皆可產生 IAA 且具 ACC deaminase 及嵌鐵蛋白活性，可提高不結球白菜植株在淹水環境下之株高及地上部重量，然於不結球白菜之幼苗發育試驗與半結球萵苣、不結球萵苣、不結球白菜、青梗白菜、莧菜及薺菜等 6 種葉菜盆栽試驗中卻無較佳之促進效果，推測可能為該 2 株菌株不具澱粉分解酵素、蛋白質分解酵素、纖維素分解酵素、幾丁質分解酵素及脂肪分解酵素，或於環境中之存活及適應能力較差，後續可監測其於土壤中之菌量變化以確認。

乙烯為植物生長與發育過程中重要的植物激素，於組織分化、側芽發育、種子發芽、根毛的發育和伸長、葉與花的老化及果實成熟等生理反應中皆扮演重要角色，亦可調節植物對逆境的反應 (Peeters *et al.*, 2002; Cox *et al.*, 2004)。淹水情況下植物所需的氧氣與光照會減少，並導致乙烯在植物體內快速累積，影響植物的生長 (Cox *et al.*, 2004; Ravanbakhsh *et al.*, 2017)，某些土壤微生物如 *Rhizobium* spp.、*Pseudomonas* spp.、*Aneurinibacillus* spp. 及 *Paenibacillus* spp. 等可產生 ACC deaminase (Ma *et al.*, 2003; Ali *et al.*, 2013; Gupta & Pandey, 2019)，該酵素可分解乙烯的前趨物質 ACC，進而降低植物體內乙烯的累積量，對植物於逆境下維持生長與發育具有重要作用 (Glick *et al.*, 2007; Siddikee *et al.*, 2011; Ravanbakhsh *et al.*, 2017)。本研究以分離出具 ACC deaminase 活性之菌株進行不結球白菜之淹水盆栽試驗，TC_LDR14、TC_LTF4 及 TCSF7-6 等 3 菌株皆可提高植株在淹水環境下之株高及地上部重量，其中 TCSF7-6 亦可產生 IAA、嵌鐵蛋白、澱粉分解酵素、蛋白質分解酵素及纖維素分解酵素，可提高不結球白菜在淹水環境下 15%株高及 17%地上部重量，且對不結球白菜幼苗發育之促進效果較其他菌株佳，相較對照組分別增加 25%株高及 79%地上部重量，此外，於半結球萵苣、不結球萵苣、不結球白菜、青梗白菜、莧菜及蕹菜等 6 種作物盆栽試驗中亦皆有促進植株生長之能力，相較對照組最高可增加 35%葉片數、27%株高及 98%地上部重量，未來可朝微生物培養條件及製劑劑型進行改良。

氮為植物生長所必需之重要元素，植物除了藉根部吸收氮元素供自身使用外，土壤中的共生或非共生固氮細菌亦為氮元素之主要提供者 (Gray & Smith, 2005; Shridhar, 2012)，然而非共生固氮細菌的固氮酵素 (nitrogenase) 受土壤水分、氧氣濃度和有機質含量之影響，其固氮活性具不穩定性 (Shridhar, 2012)。本研究篩選之 TC2-12 及 TC_LDR17 菌株具固氮活性，於結球白菜盆栽試驗中可促進植株生長，相較對照組 TC2-12 分別增加 25%-41%株高及 41%-88%地上部重量，而 TC_LDR17 分別增加 17%-32%株高及 19%-54%地上部重量，然而 TC2-12 菌液稀釋液之處理相較與 TC_LDR17 同倍率稀釋之處理效果較佳，推測可能與 TC2-12 具 IAA 生合成活性及多種分解酵素活性或 TC_LDR17 之環境適應能力較差有關，未來可朝作物生長環境及微生物培養條件之篩選與優化進行嘗試。

本研究篩選出 7 株具耐候潛力之微生物菌株，可產生 IAA 之 TC2-10 及 TC2-11 菌株及具固氮活性之 TC2-12 及 TC_LDR17 皆可促進葉菜類作物之生長，具 ACC deaminase 之 TC_LDR14 及 TC_LTF4 菌株可提高不結球白菜在淹水環境下之生長情形，而 TCSF7-6 菌株則可促進葉菜類作物之生長且提高不結球白菜在淹水環境下之生長。這些微生物菌株具有發展為功能性微生物製劑之潛力，後續將進行培養條件之改良，提升其肥效及幫助植物耐淹水之能力，用以提高作物環境適應性及減少化學肥料的使用，作為減輕氣候變遷影響之工具，達到低碳、永續農業之目標。

參考文獻

1. Ahemad, M., Kibret, M. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. J. King Saud Univ. Sci. 26, 1-20.
2. Ali, S. Z., Sandhya, V., Venkateswar Rao, L. 2013. Isolation and characterization of drought-tolerant ACC deaminase and exopolysaccharide-producing fluorescent *Pseudomonas* sp. Ann. Microbiol. 64, 493-502.
3. Bashan, Y., Levanony, H. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. Can. J. Microbiol. 36, 591-608.
4. Belimov, A. A., Hontzeas, N., Safronova, V. I., Demchinskaya, S. V., Piluzza, G., Bullitta, S., Glick, B. R. 2005. Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). Soil Biol. Biochem. 37, 241-250.
5. Beneduzi, A., Ambrosini, A., Passaglia, L. M. P. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria: their potential as antagonists and biocontrol agents. Genet. Mol. Biol. 35, 1044-1051.
6. Braud, A., Jézéquel, K., Vieille, E., Tritter, A., Lebeau, T. 2006. Changes in extractability of Cr and Pb in a polycontaminated soil after bioaugmentation with microbial producers of biosurfactants, organic acids and siderophores. Water Air Soil Pollut. 6, 261-279.
7. Burd, G. I., Dixon, D. G., Glick, B. R. 2000. Plant growthpromoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. Can. J. Microbiol. 46, 237-245.
8. Chen, M. C., Lin, T. C., Huang, J. W. 2010. Factors affecting IAA production by rhizobacteria. Plant Pathol. Bull. 19, 201-212.
9. Cheng, C. W., Yang, S. S. 1995. Amylase production of *Streptomyces rimosus* TM-55 and their 2-deoxyglucose resistant mutants. Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi 28, 109-116.
10. Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clement, C., Barka, E. A. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. Appl. Environ. Microbiol. 71, 4951-4959.
11. Cox, M. C., Benschop, J. J., Vreeburg, R. A., Wagemaker, C. A., Moritz, T., Peeters, A. J., Voeselek, L. A. 2004. The roles of ethylene, auxin, abscisic acid, and gibberellin in the hyponastic growth of submerged *Rumex palustris* petioles. Plant Physiol. 136, 2948-2960.
12. Damam, M., Kaloori, K., Gaddam, B., Kausar, R. 2016. Plant growth promoting substances (phytohormones) produced by rhizobacterial strains isolated from the rhizosphere of medicinal plants. Int. J. Pharm. Sci. Rev. 37, 130-136.

13. Datta, C., Basu, P. S. 2000. Indole acetic acid production by a *Rhizobium* species from root nodules of a leguminous shrub, *Cajanus cajan*. Microbiol. Res. 155, 123-127.
14. De Boer, W., Unnewiek, P. J. A. K., Lafeber, P., Janse, J. D., Spit, B. E., Woldendorp, J. W. 1998. Anti-fungal properties of chitinolytic dune soil bacteria. Soil Biol. Biochem. 30, 193-203.
15. De Garcia Salamone, I. E., Hynes, R. K., Nelson, L. M. 2005. Role of cytokinins in plant growth promotion by rhizosphere bacteria. In "PGPR: Biocontrol and Biofertilization", ed. Siddiqui, Z. A. pp. 173-195. Netherlands: Springer.
16. Glick, B. R. 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. Scientifica, 1-15.
17. Glick, B. R., Todorovic, B., Czarny, J., Cheng, Z., Duan, J., McConkey, B. 2007. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. CRC Crit. Rev. Plant Sci. 26, 227-242.
18. Gouda, S., Kerry, R. G., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H. S., Patra, J. K. 2018. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. Microbiol. Res. 206, 131-140.
19. Gray, E. J., Smith, D. L. 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant - bacterium signaling processes. Soil Biol. Biochem. 37, 395-412.
20. Gul, N., Wani, I. A., Mir, R. A., Nowshahri, J. A., Aslam, S., Gupta, R., Verma, S., Aslam, S. 2023. Plant growth promoting microorganisms mediated abiotic stress tolerance in crop plants: a critical appraisal. Plant Growth Regul. 100, 7-24.
21. Gupta, S., Pandey, S. 2019. ACC deaminase producing bacteria with multifarious plant growth promoting traits alleviates salinity stress in french bean (*Phaseolus vulgaris*) plants. Front. Microbiol. 10, 1-17.
22. IPCC, 2023. Climate change 2023: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II, and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change In: Team, C.W., Lee, H., Romero, J. (Eds.), Geneva, Switzerland, p. 186.
23. Islam, S., Akanda, A. M., Prova, A., Islam, M. T., Hossain, M. M. 2016. Isolation and identification of plant growth promoting rhizobacteria from cucumber rhizosphere and their effect on plant growth promotion and disease suppression. Front. Microbiol. 6, 1-12.
24. Kamensky, M., Ovadis, M., Chet, I., Chernin, L. 2003. Soil-borne strain IC14 of *Serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* diseases. Soil Biol. Biochem. 35, 323-331.
25. Kang, S. M., Joo, G. J., Hamayun, M., Na, C. I., Shin, D. H., Kim, H. Y., Hong, J. K., Lee, I. J. 2008. Gibberellin production and phosphate solubilization by newly isolated strain of *Acinetobacter calcoaceticus* and its effect on plant growth. Biotechnol. Lett. 31, 277-281.

26. Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., Schroth, M. N. 1980a. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* 286, 885-886.
27. Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., Schroth, M. N. 1980b. *Pseudomonas* siderophores: A mechanism explaining disease-suppressive soils. *Curr. Microbiol.* 4, 317-320.
28. Li, Z., Chang, S., Lin, L., Li, Y., An, Q. 2011. A colorimetric assay of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) based on ninhydrin reaction for rapid screening of bacteria containing ACC deaminase. *Lett. Appl. Microbiol.* 53, 178-185.
29. Liu, D., Lian, B., Dong, H. 2012. Isolation of *Paenibacillus* sp. and assessment of its potential for enhancing mineral weathering. *Geomicrobiol. J.* 29, 413-421.
30. Ma, W., Sebastianova, S. B., Sebastian, J., Burd, G. I., Guinel, F. C., Glick, B. R. 2003. Prevalence of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase in *Rhizobium* spp. *Antonie Van Leeuwenhoek* 83, 285-291.
31. Magnelli, P. E., Martínez, A., Mércuri, O. A. 1997. Simple method for determining cellulolytic activity in fungi. *Rev. Argent. Microbiol.* 29, 210-214.
32. Nautiyal, C. S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 170, 265-270.
33. Ngumbi, E., Kloepper, J. 2016. Bacterial-mediated drought tolerance: current and future prospects. *Appl. Soil Ecol.* 105, 109-125.
34. Oteino, N., Lally, R. D., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., Germaine, K. J., Dowling, D. N. 2015. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Front. Microbiol.* 6, 745.
35. Peeters, A. J. M., Cox, M. C. H., Benschop, J. J., Vreeburg, R. A. M., Bou, J., Voesenek, L. A. C. J. 2002. Submergence research using *Rumex palustris* as a model; looking back and going forward. *J. Exp. Bot.* 53, 391-398.
36. Prieto-Samsónov, D. L., Vázquez-Padrón, R. I., Ayra-Pardo, C., González-Cabrera, J., de la Riva, G. A. 1997. *Bacillus thuringiensis*: from biodiversity to biotechnology. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19, 202-219.
37. Raaijmakers, J. M., Vlami, M., de Souza, J. T. 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek* 81, 537-547.
38. Ravanbakhsh, M., Sasidharan, R., Voesenek, L. A. C. J., Kowalchuk, G. A., Jousset, A. 2017. ACC deaminase-producing rhizosphere bacteria modulate plant responses to flooding. *J. Ecol.* 105, 979-986.

39. Reed, M. L., Warner, B. G., Glick, B. R. 2005. Plant growth-promoting bacteria facilitate the growth of the common reed *Phragmites australis* in the presence of copper or polycyclic aromatic hydrocarbons. *Curr. Microbiol.* 51, 425-429.
40. Rosbrook, P. A., Reddell, P. 1995. Isolation of *Frankia* from root nodules of three species of *Casuarina*. *Soil Biol. Biochem.* 27, 427-429.
41. Sacherer, P., Défago, G., Haas, D. 1994. Extracellular protease and phospholipase C are controlled by the global regulatory gene *gacA* in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *FEMS Microbiol. Lett.* 116, 155-160.
42. Santoro, M. V., Bogino, P. C., Nocelli, N., Cappellari Ldel, R., Giordano, W. F., Banchio, E. 2016. Analysis of plant growth-promoting effects of fluorescent *Pseudomonas* strains isolated from *Mentha piperita* rhizosphere and effects of their volatile organic compounds on essential oil composition. *Front Microbiol.* 7, 1-17.
43. Schwyn, B., Neilands, J. B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochem.* 160, 47-56.
44. Setiawati, T. C., Mutmainnah, L. 2016. Solubilization of potassium containing mineral by microorganisms from sugarcane rhizosphere. *Agric. Agric. Sci. Procedia.* 9, 108-117.
45. Shi, T. Q., Peng, H., Zeng, S. Y., Ji, R. Y., Shi, K., Huang, H., Ji, X. J. 2017. Microbial production of plant hormones: opportunities and challenges. *Bioengineered* 8, 124-128.
46. Shridhar, B. S. 2012. Review: nitrogen fixing microorganisms. *Int. J. Microbial. Res.* 3, 46-52.
47. Siddikee, M. A., Glick, B. R., Chauhan, P. S., Yim, W. J., Sa, T. 2011. Enhancement of growth and salt tolerance of red pepper seedlings (*Capsicum annuum* L.) by regulating stress ethylene synthesis with halotolerant bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase activity. *Plant Physiol. Biochem.* 49, 427-434.
48. Spaepen, S., Vanderleyden, J., Remans, R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 425-448.
49. Sulistiyana, T. R., Meliaha, S. 2017. Isolation and characterization of nitrogen fixing endophytic bacteria associated with sweet sorghum (*Sorghum bicolor*). *Proceedings The 1st SATREPS Conference* 1, 110-117.
50. Suzuki, T., Nakayama, T., Kurihara, T., Nishino, T., Esaki, N. 2001. Cold-active lipolytic activity of psychrotrophic *Acinetobacter* sp. strain no. 6. *J. Biosci. Bioeng.* 92, 144-148.
51. Tatusova, T. A., Madden, T. L. 1999. BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 174, 247-250.

52. Toyoda, H., Hashimoto, H., Utsumi, R., Kobayashi, H., Ouchi, S. 1988. Detoxification of fusaric acid by a fusaric acid-resistant mutant of *Pseudomonas solanacearum* and its application to biological control of fusarium wilt of tomato. *Phytopathology* 78, 1307-1311.
53. Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M., Pieterse, C. M. J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36, 453-483.
54. Weisburg, W. G., Brans, S. M., Pelletier, D. A., Lane, D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 697-703.
55. Zhang, L., Birch, R. G. 1996. Biocontrol of sugar cane leaf scald disease by an isolate of *Pantoea dispersa* which detoxifies albicidin phytotoxins. *Lett. Appl. Microbiol.* 22, 132-136.

Screening of microbial strains that promote growth of vegetable crops and the preliminary evaluation of their stress-tolerance¹

Shih-Chieh Chang² and Chien-Chih Kuo^{2*}

ABSTRACT

The aim of this study is to screen for microbial strains possessing stress tolerance potential. In this study, eighty strains were isolated from collected soil samples and screened for biochemical properties. According to IAA production, ACC deaminase activity, nitrogen-fixing activity, siderophore activity, phosphorus solubilizing activity and five kinds of enzyme decomposition analyses, seven strains were selected for further study. Results showed that the IAA-producing strains TC2-10 and TC2-11 and nitrogen-fixing strains TC2-12 and TC_LDR17 promoted the growth of vegetable crops. Among them, TC2-10 and TC2-11 strains promoted the growth of six crops including Fushan lettuce, lettuce, bok choy, spoon cabbage, amaranth and water spinach by increasing the number of leaves (38%), plant height (37%) and above-ground weight (134%), while TC2-12 and TC_LDR17 strains promoted the growth of Chinese cabbage by increasing plant height (up to 41%) and above-ground weight (up to 88%). TC_LDR14 and TC_LTF4 strains increased the growth of bok choy in flooding (up to 25% plant height and 34% above-ground weight). TCSF7-6 strain could promote the growth of vegetables and improved the flood tolerance of crops. It improved the development of bok choy seedlings by increasing plant height (25%) and above-ground weight (79%). It also promoted the growth of bok choy plant under flooding condition by increasing plant height (15%) and above-ground weight (17%). TCSF7-6 strain also promoted the growth of six crops by increasing the number of leaves (35%), plant height (27%) and above-ground weight (98%). These seven isolated microbial strains have the potential for further development into functional microbial agents. The optimal cultural conditions of these microbial agents and their fertilizer efficiencies to promote plant growth under flooding condition will be further investigated.

Key words: stress-tolerant microbes, flooding tolerance, functional microbial agents

¹ Contribution No. 1076 from Taichung DARES, MOA.

² Research assistant and Associate Researcher of Taichung DARES, MOA.

*Corresponding author. Chien-Chih Kuo. E-mail: kuocc@tcdares.gov.tw

