

一株植物促生菌的筛选、鉴定及其对花生的促生效应研究^①

徐文思, 姜 瑛, 李 引, 张 振, 徐 莉, 胡 锋, 李辉信*

(南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095)

摘 要:从南京板桥镇自然条件下的潮土中, 筛选出 JX15 菌株, 具有较强分泌 IAA 的能力且性能稳定, 20 h 分泌 IAA 达到 22.55 $\mu\text{g/ml}$, 并兼具解磷能力。经形态观察、部分生理生化特征测定及 16S rRNA 的保守序列鉴定, 初步确定该菌株为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*), GenBank 登录号为 JX424613。设置单因素试验对菌株生长和发酵条件进行初步研究, 结果表明促进菌株 JX15 生长和增强分泌 IAA 的最佳培养条件基本一致, 最佳培养条件是初始 pH 7~8, 装液量为 50 ml/250 ml, 30 °C 摇床培养 24 h; 最佳碳、氮源分别是甘露醇和酵母粉。在实验室条件下进行花生盆栽试验, 结果表明接种 JX15 菌液的处理, 花生植株较未接种菌液的处理其鲜重、株高、全氮、磷、钾及花生根系总长度、根平均直径、根表面积和根尖数均有显著增加。研究结果为该菌株的工程应用提供了理论依据。

关键词:潮土; 植物促生菌; 吲哚乙酸(IAA); 解磷; 条件优化

中图分类号: S154.39

植物促生菌(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^[1]。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^[2-5]。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^[6]。目前 PGPB 研究已成为国际上的热门课题。

吲哚乙酸(IAA)是植物激素的一种, 能够分泌 IAA 的植物促生菌, 可以通过提供植物所短缺的物质 IAA 直接影响新陈代谢来刺激其生长^[7]。1979 年, 科学家发现 *Azospirillum brasilense* 可以合成生长素 IAA^[8], 此后的研究发现自然环境中有许多细菌都可产生植物激素, 土壤中约一半以上的细菌可以产生植物生长素(IAA), 并对植物内源 IAA 库产生影响^[9]。过去几十年间, 报道了大量该类细菌, 包括假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)、固氮螺菌属(*Azospirillum* sp.)、固氮菌属(*Azotobacter* sp.)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella* sp.)、肠杆菌属(*Enterobacter* sp.)、产碱菌属(*Alcaligenes* sp.)、节杆菌属(*Arthobacter* sp.)、布克霍尔德氏菌属(*Burkholderia* sp.)、芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.) 以及沙雷氏菌属(*Serratia* sp.)等^[10-12]。

姚拓等^[13]在兰州盐碱地筛选到 2 株分泌 IAA 的

固氮菌; 陈国民^[14]从黄棕壤筛选出 8 株产 IAA 的芽孢杆菌; 而潮土中 PGPB 筛选的研究目前尚未见报道。本文从供试潮土中筛选了能分泌 IAA 的促生菌, 进行了鉴定, 并研究了不同培养条件对菌体的生长及产 IAA 量的影响, 以期了解该植物促生菌的最适生长环境条件; 同时在实验室条件下进行了花生盆栽实验, 为该菌株在实际生产中的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 土壤样品来源及前期处理 土样采自南京雨花台区板桥镇长江南岸冲积地的潮土, 土壤质地分类为砂质壤土, 种植制度为稻麦轮作。土壤取样深度为 0~20 cm, 鲜土采集后, 剔除石块、大中型土壤动物及根茬等残体, 然后过 5 mm 筛备用, 土壤基本性状如表 1 所示。

1.1.2 培养基 下列培养基除特殊说明外, 配制时均用蒸馏水定容至 1000 ml, 121 °C 灭菌 30 min, 需要用固体培养基时, 在此配方基础上加 20 g 琼脂。

LB 培养基: 蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, 氯化钠 10 g, 蒸馏水 1 000 ml, pH 7.0~7.2。

基金项目: 国家自然科学基金项目(30970537)资助。

* 通讯作者(huixinli@njau.edu.cn)

作者简介: 徐文思(1987—), 女, 山东枣庄人, 硕士研究生, 主要从事土壤生态学研究。E-mail: xws-17@126.com

表 1 供试土壤基本性质
Table 1 Basic properties of tested soil

土壤	有机碳(g/kg)	全氮(g/kg)	铵态氮(mg/kg)	硝态氮(mg/kg)	矿质氮(mg/kg)	pH(H ₂ O)
潮土	9.20	0.89	6.84	2.39	9.23	6.32

无机磷细菌培养基(PKO 培养基)^[15] 磷酸三钙 5 g, 葡萄糖 10 g, 硫酸铵 0.5 g, 氯化钠 0.3 g, 七水硫酸镁 0.3 g, 氯化钾 0.3 g, 硫酸锰 0.03 g, 七水硫酸亚铁 0.03 g, pH 7.0, 蒸馏水 1 000 ml。

无机盐培养基: 硫酸铵 2.0 g, 磷酸二氢钠 0.5 g, 磷酸氢二钾 0.5 g, 七水硫酸镁 0.2 g, 二水氯化钙 0.1 g, 蒸馏水 1 000 ml, pH 7.0。

1.2 分泌 IAA 的细菌筛选及测定

将 10 g 经过处理的土壤样品, 置于盛有 100 ml 灭菌水的 250 ml 的三角瓶中, 30℃、150 r/min 振荡 20 min, 静置 10 min, 得到土壤悬浮液。采用稀释法涂于 LB 平板, 30℃ 倒置培养 24 h 后, 挑取不同类型典型单个菌落, 经平板纯化数次后, 4℃ 保存在 LB 斜面待用。

分泌 IAA 细菌的定性判定: 将分离纯化后的细菌接种于含有 L-色氨酸(100 mg/L)的 LB 液体培养基, 摇床培养(30℃, 180 r/min)1 天后, 取 50 μl 菌悬液滴于白色陶瓷板上, 同时加入等体积的 Salkowski 比色液(50 ml 35% HClO₄ + 1 ml 0.5 mol/L FeCl₃)^[16], 并以加入 50 μl 未接菌的 LB 液体培养基与等体积比色液的混合溶液为对照。将白色陶瓷板于室温避光放置 30 min 后观察, 颜色变红者表示能够分泌 IAA。

分泌 IAA 的定量测定: 对初筛获得的能分泌 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悬液的 OD₆₀₀ 值, 然后将菌悬液以 10 000 r/min 离心 10 min 取上清液加入等体积 Salkowski 比色液, 避光静置 30 min, 测定其 OD₅₃₀ 值^[17]。对照标准曲线计算单位体积发酵液中 IAA 的含量。标准曲线的绘制采用分析纯的 IAA 梯度稀释制备。

1.3 植物促生菌的生理生化及 16S rDNA 分子学鉴定

1.3.1 菌株生理生化测定 根据《常见细菌系统鉴定手册》和《伯杰细菌鉴定手册》(第 8 版)进行形态和生理生化鉴定^[18-19]。

1.3.2 菌株分子学鉴定 将菌株用 LB 液体培养液培养至对数生长期, 离心收集菌体, 采用 SDS-CTAB^[20]法提取总基因组 DNA, 采用细菌 16S rDNA 通用引物 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492r (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')^[21]进行

16S rDNA 的 PCR 扩增。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 5 min, 进入热循环, 94℃ 变性 30 s, 52℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 10 min, 共 30 个循环。取 PCR 产物在 0.7% 的琼脂糖凝胶上进行电泳。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后回收纯化测序(上海英骏生物工程有限公司), 根据获得的 16S rDNA 序列在 GenBank 中 Blast 搜索同源序列, 通过 MEGA 4.0 软件, 以邻接法(Neighbour-Joining) 建立系统进化树。

1.4 不同培养条件对菌株生长及产 IAA 的影响

1.4.1 不同培养时间对菌株生长及产 IAA 的影响 取含有 L-色氨酸(100 mg/L)的 LB 培养基 50 ml 装于 250 ml 的三角瓶中, 按 1%(v/v)接种量接种对数生长期的菌株后, 置于摇床培养(30℃, 180 r/min), 于 10、15、20、32、44、56 h 破坏性采样, 并按照定量测定的方法测定其产 IAA 的量。

1.4.2 不同初始 pH 对菌株生长和产 IAA 的影响 将含有 L-色氨酸(100 mg/L)的 LB 液体培养基分别调节到不同的 pH(4、5、6、7、8、9、10), 取 50 ml 装于 250 ml 的三角瓶中, 按 1%(v/v)接种量接种对数生长期的菌株后, 摇床培养 24 h(30℃, 180 r/min), 并按定量测定的方法分别测定其产 IAA 的量。

1.4.3 不同通气量对菌株生长和产 IAA 的影响 分别取含有 L-色氨酸(100 mg/L)的 LB 液体培养基 25、50、75、100、150 ml 装于 250 ml 的三角瓶中, 按 1%(v/v)接种量接种对数生长期的菌株后, 置于 30℃, 180 r/min 摇床培养 24 h, 按定量测定的方法分别测定其产 IAA 的量。

1.4.4 不同碳源对菌株生长和产 IAA 的影响 在含有 L-色氨酸(100 mg/L)无机盐培养基中分别加入 1%(w/v)的碳源, 碳源包括葡萄糖、木糖、蔗糖、果糖、甘露醇、乳糖、麦芽糖, 并取 50 ml 装于 250 ml 的三角瓶中, 按 1%(v/v)接种量接种处于对数生长期的菌株后, 置于 30℃, 180 r/min 摇床培养 24 h, 按定量测定的方法分别测定其产 IAA 的量。

1.4.5 不同氮源对菌株生长和产 IAA 的影响 在含有 L-色氨酸(100 mg/L)无机盐培养基(不包括硫酸铵)中分别加入 0.1%(w/v)的氮源, 氮源包括硝酸铵、硫酸铵、硝酸钾、蛋白胨、酵母粉、丙氨酸、尿素, 并取 50 ml 装于 250 ml 的三角瓶中, 按 1%(v/v)接种量接种处于对数生长期的菌液后, 置于 30℃,

180 r/min 摇床培养 24 h，按定量测定的方法分别测定产其 IAA 的量。

1.5 植物促生菌的解磷效果

解磷能力的测定采用无机磷培养基。

试验方法：在 250 ml 三角瓶中装入 50 ml 培养液，121℃ 灭菌 30 min，冷却至室温。处理组按 4% 的接种量接种，对照组加等量灭活菌液，30℃ 200 r/min 恒温振荡培养箱培养 72 h。

发酵液测定 取培养 72 h 的培养液 20 ml 6 000 r/min 离心 20 min，采用钼蓝比色法测定上清液中有效磷含量^[22]。

1.6 花生温室促生试验

盆栽试验。每盆栽土 200 g，种植经催芽处理的花生种子，调节含水量至田间最大持水量的 60%，30 天后采样，用根系扫描仪(LA1600+scanner，Canada)扫描获得根系图像后，用根系分析软件(Winrhizo 2003b，Canada)进行相关根系指标分析，并测定土壤中有效磷以及 IAA 含量。

花生种子：花生种子进行 20% 双氧水表面消毒 20 min，无菌水冲洗多次，催芽 2 天，选取发芽一致的种子备用。

接菌处理：将 JX15 分别接种于 LB 液体培养基，30℃，180 r/min 摇床培养，培养菌长至对数生长期，然后将菌悬液 10 000 r/min 离心 10 min，再用无菌水重悬同样操作离心 3 次，接种量为 10⁸ CFU/g。

对照处理：作为对照，土壤不喷洒菌液，加等量

无菌水。
每个处理设 3 个重复。

2 结果分析

2.1 分泌 IAA 细菌 JX15 的生理生化及 16S rDNA 分子学鉴定

经过平板稀释法共分离出 22 株菌株，经过产 IAA 的定性筛选，共有 5 株产 IAA，分别命名为 JX1、JX6、JX8、JX15 和 JX21。定量测定结果显示 JX15 菌株分泌 IAA 最多，24 h 时转化 IAA 达到 22.55 μg/ml，后经 8 次传代，产 IAA 特性稳定。

经平板划线、革兰氏染色，观察菌株培养特征及形态特征，可见 JX15 菌落较小为白色、隆起，边缘整齐，表面光滑湿润，不透明，不规则杆状排列，产芽孢。生理生化指标见表 2。

根据 16S rDNA 的测序结果和 GenBank 中已登录的核苷酸序列进行同源性比较(图 1)，发现菌株 JX15 与 *Bacillus megaterium* IAM 13418(D16273)同源性为

表 2 JX15 菌株的生理生化特性
Table 2 Physiological characteristics of strain JX15

项目	结果	项目	结果
革兰氏染色	+	淀粉水解	+
好氧性试验	严格好氧	明胶液化	+
接触酶试验	+	硝酸盐还原	+
甲基红(M.R)反应	-	柠檬酸盐利用	+
V-P 试验	-		

注：“+”表示阳性反应，“-”表示阴性反应。

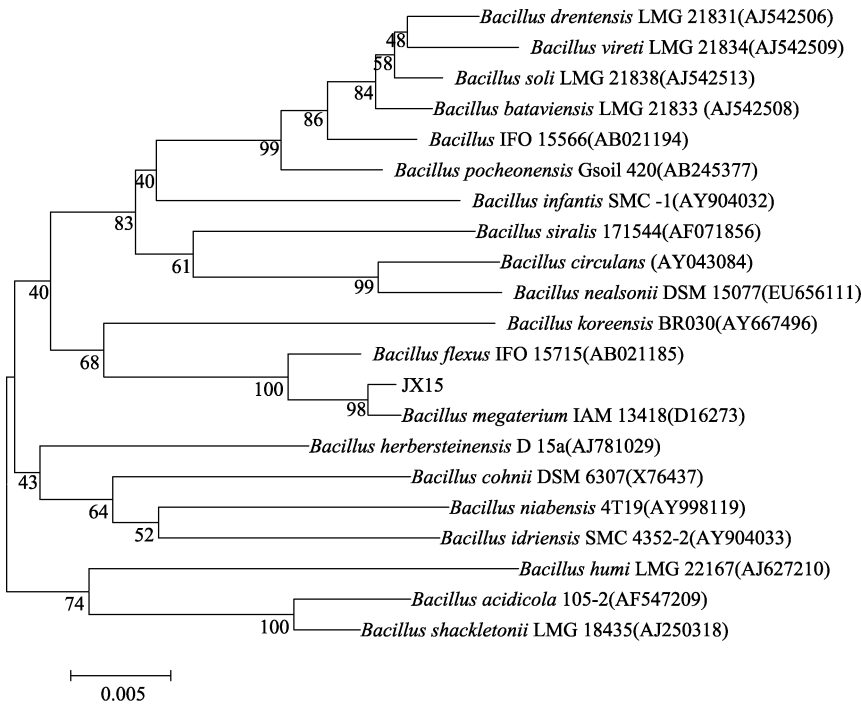


图 1 JX15 菌株 16S rRNA 基因序列系统发育树(标尺代表每 1 000 个核苷中有 5 个核苷替代)
Fig. 1 Phylogenetic tree established using the neighbor-joining method, based on 16S rRNA sequences of JX15 and the related strains

98% ,并采用 MEGA4.0 软件 NJ 方法构建 JX15 的 16S rDNA 系统发育树。结合生理生化特征结果,菌株 JX15 鉴定为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)。

2.2 不同培养条件对菌株 JX15 生长和产 IAA 的影响

2.2.1 不同培养时间对菌株 JX15 生长和产 IAA 的影响

由图 2 可以看出,10~15 h 期间 JX15 菌体生长迅速,此时为其生长的对数期,15 h 后便进入菌株生长的稳定期,而 IAA 含量自 10 h 开始不断提高,于 20 h 达到最大值 22.55 $\mu\text{g/ml}$,由此表明 IAA 主要积累于菌体生长的稳定期后期,与姚拓^[23]及李引等^[24]的试验结果一致,这是由于 IAA 是次生代谢产物,而菌体在进入稳定期会产生大量的次生代谢产物。20 h 后 IAA 的合成速率下降并且含量急剧减少,到 32 h 减少至最大量的 60.12%,之后呈缓慢减少的趋势。产生这种现象的可能原因,一方面为菌体生长稳定期的后期,由于营养物质的耗尽及比例失调,有害代谢产物的大量积累等,导致细菌繁殖越来越慢,细胞死亡数明显增多,生理代谢活动趋于停滞,因而不产生 IAA ;另一方面可能在这段时期会产生如氧化酶和过氧化物酶等降解 IAA 的酶类^[25]。

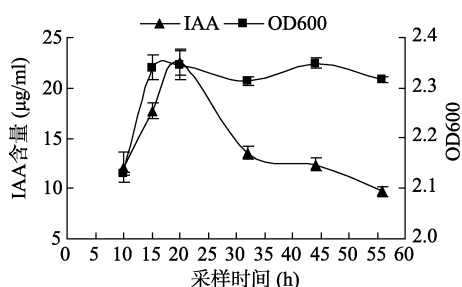


图 2 不同培养时间对菌株生长和产 IAA 的影响

Fig. 2 Effects of different time on the growth and IAA secretion of strain JX15

2.2.2 不同 pH 对菌株 JX15 生长及产 IAA 的影响

由图 3 可以看出, pH 为 4 和 10 时, JX15 菌株几乎不生长并且不产 IAA。pH 5~7 菌株生长量达最大值,在这段范围内 IAA 分泌量缓慢增加, IAA 的增长速率随着 pH 的增大迅速变大并于 pH 8 左右达到最大,随后又急剧下降,同时菌株生长量在 pH 7 后有缓慢下降的趋势,并于 pH 8 保持一段稳定后急剧下降。由此可得, JX15 菌株积累 IAA 的最适初始 pH 为 8,和其他 pH 相比有着极显著差异($P<0.01$),这和连翠飞等^[26]筛选的产 IAA 菌株最适 pH 为 8 的结果一致,但和李引等^[24]最适 pH 为 5~6 的结果不同,其原因应该由于筛选出的菌株种属不同。

2.2.3 不同通气量对菌株 JX15 生长和产 IAA 的影响

由图 4 可以看出,当 250 ml 三角瓶装液量为 25 ml 时,通气量最大,而此时 JX15 菌体的

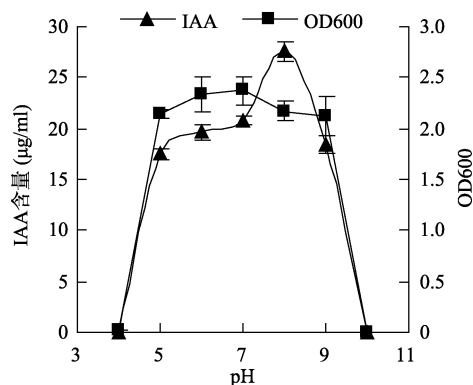


图 3 不同初始 pH 对菌株生长和产 IAA 的影响

Fig. 3 Effects of different initial pH values on the growth and IAA secretion of strain JX15

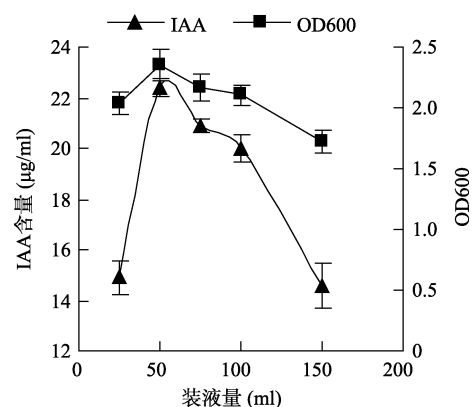


图 4 不同装液量对菌株生长和产 IAA 的影响

Fig. 4 Effects of different liquid volumes on the growth and IAA secretion of strain JX15

生长量及 IAA 的产生量均未达到最大值,说明供氧量过多,过高的 O_2 浓度可能对微生物产生毒害作用,抑制了菌体生长和代谢产物的产生。当 250 ml 三角瓶装液量为 50 ml 时, JX15 菌体的生长量及 IAA 的产生量均达到最大值,随后随着装液量的增加而逐渐下降。由此可见,菌株 JX15 生长及产生 IAA 的最佳装液量为 50 ml 和其他装液量相比差异显著($P<0.05$)。产生这种结果的原因可能是 JX15 菌株的代谢类型为好氧型,而 IAA 合成也为好氧代谢,从而当装液量增加溶氧量减少时,菌株 JX15 的生长及 IAA 的代谢会受到抑制。

2.2.4 不同碳源对菌株 JX15 生长和产 IAA 的影响

如图 5 所示,6 种碳源促进菌体生长的顺序为:甘露醇>麦芽糖>葡萄糖>蔗糖>乳糖>果糖>木糖,当甘露醇为供给碳源时,菌体生长量最大,且与其他碳源比较有极显著差异($P<0.01$)。对于 IAA 产生量来说,6 种碳源对 JX15 菌株分泌 IAA 的影响顺序为:甘露醇>乳糖>果糖>蔗糖>麦芽糖>葡萄糖>木糖。当甘露醇糖为碳源时,菌株产 IAA 的活性最强,和其他碳源相比达到极显著差异($P<0.01$);而当葡萄糖

为碳源时，菌体生长较好，但 IAA 产量低，这可能与过剩的葡萄糖与 IAA 可形成糖基酯-IAA 复合体，使 IAA 以一种无活性的状态存在，从而降低了游离态 IAA 的量有关^[27]。由此可见，菌株 JX15 生长及产 IAA 的最适供给碳源均为甘露醇。

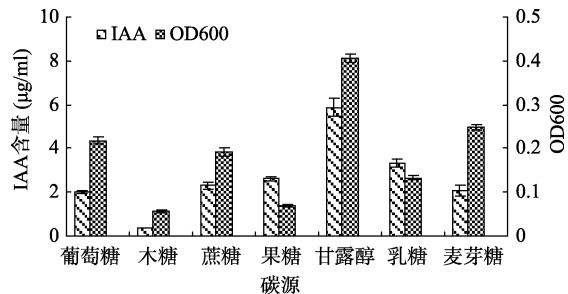


图 5 不同碳源对菌株生长和产 IAA 的影响
Fig. 5 Effects of different carbon sources on the growth and IAA secretion of strain JX15

2.2.5 不同氮源对菌株 JX15 生长和产 IAA 的影响

由图 6 可以看出，不同氮源促进菌体生长的顺序为：蛋白胨>酵母粉>NH₄NO₃>尿素>(NH₄)₂SO₄>丙氨酸>KNO₃；对于 JX15 菌株分泌 IAA 量的影响来说，酵母粉>蛋白胨>尿素>NH₄NO₃>丙氨酸>KNO₃>(NH₄)₂SO₄。由上述可得，当以酵母粉和蛋白胨为氮源时，菌株 JX15 的生长量及 IAA 产量都较高，其中 OD600 值分别达 0.014 和 0.03，IAA 产量分别达 3.93 µg/ml 和 3.56 µg/ml，与其他氮源相比均达显著性差异(P<0.05)，这说明对于 JX15 菌株生长及产 IAA 能力来说，有机氮源优于无机氮源。

2.3 产 IAA 菌株 JX15 的解磷效果的研究

通过实验可得，菌株 JX15 对磷酸三钙的转化量达 41.86 mg/L，比空白对照高出 36.45 mg/L，提高近 7 倍。说明 JX15 菌对磷酸三钙具有溶解作用，以难溶性磷酸盐为磷源进行生长，并将其转化为可溶性磷酸盐，这与郑传进等^[28]的研究结果一致，反映出 JX15

有较好的解磷作用。

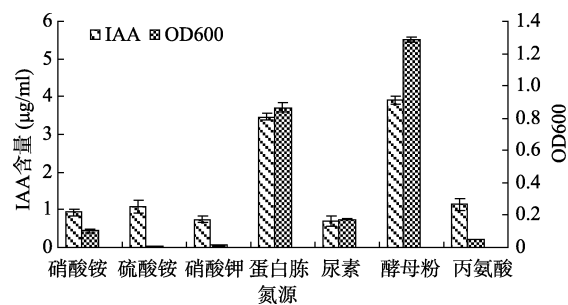


图 6 不同氮源对菌株生长和产 IAA 的影响
Fig. 6 Effects of different nitrogen sources on the growth and IAA secretion of strain JX15

2.4 菌株 JX15 对花生的温室促生试验

IAA 有刺激植株生长的作用^[7]，赵东利等^[29]的研究得到 IAA 能有效刺激大蒜根系细胞的生长。在本实验中，经接菌处理后，花生根系根长较对照处理增加了 1 倍，根表面积及根体积分别增加 82.5% 及 47.5%，而根尖数较对照处理增加了 5 倍(表 3)。以上结果与李引等^[24]所做的产 IAA 氯酚节杆菌对花生根系生长发育的研究结果一致，反映出菌株 JX15 对花生根系的发育有较好的促进作用。由于花生根系总长度、根平均直径、根表面积和根尖数较对照处理都有显著增加，增强了根的吸收能力，从而使花生植株鲜重、株高、全氮、磷、钾较对照处理都有显著增加，其中花生植株鲜重及株高较对照处理分别增加 19.4% 和 6.7%，全氮、磷、钾含量分别增加了 24.6%、61.9% 及 118.5%(表 4)，花生植株长势明显优于对照处理。此外由图 7 可知，接种 JX15 处理与不接菌处理进行对比，土壤 IAA 含量显著增加，比对照处理高出 2.94 倍；土壤有效磷含量也提高了 40.47%。因此，JX15 菌株对花生生长具有明显的促进作用，并且明显提高土壤有效磷含量。

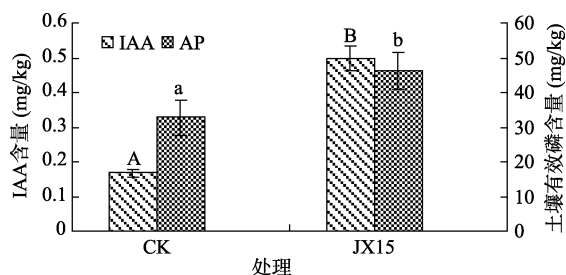
表 3 接种菌株 JX15 对花生根系的影响
Table 3 Effects of strain JX15 on root architecture of peanut

处理	根长(cm)	根表面积(cm ²)	根体积(cm ³)	根尖数(个)
CK	129.68 ± 2.82	48.46 ± 0.13	1.60 ± 0.31	155.67 ± 10.97
JX15	262.34 ± 5.39**	88.27 ± 5.39**	2.36 ± 0.11*	877.33 ± 45.35**

注：* 表示两处理间有显著性差异(P<0.05)，** 表示两处理间有极显著性差异(P<0.01)；下同。

表 4 接种菌株 JX15 对花生植株的影响
Table 4 Effects of strain JX15 on peanut plant

处理	鲜重(g)	株高(cm)	全氮(g/kg)	全磷(g/kg)	全钾(g/kg)
CK	2.68 ± 0.08	1.73 ± 0.12	17.93 ± 1.16	0.21 ± 0.05	5.37 ± 0.50
JX15	3.2 ± 0.13**	18.93 ± 0.15**	22.27 ± 1.34*	0.34 ± 0.07*	11.80 ± 0.20**



(图中不同大写字母表示处理间 IAA 含量在 $P < 0.01$ 水平差异极显著, 不同小写字母表示处理间有效磷含量在 $P < 0.05$ 水平差异显著)

图 7 接种菌株 JX15 对土壤有效磷和 IAA 的影响

Fig. 7 Effects of strain JX15 on soil available P and IAA

3 小结

本实验从潮土中筛选到 1 株分泌 IAA 能力较强的菌株 JX15, 24 h 时分泌 IAA 达到 $22.55 \mu\text{g/ml}$, 运用序列比对、结合生理生化试验鉴定 JX15 为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)。

菌体生长和产 IAA 量的最佳培养时间为 20 h, 最佳装液量是 50 ml/250 ml, 最佳 pH 是 7~8。对于生长量及产 IAA 来说, 最佳碳、氮源分别是甘露醇和酵母粉。

盆栽促生试验显示植物促生菌 JX15 显著提高土壤的 IAA 含量和有效磷含量; 对根系的生长、发育具有明显促进作用, 植株长势显著优于对照。

参考文献:

- [1] Bashan Y, LE de-Bashan. Bacteria/plant growth-promotion[C]// Hillel D. Encyclopedia of Soils in the Environment[M]. Vol. 1. Oxford, UK: Elsevier, 2005: 103-115
- [2] Robert M. Boddey, Johanna Dobereiner. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent progress and perspectives for the future[J]. Fertilizer Research, 1995, 42(1/3): 241-250
- [3] de Freitas JR, Banerjee MR, Germida JJ. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.)[J]. Biology and Fertility of Soils, 1997, 24 (4): 358-364
- [4] FM Scher, R. Baker. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium wilt* pathogens[J]. Phytopathology, 1982, 72: 1 567-1 573
- [5] Burd GI, Dixon DG, Glick B. Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2000, 46(3): 237-245
- [6] Glick BR, Bashan Y. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens[J]. Biotechnology Advances, 1997, 15(2): 353-378
- [7] Schippers B, Bakker AW, Backker PA. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms[J]. Annu. Rev. Phytopathol., 1987, 25: 339-358
- [8] Tien TM, Gaskins MH, Hubbell DH. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum Americanum* L.) [J]. Applied microbiology, 1979, 37(5): 1 016-1 024
- [9] 黄晓东, 季尚宁, Bernard Glick, Bruce Greenberg, 卢林纲. 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
- [10] Ahmad F, Ahmad I, Khan MS. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities[J]. Microbiological Research, 2008, 163(2): 173-181
- [11] Kloepper JW, Leong J, Teintze M, Schroth M. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria[J]. Nature, 1980, 28(6): 885-886
- [12] Cattelan AJ, Hartel PG, Fuhrmann JJ. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth[J]. Soil Sci. Soc. Am. J., 1999, 63: 1 670-1 680
- [13] 姚拓, 龙瑞军, 王刚, 胡自治. 兰州地区盐碱地小麦根际联合固氮菌分离及部分特性研究[J]. 土壤学报, 2004, 41(3): 444-448
- [14] 陈国民. 从植物根际分离到的 8 株细菌的促生作用及初步鉴定[D]. 武汉: 华中农业大学, 2007
- [15] 李振高, 骆永明, 滕应. 土壤与环境微生物研究法[M]. 北京: 科学出版社, 2008
- [16] Libbert E, Risch H. Interactions between plants and epiphytic bacteria regarding their auxin metabolism. V. Isolation and identification of the IAA-producing and destroying bacteria from pea plants[J]. Physiol. Plantarum., 1969, 22: 51-58
- [17] Glickmann E, Dessaux Y. A Critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria[J]. Applied microbiology, 1995, 61(2): 793-796
- [18] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001
- [19] 布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984
- [20] 夏北成, Zhou JZ. 分子生物学方法在微生物生态学中的应用. 中山大学学报(自然科学版), 1998, 37(2): 97-101
- [21] Monis PT, Giglio S, Saint CP. Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis[J]. Analytical biochemistry, 2005, 340(1): 24-34
- [22] 徐光辉, 郑洪元. 土壤微生物分析方法手册[M]. 北京: 农业出版社, 1986
- [23] 姚拓. 促进植物生长菌的研究进展[J]. 草原与草坪, 2002(4): 1-5
- [24] 李引, 虞丽, 李辉信, 徐莉, 焦加国, 胡锋. 一株花生根际促生菌的筛选鉴定及其特性研究[J]. 生态与农村环境学报, 2012, 28(4): 416-421
- [25] Datta C, Basu PS. Indole acetic acid production by a rhizobium species from root nodules of a leguminous shrub, *Cajanus cajan*[J]. Microbiological Research, 2000, 155(2): 123-127

- [26] 连翠飞, 李社增, 晁春燕, 马平, 蒋继志, 鹿秀云. 产植物激素拮抗细菌 CX-5-2 的筛选、鉴定及其特性研究[J]. 植物病理学报, 2007, 37(2): 197–203
- [27] Patten CL, Glick BR. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid[J]. Canadian Metallurgical Quarterly, 1996, 42(3): 207–220
- [28] 郑传进, 黄林, 龚明. 巨大芽孢杆菌解磷能力的研究[J]. 江西农业大学学报, 2002, 24(2): 190–192
- [29] 赵东利, 冯冠军, 蒋龙, 李佳, 李满红, 李薇薇, 潘丽娜. 吲哚乙酸(IAA)对大蒜根生长发育的影响[J]. 大连大学学报, 2008, 29(6): 89–91

Isolation, Identification of Plant Growth-promoting Bacteria and Its Promoting Effects on Peanuts

XU Wen-si, JIANG Ying, LI Yin, ZHANG Zhen, XU Li, HU Feng, LI Hui-xin*

(College of Resources and Environmental Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: IAA-producing strains were isolated from fluvo-aquic soil, out of which the strain JX15 showed the highest and most stable IAA excreting ability (22.55 $\mu\text{g/ml}$ in 20h cultivation), combining additional phosphate-dissolving capability as well. Based on morphological, part of the physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA sequences analysis, it was identified as *Bacillus megaterium* (GenBank Accession No. JX424613). Single factor tests were designed for preliminary study of the optimized conditions for the strain growth and fermentation. Results showed that the optimum condition for growth was consistent with that for excretion. The optimal culturing conditions for both growth and IAA secretion were pH 7 – 8 , filling volume 50 ml/250 ml flask, incubation at 30°C for 24 h, the best carbon and nitrogen sources were mannitol and yeast extract. These results provided the experimental basis about the strains for the development of bio-organic fertilizer in the future.

Key words: Fluvo-aquic soil, PGPB, Indole-3-acetic acid (IAA), Phosphate-dissolving, Optimization