

红壤中产吲哚乙酸并具解磷作用的促生菌筛选 鉴定及促生效果研究^①

郑文波^{1,2}, 申 飞¹, 闫小梅¹, 张舒玄¹, 孙 波², 胡 锋¹, 李辉信^{1*}

(1 南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095; 2 国家红壤改良工程技术研究中心, 中国科学院红壤生态实验站, 江西鹰潭 335211)

摘 要: 从江西红壤花生地中, 筛选出 3 株产吲哚乙酸(IAA)菌株, 其中 ZH5 菌株具有较强分泌 IAA 的能力且性能稳定, 培养 24 h 时 IAA 产量达到 43.18 $\mu\text{g/ml}$, 且菌株 ZH5 具有较强的解磷能力。通过菌株形态、生理生化特征测定及 16S rRNA 的保守序列鉴定, 初步确定菌株 ZH5 为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)。对菌株生长和发酵条件进行研究, 结果表明促进菌株 ZH5 生长和增强分泌 IAA 的最佳培养条件基本一致, 最佳培养条件初始 pH 为 6~8, 最佳通气量为 50 ml/250 ml, 30℃ 摇床培养 24 h; 最佳碳源和氮源分别是蔗糖和酵母粉。在实验室中进行盆栽试验, 结果表明用 ZH5 菌株处理的花生株高增加了 54.0%; 植株鲜重增加了 49.8%; 并且 ZH5 菌株处理的花生植株全磷及花生根长、根尖数、根表面积及根体积均有显著增加, 分别增加了 21.84%、64.20%、28.20%、34.35% 和 68.67%。该研究结果为菌株 ZH5 在农业生产中的应用提供了理论依据和实验基础。

关键词: 红壤; 植物促生菌; IAA; 促生; 解磷

中图分类号: S154.39

植物根际促生细菌(plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)指生存于植物根际、根表, 能直接或间接地促进或调节植物生长的微生物^[1]。这些微生物能够通过产生生长激素、增加氮的生物利用率或促进难溶性磷酸盐的溶解等机制促进植物生长^[2-3]。此外它们还可以提高植物对干旱、盐碱、重金属毒害等的抗逆性。

吲哚乙酸(IAA)是一种植物生长激素, 产激素菌能够分泌 IAA 促进植物生长^[4]。1979 年科学家发现巴西固氮螺菌可以合成长素 IAA^[5]。此后又有很多科学家发现自然环境中也存在很多细菌可以产生生长激素, 而且土壤中存在的很多细菌也可以产生 IAA, 并且影响植物内源 IAA 库^[6]。

红壤地区是我国主要粮食产区和热带-亚热带经济作物——橡胶、油棕、咖啡、可可、柑橘、茶叶、油桐、桑蚕的主要产区, 历来在我国农业可持续发展和生态环境建设中发挥着重要作用。但是, 由于红壤的主要特征是酸、黏、瘦、旱, 施入的磷肥非常容易被红壤中的活性铁、铝固定从而大大地降低了利用率, 因此, 改善红壤质量、提高磷肥利

用率是提高红壤地区农业持续发展的重要课题。

姚拓等^[7]在兰州盐碱地筛选到 2 株分泌 IAA 的固氮菌; 陈国民^[8]从黄棕壤筛选出 8 株产 IAA 的芽孢杆菌。但是这些菌株都没有有效地应用到农业生产中, 可能是因为大部分植物促生菌还未被驯化成可有效应用于促进植物生长并具有较好溶磷效果的菌种, 并且这些菌株未必适应红壤的土壤环境。因此从红壤中分离得到植物促生菌, 和作物形成共生体系, 利用生物修复改善红壤, 成为当前研究的关键。本文从退化红壤旱地筛选出了能分泌 IAA 的菌株, 对其进行鉴定, 以及促生特性的检测, 并进行红壤的花生盆栽试验, 为该菌在红壤培肥中的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集

土样采自江西省鹰潭中科院红壤生态实验站的花生样地, 土壤为第四纪红黏土。土壤采样深度为 0~20 cm, 采回的土壤经风干、粉碎后过 2 mm 筛待用。土壤基本性质如表 1 所示。

基金项目: 国家科技支撑计划课题项目(2011BAD41B01)资助。

* 通讯作者(huixinli@njau.edu.cn)

作者简介: 郑文波(1988—), 男, 河北邯郸人, 硕士研究生, 主要从事土壤生态与生态修复的研究。E-mail: zhengwb16@163.com

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

土壤	PH (H ₂ O)	有机质 (g/kg)	全氮 (g/kg)	全磷 (g/kg)	速效磷 (mg/kg)	速效钾 (mg/kg)	铵态氮 (mg/kg)	硝态氮 (mg/kg)
红壤	5.03	10.780	0.246	0.102	0.690	24.585	1.06	11.87

1.2 培养基

LB 培养基：蛋白胨 10 g，酵母粉 5 g，氯化钠 10 g，琼脂 20 g，蒸馏水 1 000 ml，pH 7.0~7.2。

无机盐培养基：(NH₄)₂SO₄ 2.0 g，NaH₂PO₄ 0.5 g，K₂HPO₄ 0.5 g，MgSO₄·7H₂O 0.2 g，CaCl₂·2H₂O 0.1 g，H₂O 1 000 ml，pH 7.0。

无机磷细菌培养基(PKO 培养基)：Ca₃(PO₄)₂ 5 g，C₆H₁₂O₆ 10 g，(NH₄)₂SO₄ 0.5 g，NaCl 0.3 g，MgSO₄·7H₂O 0.3 g，KCl 0.3 g，MnSO₄ 0.03 g，FeSO₄·7H₂O 0.03 g，H₂O 1 000 ml，pH 7.0~7.2。

1.3 分泌 IAA 菌株的筛选及测定

将供试红壤挑根过筛后称取 10 g 置于盛有 100 ml 灭菌水的 250 ml 三角瓶中，30℃、150 r/min 摇床振荡 20 min，静置 10 min，得到土壤悬浮液。采用稀释法稀释后涂于 LB 培养基，将平板倒置，于 30℃、恒温箱中培养 24 h 后，挑取不同类型单个菌落，经平板纯化后，4℃ 保存在 LB 斜面待用。

分泌 IAA 菌的定性测定：将分离纯化后的细菌接种于采用含有 L-色氨酸(100 mg/L)的 LB 液体培养基，30℃、180 r/min 摇床培养 1 天。取 50 μl 菌悬液滴于白色陶瓷板上，同时加 50 μl Salkowski 比色液(50 ml 35% HClO₄ + 1ml 0.5 mol/L FeCl₃)^[9]。将加入 50 μl 50 mg/L IAA 的比色液作为阳性对照。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 菌的定量测定：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悬液的 OD 600 值计算菌体的生长，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 值计算 IAA 产量^[10]。计算菌浓度 OD600 值为 1 时，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。

1.4 分泌 IAA 菌的生理生化测定

根据《常见细菌系统鉴定手册》和《伯杰细菌鉴定手册》进行形态和生理生化测定^[11-12]。

1.5 分泌 IAA 菌的 16S rDNA 序列分析

将菌株用 LB 液体培养基培养至对数生长期，离心收集菌体，采样 SDS-CTAB^[13]法提取总基因组 DNA，采用细菌 16S rDNA 通用引物 27f(5'-AGAG-

TTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492r (5'-GGTTACC-TTGTTACGACTT-3')^[14]进行 16S rDNA 的 PCR 扩增。扩增产物送至上海英骏生物工程有限公司进行测序，将获得的 16S rDNA 序列提交到 NCBI 的 GenBank 基因库上，通过 Blast，与数据库中的已知序列进行同源性分析。利用 MEGA 4.0 软件，以邻接法(Neighbour-Joining)建立系统发育树。

1.6 不同培养条件对细菌生长及产 IAA 的影响

1.6.1 不同培养时间对菌株生长及产 IAA 的影响 将含有 L-色氨酸(100 mg/L)LB 液体培养基 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。分别于 10、15、20、24、32、44、56 h 破坏性采样，并按照定量测定的方法测定产 IAA 的量，其中每个处理设置 3 个重复。另外设置对照实验，除不加 L-色氨酸外其他条件相同，并且用 OD600 测定菌株的生长曲线。

1.6.2 不同 pH 对菌株生长及产 IAA 的影响 将含有 L-色氨酸 (100 mg/L) 的 LB 培养基分别调节到不同的 pH(4、5、6、7、8、9、10、11、12)，其他条件同上，24 h 后按定量测定的方法测定产 IAA 的量，并测定 OD600 值。

1.6.3 不同装液量对菌株生长及产 IAA 的影响 将含有 L-色氨酸 (100 mg/L) LB 液体培养基按 25、50、75、100、150 ml 装于 250 ml 的三角瓶中，其他条件同上，24 h 后按定量测定的方法测定产 IAA 的量，并测定 OD600 值。

1.6.4 不同碳源对菌株生长及产 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，碳源有葡萄糖、木糖、蔗糖、甘露醇、乳糖、麦芽糖等，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，按定量测定的方法测定产 IAA 的量。

1.6.5 不同氮源对菌株生长及产 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、尿素、丙氨酸等，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 ,按定量测定的方法测定产 IAA 的量。

1.7 产 IAA 菌的解磷效果测定

将菌株接种于装有 50 ml 3 种难溶性磷酸盐(磷酸三钙、磷酸铝和磷酸铁)无机磷细菌液体培养基的 250 ml 三角瓶 ,接种量为 4% ,对照组加入等量的灭活菌数 ,然后 30 、180 r/min 培养 96 h ,取培养 96 h 的培养液装入离心管 4 下 10 000 r/min 离心 15 min。取上清液用钼蓝比色法测定有效磷含量^[15]。

1.8 菌株的促生效果测定

试验于 2012 年在南京农业大学土壤生态实验室中进行。用于 PGPR 对花生促生试验的土壤取自江西省中国科学院红壤生态实验站 ,土样带回实验室处理保存用于盆栽试验。将供试菌株接种于 LB 液体培养基中 ,30 、180 r/min 摇床培养 ,培养菌长至对数生长期 ,4 离心收集菌体 ,用无菌水洗涤 3 次后重悬浮于无菌水中。然后测定 OD600 值 ,接种到盆栽中 ,接种量为 10⁸ CFU/g ;对照试验不接种菌株 ,加等量无菌水。选取经表面消毒发芽一致的花生种子 ,均匀地种在红壤中 ,每盆两株 ,5 个重复每盆 2 000 g 土壤。于培养室内培养 ,保持含水量为田间最大持水量的 60% ,30 天后采样测定。

1.9 数据处理

采用 SPASS 19.0 软件进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 分泌 IAA 菌株的筛选与鉴定

经过平板稀释法共筛选出 7 株菌株 ,其中产 IAA 菌株 3 株 ,代码分别为 ZH2、ZH5 和 ZH6 ,经过 IAA 定量测定 ,发现 ZH5 产 IAA 最多 ,24 h 分泌 IAA 产量 43.18 μg/ml。菌株 ZH5 经过 8 次传代 ,产 IAA 特性稳定。

菌株 ZH5 经过平板划线 ,革兰氏染色 ,观察 ZH5 菌株特征为 :菌落较小为白色、隆起 ,边缘整齐 ,表面光滑湿润 ,不透明。其形态和生理生化特性见表 2。

表 2 ZH5 菌株的生理生化特性
Table 2 Physiological characteristics of strain ZH5

实验项目	实验结果	实验项目	实验结果
革兰氏染色	+	甲基红测定	-
好氧性	严格好氧	V-P 测定	-
明胶液化	+	淀粉水解	+
接触酶	+		

注 :“+”: 阳性 ;“-”: 阴性。

ZH5 所测得的 16S rDNA 片段长度约为 1.4 kb。根据菌株 ZH5 已测得的 16S rDNA 序列和 GenBank 已登录的核苷酸序列进行比较 ,可知菌株 ZH5 (GenBank 登录号为 KJ801523)与 *Bacillus megaterium* IAM 13418(D16273)同源性为 100% ,根据构建的系统发育树并结合生理生化测定结果 ,可进一步确定 ZH5 菌株为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)。

2.2 不同培养条件对菌株 ZH5 生长及产 IAA 的影响

2.2.1 不同培养时间对菌株 ZH5 生长及产 IAA 的影响 由图 2 可以发现 ,菌株 ZH5 在 10 ~ 15 h 生长迅速 ,15 h 以后开始进入对数生长期 ,而后进入菌株稳定生长期 ,24 h 后菌株 ZH5 开始进入衰亡期。溶液中吡啶乙酸 (IAA) 从 10 h 开始随着时间的推移含量不断提高 ,24 h 时含量最高 ,达到 43.18 μg/ml ,这个现象表明 IAA 主要积累于菌体生长的稳定期 ,这与李引等^[16]的试验结果一致 ,主要原因是由于 IAA 是次生代谢产物 ,而菌体在进入稳定期会产生大量次生代谢产物。IAA 含量在 24 h 达到最高后开始急速下降 ,32 h 时含量仅为 24 h 时的 48.82% ,之后下降趋势开始缓慢 ,最后趋于稳定。这种现象可能是由两方面原因造成的 ,一方面是由于细菌进入生长衰亡期 ,各种有害物质的不断积累以及营养物质的消耗殆尽等 ,造成了细菌繁殖变慢 ,细胞死亡数增多 ,生理活动趋于停滞 ,所以不再产生 IAA ;另一方面如之前 Datta 和 Basu^[17]报道的可能是产生如氧化酶和过氧化氢酶等降解 IAA 的酶类。

2.2.2 不同 pH 对菌株 ZH5 生长及产 IAA 的影响 由图 3 可知 ,当 pH 为 4 和 12 时 ,由于环境极其恶劣所以菌株 ZH5 几乎不生长且不产 IAA。当 pH 为 5~7 时 ,菌体生长量增加迅速 ,到 pH 为 7 时达到最大值。当 pH 为 7~10 时 ,随着生长环境碱性的增强 ,菌体生长受到影响越来越大 ;相应的 IAA 产生量随着 pH 的变大而增加 ,并于 pH 为 7 时达到最大 ,当 pH >7 时 ,IAA 产生量随之降低 ,当 pH >11 时菌株生长跟 IAA 产生量都急剧下降。菌株 ZH5 生长和分泌 IAA 的最适 pH 为 6 ~ 8 ,和其他 pH 相比有着显著性差异 ($P<0.05$) ,这和徐文思等^[18]及连翠飞等^[19]筛选出的产 IAA 菌株最适 pH 结果不同 ,比徐文思等^[18]筛选出的产 IAA 菌株最适 pH 应用范围更广 ,并且和李引等^[16]筛选的最适 pH 为 5~6 也不同 ,李引等筛选的菌株只能在酸性环境中生长 ,而 ZH5 不仅在酸性环境生长 ,碱性环境也可以很好地生长。

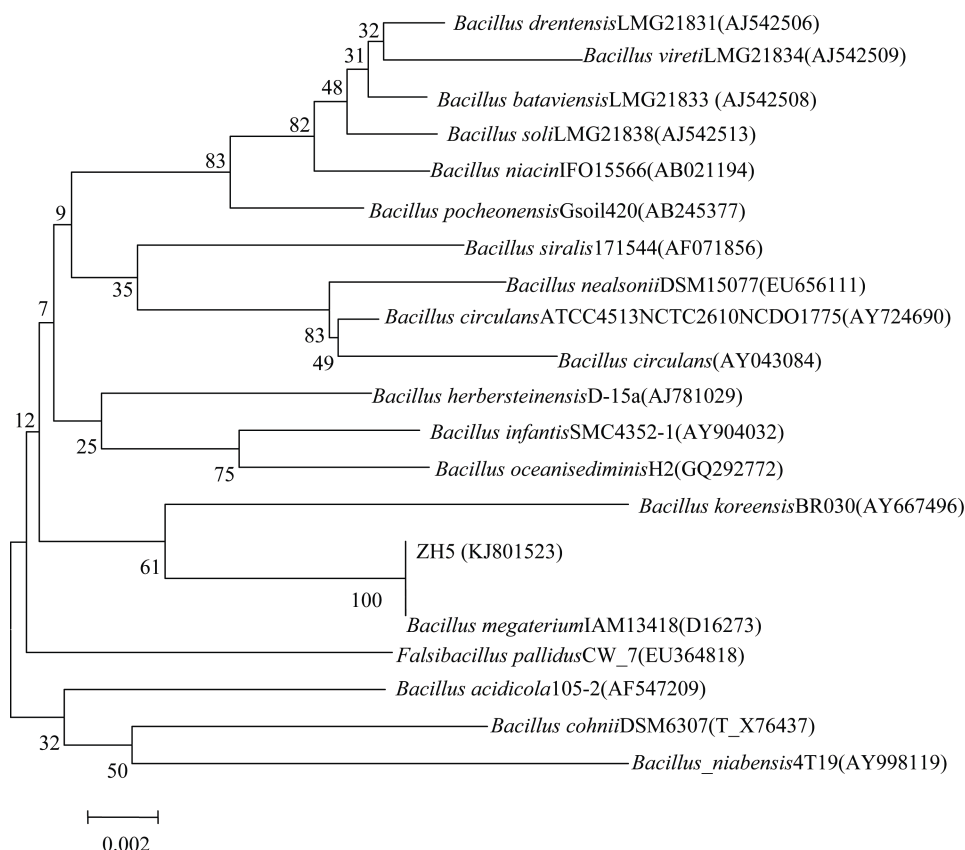


图 1 ZH5 菌株 16S rDNA 基因序列系统发育树(标尺代表每 1 000 个核苷中有 2 个核苷替代)

Fig. 1 Phylogenetic tree established using the neighbor-joining method, based on 16S rDNA sequences of ZH5 and the related strains

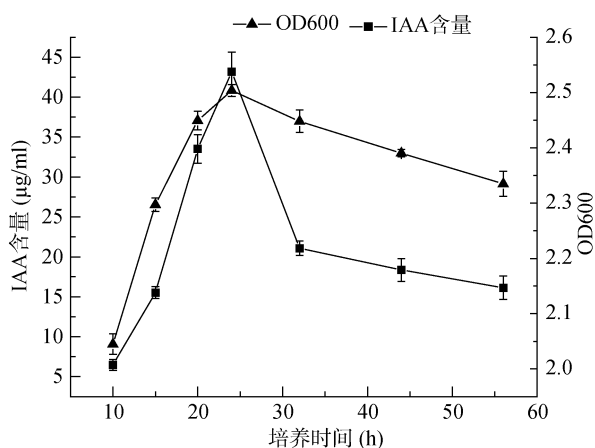


图 2 不同培养时间对 ZH5 菌株生长和产 IAA 的影响
Fig. 2 Effects of different time on the growth and IAA secretion of strain ZH5

其原因有两方面,一方面与李引等^[16]的不同主要是因为筛选出的菌株种属不同;另一方面与徐文思等^[18]的不同可能是因为菌株 ZH5 是从酸性红壤中筛选出来的,土壤的环境不同造成了菌株的最适 pH 不同。由于 ZH5 菌株的最适 pH 范围较宽,不仅能很好地生存于弱酸性和中性环境中,在弱碱性环境中也能很好地生长,故该菌有广阔的应用前景。

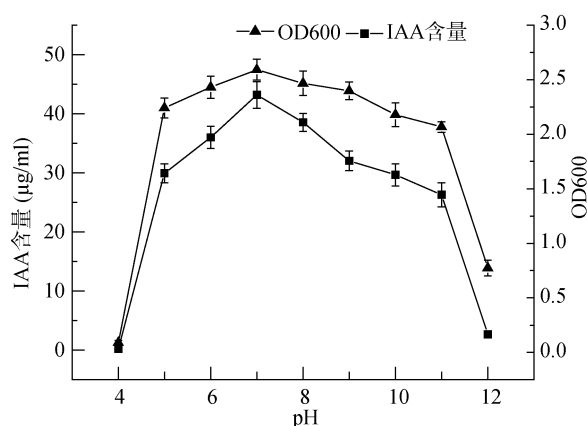


图 3 不同初始 pH 对菌株生长和产 IAA 的影响
Fig. 3 Effects of different initial pH values on the growth and IAA secretion of strain ZH5

2.2.3 不同通气量对菌株 ZH5 生长及产 IAA 的影响 从图 4 可以看出,当 250 ml 三角瓶中的装液量为 25 ml 时,虽然此时三角瓶中通气量最大,但是菌株 ZH5 的生长量及 IAA 产生量却没有达到最大值,产生这种现象的原因可能是因为此时瓶中供氧量充足, O_2 浓度过高对微生物产生毒害作用,从而对菌体的生长和代谢产物的合成产生了抑制作用。当三角瓶中装液量为 50 ml 时,菌株 ZH5 的生长量及 IAA 的产生量均达到了最高值,OD

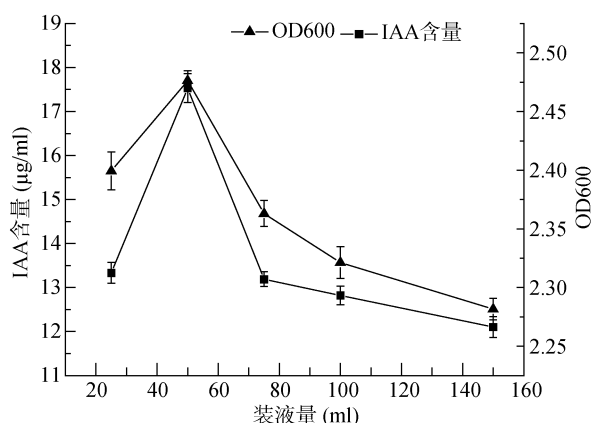


图4 不同装液量对菌株生长和产 IAA 的影响

Fig. 4 Effects of different liquid volumes on the growth and IAA secretion of strain ZH5

值为 2.48, IAA 产生量为 17.53 µg/ml。此结果与李引等^[16]和徐文思等^[18]的研究结果不同, ZH5 菌株产 IAA 量比徐文思等得到的结果高, 但是 ZH5 生长量比李引等的结果大。当装液量为 50 ~ 75 ml 时, 菌株生长量及 IAA 产生量急剧下降, 当装液量继续增大时菌株生长量及 IAA 产生量下降趋势变得缓慢。因此可以得出菌株 ZH5 的生长及 IAA 产生的最佳通气量是当三角瓶中装液量为 50 ml 时, 与其他装液量相比差异性显著 ($P < 0.05$), 这一结果与李引等^[16]结果一致。发生这种现象的原因有两

方面, 一方面可能是因为 ZH5 菌株为严格好氧性细菌, 另一方面是 IAA 的合成也为好氧代谢, 从而造成了菌株 ZH5 的生长及 IAA 的代谢随着装液量的增加而下降。

2.2.4 不同碳源对菌株 ZH5 的生长及产 IAA 的影响 由图 5 可以看出, 对于菌株 ZH5 生长来说, 6 种碳源对菌体生长促进作用依次为: 蔗糖 > 甘露醇 > 麦芽糖 > 葡萄糖 > 乳糖 > 木糖, 当蔗糖为碳源时, 菌株 ZH5 生长量最大, 其 OD 值为 1.86, 和其他碳源相比差异性显著 ($P < 0.05$)。6 种碳源对 IAA 产生量影响顺序为: 蔗糖 > 甘露醇 > 麦芽糖 > 乳糖 > 葡萄糖 > 木糖。当蔗糖为供给碳源时, 菌体产 IAA 量最大为 16.03 µg/ml, 并且与其他碳源相比差异性显著 ($P < 0.05$), 这与碳源对菌体生长影响基本一致; 但是当供给碳源为葡萄糖时, IAA 的产生量却与菌株生长趋势不同, 根据 Patten 和 Glick^[20]的研究发现当葡萄糖的浓度较高时, 过剩的葡萄糖会形成糖基酯-IAA 复合体, 使 IAA 以一种无活性状态存在, 并最终降低了游离态 IAA 的产生量。所以, 当供给碳源为蔗糖和甘露醇时, 菌株的生长及产 IAA 量最大, 与其他碳源相比差异性显著 ($P < 0.05$)。而徐文思等^[18]研究结果最适碳源为甘露醇, 李引等^[16]筛选的菌株最适生长碳源为麦芽糖, 木糖为碳源时产 IAA 最高。

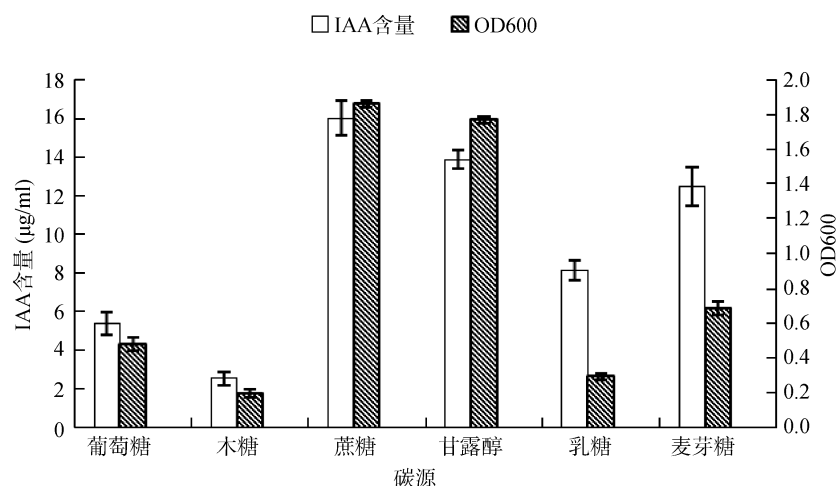


图5 不同碳源对菌株生长和产 IAA 的影响

Fig. 5 Effects of different carbon sources on the growth and IAA secretion of strain ZH5

2.2.5 不同氮源对菌株 ZH5 的生长及产 IAA 的影响 如图 6 所示, 对于菌体 ZH5 生长来说, 不同氮源的促进作用依次为: 酵母粉 > 蛋白胨 > 丙氨酸 > 硝酸铵 > 硝酸钾 > 硫酸铵 > 尿素; 当酵母粉为氮源时, 菌株生长最好; 不同氮源对菌株产 IAA 的影响为: 酵母粉 > 蛋白胨 > 尿素 > 硝酸钾 > 丙氨酸 > 硝酸

铵 > 硫酸铵, 当供给氮源为酵母粉时菌株产 IAA 量最大, 这与菌株生长最佳氮源一直, 并且与其他氮源相比差异性显著 ($P < 0.05$)。由此可以发现当供给氮源为酵母粉和蛋白胨时, 菌株的生长及产 IAA 能力均最大, 与其他氮源相比差异性极显著 ($P < 0.01$)。图中结果还显示, 对于菌株的生长及产 IAA 能力

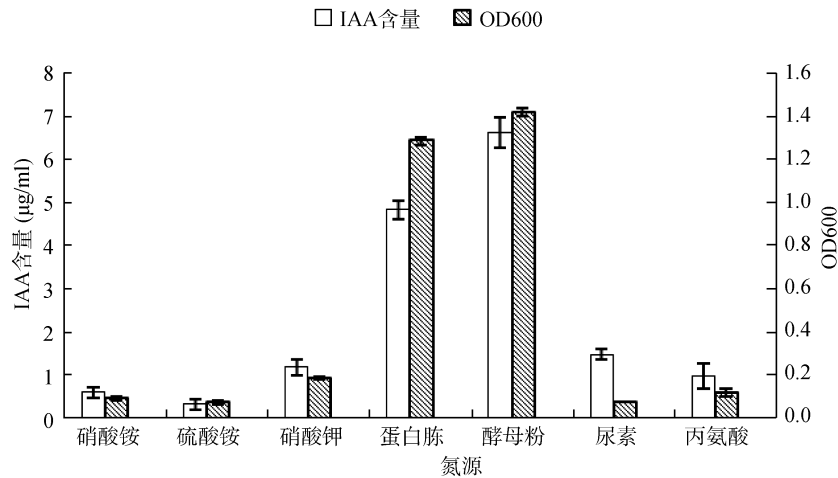


图 6 不同氮源对菌株生长和产 IAA 的影响
Fig. 6 Effects of different nitrogen sources on the growth and IAA secretion of strain ZH5

来说，有机氮源明显优于无机氮源。这一最适氮源的结果与徐文思等^[18]研究结果一致，但是菌株生长量及 IAA 产生量均比徐文思等^[18]的高。

2.3 产 IAA 菌株 ZH5 的解磷效果

通过解磷实验发现(表 3),菌株 ZH5 解磷效果比较明显，其对磷酸三钙、磷酸铝和磷酸铁的转化量比 CK 分别高出了164.73、54.26 和 82.39 mg/L。这一结果说明菌株 ZH5 对难溶性磷酸盐具有溶解作用，并且能够以难溶性磷酸盐为磷源进行生长，并将其转化成可溶性磷酸盐，这一结果与徐文思等^[18]的研究结果不完全一致，徐文思等只研究了菌株对磷酸三钙的解磷影响，其转化量为 41.86 mg/L，其菌株的解磷效果远远低于 ZH5 的解磷效果，说明 ZH5 具有更好的解磷作用。

表 3 接种菌株 ZH5 对溶液中溶磷量的影响			
Table 3 Effects of strain ZH5 on phosphate dissolution rate in the solution			
处理	磷酸三钙(mg/L)	磷酸铝(mg/L)	磷酸铁(mg/L)
CK	21.42	17.31	18.01
ZH5	186.14	71.57	101.40

表 4 接种菌株 ZH5 对花生根系和植株的影响							
Table 4 Effects of strain ZH5 on root architecture and plant of peanut							
处理	根长(cm)	根表面积(cm ²)	根体积(cm ³)	根尖数	鲜重(g/株)	株高(cm/株)	植株全磷(g/kg)
CK	346.31 ± 3.37 B	60.78 ± 0.35 B	0.83 ± 0.03 B	3 478.01 ± 26.02 b	2.05 ± 0.10 B	11.99 ± 0.35 B	5.54 ± 0.04 b
ZH5	568.65 ± 10.05 A	81.66 ± 2.13 A	1.40 ± 0.12 A	4 458.67 ± 35.50 a	3.07 ± 0.11 A	18.47 ± 0.27 A	6.75 ± 0.07 a

注：表中同列数据小写字母不同表示两处理间差异达到 $P<0.05$ 显著水平，大写字母不同表示两处理间差异达到 $P<0.01$ 显著水平。

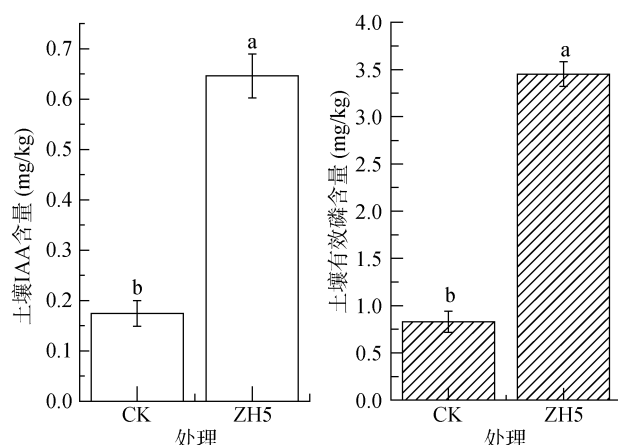
3 结论

本试验从江西红壤中筛选出一株具有产吲哚乙酸(IAA)能力并且有解磷能力的菌株 ZH5，该菌株

2.4 菌株 ZH5 对盆栽花生的促生试验

由表 4 可知，接种菌株 ZH5 的处理，花生根系的根长、根表面积、根体积和根尖数与对照 CK 相比分别增加了64.2%、34.4%、68.7% 及 28.2%，这一结果与徐文思等^[18]和李引等^[16]的研究结果不完全一致，其中 ZH5 对花生根长与根尖数的影响效果比徐文思等^[18]的研究显著，ZH5 对花生根尖数的增长效果也比李引等^[16]的研究效果明显，说明菌株 ZH5 对花生根系生长发育有较好的促进作用。由于 ZH5 菌株的促进作用，花生植株的鲜重、株高以及全磷含量与对照相比都有所提高，其中花生鲜重和株高比对照分别增加了49.8% 和 54.0%，花生植株全磷含量增加了 21.8%(表 4)。另外由图 7 可知，接种菌株 ZH5 的处理与对照处理相比，土壤中 IAA 含量和速效磷含量都显著提高，与对照相比，其中 IAA 含量提高了 3.71 倍；土壤速效磷含量提高了 88.71%。因此菌株 ZH5 对花生生长具有明显的促生作用，并且对于土壤速效磷含量也有显著提高。

24 h 分泌 IAA 能力达到 43.18 μg/ml，通过 16S rRNA 序列对比以及生理生化试验结果鉴定菌株 ZH5 为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)。菌株生长和产 IAA 的最佳通气量为 50 ml/250 ml，最佳



(图中小写字母不同表示处理间差异达到 $P < 0.05$ 显著水平)

图7 接种菌株 ZH5 对土壤有效磷和 IAA 含量的影响

Fig. 7 Effects of strain ZH5 on soil available P and IAA contents

培养时间是 24 h, 最佳 pH 范围是 6~8。对于菌株生长和产 IAA 量来说菌株的最佳碳源与氮源分别是蔗糖和酵母粉。此外花生盆栽试验显示, 接菌处理的植株鲜重、株高、花生根系、土壤中的 IAA 含量以及土壤速效磷均显著高于未接种的对照, 可见促生菌 ZH5 能够显著地促进花生的生长, 并且有很好的解磷效果。

参考文献:

- [1] Penrose DM, Glick BR. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth promoting rhizobacteria[J]. Plant Physiology, 2003, 118(1): 10-15
- [2] Boddey RM, Dobereiner J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent progress and perspectives for the future[J]. Fertilizer Research, 1995, 42(1/3): 241-250
- [3] 冯欣, 刁治民, 曹玲珍, 雷青娟, 谢红民, 邓军. PGPR 作为微生物肥料的研究进展[J]. 安徽农学通报, 2005(6): 85-87
- [4] Dubeikovskiy AN, Mordukhove EA, Kochetkov VV, Polikarpova FY, Boronin AM. Growth promotion of blackcurrant softwood cuttings by recombinant strain *Pseudomonas fluorescens* BSP53a synthesizing an increased of indole-3-acetic acid[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1993, 25(9): 1 277-1 281
- [5] 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
- [6] 黄晓东, 季尚宁, Bernard G, Bruce G, 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
- [7] 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
- [8] 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
- [9] 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]. Physiologia Plantarum, 1969, 22: 51-58
- [10] 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
- [11] 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
- [12] 布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰细菌鉴定手册. 8 版[M]. 北京: 科学出版社, 1984
- [13] 夏北成, Zhou JZ. 分子生物学方法在微生物生态学中的应用[J]. 中山大学学报(自然科学版), 1998, 37(2): 97-101
- [14] 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
- [15] 许光辉, 郑洪元. 土壤微生物分析方法手册[M]. 北京: 农业出版社, 1986: 246-248
- [16] 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
- [17] 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
- [18] 徐文思, 姜瑛, 李引, 张振, 徐莉, 胡锋, 李辉信. 一株植物促生菌的筛选、鉴定及其对花生的促生效应研究[J]. 土壤, 2014, 46(1): 119-125
- [19] 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
- [20] Patten CL, Glick BR. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid[J]. Canadian Metallurgical Quarterly, 1996, 42(3): 207-220
- [21] 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

Isolation and Identification of the IAA-producing and Phosphate-dissolving Bacteria and Its Promoting Effects on Red Soil

ZHENG Wen-bo^{1,2}, SHEN Fei¹, YAN Xiao-mei¹, ZHANG Shu-xuan¹, SUN Bo², HU Feng¹, LI Hui-xin^{1*}

(1 College of Resources and Environmental Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2 National Engineering Research and Technology Center for Red Soil Improvement, Ecological Experiment Station of Red Soil, Chinese Academy of Sciences, Yingtan, Jiangxi 335211, China)

Abstract: Three IAA-producing strains were isolated from the peanuts growing in red soil. Among the three strains, ZH5 showed the highest and most stable IAA excreting ability (43.18 $\mu\text{g/ml}$ in 24 h 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*. Single factor tests were designed to explore conditions optimal to growth and fermentation of the strain. 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 6–8, filling volume 50 ml/250 ml flask, incubation at 30 $^{\circ}\text{C}$ 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: Red soil; PGPB; Indole-3-acetic acid (IAA); Phosphate-dissolving; Growth-promoting