

耐盐菌 *Pseudomonas brassicacearum* YZX4 的筛选、鉴定及其植物促生特性*

孙晓莹^{1,2} 陈意超¹ 曹沁¹ 罗倚坪¹ 李东^{1**} 刘晓风^{1**}

¹中国科学院成都生物研究所 成都 610041

²中国科学院大学 北京 100049

摘要 植物根际促生菌 (PGPR) 具有促进植物生长的作用. 从盐碱地植物根际土壤中分离筛选耐盐菌, 测定其在盐胁迫下的1-氨基环丙烷-1-羧酸 (ACC) 脱氨酶活性、吲哚乙酸 (IAA) 合成能力、嗜铁素合成能力、无机磷溶解能力, 以及在 Ashby 无氮培养基上的生长情况; 并对同时具有以上促生功能的耐盐菌进行不同盐浓度下的促生功能测定. 小黄白 (白菜 *Brassica pekinensis* 的一个品种) 种子萌发促生实验和菌株鉴定. 结果显示, 在筛选得到的15株耐盐菌中, 菌株 YZX4 在 10 g/L NaCl 浓度下同时具有多种促生特性. 在不同盐浓度下促生功能测定实验中, 当盐浓度为 10 g/L 时, 菌株的 ACC 脱氨酶活性 (以 α -KA/Pr 计)、IAA 合成量和嗜铁素相对含量最高, 分别为 $11.07 (\pm 1.89) \mu\text{mol mg}^{-1} \text{h}^{-1}$ 、 $36.42 (\pm 1.81) \text{mg/L}$ 和 $0.61 (\pm 0.15)$, 且随着盐浓度的增加而降低; 在 20 g/L 盐浓度下, 该菌株的固氮量、有机磷溶解量和无机磷溶解量最高, 分别为 $4.79 (\pm 1.61) \text{mg/L}$ 、 $1.68 \pm (0.04) \text{mg/L}$ 和 $23.77 (\pm 1.30) \text{mg/L}$. 在小黄白种子萌发促生实验中, 当盐浓度为 5.84 g/L 时, YZX4 的菌液 (10^5CFU/mL) 对小黄白的种子萌发率、幼苗根、茎长和平均鲜重分别提高了 7.19%、17.33%、23.85% 和 22.69%. 根据形态特征、生理生化鉴定结果和 16S rDNA 序列分析, 初步确定菌株 YZX4 为油菜假单胞菌 (*Pseudomonas brassicacearum*). 上述研究结果表明在盐胁迫下同时具备多种促生特性的菌株 YZX4 可作为盐碱地改良微生物菌剂的优良菌源. (图6表4参37)

关键词 耐盐菌; 植物根际促生菌; ACC 脱氨酶; 吲哚乙酸 (IAA); 嗜铁素; 固氮; 溶磷

CLC S144 : S156.4

Isolation and identification of halotolerant *Pseudomonas brassicacearum* YZX4 and its plant growth-promoting traits*

SUN Xiaoying^{1,2}, CHEN Yichao¹, CAO Qin¹, LUO Yiping¹, LI Dong^{1**} & LIU Xiaofeng^{1**}

¹ Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China

² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100000, China

Abstract Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) play an important role in plant growth in saline soils. To study the mechanisms of action of PGPRs under certain NaCl concentrations, saline rhizosphere soil was screened for salt-tolerant bacteria with plant growth-promoting traits, such as 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase activity, indole acetic acid (IAA) and siderophore production, growth on Ashby medium, and inorganic phosphate solubilization. The strain with the greatest growth-promoting functions was identified and tested for its effect on Chinese cabbage (*Brassica pekinensis*) seed germination and plant growth under different salt concentrations. Strain YZX4 was found to have greater plant growth-promoting activity than the other strains tested. YZX4 showed the highest ACC deaminase activity ($11.07 \pm 1.89 \mu\text{mol } \alpha\text{-KA}/[\text{mg Pr} \cdot \text{h}]$), IAA production ($36.42 \pm 1.81 \text{mg/L}$), and siderophore production (0.61 ± 0.15) in the presence of 10 g/L NaCl. These activities all decreased with increasing NaCl concentrations from 10 g/L to 100 g/L. YZX4 had the highest nitrogen fixation and organic phosphate and inorganic phosphate solubilization ability in 20 g/L NaCl, reaching $4.79 \pm 1.61 \text{mg/L}$, $1.68 \pm 0.04 \text{mg/L}$, and $23.77 \pm 1.30 \text{mg/L}$, respectively. Compared with the control group, YZX4 (10^5CFU/mL) markedly increased the germination rate (7.19%), root length (17.33%), stem length (23.85%), and fresh weight (22.69%) of Chinese cabbage in 5.84 g/

收稿日期 Received: 2018-12-18 接受日期 Accepted: 2019-01-29

*国家重点研发计划课题 (2018YFD0501405)、中国科学院重点部署项目 (KFZD-SW-313-3)、中国科学院 STS 区域重点项目 (KFJ-STQY-ZD-117)、中国科学院国际合作局对外合作重点项目 (182344KYSB20170009) 和中国科学院青年创新促进会项目 (2017423) 资助 Supported by the National Key R & D Program of China (2018YFD0501405), the Key Deployment Project of Chinese Academy of Sciences (CAS) (KFZD-SW-313), the Key Project of Science and Technology Service Network Initiative (STS) of CAS (KFJ-STQY-ZD-117), the Key Project for Foreign Cooperation of International Cooperation Bureau of CAS (182344KYSB20170009), and the Project of Youth Innovation Promotion Association of CAS (2017423)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: lidong@cib.ac.cn; liuxf@cib.ac.cn)

L NaCl. Moreover, bacterial morphological observations, physiological and biochemical identification, and 16S rDNA analysis showed that strain YZX4 was *Pseudomonas brassicacearum*. These results indicate that YZX4 has the potential for use in microbial fertilizer, which could be used to promote plant growth under certain NaCl concentrations.

Keywords halotolerant bacteria; plant growth promoting rhizobacteria; 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase; siderophore; indole acetic acid (IAA); nitrogen fixation; phosphate solubilization

利用环境友好的生物方法治理盐碱地已成为当前研究重点,生物法主要包括耐盐植物法和耐盐微生物法,其中可促进植物生长的植物根际促生菌(Plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)更是受到了研究者的关注。PGPR是指定植于植物根部系统并能促进植物生长的细菌^[1],其促进植物生长的作用机制主要包括:(1)吡啶乙酸(IAA)等生长激素合成^[2];(2)1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)脱氨酶合成^[3];(3)嗜铁素合成^[4];(4)固氮^[5];(5)溶磷^[6]等。

大量研究表明,PGPR可以促进盐胁迫下植物的生长。如郑娜等筛选得到的具有ACC脱氨酶活性和IAA合成能力的 *Variovorax* sp. TY4204可以缓解番茄盐胁迫并促进番茄的生长^[7]; Egamberdieva等筛选的具有IAA合成能力的 *Pseudomonas aureantiaca* TSAU22对盐胁迫环境下小麦的生长有明显的促进作用^[8]; Bal等筛选的具备ACC脱氨酶活性的 *Alcaligenes* sp. SBI-ACC2可以有效地促进盐胁迫下水稻的种子萌发和植株生长^[9]; Sharma等筛选的耐盐 *Ochrobactrum anthropi* MBE03具备IAA合成能力、ACC脱氨酶活性和溶磷能力等多种促生特性,且可以提高花生对盐胁迫的耐受性^[10]。

目前关于耐盐PGPR的研究,主要着重于先研究其促生特性,然后再探究其耐盐能力,对于微生物在盐胁迫环境下的促生特性的研究相对较少,这可能会忽视实际应用中的盐胁迫对菌株促生特性的影响,以致耐盐PGPR不能更好地发挥其促生作用。本研究从盐碱土植物根际土壤中分离筛选在10 g/L盐浓度下同时具有多种促生特性的耐盐菌,测定其在不同盐浓度下的ACC脱氨酶活性、IAA合成能力、嗜铁素合成能力、固氮能力和溶磷(无机磷和有机磷)能力,最后考察菌株对小黄白的种子萌发和幼苗生长的促进作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源 采自内蒙古包头某盐碱地的盐角草(*Salicornia europaea*)、盐地碱蓬(*Suaeda salsa*)、猪毛蒿(*Artemisia scoparia*)、芦苇(*Phragmites australis*)、芒颖大麦草(*Hordeum jubatum*)等植物的根际土壤。

1.1.2 培养基 牛肉膏蛋白胨培养基; DF盐培养基以及ADF盐培养基^[11]; CCM培养基^[12]; MKB培养基^[13]; Pikovskaya培养基^[14]; Ashby无氮培养基^[15]。

1.1.3 主要试剂与仪器 ACC标准品购自上海毕得医药科技有限公司, IAA标准品购自梯希爱(上海)化成工业发展有限公司,其他化学试剂为分析纯。主要仪器为多功能微孔板检测仪(Synergy HTX),凯氏定氮仪(Kjeltec 2200),双槽梯度PCR仪(S1000)等。

1.2 方法

1.2.1 耐盐菌的分离筛选 用无菌水冲洗植物根部,得到根际土壤原液,将其稀释 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 倍后,涂布到含10 g/L NaCl的牛肉膏蛋白胨培养基上。将培养皿倒置30℃恒温培养1-4 d后,挑取不同类型的典型单菌落,经纯化后4℃斜面保藏。

1.2.2 耐盐菌的促生特性 ACC脱氨酶活性测定参照Penrose等的方法^[16],以单位蛋白含量的细菌菌体在单位时间内产生 α -丁酮酸(α -KA)的量,即 $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{h}^{-1}$ 表示菌株ACC脱氨酶的活性。IAA合成能力测定培养基为含1 g/L NH_4NO_3 和100 mg/L L-色氨酸的CCM液体培养基, IAA含量测定参考Glickmann和Dessaux的方法^[17]。嗜铁素合成能力测定参考王平等的方法^[13],并对嗜铁素相对含量进行定义:样品在630 nm处测定的吸光度值为 A ,未接菌的空白对照吸光度值记为 A_0 , A/A_0 代表样品中嗜铁素的相对含量, A/A_0 值在0-1.0之间代表菌株具有嗜铁素合成能力,且 A/A_0 值越小代表嗜铁素相对含量越高^[18]。无机磷溶解能力测定:将菌株接种于Pikovskaya培养基中,以未接菌为空白对照,30℃、180 r/min培养,隔0.5 d取样(0 d开始),将培养液11 000 r/min离心5 min后,取上清液用钼锑抗比色法测定速效磷含量^[19],同时测定上清液pH值。有机磷溶解能力测定:将菌株接种于含有0.5 g/L蛋黄卵磷脂的Pikovskaya基础培养基[不含 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$]中,以未接菌为空白对照,30℃、180 r/min培养4 d,将培养液11 000 r/min离心5 min后,取上清液用钼锑抗比色法测定速效磷含量。固氮能力定性测定:将菌株接种于Ashby无氮固体培养基中,30℃培养,观察菌株的生长情况;固氮能力定量测定:将菌株接种于Ashby无氮液体培养基中,以未接菌为空白对照。28℃、120 r/min培养6 d后,用凯氏定氮仪测定培养液中的总氮含量。

1.2.3 菌株耐盐碱能力 耐盐能力:将菌株分别接种到含有0、20、50、70、100、120、150、200 g/L NaCl的牛肉膏蛋白胨培养基(pH=7.2)中,以不接菌的牛肉膏蛋白胨培养基作为空白对照,30℃、180 r/min摇床培养2 d后,测定培养液在600 nm处的吸光值($\text{OD}_{600 \text{ nm}}$)。耐碱能力:将菌株分别接种到pH为7、8、9、9.5、10、11的含20 g/L NaCl牛肉膏蛋白胨培养基中,以不接菌的牛肉膏蛋白胨培养基作为空白对照,30℃、180 r/min培养2 d后,测定培养液在600 nm处的吸光值($\text{OD}_{600 \text{ nm}}$)。

1.2.4 种子萌发试验 选取发育时间相同、重量相似的小黄白种子,并进行表面消毒(70%酒精浸泡5 min,无菌水冲洗3次)。用5.84 g/L无菌NaCl溶液将YZX4菌液稀释至 10^4 和 10^5 CFU/mL,分别加到装有3层滤纸并已灭菌烘干的培养皿中,将滤纸充分均匀润湿,以5.84 g/L无菌NaCl溶液为空白对照(CK)。取经表面消毒的小黄白种子置于滤纸上。30℃培养3 d后,测定每皿种子萌发率、幼苗根茎长以及平均鲜重。运用SPSS 17.0软件对小黄白种子萌发实验中结果进行单因素方差分析。

1.2.5 菌株鉴定 形态特征和生理生化特征参照《常见细菌系统鉴定手册》测定^[20]。利用试剂盒提取菌体总DNA,以菌体总DNA为模板,采用通用引物27F(5'-AGAGTTTGAT-CCTGGCTCAG-3')和1492R(5'-GGTTACCTTGTTA-CGACTT-3')进行PCR扩增。将扩增得到的PCR产物交至上海生工公司进行测序,将测序所得基因序列提交GenBank数据库,用BLAST进行序列对比分析。选取同源性高的相关序列

采用MEGA 6.0软件进行比对分析,并用邻近法构建进化树。

2 结果与分析

2.1 耐盐菌的分离筛选

以10 g/L NaCl为筛选条件,从盐碱地原生植物根际土壤中共得到15株耐盐菌,具体的ACC脱氨酶活性、IAA合成能力、嗜铁素合成相对含量、Ashby无氮培养基生长情况和无机磷溶解能力测定结果见表1。其中,菌株YZX4同时具有上述促生特性,且ACC脱氨酶活性、IAA合成量和无机磷溶解量最高,分别为 $11.07 (\pm 1.89) \mu\text{mol mg}^{-1} \text{h}^{-1}$ 、 $36.42 (\pm 1.81) \text{mg/L}$ 和 $15.45 (\pm 2.42) \text{mg/L}$ 。

2.2 不同盐浓度下菌株YZX4的促生特性

在不同盐浓度(10、20、50、100 g/L NaCl)下对菌株YZX4的ACC脱氨酶活性、IAA合成能力、嗜铁素合成能力、固氮能力和有机磷溶解能力进行定量分析,结果见表2。YZX4的ACC脱氨酶活性、IAA合成能力和嗜铁素合成能力随着盐浓度的增加而大幅减弱。在10 g/L NaCl浓度下时ACC脱氨酶活性、IAA合成量以及嗜铁素相对含量(A/A_t)最高,分别为 $11.07 (\pm 1.89) \mu\text{mol mg}^{-1} \text{h}^{-1}$ 、 $36.42 (\pm 1.81) \text{mg/L}$ 和 $0.61 (\pm 0.15)$;在20 g/L NaCl条件下固氮量最高,为 $4.79 (\pm 1.61) \text{mg/L}$ 。YZX4在20 g/L NaCl条件下由最高的有机磷溶解量,为 $1.68 \pm (0.04) \text{mg/L}$ 。在盐浓度为20 g/L时,YZX4的溶解无机磷能力

最强(图1),此条件下培养2 d后培养液中的无机磷溶解量达到 $23.77 (\pm 1.30) \text{mg/L}$,pH达到最低值 $3.80 (\pm 0.04)$ 。对20 g/L NaCl浓度下培养液上清液中的无机磷溶解量和pH值之间作相关性分析(图2),得到回归方程 $y = -7.668x + 52.483$,相关性系数 $R^2 = 0.88$,皮尔逊系数 $r = -0.939 (P < 0.01)$,说明无机磷溶解量与pH值在 $P < 0.01$ 水平上呈显著负相关关系。

2.3 菌株YZX4的耐盐碱能力

由图3可见,菌株YZX4的NaCl耐受范围为0-70 g/L,最适生长的盐浓度为20 g/L,说明菌株具有较广泛的耐盐能力;在20 g/L NaCl浓度下,碱性pH的耐受范围为7-9,最适生长的碱性pH为9,该结果表明菌株YZX4在20 g/L盐浓度下具有一定的耐碱能力。

2.4 菌株YZX4的种子萌发促进作用

由表3和图4可得,菌株YZX4在5.84 g/L NaCl条件下对小黄白的种子萌发和幼苗生长有显著的促进作用($P < 0.05$)。与空白对照相比,菌株YZX4在菌液浓度为 10^4CFU/mL 时,对小黄白的种子萌发率、幼苗的根长、茎长和鲜重分别提高了11.49%、26.23%、14.68%和20.17%;在菌液浓度为 10^5CFU/mL 时,对小黄白的种子萌发率、幼苗的根长、茎长和鲜重分别提高了7.19%、17.33%、23.85%和22.69%。

2.5 菌株YZX4的鉴定

菌株YZX4属于好氧性革兰氏阴性菌,菌落呈圆形、黄绿

表1 10 g/L盐浓度下耐盐菌株的促生特性

Table 1 The plant growth-promoting traits of salt-tolerant bacteria under 10 g/L NaCl

菌株 Strain	ACC脱氨酶活性 ACC deaminase activity (α -KA, $A/\mu\text{mol mg}^{-1} \text{h}^{-1}$)	IAA合成量 IAA production ($\rho/\text{mg L}^{-1}$)	嗜铁素相对含量 Siderophore production (A/A_t)	无机磷溶解量 ^b Phosphate solubilizing ($\rho/\text{mg L}^{-1}$)	Ashby无氮培养基生长情况 ^c Growth on Ashby medium
YZX4	11.07 ± 1.89	36.42 ± 1.81	0.61 ± 0.15	15.45 ± 2.42	+
YX1	5.26 ± 0.83	30.22 ± 3.81	ND ^a	7.44 ± 0.31	+
YZX3	9.54 ± 1.96	31.34 ± 2.05	ND	5.35 ± 0.13	-
YZX11	ND	17.76 ± 0.26	0.77 ± 0.04	ND	-
YX15	ND	ND	0.90 ± 0.07	ND	-
YX5	ND	ND	0.38 ± 0.01	8.49 ± 0.76	+
YZX5	ND	ND	0.40 ± 0.07	1.50 ± 0.36	+
YX4	ND	ND	ND	6.33 ± 0.45	+
YZX1	ND	ND	ND	8.49 ± 0.76	+
YZX2	ND	ND	ND	13.12 ± 1.36	+
YZX7	ND	ND	ND	6.58 ± 0.32	+
YZX7-2	ND	ND	ND	4.38 ± 0.21	+
YX7-2	ND	13.73 ± 2.94	ND	ND	+
YX8	ND	13.13 ± 2.01	0.51 ± 0.04	ND	-
YX3	ND	ND	ND	ND	-

^aND: 未检出。^b无机磷溶解量: 培养过程中,接菌培养基速效磷含量减去空白对照速效磷含量后的最大速效磷含量。‘固氮能力’:“+”为菌株可在Ashby无氮培养基中生长;“-”为菌株不可在Ashby无氮培养基中生长。

^aND: Not detected. ^bPhosphate solubilization calculated using the maximum available phosphorus content of the inoculation treatment medium minus the phosphorus content of the non-inoculation treatment medium (control group) during the cultivation. ^c“+” means that strains could grow in Ashby medium;“-” means that strains could not grow in Ashby medium.

表2 不同盐浓度下菌株YZX4的促生特性

Table 2 Plant growth promoting traits of strain YZX4 under different NaCl concentration

NaCl ($\rho/\text{g L}^{-1}$)	10	20	50	100
ACC脱氨酶活性 ACC deaminase activity (α -KA, $A/\mu\text{mol mg}^{-1} \text{h}^{-1}$)	11.07 ± 1.89	9.79 ± 2.28	0.34 ± 0.11	ND ^a
IAA合成 IAA production ($\rho/\text{mg L}^{-1}$)	36.42 ± 1.81	34.03 ± 0.45	0.63 ± 0.05	ND
嗜铁素相对含量 Siderophore production (A/A_t)	0.61 ± 0.15	0.97 ± 0.03	ND	ND
^b 固氮量 Nitrogen fixation ($\rho/\text{mg L}^{-1}$)	3.67 ± 0.73	4.79 ± 1.61	ND	ND
有机磷溶解量 Organic phosphate ($\rho/\text{mg L}^{-1}$)	1.43 ± 0.05	1.68 ± 0.04	0.49 ± 0.01	0.25 ± 0.06

^aND: 未检出。^b固氮量: 培养6d后,接菌培养基总氮含量减去未接菌培养基(对照组)总氮含量。

^aND: Not detected. ^bNitrogen fixation calculated using the total nitrogen of the inoculation treatment medium minus the total nitrogen of the non-inoculation treatment medium (control group) after 6 days cultivation.

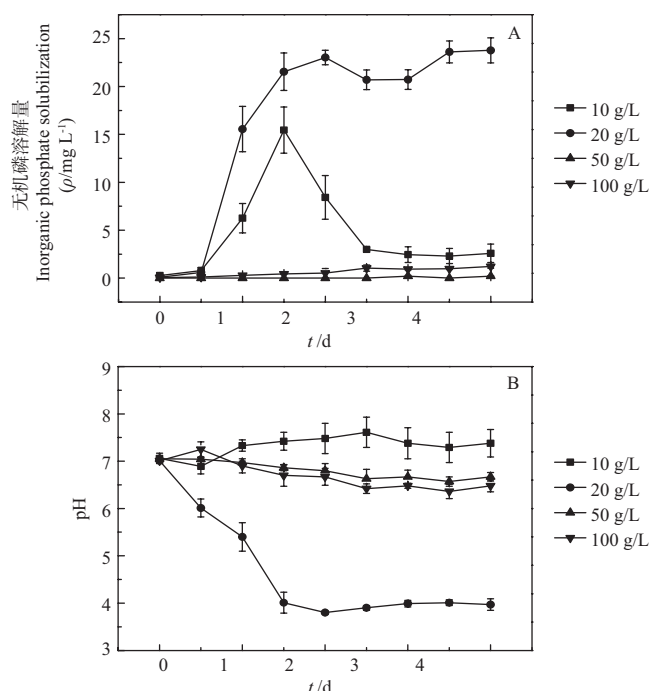


图1 不同盐浓度下菌株YZX4培养液中无机磷溶解量 (A) 与pH值 (B) 的变化。
Fig. 1 The inorganic phosphate solubilization (A) and pH (B) of strain YZX4 culture under different NaCl concentrations.

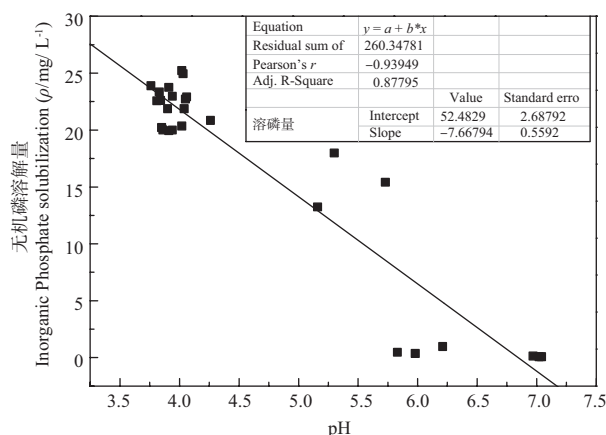


图2 20 g/L NaCl浓度下菌株YZX4培养基上清液中无机磷溶解量与pH值的关系 ($P < 0.01$)。
Fig. 2 Relationship of the inorganic phosphate solubilization and pH of strain YZX4 culture at 20 g/L NaCl concentrations at $P < 0.01$ level.

色, 边缘规则, 表面湿润。扫描电镜观测菌体呈直杆状, 不产芽孢, 菌体大小为 $(4.3-6.2) \mu\text{m} \times (21.4-58.2) \mu\text{m}$ (图5), 最适生长温度为 30°C , 其他生理生化特征见表4。测序结果显示菌株YZX4的16S rDNA基因序列长度为1439 bp, 在BLAST 数据库进行相似性比对, 并使用MEGA 6.0构建系统发育树 (图6)。结果显示, 菌株YZX4与油菜假单胞菌 (*Pseudomonas brassicacearum*) (Genbank登录号: EU391388) 的相似性达99%, 并且在系统发育树上亲缘关系最近。根据YZX4的形态特征、生理生化特征以及其16S rDNA序列分析, 初步鉴定该菌株YZX4为油菜假单胞菌 (*Pseudomonas brassicacearum*)。

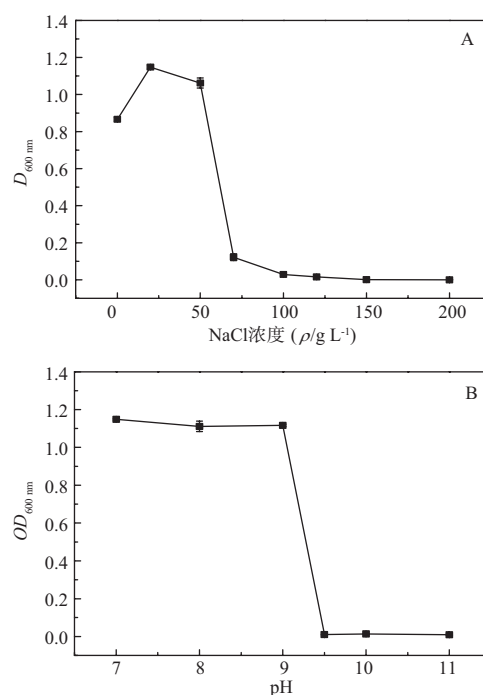


图3 菌株YZX4的NaCl浓度 (A) 和碱性pH (B) 的耐受能力。
Fig. 3 Salt (A) and alkaline (pH) (B) tolerance of strain YZX4.

表3 菌株YZX4对小白菜的种子萌发和幼苗生长的作用
Table 3 Effect of YZX4 on seed germination and seedling growth of Chinese cabbage

处理 Treatment	萌发率 Germination (r/%)	根长 Root length (l/cm)	茎长 Stem length (l/cm)	鲜重 Fresh weight (m/g)
CK	77.71 ± 0.68 ^c	2.02 ± 0.13 ^b	1.09 ± 0.11 ^a	0.0238 ± 0.0013 ^b
YZX4 ($n_{\text{CFU}}/10^4 \text{ mL}^{-1}$)	86.83 ± 1.63 ^a	2.55 ± 0.18 ^a	1.25 ± 0.23 ^a	0.0286 ± 0.0014 ^a
YZX4 ($n_{\text{CFU}}/10^5 \text{ mL}^{-1}$)	83.30 ± 1.35 ^b	2.37 ± 0.09 ^a	1.35 ± 0.10 ^a	0.0292 ± 0.0016 ^a

CK: 5.84 g/L NaCl溶液处理; 同列字母相同者表示差异不显著, 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

CK: Treatment with 5.84 g/L NaCl; The same letters in each transaction indicate no significant difference, and different letters indicate significant difference at 0.05 level.

3 讨论与结论

植物在受到盐胁迫时会大量合成乙烯^[21], 当乙烯过量时会抑制植物的生长。PGPR可以通过合成ACC脱氨酶将乙烯合成的前体物质ACC分解成氨和 α -KA的方式减少乙烯含量, 间接促进植物生长^[3, 9]。菌株YZX4在10、20、50 g/L NaCl浓度下具有ACC脱氨酶活性, 且随着盐浓度的增加而减弱, 与Bhise筛选的*Enterobacter cloacae* KBPD的测定结果^[22]相似, 且Maqshoof^[23]和Tank^[24]等认为在一定盐浓度范围内具有ACC脱氨酶活性的菌株可以降低盐胁迫环境下过量的乙烯对植物的抑制作用。

PGPR可以通过合成IAA的方式, 增强植物的抗氧化酶系统, 降低高渗透压力, 减少盐胁迫对植物生长的抑制作用^[25]。菌株YZX4的IAA合成能力随着盐浓度的增加而逐渐减弱, 与Nakbanpote等筛选的菌株*Serratia* sp. PDMCd2007的测定结

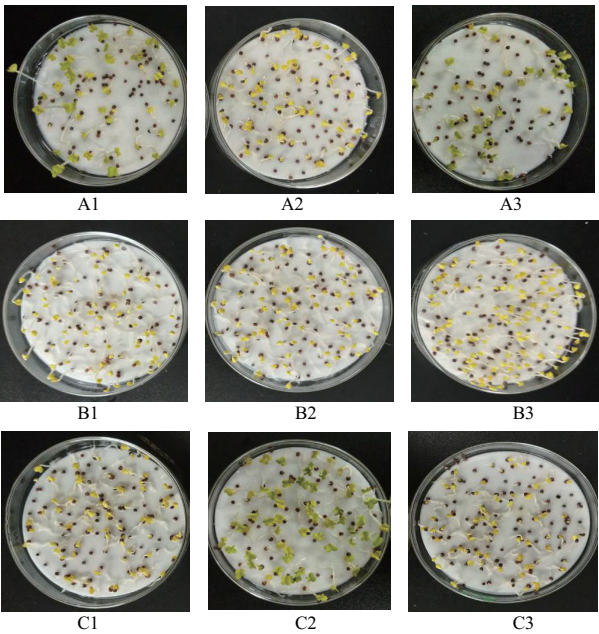


图4 菌株YZX4对小白菜种子萌发和幼苗生长的作用。A1-3: CK (5.84 g/L NaCl溶液); B1-3: YZX4菌液 (10⁴ CFU/mL) 处理组; C1-3: YZX4菌液 (10⁵ CFU/mL) 处理组。
Fig. 4 Effect of YZX4 on seed germination and seedling growth of Chinese cabbage. A1-3: CK (Treatment with 5.84 g/L NaCl); B1-3: Treatment with YZX4 (10⁴ CFU/mL); C-3: Treatment with YZX4 (10⁵ CFU/mL)

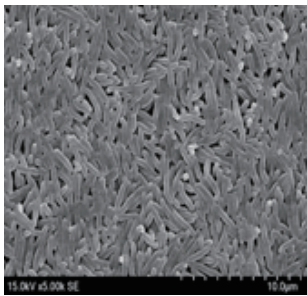


图5 菌株YZX4扫描电镜图。
Fig. 5 Scanning electron micrographs of YZX4.

果^[26]相似。在10 g/L NaCl浓度下, YZX4的IAA合成量最高, 为36.42 (±1.81) mg/L, Barua等筛选的菌株*Bacillus* sp. Can6在相同的条件下IAA合成量为21.85 mg/L^[27], 与其相比, YZX4具有较强的IAA合成能力。

菌株YZX4在10 g/L和20 g/L盐浓度下具有嗜铁素合成能力。嗜铁素是PGPR在低铁营养环境下产生的一种有机小分子物质^[28], 该物质可以通过与其他金属离子 (如Fe³⁺) 间的螯合作用或配体交换的方式^[29-30], 提高植物对离子的吸收。同时, PGPR可以通过合成嗜铁素与植物病原菌竞争铁离子, 抑制植物病原菌的生长, 减少其在植物生长过程中的危害作用^[31-32]。

在盐碱土壤中, 渗透压的增大会影响植物对生长过程必

表4 菌株YZX4生理生化鉴定结果
Table 4 Physiology and biochemistry result of YZX4

指标 Index	革兰氏染色 Gram reaction	淀粉水解 Starch hydrolysis	明胶液化 Gelatin liquefaction	脂肪酶活性 Lipase activity	纤维素酶活性 Cellulase activity	接触酶实验 Catalase reaction	甲基红(M.R) 反应 M.R reaction	V-P试验 V-P reaction	葡萄糖发酵 Glucose fermentation	蔗糖发酵 Sucrose fermentation
结果 Result	—	—	+	—	—	+	—	—	+	+

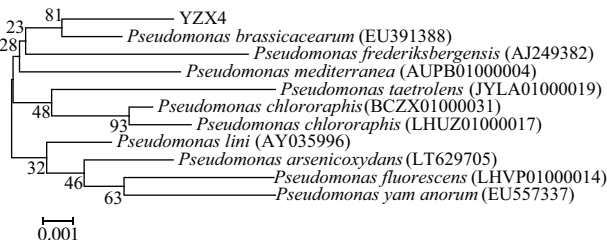


图6 菌株YZX4的系统发育树。通过邻近法构建系统发育树, 并基于1 000次重复对其进行评估。
Fig. 6 Phylogenetic tree of YZX4. The tree was generated by using neighbour-joining method and contained Bootstrap values based on 1 000 replications listed at the branching points.

要元素的吸收利用^[33]。PGPR可以通过溶磷固氮等作用, 提高盐碱土壤中的营养平衡, 促进植物生长^[10, 34]。菌株YZX4在20 g/L NaCl浓度下, 培养液上清液的无机磷溶解量与pH值呈现负相关 ($r = -0.939$, $P < 0.01$), 在菌株*Rhodococcus* sp. EC35的培养液中的无机磷溶解量与pH值也同样呈现出强烈的负相关的关系 ($r = -0.840$, $P < 0.01$)^[35]。这可能是由于微生物产生的一些酸类物质与难溶无机磷酸盐中的阳离子 (主要是钙离子) 进行了螯合作用, 将难溶无机磷转化成可溶的速效磷^[36]。因此可以证明菌株YZX4可以通过产酸的方式将盐土中的难溶无机磷转化为速效磷, 提高植物对磷元素的吸收利用。

在5.84 g/L NaCl浓度下, YZX4菌液还可显著促进小白菜的种子萌发幼苗生长 ($P < 0.05$)。这可能是菌液产生的某些代谢产物在种子萌发过程中起到了诱导和刺激种子萌发和幼苗生长的作用。Tsavkwlove等同样发现与兰花根际共生的高产IAA的菌株能够有效促进兰花种子的萌发^[37]。

菌株YZX4在10 g/L和20 g/L NaCl浓度下同时具有ACC脱氨酶活性、IAA合成能力、嗜铁素合成能力、固氮能力和溶磷 (有机磷和无机磷) 能力, 且有较强的盐碱耐受能力。在5.84 g/L NaCl浓度下, YZX4的菌液对小白菜种子萌发有显著的促进作用 ($P < 0.05$)。因此, YZX4可作为制备用于促进盐土中植物生长的微生物菌肥的优良菌源。

参考文献 [References]

- 1 Etesami H, Maheshwari DK. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: action mechanisms and future prospects [J]. *Ecotox Environ Safe*, 2018, **156** (225-246): 10.1016/j.ecoenv.2018.03.013
- 2 Costacurta A, Vanderleyden J. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria, critical reviews in microbiology, informa healthcare [J]. *Crit Rev Microbiol*, 1994, **21** (1): 1-18
- 3 Glick BR. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world [J]. *Microbiol Res*, 2014, **169** (1): 30-39
- 4 Neilands JB. Siderophores: Structure and function of microbial iron transport compounds [J]. *J Biol Chem*, 1995, **270** (45): 26723-26726
- 5 Graham PH, Vance CP, Graham PH, Vance CP. Nitrogen fixation in

- perspective: an overview of research and extension needs [J]. *Field Crop Res*, 2000, **65** (2): 93-106
- 6 Rodríguez H, Fraga R, Gonzalez T, Bashan Y. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria [J]. *Plant Soil*, 2006, **287** (1/2): 15-21
 - 7 郑娜, 柯林峰, 杨景艳, 王雪飞, 黄典, 程万里, 李嘉晖, 郑龙玉, 喻子牛, 张吉斌. 来源于污染土壤的植物根际促生细菌对番茄幼苗的促生与盐耐受机制[J]. *应用与环境生物学报*, 2018, **24** (1): 47-52 [Zheng N, Ke LF, Yang JY, Wang XF, Huang D, Cheng WL, Li JH, Zheng LY, Yu ZN, Zhang JB. Growth improvement and salt tolerance mechanisms of tomato seedlings [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2018, **24** (1): 47-52]
 - 8 Egamberdieva D. Alleviation of salt stress by plant growth regulators and IAA producing bacteria in wheat [J]. *Acta Physiol Plant*, 2009, **31** (4): 861-864
 - 9 Bal HB, Nayak L, Das S, Adhya TK. Isolation of ACC deaminase producing PGPR from rice rhizosphere and evaluating their plant growth promoting activity under salt stress [J]. *Plant Soil*, 2013, **366** (1-2): 93-105
 - 10 Sharma S, Kulkarni J, Jha B. Halotolerant rhizobacteria promote growth and enhance salinity tolerance in peanut [J]. *Front Microbiol*, 2016, **7**(368): 1-11
 - 11 赵龙飞, 徐亚军, 常佳丽, 李敏, 张艳玲, 党永杰, 王梦思, 程亚稳, 张斌月. 具ACC脱氨酶活性大豆根瘤内生菌的筛选、抗性及其促生作用[J]. *微生物学报*, 2016, **56** (6): 1009-1021 [Zhao LF, Xu YJ, Chang JL, Li M, Zhang YL, Dang YJ, Wang MS, Cheng Yw, Zhang BY. Screening, resistance and growth-promoting effect of endophytic bacteria with ACC deaminase activity isolated from soybean nodules [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2016, **56** (6): 1009-1021]
 - 12 李倍金, 罗明, 周俊, 孔德江, 张铁明. 几种禾草内生固氮菌的分离及固氮活性测定[J]. *草业学报*, 2008, **17** (5): 37-42 [Li BJ, Luo M, Luo J, Kong DJ, Zhang YM. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from several gramineae grasses and determination of their nitrogenase activity [J]. *Acta Pratac Sin*, 2008, **17** (5): 37-42]
 - 13 王平, 董颀, 李阜棣, 胡正嘉. 小麦根圈细菌铁载体的检测[J]. *微生物学通报*, 1994, **21** (6): 323-326 [Wang P, Dong B, Li FD, Hu ZJ. Detection and determination of the siderophores produced by wheat rhizobacteria [J]. *Microbiol China*, 1994, **21** (6): 323-326]
 - 14 Pikovskaya RI. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species [J]. *Microbiology*, 1948, **17**: 362-370
 - 15 Kızılkaya R. Yield response and nitrogen concentrations of spring wheat (*Triticum aestivum*) inoculated with *Azotobacter chroococcum* strains [J]. *Ecol Eng*, 2008, **33** (2): 150-156
 - 16 Penrose DM, Glick BR. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria [J]. *Physiol Plantarum*, 2003, **118** (1): 10-15
 - 17 Glickmann E, Dessaux Y. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria [J]. *Appl Environ Microb*, 1995, **61** (2): 793-796
 - 18 Payne SM. Detection, isolation, and characterization of siderophores [J]. *Method Enzymol*, 1994, **235** (235): 329
 - 19 Sumner JB. A method for the colorimetric determination of phosphorus [J]. *Science*, 1944, **100** (2601): 413-414
 - 20 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: 364-391 [Dong XZ, Cai MY. Systematic Identification of Common Bacteria [M]. Beijing: Science Press, 2001: 364-391]
 - 21 Saravanakumar D, Samiyappan R. ACC deaminase from *Pseudomonas fluorescens* mediated saline resistance in groundnut (*Arachis hypogea*) plants [J]. *J Appl Microbiol*, 2010, **102** (5): 1283-1292
 - 22 Bhise KK, Bhagwat PK, Dandge PB. Plant growth-promoting characteristics of salt tolerant enterobacter cloacae strain KBPD and its efficacy in amelioration of salt stress in *Vigna radiata* L. [J]. *J Plant Growth Regul*, 2016, **36** (1): 215-226
 - 23 Maqshoof A, Zahir ZA, H Naeem A, Asghar M. Inducing salt tolerance in mung bean through coinoculation with rhizobia and plant-growth-promoting rhizobacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase [J]. *Can J Microbiol*, 2011, **57** (7): 578-589
 - 24 Tank N, Saraf M. Salinity-resistant plant growth promoting rhizobacteria ameliorates sodium chloride stress on tomato plants [J]. *J Plant Interact*, 2010, **5** (1): 51-58
 - 25 Li H, Lei P, Pang X, Li S, Xu H, Xu Z, Feng X. Enhanced tolerance to salt stress in canola (*Brassica napus* L.) seedlings inoculated with the halotolerant *Enterobacter cloacae* HSNJ4 [J]. *Appl Soil Ecol*, 2017, **119**: 26-34
 - 26 Nakbanpote W, Panitlurtumpai N, Sangdee A, Sakulpone N, Sirisom P, Pimthong A. Salt-tolerant and plant growth-promoting bacteria isolated from Zn/Cd contaminated soil: identification and effect on rice under saline conditions [J]. *J Plant Interact*, 2014, **9** (1): 379-387
 - 27 Barua S, Tripathi S, Chakraborty A, Ghosh S, Chakrabarti K. Characterization and crop production efficiency of diazotrophic bacterial isolates from coastal saline soils [J]. *Microbiol Res*, 2012, **167** (2): 95-102
 - 28 Ahmed E, Holmström SJM. Siderophores in environmental research: roles and applications [J]. *Microb Biotechnol*, 2014, **7** (3): 196-208
 - 29 Latour X, Delorme S, Mirleau P, Lemanceau P. Identification of Traits Implicated in the Rhizosphere Competence of Fluorescent *Pseudomonads*: Description of A Strategy Based on Population and Model Strain Studies Sustainable Agriculture [M]. Springer Netherlands, 2009: 285-296
 - 30 李亚男, 蒋芬, 张杰, 范永义, 陈敬, 彭友林, 胡运高. 高原土壤中稻瘟病拮抗细菌的抑菌效果及抗菌机理[J]. *应用与环境生物学报*, 2017, **23** (1): 33-40 [Li YN, Jiang F, Zhang J, Fan YY, Chen J, Peng YL, Hu YG. Inhibition effects and antibacterial mechanism against rice blast of antagonistic bacteria in plateau soil [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2017, **23** (1): 33-40]
 - 31 Duijff BJ, Meijer JW, Bakker PaHM, Schippers, B. Siderophore-mediated competition for iron and induced resistance in the suppression of fusarium wilt of carnation by fluorescent *Pseudomonas* spp. [J]. *Neth J Plant Pathol*, 1993, **99** (5-6): 277-289
 - 32 廖萍, 刘茂柯, 张瀚能, 赵翀, 杨雅琳, 张小平, 张金羽, 赵珂. 铬污染区糙野青茅内生耐铬细菌筛选及其促生能力[J]. *应用与环境生物学报*, 2015, **21** (6): 1025-1031 [Liao P, Liu MK, Zhang HN, Zhao C, Yang YL, Zhang XP, Zhang JY, Zhao K. Chromium-resistant endophytic bacteria from *Deyeuxia scabrescens* (Griseb.) in chromium contaminated area: isolation, screening and plant growth promoting [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2015, **21** (6): 1025-1031]
 - 33 Tester M, Davenport R. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants [J]. *Ann Bot-London*, 2003, **91** (5): 503-527
 - 34 Zhou N, Zhao S, Tian CY. Effect of halotolerant rhizobacteria isolated from halophytes on the growth of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) under salt stress [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2017, **364** (11): 1-8
 - 35 Pereira SIA, Castro PML. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance Zea mays growth in agricultural P-deficient soils [J]. *Ecol Eng*, 2014, **73**: 526-535
 - 36 Kpombekou-A K, Tabatabai MA. Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rocks [J]. *Soil Sci*, 1994, **158** (6): 442-453
 - 37 Tsavkelova EA, Cherdyntseva TA, Klimova SY, Shestakov AI, Botina SG, Netrusov AI. Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin [J]. *Arch Microbiol*, 2007, **188** (6): 655-664