



研究报告

4株茶树根际促生菌菌株的鉴定及促生作用

王欢 韩丽珍*

贵州大学生命科学学院 贵州 贵阳 550025

摘要:【背景】根际促生菌可以促进植物生长、提高植物抗性。茶树根际具有特殊的根土微生物生境,可以获得具促生作用的有益微生物。【目的】探究4株茶树根际促生菌菌株的分类地位及促生作用,筛选优良的根际促生菌菌株。【方法】通过形态、生理生化特征、16S rRNA基因序列同源性比对鉴定4株茶树根际促生菌,采用钼锑抗比色法测定溶磷量,通过比色法测定ACC脱氨酶活性、CAS法测定产铁载体能力、Salkowski法测定产IAA(Indoleacetic acid)的能力进行促生作用研究,通过盆栽实验测试白菜、空心菜、苋菜及水稻的株高及鲜重以分析促生效应。【结果】鉴定KKS-6-N1为放射型土壤杆菌(*Agrobacterium radiobacter*), KKS-7-N7为铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*), GD3为*Pseudomonas hunanensis*, GD12为弯曲芽孢杆菌(*Bacillus flexus*)。固氮菌株KKS-6-N1可产铁载体;固氮菌株KKS-7-N7具有解磷及产铁载体能力,分泌的IAA含量高达101.29 mg/L;解钾菌株GD3具溶磷能力,分泌的ACC脱氨酶酶活为8.09 $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$,相对铁载体含量为0.31;具固氮解钾性能的菌株GD12分泌的ACC脱氨酶活性为14.46 $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$ 。盆栽试验表明,4个菌株对白菜、空心菜、苋菜的株高和鲜重均有明显促进作用,尤以GD3效果更甚。【结论】茶树根际促生菌菌株*Pseudomonas hunanensis* GD3促生作用显著,具有开发成微生物菌肥的潜力。

关键词: PGPR, 茶树根际, 鉴定, 促生作用

Identification of four plant growth-promoting rhizobacteria isolated from tea rhizosphere

WANG Huan HAN Li-Zhen*

College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China

Abstract: [Background] Plant growth-promoting rhizobacteria can promote plant growth and improve stress tolerance. There are special microbial habitats on tea rhizosphere and some beneficial microorganisms with growth-promoting effects could be easily acquired. [Objective] To ascertain taxonomic status and study growth-promoting characteristics of four PGPR strains isolated from tea rhizosphere, and further screen superior PGPR strain. [Methods] These four strains were identified based

Foundation items: National Nature Science Foundation of China (31760030); Science and Technology Project of Guizhou Province ([2017]5788); Science and Technology Support Project of Guizhou Province ([2017]2575); Basic Research Program in Science and Technology Project of Guizhou Province ([2018]1046)

*Corresponding author: Tel: 86-851-83856374; E-mail: hanlizhen11@163.com

Received: 27-02-2018; Accepted: 02-08-2018; Published online: 29-09-2018

基金项目: 国家自然科学基金项目(31760030); 贵州省科技计划项目(黔科合平台人才[2017]5788); 贵州省科技支撑计划项目(黔科合支撑[2017]2575); 贵州省科技计划基础研究项目(黔科合基础[2018]1046)

*通信作者: Tel: 0851-83856374; E-mail: hanlizhen11@163.com

收稿日期: 2018-02-27; 接受日期: 2018-08-02; 网络首发日期: 2018-09-29

on morphological, physiological and biochemical characteristics, homology alignments of 16S rRNA gene sequences. The plant growth-promoting characteristics of isolates were studied. Phosphorus contents were analyzed with Mo-Sb colorimetry. ACC (1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid) deaminase activity was measured by colorimetric method. Also, siderophore secreting capacity and IAA content were determined by quantitative test of CAS (Chrome zauroil S) medium and method of Salkowski, respectively. In pot experiments, plant growth-promoting effects were analyzed by measuring shoot heights and fresh weights of tested plants (including Chinese cabbage, swamp cabbage, amaranth and rice). **[Results]** The strain KKS-6-N1 was identified as *Agrobacterium radiobacter*, KKS-7-N7 identified as *Pseudomonas aeruginosa*, GD3 identified as *Pseudomonas hunanensis*, and GD12 identified as *Bacillus flexus*, respectively. In these four strains, nitrogen-fixing strains KKS-6-N1 and KKS-7-N7 produced siderophore, KKS-7-N7 also had the abilities of phosphorus-dissolving and IAA secreting as high as 101.29 mg/L. The other two strains, potassium-solubilizing strain GD3 still dissolved phosphorus, its ACC deaminase activity was 8.09 $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$ and relative content of siderophore was 0.31. whereas GD12, which had dissolved potassium and fixed nitrogen, was found to secrete ACC deaminase of 14.46 $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$. In pot experiments, shoot heights and fresh weights of Chinese cabbage, swamp cabbage and amaranth were increased obviously by inoculation of these four strains, especially GD3 is the most excellent among them. **[Conclusion]** *Pseudomonas hunanensis* GD3, which isolated from tea rhizosphere, could strongly promote plant growth. And it is possible to develop as an excellent microbial fertilizer.

Keywords: Plant growth-promoting rhizobacteria, Tea rhizosphere, Identification, Growth-promoting effect

根际促生菌(Plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)是指生长在植物根际土壤中的具有促进植物生长、提高植物抗性功能的一类有益细菌^[1]。部分 PGPR 可以通过固氮、溶磷、解钾、分泌植物激素如吲哚乙酸(Indole-3-acetic acid, IAA)等促进植物的生长发育,分泌铁载体(Siderophore)、1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylate, ACC)脱氨酶等还可增强植物对病害、重金属、盐碱等逆境的抗性^[2]。多年来,研究者在水稻、小麦等作物^[3]、牧草^[4]、药用植物^[5]中分离获得了很多 PGPR 菌株,对其促生特性进行了有益的探索,而在经济林木中的研究鲜有报道^[6]。

茶树是一种喜酸耐铝积氟植物,茶树根系广泛分布蔓延在土壤中,形成茶树根际特殊的根土微生物生境^[7]。茶树根际土壤存活着各种耐酸铝的微生物,与茶树根互利共生适应外部酸性环境和抵抗铝毒害^[8]。因而从茶树根际分离筛选具抗逆能力的促生微生物是可能的。葛恒懿等报道从茶树根际土壤中筛选到的 3 株耐铝细菌中, *Burkholderia* sp. T3 和 T6 菌株具有固氮溶磷及产铁载体能力,分泌的 ACC 脱氨

酶活性为 0.09 $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$ 和 0.196 $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$, IAA 产量分别为 2.88 mg/L 和 14.93 mg/L^[9]。显然,研究茶园根际土壤生境中的微生物具有一定的意义。

在前期研究中,我们已经从贵州不同地区茶园的茶树根际土壤中分离筛选到 4 个根际促生菌 KKS-6-N1、KKS-7-N7、GD3 和 GD12,促生特性的初步研究表明 KKS-6-N1 及 KKS-7-N7 具有固氮能力, GD3 具有解钾能力, GD12 具有固氮解钾能力,定性研究还显示出 4 株菌具有产 IAA、产 HCN、产 NH_3 、分泌铁载体或 ACC 脱氨酶活性的能力^[10]。本研究对这 4 株 PGPR 菌株进行了鉴定及促生机理的进一步研究,利用盆栽试验探讨其促生效应,以期开发促生菌剂提供菌种资源,并为根际促生菌与植物的互作机制研究奠定前期基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株

4 株根际促生菌 KKS-6-N1、KKS-7-N7、GD3 和 GD12 均由本实验室从贵州地区的茶树根际土壤中分离筛选得到。

1.1.2 培养基

PKO 培养基及 TSB 培养基^[11], DF 培养基及 ADF 培养基^[12], King's B 培养基^[13], MKB 培养基^[14]。

1.1.3 主要试剂和仪器

16S rRNA 基因扩增引物 27f/1492r 合成及 *Taq* 聚合酶, 大连 TaKaRa 公司; 细菌 DNA 提取试剂盒, Omega 公司。快速梯度 PCR 仪, Bio-Rad 公司; 紫外分光光度计, 上海元析仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 4 株 PGPR 菌株的鉴定

观察菌落形态特征及革兰氏染色特性, 生理生化试验参照《常见细菌系统鉴定手册》进行测定, 对照《伯杰细菌鉴定手册》及相关文献^[15-16]鉴定菌株。

将菌株活化后提取细菌总 DNA, 以此为模板, 以 16S rRNA 基因引物对 27f/1492r (27f: 5'-AGAGT TTAGATCMTGGCTCAG-3', 1492r: 5'-TACGGYTAC CTTGTTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增, PCR 反应体系 (25 μ L): 2 \times Premix *Taq* 12.5 μ L, 10 μ mol/L 引物各 1.0 μ L, 模板 DNA 1.0 μ L (约 50 ng), ddH₂O 补足至 25 μ L; PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 45 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min。扩增产物送上海英骏生物工程有限公司测序。所得 4 株细菌 16S rRNA 基因的核苷酸序列在 EzTaxon 数据库中与模式菌株进行同源性比对。

1.2.2 PGPR 菌株的溶磷特性研究

菌株于 30 $^{\circ}$ C、150 r/min 培养活化后转接于 PKO 培养基中, 相同条件下培养 7 d, 培养液离心后经不同处理, 利用钼锑抗分光光度法分别测定全磷浓度、培养液无机磷量及培养液上清的可溶性磷含量^[17-18], 并测定培养液 pH 值。培养液中的可溶性磷含量与空白对照培养基中的本底可溶性磷含量之差为菌株的有效磷含量。

1.2.3 PGPR 菌株的 ACC 脱氨酶活性测定

菌株经 60 mL TSB 液体培养基活化培养 24 h, 菌悬液经 8 000 r/min 离心 10 min, 以 DF 液体培养基洗涤 2 次, 并重悬于 24 mL ADF 培养基中培养 24 h; 离心收集菌体以 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH

7.6) 进行洗涤后, 重悬于 600 μ L 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.5)中; 加入 30 μ L 甲苯振荡 30 s 破碎细胞后测定粗酶液的蛋白浓度及 ACC 脱氨酶活性。蛋白浓度测定采用考马斯亮蓝法, 以牛血清白蛋白作为标准物。ACC 脱氨酶活性测定是在 200 μ L 粗酶液中加入 0.5 mol/L ACC 20 μ L 混匀, 于 30 $^{\circ}$ C 水浴 15 min 后, 加入 1 mL 0.56 mol/L HCl 终止反应; 12 000 r/min 离心 5 min 后取上清 1 mL, 加入 800 μ L 0.56 mol/L HCl 和 300 μ L 0.2% 2,4-二硝基苯肼 (2 mol/L HCl 溶解), 30 $^{\circ}$ C 水浴 30 min 后, 加入 2 mL 2 mol/L NaOH 混匀, 于 540 nm 处测定吸光度。以 α -丁酮酸标准曲线和牛血清白蛋白标准曲线计算菌株的 ACC 脱氨酶活性, 酶活的表示方法为: 反应条件下, 每毫克菌体蛋白每小时催化 ACC 脱氨形成 α -丁酮酸的微摩尔数, 单位为 α -丁酮酸 μ mol/(mg \cdot h)^[11-12]。

1.2.4 PGPR 菌株的铁载体含量测定

用铂金丝接种环将菌株接种于 MKB 液体培养基中 30 $^{\circ}$ C、150 r/min 振荡培养 2 d, 3 500 r/min 离心 15 min, 取上清。按体积比 1:1 加入 CAS 检测液 (6.0 mL 10 mmol/L 十六烷基三甲基溴化胺溶液 (HDTMA), 1.5 mL 1 mmol/L FeCl₃ 溶液, 7.5 mL 2 mmol/L 刃天青(CAS)溶液, pH 5.6 无水二甲胺-HCl 缓冲液), 充分混匀后静置 1 h, 测定 630 nm 处的吸光值(A), 以双蒸水做对照调零; 另取未接种 MKB 培养基与 CAS 检测液等体积混匀测定的吸光值作参比值(Ar), 铁载体相对含量为 A/Ar, 比值越小, 反映铁载体的产量越大^[14]。一般参考标准为: A/Ar 为 0-0.2, +++++; 0.2-0.4, +++++; 0.4-0.6, +++; 0.6-0.8, ++; 0.8-1.0, +^[19]。

1.2.5 PGPR 菌株分泌 IAA 定量测定

以 Salkowski 法测定产吲哚乙酸的能力。将活化菌株接种于含 500 mg/L 色氨酸的 King's B 液体培养基培养 3 d 后, 取 2 mL 菌悬液以 10 000 r/min 离心 15 min, 每 1 mL 上清液加 2 mL Salkowski 试剂, 室温条件下暗处显色 30 min, 测定 OD₅₃₀ 值^[13,20]。以空白培养基作对照, 并以纯 IAA 对应的 OD₅₃₀ 值作标

准曲线, 计算培养液中的 IAA 含量(mg/L)。

1.2.6 盆栽试验研究 PGPR 菌株的促生效应

盆栽试验于 2017 年 4-5 月进行, 供试土壤来自于贵州省贵阳市花溪区贵州大学附近农田, 土壤类型为黄壤。土壤性质为: 有机质 24.83 g/kg, 全氮 1.52 g/kg, 碱解氮 183 mg/kg, 速效钾含量 99 mg/kg, pH 值为 5.46。

供试作物为白菜、空心菜、苋菜及水稻。将市售白菜、空心菜、苋菜及水稻种子用 3%次氯酸钠进行表面灭菌、无菌水冲洗后, 28 °C 黑暗条件催芽后播种, 在苗床中育种 5 d 后, 选取长势基本一致的幼苗进行试验。每种植物均设置对照 1 组, 处理组各 4 组(KKS-6-N1、KKS-7-N7、GD3 和 GD12 组), 每个小组均为 3 个重复, 每个重复处理各 10 株。

供试菌株分别活化后置于 LB 培养基中摇床培养 24 h, 用无菌水调节菌悬液浓度为 1×10^8 CFU/mL (OD_{600} 约 0.5), 采用灌根方式进行接种, 接种量 3 mL/株, 设自来水处理为对照(CK)。自然条件下室内培养, 每隔 4 d 重复处理 1 次, 整个试验期间保持土壤湿润, 20 d 后收获植株测定株高及鲜重。

1.2.7 数据处理

利用 Microsoft Excel 2010 和 SPSS19.0 软件进行数据处理及图表绘制, Duncan's 新复极差法和

LSD 法进行方差分析($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 4 株 PGPR 菌株的鉴定

接种于牛肉膏蛋白胨固体培养基上培养 24 h 后的菌落及镜下特征如图 1 所示。KKS-6-N1 菌落呈较小的圆形突起状, GD3 为微突起的乳白色菌落, 而其余 2 株菌的菌落扁平; GD12 菌落表面干燥且无光泽; 较为明显的是, KKS-7-N7 菌株产蓝绿色水溶性色素。镜下见 KKS-6-N1、KKS-7-N7 和 GD3 均为 G^- 杆状细菌, GD12 为 G^+ 略弯曲的杆状、可形成芽孢。对 GD3、GD12、KKS-6-N1 和 KKS-7-N7 菌株的 16S rRNA 基因进行测序, 并获得 GenBank 登录号分别为 MH393212、MH393213、MH393214 和 MH393215。参考《伯杰细菌鉴定手册》及相关文献[15-16,21-23], 根据生理生化试验鉴定结果与相应种进行比较(表 1), 以及利用 EzTaxon 数据库各个模式种的 16S rRNA 基因进行同源性比对结果(表 2), 最终将 KKS-6-N1 鉴定为 *Agrobacterium radiobacter* (放射土壤杆菌, 原称 *Rhizobium radiobacter*, 放射型根瘤菌), KKS-7-N7 为 *Pseudomonas aeruginosa* (铜绿假单胞菌), GD3 为 *Pseudomonas hunanensis*, GD12 为 *Bacillus flexus* (弯曲芽孢杆菌)。

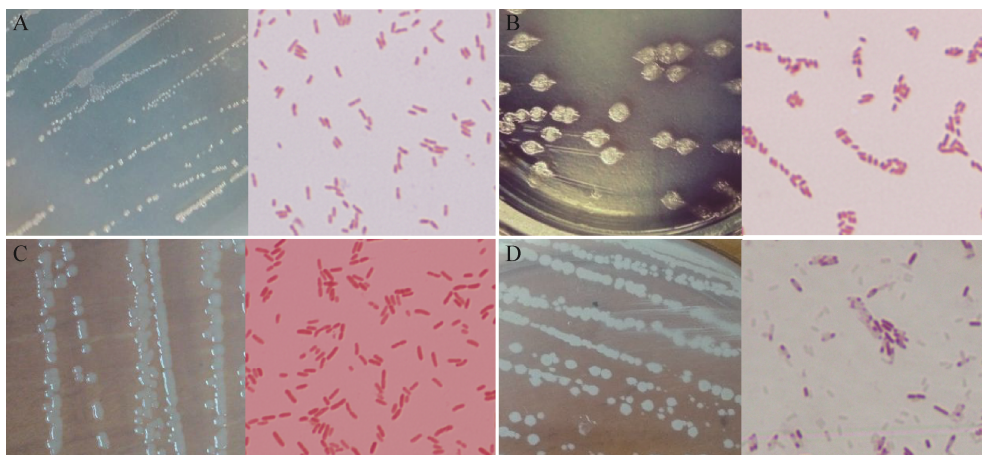


图 1 4 株 PGPR 菌株的菌落形态和光镜下 Gram 染色图

Figure 1 Colonies and Gram staining under optical microscope of four PGPR strains

注: A: KKS-6-N1 菌株; B: KKS-7-N7 菌株; C: GD3 菌株; D: GD12 菌株。

Note: A: Strain KKS-6-N1; B: Strain KKS-7-N7; C: Strain GD3; D: Strain GD12.

表 1 4 株 PGPR 菌株及相应种的生理生化特征

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of four PGPR strains and relevant species

测试项目 Test items	KKS-6- N1	<i>Agrobacterium</i> <i>radiobacter</i>	KKS-7 -N7	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	GD3	<i>Pseudomonas</i> <i>hunanensis</i>	GD12	<i>Bacillus</i> <i>flexus</i>
氧化酶 Oxidase test	+	+	+	+	+	+	-	-
接触酶 Peroxidase test	+	ND	+	+	+	ND	+	ND
淀粉水解 Starch hydrolysis	-	ND	+	-	-	ND	+	+
明胶液化 Glutin hydrolysis	-	ND	+	+	-	ND	-	+
纤维素水解 Cellulose hydrolysis	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND
柠檬酸盐利用 Citrate utilization	+	+	ND	ND	+	+	+	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+	+	+	-	-	+	-
甲基红实验 Methyl red test	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-
伏-普实验 V-P test	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-
吲哚实验 Indole test	ND	ND	ND	ND	-	ND	-	-
H ₂ S 实验 H ₂ S test	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3-酮基乳糖产生 Production of 3-keto lactose	-	d	ND	ND	ND	ND	ND	ND
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	+	+	+	+	+	+	ND	ND
丙氨酸脱羧酶 Alanine decarboxylase	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND
苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine deaminase	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-
脓青素产生 Production of pyocyanin	ND	ND	+	+	-	ND	ND	ND
荧光色素产生 Production of fluorescent pigments	ND	ND	+	+	+	+	ND	ND
5% NaCl	ND	ND	+	ND	+	+	+	ND

(待续)

(续表 1)									
葡萄糖	+	+	ND	ND	+	+	+	+	+
Glucose									
蔗糖	+	+	ND	ND	+	-	+	+	+
Sucrose									
D-乳糖	+	ND	ND	ND	-	-	+	+	+
Lactose									
海藻糖	+	+	-	-	-	-	ND	ND	ND
Mycose									
麦芽糖	+	+	ND	ND	-	-	+	+	+
Maltose									
D-果糖	+	ND	+	+	ND	ND	+	ND	ND
Fructose									
D-半乳糖	+	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Galactose									
D-山梨醇	+	+	ND	ND	-	-	ND	ND	ND
Sorbitol									
D-甘露醇	+	ND	+	ND	-	-	+	+	+
Mannitol									
L-阿拉伯糖	+	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND
Arabinose									
水苏糖	+	ND	ND	ND	-	-	ND	ND	ND
Lupeose									
D-棉子糖	+	ND	ND	ND	-	-	ND	ND	ND
Raffinose									
甘油	ND	ND	+	ND	+	ND	ND	ND	ND
Glycerinum									
丙酸	-	ND	ND	ND	+	+	ND	ND	ND
Propionic acid									
醋酸	ND	ND	+	ND	+	+	ND	ND	ND
Acetic acid									
葡萄糖酸	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Gluconic acid									
L-组氨酸	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Histidine									
L-异亮氨酸	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Isoleucine									

注: +: 阳性; -: 阴性; d: 10%–90%菌株为阳性; ND: 未测定。

Note: +: Positive; -: Negative; d: 10%–90% strains are positive; ND: Not detected.

表 2 4 株 PGPR 菌株的 16S rRNA 基因相似性比对

Table 2 Homology alignments of four PGPR strains based on 16S rRNA gene sequences

菌株	种	模式菌株	GenBank 登录号	相似性
Strains	Species	Type strain	GenBank accession No.	Homology (%)
KKS-6-N1	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	ATCC19358 ¹	AJ389904	99.70
KKS-7-N7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	JCM5962 ^T	BAMA01000316	99.72
GD3	<i>Pseudomonas hunanensis</i>	LV ^T	JX545210	99.79
GD12	<i>Bacillus flexus</i>	NBRC 15715 ^T	BCVD01000224	99.93

2.2 4 株 PGPR 菌株的促生特性

固氮菌株 KKS-6-N1 及固氮解钾菌株 GD12 不能在溶磷培养基中生长。在对两株具溶磷能力的菌株 KKS-7-N7 及 GD3 进行溶磷能力的判定时,分别测定了两株菌培养上清液中的可溶性磷含量、培养液的无机磷总量及全磷含量。上清液的可溶性磷是指不溶性磷酸钙被菌体转变为可溶性磷的量,培养液的无机磷总量还包括了被菌株吸附或含有的无机磷,全磷含量则指细胞外和细胞内储存的无机磷量及被菌体摄取并同化的有机磷量^[17]。KKS-7-N7 和 GD3 菌株的培养上清液中虽可溶性磷含量相当,但 GD3 菌株的全磷含量、培养液中的无机磷总量均高于 KKS-7-N7;接种两株菌的培养液 pH 值均显著下降(表 3);两株菌的全磷浓度、培养液的无机磷量以及上清液的可溶性磷含量与培养液 pH 值之间均存在显著的相关性。

促生特性的定量研究表明,除 GD12 菌株外,其余 3 株菌均具有分泌铁载体的能力。固氮菌

株 KKS-7-N7 还具有溶磷及极强的产 IAA 能力, IAA 产量高达 101.29 mg/L;解钾菌株 GD3 具有溶磷特性,而且可分泌较多的 ACC 脱氨酶,酶活为 8.09 $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$,铁载体相对含量为“++++”,是 4 个菌株中含量最高的;固氮解钾菌株 GD12 具有的 ACC 脱氨酶酶活高达 14.46 $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$ (表 4)。

2.3 盆栽试验

白菜、空心菜、苋菜及水稻种植 20 d 后,测量各处理组和对照组的生长参数(表 5)。在对植物鲜重的影响方面,GD3 处理的白菜鲜重与对照差异显著($P<0.05$),增加率为 41.00%,而 KKS-7-N7 和 GD12 的鲜重增加率分别为 14.00%和 17.00%,KKS-6-N1 与对照基本相同。4 株 PGPR 接种空心菜及苋菜后的鲜重增加显著($P<0.05$),空心菜经 KKS-6-N1、KKS-7-N7、GD3 和 GD12 处理的鲜重增长了 57.75%、66.67%、75.97%和 34.88%;苋菜的鲜重增加率分别达 83.33%、33.33%、100.00%和 100.00%。

表 3 2 株 PGPR 菌株的溶磷特征

Table 3 Dissolving phosphorus characteristics of two PGPR strains

菌株 Strains	培养液 pH pH value	全磷含量 Total phosphorus (mg/L)	培养液无机磷 Phosphorus in medium (mg/L)	上清液可溶性磷 Supernatant soluble phosphorus (mg/L)	有效磷 Available phosphate (mg/L)
CK	5.95±0.29a	32.37±7.89a	22.38±14.13a	17.89±4.15a	—
KKS-7-N7	3.64±0.06b	307.03±31.16b	151.52±1.12b	97.47±4.21b	79.58±4.94
GD3	3.74±0.18b	341.02±18.05c	170.01±6.75b	99.67±13.15b	81.78±4.00

注:全磷含量包括培养液上清可溶性磷和菌体磷,培养液无机磷量包括上清液可溶性磷和细胞内的无机磷,不同字母表示不同处理间差异显著($P<0.05$)。

Note: Total phosphorus is the sum of supernatant soluble phosphorus and thallus' phosphorus. Phosphorus in medium is the sum of supernatant soluble phosphorus and inorganic phosphorus in cell. Different letters represent significant differences in different treatment at 0.05 level.

表 4 4 株 PGPR 菌株的促生特性

Table 4 Growth-promoting characteristics of four PGPR strains

菌株 Strains	ACC 脱氨酶 ACC deaminase activity ($\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$)	铁载体相对含量 Siderophore (A/Ar)	产 IAA 量 IAA production (mg/L)
KKS-6-N1	—	1.00±0.01	—
KKS-7-N7	—	0.90±0.03	101.29±8.64
GD3	8.09±0.78	0.31±0.01	—
GD12	14.46±1.35	1.99±0.01	—

除 GD3 处理的水稻与对照基本无差别外, KKS-6-N1、KKS-7-N7 和 GD12 接种植株分别增加了 11.05%、12.71%和 9.39%。

4 株 PGPR 菌株对 4 种作物的株高影响也呈现不同(表 5, 图 2)。白菜接种 KKS-6-N1、GD3 菌株后, 其株高较对照分别增加 20.36%和 22.85%, 但 KKS-7-N7 及 GD12 菌株处理后分别增加 45.13%和 59.52%, 与对照呈显著差异 ($P<0.05$)。空心菜接种 GD3 菌株后呈现显著差异, 株高增长率为 38.23% ($P<0.05$); 接种 KKS-6-N1、KKS-7-N7 及 GD12 的处理组分别提高 5.26%、

17.81%和 7.12%。苋菜接种 4 株 PGPR 菌株后, 与对照相比均呈显著差异, KKS-6-N1、KKS-7-N7、GD3、GD12 处理组分别增加 35.83%、30.46%、37.48%和 15.40% ($P<0.05$)。相应地, 4 株菌处理水稻后较对照增加 10.93%、4.86%、9.65%和 15.79%, 但差异并不显著。

而且 4 株菌株对空心菜的根系形态影响显著, 图 2 可见接种菌株的空心菜根系发达, 侧根较多且细, 主根更长; 而对照侧根短小, 数量较少, 主根较短, 表明这 4 株菌对空心菜根系的生长发育具有明显促进作用。

表 5 不同 PGPR 菌株处理白菜、空心菜、苋菜及水稻的苗期生长性状

Table 5 Growth parameters of seedling stage of Chinese cabbage, swamp cabbage, amaranth and rice treated with different PGPR strains

植物 Plant	处理 Treatment	株高 Shoot height (cm)	鲜重 Fresh weight (g)
白菜 Chinese cabbage	CK	2.127±0.135a	0.100±0.022a
	KKS-6-N1	2.560±0.250ab	0.099±0.008a
	KKS-7-N7	3.087±0.387bc	0.114±0.007ab
	GD3	2.613±0.098ab	0.141±0.005b
	GD12	3.393±0.157c	0.117±0.013ab
空心菜 Swamp cabbage	CK	2.527±0.487a	0.258±0.033a
	KKS-6-N1	2.660±0.352a	0.407±0.018bc
	KKS-7-N7	2.977±0.228a	0.430±0.039bc
	GD3	3.493±0.605b	0.454±0.023c
	GD12	2.707±0.058a	0.348±0.015b
苋菜 Amaranth	CK	1.993±0.044a	0.006±0.000a
	KKS-6-N1	2.707±0.112c	0.011±0.001b
	KKS-7-N7	2.600±0.060c	0.008±0.001a
	GD3	2.740±0.092c	0.012±0.001b
	GD12	2.300±0.035b	0.012±0.001b
水稻 Rice	CK	13.722±0.680a	0.181±0.004a
	KKS-6-N1	15.222±1.057a	0.201±0.009a
	KKS-7-N7	14.389±1.082a	0.204±0.014a
	GD3	15.046±1.174a	0.180±0.010a
	GD12	15.889±0.395a	0.198±0.001a

注: 不同字母表示不同处理间数值差异显著 ($P<0.05$)。

Note: Different letters represent significant differences in different treatment at 0.05 level.



图 2 接种 4 株 PGPR 菌株的空心菜植株和根部形态

Figure 2 Plants and root morphologies of swamp cabbage treated with four PGPR strains

注: A-D 为植株, E-H 为根部形态; 每图从左至右分别为对照组(3 株)及处理组(3 株), 其中 A、E 为 CK 和 KKS-6-N1, B、F 为 CK 和 KKS-7-N7, C、G 为 CK 和 GD3, D、H 为 CK 和 GD12.

Note: A-D is plants, E-H is root morphologies. In pictures, from left to right: plants of CK and treated group (3 plants), roots of CK and treated group (3 plants), A and E are CK and KKS-6-N1 treated group, B and F are CK and KKS-7-N7 group, C and G are CK and GD3 treated group, D and H are CK and GD12 group.

3 讨论与结论

在溶磷定性测定中, GD3 和 KKS-7-N7 菌株的透明圈与菌落直径之比分别为 2.86 和 4.67^[10], 但本研究的定量测定显示两菌株的有效溶磷量基本无差别。因而对同一菌株而言, 并不是 D/d 值越

大, 在液体培养条件下的溶磷能力就越强, 这与先前的报道相一致^[24-25]。 D/d 值的判定可以用于溶磷菌株的初筛, 磷的定量测定则更为准确, 通常是通过培养上清液中的可溶性磷含量以评估菌株的溶磷能力。Pérez 等发现, 上清液中的可溶性磷

含量与培养液中剩余的不溶性磷酸钙含量之和并不等于起始培养液中的磷量, 有部分磷被溶磷微生物摄取利用或胞内储存, 因而以培养液中剩余的不溶性磷含量作为判定溶磷微生物的指标^[26]。为了探讨溶磷微生物自身可利用或储存的磷量, 本研究测定了 KKS-7-N7 和 GD3 培养液的全磷含量、培养液的无机磷含量和上清液的可溶性磷含量, 发现 2 个菌株培养上清液的可溶性磷含量仅为全磷含量的 30% 左右, 有近 20% 的磷酸盐被菌体储存, 相当于 50% 左右的磷被细菌摄取并用于合成菌体成分。有研究表明培养基中高浓度的磷酸盐, 可能导致细菌细胞对磷的奢侈吸收, 并以磷酸盐的形态大量保存在细胞中^[27]。测定结果提示忽略菌体本身吸收的有效磷, 而仅仅把培养上清液的可溶性磷含量作为指标可能会低估菌株的解磷能力^[28]。而且, 接种两菌株的培养基 pH 值与全磷浓度、培养液的无机磷量、培养上清液的可溶性磷含量之间存在相关性。多项研究表明溶磷量和培养基 pH 值之间存在相关关系^[29-30], 这与我们的报道相一致; 而有的研究表明二者之间没有显著相关性^[31]。究其原因, 主要是由于溶磷菌的溶磷机理多元化所致。有研究显示, 解磷菌在代谢过程中产生的低分子量的有机酸(葡萄糖酸、柠檬酸、草酸、乳酸等)既能降低 pH 值, 又可与铁、铝、钙等离子螯合形成可溶性复合物而释放有效磷^[32]。而通过呼吸作用或 NH_4^+ 同化作用释放质子并致 pH 值下降, 也可能是溶磷的原因^[33]。也有研究者认为部分磷细菌释放 H_2S , 可与磷酸铁进行反应而产生可溶性磷酸盐^[28]。本研究中, 两个菌株的溶磷过程伴随着 pH 值的显著下降, 解磷机理是否与分泌质子或产生有机酸有关值得深入探讨。

铁元素虽然在地壳中含量较高, 但是以溶解度极低的氧化物形式存在。部分 PGPR 可以分泌对铁具有高亲和力的低分子量铁螯合物——铁载体, 与环境中不溶性的 Fe^{3+} 螯合形成复合体后被植物直接吸收利用, 从而改善植物的铁素营养状况, 刺激植

物生长^[34-35]。其高效螯铁能力使其产生菌与同一环境中的其它微生物在对铁素营养的竞争中占据优势, 从而能够有效抑制多种植物病害的发生^[36]。敲除生防菌密旋链霉菌(*Streptomyces pactum*) 菌株 Act12 的铁载体合成酶 *Ser* 基因后, 突变体的铁载体合成量明显减少, 抑制了甜瓜种子的萌发及生长, 对苹果轮纹病菌的拮抗作用降低^[37]。研究显示菌株 *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 的铁载体所具有的信号分子作用可诱导大豆和番茄对灰葡萄孢菌 *Botrytis cinere* 的抗性^[38]。除此以外, 铁载体还可以螯合 Al^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 及 Zn^{2+} 等金属离子, 形成的大分子物质无法进入细胞内, 因而可提高植物对重金属的耐受性并用于植物修复^[39]。本研究中的 3 株 PGPR 菌株都具有产生铁载体的能力, 尤以 GD3 为甚; 这些菌株分泌的铁载体是否可诱导对植物病害的抗性或具有螯合重金属的能力值得进一步研究。

乙烯是高等植物的内源激素, 植物的生长发育通常只需要水平很低的乙烯, 逆境条件如干旱、盐碱和重金属等均可诱导体内产生大量逆境乙烯, 过量乙烯会导致植物发育受阻甚至死亡^[40]。ACC 是合成乙烯的前体物质, 许多植物根际促生菌具有 ACC 脱氨酶活性, 能够把 ACC 分解成氨和 α -丁酮酸以减少乙烯的合成, 减轻逆境胁迫对植物的影响, 并促进胁迫条件下的生长发育^[41], 提高植物对抗重金属^[42]、盐碱^[43]、干旱^[44]、水涝^[45] 的能力。研究报道当 ACC 脱氨酶酶活不低于 20 nmol/(mg·h) 时, 就可促进植物的生长^[46]。目前报道的高酶活性菌株中, 从海边盐生植物根际分离的嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*) CRG-2 菌株的酶活性最高, 为 324.3 $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$, 对黄瓜细菌性茎软腐病的田间防治效果达 73.13%^[47]; 张越己等从麻疯树根际分离到 12 株酶活高于 10 $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$ 的菌株, 最高为 128.31 $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$, 其中有 6 株菌属于 *Bacillus* sp., 部分菌株还具有固氮或解磷、或产 IAA 能力^[48]。除此之外, 从 94 株

固氮菌中筛选到 ACC 脱氨酶活性最高的菌株 *Bacillus* sp. 8134, 其分泌的酶活为 $21.98 \mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$ ^[49]。赵龙飞等报道大豆根瘤内生菌 *Bacillus* sp. DD132 菌株的 ACC 脱氨酶活性为 $15.712 \mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$, 菌株有一定的耐碱耐盐能力, 接种小麦幼苗有明显促生作用^[50]。毛晓洁等筛选到的固氮菌 *B. Megaterium* 7134 菌株的 ACC 脱氨酶活为 $21.98 \mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$, 对小白菜具有显著促生作用^[51]。前人的报道显示高 ACC 脱氨酶活性的菌株大多为芽孢杆菌属, GD12 菌株经分子和生理生化试验鉴定为 *Bacillus flexus*, 其 ACC 脱氨酶活为 $14.46 \mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$; 假单胞菌属 GD3 菌株鉴定为 *Pseudomonas hunanensis*, ACC 脱氨酶活为 $8.09 \mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$; 前者还具有解钾固氮性能, GD3 还具有解钾、较强的溶磷及产铁载体能力, 接种苋菜、白菜及空心菜均表现出显著的促生作用, 目前对这 2 株菌的抗逆性研究正在进行中。

在盆栽试验中, 接种 4 株 PGPR 菌株的植物根系发育状况明显好于对照, 主根更长且侧根更多。Bal 等的研究表明, 对水稻接种含 ACC 脱氨酶活性的 PGPR 能更好地促进根系生长^[52]。田磊等从人参内生菌中筛选到的荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*) JJ8-3 其 ACC 脱氨酶活为 $6.7 \mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$, 可以解磷固氮及产生铁载体, 明显促进人参种子及根部生长^[53]。代金霞等筛选到的肠杆菌属(*Enterobacter* sp.) AC3 有固氮解磷、产 IAA 和铁载体能力, 分泌 ACC 脱氨酶活为 $2.427 \mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$, 对接种的柠条具促生性, 尤其促进了地下部分的生长^[54]。许芳芳等从荒漠灌木梭梭的根际土中分离到 *Enterobacter* sp. FYP1101 菌株, ACC 脱氨酶活性为 $7.32 \mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$, 还具有固氮解磷、产铁载体及产 IAA 能力, 显著促进了盐胁迫下小麦幼苗的生长和根长的增加^[55]。目前的研究表明 PGPR 对根系发育的影响主要与其 ACC 脱氨酶和产 IAA 相关。乙烯对植物的生长具有抑制茎的伸长生长、促进茎或根的增粗和使茎横向

生长, 称为乙烯的三重反应^[40]。ACC 脱氨酶减少了植物细胞内乙烯前体 ACC 的浓度, 也就间接缓解乙烯对根部生长的抑制, 因而接种具 ACC 脱氨酶活性根际促生菌的植物通常根茎更长^[56]。根长和根系干重的增加还可能与菌株合成 IAA 能力有关, 有利于增加根表面积, 有效促进根系的新陈代谢^[57]。给油菜种子接种产低水平 IAA 的 *Pseudomonas putida* GR12-2 菌株, 油菜主根长度增长, 若接种能产生高水平 IAA 的 PGPR, 可导致侧根的发育和促进根毛的形成^[58]。本研究中 KKS-7-N7、GD3 和 GD12 菌株分别具有分泌 IAA 及 ACC 脱氨酶活性与更好的根系发育相一致, 但 KKS-6-N1 促进根系生长的原因还有待研究。

前期研究已经发现 KKS-6-N1、KKS-7-N7 及 GD12 具较强的固氮能力, 固氮效能值分别为 12.51、5.17、7.02 mg 氮/g 糖; GD3 及 GD12 菌株具有良好的解钾能力, 培养液中的可溶性钾含量分别可达 3.97、3.90 mg/L, 为对照组的 3 倍以上^[10]。本文通过对从茶树根际分离筛选到的 4 株 PGPR 进行鉴定及进一步促生作用的研究, 结果表明, *Agrobacterium radiobacter* KKS-6-N1 还具有一定的产铁载体能力, *Pseudomonas aeruginosa* KKS-7-N7 还具有解磷及产铁载体能力, 分泌的 IAA 含量高达 101.29 mg/L; *Pseudomonas hunanensis* GD3 除可解钾外, 具较强的溶磷能力、分泌的 ACC 脱氨酶活为 $8.09 \mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$, 相对铁载体含量为 0.31; *Bacillus flexus* GD12 除具解钾固氮能力外, 分泌的 ACC 脱氨酶活性高达 $14.46 \mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$ 。在植物促生试验中, 4 株菌接种的白菜、空心菜、苋菜的株高及鲜重明显增加, 显然是由于这些 PGPR 菌株的多重促生特性所致, 其中尤以 GD3 菌株的促生效应更为显著, 其次为 KKS-7-N7 菌株, 这 2 株菌均为假单胞菌属。研究表明, *Pseudomonas* sp. 是 PGPR 菌株中的优势菌, 可以通过多种作用模式促进植物生长^[59]。已有文献报道从 Cd 污染油田分离到的 *P. aeruginosa* 菌株 Pse-w-MT 可提高豌豆根茎

部生物量及叶绿素含量^[60]。但是, *Pseudomonas aeruginosa* 作为一种条件性致病菌, 可能导致泌尿道感染、腹膜炎、烧伤病人感染或囊性纤维化患者的肺部感染^[61]。一个理想的 PGPR 应该具有较强的根际竞争能力, 可促进多种植物生长, 对环境安全, 可以抗热、UV 辐射和氧化剂等^[62]。由于 KKS-7-N7 的潜在隐患限制了后续的田间试验。*Pseudomonas hunanensis* 是 2014 年鉴定的一个新种, 其模式菌株 LV^T 是从湖南省长期锰污染的土壤中分离到的^[22], 从加拿大圣劳伦斯河口分离到的该种 GSL-007 菌株具有氧化 Mn²⁺ 的能力^[63], 而关于该菌株的促生作用尚未见报道。本研究中, *Pseudomonas hunanensis* GD3 菌具有较强的溶磷解钾性能, 分泌的 ACC 脱氨酶及铁载体含量较高, 具有多项优良的促生特性, 盆栽试验也体现出明显的促生效果。对该菌株抗逆及防病害能力、定殖能力的进一步研究有望解析 GD3 菌株的促生机理, 并为开发微生物促生菌剂提供依据。

致谢: 感谢贵州大学生命科学学院生物技术专业 2016 届本科生朱春艳、邓兆辉和梁彩娇参与研究工作。

REFERENCES

- [1] Bashan Y, de-Bashan LE, Prabhu SR, et al. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013)[J]. *Plant and Soil*, 2014, 378(1/2): 1-33
- [2] Pérez-Montaño F, Alías-Villegas C, Bellogín RA, et al. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production[J]. *Microbiological Research*, 2014, 169(5/6): 325-336
- [3] Bhattacharyya PN, Jha DK. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, 28(4): 1327-1350
- [4] Zhao HH, Fang ZG, Ma R, et al. Screening of cadmium-tolerant and plant growth-promoting rhizobacteria and their effects on cadmium uptake and accumulation by *Lolium multiflorum* Lam[J]. *Acta Agraria Sinica*, 2017, 25(3): 554-560 (in Chinese) 赵会会, 方志刚, 马睿, 等. 耐镉根际促生菌的筛选及其对一年生黑麦草镉吸收积累的影响[J]. *草地学报*, 2017, 25(3): 554-560
- [5] Feng WW, Wu MX, Si YT, et al. Screening and biodiversity of endophytic and rhizosphere bacteria containing ACC deaminase from halophyte *Limonium sinense* (Girard) Kuntze[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(4): 719-728 (in Chinese) 冯维维, 武美贤, 司雨婷, 等. 中华补血草内生与根际具 ACC 脱氨酶活性细菌的筛选及其生物多样性[J]. *微生物学报*, 2016, 56(4): 719-728
- [6] Ma HL, Xing SJ, Liu FC, et al. Screening and identification of three plant growth-promoting rhizobacteria from winter jujube (*Ziziphus jujube* Mill.) rhizosphere[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2013, 19(4): 650-654 (in Chinese) 马海林, 邢尚军, 刘方春, 等. 冬枣(*Ziziphus jujube* Mill.)根际 3 株促生细菌的筛选与鉴定[J]. *应用与环境生物学报*, 2013, 19(4): 650-654
- [7] Fu SG, Liu P, Luo H, et al. Interaction of aluminum and fluorine stress on soil microbes of tea rhizosphere[J]. *Journal of Zhejiang Normal University (Natural Sciences)*, 2009, 32(3): 332-337 (in Chinese) 傅绍光, 刘鹏, 罗虹, 等. 铝和氟对茶树根际土壤微生物交互作用的研究[J]. *浙江师范大学学报: 自然科学版*, 2009, 32(3): 332-337
- [8] Zhao LW, Luo YY, Tan H, et al. Isolation and characterization of Aluminium-resistant yeasts from the soil of tea plant[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2011, 23(9): 792-796 (in Chinese) 赵丽伟, 罗义勇, 谭浩, 等. 茶园土壤耐铝酵母菌的分离鉴定及其耐铝特性的初步研究[J]. *中国微生态学杂志*, 2011, 23(9): 792-796
- [9] Ge HY, Song P, Feng L, et al. Plant growth-promoting properties and Al(III) absorption efficiency of three Al-tolerant rhizobacteria from tea plant[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2016, 38(6): 1086-1091 (in Chinese) 葛恒懿, 宋萍, 封磊, 等. 三株茶树根际耐铝细菌的促生性能及 Al(III) 吸附效应[J]. *江西农业大学学报*, 2016, 38(6): 1086-1091
- [10] Han LZ, Deng ZH, Zhu CY, et al. Identification and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria isolated from rhizosphere soils of tea trees[J]. *Journal of Mountain Agriculture and Biology*, 2016, 35(1): 51-56 (in Chinese) 韩丽珍, 邓兆辉, 朱春艳, 等. 茶树根际促生菌的筛选与促生特性的研究[J]. *山地农业生物学报*, 2016, 35(1): 51-56
- [11] Zhang GZ, Li HC, Sun YL, et al. Isolation and identification of rhizobacteria producing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase[J]. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2014, 42(6): 189-196 (in Chinese) 张国壮, 李海超, 孙永林, 等. 5 株产 ACC 脱氨酶细菌的筛选与鉴定[J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2014, 42(6): 189-196
- [12] Chen Q, Hu HY, Gao M, et al. Screening and identification of a nitrogen fixing bacteria with 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase activity[J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2011, 17(6): 1515-1521 (in Chinese) 陈倩, 胡海燕, 高森, 等. 一株具有 ACC 脱氨酶活性固氮菌

- 的筛选与鉴定[J]. 植物营养与肥科学报, 2011, 17(6): 1515-1521
- [13] Glickmann E, Dessaux Y. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(2): 793-796
- [14] Wang P, Dong B, Li FD, et al. Detection and determination of the siderophores produced by wheat rhizobacteria[J]. Microbiology China, 1994, 21(6): 323-326 (in Chinese)
王平, 董彪, 李阜棣, 等. 小麦根圈细菌铁载体的检测[J]. 微生物学通报, 1994, 21(6): 323-326
- [15] Dong XZ, Cai MY. Common Bacterial System Identification Manual[M]. Beijing: Science Press, 2001: 146-148, 166-167 (in Chinese)
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: 146-148, 166-167
- [16] Buchanan RE, Gibbons NE. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. 8th ed. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, trans. Beijing: Science Press, 1984 (in Chinese)
布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8版. 中国科学院微生物研究所, 译. 北京: 科学出版社, 1984
- [17] Zhu LY. Isolation of plant growth promoting rhizobacteria of rice and their influence on the growth of rice[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2008 (in Chinese)
祝凌云. 水稻根际促生菌的筛选及对水稻的促生作用[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2008
- [18] Lu RK. Soil Agrochemistry Analysis Protocoecs[M]. Beijing: China Agriculture Science Press, 2000: 166-168 (in Chinese)
鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000: 166-168
- [19] Ding LL, Liu WX, Sun JY, et al. Isolation of plant growth promoting rhizobacteria produced ACC ammonialyase and its influence on tall fescue growth[J]. Soils, 2013, 45(2): 271-276 (in Chinese)
丁琳琳, 刘五星, 孙剑英, 等. 产 ACC 脱氨酶植物根际促生菌的筛选及其对修复植物高羊茅生长的影响[J]. 土壤, 2013, 45(2): 271-276
- [20] Kang YJ, Cheng J, Mei LJ, et al. Screening and identification of plant growth-promoting rhizobacteria[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(7): 853-861 (in Chinese)
康贻军, 程洁, 梅丽娟, 等. 植物根际促生菌的筛选及鉴定[J]. 微生物学报, 2010, 50(7): 853-861
- [21] Zhang LS, Li XY, Zhang F, et al. Genomic analysis of *Agrobacterium radiobacter* DSM 30147^T and emended description of *A. radiobacter* (Beijerinck and van Delden 1902) Conn 1942 (approved lists 1980) emended. Sawada *et al.* 1993[J]. Standards in Genomic Sciences, 2014, 9(3): 574-584
- [22] Gao J, Li BY, Wang HH, et al. *Pseudomonas hunanensis* sp. nov., isolated from soil subjected to long-term manganese pollution[J]. Current Microbiology, 2014, 69(1): 19-24
- [23] Sanchez-Gonzalez M, Blanco-Gamez A, Escalante A, et al. Isolation and characterization of new facultative alkaliphilic *Bacillus flexus* strains from maize processing waste water (nejayote)[J]. Letters in Applied Microbiology, 2011, 52(4): 413-419
- [24] Li XG, Wang XL, Yao T, et al. Characters of solubilizing phosphate, secreting IAA and organic acids of phosphorus-solubilizing bacteria from rhizosphere of *Lotus corniculatus*[J]. Chinese Journal of Soil Science, 2012, 43(6): 1385-1390 (in Chinese)
李显刚, 王小利, 姚拓, 等. 溶磷菌的溶磷、分泌 IAA 及有机酸特性研究[J]. 土壤通报, 2012, 43(6): 1385-1390
- [25] Lu RX, Wang XL, Li XG, et al. Capability of dissolving phosphate and characteristics of phosphate-dissolving bacteria in rhizosphere of *Astragalus bhotanensis* in Guizhou[J]. Chinese Journal of Grassland, 2012, 34(4): 101-108 (in Chinese)
陆瑞霞, 王小利, 李显刚, 等. 地八角根际溶磷菌溶磷能力及菌株特性研究[J]. 中国草地学报, 2012, 34(4): 101-108
- [26] Pérez E, Sulbarán M, Ball MM, et al. Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2007, 39(11): 2905-2914
- [27] Zhao XR, Lin QM, Sun YX, et al. The methods for quantifying capacity of bacteria in dissolving P compounds[J]. Microbiology China, 2001, 28(1): 1-4 (in Chinese)
赵小蓉, 林启美, 孙焱鑫, 等. 细菌解磷能力测定方法的研究[J]. 微生物学通报, 2001, 28(1): 1-4
- [28] Teng ZD, Li M, Zhu J, et al. Research advances in effect of phosphate solubilizing microorganisms on soil phosphorus resource utilization[J]. Chinese Journal of Soil Science, 2017, 48(1): 229-235 (in Chinese)
滕泽栋, 李敏, 朱静, 等. 解磷微生物对土壤磷资源利用影响的研究进展[J]. 土壤通报, 2017, 48(1): 229-235
- [29] Hu S, Niu SQ, Long Y, et al. Identification of an efficient phosphorus solubilizing bacteria from saline-alkali soil in the Hexi corridor and optimization of its condition[J]. Microbiology China, 2017, 44(2): 358-365 (in Chinese)
胡山, 牛世全, 龙洋, 等. 河西走廊盐碱土壤中一株高效溶磷菌的鉴定及条件优化[J]. 微生物学通报, 2017, 44(2): 358-365
- [30] Ke CL, Chen YF, Zhou DB, et al. Isolation, identification and phosphate solubilization analysis of phosphate-solubilizing bacteria derived from banana rhizosphere soil[J]. Microbiology China, 2015, 42(6): 1032-1042 (in Chinese)
柯春亮, 陈宇丰, 周登博, 等. 香蕉根际土壤解磷细菌的筛选、鉴定及解磷能力[J]. 微生物学通报, 2015, 42(6): 1032-1042
- [31] Narsian V, Patel HH. *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2000, 32(4):

- 559-565
- [32] Rajput MS, Kumar GN, Rajkumar S. Repression of oxalic acid-mediated mineral phosphate solubilization in rhizospheric isolates of *Klebsiella pneumoniae* by succinate[J]. Archives of Microbiology, 2013, 195(2): 81-88
- [33] Richardson AE, Barea JM, McNeill AM, et al. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms[J]. Plant and Soil, 2009, 321(1/2): 305-339
- [34] Machuca A, Pereira G, Aguiar A, et al. Metal-chelating compounds produced by ectomycorrhizal fungi collected from pine plantations[J]. Letters in Applied Microbiology, 2007, 44(1): 7-12
- [35] Ma Y, Luo YM, Teng Y, et al. Plant growth promoting rhizobacteria and their role in phytoremediation of heavy metal contaminated soils[J]. Acta Pedologica Sinica, 2013, 50(5): 1021-1031 (in Chinese)
马莹, 骆永明, 滕应, 等. 根际促生菌及其在污染土壤植物修复中的应用[J]. 土壤学报, 2013, 50(5): 1021-1031
- [36] Mao DJ, Zhu YL, Han N. Siderophores and pigments produced by *Pseudomonas* bacteria[J]. Microbiology China, 2013, 40(3): 500-516 (in Chinese)
毛得奖, 朱亚玲, 韩宁. 假单胞菌铁载体及色素研究[J]. 微生物学通报, 2013, 40(3): 500-516
- [37] Zhao YL, Dong FX, Li SJ, et al. Functional analysis of *Ser* gene from biological bacterium Act12[J]. Microbiology China, 2017, 44(1): 79-85 (in Chinese)
赵玉玲, 董奉鑫, 李素俭, 等. 生防菌 Act12 铁载体合成酶 *Ser* 基因的功能[J]. 微生物学通报, 2017, 44(1): 79-85
- [38] Audenaert K, Pattery T, Cornelis P, et al. Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2002, 15(11): 1147-1156
- [39] Schalk IJ, Hannauer M, Braud A. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance[J]. Environmental Microbiology, 2011, 13(11): 2844-2854
- [40] Yao JP, Yao T, Wang XL. Research progress and application of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase[J]. Biotechnology, 2010, 20(2): 87-91 (in Chinese)
姚军朋, 姚拓, 王小利. ACC 脱氨酶的应用研究进展与评述[J]. 生物技术, 2010, 20(2): 87-91
- [41] Saleem M, Arshad M, Hussain S, et al. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2007, 34(10): 635-648
- [42] Kumar KV, Srivastava S, Singh N, et al. Role of metal resistant plant growth promoting bacteria in ameliorating fly ash to the growth of *Brassica juncea*[J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 170(1): 51-57
- [43] Islam F, Yasmeeen T, Arif MS, et al. Plant growth promoting bacteria confer salt tolerance in *Vigna radiata* by up-regulating antioxidant defense and biological soil fertility[J]. Plant Growth Regulation, 2016, 80(1): 23-36
- [44] Zahir ZA, Munir A, Asghar HN, et al. Effectiveness of rhizobacteria containing ACC deaminase for growth promotion of peas (*Pisum sativum*) under drought conditions[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 18(5): 958-963
- [45] Barnawal D, Bharti N, Maji D, et al. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase-containing rhizobacteria protect *Ocimum sanctum* plants during waterlogging stress via reduced ethylene generation[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2012, 58: 227-235
- [46] Penrose DM, Glick BR. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria[J]. Physiologia Plantarum, 2003, 118(1): 10-15
- [47] He ZD, Yan LY, Shi YX, et al. Bio-control of PGPR seed coating producing ACC deaminase to cucumber bacterial stem soft rot disease[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2017, 33(6): 817-825 (in Chinese)
贺字典, 闫立英, 石延霞, 等. 产生 ACC 脱氨酶的 PGPR 种衣剂对黄瓜细菌性茎软腐病的防治效果[J]. 中国生物防治学报, 2017, 33(6): 817-825
- [48] Zhang YJ, Qin S, Bian GK, et al. Isolation, screening and phylogenetic analysis of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase from *Jatropha curcas* L.[J]. Microbiology China, 2012, 39(7): 901-911 (in Chinese)
张越己, 秦盛, 卞光凯, 等. 具有 ACC 脱氨酶活性的麻疯树根际促生菌(PGPR)的分离筛选及系统发育分析[J]. 微生物学通报, 2012, 39(7): 901-911
- [49] Sun JG, Hu HY, Liu J, et al. Growth promotion potential and distribution features of nitrogen-fixing bacteria in field environments[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2012, 45(8): 1532-1544 (in Chinese)
孙建光, 胡海燕, 刘君, 等. 农田环境中固氮菌的促生潜能与分布特点[J]. 中国农业科学, 2012, 45(8): 1532-1544
- [50] Zhao LF, Xu YJ, Chang JL, et al. Screening, resistance and growth-promoting effect of endophytic bacteria with ACC deaminase activity isolated from soybean nodules[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(6): 1009-1021 (in Chinese)
赵龙飞, 徐亚军, 常佳丽, 等. 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
- [51] Mao XJ, Wang XM, Zhao Y, et al. Screening of multi-functional nitrogen fixing bacteria and their application in soil ecological restoration[J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(10): 148-155 (in Chinese)
毛晓洁, 王新民, 赵英, 等. 多功能固氮菌筛选及其在土壤生态修复中的应用[J]. 生物技术通报, 2017, 33(10): 148-155
- [52] Bal HB, Nayak L, Das S, et al. Isolation of ACC deaminase producing PGPR from rice rhizosphere and evaluating their plant growth promoting activity under salt stress[J]. Plant and Soil, 2013, 366(1/2): 93-105

- [53] Tian L, Jiang Y, Chen CQ, et al. Screening and identification of an endophytic bacterium with 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase activity from *Panax ginseng* and its effect on host growth[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(7): 760-769 (in Chinese)
田磊, 姜云, 陈长卿, 等. 一株人参内生 1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)脱氨酶活性细菌的筛选、鉴定及其对宿主生长的影响[J]. *微生物学报*, 2014, 54(7): 760-769
- [54] Dai JX, Zhou B, Tian PY. Screening and growth-promoting effects of rhizobacteria with ACC deaminase activity from rhizosphere soil of *Caragana korshinskii* grown in desert grassland[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2017, 26(3): 386-391 (in Chinese)
代金霞, 周波, 田平雅. 荒漠植物柠条产 ACC 脱氨酶根际促生菌的筛选及其促生特性研究[J]. *生态环境学报*, 2017, 26(3): 386-391
- [55] Xu FF, Yuan LM, Shao YF, et al. Effect of *Enterobacter* sp. FYP1101 on wheat seedling growth under salt stress[J]. *Microbiology China*, 2018, 45(1): 102-110 (in Chinese)
许芳芳, 袁立敏, 邵玉芳, 等. 肠杆菌 FYP1101 对盐胁迫下小麦幼苗的促生效应[J]. *微生物学通报*, 2018, 45(1): 102-110
- [56] Glick BR. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world[J]. *Microbiological Research*, 2014, 169(1): 30-39
- [57] Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud ML, et al. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2013, 4: 356
- [58] Glick BR, Liu CP, Ghosh S, et al. Early development of canola seedlings in the presence of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1997, 29(8): 1233-1239
- [59] Vacheron J, Moëgne-Loccoz Y, Dubost A, et al. Fluorescent *Pseudomonas* strains with only few plant-beneficial properties are favored in the maize rhizosphere[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1212
- [60] Huang JL, Liu ZB, Li SY, et al. Isolation and engineering of plant growth promoting rhizobacteria *Pseudomonas aeruginosa* for enhanced cadmium bioremediation[J]. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2016, 62(5): 258-265
- [61] Koziróg A, Otlewska A, Brycki B. Viability, enzymatic and protein profiles of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and planktonic cells after monomeric/gemini surfactant treatment[J]. *Molecules*, 2018, 23(6): 1294
- [62] Vejan P, Abdullah R, Khadiran T, et al. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability- a review[J]. *Molecules*, 2016, 21(5): 573
- [63] Wright MH, Geszvain K, Oldham VE, et al. Oxidative formation and removal of complexed Mn(III) by *Pseudomonas* species[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 560