

研究报告

一株达乌里胡枝子耐盐碱内生细菌的鉴定和促生特性

黄臣, 梁银萍, 韩玲娟, 高鹏, 杨凯元, 蒋霖, 赵祥*

山西农业大学草业学院, 山西 晋中 030600

黄臣, 梁银萍, 韩玲娟, 高鹏, 杨凯元, 蒋霖, 赵祥. 一株达乌里胡枝子耐盐碱内生细菌的鉴定和促生特性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(1): 218-234.

HUANG Chen, LIANG Yinping, HAN Lingjuan, GAO Peng, YANG Kaiyuan, JIANG Lin, ZHAO Xiang. Identification and growth promotion analysis of a salt-alkali tolerant endophyte strain isolated from *Lespedeza daurica*[J]. Microbiology China, 2023, 50(1): 218-234.

摘要:【背景】达乌里胡枝子(*Lespedeza daurica*)是黄土高原地区退化盐碱草地修复和改良的重要乡土草, 植物-内生细菌共生体在维持甚至提升植物抗逆性方面发挥重要作用。【目的】筛选优势达乌里胡枝子耐盐碱内生细菌, 对其基本特性、耐盐碱能力和促生特性进行评价。【方法】从山西省人工栽培达乌里胡枝子根系中筛选出一株耐盐碱的内生细菌菌株 DP20, 通过形态学观察、生理生化测定和 16S rRNA 基因序列分析对该菌株进行鉴定; 利用不同盐碱浓度(0、1%、3%、5%、7%)和不同 pH 值(7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0)的液体培养基测定其菌株密度; 采用功能性培养基测定其促生特性, 对促生产物进行定量测定; 采用培养皿滤纸法验证该菌对达乌里胡枝子种子萌发及生长的影响, 采用平板试验法分析该菌对拟南芥生长的影响。【结果】菌株 DP20 为路德维希肠杆菌(*Enterobacter ludwigii*), 其生长最适盐浓度为 0–5%, 最高耐受浓度达 7%。菌株 DP20 具有产生生长素吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)能力, 可达 30.81 mg/L; 具有溶解有机磷能力, 溶磷量为 0.53 mg/L; 该菌株兼具分泌铁载体和有机酸能力, 其中铁载体的相对表达量(SU 值)达 67.67%; 并且可在无氮固体培养基上生长。菌株 DP20 显著提高了达乌里胡枝子种子发芽率, 提高了达乌里胡枝子和拟南芥植株鲜重, 促进了达乌里胡枝子和拟南芥根系发育。【结论】耐盐碱菌株 DP20 促生性能显著, 这为后期应用于达乌里胡枝子改良晋北盐碱土地提供了高效促生、耐盐碱的内生细菌资源, 同时有助于开发路德维希肠杆菌在微生物菌剂方面的潜能。

关键词: 黄土高原; 乡土植物; 内生细菌; 耐盐碱性; 促生特性

资助项目: 国家自然科学基金(31870438); 山西农业大学科技创新基金(2018YJ37)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31870438) and the Science and Technology Innovation Project of Shanxi Agricultural University (2018YJ37).

*Corresponding author. E-mail: sxndzhaox@126.com

Received: 2022-07-21; Accepted: 2022-09-08; Published online: 2022-10-10

Identification and growth promotion analysis of a salt-alkali tolerant endophyte strain isolated from *Lespedeza daurica*

HUANG Chen, LIANG Yiping, HAN Lingjuan, GAO Peng, YANG Kaiyuan, JIANG Lin, ZHAO Xiang*

College of Grassland Science, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030600, Shanxi, China

Abstract: [Background] *Lespedeza daurica* is an important native grass for the restoration and improvement of degraded salt-alkali grassland in the Loess Plateau. Plant-endophyte symbiosis play an important role in maintaining and improving plant stress resistance. [Objective] To screen out the dominant endophyte with salt-alkali resistance and evaluate their basic characteristics, salt-alkali tolerance, and growth promoting properties. [Methods] A saline-alkali resistant endophyte strain DP20 was screened out from the root system of *L. daurica* artificially cultured in Shanxi Province. DP20 was identified by morphological observation, physiological and biochemical measurements, and 16S rRNA gene sequencing analysis. The liquid mediums with different salt-alkali concentration (salt concentration was 0, 1%, 3%, 5%, and 7%, and the pH was 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0, and 12.0) were used to measure their saline-alkali tolerance. The functional mediums were used to measure their growth-promoting function. Meanwhile, the catalyst was quantitatively determined. The petri dish filter paper method was used to verify the effects of this strain on the seed germination and growth of *L. daurica*. Plate test was used to explore the effects of this strain on the growth of *Arabidopsis thaliana*. [Results] The strain DP20 was *Enterobacter ludwigii*. The optimum salt concentration for its growth was 0–5%, and the highest tolerance concentration was 7%. It was found that strain DP20 had the ability to produce auxin (IAA), up to 30.81 mg/L, and the decomposition capacity of organophosphorus, reaching 0.53 mg/L. Furthermore, the strain had the ability to produce siderophores and secrete organic acids, and the concentration of siderophores reached 67.67%. Strain DP20 grew on the NFM solid medium. Strain DP20 significantly promoted the seed germination rate, plant fresh weight, and root development of *L. daurica* and *A. thaliana*. [Conclusion] The saline-alkali tolerant strain DP20 has significant growth promoting ability, which provides efficient and saline-alkali resistant endogenous resources for the later application of *L. daurica* in the improvement of saline-alkali soil in northern Shanxi, and is helpful to develop the potential of *E. ludwigii* as a microbial agent.

Keywords: Loess Plateau; native plant; endophytes; saline-alkaline tolerance; growth-promoting property

据报道,地球表面约7%的土地受到盐渍化的影响^[1]。土壤盐渍化可导致作物产量降低18%–40%,在半干旱和干旱地区尤为突出^[2]。山西省位于我国半干旱和干旱地区,共有盐渍化土

地30.13万hm²,其中晋北地区作为山西省的盐渍化土地分布的密集区,约占山西省盐碱地总面积的71.6%^[3]。晋北黄土高原地区是山西省重要的畜牧业产业基地^[4],由于当地土壤盐渍化问题

呈逐年加剧的态势,过量的盐浓度会导致土壤退化,改变土壤渗透和基质潜力,降低土壤微生物活性^[5],并会对植物直接造成毒害作用^[6],严重制约了当地生态系统和农业经济的可持续发展。

促生菌不仅能够改善土壤的质量,还能够与植物联合修复盐碱土壤^[5]。此外,植物内生细菌在促进植物生长发育和提高抗逆方面的功能已被普遍发现^[7]。其中,肠杆菌科细菌常作为内生促生菌与植物共生,主要包括欧文氏菌属(*Erwinia*)、泛菌属(*Pantoea*)和肠杆菌属(*Enterobacter*)等,通过定殖于植物地上和地下部促进植物生长^[8-9]、提升植物抗逆能力^[10]或发挥生物防治功能^[9,11]。研究表明,肠杆菌属促生菌具有良好的吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)和铁载体分泌能力等^[12-13]。IAA在植物的种子萌发、生长发育及开花结果等生命活动中具有重要作用^[14]。铁载体具有促进植物对铁素吸收的能力,通过争夺有害微生物生长所需的铁元素抑制其生长并减缓病原微生物对植物的侵染,进而促进植物生长^[15]。

目前,促生菌的筛选与开发研究多集中于水稻(*Oryza sativa*)^[16]、小麦(*Triticum aestivum*)^[17]和番茄(*Solanum lycopersicum*)^[18]等主要的经济作物,而对具有较高生态价值和饲用价值的乡土植物内生促生菌的研究鲜有报道。达乌里胡枝子作为黄土高原重要的乡土植物,是当地退化土地改良、矿区修复的重要先锋植物,具有耐寒、耐旱、耐贫瘠等特性。在胡枝子根围,施加具有溶解矿物能力的促生菌,可增加植物中木质素和半纤维素含量,从而加强植物固持水土的能力^[19]。因此,筛选出适合达乌里胡枝子的内生促生菌具有重要意义。

课题组前期从盐碱地达乌里胡枝子根系中分离筛选得到一株内生细菌 DP20,本试验对其生理生化特征、耐盐碱特性和促生性能等进行研

究,因模式植物拟南芥常用于促生菌促生能力鉴定^[20],为验证 DP20 促生特性,选用拟南芥和达乌里胡枝子为接种对象,为进一步研究其耐盐碱机制及开发适合达乌里胡枝子的耐盐碱促生菌剂产品等奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和达乌里胡枝子种子

菌株 DP20 和对照菌株 DP24 [韩国假单胞菌(*Pseudomonas koreensis*), GenBank 登录号为 ON077029]由山西农业大学草业学院提供,其中菌株 DP20 分离自达乌里胡枝子根内,菌株 DP24 分离自达乌里胡枝子根围^[21]。

‘晋农 1 号’达乌里胡枝子种子由山西农业大学草业学院保存。

1.1.2 主要试剂和仪器

Salkowski 比色液:浓 H₂SO₄ 150 mL, FeCl₃ (0.5 mol/L) 7.5 mL, 无菌水 250 mL。化学试剂均为分析纯。

培养基分装器,重庆江雪科技有限公司;光学显微镜, Olympus 公司;振荡培养箱,上海知楚仪器有限公司;涡旋仪,大龙兴创实验仪器有限公司。

1.1.3 培养基

采用漫静等^[22]方法,用蒙金娜有机磷培养基进行解磷能力鉴定,用 LB 培养基进行促生菌的常规培养,用无氮培养基(nitrogen free medium, NFM)测定菌株固氮能力。采用 Schwyn 等^[23]方法,用铬天青 S (chrome azurol S, CAS) 培养基进行解磷菌铁载体分泌能力测定。采用张晓波^[24]方法,用淀粉琼脂培养基进行淀粉水解试验,用明胶培养基进行明胶液化测试,用葡萄糖蛋白胨液体培养基进行甲基红测试。1/2MS 培养基购自北京索莱宝科技有限公司。改良金氏

(modified King B, MKB)液体培养基(g/L):酪蛋白 5.0, 甘油 15.0 mL, $K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 2.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.5, pH 7.2^[25]; 金氏培养基 B (King's B medium, KMB) (g/L): 胰蛋白胨 20.0, $K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5, 甘油 10 mL, 色氨酸 0.5, pH 7.0^[20]; 唯一碳源培养基(g/L): $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1, $(NH_4)_2SO_4$ 2.0, K_2HPO_4 0.5, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, pH 自然^[20]; 改良葡萄糖蛋白胨固体培养基(g/L): 葡萄糖 5.0, 蛋白胨 5.0, $K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 5.0, 溴甲酚紫少量, 琼脂粉 18.0, pH 7.2–7.4^[26]。上述培养基均在 1×10^5 Pa 高压灭菌锅中灭菌 20 min。

1.2 方法

1.2.1 菌悬液制备

供试菌株在 LB 液体培养基中 28 °C、180 r/min 活化培养 12 h 后, 室温 10 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 反复重悬 3 次, 菌体重新悬浮于无菌水中, 通过无菌水稀释至 OD_{600} 值约为 0.1、0.5 和 0.8。

1.2.2 菌株 DP20 的鉴定

采用平板划线法将菌株 DP20 接种在 LB 固体培养基上, 28 °C 倒置培养 72 h, 观察单菌落的颜色、大小、形状和透明度^[22]。采用张晓波等方法^[24,27]对菌株进行明胶液化、淀粉水解、甲基红试验和过氧化氢酶反应测定。将待测菌株按照 1% 接种量接种于唯一碳源培养基中(甘露醇、蔗糖、乳糖、葡萄糖、可溶性淀粉), 于 28 °C、180 r/min 振荡培养 2–3 d 后观察菌株生长情况^[20]。采用扫描电镜观察细胞形态与大小。

采用 16S rRNA 基因序列比对法对菌株进行分子鉴定。具体方法为: 使用 20 μ L 移液枪头蘸取少量菌液, 置于盛有 20 μ L 无菌水的 PCR 8 连排管中进行 PCR 扩增, 通用引物采用 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 反应体系(50 μ L): $2 \times Taq$ Master Mix 25 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 2 μ L, DNA 模板 2 μ L,

ddH₂O 19 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 次循环; 72 °C 5 min。PCR 扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 将测得的 16S rRNA 基因序列在 NCBI 数据库中注册, 获得登录号。

1.2.3 菌株 DP20 生长曲线的测定

将 DP20 菌株接种至 LB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 培养 12 h。接种 5 mL 的菌液 (OD_{600} 约为 0.1) 于 100 mL LB 液体培养基中, 30 °C、180 r/min 恒温振荡培养 30 h, 每隔 2 h 监测一次 OD_{600} 值并记录, 观测菌株的生长状况并绘制生长曲线。

1.2.4 菌株 DP20 耐盐碱能力及耐温能力测定

将活化的菌株接种于 LB 培养基中, 置于 4、12、20、28、37、60 °C 培养箱中培养 72 h, 观察、记录菌株的温度适应性。

参考柳鑫鹏等^[28]方法, 将活化的菌株接种于 LB 固体培养基(pH 分别为 7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0; NaCl 浓度分别为 0、1%、3%、5%、7%、10%), 置于 28 °C 条件下培养 48 h, 观察、记录菌株耐盐性和耐碱能力。

吸取 4 μ L 待测菌株菌悬液(OD_{600} 约为 0.1) 转移到盛有 196 μ L LB 液体培养基(pH 分别为 7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0; NaCl 浓度分别为 0、1%、3%、5%、7%、10%) 的 96 孔板中, 每个处理 3 次重复, 28 °C、180 r/min 培养, 对照组加入等量的蒸馏水, 每隔 6 h 测定 OD_{600} 值。

1.2.5 菌株 DP20 溶磷能力测定

将菌株接种于蒙金娜有机磷固体培养基上^[22], 每个菌株 5 个重复, 在第 7 天观察是否可形成明显透明圈, 利用十字交叉法测定各菌株形成的透明圈直径(D)和菌落直径(d), 计算 D/d 值(可溶性指数)。

将菌株接种于 LB 培养基上活化, 培养 48 h 后刮取菌落制备菌悬液, 吸取 1 mL 悬浮液 ($OD_{600} \approx 0.8$) 接种于盛有 60 mL 蒙金娜有机磷液

体培养基的三角瓶中, 3次重复。接种无菌水为对照, 置于28℃、180 r/min的振荡培养箱中黑暗培养5 d, 在涡旋仪上混匀5 min, 取10 mL培养液, 10 000 r/min高速离心15 min, 取出上清液采用“钼锑抗比色法”测定有效磷含量^[29]。

1.2.6 菌株 DP20 固氮能力测定

采用划线接种的方法, 将耐盐碱菌株划线于NFM固体培养基上, 28℃恒温培养10 d, 连续转接3次, 第3次依然能在NFM培养基上生长的细菌则被视为具有固氮能力^[30]。

1.2.7 菌株 DP20 产 IAA 能力测定

将菌株接种于含有L-色氨酸(0.2 g/L)的KMB液体培养基, 在30℃、180 r/min条件下培养48 h。然后于10 000 r/min离心10 min, 取3 mL上清液与等量的显色液混合, 在黑暗环境下反应30 min, 颜色变化为粉红色则表明阳性结果, 以未接菌培养基为对照, 在 OD_{530} 测定发酵液中IAA含量^[31]。

1.2.8 菌株 DP20 产铁载体能力和有机酸能力测定

定性测定: 将菌株点接种于CAS固体培养基上, 重复3次, 于28℃恒温培养5 d, 观察菌株周围是否出现橙色铁载体晕圈, 有橙色晕圈为产铁载体菌株^[23], 分别测定细菌菌落直径(d)和橙色晕圈直径(D), 计算 D/d 值。

将供试菌株在以溴甲酚紫为指示剂的葡萄糖蛋白胨固体培养基上进行接种, 28℃恒温培养箱培养3 d, 观察菌落周围是否出现橙黄色晕圈, 并通过十字交叉法测定晕圈及菌落大小。

定量测定: 制备产铁载体菌株的菌悬浮液(OD_{600} 约为0.5), 接种0.5 mL菌悬液于盛有50 mL MKB液体培养基的锥形瓶中, 重复3次, 28℃、180 r/min培养2 d。培养结束后收集发酵液于10 000 r/min离心10 min, 取3 mL上清液与等量CAS检测液混匀, 避光静置30 min, 测定630 nm波长下的吸光度(A_s), 以同样的方式测定未接种的MKB液体培养基的吸光度(A_r)^[23]。铁载体的相对表达量计算公式为^[32]:

$$SU(\%) = [(A_r - A_s) / A_r] \times 100。$$

1.2.9 菌株 DP20 促生试验测定

测定菌株DP20对达乌里胡枝子幼苗的促生试验。挑选成熟饱满的达乌里胡枝子种子, 10% NaClO浸泡5 min, 无菌水冲洗至无味。设置3个处理, A处理: 将种子置于盛有DP20菌悬液(OD_{600} 约为0.5)的无菌培养皿中浸泡12 h; B处理(菌株对照): 将种子置于盛有DP24菌悬液(OD_{600} 约为0.5)中无菌培养皿中浸泡12 h; C处理(无菌水对照): 将种子置于盛有无菌水的无菌培养皿中浸泡12 h。取出并晾干种子表面水分, 置于装有两层无菌滤纸的培养皿中, 每皿100粒种子, 每个处理4次重复, 置于光照培养箱中, 发芽条件为25℃(12 000 lx光照16 h)/20℃(暗培养8 h), 从第3天开始统计达乌里胡枝子发芽率, 14 d后立即在分析天平上测量鲜重; 用游标卡尺测量主根长度和株高; 105℃杀青30 min, 65℃烘至恒重, 分析天平测定达乌里胡枝子干重。

菌株DP20对拟南芥幼苗的促生试验: 种子用10% NaClO浸泡5 min, 无菌水洗净至无味, 95%乙醇表面酯化5 min, 20%乙醇漂白7 min。在蒸馏水中洗涤5次后, 待种子吹干后, 收集至2 mL离心管, 置于4℃低温春化1 d后, 无菌水浸泡, 使用移液枪将种子点接在1/2MS培养基上, 将其垂直放置在光周期为16 h、黑暗8 h、光强度为12 000 lx、温度为24℃的植物生长室中。设置3个处理, A处理: 距离种子根部3.5 cm处, 滴加5 μ L DP20悬浮菌液(OD_{600} 约为0.5); B组处理(菌株对照): 距离种子根部3.5 cm处, 滴加5 μ L DP24悬浮菌液(OD_{600} 约为0.5); C组处理(无菌水对照): 将拟南芥种子移至新的1/2MS培养基中, 滴加5 μ L无菌水。将处理后的拟南芥幼苗在光周期16 h、黑暗8 h、光强度为12 000 lx、温度24℃的培养条件下连续生长14 d, 每次处理重复3次。在这一时期结束时,

立即在分析天平上测量鲜重;用游标卡尺测量主根长度、侧根长度、株高;在解剖显微镜下对拟南芥根系进行拍照,使用 Camera Measure 测量根毛长度及主根宽度;105 °C 杀青 30 min, 65 °C 烘至恒重,分析天平测定拟南芥干重。

1.3 数据分析

利用 Microsoft Excel 2019 整理数据,使用 SPSS 20.0 进行数据分析,对达乌里胡枝子发芽率、干鲜重、主根长度、株高、苗长及拟南芥主根长度、干鲜重、根宽、侧根长度、根毛长度进行单因素方差分析和最小显著差法(least-significant difference, LSD)多重比较($P < 0.05$)。使用 MEGA X 软件将序列与 NCBI 数据库中的相近序列进行系统发育分析,采用邻接法(neighbor-joining method)构建系统发育树,自展值(bootstrap)为 1 000 次。

2 结果与分析

2.1 菌株 DP20 的鉴定

2.1.1 菌株 DP20 的形态学特征

菌株 DP20 在 LB 固体培养基培养 48 h 后菌落直径约为 2.85 mm,菌落规则,边缘完整,凸起呈乳白色、菌株表面光滑湿润不透明(图 1A)。菌株 DP20 革兰氏染色呈红色,为革兰氏阴性菌,大小为 $1.99 \mu\text{m} \times 0.568 \mu\text{m}$ (图 1B),无芽孢(图 1C),细胞呈长杆状(图 1D)。

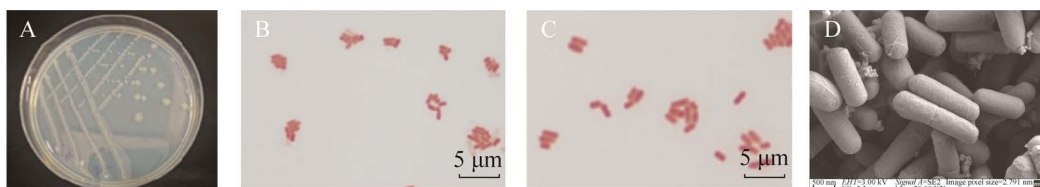


图 1 菌株 DP20 的菌株形态和菌体形态观察 A: 菌株 DP20 菌落特征. B: 革兰氏染色下菌株 DP20 的菌体形态. C: 芽孢染色下菌株 DP20 的菌体形态. D: 扫描电镜下菌体形态(20 000 \times)

Figure 1 Observation of strain morphology and morphology of strain DP20. A: Colony characteristics of strain DP20. B: Morphology of strain DP20 under Gram staining. C: Morphology of strain DP20 under spore staining. D: Morphology of strain DP20 by scanning electron microscope (20 000 \times).

2.1.2 菌株 DP20 生理生化特性

如表 1 所示,菌株 DP20 甲基红测试呈红色阳性反应;菌株 DP20 不具备水解淀粉及明胶的能力;过氧化氢酶反应呈阳性反应;可将蔗糖、甘露醇、葡萄糖、乳糖作为碳源。

2.1.3 菌株 DP20 的 16S rRNA 基因序列的系统进化分析

DP20 (GenBank 登录号为 ON662321)的 16S rRNA 基因序列长度为 1 442 bp。通过 NCBI 数据库比对和系统发育树构建(图 2),DP20 与路德维希杆菌(*Enterobacter ludwigii*) (JN700133.1)的 16S rRNA 基因序列相似性最高,达到 99.72%。结合形态学特征和生理生化特性,初步确定 DP20 为路德维希杆菌(*Enterobacter ludwigii*)。

2.1.4 菌株 DP20 的生长曲线

菌株 DP20 生长曲线分为 4 个时期,即生长停滞期、指数生长期、平稳生长期和缓慢衰落期(图 3)。在培养前 2 h 为生长停滞期,菌株接至新配好的培养液中存在适应期,主要表现为菌株生长比较缓慢;2–8 h,菌落环境、营养条件适宜,以指数倍数快速增长;在 8–22 h 以平稳速度缓慢增长,在 22 h 到达顶峰,受营养条件的限制开始缓慢下降;22–30 h 增长速度处于停滞状态,其中细菌的活菌数量不变阶段为平稳生长期,细菌开始衰亡的阶段为缓慢衰落期。

表 1 菌株 DP20 生理生化结果

Table 1 Physiological and biochemical analysis of the strain DP20

Test items	Result
Gram stain	G ⁻
Methylred reaction	+
Starch hydrolyze	-
Gelatin liquefaction	-
Catalase test	+
Only carbon source tests	
Starch soluble	-
Mannitol	+
Glucose	+
Lactose	+
Saccharose	+

+: 阳性反应; -: 阴性反应

+: Positive reaction; -: Negative reaction.

2.2 菌株 DP20 的耐盐碱及耐高低温能力

菌株 DP20 在 0–7% 盐浓度下均可生长(表 2 和图 4A), 其中在 0–5% 盐浓度水平长势较好; 除 7% 盐浓度外, 菌株在培养 22 h 后生长速度均

趋于平稳, 56 h 后不同盐浓度条件下菌株 OD_{600} 均表现出下降趋势。

菌株 DP20 在 pH 7.0–12.0 条件下均可生长(图 4B), 其中 pH 7.0–10.0 时菌株长势较好, 随着 pH 升高菌株生长受到抑制, 菌株 OD_{600} 呈现为 pH 7.0 > pH 8.0 > pH 9.0 > pH 10.0 > pH 11.0 > pH 12.0; 此外, 培养 56 h 后, 菌株在 pH 7.0–10.0 液体培养基中生长速度趋于平稳, 在 pH 11.0–12.0 的液体培养基中菌株 OD_{600} 均表现下降趋势。

菌株 DP20 在 12–37 °C 条件下均可生长(表 2), 在 4 °C 和 60 °C 条件下均不生长。

2.3 菌株 DP20 的促生特性

2.3.1 分解有机磷能力

根据可溶性指数值判断其溶磷能力。DP20 可在蒙金娜固体培养基上形成透明圈, 表明 DP20 具有分解有机磷能力(图 5)。DP20 和 DP24 可溶性指数分别为 1.62 和 1.50 (表 3)。DP20 和 DP24 分解有机磷量分别为 0.53、1.07 mg/L。

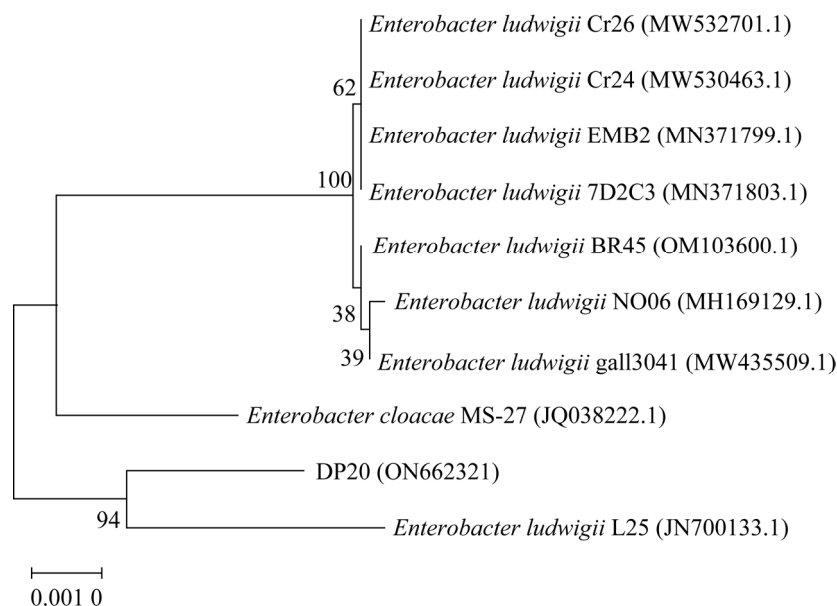


图 2 菌株 DP20 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

图中拉丁名后为菌株编号及其相关基因的 GenBank 序列号; 分支上的数字为 bootstrap 值, 代表分类单位被聚在一起的概率; 标尺代表碱基替换 Figure 2 Phylogenetic analysis of strain DP20 based on 16S rRNA gene sequence. The numbers of corresponding strains and its GenBank accession numbers followed by Latin names; The numbers on the branches are bootstrap values, which indicate the probability that the taxa are clustered together; The scale represents base substitution.

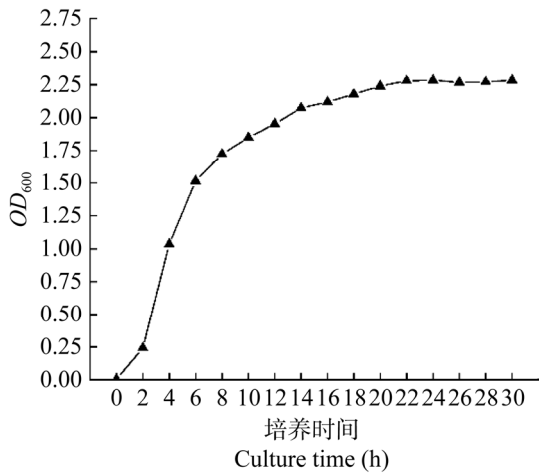


图3 菌株 DP20 的生长曲线
Figure 3 Growth curve of the strain DP20.

2.3.2 固氮能力

DP20 在无氮培养基中菌落形态明显、生长状况良好, 表明其具有一定的固氮能力。

2.3.3 分泌 IAA 能力

分泌 IAA 能力的定性检测结果和定量检测数据见表 3。暗反应 30 min, 有菌株 DP20、DP28 试管中的液体颜色变浅红, 表明具备分泌 IAA 能力。OD₅₃₀ 定量检测 DP20、DP24 分泌 IAA 量分别为 30.81、38.76 mg/L。

表 2 菌株 DP20 耐盐、耐碱和耐受高、低温能力
Table 2 Salt-alkali tolerance and high and low temperature tolerance of strain DP20

Test items	Result
High low temperature (°C)	
4	-
12	+
20	+
28	+
37	+
60	-
Salt tolerance (%)	
0	+
1	+
2	+
5	+
7	+
10	-
pH tolerance	
7.0	+
8.0	+
9.0	+
10.0	+
11.0	+
12.0	+

-: 不生长; +: 生长
-: No growth; +: Growth.

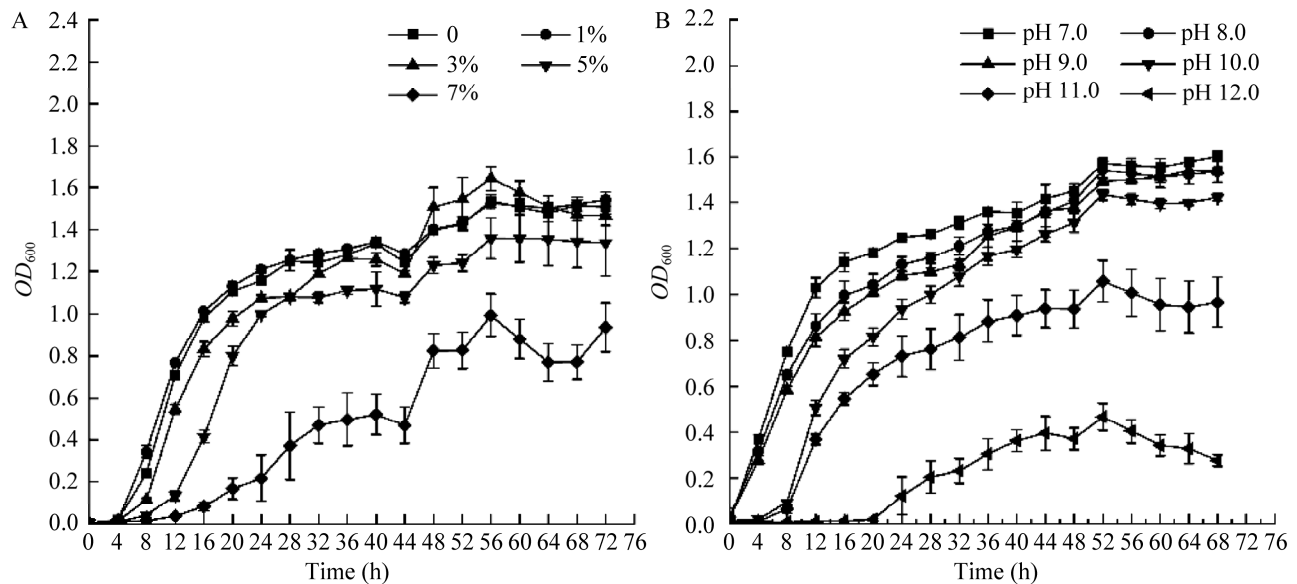


图 4 不同盐浓度(A)和不同 pH 条件下(B)菌株 DP20 的生长情况
Figure 4 Growth of the strain DP20 under different salt concentrations (A) and different pH value (B).

2.3.4 产铁载体和有机酸能力

菌株 DP20 和 DP24 在 CAS 固体培养基和溴甲酚紫为指示剂的固体培养基上均可形成明显透明圈(图 5A), 表明 2 株细菌均具备产铁载体和有机酸分泌能力; 菌株 DP20 和 DP24 的 A/A_0 值分别为 0.323 3 和 0.522 3, 折合成 SU 值分别为 67.67% 和 47.77% (表 3)。

2.4 菌株 DP20 对达乌里胡枝子和拟南芥的促生效应

2.4.1 对达乌里胡枝子幼苗促生试验的影响

DP20 菌悬液处理组达乌里胡枝子种子发芽率、植株鲜重、干重、苗长和主根长度分别为 84.5%、24.65 mg、1.81 mg、33.47 mm 和 19.01 mm, 均显著高于无菌水对照组处理和 DP24 菌悬液对照组 ($P<0.05$) (图 6)。其参数分别较无菌水对照组提高了 10.46%、45.38%、40.88%、33.61% 和 26.20%, 较 DP24 菌悬液对照组分别提高 9.74%、73.05%、94.69%、20.66% 和 75.93%。此外, 研究发现 DP20 处理后的达乌里胡枝子根系较发达, 主根长度达 19.01 mm, 显著高于无菌水对照组处理 ($P<0.05$), 增加了 40.30%, 而 DP20 菌悬液处理组和 DP24 菌悬液对照组主根长度差异不显著 ($P>0.05$)。

2.4.2 对拟南芥幼苗的促生效应

DP20 菌悬液处理组主根长度为 31.63 mm, 显著低于无菌水对照组处理 ($P<0.05$), 降低了 20.51%。DP20 菌悬液处理组拟南芥幼苗单株质

量为 18.56 mg, 显著高于无菌水对照组 ($P<0.05$), 较无菌水对照组质量增加了 29.97% (图 7)。进一步用解剖镜(目镜 2×)观察拟南芥根系, 经 DP20 处理的拟南芥幼苗粗壮, 侧根长度显著增长, 并且根毛较发达且密集(图 8)。DP20 菌悬液处理组主根宽度达 54.64 μm , 显著高于无菌水对照组 ($P<0.05$), 增加了 34.52%; DP20 菌悬液处理组侧根长度达 11.98 μm , 显著高于无菌水对照组和 DP24 菌悬液对照组 ($P<0.05$), 分别增加了 218% 和 33.41%; 处理组根毛长度为 95.35 μm , 显著高于无菌水对照组处理 ($P<0.05$), 增加了 62.61%。

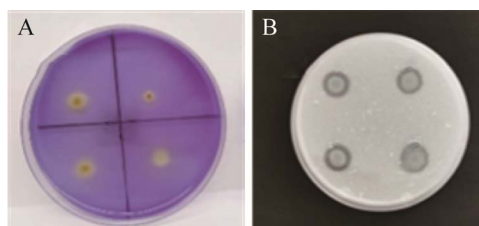


图 5 菌株 DP20 分泌有机酸和溶解有机磷能力
A: 接种于溴甲酚紫为指示剂固体培养基的菌株 DP20 菌落形态. B: 接种于蒙金娜固体培养基的菌株 DP20 菌落形态

Figure 5 The ability of strain DP20 to secrete siderophore and dissolve organic phosphorus. A: Colony morphology of strain DP20 inoculated in solid medium with bromocresol purple as indicator. B: Colony morphology of strain DP20 inoculated on Monkina solid medium.

表 3 菌株 DP20 和 DP24 溶磷能力和 IAA、有机酸、铁载体分泌能力测定结果

Table 3 Results of phosphate solubilization and secretion of IAA, organic acids and siderophores by DP20 and DP24

Treatment	item	Strain	
		DP20	DP24
Observation measurement	Solubility index	1.62±0.02	1.50±0.38 ^[21]
	IAA	Pink	Pink
	D/d value	1.61±0.06	1.70±0.26
	Organic acid index	3.76±0.14	2.58±0.37 ^[21]
Quantitative measurement	Phosphate-solubilizing ability (mg/L)	0.53	1.07 ^[21]
	IAA (mg/L)	30.81	38.76
	Siderophores (%)	67.67	47.77

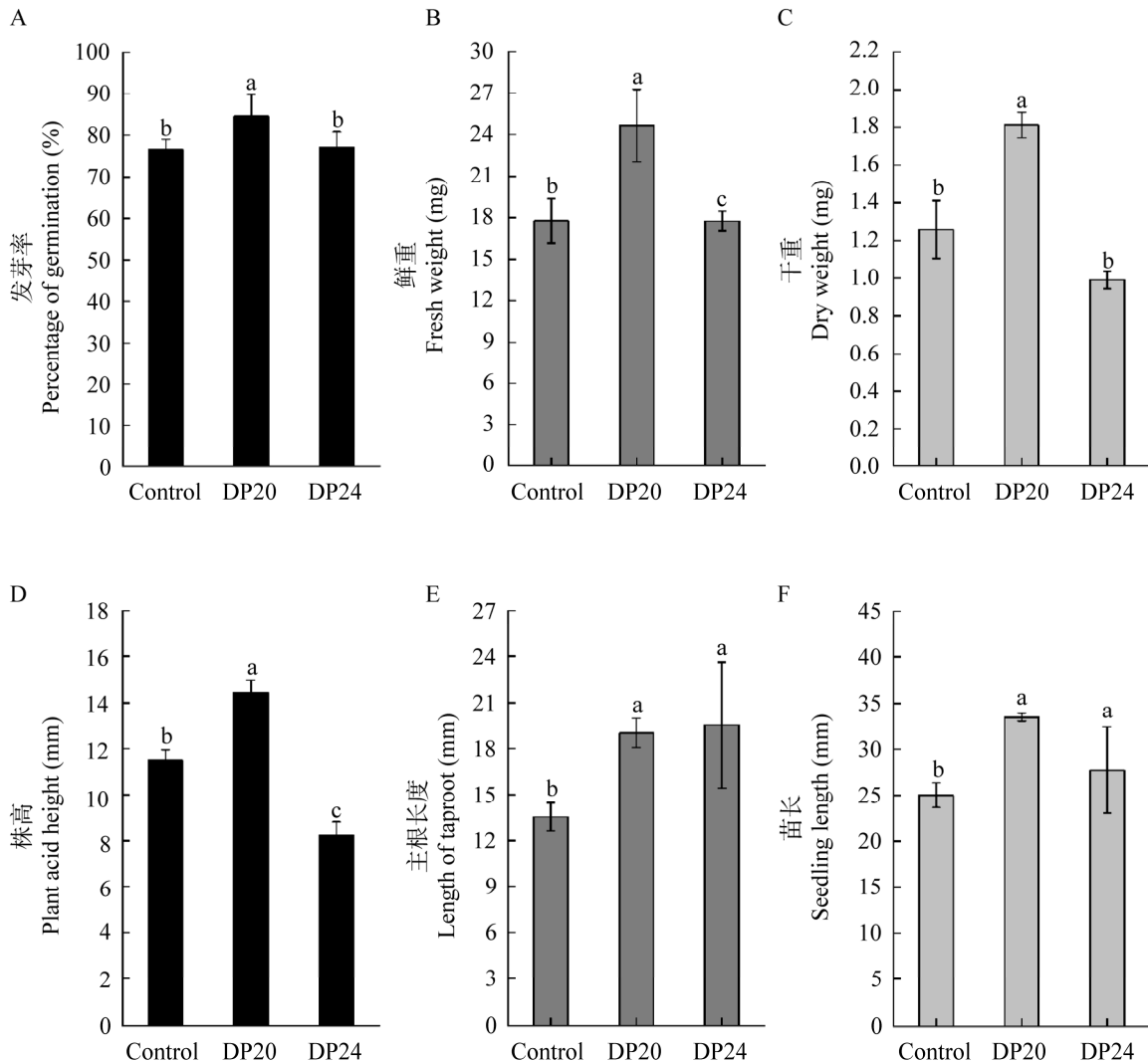


图 6 接种菌株 DP20 对达乌里胡枝子幼苗生长指标的影响 A: 接种无菌水、菌株 DP20 菌悬液、菌株 DP24 菌悬液后对达乌里胡枝子种子发芽率的影响. B: 接种无菌水、菌株 DP20 菌悬液、菌株 DP24 菌悬液后对达乌里胡枝子幼苗鲜重的影响. C: 接种无菌水、菌株 DP20 菌悬液、菌株 DP24 菌悬液后对达乌里胡枝子幼苗干重的影响. D: 接种无菌水、菌株 DP20 菌悬液、菌株 DP24 菌悬液后对达乌里胡枝子幼苗株高的影响. E: 接种无菌水、菌株 DP20 菌悬液、菌株 DP24 菌悬液后对达乌里胡枝子幼苗主根长度的影响. F: 接种无菌水、菌株 DP20 菌悬液、菌株 DP24 菌悬液后对达乌里胡枝子幼苗苗长的影响

Figure 6 The growth indexes of *Lespedeza davurica* seedlings was affected by strain DP20. A: Effects of sterile water, strain DP20 and strain DP24 on germination rate of *Lespedeza davurica* seedlings. B: Effects of sterile water, strain DP20 and strain DP24 on fresh weight of *Lespedeza davurica* seedlings. C: Effects of sterile water, strain DP20 and strain DP24 on dry weight of *Lespedeza davurica* seedlings. D: Effects of sterile water, strain DP20 and strain DP24 on plant acid height of *Lespedeza davurica* seedlings. E: Effects of sterile water, strain DP20 and strain DP24 on the length of taproot of *Lespedeza davurica* seedlings. F: Effects of sterile water, strain DP20 and strain DP24 on seedling length of *Lespedeza davurica*.

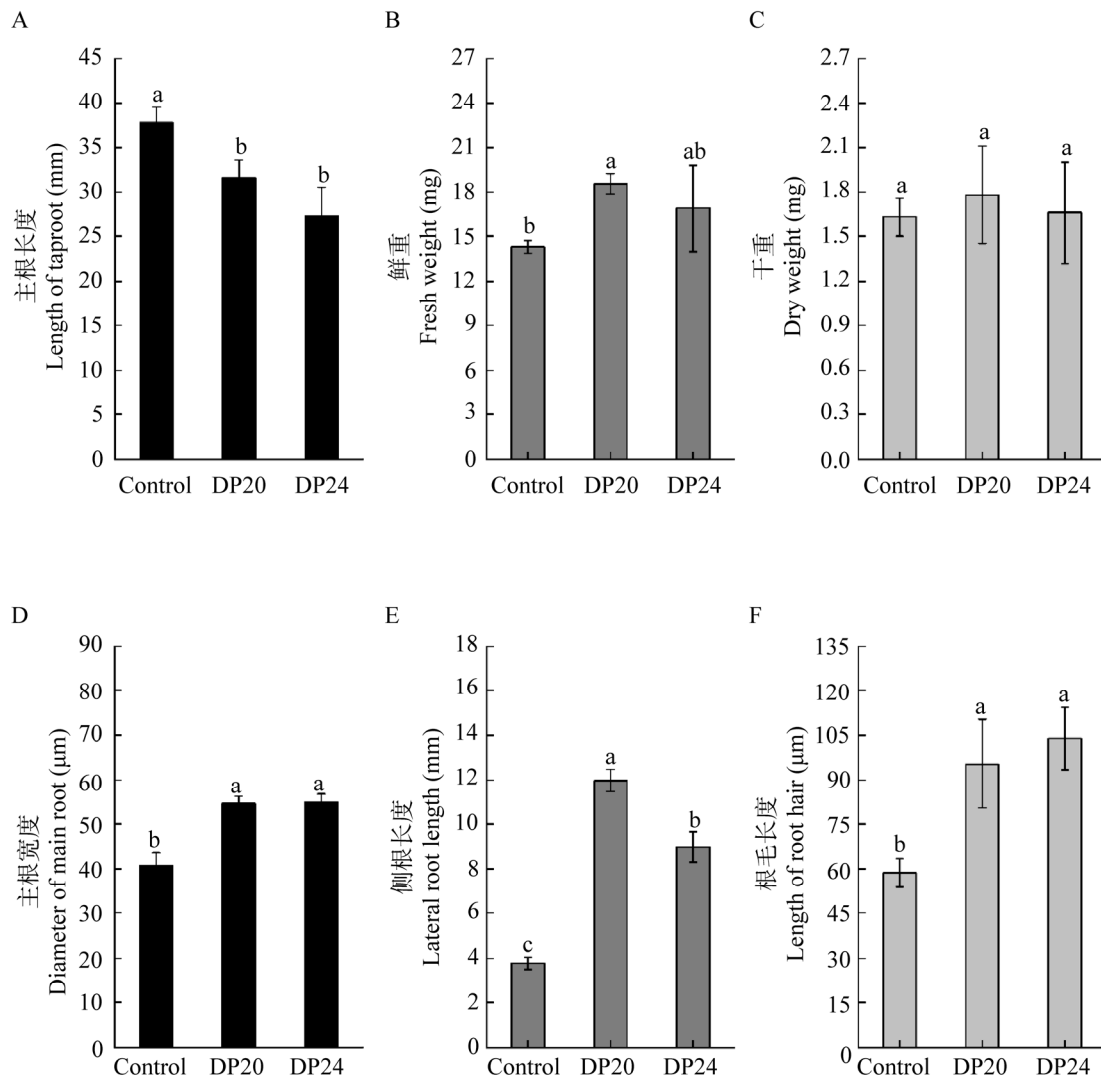


图7 接种菌株 DP20 对拟南芥幼苗生长指标的影响 A: 接种无菌水、菌株 DP20 菌悬液、菌株 DP24 菌悬液后对拟南芥幼苗主根长度的影响. B: 接种无菌水、菌株 DP20 菌悬液、菌株 DP24 菌悬液后对拟南芥幼苗鲜重的影响. C: 接种无菌水、菌株 DP20 菌悬液、菌株 DP24 菌悬液后对拟南芥幼苗干重的影响. D: 接种无菌水、菌株 DP20 菌悬液、菌株 DP24 菌悬液后对拟南芥幼苗主根宽度的影响. E: 接种无菌水、菌株 DP20 菌悬液、菌株 DP24 菌悬液后对拟南芥幼苗侧根长度的影响. F: 接种无菌水、菌株 DP20 菌悬液、菌株 DP24 菌悬液后对拟南芥幼苗根毛长度的影响

Figure 7 The growth indexes of *Arabidopsis thaliana* seedlings was affected by strain DP20. A: Effects of sterile water, strain DP20 and strain DP24 on the length of taproot of *Arabidopsis thaliana* seedlings. B: Effects of sterile water, strain DP20 and strain DP24 on fresh weight of *Arabidopsis thaliana* seedlings. C: Effects of sterile water, strain DP20 and strain DP24 on dry weight of *Arabidopsis thaliana* seedlings. D: Effects of sterile water, strain DP20 and strain DP24 on the diameter of main root of *Arabidopsis thaliana* seedlings. E: Effects of sterile water, strain DP20 and strain DP24 on lateral root length of taproot of *Arabidopsis thaliana* seedlings. F: Effects of sterile water, strain DP20 and strain DP24 on length of root hair of *Arabidopsis thaliana* seedlings.

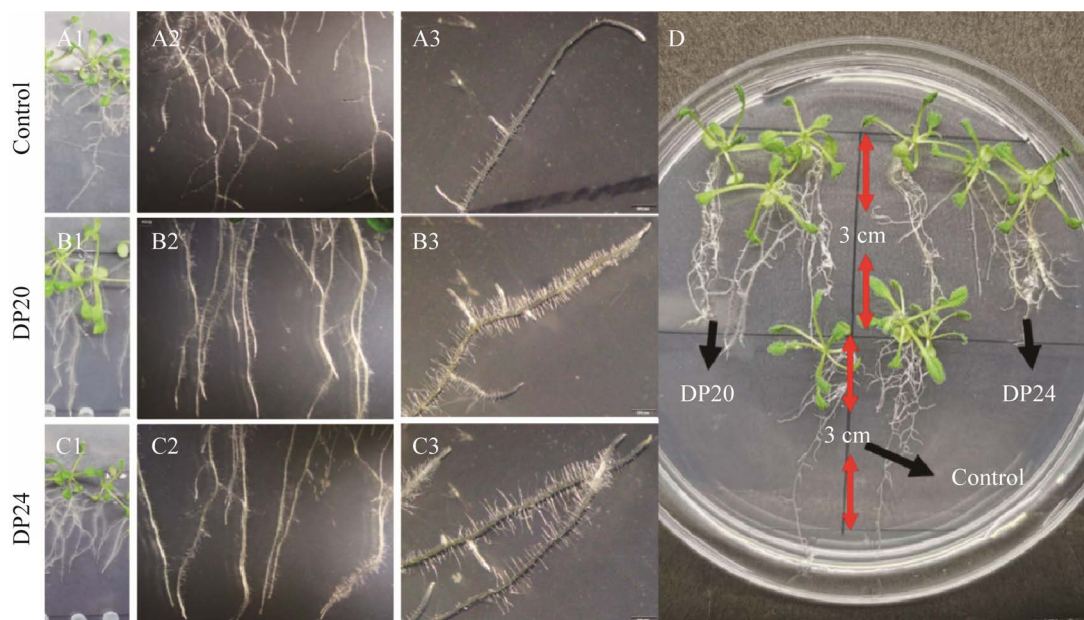


图 8 接种菌株 DP20 对拟南芥幼苗根系结构的影响 A1、A2、A3: 对照组拟南芥幼苗根系结构. B1、B2、B3: 接种 DP20 菌悬液后拟南芥根系结构. C1、C2、C3: 接种 DP24 菌悬液后拟南芥根系结构. D: 不同处理下拟南芥幼苗的生长状况

Figure 8 The root structure of *Arabidopsis thaliana* seedlings was affected by strain DP20. A1, A2, A3: Root structure of *Arabidopsis thaliana* seedlings in control. B1, B2, B3: Root structure of *Arabidopsis thaliana* seedlings inoculated with strain DP20. C1, C2, C3: Root structure of *Arabidopsis thaliana* seedlings inoculated with strain DP24. D: Growth status of *Arabidopsis* seedlings under different treatments.

3 讨论与结论

目前已报道胡枝子属植物的内生细菌包括伯克霍尔德菌属 (*Burkholderia*)、根瘤菌属 (*Rhizobium*)、慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、微杆菌属 (*Microbacterium*)、柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter*) 等^[33], 但尚未见胡枝子属植物内生肠杆菌属尤其是路德维希肠杆菌相关报道, 本研究丰富了达乌里胡枝子属植物内生细菌资源库。路德维希肠杆菌作为促生菌, 在海雀稗 (*Paspalum vaginatum*)^[34]和番茄 (*Solanum lycopersicum*)^[35]等植物体中均被发现, 而且均表现出促进植物根系生长等促生特性。表明路德维希肠杆菌具有较强的定殖能力和促生功能, 可作为优质内生细菌资

源用于后续微生物肥料的研发。

多数根围促生菌的生长环境属于中性, 它们难以适应高盐碱环境^[29]。路德维希肠杆菌在盐渍化地区广泛分布^[36], 同时路德维希肠杆菌可在盐胁迫下环境下显著改善植物长势与产量, 增强植物抗逆能力^[36-37]。本研究对分离得到的内生细菌 DP20 进行了耐盐碱能力研究, 结果表明, 菌株 DP20 是一株中度耐盐碱菌株, 可在 7% 盐浓度条件下生存, 最适生长盐浓度为 1%–5%, 在 pH 7.0–12.0 均可生存, 最适生长 pH 7.0–10.0, 这与许芳芳等^[38]研究结果基本一致。本研究样品采集地 0–20 cm 土壤 pH 值可达 8.6, 土壤水溶性盐总量为 5.33 g/kg, 其较好的耐盐碱能力可能与长期生长的土壤环境和自身特性相关, 待进一步验证。此外, 路德维希肠杆菌作为有益菌,

在我国四川^[39]、河南^[40]、内蒙古^[38]等地广泛分布,但未对其温度耐受范围进行较为系统的研究,而促生菌对不同生境的适应性存在明显差异,在一定程度上限制了根围促生菌的应用范围^[41],因此,菌株耐受温度能力应作为后期促生菌剂开发的重要参考指标。本研究发现路德维希杆菌可在 12–37 °C 条件下生长。综上所述,DP20 在晋北盐碱化土地生态修复、改善当地植物生境方面具有良好的应用潜力。

溶磷微生物与植物相互协作,将土壤中难溶性磷转化为可溶性磷,最终被植物吸收利用^[42]。菌株 DP20 可在蒙金娜固体培养基上生长,DP20 有机磷发酵液可溶磷含量为 0.52 mg/L,而从梭梭根围筛选出的路德维希杆菌 FYP1101 解有机磷量可达 2.70 mg/L^[38],可能是由于所利用磷源的差异性所致,与池景良等^[43]研究结果一致。此外,本研究发现可溶性指数和菌株溶磷量不完全呈正相关,可能是由于菌株溶磷机理的复杂性和培养条件变化所致。其中,微生物的溶磷机理包括酸解、磷酸酶作用、环境 pH 变化等,而且不同菌株分泌代谢物(有机酸、胞外酶等)的总量、种类均可能存在较大差异^[43-44]。同时,菌株解磷能力的强弱与外界条件也存在一定的联系,如介质、温度、不同碳氮源等^[45]。因此,本研究以可溶性指数作为定性评价标准,进而通过钼锑抗比色法对菌株溶解有机磷量进行定量测定,两者结合评判菌株的溶解有机磷能力具有一定的可靠性,可为后期研究提供参考。

大部分促生菌均能够分泌有机酸和对铁有亲和力的铁螯合物(即铁载体)^[29]。菌株 DP20 也具有有机酸和铁载体分泌能力。研究表明,有机酸、铁载体在调控土壤微生物磷代谢机制中均发挥重要作用^[44-46],进而促进植物生长。此外,促生菌还可通过分泌铁载体与存在于环境中的不溶性 Fe³⁺螯合,将其转化为可被植物可利用的铁,

而这些铁是植物铁元素的主要来源^[47]。同时,菌株通过这种方法与同环境微生物竞争铁,从而降低一些土传细菌病害的发生^[48]。研究表明,路德维希杆菌能够提高植物耐受重金属能力^[49-50],其原因是铁载体具有螯合 Al³⁺、Cu²⁺及 Zn²⁺等金属离子的能力,形成不能够进入细胞内部的大分子物质,从而提高植物体对于重金属胁迫的耐受能力^[51-52]。DP20 的 SU 值为 67.67%,而 DP20 分泌的铁载体是否能够应用于诱导植物抗病性并提升植物的抗病能力需进一步进行盆栽试验验证。

部分菌株可以通过分泌一定的 IAA 促进植物根系新陈代谢,增加植物对于土壤中养分的吸收^[53]。DP20 的 IAA 产量可达 30.81 mg/L,表明 DP20 具有较好的促生潜能。菌株 DP20 分离自达乌里胡枝子植物根内,属于达乌里胡枝子内生细菌。与前人研究^[16-18,20,29,34-35]相比,本研究选取多种植物对所筛菌株进行促生效果验证,探究其在不同植物上的促生表现是否存在差异。DP20 菌悬液浸种较无菌水和 DP24 菌悬液浸种显著提高了达乌里胡枝子种子萌发率、干鲜重、苗长和茎长,对达乌里胡枝子具有较好的促生作用,内生细菌较根围微生物促生效果可能更加显著、稳定。因此,内生细菌 DP20 具有作为达乌里胡枝子专用促生菌的潜力。此外,菌株 DP20 同样显著促进拟南芥的根系结构的发展,主要体现在拟南芥幼苗主根宽度、侧根长度、根毛密度与根毛长度。通过促进根系发育从而有助于拟南芥对营养物质的吸收,进而显著提高拟南芥植株鲜重^[54]。然而接种菌株 DP20 处理和接种菌株 DP24 处理主根长度均显著低于无菌水对照组,与在达乌里胡枝子主根促生表现相反,表明同一菌株在不同种植物相同部位上的促生效果具有一定差异性。接种菌株 DP20 处理拟南芥主根长度显著长于接种菌株 DP24 处理,而根毛长度促

生结果与之相反,表明 IAA 不是促进植物根系生长的唯一因素,可能与促生菌分泌的有机酸和铁载体具有一定的相关性。下一步可针对上述促生差异现象进行细致研究。总而言之,菌株 DP20 具有稳定的促生作用,既为后续研发适合晋北黄土高原退化地区建植达乌里胡枝子使用的促生菌际提供了理论基础,也丰富了其他植物促生菌种资源。

综上所述,从盐碱地达乌里胡枝子植物根内分离筛选出的中度耐盐促生菌株 DP20 具有解磷、固氮、产 IAA、铁载体和有机酸等能力,能较好地适应盐碱环境,而且对达乌里胡枝子和拟南芥幼苗均表现出较好的促生长作用。但在盐胁迫环境中,菌株 DP20 对达乌里胡枝子及胡枝子是否具有较好的促生能力,还需进一步研究。本研究对筛选出适合达乌里胡枝子的耐盐碱促生生物制剂产品提供了理论基础,这将有助于开发路德维希杆菌在微生物菌剂方面的潜能。

REFERENCES

- [1] XIAO F, ZHOU BB, WANG HB, DUAN ML, FENG L. Effects of different soil amendments on physicochemical property of soda saline-alkali soil and crop yield in Northeast China[J]. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 2022, 15(1): 192-198.
- [2] ZHANG YT, HOU K, QIAN H, GAO YY, FANG Y, XIAO S, TANG SQ, ZHANG QY, QU WG, REN WH. Characterization of soil salinization and its driving factors in a typical irrigation area of Northwest China[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 837: 155808.
- [3] 许庆方, 秦立刚, 董宽虎, 杨桂英, 赵祥, 高文俊, 佟莉蓉. 晋北黄土高原盐碱化草地的土壤理化性质[J]. *草业科学*, 2012, 29(2): 174-178.
XU QF, QIN LG, DONG KH, YANG GY, ZHAO X, GAO WJ, TONG LR. A study on physico-chemical properties of saline-alkaline grassland soil in Loess Plateau of the north of Shanxi Province[J]. *Pratacultural Science*, 2012, 29(2): 174-178 (in Chinese).
- [4] 蒯晓妍, 邢鹏飞, 张晓琳, 梁艳, 王常慧, 董宽虎. 短期放牧强度对半干旱草地植物群落多样性和生产力的影响[J]. *草地学报*, 2018, 26(6): 1283-1289.
KUAI XY, XING PF, ZHANG XL, LIANG Y, WANG CH, DONG KH. Effects of short-term grazing intensity on plant community diversity and productivity in semi-arid grassland[J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2018, 26(6): 1283-1289 (in Chinese).
- [5] 鲁凯珩, 金杰人, 肖明. 微生物肥料在盐碱土壤中的应用展望[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(7): 1695-1705.
LU KH, JIN JR, XIAO M. Prospect of microbial fertilizer in saline soil[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(7): 1695-1705 (in Chinese).
- [6] MACHADO R, SERRALHEIRO R. Soil salinity: effect on vegetable crop growth. Management practices to prevent and mitigate soil salinization[J]. *Horticulturae*, 2017, 3(2): 30.
- [7] BERENDSEN RL, PIETERSE CMJ, BAKKER PAHM. The rhizosphere microbiome and plant health[J]. *Trends in Plant Science*, 2012, 17(8): 478-486.
- [8] RANAWAT B, MISHRA S, SINGH A. *Enterobacter hormaechei* (MF₉₅₇₃₃₅) enhanced yield, disease and salinity tolerance in tomato[J]. *Archives of Microbiology*, 2021, 203(5): 2659-2667.
- [9] SHOEBITZ M, RIBAUDO CM, PARDO MA, CANTORE ML, CIAMPI L, CURÁ JA. Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41(9): 1768-1774.
- [10] PRAMANIK K, MITRA S, SARKAR A, MAITI TK. Alleviation of phytotoxic effects of cadmium on rice seedlings by cadmium resistant PGPR strain *Enterobacter aerogenes* MCC 3092[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2018, 351: 317-329.
- [11] FATIMA I, HAKIM S, IMRAN A, AHMAD N, IMTIAZ M, ALI H, ISLAM EU, YOUSAF S, MIRZA MS, MUBEEN F. Exploring biocontrol and growth-promoting potential of multifaceted PGPR isolated from natural suppressive soil against the causal agent of chickpea wilt[J]. *Microbiological Research*, 2022, 260: 127015.
- [12] SRISUK N, SAKPUNTOON V, NUTARATAT P. Production of indole-3-acetic acid by *Enterobacter* sp. DMKU-RP206 using sweet whey as a low-cost feed stock[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2018, 28(9): 1511-1516.

- [13] JHA CK, AERON A, PATEL BV, MAHESHWARI DK, SARAF M. *Enterobacter*: Role in plant growth promotion[A]//Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses[M]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011: 159-182.
- [14] PANIGRAHI S, MOHANTY S, RATH CC. Characterization of endophytic bacteria *Enterobacter cloacae* MG00145 isolated from *Ocimum sanctum* with indole acetic acid (IAA) production and plant growth promoting capabilities against selected crops[J]. South African Journal of Botany, 2020, 134: 17-26.
- [15] PATEL PJ, BHATT S, PATEL H, SARAF M. Iron chelating bacteria: a carrier for biofortification and plant growth promotion[J]. Journal of Biological Studies, 2020, 3(3): 111-120.
- [16] MIR MI, HAMEEDA B, QUADRIYA H, KUMAR BK, ILYAS N, KEE ZUAN AT, EL ENSHASY HA, DAILIN DJ, KASSEM HS, GAFUR A, SAYYED RZ. Multifarious indigenous diazotrophic rhizobacteria of rice (*Oryza sativa* L.) rhizosphere and their effect on plant growth promotion[J]. Frontiers in Nutrition, 2021, 8: 781764.
- [17] KHANGHAHI MY, STRAFELLA S, ALLEGRETTO I, CRECCHIO C. Isolation of bacteria with potential plant-promoting traits and optimization of their growth conditions[J]. Current Microbiology, 2021, 78(2): 464-478.
- [18] COCHARD B, GIROUD B, CROVADORE J, CHABLAIS R, ARMINJON L, LEFORT F. Endophytic PGPR from tomato roots: isolation, *in vitro* characterization and *in vivo* evaluation of treated tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.)[J]. Microorganisms, 2022, 10(4): 765.
- [19] LI C, JIA ZH, PENG XN, ZHAI L, ZHANG B, LIU X, ZHANG JC. Functions of mineral-solubilizing microbes and a water retaining agent for the remediation of abandoned mine sites[J]. Science of the Total Environment, 2021, 761: 143215.
- [20] 王改萍, 祝长青, 王茹. 一株耐盐甲基杆菌 *Methylobacterium* sp. W-1 的分离及促生潜能研究[J]. 微生物学通报, 2021, 48(11): 4134-4144.
- WANG GP, ZHU CQ, WANG R. Isolation and growth-promoting potential of a salt tolerant strain of *Methylobacterium* sp. W-1[J]. Microbiology China, 2021, 48(11): 4134-4144 (in Chinese).
- [21] 黄臣, 杨凯元, 高鹏, 梁银萍, 韩玲娟, 赵祥. 达乌里胡枝子根际解磷细菌的筛选、鉴定及特性研究[J]. 草地学报, 2022 30(9): 2345-2355.
- HUANG C, YANG KY, GAO P, HAN LJ, ZHAO X. Screening, identification and characteristics of phosphate-solubilizing microorganisms in *Lespedeza daurica*[J]. Acta Agrestia Sinica, 2022 30(9): 2345-2355 (in Chinese).
- [22] 漫静, 唐波, 邓波, 李佳欢, 何玉娟, 张佳良. 羊草根际促生菌的分离筛选及促生作用研究[J]. 草业学报, 2021, 30(1): 59-71.
- MAN J, TANG B, DENG B, LI JH, HE YJ, ZHANG JL. Isolation, screening and beneficial effects of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in the rhizosphere of *Leymus chinensis*[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2021, 30(1): 59-71 (in Chinese).
- [23] SCHWYN B, NEILANDS JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores[J]. Analytical Biochemistry, 1987, 160(1): 47-56.
- [24] 张晓波. 草地早熟禾根际促生菌(PGPR)特性及根际微生物区系研究[D]. 北京: 北京林业大学博士学位论文, 2008.
- ZHANG XB. Study on microflora and characteristic of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in rhizosphere of Kentucky bluegrass[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Beijing Forestry University, 2008 (in Chinese).
- [25] 刘长征, 姜晓琳, 蔡启忠, 周良云, 杨全. 何首乌根际促生菌的筛选及其对何首乌种子萌发的影响[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(20): 5247-5252.
- LIU CZ, JIANG XL, CAI QZ, ZHOU LY, YANG Q. Screening of plant growth-promoting rhizobacteria and its effect on seed germination of *Polygonum multiflorum*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2021, 46(20): 5247-5252 (in Chinese).
- [26] 康宏, 郭艾琳, 马梦彪, 曹凤麟, 李胜贤, 杨光, 王靖然. 产有机酸采油菌的筛选及产酸情况的分析[J]. 生物技术, 2011, 21(4): 89-93.
- KANG H, GUO AL, MA MB, GAO FL, LI SX, YANG G, WANG JR. Screening of organic acid yielding strain and analysis of result of producing organic acid[J]. Biotechnology, 2011, 21(4): 89-93 (in Chinese).
- [27] 沈萍, 陈向东. 微生物学[M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 2006.
- SHEN P, CHEN XD. Microbiology[M]. Second Edition. Beijing: Higher Education Press, 2006 (in Chinese).

- [28] 柳鑫鹏, 臧淑英, 智刚, 渠风甜. 盐碱土耐盐碱细菌筛选及其植物促生能力研究[J]. 土壤通报, 2022, 53(3): 567-576.
LIU XP, ZANG SY, ZHI G, QU FT. Isolation for plant-growth promoting halotolerant bacteria from alkali-saline soil[J]. Chinese Journal of Soil Science, 2022, 53(3): 567-576 (in Chinese).
- [29] ZENG QW, WU XQ, WEN XY. Identification and characterization of the rhizosphere phosphate-solubilizing bacterium *Pseudomonas frederiksbergensis* JW-SD2 and its plant growth-promoting effects on poplar seedlings[J]. Annals of Microbiology, 2017, 67(3): 219-230.
- [30] 李章雷, 刘爽, 王艳宇, 周妍, 刘权, 殷奎德. 5株耐盐碱促生细菌的筛选鉴定及其对红小豆的促生作用[J]. 微生物学通报, 2021, 48(5): 1580-1592.
LI ZL, LIU S, WANG YY, ZHOU Y, LIU Q, YIN KD. Screening and identification of five saline-alkali tolerant bacteria for growth promotion of red adzuki bean[J]. Microbiology China, 2021, 48(5): 1580-1592 (in Chinese).
- [31] 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.
- [32] MAHESHWARI R, BHUTANI N, SUNEJA P. Screening and characterization of siderophore producing endophytic bacteria from *Cicer arietinum* and *Pisum sativum* plants[J]. Journal of Applied Biology and Biotechnology, 2019, 7(5): 7-14.
- [33] PALANIAPPAN P, CHAUHAN PS, SARAVANAN VS, ANANDHAM R, SA TM. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lespedeza* sp.[J]. Biology and Fertility of Soils, 2010, 46(8): 807-816.
- [34] YOUSAF S, AFZAL M, REICHENAUER TG, BRADY CL, SESSITSCH A. Hydrocarbon degradation, plant colonization and gene expression of alkane degradation genes by endophytic *Enterobacter ludwigii* strains[J]. Environmental Pollution, 2011, 159(10): 2675-2683.
- [35] BENDAHA MEA, BELAOUNI HA. Effect of the endophytic plant growth promoting *Enterobacter ludwigii* EB4B on tomato growth[J]. Hellenic Plant Protection Journal, 2020, 13(2): 54-65.
- [36] KAPOOR R, GUPTA MK, KUMAR N, KANWAR SS. Analysis of *nhaA* gene from salt tolerant and plant growth promoting *Enterobacter ludwigii*[J]. Rhizosphere, 2017, 4: 62-69.
- [37] SAPRE S, GONTIA-MISHRA I, TIWARI S. Plant growth-promoting rhizobacteria ameliorates salinity stress in pea (*Pisum sativum*)[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2022, 41(2): 647-656.
- [38] 许芳芳, 袁立敏, 邵玉芳, 范国花, 周心爱, 郑文玲, 李冬梅, 冯福应. 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.
XU FF, YUAN LM, SHAO YF, FAN GH, ZHOU AX, ZHENG WL, LI DM, FENG FY. Effect of *Enterobacter* sp. FYP1101 on wheat seedling growth under salt stress[J]. Microbiology China, 2018, 45(1): 102-110 (in Chinese).
- [39] WANG QF, LI Q, LIN Y, HOU Y, DENG ZY, LIU W, WANG HT, XIA ZM. Biochemical and genetic basis of cadmium biosorption by *Enterobacter ludwigii* LY6, isolated from industrial contaminated soil[J]. Environmental Pollution, 2020, 264: 114637.
- [40] WANG XY, CAI DB, JI MF, CHEN ZJ, YAO LG, HAN H. Isolation of heavy metal-immobilizing and plant growth-promoting bacteria and their potential in reducing Cd and Pb uptake in water spinach[J]. Science of the Total Environment, 2022, 819: 153242.
- [41] 孙韵雅, 陈佳, 王悦, 程济南, 韩庆庆, 赵祺, 李惠茹, 李慧萍, 何傲蕾, 侯晶毅, 吴永娜, 牛舒琪, 索升州, 李静, 张金林. 根际促生菌促生机理及其增强植物抗逆性研究进展[J]. 草地学报, 2020, 28(5): 1203-1215.
SUN YY, CHEN J, WANG Y, CHENG JN, HAN QQ, ZHAO Q, LI HR, LI HP, HE AL, GOU JY, GOU AL, WU YN, NIU SQ, SUO SZ, LI J, ZHANG JL. Advances in growth promotion mechanisms of PGPRs and their effects on improving plant stress tolerance[J]. Acta Agrestia Sinica, 2020, 28(5): 1203-1215 (in Chinese).
- [42] KUMAR A, RAI LC. Soil organic carbon and phosphorus availability regulate abundance of culturable phosphate-solubilizing bacteria in paddy fields[J]. Pedosphere, 2020, 30(3): 405-413.
- [43] 池景良, 郝敏, 王志学, 李杨. 解磷微生物研究及应用进展[J]. 微生物学杂志, 2021, 41(1): 1-7.
CHI JL, HAO M, WANG ZX, LI Y. Advances in research and application of phosphorus-solubilizing microorganism[J]. Journal of Microbiology, 2021, 41(1): 1-7 (in Chinese).
- [44] PANICHIKKAL J, EDAYILEVEETIL KRISHNANKUTTY R. Rhizobacterial biofilm and plant growth promoting

- trait enhancement by organic acids and sugars[J]. *Biofouling*, 2020, 36(8): 990-999.
- [45] MARRA LM, de OLIVEIRA-LONGATTI SM, SOARES CRFS, OLIVARES FL, MOREIRA FMDS. The amount of phosphate solubilization depends on the strain, C-source, organic acids and type of phosphate[J]. *Geomicrobiology Journal*, 2019, 36(3): 232-242.
- [46] SAHA M, SARKAR S, SARKAR B, SHARMA BK, BHATTACHARJEE S, TRIBEDI P. Microbial siderophores and their potential applications: a review[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(5): 3984-3999.
- [47] CUI KP, XU T, CHEN JW, YANG HY, LIU XM, ZHUO R, PENG YH, TANG W, WANG R, CHEN LS, ZHANG X, ZHANG Z, HE ZI, WANG XN, LIU CX, CHEN YZ, ZHU YH. Siderophores, a potential phosphate solubilizer from the endophyte *Streptomyces* sp. CoT10, improved phosphorus mobilization for host plant growth and rhizosphere modulation[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2022, 367: 133110.
- [48] 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.
MAO DJ, ZHU YL, HAN N. Siderophores and pigments produced by *Pseudomonas* bacteria[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(3): 500-516 (in Chinese).
- [49] ADHIKARI A, LEE KE, KHAN MA, KANG SM, ADHIKARI B, IMRAN M, JAN R, KIM KM, LEE IJ. Effect of silicate and phosphate solubilizing rhizobacterium *Enterobacter ludwigii* GAK2 on *Oryza sativa* L. under cadmium stress[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2020, 30(1): 118-126.
- [50] JAN R, KHAN MA, ASAF S, LUBNA, LEE IJ, KIM KM. Metal resistant endophytic bacteria reduces cadmium, nickel toxicity, and enhances expression of metal stress related genes with improved growth of *Oryza sativa*, via regulating its antioxidant machinery and endogenous hormones[J]. *Plants: Basel, Switzerland*, 2019, 8(10): 363.
- [51] SCHALK IJ, HANNAUER M, BRAUD A. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance[J]. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(11): 2844-2854.
- [52] ROSKOVA Z, SKAROHLID R, MCGACHY L. Siderophores: an alternative bioremediation strategy?[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 819: 153144.
- [53] 向君亮, 唐呈瑞, 王佳琦, 刘权, 张兴梅, 殷奎德. 盐碱胁迫下一株促进苜蓿生长的细菌筛选与鉴定[J]. *干旱地区农业研究*, 2019, 37(2): 266-272.
XIANG JL, TANG CR, WANG JQ, LIU Q, ZHANG XM, YIN KD. Screening and identification of *Medicago sativa* Linn growth promoting rhizobacteria under saline-alkali stress[J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2019, 37(2): 266-272 (in Chinese).
- [54] GROVER M, BODHANKAR S, SHARMA A, SHARMA P, SINGH J, NAIN L. PGPR mediated alterations in root traits: way toward sustainable crop production[J]. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 2021, 4: 618230.