

研究报告

胞外多糖产生菌的筛选鉴定及其促生改土作用

李慧芬¹, 方安然², 冯海霞¹, 黄剑³, 赵明珠⁴, 周波^{*4}

1 青岛尚德生物技术有限公司, 山东 青岛 266111

2 青岛红樱桃生物技术有限公司, 山东 青岛 266111

3 泰安市土壤肥料工作站, 山东 泰安 271018

4 山东农业大学生命科学学院, 山东 泰安 271018

李慧芬, 方安然, 冯海霞, 黄剑, 赵明珠, 周波. 胞外多糖产生菌的筛选鉴定及其促生改土作用[J]. 微生物学通报, 2023, 50(5): 1941-1957.

LI Huifen, FANG Anran, FENG Haixia, HUANG Jian, ZHAO Mingzhu, ZHOU Bo. Screening and identification of extracellular polysaccharide-producing strain and the influence on soil quality and crop growth[J]. Microbiology China, 2023, 50(5): 1941-1957.

摘要:【背景】一些微生物具有较强的产胞外多糖潜力, 在改良盐碱土壤、促进作物生长方面潜力巨大。【目的】筛选耐盐碱且产胞外多糖的微生物, 为开发具有盐碱土壤改良效果的菌剂提供菌种资源。【方法】从滨海盐碱植物根际土中筛选可在盐碱土壤中增殖、产胞外多糖、解有机磷和钾等能力的微生物菌株, 并通过形态、生理生化、基于 16S rRNA 基因序列和 *gyrB* 基因的分子鉴定确定菌株类别, 分析该菌株的生长、产胞外多糖特性受盐碱胁迫的影响, 考察该菌对盐碱土壤不同粒径团聚体比例的影响, 并结合盐碱土壤番茄种植试验考察对植物生长指标和土壤指标的影响。

【结果】从 727 株滨海盐碱土壤菌株中筛选出一株产胞外多糖、具有较强盐碱土壤增殖能力且能解有机磷和钾的芽孢杆菌 GBW HF-98, 确定该菌为枯草芽孢杆菌沙漠亚种(*Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*)。该菌可耐受 pH 值达 10.0 和 NaCl 浓度达 110 g/L, 在改善轻和中盐度土壤中不同粒径团聚体比例的效果较为显著。该菌的高剂量浓度 T2 组, 在中度盐碱土壤的番茄种植试验中, 与对照相比显著增加了壮苗指数、根干重、全株干重、茎粗和株高等指标, 增幅分别为 33.8%、59.3%、37.2%、12.3%和 15.6% ($P<0.05$); 显著降低 pH、全盐含量和土壤容重, 降幅分别为 8.9%、27.9%和 17.9%; 显著提升土壤速效磷和速效钾指标, 增幅分别为 36.0%和 17.4% ($P<0.05$)。【结论】GBW HF-98 菌株具有较强的胞外多糖产生能力, 在中度盐碱土壤中促进番茄生长和改良土壤的效果显著, 可用于盐碱土壤改良菌剂的研制。

关键词: 耐盐碱; 胞外多糖; 土中增殖; 解磷解钾; 土壤改良

资助项目: 山东省重点研发计划(2020CXGC010803); 山东省农业重大应用技术创新项目(SD2019ZZ009)

This work was supported by the Key Research and Development Program of Shandong Province (2020CXGC010803) and the Shandong Agricultural Major Application Technology Innovation Project (SD2019ZZ009).

*Corresponding author. E-mail: zhoubo2799@163.com

Received: 2022-07-12; Accepted: 2022-08-30; Published online: 2022-10-20

Screening and identification of extracellular polysaccharide-producing strain and the influence on soil quality and crop growth

LI Huifen¹, FANG Anran², FENG Haixia¹, HUANG Jian³, ZHAO Mingzhu⁴, ZHOU Bo^{*4}

1 QingdaoShangde Biotechnology Limited Company, Qingdao 266111, Shandong, China

2 Qingdao Red Cherry Biotechnology Limited Company, Qingdao 266111, Shandong, China

3 Tai'an Soil and Fertilizer Station, Tai'an 271018, Shandong, China

4 College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong, China

Abstract: [Background] Some microorganisms, with high production of extracellular polysaccharide, can help improve saline-alkali soil and promote crop growth. [Objective] To screen saline-alkali-tolerant and extracellular polysaccharide-producing microorganisms for the development of microbial agents which can improve saline-alkali soil. [Methods] We screened strains which reproduce in saline-alkali soil, produce extracellular polysaccharide, and have the ability to solubilize phosphate and release potassium from rhizosphere soil of plants in coastal saline-alkali area. The eligible strain was identified based on morphological observation, physiological and biochemical indexes, 16S rRNA gene and *gyrB* gene sequencing. Then we analyzed growth of the strain and the production of extracellular polysaccharide under saline-alkali stress. In addition, the influence of the strain on the proportion of aggregates with different particle sizes in saline-alkali soil was investigated, and the effect on growth indexes of tomato in saline-alkali soil and soil indexes was examined. [Results] From 727 strains in coastal saline-alkali soil, strain GBW HF-98 was screened out, which, with strong reproductive ability in saline-alkali soil, produced extracellular polysaccharide and had the ability to solubilize phosphate and release potassium. The strain was identified as *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* and it can tolerate pH 10.0 stress and NaCl concentration of up to 110 g/L. It significantly improved the proportion of aggregates with different particle sizes in soil with mild and moderate salinity. The high dose of this strain (T2 group) increased the strong seedling index, root dry weight, dry weight of whole plant, stem diameter, and plant height of tomato in soil with moderate salinity by 33.8%, 59.3%, 37.2%, 12.3%, and 15.6%, respectively, as compared with the control ($P<0.05$). Moreover, it significantly reduced pH, total salt content, and soil bulk density by 8.9%, 27.9%, and 17.9%, respectively, and significantly raised soil available phosphorus content and available potassium content by 36.0% and 17.4%, separately ($P<0.05$). [Conclusion] GBW HF-98, with high production of extracellular polysaccharide, can remarkably promote the growth of tomato in moderately saline-alkali soil and improve the soil. Thus, it can be used for the development of microbial agents for the improvement of saline-alkali soil.

Keywords: saline-alkali tolerance; extracellular polysaccharide; reproduction in soil; solubilizing phosphate and releasing potassium; soil improvement

近年来, 微生物多糖应用于土壤结构改良正日益受到人们的关注^[1-2]。微生物对土壤团聚体的形成有重要影响, 其作用方式有两种: 一种是微生物菌体自身的特性, 如菌丝、自身电荷、细胞组分对土壤团聚体形成的影响; 另一种是微生物代谢产物, 如多糖、脂质和蛋白等胶结物质对土壤颗粒的黏合作用^[3]。

目前已经有较多研究关注盐碱土壤改良问题, 多数与固氮、解磷等功能特性相结合, 考察具有促生特性的功能菌在盐碱土壤环境下对植物的促生效果。然而, 功能菌在盐碱土壤环境下能否定殖进而增殖、能否产生胞外多糖等代谢物改善土壤的团粒体结构、解磷外是否可以解钾、在盐碱环境下的生长能力与产胞外多糖能力等, 都需要深入研究。此外, 对耐盐碱菌的类别鉴定, 除了常规的 16S rRNA 基因外, 也可结合 *gyrB* 等基因进一步鉴定至亚种。确定的功能微生物资源、客观准确的土壤改良效果评价方案是筛选有

效的盐碱土壤改良菌株资源的前提^[4-8]。

本研究以滨海盐碱土壤为试验材料, 通过液体发酵指标评估和平板活性测试筛选具有耐盐碱、土壤增殖、产胞外多糖、解有机磷、解钾等功能的菌株, 并考察终筛菌在中度盐碱土中改善土壤团粒结构及其对番茄的促生和土壤改良效果, 以期功能性土壤改良菌剂的研制提供菌种资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品采集

2021 年 7 月, 采集 16 份滨海盐碱土壤植物根际土样本, 用于后续耐盐碱菌株的分离。采集时除去地块表层 5 cm 浮土, 取 6–15 cm 深的耕作层土壤, 4 °C 保存。土壤样品与水按 1:5 (质量体积比) 混合后静置 5 min, 用 EC-315 型土壤 EC 计测定上清 EC 值, 确定土壤全盐含量(表 1)。

表 1 筛菌样品来源的植物根际土及其全盐含量

Table 1 Plant rhizosphere soil and its total salt content from which the sieve bacteria samples were derived

地区	不同植物根际土	土壤全盐
Area	Rhizosphere soil of different plants	Total soil salt (%)
潍坊寿光羊口海边	碱蓬 Suaeda	2.21
Weifang Shouguang, Yangkou cross the sea	棉花 Cotton	0.61
青岛即墨田横海边	莎草 Sedge	1.56
Qingdao Jimutian cross the sea	碱蓬草 Suaeda	1.85
荣城池塘边 By the pond in Rongcheng	地锦 Ground Brocade	0.95
海阳丁字湾 Haiyang t-word bay	苍耳 Xanthium sibiricum	0.87
青岛白沙河入海口	柳叶菜 Willow leaf vegetables	1.52
Qingdao Baisha River mouth into the sea	盐地碱蓬 Suaeda salsa	2.64
	碱菀 Asters	2.71
	猪毛菜 Pig and vegetable	1.95
	藜 Quinoa	1.75
	金鱼藻 Ceratophyllum	2.26
青岛胶州湾 Qingdao, Jiaozhou Bay	沙棘 Sea buckthorn	2.34
	白茅 White fescue	2.53
	盐地碱蓬 Suaeda salsa	2.38
	狗尾草 Setaria	2.16

1.1.2 培养基

耐盐碱初筛培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母浸粉 5.0, 氯化钠 70.0, 琼脂粉 20.0, pH 值调节至 8.5。

耐盐碱复筛培养基: 耐盐碱初筛培养基基础上将氯化钠调至 100 g/L, pH 值调节至 10.0。

高盐 LB 液体培养基: LB 基础上将氯化钠调至 80 g/L, pH 值调节至 7.0。

无菌盐碱土培养基: 取全盐量为 0.43%、pH 值为 8.32 盐碱土, 过 0.2 mm 筛, 经 121 °C 灭菌 1 h, 间歇冷却后, 再经过 121 °C 灭菌 1 h, 冷却备用。

解有机磷培养基(g/L): 葡萄糖 10.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5, 酵母粉 0.5, NaCl 0.3, KCl 0.3, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.03, CaCO_3 1.0, 卵磷脂 0.5, 琼脂 20.0, pH 7.0–7.5^[9-10]。

解钾培养基(g/L): 酵母膏 0.5, 蔗糖 10.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0, Na_2HPO_4 2.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, CaCO_3 1.0, 钾长石粉($\text{K}_2\text{O} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 6\text{SiO}_2$) 1.0, 琼脂 20.0, pH 7.0^[11]。

1.1.3 主要试剂和仪器

DNA 提取试剂盒、DNA Marker、 $1 \times \text{Taq}$ PCR Master Mix, 北京鼎国生物技术有限公司; 蛋白酶 K, TaKaRa 公司; 16S rRNA 基因通用引物和 *gyrB* 基因特定引物由青岛睿博兴科生物技术有限公司合成。

超净工作台, 苏州净化设备有限公司; 生化培养箱, 上海博迅医疗设备厂; 电热鼓风干燥箱, 光照培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; PCR 仪, Eppendorf 公司; 高速离心机, Sigma 公司; 紫外可见分光光度计, Unico 公司。

1.2 方法

1.2.1 高盐碱耐受且产胞外多糖芽孢杆菌的筛选

1) 耐盐碱芽孢杆菌筛选

取土壤样品 10 g 放入 90 mL 无菌水中, 于

30 °C、200 r/min 振荡提取 30 min 制成土壤液, 再经 75 °C 水浴处理 20 min 获得耐热菌, 然后进行梯度稀释。基于预实验结果, 土壤样品采用 100–10 000 倍稀释梯度, 在耐盐碱初筛培养基平板上涂布, 37 °C 倒置培养 48 h, 用灭菌竹签挑取不同形态的单菌落^[12]。将初筛菌株点接到耐盐碱复筛培养基平板上, 37 °C 倒置培养 48 h, 用灭菌竹签挑取不同形态的单菌落, 并镜检 48 h 菌落确定产孢情况, 只保留产芽孢的耐盐碱菌。

2) 30 株复筛芽孢菌在盐碱土中增殖能力比较

复筛获得耐盐碱优势芽孢杆菌, 分别经 LB 液体培养基 37 °C、200 r/min 振荡培养 24 h, 各取 100 μL 采用酶标仪测定 OD_{600} , 加无菌 LB 液体培养基调节至初始 OD_{600} 值一致; 均取 100 μL 等 OD_{600} 的菌液, 接种至 50 g 无菌盐碱土培养基内, 外加 5 mL 无菌水, 搅拌均匀, 30 °C 静置增殖培养 7 d, 7 d 后测定土壤中的目标菌量。选择前 30 株土中增殖优势菌, 进入后续功能比较试验。

3) 15 株复筛菌产胞外多糖能力比较

产胞外多糖标注曲线确定: 葡萄糖 0.100 g, 加蒸馏水溶解并定容至 100 mL, 精密移取 10 mL, 再次定容至 100 mL, 此时终浓度为 0.10 mg/mL。精密吸取葡萄糖标准溶液 0.10、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00、1.50、2.00 mL 于 10 mL 具塞试管内, 加蒸馏水至 2.00 mL, 另取一支空管加入 2.00 mL 蒸馏水作对照。每管各精密加入 60 g/L 的苯酚溶液(新鲜配制) 1 mL, 浓硫酸 5 mL, 混匀, 放置 5 min, 60 °C 水浴加热显色 30 min, 冷水浴冷却 15 min 至室温; 测定 OD_{490} , 以葡萄糖含量为横坐标, 以 OD_{490} 为纵坐标, 绘制标准曲线见图 1。

优选 15 株土壤增殖能力强且耐盐碱的复筛芽孢杆菌接种至高盐 LB 培养基中, 37 °C、

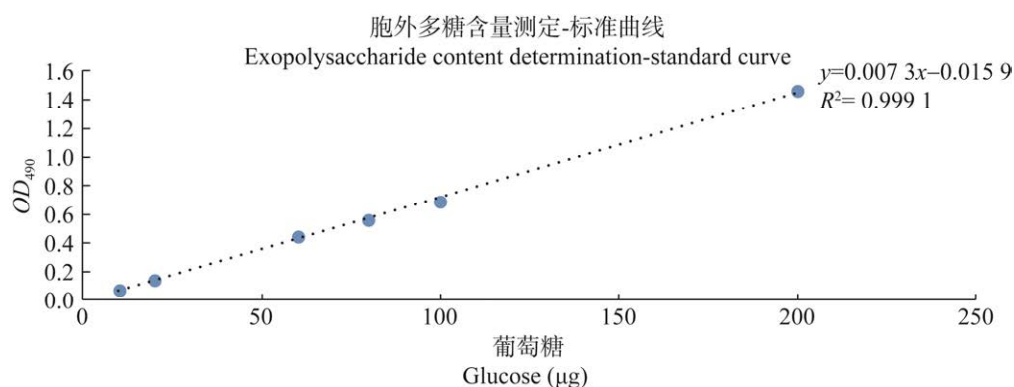


图 1 胞外多糖含量标准曲线

Figure 1 Standard curve of exopolysaccharide content.

200 r/min 培养 24 h, 按照苯酚硫酸法结合标注曲线, 比较测定 15 株菌的胞外多糖产生能力。取 4 mL 菌液, 加入 2 mL 质量分数为 30% 的三氯乙酸(TCA), 4 000 r/min 离心 15 min 去除蛋白。收集上清液, 加入 3 倍体积的无水冷乙醇沉淀过夜。4 000 r/min 离心 20 min 收集沉淀物, 并用蒸馏水溶解, 即为胞外多糖水溶液。OD₄₉₀ 测定吸光值。根据标准曲线计算出胞外多糖的含量^[13]。

4) 8 株复筛菌解磷解钾能力比较

为进一步考察 8 株优势土壤改良芽孢杆菌释放土壤营养的能力, 将这几个菌株点接到有机磷和钾培养基平板上, 37 °C 倒置培养 5 d。通过测定解磷或解钾圈除以菌落直径, 确定不同菌株的解磷或解钾能力比值。

1.2.2 产胞外多糖芽孢杆菌的生理生化与分子鉴定

1) 分子鉴定

将终筛芽孢杆菌单菌落, 接种到 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养 24 h, 10 000 r/min 离心 10 min 获得菌体。然后进行 DNA 提取和特定引物序列扩增。DNA 提取采用北京博迈德细菌基因组提取试剂盒, 获得 DNA 模板后, 再利用 16S rRNA 基因通用引物

和 *gyrB* 基因特定引物、1×*Taq* PCR Master Mix 对该菌进行 16S rRNA 基因与 *gyrB* 基因序列扩增。PCR 反应体系(50 μL): 上、下游引物(10 μmol/L) 各 1 μL, DNA 1 μL, 1×*Taq* PCR Master Mix 27 μL, ddH₂O 20 μL。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min, 35 个循环; 72 °C 6 min; 4 °C 保存, 并交由青岛睿博兴科生物技术有限公司进行测序, 引物序列见表 2。将终筛芽孢杆菌的 16S rRNA 基因与 *gyrB* 基因序列, 输入 NCBI 数据库进行 BLAST 比对, 获得相关模式菌株, 并上传序列获得 NCBI 登录号。采用 ClustalX 1.81 对目标序列与模式株序列进行初步处理后, 采用 MEGA 4.0 按照 neighbor-joining 法进行系统发育树构建。

2) 形态特征

将终筛芽孢杆菌接种到 LB 固体培养基上, 37 °C 倒置培养 24 h 考察其菌落形态。采用革兰氏染色法和 10×100 油镜显微镜观察其菌体形态^[17]。

3) 生理生化特性

将终筛芽孢杆菌在常规 LB 固体培养基进一步培养后, 根据《伯杰细菌鉴定手册》^[18]中的生理生化检测方法对该菌进行生理生化特性测定。

表 2 引物信息表

Table 2 List of primer information

引物类别	端	序列	文献
Type of primers	End	Sequence (5'→3')	References
16S rRNA gene	27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	[14]
	1492R	TACGGCTACCTTGTTACGACTT	
<i>gyrB</i> gene	F	GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNGGNGGNAARTTYGA	[15-16]
	R	AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTCACRTCNGCRTCNGTCAT	

1.2.3 产胞外多糖芽孢杆菌在不同盐碱条件下的生长特性

在高盐 LB 液体培养基基础上, NaCl 含量均为 80 g/L, 配制 pH 分别为 7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 的培养基, 接种终筛的产胞外多糖芽孢杆菌, 37 °C、200 r/min 培养 30 h, 前 18 h 每 2 h 取样, 后 12 h 每 4 h 取样, 测定 OD_{600} , 考察不同 pH 对其生长的影响。

在高盐 LB 液体培养基基础上, pH 值均为 7.0, 配制 NaCl 含量分别为 80、90、100、110、120 g/L 的培养基, 接种终筛的产胞外多糖芽孢杆菌, 37 °C、200 r/min 培养 30 h, 前 18 h 每 2 h 取样, 后 12 h 每 4 h 取样, 测定 OD_{600} , 考察不同 NaCl 含量对其生长的影响。

1.2.4 产胞外多糖芽孢杆菌在不同盐碱条件下产胞外多糖的特性

在高盐 LB 液体培养基基础上, NaCl 含量均为 80 g/L, 配制 pH 值分别为 7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 的培养基, 接种终筛的产胞外多糖芽孢杆菌, 37 °C、200 r/min 培养 5 d, 每天取样, 采用 1.2.1 中的方法测定其发酵液中胞外多糖的含量, 考察不同 pH 对其产胞外多糖能力的影响。

在高盐 LB 液体培养基基础上, pH 值均为 7.0, 配制 NaCl 含量分别为 80、90、100、110、120 g/L 的 LB 培养基, 接种终筛的产胞外多糖芽孢杆菌, 37 °C、200 r/min 培养 5 d, 每天取样, 采用 1.2.1 中的方法, 测定其发酵液中胞外多糖的含量, 考察不同 NaCl 含量对其产胞外多

糖能力的影响。

1.2.5 产胞外多糖芽孢杆菌处理对 3 种盐碱土不同粒径团聚体比例的影响

取 pH 值为 8.32, 全盐量分别为 0.2% (轻盐)、0.4% (中盐) 和 0.6% (重盐) 的盐碱土, 过 0.2 mm 筛, 各取 20 g, 置于平皿中。取等量无菌水作为对照, 试验组分别含有梯度浓度的终筛菌, T1 菌含量 1×10^6 CFU/mL, T2 菌含量 3×10^6 CFU/mL, T3 菌含量 5×10^6 CFU/mL, 每个处理重复 6 次, 液体用量为 1.2 mL/皿, 将各处理培养皿置于 28 °C 培养箱培养 30 d, 每天喷 2 mL 无菌水使其保持湿润, 最终采用湿筛法测定土壤团聚体含量^[19]。

1.2.6 产胞外多糖芽孢杆菌在中度盐碱土中的促生改土效果试验

1) 试验条件

试验采用寿光红日种苗基地提供的莱顿 1 号番茄苗, 考察产胞外多糖芽孢杆菌在中度盐碱土中的番茄促生与土壤改良效果。采用 9 cm 口径的营养钵种植番茄苗, 每个营养钵内装土 250 g。土壤取自根源生物平度基地蔬菜大棚附近 0–20 cm 土层, 过筛后去除杂草和石块备用, 土壤有机质 22.3%, 速效氮 106.2 mg/kg, 速效磷 92.7 mg/kg, 速效钾 251.1 mg/kg。番茄苗定植后, 营养钵放置于 LED 光源的光照培养箱内, 设定为白天为 30 °C、16 h、光照强度 1x, 晚上为 20 °C、8 h、光照强度 0。按照 3×3 拉丁方试验设计确定实验盆栽的位置, 每组 20 株植

株重复,不同组之间每天 12 点轮转位置与方向,以确保光照均一。

2) 试验分组

将土壤改良优势芽孢杆菌单菌落接种到 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养 24 h, 获得其发酵菌液并用无菌发酵液稀释为 2 个浓度处理组, 其中 T1 菌含量 3×10^6 CFU/mL, T2 菌含量 5×10^6 CFU/mL。试验组每次取 50 mL 进行灌根, 对照组仅用等量的无菌培养基。试验周期为 30 d, 每 5 d 灌根 1 次, 共灌根 6 次。

3) 植物相关指标

株高: 采用卷尺测定茎基部至植株自然最高处的长度; 茎粗: 采用游标卡尺测定番茄茎基底部最宽处的直径; 地上部干重: 样本 105 °C 杀青后 90 °C 烘干 3–4 h 至恒重称量; 根干重: 样本 105 °C 杀青后 90 °C 烘干 3–4 h 至恒重称量。壮苗指数=茎粗/株高×全株干重。

4) 根际土相关指标

pH 值: 1:5 与水混合后静置 5 min, 用 PHS-3C 型 pH 计测定土壤 pH 值; 电导率: 1:5 与水混合后静置 5 min, 用 EC-315 型土壤 EC 计测定土壤全盐含量; 土壤速效磷: 采用碳酸氢钠浸提后通过钼锑抗比色法测定土壤速效磷含量; 土壤速效钾: 采用乙酸铵浸提后通过火焰光度计法测定土壤速效钾含量; 土壤容重:

采用环刀法测定土壤容重^[20-21]。

1.2.7 数据统计

每组 4 个重复, 采用 Excel 2013 软件和 SPSS 18.0 软件对试验数据进行处理和差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 高盐碱耐受且产胞外多糖芽孢杆菌 GBW HF-98 的筛选结果

2.1.1 耐盐碱芽孢杆菌筛选结果

727 株菌在初筛平板上生长, 进一步复筛获得 124 株复筛菌, 通过镜检确定其中 106 株菌为芽孢杆菌, 其中菌株 GBW HF-98 来源于青岛胶州湾盐度碱蓬根际土。

2.1.2 30 株复筛菌土中增殖能力比较结果

将 106 株复筛菌的 LB 发酵液, 稀释后通过添加灭菌 LB 空白培养基, 确定各组间 OD_{600} 一致。均取 100 μ L 等 OD_{600} 的不同菌液, 接种至无菌盐碱土壤培养基中进行土壤增殖比较, 选择前 30 株土中增殖优势菌, 进入后续功能比较试验, 如图 2 所示, 其中 GBW HF-98 增殖后土中菌量可达 2.46×10^8 /g-土。

2.1.3 15 株复筛菌产胞外多糖能力比较结果

采用苯酚硫酸法, 测定 GBW HF-98、71、31、85、38、73、17、42、49、72、78、91、27、95、28、96、81、89、25、94、4、51、29、39、2、55、32、86、87、41、

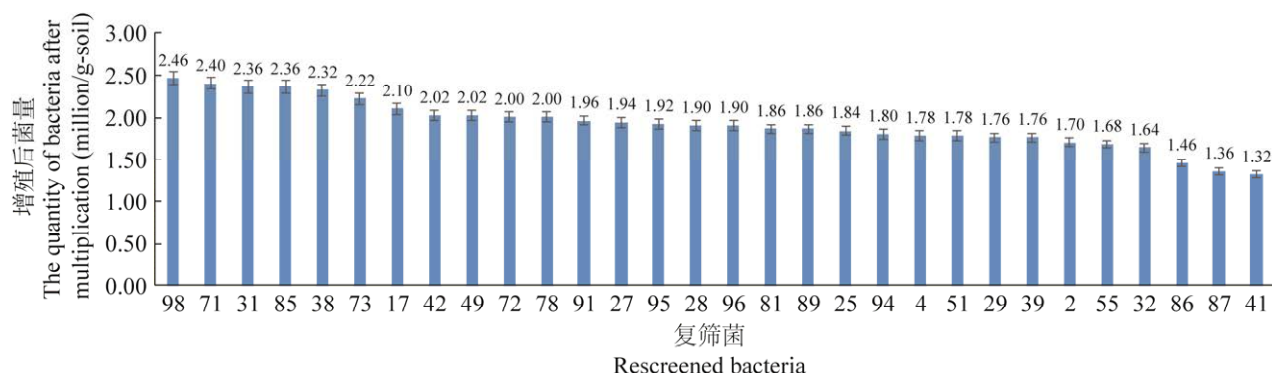


图 2 30 株复筛菌土壤中增殖能力比较

Figure 2 Comparison of proliferation ability of 30 strains of rescreened bacteria in soil.

27、95、28 这 15 株菌的胞外多糖含量, 结果如图 3 所示, 其中 GBW HF-98、73、91 这 3 株菌分别可产 2 618、2 616、2 562 mg/L 胞外多糖, 产胞外多糖能力显著强于其他菌株 ($P<0.05$)。

2.1.4 8 株复筛菌解磷解钾能力比较结果

如图 4 所示, 8 株复筛菌中, GBW HF-98 同时具有较强的解有机磷(图 4A)和解钾(图 4B)

能力, 其中解有机磷比值可达 1.38, 解钾比值可达 1.20 (图 4C), 说明该菌株的解磷、解钾能力显著强于其他菌 ($P<0.05$)。

综合整个筛选过程, 分离自青岛胶州湾盐地碱蓬根际土青岛胶州湾盐地碱蓬根际土的菌株 GBW HF-98 成为终筛综合特性较强的菌株。该菌株可在 100 g/L NaCl、pH 10.0 的复筛平板上生长, 可在盐度为 0.3% 的土壤中实现菌量增

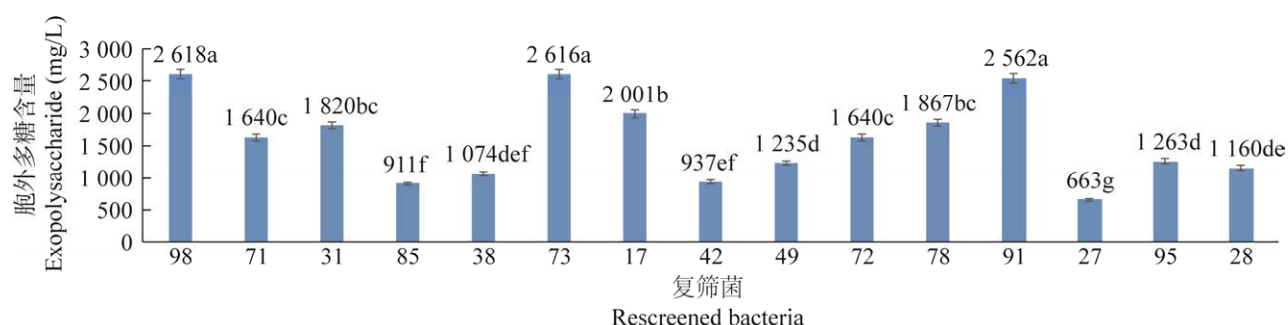


图 3 复筛菌产胞外多糖能力比较 同列不同小写字母表示 0.05 水平差异显著. 下同

Figure 3 Comparison of exopolysaccharide production ability of rescreened bacteria. Different lowercase letters in the same column indicate significant differences at 0.05 level. The same below.

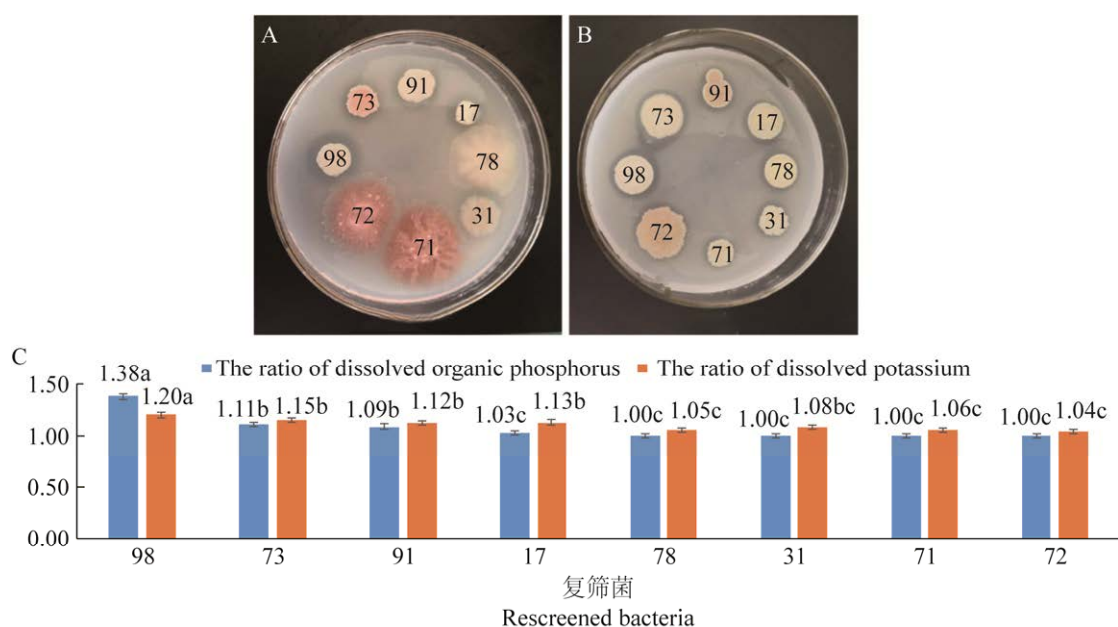


图 4 八株复筛菌解有机磷与解钾能力比较 A: 解有机磷平板. B: 解钾平板. C: 解有机磷与解钾比值

Figure 4 Comparison of organophosphorus and potassium solubilization abilities of 8 strains of rescreened bacteria. A: Plate for organophosphorus solution. B: Plate for potassium solution. C: The ratio of dissolved organic phosphorus and potassium.

殖至 $2.46 \times 10^8/\text{g}$ -土, 还可产 2 618 mg/L 胞外多糖, 并具有较强的解磷、解钾能力, 特别是解有机磷能力较强。

2.2 GBW HF-98 的生理生化与分子鉴定

2.2.1 GBW HF-98 的分子鉴定结果

终筛菌株 GBW HF-98 的 16S rRNA 基因序列上传至 NCBI 获得登录号 ON927073, 其 *gyrB* 基因序列上传至 NCBI 获得登录号 ON936731, 结合 BLAST 比对结果和相关模式株序列, 采用 neighbor-joining 法构建系统发育树。基于 16S

rRNA 基因序列构建的系统发育树见图 5A, 菌株 GBW HF-98 与 *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* KTH-61 相似性最高, 相似度达 99.93%; 基于 *gyrB* 基因的系统发育树结果见图 5B, 菌株 GBW HF-98 与 *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* NRRL B-23052 相似性最高, 相似度达 99.02%。

综合形态、生理生化和基于 16S rRNA 基因和 *gyrB* 基因的分子比对结果, 确定 GBW HF-98 为枯草芽孢杆菌沙漠亚种(*Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*)。

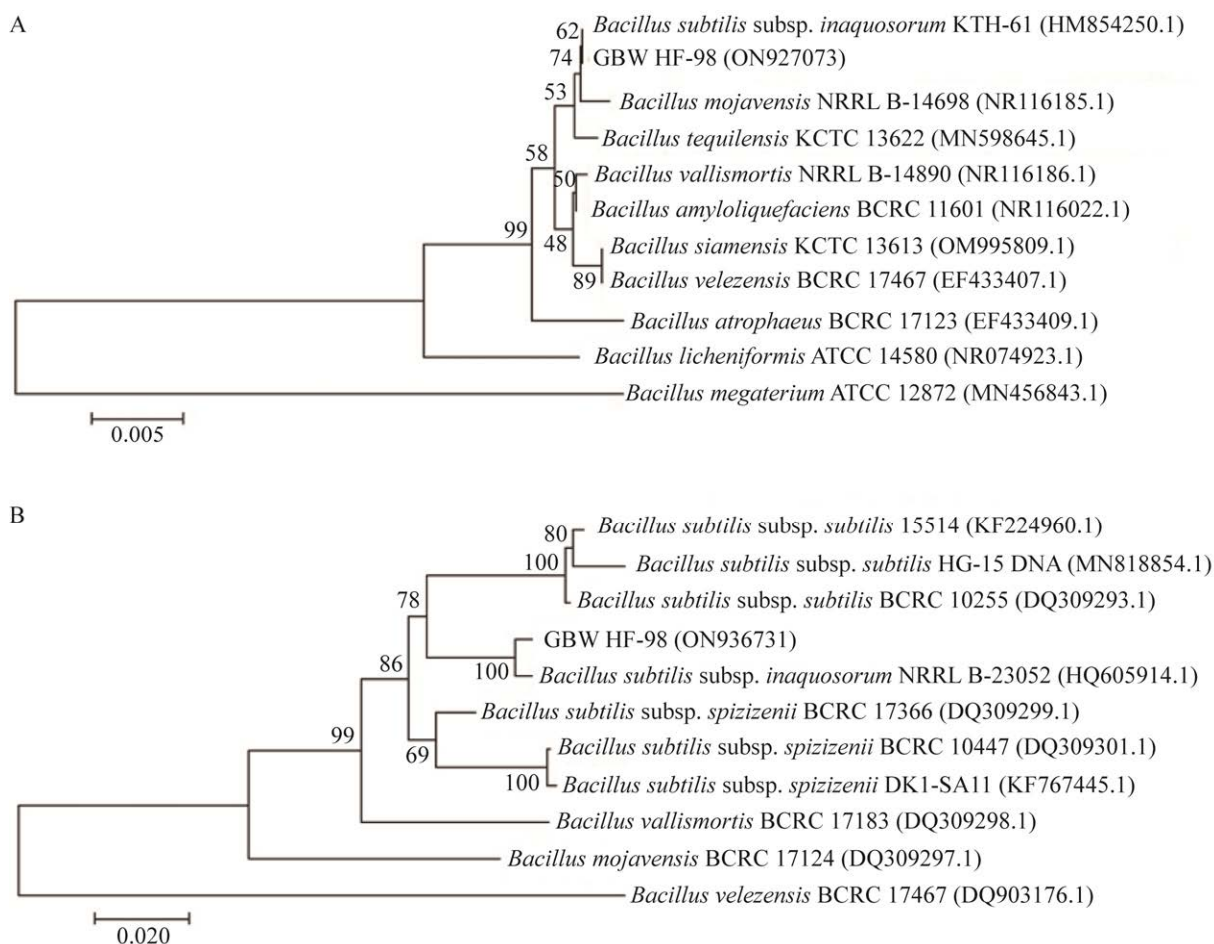


图 5 菌株 GBW HF-98 的系统发育树 A: 基于 16S rRNA 基因. B: 基于 *gyrB* 基因. 括号中数字表示在 GenBank 中的登录号; 自举值大于 70% 的在分支上显示; 标尺的数据代表进化距离

Figure 5 Phylogenetic tree of strain GBW HF-98 by adjacency. A: Based on 16S rRNA gene. B: Based on *gyrB* gene. The numbers in parentheses indicate accession numbers in GenBank; Bootstrapping values greater than 70% are displayed on branches; The ruler data represents evolutionary distances.

2.2.2 GBW HF-98 的形态特征

该菌株 LB 平板上的菌落如图 6A 所示, 浅黄色, 圆形, 表面皱褶, 边缘整齐, 菌体如图 6B 所示, 呈杆状, 单个或成对排列, 革兰氏阳性。芽胞柱形, 中生或近中生, 胞囊不膨大。

2.2.3 GBW HF-98 的生理生化特性

将菌株 GBW HF-98 采用 LB 培养基进一步培养后, 根据《伯杰细菌鉴定手册》^[18]中的生理生化检测方法, 对该菌进行生理生化特性测定, 结果如表 3 所示。该菌在 20–42 °C 温度范

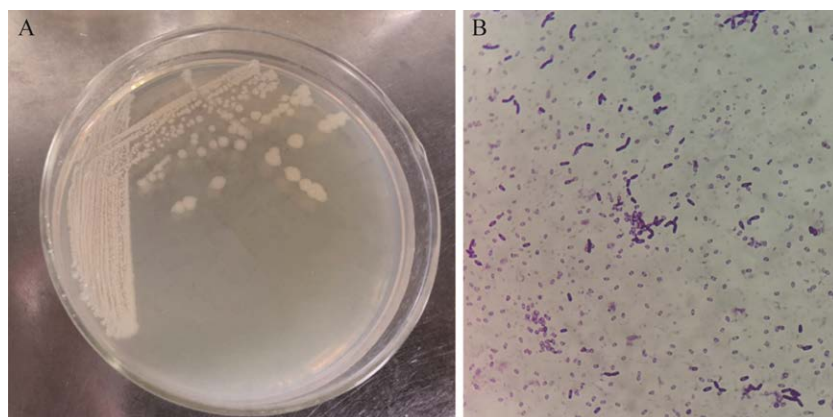


图 6 耐盐碱且产胞外多糖的终筛菌 GBW HF-98 号菌落(A)与菌体(B)形态

Figure 6 Morphology of colony (A) and cell (B) of the final screen bacteria GBW HF-98, which is salt-tolerant and exopolysaccharide-producing.

表 3 GBW HF-98 的生理生化特性

Table 3 Physiological and biochemical properties of GBW HF-98

Item	Result	Item	Result
接触酶 Contact enzyme	+	木糖 Xylose	+
氧化酶 Oxidase	+	蔗糖 Sucrose	+
VP 反应 VP reaction	+	核糖 Ribose	+
脲酶水解 Urease hydrolysis	+	肌醇 Inositol	+
酪氨酸水解 Tyrosine hydrolysis	+	明胶 Gelatin	—
丙酸盐实验 Propionate test	—	淀粉 Amylum	+
硝酸盐还原试验 Nitrate reduction test	+	古老糖 Old sugar	+
20 °C 生长 20 °C growth	+	麦芽糖 Maltose	+
37 °C 生长 37 °C growth	++	半乳糖 Galactose	—
42 °C 生长 42 °C growth	+	葡萄糖 Dextrose	+
45 °C 生长 45 °C growth	—	甘露糖 Mannose	+
10% NaCl 生长 10% NaCl growth	++	山梨醇 Sorbitol	—
12% NaCl 生长 12% NaCl growth	+	棉籽糖 Cottonseed sugar	+
pH 4.5 改良 NB 生长 pH 4.5 improved NB growth	+	海藻糖 Trehalose	+
pH 6.8 改良 NB 生长 pH 6.8 improved NB growth	++	鼠李糖 Rhamnose	—
pH 9.6 改良 NB 生长 pH 9.6 improved NB growth	+	阿拉伯糖 Arabinose	+
G+C 含量 G+C content (mol%)	42–44	纤维二糖 Cellobiose	+

+: Positive; —: Negative.

围内能生长繁殖,但其最适合生长温度在 37 ℃ 附近,在 pH 4.5–9.6 的改良 NB 培养基内均能正常生长,最适生长 pH 值范围为 6.5–7.5,该菌最高可耐受 12% NaCl,可水解脲酶、酪氨酸,接触酶、氧化酶、VP 反应均为阳性,不能利用丙酸盐。该菌可利用木糖、蔗糖、核糖、肌醇、淀粉、麦芽糖、葡萄糖、甘露糖、棉子糖、海藻糖、阿拉伯糖、纤维二糖等多种碳水化合物产酸。

2.3 GBW HF-98 在不同盐碱条件下的生长特性

GBW HF-98 在不同 pH 条件下的生长特性如图 7A 所示,结果显示在 pH≤10.0 时,GBW

HF-98 的生长基本一致,其中 pH 10.0 时稳定期 OD_{660} 值为 4.28,略低于 pH 7.0–9.0 时的 4.51–4.63,降低幅度介于 2.6%–5.1%,变化较小;而在 pH 11.0 时稳定期 OD_{660} 值为 3.29,相较于 pH 7.0 时稳定期 4.63 的 OD_{660} 值,降低幅度为 28.9%。GBW HF-98 在不同 NaCl 浓度下的生长特性如图 7B 所示,结果显示,在 NaCl 浓度≤110 g/L 时,GBW HF-98 的生长基本一致,其中 NaCl 浓度为 110 g/L 时稳定期 OD_{660} 值为 4.35,略低于 NaCl 浓度为 80–100 g/L 时的 4.63–4.46,降低幅度介于 2.5%–5.8%,变化较小;而在 NaCl 浓度为 120 g/L 时稳定期 OD_{660} 值为 3.96,相较于 NaCl 浓度为 80 g/L 时稳定

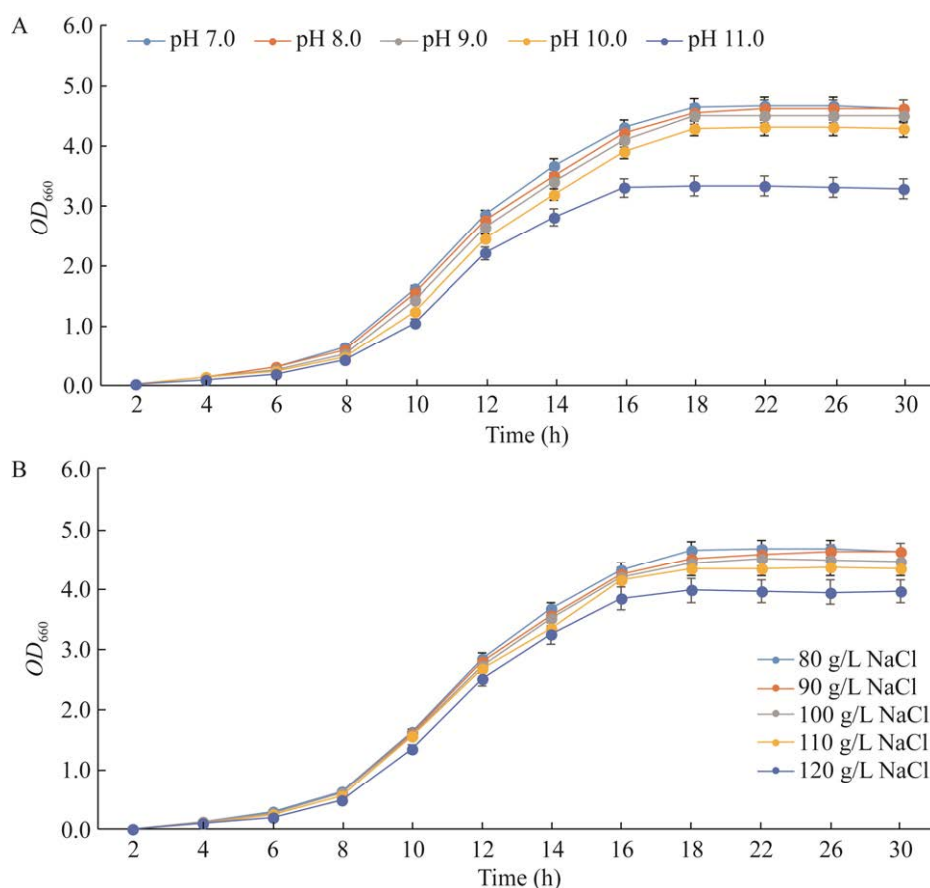


图 7 菌株 GBW HF-98 在不同盐或碱条件下的生长特性 A: 不同 pH. B: 不同 NaCl 浓度

Figure 7 Growth characteristics of strain GBW HF-98 under different salt or alkali conditions. A: Different pH. B: Different NaCl concentrations.

期 4.63 的 OD_{660} 值,降低幅度为 14.5%。该结果可以说明,GBW HF-98 可耐受 pH 值达 10.0 和 NaCl 浓度达 110 g/L,生长能力受盐碱的影响降幅 $\leq 5.8\%$ 。

2.4 GBW HF-98 在不同盐碱条件下产胞外多糖的特性

GBW HF-98 在不同 pH 条件下的生长特性如图 8A 所示,结果显示在 pH ≤ 10.0 时,GBW HF-98 的产胞外多糖能力基本一致,其中 pH 10.0 时 5 d 胞外多糖的含量为 4 466 mg/L,略低于 pH 7.0–9.0 时的 4 502–4 852 mg/L,降低幅度介于 0.8%–8.0%;而在 pH 11.0 时 5 d 胞外多糖的含量为 2 960 mg/L,相较于 pH 7.0 时 5 d 的 4 852 mg/L

胞外多糖含量,降低幅度为 39.0%。GBW HF-98 在不同 NaCl 浓度下的生长特性如图 8B 所示,结果显示,在 NaCl 浓度 ≤ 110 g/L 时,GBW HF-98 产胞外多糖的能力一致,而在 NaCl 浓度为 120 g/L 时 5 d 的胞外多糖含量为 4 389 mg/L,相较于 NaCl 浓度 80 g/L 时 5 d 的 4 852 mg/L 胞外多糖含量,降低幅度为 9.5%。该结果可以说明,GBW HF-98 可耐受 pH 值达 10.0 和 NaCl 浓度达 110 g/L,产胞外多糖能力受盐碱的影响降幅 $\leq 8.0\%$ 。

2.5 GBW HF-98 处理对 3 种盐碱土不同粒径团聚体比例的影响

梯度浓度 GBW HF-98 处理对 3 种盐碱土不同粒径团聚体比例的影响试验结果如表 4 所示。

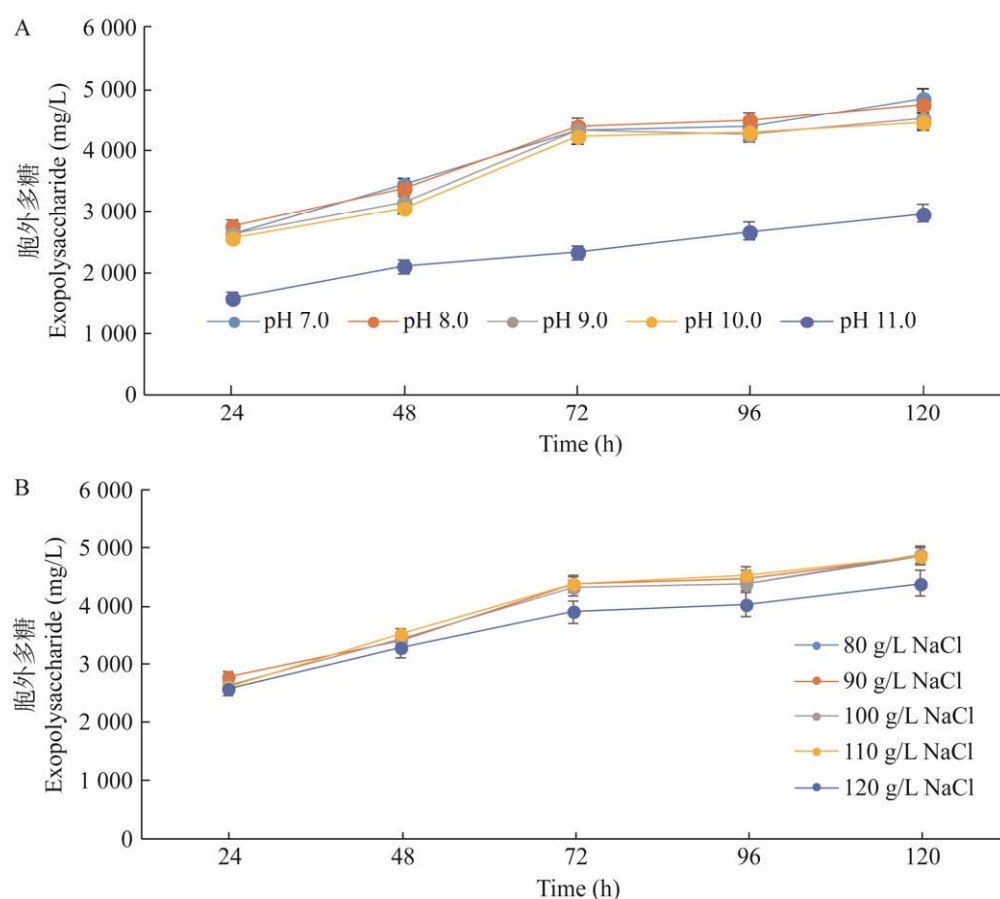


图 8 菌株 GBW HF-98 在不同盐或碱条件下产胞外多糖的特性 A: 不同 pH. B: 不同 NaCl 浓度

Figure 8 Characteristics of exopolysaccharide production by strain GBW HF-98 under different salt or alkali conditions. A: Different pH. B: Different NaCl concentration.

表 4 梯度浓度 GBW HF-98 处理对 3 种盐碱土不同粒径团聚体比例的影响

Table 4 Effects of GBW HF-98 treatment with gradient concentration on the proportion of aggregates with different particle sizes in three saline-alkali soils

处理 Treatment	轻盐 Light salt 0.2%			中盐 Medium salt 0.4%			重盐 Heavy salt 0.6%		
	≥2.00 mm	0.25–2.00 mm	<0.25 mm	≥2.00 mm	0.25–2.00 mm	<0.25 mm	≥2.00 mm	0.25–2.00 mm	<0.25 mm
CK	0.02±0.00c	0.01±0.00c	0.97±0.05a	0.01±0.00c	0.01±0.00c	0.98±0.05a	0.01±0.00c	0.01±0.00c	0.98±0.05a
T1	0.05±0.00b	0.03±0.00b	0.92±0.05ab	0.05±0.00b	0.03±0.00b	0.92±0.05ab	0.03±0.00b	0.02±0.00b	0.95±0.05a
T2	0.10±0.01a	0.06±0.00a	0.84±0.04b	0.07±0.00a	0.04±0.00a	0.89±0.04b	0.05±0.00a	0.02±0.00a	0.93±0.05a
T3	0.10±0.01a	0.06±0.00a	0.84±0.04b	0.08±0.00a	0.04±0.00a	0.88±0.04b	0.05±0.00a	0.03±0.00a	0.92±0.04a

同列不同小写字母表示 0.05 水平差异显著, 下同

Different lowercase letters in the same column indicate significant differences at 0.05 level. The same below.

相较于对照, 梯度浓度 GBW HF-98 处理可显著提升≥2.00 mm 粒径团聚体的比例, 尤其是 T2 和 T3 处理, 与其他两组达显著差异($P<0.05$)。在轻和中盐度土壤环境中, GBW HF-98 梯度处理的 3 个试验组≥2.00 mm 粒径团聚体的比例较高, 介于 0.048%–0.098%, 而在重盐土壤环境中, GBW HF-98 梯度处理的 3 个试验组≥2.00 mm 粒径团聚体的比例则介于 0.016%–0.025%, 说明 GBW HF-98 更倾向于改善低和中盐度土壤的团粒结构。梯度浓度 GBW HF-98 处理对 3 种盐碱土 0.25–2.00 mm 粒径团聚体的比例的影响, 与≥2.00 mm 粒径团聚体的比例, 有类似的趋势。在轻和中盐度土壤环境中, 较高 GBW HF-98 浓度的 T2 和 T3 处理组, <0.25 mm 粒径团聚体比例相较于对照显著降低($P<0.05$), 在重盐度土壤环境中, GBW HF-98 3 个浓度处理组的<0.25 mm 粒径团聚体比例, 无显著差异($P>0.05$)。综合结果显示, GBW HF-98 在改善轻和中盐度土壤中不同粒径团聚体比例的

效果较为显著, 尤其是 T2 和 T3 两个高浓度处理组。

2.6 GBW HF-98 在中度盐碱土中的促生改土效果试验

2.6.1 植物相关指标

中度盐碱土中梯度浓度 GBW HF-98 处理对番茄生长指标的影响结果如表 5 所示。结果显示, 在全盐 0.43%、pH 8.32 的中度盐碱土壤中, 梯度浓度 GBW HF-98 处理改善了番茄生长的壮苗指数、干重和茎粗等指标, 尤其是高剂量应用的 T2 组, 与其他两组相比, 达显著差异($P<0.05$)。与对照组相比, 高剂量浓度 GBW HF-98 的 T2 组显著增加了壮苗指数、根干重、全株干重、茎粗和株高等指标, 增幅分别为 33.8%、59.3%、37.2%、12.3%、15.6% ($P<0.05$)。

2.6.2 根际土相关指标

中度盐碱土中梯度浓度 GBW HF-98 处理对土壤指标的影响结果如表 6 所示。结果显示, 在全盐 0.43%、pH 8.32 的中度盐碱土壤中, 与

表 5 中度盐碱土中梯度浓度 GBWHF-98 处理对番茄生长指标的影响

Table 5 Effects of gradient concentration GBW HF-98 treatment on tomato growth indicators in moderate saline-alkali soil

处理 Treatment	壮苗指数 Strong seedling index	根干重 Root dry weight (g)	全株干重 Whole plant dry weight (g)	茎粗 Thick stem (mm)	株高 Plant height (cm)
CK	0.02±0.00c	0.12±0.02c	0.94±0.03c	4.30±0.06c	16.82±1.04b
T1	0.03±0.00b	0.18±0.03b	1.15±0.04b	4.59±0.08b	19.42±0.82a
T2	0.03±0.00a	0.20±0.03a	1.29±0.04a	4.83±0.07a	19.44±0.76a

表 6 中度盐碱土中梯度浓度 GBWHF-98 处理对土壤指标的影响

Table 6 Effects of gradient concentration GBW HF-98 treatments on soil indexes in moderately saline-alkali soil

处理 Treatment	pH	土壤全盐 Total soil salt (%)	土壤容重 Soil bulk density (g/cm ³)	土壤速效磷 Soil available phosphorus (mg/kg)	土壤速效钾 Soil available potassium (mg/kg)
CK	8.32±0.09a	0.43±0.02a	1.372±0.06a	51.7±2.56b	121±5.13b
T1	7.62±0.05b	0.32±0.01b	1.128±0.04b	69.1±2.74a	138±6.52a
T2	7.58±0.05b	0.31±0.01b	1.126±0.03b	70.3±2.74a	142±6.55a

对照组相比,梯度浓度 GBW HF-98 的 2 个处理组显著降低了 pH 值、全盐含量和土壤容重等指标,显著提升了土壤速效磷和速效钾指标($P<0.05$),但两组间无显著差异($P>0.05$),T2 组略强。与对照组相比,高剂量浓度 GBW HF-98 的 T2 组,显著降低了 pH 值、全盐含量和土壤容重,降幅分别为 8.9%、27.9%、17.9%;显著提升了土壤速效磷和速效钾指标,增幅分别为 36.0%和 17.4%。

3 讨论与结论

根际促生菌是定殖于植物根系能够促进植物生长的有益菌类,可通过养分活化、产生胞外多糖及激素分泌等方式促进植物生长发育,还可通过胞外多糖等代谢物改善土壤状况,现已成为发展可持续化农业生产的重要资源^[22-24]。

胞外多糖(extracellular polymeric substance, EPS)是微生物生命的基础,为化学反应、养分捕获和抵御环境胁迫(如盐度和干旱)提供了理想的环境。微生物 EPS 可以增强土壤颗粒的聚集,通过保持环境的水分和捕获养分使植物受益。此外, EPS 具有独特的特性,如生物相容性、凝胶性和增稠性,具有工业应用价值。然而,尽管对 EPS 进行了几十年的研究,但只有少数聚合物被广泛应用于不同的领域,尤其是在农业领域。

近年来,微生物多糖应用于土壤结构改良

正日益受到人们的关注^[25-26]。土壤 EPS 可以通过增加土壤团聚体稳定性和保持植物根部及周围的水分来提高农业灌溉用水生产力^[27]。艾雪从沙漠结皮中筛选出 19 株耐盐碱的细菌,并发现其胞外多糖产量与土壤结皮厚度、土壤团聚体稳定性呈极显著相关性,说明微生物所产胞外多糖对沙漠化防治及改善荒漠生态环境有着重要影响及应用价值^[28]。张文平等从江西农业大学校园及周边土壤中筛选到一株产 EPS 较高的蜡样芽孢杆菌 DT-10,该菌株在发酵培养基中 EPS 产量可达 1 300.64 mg/L,其所产胞外多糖对水稳性团聚体形成有显著促进作用($P<0.05$)^[29]。

已有的研究对于产胞外多糖菌的土壤改良进行了一些研究,然而具体功能菌株产胞外多糖能力是否受到环境 pH 和盐度的影响,已有的研究较少提及,对于具体的不同粒径团聚体比例分布的影响也较少涉及。

本研究通过对系列盐碱土壤样品筛选,优选出一株产胞外多糖优势芽孢杆菌 GBW HF-98,经形态、生理生化和基于 16S rRNA 基因和 *gyrB* 基因的分子鉴定,确定该菌为枯草芽孢杆菌沙漠亚种(*Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*)。该菌可耐受 pH 值达 10.0 和 NaCl 浓度达 110 g/L,相较于初始 pH 7.0 和 NaCl 浓度 80 g/L,生长能力受盐碱的影响降幅≤5.8%,产胞外多糖能力受盐碱的影响降幅≤8.0%。该菌在改善轻和中盐

度土壤中不同粒径团聚体比例的效果较为显著, 尤其是 T2 和 T3 两个高浓度处理组。在中度盐碱土壤的种植试验中, 与对照组相比, 高剂量浓度 GBW HF-98 的 T2 组显著增加了壮苗指数、根干重、全株干重、茎粗和株高等指标, 增幅分别为 33.8%、59.3%、37.2%、12.3%、15.6% ($P<0.05$), 还可显著降低 pH 值、全盐含量和土壤容重, 降幅分别为 8.9%、27.9%、17.9%; 显著提升土壤速效磷和速效钾指标, 增幅分别为 36.0%和 17.4% ($P<0.05$)。Islam 等研究表明, 解磷促生菌接种植株根际后, 植株生长更优且盐碱抗性也随之增强^[30]。Sattar 等研究表明, 功能性解钾菌分泌的解钾有机酸和氨基酸, 可以通过破坏硅酸盐矿物从而源源不断地释放硅酸盐中的钾, 进而促进植物生长^[31]。本研究结果与前人研究结果类似, 功能性枯草芽孢杆菌沙漠亚种 GBW HF-98 在盐碱胁迫下, 仍可以通过产胞外多糖改善土壤团粒结构, 降低体系 pH 值和盐度, 促进速效磷和速效钾的释放, 进而促进番茄的生长。本研究相较而言, 详细研究了产胞外多糖菌株在不同 pH 和 NaCl 条件下的产胞外多糖和生长能力, 并与后面的土壤团聚体结构分析、盐碱土壤中的植物实验等结果形成对应。本研究不足之处是应系统分析更多的土壤微生物变化指标, 以详细揭示菌的耐盐碱特效和耐受机制。

本研究结果表明, 耐盐碱且产胞外多糖的 GBW HF-98 菌株具有一定的盐碱土壤改良与植物促生潜力, 对于中度盐碱土壤的生物改良研究具有重要意义。

REFERENCES

- [1] 罗丽朦, 王丽学, 秦立刚, 王堃. 多糖和土壤团聚体对扁穗冰草根鞘形成的影响[J]. 生态学报, 2014, 34(17): 4859-4865.
LUO LM, WANG LX, QIN LG, WANG K. Polysaccharides and soil aggregate on the mechanism of rhizosheath formation in *Agropyron cristatum* L.[J]. Acta Ecologica Sinica, 2014, 34(17): 4859-4865 (in Chinese).
- [2] 余劲聪. 海藻寡糖在农业领域的应用研究进展[J]. 南方农业学报, 2016, 47(6): 921-927.
YU JC. Research progress in application of seaweed oligosaccharides in agriculture[J]. Journal of Southern Agriculture, 2016, 47(6): 921-927 (in Chinese).
- [3] 上官王丽. 产胞外多糖细菌多样性及其对土壤团聚体形成作用的研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2013.
SHANGGUAN WL. The diversity of exopolysaccharide-producing bacteria and their effects on aggregation in soils[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2013 (in Chinese).
- [4] 孙雪, 董永华, 王娜, 崔文会, 廖鲜艳, 刘莉. 耐盐碱促生菌的筛选及性能[J]. 生物工程学报, 2020, 36(7): 1356-1364.
SUN X, DONG YH, WANG N, CUI WH, LIAO XY, LIU L. Screening and evaluation of saline-alkali-tolerant and growth-promoting bacteria[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2020, 36(7): 1356-1364 (in Chinese).
- [5] 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).
- [6] 柳鑫鹏, 臧淑英, 智刚, 渠凤甜. 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).
- [7] 周妍, 王丽娜, 张美珍, 刘权, 殷奎德. 耐盐碱解磷菌的筛选鉴定及对绿豆的促生作用[J]. 西北农业学报, 2022, 31(4): 488-497.
ZHOU Y, WANG LN, ZHANG MZ, LIU Q, YIN KD. Screening and identification of phosphate solubilizing bacteria tolerant to salt-alkali and its growth-promoting effect on mung bean[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2022, 31(4): 488-497 (in Chinese).

- [8] 王艳宇, 刘爽, 李鑫, 王思文, 刘权, 殷奎德, 张兴梅. 3株耐盐碱促生菌对绿豆根际微生态的影响[J]. 干旱地区农业研究, 2022, 40(1): 139-145.
WANG YY, LIU S, LI X, WANG SW, LIU Q, YIN KD, ZHANG XM. Effects of three saline-alkali tolerant growth-promoting bacteria on the rhizosphere microecology of mung bean[J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2022, 40(1): 139-145 (in Chinese).
- [9] 李梦. 解有机磷菌对酸性土壤的改良和重金属污染的修复研究[D]. 西安: 西北大学硕士学位论文, 2017.
LI M. Study on the organic phosphate solubilizing bacteria on amending acidity and heavy metal in acidic contaminated[D]. Xi'an: Master's Thesis of Northwest University, 2017 (in Chinese).
- [10] 吴伟, 张鹏飞, 张桂萍, 李秀芳, 任嘉红. 连翘根际高效解有机磷细菌的筛选鉴定及促生长特性研究[J]. 西南林业大学学报(自然科学), 2018, 38(3): 93-100.
WU W, ZHANG PF, ZHANG GP, LI XF, REN JH. Screening, identification and growth promoting characteristics of high efficient organic phosphate-mineralizing bacterium from rhizosphere soils of *Forsythia suspensa*[J]. Journal of Southwest Forestry University (Natural Sciences), 2018, 38(3): 93-100 (in Chinese).
- [11] 陈定安, 魏小武, 张敏, 程伟, 王玉双, 李一路, 伍善东, 易红伟. 油茶树根际土壤解有机磷细菌的分离、鉴定及解磷能力分析[J]. 湖南农业科学, 2019(10): 8-11.
CHEN DA, WEI XW, ZHANG M, CHENG W, WANG YS, LI YL, WU SD, YI HW. Isolation, identification and phosphate solubilizing capacity of organophosphate-dissolving bacteria in tea-oil rhizosphere soil[J]. Hunan Agricultural Sciences, 2019(10): 8-11 (in Chinese).
- [12] 王艳宇, 向君亮, 周妍, 刘权, 殷奎德, 张兴梅. 耐盐碱细菌 DQSA1 的分离鉴定及盐碱胁迫下对绿豆的促生作用[J]. 微生物学通报, 2021, 48(8): 2653-2664.
WANG YY, XIANG JL, ZHOU Y, LIU Q, YIN KD, ZHANG XM. Isolation and identification of saline-alkali tolerance bacteria DQSA1 and its growth-promoting effect on mung bean under saline-alkali stress[J]. Microbiology China, 2021, 48(8): 2653-2664 (in Chinese).
- [13] 李嘉文, 刘达, 刘党生, 王昆, 谢明蓉. 乳酸菌胞外多糖产生菌的筛选与初步研究[J]. 中国微生态学杂志, 2019, 31(9): 1027-1033.
LI JW, LIU D, LIU DS, WANG K, XIE MR. Screening of and preliminary research on exopolysaccharides producing strain[J]. Chinese Journal of Microecology, 2019, 31(9): 1027-1033 (in Chinese).
- [14] 喻国辉, 牛春艳, 陈远凤, 陈燕红, 杨紫红. 利用 16S rDNA 结合 *gyrA* 和 *gyrB* 基因对生防芽孢杆菌 R31 的快速鉴定[J]. 中国生物防治, 2010, 26(2): 160-166.
YU GH, NIU CY, CHEN YF, CHEN YH, YANG ZH. Use of 16S rDNA, *gyrA* and *gyrB* gene sequence to identify a biocontrol *Bacillus* sp. strain R31[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2010, 26(2): 160-166 (in Chinese).
- [15] 李献梅, 王小芬, 杨洪岩, 高秀芝, 崔宗均. 促旋酶 (*gyrase*)B 亚单位基因 *gyrB* 在鉴别细菌近缘种中的应用[J]. 微生物学报, 2008, 48(5): 701-706.
LI A, WANG XF, YANG HY, GAO XZ, CUI ZJ. Application of *gyrB* in the identification of closely related bacteria—a review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(5): 701-706 (in Chinese).
- [16] 郝云婕, 韩素贞. *gyrB* 基因在细菌系统发育分析中的应用[J]. 生物技术通报, 2008(2): 39-41.
HAO YJ, HAN SZ. Application of *gyrB* gene in bacterial phylogenetic analysis[J]. Biotechnology Bulletin, 2008(2): 39-41 (in Chinese).
- [17] 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.
DONG XZ, CAI MY. Handbook of Identification of Common Bacterial Systems[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese).
- [18] Buchanan RE, Gibbons NE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所, 译. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984.
BUCHANAN RE, GIBBONS NE. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, trans. 8th ed. Beijing: Science Press, 1984 (in Chinese).
- [19] 杜秀娟. 产胞外多糖细菌筛选及其对土壤团聚体的影响[D]. 沈阳: 沈阳农业大学硕士学位论文, 2016.
DU XJ. Screening of exopolysaccharide-producing bacteria and their effects on soil aggregates[D]. Shenyang: Master's Thesis of Shenyang Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [20] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2000.
BAO SD. Soil and Agricultural Chemistry Analysis[M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2000 (in Chinese).
- [21] 赵小蓉, 林启美, 孙焱鑫, 姚军, 张有山. 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.
ZHAO XR, LIN QM, SUN YX, YAO J, ZHANG YS.

- The methods for quantifying capacity of bacteria in dissolving p compounds[J]. Microbiology China, 2001, 28(1): 1-4 (in Chinese).
- [22] PANKAJ U, SINGH D N, MISHRA P, GAUR P, BABU CSV, SHANKER K, VERMA RK. Autochthonous halotolerant plant growth-promoting rhizobacteria promote bacoside A yield of *Bacopa monnieri* (L.) Nash and phytoextraction of salt-affected soil[J]. Pedosphere, 2020, 30(5): 671-683.
- [23] FAHAD S, HUSSAIN S, BANO A, SAUD S, HASSAN S, SHAN D, KHAN FA, KHAN F, CHEN YT, WU C, TABASSUM MA, CHUN MX, AFZAL M, JAN A, JAN MT, HUAN JL. Potential role of phytohormones and plant growth-promoting rhizobacteria in abiotic stresses: Consequences for changing environment[J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2015, 22(7): 4907-4921.
- [24] COSTA OYA, RAAIJMAKERS JM, KURAMAE EE. Microbial extracellular polymeric substances: Ecological function and impact on soil aggregation[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1636.
- [25] LÓPEZ E, RAMOS I, SANROMÁN MA. Extracellular polysaccharides production by *Arthrobacter viscosus*[J]. Journal of Food Engineering, 2003, 60(4): 463-467.
- [26] SHER Y, BAKER NR, HERMAN D, FOSSUM C, HALE L, ZHANG XX, NUCCIO E, SAHA M, ZHOU JZ, PETT-RIDGE J, FIRESTONE M. Microbial extracellular polysaccharide production and aggregate stability controlled by switchgrass (*Panicum virgatum*) root biomass and soil water potential[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2020, 143: 107742.
- [27] le GALL S, BÉRARD A, PAGE D, LANOË L, BERTIN N, DOUSSAN C. Increased exopolysaccharide production and microbial activity affect soil water retention and field performance of tomato under water deficit[J]. Rhizosphere, 2021, 19: 100408.
- [28] 艾雪. 沙漠结皮中耐盐碱细菌的分离及其固沙特性研究[D]. 兰州: 兰州交通大学硕士学位论文, 2015.
- AI X. Isolation of saline-alkali-tolerant bacterial starins from desert crust and its characteristics in sand fixation[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Lanzhou Jiatong University, 2015 (in Chinese).
- [29] 张文平, 李昆太, 黄林, 魏赛金, 程新. 产胞外多糖菌株的筛选及其对土壤团聚体的影响[J]. 江西农业大学学报, 2017, 39(4): 772-779.
- ZHANG WP, LI KT, HUANG L, WEI SJ, CHENG X. Screening of exopolysaccharide-producing bacteria and their effects on aggregation in soil[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2017, 39(4): 772-779 (in Chinese).
- [30] ISLAM F, YASMEEN T, ARIF MS, ALI S, ALI B, HAMEED S, ZHOU WJ. 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.
- [31] SATTAR A, NAVEED M, ALI M, ZAHIR ZA, NADEEM SM, YASEEN M, MEENA VS, FAROOQ M, SINGH R, RAHMAN M, Narayan H. Perspectives of potassium solubilizing microbes in sustainable food production system: a review[J]. Applied Soil Ecology, 2019, 133: 146-159.