

研究报告



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

王艳宇 向君亮 周妍 刘权 殷奎德 张兴梅*

黑龙江八一农垦大学农学院 黑龙江 大庆 163319

摘要:【背景】近年来,大庆地区土壤盐碱化程度逐渐加剧,而微生物改良盐碱土是当今的研究热点。【目的】从大庆盐碱土中筛选出耐盐碱菌株,验证其促生作用,为改良大庆盐碱土壤提供微生物资源。【方法】采用筛选培养基从大庆盐碱土中获得耐盐碱促生菌,对其进行形态学观察、生理生化和 16S rRNA 基因鉴定,并测试菌株在盐碱胁迫下对绿豆植株和土壤细菌群落结构的影响。【结果】筛选得到一株耐盐碱促生菌 DQSA1,具有固氮、产 ACC 脱氨酶、产铁载体、产吲哚乙酸 (Indole-3-Acetic Acid, IAA) 功能;通过生理生化鉴定和系统发育分析,判定该菌株为卓贝尔氏菌属 (*Zobellella*)。在盐碱土中种植绿豆后接种菌株 DQSA1,处理后的绿豆较对照相比根系鲜重、根系干重及叶绿素含量分别增加了 33%、32%和 79%;植株叶部可溶性糖、脯氨酸和可溶性蛋白含量分别升高了 10%、80%和 73%;根系的脯氨酸及可溶性蛋白含量分别增加了 78%和 44%。对种植绿豆的土壤细菌进行高通量测序,发现菌株 DQSA1 可以在盐碱环境下定殖并促进根瘤菌和鞘氨醇杆菌等有益菌的生长。【结论】菌株 DQSA1 可以在盐碱条件下调节土壤细菌群落结构并促进植物生长,为改良盐碱土地提供了有效的微生物资源。

关键词:耐盐碱,促生菌,盐碱土改良,细菌多样性

Isolation and identification of saline-alkali tolerance bacteria DQSA1 and its growth-promoting effect on mung bean under saline-alkali stress

WANG Yanyu XIANG Junliang ZHOU Yan LIU Quan YIN Kuide ZHANG Xingmei*

College of Agriculture, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319, China

Abstract: [Background] In recent years, the degree of soil salinization in Daqing has been gradually intensified. Microbial improvement of saline-alkali soil is a hot research topic now. [Objective] Saline-alkali tolerance bacteria were screened out from Daqing saline-alkali soil, verify its growth-promoting effect, providing microbial resources for improving the saline-alkali soil in Daqing.

Foundation item: Local Characteristic Discipline Project of Heilongjiang Province

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

Received: 27-10-2020; Accepted: 03-02-2021; Published online: 22-03-2021

基金项目: 黑龙江省地方特色学科项目

*通信作者: E-mail: zxmnd@163.com

收稿日期: 2020-10-27; 接受日期: 2021-02-03; 网络首发日期: 2021-03-22

[Methods] Screening mediums were used to separate saline-alkali tolerance and growth-promoting bacteria from Daqing saline-alkali, the strains were identified by morphological observation, physiological and biochemical identification and 16S rRNA gene sequence analysis, the effect of strains on mung bean growth and soil bacterial community structure under saline-alkali stress was tested. **[Results]** A saline-alkali tolerance and growth-promoting strain DQSA1 was screened, which could fix nitrogen and produce ACC deaminase, siderophore and indole-3-acetic acid (IAA), and identified through physiological and biochemical identification and phylogenetic analysis as *Zobellella*. Inoculation of strain DQSA1 after planting mung beans in saline soil, the fresh root weight, root dry weight and chlorophyll content of mung bean after treatment increased significantly, increased by 33%, 32% and 79% respectively. Strain DQSA1 could significantly increase the content of soluble sugar, proline and soluble protein in mung bean leaves, increase by 10%, 80% and 73%, respectively. Compared with the content of CK, the proline content and soluble protein content of mung bean roots were increased by 78% and 44%, respectively. High-throughput sequencing was performed on the soil in which mung bean were grown, the results showed that the strain DQSA1 can colonization in a saline-alkali environment and promote the growth of beneficial *Rhizobium* spp. and *Sphingosine* spp. **[Conclusion]** Strain DQSA1 could change the soil bacterial and promote plant growth under saline-alkali conditions, providing effective microbial resources for improving saline-alkali soil.

Keywords: saline-alkali tolerance, growth-promoting bacteria, saline-alkali soil amendment, bacterial diversity

大庆位于松嫩平原中西部, 分布着大面积的盐碱地。近年来油田的大量开发和化肥农药的过度使用使得当地土壤盐碱化程度更加严重。土壤盐碱化不仅降低土壤养分, 还会影响作物生长, 造成粮食减产, 最终限制农牧业的发展以及生态环境的恢复^[1-2]。因此如何改良和利用盐碱地成为了当地农业生产的热点问题。

目前生物改良是盐碱地改良方法中最具生态效益和经济效益的措施, 主要分为植物改良和微生物改良 2 种形式, 其中应用耐盐碱植物改良受地域和气候限制较大, 而耐盐碱微生物在当地土壤中分布广泛, 便于开发利用^[3]。根围促生菌 (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR) 能够帮助植物获取营养、调节植物激素水平、诱导植物对生物胁迫和非生物胁迫产系统抗性^[4]。近年来, 许多学者从不同盐碱地区筛选出 PGPR, 并验证了其在胁迫条件下对植物的促生作用^[5-7], 但是关于 PGPR 施用后对土壤微生物群落结构的影响有待进一步研究。

在土壤生态系统中, 微生物是分解有机物、

参与物质循环的关键, 其群落结构多样性能够很好地反映土壤质量的变化趋势^[8-9]。高通量测序作为目前应用最普遍的新一代测序技术, 拥有测序数据量大、可信度高和成本低的优势, 能够更加准确地揭示土壤微生物群落的复杂性和多样性^[10], 已经被广泛地应用到土壤微生物多样性研究中^[11-12]。

本研究从大庆盐碱土壤中分离筛选耐盐碱菌株, 确定其分类地位, 通过盆栽试验和高通量测序技术检测耐盐碱菌株对绿豆的生长指标和生理活性物质以及土壤细菌群落结构的影响, 以期为开发和改良盐碱土地提供微生物资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品采集

土壤样品采集自大庆市盐碱地草原 (46°34'23"N, 125°10'44"E)。土壤 pH 9.77, 总盐量达 0.85%, 碱解氮、速效钾和有效磷含量分别为 59.00、334.00、17.75 mg/kg, 有机质含量为 7.50 g/kg。采用五点采样法采集深度 0-20 cm 的

土壤样品, 每个样品 3 次重复。挑出根系等杂物, 利用四分法混匀, 4 °C 保存, 用于耐盐碱促生菌的分离。

用于绿豆盆栽试验的土壤采集自植被生长较好的盐碱地草原, pH 8.34, 可溶性盐含量 0.15%, 碱解氮、速效钾和有效磷含量分别为 86.00、398.00、19.20 mg/kg, 有机质含量为 33.70 g/kg。

1.1.2 培养基

用于富集土壤细菌的培养基参照 Poli 等^[13]的方法配制; 耐盐碱培养基的配制: 在富集培养基中添加 50 mmol/L NaHCO₃, pH 9.00; 促生功能鉴定培养基, 包括阿须贝氏无氮培养基、无机磷培养基、CAS 培养基、ADF 培养基和金氏培养基分别参照参考文献[14-18]的方法配制。

1.1.3 主要试剂和仪器

细菌基因组 DNA 提取试剂盒, Omega 公司; 土壤基因组 DNA 提取试剂盒, MP Biomedicals 公司。Taq 酶, 生工生物工程(上海)股份有限公司。PCR 仪, Applied Biosystems 公司; 紫外分光光度计, 上海昂拉仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离纯化及促生功能鉴定

菌株的分离纯化参照向君亮等^[19]的方法进行, 在耐盐碱培养基上采用稀释平板法分离耐盐碱细菌, 通过多次划线获得纯种, 并保存于 30% 甘油中, 置于 -40 °C 冰箱冷藏, 用于菌株的固氮、解磷、产铁载体、产 ACC 脱氨酶和产吲哚乙酸(Indole-3-Acetic Acid, IAA)功能的定性测定。

1.2.2 菌株生理生化鉴定

菌株 MR 试验、VP 试验、接触酶试验、淀粉水解试验、明胶液化试验、酪素水解试验、硝酸盐利用试验、苯丙氨酸脱氨酶试验、革兰氏染色参照《常见细菌系统鉴定手册》^[20]和《伯杰细菌鉴定手册》^[21]进行。

1.2.3 菌株 16S rRNA 基因序列分析

用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株的总

DNA 后, 使用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')对其扩增。PCR 反应体系: DNA 模板 1 μL, 2×Taq Master Mix 25 μL, 上、下游引物 (10 μmol/L)各 1 μL, ddH₂O 补至 50 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 30 s, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后, 采用 PCR 产物纯化试剂盒进行纯化, 纯化后的产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。测序结果在 NCBI BLAST 上进行同源性分析, 应用 MEGA 7.0 作系统发育树。

1.2.4 菌株对绿豆幼苗的促生试验

促生试验的盆栽共设置 3 个处理, 即不种绿豆不接菌、种绿豆不接菌和种绿豆接菌, 每个处理 3 次重复。在播种绿豆时接菌组按照 10⁷ CFU/g 的接种量接种菌株稀释培养液, 另外 2 组加入等量培养基稀释液, 置于人工气候室中培养。出苗 15 d 后补接菌液 1 次, 接种量为前次的 50%。

1.2.5 植株生长生理指标测定

绿豆生长 30 d 后统计植株的株高、地上及地下部分的干重和鲜重; 用叶绿素仪测定叶绿素含量; 脯氨酸含量及可溶性糖含量的测定参照薄晓培等^[22]的方法进行; 可溶性蛋白含量测定采用考马斯亮蓝 G-250 法^[23]。

1.2.6 土壤微生物多样性测定

取 3 种处理的土壤样品, 使用土壤基因组 DNA 提取试剂盒提取土壤总 DNA, 并采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量; 利用通用引物对 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3')和 907R (5'-CCG TCAATTCMTTTRAGTTT-3')对 16S rRNA 基因 V4-V5 区进行扩增, PCR 反应条件、体系和 PCR 产物的纯化参照 Hao 等^[24]的方法。将纯化后的样品送上海美吉生物医药科技有限公司采用 Illumina HiSeq 平台进行高通量测序。

获得下机原始数据后, 使用 Trimmomatic 软件质控, 再采用 FLASH 软件进行拼接, 得到优化

数据后按照 97%的相似性进行分类操作单元 (Operational Taxonomic Unit, OTU)聚类,用于微生物多样性分析。

1.2.7 数据分析

应用 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,采用美吉云平台进行测序数据分析。

2 结果与分析

2.1 菌株 DQSA1 的分离及鉴定

2.1.1 菌株 DQSA1 的分离及促生功能鉴定

经筛选,最终得到 43 株耐盐碱细菌。其中固氮菌 23 株,解磷菌 2 株,具有产 ACC 脱氨酶功能菌株 15 株,具有产铁载体功能菌株 27 株,14 株具有产 IAA 功能菌株。选用具有固氮、产 ACC 脱氨酶、产铁载体和 IAA 功能的菌株 DQSA1 进行绿豆的盆栽试验。

2.1.2 菌株 DQSA1 生理生化鉴定

将菌株 DQSA1 在 LB 培养基上培养 24 h 后观察其形态,菌落外观呈白色、圆形凸起状,菌体呈短杆状。菌株 DQSA1 为革兰氏阴性菌,不能水解淀粉和酪素,接触酶试验、VP 试验、吲哚试验呈现阳性;硝酸盐利用、甲基红试验、明胶液化试验、苯丙氨酸脱氨酶试验均呈现阴性(表 1)。

表 1 菌株 DQSA1 生理生化特性

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of the strain DQSA1

试验指标 Test items	Strain DQSA1
革兰氏染色 Gram stain	-
接触酶 Catalase	+
硝酸盐利用 Nitrate reduction test	-
甲基红试验 Methyl-red test	-
VP 测定 VP test	+
淀粉水解 Amylohydrolysis test	-
明胶液化试验 Gelatin liquefaction test	-
酪素水解 Casein hydrolysis	-
苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine deaminase test	-
吲哚试验 Indole test	+

注:+: 阳性; -: 阴性

Note: +: Positive; -: Negative

2.1.3 菌株 DQSA1 分子生物学鉴定

将获得的序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对分析,菌株 DQSA1 与模式菌株反硝化卓贝尔氏菌(*Zobellella denitrificans* ZD1)的序列相似度最高,为 96.93%,16S rRNA 基因序列相似度小于 98.65%,可以认定为可能的新种或新属^[25]。利用临近法在 MEGA 7.0 软件上作系统发育树(图 1),菌株 DQSA1 与模式菌株 *Zobellella denitrificans* ZD1 处在不同的分支上,分支处 Bootstrap 值为 94,可信度高。综上所述,初步判定菌株 DQSA1 为卓贝尔氏菌属(*Zobellella*),疑似新种,其 GenBank 登录号为 MT936519。

2.2 菌株 DQSA1 对盐碱胁迫下绿豆生长及生理指标的影响

2.2.1 菌株 DQSA1 对盐碱胁迫下绿豆生长指标的影响

通过对绿豆的生长指标进行测定,结果见表 2。绿豆的根鲜重、根干重和叶绿素含量得到显著提高,分别增加了 33%、32%和 79%;菌株 DQSA1 对地上部分生长促进不明显,但株高、茎叶鲜重和干重也有增加的趋势,分别增加了 9%、14%和 14%。由此可以证明,菌株 DQSA1 提高了绿豆在盐碱胁迫下的抗性,促进绿豆生长。

2.2.2 菌株 DQSA1 对盐碱胁迫下绿豆生理指标的影响

由表 3 及表 4 可知,在接种菌株 DQSA1 后,植株的渗透胁迫性物质含量得到明显的提升。其中植株叶部可溶性糖、脯氨酸和可溶性蛋白含量均得到显著提升,分别升高了 10%、80%和 73%;植株根系的脯氨酸含量及可溶性蛋白含量增加明显,较未接种菌株 DQSA1 的含量分别增加了 78%、44%,根系可溶性糖含量有增加的趋势,但未达到显著水平。由此可见,接种菌株 DQSA1 可以增加绿豆的渗透胁迫性物质,增强绿豆的抗逆能力。

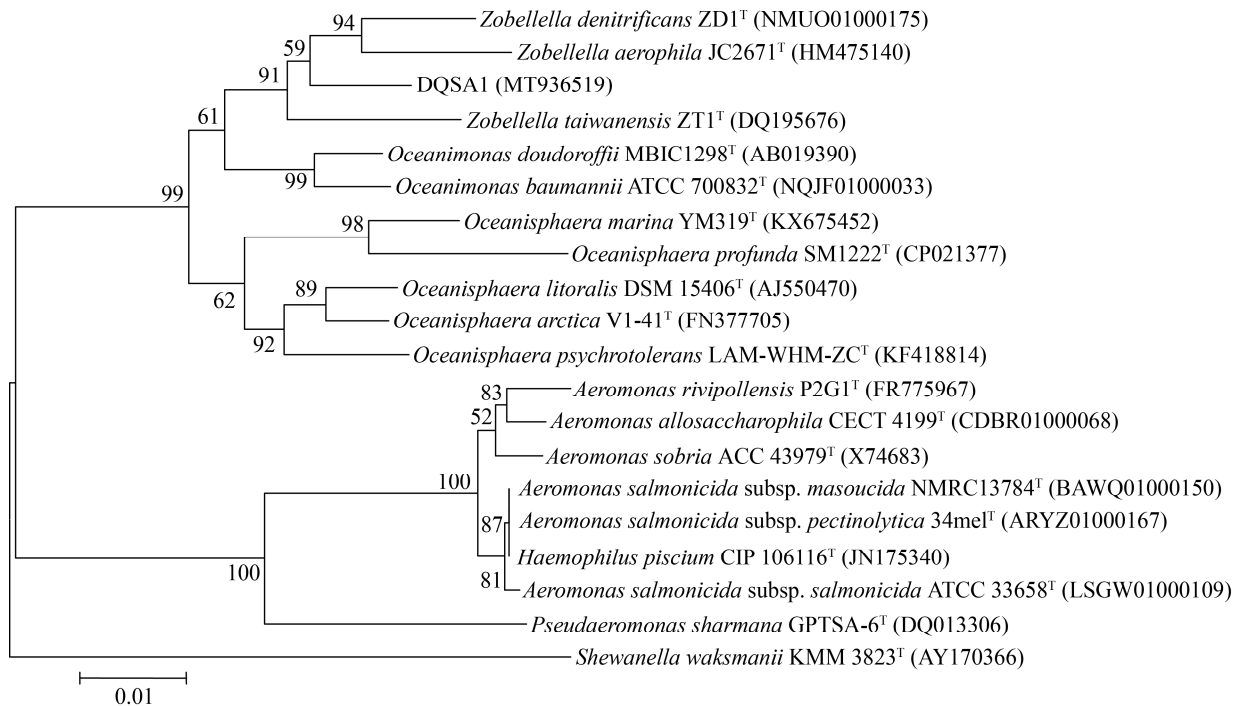


图 1 菌株 DQSA1 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of strain DQSA1 based on 16S rRNA gene sequence

注: 括号中序号为 GenBank 的登录号; 分支点处的数值为构建系统发育树时 1 000 次计算形成的 Bootstrap 值; 标尺 0.01 代表 1% 的核酸差异

Note: Numbers in parentheses is the GenBank accession numbers; Numbers at the branch nodes are bootstrap values, expressed as percentages of 1 000 replicates; The scale bar indicates 1% nucleotide substitution

表 2 菌株 DQSA1 对绿豆植株生长的影响

Table 2 Effects of DQSA1 on the growth of mung bean plants

处理	株高	根鲜重	茎叶鲜重	根干重	茎叶干重	叶绿素含量
Treatment	Stem length (cm)	Root fresh weight (g)	Fresh weight of stems and leaves (g)	Root dry weight (g)	Dry weight of stems and leaves (g)	Chlorophyll content (SPAD)
CK	15.90±2.20	0.406±0.059	0.796±0.124	0.041±0.006	0.080±0.012	15.90±1.69
DQSA1	17.30±1.74	0.539±0.0540*	0.909±0.111	0.054±0.005*	0.091±0.011	28.48±1.54**

注: 表中数据为 3 次重复结果, 同列数字后*代表差异水平显著(0.01<P<0.05); **代表差异水平极显著(P<0.01)。下同

Note: The data in the table is the result of three replicates, after the numbers in the same column, * indicates a significant level of difference (0.01<P<0.05); ** indicates a very significant level of difference (P<0.01). The same below

表 3 菌株对绿豆根系渗透胁迫物质的影响

Table 3 Effects of strains on osmotic stress substances in mung bean roots

处理	可溶性糖含量	脯氨酸含量	可溶性蛋白含量
Treatment	Soluble sugar content (mg/g)	Proline content (µg/g)	Soluble protein content (mg/g)
CK	2.55±0.15	45.11±4.68	1.06±0.09
DQSA1	2.91±0.17	80.09±5.93**	1.53±0.08**

表 4 菌株对绿豆叶部渗透胁迫物质的影响

Table 4 Effects of strains on osmotic stress substances in mung bean leaves

处理	可溶性糖含量	脯氨酸含量	可溶性蛋白含量
Treatment	Soluble sugar content (mg/g)	Proline content (µg/g)	Soluble protein content (mg/g)
CK	2.35±0.08	65.51±5.11	1.26±0.11
DQSA1	2.59±0.10*	117.71±8.39**	2.18±0.06**

2.3 菌株 DQSA1 对盐碱胁迫下绿豆根围土壤细菌群落多样性的影响

2.3.1 菌株 DQSA1 对盐碱胁迫下绿豆根围土壤细菌多样性指数和 OTU 的影响

采用 Illumina HiSeq 平台对种植绿豆的土壤进行测序分析, 3 种土壤样品的覆盖率(Coverage)都大于 97%, 测序结果能够很好地反映样本的真实情况。接菌土壤样本的 ACE 指数和 Chao1 指数较未接菌土壤和对照土壤稍有增加, 但无显著差异, 表明接种菌株 DQSA1 后, 土壤中 OTU 数有所增加(表 5)。BS 样本的 Shannon 指数最低, 表明接菌土壤的群落多样性较未接菌土壤和对照低。

韦恩图(图 2)能够体现所有土壤样品的 OTU 重叠情况, 接种菌株 DQSA1 后, 土壤中 OTU 数有所增加, 其中 BS、S、CK 样品中分别检测到

2 302、2 292、2 290 个 OTU, 其中共有的 OTU 数为 2 054 个, 特有的 OTU 数分别为 35、29、24 个, 分别占 BS、S、CK 样本的 1.52%、1.27%、1.05%, 表明接种菌株 DQSA1 增加了土壤特有的 OTU 数。

2.3.2 菌株 DQSA1 对盐碱胁迫下绿豆根围土壤细菌群落结构的影响

细菌门水平相对丰度如图 3 所示, 3 个样本中优势细菌门为变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)和酸杆菌门(*Acidobacteria*), 但是相对丰度有所不同: 在对照土壤中其分别为 23.64%、25.64%、20.41%、15.71%、3.67%; 接种菌株 DQSA1 后分别为 27.07%、21.80%、18.55%、18.60%; 在未接种菌株 DQSA1 的土壤中分别为 23.02%、22.67%、19.89%、18.35%。

表 5 细菌群落 α 多样指数

Table 5 The alpha diversity index of samples

样品 Samples	ACE 指数 ACE index	Chao1 指数 Chao1 index	覆盖率 Coverage (%)	香农指数 Shannon index	辛普森指数 Simpson index
CK	2 306.40±52.98a	2 291.31±58.91ab	98.00	6.19±0.01a	0.007±0.001a
S	2 285.69±28.39a	2 252.08±40.28b	97.70	6.18±0.01a	0.007±0.001a
BS	2 357.52±23.28a	2 346.95±25.21a	98.30	6.14±0.02b	0.008±0.001a

注: CK: 对照土壤; S: 不接种菌株 DQSA1 的绿豆根围土壤; BS: 接种菌株 DQSA1 的绿豆根围土壤, 下同; 表中数据为 3 次重复结果, 同列数字后不同小写字母代表差异水平显著($P < 0.05$)

Note: CK: Control soil; S: Mung bean rhizosphere soil without inoculation of strain DQSA1; BS: Mung bean rhizosphere soil with inoculation of strain DQSA1, the same below; The data in the table is the result of three replicates, the different small letters after the same column number indicate significant difference ($P < 0.05$)

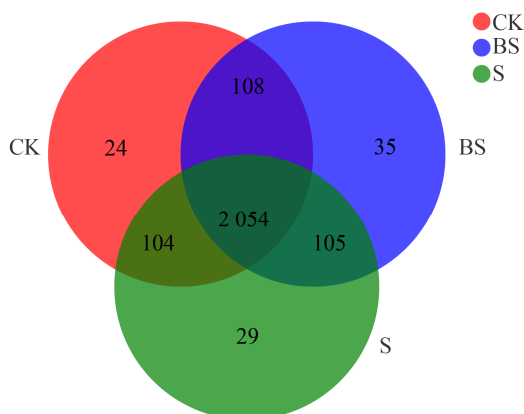


图 2 不同处理下绿豆土壤细菌 OTU 分布的韦恩图
Figure 2 OTUs venn of mung bean soil bacteria in soil samples under different treatments

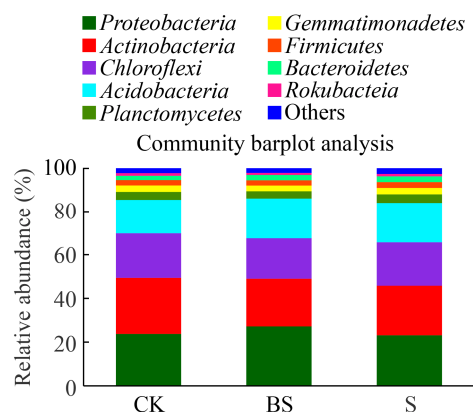


图 3 不同处理下绿豆土壤细菌门水平细菌菌群组成
Figure 3 The relative abundance of mung bean soil bacterial at phylum level under different treatments

由图 4 可知, 未接菌土壤与对照土壤的微生物类群相似度较高。3 个土壤样本在属水平上的优势菌群均为 Norank_c_Subgroup_6、UTCFOX1、Norank_f_67-14、Norank_f_JG30-KF-CM45、RB41, 接菌土壤中 Norank_c_Actinobacteria 的相对丰度较对照土壤和未接菌土壤分别降低了 0.33%、0.24%; *Defluviicoccus* 在接菌土壤中的相对丰度为 1.77%, 而在对照土壤和未接菌土壤中的相对丰度分别为 2.11%、1.73%; Unclassified_f_Aeromonadaceae (3.58%) 为接种菌株 DQSA1 土壤中特有的细菌, 其在对照土壤和未接菌土壤中相对丰度为 0。

2.3.3 菌株 DQSA1 对盐碱胁迫下绿豆根围土壤细菌差异物种的影响

图 5 为差异物种 LEfSe 分析及 LDA 判别结果(LDA 阈值>2), 通过 LEfSe 分析图中不同节点的颜色和 LDA 判别图可以看出 3 个样本的优势菌群有所不同。在种植绿豆接种菌株 DQSA1 的根围土壤中检测到 8 个标志性群落, 其 LDA 值排前 5 名的分别为气单胞菌目(*Aeromonadales*)、气单胞菌科(*Aeromonadaceae*)、g_unclassified_f_Aeromonadaceae、g_unclassified_f_Sphingobacteriaceae、根瘤菌科(*Rhizobiaceae*); 而对照土壤中的前 5 个标志性菌落分别为 Subgroup_15

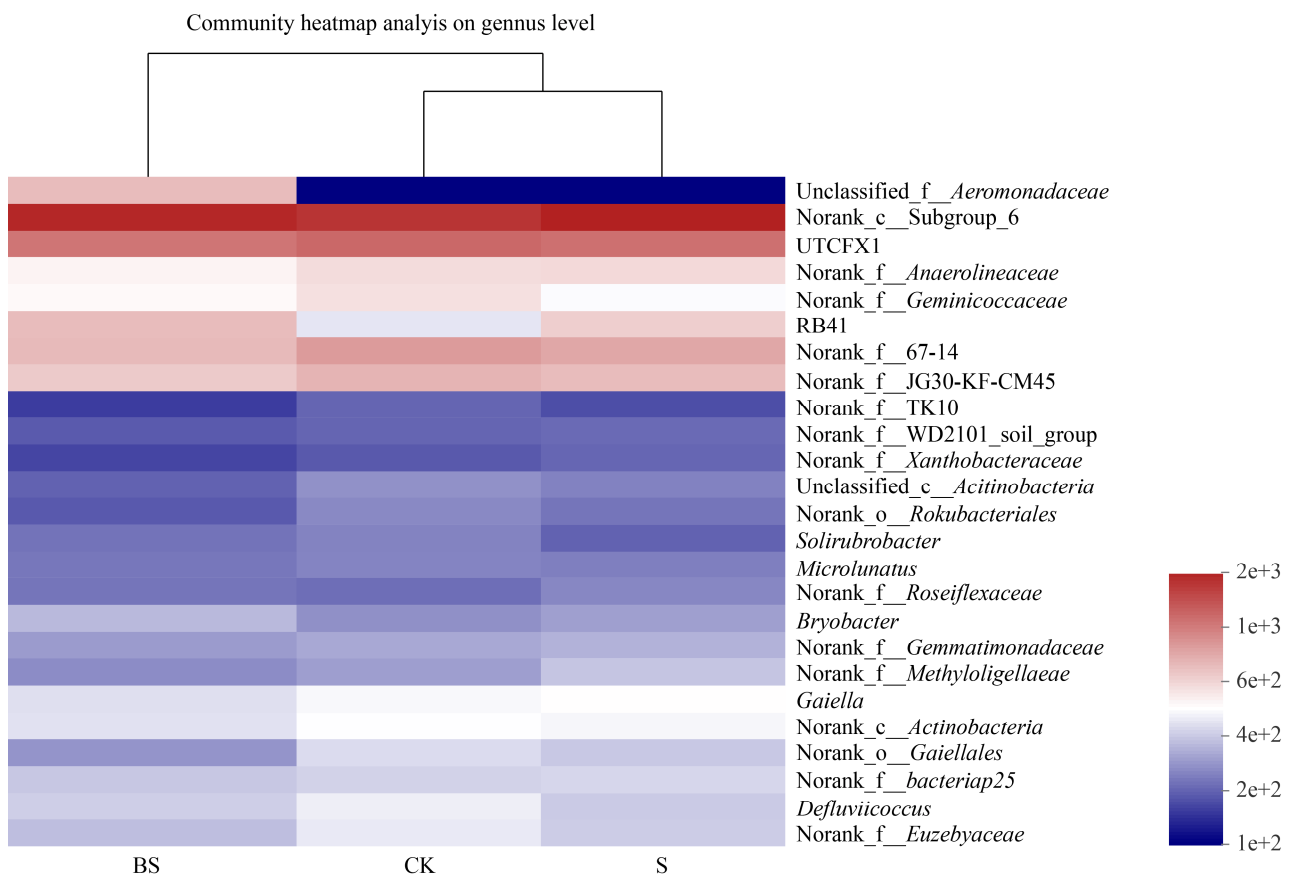


图 4 不同处理下绿豆土壤细菌属水平 Top25 丰度热图

Figure 4 Top25 abundance heatmap of mung bean soil bacterial at genus level under different treatments

注: Unclassified: 分类地位不明确的细菌类群, 下同

Note: Unclassified: Bacterial sequences that were not identified into anyone in databases, the same below

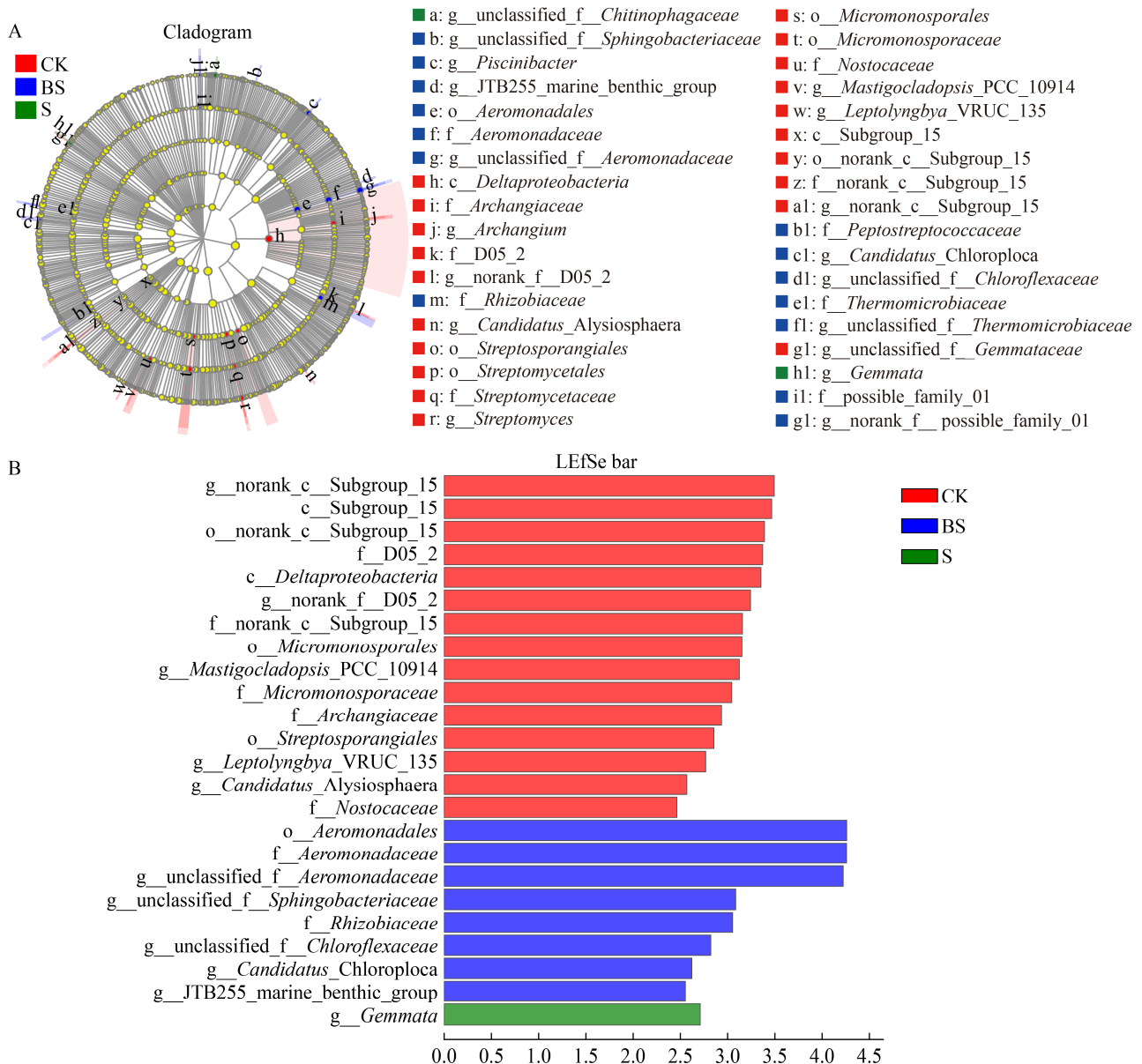


图 5 不同处理下绿豆土壤细菌差异物种 LEfSe 分析(A)及 LDA 判别结果(B)

Figure 5 LEfSe analysis (A) and LDA scores computed of microbial abundance (B) in the mung bean soil under different treatments

注: LDA 判别阈值为 2

Note: LDA scores computed for microbes with differential abundances identified with a threshold value of 2

(属)、Subgroup_15 (纲)、Subgroup_15 (目)、D05_2 (科)、变形菌纲(*Deltaproteobacteria*); 未接种菌株 DQSA1 的根围土壤中标志性菌落为出芽菌属(*Gemmata*)。由此可见, 接种 DQSA1 会改变土壤微生物标志性群落, 其中接种菌株 DQSA1 的根围土壤中特有的标志性群落根瘤菌能够促进绿豆

根瘤的生长, 从而提高绿豆的固氮能力。

3 讨论与结论

本研究采用耐盐碱培养基对大庆盐碱土进行细菌的分离筛选, 最终得到 43 株耐盐碱菌株, 通过促生功能培养基鉴定, 其中菌株 DQSA1 的综合促生功能较好。经分子生物学鉴定表明, 菌株

DQSA1 与模式菌株 *Zobellella denitrificans* ZD1 的序列相似度为 96.93% (小于 98.65%), 可能属于 *Zobellella* 的一个新种。目前学者对卓贝尔氏菌的研究主要集中在应用其好氧脱氮特性、筛选反硝化基因, 为废水生物脱氮提供高效菌种资源^[26-29], 其耐盐碱促生方面的功能未见报道。由此可见, 本研究得到一株新的耐盐碱促生菌对改良当地盐碱土壤具有重要意义。

PGPR 是定殖于植物根系, 能够促进植物生长的有益菌类^[30]。经过促生功能培养基鉴定, 菌株 DQSA1 具有产 ACC 脱氨酶、IAA 和铁载体以及固氮的功能。ACC 脱氨酶可以分解乙烯合成前体 ACC, 从而减少盐碱胁迫下乙烯的合成, 缓解其对根系生长的抑制作用^[31-32]。IAA 在盐碱胁迫下对植物侧根生长起着调控作用, 不仅能够通过增加根系的长度和数量来扩大根系与土壤的接触面积, 进而促进植物对营养元素的吸收^[33], 还可以激发 ACC 脱氨酶的活性^[34]。除此之外, 盐碱胁迫会降解叶绿素, 影响植物光合效率^[35]。铁元素在植物固氮、光合作用和呼吸作用等生理活动中是必要的, 大多数以溶解度较低的氧化物形式存在于土壤中, 部分 PGPR 能够合成对铁离子有较高亲和力的铁载体, 与环境中不溶的 Fe^{3+} 螯合形成植物能够吸收利用的复合物^[36]。试验表明, 接种菌株 DQSA1 后绿豆根部的干重和鲜重都得到了显著提升, 说明菌株 DQSA1 产生的 ACC 脱氨酶和 IAA 共同作用缓解了盐碱胁迫对绿豆根系发育的抑制; 绿豆叶绿素含量和地上部分鲜重以及干重有所增加, 由此可见, 菌株 DQSA1 的多方面协同作用显著促进了绿豆根系的生长, 并帮助其在盐碱胁迫下积累光合产物, 为植株自身的生理活动提供营养物质。

盐碱胁迫会影响植物对水分的吸收和利用, 同时植物会产生一些渗透性调节物质来维持渗透压平衡, 缓解胁迫对植物造成的伤害^[37]。脯氨酸的积累既是植物应对盐碱胁迫的一种防御行为,

也是其遭受逆境的一种信号^[38]。可溶性糖和可溶性蛋白也是重要的渗透调节物质, 其含量的积累可以降低细胞内溶质浓度, 防止细胞由于渗透作用过度脱水, 同时可溶性糖也可作为碳水化合物为植物自身合成有机物质提供能量^[39]。研究表明, 菌株 DQSA1 的施用增加了绿豆中可溶性糖、可溶性蛋白和脯氨酸含量, 通过渗透调节物的增加提高了绿豆的耐盐碱能力。

土壤中过多盐分的积累会抑制微生物的活动和数量, 酶活性和有机质分解效率也因此降低, 最终导致土壤肥力下降^[40-41]。PGPR 到达植物根系时, 会通过营养竞争和生态位竞争来保证自身在根围的定殖, 进而改变土壤微生物群落结构^[42]。本研究通过高通量测序技术发现, 菌株 DQSA1 可以在盐碱环境下于绿豆根围定殖并引起细菌群落多样性的改变。接种菌株 DQSA1 后, 绿豆根围土壤拟杆菌门和变形菌门相对丰度较对照土壤有所提升。研究表明, 拟杆菌门和变形菌门是富营养菌, 其相对丰度在高有机质水平下表现为增加^[43-44], 由此说明菌株 DQSA1 具有通过改变土壤微生物的菌群结构改善土壤肥力的能力。鞘氨醇杆菌能够分泌过氧化氢酶、提高植物抗逆性, 是土壤微生物中的有益菌^[45], 在接种菌株的土壤中是优势菌。在接种菌株 DQSA1 后的绿豆根围土壤中检测到的标志性物种 *Rhizobiaceae* 为根瘤菌科, 此结果证明菌株 DQSA1 能够促进绿豆根围的根瘤菌生长, 提高绿豆在盐碱胁迫下对氮的利用。因此, 菌株 DQSA1 具有调节土壤细菌群落结构的作用, 能够使土壤向健康的方向发展。

综上所述, 筛选得到的耐盐碱菌株 DQSA1 能够在盐碱胁迫下调节土壤微生物群落结构、促进有益菌生长并提高植物的耐盐碱能力。该菌株的发现为改良盐碱土地提供了有效的微生物资源。

REFERENCES

- [1] Liu SL, Maimaitiaili B, Joergensen RG, Feng G. Response of soil microorganisms after converting a saline desert to arable land in central Asia[J]. *Applied Soil Ecology*, 2016,

- 98: 1-7
- [2] Zhao W, Zhou Q, Tian ZZ, Cui YT, Liang Y, Wang HY. Apply biochar to ameliorate soda saline-alkali land, improve soil function and increase corn nutrient availability in the Songnen Plain[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 722: 137428
- [3] Zhang YF, Li WY, Hu H, Chen WZ, Wang XL. Research status and prospect of saline-alkali land improvement [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2017, 45(18): 7-10 (in Chinese)
张翼夫, 李问盈, 胡红, 陈婉芝, 王宪良. 盐碱地改良研究现状及展望[J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(18): 7-10
- [4] Sun YY, Chen J, Wang Y, Cheng JN, Han QQ, Zhao Q, Li HR, Li HP, He AL, Gou JY, et al. 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)
孙韵雅, 陈佳, 王悦, 程济南, 韩庆庆, 赵祺, 李惠茹, 李慧萍, 何傲蕾, 缙晶毅, 等. 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
- [5] Wang YX, Xie ZH, Zhang L, Chang DY. Screening of plant growth promoting and salt tolerant rhizobacteria in *Sesbania cannabina*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(5): 1023-1035 (in Chinese)
王艳霞, 解志红, 张蕾, 常大勇. 田菁根际促生菌的筛选及其促生耐盐效果[J]. *微生物学报*, 2020, 60(5): 1023-1035
- [6] 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)
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
- [7] Kearn J, McNary C, Lowman JS, Mei CS, Aanderud ZT, Smith ST, West J, Colton E, Hamson M, Nielsen BL. Salt-tolerant halophyte rhizosphere bacteria stimulate growth of alfalfa in salty soil[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1849
- [8] Wang D, Zhao YG, Ma R, Yang P, Zhang C, Zhou DJ, Sun FX, Zhang FH. Effects of microbial fertilizers on soil improvement and bacterial communities in saline-alkali soils of *Lycium barbarum*[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2020, 28(8): 1499-1510 (in Chinese)
王丹, 赵亚光, 马蕊, 杨鹏, 张成, 周东姣, 孙福新, 张凤华. 微生物菌肥对盐碱地枸杞土壤改良及细菌群落的影响[J]. *农业生物技术学报*, 2020, 28(8): 1499-1510
- [9] Jacobsen CS, Hjelmsø MH. Agricultural soils, pesticides and microbial diversity[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 27: 15-20
- [10] Shokralla S, Spall JL, Gibson JF, Hajibabaei M. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research[J]. *Molecular Ecology*, 2012, 21(8): 1794-1805
- [11] Lin XB, Shi H, Wu L, Cheng YH, Cai S, Huang SS, He SL, Huang QR, Zhang K. Effects of cultivation methods on soil microbial community structure and diversity in red paddy[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2020, 29(11): 2206-2214 (in Chinese)
林小兵, 时红, 武琳, 成艳红, 才硕, 黄尚书, 何绍浪, 黄欠如, 张昆. 栽培方式对红壤性稻田土壤微生物群落结构和多样性的影响[J]. *生态环境学报*, 2020, 29(11): 2206-2214
- [12] Xu LX, Han YS, Yi M, Yi HL, Guo EH, Zhang AY. Shift of millet rhizosphere bacterial community during the maturation of parent soil revealed by 16S rDNA high-throughput sequencing[J]. *Applied Soil Ecology*, 2019, 135: 157-165
- [13] Poli A, Esposito E, Orlando P, Lama L, Giordano A, De Appolonia F, Nicolaus B, Gambacorta A. *Halomonas alkaliantarctica* sp. nov., isolated from saline lake Cape Russell in Antarctica, an alkaliphilic moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2007, 30(1): 31-38
- [14] Liu Y, Liu XD, Zhang LL, Wu Y, Wang GW, Wang Q, Jiang Y. Screening, identification of multifunctional peanut root-promoting rhizobacteria and its promoting effects on peanuts (*Arachis hypogaea* L.)[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2017, 33(10): 125-134 (in Chinese)
刘晔, 刘晓丹, 张林利, 吴越, 王国文, 汪强, 姜瑛. 花生根际多功能高效促生菌的筛选鉴定及其效应研究[J]. *生物技术通报*, 2017, 33(10): 125-134
- [15] Li HY, Jiang YM, Yao T, Hou D, Ma YC, Zhang HR. Isolation, screening, identification and growth promoting characteristics of plant growth promoting rhizobacteria of vegetable crops[J]. *Journal of Plant Protection*, 2018, 45(4): 836-845 (in Chinese)
李海云, 蒋永梅, 姚拓, 侯栋, 马亚春, 张惠荣. 蔬菜作物根际促生菌分离筛选、鉴定及促生特性测定[J]. *植物保护学报*, 2018, 45(4): 836-845
- [16] Li YM, Wang QY, Tu WG, Cui YL, Zhong QD, Li LH, Chen Q, Yu XM. Growth promoting activity of siderophore secreting bacteria for peanut plant under nickel stress[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(8): 1882-1890 (in Chinese)
李艳梅, 王琼瑶, 涂卫国, 崔永亮, 钟玘狄, 李俐珩, 陈强, 余秀梅. 镍胁迫下产铁载体细菌对花生的促生性[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(8): 1882-1890
- [17] Penrose DM, Glick BR. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant

- growth-promoting rhizobacteria[J]. *Physiologia Plantarum*, 2003, 118(1): 10-15
- [18] Li ZD, Chen XR, Li P, Man BY. Identification of *Polygonum viviparum* endophytic bacteria Z5 and determination of the capacity to secrete IAA and antagonistic capacity towards pathogenic fungi[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2010, 19(2): 61-68 (in Chinese)
李振东, 陈秀蓉, 李鹏, 满百膺. 珠芽蓼内生菌 Z5 产 IAA 和抑菌能力测定及其鉴定[J]. *草业学报*, 2010, 19(2): 61-68
- [19] 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)
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
- [20] Dong XZ, Cai MY. Common Bacterial Systematic Identification Manual[M]. Beijing: Science Press, 2001 (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
- [21] Buchanan RE. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. Beijing: Science Press, 1984 (in Chinese)
布坎南 RE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1984
- [22] Bo XP, Wang MX, Cui L, Wang JH, Han BY. Evaluation on correlations of three kinds of osmoregulation substances in tea fresh leaves with low temperature during winter and spring respectively and their difference among cultivars[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49(19): 3807-3817 (in Chinese)
薄晓培, 王梦馨, 崔林, 王金和, 韩宝瑜. 茶树 3 类渗透调节物质与冬春低温相关性及其品种间的差异评价[J]. *中国农业科学*, 2016, 49(19): 3807-3817
- [23] Wu GQ, Li H, Lei CR, Lin LY, Jin J, Li SJ. Effects of additional KCl on growth and physiological characteristics of sainfoin (*Onobrychis viciaeformis*) under high salt stress[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2019, 28(6): 45-55 (in Chinese)
伍国强, 李辉, 雷彩荣, 蔺丽媛, 金娟, 李善家. 添加 KCl 对高盐胁迫下红豆草生长及生理特性的影响[J]. *草业学报*, 2019, 28(6): 45-55
- [24] Hao DC, Song SM, Mu J, Hu WL, Xiao PG. Unearthing microbial diversity of *Taxus* rhizosphere via MiSeq high-throughput amplicon sequencing and isolate characterization[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 22006
- [25] Kim M, Oh HS, Park SC, Chun J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(Pt 2): 346-351
- [26] Lei Y, Wang YQ, Liu HJ, Xi CW, Song LY. A novel heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium, *Zobellella taiwanensis* DN-7, can remove high-strength ammonium[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(9): 4219-4229
- [27] Lin YT, Shieh WY. *Zobellella denitrificans* gen. nov., sp. nov. and *Zobellella taiwanensis* sp. nov., denitrifying bacteria capable of fermentative metabolism[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56(6): 1209-1215
- [28] Li XY, Wang LP, Lai QL, Li DF, Shao ZZ. Preliminary study on aerobic denitrification characteristics of *Zobellella* sp. F13-1[J]. *Journal of Applied Oceanography*, 2016, 35(1): 122-129 (in Chinese)
李小义, 王丽萍, 赖其良, 李登峰, 邵宗泽. 一株卓贝尔氏菌 F13-1 好氧反硝化特性及其反硝化基因的初步研究[J]. *应用海洋学学报*, 2016, 35(1): 122-129
- [29] Zhao L, Fu GP, Wu JF, Pang WC, Mo SC, Zhu ZW. Isolation, identification and nitrate reduction ability of a salt-tolerant strain of *Zobellella* sp[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(5): 1354-1365 (in Chinese)
赵林, 付贵萍, 武金发, 庞伟程, 莫少聪, 祝子旺. 一株耐盐的卓贝尔氏菌(*Zobellella* sp.)的分离鉴定及其硝酸盐还原能力[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(5): 1354-1365
- [30] Pankaj U, Singh DN, 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
- [31] Glick BR. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world[J]. *Microbiological Research*, 2014, 169(1): 30-39
- [32] Street IH, Aman S, Zubo Y, Ramzan A, Wang XM, Shakeel SN, Kieber JJ, Schaller GE. Ethylene inhibits cell proliferation of the *Arabidopsis* root meristem[J]. *Plant Physiology*, 2015, 169(1): 338-350
- [33] Krome K, Rosenberg K, Dickler C, Kreuzer K, Ludwig-Müller J, Ullrich-Eberius C, Scheu S, Bonkowski M. Soil bacteria and protozoa affect root branching via effects on the auxin and cytokinin balance in plants[J]. *Plant and Soil*, 2010, 328(1/2): 191-201
- [34] Jiang HH, Wang T, Chen N, Yu SL, Chi XY, Wang M, Qi PS. Research progress in PGPR improving plant's resistance to salt and alkali[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2019, 35(10): 189-197 (in Chinese)
姜焕焕, 王通, 陈娜, 禹山林, 迟晓元, 王冕, 祁佩时. 根际促生菌提高植物抗盐碱性的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2019, 35(10): 189-197
- [35] Pruzinská A, Tanner G, Anders I, Roca M, Hörtensteiner S.

- Chlorophyll breakdown: pheophorbide a oxygenase is a Rieske-type iron-sulfur protein, encoded by the accelerated cell death 1 gene[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(25): 15259-15264
- [36] 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
- [37] Moran JF, Becana M, Iturbe-Ormaetxe I, Frechilla S, Klucas RV, Aparicio-Tejo P. Drought induces oxidative stress in pea plants[J]. *Planta*, 1994, 194(3): 346-352
- [38] Liu D, Cong RC, Dang HZ, Li QM, Liu DX, Yang QS. Comparative effects of salt and alkali stresses on plant physiology of willow[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2014, 23(9): 1531-1535 (in Chinese)
刘铎, 丛日春, 党宏忠, 李庆梅, 刘德玺, 杨庆山. 柳树幼苗渗透调节物质对中、碱性钠盐响应的差异性[J]. *生态环境学报*, 2014, 23(9): 1531-1535
- [39] Augé RM, Toler HD, Saxton AM. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and osmotic adjustment in response to NaCl stress: a meta-analysis[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 562
- [40] Tripathi AK, Verma SC, Ron EZ. Molecular characterization of a salt-tolerant bacterial community in the rice rhizosphere[J]. *Research in Microbiology*, 2002, 153(9): 579-584
- [41] Unger IM, Kennedy AC, Muzika RM. Flooding effects on soil microbial communities[J]. *Applied Soil Ecology*, 2009, 42(1): 1-8
- [42] Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Barka EA. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(9): 4951-4959
- [43] Liu JJ, Sui YY, Yu ZH, Shi Y, Chu HY, Jin J, Liu XB, Wang GH. High throughput sequencing analysis of biogeographical distribution of bacterial communities in the black soils of northeast China[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 70: 113-122
- [44] Fierer N, Lauber CL, Ramirez KS, Zaneveld J, Bradford MA, Knight R. Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6(5): 1007-1017
- [45] Chen DM, Ke WH, Chen LL, Huang JW, Wu WX, Chen T, Zhang ZY, Lin WX. Diversity of bacterial community in rhizosphere soils under effects of continuously planting burley tobacco[J]. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao*, 2010, 21(7): 1751-1758