

## 研究报告

# 一株耐盐碱柠檬酸杆菌在促进植物生长中的应用及其耐盐碱基因挖掘

喻江<sup>1</sup>, 王新珍<sup>2</sup>, 王淳<sup>1</sup>, 曹英雪<sup>3</sup>, 于镇华<sup>\*3</sup>

1 哈尔滨商业大学食品工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150028

2 中国科学院遗传与发育生物学研究所农业资源研究中心 中国科学院农业水资源重点实验室 河北省土壤生态学重点实验室, 河北 石家庄 050022

3 中国科学院东北地理与农业生态研究所 黑土区农业生态重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150081

喻江, 王新珍, 王淳, 曹英雪, 于镇华. 一株耐盐碱柠檬酸杆菌在促进植物生长中的应用及其耐盐碱基因挖掘[J]. 微生物学通报, 2024, 51(3): 864-879.

YU Jiang, WANG Xinzhen, WANG Chun, CAO Yingxue, YU Zhenhua. A saline-alkali tolerant strain of *Citrobacter*: application in promoting plant growth and mining of saline-alkali tolerance genes[J]. Microbiology China, 2024, 51(3): 864-879.

**摘要:** 【背景】耐盐碱促生细菌对改善盐碱胁迫下的作物生长和提高作物的盐碱耐受能力具有较好效果。【目的】获取兼具耐盐碱和促生功能的微生物资源, 深入探究耐盐碱菌的生理生化特性及其耐盐碱分子机理, 研究拟从宁夏回族自治区银川市盐碱地土壤中分离获得耐盐碱细菌。【方法】应用形态和显微观察、Biolog Gen III微孔板测定和 16S rRNA 基因序列测定对菌株进行鉴定; 利用细菌培养方法进行菌株耐盐碱性和促生效果分析; 应用全基因组基因功能注释分析菌株基因组信息。

【结果】菌株在 pH 8.0–12.0 及 NaCl 0%–9% 的 LB 培养基中均可生长, 且在 pH 8.5–9.5 培养环境中降碱率可达到 13% 以上。菌株碳源利用能力显示菌株可利用 54 种碳源并对另外 20 种化学敏感性测试物质敏感。菌株 YS-AT2 属于柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*), 其在盐碱胁迫下对植物的促生效应结果显示: (1) 菌株可在 pH 9.5 且含 NaHCO<sub>3</sub> 的盐碱性环境中促进拟南芥野生型种子生长; (2) 在 50–200 mmol/L NaCl 或 50–200 mmol/L NaHCO<sub>3</sub> 盐碱胁迫下促大豆种子萌发; (3) 在 pH 8.2、土壤电导率(electricity conductivity, EC)为 450 μs/cm 土壤中大豆株高、鲜重、干重和根长可分别提高 19.84%、18.75%、10.31% 和 32.58%。对菌株全基因组基因功能注释分析发现, 菌株 YS-AT2 具有多个与嗜盐和嗜碱密切相关的基因, 分析其耐盐碱机制可能是通过自身细胞对盐碱性物质的运输、对钠、钾离子的转运和调节及合成高浓度细胞物质而实现的。【结论】本研究解析了耐盐碱促生菌 *Citrobacter* YS-AT2 对拟南芥和大豆的促生效应, 挖掘其中耐盐碱相关基因, 不仅为开发具有耐盐碱促生功能的生物肥料提供理论依据和菌种资源, 还为进一步揭示嗜盐碱细菌的分子机理奠定了理论基础。

**关键词:** 柠檬酸杆菌; 耐盐碱; 促生; 基因注释

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFD190010204)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFD190010204).

\*Corresponding author. E-mail: yuzhenhua@iga.ac.cn

Received: 2023-09-11; Accepted: 2023-11-02; Published online: 2023-12-11

# A saline-alkali tolerant strain of *Citrobacter*: application in promoting plant growth and mining of saline-alkali tolerance genes

YU Jiang<sup>1</sup>, WANG Xinzhen<sup>2</sup>, WANG Chun<sup>1</sup>, CAO Yingxue<sup>3</sup>, YU Zhenhua<sup>\*3</sup>

1 School of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150028, Heilongjiang, China

2 Key Laboratory of Agricultural Water Resources, Hebei Key Laboratory of Soil Ecology, Center for Agricultural Resources Research, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Shijiazhuang 050022, Hebei, China

3 Key Laboratory of Mollisols Agroecology, Northeast Institute of Geography and Agroecology, Chinese Academy of Sciences, Harbin 150081, Heilongjiang, China

**Abstract:** [Background] Saline-alkali tolerant and plant growth-promoting bacteria are praised for the effects on improving the growth and enhancing the saline-alkali tolerance of crops under saline-alkali stress. [Objective] To acquire the microbial resources that possess both saline-alkali tolerance and growth-promoting effects and decipher the mechanism underlying saline-alkali tolerance, we aimed to isolate a bacterial strain from the saline soil in Yinchuan City, Ningxia Hui Autonomous Region, China. [Methods] The strain was identified by morphological and microscopic observation, Biolog Gen III test, and 16S rRNA gene sequencing. The culture method was used to examine the saline-alkali tolerance and growth-promoting effect of the strain. The genome information of the strain was analyzed by functional gene annotation. [Results] Strain YS-AT2 could grow in the LB media with pH 8.0–12.0 and 0%–9% (W/V) NaCl, and showed the alkali reduction rate reaching 13% and above in the media at pH 8.5–9.5. Strain YS-AT2 could use 54 carbon sources and was sensitive to 20 chemical sensitivity test substances. According to 16S rRNA gene sequencing results, YS-AT2 belonged to the genus *Citrobacter*. Strain YS-AT2 could promote the seed growth of *Arabidopsis thaliana* in a saline environment with NaHCO<sub>3</sub> (pH 9.5) and the germination of soybean seeds under 50–200 mmol/L NaCl or 50–200 mmol/L NaHCO<sub>3</sub> stress. Furthermore, it increased soybean plant height, fresh weight, dry weight, and root length by 19.84%, 18.75%, 10.31%, and 32.58%, respectively, in the soil with pH 8.2 and EC 450 μs/cm. Strain YS-AT2 carried multiple genes associated with saline-alkali tolerance. The saline-alkali tolerance of this strain was probably realized through the transport of saline-alkali substances, the transport and regulation of sodium and potassium ions, and the synthesis of high-concentration cell solutes. [Conclusion] We analyzed the growth-promoting effect of the saline-alkali tolerant strain *Citrobacter* YS-AT2 on *A. thaliana* and soybean and mined the genes associated with its saline-alkali tolerance. The findings not only provided a theoretical basis and strain resources for the development of biofertilizers with saline-alkali growth promoting function but also laid a theoretical foundation for deciphering the mechanism underlying the saline-alkali tolerance.

**Keywords:** *Citrobacter* sp.; saline-alkali tolerance; plant growth-promoting effect; gene annotation

盐碱地是一种土壤退化的障碍性土地,我国盐碱地面积达到  $9.9 \times 10^7 \text{ hm}^2$ , 约占国土总面积的 10%<sup>[1]</sup>。盐碱土壤表层积聚过多的盐碱成分致使土壤溶液浓度升高,土壤有机质和养分含量降低,土壤结构和物理性能改变,同时也会直接毒害农作物根,抑制农作物对土壤养分和水分的吸收,影响植物光合作用,最终威胁农作物产量,严重损害农户经济效益<sup>[2]</sup>。但是,对于盐碱地的改良和利用坚决不能“放弃”。我国盐碱地中约有 1/3 具有开发利用潜力,如果能唤醒这一“沉睡”的后备耕地资源,将会缓解我国耕地总量相对较少的问题,科学有效发展抗盐碱农业也会在用好耕地存量的同时提高土地增量,进而实现我国土地资源的扩容、提质和增效。

近年来,人们对盐碱地的开发利用采取了多种措施,除抗盐碱作物育种外,利用生物修复方法改善土壤质地、提高作物耐盐碱能力也一直是研究的重点<sup>[3]</sup>。土壤中聚集着大量的微生物资源,特别是部分功能微生物是植物赖以生存的“伙伴”<sup>[4-5]</sup>。例如,土壤中存在大量的固氮菌、产吲哚乙酸(Indole acetic acid, IAA)细菌、拮抗细菌和溶磷细菌<sup>[6-9]</sup>,它们参与植物的生长过程,促进植物生长,驱动陆地生态系统的物质循环。研究表明,施用耐盐碱促生菌对改善盐碱胁迫下作物生长和提高作物盐碱耐受能力均有较好效果<sup>[6,10]</sup>。

耐盐碱促生菌种类较为丰富,且在微生物资源开发和菌肥利用中具有重要地位,目前已成为微生态研究的热点。已有研究报道耐盐碱促生菌有芽孢杆菌属(*Bacillus*)<sup>[11]</sup>、固氮螺菌属(*Azospirillum*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)<sup>[12]</sup>、涅斯捷连科氏菌属(*Nesterenkonia*)<sup>[13]</sup>、肠杆菌属(*Enterobacter*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)<sup>[14]</sup>、考克氏菌属(*Kocuria*)<sup>[15]</sup>和盐单胞菌属(*Halomonas*)<sup>[16]</sup>等。上述耐盐碱促生菌耐盐碱机制较为复杂,

可以通过参与植物养分吸收、调节植物激素浓度、激活植物抗氧化防御机制、积累渗透调节物质、分泌胞外多糖、分泌 1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylate, ACC)脱氨酶、释放挥发性有机化合物或是分子调控等机制促进植物生长<sup>[17-19]</sup>。

本研究采用可培养方法拟从宁夏回族自治区银川市盐碱地土壤中分离出耐盐碱促生菌株,旨在挖掘盐碱土壤中的促生微生物资源,并探究其在盐碱环境中的促生机制。本研究的研究结果有望为盐碱地综合利用提供微生物种质资源和理论支持,对于提高盐碱地土壤利用率,促进盐碱地区农业可持续发展具有重要意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 盐碱土壤样品及植物品种

供试土壤采集于中国宁夏回族自治区银川市盐碱地,将采集的土壤过 5 mm 筛,混合均匀后放入封口袋,置于冰盒内带回实验室,保存在 4 °C 冰箱待用。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)野生型 Col-0 种子和大豆(东生 9, Dongsheng 9)种子为实验室保存。

### 1.2 主要试剂和仪器

Wizard<sup>®</sup>基因组 DNA 纯化试剂盒, Promega 公司; *rTaq* 聚合酶, TaKaRa 公司; Salkowski 试剂的配制参照 Tsavkelova 等<sup>[20]</sup>; 其他常规化学试剂均为分析纯。TBS-380 荧光仪, Turner BioSystems 公司; Biolog Gen III 微孔板, BIOLOG 公司。

### 1.3 培养基

LB 培养基参照文献<sup>[16]</sup>配制。

含色氨酸 LB 液体培养基(g/L): LB 培养基中含色氨酸 100.0。

MS 培养基购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司(产品编号为 HB8469),按照商

品说明书进行配制。

#### 1.4 菌株的分离纯化

取 5 g 供试土壤加入装有 45 mL 无菌水的锥形瓶中,同时加入灭菌玻璃珠,28 °C、180 r/min 摇床振荡 30 min 后进行逐级梯度稀释至  $10^{-6}$ ,选取 100  $\mu$ L 各浓度梯度菌悬液涂布于 9% NaCl 的 LB 固体培养基中分离耐盐细菌。将平板倒置放入 28 °C 恒温培养箱中培养 48–72 h,选取菌落形态、颜色、黏稠度和大小不同的菌株,挑取单一菌落划线培养,分别继代培养 4–5 代获得单菌落。–80 °C 甘油保存。

#### 1.5 菌株耐盐能力检测

按 1% 接种量将培养 24 h 的种子菌液接种在含有 0、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8% 和 9% NaCl 的 LB 培养基中,28 °C、180 r/min 摇床振荡培养 48 h,测定光吸收值( $OD_{600}$ ),以不接种菌液的不同 NaCl 浓度培养基为对照组,绘制生长曲线并判断菌株 NaCl 生长范围,确定菌株最适生长 NaCl 浓度,选出对 NaCl 浓度耐受能力最高的菌株进行后续试验。

#### 1.6 菌株耐碱性检测

将培养过夜后的菌悬液分别接种至 pH 值为 8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0、11.5、12.0、12.5、13.0、13.5 和 14.0 的 LB 液体培养基中(10% NaOH 用于 pH 值调节),每个梯度设 3 次重复,28 °C、180 r/min 振荡培养 48 h, $OD_{600}$  测定菌悬液浓度,以不接种菌液的不同 pH 培养基为对照组,绘制生长曲线并判断菌株 pH 生长范围,确定菌株最适生长 pH。

#### 1.7 菌株降碱能力测定

将保存菌株活化后以 1% 接种量分别接种至 pH 值为 8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0 和 11.5 的 LB 液体培养基中,28 °C、180 r/min 振荡培养 48 h 后观察菌株生长情况并测定发酵后菌液 pH,菌株降碱率计算如下:

$$\eta (\%) = (\text{pH}_{\text{前}} - \text{pH}_{\text{后}}) / \text{pH}_{\text{前}} \times 100$$

式中:  $\eta$  为菌株降碱能力;  $\text{pH}_{\text{前}}$  为菌株发酵前培养基的 pH;  $\text{pH}_{\text{后}}$  为菌株发酵后培养基的 pH<sup>[16]</sup>。

#### 1.8 菌株分子生物学鉴定

用 Wizard<sup>®</sup> 基因组 DNA 纯化试剂盒提取耐盐碱细菌基因组 DNA,用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3') 对菌株 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增<sup>[21]</sup>。PCR 反应体系 (10  $\mu$ L): 27F、1492R 引物 (50 pmol/ $\mu$ L) 各 0.1  $\mu$ L, 模板 DNA 0.3  $\mu$ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 1  $\mu$ L, 10 $\times$ ExTaq Buffer 1  $\mu$ L, rTaq 聚合酶 (5 U/ $\mu$ L) 0.3  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足 10  $\mu$ L。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 28 个循环; 72 °C 5 min。扩增产物送深圳华大基因股份有限公司进行测序。将测序得到的序列在 <https://www.ezbiocloud.net/> 网站进行序列比对,用软件 MEGA 7.0 构建系统发育树。

#### 1.9 菌株碳源特征分析

利用 Biolog Gen III 微孔板对耐盐碱菌 YS-AT2 进行碳源利用测定,共进行 94 种不同碳源和化学物质测试,其中包括 71 种碳源利用测试和 23 种化学敏感性测试。具体操作按照说明书进行。

#### 1.10 菌株产 IAA 能力测定

采用 Salkowski 比色法评估菌株分泌 IAA 的能力<sup>[22]</sup>。首先,将待测菌株在 28 °C、180 r/min 条件下培养 3 d。然后,将培养好的菌株接种到含有色氨酸的 LB 液体培养基中,每个菌株进行 3 次重复。同时,将不加菌液的 LB 培养基作为对照组,28 °C、180 r/min 培养 3 d。培养结束后将菌悬液以 10 000 r/min 的速度离心 5 min 取上清液,将上清液与 Salkowski 比色液按照 1:2 的体积比混合后加入酶标板中,避光静置反应 30 min。最后,测定  $OD_{490}$  吸光值,并

利用线性公式[IAA 浓度=( $OD_{490}-0.0683$ )/0.010 5]计算待测菌株分泌的 IAA 浓度。

### 1.11 菌株促盐碱胁迫下拟南芥生长能力测定

配制  $\text{NaHCO}_3$  为 2 mmol/L (pH 9.5) 的 1/2 MS 培养基备用。将拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)野生型 Col-0 种子用 75%酒精表面消毒后点种于 1/2 MS 培养基表面一侧于一条直线上, 每个平皿 10 粒, 4 °C 冰箱避光静置 72 h, 培养基另一侧接种 10  $\mu\text{L}$  菌悬液( $OD_{600}=1.0$ ), 以接种等量无菌水为对照, 置于光照培养箱培养(温度为 30 °C, 光照强度 12 000 lx, 光照 16 h, 黑暗 8 h), 每个处理 3 次重复, 培养 7 d 后观察拟南芥生长表型。

### 1.12 菌株促大豆种子在盐碱胁迫条件下发芽能力测定

大豆种子先用无菌水清洗表面尘土, 再用 75%酒精消毒 5 min 后用无菌水冲洗 5 次。室温下, 将种子浸没于菌悬液( $OD_{600}=1$ )中过夜, 以无菌水浸泡的大豆种子为对照。隔天将浸泡后种子置于无菌培养袋中 28 °C 恒温培养, 定期分别加入 15 mL NaCl (50、100 和 200 mmol/L) 和 15 mL  $\text{NaHCO}_3$  (50、100 和 200 mmol/L) 溶液, 5 d 后观察大豆早期幼苗生长情况。

### 1.13 菌株促盐碱胁迫条件下盆栽大豆幼苗生长效果

大豆种子于菌悬液( $OD_{600}=1$ )中浸泡过夜, 以无菌水浸泡种子作为对照, 第 2 天将大豆种子播种在 pH 8.2、土壤电导率(electricity conductivity, EC)为 450  $\mu\text{s}/\text{cm}$  的碱性土壤中, 3 次重复, 在幼苗生长的第 14 天, 向浸种处理的幼苗生长盆中浇灌 40 mL 菌液( $OD_{600}=1$ ), 于幼苗生长第 24 天收获大豆地上植株和根部, 测量地上部分株高、鲜重和干重, 清洗根部附着土壤, 用根系扫描仪(Epson scanner)扫描植株根, 并用 WinRHIZO

软件分析根长。

### 1.14 菌株基因组分析

按照 Wizard<sup>®</sup> 基因组 DNA 纯化试剂盒说明书提取菌株 YS-AT2 的基因组 DNA 后, 纯化的基因组 DNA 采用 TBS-380 荧光仪进行定量。高质量的 DNA ( $OD_{260/280}=1.8-2.0$ , DNA 总量  $\geq 5 \mu\text{g}$ , 浓度  $\geq 60 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ) 用于建库测序, 具体测序委托深圳华大基因股份有限公司完成。测序完成后采用 NCBI 原核基因组自动注释管道(prokaryotic genomes automatic annotation pipeline)进行基因组注释<sup>[23]</sup>, 以文献报道的嗜盐和嗜碱机制密切相关的基因为关键词进行检索, 在基因组水平上挖掘其可能参与耐盐碱过程的基因。

### 1.15 数据处理及分析

运用 SPSS 16.0 分析软件进行方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株分离及其耐碱性鉴定

通过含有 9% NaCl 的 LB 培养基的筛选, 从宁夏回族自治区银川市盐碱地土壤中分离多株耐盐碱细菌, 其中菌株 YS-AT2 对 NaCl 浓度和 pH 耐受范围最大[NaCl: 0%–9% (质量体积分数); pH 8.0–12.0] (图 1), 选取该菌株进行后续试验。该菌株在 LB 固体培养基上 28 °C 培养 2 d, 菌落呈圆形, 边缘整齐, 表面光滑, 略凸起, 半透明, 半流质, 淡黄色, 透射电镜下观察该菌株呈杆状(图 2)。该菌株已保藏至中国典型培养物保藏中心, 保藏编号为 CCTCC M2021238。降碱能力测定结果显示菌株在不同 pH 条件下降碱能力存在差异, 在 pH 8.5、9.0 和 9.5 环境中降碱能力最强, 降碱率分别为 14.5%、13.2% 和 13.9%。

### 2.2 菌株 YS-AT2 的分子生物学鉴定结果

为进一步确定菌株 YS-AT2 的生物学地位,

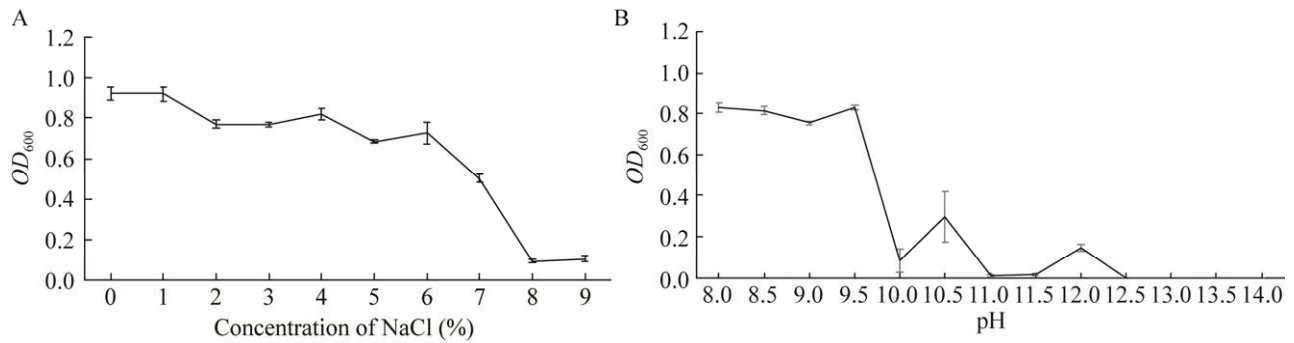


图 1 菌株 YS-AT2 在不同 NaCl 浓度(A)和不同 pH 条件下(B)的生长曲线

Figure 1 Growth curves of strain YS-AT2 under different NaCl concentrations (A) and pH conditions (B).

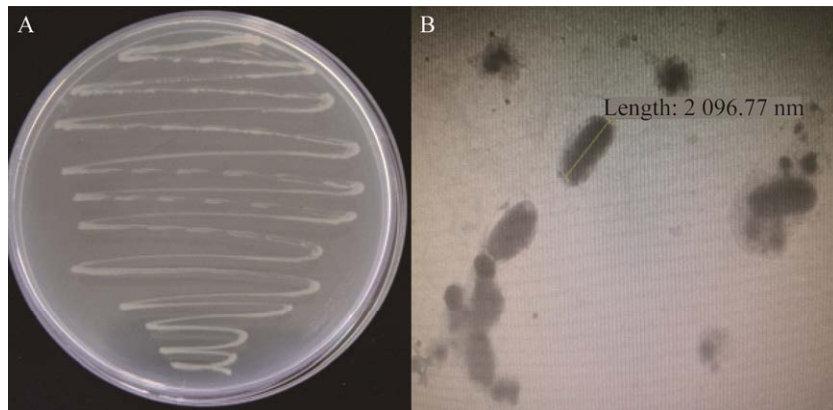


图 2 菌株 YS-AT2 形态图 A: YS-AT2 在 LB 培养基上的菌落生长观察图. B: 在透射电镜(transmission electron microscope, TEM)下观察到的菌株形态

Figure 2 Morphological map of strain YS-AT2. A: The colony growth of YS-AT2 on LB medium. B: Morphology observed under transmission electron microscopy (TEM).

将菌株 16S rRNA 基因序列进行测序,并将测序结果在 EzBioCloud 网站与已发表的典型菌株进行相似性比对,菌株 YS-AT2 与 *Citrobacter freundii* DSM 30039 相似性为 99.37%,采用 neighbor-joining 法构建的菌株系统发育树发现该菌株与 *Citrobacter freundii* DSM 30039 序列可构成稳定的进化分支。因此,确定该菌株是隶属于柠檬酸杆菌属的一个种,并将其命名为 *Citrobacter* YS-AT2 (图 3)。

### 2.3 菌株 YS-AT2 表型测定情况

根据 Biolog Gen III 微孔板显色情况可以进一步反映待测菌株 YS-AT2 对不同碳源的利用

能力。结果表明,去除阴性和阳性对照,在剩余待测的 94 种表型测试中,71 种碳源(表 1)明显显色的有 D-麦芽糖等 32 种,弱显色的有 D-海藻糖等 22 种,可见 YS-AT2 可利用碳源共有 54 种,占 76.06%,不可利用碳源有 D-松二糖等 17 种,占 23.94%。23 种化学敏感性测试(表 1)发生明显显色的有 13 种,弱显色的有 7 种,占 86.96%,不显色的有 3 种,占 13.04%。

### 2.4 菌株 YS-AT2 分泌 IAA 能力和促盐碱胁迫下拟南芥生长

为鉴定菌株 YS-AT2 分泌 IAA 的能力及盐碱环境下对植物的促生效果,采用比色法测定

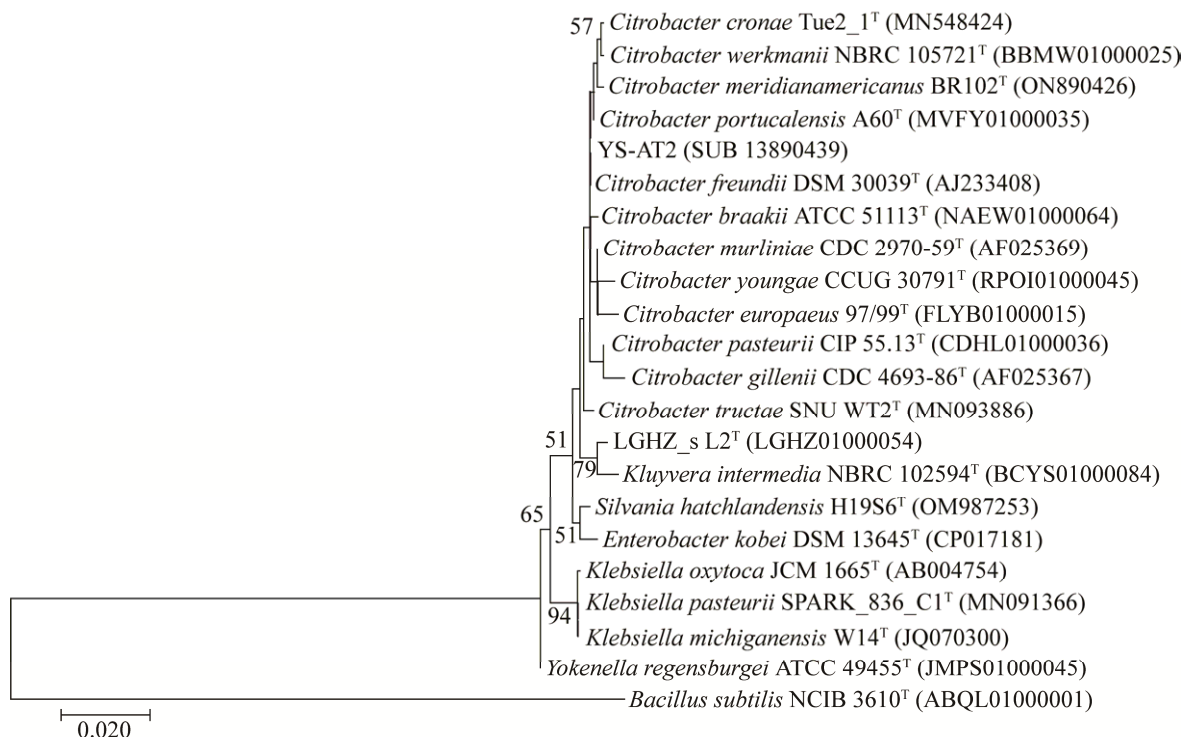


图3 基于菌株 YS-AT2 的 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 通过 1 000 次取样确定其 bootstrap 值, 大于 50% 在进化树上显示; 0.020 表示两个核苷遗传距离; 括号内序号为 GenBank 登录号

Figure 3 Phylogenetic tree of strain YS-AT2 based on 16S rRNA gene sequence. Bootstrap percentages (base on 1 000 replicates) > 50% are shown at branch points. Bar, 0.020 substitutions per nucleotide position; The serial number in parentheses in the GenBank accession number.

表 1 菌株 YS-AT2 Biolog Gen III 检测结果

Table 1 Biolog Gen III test of strain YS-AT2

项目 Item	结果 Result	项目 Item	结果 Result	项目 Item	结果 Result
阴性对照 Negative control	-	D-葡糖醛酸 D-glucuronic acid	+	p-羟基-苯乙酸 p-hydroxy-phenylacetic acid	-
糊精 Dextrin	W	葡糖醛酰胺 Glucuronamide	+	丙酮酸甲酯 Methyl pyruvate	+
D-麦芽糖 D-maltose	+	黏酸; 黏液酸 Mucic acid	+	D-乳酸甲酯 D-lactic acid methyl lester	-
D-麦海藻糖 D-trehalose	W	奎宁酸 Quinic acid	-	L-乳酸 L-lactic acid	+
D-纤维二糖 D-cellobiose	W	糖质酸 D-saccharic acid	+	柠檬酸 Citric acid	+
龙胆二糖 Gentiobiose	W	D-葡糖-6-磷酸 D-glucose-6-PO <sub>4</sub>	+	α-酮-戊二酸 α-keto-glutaric acid	W
蔗糖 Sucrose	+	D-果糖-6-磷酸 D-fructose-6-PO <sub>4</sub>	+	D-苹果酸 D-malic acid	W
D-松二糖 D-turanose	-	D-天冬氨酸 D-aspartic acid	W	L-苹果酸 L-malic acid	W

(待续)

(续表 1)

项目 Item	结果 Result	项目 Item	结果 Result	项目 Item	结果 Result
水苏糖 Stachyose	-	D-丝氨酸 D-serine	+	阳性对照 Positive control	+
肌苷 Inosine	+	$\alpha$ -D-葡萄糖 $\alpha$ -D-glucose	W	pH 6.0*	+
D-山梨醇 D-sorbitol	+	D-甘露糖 D-mannose	+	pH 5.0*	W
D-甘露醇 D-mannitol	W	D-果糖 D-fructose	+	1% NaCl*	+
D-阿拉伯醇 D-arabitol	-	D-半乳糖 D-galactose	+	4% NaCl*	+
肌醇 myo-inositol	+	3-甲酰葡萄糖 3-methyl glucose	-	8% NaCl*	W
甘油 Glycerol	+	D-果糖 D-fucose	-	1%乳酸钠* 1% sodium lactate	+
蜜三糖, 棉子糖 D-raffinose	-	L-果糖 L-fucose	+	梭链孢酸* Fusidic acid	+
$\alpha$ -D-乳糖 $\alpha$ -D-lactose	+	L-鼠李糖 L-rhamnose	+	D-丝氨酸* D-serine	W
蜜二糖 D-melibiose	-	吐温 40 Tween 40	-	万古霉素* Vancomycin	+
$\beta$ -甲酰-D-葡萄糖苷 $\beta$ -Methyl-D-glucoside	W	$\gamma$ -氨基丁酸 $\gamma$ -amino-butyric acid	-	四唑紫* Tetrazolium violet	+
D-水杨苷 D-Salicin	-	$\alpha$ -羟基丁酸 $\alpha$ -hydroxy-butyric acid	W	四唑蓝* Tetrazolium blue	+
N-乙酰-D-葡萄糖胺 N-acetyl-D-glucosamine	+	$\beta$ -羟基-D,L 丁酸 $\beta$ -hydroxy-D,L-butyric acid	W	醋竹桃霉素* Troleandomycin	W
N-乙酰- $\beta$ -D-甘露糖胺 N-acetyl- $\beta$ -D-mannosamine	+	甲酸 Formic acid	+	利福霉素 SV* Rifamycin SV	+
N-乙酰-D-半乳糖胺 N-acetyl-D-galactosamine	+	明胶 Gelatin	-	二甲胺四环素* Minocycline	-
N-乙酰神经氨酸 N-acetyl neuraminic acid	+	氨基乙酰-L-脯氨酸 Glycyl-L-proline	W	萘啶酮酸* Nalidixic acid	-
果胶 Pectin	-	L-丙氨酸 L-alanine	W	氯化锂* Lithium chloride	+
D-半乳糖醛酸 D-galacturonic acid	+	L-精氨酸 L-arginine	-	亚碲酸钾* Potassium tellurite	-
L-半乳糖醛酸内酯 L-galactonic acid lactone	+	L-天冬氨酸 L-aspartic acid	+	林肯霉素, 洁霉素* Lincomycin	+
D-葡萄糖酸 D-gluconic acid	+	L-谷氨酸 L-glutamic acid	W	盐酸胍* Guanidine HCl	+
$\alpha$ -酮-丁酸 $\alpha$ -keto-butyric acid	W	L-组胺 L-histidine	W	硫酸四癸钠* Niaproof 4	+
乙酰乙酸 Acetoacetic acid	W	L-焦谷氨酸 L-pyroglutamic acid	-	氨基曲南* Aztreonam	W
丙酸 Propionic acid	W	L-丝氨酸 L-serine	+	丁酸钠* Sodium butyrate	W
乙酸 Acetic acid	W	溴-丁二酸 Bromo-succinic acid	W	溴酸钠* Sodium bromate	W

--: 未显色; +: 明显显色; W: 弱显色; \*: 化学敏感性测试

--: No color is displayed; +: Obvious color development; W: Weak color development; \*: Chemical sensitivity test.



菌株 IAA 分泌能力, 比色板明显变色, 初步证明菌株 YS-AT2 具备 IAA 分泌能力。在 pH 9.5 的 1/2 MS 培养基平板中接种 YS-AT2 菌悬液培养 7 d 后, 拟南芥生长情况如图 4 所示, 表明菌株 YS-AT2 可明显促进碱性条件下拟南芥生长。

## 2.5 菌株 YS-AT2 促进盐碱胁迫条件下大豆种子萌发

为进一步鉴定菌株 YS-AT2 在盐碱胁迫条件下对农作物生长的影响, 选取早期大豆种子萌发情况进行研究。经测定, 加入 50、100 和 200 mmol/L NaCl 盐溶液后培养液 pH 值分别为 5.75 (图 5A)、5.82 (图 5B) 和 5.78 (图 5C), 加入 50、100 和 200 mmol/L NaHCO<sub>3</sub> 后培养液 pH 值分别升高至 8.53 (图 5D)、8.65 (图 5E) 和 8.91 (图 5F)。由图 5 可见, 菌株 YS-AT2 在不同浓度盐碱胁迫下可促进大豆种子萌发。

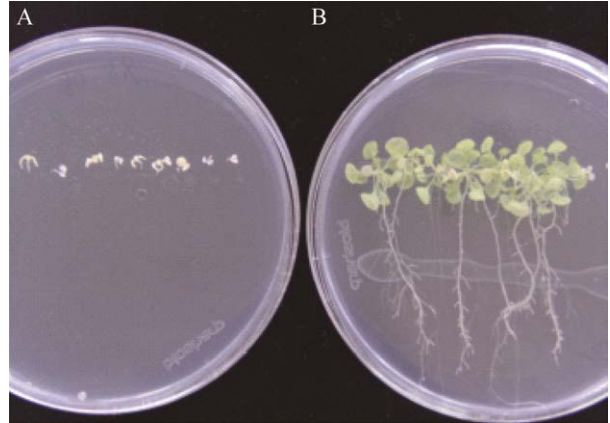


图 4 盐碱促生细菌 YS-AT2 促进盐碱胁迫环境下拟南芥生长 A: 空白对照. B: 接种 YS-AT2 菌悬液

Figure 4 Saline-alkali growth promoting bacterium YS-AT2 promotes the growth of *Arabidopsis thaliana* under saline-alkali stress. A: Control. B: YS-AT2 inoculated.

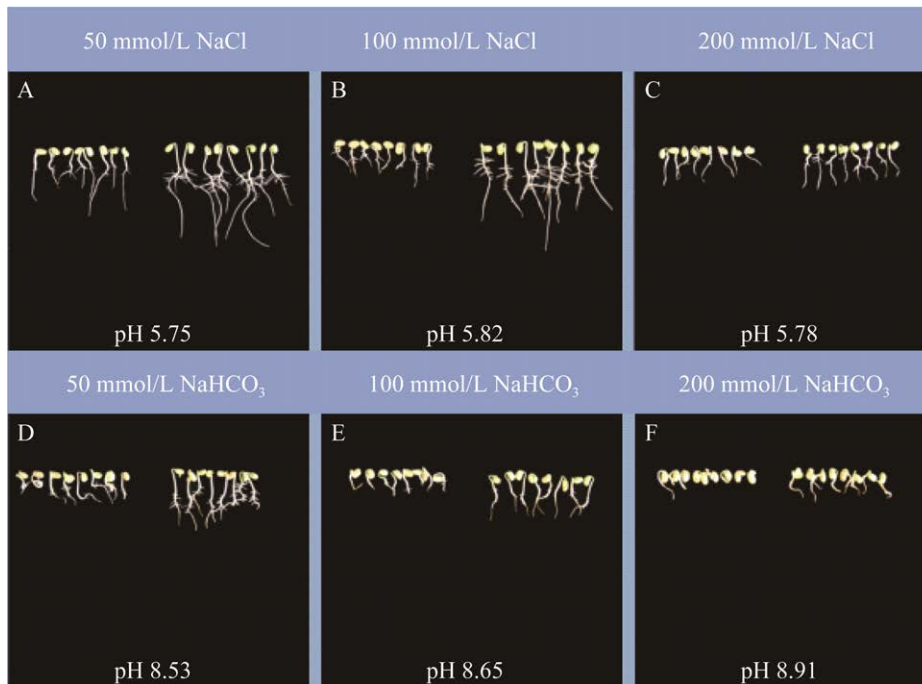


图 5 菌株 YS-AT2 在盐碱胁迫条件下促进大豆种子萌发效果 每个盐碱条件下左侧为不接菌处理, 右侧为 YS-AT2 菌液( $OD_{600}=1$ )浸种处理

Figure 5 The strain YS-AT2 promoted the germination of soybean seeds under saline-alkali stress. The left side is treated without bacteria, and the right side is treated with bacteria YS-AT2 ( $OD_{600}=1$ ).

## 2.6 菌株 YS-AT2 促进盐碱胁迫条件下大豆幼苗生长

本研究又进一步分析了菌株 YS-AT2 在盐碱胁迫下对大豆幼苗生长的影响, 菌株 YS-AT2 对 pH 8.2、EC 为 450  $\mu\text{s}/\text{cm}$  大豆幼苗生长的促进作用如图 6 所示。接菌处理的大豆株高、鲜重、干重和根长分别比对照提高 19.84%、18.75%、10.31%和 32.58%, 其中对大豆株高、鲜重和根长影响显著(表 2)。

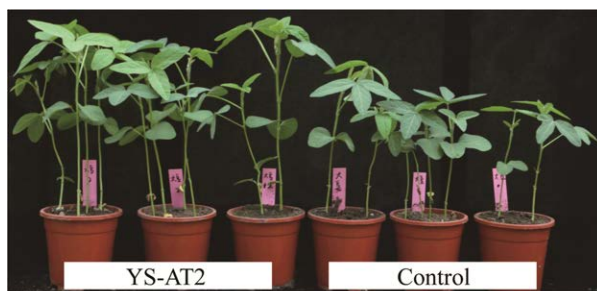


图 6 菌株 YS-AT2 对大豆生长的影响 左侧 3 盆为 YS-AT2 菌液( $OD_{600}=1$ )浸种处理, 右侧 3 盆为不接菌处理, 盆栽用土 pH 8.2

Figure 6 Effects of strain YS-AT2 on the growth of soybean. The three pots on the left are treated with bacteria YS-AT2 ( $OD_{600}=1$ ), and the three pots on the right are control. The pH of soil is 8.2.

表 2 菌株 YS-AT2 对大豆幼苗生长的促生作用  
Table 2 Growth promoting effect of strain YS-AT2 to soybean seedlings

Item	YS-AT2	不接菌对照 No bacterial control
株高 Height (cm)	28.38*	23.68
鲜重 Fresh weight (g/plant)	3.42*	2.88
干重 Dry weight (mg/plant)	775.83	703.33
根长 Length (cm)	32.72*	24.68

\*:  $P < 0.05$ .

## 2.7 菌株 YS-AT2 基因组注释分析

菌株 YS-AT2 共有 12 类基因可能与嗜盐和嗜碱有关, 分别为甘氨酸/甜菜碱转运蛋白(glycine/betaine transporter)、海藻糖合成系统(trehalose synthesis)、钠转运体(sodium symporter)、谷氨酸氨连接酶(glutamate ammonia ligase)、谷胱甘肽调节的钾外流系统(glutathione-regulated potassium-efflux system)、Trk 系统钾转运体(Trk system potassium transporter)、钾转运 ATP 酶(potassium-transporting ATPase)和其他钾转运体(other potassium transporter)和 F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP 合成酶(F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP synthase)等(表 3)。上述基因表明该菌株的耐盐碱机制可能是通过自身细胞对盐碱性物质的运输、对钠、钾离子的转运和调节以及合成高浓度细胞物质而实现的。

## 3 讨论

盐碱地是各种盐土、碱土以及不同程度盐化和碱化土壤的总称。其特点是土体中含有较多的盐碱成分, 导致土壤不良的物理化学性质, 致使大多数植物的生长受到不同程度的抑制, 严重影响植物生长发育, 制约了现代农业和经济的可持续发展, 威胁生态安全<sup>[24-25]</sup>。研究表明, 耐盐碱促生菌可通过调控植物体内激素变化、诱导形成抗氧化系统、产生渗透调节物质、分泌胞外多糖和介导离子平衡等方式来缓解盐逆境损伤, 提高植物的耐盐碱性, 促进植物生长<sup>[5,26-27]</sup>。如 Kuklinsky-sobral 等<sup>[28]</sup>研究发现, 约 80%的固氮菌属(*Azotobacter*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、20%的芽孢杆菌属(*Bacillus*)在盐碱胁迫下可以通过分泌 IAA 促进植物生长, 分泌的 IAA 可以通过参与植物质膜 H<sup>+</sup>-ATP 酶合成基因的修饰过程, 进而提高植物的抗逆能力<sup>[29]</sup>。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 在盐碱胁迫下可以通过 *proB* 和 *proA* 基因超表

表 3 菌株 YS-AT2 耐盐碱基因统计

Table 3 Saline-alkali tolerance genes of strain YS-AT2

序号 No.	基因 Class	基因描述 Description	起始序列 Start sequence	终止序列 End sequence	正向(+)/ 反向(-) Positive (+)/ Reverse (-)
1	甘氨酸/甜菜碱转运蛋白 Glycine/Betaine transporter	Glycine betaine/L-proline ABC transporter	1 042 505	1 043 500	-
		Glycine betaine/L-proline ABC transporter	1 043 568	1 044 632	-
		Glycine betaine/L-proline ABC transporter	1 044 625	1 045 827	-
		D-serine/D-alanine/glycine transporter	4 657 266	4 658 675	-
		Glycine betaine/L-proline transporter <i>ProP</i>	4 754 974	4 756 476	-
2	海藻糖合成系统 Trehalose synthesis	Trehalose-phosphatase	1 964 909	1 965 712	+
		Alpha-trehalose-phosphate synthase	1 965 687	1 967 108	+
3	钠转运体 Sodium symporter	Sodium/Glutamate symporter	86 078	87 283	+
		Sodium/Pantothenate symporter	447 708	449 159	-
		Sodium/Proline symporter <i>PutP</i>	3 241 414	3 242 922	-
4	谷氨酸氨连接酶 Glutamate ammonia ligase	Bifunctional (glutamate-ammonia ligase)-adenylyl-L-tyrosine phosphorylase/(glutamate-ammonia-ligase) adenylyl transferase	691 081	693 921	+
		Glutamate-ammonia ligase	5 041 644	5 043 053	+
		Glutathione-regulated potassium-efflux system ancillary protein <i>KefG</i>	389 573	390 124	+
5	谷胱甘肽调节的钾外流系统 Glutathione-regulated potassium-efflux system	Glutathione-regulated potassium-efflux system protein <i>KefB</i>	390 124	391 929	+
		Glutathione-regulated potassium-efflux system protein <i>KefC</i>	4 368 961	4 370 823	-
		Glutathione-regulated potassium-efflux system oxidoreductase <i>KefF</i>	4 370 816	4 371 346	-
		<i>Trk</i> 系统钾转运体 <i>Trk</i> system potassium transporter	<i>Trk</i> system potassium transporter <i>TrkA</i>	417 930	419 306
6	<i>Trk</i> 系统钾转运体 <i>Trk</i> system potassium transporter	<i>Trk</i> system potassium transporter <i>TrkH</i>	5 063 373	5 064 824	-
		Potassium-transporting ATPase subunit <i>KdpA</i>	3 607 301	3 608 980	+
7	钾转运 ATP 酶 Potassium-transporting ATPase	Potassium-transporting ATPase subunit <i>KdpB</i>	3 609 001	3 611 049	+
		Potassium-transporting ATPase subunit <i>KdpC</i>	3 611 058	3 611 624	+
		Two-component system sensor histidine kinase <i>KdpD</i>	3 611 635	3 614 319	+
		Two-component system response regulator <i>KdpE</i>	3 614 316	3 614 993	+
		Low affinity potassium transporter <i>Kup</i>	5 164 015	5 165 883	-
8	其他钾转运体 Other potassium transporter	Flagellum-specific ATP synthase <i>FliI</i>	1 911 763	1 913 133	-
		F0F1 ATP synthase subunit I	5 174 900	5 175 280	+
		F0F1 ATP synthase subunit A	5 175 288	5 176 103	+
		F0F1 ATP synthase subunit C	5 176 150	5 176 389	+
		F0F1 ATP synthase subunit B	5 176 449	5 176 919	+

(待续)

(续表 3)

序号 No.	基因 Class	基因描述 Description	起始序列 Start sequence	终止序列 End sequence	正向(+)/ 反向(-) Positive (+)/ Reverse (-)
		F0F1 ATP synthase subunit delta	5 176 934	5 177 467	+
		F0F1 ATP synthase subunit alpha	5 177 480	5 179 021	+
		F0F1 ATP synthase subunit gamma	5 179 072	5 179 935	+
		F0F1 ATP synthase subunit beta	5 179 962	5 181 344	+
10	C4-四碳二羧酸运输系 统 C4-dicarboxylate transport	C4-dicarboxylate transporter <i>DctC</i>	214 288	215 574	+
		Anaerobic C4-dicarboxylate transporter <i>DcuC</i>	481 410	482 777	-
		C4-dicarboxylate transporter <i>DcuC</i>	529 353	530 819	-
		C4-dicarboxylate transporter <i>DcuC</i>	988 341	989 708	+
		Dicarboxylate transporter/tellurite-resistance protein <i>TehA</i>	2 483 115	2 484 116	+
		Anaerobic C4-dicarboxylate transporter <i>DcuC</i>	3 670 543	3 671 928	+
		C4-dicarboxylate transporter <i>DcuC</i>	4 032 470	4 033 831	-
		Anaerobic C4-dicarboxylate transporter <i>DcuA</i>	4 720 430	4 721 731	+
		Anaerobic C4-dicarboxylate transporter <i>DcuB</i>	4 737 938	4 739 278	+
11	逆向转运 Antiporter	Hexose-6-phosphate: phosphate antiporter	36 830	38 221	+
		Putative basic amino acid antiporter <i>YfcC</i>	1 536 742	1 538 262	-
		Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter <i>NhaB</i>	2 157 820	2 159 364	-
		Sodium-potassium/proton antiporter <i>ChaA</i>	2 250 540	2 251 640	-
		Citrate/succinate antiporter <i>CitT</i>	3 680 019	3 681 482	+
		Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter <i>NhaC</i>	4 068 883	4 070 334	+
		L-carnitine/gamma-butyrobetaine antiporter	4 377 093	4 378 610	+
		Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter <i>NhaA</i>	4 403 042	4 404 208	-
		Arginine/agmatine antiporter	4 749 856	4 751 193	+
12	NO 还原酶 Nitric oxide reductase	Anaerobic nitric oxide reductase flavorubredoxin	1 015 024	1 016 472	-
		Nitric oxide reductase transcriptional regulator <i>NorR</i>	1 016 661	1 018 181	+

达而提高细胞合成脯氨酸的能力，脯氨酸属于渗透调节物质的一种，其积累可以介导提高植物的抗逆性<sup>[30-31]</sup>。

在盐碱环境中促生菌有利于缓解盐碱胁迫作用对植物的伤害，促进植物种子萌发、器官分化和生物量积累与分配，进而提高植物的产量和品质<sup>[32]</sup>。其中，种子萌发阶段是植物生长周期中最基本和最重要的阶段，影响着植物后续的生长发育<sup>[33]</sup>。盐分的过度积累会使土壤渗透势增加，阻碍种子对水分的吸收，干扰种子

内部核酸和蛋白质代谢，影响内源激素合成，抑制种子萌发<sup>[34-35]</sup>。因此，近年来关于促生菌在盐碱胁迫下促进种子萌发作用也得到了越来越多的研究和应用。苑霖等<sup>[36]</sup>从盐地碱蓬根际土中分离一株具有耐盐能力的克锡勒氏细菌(*Kushneria indalinina*) JP-JH，发现该菌接种后可通过提高根系草酸和酒石酸含量促进苗期小麦生长。Habib 等<sup>[34]</sup>研究证实分别在 75 mmol/L 和 100 mmol/L 盐胁迫下，巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*) UPMR2 和肠杆菌(*Enterobacter* sp.)

UPMR18 可以通过诱导活性氧清除酶活性, 提高秋葵的耐盐性, 促进秋葵种子的萌发。本研究从中国宁夏回族自治区银川市盐碱地土壤中获得的耐盐碱菌 *Citrobacter* YS-AT2, 经证实可以在 pH 9.5 且含  $\text{NaHCO}_3$  的盐碱性环境中促进大豆种子萌发以及拟南芥种子的生长, 因此, 耐盐碱菌 *Citrobacter* YS-AT2 是可以应用于盐碱地综合利用的潜在微生物菌种资源。

目前, 从基因组学角度解析微生物促生机制已得到了一些应用<sup>[17,37]</sup>, 但仍不全面系统, 关于微生物耐盐碱机制的微生物组学研究相对较少。微生物的耐盐碱机制相对复杂, 高通量全基因组基因功能注释方法可以在基因组水平了解基因的功能, 明确基因产物及其在生命活动中的作用, 进而可以实现基因与其表现功能关系的判断。研究表明, 耐盐碱细菌可以通过一系列策略适应盐碱环境, 如土壤中过量的  $\text{Na}^+$  会抑制植物对其他营养元素的吸收和体内分布, 造成植物体内的离子比失衡, 导致植物出现异常的生理状态, 进而抑制植物的生长<sup>[38]</sup>。然而植物体内  $\text{K}^+$  的吸收能够有效激活植物体内关键酶促反应, 维持胁迫条件下细胞渗透压平衡, 帮助植物抵御盐碱胁迫的不利影响<sup>[39]</sup>。因此, 耐盐碱细菌比一般细菌具有更强的激活  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白和  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  转运蛋白调节胞内离子渗透压的能力, 进而可以抵御外界环境中盐碱的胁迫<sup>[40]</sup>。在基因组学水平的研究有益于揭示菌株 *Citrobacter* YS-AT2 的耐盐碱促生机制, 挖掘更多的基因组信息, 本研究通过基因注释发现, 菌株 *Citrobacter* YS-AT2 基因组中含有甘氨酸/甜菜碱转运蛋白和钠转运体等基因片段, 有研究报道, 甘氨酸/甜菜碱、脯氨酸的转运广泛存在于嗜盐细菌中, 其可以作为相容性溶质来抵抗外界环境的胁迫<sup>[41]</sup>。此外, 菌株 *Citrobacter* YS-AT2 基因组中还含有 *Trk* 系统

钾转运体、钾转运 ATP 酶和逆向转运体等钾离子输出系统, 其可以通过细胞质酸化保护细胞免受亲电化化合物的不利影响, 进而保持稳定的渗透平衡, 避免或者减少细胞受到的毒害作用。研究证实菌株 *Citrobacter* YS-AT2 在盐碱环境下能够通过多个基因组互作实现自身细胞对盐碱性物质的运输, 对  $\text{K}^+$ 、 $\text{Na}^+$  的转运和调节, 进而维持体内外的渗透平衡来抵御外界高盐碱环境, 保证自身的生命活动功能不受影响。

值得关注的是, *Citrobacter* 属作为人体肠道菌群的一种, 虽被广泛报道存在于土壤、水、食物等环境中, 近年来关于 *Citrobacter* 属细菌的研究大多集中在致病力和抗生素生长潜力的研究<sup>[42-43]</sup>, 而对于其在植物生长上表现的促生功能报道相对较少。本研究获得的菌株 *Citrobacter* YS-AT2 来自盐碱地土壤, 兼具促生和耐盐碱特性, 不仅提高了人们对该属菌株特性的全面认识, 而且为明确 *Citrobacter* 属的细菌多样性提供了菌株资源。但本研究仅验证了该菌株在拟南芥和大豆生长中表现促生能力, 为全面评估该菌被开发成微生物菌肥应用到盐碱地的潜力, 还需拓展该菌对其他作物的促生效果研究, 未来也可利用多组学技术和同位素标记技术探讨该菌与作物互作和参与的土壤养分循环过程研究, 揭示耐盐碱促生菌对作物元素利用情况的深层新机制。

## 4 结论

本研究从宁夏回族自治区银川市盐碱地土壤分离获得一株耐盐碱菌 *Citrobacter* YS-AT2, 其可在 pH 8.0–12.0 及 NaCl 含量 0%–9% 条件下生长, 并可利用多种碳源和分泌 IAA, 对盐碱胁迫下拟南芥生长、大豆早期发芽和大豆幼苗生长均表现了显著的促生效应, 丰富了人们对 *Citrobacter* 属细菌多样性的认知, 同时, 该菌

也可作为潜在的微生物种质资源应用于盐碱农业的开发和综合利用。本研究在基因水平揭示了 *Citrobacter* YS-AT2 可能是通过自身细胞对盐碱性物质的运输以及对  $K^+$ 、 $Na^+$  的转运和调节进而维持体内外渗透压和细胞内 pH 稳态, 使得菌株在高盐碱环境下生存。

## REFERENCES

- [1] 张冠初. 盐胁迫对花生生理和种子际土壤特性的影响[D]. 沈阳: 沈阳农业大学博士学位论文, 2019.  
ZHANG GC. Effect of salt stress on plant physiological and spermosphere soil characteristics in peanut[D]. Shenyang: Doctoral Dissertation of Shenyang Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [2] 孙明真. 改良盐碱地高效功能微生物的筛选[D]. 烟台: 烟台大学硕士学位论文, 2020.  
SUN MZ. Screening of efficient functional microorganisms in improved saline-alkali soil[D]. Yantai: Master's Thesis of Yantai University, 2020 (in Chinese).
- [3] 张金林, 李惠茹, 郭姝媛, 王锁民, 施华中, 韩庆庆, 包爱科, 马清. 高等植物适应盐逆境研究进展[J]. 草业学报, 2015, 24(12): 220-236.  
ZHANG JL, LI HR, GUO SY, WANG SM, SHI HZ, HAN QQ, BAO AK, MA Q. Research advances in higher plant adaptation to salt stress[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2015, 24(12): 220-236 (in Chinese).
- [4] van der HEIJDEN MGA, BARDGETT RD, van STRAALLEN NM. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems[J]. Ecology Letters, 2008, 11(3): 296-310.
- [5] 沈仁芳, 赵学强. 土壤微生物在植物获得养分中的作用[J]. 生态学报, 2015, 35(20): 6584-6591.  
SHEN RF, ZHAO XQ. Role of soil microbes in the acquisition of nutrients by plants[J]. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(20): 6584-6591 (in Chinese).
- [6] 曹晶晶, 熊悯梓, 钞亚鹏, 赵盼, 汪志琴, 仲乃琴. 极耐盐碱固氮菌的分离鉴定及固氮特性研究[J]. 微生物学报, 2021, 61(11): 3483-3495.  
CAO JJ, XIONG MZ, CHAO YP, ZHAO P, WANG ZQ, ZHONG NQ. Isolation and identification of extremely salt-tolerant azotobacter and its nitrogen-fixing characteristics[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(11): 3483-3495 (in Chinese).
- [7] 宋金秋, 刘淑娇, 崔丽红, 恩特马克·布拉提白. 根际细菌溶磷、产 IAA 及其抑菌作用的研究[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(11): 4722-4728.  
SONG JQ, LIU SJ, CUI LH, BORRATHYBAY E. Study on the phosphate solubilization capacity, producing IAA and its anti-bacteria activity of rhizobacteria[J]. Genomics and Applied Biology, 2017, 36(11): 4722-4728 (in Chinese).
- [8] 刘丹丹, 李敏, 刘润进. 我国植物根围促生细菌研究进展[J]. 生态学杂志, 2016, 35(3): 815-824.  
LIU DD, LI M, LIU RJ. Recent advances in the study of plant growth-promoting rhizobacteria in China[J]. Chinese Journal of Ecology, 2016, 35(3): 815-824 (in Chinese).
- [9] 范丙全. 我国生物肥料研究与应用进展[J]. 植物营养与肥料学报, 2017, 23(6): 1602-1613.  
FAN BQ. Advances in biofertilizer research and development in China[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2017, 23(6): 1602-1613 (in Chinese).
- [10] 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).
- [11] UPADHYAY SK, SINGH DP. Effect of salt-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria on wheat plants and soil health in a saline environment[J]. Plant Biology, 2015, 17(1): 288-293.
- [12] ZHANG JH, HUSSAIN S, ZHAO FT, ZHU LF, CAO XC, YU SM, JIN QY. Effects of *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* on nitrogen transformation and enzyme activity in the rice rhizosphere[J]. Journal of Soils and Sediments, 2018, 18(4): 1453-1465.
- [13] 王丹, 赵亚光, 张凤华. 耐盐促生菌筛选、鉴定及对盐胁迫小麦的效应[J]. 麦类作物学报, 2020, 40(1): 110-117.  
WANG D, ZHAO YG, ZHANG FH. Screening and identification of salt-tolerant plant growth-promoting bacteria and its promotion effect on wheat seedling under salt stress[J]. Journal of Triticeae Crops, 2020, 40(1): 110-117 (in Chinese).
- [14] 黄臣, 韩玲娟, 梁银萍, 杨凯元, 蒋霖, 孙小涵, 范乐, 赵祥, 高鹏. 达乌里胡枝子四株耐盐碱根际促生菌的鉴定及其促生作用[J]. 草地学报, 2023, 31(4): 1036-1047.  
HUANG C, HAN LJ, LIANG YP, YANG KY, JIANG

- L, SUN XH, FAN L, ZHAO X, GAO P. Identification and plant growth promotion analysis of four salt-alkali tolerant rhizosphere-promoting bacteria isolated from *Lespedeza daurica*[J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2023, 31(4): 1036-1047 (in Chinese).
- [15] 孙培, 王罡, 张亚楠, 李倩, 季静, 杨丹, 袁东, 王畅, 王昱蓉, 王萍. 一种耐盐促生菌筛选、鉴定及对玉米幼苗生长的影响[J]. *生物技术通报*, 2019, 35(8): 27-33.  
SUN P, WANG G, ZHANG YN, LI Q, JI J, YANG D, YUAN D, WANG C, WANG YR, WANG P. Screening and identification of a salt-tolerant growth-promoting bacterium and its effect on the growth of maize seedlings[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2019, 35(8): 27-33 (in Chinese).
- [16] 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).
- [17] 张哲超. 耐盐碱根际促生菌与丛枝菌根真菌联合提高牧草盐碱耐受性的微生物机制研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学博士学位论文, 2022.  
ZHANG ZC. Microbial mechanism of combined inoculation with haloalkali tolerant rhizosphere growth promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi to improve saline-alkaline tolerance of herbage[J]. Hohhot: Doctoral Dissertation of Inner Mongolia University, 2022 (in Chinese).
- [18] 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.  
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).
- [19] 郑娜, 柯林峰, 杨景艳, 王雪飞, 黄典, 程万里, 李嘉晖, 郑龙玉, 喻子牛, 张吉斌. 来源于污染土壤的植物根际促生细菌对番茄幼苗的促生与盐耐受机制[J]. *应用与环境生物学报*, 2018, 24(1): 47-52.  
ZHENG N, KE LF, YANG JY, WANG XF, HUANG D, CHENG WL, LI JH, ZHENG LY, YU ZN, ZHANG JB. Growth improvement and salt tolerance mechanisms of tomato seedlings mediated by plant growth-promoting rhizobacteria from contaminated soils[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2018, 24(1): 47-52 (in Chinese).
- [20] TSAVKELOVA EA, CHERDYNTSEVA TA, BOTINA SG, NETRUSOV AI. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin[J]. *Microbiological Research*, 2007, 162(1): 69-76.
- [21] MUYZER G, de WAAL EC, UITTERLINDEN AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 695-700.
- [22] YU JK, YU ZR, FAN G, WANG G, LIU XS. Isolation and characterization of indole acetic acid producing root endophytic bacteria and their potential for promoting crop growth[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2016, 18: 1381-1391.
- [23] TATUSOVA T, DiCUCCIO M, BADRETDIN A, CHETVERNIN V, NAWROCKI EP, ZASLAVSKY L, LOMSADZE A, PRUITT KD, BORODOVSKY M, OSTELL J. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(14): 6614-6624.
- [24] 杨劲松, 姚荣江, 王相平, 谢文萍, 张新, 朱伟, 张璐, 孙瑞娟. 中国盐渍土研究: 历程、现状与展望[J]. *土壤学报*, 2022, 59(1): 10-27.  
YANG JS, YAO RJ, WANG XP, XIE WP, ZHANG X, ZHU W, ZHANG L, SUN RJ. Research on salt-affected soils in China: history, status quo and prospect[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2022, 59(1): 10-27 (in Chinese).
- [25] 雒珺瑜, 张帅, 朱香镇, 王春义, 吕丽敏, 李春花, 崔金杰. 盐碱旱地转基因抗虫棉田昆虫群落多样性[J]. *生物多样性*, 2016, 24(3): 332-340.  
LUO JY, ZHANG S, ZHU XZ, WANG CY, LYU LM, LI CH, CUI JJ. Insect community diversity in transgenic Bt cotton in saline and dry soils[J]. *Biodiversity Science*, 2016, 24(3): 332-340 (in Chinese).
- [26] 康贻军, 程洁, 梅丽娟, 胡健, 朴哲, 殷士学. 植物根际促生菌作用机制研究进展[J]. *应用生态学报*, 2010, 21(1): 232-238.  
KANG YJ, CHENG J, MEI LJ, HU J, PIAO Z, YIN SX. Action mechanisms of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): a review[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2010, 21(1): 232-238 (in Chinese).
- [27] 潘晶, 黄翠华, 彭飞, 尤全刚, 刘斐耀, 薛娟. 植物根际促生菌诱导植物耐盐促生作用机制[J]. *生物技*



- 术通报, 2020, 36(9): 75-87.
- PAN J, HUANG CH, PENG F, YOU QG, LIU FY, XUE X. Mechanisms of salt tolerance and growth promotion in plant induced by plant growth-promoting rhizobacteria[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2020, 36(9): 75-87 (in Chinese).
- [28] KUKLINSKY-SOBRAJ L, ARAÚJO WL, MENDES R, GERALDI IO, PIZZIRANI-KLEINER AA, AZEVEDO JL. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion[J]. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(12): 1244-1251.
- [29] 王宝山, 邹琦. 质膜转运蛋白及其与植物耐盐性关系研究进展[J]. *植物学通报*, 2000(1): 17-26.
- WANG BS, ZOU Q. Advances in the study on plasma membrane-bound translocating proteins and their relations with salt tolerance in plants[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2000(1): 17-26 (in Chinese).
- [30] ABDEL HAMED ABDEL LATEF A, HE CX. Does inoculation with *Glomus mosseae* improve salt tolerance in pepper plants?[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2014, 33(3): 644-653.
- [31] 吴志勇, 李由然, 顾正华, 丁重阳, 张梁, 石贵阳. 枯草芽孢杆菌 L-脯氨酸合成途径中 *glnA*、*proB*、*proA* 基因功能探究[J]. *微生物学报*, 2018, 58(1): 39-50.
- WU ZY, LI YR, GU ZH, DING CY, ZHANG L, SHI GY. Function of *glnA*, *proB* and *proA* genes in L-proline anabolic pathway of *Bacillus subtilis*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(1): 39-50 (in Chinese).
- [32] SHIN W, SIDDIKEE MA, JOE MM, BENSON A, KIM K, SELVAKUMAR G, KANG Y, JEON S, SAMADDAR S, CHATTERJEE P, WALITANG D, CHANRATANA M, SA TM. Halotolerant plant growth promoting bacteria mediated salinity stress amelioration in plants[J]. *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer*, 2016, 49(4): 355-367.
- [33] AHMAD P, AZOOZ MM, PRASAD MNV. *Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress*[M]. New York, NY: Springer New York, 2013.
- [34] HABIB SH, KAUSAR H, SAUD HM. Plant growth-promoting rhizobacteria enhance salinity stress tolerance in okra through ROS-scavenging enzymes[J]. *BioMed Research International*, 2016, 2016: 1-10.
- [35] 严青青, 张巨松, 李星星, 王燕提. 盐碱胁迫对海岛棉种子萌发及幼苗根系生长的影响[J]. *作物学报*, 2019, 45(1): 100-110.
- YAN QQ, ZHANG JS, LI XX, WANG YT. Effects of salinity stress on seed germination and root growth of seedlings in is-land cotton[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2019, 45(1): 100-110 (in Chinese).
- [36] 苑霖, 王新珍, 孙宏勇, 刘小京, 刘彬彬. 一株克锡勒氏菌对小麦苗期的促生耐盐效应研究[J]. *中国生态农业学报*, 2021, 29(11): 1913-1920.
- YUAN L, WANG XZ, SUN HY, LIU XJ, LIU BB. Growth promotion and mitigation of salt stress in wheat seedlings by a *Kushneria* bacterium[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2021, 29(11): 1913-1920 (in Chinese).
- [37] 郭晓萌. 组学工具解析盐碱菌独特的环境适应机理[D]. 临汾: 山西师范大学硕士学位论文, 2018.
- GUO XM. Analysis of unique environmental adaptation mechanism of saline-alkali bacteria by omics tools[D]. Linfen: Master's Thesis of Shanxi Normal University, 2018 (in Chinese).
- [38] 刘少芳, 王若愚. 植物根际促生细菌提高植物耐盐性研究进展[J]. *中国沙漠*, 2019, 39(2): 1-12.
- LIU SF, WANG RY. Advance in research on plant salt tolerance improved by plant-growth-promoting rhizobacteria[J]. *Journal of Desert Research*, 2019, 39(2): 1-12 (in Chinese).
- [39] 贾冰冰. AM 真菌提高牧草在重金属污染盐碱化土壤中耐受性的作用机制[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学硕士学位论文, 2021.
- JIA BB. Mechanism of AM fungi improving forage tolerance in heavy metal contaminated saline-alkaline soil[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia University, 2021 (in Chinese).
- [40] ETESAMI H, BEATTIE GA. Mining halophytes for plant growth-promoting halotolerant bacteria to enhance the salinity tolerance of non-halophytic crops[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 148.
- [41] QIN Y, DRUZHININA I S, PAN X, YUN Z. Microbially mediated plant salt tolerance and microbiome-based solutions for saline agriculture[J]. *Biotechnology Advances*, 2016, 34(7): 1245-1259.
- [42] 薛巧, 赵战勤, 刘会胜, 薛云, 董发明. 弗氏柠檬酸杆菌对动物和人致病性研究进展[J]. *动物医学进展*, 2015, 36(7): 81-85.
- XUE Q, ZHAO ZQ, LIU HS, XUE Y, DONG FM. Progress on *Citrobacter freundii* pathogenicity in animals and humans[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2015, 36(7): 81-85 (in Chinese).
- [43] HUSSAINI S, UMMULKUSUM M, SHUAIBU BALAM, ABDULRAHMAN ASHAFAMA. Isolation, identification and screening of bacteria with antibiotic production potential from termite mounds[J]. *Advances in Biochemistry*, 2021, 9(3): 56.