



## 兰州唐古特白刺根际微生物分离鉴定

赵诗佳<sup>1</sup>, 郭晓农<sup>1,2,3\*</sup>, 王银平<sup>1</sup>, 任琴<sup>1</sup>, 宋晓琛<sup>1</sup>, 马梦慈<sup>1</sup>

1 西北民族大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730030

2 西北民族大学生物医学研究中心, 生物工程与技术国家民委重点实验室, 甘肃 兰州 730030

3 西北民族大学生物医学研究中心, 中国-马来西亚国家联合实验室, 甘肃 兰州 730030

赵诗佳, 郭晓农, 王银平, 任琴, 宋晓琛, 马梦慈. 兰州唐古特白刺根际微生物分离鉴定. 微生物学报, 2022, 62(7): 2582–2593.

Zhao Shijia, Guo Xiaonong, Wang Yinping, Ren Qin, Song Xiaochen, Ma Mengci. Isolation and identification of microorganisms in *Nitraria tangutorum* Bobr. rhizosphere in Lanzhou. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(7): 2582–2593.

**摘要:**【目的】从兰州唐古特白刺根际分离得到对植物有潜在促生效果的功能微生物, 为研发相关菌种制剂的研究奠定基础。【方法】通过平板划线法从其根际分离纯化出 6 株细菌, 并对菌株进行形态特征观察、革兰氏染色等一系列生理生化试验。用藜麦检测各菌株的促生功能, 并对具有优良促生作用的 1 个菌株 16S rRNA 基因进行分子鉴定及基因草图绘制。【结果】根据生化鉴定结果, 6 株细菌分别属于不动杆菌属(*Acinetobacter*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)。其中, 16S rRNA 基因鉴定 BC4 属于肠杆菌属(*Enterobacter*), 具有较好的促生效果。【结论】BC4 具有较好的促生效果, 为兰州唐古特白刺菌种资源的开发和利用提供了一定的理论依据。

**关键词:** 唐古特白刺; 根际微生物; 菌种鉴定; 促生菌筛选

**基金项目:** 国家自然科学基金(31760242); 西北民族大学“双一流”和特色发展引导专项-生物工程特色学科[11080306(2019)]; 甘肃省自然科学基金(20JR10RA120); 西北民族大学 2020 年本科生科研创新项目(XBMU-BYL20061); 西北民族大学 2021 年本科生科研创新项目(XBMU21121)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31760242), by the Characteristic Discipline of Bioengineering Construction for the Special Guide Project of the “World-Class Universities and World-Class Disciplines” of Northwest Minzu University [11080306(2019)], by the Natural Science Foundation of Gansu (20JR10RA120), by the Northwest Minzu University 2020 Undergraduate Scientific Research Innovation Project (XBMU-BYL20061) and by the Northwest Minzu University 2021 Undergraduate Scientific Research Innovation Project (XBMU21121)

\*Corresponding author. E-mail: gxnwww@126.com

Received: 19 October 2021; Revised: 18 December 2021; Published online: 24 February 2022

# Isolation and identification of microorganisms in *Nitraria tangutorum* Bobr. rhizosphere in Lanzhou

ZHAO Shijia<sup>1</sup>, GUO Xiaonong<sup>1,2,3\*</sup>, WANG Yinping<sup>1</sup>, REN Qin<sup>1</sup>, SONG Xiaochen<sup>1</sup>, MA Mengci<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Life Science and Engineering College, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, Gansu, China

<sup>2</sup> Key Laboratory of Biotechnology & Bioengineering of State Ethnic Affairs Commission, Biomedical Research Center, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, Gansu, China

<sup>3</sup> China-Malaysia National Joint Laboratory, Biomedical Research Center, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, Gansu, China

**Abstract:** [Objective] Microorganisms with potential growth-promoting effects on plants were isolated from the rhizosphere of *Nitraria tangutorum* Bobr. in Lanzhou City, which laid a foundation for research and development of related preparations. [Methods] With the plate streak method, 6 bacterial strains were isolated and purified from the rhizosphere of *N. tangutorum*, and the morphological characteristics of the strains were observed. The physiological and biochemical properties were examined based on Gram staining and other tests. The effect of each strain on quinoa growth was determined. The 16S rRNA gene of a strain with excellent growth-promoting effect was sequenced and the circular genome map for the strain was plotted. [Results] According to the biochemical identification results, the 6 strains belonged to *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Sphingomonas*, and *Pseudomonas*, respectively. Further identification by 16S rRNA gene sequencing suggested that BC4, with strong growth-promoting activity, belonged to *Enterobacter*. [Conclusion] BC4 shows strong growth-promoting activity, which lays a theoretical basis for development and utilization of bacterial resources of *N. tangutorum* in Lanzhou.

**Keywords:** *Nitraria tangutorum* Bobr.; rhizosphere microorganisms; species identification; screening of growth-promoting bacteria

植物根际土壤是根系生长、代谢和吸收养分的重要环境<sup>[1]</sup>。由于根系分泌的营养物质被土壤微生物吸收利用,其丰度和多样性与非根际微生物存在较大差异,使得根际土壤微生物具有更强的活性,甚至能够起到促进植物生长的作用,因而对植物根际菌群的研究亦备受关注<sup>[2]</sup>。植物根际微生物包括有益或有害微生物,显著影响植物生长发育和产量形成<sup>[3]</sup>。植物根际促生菌(plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)作为一类有益微生物,定殖于植物根系表面或根际土壤中,调控植物生长发育、活化土壤养分和拮抗病原微生物<sup>[4]</sup>。近年来,国内外许多学者先后从植

物根际土壤中分离获得促生菌。Islam 等<sup>[5]</sup>从黄瓜根际分离得到 10 株菌株,分别属于假单胞菌(*Pseudomonas*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)和解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*),它们能促进植物生长,拮抗病原真菌,有效防治黄瓜疫霉根腐病。Ayyaz 等<sup>[6]</sup>从田间小麦根际土壤中,分离出能产生植物激素和具有溶磷特征的 *Azospirilla* 属微生物,单株接种 *Azospirillum* sp. AzoK1 和 AzoK2 可促进盆栽小麦植株生长。基于其促生特性,根际促生菌剂得到广泛应用。如 Lorena 等<sup>[7]</sup>接种 PGPR

后显著增加了万寿菊单萜烯和酚类等次生代谢产物。

兰州唐古特白刺(*Nitraria tangutorum*)属藜科(*Zygophyllaceae*)白刺属(*Nitraria* L.), 耐旱、耐盐碱、耐寒、耐瘠薄、抗风沙, 主要分布于我国西北部和北部地区<sup>[8]</sup>, 是优良的防风固沙、耐盐碱植物<sup>[9]</sup>。目前, 对兰州唐古特白刺的研究大多集中于资源保护与适生环境分析, 对其根际微生物菌群的研究甚少。兰州唐古特白刺的强抗逆性可能与根际微生物菌群密切相关<sup>[10]</sup>。众多研究表明, 微生物制剂能促进植物吸收养分和水分, 分泌生长活性物质, 提高植物拮抗和适应不良环境<sup>[10]</sup>。为此, 本研究以兰州唐古特白刺为对象, 分离纯化其根际微生物, 并进行一系列生理生化及分子鉴定, 筛选出 PGPR, 为有关微生物菌剂的研发与应用奠定科学基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 土壤样品采集

兰州唐古特白刺根际土壤样品采自甘肃省兰州市永登县(36°52'N, 103°26'E)。去除地表凋落物及表层 5 cm 土壤, 选取细根发达区域, 在 5–10 cm 深度以五点取样法采集土壤 2 kg, 取样后按四分法混匀, 装于无菌采样袋, 置于 4 °C 冰箱保存备用<sup>[11]</sup>。

### 1.2 培养基

牛肉膏蛋白胨培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 牛肉膏 3.0, 氯化钠 5.0, 琼脂 15.0, 蒸馏水 1 000 mL, pH 值调至 7.0–7.4<sup>[12]</sup>。解磷固体培养基(g/L): 蔗糖 10.0, 硫酸铵 0.5, 七水合硫酸镁 0.3, 氯化钠 0.3, 氯化钾 0.3, 七水合硫酸亚铁 0.03, 七水合硫酸锰 0.03, 磷酸钙 5.0, 琼脂 20.0, 蒸馏水 1.0 L, pH 值调至 7.2–7.5<sup>[13]</sup>。解钾固体培养基(g/L): 蔗糖 10.0, 酵母膏 0.2, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.0, FeSO<sub>4</sub> 0.03, CaCO<sub>3</sub> 2.5, 钾长

石粉 10.0, 琼脂 15.0, 蒸馏水 1.0 L, pH 值调至 7.0–7.5<sup>[14]</sup>。

### 1.3 菌种分离纯化

取 10 g 根际土壤, 加入 90 mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基富集培养(26 °C、180 r/min, 12 h), 离心后取上清液进行梯度稀释(10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>), 取 100 μL 稀释菌液均匀涂布于牛肉膏蛋白胨固体培养基上, 26 °C 倒置培养 3 d<sup>[15]</sup>, 挑取不同培养性状的单菌落, 采用四区划线法分离纯化, 得到纯化单菌落后编号并保存。

### 1.4 菌落形态与特征观察

观察并记录单菌落各项形态特征, 包括颜色、大小、表面质地、透明度和边缘形状等<sup>[16]</sup>。

### 1.5 生理生化鉴定

#### 1.5.1 革兰氏染色

对分离得到的 6 株菌株进行生理生化鉴定。取活跃生长期菌种涂片、干燥和固定。滴加草酸铵结晶紫染液染色 1–2 min 后蒸馏水冲洗至无色。碘液染色约 1 min, 水洗。用滴管流加 95% 乙醇脱色, 30 s 后水洗并吸去水分。番红复染液染色 2–3 min, 蒸馏水冲洗、干燥和镜检。显微镜下观察紫色为革兰氏染色阳性细菌; 红色为革兰氏染色阴性细菌<sup>[17]</sup>。

#### 1.5.2 过氧化氢酶试验

挑取 24 h 培养菌种涂抹于滴有 3% 过氧化氢的玻片上, 如有气泡产生则为阳性, 无气泡为阴性<sup>[18]</sup>。

#### 1.5.3 氧化酶试验

滴加 N,N-二甲基对苯二胺二盐酸盐 1% 水溶液于无菌滤纸, 挑取 18–24 h 培养的菌苔, 均匀涂抹, 10 s 内涂抹的菌苔呈现红色即为阳性, 10–60 s 滤纸上呈现红色即为延迟反应, >60 s 滤纸上未出现红色即为阴性<sup>[18]</sup>。

#### 1.5.4 淀粉水解试验

取菌种点种于含 0.2% 可溶性淀粉的基础培

培养基中, 26 °C 恒温培养形成明显菌落后, 滴加碘液呈蓝黑色, 菌落周围如有不变色透明圈, 表示淀粉水解阳性, 仍是蓝黑色为阴性<sup>[18]</sup>。

### 1.5.5 明胶液化试验

将菌种接种于明胶基础培养基(26 °C, 72 h), 观察时低温处理, 明胶表面无凹陷且为稳定的凝块, 则为明胶水解阴性。如明胶凝块部分或全部变为可流动的液体, 则为明胶水解阳性。若明胶未液化, 但明胶表面菌苔下与对照管比较出现凹陷小窝也是轻度水解, 按阳性记录<sup>[18]</sup>。

### 1.5.6 产 NH<sub>3</sub> 能力检测

将菌株接种于 10 mL 蛋白胨水中, 培养 3 d 后, 加入 0.5 mL 纳氏试剂(Nessler 试剂), 观察试管颜色变化, 颜色由褐色转为黄色的表明有 NH<sub>3</sub> 产生<sup>[19]</sup>。

### 1.5.7 吲哚试验

将菌接种至蛋白胨水, 培养 48 h 后加入 3–4 滴乙醚, 摇动数次, 静置 1–3 min, 乙醚上升后, 加入 2 滴吲哚试剂。在乙醚和培养物之间产生红色环状物为阳性反应<sup>[20]</sup>。

### 1.5.8 甲基红试验

挑取少量菌种于甲基红试验培养基中(26 °C, 3–5 d), 观察时滴入甲基红试剂 1–2 滴, 培养液颜色呈红色则为阳性反应, 黄色为阴性反应<sup>[20]</sup>。

### 1.5.9 解磷能力检测

挑取菌株接种于解磷固体培养基平板上(37 °C, 7 d), 观察透明圈产生情况, 根据透明圈直径(D)/菌落直径(d)大小确定菌株解磷能力<sup>[21]</sup>。

### 1.5.10 解钾能力检测

挑取菌株接种于解钾固体培养基平板上(37 °C, 7 d), 观察透明圈产生情况, 根据透明圈直径(D)/菌落直径(d)大小确定菌株解钾能力<sup>[21]</sup>。

## 1.6 分离菌株促生功能检测

将藜麦种子浸泡于高锰酸钾溶液消毒 10 min, 无菌水洗净。用无菌镊子挑取藜麦种子置于湿润无菌滤纸上, 25 °C 暗培养 3 d 备用。将分离获

得的菌株接种于 LB 液体培养基中, 培养(26 °C、180 r/min) 12 h, 调 OD<sub>600</sub> 值为 1.0。倒入灭菌后的 1/2 MS 培养基, 凝固后取 6 棵均匀一致的藜麦发芽种子, 以直线排列的方式沿培养皿中线种植。在距离藜麦幼苗根尖下方 3 cm 处, 滴加 200 μL 菌液(对照滴加 200 μL 无菌 LB 液体培养基)。将平板垂直置于(26±2) °C, 16 h 光照 8 h 黑暗的恒温培养箱中培养, 各菌株重复设 3 次。10 d 后观察藜麦幼苗生长情况。记录幼苗茎长、叶长、主根长、侧根数、须根数及干鲜重<sup>[22]</sup>。

## 1.7 16S rRNA 基因分子鉴定

将促生效果最优的菌株培育于 LB 液体培养基中(26 °C、180 r/min, 9 h), 离心菌液(14 000 r/min, 5 min), 收集菌体, 送至深圳微科亨科技有限公司上海测序部进行 16S rRNA 基因测序, 选择引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 进行 PCR 扩增, PCR 反应体系: 5×FastPfu Buffer 4 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL, 5 μmol/L Forward Primer 0.8 μL, 5 μmol/L Reverse Primer 0.8 μL, FastPfu Polymerase 0.4 μL, BSA 0.2 μL, Template DNA 10 ng, 补 ddH<sub>2</sub>O 至 20 μL。扩增程序: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 27 个循环; 72 °C 10 min。TBtools 软件绘制细菌基因组圈图, 用 BLAST-N (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 搜索程序, 与 GenBank 数据库进行对比, 利用 MEGA 7 将序列比对结果通过 NJ 法构建系统进化树。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌体及菌落形态观察

通过富集培养和梯度稀释涂布共分离得到 6 株菌株。革兰氏染色及镜检如图 1、图 2 和表 1 所示。

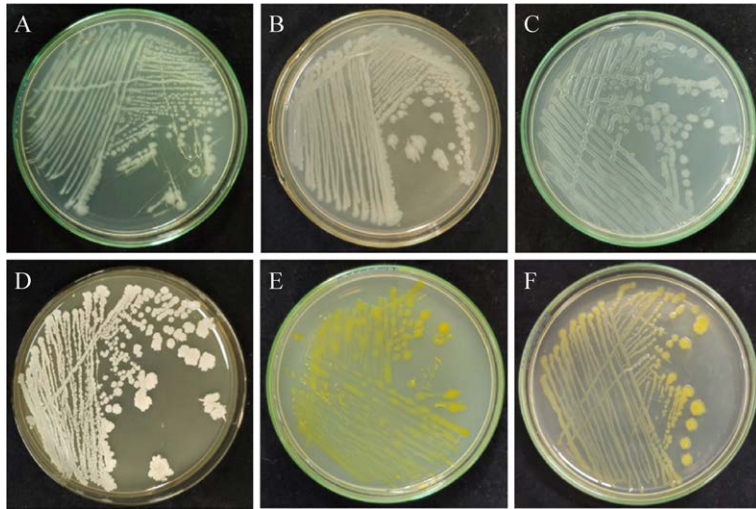


图 1 菌株形态观察

Figure 1 Morphological observation of 6 bacterial strains isolated.

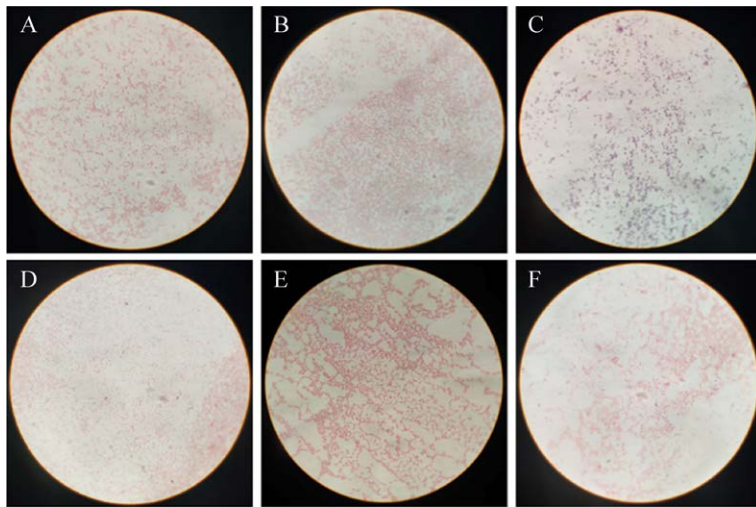


图 2 革兰氏染色和镜检

Figure 2 Gram staining and microscope examination of 6 bacterial strains isolated.

表 1 菌株菌落及镜检形态观察

Table 1 Observation of bacterial colony and microscopic morphology

| Serial number | Result observed   |
|---------------|---|
| BC1           | White, moist, round, smooth surface and edge, slightly transparent, colony diameter 2.0–4.0 mm, Gram-negative bacilli, and the cells are bulbous.   |
| BC2           | Milky white, moist, oval in shape, smooth surface and edge, raised in the middle, opaque, colony diameter 2.0–6.0 mm, Gram-negative bacilli.  |
| BC3           | White, moist, round, smooth surface and edge, the surrounding bulge is higher than the middle part, obvious depressions, transparent, colony diameter 1.0–5.0 mm, and the Gram-positive bacilli are blunt at both ends. |
| BC4           | White, smooth, moist, irregular in shape, viscous texture, slightly transparent, colony diameter 3.0–7.0 mm, Gram-negative bacilli, stubby rods, and bluntly rounded at both ends.                                      |
| BC5           | Dark yellow, moist, smooth surface and edge, oval in shape, slightly raised in the middle, opaque, colony diameter 2.0–4.0 mm, short Gram-negative bacilli, arranged in pairs.  |
| BC6           | Light yellow, moist, round, smooth surface and edge, raised in the middle, slightly transparent edges, colony diameter 2.0–5.0 mm, Gram-negative bacilli, straight or slightly curved.                                  |

## 2.2 菌种理化性质检测

生理生化特征的测定可以反映菌株的本质特征,是其本身某种代谢途径或某种酶的特有表现,从而可以将菌株区分为不同类群。对所筛菌株进行过氧化氢酶、氧化酶、产  $\text{NH}_3$  能力检测、淀粉水解试验、吲哚试验、甲基红试验和明胶液化试验等特性检测,结果见表 2。

## 2.3 解磷、解钾能力检测

将筛选得到的菌株进行解磷、解钾能力检测(表 3)。计算培养基表面所形成的透明圈与各菌株菌落直径之比,即 D/d 值,根据其数值范围可对上述 6 株菌株解磷、解钾能力进行初步检测。由表 3 可知,6 株菌株在解磷与解钾方面的能力存在差异,其中 4 株菌株获得的解磷圈与菌落直径比值在 1.0–1.3, 1 株在 1.3–1.5 之间, 1 株在 1.5–2.0 之间。通过解钾菌筛选结果发现,有 2 株菌株无

解钾能力,解钾圈与菌落直径比值在 1.0–1.3 的有 3 株,BC4 比值为 1.30。通过各菌株相互比较,BC4 和 BC6 解磷、解钾能力强于其他菌株。

## 2.4 分离菌株促生功能检测

采用藜麦验证 6 株菌株的促生效果,结果如表 4 和图 3 所示,接种不同菌株对藜麦各生长指标存在不同程度的影响。接种 BC1 与 BC2 的藜麦幼苗与空白对照组相比无明显差异,通过比较接种菌株后各组藜麦幼苗茎长、叶长、主根长、侧根数、须根数及鲜干重等指标差异,结果显示 BC4 促生效果最优,比空白对照组分别增加了 32.44%、11.59%、125.41%、33.00%、383.00%、55.39%、53.32%。BC5 与 BC6 促生效果次之,BC3 对藜麦生长有抑制作用,其各幼苗生长指标分别降低了 24.43%、8.70%、21.31%、100%、17.00%、8.99%、14.77%。

表 2 菌株生理生化特征

Table 2 The physiological and biochemical characteristics of six strains

| Characteristics            | Strains |     |     |     |     |     |
|----------------------------|---------|-----|-----|-----|-----|-----|
|                            | BC1     | BC2 | BC3 | BC4 | BC5 | BC6 |
| Catalase test              | +       | +   | +   | +   | +   | +   |
| Oxidases                   | –       | +   | –   | –   | –   | –   |
| Production of ammonia test | +       | +   | +   | +   | +   | +   |
| Starch hydrolysis test     | +       | –   | +   | +   | +   | –   |
| Indole production          | +       | +   | +   | +   | +   | –   |
| Methyl red                 | +       | +   | –   | –   | –   | +   |
| Gelatin liquefaction       | –       | +   | –   | +   | +   | +   |

+: more bacteria was positive reaction; -: more bacteria was negative reaction.

表 3 解磷、解钾能力测定

Table 3 Determination of phosphorus and potassium dissolution ability

| Serial number | Phosphate-dissolving ability |      |      | Potassium-dissolving ability |      |      |
|---------------|------------------------------|------|------|------------------------------|------|------|
|               | D/mm                         | D/mm | D/d  | D/mm                         | D/mm | D/d  |
| BC1           | 3.84                         | 3.28 | 1.17 | –                            | –    | –    |
| BC2           | 7.22                         | 5.63 | 1.28 | –                            | –    | –    |
| BC3           | 5.12                         | 4.33 | 1.18 | 5.43                         | 4.71 | 1.15 |
| BC4           | 9.34                         | 5.98 | 1.56 | 7.98                         | 6.13 | 1.30 |
| BC5           | 4.51                         | 3.67 | 1.23 | 4.07                         | 3.49 | 1.17 |
| BC6           | 6.18                         | 4.57 | 1.35 | 5.79                         | 4.65 | 1.25 |



表 4 接种各菌株后幼苗生长指标

Table 4 Seedling growth index after inoculation with each strain

| Growth indicators       | Strains    |           |            |            |             |            |            |
|-------------------------|------------|-----------|------------|------------|-------------|------------|------------|
|                         | CK         | BC1       | BC2        | BC3        | BC4         | BC5        | BC6        |
| Stem length/cm          | 2.62±0.02  | 2.41±0.01 | 2.50±0.01  | 1.98±0.01  | 3.47±0.01   | 2.86±0.01  | 2.84±0.01  |
| Leaf length/cm          | 0.69±0.01  | 0.65±0.01 | 0.65±0.01  | 0.63±0.01  | 0.77±0.01   | 0.79±0.01  | 0.84±0.01  |
| Tap root length/cm      | 1.22±0.01  | 1.44±0.01 | 1.23±0.01  | 0.96±0.01  | 2.75±0.01   | 2.16±0.02  | 2.23±0.01  |
| Number of lateral roots | 1.00±0.40  | 0.33±0.27 | 1.00±0.40  | 0.00±0.00  | 1.33±0.67   | 1.67±0.27  | 2.00±0.80  |
| Number of fibrous roots | 1.00±0.40  | 1.33±0.67 | 1.00±0.80  | 0.83±0.57  | 4.83±0.97   | 7.17±0.97  | 6.83±0.97  |
| Fresh weight/mg         | 62.67±6.81 | 62.8±5.37 | 63.43±2.84 | 57.03±2.19 | 97.38±23.65 | 96.32±1.30 | 95.82±6.19 |
| Dry weight/mg           | 6.77 ±0.25 | 6.85±0.23 | 6.88±0.13  | 5.77±0.06  | 10.38±1.66  | 9.95±0.03  | 9.78±0.09  |

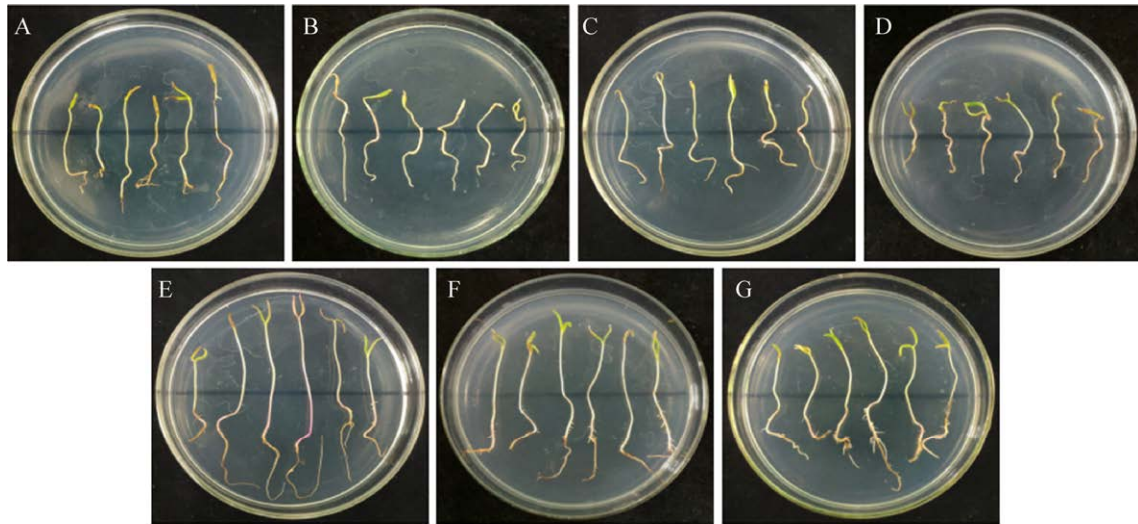


图 3 不同菌株对藜麦生长的促生效果

Figure 3 Growth-promoting effects of different strains on the growth of quinoa. A: CK (sterile); B: growth-promoting effect of BC1 on quinoa; C: growth-promoting effect of BC2 on quinoa; D: growth-promoting effect of BC3 on quinoa; E: growth-promoting effect of BC4 on quinoa; F: growth-promoting effect of BC5 on quinoa; G: growth-promoting effect of BC6 on quinoa.

## 2.5 16S rRNA 基因分子鉴定

根据测序结果运用 TBtools 软件对 BC4 菌株进行全基因组草图绘制,结果如图 4 所示。使用 MEGA 7 软件,通过邻接法构建系统发育进化树(图 5)。结

果表明,菌株 BC4 与肠杆菌属(*Enterobacter*)的同源性较高,经 NCBI 在线 BLAST 比对分析与 *Enterobacter* sp. 638 (CP000653) 序列相似性达到 99.10%, 鉴定菌株 BC4 可能为 *Enterobacter* 属(表 5)。

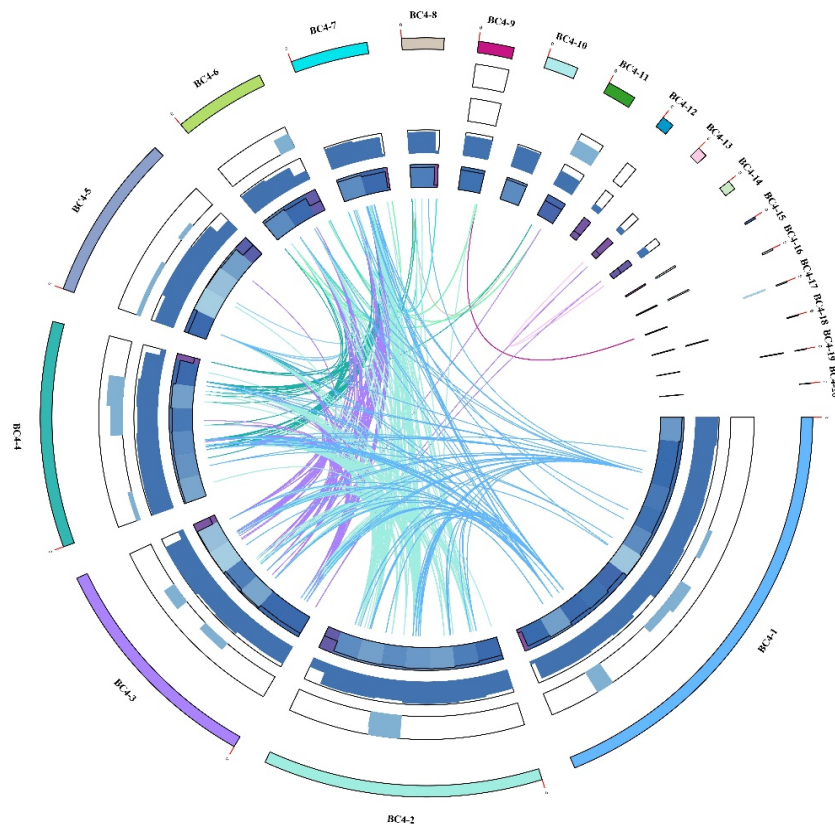


图 4 BC4 基因组圈图

Figure 4 BC4 genome circle diagram. (From the inside out) Lap 1: gene density heat map and line map; Lap 2: CDS density histogram; Lap 3: tRNA density histogram; Lap 4: rRNA density histogram.

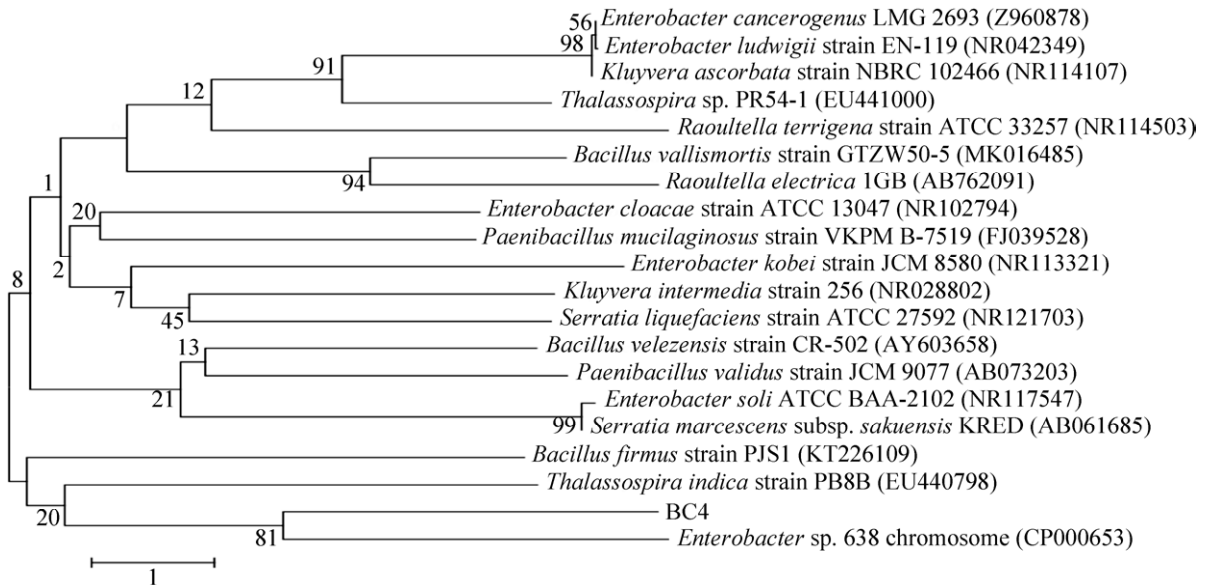


图 5 基于菌株 BC4 16S rRNA 基因的 neighbor-joining 系统发育树

Figure 5 Neighbor-joining phylogenetic tree based on BC4 16S rRNA gene. Numbers in parentheses: GenBank accession number; Numbers in branch points: branch support values; Bar length=1: nucleotide divergence between sequences.



表 5 BLAST 比对结果

Table 5 BLAST comparison results

| Scientific name                        | Max score | Total score | QUERY COVER/% | E value | Per. ident/% | Accession   |
|--|-----------|-------------|---------------|---------|--------------|-------------|
| <i>Enterobacter</i> sp. 638            | 2 988     | 20 880      | 100           | 0.0     | 99.10        | CP000653.1  |
| <i>Enterobacter soli</i> ATCC BAA-2102 | 2 743     | 2 743       | 92            | 0.0     | 98.83        | NR_117547.1 |
| <i>Enterobacter ludwigii</i>           | 2 689     | 2 689       | 90            | 0.0     | 98.74        | NR_042349.1 |
| <i>Enterobacter cancerogenus</i>       | 2 669     | 2 669       | 89            | 0.0     | 98.73        | Z96078.1    |
| <i>Enterobacter cloacae</i>            | 2 658     | 2 658       | 92            | 0.0     | 97.80        | NR_102794.2 |
| <i>Serratia marcescens</i>             | 2 582     | 2 582       | 91            | 0.0     | 97.13        | AB061685.1  |
| <i>Raoultella electrica</i>            | 2 571     | 2 571       | 87            | 0.0     | 98.62        | AB762091.1  |
| <i>Kluyvera intermedia</i>             | 2 558     | 2 558       | 86            | 0.0     | 98.62        | NR_028802.1 |
| <i>Enterobacter kobei</i>              | 2 558     | 2 558       | 88            | 0.0     | 97.96        | NR_113321.1 |
| <i>Kluyvera ascorbata</i>              | 2 556     | 2 556       | 88            | 0.0     | 97.82        | NR_114107.1 |
| <i>Serratia liquefaciens</i>           | 2 555     | 2 555       | 92            | 0.0     | 96.63        | NR_121703.1 |
| <i>Raoultella terrigena</i>            | 2 553     | 2 553       | 86            | 0.0     | 98.75        | NR_114503.1 |
| <i>Thalassospira</i> sp. PR54-1        | 1 048     | 1 048       | 90            | 0.0     | 79.95        | EU441000.1  |
| <i>Thalassospira indica</i>            | 1 040     | 1 040       | 89            | 0.0     | 79.96        | EU440798.1  |
| <i>Cytobacillus firmus</i>             | 894       | 894         | 83            | 0.0     | 78.88        | KT226109.1  |
| <i>Paenibacillus validus</i>           | 891       | 891         | 70            | 0.0     | 80.49        | AB073203.1  |
| <i>Bacillus velezensis</i>             | 869       | 869         | 83            | 0.0     | 78.48        | AY603658.1  |
| <i>Paenibacillus mucilaginosus</i>     | 850       | 850         | 70            | 0.0     | 79.97        | FJ039528.3  |
| <i>Bacillus vallismortis</i>           | 697       | 697         | 55            | 0.0     | 80.06        | MK016485.1  |

### 3 讨论

兰州唐古特白刺作为典型的荒漠盐生植物具有较强的抗逆性,这与其根际菌群的存在可能有着不可分割的联系<sup>[10]</sup>。根际具有促生功能的微生物可以通过产生不同代谢产物,将植物根际无法直接吸收的元素转化,为植物生长提供养分,并促成产量增加。

本研究从兰州唐古特白刺根际土壤中分离得到 6 株菌株。解磷解钾能力检测中,透明圈与菌落直径的比值(D/d)范围介于 1.00–2.00 的为解磷或解钾中等菌株<sup>[23]</sup>。因此,本研究筛选得到的各菌株除 BC1 和 BC2 菌株没有解钾能力外,其余 4 株菌株解磷解钾能力均为中等,BC4 菌株解磷解钾能力最强。分离菌株促生功能检测中,藜麦生长周期较短,种子大小适中,利于种植,通过平板种植藜麦,并接种菌株,能缩短实

验进程、提高幼苗筛选效率,并能有效地观察到菌株对藜麦生长的影响,初步测定分离得到的 6 株菌株的促生能力。以藜麦幼苗根长、茎长、叶长、侧根数、须根数、干鲜重为衡量标准,菌株解磷解钾能力为促生作用间接体现,最终筛选得到具有明显促生作用的 BC4 菌株。

根据菌落形态、革兰氏染色和镜检以及生化试验结果,参照《伯杰细菌鉴定手册》与《常见细菌系统鉴定手册》可以作出初步判断:菌株 BC1 可能属于不动杆菌属(*Acinetobacter*),菌株 BC2 可能属于土壤杆菌属(*Agrobacterium*),菌株 BC3 可能属于类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*),菌株 BC4 可能属于芽孢杆菌属(*Bacillus*),菌株 BC5 可能属于鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*),菌株 BC6 可能属于假单胞菌属(*Pseudomonas*)。因某些菌株具有相似的生理生化特征,对具有优良促生特性的 BC4 菌株进行 16S rRNA 基因分子鉴

定及基因组圈图绘制,圈图中由内到外第一层为基因密度热图及线形图;第二层为 CDS 密度柱状图;第三层为 tRNA 密度柱状图;第四层为 rRNA 密度柱状图;圈图内部线条表明各基因组之间的共线性关系。细菌基因组圈图能直观说明微生物各个功能基因基本信息,从整体范围分析各个基因功能及关系,对特异性菌株的开发利用和微生物分类研究有重要意义<sup>[24]</sup>。BC4 菌株存在多种基因,包括 *Arg*、*Glp*、*Cpx*、*Ppc* 等。土壤环境天然抗生素的大量存在,使 *Arg* 基因在土壤微生物群落普遍存在<sup>[25]</sup>。*Glp* 基因在病原菌感染期间,可作为靶标进行蛋白交联加固细胞壁<sup>[26]</sup>。*Cpx* 基因可在细菌包膜损伤或缺陷时,感知响应信号适应细胞内外环境变化,维持包膜功能及完整性<sup>[27]</sup>。*Ppc* 基因的存在对菌体生长、产酸量、糖酸转化率均有影响<sup>[28]</sup>。BC4 菌株经 16S rRNA 基因分子鉴定属于肠杆菌属 (*Enterobacter*)。肠杆菌解磷解钾能力较强,促进植物生长,对根系具有较显著的促生效果,这与叶维雁等<sup>[21]</sup>和王琦琦等<sup>[29]</sup>的研究结果相符。Oh 等<sup>[30]</sup>发现 *Enterobacter asburiae* 菌株 HK169 培养液处理的番茄幼苗的根和茎重分别增加了 251% 和 160%,并描述肠杆菌促进植物生长可能的机制是肠杆菌提高了植物的固氮、IAA 产生和 ACC 脱氨水平。但具体过程有待进一步研究。

目前,对植物根际促生菌的研究涉及植物生长的诸多方面,如抑制植物病原体、提高植物抗逆性、促进植物生长,进而减少化肥的使用<sup>[31]</sup>。肠杆菌在植物促生方面应用广泛,其促生效果取决于肠杆菌在土壤中的生存能力、在接种作物上的定殖能力、与土壤中本地菌群的互作能力以及环境因子等诸多因素<sup>[32]</sup>。本研究对兰州唐古特白刺根际细菌进行分离与鉴定,证明其具备促进植株生长发育的潜能,将来可作为功能菌株应用于农作物生产栽培,为开发相关微生物制剂的研究奠定一定基础。

## 参考文献

- [1] 侯贻菊, 吴晓悦, 张喜, 崔迎春, 谢涛. 林木根际土壤研究进展. 贵州林业科技, 2019, 47(4): 39–45.  
Hou YJ, Wu XY, Zhang X, Cui YC, Xie T. The research progress of rhizosphere soil of forest trees. *Guizhou Forestry Science and Technology*, 2019, 47(4): 39–45. (in Chinese)
- [2] 刘涛, 刁治民, 祁永青, 高晓杰. 根际微生物及对植物生长效应的初步研究. 青海草业, 2008, 17(4): 41–44, 47.  
Liu T, Diao ZM, Qi YQ, Gao XJ. The primary advances in rhizosphere microbiology. *Qinghai Prataculture*, 2008, 17(4): 41–44, 47. (in Chinese)
- [3] 郭凤仙, 刘越, 唐丽, 陈川川, 裴丹宁. 药用植物根际微生物研究现状与展望. 中国农业科技导报, 2017, 19(5): 12–21.  
Guo FX, Liu Y, Tang L, Chen CC, Pei DN. Research status and prospect on rhizosphere microbiome of medicinal plants. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2017, 19(5): 12–21. (in Chinese)
- [4] 麦靖雯, 黎瑞君, 张巨明. 植物根际促生菌研究综述. 现代农业科技, 2018(12): 179–180, 183.  
Mai JW, Li RJ, Zhang JM. Research summary on plant growth promoting rhizobacteria. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2018(12): 179–180, 183. (in Chinese)
- [5] Islam S, Akanda AM, Prova A, Islam MT, Hossain MM. Isolation and identification of plant growth promoting rhizobacteria from cucumber rhizosphere and their effect on plant growth promotion and disease suppression. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 6: 1360.
- [6] Ayyaz K, Zaheer A, Rasul G, Mirza MS. Isolation and identification by 16S rRNA gene sequence analysis of plant growth-promoting azospirilla from the rhizosphere of wheat. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2016, 47(3): 542–550.
- [7] Lorena DRC, Santoro MV, Nieves F, Giordano W, Banchio E. Increase of secondary metabolite content in marigold by inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. *Applied Soil Ecology*, 2013, 70(1): 16–22.
- [8] 李珍, 李毅, 苏世平, 种培芳, 李佩佩. 唐古特白刺抗旱优良家系早期选择研究. 干旱区研究, 2020, 37(5): 1301–1309.  
Li Z, Li Y, Su SP, Chong PF, Li PP. Early selection of superior families with high drought resistance in *Nitraria tangutorum*. *Arid Zone Research*, 2020, 37(5): 1301–1309. (in Chinese)

- [9] 刘峰, 杨静慧, 左凤月, 王丹丹, 刘艳军, 张越. 低温层积和预处理对白刺种子萌发的影响. *北方园艺*, 2013(11): 69–71.  
Liu Y, Yang JH, Zuo FY, Wang DD, Liu YJ, Zhang Y. Effect of low temperature layer deposition and pretreatment on seed germination of *Nitraria* L.. *Northern Horticulture*, 2013(11): 69–71. (in Chinese)
- [10] 赵艳婷. 荒漠植物根际细菌对植物抗逆性的影响. 兰州大学硕士学位论文, 2017.
- [11] 杨睿, 李娟, 龙健, 廖洪凯, 王显, 李宜蓉. 贵州喀斯特山区不同种植年限花椒根际土壤细菌群落结构特征研究. *生态环境学报*, 2021, 30(1): 81–91.  
Yang R, Li J, Long J, Liao HK, Wang X, Li YR. Structural characteristics of bacterial community in rhizosphere soil of *Zanthoxylum bungeamun* in different planting years in Karst areas of Guizhou. *Ecology and Environmental Sciences*, 2021, 30(1): 81–91. (in Chinese)
- [12] 杨城, 姚善泾, 杨志坚, 肖金星, 郑刚. 一株产酸性蛋白酶菌株的筛选、鉴定及发酵条件优化. *农业生物技术学报*, 2019, 27(2): 371–380.  
Yang C, Yao SJ, Yang ZJ, Xiao JX, Zheng G. Screening, identification and fermentation optimization of an acid protease strain. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2019, 27(2): 371–380. (in Chinese)
- [13] 吕睿, 贾凤安, 刘晨, 胡婷, 甄丽莎. 无机磷降解菌株的分离、鉴定及解磷能力. *江苏农业科学*, 2017, 45(20): 295–298.  
Lü R, Jia FA, Liu C, Hu T, Zhen LS. Isolation, identification and phosphorus solubilization ability of inorganic phosphorus degrading strain. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2017, 45(20): 295–298. (in Chinese)
- [14] 王勇, 陈燕琼, 温书恒, 陈希唐, 李晓蕾. 一株溶磷解钾菌的分离筛选与鉴定. *安徽农业科学*, 2019, 47(10): 5–9.  
Wang Y, Chen YQ, Wen SH, Chen XT, Li XL. Isolation, screening and identification of a strain of bacteria with ability of phosphate-solubilizing and potassium-solubilizing. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2019, 47(10): 5–9. (in Chinese)
- [15] 郑肖兰, 贺春萍, 李锐, 崔昌华, 马小娟, 梁艳琼. 胡椒根际溶磷真菌的分离、鉴定和生物学测定. *热带作物学报*, 2012, 33(10): 1861–1868.  
Zheng XL, He CP, Li R, Cui CH, Ma XJ, Liang YQ. Isolation, identification and test of biological property of a phosphorus-solubilizing fungus in rhizosphere of *Piper nigrum* L.. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2012, 33(10): 1861–1868. (in Chinese)
- [16] 周涛, 宋方霞, 黄村惠. 克氏原螯虾调理产品中主要腐败菌的分离鉴定. *南京师大学报: 自然科学版*, 2017, 40(4): 103–108, 115.  
Zhou T, Song FX, Huang CH. Isolation and identification of specific spoilage organisms in conditioning crayfish products. *Journal of Nanjing Normal University: Natural Science Edition*, 2017, 40(4): 103–108, 115. (in Chinese)
- [17] 李旭东. 羽毛针禾共生菌的分离鉴定及其植株表型多样性的研究. 石河子大学硕士学位论文, 2019.
- [18] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [19] 康贻军, 程洁, 梅丽娟, 殷士学. 植物根际促生菌的筛选及鉴定. *微生物学报*, 2010, 50(7): 853–861.  
Kang YJ, Cheng J, Mei LJ, Yin SX. Screening and identification of plant growth-promoting rhizobacteria. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(7): 853–861. (in Chinese)
- [20] 黄群, 麻成金, 余佶, 张永康, 吴标. 龙山大头菜乳酸菌的分离与鉴定. *湖南农业科学*, 2009(9): 11–14.  
Huang Q, Ma CJ, Yu J, Zhang YK, Wu B. Isolation and identification of lactic acid bacteria from Longshan sauerkraut. *Hunan Agricultural Sciences*, 2009(9): 11–14. (in Chinese)
- [21] 叶维雁, 吴海波, 刘惠民, 熊智, 王樱潼. 2株番木瓜根际促生菌的解磷解钾作用. *江苏农业科学*, 2017, 45(6): 247–251.  
Ye WY, Wu HB, Liu HM, Xiong Z, Wang YT. Phosphorus and potassium solubilization of two rhizosphere growth-promoting bacteria of papaya. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2017, 45(6): 247–251. (in Chinese)
- [22] 杜疏炆, 杨自强, 韩婷, 秦路平, 胡本祥, 贾敏. 促进拟南芥生长的西红花内生真菌的筛选和研究. *中药材*, 2018, 41(6): 1271–1275.  
Du SY, Yang ZQ, Han T, Qin LP, Hu BX, Jia M. Screening and study on endophytic fungi of *Crocus sativus* L. that promote the growth of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2018, 41(6): 1271–1275. (in Chinese)
- [23] 阳洁, 江院, 王晓甜, 尹坤, 秦莹溪, 谭志远. 几株高效溶磷解钾药用稻内生固氮菌的筛选与鉴定. *农业生物技术学报*, 2016, 24(2): 186–195.  
Yang J, Jiang Y, Wang XT, Yin K, Qin YX, Tan ZY. Screening and identification of several endophytic diazotrophs with high capability of phosphate solubilizing and potassium decomposing from *Oryza*

- officinalis*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2016, 24(2): 186–195. (in Chinese)
- [24] 王玮玉. 致羔羊脑膜炎型大肠杆菌 NMGCF-19 菌株的分离鉴定及全基因组测序分析. 吉林大学硕士学位论文, 2021.
- [25] 朱冬, 陈青林, 丁晶, 王一飞, 崔慧灵, 朱永官. 土壤生态系统中抗生素抗性基因与星球健康: 进展与展望. *中国科学: 生命科学*, 2019, 49(12): 1652–1663. Zhu D, Chen QL, Ding J, Wang YF, Cui HL, Zhu YG. Antibiotic resistance genes in the soil ecosystem and planetary health: progress and prospect. *Scientia Sinica: Vitae*, 2019, 49(12): 1652–1663. (in Chinese)
- [26] 马田田, 彭琦, 陈松, 张洁夫. 核盘菌诱导下甘蓝型油菜防御相关基因表达差异分析. *作物学报*, 2014, 40(3): 416–423. Ma TT, Peng Q, Chen S, Zhang JF. Differential expression of defense related genes in *Brassica napus* infected by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Acta Agronomica Sinica*, 2014, 40(3): 416–423. (in Chinese)
- [27] 吴丽雯, 曾洁, 薛云新, 赵西林. 细菌 Cpx 信号转导系统的功能及调控机制研究进展. *遗传*, 2021, 43(8): 747–757. Wu LW, Zeng J, Xue YX, Zhao XL. Progress on the function and regulatory mechanisms of bacterial Cpx signal transduction system. *Hereditas: Beijing*, 2021, 43(8): 747–757. (in Chinese)
- [28] 申彤, 徐庆阳, 张成林, 谢希贤. *ppc* 基因敲除对大肠杆菌 L-色氨酸发酵的影响. *生物技术通讯*, 2013, 24(6): 801–804. Shen T, Xu QY, Zhang CL, Xie XX. Effects of gene *ppc* disruption on L-tryptophan fermentation by *Escherichia coli*. *Letters in Biotechnology*, 2013, 24(6): 801–804. (in Chinese)
- [29] 王琦琦, 冯丽, 李杨, 褚贵新, 孙燕飞. 新疆木碱蓬 (*Suaeda dendroides*) 根际耐盐促生细菌的筛选及鉴定. *微生物学通报*, 2019, 46(10): 2569–2578. Wang QQ, Feng L, Li Y, Chu GX, Sun YF. Screening and identification of salt-tolerant promoting bacteria of the rhizosphere of *Suaeda dendroides* in Xinjiang. *Microbiology China*, 2019, 46(10): 2569–2578. (in Chinese)
- [30] Oh M, Han JW, Lee CH, Choi GJ, Kim H. Nematicidal and plant growth-promoting activity of *Enterobacter asburiae* HK169: genome analysis provides insight into its biological activities. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2018, 28(6): 968–975.
- [31] Adesemoye AO, Kloepper JW. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 85(1): 1–12.
- [32] Martínez-Viveros O, Jorquera MA, Crowley DE, Gajardo G, Mora ML. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 2010, 10(3): 293–319.

(本文责编 李磊)