

网络出版时间:2019-01-24 16:29

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2019.08.016

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20190124.1628.032.html>

新造地马铃薯根际固氮解磷微生物的 分离与鉴定

王惟帅^{1,2}, 杨世琦^{1,2}, 杨正礼^{1,2}

(1 中国农业科学院 农业环境与可持续发展研究所, 北京 100081; 2 农业部 农业环境与气候变化重点开放实验室, 北京 100081)

【摘要】【目的】揭示马铃薯根际土壤固氮解磷菌类群, 分析其固氮酶活性和溶磷能力, 为利用新造地作物根际促生菌提供依据。【方法】以采自延安市安塞区新造地的马铃薯根际土壤为供试样品, 采用 Ashby 培养基和无机磷培养基分离纯化马铃薯根际固氮解磷菌, 以 16S rDNA 基因分析马铃薯根际微生物类群组成, 以乙炔还原方法测定其固氮酶活性, 以溶菌圈法和钼蓝比色法测定其溶磷能力。【结果】从延安新造地马铃薯根际土壤中分离并筛选到 9 株固氮解磷菌, 经鉴定分别属于假单胞杆菌属(*Pseudomonas*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、节杆菌属(*Paenarthrobacter*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、贪噬菌属(*Variovorax*)、肠杆菌属(*Kosakonia*)和副球菌属(*Paracoccus*)等 8 个属; 9 株固氮解磷菌均具有固氮和溶磷特性, 其固氮酶活性在 11.88~95.08 nmol/h, 其中菌株 N34 的固氮酶活性最高, 且与其他菌株的固氮酶活性差异显著; 9 株固氮解磷菌株溶磷能力存在一定的差异, 溶磷能力为 22.05~54.9 mg/L, 其中菌株 N46 的溶磷能力最好, 7 d 累积溶磷能力达到 54.9 mg/L。【结论】分离纯化得到的 9 株固氮解磷菌均具有一定的固氮解磷能力, 可用于开发马铃薯功能菌肥。

【关键词】 新造地; 固氮解磷微生物; 固氮酶活性; 溶磷能力; 延安

【中图分类号】 S154.38⁺1

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2019)08-0127-07

Isolation and characterization of nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria from potato rhizosphere of reclaimed cropland

WANG Weishuai^{1,2}, YANG Shiqi^{1,2}, YANG Zhengli^{1,2}

(1 Institute of Environment and Sustainable Development in Agriculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 2 Key Laboratory of Agro-Environment and Climate Change, Ministry of Agricultural, Beijing 100081, China)

Abstract: 【Objective】 This study revealed the cultivable bacteria communities in the rhizosphere of potato and analyzed the bacterial capabilities for nitrogen fixation and phosphate solubilization to provide basis for utilizing growth-promoting rhizobacteria in reclaimed cropland plant. 【Method】 The rhizosphere soil of potato was collected from Ansai, Yan'an. Using Ashby and inorganic phosphorus medium, the functional bacteria strains were isolated and purified by the plate spread and streak technique. The 16S rDNA was applied to classify the isolates and reveal the community composition. The nitrogenase activities of strains were analyzed through acetylene reduction assay. Phosphorus solubility was determined by halo zone of dissolving phosphate and molybdenum blue colorimetry. 【Result】 Nine strains of nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing strains were screened from potato rhizosphere of reclaimed cropland in Yanan, and they

【收稿日期】 2018-07-06

【基金项目】 农业部行业专项“研发高效拦截环保材料、高效吸附去除的生物质材料”(2017YFD0800504)

【作者简介】 王惟帅(1987—), 男, 山西应县人, 在读博士, 主要从事环境材料研制与应用研究。E-mail: 15652599123@163.com

【通信作者】 杨正礼(1960—), 男, 山西万荣人, 研究员, 主要从事农业环境污染控制研究。E-mail: yangzhengli@caas.cn

were identified as *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Rhodococcus*, *Paenarthrobacter*, *Bacillus*, *Variovorax*, *Kosakonia*, *Paracoccus*. All strains had the characteristics of nitrogen fixation and phosphorus solution and 11.88—95.08 nmol/h nitrogenase activity. The N34 strain had the highest activity of nitrogenase, which was significantly different from other strains. The phosphorus solubility of the strains was different with the range of 22.05—54.9 mg/L. N46 had the best phosphorus dissolution ability, and the accumulated of phosphorus dissolution ability reached 54.9 mg/L in 7 days. 【Conclusion】 Nine strains with ability of nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing were obtained and they can be used to develop bacterial manure of potato.

Key words: reclaimed cropland; nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria; nitrogenase activity; phosphate solubilizing; Yan'an city

延安属黄河中游丘陵沟壑区,土壤母质疏松,植被覆盖率低,由于长期的不合理开发利用,导致土质退化、水土流失等问题^[1]。自退耕还林、还草措施实施以来,该区域植被覆盖面积明显提高,然而,退耕过度又导致退耕规模超过了人均耕地需求下限,出现了人口与耕地不平衡的局面^[2]。为缓解这一矛盾,延安政府大力开展治沟造地,但在使用机械化里切外垫等方法使新造地面积增长的同时,又致使熟土被压、土壤结构遭到破坏;并且研究发现,新造地农田土壤氮和磷含量、土壤酶活性、微生物丰度等均较低^[3-4]。

氮、磷作为植物生长必需的营养元素,对作物生长具有重要作用,但一般农田土壤中氮、磷的有效供应量很少,通常通过施肥来满足作物生长的需要。然而研究表明,化肥施用量的增加会导致化肥利用率降低;同时,化肥会污染空气、土壤及水体,破坏土壤结构和微生物多样性,还会降低农产品品质等^[5]。因此,利用土著微生物进行固氮解磷,不仅在为作物提供营养物质的同时减少了化肥施用量,而且还可以提高作物产量,改善作物品质,调节作物生长,改良土壤环境等^[6-10]。

马铃薯是延安地区主要的粮食作物之一,能够适应新造地土壤类型,随着种植面积不断扩大,其已成为该地区农业经济发展的重要推动力,在提升粮食产量和增加农民收入方面起到积极作用^[11]。因此,本研究从新造地马铃薯根际土壤中分离固氮解磷微生物,并从中筛选固氮解磷特性较好的有益功能菌株,以期为延安新造地马铃薯微生物菌肥的研制提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 土壤样品来源与处理

土壤样品采自延安

市安塞区南沟村(109°12'12"—109°22'12" E, 36°41'24"—36°46'12" N),海拔 1 219 m,年降水量 500~550 mm;土壤以黄绵土为主,质地为粉沙,抗侵蚀能力差。采用蛇型采样法,选 15 个采样点,每个采样点取马铃薯根际土壤样品 500 g,混匀后,采用四分法留取约 1 000 g 土样,将土样保留于自封袋中并运回实验室以分离固氮解磷菌。

1.1.2 培养基 (1)Ashby 无氮培养基。甘露醇 10 g, KH₂PO₄ 0.2 g, MgSO₄ 0.2 g, NaCl 0.2 g, K₂SO₄ 0.3 g, CaCO₃ 5 g, 琼脂 18 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0~7.5, 121 ℃ 灭菌 30 min。

(2)无机磷培养基。NaCl 0.3 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.3 g, KCl 0.3 g, (NH₄)₂SO₄ 0.5 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.003 g, MnSO₄ · 4H₂O 0.003 g, Ca₃(PO₄)₂ 5.0 g, 葡萄糖 10 g, 琼脂 18 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0~7.5, 121 ℃ 灭菌 30 min;

(3)LB 培养基。蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 10 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0~7.2, 121 ℃ 灭菌 30 min。

1.2 固氮解磷菌的分离与纯化

称取 10 g 新鲜土壤样品,置于 250 mL 三角瓶中,加入 90 mL 蒸馏水,30 ℃、150 r/min 振荡 40 min,静置后得到悬浮液。采用稀释法^[12]将该悬浮液稀释至不同浓度,取 0.1 mL 稀释液均匀涂布在 Ashby 无氮培养基上,于 30 ℃恒温培养箱中倒置培养 24 h,选择不同类型的单个菌落,经平板多次纯化,纯化后的菌落接种于无机磷培养基中,通过溶菌圈法^[13]筛选固氮解磷菌,纯化得到的菌株保存于 4 ℃冰箱中备用。

1.3 固氮解磷菌的形态观察与鉴定

1.3.1 形态学特征 将筛选出来的菌株划线接种至 LB 平板上,30 ℃培养 24 h,观察其在平板上的菌落生长状况、颜色、透明度、湿润度、光滑度等^[12]。

1.3.2 16S rDNA 序列分析 利用 SDS-CTAB 法^[14]提取各菌株基因组总 DNA,采用细菌 16S rDNA 通用引物 27F(5'-AGAGTTTGTATCCTGGCT-CAG-3')和 1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGAC-TT-3')进行 16S rDNA 的 PCR 扩增,扩增片段长度为 1.5 kb。PCR 反应体系为 25 μL:10×PCR Buffer 2.5 μL,dNTPs (10 mmol/L) 0.5 μL,上、下游引物(50 μmol/L)各 0.5 μL,模板 DNA(40 ng/μL) 0.5 μL,Taq DNA 聚合酶(3 U/μL) 0.5 μL,无菌 ddH₂O 20 μL。PCR 反应条件:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 30 s,52 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 10 min,共 30 个循环。PCR 产物经 0.7%琼脂糖凝胶电泳后回收纯化,送北京君诺德生物技术有限公司测序。将获得的 16S rDNA 序列在 NCBI 数据库中进行比对,BLAST 搜索同源序列,采用 MEGA 5.0 软件,以 Neighbor-joining 法^[14]建立固氮解磷菌 16S rDNA 系统发育树。

1.4 固氮解磷菌固氮解磷能力的测定

1.4.1 固氮能力测定 采用乙炔还原法^[12]测定固氮解磷菌的固氮能力。挑取 LB 斜面培养基上的单菌落接种到 Ashby 无氮培养基上,28 ℃活化;选择长势良好的菌株,挑取菌落大小相近的单菌落接种于装有 6 mL Ashby 液体培养基的西林瓶中,西林瓶体积为 10 mL,压盖密封,30 ℃、150 r/min 培养 24 h。在无菌条件下将体积分数 10%的空气抽出,注入体积分数 10%的高纯乙炔。30 ℃、150 r/min 培养 48 h,用气相色谱仪测定乙烯的生成量。按以下公式计算其固氮酶活性:

$$ARA=(V_{st} \times C_{st} \times A_{sa} \times V_{tu})/(V_{sa} \times A_{st} \times H \times 22.4)。$$

式中:ARA 为固氮酶活性,nmol/h;V_{st}为标准乙烯

进样体积,mL;C_{st}为标准乙烯浓度,nmol/mL;A_{sa}为乙烯峰面积,cm²;V_{tu}为西林瓶体积,mL;V_{sa}表示样品进样体积,mL;A_{st}表示标准乙烯峰面积,cm²;H 表示培养时间,h。

1.4.2 解磷能力测定 (1)将分离纯化得到的固氮解磷菌接转到无机磷固体培养基上,28 ℃恒温培养箱中培养 4 d,用游标卡尺测量菌落直径(*d*)和透明圈直径(*D*),用 *D/d* 值表征其溶磷能力,值越大表示溶磷能力越强^[13]。(2)将供试菌株接种于已灭过菌的装有 30 mL 无机磷液体培养基的三角瓶中,30 ℃、150 r/min 振荡培养,分别于培养 1,3,5,7 d 时取样,将样液 4 ℃、10 000 r/min 离心 10 min,取上清液采用钼蓝比色法^[9]测定有效磷含量。设不接种菌株为空白对照(CK)。

1.5 数据处理与分析

利用 Excel 2010 软件进行数据整理和制图,采用 SPSS 16.0 统计软件对数据进行方差分析和差异显著性检验,采用 MEGA 5.0 软件建立固氮解磷菌 16S rDNA 的系统发育树。

2 结果与分析

2.1 固氮解磷菌的分离及其形态学特征

通过土壤悬浮液富集培养并进行梯度稀释培养纯化后,观察菌落形态的差异,从土样中共分离出具有固氮活性的菌株 37 株,将这 37 株菌株分别接种到无机磷培养基中培养,通过溶菌圈确定具有解磷功能的菌株,进一步利用固氮解磷交叉试验最终筛选得到 9 株菌株,其皆具有固氮解磷功能,且菌株生长良好,各菌株的菌落形态及生长状况如表 1 和图 1 所示。

表 1 从马铃薯根际分离的 9 株固氮解磷菌的生长状况和菌落形态

Table 1 Growth and colonial morphology of 9 nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria isolated from potato rhizosphere

菌株 Strain	菌落形态 Colonial morphology	生长状况 Growth situation
N31	白色至透明,黏稠,边缘整齐,凸起 White to transparent,viscous,regular edges,protuberant	++++
N33	白色,干燥,散点状,扁平 White,dry,scattered point,flat	++++
N34	白色,干燥,边缘锯齿,扁平 White,dry,jagged edges,flat	+++
N46	黄色,黏稠,边缘整齐,微凸起 Yellow,viscous,regular edges,embossment	++++
P33	白色至透明,黏稠,边缘整齐,微凸起 White to transparent,viscous,regular edges,embossment	++++
P34	透明,黏稠,边缘整齐,凸起 Transparent,viscous,regular edges,protuberant	++++
P52	淡黄色,黏稠,边缘整齐,凸起 Faint yellow,viscous,regular edges,protuberant	+++
OP1	白色,黏稠,边缘整齐,凸起 White,viscous,regular edges,protuberant	+++
OP8	乳白到透明,黏稠,边缘整齐,凸起 Milky to transparent,viscous,regular edges,protuberant	++++

注:“++++”代表长势旺盛(菌落浓、厚、密),“+++”代表长势良好(满足菌落浓、厚、密中的两条)。
Notes:“++++” means growing vigorously(Dense,thick and numerous colony),“+++” means growing well(Meeting the above two).

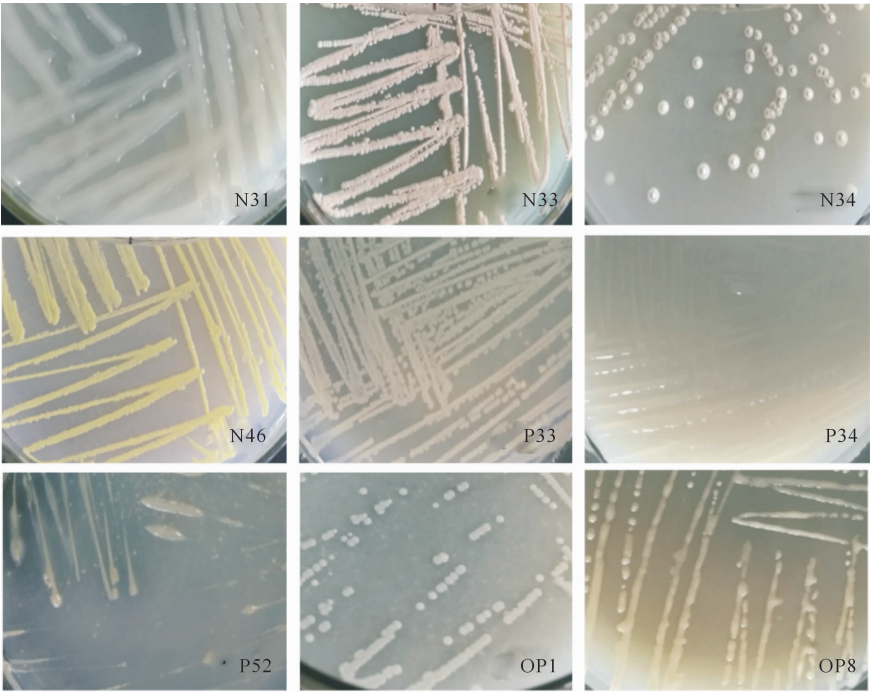


图 1 从马铃薯根际分离的 9 株固氮解磷菌的菌落形态

Fig. 1 Colonial morphology of 9 nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria isolated from potato rhizosphere

2.2 固氮解磷菌的 16S rDNA 序列同源性分析

将 9 株固氮解磷菌的 16S rDNA 基因测序后输入 NCBI 数据库进行 BLAST 比对,结果(表 2)显示,9 株菌分属于不同的菌属,其中与 N31 基因相似性最高的菌株为假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* GBAP5(100%),菌株 N33 与克雷伯氏菌 *Klebsiella pneumoniae* CRKP-1215 的基因相似性最高(100%),N34 与红球菌 *Rhodococcus erythropolis* HX-2(100%)相似性最高,N46 与节杆菌 *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* BF-R19 相似性最高(100%),P33 与芽孢杆菌 *Bacillus safensis* XQ56 的基因相似度最高(100%); P34 与贪噬菌 *Variovorax* sp. 553 相似度最高(99%),P52 与肠杆菌 *Kosakonia cowanii* P4 菌株的基因相似度最高(99%),OP1 与副球菌 *Paracoccus* sp. ENF1 相似

度最高(99%),OP8 与芽孢杆菌 *Bacillus aryabhat-tai* FORT25 相似度最高(99%)。

采用邻接法构建 9 株固氮解磷菌及其最高相似性菌株 16S rDNA 基因序列的系统进化发育树,结果(图 2)显示,9 株固氮解磷菌与其 16S rDNA 基因序列最高相似性菌株位于同一分支,说明它们具有高度的同源性。

综上所述,本试验从延安新造地马铃薯根际土壤分离得到 9 株具有固氮解磷功效的菌株,分别归属于假单胞杆菌属(*Pseudomonas*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、节杆菌属(*Paenarthrobacter*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、贪噬菌属(*Variovorax*)、肠杆菌属(*Kosakonia*)和副球菌属(*Paracoccus*),其中菌株 P33 和 OP8 均属于芽孢杆菌属。

表 2 从马铃薯根际分离的 9 株固氮解磷菌的鉴定结果

Table 2 Identification of 9 nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria isolated from potato rhizosphere

菌株 Strain	登录号 Login number	菌株鉴定 Strain identification	菌株 Strain	登录号 Login number	菌株鉴定 Strain identification
N31	MH725914	假单胞杆菌 <i>Pseudomonas</i>	P34	MH734754	贪噬菌 <i>Variovorax</i>
N33	MH734750	克雷伯氏菌 <i>Klebsiella</i>	P52	MH734755	肠杆菌 <i>Kosakonia</i>
N34	MH734751	红球菌 <i>Rhodococcus</i>	OP1	MH734756	副球菌 <i>Paracoccus</i>
N46	MH734752	节杆菌 <i>Paenarthrobacter</i>	OP8	MH734757	芽孢杆菌 <i>Bacillus</i>
P33	MH734753	芽孢杆菌 <i>Bacillus</i>			

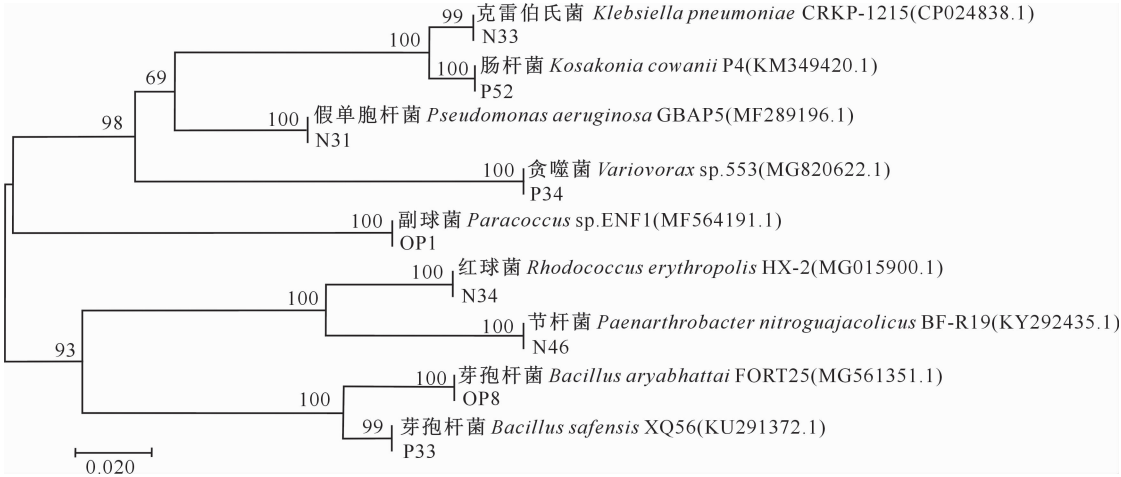


图 2 从马铃薯根际分离的 9 株固氮解磷菌的 16S rDNA 系统发育树

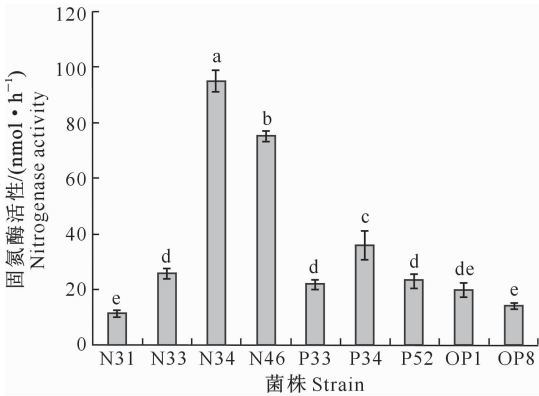
Fig. 2 Phylogenetic tree established based on 16S rDNA sequences of 9 nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria isolated from potato rhizosphere

2.3 固氮解磷菌的固氮酶活性

图 3 显示,通过筛选得到的 9 株菌均具有固氮功能,固氮酶活性为 11.88~95.08 nmol/h,且各菌株的固氮酶活性存在差异,其中菌株 N34 的固氮酶活性最高,达到 95.08 nmol/h,是菌株 N31 的 8 倍;N46 的固氮酶活性次之,为 75.58 nmol/h,且菌株 N34 和 N46 的固氮酶活性与其他菌株差异显著;菌株 N31 与 OP8 的固氮酶活性相当,N33、P33、P52 和 OP1 之间的固氮能力均没有显著差异。

2.4 固氮解磷菌的溶磷特性

图 4 表明,9 株菌在无机磷培养基中培养 4 d 后,其 D/d (透明圈直径/菌落直径) 值为 1.12~1.87,其中菌株 N46 的 D/d 值最大,且与其他菌株的溶磷能力差异显著;N34 与 OP8 的溶磷能力相当,其余各菌株间的溶磷能力均无显著差异。这说明 9 株固氮解磷菌均具有溶解不溶性磷的能力,且菌株之间存在差异。



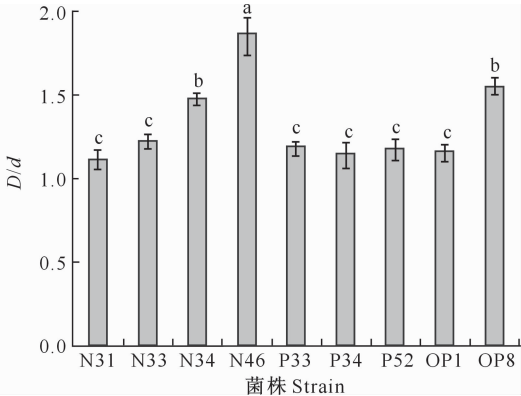
图柱上标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同

Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$). The same below

图 3 从马铃薯根际分离的 9 株固氮解磷菌的固氮酶活性

Fig. 3 Nitrogenase activity of 9 nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria isolated from potato rhizosphere

采用钼蓝比色法^[9]对 9 株菌的溶磷能力进行定量测定,结果(图 5)表明,9 株菌 7 d 内的溶磷量呈持续上升趋势,其中菌株 N46 的溶磷能力最好,7 d 的累积有效磷含量达到 54.9 mg/L,与其他菌种差



“ D/d ”表示“透明圈直径/菌落直径”

“ D/d ” means “transparent circle diameter/colony diameter”

图 4 从马铃薯根际分离的 9 株固氮解磷菌的溶磷能力

Fig. 4 Phosphate solubilizing ability of 9 nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria isolated from potato rhizosphere

异显著;菌株 N34 与 OP8 的溶磷能力相当,累积有效磷含量达到 48 mg/L;N33、P33 和 OP1 的溶磷能力基本一致,累积有效磷含量超过 37 mg/L;与其他菌种相比,菌株 N31 和 P34 的溶磷能力较差。

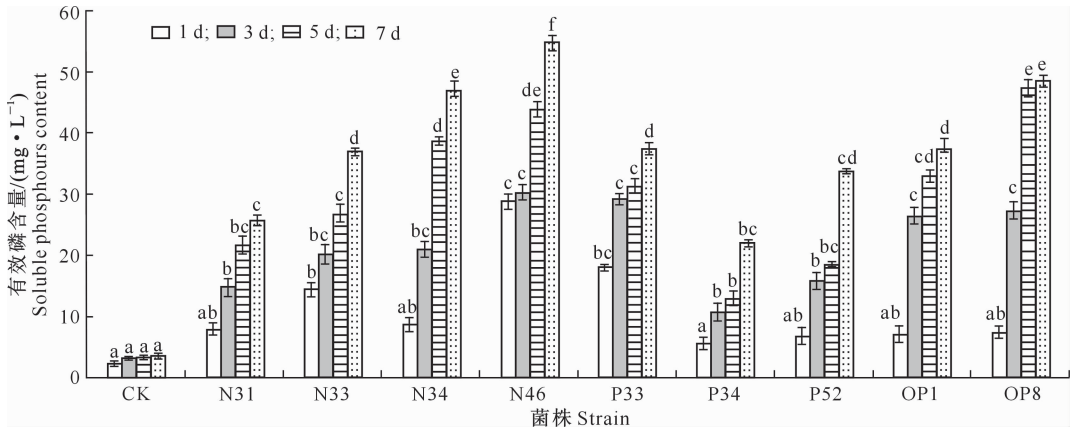


图 5 从马铃薯根际分离的 9 株固氮解磷菌的有效磷含量

Fig. 5 Phosphorus solubilization capacity of 9 nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria isolated from potato rhizosphere

3 讨 论

已有研究发现,从小麦、玉米、马铃薯等作物根际分离的固氮菌中,芽孢杆菌属、节杆菌属和假单胞杆菌属为农作物和经济作物根际常见的功能菌^[15-18]。牛艳芳等^[19]在白桦根际土壤中分离得到固氮菌的不同类群,并通过解磷试验发现假单胞杆菌属和节杆菌属的微生物具备解磷特性。李琼洁等^[20]从玉米根际分离得到一株具有较高固氮活性的菌株,该菌株还具有较好的泌铵能力,经鉴定,该菌株属于肠杆菌属。张磊^[21]从马铃薯根际分离得到固氮菌,经鉴定为节杆菌属、假单胞菌属等优势种群,且具有良好的解磷功能。姜瑛等^[12]从灰潮土中分离得到一株固氮菌,经固氮解磷试验发现,该菌株具有较强的固氮解磷功能,且可以促进花生对营养元素的吸收,经鉴定该菌株属于贪噬菌属。门惠芹等^[22]从枸杞根际分离纯化得到固氮菌,且通过试验验证接种该菌株可以促进植株的生长,鉴定发现该菌株为红球菌属。本研究从延安新造地马铃薯根际土壤中分离得到 9 株固氮解磷菌,经 16S rDNA 系统发育分析,初步鉴定其属于假单胞杆菌属(*Pseudomonas*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、节杆菌属(*Paenarthrobacter*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、贪噬菌属(*Variovorax*)、肠杆菌属(*Kosakonia*)和副球菌属(*Paracoccus*)。

固氮解磷菌在土壤中会直接或间接影响土壤肥力和地上作物的生长,在丰富土壤微生物多样性的同时,对土壤修复和作物生长起到积极的促进作用。此外,固氮解磷菌固定的氮素除供自身生长发育外,部分以无机状态或简单的有机氮化物分泌到体外;

同时,固氮解磷微生物通过分泌有机酸、质子和多糖等溶解不溶性磷,以供植物吸收利用,从而减少化肥的使用量,功能菌的这种特性使其在生产应用中具有重要意义^[23]。

在自然状态下,马铃薯根际也会存在固氮解磷菌,但与庞大的根际微生物系统相比,固氮解磷菌的种群数量相对较少,固氮量也很小;同时,新造地土壤微生物数量少,生物活性低,土壤肥力和土壤结构稳定性较差,对这类土壤进行修复的最佳方式就是施用菌剂,输入活性微生物。研究表明,将高效功能菌剂应用于生荒地后,土壤生物活性得以显著改善,对于修复生荒地土壤生态具有重要意义^[24-26]。本研究中分离筛选的固氮解磷微生物,种类丰富,打破了传统固肥菌种单一的现状,9 株菌种除具有固氮活性外,还具有溶磷功能,对于开发专用固氮解磷菌肥具有重大意义。通过此种方式筛选出的菌种,与特定作物根系互作性好,对当地土壤环境的适应性也更强,将分离出的固氮解磷微生物以回接的方式施于土壤中,可以达到增产和改善土壤环境的效果。

4 结 论

本研究从延安新造地马铃薯根际土壤中分离纯化得到 9 株固氮解磷菌,均具有固氮和解磷功能,其中固氮能力最好的菌株为 N34,固氮酶活性为 95.08 nmol/h;解磷能力最好的菌株为 N46,7 d 累计溶磷量达到 54.9 mg/L。

[参考文献]

[1] Chen Y, Wang K, Lin Y, et al. Balancing green and grain trade [J]. Nature Geoscience, 2015, 8(10): 1-3.
[2] Lü Y, Fu B, Feng X, et al. A policy-driven large scale ecological

- restoration: quantifying ecosystem services changes in the Loess Plateau of China [J]. PLoS One, 2012, 7(2): 31782.
- [3] 陈怡平, 骆世明, 李凤民, 等. 对延安黄土沟壑区农业可持续发展的建议 [J]. 地球环境学报, 2015, 6(5): 265-269.
Chen Y P, Luo S M, Li F M, et al. Proposals on the sustainable development of agriculture in Yan'an gully regions [J]. Journal of Earth Environment, 2015, 6(5): 265-269.
- [4] 刘铁辉. 陕西省子长县沟道土地的土壤肥力评价 [J]. 水土保持通报, 2013, 7(4): 26-29.
Liu T H. Evaluation of soil fertility under different landuse in valleys and gullies in Zichang county of Shaanxi province [J]. Bulletin of Soil and Water Conservation, 2013, 7(4): 26-29.
- [5] 姚拓. 促进植物生长菌的研究进展 [J]. 草原与草坪, 2002(4): 1-5.
Yao T. Research progress of plant growth promoting rhizobacteria [J]. Grassland and Turf, 2002(4): 1-5.
- [6] Bashan Y, de-Bashan L E, Prabhu S, et al. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998—2013) [J]. Plant and Soil, 2014, 378(1/2): 1-33.
- [7] Behera B, Singdevsachan S, Mishra R, et al. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove: a review [J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2014, 3(2): 97-110.
- [8] Khan M S, Ahmad E, Zaidi A, et al. Functional aspect of phosphate-solubilizing bacteria: importance in crop production [M]. Berlin Heidelberg: Springer, 2013: 237-263.
- [9] Sharma S B, Sayyed R Z, Trivedi M H, et al. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils [J]. Springer Plus, 2013, 2(1): 587.
- [10] Swarnalakshmi K, Prasanna R, Kumar A, et al. Evaluating the influence of novel cyanobacterial biofilmed biofertilizers on soil fertility and plant nutrition in wheat [J]. European Journal of Soil Biology, 2013, 55: 107-116.
- [11] 任晓虹, 刘英, 王斌. 几个不同马铃薯品种在延安北部的试验研究 [J]. 陕西农业科学, 2016, 62(7): 14-17.
Ren X H, Liu Y, Wang B. Experimental study on several different potato varieties in northern of Yanan [J]. Shaanxi Journal of Agricultural Sciences, 2016, 62(7): 14-17.
- [12] 姜瑛, 吴越, 王国文, 等. 一株固氮解磷菌的筛选鉴定及其对花生的促生作用研究 [J]. 土壤, 2015, 47(4): 698-703.
Jiang Y, Wu Y, Wang G W, et al. Plant growth-promoting bacterium variororax sp. JX14 from calcareous alluvial soil: characterization and growth promotion on peanuts [J]. Soil, 2015, 47(4): 698-703.
- [13] 邵锴, 邱业先, 徐婧. 高效溶磷菌的筛选、鉴定及其溶磷特性 [J]. 江苏农业科学, 2017, 45(8): 253-257.
Shao K, Qiu Y X, Xu J. Selection and identification of efficient phosphorus solubilizing strain and phosphorus solubilizing characteristics [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2017, 45(8): 253-257.
- [14] Xia X, Bollinger J, Ogram A. Molecular genetic analysis of the response of three soil microbial communities to the application of 2,4-D [J]. Molecular Ecology, 2008, 4(1): 17-28.
- [15] 张磊, 袁梅, 孙建光, 等. 马铃薯内生固氮菌的分离及其促生特性研究 [J]. 中国土壤与肥料, 2016(6): 139-145.
Zhang L, Yuan M, Sun J G, et al. Isolation and functional characterizations of potato endogenous nitrogen-fixing bacteria [J]. Soils and Fertilizers Sciences in China, 2016(6): 139-145.
- [16] 孙建光, 罗琼, 高森, 等. 小麦、水稻、玉米、白菜、芹菜内生固氮菌及其系统发育 [J]. 中国农业科学, 2012, 45(7): 1303-1317.
Sun J G, Luo Q, Gao M, et al. Isolation and phylogeny of nitrogen-fixing endophytic bacteria in wheat, rice, maize, Chinese cabbage and celery [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2012, 45(7): 1303-1317.
- [17] Singh R K, Mishra R P, Jaiswal H K, et al. Isolation and identification of natural endophytic rhizobia from rice (*Oryza sativa* L.) through rDNA PCR-RFLP and sequence analysis [J]. Curr Microbiol, 2006, 52(5): 345-349.
- [18] Peng G, Zhang W, Luo H, et al. *Enterobacter oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the wild rice species *Oryza latifolia* [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59: 1650-1655.
- [19] 牛艳芳, 闫伟, 陈立红. 阿尔山白桦根际土壤固氮菌多样性及特性 [J]. 东北林业大学学报, 2017, 45(5): 101-105.
Niu Y F, Yan W, Chen L H. Diversity and characterization of nitrogen-fixing bacteria in betula platyphylla rhizosphere in Arxan [J]. Journal of Northeast Forestry University, 2017, 45(5): 101-105.
- [20] 李琼洁, 程杰杰, 孙帅欣, 等. 玉米联合固氮菌 *Kosakonia radicincitans* GXGL-4A 的分离鉴定与固氮特性研究 [J]. 微生物学通报, 2016, 43(11): 2456-2463.
Li Q J, Cheng J J, Sun S X, et al. Isolation, identification and characterization of associative nitrogen-fixing endophytic bacterium *Kosakonia radicincitans* GXGL-4A in maize [J]. Microbiology Bulletin, 2016, 43(11): 2456-2463.
- [21] 张磊. 马铃薯根际细菌群落分析及多功能固氮菌筛选 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2016.
Zhang L. Analysis of potato rhizosphere bacterial community and multi-functional nitrogen fixation bacteria screening [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2016.
- [22] 门惠芹, 王亚军, 安巍, 等. 固氮菌对枸杞生长发育的影响 [J]. 北方园艺, 2015(15): 150-152.
Men H Q, Wang Y J, An W, et al. Discussions on the key problems about *Codonopsis lanceolata* interplanting [J]. Northern Horticulture, 2015(15): 150-152.
- [23] Gupta G, Panwar J, Jha P N. Natural occurrence of *Pseudomonas aeruginosa*, a dominant cultivable diazotrophic endophytic bacterium colonizing *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. [J]. Applied Soil Ecology, 2013, 64: 252-261.

北农林科技大学学报(自然科学版),2014,42(1):175-182.

Li X Y,Yang Q K,Wang C M. Effects of topographic factors on soil erosion in southern Jiangxi [J]. Journal of Northwest A&F University(Natural Science Edition),2014,42(1):175-182.

[19] 陈志明. 论中国地貌图的研制原则、内容与方法;以 1 : 4 000 000 全国地貌图为例 [J]. 地理学报,1993,48(2):105-113.

Chen Z M. On the principle, contents and methods used to compile the Chinese geomorphological maps; taking the 1 : 4 000 000 Chinese geomorphological map as an example [J]. Acta Geographica Sinica,1993,48(2):105-113.

[20] 周成虎,程维明,钱金凯,等. 中国陆地 1 : 100 万数字地貌分类体系研究 [J]. 地球信息科学学报,2009,11(6):707-724.

Zhou C H,Cheng W M,Qian J K,et al. Research on the Classification system of digital and geomorphology of 1 : 1 000 000 in China [J]. Journal of Geo-information Science, 2009,11(6):707-724.

[21] 陈学兄,常庆瑞,郭碧云,等. 基于 SRTM DEM 数据的中国地形起伏度分析研究 [J]. 应用基础与工程科学学报,2013,21(4):670-678.

Chen X X,Chang Q R,Guo B Y,et al. Analytical study of the relief amplitude in China based on SRTM DEM data [J]. Journal of Basic Science and Engineering,2013,21(4):670-678.

[22] Hani A F M,Sathyamoorthy D,Asirvadam V S. Computing surface roughness of individual cells of digital elevation models via multiscale analysis [J]. Computers & Geosciences,2012,43(6):137-146.

[23] Booth A M,Roering J J,Perron J T. Automated landslide mapping using spectral analysis and high-resolution topographic data;Puget Sound lowlands, Washington, and Portland Hills, Oregon [J]. Geomorphology,2009,109(3):132-147.

[24] Hani A F M,Sathyamoorthy D,Asirvadam V S. A method for computation of surface roughness of digital elevation model terrains via multiscale analysis [J]. Computers & Geosciences,2011,37(2):177-192.

(上接第 116 页)

[31] 李 平,王艳辉,马润宇. 碱提山茱萸多糖的理化性质及抗氧化活性研究 [J]. 中草药,2003,34(11):973-976.

Li P,Wang Y H,Ma R Y. Study on physiochemical characteristic and antioxidation activity of polysaccharide extracted with sodium hydroxide from fruit of *Cornus officinalis* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs,2003,34(11):973-976.

[32] 苗明三,杨 云. 山茱萸多糖抗氧化作用研究 [J]. 河南中医,2002,22(1):66-67.

Miao M S,Yang Y. Research on the antioxidant effect of polysaccharide from *Cornus officinalis* [J]. Henan Traditional Chinese Medicine,2002,22(1):66-67.

[33] 欧 芹,王雅丽,魏晓东,等. 山茱萸多糖对 HDF 细胞 β -半乳糖苷酶及 P16 表达的影响 [J]. 中国老年学杂志,2007,27(4):325-327.

Ou Q,Wang Y L,Wei X D,et al. Effect of *Fructus corni* polysaccharides on the activity of β -galactosidase and the expression of P16 [J]. Chinese Journal of Gerontology,2007,27(4):325-327.

[34] 张慧丹,孙 洁,欧 芹,等. 衰老 HDF 细胞 DNA 损伤与 HSP 70 mRNA 表达及山茱萸多糖的作用 [J]. 中国老年学杂志,2009,29(16):2007-2009.

Zhang H D,Sun J,Ou Q,et al. *Fructus corni* polysaccharides against DNA damage and effect on the expression of heat shock protein 70 mRNA [J]. Chinese Journal of Gerontology, 2009,29(16):2007-2009.

(上接第 133 页)

[24] 刘思宇. EM 菌肥对黄瓜根际土壤酶活性的影响 [J]. 中国瓜菜,2016,29(1):11-13.

Liu S Y. Effects of EM fertilizer on rhizosphere soil enzyme activity in cucumber [J]. China Cucurbits and Vegetables, 2016,29(1):11-13.

[25] Saleem M,Arshad M,Hussain S,et al. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology,2007,34:635-648.

[26] Arshad M,Saleem M,Hussain S. Perspectives of bacterial ACC deaminase in phytoremediation [J]. Trends Biotechnology, 2007,25(8):356-362.