学校编码：10384　　密级 _____
学号：33120141151666

厦门大学

硕 士 学 位 论 文

海马齿根际微生物群落结构及其根系植物促生菌的特性研究

Microbial Community and Plant Growth-Promoting Bacteria in Rhizosphere of Halophyte *Sesuvium portulacastrum* L.

李 华

指导教师姓名：骆苑蓉 助理教授

专 业 名 称：生　　态　　学

论文提交日期：２０１７年　　月

论文答辩时间：２０１７年　　月

2017年　　月

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为 海洋环境与恢复环境学 ）课题（组）的研究成果，获得 海洋环境与恢复环境学 课题（组）经费或实验室的资助，在（ 海洋环境学 ）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

本人声明该学术论文不存在剽窃、抄袭等学术不端行为，并愿意承担因学术不端行为所带来的一切后果和法律责任

声明人 （签名）：

指导老师（签名）：

2017年 12月 14日

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ~~√~~ ）1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于~~2019~~年~~12~~月~~16~~日解密，解密后适用上述授权。李琴

（ √ ）2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：李琴

2017年12月14日

厦门大学博硕士论文摘要库

目 录

摘要 I

Abstract III

第一章 绪论 1

1.1 植物促生长菌的概述 1

1.1.1 植物促生菌 1

1.1.2 植物促生菌的促生长机制 2

1.1.3 铁载体产生菌 3

1.1.4 ACC 脱氨酶产生菌 6

1.2 海马齿在污染水体植物修复中的应用 9

1.2.1 污染水体的植物修复 9

1.2.2 生态浮床 10

1.2.3 生态浮床修复植物海马齿 11

1.3 微生物分子生态学研究 13

1.3.1 16S rRNA 基因分析技术 14

1.3.2 高通量测序 15

1.4 本论文研究的目的及意义 16

第二章 海马齿根系内共生菌及根际细菌群落结构调查 19

2.1 材料和方法 19

2.1.1 样品来源 19

2.1.2 实验材料 20

2.1.3 基本方法 21

2.2 结果与分析 27

2.2.1 环境参数的测定 27

厦门大学博硕士论文摘要库

2.2.2 细菌数量测定 28
2.2.3 可培养菌株的分离及鉴定 30
2.2.4 宏基因组高通量测序 31
2.3 讨论 41
2.3.1 植物内共生及根际微生物 41
2.3.2 海马齿根系内共生菌和根际微生物群落组成 43
2.4 小结 49
第三章 铁载体产生菌和 ACC 脱氨酶产生菌的筛选 51
3.1 材料和方法 51
3.1.1 样品来源 51
3.1.2 实验材料 51
3.1.3 基本方法 54
3.2 实验结果与分析 57
3.2.1 铁载体产生菌的筛选及产铁载体能力的测定 57
3.2.2 ACC 脱氨酶产生菌的筛选及其活性的测定 59
3.2.3 菌株产铁载体能力与铁离子浓度的关系 61
3.3 讨论 64
3.3.1 铁载体和 ACC 脱氨酶产生菌 64
3.3.2 菌株产铁载体能力与铁浓度的关系 71
3.4 小结 72
第四章 人工微宇宙—植物促生菌根系回归模拟实验 73
4.1 材料和方法 73
4.1.1 菌株来源及植物材料选取 73
4.1.2 实验材料 73

厦门大学博硕士论文摘要库

4.1.3 实验方法 75
4.2 结果与分析 77
4.2.1 植物促生菌对海马齿生长状况的影响 77
4.2.2 实验过程中菌株数量的变化及其定殖情况 82
4.3 讨论 85
4.3.1 植物促生菌对植物生长状况的影响 85
4.3.2 促生菌在植物根系中的分布 87
4.4 小结 87
第五章 总结与展望 89
5.1 结论 89
5.2 本论文的创新点 90
5.3 展望 90
参考文献 92
附录一 可培养细菌 16S rRNA 基因鉴定结果 104
附录二 铁载体产生菌活性单位测定结果 108
致谢 110

厦门大学博硕士论文摘要库

Contents

Abstract(in Chinese) I

Abstract(in English) III

Charpter 1 Introduction 1

1.1 Summary of Plant Growth-promoting Bacteria(PGPB) 1

1.1.1 Plant Growth-promoting Bacteria 1

1.1.2 Growth Promoting Mechanisms of PGPB 2

1.1.3 Siderophore-producing Bacteria 3

1.1.4 ACC Deaminase-producing Bacteria 6

1.2 Application of *Sesuvium portulacastrum* L. in Phytoremediation of Polluted Water 9

1.2.1 Phytoremediation of Polluted Water 9

1.2.2 Eco-floating Bed System 10

1.2.3 *Sesuvium portulacastrum* L. Applied in Eco-floating Bed 11

1.3 Study Strategies for Microbial Molecular Ecology 13

1.3.1 Analysis of 16S rRNA Gene 14

1.3.2 High-throughput Sequencing Technology 15

1.4 Study Objectives and Significances 16

Chapter 2 Endospheric and Rhizospheric Microbial Community Structure in *Sesuvium portulacastrum* L. 19

2.1 Materials and Methods 19

2.1.1 Sampling 19

2.1.2 Materials 20

2.1.3 Methods 21

2.2 Results and Analysis 27

2.2.1 Environmental Parameters 27

2.2.2 Bacterial Abundance 28

厦门大学博硕士论文摘要库

2.2.3 Isolation and Identification of Culturable Bacteria 30
2.2.4 High-throughput Sequencing 31
2.3 Discussion 41
2.3.1 Endophyte and Rhizobacteria of *Sesuvium portulacastrum* L. 41
2.3.2 Microbial Community Structure of Endosphere and Rhizosphere 43
2.4 Conclusions 49
Chapter 3 Isolation of Siderophore-producing Bacteria and ACC Deaminase-producing Bacteria 51
3.1 Materials and Methods 51
3.1.1 Sampling 51
3.1.2 Materials 51
3.1.3 Methods 54
3.2 Results and Analysis 57
3.2.1 Isolation of Siderophore-producing Bacteria and Determination the Enzyme Activities 57
3.2.2 Isolation of ACC Deaminase-producing Bacteria and Determination the Enzyme Activities 59
3.2.3 Relationship between Siderphore Producing Activity and Iron Concentration 61
3.3 Discussion 64
3.3.1 Siderophore- and ACC Deaminase-producing Bacteria 64
3.3.2 Relationship between Siderphore Producing Activity and Iron Concentration 71
3.4 Conclusions 72
Chapter 4 Re-inoculation of PGPB into their Host Using Microcosms 73
4.1 Materials and Methods 73
4.1.1 Strains and Sampling 73
4.1.2 Materials 73

厦门大学博硕士论文摘要库

4.1.3 Methods 75
4.2 Results and Analysis 77
4.2.1 Effect of PGPB on the Growth of *Sesuvium portulacastrum* L. 77
4.2.2 Variations of Bacterial Copies and Bacterial Colonization 82
4.3 Discussion 85
4.3.1 Effect of PGPB on the Growth of *Sesuvium portulacastrum* L. 85
4.3.2 Distributon of Bacteria in the Root of *Sesuvium portulacastrum* L. 87
4.4 Conclusions 87
Chapter 5 Conclusions and Prospects 89
5.1 Conclusions 89
5.2 Innovations of the Research 90
5.3 Prospects 90
References 92
Appendix 1 Partial 16S rRNA Gene Sequence Identification of Culturable Bacteria 104
Appendix 2 The Siderophore Unit of Siderophoe-Producing Bacteria 108
Acknowledgements 110

厦门大学博硕士论文摘要库

摘要

植物促生菌（Plant growth-promoting bacteria, PGPB）是指能够通过直接或间接方式促进植物生长的细菌，在自然环境中 PGPB 有多种存在形式，既可以独立生存也可以与植物组织形成特定关系，常见的有根际促生菌和根系内共生菌，当前对植物根系促生菌的研究多集中于陆生植物和农作物中，而对植物修复中根系促生菌的研究相对较少。

本研究是在已开展的利用生态浮床技术进行富营养化海水植物修复的基础上，进一步研究修复植物海马齿（*Sesuvium portulacastrum* L.）根系微生物群落结构及根系促生菌对植物生长的影响。首先，通过 Illumina 高通量测序平台分析海马齿根系、根际区和非根际区微生物群落结构；然后，基于可培养技术分离纯化根际细菌和根系内共生细菌，从中筛选具有铁载体产生能力和 ACC 脱氨酶产生能力的促生菌并进行活性测定；最后，通过人工微宇宙实验，选取获得的高效促生菌进行根系回归模拟，考察菌株对海马齿生长的促进作用。主要结果归纳如下：

（1）对泉州湾和篔筜湖海马齿根系、根际和非根际微生物群落结构进行调查，共鉴定微生物 22 个门、55 个纲和 663 个属，其中变形菌门在所有样品中占绝对优势（占 58.3%-73.6%）其次为拟杆菌门（占 6.9%-22.1%）和厚壁菌门（占 2.0%-4.6%）。在纲水平上，γ-变形菌纲在所有的样品中占绝对优势，其次为 α-变形菌纲和 β-变形菌纲；ε-变形菌纲和黄杆菌纲在篔筜湖样品中占有一定的优势地位。基于可培养的方法，在两个采样点，共分离得到 76 株内共生菌经 16S rRNA 基因序列分析属于 30 属 54 种，得到 77 株根际菌经 16S rRNA 基因序列分析属于 23 属 47 种。微生物多样性在不同生境中表现一定的差异，具体来说，泉州样品中微生物多样性均高于篔筜湖样品；在篔筜湖样品中，海马齿根系微生物多样性高于根际区和非根际区微生物的多样性，而根际区与非根际区微生物多样性没有显著性的差异。

（2）在本次调查中共筛选得到铁载体产生菌 51 株，铁载体活性单位（Siderophore Unit, SU）在 10.39%-80.39%，其中 QZ-E9 的 SU 最高为 80.39%；筛选得到 1-氨基环丙烷-1-羧酸（ACC）酶产生菌 28 株，活性在 0.3-43.9 μM α-

厦门大学博硕士论文摘要库

酮丁酸/h·mg 蛋白之间，其中 YD-E41 和 YD-R26 两株菌酶活较高，分别为 37.4±0.19 和 43.9±0.68 μM α-酮丁酸/h·mg 蛋白。

（3）通过人工微宇宙，对菌株 QZ-E9 和 YD-E41 的植物促生长能力进行评价。结果显示，在贫铁（铁离子浓度为 2 μM）条件下 QZ-E9 对海马齿鲜重和根长的增长具有显著的促进效果，YD-E41 也表现出同样的效果，最终增量分别为 1.41 g、18.7 cm 和 0.91 g、20.33 cm，两株菌对叶长和株高并没有表现出显著的促生长效果。在实验中植物+细菌（P+B）组可以刺激海马齿根系系统的发育，明显促进海马齿侧根的生长。利用 qPCR 对实验中细菌数量的变化进行跟踪，发现在实验过程中细菌 DNA 拷贝数不断降低，在 28 d 时 P+B 组的细菌 DNA 拷贝数均在 10^5 的数量级上，低于细菌（B）组。利用 FISH 技术对海马齿根系细菌的定殖分布情况进行观察，发现菌株 QZ-E9 可以定殖于海马齿根系表皮、外皮层细胞及两者的细胞间隙和维管组织中，菌株 YD-E41 主要定殖于根系表皮、外皮层细胞及两者的细胞间隙中。

关键词：植物根际促生菌 ；海马齿；根系内共生菌； 铁载体产生菌；ACC 脱氨酶产生菌

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

The plant growth-promoting bacteria (PGPB)are bacteria tha can promote plant growth directly or indirectly. PGPB can be free-living, or form specific relationships with plants as rhizobacteria and endophytic bacteria combining with different plant tissues. Most studies focused on PGPB in terrestrial plants and crops, however, studies on PGPB in phytoremediation of eutrophicated seawater were rarely touched.

Based on our previous researches on the floating bed phytoremediation technology in eutrophicated seawater, we further studied the microbial community and plant growth-promoting bacteria in rhizosphere of halophyte *Sesuvium portulacastrum* L.. Firstly, PCR-based Illumina was applid to revealed the microbial community structure of endosphere, rhizosphere and non-rhizosphere of *S. portulacastrum* L.; Then, the cultured rhizobacteria and endophytic bacteria were isolated, screening PGPB as siderophore-producing and ACC deaminase-producing strains among them and detecting their corresponding activities. Finally, the selected plant growth-promoting bacteria were re-inoculated to their host in microcosms to determine the gowth promoting effect on *S. portulacastrum* L.. The main results are summarized as follows:

(1) High-throughput sequencing were conducted to study the endosphere, rhizosphere and non-rhizosphere microbial community structure of *S. portulacastrum* L. that collected from Quanzhou Bay and Yundang Lagoon. The results showed that, there were 55 classes from 22 phyla. Proteobacteria was the dominant phylum which included 3 main classes in both samples, Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria, while Epsilonproteobacteria and Flavobacteria were also the common classes in Yundang Lagoon. Furthermore， Bacteroidetes and Firmicute were also the common phyla. 76 endophytic bacteria and 77 rhizobacteria were obtained from all samples, which belonging to 30 genera, 54 species and 23 genera, 47 species respectively by 16S rRNA gene sequence analysis. Microbial diversity varied with habitat. Specifically, the microbial diversity in Quanzhou samples were higher than samples collected from Yundang Lagoon; Microbial diversity in endosphere was higher than that in rhizosphere and non-rhizosphere for Yundang samples, and there are not significant difference between rhizosphere and non-rhizosphere .

厦门大学博硕士论文摘要库

(2) In this study, we obtained 51 siderophore-producing strains which siderophore unit (SU) were ranged from 10.39% to 80.39%, and the SU of QZ-E9 was the highest up to 80.39%. Meanwhile, 28 ACC deaminase-producing strains were obtained and their enzyme activities were 0.3-43.9 μM α-ketobutyrate/h·mg protein . The enzyme activities of YD-E41 and YD-R26 were 37.4 ± 0.19 and 43.9±0.68 μM α-ketobutyrate/h·mg protein, respectively.

(3) We estimated the performance of growth promotion of strains QZ-E9 and YD-E41 through the microcosms experiment. In this work, we discovered that in deficient iron (2 μM) conditions QZ-E9 showed a significantly promotion effect on the fresh weight and root length of *S. portulacastrum* and the phenomenon also occurred to YD-E41, and the final growth increments were 1.41 g, 18.7 cm and 0.91 g, 20.33 cm respectively. However, the promotion effect didn't occurred to the leaf length and plant height. During the experiment, the Plant+Bacteria(P+B) groups could stimulate the development of the root system of *S. portulacastrum*, and it could obviously promote the growth of the lateral root. Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) were used to determine the variation numbers of the bacteria. The results showed that the DNA copies reduced constantly during the experiment. On 28 d, the DNA copies of P+B groups was 10^5, which was lower than the Bacteria(B) groups. Fluorescence in situ hybridization(FISH) was used to observe the colonization and distribution of the bacteria in the root system of *S. portulacastrum*. The results showed that QZ-E9 can colony in the epidermis, exodermic and vascular tissue of the root, while YD-E41 mainly colonized in the epidermis and exodermic.

Key Words：Plant Growth-promoting Rhizobacteria; *Sesuvium portulacastrum* L.; Endophyte; Siderophore-producing bacteria; ACC deaminase-producing bacteria

厦门大学博硕士论文摘要库

第一章 绪论

1.1 植物促生长菌的概述

1.1.1 植物促生菌

植物促生菌（Plant growth-promoting bacteria, PGPB），指能够促进植物生长的细菌，包括可以自由生长的细菌，可以与植物形成特定共生关系的外共生菌，以及可以定殖于植物部分组织或特定组织中的内共生菌及部分蓝细菌[1]，植物促生菌与植物之间的关系如图 1.1 所示[2]。尽管 PGPB 的存在形式不同，但都是通过促进植物获取生长所需物质，调节植物激素水平等直接促生长机制或通过生防菌（Biocontrol bacteria）抑制病原菌生长等间接机制促进植物的生长，正因植物促生菌兼具了促进植物生长及控制病害的功能，因此具有较高的研究价值[3]。

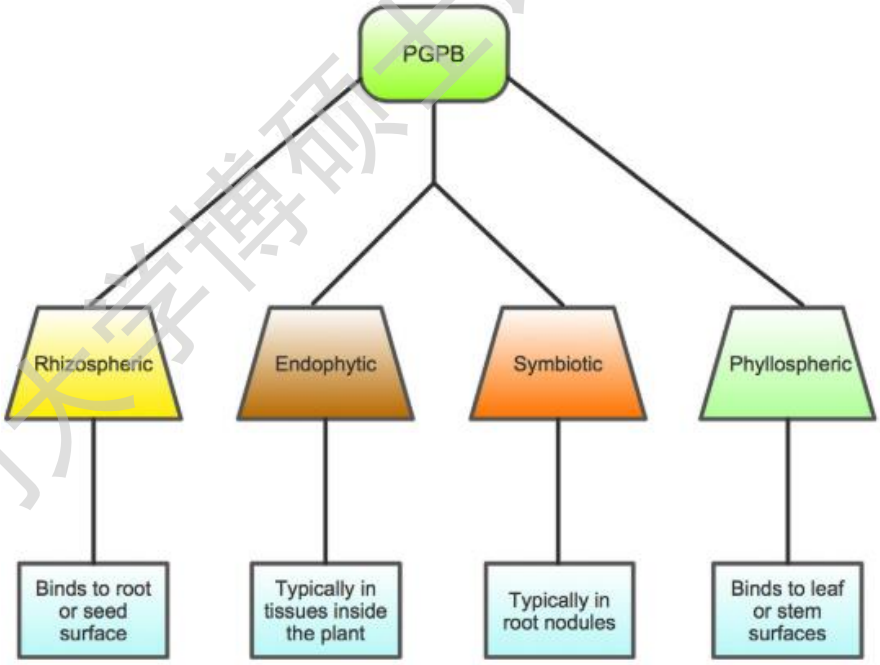

图 1.1 PGPB 包含的细菌类型及其与植物之间的关系

Fig. 1.1 PGPB includes bacteria that interact with plant in a range of different ways

在现有植物促生菌的研究中，植物促生长根际细菌（Plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR）是研究最为广泛的促生菌[4]，这一概念是由

厦门大学博硕士论文摘要库

Kloepper 和 Schroth 于 1978 年提出，指的是能定殖于植物根系系统并促进植物生长的根际细菌[5]。在之前很长一段时间里，科学家并没有注意到内共生菌的存在，人们认为在健康植物组织内是没有微生物存在的[6]，随着研究的深入，Galippe[7]，Gray 和 Smith[8]等发现附着于植物表面的微生物能进一步渗入植物组织内 部并定殖于其中，进而与植物之间形成有特定关系的内共生菌。

植物促生菌通常情况下与植物之间都存在较为亲密的关系，本次研究主要是针对植物根系所在环境中的 PGPB，因此仅以植物根系所处的环境为例讲解植物与 PGPB 之间关系。Lynch 等人发现植物根际微生物含量显著高于非根际环境中微生物含量，并且研究也表明在植物根系环境中存在大量的 PGPB，Gray 和 Smith [8]将它们表示为 ePGPB（Extracellular PGPB）和 iPGPB（Intracellular PGPB），其中 ePGPB 分布在根际（Rhizosphere）和根表（Rhizoplane），因此本文将这部分微生物称之为根际细菌（Rhizobacteria），而 iPGPB 则为定殖在根系内部的微生物，称之为内共生菌（Endophytic bacteria），本论文在不对内共生菌做特殊说明的情况下用来特指根系内共生菌。目前，关于植物促生长根际细菌和内共生菌的研究主要集中在农业生产[9]和污染生物修复[10]等方面。

1.1.2 植物促生菌的促生长机制

植物促生菌的作用机制主要包含以下几个方面：i 细菌固氮作用[11]，主要是固氮菌和根瘤菌通过固氮和结瘤的方式来提高植物可利用氮的含量；ii 氨的生成[12]；iii 溶解磷酸盐[13]，植物促生菌可以通过产生有机酸如：柠檬酸、水杨酸、茉莉酸和苹果酸等溶解环境中难溶无机磷酸盐。非特异性磷酸酶、植酸酶和 C-P 裂解酶可以分解土壤中的有机磷化合物释放可溶性磷；iv 铁载体的产生[14]，铁载体产生菌在环境中铁离子贫乏的情况下，可以通过分泌铁载体螯合环境中的铁离子满足自身生长需求，也可以与致病菌竞争铁离子，降低环境中病原微生物对植物的侵扰，进而促进植物生长；v 植物激素的产生[15]，如细菌分泌产生的吲哚乙酸（IAA）、细胞分裂素和赤霉素等可以对植物细胞的伸长、分裂和分化起到促进；vi 抗生素和溶解酶的产生[16]，有些促生菌分泌抗菌物质和溶菌酶减少植物生长环境中的致病菌，间接促进植物生长；vii ACC（1-氨基环丙烷-1-羧酸）脱氨酶的产生[17-20]，一些植物促生菌可以在植物受到外界胁迫

厦门大学博硕士论文摘要库

合成乙烯时，产生 ACC 脱氨酶裂解乙烯合成的前体物质 ACC，降低植物体内乙烯的含量，减少环境胁迫对植物生长的抑制作用[21, 22]，达到促植物生长的目的[23]。

1.1.3 铁载体产生菌

1.1.3.1 铁载体及铁载体产生菌

铁是绝大多数微生物生长所必须的元素[24]，在生物的代谢过程中具有重要作用，如铁是多种酶的辅因子[25]，在电子传递中也具有重要作用。铁元素在地壳中尽管含量非常丰富，但在 pH 中性和有氧条件下，铁元素以难溶的氧化物或氢氧化物形式存在（Ksp $Fe(OH)_3 = 10^{-39}$）[26]，致使非结合态铁含量在 10^{-9}-10^{-18} M。微生物最适生长所需的铁元素含量大约在 10^{-8} M[22, 27]，因此在有氧、中性 pH 条件下，环境中铁元素难以满足微生物的生存需要。在这种条件下一些微生物为了减缓由缺铁导致的代谢受阻，在长期进化过程中形成了应对铁胁迫的相应机制，即通过分泌胞外的铁离子螯合剂获取环境中的铁离子以满足生存的需要。

这种铁离子螯合剂被称为铁载体（Siderophore），铁载体对铁离子的活化、吸收和转运保证了微生物能有效利用铁元素。铁载体一词来源于希腊语“Iron Carriers”，是微生物在铁离子缺乏的环境条件下，分泌的低分子量、高铁螯合能力的有机物[27]，铁载体的产生可以满足微生物自身生长所必须的铁元素。铁载体的研究起源于 20 世纪 40-50 年代，开始于对动植物致病菌的研究，随后便逐步拓展到农业生产和临床医学[28]，进而推进到生态修复领域，因此关于微生物铁载体的研究，对深入理解微生物在生态学和生物地球化学循环中的作用及作为天然产物的挖掘和开发均具有重要意义。1981 年 Neilands 定义了铁载体的性质：i 低分子量（500-1000Da）；ii 铁离子特异性配体；iii 铁载体的生物合成受环境中铁离子浓度的调节；iv 铁离子-铁载体配合物的稳定常数范围为 10^{23}-10^{52}[1]。

1.1.3.2 铁载体产生菌促植物生长的研究

铁元素是植物生长所必须的元素，因为铁元素在植物体内参与许多生化反应，但由于其难容的特性以自由形式存在的铁离子在生物圈中的含量很低，植物经常遭受铁缺乏的胁迫，而微生物产生的铁载体络合铁元素会使植物更易获

厦门大学博硕士论文摘要库

Degree papers are in the “Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database”. Full texts are available in the following ways:
1. If your library is a CALIS member libraries, please log on http://etd.calis.edu.cn/ and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库