

周晓伦,万建新,王卫卫,等.一株提高植物幼苗耐受 Cr^{6+} 细菌(*Exiguobacterium* sp. S2)的分离与鉴定[J]. 江苏农业科学,2019,47(7):273-277. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.07.065

一株提高植物幼苗耐受 Cr^{6+} 细菌(*Exiguobacterium* sp. S2)的分离与鉴定

周晓伦¹,万建新¹,王卫卫²,张伟¹,姚彦红¹,高芸¹

(1.甘肃医学院病原生物学教研室,甘肃平凉 744000; 2.西北大学西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室,陕西西安 710069)

摘要:植物促生菌因其具有对植物生长促进及增强抗逆性等优点,在植物-微生物联合修复重金属污染土壤中具有有良好的应用潜力,能为环境生物修复以及工农业生产提供优良菌种资源,实现其更大范围的应用。以甘肃省平凉市污染土壤中分离得到的 Cr^{6+} 耐受菌株为目的菌,测定菌株的促植物生长特性(产 IAA、溶磷、ACC 脱氢酶活性),采用改良的 Belimov 方法筛选出 1 株促生特性较好的菌株,进行生理生化及 16S rRNA 基因序列分析鉴定。初步分离得到 32 株 Cr^{6+} 耐受菌株,根据改良的 Belimov 方法筛选出 1 株 S2 菌株,通过生理生化及 16S rRNA 鉴定 S2 菌株为 *Exiguobacterium* sp.,GenBank 登录号为 MH180821。玉米幼苗生长试验表明,与不同 Cr^{6+} 浓度处理组相比,接种了 S2 菌株的玉米幼苗根长、茎长、叶面积都有显著提高,平均根长分别增加 95.74%、41.34%、194.12%,平均茎长分别增加 32.03%、-30.13%、28.96%,平均叶面积分别增加 73.94%、35.17%、26.92%,平均鲜质量分别增加 33.33%、33.62%、-20.00%,其显著提高了玉米幼苗对 Cr^{6+} 的耐受性。该研究表明,*Exiguobacterium* sp. S2 在污染土壤中能够更好地定殖并保护促植物生长能力的发挥,为重金属污染土壤的植物-微生物联合原位修复提供了良好的微生物资源。

关键词:玉米幼苗; Cr^{6+} 耐受菌株;ACC 脱氢酶;吡啶乙酸;微小杆菌

中图分类号: X53;S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)07-0273-05

在过去几十年的工业领域中,大量的使用重金属[铬(Cr)、镍、铜、锌、铅、镉等]导致土壤和地下水污染,对人类健康和生态环境造成重大的威胁。在不同的重金属中,铬是主要的污染物之一,由皮革制革、电镀、采矿、纺织、金属加工、化肥、染料和颜料制造等各种工业应用产生^[1]。Cr 化合物对植物的毒性很大,不利于植物的新陈代谢。虽然许多植物不受低浓度 Cr ($3.8 \times 10^{-4} \mu\text{mol/L}$) 的影响,但当 Cr 浓度为 $100 \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{kg})$ 时,对高等植物有毒害^[2]。外部环境存在的 Cr 改变了植物生长发育的格局。已有研究表明根生长的减少是由于树木和植物中的重金属^[3]。

文献调查表明,几乎没有人报道植物中铬毒性的改良方法,主要原因在于大多数研究集中于通过树木和植物促进 Cr

的积累,达到植物修复的作用。Khan 报道合欢树、阿拉伯相思树和印度黄檀这些树种的菌根保护它们免受重金属的毒害和制革厂废水铬的污染^[4]。Karagiannidis 等研究泡囊丛枝菌根真菌(漏斗泡球囊霉)对硬质小麦生长和营养吸收的影响,证实泡囊丛枝菌根真菌(VAFM)能够提高小麦的生物量和减少 Cr 在植物中的含量^[5]。Davies 等发现 VAFM 能够增强向日葵耐受 Cr 的能力,VAFM 对 Cr 处理植物的组织矿物浓度、生长和气体交换都有积极的作用^[6-7]。正如 Burd 等陈述的,在重金属污染的土壤中重金属含量已经超过了植物的耐受范围,它可能会用根际微生物处理植物以此来增加植物的生物量,稳定和修复被污染环境中的植物^[8]。

植物对重金属的耐受与其产生的一种多肽类物质有关,这种物质能够螯合重金属,从而减少重金属对植物根系酶的伤害^[9]。植物根的活动可能增加金属、非金属的溶解性,通过酸化、氧化还原反应、分泌金属螯合物或者有机配体与阴离子竞争结合位点^[10]。微生物通过产生有机配体,分解土壤中的有机物质或者分泌一些代谢物能够改变金属、非金属之间

收稿日期:2019-01-21

基金项目:甘肃省高等学校科学研究项目(编号:2017A-146)。

作者简介:周晓伦(1987—),男,甘肃靖远人,硕士,讲师,主要从事土壤微生物的研究。E-mail:610253095@qq.com。

[14]熊小菊,廖春贵,胡宝清.广西防城港市旅游资源开发研究[J]. 现代园艺,2018(6):20-21.

[15]廖春贵,熊小菊,陈依兰,等.北部湾经济区社会——生态系统耦合关联分析[J]. 大众科技,2018,20(1):13-15,21.

[16]李俊刚,闫庆武,熊集兵,等.贵州省煤矿区植被指数变化及其影响因子分析[J]. 生态与农村环境学报,2016,32(3):374-378.

[17]庞静.基于地理探测器模型的自然和人为因素对植被变化的影响[D].太原:山西大学,2016.

[18]廖春贵,熊小菊,胡宝清,等.广西不同岩性植被覆盖变化及对

人类活动的响应[J]. 生态经济,2018,34(6):168-173.

[19]田义超,梁铭忠.基于 SPOT-VEGETATION 的北部湾经济区植被变化特征[J]. 农业现代化研究,2014,35(4):465-471.

[20]熊小菊,廖春贵,胡宝清.基于遥感数据的广西植被变化特征分析[J]. 科学技术与工程,2018,18(11):123-128.

[21]逯颖,王涛,田阳.秦岭山地森林植被变化及对气候响应的地形影响[J]. 江苏农业科学,2018,46(1):214-218.

[22]李晗,周艳莲,居为民,等.植被指数对藏北高寒草甸干旱的敏感性分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(1):219-224.

的转化^[11]。土壤菌群和作物根之间相互作用对植物的发育和存活有着不可估量的作用^[12]。数个植物相关细菌已被报道能够加速重金属污染的生物修复,通过促进植物生长,在促进植物修复中起着重要的作用^[13-14]。这些植物促生菌能够使宿主增长和重金属积累的过程可能包括(1)合成一些化合物[例如吲哚-3-乙酸、吲哚乙酸(IAA)、铁载体、有机酸;1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)脱氨酶];(2)刺激一些代谢途径(例如生物固氮和溶磷);(3)改变金属在植物中的迁移率和有效性。该研究从3个不同污染地区土壤中分离出32株Cr⁶⁺耐受细菌,采用改良的Belimov方法筛选出1株植物促生显著的菌株,通过测定菌株的促生特性(IAA含量、溶磷能力、ACC脱氨酶活性),同时测定其抗重金属能力,并基于16S rRNA基因序列及表型分析鉴定其种属。以期得到一批优良的土著植物促生菌,为进一步利用微生物-植物联合修复重金属污染提供一批微生物资源。

1 材料和方法

1.1 试验材料

本研究中使用的所有化学药品等级均为分析纯,由西安姚北生物科技有限公司提供。Cr⁶⁺的储备溶液(1 000 mg/L):将2.829 g重铬酸钾(K₂Cr₂O₇)溶于1 L无菌蒸馏水中,进一步稀释至工作浓度。

1.2 试验方法

1.2.1 Cr⁶⁺耐受菌株的分离 采用梅花法收集3个不同污染地区距地表15 cm的土壤:(1)甘肃省平凉市庙底下村(106.894074°E、35.49297°N);(2)甘肃省平凉市庙底下村(106.897003°E、35.490824°N);(3)甘肃省平凉市二十里铺村(106.783376°E、35.508361°N)。准确称取3个不同地区土壤各10 g,分别加入盛有90 mL无菌水(含有25~35个玻璃珠)的锥形瓶中,置振荡器上振荡15 min,得到10⁻¹浓度的土壤稀释液,连续稀释至10⁻¹¹,将10⁻¹~10⁻¹¹梯度的土壤稀释液均匀地涂布于含有100 mg/L Cr⁶⁺的LB培养基中,(35±2)℃倒置培养3~5 d。挑取形态特征不同的菌落划线至含有100 mg/L Cr⁶⁺的LB培养基中继续培养,每种菌株连续纯化3代以上,最终使平板上的菌落形态和镜检的菌体形态一致,将纯化的菌落划线至牛肉膏蛋白胨琼脂斜面,4℃保藏,以备后续研究。共分离出32株Cr⁶⁺耐受细菌,其中菌株S2能显著地提高玉米幼苗对Cr⁶⁺的耐受性,因此对其进行进一步的研究。

1.2.2 S2菌株的鉴定 菌株的形态观察及生理生化试验参照《常见细菌系统鉴定手册》方法^[15]进行。

1.2.3 16S rDNA序列测定及系统发育树的构建 Cr⁶⁺耐受细菌送生工生物工程(上海)股份有限公司完成16S rDNA扩增及序列测定。提交菌株的16S rDNA序列到美国国立生物技术信息中心(national center for biotechnology information, NCBI)网站,与已知的序列比对分析其同源性。利用ClustalX1.81将序列进行比对,利用MEGA 5.05分子进化遗传分析软件分析碱基组成、GC含量,利用Kimura2参数计算遗传距离,采用NJ邻近法构建系统发育树。

1.2.4 S2菌株ACC脱氨酶活性和产IAA能力的测定 ACC脱氨酶分解ACC产生的α-酮丁酸用来测定ACC脱氨酶活

性,参照Penrose等的方法测定α-酮丁酸含量^[16]。根据Bradford方法测定菌体蛋白含量^[17]。根据α-酮丁酸和蛋白质的标准曲线确定ACC脱氨酶活性。

将S2菌株挑1环到含有20 mL微量蔗糖盐液体(SMS)培养基[蔗糖1%、(NH₄)₂SO₄ 0.1%、K₂HPO₄ 0.2%、MgSO₄ 0.05%、NaCl 0.01%、酵母提取物0.05%、CaCO₃ 0.05%, pH值7.2]的锥形瓶中28℃、140 r/min培养96 h,液体培养基中加入0.5 mg/mL的色氨酸。取1.5 mL悬浮液到2 mL离心管中5 000 g离心15 min,取上清液1 mL到5 mL比色管中加入2 mL Salkowski's溶液,振荡混匀室温静置20 min,比色管中溶液会出现粉红色,在530 nm检测粉红色物质的吸光度^[18]。1个菌株做3个重复,根据IAA的标准曲线确定菌株产IAA能力大小。

1.2.5 溶磷和Cr⁶⁺耐受试验 将待测菌株S2接种于含无机磷酸盐的Pitkovskaya琼脂培养基,30℃倒置培养5 d。若细菌菌落周围出现清晰的晕圈,表明细菌溶解无机磷酸盐^[19]。

将待测菌株划线接种至LB培养基中,培养基中加入100~1 800 mg/L K₂Cr₂O₇,50为1个梯度进行菌株耐受Cr⁶⁺试验,倒置培养箱中28℃培养5 d,观察菌株的生长情况以此来确定生长浓度和最低致死浓度。

1.2.6 S2菌株对不同Cr⁶⁺浓度下玉米幼苗生长的影响 采用改良的Belimov等的方法确定根际细菌的植物促生根活性^[20]。接种3株菌株S2、W3、S70至6 mL LB液体培养基中28℃、180 r/min培养24 h,用无菌水悬浮菌体数为5×10⁷ CFU/mL。1 mL细菌悬浮液或无菌水(未处理的对照组)加入到含有40 mL Hoagland半固体培养基[KNO₃ 607.00 mg、Ca(NO₃)₂·4H₂O 945.00 mg、MgSO₄·7H₂O 493.00 mg、NH₄H₂PO₄ 115.00 mg、H₃BO₃ 2.86 mg、MnCl₂·4H₂O 2.13 mg、ZnSO₄·7H₂O 0.22 mg、CuSO₄·5H₂O 0.08 mg、H₂MoO₄·H₂O 0.02 mg、FeSO₄·7H₂O 5.57 mg、Na₂-EDTA 7.45 mg]试管中(内径30 mm)^[21]。处理组在半固体培养基中加入适当的Cr⁶⁺,浓度依次为10、50、100 mg/L,对照组不加金属离子。用3% H₂O₂和95%乙醇(体积比1:1)对白菜幼苗表面灭菌20 min,无菌水冲洗数次至种子表面无气泡产生,挑选15个种子到Hoagland半固体培养基,所有的试验处理组作3次重复。在光照培养箱中28℃黑暗培养15 d,培养后测量玉米幼苗的根长、茎长、叶面积、鲜质量。

1.3 数据处理

数据采用SPSS 13.0 one-way ANOVA进行分析;多重比较采用Fisher's Student-Newman-Keuls^{a,b}。

2 结果与分析

2.1 Cr⁶⁺耐受菌株S2的分离与鉴定

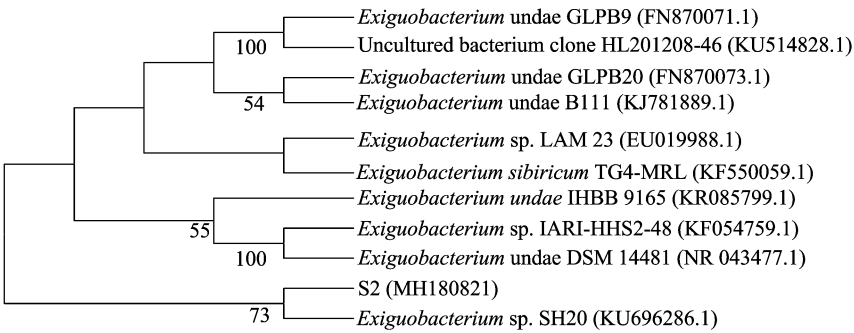
从污染土壤中分离得到Cr⁶⁺耐受菌株S2,G⁺、短杆状,在含有Cr⁶⁺营养琼脂平板上形成圆形湿润的橙黄色菌落。由表1可知,菌株S2触酶阳性,氧化酶阴性,能还原硝酸盐,水解明胶、淀粉和酪素,分解葡萄糖、蔗糖、半乳糖。根据菌体形态特征和生理生化,菌株S2为*Exiguobacterium* spp.。为了证实这一点,菌株的分子鉴定通过16S rDNA基因测序和基因Blast比对。由图1可知,菌株S2与*Exiguobacterium* sp. SH20(KU696286.1)具有密切的同源性。菌株S2的16S

rDNA 序列以唯一的登录号 MH180821 进入 GenBank。为了确定菌株的系统发育位置,笔者使用 NCBI 获得的序列及 MEGA 5.10 软件构建了系统发育树(图 1)。

表 1 Cr⁶⁺ 耐受菌株 S2 的形态特征和生化反应

特征	结果
革兰氏反应	G ⁺
细胞形态	短杆状
菌落形态	橙黄色、平坦、圆形、湿润
最适生长温度(℃)	37℃
最适酸碱度	6.5~11.5
生化反应	
氧化酶	-
过氧化氢酶	+
吡啶试验	-
甲基红试验	+
V. P. 试验	-
枸橼酸盐利用试验	-
动力试验	+
淀粉水解试验	+
明胶液化试验	+
硝酸盐还原试验	+
葡萄糖发酵试验	+
麦芽糖发酵试验	+
蔗糖发酵试验	+
乳糖发酵试验	-
甘露醇发酵试验	-
重金属 Cr ⁶⁺ 耐受浓度(mg/L)	1 050

注: + 表示阳性反应; - 表示阴性反应。



以菌株 S2 的 16S rDNA 序列为基础构建系统发育树,分支节点的数字表示每 1 000 次 bootstrap 分析所代表的次数,括号中的数字代表参比序列在 GenBank 中的提交序列号

图1 系统发育树

表 2 Cr⁶⁺ 耐受菌株 *Exiguobacterium* sp. S2 的植物促生物质

菌株	属	GenBank 登录号	ACC 脱氨酶活性 [α-酮丁酸, μmol/(mg·h)]	IAA (mg/L)	溶磷
S2	<i>Exiguobacterium</i> sp.	MH180821	152.62 ± 7.21	6.71 ± 0.32	不溶磷

注:数值为 3 次重复的平均值 ± 标准偏差。下表同。

物根长、叶面积影响比较大,对茎长、鲜质量的影响比较小,随着浓度的增加这种响应越明显,再次证明 Cr⁶⁺ 对白菜生长的影响比较严重(表 3)。

在该研究中 S2 菌株经过测定,既含有 ACC 脱氨酶又能产生吡啶乙酸,不溶解磷酸盐。根据形态特征、生理生化特征和 16S rRNA 初步鉴定为 *Exiguobacterium* sp. S2。具有 ACC 脱氨酶活性的菌株通过减少乙烯含量帮助植物抵抗逆境胁迫

2.2 S2 菌株 ACC 脱氨酶活性和产 IAA 能力测定

植物不断地暴露在非生物胁迫中,例如干旱、重金属等。引入含有 ACC 脱氨酶的植物促生菌到重金属土壤中能够缓解这种胁迫对植物生长的影响,植物促生菌能够在这种胁迫下生存,并结合在种子的表面或者植物的根上,通过 ACC 脱氨酶降解乙烯的直接前体 ACC 来降低植物体内乙烯的含量,从而促进植物的生长和发育^[22]。植物促生菌也通过合成 IAA 的方式促进植物的生长,IAA 直接刺激植物细胞的延生和分裂或者提高植物自身的防御系统^[23]。*Exiguobacterium* sp. S2 具有较高的产 IAA 能力和 ACC 脱氨酶活性,不溶解磷酸盐(表 2)。

2.3 Cr⁶⁺ 耐受菌株对不同 Cr⁶⁺ 浓度下玉米幼苗生长的影响

玉米幼苗的根长和叶面积对 Cr⁶⁺ 效应表明,玉米生长容易受这种金属的影响,这种效应随着重金属浓度的增加会更明显(表 3)。接种 3 株 Cr⁶⁺ 耐受菌株的玉米幼苗的根长、叶面积结果表明,相对于未接种 Cr⁶⁺ 耐受菌株的对照组,接种 Cr⁶⁺ 耐受菌株有利于植物根和叶面积的生长;不同浓度 Cr⁶⁺ 接种 S70 菌株的玉米幼苗根长与对照组相比显著减少;处于不同浓度的 Cr⁶⁺ 时接种 S2 菌株有利于玉米根和叶面积的生长(表 3);在不同浓度(10、50、100 mg/L)的 Cr⁶⁺ 存在时,接种 S2 菌株的玉米幼苗的平均根长分别增加 95.74%、41.34%、194.12%,平均茎长分别增加 32.03%、-30.13%、28.96%,平均叶面积分别增加 73.94%、35.17%、26.92%,平均鲜质量分别增加 33.33%、33.62%、-20.00%。在不同浓度的 Cr⁶⁺ 存在时,菌株 S2、S70、W3 接种的玉米幼苗的平均根长、茎长、叶面积都有所增加或者减少,相比之下 Cr⁶⁺ 对植

迫,是因为 ACC 脱氨酶水解 ACC 为 α-酮丁酸和氨^[24]。试验中不同浓度的 Cr⁶⁺(10、50、100 mg/L)对玉米幼苗的生长有毒害作用,但是当接种 Cr⁶⁺ 耐受菌株 *Exiguobacterium* sp. S2 后,玉米幼苗的根长、叶面积明显大于对照组。当 Cr⁶⁺ 浓度为 100 mg/L 时,接种 S2、S70、W3 菌株都有利于玉米幼苗根长和叶面积的生长,说明 3 株 Cr⁶⁺ 耐受菌株之间有显著的差异性。

表 3 Cr⁶⁺ 耐受菌株 S2、S70、W3 和 Cr⁶⁺ 对玉米幼苗生长的影响

处理组	根长 (cm)	茎长 (cm)	叶面积 (10 ⁻⁴ m ²)	鲜质量 (g/株)
10 mg/L	7.27 ± 0.25c	4.87 ± 0.21c	11.59 ± 0.57e	1.41 ± 0.05bcd
S2 + 10 mg/L	14.23 ± 0.28a	6.43 ± 0.31b	20.16 ± 0.76a	1.88 ± 0.10a
S70 + 10 mg/L	4.97 ± 0.51de	11.07 ± 0.73a	13.22 ± 0.16d	1.72 ± 0.29ab
W3 + 10 mg/L	12.27 ± 0.25b	6.43 ± 0.11b	14.10 ± 0.77cd	1.49 ± 0.40abcd
50 mg/L	3.87 ± 0.12fg	7.17 ± 0.31b	13.76 ± 0.84cd	1.16 ± 0.06cd
S2 + 50 mg/L	5.47 ± 0.25d	5.01 ± 0.36c	18.60 ± 0.63b	1.55 ± 0.09abc
S70 + 50 mg/L	3.50 ± 0.40fg	5.30 ± 0.40c	15.06 ± 0.98c	1.32 ± 0.09bcd
W3 + 50 mg/L	3.83 ± 0.31fg	5.00 ± 0.36c	14.86 ± 0.64c	1.43 ± 0.15bcd
100 mg/L	1.53 ± 0.21i	2.97 ± 0.06d	3.71 ± 0.26i	1.30 ± 0.02bcd
S2 + 100 mg/L	4.50 ± 0.40ef	3.83 ± 0.21d	8.71 ± 0.62f	1.04 ± 0.07d
S70 + 100 mg/L	1.83 ± 0.31i	3.17 ± 0.25d	5.38 ± 0.37g	1.27 ± 0.12bcd
W3 + 100 mg/L	2.60 ± 0.30h	2.97 ± 0.35d	9.23 ± 1.20f	1.65 ± 0.62abc

注:同列数据后不同小写字母表示不同试验之间差异显著($P < 0.05$)。处理组一系列数据表示 Cr⁶⁺ 浓度。

3 结论与讨论

在重金属环境中一些植物促生菌能够显著促进植物生长^[11]。植物促生菌作为植物种子菌剂,应用到含有重金属的土壤中,已经证明能够根本性地减少重金属对植物的毒害,同时提高植物的总体增长和产量收益^[25]。Bharti 等研究了 2 种耐盐 PGPR, *Bacillus pumilus* STR2 和深海细菌 (*Exiguobacterium oxidotolerans*) STR36,其中从盐碱土植物根际分离到的 *E. oxidotolerans* STR 36 菌株能够分泌丰富的胞外多糖,缓解高盐对植物体的胁迫,在原生盐碱土、次生盐碱土中接种 *Exiguobacterium oxidotolerans* STR36 的婆罗米植株生物量比未接菌分别高出 109%、138%;植物体中活性物质三萜皂苷假马齿苋皂苷 A(bacoside - A)含量比未接菌植株分别高出 36%、76%^[26]。本研究中接种菌株 S2 的玉米幼苗生物量与对照组相比分别增加 33.33%、33.62%、-20.00%,也证实了这一点。Dastager 等从印度喀拉拉邦省的西加特森林土壤中分离得到 1 株植物促生菌 *Exiguobacterium* N II - 0906, N II - 0906 菌株于 30℃ 能溶磷 84.7 μg/(mL · d),合成嗜铁素,分泌氢氰酸(HCN),可对常见的植物致病真菌产生拮抗作用,接种了 N II - 0906 菌株的植物根、茎和生物量均有显著增加^[27]。乙酰短杆菌 (*Exiguobacterium acetylicum*) 1 P (MTCC 8707) 是 1 株从苹果果园根际土壤分离得到的细菌,MTCC 8707 于 15℃ 能溶磷 (21.1 ± 1.18) μg/(mL · d),合成嗜铁素,分泌 HCN,可对常见的植物致病真菌产生拮抗作用,MTCC8707 具有分泌 IAA 的能力^[28]。这 2 种 *E. spp.* (*Exiguobacterium* N II - 0906、*Exiguobacterium acetylicum* 1P) 不仅可以提高生物质产量,并且能够增强植物的抗逆性。

在重金属 Cr⁶⁺ 胁迫下,接种 *Exiguobacterium* sp. S2 玉米幼苗的各种生理指标表明,在不同浓度 Cr⁶⁺ 存在时都能促进植物总体的增长;这项工作证明了存在重金属 Cr⁶⁺ 时引入微小杆菌能确保植物的生存,甚至保护它们;植物效应与重金属浓度、污染物的接触时间、植物固有的抗性有关。当存在微小杆菌时,能够维持玉米幼苗根长、叶面积、茎长的生长,对重金属的耐受性试验表明这种植物与微小杆菌之间有协同作用,

特别是 *Exiguobacterium* sp. S2 对污染物影响的回应。微小杆菌就像分析的那样,可以推荐用来增加植物的生物量,稳定或修复重金属污染的土壤。*Exiguobacterium* spp. 分布广泛,生存环境多样,具有分解复杂有机污染物、转化重金属、促生作用等极具实用价值的功能。

参考文献:

[1] Karthik C, Ramkumar V S, Pugazhendhi A, et al. Biosorption and biotransformation of Cr(VI) by novel *Cellulosimicrobium funkei* strain AR6 [J]. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2017, 70: 282 - 290.

[2] Cervantes C, Campos - García J, Devars S, et al. Interactions of chromium with microorganisms and plants [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2001, 25(3): 335 - 347.

[3] Tang S R, Wilke B M, Brooks R R. Heavy - metal uptake by metal - tolerant *Elsholtzia haichowensis* and *Commelina communis* from China [J]. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 2001, 32(5/6): 895 - 905.

[4] Khan A G. Relationships between chromium biomagnification ratio, accumulation factor, and mycorrhizae in plants growing on tannery effluent - polluted soil [J]. Environment International, 2001, 26(5/6): 417 - 423.

[5] Karagiannidis N, Hadjisavva - Zinoviadi S. The mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* enhances growth, yield and chemical composition of a durum wheat variety in 10 different soils [J]. Nutrient Cycling in Agroecosystems, 1998, 52(1): 1 - 7.

[6] Davies J T, Puryear J D, Newton R J, et al. Mycorrhizal fungi enhance accumulation and tolerance of chromium in sunflower (*Helianthus annuus*) [J]. Journal of Plant Physiology, 2001, 158(6): 777 - 786.

[7] Davies J T, Puryear J D, Newton R J, et al. Mycorrhizal fungi increase chromium uptake by sunflower plants: influence on tissue mineral concentration, growth, and gas exchange [J]. Journal of Plant Nutrition, 2002, 25(11): 2389 - 2407.

[8] Burd G I, Dixon D G, Glick B R. A plant growth - promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(10): 3663 - 3668.

[9] Cobbett C S. Phytochelatins and their roles in heavy metal

- detoxification[J]. *Plant Physiology*,2000,123(3):825–832.
- [10] Jones D L, Hodge A, Kuzyakov Y. Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition[J]. *New Phytologist*,2004,163(3):459–480.
- [11] Gupta D K, Rai U N, Sinha S, et al. Role of *Rhizobium*(CA-1) inoculation in increasing growth and metal accumulation in *Cicer arietinum* L. growing under fly-ash stress condition[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*,2004,73(2):424–431.
- [12] Rajkumar M, Ma Y, Freitas H. Characterization of metal-resistant plant-growth promoting *Bacillus weihenstephanensis* isolated from serpentine soil in Portugal[J]. *Journal of Basic Microbiology*,2008,48(6):500–508.
- [13] Kuffner M, Puschenreiter M, Wieshammer G A, et al. *Rhizosphere* bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows[J]. *Plant and Soil*,2008,304(1/2):35–44.
- [14] Compant S, Clément C, Sessitsch A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization[J]. *Soil Biology and Biochemistry*,2010,42(5):669–678.
- [15] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [16] Penrose D M, Glick B R. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria[J]. *Physiologia Plantarum*,2003,118(1):10–15.
- [17] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*,1976,72(1):248–254.
- [18] Sheng X F, Xia J J, Jiang C Y, et al. Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape[J]. *Environmental Pollution*,2008,156(3):1164–1170.
- [19] Sagervanshi A, Kumari P, Nagee A, et al. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from an agricultural soil[J]. *International Journal of Life Science and Pharma Research*,2012,2(3):1256–1266.
- [20] Belimov A A, Hontzas N, Safronova V I, et al. Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.)[J]. *Soil Biology and Biochemistry*,2005,37(2):241–250.
- [21] Zhang Y F, He L Y, Chen Z J, et al. Characterization of lead-resistant and ACC deaminase-producing endophytic bacteria and their potential in promoting lead accumulation of rape[J]. *Journal of Hazardous Materials*,2011,186(2/3):1720–1725.
- [22] Glick B R, Penrose D M, Li J P. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria[J]. *Journal of Theoretical Biology*,1998,190(1):63–68.
- [23] Patten C L, Glick B R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system[J]. *Applied and Environmental Microbiology*,2002,68(8):3795–3801.
- [24] Glick B R. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase[J]. *FEMS Microbiology Letters*,2005,251(1):1–7.
- [25] Chaudri A M, Allain C, Barbosa-Jefferson V L, et al. A study of the impacts of Zn and Cu on two rhizobial species in soils of a long-term field experiment[J]. *Plant and Soil*,2000,221(2):167–179.
- [26] Bharti N, Yadav D, Barnawal D, et al. *Exiguobacterium oxidotolerans*, a halotolerant plant growth promoting rhizobacteria, improves yield and content of secondary metabolites in *Bacopa monnieri* (L.) Pennell under primary and secondary salt stress[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*,2013,29(2):379–387.
- [27] Dastager S G, Kumaran D C, Pandey A. Characterization of plant growth-promoting rhizobacterium *Exiguobacterium* N II-0906 for its growth promotion of cowpea (*Vigna unguiculata*)[J]. *Biologia*,2010,65(2):197–203.
- [28] Selvakumar G, Joshi P, Nazim S, et al. *Exiguobacterium acetylicum* strain 1P(MTCC 8707) a novel bacterial antagonist from the North Western Indian Himalayas[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*,2009,25(1):131–137.
- (上接第 267 页)
- [7] Misra R, Bansal V, Agrawal G D, et al. CFD analysis based parametric study of derating factor for earth air tunnel heat exchanger[J]. *Applied Energy*,2013,103(1):266–277.
- [8] Wu H J, Zhu D S, Li J, et al. Thermodynamic analysis of earth cooling system combined with adsorption dehumidifier for air condition[J]. *Journal of South China University of Technology*,2003,31(7):37–41.
- [9] Mavroyanopoulos G N, Kyritsis S. The performance of a greenhouse heated by an earth-air heat exchanger[J]. *Agricultural and Forest Meteorology*,1986,36(3):263–268.
- [10] Ghosal M K, Tiwari G N, Srivastava N S L. Thermal modeling of a greenhouse with an integrated earth to air heat exchanger: an experimental validation[J]. *Energy and Buildings*,2004,36(3):219–227.
- [11] 陶文铨. 数值传热学[M]. 西安: 西安交通大学出版社, 2002: 218–225.
- [12] Slayer R O. Plant-water relationships[M]. London and New York: Academic Press, 1971.
- [13] Bansal V, Misra R, Agrawal G D, et al. Performance analysis of earth-pipe-air heat exchanger for winter heating[J]. *Energy and Buildings*,2009,41(11):1151–1154.
- [14] Badescu V. Simple and accurate model for the ground heat exchanger of a passive house[J]. *Renewable Energy*,2007,32(5):845–855.
- [15] Li W, Yu B, Wang Y, et al. Study on general governing equations of computational heat transfer and fluid flow[J]. *Communications in Computational Physics*,2012,12(5):1482–1494.
- [16] Hayase T, Humphery J A C, Greif R. A consistently formulated QUICK scheme for fast and stable convergence using finite-volume iterative[J]. *Journal of Comput Phys*,1992,98(1):108–118.
- [17] 帕坦卡. 传热与流体流动的数值计算[M]. 张政, 译. 北京: 科学出版社, 1989.
- [18] Patankar S V, Sparrow E M, Ivanović M. Thermal interactions among the confining walls of a turbulent recirculating flow[J]. *Int J Heat Mass Transfer*,1978,21(3):269–274.