



青藏高原多年冻土区解磷菌筛选及抗逆能力评价

张晗昱^{1,2}, 李丹丹^{1*}, 郑瑾¹, 樊金娟², 王清威¹, 杜显元¹, 任金蔓³,
宋权威¹, 吴慧君¹, 谢加才¹

- 1 中国石油天然气集团有限公司安全环保技术研究院 石油石化污染物控制与处理国家重点实验室, 北京 102206
- 2 沈阳农业大学生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110866
- 3 大庆油田水务环保公司, 黑龙江 大庆 163712

张晗昱, 李丹丹, 郑瑾, 樊金娟, 王清威, 杜显元, 任金蔓, 宋权威, 吴慧君, 谢加才. 青藏高原多年冻土区解磷菌筛选及抗逆能力评价[J]. 微生物学报, 2024, 64(6): 1876-1890.

ZHNG Hanyu, LI Dandan, ZHENG Jin, FAN Jinjuan, WANG Qingwei, DU Xianyuan, REN Jinman, SONG Quanwei, WU Huijun, XIE Jiakai. Screening of phosphorus-solubilizing strains with stress tolerance in the permafrost region of the Qinghai-Xizang Plateau[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(6): 1876-1890.

摘要:【目的】本研究旨在从青藏高原多年冻土区土壤中分离筛选高效解磷菌, 为青藏高原土壤中难利用性磷的活化提供菌株资源。【方法】以青藏高原唐古拉山口附近的多年冻土区土壤为研究对象, 利用有机磷和无机磷选择性培养基通过平板划线法分离解磷菌, 通过 16S rRNA 基因系统发育分析对菌株进行鉴定, 并对解磷菌的解磷能力和抗逆能力进行评价。【结果】分离筛选的 5 株解磷菌应归于假单胞菌属(*Pseudomonas*), 包括 3 株解无机磷菌(i5、i6、i9L)和 2 株解有机磷菌(Qb 和 Qo); 30 °C 培养条件下, Qb 和 Qo 上清液有效磷含量分别为 534.8 mg/L 和 723.7 mg/L, 显著高于 i5、i6、i9L 上清液有效磷含量(166.9–210.5 mg/L); 利用不同浓度的聚乙二醇(PEG6000)对菌株进行模拟干旱培养, 5 株解磷菌在 PEG6000 处理下均可正常生长, 而且 Qo 上清液有效磷含量最高(519.7–683.0 mg/L); 不同培养温度下, Qb 和 Qo 在 5 °C 和 10 °C 培养下解磷能力要强于

资助项目: 中国石油天然气集团有限公司安全环保技术研究院有限公司科学研究与技术开发项目(RISE2022KY08); 中国博士后科学基金(2022M713468); 中国石油天然气集团有限公司科技项目(2023ZZ1303); 中国石油天然气集团有限公司基础科学和战略储备技术研究基金(2022DQ03-A5)

This work was supported by the Scientific Research and Technology Development Program of China National Petroleum Corporation Research Institute of Safety and Environment Technology (RISE2022KY08), the China Postdoctoral Science Foundation (2022M713468), the Science and Technology Program of China National Petroleum Corporation (2023ZZ1303), and the Basic Science and Strategic Reserves Technology Research Fund Program of China National Petroleum Corporation (2022DQ03-A5).

*Corresponding author. E-mail: li1293162207@163.com

Received: 2023-11-03; Accepted: 2024-04-17; Published online: 2024-04-24

其他菌株的解磷能力。【结论】菌株 Qo 的耐低温和干旱能力强于其他 4 株菌, 是青藏高原等高寒地区菌肥开发和植被恢复研究重要菌种资源。

关键词: 青藏高原; 多年冻土区; 解磷菌; 低温胁迫; 干旱胁迫

Screening of phosphorus-solubilizing strains with stress tolerance in the permafrost region of the Qinghai-Xizang Plateau

ZHNG Hanyu^{1,2}, LI Dandan^{1*}, ZHENG Jin¹, FAN Jinjuan², WANG Qingwei¹, DU Xianyuan¹, REN Jinman³, SONG Quanwei¹, WU Huijun¹, XIE Jiakai¹

1 State Key Laboratory of Petroleum Pollution Control, China National Petroleum Corporation Research Institute of Safety and Environment Technology, Beijing 102206, China

2 College of Bioscience and Biotechnology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, Liaoning, China

3 Daqing Oilfield Water and Environmental Protection Company, Daqing 163712, Heilongjiang, China

Abstract: [Objective] To isolate efficient phosphorus-solubilizing strains from soils in the permafrost region of the Qinghai-Xizang Plateau and provide strain resources for the activation of unavailable phosphorus in the soil of the Plateau. [Methods] The selective media with organic and inorganic phosphorus were used to isolate phosphorus-solubilizing strains from the soil samples collected in the permafrost region around the Tanggula Pass of the Qinghai-Xizang Plateau by the plate streaking method. The phylogenetic tree was built based on the 16S rRNA gene sequences to identify the strains, and then the phosphorus-solubilizing abilities and stress tolerance of the strains were determined. [Results] Five strains belonging to *Pseudomonas* were isolated, including three inorganic phosphorus-solubilizing strains (i5, i6, and i9L) and two organic phosphorus-solubilizing strains (Qb and Qo). After 7 days of incubation in shake flasks at 30 °C, the content of available phosphorus in the supernatants of Qb and Qo was 534.8 mg/L and 723.7 mg/L, respectively, which was significantly higher than that (166.9–210.5 mg/L) in the supernatants of i5, i6, and i9L. The available phosphorus content in the supernatant of Qo was the highest (519.7–683.0 mg/L) among the five isolates under different concentrations of PEG6000. The phosphorus-solubilizing abilities of Qb and Qo were stronger than those of the other strains at 5 °C and 10 °C. [Conclusion] Qo outperformed the other strains in terms of tolerance to low temperature and drought stress, serving the development of microbial fertilizers and vegetation restoration in alpine regions such as the Qinghai-Xizang Plateau.

Keywords: Qinghai-Xizang Plateau; permafrost region; phosphorus-solubilizing strain; low temperature stress; drought stress

青藏高原位于我国干旱半干旱地区, 约占全国陆地总面积的 27%。其区域内平均海拔在 4 000 m 以上, 是全球中低纬度地区海拔最高、面积最大的冻土区^[1]。由于特殊的地理环境以及高寒、干旱的气候条件等因素, 青藏高原冻土区对环境变化反应极为敏感, 是极其脆弱的生态系统^[1-2]。自 20 世纪末, 随着西部大开发的积极推进, 青藏公路、青藏铁路、石油管道等工程在青藏高原开始实施, 导致青藏高原出现大面积草地退化。目前, 对这些遭到破坏的高寒草地进行快速恢复成为青藏高原生态环境保护领域的研究热点。

磷元素参与植物体的新陈代谢过程, 是限制植物生长的重要元素之一。然而, 土壤中的磷大多以有机态形式存在, 这些有机态的磷组分往往不能被植物直接吸收利用^[3-4]。此外, 土壤中含量较低的无机磷多以闭蓄态以及非闭蓄态的磷酸铁、磷酸钙或磷酸铝等难溶性磷酸盐形式存在, 这些难溶性磷也无法被植物直接利用^[5-6]。因此, 大多数生态系统往往受磷元素限制, 这意味着磷是制约植被恢复的关键营养元素之一。基于此, 将土壤中不溶性或难利用性磷转化为植物可利用性磷对促进青藏高原地区植被恢复具有重要现实意义。

土壤中存在丰富的解磷微生物, 这类微生物可以释放有机酸分子将难溶性磷酸盐转化为可溶性磷, 也可以分泌磷酸酶矿化有机磷, 从而提高土壤中植物可利用磷含量^[7-8]。随着微生物分子生态学研究技术的快速发展, 特别是高通量测序技术的应用, 极大地促进了解磷微生物原位分析能力^[9-10]。目前, 基于微生物基因组学技术方法已发现具有解磷作用的微生物类群主要包括芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、固氮杆菌属 (*Azotobacter*)、伯克氏菌属 (*Burkholderia*)、泛菌属 (*Pantoea*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*) 和不动杆菌属 (*Acinetobacter*)

等^[11-13]。开发和利用这些解磷微生物, 尤其是对极端生境下解磷菌株的资源挖掘, 不仅可以丰富人类利用微生物的种类, 还能为生态环保领域发展提供关键的技术支撑。

目前, 高寒区解磷菌株的分离筛选工作已受到研究者关注。例如: 王亚艺等^[14]从青海省农耕地石灰性土壤中筛选出可提高油菜产量的解磷菌。蔺宝珺等^[15]从青海省高寒草甸根际土中分离获得以假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) 为优势种的解磷菌, 其解磷量为 156.2–511.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。杨婉秋等^[16]在川西北高寒地区筛选出不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、沙雷氏菌属 (*Serratia*) 和芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 等 6 个属 49 株解磷菌, 其解磷量为 10.58–90.27 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。叶震等^[17]在祁连山高寒草地生态系统筛选出 13 株解磷菌, 其解磷量为 130–11 842 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。不同地区土壤结构、土壤类型和质地条件有所不同, 自然环境中微生物的种类也存在差异, 这导致不同研究中筛选的解磷菌种类及其解磷能力存在着显著差异。先前这些研究重点关注高寒区解磷菌株分离, 然而对于青藏高原冻土区解磷微生物的筛选及菌株抗逆能力研究鲜有报道。

本研究以青藏高原多年冻土区土壤为研究对象, 利用有机磷和无机磷选择性培养基分离解磷菌, 通过测定菌株的溶磷圈、菌液中 pH 和上清液有效磷含量等指标分析解磷菌的解磷能力, 结合不同干旱梯度和温度梯度培养实验评价菌株的抗逆能力, 以期为解决青藏高原冻土区磷限制问题提供优良的菌株资源, 将对干旱半干旱冻土区生态恢复具有重要意义。

1 材料与amp;方法

1.1 研究区域和样品采集

研究区域位于西藏自治区那曲市安多县唐古拉山口附近 (32°33'10.66"N, 91°50'3.97"E), 是

典型多年冻土分布区。该区域海拔 5 100 m, 全年大风日约 100 d, 年均降水量 293–430 mm, 年均气温 $-1.3\text{--}2.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ ^[18]。区域内主要植被为紫花针茅 (*Stipa basiplumosa*)、火绒草 (*Leontopodium leontopodioides*)、羽柱针茅 (*Stipa subsessiliflora*)、青藏苔草 (*Carex moorcroftii*) 和垫状驼绒藜 (*Krascheninnikovia compacta*)。土壤发育程度较低, 多为石灰性土。

2022 年 8 月, 在唐古拉山口附近, 距 109 国道垂直距离 100–150 m 范围内采集 0–10 cm 的土壤样品。通过五点取样法采集 2 kg 土样, 并按四分法对采集的土样进行混匀。混匀后的土样分成 2 份: 一份 4 °C 保存用于解磷菌株分离; 另一份土样风干后过 2 mm 筛, 用于全量养分测定。土壤 pH 值为 8.2, 有机碳含量为 4.31 g/kg, 全氮含量为 3.08 mg/kg, 全磷含量为 0.53 g/kg。

1.2 培养基

无机磷选择性液体培养基(g/L)^[19]: 葡萄糖 10.00, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5.00, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.50, NaCl 0.30, KCl 0.30, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.30, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.03, 酵母浸粉 0.50, pH 7.0–7.5。

有机磷选择性液体培养基(g/L)^[20]: 葡萄糖 10.00, 植酸钙 5.00, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5.00, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25, KCl 0.20, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.10, pH 6.8–7.0。

肉汤培养基(LB) (g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母浸粉 5.0, NaCl 10.0, pH 7.0–7.2。

固体培养基: 在液体培养基中加入 15.0 g/L 琼脂。

在进行实验前, 上述所有培养基以及实验过程中所需的蒸馏水和涂布器等需要 121 °C 灭菌 20 min。

1.3 解磷菌的分离及纯化

将 5 g 鲜土加入到 45 mL 已灭菌的蒸馏水

中, 在 180 r/min 下振荡培养 30 min。取 1 mL 混匀液分别加入到 100 mL 有机磷和无机磷选择性液体培养基中, 在 30 °C、180 r/min 下富集培养 7 d。采用 10 倍稀释法, 分别吸取 $80\text{ }\mu\text{L}$ 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 的土悬液, 均匀涂布于有机磷和无机磷固体培养基上, 每个稀释度均设置 3 个重复。涂好后的平板在室温下静置 5–10 min, 待菌液吸附到培养基内, 用封口膜封口。平板倒置于 30 °C 恒温培养箱中培养 5–7 d, 有透明圈产生的菌落初步确定为具有解磷能力的菌株。挑选可产生透明圈且菌落大小和形态不同的单菌落进行纯化 5 次。最后, 将纯化后获得的单菌接种在 LB 斜面培养基上, 放置于 4 °C 冰箱保存。

1.4 菌株 16S rRNA 基因序列分析

采用 DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]提取解磷菌的基因组 DNA。采用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')进行 PCR 扩增^[21]。PCR 反应体系(20 μL): 10×*Ex Taq* buffer 2.0 μL , *Ex Taq* 0.2 μL , dNTP Mix (2.5 mmol/L) 1.6 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL , DNA 模板 0.5 μL , ddH₂O 13.7 μL 。PCR 反应条件: 95 °C 预处理 5 min; 95 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 25 个循环; 72 °C 延伸 10 min。将扩增的 PCR 产物委托上海美吉生物医药科技有限公司进行 16S rRNA 基因测序。利用 SeqMan 进行序列拼接, 使用 EzBioCloud 数据库(<http://www.ezbiocloud.net/>)进行 16S rRNA 基因序列比对。利用 MEGA 11.0 软件, 采用 neighbor-joining 方法通过 Kimura 2-parameter 模型构建系统发育树, 设置 bootstrap=1 000 进行检验评估^[22]。

1.5 菌株生长曲线绘制

取 OD_{600} 为 0.1 的菌悬液 1 mL, 转接于 50 mL 的 LB 液体培养基中, 在 5、10、15、20、30 °C

条件下振荡培养(180 r/min), 测定不同培养时间下菌液的 OD_{600} 值, 并分别以培养时间和 OD_{600} 值为横坐标和纵坐标绘制菌株生长曲线。

1.6 菌株解磷能力的测定

1.6.1 溶磷指数测定

将 4 °C 保存的菌株接种于 LB 液体培养基中, 在 30 °C、180 r/min 下培养过夜。将培养后的菌液浓度调整 OD_{600} 为 1.0, 取 7 μ L 菌悬液接种于选择性固体培养基上, 在 30 °C 培养箱中倒置培养。培养 7 d 后, 根据透明圈直径(H)和菌落直径(h)的比值计算溶磷指数(H/h), 初步评价菌株解磷能力。

1.6.2 pH 测定

取 OD_{600} 为 1.0 的菌液 0.5 mL, 加入 50 mL 有机磷和无机磷选择性液体培养基中, 置于 30 °C、180 r/min 的摇床中培养。培养 7 d 后, 经 10 000 r/min 离心 15 min, 用 pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司)测定上清液 pH 值。将不接种菌株的液体培养基设置为对照组, 每组 3 个重复。

1.6.3 有效磷含量测定

采用钼锑抗比色法测定菌株的解磷量^[15]。取 1.6.2 节获得的上清液 2.5 mL 置于 50 mL 容量瓶中, 加入 2 滴 2-硝基苯酚指示剂, 再滴加稀硫酸直至无色, 最后加入 5 mL 钼锑抗显色剂, 用蒸馏水定容。室温条件下反应 30 min 后, 用酶标仪(北京伯腾仪器有限公司)测定 OD_{720} 的吸光值。

1.7 菌株分泌有机酸能力测定

取 1.6.2 节获得的上清液 1 mL, 过 0.22 μ m 水系滤膜后, 利用高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司)对 5 株解磷菌分泌的有机酸组分含量进行测定。色谱柱为 TSKgel ODS-100V (4.6 mm \times 250 mm, 5.0 μ m), 检测器(variable wavelength detector, VWD), 流动相为 100.0%–0.1% 磷酸水解液等度洗脱, 流速为 1 mL/min, 柱温为 25 °C, 进样量为 30 μ L, 检测波长设定 210 nm^[23-24]。

1.8 菌株耐低温和耐干旱能力测定

耐低温能力测定: 取 OD_{600} 为 0.1 的菌悬液 1 mL, 以 2% 的接种量接种于选择性液体培养基中, 分别置于 5、10、15、20 °C 培养箱中振荡培养 7 d。采用钼锑抗比色法^[15]测定 4 个培养温度下上清液中有效磷含量。

耐干旱能力测定: 聚乙二醇(PEG6000)浓度设置为 5%、10%、20% 和 25%, 用于解磷菌抗旱能力评价研究。取 OD_{600} 为 0.1 的菌悬液 1 mL, 以 2% 的接种量接种于含有 PEG6000 的选择性液体培养基中, 30 °C、180 r/min 振荡培养 7 d 后, 采用钼锑抗比色法^[15]测定上清液中有效磷含量。

1.9 数据分析

数据均以平均值 \pm 标准差(standard deviation, SD)表示。采用单因素方差分析, 通过 Duncan 检验对 5 株解磷菌的解磷能力和分泌有机酸能力进行显著性分析。利用 Spearman 相关分析评价菌株上清液中有效磷含量与有机酸含量之间的关系。所有统计分析采用 $P < 0.05$ 表示显著差异。利用 Origin 2022 进行作图, 运用 SPSS 27 对数据进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 解磷菌 16S rRNA 基因序列测定及其分析

利用无机磷和有机磷选择性培养基从青藏高原多年冻土区土壤中分离得到 7 株解无机磷菌和 19 株解有机磷菌。通过 H/h 比值选择溶磷圈明显且具有稳定解磷能力的菌株 5 株, 包括 3 株解无机磷菌(i5、i6 和 i9L)和 2 株解有机磷菌(Qb 和 Qo)(图 1)。

基于 16S rRNA 基因的系统发育分析, 5 株解磷菌应归于假单胞菌属(*Pseudomonas*)(图 2)。其中, i5 菌株与西里西亚假单胞菌(*Pseudomonas*

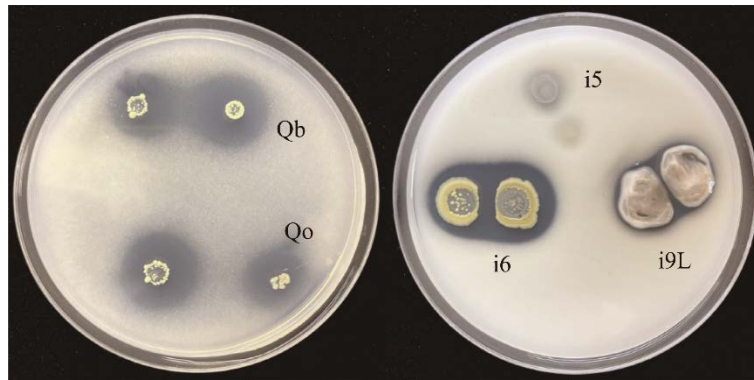


图 1 五株解磷菌的溶磷圈

Figure 1 Phosphate solubilizing circle of five phosphate solubilizing bacteria.

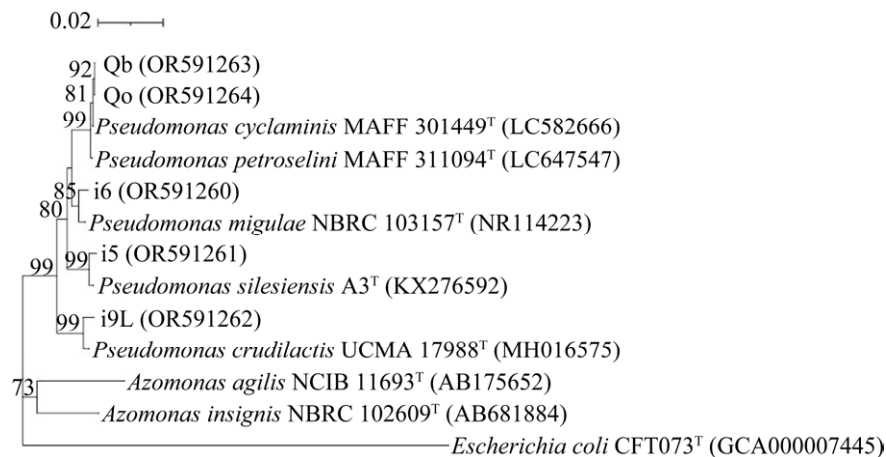


图 2 五株解磷菌的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of five phosphate solubilizing bacteria. Numbers in parentheses indicated the sequences accession number in GenBank. Numbers on the branch points represented the level of bootstrap support from 1 000 replicates. The ruler indicated 2% changes in sequence evolution.

silesiensis) A3 相似度达 99.65%; i6 菌株与米氏假单胞菌(*Pseudomonas migulae*) NBRC 103157 相似度达 99.29%; i9L 菌株与 *Pseudomonas crudilactis* UCMA 17988 相似度达 99.29%, Qb 和 Qo 菌株与 *Pseudomonas cyclaminis* MAFF 301449 相似度分别为 100.00%和 99.79% (图 2)。5 株解磷菌的 16S rRNA 基因序列已提交至 GenBank 数据库。i5、i6、i9L、Qb 和 Qo 登录号分别为 OR591261、OR591260、OR591262、OR591263 和 OR591264。

2.2 菌株生长曲线特征

菌株在不同培养温度下的生长曲线如图 3

所示。在 30 °C 时, 5 株解磷菌在培养 12–22 h 后进入稳定期(图 3A)。在 10、15、20 °C 时, i6、i9L、Qb 和 Qo 在培养 50 h 后进入稳定期(图 3B、3C、3D)。在 5 °C 时, i6、i9L、Qb 和 Qo 进入到稳定期大约需要培养 100 h, i5 则需要培养 140 h 左右进入稳定期(图 3E)。进入稳定期的 5 株解磷菌 OD_{600} 值比较结果显示: Qb 和 Qo 的 OD_{600} 值在 5–20 °C 时高于 i5、i6 和 i9L 的 OD_{600} 值, 在 30 °C 时则低于 i5、i6 和 i9L 的 OD_{600} 值。不同培养温度下, 进入稳定期的 Qb 和 Qo 的 OD_{600} 值在 15 °C 时最高(图 3)。

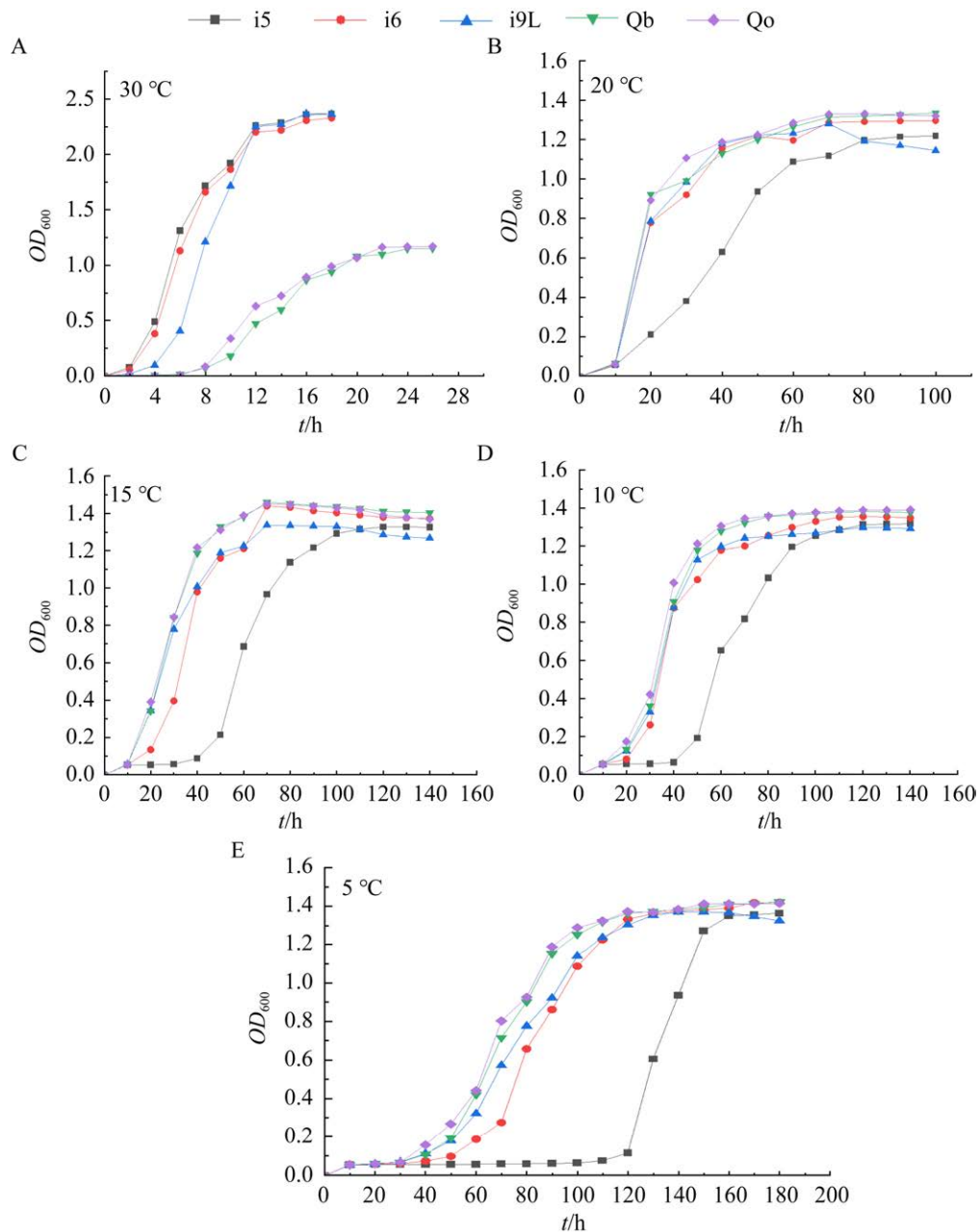


图3 五株解磷菌的生长曲线

Figure 3 Growth curves of five phosphate solubilizing bacteria.

2.3 解磷菌的解磷能力分析

通过溶磷指数(H/h)可以看出, i5、i6和i9L菌株的溶磷圈直径与菌落直径的比值低于Qb和Qo(图4A)。5株菌的上清液pH变化范围为4.8–5.8, Qb和Qo上清液的pH显著低于i5、

i6和i9L($P < 0.05$, 图4B)。从菌株的解磷量上来看, 菌株i5、i6和i9L上清液中有效磷含量为166.9–210.5 mg/L, 显著均低于菌株Qb(534.8 mg/L)和Qo(723.7 mg/L)上清液中有效磷含量(图4C)。

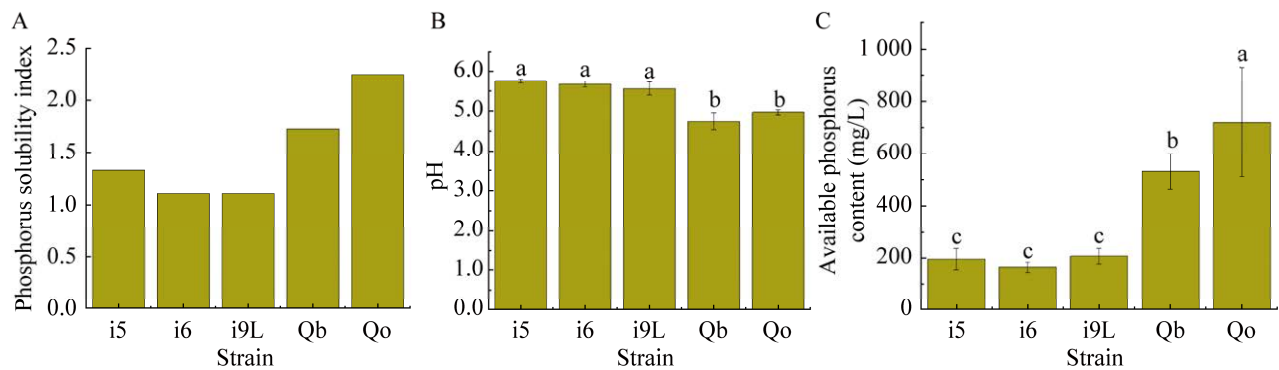


图 4 五株解磷菌的解磷能力

Figure 4 Phosphorus solubilization ability of five phosphate solubilizing bacteria. A: Phosphorus solubility index. B: pH. C: Available phosphorus content. The different letters indicate significant differences in phosphorus solubilization ability among strains at $P < 0.05$ level.

2.4 解磷菌分泌有机酸种类及其含量

如表 1 所示, 5 株解磷菌均可分泌草酸、苹果酸、酒石酸、乳酸、奎宁酸、莽草酸、丙二酸、柠檬酸、琥珀酸、马来酸和富马酸。解磷菌分泌总有机酸的量为 $Qb > i6 > Qo > i9L > i5$ 。苹果酸、草酸、乳酸和酒石酸是解无机磷菌分泌的主要有机酸组分; 苹果酸、丙二酸、酒石酸和乳酸是解有机磷菌分泌的主要有机酸组分。相关分析结果显示, 菌株上清液中有效磷含量与酒石酸和丙二酸

含量呈显著正相关($P < 0.01$, 图 5)。

2.5 干旱胁迫下菌株的解磷量分析

不同浓度 PEG6000 干旱胁迫处理下, Qo 上清液中有效磷含量最高($P < 0.05$, 表 2)。随着 PEG6000 浓度的增加, 5 株解磷菌上清液中有效磷含量大体呈现下降趋势。与浓度为 5% PEG6000 相比, 25% PEG6000 处理下的 i5、i6、Qb 和 Qo 上清液中有效磷含量分别降低了 48%、51%、44%和 24% (表 2)。

表 1 五株解磷菌株分泌 11 种有机酸含量

Table 1 The contents of eleven organic acid (mg/L) secreted by five phosphate solubilizing bacteria

Items	Strain				
	i5	i6	i9L	Qb	Qo
Oxalic acid	369.5±12.2a	381.7±7.3a	315.0±31.6b	196.8±3.5c	211.0±2.0c
Malic acid	269.6±10.1e	1 444.1±48.1b	1 336.7±35.8c	1 766.9±2.6a	1 014.9±47.8d
Tartaric acid	222.8±10.7b	186.1±36.4c	42.0±6.6d	444.7±2.8a	436.0±7.7a
Lactic acid	94.8±2.7e	487.2±5.9a	397.8±4.2c	413.5±1.6b	122.0±3.5d
Quinic acid	93.8±80.1a	62.4±56.8a	30.1±1.5a	23.5±1.6a	15.4±0.8a
Shikimic acid	43.3±0.4a	33.9±0.3c	38.0±1.1b	8.4±0.4d	6.6±0.1e
Malonic acid	18.9±2.8d	52.4±0.9c	52.7±4.8c	597.5±32.3a	509.9±5.9b
Citric acid	14.80±2.56c	74.90±10.21a	6.6±1.5d	38.0±1.8b	9.8±0.4d
Succinic acid	2.6±0.2d	25.0±1.6b	14.3±4.3c	11.1±1.6c	84.9±1.2a
Maleic acid	0.57±0.01c	1.98±0.01a	1.43±0.24b	1.62±0.08b	0.55±0.01c
Fumaric acid	1.22±0.06a	0.82±0.01b	1.15±0.18a	0.49±0.02c	0.19±0.01d
Total organic acids	1 131.9±63.6e	2 750.6±148.6b	2 235.8±32.8d	3 502.6±34.0a	2 411.1±56.6c

The different letters indicate significant differences of organic acid contents among strains at $P < 0.05$ level.

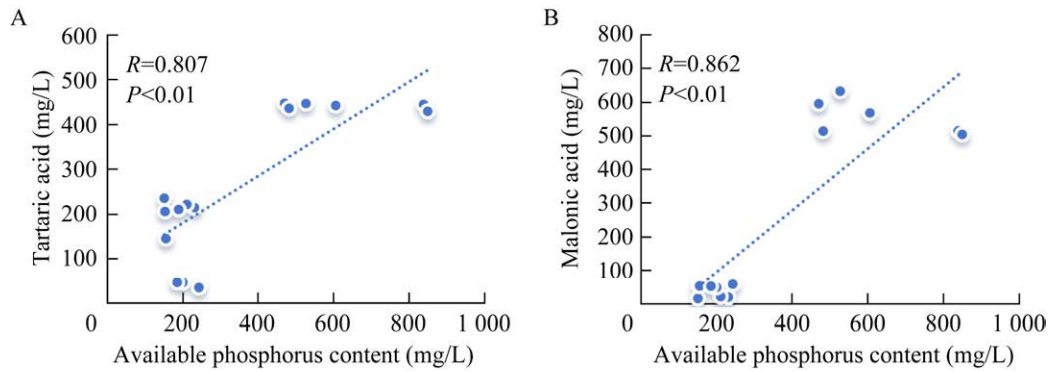


图 5 有机酸和有效磷含量的相关分析

Figure 5 Correlation analysis between available phosphorus and tartaric acid (A), and malonic acid (B) content.

表 2 五株解磷菌在不同浓度 PEG6000 处理下的解磷量

Table 2 Phosphorus solubilization capacity (mg/L) of five phosphate solubilizing bacteria at the different concentrations of PEG6000

Strains	5% PEG6000	10% PEG6000	20% PEG6000	25% PEG6000
i5	459.0±12.6Ab	302.3±23.5Bc	271.5±16.9BCc	238.8±17.5Cbc
i6	341.5±19.9Ac	231.8±23.4Bd	182.8±12.2Cd	167.0±15.9Cc
i9L	193.1±14.1Ad	185.6±35.1Ad	159.5±27.6Ad	198.7±11.7Ac
Qb	588.8±50.9Aa	543.0±25.4Ab	414.2±9.8Bb	327.5±39.3Cb
Qo	683.0±115.1Aa	640.1±47.9Aa	593.2±6.8Aa	519.7±116.6Aa

Different lowercase letters in the same column indicate the significant difference in the available phosphorus content among strains under the same PEG6000 concentration at $P<0.05$ level. Different uppercase letters in the same row indicate the difference in the available phosphorus for the same strains under different PEG6000 concentrations at $P<0.05$ level.

2.6 不同培养温度下菌株的解磷量分析

如表 3 所示, 解有机磷菌 Qb 和 Qo 在 10 °C 培养时上清液中有效磷含量显著高于该菌株在其他培养温度下上清液中有效磷含量($P<0.05$)。

菌株 i9L 和菌株 i6 分别在 5 °C 和 15 °C 培养时上清液中有效磷含量最高, 高于其他培养温度下上清液中有效磷含量。此外, 菌株 i5 在 5、10 和 15 °C 培养时上清液中有效磷含量相近, 但显著

表 3 五株解磷菌在不同温度下的解磷量

Table 3 Phosphorus solubilization capacity (mg/L) of five phosphate solubilizing bacteria at the different temperature

Strains	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C
i5	328.0±3.2Aa	329.6±12.3Ab	328.6±1.5Ab	305.9±0.9Ba
i6	264.3±65.1Bb	283.3±7.3ABd	344.5±9.3Aa	301.8±21.9ABa
i9L	343.5±16.6Aa	307.0±5.6Bc	312.6±7.6Bc	303.9±0.0Ba
Qb	354.3±13.9Aa	371.7±10.8Aa	311.6±8.6Bc	261.7±7.1Cb
Qo	356.8±8.5Ba	375.8±11.6Aa	274.1±1.8Cd	275.6±7.9Cb

Different lowercase letters in the same column indicate the significant difference in the available phosphorus content among strains under the same temperature at $P<0.05$ level. Different uppercase letters in the same row indicate the difference in the available phosphorus for the same strains under different temperature at $P<0.05$ level.

高于 20 °C 培养时上清液中有效磷含量 ($P < 0.05$)。不同菌株在相同培养温度下的解磷量分析发现, 解有机磷在低温 5 °C 和 10 °C 培养时上清液中有效磷含量显著高于解无机磷菌, 而在 20 °C 培养时显著低于解无机磷菌上清液中有效磷含量 ($P < 0.05$)。

3 讨论

本研究通过选择性培养基首次从西藏多年冻土区土壤中筛选出 3 株解无机磷菌和 2 株解有机磷菌, 均为假单胞菌属, 这可能是因为假单胞菌属的细菌在环境中分布广泛, 而且具有较强的环境适应能力^[25]。马福林等^[26]确实也从西藏沙棘根瘤中分离出 4 株具有促生作用的假单胞菌; 李明源等^[27]在祁连山高寒地区筛选出的 87 株植物促生细菌 (plant growth promoting bacteria, PGPB), 其中 85% 以上的菌株为假单胞菌。李琦等^[28]从青海省高寒草地燕麦根际处也筛选出以假单胞菌为优势种且具有解磷功能的菌株。本研究 and 先前这些研究结果表明了假单胞菌在高寒地区广泛分布, 而且较其他属的菌株更易分离获得。此外, 还考虑到高寒地区特殊生境中微生物活性较弱且生长速度较慢等因素^[7], 因此在解磷菌分离过程中选择大部分微生物代谢功能最活跃的适宜温度 (30 °C) 培养, 并在培养基中添加少量成分的酵母浸粉, 这将有利于微生物的快速生长。较高的培养温度及丰富的营养液组分可能会刺激生长速度较快的假单胞菌属的微生物繁殖。在未来的研究中, 我们将改变富集培养条件试图分离纯化获得更丰富的解磷菌株资源。

尽管本研究中所分离的解磷菌均为假单胞菌属, 但 5 株菌的解磷能力存在显著差异。根据溶磷圈直径 (H) 与菌落直径 (h) 的比值初步评价菌株解磷能力, 其比值越大往往说明菌株的解磷能力越强^[29-30]。解有机磷菌株 Qb 和 Qo 的 H/h 比

值大于解无机磷菌株 i5、i6 和 i9L 的 H/h 比值。在 30 °C 条件下培养 7 d 后, Qb 和 Qo 上清液有效磷含量分别为 534.8 mg/L 和 723.7 mg/L, 显著高于菌株 i5 (198.7 mg/L)、i6 (166.9 mg/L) 和 i9L (210.5 mg/L) 上清液中有效磷含量。该研究发现解有机磷菌在 30 °C 培养条件下比解无机磷菌具有更强的解磷能力。此外, 菌株 Qb 和 Qo 上清液有效磷的含量高于相同培养条件下的马福林等^[26]、高亚敏等^[31]和蔺宝珺等^[15]从高寒草甸土壤中分离的解磷菌。这可能是因为地理环境的不同导致解磷菌种类及其产酸能力和代谢途径等生理功能存在差异, 进而表现出不同的解磷能力^[32]。

产酸是解磷菌解磷的主要途径之一。有机酸一方面可以降低环境 pH, 另一方还可以与钙、铝、铁和镁等金属阳离子螯合, 从而将难溶性磷转化为可溶性磷。一些研究中也证实了解磷菌的解磷能力与 pH 呈显著负相关^[33-34]。本研究中也发现了 5 株菌的解磷能力随着上清液的 pH 值降低而显著增强。通过有机酸组成分析可以看出, 5 株菌均可分泌草酸、苹果酸、酒石酸、乳酸、奎宁酸、莽草酸、丙二酸、柠檬酸、琥珀酸、马来酸和富马酸。5 株解磷菌分泌总有机酸的量在 1 131.9–3 502.6 mg/L 之间, 显著高于蔺宝珺等^[15]报道的 4 株解磷菌分泌的总有机酸量 (522.0–900.0 mg/L)。已有研究指出葡萄糖酸在解磷菌解磷过程中发挥主要作用^[35-37]。此外, 也有研究发现吡啶乙酸、酒石酸、草酸、苹果酸、苯乙酸、乳酸、琥珀酸、延胡索酸和富马酸等物质也是解磷菌分泌的重要有机酸组分^[38]。本研究中发现苹果酸是 5 株解磷菌分泌量较高的有机酸组分, 这与蔺宝珺等^[15]关于高寒区土壤解磷菌分泌有机酸组分测定的研究结果相一致。由于不同类型的有机酸分子与金属离子之间的结合能力存在差异, 因此不能仅通过有机酸分泌量来判断菌株的解磷能力^[37]。相关分析结果显示菌

株上清液中有效磷含量与酒石酸和丙二酸含量呈显著正相关($P < 0.01$), 表明酒石酸和丙二酸是影响该研究区域解磷菌解磷能力的关键有机酸组分。与解无机磷菌株相比, 解有机磷菌具有更强的分泌酒石酸和丙二酸的能力。然而, 解磷菌不仅依赖于分泌有机酸, 还会通过分泌磷酸酶或释放 H^+ 、 NH_4^+ 、 CO_2 等途径调控解磷过程^[3]。因此, 在未来的研究中我们将在关注解磷菌的解磷能力的基础上进一步对解磷机制开展更深入的研究。

PEG6000 可以通过调节细胞渗透势以及细胞代谢来营造干旱环境^[39]。本研究分别设置轻度干旱胁迫(PEG6000 浓度为 5%和 10%)、中度干旱胁迫(PEG6000 浓度为 20%)和重度干旱胁迫(PEG6000 浓度为 25%)培养实验进一步评价所筛选的 5 株解磷菌的耐干旱能力。5 株菌上清液中有效磷含量大体随着 PEG6000 浓度的增高而呈下降趋势, 这可能是因为高浓度 PEG6000 处理会抑制菌株的生长。吉泽等^[40]研究也发现了马铃薯内生益生菌的生存能力在 PEG6000 干旱胁迫下会显著降低。一般来说, 微生物处于干旱环境下会导致其细胞功能会发生不可逆损伤。然而, 微生物在干旱加剧环境下也会进化出相应的适应机制。耐干旱菌株通常会分泌更多的胞外多糖, 该物质有利于微生物向环境极大程度获取并储存水分, 有助于保护胞内的水分流失^[41-42]。在本研究中, Qo 上清液有效磷含量在不同浓度 PEG6000 处理下均显著高于其他 4 株解磷菌, 进一步说明该菌株在所分离的高活性解磷菌中具有较强的抗旱能力。

本研究还发现 5 株解磷菌在 5–15 °C 条件下的解磷能力要强于 20 °C 条件下的解磷能力, 表明菌株具有较好的适应低温能力。先前也有研究从深海沉积、雪冰、极地土壤以及其他寒冷环境中分离获得适应低温的微生物^[43-44]。这些微生物

能在低温条件下存活并保持较高活性, 主要是依赖于其长期生存在低温环境下并能够形成与环境相适应的独特的细胞膜脂结构来实现的。低温往往会降低常温环境下菌株的细胞膜流动性, 导致微生物的生理功能丧失。然而, 耐低温菌株会通过提高细胞膜不饱和脂肪酸比例、缩短脂肪酸链平均链长、增加甲基分支以及顺式脂肪酸比例等方式来防止细胞膜从液晶态转变到凝胶态, 从而维持膜的流动性^[45-47]。因此, 本研究中所分离的 5 株解磷菌来源于西藏高寒多年冻土区土壤, 不同于从常温环境中分离的解磷菌, 其解磷能力在适宜生长温度条件下随着培养温度的升高而增强^[48-49]。本研究还发现, 5 株解磷菌生长到稳定期所需时间随着培养温度的降低而延长, 这与孙健等^[50]研究结果一致。在 5–20 °C 条件下, 进入稳定期的 Qb 和 Qo 的 OD_{600} 值要高于解无机磷菌的 OD_{600} 值, 这反映了解有机磷菌可能具有更强的耐低温能力。此外, 菌株 Qb 和 Qo 上清液有效磷含量仅在 5 °C 和 10 °C 培养时显著高于其他菌株上清液有效磷含量, 进一步表明解磷菌在低温条件下的生物量积累不能完全代表菌株的解磷能力。已有研究指出, 耐低温菌株在低温环境下维持较高活性往往与其自身能够产生对热不稳定的低温酶有密切关系; 这类耐低温酶大多属于环状结构, 通过增加表面电荷以及减少盐键、氢键和疏水键等方法来提高酶的柔韧性, 进而保证其功能活性的稳定^[51]。

4 结论

本研究利用选择性培养基从青藏高原多年冻土区土壤中筛选出 3 株解无机磷菌(i5、i6 和 i9L)和 2 株解有机磷菌(Qb 和 Qo)。基于 16S rRNA 基因系统发育分析结果表明, 5 株解磷菌均为假单胞菌属(*Pseudomonas*)。然而, 5 株菌在解磷能力、抗干旱和耐低温能力等方面存在显著

的差异。通过解磷菌的溶磷指数、上清液 pH 和有效磷含量的测定, 揭示了 Qb 和 Qo 解磷能力强于 i5、i6 和 i9L 的解磷能力。通过 PEG6000 模拟干旱胁迫处理以及低温培养实验发现, 菌株 Qo 较其他菌株具备更强的耐干旱和低温的能力。本研究将为青藏高原多年冻土区土壤难利用性磷活化提供重要菌株资源, 对于支撑青藏高原冻土区土壤修复和植物生长具有重要意义。

参考文献

- [1] MIEHE G, SCHLEUSS PM, SEEGER E, BABEL W, BIERMANN T, BRAENDLE M, CHEN FH, CONERS H, FOKEN T, GERKEN T, GRAF HF, GUGGENBERGER G, HAFNER S, HOLZAPFEL M, INGRISCH J, KUZYAKOV Y, LAI ZP, LEHNERT L, LEUSCHNER C, LI XG, et al. The *Kobresia pygmaea* ecosystem of the Tibetan Highlands-origin, functioning and degradation of the world's largest pastoral alpine ecosystem: *Kobresia* pastures of Xizang[J]. *The Science of the Total Environment*, 2019, 648: 754-771.
- [2] 王建林, 钟志明, 王忠红, 陈宝雄, 张宪洲, 沈振西, 胡兴祥, 大次卓嘎. 青藏高原高寒草原生态系统土壤氮磷比的分布特征[J]. *应用生态学报*, 2013, 24(12): 3399-3406.
WANG JL, ZHONG ZM, WANG ZH, CHEN BX, ZHANG XZ, SHEN ZX, HU XX, DA C. Soil N/P ratio distribution characteristics of alpine grassland ecosystem in Qinghai-Xizang Plateau[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2013, 24(12): 3399-3406 (in Chinese).
- [3] CHARANA WALPOLA B. Prospectus of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus availability in agricultural soils: a review[J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2012, 6(37): 6600-6605.
- [4] 朱德旋, 杜春梅, 董锡文, 薛春梅, 王瑞. 一株寒地高效解无机磷细菌的分离鉴定及拮抗作用[J]. *微生物学报*, 2020, 60(8): 1672-1682.
ZHU DX, DU CM, DONG XW, XUE CM, WANG R. Identification and antagonism activity of an inorganic phosphorus-dissolving bacterial strain isolated from cold region[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(8): 1672-1682 (in Chinese).
- [5] LI HP, HAN QQ, LIU QM, GAN YN, RENSING C, RIVERA WL, ZHAO Q, ZHANG JL. Roles of phosphate-solubilizing bacteria in mediating soil legacy phosphorus availability[J]. *Microbiological Research*, 2023, 272: 127375.
- [6] WANG ZH, ZHANG HH, LIU L, LI SJ, XIE JF, XUE X, JIANG Y. Screening of phosphate-solubilizing bacteria and their abilities of phosphorus solubilization and wheat growth promotion[J]. *BMC Microbiology*, 2022, 22(1): 296.
- [7] RICHARDSON AE, SIMPSON RJ. Soil microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus[J]. *Plant Physiology*, 2011, 156(3): 989-996.
- [8] 马莹, 程莹莹, 石孝均, 陈新平, 骆永明. 溶磷菌在磷素循环和生态农业中的作用与其生物肥料应用[J]. *微生物学报*, 2023, 63(12): 4502-4521.
MA Y, CHENG YY, SHI XJ, CHEN XP, LUO YM. Phosphate-solubilizing bacteria: roles in phosphorus cycling and ecological agriculture and application as potential biofertilizers[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(12): 4502-4521 (in Chinese).
- [9] JU F, ZHANG T. 16S rRNA gene high-throughput sequencing data mining of microbial diversity and interactions[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(10): 4119-4129.
- [10] WANG J, McLENACHAN PA, BIGGS PJ, WINDER LH, SCHOENFELD BIK, NARAYAN VV, PHIRI BJ, LOCKHART PJ. Environmental bio-monitoring with high-throughput sequencing[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2013, 14(5): 575-588.
- [11] ZHAO K, PENTTINEN P, ZHANG XP, AO XL, LIU MK, YU XM, CHEN Q. Maize rhizosphere in Sichuan, China, hosts plant growth promoting *Burkholderia cepacia* with phosphate solubilizing and antifungal abilities[J]. *Microbiological Research*, 2014, 169(1): 76-82.
- [12] CUI Y, ZHAO YJ, CAI R, ZHOU H, CHEN JX, FENG LR, GUO CH, WANG D. Isolation and identification of a phosphate-solubilizing *Pantoea dispersa* with a saline-alkali tolerance and analysis of its growth-promoting effects on silage maize under saline-alkali field conditions[J]. *Current Microbiology*, 2023, 80(9): 291.
- [13] GONG MB, DU P, LIU X, ZHU CX. An effective method for screening and testing the true phosphate-solubilizing fungus that enhances corn growth[J]. *Journal of Agricultural Science*, 2014, 6(9): 1916-9752.
- [14] 王亚艺, 李松龄, 蔡晓剑, 郝玉兰. 青藏高原溶磷菌菌株的分离筛选[J]. *北方园艺*, 2012(15): 161-163.
WANG YY, LI SL, CAI XJ, HAO YL. Isolation and screening of phosphorus solubilizing bacterial strains in

- Tibetan Plateau[J]. *Northern Horticulture*, 2012(15): 161-163 (in Chinese).
- [15] 蔺宝珺, 杨文权, 赵帅, 柴港宁, 鱼杨华, 武燕茹, 韩显忠, 李希来, 寇建村. 高寒草甸植物根际溶磷菌的筛选鉴定及其溶磷与促生效果[J]. *草地学报*, 2022, 30(11): 3132-3139.
- LIN BJ, YANG WQ, ZHAO S, CHAI GN, YU YH, WU YR, HAN XZ, LI XL, KOU JC. Screening and identification of phosphate-solubilizing bacteria in plant rhizosphere of alpine meadow and their effects on phosphate-solubilizing and plant growth promotion[J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2022, 30(11): 3132-3139 (in Chinese).
- [16] 杨婉秋, 敬洁, 朱灵, 高永恒. 川西北高寒草甸植物根际促生菌筛选及其特性研究[J]. *草地学报*, 2021, 29(6): 1174-1182.
- YANG WQ, JING J, ZHU L, GAO YH. Screening and characteristics of plant growth-promoting rhizobacteria from alpine meadow plants in northwestern Sichuan[J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2021, 29(6): 1174-1182 (in Chinese).
- [17] 叶震, 陈秀蓉, 杨淑君. 东祁连山高寒植被土壤解磷菌筛选及其解磷能力的初步研究[J]. *草原与草坪*, 2010, 30(5): 6-10.
- YE Z, CHEN XR, YANG SJ. Primary study on isolation and ability of phosphorus-solubilizing bacteria in soil of alpine vegetation in eastern Qilian Mountains[J]. *Grassland and Turf*, 2010, 30(5): 6-10 (in Chinese).
- [18] 傅楷翔, 贾国栋, 余新晓, 王旭. 基于改进遥感生态指数的青藏公路那(曲)安(多)段生态环境评估及驱动机制分析[J]. *环境科学*, 2024, 45(3): 1586-1597.
- FU KX, JIA GD, YU XX, WANG X. Ecological environment assessment and driving mechanism analysis of Nagqu and amdo sections of Qinghai-Xizang highway based on improved remote sensing ecological index[J]. *Environmental Science*, 2024, 45(3): 1586-1597 (in Chinese).
- [19] 漫静, 唐波, 邓波, 李佳欢, 何玉娟, 张佳良. 羊草根际促生菌的分离筛选及促生作用研究[J]. *草业学报*, 2021, 30(1): 59-71.
- MAN J, TANG B, DENG B, LI JH, HE YJ, ZHANG JL. Isolation, screening and beneficial effects of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in the rhizosphere of *Leymus chinensis*[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2021, 30(1): 59-71 (in Chinese).
- [20] NAUTIYAL CS. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, 170(1): 265-270.
- [21] 刘文干, 何园球, 张坤, 樊建波, 曹慧. 一株红壤溶磷菌的分离、鉴定及溶磷特性[J]. *微生物学报*, 2012, 52(3): 326-333.
- LIU WG, HE YQ, ZHANG K, FAN JB, CAO H. Isolation, identification and characterization of a strain of phosphate-solubilizing bacteria from red soil[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(3): 326-333 (in Chinese).
- [22] BHAMBRI P, GUPTA OP. Development of phylogenetic tree based on Kimura's method[C]//2012 2nd IEEE International Conference on Parallel, Distributed and Grid Computing. Solan, India. IEEE, 2012: 721-723.
- [23] LAPIERRE C, MONTIES B, ROLANDO C. Thioacidolysis of poplar lignins: identification of monomeric syringyl products and characterization of guaiacyl-syringyl lignin fractions[J]. *Holzforchung*, 1986, 40(2): 113-118.
- [24] BESSEAU S, HOFFMANN L, GEOFFROY P, LAPIERRE C, POLLET B, LEGRAND M. Flavonoid accumulation in *Arabidopsis* repressed in lignin synthesis affects auxin transport and plant growth[J]. *The Plant Cell*, 2007, 19(1): 148-162.
- [25] RADWAN S, MAHMOUD H, KHANAFER M, AL-HABIB A, AL-HASAN R. Identities of epilithic hydrocarbon-utilizing diazotrophic bacteria from the Arabian Gulf coasts, and their potential for oil bioremediation without nitrogen supplementation[J]. *Microbial Ecology*, 2010, 60(2): 354-363.
- [26] 马福林, 仁增卓玛, 王昌玲, 邓得坤, 冶贵生, 马玉花. 西藏沙棘根瘤内生假单胞菌的分离鉴定及促生性研究[J]. *福建农业学报*, 2023, 38(5): 624-631.
- MA FL, RENZENG ZM, WANG CL, DENG DK, YE GS, MA YH. Identification and growth-promoting effects of endophytic *Pseudomonas* sp. from *Hippophae thibetana* root nodules[J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2023, 38(5): 624-631 (in Chinese).
- [27] 李明源, 王继莲, 姚拓, 王振龙, 张惠荣, 柴加丽, 刘晓婷, 李青璞. 祁连山高寒草地扁蓿豆和黄花棘豆耐冷 PGPB 的筛选及促生特性研究[J]. *农业生物技术学报*, 2021, 29(11): 2074-2086.
- LI MY, WANG JL, YAO T, WANG ZL, ZHANG HR, CHAI JL, LIU XT, LI QP. Screening and promoting effects of cold-adapted PGPB from *Melissitus ruthenica* and *Oxytropis ochrocephala* grown in the alpine grassland of Qilian Mountains[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2021, 29(11): 2074-2086 (in Chinese).
- [28] 李琦, 杨晓蕾, 李晓林, 申友磊, 李建宏, 姚拓. 高寒草地燕麦根际解植酸磷促生菌鉴定及其优势菌假单胞

- 菌属菌株功能特性[J]. 生物技术通报, 2023, 39(3): 243-253.
- LI Q, YANG XL, LI XL, SHEN YL, LI JH, YAO T. Identification of phytate phosphorus-solubilizing PGPB in *Avena sativa* rhizosphere from alpine grassland and functional characteristics of dominant genus *Pseudomonas* sp.[J]. Biotechnology Bulletin, 2023, 39(3): 243-253 (in Chinese).
- [29] 骆韵涵, 柯志滨, 钟超, 程扬健. 红树林土壤解磷菌的分离鉴定及解磷特性[J]. 中国环境科学, 2020, 40(6): 2664-2673.
- LUO YH, KE ZB, ZHONG C, CHENG YJ. Isolation and identification of phosphate-solubilizing bacteria from mangrove and their phosphate-solubilizing characteristics[J]. China Environmental Science, 2020, 40(6): 2664-2673 (in Chinese).
- [30] 唐岷宸, 李文静, 宋天顺, 谢婧婧. 一株高效解磷菌的筛选及其解磷效果验证[J]. 生物技术通报, 2020, 36(6): 102-109.
- TANG MC, LI WJ, SONG TS, XIE JJ. Screening of a highly efficient phosphate-solubilizing bacterium and validation of its phosphate-solubilizing effect[J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(6): 102-109 (in Chinese).
- [31] 高亚敏, 姚拓, 李海云, 罗慧琴, 张建贵, 杨琰珊, 刘婷. 高寒草甸高草、珠芽蓼根际优良植物根际促生菌的分离筛选及促生特性研究[J]. 草业学报, 2019, 28(11): 114-123.
- GAO YM, YAO T, LI HY, LUO HQ, ZHANG JG, YANG YS, LIU T. Isolation, screening, and growth-promoting characteristics of plant growth promoting rhizobacteria in the rhizosphere of *Kobresia myosuroides* and *Polygonum viviparum* in alpine meadow pasture[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2019, 28(11): 114-123 (in Chinese).
- [32] 杜慧慧, 朱芙蓉, 杨敏, 郭冬琴, 赵顺鑫, 李庆天, 周浓. 不同生境滇重楼根际解磷菌的筛选与鉴定[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(4): 915-922.
- DU HH, ZHU FR, YANG M, GUO DQ, ZHAO SX, LI QT, ZHOU N. Isolation and identification of phosphatolytic bacteria in *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2021, 46(4): 915-922 (in Chinese).
- [33] CHEN YP, REKHA PD, ARUN AB, SHEN FT, LAI WA, YOUNG CC. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities[J]. Applied Soil Ecology, 2006, 34(1): 33-41.
- [34] 杨天佑, 李林波, 田静, 张士双, 吴中齐. 草酸青霉 YTY 及其突变体解磷能力、pH 和分泌有机酸的关系[J]. 应用生态学报, 2021, 32(12): 4429-4438.
- YANG TY, LI LB, TIAN J, ZHANG SS, WU ZQ. Relationships between phosphate solubilizing ability, pH, and organic acids of *Penicillium oxalicum* YTY and its mutants[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2021, 32(12): 4429-4438 (in Chinese).
- [35] WAN WJ, QIN Y, WU HQ, ZUO WL, HE HM, TAN JD, WANG Y, HE DL. Isolation and characterization of phosphorus solubilizing bacteria with multiple phosphorus sources utilizing capability and their potential for lead immobilization in soil[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 752.
- [36] CHAKDAR H, DASTAGER SG, KHIRE JM, RANE D, DHARNE MS. Characterization of mineral phosphate solubilizing and plant growth promoting bacteria from termite soil of arid region[J]. 3 Biotech, 2018, 8(11): 463.
- [37] 高威, 左振宇, 李凌凌, 周圣玉, 聂静雨, 陈慧雯. 一株高效解磷菌的筛选鉴定及溶磷性能[J]. 微生物学报, 2022, 49(9): 3873-3889.
- GAO W, ZUO ZY, LI LL, ZHOU SY, NIE JY, CHEN HW. Isolation, identification, and characterization of a phosphate-solubilizing bacterial strain[J]. Microbiology China, 2022, 49(9): 3873-3889 (in Chinese).
- [38] PRZEMIENIECKI SW, KUROWSKI TP, KOTLARZ K, KRAWCZYK K, DAMSZEL M, PSZCZÓLKOWSKA A, KACPRZAK-SIUDA K, CHAREŃSKA A, MASTALERZ J. Bacteria isolated from treated wastewater for biofertilization and crop protection against *Fusarium* spp. pathogens[J]. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 2019, 19(1): 1-11.
- [39] 张苓, 王浩然, 徐鑫, 李晓慧, 陈荣荣, 刘建秀, 郭海林, 李建建. 假俭草愈伤分化与植株再生对 PEG6000 模拟干旱胁迫的响应[J/OL]. 分子植物育种, 2023. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230703.1457.022.html>.
- ZHANG L, WANG HR, XU X, LI XH, CHEN RR, LIU JX, GUO HL, LI JJ. Response of callus differentiation and plantlet regeneration to PEG6000 simulated drought stress in centipedegrass [*Eremochloa ophiuroides* (Munro.) Hack][J/OL]. Molecular Plant Breeding, 2023. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230703.1457.022.html> (in Chinese).
- [40] 吉泽, 李俊逸, 姚遥, 祝春月, 杨金睿, 陈斌, 肖美丽. 1 株马铃薯内生 Bt 菌株的鉴定及其对干旱胁迫的缓解作用[J]. 南方农业学报, 2022, 53(12): 3389-3399.
- JI Z, LI JY, YAO Y, ZHU CY, YANG JR, CHEN B, XIAO GL. Identification of an endophytic Bt strain from potato

- and its alleviation to drought stress[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2022, 53(12): 3389-3399 (in Chinese).
- [41] MERINO N, ARONSON HS, BOJANOVA DP, FEYHL-BUSKA J, WONG ML, ZHANG S, GIOVANNELLI D. Living at the extremes: extremophiles and the limits of life in a planetary context[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 780.
- [42] BANERJEE A, SARKAR S, GOVIL T, GONZÁLEZ-FAUNE P, CABRERA-BARJAS G, BANDOPADHYAY R, SALEM DR, SANI RK. Extremophilic exopolysaccharides: biotechnologies and wastewater remediation[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 721365.
- [43] 闫法军, 田相利, 董双林, 牛宇峰. 一株低温降解菌的分离鉴定及其降解特性研究[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2011, 41(3): 24-30.
YAN FJ, TIAN XL, DONG SL, NIU YF. Isolation, identification and characterization of a low-temperature degrading bacterium[J]. *Periodical of Ocean University of China (natural science edition)*, 2011, 41(3): 24-30 (in Chinese).
- [44] 谢宇新, 徐凤花, 王彦伟, 刘阳. 低温菌株的筛选及对堆肥温度的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2011, 30(7): 1436-1442.
XIE YX, XU FH, WANG YW, LIU Y. Low temperature bacteria isolation and effect on composting temperature[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 30(7): 1436-1442 (in Chinese).
- [45] RUSSELL NJ. Toward a molecular understanding of cold activity of enzymes from psychrophiles[J]. *Extremophiles*, 2000, 4(2): 83-90.
- [46] CASANUEVA A, TUFFIN M, CARY C, COWAN DA. Molecular adaptations to psychrophily: the impact of 'omic' technologies[J]. *Trends in Microbiology*, 2010, 18(8): 374-381.
- [47] 辛玉华, 周宇光, 东秀珠. 低温细菌与古菌的生物多样性及其冷适应机制[J]. *生物多样性*, 2013, 21(4): 469-483.
XIN YH, ZHOU YG, DONG XZ. Biodiversity and cold adaptive mechanisms of psychrophiles[J]. *Biodiversity Science*, 2013, 21(4): 469-483 (in Chinese).
- [48] 梁艳琼, 雷照鸣, 贺春萍, 郑肖兰, 郑服丛. 解磷菌株黑曲霉 PSFM 发酵条件优化研究[J]. *南方农业学报*, 2011, 42(3): 240-245.
LIANG YQ, LEI ZM, HE CP, ZHENG XL, ZHENG FC. Optimization of fermentation condition for phosphate-solubilizing fungi (*Aspergillus niger*)[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2011, 42(3): 240-245 (in Chinese).
- [49] 李剑峰, 张淑卿, 龙莹, 郭金梅. 石漠生境下金银花内生/根际解磷菌在不同温度及酸碱环境下的生长和溶磷能力[J]. *西南农业学报*, 2021, 34(4): 820-826.
LI JF, ZHANG SQ, LONG Y, GUO JM. Growth and phosphate-solubilizing ability of endophytic/rhizospheric phosphate-solubilizing bacteria of *Lonicera japonica* at different temperature and pH environment in rocky desertification habitat[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2021, 34(4): 820-826 (in Chinese).
- [50] 孙健, 王亚艺, 张鑫鹏, 李松龄. 青海地区解磷微生物的筛选及对小油菜生长的影响[J]. *应用生态学报*, 2023, 34(1): 221-228.
SUN J, WANG YY, ZHANG XP, LI SL. Screening of phosphorus solubilizing microorganisms in cold environment and their effects on the growth of *Brassica napus*[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2023, 34(1): 221-228 (in Chinese).
- [51] KASANA RC, GULATI A. Cellulases from psychrophilic microorganisms: a review[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2011, 51(6): 572-579.