

山核桃根际解磷及水解复杂有机物细菌的分离

张艳梅^{1,2}, 郑梦杰^{1,2}, 杨士杰^{1,2}, 吴权杰¹, 黄坚钦^{2,3}, 彭丽媛^{1,2*}, 秦华^{1,2}

1 浙江农林大学 环境与资源学院 碳中和学院, 浙江 杭州 311300

2 浙江农林大学, 省部共建亚热带森林培育国家重点实验室, 浙江 杭州 311300

3 浙江农林大学 林业与生物技术学院, 浙江 杭州 311300

张艳梅, 郑梦杰, 杨士杰, 吴权杰, 黄坚钦, 彭丽媛, 秦华. 山核桃根际解磷及水解复杂有机物细菌的分离[J]. 微生物学报, 2024, 64(10): 3809-3824.

ZHANG Yanmei, ZHENG Mengjie, YANG Shijie, WU Quanjie, HUANG Jianqin, PENG Liyuan, QIN Hua. Isolation of bacteria activating phosphorus and hydrolyzing complex organic matter from the rhizosphere soil of *Carya cathayensis* Sarg.[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(10): 3809-3824.

摘要:【目的】挖掘兼具多种促生功能的山核桃根际解磷细菌(phosphorus-mobilizing bacteria, PMBs)菌株资源, 研发多功能生物有机肥, 促进山核桃产业绿色、可持续发展。【方法】采用稀释涂布平板法分离获取山核桃根际 PMBs, 测定其生物学功能并基于 16S rRNA 基因同源性鉴定其分类学地位。【结果】从山核桃根际土共分离获得 34 株 PMBs, 其主要来自厚壁菌门(*Bacillota*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteriota*)、薄壁菌门(*Gracilicutes*)下的 10 属细菌, 以芽孢杆菌属(*Bacillus*) (12 株)、伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia*) (9 株)、假单胞菌属(*Pseudomonas*) (5 株) 3 个属菌较多, 共计占比 76.47%。在含不同难溶性有机/无机磷源的培养基中接种 PMBs 后, 产生的可溶性磷含量范围分别为: 7.01–49.97 mg/L (磷酸铝)、3.61–27.11 mg/L (磷酸铁)、4.56–342.82 mg/L (磷酸三钙)、27.71–544.53 mg/L (植酸钠)和 3.28–27.17 mg/L (卵磷脂)。其中 23 株 PMBs 能同时溶解难溶性无机磷和有机磷。分别有 20、7、23、12、10、14、13 株 PMBs 能产吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)、铁载体和胞外蛋白酶、 β -1,3-葡聚糖酶、纤维素酶、磷酸酶及脂肪酶, 其中菌株 S3-6L 和 S3-22L 具有 5 种生物学功能。【结论】本研究筛选到的 PMBs 同时具有较高溶解磷的能力和多种生物学功能, 丰富了 PMB 菌种资源, 为研发高效、绿色山核桃复合微生物菌肥奠定了基础。

资助项目: 浙江省自然科学基金青年项目(LQ23C160004); 国家自然科学基金(32301562); 2024 浙江省大学生科技创新活动计划(新苗人才计划)(2024R412B042)

This work was supported by the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation Youth Fund (LQ23C160004), the National Natural Science Foundation of China (32301562), and the 2024 Zhejiang Provincial College Students' Science and Technology Innovation Activity Plan (New Talent Program) (2024R412B042).

*Corresponding author. E-mail: ply9116@zafu.edu.cn

Received: 2024-04-01; Accepted: 2024-07-05; Published online: 2024-07-12

关键词：山核桃；根际微生物；解磷细菌；多功能

Isolation of bacteria activating phosphorus and hydrolyzing complex organic matter from the rhizosphere soil of *Carya cathayensis* Sarg.

ZHANG Yanmei^{1,2}, ZHENG Mengjie^{1,2}, YANG Shijie^{1,2}, WU Quanjie¹, HUANG Jianqin^{2,3}, PENG Liyuan^{1,2*}, QIN Hua^{1,2}

1 College of Environment and Resources, College of Carbon Neutrality, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China

2 State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China

3 College of Forestry and Biotechnology, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] Multipurpose bioorganic fertilizers contribute to the sustainable development of the *Carya cathayensis* Sarg. industry. This work aims to explore the resources of phosphorus (P)-mobilizing bacteria (PMBs) with plant growth-promoting effects from the rhizosphere soil of *C. cathayensis* Sarg. [Methods] PMBs were isolated with the dilution-plate coating method and identified based on 16S rRNA gene homology. Moreover, plate and liquid culture tests were conducted to determine their biological functions. [Results] A total of 34 strains of PMBs were isolated from the rhizosphere soil of *C. cathayensis* Sarg. These PMBs belonged to 10 genera of four phyla: *Bacillota*, *Proteobacteria*, *Actinobacteriota*, and *Gracilicutes*. Among them, *Bacillus* (12 strains), *Burkholderia* (9 strains), and *Pseudomonas* (5 strains) were the dominant genera, with the strains accounting for 76.47% of the total isolated PMBs. After inoculation of PMBs, the content of soluble P produced by PMBs was 7.01–49.97, 3.61–27.11, 4.56–342.82, 27.71–544.53, and 3.28–27.17 mg/L in the culture media with AlPO_4 , FePO_4 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, sodium phytate, and lecithin as the sole P source, respectively. Twenty-three strains were capable of simultaneously mobilize insoluble inorganic and organic P components. Additionally, 20, 7, 23, 12, 10, 14, and 13 strains of PMBs could produce indole-3-acetic acid (IAA), siderophores, extracellular protease, β -1,3-glucanase, cellulase, phosphatase, and lipase, respectively, among which strains S3-6L and S3-22L exhibited five biological functions. [Conclusion] The PMBs identified in this study possess high P mobilization capability and multiple biological functions, enriching the resources of PMB strains and laying a foundation for the development of efficient, green, and composite microbial fertilizers for *C. cathayensis* Sarg.

Keywords: *Carya cathayensis* Sarg.; rhizosphere microorganisms; phosphorus-mobilizing bacteria; multipurpose

磷是植物体中重要组成成分,参与植物的光合作用、细胞分裂、物质转运及信号传递等生理过程,其重要性仅次于氮^[1]。大多数土壤的全磷含量丰富,但其中仅有不到 0.1%的磷可供植物直接吸收利用^[2],因此,磷成为了植物生长发育和品质形成过程中的重要限制因子。山核桃(*Carya cathayensis* Sarg.)是胡桃科(*Juglandaceae*)山核桃属(*Carya*)植物,被认为是全球性高档干果和木本油料植物,浙江省特色经济树种和干果,其主要分布在浙江、安徽交界的天目山区,种植面积大,具有较高的经济价值^[3]。山核桃主要种植在中、高山地,土壤贫瘠,磷的生物有效性普遍较低^[4]。谢林峰等^[5]调查了 259 个山核桃样地,测得平均土壤有效磷为 4.23 mg/kg,大多数样地有效磷含量不足 10 mg/kg,不利于山核桃产业发展。人工施用化学磷肥是山核桃林地补充磷素最直接、见效最快的方式,但山区陡峭不易施肥,加之山核桃林地经营需要清除林下杂草,导致磷素营养随水土流失严重;留存在土壤中的磷肥超过七成被土壤固定,造成环境污染和资源浪费^[6],极大地限制了山核桃林的可持续发展和生态稳定性。

解磷细菌(phosphorus-mobilizing bacteria, PMBs)种类丰富,占细菌种群的 1%–50%,在促进磷的循环中起着关键作用^[7]。它们通过分泌质子、有机酸、水解酶等物质,将土壤中难溶性无机磷和有机磷转化为植物可吸收利用的形式,从而扩大了植物的磷源范围^[8]。研究者们通常依据菌株在含有难溶性磷源(磷酸三钙、植酸钙、卵磷脂等)的培养基上能否生长并产生清晰的透明圈,来初步判定菌株是否为 PMB^[9]。朱德旋等^[10]从以 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 作为唯一磷源的培养基中分离得到一株高效 PMB,可应用于生物菌肥和生防制剂中。PMBs 通过溶解和矿化作用将惰性磷有效释放到土壤中,增加土壤有效磷含量,促进植物

生长^[11]。因此,除了施用化学磷肥外,微生物对磷的活化作用也是增加土壤供磷能力的有效途径。早在 1988 年,人们就将这类微生物施入土壤中,不仅提高了磷肥利用率,还促进了作物生长发育^[9]。后来,研究者们又从土壤中分离获得不同 PMBs,如芽孢杆菌属(*Bacillus*)、伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia*)等,它们对一种或者几种难溶性磷(如磷酸三钙、磷酸铝、植酸钙等)表现出良好的活化作用^[12]。目前,PMBs 肥料已在大豆^[13]、水稻^[14]、辣椒^[15]等作物中进行了试用。俞新玲^[16]从桉树林地中分离获得多株 PMBs,经鉴定以芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)为主,此外还有葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、梭形杆菌属(*Lysinibacillus*)等,对提升林地有效磷含量也有一定作用。由此可见,PMBs 的有效应用可能是提高土壤肥力、增加植物生产力、促进农林业可持续性生产的一种经济有效且环保的方法。

尽管 PMBs 肥料安全无毒、资源节约、环境友好,但相关研究及产业进展缓慢,多数在室内试验表现优异的菌株在大田实施时未获得预期效果,仅少数优良菌株被开发为微生物商品肥料,而且推广困难,在林业方面的应用则更少^[17]。究其原因,微生物肥料为活性菌剂,其定殖能力和生物活性易受生物(土著微生物和宿主植物)和非生物因素(土壤理化性质、气候因素等)影响^[18]。例如,在根际存在大量微生物,其数量一般比根际外多几倍至几十倍,它们能协助宿主植物拮抗生物和非生物胁迫、改善土壤养分和水分条件、促进植物生长等,对植物意义重大^[19]。根际微生物之间存在多种稳定的互作关系,外源菌株进入时它们可能产生拮抗、竞争作用,导致外源菌株无法定殖^[20]。此外,筛选出的菌株存在退化、功能单一现象,整体水平较低等不足,这导致田间施用 PMBs 肥料的效应变得不可预测,有时甚至与预期相反^[21]。另外,为

了获得更多功效，人们尝试将不同功能菌株混合，做成复合菌剂，但微生物间可能存在竞争，结果适得其反^[22]。研究表明，有些 PMBs 能固氮、合成植物激素(如吲哚乙酸)、提高植株对某些微量元素(如锌和铁)的利用率，从而显著促进植株生长；部分还表现出对生物和非生物胁迫的拮抗作用^[23]。因此，选育效果好、功能多、适应性强的优良菌株是推动 PMB 菌肥、促进农林业可持续发展的重要前提，并且从原位筛选菌株发展菌剂，扩大有益菌的优势度，更能适应这个山核桃林地。

因此，本研究选取了杭州市临安区山核桃主产区山核桃林地，从山核桃根际土壤分离、筛选 PMBs，并探究其微生物学特性，挖掘兼具多种促生功能的高效菌株，这不仅可以加深对山核桃经济林地下生态系统的认知，同时提高微生物菌剂研发的精准性和有效性，为其广泛应用奠定坚实的理论基础，也可为其他缺磷土壤条件下的经济林经营提供科学参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 样地

根据土壤有效磷含量选择了三片山核桃林地(林龄约 20–25 年)，其中样地 1 (S1)位于浙江省杭州市临安区玲珑街道(30°18'N, 119°65'E)，样地 2 (S2)和样地 3 (S3)位于浙江省杭州市临安区昌化镇(30°16'N, 118°52'E)，样地土壤理化性质如表 1 所示。临安区位于浙江省西北部，地处

浙江省西北部天目山区，临安地处中亚热带季风气候区南缘，属季风型气候，温暖湿润，光照充足，雨量充沛，四季分明；全年降雨量 1 628.4 mm，全年平均气温 16.4 °C，全年日照时数 1 847.3 h，森林覆盖率达 76.5%。

1.1.2 培养基

LB 培养基(g/L)：胰蛋白胨 10.0，酵母提取物 5.0，氯化钠 10.0，蒸馏水定容到 1.0 L，pH 7.2–7.4。

NA 培养基(g/L)：牛肉膏 3.0，蛋白胨 10.0，NaCl 5.0，琼脂 20.0，蒸馏水定容到 1.0 L，pH 7.0–7.5。

NBRIP 培养基(g/L)：葡萄糖 10.0，Ca₃(PO₄)₂ 5.0，MgCl₂ 5.0，KCl 0.2，MgSO₄·7H₂O 0.25，(NH₄)₂SO₄ 0.1，琼脂粉 20.0，pH 7.0。

King 培养基(g/L)：蛋白胨 20.0，K₂HPO₄ 1.5，MgSO₄·7H₂O 1.5，色氨酸 0.1，甘油 15.0 mL/L，蒸馏水定容到 1.0 L，pH 7.2。

蛋白酶检测培养基(g/L)：脱脂奶粉 15.0，琼脂粉 20.0，蒸馏水定容到 1.0 L。

脂肪酶检测培养基(g/L)：罗丹明 B 0.05，酵母粉 0.2，NaCl 0.5，KH₂PO₄ 0.5，Na₂HPO₄·7H₂O 3.5，(NH₄)₂SO₄ 5.0，花生油 1.0，琼脂粉 20.0，蒸馏水定容到 1.0 L，pH 6.0。

磷酸酶检测培养基(g/L)：葡萄糖 10.0，CaCO₃ 5.0，(NH₄)₂SO₄ 0.5，NaCl 0.3，KCl 0.3，MgSO₄·7H₂O 0.3，FeSO₄·7H₂O 0.03，蒸馏水定容到 1.0 L，pH 7.0–7.5。倒平板时每 100 mL 加 3–4 mL 蛋黄液(鸡蛋黄与 0.8% NaCl 以 1:1 配制)摇匀。

表 1 土壤化学性质

Table 1 Soil chemical properties

Samples	pH	Available nitrogen (mg/kg)	Available phosphorus (mg/kg)	Available potassium (mg/kg)	Organic matter (g/kg)
S1	4.73±0.09b	169.8±12.3a	15.02±1.03a	162.4±21.2a	50.90±2.83a
S2	4.92±0.06ab	110.3±10.1b	4.23±0.91c	127.8±6.0a	38.48±4.97b
S3	5.21±0.10a	132.8±5.2b	8.65±0.58b	147.0±24.8a	55.87±1.95a

Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$).

纤维素酶检测培养基(g/L): 羧甲基纤维素钠 2.0, 刚果红 2.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0, NaCl 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, K_2HPO_4 1.0, 琼脂粉 20.0, 蒸馏水定容到 1.0 L, pH 7.2。

β -1,3-葡聚糖酶检测培养基(g/L): 葡萄糖 1.0, 茯苓粉 4.0, K_2HPO_4 1.0, Na_2HPO_4 3.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, 琼脂粉 20.0, 蒸馏水定容到 1.0 L, 倒平板前加入 60.0 mg 水溶性苯胺蓝摇匀。

CAS 检测培养基(g/L): 蔗糖 2.0, 酸水解酪素 3.0, CaCl_2 1.11, MgSO_4 0.24, 琼脂粉 20.0, 蒸馏水定容到 1.0 L。

CAS 染液(g/L): 铬天青 0.61, FeCl_3 0.016, 十六烷基三甲基溴化胺(hexadecyl trimethyl ammonium bromide, HDTMA) 1.458。0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(g/L): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 24.27, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5.905, KH_2PO_4 0.75, NH_4Cl 2.5, NaCl 1.25, pH 6.8, 使用时 10 倍稀释。倒平板时缓慢加入 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液和 CAS 染液各 5 mL, 混合均匀。

1.2 土壤采集

2022 年 7 月, 在 3 个样地内分别随机选取间距大于 10 m、长势均一、健康的 5 株标准山核桃树为采样对象, 用铁锹清除林木基部半径 2 m 内的枯枝落叶等地表覆盖物后, 小心挖至根部末级采集细根样品, 收集 0–30 cm 深度土壤样品, 抖根法收集根际土壤, 用于分离筛选 PMBs。将同一样地的 5 个样品分别进行混合, 充分混合后共得到 3 份土壤样品。

1.3 解磷菌分离纯化

分别配置以磷酸三钙、卵磷脂和植酸钙为唯一磷源的 3 种解磷菌分离培养基平板, 备用。在 200 mL 三角瓶中放入 8 颗玻璃珠并添加 49.5 mL 去离子水, 然后使用灭菌锅 121 °C 灭菌 0.5 h, 冷却后于超净工作台中称取 0.5 g 根际土壤置入其中, 再将三角瓶置于摇床中, 180 r/min 振荡

摇匀 1 h, 静置 15 min, 取上清液, 用无菌水按 10 倍稀释法稀释成 10^{-3} – 10^{-8} 梯度的菌悬液, 吸取 0.1 mL 菌悬液分别涂布于解磷菌筛选培养基, 每个梯度设 3 个重复, 于培养箱(28.0 ± 0.5) °C 暗培养 3–7 d。挑取形态各异并且透明圈明显($D/d \geq 1$, D : 晕圈直径; d : 菌落直径)的菌落进一步划线纯化, 重复多次直至获得稳定产生透明圈的纯菌株, 后将纯化的菌株悬液与 40% 甘油按 1:1 混合保存于 -80 °C 超低温冰箱。

1.4 菌株解磷和促生特性分析

1.4.1 菌株复壮和种子液的制备

将存于 -80 °C 冰箱中的菌株取出, 划线法接种于 LB 固体培养基, 并在细菌培养箱中(28.0 ± 0.5) °C 暗培养 3–7 d。配置 NA 液体培养基, 取 20 mL 分装至 50 mL 三角瓶, 于 121 °C 灭菌锅中蒸汽灭菌 0.5 h, 冷却备用。取出 LB 固体培养基, 挑取单菌落菌株接种至 NA 液体培养基, 恒温振荡器(28.0 ± 0.5) °C、180 r/min 培养 3 d 后于超净工作台中将菌悬液移至无菌离心管中, 10 000 r/min 离心 15 min, 保留底层细胞, 加无菌生理盐水清洗, 再离心, 重复 3 次; 最后, 用无菌生理盐水调节菌悬液浓度分别为 1.0×10^3 CFU/mL 和 1.0×10^6 CFU/mL, 备用。

1.4.2 解磷能力分析

分别配制含不同难溶性无机磷[$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 AlPO_4 和 FePO_4]和有机磷(卵磷脂、植酸钠)的 NBRIP 液体培养基(磷质量浓度设置为 1 g/L), 取 20 mL 分装于 50 mL 三角瓶中, 121 °C 灭菌 30 min 后按照 1% 接种量接种供试菌株菌悬液, 恒温振荡箱(28.0 ± 0.5) °C、180 r/min 培养 3 d, 10 000 r/min 离心 15 min, 保留上清液, 采用钼蓝色比色法^[24]测定上清液中的可溶性磷含量, 以不加菌为对照, 每个处理 3 个重复。

1.4.3 水解酶产生能力分析

参考 Afzal 等^[25]描述的方法, 采用固体培养法通过观察水解圈以定性评估菌株分泌水解酶的能

力。分别配制磷酸酶、蛋白酶、纤维素酶、脂肪酶和 β -1,3-葡聚糖酶固体培养基检测平板(所用底物分别为鸡蛋黄液、脱脂奶粉、羧甲基纤维素钠、花生油和茯苓粉),挑取单菌落,点接在平板中央,每个处理重复 3 次, $(28.0\pm 0.5)^\circ\text{C}$ 培养箱中暗培养 3–7 d。磷酸酶、蛋白酶、纤维素酶、 β -1,3-葡聚糖酶鉴定方法:如菌株周围产生透明圈,则说明具有产生该水解酶的能力,反之则否。脂肪酶鉴定方法:如菌株周围产生油脂状沉淀,则说明该菌株具有产脂肪酶的能力,反之则否。

1.4.4 分泌吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)能力测定

配制 King 液体培养基,取 20 mL 分装至 50 mL 三角瓶,于 121°C 灭菌锅中灭菌 0.5 h,接种待测菌株,恒温振荡器 $(28.0\pm 0.5)^\circ\text{C}$ 、180 r/min 培养 3 d 后,将菌悬液转移至无菌离心管中,10 000 r/min 离心 15 min,采用 Salkowski 比色法^[26]测定上清液中 IAA 浓度,简单概括即:取上清液和 S2 比色液(1 mL 0.5 mol/L FeCl_3 加入到 50 mL 35% HClO_4) 等体积均匀混合,于室温静置 30 min 后观察溶液颜色变化,并于 530 nm 波长下比色,用标准 IAA 标准校准曲线测定计算培养液中的 IAA 浓度。

1.4.5 产铁载体能力分析

配制 CAS 检测平板,接种菌株,重复 3 次。 $(28.0\pm 0.5)^\circ\text{C}$ 暗培养 3–7 d,观察菌落周围能否产生橙色晕圈,若有,则表明该菌株能分泌铁载体,反之则否。

1.5 菌株的 16S rRNA 基因序列测定及其同源性分析

分别刮取少量菌体,采用 DNeasy[®] PowerSoil[®] DNA Isolation Kit [凯杰企业管理(上海)有限公司]根据说明提取 DNA,利用细菌引物对 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-CTACGGCTACCTTGTTAC GA-3') 扩增 16S rRNA 基因序列。PCR 扩增条件: 95°C 预变性 5 min; 95°C 变性 30 s, 58°C 退火 30 s,

72°C 延伸 1 min 30 s, 循环数 35 次; 72°C 终延伸 7 min。反应完成后,取 3 μL PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,确认 PCR 扩增片段。测序服务委托深圳微科盟科技集团有限公司完成。测序所得碱基序列在 NCBI 中 BLAST 比对进行近源物种分析。

1.6 数据处理与分析

采用 Microsoft Excel 2010 对数据进行基本处理与计算,SPSS 26.0 软件进行统计分析,单因素方差分析(one-way ANOVA)对结果进行检验,Duncan 法比较菌株间的差异性,显著水平为 5%,利用 Origin 2021 对菌悬液上清液有效磷含量结果进行绘图。

2 结果与分析

2.1 解磷菌的分离及鉴定结果

经反复纯化后,获得了 34 株能在含难溶性磷源的固体培养基中稳定产生较大透明圈的 PMBs, D/d 值范围为 1.09–3.82 (表 2)。其中,6 株来自样点 1,13 株来自样点 2,15 株来自样点 3。以磷酸三钙为磷源的培养基获得的菌株 9 株,以卵磷脂为磷源的培养基获得的菌株 15 株,以植酸钙为磷源的培养基获得的菌株 10 株。

利用测序数据于 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对分析,结果如表 3 所示。经鉴定这些菌株来自厚壁菌门(*Bacillota*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteriota*)、薄壁菌门(*Gracilicutes*) 4 个门,分别属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)、伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、节杆菌属(*Arthrobacter*) 等 10 个属。其中芽孢杆菌属(*Bacillus*)有 12 株,占比 35.29%;伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia*)有 9 株,占比 26.47%,假单胞菌属(*Pseudomonas*)有 5 株,占比 14.71%,为优势属(图 1),所有测序菌株的 16S rRNA 基因序列已提交至 GenBank 并获得序列登录号为 PP542097–PP542130。

表 2 山核桃根际土分离的解磷菌

Table 2 Phosphorus-mobilizing bacteria (PMBs) isolated from the rhizosphere soil of *Carya cathayensis* Sarg.

Serial number	Samples	Phosphorus source	Strains	<i>D/d</i>	Phosphate dissolved zone
1	S1	Lecithin	S1-2L	2.65	
2	S1	Lecithin	S1-11L	1.56	
3	S1	Tricalcium phosphate	S1-12T	2.16	
4	S1	Lecithin	S1-17L	2.63	
5	S1	Lecithin	S1-23L	1.97	
6	S1	Calcium phytate	S1-9C	2.81	
7	S2	Calcium phytate	S2-10C	1.24	
8	S2	Tricalcium phosphate	S2-11T	2.25	
9	S2	Tricalcium phosphate	S2-13T	2.29	
10	S2	Lecithin	S2-17L	2.43	
11	S2	Calcium phytate	S2-19C	2.15	
12	S2	Lecithin	S2-1L	1.71	
13	S2	Lecithin	S2-23L	3.82	
14	S2	Tricalcium phosphate	S2-25T	1.14	
15	S2	Lecithin	S2-2L	3.06	
16	S2	Lecithin	S2-4L	2.63	
17	S2	Tricalcium phosphate	S2-4T	1.09	
18	S2	Calcium phytate	S2-5C	1.41	
19	S2	Lecithin	S2-8L	1.95	
20	S3	Calcium phytate	S3-12C	3.75	
21	S3	Tricalcium phosphate	S3-14T	3.18	
22	S3	Lecithin	S3-15L	1.91	
23	S3	Calcium phytate	S3-16C	2.83	
24	S3	Tricalcium phosphate	S3-17T	2.15	
25	S3	Lecithin	S3-1L	2.60	
26	S3	Lecithin	S3-21L	1.19	
27	S3	Lecithin	S3-22L	2.98	
28	S3	Tricalcium phosphate	S3-29T	3.12	
29	S3	Tricalcium phosphate	S3-31T	2.18	
30	S3	Calcium phytate	S3-32C	2.20	
31	S3	Calcium phytate	S3-35C	1.95	
32	S3	Calcium phytate	S3-3C	1.24	
33	S3	Lecithin	S3-6L	2.08	
34	S3	Calcium phytate	S3-7C	1.41	

S1: Sample site 1; S2: Sample site 2; S3: Sample site 3. *D*: Colony diameter+halo (cm); *d*: Colony diameter (cm).

表3 山核桃根际 PMBs 物种鉴定结果

Table 3 Species identification results of PMBs isolated from the rhizosphere soil of *Carya cathayensis* Sarg.

Strains	Appraisal result	Name of closely related specie	NCBI reference sequence	Similarity (%)
S1-11L	<i>Bacillus cabrialesii</i>	<i>Bacillus cabrialesii</i> TE3	NR_180419.1	99.73
S1-12T	<i>Bacillus xiamenensis</i>	<i>Bacillus xiamenensis</i> MCCC 1A00008	NR_148244.1	99.93
S1-17L	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i> DSM 10	NR_027552.1	99.93
S1-23L	<i>Bacillus cabrialesii</i>	<i>Bacillus rugosus</i> SPB7	NR_181236.1	99.59
S1-2L	<i>Bacillus cabrialesii</i>	<i>Bacillus subtilis</i> IAM 12118	NR_180419.1	99.80
S1-9C	<i>Xanthomonas melonis</i>	<i>Xanthomonas melonis</i> LMG 8670	NR_026384.1	99.79
S2-10C	<i>Bacillus velezensis</i>	<i>Bacillus velezensis</i> CBMB205	NR_116240.1	99.79
S2-11T	<i>Bacillus cabrialesii</i>	<i>Bacillus inaquosorum</i> BGSC 3A28	NR_104873.1	99.73
S2-13T	<i>Variovorax ginsengisoli</i>	<i>Variovorax ginsengisoli</i> Gsoil 3165	NR_112562.1	99.73
S2-17L	<i>Bacillus velezensis</i>	<i>Bacillus velezensis</i> FZB42	NR_075005.2	99.59
S2-19C	<i>Bacillus velezensis</i>	<i>Bacillus nakamura</i> NRRL B-41091	NR_151897.1	99.39
S2-1L	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	<i>Pseudomonas rhodesiae</i> CIP 104664	NR_024911.1	99.38
S2-23L	<i>Metabacillus niabensis</i>	<i>Metabacillus niabensis</i> 4T19	NR_043334.1	99.86
S2-25T	<i>Streptomyces atratus</i>	<i>Streptomyces atratus</i> NBRC 3897	NR_112503.1	99.86
S2-2L	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	<i>Pseudomonas arenae</i> VK110	NR_181728.1	99.11
S2-4L	<i>Burkholderia stabilis</i>	<i>Burkholderia stabilis</i> LMG 14294	NR_114522.1	99.65
S2-4T	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i> BCRC 10255	NR_116017.1	99.73
S2-5C	<i>Burkholderia stabilis</i>	<i>Burkholderia stabilis</i> CIP 106845	NR_116157.1	99.92
S2-8L	<i>Burkholderia stabilis</i>	<i>Burkholderia contaminans</i> J2956	NR_104978.1	99.44
S3-12C	<i>Burkholderia ambifaria</i>	<i>Burkholderia metallica</i> R-16017	NR_042636.1	99.45
S3-14T	<i>Burkholderia stabilis</i>	<i>Burkholderia stabilis</i> LMG 14294	NR_041719.1	99.72
S3-15L	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	<i>Bacillus zhangzhouensis</i> MCCC 1A08372	NR_148786.1	99.73
S3-16C	<i>Pseudomonas vancouverensis</i>	<i>Pseudomonas vancouverensis</i> DhA-51	NR_041953.1	99.72
S3-17T	<i>Burkholderia paludis</i>	<i>Burkholderia paludis</i> MSh1	NR_178850.1	99.25
S3-1L	<i>Burkholderia stabilis</i>	<i>Burkholderia stabilis</i> CIP 105874	NR_116156.1	99.92
S3-21L	<i>Arthrobacter globiformis</i>	<i>Arthrobacter globiformis</i> DSM 20124	NR_026187.1	99.10
S3-22L	<i>Burkholderia paludis</i>	<i>Burkholderia lata</i> 383	NR_102890.1	99.25
S3-29T	<i>Rhodococcus fascians</i>	<i>Rhodococcus fascians</i> CF17	NR_037021.1	98.72
S3-31T	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	<i>Pseudomonas marginalis</i> LMG 2210	NR_027230.1	99.17
S3-32C	<i>Pseudomonas vancouverensis</i>	<i>Pseudomonas izuensis</i> IzPS43_3003	NR_181014.1	99.45
S3-35C	<i>Bacillus velezensis</i>	<i>Bacillus velezensis</i> CBMB205	NR_116240.1	99.72
S3-3C	<i>Arthrobacter bambusae</i>	<i>Arthrobacter bambusae</i> THG-GM18	NR_133968.1	99.18
S3-6L	<i>Burkholderia ambifaria</i>	<i>Burkholderia ambifaria</i> AMMD	NR_074687.1	99.39
S3-7C	<i>Paenibacillus taichungensis</i>	<i>Paenibacillus taichungensis</i> BCRC 17757	NR_044428.1	99.74

2.2 菌株解磷能力测定

2.2.1 菌株对不同难溶性无机磷源的溶解能力

山核桃根际土分离获得的菌株中共有 25 株菌(占比 73.53%)具有溶解难溶性无机磷的能力, 这些菌分布于 7 个属, 包括芽孢杆菌属(*Bacillus*)、伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)等(图 2), 各菌株对不同

难溶性无机磷源溶解能力不同(图 3A)。其中, 菌株对磷酸三钙的溶解量较高, 培养液中净可溶性磷含量(为 $C_{\text{接种处理}}$ 与 $C_{\text{未接种处理}}$ 的差值, 下同)为 4.56–342.82 mg/L, 12 株菌培养液中的净可溶性磷含量高于 50.00 mg/L, 并且接种菌株 S3-32C、S3-1L、S3-35C、S3-22L、S3-7C 的培养液中净可溶性磷含量超过 200.00 mg/L, 接种菌株 S3-32C

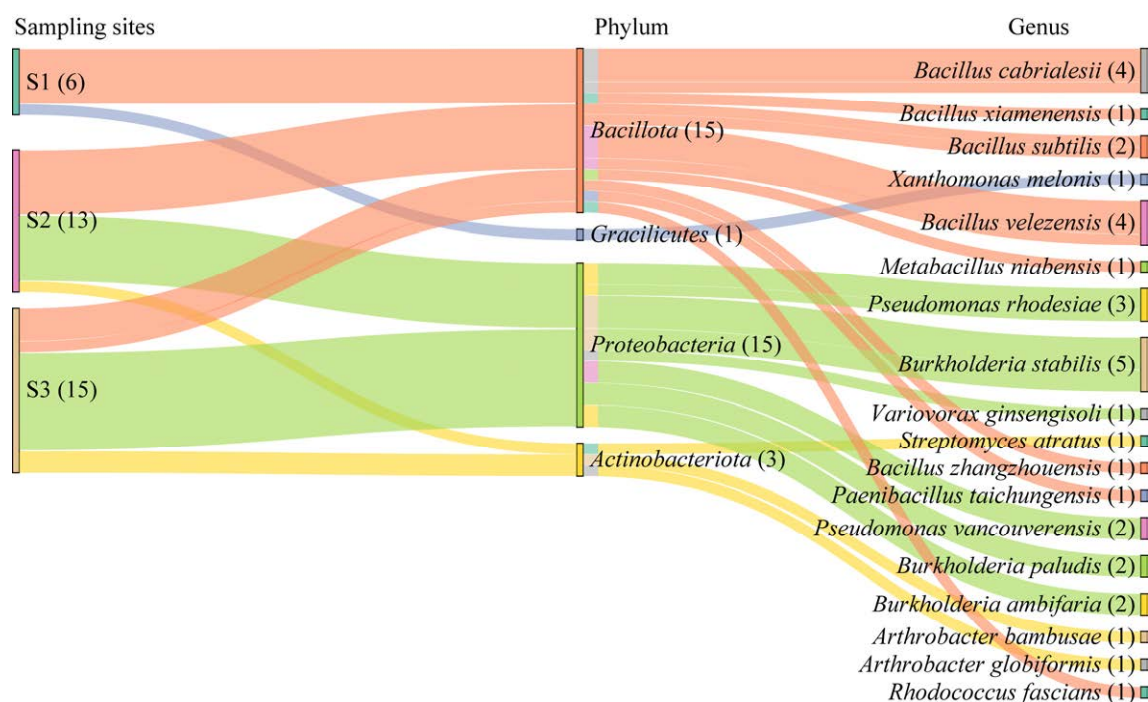


图 1 不同采样点分离的 PMBs 所属的门和属的分布

Figure 1 The classification for PMBs isolated from different sampling sites at phylum and genus levels.

的培养液中净可溶性磷含量达到 342.82 mg/L。以磷酸铁和磷酸铝为唯一磷源的培养液接种后,其净可溶性磷含量分别为 3.61–27.11 mg/L 和 7.01–49.97 mg/L, 两种磷源中分别以接种 S1-12T 和 S3-15L 后溶液中测得的可溶性磷浓度最高。

2.2.2 菌株对有机磷的水解能力

分离菌中有 31 株(占比 91.18%)具有同时活化 2 种有机磷的能力(图 2), 各菌株对有机磷的矿化能力因磷源不同而各异。如图 3B 所示, 以卵磷脂为磷源的培养液经接种培养后, 有 31 株菌具有水解卵磷脂的能力, 这些菌株分布于 7 个属, 溶液中的净可溶性磷含量变化为 3.28–27.17 mg/L, 其中, 对卵磷脂水解能力较强的菌株为 S1-11L (27.17 mg/L)、S1-2L (25.25 mg/L)、S1-23L (25.22 mg/L)、S1-17L (25.09 mg/L), 4 株菌隶属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)。

所有菌株对植酸钠均具有水解能力, 而且以植酸钠为磷源的培养液经接种培养后, 溶液中的

净可溶性磷含量为 27.71–544.53 mg/L, 菌株 S2-1L、S3-7C、S2-8L 对植酸钠的水解能力更强, 其培养液中的净可溶性磷含量分别为 544.53、469.31、360.28 mg/L。

2.3 菌株产铁载体和分泌水解酶的能力

图 4 展示了 PMBs 产铁载体和胞外水解酶分泌能力。其中 24 株至少有 2 种生物学特性, 占比 70.59%: 具有产铁载体能力的有 7 株菌, 能分泌胞外蛋白酶、 β -1,3-葡聚糖酶、纤维素酶、磷酸酶及脂肪酶的菌株分别有 23、12、10、14 和 13 株。其中, S3-6L 和 S3-22L 具有 5 种生物学功能, 均为伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia*)。

2.4 PMBs 产 IAA 能力测定

供试菌株中有 20 株菌与 Salkowski 比色液反应后呈现较深粉红色, 根据分光光度法对其产 IAA 量进行测定, 结果如表 4 所示, 其 IAA 产量在 2.73–426.14 mg/L 之间, 其中产量大于 300.00 mg/L 的 4 株菌隶属于伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia*), 产 IAA 能力最强的是 S2-8L, 其产量达 426.14 mg/L。

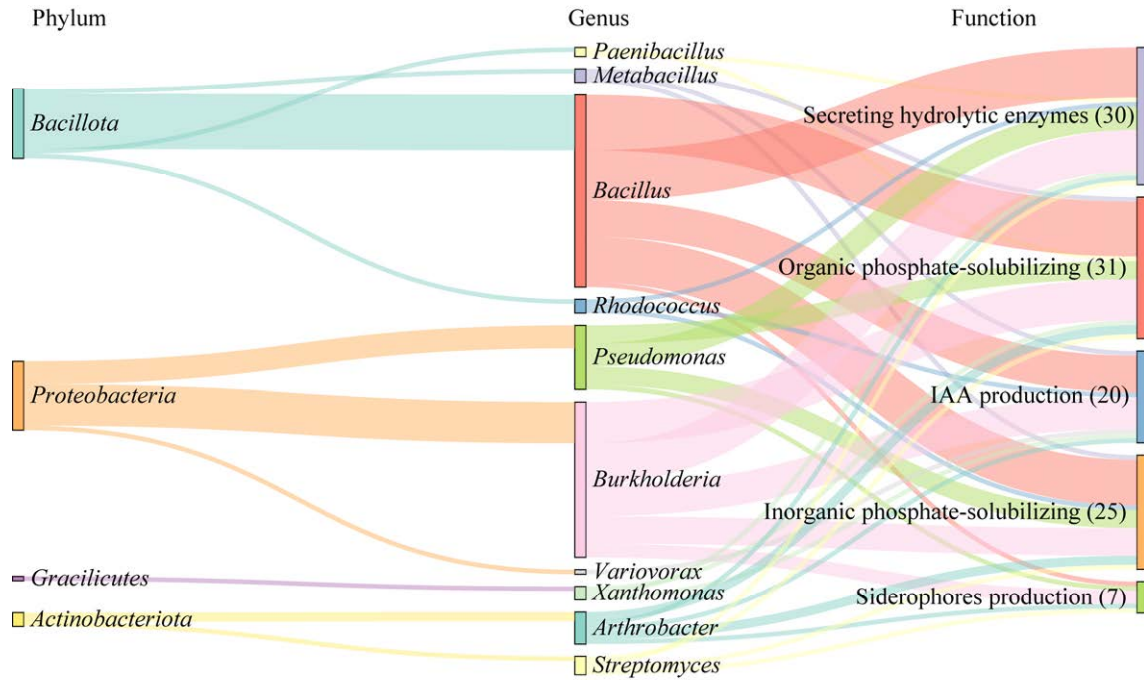


图 2 功能菌株的分类地位统计

Figure 2 Classification for functional strains isolated in this study.

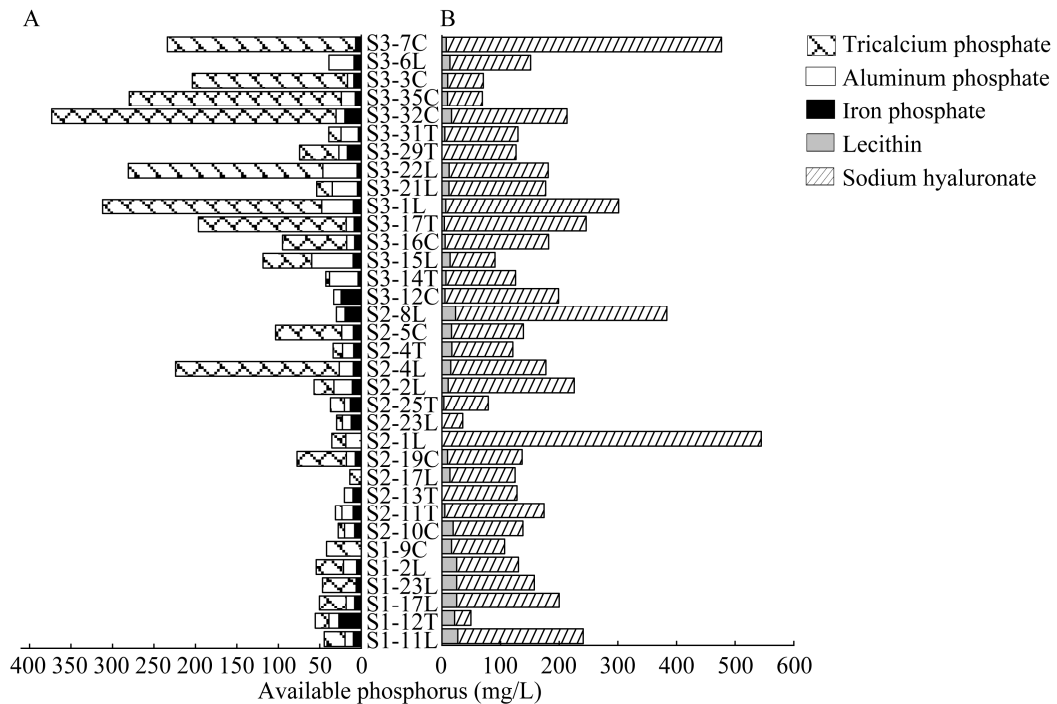


图 3 细菌的解磷能力测定

Figure 3 Determination of phosphate mobilization ability of bacteria. A: Inorganic phosphorus source. B: Organic phosphorus source. The net soluble phosphorus content is the difference between the soluble phosphorus concentration in the inoculated medium and that in the uninoculated medium.

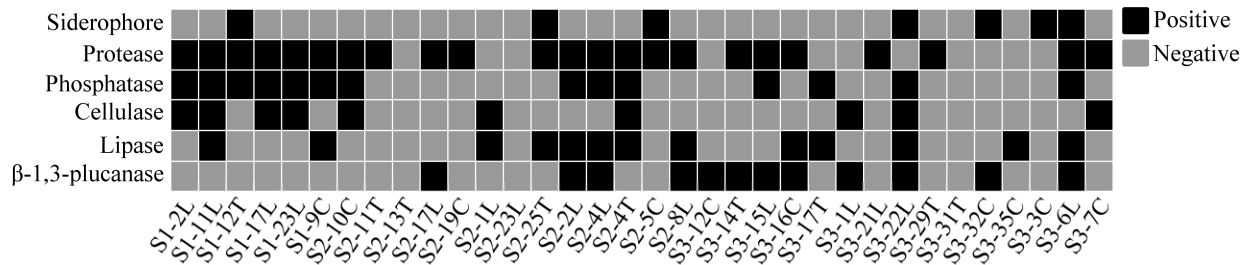


图 4 PMBs 产铁载体和水解酶分泌能力

Figure 4 Siderophore and hydrolase secretion capacity of PMBs.

表 4 菌株产 IAA 能力测定

Table 4 Strains produce IAA

Strains	Ability of the strain to produce IAA	$c(\text{IAA})/(\text{mg/L})$
S1-2L	+	9.87±3.80jk
S1-11L	++	44.73±1.12hi
S1-12T	-	-
S1-17L	+	2.73±1.05k
S1-23L	++	89.59±10.1fg
S1-9C	++	71.64±2.87gh
S2-10C	-	-
S2-11T	-	-
S2-13T	++	40.59±1.06hij
S2-17L	++	49.06±0.62hi
S2-19C	+	6.98±0.77jk
S2-1L	-	-
S2-23L	++	24.35±0.83ijk
S2-25T	-	-
S2-2L	-	-
S2-4L	++	67.33±4.30gh
S2-4T	++	107.90±10.20ef
S2-5C	++	388.20±1.90b
S2-8L	++	426.10±3.30a
S3-12C	-	-
S3-14T	++	251.80±42.20d
S3-15L	-	-
S3-16C	-	-
S3-17T	++	111.70±1.30ef
S3-1L	++	340.76±1.10c
S3-21L	-	-
S3-22L	-	-
S3-29T	++	83.21±3.50fg
S3-31T	-	-
S3-32C	-	-
S3-35C	++	135.70±14.00e
S3-3C	+	9.63±3.77jk
S3-6L	++	344.00±9.50c
S3-7C	-	-

+: Positive; ++: Strongly positive; -: Negative. Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

3 讨论

3.1 山核桃根际 PMBs 的多样性

本研究分别以植酸钙、卵磷脂和磷酸三钙为难溶性磷源配制 PMB 筛选培养基, 有 34 株菌株能稳定在含难溶性磷源的培养基上生长并且产生透明圈, 类似于覃书伟等^[27]的研究。因此, 初步判定其为 PMBs, 可能具有发展成为 PMB 菌剂的潜力。

目前已报道的 PMBs 超过 30 多个菌属, 包括假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、固氮菌属 (*Azotobacter*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*) 等, 最近的工作将该列表扩大到包括土壤杆菌属 (*Agrobacterium*)、黄杆菌属 (*Flavobacterium*)、微球菌属 (*Micrococcus*) 等^[28]。本研究对所分离保存的 PMBs 的 16S rRNA 基因进行扩增分析, 并测序所得碱基序列在 NCBI 中 BLAST 比对进行近源物种分析, 将这些菌分类为 4 门 10 属, 其中优势属 (>10%) 为芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、伯克霍尔德氏菌属 (*Burkholderia*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*), 分别占比 35.29%、26.47% 和 14.71% (图 1)。芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、伯克霍尔德氏菌属 (*Burkholderia*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 都是已报道对植物有促进生长作用的细菌类型, 包括溶磷、解钾、生防的属种^[29]。另外, 也有较少报道的菌属, 如贪噬菌属 (*Variovorax*)、黄单胞菌属 (*Xanthomonas*), 本研究通过液体培养试验发现它们具有水解植酸钠

的功能。由此可见,在山核桃林地中具有较丰富的 PMBs 资源。

3.2 PMBs 磷活化能力比较

一般情况,研究者们分离筛选获得 PMBs 的方法是在以某种难溶性磷为唯一磷源进行固体培养,并以产生透明圈为判定标准。然而,近期研究表明仅仅以溶解一种磷源及固体培养作为筛选标准是不可靠的,通常会产生许多“假阳性”PMB。有些菌株在含难溶性磷源的培养基中进行液体培养时,培养基中的可溶性磷含量不一定升高,甚至还可能降低;当进一步评估这些菌株对土壤磷活化和植物磷吸收的贡献时,只有少数被证明是 PMB^[30]。土壤 pH、磷酸盐成分和化学性质差异大,例如,酸性土壤主要含有 Fe/Al 磷酸盐,而钙质土壤中以 Ca/Mg 磷酸盐为主。这导致从特定土壤中分离出来的 PMB 无法在含有不同磷化合物的其他土壤中发挥有效作用^[31]。因此,对单一磷源的溶解能力不能作为 PMB 共性。建议采用多种磷源测定 PMB 的活化磷能力,包括碱性土壤的钙磷酸盐(包括岩石磷酸盐)、酸性土壤的铁铝磷酸盐以及多种有机磷源。本研究对分离获得的菌株进行了 5 种磷源的定量测定,培养液中的可溶性磷含量有不同程度增加,并且发现 23 株菌能同时活化有机和无机磷源,34 株能活化至少 2 种磷源,30 株最高能活化 4 种磷源。这表明,本研究中筛选到的山核桃根际 PMBs 可适应不同类型的土壤。

研究发现, PMBs 对磷源种类表现出一定选择性,不同 PMBs 对不同磷源溶解能力各异,同一株菌对不同磷源溶解能力也不同^[32]。本研究中,分别以磷酸铝、磷酸铁、磷酸三钙、植酸钠和卵磷脂为唯一磷源的选择性培养基中测得可溶性磷含量范围分别为 7.01–49.97、3.61–27.11、4.56–342.82、27.71–544.53、3.28–27.17 mg/L,菌株对难溶性磷的活化能力总体表现为植酸钠>

磷酸三钙>磷酸铝>卵磷脂>磷酸铁,与前人研究结果相似。大部分的 PMBs 溶解磷酸钙盐的能力大于磷酸铝和磷酸铁。究其原因,可能是不同难溶性磷酸盐结构成分差异大,致使解磷微生物溶解能力的差异,磷酸钙盐更容易被溶解可能是被微生物分泌有机酸络合和质子溶解双重作用的结果,而磷酸铝和磷酸铁盐可能只通过有机酸络合与螯合作用来溶解^[33]。另外,微生物活化养分的能力随其生存环境中有效养分含量的增加而逐渐降低,甚至完全丧失^[34]。在有效养分含量较高的土壤中,微生物分泌酶和活化养分的能力均被抑制^[35]。推测可能是当养分限量供应时,适量增加能促进菌株生长繁殖,提高生理活性;而养分富足时,微生物没有生存压力,因此会减少相关酶的合成代谢,进而降低了养分活化能力。然而分离获得的菌株 S3-32C、S3-1L、S3-7C 等,当环境的可溶性磷含量达到 50.00 mg/L 以上时,它们仍具有活化磷的功能,由此推测生产中施用肥料时可能不会抑制其功能。

3.3 解磷菌其他生态学能力的鉴定

研究表明,有些 PMBs 不仅能生物固氮、矿化有机氮、合成植物激素(如吲哚乙酸和赤霉素等),还能提高植株对某些微量元素(如锌和铁)的利用率,从而显著促进植株的生长。吲哚乙酸(IAA)是一种在植物中存在最广泛的促进生长的植物激素,存在于植物的整个生长周期,能在促进植物细胞生长、分裂和分化的同时促进根系生长。研究表明,许多植物促生菌都具有产 IAA 的能力,如来自假单胞菌属(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、固氮螺菌属(*Azospirillum*)、固氮菌属(*Azotobacter*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)等属的一些菌株^[36]。铁在地壳中含量较丰富,但是通常其以溶解度较低且植物不易吸收的氧化物存在^[37]。铁载体是一种螯合铁的低分子化

合物,对 Fe^{3+} 具有较高的亲和力^[38],据报道,微生物通过分泌铁载体可以螯合土壤中的 Fe^{3+} ,将铁的氧化物转化为植物可以吸收利用的有效态,有效改善了作物缺铁的胁迫,也提高了铁利用率^[39];生防菌通过分泌铁载体与病原菌竞争铁离子,有效抑制了土传病原菌生长^[40]。分泌水解酶(β -1,3-葡聚糖酶、纤维素酶、蛋白酶、磷酸酶和脂肪酶等)降解致病菌细胞壁和细胞膜,破坏病原菌细胞结构是生防菌重要的抑菌机制^[41]。本研究从山核桃根际土中分别筛选到了20、7、23、12、10、14、13株产IAA、铁载体和分泌胞外蛋白酶、 β -1,3-葡聚糖酶、纤维素酶、磷酸酶及脂肪酶的菌株,其中2株能同时具有5种生态学功能。20株具有产IAA能力的解磷菌,其分布于7个属。其中芽孢杆菌属(*Bacillus*)和伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia*)分别有8株和7株,为产IAA的优势属。另外,S3-1L、S2-5C、S3-6L、S2-8L的产IAA量超过300.00 mg/L,其产量远超过前人报道的菌株,具有较好的应用潜力^[42]。由此进一步证明,微生物具有多种生态功能,对促进宿主植物生长和生态稳定具有重要作用。本研究从山核桃根际土中筛选到兼具多功能的PMBs,这为山核桃根际解磷菌高效复合促生菌肥的研发提供了丰富的菌种资源,并且这些菌株本身就适应了山核桃林地的生物和非生物特性,能很好地适应当地林地条件,这给菌剂原位强化关键技术研发奠定物质基础,也为其他经济林经营提供科学参考。当然,为进一步剖析PMBs的功能、验证其应用效果,后续还需进一步从生理和基因组层面深入探讨其解磷机理及控制因子,并通过设置土壤培养、盆栽试验以及野外山核桃林区应用来探究菌剂实际接种效果。

4 结论

本研究从浙江省杭州市临安区的山核桃根

际土壤样品中分离纯化得到34株解磷菌,经鉴定分别属于厚壁菌门(*Bacillota*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteriota*)、薄壁菌门(*Gracilicutes*)4个门,分别属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)、伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)等10个属。其中芽孢杆菌属(*Bacillus*)有12株,占比35.29%;伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia*)有9株,占比26.47%,假单胞菌属(*Pseudomonas*)有5株,占比14.71%,为优势属。其中24株菌具有多种生态学功能(≥ 2 种),20株菌株具有产IAA能力,即功能菌占比(70.59%)较大。含不同难溶性有机/无机磷源的液体培养基中接种PMBs后,培养液中可溶性磷含量范围分别为7.01–49.97 mg/L(磷酸铝)、3.61–27.11 mg/L(磷酸铁)、4.56–342.82 mg/L(磷酸三钙)、27.71–544.53 mg/L(植酸钠)、3.28–27.17 mg/L(卵磷脂),表明供试PMBs对不同磷源具有活化能力,其中有23株菌能同时活化有机和无机磷源,34株能活化至少2种磷源。该研究结果丰富了山核桃根系微生物资源,为研发高效、绿色山核桃复合微生物菌肥奠定了基础。

作者贡献声明

张艳梅: 试验设计, 开展试验, 数据采集和处理, 撰写论文初稿; 郑梦杰、杨士杰、吴权杰: 协助试验开展; 黄坚钦: 经费支持; 彭丽媛: 试验设计, 经费、技术支持, 修改论文; 秦华: 试验设计, 提供实验设备、经费支持, 修改论文。

作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] 韦宜慧, 陈嘉琪, 赵光宇, 董玉红, 厚凌宇, 焦如珍. 杉木林土壤和苗木内生溶磷细菌的筛选及其溶磷特性[J]. 林业科学, 2020, 56(12): 1-9.
WEI YH, CHEN JQ, ZHAO GY, DONG YH, HOU LY, JIAO RZ. Screening of phosphate solubilizing bacteria from soil and endogenous environment of Chinese fir seedlings and their characterization of phosphate solubilization[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2020, 56(12): 1-9 (in Chinese).
- [2] ZHU FL, QU LY, HONG XG, SUN XQ. Isolation and characterization of a phosphate-solubilizing halophilic bacterium *Kushneria* sp. YCWA18 from daqiao saltern on the coast of Yellow Sea of China[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2011, 2011: 615032.
- [3] JIANG H, RAO YX, MEI L, WANG YJ. Antifungal activity of rapamycin on *Botryosphaeria dothidea* and its effect against Chinese hickory canker[J]. *Pest Management Science*, 2021, 77(1): 425-431.
- [4] 王艳艳. 山核桃林地土壤磷的生物有效性及其环境管理[D]. 杭州: 浙江农林大学硕士学位论文, 2012.
WANG YY. Soil phosphorus bioavailability in the orchards of Chinese hickory and its environmental management[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang A&F University, 2012 (in Chinese).
- [5] 谢林峰, 凌晓晓, 黄圣妍, 高浩展, 吴家森, 陈俊辉, 黄坚钦, 秦华. 临安区山核桃林地土壤水解酶活性空间分布特征及土壤肥力评价[J]. 浙江农林大学学报, 2022, 39(3): 625-634.
XIE LF, LING XX, HUANG SY, GAO HZ, WU JS, CHEN JH, HUANG JQ, QIN H. Spatial distribution characteristics of soil hydrolase activities and soil fertility evaluation of *Carya cathayensis* forests in Lin'an District[J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2022, 39(3): 625-634 (in Chinese).
- [6] MENEZES-BLACKBURN D, GILES C, DARCH T, GEORGE TS, BLACKWELL M, STUTTER M, SHAND C, LUMSDON D, COOPER P, WENDLER R, BROWN L, ALMEIDA DS, WEARING C, ZHANG H, HAYGARTH PM. Opportunities for mobilizing recalcitrant phosphorus from agricultural soils: a review[J]. *Plant and Soil*, 2018, 427(1): 5-16.
- [7] IGUAL JM, VALVERDE A, CERVANTES E, VELAZQUEZ E. Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study[J]. *Agronomie*, 2001, 21(6): 561-568.
- [8] RICHARDSON AE, SIMPSON RJ. Soil microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus[J]. *Plant Physiology*, 2011, 156(3): 989-996.
- [9] RODRÍGUEZ H, FRAGA R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion[J]. *Biotechnology Advances*, 1999, 17(4): 319-339.
- [10] 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).
- [11] ALORI ET, GLICK BR, BABALOLA OO. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 971.
- [12] 赵卫松, 郭庆港, 于稳欠, 王培培, 苏振贺, 张晓云, 鹿秀云, 马平, 李社增. 解淀粉芽孢杆菌 PHODB35 的溶磷特性及其对番茄的促生作用[J]. 微生物学报, 2020, 60(7): 1370-1383.
ZHAO WS, GUO QG, YU WQ, WANG PP, SU ZH, ZHANG XY, LU XY, MA P, LI SZ. Phosphate-solubilizing characteristics of *Bacillus amyloliquefaciens* PHODB35 and its growth-promoting effect on tomato[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(7): 1370-1383 (in Chinese).
- [13] 张美珍, 王丽娜, 赵微, 高迪, 张玉先, 殷奎德. 耐盐碱溶磷菌对大豆幼苗叶片脂质代谢组的影响[J]. 中国油料作物学报, 2023, 45(6): 1284-1294.
ZHANG MZ, WANG LN, ZHAO W, GAO D, ZHANG YX, YIN KD. Effects of salt/alkali-tolerant phosphate-solubilizing bacteria on lipid metabolome of soybean seedlings[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2023, 45(6): 1284-1294 (in Chinese).
- [14] 渠露露, 彭长连, 李淑彬. 一株溶植酸磷类芽孢杆菌的分离筛选及对水稻幼苗的促生作用[J]. 应用生态学报, 2020, 31(1): 326-332.
QU LL, PENG CL, LI SB. Isolation and screening of a phytate phosphate-solubilizing *Paenibacillus* sp. and its growth promoting effect on rice seedling[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2020, 31(1): 326-332 (in Chinese).

- [15] PENG LY, YI T, SONG XP, LIU H, YANG HJ, HUANG JG. Mobilization of recalcitrant phosphorous and enhancement of pepper P uptake and yield by a new biocontrol and bioremediation bacterium *Burkholderia cepacia* CQ18[J]. Journal of Applied Microbiology, 2021, 130(6): 1935-1948.
- [16] 俞新玲. 桉树土壤高效解磷菌的筛选及其对桉树生长的影响[D]. 福州: 福建农林大学硕士学位论文, 2011.
- YU XL. Screening of high-effect phosphate soluble microorganisms in Eucalyptus soils and that effect on the growth of Eucalyptus[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Agriculture and Forestry University, 2011 (in Chinese).
- [17] RAFI MM, KRISHNAVENI MS, CHARYULU PBBN. Phosphate-solubilizing microorganisms and their emerging role in sustainable agriculture[M]//Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry. Amsterdam: Elsevier, 2019: 223-233.
- [18] RAYMOND NS, GÓMEZ-MUÑOZ B, van der BOM FJT, NYBROE O, JENSEN LS, MÜLLER-STÖVER DS, OBERSON A, RICHARDSON AE. Phosphate-solubilising microorganisms for improved crop productivity: a critical assessment[J]. The New Phytologist, 2021, 229(3): 1268-1277.
- [19] BAI B, LIU WD, QIU XY, ZHANG J, ZHANG JY, BAI Y. The root microbiome: community assembly and its contributions to plant fitness[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2022, 64(2): 230-243.
- [20] ZHOU XG, ZHANG JY, RAHMAN MKU, GAO DM, WEI Z, WU FZ, DINI-ANDREOTE F. Interspecific plant interaction via root exudates structures the disease suppressiveness of rhizosphere microbiomes[J]. Molecular Plant, 2023, 16(5): 849-864.
- [21] OWEN D, WILLIAMS AP, GRIFFITH GW, WITHERS PJA. Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorus acquisition[J]. Applied Soil Ecology, 2015, 86: 41-54.
- [22] 宋时丽, 吴昊, 黄鹏伟, 孙凯, 张振华, 张勇, 戴传超. 秸秆还田土壤改良培肥基质和复合菌剂配施对土壤生态的影响[J]. 生态学报, 2021, 41(11): 4562-4576.
- SONG SL, WU H, HUANG PW, SUN K, ZHANG ZH, ZHANG Y, DAI CC. Effects of total straw incorporation combined with soil modified fertilizer substrate and compound microbial agent on soil ecology and wheat yield[J]. Acta Ecologica Sinica, 2021, 41(11): 4562-4576 (in Chinese).
- [23] GE HL, ZHANG FL. Growth-promoting ability of *Rhodospseudomonas palustris* G5 and its effect on induced resistance in cucumber against salt stress[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2019, 38(1): 180-188.
- [24] 孙亚凯. 功能性微生物菌株的筛选及组合菌群活性研究[D]. 天津: 天津大学硕士学位论文, 2006.
- SUN YK. The screen of the functional microbial strains and the study on activities of microbial combination communities[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University, 2006 (in Chinese).
- [25] AFZAL I, IQRAR I, SHINWARI ZK, YASMIN A. Plant growth-promoting potential of endophytic bacteria isolated from roots of wild *Dodonaea viscosa* L.[J]. Plant Growth Regulation, 2017, 81(3): 399-408.
- [26] 张东艳, 刘晔, 吴越, 王国文, 万兵兵, 姜瑛. 花生根际产 IAA 菌的筛选鉴定及其效应研究[J]. 中国油料作物学报, 2016, 38(1): 104-110.
- ZHANG DY, LIU Y, WU Y, WANG GW, WAN BB, JIANG Y. Isolation and identification of IAA-producing strains from peanut rhizosphere and its promoting effects on peanut growth[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2016, 38(1): 104-110 (in Chinese).
- [27] 覃书伟, 黄美卉, 杨光, 刘敏, 郭欢, 李亚航, 张霞, 曹爱萍. 不同水肥管理对红花生长的影响及红花根际解磷菌的筛选和鉴定[J]. 微生物学报, 2024, 64(2): 548-564.
- QIN SW, HUANG MH, YANG G, LIU M, GUO H, LI YH, ZHANG X, CAO AP. Effects of different water and fertilizer management measures on the growth of safflower and screening and identification of phosphorus-solubilizing bacteria in safflower rhizosphere[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(2): 548-564 (in Chinese).
- [28] RIBEIRO CM, CARDOSO EJBN. Isolation, selection and characterization of root-associated growth promoting bacteria in Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*)[J]. Microbiological Research, 2012, 167(2): 69-78.
- [29] 陈悦. 芽孢杆菌的分离鉴定及其生防特性研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2018.
- CHEN Y. Isolation, identification and biocontrol characteristics of *Bacillus* spp.[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2018 (in Chinese).

- [30] BASHAN Y, KAMNEV AA, DE-BASHAN LE. Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2013, 49(4): 465-479.
- [31] SHARMA SB, SAYYED RZ, TRIVEDI MH, GOBI TA. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils[J]. *Springer Plus*, 2013, 2: 587.
- [32] 吴安琪, 张扬, 万松泽, 方向民, 刘仁, 胡添翼, 陈伏生. 一株金黄蓝状菌解磷特性及其对毛竹的促生效应[J]. *应用生态学报*, 2019, 30(1): 173-179.
- WU AQ, ZHANG Y, WAN SZ, FANG XM, LIU R, HU TY, CHEN FS. Phosphate solubilizing characteristics of *Talaromyces aurantiacus* and its growth-promoting effect on *Phyllostachys edulis* seedlings[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2019, 30(1): 173-179 (in Chinese).
- [33] HENRI F, ANNETTE D, JOHN Q, FRANCOIS-XAVIER E. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by strains of *Pseudomonas fluorescens* isolated from acidic soils of Cameroon[J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2008, 2(7): 171-178.
- [34] YADAV BK, VERMA A. Phosphate solubilization and mobilization in soil through microorganisms under arid ecosystems[J]. *The Functioning of Ecosystems*, 2012, 4(6): 94-108.
- [35] SRINIVASAN R, YANDIGERI MS, KASHYAP S, ALAGAWADI AR. Effect of salt on survival and P-solubilization potential of phosphate solubilizing microorganisms from salt affected soils[J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2012, 19(4): 427-434.
- [36] AHMAD F, AHMAD I, KHAN MS. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities[J]. *Microbiological Research*, 2008, 163(2): 173-181.
- [37] 李雪艳, 张涛, 杨红梅, 楚敏, 高雁, 曾军, 霍向东, 张涛, 林青, 欧提库尔, 李玉国, 娄恺, 史应武. 棉花黄萎病拮抗细菌产铁载体测定及其对抑菌活性的影响[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(5): 1074-1080.
- LI XY, ZHANG T, YANG HM, CHU M, GAO Y, ZENG J, HUO XD, ZHANG T, LIN Q, OUT KR, LI YG, LOU K, SHI YW. Determination of the siderophore produced by antagonistic cotton *Verticillium* wilt bacteria and its effect on antibacterial activity[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(5): 1074-1080 (in Chinese).
- [38] SCHALK IJ, HENNARD C, DUGAVE C, POOLE K, ABDALLAH MA, PATTUS F. Iron-free pyoverdinin binds to its outer membrane receptor FpvA in *Pseudomonas aeruginosa*: a new mechanism for membrane iron transport[J]. *Molecular Microbiology*, 2001, 39(2): 351-360.
- [39] SHARMA A, JOHRI BN. Growth promoting influence of siderophore-producing *Pseudomonas* strains GRP3A and PRS9 in maize (*Zea mays* L.) under iron limiting conditions[J]. *Microbiological Research*, 2003, 158(3): 243-248.
- [40] CHAIHARN M, CHUNHALEUCHANON S, LUMYONG S. Screening siderophore producing bacteria as potential biological control agent for fungal rice pathogens in Thailand[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 25(11): 1919-1928.
- [41] MAHESHWARI DK. Bacteria in agrobiolgy: plant growth responses[M]//Potentials for biological control of plant diseases by *Lysobacter* spp., with special reference to strain SB-K88. Springer Berlin Heidelberg, 2011: 335-363.
- [42] INKAEWPUNGHAM W, INKHAM C, RUAMRUNGSRI S, CHROMKAEW Y, PANJAMA K. Assessment of IAA synthesis by endophytic bacteria in *Vanda* (*Orchidaceae*)[J]. *Acta Horticulturae*, 2022(1339): 331-338.