

重度盐碱地细菌的资源分离培养方法

谭寿生^{1,2,3}, 谭心许², 李怡君², 杨芾^{1,3}, 韦善君^{*2}, 张晓霞^{*1,3}

1 国家盐碱地综合利用技术创新中心, 山东 东营 257347

2 中央民族大学, 北京 100081

3 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所 北方干旱半干旱耕地高效利用全国重点实验室, 北京 100081

谭寿生, 谭心许, 李怡君, 杨芾, 韦善君, 张晓霞. 重度盐碱地细菌的资源分离培养方法[J]. 微生物学通报, 2025, 52(7): 3255-3270.

TAN Shousheng, TAN Xinxu, LI Yijun, YANG Fu, WEI Shanjun, ZHANG Xiaoxia. Methods for isolating bacteria from heavy saline-alkali land[J]. Microbiology China, 2025, 52(7): 3255-3270.

摘要:【背景】盐碱地是后备耕地资源, 对农业粮食安全至关重要, 施用植物促生菌是治理盐碱地的有效策略之一。【目的】探究能高效分离盐碱地细菌资源的方法, 促进盐碱地植物促生菌的开发利用。【方法】以山东省东营市重度盐碱地大豆根际土为材料, 采用平板稀释培养法分离细菌, 考察有机营养水平、pH 和 NaCl 浓度对盐碱地细菌分离培养的影响; 依托功能平板筛选具有溶解无机磷和产铁载体能力的细菌; 通过 16S rRNA 基因测序对纯化的菌株进行鉴定。【结果】共有 443 个分离株的 16S rRNA 基因测序成功, 包含 48 个属 96 个种, 潜在新种 7 个。筛选获得 28 种具有溶解无机磷功能的细菌, 13 种产生铁载体功能的细菌, 同时有 7 种具备 2 种功能的细菌。从细菌种类的丰富度和 CFU 数量角度来看, 影响强度顺序为 NaCl 浓度>有机营养水平>pH。在寡有机营养条件下, NaCl 浓度 $\geq 3\%$ 时对盐碱地细菌的生长有明显的抑制作用, 适当地提高有机营养水平可以减缓抑制效应。综合考虑 CFU 数量、种类丰富度、新种质资源、溶解无机磷细菌及产铁载体细菌的获得情况, 采用 $1/50 \times R_2A + 1.0\% NaCl + pH 8.5$ 的培养基可以获得良好的分离效果。【结论】本研究结果获得了一批重度盐碱地细菌资源, 也为其他盐碱地细菌新资源的分离培养提供了参考。

关键词: 重度盐碱地; 分离培养细菌; 有机营养; 溶解无机磷细菌; 产铁载体细菌

资助项目: 中国农业科学院科技创新工程(CAAS-ZDRW202407); 中央民族大学本科生研究训练计划(URTP2022110078)
This work was supported by the Science and Technology Innovation Program of Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS-ZDRW202407) and the Undergraduate Research and Training Program of Minzu University of China (URTP2022110078).

*Corresponding authors. E-mail: WEI Shanjun, wei.s.j@163.com; ZHANG Xiaoxia, zhangxiaoxia@caas.cn

Received: 2024-11-14; Accepted: 2025-03-09; Published online: 2025-04-02

Methods for isolating bacteria from heavy saline-alkali land

TAN Shousheng^{1,2,3}, TAN Xinxu², LI Yijun², YANG Fu^{1,3}, WEI Shanjun^{*2}, ZHANG Xiaoxia^{*1,3}

1 National Center of Technology Innovation for Comprehensive Utilization of Saline-alkali Land, Dongying 257347, Shandong, China

2 Minzu University of China, Beijing 100081, China

3 State Key Laboratory of Efficient Utilization of Arid and Semi-arid Arable Land in Northern China, Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: [Background] The saline-alkali land as a reserve arable resource is crucial to grain security. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) have been proved effective in improving saline-alkali land. **[Objective]** To explore the methods efficient in isolating PGPR and promote the development and utilization of PGPR in saline-alkali land. **[Methods]** The rhizosphere soil of soybean plants grown in the heavy saline-alkali land of Dongying City was collected for the isolation of bacteria by the dilution culture method. The effects of pH, organic nutrient level, and NaCl concentration on the isolation were evaluated. The strains capable of solubilizing inorganic phosphorus and producing siderophores were screened on functional plates. The purified isolates were identified by sequencing the 16S rRNA gene. **[Results]** A total of 443 isolates were successfully sequenced for the 16S rRNA gene, and they were identified as 96 species of 48 genera and 7 potential new species. Among these species, 28 and 13 were capable of solubilizing inorganic phosphorus and producing siderophores, respectively, and 7 species showed both functions. From points of bacterial richness and CFU count, NaCl concentration showed the greatest effect, followed by organic nutrient level, and then pH. Under the oligotrophic condition, NaCl at a concentration $\geq 3\%$ significantly inhibited the growth of bacteria isolated from saline-alkali soil, which could be alleviated considerably by increasing the organic nutrient level. Considering the CFU count, species richness, new germplasm resources, inorganic phosphorus solubilizing, and siderophore production, a medium containing 1.0% NaCl, $1/50 \times R_2A$, and with pH 8.5 was proposed to isolate bacteria from saline-alkali soil. **[Conclusion]** We isolate a batch of bacterial resources from heavy saline-alkali land and provide methodological reference for isolating new bacterial resources from saline-alkali land in other areas.

Keywords: heavy saline-alkali soil; bacterial isolation and culture; organic nutrient; inorganic phosphorus-solubilizing bacteria; siderophore-producing bacteria

土地盐碱化是一个全球性问题, 据联合国粮食及农业组织报道, 全球盐碱地面积约占土地总面积的 10%, 并且逐年增加(<https://doi.org/10.4060/cd3044en>)。在盐碱化土壤中植物会受到渗透胁迫、离子毒害、高 pH 伤害和活性氧胁迫等^[1], 导致生长发育不良甚至死亡。我国约有 9 913.3 万 hm^2 的盐碱地, 分布在全国多个

地区^[2]。然而, 我国是一个人口大国, 人均耕地面积少, 改良及修复盐碱地, 合理开发耕地后备资源已成为农业可持续发展中的一项重要任务^[3]。东营市位于山东省北部, 临近黄河入海口, 地下水位高, 在海水的长期浸泡和地表强烈蒸发下, 土壤盐碱化程度相对较重; 同时, 每年黄河带来的淤泥也会形成新的盐碱地^[4]。东

营市盐碱地面积达到 13 万 hm^2 ^[5], 按照含盐量 3‰以下、3‰–6‰和 6‰以上可将盐碱地划分为轻度、中度和重度盐碱地^[6], 这些盐碱地的农业开发潜力巨大。

施用微生物肥料是一种环境友好的农业策略, 可以提高土壤生物多样性和作物产量^[7–8]。植物和微生物在植物根际相互作用, 促进彼此的代谢、生长和发育^[9–10]。定殖于土壤或植物根际的细菌能够促进植物生长, 对植物适应生态环境起重要作用, 被称为促进植物生长的根际细菌 (plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)^[11]。PGPR 通过固氮^[12]、溶磷^[13]、解钾^[14]等提高土壤肥力, 通过产生植物激素^[15]来调节植物生长发育, 或者通过激活植物防卫基因的表达以增强植物抗逆能力^[16]。此外, 一些 PGPR 可通过分泌胞外多糖等方式减轻干旱胁迫^[17–18], 通过降低渗透势来抵抗高盐胁迫^[19]。目前已知具有增强植物抗盐功能的细菌主要是芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*) 和固氮菌属 (*Azotobacter*) 等类群, 涉及作物种类包括小麦、水稻、玉米等单子叶植物和黄瓜、番茄、花生等双子叶植物^[20]。Mahdi 等^[21]报道了贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) QA2 可溶解无机磷酸盐和锌, 产生吡啶-3-乙酸、氨、氰化氢、纤维素酶, 并诱导生物膜形成, 可抗菌和提高离子代谢活性, 并能耐受 11% NaCl 的高盐条件; 在盐渍条件下, 菌株 QA2 可以促进藜麦植株生长, 提高叶片叶绿素指数和磷吸收量, 而 Na^+ 含量则显著降低。吴铭等^[22]以 1-氨基环丙烷-1-羧酸 (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC) 为唯一氮源进行定向富集培养, 从碱蓬根际土筛选获得具 ACC 脱氨酶活性的菌株, 均可以显著增加盐胁迫下草籽的茎叶长和根长。张晓丽等^[23]发现微生物菌剂不仅可以降低土壤盐分和 pH 值, 还显著提高土壤养分含量和作物产量, 改善细菌菌群结构, 提高根际土壤的碱解氮、速效钾和有效磷含量。可见, 有益微生物可以

缓解盐碱等逆境胁迫, 促进植物生长。

微生物在治理土壤过程中具有“主场优势”的特点, 即本地的益生菌具有更好的生态适应性^[24–25]。Jiang 等^[26]的研究结果表明, 相较于外来促生菌, 本土促生菌具有更强的定殖能力以及与环境的互作能力, 在土壤贫瘠条件下, 能更有效地促进作物生长。Jiang 等^[27]使用三磷酸钙培养基和蛋黄培养基从山东省东营市土壤中分离得到 10 株磷增溶率大且能耐受 1.5 mol/L NaCl 的细菌, 在它们的培养滤液中检测到 8 种不同有机酸, 其中的 4 株菌能提高盐碱条件下花生种子的发芽率和植株生物量^[28]。孔亚东^[29]用高有机营养的 Gibbons 培养基从东营盐碱土壤中分离获得 552 株细菌, 通过筛选获得 6 株在盐碱胁迫下能够促进玉米生长的细菌。

在已有的研究中分离培养基多数为高有机营养、高 NaCl 浓度或具有富集作用的特殊营养条件, 一些喜好寡有机营养的种类很难分离获得。为了获取更多的盐碱地细菌资源, 本研究以山东省东营市重度盐碱地大豆根际土为材料, 基于盐碱地土壤低有机营养、高无机盐和偏碱性的特征, 在分离培养基中添加 Murashige and Skoog (MS) 培养基无机盐, 从有机营养水平、NaCl 浓度和 pH 值 3 个角度探究可高效分离盐碱地细菌的条件, 并筛选溶解无机磷细菌和产生铁载体细菌, 以期对盐碱地细菌资源的分离培养和植物促生功能细菌的筛选提供参考。

1 材料与方法

1.1 样品

于 2022 年 10 月采集自山东省东营市广饶县 (118°17'04"–118°57'11"E, 36°56'09"–37°21'23"N) 农高区黄河三角洲重度盐碱地大豆根际土。

1.2 培养基

R₂A 培养基、MS 培养基和蒙金娜无机磷 Pikovskaya (PVK) 筛选培养基, 青岛海博生物技术有限公司。筛选产铁载体细菌用铬天青 S (chrome azurol S, CAS) 测定培养基, 参考陈伟

等^[30]的方法配制。

1.3 主要试剂和仪器

分析纯 NaCl 和 NaOH, 中国医药集团有限公司; 通用引物(27F 和 1492R)和 2×*Taq* PCR Mix, 生工生物工程(上海)股份有限公司。pH 计, 上海高致精密仪器有限公司; 高压蒸汽灭菌锅, 施都凯仪器设备(上海)有限公司; 生化培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; 超净工作台, 苏州净化设备有限公司; PCR 仪、离心机和凝胶成像仪, Bio-Rad 公司。

1.4 培养基设计

根据文献[31]定义, 寡营养培养基中有机碳含量通常不高于 50 mg/L, 而 R₂A 培养基的有机碳含量约为 1 450 mg/L, 据此本研究设置 1×R₂A 的高营养条件、1/5×R₂A 的中营养条件以及 1/50×R₂A 的寡营养条件。按照 L₉(3⁴)正交

试验表设计 9 种分离培养基(表 1), 添加 1×MS 盐, 探究有机营养、NaCl 和 pH 的影响。根据正交试验结果, 进一步设计不同 NaCl 与有机营养组合的分离培养基 D、G、10、11 和 12 (表 2), 以验证两因素的交互效应; 然后探究寡营养条件下分离盐碱地细菌资源的适宜 NaCl 浓度。

1.5 细菌的分离培养、纯化和保存

称量 10 g 土样于含有 90 mL 无菌水的锥形瓶中, 28 °C、150 r/min 充分混匀 30 min, 制备成 10⁻¹ g/mL 的土壤悬浊液。采用 10 mL 梯度稀释, 制得浓度为 10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ g/mL 的悬浊液。将 280 μL 适宜浓度的悬浊液涂布于 Ø150 mm 的 14 种分离培养基(表 1 和表 2)平板上, 晾干表面后置于 28 °C 培养箱中暗培养 20–22 d, 观察菌落形态并记录 CFU。根据菌落形态特征, 按比例随机挑取平板上不同的单菌落, 在

表 1 不同培养基上 CFU 数量比较

Table 1 The comparison of CFU obtained on different media

培养基编号 Medium code	pH	NaCl 浓度 Concentration of NaCl (%)	有机营养水平 Level of organic nutrient	平均菌落数 Average of CFU
1	9.0	0.0	1×R ₂ A	602.33±66.12b
2	9.0	1.0	1/5×R ₂ A	665.67±91.22ab
3	9.0	5.0	1/50×R ₂ A	220.50±43.71d
4	8.5	0.0	1/50×R ₂ A	729.25±35.33a
5	8.5	1.0	1/5×R ₂ A	579.75±44.71b
6	8.5	5.0	1×R ₂ A	209.00±40.15d
7	8.0	0.0	1/5×R ₂ A	598.50±65.76b
8	8.0	1.0	1×R ₂ A	269.25±29.84cd
9	8.0	5.0	1/50×R ₂ A	292.50±33.20c

不同小写字母代表在 $P<0.05$ 水平差异显著。下同。

Different lowercase letters indicate significant differences at level of $P<0.05$. The same below.

表 2 NaCl 和有机营养对细菌分离培养的交互影响

Table 2 The interaction of NaCl and organic nutrients on bacterial isolation and cultivation

培养基编号 Medium code	pH	NaCl 浓度 Concentration of NaCl (%)	有机营养水平 Level of organic nutrient	平均菌落数 Average of CFU
D	8.5	1.0	1/50×R ₂ A	1 077.50±136.47a
G	8.5	5.0	1/50×R ₂ A	188.50±30.41c
10	8.5	5.0	1/5×R ₂ A	525.00±142.13b
11	8.5	7.5	1/5×R ₂ A	156.00±75.66c
12	8.5	7.5	1/50×R ₂ A	93.00±31.82d

1/4×R₂A+MS 的培养基平板上进行 2–3 次划线纯化。挑取纯化的菌体于含有 20%甘油的液体培养基的冻存管中, -80 °C保藏。

1.6 细菌分离株的分子生物学鉴定

挑取纯化的单克隆于装有 30 μL 无菌水的离心管中, 沸水浴 10 min, 冷却至室温后转到 -20 °C冷冻 30 min, 取出融化后即为粗制 DNA 溶液。用细菌通用引物 27F 和 1492R 扩增 16S rRNA 基因^[32]。PCR 反应体系(25 μL): 粗制 DNA 溶液 4 μL, 2×Taq PCR Mix 12.5 μL, 27F (10 μmol/L) 1 μL, 1492R (10 μmol/L) 1 μL, ddH₂O 6.5 μL。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 150 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增产物于 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 对于出现大小 1 500 bp 左右、条带清晰的样品送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。将序列上传到 EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/identify>)进行序列比对。

1.7 溶解无机磷和产铁载体细菌的筛选

采用直接涂布筛选、分离培养-点植筛选以及分离培养-纯化-点植筛选这 3 种途径获取溶解无机磷和产铁载体细菌。在直接涂布筛选途径中, 筛选溶解无机磷细菌用 10⁻⁴ g/mL 稀释度的悬浊液, 筛选产铁载体细菌用 10⁻²–10⁻⁴ g/mL 稀释度的悬浊液, 在 Ø90 mm 的筛选培养基平板上涂布接种 100 μL。在 PVK 平板上菌落周围出现无色透明圈的为解无机磷阳性细菌, 在 CAS 平板上菌落周围出现黄棕色到红棕色晕圈的为产铁载体阳性细菌。

2 结果与分析

2.1 不同分离培养基上 CFU 的比较

在 9 种培养基上接种菌悬液, 于 28 °C条件下培养 1 d 后, 除了 3 号和 9 号, 其他的培养基均出现明显的菌落。培养 5–10 d 是菌落增长快速阶段, 此后增速很慢。培养 22 d 后计数, 菌落最多的是 4 号培养基, 接着依次是 2 号、

1 号、7 号、5 号、9 号、8 号、3 号, 最少的是 6 号培养基。对三因素进行 CFU 极差分析结果表明, NaCl 浓度之间的 CFU 极差为 402.69, 有机营养水平之间 CFU 极差为 254.44, 不同 pH 之间的 CFU 极差为 109.42, 说明在所设置的条件下三因素的影响强度依次为: NaCl>有机营养>pH。在 NaCl 浓度为 5.0%的 3、6 和 9 号培养基中, CFU 值显著低于其他培养基。在低 NaCl (0 和 1 g/L)条件下, 8 号和 5 号培养基 pH 相近, 有机营养前者为 1×R₂A, 后者为 1/5×R₂A, 前者 CFU 仅为后者的 1/2 左右; 1 号和 2 号 pH 相同, 有机营养前者为 1×R₂A, 后者为 1/5×R₂A, 前者菌落较后者少 10%左右。在所设置的 3 个 pH 值中, pH 8.5 时, CFU 数量相较其他 2 个水平的偏高。这些结果说明, 浓度为 5.0%的 NaCl 对菌落形成有显著抑制作用, 采用中到寡有机营养(1/5×–1/50×R₂A)有利于培养出更多的菌落, pH 8.5 是比较适合的酸碱度。

观察菌落形态发现, 在含有 5.0% NaCl 培养基上生长的菌落总体上比较规整, 未出现明显的扩张(图 1A、1B), 有机营养水平高时菌落大且色泽鲜艳(图 1A、1C)。在含有 1.0% NaCl 的培养基(2、5、8 号)中, 8 号有机营养水平最高, 菌落扩张最严重(图 1C), CFU 数量明显低于 2 和 5 号。在不添加 NaCl 的培养基(1、4、7 号)上, 4 号培养基有机营养水平最低, 有明显扩张的菌落, 但菌苔较薄(对着光可见), 对其他菌落形成影响相对较小, 所以菌落数量最多(图 1D)。

综合比较 9 个培养基中的 CFU 数量和菌落形态发现, 菌落大小与有机营养水平呈正相关, NaCl 浓度较低条件下有一些菌落大范围蔓延, 占据了生态位, 导致 CFU 的数量下降。推测有机营养水平和 NaCl 浓度综合影响菌落的形态和数量。

2.2 寡有机营养条件下 NaCl 对细菌分离培养的影响

基于前面的正交试验结果, 为了探究有机营养水平与 NaCl 浓度之间的交互作用, 本研究

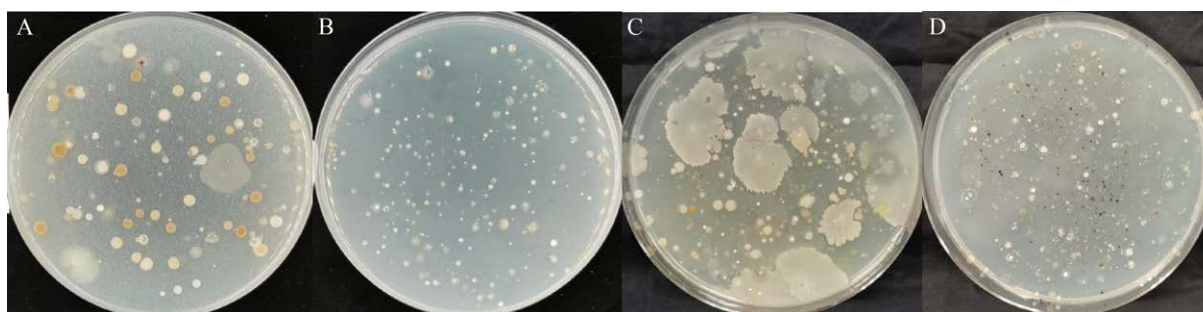


图1 四种培养基上菌落形态特征和数量 A: 6号培养基; B: 3号培养基; C: 8号培养基; D: 4号培养基。

Figure 1 The shape and number of colonies formed on four medium. Subscript numbers indicate the code of medium. A: Medium No. 6; B: Medium No. 3; C: Medium No. 8; D: Medium No. 4.

进一步设置了5种培养基,比较它们分离培养细菌效果(表2)。结果表明,涂布接入菌悬液并培养20 d后,在 $1/50 \times R_2A + 1.0\%$ NaCl的培养基平板(D号)上平均CFU达1 077.50,无明显的蔓延生长菌落。当NaCl浓度提高到5.0%时(G号),CFU下降至17.49% (188.5 ± 30.41);此时将有机营养从 $1/50 \times R_2A$ 提高到 $1/5 \times R_2A$ 时(10号),菌落数增加了179.2% (525.00 ± 142.13)。同样地,在7.5% NaCl条件下,有机营养提升也可以增加菌落数(11号 vs. 12号),但是增幅仅为67.74% (表2)。该结果说明,采用寡有机营养和低盐培养可从重度盐碱土中分离获得更多菌落,盐浓度为5%以上时显著抑制细菌的增殖,在高盐浓度下提高有机营养水平可以缓冲高盐的抑制效应。该结果与前面的正交试验结果相符合。

2.3 寡营养条件下适宜NaCl浓度

为了进一步探究NaCl对盐碱地细菌分离培养的影响,根据正交试验结果,采用pH 8.5和 $1/50 \times R_2A$ 有机营养水平、NaCl浓度分别为1.0%、2.0%、3.0%、4.0%和5.0%的5种分离培养基。接种培养2 d后,在NaCl含量1%–5%的平板上,CFU平均值分别为141.3、107.0、42.7、24.0和9.0,说明在分离培养早期3.0%的NaCl对细菌的生长抑制率大于60%。就平板上CFU增长率来看,在前6天1.0%–3.0%的增长

率较4.0%–5.0%的高,第8–22天4.0%–5.0%的增长率较1.0%–3.0%的略高。培养22 d统计结果显示(表3),总体上表现为CFU平均数随着盐浓度的升高而逐渐下降,盐浓度在1.0%与2.0%之间差异不显著,但是盐浓度在1.0%与3.0%之间以及在4.0%与5.0%之间CFU数量差异显著($P < 0.05$)。说明在寡有机营养条件下分离重度盐碱地细菌时,培养基的NaCl浓度处于1.0%–2.0%之间对细菌生长抑制效应不显著,3.0%以上时对细菌的生长抑制作用显著,不利于获得种类丰富的培养产物。

2.4 细菌分离株的分子生物学鉴定结果及不同培养基上种类比较

随机挑取各平板上的菌落进行划线纯化和16S rRNA基因测序,共成功鉴定了443个分离株。将序列与EzBioCloud平台的模式菌株序列进行比对,结果显示,这些分离株包含变形菌门

表3 不同NaCl浓度培养基上CFU数量的比较
Table 3 The comparison of CFU on medium with diverse NaCl contents

NaCl 浓度 Concentration of NaCl (%)	CFU 平均值 Average CFU
1.0	$728.7 \pm 78.4a$
2.0	$621.7 \pm 52.5ab$
3.0	$577.0 \pm 94.6b$
4.0	$539.3 \pm 89.5b$
5.0	$415.3 \pm 25.1c$

(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、放线菌门(*Actinomycetota*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)这4个门28个科48个属96种细菌,优势科为芽孢杆菌科(*Bacillaceae*)、微球菌科(*Micrococcaceae*)和链霉菌科(*Streptomycetaceae*);优势属为芽孢杆

菌属(*Bacillus*)、普里斯特氏菌属(*Priestia*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、泡状芽孢杆菌属(*Cytobacillus*)、伪芽孢杆菌属(*Fictibacillus*)和假节杆菌属(*Pseudarthrobacter*) (图2)。有42个种仅有1个分离株,占总分离

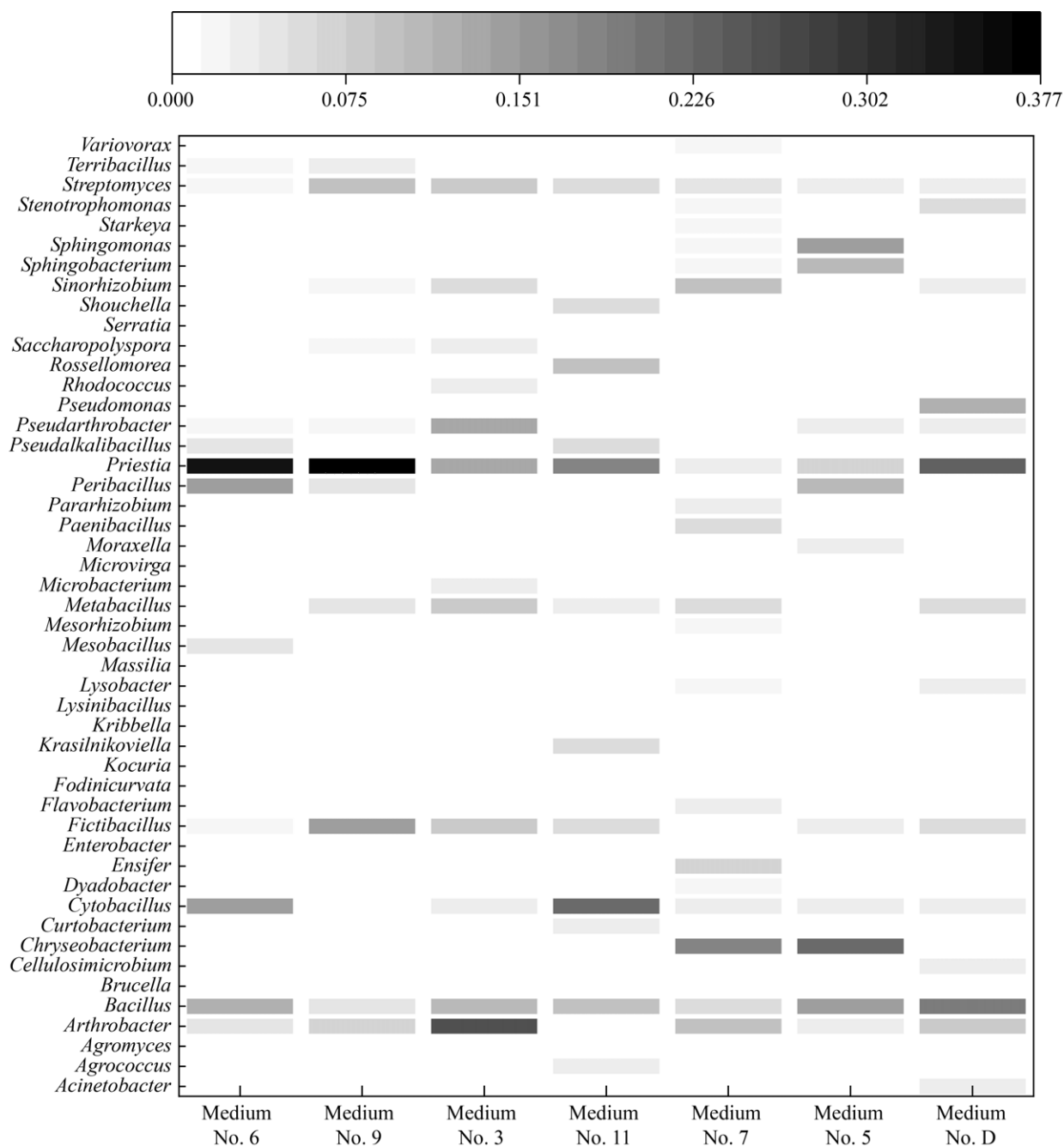


图2 不同培养基上分离株在属水平的分布

Figure 2 The distribution of isolates on different medium at genus level.

种类的 43.7%。对成功鉴定株数大于 29 个的 7 个培养基进行比较, 结果表明, 种数/鉴定分离株的比值大于 50% 的有 3 号、5 号和 D 号培养基, 分类非冗余株数/鉴定分离株的比值处于前 3 位的为 5 号、7 号和 11 号培养基(表 4)。综合种数/鉴定分离株数的比值、分类非冗余株数/鉴定分离株数的比值来看, 比值靠前的是 D 号、7 号、5 号和 11 号, 其中 D 号和 7 号 CFU 数量大, 说明采用相对低的有机营养和低盐环境更有利于获取重度盐碱地细菌资源。对高盐组(3、6、9 和 11 号, NaCl 含量 $\geq 5.0\%$)及低盐组(5、7、D, NaCl 含量 $\leq 1.0\%$)的分离株在属水平的比较分析结果表明, 高盐组的多样性明显低于低盐组(图 2)。一共有 9 株菌的 16S rRNA 基因序列与 EzBioCloud 官网模式种的序列相似性低于 99.0% (表 5), 为潜在新种^[33], 多样性高的 7 号培养基上可能新种最多, 多样性较低的高盐培

养基也获得一些新的细菌资源。

2.5 溶解无机磷细菌筛选结果

共筛选得到了溶解无机磷细菌 271 株, 包含 28 个种(表 6)。在 PVK 平板上直接筛选显阳性的菌落, 点植复筛结果多数仍为阳性, 用该途径分离到溶解无机磷阳性细菌 30 株 10 种, 有 6 种细菌仅在该途径中获得, 乙酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*)为该途径中的绝对优势菌, 占总分离株的 60%。分离平板菌落直接点植筛选获得阳性菌株 94 株 16 种, 其中源自高盐(NaCl $\geq 5.0\%$)平板有 77 株 13 种, *Priestia* 和 *Bacillus* 为前两大优势属, 株数分别占总数的 64.9% 和 14.3%; 源自低盐(添加 NaCl $\leq 1.0\%$)平板有 17 株 9 种, 其中 23.5% (4/17) 菌株为 *Priestia* sp.; 有 2 种细菌仅在该途径中获得。将经过纯化的菌落点植筛选获得 147 株 20 种, 其中源自高盐平板的有 81 株 14 种, 前 3 个优势种为

表 4 不同培养基上细菌种类多样性比较

Table 4 The comparison of bacterial species diversity on different culture medium

培养基编号 Medium code	鉴定分离株 Identified isolates	种数 Species number	种数与分离株数之比 The ration of species to isolates (%)	非冗余株数(占比) Non-redundant isolates (proportion)
3	39	21	53.8	4 (10.2%)
5	29	15	51.7	9 (31.0%)
6	41	13	31.7	1 (2.4%)
7	99	46	46.5	26 (26.3%)
9	84	26	31.0	6 (7.1%)
11	34	16	47.1	8 (23.5%)
D	35	20	57.1	2 (5.7%)

表 5 潜在新种

Table 5 The potential new species

分离株编号 Strain code	首配模式种 Top-hit taxon	首配菌株 Top-hit strain	相似度 Similarity (%)
7-3	<i>Microvirga makkahensis</i>	SV1470	98.48
7-10, 7-56	<i>Starkeya novella</i>	DSM 506	98.95
7-40	<i>Flavobacterium foetidum</i>	CJ42	98.73
7-67	<i>Mesorhizobium tianshanense</i>	CGMCC 1.2546	98.66
9-110	<i>Fodinicurvata halophila</i>	BA45AL(T)	93.37
9-61	<i>Metabacillus sediminilitoris</i>	DSL-17	98.48
11-4, P11-2	<i>Krasilnikoviella muralis</i>	T6220-5-2b	98.59

表 6 溶解无机磷细菌培养基来源

Table 6 The medium-origin of bacteria capable of dissolving inorganic phosphorus

首配模式种 Top-hit taxon	总株数 Total isolate	直接涂布筛选 Isolates from spread plate method	分离菌落点植筛选 Isolates from isolation colony				纯化菌落点植筛选 Isolates from purified colony			
			高盐 High salt		低盐 Low salt		高盐 High salt		低盐 Low salt	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	20	18	0	2			0		0	
<i>Acinetobacter</i> sp.	1	1	0	0			0		0	
<i>Arthrobacter globiformis</i>	4	0	0	0			2		2	
<i>Arthrobacter pascens</i>	25	0	1	0			15		9	
<i>Bacillus altitudinis</i>	11	0	6	2			3		0	
<i>Bacillus pumilus</i>	10	0	3	3			2		2	
<i>Bacillus safensis</i> subsp. <i>safensis</i>	9	0	2	1			5		1	
<i>Bacillus subtilis</i>	8	1	0	0			3		4	
<i>Cellulosimicrobium funkei</i>	6	0	5	1			0		0	
<i>Sinorhizobium fredii</i>	10	0	1	0			2		7	
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	4	0	2	0			0		2	
<i>Enterobacter sichuanensis</i>	1	1	0	0			0		0	
<i>Fictibacillus arsenicus</i>	22	0	2	0			17		3	
<i>Kocuria polaris</i>	2	0	1	0			1		0	
<i>Krasilnikoviella flava</i>	2	0	1	0			1		0	
<i>Metabacillus indicus</i>	12	1	0	0			6		5	
<i>Microbacterium paraoxydans</i>	1	1	0	0			0		0	
<i>Priestia</i> sp.	87	0	50	4			18		15	
<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	5	1	0	0			4		0	
<i>Pseudomonas putida</i>	4	3	0	0			0		1	
<i>Pseudomonas urmiensis</i>	2	2	0	0			0		0	
<i>Pseudomonas laurylsulfativorans</i>	3	0	1	2			0		0	
<i>Serratia nematodiphila</i>	1	0	0	0			0		1	
<i>Sphingobacterium puteale</i>	5	1	0	0			0		4	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	8	0	0	1			0		7	
<i>Streptomyces iakyrus</i>	5	0	2	0			2		1	
<i>Streptomyces sclerotialus</i>	1	0	0	1			0		0	
<i>Variovorax paradoxus</i>	2	0	0	0			0		2	

Priestia sp.、滋养节杆菌(*Arthrobacter pascens*)和砒霜伪芽孢杆菌(*Fictibacillus arsenicus*),三者合占总分离株数的 58.0% (47/81); 源自低盐平板的有 66 株 16 种, 22.7% (15/66) 为 *Priestia* sp.; 有 3 种细菌仅在该途径中获得。通过直接涂布筛选以及先筛选后纯化 2 种途径合计分离出 24 种阳性菌株, 占总量的 85.7% (24/28), 是分离筛选溶磷细菌的有效组合。在菌落点植筛选中,

高盐平板上的阳性株数远大于低盐平板, 但是阳性株/种数的比值小于低盐平板, 说明高盐对一些溶磷菌有选择效应, 而低盐则有利于分离获得更多种类的溶磷细菌。本研究中极地考克氏菌(*Kocuria polaris*)和淡黄色克拉西里尔尼科夫氏菌(*Krasilnikoviella flava*)这 2 个种仅在高盐平板上获得, 嗜线虫沙雷氏菌(*Serratia nematodiphila*)、菌核链霉菌(*Streptomyces sclerotialus*)和争论贫

噬菌(*Variovorax paradoxus*)这 3 个种仅在低盐平板上获得,说明采用不同盐浓度的培养基进行分离培养分别可以获得某些特异种类的解磷细菌。

2.6 产铁载体细菌筛选结果

将菌悬液直接涂布到 CAS 培养基平板上,接种浓度 $\geq 10^{-3}$ 时培养约 10 d 后有少量菌落长出,接种浓度 $\leq 10^{-4}$ 时没有菌落长出。将这些菌落再点植到 CAS 培养基上进行复筛,多数表现为表面油状湿润隆起、周围粉红色(图 3A)。分离培养基 2 和 7 号分别代表低 NaCl 和中等有机营养条件下的 pH 9.0 和 pH 8.0, 4、5 和 6 号代表了 pH 8.5 的不同 NaCl 和有机营养组合,从这 5 种分离平板上随机挑菌落直接点植到 CAS 平板上,共获得阳性菌落 62 个,菌落大,周围棕黄色晕圈大,说明产铁载体能力强(图 3B)。

在 2 (pH 9.0)和 7 (pH 8.0)号培养基上菌落阳性率不超过 5%,在 4、5 和 6 号培养基上菌落产铁载体阳性率均高于 15% (表 7),表明使用 pH 8.5 的培养基有利于分离培养盐碱地中的产铁载体细菌。将 2 个涂布筛选阳性菌落和 4 个直接点植筛选阳性菌落进行梯度稀释,再涂布接种到 $1/4 \times R_2A$ 培养基上,均出现 2 种以上菌落,挑取单菌落点植到 CAS 平板上进行复筛,获得 4 种纯的产铁载体细菌。然而,一些菌落在 CAS 平板上未能生长,表现为产铁载体阴性。说明通过这 2 种方法获得的产铁载体阳性菌落数量多,但是均为非纯培养物,仍需对其进行进一步分离筛选才能获得纯的产铁载体细菌。将各种培养基来源的纯化鉴定后菌株点植到 CAS 平板上筛选,获得产铁载体细菌 58 株 12 种,菌落周围棕黄色晕圈相对较小(图 3C)。

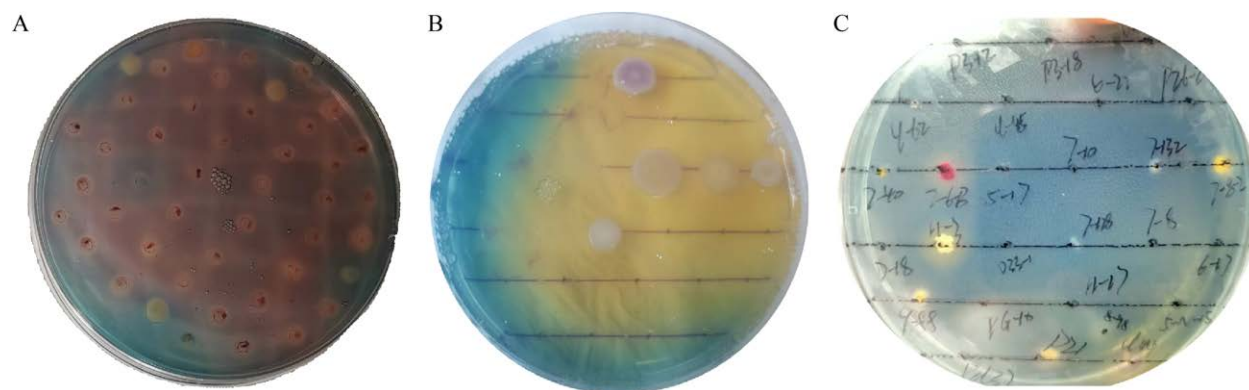


图 3 CAS 培养基上筛选出来的产铁载体细菌 A: 涂布筛选; B: 分离平板生长的菌落中筛选; C: 纯化菌落筛选。

Figure 3 The siderophore-producing bacteria screened on CAS medium. A: Screened by spread plate method; B: Screened by spotting colonies growing on isolating plates; C: Screened by spotting purified colonies.

表 7 不同分离培养基上产铁载体克隆获得率

Table 7 The rate of colony producing siderophore on different medium

培养基 Medium	点植菌落数 Planted colony	生长菌落数 Growing colony	产铁载体菌落数(阳性率) Colonies producing siderophore (positive rate)
7 (pH 8.0+0 NaCl+1/5 $\times R_2A$)	200	51	10 (5%)
4 (pH 8.5+0 NaCl+1/50 $\times R_2A$)	100	35	18 (18%)
5 (pH 8.5+1.0% NaCl+1/5 $\times R_2A$)	100	39	15 (15%)
6 (pH 8.5+5.0% NaCl+1 $\times R_2A$)	50	16	15 (30%)
2 (pH 9.0+1.0% NaCl+1/5 $\times R_2A$)	100	19	4 (4%)

本研究共获得具有产铁载体能力的细菌 68 株 13 个种, 其中 51 株 12 种在低盐培养基上分离到, 仅有 3 种 5 株源自高盐培养基; 金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)为该地产铁载体的绝对优势类群, 占总阳性株数的 51.5% (35 株), 都来自低盐培养基(表 8), 说明用低盐培养基更有利于分离获得盐碱地的产铁载体细菌。奥鲁米耶假单胞菌(*Pseudomonas urmiensis*)的 2 个阳性分离株均来源于 PVK 平板, 说明用糖含量高的 PVK 培养基不仅可以获得某些特异的溶磷细菌, 也有助于分离到一些特异的产铁载体细菌。

3 讨论

土壤系统空间复杂, 生境异质, 所以土壤中微生物种类极为丰富, 据估计占地球生物多样性的四分之一^[34]。长久以来, 微生物资源的获得主要是基于分离培养的方法^[35]。由于不适宜的生长环境、休眠状态以及缺乏种群相互作用, 用常规方法无法获得土壤中所有微生物的纯培养物, 通过模拟环境、设计不同类型的培养基和增加筛选周期可以获得更多的微生物资

源^[36]。本研究从有机营养水平、NaCl 浓度和 pH 这 3 个角度探究从盐碱地分离培养细菌的适宜条件, 并通过 3 种途径筛选具有溶解无机磷和产铁载体功能的细菌。

从盐碱化土壤中分离培养细菌资源时宜选用 NaCl 含量<3.0%的寡有机营养培养基。土壤中微生物种类丰富多样, 不同微生物之间对营养需求有差异。环境是决定物种能否生存的重要条件, 一定的培养基条件会导致细菌的生态位发生改变^[37], 某些细菌种类不能利用某些营养物质而不能生长, 而有的种类能够获取营养物质进而生长形成肉眼可见的菌落。本研究结果表明, 在有机营养、NaCl 和 pH 这 3 个因素中, NaCl 对细菌的分离培养结果影响最大, 表现为对菌落形成和扩张的抑制。通常在培养基中加入一定量的 NaCl 或无机盐以调节渗透压^[38], 使微生物在适宜的水活度下生长。在培养细菌常用的 LB 培养基中, 有机营养物质浓度和无机盐(NaCl)浓度分别 1.5%和 1.0%^[39], 而在 R₂A 培养基中二者浓度分别为 0.250%和 0.062%, 所以 R₂A 以及更低营养水平的培养基

表 8 产铁载体细菌培养基来源

Table 8 The medium-origin of siderophore-producing bacteria

首配模式种 Top-hit taxon	总株数 Total isolate	CAS	低盐 Low NaCl	高盐 High NaCl	PVK
<i>Chryseobacterium cucumeris</i>	23	2	21	0	0
<i>Chryseobacterium artocarpi</i>	12	0	12	0	0
<i>Sphingobacterium puteale</i>	5	0	4	0	1
<i>Enterobacter sichuanensis</i>	5	3	1	0	1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	6	0	4	2	0
<i>Streptomyces longisporoflavus</i>	3	0	1	2	0
<i>Massilia eburnean</i>	2	0	2	0	0
<i>Rosellomorea marisflavi</i>	1	0	1	0	0
<i>Kribbella flavida</i>	1	0	1	0	0
<i>Serratia nematodiphila</i>	1	0	1	0	0
<i>Pseudomonas laurylsulfativorans</i>	3	0	2	1	0
<i>Pseudomonas putida</i>	4	0	1	0	3
<i>Pseudomonas urmiensis</i>	2	0	0	0	2

水势高,这有利于细菌的运动和菌落扩张。本研究中,分离培养基上出现了大范围扩张的菌落,应该与培养基水势高相关。在相同的寡有机营养条件下,适当添加 NaCl 可有效抑制菌落的扩张,使平板上 CFU 数量显著增加(表 2, D 号 vs. 表 1, 4 号),但 NaCl 浓度达 3.0% 及以上时会抑制细菌生长,平板上 CFU 的数量显著下降($P < 0.05$) (表 3)。有机营养高时喜好富营养的种类快速生长并占据生态位,生长缓慢或寡营养细菌^[40]则没有机会生长形成菌落,CFU 总量也会下降(表 1, 8 号)。因而,从盐碱地中分离培养细菌资源时,建议选用寡有机营养,添加的 NaCl 以不超过 3% 为宜,可以获得数量大、种类丰富、形态规整的菌落。已报道分离获得耐盐细菌的常用方法是在培养基中添加适量的 NaCl,多数研究者添加的浓度在 5.0% 以上。例如,李章雷等^[41]在培养基中添加 10% 的 NaCl,筛选获得了 5 株耐盐碱促生细菌。本研究中,在贫营养条件下 NaCl 浓度为 5% 即对 CFU 形成的抑制率为 80% 以上,若提高培养基中的有机物含量可以缓解高盐浓度的抑制效应,显著提高 CFU 数量,说明 NaCl 浓度与有机营养之间有交互效应(表 2),所以,如果想要获得多样性丰富耐盐的细菌,所用的 NaCl 浓度需要根据培养基中有机营养水平而做出相应的调整。

从盐碱地分离解无机磷和产铁载体细菌资源宜用低盐的弱碱性培养基。磷是植物营养中的第二大矿质元素^[42],铁是生物圈中几乎所有生物体的必需微量营养元素,但是自然界中 95%–99% 的磷酸盐以固定化和沉淀形式存在^[43],铁主要以微溶的形式存在^[44],植物不能直接利用这些固化形式的磷和铁,盐碱化土壤中磷和铁元素可利用率更低。微生物通过代谢产生有机酸来溶解固态化的磷,通过合成和分泌被称为铁载体的分子来螯合环境中的铁离子,以满足自身生长需求^[45]。解磷和产铁载体的能力是 PGPR 促进植物生长的重要机制之一^[46]。本研

究用直接涂布接种、分离培养菌落直接点植接种以及纯化菌落点植接种 3 种途径来筛选溶磷和产铁载体细菌。对于解无机磷细菌的筛选,由于 PVK 培养基含葡萄糖,采用直接涂布筛选时有一些种类被高度富集,例如在本研究中 *Acinetobacter calcoaceticus* 是阳性克隆中的优势种,所以在测序鉴定之前需要对纯化的阳性菌落进行肉眼辨别以提高筛选效率。在先分离后筛选途径中,低盐分离培养基上的阳性菌落种类丰富度更高,高盐和低盐培养基均有各自特异的种类。对于产铁载体细菌的筛选,比较高效的途径是直接涂布筛选和对分离平板上的大量菌落进行先筛选后纯化,在 CAS 平板菌落周围出现红棕色到黄棕色透明圈的为产铁载体阳性^[47]。本研究通过直接涂布法筛选获得了多个阳性菌落,但多数菌落周围有大的粉红色晕圈,推测该途径获得的产铁载体细菌种类比较单一。由于 CAS 培养基中有去污剂,对微生物有一定的毒性^[48],采用直接涂布筛选时需要接种浓度较高的悬浊液,在本研究中接种浓度为 10^{-3} g/mL 以上时才有菌落生长出来。目前已知铁载体 500 多种,根据特征官能团的不同分为异羟肟酸型、儿茶酚酸型和羧酸型这三类^[49]。铬天青显色与 pH 相关,酸性条件下铬天青显红色^[50],出现红色晕圈的菌落说明产生的是羧酸型铁载体或伴有酸性物质产生。通过先分离培养再点植筛选获得了阳性菌落 62 个,在 pH 8.5 的分离培养基上阳性菌落的比率高于 pH 8.0 和 pH 9.0 的分离培养基。以上 2 种方法获得的产铁载体阳性菌落通过稀释涂布分离可获得 2 种以上不同单菌落,其中有的单菌落回接到 CAS 平板时呈阴性,推测在自然条件下这些种类可能与真正的产铁载体细菌相伴而生,它们与产铁载体细菌关系值得深入探究。在先纯化后筛选途径中获得的阳性种类中,92.31% (12/13) 是源自低盐培养基,仅有 23.08% (3/13) 是源于高盐培养基。在 6 号培养基上产铁载体

阳性克隆的比率高达 15% (表 7), 但是该培养基上菌落种类丰富度低(表 4), 推测该培养基上阳性菌落中的产铁载体种类多样性较低, 所以高盐碱环境中多数解无机磷细菌和产铁载体细菌并不耐受或喜好盐碱, 宜采用低盐的弱碱性培养基进行分离培养, 然后再进行筛选和纯化。

盐碱地的特征是含盐量高、偏碱性^[51], 但是不同地方植被、土壤肥力等因素有差异, 其中细菌的优势种类有较大差异^[52]。李良秋等^[53]从新疆塔里木盆地盐碱地土壤中分离培养获得 103 株细菌, 包含 31 个属, 优势属是 *Bacillus*、*Streptomyces*、微球菌属(*Micrococcus*)、考克氏菌属(*Kocuria*)和副球菌属(*Paracoccus*)。杨惠婷等^[54]基于文献总结出盐碱土细菌群落优势类群在属水平为鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、*Pseudomonas*、硝化螺菌属(*Nitrospira*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)和 *Bacillus*。本研究表明, 源于东营市重盐碱地大豆根际土的 433 个细菌分离株中包含 48 个属, 处于前 7 位的优势属为 *Bacillus*、*Priestia*、*Streptomyces*、*Arthrobacter*、*Cytobacillus*、*Fictibacillus* 和 *Pseudarthrobacter*, 分别有 2 个属和 1 个属与李良秋等^[53]和杨惠婷等^[54]报道的结果一致。分析不同研究结果之间差异的原因, 除了土样来源不同以外, 还与分离培养条件和筛选方法不同相关。李良秋等^[53]用的是以 R_2A 和改良 $0.1 \times TSA$ 为基础的培养基, 在获得的纯培养物中 *Bacillus* 为绝对优势属(36.27%)^[53]。在本研究中, 7 号和 9 号培养基 pH 相同, 添加的 NaCl 分别为 0 和 5.0%, 有机营养分别为 $1/5 \times R_2A$ 和 $1/50 \times R_2A$, 第一优势属分别为 *Arthrobacter* (10.1%)和 *Priestia* (38.09%) (图 2)。因此, 从多个地理位置采样以及设计多种培养基对获得盐碱地细菌资源非常重要。

4 结论

本研究从东营重度盐碱地大豆根际土中分

离获得了溶解无机磷细菌 271 株, 分别属于 28 个种; 获得产铁载体细菌 68 株, 分别属于 13 个种; 获得潜在新种 9 株, 分别归属 7 个属中的 7 个种。说明本研究获得的细菌资源丰富, 所用的分离条件可以作为盐碱地细菌分离的一种参考方法。

作者贡献声明

谭寿生: 执行调研、数据分析、撰写文章;
谭心许: 执行调研和数据分析; 李怡君和杨芾: 撰写文章; 韦善君: 方法论、数据收集与监管, 撰写文章; 张晓霞: 提出概念、获取基金、提供资源。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无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。

REFERENCES

- [1] 毛恋, 芦建国, 江海燕. 植物响应盐碱胁迫的机制[J]. 分子植物育种, 2020, 18(10): 3441-3448.
MAO L, LU JG, JIANG HY. Mechanisms of plant responses to salt-alkali stress[J]. Molecular Plant Breeding, 2020, 18(10): 3441-3448 (in Chinese).
- [2] 丁海荣, 洪立洲, 杨智青, 王茂文, 王凯, 朱小梅. 盐生植物碱蓬及其研究进展[J]. 江西农业学报, 2008, 20(8): 35-37, 40.
DING HR, HONG LZ, YANG ZQ, WANG MW, WANG K, ZHU XM. Progress of study on halophyte *Suaeda salsa*[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2008, 20(8): 35-37, 40 (in Chinese).
- [3] 宋大利, 丁文成, 周卫. 我国主要耕地后备资源时空变化特征及可持续利用战略[J]. 植物营养与肥料学报, 2024, 30(8): 1437-1446.
SONG DL, DING WC, ZHOU W. Temporal and spatial changes and sustainable utilization strategies of cultivated land reserve resources in China[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizers, 2024, 30(8): 1437-1446 (in Chinese).
- [4] 张志美. 东营盐碱地生物腐植酸改良的应用基础研究[D]. 东营: 中国石油大学(华东), 2021.
ZHANG ZM. Basic research on application of biological humic acid improvement in Dongying saline-alkali soil[D]. Dongying: China University of Petroleum (Huadong), 2021 (in Chinese).
- [5] 杜贞栋, 王孝亮, 韩民. 黄河三角洲引黄灌区发展改良盐碱地建议[J]. 山东水利, 2023(2): 4-6.

- DU ZD, WANG XL, HAN M. Suggestions on the development and improvement of saline-alkali land in the Yellow River Delta[J]. Shandong Water Resources, 2023(2): 4-6 (in Chinese).
- [6] 许坤鹏, 刘喜兵. 河套灌区盐碱地改良方案总结与探索[J]. 甘肃科技, 2021, 37(1): 41-42, 24.
- XU KP, LIU XB. Summary and exploration of saline-alkali land improvement scheme in Hetao irrigation area[J]. Gansu Science and Technology, 2021, 37(1): 41-42, 24 (in Chinese).
- [7] CHAPARRO JM, SHEFLIN AM, MANTER DK, VIVANCO JM. Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility[J]. Biology and Fertility of Soils, 2012, 48(5): 489-499.
- [8] JEZ JM, LEE SG, SHERP AM. The next green movement: plant biology for the environment and sustainability[J]. Science, 2016, 353(6305): 1241-1244.
- [9] ENAGBONMA BJ, FADIJI AE, AYANGBENRO AS, BABALOLA OO. Communication between plants and rhizosphere microbiome: exploring the root microbiome for sustainable agriculture[J]. Microorganisms, 2023, 11(8): 2003.
- [10] LIU Z, GONG HR, LI J, HOU RX, SUN ZG, OUYANG Z. Microbes with high-abundance attributes dominate the prokaryote communities of saline-alkali soil and construct more complex networks in the plant rhizosphere[J]. Geoderma, 2023, 439: 116684.
- [11] PAN J, PENG F, XUE X, YOU QG, ZHANG WJ, WANG T, HUANG CH. The growth promotion of two salt-tolerant plant groups with PGPR inoculation: a meta-analysis[J]. Sustainability, 2019, 11(2): 378.
- [12] 赵树栋, 陈建坤, 黄才成, 王超, 杨晓蕾, 李建宏. 植物根际促生菌对高原早熟禾根际土壤氮素及固氮微生物的影响[J]. 草原与草坪, 2022, 42(4): 133-138.
- ZHAO SD, CHEN JK, HUANG CC, WANG C, YANG XL, LI JH. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on nitrogen and nitrogen-fixing microorganisms in rhizosphere soil of *Poa alpigena*[J]. Grassland and Turf, 2022, 42(4): 133-138 (in Chinese).
- [13] TIMOFEEVA A, GALYAMOVA M, SEDYKH S. Prospects for using phosphate-solubilizing microorganisms as natural fertilizers in agriculture[J]. Plants, 2022, 11(16): 2119.
- [14] SHENG XF. Growth promotion and increased potassium uptake of cotton and rape by a potassium releasing strain of *Bacillus edaphicus*[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2005, 37(10): 1918-1922.
- [15] 勾宇春, 王宗抗, 张志鹏, 魏浩, 孟品品, 曾艳华, 邓祖科, 周进. 植物根际促生菌作用机制研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2023, 29(2): 495-506.
- GOU YC, WANG ZK, ZHANG ZP, WEI H, MENG PP, ZENG YH, DENG ZK, ZHOU J. Advance in role mechanisms of plant growth-promoting rhizobacteria[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2023, 29(2): 495-506 (in Chinese).
- [16] RAHMAN SS, SIDDIQUE R, TABASSUM N. Isolation and identification of halotolerant soil bacteria from coastal Patenga area[J]. BMC Research Notes, 2017, 10(1): 531.
- [17] VURUKONDA SSKP, VARDHARAJULA S, SHRIVASTAVA M, SKZ A. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria[J]. Microbiological Research, 2016, 184: 13-24.
- [18] GAUHAR SJ, QURASHI AW, LIAQAT I, ZAFAR U, VIRK MA, ARA C, FAHEEM M, MUBIN M. Halotolerant bacterial biofilms for desalination and water treatment: a pilot study[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2023, 30(28): 72563-72574.
- [19] YASMIN H, NAEEM S, BAKHTAWAR M, JABEEN Z, NOSHEEN A, NAZ R, KEYANI R, MUMTAZ S, HASSAN MN. Halotolerant rhizobacteria *Pseudomonas pseudoalcaligenes* and *Bacillus subtilis* mediate systemic tolerance in hydroponically grown soybean (*Glycine max* L.) against salinity stress[J]. PLoS One, 2020, 15(4): e0231348.
- [20] 刘少芳, 王若愚. 植物根际促生细菌提高植物耐盐性研究进展[J]. 中国沙漠, 2019, 39(2): 1-12.
- LIU SF, WANG RY. Advance in research on plant salt tolerance improved by plant-growth-promoting rhizobacteria[J]. Journal of Desert Research, 2019, 39(2): 1-12 (in Chinese).
- [21] MAHDI I, ALLAOUI A, FAHSI N, BISKRI L. *Bacillus velezensis* QA2 potentially induced salt stress tolerance and enhanced phosphate uptake in quinoa plants[J]. Microorganisms, 2022, 10(9): 1836.
- [22] 吴铭, 李玲, 杨红艳, 刘家麒, 刘延吉. ACC 脱氨酶耐盐促生菌株的筛选及产酶条件研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2013, 44(6): 837-840.
- WU M, LI L, YANG HY, LIU JQ, LIU YJ. Screening the growth-promoting strains of salt resistant and the producing conditions of ACC deaminase[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2013, 44(6): 837-840 (in Chinese).
- [23] 张晓丽, 王国丽, 常芳弟, 张宏媛, 逢焕成, 张建丽, 王婧, 冀宏杰, 李玉义. 生物菌剂对根际盐碱土壤理化性质和微生物区系的影响[J]. 生态环境学报, 2022, 31(10): 1984-1992.
- ZHANG XL, WANG GL, CHANG FD, ZHANG HY, PANG HC, ZHANG JL, WANG J, JI HJ, LI YY. Effects of microbial agents on physicochemical properties and microbial flora of rhizosphere saline-alkali soil[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2022, 31(10): 1984-1992 (in Chinese).
- [24] AYRES E, STELTZER H, SIMMONS BL, SIMPSON RT, STEINWEG JM, WALLENSTEIN MD, MELLOR N, PARTON WJ, MOORE JC, WALL DH. Home-field advantage accelerates leaf litter decomposition in forests[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2009, 41(3): 606-610.
- [25] LI YB, LI Q, YANG JJ, LÜ XT, LIANG WJ, HAN XG,

- MARTIJN BEZEMER T. Home-field advantages of litter decomposition increase with increasing N deposition rates: a litter and soil perspective[J]. *Functional Ecology*, 2017, 31(9): 1792-1801.
- [26] JIANG MT, DELGADO-BAQUERIZO M, YUAN MM, DING JX, YERGEAU E, ZHOU JZ, CROWTHER TW, LIANG YT. Home-based microbial solution to boost crop growth in low-fertility soil[J]. *New Phytologist*, 2023, 239(2): 752-765.
- [27] JIANG HH, QI PS, WANG T, WANG M, CHEN MN, CHEN N, PAN LJ, CHI XY. Isolation and characterization of halotolerant phosphate-solubilizing microorganisms from saline soils[J]. *3 Biotech*, 2018, 8(11): 461.
- [28] JIANG HH, QI PS, WANG T, CHI XY, WANG M, CHEN MN, CHEN N, PAN LJ. Role of halotolerant phosphate-solubilising bacteria on growth promotion of peanut (*Arachis hypogaea*) under saline soil[J]. *Annals of Applied Biology*, 2019, 174(1): 20-30.
- [29] 孔亚东. 耐盐碱根际促生菌的分离鉴定及对玉米植株生长的影响[D]. 泰安: 山东农业大学, 2022.
- [29] KONG YD. Isolation and identification of saline-alkali tolerant plant growth promoting rhizobacteria and the effects on maize growth[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2022 (in Chinese).
- [30] 陈伟, 舒健虹, 陈莹, 曾庆飞, 王小利, 陆瑞霞, 付薇. 黑麦草根际铁载体产生菌 WN-H3 的分离鉴定及其产铁载体培养条件的优化[J]. *生物技术通报*, 2016, 32(10): 219-226.
- [30] CHEN W, SHU JH, CHEN Y, ZENG QF, WANG XL, LU RX, FU W. Screening, identification and fermentation condition optimum of a siderophore-producing bacteria WN-H3 from rhizosphere of ryegrass[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32(10): 219-226 (in Chinese).
- [31] POINDEXTER JS. Low-nutrient environments[M]// *Encyclopedia of Microbiology*. Amsterdam: Elsevier, 2009: 240-257.
- [32] LANE DJ. 16S/23S rRNA sequencing[J]. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, 1991.
- [33] STACH JEM, MALDONADO LA, MASSON DG, WARD AC, GOODFELLOW M, BULL AT. Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(10): 6189-6200.
- [34] WAGG C, SCHLAEPI K, BANERJEE S, KURAMAE EE, van der HEIJDEN MGA. Fungal-bacterial diversity and microbiome complexity predict ecosystem functioning[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 4841.
- [35] MARTINY AC. High proportions of bacteria are culturable across major biomes[J]. *The ISME Journal*, 2019, 13(8): 2125-2128.
- [36] HE ZX, WANG YX, BAI XY, CHU M, YI YY, ZHU J, GU MY, JIANG L, ZHANG ZD. Bacterial community composition and isolation of *Actinobacteria* from the soil of flaming mountain in Xinjiang, China[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(2): 489.
- [37] BAQUERO F, COQUE TM, GALÁN JC, MARTINEZ JL. The origin of niches and species in the bacterial world[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 657986.
- [38] LI F, XIONG XS, YANG YY, WANG JJ, WANG MM, TANG JW, LIU QH, WANG L, GU B. Effects of NaCl concentrations on growth patterns, phenotypes associated with virulence, and energy metabolism in *Escherichia coli* BW25113[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 705326.
- [39] YAMAMOTO K, TOYA S, SABIDI S, HOSHIKO Y, MAEDA T. Diluted *Luria-Bertani* medium vs. sewage sludge as growth media: comparison of community structure and diversity in the culturable bacteria[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(9): 3787-3798.
- [40] KUZNETSOV SI, DUBININA GA, LAPTEVA NA. Biology of oligotrophic bacteria[J]. *Annual Review of Microbiology*, 1979, 33: 377-387.
- [41] 李章雷, 刘爽, 王艳宇, 周妍, 刘权, 殷奎德. 5株耐盐碱促生细菌的筛选鉴定及其对红小豆的促生作用[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(5): 1580-1592.
- [41] LI ZL, LIU S, WANG YY, ZHOU Y, LIU Q, YIN KD. Screening and identification of five saline-alkali tolerant bacteria for growth promotion of red adzuki bean[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(5): 1580-1592 (in Chinese).
- [42] KHAN F, SIDDIQUE AB, SHABALA S, ZHOU MX, ZHAO CC. Phosphorus plays key roles in regulating plants' physiological responses to abiotic stresses[J]. *Plants*, 2023, 12(15): 2861.
- [43] PAZ-ARES J, PUGA MI, ROJAS-TRIANA M, MARTINEZ-HEVIA I, DIAZ S, POZA-CARRIÓN C, MIÑAMBRES M, LEYVA A. Plant adaptation to low phosphorus availability: core signaling, crosstalks, and applied implications[J]. *Molecular Plant*, 2022, 15(1): 104-124.
- [44] HELL R, STEPHAN UW. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants[J]. *Planta*, 2003, 216(4): 541-551.
- [45] SAHA M, SARKAR S, SARKAR B, SHARMA BK, BHATTACHARJEE S, TRIBEDI P. Microbial siderophores and their potential applications: a review[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(5): 3984-3999.
- [46] 邓声坤, 雷锋杰, 龙漪萍, 张焕荣, 姜懿轩, 张爱华. 细菌铁载体拮抗植物病原真菌及促生作用研究进展[J]. *微生物学通报*, 2023, 50(7): 3198-3210.
- [46] DENG SK, LEI FJ, LONG YP, ZHANG HR, JIANG YX, ZHANG AH. Bacterial siderophores antagonize phytopathogenic fungi and promote plant growth: a review[J]. *Microbiology China*, 2023, 50(7): 3198-3210 (in Chinese).
- [47] SUN YX, WU JL, SHANG XY, XUE LG, JI GY, CHANG SJ, NIU JB, EMANEGHEMI B. Screening of siderophore-producing bacteria and their effects on promoting the growth of plants[J]. *Current*

- Microbiology, 2022, 79(5): 150.
- [48] MILAGRES AMF, MACHUCA A, NAPOLEÃO D. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay[J]. Journal of Microbiological Methods, 1999, 37(1): 1-6.
- [49] TIMOFEEVA AM, GALYAMOVA MR, SEDYKH SE. Bacterial siderophores: classification, biosynthesis, perspectives of use in agriculture[J]. Plants, 2022, 11(22): 3065.
- [50] BISWAS S, PAL A. Spectrophotometric determination of cationic surfactants in aqueous media using chrome azurol S as colour forming agent and 1-butanol as extracting solvent[J]. Talanta, 2020, 206: 120238.
- [51] 张皓琳. 山东省东营市河口区滨海盐碱地森林质量提升规划研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2019.
- ZHANG HL. Study on forest quality improvement planning of coastal saline-alkali land in Hekou district of Dongying city, Shandong province[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2019 (in Chinese).
- [52] 迪力热巴·阿不都肉苏力, 穆耶赛尔·奥斯曼, 祖力胡玛尔·肉孜, 马勤, 雷瑞峰, 安登第. 盐碱土壤微生物多样性与生物改良研究进展[J]. 生物技术通报, 2021, 37(10): 225-233.
- Dilireba·Abudourousuli, Muyesaier·Aosiman, Zulihumaer·Rouzi, MA Q, LEI RF, AN DD. Advances on microbial diversity and biological improvement of saline-alkali soil[J]. Biotechnology Bulletin, 2021, 37(10): 225-233 (in Chinese).
- [53] 李良秋, 郑贺云, 蔡卓平, 姚青, 朱红惠. 新疆阿克苏盐碱地土壤细菌的分离研究[J]. 生物技术进展, 2013, 3(4): 281-287.
- LI LQ, ZHENG HY, CAI ZP, YAO Q, ZHU HH. Isolation of bacteria in the saline alkaline soils of Akesu in Xinjiang[J]. Current Biotechnology, 2013, 3(4): 281-287 (in Chinese).
- [54] 杨惠婷, 冷小云, 石春芳. 盐碱化土壤细菌群落研究进展[J]. 环境科学与技术, 2021, 44(6): 230-236.
- YANG HT, LENG XY, SHI CF. Research progress on bacterial communities in saline-alkali soil[J]. Environmental Science & Technology, 2021, 44(6): 230-236 (in Chinese).