

花生根际微生物的分离及高效功能菌株筛选

黎萍^{#1}, 高新星^{#2}, 韩昆明¹, 孙利芹¹, 李岩^{*1}

1 烟台大学生命科学学院 烟台大学胶东特色微生物资源中心 烟台市特色农业生物资源保育与种质创新利用重点实验室, 山东 烟台 264005

2 泰州学院医药与化学化工学院, 江苏 泰州 225300

黎萍, 高新星, 韩昆明, 孙利芹, 李岩. 花生根际微生物的分离及高效功能菌株筛选[J]. 微生物学通报, 2023, 50(10): 4433-4447.

LI Ping, GAO Xinxing, HAN Kunming, SUN Liqin, LI Yan. Isolation and efficient strain screening of microorganisms from peanut rhizosphere[J]. Microbiology China, 2023, 50(10): 4433-4447.

摘要:【背景】花生根际分布着丰富的微生物类群, 分离筛选多种功能的高效微生物是研发高效复合菌肥的基础。【目的】从花生根际土壤及根表分离微生物, 分析可培养微生物的多样性, 筛选高效解有机磷和无机磷、产吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)和铁载体功能的菌株, 为研发花生微生物菌肥打下基础。【方法】利用稀释涂布法, 从采自山东省栖霞市、平度市、烟台市莱山区3个样点的花生根际土、根表样品中分离微生物, 基于16S rRNA基因序列对其进行系统发育分析, 并通过初筛和复筛筛选高效解磷、产IAA和铁载体的菌株。【结果】共分离、纯化、保藏147株菌, 其中75株分离自根际土壤, 72株分离自根表样品。系统发育分析表明所有的菌分布于放线菌门(*Actinomycetota*)、芽孢杆菌门(*Bacillota*)、拟杆菌门(*Bacteroidota*)和假单胞菌门(*Pseudomonadota*)这4个门的40个属, 优势属为链霉菌属(*Streptomyces*, 21.77%)、芽孢杆菌属(*Bacillus*, 16.33%); 根表样品微生物的多样性高于根际样品; 共筛选到解有机磷菌株62株, 短波单胞菌(*Brevundimonas*) YTU21021解有机磷能力最强为1.12 mg/L; 解无机磷菌株31株, 不动杆菌(*Acinetobacter*) YTU21009解无机磷能力最强为7.04 mg/L; 产IAA的菌株63株, 肠杆菌(*Enterobacter*) YTU21054产IAA量最高, 达184.19 mg/L; 产铁载体细菌7株, 伯克氏菌(*Burkholderia*) YTU21051产铁载体能力最强, A_s/A_r 为0.90。【结论】花生根际和根表样品中可培养微生物多样性较为丰富, 本研究筛选到的高效功能菌丰富了花生根际功能微生物资源, 为后续与高效根瘤菌联合研发花生复合微生物菌肥奠定了基础。

关键词: 花生; 根际微生物; 分离; 功能; 高效菌株筛选

资助项目: 山东省自然科学基金(ZR202102280248, 2020MC043); 江苏省自然科学基金(BK20210144)

[#]对本文贡献相同

This work was supported by the Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR202102280248, 2020MC043) and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20210144).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: liyan0709@hotmail.com

Received: 2023-02-13; Accepted: 2023-04-21; Published online: 2023-06-25

Isolation and efficient strain screening of microorganisms from peanut rhizosphere

LI Ping^{#1}, GAO Xinxing^{#2}, HAN Kunming¹, SUN Liqin¹, LI Yan^{*1}

1 Yantai Key Laboratory of Characteristic Agricultural Biological Resources Conservation and Germplasm Innovation Utilization, Jiaodong Microbial Resource Center of Yantai University, College of Life Sciences, Yantai University, Yantai 264005, Shandong, China

2 School of Medicine and Chemical Engineering, Taizhou University, Taizhou 225300, Jiangsu, China

Abstract: **[Background]** The rhizosphere soil harbors diverse microorganisms. The isolation and screening of efficient strains with different functions is the premise for the development of efficient composite microbial fertilizers. **[Objective]** To isolate microorganisms from the rhizosphere soil and root surface of peanut and screen out efficient strains with organic and inorganic phosphorus-solubilizing, indole-3-acetic acid (IAA)-producing, and siderophore-producing functions, so as to lay a foundation for the research and development of microbial fertilizers for peanut. **[Methods]** The dilution-plate coating method was employed to isolate the microorganisms from the peanut rhizosphere soil and root surface samples collected from Qixia City, Pingdu City, and Laishan district of Yantai City in Shandong Province. The microorganisms were identified by the phylogenetic analysis based on the 16S rRNA gene sequences. The strains with efficient organic and inorganic phosphorus-solubilizing, IAA-producing, and siderophore-producing functions were obtained through primary and secondary screening. **[Results]** A total of 147 strains were isolated, purified, and preserved in this study, including 75 strains isolated from the rhizosphere soil samples and 72 strains from the root surface samples. The isolates belonged to 40 genera of 4 phyla including *Actinomycetota*, *Bacillota*, *Bacteroidota*, and *Pseudomonadota*. *Streptomyces* (21.77%) and *Bacillus* (16.33%) were the dominant genera. The root surface samples had higher alpha diversity of microbial community than the rhizosphere samples. Among the 62 strains with organic phosphorus-solubilizing ability, *Brevundimonas* sp. YTU21021 showed the highest activity of 1.12 mg/L. Among the 31 strains with inorganic phosphorus-solubilizing ability, *Acinetobacter* sp. YTU21009 showed the highest activity of 7.04 mg/L. Among the 63 strains that could produce IAA, *Enterobacter* sp. YTU21054 showed the highest yield of 184.19 mg/L. Among the 7 strains capable of producing siderophores, *Burkholderia* sp. YTU21051 presented the highest efficiency with the A_s/A_r ratio of 0.9. **[Conclusion]** There are diverse culturable microorganisms in the rhizosphere and root surface samples of peanut. The efficient functional strains obtained in this study enrich the functional microbial resources in peanut rhizosphere and lay a foundation for the development of composite microbial fertilizers with efficient rhizobia for peanut.

Keywords: peanut; rhizospheric microorganisms; isolation; function; screening of efficient microorganisms

花生(*Arachis hypogaea* L.)又名落花生、长生果等,是起源于南美洲的一年生草本豆科植物,是国际上三大传统油料作物之一,是人类最重要的油脂来源之一^[1]。中国是世界上花生主产国之一,中国花生种植面积居世界第二,总产量居世界第一^[2],为我国国民经济贡献巨大。施肥是提高花生产量、改善花生品质的有效措施^[3]。但过度施用化肥不仅增加了种植成本,而且会导致土壤酸化,加上由于水土流失导致的河流富营养化,最终造成资源浪费和环境污染,不利于农业可持续发展。发展新型肥料,尤其是以功能微生物为主的生物肥料逐渐成为研究应用的热点。

微生物在土壤中分布广泛、生物量大,可达土壤 10^{11} 个细胞/g-土壤^[4]。根际是靠近根部的区域,植物通过根分泌了 5%–21% 的光合产物^[5],不同植物的分泌物招募了不同的根际微生物,调控着微生物的群落结构,因此根际被认为是微生物活动的热区(hotspot),是植物与微生物紧密互作发生的位点,而不同功能微生物也调节着植物生长发育、抗逆、抗病和营养吸收转化等^[6-7]。这些根际微生物已成为研发生物肥料的最重要来源。近年来,高通量测序技术的发展和大规模的微生物分离鉴定极大地促进了对根际微生物组的认识及与植物互作的理解^[8]。接种促生菌能显著提高作物产量^[9],而接种几种不同功能的菌株合成的简化群落比接种单株促生菌的效果更为稳定^[10]。开发多种功能根际微生物合成简化群落已成为农业微生物研究和应用的热点。

作为典型的豆科作物,花生能与根瘤菌结瘤进行共生固氮^[11],其固定的氮是花生重要氮素来源,能满足花生氮素需求的一半以上^[12]。与其他作物一样,花生根际也分布着多样的微生物,部分菌株具有解磷、解钾等功能^[13],相关根际高效菌株的单接种应用能够显著促进花生生长^[14]。然而分离、筛选多种功能的高效微生

物,研制含根瘤菌和多种功能微生物的复合菌剂,将在有力地提升土壤地力、降低花生生产成本、促进花生产业发展等方面发挥更大功能。

山东省花生种植面积和产量均居全国第2位,总产量约 576.7 万 t^[2],对山东省农业经济贡献很大。本研究从山东省栖霞市、平度市和烟台市莱山区 3 个采样地采集、分离了花生根际土壤和根表样品中的微生物,基于 16S rRNA 基因序列研究了可培养微生物的多样性,并筛选了高效解有机磷和无机磷、产吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)和铁载体的菌株,以期花生复合微生物菌肥的研制和应用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样 品

2021 年 7 月下旬从山东省栖霞市、平度市和烟台市莱山区采集了花生植株和根际土壤。采样方式:将花生植株连根拔起,将花生植株和根部土壤装入无菌自封袋中,立即带回实验室进行微生物分离。

1.1.2 培 养 基

培养基及配方如表 1 所示,除特殊说明外,配制时均用去离子水定容至 1 000 mL, pH 7.0,固体培养基中琼脂粉添加量为 15 g/L, 121 °C 灭菌 30 min。

1.1.3 主要试剂和仪器

蛋白胨、牛肉粉、琼脂粉、胰蛋白胨、大豆蛋白胨、酵母浸粉、牛肉膏,北京奥博星生物技术有限责任公司;氯化钠、D-甘露醇、三水合磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、七水合硫酸镁、葡萄糖、硫酸铵、氯化钾、七水合硫酸亚铁、一水合硫酸锰、碳酸钙、氯化镁、磷酸三钙、蔗糖、天冬酰胺和甘油,国药集团化学试剂有限公司;植酸钙、色氨酸、铬天青 S 和卵磷脂,上海麦克林生化科

表 1 本研究培养基信息

Table 1 The information of media used in this study

培养基名称 Medium	用途 Function	参考文献 References
NA 培养基 Nutrient agar medium	微生物分离及培养 Bacteria isolation and cultivation	[15]
TSA 培养基 Trypticase soy agar medium	微生物分离及培养 Bacteria isolation and cultivation	[16]
牛肉膏蛋白胨培养基 Beef extract peptone medium	微生物培养 Bacteria cultivation	[13]
解有机磷筛选培养基 Organo-phosphate solubilizing screen medium	解有机磷菌筛选 Organo-phosphate solubilizing bacteria screen	[17]
磷酸盐生长培养基 National botanical research institute's phosphate (NBRIP) medium	解无机磷菌复筛 Inorganic phosphate solubilizing bacteria secondary screen	[18]
无机磷筛选(PVK)培养基 Pikovskaya medium	解无机磷菌筛选 Inorganic phosphate solubilizing bacteria screen	[19]
LB 培养基 Luria-Bertani medium	微生物培养 Bacteria cultivation	[17]
MSA 培养基 Sugar-aspartic acid medium	微生物培养 Bacteria cultivation	[20]
King' B 培养基 King' B medium	产 IAA 能力筛选 IAA producing bacteria screen	[21]
CAS 培养基 Chrome azurol sulfonate medium	产铁载体菌筛选 Siderophore producing bacteria screen	[20]

技股份有限公司; 2,4-二硝基苯酚指示液, 上海易恩化学技术有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司。

超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; 紫外可见分光光度计, 上海美析仪器有限公司; 电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; PCR 仪, Bio-Rad 公司; 超微量分光光度计, Implen GmbH 公司。

1.2 花生根际及根表微生物的分离及系统发育分析

1.2.1 微生物的分离纯化

根际微生物的分离: 将花生根际土壤从根部分离, 分别称取每个样地的 5 g 花生根际土壤, 加入 50 mL 无菌 0.01 mol/L 磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffered saline, PBS), 30 °C、140 r/min 摇床振荡 30 min, 静置 15 min^[22], 取上清液, 用 PBS 缓冲溶液按 10 倍倍比稀释法稀释成 10^{-1} – 10^{-9} 浓度梯度的菌悬液。

根表微生物的分离: 将根系置无菌水中冲洗 1 次, 置于盛有无菌 PBS 缓冲溶液的烧杯中, 超声(720 W, 工作 1 min, 停歇 30 s, 共 30 min),

然后通过 8 000 r/min 离心 5 min 获得根系土壤样品^[23]。分别称取 1 g 上述 3 个地区的花生根表土壤, 加入 10 mL 0.01 mol/L PBS 缓冲溶液, 按上述方法稀释成 10^{-1} – 10^{-9} 浓度梯度的菌悬液。分别取 0.1 mL 各浓度梯度样品涂布于 NA 和 TSA 培养基表面, 30 °C 倒置培养 5–7 d, 待长出单菌落后挑取单菌落进行划线培养, 反复划线培养直至纯化^[17]。将纯菌株置于 20% (体积分数) 甘油中, 于 -80 °C 保藏备用。

1.2.2 菌株的系统发育分析

1) 细菌基因组 DNA 提取和 16S rRNA 基因扩增

分别刮取少量菌体, 利用天根细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取所有分离菌株的基因组 DNA, 并利用超微量分光光度计检测 DNA 浓度及纯度。利用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3')^[17] 进行扩增。分别取 3 μL PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 取目的条带单一、亮度好的样品送往青岛睿博兴科生物技术有限公司测序。

2) 系统发育树的构建

将测序所得序列在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对, 下载序列相似性最大的序列为参考序列。利用 MEGA 7.0 软件^[24]中的 Muscle 程序对本研究测得序列和参考序列进行比对, 进而利用 neighbor-joining 方法^[25]构建系统发育树, 自举值设置为 1 000。

1.3 分离菌株的功能分析

1.3.1 解有机磷菌的筛选

1) 解有机磷菌的初筛

将菌株分别用灭菌牙签点接至有机磷固体培养基表面, 置 28 °C 恒温箱中倒置培养 4 d^[18], 观察溶磷圈产生情况, 并采用十字交叉法分别测量溶磷圈直径(D)和菌落直径(d)^[26]。根据 D/d 比值初步确定其解有机磷的能力。

2) 解有机磷菌的解磷能力分析

将待测菌株接种于 LB 液体培养基中, 30 °C、200 r/min 振荡培养, 按照参考文献^[18,27]的方法培养菌液 OD_{600} 至 0.6, 10 000 r/min 离心 3 min 弃上清, 用 0.85% 的 NaCl 溶液清洗菌体 3 次后悬浮于 15 mL 0.85% 的 NaCl 溶液中, 取 1 mL 菌液至 NBRIP 液体培养基中, 每个菌株重复 3 次, 30 °C、180 r/min 培养 12 h。取 5 mL 菌液 12 000 r/min 离心 2 min 弃沉淀, 吸取 1 mL 上清液利用钼锑抗比色法^[28]测定培养液中的溶磷量。根据分光光度法测量不同浓度磷标准溶液的 OD_{700} 值制成磷标准曲线^[28]。

1.3.2 解无机磷细菌的筛选

1) 解无机磷细菌的初筛

分别测定所有菌株在 PVK 培养基上形成的溶磷圈/菌落直径大小, 基于比值进行初筛定性分析, 分析方法同上述解有机磷细菌初筛方法。

2) 解无机磷细菌解磷能力分析

将待测菌株接种于 50 mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 30 °C、180 r/min 培养 12 h 得到种

子液, 菌量约为 1×10^8 CFU/mL。按 1% 的接种量接种到 PVK 液体培养基中, 30 °C、180 r/min 培养 7 d^[29]。以不接菌组为对照, 每株菌设置 3 组平行。结束培养后, 分别取发酵液 10 mL, 8 000 r/min 离心 15 min, 取上清液用钼锑抗比色法测定培养液中溶磷量。

1.3.3 产 IAA 菌的筛选

1) 产 IAA 菌的初筛

采用 Salkowski 比色法^[30]进行产 IAA 细菌的初筛。将待测菌株接种于 King'B 液体培养基中, 30 °C、180 r/min 培养 1 d, 取 50 μ L 菌悬液滴于白色陶瓷板上, 同时加入等体积的 Salkowski 比色液(50 mL 35% $HClO_4$ +1 mL 0.5 mol/L $FeCl_3$), 以加入 50 μ L 未接菌的 King'B 液体培养基为对照。将白色陶瓷板于室温避光处放置 30 min 后进行观察, 颜色变粉红者为阳性, 颜色越深表示 IAA 浓度越高。

2) 产 IAA 菌的复筛

将待测菌株按上述方法培养, 培养 1 d 后取菌悬液 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液加入等体积 Salkowski 比色液, 避光静置 30 min, 测定其 OD_{530} 值。对照标准曲线计算单位体积发酵液中 IAA 的含量。IAA 标准曲线绘制按照刘晔等^[31]的方法。

1.3.4 产铁载体菌的筛选

1) 产铁载体细菌的初筛

采用 CAS 琼脂平板法^[20]进行初筛, 将待测菌株点接至 CAS 固体平板上, 30 °C 倒置培养 4 d^[32]。菌落周边产生橘黄色的晕圈为阳性菌株, 通过计算晕圈与菌落比值(D/d)^[33]初步判断菌株产铁载体能力。

2) 产铁载体细菌的复筛

将待测菌株接种至 MSA 液体培养基中, 30 °C、150 r/min 培养 48 h。取 5 mL 菌液 12 000 r/min 离心 5 min, 取 2 mL 上清液, 加入 2 mL CAS

检测液^[11],充分混匀静置 1 h 后测定 OD_{630} 值 (A_s)^[32],另取未接菌的 MSA 液体培养基与等体积 CAS 检测液混匀测定其 OD_{630} 值 (A_r)。用 A_s/A_r 表示样品中铁载体的相对含量,数值越低,表示铁载体的含量越大。

1.4 数据处理

使用 SPSS20.0 软件对试验数据进行统计分析,采用方差分析(ANOVA)和 Tukey 检验进行方差分析和多重比较($\alpha=0.05$),图表中数据为平均值 \pm 标准差。

2 结果与分析

2.1 土壤细菌的分离及鉴定结果

从 3 个地区采集的根际土壤和根表样品中共分离、保藏 147 株菌。其中,从栖霞样品中分离得到 76 株菌(45 株菌分离自花生根际土壤,31 株菌分离自根表样品);从平度样品中分离得到 41 株菌(25 株菌分离自花生根际土壤,16 株菌分离自根表样品);从烟台市莱山区样品中分离得到 30 株菌(5 株菌分离自花生根际土壤,25 株菌分离自根表样品)。

将测得的 16S rRNA 基因序列,利用 DnaSP 软件以 100%一致度划分单体型,共得到 87 个单体型,从每个单体型中随机选取一株菌为代表菌株,共选取 87 个代表菌株。代表菌株的系统发育关系分析(图 1)结果表明,这些菌株分别隶属于放线菌门(*Actinomycetota*)、芽孢杆菌门(*Bacillota*)、拟杆菌门(*Bacteroidota*)和假单胞菌门(*Pseudomonadota*)这 4 个门的 40 个属,优势属为链霉菌属(*Streptomyces*, 32 株,占比 21.77%)和芽孢杆菌属(*Bacillus*, 24 株,占比 16.33%) (图 2)。花生根际及根表细菌群落 α 多样性指数如表 2 所示,根表微生物的 Shannon-Wiener 指数、Simpson 指数和 Pielou 均匀度指数均高于根际土壤样品,这表明根表菌群的多样性高于根际

土壤菌群,而分离自烟台市莱山区的 α 多样性指数均高于平度和栖霞样点。所有测序菌株的 16S rRNA 基因序列已提交至 GenBank,获得序列登录号为 OP623513、OP630732-OP630816 和 OP744019。

2.2 解有机磷菌的筛选结果

在初筛中共有 58 株菌(占比 39.46%)具有解有机磷活性,这些菌分布于 20 个属(图 3)。如表 3 所示,菌株 D/d 值在 1.09-5.41 之间,有 6 株菌的解有机磷能力较强($D/d>3.0$),首先是不动杆菌(*Acinetobacter*) YTU21009,其 D/d 值为 5.41;其次是泛菌(*Pantoea*) YTU21008 和 YTU21010,分别为 4.30 和 3.54;再次为伯克氏菌(*Burkholderia*) YTU21051 和 YTU21086,分别为 3.39 和 3.01,以及罗尔斯通菌(*Ralstonia*) YTU21085,为 3.13。

对 D/d 值 >2.0 的解有机磷代表菌株进行解有机磷能力复筛测定,结果表明 8 株菌具有较强的解有机磷能力(表 3),溶磷能力最强的是短波单胞菌(*Brevundimonas*) YTU21021,为 1.12 mg/L。

2.3 解无机磷菌的筛选结果

初筛中共有 31 株菌(占比 19.72%)具有解无机磷能力,这些菌分布于 14 个属(图 3)。菌株 D/d 值在 1.07-2.00 之间(表 4),有 12 株菌的 D/d 值在 1.5-2.0 之间,这些菌解无机磷能力较强,其中泛菌(*Pantoea*) YTU21008 的 D/d 值最大,为 2.00。其余菌株的 D/d 值在 1.0-1.5 之间,这些菌解无机磷能力较弱,红球菌(*Rhodococcus*) YTU21110 的 D/d 最小,为 1.07。对 D/d 值 >1.10 的解无机磷代表菌株进行复筛测定,其中 9 株菌具有较强的解无机磷能力(表 4),溶磷量最大的是不动杆菌(*Acinetobacter*) YTU21009,为 7.04 mg/L。

2.4 产 IAA 菌的筛选结果

在初筛中,共有分布于 27 个属的 63 株菌具有产 IAA 的能力(图 3)。其中有 29 株菌与

Salkowski 比色液反应后呈现粉红色较深(++)。根据分光光度法,对初筛产量较高的 29 株菌进行 IAA 量测定,结果如表 5 所示,19 株菌的 IAA

产量较高,在 1.97–184.19 mg/L 之间,其中产量高的是菌株肠杆菌(*Enterobacter*) YTU21054,其产量为 184.19 mg/L。

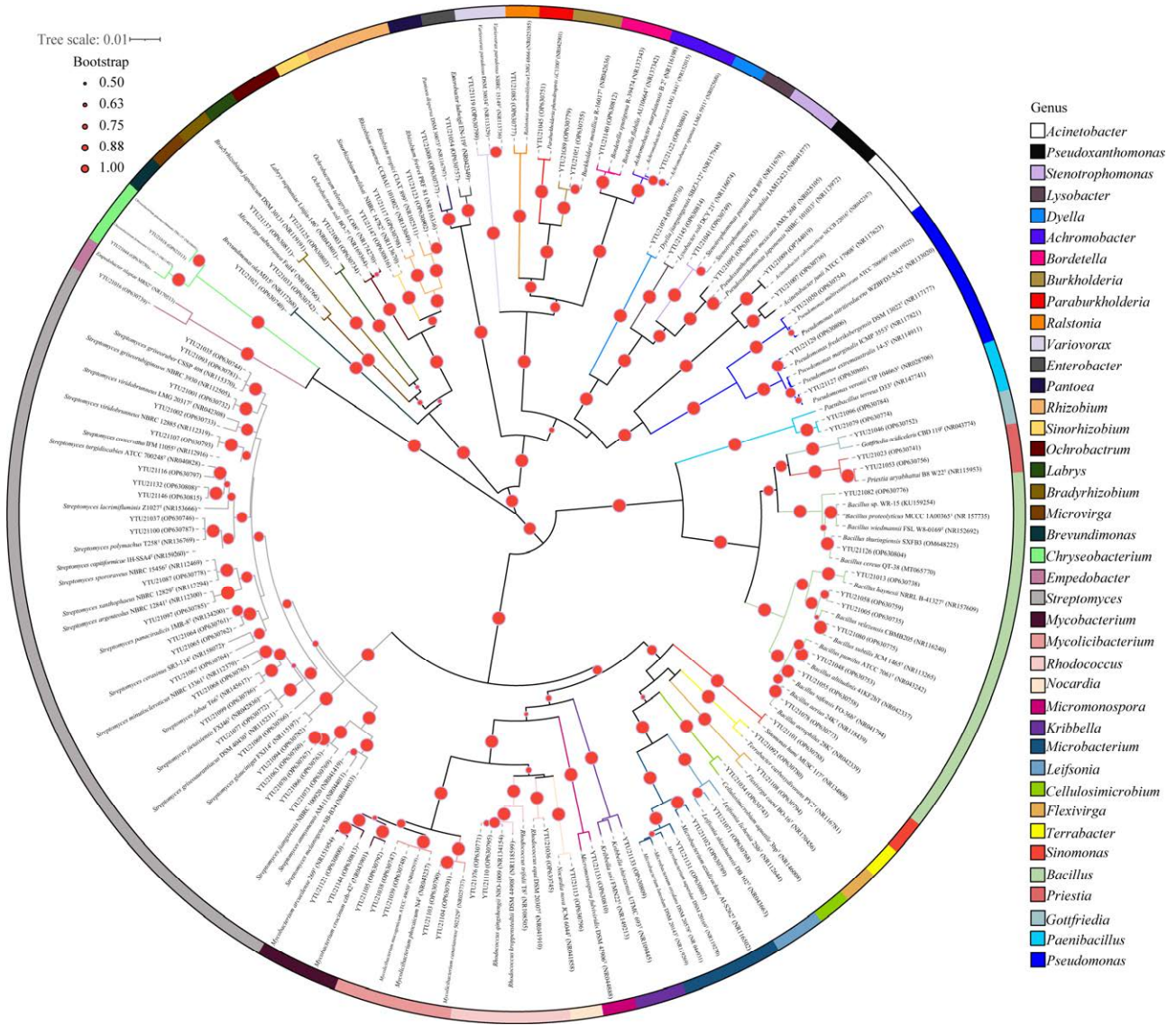


图 1 基于 16S rRNA 基因序列构建的花生根际及根表细菌的系统发育树 Tree scale 表示 1%的核酸差异;分支上的圆点表示为重复 1 000 次的自展值(bootstrap),范围在 0.5–1.0 之间,自展值越大对应的圆点越大;括号内数字是菌株的 GenBank 登录号

Figure 1 Phylogenetic tree of peanut soil bacteria constructed based on 16S rRNA gene sequences. Tree scale 0.01 indicating 1% nucleotide sequence divergence; The dots at the nodes of “tree” are represented as bootstrap values that repeat 1 000 times, ranging from 0.5–1.0, the larger the bootstrap value is, the larger the dots will be; The value in brackets is the accession number of the strain in GenBank.

2.5 产铁载体菌株的筛选结果

在初筛中共有 7 株菌具有产铁载体的能力, 分布于 4 个属: 芽孢杆菌属(*Bacillus*)、伯克氏菌属(*Burkholderia*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)和链霉菌属(*Streptomyces*) (图 3)。它们的 D/d 值在 1.37–4.32 之

间, 其中链霉菌(*Streptomyces*) YTU21035 的 D/d 值最大, 为 4.32 (表 6)。对这 7 株菌的产铁载体能力复筛, 结果如表 6 所示, 菌株伯克氏菌(*Burkholderia*) YTU21051 的 A_s/A_r 值最小, 为 0.90, 表明该菌产铁载体的能力最强。

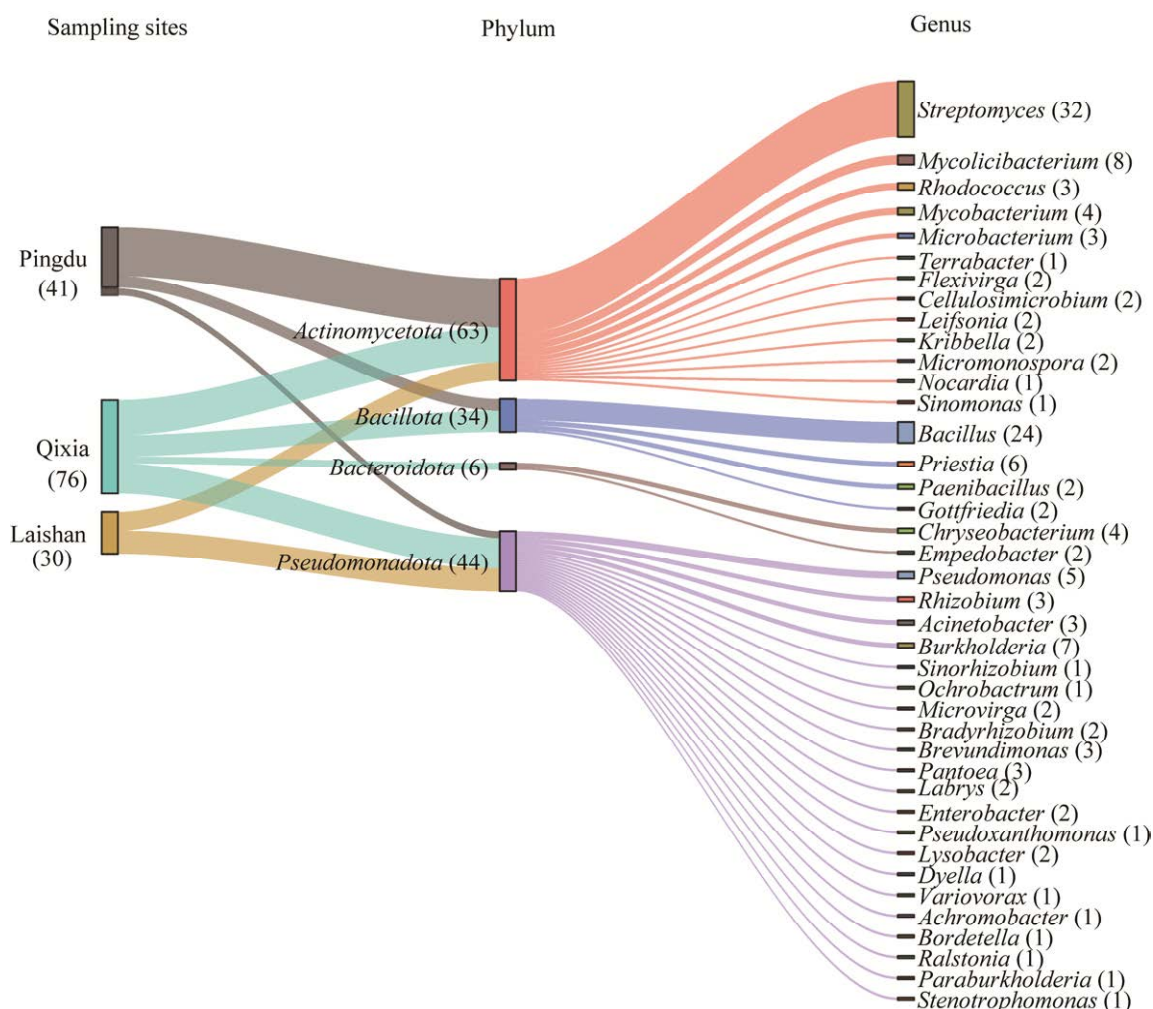


图 2 不同采样点分离的微生物在门和属水平上的分布 括号内数字为菌株的数量, 下同

Figure 2 The classification for microorganisms isolated from different sampling sites at phylum and genus levels. The values in brackets represent the strain numbers, the same below.

表 2 不同样点分离菌株 α 多样性指数表

Table 2 Alpha diversity indexes of microorganisms isolated from different sites

样点/分组	香农-威纳指数	辛普森指数	Pielou 均匀度
Sample/Group	Shannon-Wiener index	Simpson index	Pielou index
栖霞 Qixia	2.66	0.89	0.84
平度 Pingdu	2.31	0.83	0.82
莱山 Laishan	2.65	0.92	0.96
根际 Rhizosphere	2.70	0.89	0.82
根表 Rhizoplane	2.97	0.92	0.88

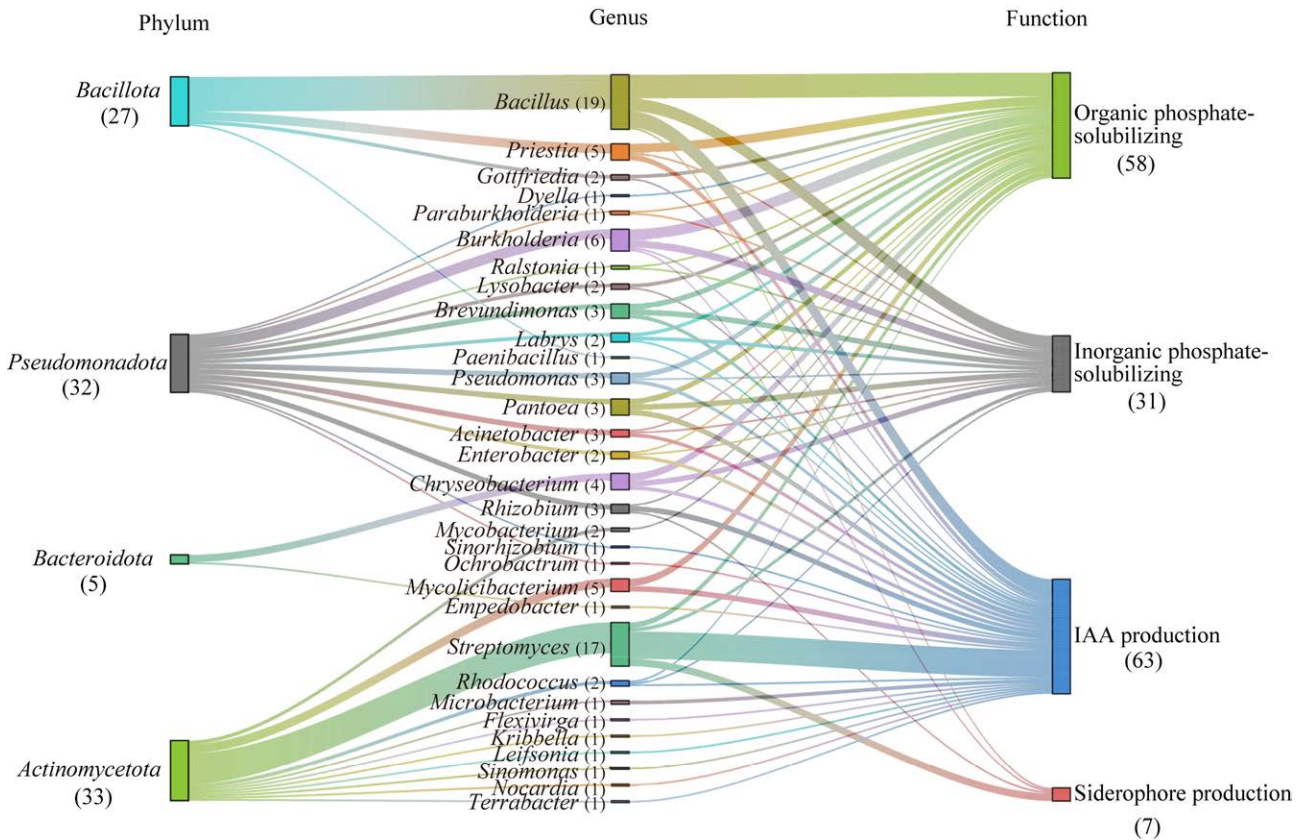


图 3 功能菌株的分类地位统计

Figure 3 Classification for functional strains isolated in this study.

3 讨论

3.1 花生根际微生物多样性

本研究从山东省平度市、栖霞市和烟台市莱山区 3 个样地采集了花生根系样品,从每个样地花生根际、根表样品分离、保藏了 147 株菌,对所有菌株的 16S rRNA 基因进行扩增分析,并基于系统发育关系将这些菌分类为 4 个门 6 个纲 40 个属,其中优势属(>10%)是链霉菌属(*Streptomyces*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*),分别占比为 27.59%和 10.34%(图 2)。

3.2 解磷、产吲哚乙酸和产铁载体高效菌株筛选

通过初筛确定了解有机磷、无机磷、产吲哚

乙酸和产铁载体的功能菌株,共有 97 株菌(占比 65.99%,分布于 31 个属)有至少 1 种测定的功能(图 3),因此,花生根际存在着丰富的功能性微生物,分别选择功能性较强的菌株进行了复筛测定,确定高效菌株。

磷是植物生长所需的三大营养元素之一,土壤中的磷大多以难溶性磷酸盐的形式存在,难以被作物直接吸收利用^[34]。解磷菌一方面可以分泌质子和有机酸,降低土壤介质的碱度或通过羟基和羧基与铁、铝、镁和钙等金属阳离子螯合,使难溶性无机磷酸盐中的磷得以释放出来;另一方面也可以通过分泌磷酸酶来矿化有机磷^[35],使得无机和有机难溶性磷酸盐中的磷元素释放,增加土壤有效磷的含量,有利于植物吸收利用^[36]。

表3 解有机磷菌的解磷能力测定

Table 3 Determination of phosphate solubilizing ability of organo-phosphate solubilizing bacteria

菌株 Strain No.	<i>D/d</i>	溶磷量 P-solubilizing capability (mg/L)
YTU21002	1.79	—
YTU21008	4.30	1.03±0.26a
YTU21009	5.41	0.08±0.03de
YTU21010	3.54	—
YTU21012	2.09	—
YTU21018	1.27	—
YTU21021	2.01	1.12±0.05a
YTU21023	1.45	—
YTU21044	1.97	—
YTU21045	2.21	0.3±0.03c
YTU21046	1.13	—
YTU21048	1.41	—
YTU21050	2.05	0.07±0.02e
YTU21051	3.39	0.18±0.04cde
YTU21054	1.39	—
YTU21062	2.00	—
YTU21074	1.66	—
YTU21076	1.29	—
YTU21080	1.20	—
YTU21085	3.13	0.79±0.04b
YTU21086	3.01	—
YTU21103	1.20	—
YTU21104	1.13	—
YTU21110	1.40	—
YTU21117	1.66	—
YTU21125	1.59	—
YTU21126	2.29	0.11±0.04de
YTU21127	1.09	—
YTU21144	1.46	—
YTU21145	1.25	—

同列不同字母表示差异显著($P < 0.05$). —: 未测其溶磷量. 下同

Different letters in the same column indicate significant difference at 0.05 level. —: Not determined. The same below.

表4 解无机磷细菌的解磷能力测定

Table 4 Determination of phosphate solubilizing ability of inorganic solubilizing bacteria

菌株 Strain No.	<i>D/d</i>	溶磷量 P-solubilizing capability (mg/L)
YTU21002	1.19	5.24±0.23b
YTU21008	2.00	0.68±0.09e
YTU21009	1.50	7.04±0.66a
YTU21010	1.87	—
YTU21014	1.53	—
YTU21018	1.55	1.43±0.45d
YTU21021	1.24	—
YTU21023	1.19	2.11±0.20c
YTU21032	1.55	—
YTU21045	1.30	—
YTU21048	1.29	—
YTU21050	1.27	—
YTU21051	1.55	0.08±0.03f
YTU21054	1.20	—
YTU21058	1.80	1.72±0.29cd
YTU21060	1.51	—
YTU21080	1.22	2.17±0.09c
YTU21085	1.35	—
YTU21086	1.53	—
YTU21110	1.07	—
YTU21125	1.65	0.06±0.02f
YTU21126	1.28	—
YTU21128	1.57	—

本研究初筛共筛选到分布于20个属的58株解有机磷菌株和分布于14个属的31株解无机磷菌。解有机磷的菌数量、属的分布均多于解无机磷菌株,这与桉树等根际解磷菌^[34]的报道一致。说明植物根际解有机磷功能的菌比解无机磷的菌分布更广泛。本研究筛选到的解无机磷、有机磷高效菌株的联合应用将更有效地利用土壤中的多种难溶性无机、有机磷。

吲哚乙酸(IAA)是一种植物激素,具有促进

表 5 产 IAA 菌株的能力测定

Table 5 Determination of IAA producing bacteria

菌株	颜色深浅	IAA 产量
Strain No.	The color depth	IAA yield (mg/L)
YTU21002	+	-
YTU21003	++	11.19±1.84lmn
YTU21007	++	35.66±4.66ef
YTU21008	++	18.42±0.13jk
YTU21016	++	24.36±0.53hj
YTU21018	++	14.70±0.66klm
YTU21021	++	31.32±1.98fg
YTU21023	++	40.87±5.53dc
YTU21037	+	-
YTU21039	++	9.21±0.66mn
YTU21046	++	83.46±2.59c
YTU21048	+	-
YTU21050	+	-
YTU21051	+	-
YTU21054	++	184.19±4.31a
YTU21064	+	-
YTU21065	+	-
YTU21066	+	-
YTU21068	+	-
YTU21069	+	-
YTU21071	+	-
YTU21076	+	-
YTU21077	+	-
YTU21078	+	-
YTU21079	++	16.91±0.38kl
YTU21080	++	80.19±1.24c
YTU21082	++	11.38±2.48lmn
YTU21085	++	27.16±0.24gh
YTU21092	+	-
YTU21093	+	-
YTU21094	+	-
YTU21099	+	-
YTU21100	+	-
YTU21102	++	36.93±5.85def
YTU21104	++	7.33±2.05no
YTU21113	++	107.47±1.81b
YTU21117	++	41.69±2.76d
YTU21119	+	-
YTU21123	+	-
YTU21125	+	-
YTU21126	+	-
YTU21146	+	-
YTU21147	++	1.97±0.69o

+: 粉红颜色浅; ++: 粉红颜色深. -: 未测其 IAA 产量
 +: Pink color light; ++: Pink color dark. -: The IAA yield is not measured.

表 6 产铁载体细菌的能力测定

Table 6 Determination of siderophore producing bacteria

Strain No.	D/d	A _s /A _r
YTU21013	1.65±0.07d	4.16±0.07a
YTU21035	4.32±0.06a	1.78±0.04c
YTU21051	1.37±0.08e	0.90±0.08d
YTU21064	1.94±0.09c	1.74±0.22c
YTU21065	1.64±0.05d	1.62±0.05c
YTU21069	3.37±0.04b	2.64±0.30b
YTU21119	1.7±0.02d	1.71±0.28c

植物细胞生长、促进细胞分裂和分化、促进根系生长等功能^[37]。已报道的多种微生物,如芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、固氮螺菌属(*Azospirillum*)、固氮菌属(*Azotobacter*)、克雷伯菌属(*Klebsiella*)等属的菌具有产 IAA 的能力^[38-39],如张东艳等^[30]从花生根际中筛选到 5 株高产 IAA 菌株,其中特基拉芽孢杆菌(*Bacillus tequilensis*) HS10 的产量高,达 52.03 mg/L。张昊鑫等^[39]从烟草根际土壤中筛选出一株产 IAA 能力的魏德曼尼芽孢杆菌(*Bacillus wiedmannii*),产量达 61.71 mg/L。本研究共筛选到分布于 27 个属的 63 株产 IAA 菌株,其中链霉菌属(*Streptomyces*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)分别有 15 株和 9 株,为产 IAA 的优势属。肠杆菌属(*Enterobacter*) YTU21054 的产量最高达 184.19 mg/L,其产量远高于国内外同行报道的高效菌株产量^[30,39-40],具有较强的应用潜力。

铁是地壳中第四丰富的元素,其虽在地壳中含量较高,但由于地球的富氧环境,铁元素通常以氧化物如 Fe(OH)₃ 等以溶解度极低的形式存在,不易被植物吸收利用^[41-42]。土壤微生物产生的铁载体可以特异螯合 Fe³⁺,即使在铁离子很低的浓度下也能将其吸收^[32],铁载体还能提高植物的抗病能力^[41,43]。目前已发现芽孢杆菌属(*Bacillus*)、普里斯特氏菌(*Priestia*)、肠杆菌属

(*Enterobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)等多个属的作物根际促生菌能产生铁载体,并有很强的促生和提升作物抗铁胁迫能力^[44]。本研究筛选到分布于4个属的7株产铁载体菌株,其中伯克氏菌(*Burkholderia*) YTU21051产铁载体的能力较强(A_s/A_r 值为0.90),有较强的应用潜力。

4 结论

本研究从山东省栖霞市、平度市和烟台市莱山区的花生根际及根表样品中分离得到147株菌,分布于4个门的40个属,丰富了花生根际微生物资源。其中分布于31个属的97株菌(占比65.99%)有至少1种测定的功能,功能菌数量占比较高。共筛选到58株解有机磷能力的菌株,其中短波单胞菌(*Brevundimonas*) YTU21021的溶磷量最大,为1.12 mg/L;解无机磷能力的菌株31株,其中不动杆菌(*Acinetobacter*) YTU21009溶磷量最大,为7.04 mg/L;产IAA菌株63株,其中肠杆菌(*Enterobacter*) YTU21054的IAA产量最高,为184.19 μg/mL;产铁载体菌株7株,其中产铁载体能力最强的是伯克氏菌(*Burkholderia*) YTU21051, A_s/A_r 值为0.90。本研究筛选到的高效解有机磷、无机磷、产IAA和产铁载体的功能菌,为后续与高效根瘤菌联合研发复合微生物菌肥奠定了基础。

REFERENCES

- [1] COLLAVINO MM, SANSBERRO PA, MROGINSKI LA, MARIO AGUILAR O. Comparison of *in vitro* solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2010, 46(7): 727-738.
- [2] 张立伟, 王辽卫. 我国花生产业发展状况、存在问题及政策建议[J]. *中国油脂*, 2020, 45(11): 116-122.
- [3] 杨吉顺, 李尚霞, 吴菊香, 张智猛, 樊宏. 控释肥对花生产量及干物质积累的影响[J]. *山东农业科学*, 2013, 45(10): 98-100, 107.
- [4] YANG JS, LI SX, WU JX, ZHANG ZM, FAN H. Effects of controlled-release fertilizer on peanut yield and dry matter accumulation[J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2013, 45(10): 98-100, 107 (in Chinese).
- [5] BHATTARAI B. Variation of soil microbial population in different soil horizons[J]. *Journal of Microbiology and Experimentation*, 2015, 2(2): 75-78.
- [6] MARSCHNER H. *Mineral Nutrition of Higher Plants*[M]. Second Ed. New York, NY: Academic Press, 2014.
- [7] MENDES R, GARBEVA P, RAAIJMAKERS JM. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2013, 37(5): 634-663.
- [8] VIVES-PERIS V, OLLAS C, GÓMEZ-CADENAS A, PÉREZ-CLEMENTE RM. Root exudates: from plant to rhizosphere and beyond[J]. *Plant Cell Reports*, 2020, 39(1): 3-17.
- [9] KNIGHT R, VRBANAC A, TAYLOR BC, AKSENOV A, CALLEWAERT C, DEBELIUS J, GONZALEZ A, KOSCIOLEK T, MCCALL LI, MCDONALD D, MELNIK AV, MORTON JT, NAVAS J, QUINN RA, SANDERS JG, SWAFFORD AD, THOMPSON LR, TRIPATHI A, XU ZZ, ZANEVELD JR, ZHU QY, CAPORASO JG, DORRESTEIN PC. Best practices for analysing microbiomes[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(7): 410-422.
- [10] SAHARAN B, NEHRA V. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review[J]. *Life Sciences and Medicine Research*, 2011, 2(1): 1-30.
- [11] HU J, WEI Z, FRIMAN VP, GU SH, WANG XF, EISENHAEUER N, YANG TJ, MA J, SHEN QR, XU YC, JOUSSET A. Probiotic diversity enhances rhizosphere microbiome function and plant disease suppression[J]. *mBio*, 2016, 7(6): e01790-16.
- [12] SHAO S, CHEN MN, LIU W, HU XK, WANG ET, YU SL, LI Y. Long-term monoculture reduces the symbiotic rhizobial biodiversity of peanut[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2020, 43(5): 126101.
- [13] ZHANG LW, WANG LW. Development status, existing problems and policy recommendations of peanut industry in China[J]. *China Oils and Fats*, 2020, 45(11): 116-122 (in Chinese).

- ACP, SIMEON BG. Efficiency of inoculation with *Rhizobium* in peanuts (*Arachis hypogaea* L.) grown in Brazilian cerrado soil[J]. Agricultural Sciences, 2019, 10(7): 948-956.
- [13] 姜焕焕, 祁佩时, 王通, 迟晓元, 陈明娜. 花生根际多功能固氮菌的分离及其耐盐碱特性研究[J]. 生物技术通报, 2019, 35(3): 24-30.
JIANG HH, QI PS, WANG T, CHI XY, CHEN MN. Screening of multi-function nitrogen-fixing bacteria in peanut rhizosphere and their tolerances to saline[J]. Biotechnology Bulletin, 2019, 35(3): 24-30 (in Chinese).
- [14] 韩丽珍, 刘畅, 周静. 接种促生菌对花生根际土壤微生物及营养元素的影响[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(7): 3065-3073.
HAN LZ, LIU C, ZHOU J. Effects of inoculation with growth-promoting bacteria on peanut rhizosphere soil microorganism and nutrient elements[J]. China Industrial Economics, 2019, 38(7): 3065-3073 (in Chinese).
- [15] 朱金霞, 周文生, 李苗, 郑国保. 木质素快速降解细菌的初筛及相关酶活力变化规律研究[J]. 宁夏农林科技, 2021, 62(7): 32-36, F0002.
ZHU JX, ZHOU WS, LI M, ZHENG GB. Selection of bacteria of lignin-degrading rapidly and changes of related enzyme activities[J]. Ningxia Journal of Agriculture and Forestry Science and Technology, 2021, 62(7): 32-36, F0002 (in Chinese).
- [16] 徐明韬. 香烟烟雾提取物对铜绿假单胞菌毒力及耐药性的作用及其机制研究[D]. 沈阳: 中国医科大学博士学位论文, 2020.
XU MT. Study on the toxicity and drug resistance of cigarette smoke extract to *Pseudomonas aeruginosa* and its mechanism[D]. Shenyang: Doctoral Dissertation of China Medical University, 2020 (in Chinese).
- [17] 赵君, 饶惠玲, 王耘籽, 黄伟, 吴承祯, 李键. 红壤区杉木根际高效解磷菌的筛选、鉴定及培养条件优化[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2022, 61(1): 112-121.
ZHAO J, RAO HL, WANG YZ, HUANG W, WU CZ, LI J. Screening, identification and optimization of culture conditions of two high-efficiency phosphorus-solubilizing bacteria in the rhizosphere of *Cunninghamia lanceolata* in red soil areas[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science Edition), 2022, 61(1): 112-121 (in Chinese).
- [18] 沈佳佳, 侯小改, 王二强, 王菲, 郭丽丽. 油用牡丹根际解有机磷细菌的筛选及解磷功能研究[J]. 生物技术通报, 2022, 38(6): 157-165.
SHEN JJ, HOU XG, WANG EQ, WANG F, GUO LL. Organic phosphate-solubilizing bacteria screening in the rhizosphere of *Paeonia ostii* and study on their phosphate-solubilizing capabilities[J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(6): 157-165 (in Chinese).
- [19] 孟建宇, 李薏, 杨鸿儒, 贾丽娟. 内蒙古荒漠灌木根际解磷菌多样性及其解磷和产铁载体能力[J]. 环境科学研究, 2021, 34(11): 2714-2721.
MENG JY, LI H, YANG HR, JIA LJ. Diversity of phosphorus-solubilizing bacteria in rhizosphere of desert shrubs in Inner Mongolia and their phosphorus-solubilizing and siderophore-producing capabilities[J]. Research of Environmental Sciences, 2021, 34(11): 2714-2721 (in Chinese).
- [20] 王卫星, 周晓伦, 李忠玲, 王明鹏, 王卫卫. CAS平板覆盖法检测氢氧化细菌铁载体[J]. 微生物学通报, 2014, 41(8): 1692-1697.
WANG WX, ZHOU XL, LI ZL, WANG MP, WANG WW. Detection of siderophore production from hydrogen-oxidizing bacteria with CAS overlay plate method[J]. Microbiology China, 2014, 41(8): 1692-1697 (in Chinese).
- [21] 董国菊. 荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* P-72-10 菌株对烟草黑胫病的生防机理研究[D]. 重庆: 西南大学, 2012.
DONG GJ. Biocontrol Mechanisms of *Pseudomonas fluorescens* strain P-72-10 on black shank disease of tobacco[D]. Chongqing: Doctoral Dissertation of Southwest University, 2012 (in Chinese).
- [22] 康慎敏, 武瑞赞, 穆文强, 尚庆茂, 李平兰. 优良植物根际促生菌的筛选及其生物学特性[J]. 中国农业大学学报, 2023, 28(1): 137-152.
KANG SM, WU RY, MU WQ, SHANG QM, LI PL. Isolation and biological characteristics investigation of superior plant growth promoting rhizobacteria[J]. Journal of China Agricultural University, 2023, 28(1): 137-152 (in Chinese).
- [23] 王子强, 许乐, 张爽, 邢倩, 刘丽娜, 洒荣波. 丹参内生拮抗细菌 DS-R5 对丹参根际和根表土壤细菌群落结构的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2022, 34(2): 150-155.
WANG ZQ, XU L, ZHANG S, XING Q, LIU LN, SA RB. Effects of endophytic antagonistic bacterium DS-R5 of *Salvia miltiorrhiza* on bacterial community structure in rhizospheric and rhizoplastic soil[J]. Chinese Journal of Microecology, 2022, 34(2): 150-155 (in Chinese).
- [24] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [25] TAMURA K, NEI M, KUMAR S. Prospects for

- inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(30): 11030-11035.
- [26] 陈佳兴, 秦琴, 邱树毅, 王雪娜. 磷尾矿土壤中解磷细菌的筛选及解磷能力的测定[J]. 生物技术通报, 2018, 34(6): 183-189.
CHEN JX, QIN Q, QIU SY, WANG XL. Isolation, identification of phosphate-solubilizing bacteria derived from phosphate tailing soil and their capacities[J]. Biotechnology Bulletin, 2018, 34(6): 183-189 (in Chinese).
- [27] 胡珊, 梁卫驱, 黄皓, 徐匆, 罗华建, 胡楚维, 黄晓彦, 陈仕丽. 中药渣堆肥中解磷细菌的筛选、鉴定及其拮抗作用[J]. 生物技术通报, 2022, 38(3): 92-102.
HU S, LIANG WQ, HUANG H, XU C, LUO HJ, HU CW, HUANG XY, CHEN SL. Screening, identification and antagonism of phosphate-solubilizing bacteria from the compost Chinese medicinal herbal residues[J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(3): 92-102 (in Chinese).
- [28] 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. Screening of functional microbial strains and study on the activity of combined flora[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University, 2006 (in Chinese).
- [29] 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).
- [30] 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).
- [31] 刘晔, 刘晓丹, 张林利, 吴越, 王国文, 汪强, 姜瑛. 花生根际多功能高效促生菌的筛选鉴定及其效应研究[J]. 生物技术通报, 2017, 33(10): 125-134.
LIU Y, LIU XD, ZHANG LL, WU Y, WANG GW, WANG Q, JIANG Y. Screening, identification of multifunctional peanut root-promoting rhizobacteria and its promoting effects on peanuts (*Arachis hypogaea* L.)[J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(10): 125-134 (in Chinese).
- [32] 许佳露, 张平, 李美芳, 廖柏寒, 彭佩钦, 李靖, 梅金星. 产铁载体菌株的分离、培养条件优化及初步应用[J]. 微生物学通报, 2022, 49(3): 1004-1016.
XU JL, ZHANG P, LI MF, LIAO BH, PENG PQ, LI J, MEI JX. Isolation, culture condition optimization, and preliminary application of siderophore-producing strains[J]. Microbiology China, 2022, 49(3): 1004-1016 (in Chinese).
- [33] 曹宏丽, 郝尚华, 楚梦晓, 邱爽, 罗梦香, 王明道. 1 株高产铁载体菌株的筛选鉴定以及化感作用的验证[J]. 河南农业大学学报, 2021, 55(4): 727-735.
CAO HL, HAO SH, CHU MX, QIU S, LUO MX, WANG MD. Screening and identification of a high-yielding siderophore strain and verification of allelopathic effect[J]. Journal of Henan Agricultural University, 2021, 55(4): 727-735 (in Chinese).
- [34] 徐欢, 俞新玲, 林勇明, 吴承祯, 谢安强, 陈灿, 李键, 洪滔. 桉树根际土壤解磷细菌的分离、筛选及其解磷效果[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2016, 45(5): 529-535.
XU H, YU XL, LIN YM, WU CZ, XIE AQ, CHEN C, LI J, HONG T. Isolation, screening of phosphate solubilizing capacity of phosphate solubilizing bacteria in *Eucalyptus* species[J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2016, 45(5): 529-535 (in Chinese).
- [35] JAYA GI, UTAMI SH, WIDADA J, YUSUF WA. Characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from acidic Ultisol soil, South Borneo[J]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2020, 449(1): 012005.
- [36] ALIYAT FZ, MALDANI M, EL GUILLI M, NASSIRI L, IBIJBIJEN J. Phosphate-solubilizing bacteria isolated from phosphate solid sludge and their ability to solubilize three inorganic phosphate forms: calcium, iron, and aluminum phosphates[J]. Microorganisms, 2022, 10(5): 980.
- [37] CHEN XR, HU XY, LU QL, YANG YY, LINGHU SS, ZHANG XY. Study on the differences in sludge toxicity and microbial community structure caused by catechol, resorcinol and hydroquinone with metagenomic analysis[J]. Journal of Environmental Management, 2022, 302: 114027.

- [38] 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.
- [39] 张昊鑫, 王中华, 牛兵, 郭慷, 刘璐, 姜瑛, 张仕祥. 产 IAA 兼具溶磷解钾高效促生菌的筛选、鉴定及其广谱性应用[J]. *生物技术通报*, 2022, 38(5): 100-111.
- ZHANG HX, WANG ZH, NIU B, GUO K, LIU L, JIANG Y, ZHANG SX. Screening, identification and broad-spectrum application of efficient IAA-producing bacteria dissolving phosphorus and potassium[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2022, 38(5): 100-111 (in Chinese).
- [40] 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.
- [41] LUCENA JJ, HERNANDEZ-APAOLAZA L. Iron nutrition in plants: an overview[J]. *Plant and Soil*, 2017, 418(1): 1-4.
- [42] 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, OUTIKUER, 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).
- [43] 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.
- [44] PHURAILATPAM L, GUPTA A, SAHU PK, MISHRA S. Insights into the functional potential of bacterial endophytes from the ethnomedicinal plant, *Piper longum* L.[J]. *Symbiosis*, 2022, 87(2): 165-174.