

## 研究报告

## 一株兼具秸秆腐解能力玉米促生菌的筛选、鉴定及发酵优化

强震宇<sup>1</sup>, 朱林<sup>1</sup>, 朱媛媛<sup>1</sup>, 张子赞<sup>1</sup>, 胡占琴<sup>1</sup>, 石心怡<sup>1</sup>, 王鑫<sup>1</sup>, 张朝春<sup>1,3</sup>, 徐文思<sup>\*2</sup>, 马超<sup>\*1</sup>

1 安徽农业大学资源与环境学院 农田生态保育与污染防控安徽省重点实验室 江淮耕地资源保护与生态修复重点实验室, 安徽 合肥 230036

2 安徽省土壤肥料总站, 安徽 合肥 230001

3 中国农业大学资源与环境学院, 北京 100091

强震宇, 朱林, 朱媛媛, 张子赞, 胡占琴, 石心怡, 王鑫, 张朝春, 徐文思, 马超. 一株兼具秸秆腐解能力玉米促生菌的筛选、鉴定及发酵优化[J]. 微生物学通报, 2023, 50(2): 526-540.

QIANG Zhenyu, ZHU Lin, ZHU Yuanyuan, ZHANG Ziyun, HU Zhanqin, SHI Xinyi, WANG Xin, ZHANG Chaochun, XU Wensi, MA Chao. Isolation and identification of a maize growth-promoting bacterial strain with straw-decomposing capacity and optimization of fermentation conditions[J]. Microbiology China, 2023, 50(2): 526-540.

**摘要:**【背景】砂姜黑土地地区存在秸秆腐解缓慢、秸秆还田后作物幼苗生长不良等问题。【目的】从砂姜黑土区农田筛选一株兼具秸秆腐解能力的玉米促生菌 MC29, 以促进秸秆腐解和玉米作物生长。【方法】通过 16S rRNA 基因序列分析对该菌株进行鉴定; 采用液态摇瓶及盆栽试验验证菌株实际促腐、促生能力及土壤养分的提升效果, 并且探究菌株的最佳生长及产吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)条件; 采用电击转化法将绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因导入菌株细胞, 并通过 PCR 琼脂糖凝胶电泳进行验证。【结果】分离筛选的玉米促生菌鉴定为纤维化纤维微细菌(*Cellulosimicrobium cellulans*)。该菌株 MC29 羧甲基纤维素(carboxymethyl cellulose, CMC)酶活可达 13.32 U/mL, 产 IAA 量为 8.63 mg/L。与对照相比, 施用菌株 MC29 后秸秆腐解率显著提高 24.8%; 玉米 soil and plant analyzer development (SPAD)值、植株总重、根表面积和根长分别提高 7.6%、21.3%、30.9%和 18.3%; 土壤碱解氮含量显著提高 68.1%, 土壤速效磷及土壤速效钾含量分别提高 5.8%及 6.0%。菌株 MC29 最佳生长条件为 pH 7.0、装液量为 25/250 mL、碳源为麦芽糖、氮源为酵母粉; 最佳产 IAA 条件为 pH 7.0、装液量为 50/250 mL、碳源为果糖、

资助项目: 国家自然科学基金(32071628); 安徽省高校自然科学基金(KJ2021ZD0009); 安徽省科技重大专项(202103a06020012); 国家大学生创新训练项目(201910364086)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32071628), the University Natural Science Fund of Anhui Province (KJ2021ZD0009), the Major Science and Technology Special Project of Anhui Province (202103a06020012), and the National Innovation Training Program for College Students (201910364086).

\*Corresponding authors. E-mail: XU Wensi, xws-17@126.com; MA Chao, chaoma@ahau.edu.cn

Received: 2022-05-18; Accepted: 2022-09-06; Published online: 2022-11-03

氮源为硝酸钾；成功构建荧光标记菌株 MC29-GFP，并据此追踪到其接入砂姜黑土 15 d 后定殖量为  $2.8 \times 10^5$ – $9.5 \times 10^5$  copies/g。【结论】所筛选的纤维化纤维微细菌 MC29 对于指导砂姜黑土区多功能秸秆促腐菌剂、微生物菌肥的研制及提升作物产量有一定的积极意义，并为探究其在砂姜黑土中的实际应用奠定基础。

关键词：纤维化纤维微细菌；玉米促生；秸秆腐解；土壤改良；发酵优化；绿色荧光蛋白

## Isolation and identification of a maize growth-promoting bacterial strain with straw-decomposing capacity and optimization of fermentation conditions

QIANG Zhenyu<sup>1</sup>, ZHU Lin<sup>1</sup>, ZHU Yuanyuan<sup>1</sup>, ZHANG Ziyun<sup>1</sup>, HU Zhanqin<sup>1</sup>, SHI Xinyi<sup>1</sup>, WANG Xin<sup>1</sup>, ZHANG Chaochun<sup>1,3</sup>, XU Wensi<sup>\*2</sup>, MA Chao<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup> Anhui Province Key Laboratory of Farmland Ecological Conservation and Pollution Prevention, Key Laboratory of JiangHuai Arable Land Resources Protection and Eco-restoration, College of Resources and Environment, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui, China

<sup>2</sup> Anhui Soil and Fertilizer Station, Hefei 230001, Anhui, China

<sup>3</sup> College of Resources and Environmental Sciences, China Agricultural University, Beijing 100091, China

**Abstract: [Background]** Shajiang black soil is characterized by heavy texture, poor structure, and low fertility. The long-term straw returning in the area with Shajiang black soil leads to stunted growing of crops and slow straw decomposition. **[Objective]** To accelerate straw decomposition and increase crop yield, we screened a strain producing both carboxymethyl cellulase (CMCase) and indoleacetic acid (IAA) from Shajiang black soil. **[Methods]** The strain was identified based on physiological and biochemical properties and 16S rRNA gene sequence analysis. Shake flask of straw decomposition and maize pot experiments were carried out to verify the straw-decomposing, growth-promoting, and soil-improving effects of the strain. Single factor tests were then carried out to optimize the conditions for strain growth and IAA production. Green fluorescent protein (GFP) gene was introduced into the strain cells by electroporation and verified by PCR combined with agarose gel electrophoresis. The colonization rate was determined by fluorescence quantitative experiment. **[Results]** The straw-decomposing and maize growth-promoting strain was screened out and named as MC29, which belonged to *Cellulosimicrobium cellulans*. It presented the CMCase activity of 13.32 U/mL and the IAA production of 8.63 mg/L. Compared with the control, the application of MC29 increased the straw decomposition rate by 24.8% and the soil and plant analyzer development (SPAD) value, total plant weight, root surface area, and root length of maize by 7.6%, 21.3%, 30.9%, and 18.3%, respectively. Furthermore, the strain increased the soil available nitrogen, available phosphorus, and available potassium by 68.1%, 5.8%, and 6.0%, respectively. The optimum growth conditions of strain MC29 were pH 7.0, liquid-loading volume of 25/250 mL, maltose as carbon source, and yeast powder as nitrogen source, while the optimum conditions

for IAA production were pH 7.0, liquid-loading volume 50/250 mL, fructose as carbon source, and potassium nitrate as nitrogen source. The strain MC29-GFP was successfully constructed, which showed the colonization amount of  $2.8 \times 10^5$  to  $9.5 \times 10^5$  copies/g 15 days after inoculation in the Shajiang black soil, demonstrating good colonization ability. **[Conclusion]** *C. cellulans* MC29 has the ability of decomposing straw and promoting maize growth, which plays a role in the development of multifunctional straw-decomposing agent and microbial fertilizer and the yield improvement of maize. The good and stable colonization ability lays a foundation for the practical application of strain MC29 in Shajiang black soil.

**Keywords:** *Cellulosimicrobium cellulans*; maize growth-promoting effect; straw decomposing; soil amelioration; optimization of fermentation conditions; green fluorescent protein

沿淮地区是我国重要的产粮之地,粮食产量巨大、秸秆资源丰富<sup>[1]</sup>。砂姜黑土作为一种广泛分布于沿淮地区的典型土壤,其质地黏重、结构性差及肥力不高的特性不利于该地区种植作物的萌发和生长<sup>[2-3]</sup>。随着化肥工业发展及农村能源结构的变化,农民对秸秆的需求逐渐下降,使得秸秆资源合理利用成为沿淮地区农业绿色发展的难点<sup>[4]</sup>。秸秆直接还田是一种较为经济和便捷的利用方式,但其导致的耕作难、泡沫田等问题使得该地区作物生长环境恶化,影响区域粮食安全<sup>[5]</sup>。因此,如何加快沿淮地区秸秆腐解、促进作物生长及提升土壤肥力成为亟须需解决的问题。

秸秆主要成分为纤维素、半纤维素及木质素,化学结构复杂,自然状态下腐解缓慢<sup>[6]</sup>。前人研究发现,针对秸秆中的难降解成分定向筛选腐解菌,可有效加速还田秸秆腐解<sup>[7-8]</sup>。而且越来越多的学者指出,从目标区域土壤中筛选秸秆腐解菌株能有效避免外源微生物入侵风险,增强秸秆腐解效果,提升土壤养分<sup>[9-10]</sup>。例如,王芳等<sup>[11]</sup>从山西地区林地土壤中筛选得到纤维素降解菌 X-7 和固氮菌 N-8,配合施用后在提高秸秆降解速率的同时,土壤养分也得到显著提高。然而,沿淮地区的典型土壤是砂姜黑土,该种土壤质地黏重、结构性差且有机质偏低,最终造成外

源腐解菌施用后存活率低且促腐功效差<sup>[12]</sup>。因此,从砂姜黑土中筛选出的秸秆腐解菌株或可提升腐解菌田间应用效果,推动区域秸秆资源高效利用。

植物促生菌可通过分泌激素在促进植株生长的同时提升植株的抗逆性,并且增加土壤中氮、磷、钾等植物营养元素,提升养分有效性<sup>[13-14]</sup>。吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)作为植物促生菌所分泌的一种植物生长素,不仅促进植物种子萌发,还能对植物生长起到调节作用<sup>[15]</sup>。李永斌等<sup>[16]</sup>在小麦、玉米等作物土壤中筛选出多株可产 IAA 的促生菌,并发现其对番茄、小麦等作物促生作用显著,具有良好的化肥替代潜力。然而,目前兼具促腐、促生功能菌株筛选的研究报道依然鲜见。因此,在砂姜黑土区开展兼具促生功能的秸秆腐解菌株筛选及应用效果的研究具有重要意义。

值得注意的是,在功能菌实际应用过程中,检测其在环境中的定殖及分布状况具有重要意义。绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)标记技术具有操作简便、荧光稳定、检测灵敏度高优点,目前广泛应用于生物、农业等领域<sup>[17]</sup>。例如,杨潇湘等<sup>[18]</sup>构建荧光标记菌 Bam22-GFP 以探究其在油菜中的定殖能力。因此,本研究从长期秸秆还田的砂姜黑土农田中分离出同时分

泌纤维素降解酶和吡啶乙酸的细菌,利用秸秆腐解和玉米盆栽试验验证菌株的实际促腐、促生能力,进而从中筛选鉴定高效菌株,并对菌株的最佳发酵条件进行探究,将 GFP 基因导入菌株以开展其土壤定殖检测,以期为砂姜黑土地地区多功能高效秸秆促腐菌剂的研发提供理论和技术支持,为沿淮地区秸秆资源高效利用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品

土壤和秸秆来源于安徽省蒙城县内农业示范科技园区长期秸秆还田试验小区的砂姜黑土和小麦秸秆,用于土壤养分检测及秸秆腐解试验,其中土壤为地下 20 cm 处的耕层土壤,有机质 12.5 g/kg,全氮 0.91 g/kg,速效磷 20.83 mg/kg,速效钾 148.3 mg/kg, pH 7.4–8.2。玉米种子为市场上购买的“郑单 958”,用于玉米盆栽促生试验。

原核表达载体 pET-21a 为本实验室保存,携带氨苄青霉素抗性基因和绿色荧光蛋白基因 GFP。

#### 1.1.2 培养基

LB 培养基、无机盐培养基、羧甲基纤维素培养基参照文献[19]配制。

SOC 培养基(g/L): 葡萄糖 3.6, 酵母提取物 5.0, 胰蛋白胨 20.0, NaCl 0.5, KCl 0.19, NaOH 调 pH 至 7.0, 于  $1 \times 10^5$  Pa 条件下高压蒸汽灭菌 20 min, 使用前加入灭菌的  $MgCl_2$  溶液 0.005 mL。

#### 1.1.3 主要试剂和仪器

细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 上海美吉生物医药科技有限公司; 质粒提取试剂、PCR 产物纯化试剂, 北京美吉桑格生物医药科技有限公司; PCR 引物, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 16S rRNA 基因片段扩增所用的各种酶、

dNTPs、 $10 \times Ex$  Taq buffer 等试剂, TaKaRa 公司; 其余试剂均为国产分析纯。孔式离心机, 湖南长沙湘仪离心机仪器有限公司; PCR 仪, 杭州朗基科学仪器有限公司; 双稳定时电泳仪、凝胶成像仪, 北京君意东方电泳设备有限公司; 荧光定量 PCR 仪, 杭州博日科技有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 菌株的分离、筛选

将土壤样品破碎过 2 mm 筛后, 称取 10 g 于 250 mL 三角瓶中, 加入无菌水 90 mL, 28 °C、150 r/min 振荡培养 30 min, 静置 15 min。取少量土壤悬液稀释至 0.1 mg/L, 均匀涂布于 LB 平板后, 在  $(30 \pm 2)$  °C 连续稀释培养分离菌株, 并进一步纯化。纤维素降解能力通过定性分析羧甲基纤维素培养基上透明圈的大小确定<sup>[20]</sup>。

#### 1.2.2 菌株的鉴定

细菌形态学鉴定和生理生化特性的研究参考《伯杰细菌鉴定手册(第 8 版)》<sup>[21]</sup>及《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[22]</sup>; 细菌基因组 DNA 的提取及 16S rRNA 基因扩增由上海美吉生物医药科技有限公司完成, 将所测序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 搜索同源序列进行比对, 通过 MEGA-X 软件构建系统发育树, 结合形态学和生理生化特征确定菌株种属。

#### 1.2.3 羧甲基纤维素(carboxymethyl cellulose, CMC)酶活测定

将菌种接种于 LB 液体培养基中, 36 °C、200 r/min 振荡培养 8 h, 取 1 mL 加入以玉米秸秆粉为唯一碳源的液体培养基中培养 60 h, 4 °C、5 000 r/min<sup>[23]</sup>离心 10 min。取 0.2 mL 上清液, 加入 1.8 mL 1% CMC-Na 溶液于 50 °C 水浴 30 min, 加入 DNS 试剂 3.0 mL, 沸水浴 5 min, 冷却后测定其吸光度  $OD_{520}$ <sup>[24]</sup>。

#### 1.2.4 IAA 含量测定

将菌种接种于含有 L-色氨酸(100 mg/L)的



LB 液体培养基, 36 °C、200 r/min 振荡培养 24 h, 将菌悬液于 5 000 r/min 离心 10 min。取上清液加入等体积的 Salkowski 比色液, 室温避光静置 30 min, 测定其吸光度  $OD_{530}$  [25]。

### 1.2.5 菌株秸秆腐解能力

秸秆液态摇瓶试验设置 2 个处理, 接种处理 (MC29): 向三角瓶中接种 10 mL 含 MC29 菌液; 对照处理 (CK): 向三角瓶中加入等体积蒸馏水, 每个对照设置 3 组平行。筛选所得菌株 36 °C、200 r/min 培养 48 h, 接种于无菌水中 5 000 r/min 离心 10 min 使其浓度达到  $10^8$  CFU/mL。将小麦秸秆粉碎过筛后, 称取 5 g 于 250 mL 三角瓶中, 加入无菌水 30 mL、硝酸钠 2 g、菌液 10 mL, 放入摇床于 28 °C、120 r/min 条件下恒温振荡, 培养 15 d 后用三层纱布进行过滤, 蒸馏水反复清洗残渣, 80 °C 烘干至恒重, 测定菌株接种前后纱布和秸秆粉末的烘干重量, 秸秆腐解率采用失重率法 [20]。

### 1.2.6 菌株玉米促生效果

玉米盆栽试验设置 2 个处理, 接种处理 (MC29): 向土壤中接种 10 mL 含 MC29 菌液; 对照处理 (CK): 向土壤中加入等体积蒸馏水, 每个对照设置 5 组平行。预先用 0.1% 的  $HgCl_2$  溶液对玉米种子表面灭菌 10 min, 无菌蒸馏水冲洗 3 次。砂姜黑土去除杂草枯枝后, 混匀过 5 mm 孔径筛, 用塑料盆盛土 5 kg。上述菌液在土壤中接种 10 mL, 并调节土壤含水量至田间持水量的 60%, 每盆播种 5 粒玉米种子, 49 d 后取样。玉米 SPAD 值选用叶绿素测定仪测定; 植株总重用百分之一天平测定; 玉米根系长度和表面积用根系扫描仪获取单个植物的根图像测定 [25]。

### 1.2.7 菌株的生长及产 IAA 条件优化

条件优化设置不同初始 pH (4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0)、装液量 (25、50、75、100、150/250 mL)、碳源 (葡萄糖、甘露醇、蔗糖、麦

芽糖、乳糖、果糖和木糖) 及氮源 (硝酸钾、硫酸铵、硝酸铵、酵母粉、谷氨酸、尿素和蛋白胨)。配制 50 mL LB 液体培养基 (含 100 mg/L L-色氨酸) 于 250 mL 三角瓶中, 按照 1% (体积分数) 接种菌株, 于摇床 30 °C、180 r/min 培养 24 h 后测定菌株生长情况 ( $OD_{600}$ ) 和产 IAA 能力 ( $OD_{530}$ ), 每组设置 3 个重复 [23]。

### 1.2.8 土壤理化性质测定

土壤碱解氮、速效磷和速效钾等养分含量采用参考文献 [26] 方法测定, 其中土壤碱解氮采用碱解扩散法, 土壤速效磷采用碳酸氢钠法, 土壤速效钾采用火焰光度法。

### 1.2.9 基因转导鉴定

菌株感受态制备及电击转化参考顾彩彩等 [27] 方法, 电击后将感受态细胞从电击杯中吸出, 置于新的无菌 1.5 mL 离心管中, 加入 900  $\mu$ L SOC 培养基, 放入摇床 36 °C、200 r/min 振荡培养 1 h, 于 3 500 r/min 离心 15 min 后弃掉上清液, 剩余沉淀轻轻吹悬后, 涂氨苄 (20 mg/L) 平板, 36 °C 培养箱中恒温培养。PCR 鉴定参考李倩倩等 [28] 方法, 基因组 DNA 采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取后作为模板进行 PCR 扩增, 重复 10 组。其中扩增引物为 T7-F (5'-TAATACGAC TCACTATAGGG-3') 和 T7-R (5'-TGCTAGTTAT TGCTCAGCGG-3'), 以无菌水作为阴性对照。PCR 反应体系 (20  $\mu$ L): 2 $\times$ Ex Taq MasterMix 10  $\mu$ L, 上、下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 0.8  $\mu$ L, 模板 2  $\mu$ L, RNase free ddH<sub>2</sub>O 6.4  $\mu$ L。PCR 反应条件: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 54/57 °C 30 s, 72 °C 60 s, 35 个循环。取 10  $\mu$ L PCR 扩增产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

### 1.2.10 菌株定殖能力测定

向上述装有砂姜黑土的相同塑料盆 (6 盆) 中接种 5 mL 含 MC29-GFP 悬浮液 (浓度为  $1.0 \times 10^8$  CFU/mL), 15 d 后对土壤进行采样, 每

盆采样 3 次，将土壤样本分装后于-80 ℃保存，初步测定 MC29-GFP 的定殖能力。菌株定殖量的测定参考王永阳等<sup>[29]</sup>方法。

1.3 数据处理

采用 Microsoft Excel 2019 和 SPSS 17.0 等软件处理数据,采用 Origin 9.0 软件进行作图分析。

2 结果与分析

2.1 菌株分离筛选结果

从长期秸秆还田砂姜黑土中筛选出 4 株秸秆腐解细菌 MC6、MC29、MC41 和 MC43，通过羧甲基纤维素钠培养基和 Salkowski 比色法初步鉴

定产 CMC 酶和 IAA 能力(图 1)。其中菌株 MC29 不仅能够产生 CMC 酶，活力为 13.32 U/mL (图 1A),还兼具产 IAA 能力,浓度可达 8.63 mg/L (图 1B),而菌株 MC6、MC41 和 MC43 均无 IAA 的产生。因此选取菌株 MC29 进行鉴定，并开展秸秆腐解试验和盆栽试验。

2.2 菌株 MC29 的形态、生理生化及遗传性状

对菌株 MC29 的菌落进行观察,发现菌落表面光滑、湿润，边缘整齐，呈黄色，不规则排列且密集分布(图 2A)。菌株个体呈杆状,无鞭毛(图 2B)。对菌株 MC29 进行生理生化分析发现，

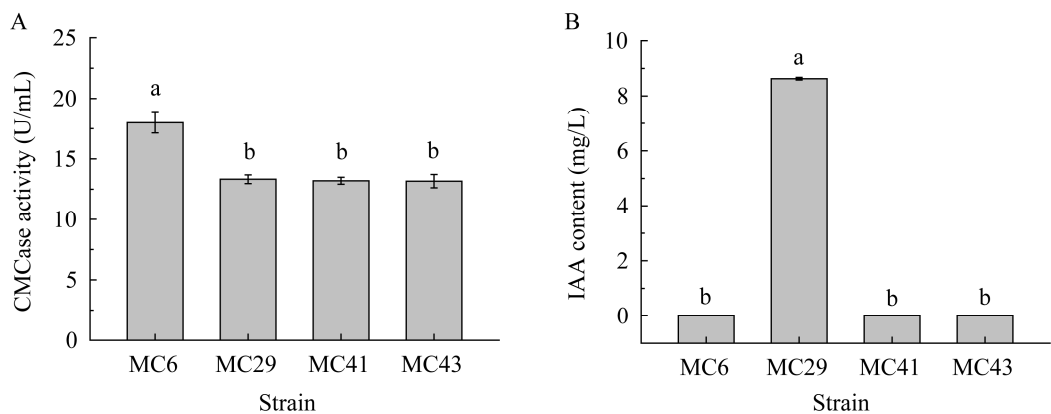


图 1 不同菌株产 CMC 酶(A)和 IAA (B)能力 图中不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ ), 下同  
Figure 1 The activity of CMC enzyme (A) and IAA (B) synthesis of different strain. Different lowercase letters represent significant differences of different strains ( $P<0.05$ ), the same below.

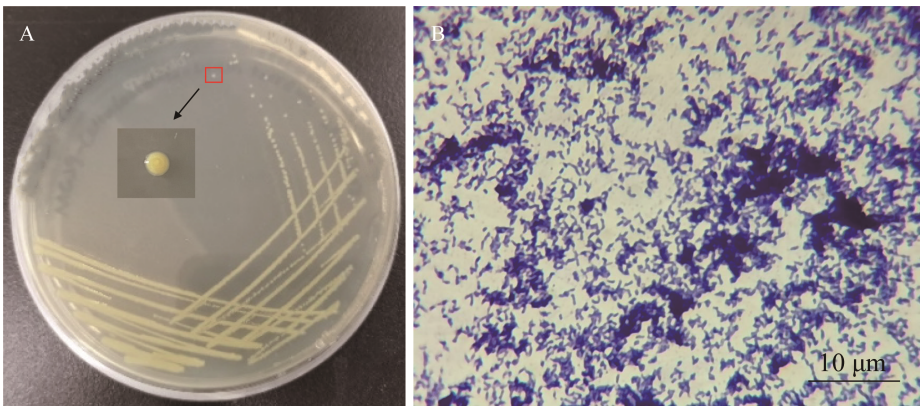


图 2 菌株 MC29 菌落形态(A)及革兰氏染色图(B) (1 000×)  
Figure 2 The colony morphology (A) and Gram staining (B) of strain MC29 (1 000×).

MC29 为革兰氏阳性菌,其甲基红反应、明胶液化试验、接触酶试验、硝酸盐还原试验均呈阳性,而 V-P 试验、淀粉水解试验、柠檬酸盐利用试验均呈阴性,同时在好氧性试验中得到其为兼性厌氧菌(表 1)。将菌株 MC29 的 16S rRNA 基因序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 搜索同源序列比对,并采用 MEGA-X 构建系统发育树确定其种属。如图 3 所示,菌株 MC29 与纤维化纤维微细菌 (*Cellulosimicrobium cellulans*)相似性最高,达到 99%以上。因此,根据生理生化和形态学分析的特征结果,可以鉴定菌株 MC29 为纤维化纤维微细菌 (*Cellulosimicrobium cellulans*)。

### 2.3 菌株 MC29 的秸秆腐解能力

由表 2 可知,通过液态摇瓶试验表明,接种菌株 MC29 的小麦秸秆 15 d 腐解率达到 12.18%,较未接种提高了 24.8%。其通过 CMC 酶活测定测得值为 13.32 U/mL。

表 1 菌株 MC29 生理生化特征

Table 1 The physiological and biochemical characteristics of strain MC29

Items	Results
革兰氏染色	+
Gram staining	
MR 试验	+
Methyl red reaction	
V-P 试验	-
V-P test	
有无鞭毛	No
Flagellum or not	
淀粉水解	-
Starch hydrolysis	
柠檬酸盐利用	-
Utilization of Citrate	
明胶液化	+
Gelatin liquefaction	
好氧性试验	兼性厌氧
Aerobic test	Facultative anaerobic
接触酶试验	+
Catalase test	
硝酸盐还原	+
Nitrate reduction	

+: Positive; -: Negative.

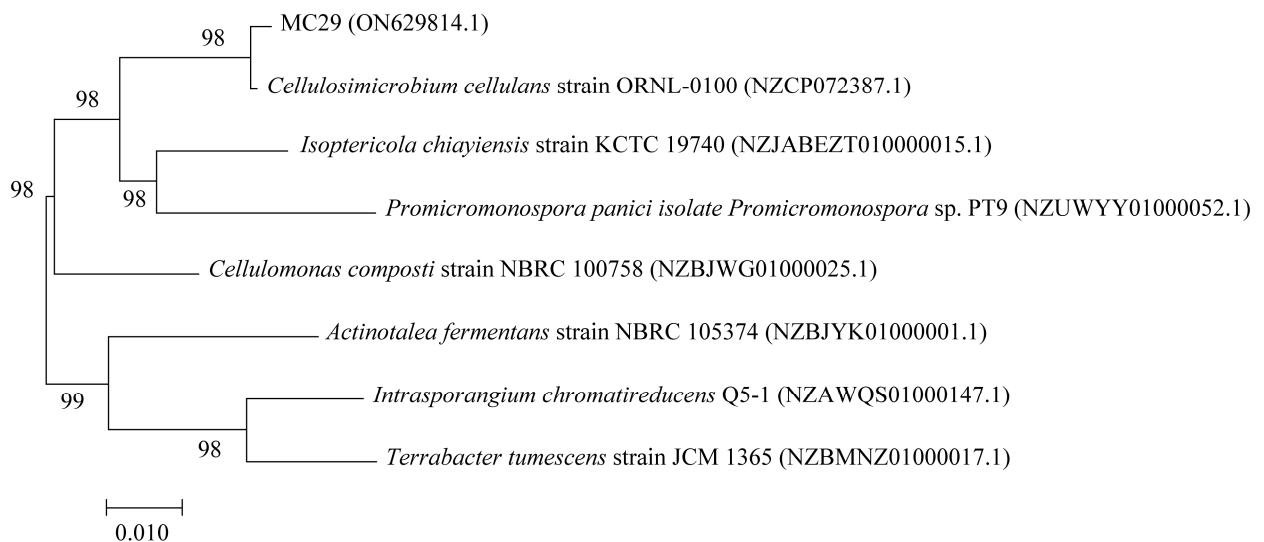


图 3 菌株 MC29 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号内序号为 GenBank 登录号;分支点上的数据代表 bootstrap 的支持率;标尺刻度 0.010 代表序列进化的分支差异长度

Figure 3 Phylogenetic tree of strain MC29 based on 16S rRNA gene sequences by adjacency method. GenBank accession No. are set in parentheses; Numbers on the branch points represent the support percentages of bootstrap; Scale 0.010 represents 1% nucleotide difference.

表 2 接种菌株 MC29 对秸秆腐解的影响

Table 2 Effects of inoculated strain MC29 on straw decomposition

处理	腐解率	CMC 酶活性
Treatment	Decomposition rate (%)	CMC enzyme activity (U/mL)
CK	9.76±0.90	0
MC29	12.18±0.60*	13.32±0.40

CK 指未接种菌株 MC29, MC29 指接种菌株 MC29; \*:  $P<0.05$ , 下同

CK refers to uninoculated strain MC29, MC29 refers to inoculated strain MC29; \*:  $P<0.05$ , the same below.

## 2.4 菌株 MC29 的玉米促生能力

由表 3 可知, 通过室内玉米盆栽试验表明, 菌株 MC29 接种土壤后 IAA 产量为 8.63 mg/L; 与未接种菌株 MC29 相比, 玉米植株的根系性状与植株条件得到显著改善, 其中 SPAD 值、植株总重、根表面积和根长分别为 42.30、6.26 g、166.80 cm<sup>2</sup> 和 27.80 cm, 分别提高 7.6%、21.3%、30.9% 和 18.3%。同时对耕作土壤中相关植物营养元素进行测定, 结果表明接种菌株 MC29 的土壤中检测出的碱解氮含量最大, 达到 32.89 mg/kg, 相较于对照组显著提高 68.1% ( $P<0.05$ ); 土壤速效磷含量为 22.76 mg/kg, 相较于对照组提高 5.8%; 土壤速效钾含量为 159.00 mg/kg, 较对照组提高 6.0%。

## 2.5 菌株 MC29 的生长及产 IAA 条件优化

由图 4 可知, 在不同 pH 和装液量条件下菌

株 MC29 生长及 IAA 产量差异性显著。菌株生长量随 pH 呈现先升后降的趋势, 而随装液量呈现下降趋势, 在 pH 值为 7.0 及装液量为 25 mL/250 mL 时增至最大。菌株 IAA 产量随 pH 值及装液量的增大均呈现先升后降的趋势, 最适 pH 值为 7.0, IAA 产量可达 12.33 mg/L, 最适装液量为 50 mL/250 mL, IAA 产量可达 21.91 mg/L。

由图 5 可知, 不同碳源和氮源对菌株 MC29 生长及 IAA 产量同样存在显著性差异, 在不同碳源条件下, 菌株 MC29 对葡萄糖、甘露醇、蔗糖、麦芽糖、乳糖、果糖、木糖均可吸收利用, 其中在促进生长方面麦芽糖显著优于其他碳源, 在促产 IAA 方面果糖显著高于其他碳源; 而在不同氮源条件下, 菌株 MC29 生长量在酵母粉培养条件下显著高于其他 6 种氮源, 而硝酸钾对 IAA 产量作用显著。

## 2.6 GFP 标记菌株 MC29 的构建与检测鉴定

为研究菌株 MC29 在砂姜黑土中的分布及定殖规律, 本研究将含 GFP 基因的 pET-21a 质粒导入菌株细胞。菌株 MC29 由于其本身不具有氨苄青霉素(ampicillin, Amp)抗性, 而 pET-21a 质粒具有 Amp 抗性基因, 电击转化后使菌株 MC29 能在 Amp 平板上生长并产生荧光(图 6A), 因此可初步鉴定 GFP 基因成功表达, 标记为 MC29-GFP。对菌株转导后的 DNA 进行提取, 使用 pET-21a 质粒

表 3 接种菌株 MC29 对玉米促生和土壤理化性质的影响

Table 3 Effects of inoculated strain MC29 on maize growth and soil physical and chemical properties

处理	玉米生长状况					土壤理化性质		
Treatment	Corn growth condition					Physical and chemical properties of soil		
	吡啶乙酸 含量 IAA value (mg/L)	相对叶绿素 含量 SPAD	植株总重 Total weight of plant (g)	表面积 Surface area (cm <sup>2</sup> )	根长 Root length (cm)	土壤碱解氮 Soil alkali- hydrolytic nitrogen (mg/kg)	土壤速效磷 Soil available phosphorus (mg/kg)	土壤速效钾 Soil available potassium (mg/kg)
CK	0	39.30±0.64	5.16±0.59	127.40±11.00	23.50±2.29	19.56±4.11	21.52±0.55	150.00±3.54
MC29	8.63±0.05	42.30±1.78*	6.26±0.56*	166.80±17.80*	27.80±4.21*	32.89±1.78*	22.76±0.49*	159.00±6.52*

\*:  $P<0.05$ .

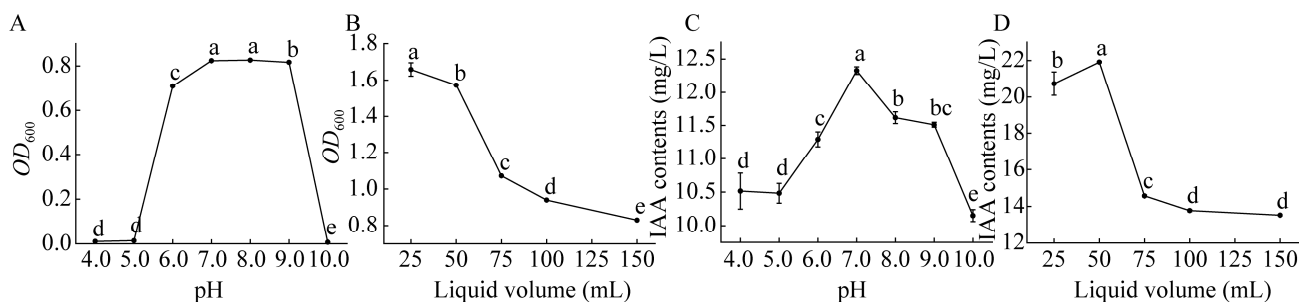


图4 不同 pH 和装液量对菌株 MC29 生长及产 IAA 的影响 A: pH 对菌株 MC29 生长的影响. B: 装液量对菌株 MC29 生长的影响. C: pH 对菌株 MC29 产 IAA 的影响. D: 装液量对菌株 MC29 产 IAA 的影响. 不同小写字母表示组间有显著差异( $P<0.05$ ), 下同

Figure 4 Effects of pH and liquid volume on the growth and IAA production of strain MC29. A: Effect of pH on strain MC29 growth. B: Effect of liquid volume on strain MC29 growth. C: Effect of pH on IAA production by strain MC29. D: Effect of liquid volume on IAA production by strain MC29. Different lowercase letters represent significant differences of different strains ( $P<0.05$ ), the same below.

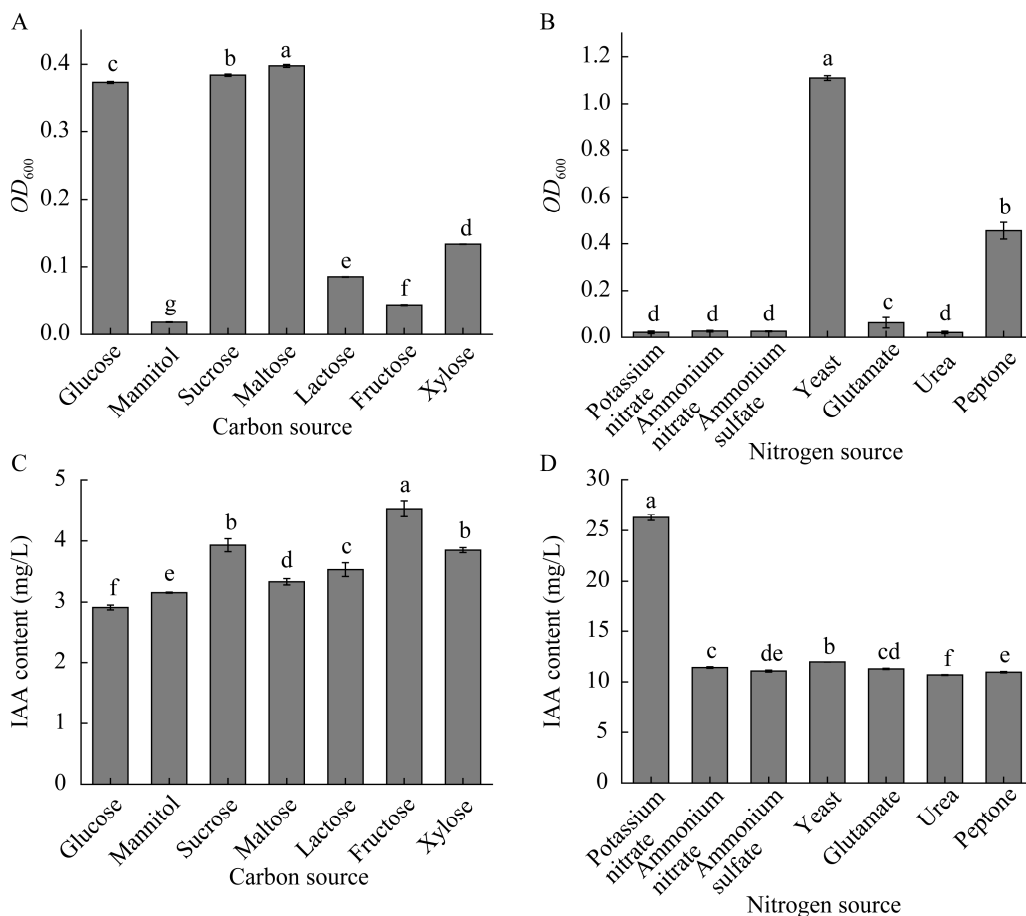


图5 不同碳源和氮源对菌株 MC29 生长及产 IAA 的影响 A: 碳源对菌株 MC29 生长的影响. B: 氮源对菌株 MC29 生长的影响. C: 碳源对菌株 MC29 产 IAA 的影响. D: 氮源对菌株 MC29 产 IAA 的影响

Figure 5 Effects of different carbon and nitrogen sources on the growth and IAA production of strain MC29. A: Effects of carbon sources on strain MC29 growth. B: Effect of nitrogen sources on strain MC29 growth. C: Effect of carbon sources on IAA production by strain MC29. D: Effect of nitrogen sources on IAA production by strain MC29.

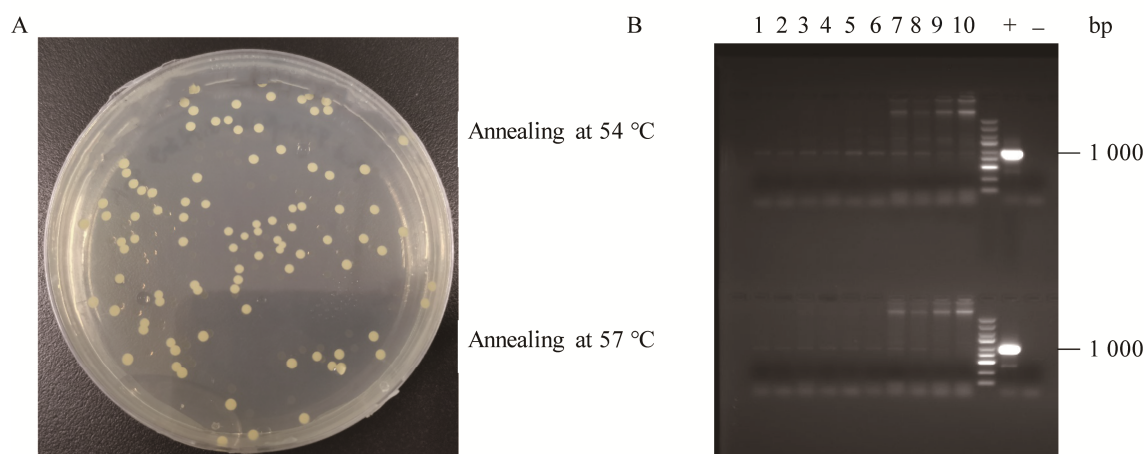


图6 MC29-GFP 电击转导培养(A)和 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图(B) 1-10 号样品均表示 MC29-GFP 所提取 DNA

Figure 6 Cultivation of MC29-GFP based on electric shock (A) and agarose gel electrophoresis of PCR products (B). Samples 1 to 10 in Figure B represent DNA extracted from MC29-GFP.

上的通用引物进行 PCR 鉴定, 扩增出约 1 000 bp 的条带(图 6B), 且与阳性对照大小相同, 而阴性对照无扩增条带出现, 再次表明 pET-21a 质粒成功转入 MC29 细胞中, 使 GFP 基因正常表达。

## 2.7 MC29-GFP 在砂姜黑土中的定殖能力

对施入 MC29-GFP 的盆栽土壤进行采样, 测定菌株的定殖量。由图 7 可知, 菌株 MC29-GFP 在砂姜黑土中具有较强的定殖能力, 15 d 定殖量达为  $2.8 \times 10^5$ – $9.5 \times 10^5$  copies/g。

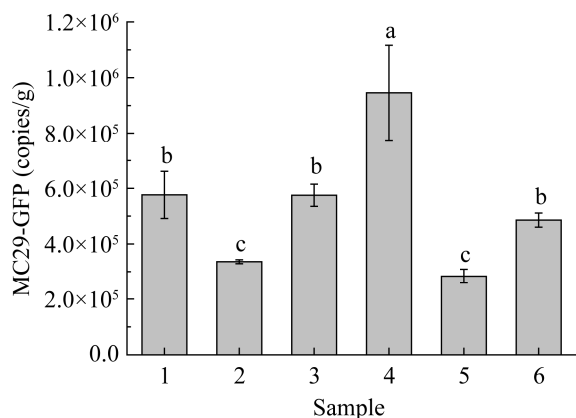


图7 MC29-GFP 在砂姜黑土中的定殖量测定

Figure 7 Determination of colonization of MC29-GFP in lime concretion black soil.

## 3 讨论

### 3.1 菌株 MC29 对秸秆降解、玉米生长和土壤养分的影响

环境中存在大量的秸秆腐解菌, 不同菌株配制的秸秆促腐菌剂可加速对秸秆的腐解作用, 但不同田间的秸秆腐解效果存在显著差异<sup>[30]</sup>。研究表明, 从目标土壤中筛选出的秸秆腐解菌的效果普遍高于外源菌种<sup>[31]</sup>。本研究从长期进行秸秆还田的砂姜黑土中筛选出一株纤维化纤维微生物, 其 CMC 酶活性达到 13.32 U/mL, 菌株施用后 15 d 秸秆腐解率为 12.18%, 相较于秸秆自然腐解显著提升 24.8%。田凤鸣等<sup>[32]</sup>从土壤中筛选出一株纤维素降解菌, CMC 酶活为 4.653 U/mL; 王勇等<sup>[33]</sup>从覆盖有枯枝落叶等腐败物的土壤中筛选出一株高效纤维素菌, CMC 酶活为 8.47 U/mL。对比分析表明, 菌株 MC29 具有较高的产 CMC 酶能力, 较其他菌株具有良好的秸秆腐解效果, 可加速砂姜黑土地区的秸秆腐解。同时, 本研究发现菌株 MC29 同时对玉米植株具有促生功能, IAA 的分泌量为 8.63 mg/L。



结合实际盆栽试验验证发现,施用菌株 MC29 后玉米植株各项生理指标显著改善,且土壤中氮磷钾的含量均显著提升。Zhang 等<sup>[34]</sup>筛选得到产 IAA 菌株 SQR9,施用后玉米根长和根表面积分别增加 33%–49%和 29%–59%,而本研究筛选的 MC29 对玉米根表面积和根长的促生效果仅为 30.9%和 18.3%,可能是菌种的差异导致促生效果的不同,同时砂姜黑土中养分含量较为匮乏,影响菌株的促生效果。熊淑萍等<sup>[35]</sup>认为,砂姜黑土中氮的有效性与微生物活动密切相关,微生物氨化、硝化等作用影响氮素转化,同时土壤中的氮含量会反作用于微生物活性。李阳阳等<sup>[36]</sup>验证其观点,并且指出土壤中速效磷、速效钾的增加归因于微生物对秸秆降解的作用,进而促进养分的释放。由以上分析可知,菌株的促生效果需结合土壤环境中养分的有效性以及菌株自身对养分利用的进行评判,同时施用菌株 MC29 后对土壤微生物群落和生物有机质的影响,下一步将进行研究。

### 3.2 菌株 MC29 的生长和产 IAA 条件分析

利用 LB 培养基、无机盐培养基及富集培养基对砂姜黑土地地区土著促生菌株进行筛选,配制菌剂后可促进植物生长、改善土壤养分,并为工业生产应用提供理论基础<sup>[37]</sup>。本研究对菌株 MC29 生长及产 IAA 条件进行分析,结果表明菌株 MC29 在 pH 7.0 时生长状态最佳,说明菌株 MC29 生长最适 pH 在中性附近,能够较好地适应砂姜黑土 pH 6.32 的环境。在发酵条件下,装液量是影响菌株生长过程中的溶氧及通气的主要因素<sup>[38]</sup>。本研究中装液量对菌株 MC29 生长影响显著,最适装液量为 25 mL/250 mL,而产 IAA 能力在 50 mL/250 mL 时达到最大值,这与吴婧等<sup>[23]</sup>研究结果不一致。其原因可能是菌株 MC29 为兼性厌氧菌,装液量升高使得含氧量降低,不利于菌株的生长<sup>[39]</sup>。本研究发现菌株

MC29 生长最佳碳源为麦芽糖,最佳氮源为酵母粉;产 IAA 最佳碳源为果糖,最佳氮源为硝酸钾。赵柏霞等<sup>[40]</sup>报道,促生菌最佳生长及产 IAA 碳源为果糖,这与本研究结果不符,其原因可能为 MC29 兼具有秸秆降解能力,对秸秆降解产物麦芽糖利用性更高,进而促进菌株生长<sup>[41]</sup>。张东艳等<sup>[42]</sup>报道,花生促生菌最佳生长氮源为酵母粉,最佳产 IAA 氮源为酵母粉,这与本研究结果一致。目前研究表明,纤维化纤维微细菌 (*Cellulosimicrobium cellulans*)除产 CMC 酶和 IAA 用于作物促腐与促生外,还可分泌木质纤维素水解酶将玉米秸秆转化为生物絮凝剂,进而去除微藻<sup>[43]</sup>。LIU 等<sup>[44]</sup>通过不同碳源和氮源对菌株 L804 生长条件进行优化,在 20 g/L 干玉米秸秆为碳源,3 g/L 酵母抽提物为氮源,以及 pH 8.2 的条件下,絮凝活性达到 80%以上,可用于有效收获微藻。同时, WALIA 等<sup>[45]</sup>对同类菌株进行产木聚糖酶条件优化,发现在培养时间为 72 h, pH 8.0,接种量为 10%,以及培养基成分为 0.55% (质量体积分数)酵母浸膏、35% (质量体积分数)尿素氮、0.06% (质量体积分数) Tween 20 和 3% (质量体积分数) CMC 的条件下,木聚糖酶产率最高为 862.86 U/g。

### 3.3 菌株 MC29-GFP 的构建与定殖

通过将 GFP 基因导入受体细胞,可应用于追踪菌株在砂姜黑土中的定殖及分布规律。本研究筛选得到菌株 MC29,通过电击转化成功将 GFP 基因导入 MC29 细胞,构建荧光标记菌 MC29-GFP,并利用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物再次证明基因的正常表达。进一步研究发现,MC29-GFP 在砂姜黑土中具有较强的定殖能力,15 d 定殖量为  $2.8 \times 10^5$ – $9.5 \times 10^5$  copies/g。目前,荧光标记菌在植物及土壤中的定殖已有大量研究。例如,董莉等<sup>[46]</sup>构建的马铃薯立枯丝核菌拮抗菌 QHZ11 在土壤中定殖的检出量为  $1 \times 10^3$ –

$1 \times 10^{10}$  copies/g, 具有较强的定殖能力, 为病原微生物互作的基础; 高竞等<sup>[47]</sup>构建荧光标记的解淀粉芽孢杆菌 GFP-WK1 在土壤和山核桃树体中的定殖量为  $1 \times 10^4 - 1 \times 10^6$  CFU/g, 可应用于葡萄座腔菌的防控。因此, 构建荧光标记兼具秸秆腐解和玉米促生的菌株 MC29-GFP, 可为实际田间秸秆促腐还田和提高粮食产量的研究奠定基础, 为沿淮地区秸秆资源高效利用提供科学依据。

## 4 结论

(1) 本研究从砂姜黑土中筛选得到一株兼具秸秆腐解及玉米促生能力的菌株 MC29, 经鉴定为纤维化纤维微细菌 (*Cellulosimicrobium cellulans*), 其 CMC 酶活可达 13.32 U/mL, 产 IAA 量为 8.63 mg/L, MC29 施用后秸秆腐解率提升 24.8%, 玉米植株的根系性状与植株条件得到显著改善, 土壤碱解氮含量提升 68.1%, 土壤速效磷含量提升 5.8%, 土壤速效钾提升 6.0%。

(2) 菌株 MC29 生长最适 pH 值为 7.0, 最佳装液量为 25 mL/250 mL, 最佳生长的碳源和氮源分别为麦芽糖和酵母粉; 最佳产 IAA 条件为 pH 7.0, 最佳装液量为 50 mL/250 mL, 最佳产 IAA 的碳源和氮源分别为果糖和硝酸钾。

(3) 成功构建荧光标记菌 MC29-GFP, 并通过对 GFP 基因进行 Q-PCR 实验分析出其接入砂姜黑土中 15 d 后的存活量为  $2.8 \times 10^5 - 9.5 \times 10^5$  copies/g。

## REFERENCES

- [1] 杨普, 张长青. 安徽省沿淮地区粮食生产现状分析及对策研究[J]. 农业科技管理, 2009, 28(4): 21-24.  
YANG P, ZHANG CQ. Present situation analysis and countermeasures of grain production in Anhui Province along Huaihe River[J]. Management of Agricultural Science and Technology, 2009, 28(4): 21-24 (in Chinese).
- [2] 曹承富, 肖扬书, 武际, 曹军, 高峰, 李学章, 牛泉清, 杨剑波. 沿淮淮北砂姜黑土区小麦大面积超高产栽培理论与实践[J]. 农学学报, 2014, 4(9): 13-18.  
CAO CF, XIAO YS, WU J, CAO J, GAO F, LI XZ, NIU QQ, YANG JB. The practices and theories of wheat super-high-yielding cultivation in large lime concretion black soil area of Huaibei[J]. Journal of Agriculture, 2014, 4(9): 13-18 (in Chinese).
- [3] 李玮, 乔玉强, 陈欢, 曹承富, 杜世州, 赵竹. 秸秆还田和施肥对砂姜黑土理化性质及小麦-玉米产量的影响[J]. 生态学报, 2014, 34(17): 5052-5061.  
LI W, QIAO YQ, CHEN H, CAO CF, DU SZ, ZHAO Z. Effects of combined straw and N application on the physicochemical properties of lime concretion black soil and crop yields[J]. Acta Ecologica Sinica, 2014, 34(17): 5052-5061 (in Chinese).
- [4] 俞晓飞. 基于 MODIS 数据的秸秆焚烧遥感监测研究[J]. 测绘与空间地理信息, 2022, 45(2): 163-165.  
YU XF. Research on remote sensing monitoring of straw burning based on MODIS data[J]. Geomatics & Spatial Information Technology, 2022, 45(2): 163-165 (in Chinese).
- [5] LI MH, TANG CG, CHEN X, HUANG SW, ZHAO WW, CAI DQ, WU ZY, WU LF. High performance bacteria anchored by nanoclay to boost straw degradation[J]. Materials: Basel, Switzerland, 2019, 12(7): 1148.
- [6] 李亚茹, 时君友, 宋晓敏, 徐文彪, 李翔宇. 玉米秸秆组分分离预处理方法的研究进展[J]. 林产工业, 2021, 58(10): 73-76, 79.  
LI YR, SHI JY, SONG XM, XU WB, LI XY. Research progress on separation and pretreatment methods of corn straw components[J]. China Forest Products Industry, 2021, 58(10): 73-76, 79 (in Chinese).
- [7] SONG SL, LUO X, WU H, LU XL, XU FJ, ZHANG ZH, GUAN YX, DAI CC. Combined system of organic substrate and straw-degrading microbial agents improved soil organic matter levels and microbial abundance in a rice-wheat rotation[J]. Current Microbiology, 2022, 79(6): 172.
- [8] 杨欣润, 许邳, 何治逢, 吴婧, 庄睿花, 马超, 柴如山, KALKHAJEH YK, 叶新新, 朱林. 整合分析中国农田腐秆剂施用对秸秆腐解和作物产量的影响[J]. 中国农业科学, 2020, 53(7): 1359-1367.  
YANG XR, XU B, HE ZF, WU J, ZHUANG RH, MA C, CHAI RS, KALKHAJEH YK, YE XX, ZHU L. Impacts of decomposing microorganism inoculum on straw decomposition and crop yield in China: a meta-analysis[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2020, 53(7): 1359-1367 (in Chinese).



- [9] 马超, 龚鑫, 郜红建, 吴婧, 李大明, 陈小云, 李辉信, 刘满强. 历史因素对土壤微生物群落与外来细菌入侵间关系的影响[J]. 生态学报, 2018, 38(22): 7933-7941.  
MA C, GONG X, GAO HJ, WU J, LI DM, CHEN XY, LI HX, LIU MQ. Legacy impacts on the relationships between soil microbial community and the invasion potential of non-indigenous bacteria[J]. Acta Ecologica Sinica, 2018, 38(22): 7933-7941 (in Chinese).
- [10] HARINDINTWALI JD, ZHOU JL, YU XB. Lignocellulosic crop residue composting by cellulolytic nitrogen-fixing bacteria: a novel tool for environmental sustainability[J]. The Science of the Total Environment, 2020, 715: 136912.
- [11] 王芳, 胡培毅, 李莎, 冯李鹏, 王瑶, 高莉. 玉米秸秆降解菌筛选鉴定及其盆栽试验对生土性能影响[J]. 东北农业大学学报, 2016, 47(12): 30-37.  
WANG F, HU PY, LI S, FENG LP, WANG Y, GAO L. Screening and identification of corn straw cellulose degradation strain and the effects on quality of immature soil in potted experiment[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2016, 47(12): 30-37 (in Chinese).
- [12] 马超, 周静, 刘满强, 郑学博, 崔键, 李辉信, 康炳龙. 秸秆促腐还田对土壤养分及活性有机碳的影响[J]. 土壤学报, 2013, 50(5): 915-921.  
MA C, ZHOU J, LIU MQ, ZHENG XB, CUI J, LI HX, KANG BL. Effects of incorporation of pre-treated straws into field on soil nutrients and labile organic carbon in Shajiang black soil[J]. Acta Pedologica Sinica, 2013, 50(5): 915-921 (in Chinese).
- [13] ZHANG C, WANG MY, KHAN N, TANLL, YANG S. Potentials, utilization, and bioengineering of plant growth-promoting *Methylobacterium* for sustainable agriculture[J]. Sustainability, 2021, 13: 3941.
- [14] 徐文思, 姜瑛, 李引, 张振, 徐莉, 胡锋, 李辉信. 一株植物促生菌的筛选、鉴定及其对花生的促生效应研究[J]. 土壤, 2014, 46(1): 119-125.  
XU WS, JIANG Y, LI Y, ZHANG Z, XU L, HU F, LI HX. Isolation, identification of plant growth-promoting bacteria and its promoting effects on peanuts[J]. Soils, 2014, 46(1): 119-125 (in Chinese).
- [15] 邹锋康, 王秋红, 周建朝, 丁广洲. 生长素调节植物生长发育的研究进展[J]. 中国农学通报, 2018, 34(24): 34-40.  
ZOU FK, WANG QH, ZHOU JC, DING GZ. Auxin regulating plant growth and development: research progress[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2018, 34(24): 34-40 (in Chinese).
- [16] 李永斌, 李云龙, 关国华, 陈三凤. 植物根际促生菌的筛选、鉴定及其对小麦的减肥增产效果[J]. 农业生物技术学报, 2020, 28(8): 1471-1476.  
LI YB, LI YL, GUAN GH, CHEN SF. Screening, identification of plant growth promoting rhizobacteria and its effect on reducing fertilization while increasing efficiency in wheat (*Triticum aestivum*)[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2020, 28(8): 1471-1476 (in Chinese).
- [17] 邓超, 黄大昉, 宋福平. 绿色荧光蛋白及其应用[J]. 中国生物工程杂志, 2011, 31(1): 96-102.  
DENG C, HUANG DF, SONG FP. Green fluorescence protein and its application[J]. China Biotechnology, 2011, 31(1): 96-102 (in Chinese).
- [18] 杨潇湘, 黄小琴, 张蕾, 张重梅, 鲜贇曦, 周西全, 刘勇. 绿色荧光蛋白标记解淀粉芽孢杆菌 Bam22 在油菜体内的定殖[J]. 中国农学通报, 2022, 38(1): 125-130.  
YANG XX, HUANG XQ, ZHANG L, ZHANG ZM, XIAN YX, ZHOU XQ, LIU Y. Colonization of GFP-labelled *Bacillus amyloliquefaciens* Bam22 in *Brassica napus*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2022, 38(1): 125-130 (in Chinese).
- [19] 黄青盈, 吕嘉昕, 何秋愉, 武全, 刘明秋. 纤维素降解菌种的筛选测定及其对秸秆的降解[J]. 复旦学报(自然科学版), 2022, 61(1): 34-42.  
HUANG QY, LÜ JX, HE QY, WU Q, LIU MQ. Screening and determination of cellulose-degrading strains and their utilization in degrading straw[J]. Journal of Fudan University: Natural Science, 2022, 61(1): 34-42 (in Chinese).
- [20] 程鹏, 刘姗姗, 王玉, 卢存龙, 刘爱民. 1株高产纤维素酶菌株的筛选鉴定及对稻秆降解的研究[J]. 华南农业大学学报, 2019, 40(1): 84-91.  
CHENG P, LIU SS, WANG Y, LU CL, LIU AM. Screening and identification of a cellulase-producing strain and its degradation of rice straw[J]. Journal of South China Agricultural University, 2019, 40(1): 84-91 (in Chinese).
- [21] 布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1984.  
BUCHANAN RE, GIBBONS NE. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. Beijing: Science Press, 1984 (in Chinese).
- [22] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.  
DONG XZ, CAI MY. Handbook of Identification of Common Bacterial Systems[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese).

- [23] 吴婧, 聂彩娥, 朱媛媛, 黄薇, 马超, 姜瑛, 朱林, 郅红建. 一株兼具产 IAA 能力纤维素降解菌的筛选、鉴定及条件优化[J]. 生物技术通报, 2020, 36(12): 54-63.  
WU J, NIE CE, ZHU YY, HUANG W, MA C, JIANG Y, ZHU L, GAO HJ. Isolation, identification of a cellulose-degrading bacterium with IAA-producing ability and optimization of its culture conditions[J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(12): 54-63 (in Chinese).
- [24] 陈晶晶, 王伏伟, 刘曼, 朱林, 叶爱华, 王晓波, 车威. 土壤中纤维素降解真菌的筛选及其纤维素酶活性的研究[J]. 安徽农业大学学报, 2014, 41(4): 654-661.  
CHEN JJ, WANG FW, LIU M, ZHU L, YE AH, WANG XB, CHE W. Isolation of cellulose-decomposing fungi from the soil and analyzing its cellulase activity[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2014, 41(4): 654-661 (in Chinese).
- [25] 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).
- [26] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.  
LU RK. Agricultural Chemical Analysis Method of Soil[M]. Beijing: China Agriculture Sciencetech Press, 2000 (in Chinese).
- [27] 顾彩彩, 王震, 王露蓉, 毛莲英, 宋奇琦, 杨丽涛, 邢永秀, 李杨瑞. 固氮细菌 DX120E 的 gfp 标记及对不同甘蔗品种的接种效应[J]. 南方农业学报, 2018, 49(6): 1075-1081.  
GU CC, WANG Z, WANG LR, MAO LY, SONG QQ, YANG LT, XING YX, LI YR. Gfp maker of nitrogen-fixing bacteria DX120E and inoculation effects on different sugarcane varieties[J]. Journal of Southern Agriculture, 2018, 49(6): 1075-1081 (in Chinese).
- [28] 李倩倩, 靳元元, 赵强, 李峰, 尉发正, 任洪林, 胡盼, 王晓旭. 狐、貉源大肠杆菌分离鉴定及毒力基因检测[J]. 微生物学通报, 2022, 49(03): 1048-1056.  
LI QQ, JIN YY, ZHAO Q, LI F, YU FZ, REN HL, HU P, WANG XX. Isolation, identification, and virulence gene detection of *Escherichia coli* from fox and raccoon dog[J]. Microbiology China, 2022, 49(3): 1048-1056 (in Chinese).
- [29] 王永阳, 杜佳, 高克祥. 苦瓜枯萎病生防木霉的筛选鉴定及其定殖的 qPCR 检测[J]. 山东农业科学, 2018, 50(8): 110-115.  
WANG YY, DU J, GAO KX. Screening and identification of biocontrol *Trichoderma* to wilt of bitter melon and detection of its colonization by qPCR[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2018, 50(8): 110-115 (in Chinese).
- [30] 黄薇, 吴凉萍, 宋路遥, 柴如山, 刘梦丽, 陆银萍, 曹小闯, 邬刚, 马超. 配施不同腐秆剂对还稻田麦秸腐解和水稻产量的影响[J]. 土壤, 2022, 54(1): 40-46.  
HUANG W, WU LP, SONG LY, CHAI RS, LIU ML, LU YP, CAO XC, WU G, MA C. Impact of various SDMIs on wheat straw decomposition and rice yield[J]. Soils, 2022, 54(1): 40-46 (in Chinese).
- [31] 宋彩红, 齐辉, 魏自民, 席北斗. 堆肥土著微生物演替响应抗酸化菌剂研究[J]. 东北农业大学学报, 2020, 51(9): 43-53.  
SONG CH, QI H, WEI ZM, XI BD. Study on response of succession of indigenous microorganism during composting to anti-acidification microbial agent[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2020, 51(9): 43-53 (in Chinese).
- [32] 田凤鸣, 陈强, 王瀚, 卓平清, 黄兆辉. 一株纤维素酶高产菌的分离及鉴定[J]. 绵阳师范学院学报, 2017, 36(5): 50-54.  
TIAN FM, CHEN Q, WANG H, ZHUO PQ, HUANG ZH. Screening and identification of a high cellulase-producing strain[J]. Journal of Mianyang Teachers College, 2017, 36(5): 50-54 (in Chinese).
- [33] 王勇, 张育铭, 朱洪磊, 马超, 张宝俊. 高效纤维素降解菌的筛选及产酶活力测定[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(23): 255-260.  
WANG Y, ZHANG YM, ZHU HL, MA C, ZHANG BJ. Screening of high-efficiency cellulose-degrading bacteria and determination of enzyme-producing activity[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2020, 48(23): 255-260 (in Chinese).
- [34] ZHANG N, YANG DQ, WANG DD, MIAO YZ, SHAO JH, ZHOU X, XU ZH, LI Q, FENG HC, LI SQ. Whole transcriptomic analysis of the plant-beneficial rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 during enhanced biofilm formation regulated by maize root exudates[J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 685.
- [35] 熊淑萍, 丁世杰, 王小纯, 马新明, 吴懿鑫, 杜盼, 于旭昊. 影响砂姜黑土麦田土壤氮素转化的生物学因素及其对供氮量的响应[J]. 中国生态农业学报, 2016, 24(5): 563-571.

- XIONG SP, DING SJ, WANG XC, MA XM, WU YX, DU P, YU XH. Biological factors influencing nitrogen transformation in wheat fields of lime concreted black soils and their response to different nitrogen supplings[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2016, 24(5): 563-571 (in Chinese).
- [36]李阳阳, 陈帅民, 范作伟, 徐铭鸿, 王学文, 张立明, 刘慧涛, 吴海燕. 水稻秸秆降解复合菌系的筛选构建及其田间应用效果[J]. 植物营养与肥料学报, 2021, 27(12): 2083-2093.
- LI YY, CHEN SM, FAN ZW, XU MH, WANG XW, ZHANG LM, LIU HT, WU HY. Construction and screening of complex microbial system for efficient degradation of rice straw and their application effects under field condition[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizers, 2021, 27(12): 2083-2093 (in Chinese).
- [37]邓天天, 周士波, 胡烨, 黄坦, 梁耀洪. 添加微生物菌剂对土壤中氮磷形态及含量的影响[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(9): 276-280.
- DENG TT, ZHOU SB, HUANG T, LIANG YH. Effects of microbial additives on forms and contents of nitrogen and phosphorus in soil[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2019, 47(9): 276-280 (in Chinese).
- [38]吴翔, 甘炳成, 黄忠乾, 彭卫红. 一株产 IAA 菌株的筛选、鉴定及培养条件优化[J]. 四川农业大学学报, 2014, 32(4): 432-435, 461.
- WU X, GAN BC, HUANG ZQ, PENG WH. Screening and identification of a IAA biosynthesis strain and optimization of its culture conditions[J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2014, 32(4): 432-435, 461 (in Chinese).
- [39]WU JY, CHAI K, XIAO WL, YANG YH, HAN EH. The single effect of microbe on the corrosion behaviors of 25 steel in seawater[J]. Acta Metallurgica Sinica, 2010, 46(6): 755-760.
- [40]赵柏霞, 刘浩强, 孙丽娜, 肖敏, 郑玮, 赵慧, 潘凤荣. 甜樱桃根际 IAA 产生菌的筛选、鉴定及最佳产素条件优化[J]. 中国南方果树, 2017, 46(3): 23-28.
- ZHAO BX, LIU HQ, SUN LN, XIAO M, ZHENG W, ZHAO H, PAN FR. Screening and identification of IAA production microbes in rhizosphere of cheery and optimization of its culture conditions[J]. South China Fruits, 2017, 46(3): 23-28 (in Chinese).
- [41]NOUAILLE R, MATULOVA M, PÄTOPRSTÝ V, DELORT AM, FORANO E. Production of oligosaccharides and cellobionic acid by *Fibrobacter succinogenes* S85 growing on sugars, cellulose and wheat straw[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 83(3): 425-433.
- [42]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).
- [43]DOU TY, CHEN J, LIU CL. Isolation and subunit compositions of the xylanosome complexes produced by *Cellulosimicrobium* species[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2020, 133(1): 109445.
- [44]LIU WJ, ZHAO CC, JIANG JH, LU Q, HAO Y, WANG L, LIU C. Bioflocculant production from untreated corn stover using *Cellulosimicrobium cellulans* L804 isolate and its application to harvesting microalgae[J]. Biotechnology for Biofuels, 2015, 8(1): 170.
- [45]WALIA A, MEHTA P, CHAUHAN A, SHIRKOT CK. Optimization of cellulase-free xylanase production by alkalophilic *Cellulosimicrobium* sp. CKMX1 in solid-state fermentation of apple pomace using central composite design and response surface methodology[J]. Annals of Microbiology, 2013, 63(1): 187-198.
- [46]董莉, 邱慧珍, 周洋子, 董爱菊, 陈兰兰, 王友玲, 王川. 马铃薯立枯丝核菌拮抗菌 QHZ11 的实时荧光定量 PCR 快速检测与应用[J]. 微生物学通报, 2020, 47(12): 4338-4348.
- DONG L, QIU HZ, ZHOU YZ, DONG AJ, CHEN LL, WANG YL, WANG C. Rapid detection and application of antagonistic bacterium QHZ11 against *Rhizoctonia solani* in potato by real-time fluorescence quantitative PCR[J]. Microbiology China, 2020, 47(12): 4338-4348 (in Chinese).
- [47]高竞, 方伟, 顾佳悦, 严淑娴, 邵帅, 梁辰飞, 秦华, 陈俊辉, 徐秋芳. 荧光标记解淀粉芽孢杆菌 WK1 在山核桃树体和土壤中的定殖规律[J]. 浙江农业学报, 2021, 33(1): 77-86.
- GAO J, FANG W, GU JY, YAN SX, SHAO S, LIANG CF, QIN H, CHEN JH, XU QF. Colonization of fluorescently labeled *Bacillus amylolyticus* WK1 in *Carya cathayensis* Sarg. and soil[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2021, 33(1): 77-86 (in Chinese).