

研究报告

具促生功能拟蕈状芽孢杆菌(*Bacillus paramycooides*) SH-1464 发酵条件优化及其活性

申云鑫^{1,2}, 赵江源³, 王楠^{1,2}, 李铭刚³, 施竹凤², 冯路遥^{1,3}, 李者芬^{1,2},
陈齐斌^{*1}, 杨佩文^{*2}

1 云南农业大学植物保护学院, 云南 昆明 650000

2 云南省农业科学院农业环境资源研究所, 云南 昆明 650205

3 云南大学, 云南 昆明 650091

申云鑫, 赵江源, 王楠, 李铭刚, 施竹凤, 冯路遥, 李者芬, 陈齐斌, 杨佩文. 具促生功能拟蕈状芽孢杆菌(*Bacillus paramycooides*) SH-1464 发酵条件优化及其活性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(6): 2436-2451.

SHEN Yunxin, ZHAO Jiangyuan, WANG Nan, LI Minggang, SHI Zhufeng, FENG Luyao, LI Zhefen, CHEN Qibin, YANG Peiwen. Optimization of fermentation conditions of *Bacillus paramycooides* SH-1464 with growth-promoting activity[J]. Microbiology China, 2023, 50(6): 2436-2451.

摘要:【背景】植物根际促生菌在促进植物生长、提高植物系统抗性及改善土壤养分状况等方面具有极大的应用潜力。【目的】为微生物菌肥的开发利用提供高效微生物资源。【方法】采用稀释涂布平板法分离烟草根际土壤可培养细菌, 利用 PVK 培养基筛选具强溶无机磷活性的菌株, 结合钼锑抗比色法测定菌株溶磷活性; 利用 Salkowski's 比色液检测菌株产吲哚乙酸(indole acetic acid, IAA)活性; 以菌株溶磷量和 IAA 产量为指标, 采用单因素试验设计进行发酵条件优化, 以得到菌株溶磷活性和产 IAA 的最佳发酵方案; 基于种子促发芽及幼苗促生长试验验证菌株的促生效果; 结合形态学、生理生化和 16S rRNA 基因序列对菌株进行分类学鉴定。【结果】于烟草根际土壤分离得到 127 个不同分类的菌株, 10 个菌株具溶无机磷的能力, 其中菌株 SH-1464 溶磷活性最强, 溶磷圈直径为 16.11 mm, 溶磷量为 119.22 mg/L; Salkowski's 比色结果表明, 菌株具有极强的产 IAA 活性, 为 39.88 μg/mL。单因素试验结果表明, 菌株 SH-1464 溶磷的最佳碳源为 10 g/L 葡萄糖, 最佳氮源为 0.5 g/L 蛋白胨, 最佳无机磷源及其添加量为 2.5 g/L 磷酸三钙, 最佳初始 pH 值为 7.5, 温度 30 °C, 转速 200 r/min; 菌株 SH-1464 产 IAA 最佳培养条件为: 麦芽糖 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, NH₄NO₃ 10 g/L, 氯化钾 2.5 g/L, L-色氨酸 0.1g/L, pH 6.5, 温度 30 °C, 转速 180 r/min。基于单因素试验结果进行优化前后菌株溶磷量及 IAA 产量对比试验可知, 优化后菌株的溶磷量为 225.9 mg/L, 提升 84.5%; IAA 产量为 75.3 μg/mL, 提升 88.8%。促生试验结果表明: 菌株 SH-1464 处理下番茄种

资助项目: 云南省科技计划重大科技专项(202202AE090015, 202202AE090010); 国家自然科学基金(32060624)

This work was supported by the Major Science and Technology Project of Yunnan Province (202202AE090015, 202202AE090010) and the National Natural Science Foundation of China (32060624).

*Corresponding authors. E-mail: CHEN Qibin, tclass99@163.com; YANG Peiwen, pwyang2000@126.com

Received: 2022-11-15; Accepted: 2023-02-07; Published online: 2023-02-24

子的发芽率提高 84.5%，株高提高 55.1%，茎围提高 32.5%，根长、根重分别提高 16.4%和 149%，地上部分鲜重和干重分别提高 172.2%和 203.6%。结合形态学和分子生物学鉴定菌株 SH-1464 为拟蕈状芽孢杆菌(*Bacillus paramycooides*, GenBank 登录号为 ON417365, 保藏号为 CCTCCM 2022924); 此外, 菌株还具有产蛋白酶、产纤维素酶、固氮、分泌铁载体的能力。【结论】菌株 SH-1464 具有强溶无机磷、固氮、分泌 IAA、产蛋白酶、产纤维素酶及分泌铁载体等能力, 可显著提高番茄种子的发芽率, 对番茄幼苗株高、茎围、根长、根重、地上部分鲜重和干重等农艺性状具有显著促进作用, 可作为高效微生物资源在微生物菌剂的开发利用等方面展现广泛应用前景。

关键词: 拟蕈状芽孢杆菌; 无机磷; 吲哚乙酸(IAA); 发酵条件优化; 微生物肥料

Optimization of fermentation conditions of *Bacillus paramycooides* SH-1464 with growth-promoting activity

SHEN Yunxin^{1,2}, ZHAO Jiangyuan³, WANG Nan^{1,2}, LI Minggang³, SHI Zhufeng², FENG Luyao^{1,3}, LI Zhefen^{1,2}, CHEN Qibin^{*1}, YANG Peiwen^{*2}

1 College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650000, Yunnan, China

2 Agricultural Environment and Resources Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, Yunnan, China

3 Yunnan University, Kunming 650091, Yunnan, China

Abstract: [Background] Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) has great potential in improving plant resistance and regulating soil nutrient status. **[Objective]** To provide efficient microbial resources for the development and utilization of microbial fertilizer, we isolated and screened out the strains with strong growth-promoting properties from the rhizosphere soil of tobacco. **[Methods]** The culturable bacteria in the rhizosphere soil of tobacco were isolated by the dilution-plate coating method. The strains with strong phosphorus-solubilizing activity were screened by PVK medium, and the phosphorus-solubilizing activity of each strain was determined by molybdenum-antimony resistance colorimetry. Salkowski's colorimetric solution was used to determine the production of indole acetic acid (IAA). With the phosphorus-solubilizing amount and IAA yield as indicators, we optimized the fermentation conditions by single factor tests to obtain the optimal fermentation scheme for phosphorus solubilization and IAA production. The growth-promoting activity of the strain was verified by seed germination and seedling growth experiments. The strain was identified based on the morphological, physiological, and biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequence. **[Results]** A total of 127 strains were isolated from the rhizosphere soil of tobacco. Ten of the strains had the ability to solubilize inorganic phosphorus, among which SH-1464 had the highest phosphorus-solubilizing activity with a diameter of 16.11 mm and an amount of 119.22 mg/L. Strain SH-1464 had strong IAA production of 39.88 $\mu\text{g/mL}$. The optimal fermentation conditions of SH-1464 for solubilizing phosphorus was 10 g/L glucose as the carbon source, 0.5 g/L peptone as the nitrogen source, 2.5 g/L $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ as the inorganic phosphorus source, initial pH

7.5, temperature of 30 °C, and rotation speed of 200 r/min. The optimum conditions of strain SH-1464 for producing IAA were 10 g/L maltose, 5 g/L yeast powder, 10 g/L NH₄NO₃, 2.5 g/L KCl, 0.1 g/L L-tryptophan, pH 6.5, 30 °C, and 180 r/min. The phosphorus-solubilizing amount and IAA yield of the strain were compared before and after optimization. After optimization, the phosphorus-solubilizing amount and IAA yield of the strain was 225.9 mg/L and 75.3 µg/mL, which increased by 84.5% and 88.8%, respectively, compared with those before optimization. The inoculation of SH-1464 increased the germination rate of tomato seeds by 84.5%, plant height by 55.1%, stem circumference by 32.5%, root length by 16.4%, root weight by 149%, aboveground part fresh weight by 172.2%, and aboveground part dry weight by 203.6%. Strain SH-1464 was identified as *Bacillus paramycooides* (GenBank accession number: ON417365, deposit number: CCTCCM 2022924). In addition, the strain had the abilities of producing protease and cellulase, fixing nitrogen, and secreting siderophore. **[Conclusion]** Strain SH-1464 had the abilities of solubilizing inorganic phosphorus, fixing nitrogen, and producing IAA, protease, cellulase, and siderophore. It significantly improved the germination rate of tomato seeds and the seedling agronomic traits such as plant height, stem circumference, root length, root weight, and fresh and dry weight of aboveground part. This strain has a wide application prospect in the development and utilization of microbial agents.

Keywords: *Bacillus paramycooides*; inorganic phosphorus; indole acetic acid (IAA); fermentation condition optimization; microbial fertilizer

随着中国农业现代化进程的不断加快,化肥和农药的施用量大幅增加,对生态环境造成的破坏也大幅提高,如何在农业生产中达到“减肥增效”的目标是亟须探究的问题^[1]。植物根际促生菌(plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)是植物根际非致病有益细菌的总称,不仅具有环保、安全、有效等特点,同时还可促进植物生长、提高植物系统抗性、改善土壤养分状况等功能,具有极大的潜力^[2-3]。然而菌株的生长速度、生物量及次生代谢产物分泌量等与发酵条件相关,不同的生境偏好性决定菌株的生长代谢过程^[4]。因此,分离筛选活性强、功能多样化的 PGPR 是推进农业绿色发展的有效措施,优化其发酵条件是提高其生物量、增加次生代谢物产量的有效途径,更是推进活性菌株产业化和商业化的主要措施之一。

目前,对 PGPR 的研究主要以伯克霍氏菌属(*Burkholderia*)、弗兰克氏菌属(*Frankia*)、固

氮菌属(*Azotobacter*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)等为主。其中,芽孢杆菌属以解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和暹罗芽孢杆菌(*Bacillus siamensis*)等居多,而对拟蕈状芽孢杆菌(*Bacillus paramycooides*)的研究较少,分离自海洋的拟蕈状芽孢杆菌 Gxun-30 具有产角蛋白酶的活性,可有效促进动物羽毛的水解^[5];拟蕈状芽孢杆菌 AUUP3 可显著提高盐胁迫下幼苗的根长、茎长、根鲜干重、茎鲜干重^[6]。张妙宜等^[7]于诺尼树植株分离得到的内生暹罗芽孢杆菌(*Bacillus siamensis*)可促进番茄种子萌发,显著提高植株的生长,同时对青霉素、硫酸链霉素等具有明显的抗性。庄馥璐等^[8]于苹果根际土壤筛选所得的菌株 PsbM4 可矿化植酸钙,具有解磷活性且磷酸酶活性较强,并可刺激拟南芥植株分泌氢离子从而更好地应对低磷

环境胁迫。杨华等^[9]于水稻根围分离得到的 5 株菌均使水稻种子的萌发和根系的生长得到显著的促进, 而且均对其根长、茎的生长及分蘖具有促进作用。综上可知, PGPR 具有物种多样、来源广泛、功能多样化等特点, 分离筛选功能多样化且对作物具有良好促生作用的菌株, 可为微生物肥料的开发提供高效的菌种资源, 以满足可持续发展和生态文明建设背景下的农业生产需求。

PGPR 可通过分泌生长素和细胞分裂素等生理活性物质促进植物生长, 通过固氮以及将有机磷水解转化为无机磷酸盐、将不溶性无机磷转化为可溶性磷酸盐等方式改善土壤养分状况, 已经成为微生物肥料领域的研究热点且被广泛应用^[10]。

本研究基于健康烟草根际土壤, 分离筛选具溶磷和分泌吲哚乙酸(indole acetic acid, IAA)活性的菌株, 基于单因素试验设计探究功能菌株最适溶磷培养条件及最适分泌 IAA 培养条件, 以提高菌株的溶磷活性和 IAA 分泌量, 并结合促番茄种子萌发和幼苗生长试验验证其促生活性; 使用形态学、生理生化及分子生物学鉴定方法对其进行鉴定, 并测定其分泌蛋白酶、纤维素酶及产铁载体活性, 以期为微生物肥料的开发利用提供高效微生物资源, 为菌株的开发和推广应用提供理论支撑。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 样品

土壤样品: 采样地点位于云南省丽江市长期轮作健康烟田, 每个县(区)选择 5 个乡镇, 各选择 3 个村, 共 30 个样点, 采集健康烟株的根际土壤, 混合为一个土壤样品, 置于 50 mL 的无菌离心管中, 带回实验室做土壤细菌分离。

1.1.2 培养基

蒙金娜液体培养基(PVK 培养基) (g/L)^[8]: 葡萄糖 10.00, 硫酸铵 0.50, 酵母浸粉 0.50, 氯化钠 0.30, 氯化钾 0.30, 硫酸镁 0.30, 硫酸亚铁 0.03, 硫酸锰 0.03, 磷酸钙 5.00, pH 7.00, 121 °C 灭菌 30 min。供试磷源: 磷酸三钙 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (分析纯, P 质量分数 20.0%); 磷酸铁 FePO_4 (分析纯, P 质量分数 16.6%); 磷酸铝 AlPO_4 (分析纯, P 质量分数 25.0%), 以 PVK 培养基为基础, 进行解磷菌的研究。作为产 IAA 优化基础培养基的 LB 培养基(g/L): 酵母粉 5.00, 蛋白胨 10.00, 氯化钠 10.00, L-色氨酸 0.10, pH 7.20–7.50。NA 培养基、固氮选择培养基、NB 培养基、PDA 培养基、脱脂牛奶培养基、纤维素培养基、果胶培养基、解钾选择培养基和纤维素培养基按参考文献[1,3-5]配制。CAS 双层平板: 下层为显色培养基(270 mL 水琼脂培养基加 30 mL CAS 显色液), 上层为 NA 培养基。CAS 显色液: 称取 0.060 5 g 铬天青 S (chromeazurol S, CAS)溶于 50 mL 去离子水中, 并加入 10 mL FeCl_3 溶液(1 mmol/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ +10 mmol/L HCl)搅拌均匀, 标记为“A 液”; 称取 0.072 9 g 十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyl trimethyl ammonium bromide, HDTMA)溶于 40 mL 去离子水, 标记为“B 液”, 最后将 A 液缓慢倒入 B 液中, 搅拌均匀^[11]。

1.1.3 主要试剂和仪器

磷酸三钙、磷酸铁、磷酸铝, 北京德科岛金科技有限公司; L-色氨酸、抗坏血酸、十六烷基三甲基溴化铵, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 铬天青和酒石酸锑钾, 上海麦克林生化科技股份有限公司; IAA 标准品, 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; 钼酸铵, 成都润泽本土化工有限公司; TaKaRa MiniBEST Bacteria Genomic DNA Extraction Kit, TaKaRa 公司。

微型 pH 仪, 上海仪电科学仪器股份有限公司; 紫外分光光度计, 上海元析仪器有限公司; 超高速离心机, 上海龙跃仪器设备有限公司; 恒温摇床、生化培养箱, 上海智城分析仪器制造有限公司; 超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; 扫描电镜, 复纳科学仪器(上海)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 功能菌株分离及筛选

取 2 g 土壤样品置于 198 mL 无菌水中(500 mL 锥形瓶加玻璃珠), 30 °C、180 r/min 摇床复苏 1 h 左右, 静置 2–3 min, 取上清液梯度稀释至 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} , 3 次重复, 分别吸取 0.2 mL 均匀涂布于 PVK 培养基上, 30 °C 恒温培养 3 d, 挑取并纯化具溶磷圈的菌株作为复筛活性菌株^[1]。

1.2.2 功能菌株的复筛

取纯化后的菌株制成 1×10^8 CFU/mL 菌悬液, 以 1% 的接种量接种于灭菌 PVK 培养基中, 空白培养基为对照, 3 次重复, 28 °C、120 r/min 培养 3 d 后转移至 50 mL 无菌离心管中加(或不加) 0.5 g 无磷活性炭, 采用超声波清洗器进行超声波细胞破碎(工作 2 s 停 3 s, 30% 功率 20 min), 以释放细胞内可溶性磷, 4 000 r/min 离心 20 min, 利用钼锑抗比色法^[10]测定可溶性磷含量。

1.2.3 功能菌株分泌 IAA 特性鉴定

1) 定性检测

挑取单菌落接种于 LB 培养基中, 30 °C、180 r/min 培养 24 h, 无菌条件吸取 4 mL 发酵液于离心管中, 快速与 4 mL Sackowcki's 显色剂(将 150 mL 的浓硫酸缓缓加入到 250 mL 的去离子水中, 边加边搅拌, 待溶液冷却后加入 7.5 mL 0.5 mol/L 的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶液)混合, 常温避光静置显色 40 min, 观察并记录颜色变化。

2) 定量检测

称取 10 mg IAA 标准品溶解于少量乙醇, 蒸馏水定容至 100 mL (浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 梯度稀释至 0、10、20、30、40、50、60 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 各取 4 mL, 等体积加入显色剂, 40 °C 避光静置显色 40 min, 测定其 OD_{535} 值, 绘制标准曲线。将菌悬浮液和空白对照 10 000 r/min 离心 10 min 后取上清液 4 mL 与显色剂 1:1 混合均匀, 在黑暗中静置 40 min, 用分光光度计测定其 OD_{535} 值; 重复 3 次, 以空白显色剂调零, 对比绘制的标准曲线, 连续测定 7 d, 记录不同发酵时间颜色变化, 并计算各时间段菌株的 IAA 产量, 以得出菌株产 IAA 最佳发酵时间^[12]。

1.2.4 功能菌株 SH-1464 溶磷和 IAA 产量发酵条件的单因素试验设计

以 PVK 液体培养基和 LB 培养基为基础培养基, 接种量 1%, 培养时间分别为 72 h 和 48 h, 并以溶磷量和发酵液 IAA 含量为指标进行单因素条件优化, 包括: 碳源(葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、可溶性淀粉), 氮源(蛋白胨、胰蛋白胨、酵母粉、氯化铵), 无机盐源(针对生长素), 难溶性磷源(磷酸三钙 5.0 g/L、磷酸铁 6.0 g/L、磷酸铝 4.0 g/L)及其含量(2.5、5.0、7.5 g/L), 初始 pH (4.5、5.5、6.5、7.5、8.5), 培养温度(21、24、27、30、33、36、39 °C), 以及摇床转速(120、140、160、180、200、220、240 r/min), 以确定最佳组合。

1.2.5 菌株促番茄种子发芽能力测定

共设 4 个处理: (1) 菌株 SH-1464 发酵 48 h 后 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 用无菌水重悬菌体并调节浓度为 1.0×10^8 CFU/mL; (2) 菌株 SH-1464 发酵 48 h 后 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液稀释 1 000 倍; (3) 无菌水; (4) IAA 标准品(100 mg/L)。按上述分组进行 24 h 浸种处理后, 取各组种子置于铺垫 2–3 层灭菌

滤纸的 9 cm 透明培养皿中, 每盒 15 粒, 重复 3 次, 共 45 颗种子, 于 27 °C 人工气候箱, 光、暗交替时间为 16 h 和 8 h, 培养 7 d 测定根长及整株长。

1.2.6 菌株促番茄幼苗生长能力测定

按 1% 的接种量将菌接种于 NB 液体培养基中, 30 °C、180 r/min 摇床培养 48 h, 培养至活菌数约为 1.2×10^{11} – 3.5×10^{11} CFU/mL, 稀释 1 000 倍待用。筛选长势相近的番茄幼苗, 移栽至直径 14 cm 且装有灭菌蔬菜种植基质的花盆中, 每盆 4 株。设置试验组(菌液)、对照组(灭菌水 CK1、灭菌 NB 液体培养基 CK2), 每个处理 5 盆共 20 株, 室内常规处理 7 d 后, 每周使用菌株 SH-1471 发酵液进行灌根, 每盆 200 mL。生长期间每 3 天浇水一次, 日夜温度分别为 25 °C、20 °C, 光照时长 14 h、黑暗时长 10 h。35 d 后测量番茄植株株高、茎围、根长、根重及地上部鲜重和地上部干重。

1.2.7 菌株形态学及生理生化特征鉴定

参照《伯杰氏系统分类手册》^[13]和《常见细菌系统鉴定手册》^[14]中的方法对菌株 SH-1464 进行形态学鉴定和生理生化特性检测。

1.2.8 菌株分子生物学鉴定

将菌株 SH-1464 接种至 NB 培养基中, 37 °C、180 r/min 振荡培养, 当发酵液 OD_{600} 值近似于 1.00 (约 1×10^9 CFU/mL) 时结束培养。采用 TaKaRa MiniBEST Bacteria Genomic DNA Extraction Kit 提取菌株基因组 DNA。采用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGA TCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGYTA CCTTGTTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(25 μ L): 细菌 DNA 模板 2 μ L, $2 \times Taq$ PCR Master Mix 12.5 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L) 各 1 μ L, ddH₂O 8.5 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 60 s, 53 °C 60 s, 72 °C 2 min,

35 个循环; 72 °C 7 min; 4 °C 保存。反应结束后, 取 5 μ L 反应产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳在凝胶成像系统中观察。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳纯化回收后, 委托北京擎科生物科技有限公司测序。结果经 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 后于 GenBank 数据库进行比较分析, 选用相似性较高的模式菌株序列作为参比对象, 用 MEGA 7.0 软件的邻接法 (neighbor-joining method) 构建系统发育树, bootstrap 值设定为 1 000, 其余均为默认值。

1.2.9 功能菌株体外产酶、解钾、固氮及产铁载体能力测定

将菌株分别点接到脱脂牛奶培养基、纤维素培养基、果胶培养基、解钾选择培养基和固氮选择培养基上, 37 °C 培养 48 h, 若有透明圈生成则说明具有相应活性, 使用 CAS 双层平板检测菌株产铁载体能力^[11]。

1.3 数据处理

数据采用单因素方差分析、多重比较及独立样本 *t* 检验分析比较处理间的显著性差异。选择 Excel 和 SPSS Statistics 20.0 软件进行数据统计分析, 采用 Origin 2021 和 GraphPad Prism 8 制图。

2 结果与分析

2.1 溶磷菌筛选结果

经分离纯化, 于烟草根际土壤中分离纯化得到 127 个形态不同的菌株, 分别接种于无机磷细菌培养基进行初筛, 结果表明其中 10 株具有溶磷功能, 溶磷能力如表 1 所示, 其中菌株 SH-1464 的溶磷圈直径最大, 为 16.11 mm (图 1A), 而且溶磷量达 119.22 mg/L, 表明菌株 SH-1464 具有较强的溶磷能力, 因此选为目的的菌株。

表 1 溶磷菌初筛结果

Table 1 Results of initial screening of phosphate-solubilizing bacteria

菌株编号	溶磷圈直径	溶磷量
Strain No.	Dissolved phosphorus ring (mm)	Phosphorus soluble content (mg/L)
SH-1464	16.11±0.85a	119.22±2.02a
SH-5	13.20±0.58b	108.44±2.58b
SH-24	8.11±0.32c	98.86±1.58c
SH-13	8.06±0.35c	90.26±2.88d
SH-14	7.97±0.58c	88.64±2.18d
SH-16	7.61±0.48c	84.22±3.96d
SH-18	7.55±0.89c	69.44±4.58de
SH-21	6.98±0.78c	55.12±2.57e
SH-23	6.66±0.99c	55.46±3.58e
SH-25	5.42±0.87c	48.13±4.56f

数据为 3 次重复的平均值±标准差, 不同小写字母表示不同菌株之间具有显著差异($P<0.05$)

The data is the mean±standard deviation of 3 replicates. Different lowercase letters indicate significant differences between different strains ($P<0.05$).

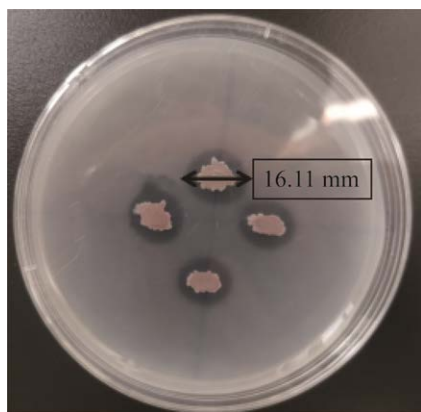


图 1 菌株 SH-1464 在固体培养基上的溶磷圈

Figure 1 Phosphoric cycle of strain SH-1464 on solid culture medium.

2.2 菌株 SH-1464 分泌 IAA 能力

使用紫外分光光度计在 OD_{535} 处测定 IAA, 标准曲线为 $y=0.0069x+0.0058$ ($r=0.9989$)。菌株 SH-1464 经 LB 培养基连续培养 7 d 后, 结果表明, 菌株 SH-1464 发酵液与 Salkowski's 显色剂反应呈粉红色, 表明菌株 SH-1464 具有产

IAA 的能力, 并于发酵 48 h 时显色颜色最深, OD_{535} 最大, 为 0.281 (图 2, 图 3), 即 IAA 产生量最大, 为 39.88 $\mu\text{g/mL}$ 。经计算菌株 SH-1464 的 IAA 分泌量范围为 31.56–39.88 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3 不同培养基对菌株溶磷能力和 IAA 产量的影响

以 PVK 液体培养基为优化对象进行菌株

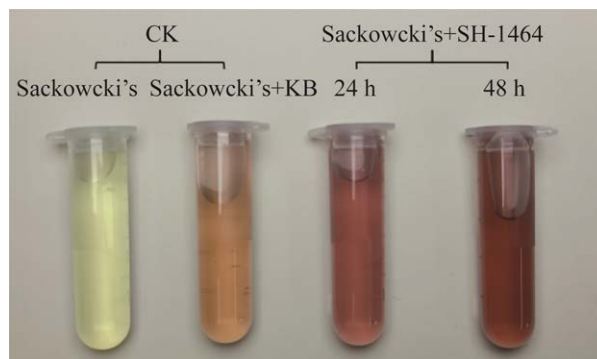


图 2 菌株 SH-1464 分泌生长素活性测定

Figure 2 Determination of IAA activity of strain SH-1464.

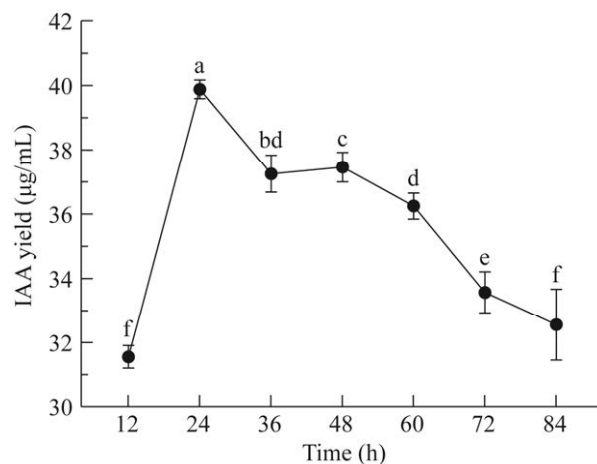


图 3 菌株 SH-1464 在不同发酵时间生长素产量测定 不同小写字母表示菌株不同发酵时间 IAA 产量具有显著差异($P<0.05$)

Figure 3 The IAA yield of strain SH-1464 was measured at different fermentation times. Different lowercase letters indicated significant difference in IAA yield at different fermentation times ($P<0.05$).

SH-1464 溶磷条件优化, 以葡萄糖为碳源, 菌株 SH-1464 的溶磷能力最强, 溶磷量为 175 mg/L (图 4A); 以蛋白胨(peptone)为氮源时溶磷量最高, 达 174.68 mg/L (图 4B); 此外, 发酵条件对菌株溶磷能力也具有一定的影响, 基于上述结果优化发酵条件, 当 pH 为 7.5 时, 菌株 SH-1464 的溶磷量达为 197 mg/L (图 4C); 当发酵温度为 30 °C 时, 溶磷量达 198.5 mg/L (图 4D); 当转速为 220 r/min 时, 溶磷量达 228 mg/L (图 4E)。而且菌株 SH-1464 对不同难溶性磷的溶解能力不同, 以 2.5 g/L 磷酸三钙为磷源时, 溶磷量达 213 mg/L (图 4G、4H)。

以 LB 液体培养基为优化对象进行菌株 SH-1464 产 IAA 条件优化, 以麦芽糖为碳源时 IAA 产量最高, 达 74.06 $\mu\text{g/mL}$ (图 4A); 以豆粕为氮源时(图 4B)菌株的 IAA 产量最高, 达 60.13 $\mu\text{g/mL}$; 此外, 培养条件优化结果表明, pH (图 4C)、温度(图 4D)、转速(图 4E)等对菌株 IAA 产量的增加效果在不同梯度下具有一定的差异, 在初始 pH 值为 6.5 时, IAA 产量为 74.35 $\mu\text{g/mL}$; 转速为 180 r/min 时最高, 为 74.13 $\mu\text{g/mL}$; 发酵温度为 30 °C 时, IAA 产量高于其他培养温度, 为 72.13 $\mu\text{g/mL}$, 以 KCl 为无机盐时(图 4F), IAA 产量达 61.45 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.4 菌株 SH-1464 发酵条件优化前后对比试验结果

基于单因素试验结果, 利用优化所得的最佳发酵配方及发酵条件进行连续 3 批发酵实验对比, 结果如图 5 所示, 优化后菌株溶磷量达到 225.9 mg/L, 相较于优化前提升了 84.5%; 菌株的 IAA 产量达 75.3 $\mu\text{g/mL}$, 相较于优化前提升了 88.8%。综上所述, 发酵优化试验结果可靠, 对菌株的溶磷量及 IAA 产量均具有较强的提高效果。

2.5 菌株对番茄种子发芽的促进作用

将番茄种子进行纸床培养 7 d 结果表明

(图 6, 图 7), 菌株 SH-1464 对番茄种子发芽及其生长具有显著的促进作用, 促生菌 SH-1464 发酵 1 000 倍稀释液对番茄种子萌发的促进作用最强, 萌发率达 84.5%, 而且能促进番茄种子的根长和整株的生长, 菌株发酵稀释液处理下, 其根长较无菌水处理提高了 218.6%, 整株长是无菌水处理的 13.3 倍; 与菌株促生效果相近, IAA 标准品处理下, 种子发芽率达 75.6%, 也可使其根长和整株长显著提高, 分别是无菌水处理的 4.45 倍和 14.4 倍。在促生菌 SH-1464 菌悬液处理下, 种子发芽率仅为 37.8%, 平均根长为 0.65 cm, 与无菌水处理相近, 可能是由于菌体在纸片上缺乏营养, 导致生长受阻的原因。菌株 SH-1464 发酵液对番茄种子促发芽效果强, 对根、芽均具有良好的促生效果, 菌株菌悬液对种子发芽率效果与对照无显著差异, 但其对整株长具有一定的促进效果, 表明菌株悬液对其生长也具有促进作用, 说明菌株发酵液及菌悬液均对番茄种子萌发和生长具有促进作用。

2.6 菌株对番茄幼苗的促生长作用

对菌株 SH-1464 进行番茄幼苗促生长试验, 结果(表 2, 图 8)表明, 接种菌株 SH-1464 的 1 000 倍稀释发酵液可显著促进番茄幼苗的生长, 表现为提高番茄株高、促进主根生长、增加须根数量以及增加地上部鲜重和干重, 菌株发酵液处理下, 与无菌水(CK1)相比番茄株高、茎围、根长、根重、地上部鲜重和地上部干重分别提高了 55.1%、32.5%、16.4%、149.2%、172.2%和 203.6%; 与灭菌 NB 液体培养基(CK2)相比番茄株高、茎围、根长、根重、地上部鲜重和干重分别提高了 16.3%、26.7%、6.5%、15.7%、37.1%和 65.3%, 表明菌株 SH-1464 对番茄具有良好的促生长作用, 可作为高效的促生菌株资源。

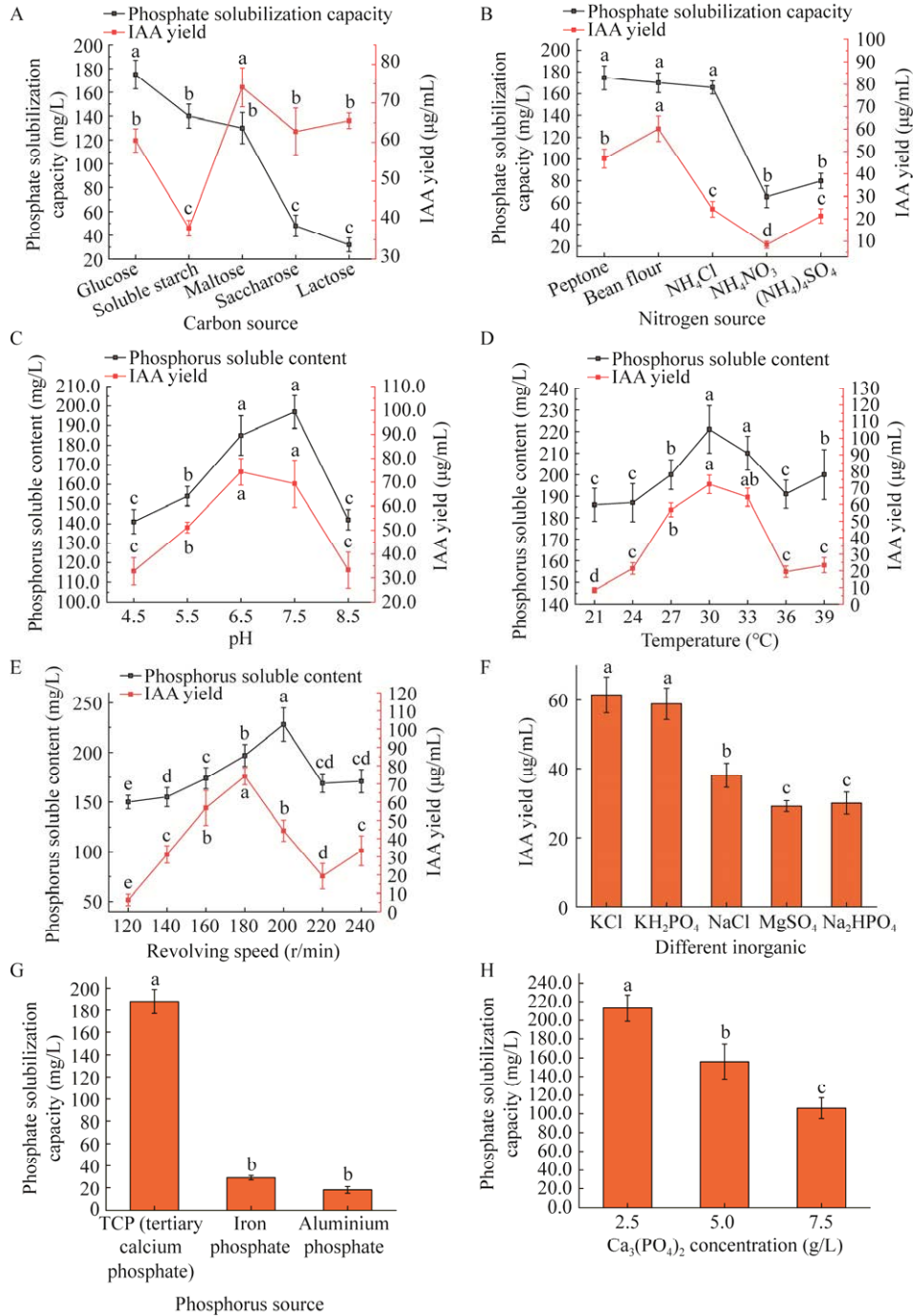


图4 菌株 SH-1464 溶磷能力和分泌 IAA 活性的单因素优化试验结果 A: 碳源. B: 氮源. C: pH. D: 温度. E: 转速. F: 不同无机盐对菌株 SH-1464 IAA 产量的影响. G、H 分别代表菌株 SH-1464 对不同无机磷的溶解能力及其最适添加量. 不同字母表示具显著差异($P<0.05$)

Figure 4 Single factor optimization of phosphorus-solubilizing ability and IAA secretion activity of strain SH-1464. A, B, C, D and E respectively represent the effects of different carbon sources, nitrogen sources, pH, temperature and rotational speed on the phosphorous solubility and IAA yield of strain SH-1464. F represents the effects of different inorganic salts on IAA yield of strain SH-1464. G, H represent the solubility of SH-1464 strain to different inorganic phosphorus and the optimal addition amount. Different letters indicate significant differences ($P<0.05$).

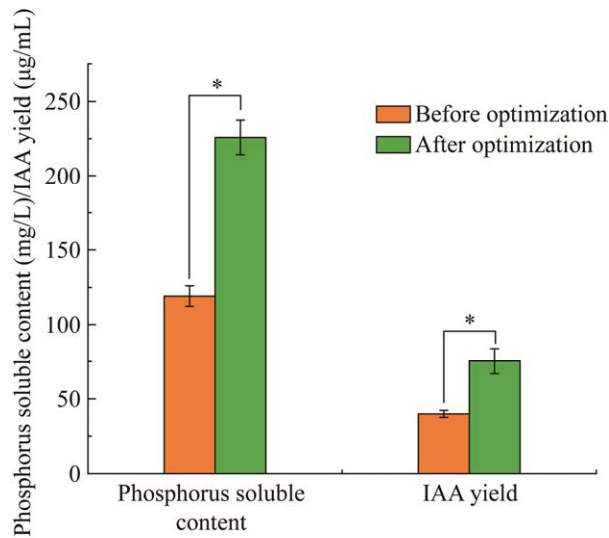


图 5 基于单因素优化结果前后菌株溶磷量及产 IAA 量变化

Figure 5 Changes in phosphorus solubility and IAA production of strains before and after optimization based on single factor. *: $P < 0.05$.

2.7 菌株形态学及生理生化鉴定结果

对解磷活性菌株 SH-1464 进行革兰氏染色、形态学及生理生化鉴定表明(图 9), 菌株 SH-1464 为革兰氏阳性细菌, 菌落形态呈粉白色、扁平状, 接触酶、淀粉水解、硝酸还原反应、吲哚反应、柠檬酸反应、精氨酸双水解、蔗糖发酵反应、葡萄糖发酵反应、固氮作用及明胶反应等均为阳性, MR 反应、解钾作用和尿素酶反应为阴性。

2.8 菌株分子生物学鉴定结果

经NCBI的BLAST分析,SH-1464的16S rRNA 基因序列(GenBank 登录号为 ON417365)与拟蕈状芽孢杆菌 MAOI01000012 相似度为 100%, 利用邻接法构建系统发育树(图 10), 结合形态学、生理生化特征及分子生物学鉴定, 菌株 SH-1464 为拟蕈状芽孢杆菌(*Bacillus paramycoides*), 且

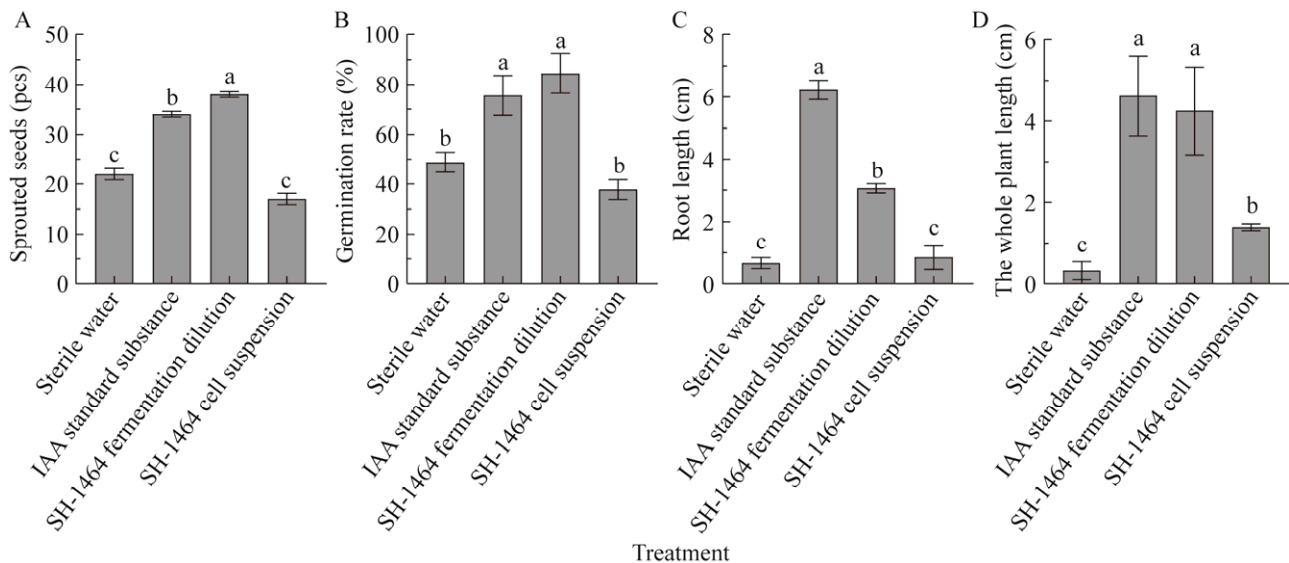


图 6 促生菌 SH-1464 对番茄种子发芽的影响

A: 发芽种子数. B: 发芽率. C: 根长. D: 整株长. 不同小写字母表示不同处理具显著差异($P < 0.05$)

Figure 6 Effects of SH-1464 on tomato seed germination. A: Sprouted seeds. B: Germination rate. C: Root length. D: The whole plant length. Different lowercase letters indicate significant differences between different treatments ($P < 0.05$).

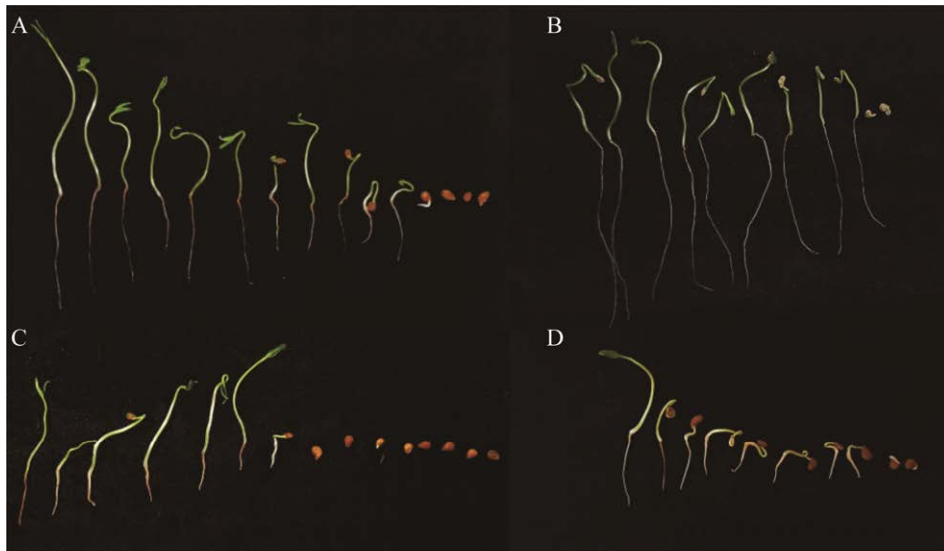


图 7 菌株 SH-1464 对番茄种子萌发的影响 A: SH-1464 发酵稀释液. B: IAA 标准品. C: SH-1464 菌悬液. D: 无菌水

Figure 7 Effect of SH-1464 on tomato seed germination. A: SH-1464 fermentation dilution. B: IAA standard substance. C: SH-1464 cell suspension. D: Sterile water.

表 2 菌株 SH-1464 发酵稀释液对番茄幼苗生长的影响

Table 2 Effect of fermentation dilution of strain SH-1464 on growth of tomato seedlings

处理 Treatment	株高 Height (cm)	茎围 Stem thick (cm)	根长 Root length (cm)	根重 Root weight (g)	地上部分鲜重 Fresh weight of above-ground part (g)	地上部分干重 Dry weight of above-ground part (g)
SH-1464	62.90±0.82a	2.50±0.10a	19.70±0.15a	0.54±0.01a	15.10±0.15a	3.15±0.04a
CK2	54.10±0.70b	1.97±0.03b	18.50±0.15b	0.47±0.02b	10.90±0.18b	1.90±0.02b
CK1	40.60±1.15c	1.89±0.02b	16.90±0.10c	0.22±0.01c	5.53±0.08c	1.04±0.02c

数据为平均值±标准差, 不同字母表示不同菌株之间具有显著差异($P<0.05$)

The data is the mean±standard. Different letters indicate significant differences between different strains ($P<0.05$).

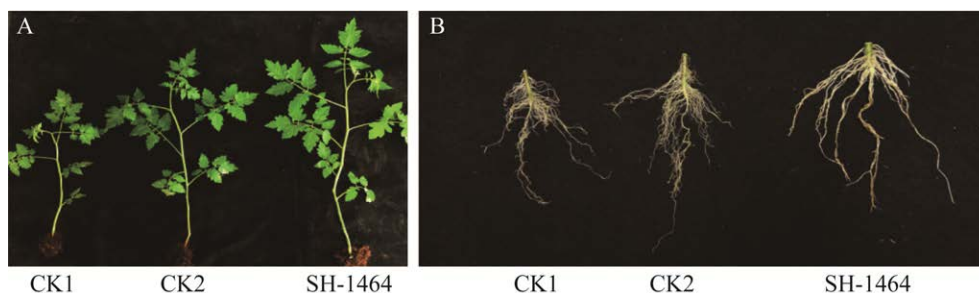


图 8 菌株 SH-1464 对番茄生长的影响 A: 番茄植株地上部分. B: 番茄植株地下部分

Figure 8 Effect of strain SH-1464 on tomato growth. A: The above-ground part of the tomato plant. B: The underground part of the tomato plant.

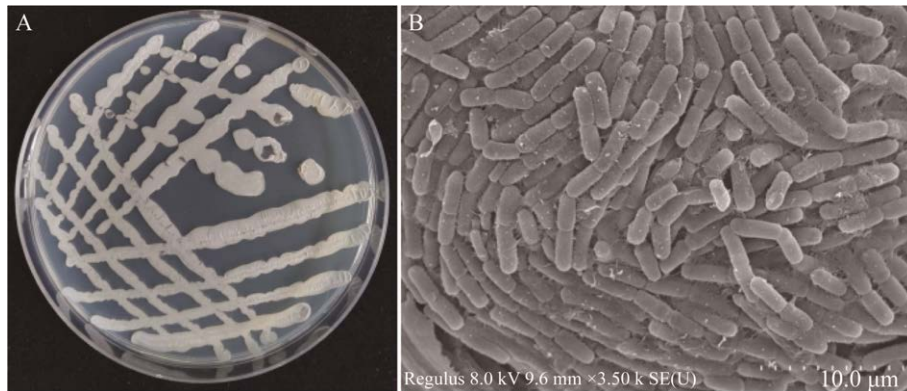


图 9 功能菌株 SH-1464 菌落形态及扫描电镜图 A: 菌株 SH-1464 菌落形态图. B: 菌株 SH-1464 扫描电镜图

Figure 9 Colony morphology and SEM photograph of functional strain SH-1464. A: Colony morphology of strain SH-1464. B: Scanning electron microscope image of strain SH-1464.

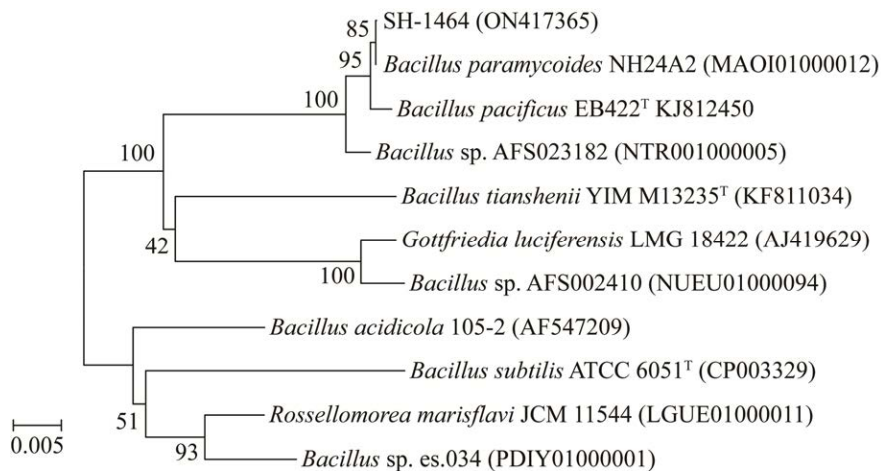


图 10 菌株 SH-1464 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号内序号为菌株的 GenBank 登录号; 上标“T”表明为模式菌株; 分支数字表示 bootstrap 支持率; 标尺所示长度为 0.005 核苷酸置换率
 Figure 10 Phylogenetic tree of strain SH-1464 based on 16S rRNA gene sequence. The serial number in parentheses is the GenBank accession number of the strain; The superscript “T” indicates the type strain; The branch number indicates the bootstrap support rate; The length indicated by the scale is 0.005 nucleotide substitution rate.

菌株已于 2022 年 6 月 20 日保存于中国典型培养物保藏中心, 保藏号为 CCTCC M 2022924。

2.9 菌株 SH-1464 体外产酶、解钾、固氮及产铁载体能力

通过底物降解法测定发现菌株 SH-1464 具有分泌蛋白酶、纤维素酶、固氮以及产铁载体的

能力, 不具备分泌果胶酶、解钾的能力(图 11)。

3 讨论与结论

在可持续发展和生态文明建设的背景下, 生物肥料产业得以快速发展, 但其种类和数量远少于化学肥料, 总体上呈现出市场需求较

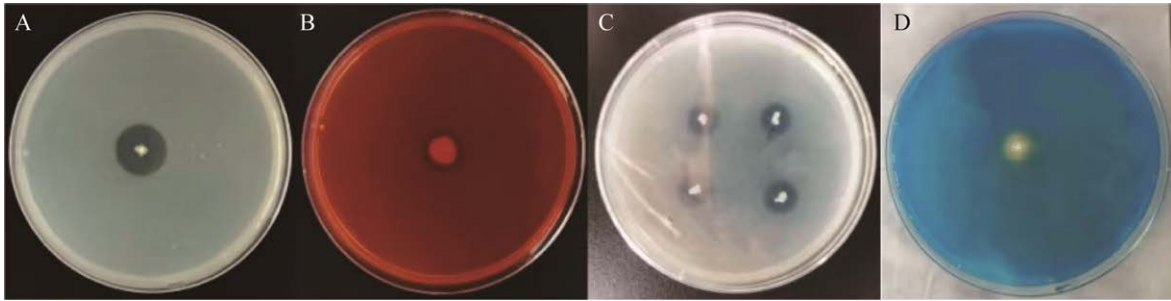


图 11 菌株 SH-1464 功能测定结果 A: 蛋白酶. B: 纤维素酶. C: 固氮. D: 产铁载体

Figure 11 Results of functional determination of strain SH-1464. A: Protease. B: Cellulase. C: Nitrogen fixation. D: Excreting siderophore.

大但品种较少的现象^[15]。土壤是天然的微生物菌种资源库, 其中广泛存在功能多样化的有益微生物^[16]。目前, 从不同的植物根际土壤所筛选的 PGPR 种类繁多, 应用在农业生产中的 PGPR 主要包括芽孢杆菌属(*Bacillus*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)、青霉(*Penicillium*)等^[2], 此类微生物肥料兼具经济和环保的特点, 可替代部分化肥施用, 起到增加作物产量和提高品质的作用, 是农业可持续发展中减施化学肥料的有效补充^[17]。

目前的研究中, 多数 PGPR 分离自作物根际土壤、植物组织内部或海洋湖泊等水体, 具有来源广泛、适应能力强等特点, 其大多具有固氮、溶磷、解钾、产铁载体、产 IAA 能力等多样化的功能。分离自番茄根际土壤和岷山红三叶根际的高效溶磷菌, 分别具有溶磷、分泌生长素的功能, 对病原物也具有一定的抑制活性, 对作物的产量和品质均有显著的影响^[18-19]。菌株 PGPR LZT-5 和 FQG-5 分别属于不动杆菌属(*Acinetobacter*)和嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*), 对土壤理化指标、营养物质含量、作物农艺性状、产量等均具有良好的促进效果^[20]。吴慧丽等^[21]于镉污染地区的植物根际土壤分离得到 30 株耐镉细菌, 其中两株具有高产 IAA 活性、溶磷活性,

以及产 1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)脱氨酶和铁载体活性, 在促进作物生长的同时, 也促进植物对镉的吸收并促进土壤镉有效化。马聪毓等^[22]使用黄芪根系和根际土壤, 分离所得 76 株兼具固氮酶活性、溶磷及分泌 IAA 能力的 PGPR, 为研制生物菌肥提供优良菌种。高亚慧等^[23]从海洋样品中分离得到一株橙色微杆菌(*Microbacterium aurantiacum*), 其具有较强的溶有机/无机磷活性、固氮活性及产 IAA 活性, 对作物的农艺性状具有显著的促进作用。

菌株生物量及次生代谢物分泌量与培养条件密切相关, 不同培养条件对其具有一定的影响。进行发酵条件优化是提高菌株生物量以及增加次生代谢物分泌量的有效途径。前人研究表明, 菌株 HP2 溶磷能力在不同的碳源培养基上具有一定差异, 以单糖(葡萄糖、果糖)和二糖(麦芽糖、蔗糖)作为碳源时, 供试菌的溶磷能力比较强^[24]。牛蒡根际土壤解磷菌 PSM-5, 当初始 pH 3.79、发酵温度 28.46 °C、盐浓度 10.46 g/L 时溶磷量可达 198.28 mg/L^[25]。本文通过对菌株 SH-1464 进行试验探究发现, 在碳源为葡萄糖、氮源为蛋白胨、pH 为 7.5、温度 30 °C、转速 200 r/min 条件下, 菌株的溶磷能力具有显著提升。菌株 n3 在 pH 值分别为 5.0、6.0 时产 IAA 能力最佳, 说明其具有耐酸

能力^[26]。张东艳等^[27]从花生根际土壤中所得的特基拉芽孢杆菌在 pH 8.0 时 IAA 产量最高。本研究中, 菌株 SH-1464 最适 pH 值为 6.5, 这可能是由于菌株长期生存的自然环境不同, 从而导致菌株的生理适应性不同。此外, 氮源是菌株生长必需的物质之一, 菌株满足自身生长代谢所需的营养元素大多来自氮源, 但不同菌株对氮源的偏好性也具有显著差异, Sheng 等^[28]和 Jiang 等^[29]的研究结果表明, 以 NH_4NO_3 作为唯一氮源时, 菌株发酵液酸性过强, 从而导致菌株生物量大幅降低。然而在本研究中, 当选用 NH_4NO_3 作为菌株生长的唯一氮源时, 菌株产 IAA 的活性最强, 但以酵母粉等作为氮源时效果不佳, 说明菌株对无机氮源的适应性较强。

综合以上分析, PGPR 具有物种丰富、促生能力各异、促生方式不同等特点, 大多可通过解磷、溶磷、解钾、固氮等能力调整土壤营养组成与结构, 提高土壤养分的有效性; 也可定殖于植物根际或植物内部, 通过分泌生长素等形式促进植物生长, 提高植株的农艺性状及抗逆性, 同时植株根系的生长会影响根际土壤微生物的生物量和生物活性, 进而达到相互促进的效果。本研究筛选所得拟蕈状芽孢杆菌 (*Paramycooides*) SH-1464 具有较强的溶磷能力以及具有高产 IAA 活性, 对其进行发酵条件优化后菌株的溶磷量提高至 225.9 mg/L, IAA 产量提高至 75.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 可显著提高番茄种子的发芽率, 提高番茄幼苗的株高、茎围、根长、根重、地上部分鲜重和干重等农艺性状; 同时具有固氮、分泌蛋白酶、纤维素酶、铁载体等多种活性, 可在生物肥料方面作为优良的菌种资源, 具有极大的开发潜力。但其在土壤或植株内部的定殖能力还有待探讨, 今后可进一步结合荧光定量检测技术等措施, 探究菌株的定

殖能力以及作用机制, 为菌株的进一步开发及其推广应用提供理论依据。

REFERENCES

- [1] 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).
- [2] BASU A, PRASAD P, DAS SN, KALAM S, SAYYED RZ, REDDY MS, EL ENSHASY H. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: recent developments, constraints, and prospects[J]. Sustainability, 2021, 13(3): 1140.
- [3] 江美彦, 周杨, 刘仁浪, 姚菲, 杨云舒, 侯凯, 冯冬菊, 吴卫. 白芷根际促生菌的筛选及其促生效果研究[J]. 生物技术通报, 2022, 38(8): 167-178.
JIANG MY, ZHOU Y, LIU RL, YAO F, YANG YS, HOU K, FENG DJ, WU W. Screening and plant growth promoting of grow-promoting bacteria in rhizosphere bacteria of *Angelica dahurica* var. *Formosana*[J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(8): 167-178 (in Chinese).
- [4] 吴志美, 兰明先, 高熹, 李梦月, 袁远, 郭子俊, 殷兴华, 吴国星. 除草活性成团泛菌 ZLSY20 菌株发酵条件的优化[J]. 南方农业学报, 2019, 50(9): 1990-1997.
WU ZM, LAN MX, GAO X, LI MY, YUAN Y, GUO ZJ, YIN XH, WU GX. Screening of fermentation conditions for herbicidal activity of *Pantoea agglomerans* strain ZLSY20[J]. Journal of Southern Agriculture, 2019, 50(9): 1990-1997 (in Chinese).
- [5] 张红岩, 张妮, 杨梦莹, 刘聪, 杨立芳, 申乃坤, 姜明国. 拟蕈状芽孢杆菌 Gxun-30 产角蛋白酶液体发酵条件优化[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(4): 136-143.
ZHANG HY, ZHANG N, YANG MY, LIU C, YANG LF, SHEN NK, JIANG MG. Optimization of liquid fermentation conditions of keratinase produced by *Bacillus paramycooides* Gxun-30[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(4): 136-143 (in Chinese).
- [6] PANDEY S, GUPTA S. Diversity analysis of ACC deaminase producing bacteria associated with rhizosphere of coconut tree (*Cocos nucifera* L.) grown

- in Lakshadweep Islands of India and their ability to promote plant growth under saline conditions[J]. *Journal of Biotechnology*, 2020, 324: 183-197.
- [7] 张妙宜, 高祝芬, 唐文, 赵炎坤, 李凯, 王尉, 谢江辉, 张锡炎, 黄绵佳. 促生细菌 *Bacillus* sp. QN₂MO-1 的鉴定及对番茄生长的影响[J]. *热带作物学报*, 2020, 41(12): 2474-2481.
- ZHANG MY, GAO ZF, TANG W, ZHAO YK, LI K, WANG W, XIE JH, ZHANG XY, HUANG MJ. Identification of probiotic bacterium *Bacillus* sp. QN₂MO-1 and its effect on tomato growth[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2020, 41(12): 2474-2481 (in Chinese).
- [8] 庄馥璐, 柴小粉, 高蓓蓓, 王忆. 苹果根际解磷菌的分离筛选及解磷能力[J]. *中国农业大学学报*, 2020, 25(7): 69-79.
- ZHUANG FL, CHAI XF, GAO BB, WANG Y. Isolation and screening of phosphorus-solubilizing bacteria in apple rhizosphere[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2020, 25(7): 69-79 (in Chinese).
- [9] 杨华, 胡展, 郭照辉, 肖蓉, 罗容珺, 付祖姣, 魏小武, 蔡长平, 王玉双. 水稻促生菌的筛选、鉴定及其促生效果[J]. *微生物学通报*, 2022, 49(6): 2088-2099.
- YANG H, HU Z, GUO ZH, XIAO R, LUO RJ, FU ZJ, WEI XW, CAI CP, WANG YS. Screening and identification of rice growth-promoting strains and their effects on rice growth[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(6): 2088-2099 (in Chinese).
- [10] BHATTACHARYYA PN, JHA DK. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, 28(4): 1327-1350.
- [11] 何翔, 张庆, 李楚, 番华彩, 李铭刚, 徐胜涛, 陈齐斌, 杨明英, 杨佩文. 具铁载体活性病原细菌的筛选及铁摄取干预对其生长影响[J]. *植物保护*, 2020, 46(3): 85-93.
- HE X, ZHANG Q, LI C, FAN HC, LI MG, XU ST, CHEN QB, YANG MY, YANG PW. Screening of the pathogenic bacteria with siderophore-producing activity and the effect of intervention in iron uptake on its growth[J]. *Plant Protection*, 2020, 46(3): 85-93 (in Chinese).
- [12] PRASHANTH S, MATHIVANAN N. Growth promotion of groundnut by IAA producing rhizobacteria *Bacillus licheniformis* MML2501[J]. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 2010, 43(2): 191-208.
- [13] BUCHANAN RE, GIBBONS NE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所, 译. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984.
- BUCHANAN RE, GIBBONS NE. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*[M]. 8th ed. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, trans. Beijing: Science Press, 1984 (in Chinese).
- [14] 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).
- [15] 周璇, 沈欣, 辛景树. 我国微生物肥料行业发展状况[J]. *中国土壤与肥料*, 2020(6): 293-298.
- ZHOU X, SHEN X, XIN JS. Review on development of the microbial fertilizer industry in China[J]. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2020(6): 293-298 (in Chinese).
- [16] 朱永官, 彭静静, 韦中, 沈其荣, 张福锁. 土壤微生物组与土壤健康[J]. *中国科学: 生命科学*, 2021, 51(1): 1-11.
- ZHU YG, PENG JJ, WEI Z, SHEN QR, ZHANG FS. Linking the soil microbiome to soil health[J]. *Scientia Sinica (Vitae)*, 2021, 51(1): 1-11 (in Chinese).
- [17] 李俊, 姜昕, 马鸣超, 关大伟, 曹凤明, 李力. 我国微生物肥料产业需求与技术创新[J]. *中国土壤与肥料*, 2019(2): 1-5.
- LI J, JIANG X, MA MC, GUAN DW, CAO FM, LI L. Development demand and technical innovation for bio-fertilizer industry in China[J]. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2019(2): 1-5 (in Chinese).
- [18] VASSEUR-CORONADO M, BOULOIS HDD, PERTOT I, PUOPOLO G. Selection of plant growth promoting rhizobacteria sharing suitable features to be commercially developed as biostimulant products[J]. *Microbiological Research*, 2021, 245: 126672.
- [19] 荣良燕, 姚拓, 马文彬, 李德明, 李儒仁, 张洁, 陆飒. 岷山红三叶根际优良促生菌对其宿主生长和品质的影响[J]. *草业学报*, 2014, 23(5): 231-240.
- RONG LY, YAO T, MA WB, LI DM, LI RR, ZHANG J, LU S. The inoculant potential of plant growth promoting rhizobacteria strains to improve the yield and quality of *Trifolium pratense* cv. Minshan[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2014, 23(5): 231-240 (in Chinese).
- [20] 贺字典, 高玉峰, 王燕, 李翠霞, 高歆瑶, 张志浩. 植物根际促生菌(PGPR)解磷菌的筛选及其对番茄促生作用的研究[J]. *西南农业学报*, 2020, 33(12):

- 2891-2896.
- HE ZD, GAO YF, WANG Y, LI CX, GAO XY, ZHANG ZH. Study on phosphate-solubilizing strain selection of plant growth promoting rhizobacteria and its effect on tomato growth promotion[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2020, 33(12): 2891-2896 (in Chinese).
- [21] 吴慧丽, 田薇, 纪燕玲, 娄来清, 蔡庆生. 促进镉吸收积累的植物根际促生菌的筛选及其对一年生黑麦草的影响[J]. 草业学报, 2021, 30(7): 53-61.
- WU HL, TIAN W, JI YL, LOU LQ, CAI QS. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria that promote cadmium absorption and accumulation and their effects on annual ryegrass[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2021, 30(7): 53-61 (in Chinese).
- [22] 马骢毓, 张英, 马文彬, 李建宏, 姚拓. 黄芪根际促生菌(PGPR)筛选与特性研究[J]. 草业学报, 2017, 26(1): 149-159.
- MA CY, ZHANG Y, MA WB, LI JH, YAO T. Identification of plant growth promoting rhizobacteria *Astragalus membranaceus* and their effectiveness[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2017, 26(1): 149-159 (in Chinese).
- [23] 高亚慧, 姜明国, 丰景, 周桂. 产生促生挥发性物质的潜在 PGPR 菌株筛选及其促生特性研究[J]. 生物技术通报, 2022, 38(3): 103-112.
- GAO YH, JIANG MG, FENG J, ZHOU G. Screening of potential PGPR strains producing growth-promoting volatile compounds and study on their growth-promoting characteristics[J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(3): 103-112 (in Chinese).
- [24] 康贻军, 胡健, 单君, 何芳, 朴哲, 殷士学. 两株解磷真菌的解磷能力及其解磷机理的初步研究[J]. 微生物学通报, 2006(5): 22-27.
- KANG YJ, HU J, SHAN J, HE F, PIAO Z, YIN SX. Solubilization capacity of insoluble phosphates and its mechanism by two phosphate solubilizing fungi (PSF)[J]. Microbiology, 2006(5): 22-27 (in Chinese).
- [25] 孙科, 耿凤英, 于秋菊, 王锋. 牛蒡根际土壤中解磷菌筛选、鉴定及解磷条件优化[J]. 中国蔬菜, 2021(1): 66-72.
- SUN K, GENG FY, YU QJ, WANG F. Screening and identification of phosphate-solubilizing microorganism (PSM) in burdock rhizosphere soil and optimization of phosphate-solubilizing conditions[J]. China Vegetables, 2021(1): 66-72 (in Chinese).
- [26] 吴婧, 聂彩娥, 朱媛媛, 黄薇, 马超, 姜瑛, 朱林, 郜红建. 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).
- [27] 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).
- [28] SHENG P, HUANG SW, WANG Q, WANG AL, ZHANG HY. Isolation, screening, and optimization of the fermentation conditions of highly cellulolytic bacteria from the hindgut of *Holotrichia parallela* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae)[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 167(2): 270-284.
- [29] JIANG Y, LI PP, WU Y, LIU Y, WANG Q, HAN YL. A new isolated indole-3-acetic acid producing rhizobacteria *Bacillus muralis* HS4 from sandy soil: characterization and growth enhancement on peanuts[J]. Journal of Computational and Theoretical Nanoscience, 2016, 13(8): 5171-5177.