

低温耐盐碱解磷菌的筛选及其作用分析

葛紫怡, 王思宇, 苏旭, 甘诗韵, 蒋欣桐, 黄玉威, 孟军*

沈阳农业大学 国家生物炭研究院, 农业农村部生物炭与土壤改良重点实验室, 辽宁 沈阳

葛紫怡, 王思宇, 苏旭, 甘诗韵, 蒋欣桐, 黄玉威, 孟军. 低温耐盐碱解磷菌的筛选及其作用分析[J]. 微生物学报, 2025, 65(12): 5573-5589.

GE Ziyi, WANG Siyu, SU Xu, GAN Shiyun, JIANG Xintong, HUANG Yuwei, MENG Jun. Isolation and function analysis of phosphate-solubilizing bacteria with psychrotolerance and saline-alkaline tolerance[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(12): 5573-5589.

摘要:【目的】针对寒区盐碱土壤磷素有效性受限这一生态瓶颈问题, 分离兼具低温适应性与盐碱抗逆性的功能型解磷细菌, 评估其解磷性能及环境适应性, 并初步探究其解磷机制。【方法】以吉林省白城市的盐碱土壤为研究材料, 采用无机磷选择性培养基进行细菌分离。利用钼锑抗比色法定量测定细菌的解磷能力, 通过形态学观察及 16S rRNA 基因系统发育树构建完成细菌的分类鉴定。运用多参数梯度优化实验确定最佳解磷条件。进一步采用 HPLC 定量分析有机酸代谢谱, 结合结晶紫染色法及苯酚-硫酸法表征生物膜形成能力及胞外多糖(extracellular polysaccharide, EPS)组分。【结果】成功筛选得到的一株嗜冷假单胞菌(*Pseudomonas psychrophila*) MPP2402, 该菌表现出广泛的环境适应性, 可在温度 5–30 °C、pH 7.0–10.0、NaCl 0.2–0.8 mol/L 的条件下稳定增殖。经参数优化, 其最佳解磷条件为温度 15 °C、初始 pH 7.0、NaCl 0.4 mol/L、接种量 1%、Ca₃(PO₄)₂ 添加量 5 g/L, 此时可溶性磷含量高达 574.66 mg/L, 较基础培养条件提高 14.8%。MPP2402 的解磷作用可能是通过分泌琥珀酸(51.53 μg/mL)、草酸(22.84 μg/mL)、酒石酸(15.11 μg/mL)和苹果酸(5.93 μg/mL)等有机酸协同发挥磷酸盐溶解功能, 并利用 EPS 构建生物膜屏障和调节活菌数量以抵御低温、盐碱等不良环境。【结论】细菌 MPP2402 的分离为高效耐盐碱菌种资源挖掘和冷凉地区土壤养分改良奠定了前期基础。

关键词: 解磷菌; 低温; 盐碱; 有机酸; 生物膜

资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-01-51); 辽宁省科技计划(2024JH2/102400001)

This work was supported by the National Modern Agricultural Industrial Technology System (CARS-01-51) and the Liaoning Provincial Science and Technology Program (2024JH2/102400001).

*Corresponding author. E-mail: mengjun1217@syau.edu.cn

Received: 2025-06-04; Accepted: 2025-07-11; Published online: 2025-08-05

Isolation and function analysis of phosphate-solubilizing bacteria with psychrotolerance and saline-alkaline tolerance

GE Ziyi, WANG Siyu, SU Xu, GAN Shiyun, JIANG Xintong, HUANG Yuwei, MENG Jun*

Key Laboratory of Biochar and Soil Improvement, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Institute of Biochar, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning, China

Abstract: [Objective] To isolate multifunctional phosphate-solubilizing bacteria (PSB) exhibiting psychrophilic adaptation and saline-alkaline tolerance in response to the ecological challenge of phosphorus limitation in saline-alkaline soils in cold regions, evaluate their phosphate-solubilizing efficiency and environmental adaptability, and preliminarily investigate their phosphate-solubilizing mechanisms. [Methods] We used an inorganic phosphorus-selective medium to isolate bacterial strains from saline-alkaline soils in Baicheng, Jilin Province. The phosphate-solubilizing capacity was quantitatively determined through the molybdenum-antimony colorimetric method. Taxonomic identification was performed through morphological characterization and phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences. The phosphate solubilization conditions were optimized *via* multi-parameter gradient optimization. HPLC was employed to quantify organic acid metabolites. Phenol-sulfuric acid assay and crystal violet staining were employed to characterize biofilm formation and extracellular polysaccharide (EPS) synthesis. [Results] The isolated strain *Pseudomonas psychrophila* MPP2402 demonstrated broad-spectrum environmental adaptability, maintaining stable growth at 5–30 °C, pH 7.0–10.0, and 0.2–0.8 mol/L NaCl. The strain achieved 574.66 mg/L soluble phosphorus (14.8% increase) under optimal conditions: 15 °C, pH 7.0, 0.4 mol/L NaCl, 1% inoculum density, and 5 g/L Ca₃(PO₄)₂. MPP2402 may exert the phosphate-solubilizing effect through the secretion of organic acids such as succinic acid (51.53 µg/mL), oxalic acid (22.84 µg/mL), tartaric acid (15.11 µg/mL), and malic acid (5.93 µg/mL), which worked in concert to solubilize phosphate. Additionally, the strain utilized EPS to construct a biofilm barrier and regulated the viable count in adverse environments such as low-temperature and saline-alkaline conditions. [Conclusion] The successful isolation of MPP2402 establishes a foundational resource for developing efficient saline-alkaline tolerant microbial agents and improving soil nutrient management in cold-region ecosystems.

Keywords: phosphate-solubilizing bacteria; low temperature; saline-alkaline; organic acids; biofilm

磷是植物生长发育所必需的大量元素之一，在细胞能量交换和生物合成过程中起着关键作用^[1]。与其他大量营养元素相比，磷元素具有较高的固相亲和性，易与土壤中的Ca、Fe、Al等金属元素结合形成难溶性磷酸盐^[2]。因此，提高土壤磷素利用效率对于维持农业生产力和稳定

生态系统均具有重要的实际意义。

在土壤-植物-微生物循环中，解磷菌能够将难溶性磷酸盐转化为植物可直接利用的形态，是实现土壤磷素形态转化和利用的有效工具^[3]。这类功能细菌主要通过分泌有机酸(如琥珀酸、苹果酸等)降低土壤或微环境中的pH值，促使

PO_4^{3-} 转化为 HPO_4^{2-} 和 H_2PO_4^- , 从而显著提高有效磷含量^[4]。此外, 研究表明苹果酸、酒石酸等有机酸能够调节编码细胞运动及代谢相关蛋白的基因表达, 促进生物膜的形成^[5]。在胁迫条件下, 这种调节作用能够增加胞外多糖 (extracellular polysaccharide, EPS) 等关键代谢产物的生成, 这些代谢产物通过与金属离子形成络合物, 也可能成为微生物解磷的有效途径^[6]。

在农业领域, 自 1903 年 Stalstrom^[7] 首次从土壤中分离出解磷菌后, 国内外学者陆续开展了大量相关研究。目前, 已有芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、青霉菌属 (*Penicillium*) 等 20 多个菌属被陆续发现^[8], 且在试验培养条件及水稻 (*Oryza sativa* L.)、玉米 (*Zea mays* L.)、大豆 [*Glycine max* (Linn.) Merr.] 等作物栽培实际应用中均显示出较高的解磷能力^[9-13]。大量研究表明, 土壤中解磷菌分布广泛, 其对难溶磷的转化主要受温度、土壤 pH、盐度等因素影响^[14-17]。其中, 低温可能会提高细菌死亡率或诱导细菌进入休眠状态。当温度条件改善时, 休眠的细菌可能恢复活性, 但这一过程取决于剩余活跃种群的状态和数量^[15]。土壤中的盐碱胁迫会使磷素被盐基离子吸附, 以无效态形式存在于高 pH 土壤中, 从而影响细菌的生存和代谢活动, 限制了磷的形态转化和可用性^[18-19]。以往研究主要从不同生态地区筛选解磷细菌, 研究其解磷特性^[3,9,20]。对低温、耐盐碱解磷细菌的研究还相对薄弱, 这制约着对冷凉盐碱地区土壤改良及细菌胁迫适应研究的认识。

本研究于冬季从世界三大苏打盐碱地集中分布区之一的吉林省白城市地区 (122°E, 45°N) 采集盐碱土壤样品, 分离筛选出一株兼具低温适应性与盐碱抗逆性的功能型解磷细菌。利用无机磷选择培养基在不同温度下对其解磷能力进行定性和定量测定, 结合形态学观察及 16S rRNA 基因序列分析方法开展菌种鉴定。探究温度、pH、NaCl、接种量及 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 添加量等

因素对所筛选菌种解磷效果的影响, 确定其发挥最佳解磷能力的环境参数组合。进一步从有机酸-生物膜-EPS 等方面分析该菌种的解磷作用, 以期改善冷凉盐碱土壤养分状况、促进磷素的转化和利用效率提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

土壤样品于 2023 年 11 月采集自吉林省白城市盐碱地 (土壤的理化性质见表 1)。采用随机五点取样法在 0-20 cm 表层土壤剖面取样^[21]。样品置于无菌袋中, 在冷藏条件下带回实验室, 置于 4 °C 冰箱保藏, 供后续研究。

1.2 培养基

LB 培养基 (g/L): 胰蛋白胨 10.0, NaCl 10.0, 酵母提取物 5.0, 琼脂 18.0-20.0 (液体培养基不加), pH 7.0-7.2, 121 °C 灭菌 20 min。

无机磷培养基 (g/L): 葡萄糖 10.0, NaCl 0.3, KCl 0.3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.03, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5.0, 琼脂 18.0-20.0 (液体培养基不加), pH 7.0-7.5, 115 °C 灭菌 30 min。

1.3 解磷菌的分离及鉴定

取 10 g 土壤置于 90 mL LB 培养液中, 30 °C、180 r/min 培养 3 d; 以 5% 接种量转接至

表1 土壤基本理化性质

Table 1 Basic physical and chemical properties of soil

项目 Items	含量 Content
全磷 Total phosphorus (g/kg)	0.30±0.05
速效磷 Available phosphorus (mg/kg)	9.83±0.21
全钾 Total potassium (g/kg)	19.73±2.27
速效钾 Available potassium (mg/kg)	208.00±1.00
全氮 Total nitrogen (g/kg)	0.37±0.02
全碳 Total carbon (g/kg)	5.01±0.20
pH	9.80±0.16
EC (μS/cm)	1 105.33±28.86

LB 培养液中, 在相同条件下再次培养 3 d。随后, 将温度分别降低至 15 °C 和 5 °C, 重复上述操作。将目标菌液逐步稀释至 10^{-3} - 10^{-8} 后, 各取 0.1 mL 均匀涂布于无机磷固体培养基, 于 30 °C 倒置培养 3-7 d。

对长势较好的单菌落进行定性分析, 测量菌落直径(d)和透明圈直径(D), 计算溶磷指数(D/d), 初步判断细菌的解磷能力^[11]。

将初步筛选的细菌接种于无机磷培养液中, 分别在温度为 5、15、30 °C、转速 180 r/min 的条件下振荡培养 7 d 进行复筛, 每天取 1 mL 培养液于离心管中, 4 000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 采用钼锑抗比色法测定可溶性磷含量^[22]。以未接种解磷菌的无机磷培养液作为空白对照(CK), 每个处理设置 3 次重复。

对解磷细菌进行形态特征和生理生化鉴定, 并采用 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取 DNA, 进行分子生物学鉴定^[23]。将获得的 16S rRNA 序列输入 GenBank 数据库, 用 BLAST 程序与数据库中的序列进行比对, 通过 MEGA 7.0 软件构建系统发育树。

1.4 细菌耐受性单因素条件优化

以初始接种量 5%、初始 pH 7.2 为基准条件, 依次考察温度(5、10、15、20 °C)、pH(7.0、8.0、9.0、10.0)、NaCl(0.2、0.4、0.6、0.8 mol/L)、接种量(1%、3%、5%、7%)以及 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 添加量(2.5、5、7.5、10 g/L)对培养液中解磷能力、pH、活菌数的影响。所有试验参数的调整均基于前一变量已获得最优培养液的基础上进行, 并以未接种解磷菌的无机磷培养液作为空白对照(CK), 每个处理设置 3 次重复。

1.5 有机酸含量的测定

取 1.4 节研究得到的最优结果对应的培养液, 于 4 °C、4 000 r/min 离心 20 min 后取上清液, 并过 0.22 μm 滤膜。利用高效液相色谱法(HPLC)测定滤液中有机酸(草酸、苹果酸、酒石

酸、柠檬酸和琥珀酸)的含量^[24]。高效液相色谱柱: C18 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm); 流动相 A: 20 mmol/L 磷酸氢二钠用磷酸(调 pH 至 2.6): 甲醇=99:1; 流动相 B: 甲醇; 紫外检测波长: 210 nm; 进样量: 10 μL ; 柱温: 30 °C; 流速: 0.7 mL/min。

1.6 生物膜形成量和胞外多糖(EPS)成分分析

取 20 μL 培养液和 180 μL 无机磷培养基加入 96 孔板中培养 24 h 后, 用 200 μL 无菌 PBS 缓冲液清洗板孔 3 次, 然后在室温下用 200 μL 的 0.1% 结晶紫染色 20 min。随后再次用 200 μL 无菌 PBS 缓冲液清洗板孔 3 次, 并将孔板置于 200 μL 95% 乙醇溶液中孵育 20 min 以溶解结晶紫, 用酶标仪在 595 nm 处检测吸光度, 从而获得生物膜形成量^[25]。

将 MPP2402 发酵液 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min 收集上清液, 加入 3 倍体积无水乙醇并混合均匀, 4 °C 静置 24 h 使 EPS 析出后, 再次离心后弃去上清, 保留沉淀并烘干备用^[26]。采用苯酚-硫酸法和 Bradford 法分别测定多糖和蛋白质的含量^[27]。

1.7 数据处理

使用 SPSS 27 对试验数据进行正态性和方差齐性检验, 根据检验结果进行单因素 ANOVA 和非参数检验的显著性分析, 并使用 Origin Pro 2021 作图, 数据用平均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示。

2 结果与分析

2.1 解磷菌的分离、筛选及鉴定

2.1.1 解磷菌形态学和生化鉴定结果

利用无机磷培养基对吉林白城盐碱地区土壤中的解磷菌进行筛选, 通过观察菌落周围是否形成清晰透明圈进行初步筛选, 透明圈的形成表明细菌具有解磷能力。经过 3 轮透明圈法

筛选, 选取溶磷指数(D/d) ≥ 1.5 的细菌作为候选菌进行纯化培养。其中, MPP2402 的 D/d 值为 1.75 ± 0.07 , 表现出较强的解磷能力。MPP2402 在 LB 固体培养基上的菌落呈黄色, 表面光滑隆起, 边缘整齐, 不透明。经染色分析, 鉴定为革兰氏阴性杆菌, 无芽孢(图 1)。其生理生化测定结果如表 2 所示。

2.1.2 解磷能力测定

MPP2402 经不同梯度恒温培养(7 d)显示(图 2), 其不仅能在 $5\text{--}30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的宽温域范围内保持正常生长代谢, 且表现出显著的无机磷溶解动态特性。此外, 可溶性磷浓度在培养初期(0–3 d)呈增长趋势, 随后进入稳定期(3–7 d)浓度呈下降趋势。值得注意的是, $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时 MPP2402

在第 3 天达到峰值(500.62 mg/L), 显著高于 $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (374.82 mg/L)、 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (362.47 mg/L)。这种非对称温度响应模式表明, MPP2402 具有最适解磷温度向低温区偏移的特征。

2.1.3 16S rRNA 基因鉴定

基于 16S rRNA 基因序列分析, 菌株 MPP2402 (GenBank 登录号为 PV664474)与嗜冷假单胞菌(*Pseudomonas psychrophila*)的相似性高达 99.93% (图 3)。进一步通过形态与生理生化特征比较发现: MPP2402 与同属模式菌株——恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)^[28]、维罗纳假单胞菌(*Pseudomonas veronii*)^[29]和莫尔氏假单胞菌(*Pseudomonas umsongensis*)^[30]共享革兰氏阴性杆菌形态、葡萄糖利用能力阳性、过氧化氢

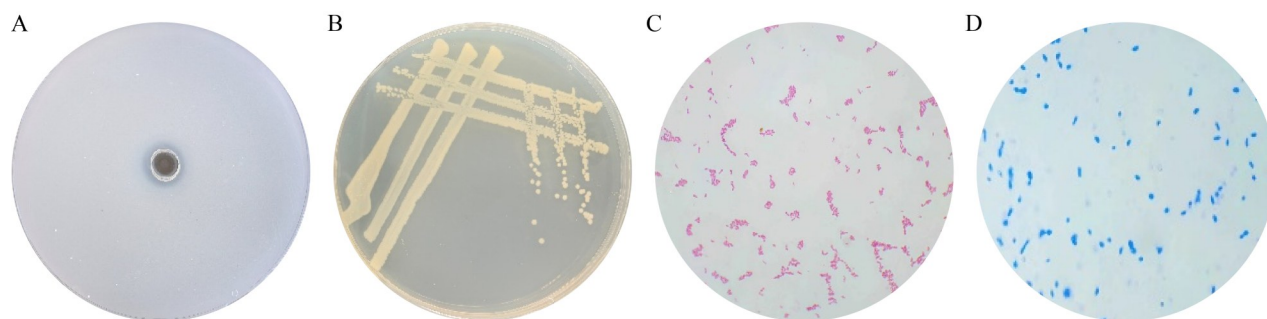


图1 嗜冷假单胞菌MPP2402解磷圈及形态特征。A: 解磷圈; B: 形态特征; C: 革兰氏染色(1 000 \times); D: 芽孢染色(1 000 \times)。

Figure 1 Phosphorus solubilizing circle and morphological characteristics of *Pseudomonas psychrophila* MPP2402. A: Phosphorous solution ring; B: Morphological characteristics; C: Gram staining (1 000 \times); D: Spore staining (1 000 \times).

表2 嗜冷假单胞菌MPP2402生理生化特征

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of *Pseudomonas psychrophila* MPP2402

测试项目 Test items	结果 Results	测试项目 Test items	结果 Results
葡萄糖发酵试验 Glucose fermentation test	+	淀粉水解试验 Starch hydrolysis test	+
乳糖发酵试验 Lactose fermentation test	-	硝酸盐还原试验 Nitrate reduction test	-
蔗糖发酵试验 Sucrose fermentation test	-	吲哚试验 Indole test	+
麦芽糖发酵试验 Maltose fermentation test	-	甲基红试验 Methyl red test	-
过氧化氢酶试验 Catalase test	+	柠檬酸试验 Citric acid test	+

+: 阳性反应; -: 阴性反应。

+: Positive reaction; -: Negative reaction.

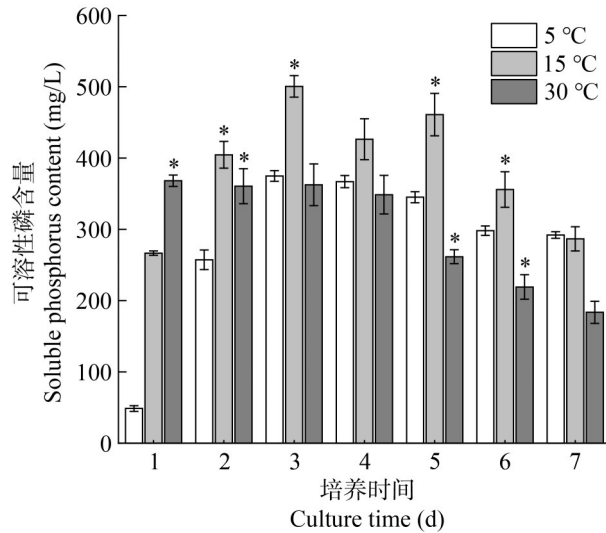


图2 嗜冷假单胞菌MPP2402在不同温度下的解磷能力

Figure 2 Phosphorus solubilization capacity of *Pseudomonas psychrophila* MPP2402 at different temperatures. In the same culture time, * indicates significant differences between treatments ($P < 0.05$).

酶阳性及柠檬酸盐利用能力阳性等属级特征，但其温度适应性有所差异(表 3)。综上所述，MPP2402 符合假单胞菌属定义。

2.2 细菌耐受性优化

2.2.1 培养温度

如图 4 所示，嗜冷假单胞菌 MPP2402 的溶磷效能呈现典型的中低温适应性。其中，温度为 15 °C 和 20 °C 时解磷能力较好，分别为 504.74 mg/L 和 494.81 mg/L，二者无显著差异。无机磷培养液 pH 降至 4.64–5.73，呈偏酸性。这表明 MPP2402 在溶解 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 过程中会产生酸性物质，导致环境中 pH 值降低，而且产酸能力越强可溶性磷含量越高。值得注意的是，温度为 10 °C 时活菌数最高(2.49×10^8 CFU/mL)，但其解磷能力为 408.16 mg/L，显著低于 15 °C 组。综合考虑，15 °C 呈现出“适当密度高效”的理想模式，可将其作为后续试验的优化温度。

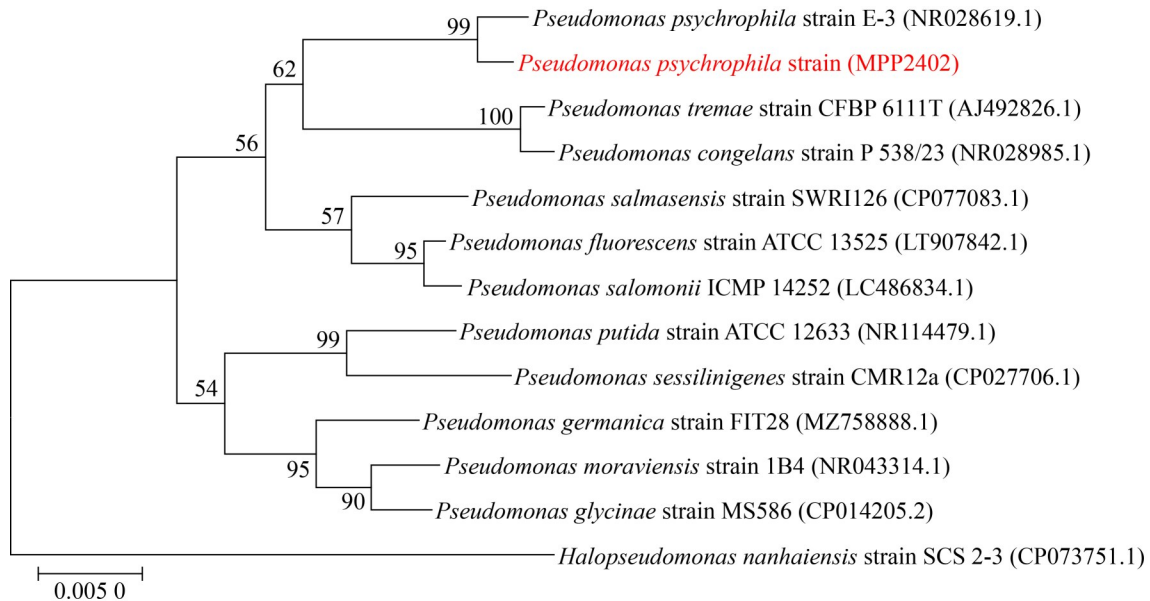


图3 嗜冷假单胞菌MPP2402系统发育树。括号内为GenBank登录号；分支点数值代表基于1 000次重复抽样的自展支持率(百分比)；比例尺代表每个核苷酸位点0.005 0替换。

Figure 3 Phylogenetic tree of *Pseudomonas psychrophila* MPP2402. GenBank accession number is in parentheses; The branch point value represents the self-expansion support rate (percentage) based on 1 000 repeated sampling; The scale bar represents 0.005 0 substitutions per nucleotide site.

表3 嗜冷假单胞菌MPP2402与同属近缘模式种的形态及生理生化特征比较

Table 3 Comparison of morphological and physiological and biochemical characteristics of *Pseudomonas psychrophila* MPP2402 with those of the type strains of related species in the same genus

特征 Characteristic	嗜冷假单胞菌 <i>Pseudomonas psychrophila</i> MPP2402	恶臭假单胞菌 <i>Pseudomonas</i> <i>putida</i> ^[28]	维罗尼假单胞菌 <i>Pseudomonas</i> <i>putida</i> ^[29]	莫尔氏假单胞菌 <i>Pseudomonas umsongensis</i> ^[30]
菌落特征 Colony characteristics	黄色, 表面光滑隆起 Yellow, smooth and raised surface			菌落中间凸起, 圆形, 淡黄色 The middle of the colony is raised, rounded, yellowish
生长温度 Growth temperature (°C)	5-30	30	30	28
革兰氏染色 Gram stain	-	-	-	-
淀粉水解试验 Starch hydrolysis test	+	+	-	-
甲基红试验 Methyl red test	-	+	-	-
吲哚试验 Indole test	+	-	+	-
葡萄糖发酵试验 Glucose fermentation test	+	+	-	+
过氧化氢酶试验 Catalase test	+	+	+	+
柠檬酸试验 Lactic acid test	+		+	

+: 阳性反应; -: 阴性反应。

+: Positive reaction; -: Negative reaction.

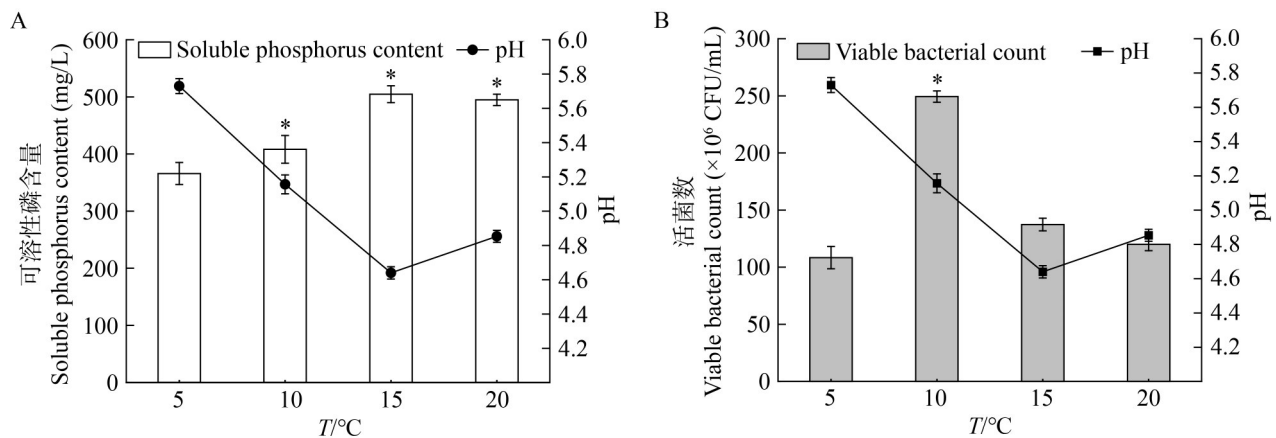


图4 温度对嗜冷假单胞菌MPP2402可溶性磷含量及活菌数的影响。A: 嗜冷假单胞菌MPP2402可溶性磷含量及pH值变化; B: 嗜冷假单胞菌MPP2402活菌数及pH值变化。

Figure 4 Effect of temperature on soluble phosphorus content and viable bacterial count of *Pseudomonas psychrophila* MPP2402. A: Changes in soluble phosphorus content and pH value of *Pseudomonas psychrophila* MPP2402; B: Effects on viable bacterial count and changes in pH value of *Pseudomonas psychrophila* MPP2402. In the same culture time, * indicates significant differences between treatments ($P < 0.05$).

2.2.2 培养液 pH 值

由表 4 可知, MPP2402 的解磷能力随着初始 pH 升高呈现下降趋势, 在初始 pH 为 7.0 时解磷能力最优(504.05 mg/L)。活菌数却呈现增加趋势, 初始 pH 为 10.0 时活菌数最高(3.30×10^8 CFU/mL), 初始 pH 为 7.0 时活菌数最低(1.35×10^8 CFU/mL), 说明活菌数的增加未能有效提高培养液中的可溶性磷含量。与此同时, MPP2402 在 pH 7.0–10.0 的 LB 培养基均能生长。其中 pH 为 9.0 时, MPP2402 培养第 1 天活菌数相对较低, 但第 2 天活菌数显著增加, 表明其通过延滞期调控来适应碱性胁迫; 而 pH 为 10.0 时, 活菌数整体偏低, 但仍维持一定活性。综上所述, MPP2402 展现出广泛的 pH 适应性(pH 7.0–10.0), 属于耐碱微生物(表 5、图 5)。

培养 3 d 后, 液体中的 pH 值有所下降(4.35–5.47), 这与温度条件下的结果相吻合, 而从整体来看, pH 值仍呈现升高趋势。进一步分析发现, 培养后的 pH 值和活菌数的变化趋势具有一定相似性。基于以上观察分析, 综合考虑解磷效果、细菌的稳定性和适应性, 以及实际应用需求, 选择以 pH 为 7.0 的条件继续后续试验。

表4 不同初始pH值对嗜冷假单胞菌MPP2402可溶性磷含量及活菌数的影响

Table 4 Effects of different initial pH values on the soluble phosphorus content and viable bacterial count of *Pseudomonas psychrophila* MPP2402

初始 pH Initial pH	可溶性磷含量 Soluble phosphorus content (mg/L)	活菌数 Viable bacterial count ($\times 10^6$ CFU/mL)	pH
7.0	504.05 \pm 20.11	135.00 \pm 11.53	4.35 \pm 0.11
8.0	461.42 \pm 12.64	149.67 \pm 11.93	4.46 \pm 0.09
9.0	400.84 \pm 20.14*	230.33 \pm 13.20	4.82 \pm 0.04*
10.0	198.49 \pm 8.58*	330.33 \pm 5.51*	5.47 \pm 0.08*

*表示处理间差异显著($P < 0.05$)。

* indicates significant differences between treatments ($P < 0.05$).

表5 不同pH值对嗜冷假单胞菌MPP2402活菌数的变化

Table 5 Changes in the viable bacterial count of *Pseudomonas psychrophila* MPP2402 at different pH values ($\times 10^6$ CFU/mL)

pH	1 d	2 d	3 d
7.0	406.67 \pm 15.28	456.67 \pm 25.17	526.67 \pm 5.77
8.0	376.67 \pm 25.17	453.33 \pm 15.28	506.67 \pm 20.82
9.0	266.33 \pm 7.09*	393.33 \pm 20.82*	416.67 \pm 15.28
10.0	261.67 \pm 6.66*	353.33 \pm 20.82*	256.00 \pm 8.71*

*表示处理间差异显著($P < 0.05$)。

* indicates significant differences between treatments ($P < 0.05$).

2.2.3 培养液 NaCl 浓度

将 MPP2402 分别接种于不同盐浓度(0.2–0.8 mol/L NaCl)的无机磷培养液中培养 3 d, 其均能正常生长且均具有一定解磷能力(图 6)。随着 NaCl 浓度的升高, 解磷能力呈现先升高后降低的趋势, 而 pH 值则呈相反趋势。与上述结果存在差异的是, 该变量培养液中的 pH 值均小于 5.0。特别地, 当 MPP2402 处于 0.4 mol/L NaCl 环境时解磷能力最高, 为 558.60 mg/L, 同时培养液中的 pH 值最低, 为 4.44。据此, 可判定其为耐盐微生物。

活菌数在不同浓度 NaCl 环境下普遍较低。相较于低浓度的 NaCl 环境, MPP2402 在高浓度 NaCl 条件下的生长状况受到更为显著的抑制, 菌落直径减小, 生物量也有所下降。这一结果表明, 尽管 MPP2402 具备耐盐能力, 但过高的 NaCl 浓度仍会对其生长产生负面影响。

2.2.4 细菌接种量

在初始 pH 7.0、0.4 mol/L NaCl 的条件下配制无机磷培养基, 测定 MPP2402 不同接种量对其解磷能力、活菌数及 pH 值的影响。如图 7 所示, MPP2402 的解磷能力随着接种量的增加呈现降低趋势。其中, 接种量为 1% 和 3% 时解磷能力较好, 分别为 572.96 mg/L 和 563.24 mg/L, 且二者无显著性差异。

MPP2402 的活菌数总体呈现上升趋势, 但

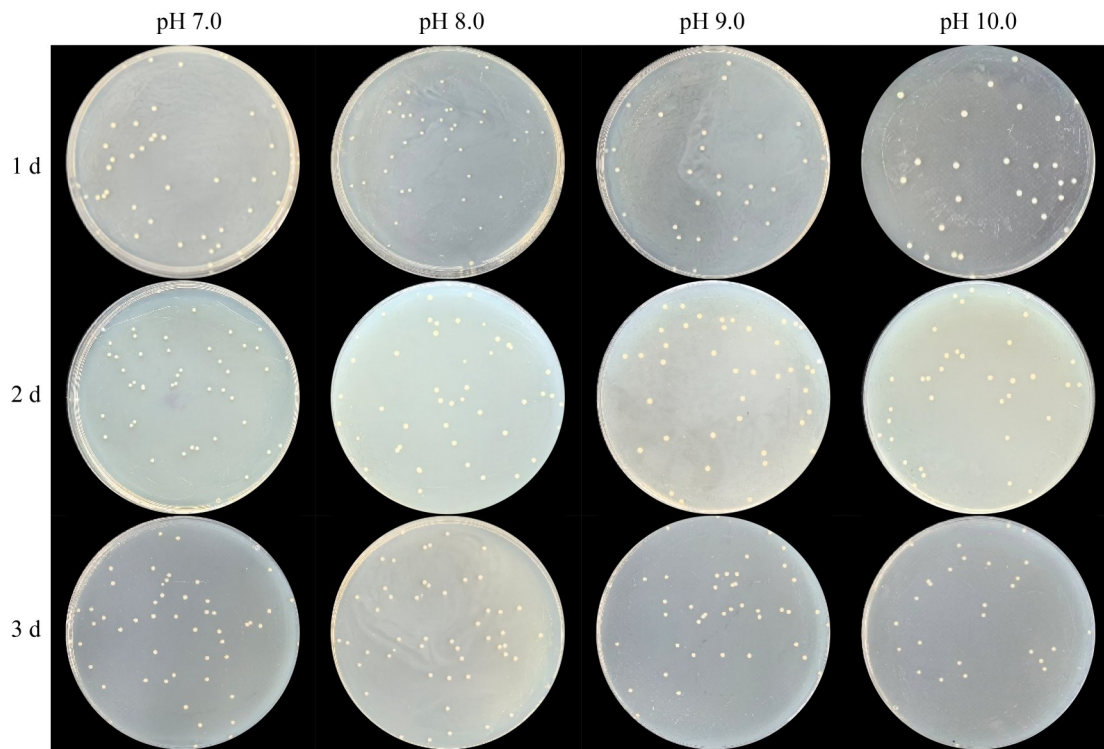


图5 嗜冷假单胞菌MPP2402耐受效果图

Figure 5 Tolerance effect diagram of *Pseudomonas psychrophila* MPP2402 ($\times 10^7$ CFU/mL).

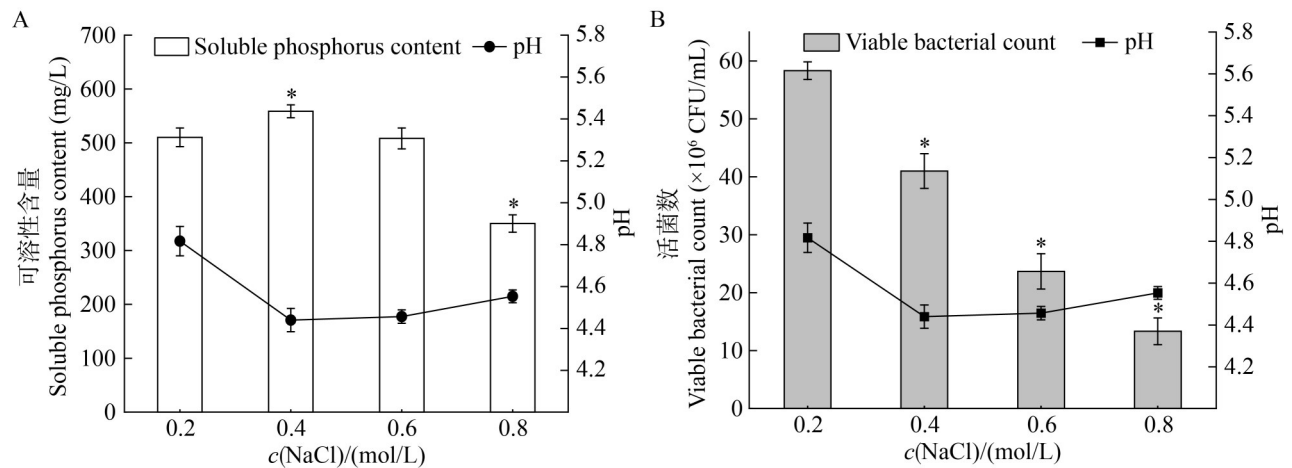


图6 NaCl浓度对嗜冷假单胞菌MPP2402可溶性磷含量及活菌数的影响

Figure 6 Effect of NaCl concentration on soluble phosphorus content and viable bacterial count of *Pseudomonas psychrophila* MPP2402.

在接种量为 1%、3%、5% 时，活菌数量相对较少。与此同时，培养液中的 pH 值呈现上升趋势。值得注意的是，接种量为 1%、3%、5% 的

培养液中的 pH 值均低于 5.0，这与上述研究结果相吻合。综上所述，MPP2402 的最适接种量为 1%。

2.2.5 培养液中 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 含量

当以 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 为唯一磷源时, 5 g/L $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 添加量的解磷能力显著高于其他添加量, 为 574.7 mg/L (图 8)。活菌数和培养液中的 pH 值呈现逐步上升的趋势。其中, 添加量为 2.5 g/L $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 培养液逐渐变为透明, 经过计算发现该浓度大约可以释放 499.0 mg/L 可溶性磷, 说明培养液中的可溶性磷含量几乎被完全释放出

来。综上所述, 本次优化试验结果可靠, 可以有效增强 MPP2402 的解磷能力。

2.3 低温、耐盐碱解磷菌的作用分析

2.3.1 有机酸种类及含量

通过采用 HPLC 对 MPP2402 优化发酵液中的 5 种有机酸进行定量分析(表 6、图 9), 结果显示 MPP2402 分泌 4 种有机酸, 其中琥珀酸含

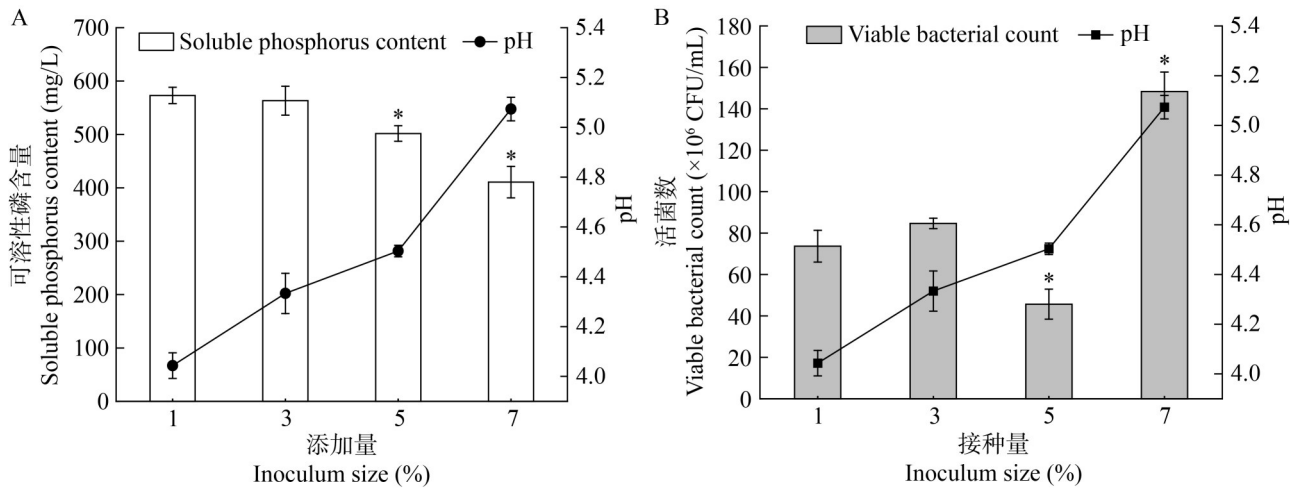


图7 接种量对嗜冷假单胞菌MPP2402可溶性磷含量及活菌数的影响

Figure 7 Effect of inoculum size on soluble phosphorus content and viable bacterial count of *Pseudomonas psychrophila* MPP2402.

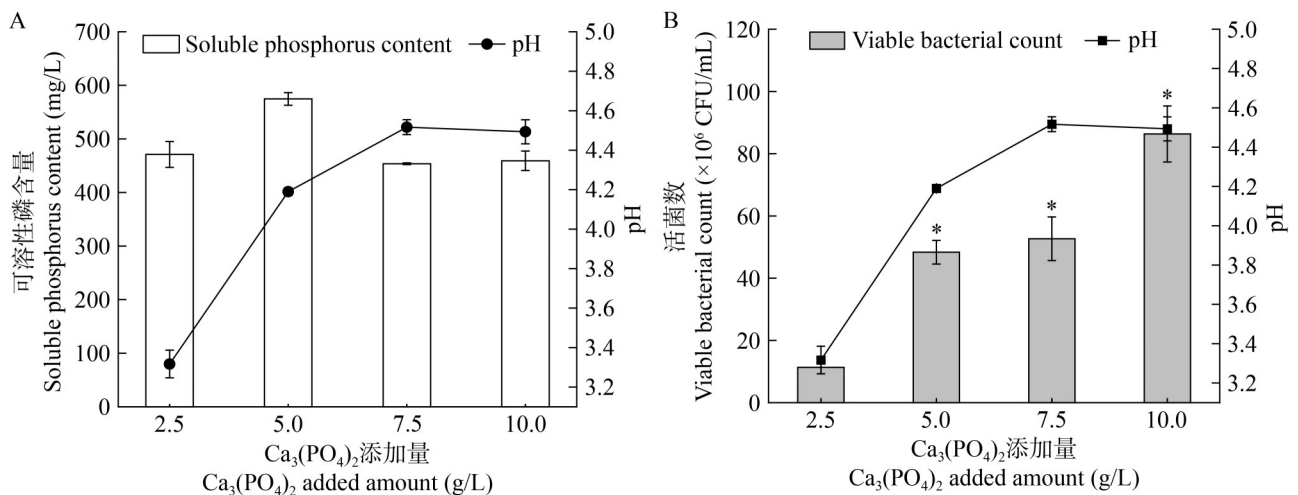


图8 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 添加量对嗜冷假单胞菌MPP2402可溶性磷含量及活菌数的影响

Figure 8 Effect of $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ added amount on soluble phosphorus content and viable bacterial count of *Pseudomonas psychrophila* MPP2402.

表6 嗜冷假单胞菌MPP2402产有机酸种类及含量
Table 6 Types and contents of organic acids produced by *Pseudomonas psychrophila* MPP2402

类型 Types	Content ($\mu\text{g/mL}$)
苹果酸 Malic acid	5.93 \pm 0.50
草酸 Oxalic acid	22.84 \pm 0.97*
酒石酸 Tartaric acid	15.11 \pm 0.64*
柠檬酸 Citric acid	0.00 \pm 0.00
琥珀酸 Succinic acid	51.53 \pm 3.80*

量最多, 为 51.53 $\mu\text{g/mL}$, 其次为草酸、酒石酸、苹果酸, 但未检测出柠檬酸。由此可知, MPP2402 在解磷过程中培养液 pH 下降归因于有机酸的产生。

2.3.2 生物膜及 EPS 组分分析

如图 10 所示, MPP2402 在低温、盐碱胁迫处理(优化后)条件下促进生物膜的形成, 其形成量随时间推移持续增加。此外, MPP2402 分泌的 EPS 中成分以多糖为主, 蛋白质为辅。在未胁迫处理(优化前)条件下, 培养液中的多糖和蛋白质含量呈现“先下降后稳定”的趋势; 而胁迫后 MPP2402 生长速率降低, 培养液中的多糖和

蛋白质含量持续下降。进一步分析 EPS 组分发现, 优化后多糖/蛋白比值在胁迫初期(0–48 h)升高, 多糖合成占优; 胁迫后期(48–72 h)比值降低, 蛋白质合成占优。综上所述, 胁迫通过分阶段调控 EPS 组分驱动细菌形成抗逆性生物膜, 体现了 MPP2402 在逆境中“生存优先”的适应性。

3 讨论

3.1 解磷菌的筛选及其低温盐碱环境

本研究从吉林省白城市的苏打盐碱地成功分离筛选出嗜冷假单胞菌 (*Pseudomonas psychrophila*) MPP2402, 经定向优化后其溶磷效能提升至 574.67 mg/L, 表现出显著优于同类细菌的代谢潜力。系统文献计量分析显示: 张晗昱等^[20]从青藏高原年多冻土区分离出 3 株解磷假单胞菌, 在 15 $^{\circ}\text{C}$ 时可溶性磷含量为 312.60–344.58 mg/L; 李琦等^[31]在高寒草地筛选解磷菌, 发现假单胞菌为优势细菌, 进一步证明了假单胞菌在低温环境中的广泛分布和解磷潜力, 但其环境适应性研究未涉及盐碱因子。

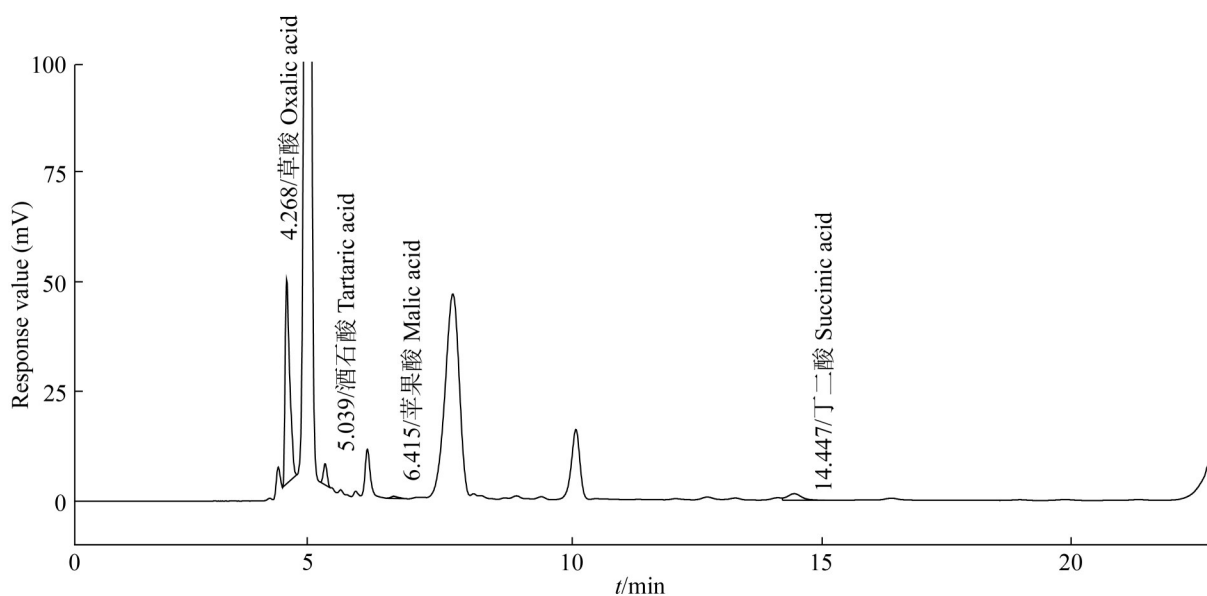


图9 有机酸色谱图示意图

Figure 9 Schematic diagram of the chromatogram of organic acids.

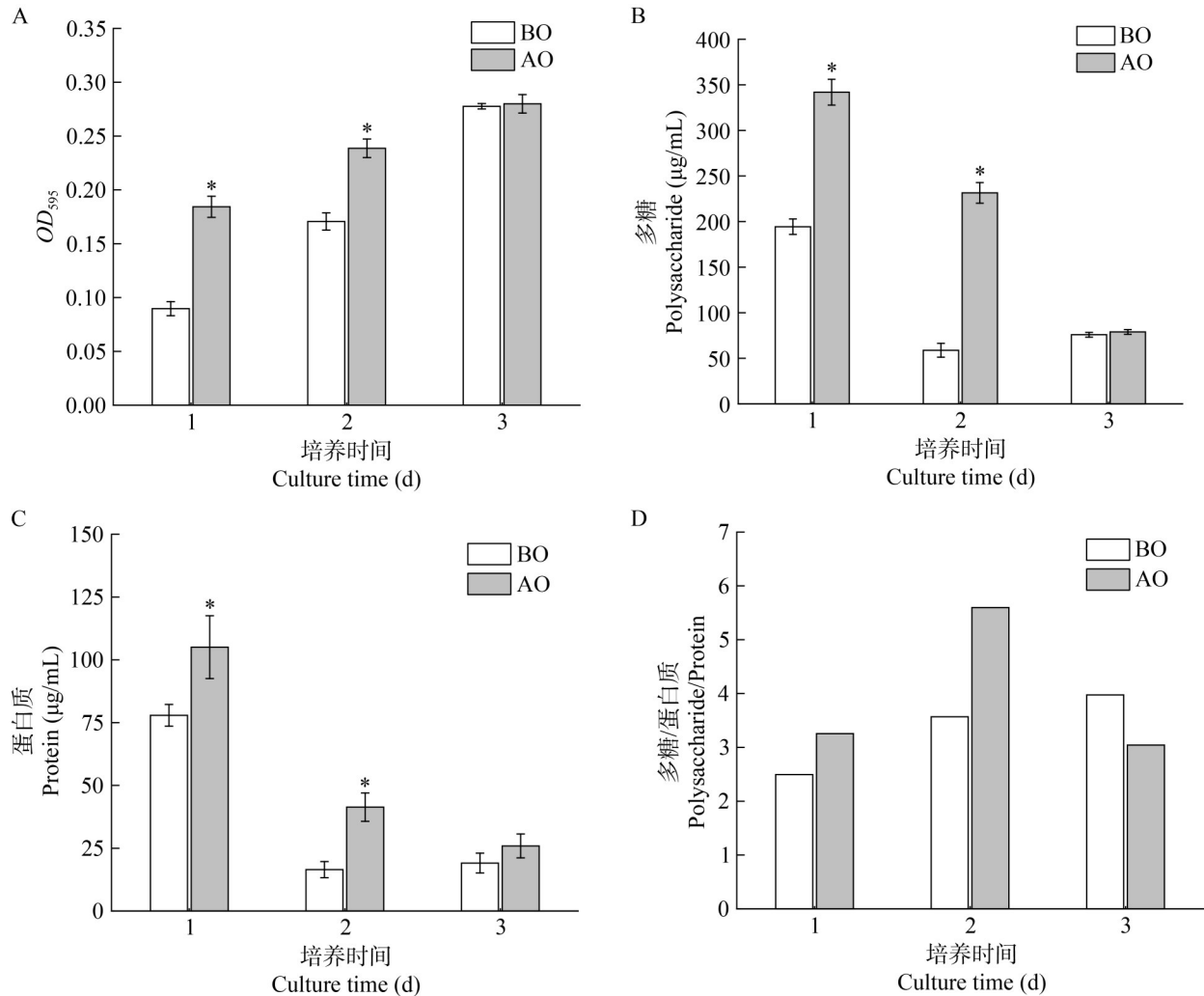


图10 嗜冷假单胞菌MPP2402优化前后生物膜形成能力及EPS含量。A: 生物膜; B: 多糖; C: 蛋白质; D: 多糖/蛋白质。BO: 优化前处理; AO: 优化后处理。

Figure 10 Biofilm formation ability and EPS content of *Pseudomonas psychrophila* MPP2402 before and after optimization. A: Biofilm; B: Polysaccharide; C: Protein; D: Polysaccharide/protein. BO: Before optimization; AO: After optimization.

与既往研究多聚焦单一环境因子不同, 本研究构建了低温-盐碱胁迫试验体系。结果表明MPP2402在温度5–30 °C、初始pH 7.0–10.0、NaCl 0.2–0.8 mol/L范围内均能保持代谢活性且具有解磷功能, 为功能生物菌剂的开发提供了优良种质资源和理论支持。

在耐受性条件优化过程中, 试验结果表明pH在细菌生长和解磷能力方面起关键作用。

MPP2402培养液中的pH下降可使难溶性磷转化为可溶性磷, 该结果与Etesami等^[32]和Xu等^[33]的研究一致。此外, MPP2402在不同pH条件下, LB培养基与无机磷培养基中的活菌数变化存在显著差异, 这种差异可能源于细菌在过酸环境(pH<5.0)下生长受限, 这一结论与不动杆菌JL-1^[34]和施氏假单胞菌^[35]的研究结果一致。然而, MPP2402在高初始pH环境下表现出独

特的适应性, 其活菌数随初始 pH 的增加而增加, 这一特性与高威等^[36]的研究结果(活菌数会随着初始 pH 的增加呈现先增加后减少的趋势)存在差异。然而, 菌株 MPP2402 在高初始 pH 环境下的活菌数随 pH 升高呈线性增长趋势, 表明高碱性环境对 MPP2402 生长更具适应性, 这与高威等^[36]的研究结果(活菌数会随着初始 pH 的增加呈现先增加后减少的趋势)存在差异。此外, 观察到 MPP2402 随着盐度增加, 活菌数呈现减少趋势, 且细菌个体较小。这与王宏燕等^[37]报道的细菌生长量随盐度增加而减少, 以及李青青等^[38]发现的细菌活性表现较差, 且生长呈现扁平状等现象相一致。这些研究共同印证了高盐浓度对细菌生长的负面影响。然而, 当前摇瓶试验体系(液相均质环境)与农田土壤(多相异质体系)在氧分压、离子梯度等方面存在显著差异, 后续考虑开发土壤微宇宙模拟系统评估细菌原位定殖能力; 同时, 为了进一步提高细菌在盐碱环境中的适应性和生存能力, 将利用启动子置换策略强化 ectoine 合成途径, 通过替换关键基因的启动子, 提高 ectoine 的合成效率, 从而增强细菌在盐碱环境中的渗透压调节能力。

3.2 低温、耐盐碱解磷菌的作用分析

解磷菌的主要作用机制归因于分泌有机酸化周质空间^[1], 并与 Ca^{2+} 、 Al^{3+} 、 Fe^{3+} 螯合释放可溶性磷^[4]。HPLC 分析显示, MPP2402 上清培养液中存在多种有机酸, 即琥珀酸($51.53 \mu\text{g/mL}$)、草酸($22.84 \mu\text{g/mL}$)、酒石酸($15.11 \mu\text{g/mL}$)、苹果酸($5.93 \mu\text{g/mL}$)。这表明 MPP2402 通过分泌有机酸与 Ca^{2+} 螯合, 降低培养液中 pH 值, 促进 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的释放, 提高可溶性磷含量。已有研究发现, 施加解磷菌会影响 pH 和总酸度的产生, 并提高有效 P 组分的可利用性^[39]。De Almeida 等^[40]研究对不同解磷菌的有机酸含量与可溶性磷含量以及可溶性磷含量和 pH 之间进行 Pearson 相关性分析发现存在显著相关性。在本研究检测的有机酸中, MPP2402 所释放的琥珀酸占比最高, 达到有机酸总量的 54%。这一现象与 Vyas 等^[41]

的研究结论相符, 即琥珀酸是解磷细菌发挥功能的关键物质, 高效菌株通常大量分泌琥珀酸, 而低效菌株的分泌量则显著偏低。转录组分析也表明, 近缘菌株 PSB W134 (假单胞菌属)通过特异性上调丙酮酸羧化酶相关基因(如 BLU65_RS05250/oadA), 并协同激活琥珀酸脱氢酶基因(BLU65_RS26355/BLU65_RS26360)驱动 TCA 循环碳流重组, 促进琥珀酸积累及下游苹果酸等有机酸的分泌, 从而增强对难溶性磷酸盐的溶解能力^[42]。值得注意的是, 尽管柠檬酸在微生物代谢中是一个关键的中间体, 通常在三羧酸循环中起着核心作用^[43]。然而 MPP2402 并未检测到柠檬酸的分泌, 这可能意味着 MPP2402 在代谢过程中将碳源优先导向了琥珀酸的合成, 而非柠檬酸的积累, 这种调整可能是 MPP2402 在特定环境条件下提高适应性的一种策略^[44]。

MPP2402 在低温、盐碱胁迫处理(优化后)能够显著促进生物膜的形成及其 EPS 的分泌。Ferguson 等^[45]研究表明, 细菌在面对不利环境时能够通过增强生物膜的构建来增强自身的抗逆性, 有助于保护细胞免受外界不利因素的直接侵害, 与本研究结果一致。生物膜的持续形成也暗示了细菌在胁迫环境下仍具有生长和繁殖能力^[35]。这种增强的生物膜形成能力可能源于 MPP2402 [属于假单胞菌属(*Pseudomonas*)]基因组编码的精密调控网络。该网络包括复杂的信号系统(如 Gac/Rsm 系统、c-di-GMP 信号系统)和关键结构基因(如 *pel*、*psl* 操纵子, *lapA* 等), 使其能够动态调控生物膜形成及 EPS 组分以响应环境胁迫信号^[46-47]。此外, L-苹果酸作为核心信号分子可以通过 *yqxM* 操纵子和 KinD-Spo0A 通路促进生物膜形成^[48-49]。本研究还观察到 MPP2402 在未胁迫处理(优化前)下, 培养液中的多糖和蛋白质含量呈现“先下降后稳定”的趋势, 这一变化规律反映了细菌在生长初期对营养物质的快速利用, 葡萄糖作为主要碳源用于细菌的生长和代谢, 导致培养液中多糖含量下降^[50]。随着时间的推移, 细菌的代谢产物

会代替碳源维持能量生产,使得培养液中的多糖和蛋白质含量趋于稳定^[51]。然而,在胁迫处理(优化后)下培养液中的多糖和蛋白质含量持续下降,说明胁迫环境对细菌的生长和代谢产生了显著的抑制作用,与优化过程中的活菌数结果^[52]一致。但是 MPP2402 仍然能够通过调控 EPS 组分来适应胁迫环境。优化后多糖/蛋白比值呈现“先升后降”的阶段性变化,胁迫初期(0-48 h)比值升高,这可能是高 c-di-GMP 水平优先诱导 *pel*、*psl* 等基因表达,促进多糖合成^[53]。多糖具有较高的黏性和稳定性,能够为生物膜提供结构支撑和保护作用^[54]。胁迫后期(48-72 h)比值降低,这可能意味着在生物膜结构相对稳定后细菌开始注重蛋白质的合成,以增强生物膜的功能性,如提高生物膜对营养物质的摄取能力、改善细胞间的信号传导等,从而更好地适应长期的胁迫环境^[55]。这种 EPS 组分的阶段性动态调控可能与群体感应(QS)机制紧密相关。在胁迫条件下, MPP2402 强烈的聚集行为形成了具有空间异质性的生物膜结构。在生物膜内部有限的 EPS 基质空间内,局部细胞密度远高于培养液的平均水平,从而激活的 QS 系统调控了 EPS 合成相关基因^[56]。

4 结论

本研究采用定向筛选策略从我国典型的苏打盐碱地分布区域分离出一株兼具耐低温和盐碱的广适性嗜冷假单胞菌 MPP2402。其在 15 °C、初始 pH 7.0、NaCl 0.4 mol/L、接种量 1%、Ca₃(PO₄)₂ 添加量 5 g/L 条件下的解磷量可达 574.66 mg/L。该菌的解磷作用可能通过产生有机酸(95.41 μg/mL)降低培养液 pH,进一步通过形成生物膜增加 EPS 分泌量及活菌数量抵御低温和盐碱等不良环境。本研究为开发适用于东北寒区盐碱地的多功能生物磷肥提供了菌种资源。未来研究将重点解析其逆境响应基因簇

的调控网络,并通过根际定殖强化技术构建微生物-植物联合修复体系,推动其在苏打盐碱土改良中的工程化应用。

作者贡献声明

葛紫怡:提出概念,数据收集与监管,数据分析,撰写文章;王思宇:软件程序,监督管理,验证;苏旭:收集耐受性单因素条件优化的数据与整理;甘诗韵:收集生物膜形成量和胞外多糖(EPS)成分的数据与整理;蒋欣桐:完成呈现;黄玉威:数据分析;孟军:审阅,获取基金,提供资源,软件程序,监督管理。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] CHENG YY, NARAYANAN M, SHI XJ, CHEN XP, LI ZL, MA Y. Phosphate-solubilizing bacteria: their agroecological function and optimistic application for enhancing agro-productivity[J]. *Science of The Total Environment*, 2023, 901: 166468.
- [2] YU X, KEITEL C, DIJKSTRA FA. Global analysis of phosphorus fertilizer use efficiency in cereal crops[J]. *Global Food Security*, 2021, 29: 100545.
- [3] 骆韵涵,柯志滨,钟超,程扬健.红树林土壤解磷菌的分离鉴定及解磷特性[J]. *中国环境科学*, 2020, 40(6): 2664-2673.
- [4] LUO YH, KE ZB, ZHONG C, CHENG YJ. Isolation and identification of phosphate-solubilizing bacteria from mangrove and their phosphate-solubilizing characteristics[J]. *China Environmental Science*, 2020, 40(6): 2664-2673 (in Chinese).
- [5] PAN L, CAI BY. Phosphate-solubilizing bacteria: advances in their physiology, molecular mechanisms and microbial community effects[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(12): 2904.
- [6] ZHANG H, QIAN YY, FAN DD, TIAN YN, HUANG X. Biofilm formed by *Hansschlegelia zhihuaiae* S113 on root surface mitigates the toxicity of bensulfuron-methyl residues to maize[J]. *Environmental Pollution*, 2022, 292: 118366.
- [7] RAWAT P, DAS S, SHANKHDHAR D, SHANKHDHAR SC. Phosphate-solubilizing microorganisms: mechanism and their role in phosphate solubilization and uptake[J]. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 2021, 21(1): 49-68.
- [7] STALSTROM VA. Beitrag Zur Kenntnistruder einwinking

- sterilizer and in garung befindlicher striffe any dil loslieshkeit der phosphorus are destrical cum phosphours[J]. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. Abteilung II, 1903, 11: 724-732.
- [8] 李小莉, 赵学强, 董晓英, 沈仁芳. 酸性土壤中解磷菌的分离及其促生效果研究[J]. 中国土壤与肥料, 2023(1): 224-230.
LI XL, ZHAO XQ, DONG XY, SHEN RF. Isolation of phosphate-solubilizing bacteria from acidic soil and its growth promoting effect[J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2023(1): 224-230 (in Chinese).
- [9] 周晓倩, 冯薇, 贺斌, 秦树高, 张宇清. 毛乌素沙地土壤解磷菌的分离筛选及其解磷机制[J]. 农业工程学报, 2024, 40(11): 109-118.
ZHOU XQ, FENG W, HE B, QIN SG, ZHANG YQ. Isolation and screening of soil phosphate-solubilizing bacteria and their phosphate solubilization mechanisms in the Mu Us Desert[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2024, 40(11): 109-118 (in Chinese).
- [10] 谢东, 汪流伟, 李宁健, 李泽霖, 徐子航, 张庆华. 一株多功能菌株的发掘、鉴定及解磷条件优化[J]. 生物技术通报, 2023, 39(7): 241-253.
XIE D, WANG LW, LI NJ, LI ZL, XU ZH, ZHANG QH. Exploration, identification and phosphorus-solubilizing condition optimization of a multifunctional strain[J]. Biotechnology Bulletin, 2023, 39(7): 241-253 (in Chinese).
- [11] BAKHSHANDEH E, PIRDASHTI H, LENDEH KS. Phosphate and potassium-solubilizing bacteria effect on the growth of rice[J]. Ecological Engineering, 2017, 103: 164-169.
- [12] 车欣宇, 彭启超, 张志鹏, 张鑫鹏, 魏浩, 李俊, 王莹, 黄德龙, 邓祖科. 一株根际解磷菌的筛选鉴定及促生作用研究[J]. 中国土壤与肥料, 2024(1): 218-225.
CHE XY, PENG QC, ZHANG ZP, ZHANG XP, WEI H, LI J, WANG Y, HUANG DL, DENG ZK. Screening and identification of a rhizosphere phosphate-solubilizing bacteria and its growth-promoting effect[J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2024(1): 218-225 (in Chinese).
- [13] 林志伟, 肖翠红, 白鑫雨, 孙冬梅. 解磷菌 DQ-N 对大豆种子萌发及苗期生长的影响[J]. 大豆科学, 2021, 40(5): 676-681.
LIN ZW, XIAO CH, BAI XY, SUN DM. Effects of DQ-N strain on seed germination and seedling growth of soybean[J]. Soybean Science, 2021, 40(5): 676-681 (in Chinese).
- [14] ZHU HJ, SUN LF, ZHANG YF, ZHANG XL, QIAO JJ. Conversion of spent mushroom substrate to biofertilizer using a stress-tolerant phosphate-solubilizing *Pichia farinose* FL7[J]. Bioresource Technology, 2012, 111: 410-416.
- [15] MOOSHAMMER M, HOFHANSL F, FRANK AH, WANKE W, HÄMMERLE I, LEITNER S, SCHNECKER J, WILD B, WATZKA M, KEIBLINGER KM, ZECHMEISTER-BOLTENSTERN S, RICHTER A. Decoupling of microbial carbon, nitrogen, and phosphorus cycling in response to extreme temperature events[J]. Science Advances, 2017, 3(5): e1602781.
- [16] PRIYA P, ANEESH B, SIVAKUMAR KC, HARIKRISHNAN K. Comparative proteomic analysis of saline tolerant, phosphate solubilizing endophytic *Pantoea* sp., and *Pseudomonas* sp. isolated from *Eichhornia* rhizosphere[J]. Microbiological Research, 2022, 265: 127217.
- [17] LI Z, WANG Y, LIU Z, HAN F, CHEN SG, ZHOU WZ. Integrated application of phosphorus-accumulating bacteria and phosphorus-solubilizing bacteria to achieve sustainable phosphorus management in saline soils[J]. Science of the Total Environment, 2023, 885: 163971.
- [18] SUN XD, WANG W, YI SJ, ZHENG FR, ZHANG ZH, ALHARBI SA, FILIMONENKO E, WANG ZL, KUZYAKOV Y. Microbial composition in saline and alkaline soils regulates plant growth with P-solubilizing bacteria[J]. Applied Soil Ecology, 2024, 203: 105653.
- [19] LI YL, GAO MY, ZHANG WT, LIU YC, WANG SS, ZHANG HH, LI XY, YU SY, LU L. Halotolerant *Enterobacter asburiae* A103 isolated from the halophyte *Salix linearistipularis*: genomic analysis and growth-promoting effects on *Medicago sativa* under alkali stress[J]. Microbiological Research, 2024, 289: 127909.
- [20] 张晗昱, 李丹丹, 郑瑾, 樊金娟, 王清威, 杜显元, 任金蔓, 宋权威, 吴慧君, 谢加才. 青藏高原多年冻土区解磷菌筛选及抗逆能力评价[J]. 微生物学报, 2024, 64(6): 1876-1890.
ZHANG HY, LI DD, ZHENG J, FAN JJ, WANG QW, DU XY, REN JM, SONG QW, WU HJ, XIE JC. Screening of phosphorus-solubilizing strains with stress tolerance in the permafrost region of the Qinghai-Xizang Plateau[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(6): 1876-1890 (in Chinese).
- [21] 刘荣灿, 刘晓霞, 冯洋, 赵乾程, 胡雪松, 杜闫彬, 于彩虹. 长期复合重金属污染对土壤解磷微生物的影响[J]. 中国环境科学, 2023, 43(2): 915-926.
LIU RC, LIU XX, FENG Y, ZHAO QC, HU XS, DU YB, YU CH. Effects of long-term combined heavy metal pollution on soil phosphate solubilizing microorganisms[J]. China Environmental Science, 2023, 43(2): 915-926 (in Chinese).
- [22] 苏楠楠, 赵庆照, 王芳, 安天赐, 牛晶晶, 闫嘉欣, 杨建军, 韩辉. 解磷细菌 *Klebsiella* sp. M2 钝化重金属及阻控小麦吸收 Cd 和 Pb 效应[J]. 环境科学, 2024, 45(7): 4321-4331.
SU NN, ZHAO QZ, WANG F, AN TC, NIU JJ, YAN JX, YANG JJ, HAN H. Immobilization of heavy metals by phosphorus-solubilizing bacteria and inhibition of Cd and Pb uptake by wheat[J]. Environmental Science, 2024, 45(7): 4321-4331 (in Chinese).
- [23] 王思宇, 葛紫怡, 陈义轩, 朱晓琳, 刘赛男, 孟军. 一株霍氏肠杆菌对四环素的降解作用及其降解产物的毒性评估[J]. 微生物学报, 2024, 64(3): 826-839.
WANG SY, GE ZY, CHEN YX, ZHU XL, LIU SN, MENG J. Biodegradation of tetracycline by an *Enterobacter hormaechei* strain and toxicity of degradation products[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(3): 826-839 (in Chinese).

- [24] LU JK, LIU SN, CHEN WF, MENG J. Study on the mechanism of biochar affecting the effectiveness of phosphate solubilizing bacteria[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2023, 39(3): 87.
- [25] WANG SY, HAN J, GE ZY, SU X, SHI YJ, XIA F, HUANG YW, MENG J. Mechanistic insight into enhancement of undissolved rice husk biochar on tetracycline biodegradation by strain *Serratia marcescens* basing on electron transfer response[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2025, 491: 137895.
- [26] 刘丙花, 丁延芹, 刘方春, 刘幸红, 马胜国, 彭琳, 孙铭婕, 于连家, 马海林. 一株高产胞外多糖巨大芽孢杆菌的筛选鉴定、发酵条件优化及其对土壤团聚体的影响[J]. *微生物学报*, 2024, 64(10): 3968-3979.
- LIU BH, DING YQ, LIU FC, LIU XH, MA SG, PENG L, SUN MJ, YU LJ, MA HL. Screening, identification, fermentation condition optimization of an exopolysaccharide-producing strain and the influence on soil macro-aggregate formation[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024, 64(10): 3968-3979 (in Chinese).
- [27] DuBOIS M, GILLES KA, HAMILTON JK, REBERS PA, SMITH F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. *Analytical Chemistry*, 1956, 28(3): 350-356.
- [28] 于淼, 吴红艳, 冯健, 方新, 王智学. 解磷菌 623-3 的鉴定、培养条件优化及应用[J]. *四川农业大学学报*, 2020, 38(5): 572-579.
- YU M, WU HY, FENG J, FANG X, WANG ZX. Identification, optimization of culture conditions and application of dephosphorizing bacteria 623-3[J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2020, 38(5): 572-579 (in Chinese).
- [29] 刘希旻, 杨海霞, 黄灵曦, 李晓雁, 权桂芝, 杨红澎, 黄海东. 一株高效解磷假单胞菌的分离鉴定及解磷特性[J]. *天津农学院学报*, 2019, 26(4): 49-53.
- LIU XM, YANG HX, HUANG LX, LI XY, QUAN GZ, YANG HP, HUANG HD. Isolation and identification of a high-efficiency phosphate solubilizing *Pseudomonas* and its phosphate solubilizing characteristics[J]. *Journal of Tianjin Agricultural University*, 2019, 26(4): 49-53 (in Chinese).
- [30] 马福林, 仁增卓玛, 王昌玲, 邓得坤, 冶贵生, 马玉花. 西藏沙棘根瘤内生假单胞菌的分离鉴定及促生性研究[J]. *福建农业学报*, 2023, 38(5): 624-631.
- MA FL, REN Z, WANG CL, DENG DK, YE GS, MA YH. Identification and growth-promoting effects of endophytic *Pseudomonas* sp. from *Hippophae thibetana* root nodules[J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2023, 38(5): 624-631 (in Chinese).
- [31] 李琦, 杨晓蕾, 李晓林, 申友磊, 李建宏, 姚拓. 高寒草地燕麦根际解植酸磷促生菌鉴定及其优势菌假单胞菌属菌株功能特性[J]. *生物技术通报*, 2023, 39(3): 243-253.
- LI Q, YANG XL, LI XL, SHEN YL, LI JH, YAO T. Identification of phytate phosphorus-solubilizing PGPB in *Avena sativa* rhizosphere from alpine grassland and functional characteristics of dominant genus *Pseudomonas* sp.[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2023, 39(3): 243-253 (in Chinese).
- [32] ETESAMI H, SCHALLER J. Improving phosphorus availability to rice through silicon management in paddy soils: a review of the role of silicate-solubilizing bacteria[J]. *Rhizosphere*, 2023, 27: 100749.
- [33] XU SQ, JIA KX, ZHENG Y, CHEN WJ, WANG ZG, WEI D, SUN BR, CHENG MD, FAN BB, LI J, WEI YQ. Phosphorus transformation behavior and phosphorus cycling genes expression in food waste composting with hydroxyapatite enhanced by phosphate-solubilizing bacteria[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 376: 128882.
- [34] 李文, 戴玲, 王陶, 严斌, 倪琳, 李同祥. 不动杆菌 JL-1 菌株的解磷机理[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(5): 1377-1387.
- LI W, DAI L, WANG T, YAN B, NI L, LI TX. Research on phosphate solubilization by *Acinetobacter indicus* JL-1[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(5): 1377-1387 (in Chinese).
- [35] 闫宁, 杨智敏, 尚立国, 戴淑玲, 战崑华, 陆伟, 林敏, 燕永亮. 非生物胁迫条件下施氏假单胞菌生物膜形成规律的研究[J]. *生物技术通报*, 2017, 33(2): 172-178.
- YAN N, YANG ZM, SHANG LG, DAI SL, ZHAN YH, LU W, LIN M, YAN YL. Patterns of biofilm formation in *Pseudomonas stutzeri* under abiotic stresses[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2017, 33(2): 172-178 (in Chinese).
- [36] 高威, 左振宇, 李凌凌, 周圣玉, 聂静雨, 陈慧雯. 一株高效解磷菌的筛选鉴定及溶磷性能[J]. *微生物学通报*, 2022, 49(9): 3873-3889.
- GAO W, ZUO ZY, LI LL, ZHOU SY, NIE JY, CHEN HW. Isolation, identification, and characterization of a phosphate-solubilizing bacterial strain[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(9): 3873-3889 (in Chinese).
- [37] 王宏燕, 韩凯鑫, 冯丽荣, 于志鹏, 王露, 范金霞, 章圣龙, 孙岩. 耐盐解磷菌筛选鉴定及生理特性研究[J]. *东北农业大学学报*, 2023, 54(5): 28-37.
- WANG HY, HAN KX, FENG LR, YU ZP, WANG L, FAN JX, ZHANG SL, SUN Y. Screening and identification of salt-resistant phosphorus bacteria and its physiological characteristics[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2023, 54(5): 28-37 (in Chinese).
- [38] 李青青, 张芮, 高彦婷, 张红娟, 刘柯含. 耐盐碱解磷菌的溶磷效果及其对黄豆萌发的影响[J]. *微生物学通报*, 2024, 51(11): 4574-4589.
- LI QQ, ZHANG R, GAO YT, ZHANG HJ, LIU KH. Phosphorus solubilization effect of saline-tolerant phosphorus-solubilizing bacteria and its effect on soybean germination[J]. *Microbiology China*, 2024, 51(11): 4574-4589 (in Chinese).
- [39] WEI YQ, ZHAO Y, SHI MZ, CAO ZY, LU Q, YANG TX, FAN YY, WEI ZM. Effect of organic acids production and bacterial community on the possible mechanism of phosphorus solubilization during composting with enriched phosphate-solubilizing bacteria inoculation[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 247: 190-199.
- [40] De ALMEIDA LEITE R, MARTINS Da COSTA E, CABRAL MICHEL D, DO AMARAL LEITE A, de OLIVEIRA-LONGATTI SM, de LIMA W, KONSTANTINIDIS KT, de SOUZA MOREIRA FM. Genomic insights into organic acid production and plant growth promotion by different species of phosphate-

- solubilizing bacteria[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2024, 40(10): 311.
- [41] VYAS P, GULATI A. Organic acid production *in vitro* and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas*[J]. BMC Microbiology, 2009, 9: 174.
- [42] WANG SB, LI Y, ZHANG J, WANG XY, HONG JP, QIU C, MENG HS. Transcriptome profiling analysis of phosphate-solubilizing mechanism of *Pseudomonas* strain W134[J]. Microorganisms, 2022, 10(10): 1998.
- [43] LATIF A, HASSAN N, ALI H, NIAZI MBK, JAHAN Z, GHUMAN IL, HASSAN F, SAQIB A. An overview of key industrial product citric acid production by *Aspergillus niger* and its application[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2025, 5210.1093: jimb.
- [44] DU S, XU LJ, JIANG C, XIAO YZ. Novel strategy to understand the bacteria-enzyme synergy action regulates the ensiling performance of wheat straw silage by multi-omics analysis[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 289: 138864.
- [45] FERGUSON RMW, O' GORMAN EJ, McELROY DJ, McKEW BA, COLEMAN RA, EMMERSON MC, DUMBRELL AJ. The ecological impacts of multiple environmental stressors on coastal biofilm bacteria[J]. Global Change Biology, 2021, 27(13): 3166-3178.
- [46] MANN EE, WOZNIAK DJ. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2012, 36(4): 893-916.
- [47] VALENTINI M, FILLOUX A. Biofilms and cyclic di-GMP (c-di-GMP) signaling: lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and other bacteria[J]. Journal of Biological Chemistry, 2016, 291(24): 12547-12555.
- [48] RUDRAPPA T, CZYMMEK KJ, PARÉ PW, BAIS HP. Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria[J]. Plant Physiology, 2008, 148(3): 1547-1556.
- [49] CHEN Y, CAO SG, CHAI YR, CLARDY J, KOLTER R, GUO JH, LOSICK R. A *Bacillus subtilis* sensor kinase involved in triggering biofilm formation on the roots of tomato plants[J]. Molecular Microbiology, 2012, 85(3): 418-430.
- [50] HILL RA, HUNT J, SANDERS E, TRAN M, BURK GA, MLSNA TE, FITZKEE NC. Effect of biochar on microbial growth: a metabolomics and bacteriological investigation in *E. coli*[J]. Environmental Science & Technology, 2019, 53(5): 2635-2646.
- [51] COULET M, KEPP O, KROEMER G, BASMACIOGULLARI S. Metabolic profiling of CHO cells during the production of biotherapeutics[J]. Cells, 2022, 11(12): 1929.
- [52] TENG ZD, SHAO W, ZHANG KY, HUO YQ, ZHU J, LI M. Pb biosorption by *Leclercia adecarboxylata*: protective and immobilized mechanisms of extracellular polymeric substances[J]. Chemical Engineering Journal, 2019, 375: 122113.
- [53] HICKMAN JW, HARWOOD CS. Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor[J]. Molecular Microbiology, 2008, 69(2): 376-389.
- [54] 吴一超, 张铭, 高春辉, 渠晨晨, 戴珂, 黄巧云, 蔡鹏. 土壤生物膜与退化土壤修复[J/OL]. 科学通报, 2025: 1-11. (2025-04-22). <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=KXTB20250421004&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ>.
WU YC, ZHANG M, GAO CH, QU CC, DAI K, HUANG QY, CAI P. Soil biofilm and restoration of degraded soil[J/OL]. Chinese Science Bulletin, 2025: 1-11. (2025-04-22). <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=KXTB20250421004&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ> (in Chinese).
- [55] SYCH T, LEVENTAL KR, SEZGIN E. Lipid-protein interactions in plasma membrane organization and function[J]. Annual Review of Biophysics, 2022, 51: 135-156.
- [56] LUO PP, HUANG YQ, HANG XD, TONG Q, ZENG LP, JIA J, ZHANG GX, BI HK. Dihydroxanthone I is effective against drug-resistant *Helicobacter pylori* *in vitro* and *in vivo*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2021, 65(3): e01921-20.