

耐低氮磷回交系水稻群体中根际促生菌的筛选、鉴定及其应用探索

张馨蕾¹, 范雨欣¹, 蒋昕彤¹, 杨玉玺¹, 沈红艳¹, 庄姗², 王建衡¹,
刘欣语¹, 白净³, 齐彦杰¹, 韩东飞^{1*}

1 苏州科技大学 环境科学与工程学院, 江苏 苏州

2 中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所, 北京

3 苏州科技大学 化学与生命科学学院, 江苏 苏州

张馨蕾, 范雨欣, 蒋昕彤, 杨玉玺, 沈红艳, 庄姗, 王建衡, 刘欣语, 白净, 齐彦杰, 韩东飞. 耐低氮磷回交系水稻群体中根际促生菌的筛选、鉴定及其应用探索[J]. 微生物学报, 2026, 66(4): 1819-1838.

ZHANG Xinlei, FAN Yuxin, JIANG Xintong, YANG Yuxi, SHEN Hongyan, ZHUANG Shan, WANG Jianheng, LIU Xinyu, BAI Jing, QI Yanjie, HAN Dongfei. Isolation, identification, and application of plant growth-promoting rhizobacteria from backcross inbred rice populations with tolerance to low nitrogen and low phosphorus[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(4): 1819-1838.

摘要: 【目的】从低氮磷处理的耐低氮磷水稻品种 YTZ 和耐低氮磷水稻回交子代品种 H8 的根系组织中分离并筛选出具有促生功能的水稻根际促生菌。【方法】采用平板划线法分离纯化菌株; 利用 16S rRNA 基因测序等方法进行菌种鉴定; 通过解磷、固氮、产吲哚-3-乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)等功能指标筛选促生菌株; 对目标菌株进行全基因组测序分析, 挖掘其功能基因, 揭示其分子机制。通过盆栽试验测定根际相关土壤理化性质, 探究目标菌株对水稻苗期氮、磷吸收效率的促进作用; 利用 16S rRNA 基因扩增子测序分析其对水稻根际微生物群落结构的影响, 结合菌群构建及菌群载体效果评价探索菌剂的应用潜力。【结果】共筛选出 7 株具有解磷、固氮能力的菌株, 并对其 IAA 产生能力进行定量分析, 最终筛选出 5 株具代表性的菌株进行盆栽试验。其中, 高地芽孢杆菌(*Bacillus altitudinis*) Hxx04 的促生效果最为显著, 使水稻植株鲜重增加 47.2%, 株高增加 48.6%, 显著提升了水稻苗期氮、磷吸收效率。根际土壤中全氮、碱解氮、全磷及有效磷含量均显著降低, 表明目标菌株促进了水稻对氮磷养分的吸收。群落分析显示, 接入目标菌株后根际群落呈现高丰度分布, 为水稻生长提供了氮素营养支持。在以 *B. altitudinis* Hxx04 为核心菌株的两两联合接种(双菌组合)评估中“膨润土+秸秆”载体组合效果最佳。【结论】

资助项目: 姑苏领军人才计划(ZXL2024372); 江苏省大学生创新创业训练计划(202310332004Z); 苏州市关键核心技术攻关项目(SNG2023018)

This work was supported by the Gusu Innovation and Entrepreneurship Talent Program (ZXL2024372), the Jiangsu Provincial College Students' Innovation and Entrepreneurship Training Program (202310332004Z), and the Science and Technology Program of Suzhou (SNG2023018).

*Corresponding author. E-mail: dongfeihan@usts.edu.cn

Received: 2025-08-15; Accepted: 2025-09-22; Published online: 2025-11-19

菌株 *B. altitudinis* Hxx04 能高效利用氮磷并显著促进水稻生长, 使水稻在鲜重和株高方面均有显著提升, 同时减少了对化肥的依赖, 兼具增产与环境保护效益。本研究为绿色农业提供了新的微生物资源与理论支持, 有助于实现水稻氮磷高效利用与生态环境保护的协同目标。

关键词: 水稻根际促生菌; 高地芽孢杆菌(*Bacillus altitudinis*); 氮磷利用; 菌株鉴定; 促生作用; 绿色农业

Isolation, identification, and application of plant growth-promoting rhizobacteria from backcross inbred rice populations with tolerance to low nitrogen and low phosphorus

ZHANG Xinlei¹, FAN Yuxin¹, JIANG Xintong¹, YANG Yuxi¹, SHEN Hongyan¹, ZHUANG Shan², WANG Jianheng¹, LIU Xinyu¹, BAI Jing³, QI Yanjie¹, HAN Dongfei^{1*}

1 School of Environmental Science and Engineering, Suzhou University of Science and Technology, Suzhou, Jiangsu, China

2 Institute of Environment and Sustainable Development in Agriculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, China

3 School of Chemistry and Life Sciences, Suzhou University of Science and Technology, Suzhou, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] To isolate and characterize plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) from the roots of the rice variety YTZ and the backcross progeny H8 with tolerance to low nitrogen and low phosphorus, and evaluate the potential of PGPR in promoting the growth of rice seedlings. **[Methods]** Bacterial strains were isolated by plate streaking and taxonomically identified through 16S rRNA gene sequencing. Functional traits, including phosphate solubilization, nitrogen fixation, and indole-3-acetic acid (IAA) production, were assessed for strain selection. Whole-genome sequencing was performed to mine functional genes and elucidate potential molecular mechanisms of target strains. Pot experiments were conducted to evaluate strain effects on the physicochemical properties of soil and nutrient (nitrogen and phosphorus) uptake of seedlings, while 16S rRNA gene amplicon sequencing was employed to analyze rhizosphere microbial community dynamics. In addition, synthetic microbial consortia and carrier combinations were developed and assessed for application feasibility. **[Results]** Seven strains with phosphate-solubilizing and nitrogen-fixing capabilities were obtained, and their IAA production was quantitatively determined. Five representative strains were selected for pot experiments. Among them, *B. altitudinis* Hxx04 exhibited the strongest plant growth-promoting effect, increasing the fresh weight by 47.2% and plant height by 48.6%, while significantly enhancing nitrogen and phosphorus uptake efficiency of rice seedlings. Inoculation with Hxx04 led to marked reductions in soil total nitrogen, alkali-hydrolyzable nitrogen, total phosphorus, and available phosphorus, indicating improved nutrient uptake by rice plants. Rhizosphere community analysis revealed increased microbial abundance

following inoculation, which supported the nitrogen supply for seedling growth. Furthermore, a synthetic microbial consortium centered on *B. altitudinis* Hxx04 performed optimally when being inoculated with the carrier combination of bentonite and straw. **[Conclusion]** *B. altitudinis* Hxx04 demonstrated high efficiency in nitrogen and phosphorus utilization and significantly promoted rice growth (evidenced by increased fresh weight and plant height), thereby reducing chemical fertilizer dependence. Its dual contribution to yield enhancement and environmental sustainability highlights its potential as a valuable microbial resource for green agriculture, supporting the goal of coordinating nutrient use efficiency with ecological conservation in rice production.

Keywords: rice growth-promoting rhizobacteria; *Bacillus altitudinis*; nitrogen and phosphorus utilization; strain identification; plant growth-promoting effect; green agriculture

水稻作为我国三大主要粮食作物之一,在粮食生产及消费中占据着绝对重要的地位^[1]。为满足人口不断增长的需求,对水稻产量提出了更高要求。在一定程度上,水稻产量与土壤中氮磷的利用程度呈正相关,因此施用氮肥和磷肥更易实现高产。然而,氮肥和磷肥的大量施用往往会造成严重的资源浪费和环境破坏,尤其是磷资源的利用问题愈发受到关注。与氮素不同,磷元素无法像氮气那样通过固氮作用转化为生物可利用形态,其主要来源是有限的矿石磷酸盐,开采后难以再生和回收,因而被视为不可再生资源^[2]。农业生产中过量施用磷肥不仅会造成资源流失,还会引发水体富营养化等环境问题^[3]。为解决水稻产量与环境保护之间的矛盾,最大程度减轻氮肥和磷肥过度使用对环境的破坏,找到平衡两者关系的方法是关键。近年来研究发现植物根际微生物在水稻营养吸收方面发挥着重要作用^[4]。通过对耐低氮磷水稻品种根际微生物进行筛选分析并加以利用,有望从调节根际微生物群落结构的角提高水稻耐低氮磷特性。微生物对植物生长过程极为重要,具有提高植物生产力和可持续性的潜力。Edwards等^[5]研究表明,在稻田土壤中产甲烷菌、甲烷氧化菌、合成菌和甲烷循环类群一般作为甲烷循环的功能菌群。此外,氮循环中的细菌,如亚硝基单胞菌也发挥重要作用^[6]。Ding等^[7]研究发现,由于水稻根际具有缺氧特性,在

促生过程中更有利于厌氧功能微生物的生长,如铁还原菌属(*Geobacter*)和脱硫弧菌属(*Desulfococcus*)等。Ding等^[8]利用 δ -变形菌纲(*Deltaproteobacteria*)的营养有效性在促进水稻生长的同时抑制病害。Yang等^[9]利用水稻根系与丛枝菌根的共生关系显著提升了水稻根系对磷的吸收。Rios-Ruiz等^[10]通过对比水稻根和茎鲜重研究芽孢杆菌属(*Bacillus*)和普里斯特菌属(*Priestia*)在根和茎中的内生定殖作用,发现菌株暹罗芽孢杆菌(*Bacillus siamensis*)TUR07-02b和巨大普里斯特氏菌(*Priestia megaterium*)SMBH14-02具有显著固氮能力,可配制成新型接种剂以减少氮肥使用,是潜在的微生物资源。

Rui等^[11]研究发现氮磷养分在丛枝菌根(arbuscular mycorrhizal, AM)共生中的复杂作用,低氮磷条件下通过诱导苜蓿中菌根标记基因MtPT4和MtBCP1的表达促使AM水平增加。Chen等^[12]研究表明,具有较大根系的超级杂交稻在低氮条件下有利于提高氮素的吸收效率。Das等^[13]发现在水稻中OsPHR2对菌根定殖、菌根磷吸收和产量至关重要。卫甜等^[14]筛选出2株高地芽孢杆菌,分别为*B. altitudinis*JYW21和*B. altitudinis*JYW26,研究发现二者不仅具有防治稻瘟病等多种真菌病害的潜在应用价值,还可通过增加水稻叶片叶绿素含量有效促进水稻生长。

为缓解长期施用化肥农药的不良影响,提

升作物产量与品质, 微生物制剂及微生物肥料应运而生。微生物制剂是一种含有活微生物的物质, 可与植物根瘤或内部结合, 增加宏量和微量营养素的供应, 微生物制剂指含活性微生物的产品, 可定殖于植物根际或体内, 促进宏量与微量营养素的供应。依据 Singh 等^[15]的定义, 微生物肥料则是含特定微生物的培养物, 旨在活化土壤养分并增强其植物有效性。因此, 微生物制剂在农业生产中日益成为研究重点^[16]。Chen 等^[17]研究表明, 对小麦施用菌剂后可显著提高产量并增加土壤有效氮含量; Sarabia 等^[18]发现根际酵母不仅能够改善玉米枝条和根系生长, 还能在一定程度上提升土壤肥力; Al Methyeb 等^[19]研究指出, 在酸性和养分缺乏的土壤中微生物菌剂与有机肥联合施用能显著提高植物产量与养分吸收; Shen 等^[20]研究发现, 微生物菌剂能提高玉米根系多胺、有机酸和醛类含量, 增强其抗酸、抗旱能力并促进茎叶发育; Shah 等^[21]研究表明, 用 *Bacillus* 处理番茄能提高番茄种子的发芽率、幼苗活力指数及株高、根长、鲜重等生长参数。综上所述, 微生物菌剂在农业中的应用不仅有利于改善农作物产量和品质, 还能改善土壤环境, 缓解化肥长期过量施用带来的不良影响。

我国生物肥料的研发与应用已有数十年, 但产业化进程仍相对缓慢。关键制约因素在于: 实验室筛选的菌株常表现优异, 而在温室或田间实际应用中其效应易受复杂土壤环境、土著微生物竞争及载体特性差异等因素影响, 表现出波动性^[22]。细菌在自然环境中常依赖生物膜附着于各类表面, 这对环境适应及进化至关重要^[23]。Bais 等^[24]研究表明, 生物膜形成是其稳定定殖于植物根际的关键机制, 通过构建致密结构增强定殖密度, 进而发挥促生与生防功能。微生物制剂通常由特定菌株群(或单菌)与固态/液态载体、保护剂及黏附剂构成。其功效受载体理化特性(如粒径)、施用对象(土壤/作物类型)、施用方式以及养分植物有效性等因素综合影响。

例如, 以海藻酸盐为基础的枯草芽孢杆菌生物制剂可促进豆类和莴苣生长^[17]。

尽管在水稻根际促生菌培养研究中已成功分离出不少菌株, 但成功分离的种类仍远少于水稻根际中潜在存在的数量, 且多数研究集中于单一功能菌株的探索, 如单独考察解磷菌、固氮菌或产吲哚-3-乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)菌株的促生效果, 而对多功能菌株的系统研究仍然有限。现有报道普遍缺乏对同时具备解磷、固氮及产 IAA 能力的复合型菌株的深入评估, 也鲜有涉及其在绿色载体体系中的稳定性与应用潜力。本研究将提供一种新的水稻根际促生菌 *B. altitudinis* Hxx04 (全基因数据收录于 NCBI 数据库中, Genome accession ID: CP180628–CP180629), 该菌株兼具解磷、固氮及产 IAA 的多促生特性, 能够显著提升水稻对氮、磷的吸收效率和生长表现。此外, 本研究探索了“膨润土+秸秆”复合载体对 Hxx04 的负载和施用效果, 评估其在固态环境下的生存稳定性及促生功能, 为微生物肥料的制剂化和绿色农业推广提供了新思路。本研究旨在丰富水稻根际促生菌研究内容, 同时为实现氮磷高效利用与减肥增效提供新的理论与应用支撑。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

本研究的水稻根系样品来自中国农业科学院作物科学研究所。选取高用明研究员及其团队^[25-27]培育的耐低氮磷子代(BC₂F₄群体)、我国当前生产上大面积推广应用且生理性状良好的籼稻恢复系‘明恢 86’(MH86)和‘蜀恢 527’(SH527)作为轮回亲本, 耐低氮低磷环境的籼稻品种‘爷驼崽’(YTZ)和 2004 为供体亲本, 分别进行杂交配组。然后以轮回亲本‘明恢 86’和‘蜀恢 527’与 F₁ 回交产生 BC₁F₁, 从每个组合 BC₁F₁ 后代中随机选择 25 个单株, 继续与轮回亲本回交得到 BC₂F₁, 加代繁殖并混收其自交种

子得到 BC₂F 群体。2010 年夏, 在安徽宣城地区的低氮磷红壤土田块种植 BC₂F₂ 群体, 每个群体在不施氮肥和磷肥的条件下各种植 1 000 株。蜡熟期通过田间产量性状鉴定, 选留产量性状优良的单株(‘蜀恢 527’/‘爷驼崽’群体 60 个、‘明恢 86’/‘爷驼崽’群体 54 个、‘蜀恢 527’/2004 群体 40 个和‘明恢 86’/2004 群体 42 个), 获得 4 个 BC₂F₃ 耐低磷低氮选择导入系群体。2010 年冬季于海南加代繁殖并按单株收获, 获 BC₂F₄ 群体(H8)^[27]。本研究选用回交系材料, 主要目的在于保证遗传背景相对统一, 同时保留供体亲本的低氮低磷耐受性, 有助于评估促生菌株在不同宿主基因型下的定殖与促生效果, 为微生物资源与作物遗传改良的结合提供依据。

本研究中盆栽用土来自相城区望亭镇迎湖村(31.409 909°N, 120.416 408°E), 土壤样品检测分析得到其 pH 值为 6.9、有机质 35.70 g/kg、全氮 1.65 g/kg、有效磷 11.72 mg/kg、速效磷 131.0 mg/kg、缓效钾 260.0 mg/kg。

1.2 培养基

R₂A 培养基(含琼脂, BD 公司)(g/L): 胰蛋白胨 0.25, 酸水解酪蛋白 0.5, 酵母浸粉 0.5, 可溶性淀粉 0.5, 磷酸氢二钾(K₂HPO₄) 0.3, 硫酸镁(MgSO₄) 0.1, 丙酮酸钠 0.3, C₆H₁₂O₆ 0.25, pH 7.2±0.2; LB 固体与液体培养基(g/L): 酵母提取物 5.0, 蛋白胨 10.0, 氯化钠(NaCl) 10.0, pH 7.0, 配制固体培养基时加入琼脂 15.0 g/L; 阿须贝(Ashby)无氮培养基(g/L): 硫酸钙(CaSO₄) 0.1, 磷酸二氢钾(KH₂PO₄) 0.2, NaCl 0.2, 碳酸钙(CaCO₃) 5.0, 硫酸镁(MgSO₄) 0.2, 葡萄糖(C₆H₁₂O₆) 10.0, 琼脂 15.0, pH 7.0; 解有机磷细菌培养基(g/L): 植酸钙 1.0, C₆H₁₂O₆ 30.0, 硝酸铵(NH₄NO₃) 5.0, MgSO₄ 0.5, 硫酸锰(MnSO₄) 0.05, 硫酸亚铁(FeSO₄) 0.5, 氯化钾(KCl) 0.5, 琼脂 15.0, pH 7.0; NBRIP 无机磷培养基(g/L): C₆H₁₂O₆ 10.0, 磷酸三钙[Ca₃(PO₄)₂] 5.0, 氯化镁六水合物(MgCl₂·6H₂O) 5.0, 硫酸镁七水合物(MgSO₄·7H₂O) 0.25, KCl 0.2, 硫酸铵

[(NH₄)₂SO₄] 0.1, 琼脂 15.0, pH 7.0。

所有培养基在使用前均经高压蒸汽灭菌处理: R₂A、LB 及 Ashby 培养基在 121 °C 下灭菌 15 min; 解磷细菌培养基在 116 °C 下灭菌 30 min。

1.3 微生物分离培养

水稻根用自来水清洗干净, 切成约 3 cm 小段, 吸干水分; 称取 1 g 水稻根部组织, 进行表面消毒^[28], 用 5% 次氯酸钠浸泡消毒 1 min 后, 用 75% 乙醇浸泡消毒 1 min, 再用无菌水清洗 2–3 次至消毒液彻底洗掉, 用灭菌滤纸将水分吸干; 将根部组织转移到已灭菌的研钵中磨碎, 加入 1 mL 无菌水研磨, 制成原浆, 在原浆中补加 8 mL 无菌水并混匀, 即获得浓度为 10⁻¹ 的菌悬液。根据稀释分离程序制成 10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 不同浓度梯度菌液, 同时为验证分离的是根系内生菌而非表面杂菌, 保留了最后 1 次清洗液用于涂布平板观察是否无菌落, 其余稀释菌液分别取 20 μL 菌悬液涂布于 R₂A、LB、1/10 LB 3 种平板上, 每稀释度 3 个重复; 另取 2 种平板各涂 20 μL 最后 1 次清洗的无菌水作为对照, 28 °C 培养箱中培养 24–48 h 观察菌落生长动态。待有细菌菌落产生, 选取平板上菌落形态和颜色特征不同的单个菌落, 分别编号, 用接种环刮取单菌落在 LB 固体培养基上进行划线培养。挑选形态不同的单菌落在 LB 固体培养基上用平板划线法获得纯培养菌落, 纯培养物接种到 LB 培养基中培养 1 d, 重复 2 次, 得到分离菌株。将单菌落划线纯化后制成菌悬液, 把菌液和 50% 的灭菌甘油按 1:1 的比例于 -80 °C 下保存, 备用。

1.4 16S rRNA 基因鉴定

从单菌落上挑取菌体制成菌悬液, 采用沸水浴法制备 DNA 粗提溶液^[29]。以提取的 DNA 粗提溶液为模板, 用通用引物 27F (5'-AGAGTT TGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTAC CTTGTTACGACTT-3') 对 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μL): 2×Taq Plus

Master Mix II 25 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL , DNA 模板 2 μL , ddH_2O 21 μL 。PCR 反应条件: 95 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s, 56 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 90 s, 共 25 个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 终延伸 10 min。

扩增产物经凝胶电泳检测, 在 2 500 bp 左右出现明亮单条带。其余产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。测得序列上传至 NCBI 数据库并进行 BLAST 比对(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), 并选取相似度最高的前 10 个菌株序列, 利用 MEGA 11.0 软件构建系统发育树, 分析菌株的亲缘关系。

1.5 促生实验

1.5.1 氮功能鉴定

将 5 μL 菌悬液点接于阿须贝氏培养基上, 于 28 $^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中培养, 观察菌落生长情况。若该菌株能够在阿须贝氏(固氮)培养基中生长, 则证明其具有固氮能力。

1.5.2 解无机磷菌种鉴定

将 5 μL 菌悬液点接于无机磷(NBRIP)固体培养基上, 28 $^\circ\text{C}$ 培养 3 d, 能够产生透明溶磷圈则证明该菌株具有降解无机磷的能力。

1.5.3 解有机磷鉴定

将同时具有固氮和解无机磷功能的菌株悬液点接在解有机磷菌株鉴定培养基上, 25 $^\circ\text{C}$ 、200 r/min 培养 4 d, 菌株在该培养基上产生明显降解圈, 证明该菌株具有降解有机磷(植酸钙)功能。

1.5.4 产 IAA 定性验证

配制 LB 培养基(含 100 mg/L 2-色氨酸), 灭菌后将菌悬液按体积比 1:100 接种, 设置 3 个重复, 设置不接种菌悬液的 LB 培养基作为空白对照; 28 $^\circ\text{C}$ 、120 r/min 避光培养 5 d, 取发酵液 2 528 r/min 离心 5 min; 吸取上清液和 Salkowski 显色剂各 2 mL 在比色管中避光反应 30 min, 以 LB+Salkowski 显色剂作为空白对照。以 50 mg/L IAA 标准溶液+Salkowski 显色剂作为阳性对照,

观察溶液颜色变化, 变为粉红即表示菌株能够分泌 IAA。

1.5.5 产 IAA 定量验证

配制 LB 培养基(含 100 mg/L 2-色氨酸), 灭菌后将菌悬液按体积比 1:100 接种, 设置 3 个重复, 设置不接种菌悬液的 LB 培养基作为空白对照。在 28 $^\circ\text{C}$ 、120 r/min 避光培养 5 d, 取发酵液 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液+Salkowski 各 2 mL 在比色管中避光反应 30 min, 测定其 OD_{530} 值, 纯水对照调零。根据 IAA 标准溶液 0–25 mg/L 的校准曲线计算 IAA 浓度。

1.6 盆栽试验

在扦插盆中加入 600 g 土壤, 并使用纯水湿润测量初始株高, 将前期处理所得幼苗移栽, 每盆 10 株, 设置 3 组重复试验。盆栽试验过程中分别在第 1 天与第 8 天时使用菌悬液进行灌根处理(每株苗灌根 1 mL)。培养期间每天观察存活株数, 并在第 15 天时测量株高及地上部分鲜重, 计算株高平均值。盆栽种植前后分别测定土壤中全氮、全磷、碱解氮、有效磷的浓度。

1.7 根际土壤微生物群落分析

1.7.1 DNA 提取与质量检测

使用 E.Z.N.A. Soil DNA Kit (Omega Bio-Tek 公司)试剂盒提取土壤样本的基因组 DNA, 通过 NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific 公司)检测基因组 DNA 质量和浓度。

1.7.2 PCR 扩增

使用通用引物 338F (5'-ACTCCTACGGG AGGCAGCAG-3')和 806R (5'-GGACTACHVGG GTWTCTAAT-3')扩增细菌 16S rRNA 基因的 V3–V4 区。在上游引物和下游引物的 5'末端各添加 8 bp 的 barcode 序列, 以区分不同的样本。最后合成带有 barcode 序列的通用引物在 PCR 仪 (Applied Biosystems 公司)上进行扩增。PCR 反应体系(25 μL): 2 \times Taq Plus Master Mix 12.5 μL , 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA, 2 ng/ μL) 3 μL , 上、下游引物(5 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL , DNA 模

板 2 μL , ddH₂O 5.5 μL 。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 45 s, 共 28 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。

1.7.3 PCR 产物电泳检测及产物纯化

使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增目的条带大小(170 V、30 min)。产物使用核酸纯化试剂盒进行自动化纯化。

1.7.4 文库构建

对 PCR 纯化后的产物进行末端修复和加 A 尾处理, 连接接头形成“Y”形结构。使用磁珠纯化并去除接头自连片段后, 对接头连接的 DNA 片段进行 PCR 扩增和富集, 获得测序文库。

1.7.5 测序方法

采用 Illumina 平台的边合成边测序 (sequencing-by-synthesis, SBS) 技术。文库片段一端与流动槽表面的寡核苷酸引物互补并固定, 另一端随机退火形成“桥”结构, 经桥式扩增形成簇。测序过程中, DNA 聚合酶逐轮掺入带有可逆终止基团和荧光标记的核苷酸, 激光扫描捕获荧光信号后切除终止基团, 恢复 3' 端活性并进入下一轮合成, 直至获得完整模板序列。

1.7.6 OTUs 聚类分析

将高质量的非冗余序列(clean tags)按相似性进行聚类, 生成 OTUs。聚类方法使用 UPARSE 聚类法^[30], 降噪法为 unoise3 方法。

1.7.7 群落丰富度计算

Chao1 指数^[31]: 即菌种丰富度指数, 用以估计群落中的 OTU 数目, 计算如公式(1)所示。

$$S_{\text{Chao1}} = S_{\text{obs}} + n_1(n_1 - 1) / 2(n_2 + 1) \quad (1)$$

式中: S_{Chao1} 为估计的 OTU 数, S_{obs} 为观测到的 OTU 数, n_1 为只有 1 条序列的 OTU 数目, n_2 为只有 2 条序列的 OTU 数目。

Simpson 指数^[32]: 用于估算样品中微生物多样性指数之一, 结果以 $1-D$ 表示, 计算如公式(2)所示。

$$1 - D = 1 - \sum (N_i / N)^2 \quad (2)$$

式中: D 值反映的是在同一样本中随机抽取

2 个个体来自同一类的概率。

Simpson 指数兼顾丰富度和均匀度, 其中的 D 值反映的是在同一个样本中随机地抽取 2 个个体, 这 2 个个体来自同一个类的概率。即 D 值是发现的某一特定物种的个体的总数(N_i)除以发现的个体总数(N)。 D 值在 0-1 之间, 0 表示无限多样, 1 表示无多样性。因此 $1-D$ 值越大, 则说明群落多样性越高。

1.7.8 物种组成分析及物种组成热图绘制

使用 R (v3.6.0) 的 reshape2、ggplot2 包对属水平物种组成进行分析和作图。使用 R (v3.6.0) 的 vegan、vegdist 和 hclust 包进行距离矩阵计算和聚类分析。距离矩阵算法: Bray-Curtis; 聚类方法: Complete。使用 R (v3.6.0) 的 ade4、ggplot2、ggrepel、grid、mixOmics 包进行分析和作图。

1.8 基因组分析

基于 Nanopore 三代测序技术平台和二代测序技术平台进行测序, 三代测序通过 GuPPy (version 5.0.16) 进行 Base calling 后转换为 Fastq 格式。将原始测序数据进行质量过滤($Q \geq 7$)和长度过滤($\text{length} \geq 1\ 600$ bp)得到有效数据, 用于后续组装分析。二代原始测序数据经 Fastp (version 0.23.2) 过滤后, 得到有效测序数据(clean data)共 1 973 535 504 bp。过滤标准如下: 当任一测序 reads 中 N 含量超过该 reads 碱基数的 10% 时去除此 paired reads; 当任一测序 reads 中含有的低质量($Q \leq 5$)碱基数超过该条 reads 碱基数的 50% 时去除此 paired reads。

使用 Unicycler (version 0.5.0) 软件对过滤后的 reads 进行组装: 首先使用高准确度的 Illumina 数据($Q_{30} > 85\%$)进行组装, 得到高质量的细菌基因组骨架(contig); 然后再使用 Nanopore 数据将高质量 contig 连接成完成图。该策略组装得到的细菌完成图, 准确度由 Illumina 数据的准确度决定, 而且可以有效避免 Nanopore 数据拆分错误引入的序列污染。最后使用 Pilon 软件利用二代数据进一步对组装基因

组进行纠错, 得到最终准确度更高的基因组。在 NCBI 数据库中下载固氮、解磷以及产 IAA 过程中功能基因的样本序列, 使用 Linux Shell (L)整合并导入 TBtools (v2.1)建库比对, 筛选功能基因。

组装后共获得 2 条 contigs, 其中主 contig 长度为 3 730 917 bp, 次 contig 长度为 5 318 bp; G+C 含量分别为 41.41% 和 35.95%, 且 2 条 contigs 均为闭合环状; 由于组装结果仅包含 2 条 contigs, 其中 1 条长度为 3.73 Mb, 占据绝大部分基因组, 因此 N50=3 730 917 bp; 主 contig 测序深度: Illumina 平均覆盖深度 522.76×; Nanopore 平均覆盖深度 382.22×, 次 contig 测序深度: Illumina 平均覆盖深度 1 777.24×; Nanopore 平均覆盖深度 1 540.44×, 高测序深度确保了组装的可靠性。

1.9 双菌组合微生物群落构建及菌剂载体研究

分别选取粒径为 2–4 mm 的秸秆和膨润土, 取 30 cm³ 秸秆-膨润土复合水凝胶作为菌剂载体, 加入 5 mL (*OD*₆₀₀≈1.0)的菌液, 混匀后用于后续固定化实验。

设计 3 组合成微生物群落, 分别为 Hxx03+Hxx04、Hxx04+Hxx05、Hxx04+Hxx10; 同时设置未接种菌剂的空白对照; 并选择 4 种载体, 分别为膨润土、秸秆、膨润土+秸秆、海藻酸钠水凝胶, 同时设置无载体空白对照。对上述所得双菌组合微生物群落及载体进行盆栽试验验证, 通过观察 15 d 内水稻苗期的株高进行验证, 对盆栽种植结束后株高进行测量, 1、2、3、4、5 分别为 5 组平行实验。

2 结果与分析

2.1 菌株筛选与鉴定

实验选取了正常生长的、经低氮、磷处理后的水稻品种 YTZ (YTZ-1-1、YTZ-L-N、

YTZ-L-P)及经低氮、磷处理的水稻品种 H8 (H8-L-N、H8-L-P), 使用 R₂A、固体 LB、1/10 固体 LB 培养基进行筛菌。初筛得到 20 株纯培养菌株, 通过凝胶电泳及 16S rRNA 基因测序分析最终得到 7 株纯培养菌株, 经比对后命名, 如表 1 所示。

将 7 株菌株进行 16S rRNA 基因序列比对后, 由于 *Bacillus* 等分类群的 16S rRNA 基因相似度通常>99%, 因此对筛选后的代表性菌株 *B. altitudinis* strain Hxx04 进行全基因组测序。在 GTDB (genome taxonomy database) 网站下载 *B. altitudinis* 的模式菌株——*B. altitudinis* strain GR-8, 与菌株 *B. altitudinis* Hxx04 进行基因组比对, 通过模型计算得 ANI 值为 98.48, dDDH 值为 96.70。高 ANI 值与 dDDH 值表明二者基因组在核苷酸水平上高度相似, 菌株关系紧密, 属于同一物种。

2.2 菌株促生定性实验

对上述所得 7 株菌进行促生情况测定, 分别从解无机磷、解有机磷、固氮、促进 IAA 产生 4 个指标进行了测定, 所得实验结果如表 2 所示。

2.3 生长素定量测定

对以上 7 株菌使用液体 LB 培养制备菌悬液, 7 d 后对菌悬液上清液中的生长素浓度进行

表1 菌株名称及来源

Table 1 Strain names and sources

Name	Origin
<i>Priestia</i> sp. strain Hxx02	YTZ-1-1
<i>Bacillus</i> sp. strain Hxx03	H8-L-N
<i>B. altitudinis</i> Hxx04	YTZ-L-P
<i>Priestia</i> sp. strain Hxx05	YTZ-L-P
<i>Bacillus</i> sp. strain Hxx07	H8-L-P
<i>Bacillus</i> sp. strain Hxx09	YTZ-L-N
<i>Bacillus</i> sp. strain Hxx10	YTZ-L-N

表2 菌株促生情况

Table 2 Promotion of bacterial strains

Name	IP ¹	OP ²	Nitrogen fixation ³	IAA ⁴
<i>Priestia</i> sp. strain Hxx02	+	+	+	+
<i>Bacillus</i> sp. strain Hxx03	-	+	+	+
<i>B. altitudinis</i> Hxx04	+	+	+	+
<i>Priestia</i> sp. strain Hxx05	+	+	+	+
<i>Bacillus</i> sp. strain Hxx07	+	+	+	+
<i>Bacillus</i> sp. strain Hxx09	+	+	+	+
<i>Bacillus</i> sp. strain Hxx10	+	+	+	+

+: 表示具有溶磷、固氮或促进IAA产生的能力; -: 表示不具备溶磷能力或不能促进IAA产生; IP: 代表无机磷; OP: 代表有机磷。

+: It has the ability to release phosphorus and fix nitrogen or promote the production of IAA; -: The phosphorus fixation ability is not solved or the production of IAA cannot be promoted; IP: Inorganic phosphorus; OP: Organophosphorus.

定量测定, 重复多组后对其产生生长素能力进行定量评估。所得生长素浓度如图 1A 所示。

根据促生定性及生长素定量实验, 本研究选取了 5 株具有代表性的菌株进行后续盆栽种植, 分别为: Hxx03、Hxx04、Hxx05、Hxx09、Hxx10。

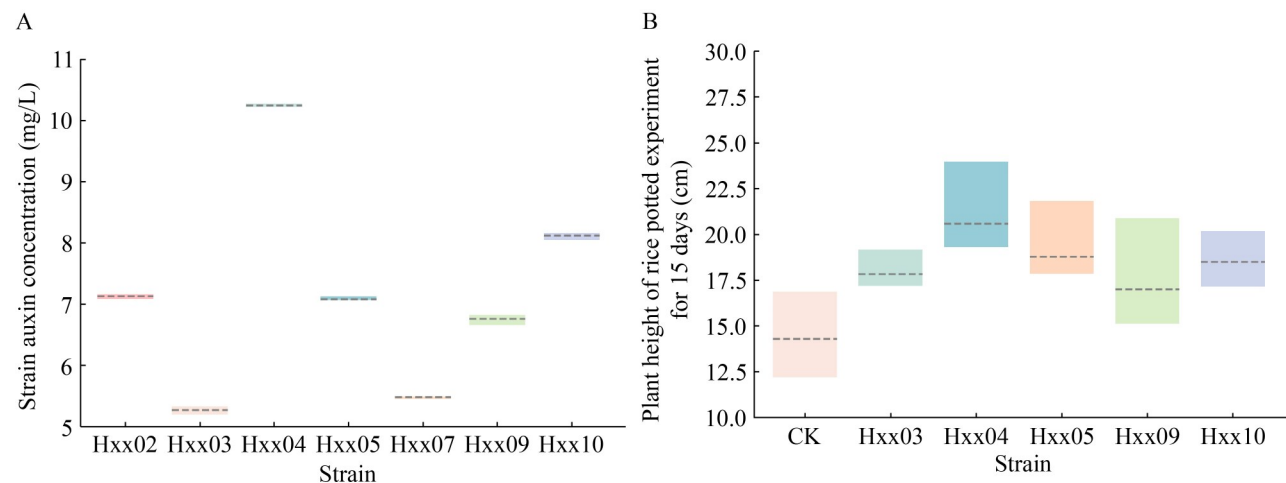


图1 不同菌株的生长素产生能力及其对水稻生长的影响

Figure 1 Auxin production capacity of different strains and their effects on rice growth. A: Determination of auxin concentration of different strains; B: Comparison of rice plant height after 15 days of pot experiment (dashed line indicates the median value).

2.4 水稻盆栽试验

水稻盆栽试验 15 d 株高测定结果可看出 (图 1B), Hxx04 对水稻苗期的株高有明显的促进作用, 株高最多增加了 47.2%。同时, 结合表 3 的单株鲜重数据, 本研究选取鲜重显著增加 48.6% 的菌株 Hxx04 进行后续实验。

2.5 土壤氮磷检测及根与根际土群落检测

待 15 d 盆栽种植结束后收集盆栽试验所得的水稻根系组织、根际土、根相关土, 分别测定土壤氮磷和群落物种组成。

2.5.1 盆栽试验前后土壤氮磷测定数据

本研究测定了盆栽种植前后土壤中的全氮(TN)、全磷(TP)、碱解氮(AN)、有效磷(AP) 4 个指标, 其中初始值为未种植土壤背景值, 对照组为未接入菌株组, 实验组为接入 Hxx04 菌株组, 所得结果如表 4 所示。

由表 4 盆栽前后土壤理化性质数据对比可观察到: 接入菌株 Hxx04 的实验组 4 个指标相较于对照组均有明显降低, 表明接入 Hxx04 的水稻组别对氮、磷的吸收显著提高。

表3 盆栽试验植株地上部分单株鲜重

Table 3 Fresh weight of aboveground parts of potted experimental plants per plant

Group	1 (g)	2 (g)	3 (g)	Average value (g)
CK	0.55	0.56	0.49	0.53±0.03
Hxx03	0.60	0.60	0.58	0.59±0.01
Hxx04	0.79	0.77	0.79	0.78±0.01
Hxx05	0.61	0.63	0.66	0.63±0.02
Hxx09	0.66	0.67	0.70	0.68±0.02
Hxx10	0.60	0.65	0.57	0.60±0.03

1, 2, and 3 represent the measured values of three parallel plants within the same treatment group; Data are presented as mean±SD, $n=3$.

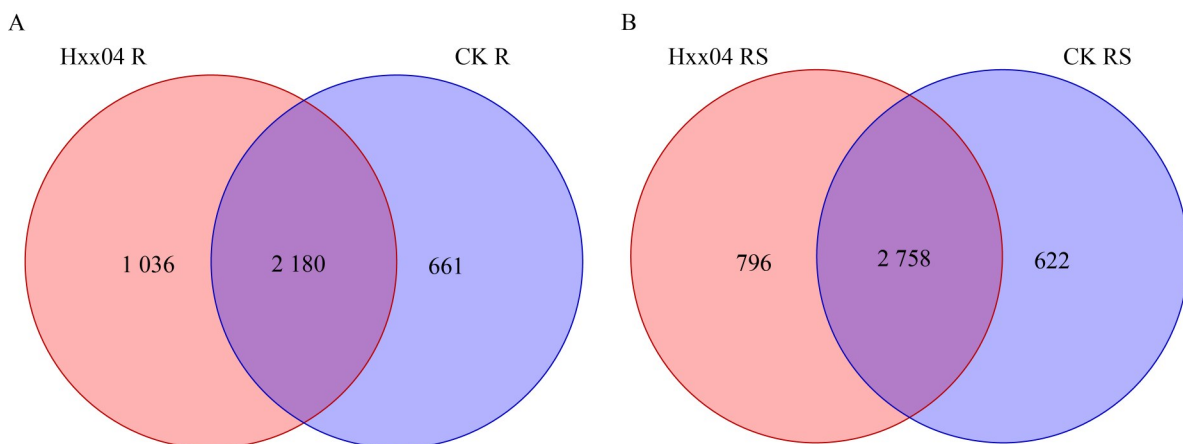
2.5.2 根与根际土群落检测

如图 2A、2B 所示, R 为根内生组织群落数据, RS 为根际土群落数据, CK 为未接入菌株的空白组。对微生物组测序结果进行分析发现, 接入菌株 Hxx04 与对照组相比, 其微生物组多样性和丰富度具有明显差异。其中接入 Hxx04 的组别根里的多样性显著高于对照组

表4 盆栽前后土壤理化性质对比

Table 4 Comparison of soil physical and chemical properties before and after potting

Project	Initial value	Mean of the control group	Mean of the experimental group
TN (mg/kg)	1 650.00±1.50	1 640.00±0.60	1 620.00±3.60
AN (mg/kg)	116.50±0.66	110.37±0.83	105.73±0.25
TP (mg/kg)	570.00±6.50	540.00±5.80	470.00±20.00
AP (mg/kg)	17.50±0.06	16.67±0.06	15.10±0.53



(图 2C、2D)。如图 2E 所示, 为 PLS-DA 分析所得, 由图可判断各个组别之间存在一定差异, 误差值在正常范围内。如图 2F 所示, 微生物相对富集热图中主要富集微生物为 *Bacillaceae*, 相关度可达 63.413, *Sphingomonadaceae* 与 *Rhizobiaceae* 次之。

2.6 全基因组测序分析

对代表性菌株 *B. altitudinis* Hxx04 的全基因组测序结果进行分析, 组装后基因组总长度为 3.73 Mb, 平均 G+C 含量为 41.41%。根据全基因组数据绘制全基因组发育树, 如图 3 所示。

2.7 基因功能注释

为获取全面的基因功能信息, 本研究利用八大数据库对预测编码基因进行功能注释与分类, 包括通用蛋白资源库 (universal protein resource, UniProt)、京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 及 KEGG 通路数据库 (KEGG pathway)、GO (gene ontology)、蛋白家族数据库 (protein

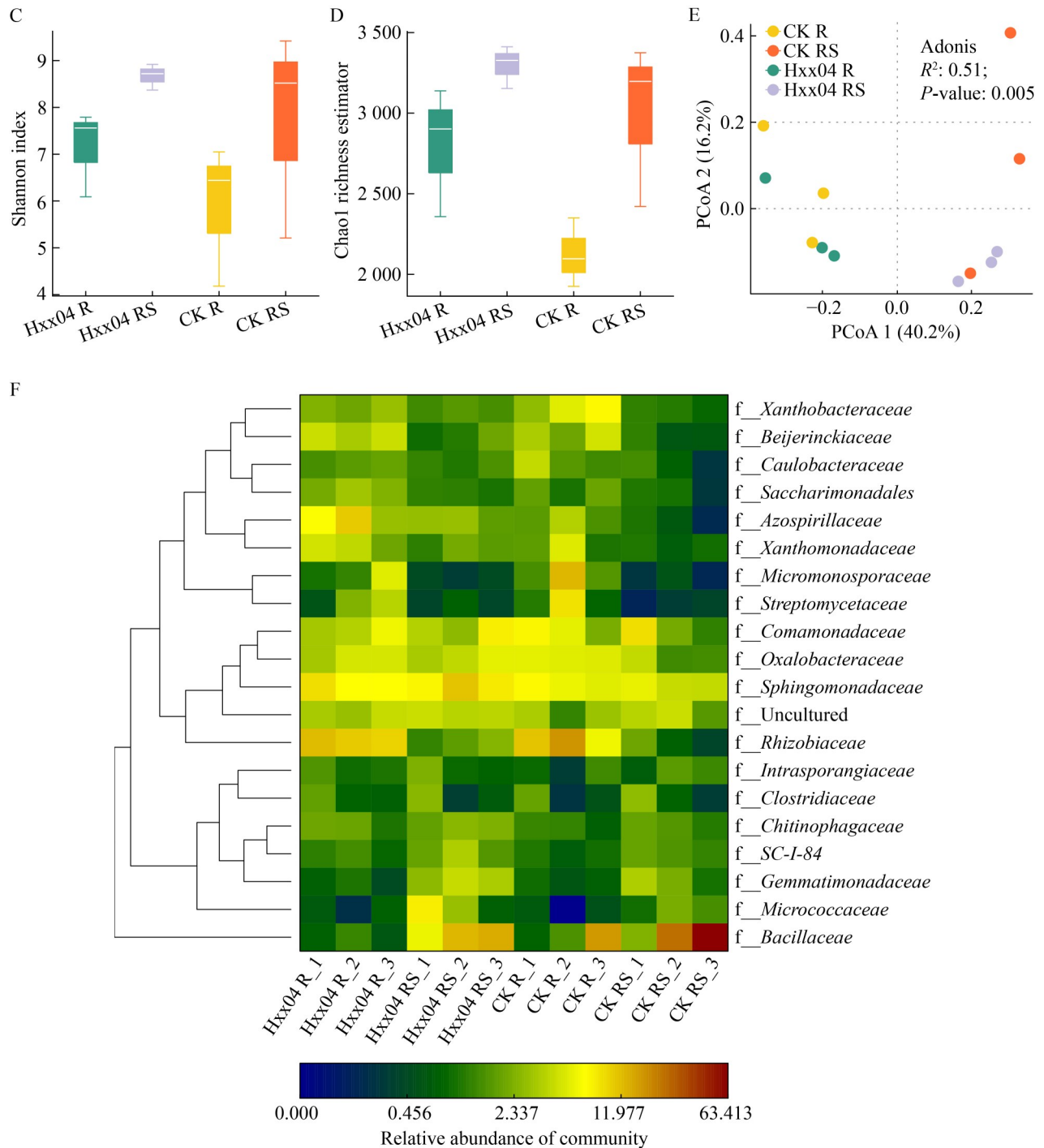


图2 水稻根及根际土OTUs分布及微生物群落差异分析

Figure 2 Distribution of OTUs in rice roots and rhizosphere soil and analysis of microbial community differences. A, B: Represent the Venn diagrams of OTUs distribution in rice roots and rhizosphere soil; C, D: Represent the species richness index and microbial diversity index; E: Represents PLS-DA analysis; F: Represents the microbial relative enrichment heatmap. R: Denotes root samples; RS: Denotes rhizosphere soil samples; CK: Denotes the uninoculated control group.

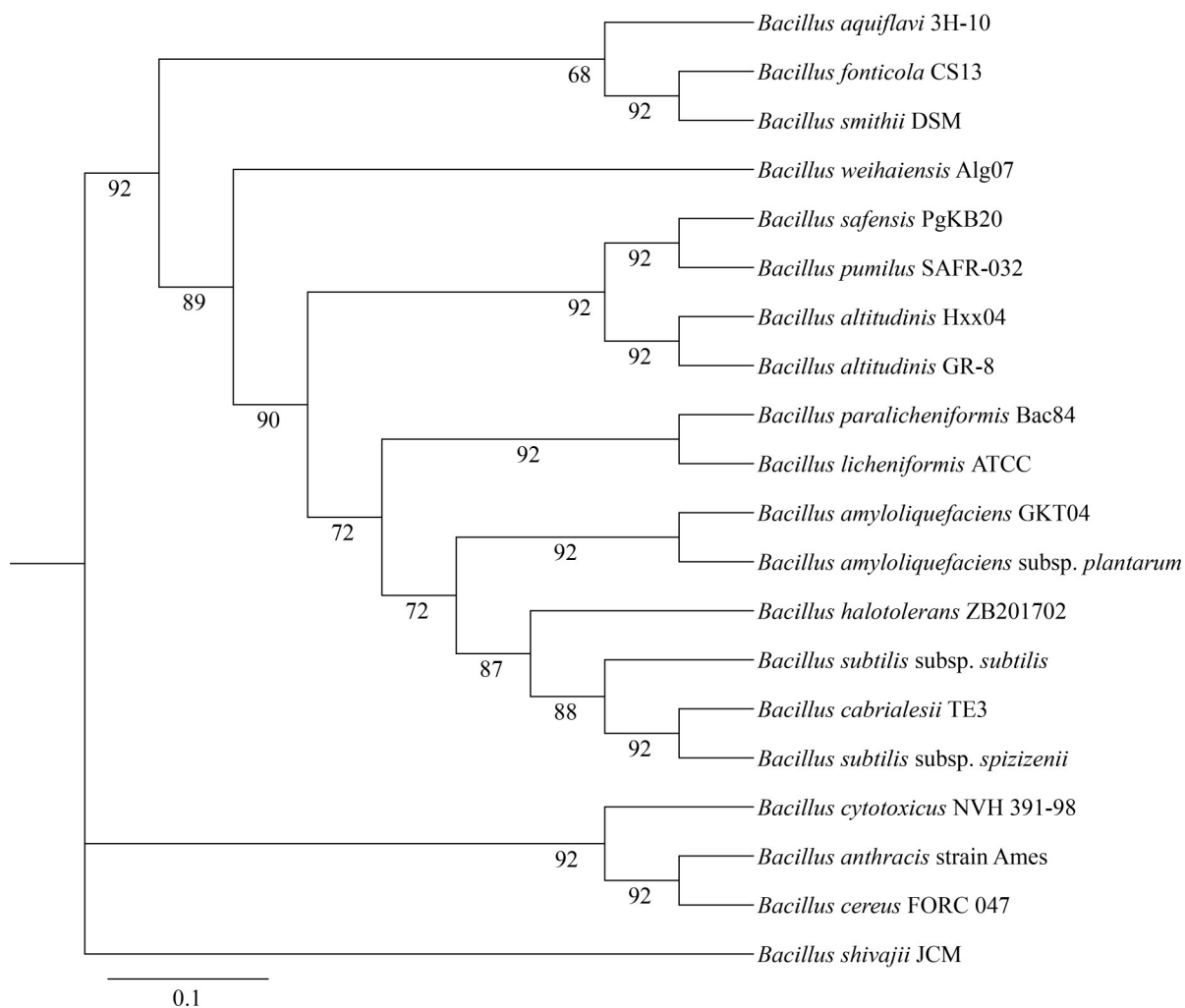


图3 基于全基因组序列的*Bacillus*系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree of *Bacillus altitudinis* Hxx04 and 19 other *Bacillus* strains based on whole-genome sequences. The phylogenetic tree was constructed based on the whole-genome sequences of 20 *Bacillus* strains. Numbers on the branches indicate bootstrap support values, and the scale bar (0.1) represents evolutionary distance.

families database, Pfam)、直系同源蛋白簇数据库 (clusters of orthologous groups of proteins, COG)、TIGRFAMs (the institute for genomic research protein families)、参考序列数据库 (reference sequence database, RefSeq) 和非冗余蛋白序列数据库 (non-redundant protein sequence database, NR), 用于对预测编码基因进行功能注释和分类。KEGG 是一个用于系统分析基因产物在细

胞中的代谢途径(pathway)以及这些基因产物功能的主要公共数据库。对基因进行 KEGG 注释后, 根据其参与的 KEGG 代谢通路进行分类, 结果如图 4 所示。

2.8 功能基因信息比对

Hxx04 的关键功能基因注释比对结果显示其包含解磷、固氮/氮代谢及 IAA 相关基因, 如表 5 所示。

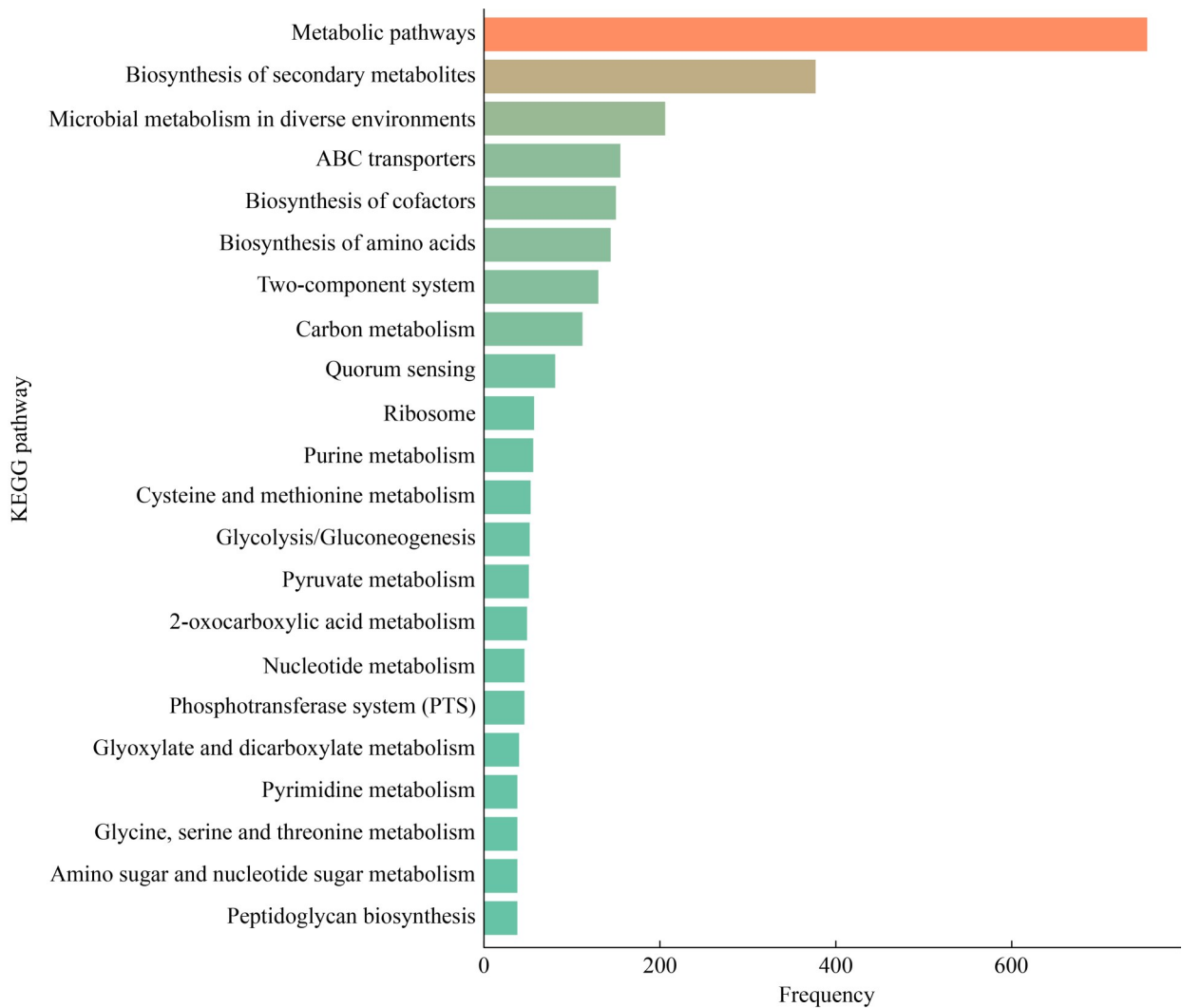


图4 KEGG注释图

Figure 4 KEGG annotation.

表5 功能基因

Table 5 Functional genes

Function	Gene ID	Gene name	Full name
Phosphorus-solubilizing	ctg_02753	<i>phoR</i>	Phosphate metabolism sensor kinase
	ctg_02754	<i>phoP</i>	Phosphate metabolism regulator
	ctg_01376	<i>arlR</i>	Antibiotic resistance regulator
Nitrogen fixation	ctg_02628	<i>nifS</i>	Nitrogen fixation sulfur carrier
	ctg_00401	<i>glnK</i>	Glutamine synthetase regulatory protein K
	ctg_01807	<i>glnA</i>	Glutamine synthetase
	ctg_02324	<i>norR</i>	Nitric oxide reductase regulator
IAA-producing	ctg_01019	<i>amiF</i>	ABC transporter of multiple peptides F
	ctg_00282	<i>amiE</i>	Acetylmuramoyl-L-alanine amidase E

2.9 双菌组合微生物群落与载体研究

水凝胶可为微生物提供柔软、适宜的生存环境，膨润土则提供稳定的支撑和吸附能力，秸秆中含有纤维素和有机质，可为菌体提供碳源并改善孔隙结构。三者相互结合可提高载体的保水、缓释和吸附性能，为微生物提供养分和附着空间，形成类似土壤“有机-无机”复合体的结构，更利于菌剂在其中存活和发挥作用。使用双菌组合微生物群落与菌剂处理，进行为期 15 d 的水稻盆栽试验，记录盆栽试验前后水稻苗期的株高(图 1B)，并将不同载体盆栽种植后的水稻株高数据整理记录，如表 6 所示。对

以上数据进行显著性分析，结果如图 5 所示。

由上述数据知，以 *B. altitudinis* Hxx04 为核心菌株筛选出较优的双菌组合微生物为 Hxx04+Hxx05，进行筛选验证得出最优载体为膨润土+秸秆，可构建出以生产为导向的微生物制剂。

3 讨论

3.1 菌株筛选与促生效果

本研究筛选出 7 株具有解磷、固氮能力的菌株，并对其产 IAA 能力进行定量测定分析，筛选出 5 株具有代表性的菌株进行盆栽水稻种植实验。最终确定 Hxx04 促生能力优良，经鉴

表6 不同载体盆栽组合处理后水稻株高

Table 6 Plant height (cm) of rice treated with combination of synthetic microbial communities and different vectors

Group	Vector	Synthetic microbial communities					Mean±SD	Significance analysis
		1 (g)	2 (g)	3 (g)	4 (g)	5 (g)		
Hxx04+Hxx03	Bentonite	22.0	21.1	21.1	20.9	21.4	21.30±0.43	ab
	Straw	21.5	20.4	20.4	20.2	19.9	20.50±0.61	bc
	Bentonite+Straw	22.7	22.0	21.7	21.9	21.7	22.00±0.41	a
	Hydrogel	19.8	19.6	19.9	19.2	19.5	19.60±0.27	cd
	No carrier	18.8	18.5	17.8	18.9	20.0	18.80±0.80	d
Hxx04+Hxx05	Bentonite	22.7	22.5	23.0	21.5	21.1	22.16±0.82	b
	Straw	20.6	20.7	20.4	20.7	20.3	20.54±0.18	c
	Bentonite+Straw	24.7	24.1	24.5	23.8	24.5	24.32±0.36	a
	Hydrogel	20.1	20.0	20.3	20.2	20.2	20.16±0.11	cd
	No carrier	19.9	19.3	19.5	19.4	19.8	19.58±0.26	d
Hxx04+Hxx10	Bentonite	19.6	19.3	19.0	19.4	19.5	19.36±0.23	b
	Straw	18.3	18.1	18.5	18.2	17.9	18.20±0.22	c
	Bentonite+Straw	21.5	21.7	21.6	21.9	21.6	21.66±0.15	a
	Hydrogel	18.2	18.0	17.7	17.5	17.3	17.74±0.36	c
	No carrier	17.0	16.8	16.7	17.1	17.2	16.96±0.21	d
Uninoculated control	Bentonite	15.4	15.4	15.6	16.0	15.3	15.54±0.28	b
	Straw	15.0	14.4	14.2	14.8	14.6	14.60±0.32	c
	Bentonite+Straw	16.6	16.5	16.8	17.7	17.4	17.00±0.52	a
	Hydrogel	14.9	14.6	14.3	14.5	14.7	14.60±0.22	c
	No carrier	14.0	14.2	14.5	14.1	13.6	14.08±0.33	c

Different lowercase letters indicate significant differences between treatments ($P<0.05$), while the same letter indicates no significant difference.

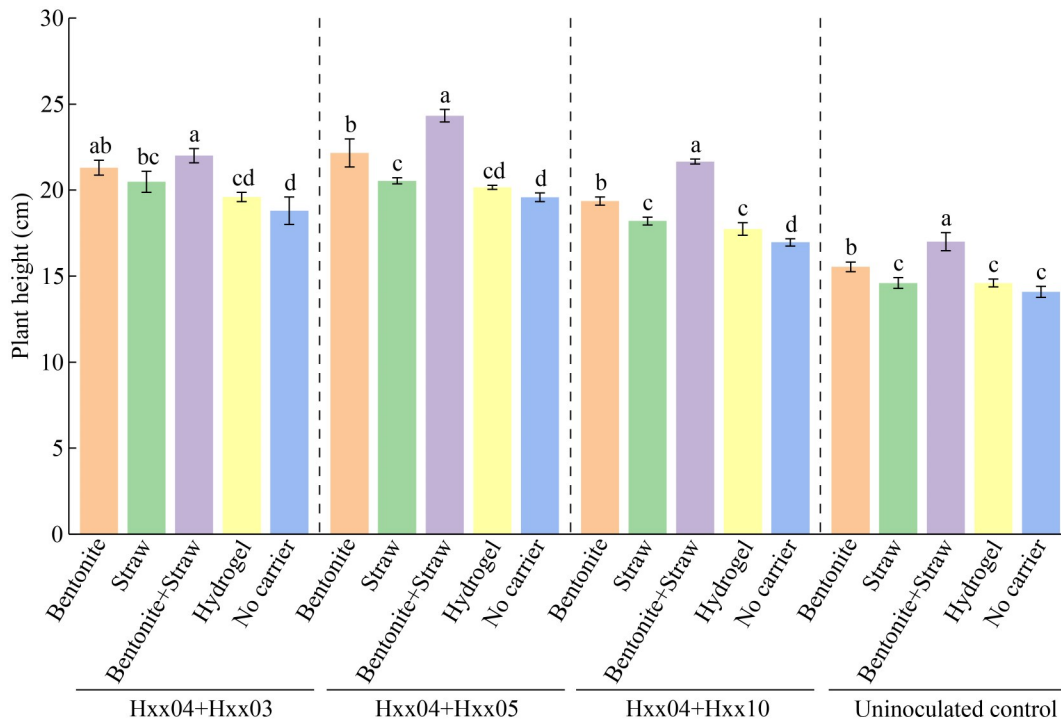


图5 双菌组合微生物群落与载体对水稻株高的影响

Figure 5 Effects of synthetic microbial communities and different carriers on rice plant height. Different lowercase letters indicate significant differences among treatments ($P < 0.05$), while identical letters indicate no significant difference.

定为 *B. altitudinis* Hxx04。在 IAA 定量测定实验中 Hxx04 与其他菌株相比具有显著性差异；在盆栽水稻种植实验中 Hxx04 表现出对苗期水稻株高的显著提高效果，并促进水稻植株在苗期对氮、磷的吸收和利用。因此，本研究后续对 *B. altitudinis* Hxx04 进行了全基因组测序及分析。

3.2 *B. altitudinis* Hxx04 的促生机制验证

芽孢杆菌属是植物促生的关键菌属，常伟娜等^[33]研究指出 *B. altitudinis* 可通过产生生长素、具备解有机磷和无机磷能力、抑制病原菌，从而促进水稻等农作物生长并改善作物品质。本研究分别从土壤全氮、碱解氮、全磷以及有效磷 4 个指标分析测定盆栽试验前后土壤理化性质，明显发现与对照组相比，接入本研究菌株 *B. altitudinis* Hxx04 后的土壤中所测得数值显

著降低，这说明水稻植株吸收增强。此外，本研究测定了盆栽试验后植株地上部分单株鲜重，发现菌株 *B. altitudinis* Hxx04 对水稻苗期株高有明显的直接促进作用，相较于对照组，盆栽平行实验中植株高度最多提高了 48.6%，直接印证了该菌株对水稻生长的促进作用。

3.3 根际微生物群落与协同效应

水稻根系微生物组具有多样性且每个根室中可能有不同的微生物菌种参与，不同菌种对水稻植株生长有针对性地发挥不同有益功能^[8]，因此需要同时培养多个菌株才能对水稻起到多功能促生作用。Rios-Ruiz 等^[10]通过对比水稻穗长、每穗粒数以及产量等农艺参数，证明了菌种对水稻生长的固氮作用显著，因而可减少氮肥施用，而本研究从低磷处理后的水稻品种岑驼崽根际中筛选得到菌株 *B. altitudinis* Hxx04，

该菌株同时具有解磷、固氮、产 IAA 的功能，丰富了水稻根际促生菌的资源。根据对群落的影响实验数据分析，结果显示芽孢杆菌科 (*Bacillaceae*) 为主要富集微生物，其次为鞘氨醇单胞菌科 (*Sphingomonadaceae*)、根瘤菌科 (*Rhizobiaceae*)，二者均能为植物提供氮素营养，从而促进植物的生长和发育。Liu 等^[34]研究发现大豆根可分泌代谢物以增加 *Sphingomonadaceae* 在大豆根际中的积累，同时显著促进对氮素的吸收。常伟娜等^[33]研究发现菌株 *Sphingomonas* sp. CL01 有高效解磷能力，最大解磷量可达 642.60 mg/L，可分泌 IAA，且对西瓜根系形态起一定优化作用。由此可见，*Sphingomonadaceae* 与 *Rhizobiaceae* 是固氮体系中的高效菌群，本研究检测到这 2 种菌群在根际土壤中大量富集，可将空气中的氮气转化为氨盐供土壤中作物吸收生长，对水稻生长有良好的固氮作用，促进水稻生长。

根据群落分析结果，*Bacillaceae*、*Sphingomonadaceae* 与 *Rhizobiaceae* 在根际均有较高丰度，三者的功能可能具有互补与协同关系。*Bacillaceae* 主要通过分泌有机酸和磷酸酶溶解难溶性磷，并产生 IAA 等激素促进根系生长，同时释放抗生素抑制病原菌^[35]；*Sphingomonadaceae* 能分泌胞外多糖、改善根际环境并与其他促生菌形成生物膜，增强养分利用和病害抑制；*Rhizobiaceae* 则通过固氮酶将大气氮转化为可利用氮源^[36]。本研究推测三者可在根际可形成“溶磷-固氮-微环境调节”的功能互补网络，共同提升氮磷供应、病害抑制和植株生长，是合成促生菌群的重要核心类群。

3.4 基因组功能解析

解磷基因(phosphate solubilizing gene)是指参与土壤中难溶性磷转化为可溶性磷的基因，该类基因编码的酶或蛋白质能够分解有机磷或溶解无机磷，从而提高植物对磷的吸收效率。在本基因组分析中 *phoR* 和 *phoP* 基因为主要功能基因，二者共同构成双组分调控系统并相互作用，

调控微生物对磷的需求^[37]。前者通过感应环境磷浓度进行信号传递，后者则是基因表达的调控者，以激活解磷相关基因的表达促进磷的释放和吸收。此外，如 *arlR* 基因，可通过调控有机酸合成基因调节磷酸盐饥饿响应机制，从而影响解磷作用^[38]。

固氮基因(nitrogen fixation genes)是一类编码固氮酶及相关调控因子的基因簇，在本基因组分析中以 *nifS* 基因编码为首的蛋白质将半胱氨酸分解为丙氨酸和硫化物(S^{2-})，生成能够为固氮酶传递电子的铁硫簇(Fe-S clusters)，维持固氮酶的活性。*glnK* 和 *glnA* 基因在固氮作用中也扮演了关键角色，前者可通过感知细胞内的氮状态(如 α -酮戊二酸/谷氨酰胺比例)和能量状态(ATP/ADP)来协调固氮酶的活性^[39]。此外，一些其他基因如 *norR* 基因，通过调控一氧化氮(NO)代谢，减轻 NO 对固氮酶的毒性，间接支持微生物的固氮功能。

IAA 是一种可调控植物种子萌发、根系发育、生长代谢的植物激素^[40]。产 IAA 的主要功能基因为 *YUCAA* 基因家族与 *TAAI/TAR* 基因家族，通过与 IAA 样本功能基因的比对，本基因组序列中未发现与二者相匹配的基因。然而，在本基因组序列中发现部分基因如 *amiF* 和 *amiE* 基因，虽未直接参与生长素的合成与代谢，但可能通过参与氨基酸代谢从而间接影响生长素的合成。因此，该菌可能具有产 IAA 的功能。

在本研究中已对 *B. altitudinis* Hxx04 的解磷、固氮及产 IAA 的功能进行了实验，观察到该菌株在无机磷固体培养基中能够产生透明溶磷圈，在有机磷固体培养基中产生明显降解圈，在阿须贝氏(固氮)培养基中具备生长能力，在加有 Salkowski 显色剂的菌悬液中发现溶液变粉红色，因此得出结论该菌株具备促进分泌 IAA 的能力。

3.5 微生物载体固定化的探索与创新

选取 3 种载体对微生物制剂进行固定化，分别为膨润土、秸秆、海藻酸钠水凝胶。膨润土载体微生物固定化试剂目前被广泛使用于微

生物废水处理及污染土壤修复方面^[41-43]；秸秆载体微生物固定化试剂目前大多用于对富营养水体的脱氮研究^[44]、降解正构烷烃、含 Cr 废水的微生物固定化处理^[45]等；海藻酸钠水凝胶市面上多用于医用敷料(促糖尿病感染创面愈合)，海藻酸钠具有安全无毒、价格低廉、固定化操作简单、反应条件温和等优点，对包埋微生物损伤小，非常适合固定化操作，而且以海藻酸钠为载体材料制备的小球传质性较好且生物活性较高^[46]。

本研究创新性地将在医用及环保领域相对成熟的载体(如海藻酸钠、水凝胶和膨润土)引入农业微生物制剂领域，开发出环境友好、低成本且可生物降解的专用载体，为解决菌剂田间效果不稳定问题提供了新方案。从低氮磷处理的籼稻根际分离筛选获得 1 株多功能协同菌株 *B. altitudinis* Hxx04，该菌株集高效解磷、生物固氮与分泌 IAA 能力于一体。在全基因组测序分析中鉴定出调控解磷(*phoR*、*phoP*)、固氮(*nifS*)及 IAA 合成(*amiE*、*amiF* 等)的关键基因簇，从分子层面揭示了其多功能协同机制。同时，通过根际微生物组分析和盆栽试验证实，该菌株 Hxx04 能高效定殖并同步激活“解磷-固氮-促根”功能网络，显著提升水稻氮磷吸收效率，使地上部单株鲜重和株高最高分别增加 47.2% 和 48.6%，从“微生物-土壤-植物”系统层面阐明了其驱动氮磷协同增效的路径与效能，为水稻氮磷养分高效利用提供了特色微生物资源和理论基础。

3.6 研究局限和展望

采用 15 d 的盆栽试验系统验证了 *B. altitudinis* Hxx04 对水稻苗期氮磷吸收及株高、鲜重等性状的显著促进作用，但仍存在一些局限性如实验周期较短，尚未涵盖水稻整个生育期的动态变化，尤其未涉及产量相关性状(如穗粒数、千粒重等)的考察。因此，研究结论主要局限于早期生长阶段，不能完全代表水稻成熟期的整体表现。此外，盆栽条件与田间环境仍存在差异，

如土壤微生物群落、气候因子和长期养分供需等方面均可能对结果产生影响。后续研究需要在田间开展长期定位试验，并结合不同生育期的表型及产量指标，以验证和补充本研究的发现，从而更全面、客观地评估其对水稻生产的实际意义。

本研究将菌株 Hxx04 与回交系水稻相结合，探索了微生物-宿主互作对养分吸收的促进效应，为不同遗传背景下促生菌株的精准利用提供了思路。这一策略有助于揭示水稻基因型对菌株定殖及促生效率的影响，为水稻育种与微生物资源协同利用开辟新途径。此外，本研究尝试通过双菌联合接种评估菌株组合的促生潜力，这在当前促生研究中仍相对较少涉及。相比单菌株，合理设计的微生物组合能够模拟根际更真实的群落结构，可能产生功能互补或代谢协同效应，从而增强氮磷吸收及植物生长反应。未来可结合群落生态学、宏基因组学等手段，解析组合中菌株的分工、互作网络与信号通路，构建更稳定、高效的“合成促生菌群”。在载体层面，本研究通过将“膨润土+秸秆”的复合载体进行固定化实验，菌株表现出良好的存活率和促生效果，但其理化性质和田间适应性仍需进一步评估。然而，本研究中分离菌株主要依赖液体培养基，而其群落特征可能与原位土壤微生物多样性存在差异。一方面，人工培养基的营养组成与根际土壤复杂基质不同，可能导致部分难培养或依赖共生的微生物未被检出；另一方面，液体培养缺乏土壤团聚体所提供的孔隙、氧化还原梯度及微环境保护效应，难以完全再现微生物在土壤中的空间分布与功能状态。因此，未来需结合高通量测序和基于土壤微环境的培养技术，以更全面解析根际微生物多样性与生态功能。

综上所述，本研究通过盆栽试验验证了 *B. altitudinis* Hxx04 对水稻苗期氮磷吸收和生长的显著促进作用，并探索了其回交系水稻的互作效应及双菌组合的应用潜力。结果表明，合理设计的菌群比单菌更能增强养分利用和促

生反应;“膨润土+秸秆”复合载体为菌株提供了稳定、养分友好的固定化环境,提升了菌剂在固态体系下的生存与促生效果。未来需通过长期田间试验及基于生态学的群落设计,进一步完善氮磷高效利用与绿色减肥增效的应用前景。

4 结论

本研究从低磷处理后的水稻品种‘爷驼崽’根组织内筛选到1株 *B. altitudinis* Hxx04,丰富了水稻根际促生菌的资源。该菌株具备解磷、固氮和产 IAA 等功能,并在实验中得到了系统验证;同时完成了其全基因组测序与功能预测分析。盆栽试验结果表明,接种 *B. altitudinis* Hxx04 可显著促进水稻苗期氮、磷的吸收,植株鲜重至多提高 47.2%,株高至多提高 48.6%。对盆栽试验前后土壤理化性质的分析显示,接入该菌株后土壤全氮、碱解氮、全磷及有效磷含量显著降低,进一步验证了其促生效应。观察到该菌株在根际土壤中保持较高丰度,其生物促生功能为水稻生长提供了重要营养支持,从而显著提升了植株生长性能。本研究为绿色农业发展提供了新的菌株资源与理论支撑,有助于减少氮、磷化肥的过量施用及其对环境的负面影响。同时,该菌株在不同土壤类型(如酸性红壤、盐碱土等)中的适应性仍有待深入系统验证,不同土壤理化特性可能影响其定殖效率与促生效果。未来需结合长期田间试验及多区域、多类型土壤的应用探索,全面评估其在复杂生态环境中的稳定性与功能表现,从而拓展其在多样化农业生态系统中的应用潜力。

作者贡献声明

张馨蕾: 论文撰写、修改润色,数据收集、处理及分析;范雨欣: 研究构思和论文撰写,数据收集、处理;蒋昕彤: 数据收集和分析,论文撰写、修改润色;杨玉玺: 数据收集和处理,论文修改润色;沈红艳: 数据收集,论文修改润色;庄珊: 提出概念,实验与论文指导;王建衡: 实验与论文指导(数据处理

及分析指导);刘欣语: 论文指导;白净: 实验与论文指导(实验指导);齐彦杰: 论文指导(方法论指导);韩东飞: 提出概念,获取基金,项目管理,提供资源,实验与论文指导、修改润色。

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] 赵凌,赵春芳,周丽慧,王才林. 中国水稻生产现状与发展趋势[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(10): 105-107.
- [2] Khelalfa A, Delimi R, Benredjem Z. Distribution and extraction of chromium from phosphate ore[J]. *Journal of Water Reuse and Desalination*, 2016, 6(4): 524-532.
- [3] Qu JH, Wang SQ, Li ZW, Wei SQ, Bi FX, Yan SJ, Yu H, Wang L, Zhang Y. Highly efficient recovery of phosphate from water using cerium carbonate hydroxide-decorated magnetic biochar: a slow-release phosphate fertilizer for agricultural reuse[J]. *ACS ES&T Engineering*, 2024, 4(12): 3045-3056.
- [4] Jiang HB, Xu XY, Fang Y, Ogunyemi SO, Ahmed T, Li XQ, Yang Y, Yan CQ, Chen JP, Li B. Metabarcoding reveals response of rice rhizosphere bacterial community to rice bacterial leaf blight[J]. *Microbiological Research*, 2023, 270: 127344.
- [5] Edwards J, Johnson C, Santos-Medellín C, Lurie E, Podishetty NK, Bhatnagar S, Eisen JA, Sundareshan V. Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(8): E911-E920.
- [6] Zheng Y, Huang R, Wang BZ, Bodelier PLE, Jia ZJ. Competitive interactions between methane- and ammonia-oxidizing bacteria modulate carbon and nitrogen cycling in paddy soil[J]. *Biogeosciences*, 2014, 11(12): 3353-3368.
- [7] Ding LJ, Su JQ, Xu HJ, Jia ZJ, Zhu YG. Long-term nitrogen fertilization of paddy soil shifts iron-reducing microbial community revealed by RNA-¹³C-acetate probing coupled with pyrosequencing[J]. *The ISME Journal*, 2015, 9(3): 721-734.
- [8] Ding LJ, Cui HL, Nie SA, Long XE, Duan GL, Zhu YG. Microbiomes inhabiting rice roots and rhizosphere[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2019, 95(5): fiz040.
- [9] Yang SY, Grønlund M, Jakobsen I, Grottemeyer MS, Rentsch D, Miyao A, Hirochika H, Kumar CS, Sundareshan V, Salamin N, Catausan S, Mattes N, Heuer S, Paszkowski U. Nonredundant regulation of rice arbuscular mycorrhizal symbiosis by two members of the *Phosphate transporter1* gene family[J]. *The Plant Cell*, 2012, 24(10): 4236-4251.
- [10] Rios-Ruiz WF, Tuanama-Reátegui C, Huamán-Córdova G, Valdez-Nuñez RA. Co-inoculation of endophytes

- Bacillus siamensis* TUR07-02b and *priestia megaterium* SMBH14-02 promotes growth in rice with low doses of nitrogen fertilizer[J]. *Plants*, 2023, 12(3): 524.
- [11] Rui WJ, Mao ZP, Li ZF. The roles of phosphorus and nitrogen nutrient transporters in the arbuscular mycorrhizal symbiosis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(19): 11027.
- [12] Chen M, Chen G, Di DW, Kronzucker HJ, Shi WM. Higher nitrogen use efficiency (NUE) in hybrid “super rice” links to improved morphological and physiological traits in seedling roots[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2020, 251: 153191.
- [13] Das D, Paries M, Hobecker K, Gigl M, Dawid C, Lam HM, Zhang JH, Chen MX, Gutjahr C. PHOSPHATE STARVATION RESPONSE transcription factors enable arbuscular mycorrhiza symbiosis[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 477.
- [14] 卫甜, 杨倩, 刘怀阿, 朱锦磊, 吕敏. 高地芽孢杆菌对稻瘟病的防治及促生作用[J]. *中国农学通报*, 2024, 40(7): 123-128.
Wei T, Yang Q, Liu HA/E/E, Zhu JL, (Lü/Lv/Lu/Lyu) M. Effects of *Bacillus altitudinis* against rice blast and promote rice growth[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2024, 40(7): 123-128 (in Chinese).
- [15] Singh V, Kumar B. A review of agricultural microbial inoculants and their carriers in bioformulation[J]. *Rhizosphere*, 2024, 29: 100843.
- [16] 周益帆, 白寅霜, 岳童, 李庆伟, 黄艳娜, 蒋玮, 何川, 王金斌. 植物根际促生菌促生特性研究进展[J]. *微生物学通报*, 2023, 50(2): 644-666.
Zhou YF, Bai YS, Yue T, Li QW, Huang YN, Jiang W, He C, Wang JB. Research progress on the growth-promoting characteristics of plant growth-promoting rhizobacteria[J]. *Microbiology China*, 2023, 50(2): 644-666 (in Chinese).
- [17] Chen YH, Li SS, Liu N, He H, Cao XY, Lv C, Zhang K, Dai JL. Effects of different types of microbial inoculants on available nitrogen and phosphorus, soil microbial community, and wheat growth in high-P soil[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021, 28(18): 23036-23047.
- [18] Sarabia M, Cazares S, González-Rodríguez A, Mora F, Carreón-Abud Y, Larsen J. Plant growth promotion traits of rhizosphere yeasts and their response to soil characteristics and crop cycle in maize agroecosystems[J]. *Rhizosphere*, 2018, 6: 67-73.
- [19] Al Methyeb M, Ruppel S, Eichler-Löbermann B, Vassilev N. The combined applications of microbial inoculants and organic fertilizer improve plant growth under unfavorable soil conditions[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(7): 1721.
- [20] Shen MC, Li JG, Dong YH, Liu H, Peng JW, Hu Y, Sun Y. Profiling of plant growth-promoting metabolites by phosphate-solubilizing bacteria in maize rhizosphere[J]. *Plants*, 2021, 10(6): 1071.
- [21] Shah R, Amaresan N, Patel P, Jinal HN, Krishnamurthy R. Isolation and characterization of *Bacillus* spp. endowed with multifarious plant growth-promoting traits and their potential effect on tomato (*Lycopersicon esculentum*) seedlings[J]. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 2020, 45(6): 4579-4587.
- [22] 李庆荣, 邢东旭, 肖阳, 廖森泰, 邹宇晓, 刘凡, 黎尔纳, 周东来, 杨琼. 枯草芽孢杆菌生防菌株 SEM-9 根际定植及对根际土壤微生物多样性的影响[J]. *华南农业大学学报*, 2022, 43(4): 82-88.
Li QR, Xing DX, Xiao Y, Liao ST, Zou YX, Liu F, Li EN, Zhou DL, Yang Q. Rhizosphere colonization of *Bacillus subtilis* biocontrol strain SEM-9 and the effect on microbial diversity in rhizosphere soil[J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2022, 43(4): 82-88 (in Chinese).
- [23] Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2(2): 95-108.
- [24] Bais HP, Fall R, Vivanco JM. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* facilitated by biofilm formation and surfactin production[J]. *Plant Physiology*, 2004, 134(1): 307-319.
- [25] 任洁, 赵秀琴, 丁在松, 项超, 张晶, 王超, 张俊巍, Charles Augustino JOSEPH, 张强, 庞昀龙, 高用明, 石英尧. 利用选择导入系进行水稻耐低磷鉴定与 QTL 定位分析[J]. *中国水稻科学*, 2015, 29(1): 1-13.
Ren J, Zhao XQ, Ding ZS, Xiang C, Zhang J, Wang C, Zhang JW, Joseph C, Zhang Q, Pang YL, Gao YM, Shi YY. Dissection and QTL mapping of low-phosphorus tolerance using selected introgression lines in rice[J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2015, 29(1): 1-13 (in Chinese).
- [26] 张俊巍, 项超, 张晶, 任洁, 刘周, 王超, 曲丽君, 石英尧. 利用耐低磷选择回交导入系群体定位水稻产量性状 QTL[J]. *中国农学通报*, 2014, 30(6): 56-65.
Zhang JW, Xiang C, Zhang J, Ren J, Liu Z, Wang C, Qu LJ, Shi YY. Mapping QTL controlling yield traits using low phosphorus tolerance selected backcrossing introgression lines of rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2014, 30(6): 56-65 (in Chinese).
- [27] 任洁. 利用选择导入系进行水稻耐低磷鉴定与 QTL 定位分析[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2014.
Ren J. Dissection and QTL mapping of low-phosphorus using selected introgression lines in rice (*Oryza Sativa* L.) [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2014 (in Chinese).
- [28] Eevers N, Gielen M, Sánchez-López A, Jaspers S, White JC, Vangronsveld J, Weyens N. Optimization of isolation and cultivation of bacterial endophytes through addition of plant extract to nutrient media[J]. *Microbial Biotechnology*, 2015, 8(4): 707-715.
- [29] 孟炯放. 功能性内生菌的筛选及其对水稻幼苗生长的影响[D]. 保定: 河北农业大学, 2019.
Meng JF. Screening of functional endophytic bacteria and effects on the growth of rice seedlings[D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [30] Edgar RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 996-998.

- [31] Chao A. Non-parametric estimation of the classes in a population[J]. *Scandinavian Journal of Statistics*, 1984, 11(4): 265-270.
- [32] Shannon CE. A mathematical theory of communication[J]. *Bell System Technical Journal*, 1948, 27(3): 379-423.
- [33] 常伟娜, 徐伟慧, 王志刚. 高地芽孢杆菌对水稻根际真菌群落的影响[J]. *高师理科学刊*, 2023, 43(8): 78-84.
Chang WN, Xu WH, Wang ZG. Effects of *Bacillus altitudinis* on rhizosphere fungal community in rice[J]. *Journal of Science of Teachers' College and University*, 2023, 43(8): 78-84 (in Chinese).
- [34] Liu Y, Han Q, Zhang JM, Zhang XH, Chen YQ, Li MB, Hao YF, Hong YJ, Tang RZ, Ferguson BJ, Gresshoff PM, Kuai J, Zhou GS, Li X, Ji HT. Soybean nodulation shapes the rhizosphere microbiome to increase rapeseed yield[J]. *Journal of Advanced Research*, 2025, 75: 95-110.
- [35] Khamsuk K, Dell B, Pathom-aree W, Pathaichindachote W, Suphrom N, Nakaew N, Jumpathong J. Screening plant growth-promoting bacteria with antimicrobial properties for upland rice[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2024, 34(5): 1029-1039.
- [36] Joshi S, Jaggi V, Gangola S, Singh A, Sah VK, Sahgal M. Contrasting rhizosphere bacterial communities of healthy and wilted *Dalbergia sissoo* Roxb. forests[J]. *Rhizosphere*, 2021, 17: 100295.
- [37] 郭庆港, 王培培, 董丽红, 苏振贺, 张晓云, 宋健, 赵卫松, 鹿秀云, 李社增, 马平. PhoR/PhoP 双组分系统对枯草芽孢杆菌 NCD-2 菌落形态和芽胞形成的影响[J]. *植物病理学报*, 2019, 49(4): 552-559.
Guo QG, Wang PP, Dong LH, Su ZH, Zhang XY, Song J, Zhao WS, Lu XY, Li SZ, Ma P. The PhoR/PhoP two-component system regulates colony morphology and sporulation in *Bacillus subtilis* strain NCD-2[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2019, 49(4): 552-559 (in Chinese).
- [38] 严辉. 金黄色葡萄球菌效应调节因子 ArlR 以及钝节螺旋藻 Ap-phr 蛋白的结构和功能研究[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2019.
Yan H. The structural and functional analysis of a response regulator ArlR in *Staphylococcus aureus* and photolyase Ap-phr in *Arthrospira platensis*[D]. Hefei: University of Science and Technology of China, 2019 (in Chinese).
- [39] 王珊珊, 毋少宇, 刘一超, 战崑华, 柯秀彬, 陆伟, 燕永亮. 施氏假单胞菌氮代谢调控蛋白 GlnK 与碳信号分子 α -酮戊二酸的体外互作研究[J]. *生物技术进展*, 2021, 11(1): 91-98.
Wang SS, Wu SY, Liu YC, Zhan YH, Ke XB, Lu W, Yan YL. *In vitro* interaction between nitrogen regulatory protein GlnK with the carbon signaling molecule α -ketoglutarate in nitrogen-fixing *Pseudomonas stutzeri*[J]. *Current Biotechnology*, 2021, 11(1): 91-98 (in Chinese).
- [40] 常海霞, 李静, 李明源, 茹仙古丽·尤努斯, 王继莲. 耐盐产吲哚乙酸(IAA)多功能菌株筛选及对盐胁迫小麦的促生效应[J]. *江苏农业学报*, 2025, 41(1): 9-20.
Chang HX, Li J, Li MY, Ruxiangul·Yunus, Wang JL. Screening of multifunctional salt-tolerant indole-3-acetic acid (IAA)-producing strains and their growth-promoting effects on wheat under salt stress[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2025, 41(1): 9-20 (in Chinese).
- [41] 王启山, 韩笑, 于春来, 宋金洪, 卢振兰. CMC-膨润土固定化微生物降解对硝基苯酚废水的研究[J]. *水处理技术*, 2018, 44(7): 62-65, 82.
Wang QS, Han X, Yu CL, Song JH, Lu ZL. Study on degradation of p-nitrophenol wastewater by immobilized microorganism with CMC-bentonite[J]. *Technology of Water Treatment*, 2018, 44(7): 62-65, 82 (in Chinese).
- [42] 孙国强. 固定化降解菌 *Pseudomonas* sp. DNB-S1 对 DBP 污染土壤修复的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2015.
Sun GQ. The research of DBP contaminated soil remediation with immobilized degradation bacterium *Pseudomonas* sp. DNB-S1[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [43] 刘晓玉, 张亦飞, 邓立聪. 碱化膨润土-海藻酸钙固定化颗粒作为微生物载体对微污染废水的处理性能[J]. *过程工程学报*, 2022, 22(11): 1584-1592.
Liu XY, Zhang YF, Deng LC. Performance of alkaline bentonite-calcium alginate immobilized particles for micro-polluted wastewater treatment as microbial carriers[J]. *The Chinese Journal of Process Engineering*, 2022, 22(11): 1584-1592 (in Chinese).
- [44] 郭鹏飞. 缓释氧材料与芦苇秸秆固定化微生物对富营养水体的脱氮研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2021.
Guo PF. Denitrification of eutrophic water by slow-release oxygen materials and immobilized microorganisms of reed straw[D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2021 (in Chinese).
- [45] 许燕, 陈晓明, 王超, 刘小玲, 阮晨, 宋收. 固定化混合微生物对 Cr(VI) 的去除效应[J]. *安全与环境工程*, 2015, 22(3): 46-50.
Xu Y, Chen XM, Wang C, Liu XL, Ruan C, Song S. Removal effect of immobilized mixed microorganisms on Cr(VI) treatment[J]. *Safety and Environmental Engineering*, 2015, 22(3): 46-50 (in Chinese).
- [46] 滕晓芸, 胡春义, 石瑶瑶. 包埋法固定化微生物技术的载体选择[J]. *工业微生物*, 2023, 53(2): 73-75.
Teng XY, Hu CY, Shi YY. On the carrier selection of immobilized microorganism technology by embedding method[J]. *Industrial Microbiology*, 2023, 53(2): 73-75 (in Chinese).