



1株白三叶根际产铁载体菌的功能特性及培养条件

韦鑫 韦兴迪 曾庆飞 李亚娇 丁磊磊 王小利

Functional characteristics and optimum fermentation condition of a siderophore-producing bacteria from the rhizosphere of *Trifolium repens*

WEI Xin, WEI Xingdi, ZENG Qingfei, LI Yajiao, DING Leilei, WANG Xiaoli

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2023-0305>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

5株植物根际促生菌功能特性及培养条件

Functional characteristics and culture conditions of five plant growth-promoting rhizobacteria strains

草业科学. 2022, 39(1): 30 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2021-0105>

高寒地区牧草根际促生菌的筛选与特性

Screening and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from rhizosphere of forage species in an alpine region

草业科学. 2022, 39(9): 1752 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2021-0553>

若尔盖高寒草地优势牧草植物根际促生菌的筛选及特性

Isolation, screening, and characterization of dominant plant growth-promoting rhizobacterial species in Zoige alpine grassland

草业科学. 2023, 40(2): 319 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2021-0534>

高寒草地优势植物根际细菌促生特性及初步鉴定

Characteristic analysis and preliminary identification of plant growth-promoting rhizobacteria of dominant plants in alpine grassland

草业科学. 2023, 40(11): 2729 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2022-0551>

植物根际促生菌发酵液中植物激素含量的液液萃取-高效液相色谱测定法

Determination of plant hormones in bacterial fermentation products of plant growth-promoting rhizobacteria by liquid-liquid extraction high-performance liquid chromatography

草业科学. 2022, 39(10): 2222 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2021-0649>

耐盐促生菌的筛选及其对狗牙根耐盐性的影响

Screening and identification of salt-tolerant and growth-promoting microbial strains in the rhizosphere and their effect on the salt tolerance of Bermuda grass

草业科学. 2022, 39(11): 2297 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2022-0114>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

DOI: 10.11829/j.issn.1001-0629.2023-0305

韦鑫, 韦兴迪, 曾庆飞, 李亚娇, 丁磊磊, 王小利. 1 株白三叶根际产铁载体菌的功能特性及培养条件. 草业科学, 2024, 41(4): 919-930.

WEI X, WEI X D, ZENG Q F, LI Y J, DING L L, WANG X L. Functional characteristics and optimum fermentation condition of a siderophore-producing bacteria from the rhizosphere of *Trifolium repens*. Pratacultural Science, 2024, 41(4): 919-930.

1 株白三叶根际产铁载体菌的功能特性及培养条件

韦鑫, 韦兴迪, 曾庆飞, 李亚娇, 丁磊磊, 王小利

(贵州省草业研究所, 贵州 贵阳 550006)

摘要: 为充分利用贵州岩溶山区牧草根际促生菌资源, 以野生白三叶 (*Trifolium repens*) 根际铁载体产生菌 TSQA26-3 为研究对象, 结合形态观察、VITEK-2 全自动微生物鉴定系统和 16S rRNA 基因序列分析对菌株进行分类鉴定, 开展菌株促生特性研究, 筛选适宜菌株合成铁载体的发酵基础培养基, 通过单因素试验和正交试验相结合, 确定最佳培养基成分和培养条件, 促进菌株合成铁载体能力的提升。结果表明, 菌株 TSQA26-3 为恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*); 菌株同时还具有溶解无机磷、产植物生长素 (IAA) 和固氮能力; 优化后的培养基 (MG 培养基) 配方为, 甘露醇 $25.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, L-谷氨酰胺 $2.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; 最佳培养条件为, 培养基初始 pH 7.0, 摇床转速 $170 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 培养温度 $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 培养基装液量为每 250 mL 瓶中装 70 mL。

关键词: 白三叶; 植物根际促生菌; 铁载体; 鉴定; 促生特性; 培养条件优化; 发酵培养基

文献标识码: A 文章编号: 1001-0629(2024)04-0919-12

Functional characteristics and optimum fermentation condition of a siderophore-producing bacteria from the rhizosphere of *Trifolium repens*

WEI Xin, WEI Xingdi, ZENG Qingfei, LI Yajiao, DING Leilei, WANG Xiaoli

(Guizhou Institute of Pratacultural, Guiyang 550006, Guizhou, China)

Abstract: In order to fully utilize the resources of the plant growth promoting rhizobacteria associated with wild forages in Guizhou Province, the siderophore-producing bacterial strain TSQA26-3 was isolated from the rhizosphere soil of wild *Trifolium repens* and used as the research object in this study. Morphological observation, VITEK-2, and 16S rRNA gene sequence analysis were used to identified the strain. The growth-promoting characteristics of the strain were investigated, and the suitable fermentation medium for the siderophore produced by the strain was optimized using single factor and orthogonal experiments. The result showed that the strain TSQA26-3 was identified as *Pseudomonas putida* and had the ability to dissolve inorganic phosphorus, produce IAA, and fix nitrogen. Mannitol-Glutamine was proven to be the optimal medium for siderophore production. The fermentation medium formula and cultivation conditions were as follows: $25.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Mannitol, $2.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ L-Glutamine, $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ K_2HPO_4 , $0.25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, initial pH 7.0, $170 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, temperature $30 \text{ }^\circ\text{C}$, and medium volume 70 mL in 250 mL conical flask.

收稿日期: 2023-06-06 接受日期: 2023-10-18

基金项目: 贵州省农业科技支撑计划项目 (黔科合支撑 [2023] 一般 070); 贵州省科学技术基金项目 (黔科合基础 [2020]1Y062); 贵州省科研机构创新能力建设专项资金 (黔科合服企 [2022]004); 贵州省草业研究所科技创新课题 (草业所科技创新课题 [2018]03 号)

第一作者: 韦鑫 (1992-), 女 (苗族), 贵州修文人, 助理研究员, 硕士, 研究方向为草业科学和土壤微生物发掘与利用。E-mail: 649411373@qq.com

通信作者: 王小利 (1977-), 男, 甘肃镇原人, 研究员, 博士后, 研究方向为草业科学及牧草种质资源创新与分子定向改良。

E-mail: 398189177@qq.com

Keywords: *Trifolium repens*; plant growth promoting rhizobacteria; siderophores; identification; growth-promoting characteristics; optimum fermentation condition; fermentation medium

Corresponding author: WANG Xiaoli E-mail: 398189177@qq.com

铁(Fe)作为地球上几乎所有生物体必不可少的营养元素之一,维持着细胞内多种酶的组成和活性,并在多种代谢活动中起到重要调节作用。铁元素在地壳中的含量十分丰富,在所有元素中居第四位,但环境中的铁主要以难溶性氧化铁或氢氧化铁复合物形式存在,可供生物利用的有效铁含量较为匮乏^[1-2],铁元素缺乏会限制生物的生长。在自然界中,几乎所有好氧和兼性厌氧的真菌和细菌,在低铁环境下均可通过分泌铁载体从环境中有效地获得必需的铁元素^[3]。

铁载体(Siderophores)是一类对 Fe^{3+} 具有极强亲和性的高特异性小分子量(500~1500 Da)化合物^[4],可以螯合周围环境中难溶的铁,形成稳定的复合物,随后通过细胞膜上的特异性铁受体蛋白,运输到细胞内,为生物体提供生长所需的铁元素^[5-6]。铁载体种类繁多,被分离鉴定的铁载体已经超过500种^[7]。一方面,铁载体能使微生物在低铁环境下有效摄取铁元素,从而满足菌体细胞生理代谢的需要;另一方面,植物根际铁载体产生菌(siderophore-producing bacteria, SPB)分泌的铁载体,能改变土壤中铁的有效性,释放难溶性铁,极大地提高了植物对根际环境中铁的吸收利用,从而促进了植物生长^[8]。除此之外,铁载体还可以螯合土壤中的铝、镉、锰、锌、铜、铅等金属离子,提高其溶解性,促进植物对金属的富集^[9-10]。此外,铁载体与阿波霉素和沙霉素等抗生素偶联,能够有效抑制或杀死细菌,在医药研发领域具有广阔的前景^[8]。

国内外已报道的具有铁载体分泌功能的微生物主要有芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、伯克霍尔德菌(*Burkholderia*)和链霉菌属(*Streptomyces*)的细菌^[11-12]。研究者分别从土壤、牧草根际、果树根际、森林土壤中分离产铁载体菌,经鉴定发现均为假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)^[12-15]。假单胞菌种类多样,分布广泛,普遍存在于土壤、水和其他基质上,常被作为植物促生菌来研究^[16-17]。有研究者报道从植物根际土壤中分离出的假单胞菌还具有解磷、解钾、固氮、产IAA(3-Indoleacetic acid)、产铁载体、ACC

脱氨酶(1- α -aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase)活性和抑制植物病原菌能力^[18-19]。

白三叶(*Trifolium repens*)又名白车轴草,属豆科车轴草属多年生草本植物,具有饲草、建植草地等多种应用价值,在我国许多地区均有种植。对白三叶根际促生菌的研究多有报道,蔡璐等^[20]对白三叶根际溶磷菌进行分离鉴定,发现该菌株具有提高白三叶幼苗生物产量的作用;程宇阳^[21]从白三叶根际分离出对卵磷脂和磷酸三钙均有溶解能力的促生菌株,该菌株对白三叶生长同样具有促进作用;韦兴迪等^[22]对贵州地区野生白三叶根瘤菌资源作调查分析,共发现6个属20个种,其中*Rhizobium leguminosarum*的分离频率最高;Kumar等^[23]分离鉴定白三叶根际促生菌,并表明产ACC脱氨酶的*Pseudomonas* sp.和产铁载体的*Bacillus aerophilus*联合应用能提高植物对铜的吸收以及植物的生物量。目前白三叶根际促生菌中,对溶磷菌和根瘤菌的研究最多,但对其根际产铁载体细菌报道较少。

为进一步利用牧草根际土壤微生物资源,本试验以从贵州岩溶山区野生白三叶根际土壤中分离筛选得到的1株铁载体产生菌为研究对象,结合形态观察、VITEK-2鉴定和16S rRNA基因序列分析,对菌株进行鉴定,并通过对其溶磷、固氮、产IAA等特性的测定,探索菌株的促生特性。通过对菌株分泌铁载体发酵培养基的筛选、培养基成分正交试验和培养条件试验,优化其产铁载体发酵培养基和培养条件,同时进一步挖掘菌株产铁载体潜力,为铁载体的高效合成和利用提供理论和实践基础。

1 材料与方 法

1.1 产铁载体菌株的分离

分别从贵州省黔西南州安龙县(2021年4月16日采集,采集地105.49°E, 25.21°N,海拔1250 m,土样编号TSQA26)、铜仁市松桃县(2021年5月26日采集,采集地108.80°E, 28.01°N,海拔879 m,土样编号TSTS36)和铜仁市普觉镇(2021年5月27日采集,采集地109.01°E, 28.03°N,海拔488 m,

土样编号 TSTP39) 采集野生白三叶根际土壤, 带回实验室, 采用铬天青 (Chrome azurol S, CAS) 平板稀释法对根际产铁载体细菌进行分离^[14], 挑选在 CAS 平板上产生明显橙黄色晕圈的菌落进行纯化保存。根据荣良燕等^[24]方法测定菌株可溶性指数: 可溶性指数 = 晕圈直径/菌落直径; 根据雷平等^[25]方法计算菌株噬铁圈大小, 噬铁圈 = (晕圈直径 - 菌落直径)/2 (图 1)。通过菌株可溶性指数和噬铁圈大小, 初步判断菌株产铁载体能力。选择产铁载体能力较强的菌株进行后续试验。

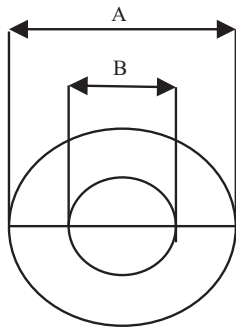


图 1 可溶性指数和噬铁圈计算方法

Figure 1 The calculation method for soluble index and zone radius

A: 晕圈直径; B: 菌落直径; 可溶性指数 = A/B ; 噬铁圈 = $(A - B)/2$ 。

A: halo diameter; B: colony diameter; Soluble index = A/B ; Zone radius = $(A - B)/2$ 。

1.2 检测液及培养基

CAS 检测液: A 液, 0.605 g CAS 加入 500 mL 蒸馏水, 0.027 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 加入 100 mL 稀盐酸中; B 液, 0.729 g HDTMA (十六烷基三甲溴化铵) 加入 400 mL 蒸馏水。将 A 液缓慢加入 B 液中, 得到蓝色 CAS 检测液。

CAS 培养基: 按照陈伟等^[14]的方法进行配置。

NB (Nutrient Broth) 培养基: 蛋白胨 $10.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 牛肉浸粉 $3.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NaCl $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 购买自杭州百思生物技术有限公司。NB 培养基中加入 $18.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂, 得 NB 固体培养基。

MKB (Modified King B) 培养基^[26]: 甘油 15.0 mL , 酸水解酪蛋白 $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

SM (Succinate medium) 培养基^[27]: K_2HPO_4 $6.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, KH_2PO_4 $3.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 琥珀酸 $4.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 调节 pH 7.0。

MSA (Modified Sucrose-Aspartate) 培养基^[28]: 蔗糖 $20.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, L-天门冬酰胺 $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.3 菌株鉴定

1.3.1 形态学观察

将 TSQA26-3 菌株分别接种到 NB 平板和 CAS 平板上, 恒温培养箱中 $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 2 d, 观察其菌落特征, 并进行革兰氏染色。

1.3.2 VITEK-2 全自动微生物鉴定

使用法国梅里埃公司生产的 VITEK 2 COMPACT 全自动微生物鉴定系统及其自带的革兰氏阴性细菌鉴定卡 GN, 对菌株 TSQA26-3 进行鉴定。检测步骤严格按照仪器操作手册进行: 用无菌棒挑取适量传代培养后的菌落, 均匀混合入装有 3 mL 无菌盐水的清洁塑料管 ($12 \text{ m} \times 75 \text{ mm}$) 中, 菌悬液调节麦氏浓度至 $0.50 \sim 0.63$, 将悬浮液管及 GN 卡置于载卡台上, 放入仪器中, 将鉴定卡取出置入孵育室实施自动培养和检测, 15~18 h 后得到结果。

1.3.3 分子鉴定

菌株在 NB 平板上培养 2 d, 提取菌株基因组 DNA, 使用通用引物 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGG CTCAG-3') 和 1492r (5'-TACGGCTACCTGTTACG ACTT-3') 进行 PCR 扩增, 回收目的条带, 进行 16S rRNA 基因序列测定。所得序列通过 NCBI 网站进行 BLAST 比对, 寻找相似菌株, 从 GenBank 数据库中下载同源性较高的序列作为参考序列, 通过 BioEdit 软件进行多重比对, 用 Mega 6 软件进行聚类分析和构建系统发育树。

1.4 菌株促生特性检测

对菌株溶磷、固氮、解钾、产 IAA 能力进行检测。分别配置 NBRIP (national botanical research institute's phosphate) 固体培养基^[26]和培养液, 使用 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 作为无机磷源, 使用卵磷脂作为有机磷源, 将菌株点种到固体培养基上, $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 7 d, 观察菌株形成溶磷圈情况, 判断菌株是否具有溶磷能力^[28], 采用钼锑抗比色法测定菌株培养上清液中磷含量^[26]。配置 YMA (yeast mannitol agar) 液体培养基^[29], 接入菌株, $28 \text{ }^\circ\text{C}$ $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 4 d, 使用江苏酶免实业有限公司生产的微生物固氮酶 (NITS) ELISA 试剂盒检测上清液中固氮酶活性。配置解钾培养基^[26], 将

菌株点种到固体培养基上, 28 °C 培养 7 d, 观察菌株形成解钾圈情况, 判断菌株是否具有解钾能力^[28], 采用火焰光度计法测定菌株培养上清液中钾含量^[26]。配置产 IAA 培养基, 采用 Salkowski 比色法测定培养上清液中 IAA 含量^[26]。

1.5 适宜铁载体合成的培养基筛选

菌株在 CAS 固体培养基中划线培养 48 h, 挑取单菌落分别接入 NB、MKB、MSA 和 SM 液体培养基中, 每个处理 3 个重复, 28 °C, 150 r·min⁻¹ 摇菌 2 d, 菌液 10000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液 1 mL, 加入 1 mL CAS 检测液, 静置 60 min, 在 OD₆₃₀ 下测定其吸光度 (As), 以不接菌的空白培养基为对照, OD₆₃₀ 下测定其吸光度 (Ar), 分别计算铁载体活性单位 (su)。计算公式:

$$su = [(Ar - As) / Ar] \times 100\%$$

1.6 培养基成分对菌株产铁载体能力的影响

1.6.1 不同碳源

根据培养基筛选结果, 选择 MSA 培养基作为基础发酵培养基。选择蔗糖 (Sucrose)、葡萄糖 (Glucose)、麦芽糖 (Maltose)、琥珀酸 (Amber acid)、甘露醇 (Mannitol)、可溶性淀粉 (Soluble starch) 作为碳源进行试验, 碳源用量均为 20.0 g·L⁻¹, 每个碳源处理 3 个重复, 测定各处理 su, 筛选菌株产铁载体最佳碳源。

1.6.2 不同氮源

选择 L-天冬酰胺 (L-Asparagine)、L-精氨酸 (L-Arginine)、L-谷氨酰胺 (L-Glutamine)、L-脯氨酸 (L-Proline)、甘氨酸 (Glycine) 和硫酸铵 [Ammonium sulfate, (NH₄)₂SO₄] 作为氮源进行试验, 氮源用量均为 2.0 g·L⁻¹, 每个氮源处理 3 个重复, 测定各处理 su, 筛选菌株产铁载体最佳氮源。

1.6.3 培养基成分正交试验

在碳、氮源试验的基础上, 选择更适宜菌株的碳、氮源进行试验, 设计 4 因素 3 水平的培养基成分正交试验, 因素水平如表 1 所列。采用 L₉ (3⁴) 正交表, 每个处理 3 个重复, 测定各处理 su, 优化培养基配方。

1.7 菌株产铁载体培养条件优化

根据 1.6.3 正交试验结果, 配置改良后的培养

表 1 培养基成分正交试验设计
Table 1 The orthogonal test of factors of the medium

水平 Level	因素 Factor			
	碳源 Carbon source/(g·L ⁻¹)	氮源 Nitrogen source/(g·L ⁻¹)	K ₂ HPO ₄ / (g·L ⁻¹)	MgSO ₄ ·7H ₂ O/ (g·L ⁻¹)
1	15.0	1.5	0.5	0.25
2	20.0	2.0	1.0	0.50
3	25.0	2.5	1.5	0.75

基, 分别试验培养基初始 pH (6.5、7、7.5、8、8.5), 摇床转速 (130、150、170、190、210 r·min⁻¹), 培养温度 (24、26、28、30、32 °C), 250 mL 锥形瓶装液量 (50、70、90、100、110 mL) 对菌株合成铁载体能力的影响, 每个处理 3 个重复, 测定各处理 su, 优化培养条件。

1.8 数据分析

使用 Excel 2010 进行数据整理和作图, 使用 SPSS 19.0 进行数据统计和分析, 各测定数据使用单因素方差分析, 并用 Duncan 法进行多重比较, 用平均值 ± 标准误差表示测定结果。

2 结果与分析

2.1 产铁载体菌株的分离

如表 2 所列, 分离得到的 3 株产铁载体菌中, 可溶性指数无明显差异, TSQA26-3 菌株最高, 为 5.14。菌株 TSQA26-3 产生的噬铁圈最大, 为 8.42 mm, 极显著高于其他两个菌株 (P < 0.01)。初步分析 3 株细菌中, 菌株 TSQA26-3 可溶性指数最高、噬铁圈最大, 因此, 选择此菌株进行后续的菌种鉴定、促生特性检测和产铁载体培养条件优化试验。

2.2 菌株鉴定

2.2.1 形态观察

菌株形态及革兰氏染色结果如图 2 所示。在 NB 固体培养基上, 菌落呈白色小菌落, 不透明, 中间凸起, 表面光滑明亮, 质地湿润。在 CAS 培养基上菌落较小, 淡黄色, 表面湿润光滑, 菌落周围产生明显橙黄色晕圈。显微镜下观察细菌为短杆状, 革兰氏染色呈红色, 为革兰氏阴性菌。

2.2.2 VITEK-2 全自动微生物鉴定

使用 VITEK-2 全自动微生物鉴定系统对菌株

表2 分离菌株产铁载体能力分析
Table 2 Analysis of siderophores produced by the isolated strains

序号 No.	土壤编号 Soil No.	菌株编号 Strains No.	可溶性指数 Soluble index	噬铁圈 Zone radius/mm
1	TSQA26	TSQA26-3	5.14 ± 0.08aA	8.42 ± 0.22aA
2	TSTS36	TSTS36-3	5.07 ± 0.09aA	6.53 ± 0.46bB
3	TSTP39	TSTP39-1	4.96 ± 0.06aA	6.31 ± 0.31bB

同列不同大写字母和小写字母分别表示差异极显著($P < 0.01$)和差异显著($P < 0.05$)。

The capital letters indicate significant differences at the 0.01 level, and the lowercase letters indicate significant differences at the 0.05 level.

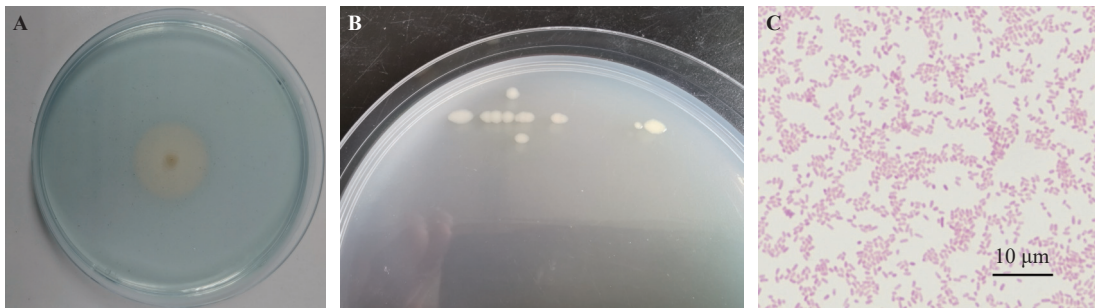


图2 TSQA26-3 菌落形态及革兰氏染色结果

Figure 2 The morphology and Gram staining result of TSQA26-3

A 为菌株 TSQA26-3 在 CAS 培养基上的形态; B 为菌株在 NB 固体培养基上的形态; C 为革兰氏染色镜检结果。

A is the morphology of the strain TSQA26-3 on CAS medium; B is the morphology of the strain TSQA26-3 on NB medium; C is the result of Gram-stain microscopy.

进行鉴定,结果显示,菌株 TSQA26-3 的生理生化反应与恶臭假单胞菌 (*P. putida*) 高度相似。

2.2.3 分子鉴定

将菌株的 16S rRNA 基因序列在 NCBI 网站上进行 BLAST 比对,发现菌株与假单胞菌多个种同源性达 99% 以上,其与 *P. putida* OsEnb_HZB_G20 (MN889396) 和 *P. putida* E13 (MK849864) 相似性均为 99.93%,通过菌株系统发育树可见(图 3),菌株的 16S rRNA 基因序列与 *P. putida* OsEnb_HZB_G20 (MN889396) 最为接近。

通过形态观察、VITEK-2 全自动微生物鉴定以及 16S rRNA 基因序列分析,菌株 TSQA26-3 鉴定为恶臭假单胞菌 (*P. putida*)。

2.3 菌株促生特性检测

如表 3 所列,菌株 TSQA26-3 在以 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 为无机磷源的固体培养基上能产生清晰的溶磷圈,说明菌株具有溶解无机磷能力,其溶磷量为 $30.31 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;在卵磷脂为有机磷源的固体培养基上不产生溶磷圈,且培养上清液中磷含量为 $0.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,

说明菌株不具有溶解有机磷能力。经检测,菌株固氮酶活性为 $88.24 \text{ IU} \cdot \text{L}^{-1}$,在添加 L-色氨酸的培养基中 IAA 产量为 $9.71 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。菌株在解钾培养基上不形成解钾圈,且培养上清液中钾含量为 $0.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,说明菌株不具有解钾能力。

2.4 培养基筛选

如图 4 所示,SM、MSA、MKB 和 NB 4 种培养基中,NB 和 MKB 培养基不适宜菌株合成铁载体,菌株在 MSA 培养基中铁载体合成量最高,其 *su* 为 82.16%,显著高于其他培养基 ($P < 0.05$),因此,MSA 培养基为 TSQA26-3 菌株合成铁载体最适宜发酵基础培养基。

2.5 培养基成分对菌株铁载体合成的影响

2.5.1 碳源对菌株铁载体合成的影响

使用 MSA 为发酵基础培养基,如图 5 所示,蔗糖、甘露醇和琥珀酸作为碳源,均有利于菌株铁载体的合成,培养基 *su* 均在 85% 以上,显著高于其他碳源 ($P < 0.05$),其中,使用甘露醇的 *su* 最大,为 88.36%。使用葡萄糖作为碳源,培养基 *su* 为 70.98%,

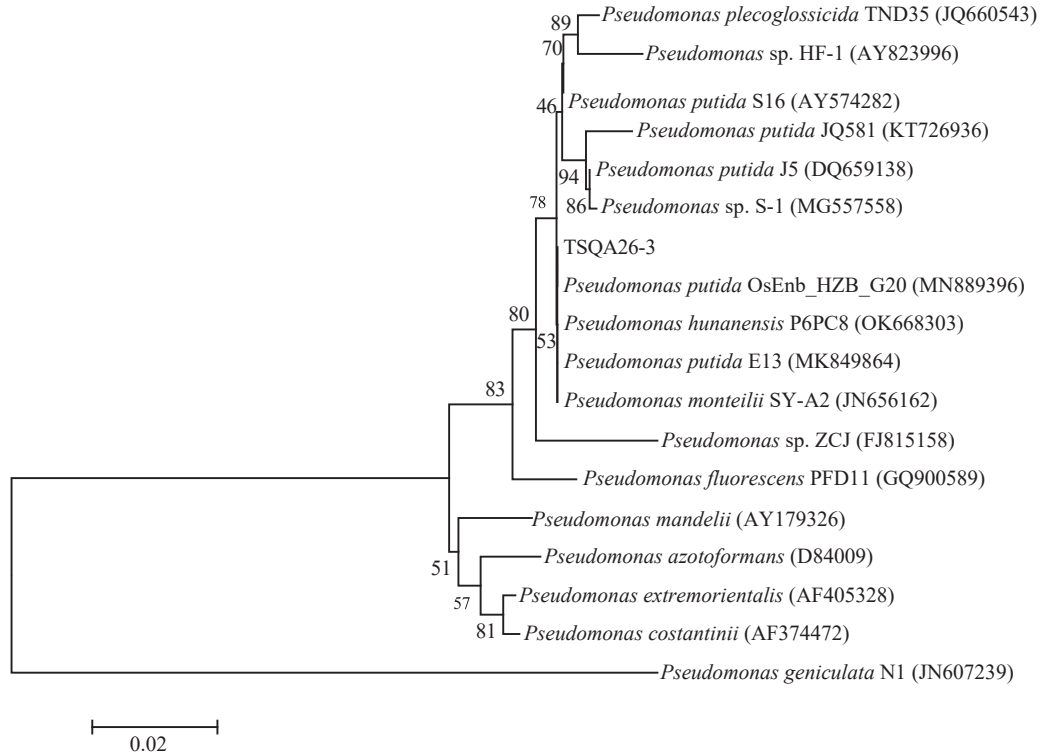


图 3 菌株基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree of the strain TSQA26-3 based on its 16S rRNA gene sequences

表 3 TSQA26-3 促生特性检测

Table 3 Detection of the plant-promoting ability of TSQA26-3

促生特性检测 Plant-promoting ability		定量分析 Quantitative analysis	
指标 Parameter	活性 Activity	指标 Parameter	值 Value
溶解无机磷能力 Phosphate solubilization (inorganic)	+	无机磷溶磷量 Inorganic phosphorus solubilizing amount/(mg·L ⁻¹)	30.31 ± 5.29
溶解有机磷能力 Phosphate solubilization (organic)	-	有机磷溶磷量 Organic phosphorus solubilizing amount/(mg·L ⁻¹)	0
固氮能力 Nitrogen fixation	+	固氮酶活性 Nitrogenase activity/(IU·L ⁻¹)	88.24 ± 3.04
产IAA IAA production	+	产IAA能力 Capacity of IAA secretion/(mg·L ⁻¹)	9.71 ± 0.31
解钾能力 Potassium decomposition	-	解钾能力 Soluble potassium content/(mg·L ⁻¹)	0

可溶性淀粉作为碳源最不利于菌株合成铁载体。

2.5.2 氮源

使用 MSA 为发酵基础培养基, 如图 6 所示, L-天冬酰胺、L-精氨酸和 L-谷氨酰胺作为氮源, 均有利于菌株合成铁载体, 培养基 *su* 均在 80% 以上, 其中, 使用 L-谷氨酰胺的 *su* 最大, 为 84.11%。使用 L-脯氨酸和甘氨酸作为氮源时, 培养基的 *su* 分别为 72.24% 和 61.34%。使用硫酸铵作为氮源时, 菌株培养基的 *su* 仅为 4.96%, 显著低于其他氮源 ($P < 0.05$), 说明菌株在无机氮作为氮源时, 合成铁载体能力极低。

2.5.3 培养基营养成分正交试验

以 MSA 为发酵基础培养基, 根据碳源、氮源的试验结果, 选择甘露醇为碳源, L-谷氨酰胺为氮源, 以甘露醇、L-谷氨酰胺、K₂HPO₄ 和 MgSO₄·7H₂O 4 种成分, 进行 4 因素 3 水平正交试验, 根据菌株合成 *su* 结果确定发酵培养基最终配比, 结果如表 4 所列。菌株合成铁载体发酵培养基最佳配方为: 甘露醇 25.0 g·L⁻¹, L-谷氨酰胺 2.5 g·L⁻¹, K₂HPO₄ 1.0 g·L⁻¹, MgSO₄·7H₂O 0.25 g·L⁻¹, 此时 *su* 值最大为 89.44%, 菌株合成铁载体能力最强。通过极差 R 值分析, 培

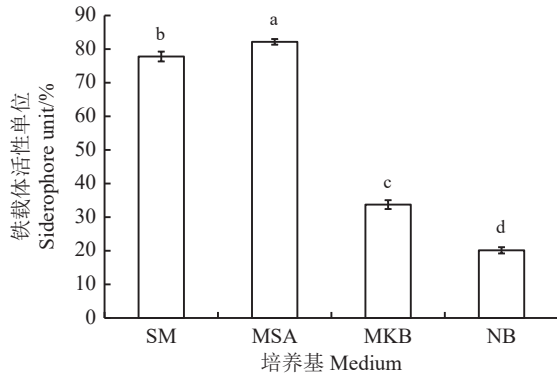


图 4 不同培养基对菌株铁载体合成的影响

Figure 4 Effects of different media on the siderophores produced by TSQA26-3

不同小写字母表示不同处理之间差异显著 ($P < 0.05$); 下同。

Different lowercase letters indicate significant differences between treatments at the 0.05 level. This is applicable for the following figures and table as well.

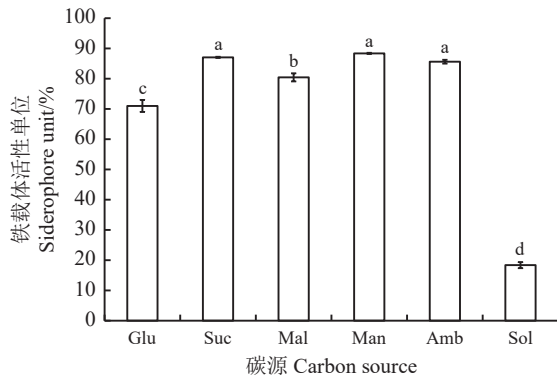


图 5 不同碳源对菌株铁载体合成的影响

Figure 5 Effects of different carbon sources on the siderophores produced by TSQA26-3

Glu、Suc、Mal、Man、Amb、Sol 分别代表葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、甘露醇、琥珀酸和可溶性淀粉。

Glu, Suc, Mal, Man, Amb, Sol indicate glucose, sucrose, maltose, mannitol, amber acid and soluble starch, respectively.

培养基的 4 种成分对菌株产铁载体能力影响从高到低为 $MgSO_4 \cdot 7H_2O > K_2HPO_4 > L\text{-谷氨酰胺} > 甘露醇$ 。

2.6 培养条件优化

2.6.1 pH

为研究培养基初始 pH 对菌株合成铁载体能力的影响, 试验设置 6.5、7、7.5、8、8.5 5 个 pH, 如图 7A 所示, 培养基初始 pH 为 7 时, su 值最高, 为 90.72%, 随着培养基初始 pH 的升高, 其 su 值越低。初始 pH 为 7.5 时, 培养基 su 值为 87.56%, 初始 pH 为 8.5 时, su 值降低至 82.08%。培养液初始 pH 为 7 最有利于菌株铁载体的合成。

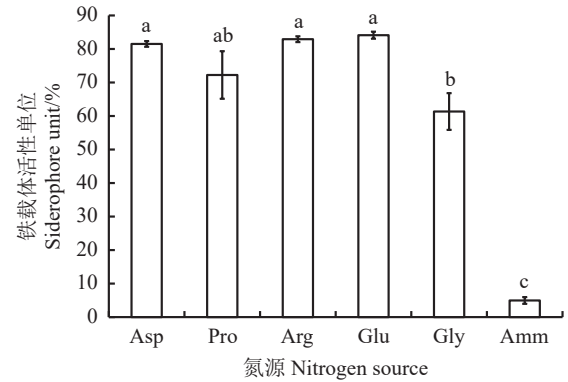


图 6 不同氮源对菌株铁载体合成的影响

Figure 6 Effects of different nitrogen sources on the siderophores produced by TSQA26-3

Asp、Pro、Arg、Glu、Gly、Amm 分别表示 L-天冬酰胺、L-脯氨酸、L-精氨酸、L-谷氨酰胺、甘氨酸和硫酸铵。

Asp, Pro, Arg, Glu, Gly, Amm indicate L-Asparagine, L-Proline, L-Arginine, L-Glutamine, Glycine and $(NH_4)_2SO_4$.

表 4 培养基中各营养成分正交试验结果
Table 4 Results of the orthogonal test with different nutritional facts in the medium

序号 No.	甘露醇 Mannitol	L-谷氨酰胺 L-Glutamine	K_2HPO_4	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	$su/\%$
1	1	1	1	1	$69.19 \pm 3.47b$
2	1	2	2	2	$69.85 \pm 1.58b$
3	1	3	3	3	$76.56 \pm 1.11b$
4	2	1	2	3	$46.79 \pm 5.07d$
5	2	2	3	1	$88.79 \pm 0.67a$
6	2	3	1	2	$57.75 \pm 4.31c$
7	3	1	3	2	$68.88 \pm 4.48b$
8	3	2	1	3	$45.07 \pm 4.98d$
9	3	3	2	1	$89.44 \pm 0.53a$
K_1	71.87	61.62	57.34	82.47	
K_2	64.44	67.90	68.69	65.49	
K_3	67.80	74.58	78.07	56.14	
R	7.43	12.96	20.74	26.33	

碳氮源, K_2HPO_4 和 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 下的 1, 2, 3 与表 1 相同。R 为极差。1, 2, and 3 in the carbon, nitrogen sources, K_2HPO_4 , and $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ column are the same as in Table 1. R is a range.

2.6.2 转速

如图 7B 所示, 菌株在转速为 $170 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 时, 培养基 su 值最高, 为 90.99%, 显著高于其他转速条件 ($P < 0.05$)。因此, 最适宜菌株合成铁载体的摇床培养转速为 $170 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

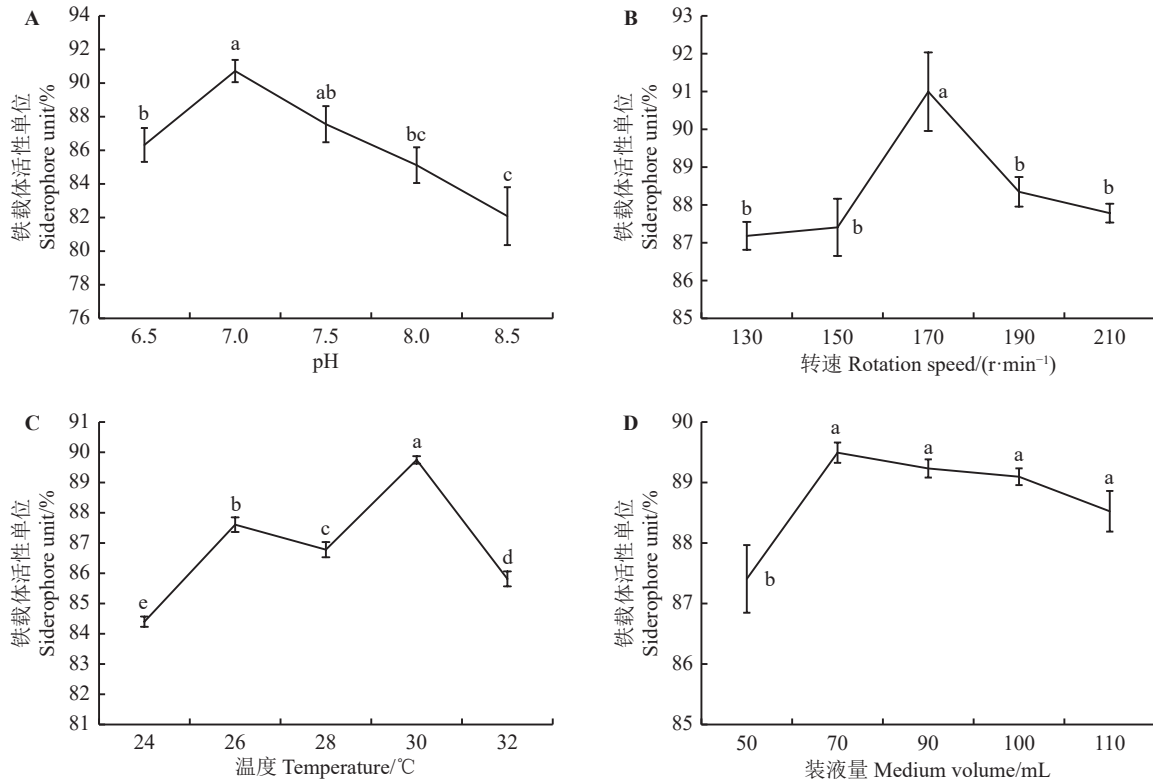


图7 不同培养条件对菌株合成铁载体的影响

Figure 7 Effects of different culture conditions on the siderophores produced by TSQA26-3

2.6.3 温度

如图7C所示,培养温度过高(32 °C)和过低(24 °C)均会导致菌株合成铁载体能力降低,培养温度为30 °C时,*su*值最高,为89.75%,其次为培养温度为26 °C时,*su*值为87.61%,各培养温度之间差异显著($P < 0.05$)。最适宜菌株合成铁载体的培养温度为30 °C。

2.6.4 装液量

在250 mL锥形瓶中分别装入50、70、90、100、110 mL培养基,试验装液量对菌株合成铁载体能力的影响。从图7D中看出,装液量为50 mL时,培养液*su*值最低,且与其他处理差异显著($P < 0.05$),当装液量为70~100 mL时,培养液*su*值均高于89%,其中装液量为70 mL时*su*值最高,为89.49%,装液量为每250 mL瓶中装70 mL最有利菌株合成铁载体。

3 讨论

本研究从贵州岩溶山区野生白三叶根际土壤中筛选得到1株铁载体产生菌TSQA26-3,并对其进行分类鉴定。细菌的分子生物学鉴定方法准确性高,结果稳定,数据库全面,其中,16S rRNA基因序列具

有普遍存在性和序列保守性特点,是微生物分子鉴定的最优标志物之一^[30-31]。将菌株的16S rRNA基因序列通过BLAST比对,发现菌株与假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)细菌中多个种同源性达99%以上,在系统发育树上,16S rRNA基因序列与*P. putida* OsEnb_HZB_G20 (MN889396)最为接近,但同一聚类上同时出现*P. hunanensis*和*P. monteilii*,因此,16S rRNA基因序列分析无法准确确定菌株的分类地位。VITEK-2全自动微生物鉴定系统根据微生物特征性生化反应而对微生物进行鉴定,适用于微生物实验室的日常检测工作^[32]。有研究报道,其对蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)检出率较高^[33],可将金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)鉴定到种^[34],在医疗和食品领域得到广泛应用。子建文等^[35]利用该系统进行土壤厌氧菌的鉴定,张帆等^[32]利用该系统对铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)的鉴定结果作参考标准。虽然VITEK-2系统具有准确、快速、自动化高等特点,但该系统仅能鉴定其数据库中所包含的微生物种类^[36]。经鉴定,菌株TSQA26-3的生化反应与VITEK-2全自动微生物鉴定系统中的恶臭假单胞菌(*P. putida*)高度相似。结合形态观察、

VITEK-2 全自动微生物鉴定和 16S rRNA 基因序列分析, TSQA26-3 菌株鉴定为恶臭假单胞菌 (*P. putida*)。

有研究报道, 于素芳等^[37]从棉花 (*Gossypium* spp.) 根际细菌中分离筛选出 1 株产铁载体能力强的恶臭假单胞菌; 刘艳萍等^[38]从大棚蔬菜根际土中分离到 1 株高产铁载体的恶臭假单胞菌, 其铁载体在低铁条件下具有促进黄瓜 (*Cucumis sativus*) 幼苗生长的作用。陈伟等^[14]从黑麦草 (*Lolium perenne*) 根际分离纯化了 1 株与恶臭假单胞菌相似的产铁载体菌, 对黄瓜灰霉病 (*Botrytis cinerea*) 有抑制作用; 曹宏丽等^[39]从地黄 (*Rehmannia glutinosa*) 种植地土壤中分离得到 1 株恶臭假单胞菌, 该菌不仅铁载体合成量高, 合成的铁载体还对拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 主根的生长有抑制作用。前人研究显示, 恶臭假单胞菌是 1 株高产铁载体的优势菌株, 并在植物根际土壤中广泛存在, 这与本研究结果一致, 但有关恶臭假单胞菌的进一步应用还有待研究。

在对植物促生菌的研究中发现, 牧草根际促生菌同时具有溶磷、固氮、分泌 IAA 等多种促生特性^[40]。有研究者报道, 铁载体产生菌 (SPB) 除了具有产铁载体能力, 还具有溶磷、固氮等促进植物生长特性。李韵雅^[28]分离获得的铁载体产生菌 *Bacillus tequilensis* CD36 同时具有产 ACC 脱氢酶、产 IAA、溶解无机磷和解钾等作用; 雷平等^[25]从辣椒 (*Capsicum annuum*) 内生菌中分离得到的假单胞菌 PEB40 具有较好的产 IAA 和溶解有机磷能力; 龙云川等^[41]从富硒土壤中筛选出的 3 株高效铁载体产生菌, 均具有产 IAA 能力。本研究显示, TSQA26-3 菌株除了能分泌铁载体外, 还具有溶解无机磷、固氮和产 IAA 能力, 说明恶臭假单胞菌 (*P. putida*) 具有多种促进植物生长机制, 有较大的促生潜力。

不同的细菌最适宜分泌铁载体的条件是不同的, 影响铁载体合成的因素除了细菌本身性质差异外, 还包括培养基、碳氮源、金属离子、pH、培养温

度等^[8]。朱慧明等^[13]研究显示, 细菌在 LB 培养基中生长最好, 但铁载体活性单位极低。陈佳亮^[27]的研究也表明, 细菌在 NB 和 LB 这类富营养培养基中不能分泌铁载体, 而 SM、MSA 和 MKB 培养基常被用作细菌合成铁载体的发酵培养基。本研究发现, 最适宜 TSQA26-3 菌株合成铁载体的培养基为 MSA 培养基。本研究结果显示, 最适宜菌株发酵的碳源为甘露醇, 与 Mohamed^[42]研究结果一致。使用不同氨基酸作为氮源时, 菌株的铁载体活性单位不同, 但均在 60% 以上, 而使用硫酸铵作为氮源时, 铁载体活性单位明显降低, 说明无机氮源不利于菌株铁载体的合成, 最适宜菌株合成铁载体的氮源为 L-谷氨酰胺。培养基成分正交试验显示, 对菌株合成铁载体影响最大的是 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 其次为 K_2HPO_4 , 发酵培养基中无机盐的量对菌株合成铁载体的影响大于碳氮源。本研究在优化发酵培养基的基础上, 进一步研究培养基初始 pH、转速、培养温度和装液量对菌株合成铁载体的影响, 优化其培养条件, 提高菌株合成铁载体能力, 为铁载体进一步的探索与利用研究提供技术基础。

4 结论

结合菌株形态观察、VITEK-2 全自动微生物鉴定、16S rRNA 基因序列分析, 菌株 TSQA26-3 鉴定为恶臭假单胞菌 (*P. putida*), 且菌株具有溶解无机磷、分泌 IAA 和固氮能力。通过对适宜菌株产铁载体基础发酵培养基的筛选, 培养基各组分和配比的优化, 以及培养条件研究, 菌株合成铁载体最佳发酵培养基为甘露醇 (Mannitol) 和 L-谷氨酰胺 (L-Glutamine) 培养基, 简称 MG 培养基。配方为: 甘露醇 $25.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, L-谷氨酰胺 $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ $0.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 最佳培养条件为: 初始 pH 7.00, 转速 $170 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 培养温度 $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 装液量每 250 mL 瓶中装 70 mL。

参考文献 References:

- [1] GAMIT D A, TANK S K. Effect of siderophore producing microorganism on plant growth of *Cajanus cajan* (pigeon pea). *International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology*, 2014, 4(1): 20-27.
- [2] FRANCESCO M, STEFANO C. Evolution of macromolecular docking techniques: The case study of nickel and iron metabolism in pathogenic bacteria. *Molecules*, 2015, 20(8): 14265-14292.

- [3] HAAS D, DÉFAGO G. Biological control of soil-borne pathogens by *fluorescent Pseudomonads*. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(4): 307-319.
- [4] 方涛, 李道季, 余立华. 海洋微生物铁载体的研究. *海洋科学*, 2007, 31(10): 87-91.
FANG T, LI D J, YU L H. Advance of the siderophores produced by marine microorganisms. *Marine Sciences*, 2007, 31(10): 87-91.
- [5] TAGHAVI S, VAN DER LELIE D, HOFFMAN A, ZHANG Y B, WALLA M D, VANGRONSVELD J, NEWMAN L, MONCHY S. Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium *Enterobacter* sp. 638. *PLoS Genetics*, 2010, 6(5): e1000943.
- [6] SAHA M, SARKAR S, SARKAR B, SHARMA B K, BHATTACHARJEE S, TRIBEDI P. Microbial siderophores and their potential applications: A review. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(5): 3984-3999.
- [7] CORNELIS P, MATTHIJS S. Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in *Fluorescent pseudomonads*: Not only pyoverdines. *Environmental Microbiology*, 2002, 4(12): 787-798.
- [8] 殷俊杰, 王齐, 葛淼淼, 鲁统壮, 任丽英. 微生物铁载体的应用研究进展. *环境保护与循环经济*, 2021(7): 20-24, 69.
YIN A J, WANG Q, GE M M, LU T Z, REN L Y. Research progress on the microbial siderophore. *Environmental Protection and Circular Economy*, 2021(7): 20-24, 69.
- [9] 魏本杰, 曾晓希, 刘志成, 杨少迪, 朱生翠, 汤建新. 产铁载体菌的筛选鉴定及活化镉的性能探究. *环境科学与技术*, 2014, 37(11): 26-31.
WEI B J, ZENG X X, LIU Z C, YANG S D, ZHU S C, TANG J X. Isolation, identification and study on cadmium-mobilization ability of siderophores-producing bacteria. *Environmental Science & Technology*, 2014, 37(11): 26-31.
- [10] 晋银佳, 刘文, 朱跃, 王丰吉. 荧光假单胞菌产铁载体对油菜吸收砂基和水基中镉的影响. *环境工程学报*, 2016, 10(1): 415-420.
JIN Y J, LIU W, ZHU Y, WANG F J. Effects of siderophore produced by *Pseudomonas fluorescence* on cadmium uptake from sand-base and water-base systems by lettuces. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2016, 10(1): 415-420.
- [11] 黎循航, 张言周, 李韵雅, 孙萌, 管政兵, 蔡宇杰, 廖祥儒. 铁载体产生菌筛选、鉴定及防治 *Botryosphaeria dothidea*. *食品与生物技术学报*, 2019, 38(3): 144-151.
LI X H, ZHANG Y Z, LI Y Y, SUN M, GUAN Z B, CAI Y J, LIAO X R. Isolation and characterization of siderophore producing bacteria for biocontrol *Botryosphaeria dothidea*. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2019, 38(3): 144-151.
- [12] SRIVASTAVA P, SAHGAL M, SHARMA K, ENSHASY H A E, GAFUR A, ALFARRAJ S, ANSARI M J, SAYYED R Z. Optimization and identification of siderophores produced by *Pseudomonas monteilii* strain MN759447 and its antagonism toward fungi associated with mortality in *Dalbergia sissoo* plantation forests. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 984522.
- [13] 朱慧明, 张彦, 杨洪江. 高产铁载体假单胞菌的筛选及其对铁氧化物的利用. *生物技术通报*, 2015, 31(9): 177-182.
ZHU H M, ZHANG Y, YANG H J. Screening of *Pseudomonas* strains producing high-yield siderophore and its utilization of iron hydroxides. *Biotechnology Bulletin*, 2015, 31(9): 177-182.
- [14] 陈伟, 王小利, 付薇, 曾庆飞, 陈莹, 舒健虹. 黑麦草根际产铁载体细菌 HMGY6B 的筛选鉴定及对病原菌的拮抗作用. *微生物学报*, 2016, 43(10): 2207-2215.
CHEN W, WANG X L, FU W, ZENG Q F, CHEN Y, SHU J H. Screening, identification and antagonistic against the pathogens of a siderophore-producing bacteria HMGY6B from rhizosphere of ryegrass. *Microbiology China*, 2016, 43(10): 2207-2215.
- [15] GAO B B, CHAI X F, HUANG Y M, WANG X N, HAN Z H, XU X F, WU T, ZHANG X Z, WANG Y. Siderophore production in *pseudomonas* SP. strain SP3 enhances iron acquisition in apple rootstock. *Journal of Applied Microbiology*, 2022, 133(2): 720-732.
- [16] 俞华富. 丁香假单胞菌 MB03 杀线虫毒性基因的克隆表达与杀虫活性研究. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2016.
YU H F. Expression of pathogenic gene from *Pseudomonas syringae* MB03 and nematicidal activity against *Caenorhabditis elegans*. Master Thesis. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016.
- [17] 王振龙, 姚拓, 李明源, 李青璞, 柴加丽, 张琛, 张银翠. 若尔盖高寒草地优势牧草植物根际促生菌的筛选及特性. *草业科学*, 2023, 40(2): 319-328.
WANG Z L, YAO T, LI M Y, LI Q P, CHAI J L, ZHANG C, ZHANG Y C. Isolation, screening, and characterization of dominant plant growth-promoting rhizobacterial species in Zoige alpine grassland. *Pratacultural Science*, 2023, 40(2): 319-328.

- [18] 杨杉杉, 李国光, 张胜男, 路晓培, 丁悦, 国情文, 田再民, 冯福应. 假单胞菌 BP16 的分离鉴定及其植物促生性状和效应. 微生物学通报, 2018, 45(10): 2121-2130.
YANG S S, LI G G, ZHANG S N, LU X P, DING Y, GUO Q W, TIAN Z M, FENG F Y. Isolation and identification of *Pseudomonas* sp. BP16 and its plant growth-promoting traits and effects. Microbiology China, 2018, 45(10): 2121-2130.
- [19] 葛红莲, 纪秀娥. 黄瓜根际解钾细菌的分离筛选、鉴定及其促生效果. 北方园艺, 2017(13): 21-25.
GE H L, JI X E. Screening, identification and promoting effects of potassium-solubilizing bacteria in rhizosphere of cucumber. Northern Horticulture, 2017(13): 21-25.
- [20] 蔡璐, 王小利, 陈莹, 王子苑, 李小冬. 无机磷溶解菌 RW8 的筛选、鉴定及对白三叶促生效果研究. 草业学报, 2017, 26(5): 181-188.
CAI L, WANG X L, CHEN Y, WANG Z Y, LI X D. Isolation and identification of an inorganic phosphorus-solubilizing bacterium RW8 and its growth-promoting effect on white clover (*Trifolium repens*). Acta Prataculturae Sinica, 2017, 26(5): 181-188.
- [21] 程宇阳. 苹果园白三叶根际土溶磷菌的分离、鉴定及其特性研究. 咸阳: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2020.
CHENG Y Y. Isolation, identification and characterization of phosphorus soluble bacteria in rhizosphere soil of apple orchard. Master Thesis. Xi'an: Northwest A&F University, 2020.
- [22] 韦兴迪, 曾庆飞, 谭玉兰, 韦鑫, 李亚娇, 陈超. 贵州部分地区野生白三叶根瘤菌资源调查与区系分析. 作物杂志, 2018(2): 35-43.
WEI X D, ZENG Q F, TAN Y L, WEI X, LI Y J, CHEN C. Investigation and floristic analysis on rhizobial resources of *Trifolium repens* in some regions of Guizhou Province. Crops, 2018(2): 35-43.
- [23] KUMAR A, TRIPTI, MALEVA M, BRUNO L B, RAJKUMAR M. Synergistic effect of ACC deaminase producing *Pseudomonas* sp. TR15a and siderophore producing *Bacillus aerophilus* TR15c for enhanced growth and copper accumulation in *Helianthus annuus* L. Chemosphere, 2021, 276: 130038.
- [24] 荣良燕, 姚拓, 赵桂琴, 柴强, 席琳乔, 王小利. 产铁载体 PGPR 菌筛选及其对病原菌的拮抗作用. 植物保护, 2011, 37(1): 59-64.
RONG L Y, YAO T, ZHAO G Q, CHAI Q, XI L Q, WANG X L. Screening of siderophore-producing PGPR bacteria and their antagonism against the pathogens. Plant Protection, 2011, 37(1): 59-64.
- [25] 雷平, 黄军, 黄彬彬, 毕世宇, 郭照辉, 刘清术, 唐滢. 1株产铁载体辣椒内生细菌的分离鉴定及其促生长作用. 激光生物学报, 2020, 29(4): 379-384.
LEI P, HUANG J, HUANG B B, BI S Y, GUO Z H, LIU Q S, TANG Y. Isolation, identification and growth promoting effect of a siderophore-producing endophytic bacterium from *Capsicum*. Acta Laser Biology Sinica, 2020, 29(4): 379-384.
- [26] 王亚军, 冯炬威, 李雅倩, 虞方伯. 高产铁载体菌 *Burkholderia vietnamiensis* YQ9 促生特性研究及其对重金属胁迫条件下种子萌发的影响. 环境科学学报, 2022, 42(2): 430-437.
WANG Y J, FENG J W, LI Y Q, YU F B. Studies on growth-promoting properties of an efficient siderophore producing bacterium, *Burkholderia vietnamiensis* YQ9, and its effects on seed germination under heavy metal stress. Acta Scientiae Circumstantiae, 2022, 42(2): 430-437.
- [27] 陈佳亮. 烟草根际促生菌 Sm-1 的分离及其外泌铁载体的纯化与鉴定. 长沙: 湖南农业大学硕士学位论文, 2017.
CHEN J L. Separation of growth-promoting bacteria Sm-1 and purification and identification of siderophore. Master Thesis. Changsha: Hunan Agricultural University, 2017.
- [28] 李韵雅. 高产铁载体根际促生菌的筛选及其在土壤修复方面的潜在应用. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2018.
LI Y Y. Screening of siderophore-high-yield plant growth promoting rhizobacteria and its potential application in soil remediation. Master Thesis. Wuxi: Jiangnan University, 2018.
- [29] 舒健虹, 王子苑, 刘晓霞, 曾庆飞, 王小利. 牧草促生菌分离鉴定及对大豆促生性能的研究. 中国土壤与肥料, 2020(4): 215-222.
SHU J H, WANG Z Y, LIU X X, ZENG Q F, WANG X L. Identification of forage-promoting strains and their effects on soybean growth and quality. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2020(4): 215-222.
- [30] 焦振泉, 刘秀梅. 细菌分类与鉴定的新热点: 16S-23S rDNA 间区. 微生物学通报, 2001, 28(1): 84-89.
JIAO Z Q, LIU X M. New hotspot in bacterial classification and identification: 16S-23S rDNA Interregion. Microbiology China, 2001, 28(1): 84-89.
- [31] CLARRIDGE J E. III Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and

- infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 2004, 17(4): 840-862.
- [32] 张帆, 李树垚, 张子豪, 蔡雪凤, 任岩, 刘凯, 侯翠艳, 易欣欣, 高秀芝. 铜绿假单胞菌检测方法的比较与优化. *生物技术通报*, 2018, 34(3): 67-74.
ZHANG F, LI S Y, ZHANG Z H, CAI X F, REN Y, LIU K, HOU C Y, YI X X, GAO X Z. Comparison and optimization of the detection method for *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechnology Bulletin*, 2018, 34(3): 67-74.
- [33] 白李明, 王宝国. 蜡样芽孢杆菌检测中 VITEK-2 全自动微生物鉴定仪的应用研究. *中国医疗器械信息*, 2023, 29(3): 49-51.
BAI L M, WANG B G. Application of VITEK-2 automatic microbial identification instrument in the detection of *Bacillus cereus*. *China Medical Device Information*, 2023, 29(3): 49-51.
- [34] 孟令缘, 牛沁雅, 廉鲁昕, 黄巾凌, 崔生辉, 闫韶飞, 李凤琴, 杨保伟. 基于 16S rDNA 序列、MALDI-TOF-MS 和 VITEK 的沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的鉴定. *中国食品学报*, 2021, 21(10): 197-205.
MENG L Y, NIU Q Y, LIAN L X, HUANG J L, CUI S H, YAN S F, LI F Q, YANG B W. Identification of *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* using 16S rDNA Sequencing, MALDI-TOF-MS and VITEK System. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(10): 197-205.
- [35] 子建文, 唐辉, 李倩, 资云海, 张玉岭, 李晓霞. 滇藏相邻地区高海拔山脉土壤微生物学调查. *西南国防医药*, 2016, 26(9): 1089-1091.
ZI J W, TANG H, LI Q, ZI Y H, ZHANG Y L, LI X X. Investigation on soil microbiology of high altitude mountains in the adjacent areas of yunnan and Tibet. *Medical Journal of National Defending Forces in Southwest China*, 2016, 26(9): 1089-1091.
- [36] 郭瑞军. VITEK 2 Compact 及其在食品微生物检测中的应用研究. *现代食品*, 2020(12): 192-193, 201.
GUO R J. VITEK 2 Compact system and its application in food microbiological detection. *Modern Food*, 2020(12): 192-193, 201.
- [37] 于素芳, 丁延芹, 姚良同, 岳宝强, 杜秉海. 一株棉花根际铁载体产生菌 E19 的分离鉴定. *生物技术*, 2007, 17(6): 19-21.
YU S F, DING Y Q, YAO L T, YUE B Q, DU B H. Isolation and identification of siderophores producing bacteria E19 from cotton rhizosphere. *Biotechnology*, 2007, 17(6): 19-21.
- [38] 刘艳萍, 滕松山, 赵蕾. 高产嗜铁素恶臭假单胞菌 A3 菌株的鉴定及其对黄瓜的促生作用. *植物营养与肥料学报*, 2011, 17(6): 1507-1514.
LIU Y P, TENG S S, ZHAO L. Identification of a siderophore-producing bacterium *Pseudomonas putida* A3 and its growth-promoting effects on cucumber seedlings. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2011, 17(6): 1507-1514.
- [39] 曹宏丽, 郝尚华, 楚梦晓, 邱爽, 罗梦香, 王明道. 1 株高产铁载体菌株的筛选鉴定以及化感作用的验证. *河南农业大学学报*, 2021, 55(4): 727-735.
CAO H L, HAO S H, CHU M X, QIU S, LUO M X, WANG M D. Screening and identification of a high-yielding siderophore strain and verification of allelopathic effect. *Journal of Henan Agricultural University*, 2021, 55(4): 727-735.
- [40] 杨晓蕾, 李建宏, 姚拓, 梅丽娜, 李琦, 白洁, 朱青青, 赵晓倩, 赵树栋. 5 株植物根际促生菌功能特性及培养条件. *草业科学*, 2022, 39(1): 30-38.
YANG X L, LI J H, YAO T, MEI L N, LI Q, BAI J, ZHU Q Q, ZHAO X Q, ZHAO S D. Functional characteristics and culture conditions of five plant growth-promoting rhizobacteria strains. *Pratacultural Science*, 2022, 39(1): 30-38.
- [41] 龙云川, 陈轩, 周少奇. 高产铁载体根际菌的筛选鉴定及硒活化特性评价. *生物技术进展*, 2017, 7(5): 402-408.
LONG Y C, CHEN X, ZHOU S Q. Isolation, identification and assessment on selenium biofortification of siderophore-producing rhizobacteria. *Current Biotechnology*, 2017, 7(5): 402-408.
- [42] MOHAMED H A. Growth and siderophore production in vitro of *Bradyrhizobium* (Lupin) strains under iron limitation. *European Journal of Soil Biology*, 1998, 34(2): 99-104.

(责任编辑 张瑾)