

曾涛, 把梦娅, 夏围围, 张耀鸿, 蔡元锋, 陈晓芬, 贾仲君. 不同富集策略下土壤可培养解钾细菌群落特征变化[J]. 土壤学报, 2025, ZENG Tao, BA Mengya, XIA Weiwei, ZHANG Yaohong, CAI Yuanfeng, CHEN Xiaofen, JIA Zhongjun. Changes of Community Diversity and Assembly Processes of Culturable Potassium-Solubilizing Bacteria in Soil under Different Enrichment Strategies[J]. Acta Pedologica Sinica, 2025,

不同富集策略下土壤可培养解钾细菌群落特征变化*

曾涛¹, 把梦娅¹, 夏围围^{1†}, 张耀鸿¹, 蔡元锋², 陈晓芬³, 贾仲君

2,4

(1. 南京信息工程大学生态与应用气象学院/农业与生态气象江苏省高校重点实验室, 南京 210044; 2. 中国科学院南京土壤研究所, 南京 211135; 3. 江西省农业科学院土壤肥料与资源环境研究所, 南昌 330200; 4. 中国科学院东北地理与农业生态研究所, 长春 130102)

摘要: 解钾细菌 (Potassium-solubilizing bacteria, KSB) 具有独特解钾优势, 被视为生态农业可持续发展的核心植物促生菌。为充分发掘环境中的解钾细菌资源, 探究多种富集策略下土壤解钾细菌群落特征变化, 选用解钾细菌富集培养基 (KM), 并以细菌富集培养基 (BM) 作为对照, 通过液体 (L) 与固体 (S) 培养法, 连续传代三次 (1st、2nd 和 3rd) 富集培养供试土壤中细菌或解钾细菌, 收集每一代次可培养微生物富集物, 再运用高通量测序技术分析土壤本底和富集物中 16S rRNA 基因, 评估不同富集策略下可培养细菌或解钾细菌占土壤本底细菌群落的比例、组成和多样性变化规律。结果表明: 培养基 BM 和 KM 富集的细菌多样性显著低于土壤本底, 且 KM 富集的细菌多样性显著高于 BM。在 L-KM 和 S-KM 中共检测到细菌 17 门、38 纲、91 目、145 科和 267 属, 在门水平占土壤本底细菌比例最高, 约为 29.31%。培养基 L-KM 富集的细菌分类单元数在各水平上均高于 S-KM。在门水平, L-KM 中的优势门为 Firmicutes、Proteobacteria; S-KM 优势门为 Actinobacteriota、Proteobacteria。在属水平上, 通过连续三次传代富集了生理代谢特征具有明显差异的类群, 其中 L-KM 中优势属为 *Aminobacter*、*Chelatococcus*、*Cupriavidus*、*Hydrogenophilus*、*Microvirga*、*Paenibacillus*、*Phenylobacterium*, S-KM 中优势属仅 *Cupriavidus* 属与 L-KM 相同, 其他优势属主要是 *Burkholderia*、*Luteibacter*、*Massilia*、*Pseudomonas*、*Ralstonia* 等。与已知解钾细菌数据库比对发现, KM 中仅富集 50 个已知属, 未知解钾细菌占比 81% 以上。利用零模型反演连续不同培养基传代富集的细菌群落构建过程, 发现确定性过程主导了细菌从土壤悬液至培养基的第一代次群落结构变化, 而以遗传漂变为主的随机性过程则主导了代际间的细菌群落演替。上述结果表明培养基成分和形态是影响可培养解钾细菌群落的主控因子, 但连续传代富集不会导致群落结构同质化和单一化。不同富集策略下可获得较多的已知和未知解钾细菌属, 丰富了现有解钾细菌种质资源库, 为解钾细菌资源进一步开发和利用提供借鉴。

关键词: 解钾细菌; 连续传代; 富集策略; 高通量测序; 群落构建

中图分类号: X171; S154.3 文献标志码: A

Changes of Community Diversity and Assembly Processes of Culturable Potassium-

* 国家自然科学基金项目 (42177280, 42175138) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 42177280, 42175138)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: wxxia@nuist.edu.cn

作者简介: 曾涛 (2000—), 男, 四川内江人, 硕士研究生, 从事土壤微生物生态学研究。E-mail: ZT1509456525@outlook.com

收稿日期: 2024-06-23; 收到修改稿日期: 2024-10-05; 网络首发日期 (www.cnki.net):

Solubilizing Bacteria in Soil under Different Enrichment Strategies

ZENG Tao¹, BA Mengya¹, XIA Weiwei^{1†}, ZHANG Yaohong¹, CAI Yuanfeng², CHEN Xiaofen³, JIA Zhongjun^{2,4}

(1. Jiangsu Provincial University Key Laboratory of Agricultural and Ecological Meteorology, School of Ecology and Applied Meteorology, Nanjing University of Information Science and Technology, Nanjing 210044, China; 2. Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 211135, China; 3. Soil and Fertilizer & Resources and Environment Institute, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200, China; 4. Northeast Institute of Geography and Agroecology, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130102, China)

Abstract: 【Objective】 Potassium-solubilizing bacteria (KSB) are considered key plant growth-promoting bacteria for the sustainable development of ecological agriculture due to their unique advantage of potassium solubilization. To fully explore the resources of potassium-solubilizing bacteria in the environment, the changes in the characteristics of soil potassium-solubilizing bacterial communities were investigated in this study under various enrichment strategies. 【Methods】 By using a potassium-solubilizing bacteria enrichment medium (KM), with a bacterial enrichment medium (BM) as a control, the study employed liquid (L) and solid (S) culture methods to continuously enrich and culture potassium-solubilizing bacteria in the test soil samples through three consecutive passages (1st, 2nd, and 3rd). The culturable microbial enrichments from each passage were collected, and high-throughput sequencing technology was used to analyze the 16S rRNA genes in the soil background and the enrichments. This analysis aimed to evaluate the proportion of culturable bacteria or potassium-solubilizing bacteria in the soil background bacterial community, as well as the community composition and diversity patterns under different enrichment strategies. 【Results】 The results indicated that the bacterial diversity enriched by both media BM and KM was significantly lower than that in the background soil and the bacterial diversity in KM enrichments was significantly higher than that in BM enrichments. A total of 17 phyla, 38 classes, 91 orders, 145 families, and 267 genera of bacteria were detected in both L-KM and S-KM enrichments, with the most significant proportion at the phylum level accounting for approximately 29.31% of the soil background bacteria. The number of bacterial taxa enriched with L-KM medium was higher than S-KM at all levels. At the phylum level, the dominant phyla in L-KM were Firmicutes and Proteobacteria while in S-KM, the dominant phyla were Actinobacteriota and Proteobacteria. At the genus level, groups with distinct physiological and metabolic characteristics were enriched through three consecutive passages. Among them, the dominant genera in L-KM were *Aminobacter*, *Chelatococcus*, *Cupriavidus*, *Hydrogenophilus*, *Microvirga*, *Paenibacillus*, and *Phenylobacterium*. The only genus in S-KM that overlapped with L-KM was *Cupriavidus*, while other dominant genera included *Burkholderia*, *Luteibacter*, *Massilia*, *Pseudomonas*, and *Ralstonia*. Compared with known potassium-solubilizing bacteria databases, only 50 known genera were enriched in the KM medium, while unknown potassium-solubilizing bacteria accounted for over 81%. Using null model inversions to analyze the bacterial community assembly process during continuous passaging enrichment under different media, it was found that deterministic processes dominated the changes in community structure from the soil suspension inoculation to the first-generation media, while stochastic processes, mainly genetic drift, governed the intergenerational bacterial community succession. 【Conclusion】 These results indicate that the composition and form of the medium are the main factors influencing the culturable potassium-solubilizing bacterial community, but continuous passaging enrichment does not lead to homogenization and simplification of the community structure. A relatively large number of both known and unknown potassium-solubilizing bacterial genera can be obtained under different enrichment strategies and used to enrich the existing resource bank of potassium-solubilizing bacteria. This can provide valuable insights for further development and utilization of these bacteria.

Key words: Potassium-solubilizing bacteria; Successive generations; Enrichment strategies; High-throughput sequencing; Community assembly

钾 (K) 作为植物生长必需元素之一, 既是酶活化剂, 又能参与植物光合与呼吸过程, 提高植物

抗逆性,促进植物生长^[1]。我国土壤富含钾元素,但植物能直接吸收利用的钾素仅为全钾的1%~2%^[2]。农业上往往依赖施用化学钾肥缓解这一矛盾,但长期过度施用化学肥料给人类健康和生态环境带来潜在风险^[3]。解钾细菌肥的研究和应用为我国农业可持续发展提供了新思路。解钾细菌是一类植物根际促生菌^[4],可以转化土壤中稳定的含钾矿物,提高土壤速效钾含量^[5-6]。通过筛选高效解钾细菌,向土壤施用解钾细菌肥,有助于促进植物健康生长,减少化学钾肥使用,降低环境污染^[5]。

在筛选土壤解钾细菌的众多研究中,传统固体培养法(如平板培养法)仅对微生物群落进行定性描述,缺少定量评估,尤其是在连续传代富集培养并分离过程中解钾细菌群落多样性的演变规律鲜有报道;同时,传统固体培养基对解钾细菌的富集分离,严重依赖对单个菌落的筛选与纯化,一些肉眼难以分辨的解钾细菌菌落可能会被遗漏,因此无法准确获得环境解钾细菌群落的全部信息^[7]。而在利用液体培养法进行富集分离时,养分能够通过扩散来满足微生物自身生长需求^[8],但与氧气的接触限制可能会不利于某些好氧微生物生长。而固体平板培养,微生物生长更易获取氧气,且固体培养基本身为微生物生长提供了附着界面,能够影响微生物的一些生理生化过程,例如群体感应机制、生物膜的形成^[9],是液体培养基所不具备的,这也可能成为微生物选择性富集的重要原因。

其他富集培养条件(培养基成分、传代次数等)的不同,也可能导致特定解钾细菌的偏好性生长,进而遗漏一些在环境中发挥重要功能的微生物,无法全面准确评估土壤解钾细菌群落组成全貌。少量研究表明,在连续传代培养过程中,液体和固体培养基中优势菌和稀有菌的比例均保持相对稳定,随着传代次数增加,丰度较低的稀有菌由于竞争力不足,往往会被生长迅速的优势菌所淘汰^[7]。此外,与土壤本底微生物多样性相比,在连续传代富集过程中,不同成分培养基可能选择特定的微生物类群,尤其是第一代次富集的微生物类群,但在传代过程中这些被富集的微生物是随机出现或是稳定连续生长等尚不明确。

高通量测序技术为研究土壤微生物群落变化提供了强大的技术支持,该技术一次性能读取几十万乃至上百万条DNA分子序列,为揭示微生物群落组成提供便利^[10]。例如,利用高通量测序技术对特殊培养基富集的固氮菌进行筛选发现,传统分离方法会遗漏高达95.2%的固氮菌属,这意味着在连续传代过程中,大量尚未获得分离的固氮菌可能会被选择性遗漏^[7,11]。目前各国学者已从土壤中分离出众多纯培养解钾细菌菌株^[12-15],可据此建立已知解钾细菌数据库,为识别和评估土壤解钾细菌多样性提供有力支撑。

群落构建过程决定微生物群落多样性和组成,与群落功能密切相关,一直是微生物生态学研究的热点和难点之一。在不同生态系统^[16]、不同生境条件^[17]以及不同研究尺度^[18]下,微生物群落构建过程中确定过程和随机过程的相对重要性有所不同。而传代富集培养技术可为微生物生长提供一个连续稳定的培养环境,体系变量明确,利用该体系进行微域尺度下的群落构建理论研究,可以进一步验证宏观生态系统中得出的结论,为理论的普适性推广提供更多线索。

综上,本研究利用解钾细菌富集培养基(KM)对解钾细菌进行专性富集培养,并以细菌富集培养基(BM)富集土壤可培养细菌作为参照,对比分析以凸显解钾细菌独特的生理特性和富集效果。同时,采用液体与固体两种培养基,进行连续三次传代培养,结合高通量测序分析技术,进一步与已知解钾细菌数据库进行比较,以期精确定量土壤可培养解钾细菌的多样性、比例及富集规律,再利用零模型反演连续传代富集培养过程中细菌群落构建过程,揭示不同富集策略(培养基成分、培养基形态及传代次数)对土壤可培养解钾细菌群落特征的影响。

1 材料与方法

1.1 供试土壤描述

土壤于2019年11月采自江西新余市渝水区罗坊镇(27°47'N, 115°7'E),为冲积性水稻土。采

用五点交叉取样法,用土钻采集耕作层土壤,清除石块和植物残体,过 2 mm 筛,混匀组成代表性土样约 1 kg, 4 °C 保存。土壤 pH 5.89, 有机碳含量 20.78 g·kg⁻¹, 碱解氮含量 173.95 mg·kg⁻¹, 速效钾含量 108.67 mg·kg⁻¹。

1.2 土壤细菌和解钾细菌的富集策略

1.2.1 培养基类型 分别采用以下四种传统培养基进行细菌富集。固体细菌富集培养基 (S-BM) 主要成分包括: 牛肉膏 3.0 g、蛋白胨 10.0 g、NaCl 5.0 g、琼脂 18.0 g, 加水定容至 1 000 mL, 加适量 NaOH 溶液调节 pH 至 7.2~7.4。液体细菌富集培养基 (L-BM) 除不加入琼脂外, 其余配方与上述固体培养基相同。

固体解钾细菌富集培养基 (S-KM) 主要成分^[19]: 蔗糖 10.0 g、磷酸氢二钠 1.0 g、硫酸铵 0.5 g、硫酸镁 1.0 g、酵母膏 0.2 g、硫酸亚铁 0.03 g、碳酸钙 2.5 g、钾长石粉 10.0 g、琼脂 18.0 g, 加蒸馏水定容至 1 000 mL, pH 调节到 7.0~7.5。液体解钾细菌富集培养基 (L-KM) 主要成分: 蔗糖 10.0 g、七水硫酸镁 0.5 g、硫酸铵 0.2 g、氯化钠 0.1 g、碳酸钙 0.1 g、钾长石粉 5.0 g, 加水定容至 1 000 mL, pH 调节至 7.0~7.5。最后将所有配置好的培养基置于高压灭菌锅中, 115 °C 灭菌 30 min。待固体培养基稍冷却后, 在超净台进行无菌平板制备。待液体培养基稍冷却后, 在超净台进行分装。

1.2.2 土壤细菌和解钾细菌连续传代富集 本研究涉及的可培养细菌, 特指在培养基中生长的细菌菌落或菌体集合, 可被认为是“潜在”可分离的纯培养菌株, 也是可利用人工配方营养的细菌富集物。其中, BM 富集的“潜在”可培养细菌, 可能包含部分“潜在”可培养解钾细菌, 而 KM 更有针对性地富集大部分“潜在”可培养解钾细菌。具体操作如下: 称取土壤样品 1.0 g, 加入 100 mL 无菌水, 于三角瓶中溶解, 加入 5.0 g 玻璃珠, 在 200 r·min⁻¹ 和 30 °C 下震荡 0.5 h, 制备土壤悬浮液作为接种液。

利用固体 (S) 培养基富集培养步骤: 吸取 100 μL 土壤悬浮液, 均匀涂布在培养基表面, 然后在 30 °C 培养箱中倒置培养 5 d, 再将平板取出。在超净台里, 采用 10 mL 无菌水分多次洗脱培养基表面菌落细胞至 15 mL 无菌离心管 (借助酒精灼过的涂布棒刮除培养基表面菌体), 制成了第一代混合菌液 (1st), 保存于 -20 °C。然后, 再吸取上述 100 μL 菌液, 再次使用平板涂布法接种传代培养, 培育 5 d, 将第二代菌落细胞冲洗脱到 15 mL 无菌试管中, 制成了第二代混合菌液 (2nd)。利用上述方法, 制成第三代混合菌液 (3rd)。每代设置四次生物学重复。

利用液体 (L) 培养基富集培养步骤: 吸取 100 μL 土壤悬浮液接种至 100 mL 无菌液体培养基, 将培养瓶放入 30 °C 培养箱中, 震荡培养 7 d, 将菌液以 4 000×g 离心 10 min, 弃上清液, 加入 10 mL 无菌水振荡混匀, 浓缩为 10 mL 第一代混合菌液。稍后, 吸取上述 100 μL 菌液, 接种至新的 100 mL 液体培养基中, 传代培养 7 d, 采用上述相同方法浓缩为 10 mL 第二代混合菌液, 第三代混合菌液制备方法同上。收集的混合菌液均保存于 -20 °C。每代设置三次生物学重复。

1.3 细菌群落特征分析

1.3.1 土壤本底细菌 DNA 提取 采用 FastDNA[®] Spin Kit for Soil (MP Bio) 试剂盒提取土壤 DNA, 具体操作如下: 称取 0.5 g 土壤于 2 mL 离心管中, 再加入 SPB 和 MT 缓冲液后, 利用 Fast Prep 核酸提取仪以 6.0 m·s⁻¹ 的平均速度振荡 45 s, 14 000×g 离心 15 min。将离心后的上清液转移至新 2 mL 离心管中, 以 PPS 沉淀蛋白溶液, Binding Matrix 结合 DNA, SEWS-M 洗涤过滤后, 将 DNA 溶解于 50 mL DES 缓冲液。设置三次重复。

1.3.2 可培养细菌富集物 DNA 提取 采用 E.Z.N.A.[®] Bacterial DNA Kit (Omega) 试剂盒进行提取可培养细菌富集物 DNA, 具体操作如下: 将 1 mL 富集菌液 4 000×g 离心 10 min, 去除上清, 加入 100 μL TE 缓冲液重悬, 分别利用溶菌酶、蛋白酶 K 溶液和核糖核酸酶 A 裂解细胞, 去除蛋白质和 RNA, 100% DNA 洗涤缓冲液洗涤过滤后, 加入 50 μL 洗脱液, 过滤收集 DNA, 保存于 -20 °C。

1.3.3 Illumina NovaSeq 高通量测序及物种注释 由上海派森诺生物科技股份有限公司扩增土壤和富集菌液中细菌 16S rRNA 基因 (引物 515F/907R), 在 Illumina NovaSeq 测序系统上对其双端测序。

根据 barcode 信息划分样本, 通过 QIIME2 流程进行质控、去噪、拼接、去嵌合体: 使用 dada2 denoise-single 插件进行质控和特征序列 ASV 提取(--p-trim-left0--p-trunc-len350), 获取 ASVs 丰度表; 再将 ASVs 用 classify-consensus-blast 插件按照默认参数, 以 Greengenes 数据库 (Release 13.8, <http://greengenes.secondgenome.com>) 为参考对物种进行注释, 分析样本所获序列在各分类水平的物种分类信息 (包括分类单元数及其对应的相对丰度)。高通量测序概况如表 1 所示。测序原始数据上传至 NCBI 数据库, 序列号 PRJNA1108644。

表 1 土壤细菌的高通量测序结果

Table 1 High throughput sequencing results of soil bacteria

样品来源 Sample source	代次 Generation	高质量测序条数 Sequence	
供试土壤 Soil		68 240±11 982	
细菌富集培养基	液体	第 1 代菌体富集物 (1st)	
Enrichment medium for bacteria (BM)	Liquid (L)	第 2 代菌体富集物 (2nd)	
		第 3 代菌体富集物 (3rd)	
	固体	第 1 代菌体富集物 (1st)	
解钾细菌富集培养基	Solid (S)	第 2 代菌体富集物 (2nd)	
		第 3 代菌体富集物 (3rd)	
	液体	第 1 代菌体富集物 (1st)	
	Enrichment medium for potassium solubilizers (KM)	Liquid (L)	第 2 代菌体富集物 (2nd)
			第 3 代菌体富集物 (3rd)
		固体	第 1 代菌体富集物 (1st)
	第 2 代菌体富集物 (2nd)		
	第 3 代菌体富集物 (3rd)		

1.4 可培养细菌群落多样性及群落构建过程分析

细菌群落 α 多样性采用香农指数和辛普森指数表征^[20]。通过基于 Bray-Curtis 距离算法的主坐标分析 (Principal co-ordinates analysis, PCoA) 确定细菌群落 β 多样性及结构差异性。

细菌群落构建过程受确定性过程和随机性过程影响。利用零模型反演细菌群落构建过程, 用 β NTI (最近种间亲缘关系指数) 来评估不同时空尺度下微生物群落聚集机制^[21]。

1.5 可培养细菌比例计算

可培养细菌比例=富集物中细菌分类单元数量/土壤中所有细菌分类单元总数

其中, 土壤中所有细菌分类单元总数通过提取土壤 DNA, 高通量测序细菌 16S rRNA 基因, 并在门、纲、目、科、属水平进行注释, 获得土壤中所有细菌的系统发育分类信息; 富集物中细菌分类单元数量根据前述分析方法, 分别获得液体与固体培养基中第一代、第二代和第三代所有富集物的细菌或解钾细菌的分类信息。

1.6 已知解钾细菌数据库的构建

针对以往文献^[12-15]报道的已分离可培养解钾微生物进行检索并整理, 共汇总到 104 属解钾细菌 (真菌除外), 见表 2, 作为本研究的参考数据库。

表 2 本研究构建的已知解钾细菌数据库

Table 2 The constructed database of "known potassium-solubilizing bacteria" from previous literature

门水平 Phylum	纲水平 Class	属水平 Genus
Actinobacteria	Actinomycetia	<i>Alloactinosynnema</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Brevibacterium</i> ,
		<i>Cellulosimicrobium</i> , <i>Kocuria</i> , <i>Leucobacter</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Micrococcus</i> ,
		<i>Paenarthrobacter</i> , <i>Pseudarthrobacter</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Streptomyces</i>
Archaea-	Nitrososphaeria	<i>Nitrososphaera</i>
Thaumarchaeota		

	Chitinophagia	<i>Filimonas</i> , <i>Pseudoflavitalea</i>
Bacteroidetes	Cytophagia	<i>Chryseolinea</i> , <i>Dyadobacter</i> , <i>Flectobacillus</i> , <i>Flexibacter</i> , <i>Siphonobacter</i>
	Flavobacteriia	<i>Chryseobacterium</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Myroides</i>
	Sphingobacteriia	<i>Sphingobacterium</i>
Deinococcus- Thermus	Deinococci	<i>Deinococcus</i>
Firmicutes	Bacilli	<i>Amphibacillus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Brevibacillus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Exiguobacterium</i> , <i>Fictibacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Lysinibacillus</i> , <i>Metabacillus</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Peribacillus</i> , <i>Priestia</i> , <i>Staphylococcus</i>
	Clostridia	<i>Clostridium</i>
	Acidithiobacillia	<i>Acidithiobacillus</i>
	Alphaproteobacteria	<i>Agrobacterium</i> , <i>Allorhizobium</i> , <i>Aureimonas</i> , <i>Bradyrhizobium</i> , <i>Brevundimonas</i> , <i>Caulobacter</i> , <i>Ensifer</i> , <i>Inquilinus</i> , <i>Mesorhizobium</i> , <i>Methylobacterium</i> , <i>Mycoplana</i> , <i>Ochrobactrum</i> , <i>Paracoccus</i> , <i>Phyllobacterium</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Rhodopseudomonas</i> , <i>Sinorhizobium</i> , <i>Sphingobium</i> , <i>Sphingomonas</i>
Proteobacteria	Betaproteobacteria	<i>Cupriavidus</i> , <i>Duodenibacillus</i> , <i>Janthinobacterium</i> , <i>Massilia</i> , <i>Mitsuaria</i> , <i>Paraburkholderia</i> , <i>Ralstonia</i> , <i>Roseateles</i> , <i>Variovorax</i> <i>Acinetobacter</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Azotobacter</i> , <i>Cellvibrio</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Cronobacter</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Frateriia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Kluiveria</i> , <i>Kosakonia</i> , <i>Providencia</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Pseudoxanthomonas</i> , <i>Psychrobacter</i> , <i>Rahnella</i> , <i>Raoultella</i> , <i>Serratia</i> , <i>Stenotrophomonas</i>
	Gammaaproteobacteria	<i>Leclercia</i> , <i>Luteimonas</i> , <i>Lysobacter</i> , <i>Pantoea</i> , <i>Phytobacter</i> , <i>Plesiomonas</i> , <i>Proteus</i> , <i>Providencia</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Pseudoxanthomonas</i> , <i>Psychrobacter</i> , <i>Rahnella</i> , <i>Raoultella</i> , <i>Serratia</i> , <i>Stenotrophomonas</i>
	Synergistetes	Synergistia <i>Aminobacter</i>

1.7 数据处理与制图

运用 SPSS 24.0 进行数据统计分析, 使用 Origin 2024 作图。Venn 图通过在线工具 (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/>)生成。

2 结果

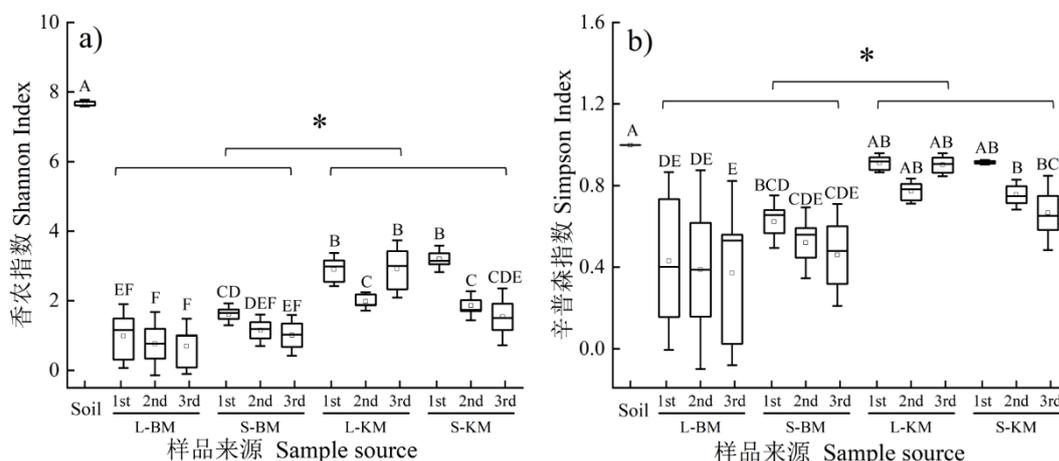
2.1 可培养细菌群落多样性与群落构建机制

基于 ASV 水平的分析结果显示: 不同富集策略下, 土壤本底细菌 α 多样性显著高于 KM, 而 KM 富集细菌 α 多样性显著高于 BM ($P < 0.05$)。培养基 BM 富集的细菌香农指数在 0.31~1.82 之间, KM 富集的解钾细菌香农指数在 0.91~3.15 之间, 而土壤本底香农指数高达 7.70。在连续三次传代培养过程中, 固体培养基 S-BM 和 S-KM 富集的细菌香农指数均呈下降趋势, S-BM-1st 和 S-KM-1st 中细菌香农指数最高, 分别为 1.61 和 3.20。液体培养基 L-BM 富集的细菌香农指数在代际间无显著差异, 而 L-KM 富集的解钾细菌香农指数为先下降后升高, 但 L-KM-1st 与 L-KM-3rd 无显著差异 (图 1a)。

与香农指数变化规律相似, 土壤本底辛普森指数显著高于 KM, 而 KM 高于 BM ($P < 0.05$)。培养基 BM 富集的细菌辛普森指数在 0.40~0.63 之间, 而 KM 富集的解钾细菌辛普森指数在 0.60~0.92 之间。在连续三次传代培养过程中, 无论液体还是固体培养基, 代际间辛普森指数无显著性差异 (图 1b)。

采用 PCoA 主坐标分析评估土壤可培养细菌群落 β 多样性。无论液体还是固体培养基, BM 与 KM 富集物样品均与土壤本底相距较远, 即与土壤本底细菌群落结构相比, 富集细菌群落呈现明显差异; 同时, BM 与 KM 之间也表现出较大差异, 在 L-BM 和 S-BM 间差异不显著, 而在 L-KM 和 S-KM 之间差异较大 (图 2a)。

培养基 L-BM 富集的细菌, 土壤与第一代之间 β NTI 多数大于 2, 确定性过程为主, 三次传代之间 β NTI 主要集中在 -2~2 之间, 随机性过程为主, 其中基于 Bray-Curtis 的 RC_{bray} 主要集中在 -0.95 处, 即随机性过程主要为均质扩散和遗传漂变; 培养基 S-BM 富集的细菌, 土壤与第一代之间 β NTI 全部大于 2, 确定性过程为主, 三次传代之间 β NTI 主要集中在 -2~2 之间, 随机性过程为主, 其中 RC_{bray} 主要集中在 -0.95~0.95 之间, 即随机性过程主要为遗传漂变。培养基 L-KM 富集的解钾细菌, 土壤与第一代之间 β NTI 全部大于 2, 确定性过程为主, 三次传代之间 β NTI 主要集中在 -2 分界线处, 半数以上位于 -2~2 之间, 大部分随机性过程为主, 其中 RC_{bray} 主要集中在 -0.95~0.95 之间, 即随机性过程主要为遗传漂变; 培养基 S-KM 富集的解钾细菌, 土壤与第一代之间 β NTI 一半大于 2, 一半在 -2~2 之间, 确定性过程和随机性过程各参半, 三次传代之间 β NTI 大部分在 -2~2 之间, 随机性过程为主, RC_{bray} 主要集中在 -0.95~0.95 之间, 即随机性过程主要为遗传漂变 (图 2b)。

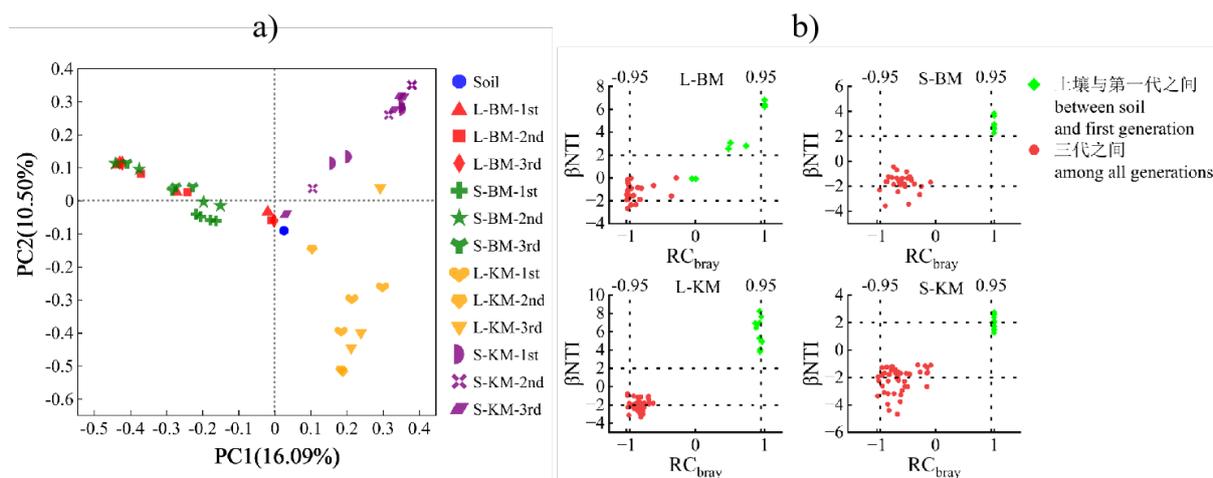


注: Soil 代表土壤本底; BM 和 KM 分别代表细菌富集培养基和解钾细菌富集培养基; L 和 S 分别代表固体和液体培养基; 1st、2nd 和 3rd 代表传代培养的第一代、第二代和第三代。图中大写字母代表不同培养基与代次间差异显著性, *代表细菌与解钾细菌间差异显著性 ($P<0.05$)。下同。Note: Soil represents the soil background; BM and KM represent enrichment media for bacteria and Potassium Solubilizers respectively; L and S represent for liquid and solid media respectively; 1st, 2nd and 3rd represent for the first, second, and third generations during the serial passages. In the figure, the uppercase letters represent the significance of differences between different media and passages, and the asterisks (*) represent the significance of differences between bacteria and potassium-solubilizing bacteria ($P<0.05$). The same below.

图 1 基于 ASV 水平下土壤本底和培养富集物中细菌的香农指数 (a) 和辛普森指数 (b)

Fig. 1 The Shannon index (a) and Simpson index (b) of bacteria in the soil background and culture enrichment samples, based on the ASV

level



注：图 2b 中，土壤与第一代之间代表土壤本底与第一次传代培养的群落构建差异，三代之间代表第一次传代、第二次传代、第三次传代培养之间的群落构建差异。Note: In Fig. 2b, between the soil and the first generation represent the differences in community construction between the soil background and the first subculture, while among the three generations represent the differences in community construction between the first, second and third passages of the subculture.

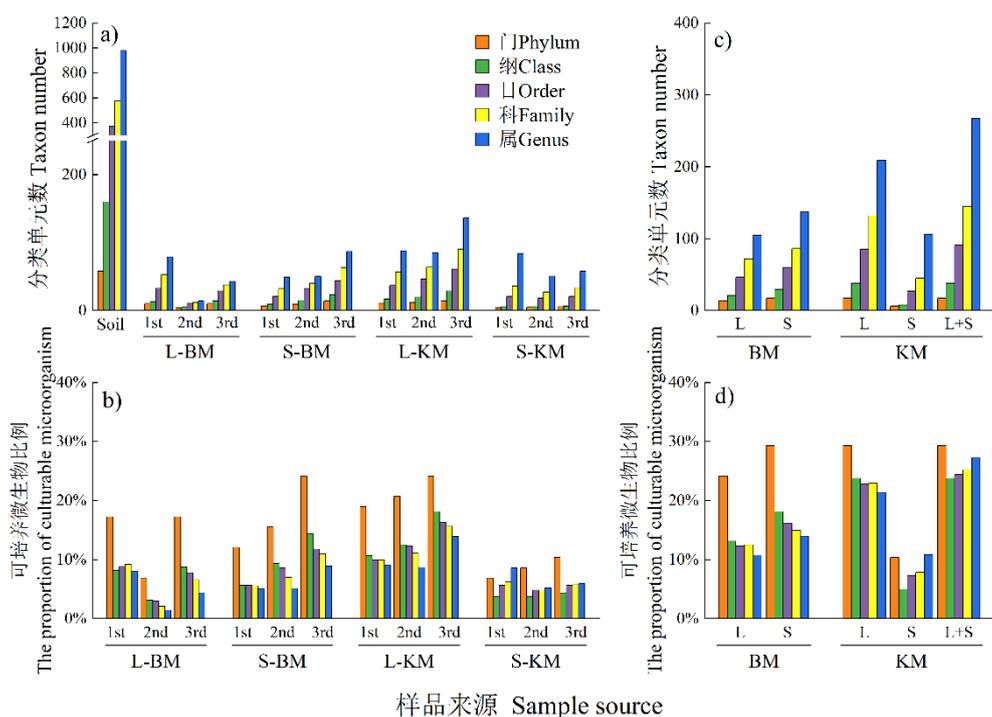
图 2 不同富集策略下细菌群落结构 (a) 及群落构建过程 (b) 差异

Fig. 2 Differences of bacterial community structure (a) and assembly processes (b) under different enrichment strategies

2.2 各分类水平上可培养解钾细菌比例

在各分类水平，供试土壤本底检测到的细菌分类单元数均高于可培养细菌（图 3a）。不同代次来源 L-KM 和 S-KM 共检测到 17 门、38 纲、91 目、145 科和 267 属细菌（图 3c），在门、纲、目、科和属水平分别占土壤本底细菌的 29.31%、23.75%、24.40%、25.22%和 27.27%（图 3d），其中 L-KM 共检测到 17 门、38 纲、85 目、132 科和 209 属（图 3c），分别占土壤本底细菌的 29.31%、23.75%、22.79%、22.96%和 21.35%（图 3d）；S-KM 富集的不同代次来源的解钾细菌共检测到 6 门、8 纲、27 目、45 科和 106 属（图 3c），分别占土壤本底细菌的 10.34%、5.00%、7.24%、7.83%和 10.83%（图 3d）。

在相同分类水平下，连续三次传代培养过程中，L-BM 富集的细菌种类（即在门、纲、目、科、属水平）均呈现先下降再升高的趋势，S-BM 为逐渐上升趋势；培养基 L-KM 与 S-KM 富集的解钾细菌种类均呈现上升趋势，但 L-KM 富集的解钾细菌种类明显高于 S-KM（图 3b）。培养基 BM 和 KM 富集的细菌均在门水平上可培养比例较高，在液体培养基中分别为 24.14%和 29.31%，在固体培养基中分别为 29.31%和 10.34%，总体而言，四种培养基富集可培养细菌种类高低排序大致为：L-KM>S-BM>L-BM>S-KM（图 3d）。



注：分组样品的细菌分类单元数，由组内样品检测到的共有和特有细菌分类单元数求和得到。Note: The bacterial taxon number of group samples was obtained by summing the number of shared and specific bacterial taxa detected in samples in the group.

图3 在各分类水平上，土壤本底和富集物中细菌分类单元数 (a, c) 和可培养比例 (b, d)

Fig. 3 At various taxonomic levels, the number of bacterial taxonomic units (a, c) and the cultivable proportion (b, d) in soil background and enrichment samples

2.3 可培养细菌门、属共现规律

在门水平，S-KM 富集的 6 个细菌门均能在 L-KM 中找到，L-KM 共富集 17 个细菌门，其中 14 门在 BM 中也有所富集（图 4a）。在属水平，L-BM 和 S-BM 分别富集了 105 和 137 个属，其中有 54 个相同属；培养基 L-KM 和 S-KM 分别富集了 209 和 106 个属，其中只有 48 个属在两种培养基中同时富集。L-KM 中富集的 76 个属在 BM 中也有所富集，S-KM 中的 49 个属同样也出现在 BM 中（图 4a）。

以已知解钾细菌数据库为参考，实验富集了已知解钾细菌 7 个门中的 6 个、104 属中的 55 个，占比 52.38%，仍有 49 个属未富集。培养基 BM 富集的细菌中，检测到有 40 个已知解钾细菌属；而 KM 富集的解钾细菌中，检测到有 50 个属和数据库中相同，但还有 217 个未知属，占 KM 富集的解钾细菌的 81% 以上，L-KM 富集的 209 个属中，已知解钾细菌有 44 个属(21.05%)，S-KM 富集的 106 个属中，已知解钾细菌有 30 个属(28.30%)（图 4b）。

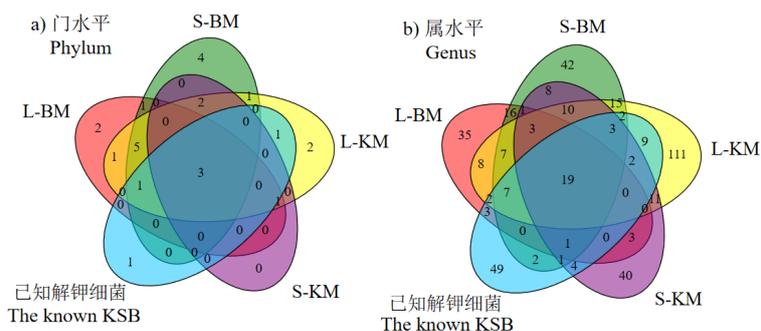
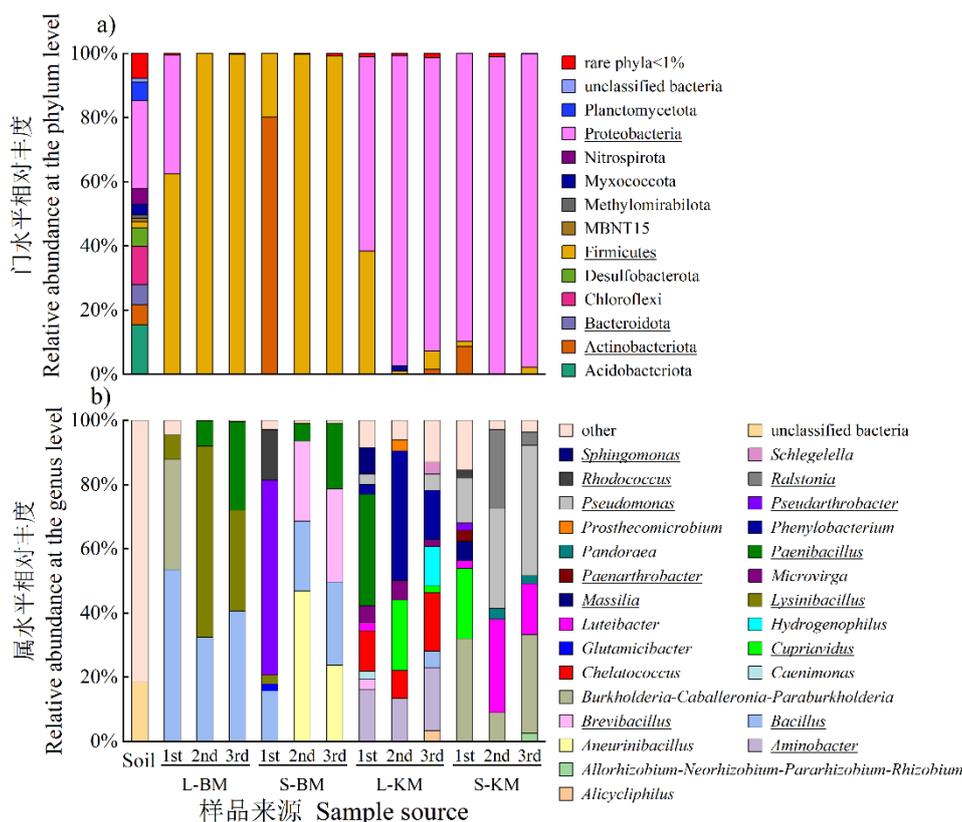


图 4 在门 (a) 与属 (b) 分类水平上, 可培养细菌、解钾细菌、已知解钾细菌数据库之间多样性的比较
Fig. 4 Comparison of the diversity of cultivable bacteria, potassium-solubilizing bacteria, and known potassium-solubilizing bacteria databases at the genus taxonomic level in the phylum (a) and genus (b) classification level

2.4 可培养细菌群落组成比较

在门水平, 土壤本底优势细菌从高到低主要为: Proteobacteria (27.45%) > Acidobacteriota (15.38%) > Chloroflexi (11.9%) > Actinobacteriota (6.40%) > Bacteroidota (6.14%) > Planctomycetota (5.68%) > Nitrospirota (4.98%), 以上七大类群总共占土壤本底总细菌群落的 77.93% (图 5a)。在 BM 连续三次传代培养过程中, 富集物优势菌门是 Actinobacteriota、Firmicutes 和 Proteobacteria, 其中 L-BM 富集的第一代优势菌门为 Firmicutes 和 Proteobacteria, 二者之和达 99.45%, 第二、第三代优势菌门均为 Firmicutes, 所占比例分别为 99.92% 和 99.66%; 培养基 S-BM 第一代富集的优势菌门为 Actinobacteriota 和 Firmicutes, 二者之和达 99.90%, 第二和第三代优势菌门均为 Firmicutes, 所占比例分别为 99.65%、99.20%。在 KM 连续三次传代培养过程中, 富集物中优势解钾细菌门也是 Actinobacteriota、Firmicutes 和 Proteobacteria, 其中 L-KM 富集的第一代优势解钾细菌门为 Firmicutes 和 Proteobacteria, 二者之和达 98.88%, 第二、第三代优势菌门均为 Proteobacteria, 占比分别为 96.70% 和 91.34%; 培养基 S-KM 第一代富集的优势解钾细菌门为 Actinobacteriota 和 Proteobacteria, 二者之和达 98.43%, 第二、第三代优势菌门为 Proteobacteria, 占比分别为 98.84% 和 97.63% (图 5a)。

图 5b 为富集的优势细菌属(相对丰度>2%)。在 BM 富集的细菌中, L-BM 主要优势属为 *Bacillus*、*Burkholderia*、*Lysinibacillus* 和 *Paenibacillus*, 其中在三次传代过程中, 优势属 *Burkholderia* 被 *Lysinibacillus* 和 *Paenibacillus* 取代; S-BM 优势属同样包含 *Bacillus* 和 *Paenibacillus*, 除此外还有 *Aneurinibacillus*、*Brevibacillus*、*Pseudarthrobacter* 和 *Rhodococcus* 等, 三次传代过程中, *Pseudarthrobacter* 和 *Rhodococcus* 相对丰度下降, *Aneurinibacillus* 和 *Paenibacillus* 相对丰度上升。对 KM 富集的解钾细菌而言, L-KM 中优势属较多, 主要为 *Aminobacter*、*Chelatococcus*、*Cupriavidus*、*Hydrogenophilus*、*Microvirga*、*Paenibacillus* 和 *Phenylobacterium* 等; 培养基 S-KM 富集的优势属与 L-KM 差异很大, 仅有 *Cupriavidus* 为共有属, 其他优势属主要是 *Burkholderia*、*Luteibacter*、*Massilia*、*Pseudomonas* 和 *Ralstonia* 等。



注：下划线表示该门或属为已知解钾细菌门或属。Note: Underline indicates that the phylum or genus is a known solution for KSB.

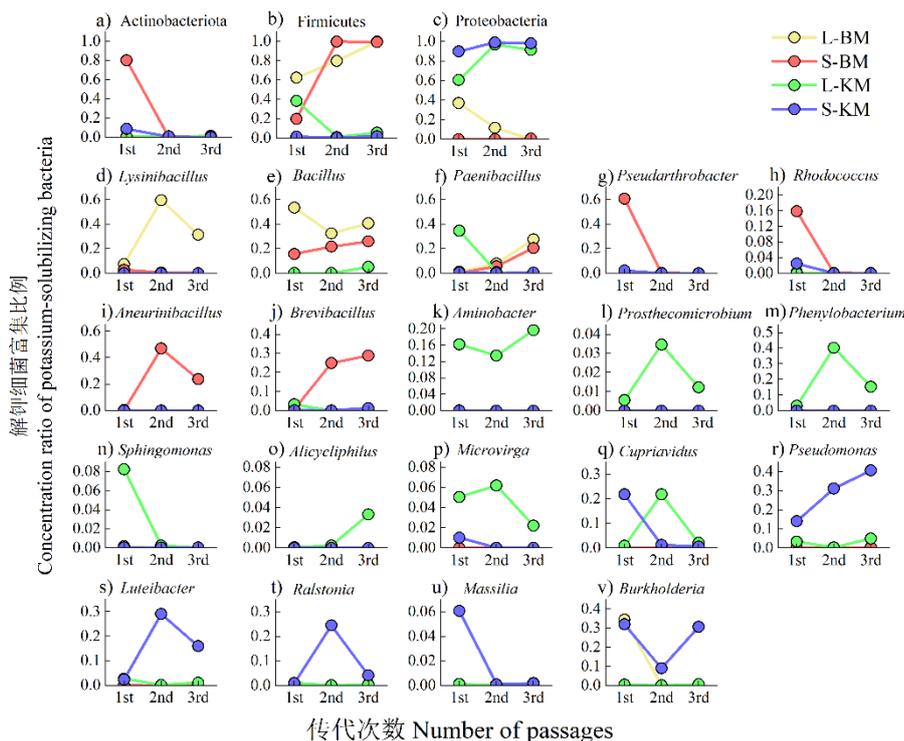
图 5 土壤本底和培养基富集的细菌在门水平 (a) 和属水平 (b) 的相对丰度

Fig. 5 Relative abundance of bacteria enriched in soil background and medium at the phylum (a) and genus level (b)

2.5 不同培养基中的优势菌属与丰度

在门水平下, Actinobacteriota 仅在 S-BM 第一代中大量富集, 在其他培养基中富集较少, 且随传代丰度锐减 (图 6a); Firmicutes 在 L-BM、S-BM、L-KM 中均有一定富集, 并在 L-BM 与 S-BM 中随传代丰度明显增加, 在 L-KM 中却随传代丰度降低, 最后几乎接近于 0 (图 6b); Proteobacteria 富集情况与 Firmicutes 相反, 其在 L-KM 与 S-KM 培养基中大量富集, 且丰度随传代增加, L-BM 也能富集一些 Proteobacteria, 但随传代丰度降低, 而在 S-BM 中并未有 Proteobacteria 富集 (图 6c)。

在属水平下, 不同富集策略各属细菌的相对丰度变化规律变化趋势差异较大。Bacillus、Burkholderia、Lysinibacillus 和 Paenibacillus 在 L-BM 中富集比例明显高于其他培养基, 其中 Bacillus 和 Lysinibacillus 在传代三次情况下, 富集比例依旧较高, 相对丰度达到 40% 以上 (图 6d-f, 图 6v); 在 S-BM 中, 主要富集了 Bacillus、Paenibacillus、Pseudarthrobacter、Rhodococcus、Aneurinibacillus 和 Brevibacillus, 其中 Bacillus、Paenibacillus 和 Brevibacillus 随传代丰度逐渐增加, Pseudarthrobacter 和 Rhodococcus 随传代丰度急剧下降, Aneurinibacillus 随传代丰度表现为先升高后降低 (图 6e-j)。培养基 L-KM 中富集了 Aminobacter、Prosthecomicrobium、Phenylobacterium、Sphingomonas、Alicyclophilus、Microvirga 和 Cupriavidus, 还有 BM 富集的细菌中出现的 Paenibacillus 也有所富集, 其中除了 Aminobacter、Cupriavidus、Paenibacillus 和 Phenylobacterium 在培养基中出现过高丰度外, 其他属很少富集, 相对丰度不到 8% (图 6f, 图 6k-q)。Cupriavidus 和 Burkholderia 在 S-KM 中也有富集, S-KM 还富集了 Pseudomonas、Luteibacter、Ralstonia 和 Massilia, 其中 Cupriavidus 和 Massilia 随着传代丰度下降, Luteibacter 和 Ralstonia 表现为先增加后下降, Burkholderia 表现为先下降后增加, 只有 Pseudomonas 随传代丰度不断增加 (图 6q-v)。



注: a-c 图为在门水平不同细菌相对丰度随传代次数的变化; d-v 图为在属水平不同细菌的相对丰度随传代次数的变化。Note: Fig. a-c shows the relative abundance of different bacteria at the phylum level; Fig. d-v shows the relative abundance of different bacteria with the number of passages at the genus level.

图 6 不同培养基类型和传代次数可培养细菌相对丰度的变化

Fig. 6 Changes in the relative abundance of culturable bacteria for different media types and passages

3 讨论

在连续传代富集中, 确定性过程主导了细菌从土壤悬液至培养基的第一代次细菌群落构建过程, 而以遗传漂变为主的随机性过程则控制了代际间的细菌群落构建。原因在于: 在进行第一代次培养时, 微生物从土壤转移至培养基, 由于用以模拟微生物生长环境的培养基的生长空间、营养物质、理化性质等与土壤原位环境差异较大^[22], 环境选择压力在群落构建中占据主导, 导致培养富集物中微生物多样性显著降低。而随着连续传代的进行, 培养基保持不变, 外部环境条件趋于稳定, 此时, 微生物之间的作用, 例如: 微生物群落区域扩张先后、微生物之间交互喂养和群体感应、微生物的代谢物质等^[9], 这些高随机性过程, 由于目前无法阐明其中具体的机理, 进而将这些随机过程归纳为生态漂变。当外部环境条件趋于稳定时, 生态漂变对群落构建的作用增大, 导致随机性主导的不同代际间富集出了明显差异的解钾细菌类群^[23], 例如, L-KM-1st 的优势属为 *Aminobacter*、*Chelatococcus* 和 *Paenibacillus*, 而 L-KM-2nd 的优势属为 *Aminobacter*、*Cupriavidus* 和 *Phenyllobacterium*。

本研究中, 环境选择压力主要表现为不同培养基类型, 在 BM 富集策略下, 碳源和能源较为充足, 细菌对碳源和能源的竞争和利用易形成绝对优势, 因此, 快生长菌“数强独大”, 慢生长菌被“竞争排除”, 致使群落多样性大大降低; 而 KM 培养基提供的是一个“寡营养”环境, 其中细菌的生长不仅受到钾源利用的限制, 同时可利用的碳源和能源也极度缺乏, 细菌更倾向于通过“抱团合作”来缓解资源限制、维持生命过程, 致使 KM 富集的解钾细菌多样性和均匀度高于 BM, 进一步验证了最新提出的“饥饿游戏 (hunger games)”假说^[24]。此外, 与液体培养中微生物悬浮生长相

比, 固体平板培养为微生物生物膜的形成提供了界面附着环境, 因不同培养基类型而形成独特微生物空间组织模式, 通过微生物代谢产物和养分不均匀分布共同塑造培养基的异质性分布特征, 影响微生物相互作用, 从而驱动了不同微生物群落的构建^[9]。然而, 由于微生物群落的复杂性以及研究方法的局限性, 微生物空间组织模式的形成和协同机制研究目前仍然处于起步阶段。

连续三次传代过程中, KM 富集的解钾细菌, 主要来自 Actinobacteriota、Firmicutes 和 Proteobacteria 三门, 这与 Divjot 等^[15]的研究相同, 说明本实验有效富集了土壤优势细菌与解钾细菌, 为解钾细菌多样性评估提供了可靠的数据支持。但不同富集策略下可培养的细菌菌属组成差异明显, 连续传代富集未导致群落结构同质化和单一化。解钾细菌的解钾作用是通过释放有机酸或无机酸, 一方面降低土壤的 pH, 释放可交换性钾, 提高土壤速效钾含量^[5,25]; 另一方面, 有机酸具有羟基和羧基官能团, 可以与矿物中的金属离子产生络合反应, 破坏矿物结构, 促进钾释放^[26]。不同类群解钾细菌分泌物成分与活性差异自然较大, 行使解钾功能所需外部条件也大不相同, 受培养基中氧气含量、营养物质等影响^[7], 不同培养基中富集出的解钾细菌也有明显差异, 例如, 在属水平下, L-KM 中有较高丰度的 *Aminobacter*、*Chelatococcus* 和 *Phenylobacterium*, 而 S-KM 中 *Burkholderia*、*Luteibacter*、*Pseudomonas* 和 *Ralstonia* 丰度较高, 这些因素也可用于解释 BM 中细菌群落的差异。并且有研究发现微生物面临不利环境条件时会进入休眠状态, 休眠后的复苏受诸多因素调控, 这些因素的相互作用导致微生物复苏的时机和程度难以预测, 休眠后的复苏也就成了一个随机过程, 因而传代过程中发生了优势微生物群的更替、新微生物群的出现^[27], 如 L-KM-1st 中优势属 *Paenibacillus* 在 L-KM-2nd 中极少富集, L-KM-2nd 中出现了新的属 *Cupriavidus*。

在 KM 连续三次传代培养过程中, 富集更多的优势解钾细菌属。在 L-KM 中, *Aminobacter*、*Paenibacillus* 和 *Phenylobacterium* 相对丰度较高, 其中, *Aminobacter* 是已报道的一类解钾细菌^[28], Artuso 等^[29]研究表明, *Aminobacter* 菌株均具有广泛的同化和分解代谢能力, 而在 KM 中 *Aminobacter* 大量富集, 恰好也印证了这一点。赵诗佳等^[30]研究发现, *Paenibacillus* 同时具有解磷、解钾能力, 但解钾能力处于中等水平, 因而 *Paenibacillus* 在培养基中第一代丰度较高, 但在第二代、第三代的相对丰度却不到 1%, 可能由于 *Paenibacillus* 在传代过程与其他微细菌的竞争中并不占优。*Phenylobacterium* 也是 KM 培养基中丰度较高的细菌属, 但在过去报道中 *Phenylobacterium* 多被定义为固氮菌^[31], 而本实验 *Phenylobacterium* 在 KM 中大量富集, 表明其具有潜在解钾功能, 作为一类尚未被证实的解钾细菌仍有待进一步纯化研究。培养基 S-KM 富集的优势解钾细菌属也较多, 如: *Burkholderia*、*Luteibacter*、*Ralstonia* 和 *Pseudomonas*, 除了 *Luteibacter* 外, 其他三个属均已被证实具有解钾能力^[12,32-33], 其中 *Pseudomonas* 专性好氧, 所以在 S-KM 中大量富集, 在 L-KM 富集较少^[7]。然而 *Luteibacter* 的报道很少, Feng 等^[34]研究发现 *Luteibacter* 能够有效降解乙草胺, Guglielmetti 等^[35]将其归为一类植物根系促生细菌, 而 *Luteibacter* 在 KM 中大量富集则说明它也可能是一种未知解钾细菌。*Cupriavidus* 具有解钾和固氮能力^[13,36], 其在 L-KM 与 S-KM 中为唯一富集的共有解钾细菌属, 表明 *Cupriavidus* 能同时适应液体和固体富集策略。笔者研究发现仅有 *Paenibacillus* 这一属在 BM 和 KM 培养基中均大量富集, 印证了 *Paenibacillus* 具有较强生存能力, 能够在不同培养条件下依然保持显著生长优势^[7-8,11], 可能更适合作为解钾细菌肥的候选菌种。

尽管本研究将所有在解钾培养基 (KM) 中富集的细菌定义为可培养“潜在”解钾细菌, 但混菌培养时细菌间的相互作用不可避免, 可培养“解钾细菌”的生长策略可能存在差异。在 KM 富集的细菌中, 有的解钾细菌能独立生长并分解钾长石获取钾源, 例如, 胥婷等^[37]筛选出的 *Pseudomonas* 能分解培养基中的钾长石; 有的解钾细菌可能不能单独解钾, 但能通过其他方式获得钾源, 如 Ge 等^[38]报道的一对交叉互养的土壤细菌, 它们单独生长极差, 但通过互利共生, 提高了双方竞争力, 在培养基中也许存在相互协作的两种或多种微生物, 通过特殊的共生关系, 让它们能够利用钾长石获取钾源; 当然微生物不一定需要分解钾长石才能存活, 有研究发现某些微生物能作为作弊者享受其他合作者的成果^[39], 不直接分解钾长石, 但窃取利用其他微生物分解产生的钾而繁殖。对比已报道

的 104 个解钾细菌属^[12-15], KM 富集到的 267 个属中仅有 50 个已知属, 217 个属于未知解钾细菌属, 这些未知解钾细菌是否具有直接解钾活性及其生长策略, 需要进一步分离验证。

4 结论

不同富集策略影响土壤可培养解钾细菌的群落特征。培养基类型是可培养细菌群落产生差异的主要原因, 但代际间的细菌群落结构也未趋于同质化和单一化。培养基 KM 富集的解钾细菌主要优势门为 Firmicutes 和 Proteobacteria。与已知解钾细菌数据库比对, KM 中富集到 267 个潜在解钾细菌属中仅有 50 个已知属, 表明至少 80.28% 的未知解钾细菌有待被分离纯化并验证, 例如, KM 成功富集了优势菌属 *Phenylobacterium* 和 *Luteibacter*, 但二者尚未被报道具有解钾功能, 有望成为后续解钾细菌筛选的新菌属。此外, *Paenibacillus* 在多种培养策略下均展现出良好生长优势, 表明其具有较强的适应性和生存能力, 因此该属可能作为解钾细菌肥的候选菌属, 具有潜在的应用价值。

参考文献 (References)

- [1] Chen L, Li K K, Mi G H, et al. Screening and identification of potassium-solubilizing bacteria and their promoting effects on maize in black soil of Northeast China[J]. Microbiology China, 2021, 48(5): 1560-1570. [陈腊, 李可可, 米国华, 等. 解钾促生菌的筛选鉴定及对东北黑土区玉米的促生效应[J]. 微生物学通报, 2021, 48(5): 1560-1570.]
- [2] Li C J, Li T, Li L L, et al. Effects of potassium-solubilizing bacteria loaded biochar on soil enzyme activity and microbial community structure[J]. Acta Pedologica Sinica, 2023, 60(5): 1531-1542. [李昌骏, 李婷, 李露露, 等. 生物质炭负载解钾菌对土壤酶活性与微生物群落结构的影响[J]. 土壤学报, 2023, 60(5): 1531-1542.]
- [3] Li D P, Wu Z J. Impact of chemical fertilizers application on soil ecological environment[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2008, 19(5): 1158-1165. [李东坡, 武志杰. 化学肥料的土壤生态环境效应[J]. 应用生态学报, 2008, 19(5): 1158-1165.]
- [4] Zhou Y F, Bai Y S, Yue T, et al. Research progress on the growth-promoting characteristics of plant growth-promoting rhizobacteria[J]. Microbiology China, 2023, 50(2): 644-666. [周益帆, 白寅霜, 岳童, 等. 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.]
- [5] Han M, Zhu X Y, Chen G W, et al. Advances on potassium-solubilizing bacteria and their microscopic potassium solubilizing mechanisms[J]. Acta Pedologica Sinica, 2022, 59(2): 334-348. [韩苗, 朱晓艳, 陈国炜, 等. 解钾菌及其释钾微观机制的研究进展[J]. 土壤学报, 2022, 59(2): 334-348.]
- [6] Wang Y J, Yan X Y, Su M, et al. Isolation of potassium solubilizing bacteria in soil and preparation of liquid bacteria fertilizer from food wastewater[J]. Biochemical Engineering Journal, 2022, 181: 108378.
- [7] Wen C L, Cao W W, Tang X L, et al. High-throughput sequencing technology based research on the changes of culturable bacteria communities in soil during serial enrichment[J]. Journal of Ecology and Rural Environment, 2023, 39(1): 123-135. [文昌丽, 曹伟伟, 唐雪莲, 等. 基于高通量测序的连续传代富集土壤可培养菌菌群变化规律研究[J]. 生态与农村环境学报, 2023, 39(1): 123-135.]
- [8] Xia W W, Zhang Z L, Zou M M, et al. Culture media and generations influence diversity assessment of soil culturable phosphate-solubilizing bacteria[J]. Acta Pedologica Sinica, 2024, 61(6): 1680-1693. [夏围围, 张泽霖, 邹萌萌, 等. 培养基和代次影响土壤可培养解磷菌多样性评估[J]. 土壤学报, 2024, 61(6): 1680-1693.]
- [9] Han M, Ruan C J, Han Z, et al. Spatial organization patterns: Rules of “game” for microbial community assembly[J]. Microbiology China, 2022, 49(10): 4391-4411. [韩苗, 阮楚晋, 韩峥, 等. 空间组织模式: 微生物群落组装的“游戏”规则[J]. 微生物学通报, 2022, 49(10): 4391-4411.]
- [10] Qiu D Y, Zhang B, Yang Y F, et al. History, current status and the prospects of taxol biosynthesis research[J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(4): 56-64. [邱德有, 张彬, 杨艳芳, 等. 紫杉醇生物合成研究历史、现状及展望[J]. 生物技术通报, 2015, 31(4): 56-64.]
- [11] Yang L J, Jia Z J. History and definition of the “99% unculturability paradigm”: Case analysis with nitrogen-fixing bacteria[J]. Acta

- Microbiologica Sinica, 2021, 61(4): 903-922. [杨丽洁, 贾仲君. “99%难培养”微生物的概念与初步评价: 以固氮菌为例[J]. 微生物学报, 2021, 61(4): 903-922.]
- [12] Sun F, Ou Q J, Wang N, et al. Isolation and identification of potassium-solubilizing bacteria from *Mikania micrantha* rhizospheric soil and their effect on *M. micrantha* plants[J]. Global Ecology and Conservation, 2020, 23: e01141.
- [13] Yan Y N, Ye X Q, Wu M, et al. Diversity and potassium-solubilizing activity of rhizosphere potassium-solubilizing bacteria of invasive *Solidago canadensis*[J]. Chinese Journal of Plant Ecology, 2019, 43(6): 543-556. [闫雅楠, 叶小齐, 吴明, 等. 入侵植物加拿大一枝黄花根际解钾菌多样性及解钾活性[J]. 植物生态学报, 2019, 43(6): 543-556.]
- [14] Zhang L H, Liu Y J, Zhang H, et al. Potassium conversion and cycling in rhizosphere microecosystems[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2023, 55(3): 166-172. [张丽红, 刘英杰, 张宏, 等. 根际微生态系统中钾素转化与循环研究进展[J]. 山东农业科学, 2023, 55(3): 166-172.]
- [15] Divjot K, Kusam L R, Tanvir K, et al. New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering[M]. Amsterdam: Elsevier, 2020: 177-202.
- [16] Cao Y, Chai Y F, Jiao S, et al. Bacterial and fungal community assembly in relation to soil nutrients and plant growth across different ecoregions of shrubland in Shaanxi, Northwestern China[J]. Applied Soil Ecology, 2022, 173: 104385.
- [17] Zhao P Y, Liu J X, Jia T, et al. Environmental filtering drives bacterial community structure and function in a subalpine area of northern China[J]. Journal of Basic Microbiology, 2019, 59(3): 337-347.
- [18] Wang P D, Li S P, Yang X, et al. Mechanisms of soil bacterial and fungal community assembly differ among and within islands[J]. Environmental Microbiology, 2020, 22(4): 1559-1571.
- [19] Wang Y, Chen Y Q, Wen S H, et al. Isolation, screening and identification of a strain of bacteria with ability of phosphate-solubilizing and potassium-solubilizing[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2019, 47(10): 5-9. [王勇, 陈燕琼, 温书恒, 等. 一株溶磷解钾菌的分离筛选与鉴定[J]. 安徽农业科学, 2019, 47(10): 5-9.]
- [20] Wang Y H, Li H G, Zhu A M, et al. Effects of stocking rate and nitrogen addition on plant diversity of *Stipa breviflora* desert steppe[J]. Chinese Journal of Grassland, 2023, 45(7): 144-150. [王悦骅, 李海港, 朱爱民, 等. 载畜率和氮素添加对短花针茅荒漠草原植物多样性的影响[J]. 中国草地学报, 2023, 45(7): 144-150.]
- [21] Zhou J Z, Ning D L. Stochastic community assembly: Does it matter in microbial ecology?[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2017, 81(4): e00002-17.
- [22] Li K K, Cao W W, Wen C L, et al. Assessment of differences between high-throughput sequencing and plate-dilution method for microbial ecology study of soils under distinct land use scenarios[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(11): 4447-4464. [李凯凯, 曹伟伟, 文昌丽, 等. 基于高通量测序的稀释平板计数细菌群落变化研究[J]. 微生物学报, 2022, 62(11): 4447-4464.]
- [23] Gao C, Guo L D. Progress on microbial species diversity, community assembly and functional traits[J]. Biodiversity Science, 2022, 30(10): 168-180. [高程, 郭良栋. 微生物物种多样性、群落构建与功能性状研究进展[J]. 生物多样性, 2022, 30(10): 168-180.]
- [24] Dai T J, Wen D H, Bates C T, et al. Nutrient supply controls the linkage between species abundance and ecological interactions in marine bacterial communities[J]. Nature Communications, 2022, 13: 175.
- [25] Sheng X F, He L Y. Solubilization of potassium-bearing minerals by a wild-type strain of *Bacillus edaphicus* and its mutants and increased potassium uptake by wheat[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2006, 52(1): 66-72.
- [26] Wang J, Li X K, Lu J W, et al. Effects of different low-molecular weight organic acids and cations on release of potassium from potassium-bearing minerals[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2013, 32(3): 67-71. [王瑾, 李小坤, 鲁剑巍, 等. 小分子有机酸和阳离子对含钾矿物钾素释放的影响[J]. 华中农业大学学报, 2013, 32(3): 67-71.]
- [27] Li B B, Wu D N, Nie G X, et al. Isolation and culture techniques of uncultured microorganisms: Challenges and opportunities[J]. Microbiology China, 2023, 50(2): 832-844. [李斌斌, 吴丹妮, 聂国兴, 等. 未/难培养微生物可培养策略研究: 机遇与挑战[J]. 微生物学通报, 2023, 50(2): 832-844.]
- [28] Sattar A, Naveed M, Ali M, et al. Perspectives of potassium solubilizing microbes in sustainable food production system: A review[J]. Applied Soil Ecology, 2019, 133: 146-159.

- [29] Artuso I, Turrini P, Pirolo M, et al. Phylogenomic reconstruction and metabolic potential of the genus *Aminobacter*[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(6): 1332.
- [30] Zhao S J, Guo X N, Wang Y P, et al. Isolation and identification of microorganisms in *Nitraria tangutorum* bobr. rhizosphere in Lanzhou[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(7): 2582-2593. [赵诗佳, 郭晓农, 王银平, 等. 兰州唐古特白刺根际微生物分离鉴定[J]. *微生物学报*, 2022, 62(7): 2582-2593.]
- [31] Qian Y L, Liang Z T, Cao Q, et al. Effects of grass-planting on soil bacterial community composition of apple orchard in Longdong arid region[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2018, 37(10): 3010-3017. [钱雅丽, 梁志婷, 曹铨, 等. 陇东旱作果园生草对土壤细菌群落组成的影响[J]. *生态学杂志*, 2018, 37(10): 3010-3017.]
- [32] Sarikhani M R, Oustan S, Ebrahimi M, et al. Isolation and identification of potassium-releasing bacteria in soil and assessment of their ability to release potassium for plants[J]. *European Journal of Soil Science*, 2018, 69(6): 1078-1086.
- [33] Khuong N Q, Sakpirom J, Oanh T O, et al. Isolation and characterization of novel potassium-solubilizing purple nonsulfur bacteria from acidic paddy soils using culture-dependent and culture-independent techniques[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2023, 54(3): 2333-2348.
- [34] Feng J Y, Sun J T, Xu J L, et al. Degradation of acetochlor in soil by adding organic fertilizers with different conditioners[J]. *Soil and Tillage Research*, 2023, 228: 105651.
- [35] Guglielmetti S, Basilico R, Taverniti V, et al. *Luteibacter rhizovicinus* MIMR1 promotes root development in barley (*Hordeum vulgare* L.) under laboratory conditions[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2013, 29(11): 2025-2032.
- [36] Liu L, Zhan Q C, Peng W Z. Advances in biogeography of rhizobia[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(2): 202-208. [刘璐, 詹庆才, 彭伟正. 根瘤菌生物地理学的研究进展[J]. *微生物学报*, 2018, 58(2): 202-208.]
- [37] Xu T, Yang L Q, Song Y, et al. Endophytic bacterial community structure and function of *Stipa* roots from different types of steppes in northern China[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2015, 34(11): 3101-3110. [胥婷, 杨丽强, 宋宇, 等. 不同草原类型针茅根部可培养内生细菌群落结构及其功能[J]. *生态学杂志*, 2015, 34(11): 3101-3110.]
- [38] Ge Z B, Zhai Z Q, Xie W Y, et al. Two-tiered mutualism improves survival and competitiveness of cross-feeding soil bacteria[J]. *The ISME Journal*, 2023, 17(11): 2090-2102.
- [39] Luo N, Lu J, Şimşek E, et al. The collapse of cooperation during range expansion of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Nature Microbiology*, 2024, 9(5): 1220-1230.

(责任编辑: 卢萍)