

一株高效解无机磷细菌 BS06 的鉴定及其解磷能力分析

史国英^{1,2} 莫燕梅^{3,4} 岑贞陆¹ 曾泉¹ 余功明³ 杨丽涛^{1,3} 胡春锦^{1,2*}

(1. 广西农业科学院微生物研究所 广西 南宁 530007)

(2. 广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室 广西 南宁 530007)

(3. 广西大学 广西 南宁 530004)

(4. 贺州学院 广西 贺州 542800)

摘要:【目的】对一株来源于广西甘蔗根际土壤的高效解无机磷细菌 BS06 的分类和解磷能力进行探讨, 以期了解磷微生物在广西甘蔗生产上的开发和应用提供理论依据。【方法】通过形态观察、生理生化测定及 16S rRNA 基因序列同源性分析, 进一步结合种特异的 *recA* 基因序列分析对解磷菌 BS06 进行分类鉴定; 通过改变无机磷培养基中的碳源、氮源对菌株解磷能力的影响, 分析菌株的解磷特性; 通过盆栽试验了解菌株对甘蔗品种粤糖 00236、桂糖 28 磷素吸收的影响。【结果】分类鉴定结果表明菌株 BS06 属于洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*); 菌株在以乳糖为碳源条件下具有较强的解磷能力, 其发酵液中水溶性磷含量为 262.71 mg/L; 在以硝酸钠为氮源条件下有较强解磷能力, 其发酵液中水溶性磷含量达到 305.85 mg/L; 接种 BS06 菌株显著促进甘蔗组培苗的生长并提高甘蔗植株的含磷量。【结论】解磷细菌 BS06 具有较大的开发利用潜力。

关键词: 甘蔗, 解磷细菌, 鉴定, 解磷能力

Identification of an inorganic phosphorus-dissolving bacterial strain BS06 and analysis on its phosphate solubilization ability

SHI Guo-Ying^{1,2} MO Yan-Mei^{3,4} CEN Zhen-Lu¹ ZENG Quan¹ YU Gong-Ming³
YANG Li-Tao^{1,3} HU Chun-Jin^{1,2*}

(1. Institute of Microbiology, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, Guangxi 530007, China)

(2. Guangxi Crop Genetic Improvement and Biotechnology Laboratory, Nanning, Guangxi 530007, China)

(3. Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004, China)

(4. Hezhou University, Hezhou, Guangxi 542800, China)

Abstract: [Objective] The purpose of the present study was to investigate the phosphate-solubilizing ability of a bacterial strain BS06, for developing and applying effectively phosphate-solubilizing microbes in sugarcane production in Guangxi. [Methods] 16S rRNA gene sequence homology comparison, *recA*

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31101122); 广西自然科学基金项目(No. 2011GXNSFA018076); 广西农科院基金项目(No. 2013YT04, 2013JQ09, 2012GW06); “广西特聘专家”专项项目

*通讯作者: Tel: 86-771-3242208; ✉: chunjin-hu@126.com

收稿日期: 2014-09-23; 接受日期: 2014-12-02; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-12-11

gene analysis as well as morphological, physiological and biochemical analyses were carried out to identify the bacterial strain BS06. The phosphate-solubilizing ability of BS06 was investigated under the conditions of changing the carbon and nitrogen source, separately in inorganic phosphate medium. [Results] The strain BS06 was identified as *Burkholderia cepacia*. The strain had high and efficient phosphate-solubilizing ability under the condition of carbon source with lactose and nitrogen source with sodium nitrate separately, and the concentration of water soluble phosphorus in fermentation solution was 262.71 mg/L and 305.85 mg/L, respectively. Compared with the uninoculated controls, BS06 significantly increased dry weights and phosphorus contents of micropropagated sugarcane seedlings. [Conclusion] The bacterial strain BS06 had high potential of exploitation.

Keywords: Sugarcane, Phosphate-solubilizing bacteria, Identification, Phosphate-solubilizing ability

磷素供给不足已成为农业增产的重要限制因素。我国有 74%耕地土壤缺磷,主要是由于土壤磷固定造成的,大部分磷肥施入土壤后很快被固定为植物难以利用的形态,广西甘蔗主产区红黄壤土对磷肥的固定尤为强烈。提高土壤中磷的利用率是解决磷素缺乏的关键。

解磷菌是一类能将植物难以吸收利用的磷转化为植物可吸收利用磷的微生物。利用微生物的解磷作用弥补土壤磷素营养不足是当前国内外的研究热点。土壤微生物与土壤磷之间关系的研究始于 20 世纪初,50 年代开始对细菌解磷进行了更为深入的研究,我国对解磷细菌的研究也在此时开展,先后有人从东北黑土和灰化土中分离出解磷能力很强的芽孢杆菌,中国科学院沈阳应用生态研究所也从东北黑土中分离出一种极毛杆菌^[1]。目前报道的解磷细菌主要集中在芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、埃希氏菌属(*Escherichia*)、欧文氏菌(*Erwinia*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、肠细菌属(*Enterbacter*)、伯克霍尔德菌属(*Burkholderia*)等^[2-6]。大量研究表明,解磷微生物在土壤磷循环相关的生物学系统担任着重要的角色,它可以将难溶磷转化为植物可以吸收利用的可溶性磷,提高磷肥利用率,尤其是在植物根际部分解磷微生物还起到一定程度的促生作用^[7-10]。

作者在前期研究中从甘蔗的根际土壤中分离筛选获得了一株高效无机磷降解细菌 BS06,该菌株在 Pikovaskaia's 培养基平板上的溶磷圈直径(D)与菌落直径(d)比值(D/d)大于 2.8,显示出较强的解

磷能力。本文拟进一步探讨解磷细菌 BS06 的实际解磷能力和解磷特性,同时通过菌株的形态特征、生理生化、16S rRNA 基因序列以及种特异的 *recA* 基因序列分析,确定该菌株的分类地位,以期了解磷微生物的开发和应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

供试细菌菌株编号为 BS06,保存于广西农科院微生物研究所。该菌株分离于广西甘蔗主产区的甘蔗根际土壤,通过筛选和功能评价已证实具有较好降解无机磷特性。

1.2 培养基

无机磷培养基(g/L):葡萄糖 10.00, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.50, NaCl 0.30, KCl 0.30, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.30, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.03, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5.00, 酵母粉 0.50, 琼脂粉 10.00, 加蒸馏水至 1 L, pH 7.0。

不同碳源的无机磷液体培养基:分别以乳糖、甘露醇、蔗糖替换无机磷液体培养基中的葡萄糖,其它成分不变。

不同氮源的无机磷液体培养基:分别以酵母粉、硝酸铵、硝酸钠、硫酸铵替换无机磷液体培养基中的氮源 $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{酵母粉}]$,其它成分不变。

LB 液体培养基(g/L):蛋白胨 10, 酵母粉 5, 氯化钠 5, 加蒸馏水至 1 L, pH 7.0。

NA 培养基(g/L):牛肉浸膏 3, 酵母粉 1, 蛋白胨 5, 蔗糖 10, 琼脂粉 10, 加蒸馏水至 1 L, pH 7.0。

1.3 菌株 BS06 解磷能力的测定

1.3.1 种子液的制备:将实验室保藏的菌株 BS06

移接至新鲜牛肉膏蛋白胨无菌斜面,置 28 °C 活化培养 16 h;接种于 LB 液体培养基中 28 °C、120 r/min 培养 24 h,调整菌体浓度至 OD_{600} 值为 1.0 左右,制得种子液。

1.3.2 液体培养: 准备含不同 C 源、N 源的无机磷培养基,将 25 mL 培养基装入 75 mL 的三角瓶中,将种子液按 1% 的量接入无机磷液体培养基中,于 28 °C、120 r/min 培养 5 d,每处理设 3 个重复,对照不接菌。

1.3.3 菌株解磷能力测定: 采用磷钼蓝比色法测定发酵液中的磷含量,具体方法参照文献[11]。

1.4 菌株对甘蔗组培苗磷素吸收的影响

供试甘蔗品种:粤糖 00236,桂糖 28。

盆栽土壤:菜地表层土与未耕作红壤土以 1:1 比例混合,盆钵为蓝色塑料桶(桶高 29 cm,上沿直径 33 cm,底面直径 27 cm),底部穿孔,每桶装 10 kg 晒干后充分混匀的土壤。

盆栽土壤的基本养分状况:全氮 0.179%,全磷 0.236%,全钾 1.115%,速效磷 107.88 g/mg,有机质 35.83 g/kg, pH 6.44。

将供试菌株活化后在 LB 液体培养基上培养过夜,离心(6 000 r/min, 15 min)收集菌体,用无菌水悬浮离心清洗 2 次后稀释到每毫升 $(1-2) \times 10^8$ 个细胞。将炼苗后生长一致的甘蔗组培苗移栽到装有栽培基质土的塑料桶中,每桶 3 株甘蔗苗,每桶浇入上述供试菌株 BS06 的菌悬液 300 mL。15 d 后再以 300 mL 同样浓度的菌悬液灌根接种,空白对照接种等量无菌水。每个处理设 3 个重复。对甘蔗整个管理过程中没有施肥,只浇水。甘蔗移栽 120 d 后收获,分地上部分(茎叶)和地下部分(根系)收取,根系用水冲洗干净,105 °C 杀青 30 min,70 °C 烘干至恒重,另外采用 $H_2SO_4-H_2O_2$ 消煮,钒钼黄比色法,测定植株根、茎、叶的全磷含量,具体方法参考《土壤农业化学分析方法》^[12]。

1.5 菌株 BS06 的分类鉴定

1.5.1 形态学鉴定: 将菌株在 LB 平板上培养 48 h,观察菌落生长特征,并作记录;参照文献[13]进行

革兰氏染色;利用电子显微镜观察菌体形态、大小和鞭毛,拍照记录。

1.5.2 生理生化鉴定: 生理生化实验按照常见细菌系统鉴定手册方法进行^[14]。

1.5.3 菌株的 16S rRNA 基因序列分析: 菌株活化培养后,利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA。16S rRNA 基因扩增引物为 27F (5'-AGA GTTTGATCATGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGG TTACCTTGTTACGACTT-3')。50 μ L PCR 反应体系为:DNA 模板 2.5 μ L,引物(10 μ mol/L)各 1.5 μ L, dNTP mixture (2.5 μ mol/L) 25.0 μ L, ddH₂O 19.5 μ L。反应条件:94 °C 3 min;94 °C 1 min, 52 °C 1 min,72 °C 1.0 min,32 个循环;72 °C 10 min。PCR 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。扩增产物经纯化后,送上海生工生物工程技术有限公司进行 PCR 产物的直接测序,测序结果用 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 网页上的 BLAST 程序进行同源性比较,并用软件 MEGA 4.0^[15] 构建系统发育树。

1.5.4 基于 *recA* 基因的 PCR 扩增和序列分析: *recA* 基因扩增引物为 BCR1 (5'-TGACCGCCGAGA AGAGCAA-3')和 BCR2 (5'-CTCTTCTTCGTCCATC GCCTC-3')。PCR 反应体系同 1.5.3,扩增反应条件:94 °C 3 min;94 °C 55 s,58 °C 50 s,72 °C 1.2 min,35 个循环;72 °C 10 min。PCR 产物的检测、序列测定与分析同 1.5.3。

1.6 统计分析

用 Excel 2003 和 DPS 9.50 数据统计分析软件进行分析,采用 Duncan's 新复极差法进行比较。

2 结果与分析

2.1 BS06 菌株的解磷能力

研究表明,BS06 在常用无机磷液体培养基上培养 5 d,发酵液中水溶性磷含量最高可达到 305.85 mg/L,显示出较强的无机磷降解能力。

为明确碳、氮源对 BS06 菌株解磷能力的影响,分别测定了 4 种不同碳源和 4 种不同氮源条件下菌株的解磷效果,结果表明:BS06 可利用所有供试

碳、氮源,但对不同碳、氮源条件下菌株的解磷能力存在显著差异(图 1)。不同碳源条件下 BS06 的解磷强度从高到低依次为乳糖、葡萄糖、蔗糖、甘露醇;在 4 种不同氮源条件下,菌株在以硝酸钠为氮源的条件下降磷能力最强,接种后培养 5 d,发酵液的可溶性磷含量达到 305.85 mg/L。

2.2 BS06 菌株对甘蔗磷素吸收的影响

接种 BS06 能显著促进甘蔗品种粤糖 00236 和桂糖 28 的生长,各处理的株高、干重均高于对照;此外,接菌处理的甘蔗植株的叶、茎、根的全磷含量以及植株的总磷累积量与对照相比均达差异显著水平(表 1)。BS06 对两个不同甘蔗品种的促生长作用存在一定差异,其中对粤糖 00236 的促进作用更为明显,其处理植株的茎含磷量比对照提高 96.25%。该研究结果表明 BS06 菌株对甘蔗具有较

好的促生长作用。

2.3 菌株 BS06 的形态学鉴定

菌株 BS06 革兰氏染色为阴性,菌体呈杆状,长 1.47–2.45 μm ,宽 0.89–1.06 μm ,链状排列,鞭毛单极生或周生,有菌毛。在 NA 平板上 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d,菌落淡黄色,直径 2.5 mm 左右,圆形,表面光滑,平凸,边缘整齐,无粘性,没有可溶性色素产生,有臭味(图 2)。

2.4 生理生化特征

菌株 BS06 的生理生化特征见表 2,参考《常见细菌系统鉴定手册》,菌株与伯克霍尔德氏菌 *Burkholderia cepacia* 非常相似。

2.5 16S rRNA 基因序列分析及其系统发育树的构建

以 27F 和 1492R 为引物,对菌株 BS06 的基因

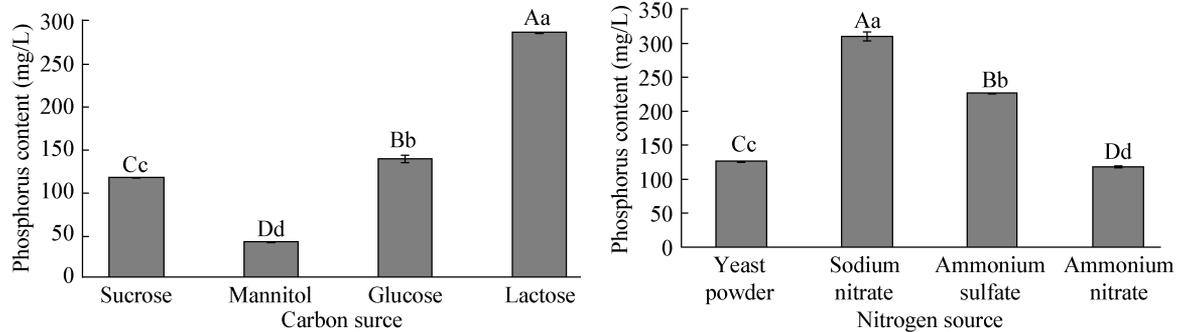


图 1 不同碳、氮源对菌株 BS06 溶磷能力的影响

Figure 1 Effect of different carbon and nitrogen sources on phosphate solubilization of BS06

注:不同字母表示处理间差异在 0.05, 0.01 水平上差异显著,下同。

Note: Different letters mean significant difference at 0.05 and 0.01 level. The same below.

表 1 BS06 接种对甘蔗生长和植株磷素含量的影响

Table 1 Inoculation effects of BS06 on micropropagated sugarcane seedlings

处理 Treatment	叶全磷含量 Total P content in leaf (g/kg)	茎全磷含量 Total P content in stalk (g/kg)	根全磷含量 Total P content in root (g/kg)	株高 Seedling height (cm)	干重 Dry weight (g)	全株总磷累积量 Total P content in whole plant (g)
粤糖 00236 Yuetang 00236	1.025 7 Aa	2.706 1 Aa	0.684 4 Aa	116.00±4.79 Aa	27.20±0.69 Aa	0.032 49 Aa
粤糖 00236CK Yuetang 00236	0.841 7 Bb	1.378 9 Bb	0.614 8 Bb	101.54±1.94 Bb	22.83±1.62 Ab	0.020 00 Bb
桂糖 28 Guitang 28	0.885 7 Aa	1.865 2 Aa	0.573 8 Aa	111.85±7.28 Aa	25.24±0.99 Aa	0.024 10 Aa
桂糖 28CK Guitang 28 CK	0.723 8 Bb	1.730 4 Bb	0.551 4 Ab	96.24±2.18 Ab	20.41±1.05 Bb	0.016 20 Bb

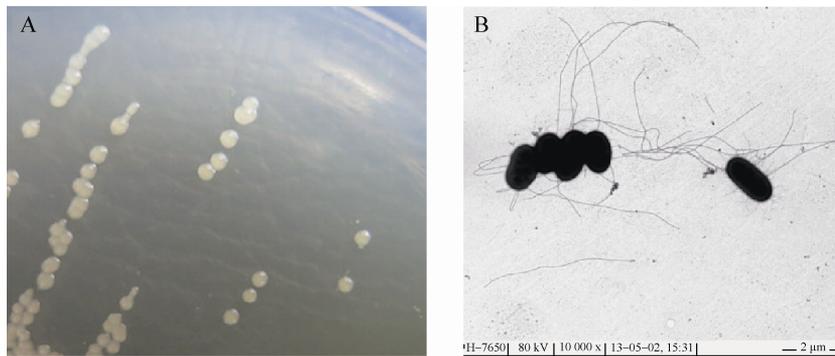


图 2 菌株 BS06 的形态特征

Figure 2 Morphological characteristics of BS06

注: A: 单菌落; B: 菌体. 尺标=2 μm.

Note: A: Single colonies; B: A bacterial cell. Scale bar=2 μm.

表 2 生理生化试验结果

Table 2 Physiological and biochemical characteristics

Test item	BS06	<i>B. cepacia</i>	Test item	BS06	<i>B. cepacia</i>
反硝化 Denitrification	-	-	V-P test	-	-
氧化酶 Oxidase	-	V	硫化氢 H ₂ S production	-	-
过氧化氢酶 Catalase	+	+	麦芽糖 Maltose	-	-
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	-	-	鼠李糖 Rhamnose	-	V
明胶水解 Gelatin hydrolysis	-	V	D-酒石酸盐 D-tartaric acid	+	+
淀粉水解 Starch hydrolysis	-	-	柠檬酸盐 Citrate	+	+

注: +: 阳性或能够利用; -: 阴性或不能利用; V: 阳性或阴性, 不同菌株存在差异.

Note: +: Positive (growth or reaction); -: Negative (no growth or no reaction); V: Positive or negative, varied with different strains.

组进行 PCR 扩增, 得到约 1 400 bp 的 16S rRNA 基因片段。采用 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 网页上的 BLAST 程序进行比较分析, 发现菌株与多株伯克霍尔德氏菌株(登录号分别为: NR074686、JX174229 等)的相似性为 99%。菌株 BS06 的 16S rRNA 基因的序列已在 GenBank 登录, 登录号为 KM081704。利用软件 MEGA 4.0 以部分 *Burkholderia* sp. 属菌株为基础构建 16S rRNA 基因进化树(图 3), 结果显示 BS06 菌株与菌株登录号为 NR074686 的 *Burkholderia cenocepacia* 有最大相似性。表明菌株与伯克霍尔德氏菌具有较高的遗传相似性, 与生理生化分析结果相符。

2.6 菌株的 *recA* 基因扩增和序列分析结果

利用 *recA* 基因 Bcc 引物(BCR1/BCR2)对 BS06

菌株进行 PCR 扩增, 获得了一条约 1 000 bp 的清晰条带。序列测定与分析结果显示该菌株的 *recA* 基因与 GenBank 中洋葱伯克霍尔德氏菌(*B. cepacia*)的相似性最高, 进一步确定该菌株为 *B. cepacia*。

3 结论与讨论

解磷微生物在土壤中磷循环相关的生物学系统中担任着重要的角色, 它可以将难溶磷素转化为可溶性磷, 提高磷肥利用率。解磷微生物广泛分布于土壤、水体和植物体内, 但是, 在自然条件下, 这些解磷微生物的数量不足以与植物微生态系统中其他微生物竞争, 难以发挥其活性, 仅仅依靠自然条件的作用不足以释放满足植物生长发育所需的磷素。因此, 人们便设想从自然条件下或生物

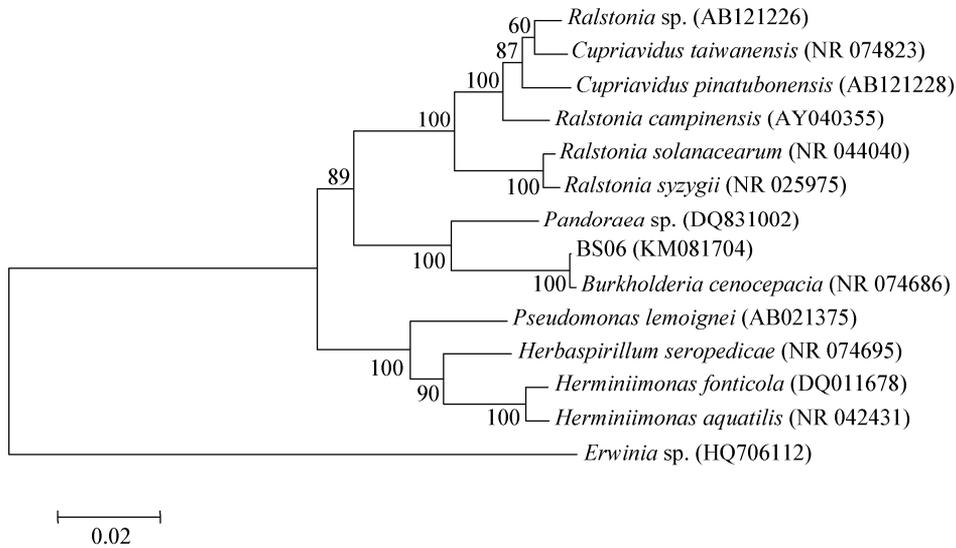


图3 基于16S rRNA基因序列同源性的BS06菌株系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence homology of strain BS06

注：括号中为相关细菌的GenBank的登录号；分支位置中的数字表示Bootstrap支持率；尺标表示每个核苷酸位点上的0.02替换值。
Note: The numbers in parentheses represent the sequence accession numbers in GenBank. The numbers in each branch points denote the percentages supported by bootstrap. The scale bar represents 0.02 substitutions per nucleotide position.

体内筛选解磷菌株，制成菌剂后回接到土壤中以转化足够的有效磷^[16-17]。本研究通过无机磷平板从甘蔗根际分离筛选获得了一株高效解无机磷细菌菌株BS06，磷钼蓝比色法测定结果表明该菌株对难溶性磷酸盐 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 具有较好的解磷效果；结合菌体形态特征、生理生化、16S rRNA基因以及*recA*基因序列分析等多种研究方法，最终将菌株BS06的分类地位明确为洋葱伯克霍尔德菌(*B. cepacia*)。

关于植物根际解磷细菌的种类及其解磷作用已有许多相关报道，其中不乏具有较好解磷效果的*Burkholderia* sp.细菌，如Oliveira等^[18]从玉米根际分离得到45株解磷微生物中以*Burkholderia* sp.细菌对磷酸钙的溶解能力最强。但是，不同种类的解磷菌或不同菌株之间的解磷能力有较大差异，如戴沈艳等^[6]获得的伯克霍尔德菌属菌株T4溶解磷矿粉的能力为193.1 mg/L，陶涛等^[19]筛选的4株解无机磷菌株其解磷量为102.77-174.08 mg/L，而本研究的BS06菌株可以使培养液中可溶性磷含量达到305.848 3 mg/L。大量研究表明，不同种类或不同

来源的解磷细菌其稳定性、生命力、适应性等存在较大的差异，同一株解磷细菌在利用不同的碳氮源时表现的解磷能力并不一致^[20-21]，本研究的菌株BS06在不同碳氮源条件下也表现出解磷能力差异较大的结果。这些研究结果说明解磷细菌的解磷能力与其所处环境有较大关系，筛选解磷量高、生命力强、适应广的解磷菌依然是解磷细菌应用的核心工作。

近年来，利用解磷细菌促进作物生长有许多成功的研究报道。朱培森等^[22]研究表明解磷细菌K3、K9对玉米有良好的促生长作用，接菌处理植株的茎粗、株高和鲜重分别较CK增加21.1%、25.0%和60.0%；王婧^[23]利用桔黄假单胞菌JD37接种番茄，处理组与对照组相比其平均根长、平均苗高、平均鲜重和平均干重均有显著的提高；李娜等^[24]施用解磷混合菌肥，可以增加油菜土壤有效磷和磷酸酶活性及油菜品质，与单施有机肥相比，土壤有效磷含量、酸碱磷酸酶活性、油菜干重、鲜重、吸磷量显著增加，分别提高15.44%、10.49%、14.25%、34.45%、27.80%、67.18%；戴沈艳等^[6]利用菌株T4制成微

生物菌肥施用于水稻田,可减施 30%磷肥而不致水稻减产。广西是我国主要甘蔗主产区,甘蔗和蔗糖产量占全国 60%以上。但是,甘蔗主产区的土壤主要为红壤土,对磷素固定能力较强,因此其供磷能力普遍比较差,大部分磷肥施入土壤后很快被固定为植物难以利用的形态。因此,挖掘和利用甘蔗解磷微生物资源具有重要意义。本研究探讨了 BS06 菌株接种对甘蔗生长的影响,盆栽试验结果表明接种该菌株能够显著提高供试甘蔗的株高和干重,促进甘蔗对磷素的吸收,接种处理植株的磷素累积量比对照增加 90%以上,显示出良好的应用前景。

在筛选高效解磷细菌时,根据平板观察细菌生长和菌落特征以及液体培养细菌解磷量筛选高效解磷细菌是不够的,这是因为细菌液体培养解磷量特别是水溶磷呈动态变化,不同细菌其变化规律不同。目前,测定微生物的解磷能力一般有 3 种方法:(1)将解磷菌株在含有难溶性磷酸盐的固体培养基上培养,测定菌落周围产生的透明圈的大小;(2)进行液体培养,测定培养液中可溶性磷的含量;(3)进行土壤培养,测定土壤有效磷的含量^[25-26]。本研究主要利用前两种方法对菌株 BS06 的解磷能力进行探讨,同时利用盆栽试验证明菌株能较好地促进甘蔗植株的生长和磷素的吸收。但是,由于本研究盆栽所用塑料桶底部有穿孔,在甘蔗的日常栽培管理过程中,可能发生土壤磷素随着水流流失的情况,因此无法通过分析接种后土壤有效磷素含量的变化证明菌株的解磷能力。在进一步的研究中,作者将进一步采用土壤培养法验证 BS06 菌株在土壤中的解磷作用;同时,作者将分析不同土壤类型以及主要土壤因子(如氮、磷、钾、有机质含量等)对 BS06 解磷效果的影响,并就该菌株对甘蔗生长的实际促生长效果及其生态安全性进行进一步的评价。

参 考 文 献

[1] Wang GH, Zhao Y, Zhou DR, et al. Review of phosphate-solubilizing microorganisms[J]. Ecology and Environment, 2003, 12(1): 96-101 (in Chinese)
王光华, 赵英, 周德瑞, 等. 解磷菌的研究现状与展望[J]. 生

- 态环境, 2003, 12(1): 96-101
- [2] Rivas R, Trujillo ME, Sánchez M, et al. *Microbacterium ulmi* sp. nov., a xylanolytic, phosphate-solubilizing bacterium isolated from sawdust of *Ulmus nigra*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54(Pt2): 513-517
- [3] Peix A, Rivas R, Santa-Regina I, et al. *Pseudomonas lutea* sp. nov., a novel phosphate-solubilizing bacterium isolated from the rhizosphere of grasses[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54(Pt3): 847-850
- [4] Loganathan P, Nair S. *Swaminathania salitolerans* gen. nov., sp. nov., a salt-tolerant, nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacterium from wild rice (*Porteresia coarctata* Tateoka)[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54(Pt4): 1185-1190
- [5] Babu-Khan S, Yeo TC, Martin WL, et al. Cloning of a mineral phosphate-solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(3): 972-978
- [6] Dai SY, Shen WS, He YJ, et al. Screening of efficient phosphate-solubilizing bacterial strain and its application in red paddy soil to rice cultivation[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2011, 17(5): 678-683 (in Chinese)
戴沈艳, 申卫收, 贺云举, 等. 一株高效解磷细菌的筛选及其在红壤性水稻土中的施用效果[J]. 应用与环境生物学报, 2011, 17(5): 678-683
- [7] Yu X, Zhu TH, Liu X. Effects of different phosphate-solubilizing bacteria on rhizosphere microorganism and enzyme activities of pecan seedlings[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2012, 48(2): 117-123 (in Chinese)
余旋, 朱天辉, 刘旭. 不同解磷菌剂对美国山核桃根际微生物和酶活性的影响[J]. 林业科学, 2012, 48(2): 117-123
- [8] He MX, Gao Y, Hu ZX, et al. Screening identification and phosphate-solubilizing capability of phosphate-solubilizing bacterial strain B25[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2012, 23(1): 235-239 (in Chinese)
贺梦醒, 高毅, 胡正雪, 等. 解磷菌株 B25 的筛选、鉴定及其解磷能力[J]. 应用生态学报, 2012, 23(1): 235-239
- [9] Han S, Xia DL, Li LB, et al. Diversity of the phosphate solubilizing bacteria isolated from the root of *Phyllostachys pubescens*[J]. Journal of Agricultural University Hebei, 2010, 33(2): 26-31 (in Chinese)
韩烁, 夏冬亮, 李潞滨, 等. 毛竹根部解磷细菌的筛选及多样性研究[J]. 河北农业大学学报, 2010, 33(2): 26-31
- [10] Hu XF. Screening of phosphate solubilizing bacteria, optimization of phosphate dissolving conditions and ITS promotion to maize growth[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2010 (in Chinese)
胡晓峰. 溶磷菌的筛选、溶磷条件优化及对玉米的促生作用研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2010
- [11] Qin P. A compared study on the phosphate-dissolving ability of phosphate-solubilizing bacteria with different ratio and cloning of inorganic phosphorus dissolving gene[D]. Harbin: Master's Thesis of Heilongjiang University, 2007 (in Chinese)
秦平. 不同解磷菌配比解磷能力比较及解无机磷基因的克隆[D]. 哈尔滨: 黑龙江大学硕士学位论文, 2007
- [12] Lu RK. The Analysis Method of Soil Agricultural Chemistry[M]. Beijing: Chinese Agricultural Science and Technology Press, 2000: 312-314 (in Chinese)
鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000: 312-314
- [13] Ren XZ. Classification and Identification of Plant Pathogenic Bacteria[M]. Beijing: Chinese Agricultural Science and

- Technology Press, 1994: 5 (in Chinese)
任欣正. 植物病原细菌的分类和鉴定[M]. 北京: 中国农业出版社, 1994: 5
- [14] Dong XZ, Cai MY. Common Bacterial System Identification Manual[M]. Beijing: Science Press, 2001: 169 (in Chinese)
东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 169
- [15] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1596-1599
- [16] Molla MAZ, Chowdhury AA, Islam A, et al. Microbial mineralization of organic phosphate in soil[J]. *Plant and Soil*, 1984, 78(3): 393-399
- [17] Illmer P, Schinner F. Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanism[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1995, 27(3): 257-263
- [18] Oliveira CA, Alves VMC, Marriel IE, et al. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 41(9): 1782-1787
- [19] Tao T, Ye M, Liu D, et al. On isolation and identification of inorganic Phosphobacteria and its phosphate-solubilizing capacity[J]. *Journal of Hefei University of Technology (Natural Science Edition)*, 2011, 34(2): 304-308 (in Chinese)
陶涛, 叶明, 刘冬, 等. 无机解磷细菌的筛选、鉴定及其溶磷能力研究[J]. 合肥工业大学学报: 自然科学版, 2011, 34(2): 304-308
- [20] Reyes I, Valery A, Valdúz Z. Phosphate-solubilizing microorganisms isolated from rhizospheric and bulksoils of colonizer plants at an abandoned rock phosphate mine[J]. *Plant and Soil*, 2006, 287(1/2): 69-75
- [21] Fan BQ, Jing JY, Ge C. Isolation of penicillium oxalicum and its effect on solubilization of insoluble phosphate under different conditions [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2002, 35(5): 525-530 (in Chinese)
范丙全, 金继运, 葛诚. 溶磷草酸青霉菌筛选及其溶磷效果的初步研究[J]. 中国农业科学, 2002, 35(5): 525-530
- [22] Zhu PM, Yang XM, Xu YC, et al. High effective phosphate-solubilizing bacteria: their isolation and promoting effect on corn seedling growth[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2007, 18(1): 107-112 (in Chinese)
朱培森, 杨兴明, 徐阳春, 等. 高效解磷细菌的筛选及其对玉米苗期生长的促进作用[J]. 应用生态学报, 2007, 18(1): 107-112
- [23] Wang J. Promotion of plant growth and the development of microbial fertilizer by *Pseudomonas aurantiaca* JD37[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Normal University, 2012 (in Chinese)
王婧. 桔黄假单胞菌JD37菌株对植物的促生作用及其微生物肥料的研制[D]. 上海: 上海师范大学硕士学位论文, 2012
- [24] Li N, Qiao ZW, Hong JP, et al. Effect of soluble phosphorus microbial mixed fertilizers on phosphorus nutrient and phosphorus adsorption-desorption characteristics in calcareous cinnamon soil[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2014, 20(4): 662-668 (in Chinese)
李娜, 乔志伟, 洪坚平, 等. 溶磷混合菌肥对石灰性褐土磷素养分及解析特性的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2014, 20(4): 662-668
- [25] Chen SQ. Phosphate solubilization of two isolates in calcareous soil and acid soil[D]. Beijing: Master's Thesis of China Agricultural University, 2003 (in Chinese)
程淑琴. 两株溶磷菌在两种土壤中的溶磷作用[D]. 北京: 中国农业大学硕士学位论文, 2003
- [26] Liu XH, Zhang LY, Fan YH. et al. Isolation, identification and promoting effect of phosphate-solubilizing bacteria in rhizosphere of Zhanhua Winter Jujube[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2013, 28(3): 204-209 (in Chinese)
刘雪红, 张丽燕, 范延辉, 等. 沾化冬枣根际解无机磷细菌的分离、鉴定及其在土壤中溶磷效果的研究[J]. 华北农学报, 2013, 28(3): 204-209