

张芬芬, 周晓伦, 贺洋洋. 一株溶磷促生菌的分离、鉴定及其对玉米幼苗生长的影响 [J]. 广东农业科学, 2021, 48(5): 76–82.

一株溶磷促生菌的分离、鉴定及其 对玉米幼苗生长的影响

张芬芬, 周晓伦, 贺洋洋

(甘肃医学院临床医学系 / 基础医学院, 甘肃 平凉 744000)

摘要: 【目的】分离能高效溶磷的促生菌菌株, 研究不同溶磷菌胁迫对玉米幼苗生长的影响。【方法】采用改良 SRSM 培养基及改良 Belimov 方法从平凉市化肥施用冬小麦土壤中筛选溶磷菌株, 利用形态特征和 16S rDNA 序列对筛选菌进行鉴定、分析其促生特性, 盆栽试验分析不同溶磷胁迫下玉米幼苗抗逆性等。【结果】在初步分离得到 8 株溶磷菌株中, 筛选出 1 株 ZX-2020 菌株, 通过生理生化及 16S rRNA 鉴定 ZX-2020 为 *Pseudomonas* sp., GenBank 登录号为 MT084758。玉米幼苗生长试验表明, 接种 ZX-2020 菌株的玉米与不同溶磷菌处理相比, 其幼苗根、茎长度和叶面积均有显著提高, 分别增加 54.49%、26.96% 和 36.06%, 产 IAA 量为 6.71 mg/L, 溶磷量为 198.26 μg/mL。【结论】*Pseudomonas* sp. ZX-2020 在施用化肥土壤中能更好地定殖, 保证促植物生长能力的发挥, 并为化肥污染土壤的植物 – 微生物联合原位修复提供优良菌株资源。

关键词: 根际促生菌; 玉米幼苗; 溶磷菌; ACC 脱氨酶; 吲哚乙酸

中图分类号: S154.3

文献标志码: A

文章编号: 1004-874X (2021) 05-0076-07

Isolation and Identification of a Phosphorus-solubilizing Growth-promoting Bacterium and its Effect on the Growth of *Zea mays* L. Seedlings

ZHANG Fenfen, ZHOU Xiaolun, HE Yangyang

(Department of Clinical Medicine and School of Basic Medicine, Gansu Medical College, Pingliang 744000, China)

Abstract: 【Objective】The study was carried out to isolate growth-promoting strains with high phosphorus-solubilizing efficiency and explore the effects of different phosphorus-solubilizing bacteria strain stresses on the growth of *Zea mays* L. seedlings. 【Method】The improved SRSM culture medium and Belimov method were used to screen out the phosphorus-solubilizing strains from the soil of winter wheat applied with chemical fertilizer in Pingliang City. The strains were identified by morphological characteristics and 16S rDNA sequence and their growth-promoting characteristics were analyzed. The resistance of *Z. mays* L. seedlings growth under different phosphorus bacteria stresses was studied by pot experiment. 【Result】Among 8 preliminarily isolated phosphorus-solubilizing strains, the ZX-2020 strain was screened out, which was identified as *Pseudomonas* sp. through physiological and biochemical and 16S rRNA with the GenBank accession number was MT084758. The test results of *Z. mays* L. seedlings growth showed that, compared with those under different phosphorus-solubilizing strains treatments, the root length, stem length and leaf area of *Z. mays* L. seedling inoculated with ZX-2020 strain increased by 54.49%, 26.96% and 36.06%, respectively, with the IAA yield of 6.71 mg/

收稿日期: 2020-12-17

基金项目: 甘肃省高等学校创新能力提升项目 (2019B-203)

作者简介: 张芬芬 (1990—), 女, 硕士, 讲师, 研究方向为生物物理学, E-mail: 1046767776@qq.com

通信作者: 周晓伦 (1987—), 男, 硕士, 讲师, 研究方向为土壤微生物, E-mail: 610253095@qq.com

L and the dissolved phosphorus content of 198.26 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 【Conclusion】 *Pseudomonas* sp. ZX-2020 can colonize better in contaminated soil and promote plant growth, which can be used as a good microbial resource for plant-microorganism *in situ* remediation of chemical fertilizer contaminated soil.

Key words: plant growth-promoting rhizobacteria; *Zea mays* L. seedling; phosphorus-solubilizing bacteria; 1-a-minocyclopropane-1-carboxylate deaminase; indole-3-acetic acid

【研究意义】粮食生产对人类生存至关重要，玉米(*Zea mays* L.)是世界重要的粮食作物之一，广泛应用于工业、养殖业以及畜牧业中^[1]。氮、磷参与植物光合作用、营养吸收、细胞分裂和生物氧化等重要代谢途径，是植物生长发育所必需的大量营养元素^[2]。为了满足农作物生存、生产所需的氮、磷等营养元素，几乎所有的土壤都需要化肥来补充无机磷支持作物生产，但反复使用化肥会导致土壤结构恶化^[3]，而且土壤中95%的磷的存在形式难以被植物吸收利用^[4]。因此，分离和利用土壤溶磷微生物，促进植物吸收磷元素，应用微生物肥料替代部分化肥逐渐成为现代农业技术的研究热点。植物根际促生菌(Plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)是指定殖于植物根际系统，并能促进植物生长和提高产量的一类细菌的总称^[5]。PGPR在促进作物固氮能力、改善土壤环境以及提高植物抗病抗逆能力等方面有重要研究意义^[6]。【前人研究进展】有研究报道关于植物根际促生菌的固氮、溶磷、产氨作用，溶磷菌可以释放有机酸、螯合和离子交换使土壤中的不溶性磷转化成可溶性磷，以提高土壤肥力^[7-9]。溶磷剂对粮食和饲料作物也有部分相应的促进作用^[10-12]。大量的文献主要说明了根际促生菌其自身的促生作用和菌株的生理特征，但促生菌对植株-土壤-微生物整个体系作用的研究相对很少^[13]。【本研究切入点】陇东地区对PGPR菌株作为生物菌肥应用到农作物中以及促生效应的研究甚少。筛选一批促生作用显著的根际植物促生菌，可为进一步利用微生物-植物促生相互作用促进农作物的增长，提供优质的菌种资源，提高粮食产量，减少化学肥料对土壤特征的影响。【拟解决的关键问题】为探索PGPR对土壤中无机磷的溶磷能力以及植物的促生作用机制，本试验以冬小麦根际土壤为研究材料筛选具有溶磷能力和产生促生效应物质的菌株，采用改良的Beliomov方法获得一株显著促进玉米幼苗生长的菌株，通过16S rRNA基因序列及表型分

析鉴定其为*Pseudomonas* sp，其作为优质的菌种资源，可促进农作物产量的提高和改善局部土壤的理化特征，扩大了生物菌肥的资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试土样采集自冬小麦根际土壤5~15 cm的土层。

试验使用的化学药品均为分析纯，均由西安姚北生物科技有限公司提供。

LB固体培养基：胰蛋白胨10.00 g，酵母膏5.00 g，NaCl 10.00 g，琼脂20.00 g，H₂O 1 L，调节pH为7.0，用于观察溶磷菌的菌落特征。

改良SRSM培养基^[14]：琼脂15 g，Glucose 10 g，Ca₃(PO₄)₂ 5 g，(NH₄)₂SO₄ 0.5 g，KCl 0.2 g，MgSO₄·7H₂O 0.3 g，MnSO₄ 0.004 g，FeSO₄ 0.002 g，NaCl 20 g，Yeast extract 0.5 g，Bromocresol purple 0.1 g，加蒸馏水至1 L，调节pH为6.8~7.0，用于溶磷菌株的分离、纯化。

1.2 溶磷菌株筛选

取采集的冬小麦根际土壤10 g，加入到100 mL(含有25~35个玻璃珠)的LB液体培养基的锥形瓶中，置振荡器上震荡15 min，得到10⁻¹浓度的土壤稀释液，连续稀释至10⁻⁶，将10⁻¹~10⁻⁶梯度的土壤稀释液均匀涂布于SRSM培养基中，培养温度为30(±2)℃，倒置、恒温培养3~5 d。菌落周围若出现溶磷圈即为溶磷菌，挑取具有明显溶磷圈的菌株进行纯化，重复3次，直至显微镜中观察出现形态、大小一致的细菌。将其保存4℃备用。

1.3 溶磷菌株鉴定

1.3.1 菌株形态观察及生理生化试验 菌落形态特征及革兰氏染色特性参照《常见细菌系统鉴定手册》进行观察，菌株的各项生理生化指标参照《伯杰细菌鉴定手册》及相关文献鉴定^[15]。

1.3.2 16S rDNA序列测定及系统发育树构建 分别提取菌株的总基因DNA，采用16S rDNA通用

引物 27f (5'-AGAGTTT-G-ATCCTGGCTCAG-3') 和 1492r (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增, 将 PCR 产物送西安擎科生物公司完成 16S rDNA 扩增及序列测定。提交菌株的 16S rDNA 序列到 NCBI 网站, 与已知的序列比对分析其同源性。利用 Blast 将序列进行比对, MEGA5.05 分子进化遗传分析软件分析碱基组成、GC 含量, Kimura2 参数计算遗传距离, 采用 NJ 邻近法构建系统发育树。

1.4 溶磷菌株 ACC 脱氨酶活性和产 IAA 能力测定

参照 Penrose 等^[16]的方法, ACC 脱氨酶的活性通过 ACC 脱氨酶分解 ACC 产生的 α -酮丁酸来测定。菌体蛋白含量根据 Bradford^[17]的方法测定。根据 α -酮丁酸和蛋白质的标准曲线即可测算 ACC 脱氨酶的活性。

参照 Glickman 等^[18]的方法, 将分离纯化的菌株分别接种于添加 L- 色氨酸、终浓度为 0.5 g/L 的 LB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 震荡培养 2 d, 离心后取 50 μ L 上清液加入等体积 Sackowcki's 显色剂, 在白瓷板上避光显色 30 min 后观察, 若显示粉红色即为阳性, 表明该菌株能够分泌 IAA。

定量测定: 取阳性菌株的上清液与 Sackowcki's 显色剂避光显色 30 min 后的混合液, 测定在 530 nm 的吸光值, 以空白培养基作对照, 标准曲线以纯 IAA 的吸光值制作, 计算各反应中的阳性菌株产 IAA 的量 (μ g/mL)^[19]。

1.5 根际细菌溶磷能力测定

1.5.1 定性测定 待测菌株在改良 SRSM 固体培养基上活化, 然后用接种针点接菌株至改良的 SRSM 固体培养基, 每菌株在一个皿上接 4 个重复, 在 30 °C 培养箱中培养 8 d 后观察菌株周围是否有透明圈产生。

1.5.2 定量测定 不加磷的改良 SRSM 液体培养基 100 mL 分装在 250 mL 三角瓶中, 灭菌后精确加入 0.5 g 灭菌的 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 粉、1 mL (1×10^8 CFU/mL) 培养 24 h 菌液, 28 °C、120 r/min 摆床培养, 分别在 48、72、96、120、144 h 测定菌株溶解无机磷能力^[14]。吸取 2 mL 混匀菌株培养液, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液采用钼锑抗比色法测定其溶磷量^[20], 同时用酸度计测定培养液的 pH 值。每菌株 3 次重复, 以基础培养基(不

接种菌株)为对照。根据磷酸二氢钾标准曲线确定菌株的溶磷量。

1.6 溶磷菌株对玉米幼苗生长的影响

于 2019 年 5—6 月进行盆栽试验, 供试土壤来自平凉农田, 供试作物为玉米。试验设接种 ZX-10、ZX-3、ZX-40、ZX-7、ZX-701、ZX-2020、ZX-30、ZX-401 及不接种任何菌剂对照 9 个处理, 5 次重复。供试菌株分别活化后置于 LB 培养基振荡培养 24 h, 用无菌水调节菌悬液浓度为 1×10^8 CFU/mL, 采用灌根方式进行接种, 接种量 10 mL/ 株。自然条件下室内培养, 每隔 5 d 重复处理 1 次, 整个试验期间保持土壤湿润, 30 d 后收获植株测定生物学数据。

试验数据采用 SPSS13.0 one-way ANOVA 进行分析, 采用 Fisher's Student-Newman-Keuls^{a,b} 进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 溶磷菌株的筛选

将分离纯化的菌株以稀释涂布的方式接种于改良 SRSM 固体培养基 5 d 后, 测定菌落直径和溶磷圈直径, 根据溶磷圈大小筛选到 8 株具有溶磷能力的菌株, 其对应平板上都观察到明显的溶磷圈。其中, ZX-2020 菌落直径为 2.3 mm, 溶磷圈直径为 4.8 mm (图 1 中箭头所示), 计算得 SI=2.08, 为 8 株菌株中最大, 因此对 ZX-2020 平板上的溶磷菌株进行纯化和传代培养, 表明菌株纯度和溶磷能力稳定。

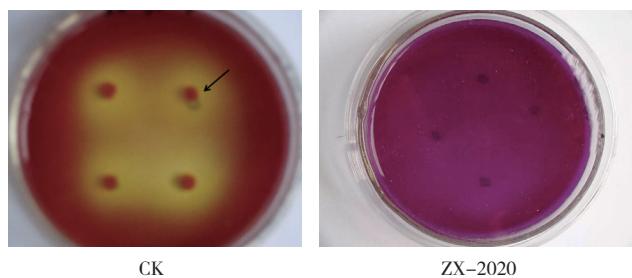


图 1 菌株 ZX-2020 的溶磷圈

Fig. 1 Phosphorous-solubilizing halos of strain ZX-2020

2.2 溶磷菌株的菌体形态特征和生理生化特性

菌株 ZX-2020 为乳白色或淡黄菌落, 表面光滑, 半透明, 湿润粘稠, 圆形, 边缘规则, 革兰氏染色阴性, 具运动性。生化反应结果见表 1。

另外，在SRSM液体培养基中，菌株ZX-2020在pH 6.5~11.5之间均可生长，在37℃下生长状况最好。根据菌体形态特征和生理生化，菌株ZX-2020为*Pseudomonas* spp.

表1 溶磷菌株*Pseudomonas* sp. ZX-2020的形态特征和生化反应

Table 1 Morphological characteristics and biochemical reactions of *Pseudomonas* sp. strain ZX-2020

特性 Feature	测试项目 Test item	结果 Result
形态特征 Morphological characteristics	革兰氏反应	阴性
	细胞形态	短杆状
	菌落形态	半透明、菌落边缘不规则
生化反应 Biochemical reaction	最适生长温度(℃)	37
	最适酸碱度	6.5~11.5
	氧化酶	+
	过氧化氢酶	+
	吲哚	+
	甲基红	+
	VP	-
	枸橼酸盐	-
	动力实验	+
	淀粉水解	-
	明胶液化	+
	硝酸盐还原	-
	葡萄糖	+
	果糖	-
	乳糖	-
	色氨酸脱氨酶	+
苯丙氨酸脱氨酶	苯丙氨酸脱氨酶	-
	精氨酸双水解酶	+

注：+为阳性结果，-为阴性结果。

Note: + represents positive result, - represents negative result.

2.3 菌株ZX-2020 16S rDNA序列测定

为了鉴定菌株的生理生化特性，以菌株ZX-2020的总DNA为模板，利用细菌16S rDNA引物进行PCR扩增，得到长度约为1.5 kb的扩增产物。将此序列提交至Genbank，获得的登录号为MT084758。根据Genbank序列同源性比较，利用NCBI数据库提供的Blast功能进行核苷酸比对，结果显示，菌株ZX-2020与*Pseudomonas aeruginosa* strain P1 (MK881024.1)、*Pseudomonas aeruginosa* strain LCS1 (MK430420.1)及*Pseudomonas aeruginosa* strain BUYA-2 (MN490066.1)的16S rDNA基因序列一致性均高达100%。根据16S rDNA基因序列的相似性，利用MEGA5.0构建系统发育树（图2），显示菌株ZX-2020在系统发育上最接近于铜绿假单胞菌属（*Pseudomonas aeruginosa*）。

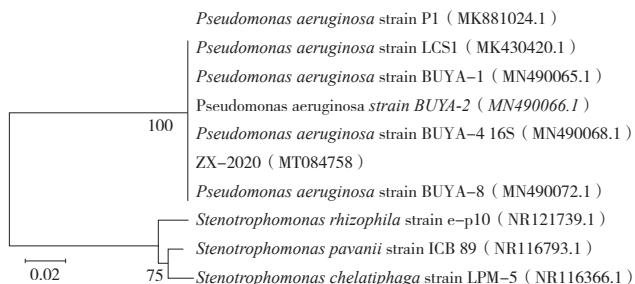


图2 基于菌株ZX-2020 16S rDNA基因序列构建的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree constructed based on the 16S rDNA gene sequence of strain ZX-2020

2.4 菌株ZX-2020 ACC脱氨酶活性和产IAA能力

植物促生菌可以定植在植物的根以及种子表面，菌株产生的1-氨基环丙烷-1-羧酸脱氨酶可降解乙烯的前体1-氨基环丙烷-1-羧酸，从而降低乙烯在植物体内的含量，促进植物的生长和发育。IAA也可通过直接刺激植物细胞的延伸和分裂，促进植物的生长并提高植物自身的防御系统。试验结果显示，*Pseudomonas* spp. ZX-2020溶磷量为198.26 (± 10.04) μg/mL，ACC脱氨酶活性为152.62 (± 7.21) μmol/mg · h，产IAA量为6.71 (± 0.32) mg/L，具有较高的产IAA能力。

2.5 菌株ZX-2020溶磷能力

难溶性磷在酸性土壤中会转化成磷酸铝和磷酸铁，在石灰性土壤中会转化为磷酸钙，而溶磷微生物能把此类难溶性磷转化成植物可以吸收利用的有效磷。为了分析测试菌株ZX-2020转化土壤中难溶性磷酸盐并且改善土壤的供磷能力，将菌液与供试土壤按照10%的比例进行混合，3 d后，土壤中的有效磷含量从最初的8.63 mg/kg上升为12.66 mg/kg。起初的土壤有效磷含量比较少，属于低能力供磷水平，在施加菌株ZX-2020后，土壤有效磷含量明显增加，达到中等供磷水平，证明菌株ZX-2020可以改善土壤的供磷水平。

2.6 菌株ZX-2020对幼苗生长的影响

通过不同溶磷菌株对幼苗进行灌根处理，30 d后测定植株的生理生长指标。盆栽试验显示，与对照相比，接种ZX-7、ZX-2020、ZX-30、ZX-401菌株的幼苗根长均显著增长，接种ZX-40、ZX-2020、ZX-30、ZX-401菌株的幼苗茎长均显著增长，接种ZX-40、ZX-701、ZX-30、ZX-401、ZX-2020的幼苗鲜重均显著增加，接种

ZX-10、ZX-7、ZX-2020 菌株的幼苗叶面积均显著增加(表2)。表明接种8种菌株的玉米幼苗根长、茎长、鲜重、叶面积均有不同程度的增加,以ZX-2020菌株的促生效应更为突出,接种ZX-2020菌株的玉米幼苗根长增长54.49%,茎长增长26.96%,鲜重增加1.93%,叶面积增加36.06%。同时,接种溶磷菌株的幼苗植株与对照相比根部生长更为旺盛,根毛数更多,根须更长,根系更为发达。

表2 8株溶磷菌株对玉米幼苗生长的影响

Table 2 Effects of 8 phosphorus-solubilizing strains on the growth of *Zea mays L.* seedlings

处理 Treatment	根长 Root length (mm)	茎长 Stem length (mm)	单株鲜重 Fresh weight per plant (mg)	叶面积 Leaf area (× 10 ⁻⁴ m ²)
CK	102.12 ± 8.41c	55.23 ± 3.31b	1501 ± 19bcd	12.34 ± 0.12c
ZX-10	83.73 ± 9.29d	62.81 ± 7.48b	1899 ± 21ab	15.45 ± 0.26b
ZX-3	93.28 ± 7.58d	51.79 ± 2.34c	1455 ± 34bcd	10.57 ± 0.09d
ZX-40	76.70 ± 5.18e	73.85 ± 6.55a	1958 ± 22a	11.36 ± 0.15cd
ZX-7	119.36 ± 7.56b	42.17 ± 7.17c	1254 ± 13d	15.09 ± 0.08b
ZX-701	110.12 ± 6.17bc	49.84 ± 4.20c	1774 ± 30ab	9.24 ± 0.66de
ZX-2020	157.77 ± 8.54a	70.12 ± 8.18a	1530 ± 17bcd	16.79 ± 0.38a
ZX-30	121.14 ± 4.74b	60.10 ± 5.46b	1678 ± 28ab	8.83 ± 0.57e
ZX-401	123.88 ± 9.28b	63.81 ± 2.33b	1700 ± 18ab	10.48 ± 0.18d

注:同列数据后小写英文字母不同者表示差异显著。

Note: Different lowercase letters after data in the same column represent significant differences.

3 讨论

土壤、根系及微生物三者相互作用的区域称为植物根际^[21],植物根系可分泌大量的糖类、氨基酸、激素和维生素,根际细菌的定植在土壤养分转化和溶解等方面发挥着至关重要的作用^[22]。大多数的解磷、溶磷菌都可以促进作物生长、提高作物产量、增强抗病力^[23],假单胞菌属作为主要溶磷微生物之一,很多研究都表明假单胞杆菌属菌株对难溶性磷酸盐有较好的溶磷效果。郭莹等^[24]研究表明铜绿假单胞菌JM1对磷酸钙和磷酸铝的溶磷量分别达到240.63和2.73mg/L。孙珊等^[25]筛选的一株假单胞菌属菌株CJT-1对磷酸钙和宜昌磷矿粉的溶磷量分别达到224.51和120.59mg/L,刘辉等^[26]筛选的一株荧光假单胞菌JW-JS1对磷酸钙的溶磷量最高达708.34mg/L。本研究筛选得到的ZX-2020菌株对磷酸钙溶的溶磷量为198.26mg/L,该菌株对难溶

性磷酸盐的溶解能力与上述报道的结果相近,甚至效果更优。溶磷菌的溶磷机理非常复杂,有的溶磷菌通过释放质子来降低土壤pH值而达到降磷效果,部分溶磷菌通过分泌有机酸而起到溶磷作用,也有溶磷菌通过分泌磷酸酶来溶磷,或者是多种机制并存起到的综合作用^[27-28]。目前,大部分研究认为真菌溶磷的能力主要与其向培养基中分泌的小分子有机酸有关,分泌有机酸一方面可以降低培养基pH利于难溶性磷酸盐的溶解,另一方面可以通过结合铁镁钙铝等离子将磷酸盐释出来^[29-30],因此造成不同浓度的溶磷菌株溶解能力的差异可能与金属离子的螯合能力不同或其分泌的有机酸含量有关。溶磷菌剂的使用,直接增加其在土壤中的数量,有利于植物对磷素的吸收利用^[31]。万水霞等^[32]通过盆栽试验,发现土壤根际筛选出的优良PGPR菌株(CH70)对苋菜的株高及地上部鲜重都有一定的促进作用,并且从根际土壤分离获得的溶磷菌株,其菌剂能有效促进苗期生长和增加产量^[33]。陈佳怡等^[34]对水稻根际土壤进行溶磷菌筛选纯化,分离得到的假单胞菌有高效的溶磷能力,可用来研制微生物菌肥。在陇东地区,过量使用化肥使农业生态环境遭到破坏,迫切需要绿色高效的生物菌肥代替化肥,因此,在今后的研究中,改善土壤微环境,溶磷微生物能够推动土壤中有效磷的释放,从而促进植物生长发育,增加作物产量,筛选更多优良PGPR菌株尤为重要。

4 结论

本研究从平凉市化肥施用冬小麦土壤中初步筛选分离得到8株溶磷菌株,通过植物促生试验得到一株溶磷能力强(198.26mg/L)、产吲哚乙酸(6.71mg/L)、ACC脱氨酶活性强(152.62μmol/mg·h)的铜绿假单胞菌属,可以作为生物菌肥应用到农耕活动中,不但可以增加农作物对磷元素的吸收,而且吲哚乙酸也可以促进植物的生长,ACC脱氨酶可以帮助植物抵抗非生物胁迫条件,如重金属、干旱、高盐等,增加植物的抗逆性。当ZX-2020菌株进入土壤中定植于植物根系后,产生的吲哚乙酸、ACC脱氨酶和溶解无机磷的能力相互作用,促进植物生长,提高农作物的生物量,同时也为化肥土壤的生物修复提供了菌种资源。

参考文献 (References) :

- [1] AMI R A. Alleviating the adverse effects of NaCl stress in maize seedlings by pretreating seeds with salicylic acid and 24-epibrassinolide [J]. *South African Journal of Botany*, 2013, 88: 171–177. DOI: 10.1016/j.sajb.2013.07.019.
- [2] ILLMER P, SCHINNER F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1992, 24: 389–395. DOI: 10.1016/0038-0717(92)90199-8.
- [3] TEWARI S K, DAS B, MEHROTRA S. Cultivation of medicinal plants—tool for rural development [J]. *Rural Technology*, 2004, 3: 147–150. DOI: 10.1007/1-4020-5449-1-3.
- [4] 赵素芬, 刘建新, 倪海娣. 畜禽废弃物高温好氧堆肥过程中磷素的变化研究 [J]. 农业环境科学学报, 2005, 24 (2):384–386. DOI: 10.3321/j.issn:1672–2043.2005.02.039.
- ZHAO S F, LIU J X, NI M D. Dynamic phosphorus contents during aerobic and thermophilic composting of livestock wastes [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2005, 24 (2): 384–386. DOI: 10.3321/j.issn:1672–2043.2005.02.039.
- [5] AHMAD F, AHMAD I, KHAN M S. Screening of freeliving rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities [J]. *Microbiological Research*, 2008, 163 (2): 173–181. DOI: 10.1016/j.micres.200604001.
- [6] 卢秉林, 李娟, 郭天文. 甘肃微生物肥料研发应用现状及其发展对策 [J]. 甘肃农业科技, 2007 (8): 36–38. DOI: 10.3969/j.issn.1001–1463.2007.08.016.
- LU B L, LI J, GUO T W. Application status and development strategies of microbial fertilizers in Gansu Province [J]. *Gansu Agricultural Science and Technology*, 2007 (8): 36–38. DOI: 10.3969/j.issn.1001–1463.2007.08.016.
- [7] OMAR S. The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and vesicular–arbuscular-mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1997 (14): 211–218. DOI: 10.1023/A:1008830129262.
- [8] NARULA N, KUMAR V, BEHL R K, DUEBEL A A, GRANSEE A, MERBACH W. Effect of P solubilizing *Azotobacter chroococcum* on N, P, K uptake in P responsive wheat genotypes grown under green house conditions [J]. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2000, 163: 393–398. DOI: 10.1002/1522–2624 (200008)163:4<393::AID-JPLN393>3.0.CO;2-W.
- [9] WHITELAW M A. Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi [J]. *Advances in Agronomy*, 2000, 69: 99–151. DOI: 10.1016/S0065–2113 (08)60948–7.
- [10] DEY R, PAL K K, BHATT D M, CHAUHAN S M. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria [J]. *Microbiological Research*, 2004, 59: 371–394. DOI: 10.1016/j.micres.2004.08.004.
- [11] MITTAL V, SINGH O, NAYYAR H, KAUR J, TEWARI R. Stimulatory effect of phosphatesolubilizing fungal strains (*Aspergillus awamori* and *Penicillium citrinum*) on the yield of chickpea (*Cicer arietinum* L. cv. GPF2) [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40: 718–727. DOI: 10.1016/j.soilbio.2007.10.008.
- [12] GULATI A, VYAS P, RAHI P, KASANA R C. Plant growth promoting and rhizosphere competent acinetobacter rhizosphere strain BIHB 723 from the cold desert of Himalayas [J]. *Current Microbiology*, 2009, 58:371–377. DOI: 10.1007/s00284–008–9339–x.
- [13] KOHLER J, CARAVACA F, ROLDAN A. Effect of drought on the stability of rhizosphere soil aggregates of *Lactuca sativa* grown in a degraded soil inoculated with PGPR and AM fungi [J]. *Applied Soil Ecology*, 2009, 42 (2):160–165. DOI: 10.1016/j.apsoil.2009.03.007.
- [14] VAZQUEZ P, HOLGUIN G, PUENTE M, LOPEZ-CORTES A, BASHAN Y. Phosphate–solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2000, 30:460–468. DOI: 10.1007/s003740050024.
- [15] OLIVEIRA C A, ALVES V M C, MARRIEL I E, GOMES E A, SCOTTI M R, CARNEIRO N P, GUIMARAES C T, SCHAFFERT R E, Sá N M H. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41:1782–1787. DOI: 10.1016/j.soilbio.2008.01.012.
- [16] PENROSE D M, GLICK B R. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase containing plant growth-promoting rhizobacteria [J]. *Physiologia Plantarum*, 2003, 118 (1): 10–15. DOI: 10.1034/j.1399–3054.2003.00086.x.
- [17] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72 (1): 248–254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.
- [18] GLICKMANN E, DESSAUX Y A. Critical examination of the specificity of the salkowski reagent for compounds produced by phytopathogenic bacteria [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61 (2): 793–796. DOI: 10.1128/AEM.61.2.793–796.1995.
- [19] 张东艳, 刘晔, 吴越, 王国文, 万兵兵, 姜瑛. 花生根际产IAA菌的筛选鉴定及其效应研究 [J]. 中国油料作物学, 2016, 38(1):104–110. DOI: 10.7505/j.issn.1007–9084.2016.01.016.
- ZHANG D Y, LIU Y, WU Y, WANG G W, WAN B B, JIANG Y. Isolation and identification of IAA-producing strains from peanut rhizosphere and its promoting effects on peanut growth [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2016, 38 (1):104–110. DOI: 10.7505/j.issn.1007–9084.2016.01.016.
- [20] 许光辉, 郑洪元. 土壤微生物分析方法手册 [M]. 北京: 农业出版社, 1986:187–189.
- XU G H, ZHENG H Y. Manual of soil microbial analysis methods [M]. Beijing: Agricultural Press of China, 1986: 187–189.
- [21] TRAVIS S W, HARSH P B, ERICH G, JORGE M V. Rootexudation and rhizosphere biology [J]. *Plant Physiology*, 2003, 132 (1):44–51. DOI:

- 10.1104/pp.102.019661.
- [22] SARKAR J, CHAKRABORTY B, CHAKRABORTY U. Plant growth promoting rhizobacteria protect wheat plants against temperature stress through antioxidant signalling and reducing chloroplast and membrane injury [J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2018, 37 (4):1396–1412. DOI: 10.1007/s00344–018–9789–8.
- [23] 马骢毓, 张英, 孙广正, 刘婷, 姚拓. 披碱草根际促生菌筛选及其接种剂的促生作用 [J]. 植物营养与肥料学报, 2016, 22 (4): 1039–1048. DOI: 10.11674/zwyf.15449.
- MA C Y, ZHANG Y, SUN G Z, LIU T, YAO T. Identification of plant growth promoting rhizobacteria *Elymus dahuricus* and their effectives [J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2016, 22 (4): 1039–1048. DOI: 10.11674/zwyf.15449.
- [24] 郭莹, 鞠天琛, 秦玉莹, 冷粟, 吴迪, 李明堂. 一株铜绿假单胞菌的溶磷特征及其对底泥中 Pb 的固定化 [J]. 吉林大学学报(理学版), 2016, 54 (6): 276–282. DOI: 10.13413/j.cnki.jdxbxb.2016.06.49.
- GUO Y, JU T C, QIN Y Y, LENG S, WU D, LI M T. Characteristics of phosphate solubilization of *Pseudomonas aeruginosa* and its immobilization of Pb in sediment [J]. *Journal of Jilin University (Science Edition)*, 2016, 54 (6): 276–282. DOI: 10.13413/j.cnki.jdxbxb.2016.06.49.
- [25] 孙珊, 黄星, 范宁杰, 冯昭中, 李会会, 李顺鹏. 一株溶磷细菌的分离、鉴定及其溶磷特性研究 [J]. 土壤学报, 2010, 42 (1):119–124. DOI: 10.13758/j.cnki.tr.2010.01.004.
- SUN S, HUANG X, FAN N J, FENG Z Z, LI H H, LI S P. Studies on phosphorus solubilizing activity of a strain isolated from crop rhizosphere [J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2010, 42 (1): 119–124. DOI: 10.13758/j.cnki.tr.2010.01.004.
- [26] 刘辉, 吴小芹, 任嘉红, 陈丹. 一株荧光假单胞菌的溶磷特性及其对杨树的促生效果 [J]. 林业科学, 2013, 49 (9):112–118. DOI: 10.11707/j.1001–7488.20130916.
- LIU H, WU X Q, REN J H, CHEN D. Phosphate-dissolving characteristics and growth promoting effect of *Pseudomonads fluorescent JW-JSI* on poplar seedlings [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2013, 49 (9): 112–118. DOI: 10.11707/j.1001–7488.20130916.
- [27] 吴海燕, 金荣德, 范伟, 胡会军, 孙甜田, 赵兰坡. 解磷巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 的溶磷机理探讨 [J]. 吉林农业大学学报, 2014 (2):171–175. DOI:10.13327/j.jjlau.2014.1713.
- WU H Y, JIN R D, FAN Z W, HU H J, SUN T T, ZHAO L P. Mechanism of solubilizing phosphate by *Bacillus megaterium* [J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2014 (2):171–175. DOI: 10.13327/j.jjlau.2014.1713.
- [28] 詹杨, 韩旭, 萧龙珍, 崔俊涛, 王呈玉. 溶磷放线菌研究进展 [J]. 广州化工, 2016, 44 (8): 8–9,23. DOI: 10.3969/j.issn1001–9677.2016.08.003.
- ZHAN Y, HAN X, XIAO L Z, CUI J T, WANG C Y. Research progress on phosphate-solubilizing actinomycetes [J]. *Guangzhou Chemical*, 2016, 44 (8): 8–9, 23. DOI: 10.3969/j.issn1001–9677.2016.08.003.
- [29] 王光华, 周德瑞, 杨谦, 周克琴, 赵英. 低分子量有机酸对磷矿粉的释磷效应 [J]. 农业环境科学学报, 2004, 23 (1): 80–84. DOI: 10.3321/j.issn:1672–2043.2004.01.019.
- WANG G H, ZHOU D R, YANG Q, ZHOU K Q, ZHAO Y. Effects of low-molecular-weight organic acids on release of phosphorus from rock phosphate [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2004, 23 (1): 80–84. DOI: 10.3321/j.issn:1672–2043.2004.01.019.
- [30] 章爱群, 贺立源, 赵会娥, 郭再华, 崔雪梅. 有机酸对土壤无机态磷转化和速效磷的影响 [J]. 生态学报, 2009, 29 (8):4061–4069. DOI: 10.3321/j.issn:1000–0933.2009.08.006.
- ZHANG A Q, HE L Y, ZHAO H E, GUO Z H, CUI X M. Effect of organic acids on inorganic phosphorus transformation in soils and its readily available phosphate [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29 (8):4061–4069. DOI: 10.3321/j.issn:1000–0933.2009.08.006.
- [31] JIMENEZ B, REBOLEIRO RIVAS P, GONZALEZ L J, PESCIAROLI C. Immobilization of *Delftia tsuruhatensis* in macro-porous cellulose and biodegradation of phenolic compounds in repeated batch processes [J]. *Journal of Biotechnology*, 2012,157 (1): 148–153. DOI: 10.1016/j.biotec.2011.09.026.
- [32] 万水霞, 王静, 李帆, 蒋光月, 徐文静, 刘祚军. 玉米根际高效溶磷菌的筛选、鉴定及促生效应研究 [J]. 生物技术通报, 2020,36 (5):98–103. DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2019–0678.
- WAN S X, WANG J, LI F, JIANG G Y, XU W J, LIU Z J. Screening and identification of phosphate solubilizing bacteria from maize rhizosphere soil and its growth promoting effect [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2020, 36 (5):98–103. DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2019–0678.
- [33] 乔策策, 王甜甜, 王若斐, 刘超, 高琦, 李荣. 高效溶磷菌的筛选及其促生效应研究 [J]. 南京农业大学学报, 2017 (4): 664–670. DOI: 10.7685/jnau.201606030.
- QIAO C C, WANG T T, WANG R F, LIU C, GAO Q, LI R. Screening phosphate solubilizing bacterial strains from maize rhizosphere and research on their plant growth promotion effect [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2017,40 (4):664–670. DOI: 10.7685/jnau.201606030.
- [34] 陈佳怡, 徐晶秀, 陈紫茵, 陈敏威, 徐迎微, 方勇. 两株根际高效溶磷菌的筛选、鉴定和溶磷特性 [J]. 草业科学, 2020, 37(10):1979–1985. CHEN J Y, XU J X, CHEN Z Y, CHEN M W, XU Y A, FANG Y. Screening, identification, and characteristics of two phosphate-solubilizing bacteria in the rhizosphere [J]. *Pratacultural Science*, 2020, 37 (10): 1979–1985. DOI: 10.11829/j.issn.1001–0629.2020–0158.

(责任编辑 邹移光)