

红壤溶磷菌的筛选及溶磷机制*

王 同^{1,2} 孔令雅¹ 焦加国¹ 刘满强¹ 胡 锋¹ 孙 波² 李辉信^{1†}

(1 南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095)

(2 国家红壤改良工程技术研究中心, 中国科学院红壤生态实验站, 江西鹰潭 335211)

摘要 采用以磷酸铝为磷源的蒙金娜(PVK)液体培养基研究了从红壤土中筛选出的 4 种溶磷菌的溶磷效果, 选出其中的优势菌株 B1, 并对其溶磷机理做出初步探讨。结果表明, 所筛选出的 4 株溶磷菌在液体培养条件下均有显著的溶磷效果, 其中菌株 B1 在培养 4 d 后有效溶磷量最大, 达到 292.8 mg L⁻¹。各处理培养液 pH 在培养期间均有显著下降, pH 从 7.0 下降至 3.2~4.7。高效液相色谱测定发现, 各菌株培养液中有机的种类与含量随培养时间变化而不同, 其中菌株 B1 主要分泌草酸和苹果酸, 培养 1 d 后有机酸总量可达到 5 mmol L⁻¹; 通过添加有机酸对磷酸铝活化的试验表明, 分泌有机酸溶磷仅是菌株 B1 溶磷机制之一, 可能还存在其他溶磷机制。菌株 B1 生长的适宜 pH 范围为 5~9, 最适培养温度为 30 ℃, 100 ml 三角瓶的最适装液量为 30~40 ml。经鉴定, 菌株 B1 与苏云金芽孢杆菌有 99.9% 的相似性。

关键词 溶磷菌; 液体培养; 有机酸; 溶磷机制; 菌种鉴定

中图分类号 S154.39 **文献标识码** A

土壤中 95% 以上的磷对植物是无效的, 无法被植物直接吸收利用^[1]。这就要求人们必须添加外源磷肥或有机肥才能提高土壤的磷素肥力状况, 而大量施入土壤中的磷肥又会被土壤里的金属阳离子固定而形成难溶性的磷酸盐, 移动性很差, 造成土壤磷素的累积^[2]。目前很多研究表明, 溶磷微生物的活动是溶解土壤中难溶性磷的一个有效途径^[3]。溶磷微生物不但能分解植物无效态磷, 还能分泌一些生长调节物质, 促进植物根系生长、增强植株的抗病能力^[4]。近年来, 从植物根际土壤中筛选出高效溶磷菌来活化土壤中难溶性磷成为提高土壤磷利用率的研究热点^[5]。

磷有效性低是限制红壤生产力最重要的因子之一^[6], 为了增加红壤的有效磷含量、满足植物生长所需, 需要人为地向红壤中投入大量的化肥、有机肥等^[7]。高效溶磷菌的筛选不但可以解决土壤磷素缺乏, 又能预防红壤退化和水源污染。戴沈燕等^[8]从江西鹰潭水稻土中分离得到一株高效溶磷菌 Y5, 其对磷酸钙的溶解量为 159.1 mg L⁻¹, 但对磷酸铝的溶解量很低; 刘文干等^[9]从江西红壤

实验站的花生植株根际土中筛选了一株高效溶磷菌 C5-A, 其对磷酸铝的溶解量达到 227.3 mg L⁻¹。目前对溶磷菌溶磷机理的研究侧重点也各有不同, 学者们发现不同的溶磷菌溶磷机理也各不相同。钟传青等^[10]研究认为溶磷菌 P17 的溶磷效果与其分泌的磷酸酶活性成正相关; Chen 等^[11]研究发现溶磷菌之所以溶磷是因为分泌了大量柠檬酸、草酸等溶磷高效有机酸; Yi 等^[12]在研究过程中发现溶磷菌株产生的胞外多糖能够显著增强菌株的溶磷作用。

目前国内针对红壤溶磷菌的研究还较少, 筛选出的菌株均为高效溶解钙磷, 无法为溶磷菌的实际应用提供参考。本研究首先对红壤高效溶磷菌进行筛选, 在此基础上研究了优势菌株可能的溶磷机制及最适生长条件。

1 材料与方 法

1.1 供试土壤与细菌培养基

本试验所用的土壤采自江西省红壤研究所(进

* 国家科技支撑计划项目(2009BAD6B03, 2011BAD41B01)资助

† 通讯作者, E-mail: huixinli@njau.edu.cn

作者简介: 王 同(1985—), 女, 江苏盐城人, 博士研究生, 主要从事土壤微生物生态的研究。E-mail: wtcu@163.com

收稿日期: 2013-02-25; 收到修改稿日期: 2013-11-26

贤县),该区位于中亚热带地区,气候温和、雨量充足、日照时间长、干湿季节明显,年均温 17.7 ~ 18.5℃。地形为典型低丘。母质类型属于第四纪红黏土发育形成的旱地红壤,肥力中等。土壤的基本理化性质为 pH 5.76,有机质 7.48 g kg⁻¹,全氮 0.87 g kg⁻¹,全磷 0.1 g kg⁻¹,有效磷 11.76 mg kg⁻¹。

细菌培养基采用常见的 LB 液体培养基,配方参考文献[13]。PVK 培养基(Pikovskaya's Medium):磷酸铝 5 g、蔗糖 10 g、硫酸铵 0.5 g、氯化钠 0.1 g、七水合硫酸镁 0.1 g、氯化钾 0.2 g、硫酸锰 0.03 g、七水合硫酸亚铁 0.03 g、酵母菌膏 0.5 g、琼脂 15 g、水 1 000 ml、pH 7.0 ~ 7.2。

1.2 溶磷微生物的培养与分离

选用稀释度为 10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 的土壤菌悬液均匀涂布于 PVK 平板上,于 28℃ 培养箱培养 4 d,根据生长情况和溶磷菌的大小进一步筛选优势菌落。用接种环取上述筛选出的菌落,用平板划线法将其分别培养于 PVK 培养基上,只有连续划线培养 3 次后仍能在 PVK 平板上生长的菌株才被视为有效溶磷菌,对其菌落要进一步纯化。

1.3 菌株溶磷能力的定量比较

将 40 ml 液体培养基(不加磷酸铝、琼脂,其余同 PVK 培养基配方)分装于 100 ml 三角瓶中,加 0.4 g 磷酸铝,1 × 10⁵ Pa,121℃ 条件下灭菌 30 min。分别接入筛选出的溶磷能力较好的 4 种菌株(编号为 B1、B2、B3、B4)制成的 1 ml 菌悬液(细胞生长量 OD₆₀₀ 均为 0.5),置于恒温摇床(180 r min⁻¹,28℃)培养 6 d,每 24 h 取一次样。将培养液过滤至清亮、测定滤液中的有效磷含量,同时以不接种细菌悬液为对照。试验设置 4 次重复。

1.4 不同有机酸与菌株 B1 溶磷能力的比较

根据之前液体培养试验的数据得出,菌株 B1 在溶磷过程中会产生大量的有机酸,其中以草酸和苹果酸的含量为最多,总量可达到 5 mmol L⁻¹,分别向上述液体培养基中加入 1 ml 草酸(5 mmol L⁻¹)、苹果酸(5 mmol L⁻¹)和两种酸混合液(草酸 0.5 mmol L⁻¹ + 苹果酸 4.5 mmol L⁻¹)(模拟菌株 B1 培养液中的草酸和苹果酸的浓度比例),与接种菌株 B1 的培养基一起恒温摇床(180 r min⁻¹,28℃)培养 4 d,测定培养液中有效磷含量,每个处理设置 4 次重复。

1.5 不同生长因素对菌株 B1 生长的影响

pH 对菌株生长的影响。以 0.5 为梯度,精确调节 LB 液体培养基的 pH 至 3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、

6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5; 1 × 10⁵ Pa,121℃ 条件下灭菌,接种 1 ml 菌液于恒温摇床(180 r min⁻¹,28℃)培养 1 d,测定细胞生长量(OD₆₀₀),确定菌株的最适生长 pH 范围。

温度对菌株生长的影响。在 100 ml 三角瓶中装入 40 ml LB 液体培养基,1 × 10⁵ Pa,121℃ 条件下灭菌;放置不同温度(20℃、25℃、30℃、35℃、40℃)摇床上培养 1 d,测定 OD₆₀₀。

装液量(通气量)对菌株生长的影响。在 100 ml 三角瓶中分别装入 10、15、20、25、30、35、40、45、50 和 60 ml LB 液体培养基,1 × 10⁵ Pa,121℃ 条件下灭菌,接种 1 ml 菌液于恒温摇床(180 r min⁻¹,28℃)培养 1 d,测定 OD₆₀₀。

1.6 菌株鉴定

菌株生理生化特性测定参考文献[13]。菌株分子鉴定:选取纯化培养的菌株 B1 单菌落,交由南京金斯瑞生物科技公司对其 16S rDNA 进行测序,利用 Blast 软件在 GenBank 中与其他 16S rDNA 序列进行同源性比较,选择菌株 B1 以及与 B1 相近的序列用 MEGA version 软件构建 B1 的 16S rDNA 系统进化树。

1.7 测定方法

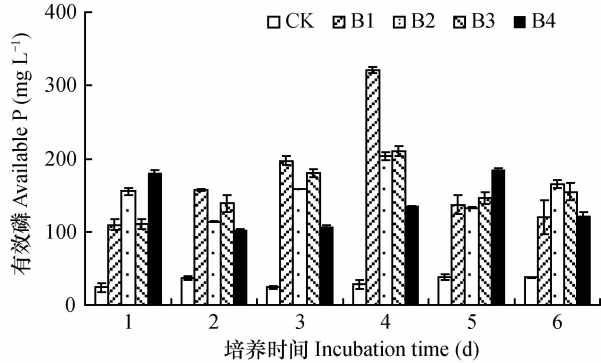
菌体量采用比浊法(600 nm)测定^[14]。培养液的酸度采用 pH 计测定。滤液中有效磷含量采用钼锑抗比色法测定^[15]。有机酸测定:培养液过 0.45 μm 无菌滤膜,用 HPLC(岛津—LC—10A)液相色谱仪测定溶液中有有机酸成分^[16]。色谱条件:分析柱 RP—ODS—C18,检测波长 214 nm,柱温 30℃,流动相为 0.01 mol L⁻¹ 磷酸二氢铵(pH 2.5),流速 1 ml min⁻¹。

2 结果与讨论

2.1 不同液体培养滤液中有效磷含量变化

许多研究报道液体培养基中接种溶磷菌可以明显地提高其有效磷含量^[17-19],但这些研究均是使用钙磷为唯一磷源。铝磷是我国南方广大红壤地区主要的土壤磷固定形态,本试验是以铝磷为唯一磷源,试验结果(图 1)显示,接种溶磷菌的处理在培养 1 d 后,其培养液有效磷含量就显著高于对照处理,并在整个培养过程中一直保持显著差异水平($p < 0.05$,下同);培养 4 d 后,各处理间的溶磷差异水平达到极显著($p < 0.01$),其中菌株 B1 的有效溶磷量最大,达到 292.8 mg L⁻¹。其中,接种菌株 B1、

B2、B3 处理的有效磷含量变化趋势均是先增加后减少,这与前人的研究结果相吻合^[20-21],且均在培养 4 d 后达到最大值。



注 Note: CK: 空白对照 Control; B1: 添加B1菌悬液 With B1 added; B2: 添加B2菌悬液 With B2 added; B3: 添加B3菌悬液 With B3 added; B4: 添加B4菌悬液 With B4 added. 误差线以标准误差表示 ($n=4$) Error bars represent standard deviations ($n=4$)

图 1 液体培养条件下菌株溶磷能力的比较

Fig. 1 Comparison between strains in phosphorus solubilizing capacity under the same incubation conditions

2.2 不同液体培养滤液中 pH 的变化

林启美等^[22]发现具有溶磷能力的细菌,在培养期间,培养介质的酸度一般均会降低;不具有溶磷能力的微生物,其培养介质的 pH 不仅不降低,反而升高,但是,培养介质的 pH 与溶磷量之间并不存在显著的相关性。这与本试验得出的结论相一致。朱颖等^[23]研究发现培养液中有效磷增量与培养液 pH 关系较为密切,说明培养介质的酸度对溶解难溶性磷比较重要。在本试验中,接种菌株处理的培养液 pH 在培养过程中与对照相比均出现显著的下降,结果如表 1。培养 1 d 后,除菌株 B1 处理外其余接菌处理的培养液 pH 均显著低于对照处理;各接菌处理的培养液 pH 在培养 3~4 d 后达到最低值,而后趋于平稳,这与培养液中有效磷含量的变化趋势比较吻合。溶磷微生物在发挥其溶磷作用时可能会分泌出某些酸性物质导致培养液 pH 的下降。由此可以看出,溶磷必然伴随着培养液 pH 的下降,但培养液 pH 下降的程度却与溶磷量的多少没有明显的数量关系。

表 1 不同培养液中 pH 的变化

Table 1 Variation of pH in the different culture medium

处理 Treatments	培养时间 Incubation time					
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d
CK	5.13 ± 0.01d	5.33 ± 0.02f	4.79 ± 0.00e	4.62 ± 0.00f	4.78 ± 0.01f	4.73 ± 0.04e
B1	5.18 ± 0.07d	4.14 ± 0.14d	3.30 ± 0.01b	3.38 ± 0.01d	4.00 ± 0.00e	3.48 ± 0.01c
B2	4.84 ± 0.01c	4.52 ± 0.01e	3.94 ± 0.02d	3.71 ± 0.03e	3.64 ± 0.08d	3.66 ± 0.03d
B3	4.77 ± 0.04c	3.85 ± 0.05c	3.50 ± 0.04c	3.06 ± 0.02a	3.09 ± 0.01a	3.22 ± 0.01a
B4	4.28 ± 0.04b	3.94 ± 0.02c	3.29 ± 0.01b	3.33 ± 0.01c	3.37 ± 0.01c	3.34 ± 0.01b

注 Note: CK: 空白对照 Control; B1: 添加 B1 菌悬液 With B1 added; B2: 添加 B2 菌悬液 With B2 added; B3: 添加 B3 菌悬液 With B3 added; B4: 添加 B4 菌悬液 With B4 added. a、b、c、d 表示同一培养时间内处理间差异达显著水平 ($p < 0.05$; Duncan 检验) Different letter denoted statistical difference between treatments the same in duration of incubation according to Duncan's test ($p < 0.05$)

2.3 不同液体培养滤液中有机酸的组成与含量变化

溶磷菌在溶磷过程中或多或少地均会分泌出有机酸,不同溶磷菌分泌有机酸的种类和数量差异明显^[24-25]。本试验筛选分离出的溶磷菌在溶解磷酸铝的过程中,分泌的有机酸以草酸和苹果酸为主,在培养过程中每天均能检测到,很多研究发现草酸(葡萄糖酸)是大多数溶磷菌产生的最主要的有机酸,此外还包含一些苹果酸、乙酸、柠檬酸等^[26-27]。其中,在菌株 B2 和 B3 的培养液中还能检测到甲酸、乙酸和柠檬酸。虞伟斌等^[28]在研究菌株 K3 的溶磷机理时发现菌株分泌的有机酸有草酸、苹

果酸和乳酸,其中苹果酸的浓度在培养 1 d 后达到最大值。在菌株 B2 的培养液中,乙酸在第二天开始分泌,且分泌量最多;而在菌株 B3 培养液中柠檬酸的分泌量仅次于苹果酸,但同样的柠檬酸也是从培养第二天才开始分泌。菌株 B4 培养液中有有机酸的量到培养后期才逐渐增大,与菌株 B1 相似,分泌的有机酸量为苹果酸 > 草酸。总有机酸量最大的菌株其有效磷增量并不是最大,反之亦然,两者之间并无相关性,这与 Scervino 等^[29]的研究结果相同。说明菌株分泌有机酸的能力并不能完全反映出菌株的溶磷效果。

表 2 培养液中有有机酸组成及含量

Table 2 Types and quantities of organic acids in the different culture medium (mg L⁻¹)

菌株 Strain	产酸类型 Organic acid type	培养时间 Incubation time					
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d
B1	草酸 Oxalic acid	50.28	21.88	20.06	20.46	1.13	3.21
	苹果酸 Malic acid	465.89	250.43	266.96	30.70	50.08	36.82
	总量 Total	516.17	272.31	287.02	51.16	51.21	40.03
B2	草酸 Oxalic acid	14.98	21.57	14.15	7.43	7.20	11.53
	柠檬酸 Citric acid	0.19	0.15	0.17	0.18	0.17	0.18
	乙酸 Acetic acid	—	90.03	59.58	80.11	82.41	74.91
	总量 Total	15.17	111.86	73.90	87.98	90.00	86.88
B3	草酸 Oxalic acid	51.11	59.40	42.91	51.90	60.59	62.25
	苹果酸 Malic acid	38.84	513.00	407.82	328.12	353.68	338.23
	柠檬酸 Citric acid	—	198.37	34.22	5.58	18.83	—
	甲酸 Formic acid	—	—	—	0.18	0.21	0.19
	总量 Total	89.95	770.77	484.95	385.78	433.31	400.67
B4	草酸 Oxalic acid	6.07	7.71	12.20	15.15	36.62	13.13
	苹果酸 Malic acid	8.76	6.67	18.15	45.27	55.91	75.41
	总量 Total	14.83	14.38	30.56	60.42	92.53	88.54

注：“—”代表未检测到 Note：“—” represents that no organic acid was detected

2.4 菌株 B1 与不同有机酸溶磷能力的比较

由表 3 可以看出,在所添加的两种有机酸中,苹果酸对磷酸铝的活化能力最弱,溶磷量只有 150.8 mg L⁻¹,菌株 B1 对磷酸铝的溶解能力要显著高于草酸和苹果酸对磷酸铝的活化能力。同样浓度的有机酸混合液的溶磷量也要显著低于菌株 B1 的溶磷量。由此可以说明分泌有机酸溶磷是菌株 B1 溶磷的主要机理。Goldstein^[30] 研究认为分泌葡萄糖酸是很多革兰氏阴性溶磷菌的主要溶磷机制。Chen 等^[11] 发现分泌有机酸是所筛选溶磷菌的主要溶磷机理,有机酸能够与溶液中的金属阳离子相螯合促使磷酸根离子的释放,也有小部分溶磷菌未分泌有机酸,但仍然能够溶磷;Yi 等^[12] 研究发现溶磷菌的胞外多糖能够影响有机酸对磷酸钙的活化动态平衡,可以促进磷酸钙的溶解。对于菌株 B1 存在的其他溶磷机制还需进一步研究。

2.5 不同生长因素对菌株 B1 生长的影响

溶磷微生物能够通过自身代谢来促进难溶性磷的溶解,将其转化为植物有效态磷,这样可达到降低肥料成本,修复生态环境和提高作物产量的目的^[31]。有学者指出,微生物的溶磷能力主要受自身遗传特性的影响,其生长的环境因素也会影响到菌株的溶磷能力^[32]。若环境条件适宜,微生物能够维持正常的代谢、生长和繁殖;若环境条件不适宜,会严重影响到微生物的代谢活动,导致生长受抑,甚至

表 3 菌株 B1 与不同有机酸溶磷能力的比较

Table 3 Comparison between strain B1 and organic acids in phosphorus solubilizing effect

处理 Treatments	溶磷量	
	Solubilized P (mg L ⁻¹)	pH
草酸 Oxalic acid	170.8 ± 7.2a	3.40 ± 0.02a
苹果酸 Malic acid	150.8 ± 6.4a	3.54 ± 0.26a
草酸 + 苹果酸 Oxalic acid + Malic acid	158.5 ± 6.7a	3.47 ± 0.28a
B1	292.8 ± 11.6b	3.36 ± 0.20a

注:表中 a、b 表示同一培养时间内处理间差异达显著水平 ($p < 0.05$; Duncan 检验) Note: Different letters denote statistical difference between treatments, the same in incubation time according to Duncan's test ($p < 0.05$)

死亡^[33]。从图 2 可以看出,菌株 B1 对培养介质的 pH 有着较广的适应范围。其中最适合菌株 B1 生长的 pH 为 5.0,在 pH 5.5 ~ 9.0 范围内培养介质 pH 对菌株 B1 生长影响不显著。菌株 B1 在 30 °C 左右时菌体生长量最高,当培养温度超过 35 °C 时,高温会明显地抑制菌株 B1 的生长。在 100 ml 三角瓶中最适合菌株 B1 生长的装液量范围为 30 ~ 40 ml。当装液量低于 20 ml 时,菌株生长会受到一定的抑制,其原因可能是分子氧的毒害作用。过多的氧气供应容易导致大量超氧阴离子自由基 (O_2^-) 的

产生,机体内的超氧化物歧化酶和过氧化氢酶不能及时地还原超氧阴离子自由基,其结果导致细胞内各种重要生物高分子和膜的破坏,使种群生长量受到抑制^[34]。

2.6 菌种鉴定

观察 PVK 培养基,发现菌株 B1 的直径较大,呈白色、圆形、不透明、湿润无光泽、菌落隆起(如图 3)。菌株 B1 的一些生理生化特性详见表 4。

根据南京金斯瑞生物科技公司给出的 16S rDNA 的测序结果,发现菌株 B1 与芽孢杆菌属有密切的序列同源性,选择菌株 B1 以及与 B1 相近的序列构建 B1 的 16S rDNA 系统进化树。根据基因序列的系统发育分析再结合生理生化特征结果发现菌株 B1 与苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)有 99.9% 的相似性。

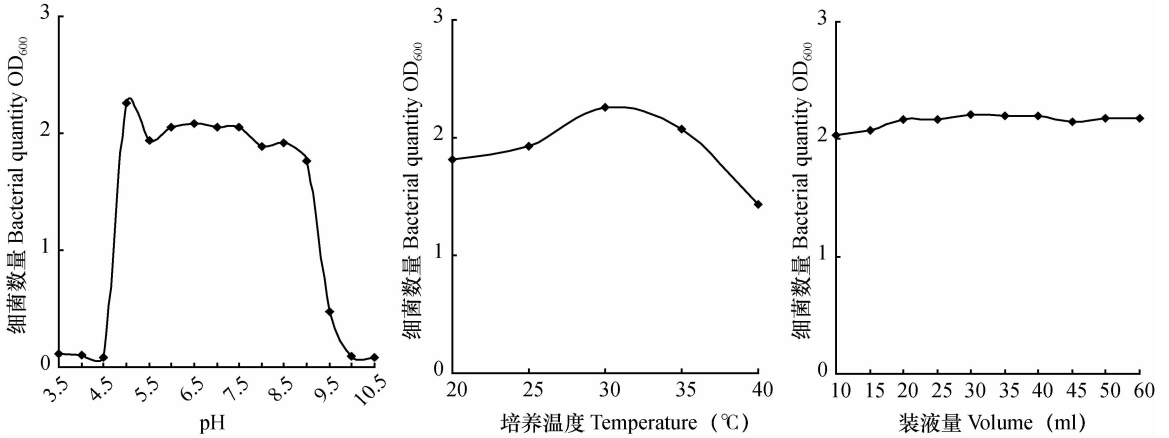


图 2 不同生长因素对菌株 B1 生长的影响

Fig. 2 Effects of different factors on growth of strain B1 in liquid medium

表 4 菌株 B1 的生理生化特性

Table 4 Physiological and biochemical properties of strain B1

菌株 Strain	G 染色 Gram staining	VP 反应 VP test	甲基红 M. R test	淀粉 水解 Amylolysis	明胶 水解 Gelatin hydrolysis	精氨酸脱羧酶 Arginine decarboxylase	卵磷 脂酶 Lecithase	蔗糖 Sucrose	甘露糖 Manose
B1	+	+	+	+	+	+	+	+	-

注:“+”表示呈阳性反应,“-”表示呈阴性反应 Note:“+”represented test positive;“-”represented test negative

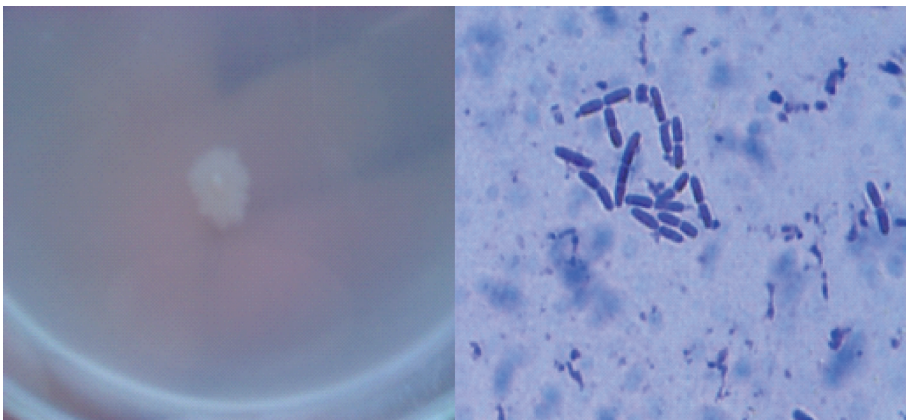


图 3 菌株 B1 的形态特征

Fig. 3 Morphological features of strain B1

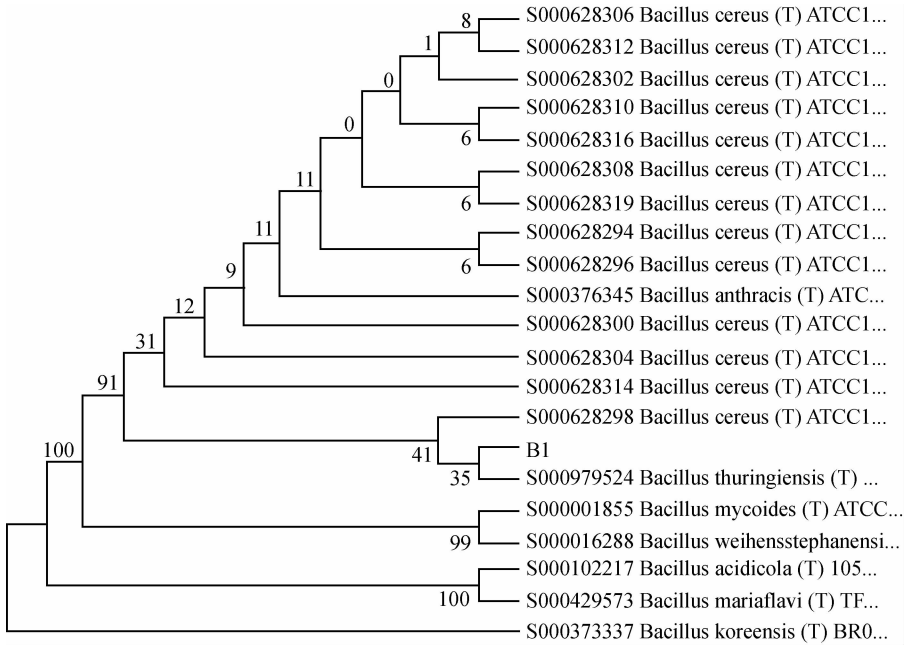


图 4 基于 16S rDNA 序列的菌株 B1 系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA gene sequences of strain B1

3 结 论

从红壤茶园土中筛选出的 4 株溶磷菌在液体培养条件下对磷酸铝均有很好的溶解作用,其中优势菌株 B1 最大溶磷量为 292.8 mg L^{-1} ,在培养过程中能够产生草酸和苹果酸,并且发现等量的草酸和苹果酸以及二者的混合液对磷酸铝的活化能力远低于菌株 B1 的溶磷能力,由此推断溶磷菌 B1 还存在其他的溶磷机制。菌株 B1 的适宜 pH 范围为 5~9,最适培养温度为 $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$,100 ml 三角瓶的最适装液量为 30~40 ml。经鉴定,菌株 B1 与苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 有 99.9% 的相似性。

参 考 文 献

- [1] 赵小蓉,林启美. 微生物解磷的研究进展. 土壤肥料,2001,5(3):7—11. Zhao X R, Lin Q M. A review of phosphate-dissolving microorganisms (In Chinese). Soil Fertilizer, 2001, 5 (3) : 7—11
- [2] Yadav K S, Dadarwal K R. Phosphate solubilization and mobilization through soil microorganisms//Dadarwal K R. Biotechnological approaches in soil microorganisms for sustainable crop production. Jodhpur: Scientific Publishers, 1997: 293—308
- [3] Zhu F L, Qu L Y, Hong X G, et al. Isolation and characterization of a phosphate-solubilizing halophilic bacterium *kushneria* sp. YC-WA18 from daqiao saltern on the coast of Yellow Sea of China. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2011,

2011;6

- [4] 赵建宁,沈其荣,冉炜. 太湖地区侧渗水稻土连续施磷处理下稻田磷的径流损失. 农村生态环境, 2005, 21 (3) : 29—33. Zhao J N, Shen Q R, Ran W. Phosphorus loss with runoff from a side bleaching paddy soil under continual P application in Taihu Lake region (In Chinese). Rural Eco-Environment, 2005, 21 (3) : 29—33
- [5] 冯宏,李永涛,张志红,等. 类芦根际溶磷真菌的筛选、鉴定及其溶磷能力分析. 微生物学通报, 2010, 37 (5) : 677—681. Feng H, Li Y T, Zhang Z H, et al. Screening, identification, and capability assessment of a phosphorus solubilizing fungus in rhizosphere of burma reed (In Chinese). Microbiology China, 2010, 37 (5) : 677—681
- [6] 李杰,石元亮,陈智文. 我国南方红壤磷素研究概况. 土壤通报, 2011, 42 (3) : 763—768. Li J, Shi Y L, Chen Z W. Research on phosphorus in southern red soils of China (In Chinese). Chinese Journal of Soil Science, 2011, 42 (3) : 763—768
- [7] 陈国潮,何振立,黄昌勇. 菜茶园红壤微生物量磷与土壤磷以及磷植物有效性之间的关系研究. 土壤学报, 2001, 38 (1) : 75—80. Chen G C, He Z L, Huang C Y. Study on relationships among microbial biomass P, soil P and plant availability of P in red soils (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2001, 38 (1) : 75—80
- [8] 戴沈艳,贺云举,申卫收,等. 一株高效解磷细菌的紫外诱变选育及其在红壤稻田施用效果. 生态环境学报, 2010, 19 (7) : 1646—1652. Dai S Y, He Y J, Shen W S, et al. Mutagenesis of a phosphate dissolving bacterial strain by UV and its application to rice cultivation in red soil (In Chinese). Ecology and Environmental Sciences, 2010, 19 (7) : 1646—1652

- [9] 刘文干,何园球,张坤,等. 一株红壤溶磷菌的分离、鉴定及溶磷特性. 微生物学报,2012,52(3):326—333. Liu W G, He Y Q, Zhang K, et al. Isolation, identification and characterization of a strain of phosphate-solubilizing bacteria from red soil (In Chinese). Acta Microbiologica Sinica,2012,52(3):326—333
- [10] 钟传青,黄为一. 磷细菌 P17 对不同来源磷矿粉的溶磷作用及机制. 土壤学报,2004,41(6):931—937. Zhong C Q, Huang W Y. Effects and mechanism of P-solubilizing bacillus P17 strain on phosphorus solubilization of different phosphate rocks (In Chinese). Acta Pedologica Sinica,2004,41(6):931—937
- [11] Chen Y P, Rekha P D, Arun A B, et al. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. Applied Soil Ecology,2006,34:33—41
- [12] Yi Y M, Huang W Y, Ge Y. Exopolysaccharide: A novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24: 1059—1065
- [13] Breed. 伯杰细菌鉴定手册. 第 7 版. 北京:科学出版社,1984:152—160. Breed. Bergey's manual of determinative bacteriology (In Chinese). 7th ed. Beijing: Science Press, 1984: 152—160
- [14] 严益民. 比浊法在测定发酵液菌体浓度中的应用. 抚顺石油学院学报,2001,21(1):23—26. Yan Y M. Application of nephelometry on determining the cell concentration in fermentation liquid (In Chinese). Journal of Fushun Petroleum Institute, 2001,21(1):23—26
- [15] 梁运江,谢修鸿,许广波,等. 磷钼蓝比色法合适工作波长及线性范围的探讨. 中国环境监测,2007,23(1):35—37. Liang Y J, Xie X H, Xu G B, et al. Studied on proper wavelength and linear range in the colorimetry of phospho molybdenum blue (In Chinese). Environmental Monitoring in China, 2007, 23(1): 35—37
- [16] 易艳梅. 细菌溶磷作用及其对磷矿粉重金属释放和小麦盐胁迫的缓解. 南京:南京农业大学生命科学院,2008. Yi Y M. Dissolving phosphorus, releasing heavy metals from phosphate rock and alleviating wheat salt-stress by phosphate solubilizing bacteria (In Chinese). Nanjing: College of Life Science, Nanjing Agricultural University, 2008
- [17] Park K H, Lee O M, Jung H I, et al. Rapid solubilization of insoluble phosphate by a novel environmental stress-tolerant *Burkholderia vietnamiensis* M6 isolated from ginseng rhizosphere soil. Applied Microbiology & Biotechnology, 2010, 86: 947—955
- [18] 张宝贵,李贵桐. 土壤生物在土壤磷有效化中的作用. 土壤学报,1998,35(1):102—111. Zhang B G, Li G T. Roles of soil organisms on the enhancement of plant availability of soil phosphorus (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 1998, 35(1): 102—111
- [19] 杜春梅,金术超,平文祥,等. 几株侧孢芽孢杆菌解磷能力的研究. 生物技术,2005,15(3):64—67. Du C M, Jin S C, Ping W X, et al. Studies on the capacity of *Bacillus Laterosporus* in dissolving phosphorus (In Chinese). Biotechnology, 2005, 15(3):64—67
- [20] Elizabeth P, Miguel S, María M, et al. Isolation and characterization of mineral phosphate solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. Soil Biology & Biochemistry, 2007, 39: 2905—2914
- [21] Mounira B F, Ameny F, Wacim B, et al. Characterization of the mineral phosphate solubilizing activity of *Serratia marcescens* CTM 50650 isolated from the phosphate mine of Gafsa. Archives of Microbiology, 2009, 191: 815—824
- [22] 林启美,赵小蓉,孙众鑫,等. 四种不同生态环境土壤中解磷细菌的数量及种群分布. 土壤与环境,2000,9(1):34—37. Lin Q M, Zhao X R, Sun Z X, et al. Community characters of soil phosphobacteria in four ecosystems (In Chinese). Soil and Environmental Sciences, 2000, 9(1): 34—37
- [23] 朱颖,姚拓,李玉娥,等. 红三叶根际溶磷菌分离及其溶磷机制初探. 草地学报,2009,17(2):259—263. Zhu Y, Yao T, Li Y E, et al. Screening of phosphate-solubilizing bacteria and their acting mechanisms in the rhizosphere of red clover (In Chinese). Acta Agretia Sinica, 2009, 17(2): 259—263
- [24] Lu L L, Shu Y Q. Effect of different carbon sources on phosphate-solubilizing fungi isolated from phosphate mines. International Conference on Computer Distributed Control and Intelligent Environmental Monitoring, 2011: 1124—1127
- [25] Vassilev N, Massimiliano F, Federico F. Rock phosphate solubilization with gluconic acid produced by immobilized *Penicillium variable* P16. Bioresource Technology, 1996, 10(8): 585—588
- [26] Hwangbo H, Park R D, Kim Y W, et al. 2-Ketogluconic acid production and phosphate solubilization by *Enterobacter intermedi-um*. Current Microbiology, 2003, 47(2): 87—92
- [27] Patel D K, Archana G, Kumar G N. Variation in the nature of organic acid secretion and mineral phosphate solubilization by *Citrobacter* sp. DHRSS in the presence of different sugars. Current Microbiology, 2008, 56(2): 168—174
- [28] 虞伟斌,杨兴明,沈其荣,等. K3 解磷菌的解磷机理及其对缓冲容量的响应. 植物营养与肥料学报,2010,16(2):354—361. Yu W B, Yang X M, Shen Q R, et al. Mechanism on phosphate solubilization of *Pseudomonas* sp. K₃ and its phosphate solubilization ability under buffering condition (In Chinese). Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2010, 16(2): 354—361
- [29] Scervino J M, Papinutti V L, Godoy M S, et al. Medium pH, carbon and nitrogen concentrations modulate the phosphate solubilization efficiency of *Penicillium purpurogenum* through organic acid production. Journal of Applied Microbiology, 2011, 110(5): 1215—1223
- [30] Goldstein A H. Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous phosphates by Gram-negative bacteria. Washington, DC: ASM Press, 1996: 197—203
- [31] 张毅民,孙亚凯,吕学斌,等. 高效溶磷菌株 Bmp5 筛选及活力和培养条件的研究. 华南农业大学学报,2006,27(3):61—65. Zhang Y M, Sun Y K, Lü X B, et al. Isolation of the high efficiency phosphate solubilization bacterium Bmp5 and its activity and culture conditions (In Chinese). Journal of South China Agricultural University, 2006, 27(3): 61—65
- [32] 冯瑞章,姚拓,周万海,等. 不同生存环境和磷酸盐对四株溶磷菌溶磷能力的影响. 应用与环境生物学报,2009,15(6):

856—860. Feng R Z, Yao T, Zhou W H, et al. Effects of different habitats and insoluble phosphates on phosphate solubilizing activity of four phosphate solubilizing bacteria (In Chinese). Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2009, 15 (6): 856—860

- [33] 梁艳琼, 雷照鸣, 贺春萍, 等. 解磷菌株黑曲霉 PSFM 发酵条件优化研究. 南方农业学报, 2011, 42(3): 240—245. Liang Y Q, Lei Z M, He C P, et al. Optimization of fermentation condition

for phosphate solubilizing fungi (*Aspergillus niger*) (In Chinese). Journal of Southern Agriculture, 2011, 42(3): 240—245

- [34] 黄伟, 黄欠如, 胡锋, 等. 红壤溶磷菌的筛选及溶磷能力的比较. 生态与农村环境学报, 2006, 22(3): 37—40. Huang W, Huang Q R, Hu F, et al. Screening and comparing of phosphorus solubilizing bacteria in red soil (In Chinese). Journal of Ecology and Rural Environment, 2006, 22(3): 37—40

SCREEING OF PHOSPHATE-SOLUBILIZING BACTERIA IN RED SOIL AND THEIR ACTING MECHANISMS

Wang Tong^{1,2} Kong Lingya¹ Jiao Jiaguo¹ Liu Manqiang¹ Hu Feng¹ Sun Bo² Li Huixin^{1†}

(1 College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

(2 National Engineering Research and Technology Center for Red Soil Improvement, Red Soil Ecological Experiment Station, Chinese Academy of Sciences, Yingtan, Jiangxi 335211, China)

Abstract Phosphorus solubilizing effects of four strains of phosphorus solubilizing bacteria (PSB) screened out of the red soil in Jiangxi Province were studied and compared through incubation in PVK solution containing AlPO_4 as phosphorus source. Results show that all the four strains displayed significant phosphorus solubilizing effects in the solution. Among the four, Strain B1 was the most effective in dissolving phosphorus. After four days of incubation, it dissolved 292.8 mg L^{-1} phosphorus. Solution pH in all the treatments decreased to a varying extent from pH 7.0 to pH 3.2 ~ 4.7, during the incubation period. HPLC analysis shows that the presence of organic acids, varying in type and amount with the time of incubation, in the culture medium of all the strains. Oxalic acid and malic acid were found to be the dominant organic acids in the culture medium of strain B1 and reached 5 mmol L^{-1} in total concentration after 1 day of incubation. The experiment of adding organic acids to activate AlPO_4 indicates that B1 secreting organic acids to dissolve phosphorus is only one of the mechanisms of its phosphorus solubilizing capability. It was found that B1 favored a solution with pH varying between 5 and 9 and incubation under 30°C and for a triangular flask (100 ml), the most suitable content of medium was 30 ~ 40 ml. Identification of strain B1 shows that the strain is 99.9% in similarity to *Bacillus thuringiensis* in 16S rDNA genes.

Key words Phosphate-solubilizing bacteria; Liquid culture; Organic acids; Phosphate-solubilizing mechanism; Strain identification

(责任编辑: 檀满枝)