

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2020.04.011

杉木人工林土壤溶磷细菌筛选及培养条件优化

韦宜慧, 陈嘉琪, 董玉红, 厚凌宇, 焦如珍*

(中国林业科学研究院林业研究所, 林木遗传育种国家重点实验室, 北京 100091)

摘要: [目的] 从红壤区杉木人工林土壤中, 筛选出具有高效溶磷能力的菌株及优化其培养条件。[方法] 通过 Pikovskava (PVK) 无机磷培养基分离、筛选溶磷细菌, 通过生理生化试验 16SrDNA 基因序列分析对溶磷能力强的菌株进行鉴定; 采用单因素试验, 比较菌株在不同培养时间、培养初始 pH、培养温度、接种量、碳源、氮源、磷源条件下的溶磷能力; 采用正交试验进行菌株培养条件优化。[结果] 筛选出 13 株具有溶磷能力的细菌, 其中 P5 的溶磷能力最强, 在 PVK 培养基中溶解磷含量为 $196.61 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。根据其生理生化特性和 16SrDNA 基因序列分析, 该细菌鉴定为 *Burkholderia ubonensis*。单因素试验表明菌株较耐高温, 耐低 pH, 正交试验结果显示 P5 溶磷效果最佳培养基组合和培养条件为 2.0% (w/v) 蔗糖, 0.2% (w/v) 氯化铵, 初始 pH 为 5.5, 培养温度为 30℃。在最佳条件下培养基有效磷含量为 $268.69 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 约为 PVK 培养基的 1.4 倍。[结论] 菌株 P5 耐高温、低 pH, 溶磷能力较强, 在微生物肥料的开发利用及在环境胁迫土壤中具有应用潜力。

关键词: 杉木人工林; 溶磷细菌; 培养条件; 优化

中图分类号: S714.3

文献标志码: A

文章编号: 1001-1498(2020)04-0083-09

磷是植物生长和发育的重要营养元素之一, 参与植物的重要代谢途径, 如光合作用, 养分吸收及细胞分裂^[1-2]。然而土壤中的磷大部分是难以利用的难溶性磷酸盐, 可被植物直接吸收利用的水溶态磷含量低, 土壤磷利用率通常只有 10%~15%, 少部分植物利用率达到 25%^[3-4]。因此, 磷常常成为限制植物生产力的主要因素之一。杉木是我国南方特有的速生用材树种, 木材产量超过了全国商品用材的四分之一^[5]。然而南方地区淋溶强烈, 土壤富含铝离子和铁离子, 磷极易被固定, 土壤磷利用率极低, 严重制约了杉木人工林可持续发展^[6]。因此, 越来越多的研究已经转向土壤磷可持续利用。众多研究发现, 土壤中存在大量具有溶磷能力的微生物, 这些微生物通过自身代谢作用, 将土壤中的难溶性磷酸盐转化为植物可吸收利用的水溶性磷^[7-9]。开发利用溶磷微生物, 提高土壤磷利用率, 已经成

为当前研究热点。目前大多数报道的溶磷微生物菌分离自农作物, Mukhtar^[10] 等从甘蔗根际分离出 2 株高效溶磷细菌, 均属芽孢杆菌属 (*Bacillus*), Zhao 等^[11] 从玉米根际筛选到 1 株耐盐的洋葱伯克氏菌 (*Burkholderia cepacia*)。

红壤是我国杉木种植区主要土壤类型之一, 具有“酸”、“粘”、“瘦”的特点, 土壤磷素有效性低, 严重制约着杉木生产力的提高^[12]。本研究从红壤地区杉木人工林土壤分离筛选溶磷细菌, 通过生理生化和 16SrDNA 基因序列确定其分类地位, 运用单因素试验和正交试验优化培养条件, 为杉木菌肥的开发利用提供高效溶磷菌株。

1 材料与方法

1.1 菌株的分离与筛选

土壤样品采自江西省大岗山山下林场 (27°36' N,

收稿日期: 2019-10-16 修回日期: 2020-03-09

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (CAFYBB018SY001); 国家重点研发计划项目 (2016YFD0600300)

* 通讯作者: 焦如珍, Email: jiaorz@163.com

114°24' E) 18年生杉木人工林, 该区域属于低山丘陵地貌, 海拔 220~300 m, 土壤类型为红壤。通过 S 形采样法在样地内布设 7 个采样点, 用土钻钻取 0~20 cm 土壤, 将 7 个采样点土壤混合装入灭菌袋后立即带回实验室, 4℃ 保存。称取 10 g 新鲜土样, 置于装有 90 mL 无菌水的三角瓶中, 振荡 30 min。将土壤悬浮液连续稀释 10 倍至 10^{-4} , 取 0.05 mL 稀释度为 10^{-3} 、 10^{-4} 土壤悬浮液涂布于 Pikovskaya(PVK)^[13] 琼脂平板上, 28℃ 培养 5~7 d, 检查平板是否存在产生透明晕圈的菌落。挑取溶磷圈明显的菌落, 用连续划线法进一步纯化。

采用钼锑抗比色法^[14]对菌株溶磷能力进行测定: 在 250 mL 三角瓶中加入 100 mL PVK 液体培养基(磷酸钙灭菌后加入), 接入 1 mL 培养过夜的菌液, 置于恒温摇床中 28℃, 180 r·min⁻¹ 培养 7 d 后测定菌株溶磷能力。

1.2 形态观察及菌株鉴定

根据伯杰细菌鉴定手册, 研究菌株的生理生化特性。采用试剂盒法提取细菌基因组 DNA, PCR 扩增后进行 16SrDNA 测序。扩增引物为: 27F: 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3'; 1492R: 5'TACGGCTACCTTGTACGACTT3', 扩增体系参考刘彩霞的方法^[15]。测序结果在 GenBank 中进行比对, 运用 MEGA7 构建系统发育树确定菌株分类地位。

1.3 菌株培养条件优化

1.3.1 单因素试验 根据溶磷能力测定的结果, 选择溶磷能力强的菌株进行溶磷培养条件优化。为了验证菌株的溶磷能力, 所有培养过程均采用 PVK 培养基。影响菌株溶磷能力的因素主要有培养时间、培养初始 pH、培养温度、接种量、碳源、氮源、磷源。通过单因素试验, 培养时间设置为 24、48、72、96、120、144、168 h; 培养基 pH 设置为 4、5、6、7、8、9、10; 培养温度设置为 10、15、20、25、30、35、40℃; 接种量设置为 0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4%。分别以 1%(w/v)、0.05%(w/v)、0.5%(w/v) 的浓度提供不同碳源(葡萄糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇、可溶性淀粉)、氮源(硫酸铵、硝酸钾、氯化铵、尿素、蛋白胨、酵母浸粉)、磷源(磷酸钙、磷酸铁、磷酸铝)。接种后置于恒温摇床中 28℃, 180 r·min⁻¹ 培养 7 d, 测定培养基中菌株生长量、有效磷含量, 以未接种 PVK 液体培养基为对照。菌株生长量通过测定培养液在波长 600 nm 时的光密度

值表示(OD600)。有效磷含量采用钼锑抗比色法测定。

1.3.2 正交试验 根据单因素试验的结果, 设计了蔗糖(2.0%, 2.5%, 3.0%), 氯化铵(0.1%, 0.15%, 0.2%), pH(5, 5.5, 6), 温度(25℃, 30℃, 35℃)四因素三水平的正交试验对溶磷条件进行优化。选用 L₉(3⁴) 正交表, 因素水平见表 1。

表 1 L₉(3⁴) 正交试验因素水平

Table 1 Factors and levels employed in orthogonal test

水平 Level	因素 Factor			
	A 蔗糖/% Sucrose	B 氯化铵/% Ammonium chloride	C pH	D 温度/℃ Temperature
1	2.0	0.10	5.0	25
2	2.5	0.15	5.5	30
3	3.0	0.20	6.0	35

1.4 数据分析

数据分析采用 SPSS20.0 软件进行方差分析(ANOVA)。

2 结果与分析

2.1 溶磷能力测定

利用 PVK 平板分离杉木人工林土壤中的溶磷细菌, 经过多次纯化得到 13 株具有明显溶磷圈的细菌。各菌株溶磷能力如表 2 所示, 培养液中有效磷含量在 21.61~195.61 mg·L⁻¹ 之间, 有效磷含量最高的是 P5(195.61 mg·L⁻¹)。因此, 选择 P5 作为后续研究供试菌株。

2.2 菌株生理生化鉴定及 16SrDNA 序列分析

革兰氏染色试验表明菌株 P5 为革兰氏阴性菌, 在 PVK 琼脂平板上 28℃ 培养 3 d 后的菌落形态为圆形, 边缘整齐, 白色不透明且表面光滑湿润, 具有明显溶磷圈。以下生理生化试验为阳性: 硝酸盐还原试验, 葡萄糖试验, 阿拉伯糖试验, 甘露醇试验以及柠檬酸盐试验。以下生理生化试验为阴性: 甲基红试验, 氧化酶/VP 试验, 硫化氢试验, 明胶水解试验及丙二酸盐试验。

将菌株 P5 16SrDNA 序列与 Genbank 中的模式菌株序列进行比较, P5 菌株与 *Burkholderia ubonensis* 序列相似度为 99.09%, 一致性为 98.8%。选择数据库中相似度最高的 7 株标准菌株及 1 株外群菌株构建系统发育树, 如图 1 所示。P5 菌株与

表2 菌株溶磷能力

Table 2 Phosphorus solubilizing ability of bacterial strains

菌株 Strain	有效磷/(mg·L ⁻¹) Available phosphorus
P1	21.61±1.82 e
P2	52.68±4.86 bc
P3	45.67±3.94 c
P4	39.62±3.59 cd
P5	195.61±14.92 a
P6	56.63±4.29 b
P7	49.54±1.10 bc
P8	46.54±3.01 c
P9	36.63±2.85 d
P10	24.13±1.81 e
P11	50.77±2.45 bc
P12	47.08±1.29 c
P13	51.73±1.97 bc

注: 同列不同小写字母表示不同菌株在同一测定指标中差异显著 ($P<0.05$), 下同。

Note: Different lowercase letters indicate significant differences in the same index ($P<0.05$). The same below.

Burkholderia ubonensis 同源, 相似度和一致性均大于 98%, 置信度为 78, 结合生理生化判断 P5 为 *Burkholderia ubonensis*。

2.3 培养条件优化

2.3.1 菌株在不同碳源、氮源、磷源培养基中生长情况 由图 2 可看出菌株生长量与有效磷含量对不同培养时间、pH、温度及接种量的响应有显著差异, 但两者之间无明显相关性。培养时间对菌株溶磷量的影响如图 2a 所示, 培养基中菌株生长量随着时间的增加先升高后降低, 在 72 h 达到最大值, 有效磷含量则在 96 h 达到最高后趋于平稳。从图 2b 可以看出 pH 在 4~10 范围内, 有效磷含量和菌株生长量均呈现先上升后逐渐下降的规律, P5 生长适应范围为 5~6, 最适 pH 为 5。菌株生长量和有效磷含量在酸性条件下显著高于碱性条件,

表明 P5 耐低 pH。温度在 10~40℃ 范围内, P5 培养液中有有效磷含量也呈现先上升后下降的趋势 (图 2c)。温度在 25~30℃ 之间, 菌株生长量和有效磷含量均达到最大值。在 40℃ 时菌株光密度值 OD₆₀₀ 大于 1, 显著高于 10~15℃, 说明菌株较耐高温。菌株生长量和有效磷含量都随着接种量的增加先升高后降低 (图 2d)。菌株生长量在接种量为 3% 时达到了最高点, 而有效磷含量在接种量为 2% 时达到最大值。单因素试验结果表明, 菌株 P5 最适培养时间为 72~96 h, 最适 pH 为 5~6, 最适温度在 25~30℃ 之间, 最适接种量为 1.5%。

6 种不同碳源 (葡萄糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇、淀粉) 对菌株溶磷能力的影响差异显著 (图 3a), 葡萄糖、蔗糖作为唯一碳源时, 有效磷含量和菌株生长量显著高于其余 4 种碳源。其中蔗糖是菌株 P5 的最佳碳源, 其次为葡萄糖>麦芽糖>乳糖>甘露醇>淀粉。为了确定蔗糖浓度对菌株解磷能力的影响, 在 0.5%~4% (w/v) 范围内设置 8 个浓度蔗糖 (梯度为 0.5%)。图 3b 表明随着蔗糖浓度的增加, 有效磷含量逐渐增加, 蔗糖浓度为 3% 时有效磷含量最高, 浓度继续增加时有效磷含量无明显变化。菌株生长量随蔗糖浓度的增加先上升后下降, 在浓度为 1%~2% 间达到最大值。不同蔗糖浓度下 P5 菌株生长量及溶磷量无明显相关性。

将不同氮源 (硫酸铵、硝酸钾、氯化铵、尿素、蛋白胨、酵母浸粉) 以 0.05% (w/v) 的浓度加入培养基中, 测定不同氮源对有效磷含量的影响。如图 4a 所示, 在以硫酸铵和氯化铵为氮源时, 菌株 P5 有效磷含量显著高于其余 4 种氮源, 其中氯化铵培养基中菌株生长量最高, 是菌株 P5 溶解磷的最佳氮源。将氯化铵按 0.05%~0.4% (w/v) 范围内分 8 个浓度 (梯度为 0.05%) 添加到培养基中, 结果如图 4b, 浓度为 0.15% 时培养基中有有效磷含量最高, 高于或低于该浓度的培养基有效磷含量均减少。氯化铵浓度对菌株生长的影响

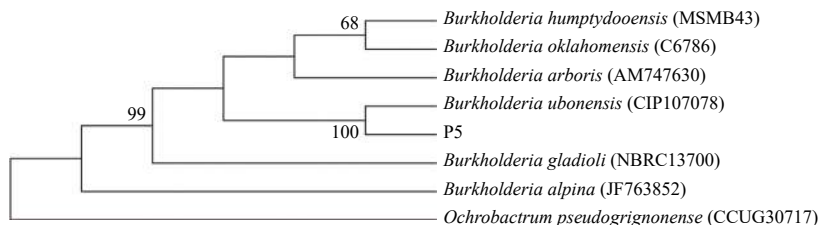


图1 P5 菌株系统发育树状图

Fig. 1 Phylogenetic tree of P5

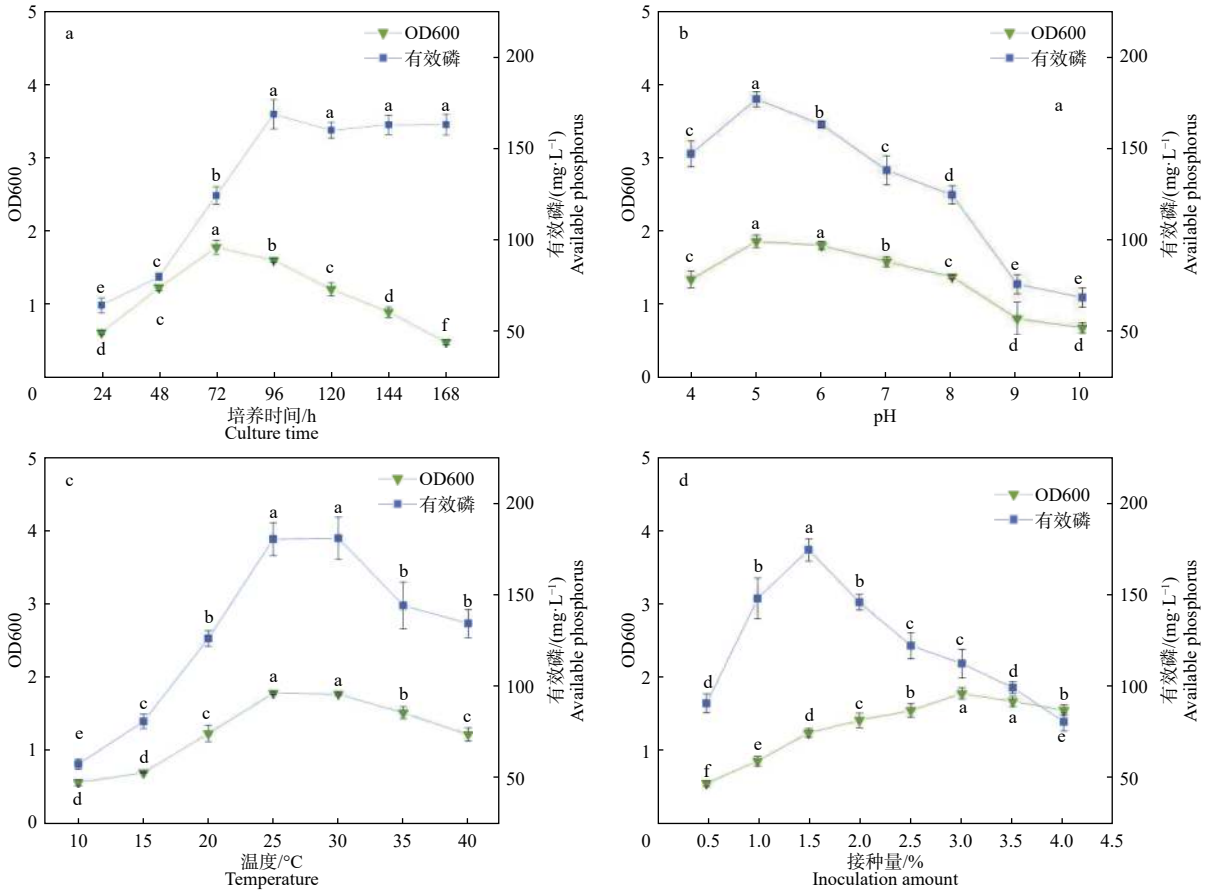


图2 培养条件对P5溶磷能力的影响

Fig. 2 Effect of culture conditions on the ability of P5 to dissolve phosphorus

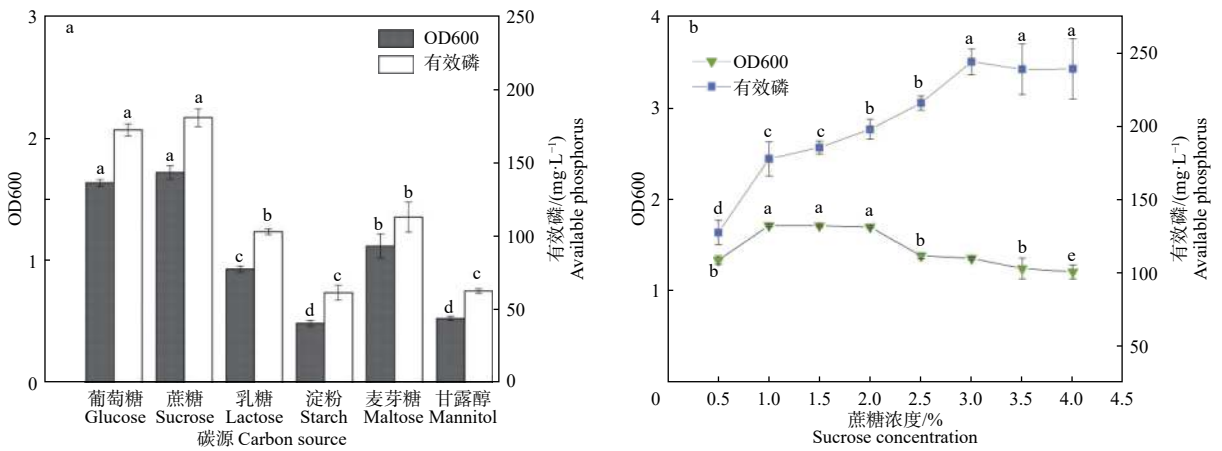


图3 不同碳源及不同蔗糖浓度对P5溶磷能力的影响

Fig. 3 Phosphorus dissolving ability of P5 under different different carbon sources and sucrose concentrations

与有效磷含量变化一致，氯化铵浓度为0.2%、0.15%时菌株生长量和有效磷含量分别达到最高值。

由图5a可知，3种不同磷源条件下，有效磷含量及菌株生长量大小排序为磷酸钙>磷酸铝>磷酸铁。在0.5%~4% (w/v) 范围内分8个浓度(梯度为0.5%)将磷酸钙添加到培养基中，结果如

图5b所示，菌株P5在0.5%~4% (w/v) 范围内有效磷含量呈现先上升后下降的趋势，在1.5%浓度时有效磷含量达到最高。菌株生长量在浓度范围为0.5%~1.5%之间无明显变化，浓度增加至2%时菌株生长量显著减少。

2.3.2 正交设计优化 在单因素试验的基础上，选

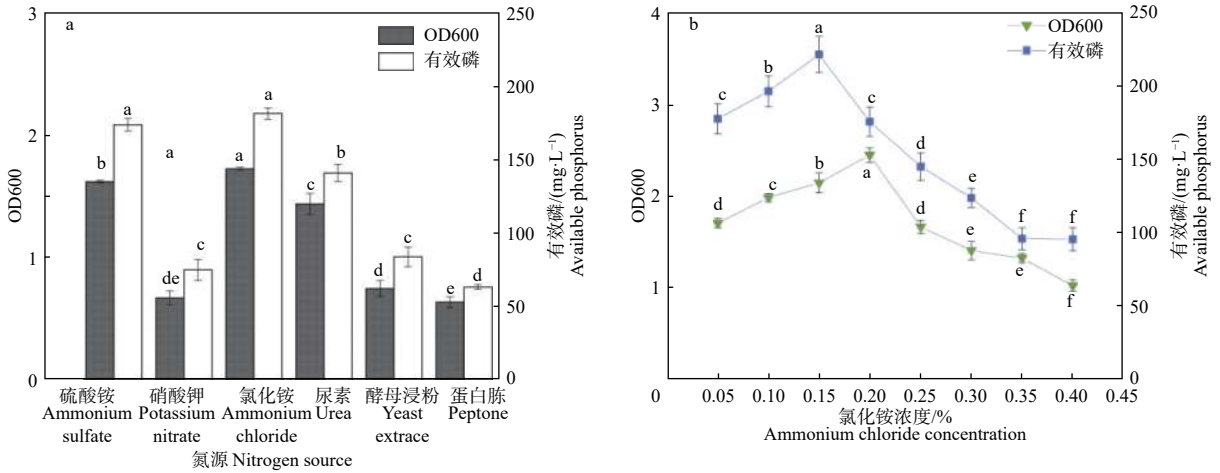


图4 不同氮源及不同氯化铵浓度对P5溶磷能力的影响

Fig. 4 Phosphorus dissolving ability of P5 under different different nitrogen sources and ammonium chloride concentrations

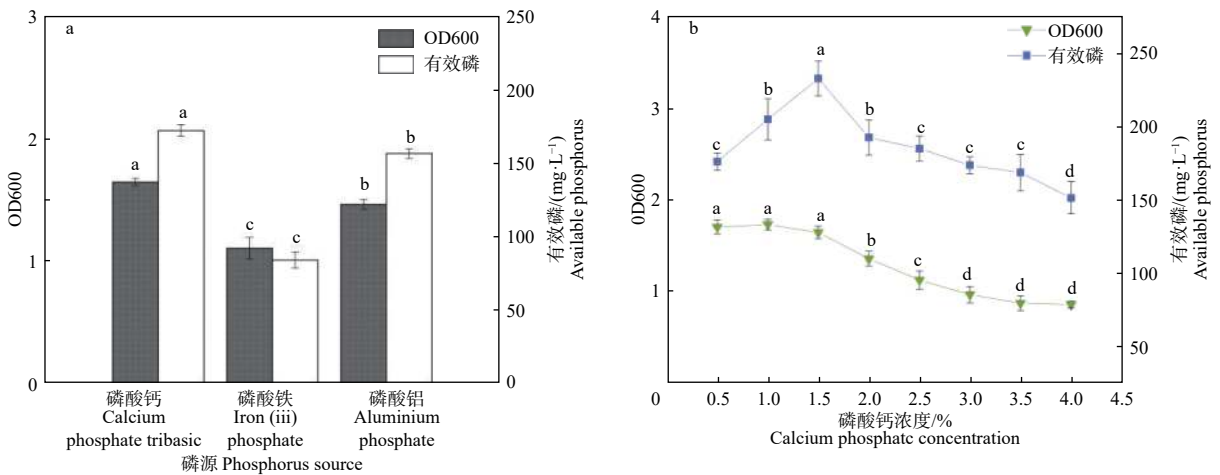


图5 不同磷源及不同磷酸钙浓度对P5解磷能力的影响

Fig. 5 Phosphorus dissolving ability of P5 under different different phosphorus sources and calcium phosphate concentrations

择蔗糖、氯化铵、pH、温度进行四因素三水平正交试验。从表3和表4可知,因素B、C对菌株解磷能力影响显著($P < 0.05$),因素D极显著($P < 0.01$),因素A不显著,影响P5溶磷能力的因素主次顺序为 $D > B > C > A$,即温度>氯化铵>pH>蔗糖。由表3可知,因素A、B、C、D优水平为A2、B3、C2、D2,优组合为A2B3C2D2。由于因素A的水平改变对试验结果几乎无影响,从经济角度考虑,选A1,因此培养条件优组合为A1B3C2D2,即蔗糖浓度为2.0%,氯化铵浓度为0.2%,pH为5.5,温度为30℃。为了验证该条件下P5溶磷能力,进行了补充试验,试验结果表明该条件下P5培养液中有效磷含量高达 $268.69 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,显著高于优化前培养条件(PVK液体培养基),后者

有效磷含量为 $195.61 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。证明通过正交试验,调整后的培养条件更有利于提高菌株P5的溶磷能力。

3 讨论

从杉木人工林土壤中筛选到一株高效溶磷菌株P5,通过生理生化试验和16S rDNA基因序列分析鉴定为*Burkholderia ubonensis*。研究表明,随着培养时间的增加,菌株生长量先上升后下降,而有效磷含量上升到最高后保持平稳,可能是因为菌株生长达到了稳定期,菌体繁殖速度开始下降,但菌株分泌的代谢产物在这段时间内大量积累,促进了难溶性磷的溶解^[16-17]。菌株P5生长最适pH范围为5~6,最适温度范围为25~30℃。杨艳红等^[18]研

表3 L₉(3⁴) 正交试验结果

Table 3 Results of the orthogonal test

序号 No.	A蔗糖/% Sucrose	B氯化铵/% Ammonium chloride	C pH	D温度/°C Temperature	有效磷P/(mg·L ⁻¹) Available phosphorus
1	1	1	1	1	219.82
2	1	2	2	2	247.66
3	1	3	3	3	229.82
4	2	1	2	3	235.35
5	2	2	3	1	215.25
6	2	3	1	2	255.35
7	3	1	3	2	229.82
8	3	2	1	3	208.77
9	3	3	2	1	239.12
K1	697.31	684.99	683.94	674.19	
K2	705.95	671.68	722.13	732.88	
K3	677.71	724.29	674.89	673.94	
极差R	28.24	52.61	47.24	58.88	
主次顺序		D>B>C>A			
优水平	A2	B3	C2	D2	
优组合		A2B3C2D2			

表4 正交试验方差分析

Table 4 Variance analysis of the orthogonal test

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F值 F-value	P值 P-value
A(蔗糖)	418.836	2	209.418	1.254	0.309
B(氯化铵)	1 496.670	2	748.335	4.480*	0.026
C(pH)	1 257.274	2	628.637	3.763*	0.043
D(温度)	2 301.778	2	1 150.889	6.889**	0.006
误差 Error	3 006.939	18	167.052		
总计 Total	1 451 950.498	27			

注: *表示在 $P<0.05$ 水平差异显著, **表示在 $P<0.01$ 水平差异显著。

Note: *Shows significantly differences at $P<0.05$. **Shows significantly differences at $P<0.01$.

究得出, 芽孢杆菌的最适生长温度和 pH 分别为 37℃、7.0; 刘晓璐等^[19]从烟草根际分离的功能菌最适生长温度为 30℃, pH 为 7.5。研究表明, pH 和温度通过影响微生物体内酶驱动过程而改变代谢速率, 低温条件下菌株生长繁殖缓慢, 活力下降, 高温则容易导致菌体自溶^[20]。接种量逐渐增加, 菌株对空间和营养物质的争夺越强烈, 导致细菌代谢速度逐渐减慢, 代谢产物的累积速率减缓, 从而导致有效磷含量减少, 也可能是因为菌株生长过程产生了有毒代谢物质或细胞的自溶作用减缓了细菌代谢速率^[21-22]。土壤 pH 值对林木生长有重要影响,

极酸、极碱立地不利于林木生长, 改良需要花费大量人力物力, 且微生物肥料使用受限, 土壤质量难以提高^[23]。本研究筛选的 P5 菌株在 4~10 时均可生长, 可在不同 pH 值土壤中应用。

本研究筛选的 P5 菌株的最佳碳源和氮源分别是蔗糖和氯化铵, 而乔志伟等^[24]分离的具有溶磷能力的伯克氏菌 W4 的适宜碳源、氮源分别为葡萄糖和硝酸钾。Park 等^[25]发现伯克氏菌 *Burkholderia vietnamiensi* 的最佳碳源和氮源分别是葡萄糖和尿素。其原因可能与微生物代谢机制的多样性以及不同碳、氮源的物理化学性质有关, 不同碳源和氮源

通过改变微生物代谢路径,导致其分泌的有机酸的种类和数量发生变化,从而改变了溶磷微生物的溶磷能力^[26-29]。不同浓度碳源、氮源对不同菌株生长和溶磷效果影响不同,刘玉凤^[28]等分离的假单胞菌的最适葡萄糖浓度为1%;Park等^[25]研究发现葡萄糖浓度为3.5%时 *Burkholderia vietnamiensis* 的生长量最大,有效磷含量最高。本研究中蔗糖浓度为3%时,菌株生长量和有效磷达到最大值,此时菌株分泌大量有机酸,抑制了微生物的生长代谢,导致菌株生长量开始下降,培养液有效磷含量增加受限;氮源浓度高则引起微生物对磷的吸收增加,从而降低有效磷含量^[30]。不同磷源对溶磷微生物的溶磷能力与难溶性磷酸盐的结构有关,本研究中菌株 P5 对磷酸钙的溶解效果最佳。菌株溶磷机制包括以下几种:分泌有机酸,呼吸酸化, NH_4^+ 同化,胞外酶水解^[31-33]。Ca-P 较易溶解可能与溶磷微生物分泌的有机酸种类有关,也可能是 Ca-P 的溶解是微生物分泌质子和有机酸螯合阳离子双重作用的结果,而 Al-P 和 Fe-P 只能通过螯合作用来释放磷酸盐^[34-35]。磷源浓度也是影响溶磷微生物溶磷量的因素之一,磷浓度高,使微生物释放的磷再次被阳离子固定,形成难溶性磷酸盐,而低磷供应减少微生物蛋白质合成,降低微生物活性^[36]。培养条件优化结果显示 pH 值对菌株溶磷量的影响极显著,温度、氮源对菌株溶磷量影响显著,这主要是因为菌株在不同培养条件下,基因调控及蛋白合成均会发生变化,从而引起菌株细胞膜通透性及对营养物质的吸收、菌株代谢产物及胞外酶活的变化^[37-38]。然而,需要进一步研究以了解 P5 的溶磷机制,并在温室或田间条件下探索其促生能力及促生机制。

4 结论

从杉木人工林土壤分离到1株耐酸,耐高温的高效溶磷细菌 *Burkholderia ubonensis* P5。单因素试验表明 P5 最适培养时间为 72~96 h,最适 pH 为 5.0~7.0,最适温度在 25℃~30℃ 之间,最适接种量为 1.5%,最适碳源为蔗糖,氮源为氯化铵,磷源为碳酸钙。正交试验表明 P5 在蔗糖浓度为 2.0%,氯化铵浓度为 0.2%,pH 为 5.5,温度为 30℃ 条件下溶磷能力显著提高。对菌株溶磷条件进行优化是有效发挥细菌溶磷能力的必要前提,为菌株 P5 的溶磷机制及其对植物生长的作用等后续研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] 陈隆升,陈永忠,彭邵锋,等.油茶对低磷胁迫的生理生化效应研究[J].林业科学研究,2010,23(5):782-786.
- [2] 王保明,陈永忠,王湘南,等.植物低磷胁迫响应及其调控机制[J].福建农林大学学报:自然科学版,2015,44(6):567-575.
- [3] Johnston A E, Poulton P R, Fixen P E, et al. Phosphorus: Its efficient use in agriculture[J]. Advances in Agronomy, 2014, 123: 177-228.
- [4] 程明芳,何萍,金继运.我国主要作物磷肥利用率的研究进展[J].作物杂志,2010,(1):12-14.
- [5] 李蓉.杉木PGPR菌分离筛选及其微生物复合菌肥研制[D].长沙,中南林业科技大学,2012.
- [6] 李杰,石元亮,陈智文,等.我国南方红壤磷素研究概况[J].土壤通报,2011,42(3):763-768.
- [7] Illmer P, Barbato A. Solubilization of hardly-soluble AlPO_4 with P-solubilizing microorganisms[J]. Soil Biology & Biochemistry, 1995, 27(3):265-270.
- [8] Arcand M M, Schneider K D. Plant- and microbial-based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: a review[J]. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 2006, 78(4):791-807.
- [9] 王舒,张林平,张扬,等.红壤区油茶根际解磷细菌的筛选、鉴定及其解磷能力[J].林业科学研究,2015,28(3):409-416.
- [10] Mukhtar S, Shahid I, Mehnaz S, et al. Assessment of two carrier materials for phosphate solubilizing biofertilizers and their effect on growth of wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. Microbiological Research, 2017, 205: 107-117.
- [11] Zhao K, Penttinen P, Zhang X, et al. Maize rhizosphere in Sichuan, China, hosts plant growth promoting *Burkholderia cepacia* with phosphate solubilizing and antifungal abilities[J]. Microbiological Research, 2014, 169(1):76-82.
- [12] 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[J].微生物学报,2012,52(3):326-333.
- [13] Joe M M, Deivaraj S, Benson A, et al. Soil extract calcium phosphate media for screening of phosphate-solubilizing bacteria[J]. Agriculture and Natural Resources, 2018, 52(3):305-308.
- [14] 张祥胜.铅锶抗比色法测定磷细菌发酵液中有效磷含量测定值的影响因素分析[J].安徽农业科学,2008,(12):4822-4823.
- [15] 刘彩霞.杉木幼林土壤微生物对氮沉降的响应及固氮菌株的研究[D].北京,中国林业科学研究院,2017.
- [16] 朱艳蕾.细菌生长曲线测定实验方法的研究[J].微生物学杂志,2016,36(5):108-112.
- [17] 林欣,王立立,杨平,等.一株溶磷菌对盐地碱蓬修复盐渍土 Cd 污染的促进效应[J].农业环境科学学报,2018,37(5):49-57.
- [18] 杨艳红,李世川,胡燕,等.多功能芽孢杆菌 AF1 的生长条件与生理耐受特性研究[J].重庆理工大学学报:自然科学,2015,29(8):78-83.
- [19] 刘晓璐,杨柳青,吕乐,等.烟草根际固氮菌的筛选、鉴定及优化培养[J].中国烟草学报,2015,21(1):89-94.
- [20] 黄萍.温度对微生物生长的影响[J].明胶科学与技术,2011,

- 31(1): 29.
- [21] 刘 阳, 邓 静, 吴华昌, 等. 盐胁迫对枯草芽孢杆菌发酵代谢产物的影响[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(7): 29-33.
- [22] Yael K K, Dikla L, Ghil J, *et al.* A bacterial growth law out of steady state[J]. *Cell Reports*, 2018, 23(10): 2891-2900.
- [23] 邱 婷, 张 屹, 肖姬玲, 等. 土壤酸化及酸性土壤改良技术研究进展[J]. 湖南农业科学, 2016, (10): 114-117.
- [24] 乔志伟, 腾飞龙, 邵晓贵, 黄壤伯克氏溶磷细菌的筛选鉴定及溶磷特性[J]. 山西农业大学学报: 自然科学版, 2019, 39(1): 1-6.
- [25] 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 rhizospheric soil[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 86(3): 947-955.
- [26] 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.
- [27] 林启美. 4株溶磷细菌和真菌溶解磷矿粉的特性[J]. 微生物学通报, 2002, 29(6): 24-28.
- [28] 王光华, 周克琴, 金 剑, 等. 不同氮源对3种溶磷真菌溶解磷矿粉能力的影响[J]. 土壤与作物, 2003, 19(4): 260-263.
- [29] 刘玉凤, 马丽娟, 张婷婷, 等. 红花根际溶磷菌的筛选与培养条件优化[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(18): 287-291.
- [30] 乔志伟, 洪坚平, 谢英荷, 等. 石灰性土壤拉恩式溶磷细菌的筛选鉴定及溶磷特性[J]. 应用生态学报, 2013, 24(8): 2294-2300.
- [31] Illmer P, Schinner F. Solubilization of inorganic calcium phosphates—Solubilization mechanisms[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1995, 27(3): 257-263.
- [32] Sharan A, Shikha, Darmwal N S. Efficient phosphorus solubilization by mutant strain of *Xanthomonas campestris* using different carbon, nitrogen and phosphorus sources[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2008, 24(12): 3087-3090.
- [33] Behera B C, Singdevsachan S K, Mishra R R, *et al.* Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove—A review[J]. *Biocatalysis & Agricultural Biotechnology*, 2014, 3(2): 97-110.
- [34] 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[J]. 植物营养与肥料学报, 2010, 16(2): 354-361.
- [35] Panda B, Rahman H, Panda J. Phosphate solubilizing bacteria from the acidic soils of Eastern Himalayan region and their antagonistic effect on fungal pathogens[J]. *Rhizosphere*, 2016, 2: 62-71.
- [36] 李玉娥. 苜蓿和红豆草根际溶磷菌溶磷特性研究及其对苜蓿生长的影响[D]. 兰州, 甘肃农业大学, 2009.
- [37] Yang M, Wang C, Wu Z, *et al.* Phosphorus dissolving capability, glucose dehydrogenase gene expression and activity of two phosphate solubilizing bacteria[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(4): 651-663.
- [38] Chen W, Yang F, Zhang L, *et al.* Organic acid secretion and phosphate solubilizing efficiency of *pseudomonas sp.* PSB12: effects of phosphorus forms and carbon sources[J]. *Geomicrobiology Journal*, 2016, 33(10): 870-877.

Screening Phosphorus-Solubilizing Bacteria from Chinese Fir Plantation Soil and Optimizing Its Culture Conditions

WEI Yi-hui, CHEN Jia-qi, DONG Yu-hong, HOU Ling-yu, JIAO Ru-zhen

(Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, Beijing 100091, China)

Abstract: [Objective] To isolate and screen phosphorus-solubilizing bacteria from the soil of Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) plantation in red soil region and optimize its culture conditions. [Method] The phosphorus-solubilizing bacteria were isolated and screened by Pikovskaya (PVK) medium. The strains with strong phosphorus-solubilizing capacity were identified by physiological and biochemical tests and 16SrDNA gene sequence alignment. Single factor test was used to compare the phosphorus-solubilizing capacity of the strains under different culture time, initial pH, culture temperature, inoculum size, carbon source, nitrogen source and phosphorus source. Orthogonal test was used to optimize the culture conditions of the strains. [Result] Thirteen strains were screened out, among which the phosphorus-solubilizing capacity of strain P5 was the highest. The content of available phosphorus of strain P5 in PVK was $196.61 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Strain P5 were identified as *Burkholderia ubonensis* by physiological and biochemical tests and sequence analysis of 16SrDNA gene. Single factor test showed that strain P5 was resistant to high temperature and low pH. The result of the orthogonal experiment indicated that the optimal culture condition of strain P5 are as follows: 2.0% (w/v) sucrose, 0.2% (w/v) ammonium chloride, pH 5.5, 30°C, under which the maximum phosphorus-solubilizing capacity could be up to $268.69 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and the content of available phosphorus was about 40% higher. [Conclusion] The result indicates that strain P5, a highly efficient phosphorus-solubilizing bacteria, could be a potential candidate for the development of microbial fertilizer applied to environmentally stressed soil due to their phosphorus-solubilizing capacity and tolerance to high temperature and low pH.

Keywords: Chinese fir plantation; phosphorus-solubilizing bacteria; culture condition; optimization

(责任编辑: 崔 贝)